

厚生労働科学研究研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

新しい薬物療法の導入と
その最適化に関する研究

主任研究者 西條 長宏

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17年（2005年） 4月

厚生労働科学研究研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

新しい薬物療法の導入と
その最適化に関する研究

主任研究者 西條 長宏

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17年（2005年） 4月

目 次

I. 総括研究報告	
新しい薬物療法の導入とその最適化に関する研究 西條長宏	----- 1
II. 分担研究報告	
1. がん生物学に基づく新治療法の開発と評価に 関する研究 西條長宏	----- 13
2. 分子標的薬等薬物療法のファーマコダイナミクス 研究 西尾和人	----- 16
3. 乳癌の生物学的情報による治療法の選択 戸井雅和	----- 18
4. 抗がん剤の分子標的評価と最適化研究 掛谷秀昭	----- 21
5. 固形癌に対する分子標的治療の原理の証明のため の臨床研究 田村友秀	----- 23
6. 肺癌の生物学的情報による治療法の臨床評価 福岡正博	----- 26
7. 分子標的薬を含む薬物治療の最適化の基盤研究 桑野信彦	----- 28
8. トランスポーターの制御による分子標的治療の 開発 杉本芳一	----- 33
9. 分子標的の修飾に基づくがん治療最適化の研究 前原喜彦	----- 35
10. 分子標的薬物の効率的な臨床評価法に関する研究 南 博信	----- 37
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 49

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

新しい薬物療法の導入とその最適化に関する研究

主任研究者 西條 長宏 国立がんセンター東病院副院長

研究要旨 EGFR 遺伝子の Exon19 に欠失を有する非小細胞肺癌株 PC-9 はゲフィチニブに対する高い感受性を示した。PC-9 由来の 15 塩基欠損 EGFR の遺伝子導入細胞は EGFR 特異的チロシンキナーゼ阻害剤 AG1478、VEGFR-EGFR dual 阻害剤 ZD6474 に対しても高い感受性を示した。欠損型 EGFR 導入細胞では自己リン酸化の亢進が認められ低濃度のチロシンキナーゼ阻害剤によって抑制された。トランスポーターBCRP および P 糖蛋白のタンパク質発現低下あるいは機能低下に關与する SNPs を 2 個ずつ同定した。種々のエストロゲン、抗エストロゲン、フラボノイド、キナーゼ阻害剤、ゲフィチニブが BCRP 阻害作用のあることを見出した。これらの薬剤はトポイソメラーゼ阻害剤耐性を克服した。トランスポーターの発現を変化させる小分子化合物を同定した。主として微生物代謝産物由来の新規細胞周期阻害剤の探索的研究を行いトリコスタチン類、ETP、フォスミドシン、ルシラクチンなどをえてきた。エボラクトンの分子標的の候補として HSP60 を同定した。Cold shock family 蛋白の YB-1 の核内移行が P 糖蛋白による多剤耐性やシスプラチン、マイトマイシン C 等に対する薬剤耐性に関わることを証明した。アポトーシス阻害タンパク質ファミリーの一員であるサーバイピンは P53 野生株の場合、アドリアマイシンとの接触によってその発現が次第に抑制された。また SiRNA による Survivin の一時的発現抑制はがん細胞の増殖を有意に抑制した。すなわち Survivin の発現阻害ががん増殖抑制に寄与することが示された。治療前ビリルビン値は CPT-11 投与後の白血球減少の予測因子となること、およびこの現象は UGT1A1 機能を反映したものであることを示した。

分担研究者 西條 長宏
国立がんセンター東病院
副院長
西尾 和人
国立がんセンター研究所
室長
戸井 雅和
東京都立駒込病院
部長
掛谷 秀昭
独立行政法人理化学研究所
副主任研究員
田村 友秀
国立がんセンター中央病院
部長
福岡 正博
近畿大学医学部
教授
桑野 信彦
久留米大学・先端癌治療研究センター

教授
杉本 芳一
共立薬科大学
教授
前原 喜彦
九州大学大学院
南 博信
国立がんセンター東病院
医長

A. 研究目的

がんの分子生物学的研究の進歩により増殖・浸潤・転移など、がんの生物学的特性を左右する分子が同定され、がん細胞自身あるいはその周辺環境を特異的に修飾することを目的とした治療法が臨床にも導入されている。慢性骨髄性白血病、乳がん、B細胞型白血病、肺非小細胞がんに対し各々イマチニブ、トラスツズマブ、リタキシマブ、ゲフィチニブの抗腫瘍効果が報告されているものの大半の化合物やマクロモルキュルを用いた治療法の効果は目立った成果を挙げていない。この理由として、①創薬の標的が不適切、②化合物

自身が治療手段として不適切、③非臨床研究が不適切かつ不十分、④臨床評価の方法が不適切等の理由が考えられる。

本研究ではこれらの反省点をふまえ、がん細胞により特異性の高い分子を同定するとともに、改変がん遺伝子を治療標的とするなど、更に特異性及び治療効果の高い治療法の開発を目指す。また、臨床導入に必要な非臨床研究を行い、その範囲を明らかにする。既に臨床研究段階にある化合物について適切な臨床評価法を提示し実行する。Molecular correlative study と呼ばれる抗悪性腫瘍薬の抗腫瘍活性の原理の証明 (Proof of principle) 研究を遂行することにより、その効果をモニターしうる生物学的サロゲートマーカーの検討を行い、その妥当性を明らかにする。この過程で新たに得られた、臨床的および分子生物学的情報を基に、リバーストランスレショナルスタディによってがん治療の新しい分子標的を同定し治療薬の開発を目指す。

わが国ではがんの基礎研究のレベルは高いものの、その成果を臨床に還元するトランスレショナルスタディを系統的に行える研究室は乏しい。したがってその成果が、がんの治療成績の向上に還元されてこなかった。本研究により、治療効果、副作用の正確な予測が可能となれば、がんの治療効果が飛躍的に向上するとともに、より優れた新しい薬物療法が効率よく導入され最適化されると期待される。

B. 研究方法

1) 細胞周期 G2/M 期進行に必須なセリン/スレオニンキナーゼ・Cdc2 キナーゼが温度感受性に変異したマウス乳癌細胞 tsFT210 を用いた実験系は、G2/M 期進行に影響を与える薬剤の探索系に優れているだけでなく、簡便に細胞群を G2 期に同調できるために「G2 期→M 期→G1 期→S 期」の移行における薬剤の影響を評価する系としても優れている。tsFT210 細胞を用いて phosmidosine (G0/G1 期), lucilactene (G0/G1 期), tryprostatin 類 (M 期) の構造活性相関研究を行い、活性発現に関する知見を得るとともに、標的分子同定のための分子プローブを創製する。上記化合物の詳細な作用機構を解析するとともに、それぞれに創製した分子プローブを利用して標的分子の同定を行う。上記化合物が抗がん剤のリード化合物として応用可能か否かを動物実験モデルを用いて検討する。

2) BCRP は ABC トランスポーターの一種でグフィチニブ、トポイソメラーゼ I 阻害剤の輸送に関与している。これまでに estrone, estradiol を始めとして estrogen 剤、抗 estrogen 剤、植物

estrogen, flavonoid など種々の BCRP 阻害剤を同定した。これらの阻害剤の有効性を動物モデルなどで検証する。また、これらの阻害剤の特異性を他のトランスポーターの遺伝子導入細胞を用いて調べる。BCRP の 2 量体形成に関与する部位、抗癌剤結合部位などの同定を試みる。BCRP が実際に flavonoid などの BCRP 阻害剤を輸送するかどうかを、K562/BCRP の膜ベジクルを用いた実験系、および腎臓の尿細管細胞由来 LLC/BCRP 細胞を用いた経細胞輸送系で調べる。

3) 再発乳癌、原発性乳癌よりえた乳癌腫瘍組織を用い、腫瘍組織内血管新生活性、血管新生誘導因子・阻害因子の発現、Her-family (Her-1, Her-2, Her-3, Her-4) とその下流に位置する細胞内情報伝達系蛋白の発現とそのリン酸化、cyclooxygenase (COX)-1, COX-2, TP などについて免疫組織化学的解析、e-Tag システムを用いた蛋白解析、定量的 PCR による遺伝子発現解析、プロテオミクス解析を行う。血管新生阻害剤については症例に応じて画像診断上の血管透過性の変化を評価に加える。Her-family の検索は e-Tag システムを用い、数十の関連蛋白についてリン酸化、非リン酸化別に解析する。'pro-tumor' 反応の解析は経時的に腫瘍組織採取が可能な系 (術前治療系など) で行い、主要な分子の探索には定量的 PCR を用いる。探索的に、治療施行前、中、後の血液サンプルを用いたプロテオミクス解析を行う。以上の結果と臨床的抗腫瘍効果、病理学的抗腫瘍効果、奏功期間、毒性の相関関係を分析する。

4) 胃癌、食道癌、膵癌、大腸癌における抗癌剤、分子標的薬の感受性・有害反応・予後決定遺伝子の発現変動解析、キナーゼ活性の定量を行う。国立がんセンター中央病院内科により実施される臨床試験「消化器癌における抗癌剤感受性規定遺伝子の検討」として実施する。①化学療法前の内視鏡生検癌組織を用いて、腫瘍縮小効果予測因子および予後因子となり得る遺伝子群を cDNA アレイ、腫瘍部のキナーゼ活性を測定し、それらの感受性予測因子としての可能性を検討する。②治療前後の末梢血単核球細胞、可能な場合、癌部の遺伝子発現変化を検出することにより、照射の生物学的効果をモニターし、その組織における反応性を解析することにより、個々の癌組織における放射線感受性を予測する。③EGFR, PDGFR などのチロシンキナーゼ活性を腫瘍部で測定し、治療前後での比較をおこなう。また、アッセイ系の構築、検証、測定分子の選択を基礎的に検討する。

5) 分子標的薬の感受性、耐性規定因子探索の

一環として、gefitinib 耐性細胞の樹立、その性状解析を実施し、耐性を予測するためのマーカー（イレッサ耐性遺伝子等）を選択しつつある。本研究班では、同マーカーの生物学的機能をさらに解析する。選択された gefitinib 耐性マーカーを用い、gefitinib の臨床試験の付随研究として、腫瘍組織の免疫病理学的研究、代替組織における遺伝子発現解析、血清学的見当をおこなうことにより、イレッサの効果の予測力を検討し、有効な症例を予測する方法を確立する。分子標的薬物の薬理作用は、腫瘍縮小効果以外にも腫瘍の代謝能低下として観察されることが期待される。分子標的薬物の臨床試験において、治療の開始前後で PET を用いて SUV を測定することにより腫瘍の代謝能の変化を評価する。乳がんに対する第 II 相試験で、均一な患者集団を対象とし PET による代謝能の変化と CT などによる腫瘍の大きさの評価との対比を行う。Raf kinase の阻害薬である BAY43-9006 の第 I 相試験においても PET による代謝能評価を行う。これらにより、PET による評価の意義付けを検討する。

6) 臨床的な観察に基づき薬剤代謝酵素の活性を予測し薬剤の至適投与法、投与量を確立する。本年度は CPT-11、SN-38 の代謝の予測因子を同定する。

（倫理面への配慮）

動物実験においては必要最小動物数を用いるとともに適正な飼育を行う。ト殺は苦痛を伴わないよう配慮するとともに大きな腫瘍を担癌状態で長期飼育し苦痛を与えるような事はしない。臨床試験は GCP に準じ全てのプロトコールは各施設の臨床試験審査委員会の許可の下に行う。また効果安全性評価委員により研究の続行中止などに関するアドバイスを受ける。

C. 研究結果

Epolactaene の構造活性相関研究の結果、アポトーシス誘導活性には γ -ラクタム構造と α, β -不飽和カルボニル基を含んだ脂溶性側鎖が重要であることが判明し、より強力な活性を有する類縁化合物 ETB (epolactaene tert-butyl ester) の創製に成功した。ETB はヒトがん細胞パネル試験においてさまざまな細胞種に対して顕著な増殖抑制効果を示した。さらに、ETB/Epolactaene の標的タンパク質を探索するために活性を保持したビオチン化 ETB/Epolactaene 分子プローブ (Bio-ETB) の創製に成功した。Bio-ETB を用いたプロテオミクス的手法により、ETB/Epo の結合タンパク質の 1 つとして分子シャペロン Hsp60 (chaperonin) を同定した。

Phosmidosine の構造活性相関研究の結果、分子内のホスホアミダート結合部分、および L-プロリン残基が活性発現に重要であることが判明した。さらに、phosmidosine の分子内のメトキシ基をエトキシ基に変換した化合物 phosmidosine-Et が安定性および活性に優れていることを明らかにした。

BCRP はイリノテカンなどの抗癌剤を排出する ABC 輸送体として知られている。Estrogen が K562/BCRP の薬剤耐性を克服することを示し、さらに BCRP は estrogen は輸送しないが硫酸抱合 estrogen を輸送することを明らかにするとともに phytoestrogen/flavonoid が BCRP 阻害作用を持つことを見出した。Genistein は estrogen より数倍強い BCRP 阻害活性を示した。LLC/BCRP 細胞を用いた transcellular transport assay により、genistein は estrogen とは異なりそれ自体で BCRP により輸送されることを明らかにした。

Gefitinib は EGFR の tyrosine kinase の阻害剤であるが、gefitinib が強い BCRP 阻害作用を持つことを見出した。Gefitinib に高感受性なヒト扁平上皮癌細胞 A549、ヒト肺癌細胞 PC-9 に BCRP 遺伝子を導入した A549/BCRP、PC-9/BCRP は 8~10 倍の gefitinib 耐性を獲得した。よって BCRP は gefitinib の感受性規定因子であると明らかにされた。

ヒト乳癌細胞 MCF-7 を生理的濃度の estrogen 存在下で培養すると BCRP のタンパク発現が低下することを見出した。estrogen は MCF-7/BCRP 細胞の外因性 BCRP の発現も低下させた。この estrogen による BCRP の発現抑制は抗 estrogen 剤により阻害を受ける、estrogen 受容体依存性の反応であることが示された。

抗 Her-2 療法：パラフィン包埋標本を用いた初期的探索において、eTag 法により定量される Her 受容体ヘテロ 2 量体形成量 (index) と trastuzumab の臨床的抗腫瘍効果が強く相関することが見出された。さらに、100 例の再発乳癌を対象に多施設共同の検証試験を企画し、症例を集積、測定ならびに index の算定を終了した。現在、統計的に妥当性の検証を行っている。ADCC 活性は trastuzumab を対象に患者血液から分離した末梢血単核球をエフェクター細胞、MCF-7 細胞を標的細胞としてアッセイ系を作成した。安定した成績がえられるようになり、アッセイ系として確立した。

血管新生阻害療法：原発性乳癌において、VEGF/sVEGFR-1 バランスが強力な予後因子になることが見出された。VEGF 高値が予後不良因子であることは以前より知られているが、今回、

VEGF と sVEGFR-1間の優位性を検証することでより正確に原発性乳癌患者の予後を予測できることが示された。

化学療法、ホルモン療法併用が及ぼす標的分子発現修飾に関する研究：原発性乳癌を対象にした術前化学療法の研究から、化学療法がその作用のひとつとして種々の血管新生誘導因子、抗アポトーシス分子の発現を誘導することが見出された。NF-kB, thymidine phosphorylase (TP), Cyclooxygenase (COX)-2 などである。一方、ホルモン療法を用いた検討では、アロマトラーゼ阻害剤が腫瘍組織中の Her-2 蛋白ならびに Her-2 遺伝子発現を低下させることが明らかになった。特に奏効例においてその傾向が顕著であった。

In frame, simple deletion 型の EGFR 遺伝子導入細胞は、ゲフィチニブに高度感受性(約 1 万倍、MTT アッセイ)を示した。同細胞においては、EGFR の恒常的リン酸化の更新、2 量体形成の増加が認められた。リン酸化のキネテクス解析でも、野生型 EGFR では ATP 付加により ATP 濃度依存的にリン酸化反応が認められたが、変異型 EGFR では ATP 濃度非依存的に既にリン酸化していた。同欠失型 EGFR は、恒常的に活性化していると考えられた。下流シグナルの検討では、EGF 刺激により細胞増殖の低下、EGFR リン酸化、MAPK、AKT の低下が認められた。ゲフィチニブ接触により MAPK に比し AKT のリン酸化が強く抑制され、同変異型 EGFR において AKT が下流シグナルの主流と考えられた。

化学療法未施行非小細胞肺癌症例に対するゲフィチニブ単剤治療の第 II 相試験(金沢大学笠原ら)における探索的付随研究として、血清中の腫瘍由来 EGFR を nested PCR をもちいて回収し、欠失型 EGFR、突然変異型 EGFR の同定をおこなった。欠失型 EGFR が 30%程度に同定でき、ゲフィチニブの効果と、治療後血清サンプルにおける EGFR 変異が有意に相関した。また、同一患者における EGFR 変異の有無の一致率は 80%であった。

バイオプリーズ(BioPlex)を用いて血漿中サイトカインレベルとゲフィチニブの薬力学的効果との関連性について検討した。ゲフィチニブ投与前の 17 種類のサイトカインレベルを測定した。MIP-1b が皮膚障害出現群で有意に低値を示した(P=0.042, K-Nearest Neighbor Prediction test)。MIP-1b は血管新生、炎症に関連するサイトカインであり、皮膚障害の予測マーカーとした。

PC-9/ZD 細胞では EGFR の 15 塩基欠失以外の EGFR、HER2、HER3 の全エクソンにおいて変異は認められなかった。PC-9/ZD in vivo においてエクソン 20 に点突然変異を認めた。PC-9/ZDf

においては EGFR 変異は認められなかった。

BAY43-9006 の第 I 相試験にエントリーした症例を対象として設定された FDG-PET の撮影条件にしたがって PET 検査を行った。すなわち検査前 6 時間の糖分摂取を禁止し、FDG 投与から撮影開始までの時間を厳密に 60 分とした。SUV の測定は 8 mm 以上の径の腫瘍病巣を 3 個選択して行った。BAY43-9006 の第 I 相試験で治療された患者のうち、本年度までに PET による SUV が解析可能であったのは 200 から 1200 mg/day で治療された 20 例(非小細胞肺癌 6 例、大腸癌 6 例、腎癌 2 例、その他 6 例)であった。

本年度に解析対象とした 20 例中 1 例で PR を認め、さらに 4 ヶ月以上 SD が持続した症例が 6 例みられた。この 7 例のうち 6 例で SUV が治療前値と比べて 25%以上低下していた。残りの 1 例でも 23%の SUV の低下を認めた。一方、4 例で CT での効果判定が PD であったが、これら 4 例全例でも SUV は低下傾向を示し、うち 2 例では 25%以上 SUV が低下していた。

治療開始 1 ヶ月後の PET で SUV が 25%以上の減少を示さなかった症例は 9 例あったが、このうち 8 例が 2 ヶ月目までに病状の悪化などで BAY43-9006 による治療を中止していた。一方、1 ヶ月の段階で SUV が 25%以上減少した 11 例では 5 例のみが 2 ヶ月以内に治療を中止していただいていた。

PR を示した非小細胞肺癌の症例では、当初は SUV は増大も低下も示さなかったが、BAY43-9006 による治療開始後 8 ヶ月を超えた時点で SUV は減少し、同じ時期より CT でも腫瘍の縮小が観察されていた。

シスプラチン(CDDP) + イリノテカン(CPT-11) 療法を受けた肺癌患者を対象に、治療前総ビリルビン(T-Bil) 値と好中球減少、下痢との関連を検討した。対象とした 127 例の背景は、男 93 女 34、年齢中央値(範囲) 61 才(24-74)、PS 0/1/2 34/91/2、非小細胞肺癌 64 小細胞肺癌 63、前化学療法なし 110 あり 17 で、治療直近空腹時 T-Bil は平均 0.6 mg/dL、範囲 0.2-2.4 であった。化学療法のスケジュールは、CDDP 60 mg/m² day1 + CPT-11 60 mg/m² day 1,8 every 3wk が 32 例、CDDP 60 mg/m² day1 + CPT-11 60 mg/m² day 1,8,15 every 4wk が 39 例、CDDP 80 mg/m² day1 + CPT-11 60 mg/m² day 1,8 every 3wk 24 例、CDDP 80 mg/m² day1 + CPT-11 60 mg/m² day 1,8,15 every 4wk が 32 例であった。これらの症例に認められた標的毒性は、grade 4 の好中球減少 23% (grade 2/3/4 : 20/50/29 例)、grade 3-4 の下痢 10% (grade 2/3/4 : 30/13/0 例)、発熱性好中球減少を 9% (12 例) であった。治療

前の早朝空腹時 T-Bil 値は、Grade4 の好中球減少を認めた症例においてより高値であった (p =0.03, Mann-Whitney U)。多変量解析では、治療前 T-Bil 値 (≤0.7 vs. >0.7 mg/dl のみ) が Grade4 の好中球減少発現の有意な予測因子となった (OR : 5.77 ; 95%CI : 1.76-18.98)。また、grade 3-4 の下痢については、単変量解析、多変量解析において有意な予測因子はなかった。

D. 考察

ETB/Epilactaene の活性発現に分子内の α,β -不飽和カルボニル基が重要であることから、ETB/Epilactaene は α,β -不飽和カルボニル基を介して Hsp60 と結合していることが示唆された。Phosmidosine-Et が phosmidosine より安定性および活性に優れていることから、分子内のエトキシ基部分の重要性が示唆された。

種々の化合物が BCRP 阻害作用を持つことが示された。genistein は大豆に含まれる flavonoid であるが、数十グラム程度の大豆の摂取による genistein の血中濃度は、BCRP 阻害作用を示すのに十分な濃度である。また、経口投与された gefitinib の血中濃度も BCRP 阻害作用を示すのに十分である。こうした BCRP 阻害性化合物は BCRP により輸送される薬物・生体化合物の体内動態に影響すると考えられ、抗癌剤と併用される薬の抗 BCRP 作用による抗癌剤の体内動態の変化とその結果としての副作用 (広い意味での薬物相互作用) の理解と防止にも役立つと考えられる。

抗 Her-2 療法の適応は現在腫瘍組織中の Her-2 発現によってのみ決定されているが、治療標的関連分子の発現を詳細に測定することで、さらに精度の高い治療効果予測が可能になると思われる。内因性の VEGF 阻害蛋白 sVEGFR-1 の測定は抗 VEGF 治療を必ずしも必要としない患者群の同定に役立つ可能性がある。医療経済学的な側面においてもその意義は大きいかもしれない。複数の治療法を組み合わせると、互いに相乗、相加的あるいは干渉的に作用する可能性があることはよく知られているが、今回の研究では化学療法における血管新生、抗アポトーシス分子の発現誘導、ホルモン療法による Her-2 分子の発現抑制が見出された。いずれも今後の併用療法を考慮する上で重要な知見と考えられる。

欠失型 EGFR は、ゲフィチニブの治療効果に関連する主な EGFR 遺伝子変異であり、その生物学的意義の検討は重要である。他の変異型は恒常的な活性化はしめさないと報告され、その違いは同欠失型が in frame の単純型欠失であることが関連している可能性がある。GIST における c-kit など活性型変異であり、今回の結果は、感受性獲

得の機序としては合理的である。また、変異型 EGFR 発現による発がんにおける役割が推察される。また AKT のリン酸化の程度とゲフィチニブ感受性の関係についての報告があるが、我々のリン酸化 AKT が変異型 EGFR の下流シグナルとして重要であるとの結論と一致する。

血清中と腫瘍中の EGFR 変異検出の一致率 (80%) は、過去の p53, p16 などの血清中での検出力 (60-70%) に劣っているわけではないが、投与前診断への応用は難しい。

獲得耐性株 PC-9/ZD in vivo におけるエクソン 20 の点突然変異は、最近報告された臨床的耐性例での変異が exon 20 に認められた点では一致するが、獲得耐性との関連性は不明である。

BAY43-9006 の第 I 相試験において、PET による病巣の代謝能の評価と CT によるサイズの測定を行ったが、4ヶ月以上の NC や PR といった、いわゆる clinical benefit が期待できる 9 例では SUV が低下し、8 例で 25% 以上の低下を示していた。分子標的薬物は長期間の NC が薬効として期待されているが、SUV はそれを早期に検出できる可能性が示唆される。これは昨年度までに施行した GW572016 の第 I 相試験での SUV 解析と同様の結果であった。分子標的薬の生物学的活性を PET で評価できる可能性を示しているものと考えられた。

肺がんに対する標準的治療のひとつである CDDP+CPT-11 療法において、治療前 T-Bil 値が好中球減少と相関することを示した。CPT-11 による化学療法における治療前 T-Bil 値と好中球減少との相関は、CPT-11 単剤の大量療法 (350 mg/m²) で報告されている。今回の解析では、CPT-11 の薬物動態データはないが、UGT-1A1 の活性を通じてビリルビン値と CPT-11 の活性代謝物 SN-38 薬物動態が相関する結果と考える。下痢については、相関を認めなかったが、下痢発現のメカニズムとしては、血中 SN-38 濃度より胆汁に排泄された SN-38 未変化体、あるいは排泄後脱抱合を受ける SN-38-gluconide がより重要なものかもしれない。測定が簡便な T-Bil の好中球減少の指標としての有用性は今後さらなる検討を要する。

E. 結論

1) がん細胞により特異性の高い分子の同定によりがん特異的な治療効果の高い治療法の開発が具体化される。

2) 薬剤感受性・耐性を左右する分子生物学的および臨床的因子の同定により毒性・効果の観点から各々の患者に至適治療法の臨床導入が可能になると思われる。

3) 抗腫瘍効果に直接影響をもたらす分子の探索と治療効果の相関の検討によって (Proof of principle study) がん治療の新しい分子標的の模索が可能になる。また、分子マーカーの探索によって各々の化合物が有効な対象症例を同定しうると思われる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo, N. Summary of the ASCO-JSCO joint symposium. *Int. J. Clin. Oncol.*, 9(5): 343-345, 2004.
- 2) Saijo, N. What are the reasons for negative phase III trials of molecular-target-based drugs? *Cancer Sci.*, 95(10): 772-776, 2004.
- 3) Saijo, N., Horiike, A. Topoisomerase I inhibitors in small-cell lung cancer. The Japanese experience. *Oncology*, 18(7 suppl 4): 11-16, 2004.
- 4) Taguchi, F., Kusaba, H., Asai, A., Iwamoto, Y., Yano, K., Nakano, H., Mizukami, T., Saijo, N., Kato, H., Nishio, K. hnRNP L enhances sensitivity of the cells to KW-2189. *Int. J. Cancer*, 108(5): 679-685, 2004.
- 5) Ohe, Y., Niho, S., Kakinuma, R., Kubota, K., Ohmatsu, H., Goto, K., Nokihara, H., Kunitoh, H., Saijo, N., Aono, H., Watanabe, K., Tango, M., Yokoyama, A., Nishiwaki, Y. A phase II study of cisplatin and docetaxel administered as three consecutive weekly infusions for advanced non-small cell lung cancer in elderly patients. *Ann. Oncol.*, 15(1): 45-50, 2004.
- 6) Saijo, N. Adjuvant lung cancer trials using UFT based chemotherapy. *Lung Cancer*, 46: Suppl.1, S14-S15, 2004.
- 7) Koizumi, F., Shimoyama, T., Taguchi, F., Saijo, N., and Nishio, K. Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib. *Int. J. Cancer*, (in press).
- 8) Ohe, Y., Negoro, S., Matsui, K., Nakagawa, K., Sugiura, T., Takada, Y., Nishiwaki, Y., Yokota, S., Kawahara, M., Saijo, N., Fukuoka, M., Ariyoshi, Y. Phase I-II study of amrubicin and cisplatin in previously untreated patients with extensive-stage small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.*, (in press).
- 9) Park, J.K., Lee, S.H., Kang, J.H., Nishio, K., Saijo, N., and Kuh, H.J. Synergistic

- interaction between gefitinib (Iressa, ZD1839) and paclitaxel against human gastric carcinoma cells. *Anticancer Drugs*, 15: 809-818, 2004.
- 10) Nishio, K., Korfee, S., Eberhardt, W., Fujiwara, Y., and Saijo, N. The translational study for lung cancer. *Lung Cancer*, 45: S16-S17, 2004.
 - 11) Korfee, S., Eberhardt, W., Fujiwara, Y., and Nishio, K. The role of DNA-microarray in translational cancer research. *Curr. Pharmacogenomics*, (in press).
 - 12) Kuwano, M., Oda, Y., Izumi, H., Yang, S.J., Uchiumi, T., Iwamoto, Y., Toi, M., Fujii, T., Yamana, H., Kinoshita, H., Kamura, T., Tsuneyoshi, M., Yasumoto, K., Kohno, K. The role of YB-1 as a global marker of drug resistance. *Mol. Cancer Ther.*, 3: 1485-1492, 2004.
 - 13) Toi, M., Bando, H., Chow, W.C.L. Novel insights in clinical trials with preoperative systemic therapy for primary breast cancer. *Biomed. Pharmacother.*, 58: 531-535, 2004.
 - 14) Zhu, L., Chow, L., Loo, WTY., Guan, X., Toi, M. Her2/neu expression predicts the response to antiaromatase neoadjuvant therapy in primary breast cancer: subgroup analysis from celecoxib antiaromatase neoadjuvant trial. *Clin. Cancer Res.*, 10: 4639-4644, 2004.
 - 15) Tominaga, T., Kimura, M., Asaga, T., Yoshida, M., Awane, H., Koyama, H., Takatsuka, Y., Mitsuyama, S., Ikeda, T., Ogita, M., Aoyama, H., Sano, M., Abe, R., Nishi, T., Wada, T., Danno, M., Toi, M., Takashima, S. 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil + cyclophosphamide + tamoxifen versus CMF + tamoxifen in women with lymph node-positive breast cancer after primary surgery: a randomized controlled trial. *Oncol Rep.*, 12: 797-803, 2004.
 - 16) Bando, H., Brokelmann, M., Toi, M., Alitalo, K., Sleeman, J.P., Sipos, B., Grone, H.J., Weich, H.A. Immunodetection and quantification of vascular endothelial growth factor receptor-3 in human malignant tumor tissues. *Int. J. Cancer*, 111: 184-191, 2004.
 - 17) Morita, S., Toi, M., Kobayashi, T., Ito, Y., Hozumi, Y., Ohno, S., Iwata, H., Sakamoto, J. Application of a continual reassessment method to a phase I clinical trial of capecitabine in combination with cyclophosphamide and epirubicin (CEX) for inoperable or recurrent breast cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 34: 104-106, 2004.

- 18) Weich, H.A., Bando, H., Brokelmann, M., Baumann, P., Toi, M., Barleon, B., Alitalo, K., Sipos, B., Sleeman, J. Quantification of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) by a novel ELISA. *J. Immunol. Methods*, 285: 145-155, 2004.
- 19) Nakanishi, C., Yamaguchi, T., Iijima, T., Saji, S., Toi, M., Mori, T., Miyaki, M. Germline mutation of the LKB1/STK11 gene with loss of the normal allele in an aggressive breast cancer of Peutz-Jeghers syndrome. *Oncology*, 67: 476-479, 2004.
- 20) Takada, M., Kataoka, A., Toi, M., Bando, H., Toyama, K., Horiguchi, S., Ueno, T., Linder, S., Saji, S., Hayashi, Y., Funata, N., Kinoshita, J., Murakami, S., Ohno, S. A close association between alteration in growth kinetics by neoadjuvant chemotherapy and survival outcome in primary breast cancer. *Int. J. Oncol.*, 25: 397-405, 2004.
- 21) Matsumoto, G., Rahman, M.A., Muta, M., Nakamura, T., Bando, H., Saji, S., Tsuruta, K., Okamoto, A., Toi, M. DFU, a selective COX-2 inhibitor, suppresses MCF-7 xenograft tumor growth in mice. *Oncol. Rep.*, 12:281-285, 2004.
- 22) Toi, M., Bando, H., Horiguchi, S., Takada, M., Kataoka, A., Ueno, T., Saji, S., Muta, M., Funata, N., Ohno, S. Modulation of thymidine phosphorylase by neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. *Br. J. Cancer*, 90: 2338-43, 2004.
- 23) Toi, M., Takada, M., Bando, H., Toyama, K., Yamashiro, H., Horiguchi, S.-I., Saji, S. Current status of antibody therapy for breast cancer. *Breast Cancer*, 11: 10-14, 2004.
- 24) Saji, S., Toi, M. Novel sensitizing agents; Potential contribution of COX-2 inhibitor for endocrine therapy of breast cancer. *Breast Cancer*, 11: 129-133, 2004.
- 25) Toi, M., Rahman, M.A., Bando, H., Chow, W.C.L. Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial-cell growth factor) in cancer biology and treatment. *Lancet Oncol.*, 6: 158-166, 2005.
- 26) Matsumoto, G., Namekawa, J., Muta, M., Nakamura, T., Bando, H., Tohyama, K., Toi, M., Umezawa, K. Targeting of nuclear factor kappaB Pathways by dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel inhibitor of breast carcinomas: antitumor and antiangiogenic potential in vivo. *Clin. Cancer Res.*, 11: 1287-1293, 2005.
- 27) Bando, H., Weich, H.A., Brokelmann, M., Horiguchi, S., Funata, N., Ogawa, T., Toi, M. Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer*, 92: 553-561, 2005.
- 28) Yasuno, M., Mori, T., Koike, M., Takahashi, K., Toi, M., Takizawa, T., Shimizu, S., Yamaguchi, T., Matsumoto, H. Importance of thymidine phosphorylase expression in tumor stroma as a prognostic factor in patients with advanced colorectal carcinoma. *Oncol. Rep.*, 13: 405-412, 2005.
- 29) Saeki, T., Takashima, S., Terashima, M., Satoh, A., Toi, M., Osaki, A., Toge, T., Ohno, S., Nomura, N., Fukuyama, Y., Koizumi, W., Taguchi, T. A Japanese phase I study of continuous oral capecitabine in patients with malignant solid tumors. *Int. J. Clin. Oncol.*, 10: 51-57, 2005.
- 30) Nakanishi, C., Toi, M. Nuclear factor k-B inhibitors as sensitizer of anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* April, 2005 (in press).
- 31) Saji, S., Kawakami, M., Hayashi, S.-I., Yoshida, N., Hirose, M., Horiguchi, S.-I., Itoh, A., Funata, N., Schreiber, S.L., Yoshida, M., Toi, M. Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor positive breast cancer *Oncogene*, 2005 (in press).
- 32) Nagumo, Y., Takeya, H., Yamaguchi, J., Uno, T., Shoji, M., Hayashi, Y., Osada, H. Structure-activity relationships of epolactaene derivatives: Structural requirements for inhibition of Hsp60 chaperone activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 4425-4429, 2004.
- 33) Sekine, M., Okada, K., Seio, K., Obata, T., Sasaki, T., Takeya, H., Osada, H. Synthesis of a biotin-conjugate of phosmidosine O-ethyl ester as a G1 arrest antitumor drug. *Bioorg. Med. Chem.*, 12: 6343-6349, 2004.
- 34) Sekine, M., Okada, K., Seio, K., Takeya, H., Osada, H. Structure-activity relationship of phosmidosine: importance of the 7,8-dihydro-8-oxoadenosine residue for antitumor activity. *Bioorg. Med. Chem.*, 12: 5193-5201, 2004.
- 35) Asami, Y., Takeya, H., Onose, R., Chang, Y.-H., Toi, M., Osada, H. RK-805, an endothelial-cell- growth inhibitor

- produced by *Neosartorya* sp., and a docking model with methionine aminopeptidase-2. *Tetrahedron*, 60: 7085-7091, 2004.
- 36) Mitsui, T., Miyake, Y., Takeya, H., Osada, H., Kataoka, T. Epoxycyclohexenone, a specific inhibitor of Fas ligand-dependent apoptosis in CTL-mediated cytotoxicity. *J. Immunology*, 172: 3428-3436, 2004.
- 37) Shoji, M., Imai, H., Shiina, I., Takeya, H., Osada, H., Hayashi, Y. Different reaction modes for the oxidative dimerization of epoxyquinols and epoxyquinones -Importance of the intermolecular hydrogen-bonding. *J. Org. Chem.*, 69: 1548-1556, 2004.
- 38) Sekine, M., Okada, K., Seio, K., Takeya, H., Osada, H., Obata, T., Sasaki, T. Synthesis of chemically stabilized phosmidosine analogues and the structure-activity relationship of phosmidosine. *J. Org. Chem.*, 69: 314-326, 2004.
- 39) 掛谷秀昭、長田裕之. 血管内皮増殖因子 (VEGF)の機能を標的とした新規血管新生阻害剤. *日本臨床*, 62: 1264-1270, 2004.
- 40) 長田裕之、掛谷秀昭. 癌分子標的治療のための新しい血管新生阻害剤. *日本臨床*, 62: 1257-1263, 2004.
- 41) 三宅靖延、掛谷秀昭、長田裕之. デスレセプター依存性アポトーシス抑制化合物 ECH の作用機序および標的分子. *日本臨床*, 62: 1283-1289, 2004.
- 42) Goto, K., Sekine, I., Nishiwaki, Y., Kakinuma, R., Kubota, K., Matsumoto, T., Ohmatsu, H., Niho, S., Kodama, T., Shinkai, T., Tamura, T., Ohe, Y., Kunitoh, H., Yamamoto, N., Nokihara, H., Yoshida, K., Sugiura, T., Matsui, K., Saijo, N. Multi-institutional phase II trial of irinotecan, cisplatin, and etoposide for sensitive relapsed small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, 91(4): 659-665, 2004.
- 43) Sekine, I., Noda, K., Oshita, F., Yamada, K., Tanaka, M., Yamashita, K., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T., Kodama, T., Sumi, M., Saijo, N. Phase I study of cisplatin, vinorelbine, and concurrent thoracic radiotherapy for unresectable stage III non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.*, 95(8): 691-695, 2004.
- 44) Sekine, I., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T., Kodama, T., Saijo, N. Treatment of small cell lung cancer in the elderly based on a critical literature review of clinical trials. *Cancer Treat. Rev.*, 30(4): 359-368, 2004.
- 45) Takano, T., Ohe, Y., Kusumoto, M., Tateishi, U., Yamamoto, S., Nokihara, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Kunitoh, H., Tamura, T., Kodama, T., Saijo, N. Risk factors for tumor response in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with gefitinib. *Lung Cancer*, 45(1): 93-104, 2004.
- 46) Koizumi, F., Kanzawa, F., Ueda, Y., Koh, Y., Tsukiyama, S., Taguchi, F., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K. Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib ("Iressa") and the DNA topoisomerase I inhibitor CPT-11 (irinotecan) in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer*, 108(3): 464-472, 2004.
- 47) Sekine, I., Nokihara, H., Horiike, A., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T., Kodama, T., Saijo, N. Phase I study of cisplatin analogue nedaplatin (254-S) and paclitaxel in patients with unresectable squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 90(6): 1125-1128, 2004.
- 48) Hichiya, H., Tanaka-Kagawa, T., Soyama, A., Jinno, H., Koyano, S., Katori, N., Matsushima, E., Uchiyama, S., Tokunaga, H., Kimura, H., Minami, N., Katoh, M., Sugai, K., Goto, Y., Tamura, T., Yamamoto, N., Ohe, Y., Kunitoh, H., Nokihara, H., Yoshida, T., Minami, H., Saijo, N., Ando, M., Ozawa, S., Saito, Y., Sawada, JI. Functional Characterization of Five Novel CYP2C8 Variants, G171S, R186X, R186G, K247R and K383N, Found in a Japanese Population. *Drug Metab. Dispos.*, Feb 16, 2005.
- 49) Yamamoto, N., Tamura, T., Murakami, H., Shimoyama, T., Nokihara, H., Ueda, Y., Sekine, I., Kunitoh, H., Ohe, Y., Kodama, T., Shimizu, M., Nishio, K., Ishizuka, N., Saijo, N. Randomized pharmacokinetic and pharmacodynamic study of docetaxel: dosing based on body-surface area compared with individualized dosing based on cytochrome P450 activity estimated using a urinary metabolite of exogenous cortisol. *J. Clin. Oncol.*, 23(6): 1061-9, 2005.
- 50) Yamamoto, N., Fukuoka, M., Negoro, S., Nakagawa, K., Saito, H., Matsui, K., Kawahara, M., Senba, H., Takada, Y., Kudoh, S., Nakano, T., Katakami, N., Sugiura, T., Hosoi, T., Ariyoshi, Y. for the West Japan Thoracic Oncology

- Group. Randomized phase II study of docetaxel/ cisplatin versus docetaxel/ irinotecan in advanced non-small cell lung cancer: a West Japan Thoracic Oncology Study (WJTOG9803). *Br. J. Cancer*, 90: 87-92, 2004.
- 51) Kurata, T., Tamura, K., Kaneda, H., Nogami, T., Uejima, H., Asai, G., Nakagawa, K., Fukuoka, M. Effect of re-treatment with gefitinib ('Iressa', ZD1839) after acquisition of resistance. *Ann. Oncol.*, 15: 173-174, 2004.
 - 52) Kurata, T., Tamura, K., Yamamoto, N., Nogami, T., Satoh, T., Kaneda, H., Nakagawa, K., Fukuoka, M. Combination phase I study of nedaplatin and gemcitabine for advanced non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, 90: 2092-2096, 2004.
 - 53) Kaneda, H., Tamura, K., Kurata, T., Uejima, H., Nakagawa, K., Fukuoka, M. Retrospective analysis of the predictive factors associated with the response and survival benefit of gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 46: 247-254, 2004.
 - 54) Herbst, RS., Fukuoka, M., Baselga, J. Timeline:Gefitinib-a novel targeted approach to treating cancer: *Nat. Rev. Cancer*, 4: 956-965, 2004.
 - 55) Kakiuchi, S., Daigo, Y., Ishikawa, N., Furukawa, C., Tsunoda, T., Yano, S., Nakagawa, K., Tsuruo, T., Kohno, N., Fukuoka, M., Sone, S., Nakamura, Y. Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839). *Hum. Mol. Genet.*, 13: 3029-3043, 2004.
 - 56) Fukuda, T., Ashizuka, M., Nakamura, T., Shibahara, K., Maeda, K., Izumi, H., Kohno, K., Kuwano, M. and Uchiumi, T. Characterization of 5'-untranslated region of YB-1 mRNA and autoregulation of translation by YB-1 protein. *Nucleic Acids Res.*, 32: 611-622, 2004.
 - 57) Kuwano, T., Nakao, S., Yamamoto, H., Tsuneyoshi, M., Yamamoto, T., Kuwano, M. and Ono, M. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J.*, 18: 300-310, 2004.
 - 58) Ono, M., Hirata, A., Kometani, T., Miyagawa, M., Ueda, S., Kinoshita, H., Fujii, T. and Kuwano, M. Sensitivity to gefitinib ('Iressa', ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation. *Molec. Cancer Therapeutics*, 3: 465-472, 2004.
 - 59) Shibahara, K., Uchiumi, T., Fukuda, T., Kura, S., Tominaga, Y., Maehara, Y., Kohno, K., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T. and Kuwano, M. Targeted disruption of one allele of the Y-box binding-1 (YB-1) gene in mouse embryonic stem cells and increased sensitivity to cisplatin and mitomycin C. *Cancer Sci.*, 95: 348-353, 2004.
 - 60) Hisaeda, K., Inokuchi, A., Nakamura, T., Kohno, K., Iwamoto, Y., Kuwano, M. and Uchiumi, T. IL-1 β represses multidrug resistance protein2 gene expression through inactivation of IRF3 in human hepatic cells. *Hepatology*, 39: 1574-1582, 2004.
 - 61) Hirata, A., Uehara, H., Izumi, K., Naito, S., Kuwano, M. and Ono, M. Direct inhibition of EGF receptor activation in vascular endothelial cells by gefitinib ('Iressa', ZD1839). *Cancer Science*, 95: 614-618, 2004.
 - 62) Hirata, K., Masuda, K., Morikawa, W., He, J-W., Kuraoka, A., Kuwano, M., and Kawabuchi, M. N-myc downstream-regulated gene 1 expression in injured sciatic nerves. *GLIA*, 47: 325-334, 2004.
 - 63) Kuwano, M., Oda, Y., Izumi, H., Yang, S-J., Uchiumi, T., Iwamoto, Y., Toi, M., Fujii, T., Yamana, H., Kinoshita, H., Kamura, T., Tsuneyoshi, M., Yasumoto, K. and Kohno, K. The role of nuclear YB-1 as a global marker in drug resistance. *Molec. Cancer Therapeutics*, 3: 1458-1492, 2004.
 - 64) Torigoe, T., Izumi, H., Ishiguchi, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., Yoshida, T., Igarashi, T., Niina, I., Wakasugi, T., Imaizumi, T., Momii, Y., Kuwano, M. and Kohno, K. Cisplatin resistance and transcription factors. *Curr. Med. Chem. -Anti-Cancer Agents*, 5: 15-27, 2005.
 - 65) Yokoyama, G., Fujii, T., Tayama, K., Yamana, H., Kuwano, M., Shirouzu, K. PKC δ and MAPK mediate G₁ arrest induced by PMA in SKBR-3 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 327: 720-726, 2005.
 - 66) Hirata, A., Hosoi, F., Miyagawa, M., Ueda, S., Naito, S., Fujii, T., Kuwano, M. and Ono, M. HER2 overexpression increases sensitivity to gefitinib, an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor through inhibition of HER2/ HER3 heterodimer formation in lung cancer

- cells. *Cancer Res.*, 2005 (in press).
- 67) Kuwano, M., Basaki, Y., Kuwano, T., Nakao, S., Oie, S., Kimura, Y.N., Fujii, T. and Ono, M. The critical role of inflammatory cell infiltration in tumor angiogenesis—a target for antitumor drug development? In “New Angiogenesis Research” by Nova Science Publishers, Inc., New York, (in press).
- 68) Oda, Y., Saito, T., Tateishi, N., Ohishi, Y., Tamiya, S., Yamamoto, H., Yokoyama, R., Uchiyumi, T., Iwamoto, Y., Kuwano, M., and Tsuneyoshi, M. ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human soft tissue sarcomas. *Int. J. Cancer*, (in press).
- 69) Nakamura, H., Takamori, S., Fujii, T., Ono, M., Yamana, H., Kuwano, M. and Shirouzu, K. Cooperative cell-growth inhibition by combination treatment with ZD1839 (Iressa) and trastuzumab (Herceptin) in non-small-cell lung cancer. *Cancer Lett.*, (in press).
- 70) Sanda, T., Kuwano, T., Nakao, S., Iida, S., Ishida, T., Komatsu, H., Shudo, K., Kuwano, M., Ono, M. and Ueda, R. Anti-myeloma effects of a novel synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) through inhibition of angiogenesis. *Leukemia*, (in press).
- 71) Imai, Y., Tsukahara, S., Asada, S., and Sugimoto, Y. Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.*, 64: 4346-4352, 2004.
- 72) Yanase, K., Tsukahara, S., Asada, S., Ishikawa, E., Imai, Y., and Sugimoto, Y. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Mol Cancer Ther.*, 3 : 1119-1125, 2004.
- 73) Wang, X., Nitanda, T., Shi, M., Okamoto, M., Furukawa, T., Sugimoto, Y., Akiyama, S., and Baba, M. Induction of cellular resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors by the wild-type breast cancer resistance protein. *Biochem. Pharmacol.*, 68: 1363-1370, 2004.
- 74) Imai, Y., Ishikawa, E., Asada, S., and Sugimoto, Y. Estrogen-mediated Post-transcriptional Down-regulation of Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2. *Cancer Res.*, 65: 596-604, 2005.
- 75) Morita, H., Koyama, K., Sugimoto, Y., and Kobayashi, J. Antimitotic activity and reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by stilbenoids from *Bletilla striata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15: 1051-1054, 2005.
- 76) Oda, S., Maehara, Y. Microsatellite instability in human cancers: Its virtual and real images. *Dynamical Genetics* 167-184, 2004. Valerio Parisi Valeria De Fonzo Filippo Aluffi-Pentini Research Signpost (India)
- 77) Oda, S., Maehara, Y. Microsatellite instability in cancer: Assessment by high resolution fluorescent microsatellite analysis. *Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas* 55-63, 2004. M. A. Hayat Elsevier (USA)
- 78) Maehara, S., Maehara, Y., et al., Selenoprotein P, as a predictor for evaluating gemcitabine resistance in human pancreatic cancer cells. *Int. J. Cancer*, 112: 184-189, 2004.
- 79) Fukushima-Uesaka, H., Saito, Y., Watanabe, H., Shiseki, K., Saeki, M., Nakamura, T., Kurose, K., Sai, K., Komamura, K., Ueno, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Nakajima, T., Matsumoto, K., Saito, H., Goto, Y., Kimura, H., Katoh, M., Sugai, K., Minami, N., Shirao, K., Tamura, T., Yamamoto, N., Minami, H., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., Kitamura, Y., Kamatani, N., Ozawa, S., Sawada, J. Haplotypes of CYP3A4 and their close linkage with CYP3A5 haplotypes in a Japanese population. *Hum. Mutation*, 23: 100, 2004 (Mutation in Brief #681, 2004 Online).
- 80) Sai, K., Saeki, M., Saito, Y., Ozawa, S., Jinno, H., Hasegawa, R., Kaniwa, N., Sawada, J., Komamura, K., Ueno, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Kitamura, Y., Kamatani, N., Minami, H., Ohtsu, A., Shirao, K., Yoshida, T., Saijo, N. UGT1A1 haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese cancer patients. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 75(6): 501-515, 2004.
- 81) Minami, H., Ohe, Y., Niho, S., Goto, K., Ohmatsu, H., Kubota, K., Kakinuma, R., Nishiwaki, Y., Nokihara, H., Sekine, I., Saijo, N., Hanada, K., Ogata, H. Comparison of pharmacokinetics and pharmacodynamics of docetaxel and cisplatin in elderly and non-elderly patients, why is toxicity increased in elderly patients? *J. Clin. Oncol.*, 22: 2901-2908, 2004.

- 82) Fukushima-Uesaka, H., Sai, K., Maekawa, K., Koyano, S., Kaniwa, N., Ozawa, S., Kawamoto, M., Kamatani, N., Komamura, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Tomoike, H., Ueno, K., Minami, H., Ohtsu, A., Shirao, K., Yoshida, T., Saijo, N., Saito Y, Sawada J. Genetic variations of the AHR gene encoding aryl hydrocarbon receptor in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 19: SNP24(320)-SNP32(326), 2004.
- 83) Minami, H. A point, a line, or an area, which is the most important in the pharmacological analysis of cancer chemotherapy. *J. Clin. Oncol.*, 23: 405-406, 2005.
- 84) Kawada, K., Minami, H., Okabe, K., Watanabe, T., Inoue, K., Sawamura, M., Yagi, Y., Sasaki, T., Takashima, S. A multicenter and open label clinical trial of zoledronic acid 4 mg in patients with Hypercalcemia of malignancy. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 35: 28-33, 2005.
- 85) Koyano, S., Saito, Y., Kurose, K., Ozawa, S., Nakajima, T., Matsumoto, K., Saito, H., Shirao, K., Yoshida, T., Minami, H., Ohtsu, A., Saijo, N., Sawada, J. Novel genetic polymorphisms in the NR3C1 (glucocorticoid receptor) gene in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 20: SNP1 (79)-SNP6 (84), 2005.
- 86) Saeki, M., Saito, Y., Jinno, H., Sai, K., Kaniwa, N., Ozawa, S., Komamura, K., Kotake, T., Morishima, H., Kamakura, S., Kitakaze, M., Tomoike, H., Shirao, K., Minami, H., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., Kamatani, N., Sawada, J. Genetic polymorphisms of UGT1A6 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokin* 20: SNP7 (85)-SNP12 (90), 2005.
- 87) Kohno, N., Aogi, K., Minami, H., Nakamura, S., Asaga, T., Iino, Y., Watanabe, T., Goessl, C., Ohashi, T., Takashima, S. Zoledronic acid significantly reduces skeletal complications compared with placebo in Japanese women with bone metastases from breast cancer: a randomized, placebo-controlled trial. *J. Clin. Oncol.*, (in press).
- 88) Ando, M., Saka, H., Ando, Y., Minami, H., Kuzuya, T., Yamamoto, M., Watanabe, A., Sakai, S., Shimokata, K., Hasegawa, Y. Sequence effect of docetaxel and carboplatin on toxicity, tumor response and pharmacokinetics in non-small cell lung cancer patients, a phase I study of two sequences. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, (in press).
- 89) Ebi, H., Shigeoka, Y., Saeki, T., Kawada, K., Igarashi, T., Usubuchi, N., Ueda, R., Sasaki, Y., Minami, H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of fluoropyrimidine derivatives, capecitabine and 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR). *Cancer Chemother. Pharmacol.*, (in press).
- 90) Nozawa, T., Minami, H., Tsuji, A., Tamai, I. Role of organic anion transporter OATP1B (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its metabolite SN-38, in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab. Dispos.*, (in press).
- 91) Hichiya, H., Tanaka-Kagawa, T., Soyama, A., Jinno, H., Koyano, S., Katori, N., Matsushima, E., Uchiyama, S., Tokunaga, H., Kimura, H., Minami, N., Katoh, M., Sugai, K., Goto, Y., Tamura, T., Yamamoto, N., Ohe, Y., Kunitoh, H., Nokihara, H., Yoshida, T., Minami, H., Saijo, N., Ozawa, S., Saito, Y., Sawada, J. Functional characterization of five novel CYP2C8 variants, G171S, R186X, R186G, K247R and K383N, found in a Japanese population. *Drug Metab. Dispos.*, (in press).

2. 学会発表

- 1) 桑野信彦 がんのオーダーメイド医療の進歩 日本薬学会九州支部主催「くすり作りと化学療法の最前線」(特別講演) 2004年1月18日(福岡)
- 2) Nakamura, H., Takamori, S., Fujii, T., Fukunaga, M., Shirouzu, H., Yamana, H., Kuwano, M. Combination of gefitinib and trastuzumab as a novel therapeutics strategy in human non-small cell lung cancer 第6回米国癌研究会議(AACR)-日本癌学会合同会議 2004年1月25日-29日(Hawaii)
- 3) Fujii, T., Yamana, H., Nakamura, H., Shirouzu, K., Kuwano, M. Clinicopathologic study of vascular index in superficial esophageal carcinoma 第6回米国癌研究会議(AACR)-日本癌学会合同会議 2004年1月25日-29日(Hawaii)
- 4) Ono, M., Kuwano, T., Nakao, S., Kuwano, M. Tumor and their stromal interaction: involvement of IL-1-induced angiogenesis through dual pathways-

- COX2 and angiogenic factors 第6回米国癌研究会議 (AACR) -日本癌学会合同会議 2004年1月25日-29日 (Hawaii)
- 5) 持田泰、和田守正、田口健一、恒吉正澄、谷口秀一、前原喜彦、桑野博行、桑野信彦 大腸癌発生におけるP糖蛋白質は抑制的か促進的かー上皮および癌細胞へのP糖蛋白質の作用ー 第104回日本外科学会定期学術集会 2004年4月7日-9日 (大阪)
- 6) 和田守正、林健志、古野純典、桑野信彦 P糖蛋白質/MDR1の発がんへの関与と化学予防薬の開発戦略 第63回日本癌学会学術総会 (シンポジウム) 2004年9月29-10月1日 (福岡)
- 7) 内海健、和田守正、桑野信彦 薬剤排出を担うABCトランスポーターの肝、腸管での発現制御 第63回日本癌学会学術総会 (シンポジウム) 2004年9月29-10月1日 (福岡)
- 8) 中尾新太郎、桑野隆史、桑野信彦、小野真弓 腫瘍関連マクロファージとがん血管新生の進展 第63回日本癌学会学術総会 (シンポジウム) 2004年9月29-10月1日 (福岡)
- 9) 丸山祐一郎、大家真治、馬崎雄二、小野真弓、岩村威志、木下壽文、桑野信彦 Cap43遺伝子の発現は膵癌の悪性形質の分子標的となるか? 第63回日本癌学会学術総会 (ポスター) 2004年9月29-10月1日 (福岡)
- 10) 桑野隆史、三田貴臣、中尾新太郎、飯田真介、桑野信彦、上田龍三、小野真弓 多発性骨髄腫細胞における血管新生の誘導とレチノイン酸誘導体 (Am80) による抑制 第63回日本癌学会学術総会 (ワークショップ) 2004年9月29-10月1日 (福岡)
- 11) 平田晃、上田秀一、桑野信彦、小野真弓、内藤誠二 HER2強制発現によるGefitinib (Iressa)感受性への影響 第63回日本癌学会学術総会 (ワークショップ) 2004年9月29-10月1日 (福岡)
- 12) 上田秀一、向坂彰太郎、吉江真澄、小川勝洋、桑野信彦、小野真弓 イレッサによる肝がん細胞で誘導される血管新生の阻害機序 第63回日本癌学会学術総会 (ポスター) 2004年9月29-10月1日 (福岡)
- 13) Kuwano, M. Targeting angiogenesis as a inflammatory response in tumor growth, invasion and metastasis. The 9th International Symposium on Cancer Chemotherapy, December 2-3, 2004 (Tokyo)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
- ・ 特願 1996-259945
ヒト CMOAT 遺伝子とその CDNA
 - ・ 特願 2003-332584
MDR1 遺伝子の5'制御領域における SNP s
2. 実用新案登録
- なし
3. その他
- なし

厚生労働科学研究費補助金第3次対がん総合戦略研究事業
分担研究報告書

がん生物学に基づく新治療の開発と評価に関する研究

分担研究者 西條 長宏 国立がんセンター東病院副院長

研究要旨

細胞傷害性の抗悪性腫瘍薬に加え分子標的治療薬が多数臨床導入されつつあるがその作用点は必ずしも開発当初想定されたものとは一致しない。薬剤排出ポンプの一つとして知られる MDR-1 遺伝子とその遺伝子産物 PGP の発現変動がアドリアマイシン、タキソール投与症例の乳がん組織で認められた。またプロテアソーム阻害剤、PS-341 が MDR-1 による耐性を克服する作用を示すことを証明した。

A. 研究目的

抗悪性腫瘍薬の直接的間接的分子標的は必ずしも証明されていない現状である。トランスポータ蛋白は薬剤感受性を左右する因子の一つである。しかし様々なトランスポータが各々の抗悪性腫瘍薬に対しどのように作用するかは不明である。また臨床検体で継続的にトランスポータの発現の変異をみた研究は極めて少ない。本研究ではトランスポータ蛋白の発現解析を行い POP study として意義を検討する。

B. 研究方法, C. 研究結果

臨床試験の付随研究として実施される molecular correlative study の共同研究を行った。1) 各種臨床試験付随研究の臨床サンプルの収集、保存、精製を実施した。2) 特に固形がんにおける薬物療法の臨床試験において、臨床研究デザインの立案、実施を行うとともに、遺伝子発現データの解析を行った。抗がん剤の耐性に関わるトランスポータスーパーファミリー全般について、アドリアマイシン、タキソールを含む臨床試験付随研究を担当した。現在 20 の臨床サンプルでこの知見の再現性について、別のデータセットでもって、検証することが重要であり、別の約 100 の臨床サンプルの遺伝子セットでの再解析を実施する予定である。

(倫理面への配慮)

臨床試験および POP study の臨床研究の試験計画書を倫理審査委員会で審査の上、承認をえた。また個人情報保護を含むインフォームドコンセントを患者より得て研究を行った。

D. 考察, E. 結論

抗悪性腫瘍薬の感受性を左右する因子として薬剤のトランスポータは重要な因子と思える。トランスポータ遺伝子の網羅的解析によりアドリアマイシン、タキソール投与前後の MDR-1 発現の変化をとらえることができたことは、この手法の臨床的役割を確認しえたと思われる。また骨髄腫に対する特効薬として知られる PS-341 が MDR-1 発現を抑制しうることの発見より、この薬剤を臨床での耐性克服薬として使用する意義が拡大されたと示唆される。今後、新しい他の分子標的薬について網羅的解析により新しい分子標的を同定し、それをモニターすることによって新しい薬剤療法の最適化が可能になると思える。

F. 論文発表

- 1) Arao, T., Fukumoto, H., Takeda, M., Tamura, T., Saijo, N. and Nishio, K. Small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor as a target for ZD6474. Cancer Res., 64(24): 9101-9104, 2004.

- 2) Taguchi, F., Koh, Y., Koizumi, F., Tamura, T., Saijo, N., and Nishio, K. Anticancer effects of ZD6474, a VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, in gefitinib ("Iressa")-sensitive and resistant xenograft models. *Cancer Sci.*, 95(12): 984-989, 2004.
- 3) Saijo, N. Summary of the ASCO-JSCO joint symposium. *Int. J. Clin. Oncol.*, 9(5): 343-345, 2004.
- 4) Saijo, N. What are the reasons for negative phase III trials of molecular-target-based drugs? *Cancer Sci.*, 95(10): 772-776, 2004.
- 5) Fukushima-Uesaka, H., Sai, K., Maekawa, K., Koyano, S., Kaniwa, N., Ozawa, S., Kawamoto, M., Kamatani, N., Komamura, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Tomoike, H., Ueno, K., Minami, H., Ohtsu, A., Shirao, K., Yoshida, T., Saijo, N., Saito, Y. and Sawada, J. Genetic variations of the AHR gene encoding aryl hydrocarbon receptor in a Japanese population. *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 19(4): 320-326, 2004.
- 6) Sekine, I., Noda, K., Oshita, F., Yamada, K., Tanaka, M., Yamashita, K., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T., Kodama, T., Sumi, M., Saijo, N. Phase I study of cisplatin, vinorelbine, and concurrent thoracic radiotherapy for unresectable stage III non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.*, 95(8): 691-695, 2004.
- 7) Goto, K., Sekine, I., Nishiwaki, Y., Kakinuma, R., Kubota, K., Matsumoto, T., Ohmatsu, H., Niho, S., Kodama, T., Shinkai, T., Tamura, T., Ohe, Y., Kunitoh, H., Yamamoto, N., Nokihara, H., Yoshida, K., Sugiura, T., Matsui, K. and Saijo, N. Multi-institutional phase II trial of irinotecan, cisplatin, and etoposide for sensitive relapsed small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, 91(4): 659-665, 2004.
- 8) Minami, H., Ohe, Y., Niho, S., Goto, K., Ohmatsu, H., Kubota, K., Kakinuma, R., Nishiwaki, Y., Nokihara, H., Sekine, I., Saijo, N., Hanada, K., Ogata, H. Comparison of pharmacokinetics and pharmacodynamics of docetaxel and cisplatin in elderly and non-elderly patients: why is toxicity increased in elderly patients? *J. Clin. Oncol.*, 22(14): 2901-2908, 2004.
- 9) Takano, T., Ohe, Y., Kusumoto, M., Tateishi, U., Yamamoto, S., Nokihara, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Kunitoh, H., Tamura, T., Kodama, T., Saijo, N. Risk factors for interstitial lung disease and predictive factors for tumor response in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with gefitinib. *Lung Cancer*, 45(1): 93-104, 2004.
- 10) Sai, K., Saeki, M., Saito, Y., Ozawa, S., Katori, N., Jinno, H., Hasegawa, R., Kaniwa, N., Sawada, J., Komamura, K., Ueno, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Kitamura, Y., Kamatani, N., Minami, H., Ohtsu, A., Shirao, K., Yoshida, T., Saijo, N. UGT1A1 haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese patients with cancer. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 75(6): 501-505, 2004.
- 11) Saijo, N., Horiike, A. Topoisomerase I inhibitors in small-cell lung cancer. The Japanese experience. *Oncology*, 18(7 suppl 4): 11-16, 2004.
- 12) Sekine, I., Nokihara, H., Horiike, A., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T., Kodama, T., Saijo, N. Phase I study of cisplatin analogue nedaplatin (254-S) and paclitaxel in patients with unresectable squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 90(6): 1125-1128, 2004.
- 13) Taguchi, F., Kusaba, H., Asai, A., Iwamoto, Y., Yano, K., Nakano, H., Mizukami, T., Saijo, N., Kato, H., Nishio, K. hnRNP L enhances sensitivity of the cells to KW-2189. *Int. J. Cancer*, 108(5): 679-685, 2004.
- 14) Sekine, I., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T., Kodama, T., Saijo, N. Treatment of small cell lung cancer in the elderly based on a critical literature review of clinical trials. *Cancer Treat. Rev.*, 30(4): 359-368, 2004.
- 15) Ohe, Y., Niho, S., Kakinuma, R., Kubota, K., Ohmatsu, H., Goto, K., Nokihara, H., Kunitoh, H., Saijo, N., Aono, H., Watanabe,

- K., Tango, M., Yokoyama, A., Nishiwaki, Y. A phase II study of cisplatin and docetaxel administered as three consecutive weekly infusions for advanced non-small cell lung cancer in elderly patients. *Ann. Oncol.*, 15(1): 45-50, 2004.
- 16) Fukushima-Uesaka, H., Saito, Y., Watanabe, H., Shiseki, K., Saeki, M., Nakamura, T., Kurose, K., Sai, K., Komamura, K., Ueno, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Hanai, S., Nakajima, T., Matsumoto, K., Saito, H., Goto, Y., Kimura, H., Katoh, M., Sugai, K., Minami, N., Shirao, K., Tamura, T., Yamamoto, N., Minami, H., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., Kitamura, Y., Kamatani, N., Ozawa, S., Sawada, J. Haplotypes of CYP3A4 and their close linkage with CYP3A5 haplotypes in a Japanese population. *Hum. Mutat.*, 23(1): 100, 2004.
- 17) Koizumi, F., Kanzawa, F., Ueda, Y., Koh, Y., Tsukiyama, S., Taguchi, F., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K. Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib ("Iressa") and the DNA topoisomerase I inhibitor CPT-11 (irinotecan) in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer*, 108(3): 464-472, 2004.
- 18) Saijo, N. Adjuvant lung cancer trials using UFT based chemotherapy. *Lung Cancer*, 46: Suppl.1, S14-S15, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

分子標的薬等薬物療法のファーマコダイナミクス

分担研究者 西尾 和人 国立がんセンター研究所薬効試験部

研究要旨

チロシンキナーゼ阻害剤に対する効果予測因子の検討を基礎的、臨床的に実施した。①欠失型EGFRは、活性型変異であり、AKT経路が下流シグナルとして重要である。②血清中の腫瘍由来EGFR変異の検出が可能である。③ゲフィチニブの皮膚障害のバイオマーカーを同定した。④ゲフィチニブ獲得耐性株においてEGFRエクソン20の新たな変異が認められた。

A. 研究目的

分子標的薬の臨床試験において、ファーマコジェノミクスによる付随研究を実施し、薬物の薬力学的作用の評価およびそのバイオマーカーの選択をおこなう。EGFR特異的チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブの効果とEGFR遺伝子変異との関連性について基礎的、臨床的研究を実施する。

B. 研究方法

①ヒト肺がん細胞株PC-9細胞において同定した15塩基欠失型EGFR遺伝子の導入細胞を作製し、EGFRおよびその下流の生物学的変化、ゲフィチニブの感受性獲得機序を検討した。また、欠失型EGFRの2量体形成の変化と、その下流の変化を検討するため、野生型、変異型EGFRの両遺伝子の導入細胞を作製し、クロスリンク、イムノプロットなど生化学的手法で解析した。

②ゲフィチニブを投与した肺がん患者の血清、血漿中から微量の腫瘍由来DNAを回収し、そのEGFR遺伝子変異の有無を各種分子生物学的手法を用いて検討した。欠失型にはバイオアナライザーによる高感度検出法を、点突然変異型にはRFLPなどを実施した。変異はダイレクトシーケンス、サブクローニングにて確定した。また血清または血漿中のサイトカイン量をバイオビーズ(BioPlex)をもちいて検討した。

③ゲフィチニブ治療後に新たに獲得される遺伝子変異を探索した。イレッサ耐性細胞PC-9/ZD細胞、xenograftモデルで樹立したPC-9/ZDin vivo細胞、低濃度持続接触にて新たに樹立したPC-9/ZD細胞における、EGFR、HER2、HER3の全塩基配列を解析した。

(倫理面への配慮)

当該施設の倫理委員会の承認の上、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理的指針に準拠して実施し

た。また、小動物を用いた基礎研究では、動物倫理委員会の了承を得て実施するか、それ以前はIBBBの指針にのっとり実施した。さらに、同研究過程のすべての実験データは保存し、必要な場合、公表することとした。

C. 研究結果

〔1〕欠失型EGFR遺伝子の生物学的、薬理学的動態

In frame, simple deletion 型のEGFR遺伝子導入細胞は、ゲフィチニブに高度感受性（約1万倍、MTTアッセイ）を示した。同細胞においては、EGFRの恒常的リン酸化の更新、2量体形成の増加が認められた。リン酸化のキネテクス解析でも、野生型EGFRではATP付加によりATP濃度依存的にリン酸化反応が認められたが、変異型EGFRではATP濃度非依存的に既にリン酸化していた。同欠失型EGFRは、恒常的に活性化していると考えられた。下流シグナルの検討では、EGF刺激により細胞増殖の低下、EGFRリン酸化、MAPK、AKTの低下が認められた。ゲフィチニブ接触によりMAPKに比しAKTのリン酸化が強く抑制され、同変異型EGFRにおいてAKTが下流シグナルの主流と考えられた。

〔2〕血清、血漿中の腫瘍由来DNAのEGFR遺伝子変異の検出

化学療法未施行非小細胞肺癌症例に対するゲフィチニブ単剤治療の第II相試験（金沢大学笠原ら）における探索的付随研究として、血清中の腫瘍由来EGFRをnested PCRをもちいて回収し、欠失型EGFR、突然変異型EGFRの同定をおこなった。欠失型EGFRが30%程度に同定でき、ゲフィチニブの効果と、治療後血清サンプルにおけるEGFR変異が有意に相関した。また、同一患者におけるEGFR変異の有無の一致率は80%であった。

バイオビーズ(BioPlex)を用いて血漿中サイトカインレベルとゲフィチニブの薬力学的効果との関連性

について検討した。ゲフィチニブ投与前の17種類のサイトカインレベルを測定した。MIP-1bが皮膚障害出現群で有意に低値を示した(P=0.042、K-Nearest Neighbor Prediction test)。MIP-1bは血管新生、炎症に関連するサイトカインであり、皮膚障害の予測マーカーとした。

〔3〕ゲフィチニブに対する耐性獲得機構の検討
PC-9/ZD細胞ではEGFRの15塩基欠失以外のEGFR、HER2、HER3の全エクソンにおいて変異は認められなかった。PC-9/ZD in vivo においてエクソン20に点突然変異を認めた。PC-9/ZDfにおいてはEGFR変異は認められなかった。

D. 考察

欠失型EGFRは、ゲフィチニブの治療効果に関連する主なEGFR遺伝子変異であり、その生物学的意義の検討は重要である。他の変異型は恒常的な活性化はしめないと報告され、その違いは同欠失型がin frameの単純型欠失であることが関連している可能性がある。GISTにおけるc-kitなどは活性型変異であり、今回の結果は、感受性獲得の機序としては合理的である。また、変異型EGFR発現による発がんにおける役割が推察される。またAKTのリン酸化の程度とゲフィチニブ感受性の関係についての報告があるが、我々のリン酸化AKTが変異型EGFRの下流シグナルとして重要であるとの結論と一致する。

血清中と腫瘍中のEGFR変異検出の一致率(80%)は、過去のp53、p16などの血清中での検出力(60-70%)に劣っているわけではないが、投与前診断への応用は難しい。

獲得耐性株PC-9/ZD in vivoにおけるエクソン20の点突然変異は、最近報告された臨床的耐性例での変異がexon 20に認められた点では一致するが、獲得耐性との関連性は不明である。

E. 結論

- ①欠失型EGFRは、活性型変異であり、AKT経路が下流シグナルとして重要である。
- ②血清中の腫瘍由来EGFR変異の検出が可能である。
- ③ゲフィチニブの皮膚障害のバイオマーカーを同定した。
- ④ゲフィチニブ獲得耐性株においてEGFRエクソン20の新たな変異が認められた。

F. 研究発表

1. Korfee, S., Eberhardt, W., Fujiwara, Y., and Nishio, K. The role of DNA-microarray in translational cancer research. Curr.

Pharmacogenomics, (in press).

2. Koizumi, F., Shimoyama, T., Taguchi, F., Saijo, N., and Nishio, K. Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib. Int. J. Cancer, (in press).
3. Yamamoto, N., Tamura, T., Murakami, H., Shimoyama T., Nokihara, H., Ueda, Y., Sekine, I., Kunitoh, H., Ohe, Y., Kodama, T., Shimizu, M., Nishio, K., Ishizuka, N., and Saijo, N. Randomized pharmacokinetic and pharmacodynamic study of docetaxel: dosing based on body-surface area compared with individualized dosing based on cytochrome p450 activity estimated using a urinary metabolite of exogenous cortisol. J. Clin. Oncol., 23:1061-1069, 2005.
4. Arao, T., Fukumoto, H., Shimoyama, T., Takeda, M., Tamura, T., Saijo, N., and Nishio, K. Small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor as a target for ZD6474. Cancer Res., 64:9101-9104, 2004.
5. Taguchi, F., Koh, Y., Koizumi, F., Tamura, T., Saijo, N., and Nishio, K. Anticancer effects of ZD6474, a VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, in gefitinib ('Iressa')-sensitive and resistant xenograft models. Cancer Sci., 95:984-989, 2004.
6. Park, J.K., Lee, S.H., Kang, J.H., Nishio, K., Saijo, N., and Kuh, H.J. Synergistic interaction between gefitinib (Iressa, ZD1839) and paclitaxel against human gastric carcinoma cells. Anticancer Drugs, 15:809-818, 2004.
7. Nishio, K., Korfee, S., Eberhardt, W., Fujiwara, Y., and Saijo, N. The translational study for lung cancer. Lung Cancer, 45:S16-S17, 2004.
8. Taguchi, F., Kusaba, H., Asai, A., Iwamoto, Y., Yano, K., Nakano, H., Mizukami, T., Saijo, N., Kato, H., and Nishio, K. hnRNP L enhances sensitivity of the cells to KW-2189. Int. J. Cancer, 108:679-685, 2004.
9. Koizumi, F., Kanzawa, F., Ueda, Y., Koh, Y., Tsukiyama, S., Taguchi, F., Tamura, T., Saijo, N., and Nishio, K. Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib ('Iressa') and the DNA topoisomerase I inhibitor CPT-11 (Irinotecan) in human colorectal cancer cells. Int. J. Cancer, 108:464-472, 2004.

G. 知的財産等の出願・登録状況(予定を含む。)なし