

## ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発

所 属 国立がんセンター研究所薬効試験部  
研究者 西尾 和人

研究要旨 非臨床、臨床試験において、フッ化ピリミジン、タモキシフェン等およびその誘導体を合成し、親和性のある標的蛋白質の同定をできるケミカルゲノミクスの手法を確立した。胃癌患者を対象とする臨床試験を実施し、網羅的遺伝子発現解析で、フッ化ピリミジン代謝関連酵素の解析をおこなうとともに、新規標的分子の候補を同定し、医薬品開発を開始した。

### 分担研究者

- (1) 長浜バイオ大学バイオサイエンス学部 水上 民夫
- (2) 三菱化学安全科学研究所鹿島研究所先端技術 研究部 関島 勝
- (3) 国立がんセンター中央病院第一領域外来部 山田康秀
- (4) 熊本大学薬学部大学院 大川原 正

### A. 研究目的

非臨床、臨床試験において、S1、5-FU等主要抗癌剤の新規薬効貢献因子をケミカルゲノミクスの手法を用いて探索し、同定された因子を標的として、より優れた抗癌活性を有する次世代分子標的抗癌剤を探索・開発する。また、臨床試験を実施し、

- (1) 臨床サンプルの集積、検体管理、RNA抽出、品質管理
- (2) 臨床検体用いた遺伝子発現解析の実施と定量的PCRなどによるその再現性の確認
- (3) 癌化に伴う5FU代謝関連遺伝子群の発現変化の検討
- (4) 胃癌の治療標的となりうる遺伝子の同定と治療への応用することを目的としている。

### B. 研究方法

#### (1) 化合物ライブラリー合成

Tamoxifen, 5FU, Gefitinibを薬効貢献分子として選び、リンカー鎖として4-amino-butyl基を結合し、これにビオチン、Affinity Gelに固定化するリガンドの合成することを目的に化学合成の手法を用いて、目的化合物の合成を行った。

#### (2) 抗癌剤固定化アフィニティクロマトグラフィーによる結合蛋白質の精製と質量分析

Tamoxifen、5FUとそれらの誘導体を用いた低分子化合物の固定化法の確立を本年度の目的とした。

Tamoxifenの代謝活性体である4-hydroxytamoxifen (4-OHT)へ一級アミンを導入した誘導体(Tam-NH<sub>2</sub>)を用い、ゲルへの固定化と標的分子であるエストロゲン受容体との結合の有無を検討した。

- i) Tam-NH<sub>2</sub>の細胞増殖活性を検討した。
- ii) Tam-NH<sub>2</sub>のアフィニティカラムの作成と、エストロゲン受容体との結合を検討した。

また、ハイスループットな標的スクリーニングシ

システムおよび構造活性相関解析法の構築をめざした各種抗癌剤誘導体の結合タンパク質の精製と抗癌剤誘導体の細胞増殖阻害活性の測定についての基礎的手法の確立を目指し下記の研究を実施した。

1. 5-FU とその誘導体固定化カラムを用いた、癌細胞株の細胞抽出溶液のアフィニティ精製による結合分子の同定:本研究課題の主要な研究対象抗癌剤である 5-FU について、カラム固定化のための誘導体および、さらに官能基を付加した数種の誘導体を用いて、結合タンパク質同定系の確立のために条件検討を行った。化合物固定は、ハイスループットな系の確立を目指すため、本課題研究の他の分担研究において既にその標的固定手法としての有効性が示されたピオチン-アビジン系を介したアガロースビーズ担体への固定法に替えて、3M社から販売されている 3M エムポア™ アフィニティアズラクトンカラム (スピнкаラム, 96 ウェルプレート) を利用して行った。本製品は、担体ビーズ表面に存在するアズラクトン基に化合物 (誘導体) の 1 級アミンをアミド結合により直接固定化することができ、ピオチン-アビジン系よりシンプル且つ安定な固定化が可能である。さらに、担体ビーズは繊維に固定化され膜状になっているため扱いが簡単であること、また、96 ウェルプレートの製品も販売されていることなど、手法のハイスループット化に適している。反面、固定化の際のアーム長の選択が容易にできないことが、ピオチン-アビジン系より劣っている点である。

5-FU および実験に供した 3 種の 5-FU 誘導体を図 1 に示した。導入した官能基のうち、全ての誘導体に存在するアームを介して結合した 1 級アミンは、5-FU (誘導体) 結合性タンパク質の同定実験の際に担体に固定化する目的で導入されたものである。また、5-FU の主要適応癌種である大腸癌由来の細胞株である DLD-1 を結合タンパク質同定の対象とした。カラムへの化合物固定法は、以下の通りである。

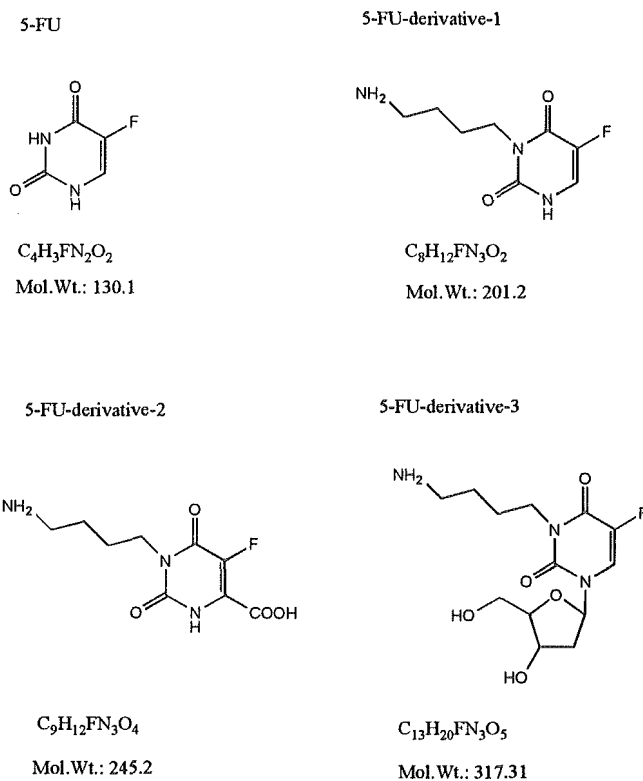


図 1 実験に用いた 5-FU およびその 3 種の誘導体。

1. 各種化合物を水に溶解する。化合物濃度を高くすることで、カラムの官能基との結合率を上げることができるので化合物により水への溶解性を考慮しながらなるべく高濃度の水溶液を作製する (~100 mM)。
2. スピнкаラムに化合物溶液 300 · 1 を加え、室温で 60 分間インキュベーションして結合反応を行う。
3. 100 × g, 2 分間の遠心により化合物溶液を除去する。
4. 500 · 1 の PBS をスピнкаラムに加えて 400 × g, 2 分間の遠心を行ない、カラムを洗浄する。この操作を 4 回以上繰り返し、未反応の化合物を洗浄する。
5. 500 · 1 の 3 M モノエタノールアミン溶液 (pH9.5) をカラムに加えて、100 × g, 2 分間の遠心を行ない 3 M モノエタノールアミン溶液をカラムに浸透させる。再度 500 · 1 の 3 M モノエタノール

ールアミン溶液 (pH9.5) をカラムに加えて室温で 2 時間インキュベーションし未反応のアズラクトン基をクエンチングする。

6. 4. と同様の操作によりスピнкаラムを洗浄する。

7. 非特異的なタンパク質の結合を防ぐため、3M ブロッキング緩衝液により、カラムをブロッキングする。500・1のブロッキング緩衝液をカラムに加えて 100×g, 2 分間の遠心を行ないブロッキング緩衝液をカラムに浸透させる。さらに 500・1のブロッキング緩衝液を加え室温で 60 分インキュベーションする。

8. 4. と同様の操作によりスピнкаラムを洗浄する (5 回)。

9. SIGMA 社製 CellLytic M Cell Lysis Reagent をもちいて、添付プロトコルに従い、DLD-1 細胞から抽出したタンパク質約 300・g を含む溶液 300・1 をカラムに加え 100×g, 2 分間の遠心を行ないカラムに溶液を浸透させた後、流下した溶液を再度カラムに加えて 15 分室温でインキュベートすることにより化合物に結合タンパク質を結合させる。

10. 4. と同様の操作によりスピнкаラムを洗浄する (5 回)。洗浄は、PBS 以外に、0.5M NaCl/PBS, 0.5M NaCl, 1% NP-40/PBS, 1M NaCl/PBS, 1M NaCl, 1% NP-40/PBS により行ない、適切な洗浄条件を検討した。

11. 240・1の 0.1M グリシン, 2.0%酢酸 (pH2.0) 溶液をスピнкаラムに加え、100×g, 2 分間の遠心を行ないカラムに溶液を浸透させた後、流下した溶液を再度カラムに加えて 400×g 2 分間の遠心により結合タンパク質を溶出する。

以上の操作により溶出した結合タンパク質を、SDS-PAGE に供した後、銀染色によりタンパク質を検出した。

(3) 内視鏡生検胃癌組織における抗癌剤感受性規定因子の検討

国立がんセンター中央病院において「胃がんにお

ける抗癌剤感受性規定因子の検討」(国立がんセンター中央病院 H15 度倫理委員会承認)の臨床試験に登録され、同意を得た症例を対象に、臨床試験を実施した。また付随研究として、内視鏡下生検、および末梢血を採取した。末梢血より、単核球を分離、臨床サンプルの蛋白質、核酸を集積、保管した。

[対象] 5FU を用いた化学療法の適応となる進行胃癌症例。治療は 5-fluorouracil 系薬剤 (5FU, TS-1) を中心とし、一部塩酸イリノテカンを受ける症例を含む。JCOG 消化器癌グループ臨床試験ベースの症例。登録前に提供者の文書による同意を得た。

[集積期間] 2003 年 7 月 24 日から 2006 年 3 月 [目標症例数] 70 例 [検体] 内視鏡生検サンプルは治療開始前と治療後の 2 時点において、胃癌原発巣と正常胃粘膜組織からそれぞれ 1 検体ずつ採取し、リンパ球検体は化学療法施行前に末梢血を 10ml、治療開始 8 日後 10ml それぞれ 1 検体ずつ採取した (図 2)。[検体管理] 内視鏡検体は RNA 保存液中に攪拌し-80 度で保存し、単核球検体は末梢血から抽出し、-80 度で冷凍保存した。個人識別情報は匿名化され厳重に管理した。

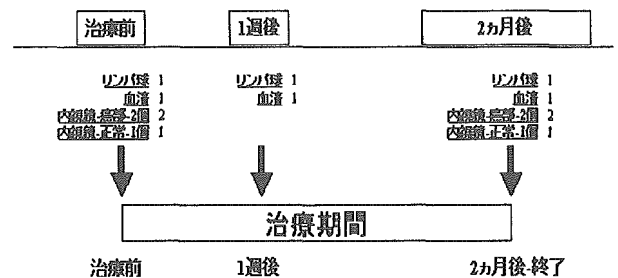


図2

図2 サンプル採取時期

1) 化学療法治療前、2) 治療開始 1 週間後、3) 治療終了時の 3 点において、内視鏡生検サンプル、リンパ球サンプル、血清を採取する。

集積された臨床検体は厳重な匿名化後、三菱安全科学研究所に送付され RNA 抽出、マイクロアレイ測定を実施した。RNA の quality check では、9 割前

後のサンプルが問題なく測定可能であった。遺伝子発現解析は Affymetrics 社製 Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いた。遺伝子発現解析データの妥当性を評価するため、同定された標的候補遺伝子に対し適宜 real-time RT-PCR による臨床検体並びに癌細胞株での発現を検討した。

#### (倫理面への配慮)

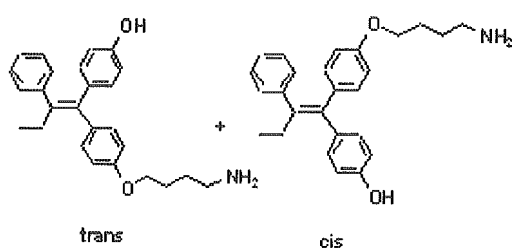
in vitro の研究は、臨床サンプルを対象としていない。本研究における遺伝子発現解析はゲノムを対象とせず、ゲノム解析の範疇に属さない。しかし、当該施設の IRB およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理的指針に準拠して実施した。さらに、同研究過程のすべての実験データは保存し、必要な場合、公表することとした。

### C. 研究結果

#### (1) 化合物ライブラリー合成

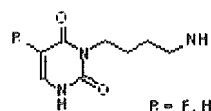
##### 1. 4-aminobutyl tamoxifen の合成

Ethyl 2-phenylbutyrate と 4-MOMphenylmagnesium bromide の反応により、酸処理後、4,4'-dihydroxytamoxifen を合成し、ついで N-4-bromobutylphthalimide で処理し、cis, trans 混合物 (1:4) とし、40% methylamine 水溶液で保護基を除去して目的化合物を得た。



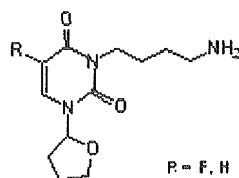
##### 2. 4-aminobutyl 5FU, 4-aminobutyl Uracil の合成

5FU, Uracil を トシル 保 護 し、N-4-bromobutylphthalimide で処理した後、トシル基を除去、40% methylamine 水溶液で保護基を除去して目的化合物を得た。



### 3. 4-aminobutyl Futrafur の合成

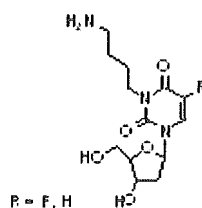
Futrafur を N-4-bromobutylphthalimide で処理し、ついで脱保護し目的化合物を得た。



### 4. 3-(4-aminobutyl)-d5FU,

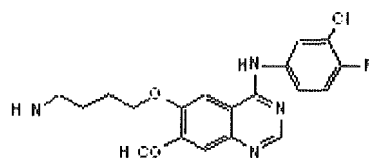
#### 3-(4-aminobutyl)-dUridine の合成

d5FU, uridine へ 4-aminobutyl 基の導入を行った。市販の化合物名 18a, 18b より N-4-bromobutylphthalimide で処理し、ついで脱保護し目的化合物を得た。



### 5. 6-(4-aminobutyl) gefitinib の合成

3-hydroxy-4-methoxy-benzoic acid をベンジル化し、ついでニトロ化、還元を経て、formamide 中で加熱後、脱ベンジル化、アセチル化した。次に POCl<sub>3</sub> 中で加熱後 3-chloro-4-fluoroaniline で処理して、アセチル基を除去し、N-(4-aminobutyl)phthalimide でアルキル化、脱保護し目的化合物を得た。



#### (2) 抗癌剤固定化アフィニティクロマトグラフィーによる結合蛋白質の精製と質量分析

i) エストロゲン受容体を発現するヒト由来乳癌細胞株 MCF-7 に対する細胞増殖抑制効果を指標に Tam-NH<sub>2</sub> の活性を確認した。Tam-NH<sub>2</sub> は、Tamoxifen と同程度の細胞増殖抑制効果 (Tamoxifen; 16.1 · M, Tam-NH<sub>2</sub>; 15.6 · M) を示し、活性を保持していることが確認された。

ii) 固定化担体は Affi-Gel 10 (Bio-Rad) を用いた。Affi-Gel 10 の N-hydroxysuccinimide ester と Tam-NH<sub>2</sub> の一級アミンは DMSO 溶液中で反応させアフィニティカラムを作成した。このアフィニティカラムへ MCF-7 細胞抽出液をとおり、結合蛋白質を SDS-PAGE にて分離し、結合蛋白質を銀染色で可視化した。また、標的蛋白質であるエストロゲン受容体をウェスタンブロットにより検出した。ネガティブコントロールとして、エストロゲン受容体を発現しないヒト由来乳癌細胞株 MDAMB-468 を使用し、同様の操作を行った。MCF-7 細胞抽出液を通したカラムにおいてエストロゲン受容体・の結合が確認された (図3)。

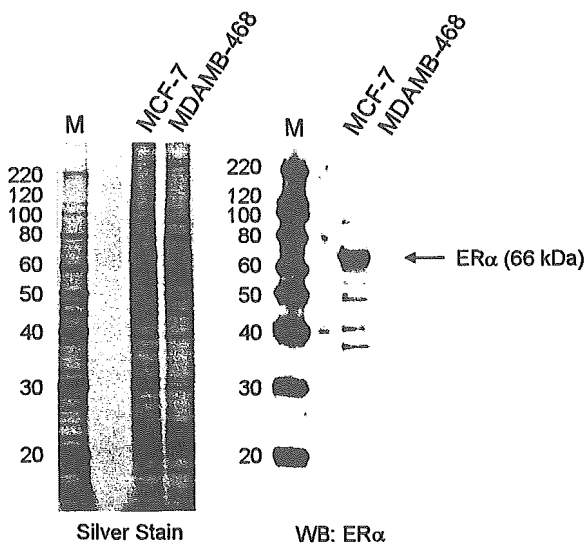


図3 MCF-7 細胞抽出液を通したカラムに結合した分画の銀染色 (左) と抗エストロゲン受容体抗体によるウェスタンブロットティング

iii) 5-FU とその誘導体固定化カラムを用いた、癌細胞株の細胞抽出溶液のアフィニティ精製による結合分子の同定: ステップ 10 のカラム洗浄を PBS

で行った実験結果を図4に示した。

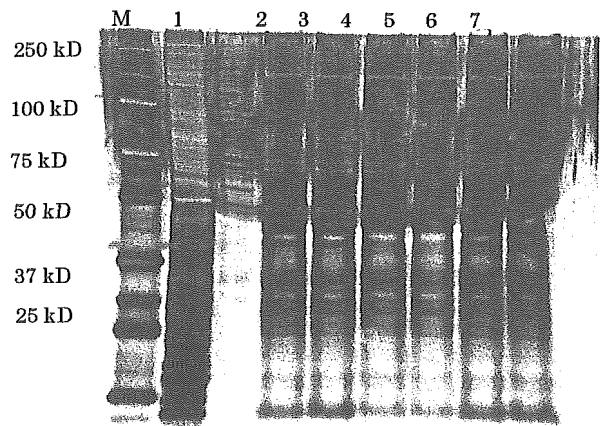


図4 5-FU 誘導体固定化カラムによる DLD-1 細胞抽出タンパク質の精製。レーン1: DLD-1 抽出タンパク質, レーン2: 化合物を固定化していないカラム, レーン3: 5-FU 誘導体1, レーン4: 5-FU 誘導体2, レーン5: 5-FU 誘導体3, レーン6, 7: 化合物を固定化していない, 各カラムに対する結合タンパク質。

化合物を固定していないカラムにも多くのタンパク質が非特異的に結合しており、化合物固定カラムから溶出した画分に特異的なタンパク質を検出することは不可能であった。そこで、5-FU 誘導体1 固定化カラムを用いて、溶出前の洗浄条件の検討を行った (図5)。

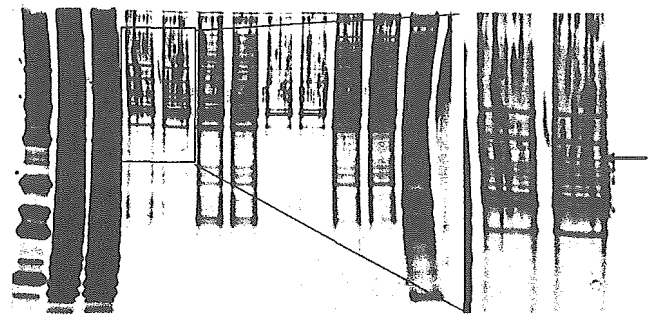


図5 5-FU 誘導体1 固定化カラムを用いた、洗浄条件の検討。レーン1, 2: DLD-1 抽出タンパク質, 3, 4: 0.5M NaCl/PBS, 5, 6: 0.5M NaCl, 1% NP-40/PBS, 7, 8: 1M NaCl/PBS, 9, 10: 1M NaCl, 1% NP-40/PBS, 11: PBS, による洗浄。奇数レーンは、化合物を固定化していないカラム, 偶数レーンは5-FU 誘導体1 固定化カラムの結合タンパク質。矢印は検出された結合タンパク質を示している。

その結果、PBS 中の塩濃度を高くすることで、非特

異的な結合タンパク質を洗浄することが可能であることが明らかとなった。また、洗浄効果を上げるために添加した NP-40 が、逆に非特異的結合を増加させることも明らかとなった。洗浄条件の改善により、図4では見られなかった 5-FU 誘導体 1 の結合タンパク質と考えられる 80kDa 付近のバンドを検出することができた。

(3) 内視鏡生検胃癌組織における抗癌剤感受性規定因子の検討

i) [プロトコール承認]本臨床試験付随研究の骨子「胃癌における抗癌剤感受性規定遺伝子の検討」については、国立がんセンター倫理委員会により 2004 年 7 月 24 日に承認された。

[症例登録状況]2004 年 7 月から登録を開始し、現在 (2005 年 3 月 17 日)まで 41 例の登録を終了した。内視鏡検体 234 サンプル、リンパ球検体 122 サンプル採取し、保存中である。

ii) 本年度は症例集積中であり、マイクロアレイ測定 validation 目的を兼ねて本試験解析予定の一部のサンプルを用いて、遺伝子発現解析を行なった。検体は、同一症例の内視鏡検体癌部 1 サンプル・非癌部 1 サンプルを 11 症例分、計 22 サンプルを解析した。

iii) 5FU は薬剤代謝関連遺伝子群が比較的明らかになっている薬剤であるが、関連遺伝子群を同一症例内で同時に網羅的に検討した報告はない。今回は正常部 11 サンプル・癌部 11 サンプルの DNA マイクロアレイ解析データを用いて、同一症例の正常部の遺伝子発現に比べて癌部がどう変化したのかを 5FU 代謝関連遺伝子群 30 遺伝子を抽出し検討した (図 6)。ほとんどの遺伝子が癌化に伴い発現が亢進しており、6 遺伝子が 2 倍以上の変化を認めた。

iv) 胃癌特異的遺伝子の同定のため、上記の 22 サンプルを正常部と癌部で発現の変化を paired-t 検定で解析し、有意差  $p < 0.0001$  以下の約 200 遺伝子を同定した。

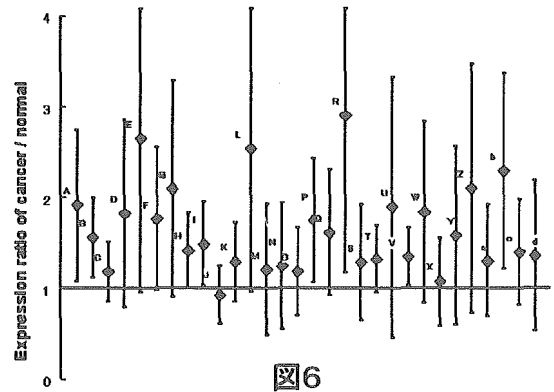


図6 5FU 薬剤代謝関連遺伝子群の網羅的解析 同一症例内の胃生検組織において、5FU 薬剤代謝関連遺伝子群の各遺伝子について癌部、正常部の発現比を示した。今回は治療前サンプルのみであるが、paired サンプルにおいて、同時に関連遺伝子発現変化を評価することが可能であることを示している。

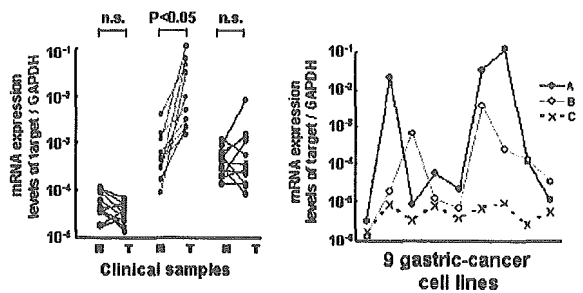


図7 マイクロアレイデータの再現性 real-time RT-PCR を用いてマイクロアレイで同定された遺伝子発現 (遺伝子 A) の再現性を臨床検体で確認した。赤で示すように同遺伝子の発現は癌部では、全例正常部に比べて 10 倍発現が亢進していることを示している。右は胃癌細胞株でも高い発現が確認された。

これらの中には、発癌において新規の 5 遺伝子、胃癌において新規の 25 遺伝子を含んでいた。そのうち、「遺伝子 A」は、アレイデータと独立した real-time RT-PCR においても臨床検体癌部で有意に発現亢進が確認され、さらに胃癌細胞株では分化に関連する傾向を認めた (図 7)。この遺伝子について

ては ELISA による蛋白レベルでも mRNA レベルとの強い相関を確認した。また胃癌治療標的としては新規の「遺伝子 B」においても同様に real-time RT-PCR で細胞株の発現亢進が確認され(図 3)特に胃癌・大腸癌での消化器癌特異的な発現傾向が示唆された。Flowcytometry による解析では蛋白レベルでも同様の結果が得られた(図 8)。

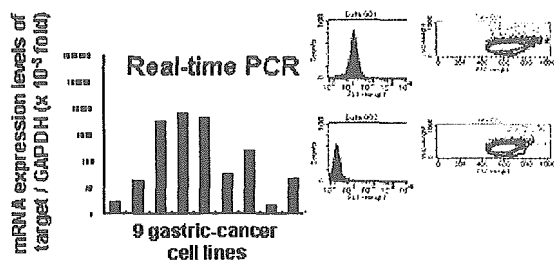


図8

#### 図8 新規標的遺伝子

今回同定された「遺伝子B」は上皮組織での発現は知られていなかったが、胃癌株の一部で強く発現していることが示された。右はフローサイトメトリーで蛋白レベルでも確認された。

#### D. 考察

##### (1) 化合物ライブラリー合成

Tamoxifen 誘導体に関しては、目的化合物の合成がなされた。5FU に関しては、活性体である d5FUMP の誘導体 3-(4-aminobutyl)-d5FUMP の合成を検討している。Gefitinib 合成に関しては、別途合成経路として工程が短い経路も検討している。

##### (2) 抗癌剤固定化アフィニティクロマトグラフィーによる結合蛋白質の精製と質量分析

アフィニティカラムに結合した蛋白質を銀染色にて可視化した結果、エストロゲン受容体のほかにも複数のバンドが認められ、Tamoxifen と相互作用する可能性を有する蛋白質であることが示唆された。

また、今回用いた手法によって各種 5-FU 誘導体の結合タンパク質を精製することが可能であるこ

とが示唆された。今後は、残り 2 種の誘導体の結合タンパク質の検出を行ない、構造決定によりタンパク質を同定する予定である。また、さらに多くの誘導体に対して同様の実験を行い、多くの結合タンパク質を同定し、その結合性と誘導体の構造特性の相関関係を解析する。課題としては、高いレベルで検出されるカラムに対する非特異的結合タンパク質を減少させることがあげられる。また、タンパク質の分離能の高い 2 次元電気泳動により、さらに多くの結合タンパク質が検出できる可能性がある。

様々な構造的特徴を有する 5-FU 誘導体について、上述 1 の実験で得られる結合タンパク質の情報と、2 の実験で得られる細胞増殖阻害活性を指標とした薬理活性の情報を蓄積し、相関解析を行うことで 5-FU の構造特性と代謝機構や薬理活性に関する有用な情報が得られることが期待される。また、その過程で確立される手法は、様々な薬剤の構造相関活性の評価に役立つことが期待できる。

##### (3) 内視鏡生検胃癌組織における抗癌剤感受性規定因子の検討

症例の集積、臨床サンプルの採取、検体管理、RNA 抽出、品質管理は概ね順調である。特に検体管理に関しては quality の高い RNA が得られており、その理由として従来のような 1 時間近い阻血後の手術標本ではなく内視鏡による生検直後から検体処理を行なう点が推察される。マイクロアレイデータの再現性については、同じ臨床検体あるいは細胞株において独立した検出法である real-time RT-PCR でも高い再現性が得られており、いくつかの興味ある遺伝子については ELISA による蛋白レベルでの検討においても高い再現性を認めている。臨床検体を用いた 5FU 代謝関連遺伝子群の検討においては図 2 の如く同一症例において容易に網羅的、同時的に解析可能であることが示された。

胃癌の治療の標的となりうる遺伝子の同定のために行なった解析においては約 30 の新規治療標的候補遺伝子が同定された。癌で特異的に発現亢進が確認されたそのうち 3 つの遺伝子産物については、現

在その機能を阻害する治療応用可能なヒト化中和抗体を作成中である。胃癌治療標的としては新規の「遺伝子B」については消化器癌に特異性が高いことが示され、現在臨床検体を用いて免疫組織染色により発現の分布、意義を検討中である。

## E. 結論

Tamoxifen, 5FU, Gefitinib における新規薬効貢献分子探索を目的とし、各化合物に 4-amino-butyl 基を導入した誘導体を合成し、化合物を固定化したアフィニティカラムの作成が可能となった。

Affi-Gel 10 は、Tamoxifen での検討から固定化担体として適当であると考えられ、同様の手法を用い 5-FU での検討が可能と考えられる。今後の検討課題として、カラム作成の際の誘導体の担体への固定化反応を測定し、担体への固定化量を見積もり、カラムの最適化を検討する必要があると考えられる。

5-FU とその誘導体固定化カラムを用いた、癌細胞株の細胞抽出溶液のアフィニティ精製による結合分子の同定をおこない、5-FU 誘導体 1 の結合タンパク質と考えられる 80kDa 付近のバンドを検出した。

胃癌の 5FU 感受性因子並びに有害事象規定因子を予測するモデルを構築するために実施中の本研究は順調に進行している。また副次的に得られた、胃癌の治療標的となりうる遺伝子の同定からその治療応用への研究も同時に進行している。

## F. 健康危険情報 特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yanagihara, K., Takigahira, M., Tanaka, H., Komatsu, T., Fukumoto, H., Koizumi, F., Nishio, K., Ochiya, T., Ino, Y., Hirohashi, S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. *Cancer Sci.*, (in press).

2. Nishio, M., Ohyanagi, F., Nishio, K.,

Gefitinib Treatment Affects Androgen Levels in Non-Small Cell. *British Journal of Cancer* (in press).

3. Korfee, S., Eberhardt, W., Fujiwara, Y., Nishio, K. The role of DNA-microarray in translational cancer research. *Curr. Pharmacogenomics*, (in press).
4. 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.*, 23:1061-1069, 2005.
5. Arao, T., Fukumoto, H., Shimoyama, T., Takeda, M., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K. Small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor as a target for ZD6474. *Cancer Res.*, 64:9101-9104, 2004.
6. Park, J. K., Lee, S. H., Kang, J. H., Nishio, K., Saijo, N., 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., Saijo, N. The translational study for lung cancer. *Lung Cancer*, 45:S16-S17, 2004.
8. 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 . . . inhibitor CPT-11 (Irinotecan) in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer*, 108:464-472, 2004.
9. Hosokawa, A., Shimada, Y., Shirao, K., Matsumura, Y., Yamada, Y., Muro, K., Hamaguchi, T., Goto, M., Shimoda, T. Long-term survivor of gastric small cell carcinoma. *Hepato-Gastroenterology*, 51:1567-1570, 2004
10. Shirao, K., Hoff, P. M., Ohtsu, A., Loehrer, P. J., Hyodo, I., Wadler, S., Wadleigh, R. G., O’Dwyer, P. J., Muro, K., Yamada, Y., Boku, N., Nagashima, F., Abbruzzese, J. L. Comparison of the efficacy, toxicity, and pharmacokinetics of a Uracil/Tegafur (UFT) plus Oral Leucovorin (LV) regimen between



Japanese and American patients with advanced colorectal cancer: joint United States and Japan study of UFT/LV. J. Clin. Oncol., 22:3466-3474, 2004

1 1. Yonemori, K., Shimada, Y., Goto, A., Ura, T., Arai, T., Hamaguchi, T., Muro, K., Yamada, Y., Shirao, K. Retrospective analysis of clinical results and predictors of response in chemo-naive patients with advanced gastric cancer treated with S-1, an oral fluoropyrimidine derivative, as single-agent chemotherapy. Gastric Cancer, 7:204-210, 2004

## 2. 学会発表

1. Nishio, K. Preclinical And Molecular Correlative Study For EGFR-specific Tyrosine Kinase Inhibitors In Japan. The 20th Bristol-Myers Squibb Nagoya International Cancer Treatment Symposium & Meet the Expert. 2005.3.10-12. Nagoya.
2. Nishio, K. Targeted Drugs. 7th Essen Thoracic Oncology Expert Meeting. 2004.12.9-12. Essen Germany.
3. Nishio, K., Korfee, S., Eberhardt, W., Saijo, N., Tamura, T. Translational research for lung cancer-An update. 9th Central European Lung Cancer Conference. 2004.9.23-25. Gdansk Poland.
4. Shimoyama, T., Koizumi, F., Korfee, S., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K. Schedule-dependent interactions between the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib ( 'Iressa' , ZD1839) and the DNA topoisomerase I inhibitor SN-38 in human lung cancer cells. American Association for Cancer Research 95<sup>th</sup> Annual Meeting. 2004.3.27-31. Orlando Florida.
5. Yamada, Y., Yamamoto, N., Shimoyama, T., Horiike, A., Fujisaka, Y., Takayama, K., Sakamoto, T., Nishioka, Y., Yasuda, S., Tamura, T. A phase I pharmacokinetic and pharmacogenomic study of E7070 administered once every 21 days. Proc ASCO 23: 2030, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし