

トランスポーターの制御による分子標的治療法の開発と薬効評価に関する研究

分担研究者 杉本 芳一 慶応義塾大学薬学部教授

研究要旨

ヒトABCB5が、1257アミノ酸の細胞膜タンパク質であり、6回膜貫通領域とATP結合領域をそれぞれ2つずつ持つ、P-gpによく似た構造のABC輸送体であることを明らかにした。ヒトABCB5は、prostate、testisなどに発現し、抗がん剤を排出するトランスポーターとして機能することが示された。よって、ABCB5は、がん薬物療法の効果に影響すると考えられる。

A. 研究目的

ABCB5は、P-糖タンパク質（P-gp、ABCB1）と同じサブファミリーに属し、メラノーマのstem cellに発現するABC輸送体として注目されている。2003年に報告されたヒトABCB5（ABCB5 β ）は、812アミノ酸のタンパク質であった。しかしこのABCB5 β のN末付近にはP-gpのN末側のATP結合領域と相同性のある配列が認められ、また、そのcDNAの5'-non-coding regionにはstop codonが存在しなかった。このことから、我々はABCB5 β がABCB5のsplicing variantであると考え、ABCB5の全長cDNAを単離してその機能を調べることとした。

B. 研究方法

ABCB5 β の塩基配列をもとに、5'-RACE法および3'-RACE法によりヒトABCB5のcDNAクローニングをした。得られたABCB5 cDNAを以下の実験に用いた。

ABCB5のN末側にc-Myc-tagを付けたMyc-ABCB5のcDNAを作成した。このcDNAをCAGプロモーターとZeocin耐性遺伝子を持つ発現ベクターであるpCAL-IRES-ZE0に組み込み、ヒト胎児腎由来HEK293細胞に導入した。Zeocinで選択して得られた細胞をHEK293/Myc-ABCB5-mixとした。さらに、限界希釈法によりABCB5高発現クローンを得た。Myc-ABCB5の発現は、抗c-Myc抗体を用いたWestern blotにより検出した。ABCB5高発現クローンの抗がん剤感受性は、細胞増殖阻害試験により検討した。

ABCB5のC末側にEGFPを付けたABCB5-EGFPを発現させるpEGFP-N2-ABCB5 plasmidを作成した。このplasmidをHEK293細胞に導入し、EGFPによる蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ABCB5-EGFPの発現は、FACS及び抗EGFP抗体を用いたWestern blotにより確認した。

ヒトの各正常臓器由来cDNA libraryを鋳型として、ABCB5 mRNAの5'側および3'側をPCRで増幅させることにより、各組織におけるABCB5の発現を確認した。

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

得られたヒトABCB5のcDNAは5184 nucleotidesからなり、3774 base pairsのopen reading frameを持ち、1257アミノ酸のタンパク質をコードしていた。この1257アミノ酸のABCB5は、6回膜貫通領域とATP結合領域をそれぞれ2つずつ持つ、P-gpによく似た構造のABC輸送体であると推定された。ABCB5遺伝子は7p15.3に存在しており、28個のexonよりなる。また、ABCB5 β がABCB5遺伝子のexon 13からexon 28にコードされているsplicing variantであることも示された。

ABCB5-1257のN末側にMycタグを付けてHEK293細胞に遺伝子導入した。抗Myc抗体およびABCB5-812に対するpolyclonal抗体を用いたwestern blotにより、ABCB5-1257は、140kDaおよびそれ以上の高分子量のタンパク質として検出された。

ABCB5-1257のN末にEGFPを結合させた融合遺伝子のcDNAをHEK293細胞に導入したところ、細胞膜上にEGFPの蛍光が観察された。

このABCB5-1257発現細胞は、docetaxel、paclitaxel、doxorubicinに、2-3倍の耐性を示した。

ABCB5-1257 mRNAの5'側（-187-457）の発現はprostate、testisで確認された。3'側（2543-3026）は、多くの臓器で発現していた。

D. 考察

今回の研究で、分子内二量体型のABCB5の存在が示された。ABCB5が160 kDa付近を中心とするブロードなバンドとして検出されたことから、ABCB5は糖鎖付加を受けると推定された。今回、ABCB5を強制発現させた細胞が、抗がん剤に2-3倍の耐性を示したことから、ABCB5もP-gpなどと同様にトランスポーターとして機能することが示唆された。ABCB5の発現が確認されたtestisには、血液精巣関門が存在し、ここに多くのトランスポーターが、精巣の細胞を種々の抗がん剤や毒物から守っていると考えられている。ABCB5もまた、そうした役割の一部を担っていると考えられる。

E. 結論

ヒトABCB5の全長cDNAをクローニングした。ヒトABCB5は、1257アミノ酸の細胞膜タンパク質であり、6回膜貫通領域とATP結合領域をそれぞれ2つずつ持つ、P-gpによく似た構造のABC輸送体であると推定された。ヒトABCB5は、prostate、testisなどに発現し、抗がん剤を排出するトランスポーターとして機能することが示された。よって、ABCB5は、がん薬物療法の効果に影響すると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

- 1) Mashima, T., Sato, S., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Seimiya, H. Promotion of glioma cell survival by acyl-CoA synthetase 5 under extracellular acidosis conditions. *Oncogene*, 28(1):9-19, 2009.
- 2) Noguchi, K., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y. Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61(1):26-33, 2009.
- 3) Katayama, K., Shibata, K., Mitsuhashi, J., Noguchi, K., Sugimoto, Y. Pharmacological interplay between breast cancer resistance protein and gefitinib in epidermal growth factor receptor signaling. *Anticancer Res.*, 29(4):1059-1065, 2009.
- 4) Kato, N., Suzuki, H., Takagi, H., Asami, Y., Kakeya, H., Uramoto, M., Usui, T., Takahashi, S., Sugimoto, Y., Osada, H. Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem*, 10(5):920-928, 2009.
- 5) Takeshita, A., Shinjo, K., Yamakage, N., Ono, T., Hirano, I., Matsui, H., Shigeno, K., Nakamura, S., Tobita, T., Maekawa, M., Ohnishi, K., Sugimoto, Y., Kiyoi, H., Naoe, T., Ohno, R. CMC-544 (inotuzumab ozogamicin) shows less effect on multidrug resistant cells: analysis in cell lines and cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and lymphoma. *Br. J. Haematol.*, 146(1):34-43, 2009.
- 6) Takeshita, A., Yamakage, N., Shinjo, K., Ono, T., Hirano, I., Nakamura, S., Shigeno, K., Tobita, T., Maekawa, M., Kiyoi, H., Naoe, T., Ohnishi, K., Sugimoto, Y., Ohno, R. CMC-544

(inotuzumab ozogamicin), an anti-CD22 immunoglobulin conjugate of calicheamicin, alters the levels of target molecules of malignant B-cells. *Leukemia*, 23(7):1329-1336, 2009.

- 7) Mashima, T., Sato, S., Okabe, S., Miyata, S., Matsuura, M., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Seimiya, H. Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide. *Cancer Sci.*, 100(8):1556-1562, 2009.
- 8) Noguchi, K., Kawahara, H., Kaji, A., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y. Substrate-dependent bidirectional modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib. *Cancer Sci.*, 100(9):1701-1707, 2009.
- 9) Katayama, R., Koike, S., Sato, S., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Fujita, N. Dofequidar fumarate sensitizes cancer stem-like side population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export. *Cancer Sci.*, 100(11):2060-2068, 2009.
- 10) Usuda, J., Tsunoda, Y., Ichinose, S., Ishizumi, T., Ohtani, K., Maehara, S., Ono, S., Tsubutsui, H., Ohira, T., Okunaka, T., Furukawa, K., Sugimoto, Y., Kato, H., Ikeda, N. Breast cancer resistance protein (BCRP) is a molecular determinant of the outcome of photodynamic therapy (PDT) for centrally located early lung cancer. *Lung Cancer*, 67(2):198-204, 2010.
- 11) Kawahara, H., Noguchi, K., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y. Pharmacological interaction with sunitinib is abolished by a germ line mutation (1291T>C) of BCRP/ABCG2 gene. *Cancer Sci.*, in press.

H. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

生物学的特性に基づく癌分子標的治療法の開発と臨床導入に関する研究

分担研究者 中川和彦 近畿大学医学部内科学腫瘍内科学部門 教授

研究要旨

本研究においてソラフェニブはKRAS野生型非小細胞肺癌細胞ではB-RAFを、KRAS変異株非小細胞肺癌細胞ではC-RAFをターゲットにして抗腫瘍効果を発揮していることを見出した。これはKRAS遺伝子の状態によりその下流のRAFアイソタイプの役割が異なることを示した最初の所見である。

A. 研究目的

ソラフェニブはマルチキナーゼ阻害剤として開発された新規分子標的薬である。血管内皮細胞においてVEGF受容体を直接阻害し、腫瘍の血管新生を阻害し抗腫瘍効果を示す。また腫瘍細胞においてRAFキナーゼを阻害することで腫瘍細胞増殖を抑制する。RAFキナーゼはMAPKシグナル伝達経路における重要なメディエーターのひとつであるセリンスレオニンキナーゼであり、3つのアイソタイプが報告されている。その主たるタイプはBRAFとCRAFであり、特にBRAFはさまざまな固形癌で高頻度に遺伝子変異を起こすことが報告され注目を集めている。ソラフェニブはBRAF、CRAFどちらも抑制するが、CRAFのほうにより強い抑制効果を示すことが知られている。非小細胞肺癌においてBRAFとCRAFがそれぞれどのようにMAPKに関与しているのかはまだ全く分かっていない。またソラフェニブが非小細胞肺癌細胞に対してどのような効果をもたらすかについてもほとんど報告がない。本研究ではソラフェニブによるRAFキナーゼ抑制が細胞にどのような効果を与えるかを検討した。

停止をもたらしている可能性があることが示唆される。そこで、BRAFとCRAFそれぞれがどのように下流のERKリン酸化にかかわっているのかをsiRNAを用いて検討した。BRAF発現低下はKRAS野生株においてERKリン酸化を阻害し、細胞増殖抑制とG1期停止をもたらしたが、CRAF発現低下にこの作用はなかった。一方、CRAF発現低下はKRAS変異株においてERKリン酸化に影響を与えることなく細胞増殖を抑制しG1期停止を誘発した。これらのデータから、KRAS野生型非小細胞肺癌ではBRAF-ERKシグナルが、KRAS変異非小細胞肺癌ではCRAFシグナルが細胞増殖の調節に主要な役割を果たしていることが考えられた。CRAFの下流にあると考えられているcyclin Eの発現は、BRAFの発現低下ではなく、CRAFの発現低下とソラフェニブの治療によって抑制されたことから、KRAS変異型細胞においてソラフェニブはやはりCRAFシグナルを抑制することで細胞増殖抑制効果をもたらしているものと考えられた。よって、ソラフェニブはKRAS野生型NSCLCではBRAFを、KRAS変異NSCLCではCRAFを標的とすることで非小細胞肺癌細胞増殖を阻害することが示唆された。

B. 研究方法

ソラフェニブのRAFキナーゼの下流シグナルへの影響をウエスタンブロット法で、細胞増殖抑制効果をMTTアッセイで確認した。増殖抑制の機序をフローサイトを用いて細胞周期の変化を確認した。BRAFとCRAFそれぞれの特異的な下流シグナルを検出するためにsmall interfering RNA法 (siRNA) を用いた。

C. 研究結果

RAFキナーゼの下流にあるERKのリン酸化に対するソラフェニブの影響をウエスタンブロット法で確認した。ソラフェニブはKRAS野生型NSCLC株においてERKリン酸化を阻害したが、KRAS変異型NSCLC細胞株では阻害しなかった。このERKリン酸化へ及ぼす影響の違いにもかかわらず、ソラフェニブはKRAS変異型、野生型双方で細胞増殖を阻害し、G1期停止を誘発した。このことからKRAS変異細胞ではソラフェニブはERK非依存性に細胞増殖抑制とG1期

D. 考察

これらの結果はソラフェニブのRAFキナーゼ阻害を介する抗腫瘍効果に関する新たな発見であり、現在進行中の再発非小細胞肺癌を対象としたGlobal試験における本剤の臨床的有用性を検討する上で、極めて重要な分子生物学的事実と考えられる。

E. 結論

本研究においてソラフェニブはKRAS野生型非小細胞肺癌細胞ではB-RAFを、KRAS変異株非小細胞肺癌細胞ではC-RAFをターゲットにして抗腫瘍効果を発揮していることを見出した。これはKRAS遺伝子の状態によりその下流のRAFアイソタイプの役割が異なることを示した最初の所見であるとともに、B-RAF、C-RAFの双方の酵素活性を阻害するソラフェニブの有用性を示唆するものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

- 1) Tanaka, K., Arao, T., Maegawa, M., Matsumoto, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Yokote, H., Yanagihara, K., Yamada, Y., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K. SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion. *Int J Cancer*, 124:1072-1080, 2009.
- 2) Takeda, K., Negoro, S., Tamura, T., Nishiwaki, Y., Kudoh, S., Yokota, S., Matsui, K., Semba, H., Nakagawa, K., Takada, Y., Ando, M., Shibata, T., Saijo, N. Phase III trial of docetaxel plus gemcitabine versus docetaxel in second-line treatment for non-small-cell lung cancer: results of a Japan Clinical Oncology Group trial (JCOG0104). *Annals of Oncology*, 20(5):835-841, 2009.
- 3) Okabe, T., Okamoto, I., Tsukioka, S., Uchida, J., Hatashita, E., Yamada, Y., Yoshida, T., Nishio, K., Fukuoka, M., Janne, PA., Nakagawa, K. Addition of S-1 to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib overcomes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines with MET amplification. *Clin Cancer Res.*, 15(3):907-13, 2009.
- 4) Okamoto, K., Tsurutani, J., Terashima, M., Okamoto, I., Nakagawa, K. Zoledronic acid-induced regression of multiple metastases at nonskeletal sites. *Ann Oncol.*, 20(4):796-7, 2009.
- 5) Yamamoto, N., Sekine, I., Nakagawa, K., Takada, M., Fukuoka, M., Tanigawara, Y., Saijo, N. A Pharmacokinetic and Dose Escalation Study of Pegfilgrastim (KRN125) in Lung Cancer Patients with Chemotherapy-induced Neutropenia. *Jpn J Clin Oncol.*, 39(7):425-30, 2009.
- 6) Tamura, K., Okamoto, I., Ozaki, T., Kashii, T., Takeda, K., Kobayashi, M., Matsui, K., Shibata, T., Kurata, T., Nakagawa, K., Fukuoka, M. Phase I/II study of S-1 plus carboplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, 45(12):2732-7, 2009.
- 7) Shimizu, T., Okamoto, I., Tamura, K., Satoh, T., Miyazaki, M., Akashi, Y., Ozaki, T., Fukuoka, M., Nakagawa, K. Phase I clinical and pharmacokinetic study of the glucose-conjugated cytotoxic agent D-19575 (glufosfamide) in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 65:243-250, 2009.
- 8) Kurata, T., Kashii, T., Takeda, K., Seki, N., Tsuboi, M., Kobayashi, M., Satoh, T., Nakagawa, K., Fukuoka, M. A phase I study of topotecan plus carboplatin for relapsed SCLC: WJTOG trial. *J Thorac Oncol.*, 4(5):644-8, 2009.
- 9) Satoh, T., Okamoto, I., Miyazaki, M., Morinaga, R., Tsuya, A., Hasegawa, Y., Terashima, M., Ueda, S., Fukuoka, M., Ariyoshi, Y., Saito, T., Masuda, N., Watanabe, H., Taguchi, T., Kakihara, T., Aoyama, Y., Hashimoto, Y., Nakagawa, K. Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.*, 15(11):3872-80, 2009.
- 10) Nakagawa, K., Minami, H., Kanezaki, M., Mukaiyama, A., Minamide, Y., Uejima, H., Kurata, T., Nogami, T., Kawada, K., Mukai, H., Sasaki, Y., Fukuoka, M. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic trial of Lapatinib (GW572016), a selective oral dual inhibitor of ErbB-1 and -2 tyrosine kinases, in Japanese patients with solid tumors. *Jpn J Clin Oncol.*, 39(2):116-123, 2009.
- 11) Takezawa, K., Okamoto, I., Yonesaka, K., Hatashita, E., Yamada, Y., Fukuoka, M., Nakagawa, K. Sorafenib inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting B-RAF in KRAS wild-type cells and C-RAF in KRAS mutant cells. *Cancer Res.*, 69(16):6515-21, 2009.
- 12) Iwasa, T., Okamoto, I., Suzuki, M., Hatashita, E., Yamada, Y., Fukuoka, M., Ono, K., Nakagawa, K. Inhibition of Insulin-Like growth factor 1 receptor by CP-751,871 radiosensitizes Non-Small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res.*, 15(16):5117-25, 2009.
- 13) Sekine, I., Ichinose, Y., Nishiwaki, Y., Yamamoto, N., Tsuboi, M., Nakagawa, K.

- Shinkai, T., Negoro, S., Imamura, F., Eguchi, K., Takeda, K., Itoh, Y., Tamura, T., Saijo, N., Fukuoka, M. Quality of life and disease-related symptoms in previously treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer: results of a randomized phase III study (V-15-32) of gefitinib versus docetaxel. *Annals of Oncology*, 20(9):1483-1488, 2009.
- 14) Okamoto, K., Okamoto, I., Takezawa, K., Tachibana, I., Fukuoka, M., Nishimura, Y., Nakagawa, K. Cisplatin and Etoposide Chemotherapy Combined with Early Concurrent Twice-daily Thoracic Radiotherapy for Limited-disease Small Cell Lung Cancer in Elderly Patients. *Jpn J Clin Oncol.*, 40(1):54-59, 2009.
- 15) Kunitoh, H., Tamura, T., Shibata, T., Nakagawa, K., Takeda, K., Nishiwaki, Y., Osaki, Y., Noda, K., Yokoyama, A., Saijo, N.; JCOG Lung Cancer Study Group Tokyo Japan. A phase-II trial of dose-dense chemotherapy in patients with disseminated thymoma: report of a Japan Clinical Oncology Group trial (JCOG 9605). *Br J Cancer*, 101(9):1549-54, 2009.
- 16) Yoshida, T., Okamoto, I., Okamoto, W., Hatashita, E., Yamada, Y., Kuwata, K., Nishio, K., Fukuoka, M., Jänne, P.A., Nakagawa, K. Effects of Src inhibitors on cell growth and epidermal growth factor receptor and MET signaling in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells with acquired MET amplification. *Cancer Sci.*, 101(1):167-72, 2010.
- 17) Okamoto, I., Doi, T., Ohtsu, A., Miyazaki, M., Tsuya, A., Kurei, K., Kobayashi, K., Nakagawa, K. Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of RAD001 (Everolimus) Administered Daily to Japanese Patients with Advanced Solid Tumors. *Jpn J Clin Oncol.*, 40(1):17-23, 2010.
- 18) Kaneda, H., Okamoto, I., Hayashi, H., Yoshioka, H., Miyazaki, M., Kudoh, S., Kimura, T., Sugiura, T., Sawa, T., Takeda, K., Iwamoto, Y., Satouchi, M., Akita, K., Saito, H., Goto, I., Shibata, K., Fukuoka, M., Nakagawa, K. Phase II Trial of Amrubicin for Second-Line Treatment of Advanced Non-small Cell Lung Cancer: Results of the West Japan Thoracic Oncology Group Trial (WJTOG0401). *J Thorac Oncol.*, 5(1):105-9, 2010.
- 19) Takeda, K., Hida, T., Sato, T., Ando, M., Seto, T., Satouchi, M., Ichinose, Y., Katakami, N., Yamamoto, N., Kudoh, S., Sasaki, J., Matsui, K., Takayama, K., Kashii, T., Iwamoto, Y., Sawa, T., Okamoto, I., Kurata, T., Nakagawa, K., Fukuoka, M. Randomized Phase III Trial of Platinum-Doublet Chemotherapy Followed by Gefitinib Compared With Continued Platinum-Doublet Chemotherapy in Japanese Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a West Japan Thoracic Oncology Group Trial (WJTOG0203). *J Clin Oncol.*, 28(5):753-60, 2010.
- 20) Mitsudomi, T., Morita, S., Yatabe, Y., Negoro, S., Okamoto, I., Tsurutani, J., Seto, T., Satouchi, M., Tada, H., Hirashima, T., Asami, K., Katakami, N., Takada, M., Yoshioka, H., Shibata, K., Kudoh, S., Shimizu, E., Saito, H., Toyooka, S., Nakagawa, K., Fukuoka, M.; for the West Japan Oncology Group. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.*, 11(2):121-8, 2010.
- 21) Takeda, M., Okamoto, I., Fujita, Y., Arai, T., Ito, H., Fukuoka, M., Nishio, K., Nakagawa, K. De Novo Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR Mutation-Positive Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.*, 5(3):399-400, 2010.
- 22) Okamoto, I., Munakata, M., Miyazaki, M., Satoh, T., Takahata, T., Takamatsu, Y., Muto, O., Koike, K., Ishitani, K., Mukaiyama, T., Sakata, Y., Nakagawa, K., Tamura, K. Disturbance of the Growth Hormone-Insulin-like Growth Factor-1 Axis Associated with Poor Performance Status in Patients with Solid Tumors. *Jpn J Clin Oncol.*, in press, 2010.
- 23) Kaneda, H., Arai, T., Tanaka, K., Tamura, D., Aomastu, K., Kudo, K., De, Velasco, M.A., Mastumoto, K., Fujita, Y., Yamada, Y., Tsurutani, J., Okamoto, I., Nakagawa,

- K., Nishio, K. FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth. Cancer Research, in press, 2010.
- 24) Kubota, K., Sakai, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Nakagawa, K., Takeda, K., Ichinose, Y., Saijo, N., Ariyoshi, Y., Fukuoka, M. A Multi-Institution Phase I/II Trial of Triweekly Regimen with S-1 Plus Cisplatin in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer. J Thorac Oncol., in press, 2010.
- 25) Okamoto, I., Miyazaki, M., Morinaga, R., Kaneda, H., Ueda, S., Hasegawa, Y., Satoh, T., Kawada, A., Fukuoka, M., Fukino, K., Tanigawa, T., Nakagawa, K. Phase I clinical and pharmacokinetic study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer. Invest New Drugs, in press, 2010.
- 26) Takeda, M., Okamoto, I., Fukuoka, M., Nakagawa, K. Successful treatment with erlotinib after gefitinib-related severe hepatotoxicity. J Clin Oncol., in press, 2010.
- 27) Hayashi, H., Okamoto, I., Ichikawa, Y., Miyazaki, M., Yoshioka, H., Kunimasa, K., Nakagawa, K. Retreatment of recurrent malignant pleural mesothelioma with cisplatin and pemetrexed. International Journal of Clinical Oncology, in press, 2010.
- 28) Takeda, M., Okamoto, I., Makimura, C., Fukuoka, M., Nakagawa, K. Successful treatment with erlotinib after gefitinib-induced severe interstitial lung disease. J Thorac Oncol., in press, 2010.
- H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他

乳癌の化学療法効果予測法の開発に関する研究

分担研究者 野口眞三郎 大阪大学大学院医学系研究科乳腺内分泌外科教授

研究要旨

乳がん患者に対する術前化学療法（パクリタキセル→アンストラサイクリン療法）施行前に採取した腫瘍組織の遺伝子発現プロファイル解析（マイクロアレイ）を実施し、有効例と無効例で発現に差のある70遺伝子を用いた精度の高い効果予測システムを作成した（感度=91%、陰性的中率=93%）。

A. 研究目的

乳がん治療に於いては化学療法が汎用されるが、臨床上の最大の問題点は化学療法の効果を予測する方法（感受性診断法）が存在しないことである。そのため、不必要な化学療法が頻繁に実施されているのが現状である。本研究の目的は、乳がん治療において汎用されているパクリタキセル→アンストラサイクリン逐次療法を術前化学療法として実施する症例を対象とし、かつ、Pathological complete response (pCR)を指標として遺伝子発現プロファイル解析に基づく化学療法感受性診断法を作成することである。

B. 研究方法

(1)術前化学療法 Paclitaxel (80mg/m² q1w x 12 cycles) →FEC (5-FU 500mg/m², epirubicin 75mg/m², cyclophosphamide 500mg/m² q3w x 4 cycles) (以下、P→FEC療法)で治療を受けた乳がん症例(n=84例)において、化学療法前に採取した腫瘍サンプルからRNAを抽出し、マイクロアレイ (Affymetrix U133plus2.0)を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。

(2)全例において手術標本を用いて化学療法の効果を病理学的に判定した。病理学的ながん細胞の消失(pCR)を本研究のエンドポイントとした。

(2)上記の84例を Learning set (n=50) と Validation set (n=34)に分け、まず、Learning setを用いて化学療法の効果予測システム(Between Group Analysis(BGA))を作成した。次に、その効果予測システムの有用性を Validation set (n=34)で検証した。

(倫理面への配慮)

今回実施した研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、

および、臨床研究に関する倫理指針に基づき大阪大学医学倫理委員会で承認を受けたものである。

C. 研究結果

(1)Learning set (n=50例)の症例を対象として、まず、有効例と無効例で発現に差のある遺伝子を抽出し(表1)、BGAアルゴリズムを用いて病理学的効果を予測するシステム(70遺伝子による診断システム)を作成した。

表1. 有効例と無効例で発現に差のある遺伝子TOP10

no	Gene Symbol	Fold Change	P-value (SAM)
1	---	2.88 ↓	3.0E-04
2	---	4.58 ↓	3.2E-04
3	FAM161A	2.25 ↑	3.9E-04
4	---	3.54 ↓	4.1E-04
5	COL4A3	2.97 ↑	4.2E-04
6	GPR126	2.96 ↑	4.4E-04
7	HCG4	2.55 ↓	4.6E-04
8	AKAP2	2.90 ↑	4.7E-04
9	---	3.10 ↓	5.4E-04
10	CNKSR2	3.30 ↑	5.4E-04

(2)次に、Validation set(n=34例)の症例で本診断システムを検証した。Learning setにおける、Negative predictive value (NPV)は100%、Positive predictive value (PPV)は56%であり、Validation setにおけるNPVは93%、PPVは53%と良好な再現性のある結果を得ることができた。

D. 考察

ER (estrogen receptor) は乳がん診療でルーチンに測定されているがその目的はホルモン療法に対する効果予測である。ERのPPVは約50%、NPVは約90%であ

り、今回我々が作成した化学療法の効果予測システムはほぼ同等のPPVとNPVを有していることが明らかとなった。このことは、本法 (70-gene classifier) が臨床的に意義のある診断精度を有していることを示している。

E. 結論

現時点では臨床的に有用な乳がんの化学療法効果予測システムはまだ開発されていない。今回我々が開発した効果予測システムは高い精度を有しており (感度=91%、陰性的中率=93%)、今後臨床の場において適切な化学療法剤選択に貢献することが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

- 1) Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S. J., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Noguchi, S. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res.*, 15(12):4234-41, 2009.
- 2) Tamaki, Y., Akiyama, F., Iwase, T., Kaneko, T., Tsuda, H., Sato, K., Ueda, S., Mano, M., Masuda, N., Takeda, M., Tsujimoto, M., Yoshidome, K., Inaji, H., Nakajima, H., Ko moike, Y., Kataoka, TR., Nakamura, S., Suzuki, K., Tsugawa, K., Wakasa, K., Okino, T., Kato, Y., Noguchi, S., Matsuura, N.: Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res.*, 15(8):2879-84, 2009.
- 3) Shimomura, A., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Noguchi, S.: Association of loss of BRCA1 expression with centrosome aberration in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 135(3):421-30, 2009.
- 4) Okishiro, M., Taguchi, T., Jin, Kim, S., Shimazu, K., Tamaki, Y., Noguchi, S.: Genetic polymorphisms of CYP2D6 10 and CYP2C19 2, 3 are not associated with prognosis, endometrial thickness, or bone mineral density in Japanese breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Cancer*, 115(5):952-61, 2009.
- 5) Okishiro, M., Taguchi, T., Kim, S. J., Tanji, Y., Shimazu, K., Tamaki, Y., Noguchi, S.: In

cidence of joint symptoms and bone fractures in Japanese postmenopausal breast cancer patients treated with adjuvant anastrozole. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 135(6):823-7, 2009.

- 6) Morimoto, K., Kim, S. J., Tanei, T., Shimazu, K., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Terada, N., Noguchi, S.: Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci.*, 100(6):1062-8, 2009.
- 7) Kim SJ, Taguchi T, Shimazu K, Tanji Y, Tamaki Y, Noguchi S: Good Response to Paclitaxel Predicts High Rates of Pathologic Complete Response for Breast Cancer Patients Treated Preoperatively with Paclitaxel Followed by 5-Fluorouracil, Epirubicin and Cyclophosphamide. *Oncology*, 77(2):134-9, 2009.

H. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

「乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法」
(特願2009-272501)

2. 実用新案登録

3. その他

固形癌の臨床試験に付随するバイオマーカー探索とその応用に関する研究

分担研究者 西尾 和人 近畿大学医学部ゲノム生物学教室 教授

研究要旨

プロテアソーム阻害薬ボルテゾミブは、血管内皮細胞に対して強力な増殖抑制効果を有し、VEGFR2シグナル非依存的に血管新生阻害効果を誘導することを示した。これらのメカニズム解明により、臨床での治療におけるボルテゾミブの効果予測および有害事象発生に対するアプローチが可能になると考えられる。

A. 研究目的

ボルテゾミブ（ベルケード、PS-341）は骨髄腫やリンパ腫の治療に臨床応用されているプロテアソーム阻害剤であるが、その血管新生阻害作用に関してのメカニズムに関しては明らかになっていない。本研究では、同薬剤による血管新生阻害作用を明らかにするために検討を行った。

B. 研究方法

血管内皮細胞（HUVEC）に対するボルテゾミブの薬剤作用をin vitroで検討した。細胞増殖抑制効果は、MTT法によって評価した。薬剤のVEGFRシグナルへの影響についてはウエスタンブロット法を用いた。薬剤による血管透過性への評価は、in vitro vascular permeability assay kitを使用した。薬剤のHUVECの細胞周期への作用はフローサイトメトリー・ギムザ染色・リン酸化ヒストン免疫染色を用いて評価した。細胞周期関連タンパク（cyclin B1, cdc2, wee1, cdc25C, など）への作用はUbiquitin抗体での免疫沈降法などを併用してウエスタンブロット法を用いて検出した。

（倫理面への配慮）

本研究は主にヒト血管内皮細胞株およびがん細胞株に対する基礎研究であるため、個人情報保護法や3省合同遺伝子倫理指針の対象には該当しない。

C. 研究結果

ボルテゾミブは、HUVECの細胞増殖に対し強力な増殖抑制効果を示した（IC50値：2 nM）。その作用はVEGFシグナル非依存的に細胞増殖抑制効果を示した。また、血管透過性に対する作用は、VEGFRチロシンキナーゼ阻害剤が透過性を抑制するのに対して、ボルテゾミブは、有意に血管透過性を亢進させた。アポトーシス誘導作用については、ボルテゾミブは10 nMから血管内皮細胞に対して強力な作用を示した。従来ボルテゾミブは細胞周期に与える影響についてM期停止作用を持つと考えられて

いたが、M期停止作用をもつチューブリン作用薬との比較により、ボルテゾミブは血管内皮細胞に対してG2期からM期への移行を阻害することを明らかにした。

細胞周期関連タンパクの検討においては、ボルテゾミブはcyclin B1を用量依存的に増加させること、cyclin B1-cdc2複合体の形成を促進すること、cdc2のリン酸化を亢進させることを明らかにした。また、wee1のタンパクレベル、リン酸化レベルを亢進させることが、ボルテゾミブの抗血管新生作用メカニズムに一部関与していることを示した。最後にボルテゾミブはcyclin B1およびwee1に対して主作用であるユビキチン化を亢進させ、Cdc2-cyclin B複合体のキナーゼ活性を抑制して細胞周期を停止させるメカニズムを明らかにした。

D. 考察

本研究において、ボルテゾミブはがん細胞に対する直接的抗腫瘍効果に加えて、強力な血管新生阻害作用を持つことが示された。細胞周期に与える影響については、ボルテゾミブは細胞をM期に細胞周期を停止させると考えられていたが、G2-M期移行の阻害であることを明らかにした。一方、本薬剤による血管透過性亢進作用は、capillary leak syndromeのような臨床的有害事象解決へのアプローチが可能になることが期待させる。

E. 結論

本研究により、ボルテゾミブは血管内皮細胞に対して強力な増殖抑制効果を有し、プロテアソーム阻害作用を介して、VEGFR2シグナル非依存的に血管新生阻害効果を誘導することを示した。これらのメカニズムを解明したことにより、臨床での治療におけるボルテゾミブの効果予測および有害事象発生に対するアプローチが可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

- 1) Sekine, I., Shimizu, C., Nishio, K., Saijo, N., Tamura, T. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with breast cancer. *Int J Clin Oncol.*, 14(2): 112-9, 2009.
- 2) Maegawa, M., Arao, T., Yokote, H., Matsumoto, K., Kudo, K., Tanaka, K., Kaneda, H., Fujita, Y., Ito, F., Nishio, K. EGFR mutation up-regulates EGR1 expression through the ERK pathway. *Anticancer Res.*, 29(4): 1111-7, 2009.
- 3) Hosoi, F., Izumi, H., Kawahara, A., Murakami, Y., Kinoshita, H., Kage, M., Nishio, K., Kohno, K., Kuwano, M., Ono, M. N-myc downstream regulated gene 1/Cap43 suppresses tumor growth and angiogenesis of pancreatic cancer through attenuation of inhibitor of kB kinase β expression. *Cancer Res.*, 69(129): 4983-91, 2009.
- 4) Fukui, T., Kodera, Y., Nishio, K., Masuda, N., Tamura, T., Koizumi, F. Synergistic interactions between the synthetic retinoid tamibarotene and glucocorticoids in human myeloma cells. *Cancer Sci.*, 100(6): 1137-43, 2009.
- 5) Ohashi, R., Tajima, K., Takahashi, F., Cui, R., Gu, T., Shimizu, K., Nishio, K., Fukuoka, K., Nakano, T., Takahashi, K. Osteopontin modulates malignant pleural mesothelioma cell functions in vitro. *Anticancer Res.*, 29(6): 2205-14, 2009.
- 6) Matsumoto, K., Arao, T., Tanaka, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Tamura, D., Aomatsu, K., Tamura, T., Yamada, Y., Saijo, N., Nishio, K. mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. *Cancer Res.*, 69(18): 7160-4, 2009.
- 7) Yoshida, T., Okamoto, I., Okamoto, W., Hatashita, E., Yamada, Y., Kuwata, K., Nishio, K., Fukuoka, M., Janne PA., Nakagawa, K. Effects of Src inhibitors on cell growth and epidermal growth factor receptor and MET signaling in gefitinib-

resistant non-small cell lung cancer cells with acquired MET amplification. *Cancer Sci.*, E-pub ahead of print, 2009.

- 8) Takeda, M., Okamoto, I., Fujita, Y., Arao, T., Ito, H., Fukuoka, M., Nishio, K., Nakagawa, K. De novo resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutation positive NSCLC patients. *J Thorac Oncol.*, in press, 2009.
- 9) Kaneda, H., Arao, T., Tanaka, K., Tamura, D., Aomatsu, K., Kudo, K., Sakai, K., Velasco, MA., Matsumoto, K., Fujita, Y., Yamada, Y., Tsurutani, J., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K. FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth. *Cancer Res.*, in press, 2009.
- 10) Tamura, D., Arao, T., Tanaka, K., Kaneda, H., Matsumoto, K., Kudo, K., Aomatsu, K., Fujita, Y., Watanabe, T., Saijo, N., Kotani, Y., Nishimura, Y., Nishio, K. Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition. *Cancer Sci.*, in press, 2010.

H. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

(特許出願中)

1. ロタキサン化合物及び抗ガン剤
(PCT/JP2009/005503 国外)
2. 治療効果観察のためのバイオマーカー使用方法又はシステム
(EP 09154964.2 国外)

(特許公開)

1. 胃癌の判定方法
(特許公開2009-276153)
2. 結合型糖鎖を利用した膵臓癌の診断方法
(特許公開2009-270996)
3. 5員複素環化合物を有効成分とする抗ガン剤および新規5員複素環化合物
(特許公開2009-256274)
4. 抗癌剤の有効性予測方法
(特許公開2009-244147)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Ando, R., Makino, Y., Tamura, T., Yamamoto, N., Nishigaki, R., Kimura, T., Yokote, N., Yamamoto, H.	Simple and sensitive HPLC method for determination of amrubicin and amrubicinolin human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study.	Biomed Chromato gr.	4 (3)	301-306	2010
2	Yamamoto, N., Tamura, T., Kurata, T., Yamamoto, N., Sekine, I., Kunitoh, H., Ohe, Y., Saijo, N.	A dose-finding and pharmacokinetic study of nedaplatin in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer.	Cancer Chemother Pharmacol.	65(1)	79-88	2009
3	Sekine, I., Sumi, M., Ito, Y., Tanai, C., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T.	Gender Difference in Treatment Outcomes in Patients with Stage III Non-small Cell Lung Cancer Receiving Concurrent Chemoradiotherapy.	Jpn J Clin Oncol.	39(11)	707-712	2009
4	Tanai, C., Nokihara, H., Yamamoto, S., Kunitoh, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Ohe, Y., Tamura, T.	Characteristics and outcomes of patients with advanced non-small-cell lung cancer who declined to participate in randomised clinical chemotherapy trials.	Br J Cancer	100(7)	1037-1042	2009
5	Goto, Y., Sekine, I., Sekiguchi, H., Yamada, K., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T.	Differences in the quality of information on the internet about lung cancer between the United States and Japan.	J Thorac Oncol.	4(7)	829-833	2009
6	Sekine, I., Shimizu, C., Nishio, K., Saijo, N., Tamura, T.	A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with breast cancer.	Int J Clin Oncol.	14(2)	112-119	2009
7	Kataoka, Y., Mukohara, T., Shimada, H., Saijo, N., Hirai, M., Minami, H.	Association between gain-of-function-mutations in PIK3CA and resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines.	Ann Oncol	21(2)	255-262	2010
8	Mukohara, T., Shimada, H., Ogasawara, N., Wanikawa, R., Shimomura, M., Nakatsura, T., Ishii, G., Park, JO., Jänne, PA., Saijo, N., Minami, H.	Sensitivity of breast cancer cell lines to the novel Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R) inhibitor NVP-AEW541 is dependent on the level of IRS-1 expression.	Cancer letters	282 (1)	14-24	2009
9	Nakagawa, K., Minami, H., Kanezaki, M., Mukaiyama, A., Minamide, Y., Uejima, H., Kurata, T., Nogami, T., Kawada, K., Mukai, H., Sasaki, Y., Fukuoka, M.	Phase I Dose-Escalation and Pharmacokinetic Trial of Lapatinib (GW572016), a Selective Oral Dual Inhibitor of ErbB-1 and ErbB-2 Tyrosine Kinases, in Japanese Patients with Solid Tumors.	Jpn J Clin Oncol	39	116-123	2009

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

10	Yamamoto, Y., Kosaka, N., Tanaka, M., <u>Koizumi, F.</u> , Kanai, Y., Mizutani, T., Murakami, Y., Kuroda, M., Miyajima, A., Kato, T., Ochiya, T.	MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma.	Biomarke rs.	14(7)	529- 538	2009
11	Fukui, T., Kodera, Y., <u>Nishio, K.</u> , Masuda, N., <u>Tamura, T.</u> , <u>Koizumi, F.</u>	Synergistic interactions between the synthetic retinoid tamibarotene and glucocorticoids in human myeloma cells.	Cancer Sci.	100(6)	1137- 1143	2009
12	Kawaishi, M., Fujiwara, Y., Fukui, T., Kato, T., Yamada, K., Ohe, Y., Kunitoh, H., Sekine, I., Yamamoto, N., Nokihara, H., Watabe, T., Shimoda, Y., Arao, T., <u>Nishio, K.</u> , <u>Tamura, T.</u> , <u>Koizumi, F.</u>	Circulating endothelial cells in non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel.	J. Thorac. Oncol.	4(2)	208- 213	2009
13	Basaki, Y., Taniguchi, K., Izumi, H., Kubo, T., Hosoi, F., Watari, K., Nakano, K., Kawaguchi, H., Ohno, S., Kohno, K., Ono, M., and <u>Kuwano, M.</u>	Y-box protein-1(YB-1) promotes cell cycle progression through CDC6-dependent pathway in human cancer cells.	Eur J Cancer		in press	2009
14	Kidani, A., Izumi, H., Yoshida, Y., Kashiwagi, E., Ohmori, H., Tanaka, T., , <u>Kuwano, M.</u> and Kohno, K.	Thioredoxin2 enhances the damaged DNA binding activity of mtTFA through direct interaction.	Int J Oncol	35	1435- 1440	2009
15	Kashihara, M., Azuma, K., Kawahara, A., Basaki, Y., Hattori, S., Yanagawa, T., Terazaki, Y., Takamori, S., Shirouzu, K., Aizawa, H., Nakao, K., Kage, M., <u>Kuwano, M.</u> , Ono, M.	Nuclear Y-box binding protein-1 (YB-1) a predictive marker of prognosis, is correlated with expression of HER2/ErbB2 and HER3/ErbB3 in non-small cell lung cancer.	J Thoracic Oncology	4	1066- 1074	2009
16	Hosoi, F., Izumi, H., Kawahara, A., Yuichi, M., Kinoshita, H., Kage, M., <u>Nishio, K.</u> , Kohno, K., <u>Kuwano, M.</u> , and Ono, M.	N-myc downstream regulated gene 1/Cap43 suppresses tumor growth and angiogenesis of pancreatic cancer through attenuation of IKKbeta expression.	Cancer Res	69	4983- 4991	2009
17	Aoki, D., Oda, Y., Hattori, S., Taguchi, K., Ohishi, Y., Basaki, Y., Oie, S., Suzuki, N., Kono, S., Tsuneyoshi, M., Ono, M., <u>Kuwano, M.</u>	Overexpression of class III -tubulin predicts good response to taxane-based chemotherapy in ovarian clear cell adenocarcinoma.	Clinic Cancer Res	15	1473- 1480	2009

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

18	Hayashi, Y., Sankar, K., Ishikawa, H., Nozawa, Y., Mizoue, K., <u>Takeya, H.</u>	Total synthesis and determination of the absolute configuration of FD-838, a naturally occurring azaspirobicyclic product.	Bioorg. Med. Chem. Lett.	19 (14)	3863- 3865	2009
19	Kato, N., Suzuki, H., Takagi, H., Asami, Y., <u>Takeya, H.</u> , Uramoto, M., Usui, T., Takahashi, S., Sugimoto, Y., Osada, H.	Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgen biosynthesis in <i>Aspergillus fumigatus</i> .	ChemBio Chem.	10 (5)	920- 928	2009
20	Katayama, R., Koike, S., Sato, S., <u>Sugimoto, Y.</u> , Tsuruo, T., Fujita, N.	Dofequidar fumarate sensitizes cancer stem-like side population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export.	Cancer Sci.	100(11)	2060- 2068	2009
21	Noguchi, K., Kawahara, H., Kaji, A., Katayama, K., Mitsuhashi, J., <u>Sugimoto, Y.</u>	Substrate-dependent bidirectional modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib.	Cancer Sci.	100(9)	1701- 1707	2009
22	Mashima, T., Sato, S., Okabe, S., Miyata, S., Matsuura, M., <u>Sugimoto, Y.</u> , Tsuruo, T., Seimiya, H.	Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide.	Cancer Sci.	100(8)	1556- 1562	2009
23	Katayama, K., Shibata, K., Mitsuhashi, J., Noguchi, K., <u>Sugimoto, Y.</u>	Pharmacological interplay between breast cancer resistance protein and gefitinib in epidermal growth factor receptor signaling.	Anticance r Res.	29(4)	1059- 1065	2009
24	Noguchi, K., Katayama, K., Mitsuhashi, J., <u>Sugimoto, Y.</u>	Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy.	Adv Drug Deliv Rev.	61(1)	26-33	2009
25	Mashima, T., Sato, S., <u>Sugimoto, Y.</u> , Tsuruo, T., Seimiya, H.	Promotion of glioma cell survival by acyl-CoA synthetase 5 under extracellular acidosis conditions.	Oncogene	28(1)	9-19	2009
26	Takeda, M., Okamoto, I., Fujita, Y., Arao, T., Ito, H., Fukuoka, M., <u>Nishio, K.</u> , <u>Nakagawa, K.</u>	De Novo Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR Mutation-Positive Patients with Non-small Cell Lung Cancer.	J Thorac Oncol.	5(3)	399- 400	2010

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

27	Yoshida, T., Okamoto, I., Okamoto, W., Hatashita, E., Yamada, Y., Kuwata, K., <u>Nishio, K.</u> , Fukuoka, M., Jänne, PA., <u>Nakagawa, K.</u>	Effects of Src inhibitors on cell growth and epidermal growth factor receptor and MET signaling in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells with acquired MET amplification.	Cancer Sci	101(1)	167- 172	2010
28	Iwasa, T., Okamoto, I., Suzuki, M., Hatashita, E., Yamada, Y., Fukuoka, M., Ono, K., <u>Nakagawa, K.</u>	Inhibition of Insulin-Like growth factor 1 receptor by CP-751,871 radiosensitizes Non-Small cell lung cancer cells.	Clin Cancer Res.	15(16)	5117- 5125	2009
29	Takezawa, K., Okamoto, I., Yonesaka, K., Hatashita, E., Yamada, Y., Fukuoka, M., <u>Nakagawa, K.</u>	Sorafenib inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting B-RAF in KRAS wild-type cells and C-RAF in KRAS mutant cells.	Cancer Res	69(16)	6515- 6521	2009
30	Okabe, T., Okamoto, I., Tsukioka, S., Uchida, J., Hatashita, E., Yamada, Y., Yoshida, T., <u>Nishio, K.</u> , Fukuoka, M., Janne, PA., <u>Nakagawa, K.</u>	Addition of S-1 to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib overcomes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines with MET amplification.	Clin Cancer Res	15(3)	907- 913	2009
31	Tanaka, K., Arai, T., Maegawa, M., Matsumoto, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Yokote, H., Yanagihara, K., Yamada, Y., Okamoto, I., <u>Nakagawa, K.</u> , <u>Nishio, K.</u>	SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion.	Int J Cancer	124	1072- 1080	2009
32	Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S. J., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., <u>Noguchi, S.</u>	Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers.	Clin Cancer Res	15	4234- 4241	2009
33	Okishiro, M., Taguchi, T., Jin Kim, S., Shimazu, K., Tamaki, Y., <u>Noguchi, S.</u>	Genetic polymorphisms of CYP2D6 10 and CYP2C19 2, 3 are not associated with prognosis, endometrial thickness, or bone mineral density in Japanese breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen.	Cancer	115	952- 961	2009

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

34	Okishiro, M., Taguchi, T., Kim, S. J., Tanji, Y., Shimazu, K., Tamaki, Y., <u>Noguchi, S.</u>	Incidence of joint symptoms and bone fractures in Japanese postmenopausal breast cancer patients treated with adjuvant anastrozole.	J Cancer Res Clin Oncol	135	823-827	2009
35	Kim, S. J., Taguchi, T., Shimazu, K., Tanji, Y., Tamaki, Y., <u>Noguchi, S.</u>	Good Response to Paclitaxel Predicts High Rates of Pathologic Complete Response for Breast Cancer Patients Treated Preoperatively with Paclitaxel Followed by 5-Fluorouracil, Epirubicin and Cyclophosphamide.	Oncology	77	134-139	2009
36	Matsumoto, K., Arai, T., Tanaka, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Tamura, D., Aomatsu, K., <u>Tamura, T.</u> , Yamada, Y., Saijo, N., <u>Nishio, K.</u>	mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells.	Cancer Res	69(18)	7160-7164	2009
37	Maegawa, M., Arai, T., Yokote, H., Matsumoto, K., Kudo, K., Tanaka, K., Kaneda, H., Fujita, Y., Ito, F., <u>Nishio, K.</u>	EGFR mutation up-regulates EGR1 expression through the ERK pathway.	Anticancer Res	29(4)	1111-1117	2009
38	Matsumoto, K., Shimizu, C., Arai, T., Andoh, M., Katsumata, N., Koho, T., Yonemori, K., <u>Koziumi, E.</u> , Yokote, H., Aogi, K., Tamura, K., <u>Nishio, K.</u> , Fujiwara, Y.	Identification of predictive biomarkers for response to Trastuzumab using plasma FUCA activity and N-Glycan identified by MALDI-TOF-MS.	J Proteome Res	8(2)	457-462	2009
39	Maegawa, M., Arai, T., Yokote, H., Matsumoto, K., Kudo, K., Tanaka, K., Kaneda, H., Fujita, Y., Ito, F., <u>Nishio, K.</u>	Epidermal growth factor receptor lacking C-terminal autophosphorylation sites retains signal transduction and high sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor.	Cancer Sci	100(3)	552-557	2009
40	Takeuchi, K., Shin-Ya, T., <u>Nishio, K.</u> , Ito, F.	Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 modulated JNK activation is critical for apoptosis induced by inhibitor of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase.	FEBS J	276(5)	1255-1265	2009

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

新しい薬物療法の導入とその最適化に関する研究

研究成果の刊行物・別刷

研究代表者	田村 友秀	国立がんセンター中央病院
研究分担者	南 博信	神戸大学大学院医学系研究科
	小泉 史明	国立がんセンター研究所
	桑野 信彦	九州大学 先端融合医療レドックスナビ研究拠点
	掛谷 秀昭	京都大学大学院薬学研究科
	杉本 芳一	慶應義塾大学薬学部
	中川 和彦	近畿大学医学部
	野口 眞三郎	大阪大学大学院医学系研究科
	西尾 和人	近畿大学医学部

平成22年（2010年）3月

Simple and sensitive HPLC method for determination of amrubicin and amrubicinol in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study

Reiko Ando^{a*}, Yoshinori Makino^a, Tomohide Tamura^b, Noboru Yamamoto^b, Rena Nishigaki^a, Takehiro Kimura^a, Nobuaki Yokote^a and Hiroshi Yamamoto^a

ABSTRACT: A simple and sensitive high-performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for determination of amrubicin and its metabolite amrubicinol in human plasma. After protein precipitation with methanol without evaporation procedure, large volume samples were injected and separated by two monolithic columns with a guard column. The mobile phase consisted of tetrahydrofuran–dioxane–water (containing 2.3 mM acetic acid and 4 mM sodium 1-octanesulfonate; 2:6:15, v/v/v). Wavelengths of fluorescence detection were set at 480 nm for excitation and 550 nm for detection. Under these conditions, linearity was confirmed in the 2.5–5000 ng/mL concentration range of both compounds. The intra- and inter-day precision and intra- and inter-day accuracy for both compounds were less than 10%. The method was successfully applied to a clinical pharmacokinetic study of amrubicin and amrubicinol in cancer patients. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: amrubicin; amrubicinol; cancer; protein precipitation; monolithic column

Introduction

Amrubicin, a completely synthetic 9-aminoanthracycline, is an active anticancer agent. Both amrubicin and amrubicinol, the C-13 hydroxy active metabolite of amrubicin, are inhibitors of the DNA topoisomerase II mediated cleavable complex. The antitumor activity of amrubicinol is 10–100 times greater than that of the parent compound *in vitro* (Yamaoka *et al.*, 1998). In phase I/II trials conducted in Japan the recommended dose of amrubicin was determined to be 45 mg/m² for three consecutive days every 3 or 4 weeks. In phase II trials of amrubicin monotherapy the response rate of small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC) was found to be 75.8% (Yana *et al.*, 2007) and 27.9% (Sawa *et al.*, 2006), respectively. Amrubicin was approved in Japan for the treatment of SCLC and NSCLC in December 2002. The major problem with amrubicin is hematological toxicity. An incidence of grade 3 or 4 toxicity of 76.8% has been found for neutropenia, 54.7% for leucopenia, 26.0% for anemia, 22.1% for thrombocytopenia and 35% for the more serious toxicity, febrile neutropenia (Kato *et al.*, 2006). The severity of these toxicities varies from individual to individual. Neutropenia has been reported to be associated with the area under the curve of the plasma amrubicinol concentration, which is one of the major pharmacokinetic (PK) parameters (Matsunaga *et al.*, 2006). A prospective PK and pharmacodynamic (PD) study was planned in our institution, the National Cancer Center Hospital (Tokyo, Japan), to evaluate the PK and PD parameters of amrubicin and amrubicinol and to develop an individualized dosing strategy for amrubicin.

Development of a simple and sensitive HPLC method for determination of amrubicin and amrubicinol in human plasma was required to conduct the PK/PD study. Four methods, including two HPLC methods (Noguchi *et al.*, 1998; Matsunaga *et al.*, 2006), an HPLC-MS-MS method (Yanaiharu *et al.*, 2007) and a UPLC-MS-MS method (Li *et al.*, 2008), have already been reported. The two HPLC methods (Noguchi *et al.*, 1998; Matsunaga *et al.*, 2006) involve preparation by liquid–liquid extraction and solid-phase extraction, respectively, and they lack sensitivity because of low recovery and loss during processing. The HPLC-MS-MS method (Yanaiharu *et al.*, 2007), on the other hand, involves preparation by solid-phase extraction, but the lower limits of quantification (LOQ) of amrubicin and amrubicinol is 20 ng/mL, which is higher than the plasma concentration of amrubicin 24 h after an intravenous bolus and higher than the concentration of amrubicinol, stated in the application for the approval of amrubicin. However,

* Correspondence to: R. Ando, Division of Pharmacy, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan. E-mail: reando@ncc.go.jp

^a Division of Pharmacy, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

^b Division of Internal Medicine and Thoracic Oncology, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

Abbreviations used: NSCLC, non-small cell lung cancer; PD, pharmacodynamic; PK, pharmacokinetic; SCLC, small cell lung cancer.

although an UPLC-MS-MS method by protein precipitation (Li *et al.*, 2008) improved the LOQ and preparation procedure, it is not general measurement equipment in hospitals because the equipment is too expensive.

A monolithic column, which has applied for bioanalysis with in the past 10 years, has a lower back-pressure than packed beds (Nguyen *et al.*, 2006). Many applications of analysis using monolithic column have been investigated in μ -HPLC and capillary electrochromatography. Otherwise, few methods refer to the use of a monolithic column by HPLC. The advantage of using monolith columns is that sensitivity can be improved by a long column and large volume samples can be injected.

There are many methods of sample preparation, including protein precipitation, liquid-liquid extraction and solid-phase extraction. Protein-precipitation is the simplest method in terms of procedure and technique. Moreover, recovery with protein precipitation is higher than that with liquid-liquid extraction or solid-phase extraction because amrubicin and amrubicinol have both hydrophilic sites and hydrophobic sites.

The aim of this study was to use monolithic columns to develop a simple and sensitive HPLC method for determination of amrubicin and amrubicinol in human plasma.

Experimental

Chemicals

Amrubicin and amrubicinol were provided by Dainippon Sumitomo Pharmaceuticals Co. Ltd (Osaka, Japan). The chemical structure of amrubicin and amrubicinol are shown in Fig. 1. All other chemicals and reagents used were of analytical reagent grade or HPLC grade and were purchased from Wako (Osaka, Japan).

Chromatographic Instrumentation and Conditions

The chromatographic system consisted of an LC-20AD pump, a SIL-20AC auto sampler, an RF-10AXL fluorescence detector and C-R8A Chromatopac integrator with a CTO-10A oven (Shimadzu, Kyoto, Japan). Two connected Onyx Monolithic C_{18} (100 \times 4.6 mm) columns were used with an Onyx Monolithic C_{18} Guard Cartridge (10 \times 4.6 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Effluent was monitored with a fluorescence detector set at an excitation wavelength of 480 nm and a detection wavelength of 550 nm. The mobile phase consisted of tetrahydrofuran-dioxane-water (containing 2.3 mM acetic acid and 4 mM sodium 1-octanesulfonate; 2.6:15, v/v/v) pumped at flow rate of 0.9 mL/min at a column temperature of 35°C.

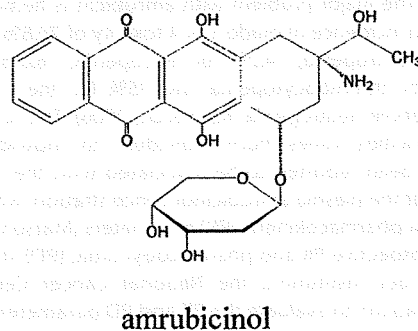
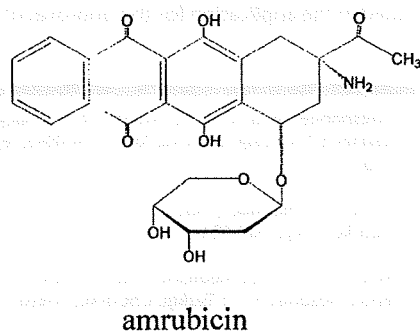


Figure 1. Chemical structures of amrubicin and amrubicinol.

Preparation of Standards and Plasma Samples

Stock solutions of amrubicin and amrubicinol were stored in plastic microtubes to avoid adsorption to glassware, and stored at -80°C . Working solutions were obtained by diluting the stock solutions with acetonitrile. Blank plasma samples for use in validating the method were obtained from healthy volunteers. The patient plasma samples were obtained from the National Cancer Center Hospital. Both the blank plasma samples and patient plasma samples were stored at -80°C until analyzed. Heparin sodium salt was added to patient blood samples to prevent coagulation. Then the blood samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 min.

Extraction Procedure

Plasma (100 μL) in a 1.5 mL screw-capped tube was diluted with 20 μL of 16 mM citric acid-16 mM Na_2HPO_4 -0.9% NaCl solution, and after adding 480 μL of methanol the tube was shaken for 30 min. The mixture was then centrifuged for 10 min at 12,000 rpm. The supernatant was filtered through an UltraFree-MC filter (Millipore, Tokyo, Japan), and 250 μL of the solution was transferred into auto sampler vials and vortex-mixed with a 500 μL of 16 mM citric acid-16 mM Na_2HPO_4 -0.9% NaCl solution. A 450 μL volume of the solution was injected into the HPLC system for analysis.

Validation

Specificity. The specificity of the method was evaluated by comparing different blank plasma samples and plasma samples spiked with amrubicin and amrubicinol. The blank plasma samples were collected from nine volunteers.

Accuracy, precision and recovery. Accuracy and precision were determined by replicate analysis ($n = 6$) of plasma samples spiked with three concentrations of amrubicin and amrubicinol: 10, 100 and 1000 ng/mL. Accuracy was evaluated as relative error (RE), and precision was evaluated as coefficient of variation (CV). Recovery was assessed by comparing the results of analyses of extracted plasma samples and unextracted standards containing the same concentrations.

Calibration curve. The LOQ was determined from the peak and the standard deviation of the noise level (SN). The LOQ was defined as the concentration of amrubicin and amrubicinol resulting in a peak height of 10 times SN. The calibration curve was generated by linear regression of the peak areas (y) of amrubicin and amrubicinol against the corresponding concentrations (x) of amrubicin and amrubicinol in plasma.

Analysis of Patient Samples

For the analysis of plasma concentration of amrubicin and amrubicinol, plasma samples were obtained from lung cancer patients treated with 40 mg/m² of amrubicin. All patients were enrolled in the prospective PK/PD study, which was aimed to evaluate the correlation between PK and PD of amrubicin and amrubicinol. Written informed consent was obtained from all patients. This study was approved by the Ethical Review Board of National Cancer Center Hospital and is ongoing. The plasma samples were obtained from blood samples collected immediately before injection, and immediately after the injection, and 5, 15 and 30 min, and 1, 2, 4, 8 and 24 h after the end of injection. Each sample was determined in triplicate.

Results

Specificity

No endogenous interference was observed at the retention times of amrubicin and amrubicinol. The retention time of amrubicin and amrubicinol was approximately 8.5 and 10.2 min, respectively. Representative chromatograms of the blank plasma sample, the plasma sample spiked and the patient plasma sample are shown in Fig. 2. The capacity factors (*k'*) of amrubicin and amrubicinol were 1 and 1.4, respectively.

Accuracy, Precision and Recovery

The results for intra- and inter-day accuracy, precision and recovery are shown in Table 1. Intra-day accuracy ranged between -4.1 and 0.8% for amrubicin and between -9.8 and -2.1% for amrubicinol. Inter-day accuracy was between -3.1 and 3.0% for amrubicin and between -4.0 and 2.3% for amrubicinol. Intra-day precision was 1.4–8.8% for amrubicin and 1.3–4.2% for amrubicinol. Inter-day precision was 2.7–8.8% for amrubicin and 5.3–5.5% for amrubicinol. Recovery was greater than 95% at all concentrations (10, 100 and 1000 ng/mL) of amrubicin and amrubicinol.

Lower Limit of Quantitation

The LOQ was 2.5 ng/mL for both amrubicin and amrubicinol. At that level the coefficient of variation (CV) was 8.3% for amrubicin and 3.2% for amrubicinol (*n* = 6).

Linearity

Under the chromatographic conditions described, linearity and the appropriate correlation coefficient were achieved for amrubicin within the concentration range from 2.5 to 5000 ng/mL. The linear regression equation for amrubicin was $y = 526.3x + 6156.3$, and the correlation coefficient (*r*) was 0.999. Similar results were obtained for amrubicinol with the concentration range from 2.5 to 5000 ng/mL. The linear regression equation for amrubicinol was $y = 662.9x + 2947.7$, and the correlation coefficient (*r*) was 0.996.

Analysis of Patient Plasma Samples

The amrubicin and amrubicinol in the patient plasma samples were separated well under the optimal chromatographic conditions. Figure 2(C) shows a chromatogram of amrubicin and amrubicinol in a plasma sample from a patient who was treated at dose of 40 mg/m² of amrubicin. Figure 3 shows the concentra-

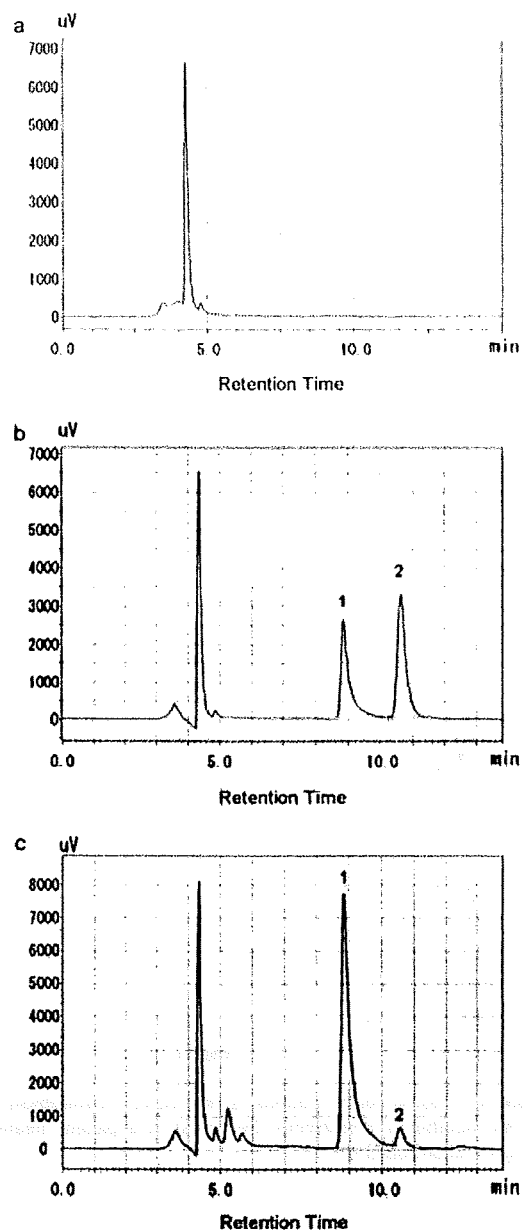


Figure 2. Representative HPLC chromatogram. (a) Blank plasma sample; (b) plasma sample spiked with 100 ng/mL amrubicin and amrubicinol; (c) patient plasma sample obtained 2 h after an intravenous bolus dose of 40 mg/m² of amrubicin. Peaks: 1 = amrubicin; 2 = amrubicinol. For chromatographic condition see Experimental section.

tion-time profiles for amrubicin and amrubicinol after an intravenous bolus. The amrubicin concentrations ranged between 4.3 and 2504 ng/mL, and the amrubicinol concentrations ranged between 3.0 and 18.5 ng/mL. These concentrations were similar to the concentrations stated in the application for approval of amrubicin.

Discussion

We developed a simple and sensitive method of determination for amrubicin and amrubicinol by HPLC. In our method protein

Table 1. Intra-day and inter-day accuracy, precision and recovery of the HPLC method for amrubicin and amrubicinol

	Nominal concentration (ng/mL)	<i>n</i>	Experimental concentration (mean ± SD, ng/mL)	Precision (% CV)	Mean recovery (%)	Accuracy (%RE)
<i>Intra-day</i>						
Amrubicin	10	6	9.9 ± 0.6	5.9	98.9	-1.1
	100	6	95.9 ± 1.3	1.4	100.0	-4.1
	1000	6	1007.6 ± 88.2	8.8	100.7	0.8
Amrubicinol	10	6	9.0 ± 0.4	4.2	98.5	-9.8
	100	6	97.8 ± 1.3	1.3	97.8	-2.1
	1000	6	954.9 ± 14.6	1.5	95.5	-4.5
<i>Inter-day</i>						
Amrubicin	10	6	9.7 ± 0.3	2.7	98.0	-3.1
	100	6	102 ± 8.6	8.4	100.0	2.0
	1000	6	1029.8 ± 90.9	8.8	100.7	3.0
Amrubicinol	10	6	10.0 ± 0.5	5.3	99.3	0.1
	100	6	96.0 ± 5.5	5.7	99.3	-4.0
	1000	6	1023.2 ± 56.4	5.5	100.4	2.3

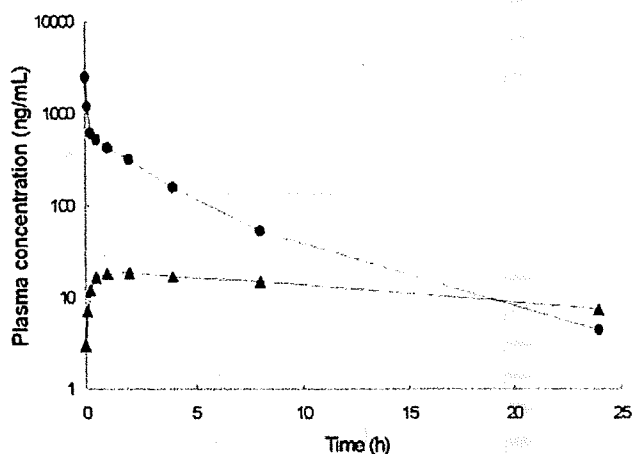


Figure 3. Plasma concentrations vs time curves of amrubicin (circles) and its metabolite amrubicinol (triangles) in a patient treated with 40 mg/m² of amrubicin.

precipitation is used to prepare the samples, and monolithic columns are used to make determination.

During the past decade monolithic columns have emerged as an alternative to traditional packed-bed columns. Monolithic columns are structurally very different from packed-bed columns. The most interesting characteristic of monoliths is their high external porosity resulting from the structure of the network of through-macropores. Another interesting characteristic is the structure of the stationary phase skeleton, which consists of a network of small, thin threads of porous silica. These structural characteristics allow the combination of the low hydraulic resistance of the column to the stream of mobile phase and an enhancement of the column of the rate of the mass transfer of the sample molecules through the column. In this way, the monolithic column improves back-pressure. Yunsheng *et al.* (2003) investigated the utility of monolithic column for direct HPLC-MS-MS analysis. Although access to the matrix in biological samples was prevented in analysis by packed-bed columns, the

monolith column with high porosity could remove matrix macromolecules.

In this study, we evaluated packed-bed columns, such as Sumipax ODS A-212 (5 µm, 6 mm × 15 cm), Synergi Hydro-RP (4 µm, 4.6 mm × 15 cm), Luna C₁₈ (4 µm, 4.6 mm × 15 cm) and Luna C₁₈ (3 µm, 4.6 mm × 15 cm). The LOQ using Sumipax ODS A-212 was 5 ng/mL for both amrubicin and amrubicinol. Using the other three columns, we could not obtain sufficient result (data not shown). We considered the reason why small particles prevented the access of macromolecules in biological samples.

We connected two monolithic columns in tandem like a long column, which made it possible to determine low concentrations of amrubicin and amrubicinol without high pressure. As a result, the sensitivity of our method is equal or superior to that of other methods, including methods that use HPLC-MS-MS or UPLC-MS-MS, and its sensitivity is adequate for performance of the analyses in the PK study.

The sample preparation procedure in this method is based on protein precipitation, because it is simple. Moreover, recovery by protein precipitation is higher than by liquid-liquid extraction or solid-phase extraction, because amrubicin and amrubicinol have both hydrophilic sites and hydrophobic sites. Methanol was selected for protein precipitation, because methanol makes sharper peaks and enables better separation than other organic solvent (data not shown). We added an appropriate amount of buffer, which prevents broad peaks, to the samples after protein precipitation.

The fluorescence detector was set at an excitation wavelength of 480 nm and a detection wavelength of 550 nm. In the excitation wavelength, the highest energy should be obtained in the 480 nm region at the level of excitation lamps, according to the proposal for determination of anthracyclines (Sepaniak and Yeung, 1980). We set the excitation wavelength at 480 nm. Since the most sensitive detection wavelength for amrubicin and amrubicinol was 550 nm, we used it as the detection wavelength in our method. The mobile phase was a modification of a previous report (Noguchi *et al.*, 1998). 1-Octanesulfonate improved separation compared with other ion-pair agents including 1-heptanesulfonate, which used Noguchi's method (data not