

「抗がん剤の分子標的評価と最適化」に関する研究

研究分担者 服部 明 京都大学大学院薬学研究科 准教授

研究要旨

低酸素誘導因子(HIF) -1はがんの悪性化に深く関与しているbasic loop-helix-loop型の転写因子である。本研究では、HIF-1ヘテロ二量体化を標的とした新しい抗がん剤の評価・開発に向けて、二分子蛍光相補法を用いたHIF-1ヘテロ二量体化の評価系の構築を行った。

A. 研究目的

低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor: HIF) -1は固形腫瘍内などの低酸素環境に曝されている組織・細胞において特異的に活性化される転写因子であり、その標的遺伝子の活性化を介して、腫瘍細胞の生存や悪性化に深く関与している。HIF-1はbasic loop-helix-loop型転写因子であり、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニットが各分子内に存在するPAS (Per ARNT Sim)ドメインを介して結合したヘテロ二量体構造をとっている。HIF-1の活性化にはヘテロ二量体化が必要であることから、本研究では、HIF-1ヘテロ二量体化を標的とした新しい抗がん剤の評価・開発に向けたハイコンテンツスクリーニング系の構築を行った。

B. 研究方法

HIF-1各サブユニットのPASドメイン間の相互作用の評価にはサンゴ由来蛍光タンパク質 Kusabira-Green (KG) を用いた二分子蛍光相補法を導入した。

KGタンパク質をN末端側とC末端側に分割させて発現させる動物細胞発現ベクター (CoralHue Fluo-chase Kit ; Amalgaam社) にHIF-1 $\alpha$ および1 $\beta$ の各PASドメインをコードするDNA配列を挿入することで、HIF-1-KG融合タンパク質の発現プラスミドを作製した。各融合タンパク質発現プラスミドを様々な組み合わせでCHO細胞に導入し、HIF-1 $\alpha$ および1 $\beta$ の相互作用に基づいて再構築されたKGが発する蛍光を蛍光顕微鏡下で観察・定量した。特定のHIF-1-KG断片の組み合わせにおいて生じる蛍光がHIF-1各サブユニットのPASドメインでの相互作用に起因することを、共免疫沈降法やKG断片の融合していないPASドメインの過剰発現による競合実験により確認した。

(倫理面への配慮)

組換えDNA実験内容については京都大学内委員会にて承認されている。

C. 研究結果

HIF-1 $\alpha$ および1 $\beta$ の各PASドメインとKGタンパク質

のN末端断片 (KGN) あるいはC末端断片 (KGC) との融合タンパク質発現ベクターを、各断片の組み合わせおよび配向性 (KG断片への融合位置) をすべて考慮して、HIF-1 $\alpha$ 、HIF-1 $\beta$ それぞれにつき4種類、合計8種類構築した。KGN融合タンパク質およびKGC融合タンパク質をCHO細胞内で共発現させた際の蛍光像を観察した結果、いくつかの組み合わせにおいて、蛍光回復が認められた。なかでも、KGNのN末端側に $\alpha$ サブユニットPASドメインを融合させたタンパク質 (1 $\alpha$ -KGN) とKGCのC末端側に $\beta$ サブユニットPASドメインを融合したタンパク質 (KGC-1 $\beta$ ) を共発現させた場合には、CHO細胞の核内で強い蛍光像が観察された。再構築KGの核内局在は内在性HIF-1のそれと同じであり、今回導入したHIF-1の各サブユニット中の核移行シグナルが正しく機能している結果であると考えられる。これら結果から、1 $\alpha$ -KGNとKGC-1 $\beta$ を利用することで、KG蛍光回復によるHIF-1ヘテロ二量体化の評価が可能であり、さらにHIF-1の細胞局在性をも同時に評価できることが示めされた。また、1 $\alpha$ -KGNとKGC-1 $\beta$ が実際にヘテロ複合体を形成していることは、遺伝子導入後の細胞抽出液を用いた共免疫沈降実験により確認された。さらに、1 $\alpha$ -KGNとKGC-1 $\beta$ による蛍光回復がHIF-1 $\beta$ のPASドメインのみの過剰発現で阻害されたことから、両PASドメイン間の特異的な相互作用によりKG蛍光が回復していることも明らかとなった。

一方、断片を融合していないKGNとKGCを発現させた細胞においても遺伝子導入後、24時間を経過すると蛍光像が観察された。このことから本システムでは過剰な外来性タンパク質の発現によって、バックグラウンドが生じることが明らかとなった。そこで、KG融合タンパク質の発現制御を目指して、Doxycycline (Dox) を用いた転写調節システムの本系への導入を試みた結果、バックグラウンドの大幅な低減が認められた。

D. 考察

Doxによる転写制御システムを導入することで、KGNとKGC間での非特異的な相互作用に起因する

バックグラウンドを低減させることができることが明らかとなったことから、1 $\alpha$ -KGNとKGC-1 $\beta$ 融合タンパク質をDox制御下で発現可能な安定発現CHO細胞株を今後樹立することで、HIF-1ヘテロ二量体化の評価に資するスクリーニング系の構築が可能であると考えられる。

#### E. 結論

本研究の結果、HIF-1各サブユニット間の相互作用に依存した二分子蛍光相補が可能であることが明らかとなった。本系を用いたハイコンテツスクリーニングを展開することで、HIF-1ヘテロ二量体化を標的とした新しいタイプの抗がん剤の開発が期待できる。

#### 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) Ohno, Y., Hattori, A., Ueda, M., Kageyama, T., Yoshiki, T., Kakeya, H. Multiple NF-Y binding CCAAT boxes are essential for transcriptional regulation of the human C7orf24 gene, a novel tumor-associated gene. FEBS J., 278(21):4088-4099, 2011.

#### H. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1.特許取得

該当なし

##### 2.実用新案登録

該当なし

##### 3.その他

該当なし

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

研究分担者 杉本 芳一 慶應義塾大学薬学部 教授

研究要旨

新規BCRP阻害薬であるYHO-13177は強いBCRP阻害作用をもち、P-gpとMRP1を阻害しない。YHO-13177は、BCRPを発現するヒトがん細胞のSN-38感受性を数倍増強した。YHO-13177は、種々のSNP型、変異型BCRPに対して阻害作用を示したが、F431L-BCRPは阻害できなかった。YHO-13177の水溶性のプロドラッグであるYHO-13351は、P338/B CRPおよびHCT116/BCRPのマウス移植モデルにおいて、irinotecanの効果を増強した。

A. 研究目的

BCRP (ABCG2) は、構造的にP-糖タンパク質の半分の大きさのABC輸送体であり、ホモ2量体として機能する。BCRP発現細胞はirinotecan、gefitinibなどの抗がん剤に耐性を示す。本研究では、新規BCRP阻害薬であるYHO-13177とその水溶性のプロドラッグであるYHO-13351について、トランスポーター阻害作用、抗がん剤の効果増強作用、SNP型BCRPに対する効果、irinotecanとの併用での*in vivo*での抗腫瘍効果などを検討することを目的とした。

B. 研究方法

ABC輸送体を発現する抗がん剤耐性細胞として、ヒト大腸がん細胞株のHCT116とそのBCRP遺伝子導入細胞株HCT116/BCRP、マウス白血病細胞株のP388とそのBCRP遺伝子導入細胞株P388/BCRP、ヒト白血病細胞株のK562とそのMDR1遺伝子導入細胞株K562/MDR、ヒト子宮頸がん株のHeLaに由来するKB-3-1細胞とそのMRP1遺伝子導入細胞株KB/MRPを用いた。また、内在性にBCRPを発現する細胞として、ヒト肺がん細胞株のNCI-H460とNCI-H23、ヒト骨髄腫細胞株のRPMI-8226、ヒト膵臓がん細胞株のAsPC-1を用いた。野生型、SNP型および変異型BCRP遺伝子導入細胞として、マウス繊維芽細胞PA317にそれぞれのcDNAを導入したPA/WT、PA/Q141K、PA/F431L、PA/R482G、PA/R482S、PA/H630Eを用いた。

バキュロウイルス発現系によりWT-BCRP、Q141K-BCRP、F431L-BCRPを高発現させたSf-21細胞から、細胞膜vesicleを作製した。vesicle内への<sup>3</sup>H標識した硫酸エストロン (E<sub>1</sub>S) のATP依存的な取り込みに対するYHO-13177の効果を検討した。

P388、P388/BCRPをマウスの腹腔に移植し、irinotecanとYHO-13351を腹腔内投与して、抗腫瘍効果を検討した。HCT116、HCT116/BCRPをヌードマウスの背部皮下に移植し、irinotecanとYHO-13351をiv投与して、抗腫瘍効果を検討した。また、HCT116、HCT116/BCRP

をヌードマウスの背部皮下に移植し、irinotecanのiv投与とYHO-13351の経口投与で、抗腫瘍効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子組換え実験は、所属機関の遺伝子組換え実験安全要綱に従って行なわれた。本研究における動物実験は、所属機関の動物実験規程に従い、使用する動物を最少限とする、動物に対する苦痛を最小限にする、などの配慮のもとに行なわれた。

C. 研究結果

YHO-13177は、PA/BCRPのSN-38耐性を濃度依存的に低下させた。一方、YHO-13177は、K562/MDRのvincristine耐性、KB-3-1/MRP1のdoxorubicin耐性を変化させなかった。この結果は、YHO-13177がBCRP特異的であることを示している。YHO-13177は、BCRPを発現するヒト骨髄腫細胞RPMI8226、ヒト肺がん細胞NCI-H23とNCI-H460、ヒト膵臓がん細胞AsPC-1に対するSN-38の効果を3~6倍増大させた。YHO-13177は、SNP型BCRP発現細胞であるPA/Q141K、活性化変異型BCRPPA/R482G、PA/R482S、PA/H630EのSN-38耐性を野生型BCRP発現細胞であるPA/WTと同様に低下させたが、もうひとつのSNP型BCRP発現細胞であるPA/F431LのSN-38耐性にはほとんど影響を与えなかった。

WT-BCRP、Q141K-BCRP、F431L-BCRPのそれぞれを高発現する細胞膜vesicleを用いて、<sup>3</sup>H E<sub>1</sub>Sのvesicle内への取り込みに対するYHO-13177の効果を検討したところ、YHO-13177は、WT-BCRP、Q141K-BCRPのE<sub>1</sub>S輸送を濃度依存的に阻害した。一方、YHO-13177は、F431L-BCRPのE<sub>1</sub>S輸送は阻害しなかった。WT-BCRP、Q141K-BCRPのE<sub>1</sub>S輸送に対するYHO-13177の阻害は、競合阻害であった。

YHO-13351は、YHO-13177の水溶性のプロドラッグである。マウスに117mg/kgのYHO-13351を経口投与したところ、YHO-13351は体内で速やかに加水分解されてYHO-13177となり、YHO-13177の血漿中濃度は8時間にわ

たつて約10 $\mu$ Mのレベルで維持された。YHO-13351は、腹腔内投与で、P388/BCRPのマウス移植モデルにおいて、irinotecanの効果を増強した。YHO-13351は、経口投与で、HCT116/BCRPのマウス移植モデルにおいて、irinotecanの効果を増強した。また、YHO-13351は、iv投与でも、HCT116/BCRPのマウス移植モデルにおいて、irinotecanの効果を増強した。

#### D. 考察

本研究により、YHO-13177が、強いBCRP阻害作用をもち、またBCRPに選択的な阻害薬であることが示された。YHO-13177は、SNP型BCRPであるF431L-BCRPは阻害しなかった。我々は以前に、F431L-BCRPはsunitinibおよびfuntremogin Cによっても阻害されないことを報告した。F431L-BCRPはBCRPの2番目の膜貫通領域内のアミノ酸の変異であり、この部位がBCRPの基質認識に重要であることを示している。

YHO-13177の水溶性のプロドラッグであるYHO-13351は、マウス血中で速やかにYHO-13177に変換され、十分にBCRPを阻害する血中濃度が8時間にわたって維持された。YHO-13351は、HCT116/BCRPのマウス移植モデルに対して、経口投与、iv投与の両方でirinotecanの効果を増強した。今後、YHO-13351の単独投与およびirinotecanとの併用における毒性の発現などについて慎重に検討を行う予定である。

#### E. 結論

新規BCRP阻害薬であるYHO-13177は強いBCRP阻害作用をもち、P-gpとMRP1を阻害しない。YHO-13177は、BCRPを発現するヒトがん細胞のSN-38感受性を数倍増強した。YHO-13177は、種々のSNP型、変異型BCRPに対して阻害作用を示したが、F431L-BCRPは阻害できなかった。YHO-13177の水溶性のプロドラッグであるYHO-13351は、P388/BCRPおよびHCT116/BCRPのマウス移植モデルにおいて、irinotecanの効果を増強した。

#### F. 健康危険情報

#### 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. Yamazaki, R., Nishiyama, Y., Furuta, T., Hatanoh, H., Igarashi, Y., Kodaira, H., Takahashi, H., Aiyama, R., Matsuzaki, T., Yagi, N., Sugimoto, Y. Novel acrylonitrile derivatives, YHO-13177 and YHO-13351, reverse BCRP/ABCG2-mediated

drug resistance *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.*, 10(7):1252-1263, 2011.

2. Masuda, Y., Noguchi, K., Segawa, H., Tanaka, N., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y. Novel regulatory role for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vFLIP in chemosensitization to bleomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 415(2):305-312, 2011.
3. Yasuda, A., Noguchi, K., Minoshima, M., Kashiwazaki, G., Kanda, T., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Bando, T., Sugiyama, H., Sugimoto, Y. A DNA ligand designed to antagonize EBNA1 represses Epstein-Barr virus-induced immortalization. *Cancer Sci.*, 102(12):2221-2230, 2011
4. Kawanobe, T., Kogure, S., Nakamura, S., Sato, M., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Noguchi, K., Sugimoto, Y. Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 418(4):736-741, 2012.

#### H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

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

研究分担者 岡本 勇 近畿大学医学部内科学腫瘍内科学部門 准教授

研究要旨

EGFRチロシンキナーゼ阻害剤のアポトーシス誘導の分子メカニズムを詳細に解明することにより、その分子メカニズムに応じて新治療の基礎的検討を行い臨床へ導入を図ることを目的とする。

A. 研究目的

EGFR(上皮成長因子受容体)チロシンキナーゼ阻害剤はEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者の治療において非常に優れた抗腫瘍効果を発揮する分子標的治療薬であり、すでに臨床導入されている。しかし、EGFR遺伝子変異を認めていても抗腫瘍効果を発揮しない症例や、抗腫瘍効果を認めた症例においても薬剤耐性が生じることが臨床的に問題となっている。一方、In vitroにおいてEGFRチロシンキナーゼ阻害剤はEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株においてアポトーシスを引き起こすが、その分子メカニズムは十分に解明されていない。そこで本研究においてはゲフィチニブのアポトーシス関連因子への効果を検討し、その分子メカニズムに応じて新治療の基礎的検討を行い臨床へ導入を図ることを目的とする。

B. 研究方法

EGFR遺伝子変異を有しEGFRチロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブに対して高感受性を呈する肺癌細胞株と遺伝子変異を持たない非感受性株に対してゲフィチニブを暴露した際に、IAP family蛋白の発現量に変化が生じるかどうかをWestern blot法で確認する。また、そのシグナル伝達経路に関しても、EGFRの下流として知られているAKTやERKの阻害剤、siRNAを用いた実験により検討する。また、EGFR遺伝子変異をもつPC9とHCC827に対してレトロウイルスを用いてIAP family蛋白を高発現させて、感受性に変化が生じるかどうかをMTT assay及びAnnexin法を用いて検討する。また、ヌードマウスを用いたin vivoの実験においても樹立した細胞株を用いてゲフィチニブの抗腫瘍効果を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を遵守し細胞株、ヌードマウスを用いた実験を行う。またレトロウイルスを用いた遺伝子組換え実験に関しては当院安全委員会で承認を得た上で実験を施行する。

C. 研究結果

EGFR遺伝子変異を有しEGFRチロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブに対して高感受性を呈する肺癌細胞株にゲフィチニブを暴露した際にはIAP family蛋白のひとつであるサバイビンの発現量が低下することを見出した。他のIAP family蛋白は著明な変化を認めなかった。また、AKT、ERKの阻害剤、siRNAを用いた実験において、サバイビンの発現低下はAKT経路に依存していることを突き止めた。さらにEGFR遺伝子変異をもつPC9とHCC827に対してレトロウイルスを用いてサバイビンを高発現させた細胞株(PC9/Survivin、HCC827/Survivin)を樹立することに成功した。これらのサバイビン高発現株においては、in vitroにおいて親株と比較してゲフィチニブによるアポトーシスが抑制され、またマウスを用いたin vivoにおいても親株と比較してゲフィチニブに対して耐性を示した。また、これまでにゲフィチニブによるアポトーシスとの関連が報告されているBCL family蛋白の一つであるBIMの発現変化との関係性についても実験を行ったところ、BIMの発現変化はERK経路に依存しており、AKT-サバイビンとは別々にゲフィチニブのアポトーシスに関与していることがわかった。

D. 考察

ゲフィチニブによって、EGFR遺伝子変異を持ち、感受性のある細胞株においてはサバイビンの発現低下が生じ、感受性株にサバイビンを高発現させるとゲフィチニブによるアポトーシスの誘導が抑制され、in vivoにおいても抗腫瘍効果が抑制されることから、サバイビンの発現低下がゲフィチニブによるアポトーシスに関与していることを示した。またその発現低下はAKT経路に依存しており、これまで二報告されているERK-BIMの経路とは別々にゲフィチニブのアポトーシスに関与していることが示された。これら2つの経路が同時に働くことがゲフィチニブによるアポトーシスを十分に生じる為に必要であると考えられる。

## E. 結論

EGFR遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌株においてはゲフィチニブによるアポトーシスにはサバイビンの発現低下が重要な役割を果たしており、またこの発現低下はAKT経路に依存していることを示した。またこのAKT-サバイビン経路はERK-BIM経路とは別々にアポトーシスに関連していることを示した。

## 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. Okamoto, I., Shimizu, T., Miyazaki, M., Tsurutani, J., Ichikawa, Y., Terashima, M., Takeda, M., Fumita, S., Ohki, E., Kimura, N., Hashimoto, J., Nakagawa, K. Feasibility study of two schedules of sunitinib in combination with pemetrexed in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 30(2):639-646, 2012.
2. Takeda, M., Okamoto, I., Sakai, K., Tanaka, K., Terashima, M., Nishio, K., Nakagawa, K. Successful long-term treatment with pemetrexed of NSCLC associated with EML4-ALK and low thymidylate synthase expression. *Clinical Lung Cancer*, 13(2):157-159, 2012.
3. Okamoto, K., Okamoto, I., Hatashita, E., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Kita, A., Yamanaka, K., Ono, M., Nakagawa, K. Overcoming Erlotinib Resistance in EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Targeting Survivin. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(1):204-213, 2012.
4. Azuma, K., Okamoto, I., Kawahara, A., Taira, T., Nakashima, K., Hattori, S., Kinoshita, T., Takeda, M., Nakagawa, K., Takamori, S., Kuwano, M., Ono, M., Kage, M. Association of the expression of mutant EGFR protein as determined with mutation-specific antibodies in non-small cell lung cancer with progression-free survival after gefitinib treatment. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(1):122-127, 2012.
5. Tanizaki, J., Okamoto, I., Fumita, S., Okamoto, W., Nishio, K., Nakagawa, K. Roles of BIM induction and survivin down-regulation in lapatinib-induced apoptosis in breast cancer cells with HER2 amplification. *Oncogene*, 30(39):4097-4106. 2011.
6. Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Okamoto, I., Satoh, T., Cappuzzo, F., Souglakos, J., Ercan, D., Rogers, A., Roncalli, M., Takeda, M., Fujisaka, Y., Philips, J., Shimizu, T., Maenishi, O., Cho, Y., Sun, J., Destro, A., Taira, K., Takeda, K., Okabe, T., Swanson, J., Itoh, H., Takada, M., Lifshits, E., Okuno, K., Engelman, A. J., Shivdasani, A. R., Nishio, K., Fukuoka, M., Garcia, V. M., Nakagawa, K., and Jänne, A. P. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Science Translation Medicine*, 3(99):99ra86, 2011.
7. Tanizaki, J., Okamoto, I., Okamoto, K., Takezawa, K., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Nakagawa, K. MET Tyrosine Kinase Inhibitor Crizotinib (PF-02341066) Shows Differential Antitumor Effects in Non-small Cell Lung Cancer According to MET Alterations. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(10):1624-1631, 2011.
8. Tanizaki, J., Okamoto, I., Sakai, K., Nakagawa, K. Differential roles of trans-phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as heterodimerization partners of MET in lung cancer with MET amplification. *British Journal of Cancer*, 105(6):807-813, 2011.
9. Okamoto, I., Takahashi, T., Okamoto, H., Nakagawa, K., Watanabe, K., Nakamatsu, K., Nishimura, Y., Fukuoka, M., Yamamoto, N. Single-agent gefitinib with concurrent radiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer harboring mutations of the epidermal growth factor receptor. *Lung Cancer*, 72(1):199-204, 2011.
10. Takezawa, K., Okamoto, I., Okamoto, W., Takeda, M., Sakai, K., Tsukioka, S., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Nishio, K., Nakagawa, K. Thymidylate synthase as a determinant of pemetrexed sensitivity in non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 104(10):1594-1601, 2011.
11. Takezawa, K., Okamoto, I., Nishio, K., Janne, P., Nakagawa, K. Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathways in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(8):2140-8, 2011.
12. Okamoto, W., Okamoto, I., Arao, T., Yanagihara, K., Nishio, K., Nakagawa, K. Differential roles of STAT3 depending on the mechanism of STAT3 activation in gastric cancer cells. *British Journal of Cancer*, 105(3):407-12, 2011.
13. Takeda, M., Okamoto, I., Hirabayashi, N., Kitano, M., Nakagawa, K. Thymidylate synthase and dihydropyrimidinase as determinants of pemetrexed sensitivity in non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(10):1632-1638, 2011.

roprimidine dehydrogenase expression levels are associated with response to S-1 plus carboplatin in advanced non-small cell lung cancer. Lung Cancer, 73(1):103-109, 2011.

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

なし

乳癌の化学療法効果予測法の開発に関する研究

研究分担者 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

乳がん患者の血中循環腫瘍ゲノムの検出法として、GSTP1, RASSF1A, RARbのプロモーター領域のメチル化をターゲットとしてOS-MSP法を開発した。本法は従来法の約200倍の感度を有し、早期乳癌症例の予後予測に有用であることを示した。

A. 研究目的

乳癌患者の予後および化学療法感受性を正確に予測することは個々の患者に的確な治療（個別化治療）を実施する上で極めて重要である。従来の病理学的な因子での予後や化学療法の効果予測では不十分であり更に精度の高い診断法の開発が切に望まれている。我々は、血清中のメチル化DNA（腫瘍組織由来のDNA）に着目し、従来のMSP法よりも高感度にメチル化DNAを検出可能なOS-MSP (one-step methylation specific PCR) 法を開発しその予後因子としての意義を明らかにする。また、腫瘍組織における種々の癌抑制遺伝子のメチル化に基づく化学療法効果予測法の開発を目指す。

B. 研究方法

(1) OS-MSP法の開発：

- ① 乳癌組織で比較的高率にメチル化されていると報告されている16の遺伝子からメチル化率の高い遺伝子を抽出する。
- ② 血清からのDNA抽出のステップを割愛したOS-MSP法の基礎検討（測定条件の最適化）を行う。
- ③ ①で抽出した遺伝子をターゲットとしたOS-MSP法を確立する。

(2) OS-MSP法の予後予測への応用

- ① 原発乳癌症例 (Stage I, II) を対象として、術前に採取した血清中のGSTP1, RASSF1A, RARbのプロモーター領域のメチル化をOS-MSP法で測定し予後との相関を検討する。

(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に基づき倫理委員会にて承認を受けたものである。

C. 研究結果

(1) OS-MSP法の開発

GSTP1, RASSF1A, RARbのプロモーター領域のメチル化をターゲットとしたOS-MSP法を開発した（図1）。本法によるメチル化DNAの検出感度は従来法の約200倍であった。

One-step Methylation Specific-PCR

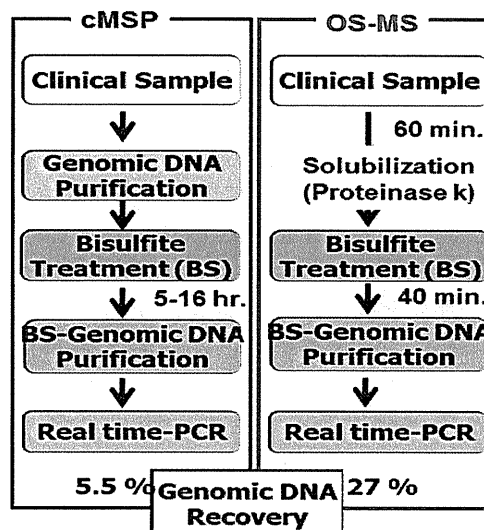


図1. OS-MSP法は、従来法(cMSP法)に比してDNA回収率が効率である(27% vs 5.5%)。

(2) OS-MSP法による予後予測

336例(stage I/II)の原発乳癌症例の術前に採取した血清を用いて、GSTP1, RASSF1A, and RARbのプロモーター領域のメチル化をOS-MSP法で測定した。また、合わせて血清中の全DNA量も測定した。336例中、33例(10%)で上記の何れかの遺伝子にメチル化が認められた(met-DNA陽性)。Met-DNA陽性例は陰性例に比して有意に予後不良であった(術後100か月の全生存率、78% vs 95%;  $P = 0.002$ )。また、血清中の全DNA量が高値例( $n=112$ )は低値例( $n=224$ )に比しては有意に予後不良であった(86% vs 97%;  $P = 0.001$ )。Met-DNA陽性かつ全DNA量高値症例( $n=18$ )の予後はそれ以外の症例に比して( $n=318$ )更に不良であった(65%



vs 94%;  $P < 0.001$ ) (図2)。

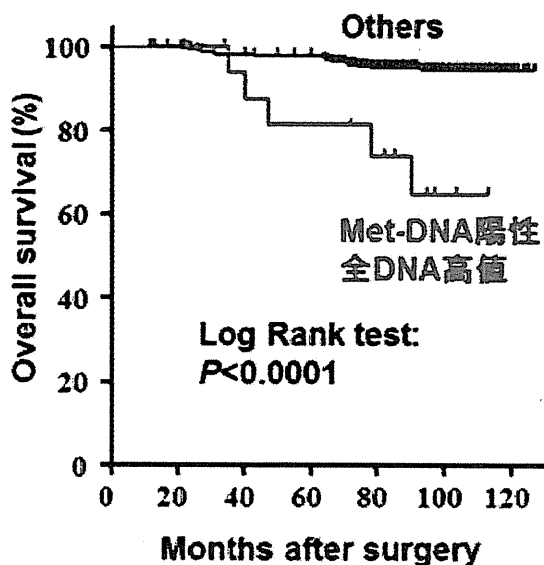


図2. Met-DNA陽性かつ全DNA高値例 vs Othersの予後比較

#### D. 考察

我々は高感度の血中循環腫瘍ゲノム (CTG) 検出法として OS-MSP 法を開発した。本法を用いることによって従来法の約 200 倍の感度で血中メチル化 DNA (標的とする遺伝子は GSTP1, RASSF1A, and RAR $\beta$ 2) を検出することができた。また、早期乳癌症例の予後予測に適用したところ、met-DNA 陽性症例の予後が met-DNA 陰性症例の予後に比して有意に不良であることが判明した。また、興味あることに血清中の全 DNA 量高値との組み合わせによって更に予後不良な症例群を同定することが可能であることが示唆された。OS-MSP 法は、乳癌の予後予測のみならず、再発乳癌の早期診断や原発乳癌の早期診断 (スクリーニング) にも応用可能であると期待される。特に、マンモグラフィーの検出感度が低い閉経前乳癌の検診への応用が期待される。

#### E. 結論

OS-MSP法は、高感度の血中循環腫瘍ゲノムの検出法であり、早期乳癌患者の予後予測に有用であることが示唆された。

#### 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. Iwamoto, T., Yamamoto, N., Taguchi, T.,

Tamaki, Y., Noguchi, S. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation. *Breast Cancer Res Treat.*, 129(1):69-77, 2011.

2. Kim, S.J., Masago, A., Tamaki, Y., Akazawa, K., Tsukamoto, F., Sato, J., Ozawa, T., Tsujino, Y., Noguchi, S. A novel approach using telomerase-specific replication-selective adenovirus for detection of circulating tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.*, 128(3):765-773, 2011.

3. Naoi, Y., Kishi, K., Tanei, T., Tsunashima, R., Tominaga, N., Baba, Y., Kim, S.J., Taguchi, T., Tamaki, Y., Noguchi, S. Development of 95-gene classifier as a powerful predictor of recurrences in node-negative and ER-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.*, 128(3):633-641, 2011

4. Naoi, Y., Kishi, K., Tanei, T., Tsunashima, R., Tominaga, N., Baba, Y., Kim, S.J., Taguchi, T., Tamaki, Y., Noguchi, S. High genomic grade index associated with poor prognosis for lymph node-negative and estrogen receptor-positive breast cancers and with good response to chemotherapy. *Cancer*, 117(3):472-479, 2011.

5. Naoi, Y., Kishi, K., Tanei, T., Tsunashima, R., Tominaga, N., Baba, Y., Kim, S.J., Taguchi, T., Tamaki, Y., Noguchi, S. Prediction of pathologic complete response to sequential paclitaxel and 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide therapy using a 70-gene classifier for breast cancers. *Cancer*, 117(16):3682-3690, 2011.

6. Nukatsuka, M., Saito, H., Nakagawa, F., Abe, M., Uchida, J., Shibata, J., Matsuo, K., Noguchi, S., Kiniwa, M. Oral fluoropyrimidine may augment the efficacy of aromatase inhibitor via the down-regulation of estrogen receptor in estrogen-responsive breast cancer xenografts. *Breast cancer research and treatment*, 128(2):381-390, 2011.

7. Oshima, K., Naoi, Y., Kishi, K., Nakamura, Y., Iwamoto, T., Shimazu, K., Nakayama, T., Kim, S.J., Baba, Y., Tamaki, Y., Noguchi, S. Gene expression signature of TP53 but not

- its mutation status predicts response to sequential paclitaxel and 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in human breast cancer. *Cancer Lett*, 307(2):149-157, 2011.
8. Tanei, T., Shimomura, A., Shimazu, K., Nakayama, T., Kim, S.J., Iwamoto, T., Tamaki, Y., Noguchi, S. Prognostic significance of Ki67 index after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Surg Oncol.*, 37(2):155-161, 2011.
  9. Yasojima, H., Shimomura, A., Naoi, Y., Kishi, K., Baba, Y., Shimazu, K., Nakayama, T., Kim, S.J., Tamaki, Y., Noguchi, S. Association between c-myc amplification and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Cancer*, 47(12):1779-1788, 2011.
  10. Naoi, Y., Tanei, T., Kishi, K., Tsunashima, R., Tominaga, N., Baba, Y., Nakayama, T., Shimazu, K., Kim, S.J., Tamaki, Y., Noguchi, S. 70-Gene classifier for differentiation between paclitaxel- and docetaxel-sensitive breast cancers. *Cancer Lett.*, 314(2):206-212, 2012.
  11. Yamamoto, N., Nakayama, T., Kajita, M., Miyake, T., Iwamoto, T., Kim, S.J., Sakai, A., Ishihara, H., Tamaki, Y., Noguchi, S. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RARbeta2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay. *Breast Cancer Res Treat.*, 132(1):165-173, 2012.
  12. Tamaki, Y., Sato, N., Homma, K., Takabatake, D., Nishimura, R., Tsujimoto, M., Yoshidome, K., Tsuda, H., Kinoshita, T., Kato, H., Taniyama, K., Kamio, T., Nakamura, S., Akiyama, F., Noguchi, S. Routine clinical use of the one-step nucleic acid amplification assay for detection of sentinel lymph node metastases in breast cancer patients: Results of a multicenter study in Japan. *Cancer*, in press, 2012.
  13. Kim, S.J., Nakayama, S., Shimazu, K., Tamaki, Y., Akazawa, K., Tsukamoto, F., Torikoshi, Y., Matsushima, T., Shibayama, M., Ishihara, H., Noguchi, S. Recurrence risk score based on the specific activity of CDK1 and CDK2 predicts response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide in breast cancers. *Annals Oncol.*, in press, 2012.
  14. Okishiro, M., Kim, S.J., Tsunashima, R., Nakayama, T., Shimazu, K., Shimomura, A., Maruyama, N., Tamaki, Y., Noguchi, S. MDM2 SNP309 and TP53 R72P associated with severe and febrile neutropenia in breast cancer patients treated with 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide. *Breast Cancer Res Treat.*, in press, 2012.
- 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

がん薬物療法に対するバイオマーカー特定とその臨床応用に関する研究

研究分担者 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

胃がん手術例267症例を対象にFGFR2遺伝子増幅を検討し、国内外で初めて4.1%（11例/267例）のFGFR2遺伝子増幅を明らかにした。パラフィン包埋ホルマリン固定サンプルを試料として、定量的PCRベースのCopy number assay がスクリーニングに有用であることを示した。本研究によりFGFR2増幅胃癌に対するFGFR標的治療の臨床導入の可能性を示した。

A. 研究目的

新しいがん薬物療法として、FGFR標的治療の臨床導入が期待されている。我々は、FGFR阻害薬がFGFR2増幅胃癌細胞株に著効することおよび胃癌へのFGFR標的治療の導入の可能性について基礎研究を報告してきた。本研究ではFGFR標的治療の臨床導入にあたり、胃癌臨床検体でのFGFR2増幅の頻度およびハイスループットなスクリーニング法の開発を目的として研究を行った。

B. 研究方法

がん研究センター中央病院の胃がん手術例267症例を対象とし、FFPE（パラフィン包埋ホルマリン固定）サンプルからマクロダイセクションでDNAを抽出した。そのDNAに対し、qPCRベースのCopy number assay を用いてDNAコピー数検討を行った。

（倫理面への配慮）

臨床サンプルの解析は当該施設の倫理委員会の承認を得たのち臨床研究に関する倫理指針に準じ実施した。

C. 研究結果

本研究において、国内外で初めて臨床検体におけるFGFR2の遺伝子増幅胃癌症例の存在を示した。FGFR2の遺伝子増幅は4.1%（11例/267例）の胃癌症例で検出された。10コピー以上の高度遺伝子増幅例は、2%以上にあたる6例が特定された。FGFR2コピー数の増加は、FGFR2に対するFISHでも確認され、結果は完全に一致していた。FGFR2増幅胃癌の臨床背景因子としては、術後生存期間が予後不良の傾向であることが明らかになった（ $p=0.075$ ）。病理組織学的には低分化型のみと考えられていたが、分化型の胃癌も一部混じっていること（3例/11例）を明らかにした。

D. 考察

実際の臨床検体においてFGFR2の遺伝子増幅は4.1%存在することを示したが、FGFR2増幅をバイオマーカーとして症例選択を行うことにより、胃癌へのFGFR標的

治療の導入が可能になることが示された。

現在までほとんど解析不可能であったパラフィン包埋サンプルに対して、安定して遺伝子増幅が検出できる定量的PCRベースの解析方法のcopy number assayを開発した。この方法は簡便でスループット性が高い点等からFFPEサンプルに対してきわめて有効なことを示した。

E. 結論

臨床検体におけるFGFR2の遺伝子増幅胃癌症例の存在を示し、FGFR2増幅胃癌に対するFGFR標的治療の臨床導入の可能性を示した。Copy number assayは、分子標的治療の対象症例（FGFR2遺伝子増幅胃癌）の選択における有用なバイオマーカー測定法となり得ることを示した。

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. Matsumoto, K., Arao, T., Hamaguchi, T., Shimada, Y., Kato, K., Oda, I., Taniguchi, H., Koizumi, F., Yanagihara, K., Sasaki, H., Nishio, K., Yamada, Y. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. Br J Cancer, 106(4):727-32, 2012.
2. Kaneda, H., Okamoto, I., Sakai, K., Tanizaki, J., Takeda, M., Nishio, K., Nakagawa, K. Marked response to both S-1 and pemetrexed in a patient with echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase-positive lung adenocarcinoma. Acta Oncol., E-pub ahead of print, 2012.

3. Aomatsu, K., Arao, T., Abe, K., Kodama, A., Sugioka, K., Matsumoto, K., Kudo, K., Kimura, H., Fujita, Y., Hayashi, H., Nagai, T., Shimomura, Y., Nishio, K. Slug is upregulated during wound healing and regulates cellular phenotypes in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 53(2):751-6, 2012.
4. Tanaka, K., Arao, T., Tamura, D., Aomatsu, K., Furuta, K., Matsumoto, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Kimura, H., Yanagihara, K., Yamada, Y., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K. SRPX2 is a novel chondroitin sulfate proteoglycan that is overexpressed in gastrointestinal cancer. *Plos One*, 7(1):e27922, 2012.
5. Matsuoka, H., Arao, T., Makimura, C., Takeda, M., Kiyota, H., Tsurutani, J., Fujita, Y., Matsumoto, K., Kimura, H., Otsuka, M., Koyama, A., Imamura, CK., Tanigawara, Y., Yamanaka, T., Tanaka, K., Nishio, K., Nakagawa, K. Expression changes in arrestin  $\beta 1$  and genetic variation in catechol-O-methyltransferase are biomarkers for the response to morphine treatment in cancer patients. *Oncol Rep.*, 27(5):1393-9, 2012.
6. Tanizaki, J., Okamoto, I., Takezawa, K., Sakai, K., Azuma, K., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Hatashita, E., Nishio, K., Janne, PA., Nakagawa, K. Combined effect of ALK and MEK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small-cell lung cancer cells. *Br J Cancer*, 106(4):763-7, 2012.
7. Makimura, C., Arao, T., Matsumoto, K., Takeda, M., Kiyota, H., Tsurutani, J., Fujita, Y., Matsumoto, K., Kimura, H., Otsuka, M., Koyama, A., Imamura, CK., Yamanaka, T., Nishio, K., Nakagawa, K. Prospective study evaluating the plasma concentrations of twenty-six cytokines and response to morphine treatment in cancer patients. *Anticancer Res.*, 31(12):4561-8, 2011.
8. Sakamoto, H., Kimura, H., Sekijima, M., Matsumoto, K., Arao, T., Chikugo, T., Yamada, Y., Kitano, M., Ito, A., Takeyama, Y., Kudo, M., Nishio, K. Plasma concentrations of angiogenesis-related molecules in patients with pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol.*, 42(2):105-12, 2012.
9. Arao, T., Matsumoto, K., Megawa, M., Nishio, K. What can and cannot be done using a microarray analysis? Treatment stratification and clinical applications in oncology. *Biol Pharm Bull.*, 34(12):1789-93, 2011.
10. Murakami, H., Tamura, T., Takahashi, T., Nokihara, H., Naito, T., Nakamura, Y., Nishio, K., Seki, Y., Sarashina, A., Shahidi, M., Yamamoto, N. Phase I study of continuous afatinib (BIBW2992) in patients with advanced non-small cell lung cancer after prior chemotherapy/erlotinib/gefitinib (LUX-Lung 4). *Cancer Chemother Pharmacol.*, E-pub ahead of print, 2011.
11. Takeda, M., Okamoto, I., Sakai, K., Tanaka, K., Terashima, M., Nishio, K., Nakagawa, K. Successful long-term treatment with pemetrexed of NSCLC associated with EML4-ALK and low thymidylate synthase expression. *Clin Lung Cancer*, 13(2):157-9, 2012.
12. Furuta, K., Arao, T., Sakai, K., Kimura, H., Nagai, T., Tamura, D., Aomatsu, K., Kudo, K., Kaneda, H., Fujita, Y., Matsumoto, K., Yamada, Y., Yanagihara, K., Sekijima, M., Nishio, K. Integrated analysis of whole genome exon array and array-comparative genomic hybridization in gastric and colorectal cancer cells. *Cancer Sci.*, 103(2):221-7, 2012.
13. Nishio, M., Yamanaka, T., Matsumoto, K., Kimura, H., Sakai, K., Sakai, A., Sone, T., Horiike, A., Koizumi, F., Kasahara, K., Ohira, T., Ikeda, N., Saijo, N., Arao, T., Nishio, K. Serum heparan sulfate concentration is correlated with the failure of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.*, 6(11):1889-94, 2011.
14. Fujita, Y., Islam, R., Kaneda, H., Kudo, K., Tamura, D., Aomatsu, K., Nagai, T., Kimura, H., Matsumoto, K., Velasco, MA., Arao, T., Okawara, T., Nishio, K. Aza-derivatives of resveratrol are potent

- macrophage migration inhibitory factor inhibitors. *Invest New Drugs*, E-pub ahead of print, 2011.
15. Goto, K., Ichinose, Y., Ohe, Y., Yamamoto, N., Negoro, S., Nishio, K., Itoh, Y., Jiang, H., Duffield, E., McCormack, R., Saijo, N., Mok, T., Fukuoka, M. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.*, 7(1):115-21, 2012.
  16. Yonesaka, K., Zejmullahu, K., Okamoto, I., Satoh, T., Cappuzzo, F., Souglakos, J., Ercan, D., Rogers, A., Roncalli, M., Takeda, M., Fujisaka, Y., Philips, J., Shimizu, T., Maenishi, O, Cho, Y., Sun, J., Destro, A., Taira, K., Takeda, K., Okabe, T., Swanson, J., Shivdasani, RA., Nishio, K., Fukuoka, M., Verella-Garcia, M., Nakagawa, K., Janne, PA. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med.*, 3(99):99ra86, 2011.
  17. Kaneda, H., Arao, T., Matsumoto, K., Velasco, MA., Tamura, D., Aomatsu, K., Kudo, K., Sakai, K., Nagai, T., Fujita, Y., Tanaka, K., Yanagihara, K., Yamada, Y., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K. Activin a inhibits vascular endothelial cell growth and suppresses tumor angiogenesis in gastric cancer. *Br J Cancer*, 5(8):1210-7, 2011.
  18. Arao, T., Matsumoto, K., Furuta, K., Kudo, K., Kaneda, H., Nagai, T., Sakai, K., Fujita, Y., Tamura, D., Aomatsu, K., Koizumi, F., Nishio, K. Acquired drug resistance to vascular endothelial growth factor receptor 2 tyrosine kinase inhibitor in human vascular endothelial cells. *Anticancer Res.*, 31(9):2787-96, 2011.
  19. Okamoto, W., Okamoto, I., Arao, T., Yanagihara, K., Nishio, K., Nakagawa, K. Differential roles of STAT3 depending on the mechanism of STAT3 activation in gastric cancer cells. *Br J Cancer*, 105(3): 407-12, 2011.
  20. Kodera, Y., Katanasaka, Y., Kitamura, Y., Hitoshi, T., Nishio, K., Tamura, T., Koizumi, F. Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3. *Breast Cancer Res.*, 13(3):R66, 2011.
  21. Tanizaki, J., Okamoto, I., Fumita, S., Okamoto, W., Nishio, K., Nakagawa, K. Roles of BIM induction and survivin downregulation in lapatinib-induced apoptosis in breast cancer cells with HER2 amplification. *Oncogene*, 30(39):4097-106, 2011.
  22. Takezawa, K., Okamoto, I., Okamoto, W., Takeda, M., Sakai, K., Tsukioka, S., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Nishio, K., Nakagawa, K. Thymidylate synthase as a determinant of perimetrex sensitivity in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 104(10):1594-601, 2011.
  23. Takezawa, K., Okamoto, I., Nishio, K., Janne, P., Nakagawa, K. Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathways in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res.*, 17(8):2140-8, 2011.
  24. Azuma, K., Tsurutani, J., Sakai, K., Kaneda, H., Fujisaka, Y., Takeda, M., Watatani, M., Arao, T., Satoh, T., Okamoto, I., Kurata, T., Nishio, K., Nakagawa, K. Switching addictions between HER2 and FGFR2 in HER2-positive breast tumor cells: FGFR2 as a potential target for salvage after lapatinib failure. *Biochem Biophys Res Commun.*, 407(1):219-24, 2011.
  25. Yamada, K., Yamamoto, N., Yamada, Y., Nokihara, H., Fujiwara, Y., Hirata, T., Koizumi, F., Nishio, K., Koyama, N., Tamura, T. Phase I dose escalation study and biomarker analysis of E7080 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.*, 17(8):2528-37, 2011.
  26. Kato, H., Nishimura, T., Ikeda, N., Yamada, T., Kondo, T., Saijo, N., Nishio, K., Fujimoto, J., Nomura, M., Oda, Y., Lindmark, B., Maniwa, J., Hibino, H., Unno, M., Ito, T., Sawa, Y., Tojo, H., Egawa, S., Edula, G., Lopez, M., Wigmore, M., Inase,

N., Yoshizawa, Y., Nomura, F., Marko-Varga, G. Developments for a growing Japanese patient population: Facilitating new technologies for future health care. J Proteomics, 74(6):759-64, 2011.

27. Kashiwagi, E., Izumi, H., Yasuniwa, Y., Baba, R., Doi, Y., Kidani, A., Arao, T., Nishio, K., Naito, S., Kohno, K. Enhanced expression of nuclear factor I/B in oxaliplatin-resistant human cancer cell lines. Cancer Sci., 102(2):382-6, 2011.
28. Aomatsu, K., Arao, T., Sugioka, K., Matsumoto, K., Tamura, D., Kudo, K., Kaneda, H., Tanaka, K., Fujita, Y., Shimomura, Y., Nishio, K. TGF- $\beta$  induces sustained up-regulation of SNAI1 and SNAI2 through Smad and non-Smad pathways in a human corneal epithelial cell line. Invest Ophthalmol Vis Sci., 52(5):2437-43, 2011.

#### H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

- ソラフェニブの効果予測方法、西尾和人 他3名、特願2011-104275、2011年5月9日出願

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	Sekine, I., Sumi, M., Ito, Y., Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Kubota, K., <u>Tamura, T.</u>	Phase I study of concurrent high-dose three-dimensional conformal radiotherapy with chemotherapy using cisplatin and vinorelbine for unresectable stage III non-small-cell lung cancer.	Int J Radiat Oncol Biol Phys.	82(2)	953-959	2012
2	Asahina, H., Sekine, I., Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kubota, K., <u>Tamura, T.</u>	Retrospective Analysis of Third-Line and Fourth-Line Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer.	Clin Lung Cancer	13(1)	39-43	2012
3	Watari, K., Nakamura, M., Fukunaga, Y., Furuno, A., Shibata, T., Kawahara, A., Hosoi, F., Kuwano, T., <u>Kuwano, M.</u> , and Ono, M.	The antitumor effect of a novel angiogenesis inhibitor (an octahydronaphthalene derivative) targeting both VEGF receptor and NF- $\kappa$ B pathway.	Int J.Cancer,		in press	2012
4	Azuma, K., Kawahara, A., Hattori, S., Taira, T., Tsurutani, J., Watari, K., Shibata, T., Murakami, Y., Takamori, S., Ono, M., Izumi, H., Kage, M., Yanagawa, T., Nakagawa, K., Hoshino, T., <u>Kuwano, M.</u>	NDRG1/Cap43/Drg-1 may predict tumor angiogenesis and poor outcome in patients with lung cancer.	J Thorac Oncol.		in press	2012
5	Kawanobe, T., Kogure, S., Nakamura, S., Sato, M., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Noguchi, K., <u>Sugimoto, Y.</u>	Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines.	Biochem. Biophys. Res. Commun.,	418(4)	736-741	2012
6	<u>Okamoto, I.</u> , Shimizu, T., Miyazaki, M., Tsurutani, J., Ichikawa, Y., Terashima, M., Takeda, M., Fumita, S., Ohki, E., Kimura, N., Hashimoto, J., Nakagawa, K.	Feasibility study of two schedules of sunitinib in combination with pemetrexed in patients with advanced solid tumors.	Investigational New Drugs.,	30(2)	639-646	2012

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

7	Takeda, M., <u>Okamoto, I.</u> , Sakai, K., Tanaka, K., Terashima, M., <u>Nishio, K.</u> , Nakagawa, K.	Successful long-term treatment with pemetrexed of NSCLC associated with EML4-ALK and low thymidylate synthase expression.	Clinical Lung Cancer.,	13(2)	157-159	2012
8	Okamoto, K., <u>Okamoto, I.</u> , Hatashita, E., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Kita, A., Yamanaka, K., Ono, M., Nakagawa., K.	Overcoming Erlotinib Resistance in EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Targeting Survivin.	Molecular Cancer Therapeutics	11(1)	204-213	2012
9	Naoi, Y., Tanei, T., Kishi, K., Tsunashima, R., Tominaga, N., Baba, Y., Nakayama, T., Shimazu, K., Kim, S.J., Tamaki, Y., <u>Noguchi, S.</u>	70-Gene classifier for differentiation between paclitaxel- and docetaxel-sensitive breast cancers.	Cancer Lett	314(2)	206-212	2012
10	Yamamoto, N., Nakayama, T., Kajita, M., Miyake, T., Iwamoto, T., Kim, S.J., Sakai, A., Ishihara, H., Tamaki, Y., <u>Noguchi, S.</u>	Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RARBeta2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay.	Breast Cancer Res Treat	132(1)	165-173	2012
11	Tamaki, Y., Sato, N., Homma, K., Takabatake, D., Nishimura, R., Tsujimoto, M., Yoshidome, K., Tsuda, H., Kinoshita, T., Kato, H., Taniyama, K., Kamio, T., Nakamura, S., Akiyama, F., <u>Noguchi, S.</u>	Routine clinical use of the one-step nucleic acid amplification assay for detection of sentinel lymph node metastases in breast cancer patients: Results of a multicenter study in Japan.	Cancer		in press	2012
12	Kim, S.J., Nakayama, S., Shimazu, K., Tamaki, Y., Akazawa, K., Tsukamoto, F., Torikoshi, .Y., Matsushima, T., Shibayama, M., Ishihara, H., <u>Noguchi, S.</u>	Recurrence risk score based on the specific activity of CDK1 and CDK2 predicts response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide in breast cancers.	Annals Oncol		in press	2012



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

13	Okishiro, M., Kim, S.J., Tsunashima, R., Nakayama, T., Shimazu, K., Shimomura, A., Maruyama, N., Tamaki, Y., <u>Noguchi, S.</u>	MDM2 SNP309 and TP53 R72P associated with severe and febrile neutropenia in breast cancer patients treated with 5-FU/epirubicin/ cyclophosphamide.	Breast Cancer Res Treat		in press	2012
14	Aomatsu, K., Arao, T., Abe, K., Kodama, A., Sugioka, K., Matsumoto, K., Kudo, K., Kimura, H., Fujita, Y., Hayashi, H., Nagai, T., Shimomura, Y., <u>Nishio, K.</u>	Slug is upregulated during wound healing and regulates cellular phenotypes in corneal epithelial cells.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	53(2)	751-756	2012
15	Tanaka, K., Arao, T., Tamura, D., Aomatsu, K., Furuta, K., Matsumoto, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Kimura, H., Yanagihara, K., Yamada, Y., <u>Okamoto, I.</u> , Nakagawa, K., <u>Nishio, K.</u>	SRPX2 is a novel chondroitin sulfate proteoglycan that is overexpressed in fastrointestinal cancer.	Plos One	7(1)	e27922	2012
16	Matsumoto, K., Arao, T., Hamaguchi, T., Shimada, Y., Kato, K., Oda, I., Taniguchi, H., <u>Koizumi, F.</u> , Yanagihara, K., Sasaki, H., <u>Nishio, K.</u> , Yamada, Y.	FGFR2 gene amplification and clinicopathological featuers in gastric cancer.	Br J Cancer	106(4)	727-732	2012
17	Tanizaki, J., <u>Okamoto, I.</u> , Takezawa, K., Sakai, K., Azuma, K., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Hatashita, E., <u>Nishio, K.</u> , Janne, PA., Nakagawa, K.	Combined effect of ALK and MEK inhibotors in EML4-ALK-positive non-small-cell lung cancer cells.	Br J Cancer	106(4)	763-767	2012

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

18	Murakami, H., <u>Tamura, T.</u> , Takahashi, T., Nokihara, H., Naito, T., Nakamura, Y., <u>Nishio, K.</u> , Seki, Y., Sarashina, A., Shahidi, M., Yamamoto, N.	Phase I study of continuous afatinib (BIBW2992) in patients with advanced non-small cell lung cancer after prior chemotherapy/erlotinib/gefitinib (LUX-Lung 4).	Chemother Pharmacol.	69(4)	891-899	2012
19	Furuta, K., Arao, T., Sakai, K., Kimura, H., Nagai, T., Tamura, D., Aomatsu, K., Kudo, K., Kaneda, H., Fujita, Y., Matsumoto, K., Yamada, Y., Yanagihara, K., Sekijima, M., <u>Nishio, K.</u>	Integrated analysis of whole genome exon array and array-comparative genomic hybridization in gastric and colorectal cancer cells.	Cancer Sci.	103(2)	221-227	2012
20	Goto, K., Ichinose, Y., Ohe, Y., Yamamoto, N., Negoro, S., <u>Nishio, K.</u> , Itoh, Y., Jiang, H., Duffield, E., McCormack, R., Saijo, N., Mok, T., Fukuoka, M.	Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer.	J Thorac Oncol.	7(1)	115-121	2012
21	Azuma, K., <u>Okamoto, I.</u> , Kawahara, A., Taira, T., Nakashima, K., Hattori, S., Kinoshita, T., Takeda, M., Nakagawa, K., Takamori, S., <u>Kuwano, M.</u> , Ono, M., Kage, M.	Association of the expression of mutant epidermal growth factor receptor protein as determined with mutation-specific antibodies in non-small cell lung cancer with progression-free survival aftergefitinib treatment.	J Thorac Oncol.	7(1)	122-127	2012
22	Kodera, Y., Katanasaka, Y., Kitamura, Y., Tsuda, H., <u>Nishio, K.</u> , <u>Tamura, T.</u> , <u>Koizumi, F.</u>	Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3.	Breast Cancer Res.	13(3)	R66	2011
23	Taguchi, F., Kodera, Y., Katanasaka, Y., Yanagihara, K., <u>Tamura, T.</u> , <u>Koizumi, F.</u>	Efficacy of RAD001 (everolimus) against advanced gastric cancer with peritoneal dissemination.	Invest New Drugs	29(6)	1198-12 05	2011

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

24	Sekine, I., Kubota, K., Tamura, Y., Asahina, H., Yamada, K., Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., <u>Tamura, T.</u>	Innovator and generic cisplatin formulations: comparison of renal toxicity.	Cancer Sci.	102(1)	162-165	2011
25	Furugen, M., Sekine, I., Tsuta, K., Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kubota, K., <u>Tamura, T.</u>	Combination chemotherapy with carboplatin and paclitaxel for advanced thymic cancer.	Jpn J Clin Oncol.	41(8)	1013-10 16	2011
26	Yoshida, H., Sekine, I., Tsuta, K., Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kubota, K., <u>Tamura, T.</u>	Amrubicin monotherapy for patients with previously treated advanced large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung.	Jpn J Clin Oncol.	41(7)	897-901	2011
27	Sato, Y., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., <u>Minami, H.</u> , Laird, NM., Katori, N., Saito, Y., Ohnami, S., Sakamoto, H., Sawada, J., Saijo, N., Yoshida, T., <u>Tamura, T.</u>	Genome-wide association study detected candidate polymorphisms associated with overall survival in advanced non-small cell lung cancer treated with carboplatin and paclitaxel.	J Thorac Oncol.	6(1)	132-138	2011
28	Okamura, A., Yakushijin, K., Inui, Y., Funakoshi, Y., Kawamori, Y., Shimada, T., Toyoda, M., Chayahara, N., Kiyota, N., Fujiwara, Y., Mukohara, T., Matsuoka, H., Yamamoto, K., <u>Minami, H.</u>	Successful neutrophil engraftment by reduced use of granulocyte colony-stimulating factor after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with mycophenolate mofetil for greft-versus- host disease prophylaxis.	Int J Hematol	93 (6)	765-770	2011
29	Tahara, M., <u>Minami, H.</u> , Hasegawa, Y., Tomita, K., Watanabe, A., Nibu, K., Fujii, M., Onozawa, Y., Kurono, Y., Sagae, D., Seriu, T., Tsukuda, M.	Weekly paclitaxel in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer.	Cancer Chemother Pharmacol.	68(3)	769-776	2011

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

30	Yamamoto, K., Matsuoka, H., Yakushijin, K., Funakoshi, Y., Okamura, A., Hayashi, Y., <u>Minami, H.</u>	A novel five-way translocation, t(3;9;13;8;14)(q27;p13;q32;q24;q32), with concurrent <i>MYC</i> and <i>BCL6</i> rearrangements in primary bone marrow B-cell lymphoma.	Cancer Genetics	204(9)	501-506	2011
31	Tahara, M., Araki, K., Okano, S., Kiyota, N., Fuse, N., Minashi, K., Yoshino, T., Doi, T., Zenda, S., Kawashima, M., Ogino, T., Hayashi, R., <u>Minami, H.</u> , Ohstu, A.	Phase I trial of combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin and S-1 (TPS) in patients with locally advanced or recurrent/metastatic head and neck cancer (HNC).	Ann Oncol.	22(1)	175-180	2011
32	Tahara, M., <u>Minami, H.</u> , Kawashima, M., Kawada, K., Mukai, H., Sakuraba, M., Matsuura, K., Ogino, T., Hayashi, R., Ohtsu, A.	Phase I trial of chemoradiotherapy with the combination of S-1 plus cisplatin for patients with unresectable locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck.	Cancer Sci.	102 (2)	419-424	2011
33	Yamamoto, K., Matsuoka, H., Funakoshi, Y., Yakushijin, K., Okamura, A., Itoh, T., <u>Minami, H.</u>	A novel dicentric chromosome, dic(9;9)(p12;q34), leading to trisomy 9 in follicular lymphoma without t(14;18).	Leukemia Res. (Letter)	35 (7)	e100-103	2011
34	Yamamoto, K., Yakushijin, K., Funakoshi, Y., Inui, Y., Okamura, A., Matsuoka, H., <u>Minami, H.</u>	Biallelic <i>ETV6</i> rearrangements by recurrent translocations t(7;12)(p15;p13) and t(3;12)(q26.2;p13) in acute myeloid leukemia.	Leukemia Res.	35(11)	e212-214	2011
35	Kataoka, Y., Mukohara, T., Tomioka, H., Funakoshi, Y., Kiyota, N., Fujiwara, Y., Yashiro, M., Hirakawa, K., Hirai, M., <u>Minami, H.</u>	Foretinib (GSK1363089), a multi-kinase inhibitor of MET and VEGFRs, inhibits growth of gastric cancer cell lines by blocking inter-receptor tyrosine kinase networks.	Invest New Drugs		in press	2011
36	Uramoto, H., Shimokawa, H., Hanagiri, T., <u>Kuwano, M.</u> , Ono, M.	Expression of selected gene for acquired drug resistance to EGFR-TKI in lung adenocarcinoma.	Lung Cancer	73(3)	361-365	2011