

甲状腺低分化・未分化癌細胞における新規分子標的薬 lapatinib と抗癌化学療法剤の併用効果

惣田 麻衣

【目的】治療に難渋する甲状腺低分化・未分化癌細胞における新規分子標的薬 lapatinib (Lap) の抗腫瘍活性ならびに抗癌化学療法剤との併用効果を検討した。

【材料と方法】当教室で樹立された3種類の甲状腺癌細胞株(低分化乳頭癌細胞株 KTC-1, 未分化癌細胞株 KTC-2, KTC-3)を用いた。Lap 及び抗癌化学療法剤 (5-fluorouracil [FU], doxorubicin [Dox], paclitaxel [Pac], SN-38, cisplatin [Cis], etoposide [Eto], Cis+Eto) を単剤または併用投与し, 細胞増殖, 細胞周期, アポトーシス誘導, アポトーシス関連因子発現に与える影響を調べた。

【結果】Lap は, いずれの細胞株においても用量依存性に増殖抑制 (50%増殖阻止濃度: KTC-1 細胞株 5.0 μ M, KTC-2 細胞株 3.4 μ M, KTC-3 細胞株 3.5 μ M) とアポトーシス誘導を起こした。Lap は, KTC-1 細胞株では SN-38, Cis, Eto, Cis+Eto と, KTC-2 細胞株では Cis+Eto と, KTC-3 細胞株では Dox, Pac と相加的な増殖抑制効果を示した。KTC-1 細胞株において Cis+Eto と Lap の併用は, 相加的に survivin の蛋白発現低下とアポトーシス誘導を起こした。

【結論】新規分子標的薬 Lap は, 甲状腺低分化・未分化癌細胞に対して, アポトーシスを誘導し抗腫瘍活性を示した。Lap は抗癌化学療法剤の種類によっては, 相加的な抗腫瘍効果が認められた。甲状腺低分化・未分化癌の治療に Lap が有用なことが示唆された。

(平成20年9月2日受理)

Combined Antitumor Effects of A New Molecular Targeting Agent Lapatinib with Chemotherapeutic Agents in Poorly Differentiated and Undifferentiated Thyroid Cancer Cells

Mai SOHDA

【Subjective】

Poorly differentiated and undifferentiated thyroid cancers are resistant to various therapies. Antitumor activity of a new molecular targeting agent lapatinib (Lap) alone and its combination with chemotherapeutic agents were investigated in poorly differentiated and undifferentiated thyroid cancer cells.

【Materials and Methods】

Three thyroid cancer cell lines (KTC-1 poorly differentiated papillary thyroid cancer cell line, and

Table 1. 甲状腺癌細胞株の特徴

細胞株	KTC-1	KTC-2	KTC-3
組織型	低分化乳頭癌	未分化癌	未分化癌
増殖形態	単層	単層	単層
倍化時間(時間)	48	36	24
染色体数	46, XY	102-124 (最頻値 109)	140-151 (最頻値 146)
サイログロブリン発現	弱	弱	弱

cisplatin (Cis), etoposide (Eto) はシグマケミカル社 (St. Louis, MI, USA) より購入した。SN-38 (塩酸イリノテカンの活性代謝産物) は第一製薬株式会社 (東京) より供与を受けた。Lap 及び抗癌化学療法剤は, dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解し, 最終濃度が0.3%以下になるように添加した。

3) 細胞培養

薬剤の細胞増殖への影響を調べる実験では, 各細胞株を 1×10^5 個/well に調整し, 12穴プレート (SB Medical 社, 東京) に播種した。まず, RPMI1640培地 (シグマケミカル社) に10%牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS; ICN Biochemicals Japan 社, 大阪) を加えた培養液で, 2日間, 37°C, 5% CO₂ 下で培養した。その後, 培地を除去し, 各wellを phosphate-buffer saline (PBS) で洗浄後, フェノールレッド無添加 RPMI1640培地 (シグマケミカル社) に2%活性炭処理 FBS (Hyclone, UT, USA) を添加した培地 (内因性のステロイドホルモンや増殖因子を減らした培地) に0~10 µM濃度の Lap ± 各種抗癌化学療法剤を加えた培地で3日間培養した。抗癌化学療法剤は臨床的に達成可能な濃度を考慮し, 通常投与量の最高血中濃度前後の濃度を添加した。

4) 細胞数測定

0.05%トリプシン/0.02% EDTA入り PBS を用い約10分間細胞を分散, 攪拌後, Coulter counter (Coulter Electronics, Harpenden, UK) を用いて細胞数を計測した。コントロールの well には, 最終濃度が薬剤処理群と同じになるように DMSO を加えた。コントロール及び薬剤処理群は triplicate で細胞数を計測した。再

現性をみるため, 2回以上同様の実験を行った。

5) 細胞周期解析

各細胞株を 2×10^5 個/well に調整し, 6穴プレート (SB Medical) に播種した。まず, RPMI1640培地 + 10% FBS 培地で2日間, 37°C, 5% CO₂ 下で培養した。その後, 培地を除去し, 各wellを PBS で洗浄後, フェノールレッド無添加 RPMI1640 + 2%活性炭処理 FBS + 2 µM Lap ± 各種濃度の抗癌化学療法剤を加えた培地で3日間培養した。0.05%トリプシン/0.02% EDTA入り PBS で細胞を分散し, 直ちに細胞周期解析を行った。回収した細胞を Cycle Test Plus DNA Reagent kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を用い, propidium iodide で DNA を染色後, FACS Caliber (Becton Dickinson) で flow cytometry を施行した。DNA ヒストグラムは CELL Quest version 1.2.2 (Becton Dickinson) を用い分析した⁴⁾。再現性をみるため, 2回以上同様の実験を行った。

6) アポトーシス分析

回収した細胞を *in situ* cell death detection kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて処理し, FACS Caliber (Becton Dickinson) で分析した⁴⁾。

7) ウエスタンブロット法

回収した細胞を PBS で洗浄後, 200 µl/well の冷却した RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholic acid sodium, 0.05% SDS) に 4 µl/well のプロテアーゼ阻害剤 (シグマケミカル社) を加えて溶解し, 10分間, 4°C, 14,000×g で遠心分離を行い, 上清を回収した。採取した蛋白約 20-30 µg を 95°C, 5分間, Laemmli gel

Table 2. 定量 RT-PCR で用いたプライマー配列とプロダクトサイズ

標的分子	プライマー配列
GAPDH	forward 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'
	reverse 5'-CTAGAAGCATTTCGCGTGGACGACGGAGGG-3'
	サイズ : 661-bp
Bcl-2	forward 5'-ACTTGTGGCCCAGATAGGCACCCAG-3'
	reverse 5'-CGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG-3'
	サイズ : 389-bp
Bax	forward 5'-AAGAAGCTGAGCGAGTGTCTC-3'
	reverse 5'-TGTCCAGCCCATGATGGTTCT-3'
	サイズ : 252-bp
survivin	forward 5'-GGACCACCGCATCTCTACAT-3'
	reverse 5'-GACAGAAAGGAAAGCGCAAC-3'
	サイズ : 223-bp

loading buffer で熱処理後, 12.5% polyacrylamide gel (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) に注入し電気泳動を行い, nitrocellulose membranes (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK) に転写した。

1次抗体として, 抗 survivin マウスモノクローナル IgG2a 抗体 (Purified clone 60.11; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), 抗 Bcl-2 マウスモノクローナル IgG1 抗体 (sc-7382; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 抗 BAX マウスモノクローナル IgG1 抗体 (sc-7382; Santa Cruz Biotechnology), 内部標準として抗 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) マウスモノクローナル抗体 (CHEMICON, Temecula, CA, USA) を用いた。各々の1次抗体に合わせ horseradish peroxidase 結合2次抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を反応させ, ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Life Sciences) を用い発色させた。検索遺伝子の蛋白発現量は, GAPDH

のバンドの濃度と比較した⁴⁾。再現性をみるため, 2回以上同様の実験を行った。

8) 定量 real time reverse transcription (RT) - polymerase chain reaction (PCR) 法

内部標準遺伝子として GAPDH, 標的遺伝子として抗アポトーシス遺伝子 Bcl-2 と survivin, アポトーシス誘導遺伝子 Bax を検討した。RT-PCR は SYBR Premix Ex Taq (TAKARA BIO, Inc., LA, CA, USA) を用いて行った。プライマーの配列及びプロダクトサイズを Table 2 に示す。

9) 統計学的処理

計測データは, MS エクセル及び StatView ソフトウェアを用い統計学的処理を行い, 平均値±標準誤差で表示した。連続変数の群間比較は, 分散分析を用いた。P 値が0.05未満を統計学的有意差と判定した。

【結 果】

① Lap 単剤の抗腫瘍効果

Lap 単独処理は、いずれの細胞株においても用量依存性に増殖抑制効果を示した。50%増殖阻止濃度 (inhibitory concentration, IC) は、KTC-1 細胞株で $5.0 \mu\text{M}$ 、KTC-2 細胞株で $3.4 \mu\text{M}$ 、KTC-3 細胞株で $3.5 \mu\text{M}$ であった (Fig. 1)。通常投与量の Lap の血中トラフ値は約 $2 \mu\text{M}$ と報告されており、3 細胞株の 50% IC はそれより高かった。各細胞株における HER1/HER2 の発現量と 50% IC との間に相関は認められな

かった⁴⁾。

②各種抗癌剤との併用効果

Lap の濃度は血中トラフ値を参考に $2 \mu\text{M}$ を用いた。また、各種抗癌剤の濃度も Lap と同様に、臨床例で報告されている最高血中濃度を参考にその前後の濃度を用いた。3 種類の甲状腺癌細胞株に対する化学療法剤単独と Lap 併用投与時の増殖阻止曲線を Figures 2-8 に示す。

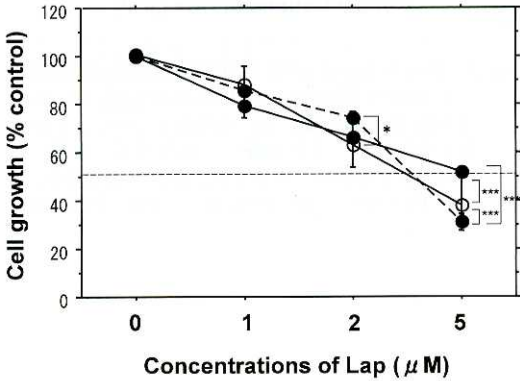


Fig. 1. Lap 単独処理時の細胞増殖抑制効果：●—●, KTC-1 細胞株；●---●, KTC-2 細胞株；○—○, KTC-3 細胞株；平均値 (○または●) ± 標準誤差 (縦棒, 小さい時は平均値のフォント内に隠れて見えない) (* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$)

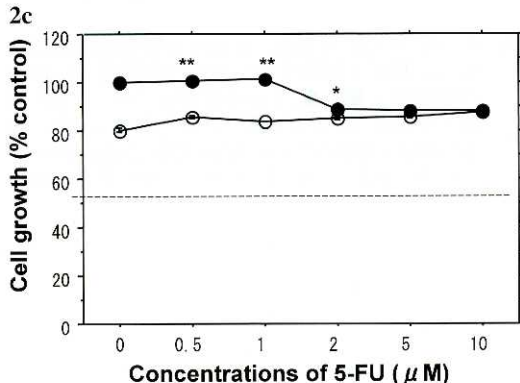
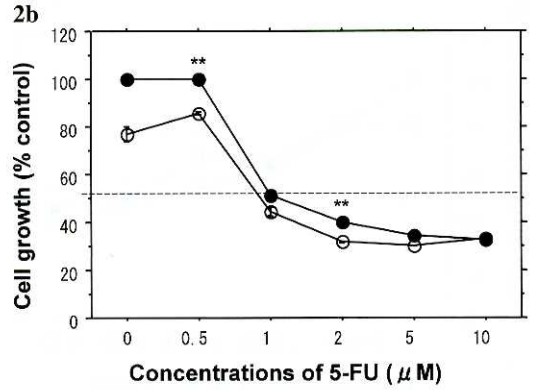
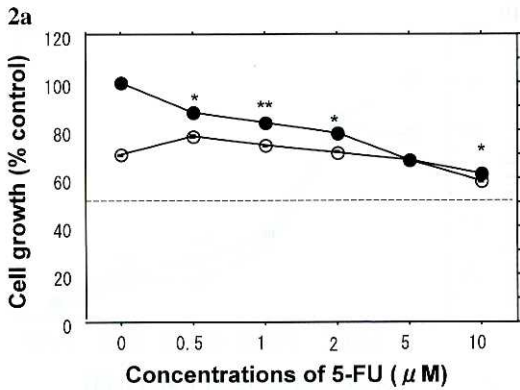


Fig. 2. 5-FU と Lap ($2 \mu\text{M}$) 併用時の細胞増殖抑制効果：a, KTC-1 細胞株；b, KTC-2 細胞株；c, KTC-3 細胞株；●—●, Lap 非添加；○—○, Lap 添加；平均値 (○または●) ± 標準誤差 (縦棒, 小さい時は平均値のフォント内に隠れて見えない) (* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$)

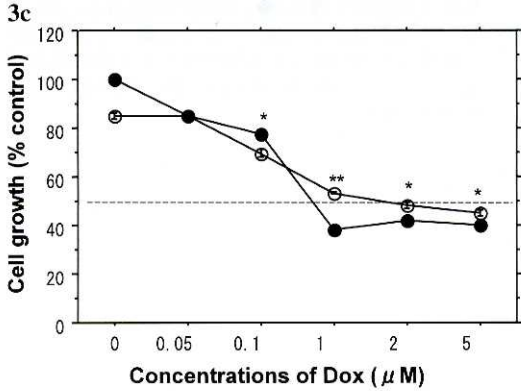
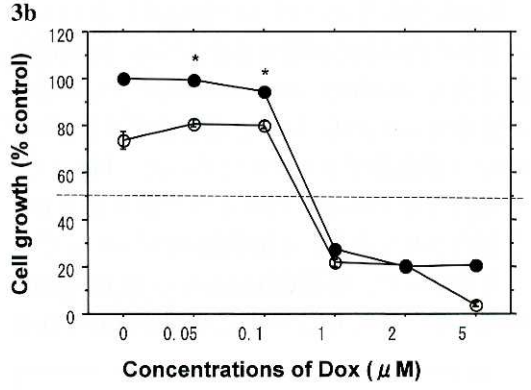
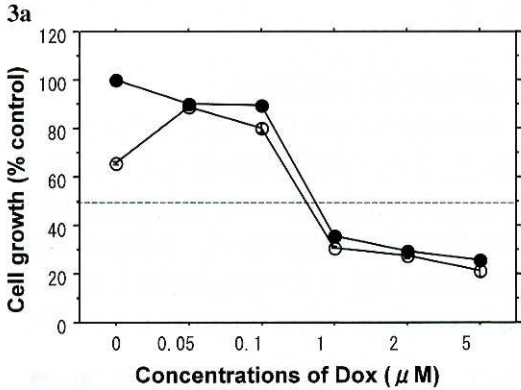


Fig. 3. Dox と Lap (2 μM) 併用時の細胞増殖抑制効果 : a, KTC-1 細胞株 ; b, KTC-2 細胞株 ; c, KTC-3 細胞株 ; ●—●, Lap 非添加 ; ○—○, Lap 添加 ; 平均値 (○または●) ± 標準誤差 (縦棒, 小さい時は平均値のフォント内に隠れて見えない) (* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001)

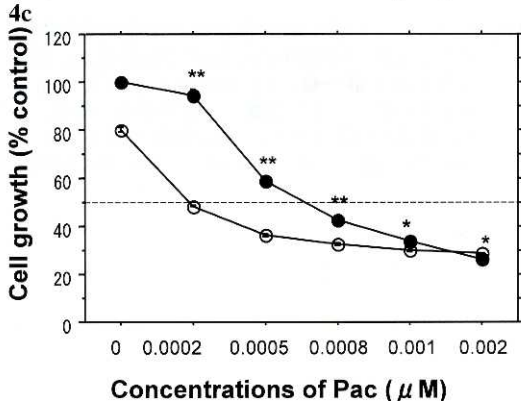
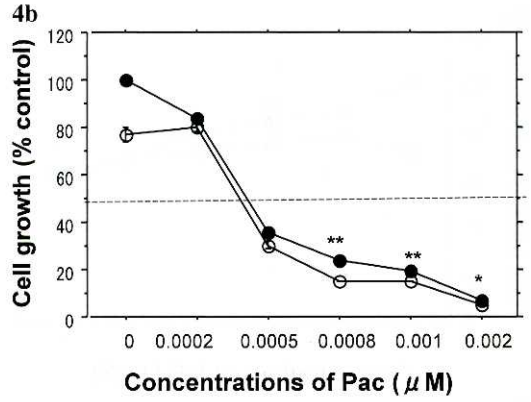
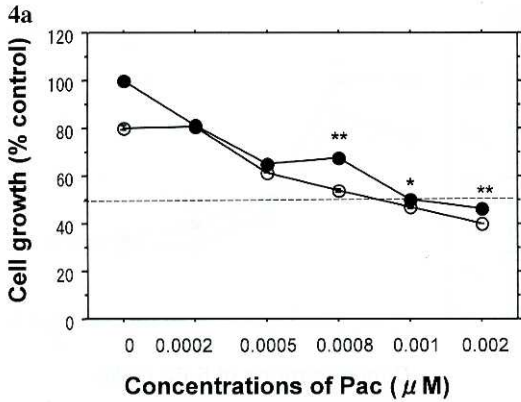


Fig. 4. Pac と Lap (2 μM) 併用時の細胞増殖抑制効果 : a, KTC-1 細胞株 ; b, KTC-2 細胞株 ; c, KTC-3 細胞株 ; ●—●, Lap 非添加 ; ○—○, Lap 添加 ; 平均値 (○または●) ± 標準誤差 (縦棒, 小さい時は平均値のフォント内に隠れて見えない) (* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001)

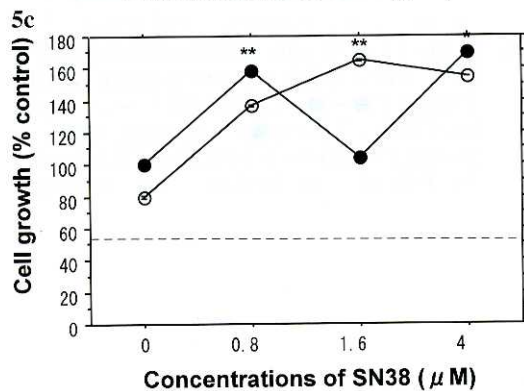
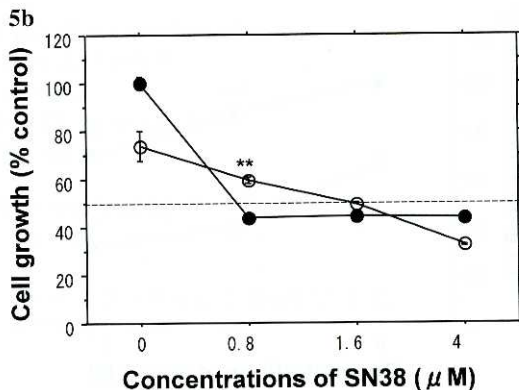
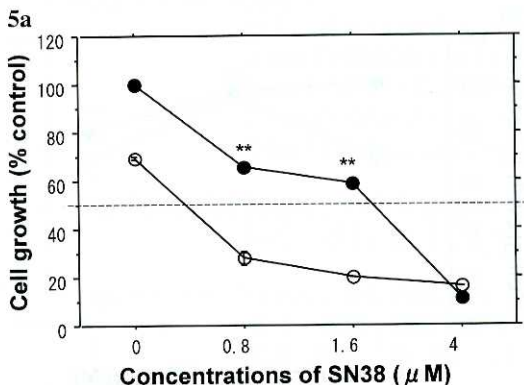


Fig. 5. SN38 と Lap(2 μM) 併用時の細胞増殖抑制効果：a, KTC-1 細胞株；b, KTC-2 細胞株；c, KTC-3 細胞株；●—●, Lap 非添加；○—○, Lap 添加；平均値 (○または●) ± 標準誤差 (縦棒, 小さい時は平均値のフロント内に隠れて見えない) (* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001)

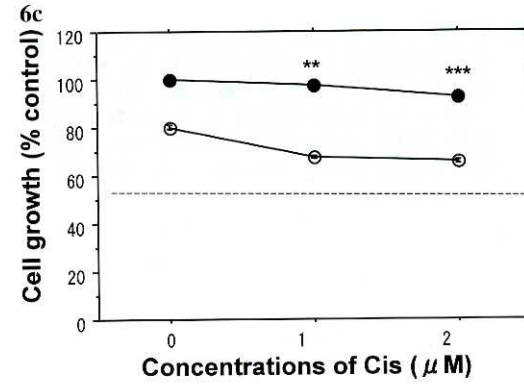
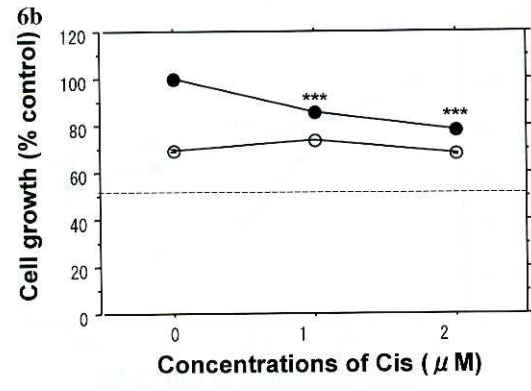
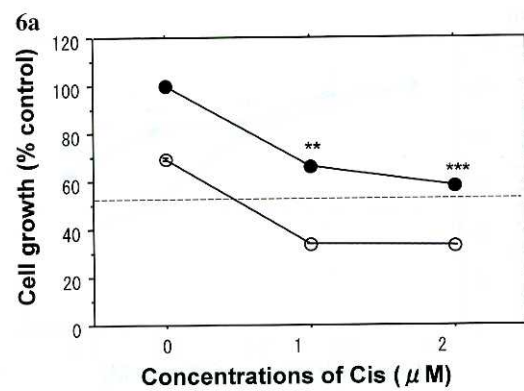


Fig. 6. Cis と Lap (2 μM) 併用時の細胞増殖抑制効果：a, KTC-1 細胞株；b, KTC-2 細胞株；c, KTC-3 細胞株；●—●, Lap 非添加；○—○, Lap 添加；平均値 (○または●) ± 標準誤差 (縦棒, 小さい時は平均値のフロント内に隠れて見えない) (* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001)

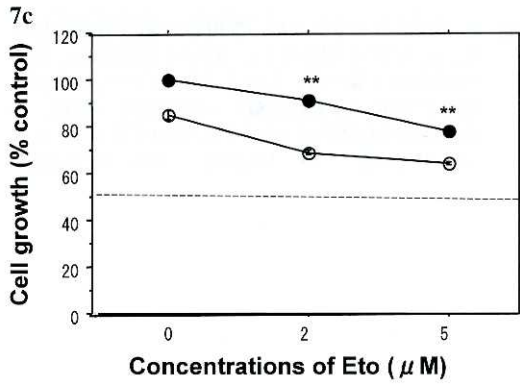
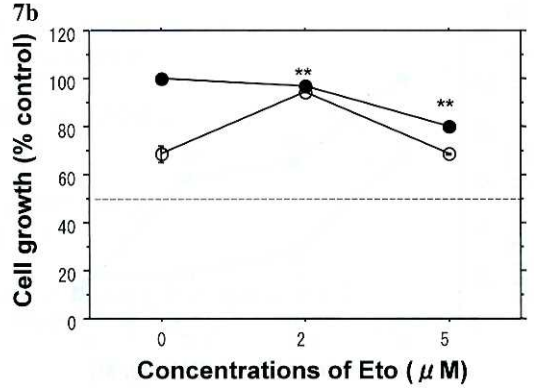
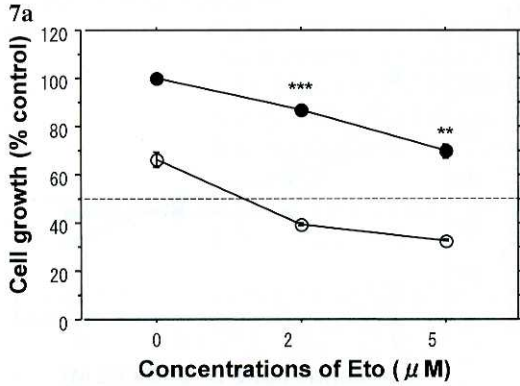


Fig. 7. Eto と Lap ($2 \mu\text{M}$) 併用時の細胞増殖抑制効果: a, KTC-1 細胞株; b, KTC-2 細胞株; c, KTC-3 細胞株; ●—●, Lap 非添加; ○—○, Lap 添加; 平均値 (○または●) \pm 標準誤差 (縦棒, 小さい時は平均値のフォント内に隠れて見えない) (* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$)

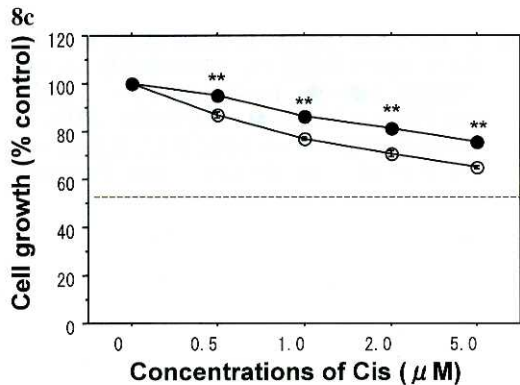
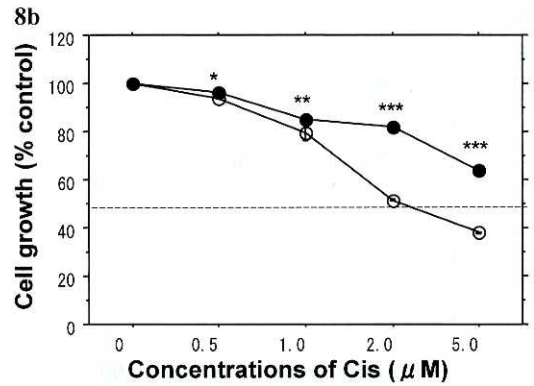
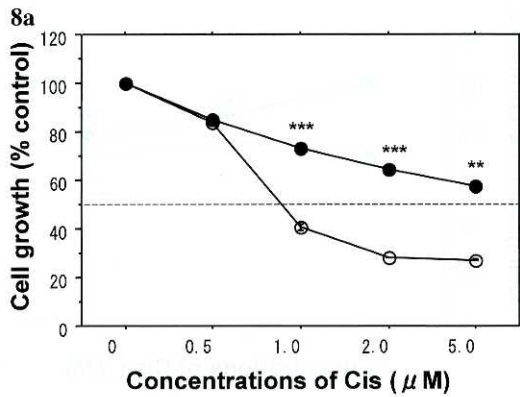


Fig. 8. Cis + Eto($5 \mu\text{M}$) と Lap($2 \mu\text{M}$) 併用時の細胞増殖抑制効果: a, KTC-1 細胞株; b, KTC-2 細胞株; c, KTC-3 細胞株; ●—●, Lap 非添加; ○—○, Lap 添加; 平均値 (○または●) \pm 標準誤差 (縦棒, 小さい時は平均値のフォント内に隠れて見えない) (* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$)

Table 3. Lap と抗癌剤併用時の50%増殖阻止濃度 (μM)

	KTC-1	KTC-2	KTC-3
Lap	5.0 ^a	3.4	3.5
5-FU	NR	1.0 ^b	NR
5-FU+Lap	NR	0.9 ^b	NR
Dox	0.8 ^c	0.7	2.0
Dox+Lap	0.7 ^c	0.6	1.0
Pac	0.001 ^d	0.0004	0.0006
Pac+Lap	0.0009 ^d	0.0004	0.0002
SN38	2 ^e	0.8	NR
SN38+Lap	0.4 ^e	1.6	NR
Cis	>2.0 ^f	NR	NR
Cis+Lap	0.5 ^f	NR	NR
Eto	>2.0 ^g	NR	NR
Eto+Lap	0.6 ^g	NR	NR
Cis+Eto	>5.0 ^h	>5.0	NR
Cis+Eto+Lap	0.9 ^h	2.0	NR

NR：50%阻止に到達せず

a, Lap 濃度；b, 5-FU 濃度；c, Dox 濃度；d, Pac 濃度；e, SN38 濃度；

f, Cis 濃度；g, Eto 濃度；h, Cis 濃度

(Figs. 1-8 参照)

灰色背景：相加効果あり

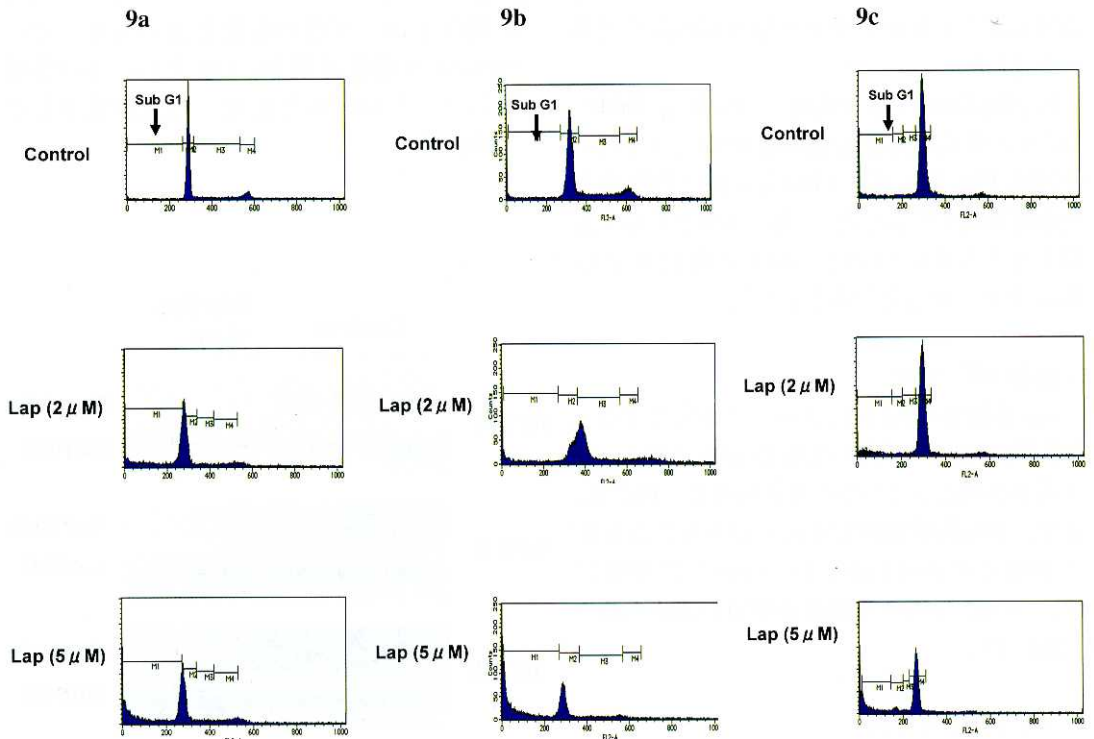


Fig. 9. Lap 単独処理時の細胞周期解析結果；a, KTC-1 細胞株；b, KTC-2 細胞株；c, KTC-3 細胞株

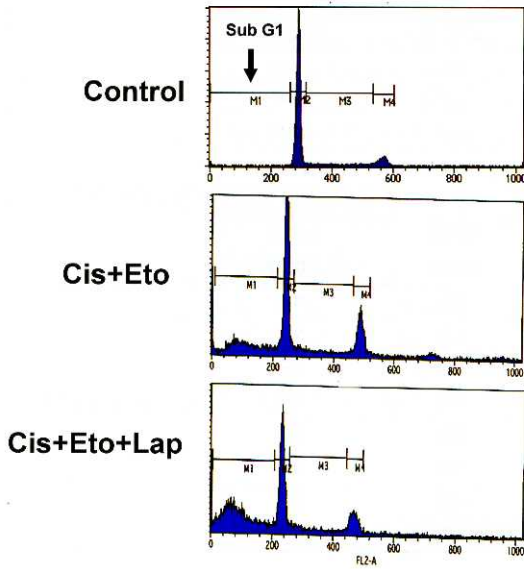


Fig. 10. Cis(各種濃度) + Eto (5 μ M) と Lap(2 μ M) 併用時の細胞周期解析結果 (KTC-1 細胞株)

なお、Eto と Cis は、甲状腺未分化癌の治療法として同時併用で用いられるため、両薬剤の併用時にさらに Lap を加えた時の増殖阻止効果も検討した。

化学療法剤と Lap 併用時の50% IC を Table 3 にまとめる。低分化癌細胞株 KTC-1 では、SN-38, Cis, Eto, Cis + Eto と Lap は相加的な増殖抑制効果を示した。一方、未分化癌細胞株 KTC-2 では Cis + Eto と、KTC-3 細胞株では Dox, Pac と相加的效果を示した。

③細胞周期の変化

Lap 単独処理時には、すべての細胞株で用量依存性に sub-G1 分画の増加を認め、アポトーシス誘導が起こっていると考えられた (Fig. 9)。また、相加的増殖抑制効果の認められた KTC-1 細胞における Lap と Cis + Eto の併用時には、sub-G1 分画の相加的な増加が認められた (Fig. 10)。

④アポトーシス分析

細胞周期分析で確認された sub-G1 分画がアポトーシスであることを確認するため *in situ*

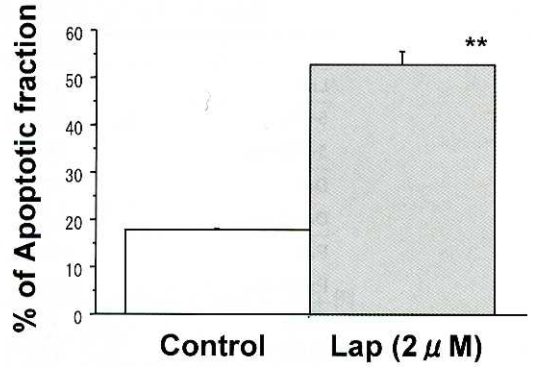


Fig. 11. Lap 単独処理時のアポトーシス分画の変化 (KTC-1 細胞株) : **, $P < 0.01$

cell death detection kit を用いた。KTC-1 細胞株では、Lap により有意にアポトーシス誘導が起こっていることが確認された (Fig. 11)。

⑤アポトーシス関連因子発現の変化

Lap と Cis + Eto 併用時のアポトーシス関連因子の mRNA 及び蛋白発現レベルの変化を検討した。抗アポトーシス因子 survivin 以外の遺伝子は、有意の変化を認めなかった。Survivin の蛋白発現は、Lap と Cis + Eto 併用時にコントロールと比較し有意に低下した (Fig. 12)。

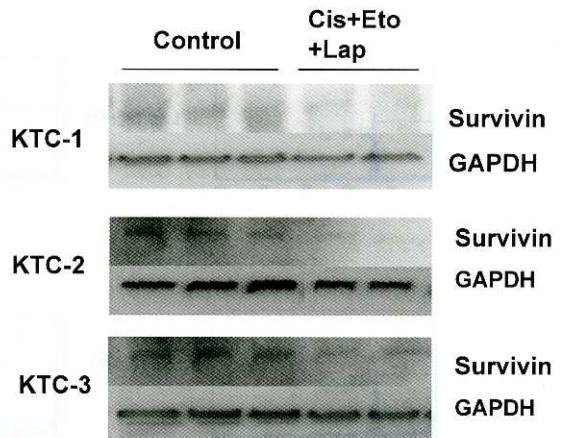


Fig. 12. Cis + Eto (5 μ M) と Lap (2 μ M) 併用時の survivin の蛋白発現量の変化 (KTC-1 細胞株, Western blot 法)

【考 察】

最近、癌細胞において特異的に活性化を受けたシグナル伝達を標的とした分子標的療法が注目されている。しかし、1) 分子標的療法単独の抗腫瘍効果には限界があること、2) 分子標的薬には抗腫瘍化学療法の効果を増強する作用があることが理論的根拠となり、両薬剤の併用投与に注目が集まっている。例えば、進行・再発 HER2 過剰発現乳癌患者を対象とした臨床試験において、ヒト化抗 HER2 モノクローナル抗体 trastuzumab と Pac の併用や Lap と 5-FU 系経口抗癌剤 capecitabine との併用により、抗癌剤単独に比べ抗腫瘍効果の増強や無進行生存期間の延長が検証されている^{10), 11)}。

甲状腺低分化・未分化癌に対しては、Cis と Eto の同時併用療法をはじめとして多くの化学療法が試みられているが、臨床的有用性は検証されていない¹²⁾。従って、甲状腺低分化・未分化癌に対する分子標的薬の応用や分子標的薬と化学療法との併用に注目が集まっている。そこで我々は、甲状腺低分化・未分化癌細胞に対する Lap と各種抗癌剤の併用効果を検討した。

Lap は、HER1 及び HER2 受容体の自己チロシンリン酸化を特異的・可逆的に阻害する経口投与可能な低分子化合物である。本剤は、HER1, HER2 の細胞内シグナル伝達を同時に阻害し、従来の HER2 を単独で阻害する薬剤に比し、より強い抗腫瘍効果が期待される¹³⁾。HER1, HER2 は、様々な悪性腫瘍で過剰発現し、癌細胞の生存、増殖、浸潤、転移などを促進することが知られている¹⁴⁾。

Lap の臨床効果に関しては、乳癌や腎細胞癌など数多くの癌ですでに検証されている^{5), 6)}。国際的多施設共同無作為化臨床試験 (EGF 100151) では、trastuzumab 抵抗性の転移性乳癌患者 392 名に対し、capecitabine 単独対 Lap + capecitabine 併用が行われ、併用群では無進行生存期間が有意に延長した¹¹⁾。最近、本試験結果により Lap は米国において製造販売が

認可された。

今回我々が用いた甲状腺低分化・未分化癌 3 細胞株は、いずれも HER1/HER2 の過剰発現はすでに確認されている⁴⁾。さらに、HER1 のチロシンリン酸化阻害剤 gefitinib を用いた実験において、本剤の用量依存性増殖抑制効果やアポトーシス誘導作用が示されている⁴⁾。従って、今回の実験において、これらの甲状腺癌細胞株に対し、Lap が抗腫瘍効果を示したことは予想通りであった (Fig. 1)。

現在、臨床の場において、甲状腺未分化癌に対し Cis と Eto の併用療法が行われているが、その効果は十分とは言い難い¹¹⁾。そこで Cis + Eto 投与に加え Lap をさらに併用投与しその効果について検討した。その結果、低分化甲状腺細胞株 KTC-1 及び未分化癌細胞株 KTC-2 において、相加的抗腫瘍効果が認められた (Table 3, Figs. 8a, 8b)。これらの結果は、Lap は甲状腺低分化・未分化癌の治療で用いられている Cis と Eto の併用療法の抗腫瘍効果を高めることを示唆している。さらに、その作用メカニズムとして、抗アポトーシス因子 survivin の発現低下によるアポトーシスの相加的な増加作用が関与していることが示唆された (Figs. 10-12)。これまでに、Lap 単剤投与による survivin の発現低下、アポトーシス誘導作用は報告されているが¹⁵⁾、抗癌剤との併用においても survivin が有意に変化することが初めて示された。

【結 語】

1) 新規分子標的薬 Lap は、HER1/HER2 を過剰発現する甲状腺低分化・未分化癌細胞に対して、単剤で用量依存性にアポトーシスを誘導し抗腫瘍活性を示した。

2) Lap は Cis + Eto 併用及びいくつかの抗癌化学療法剤と併用すると、相加的な抗腫瘍効果が認められた。

3) Lap と Cis + Eto 併用は、抗アポトーシス因子 survivin の減少、アポトーシス誘導を介し

て、相加的な抗腫瘍活性を示した。

4) 治療に難渋する甲状腺低分化・未分化癌の治療にLapが有用なことが示唆された。

【謝 辞】

本研究を遂行するに当たり、御指導と御高覧を賜りました川崎医科大学外科学(乳腺甲状腺)教室 園尾博司教授ならびに紅林 淳一准教授に深甚なる謝意を表します。また研究の技術的面にご協力頂きました川崎医科大学外科学(乳腺甲状腺)教室 田中 克浩

講師、大久保 澄子元臨床助教、川崎医科大学衛生学 大槻 剛巳教授、三浦 由恵助教、前田 恵助教、幡山 圭代研究補助員、山下 佳子研究補助員、また細胞培養や実験手技について直接ご指導頂きました組織培養・免疫センターの東脇 久恵研究補助員、桑田なるみ研究補助員、伊賀 典子研究補助員、坂口 治子研究補助員に深謝いたします。

なお、本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費(No.18-101, No.19-109N)および文部科学省・学術振興会科学研究費補助金(課題番号18591448)の援助により行われた。

【参 考 文 献】

- 1) Schiff BA, McMurphy AB, Jasser SA, Younes MN, Doan D, Yigitbasi OG, Kim S, Zhou G, Mandal M, Bekele BN, Holsinger FC, Sherman SI, Yeung SC, El-Naggar AK, Myers JN.S : Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in anaplastic thyroid cancer, and the EGFR inhibitor gefitinib inhibits the growth of anaplastic thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 10 : 8594 - 8602, 2004
- 2) Ensinger C, Spizzo G, Moser P, Tschöerner I, Prommegger R, Gabriel M, Mikuz G, Schmid KW : Epidermal growth factor receptor as a novel therapeutic target in anaplastic thyroid carcinomas. *Ann N Y Acad Sci* 1030 : 69 - 77, 2004
- 3) Nobuhara Y, Onoda N, Yamashita Y, Yamasaki M, Ogisawa K, Takashima T, Ishikawa T, Hirakawa K : Efficacy of epidermal growth factor receptor-targeted molecular therapy in anaplastic thyroid cancer cell lines. *Br J Cancer* 92 : 1110 - 1116, 2005
- 4) Kurebayashi J, Okubo S, Yamamoto Y, Ikeda M, Tanaka K, Otsuki T, Sonoo H : Additive antitumor effects of gefitinib and imatinib on anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 58 : 460 - 470, 2006
- 5) Burris HA 3rd, Hurwitz HI, Dees EC, Dowlati A, Blackwell KL, O'Neil B, Marcom PK, Ellis MJ, Overmoyer B, Jones SF, Harris JL, Smith DA, Koch KM, Stead A, Mangum S, Spector NL : Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical activity study of lapatinib (GW572016), a reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients with metastatic carcinomas. *J Clin Oncol* 23 : 5305 - 5313, 2005
- 6) Sonpavde G, Hutson TE : Recent advances in the therapy of renal cancer. *Expert Opin Biol Ther* 7 : 233 - 242, 2007
- 7) Kurebayashi J, Tanaka K, Otsuki T, Moriya T, Kunisue H, Uno M, Sonoo H : All-trans-retinoic acid modulates expression levels of thyroglobulin and cytokines in a new human poorly differentiated papillary thyroid carcinoma cell line, KTC-1. *J Clin Endocrinol Metab* 85 : 2889 - 2896, 2000
- 8) Kurebayashi J, Otsuki T, Tanaka K, Yamamoto Y, Moriya T, Sonoo H : Medroxyprogesterone acetate decreases secretion of interleukin-6 and parathyroid hormone-related protein in a new anaplastic thyroid cancer cell line, KTC-2. *Thyroid* 13 : 249 - 258, 2003
- 9) Pushkarev VM, Starenki DV, Saenko VA, Namba H, Kurebayashi J, Tronko MD, Yamashita S : Molecular mechanisms of the effects of low concentrations of taxol in anaplastic thyroid cancer cells. *Endocrinology* 145 : 3143 - 3152, 2004
- 10) Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L : Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344 : 783 - 792, 2001

- 11) Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, Kaufman B, Skarlos D, Campane M, Davidson N, Berger M, Oliva C, Rubin SD, Stein S, Cameron : Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 355 : 2733 – 2743, 2006
- 12) Chemotherapy Committee, The Japanese Society of Thyroid Surgery : Intensive chemotherapy for anaplastic thyroid carcinoma : combination of cisplatin, doxorubicin, etoposide and peplomycin with granulocyte granulocyte colony-stimulating factor support. *Jpn J Clin Oncol* 25 : 203 – 207, 1995
- 13) Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, Untch M, Rusnak DW, Spehar G, Mullin RJ, Keith BR, Gilmer TM, Berger M, Podratz KC, Slamon DJ : Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW 572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res* 66 : 1630 – 1639, 2006
- 14) Hynes NE, Lane HA : ERBB receptors and cancer : the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5 : 341 – 354, 2005
- 15) Xia W, Bisi J, Strum J, Liu L, Carrick K, Graham KM, Treece AL, Hardwicke MA, Dush M, Liao Q, Westlund RE, Zhao S, Bacus S, Spector NL : Regulation of survivin by ErbB2 signaling : therapeutic implications for ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer Res* 66 : 1640 – 1647, 2006