

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）総括研究報告書

分野6：新しい治療法の開発に関する研究

研究テーマ：新しいがん薬物療法の研究

主任研究者 西條 長宏 国立がんセンター中央病院 放射線治療部長

研究要旨 1) 抗がん剤感受性・耐性関連遺伝子発現の解析をcDNAアレイを用い行った、薬剤と接触後細胞周期関連遺伝子が一過性に上昇した。薬剤耐性細胞では薬剤と接触後母細胞と比べ遺伝子発現の変化が異なった。2) K201 (1,4-Benzothiazepin 誘導体) は細胞毒性を示さない濃度 (10 μ M) でシスプラチン耐性細胞 PC-14/CDDP のシスプラチン感受性を母細胞と同程度に回復させた。細胞内プラチナ濃度はK201併用で有意に増加した。In vivoにおいてもK201併用下でシスプラチンの抗腫瘍効果を増強した。3) ABC トランスポーターMRP ファミリーのcMOAT/MRP-2, MRP-3, S-MRP/MRP-5 の全cDNA を単離した。cMOAT/MRP-2 はシスプラチン、CPT-11 やピンクリスチンの、MRP3 はエトポシドの感受性に関与する事を示した。4) cMOATcDNA 移入 LLC-PK1/cMOAT 細胞の membrane vesicle による ATP 依存性ロイコトリエンC4 輸送阻害物質として CSA, PSC833, PAK-104P を同定した。PAK-104 は LRP による核からの薬剤排出も抑制した。LRP 発現細胞由来単離核には LRP が存在しその核からの ADM の排出は PAK-104P で阻害された。5) 新抗がん剤第I相、第I/II 相試験を効率よく展開し短期で終了しうる体制を確立した。この過程で薬物動態の分析を平行して行い PGDE および CRM を併用した増量法で全患者数を少なく第I 相試験を終了できた。TOP-53, UCN-01 などの第I 相試験の過程で蛋白非結合薬物の薬物動態検討の必要性を示した。プラチナを含む併用化学療法および含まない併用化学療法の第I/II 相試験を intensive に行い至適投与量を決定した。

分担研究者

西條長宏（国立がんセンター中央病院部長）、西尾和人（国立がんセンター研究所室長）、桑野信彦（九州大学医学部教授）、秋山伸一（鹿児島大学医学部教授）、杉本芳一（財）癌研究所主任研究員）、佐々木琢磨（金沢大学がん研究所教授）、福岡正博（近畿大学医学部教授）、田村友秀（国立がんセンター中央病院医長）、南博信（国立がんセンター東病院医員）

A. 研究目的

抗がん剤感受性・耐性を左右する因子として P-糖蛋白、multidrug resistant protein (MRP)、multicanalicular organic anion transporter (cMOAT)、lung resistance protein (LRP)等のトランスポーター、DNAトポイソメラーゼII、チユプリン、細胞周期調節蛋白、解毒酵素、DNA 修復能などを挙げる事ができる。これらの分子標的遺伝子のクローニングを行うとともにヒト腫瘍における発現の機序・意義を把握し、様々な抗がん剤感受性における関与を明らかにする。これらの多剤耐性および各々の抗がん剤に特異的な耐性を克服する方法（主に small molecule)を探索する。また、多剤耐性に関与す

る細胞膜の ABC スーパーファミリー遺伝子群や薬剤感受性・耐性に関わる分子標的のヒト腫瘍での発現様式を把握する。臨床的に抗がん剤感受性の有用な診断マーカーとなるか否かを明らかにすることによって適切な抗がん剤の選択ならびに新しい治療法、治療法の開発に貢献する。抗がん剤耐性に関係した蛋白質の機能を阻害する small molecule を同定したり、これらのトランスポーターの輸送基質とならない新抗がん剤の開発を行う。一方、非交叉耐性のない抗がん剤の導入を目指す。具体的には核酸系代謝酵素反応の有機科学的解明から新規代謝抗がん剤である DMDC, CNDAC, Ecyd, Eurd を導入してきたが、その作用機序、併用効果を明らかにする。また、その臨床効果を評価する。新しい手法を用い抗がん剤の併用による臨床効果を予測する方法を開発したがその臨床的意義を検討する。耐性克服の一つの方法論である大量化学療法の可能性を造血幹細胞に MDRI・MGMT 遺伝子を導入し追及する。新しく開発された抗がん剤、修飾剤等を用いた第I 相試験の体制を確立する。このために国内で第I 相試験に関し、最も積極的かつ具体的成果を挙げうる研究グループを構成し、実際に基礎・臨床を通じた、新抗がん剤の開発体系を確

立する。

B. 研究計画

シスプラチン等の抗がん剤をがん細胞外に排出する可能性のある輸送ポンプ SMRP (short type multidrug resistant protein) 遺伝子の転写産物の解析、SMRP に対する抗体の作製およびそれによる SMRP 蛋白質の解析、関連を明らかにする。YB-1 に関して核内か細胞質かの発現局在とヒト腫瘍における悪性度、治療の有効性ととの有無さらに予後との関連性について消化器がんならびに肺がんについて検討する。DNA トポイソメラーゼ II α の発現と転写因子 YB-1 の核内局在との関連をヒト大腸がんで検討する。MRP2 および MRP3 の発現について定量 PCR と免疫染色法を用いてヒト肝がんならびにヒト大腸がんについての特異的発現を検討する。MRP2、MRP3 さらに IL13 レセプターが各々の抗がん剤感受性を担っているかをセンスやアンチセンス cDNA 導入法で検討する。

MRP 高発現細胞を用い、CPT-11、SN-38 に対する耐性への MRP の関与、MRP による CPT-11、SN-38 の輸送を検討する。その輸送を阻害し耐性を克服する薬剤の開発を行う。cMOATcDNA をブタ腎臓細胞 LLC-PK1 にトランスフェクトし cMOAT 高発現細胞を作り、この細胞に dominant negative に働くことが知られている変異型 p53 遺伝子を導入・強制発現させ、シトシンヌクレオシドに対する薬剤感受性ならびにアポトーシス誘導能について検討すると共にヌードマウス腹膜播種モデルでの薬剤感受性を比較検討する。

新規サブレッサー型耐性因子を単離同定する方法として、antisense mRNA あるいは dominant-negative peptide を発現させるように構築した retrovirus 発現 library を細胞に導入し、種々の抗癌剤で選択して耐性細胞を得る。この耐性細胞株に組み込まれた retrovirus 中の cDNA を回収し、さらにこれをもとに全長 cDNA を単離する。得られた遺伝子産物の機能の解析を行い、抗癌剤感受性のメカニズムを明らかにする。既知のサブレッサー型耐性因子としては DNA topoisomerase I に着目して研究を行う。DNA topoisomerase I を標的とする抗癌剤である camptothecin 類に耐性を獲得した細胞株が発現している、アミノ酸変異型、あるいは部分欠損型の DNA topoisomerase I 遺伝子を単離して発現ベクターに組み込み、細胞に導入することで、これら変異型あるいは部分欠損型 DNA topoisomerase I 遺伝子の抗

細胞内分布を検討する。さらにシスプラチン耐性を克服する物質の同定とその機序、とくにシスプラチン輸送ポンプに対する作用について検討する。

ABC トランスポーターのうち P-糖蛋白質の腫瘍特異性の発現については、白血病をはじめとして、膀胱がんならびに大腸がんなどの臨床腫瘍での YB-1 の核内局在や DNA メチル化との関連ならびに化学療法の有無との細胞を用いて cMOAT の抗癌剤耐性への関与、薬剤輸送機能を解析する。cMOAT の輸送機能を阻害して耐性を克服する薬剤を探索する。ヒト大腸癌 SW620 細胞に LRPCDNA 特異的リボザイムを発現させ、酪酸ナトリウム (NaB) で処理する。リボザイムを発現していない細胞では LRP が誘導され、発現している細胞では誘導されない。これらの細胞を用いて LRP の薬剤耐性への関与、LRP による耐性賦与の機構とその克服について研究を行う。ウイルス病の原因遺伝子の産物タンパク質である ATP7B がシスプラチンを輸送するか調べる。シスプラチン耐性を KCP-4 細胞で ATP7B の発現が高く、復帰変異株 KCP-4R で発現レベルが親株と等しい遺伝子をクローニングし、その構造と機能を調べる。

In vitro および *in vivo* の両実験系で薬剤感受性の比較検討が可能であり、さらに野生型 p53 遺伝子を有する細胞として、高度膜播種性ヒト胃がん細胞 MKN-45P を用いて薬剤耐性に対する関与を調べる。

PGDE ではマウス LD₅₀ における AUC とヒト最大耐用量 (MTD) における AUC が等しいと仮定している。その際、活性型薬物の AUC を目標とすべきであり、蛋白結合率に種差があるときは AUC_fではなく AUC_uを用いる。そこで、薬物動態 (投与量と AUC の関係) と、薬力学 (AUC と毒性との関係) をマウスおよびイヌにおいて調べ、臨床第 I 相試験におけるヒトでの関係と比較する。その際、AUC_fを用いた場合と AUC_uを用いた場合を比べ、PGDE の指標として AUC_uを用いる必要性を検討する。

第 I 相試験において設定した開始量・増量計画の妥当性と問題点の検証より、至適設定法を検討する。

(倫理面への配慮)

動物実験においては必要最小限の動物数を用いるとともに適正な飼育を行う。ト殺は苦痛を伴わないよう配慮するとともに大きな腫瘍を担かん状態で長期飼育し苦痛を与えるようなことはしない。臨床試験は GCP に準じ全てのプロトコールは IC を含み各施設の臨床試験審査委員会の許可の下に行う。また効果安全性評価委員

により研究の続行の可否に関するアドバイスをうける。

C. 研究方法

SMRP 特異的なペプチド抗体、リコンビナントの融合蛋白質を作成し、ウサギに静脈内投与し、抗体価上昇のち、血清採取、抗体精製を行う。同抗体のウエスタンブロットティング、免疫染色、フローサイトメトリーによる SMRP タンパクに対する染色性および特異性細胞内分布を検討する。SMRP の正常およびがん組織における転写産物の検討 ヒト SMRP のマウスホモログのクローニングを EST 検索およびマウスライブラリーのブランクハイブリダイゼーションにより行い、ヒト SMRP との塩基配列の比較により、構造解析をおこなう。転写物の MRP5 との異同を検討する。またヒト・マウスにおける正常とがん組織における MRP5/SMRP の転写物発現様式を検討する。21 種類のヒト正常組織の cDNA ライブラリーを用い SMRP/MRP5 の発現を RT-PCR 法によって検討する。また消化管がん患者 26 例 (胃がん 6 例、食道がん 3 例、大腸がん 17 例) の手術検体の腫瘍および正常組織において SMRP/MRP5 の発現を検討する。シスプラチン耐性克服剤の同定とその *in vitro* および *in vivo* における耐性克服作用およびその作用機序の決定を目的とし細胞内カルシウム動態に影響を与える化合物群のうち、心毒性を有さない新規化合物を選択する。選択した同化合物 (1,4-benzothiazepin 誘導体) によるヒトシスプラチン耐性肺がん細胞に対するシスプラチン耐性克服作用を、*in vitro* MTT アッセイ、*in vivo* 担がんマウスモデルで検討する。作用機序の検討として、腫瘍内シスプラチン集積に対する同化合物の効果を検討する。

ヒト IL13 レセプターの発現は IL13 レセプターの抗体を作製して免疫沈降法や免疫染色法で調べる。さらに YB-1 の抗体と用いてヒト腫瘍における核内と細胞質内発現の有無を免疫染色法で行う。P-糖蛋白質、MRP ファミリー遺伝子の発現などは Northern blot やまた臨床材料での検索は定量的 PCR 法を用いる。DNA メチル化の有無についてはメチル塩基を認識する制限酵素などを用いた後の Southern blot や PCR などで定量的な解析を行う。ABC トランスポータや IL13 レセプターと感受性を示す抗がん剤との対応については、安定なセンスまたアンチセンス cDNA 導入株を樹立する。

MRPcDNA をトランスフェクトして MRP を高発現させた KB 細胞と ADM 耐性 CA-120 細胞を用い、CPT-11、SN-38 に対する耐性への MRP の関与、耐性克服薬剤に

よる感受性の増加を MTT アッセイで調べる。MRP による CPT-11、SN-38 の輸送を調べるため、細胞内、培地中の CPT-11、SN-38 濃度を HPLC で測定する。cMOATcDNA をブタ腎臓細胞 LLC-PK1 にトランスフェクトして作成した cMOAT 高発現細胞から membrane vesicle を調製し、cMOAT による LTC4 の能動輸送、耐性克服薬剤による輸送阻害の実験に用いる。ヒト大腸癌 SW620 細胞に LRPCDNA 特異的リボザイムを発現させ、酪酸ナトリウム (NaB) で処理する。リボザイムを発現していない細胞では LRP が誘導され、発現している細胞では誘導されない。これらの細胞の抗癌剤感受性を MTT アッセイで調べ、蛍光顕微鏡で ADM の細胞内局在を調べる。また、核を単離して ADM の蓄積を調べる。ATP7BcDNA を KB-3-1 細胞にトランスフェクトし、ATP7B 高発現株を樹立して、シスプラチン耐性、シスプラチン蓄積、排出を検討する。蛍光ディフュレンシャルディスプレイ法を用いて、シスプラチン耐性形質と連動して発現が変化する遺伝子をクローニングする。

MKN-45P 細胞に p53 変異の hotspot であり、dominant negative に作用することが知られる codon143、248、273 の変異型遺伝子 (V143A、R248W、R273L) を導入、比較対照としては、MKN-45P 細胞に blasticidin 耐性遺伝子のみを有するコントロールベクターを導入した細胞 (MKN-45P/bsr) を用いる。変異遺伝子導入細胞におけるシトシンヌクレオシド (CNDAC、ECyd)、CDDP および ADM に対する感受性を *in vitro* MTT 法により検討する。さらに、薬剤処理後、各細胞における細胞形態の変化を蛍光色素染色法およびギムザ染色法により、また DNA fragmentation をアガロースゲル電気泳動法により観察することによりアポトーシス誘導感受性を比較する。変異遺伝子導入細胞のヌードマウス腹腔内移植の 3 日後に、ECyd を腹腔内投与し、投与後 24 時間における腹腔内のがん細胞におけるアポトーシス細胞をギムザ染色法により観察する。腹腔癌モデルにおける薬剤感受性を比較するために、MKN-45P 細胞 (1×10^7) を腹腔内移植 1 日後より CNDAC 30 mg/kg または ECyd 0.3 mg/kg を隔日 9 回、腹腔内投与した。薬剤感受性は、延命率を比較する。

新規サブレッサー型耐性因子の単離同定を目的として、マウス NIH3T3 細胞の cDNA 断片を LNCX retrovirus ベクターに組み込んだ retrovirus expression library を作製して NIH3T3 細胞に導入する。抗癌剤耐

性となった遺伝子導入細胞に retrovirus のヘルパープラスミドを導入して組み込まれた retrovirus を回収し、NIH3T3 細胞に再導入することにより、retrovirus の発現が抗癌剤耐性に関与していることを確認する。この耐性細胞株に組み込まれた retrovirus 中の cDNA を PCR により回収し、さらにこれをもとに全長 cDNA を単離し、構造を決定する。RPMI8402 細胞の CPT-11 耐性細胞 K5 では 533 番目のアミノ酸がグリシンに変異した DNA topoisomerase I が発現している。また、HT-29 細胞の camptothecin 耐性株 HT-29/CPT では野生型より短い DNA topoisomerase I mRNA が発現している。これらの全長 cDNA を発現ベクターに組み込み、マウス NIH3T3 細胞に導入し、遺伝子導入細胞における camptothecin 感受性の変化を調べる。

Epipodophyllotoxin の誘導体である TOP-53 は前臨床動物でも白血球減少が主たる毒性であることを確認した後、マウスに 5.7、28.5、56.7 mg/m²、イヌに 14.9、29.7、59.4、79.2 mg/m² の TOP-53 を投与し、血漿中の薬物総濃度および蛋白非結合濃度を測定し AUC₀₋₂₄ および AUC₀₋₆ を算出してヒトと比較する。また、血球数を経時的に測定し、白血球数量最低値と前値の差を前値で除した白血球減少率 (SF) を算出し、AUC との薬力学的関係をヒトと比較検討する。ヒトにおける臨床第 I 相試験では PGDE を応用し、5.7、11.4、22.8、45.6、60.4、80.4、107.2、143.1 mg/m² と増量する。投与量と AUC の関係および AUC と白血球減少率の関係を、マウス、イヌ、ヒトにおいて比較する。その際、投与量と AUC の関係の解析には線形モデル、 $AUC = a \times Dose$ を、AUC と白血球減少率の関係の解析には sigmoidal Emax model、 $SF = 100 \times AUC^r / (AUC^r + EC^r)$ を用いる。ここで、a、r、EC は係数である。次に、camptothecin の誘導体である DX-8951f においても同様の検討を行う。DX-8951f に対する感受性は、前臨床動物のうちイヌが最も高かったので、イヌとヒトの比較を行う。投与量はイヌでは 0.1、0.4、2.2、11.0、22.9、55.8 mg/m²、ヒトでは臨床第 I 相試験の 3.0、5.0、6.65 mg/m² におけるデータを用いる。

新規抗癌性腫瘍 6 剤の 7 つの第 I 相試験について開始量増量法の設定方法、結果からみたその妥当性および問題を解析する。

D. 研究結果

精製した抗 SMRP ポリクロナール抗体を用いたウエ

スタンプロットングにより、目的の分子量を有するバンドが検出されたが、染色には高濃度の抗体を必要とした。また免疫染色においては細胞質小器官に対する非特異的染色がみられ臓器特異性が乏しかった。マウス SMRP/MRP5 ホモログをクローニングし mrp5 と命名した。ヒト・マウスの構造比較により SMRP は MRP5 の splicing variant である可能性が示唆された。20 種類の正常組織の cDNA ライブラリーで MRP5 および SMRP の発現が見られた。唾液腺で MRP5 の発現が見とめず、脳下垂体等で少なくとも 2 つの新規 splicing variant が発現している結果を得た。消化管腫瘍部全例で SMRP と MRP5 の共発現が見られた。1,4-benzothiazepin 誘導体 (K201) のシスプラチン耐性克服効果を in vitro MTT アッセイで検討した。シスプラチン耐性細胞 PC-14/CDDP において、単独で細胞毒性の出現しない濃度 10 μM でシスプラチン耐性を親株のレベルまで克服した。親株に対する感受性増強効果は軽微であった。PC-14/CDDP のシスプラチンの細胞内集積は K201 の存在により有意に増加し、細胞内集積の増加作用が克服機序と推察された。また担がんマウスモデルにおけるシスプラチンの同耐性細胞に対する抗腫瘍効果は、シスプラチンと K201 の同時投与 (i.v.) により増強し、明らかな急性毒性はみとめなかった。

婦人科領域の卵巣がん患者において YB-1 の核内局在を示す症例の予後が細胞質内局在を示す症例に比べて極めて悪いことが観察された。YB-1 はシスプラチン処理 DNA に極めて高い親和性を示した。さらに MDR1 遺伝子の発現上昇にはそのプロモーター領域上の Y-box が重要である。骨肉腫や乳がんまた卵巣がんにおいて Y-box へ結合するタンパク質 YB-1 の核また細胞質の局在が P-糖蛋白質の発現と相関した。さらに MDR1 遺伝子発現上昇に、5'-制御領域の遺伝子再編成があることを耐性ヒト乳がん細胞や大腸がん細胞で見出した。MDR1 遺伝子のもう一つの機構としてプロモーター領域の CpG メチル化の有無が重要である。P-糖蛋白質発現上昇が寛解率とよく相関を示す急性骨髄性白血病において、CpG メチル化の有無が P-糖蛋白質発現と相関した。さらに化学療法後の再発の際に発現上昇の見られる膀胱がんの症例において有意に MDR1 遺伝子プロモーター領域の低メチル化の傾向が観察された。MRP2 に関してシスプラチンやビンクリスチンまた CPT-11 を、一方 MRP3 に関してエトポシドの感受性に各々関与することを見出した。さらに 5 つの ABC トランスポー

タのうち MRP2 のみが大腸がん症例において特異的にがん部位で発現上昇を示した。さらに肝臓での特異的発現に関与するプロモーター上のエレメントを同定した。DNA トポイソメラーゼ II α のヒト大腸がんの症例における発現が核内の YB-1 局在と有意に相関した。しかし P-糖蛋白質とは相関しなかった。IL13 レセプターについてはそのプロモーター領域を単離しシスプラチンによって活性化される機序を明らかにした。

MRP は CPT-11 と SN-38 に対する耐性に関与しており、これらの薬剤を ATP 依存性に輸送すると考えられた。また、KB 細胞由来シスプラチン耐性細胞 KCP-4 も CPT-11 と SN-38 に交差耐性を示し、CPT-11 と SN-38 を能動的に排出した。KCP-4 細胞には P-糖蛋白質、MRP、cMOAT のいずれも発現しておらず、未知のポンプの発現が強く示唆された。MRP の耐性を克服する薬剤として新たに Agosterol A とタクスピン C 誘導体である BTK を見い出した。両薬剤とも MRP に直接作用して MRP の輸送機能を阻害したが、その他にそれぞれ細胞内 GSH 低下作用、細胞内小胞 pH 上昇作用を有し、これらの作用が耐性克服活性に関与していることが明らかになった。Agosterol A は YCF1 の機能を阻害しなかった。LLC/PK1/cMOAT 細胞は VCR、シスプラチン、SN-38 に耐性になった。この耐性を多剤耐性克服薬剤であるシクロスポリン A、PAK-104P が完全に克服した。シクロスポリン A、PAK-104P は cMOAT の LTC₄ 結合部位に拮抗的に作用して輸送機能を阻害することを明らかにした。ヒト大腸癌 SW-620 細胞を sodium butyrate (NaB) で 2 週間処理すると抗癌剤 (アドリアマイシン (ADM)、ビンクリスチン (VCR)、VP-16、グラミシジン D、タキソール) に対して耐性となり、LRP がこの耐性に関与していた。LRP が核から細胞質への ADM の輸送に関与していること、PAK-104P が LRP の作用を阻害する可能性を示した。ATP7B 発現細胞はシスプラチンに耐性になり、シスプラチンの排出が亢進し、蓄積が減少していた。シスプラチン耐性 KCP-4 細胞で発現が上昇し、復帰変異株 KCP-4R でその発現が親株レベルまで低下している遺伝子を 2 つ同定した。

V143A 変異型 p53 導入細胞では、ヌクレオシド誘導体に対する *in vitro* の薬剤感受性の低下は認められず、アポトーシス感受性についても相違は認められなかった。一方、R248W および R273L 細胞は *in vitro* において CNDAC、ECyd、CCDP および ADM のいずれの薬剤に対しても低感受性を示したが、高濃度 (IC₅₀ 値の

20 倍) でのアポトーシス誘導に対する感受性には顕著な相違は認められなかった。しかし、変異型 p53 の遺伝子導入細胞をヌードマウスに移植し *in vivo* におけるアポトーシス誘導に対する感受性を比較検討した結果、変異型 (R248W) 導入細胞ではアポトーシス細胞が親株に比して 1/6 以下に減少していた。さらに、腹膜播種モデルでの ECyd および CNDAC に対する薬剤感受性を MKN-45 P/bsr と R273L 細胞とで比較した結果、ECyd および CNDAC は MKN-45 P/bsr 細胞移植マウスと R273L 細胞移植マウスのいずれにおいても対照群と比較して有意な延命効果を示したが、ECyd の延命効果は MKN-45 P/bsr 細胞移植マウスに比べ (T/C 188.6%)、R273L 細胞移植マウスにおいて明らかに減少していた (T/C 146.9%)。また、CNDAC の効果も MKN-45 P/bsr 細胞移植マウス (T/C 238.6%) に比較して、R273L 細胞移植マウス (T/C 198.0%) において減少傾向を示した。

マウス NIH3T3 細胞由来の retrovirus cDNA library を NIH3T3 細胞に導入し、種々の抗癌剤で選択して耐性クローンを単離し、組み込まれた cDNA を解析した。既知の遺伝子としては、NADH-ubiquinone oxidoreductase の chain 5 の antisense の導入によって細胞が adriamycin 耐性を獲得すること、paclitaxel 耐性を獲得することが示された。新規遺伝子としては、adriamycin 耐性クローン Ac2 株に組み込まれた cDNA の構造解析を行った。この遺伝子は、その発現がマウスでは testis と embryo に高いことから、TASP (Testis-specific Adriamycin Sensitivity Protein) と名付けられた。TASP 全長 cDNA がコードする蛋白質は 450 アミノ酸よりなる膜蛋白と推定され、細胞膜を 7 回貫通する構造をもつ G-protein 受容体である p40 とアミノ酸レベルで 54% の高い相同性を示した。このことは、TASP も G-protein と共役して細胞のシグナル伝達に関与することを示唆する。Ac2 株に組み込まれた retrovirus (TASP の antisense を発現する) を再導入された NIH3T3 細胞は adriamycin 耐性と paclitaxel 耐性を同時に獲得した。よって TASP は細胞の adriamycin 感受性と paclitaxel 感受性に関与していると推定された。RPM18402 細胞の CPT-11 耐性細胞 K5 で発現している Gly-533 変異型 DNA topoisomerase I を導入したマウス NIH3T3 細胞は、親株に比して camptothecin に約 2 倍の耐性を獲得した。HT-29 細胞の camptothecin 耐性株 HT-29/CPT で発現している野生型より短い DNA topoisomerase I

mRNAは、DNA topoisomerase I 遺伝子の exon 3 から exon 9 までが欠損したものであった。この欠損型 cDNA の全長を発現ベクターに組み込み、マウス NIH3T3 細胞に導入したが、遺伝子導入細胞の camptothecin 感受性は変化しなかった。

TOP-53 の投与量と AUC の関係を線形モデルで解析したところ、AUC₀を用いた時の係数 a は、マウス、イヌ、ヒトにおいてそれぞれ、53、19、338 (hr x m²/L) と差を認めたのに対し、AUC_∞を用いたときの係数は、22、10、17 (hr x m²/L) とほぼ一致した。これをクリアランスで検討すると、総濃度に関するクリアランスはマウス、イヌ、ヒトにおいてそれぞれ、18.5、51.0、3.3 (L/hr/m²) であり、マウス、イヌはヒトのそれぞれ 5.7、15.7 倍のクリアランスを有していた。一方、蛋白非結合の薬物のクリアランスはそれぞれ、45.1、96.2、62.8 (L/hr/m²) であり、マウス、イヌはそれぞれヒトの 0.7、1.5 倍程度のクリアランスであった。すなわち、3 種の動物における薬物動態を AUC₀ で比較すると大きな種差を認めたが、AUC_∞ で解析すると種差は小さくなった。同様に、TOP-53 の AUC と白血球減少率の関係も、AUC₀ ではヒトと 2 種の動物では 10 倍以上の差を認めたが、AUC_∞ では、sigmoid Emax model の EC の値として、マウス、イヌ、ヒトでそれぞれ、461、408、894 (ng x hr/mL) とほぼ一致した。血漿中の薬物のうち、非結合薬物はヒトでは 2~10% であるのに対し、イヌでは 53%、マウスでは 41% であった。TOP-53 は α₁-酸性糖タンパク (AGP) と結合することが分かっているため、ヒトにおける非結合率 (fu) と AGP (μ M) の関係を解析すると、 $fu = 1 / (3.68 + 0.59 \times AGP)$ と表すことができ ($r^2 = 0.41$, $p < 0.0001$)、fu を予測できる可能性も示唆された。DN-8951f においても、イヌとヒトの薬物動態および薬力学的関係を比較した。総濃度のクリアランスはイヌはヒトの 15.4 倍であったのに対し、蛋白非結合薬物のクリアランスは 2.7 倍であった。同様に、AUC と白血球減少率の関係も AUC₀ よりも AUC_∞ の方がイヌとヒトの曲線は近接していた。蛋白非結合薬物の割合は、ヒトで 2.5%、イヌで 14% であった。

ヒトでの初めての第 1 相試験となる 4 試験 (薬剤 ABDE) においては、開始量を 1/10 マウス LD₁₀ としたものが 2 試験、1/3 イヌ TDL としたものが 2 試験であった。1/3 イヌ TDL を採用した 2 試験は、1/10 マウス LD₁₀ より低値、難溶性のため 1/10 マウス LD₁₀ 決定不能、のためであった。これら 4 試験の増量法は、Fibonacci 変

法、PGDE (pharmacokinetically-guided dose escalation)、倍増法 (規定の毒性出現後 Fibonacci 変法) であった。一方、海外データのある薬剤 C では、開始量を推奨量の 50%、増量幅を開始量の 25% としており、異なる投与方法 (単回) の臨床データのある 2 剤では開始量を前試験で安全とされる投与量を 5 分割して用い、増量幅をそれぞれ 50%、100% と設定している。Fibonacci 変法を採用した 2 試験のうち、薬剤 B は好中球減少が DLT となりレベル 5 が MTD、レベル 4 が推奨量とほぼねらいどおりの結果となった。一方、薬剤 D ではレベル 5 まで増量され、倦怠感・肺毒性などの非血液毒性を総合評価した上でこれ以上の増量は行わないと決定された。これは海外で同時進行した試験の結果を考え合わせたうえでの結論で、それなしではさらに増量は続いたと考えられる。薬剤 E の試験では、一定の毒性が出現するまで倍増法その後 Fibonacci 変法とする計画であったが、第 1 例めに肝障害 grade 3 の毒性が出現し、直ちに Fibonacci 変法が採用された。しかし、問題となる肝障害はその後全く出現せず、6 投与量レベルまで増量され、DLT は血液毒性となった。結局、第 1 例以後の 10 例ほどはほとんど毒性を認めず、総計 29 例の登録を要することとなった。PGDE を採用した薬剤 A では、規定に従うと開始量の 6 倍量への増量となったが、効果安全性委員会の勧告によりまず半分の 3 倍量へ増量された。3 倍量までの症例の半数に投与局所の血管炎が認められていたが、次レベル (レベル 3) 6 倍量の 1 例めで薬剤の局所刺激性に起因する重篤な毒性がみられたため、試験は全 7 例で終了となった。薬剤 C は、予定どおり海外での第 1 相試験とほぼ同様の結果を得て、終了した。薬剤 F は、国内の単回投与方法のデータが存在したが、そこで報告されてなかった血管炎によりわずか 4 例で試験を終了する結果となった。

E. 考察

SMRP の機能解析の為に、汎用性のある抗体の作製を継続する必要がある。正常およびがん組織における SMRP の新規スライミングバリエーションには何らかの生物学的意義があると推察されるため、その機能の解析が必要である。1,4-benzothiazepin 誘導体は臨床応用可能なシスプラチン耐性克服剤と考えられ、毒性、薬物集積増強効果の作用機転をさらに明確にする必要がある。

YB-1 の核内局在について予後や悪性因子であることを卵巣がんで見出したが、肺がんをはじめその他の腫瘍

においてはどうか、また p53 との関連性はどうかを明らかにする必要がある。P-糖蛋白質の発現上昇に関して YB-1 の核内局在やプロモーター領域の低メチル化と関連する症例以外に遺伝子再編成やその他転写因子の関与などを検討して、がん特異的な発現機構からみた P-糖蛋白質の分子診断を進める。MRP3 や IL13 レセプターの発現については抗がん剤感受性診断の分子標的になるか否かは臨床検体での発現について検討する必要がある。

MRP は CPT-11 と SN-38 を輸送しこれらの薬剤の耐性に関与している。CPT-11 を用いて腫瘍の治療を行う時には、MRP の発現レベルを考慮すべきであろう。MRP の関与した多剤耐性を克服する薬剤中には MRP の機能を阻害するとともに、その他の耐性克服作用もあわせ持つ薬剤があることが分かり新しい耐性克服薬剤として注目される。cMOAT が抗がん剤耐性を担っていることが明らかとなった。耐性薬剤のスペクトラムは MRP の場合と異なること、cMOAT の輸送機能が CsA で強く抑制されることが判った。これらの結果は cMOAT と MRP の輸送基質が異なっていることを示している。cMOAT が臨床でどの程度耐性に関与しているかを検討する必要がある。LRP が多剤耐性に関与していることが、LRP mRNA 特異的リボザイムを用いた実験で確認された。今後、LRP がどのように細胞質と核の間の輸送、小胞輸送に関与しているか、また、LRP の腫瘍での発現と予後との関係について調べたい。ATP7B はシスプラチン耐性に関与していた。今後 ATP7B の遺伝子に突然変異を導入し、ATP7B のシスプラチン結合部位や、シスプラチンを細胞外へ輸送する分子機構について解明していきたい。シスプラチン耐性 KCP-1 細胞で発現が増加している遺伝子がシスプラチン耐性に関与しているかを、トランスフェクション実験で明らかにする必要がある。

p53 遺伝子の表現型はシトシンクレオシドに対する *in vitro* および *in vivo* における薬剤感受性を規定する重要な因子の一つとなることが明らかにされた。特に、シトシンクレオシドに対する薬剤感受性の違いは *in vivo* において顕著に認められ、このことは変異型 p53 を有する細胞であっても野生型 allele が維持されている場合、低濃度で感受性の差がより明瞭に現れることを示している。

これまでの抗がん剤耐性の研究は dominant な抗がん剤耐性遺伝子に関する研究が中心であったが、細胞の抗がん剤

感受性に関与する遺伝子群の同定は、がん細胞の抗がん剤耐性化機構の理解に新しい貢献をすると期待される。2 系の異なる camptothecin 耐性細胞で、変異型 DNA topoisomerase I mRNA の発現が見られた。RPMI8402 細胞の CPT-11 耐性細胞 K5 で発現している Gly-533 変異型 DNA topoisomerase I は、dominant に camptothecin 耐性遺伝子として働くことが推定された。HT-29 細胞の camptothecin 耐性株 HT-29/CPT で発現している exon 3 から exon 9 までが欠損した DNA topoisomerase I mRNA は、細胞内の CPT 感受性な DNA topoisomerase I の発現を減少させて camptothecin 耐性としていることが推定された。

ヒトにおける薬物動態および薬力学的関係を前臨床試験の結果から予測する場合、蛋白結合率に種差が存在するときは非結合薬物の動態指標を用いる必要があることが確認された。したがって、PGDE を臨床第 I 相試験に適用する場合、マウスとヒトにおける蛋白結合率に種差があるときは、非結合薬物の AUC を指標に PGDE を遂行する必要がある。先行する臨床試験の結果が利用でき、結合蛋白の濃度からヒトの *in vivo* における蛋白非結合率が予測できる場合は、非結合薬物の濃度を測定しなくても PGDE を適用できる可能性はある。今後は、PGDE で 100% 増量から 33% 増量に切り替える投与量（マウス LD₁₀ の AUC の 40% となる投与量）の妥当性や、DLT 以外の毒性情報を利用する方法の検討も、抗がん剤の第 I 相試験の方法を改善するために必要である。

初めての第 I 相試験では、規定どおり 1/10 マウス LD₁₀ あるいは 1/3 イヌ TDL が初回投与量の決定に採用されている。薬剤 E では 1/10 マウス LD₁₀ を採用した場合、すでに開始量で MTD を越える結果となり、1/3 イヌ TDL の採用が妥当であった。Fibonacci 変法による増量ではほぼうまく機能していたが、多くの増量段階を必要としてしまう可能性は十分考えられた。その改良型ともいえる倍増法との併用は、薬剤 E の場合 1 例のみの"特殊な毒性"のためうまく機能せず、結局多くの症例を必要とした。改善策としては、複数例の毒性を確認して Fibonacci に切り替える方法が考えられる。PGDE を採用した試験では、マウスと異なる毒性の出現という PGDE 採用の前提条件よりはるかに落ち穴をみることとなった。増量において薬物動態の情報は極めて有用ではあるが、PGDE のみに頼るのはリスクが高いと言わざるを得ない。すでに臨床データのある場合には、より高い開始量の設定が可能であるが、違う投与法での新た

な毒性の出現の可能性に十分な注意が必要である。また、特に DLT が非血液毒性であった場合にうまく機能しない傾向がみられた。

F. 研究発表

1. Oshita, F., Kameda, Y., Nishio, K., Tanaka, G., Yamada, K., Nomura, I., Nakayama, H., and Noda, K. Increased expression levels of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 correlate with good responses to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncology Rep.*, (in press).
2. Fukuoka, K., Nishio, K., Fukumoto, H., Arioka, H., Kurokawa, H., Ishida, T., Iwamoto, Y., Tomonari, A., Suzuki, T., Usuda, J., Narita, N., and Saijo, N. Ectopic p16INK Expression Enhances CPT-11-induced Apoptosis Through The Increased Delay in S Phase Progression in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Int. J. Cancer*, (in press).
3. Oguri, T., Isobe, T., Suzuki, T., Nishio, K., Fujiwara, Y., Katoh, O. and Yamakido, M. Increased expression of the MRP5 gene is associated with exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int. J. Cancer* (in press).
4. Saijo, N., Tamura, T. and Nishio, K. Problems in the development of target-based drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (in press).
5. Kubota, K., Saijo, N., et al., Phase II study of concurrent chemotherapy and radiotherapy for unresectable stage III non-small-cell lung cancer: long-term follow-up results. *Japan Clinical Oncology Group Protocol 8902. Ann Oncol.*, (in press).
6. Arima, J., Imazono, Y., Takebayashi Y., Nishiyama K., Shirahama, T., Akiba, S., Akiyama, S. and Ohi, Y. Expression of thymidine phosphorylase as an indicator of poor prognosis in human transitional cell carcinoma. *Cancer* (in press).
7. Shimaoka, S., Matushita, S., Nitanda, T., Matsuda, A., Nioh, T., Suenaga, T., Nishimata, Y., Akiba, S., and Akiyama, S. Role of thymidine phosphorylase expression in the invasion of gastric carcinomas. *Cancer* (in press).
8. Komatsu, M., Sumizawa, T., Mutoh, M., Chen, Z-S., Terada, K., Furukawa, T., Yang, X-L., Hui Gao, Miura, T., Sigiyaama T., and Akiyama, S. Copper transporting P-type ATPase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res.* (in press).
9. Ren X-Q., Furukawa, T., Chen, Z-S., Okumura, H., Aoki, S., Sumizawa, T., Tani, A., Komatsu, M., Mei X-D, and Akiyama, S. Functional comparison between YCF1 and MRP1 expressed in Sf21 insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (in press).
10. Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Pastan, I., and Gottesman, M. M. Bicistronic retrovirus vectors encoding drug-resistant genes. In: R. A. Aubin (ed.), *Transgene Delivery and Expression in Mammalian Cells (a volume of Methods in Molecular Biology)* Human Press, (in press).
11. Yanase, K., Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Ohhara, T., Andoh, T., and Tsuruo, T. Identification and characterization of a deletion mutant of DNA topoisomerase I mRNA in a camptothecin-resistant subline of human colon carcinoma. *Jpn.J. Cancer Res.*, (in press).
12. Kubota, K., Saijo, N., et al., Phase I study of weekly docetaxel, carboplatin, and concurrent thoracic radiotherapy in stage III non-small-cell lung cancer. *Proc. ASCO 19: #2105, 2000.*
13. Usuda, J., Saijo, N., Fukuoka, K., Fukumoto, H., Hyo-Jeng. Kuh, Nakamura, T., Koh, Y., Suzuki, T., Koizumi, F., Tamura, T., Kato, H., and Nishio, K. Molecular determinants of UCN-01 induced growth inhibition in human lung cancer cells. *Int. J. Cancer*, 85: 275-280, (2000).
14. Suzuki, T., Sasaki, H., H-J. Kuh, Agui, M., Tatsumi, Y., Tanabe, S., Terada, M., Saijo, N., and Nishio, K. A Detailed Structural Analysis on Both Human MRP5 and Mouse mrp5 Transcripts. *Gene*. 242: 167-173, (2000).
15. Saijo, N., Antiemetic therapy. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 29: 57, (1999).
16. Sekine, I., Tamura, T., Kunitoh, H., Kubota, K.

- Shinkai, T., Kamiya, T., Saijo, N. Progressive disease rate as a surrogate endpoint of phase II trials of non-small cell lung cancer. *Ann. Oncol.*, 10: 731-733, (1999).
17. Kunitoh, H., Sekine, I., Kubota, K., Tamura, T., Shinkai, T., Kodama, T., Saijo, N., Naruke, T., Yamaguchi, N. Histologic types of lung carcinoma and related family history of anatomic sites and histologic types of cancers. *Cancer*, 86: 1182-1188, (1999).
18. Okamoto, H., Watanabe, K., Nishiwaki, Y., Mori, K., Kurita, Y., Hayashi, I., Masutani, M., Nakata, K., Tsuchiya, S., Isobe, H., Saijo, N. & JCOG. Phase II study of area under the plasma concentration-versus time curve-based carboplatin plus standard dose intravenous etoposide in elderly patients with small cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 17: 3540-3545, (1999).
19. Harada, T., Takabe, K., Hara, T., Yamamoto, N., Tamura, T., Saijo, N. Inhibitory effects off repeated iv injections of dexamethasone on pulmonary toxicity of a new mitomycin C analogue, KW-2149, in a novel rat model. *J. Toxicol. Sci.*, (1999).
20. Fukumoto, H., Tamura, T., Kamiya, Y., Usuda, J., Suzuki, T., Kanzawa, F., H-J. Kuh, Ohe, Y., Saijo, N., and Nishio, K. Activation-induced apoptosis of peripheral lymphocytes treated with 7-hydroxystaurosporine, UCN-01. *Invest. New Drugs* 17: 335-341, (1999).
21. Nishio, K., Nakamura, T., Koh, Y., Suzuki, T., Fukumoto, H., and Saijo, N. Drug resistance in lung cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, 11:109-115, (1999)
22. Arioka, H., Nishio, K., Ishida, T., Fukumoto, H., Fukuoka, K., Nomoto, T., Kurokawa, H., Yokote, H., Abe, S., and Saijo, N. Enhancement of Cisplatin Sensitivity in High Mobility Group 2 cDNA-transfected Human Lung Cancer Cell. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 108-115, (1999).
23. Kanzawa, F., Nishio, K., Fukuoka, K., Sunami, T., and Saijo, N. In vitro interactions of a new derivative of spicamycin, KRN5500, and other anticancer drugs using a three-dimensional model. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 43:353-363, (1999).
24. Kurokawa, H., Nishio, K., Fukumoto, H., Tomonari, A., Suzuki, T., and Saijo, N. Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells. *Oncology Rep.*, 6:33-37 (1999).
25. Nishio, K., and Saijo, N. Cytoskeletons and antimetabolic agents developed in Japan. *Anti-Cancer Drug Design*, 14:133-141, (1999).
26. Sunami, T., Nishio, K., Kanzawa, F., Fukuoka, K., Kudoh, S., Yoshikawa, J., and Saijo, N. Combination effects of TAS-103, a novel dual topoisomerase I and II inhibitor, with other anticancer agents on human small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 43: 394-401, (1999).
27. Tanaka, T., Uchiumi, T., Nomoto, M., Kohno, K., Kondo, T., Nishio, K., Saijo, N., and Kuwano, M. Cellular balance of glutathione levels through the expression of γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione thiol transferase genes in human hepatic cells resistant to a glutathione poison. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1427: 367-377, (1999).
28. Nishio, K., Fukuoka, K., Fukumoto, H., Sunami, T., Iwamoto, Y., Suzuki, T., Usuda, J., and Saijo, N. Mitogen-activated protein kinase antisense oligonucleotide inhibits the growth of human lung cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 14:461-469, (1999).
29. Fukumoto, H., Nishio, K., Ohta, S., Hanai, N., Fukuoka, K., Ohe, Y., Sugihara, K., Kodama, T., and Saijo, N. Effect of a chimeric anti-ganglioside GM2 antibody on ganglioside GM2-expressing human solid tumors in vivo. *Int. J. Cancer*, 82: 759-764, (1999).
30. Yokote, H., Nishio, K., Arioka, H., Kurokawa, H., Fukuoka, K., Fukumoto, H., Ishida, T., Terada, T., Itakura, T., and Saijo, N. The C-terminal domain of p53 catalyzes DNA-renaturation and strand exchange toward annealing between intact ssDNAs and toward eliminating damaged ssDNA from duplex formation through preferential

- recognition of damaged DNA by a duocarmycin. *Mut. Res.*, 409:147-162, (1999).
31. Kamura, T., Yahata, H., Amada, S., Ogawa, S., Sonoda, T., Kobayashi H., Mitsumoto M., Kohno, K., Kuwano, M., Nakano, H. Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer*, 85: 2450-2454, (1999).
32. Ise, T., Nagatani, G., Imamura, T., Kato, K., Takano, H., Nomoto, M., Izumi, H., Ohmori, H., Okamoto, T., Ohga, T., Uchiumi, T., Kuwano, M. and Kohno, K. Transcription factor Y box-binding protein-1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res.*, 59: 342-346, (1999).
33. Harada, T., Nagayama, J., Kohno, K., Mickley, L., Fojo, T., Kuwano, M. and Wada, M. Alu-associated interstitial deletions and chromosomal rearrangement in two human multidrug resistant cell line. *Int. J. Cancer*: in press (1999).
34. Kusaba, H., Nakayama, M., Harada, T., Nomoto, M., Kohno, K., Kuwano, M., and Wada M. Association of 5' CpG demethylation and altered chromatin structure in the promoter region with transcriptional activation of multidrug resistance 1 gene in human cancer cells. *Europ. J. Biochem.*, 262: 924-932, (1999).
35. Kuwano, M., Toh, S., Uchiumi, T., Takano, H., Kohno, K. and Wada, M. Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance. *Anti-Cancer Drug Design*, 14: 123-131 (1999)
36. Kawabe, T., Chen, Z., Wada, M., Uchiumi, T., Ono, M., Akiyama, S. and Kuwano, M. Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter(cMOAT/MRP2). *FEBS Lett.* 456: 327-331, (1999).
37. Chen, Z., Kawabe, T., Ono, M., Aoki, S., Sumizawa, T., Furukawa, T., Uchiumi, T., Wada, M., Kuwano, M. and Akiyama, S. Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Molec. Pharmacology*, 56: 1219-1228, (1999).
38. Tanaka, T., Uchiumi, T., Hinoshita, E., Inokuchi, A., Toh, S., Wada, M., Takano, H., Kohno, K., and Kuwano, M. The human multispecific resistance protein2 gene : functional characterization of 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology* 30: 1507-1512, (1999).
39. Takano, H., Ise, T., Nomoto, M., Kato, K., Murakami, T., Ohmori, H., Imamura, T., Nagatani, G., Okamoto, T., Ohta, R., Furukawa, M., Shibao, K., Izumi, H., Kuwano, M. and Kohno, K. Structural and functional analysis of the control region of human DNA topoisomerase II α gene in drug resistant cells. *Anti-Cancer Drug Design*, 14: 87-92, (1999).
40. Sibao, K., Takano, H., Nakamura, Y., Okazaki, K., Nagata, N., Izumi, H., Uchiumi, T., Kuwano, M., Kohno, K. and Itoh, H. Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II α genes in human colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer* 83: 732-737, (1999).
41. Ise, T., Izumi, H., Nagatani, G., Takano, H., Wada, M., Kuwano, M. and Kohno, K. Structural characterization of the human interleukin-13 receptor α 1 gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265: 387-394, (1999).
42. Takebayashi, Y., Natsugoe, S., Baba, M., Akiba, S., Fukumoto, T., Miyadera, K., Yamamoto, Y., Takao, S., Akiyama, S. and Aikou T. Thymidine phosphorylase in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 85: 282-289, (1999).
43. Chu, X.-Y., Suzuki, H., Ueda, K., Kato, Y., Akiyama, S. and Sugiyama Y. Active efflux of CPT-11 and its metabolites in human KB-derived cell lines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288: 753-741, (1999).
44. Fukuiwa, T., Takebayashi, Y., Akiba, S., Matsuzaki, T., Hanamura, Y., Miyadera, K., Yamada, Y., and Akiyama, S. Expression of

- thymidine phosphorylase and vascular endothelial cell growth factor in human head and neck squamous cell carcinoma and their different characteristics. *Cancer*, 85: 960-969, (1999).
45. Fukuda, S., Shirahama, T., Imazono, Y., Tsushima, T., Ohmori, H., Kayajima, T., Take, S., Nishiyama, K., Yonezawa, S., Akiba, S., Akiyama S., and Ohi, Y. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. *Cancer*, 85: 1323-1330, (1999).
46. Chen, Z.-S., Sumizawa, T., Furukawa, T., Ono, K., Tani, A., Komatsu, M., and Akiyama S. An enhanced active efflux of CPT-11 and SN-38 in cisplatin-resistant human KB carcinoma cells. *Cancer Lett.*, 138: 13-22, (1999).
47. Ueda, K., Suzuki, H., Akiyama S., and Sugiyama, Y. Differences in substrate specificity among GS-X pump family members: Comparison between MRP and a novel transporter expressed on a cisplatin-resistant cell line (KCP-4). *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 439-447, (1999).
48. Matsushita, S., Nitanda, T., Furukawa, T., Sumizawa, T., Tani, A., Nishimoto, K., Akiba, S., Miyadera, K., Fukushima, M., Yamada, Y., Yoshida, H., Kanzaki, T., and Akiyama S. The effect of a thymidine phosphorylase inhibitor on angiogenesis and apoptosis in tumors. *Cancer Res.*, 59: 1911-1961, (1999).
49. Chen, Z.S., Furukawa, T., Sumizawa, T., Ono, K., Ueda, K., Seto, K., and Akiyama S. ATP-dependent efflux of CPT-11 and SN-38 by the multidrug resistance protein (MRP) and its inhibition by PAK-104. *Mol. Pharmacol.* 55: 921-928, (1999).
50. Kitazono, M., Sumizawa, T., Takebayashi, Y., Chen, Z.-S., Furukawa, T., Nagayama, S., Tani, A., Takao, S., Aikou, T., and Akiyama S. Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 91: 1647-1653, (1999).
51. Aoki, S., Setiawan, A., Yoshida, Y., Higuchi, K., Fudetani, R., Chen, Z.-S., Sumizawa, T., Akiyama S., and Kobayashi, M. Reversal of multidrug resistance in human carcinoma cell line by agosterols, marine spongean sterols. *Tetrahedron*, 55: 13965-13972, (1999).
52. Hasui, K., Sato E., Kitazono M., Akiyama S., Tanaka, Y., Higashi, M., Taki, C., Sakoda A., Tashiro, Y., and Shirahama, H. Immunohistochemical analysis of thymidine phosphorylase overexpression in malignant lymphomas (ML), especially in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Dendritic Cells* 9: 15-25, (1999).
53. Yanase, K., Sugimoto Y., Andoh, T., Tsuruo, T., Retroviral expression of a mutant (Gly-533) human DNA topoisomerase I cDNA confers a dominant form of camptothecin resistance. *Int. J. Cancer*, 81: 134-140, (1999).
54. Hibino, H., Tani, K., Ikebuchi, K., Wu, M., Sugiyama, H., Nakazaki, Y., Tanabe, T., Takahashi, S., Tojo, A., Suzuki, S., Tanioka, Sugimoto Y., Nakahata, T., and Asano, S., The common marmosets as a target preclinical primate model for cytokine and gene therapy studies. *Blood* 93: 2839-2848, (1999).
55. Ando, M., Ando, Y., Sugiura, A., Minami H., Saka, H., Shimokata, K., Hasegawa, Y. Prognostic factors for short-term survival in patients with stage IV non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 249-253, (1999).
56. Kodama, K., Yokose, T., Takahashi, K., Minami H., Nagai, K., Matsuno, Y., Nishiwaki, Y., Ochiai, A. Low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in the lung: a case report of a case with pleura dissemination. *Lung Cancer*, 24: 175-178, (1999).
57. Minami H., Lad, T. E., Nicholas, M. K., Vokes, E. E., Ratain, M. J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 9-aminocamptothecin infused over 72 hours in phase II studies. *Clin Cancer Res* 5: 1325-1330, (1999).
58. Ando, M., Minami H., Ando, Y., Sakai, S., Shimon, Y., Sugiura, S., Saka, H., Hasegawa, Y., Shimokata, K. Pharmacological analysis of

- etoposide in elderly patients with lung cancer. *Clin Cancer Res* 5: 16909-1695, (1999).
59. Takeda, K., Negoro, S., Kudoh, S., Okishio, K., Masuda, N., Takada, M., Tanaka, M., Nakajima, T., Tada, T., and Fukuoka, M. Phase I study of weekly irinotecan and concurrent radiation therapy for locally advanced non-small cell lung cancer. *Br.J.Cancer*, 79: 1462-1467, (1999).
60. Tohda, Y., Kudoh, S., Fukuoka, M., and Furuse, K. Intrapleural administration of cisplatin and etoposide to treat malignant pleural effusions in patients with non-small cell lung cancer. *Chemotherapy*, 45: 197-204, (1999).
61. Yamamoto, N., Tamura, T., Fukuoka, M., and Saijo, N. Survival and prognostic factors in lung cancer patients treated in phase I trials: Japanese experience. *Int.J.Oncol.*, 15: 737-41, (1999).
62. Furuse, K., Fukuoka, M., Kawahara, M., Nishikawa, H., Takada, Y., Kudoh, S., Katagami, N., and Ariyoshi, Y. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung. *J.Clin. Oncol.*, 17: 2692- , (1999).
63. Furuse, K., Kawahara, M., Nishiwaki, Y., Fukuoka, M., Takada, M., Miyashita, M., and Ohashi, Y. Phase I/II study of vinorelbine, mitomycin, and cisplatin for stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.*, 17: 3195-3200, (1999).
64. Masuda, N., Negoro, S., Takeda, K., Takifuji, N., Hirashima, T., Yana, T., Kurata, N., Kuwabara, T., Kobayashi, S., Kudoh, S., Matsui, K., Takada, M., and Fukuoka, M. Phase I and pharmacologic study of oral (E)-2'-deoxy-2'-(fluoromethylene) cytidine on a daily x 5-day schedule. *Invest New Drugs*, 16: 245-254, (1999).
65. Komiya, T., Hirashima, T., Kikui, M., Fukuoka, M., Ohno, A., and Kawase, I. GPI-anchored molecule-like protein (GML) expression in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Anticancer Res.*, 19: 4315-4319. (1999).

厚生科学研究費補助金（がん克服10ヶ年総合戦略研究事業）
分担研究報告書

新しいがん薬物療法の研究
分担研究課題 分子化学療法による進行がんの制御に関する研究

分担研究者 西條長宏 国立がんセンター中央病院 部長

研究要旨：切除不能 III 期非小細胞肺癌を対象にカルボプラチン、ドセタキセルの weekly 投与と通常分割の胸部放射線治療同時併用療法の第 I 相試験を行った。ドセタキセルは 20 mg/m² に固定し、カルボプラチンの開始用量を AUC 目標値=1 mg/ml x min とし、0.5 ずつ増量した。12 例が登録された。主な用量制限毒性は食道炎、肺毒性であった。最大耐用量は level 2（カルボプラチン AUC=1.5）であり、推奨用量は level 1 と考えられた。

A. 研究目的

切除不能 III 期非小細胞肺癌に対する weekly ドセタキセル、カルボプラチンと胸部放射線治療同時併用療法におけるカルボプラチンの至適投与量の決定および有害反応、奏効率、全生存期間の検討。

B. 研究計画

対象は未治療の IIIA、IIIB 非小細胞肺癌患者で、年齢 75 歳以下、performance status (PS) 0-1、適当な臓器機能を有する症例とした。胸部放射線治療は通常分割法で総線量 60 Gy、ドセタキセルの投与量は 20 mg/m²/week に固定し、カルボプラチンの増量を試みた。

C. 研究方法

カルボプラチンの投与量は Calvert の式を用い目標 AUC を設定した。開始用量 (level 1) の目標 AUC=1 mg/ml x min とし、0.5 ずつ増量した。胸部放射線治療は 1 日 1 回 2 Gy、週 5 回。照射野は腫瘍辺縁より 1.5 cm のマージンを取り、同側肺門、両側上縦隔リンパ節を含め、照射野は一側肺の 1/2 を超えない範囲とした。同一用量において 3 症例の検討を行い、DLT が少なくとも 1 例に出現した場合はさらに 3 例の症例追加を行った。6 例中 DLT が 3 例以上に出現した場合は増量を中止し、その段階を最大耐量 (MTD) とした。推奨用量はその他の毒性、奏効率から総合的に判断し、MTD あるいはその一つ下のレベルとした。

D. 研究結果

1998 年 7 月から 1999 年 9 月まで 12 例が登録

された。Level 1 で登録された 6 例中 5 例は予定された治療を完遂したが、level 2 に登録された 6 例中、6 サイクルの化学療法が施行された症例は 3 例のみであった。血液毒性は比較的軽度で、level 1 での grade 3 の白血球減少 1 例、level 2 で grade 3 の白血球、好中球、血小板減少を 1 例に認めたのみであった。Level 1 では 1 例に grade 5 の肺毒性を認めた以外は grade 3/4 の非血液毒性を認めなかった。Level 2 では 4 例に grade 3 の食道炎、1 例に grade 3 の肺毒性を認めた。Level 2 での DLT は 4 例に認め、MTD とした。抗腫瘍効果は 12 例中 PR11 例、NC1 例で奏効率 92% であった。推奨用量は level 1（ドセタキセル 20 mg/m²、カルボプラチン目標 AUC=1 mg/ml x min）と考えられた。

E. 考察

切除不能 III 期非小細胞肺癌に対する標準的治療は化学療法と胸部放射線治療との併用量法であり、全生存期間の延長と共に長期生存例の増加も報告されている。本研究でのカルボプラチンの至適用量は低かったが、ドセタキセルの放射線増感効果の強さがこの結果に影響している可能性がある。

F. 発表論文

1. Saijo, N.,

Antiemetic therapy.

Jpn. J. Clin. Oncol., 29: 57, 1999

2. Sekine, I., Tamura, T., Kunitoh, H., Kubota, K., Shinkai, T., Kamiya, T., Saijo, N.,

Progressive disease rate as a surrogate endpoint of phase II trials of non-small cell lung cancer.

Ann. Oncol. , 10: 731-733, 1999

3. Kunitoh, H., Sekine, I., Kubota, K., Tamura, T., Shinkai, T., Kodama, T., Saijo, N., Naruke, T., Yamaguchi, N.,

Histologic types of lung carcinoma and related family history of anatomic sites and histologic types of cancers.

Cancer, 86: 1182-1188, 1999

4. Okamoto, H., Watanabe, K., Nishiwaki, Y., Mori, K., Kurita, Y., Hayashi, I., Masutani, M., Nakata, K., Tsuchiya, S., Isobe, H., Saijo, N. & JCOG

Phase II study of area under the plasma concentration-versus time curve-based carboplatin plus standard dose intravenous etoposide in elderly patients with small cell lung cancer.

J. Clin. Oncol. , 17: 3540-3545, 1999

5. Yamamoto, N., Tamura, T., Fukuoka, M., Saijo, N.

Survival and prognostic factors in lung cancer patients treated in phase I trials: Japanese experience

Int. J. Oncol. , 15: 737-741, 1999

6. Harada, T., Takabe, K., Hara, T., Yamamoto, N., Tamura, T., Saijo, N.

Inhibitory effects off repeated iv injections of dexamethasone on pulmonary toxicity of a new mitomycin C analogue, KW-2149, in a novel rat model.

J. Toxicol. Sci., 1999

7. Kubota, K., Saijo, N., et al.

Phase I study of weekly docetaxel, carboplatin, and concurrent thoracic radiotherapy in stage III non-small-cell lung cancer.

Proc. ASCO 19: #2105, 2000

8. Kubota, K., Saijo, N., et al.

Phase II study of concurrent chemotherapy and radiotherapy for unresectable stage III non-small-cell lung cancer: long-term follow-up results. Japan Clinical Oncology Group Protocol 8902.

Ann Oncol. , in press

新規薬剤輸送ポンプSMRPの機能の解析とシスプラチン耐性克服法の開発

分担研究者 西尾 和人 国立がんセンター研究所薬効試験部・室長

研究要旨

SMRP遺伝子がSMRP5のサブリングバリエーションであること、正常組織がん組織における発現が臓器により異なることを示した。新規ベンゾチアゼピン化合物が肺がんにおけるシスプラチン耐性解除作用を*in vitro* および *in vivo*で有することを発見した。

A. 研究目的

固形がんに対する癌化学療法による治療成績の向上には、抗がん剤に対する耐性の克服は重要である。とくに肺がん等、固形がんに対し中心的に用いられているシスプラチン（プラチナ化合物）に対する耐性は、多剤耐性機構とは異なり、その作用機序の解明も克服法の開発に重要である。当研究においてはシスプラチンを中心とする抗がん剤耐性の機序の解明およびその克服法の開発を目的とする。

B. 研究方法

(1) 抗SMRP抗体の作成、細胞内分布の検討： SMRP特異的なペプチド抗体、リコンビナントの融合蛋白質を作成し、ウサギに静脈内投与し、抗体価上昇ののち、血清採取、抗体精製を行う。同抗体のウエスタンブロットリング、免疫染色、フローサイトメトリーによるSMRPタンパクに対する染色性および特異性を検討する。

(2) SMRPの正常およびがん組織における転写産物の検討： ヒトSMRPのマウスホモログのクローニングをEST検索およびマウスライブラリーのブランクハイブリダイゼーションにより行い、ヒトSMRPとの塩基配列の比較により、構造解析をおこなう。転写物のMRP5との異同を検討する。またヒト・マウスにおける正常とがん組織におけるMRP5/SMRPの転写物発現様式を検討する。21種類のヒト正常組織のcDNAライブラリーを用いSMRP/MRP5の発現をRT-PCR法によって検討する。また消化管がん患者26例（胃がん6例、食道がん3例、大腸がん17例）の手術検体の腫瘍および正常組織において検討する。

(3) シスプラチン耐性克服剤の同定とその *in vitro* および *in vivo*における耐性克服作用およびその作用機序の決定： 細胞内カルシウム動態に影響を与える化合物群のうち、心毒性を有さない新規化合物を選択する。選択した同化合物（1,4-benzothiazepin誘導体）によるヒトシスプラチン耐性肺がん細胞に対するシスプラチン耐性克服作用を、*in vitro* MTTアッセイ、*in vivo* 担がんマウスモデルで検討する。作用機序の検討として、腫瘍内シスプラチン集積に対する同化合物の効果を検討する。

同研究は基礎検討であるため倫理的に問題ないと考

えられる。

C. 研究結果

(1) 抗SMRP抗体の作成および免疫染色による細胞内分布の検討： ペプチド静注により抗体の上昇をみとめ抗SMRP抗体を作製、精製した。同ポリクロナール抗体によりウエスタンブロットリングにより、目的の分子量を有するバンドが検出されたが、染色には高濃度の抗体を必要とした。また免疫染色においては細胞質小器官に対する非特異的染色、フローサイトメトリーによる染色に特異性が乏しかった。

(2) SMRPの正常およびがん組織における転写産物の検討： マウスSMRP/MRP5ホモログをクローニングしmrp5と命名した。ヒト・マウスの構造比較によりSMRPはMRP5のsplicing variantである可能性が示唆された。20種類の正常組織のcDNAライブラリーでMRP5およびSMRPの発現が見られた。唾液腺でMRP5の発現が見とめず、脳下垂体等で少なくとも2つの新規splicing variantが発現している結果を得た。消化管腫瘍部全例でSMRPとMRP5の共発現が見られた。

(3) シスプラチン耐性克服剤の同定とその *in vitro* および *in vivo*における耐性克服作用：

1,4-benzothiazepin誘導体（K201）のシスプラチン耐性克服効果を*in vitro* MTTアッセイで検討した。シスプラチン耐性細胞PC-14/CDDPにおいて、単独で細胞毒性の出現しない濃度10 μ Mでシスプラチン耐性を親株のレベルまで克服した。親株に対する感受性増強効果は軽微であった。PC-14/CDDPのシスプラチンの細胞内集積はK201の存在により有意に増加し、細胞内集積の増加作用が克服機序と推察された。また担がんマウスモデルにおけるシスプラチンの同耐性細胞に対する抗腫瘍効果は、シスプラチンとK201の同時投与（*i. v.*）により増強し、明らかな急性毒性はみとめなかった。

D. 考察

SMRPの機能解析の為に、汎用性のある抗体の作製を継続する必要がある。正常およびがん組織におけるSMRPの新規サブリングバリエーションの存在は何らかの生物学的意義があると推察されるため、その機能の解析が必要である。1,4-benzothiazepin誘導体は臨床応

用可能なシスプラチン耐性克服剤と考えられ、毒性、薬物集積増強効果の作用機転をさらに明確にする必要がある。同研究において、特に耐性克服の観点から、がん薬物療法の治療成績の向上に寄与する可能性があると考えられた。

E. 結論

新規ベンゾチアゼピン化合物が肺がんにおけるシスプラチン耐性解除作用を *in vitro* および *in vivo* で有することを見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Usuda, J., Saijo, N., Fukuoka, K., Fukumoto, H., Hyo-Jeng. Kuh, Nakamura, T., Koh, Y., Suzuki, T., Koizumi, F., Tamura, T., Kato, H., and Nishio, K. Molecular determinants of UCN-01 induced growth inhibition in human lung cancer cells., *Int. J. Cancer*, 85: 275-280 (2000)
- 2) Fukuoka, K., Nishio, K., Fukumoto, H., Arioka, H., Kurokawa, H., Ishida, T., Iwamoto, Y., Tomonari, A., Suzuki, T., Usuda, J., Narita, N., and Saijo, N. Ectopic p16INK Expression Enhances CPT-11-induced Apoptosis Through The Increased Delay in S Phase Progression in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Int. J. Cancer*, 86:197-203 (2000)
- 3) Oguri T, Isobe T, Suzuki T, Nishio K, Fujiwara Y, Katoh O, Yamakido M Increased expression of the MRP5 gene is associated with exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int. J. Cancer* 86:950100 (2000)
- 4) Suzuki, T., Sasaki, H., H-J. Kuh, Agui, M., Tatsumi, Y., Tanabe, S., Terada, M., Saijo, N., and Nishio, K. A Detailed Structural Analysis on Both Human MRP5 and Mouse mrp5 Transcripts., *Gene*, 242: 167-173 (2000)
- 5) Fukumoto, H., Tamura, T., Kamiya, Y., Usuda, J., Suzuki, T., Kanzawa, F., H-J. Kuh, Ohe, Y., Saijo, N., and Nishio, K. Activation-induced apoptosis of peripheral lymphocytes treated with 7-hydroxystaurosporine, UCN-01., *Invest. New Drugs* 17: 335-341 (1999)
- 6) Nishio, K., Nakamura, T., Koh, Y., Suzuki, T., Fukumoto, H., and Saijo, N. Drug resistance in lung cancer., *Curr. Opin. Oncol.*, 11:109-115(1999)
- 7) Arioka, H., Nishio, K., Ishida, T., Fukumoto, H., Fukuoka, K., Nomoto, T., Kurokawa, H., Yokote, H., Abe, S., and Saijo, N. Enhancement of Cisplatin Sensitivity in High Mobility Group 2 cDNA-transfected Human Lung Cancer Cell., *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 108-115 (1999)
- 8) Kanzawa, F., Nishio, K., Fukuoka, K., Sunami, T., and Saijo, N. In vitro interactions of a new derivative of spicamycin, KRNS500, and other anticancer drugs using a three-dimensional model., *Cancer Chemother Pharmacol.*, 43:353-363 (1999)
- 9) Kurokawa, H., Nishio, K., Fukumoto, H., Tomonari, A., Suzuki, T., and Saijo, N. Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells., *Oncology Rep.*, 6:33-37 (1999)
- 10) Nishio, K., and Saijo, N. Cytoskeletons and antimetabolic agents developed in Japan., *Anti-Cancer Drug Design*, 14:133-141 (1999)
- 11) Sunami, T., Nishio, K., Kanzawa, F., Fukuoka, K., Kudoh, S., Yoshikawa, J., and Saijo, N. Combination effects of TAS-103, a novel dual topoisomerase I and II inhibitor, with other anticancer agents on human small cell lung cancer cells., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 43: 394-401 (1999)
- 12) Tanaka, T., Uchiyumi, T., Nomoto, M., Kohno, K., Kondo, T., Nishio, K., Saijo, N., and Kuwano, M. Cellular balance of glutathione levels through the expression of γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione thiol transferase genes in human hepatic cells resistant to a glutathione poison. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1427: 367-377 (1999)
- 13) Nishio, K., Fukuoka, K., Fukumoto, H., Sunami, T., Iwamoto, Y., Suzuki, T., Usuda, J., and Saijo, N. Mitogen-activated protein kinase antisense oligonucleotide inhibits the growth of human lung cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 14:461-469 (1999)
- 14) Fukumoto, H., Nishio, K., Ohta, S., Hanai, N., Fukuoka, K., Ohe, Y., Sugihara, K., Kodama, T., and Saijo, N. Effect of a chimeric anti-ganglioside GM2 antibody on ganglioside GM2-expressing human solid tumors in vivo. *Int. J. Cancer*, 82: 759-764 (1999)
- 15) Yokote, H., Nishio, K., Arioka, H., Kurokawa, H., Fukuoka, K., Fukumoto, H., Ishida, T., Terada, T., Itakura, T., and Saijo, N. The C-terminal domain of p53 catalyzes DNA-renaturation and strand exchange toward annealing between intact ssDNAs and toward eliminating damaged ssDNA from duplex formation through preferential recognition of damaged DNA by a duocarmycin. *Mut. Res.*, 409:147-162 (1999)

2. 学会発表

Suzuki T., Sasaki H., Kuh H.J., Agui M., Nakamura

T., Fukumoto H., Tanabe S., Terada, M., Saijo N. and Nishio K. Molecular cloning in human and mouse of MRP5 cDNA. PROC. AMER. ASSOC. CANCER RES. Abst 4412

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ABCトランスポーターとトポイソメラーゼを標的とした抗がん剤感受性の分子診断

分担研究者 桑野 信彦 九州大学大学院医学系研究科分子常態医学専攻生化学講座医化学分野・教授

研究要旨：ABCトランスポーターやDNAトポイソメラーゼII α のヒトがんにおける発現制御の分子標的を把握し、関連する抗がん剤の感受性を診断する分子マーカーとなるか否かを明らかにする。

A 研究目的

耐性がんの克服や副作用の軽減また適切な抗がん剤の選択に関する研究を進めることは抗がん剤治療を改善向上する上では多大な貢献が期待できる。そこでABCトランスポーター、DNAトポイソメラーゼII α やIL13レセプターの発現ならびに転写因子YB-1の分子標的に関して、

1. 腫瘍と正常組織での対比と腫瘍での特異性の有無をはっきりさせる。
2. 特異的な親和性を示し感受性を規定する抗がん剤を明らかにする。

B 研究方法

1. ヒトIL13レセプターの発現はIL13レセプターの抗体を作製して免疫沈降法や免疫染色法で調べる。さらにYB-1の抗体を用いてヒト腫瘍における核内と細胞質内発現の有無を免疫染色法で行う。
2. P-糖蛋白質やMRPファミリー遺伝子の発現などはNorthernblotおよび臨床材料での検索は定量的PCR法で進める。
3. DNAメチル化の有無についてはメチル塩基を認識する制限酵素などで切断した後SouthernblotやPCRなどで定量的な解析を進める。
4. ABCトランスポーターやIL13レセプターと感受性を示す抗がん剤との対応については、安定なセンスまたアンチセンスcDNA導入株を樹立する。

（倫理面への配慮）

ヒト腫瘍を実験の対象とする場合にはインフォームドコンセントをとり九州大学倫理委員会の許可を必ずとることにした。

C 研究結果

1. 婦人科領域の卵巣がん患者においてYB-1の核内局在を示す症例の予後が細胞質内局在を示す症例に較べて極めて悪いことが観察された¹⁾。
2. YB-1はシスプラチン処理DNAに極めて高い親和性²⁾を示した。さらにMDR1遺伝子の発現上昇にはそのプロモーター領域上のY-boxが重要である。骨肉腫や乳がんまた卵巣がん¹⁾においてY-boxへ結合するタンパク質YB-1の核また細胞質の局在がP-糖蛋白質の発現と

相関した。さらにMDR1遺伝子発現上昇に、5'-制御領域の遺伝子再編成があることを耐性ヒト乳がん細胞や大腸がん細胞で見出した。MDR1遺伝子のもう一つの機構としてプロモーター領域のCpGメチル化の有無が重要である³⁾。P-糖蛋白質発現上昇が寛解率とよく相関を示す急性骨髄性白血病において、CpGメチル化の有無がP-糖蛋白質発現と相関した。さらに化学療法後の再発の際に発現上昇の見られる膀胱がんの症例において有意にMDR1遺伝子プロモーター領域の低メチル化の傾向が観察された。

3. MDR1遺伝子のもう一つの機構としてプロモーター領域のCpGメチル化の有無が重要である³⁾。P-糖蛋白質発現上昇が寛解率とよく相関を示す急性骨髄性白血病において、CpGメチル化の有無がP-糖蛋白質発現と相関した。さらに化学療法後の再発の際に発現上昇の見られる膀胱がんの症例において有意にMDR1遺伝子プロモーター領域の低メチル化の傾向が観察された。
4. MRP2に関してシスプラチンやビンクリスチンまたCPT-11^{4, 5, 6)}を、一方MRP3に関してエトホシドの感受性に各々関与することを見出した。さらに5つのABCトランスポーターのうちMRP2のみが大腸がん症例において特異的にがん部位で発現上昇を示した。さらに肝臓での特異的発現はプロモーター上のエレメントを同定した⁷⁾。
5. DNAトポイソメラーゼII α のヒト大腸がんの症例における発現が核内のYB-1局在と有意に相関した。しかしP-糖蛋白質とは相関しなかった^{8, 9)}。
6. IL13レセプターについてはそのプロモーター領域を単離しシスプラチンによって活性化される機序を明らかにした¹⁰⁾。抗がん剤感受性との関連性については現在検討中である。

D 考察

1. YB-1の核内局在について予後や悪性因子であることを卵巣がんで見出したが、肺がんをはじめその他の腫瘍においてはどうか、またp53との関連性はどうかを明らかにする必要がある。
2. P-糖蛋白質の発現上昇に関してYB-1の核内局在やプロモーター領域の低メチル化と関連する症例以外に遺伝子再編成やその他転写因子の関与などを検討して、がん特異的な発現機構からみたP-糖蛋白質の分子診断を進めていきたい。
3. MRP3やIL13レセプターの発現については抗がん剤感受性診断の分子標的になるか否かは臨床腫瘍での発現について検討する必要がある。

る。

E 結論

1. P-糖蛋白質のヒトがんにおける発現は YB-1 の核内局在とプロモーター上の CpG のメチル化の有無を同時に検索することによつて的確な分子診断マーカーとなる。
2. MRP/cMOAT はシスプラチン、カンプトラミンやピンクリスチンの細胞外排出に関与し、大腸がんで発現上昇が見られた。
3. 大腸がんにおける DNA トポイソメラーゼ II α の発現上昇には YB-1 の核内局在が相関しており、エピポドフィロトキシン系抗がん剤感受性の診断マーカーとなる可能性を示した。

F 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kamura, T., Yahata, H., Amada, S., Ogawa, S., Sonoda, T., Kobayashi H., Mitsumoto M., Kohno, K., Kuwano, M., Nakano, H., Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer*, 85: 2450-2454 (1999)
- (2) Ise, T., Nagatani, G., Imamura, T., Kato, K., Takano, H., Nomoto, M., Izumi, H., Ohmori, H., Okamoto, T., Ohga, T., Uchiumi, T., Kuwano, M. and Kohno, K., Transcription factor Y box-binding protein-1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res.*, 59: 342-346 (1999)
- (3) Kusaba, H., Nakayama, M., Harada, T., Nomoto, M., Kohno, K., Kuwano, M., and Wada M., Association of 5' CpG demethylation and altered chromatin structure in the promoter region with transcriptional activation of multidrug resistance 1 gene in human cancer cells. *Europ J. Biochem.*, 262: 924-932 (1999)
- (4) Kuwano, M., Toh, S., Uchiumi, T., Takano, H., Kohno, K. and Wada, M., Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance. *Anti-Cancer Drug Design*, 14: 123-131 (1999)
- (5) Kawabe, T., Chen, Z., Wada, M., Uchiumi, T., Ono, M., Akiyama, S. and Kuwano, M., Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter(cMOAT/MRP2). *FEBS Lett.* 456: 327-331 (1999)
- (6) Chen, Z., Kawabe, T., Ono, M., Aoki, S., Sumizawa, T., Furukawa, T., Uchiumi, T., Wada, M., Kuwano, M. and Akiyama, S., Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter.

Molec. Pharmacology, 56: 1219-1228 (1999)

- (7) Tanaka, T., Uchiumi, T., Hinoshita, E., Inokuchi, A., Toh, S., Wada, M., Takano, H., Kohno, K., and Kuwano, M. The human multispecific resistance protein2 gene : functional characterization of 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology* 30: 1507-1512 (1999)
- (8) Takano, H., Ise, T., Nomoto, M., Kato, K., Murakami, T., Ohmori, H., Imamura, T., Nagatani, G., Okamoto, T., Ohta, R., Furukawa, M., Shibao, K., Izumi, H., Kuwano, M. and Kohno, K. Structural and functional analysis of the control region of human DNA topoisomerase II α gene in drug resistant cells. *Anti-Cancer Drug Design*, 14: 87-92 (1999)
- (9) Sibao, K., Takano, H., Nakamura, Y., Okazaki, K., Nagata, N., Izumi, H., Uchiumi, T., Kuwano, M., Kohno, K. and Itoh, H., Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II α genes in human colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer* 83: 732-737 (1999)
- (10) Ise, T., Izumi, H., Nagatani, G., Takano, H., Wada, M., Kuwano, M. and Kohno, K., Structural characterization of the human interleukin-13 receptor α 1 gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265: 387-394 (1999)

2. 学会発表

- (1) Kuwano, M., "Molecular mechanisms for specific expression of MDR1 gene in human tumors: YB-1, DNA methylation and gene rearrangements" ATP-Binding Cassette Transporters: From Multidrug Resistance to Genetic Disease (Symposium) (オーストリア) 2/24/1999
- (2) 桑野信彦 「抗がん剤の感受性を制御する分子標的と癌治療への応用」第 99 回日本外科学会総会 (特別講演) (福岡) 1999 年 3 月 25 日
- (3) 桑野信彦 「薬剤耐性遺伝子を巡る最近の知見」第 37 回日本癌治療学会総会 (教育講演) (岐阜) 1999 年 10 月 13 日

抗がん剤耐性とグルタチオン抱合体排出ポンプに関する研究

分担研究者 秋山 伸一 鹿児島大学医学部腫瘍研

研究要旨

多剤耐性を担う蛋白質として、P-糖蛋白質、MRPとLung resistance-related protein (LRP)が報告されている。グルタチオン抱合体排出ポンプとしてMRPの他にcMOATが知られているが、その本体が明らかとなり、抗癌剤耐性への関与が示唆されている。MRPとcMOATの抗癌剤耐性への関与を調べ、MRPはCPT-11とSN-38に対する耐性に関与し、cMOATはVCR、シスプラチン、SN-38に対する耐性に関与していることが判明した。cMOATの関与した耐性を多剤耐性克服薬剤であるシクロスポリンA、PAK-104Pが完全に克服した。シクロスポリンA、PAK-104PはcMOATのLTC4結合部位に拮抗的に作用して輸送機能を阻害することを明らかにした。LRPについても、抗癌剤(アドリアマイシン(ADM)、ビンクリスチン(VCR)、VP-16、グラミシジンD、タキソール)に対する耐性に関与していることをLRP mRNA特異的リボザイムを用いた実験で明らかにした。銅輸送タンパク質 ATP7Bはシスプラチンに対する耐性に関与し、シスプラチンの排出を亢進し、蓄積を減少させた。

A. 研究目的

多剤耐性を担う蛋白質として、P-糖蛋白質、MRPとLung resistance-related protein (LRP)が報告されている。グルタチオン抱合体排出ポンプとしてMRPの他にcMOATが知られているが、その本体が明らかとなり、抗癌剤耐性への関与が示唆されている。MRPとcMOATの抗癌剤耐性への関与を調べ、それらの輸送機能を阻害し耐性を克服する薬剤を開発する。LRPについても、抗癌剤耐性への関与を確認し、耐性機構を解明し、耐性克服の方法を見出す。さらにシスプラチンを輸送するポンプの本体解明をめざす。

B. 研究方法

1、MRP cDNAをトランスフェクトしてMRPを高発現させたKB細胞とADM耐性CA-120細胞を用い、CPT-11、SN-38に対する耐性へのMRPの関与、耐性克服薬剤による感受性の増加をMTTアッセイで調べる。MRPによるCPT-11、SN-38の輸送を調べるため、細胞内、培地中のCPT-11、SN-38濃度をHPLCで測定した。

2、cMOAT cDNAをブタ腎臓細胞LLC-PK1にトランスフェクトして作成したcMOAT高発現細胞からmembrane vesicleを調製し、cMOATによるLTC4の能動輸送、耐性克服薬剤による輸送阻害の実験に用いた。

3、ヒト大腸癌SW620細胞にLRP cDNA特異的リボザイムを発現させ、酪酸ナトリウム(NaB)で処理する。リボザイムを発現していない細胞ではLRPが誘導され、発現している細胞では誘導されない。これらの細胞の抗癌剤感受性をMTTアッセイで調べ、蛍光顕微鏡でADMの細胞内局在を調べた。また、核を単離してADMの蓄積を調べた。

4、ATP7B cDNAをKB-3-1細胞にトランスフェクトし、ATP7B高発現株を樹立して、シスプラチン耐性、シスプラチン蓄積、排出を調べる。

5、蛍光デイクマレンシャルディスプレイ法を用いて、シスプラチン耐性形質と連動して発現が変化する遺伝子をクローニングする。

C. 研究結果

(1) MRPはCPT-11とSN-38に対する耐性に関与しており、これらの薬剤をATP依存性に輸送すると考えられた(2、8)。また、KB細胞由来シスプラチン耐性細胞KCP-4もCPT-11とSN-38に交差耐性を示し、CPT-11とSN-38を能動的に排出した(5)。KCP-4細胞にはP-糖蛋白質、MRP、cMOATのいずれも発現しておらず、未知のポンプの発現が強く示唆された(6)。MRPの耐性を克服する薬剤として新たにAgosterol AとタクスピンC誘導体であるBTKを見出した(11)。両薬剤ともMRPに直接作用してMRPの輸送機能を阻害したが、その他にそれぞれ細胞内GSH低下作用、細胞内小胞pH上昇作用を有し、これらの作用が耐性克服活性に関与していることが明らかになった。

Agosterol AはYCF1の機能は阻害しなかった(17)。

(2) LLC-PK1/cMOAT細胞はVCR、シスプラチン、SN-38に耐性になった。この耐性を多剤耐性克服薬剤であるシクロスポリンA、PAK-104Pが完全に克服した。シクロスポリンA、PAK-104PはcMOATのLTC4結合部位に拮抗的に作用して輸送機能を阻害することを明らかにした(10、12)。