

リア抗体の添加により細胞外弱毒化ジフテリア毒素による細胞障害効果は、消失したが、EPとの併用群では、著明な細胞障害効果を得た。PC9またはASPC-1細胞1x10⁶を Balb/cヌードマウスの皮下に接種し、14-15日後、saporin 1 μ g 腫瘍内に注入後、針電極を腫瘍外側に2本挟んだ状態で挿入しEP (200V、10msec、n=8 x2) を行った。24時間後から腫瘍の中心部に壊死を認めた。N 頃日後、PC9腫瘍では80%、ASPC-1腫瘍では、100%の完全退縮を得た。

D. 考察

チロシンキナーゼ阻害活性を有する大黃由来のエモジン (アントラキノン誘導体) と多彩な生物学的活性を発揮するグリチルリチン (GL) を併用することによりヒト癌細胞株、A431細胞に対して著明な増殖抑制効果を invitro および invivo (MethA 腫瘍細胞) で認めた。作用機序として細胞内活性酸素の増加および蓄積によるアポトーシスが示唆された。植物由来の毒素である saporin またはホルマリン弱毒化ジフテリア毒素 (fDT) と EP を併用することによりヒト肺癌細胞株 (PC9) およびヒト膵癌細胞株 (ASPC-1) に対して、EP との併用により細胞質内リボゾームの不活化により蛋白合成阻害をおこし著明な効果 (90%以上) を得た。

E. 結論

チロシンキナーゼ阻害活性を有する大黃由来のエモジンとグリチルリチン (GL) の併用により、各種癌細胞の増殖が、invitro および invivo において抑制された。また、saporin または弱毒化ジフテリア毒素とエレクトロポレーション (EP) の併用療法の有用性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mashiba, H. and Matsunaga, K. Augmented inhibition of tumor cell proliferation by intracellular introduction of a plant toxin, saporin, in combined use of electroporation. Proceedings 90th Annual Meeting Amer. Assoc. Cancer Res. 40:490, 1999.

2. Mashiba, H., Ozaki, Y. and Matsunaga, K.

Augmented inhibition of tumor cell proliferation in combined use of electroporation with a plant toxin, saporin. In: H. Murata (ed.), Annuals of the New York Academy of Sciences. Vol. 886 Anticancer Molecules Structure, Function, and Design, pp. 233-235, 1999.

2. 学会発表

1. Mashiba, H. Matsunaga, K.

Augmented inhibition of tumor cell proliferation by intracellular introduction of a plant toxin, saporin, in combined use of electroporation. 90th Annual Meeting Amer. Assoc. Cancer Res. 1999.

2. 真柴温一、松永恵子 チロシンキナーゼ阻害剤エモジンとグリチルリチンの併用による癌細胞増殖の抑制：EGFレセプター高発現ヒト癌細胞株(A431)に対する効果 第58回日本癌学会総会 1999

3. 松永恵子、真柴温一 Electroporationの癌治療への応用に関する研究：サポリンとの併用によるヒト肺癌細胞増殖抑制効果の増強 第58回日本癌学会総会 1999.

4. 斎藤俊章、岡留雅夫、宮本新吾、松永恵子、真柴温一 婦人科癌患者の細胞性免疫反応：スーパー抗原に対する末梢血および所属リンパ節リンパ球の反応性 第58回日本癌学会総会 1999.

5. Mashiba, H., Ozaki, Y., Ikuno, S. and Matsunaga, K. Attempt to inhibit cell proliferation by introduction of anti-ras antibody into a human pancreatic cancer cell line (ASPC-1) using electroporation. Int. Conf. on Antibody Engineering 1999.

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

骨転移機構の解明と治療法の開発に関する研究

分担研究者 井口東郎 国立病院九州がんセンター・医長

研究要旨

PTHrPにて惹起された高Ca血症に対するras farnesyltransferase阻害剤(B1620)による抑制効果をin vivoにて検討したが、我々の用いたヒト肺扁平上皮癌細胞(HARA-B)による高Ca血症モデルにおいてはB1620による高Ca血症の抑制はみられなかった。

A. 研究目的

骨転移成立に特異的な“破骨細胞活性化→骨吸収亢進”過程に参与するサイトカインを明らかにし、それを標的とした治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

PTHrPは骨転移成立に重要な役割を担っており、骨転移治療の分子標的のひとつである。ras farnesyltransferase阻害剤はPTHrPおよびPTHrPのシグナル伝達経路 (ras-MAP kinase系)を阻害するため、PTHrPによって惹起される高Ca血症を抑制するとの報告もみられる(Cancer Res 57 :4517, 1997)。そこで、新規ras farnesyltransferase阻害剤であるB1620 (エーザイ)を入手し、我々の確立したHARA-B細胞を用いたPTHrPによる高Ca血症モデルにおいて本剤の効果について検討した。具体的には、HARA-B細胞 (5×10⁶)をヌードマウス皮下に接種、3週目頃より体重減少が始まるが、体重が20g前後まで減少した時点でB1620 (12.5, 25, 50 mg/kg)を連続10日間腹腔内に投与し、10日目に採血を行い、血中CaおよびPTHrP値を測定した。

C. 研究結果

B1620 12.5、25および50 mg/kgのいずれにおいても血清Ca値の低下はあまり認められず、一部のマウスに血清Ca値の低下をみとめたもののB1620の用量反応性は認められなかった。また、血清PTHrP値についてはいずれの群においても高値であった。

D. 考察

HARA-B細胞を用いた高Ca血症モデルにおいてはB1620によるPTHrP作用の抑制が認められず、このことは、B1620がHARA-B細胞の骨転移抑制に対しても効果がないことを示唆している。ras farnesyltransferase阻害剤は一部の高Ca血症モデルでのCa低下作用が報告されているが、その作用はどういった細胞を用いるかによって相反する結果が得られており、本剤によるPTHrP抑制効果については一定の見解が得られていないというのが現況のようである。

E. 結論

今回の検討では、B1620の骨転移抑制効果は期待できなかったが、我々の確立したHARA-B細胞を用いたPTHrPにより高Caモデルを用いることで、骨転移抑制の新規薬剤のスクリーニングを継続していきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 名和田 新、後藤公宣、市野 功、生山祥一郎、柳瀬敏彦、大庭功一、下田聖子、高柳涼一、大江賢治、船越顕博、蘆田健二、足立雅広、井口東郎：臨床医学の展望「内分泌学」、日本医事新報 3911：11-20, 1999.

2. 大西 裕、明石哲郎、國吉政美、福富真理恵、横田昌樹、井口東郎、船越顕博、若杉英之：腫瘍を形成したリンパ腫型成人T細胞性白血病の1例。日本消化器病学会雑誌 96：64-69, 1999.

3. Inoue H, Iguchi H, Kono A, Tsuruta Y : Highly sensitive determination of N-terminal prolyl dipeptides, proline and hydroxyproline in urine by high-performance liquid chromatography using a new fluorescent labelling reagent, 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyle chloride. J Chromato B 724 : 221-230, 1999.
4. 若杉英之、船越顕博、井口東郎 : 内科医からみた膵癌切除の適応. 消化器病セミナー 76 : 121-132, 1999.
2. 学会発表
1. 井口東郎、藤也寸志、井村穰二、尾形佳郎 : 膵癌における転移関連遺伝子 (KAI-1, MTA-1)の発現とその意義. 第8回がん転移研究会 1999年5月24, 25日 (東京).
4. 井口東郎、小野真弓、松島綱治、桑野信彦 : IL-8による骨転移抑制. 第3回がん分子標的治療研究会総会 1999年6月3, 4日 (福岡).
5. 井口東郎、小野真弓、松島綱治、桑野信彦 : IL-8による骨転移抑制. 第58回日本癌学会総会 1999年9月29日-10月1日 (広島).
6. 井村穰二、富田茂樹、児崎隆純、井口東郎、上田善彦、藤盛孝博、尾形佳郎 : 膵癌における9p上のコピー数異常とCDKN2遺伝子変化の比較検討. 第58回日本癌学会総会 1999年9月29日-10月1日 (広島).
7. 井口東郎、横田昌樹、福富真理恵、船越顕博、若杉英之 : 悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症におけるIL-6の役割. 第37回日本癌治療学会総会 1999年10月12日-14日 (岐阜).
8. 福富真理恵、横田昌樹、井口東郎 : 肝細胞癌における骨転移合併頻度の増加ならびにその対策. 第37回日本癌治療学会総会 1999年10月12日-14日 (岐阜).
9. 福富真理恵、横田昌樹、河合宏美、明石哲郎、船越顕博、若杉英之、井口東郎 : 肝細胞癌に合併した骨転移症例の臨床的検討. DDW Japan 1999 1999年10月28日-31日 (広島).
10. 明石哲郎、河合宏美、福富真理恵、横田昌樹、井口東郎、船越顕博、若杉英之 : 当院で経験した膵鉤部癌症例の検討. DDW Japan 1999 1999年10月28日-31日 (広島).
11. 河合宏美、船越顕博、明石哲郎、福富真理恵、横田昌樹、井口東郎、若杉英之、自見厚郎 : エリスロポイエチン産生膵癌の一例. DDW Japan 1999 1999年10月28日-31日 (広島).
12. 福富真理恵、遠城寺宗近、井口東郎 : 胆管細胞癌の分化に伴うテロメラーゼ活性の変動. ワークショップ12「消化器疾患とテロメラーゼ」 DDW Japan 1999 1999年10月28日-31日 (広島).
13. 井口東郎 : 癌患液質とサイトカイン. 厚生省がん研究助成金「増殖因子、サイトカインによる癌病態の修飾に関する研究」班 平成11年度第2回班会義 1999年11月30日 (東京).
14. 井口東郎 : 骨転移の新しい治療法についての基礎的検討. 厚生省がん克服戦略研究事業「がんに伴う遺伝子変化を標的とした治療法の開発」班 平成11年度班会義 1999年12月18日 (福岡).

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

抗がん性薬剤の排出に関与する分子機構

分担研究者 和田守正 九州大学・大学院医学系研究科・医化学分野・助教授

研究要旨：化学療法抵抗性の獲得に関与する分子的背景を具体的に把握するために、【1】MDR1遺伝子以外の抗がん剤排出ポンプの実体を同定し、【2】ポンプ遺伝子の臨床例における発現亢進機構および、発現亢進をトリガーする遺伝子変化を解明することを試みた。今年度は、（1）MRP2およびMRP3遺伝子はそれぞれシスプラチンおよびエトポシド感受性に関与すること、（2）メチル化によるMDR1遺伝子の発現制御は急性骨髄性白血病に限らず、膀胱がんや大腸がんなどの固形腫瘍でも観察されること、（3）MDR1遺伝子プロモーター領域のゲノム再編成やレトロウイルスの挿入による新しいMDR1遺伝子の活性化機構を明らかにした。このような、臓器や腫瘍特異的な抗がん剤耐性獲得機構を正しく把握することが、がんに伴う遺伝子変化やエピジェネティックな変化を標的としたより有効な診断、治療法に繋がると信じている。

A. 研究目的

がん治療を向上する為に、化学療法抵抗性の獲得に関与する分子的背景を具体的に把握し、ポンプ蛋白の発現そのものを抑制させるがん治療法ならびに、ポンプの発現の予知による適切な抗がん剤の選択への道を開くことを目的とする。

B. 研究方法

【1】MDR1遺伝子以外の抗がん剤排出ポンプの実体を同定し、それぞれの排出ポンプが輸送する抗がん剤のスペクトラムを明らかにし、また臨床例における耐性獲得マーカーとしての有効性を検討する。【2】排出ポンプ遺伝子の臨床例における発現亢進機構および、発現亢進をトリガーする遺伝子変化を明らかにする。

C. 研究結果

昨年度までに、【1】に関して、（1）我々が単離していたMRP2/cMOAT遺伝子について、センスcDNAを用いたトランスフェクション実験により、MRP2/cMOATはMRP1と同様、GSH-bimaneやロイコトリエンC4などのグルタチオン抱合体を輸送しうることを明らかにした。このことからMRP2/cMOATは、シスプラチンやCPT-11などのようなグルタチオンやグルクロン酸抱合

されうる抗がん剤を排出する可能性が示された。

（2）MRP2/cMOAT遺伝子のアンチセンスcDNAをHepG2細胞へ導入発現させることにより、シスプラチンを含む複数の抗癌剤に対する感受性を増加させうることを見出した。また、センスcDNAをCHO細胞に強制発現させた細胞では、ビンクリスチンやシスプラチンに耐性を獲得していたがエトポシド感受性は変化しておらず、がん細胞が、異なる抗がん剤に対して異なる排出ポンプを利用して耐性を獲得する機構が示唆された。

また【2】に関しては（1）ヒトMDR1遺伝子が耐性細胞株で発現亢進する機構について、プロモーター部位のメチル化と遺伝子発現が逆相関することを培養細胞系で明らかにした。脱メチル化剤5-aza-CdR処理により未処理の100倍の耐性株出現頻度を認め、メチル化による発現抑制を確認した。さらに、MDR1遺伝子発現亢進細胞株では親株より高いDNase I感受性が示され、MDR1遺伝子プロモーター領域のCpG部位が脱メチル化されることによりクロマチン構造が弛緩し、発現亢進することが明らかになった。

（2）急性骨髄性白血病(AML)の43検体について、定量的RT-PCR法によるMDR1遺伝子発現の定量、およびメチル化感受性酵素

HpaII切断後に定量的PCR法を行うことによるプロモーター部位のメチル化の定量を行うことにより、プロモーター部位のメチル化と遺伝子発現の逆相関が臨床でも認められることを明らかにした。また特定の患者の、治療経過に伴うプロモーター部位のメチル化と遺伝子発現の変化及び、予後との関連を解析した結果、1 ヒトMDR1遺伝子のプロモーター部位はがん化に伴いメチル化を受け（初発）、寛解から再発へ至る過程で、まず脱メチル化が起こり、続いてMDR1遺伝子が発現亢進されることが示唆された。

(3) 癌化および制癌剤耐性にともなうMDR1遺伝子周辺のゲノム再編成を検出するための第一歩として、7q21.1のMDR1遺伝子を含む1.5Mbの酵母人工染色体(YAC)コンテイングを完成させ、この領域の遺伝子構造を明らかにした。

などの成果を上げていたが、今年度はさらに、【1】に関して、

(1) 既に単離しているMRP2/cMOAT遺伝子に加え、新たにMRP3遺伝子の完全長cDNAおよびMRP4, MRP5, MRP6遺伝子の部分cDNAを単離した。加えてMRP遺伝子に近縁の未知遺伝子の部分cDNAを単離した。

(2) LLC-PK1細胞からMRP3遺伝子の安定導入細胞株を単離し、感受性試験によりMRP3遺伝子が抗がん剤エトポシドに対する耐性獲得に関与することを明らかにした。

(3) 大腸がん45検体について、MRPサブファミリー遺伝子群の発現を定量的PCR法により検討した結果、MRP2遺伝子発現が非がん部に比較し有意に亢進していた。さらに、SDI法による抗がん剤感受性評価との相関を検討した結果、MRP2遺伝子発現がシスプラチン感受性に関与していることが示された。

また【2】に関しては、急性骨髄性白血病(AML)における検討結果を拡大発展させて以下の結果を得た。

(1) メチル化によるMDR1遺伝子の発現制御は膀胱がんや大腸がんなどの固形腫瘍でも観察されること、この発現制御はプロモーターの特定部位のメチル化によるのではなく、プロモーター領域全体のメチル化の程度に依存することを明らかにした。このことは、造血系腫瘍、固形腫瘍を問わず、MDR1遺伝子の選択的なメチル化によって耐性を克服すると

いう新しい治療法開発への足がかりであると期待している。

(2) 抗がん剤耐性にともなうMDR1遺伝子周辺のゲノム再編成を解析した結果、DNA再編成により遠隔遺伝子のプロモーターがMDR1遺伝子上流に結合してMDR1遺伝子の発現を活性化する機構を発見した。このうち2例について再編成の接合領域の構造を詳細に解析した結果、再編成にはAlu配列が関与すること、再編成はDNAの相同領域を利用しつつ非相同組み換えの機構によると考えられることを明らかにした。このような機構や関与する因子の解析から、悪性腫瘍に特異的な分子を標的とした治療法の開発につながると確信している。

(3) 臨床検体の解析を行う場合に不可避の不均一性の問題と培養細胞系の限界を補うため、白血病担がんマウスの治療モデルを用いて耐性獲得機構の解析を行った。生体内での耐性獲得に伴いmdr1a遺伝子の発現亢進が観察された。この発現亢進は遺伝子増幅や脱メチル化によるものではなく、レトロウイルスの挿入によるmdr1a遺伝子の活性化であることが示唆された。現在、ATLなどのウイルスが関与するヒト造血器腫瘍について、この機構の関与を検索中である。

D. 考察

(1) ESTデータベースの検索によるとMDR1やMRPに類似のトランスポーターがさらに少なくとも40種類存在する。そこで、ABCファミリーを構成する他の遺伝子群をさらに同定して、耐性獲得マーカーとしての有効性を検討してゆく必要がある。

(2) ヒトMDR1遺伝子のプロモーター部位の脱メチル化が、ヒトMDR1遺伝子発現亢進の必要条件であることが明らかになったので、このメチル化状態の解析によりMDR1遺伝子の発現予測、ひいては耐性獲得予測が行える可能性が考えられた。

E. 結論

(1) 遺伝子安定導入細胞株を用いた感受性試験から、MRP3遺伝子は抗がん剤エトポシドに対する耐性獲得に関与する。

(2) 大腸がんにおいてはMRP2遺伝子の発現が非がん部に比較し亢進している。また、

大腸がんにおけるMRP2遺伝子発現量はシスプラチン感受性と相関する。

(3) メチル化によるMDR1遺伝子の発現制御は、急性骨髄性白血病に限らず膀胱がんや大腸がんなどの固形腫瘍でも観察される。

(4) MDR1遺伝子プロモーター領域のゲノム再編成による、MDR1遺伝子活性化機構を明らかにした。

(5) 白血病担がんマウスの治療モデルを用いて、レトロウイルスの挿入による新しいmdr1a遺伝子の活性化機構を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka, T., Uchiumi, T., Hinoshita, E., Inokuchi, A., Toh, S., Wada, M., Takano, H., Kohno, K., and Kuwano, M.: Functional Characterization of 5'-Flanking Region of the Human Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter/Multidrug Resistance Protein2(cMOAT/MRP2) Gene and its Specific Expression in Hepatic Cells. *Hepatology* 30: 1507-1512, 1999

2. Kawabe, T., Chen, Z-S., Wada, M., Uchiumi, T., Ono, M., Akiyama, S. and Kuwano, M.: Enhanced transport of anticancer agents and leukotrien C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett.*, 456: 327-331, 1999.

3. 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 the transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Molec. Pharmacology* 56: 1219-1228, 1999

4. Kuwano, M., Toh, S., Uchiumi, T., Takano, H., Kohno, K. and Wada, M.: Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance. [Review] [76 refs]. *Anti Cancer Drug Design*, 14: 123-31, 1999.

5. Toh, S., Wada, M., Uchiumi, T., Inokuchi, A., Makino, Y., Horie, Y., Adachi, Y., Sakisaka, S. and Kuwano, M.: Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 64: 739-46, 1999.

6. 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 the multidrug resistance 1 gene in human cancer cells. *European Journal of Biochemistry*, 262: 924-32, 1999.

2. 学会発表

1. Kawabe, T., Wada, M., Nakamura, T., Uchiumi, T., Ono, M., Chen Z-s., Akiyama, S-i. Transfection of human cMOAT/MRP2 cDNA induces altered sensitivity to anticancer agents and membrane transport of glutathione conjugates. 90th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (Poster Discussion) 1999/4/10-4/14 (Philadelphia)

2. Harada, T., Nagayama, J., Nakayama, M., Mickley, L., Fojo, T., Wada, M. and Kuwano, M. Identification of the junction sequence of rearrangements in Alu repeats at human multidrug resistance 1 (MDR1) upstream region and its upstream promoter activation. 90th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (Poster session) 1999/4/10-4/14 (Philadelphia)

3. Nagayama, J., Harada, T., Nakayama, M., Kusaba, H., Kiue, A., Iino, M., Wada, M. and Kuwano, M. Activation of mouse mdr3 gene by inserted murine leukemia virus on early stage of acquirement of multidrug resistance

in vincristine-selected p388 cells. 90th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session)1999/4/10-4/14(Philadelphia)

4. Haga,S., Uchiumi,T., Hinoshita,E., Wada,M., Ikezaki,K., Fukui,M. and Kuwano,M. Expression of cMOAT/ MRP3 and cisplatin resistance in human glioma cell. 90th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(Poster session) 1999/4/10-4/14(Philadelphia)

6. 和田守正、原田大志、桑野信彦. 遺伝子再編成とMDR1遺伝子発現亢進 第3回がん分子標的治療研究会総会 (ワークショップ) 1999年6月3日 (福岡)

7. 河邊毅、陳哲生、内海健、小野真弓、和田守正、秋山伸一、桑野信彦. ヒトABCトランスポータ遺伝子cMOAT/MRP2が制御する抗癌剤感受性 第3回がん分子標的治療研究会総会 (ポスターセッション) 1999年6月4日 (福岡)

8. 永山淳、飯野真由美、木上昭、原田大志、中山雅晴、和田守正、桑野信彦. マウス白血病細胞の多剤耐性の獲得過程におけるmdr-3遺伝子活性化-マウス白血病ウイルス (MuLV) ゲノム挿入による遺伝子再編成 第3回がん分子標的治療研究会総会 (ポスターセッション) 1999年6月4日 (福岡)

9. 内海健、田中聡也、日下英司、和田守正、野本実、河野公俊、桑野信彦. ヒトABCスーパーファミリーcMOAT/MRP2遺伝子の発現制御第58回日本癌学会総会 (一般口演) 1999年9月30日 (広島)

10. 芳賀整、内海健、日下英司、和田守正、桑野信彦. 血管脳関門におけるABCトランスポーターファミリー遺伝子群MRPfamilyの発現とその局在 第58回日本癌学会総会 (一般口演) 1999年9月30日 (広島)

11. 日下英司、内海健、西江昭弘、芳賀整、

中村崇規、大野真司、前原喜彦、和田守正、杉町圭藏、桑野信彦. ヒト大腸癌におけるABCスーパーファミリーMDR1、MRP1、cMOAT/MRP2、MRP3の発現と抗癌剤感受性 第58回日本癌学会総会 (一般口演) 1999年9月30日 (広島)

12. 多田靖弘、中山雅晴、原田大志、永山淳、内藤誠二、中川昌之、高木幸一、和田守正、桑野信彦. 膀胱および大腸腫瘍におけるヒト多剤耐性MDR1遺伝子の発現と5'-制御領域のDNAメチル化と遺伝子再編成 第58回日本癌学会総会 (ポスターセッション) 1999年9月30日 (広島)

13. 永山淳、飯野真由美、木上昭、名和田新、原田実根、岡村純、和田守正、桑野信彦. ヒト・マウス造血器腫瘍におけるMDR遺伝子再編成と発現誘導 第58回日本癌学会総会 (ポスターセッション) 1999年9月30日 (広島)

14. 桑野信彦、和田守正、内海健、小野真弓、河野公俊. がんの血管新生と薬剤感受性の分子標的 第58回日本癌学会総会 (シンポジウム) 1999年9月30日 (広島)

5 Chen, Z. S., Kawabe, T., Ono, M., Sumizawa, T., Furukawa, T., Uchiumi, T., Wada, M., Kuwano, M., and Akiyama, S. Effect of multidrug resistance reversing agents on the transporting activity of human canalicular multispecific organic anion Transporter(cMOAT). AACR-NCI-EORTC Conference (Molecular Target and Cancer Therapeutics)1999年11月

15. 日下英司、内海健、橋本健吉、中村崇規、芳賀整、Scheffer GL、和田守正、桑野信彦. ABCトランスポータ遺伝子ヒトMRP3の基質特異性と細胞内局在 第22回日本分子生物学会年会 (ポスターセッション) 1999年12月9-10日 (福岡)

16. 原田大志、西江昭弘、大坪路弘、鳥越清之、庄野貞久、池崎清信、和田守正、桑野信彦. ヒト脳組織と脳腫瘍におけるADAMファ

ミリー遺伝子、MDC2スプライシングバリエーションの発現様式第22回日本分子生物学会年会（ポスターセッション）1999年12月9-10日（福岡）

17. 和田守正、内海健、桑野信彦、
MRP2/cMOAT遺伝子のゲノム構造と
Dubin-Johnson症候群における変異第22回日本分子生物学会年会（ワークショップ）1999年12月7日（福岡）

18. 井口明彦、日下英司、内海健、和田守正、
桑野信彦 胆汁鬱滞における肝臓のABCスーパーファミリー遺伝子MRP2とMRP3発現の制御 第22回日本分子生物学会年会（ポスターセッション）1999年12月9-10日（福岡）

MAGE peptideを用いた消化器癌に対する癌特異的免疫療法に関する研究

分担研究者 森 正樹 九州大学生体防御医学研究所・教授

研究要旨

腫瘍拒絶抗原であるMAGE-3は癌特異的免疫療法の標的になると考えられている。我々は、進行再発消化器癌症例（MAGE-3陽性、HLA-A24 or A2）に対し、患者末梢血由来の樹状細胞（Dendritic cells; DC）を分離培養し、これにMAGE-3ペプチドをパルスし患者にワクチンとして投与するDCワクチン療法を施行した。治療に伴う有害事象の発生は認めず、ペプチドに対する免疫応答、さらに腫瘍縮小を認めた症例もあることから、消化器癌に対する新たな治療法として期待される。

A. 研究目的

近年、欧米を中心に腫瘍抗原を用いた癌ワクチン療法の臨床試験が主としてメラノーマに対して進行中である。メラノーマにおいて腫瘍拒絶抗原として同定されたMAGEは、消化器癌などの他の悪性腫瘍にもその発現が認められ、さらに精巣以外の正常組織に発現を認めない癌特異性があるため、癌ワクチン療法の良い標的と考えられる。

一方、消化器癌は我が国において最も頻度の高い癌の一つであるが、手術後の再発癌、あるいは高度進行癌症例に対して、有効な治療法は少なく、新たな治療法の確立が必要と考えられる。

我々は進行再発消化器癌症例に対し、MAGEペプチドを用いた癌ワクチン療法の臨床試験を当研究所倫理委員会承認の下施行している。そこで、(1)臨床研究として、進行再発消化器癌に対する癌ワクチン療法について、治療の安全性、免疫学的評価、ならびに臨床効果について検討する。さらに(2)基礎研究として、適応症例拡大のためおよび治療法の効果増強のため、新たなペプチドの同定を目的とする。

B. 研究方法

(1)臨床研究：HLA-A2またはA24で、原発、再発癌のMAGE-3発現があり、他に有効な治療法のない進行再発消化器癌症例を対象とした。末梢血単核球の付着細胞をin vitroで

GM-CSF, IL-4の存在下にて培養し、樹状細胞（Dendritic cells; DC）を得る。DCに患者HLAに応じたMAGE-3ペプチドをパルスして、ワクチン(DCワクチン)として3週間ごとiv投与を4クール施行した。治療の安全性（日本癌治療学会薬物有害事象判定基準）、免疫学的評価（CTL precursor, DTH）、抗腫瘍効果（腫瘍マーカー、画像による判定）について検討した。

(2) 基礎研究：DCワクチン療法の対象症例拡大のために、新たなHLA-A24拘束性のMAGE-1, MAGE-2ペプチドの同定を行った。HLA-A24のbinding motifをもつペプチドを合成し、binding affinityの高いものを候補ペプチドとして選択した。健常人の末梢血から週1回のペプチド刺激を加え、ペプチド特異的CTL誘導を試み、細胞障害活性をクロムリリース法を用いて評価し、免疫原性の強いペプチド同定を試みた。

C. 研究結果

(1) 臨床研究：DCワクチン療法を10例について行った。内訳は食道癌3例、胃癌6例、大腸癌1例である。全例前治療が無効な進行再発癌症例である。予定通り4クール施行できた症例は7例で、3例は原疾患の進行による全身状態の悪化により中段した。治療による有害事象の発生は認めなかった。免疫学的評価としては、評価可能7例中4例に治療後のPBMCからCTL誘導が可能であり、CTL

precursorの増加が認められた。ペプチドに対する皮内反応（DTH）は治療前には全例陰性であったが、治療後には評価6例中3例に陽性化した。また抗腫瘍効果については、治療開始後に腫瘍マーカー（CEA, CA 19-9 or SCC）の低下は7例に認められ、画像による腫瘍縮小は3例（MR）に認められた。

(2) 基礎研究：MAGE-1について、5種類の候補ペプチドのうち、binding affinityの最も高いNYKHCFPEIにおいて、ペプチド特異性のあるHLA-A24拘束性のCTLが誘導され、さらに内因性にMAGE-1を発現する培養細胞株も障害された。同様にMAGE-2について、8種類の候補ペプチドのうちEYLQLVFGIを用いることで、ペプチド特異的CTLの誘導が可能となった。

D. 考察

(1) 臨床研究：自己樹状細胞とMAGE-3ペプチドを用いたDCワクチン療法は、消化器癌においても副作用を認めず安全に施行することが可能であった。治療後にCTL precursorの増加やペプチドに対する皮内反応が認められた症例もあり、さらには抗腫瘍効果を3例に認めたことから、本治療法は消化器癌に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

(2) 基礎研究：HLA-A24拘束性のMAGE-1およびMAGE-2ペプチドが同定された。これらのペプチドを用いることで、DCワクチン療法の対象症例が拡大され、また複数を発現する腫瘍に対しては、複数のペプチドを用いて治療を行うことが可能になり、治療効果の増強が期待される。

E. 結論

MAGEペプチドを用いたDCワクチン療法は、消化器癌症例に対して臨床応用可能であり、今後さらに治療効果増強を目指して基礎、臨床研究を続けて行く予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mori M, Shiraishi T, Tanaka S, Yamagata M, Mafune K, Tanaka Y, Ueo H, Barnard GF, Sugimachi K. Lack of DMBT1 expression in oesophageal, gastric and colon cancer. *Br J Cancer* 79 211-213, 1999

2. Mori M, Mimori K, Ueo H, Tsuji K, Shiraishi T, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T. Vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor mRNA expression in patients with chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 14 353-359, 1999

3. Yamagata M, Mori M, Mimori K, Mafune K, Tanaka Y, Ueo H, Akiyoshi T. Expression of pyrimidine nucleoside phosphorylase mRNA plays an important role in the prognosis of patients with oesophageal cancer. *Br J Cancer* 79 565-569, 1999

4. Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y, Makuuchi M, Sugimachi K, Wands JR. Biologic significance of Angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 103 341-345, 1999

5. Sadanaga N, Nagashima H, Kouichirou T, Yoshikawa Y, Mori M. The heterogeneous expression of MAGE-3 protein: Difference between primary lesions and metastatic lymph nodes in gastric carcinoma. *Oncol Rep* 6 975-977, 1999

6. Mimori K, Ueo H, Shirasaka C, Shiraishi T, Yamagata M, Haraguchi M, Mori M. Up-regulated pyrimidine nucleoside phosphorylase in breast carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Ann Oncol* 10 111-113, 1999

7. Shibata K, Tanaka S, Shiraishi T, Kitano S, Mori M. G-protein γ 7 is down-regulated in cancers and associated with p27kip1 induced growth arrest. *Cancer Res* 59 1096-1101, 1999

8. Fujie T, Tahara K, Tanaka F, Mori M, Takesako K, Akiyoshi T. A MAGE-1-encoded HLA-A24-binding synthetic peptide induces specific anti-tumor cytotoxic T

- lymphocytes. *Int J Cancer* 80 169-172, 1999
9. Tahara K, Mori M, Sadanaga N, Sakamoto Y, Kitano S, Makuuchi M. Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma. *Cancer* 85 1234-40, 1999
10. Ikeda Y, Mori M, Yoshizumi T, Sugimachi K. Cancer and adenomatous polyp distribution in the colorectum. *Am J Gastroenterol* 94 191-193, 1999
11. Ishii H, Baffa R, Numata S, Murakumo Y, Rattan S, Inoue H, Mori M, Fidanza V, Alder H, Croce C. The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine-zipper protein, and its expression is altered in multiple human tumors. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 96 3928-3933, 1999
12. Begum NA, Shibuta K, Mori M, Barnard GF. Reduced expression of the CXCR4 receptor mRNA in hepatocellular carcinoma and lack of inducibility of its ligand a-chemokine hIRH/SDF1a/PBSF in vitro *Int J Oncol* 14 927-934, 1999
13. Mitra P, Shibuta K, Mathai J, Shimoda K, Banner BF, Mori M, Barnard GF. CXCR4 mRNA expression in colon, esophageal and gastric cancers and hepatitis C infected liver *Int J Oncol* 14 917-925, 1999
14. 長嶋秀樹、定永倫明、田原光一郎、森正樹 MAGE特異的CTL *Surgery Frontier* 6 119-125, 1999
2. 学会発表
1. 定永倫明、田原光一郎、長嶋秀樹、白石猛、田中真二、洪田健二、佐藤浩一、森正樹 (特別企画) BRMの新しい展開と癌免疫療法 第20回癌免疫外科研究会 1999.5.27 (広島)
2. 田原光一郎、定永倫明、長嶋秀樹、秋吉毅、森正樹. HLA-A 24拘束性MAGE-2 特異的CTLの誘導とcell susceptibilityの解析 第20回癌免疫外科研究会 1999.5.27 (広島)
3. 長嶋秀樹、定永倫明、田原光一郎、吉河康二、森正樹. ヒト胃癌における Fas ligand(FasL)発現と腫瘍の進展 第20回癌免疫外科研究会 1999.5.28 (広島)
4. 定永倫明、田原光一郎、長嶋秀樹、藤江達郎、田中文明、田中真二、森正樹、秋吉毅. 腫瘍拒絶抗原(MAGE)遺伝子を用いた消化器癌の癌特異的免疫療法 第53回日本消化器外科学会総会 1999.2.18 (京都)
5. 定永倫明、長嶋秀樹、増野浩二郎、田原光一郎、井上裕、森正樹、竹迫一任、秋吉毅. 進行再発消化器癌症例に対する自己樹状細胞を用いたMAGEペプチドワクチン療法 第3回基盤的癌免疫研究会総会 1999.7.14 (大阪)
6. 長嶋秀樹、定永倫明、増野浩二郎、白石猛、宇都宮徹、洪田健二、佐藤浩一、井上裕、森正樹. 消化器癌におけるMAGE-B family発現の検索 第58回九州癌学会 1999.7.29 (長崎)
7. 定永倫明、増野浩二郎、長嶋秀樹、田原光一郎、白石猛、宇都宮徹、洪田健二、佐藤浩一、井上裕、森正樹、竹迫一任、秋吉毅. (ワークショップ) 消化器癌に対するMAGEペプチドワクチン療法 第37回日本癌治療学会総会 1999.10.12 (岐阜)
8. 長嶋秀樹、定永倫明、吉河康二、田原光一郎、増野浩二郎、井上裕、森正樹. CD95ligand(CD95L)の胃癌での発現と腫瘍進展 第58回日本癌学会総会 1999.9.29 (広島)
9. 長嶋秀樹、定永倫明、増野浩二郎、井上裕、森正樹. 食道扁平上皮癌におけるMAGE-Bの発現 第12回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (旧:日本BRM会) 1999.12.9 (横浜)

10. 定永 倫明、増野浩二郎、長嶋秀樹、井上裕、森 正樹. (ワークショップ) 癌特異的免疫療法の標的MAGE-3蛋白の発現; 胃癌原発巣とリンパ節転移巣における検討 第12回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (旧: 日本BRM会) 1999.12.9 (横浜)

11. 定永 倫明、長嶋 秀樹、田原 光一郎、藤江 達郎、渋谷 健二、佐藤 浩一、森 正樹、秋吉 毅. 消化器癌症例に対する腫瘍拒絶抗原MAGEペプチドを用いた癌ワクチン療法 第99回日本外科学会総会 1999.3.24 (福岡)

12. 長嶋 秀樹、定永 倫明、田原 光一郎、南原 繁、狩峰 信也、原口 勝、森 正樹. 胃癌におけるFas ligand (Fas-L)の発現と腫瘍の進展 第99回日本外科学会総会 1999.3.25 (福岡)

13. 藤江 達郎、田原 光一郎、定永 倫明、田中 文明、長嶋 秀樹、上尾 裕昭、竹迫 一任、秋吉 毅、森 正樹. HLA-A24 拘束性MAGE-1ペプチドの同定 第99回日本外科学会総会 1999.3.26 (福岡)

14. 田原 光一郎、定永 倫明、長嶋 秀樹、松山 歩、藤江 達郎、秋吉 毅、森 正樹. HLA-A24拘束性MAGE-2 ペプチドの同定 第99回日本外科学会総会 1999.3.25 (福岡)