

Minireview

The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance

Michihiko Kuwano,¹ Yoshinao Oda,⁶ Hiroto Izumi,⁴ Song-Ju Yang,¹ Takeshi Uchiumi,⁷ Yukihide Iwamoto,⁸ Masakazu Toi,⁹ Teruhiko Fujii,^{1,2} Hideaki Yamana,^{1,2} Hisafumi Kinoshita,^{1,2} Toshiharu Kamura,^{1,3} Masazumi Tsuneyoshi,⁶ Kosei Yasumoto,⁵ and Kimitoshi Kohno⁴

¹Research Center for Innovative Cancer Therapy of the 21st Century COE Program for Medical Science, and Departments of ²Surgery and ³Gynecology Obstetrics, Kurume University, Fukuoka, Japan; Departments of ⁴Molecular Biology and ⁵Surgery, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, Japan; Departments of ⁶Anatomic Pathology, ⁷Medical Biochemistry, and ⁸Orthopedic Surgery, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan; ⁹Breast Oncology, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital, Tokyo, Japan

Abstract

Gene expression can be regulated by nuclear factors at the transcriptional level. Many such factors regulate *MDR1* gene expression, but what are the sequence elements and transcription factors that control the basal and inducible expression of this gene? The general principles through which transcription factors participate in drug resistance are now beginning to be understood. Here, we review the factors involved in the transcriptional regulation of the *MDR1* gene. In particular, we focus on the transcription factor Y-box binding protein 1 and discuss the possible links between Y-box binding protein 1 expression and drug resistance in cancer, which are mediated by the transmembrane P-glycoprotein or non-P-glycoprotein. [Mol Cancer Ther 2004;3(11):1485–92]

Introduction

Drug export from cells is mediated through a group of proteins belonging to the ATP binding cassette family of transporters. The 170-kDa transmembrane protein P-glycoprotein (PGP), which is encoded by the multidrug resistance 1 (*MDR1*) gene, is a representative example of

an ATP binding cassette transporter. PGP consists of two membrane-spanning domains and two nucleotide binding domains and has been reported to affect the pharmacokinetics of drugs by limiting the rate at which they are absorbed (1–5). Various molecules are targeted by drug treatments for cancer; however, PGP expression is responsible for resistance to the widest range of anticancer drugs (6, 7).

The expression of *MDR1*/PGP in human malignant cancers is expected to play a critical role in limiting their sensitivity to anticancer agents. Therefore, the determination of *MDR1* gene expression levels, along with studies of the regulatory mechanisms of this gene, will be useful in developing tailor-made therapeutic strategies for cancer patients.

The partial sequence of the human *MDR1* gene was first reported in the 1980s (8), and its complete sequence, including clustered CpG sites that are not associated with a TATA box, is now known (9). Within the *MDR1* promoter sequence, a GC box forming a Sp1 site and an inverted CCAAT (ATTGG) site for Y-box binding protein 1 (YB-1) or nuclear factor Y (NF-Y) binding both play key roles in *MDR1* gene expression (10).

MDR1 gene expression is often observed in recurrent cancers and appears after the chemotherapeutic treatment of various human malignancies. In cultured human cancer cells, the *MDR1* promoter was activated by both PGP targeting drugs (vincristine and doxorubicin) and non-PGP-targeting drugs (5-fluorouracil and etoposide; ref. 11). In addition, treatment with retinoic acids and other differentiating agents resulted in enhanced expression of the *MDR1* gene product PGP (12). Expression of the *MDR1* gene was also up-regulated by heat shock, arsenate, and serum starvation in cultured human cancer cells (13–16). Consistent with these findings, *MDR1* gene expression was markedly induced by anticancer agents (17); the gene promoter was also activated in response to both anticancer agents and UV light (18, 19). These results show that *MDR1* gene expression is highly susceptible to various environmental stimuli (Table 1) and might therefore be stress responsive (11).

This review focuses on the molecular mechanism of the transcriptional regulation of human *MDR1*/PGP and the role of YB-1 expression in the acquisition of drug resistance.

Transcriptional Regulation of the Human *MDR1* Gene

Many studies have shown the involvement of various cis-acting elements in *MDR1* gene expression, suggesting

Received 5/21/04; revised 8/11/04; accepted 8/27/04

Grant support: Ministry of Education, Science, Technology, Sports and Culture of Japan and Ministry of Health and Welfare of Japan.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Kimitoshi Kohno, Department of Molecular Biology, University of Occupational and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan. Phone: 81-93-691-7423; Fax: 81-93-692-2766. E-mail: k-kohno@med.uoeh-u.ac.jp

Copyright © 2004 American Association for Cancer Research.

Table 1. Transcriptional regulation of the *MDR1* gene in human cell lines

Transcription factor	Inducers	References
NF-Y	None	(40)
	Sodium butylate	(43)
	Trichostatin A	(42)
Sp1	None	(45)
YB-1	UV light	(30, 32)
	Anticancer agents	(31)
Nuclear factor-interleukin-6	Phorbol ester	(52, 78)
EGR1	Phorbol ester	(45, 46)
HSF1	Heat shock	(15, 55)
20-kDa protein	Serum starvation	(16)
Transcription factor 4/ β -catenin	None	(56)
Human T-cell lymphotropic virus-1 Tax	Virus infection	(79)
SXR	Digoxin	(80)
<i>MDR1</i> promoter-enhancing factor 1/RNA helicase A	None	(59, 60)
Nuclear factor- κ B	Daunomycin	(58)
p53	None	(49–51)

pleiotropic mechanisms (10). As shown in Table 1, several transcription factors are expected to play critical roles in the basal expression of the *MDR1* promoter in addition to stimulus-induced activation.

Y-Box Binding Protein 1

Many reports on the factors associated with drug resistance have shown a plausible association of YB-1 with drug resistance both in cultured cancer cells and in numerous clinical human tumor samples.

YB-1 is a member of the cold shock domain (CSD) protein family, which is found in the cytoplasm and nucleus of mammalian cells. It has pleiotropic functions in the regulation of gene transcription and translation, DNA repair, drug resistance, and cellular responses to environmental stimuli (20–22). The structures of YB-1 and two other members of the CSD family, hdbpA (23) and Contrin/hdbpC (24), are presented in Fig. 1A. The *YB-1* gene, which is located on chromosome 1p34 (25, 26), contains eight exons spanning 19 kb of genomic DNA (Fig. 1B). The 1.5-kb mRNA encodes a 43-kDa protein comprising three domains: a variable NH₂-terminal tail domain (A/P domain), a highly conserved nucleic acid binding CSD, and a COOH-terminal tail domain (B/A repeat; refs. 27–29). The A/P domain (amino acids 1–51) seems to be involved in transcriptional regulation, whereas the CSD domain and part of the B/A repeat (amino acids 51–205) function in binding the Y-box (inverted CCAAT box) or double-stranded DNA. Most of the COOH-terminal region of the B/A repeat domain (amino acids 129–324) is thought to bind ssDNA or RNA, and part of this region (amino acids 129–205) is involved in dimerization.

We identified YB-1 as a transcription factor that binds to the inverted CCAAT box of the *MDR1* promoter (30).

Decreased expression of YB-1, resulting from the introduction of YB-1 antisense expression constructs into cancer cells, markedly reduced the activation of the *MDR1* gene by DNA-damaging agents (31).

YB-1 is normally present in the cytoplasm, although it is translocated to the nucleus when cells are exposed to anticancer agents, hyperthermia, or UV light irradiation (19, 32, 33). YB-1 is often overexpressed in malignant cells and its expression is regulated by both the proto-oncogene product c-Myc and the tumor suppression gene product p73 (25, 34). The COOH-terminal tail domain seems to play a key role in the localization of YB-1 to either the cytoplasm or the nucleus (32). Studies have shown that cell cycle-specific nuclear translocation is mediated by cooperation of the CSD and COOH-terminal tail domain (35) and that the nuclear translocation of YB-1 requires wild-type p53 (36). The introduction of antisense RNA into human cancer cell lines,¹⁰ and the targeted disruption of one Y-box allele in chicken DT40 cells (37) both inhibited growth. By contrast, the targeted disruption of one allele of the *YB-1* gene in mouse ES-1 cells had no effect on the growth rate (38).

Nuclear Factor Y

The CCAAT box is among the most ubiquitous DNA elements in both forward and reverse orientation. NF-Y is the major transcription factor recognizing the CCAAT box (39). This heteromeric protein is composed of three subunits, NF-YA, NF-YB, and NF-YC, all of which are necessary for DNA binding (Fig. 1A). Mutation and/or deletion of the CCAAT box have been shown to result in a significant loss of *MDR1* promoter activity (40). It has been reported that both the inverted CCAAT box and the GC box are required for activation of the *MDR1* promoter by UV light, and NF-Y, not YB-1, is thought to be the factor regulating the *MDR1* gene (41). However, these findings are not consistent with the results discussed above. The YB-1 protein is abundant and localized in the cytoplasm; however, when the effect of YB-1 overexpression on *MDR1* promoter activity was evaluated in human cancer KB cells, it was unclear whether the nuclear YB-1 content was increased. As YB-1 is known to repress translation, increased levels of cytoplasmic YB-1 might inhibit the translation of luciferase mRNA. Further studies are required to resolve this issue. Treatment with a histone deacetylase inhibitor (trichostatin) induced a marked increase in the amount of *MDR1* mRNA, although this drug-induced increase was inhibited in dominant-negative NF-Y mutants (42). NF-Y therefore seems to regulate *MDR1* gene expression through an interaction with p300/CBP-associated factor, which shows histone acetylation activity. NF-Y might also be responsible for the sodium butyrate-induced *MDR1* gene up-regulation in colon cancer cells (43). This transcription factor therefore plays a pivotal role in *MDR1* gene expression. Recently, the antitumor agent HMN-176, which interacts with NF-YB, has been shown to inhibit *MDR1* gene expression and to restore chemosensitivity to MDR cells (44).

¹⁰ K. Kohno and M. Kuwano, unpublished data.

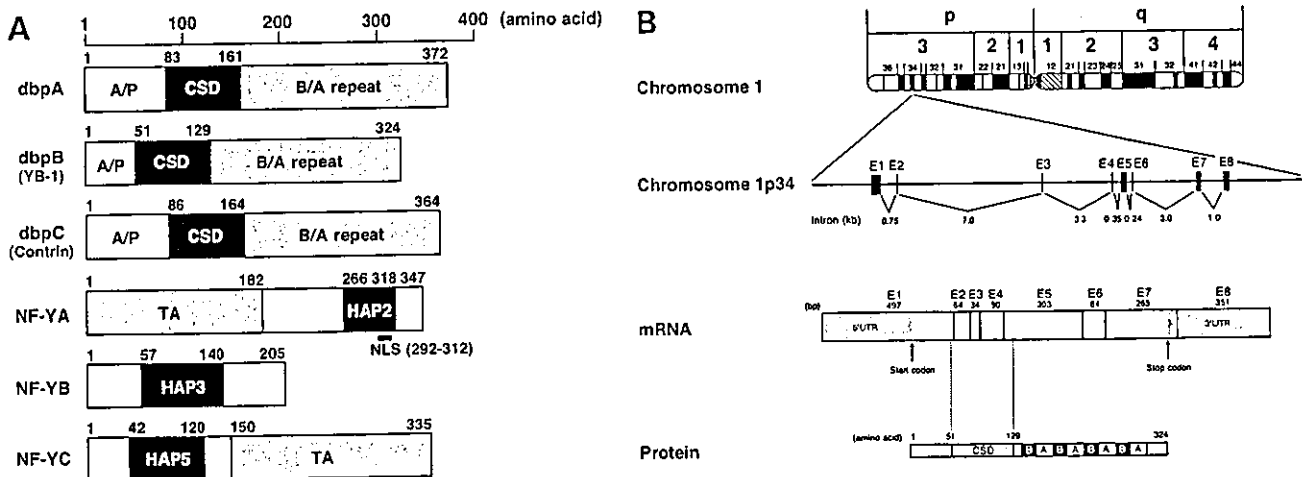


Figure 1. A, protein structure and functional domains of hdbpB/YB-1, hdbpA, hdbpC, NF-YA, NF-YB, and NF-YC. A/P, alanine and proline domain, residues 1-82, 1-50, and 1-85 in hdbpA, hdbpB/YB-1, and Contrin/hdbpC, respectively. CSD, residues 83-161, 51-129, and 86-164. B/A repeat, basic and acidic amino acid, residues 162-372, 130-324, and 165-364. The CSD domains of the three genes are highly homologous. Of the three subunits of NF-Y, NF-YB and NF-YC contain histone folding motifs homologous to the yeast transcription factors HAP3 and HAP5, respectively. NF-YA contains a domain homologous to HAP2, which interacts with NF-YB and NF-YC, and the heterotrimer of NF-Y binds to DNA. Both NF-YA and NF-YC contain glutamine-rich domains and activate transcription. B, general structure of the genomic DNA, mRNA, and protein product of YB-1. The gene is mapped at chromosome 1p34 and has eight exons (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, and E8). The YB-1 protein consists of 324 amino acids. B, basic amino acid clusters; A, acidic amino acid clusters.

Sp1 and Early Growth Response Element 1

The introduction of mutations in the GC-rich region -59 to -45 (G region) of the *MDR1* promoter markedly decreased its activity as a result of the transcription factor Sp1 (40, 45). Sp1 was first cloned and identified as a transcription factor specifically bound to the GC box of the SV40 promoter. A GC box is found in the promoter region of many eukaryotic genes. The Sp1 family is involved in various cellular functions including proliferation, apoptosis, differentiation, and neoplastic changes. As the early growth response element 1 (EGR1) binding motif partially overlaps with the Sp1 binding sites, it is conceivable that they mutually influence *MDR1* gene expression in a competitive manner (45). Treatment with phorbol ester induced the expression of both *EGR1* and *MDR1* genes in human leukemia cells (46). However, the expression of *EGR1* alone did not enhance *MDR1* promoter activity. Coexpression of the oncosuppressor gene *WT1* resulted in the inhibition of *MDR1* promoter activation by *EGR1* or phorbol ester (47). Therefore, the direct binding of *WT1* to the GC box might compete with Sp1 to down-regulate the *MDR1* gene. These findings suggest that interactions between *EGR1* and *WT1* might play a key role in *MDR1* promoter activation.

p53

Mutant p53 has been shown to enhance *MDR1* promoter activity in mouse cells; this was reversed by wild-type p53 (14, 48). By contrast, stimulation of the *MDR1* promoter by wild-type, but not mutant, p53 was shown in several human p53-null cancer cell lines. The *MDR1* promoter region -39 to +53 is responsible for this p53-mediated activation (49), whereas the region -189

to +133 is thought to be responsible for negative regulation by wild-type p53 (50). In addition, p53 has been reported recently to bind directly to a novel binding element (-72 to -40) within the *MDR1* core promoter and to repress its promoter activity (51).

Nuclear Factor-Interleukin-6

The treatment of human monocytic cells with phorbol ester enhanced *MDR1* promoter activity through interaction with nuclear factor-interleukin-6, which is a CCAAT/enhancer binding protein family member. This study also revealed that the mitogen-activated protein kinase pathway activates nuclear factor-interleukin-6 (52). In addition, CCAAT/enhancer binding protein β has been shown recently to transactivate the *MDR1* promoter by interaction with the Y-box (53).

Heat Shock Factor

MDR1 promoter activation in response to arsenate or heat shock seems to be mediated through a heat shock element in the -178 to -165 region. An additional region at -136 to -76 has also been proposed as a critical heat shock element for the heat shock response (15, 54), although no direct binding of heat shock factor to this region has been shown. Recently, Vilaboa et al. (55) reported that infection with adenovirus carrying heat shock transcription factor 1 cDNA increased the levels of *MDR1* mRNA and PGP.

Transcription Factor 4/ β -Catenin

Transcriptional profiles produced using cDNA microarrays in human colon cancer cell lines identified the *MDR1* gene as the target of transcription factor 4/ β -catenin. Seven transcription factor 4/ β -catenin binding sites were in the promoter region between -2,030 and +31 (56).

Nuclear Factor- κ B

The hepatocarcinogen 2-acetylaminofluorene was shown to activate the *MDR1* gene in human hepatoma cells and the induction of *MDR1* by 2-acetylaminofluorene was mediated by a nuclear factor- κ B binding site located around -6 kb (57). Another group showed that the inhibition of nuclear factor- κ B reduced levels of *MDR1* mRNA and PGP expression and that nuclear factor- κ B transactivated the *MDR1* promoter in human colon cancer HCT15 cells (58). This study identified a nuclear factor- κ B binding site in the first intron.

MDR1 Promoter-Enhancing Factor 1/RNA Helicase A

MDR1 promoter-enhancing factor 1 has been shown to bind to the CCAAT sequence causing up-regulation of the *MDR1* gene (59). RNA helicase A has also been reported to bind to the CCAAT box as a member of the *MDR1* promoter-enhancing factor 1 complex (60). Overexpression of RNA helicase A enhanced the expression of both the *MDR1* promoter-reporter construct and endogenous PGP.

Clinical Implications of PGP Expression and Nuclear Translocation of YB-1

PGP triggers resistance to a wide range of anticancer agents including *Vinca* alkaloids, anthracyclines, epipodophylotoxins, and taxols (7). In addition, YB-1 plays a role in limiting the drug sensitivity of cancer cells by increasing the expression of PGP and other proteins. Immunohistochemical studies of YB-1 expression in the nuclei of untreated primary breast cancers showed an almost complete association between nuclear YB-1 and PGP expression in 9 of 27 cases (Table 2; ref. 61). Studies of clinical specimens have also shown an association between YB-1 and PGP in osteosarcoma (62), synovial sarcoma (63), breast cancer (64, 65), ovarian cancer (66-68), and prostate cancer (Table 2; ref. 69). Figure 2 shows examples of the presence and absence of YB-1 and PGP in clinical samples of osteosarcoma and synovial sarcoma based on the results of immunohistochemical analyses with anti-YB-1 and anti-PGP antibodies.

Table 2. The association of nuclear expression of YB-1 with PGP-mediated and/or non-PGP-mediated drug resistance in human malignancies

Tumor type	Malignant characteristics	References
Ovarian cancer	PGP* \uparrow	(66)
	PGP* \uparrow	(67)
	Cisplatin resistance	(68)
Breast cancer	PGP \uparrow	(61)
	PGP* \uparrow	(64)
	Drug resistance	(65)
Osteosarcoma	PGP \uparrow	(62)
Synovial sarcoma	PGP* \uparrow	(63)
Prostate cancer	PGP* \uparrow	(69)

*These studies also reported a significant correlation between nuclear YB-1 expression and disease progression or prognosis.

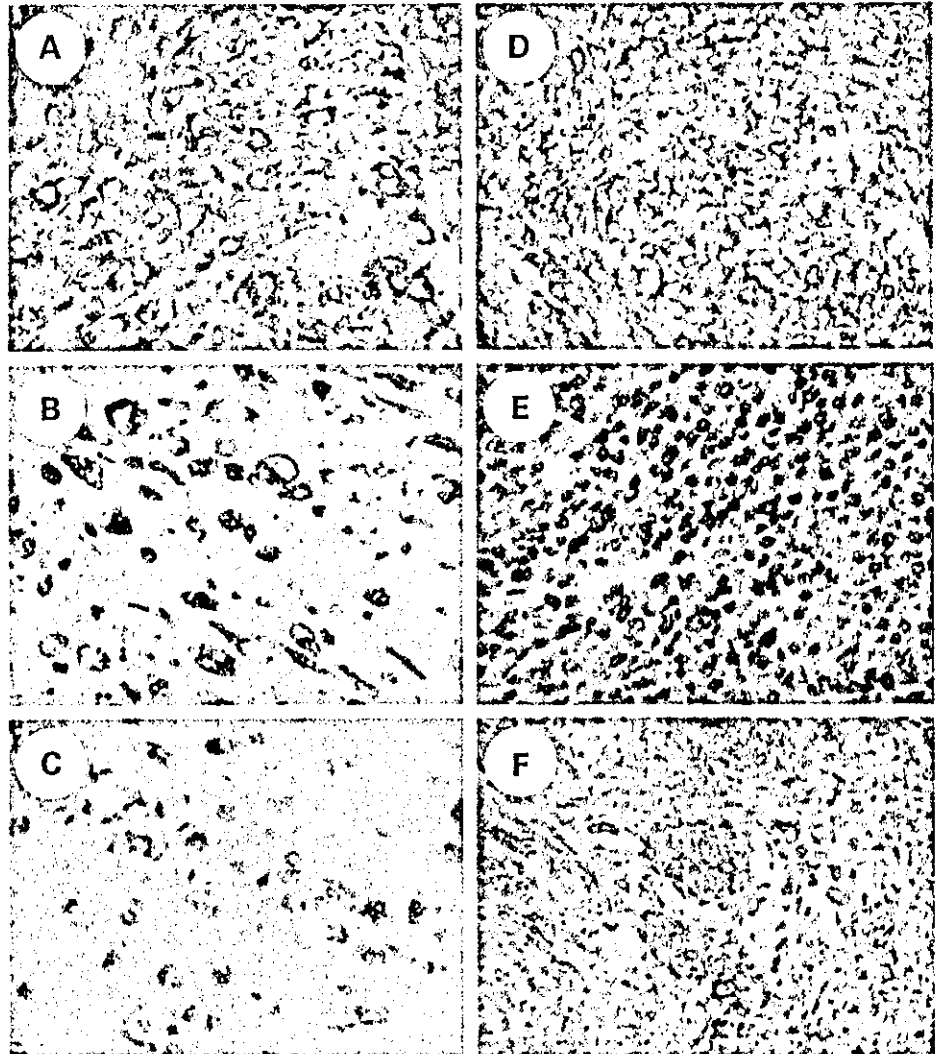
There was a significant correlation between the nuclear expression of YB-1 and the presence of PGP in 69 cases of osteosarcomas (62). A recent study confirmed that YB-1 expression was specifically associated with the overexpression of PGP rather than with three other ATP binding cassette transporters: MRP1, MRP2, and MRP3 (63). By contrast, no association was observed between YB-1 and PGP expression in colon cancers (70). It remains unclear whether YB-1 is directly involved in the transcriptional regulation of PGP in human malignancies. Nevertheless, measurements of the expression of YB-1 and PGP could suggest treatment modalities for individual cancer patients. Recently, we showed that coexpression of YB-1 and PGP correlated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer (67). The expression of *MDR1* is augmented in cancerous areas in breast cancer and other tumors, resulting in drug resistance. Furthermore, the presence of YB-1 in the nuclei of cancer cells is closely associated with the clinical outcome. YB-1 could therefore be a useful indicator of malignancy as well as a promising target for cancer therapy. We recommend the use of non-PGP-targeting drugs against malignant tumors with nuclear YB-1 expression.

Clinical Implications of Nuclear Localization of YB-1: Drug Resistance to non-PGP-Targeting Drugs

As described above, YB-1 is translocated to the nucleus in response to various environmental stresses including UV light, anticancer agents, heat, and infection in cultures of cancer cells (21). YB-1 was shown to be overexpressed in cisplatin-resistant cell lines, and antisense YB-1 RNA triggered the augmentation of sensitivity to cisplatin, mitomycin C, UV light, and hydrogen peroxide (30, 38). YB-1 associates with p53 (71) and proliferating cell nuclear antigen (72), both of which modulate DNA repair, cell cycle, transcription, and drug sensitivity. Moreover, wild-type p53 is required for the nuclear translocation of YB-1, which in turn inhibits p53-induced cell death (36). However, it remains unclear how reduced YB-1 expression increases resistance to non-PGP-targeting DNA-damaging agents such as cisplatin and mitomycin C. Potential mechanisms might include a reduction in the YB-1 interaction with proliferating cell nuclear antigen, which is necessary for nucleotide excision repair, or in the interaction with p53. However, pleiotropic drug resistance to DNA-interacting drugs (e.g., aphidicolin, hydroxyurea, cytarabine, etoposide, doxorubicin, and mafosfamide) is associated with the increased expression of YB-1 and 19 other genes that are involved in DNA replication, repair, and stress responses (73).

Nuclear expression of YB-1 was reported to be a prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma (66). It was also associated with cisplatin resistance in ovarian cancer cell lines, and expression levels were increased at some sites of ovarian cancer recurrence (68). This pattern was seen in 7 of 21 serous adenocarcinomas, 2 of 7 clear cell

Figure 2. Immunohistochemical detection of nuclear and cytoplasmic YB-1 in osteosarcoma and synovial sarcoma. Antibodies were used against YB-1 (A, B, D, and E) or PGP (C and F). Osteosarcoma is shown with cytoplasmic YB-1 expression (A), nuclear YB-1 expression (B), and PGP expression (C). Synovial sarcoma is shown with cytoplasmic YB-1 expression (D), nuclear YB-1 expression (E), and PGP expression (F). The patient in D showed no evidence of disease 131 months after surgery. The patient in F died of lung metastasis 8 months after the initial surgery.



adenocarcinomas, and 1 of 4 mucinous adenocarcinomas (Table 2). There was also a positive correlation between the nuclear expression of YB-1 and poor prognosis in synovial sarcoma (63).

Analysis of the clinical relevance of YB-1 expression in the cytoplasm or nucleus in 83 cases of breast cancer, after a median follow-up of 61 months, revealed that the 5-year relapse rate was 66% in patients with high YB-1 expression who received postoperative chemotherapy (65). By contrast, none of the patients with low YB-1 expression experienced relapse. Taken together, these findings indicate that the overexpression and nuclear expression of YB-1 have a predictive value in some human malignancies, both with and without postoperative chemotherapy.

An investigation of 588 genes associated with mouse lung tumor progression revealed that 19 were differentially expressed between lung adenoma and adenocarcinoma; YB-1 was one of these candidate lung tumor progression genes (74). Overexpression of YB-1 was observed in >90% of anaplastic thyroid carcinomas,

whereas it was absent in normal follicles and other pathologic tumor types. These findings suggested the involvement of YB-1 in the anaplastic transformation of thyroid carcinoma (75). YB-1 expression induced a strong cellular resistance to malignant transformation through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway possibly through the inhibition of protein synthesis that is required for the phosphatidylinositol 3-kinase- or Akt-induced oncogenic transformation (76).

Conclusion

The ancestral protein YB-1 modulates cell growth, apoptosis, drug resistance, DNA repair, transcription, and translation as a pleiotropic regulator. YB-1 overexpression or nuclear YB-1 expression might play a key role not only in the acquirement of PGP-mediated drug resistance but also in sensitivity to non-PGP-targeting chemotherapeutic agents. YB-1 in the nucleus modulates drug resistance to PGP-targeting and non-PGP-targeting drugs in cancer cells

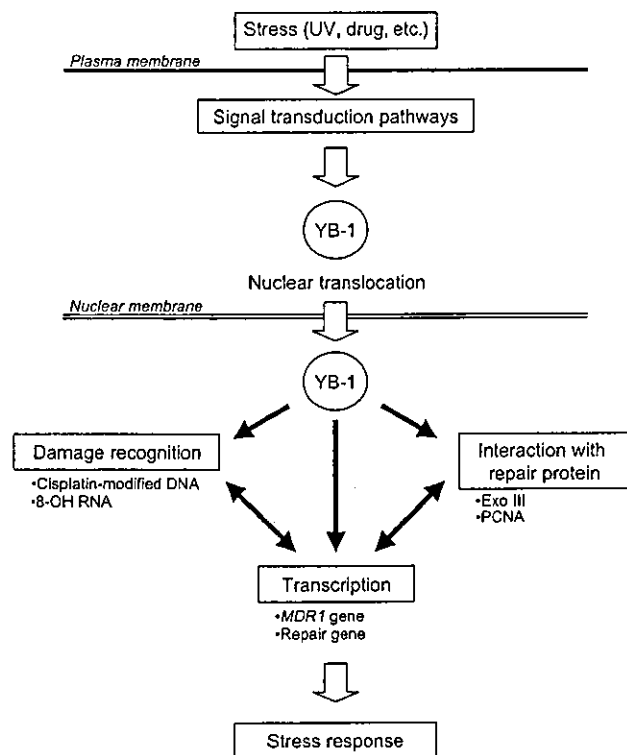


Figure 3. Schematic summary of MDR mediated by PGP or non-PGP. YB-1 is normally present in the cytoplasm but is translocated to the nucleus by treatment with anticancer agents, hyperthermia, or UV light irradiation. YB-1 in the nucleus functions as a transcription factor, which can bind to the Y-box and transactivate promoters, such as the *MDR1* gene or repair genes. By contrast, YB-1 can bind directly to cisplatin-modified DNA and interact with repair proteins including NTH1 (*Exo III*) and proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*). These functions might be advantageous for the acquisition of drug resistance.

that are exposed to anticancer and other cytotoxic DNA-damaging agents (Fig. 3). In one response pathway to environmental stimuli, YB-1 is translocated to the nucleus and up-regulates *MDR1* gene expression through binding to the Y-box on the promoter. Alternatively, YB-1 might operate its DNA repair pathway through interactions with p53 (71), proliferating cell nuclear antigen (72), and other molecules (77) when DNA is damaged (Fig. 3). Further research is needed to fully understand the role of YB-1 in cancer and drug resistance.

Acknowledgments

We thank our colleagues for invaluable help in completing the studies presented in this article.

References

- Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;15:4028–33.
- Schinkel AH. Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998;36:9–13.
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:361–98.

- Watkins PB. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;15:161–70.
- Fromm MF. The influence of *MDR1* polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;18:1295–310.
- Scherf U, Ross DT, Waltham M, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 2000;24:236–44.
- Alvarez M, Paull K, Monks A, et al. Generation of a drug resistance profile by quantitation of *mdr-1*/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *J Clin Invest* 1995;95:2205–14.
- Ueda K, Clark DP, Chen CJ, Roninson IB, Gottesman MM, Pastan I. The human multidrug resistance (*MDR1*) gene. cDNA cloning and transcription initiation. *J Biol Chem* 1987;262:505–8.
- Kohno K, Sato S, Uchiyama T, Takano H, Kato S, Kuwano M. Tissue-specific enhancer of the human multidrug-resistance (*MDR1*) gene. *J Biol Chem* 1990;15:19690–6.
- Labielle S, Gayet L, Marthinet E, Rigal D, Baggetto LG. Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochem Pharmacol* 2002;64:943–8.
- Kohno K, Sato S, Takano H, Matsuo K, Kuwano M. The direct activation of human multidrug resistance gene (*MDR1*) by anticancer agents. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:1415–21.
- Bates SE, Mickley LA, Chen YN, et al. Expression of a drug resistance gene in human neuroblastoma cell lines: modulation by retinoic acid-induced differentiation. *Mol Cell Biol* 1989;9:4337–44.
- Chin KV, Tanaka S, Darlington G, Pastan I, Gottesman MM. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (*MDR1*) gene in human renal carcinoma cells. *J Biol Chem* 1990;265:221–6.
- Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Modulation of activity of the promoter of the human *MDR1* gene by Ras and p53. *Science* 1992;255:459–62.
- Miyazaki M, Kohno K, Uchiyama T, et al. Activation of human multidrug resistance-1 gene promoter in response to heat shock stress. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:677–84.
- Tanimura H, Kohno K, Sato S, et al. The human multidrug resistance 1 promoter has an element that responds to serum starvation. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;183:917–24.
- Chaudhary PM, Roninson IB. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:632–9.
- Asakuno K, Kohno K, Uchiyama T, et al. Involvement of a DNA binding protein, MDR-NF1/YB-1, in human *MDR1* gene expression by actinomycin D. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199:1428–35.
- Uchiyama T, Kohno K, Tanimura H, et al. Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ* 1993;4:147–57.
- Izumi H, Imamura T, Nagatani G, et al. Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'–5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res* 2001;29:1200–7.
- Kohno K, Izumi H, Uchiyama T, Ashizuka M, Kuwano M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* 2003;25:691–8.
- Kuwano M, Uchiyama T, Hayakawa H, et al. The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. *Cancer Sci* 2003;94:9–14.
- Kudo S, Mattei MG, Fukuda M. Characterization of the gene for *dbpA*, a family member of the nucleic-acid-binding proteins containing a cold-shock domain. *Eur J Biochem* 1995;231:72–82.
- Tekur S, Pawlak A, Guellaen G, Hecht NB, Contrin, the human homologue of a germ-cell Y-box-binding protein: cloning, expression, and chromosomal localization. *J Androl* 1999;20:135–44.
- Makino Y, Ohga T, Toh S, et al. Structural and functional analysis of the human Y-box binding protein (YB-1) gene promoter. *Nucleic Acids Res* 1996;24:1873–8.
- Toh S, Nakamura T, Ohga T, et al. Genomic organization of the human Y-box protein (YB-1) gene. *Gene* 1998;206:93–7.
- Wolfe AP. Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays* 1994;16:245–51.

28. Ladomery M, Sommerville J. A role for Y-box proteins in cell proliferation. *Bioessays* 1995;17:9–11.
29. Graumann PL, Marahiel MA. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* 1998;23:286–90.
30. Ohga T, Koike K, Ono M, et al. Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Res* 1996;56:4224–8.
31. Ohga T, Uchiumi T, Makino Y, et al. Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J Biol Chem* 1998;273:5997–6000.
32. Koike K, Uchiumi T, Ohga T, et al. Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett* 1997;417:390–4.
33. Stein U, Jurchott K, Walther W, Bergmann S, Schlag PM, Royer HD. Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *J Biol Chem* 2001;276:28562–9.
34. Uramoto H, Izumi H, Ise T, et al. p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. *J Biol Chem* 2002;277:31694–702.
35. Jurchott K, Bergmann S, Stein U, et al. YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem* 2003;278:27988–96.
36. Zhang YF, Homer C, Edwards SJ, et al. Nuclear localization of Y-box factor YB-1 requires wild-type p53. *Oncogene* 2003;22:2782–94.
37. Swamynathan SK, Varma BR, Weber KT, Guntaka RV. Targeted disruption of one allele of the Y-box protein gene, *Chk-YB-1b*, in DT40 cells results in major defects in cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:451–7.
38. Shibahara K, Uchiumi T, Fukuda T, et al. Targeted disruption of one allele of Y-box binding protein-1 (*YB-1*) gene in mouse embryonic stem cells and increased sensitivity to cisplatin and mitomycin C. *Cancer Sci* 2004;95:348–53.
39. Mantovani R. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 1999;239:15–27.
40. Sundseth R, MacDonald G, Ting J, King AC. DNA elements recognizing NF-Y and Sp1 regulate the human multidrug-resistance gene promoter. *Mol Pharmacol* 1997;51:963–71.
41. Hu Z, Jin S, Scotto KW. Transcriptional activation of the *MDR1* gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1. *J Biol Chem* 2000;275:2979–85.
42. Jin S, Scotto KW. Transcriptional regulation of the *MDR1* gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y. *Mol Cell Biol* 1998;18:4377–84.
43. Morrow CS, Nakagawa M, Goldsmith ME, Madden MJ, Cowan KH. Reversible transcriptional activation of *mdr1* by sodium butyrate treatment of human colon cancer cells. *J Biol Chem* 1994;269:10739–46.
44. Tanaka H, Ohshima N, Ikenoya M, Komori K, Katoh F, Hidaka H. HMN-176, an active metabolite of the synthetic antitumor agent HMN-214, restores chemosensitivity to multidrug-resistant cells by targeting the transcription factor NF-Y. *Cancer Res* 2003;63:6942–7.
45. Cornwell MM, Smith DE. Sp1 activates the *MDR1* promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity. *J Biol Chem* 1993;268:19505–11.
46. McCoy C, Smith DE, Cornwell MM. 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the *MDR1* promoter is mediated by EGR1. *Mol Cell Biol* 1995;15:6100–8.
47. Madden SL, Cook DM, Morris JF, Gashler A, Sukhatme VP, Rauscher FJ III. Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product. *Science* 1991;253:1550–3.
48. Thottassery JV, Zambetti GP, Arimori K, Schuetz EG, Schuetz JD. p53-dependent regulation of *MDR1* gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11037–42.
49. Goldsmith ME, Gudas JM, Schneider E, Cowan KH. Wild type p53 stimulates expression from the human multidrug resistance promoter in a p53-negative cell line. *J Biol Chem* 1995;270:1894–8.
50. Strauss BE, Haas M. The region 3' to the major transcriptional start site of the *MDR1* downstream promoter mediates activation by a subset of mutant P53 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217:333–40.
51. Johnson RA, Ince TA, Scotto KW. Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element. *J Biol Chem* 2001;276:27716–20.
52. Combates NJ, Kwon PO, Rzepka RW, Cohen D. Involvement of the transcription factor NF-IL6 in phorbol ester induction of P-glycoprotein in U937 cells. *Cell Growth Differ* 1997;8:213–9.
53. Chen GK, Sale S, Tan T, Ermoian RP, Sikic, BI. CCAAT/enhancer-binding protein β (nuclear factor for interleukin 6) transactivates the human *MDR1* gene by interaction with an inverted CCAAT box in human cancer cells. *Mol Pharmacol* 2004;65:906–16.
54. Kioka N, Yamano Y, Komano T, Ueda K. Heat-shock responsive elements in the induction of the multidrug resistance gene (*MDR1*). *FEBS Lett* 1992;301:37–40.
55. Vilaboa NE, Galan A, Troyano A, de Blas E, Aller P. Regulation of multidrug resistance 1 (*MDR1*)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1). *J Biol Chem* 2000;275:24970–6.
56. Yamada T, Takaoka AS, Naishiro Y, et al. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/ β -catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 2000;60:4761–6.
57. Kuo MT, Liu Z, Wei Y, et al. Induction of human *MDR1* gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NF- κ B signaling. *Oncogene* 2002;21:1945–54.
58. Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, et al. NF- κ B transcription factor induces drug resistance through *MDR1* expression in cancer cells. *Oncogene* 2003;22:90–7.
59. Ogretmen B, Safa AR. Identification and characterization of the *MDR1* promoter-enhancing factor 1 (MEF1) in the multidrug resistant HL60/VCR human acute myeloid leukemia cell line. *Biochemistry* 2000;39:194–204.
60. Zhong X, Safa AR. RNA helicase A in the MEF1 transcription factor complex up-regulates the *MDR1* gene in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem* 2004;279:17134–41.
61. Bargou RC, Jurchott K, Wagener C, et al. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic *MDR1* gene expression. *Nat Med* 1997;3:447–50.
62. Oda Y, Sakamoto A, Shinohara N, et al. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 1998;4:2273–7.
63. Oda Y, Ohishi Y, Saito T, et al. Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II α expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J Pathol* 2003;199:251–8.
64. Saji H, Toi M, Saji S, Koike M, Kohno K, Kuwano M. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human breast carcinoma. *Cancer Lett* 2003;190:191–7.
65. Janz M, Harbeck N, Dettmar P, et al. Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int J Cancer* 2002;97:278–82.
66. Kamura T, Yahata H, Amada S, et al. Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer* 1999;85:2450–4.
67. Huang X, Ushijima K, Komai K, et al. Co-expression of Y box-binding protein-1 and P-glycoprotein as a prognostic marker for survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004;93:287–91.
68. Yahata H, Kobayashi H, Kamura T, et al. Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:621–6.
69. Gimenez-Bonafe P, Fedoruk MN, Whitmore TG, et al. YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity. *Prostate* 2004;59:337–49.
70. Shibao K, Takano H, Nakayama Y, et al. Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II α genes in human colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1999;83:732–7.
71. Okamoto T, Izumi H, Imamura T, et al. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene* 2000;19:6194–202.
72. Ise T, Nagatani G, Imamura T, et al. Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res* 1999;59:342–6.
73. Levenson VV, Davidovich IA, Roninson IB. Pleiotropic resistance to DNA-interactive drugs is associated with increased expression of genes involved in DNA replication, repair, and stress response. *Cancer Res* 2000;60:5027–30.

74. Yao R, Wang Y, Lubet RA, You M. Differentially expressed genes associated with mouse lung tumor progression. *Oncogene* 2002;21:5814–21.
75. Ito Y, Yoshida H, Shibahara K, et al. Y-box binding protein expression in thyroid neoplasms: its linkage with anaplastic transformation. *Pathol Int* 2003;53:429–33.
76. Bader AG, Felts KA, Jiang N, Chang HW, Vogt PK. Y box-binding protein 1 induces resistance to oncogenic transformation by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12384–9.
77. Marenstein DR, Ocampo MT, Chan MK, et al. Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor. *J Biol Chem* 2001;276:21242–9.
78. Combates NJ, Rzepka RW, Chen YN, Cohen D. NF-IL6, a member of the C/EBP family of transcription factors, binds and trans-activates the human *MDR1* gene promoter. *J Biol Chem* 1994;269:29715–9.
79. Chuang SE, Doong SL, Lin MT, Cheng AL. Tax of the human T-lymphotropic virus type I transactivates promoter of the *MDR-1* gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:482–6.
80. Takara K, Takagi K, Tsujimoto M, Ohnishi N, Yokoyama T. Digoxin up-regulates multidrug resistance transporter (*MDR1*) mRNA and simultaneously downregulates steroid xenobiotic receptor mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:116–20.

特集／トランスポーター

7. 多剤耐性トランスポーター：
抗がん剤の MDR*¹久留米大学先端癌治療研究センター*²九州大学医学研究院医化学*³産業医科大学医学部分子生物学桑野信彦*¹和田守正*²和泉弘人*³河野公俊*³

1. はじめに

薬剤を感染症やがん患者の治療のために投与を続けると、しばしば薬剤効果の低下が観察される。抗生物質に対する耐性病原細菌の出現ならびに抗がん剤に対する耐性がんの出現は、化学療法が始まって以来、長い治療戦略の歴史とともに簡単に解決できない大きな難問として現在まで続いている。病原細菌とがん細胞の耐性について多くの共通するメカニズムが存在すると同時に、各々特徴的なメカニズムも存在している。とくに本稿では、構造や作用点の異なる多くの抗がん剤に同時に耐性を示すがん多剤耐性¹⁾について、P糖蛋白質/MDR1 遺伝子を中心に、さらに MRP 遺伝子(本特集の野崎らの項 p. 81 参照)などの関与について一部述べる。

P糖蛋白質やその他の ABC トランスポーター(MRP1 や BCRP などを含む)の発現上昇は、抗がん剤やその他薬剤に対する耐性で選択した耐性体細胞株でしばしば観察される。Victor Ling 博士は vincristine 耐性のハムスター細胞株を、秋山伸一博士は colchicine 耐性のヒトがん細胞を各々単離樹立した。さまざまな薬剤の排出を亢進させる多剤耐性の獲得に寄与する ABC トランスポーター MDR1 遺伝子が、Victor Ling 博士や Ira Pastan 博士と植田和光博士らの研究グループによって単離された。我々の研究室で単離した2種類のヒトがん細胞由来の多剤耐性細胞株 KB/VJ300 と KB/VM4 は、各々選択に用いた薬剤

Table 1 ヒトがん細胞より樹立した P 糖蛋白質 (KB/VJ300) と MRP1 (KB/VM4) 発現の多剤耐性細胞株の抗がん剤に対する耐性パターン^{a)}

抗がん剤	KB/VJ300	KB/VM4
doxorubicin	10	14
vincristine	400 ^{b)}	2
actinomycin-D	100	2
daunorubicin	20	9
etoposide (VP16)	5	150
teniposide (VM26)	5	110 ^{b)}
camptothecine	4	1
cisplatin	1	0.5

a) : 細胞集落形成能における 10% 生存率から親株 KB3-1 を 1.0 としたときの相対的薬剤濃度を示す。

b) : KB/VJ300 と KB/VM4 は各々 vincristine と teniposide で選択した細胞株で P 糖蛋白質/MDR1 と MRP1 が各々優位に発現している。

に耐性を示すだけでなく、他薬剤に対しても交差耐性を示している^{2,3)} (Table 1)。KB/VJ300 では MDR1 遺伝子の発現上昇が、KB/VM4 では MRP1 遺伝子発現上昇が各々観察され、両 ABC トランスポーター遺伝子が多剤耐性の獲得に寄与していることが示されている。

現在、50 個近い ABC トランスポーターが単離され、その中には研究が進み抗がん剤の耐性や細胞外排出に関与するトランスポーターが同定されている^{4,5)}。薬剤耐性で選択された多剤耐性細胞や cDNA 導入強制発現株、また動物のノックアウトマウスなどの実験結果から明らかにされてきた P 糖蛋白質をはじめとする 4 つのトランスポーターと関連する抗がん剤を Table 2 に示している^{6,7)}。その中でも、P 糖

Key words : multidrug resistance, P-glycoprotein, MDR1, MRP1, ABC transporter

*¹ 〒 830-0011 久留米市旭町 67

Table 2 P糖蛋白質, MRP2, MRP3 および BCRP が認識し耐性と関連する抗がん剤

P糖蛋白質	MRP2	MRP3	BCRP
doxorubicin	doxorubicin	etoposide	vincristine
daunorubicin	vincristine	teniposide	camptothecine
etoposide	camptothecine	methotrexate	mitoxantrone
teniposide	cisplatin		
vincristine	methotrexate		
paclitaxel			
actinomycin-D			

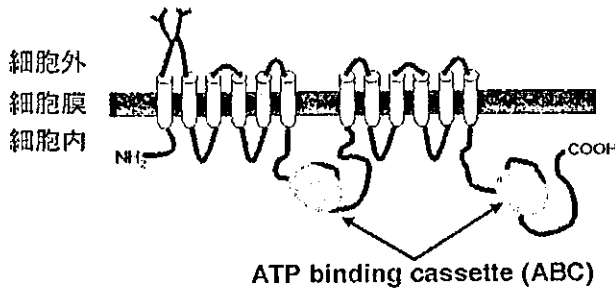


Fig. 1 P糖蛋白質の構造

白質と MRP1 は遺伝子が単離されたのが古いこともあって、抗がん剤の多剤耐性への関与に関する研究が進んでいる。

2. MDR1/P糖蛋白質と多剤耐性

P糖蛋白質は、嚢胞性線維症 (cystic fibrosis) の原因遺伝子 CFTR と並んで、最も研究の進んでいるヒト ABC トランスポーターである (Fig. 1)。Alvarez ら⁸⁾は、60 種類のヒトがん細胞株で抗がん剤の感受性をスクリーニングした結果、感受性に関与する鍵を握る最も重要な分子標的は P糖蛋白質であったと報告している (Table 1, 2 参照)。P糖蛋白質は、肝、脾、腎、副腎、子宮(妊娠時)、精巣、胎盤、卵巣、腸、骨格筋などの正常器官や組織で発現しており、ステロイドをはじめ多くの生理物質の輸送や排泄にかかわっている (Table 3)。さらに、Peter Borst 博士らのグループによるノックアウトマウスの実験からも示されたように、脳血液関門など生体内外の毒物などに対しても、生体防御の重要な働きを担っている⁹⁾。

MDR1 遺伝子の発現の多剤耐性の獲得への寄与について、培養系のがん細胞などで得られた情報のほかに個体レベルで証明したのは Ira Pastan 博士らの研究グループの発表である¹⁰⁾。彼らは MDR1 遺伝子を、骨髄系細胞に選択的に発現する耐性トランスジェニックモデルマウスを作製し、鶴尾隆博士らによって開発

Table 3 ヒト正常組織とがんにおける P糖蛋白質と MRP1 の発現

	P糖蛋白質	MRP1
正常組織	副腎, 子宮(妊娠時), 腎, 脳, 肝, 大腸	胎盤, 心, 精巣, 単球, 肺, 骨格筋
がん	白血病, 大腸がん, リンパ腫, 腎がん, 乳がん, 肺がん, 膵がん, 卵巣がん	神経芽腫, 甲状腺がん, リンパ腫, 食道がん, 白血病, 胃がん, 肺がん, 乳がん

されていた P糖蛋白質に特異的なモノクローナル抗体と緑膿菌毒素のキメラ蛋白の投与によって、白血球数の減少がみられることを報告した。さらにこのマウスに、daunorubicin 単独投与では白血球数の減少はみられないが、P糖蛋白質の機能を抑える verapamil を併用すると著明な白血球数の減少が観察された。以上の実験から、MDR1 遺伝子が確かに個体レベルでも、“耐性獲得”に関与していることが明らかにされたわけである。

ヒト MDR1 遺伝子は染色体 7q21.1 上に位置しており、Fig. 2 にゲノム構造と MDR1 遺伝子の 5'-制御領域について示している¹¹⁾。ヒト MDR1 や MDR3 を含むゲノム 500 キロベース (kb) を酵母染色体に連結させて酵母人工染色体 (YAC) を作製し、マウス細胞に導入し、vincristine 存在下に多段階に濃度を上昇させて、数倍から数百倍の耐性度の異なるマウス耐性細胞株を単離した。その結果、マウス多剤耐性遺伝子の発現上昇は全くみられないときに、YAC 上のヒト MDR1 遺伝子領域が特異的に遺伝子増幅と発現上昇がみられることが観察された。ヒト染色体 7q21.1 上の MDR1 ゲノム領域が、“多剤耐性”の獲得に必要なゲノム情報をもっていることが明らかになった。

MDR1 遺伝子は、多くの悪性腫瘍で発現していることが知られている (Table 3)。MDR1 遺伝子の発現上昇の機序に関して、培養系で耐性選択された MDR1 遺伝子の過剰発現分子機序の研究が進められた。その結果、MDR1 遺伝子の遺伝子増幅、5'-制御領域の遺伝子再編成や転写発現亢進などによる制御機序について発表された。しかし、それらの機序のうち、がん患者における MDR1 遺伝子発現の上昇に直接関与するものは、それぞれの分子的背景であるのかを明らかにすることはがんの多剤耐性を把握するうえで極めて大切なことである。とくに転写因子 YB-1 (Y-box 結合蛋白-1) やプロモーター上の CpG サイトのメチル化の有無が MDR1 遺伝子と相関する臨床研

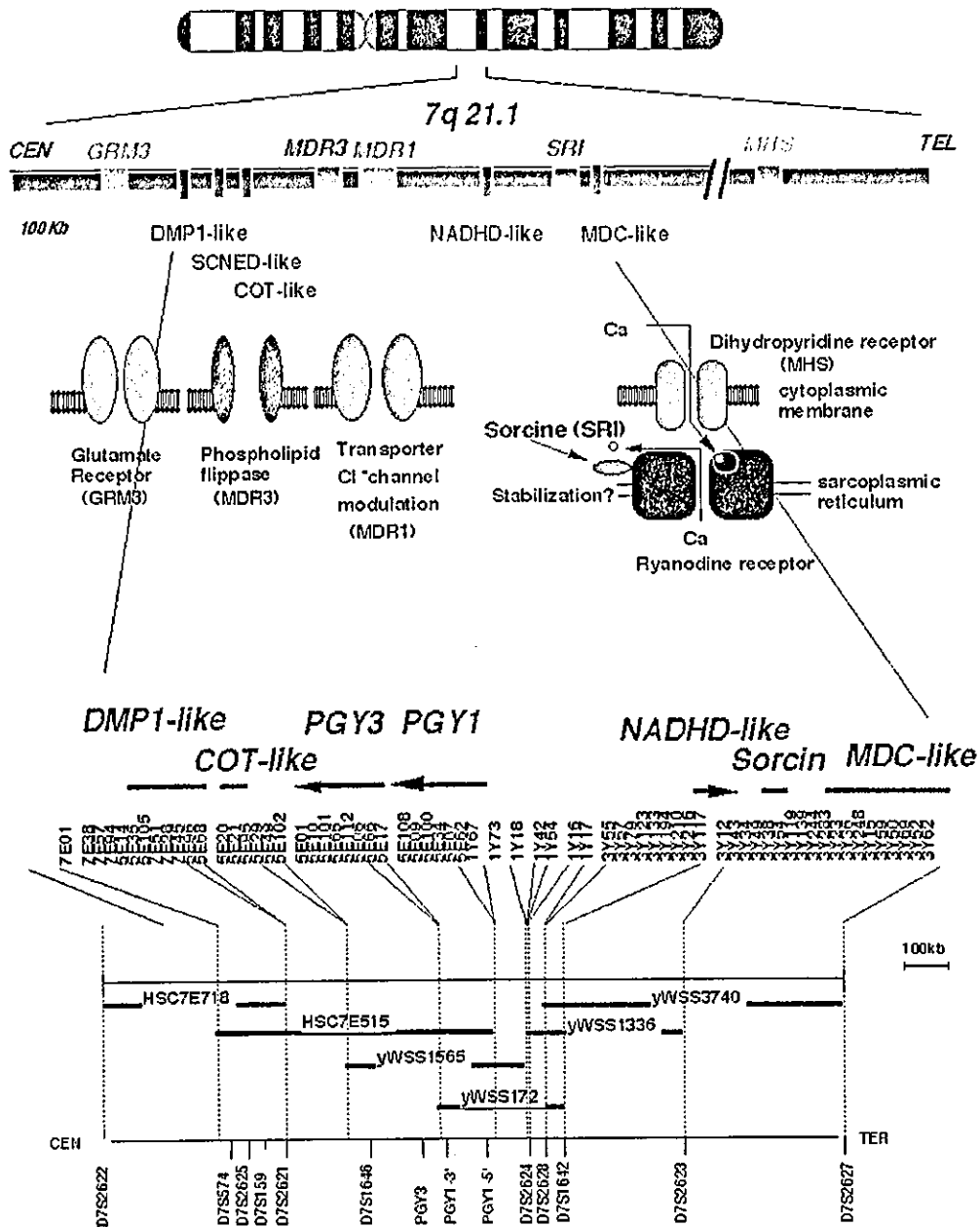


Fig. 2 ヒト7番染色体q21.1におけるゲノム再編成

がん化や抗がん剤耐性に伴うMDR1遺伝子周辺のゲノム再編成や遺伝子増幅や遺伝子発現などを把握するために、MDR1遺伝子領域の1.5 Mbの構造を明らかにした。YACクローンからエクソン・トラップ法によってエクソンの単離を試みている。MDR1 (PGY1) ともう1つのABCトランスポーターMDR3 (PGY3) は約30 kb 離れて存在している。

究について、我々の研究成果を中心に言及する。

我々は、MDR1 遺伝子の発現が抗がん剤やDNA障害ストレスによって誘導されることを培養系がん細胞で最初に報告した¹²⁾。その分子機序を理解するために研究を進めた結果、MDR1 遺伝子プロモーター上で存在するCCAAT 逆向き配列 (Y-boxと呼ばれる) に結合する蛋白としてYB-1を単離した。YB-1は熱ショック蛋白ドメインを大腸菌からヒトまで進化的に

保存された原始蛋白であり、細胞質や核内に局在して転写、翻訳、DNA修復・複製などの多岐にわたる働きを示すことが明らかにされはじめている^{6,13,14)}。とくに紫外線照射やcisplatin処理などによるYB-1の核内移行がMDR1発現を誘導したり、またYB-1の核内発現レベルの減少が外界ストレスによるMDR1発現誘導を減少させるなどの基礎的知見が蓄積してきた。

Table 4 P糖蛋白質の発現上昇と YB-1 の核内局在が相関するヒトのがん

発表者	ヒトがんの種類
Bargou ら (1997)	乳がん
Saji ら (2003)	乳がん
Kamura ら (2003)	卵巣がん
Oda ら (1998)	骨肉腫
Oda ら (2003)	滑膜肉腫

他方, Bargou らが最初に YB-1 の核内局在が P 糖蛋白質の発現と極めて高い相関を示すことを乳がん患者で報告した¹⁵⁾。以来, 卵巣がん, 骨肉腫, 乳がん, 滑膜肉腫などで, YB-1 の核内局在と P 糖蛋白質発現が相関することが発表されている (Table 4)。もちろん, YB-1 の活性化が MDR1 遺伝子の発現を正に制御するという基礎研究が臨床データと直接関連しているか否かは明らかではない。しかし, YB-1 の核内局在と P 糖蛋白質の 2 つの分子標的を検討することは, がん患者の予後やがん治療の効果とも相関する臨床データも蓄積されつつあり, 各々のがんの悪性形質に関連する分子標的として YB-1 の核内局在の有無は重要な診断マーカーになることを期待している^{13,14)}。

他方, もう 1 つ P 糖蛋白質が関与する臨床多剤耐性に, MDR1 遺伝子のプロモーター領域の CpG サイトのメチル化の有無が重要な鍵を握っていることが明らかになってきた (Fig. 3)。その最初の研究のきっかけは, ヒトがん細胞から vincristine 耐性として単離した多剤耐性細胞株 KB/VJ300 に関する解析結果からであった¹⁶⁾。KB/VJ300 細胞では, P 糖蛋白質/MDR1 遺伝子が秋山伸一博士らが colchicine 耐性で単離した遺伝子増幅型の多剤耐性株とは異なり, 全く増幅はみられないが MDR1 mRNA のレベルは同じくらい著明に上昇していた。そのメカニズムについてははっきりしたのは, 単離してから実に 10 年近く経過してからであった。MDR1 プロモーター領域の -100 bp 付近の CpG メチル化が消失していることが判明した¹⁷⁾。

次に, KB/VJ300 細胞における MDR1 遺伝子発現上昇に MDR1 プロモーター上の CpG のメチル化の有無が重要であるという知見を, “臨床多剤耐性の獲得” と関連するか否かについて研究をスタートさせた⁶⁾。我々は, 白血病患者について名古屋市大の上田龍三博士らのグループと, 膀胱がん患者について九州大学の内藤誠二博士らのグループと各々の共同研究を進めた。その結果, 急性骨髄性白血病患者においても

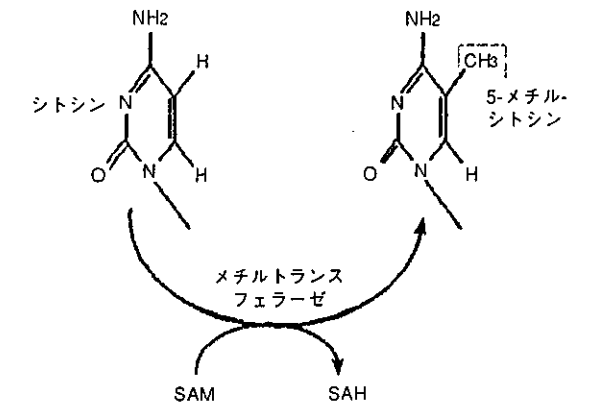
膀胱がん患者においても, MDR1 プロモーター領域の CpG サイトの脱メチル化のレベルと MDR1 遺伝子の発現レベルが極めて有意な相関を示すことが観察された^{18,19)}。膀胱がん患者において, 治療経過に伴ってフォローした結果, 初発時には MDR1 遺伝子プロモーターはメチル化を受けていることが多く, 化学療法によって寛解のあと再発に至る過程で脱メチル化が起こり MDR1 遺伝子の発現が亢進されることが示唆された (Fig. 3)。

以上, P 糖蛋白質の発現の亢進がみられるがん患者において, YB-1 の核内移行や MDR1 プロモーター上の CpG サイトの脱メチル化が誘導されていることから, “多剤耐性” 獲得の新しい分子診断への道が開かれるのではないかと考えられる。

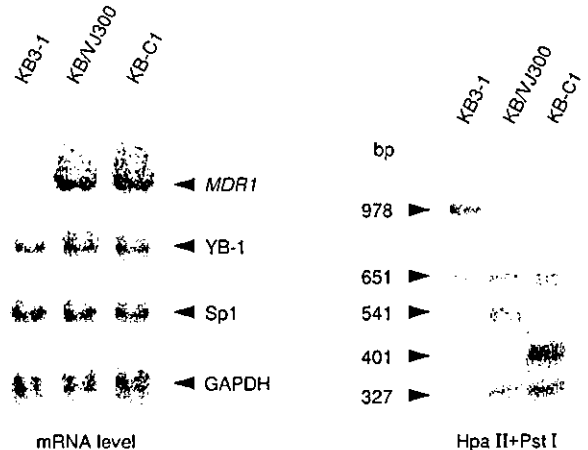
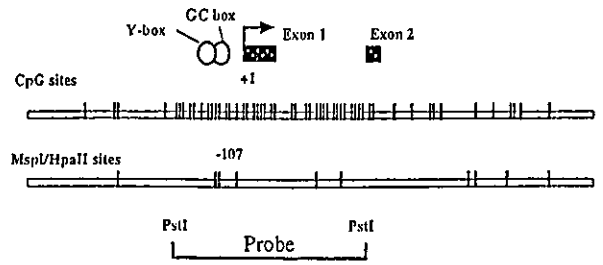
3. MRP1 と多剤耐性

多剤耐性細胞株で, P 糖蛋白質/MDR1 遺伝子の過剰発現によって多剤耐性形質を獲得している例はしばしばみられる。しかし, MDR1 遺伝子の発現上昇がみられないで多剤耐性を獲得している細胞株もみられ, William Beck 博士はこれらの多剤耐性に atypical MDR (非定型多剤耐性) と呼び, DNA トポイソメラーゼやその他のトランスポーターの存在を示唆した^{3,20,21)}。その結果, MDR1 とは異なる新しい多剤耐性に関連する遺伝子として MRP1 が同定されたことになった。MRP1 遺伝子はヒト染色体 16p13.1 上に位置し, 胎盤, 精巣, 心肺, 卵巣, 単核球などの正常組織に発現している^{5,6)} (Table 3)。

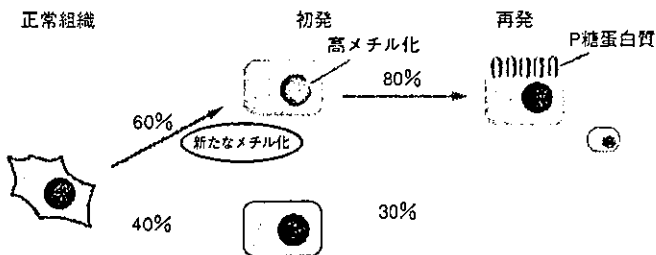
P 糖蛋白質が疎水性または負の荷電をもたない両親媒性の薬剤を基質にするのに対して, MRP サブファミリーは負の荷電をもつ両親媒性薬剤に親和性が高いことが明らかにされている。また, MRP サブファミリーの間でも基質特異性は異なっており, MRP1 と MRP2 はグルタチオン抱合体やグルクロン酸抱合体を, MRP3 はグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体を, MRP4 や MRP5 のヌクレオチドの誘導体をよい基質とすることがわかってきた^{5,6,20)}。一方, MRP1 の基質認識機構についてはほとんどわかっていない。そこで, 抗がん剤および有機アニオンを基質にするがその特異性が異なるヒト多剤耐性蛋白質 MRP1 と MRP2 に注目し, この基質特異性の決定機構を明らかにするため MRP1 と MRP2 との間でキメラ蛋白質を作製し, 基質輸送の特異性を担うドメインの特定を試みた。その結果, MRP1 のロイコトリエン C4 (LTC4) に対する親和性は MRP2 より 10 倍高いが, MRP2



(A) DNA上のシトシンはメチルトランスフェラーゼによって5-メチルシトシンを生成する。



(B) MDR1のプロモーター領域のCpGサイトを示している。ヒトがん細胞KB3-1由来の多剤耐性株KB/VJ300とKB-C1は、MDR1遺伝子発現が上昇している。メチル化を特異的に認識する制限酵素Hpa IIで両多剤耐性株のMDR1プロモーター領域や親株KB3-1と異なり切断されていることから、低メチル化になっていることを示している。



(C) 膀胱がんの治療経過に伴うプロモーター領域のメチル化とMDR1遺伝子発現の変化を検討した。その結果、初発時に60%の患者においてMDR1プロモーターはメチル化を受ける。そのうち化学療法後の寛解から再発へ至る過程で、脱メチル化とMDR1遺伝子の発現亢進が観察された。

Fig. 3 DNAメチル化とMDR1遺伝子の発現制御

真核細胞では転写因子によるトランス制御とともに遺伝子のプロモーター領域のCpGメチルによる制御が重要な役割を担っている。

のN末端846アミノ酸をMRP1に置換したキメラではMRP1とほぼ同じ親和性を示した。このことから、MRP1の1-846アミノ酸がMRP1型の高い親和性によるLTC₄輸送に重要な領域と考えられた。一方、N末端116アミノ酸をMRP1に置換したキメラではMRP2の約5倍高い親和性を示し、さらにMRP1の領域を長くするにつれ徐々に親和性は上昇した。これは、MRP1のN末端の116アミノ酸、すなわちN末端から1,2および3番目の膜貫通セグメントがLTC₄に高い親和性を示すために必要な領域であり、加えて116番目から846番目のアミノ酸にも、LTC₄に親和性を示す領域が存在することを示唆する。さらに、etoposideに対する相対的耐性度はMRP1が16.5、MRP2が2.2であったが、MRP2と比較して、N末端116および480アミノ酸をそれぞれMRP1のN末端の116アミノ酸および239番目から480番目のアミノ酸(膜貫通セグメント6~9)がetoposide耐性に

重要な役割を果たすことが示唆された²²⁾。

MRP1は白血病、食道がん、肺がん(NSCLC)、神経芽腫などで発現が上昇していることが報告されて以来²³⁾、その他のがんでも発現上昇が報告されている(Table 3)。小児の神経芽腫では、N-mycの遺伝子増幅が化学療法抵抗性の指標となっているが、この遺伝子増幅を伴う症例ではMRP1のmRNAレベルが有意に高い。さらに、N-mycの遺伝子増幅とは関係なくMRP1のmRNAレベルが強い予後因子となるとの報告もされている。その他のMRPファミリーについても、腫瘍における発現様式や予後との相関などについてはようやく解析が始まったばかりである。最近、ヒトの卵巣がんにおいてMRP1の高発現やMRP1とMRP3の共発現が予後に強く影響することが報告されている²⁴⁾。さらに、乳がんにおいてMDR1以外にもMRP1がBCRPやボルト蛋白LRPなどとともにその高発現が生存率に影響することが報告され

Table 5 MDR1 遺伝子の SNP 頻度の人種差

MDR1 exon/intron	塩基置換	アミノ酸置換	アレル頻度			
			Hoffmeyer, 2000		Tanabe, 2001	
exon1b	T-129C	Noncoding			T (0.92)	C (0.08)
exon12	C1236T	wobble	C (0.76)	T (0.24)	C (0.65)	T (0.35)
exon21	G2677T	Ala893Ser	G (0.36)	T (0.64)	G (0.37)	T (0.42)
	G2677A	Ala893Thr				A (0.22)
exon26	C3435T	Ile1145Ile	C (0.50)	T (0.50)	C (0.51)	T (0.49)

ている²⁵⁾。

MDR1 に比べ MRP1 のがんでの発現上昇の分子的背景については、はっきりしていないところが多い。転写レベルでの制御に関して、MRP1 のコアプロモーター領域にはいくつかの GC box が存在し、転写因子 Sp1 が MRP1 の発現を制御していることが示されている。その後の解析から、転写開始点より -511~-477 に AP-1 結合領域をもつ抗酸化応答領域 (ARE) が見い出された。その領域はエンハンパーとして働き、MRP1 が過剰発現している多剤耐性株では親株に比べ ARE が結合する核内因子は約 3 倍増加していることがゲルシフト法で示された。その因子は cJUN と同定されている²⁶⁾。薬剤によって MRP1 発現誘導に関するいくつかの報告があるが、分子レベルの解析はほとんど手をつけられていない。MRP1 の発現誘導についても、 β -acetylaminofluorene で誘導される。多くの腫瘍で MRP1 が発現していることから、がんの悪性化の機構に MRP の発現が示唆されている。Sullivan ら²⁷⁾により、MRP1 の発現が変異 p53 によって増加することが前立腺がん細胞で示された。ABC トランスポーターのプロモーター領域は複雑な制御を受けている。しかし、明らかな p53 結合領域がないことから、転写制御因子との分子会合を介した間接的な作用によるものと考えられる。

4. MDR1 や MRP1 と遺伝子多型

MDR1 や MRP1 は抗がん剤耐性に関与するとともに、薬物感受性の個人差や体内動態に関与する重要な因子の 1 つと考えられる。したがって、その発現量や活性に影響を及ぼす遺伝子多型を検索することが、薬物応答性の個人差を考えるうえで必要になってくる。しかし、MDR1 や MRP1 の遺伝子多型や薬物応答性との相関に関する研究は、ようやく始まったばかりである。

MDR1 遺伝子について、Hoffmeyer らがはじめて包括的な遺伝子多型の検索結果を報告した²⁸⁾。コアプ

ロモーター、エクソンおよび周辺イントロンにつき検索した結果、17 個の 1 塩基置換 (single nucleotide polymorphism: SNP) を同定した (Table 5)。さらに、健常人の十二指腸生検材料を用いた解析を進め、アレル頻度の高い C3435T について P 糖蛋白質の発現レベルおよび P 糖蛋白質の基質である digoxin の血中濃度と相関することを報告している。C3435T については報告が相次ぎ、胎盤の P 糖蛋白質発現レベルと相関する傾向はあるものの統計的な有意差はない、末梢の CD56⁺NK 細胞でローダミン 123 の排出活性と相関する、cyclosporin の体内動態や拒絶反応の有無との相関はないなどが報告されている。C3435T はアミノ酸置換を伴わない塩基置換なので、P 糖蛋白質の発現レベルや薬物の体内動態へどのように関与するのかわからない。C3435T の C のアレル頻度が白人や黄色人種では 35~60% であるのに対し、黒人では 75~85% と高いことも薬物療法の至適量を決めるうえで考慮すべきことである。Table 5 に、アレル頻度の高い MDR1 遺伝子の SNP につき、白人と日本人でのアレル頻度を比較した。また、発現量と SNP の相関についても人種差があるようである。最近、日本人においては C3435T ではなく、プロモーター領域の SNP が発現レベルに相関することを我々は見い出している²⁹⁾。他のトランスポーターの SNP についても、ゲノムデータベースに多数登録が始まっているが、発現レベルや臨床パラメータとの関連については今後の課題である。

薬物排出トランスポーターは、さまざまな薬物で発現誘導や阻害がみられることが報告されている。すでに述べたように、P 糖蛋白質は rifampicin、薬草のセイヨウオトギリソウや抗がん剤で、MRP2 は cyclic AMP、dexamethasone、rifampicin、tamoxifen、cisplatin、2-acetylaminofluorene、cycloheximide などで発現誘導が、またリポ多糖やサイトカインで発現の低下が観察されている。なかでも、抗がん剤などによる P 糖蛋白質の発現誘導には Y-box 結合

蛋白質が、また rifampicin や paclitaxel による発現誘導についてはオーファンレセプター-SXP の関与が示され、発現誘導機構が分子レベルで明らかにできる段階に入った。したがって、このような薬剤や環境因子が薬物排出トランスポーターの発現レベルに関与することは明らかである。他方、大腸がんや肝がん患者の非がん部について、免疫染色および RT-PCR により解析した我々の結果から、P 糖蛋白質/MDR1 などの ABC トランスポーターの発現量に個人差が存在することがわかってきた。この場合、患者は一定の術前環境に置かれるので、薬剤使用の有無などによって発現の個人差が生じるとは考えにくい。やはり、遺伝子多型から生じる個人差があるはずである。また、すでに述べたように MDR1 遺伝子の場合、プロモーター領域の CpG のメチル化により発現は負に制御されることが明らかになっているので、構成的発現量の個人差を規定している因子としてエピジェネティックな因子も考慮する必要がある。今後、転写因子、コアクティベーターやサイトカインなどの内在性誘導因子を含めたトランス作用因子の遺伝子多型も検討することが必要となるであろう。

5. おわりに

1) P 糖蛋白質は多剤耐性を担う代表的な ABC トランスポーターである。P 糖蛋白質ががんの悪性形質である多剤耐性の獲得に関与することはほぼ明らかにされた。正常組織では発現がないか少ない場合、その細胞由来のがん悪性化に伴って発現亢進がみられる分子的背景（たとえば YB-1 やメチル化）を同時に検討していくことは、各々のがんの特徴を具体的に把握するうえで大切である。

2) P 糖蛋白質だけでなく、その他の ABC トランスポーターが各々のヒトがんで発現上昇がみられる場合も多い^{19,24)}。それぞれの ABC トランスポーターがそれぞれのがんで多剤耐性の鍵を握っているかを明らかにすることが、今後の課題である。

3) P 糖蛋白質をはじめとして、ABC トランスポーターが多剤耐性の獲得に関与しているとするれば、その耐性克服についての戦略を提示していくこと、および多剤耐性がんの出現を減少させる治療プロトコルや治療法を考案することは必須の課題である。とくにそれぞれのがんがそれぞれの ABC トランスポーターを誘導しやすいか否かを、*in vitro* や *in vivo* 系でその分子的背景も含めて明らかにすることは重要である。

以上、多剤耐性に関する ABC トランスポーターについても、さまざまな問題がまだ未解決のままである。しかし、多剤耐性に関する基礎研究で得られた知見やシナリオを、がん患者の多剤耐性や個別化治療へ結びつける可能性をたえず検討していく努力が今後ますます大切である。そこから、新しい耐性克服の戦略が誕生してくると確信している。

文 献

- 1) 秋山伸一. 抗がん剤のはたらき-課題と展望-. 共立出版, 1991.
- 2) 河野公俊, 桑野信彦. 多剤耐性遺伝子 MDR1 の発現制御. 癌と化学療法 1980; 17: 1975-81.
- 3) 和田守正, 長谷川周二, 河野公俊, 桑野信彦. 多剤耐性. 癌と化学療法 1994; 21: 936-44.
- 4) 桑野信彦, 内海健, 和田守正, 河野公俊. ABC トランスポーター. *Cancer Frontier* 1999; 1: 46-52.
- 5) 和田守正, 内海健, 桑野信彦. ABC トランスポーター: 構造と機能研究の新展開. *生化学* 2001; 73: 537-46.
- 6) Kuwano M, Uchiumi T, Hayakawa H, Ono M, Wada M, Izumi H, Kohno K. The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. *Cancer Sci* 2003; 94: 9-14.
- 7) Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Review Cancer* 2002; 2: 48-58.
- 8) Alvarez M, Paull K, Monks A, Hose C, Lee JS, Weinstein J, Grever M, Bates S, Fojo T. Generation of a drug resistance profile by quantitation of MDR-1/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anti-cancer Drug Screen. *J Clin Invest* 1995; 95: 2205-14.
- 9) Schinkel AH, Smit JJ, Van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, Van Deemmen EC, Riele HP, Berns AJM, Borst P. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994; 77: 491-502.
- 10) Mickisch G, Merlino G, Galski H, Gottesman M, Pastan I. Transgenic mice that express the human multidrug resistance gene in bone marrow enable a rapid identification of agents that reverse drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 547-51.
- 11) Torigoe K, Harada T, Kusaba H, et al. Localization of 67 exons on a YAC contig spanning 1.5 Mb around the multidrug resistance gene region of human chromosome 7q21.1. *Genomics* 1998; 49: 14-22.
- 12) Kohno K, Sato S, Takano H, Matsuo K, Kuwano M. The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer agents. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 1415-21.
- 13) 河野公俊, 和泉弘人, 桑野信彦. 転写因子 YB-1 の核内局在と癌の薬剤耐性. *Cancer Frontier* 2001; 3: 68-73.
- 14) Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* 2003; 25: 691-8.
- 15) Bargou RC, Jurchott K, Wagener C, et al. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in

- primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med* 1997 ; 3 : 447-50.
- 16) Kohno K, Kikuchi J, Sato S, Takano H, Saburi Y, Asoh K, Kuwano M. Vincristine-resistant human cancer KB cell line and increased expression of multidrug-resistance gene. *Jpn J Cancer Res* 1988 ; 79 : 1233-46.
 - 17) Kusaba H, Nakayama M, Harada T, Nomoto M, Kohno K, Kuwano M, 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. *Eur J Biochem* 1999 ; 262 : 924-32.
 - 18) Nakayama M, Wada M, Harada T, Nagayama J, Kusaba H, Ohshima K, Kozuru M, Komatsu H, Ueda R, Kuwano M. Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood* 1998 ; 92 : 4296-307.
 - 19) Tada Y, Wada M, Kuroiwa K, Kinukawa N, Harada T, Nagayama J, Nakagawa M, Naito S, Kuwano M. MDR1 gene overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment. *Clin Cancer Res* 2000 ; 6 : 4618-27.
 - 20) Loe DW, Deely RG, Cole SP. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *Eur J Cancer* 1996 ; 32 : 945-57.
 - 21) Kuwano M, Toh S, Uchiumi T, Takano H, Kohno K, Wada M. Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance. *Anticancer Drug Des* 1999 ; 14 : 123-31.
 - 22) Konno T, Ebihara T, Hisaeda K, Uchiumi T, Nakamura T, Shirakusa T, Kuwano M, Wada M. Identification of domains participating in the substrate specificity and subcellular localization of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 22908-17.
 - 23) Nooter K, Westerman AM, Flens MJ, et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin Cancer Res* 1995 ; 1 : 1301-10.
 - 24) Ohishi Y, Oda Y, Uchiumi T, Kobayashi H, Hirakawa T, Miyamoto S, Kinukawa N, Nakano H, Kuwano M, Tsuneyoshi M. ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human primary ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002 ; 8 : 3767-75.
 - 25) Berger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JGM, Wiemer C, Stoter G, Nooter K. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer : correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* 2003 ; 9 : 827-36.
 - 26) Kurz EU, Cole SPC, Deeley RG. Identification of DNA-protein interactions in the 5' flanking and 5' untranslated regions of the human multidrug resistance protein (MRP1) gene : evolution of a putative antioxidant response element/AP-1 binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ; 285 : 981-90.
 - 27) Sullivan GF, Yang J-M, Vassil A, Yang J, Bash-Babula J, Hait WN. Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells. *J Clin Invest* 2000 ; 105 : 1261-7.
 - 28) Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene : multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 3473-8.
 - 29) Taniguchi S, Mochida Y, Uchiumi, et al. Genetic polymorphism at the 5' regulatory region of multidrug resistance 1 (MDR1) and its association with interindividual variation of expression level in colon. *Molec Cancer Therapeut* 2003 ; 2 : 1351-9.

8. その他の治療

(1) 血管新生阻害薬

藤井 輝彦* 山名 秀明*
桑野 信彦*

<Key point>

はじめに

血管新生

血管新生とは微小血管の血管内皮細胞が刺激に反応して新しい血管網を形成する現象である。血管新生は組織の代謝を維持し、生体の機能的恒常性を保持するために不可欠であり、血管内皮細胞の重要な特性の一つである。血管新生は悪性腫瘍が増大するためにも重要であり、癌や間質から生産される血管新生促進因子によって内皮細胞が活性化され、血管構築のための分子群の発現が上昇し血管新生が誘導される。血管新生は、悪性腫瘍が増大するだけでなく、癌細胞の浸潤・転移、あるいは前癌状態から悪性癌への形質転換なども深く関与している。

促進因子
抑制因子

血管新生は促進因子と抑制因子のバランスによって制御されており、関連する多くの因子が報告されている。促進因子も抑制因子も癌細胞をはじめとして血管内皮細胞、線維芽細胞、マクロファージ、その他の血球細胞などの間質細胞からも産生される。正常の組織では抑制因子の発現が促進因子の発現より亢進しているため血管新生

Key words : 血管新生, 促進因子, 抑制因子, 胃癌, 血管新生阻害薬

Angiogenesis Inhibitor for Gastric Cancer

Teruhiko Fujii/Hideaki Yamana/Michihiko Kuwano

*久留米大学先端癌治療研究センター (分子外科) (〒 830-0011 福岡県久留米市旭町 67)

表 1 胃癌における血管新生の調節因子

促進因子	抑制因子
VEGF	Thrombospondin-1
MMP	PTEN
IL-8	TGF- β^a)
VCAM-1	PF-4
Angiopoietin-2	TIMP
uPA	PAI-1
COX-2	
Neuropilin-1	
Erythropoietin	
iNOS	

^{a)}: 促進作用と抑制作用の報告がある。

胃癌

は抑制されている。他方、腫瘍では促進因子の亢進により血管新生抑制因子とのアンバランスが起こっていると考えられる。胃癌においても血管新生の調節因子が報告されている(表1)。さまざまな癌で、血管新生(微小血管密度)が多いか少ないかは癌の転移や予後と深く関連することが報告されている¹⁾。胃癌においても、血管新生関連因子の発現が転移や浸潤などの悪性形質の獲得に関与することが知られている。表2にそれらの臨床的意義を列記した。

血管新生阻害薬

以下に、おもな血管新生に関連する因子と胃癌を中心とした血管新生との関係を解説し、血管新生阻害薬の臨床応用への可能性を述べる。

I] Vascular endothelial growth factor (VEGF)

VEGFは分子量34~45 kDaの代表的な血管新生因子である。血管内皮細胞に特異的な増殖因子として下垂体の濾胞細胞から単離された。平滑筋細胞、マクロファージ、肝細胞などの正常細胞で産生されるほか、胃癌細胞からも産生される。

VEGFが胃癌の新生血管に強く関与することも報告されている^{2),3)}。実際、動物モデルを用いた検討では、VEGFを抑制することにより抗腫瘍効果が得られている。すなわち、抗VEGF抗体により胆癌ヌードマウスの腫瘍増殖や肝転移は抑制され、微小血管密度は減少し、アポトーシスは増加した⁴⁾。また、VEGF受容体のアンチセンス療法はヌードマウスの腹膜播種を抑制することから⁵⁾、強い新生血管作用を有するVEGFを抑制することにより原発巣に対する

表 2 胃癌におけるおもな血管新生調節因子とその臨床的意義

因子	臨床的意義	報告
VEGF	VEGF-C は独立した予後因子である	Duff ら (2003)
	VEGF-A はリンパ節転移と相関	Yu ら (2003)
	早期未分化癌で VEGF-C, -D はリンパ節転位と相関	Ishikawa ら (2003)
	血清中の VEGF 濃度は胃癌患者で高く, 予後因子である	Karayiannakis ら (2002)
MMP	MMP-7 は腹膜播種に関与している	Yonemura ら (2000)
	MMP-2 は深達度, リンパ節転移, 遠隔転移と相関	Monig ら (2001)
	血清中の MMP-9 濃度は胃癌患者で高く, リンパ節転移などと相関	Torii ら (1997)
IL-8	IL-8 は深達度, 脈管侵襲と相関しており予後因子である	Kido ら (2001)
PTEN	PTEN と予後は相関	Lee ら (2003)
	進行癌やリンパ節転移例は PTEN の発現が減弱している	Yang ら (2003)
VCAM-1	血清中の VCAM-1 濃度が高い患者の予後は不良である	Velikova ら (1997)
	血清中の VCAM-1 濃度は深達度, リンパ節転移, 遠隔転移と相関	Alexiou ら (2003)
Angiopoietin-2 (Ang-2)	Ang-2 は癌組織に多く発現し, リンパ節転移と相関	Lee ら (2001)
	Ang-2 を発現している胃癌症例は進行癌が多く, 予後不良	Etoh ら (2001)
TGF- β	Smad 4 発現を伴った TGF- β 陽性例は予後良好である	Xiangming ら (2001)
	血清中の TGF- β 濃度はリンパ節転移, 予後と相関	Saito ら (2000)
	TGF- β の発現は深達度, リンパ節転移と相関	Maehara ら (1999)
	TGF- β 発現は独立した予後因子である	Nakamura ら (1998)
COX-2	COX-2 の発現とリンパ節転移, stage が相関	Xue ら (2003)
	COX-2 の発現とリンパ節転移, 予後が相関	Costa ら (2002)
	COX-2 の発現は癌組織に強く, 深達度と相関	Ohno ら (2001)

治療効果のみならず, 腹膜播種にも有効と考えられる. VEGF とそのファミリー蛋白は, VEGF 受容体 (VEGF-R 1/2/3 など) を介して血管新生だけでなくリンパ管新生にも関与しており, 血管新生阻害薬開発の有用な標的である (表 3 参照).

II) Matrix metalloproteinase (MMP)

MMP は細胞外マトリックスを分解する酵素であり、ヒト腫瘍において活性が高いことが知られている。MMP を阻害することにより腫瘍の組織への浸潤、多臓器への転移および腫瘍血管新生を抑制することができると考えられる。MMP の阻害薬である Marimastat[®] は SCID マウスを用いた胃癌腹膜播種モデルにおいて、腫瘍新生血管を抑制することにより腹膜播種を抑制した⁶⁾。

III) Interleukin-8 (IL-8)

IL-8 は C-X-C ファミリーに属する α -ケモカインの一つで、分子量 8 kDa のポリペプチドである。おもにマクロファージから分泌されるほか、線維芽細胞や血管内皮細胞からも分泌される。好中球やリンパ球の遊走を増加させる作用のほか、腫瘍の血管新生に関与していることが報告されている。IL-8 遺伝子を導入した胃癌細胞をヌードマウスの胃壁に移植すると、その増殖速度は速くなり、血管新生も増加した⁷⁾。IL-8 もまた胃癌における強い血管新生因子の一つと考えられる。

IV) Thrombospondin-1 (TSP-1)

TSP は血小板に含有される分子量 45 kDa の糖蛋白質で、癌細胞やマクロファージ、その他の細胞より産生されており、細胞外マトリックスに存在している。TSP-1 の C 末端の 140 kDa 断片は TSP-1 の受容体と考えられている CD 36 への結合を抑制したり、basic fibroblast growth factor (bFGF) の細胞外マトリックスへの結合を抑制し、血管新生を抑制する。TSP-1 を強く発現している胃癌症例では発現が弱い症例に比べ微小血管数が明らかに多く、TSP-1 は胃癌の新生血管に重要な役割を果たしていると考えられる⁸⁾。

V) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)

VCAM-1 はイムノグロブリンスーパーファミリーを形成する接着因子の一つである。VCAM-1 は、血管内皮細胞のほかに平滑筋細