

胞、線維芽細胞、マクロファージ、樹状細胞、神経細胞などで発現し、サイトカイン刺激に伴う血管内皮細胞と白血球の接着と血管新生へ関与している。胃癌における VCAM-1 の発現は、進行癌に頻度が高く、リンパ節転移と相関しており、血管新生に強く関与している。また、血清中の VCAM-1 の濃度と癌組織における VCAM-1 発現も相関が認められた⁹⁾。

VI Angiopoietin-2 (Ang-2)

Ang-2 は血管内皮細胞表面に発現する新規のチロシンキナーゼ遺伝子であり、Tie のリガンドとして同定された。Ang は Ang-1 と Ang-2 が同定されており、Ang-2 は Ang-1 の働きを阻害して、VEGF など各種因子の内皮細胞へのアクセスを促して血管新生や再構築を促進する。Ang-2 を発現している胃癌症例は進行癌が多く、予後不良である。また、Ang-2 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血管の密度が上昇したことから、Ang-2 の胃癌の血管新生への関与が示唆された¹⁰⁾。

VII Transforming growth factor- β (TGF- β)

TGF- β は癌細胞周辺の正常細胞からの生産が亢進しており、細胞外マトリックスの増加や血管新生の促進、また免疫能の低下などに関与している。TGF- β を発現している胃癌患者では、癌の深達度や進行度と VEGF 発現に有意に相関が認められ、TGF- β 陽性症例では予後不良であったと報告されている¹¹⁾。一方、Smad 4 発現を伴った TGF- β 陽性例は予後良好であるとの報告もあり¹²⁾、統一した見解は未だ得られていない。

VIII Urokinase-type plasminogen activator (uPA)

uPA はセリンプロテイナーゼに属する PA の一つで、プラスミノゲンをプラスミンに変換する。胃癌において uPA の発現は微小血管密度と相関しており、予後因子の一つであることが報告されている¹³⁾。

IX PTEN

PI 3 キナーゼの反応産物は Akt/PKB の PH ドメインに結合して活性化し生存シグナルを伝えるが, PTEN に変異を認めたり発現が減少すると PI (3, 4, 5) P 3 が増加して Akt/PKB が活性化してくる. Zheng らは, PTEN 発現の減少は微小血管密度と逆相関しており, 胃癌の血管新生に PTEN が重要な役割を果たしていることを報告している¹⁴⁾.

X Cyclooxygenase-2 (COX-2)

COX はアラキドン酸からプロスタグランジン H₂を誘導する. とくに, 誘導型の COX-2 は腫瘍の増大と深いつながりがあることが報告されている. 胃癌患者において COX-2 発現と微小血管密度は相関しており, COX-2 を発現している患者ではリンパ節転移陽性率が高率であった¹⁵⁾. また, 胃癌において COX-2 と VEGF の関係も検討されており, COX-2 発現と微小血管密度および VEGF の発現には関連性がみられた. COX-2 を過剰発現させると VEGF の発現が上昇することから, 胃癌において COX-2 と VEGF は血管新生のネットワークを形成していると考えられる¹⁶⁾.

おわりに

1972 年, Folkman は, 悪性腫瘍への新生血管による血液供給を標的として癌を治療する“血管新生療法”の概念を提唱した. 血管新生阻害薬は腫瘍の増殖を抑制するだけでなく, 浸潤や転移さらに, 発癌を抑制する可能性があり, 多大の注目を集めている.

肺癌, 前立腺癌, 大腸癌などでさかんに臨床試験が行われているが, 現在, 臨床試験が進められている血管新生阻害薬のおもなものを表 3 に示す¹⁷⁾. これまで MMP 阻害薬をはじめ, VEGF 受容体阻害薬やフマジリン誘導体, インテグリンや VEGF 抗体, 血管新生阻害ペプチド (アンジオスタチンやエンドスタチン) など多くの血管新生阻害薬の前臨床および臨床試験が行われた. 大きな期待に反して臨床効果のある血管新生阻害薬の報告はなかった. しかし, 最近, アメリカ臨床腫瘍学会 (ASCO, 2003 年 6 月) において, 進行性大腸癌患者に対して従来のイリノテカン/5-フルオロウラシル/ロイコ

表 3 臨床試験が進められている血管新生阻害性の分子標的薬剤

薬 剤	薬剤タイプ	分子標的	機 序
PTK 787	低分子	VEGF-R 1/2/3 ^{a)}	チロシンキナーゼ
SU 6668	低分子	VEGF-R 2 PDGF-R β	チロシンキナーゼ
SU 11248	低分子	VEGF-R 2 PDGF-R β	チロシンキナーゼ
AZD 6474	低分子	VEGF-R 2	チロシンキナーゼ
AZD 2171	低分子	VEGF-R 3	チロシンキナーゼ
CEP-7055	低分子	VEGF-R 1/2/3	チロシンキナーゼ
CP-547. 632	低分子	VEGF-R 2	チロシンキナーゼ
786034	低分子	VEGF-R 2	チロシンキナーゼ
IMC-1 C 11	抗体	VEGF-R 2	拮抗作用
Angiozyme	リボザイム	VEGF-R 1	mRAN 切断
Avastin	抗体	VEGF	拮抗作用
VEGF-Trap	可溶型 VEGF-R	VEGF	拮抗作用
Vitaxin	抗体	$\alpha_v\beta_3$ -integrin	拮抗作用
EMD 121974	低分子	$\alpha_v\beta_3$ -integrin	拮抗作用

^{a)} : VEGF-R 1/2/3 ; VEGF 受容体 1 型, 2 型, 3 型

[Marm , D. : J. Cancer Res. Clin. Oncol. 129 ; 607-620, 2003¹⁷⁾より引用・改変]

ボリン治療に比べて VEGF 抗体薬剤 (AvastinTM) を併用することにより有意な生存率の改善が観察され, 多大な注目をあびている。臨床試験における血管新生阻害薬の有効性を示した初めての報告である。胃癌では未だ効果のある血管新生阻害薬の報告はみられていない。大腸癌のように, VEGF 抗体や IL-8 抗体などを用いて血管新生を阻害することにより胃癌に対する有効な血管新生阻害療法が確立されることを期待したい。

謝辞: 本稿をまとめるにあたり, 九州大学医学研究院小野眞弓博士のご教示と, 原稿をまとめていただいた久留米大学先端癌治療研究センター津留崎智子氏に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 小野眞弓, 桑野信彦: 血管新生とがん. 生化学 70 ; 1159-1170, 1998
- 2) Maehara, Y., Kabashima, A., Koga, T., et al. : Vascular invasion and potential for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma. Surgery 128 ; 408-416, 2000
- 3) Saito, H., Tujitani, S., Ikeguchi, M., et al. : Neoangiogenesis and relationship to nuclear p 53 accumulation and vascular endothelial growth factor expression in advanced gastric carcinoma. Oncology 57 ; 164-172, 1999
- 4) Kamiya, K., Konno, H., Tanaka, T., et al. :

- Antitumor effect on human gastric cancer and induction of apoptosis by vascular endothelial growth factor neutralizing antibody. *Jpn. J. Cancer Res.* 90 ; 794-800, 1999
- 5) Kamiyama, M., Ichikawa, Y., Ishikawa, T., et al. : VEGF receptor antisense therapy inhibits angiogenesis and peritoneal dissemination of human gastric cancer in nude mice. *Cancer Gene. Ther.* 9 ; 197-201, 2002
 - 6) Wada, N., Otani, Y., Kubota, T., et al. : Reduced angiogenesis in peritoneal dissemination of gastric cancer through gelatinase inhibition. *Clin. Exp. Metastasis* 20 ; 431-435, 2003
 - 7) Kitadai, Y., Takahashi, Y., Haruma, K., et al. : Transfection of interleukin-8 increases angiogenesis and tumorigenesis of human gastric carcinoma cells in nude mice. *Br. J. Cancer* 81 ; 647-653, 1999
 - 8) Zhang, J., Ito, R., Oue, N., et al. : Expression of thrombospondin-1 is correlated with microvessel density in gastric carcinoma. *Virchows. Arch.* 442 ; 563-568, 2003
 - 9) Ding, Y. B., Chen, G. Y., Xia, J. G., et al. : Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 9 ; 1409-1414, 2003
 - 10) Etoh, T., Inoue, H., Tanaka, S., et al. : Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma : possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Res.* 61 ; 2145-2153, 2001
 - 11) Saito, H., Tsujitani, S., Oka, S., et al. : The expression of transforming growth factor- β 1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 86 ; 1455-1462, 1999
 - 12) Xiangming, C., Natsugoe, S., Takao, S., et al. : Preserved Smad 4 expression in the transforming growth factor β signaling pathway is a favorable prognostic factor in patients with advanced gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* 7 ; 277-282, 2001
 - 13) Kaneko, T., Konno, H., Baba, M., et al. : Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer. *Cancer Sci.* 94 ; 43-49, 2003
 - 14) Zheng, H. C., Li, Y. L., Sun, J. M., et al. : Growth, invasion, metastasis, differentiation, angiogenesis and apoptosis of gastric cancer regulated by expression of PTEN encoding products. *World J. Gastroenterol.* 9 ; 1662-1666, 2003
 - 15) Li, H. X., Chang, X. M. and Song, Z. J. : Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* 9 ; 674-677, 2003
 - 16) Leung, W. K., To, K. F., Go, M. Y., et al. : Cyclooxygenase-2 upregulates vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in human gastric carcinoma. *Int. J. Oncol.* 23 ; 1317-1322, 2003
 - 17) Marm , D. : The impact of anti-angiogenic agents on cancer therapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129 ; 607-620, 2003

日本臨牀 第 62 卷・第 7 号（平成 16 年 7 月号）別刷

特集：癌の分子標的治療

分子標的治療の現状と将来への展望

桑野信彦 藤井輝彦 小野真弓 和泉弘人 河野公俊

序 文

分子標的治療の現状と将来への展望

桑野信彦¹ 藤井輝彦¹ 小野真弓² 和泉弘人³ 河野公俊³

Molecular targeting drugs—present status and future development

¹Michihiko Kuwano, ¹Teruhiko Fujii, ²Mayumi Ono,³Hiroto Izumi, ³Kimitoshi Kohno¹Research Center for Innovative Cancer Therapy, Kurume University²Department of Medical Biochemistry, Graduate School of Medical Sciences,Kyushu University ³Department of Molecular Biology,

University of Occupational and Environmental Health

Abstract

Development of molecular targeting drugs is a recent highlight in cancer therapeutic field. One can look for 'drugable' target(s) from many molecular targets specific in malignant characteristics of human cancers. Drugs targeting various malignancy-linked molecules such as EGF receptor and its family proteins. Bcr-abl, CD20, Ras and others are now approved or under clinical trials against cancer patients. These molecular targeting drugs will provide a novel and useful therapeutic strategy, but, at the same time, we have many problems to overcome. We should continue our further efforts to answer following problems: ① How therapeutic efficacy of molecular targeting drugs could be determined in patients in evidence-based manner? ; ② What is promising molecular target for development of drug? ; ③ How combination therapy of molecular targeting drug with other cytotoxic drugs should be designed?

Key words: molecular targets, molecular targeting drugs, EGF receptor family, tyrosine kinase inhibitors, tumor angiogenesis

はじめに

がんの分子標的治療薬の登場はがん治療戦略を魅力的にするとともに、'従来型のがん化学療法'になかった新しい治療のコンセプトを我々に提示してくれている。がん分子標的治療薬が登場してきた歴史的な背景として、以下のことが考えられる。①細胞増殖、DNA、RNA

や蛋白合成などの阻害を標的として抗がん剤が開発された1980年代までの時代的背景に比べ、その後のヒト細胞に関する分子生物学研究は増殖、細胞周期、DNA複製、転写や翻訳などが分子レベルで把握されるようになった。②がん化ならびにがんの悪性化を特徴づける分子的背景を担う因子が次々に明らかにされていった。特にがん遺伝子やがん抑制遺伝子の発見は、が

¹久留米大学先端癌治療研究センター ²九州大学大学院医学研究院医化学分野 ³産業医科大学医学部分子生物学

んの生物学的性質の分子基盤を確実なものにした。③がんはがん細胞だけでなく血管、細胞外基質、様々な血球細胞、線維芽細胞などを含む間質細胞から構成されており、異なる細胞間の互いの反応やサイトカインや因子などが介在するがんの微小環境が明らかになりつつある。更に、④最近の個別化医療(オーダーメイド)の概念の導入¹⁻³⁾は、個々のがんの特徴の遺伝的背景や発現パターンを把握することの重要性^{4,5)}を我々に提示しつつある。

我が国においては1997年に‘がん分子標的研究会’が発足し、現在までに着実な歩を進めてきている⁶⁾。この研究会で発表される‘分子標的’は毎年毎年その数が増加している。増殖因子受容体とそのシグナル伝達因子、細胞周期制御因子、がん遺伝子/抑制遺伝子、血管新生因子、浸潤/転移関連因子、テロメラーゼ、接着因子、分化因子、分子シャペロンなど実に多岐にわたっている。これらの数多くの因子の中から、がん患者の治療へ応用できる‘本物の分子標的’を選択することが重要な我々の課題である。

I. 分子標的治療の現状

どんな分子標的をベンチサイドから選択してベッドサイドへの治療戦略を目指すかは各々の研究者にとって大きな課題である。以下に著者らの幾つかの意見を述べる。

1. 臨床効果を示す分子標的薬剤から学ぶ

臨床試験の結果、がん患者に応用されている幾つかの治療薬が知られている(本誌, ‘治療法の進歩’の編参照)。Glivec, Iressa, HerceptinやRituximabなどがなぜ抗がん効果を示すことができるのかを考えることも大切である。IressaやHerceptinが標的とするEGF受容体をはじめとするHERファミリー蛋白は、実に数多くの種類のタイプのがんで発現していることが報告されている。多くの増殖因子受容体ファミリーの中で、HERファミリー蛋白が増殖や細胞死の制御に特に大きな役割を担っているためかもしれない。更に、臨床応用の対象になっている肺がんや乳がんにおいてEGF受容体フ

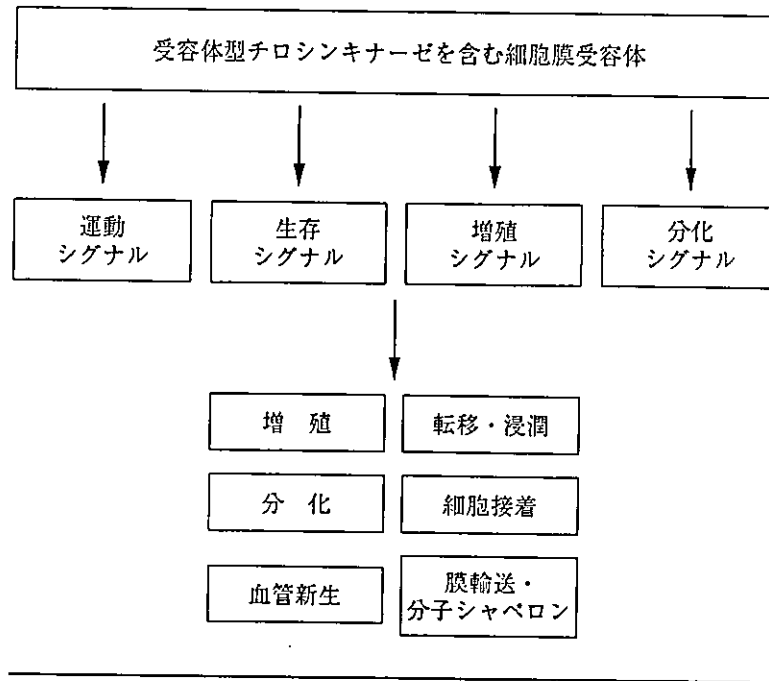
ファミリーは特別なシグナル伝達を担っているのだろうか? いずれにせよ、肺がんや乳がんにおいて感受性の有無を決める機序と関与する分子標的を明らかにすることが大切である。個々のがんの増殖や生存シグナルが標的とするEGF受容体やその他の分子に、いかに緊密に依存しているかが、感受性や治療効果を左右するうえで大きな鍵となる⁷⁾。

他方、EGF受容体が広い発現パターンを示すのに比べ、GlivecやRituximabが標的とするBcr-ablやCD20はその対象とするがんは白血病やリンパ腫と限られている。これは、これらの分子標的が各々のがんの発症と特異的に関連しているためである。しかし、Glivecが骨髄性白血病だけでなくc-Kitが責任遺伝子といわれるgastrointestinal stromal tumor (GIST)に対しても効果を示すことは、標的分子の構造または機能の類似性を示唆して興味深い。現在、Ras阻害剤やHDAC阻害剤、またFlavopiridolなどの臨床試験が開始されているが、有効な新しい薬剤の登場を期待したい(図1)。

EGF受容体に代表される受容体型チロシンキナーゼはがん細胞の運動、生存(細胞死)、増殖や分化のシグナル伝達を活性化する。したがってチロシンキナーゼ阻害剤を投与することによって細胞分裂だけでなく分化、接着、細胞死、血管新生また転移・浸潤などを阻害し、抗がん効果を示すことが期待される。しかし、チロシンキナーゼ阻害剤の投与によって各々のシグナルや生物活性が特異的に生体内で阻害された結果、抗がん効果を示しているのだという確証を得ることは容易なことではない。臨床検体でチロシンキナーゼ活性が確かに影響を受けているか否かを実証(proof of principle)するアッセイ系を構築することは重要な命題の一つである^{8,9)}。

2. 血管新生阻害剤などの分子標的薬剤と、 これまでの抗がん剤とうまく併用する ことが大切である

がんの血管新生を標的とした血管新生阻害剤の開発は、がん細胞自身でなくその間質を対象とすることにより、これまでの抗がん剤と全く異なる新しい治療概念を提示した^{10,11)}。す



薬剤：Glivec (Bcr-abl)^a
 Iressa (EGFR)^a
 Herceptin (HER2)^a
 Rituximab (CD20)^a
 Avastin (VEGF)^a

Ras 阻害剤^b
 HDAC 阻害剤^b
 Flavopiridol^b
 Raditicol^b

図1 がん細胞の増殖シグナルと分子標的薬剤の標的

IressaやHerceptinは受容体型チロシンキナーゼを標的とする分子標的薬剤である。がん細胞は受容体型チロシンキナーゼを活性化することによって運動、生存、増殖や分化のシグナルを誘導する。その結果、がんの悪性形質が獲得される。これらの受容体、また関連する因子を阻害する分子標的薬剤が現在ベッドサイドで使用されたり(a)、試験中であったり(b)するが、それらの薬剤を列挙している。

なわち、血管新生ががんの増大だけでなく浸潤・転移、更に発がんにも深く関与することから、がんの新しい治療戦略を提示できると発表したFolkman博士の最初の提言に、多くの期待がかけられた。マトリックスメタルプロテイナーゼ、インテグリン、血管内皮増殖阻害ペプチド、血管新生因子(VEGF, bFGFなど)とそれらの受容体などを標的とした数多くの血管新生阻害剤が開発され臨床試験が進められた。しかし、それらのほとんどは臨床効果において有効であるという報告はみられなかった。

米国臨床腫瘍学会(2003年6月)でVEGF抗体であるAvastinをCPT-11/5-fluorouracil/leucovorinと併用することにより、進行性大腸がん患者の生存率を有意に延長させることが報告

された。VEGF受容体の阻害剤は効果がみられなかったという臨床試験の報告に比べVEGF標的薬剤の効果がみられたという報告は、非常に勇気づけられるものである。併用するがん化学療法によって、がんの分子標的の量また質的变化によって高感受性になるか否かを明らかにすることは、分子標的薬剤と抗がん剤との併用療法を展開するうえで大切である。

3. 分子標的薬剤の出現は克服すべき新たな課題を提示する

これまでの抗がん剤を適切に使用するためにオーダーメイド医療が必須であることが最近しばしば言及されている(図2)¹⁾。ヒトゲノムを基盤とする薬理ゲノム学の展開は、解毒排泄や不活化に関与する酵素やトランスポーター群に

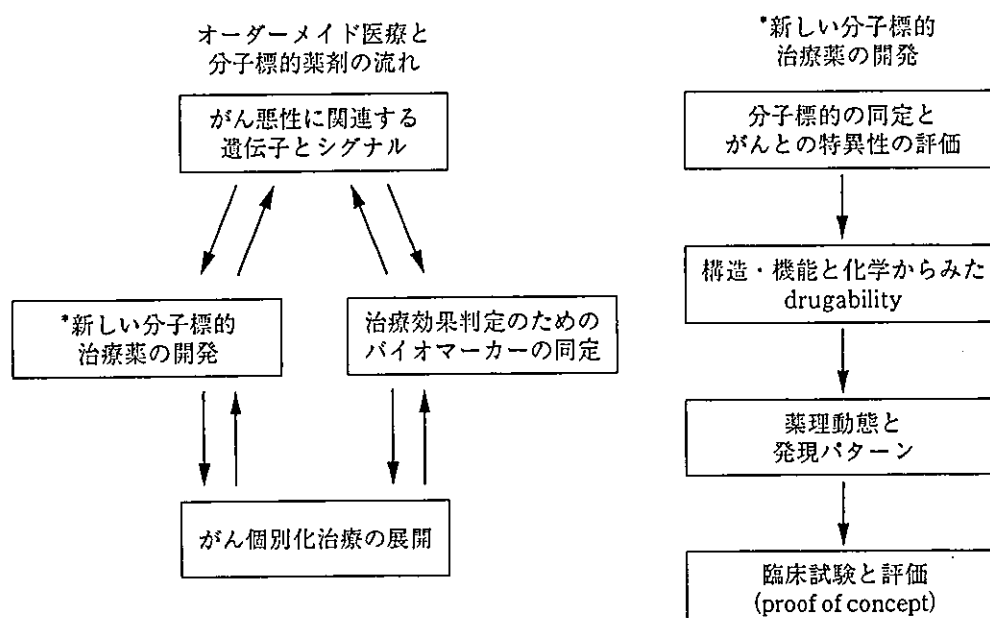


図2 がん分子標的薬剤の開発と個別化医療(オーダーメイド)の展開

がんの悪性に関連する分子標的を探索したり発見することは新しい分子標的薬剤の開発のみならず、それらの薬剤の効果判定のためのマーカーとして多大な貢献をする。その結果、オーダーメイド医療の展開が可能となる。特に治療薬の開発において各々の分子が薬の標的としてよいかどうか、更に治療へ応用される際にはきちんとした定量的評価が要求される。

そのためには情報の流れが片方向だけでなく両方向が必要であり、フィードバックシステムを構築することが大切である。更に、分子標的治療薬の開発については右欄*に示している。

ついて活発な研究が展開されている。遺伝子発現パターンや遺伝子多型を明らかにすることはこの分野に大きく貢献すると考えられる。一方、これまでの抗がん剤でしばしば問題となってきた‘耐性がん’の出現は分子標的薬剤についても問題となっている。特に小分子の標的薬剤である Iressa や Glivec など、また耐性がんが誘導される。この耐性出現の機序を明らかにし、耐性克服への取組みもまた分子標的治療の大切な課題である。

II. これからの展望

Iressa の臨床応用は進行性非小細胞肺癌患者に対して、20% 近い人でがんの縮小がみられるという。治療効率も女性の非喫煙者で腺がんであれば40%以上と高くなることも知られている⁹⁾。この臨床報告は極めて示唆的である。なぜ性別の違いがあり、腺がんと扁平上皮がんの違いがあるのだろうか？この貴重な臨床効

果の知見を基に、機序を明らかにすることができれば、更に分子標的薬剤による治療法を向上させることができるであろう。他方、Iressa の副作用として注目されている間質性肺炎は約3%の患者に出現するという。この肺炎がなぜ誘導されるのかは大きな問題であるとともにその機序を明らかにすることも緊急な課題である。

分子標的薬剤もまた各々の薬剤動態と関連する代謝酵素やトランスポーターを同定することが大切である。更に、ゲノム遺伝子多型を検討すると同時に、がん化や薬剤投与による体細胞遺伝子変化や蛋白レベルでの発現プロファイルの変化を明らかにすることも大切である¹²⁾。

がんの悪性形質と関連する遺伝子やシグナルを具体的に把握することは、分子標的治療薬を開発することに貢献するだけでなく、治療効果判定のためのバイオマーカーとしても有用である(図2)。その結果、分子標的治療薬の臨床応用に際して、オーダーメイド療法の実施も可能

となることが期待できる。最も重要なことは、必ずその情報をフィードバックするシステムを新しい分子標的の発見と関連薬剤の開発、それ構築することである¹²⁾。
に続く臨床への応用の流れを一方向だけでなく、

文 献

- 1) Workman P: The opportunities and challenges of personalized genome-based molecular therapies for cancer: targets, technologies, and molecular chaperones. *Cancer Chemother Pharmacol* 52 (Suppl 1): s45-s56, 2003.
- 2) Adlard JW, et al: Prediction of the respond of colorectal cancer to systemic therapy. *Lancet Oncol* 3: 75-82, 2002.
- 3) 前原喜彦, 馬場秀夫: EBM に基づいた癌の薬物療法(特集). *臨牀と研究* 80: 1-6, 2003.
- 4) 清水信義: ゲノム: 大規模シーケンスと病因遺伝子の解明(基礎). *現代医療* 32: 47-54, 2000.
- 5) 中村祐輔, 菅野純夫: ゲノム研究の現状と医学への応用(対談). *現代医療* 32: 2-13, 2000.
- 6) 鶴尾 隆: 癌の分子標的治療オーバービュー(特集). *現代医療* 32: 20-25, 2000.
- 7) Ono M, et al: Sensitivity to gefitinib (Iressa: ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the EGF receptor/ERK1/2 and EGF receptor/AKT pathway for proliferation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2004. (in press)
- 8) 西條長宏(特長企画): 癌ゲノム薬理学(特集). *血液・免疫・腫瘍* 8: 12-63, 2003.
- 9) 楠本 茂, 西條長宏: 新しい分子標的治療薬(特集). *臨牀と研究* 80: 92-99, 2003.
- 10) Marmé D: The impact of anti-angiogenic agents on cancer therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 129: 607-620, 2003.
- 11) 小野真弓, 桑野信彦: 抗血管新生と療法の現状 血管新生研究の新しい展開(佐藤靖史編). *医学のあゆみ(別冊)*: 817-823, 2002.
- 12) 西條長宏ほか: トランスレーショナルリサーチ. *Cancer Frontier* 4: 221-230, 2002/2003.

Experimental Medicine

実験医学



別 刷

株式 羊 土 社
会 社

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1神田三和ビル

TEL 03(5282)1211 FAX 03(5282)1212

E-mail: eigyo@yodosha.co.jp

4. 抗癌剤の感受性を担う分子標的と オーダーメイド化学療法

河野公俊, 和泉弘人, 吉田 毅, 五十嵐友紀, 若杉哲郎, 新名一郎,
舩井泰朋, 今泉拓也, 桑野信彦

临床上, 抗癌剤耐性は癌化学療法において大きな障害である。薬剤感受性/耐性研究はより有効な治療を考案し, 個別化治療や耐性克服を進め, 治療成績を上げるうえで大切な研究課題である。DNA マイクロアレイや組織アレイ, さらにプロテオーム解析などゲノムワイドな研究法の出現により, 薬剤感受性/耐性研究も様変わりしてきている。これらの研究から, 将来個々の患者に対し最適な治療が選択できるようになる可能性が開けてくるだけでなく, 耐性克服や創薬のための新しい分子標的の同定が進んでいくと考えられる。本稿ではわれわれが進めてきたABC トランスポーターの研究に加え, ゲノムを基盤としたこれからの耐性研究について概説する。

はじめに

癌化学療法は白血病などの血液疾患のみならず, 種々の固形癌の治療にも重要な位置を占めてきている。残念ながら現在臨床使用されている薬剤では治療効果も限られており, 個人差があることもわかってきた。不適切な治療は副作用の増大や耐性形質の出現につながると考えられる。これまで, さまざまな癌細胞株を用いて種々の薬剤に対する耐性株の樹立が進めら

れ, その解析から多くの薬剤感受性/耐性因子が同定された。このことは, 薬剤耐性株の樹立は重要な研究手法であることを如実に示している。これまでの成果について, その概要を表1にまとめた。薬剤に対する耐性機構にはこれらの耐性因子が複数かわり, その制御は多岐に渡ることが知られている。なかでも, Lingらに発見され1980年代にクローニングされたP-糖タンパク (p-gp) 研究は, その後, 90年代に入ってColeらによりクローニングされたMRPとともに, その後

[キーワード&略語]

ABC トランスポーター, YB-1, 発現プロファイル, オーダーメイド化学療法, 分子標的

ABC : ATP binding cassette (多剤耐性ATP結合カセット)

MDR1 : multidrug resistance 1 (多剤耐性1)

MRP : multidrug resistance related protein (多剤耐性関連タンパク質)

YB-1 : Y-box binding protein (Yボックス結合タンパク質)

PCNA : proliferating cell nuclear antigen (増殖細胞核抗原)

SNP : single nucleotide polymorphism (一塩基多型)

Molecular target for chemosensitivity and order-made chemotherapy

Kimitoshi Kohno¹⁾/Hiroto Izumi¹⁾/Takeshi Yoshida¹⁾/Tomonori Igarashi¹⁾/Tetsuro Wakasugi¹⁾/Ichiro Niina¹⁾/Yasutomo Momii¹⁾/Takuya Imaizumi²⁾/Michihiko Kuwano²⁾: Department of Molecular Biology, University of Occupational and Environmental Health¹⁾/Research Center for Innovative Cancer Therapy, Kurume University²⁾ (産業医科大学医学部分子生物学¹⁾/久留米大学先端癌治療研究センター²⁾)

表1 これまでに解析された薬剤耐性関連分子

核内	
1) DNA修復系	塩基除去修復酵素 (ERCC1 など) ミスマッチ修復酵素
2) 転写系	転写因子 (YB-1など) 癌抑制遺伝子 (p53, p73)
3) DNA構造変換系	DNAトポイソメラーゼ I/II
細胞質内	
1) 低分子	グルタチオン
2) 解毒/抱合系	メタロチオネイン p450 グルタチオン-S-トランスフェラーゼ
3) 酸化・還元系	チオレドキシン
4) 薬剤活性・不活性系	エステラーゼ ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ アスバラギナーゼ
5) ミトコンドリア系	Bcl-2, Bax
細胞膜	
1) ABCトランスポーター	MRPs P型ATPase (ATP7B)
2) その他のトランスポーター	非P型V-ATPase (プロトンポンプ)

のABCトランスポーター^{*1}研究の口火を切った。現在までに約50種のABCトランスポーターが確認されている。

一方、ヒトゲノム情報が利用可能になった現在、多岐に渡る薬剤感受性/耐性関連遺伝子の網羅的解析が可能となってきた。例えば、DNAマイクロアレイによる発現遺伝子の解析や、一塩基多型、DNAのメチル化、DNase I 感受性領域などのゲノムワイドでの解析は今後の新しい研究手段として注目されてくると考えられる。すなわち薬剤耐性に関しても、DNA/クロマチンのゲノムワイドの変化の比較や、RNA およびタンパクレベルでのゲノムワイドの発現プロファイルの比較は、分子標的の同定や創薬に向けた大切な研究テーマとなりつつある。

1 ABC トランスポーターを中心としたこれまでの耐性研究

P-糖タンパクの発現はさまざまな癌細胞で観察されるだけでなく抗癌剤耐性細胞でも観察され、自然耐性と獲得耐性に関与する多剤耐性遺伝子としても認知されている。その後発見されたMRP遺伝子も同様に多剤耐性形質を担っている。'90年代より飛躍的に進んできたABCトランスポーター研究の結果、現在まで約50種の遺伝子が見出されている¹⁾。これらは、正

常組織においておのおの特異な発現パターンを示し、生体物質の正常代謝に関与しているだけでなく、想定されるさまざまな外界からのストレスに対応し、生体防御機能にも関与するのではないかと考えられている。トランスポーターの突然変異による遺伝的疾患も知られている。表2に代表的なABCトランスポーター13種と2つのユニークなトランスポーターについて染色体位置、mRNAの長さ、コードするアミノ酸数、耐性に関与する薬剤、基質となる薬剤、生理的基質と生理機能、関連疾患などの情報をデータシート形式でまとめた。ABCトランスポーターの1つであるMDR1については、その発現が患者に対する化学療法を無効にし、予後不良となることが広く認知されている。MRP1についても、その発現が予後と関連することが報告されている。そのほかのMRPファミリーについては、現在解析が進みつつある。ABCトランスポーターとは異なるトランスポーターとして、ATP7B²⁾

※1 ABC トランスポーター

ATP結合領域(ATP binding cassette)を2カ所もつ膜タンパクであり、現在約50個の遺伝子が同定されている。P-糖タンパク質は、真核生物で最初にみつかったABCトランスポーターであり、脂溶性異物を細胞膜中で捕らえ、ATP加水分解のエネルギーを利用して細胞外へ排出する防御機構の最前線として働いている。

表2 これまで解析がされてきているトランスポーターのデータシート

遺伝子	染色体	mRNA (kb)	アミノ酸数	組織/臓	抗癌剤 (基質/耐性)	その他の薬剤 (基質)	機能 (生理的基質)	関連疾患
ABCトランスポーター								
<i>MDR1</i> <i>ABCB1</i>	7q21.1	~4.9	1,280	消化器系上皮 血液腫瘍門	ビンカルカロイド アンスラサイクリン バクリタキセル エトポシド	ジゴキシン ローダミン サイクロスポリン	ステロイド? pH制御	潰瘍性大腸炎 パーキンソン病
<i>MDR3</i> <i>ABCB4</i>	7q21.1	~5.7	1,279	肝			ホスファチジルコリン トランスロカーゼ	胆汁うっ滞
<i>MRP1</i> <i>ABCC1</i>	16q13.1	~6.0	1,531	肺 末梢血	ドキシソルビン	アルセナイト アンチモン	葉酸 ロイコトルエンC4 有機イオン 胆汁	
<i>MRP2</i> <i>ABCC2</i>	10q24	~4.9	1,545	肝	シスプラチン ドキシソルビン ビンクリスチン ガンプトテシン メトトレキサート エトポシド メトトレキサート			デュビン・ジョンソン症候群
<i>MRP3</i> <i>ABCC3</i>	17q21	~4.8	1,528	胃, 小腸				
<i>MRP4</i> <i>ABCC4</i>	13q32	~5.9	1,325	広範囲		ガンシクロビル	プロスタグランジン 還元型グルタチオン ステロイド サイクリックスクレオチド グルタチオン抱合体 チャネル機能	
<i>MRP5</i> <i>ABCC5</i>	3q27	~5.9	1,437	肝	シスプラチン			
<i>MRP6</i> <i>ABCC6</i>	16p13.1	~4.5	1,503	肝, 腎	アンスラサイクリン			弾性繊維偽黄色腫
<i>MRP7</i> <i>ABCC7</i>	7q31.2	~6.1	1,480	腎, 肺				慢性肺病
<i>MRP8</i> <i>ABCC11</i>	16q21.1	~4.5	1,344	肝, 乳腺	エトポシド ドキシソルビン			
<i>MRP9</i> <i>ABCC12</i>	16q21.1	~5.1	1,342	乳腺	5-FU ddC PMEA			
<i>BCRP</i> <i>ABCG2</i>	4q22	~2.5	655	乳腺 胎盤, 小腸	マイトサントロン カンプトテシン ビンクリスチン バクリタキセル		ハーフトランスポーター 胆汁酸	
<i>BSEP</i> <i>ABCB11</i>	2q24	~4.3	1,321	肝				家族性肝内胆汁うっ滞
その他								
<i>ATP7B</i>	13q14	~6.7	1,465	肝	シスプラチン		銅, 亜鉛 P型 ATPase pH制御 (V-ATPase: プロトンポンプ)	ウィルソン病
<i>ATP6</i> 複合サブユニット				広範囲	シスプラチン			骨疾患 (大型石病)

とATP6がある。前者はP型ATPase、後者は非P型V-ATPaseであり、両者ともにシスプラチン※2耐性に関与する。V-ATPaseは細胞内pHの制御分子である。シスプラチンは酸性下でDNAによく結合するが、シスプラチン耐性細胞ではV-ATPaseが高発現し細胞外へプロトン排出することにより細胞内はアルカリ化しているため、シスプラチンがDNAに結合できないと考えられる³⁾。

2 ABC トランスポーター発現制御からみた耐性研究

癌患者が自然耐性や獲得耐性のため化学療法の治療効果が望めないことは大きな問題であり、その耐性形質発現の分子的背景を明らかにすることは重要な研究である。特に化学療法後の再発癌では高頻度にP-糖タンパクが発現し、次の抗癌剤に抵抗性を示すことがよく知られている。なぜ抗癌剤による治療でP-糖タ

ンパクが発現してくるのであるのか？ われわれは*MDR1* 遺伝子をモデルとして、その発現制御の解析から転写因子であるY-box 結合タンパク1 (YB-1) を見出した。これまで多くの研究グループが*MDR1* 遺伝子発現調節の研究を進め、YB-1以外にもさまざまな転写因子が関与することがわかってきた。しかし、それらの転写因子と*MDR1* の発現について明確な相関を臨床試料で示した報告は全くない。一方、われわれの見出したYB-1は転写因子であり、その標的*MDR1* 遺伝子発現とYB-1発現が臨床試料でこれほど相関を示しているものはない。YB-1発現とP-糖タンパク発

※2 シスプラチン

シスプラチンの主な細胞内標的はDNAであり、cisGGあるいはcisAGでDNA架橋を起こし、転写や複製障害などにより細胞死を誘導する。シスプラチンはDNA損傷ストレス以外に酸化ストレスや小胞体(ER)ストレスを引き起こすことも知られている。

表3 臨床腫瘍におけるYB-1の発現とその意義

報告者	癌組織	年代	要旨	発表論文
Bargou	乳癌	1997	YB-1の核内発現はP-糖タンパク発現と相関がある	4
小田	骨肉種	1998	YB-1の核内発現はP-糖タンパク発現と相関がある	5
柴尾	大腸癌	1999	YB-1の発現はトポイソメラーゼⅡ1 α やPCNA遺伝子発現と相関する	6
嘉村	卵巣癌	1999	YB-1の核内発現は予後と相関し、化学療法感受性に影響を与える	7
Del Valle	神経膠芽腫	2000	YB-1はJCV遺伝子発現を活性化して神経膠芽腫を再発させる	8
Carobbio	乳癌	2001	シスプラチンやバクリタキセル耐性細胞ではYB-1の核内集積がある	9
Gu	肺癌	2001	YB-1の発現はトポイソメラーゼⅡ1 α やPCNA遺伝子発現と相関する	10
Janz	乳癌	2002	YB-1の高発現は化学療法が無効で予後不良である	11
八幡	乳癌	2002	シスプラチン耐性細胞ではYB-1の核内集積がある	12
小田	滑膜肉腫	2003	YB-1の核内発現は予後と相関し、P-糖タンパクおよびトポイソメラーゼⅡ α 発現と相関がある	13
佐治	乳癌	2003	YB-1の核内発現はP-糖タンパク発現と相関がある	14
Gimenez-Bonafe	前立腺癌	2004	YB-1の高発現はP-糖タンパクの活性を高める	15
Huang	卵巣癌	2004	YB-1の核内発現はP-糖タンパク発現と相関がある	16

現および予後などを臨床試料で解析した報告を表3にまとめた^{4)~16)}。YB-1は転写因子としての機能だけでなく多機能タンパクであることも知られている¹⁷⁾。非ストレス下ではYB-1の多くは細胞質に局在しているが、抗癌剤や紫外線処理、熱ショックなどのストレスにより核に移行し、DNA修復や転写制御に関与する。YB-1の発現上昇はそれだけでシスプラチンなどDNA損傷を惹起する薬剤に耐性を示す¹⁸⁾。さらに、YB-1の発現は細胞増殖にも密接に関連しており、YB-1のノックアウトマウスは胎生致死である。YB-1ヘテロノックアウトのマウスES細胞もDNA損傷薬剤に感受性を示すことがわかっている¹⁹⁾。一方でDNA損傷に伴うゲノム応答の1つとしてYB-1のDNA修復への関与が示唆されている。特に、YB-1自身がシスプラチン架橋DNAを認識して結合すること²⁰⁾、またPCNAやエンドヌクレアーゼと分子会合することが報告されている。ここで大切な点として、薬剤耐性へのp53の関与があげられる。すなわち、p53もトランスポーターの発現制御に関与している。p53はYB-1とも分子会合しMDR1遺伝子の転写を抑制する²¹⁾。p53の変異は薬剤耐性と密接に相関することはよく知られた事実であり、最近ではp53の一塩基多型(SNP)も活性化されたp53の細胞内局在の変化やアポトーシス誘導に大きく影響することが示されている^{22) 23)}。

3 ゲノムワイドの薬剤感受性/耐性研究の現状

薬剤感受性/耐性に関与する遺伝子を同定する一般

的な方法として、細胞増殖抑制やアポトーシスなどの薬剤反応性プロファイルと発現プロファイルの相関を検討することがあげられる(図1)。これまでの研究成果としては、Scherfらによる60種のヒト癌細胞株についての118種の薬剤感受性プロファイルと発現プロファイルを比較したデータベースが有名である²⁴⁾。また同様の報告として、55種の抗癌剤感受性データと39種のヒト癌細胞株の発現プロファイルの解析もあげられる²⁵⁾。また、Zembutsuらは85種のヌードマウス移植ヒト癌細胞の薬剤感受性と発現プロファイルの解析について報告している²⁶⁾。細胞株ではなく胃癌の臨床試料から、4種の薬剤感受性プロファイルと発現プロファイルを解析した報告もされている²⁷⁾。一方、薬剤処理前後に、発現誘導される遺伝子の発現プロファイルを比較検討した報告もされている^{28) 29)}。一過性の薬剤処理による遺伝子発現プロファイルの変化から薬剤感受性/耐性に関連する遺伝子を同定していく方法と、薬剤を毎週処理して経時的な発現プロファイルの変化から、より*in vivo*に近い耐性獲得を模倣して同定していく方法が試みられている³⁰⁾。また、*in vitro*で樹立した耐性細胞株と親株との発現プロファイルの比較から耐性関連遺伝子を同定していく方法も報告されている^{31) 32)}。これらの解析で同定される耐性関連遺伝子群の中には、生存シグナルもしくは抗アポトーシスに関与するものが含まれると考えられる。われわれはシスプラチンによるDNA損傷で発現が誘導され、耐性細胞株でも高発現している遺伝子の同定を進め、その中でも転写因子に着目して解析を行った(図2)。

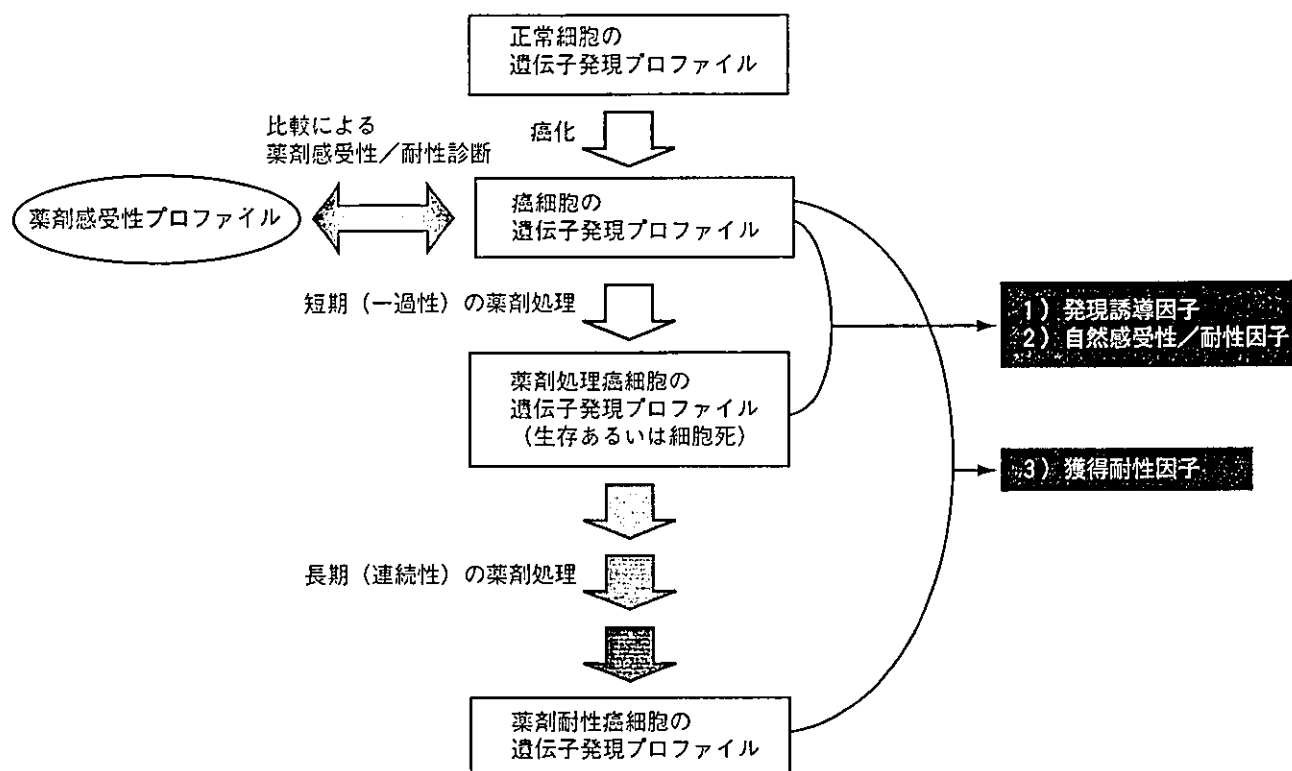


図1 癌細胞遺伝子発現プロファイル比較解析と耐性研究

各種癌細胞の遺伝子発現プロファイルを各種薬剤感受性プロファイルと比較することで自然耐性の診断が可能となる。一方、薬剤処理前後での遺伝子発現プロファイルまたは感受性細胞と耐性細胞の遺伝子発現プロファイルの比較から図中1)～3)にあげる因子が同定される。これらの情報から新規薬剤の作用を推測したり、創薬に結びつく有力な分子標的が見出されてくる

方法としては、まずシスプラチンにより発現誘導される遺伝子を同定し、その中から耐性細胞株においても高発現している遺伝子を選別した。次にその遺伝子のプロモーター解析から、発現誘導にかかわる転写因子の同定を行った。その結果、シスプラチン耐性に直接的および間接的に関与する3つの転写因子を見出している^{33)～35)}。われわれは、さらにこれらの転写因子が核内で薬剤処理前後もしくは親株と耐性細胞株との間で会合分子プロファイルを変化させ、異なった機能をするのではないかと考え、会合分子のプロテオーム解析を試行している。このような研究から有力な創薬の対象となる分子標的が見出される可能性が高い。薬剤感受性/耐性の診断をするためには同定された遺伝子が直接的に薬剤感受性/耐性に関与するかどうかは問題ではないが、より少ない因子で効率よく診断するためには、直接耐性に関与するかどうか詳細に研究することも必須となる。個々の患者についてより簡便で迅速な診断方法の開発が現在模索されている。生体内に

ある癌細胞などの遺伝子発現プロファイルを正確に評価するためには、マイクロダイセクション法とDNAマイクロアレイ法を組み合わせることが理想である。しかし、診断に用いる遺伝子/タンパクが限定され、その数が少なければ、抗体を用いた免疫組織染色で診断する方法が臨床に応用されやすいことが予想される。

4. その他のゲノムワイドの解析と薬剤感受性/耐性研究

薬剤感受性は癌細胞のもつゲノム不安性に基づくさまざまなゲノム構造の変化にも影響される。そこで、発現プロファイルのみならずその分子基盤である遺伝子そのものに目を向けた研究も始まっている。その方法は、ゲノム構造に起こる変化の解析とエピジェネティックな変化の解析の大きく2つに分類される。前者には、遺伝子の増幅/欠失解析や一塩基多型(SNP)解析などが含まれる。後者にはDNAメチル化とDNase I感受性領域の同定などの解析が含まれる^{36) 37)}。ま

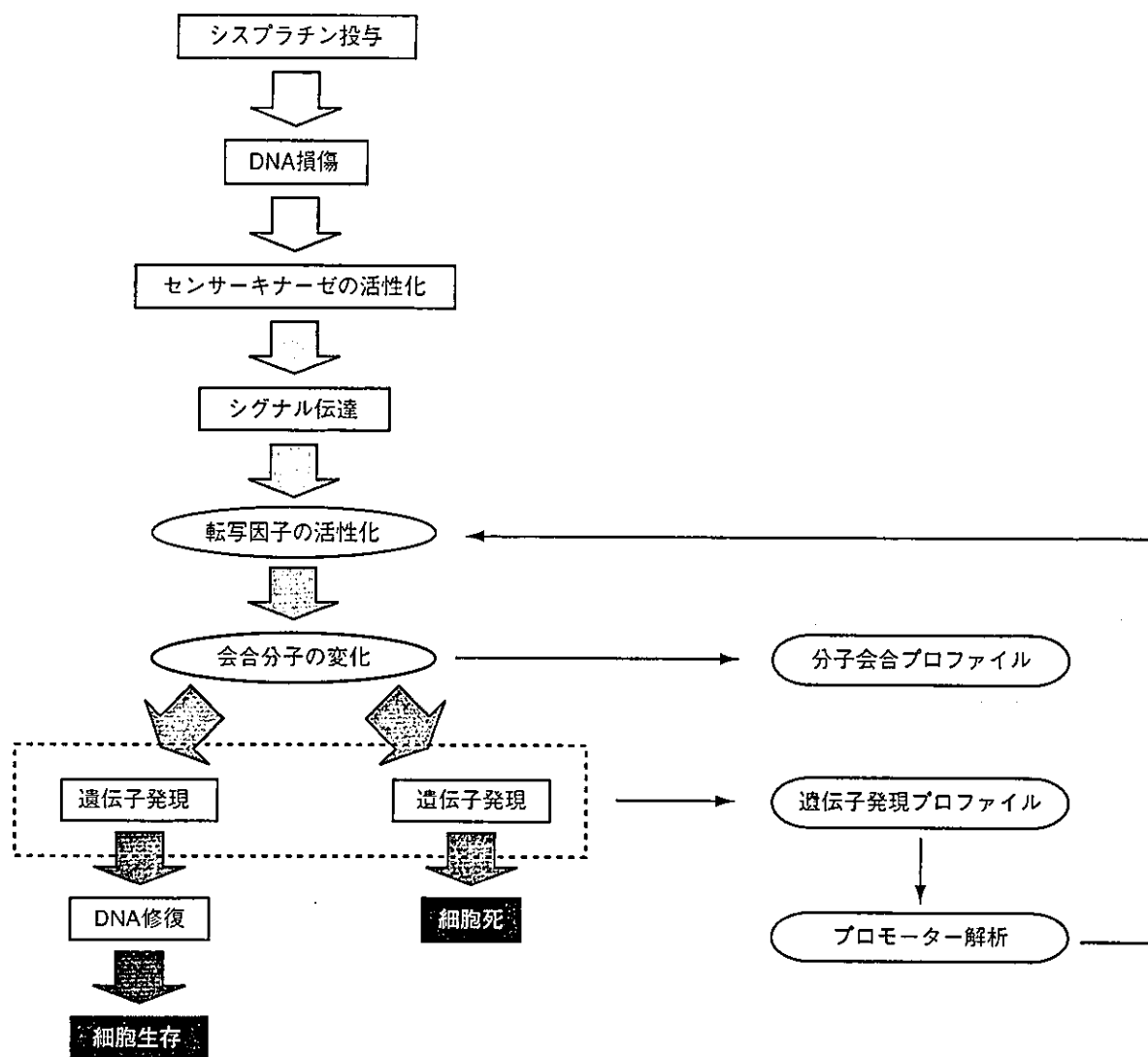


図2 シスプラチンによるストレス応答と転写因子

シスプラチンにより惹起されるDNA損傷ストレスはセンサーキナーゼの活性化から始まるシグナル伝達により核内の転写因子を活性化させて標的遺伝子の発現を変化させる。DNA損傷の程度により活性化された転写因子による遺伝子発現の差異が細胞生存と細胞死という細胞の運命を決定するのであろう。このとき、損傷DNAの認識やDNA修復にも転写因子は関与する。このゲノムストレス応答の主役と考えられる転写因子はさまざまな分子と会合し、ストレスに対応する。この会合プロファイルの変化や標的遺伝子のプロモーター解析からストレス応答に対する新しい転写因子が同定できる

た、薬剤に対する反応性の個人差は薬剤の体内動態を制御する因子や薬剤感受性／耐性を制御する因子の発現量や機能レベルを規定する遺伝子多型に基づくと考えられる。ABCトランスポーターだけでなく、薬剤代謝に関与するp450などの遺伝子についてもその発現とSNP解析が大切となってくる。さらにこのような研究をタンパクレベルで行うプロテオミクスが有望視されている。この場合、質的および量的解析、すなわち発現プロテオミクスと機能プロテオミクスの両方を考慮していくことが大切である。

おわりに

複雑な薬剤感受性／耐性関連遺伝子の解析にはゲノムワイドな解析手法が有力であるだけでなく、これらの解析により新しい薬剤の分子標的の探索や創薬に多くの情報を供給することができる。今後は癌患者に対する治療の臨床効果や副作用の評価にも必須な手法となると予想される。また個々の候補因子を*in vitro*および*in vivo*の癌細胞のみで評価するのではなく、その周辺を含む癌組織にも注意を払って評価することが

より大切となる。薬剤耐性も同様に癌細胞自身の薬剤感受性／耐性因子だけでなく、生体での薬物動態制御因子、また個々人のゲノムレベルやエピジェネティックレベルの変化にまで配慮していくことが究極の個別化治療につながると考えられる。

文献

- 1) Borst, P. & Elferink, R. O. : Annu. Rev. Biochem., 71 : 537-592, 2002
- 2) Nakayama, K. et al. : Int. J. Cancer, 101 : 488-495, 2002
- 3) Murakami, T. et al. : Int. J. Cancer, 93 : 869-874, 2001
- 4) Bargou, R. C. et al. : Nature Med., 3 : 447-450, 1997
- 5) Oda, Y. et al. : Clin. Cancer Res., 4 : 2273-2277, 1998
- 6) Shibao, K. et al. : Int. J. Cancer, 83 : 732-737, 1999
- 7) Kamura, T. et al. : Cancer, 85 : 2450-2454, 1999
- 8) Del Valle, L. et al. : Ann. Neurol., 48 : 932-936, 2000
- 9) Carobbio, S. et al. : Curr. Genet., 39 : 2-9, 2001
- 10) Gu, C. et al. : Anticancer Res., 21 : 2357-2362, 2001
- 11) Janz, M. et al. : Int. J. Cancer, 97 : 278-282, 2002
- 12) Yahata, H. et al. : J. Cancer Res. Clin. Oncol., 128 : 621-626, 2002
- 13) Oda, Y. et al. : J. Pathol., 199 : 251-258, 2003
- 14) Saji, H. et al. : Cancer Lett., 190 : 191-197, 2003
- 15) Gimenez-Bonafe, P. et al. : Prostate, 59 : 337-349, 2004
- 16) Huang, X. et al. : Gynecol. Oncol., 93 : 287-291, 2004
- 17) Kohno, K. et al. : Bioessays, 25 : 691-698, 2003
- 18) Ohga, T. et al. : Cancer Res., 56 : 4224-4228, 1996
- 19) Shibahara, K. et al. : Cancer Sci., 95 : 348-353, 2004
- 20) Ise, T. et al. : Cancer Res., 59 : 342-346, 1999
- 21) Okamoto, T. et al. : Oncogene, 19 : 6194-6202, 2000
- 22) Dumont, P. et al. : Nature Genet., 33 : 357-365, 2003
- 23) Leu, J. I. et al. : Nature Cell. Biol., 6 : 443-450, 2004
- 24) Scherf, U. et al. : Nature Genet., 24 : 236-244, 2000
- 25) Dan, S. et al. : Cancer Res., 62 : 1139-1147, 2002
- 26) Zembutsu, H. et al. : Cancer Res., 62 : 518-527, 2002
- 27) Suganuma, K. et al. : Cancer Sci., 94 : 355-359, 2003
- 28) Kudoh, K. et al. : Cancer Res., 60 : 4161-4166, 2000
- 29) Maxwell, P. J. et al. : Cancer Res., 63 : 4602-4606, 2003
- 30) Whiteside, M. A. et al. : Oncogene, 23 : 744-752, 2004
- 31) Kim, H. K. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 316 : 781-789, 2004
- 32) Kang, H. C. et al. : Clin. Cancer Res., 10 : 272-284, 2004
- 33) Yoshida, Y. et al. : Cancer Res., 63 : 3729-3734, 2003
- 34) Tanabe, M. et al. : Cancer Res., 63 : 8592-8595, 2003
- 35) Ishiguchi, H. et al. : Int. J. Cancer, in press (2004)
- 36) Crawford, G. E. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 101 : 992-997, 2004
- 37) Ballestar, E. et al. : EMBO J., 22 : 6335-6345, 2003

<筆頭著者プロフィール>

河野公俊：1975年九州大学医学部卒業，第一内科入局。'81年九州大学大学院医学研究科博士課程修了。'83～'86年米国国立衛生研究所（NIH）留学。'87年大分医科大学医学部生化学助教授。'94年九州大学医学部医化学第一講座助教授。'96年産業医科大学医学部分子生物学教授。現在DNA損傷などのストレスシグナルによる核内転写因子の会合プロファイルのプロテオーム解析を進めている。薬剤耐性診断や治療／創薬に結びつく分子標的を探索したい。

Cisplatin Resistance and Transcription Factors

Takayuki Torigoe¹, Hiroto Izumi¹, Hiroshi Ishiguchi¹, Yoichiro Yoshida¹, Mizuho Tanabe¹, Takeshi Yoshida¹, Tomonori Igarashi¹, Ichiro Niina¹, Tetsuro Wakasugi¹, Takuya Imaizumi¹, Yasutomo Momii¹, Michihiko Kuwano² and Kimitoshi Kohno^{1,*}

¹Department of Molecular Biology, University of Occupational and Environmental Health, School of Medicine, Kitakyushu, Fukuoka 807-8555, Japan and ²Research Center for Innovative Cancer Therapy of the 21st Century COE Program for Medical Science, Kurume University, Kurume, Fukuoka 830-0011, Japan.

Abstract: Cisplatin is one of the most potent and widely used anti-cancer agents in the treatment of various solid tumors. However, the development of resistance to cisplatin is a major obstacle in clinical treatment. Several mechanisms are thought to be involved in cisplatin resistance, including decreased intracellular drug accumulation, increased levels of cellular thiols, increased nucleotide excision-repair activity and decreased mismatch-repair activity. In general, the molecules responsible for each mechanism are upregulated in cisplatin-resistant cells; this indicates that the transcription factors activated in response to cisplatin might play crucial roles in drug resistance. It is known that the tumor-suppressor proteins p53 and p73, and the oncoprotein c-Myc, which function as transcription factors, influence cellular sensitivity to cisplatin. So far, we have identified several transcription factors involved in cisplatin resistance, including Y-box binding protein-1 (YB-1), CCAAT-binding transcription factor 2 (CTF2), activating transcription factor 4 (ATF4), zinc-finger factor 143 (ZNF143) and mitochondrial transcription factor A (mtTFA). Two of these—YB-1 and ZNF143—lack the high-mobility group (HMG) domain and can bind preferentially to cisplatin-modified DNA in addition to HMG domain proteins or DNA repair proteins, indicating that these transcription factors may also participate in DNA repair. In this review, we summarize the mechanisms of cisplatin resistance and focus on transcription factors involved in the genomic response to cisplatin.

Key Words: ATF4, cisplatin, c-Myc, CTF2, mtTFA, p53/p73, YB-1, ZNF143.

INTRODUCTION

cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin) plays a crucial role in the treatment of many solid tumors. The mechanisms of cisplatin-induced cytotoxic activity are not completely understood; however, the therapeutic effect of cisplatin is believed to result from the formation of covalent adducts with DNA [1, 2]. Cisplatin has been shown to cause the formation of intrastrand cross-links between adjacent purines in genomic DNA. The major cisplatin cross-links are intrastrand 1, 2-d(GpG) and d(ApG); DNA damage signals then induce apoptosis in various solid tumor cells [1, 2]. Cisplatin treatment induces not only DNA damaging stress, but also oxidative and endoplasmic reticulum (ER) stresses [3, 4]. This, along with the other available evidence, demonstrates the highly complex nature of cellular sensitivity to cisplatin. Of the induced genomic responses, anti-apoptotic defenses are activated simultaneously with apoptotic signaling [5]. The major limitation to clinical treatment is the development of cisplatin resistance by tumors through these mechanisms, which include efflux and detoxification of cisplatin, and DNA repair. Other genes that are differentially expressed in association with acquired cisplatin resistance have been identified, including

cytochrome oxidase I, ribosomal protein S28, elongation factor 1 α , α -enolase, stathmin and HSP70 [6]. Understanding the molecular basis of cisplatin-induced genomic responses in cisplatin resistance is therefore important for determining clinical strategies.

Many genes have been identified that affect cancer cells during programmed cell death following various genotoxic stresses. The activation of the typical tumor-suppressor proteins p53 and p73 can result in cell-cycle arrest, DNA repair or apoptosis [7, 8]. Loss of p53 function confers resistance to cisplatin in various human cancer cell lines [9], whereas overexpression of p73 is associated with cisplatin resistance [10]. Recently, it has been shown that codon 72 polymorphic variants of p53 display altered mitochondrial translocation and apoptotic potential [11]. Furthermore, mutations in the *p53* gene have been widely detected in various human cancer cells, indicating that p53 might be critical in determining drug sensitivity [12]. However, it is not clear how many transcription factors play significant roles in cisplatin-induced stress responses and drug sensitivity. We believe that transcription factors for genes involved in cisplatin resistance are often activated by DNA damage; therefore, identification and characterization of cisplatin-induced transcription factors might provide a shortcut to deciphering cisplatin sensitivity and resistance in clinical treatment.

In this article, we describe the main mechanisms of cisplatin-induced apoptosis and cisplatin resistance, and discuss the transcription factors involved in resistance to

*Address correspondence to this author at the Department of Molecular Biology, University of Occupational and Environmental Health, School of Medicine, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu, Fukuoka 807-8555, Japan; Tel: +81-93-691-7423; Fax: +81-93-692-2766; E-mail: k-kohno@med.uoeh-u.ac.jp

cisplatin: p53/p73, c-Myc, YB-1, CTF2, ATF4, ZNF143 and mtTFA. Additionally, we refer to the potential responses of some other transcription factors, including octamer transcription factor Oct1 and the zinc-finger protein Sp1, to anti-cancer agents.

CISPLATIN-INDUCED APOPTOSIS

DNA is the primary target of cisplatin in cancer cells and one of the major cytotoxicities of cisplatin is thought to be caused by the formation of cisplatin–DNA adducts. Cisplatin binds preferentially to the N7 atom of guanine residues, especially in regions of two or more consecutive guanines. Thus, the major cisplatin cross-links are intrastrand 1, 2-d(GpG) and d(ApG), whereas the minor cross-links include intrastrand 1, 3-d(GpNpG), as shown in Fig. (1) [1, 2]. Intrastrand 1, 2-d(GpG) and d(ApG) provide the strongest basis for cisplatin-induced cytotoxicity. Cisplatin is hydrolyzed and equilibrium is maintained between cisplatin (the Cl–Cl species; $(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2$), the charged species (the H_2O –Cl species; $[(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})]^+$), and the neutral species (the OH–Cl species; $(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}(\text{OH})$) in physiological conditions of intracellular pH and chloride concentration. Charged species under low Cl^- and/or low pH conditions, such as the H_2O –Cl and H_2O – H_2O species, are more reactive than the Cl–Cl species because of their nucleophilic properties (Fig. (2)). Thus, intracellular Cl^- and pH levels could modulate the cytotoxicity of cisplatin [13].

Cisplatin can induce two major distinct apoptotic pathways via various stress signalings: the first is p53-dependent mitochondrial apoptosis, which begins with translocation of the p53-induced Bax from the cytosol to the mitochondria, followed by cytochrome *c* release and activation of caspase-9 and -3 [14]; the second is the Fas/Fas ligand-dependent caspase-8-induced apoptotic cascade [15].

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways, including the extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathways, play important roles in cellular responses to stress conditions, including various anti-cancer agents [16]. The ERK signaling pathway is involved in the regulation of cell growth, differentiation, proliferation and survival. By contrast, the p38 and JNK signaling pathways are stress dependent and have apoptotic regulatory functions. Cisplatin-induced activation of ERK signaling could contribute to resistance to cisplatin [17]; conversely, induction of the JNK/p38 signaling pathway in response to cisplatin induced apoptosis via Fas ligand induction in ovarian cancer cells [15]. However, Wang *et al.* have shown that ERK activation plays an important role in the cisplatin-induced apoptosis of Hela cells [3]. These results suggest that such differential effects of MAPK signals in response to drug-induction could reflect cell-type specificity. The functions of the JNK signaling pathway in apoptosis induced by cisplatin also remain unclear, as does ERK signaling [15, 18]. Further investigation is necessary to probe the exact cisplatin-induced mechanisms of these signaling pathways.

Initially, DNA damage signals induced by cisplatin can activate so-called sensor kinases. It was reported that cisplatin induces the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT signaling pathway to mediate p21 expression, suggesting that it might be involved in cell-cycle regulation; however, inhibition of the PI3K/AKT pathway had no influence on sensitivity to cisplatin [19]. However, it was recently reported that AKT phosphorylates the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and is involved in cisplatin resistance [20]. Moreover, cisplatin could phosphorylate p53 at serine 15 and induce p53 downstream genes via activation of ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related protein (ATR) kinase [21]. ATR signaling has also

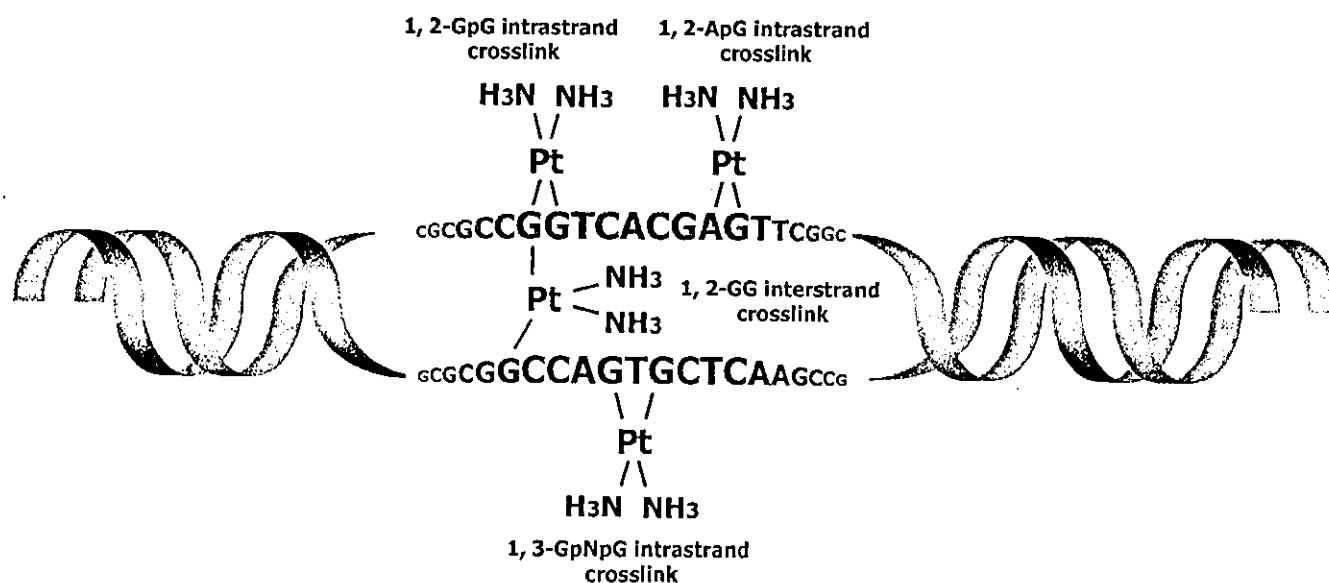


Fig. (1). Schematic diagram of cisplatin–DNA adducts.

Intrastrand 1, 2-d(GpG) and d(ApG) are the major cisplatin cross-links (85–90% of total lesions), whereas the minor cross-links is intrastrand 1, 3-d(GpNpG). The major lesions provide the strongest basis for cisplatin-induced cytotoxicity.