

tumor progression and metastasis. The close correlation of the abundance of TAMs in tumor stroma and poor prognosis appears to be due to at least in part to angiogenesis [1, 12]. In keeping with this notion, TAMs produce various proangiogenic factors (VEGF, bFGF, PDGF, HGF angiopoetin-1 and 2, IL-8, thymidine phosphorylase), inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1), proteases (PA, MMP-7 and MMP-9), and NO [4, 11 - 13] (Figure 5). Infiltration of abundant COX-2-positive cells, including macrophages and neutrophils, is recognized near neovasculatures that are evident in cornea by IL-1 β [13]. TAMs also express VEGF-C and D as well as VEGF receptor 3 (VEGFR-3), suggesting that TAMs could modulate not only hemangiogenesis but also lymphangiogenesis [11]. A recent study by Cursiefen et al demonstrated that VEGF-A recruitment of monocyte/ macrophages plays a crucial role in induction of inflammatory angiogenesis by supplying signals essential for both hemangiogenesis and lymphangiogenesis [49]. TAMs are thus implicated in the formation of blood vessels and lymphatic vessels by alteration of the local balance of proangiogenic factors during tumor development.

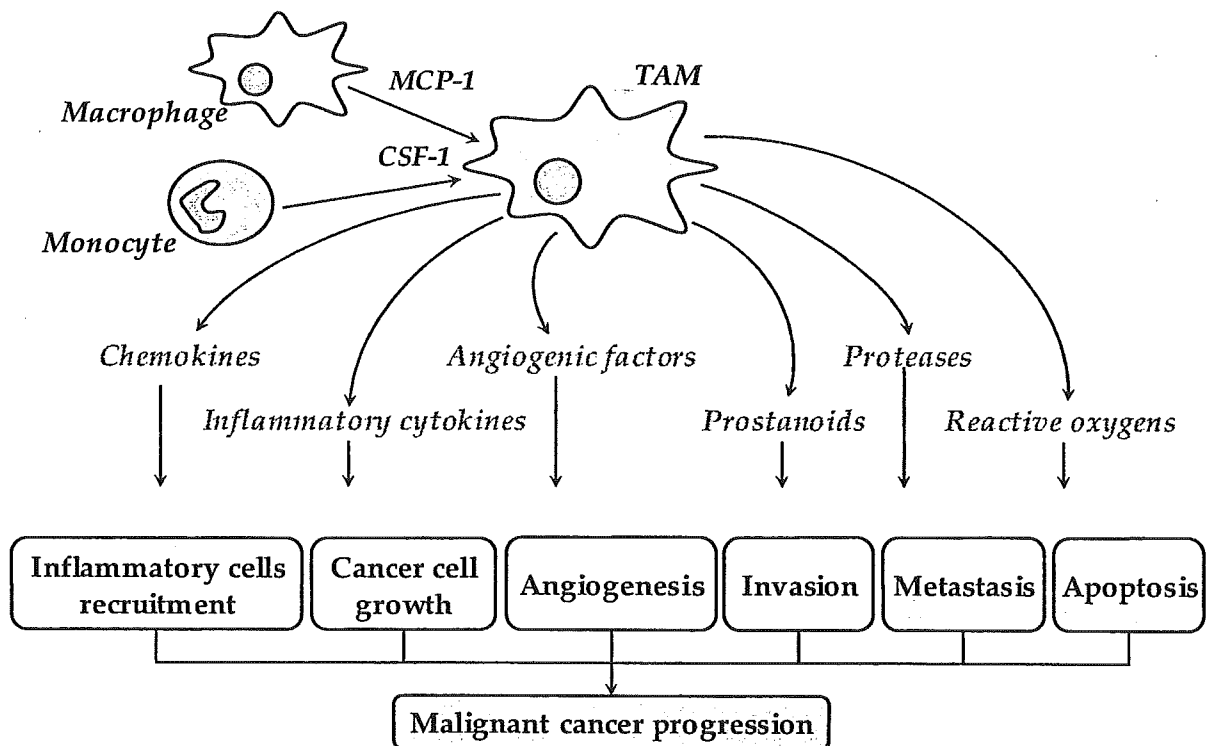


Figure 5. Tumor-associated macrophages (TAMs) have pro-tumorigenic and pro-angiogenic functions through formation of a complex network system of various cell types in the tumor stroma. Monocytes/ macrophages are recruited to the malignant tumor area by chemotactic cytokines, such as MCP-1, secreted by tumor. The soluble colony-stimulating factor (CSF-1), abundant molecule in the tumor microenvironment, transforms infiltrated macrophages to TAMs: CSF-1 has two forms both soluble CSF-1 (sCSF-1) and cell-surface CSF-1. TAMs are expected to promote recruitment of inflammatory cells, tumor growth, angiogenesis, invasion, metastasis and apoptosis by production of various factors.

Therapeutic Potential of Anticancer Drugs by Targeting Inflammatory Angiogenesis and TAMs

The significant contribution of COX-2 in cancer promotion has been demonstrated in a model of human familial adenomatous polyps. Inhibitors of COXs may therefore reduce cancer risk. Representative drugs developed by targeting inflammation are both COX-1- and COX-2-targeting agents such as aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) that reduce colon cancers risk and also prevent breast, lung, esophagus and stomach cancer [50, 51]. There have been many clinical trials of NSAIDs not only for familial adenomatous polyposis and sporadic colorectal neoplasia but also for cancer of breast esophagus, stomach, pancreas, ovarian, urinary tract, prostate and other organs [50]. Aspirin and other NSAIDs may provide protection against cancer in gastrointestinal tract. However, the effects of NSAIDs on cancers outside the gastrointestinal tract remain to be investigated.

COX-2 contributes to angiogenesis in inflammatory diseases and malignant tumors [29], and the expression in both cancer cells and multiple cell types in the tumor environment may play an important role in tumor progression and angiogenesis through production of angiogenic eicosanoids, and angiogenic factors. COX-2 expression is apparently up-regulated in multiple cell types including macrophages that are infiltrated in neovasculatures developed by IL-1 β in mouse corneas [37]. COX-2 inhibitors, as well as NSAIDs, may limit tumor growth, invasion and metastasis through inhibition of angiogenesis in some tumor types. Chang et al reported that COX-2 overexpression in the mammary glands of transgenic mice induces tissue specific tumorigenic transformation with angiogenesis in the stromal tissues of mammary glands [35]. Up-regulation of angiogenesis factor genes in COX-2-transgenic mice can be inhibited by treatment with indomethacin, an inhibitor of COX-2-induced prostanoid synthesis. Moreover, a COX-2-specific inhibitor, Celecoxib, can markedly reduce tumor growth and angiogenesis which are partly mediated through PGE₂-EP₁, 2, 4 receptor pathway in tumor in COX-2-transgenic mice [35].

TNF- α , a proinflammatory cytokine as well as IL-1 α/β , mediates downstream signaling in inflammation. Antibody developed against TNF- α shows therapeutic efficacy in rheumatic disease [52]. Since these inflammatory cytokines play important roles in angiogenesis in inflammatory diseases and cancer [40, 53], drugs targeting TNF- α and IL-1 α/β may be effective in anticancer treatment. For example, thalidomide which is now approved to treatment of Hansen's disease and multiple myeloma, affects production of various cytokines, in particular, TNF- α from monocytic cells in culture. Development of thalidomide derivatives that potently inhibit TNF- α production have marked antiangiogenesis activity [59], suggesting a close link between TNF- α and angiogenesis. D'Amato et al reported antiangiogenesis activity by thalidomide in a rabbit corneal angiogenesis model using bFGF [55]. However, further studies have reported disputed findings. Thalidomide-induced antitumor effects in mice appear not to be due to a decrease of VEGF level [56]. Thalidomide shows pleiotropic effects such as increase of T cells and activation of NK cell [57], inhibition of IFN- γ production [58], inhibition of α V β 3 integrin expression [59] and interaction with DNA [60], suggesting that its teratogenic activity and antitumor activity are mediated through complex mechanisms. Further investigations are required to understand at the molecular basis how thalidomide could induce antitumor effects in some malignant tumor types.

TAMs, the main components of tumor microenvironment, are expected to potentiate tumor progression together with other many immunity-related cells such as neutrophils and mast cells, and one of their pleiotropic responses is induction of angiogenesis in the tumor environment. TAMs, along with mast cells and neutrophils, promote tumor progression and metastasis by production of angiogenic factors, proteases, growth factors and cytokines, resulting in formation of tumor stroma characteristics for each malignant cancer [1, 4]. If continuous inflammation due to persistent infection and other irritants play a critical role in tumor progression, TAMs hold promise as target cells of intrinsic importance for the development of antiangiogenesis and antitumor drugs. One approach for the anti-inflammatory and antitumor strategy could be developed by targeting proteases such as PAs, MMPs, inflammation cytokines, COXs, growth factors, and inflammatory cytokines. Another approach is to target TAMs and other pronounced inflammatory cells by either blocking cell migration of inflammatory cells such as TAMs, neutrophils and mast cells, or killing the TAMs themselves. We need further study to understand which molecular targets or which tumor-associated inflammatory cells should be aimed at to develop antitumor drugs.

Acknowledgements

This study was supported by grant-in-aid for cancer research of Ministry of Education, Culture, Sport and Scientific Technology, Japan (M. K., M. O.). We also thank editorial helps for Naomi Shinbaru. The authors are also indebted to Prof. J. Patrick Barron of the International Medical Communications Center of Tokyo Medical University for his review of this manuscript.

References

- [1] Coussens LM, and Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002, 420: 860-867.
- [2] Balkwill F. and Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001, 357: 539-545.
- [3] Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986, 315: 1650-1659.
- [4] Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004, 4: 71-78.
- [5] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003, 9: 653-660.
- [6] Baldwin ME, Stacker SA, and Achen MG. Molecular control of lymphangiogenesis. *Bioessays*. 2002, 24: 1030-1040.
- [7] Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, and Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*. 1996, 56: 4625-4629.
- [8] Toi M, Ueno T, Matsumoto H, Saji H, Funata N, Koike M, and Tominaga T. Significance of thymidine phosphorylase as a marker of protumor monocytes in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1999, 5: 1131-1137.
- [9] Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H, Ito Y, Inamura T, Ikezaki K, Fukui M, Iwaki T, and Kuwano M. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1

- expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res.* 1999, 5: 1107-1113.
- [10] Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, and Kuwano M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. *Int J Cancer.* 2000, 85: 182-188.
- [11] Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, and Kerjaschki D. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol.* 2002, 161: 947-956.
- [12] Ono M, Torisu H, Fukushi J, Nishie A, and Kuwano M. Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999, 43: 69-71.
- [13] Kuwano M, Fukushi J, Okamoto M, Nishie A, Goto H, Ishibashi T, and Ono M. Angiogenesis factors. *Intern Med.* 2001, 40: 565-572.
- [14] Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, and Apte RN. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100: 2645-2650.
- [15] Yano S, Nokihara H, Yamamoto A, Goto H, Ogawa H, Kanematsu T, Miki T, Uehara H, Saijo Y, Nukiwa T, and Sone S. Multifunctional interleukin-1beta promotes metastasis of human lung cancer cells in SCID mice via enhanced expression of adhesion-, invasion- and angiogenesis-related molecules. *Cancer Sci.* 2003, 94: 244-252.
- [16] Saijo Y, Tanaka M, Miki M, Usui K, Suzuki T, Maemondo M, Hong X, Tazawa R, Kikuchi T, Matsushima K, and Nukiwa T. Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction. *J Immunol.* 2002, 169: 469-475.
- [17] Salven P, Hattori K, Heissig B, and Rafii S. Interleukin-1alpha promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. *FASEB J.* 2002, 16: 1471-1473.
- [18] Song X, Voronov E, Dvorkin T, Fima E, Cagnano E, Benharroch D, Shendler Y, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA, and Apte RN. Differential effects of IL-1 alpha and IL-1 beta on tumorigenicity patterns and invasiveness. *J Immunol.* 2003, 171: 6448-6456.
- [19] Anasagasti MJ, Alvarez A, Martin JJ, Mendoza L, and Vidal-Vanaclocha F. Sinusoidal endothelium release of hydrogen peroxide enhances very late antigen-4-mediated melanoma cell adherence and tumor cytotoxicity during interleukin-1 promotion of hepatic melanoma metastasis in mice. *Hepatology.* 1997, 25: 840-846.
- [20] Vidal-Vanaclocha F, Alvarez A, Asumendi A, Urcelay B, Tonino P, and Dinarello CA. Interleukin 1 (IL-1)-dependent melanoma hepatic metastasis in vivo; increased endothelial adherence by IL-1-induced mannose receptors and growth factor production in vitro. *J Natl Cancer Inst.* 1996, 88: 198-205.
- [21] Okamura K, Sato Y, Matsuda T, Hamanaka R, Ono M, Kohno K, and Kuwano M. Endogenous basic fibroblast growth factor-dependent induction of collagenase and interleukin-6 in tumor necrosis factor-treated human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1991, 266: 19162-19165.

- [22] Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, and Kuwano M. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem.* 1996, 271: 28220-28228.
- [23] Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, and Kuwano M. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 1997, 17: 4015-4023.
- [24] Massia SP, and Hubbell JA. Immobilized amines and basic amino acids as mimetic heparin-binding domains for cell surface proteoglycan-mediated adhesion. *J Biol Chem.* 1992, 267: 10133-10141.
- [25] Nakao S, Kuwano T, Ishibashi T, Kuwano M, and Ono M. Synergistic effect of TNF-alpha in soluble VCAM-1-induced angiogenesis through alpha 4 integrins. *J. Immunol.*, 2003, 170: 5704 - 5711.
- [26] Fukushi J, Morisaki T, Shono T, Nishie A, Torisu H, Ono M, and Kuwano M. Novel biological functions of interleukin-4: formation of tube-like structures by vascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 250: 444-448.
- [27] Fukushi J, Ono M, Morikawa W, Iwamoto Y, and Kuwano M. The activity of soluble VCAM-1 in angiogenesis stimulated by IL-4 and IL-13. *J Immunol.* 2000, 165: 2818-2823.
- [28] Kaneko Y, Kitazato K, and Basaki Y. Integrin-linked kinase regulates vascular morphogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.*, 2004, 117: 407-415.
- [29] Gately S, and Kerbel R. Therapeutic potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in the management of tumor angiogenesis. *Prog Exp Tumor Res.* 2003, 37: 179-92.
- [30] Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, and Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell.* 1996, 87: 803-809.
- [31] Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, Narumiya S, and Taketo MM. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res.* 2002, 62: 506-511.
- [32] Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Sasaki Y, Kawano S, and Hori M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest.* 1999, 79: 1469-1477.
- [33] Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, and DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest.* 2000, 105: 1589-1594.
- [34] Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, and DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998, 93: 705-716.
- [35] Su JL, Shih JY, Yen ML, Jeng YM, Chang CC, Hsieh CY, Wei LH, Yang PC, and Kuo ML. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2004, 64: 554-564.
- [36] Amano H, Hayashi I, Endo H, Kitasato H, Yamashina S, Maruyama T, Kobayashi M, Satoh K, Narita M, Sugimoto Y, Murata T, Yoshimura H, Narumiya S, and Majima M.

- Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med.* 2003, 197: 221-232.
- [37] Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, Tsuneyoshi M, Yamamoto T, Kuwano M, and Ono M. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J.* 2004, 18: 300-310.
- [38] Hanahan D, and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996, 86: 353-364.
- [39] Ria R, Roccaro AM, Merchionne F, Vacca A, Dammacco F, and Ribatti D. Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma. *Leukemia.* 2003, 17: 1961-1966.
- [40] Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, Podar K, Akiyama M, Gupta D, Richardson P, Munshi N, and Anderson KC. The biological sequelae of stromal cell-derived factor-1alpha in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther.* 2002, 1: 539-544.
- [41] Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, and Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1994, 87: 503-508.
- [42] Vacca A, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, Iurlaro M, Ria R, Albin A, Bussolino F, and Dammacco F. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood.* 1999, 93: 3064-3073.
- [43] Sezer O, Niemoller K, Eucker J, Jakob C, Kaufmann O, Zavrski I, Dietel M, and Possinger K. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol.* 2000, 79: 574-577.
- [44] Iwasaki T, Hamano T, Ogata A, Hashimoto N, Kitano M, and Kakishita E. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2002, 116: 796-802.
- [45] Dankbar B, Padro T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, and Kienast J. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood.* 2000, 95: 2630-2666.
- [46] Pulkki K, Pelliniemi TT, Rajamaki A, Tienhaara A, Laakso M, and Lahtinen R. Soluble interleukin-6 receptor as a prognostic factor in multiple myeloma. Finnish Leukaemia Group. *Br J Haematol.* 1996, 92 : 370-374.
- [47] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, and Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999, 13: 9-22.
- [48] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997, 386: 671-674.
- [49] Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, D'Amore PA, Dana MR, Wiegand SJ, and Streilein JW. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest.* 2004, 113: 1040-1050.
- [50] Baron JA, and Sandler RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med.* 2000, 51: 511-523.
- [51] Garcia-Rodriguez LA, and Huerta-Alvarez C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Epidemiology.* 2001, 12: 88-93.
- [52] Shanahan JC, and St Clair W. Tumor necrosis factor-alpha blockade: a novel therapy for rheumatic disease. *Clin Immunol.* 2002, 103: 231-242.

- [53] Majumdar S, Lamothe B, and Aggarwal BB. Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H₂O₂, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. *J Immunol.* 2002, 168: 2644-2651.
- [54] Hashimoto Y. Structural development of synthetic retinoids and thalidomide-related molecules. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003, 1: 16-23.
- [55] D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, and Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994, 91: 4082-4085.
- [56] Neben K, Moehler T, Kraemer A, Benner A, Egerer G, Ho AD, and Goldschmidt H. Response to thalidomide in progressive multiple myeloma is not mediated by inhibition of angiogenic cytokine secretion. *Br J Haematol.* 2001, 115: 605-608.
- [57] Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai YT, Lin B, Podar K, Gupta D, Chauhan D, Treon SP, Richardson PG, Schlossman RL, Morgan GJ, Muller GW, Stirling DI, and Anderson KC. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood.* 2001, 98: 210-216.
- [58] Meierhofer C, Dunzendorfer S, and Wiedermann CJ. Theoretical basis for the activity of thalidomide. *BioDrugs.* 2001, 15: 681-703.
- [59] Stephens TD, Bunde CJ, and Fillmore BJ. Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. *Biochem Pharmacol.* 2000, 59: 1489-1499.
- [60] Parman T, Wiley MJ, and Wells PG. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med.* 1999, 5: 582-585.

IV-2. 抗がん剤感受性と Dubin-Johnson 症候群

内海 健, 和田守正, 桑野信彦

1. 抗がん剤感受性と ABC 蛋白質

1.1 多剤耐性

抗がん剤をがん患者に投与すると、投与するにつれて効果が減少してくることがよく知られている。つまり、生体内において抗がん剤に対して耐性の腫瘍細胞の出現が推察される。細胞が抗がん剤耐性を獲得する機構には、①抗がん剤の細胞内取り込みの低下、②解毒作用の増強、③標的分子の変化、④細胞外への薬剤排出などがある。このうち細胞内の抗がん剤が排出しやすくなるという機構は、がん細胞に同時に構造や作用機序の異なる複数の抗がん剤に対する耐性（多剤耐性，MDR：multiple drug resistance）を付与することからも重要である。その実体として P 糖蛋白質（*MDR1* 遺伝子）や MRP（*MRP1* 遺伝子）が同定され、いずれもが ABC トランスポーターに属することがわかった。この P 糖蛋白質（*MDR1* 遺伝子）は、ATP のエネルギーに依存して作動する排出ポンプであることが明らかにされ、がん細胞は最初に用いた抗がん剤はもとより、他の抗がん剤に対しても耐性となり多剤耐性を示す^{1)~3)}。

多剤耐性の出現は抗がん剤治療を困難なものにし、多剤耐性を獲得したがん細胞はさらに、ゲノム不安定性、チェックポイント機構の破綻などの変化を生じ、さらなるがん治療を困難かつ複雑なものにしている。また、薬の副作用や個人差などに影響を与える経口投与による腸からの吸収や、肝臓、腎臓における排出をはじめとする薬物動態にも、多大な関与が認められる^{4),5)}。

ABC 蛋白質は生体における種々の異物に対する解毒、抱合、排出機構に大いに関与している。したがって、多くの疾病が各トランスポーターの機能異常によりもたらされると予測されている。このように、ABC トランスポーターは

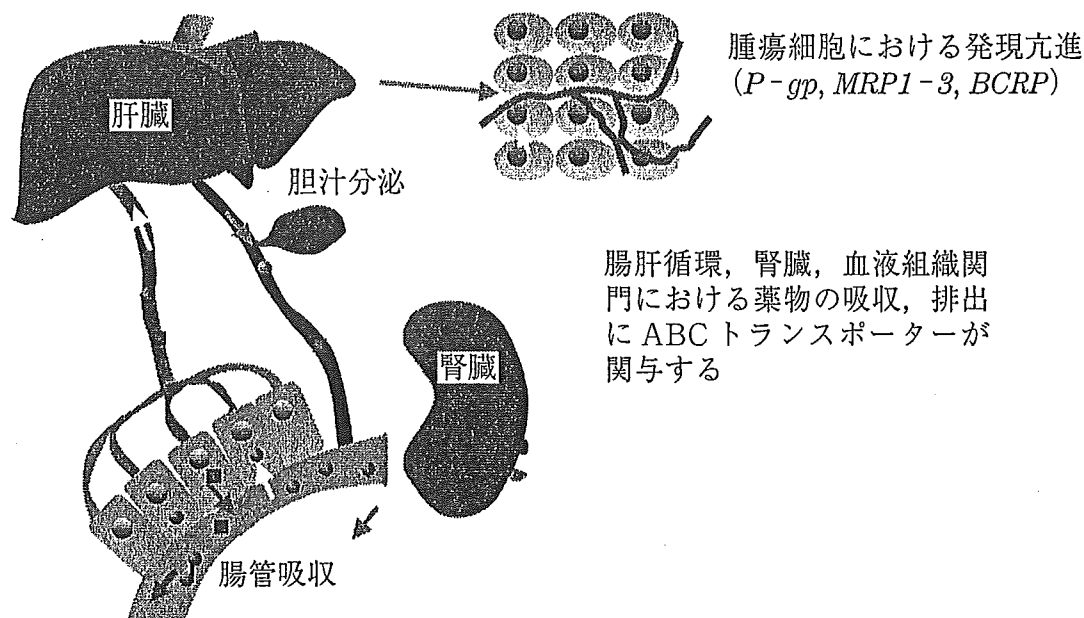


図1 トランスポーターの薬理ゲノムとがん化学療法の関わり

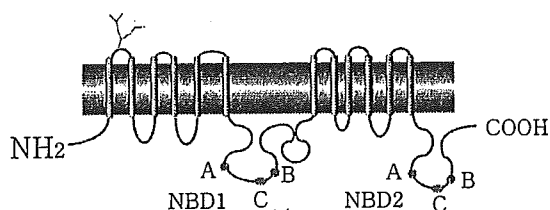
抗がん剤を排出することにより、哺乳類細胞の薬剤耐性の獲得に深く関与するばかりでなく、個体レベルでの薬剤排出による生体防御機構をも担っている。ノックアウトマウスなどの解析より、ABC蛋白質は脳血液関門としての役割、小腸における異物、薬物の吸収、精巣血液関門、脈絡層での防御機構、腎臓での排泄に深く関与することが示されている。このことは、がん化学療法における組織でのドラッグデリバリーにABC蛋白質が関与していることを意味する。さらに最近の遺伝子多型の研究より、これらABC蛋白質の遺伝子多型と薬剤の血中濃度との相関が報告されつつある。すなわち、ABC蛋白質の遺伝子多型が個人の薬物感受性を左右する因子であり、薬効、副作用に大きな影響をもたらしていると考えられている。個人におけるこれらABCトランスポーター遺伝子の発現の程度が、個人の抗がん剤による感受性を規定する因子の一つとなる(図1)^{5)~8)}。

これまでに約48種類のABC蛋白質が単離、同定されている。ゲノム計画の推進により、各臓器での発現も明らかになりつつある。ABCトランスポーター遺伝子のうち種々の抗がん剤の排出に関与していると考えられているのは、ABCB1(糖蛋白質), ABCC1(MRP1), ABCC2(MRP2, cMOAT)とABCG2(BCRP, MXR, ABCP)である(表1)。このファミリーのメンバーはいずれもがATP結合領域(ATP結合カセット ATP-binding cassette, nucleotide

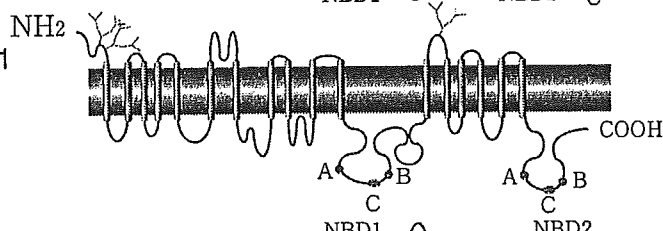
表1 ABC スーパーファミリー遺伝子の発現

	ABCB1	ABCC1	ABCC2	ABCC3	ABCG2	ABCB11
遺伝子	<i>MDR1</i>	<i>MRP/MRP1</i>	<i>cMOAT/MRP2</i>	<i>MRP3</i>	<i>BCRP/MXR1/ABC P</i>	<i>BSEP/sPGP</i>
蛋白質	P 糖蛋白質	MDR 関連蛋白質	胆管有機アニオントランスポーター	MDR 関連蛋白質	乳癌関連蛋白質	P 糖蛋白質
	1280 アミノ酸	1531 アミノ酸	1545 アミノ酸	1527 アミノ酸	655 アミノ酸	1321 アミノ酸
染色体	7q21	16p13.1	10q24	17q11-12	4q22	2q24
正常組織の発現	副腎, 腎, 大腸, 肝(毛細胆管側膜), 脳(血管内皮), 胎盤, 子宮(妊娠時)	肺, 精巣, 単核球, 肝(類洞側膜)	肝(毛細胆管側膜) 腎	肝(類洞側膜), 小腸, 前立腺, 膵臓	胎盤, 脳, 前立腺, 小腸, 精巣, 卵巣	肝(毛細胆管側膜)

1. ABCB1/MDR1



2. ABCC1/MRP1



3. ABCG2/MXR1

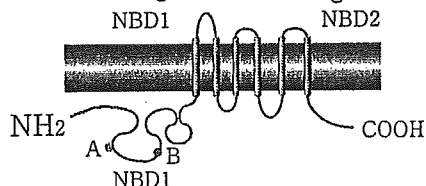


図2 トランスポーターの構造モデル

binding fold ; NBF) ドメインをもつことから, ABC トランスポーター・スーパーファミリーと呼ばれ, いずれも ATP のエネルギーに依存して様々な物質を膜の内外へ能動輸送すると考えられている. その構造は, ヒトでは, 数回膜を貫通する疎水性のドメインと ATP 結合領域を含む細胞質ドメインが 2 回繰り返される形になっている場合と, N 末端と C 末端の半分ずつが独立したポリペプチドにより構成される場合とがある (図 2)^{9), 10)}.

1.2 抗がん剤感受性に関わる ABC 蛋白質

ABCB1/MDR1 (P 糖蛋白質) MDR1/P 糖蛋白質 (multidrug resistance 1/P-glycoprotein)

ABCB1 遺伝子は第 7 染色体 7q21.1 に存在し、1,280 のアミノ酸残基からなる。1986 年に抗がん剤多剤耐性細胞から初めて単離された¹¹⁾。*MDR1* 遺伝子はバクテリアからヒトまでよく保存され、その構造は 6 回の膜貫通ドメインと ATP 結合領域を含む 1 つの細胞質ドメインが各 2 回繰り返される構造をしている (図 2)。ヒトでは 2 種、マウスでは 3 種の MDR ファミリー遺伝子が単離されており、培養細胞での強制発現実験から、耐性獲得に関与するのはこのうちヒト *MDR1*、マウス *mdr1a* および *mdr1b* 遺伝子であることが明らかにされている。P 糖蛋白質は種々の抗がん剤をはじめとする疎水性薬物を排出するポンプである。培養細胞から樹立した薬剤耐性株の耐性薬剤スペクトラムおよび cDNA を用いた強制発現実験から得られた、MDR1/P 糖蛋白質の関与する抗がん剤を表 2 にまとめた¹²⁾。

正常組織においても P 糖蛋白質は発現し、細胞内の異物、薬物変化体の排出に関与して組織、生体の防御機構に深く関わっている。特に、脳血液関門における機能バリアーとして働き、脳内への薬物の侵入を阻害し、脳の防御基点と考えられている¹³⁾。実際、*mdr1a*, *mdr1b* ノックアウトマウスは長期間生存し、野生型マウスと著明に異なる表現型は観察されなかった。しかし、ノックアウトマウスでは異物に対する感受性が増し、特に脳への影響が大きく、MDR1/P 糖蛋白質が血液脳関門で異物排泄に働いていることが示唆される。また、P 糖蛋白質は妊娠時の子宮胎盤、腎臓、小腸、副腎、肝臓の apical 側に発現しており、生理基質であるステロイドや毒性物質を管空側に排出していると考えられている。血液幹細胞にも P 糖蛋白質は発現しており、血液幹細胞の防護にも深く関わることを示唆される¹⁴⁾。

ABCC1/MRP1 (multidrug resistance-associated protein)

ABCC1 は第 16 染色体 16p13.1 に位置し、Cole らによりアドリアマイシン耐性肺小細胞がん細胞株から 1992 年に単離された¹⁵⁾。MRP1 も種々の耐性腫瘍細胞に発現しており、グルタチオン抱合を受けた薬物、異物を排出するポンプである。アミノ酸配列やその Kyte-Doolittle 疎水性分析の結果から、P 糖蛋白

表 2 ABC スーパーファミリー-遺伝子と抗がん剤

シンボル	ABCBI	ABCC1	ABCC2	ABCC3	ABCC2	ABCB11
遺伝子	<i>MDR1</i>	<i>MRP/MDR1</i>	<i>cMOAT/MDR2</i>	<i>MRP3</i>	<i>BCRP/MXR1/ABCP</i>	<i>BSEP/sPGP</i>
抗がん剤	アンストラサイクリン ドキシソルビシン ダウノルビシン ビンカアルカロイド ビンクリスチン ビンブラスタチン エピドファイロトキシン エトポシド テニポシド 抗微小管剤 コルヒチン タキソール アクチマブ	アンストラサイクリン ドキシソルビシン ダウノルビシン ビンカアルカロイド ビンクリスチン ビンブラスタチン エピドファイロトキシン エトポシド テニポシド メトトレキセート	ビンカアルカロイド ビンクリスチン ビンブラスタチン カンプトテシン誘導体 CPT-11 SN-38 シスプラチン	エピドファイロトキシン エトポシド テニポシド メトトレキセート アンストラサイクリン ドキシソルビシン	アンストラサイクリン ドキシソルビシン ダウノルビシン マイトキサントロン カンプトテシン誘導体 CPT-11 SN-38	抗微小管剤 タキソール
生理基質	中性、陽イオン化合物	グルタチオン抱合体 グルクロン酸抱合体 グルタチオン	有機アニオン グルタチオン抱合体 グルクロン酸抱合体 グルタチオン	グルクロン酸抱合体 硫酸抱合体	有機アニオン ステロイド	胆汁酸

質と相似性を示す ABC トランスポーター膜貫通蛋白質であることが明らかにされた。MRP は N 末端側半分は 11 回，C 末端側半分は 6 回の合計 17 回の膜貫通ドメインをもつ構造モデルが提唱されている (図 2)¹⁶⁾。

P 糖蛋白質と MRP1 蛋白質の基質の多くはオーバーラップしているが，MRP1 は特にグルタチオン抱合を受けた薬物を主に排出する。MRP は P 糖蛋白質とわずか 17% の相同性しかもたないにもかかわらず，両者はアンスラサイクリン，ビンカアルカロイド，エピポドフィロトキシンを含む共通した薬剤に対して耐性を付与する。しかし，MRP の過剰発現株は P 糖蛋白質の場合と異なり，コルヒチン，タキソールには耐性を示さず，ヒ素またはアンチモンを含む酸化アニオンに耐性を示す (表 2)。MRP1 はさまざまなグルタチオン抱合体を排出し，抗がん剤もグルタチオン抱合体として，またはグルタチオンと共輸送の形で細胞外に輸送するとされている。

Borst らは，MRP のノックアウトマウス *mrp^{-/-}* が，ロイコトリエン C₄ の排出低下のみならず，抗がん剤エトポシドやビンクリスチンに対する毒性が減弱していることを観察し^{17), 18)}，*in vivo* での MRP の抗がん剤排出を示唆している。MRP1 は生理基質として炎症メディエーターであるロイコトリエン C₄ を含むグルタチオン抱合体を輸送し，化学物質，酸化ストレスに対する生体防御の役割に深く関わっていると推察されている。気管支上皮細胞などの上皮および心臓，sarcolemma vesicle で行われるグルタチオン抱合体の輸送，マクロファージでアナフィラキシーや喘息に関係するロイコトリエン C₄ の輸送に関与している可能性がある。実際，野生型マウスの耳をアラキドン酸で処理すると炎症の指標である血管透過性が増して浮腫を起こすが，MRP1 ノックアウトマウスではこの反応が起こらない。また内分泌機能をもった細胞，副腎皮質，胎盤トロホプラスト，精巣のテストステロン産生細胞に MRP が発現していることと，*in vitro* でステロイド (17β-エストラジオール) のグルクロン酸抱合体を輸送することとを考えると，ホルモン輸送に関与している可能性もある¹⁹⁾。

ABCC2/MRP2/cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter)

ABCC2 は第 10 染色体 10q24 に位置し，主に肝臓の毛細胆管側に発現している。この MRP2/cMOAT は，MRP1 と 47%，CFTR と 3%，また MDR1 と 18% の相同性を示すが，疎水性分析の結果から，MRP の構造との相同性が高

い (図 2)^{20), 21)}. *MRP2/cMOAT* 遺伝子のアンチセンス cDNA を HepG2 細胞へ導入発現させると, シスプラチンを含む複数の抗がん剤に対する感受性を増加させることができるから, ヒト cMOAT が細胞のシスプラチン輸送体として機能している可能性が示唆された²²⁾. *MRP2/cMOAT* の関与する抗がん剤については表 2 に示した. *MRP2* が過剰発現した細胞では抗がん剤に対して耐性を示すようにはなるが, 臨床上的での *MRP2* の重要性はまだはっきりとはしていない. 大腸がん細胞, 肺がん細胞で *MRP2* の発現亢進が報告されている.

MRP2 は肝細胞からビリルビンをはじめとする有機アニオン化合物を胆汁中に排出する. *MRP2* の欠失したラットで黄疸を示し, 有機アニオン化合物の排出活性が低下する. 一方, ヒトの Dubin-Johnson 症候群の患者では, 有機アニオンの 1 つであるグルクロン酸抱合型ビリルビンの肝細胞から胆管への輸送に欠損があることが以前より指摘されていたが, 実際にこの疾患の患者の cMOAT 遺伝子に変異のあることが見いだされ, 原因遺伝子であることが示された. そして, *MRP2/cMOAT* は肝臓においてビリルビンなどの有機アニオンの排泄を行っていることが明らかにされた²³⁾.

ABCC3/MRP3

ヒトゲノムプロジェクト研究で進められている EST データベースから, *MRP* や cMOAT 以外に数種類の *MRP* ファミリー蛋白質が存在することが示唆され, 筆者らは新規 *MRP* ファミリー遺伝子 *MRP3* のクローニングに成功した. *MRP3* は cMOAT や *MRP1* に高い相同性を示し, さらに疎水性解析の結果も近縁 ABC トランスポーターであることを示している (表 1)^{24), 25)}. *MRP3* は染色体上 17q11-12 に位置し, 強制発現細胞株を用いた系によりマイトキサントロンを基質とすることが示唆された. 臨床上的での *MRP3* の重要性はまだはっきりとはしていない.

ABCG2 MXR/BCRP/ABCP

第 4 染色体 4q22 に位置する *ABCG2* 産物はアミノ酸 655 の ATP 結合領域を 1 つだけでも half-transporter であり, BCRP (breast cancer resistance protein), MXR (mitoxantrone resistance gene) と名づけられた²⁶⁾. mitoxantrone に対して耐性を示す細胞株に *ABCG2* の過剰発現が観察された結果, 見つ

かった遺伝子である。トランスフェクションの実験より、マイトキサントロン、ドキソルビシン、ダウノルビシンに耐性を示した。この half transporter はホモダイマーとして働くと考えられている。血液幹細胞において発現亢進が認められ、ローダミンなどの色素を排出することが観察されている、このことは血液幹細胞の異物からの防御に働くことを示していると考えられるが、生理的な基質はわかっていない²⁷⁾。ABCG2 は胎盤において強く発現しており、母胎から胎児への薬物、異物移行の防御的役割、および胎児からの有害物質の排出に関与するものと考えられている。mdr1a, mdr1b, mrp1 トリプルノックアウトマウスでは mitoxantrone 投与により ABCG2 の発現誘導がみられた²⁸⁾。このことから、ABCB1, ABCC1 に並び ABCG2 が抗がん剤耐性の重要な因子であることがうかがえる。ABCG2 の阻害剤も有効な抗がん剤耐性克服剤になる可能性がある。

ABCB11/BSEP

胆汁酸排出ポンプ (BSEP : bile salt export pump) の実体として長らく不明であった遺伝子がラットでクローニングされ、すでに部分的にクローニングされていた *sPGP* (sister of P-glycoprotein) と同一の遺伝子であることがわかった。*sPGP* は肝毛細胆管側に発現し、2つの ATP 結合領域をもち、マウス *mdr1b* に 70% の相同性を示す MDR ファミリーに属する (表 1)。トランスフェクションの実験からは、タキソールにだけ耐性を示し、ビンブラスチンなどの薬剤には耐性を示さない (表 2)²⁹⁾。しかし、タキソールが *sPGP* の基質となることの証明、また臨床検体における *sPGP* の発現についての検討はまだ行われておらず、トランスポーターとしての薬剤耐性への関与は明らかではない。BSEP はやはり肝臓で発現している。ラットの BSEP は胆汁酸を輸送できることが *in vitro* の実験で確認された。

ABCB2/MDR3

多剤耐性に関与しない *mdr2* 遺伝子 (ヒト *PGY3/MDR3* のオルソログ) のノックアウトマウスも長期間生存したが、こちらは血清中のビリルビン、アルカリホスファターゼなどの酵素活性が上昇しており、肝機能障害が推測された。実際にこのノックアウトマウスの肝組織を病理学的に検討した結果、胆管細胞の

増殖や炎症が観察された。 *mdr2* 遺伝子は肝の毛細胆管細胞の膜に発現しており、胆汁中への未知物質の分泌に関与している可能性が示唆された。胆汁成分を分析した結果、 *mdr2* ノックアウトマウスではリン脂質の分泌が顕著に減少していることが明らかになった³⁰⁾。この結果について、リン脂質不在の胆汁が毛細胆管細胞膜からリン脂質、コレステロールを溶出させ、その結果、肝に障害を与えるのではないかと考えられている。一方、 *mdr2* ノックアウトマウスが示す表現型は、3型の進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (PFIC) の臨床所見に一致している。胆汁は胆汁酸、電解質、脂質より構成され、腸で脂肪の乳濁、蠕動増加および腐敗の防止といった役割を担っている。また、胆汁は肝臓から胆管を經由して十二指腸に放出されるが、この胆汁流 (bile flow) は各成分の能動輸送により生ずると考えられている。この胆汁産生や胆汁流の衰弱した状態が胆汁うっ滞である。3型の患者では *PGY3/MDR3* 遺伝子の mRNA と蛋白質が欠如していること、さらに *PGY3/MDR3* 遺伝子に変異のあることが示されている³¹⁾。

1.3 耐性克服

ABC 蛋白質の阻害剤の研究がなされている。これら ABC 蛋白質の阻害剤は抗がん剤化学療法治療中の多剤耐性を変化させ、抗がん剤を効きやすくさせることが期待されている。特に、P 糖蛋白質の高発現している腫瘍においては P 糖蛋白質阻害剤のベラパミル (verapamil) などが有効であるか否かが、前臨床試験、臨床試験で検証されている。

1.4 *MDR1*, *MRP* 遺伝子群の発現誘導

ABCB1/MDR1 遺伝子の発現誘導

P 糖蛋白質が過剰産生され耐性を獲得するには、 *MDR1* 遺伝子の増幅、転写因子の発現亢進、活性化、翻訳レベルの活性化、糖鎖修飾などの翻訳後活性化などのメカニズムが考えられているが、臨床例はなかった。ヒト *MDR1* 遺伝子領域を含む酵母人工染色体 (YAC) をマウス細胞に導入し、外来性ヒト *MDR1* 遺伝子と内在性マウス *mdr1a*, *mdr1b* 遺伝子の発現を解析し、DNA メチル化が発現調節のキーを担っていることが明らかになった。さらに、ヒトがん培養細胞株および AML や膀胱腫瘍の臨床検体を用いて、 *MDR1* 遺伝子プロモー

I. 正常組織



II. がん組織

1. 転写因子 YB-1 の核内移行 (骨肉腫, 乳がん)



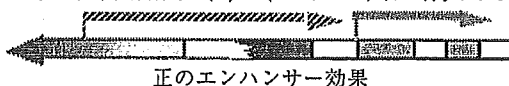
2. 5'-制御領域の脱メチル化 (AML, 膀胱腫瘍)



- 3.1. 遺伝子再編成 (1) (乳がん細胞株, ALL?)



- 3.2. 遺伝子再編成 (2) (マウス白血病
- in vivo*
- モデル)



4. 遺伝子増幅 (なし)

図3 がんにおける *MDR1/P* 糖蛋白質遺伝子の多様な発現制御

ター領域 CpG 部位の脱メチル化が *MDR1/P* 糖蛋白質発現の必須条件となっていることが明らかになった³²⁾。一方, *MDR1* 遺伝子の転写因子として YB-1 が重要であることがわかっていたが, 最近, 乳がんの臨床検体で, YB-1 の核移行が P 糖蛋白質発現と 100% 相関することが示された。MDR1/P 糖蛋白質については, 臨床での耐性の獲得機構がようやく明らかにされつつあり, 今後のさらなる解析と, YB-1 の核移行や *MDR1* 遺伝子の DNA メチル化を阻止することによる新しい治療法開発への展開が期待される (図 3)³³⁾。

***MRP2/cMOAT* 遺伝子発現の個人差と発現誘導**

変異や多型による MRP2 蛋白質の機能異常とともに, *MRP2/cMOAT* 遺伝子の発現レベルも重要である。MRP2 蛋白質は, cAMP, デキサメサゾン, リファンピシン, タモキシフェン, シスプラチン, 2-アセチルアミノフルオレン, シクロヘキシミドなどで発現誘導が, またリポ多糖やサイトカインで発現の低下

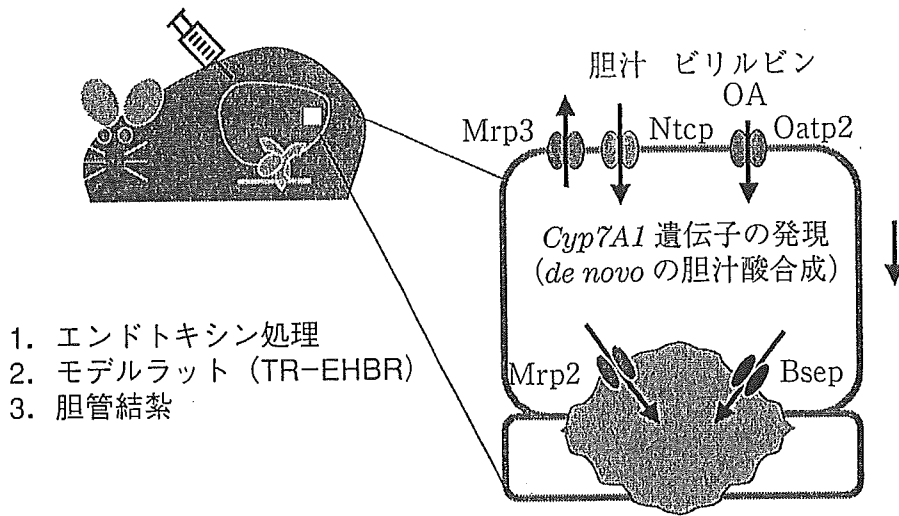
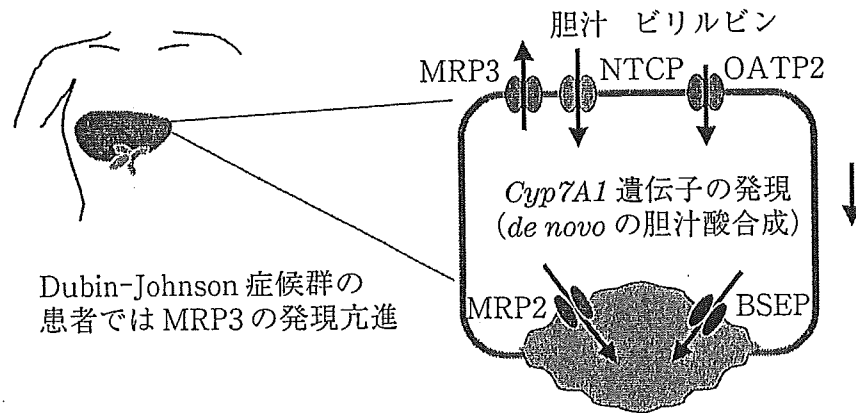


図4 黄疸、胆汁うっ滞を示す肝病変における ABC トランスポーターの発現変化 (動物モデル)



実験モデル	発現の変化	転写因子
胆汁酸処理	NTCP ↓, Cyp7A1 ↓	FXR, SHP
LPS 処理	NTCP ↓, OATP2 ↓	HNF1α
C 型肝炎ウイルス接種 炎症惹起サイトカイン	MRP2 ↓	IRF-3

図5 黄疸、胆汁うっ滞を示す肝病変における ABC トランスポーターの発現変化

が観察されている。一方、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 により解析した筆者らの結果から、cMOAT 蛋白質や *MRP2/cMOAT* mRNA の発現量には劇的な個人差が存在することがわかってきた。*MRP2/cMOAT* 遺伝子と同様に ABC トランスポーターファミリーに属する *MDR1* 遺伝子の場合には、プロモーター領域の CpG のメチル化により発現が負に制御されていることが急性骨髄性白血病、膀胱がん、大腸がんおよび正常大

腸粘膜を用いた解析から明らかになったことや、*MRP2/cMOAT* 遺伝子のプロモーター領域にも複数の CpG が存在していることから、*MRP2/cMOAT* mRNA の発現量の個人差も CpG メチル化などのエピジェネティックな機構により制御されている可能性がある。発現の多寡とプロモーターなどの遺伝子多型との関連についても今後明らかにされるであろう。さらに、*MRP2/cMOAT* 遺伝子の多型と排出活性、基質特異性や遺伝子発現の異常との相関、薬物への感受性の個人差や体内動態への関与が間もなく明らかにされてゆくであろう。

肝臓と、腸管では多くの ABC トランスポーターが発現しており、薬物や異物の排出に関わっている。これら ABC トランスポーターの発現レベルの変化は薬物に対する感受性の個人差や、体内動態に深く関与している。特に、炎症性疾患や肝障害などにおいて ABC トランスポーター遺伝子発現が著明に変化することが予測される (図 4)。実際に、C 型肝炎感染者症例では、肝臓で 5 つの ABC トランスポーターの中で特異的に *MRP2* の発現レベルが著しく低下していることが観察された³⁴⁾。また、炎症性サイトカイン IL-1 (インターロイキン-1) により *MRP2* プロモーターの活性低下が認められ、ISRE 領域がこの活性に関与することが最近明らかになった。一方、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 により解析した結果から、*cMOAT* 蛋白質や *MRP2/cMOAT* mRNA の発現量には劇的な個人差が存在することがわかってきた。(図 5)

代表的 ABC トランスポーターである P 糖蛋白質/MDR 遺伝子ならびに *MRP2* や *MRP3* についても、ヒトがんにおける特異的発現機構の研究が明らかになりつつある。特に、がん治療と診断への関与を進め、薬剤耐性や感受性を制御する分子機構を解明し、この分野の適切な薬剤投与の基盤づくりに寄与できると考えられる。

2. Dubin-Johnson 症候群

肝は多くの代謝産物や異物を、直接あるいは解毒、抱合し排泄するというきわめて重要な機能をもつ。したがって、各トランスポーターの機能異常や発現量の多寡により多くの疾病がもたらされ、また薬物の体内動態が影響を受けることが予測される。このような疾病の病態と発症機構の解析から、各疾病の診

断と治療が可能になると同時に、各トランスポーターの生理機能を知ることができる。ABC トランスポーターファミリーに属する *MRP2/cMOAT* 遺伝子について、この遺伝子が遺伝性の黄疸疾患である Dubin-Johnson 症候群の責任遺伝子であることや、肝臓の胆管側膜に発現する MRP2 蛋白質はグルクロン酸抱合型ビリルビンと他の有機アニオンを輸送するトランスポーターであることが明らかになった。

2.1 Dubin-Johnson 症候群と体質性黄疸

体質性黄疸とは、先天性のビリルビン代謝異常により血中ビリルビンの上昇した状態である。ヒトの血清中ビリルビンの 80% は老廃赤血球のヘモグロビンに由来し、正常体内では肝細胞で、有機アニオンの一つであるグルクロン酸などに抱合解毒されたのちに胆管から腸へと排泄される。体質性黄疸では、血中ビリルビンの上昇原因として考えられる機作のうち、溶血、肝細胞障害、胆道閉塞は関与せず、ビリルビンの摂取、抱合、細胞内輸送、排泄のいずれかが障害されていると考えられている (図 6)。上昇ビリルビンのタイプにより、間接 (非抱合型) 高ビリルビン血症を示す Craigler-Najar 症候群 I 型, 同 II 型, Gilbert 病と、直接 (抱合型) 高ビリルビン血症を示す Dubin-Johnson 症候群, Rotor 症候群に分類される。間接高ビリルビン血症については 3 症候群いずれもでビリルビン UGT (UDP-glycosyltransferase,) 遺伝子 (*UGT1A1*) の変異が同定されている。直接高ビリルビン血症のうち Rotor 症候群については、責任遺伝子が未だ同定されていない。

Dubin-Johnson 症候群は稀な疾病であるが、ユダヤ系イラン人では 1,300 人

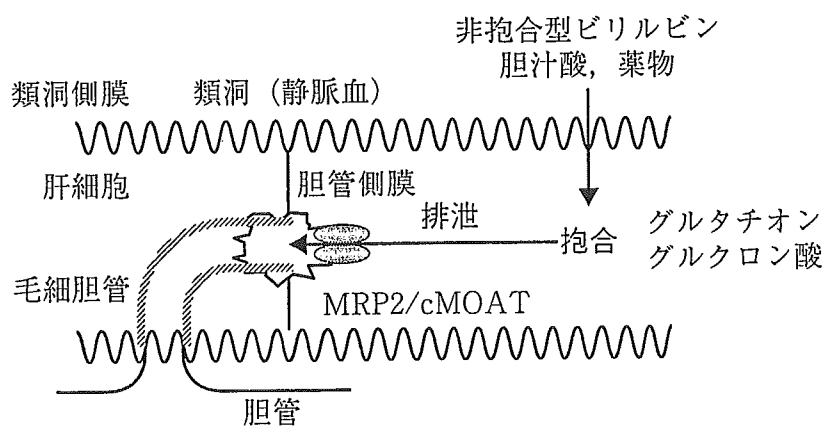


図 6 肝臓におけるビリルビンの抱合、排泄経路