

がん分子標的治療開発に関する基盤研究

— ベットサイドへの貢献を目指して —

久留米大学先端癌治療研究センター分子外科部門
癌分子標的治療研究部門 (久留米大学 COE)

桑野 信彦・藤井 輝彦

久留米医学会雑誌 第68巻 第1・2号 別冊

平成17年2月25日発行

The Journal of the Kurume Medical Association

Vol. 68 No. 1・2, P. 16 ~ 21, February 2005

がん分子標的治療開発に関する基盤研究

— ベットサイドへの貢献を目指して —

久留米大学先端癌治療研究センター分子外科部門
癌分子標的治療研究部門 (久留米大学 COE)

桑野信彦*・藤井輝彦

我々の部門では、分子外科のスタッフを中心にアジアからのポストドク、大学院生と研究生らで仕事を進めている。1カ月に2回の英文論文抄読会と1回の仕事発表会を行っている。約2年経過してがんの分子標的に関する研究の基盤が少しずつ構築されはじめた状況である。特に大切にしているのは久留米から独自性のあるがん研究を発信することであり、がんの診断・治療と予防などに貢献できる仕事を発展させたいと祈念している。学内の各教室の協力に加えて九州大学・院医・医化学教室の小野眞弓先生 (久留米大学・客員教授予定) や産業医科大学・医・分子生物学教室の河野公俊先生 (久留米大学・客員教授予定) らの研究グループ、さらに大鵬薬品飯能研究センター長の山田雄次先生 (久留米大学・客員教授予定) らの研究グループと人的交流や共同研究を進めている。

研究プロジェクトとしては現在次の2項目について進めている。

- I. 抗がん剤感受性/耐性や効果を制御するがん細胞の分子標的
 1. 抗がん剤の感受性を制御する ABC (ATP 結合力セット) トランスポーター¹⁾⁻⁴⁾
 2. 抗がん剤の感受性を制御する YB-1 (Y-box 結合蛋白-1)⁵⁾⁶⁾
 3. 分子標的薬剤 Gefitinib (イレッサ) の感受性を左右する機序と標的⁷⁾⁻¹⁰⁾
 4. 肝癌におけるインターフェロン α と他剤との併用効果を制御する因子

- II. がんの分子や転移また生存率/予後に関わる分子標的と血管新生及びマクロファージ
 1. 膵癌, 乳癌, 肝癌における Cap43/NDRG1 の機能と臨床的意義¹¹⁾⁻¹⁴⁾
 2. 肝癌における IGF (インスリン様増殖因子) シグナルの働きと臨床的意義
 3. がんの間質応答の中で炎症性サイトカインで誘導される血管新生とマクロファージ¹⁵⁾¹⁶⁾

上記のプロジェクトの中から I-1 (I-2 の一部を含む) と I-3 の2つを選んで簡単に説明したい。

I. ABC トランスポーター

1. 胆汁排出の一つの鍵をにぎる ABC トランスポーター: MRP2/cMOAT/ABCC2

ABC トランスポーター (ATP 結合カセットトランスポーター) は現在、約 50 個近くヒトゲノム上に存在するが、ATP 結合部位が2箇所ある膜貫通型糖蛋白質でイオンチャンネル (この胞性線維症の原因遺伝子なども含む) や生理活性物質や異物の輸送を担うトランスポーターとして働く。我々の身体の中の多くの臓器に発現しているが、特に血液・脳関門をはじめ血管・臓器関門に発現して我々の体内で異物や毒物などから防御したり生理活性物質の排出や吸収に働いて生体の恒常性を保持するのに重要である (図 1A, B)。図 1C に腸肝循環における幾つかの ABC トランスポーターの局在と発現を示す。我々は 1996 年にヒト MRP2/ABCC2 をはじめて単離し¹⁾、さらに体質

*学長特命教授

M. Kuwano and T. Fujii. Development of anticancer molecular targeting diagnosis and therapeutics strategy from bench to bed.

性黄疸症である Dubin-Johnson (D-J) 症候群の原因遺伝子であることを明らかにした³⁾³⁾。MRP2 の D-J 遺伝子変異のうち Q1382R は成熟型 (180~190KDa) を示すが ATP 分解活性がないこと、さらに R768W や K667R の変異は前駆体 (160~170KDa) から活性型の成熟型へ変換しないために高ビリルビン血症をひきおこすことを明らかにした (図2)⁴⁾。さらに MRP2 もまた炎症関連物質であるロイコトリエン C4 だけでなくピンカアルカロイド、カンプトテシンやシスプ

ラチンなどの抗がん剤感受性にも関与することを見出した。

2. YB-1 (Y-ボックス結合蛋白-1) とがんにおける P-糖蛋白質の発現

P-糖蛋白質 (MDR1) は代表的な ABC トランスポーターであり、抗がん剤だけでなく、抗アレルギー剤、抗生物質、免疫抑制物質、カルシウム拮抗剤、ステロイド、循環器系薬剤、モルヒネ、脳神経薬剤など実に多岐にわたる薬剤を基質とすることが知られている。他方、P-糖蛋白質のが

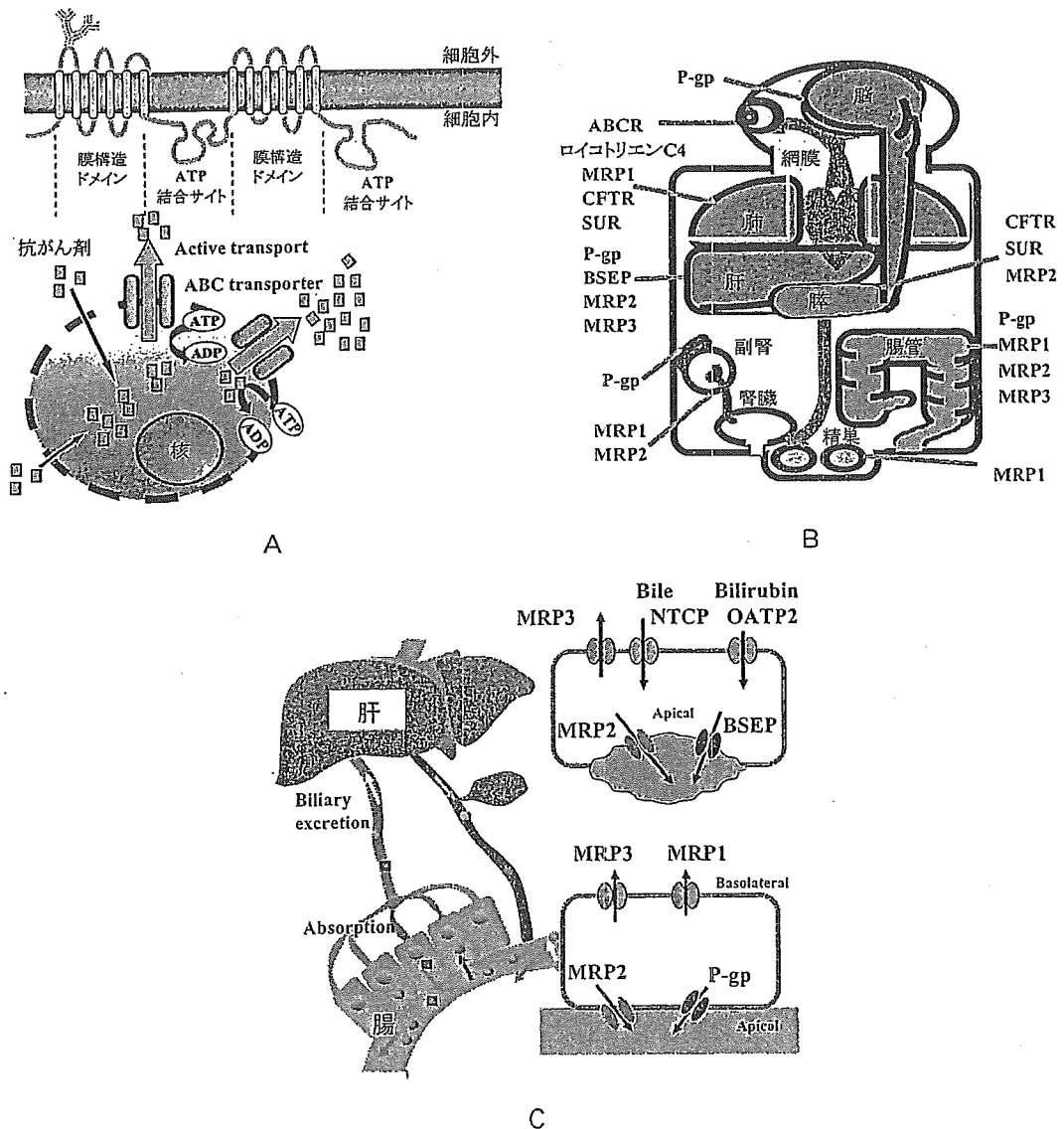


図1 A ABCトランスポーターの構造と機能。
 B 各臓器で異物や生理活性物質の輸送・排泄に関与する ABCトランスポーターの臓器や血液・臓器関門における発現と局在。
 C 腸肝における ABCトランスポーターと他のトランスポーターの発現と局在。

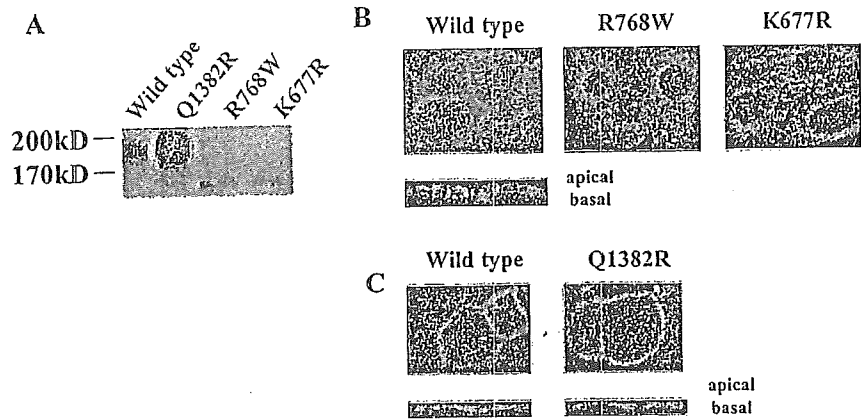


図2 野性型と D-J 変異 Q1382R の MRP2 は 180-190KDa の分子量を示すが、他の D-J 変異 R768W と K677R は 170KDa の前駆体のままである (A)。さらに野性型 MRP2 は細胞膜に局在するが、2つの D-J 変異型は細胞質に未成熟型として存在する (B)。また野性型と Q138R は apical 側に局在する (C)。

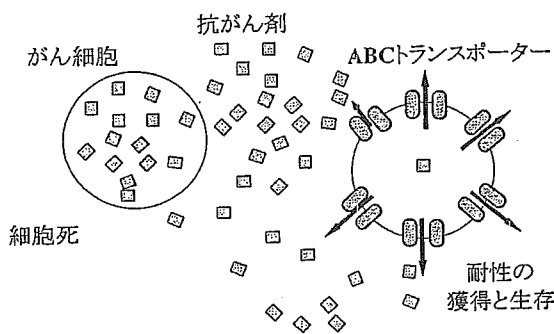


図3 ABC トランスポーターと治療：P-糖蛋白質を代表する ABC トランスポーターが発現すると親和性のある抗がん剤に対して多剤耐性の獲得や感受性を変化させる。

んにおける発現上昇はしばしば抗がん剤治療に対する多剤耐性の獲得を誘導する (図3)。

抗がん剤治療の後に、P-糖蛋白質のがんにおける過剰発現は色々のタイプのがんでしばしば観察される。臨床がんにおいて治療のあとの P-糖蛋白質依存性の多剤耐性の獲得に関与する機序として我々は、MDR1 遺伝子の発現を制御するプロモーター領域の CpG のメチル化の有無が重要であることを白血病と膀胱癌患者で見出した。他方もう一つの機序として図4に示すように細菌からヒトまで保存されているコールドショック・ド

メインをもつ原始的な蛋白質である YB-1 の核内局在が P-糖蛋白質の発現上昇に重要な鍵をにぎっていることをヒトがんで観察した。抗がん剤や放射線による DNA 障害によって MDR1 遺伝子発現が誘導されること、そしてその誘導に YB-1 が関与することを河野公俊博士らと共同で 1989 年に発見した⁵⁾。この YB-1 が MDR1 遺伝子の発現誘導とシスプラチンなどの DNA 障害の修復に関与することを観察した (図4)。そこでこの基礎知識をもとにがん患者ではどうかという問いかけを行った。その結果、乳癌をはじめ幾つかの種類のがんで P-糖蛋白質の発現と YB-1 の核内局在が緊密に相関することが見出されている⁶⁾。YB-1 が臨床診断や治療にも有用な分子標的となるか否かが今後の我々の課題である。

II. EGF レセプター (EGFR) と Cap43/NDRG1/Drg-1 はがん治療薬開発や悪性病理診断の分子標的?

1. 古くて新しい増殖因子レセプターである EGFR ファミリー

がんの悪性形質の獲得に関与する分子を標的にした分子標的薬剤の登場は最近のハイライトである⁷⁾。分子標的薬剤の使用にあたって “proof of principle” を患者で明らかにしていくことが大切であるといわれている。ゲフィチニブ (イレッ

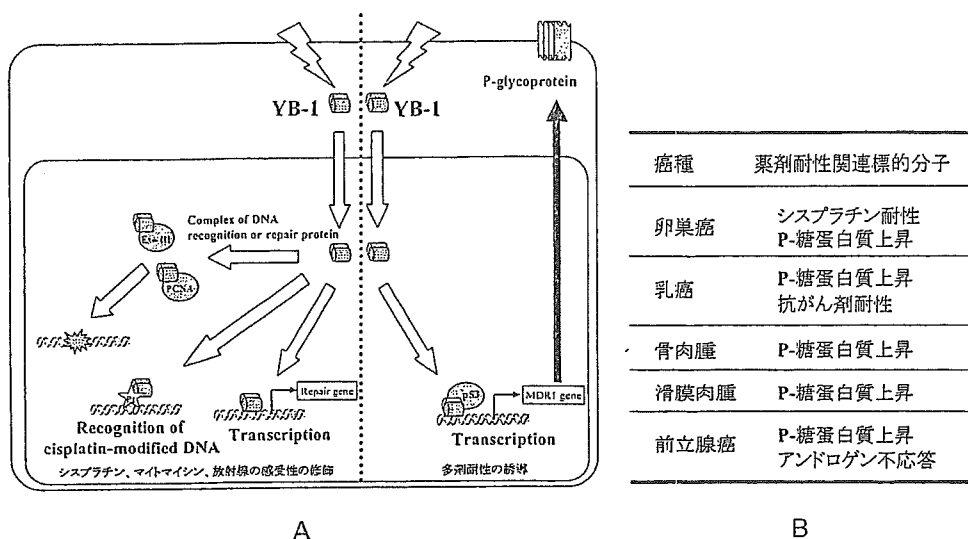


図4 A YB-1による薬剤感受性の制御は2つの経路が関与する。抗がん剤や放射線照射によってYB-1が核内へ移行しシスプラチンなどのP-糖蛋白質非依存性の耐性とP-糖蛋白質依存性の多剤耐性に関与する我々のモデル。
B YB-1核内局在とP-糖蛋白質発現中薬剤耐性が有意な相関を示すヒトがん。

サ) やハーセプチンは肺癌や乳癌のEGFRファミリーであるEGFRやHER2を標的としており、久留米大学ではイレッサとハーセプチンの併用に関する基礎研究が進められている⁸⁾。EGFRのチロシンキナーゼ・ドメインの変異の中にゲフィチニブに高感受性である非小細胞肺癌(NSCLC)症例が見出され注目されている。さらに高感受性を示す日本人女性の非小細胞肺癌(腺癌)にEGFRの突然変異の頻度が高いことが報告されている。小野眞弓博士らも世界に先駆け独立に、NSCLCの各々のEGFRシグナルが各細胞の増殖や細胞死とどれだけ緊密に関連しているか否かが肺癌細胞のゲフィチニブ感受性の鍵をにぎっていることを報告している⁹⁾(図5)。現在さらにHER2やHER3のヘテロダイマーの形成の有無が同薬剤の治療効果のもう一つの鍵をにぎるのではないかと考えて研究が進められている¹⁰⁾。

2. 分化能や転移抑制と関連するCap43/NDRG1/Drg-1

Cap43遺伝子はカルシウムで誘導される分子量が43KDaのタンパクであり、Charcote-Marie-Tooth病の原因遺伝子でもある。最近、ノックアウトマウスで神経の脱エミリン化をひき

おこしていること¹¹⁾や、さらに神経の再生や分化にも深くかかわることが知られている¹²⁾。低酸素、金属イオン、ホルボールエステル、p53、N-mycなどでその発現が著明に修飾されるが、我々は2001年にヒト腎癌から同遺伝子を単離した¹³⁾¹⁴⁾。最近、前立腺癌や乳癌でCap43の発現が予後マーカーとして報告されて以来、Cap43に関する研究が次第に増えはじめています。我々は、Cap43の発現が膵癌、乳癌また肝癌の治療効果の判定マーカーになるのではないかと考えて研究を進めています。現在、丸山祐一郎君(久留米大・外科)らは“何故膵癌は悪性度が高いのか?” “何かいい治療法はないか?”という問いかけのもとに膵癌でのCap43の研究に取り組んでおり、Cap43の発現が膵癌の予後や転移能と緊密に関連することを観察している(Maruyama, Aoyagi, Kinoshita, Kuwanoら論文準備中)。

以上、現在進行中の幾つかのプロジェクトについて簡単に記載した。これらの分子標的や基礎研究の中からベットサイドへ役に立つ有用なものを我々の研究部門から一つでも二つでも提示できるように努力をしていきたい。

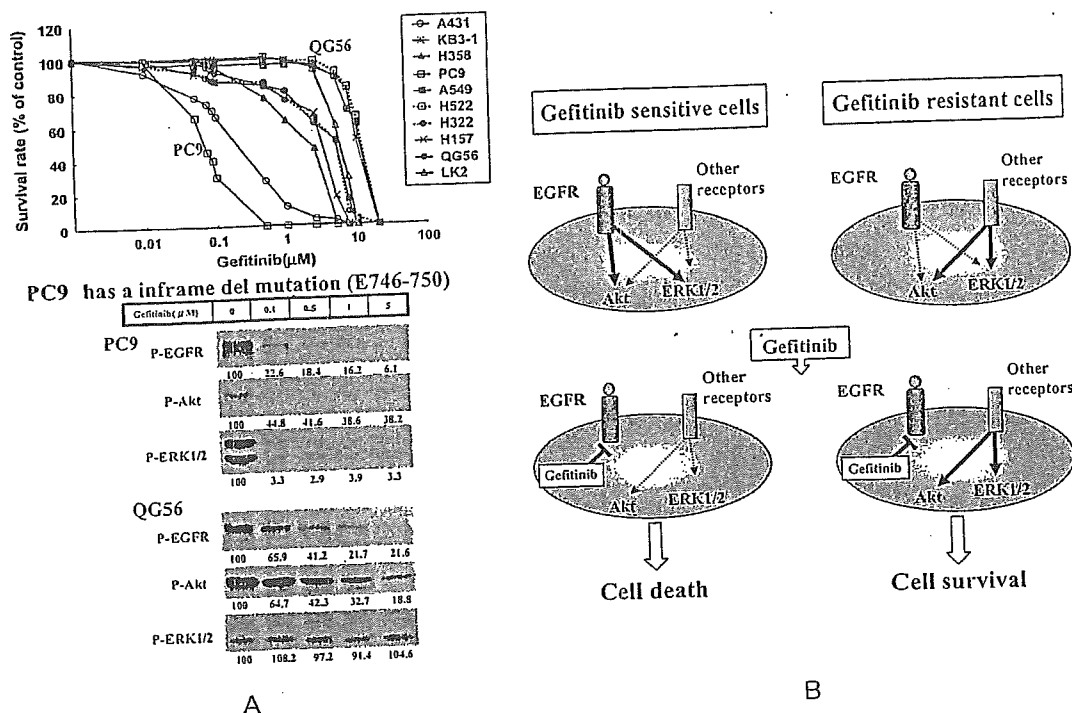


図5 A ヒト肺癌細胞におけるゲフィチニブ感受性とシグナル伝達の阻害。
 B ヒト肺癌細胞におけるゲフィチニブ感受性はEGF/EGFレセプターに細胞死と増殖が
 どれだけ緊密に依存するかによって決められる。

謝 辞

本研究をまとめるにあたり山名秀明教授（先端
 癌治療研究センター長）をはじめ共同研究者の皆
 さんへ感謝します。

文 献

- 1) Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S, Kuwano M: A human canalicular multispecific iroganic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.*, 56: 4124-4129, 1996
- 2) Wada M, Toh S, Taniguchi K, Uchiumi T, Kohno K, Yoshida I, Kimura A, Sakisaka S, Adachi Y, Kuwano M: Mutation in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II / Dubin-Johnson syndrome. *Human Molec. Genet.*, 7: 203-207, 1998
- 3) Toh S, Wada M, Uchiumi T, Inokuchi A, Makino Y, Horie H, Adachi Y, Sakisaka S, Kuwano M: Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene and mutations in the ATP binding cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am. J. Human Genet.*, 64: 739-746, 1999
- 4) Hashimoto K, Uchiumi T, Konno T, Ebihara T, Nakamura T, Wada M, Sakisaka S, Mamiwa F, Amachi T, Ueda K, Kuwano M: Trafficking and functional defects by mutations of the ATP-binding domains in MRP2 in patients with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology*, 36: 1236-1245, 2002
- 5) Kohno K, Izumi H, Uchiumi T,

- Ashizuka M, Kuwano M : The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bio Essays*, 25 : 691 - 698, 2003 (review)
- 6) Kuwano M, Oda Y, Izumi H, Yang S-J, Uchiumi T, Iwamoto Y, Toi M, Fujii T, Yamana H, Kinoshita H, Kamura T, Tsuneyoshi M, Yasumoto K, Kohno K : The role of nuclear YB-1 as a global marker in drug resistance. *Molec. Cancer Therapeut.*, 3 : 1458 - 1492, 2004 (review)
- 7) Hirata A, Ogawa S, Kometani T, Kuwano T, Naito S, Kuwano M, Ono M : ZD1839 (Iressa) induces anti-angiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res.*, 62 : 2554 - 2560, 2002
- 8) Nakamura H, Takamori S, Fujii T, Ono M, Yamana H, Kuwano M, Shirouzu K : Cooperative cell-growth inhibition by combination treatment with ZD1839 (Iressa) and trastuzumab (Herceptin) in non-small-cell lung cancer. *Cancer Lett.*, in press.
- 9) Ono M, Hirata A, Kometani T, Miyagawa M, Ueda S, Kinoshita H, Fujii T, Kuwano M : Sensitivity to gefitinib ('Iressa', ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor / extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation. *Molec. Cancer Therapeut.*, 3 : 465 - 472, 2004
- 10) Hirata A, Hosoi F, Ueda S, Miyagawa M, Naito S, Fujii T, Kuwano M, Ono M : HER2 Overexpression increases sensitivity to gefitinib, an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor, through inhibition of HER2/HER3 heterodimer formation in lung cancer cells. *Cancer Res.*, in press.
- 11) Okuda T, Higashi Y, Kokame K, Tanaka C, Kondoh H, Miyata T : *NdrG1*-deficient mice exhibit a progressive demyelinating disorder of peripheral nerves. *Mol. Cell. Biol.*, 24 : 3949 - 3956, 2004
- 12) Hirata K, Masuda K, Morikawa W, He J-W, Kuraoka A, Kuwano M, Kawabuchi M : N-myc downstream-regulated gene 1 expression in injured sciatic nerves. *GLIA*, 47 : 325 - 334, 2004
- 13) Masuda K, Ono M, Okamoto M, Morikawa W, Otsubo M, Migita T, Tsuneyoshi M, Okuda H, Shuin T, Naito S, Kuwano M : Downregulation of CAP43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells. *Int. J. Cancer*, 105 : 803 - 810, 2003
- 14) Nishie A, Masuda K, Otsubo M, Migita T, Tsuneyoshi M, Kohno K, Shuin T, Naito S, Ono M, Kuwano M : High expression of the Cap43 gene in infiltrating macrophages of human renal cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 7 : 2145 - 2151, 2001
- 15) Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, Tsuneyoshi M, Yamamoto T, Kuwano M, Ono M : Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J.*, 18 : 300 - 310, 2004
- 16) Kuwano M, Basaki Y, Kuwano T, Nakano S, Oie S, Y N Kimura, Fujii T, Ono M : The critical role of inflammatory cell infiltration in tumor angiogenesis-a target for antitumor drug development? In "New Angiogenesis Research" by Nova Science Publishers, Inc., New York, in press

Frontiers in Cancer Treatment

癌治療と宿主

—別刷—

(株)メディカルレビュー社

〒113-0034 東京都文京区湯島 3-19-11 イトーピア湯島ビル Tel. 03-3835-3041

癌の分子標的治療の進歩

桑野信彦

久留米大学先端癌治療研究センター分子外科部門教授

個々の細胞や細胞社会(組織や器官)の構造と機能に関する基礎研究は、癌の悪性形質獲得の分子的背景を把握するうえで大きく貢献してきた。個々の癌細胞増殖や細胞死に関与する増殖因子やサイトカインと受容体、ならびにそれらのシグナリングなどを標的として登場してきたのが分子標的薬剤である。分子標的薬剤の登場は、癌のベンチ研究をベッドサイドへ橋わたしできる可能性を秘めており、創薬研究の分野をかつてないほど魅力的かつ戦略的にしている。EGF 受容体を標的としたゲフィチニブ(イレッサ®)の肺癌治療に関する発表は、米国臨床腫瘍学会(ASCO)の会場を興奮させ拍手がなりやまなかったと聞いている。

近年、癌細胞と間質との応答が癌の悪性化の進展に重要な役割を果たしていることが注目されている。癌の増大のみならず、転移・浸潤・血管新生・リンパ管新生などにおける間質応答を担う標的を対象にした創薬研究の、これからの発展も期待したい。

分子標的治療薬の臨床応用の過程で、“予想しなかった発見や副作用”が報告されている。BCR-ABL を標的とするイマチニブが、KIT が責任遺伝子である消化器間質腫瘍にも効果を示すこと、ゲフィチニブが高感受性を示す肺癌の EGF 受容体の遺伝変異、メタロプロテアーゼ阻害薬投与後の関節や筋肉痛、また VEGF 抗体薬ベバシズマブと化学療法剤との併用の抗腫瘍効果など、臨床の現場からの情報を大切に学びフィードバックしていくことはきわめて大切である。

プロテインキナーゼ C の発見者西塚泰美先生(2004年11月他界)は、いつも“誰もやらないことをやる”というメッセージを口にされていた。わが国発の分子標的治療薬の誕生を期待したい。

“イレッサ(ゲフィチニブ)”と“サリドマイド”と
基礎医学への期待

くわ 桑 の 野 みち 信 ひこ 彦

月刊 臨 牀 と 研 究 別 冊

平 成 17 年 10 月 発 行

第 82 卷 第 10 号

青 ペ ー ジ

“イレッサ(ゲフィチニブ)”と“サリドマイド”と
基礎医学への期待くわ の みち ひに
桑 野 信 彦

新しい概念のもとに開発された最近、注目される薬剤に“分子標的薬剤”(Molecular Targeting Drug)がある。がんの代表的増殖因子である上皮増殖因子(EGF)の受容体を標的としたイレッサや、EGF受容体のファミリーの一員であるHER2を標的としたハーセプチンや白血病の発症に関わっているがん遺伝子Bcr-Ablを標的としたグリーバック等がそうである。細胞増殖やDNA複製やRNA合成等を阻害する従来の抗がん剤であるエンドキサンや5-フルオロウラシル、シスプラチン、ドキソルビシン、カンプトテシンとは薬剤開発の発想から臨床効果の評価等が異なることから多くの論議がわが国でもなされている。

アストラゼネカ社のイレッサが世界に先駆けて最初にわが国で臨床応用が開始されたのは、福岡正博先生をはじめとした臨床腫瘍学者の努力による所が大きい。これに先立ち、カンプトテシンについて日本発の臨床試験研究が権威あるJournal of Clinical Oncologyに発表され日本の臨床研究が国際的信頼を得たことは、有吉寛先生、西條長宏先生や福岡先生をはじめとする、わが国の臨床腫瘍学者たちの科学的根拠に基づく臨床試験の基盤づくりがあったからだということに異論をささむヒトはいないだろう。

わが国としては、異例と思えるスピードで2003年にイレッサの臨床応用が開始されるとまもなく、その非小細胞肺癌(NSCLC)への効果に驚嘆の声があがった。と同時に投与患者の数%に生じる間質性肺炎のリスクをメディアは大々的に報告し

た。多くの治療薬の投与で経験される間質性肺炎が、イレッサに特徴的な副作用であるかのような社会的風潮を根づかせはじめた。その頃、イレッサのNSCLCの臨床効果について、①男性より女性に有効性が高い。②腺癌が上皮性癌より有効性が高い。③日本人が欧米人に比べ有効性が高い。等“イレッサの不思議”として注目されていた。この疑問に答えて2004年に米国の2つの研究グループから独立に報告があった。癌にEGF受容体のチロシンキナーゼ・ドメインに突然変異が見出された肺癌患者はイレッサに応答性が高いこと、さらに日本人女性や腺癌にこの突然変異の頻度が高いこと等に関する報告であった(Lynch et al., New Engl. J. Med., 350: 2129, 2004; Paez et al., Science, 304: 1497, 2004)。一方、これらの発表と同じ頃、わが国からも肺癌細胞の細胞死や増殖がどれだけEGF受容体のシグナルに依存しているかが、イレッサ感受性の重要な鍵であることが報告された(Ono et al., Molec. Cancer Therapeut., 3: 465, 2004)。このEGF受容体シグナルの肺癌細胞の細胞死/増殖への緊密な依存度は、突然変異の有無に影響されるというのが結論である。“肺癌患者に効果がみられる薬が登場したことを肺癌の臨床医としてはじめて経験することができました。”と愛知県がんセンターの光富徹哉博士が語っていたのが印象的であった。このイレッサをはじめとしてその分子標的の存在や発現様式を把握しながらがん治療を進めることは、いわゆる科学的根拠(Principle of Proof)に基づいたオーダーメイド医療の実践でもある。

他方、妊婦をはじめとして鎮痛また催眠薬としてその当時の化学者たちが最高の発明だと自信を持って世へ送り出したのが合成薬サリドマイド(Thalidomide)であった。半世紀前のサリドマイド投与による畸型児サリドマイドベビーは、人類に対してくすりの恐ろしさを示す、繰り返してはならない薬害の大きな警告であった。唯この50年間サリドマイドの催畸作用だけでなく生物活性と構造に関する研究が続けられてきたのは、非常に驚きである。血管新生を阻害したというFolkman博士の研究室からの報告も再現性については問題があるけれども多大な注目をあつめた。サリドマイドの多発性骨髄腫に対する臨床応用が進められている(唯、妊婦を除くという条件付で)。しかし、このサリドマイドについて最も難しいと考えられる点はその抗腫瘍効果の作用機序がはっきりしていないことである。我々の研究室でもサリドマイドの仕事を続けてきたけれども、ことごとく失敗を繰り返して1報の報告もできなかった。

標的がはっきりしているイレッサとはっきりしていないサリドマイドの2つをとりあげた。“薬を投与する際に毎日を忙しく頑張っている医師たちが薬の作用のしくみや患者の適応性について充分考慮する十分な時間があるのだろうか?” また“投与する薬のことだけでなく、目の前の患者に関する科学的根拠に基づいた病態を把握できているのだろうか?”などと疑問がわいてくる。そんな時に、私は基礎医学の重要性を考えてしまうのである。学生が入学して最初の教養課程(今はこんなことばはないかも知れないが)での生物学をはじめとして、科学の魅力を、より魅力的に語り

かける基礎医学教育が極めて大切ではなからうかと思ってしまうのである。私が専攻した生化学や医化学をはじめとして解剖学、生理学、公衆衛生学や薬理学などの基礎医学を学生諸君に臨床医学以上の魅力で語りかけることが大切である。健康や病気に関する科学の基盤を徹底的に学び、医学の根幹をなす基礎医学を真剣に学ぶことこそイレッサやサリドマイドなどの新薬をベッドサイドで使用していく上で極めて重要である。

病気を科学し、その診断や治療を実践していくために基礎医学と臨床医学は対等のパートナーであるべきである。対等のパートナーとなるためには、基礎医学は医学教育の実践に今までの殻を破って本当の全力投球をやる時代がきている。イレッサもサリドマイドもその作用に関する科学を学ばずして患者への投与はあるべきではない。十分な時間を費やして学生と教授をはじめとする教官は顔と顔をあわせて、一緒に医学を学ぶ姿を目指していくべきであろう。どんな秀才も知識だけではコンピューターに負ける。科学的根拠のもとに目の前の一つ一つの病気の診断と治療を進めることができるための教育と研究の環境づくりと医学の担い手を育成することは、緊急性のある重要課題であろう。アメリカ流の研修医制度の導入は、わが国の臨床医学の混乱だけでなく基礎医学の教育と研究へ深刻な問題を新たに生じさせている。基礎医学をわが国で、わが国にマッチするやり方でどう育成していくかは今我々につきつけられた課題である。私自身もこれまでを反省しながら新たにこの課題にとりくんでいきたいと考えている。

血管新生阻害剤

Angiogenesis-targeting drugs



桑野信彦(写真) 小野真弓

Michihiko Kuwano¹ and Mayumi Ono²

久留米大学先端癌治療研究センター¹, 九州大学大学院医学研究院医化学分野²

◎がんは自己増殖する能力を有しているが、ある一定以上の大きさになるためには血管による栄養の供給を必要とする。したがって、がんにつくられる新生血管を標的とした治療薬は、がんの増大を阻害することが期待される。さらに、血管新生ががんの浸潤や転移と密接に関連していることから、血管新生阻害剤が転移を阻害することも期待されている。最近、代表的な血管新生因子 VEGF を標的とした抗体治療薬 Avastin[®] が、抗がん剤との併用で進行性大腸癌をはじめ難治性がんの有効性が報告され、多大の注目を集めている。がんの血管新生のメカニズムやネットワークシステムを基盤にした新しい有効な分子標的薬剤の登場に期待したい。



血管新生阻害剤, VEGF/VEGFRレセプター, がん血管新生, アバステン[®]

従来のがん化学療法剤の開発はがん細胞自身の増殖や細胞周期に関連する酵素や因子に加えて、DNA, RNA や蛋白合成などを対象に進められてきた。これと対照的ながんの間質応答のひとつ“新生血管”を標的とした治療薬の開発は、Folkman 博士の発表以来、大きな期待が寄せられた (Folkman, 1971)。その結果、VEGF をはじめとした血管新生関連因子を標的とした治療薬の開発研究が積極的に進められてきた。すなわち、エンドスタチンやアンジオスタチンをはじめとした内在性血管新生抑制因子、matrix metalloproteinases (MMPs) 阻害剤、血小板第IV因子 (PF-4)、メチオニンアミノペプチダーゼ (Met AP-2) などのプロテアーゼ阻害剤、フマジリン誘導体、インテグリン阻害剤、また VEGF レセプター (VEGFR) 阻害剤などを含む多くの血管新生阻害剤が開発され、臨床応用が開始された¹⁻³⁾。しかし最近まで、確実な臨床効果が報告されたものはなかった。現在、臨床試験が進められている血管新生阻害剤を表1に示している。

本稿では、2003年のアメリカ臨床腫瘍学会(ASCO)

で臨床効果が報告された抗 VEGF ヒト型モノクローナル抗体 Bevacizumab (Avastin[®]) やがんの炎症応答と関連する血管新生について述べる。

臨床試験で効果が報告された抗血管新生治療薬——VEGFを標的として

VEGF は血管内皮細胞に特異性の高い分子量 34~45 kDa の増殖因子で、血管透過性因子 (VPF) と同一である。VEGF の発現亢進は多くの固形腫瘍をはじめとして、糖尿病性網膜症や関節リウマチなどの疾患でも報告されている。VEGF はさまざまなサイトカインや増殖因子、低酸素、低グルコースなどによって誘導される。VEGF に対して親和性を示すレセプターとして VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), VEGFR-3, Neuropilin-1, Neuropilin-2 などが知られている。それぞれの VEGF ファミリーのリガントに対応して血管内皮とリンパ管内皮で働くレセプター群を表2に示している。血管新生の誘導にもっとも深く関与すると考えられている VEGF-A/VEGFR-2 のシグナル機序が明らかになってきた。さらに、近年、リ

表 1 臨床試験が進められている血管新生阻害性作用のある分子標的薬剤

| 薬剤 | 薬剤タイプ | 分子標的 | 機序 |
|----------------------|------------|-----------------------------|----------|
| PTK787 | 低分子 | VEGF-R1/2/3* | チロシンキナーゼ |
| SU6668 | 低分子 | VEGF-R2 | チロシンキナーゼ |
| | | PDGF-R β | |
| SU11248 | 低分子 | VEGF-R2 | チロシンキナーゼ |
| | | PDGF-R β | |
| AZD6474 | 低分子 | VEGF-R2 | チロシンキナーゼ |
| AZD2171 | 低分子 | VEGF-R3 | チロシンキナーゼ |
| CEP-7055 | 低分子 | VEGF-R1/2/3 | チロシンキナーゼ |
| CP-547.632 | 低分子 | VEGF-R2 | チロシンキナーゼ |
| 786034 | 低分子 | VEGF-R2 | チロシンキナーゼ |
| IMC-1C11 | 抗体 | VEGF-R2 | 拮抗作用 |
| Angiozyme | リボザイム | VEGF-R1 | 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 |
| EMD121974 | 低分子 | $\alpha_v\beta_3$ -integrin | 拮抗作用 |

*VEGF-R1/2/3 : VEGF 受容体 1 型, 2 型, 3 型.

表 2 VEGFファミリーと関連レセプターの血管新生とリンパ管新生への関与

| リガント | レセプター | 標的の内皮細胞 | 生物活性 |
|----------------------------------|--------------------|---------|--------|
| VEGF-B PlGF VEGF-A | VEGFR-1 (Flt-1) | 血管内皮 | 血管新生 |
| (VEGF-B) (PlGF) (VEGF-A) | Neuropilin-1 | 血管内皮 | 血管新生 |
| VEGF-A VEGF-C VEGF-D | VEGFR-2 (KDR) | 血管内皮 | 血管新生 |
| VEGF-A VEGF-C VEGF-D | VEGFR-2 | リンパ管内皮 | リンパ管新生 |
| (VEGF-A) (VEGF-C) (VEGF-D) | Neuropilin-2 | リンパ管内皮 | リンパ管新生 |
| VEGF-C VEGF-D | VEGFR-3 | リンパ管内皮 | リンパ管新生 |

()で示すリガントは比較的最弱の活性。

リンパ管新生を誘導する VEGF-C/VEGFR-3 の役割も注目されている。すなわち、表 3 に示すように血管とリンパ管に発現しているマーカーが、つぎつぎに単離され、血管新生とは異なるリンパ管新生の分子機序が提示されている。VEGFR-1 や VEGFR-2 また Neuropilin-1 などは血管内皮に比較的特異的に発現しているために、これらを標的

にすることにより選択的な血管新生阻害が期待された。しかし、VEGFR-1 や VEGFR-2 を標的とした低分子阻害剤は動物実験系では非常に抗腫瘍や転移阻害活性を示しても、臨床試験においてはいまだ確実な効果が観察されなかった。その理由についてははっきりしていない。

他方、アメリカの Genentech 社が VEGF-A を標

表 3 血管とリンパ管に発現している分子マーカー

| マーカー | 血管 | リンパ管 | 発現細胞と組織 |
|---------------|----|-------|--------------------------------|
| Prox 1 | — | + | 眼, CNS, IS, 肝, 膵 |
| LYVE-1 | — | + | マクロファージ, 血管類洞内皮(肝, 膵) |
| Podoplanin | — | + | 破骨細胞, 肺口胞細胞, 腎ポドサイト, 上皮ケラチノサイト |
| VEGFR-3 | — | + | がん血管, マクロファージ, 樹状細胞 |
| Neuropilin-2 | — | + | ニューロン細胞 |
| Desmoplakin | — | + | 上皮細胞, 心筋 |
| Laminin | + | -/(+) | ECM, 基底ラミナ |
| CollagenIV | + | -/(+) | 上皮性基底ラミナ |
| Neuropilin-1 | + | — | ニューロン細胞 |
| CD34 | + | — | 血球前駆細胞 |
| VEGFR-1 | + | — | 単球/マクロファージ |
| CD31(PECAM-1) | + | (+) | |
| VEGFR-2 | + | + | |

CNS: 中枢神経系.

表 4 転移性大腸癌患者に対するVEGFモノクローナル抗体Avastin®の5-FU/LV(5-FU+ロイコボリン)との併用効果

| 治療レジメ | 5-FU/LV | 5 mg/kg Avastin® | 10 mg/kg Avastin® |
|------------------|---------|------------------|-------------------|
| | | + 5-FU/LV | + 5-FU/LV |
| 患者数 | n=36 | n=35 | n=33 |
| 生存期間中央値(月) | 13.6 | 17.7 | 15.2 |
| 病状進行なし生存期間中央値(月) | 5.2 | 9.0 | 7.2 |
| 臨床的奏効率(%) | 17% | 40% | 24% |

的にした中和抗体 RHnMAb である Bevacizumab (Avastin®)を開発した. Genentech 社の Ferrara 博士らは多くのヒトがんの xenograft モデル系でがんの増大や転移に VEGF 抗体が有効であることを数多く報告した⁴⁾.

Avastin® はまず進行性がんに対しての臨床応用が開始され, 2003 年の ASCO で進行性(転移性)大腸癌に対してイリノテカンや 5-FU/LV との併用で, 生存期間の延長が観察された(表 4)⁵⁾. 表 4 に Avastin® と 5-FU/LV との併用効果を示している. 他方, Avastin® はタキソール系抗がん剤, MMP 阻害剤, トポテカン, ドキソルビシンなどとの併用が xenograft モデル系の乳癌, 前立腺癌, 膵癌, 卵巣癌, 神経芽細胞腫, Wilms 腫瘍などに対して抗腫瘍効果を示すことが数多く報告されている. そのなかでヒト卵巣癌細胞株の xenograft モデルで, パクリタキセルと Avastin® との併用に関する抗腫瘍と腹小貯留に対する効果が報告された(図 1)⁶⁾.

2005 年の ASCO においても Avastin® は大きな注目を集めている. 治療抵抗性で進行性の大腸癌に対しても Avastin® 単独では効果はみられないが, 併用化学療法剤の治療効果を Avastin® は確実に上昇させている. Jain らは, VEGFR-2 の抗体で治療するとがんの血管構築を正常血管のそれに近いものにする事により, 抗がん剤のがんへの蓄積が増大する可能性を示唆している⁷⁾. 同様な効果が Avastin® でも期待されている. 現在大腸癌だけでなく多くの他のがんに対しても化学療法剤の併用の臨床試験が進められている.

これから期待したい炎症と関連する血管新生阻害剤——NF- κ BとCOX2を標的として

Virchow 博士ががんの病態に炎症が深く関わっていることを提言して以来長い月日が流れている. がんと炎症の問題がいま, 重要な研究対象として注目を集め, がんと炎症を関連づける具体的なシグナル因子や標的細胞が明らかにされはじ

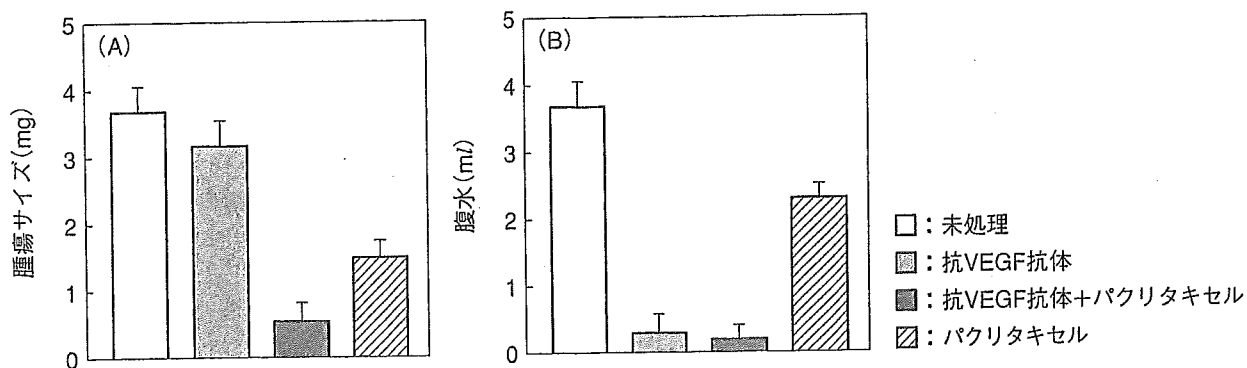


図 1 ヒト卵巣癌xenograftの腫瘍増殖(A)と腹水貯留(B)に対する抗VEGF抗体とパクリタキセルの作用
平均値±標準誤差, $n=12$.

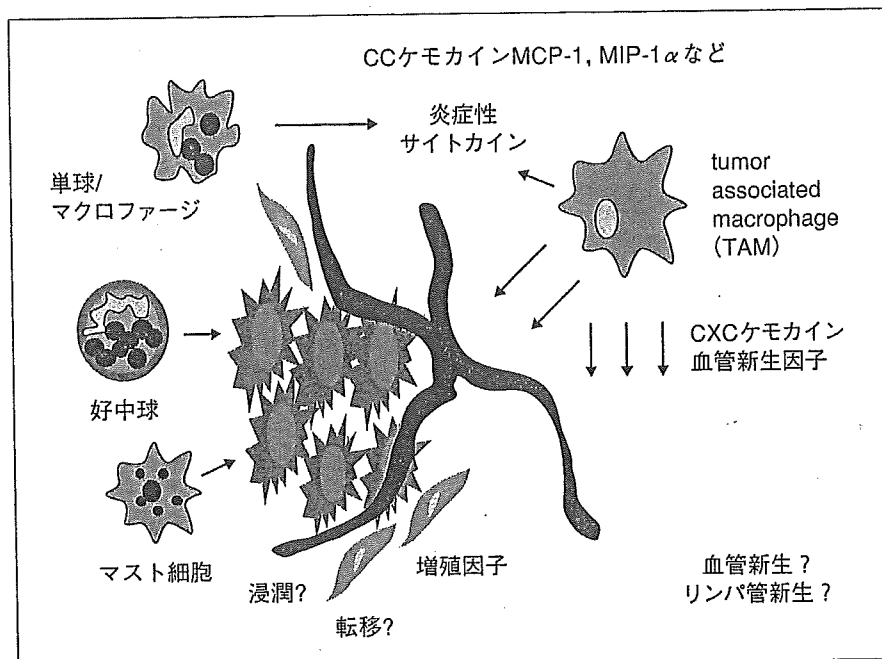


図 2 がん間質の炎症応答としてのがん関連マクロファージ(TAM)の関与
TAM はがんの間質の血管新生誘導に深く関与している。TAM の浸潤は、乳癌、子宮頸癌、肺癌、膀胱癌、グリオーマ、メラノーマなどで予後不良と密接に相関を示す。

めている。ヘリコバクターピロリ菌と胃癌や、肝炎 B や C 型ウイルス感染と肝癌との関係など実に多くの癌で、炎症ががん化のメカニズムに関与していることが知られている⁸⁻¹⁰。NF- κ B は重要な炎症標的のひとつであり、炎症反応を担って細胞死、発癌や薬剤や放射線耐性に深く関与している。最近 Karin 博士らは、Okayasu 博士(北里大学)らの報告した、塩によって慢性炎症を起こしやがて大腸癌を発症させるモデル系を駆使して、NF- κ B のシグナルを阻害することによって大腸癌の発症を著明に減少させることに成功した¹¹。さらに他の実験モデル系で、NF- κ B を阻害すること

により肝癌の発症を著明に減少させたり、Ras でがん化した乳癌細胞の肺転移を減少させることも報告されている。現在多くの NF- κ B を標的とした阻害剤が開発されており、臨床効果のある薬剤の登場に期待したい¹²。

NF- κ B の炎症シグナルと関連して乳癌の実験モデル系で、マクロファージが CSF-1 によって遊走蓄積すると乳癌の増大や転移を促進することも報告されている¹³。ジキルとハイドの二面性をもつマクロファージのうちがんの間質に蓄積するのは tumor-associated macrophage (TAM) とよばれ、多くのヒトがんで悪性度と有意に相関することが

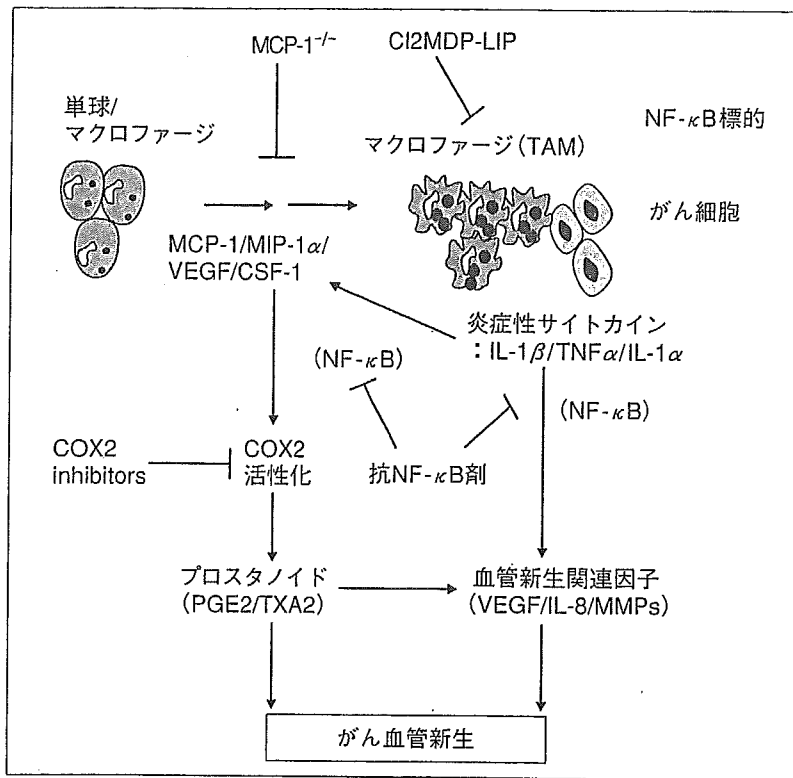


図3 現在著者らが考えているがんの血管新生や浸潤/転移における炎症性サイトカイン、NF-κB、COX2とマクロファージの関与

知られている¹⁴⁾。がんの間質応答として炎症と関連する血管新生が重要な役割を果たしているのではないかと期待されている。図2にTAMのがんの間質応答に関与するモデルを提示している。

アラキドン酸カスケードの律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ(COX)には、これまでに2種類のアイソザイム(COX1, COX2)が同定されている。アスピリンなどに代表されるCOX阻害剤がしばしば消炎や鎮痛効果を示すことからわかるように、COXもまた炎症の代表的な担い手である。COX1もCOX2も、従来の非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)であるアスピリンやインドメタシンで阻害される。NSAIDsを長期にわたって服用していたヒトは、大腸癌による死亡率が40~50%低いことが報告されたことから、がんの予防効果が明らかになった。また、大腸癌を誘導する家族性ポリポーシスのモデル動物では、COX2の阻害は大腸のポリープ形成を抑制することも報告されている。Tsujiiらにより¹⁵⁾、COX2強制発現大腸癌細胞ではPGE2やVEGF, bFGF, PDGFなどの血管新生促進因子の産生やヒト臍帯由来血管内皮細胞の遊走活性や管腔形成を亢進すること、これらは

COX2特異的阻害薬で濃度依存性に抑制されることが報告された。

炎症性サイトカインであるIL-1βがマウス角膜で著明に血管新生を誘導しCOX2阻害剤がほぼ完全に阻害すること、さらにプロスタノイドのうちPGE2やTXA2がとくに強く血管新生を誘導することなどを著者らのグループは報告している¹⁶⁾。IL-1βで誘導した血管新生に向かって遊走してくる炎症性細胞のなかに多数のマクロファージが観察され、COX2陽性であることも観察されている¹⁶⁾。さらに実験モデルマウスにおいて、血中のマクロファージを標的薬剤で除去すると、IL-1βによる血管新生が著明に減少することを観察している¹⁷⁾、図3に著者らが現在考えているモデルを示す。がんの間質における炎症性の血管新生を標的にしてCOX2やNF-κBやマクロファージなどを標的とした新しい抗血管新生治療戦略を考えていくことが大切と考えている。

おわりに

VEGFに対するモノクローナル抗体の臨床効果のニュースはこの分野で仕事をしてきた者が勇気

づけられるものであった。ただ、VEGF 抗体に効果があって VEGFR-1/VEGFR-2 の阻害剤に明らかな臨床効果が報告されなかったのはたいへん不思議に思われる。“がんの血管新生に VEGF の関与がどれだけかかわっているのでしょうか”という疑問とともに、“VEGF 抗体がリンパ管新生には影響しないのでしょうか”といった疑問なども生じてくる。がんの悪性形質の獲得に關与する血管新生の全体像を把握して、あらたな分子標的と治療戦略を探索していく努力が大切であろう。

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) 小野眞弓, 桑野信彦: 抗血管新生療法の現状. 医学のあゆみ, **194**: 817-823, 2000.
- 3) 今野弘之, 中村 達: 癌の抗血管新生療法. 医学のあゆみ, **194**: 824-828, 2000.
- 4) Warren, R. S. et al.: Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J. Clin. Invest.*, **95**: 1789-1797, 1995.
- 5) Hurwitz, H. et al.: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, **350**: 2335-2342, 2004.
- 6) Hu, L. et al.: Vascular endothelial growth factor immunoneutralization plus paclitaxel markedly reduces tumor burden and ascites in athymic mouse model of ovarian cancer. *Am. J. Pathol.*, **161**: 1917-1924, 2002.
- 7) Tong, R. T. et al.: Vascular normalization by vascular endothelial growth factor 2 blocked induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res.*, **64**: 3731-3736, 2004.
- 8) Coussens, L. M. and Werb, Z.: Inflammation and cancer. *Nature*, **420**: 860-867, 2002.
- 9) Marx, J.: Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science*, **306**: 966-968, 2004.
- 10) Karin, M.: Inflammation and cancer: the long reach of Ras. *Nat. Med.*, **11**: 20-21, 2005.
- 11) Greten, F. R. et al.: Ikk β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, **118**: 285-296, 2004.
- 12) Chen, F.: Endogenous inhibitors of nuclear factor- κ B, an opportunity for cancer control. *Cancer Res.*, **64**: 8135-8138, 2004.
- 13) Pollard, J. W.: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, **4**: 71-78, 2004.
- 14) Kuwano, M. et al.: The critical role of inflammatory cell infiltration in tumor angiogenesis—a target for antitumor drug development? *In: New Angiogenesis Research*. Nova Science Publ., New York, 2005, pp.157-170.
- 15) Tsujii, M. et al.: Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, **93**: 705-716, 1998.
- 16) Kuwano, T. et al.: Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J.*, **18**: 300-310, 2004.
- 17) Nakao, S. et al.: Infiltration of COX2-expressing macrophage is prerequisite for IL-1 β -induced neovascularization and tumor growth. *J. Clin. Invest.* (in press)

* * *

Estrogen-Mediated Post transcriptional Down-regulation of Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2

Yasuo Imai,¹ Etsuko Ishikawa,¹ Sakiyo Asada,¹ and Yoshikazu Sugimoto^{1,2}

¹Division of Molecular Biotherapy, Japanese Foundation for Cancer Research, Toshima-ku, Tokyo, and ²Department of Chemotherapy, Kyoritsu University of Pharmacy, Minato-ku, Tokyo, Japan

Abstract

Breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 mediates concurrent resistance to chemotherapeutic agents, such as 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), mitoxantrone, and topotecan, by pumping them out of cells. We previously reported that BCRP transports sulfated estrogens. In the present study, we show that at physiologic levels, estrogens markedly decrease endogenous BCRP expression in the estrogen-responsive and estrogen receptor α (ER α)-positive human breast cancer MCF-7 cells, but not in estrogen-nonresponsive human cancer cells. 17 β -Estradiol (E₂) also significantly reduces exogenous BCRP expression, driven by a constitutive promoter, in BCRP-transduced estrogen-responsive and ER α -positive MCF-7 (MCF-7/BCRP) and T-47D cells, but not in BCRP-transduced estrogen-nonresponsive MDA-MB-231 and SKOV-3 cells. E₂ potentiates the cytotoxicity of SN-38, but not vincristine, in MCF-7/BCRP cells significantly, and increases cellular topotecan uptake in MCF-7 and MCF-7/BCRP cells. Antiestrogen tamoxifen partially reverses E₂-mediated BCRP down-regulation in MCF-7 and MCF-7/BCRP cells and treatment of MCF-7/BCRP cells with an ER α small interfering RNA abolished E₂-mediated BCRP down-regulation, suggesting that interaction of E₂ and ER α is necessary for BCRP down-regulation. E₂ does not affect endogenous BCRP mRNA levels in MCF-7 cells or exogenous BCRP mRNA levels in MCF-7/BCRP cells. The results from pulse-chase labeling experiments with MCF-7/BCRP cells suggest that decreased protein biosynthesis and maturation, but not alterations in protein turnover, might underlie E₂-mediated BCRP down-regulation. These data indicate that estrogen down-regulates BCRP expression by novel posttranscriptional mechanisms. This is the first report of small molecules that can affect BCRP protein expression in cells and may therefore assist in establishing new strategies for regulating BCRP expression. (Cancer Res 2005; 65(2): 596-604)

Introduction

Breast cancer resistance protein (BCRP), also known as ABCG2, is a half-size ATP-binding cassette transporter with a molecular weight of 80 kDa (1–3). BCRP mediates concurrent resistance to chemotherapeutic agents, such as 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38, an active metabolite of CPT-11), mitoxantrone and topotecan, presumably by pumping these compounds out of the cell and thus lowering their cytotoxic effects (1–5). The expression

of BCRP in cancer cells may therefore be an important determinant of the efficacy of anticancer agents. We previously reported that estrone (E₁) and 17 β -estradiol (E₂) circumvent BCRP-mediated drug resistance and that BCRP transports sulfated estrogens as physiologic substrates (6, 7). In our present study, we have examined the possible effect of estrogens on BCRP expression in cancer cells.

The structure and characterization of the BCRP promoter has previously been reported (8). More recently, the identification of an estrogen response element in the BCRP promoter and an E₂-mediated increase in BCRP mRNA expression in T47D:A18 cells have been shown (9). These findings therefore suggested that estrogens might induce BCRP expression in estrogen-responsive cells.

In the present study, however, we show that BCRP expression is negatively regulated by estrogen at the protein level in MCF-7 and T-47D cells, both of which are estrogen responsive. In addition, we present data suggesting that estrogen down-regulates BCRP expression by posttranscriptional inhibition of protein biosynthesis. This is the first report showing that small molecules can modulate BCRP protein expression in cells and our findings provide new insights on the regulation of BCRP expression in the cell.

Materials and Methods

Reagents. The anti-BCRP mouse monoclonal antibody, BXP-21, was purchased from Chemicon (Temecula, CA) and the anti-*c-myc* mouse monoclonal antibody, 9E10, was obtained from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). PRO-MIX L-[³⁵S] *in vitro* Cell Labeling Mix (L-[³⁵S] Methionine > 1,000 Ci/mmol) was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, United Kingdom).

Cell Cultures. Human breast cancer cell lines MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, ovarian cancer SKOV-3 cells, and lung cancer A549 cells were maintained in DMEM supplemented with 7% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. MCF-7, A549, and MDA-MB-231 cell clones were established by a limiting dilution method. MCF-7 clone 3, A549 clone 8, and MDA-MB-231 clone 4 were used for further analyses. Hereinafter in the text of this report, MCF-7, A549, and MDA-MB-231 cells represent MCF-7 clone 3, A549 clone 8, and MDA-MB-231 clone 4, respectively, unless otherwise stated. T-47D cells were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD) and immediately used for the experiments. To investigate the effects of estrogens upon BCRP expression levels, cells were cultured in the absence or presence of the indicated concentrations of reagents for 4 days in phenol red-free (PRF)-medium containing 93% PRF-DMEM (Roche) and 7% charcoal/dextran-treated FBS (CDFBS; HyClone, Logan, UT).

Establishment of MCF-7/BCRP, T-47D/BCRP, MDA-MB-231/BCRP, and SKOV-3/BCRP Cells. MCF-7/BCRP, T-47D/BCRP, MDA-MB-231/BCRP, and SKOV-3/BCRP cells were established by transduction of MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, and SKOV-3 cells, respectively, with a HaBCRP retrovirus, bearing a myc-tagged human BCRP cDNA (10). Subsequent selection for the enrichment of transduced cells was done using 50 nmol/L

Requests for reprints: Yoshikazu Sugimoto, Department of Chemotherapy, Kyoritsu University of Pharmacy, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan. Fax: 81-35400-2669; E-mail: sugimoto-ys@kyoritsu-ph.ac.jp.
©2005 American Association for Cancer Research.

SN-38 for 5 to 10 days, with the exception of T-47D cells, which were selected using 24 nmol/L SN-38 for 13 days. The mixed populations of stably transduced cells that were generated by selection were used in subsequent experiments. The levels of myc-tagged BCRP protein in each transduced cell line were unchanged for at least 2 months.

Western Blot Analysis of BCRP. Cells were cultured in the absence or presence of the indicated reagent concentrations for 4 days in PRF-medium. Exponentially growing cells were harvested, washed, and lysed in T buffer [10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% Triton-X 100, 10 mmol/L MgSO₄, 2 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride] with or without 1 mmol/L DTT. After centrifugation, the cell lysates were solubilized with 2% SDS, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), in the absence or presence of 5% 2-mercaptoethanol and resolved by 5% to 20% SDS-PAGE. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, and blots were then incubated with either 5 µg/mL of the anti-BCRP mouse monoclonal antibody BXP-21 for detection of endogenous BCRP or with 10 µg/mL of the anti-*c-myc* mouse monoclonal antibody 9E10 for detection of exogenous BCRP. After washing, the blots were incubated with the anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham Pharmacia). Membrane-bound peroxidase was visualized on Kodak XAR film (Rochester, NH) after enhancement using a chemiluminescence detection kit (Amersham Pharmacia).

To see how soon the E₂-mediated BCRP down-regulation occurs in MCF-7 and MCF-7/BCRP cells, cells were cultured for 1, 2, 3, and 4 days in PRF-medium in the presence of 3 nmol/L E₂. The following procedure was the same as described above.

Western Blot Analysis of ERα. Cells (1.5 × 10⁵) were solubilized in sample buffer (62 mmol/L Tris, 2% SDS, 10% glycerol) and resolved by 5% to 20% SDS-PAGE. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, and blots were incubated with the anti-ERα monoclonal antibody, NCL-ER-6F11 (1:30 dilution). The ensuing procedure was the same as described for Western blotting of BCRP.

Cell Growth Studies. To investigate the mitogenic activity of E₂, exponentially growing MCF-7 or MCF-7/BCRP cells (3 × 10⁴/well) were seeded in a 12-well plates and cultured at 37°C in PRF-DMEM supplemented with the indicated concentrations of CDFBS and E₂ for 4 days. Cell numbers were then determined using a cell counter (Sysmex, Kobe, Japan), and presented as percentages relative to those of control cells cultured in PRF-medium. To investigate the effects of E₂ on anticancer drug resistance, the cells were cultured in PRF-medium supplemented with the indicated concentrations of E₂ for 4 days. The exponentially growing cells (3 × 10⁴) were then seeded in 12-well plates and cultured for a further 4 days in PRF-medium supplemented with the same concentration of E₂ used in the pretreatment, in the absence or presence of increasing doses of specific anticancer agents. Cell numbers were determined using a cell counter and presented as percentages relative to those of control cells cultured in the absence of anticancer agents. IC₅₀ values (drug dosages that cause 50% inhibition of cell growth) were determined from the growth inhibition curves.

Intracellular Topotecan Uptake in MCF-7 and MCF-7/BCRP Cells. The effects of E₂ on the cellular accumulation of topotecan were determined by flow cytometry. Cells were cultured in PRF-medium supplemented with the indicated concentrations of E₂ for 4 days. After trypsinization, cells (5 × 10⁵) were incubated with 20 µmol/L topotecan for 30 minutes at 37°C, washed in ice-cold PBS, and subjected to fluorescence analysis using FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). The data are representative of two independent experiments.

Effects of E₂ on BCRP Expression in MCF-7/BCRP Cells Following Small Interfering RNA-induced ERα Knockdown. Cells (2.5 × 10⁵/well) were cultured in PRF-medium in six-well plates for 24 hours and transfected with 100 nmol/L of small interfering RNA (siRNA; for ERα knockdown,

ESR1; for control, Luciferase GL3 Duplex, both obtained from Dharmacon, Lafayette, CO) using LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. To confirm subsequent ERα knockdown, the culture medium was exchanged with fresh PRF-medium 6 hours after transfection. After 48 hours, whole cell lysates of 1.5 × 10⁵ cells were subjected to Western blotting. ERα expression was detected with the anti-ERα antibody, NCL-ER-6F11. To investigate the effects of ERα knockdown on E₂-mediated BCRP down-regulation, the culture medium was exchanged with fresh PRF-medium containing the indicated concentrations of E₂, 6 hours after transfection. After 96 hours, cells were harvested and exogenous BCRP expression was determined by Western blotting.

Semi-quantitative Reverse Transcription-PCR Analysis of BCRP Expression in MCF-7 Cells. BCRP mRNA expression in MCF-7 cells was examined by reverse transcription (RT)-PCR. Cells (5 × 10⁵) were incubated in PRF-medium with various concentrations of E₂ for 4 days. Extraction of total RNA and subsequent RT-PCR were done using an RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) and an LA-RT-PCR kit (TaKaRa, Kyoto, Japan), according to the manufacturer's instructions, respectively. First-strand cDNA was synthesized with 0.3 µg of total RNA and a 315-bp BCRP cDNA fragment was amplified with the primers 5'-CAGGTGGAGGCAAACTCTTCGT-3' (forward) and 5'-ACACACCACGGATAAACTGA-3' (reverse). As an internal control, amplification of GAPDH mRNA (551 bp fragment) was carried out with the primers 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCGA-3' (forward) and 5'-GCTTACCACCTTCTTGAT GT-3' (reverse). The PCR conditions were as follows: 95°C for 9 minutes, then increasing cycle numbers of 95°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, and a final 15-min incubation at 72°C. Data are representative of two independent experiments.

Northern Blot Analysis of BCRP Expression in MCF-7 and MCF-7/BCRP Cells. Cells (5 × 10⁵) were incubated in PRF-medium with varying concentrations of E₂ for 4 days. Either 20 µg (MCF-7) or 10 µg (MCF-7/BCRP) of total RNA was fractionated on a 1% agarose-formaldehyde gel and transferred to Hybond-N+ (Amersham Pharmacia). The blot was hybridized at 42°C for 16 hours with a 456-bp fragment, from nucleotides 574 to 1029 of BCRP cDNA, which was ³²P-labeled with a High Prime Probe Labeling Kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. The membrane was thoroughly washed and exposed to Kodak XAR film for either 21 days (MCF-7) or 7 days (MCF-7/BCRP). The presented data are representative of two independent experiments.

Metabolic Labeling of BCRP in MCF-7/BCRP Cells. First, cells (1 × 10⁶/well for E₂-treated cells, respectively) were cultured in PRF-medium in six-well plates for 4 days in the absence or presence of 3 nmol/L E₂. After incubation in methionine- and cystine-free DMEM (Roche) supplemented with 7% CDFBS (labeling medium) for 1.5 hours just before beginning the experiment, the resulting 70% to 80% confluent cells were incubated in labeling medium, supplemented with 300 µCi/mL of [³⁵S], for 0.5 and 1 hour. The cells labeled for 1 hour were subsequently chased for an additional 3 hours. For E₂-pretreated cells, 3 nmol/L E₂ was present in the medium throughout the experiment. Cells were then harvested, lysed in T buffer without DTT, and centrifuged. The supernatant was supplemented with 1% of Triton-X and the protein concentration was measured by the Bradford method. Cell lysates (100 µg) were incubated with 0.5 µg of the anti-BCRP antibody, BXP-21, for 30 minutes on ice, and further incubated for an additional 30 minutes on ice after the addition of 5% (v/v) Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia). The immune complex precipitated with Protein A-Sepharose was then washed six times with wash buffer [10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride, 1% Aprotinin, 0.1% Triton-X 100], and the pellets were resuspended in 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5). The labeled protein was subjected to SDS-PAGE and autoradiographed. The relative rates of labeled BCRP after 4 hours in the presence of E₂ to the