

分子標的化学療法班報告

班長 西山正彦

研究班班員

西山正彦 広島大学原爆放射能医学研究所分子情報
 長町幸雄 群馬大学医学部第一外科
 浅尾高行 群馬大学医学部第一外科
 栗原 稔 昭和大学豊州病院消化器科
 山本 亘 昭和大学豊州病院消化器科
 峠 哲哉 広島大学原爆放射能医学研究所腫瘍外科
 金 隆史 広島大学原爆放射能医学研究所腫瘍外科

はじめに

固形癌，ことに消化器癌に対する化学療法の治療成績は未だ満足しうるものではない。新規抗癌剤の開発やさまざまな工夫も治療成績の改善にはなかなか結び付かず，試行錯誤の状態がつづいている。こうしたなか，従来の化学療法と一線を画す「分子標的治療」という新しい治療概念が芽生えてきた。治療成績の飛躍的な改善を望むには抗腫瘍効果の増強を目指すだけでなく，症例ごと腫瘍ごとの生物学的個体差への対応と殺細胞効果の腫瘍選択性の獲得が必要要件となる。分子標的化学療法とはそれらを現実のものとするために，癌に特徴的な分子を求め，それを標的に特異的な修飾を加え癌を治癒に導こうとする考え方である。本研究班の目的は，その消化器癌における治療モデルを確立することにある。

分子標的化学療法の研究は当然分子標的の索定とその修飾法の確立の二段階に分けられ，いかに

臨床上重要な分子標的を見出すかがその実現の鍵となる。抗癌剤には効くか効かないか，それを規定する因子が必ず存在する。本研究班では，消化器癌で現在広く用いられているあるいは今後効果が期待される薬剤5種類に絞り，薬剤ごとにもっとも重要な耐性因子（効果規定因子）を見出し，これを分子標的として治療モデルを導くことにした。平成9年度はその第一段階，すなわち有用な分子標的（抗癌剤のもっとも重要な効果規定因子）の同定に重点をおいて研究を進めた。

研究成果

抗癌剤耐性に関してはすでに多くの研究がなされている。170 KDの細胞膜P糖蛋白(GP-170)のように耐性への関与がきわめて明確に示された因子も少なくない¹⁾。しかしながら，その大半は長期間抗癌剤接触により生き残ったクローン（獲得耐性細胞）を用いた研究成果であり，そうした高度耐性細胞と臨床の実際とで因子の意義・重さに大きな差があるとの報告も少なくない²⁾。また，複雑な生命現象を単一因子で説明することにも無理がある。本研究は実際の治療を目指すものである。獲得耐性以外の耐性細胞を中心に広く認知されている耐性因子を網羅解析し，そのなかから抗腫瘍効果と深く関連する因子を数にこだわらず求めることとした。その結果を以下に示す。

1. 耐性因子解析細胞パネルの確立

解析に用いた腫瘍細胞のうち大腸癌 HCC-48, -50, 食道癌 HEC-46, 胃癌 HSC-42 の4株は化学療法が全く効を奏せずきわめて短期間で死亡した症例の腹水から樹立した本態性多剤耐性細胞である³⁾。耐性関連因子として、薬剤膜輸送系関連因子である多剤耐性随伴蛋白(MRP), GP-170 (*MDR1*), canalicular multispecific organic transporter (cMOAT), 薬剤活性・不活化関与因子として glutathione S-transferase (GST, *GSTπ*), NADPH/cytochrome P 450 reductase (P 450 red.), NADPH/quinone oxidoreductase (DTD, *NQO1*), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), 薬剤作用標的として thymidine synthase (TS), α , β -tubulin (type 1), topoisomerase I, II を選択し、遺伝子発現および生化学的解析を行った。

図1は遺伝子発現の、表1は生化学的定量的解析結果である。耐性因子に関し細胞ごとに異なった遺伝子発現や量・活性のパターンが示されている。すなわち、抗癌剤応答に関して異なった生物学的特性を有する実験細胞パネルが設定されたことになる。したがって、これら異なったレベルの各因子と抗癌剤による効果との関連性を詳細に検討することにより、効果規定因子の絞り込みが可能となった。

2. 抗癌剤耐性(効果)規定因子

解析対象抗癌剤は、マイトマイシンC(MMC), 5-フルオロウラシル(5-FU), シスプラチン(CDDP), 塩酸イリノテカン(CPT-11), ドセタキセル(TXT)とした。研究班が組織された時点でMMCとCPT-11についてはすでにかなり検討が進められており^{4,5)}、両剤についてはさらに多くの耐性因子解析を加え、結果の普遍性を確認することとした。

①マイトマイシンC(MMC)

MMCの効果と深く関連する因子は既報どおり DTDとGSTであった。他の因子との間には全く関連性がなかったが、図2のようにMMC耐性に対してDTD活性は負の、GST活性は正の関係に

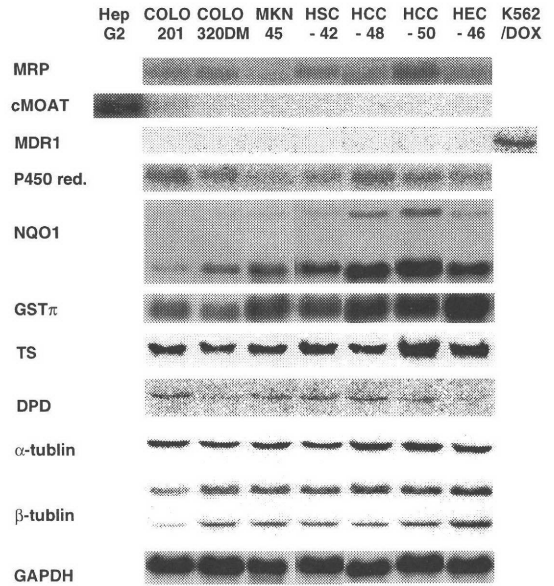


図1 Expressions of genes related to drug resistance.

あることが示された。統計学的相関関係が得られなかったことから、いずれも単独ではMMC耐性を説明することは困難と考えられた。しかしながら、両者の遺伝子発現比を検討すると、MMC感受性の高い細胞ではDTD遺伝子(*NQO1*)のみが発現し、細胞が耐性化するにつれ*NQO1*に対する*GSTπ*の発現比が高くなることが明らかとなった。DTDによる還元活性化とGSTによる不活性化の引き合いによりMMCの効果が決定されると考えられる。DTDのpH依存性代謝、エタクリン酸のGST活性阻害を利用した実験によってこの仮説が正しいことが証明されている。MMCの効果は低いpHすなわちpH6の条件下で最大となり、エタクリン酸併用によるGST活性の阻害もMMC効果を有意に増強した。

DTD, GSTはおのおの活性化, 不活化を担うMMCの効果規定因子であり、その特異的修飾はMMC効果増強をきたす。両者はMMCを用いた化学療法の有用な分子標的と結論した。

②5-フルオロウラシル(5-FU)

5-FUのもっとも重要な耐性(効果規定)因子はDPDと考えられた(図3)⁶⁾。しかしながら、すべての細胞で3-cyano-2,6-dihydroxypyrimidine

表1 Activities of probable enzymes involved in drug resistance and glutathione (GSH) content in human gastrointestinal cancer cells

	Enzymic activity				GSH Content (nmoles/mg protein)
	DPD (nmoles/hr/mg protein)	P 450 red. (nmoles/min/mg protein)	DTD (nmoles/min/mg protein)	GST (nmoles/min/mg protein)	
COLO 201	2.5±0.9	4.6±0.2	12± 2	118±14	13.8±2.9
COLO 320 DM	1.1±0.3	4.9±0.3	11± 2	113±20	15.2±0.8
MKN 45	2.8±0.4	4.3±0.3	210±39	69± 8	13.6±2.1
HSC-42	2.9±0.6	4.7±0.2	75±14	168±47	12.9±0.2
HCC-48	1.8±0.2	4.5±0.5	90±17	202±44	11.7±4.2
HCC-50	4.0±0.5	5.2±0.2	79± 8	180±37	13.9±3.6
HEC-46	0.5±0.3	3.3±0.4	86±16	182±36	12.0±0.7

DPD, dihydropyrimidine dehydrogenase ; P 450 red., NADPH/cytochrome P 450 reductase ; DTD, NADPH/quinone oxidoreductase ; GST, glutathione S-transferase

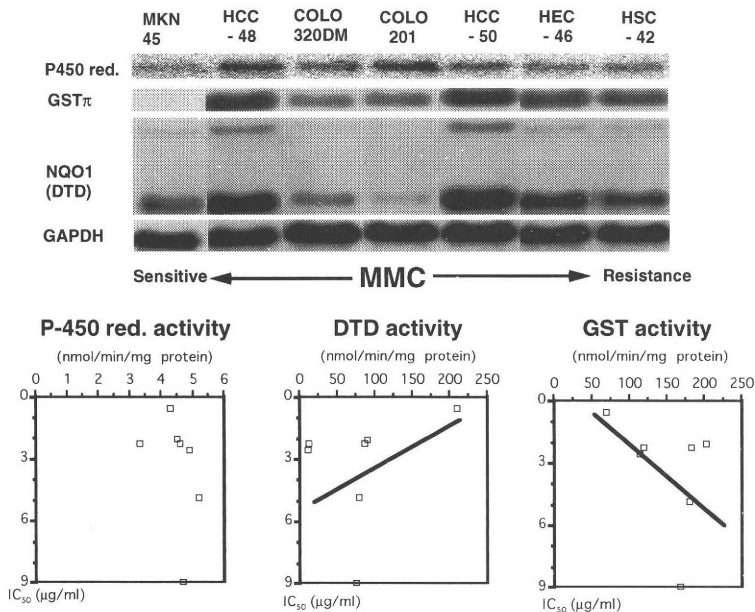


図2 Critical determinants of mitomycin C activity.

(CNDP)により活性阻害が5-FU感受性が増強するものの、DPD活性・遺伝子発現と5-FU効果の相関性は消化器癌細胞のみに認められ、白血病細胞 K 562 や K 562/DOX, 鼻咽腔癌 KB などを含めると両者の相関性は認められなくなった (図3)。DPDの5-FU耐性への関与は明らかであるが、おそらく臓器、組織によってDPDの細胞内レベルは大きく異なると思われる。その効果規定因子としての意義を明らかにするため、現在DPD

の生体内組織分布およびthymidine synthase (TS)との意義・重さとの比較を行っている。

③シスプラチン(CDDP)

CDDPのもっとも重要な耐性(効果規定)因子はGSTと考えられた。図4に示すように、唯一GSTπの遺伝子発現レベル、酵素活性のみがCDDPの耐性度とよく相関した。また、エタクリン酸によるGST活性阻害実験でCDDPの効果が増強することが確認されたことから、GSTは

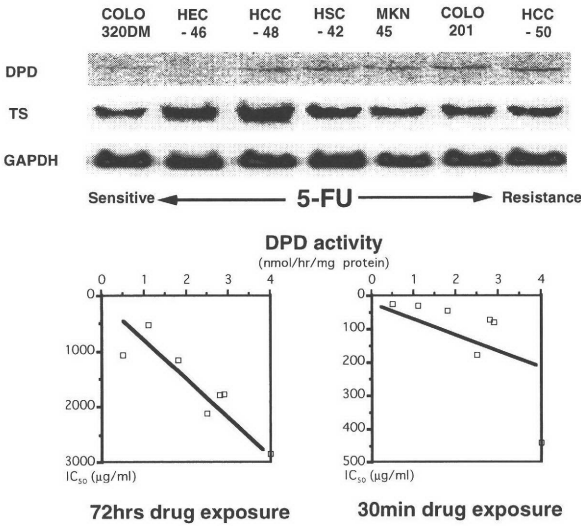


図 3 Critical determinant of 5-fluorouracil activity.

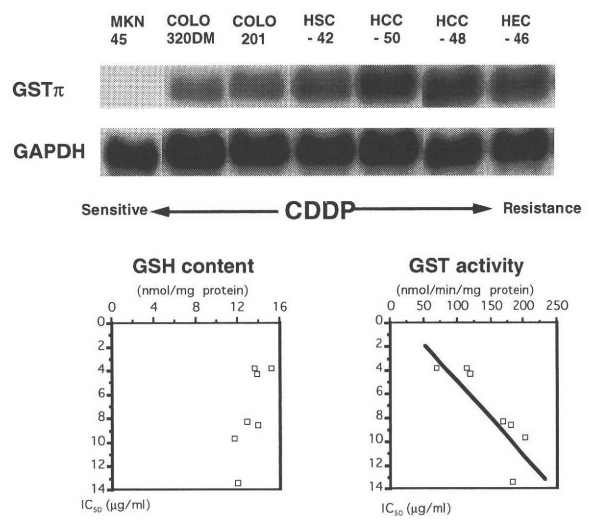


図 4 Critical determinant of cis-DDPlatinum activity.

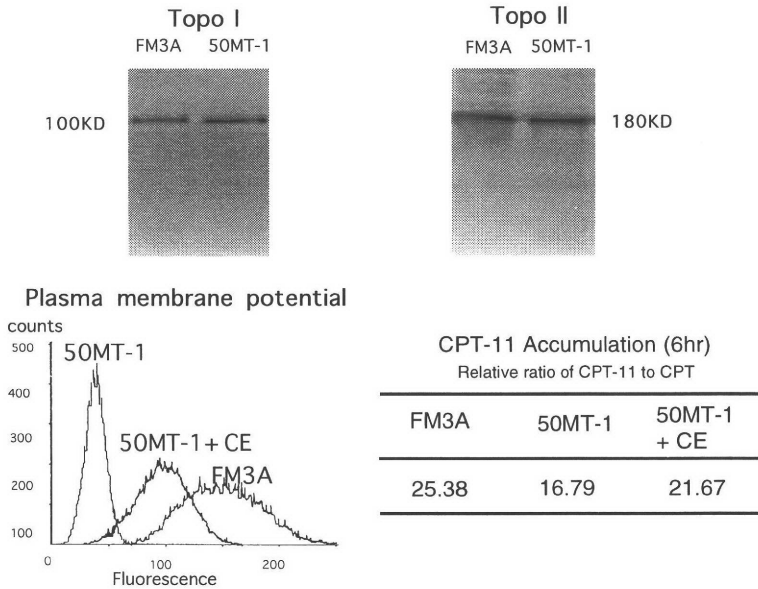


図 5 Critical determinant of camptothecin (CPT-11) activity.

CDDP 効果増強のもっとも有用な分子標的と考えられた。

④塩酸イリノテカン (CPT-11)

細胞膜電位差がもっとも CPT-11 の耐性・効果に深く関連する因子と考えられた(図 5)。CPT-11 の効果は作用標的である Topo I の活性、レベルとも相関せず、候補とした既知の因子のなかから

その耐性規定因子を同定することはできなかった。CPT-11 獲得耐性細胞系でも、耐性細胞内薬剤濃度の低下を除き、Topo I, II, GP-170 をはじめ、広く知られる耐性関連因子の発現、活性に差は認められなかった。唯一、細胞内薬剤濃度の低下を伴う CPT-11 耐性を説明できたのが細胞膜電位差の相違であった⁵⁾。

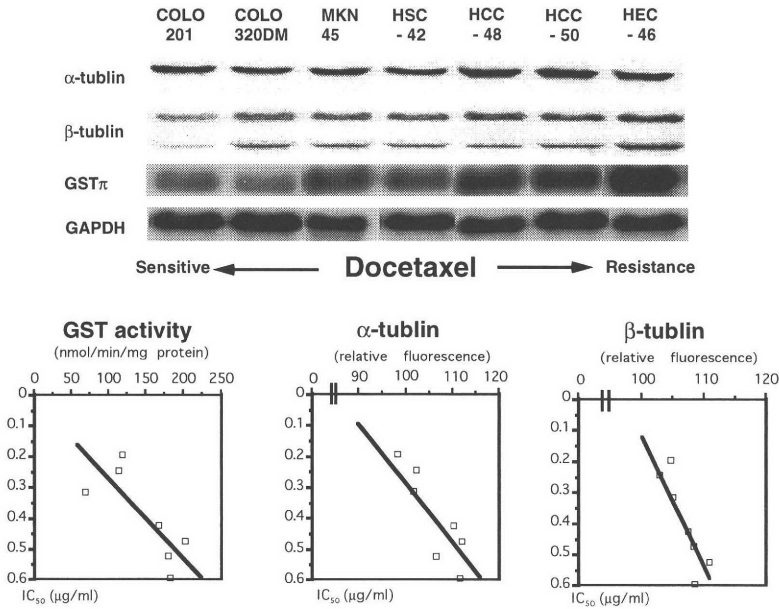


図 6 Critical determinants of docetaxel activity.

細胞膜電位差は生体内で陽性荷電する薬剤の膜受動輸送にかかわり、耐性細胞は電位差が低いため膜移行薬剤量が減少すると考えられている。実際、CPT-11 感受性親株と耐性細胞の細胞膜電位差には著明な差が認められた。また、セファランチンにより耐性細胞の膜電位差を増大させると CPT-11 の細胞内薬剤濃度は増加し抗腫瘍効果が増強することも示された。

しかしながら、その責任遺伝子も細胞膜電位差を規定する細胞内分子も解明されていない。治療前個別診断にはそれらの同定が不可欠である。また、耐性（効果規定）因子としての普遍性を評価するためにもその詳細な解明が必要である。現在、責任遺伝子のクローニングを行っている。

⑤ドセタキセル(TXT)

TXT の抗腫瘍効果規定因子は、細胞の tublin 量, GST, 膜 P 糖蛋白(GP-170, *MDR1*), と考えられた。図 6 上段に示すように、 α , β -tublin (type 1), あるいは *GST π* の高発現細胞ほど TXT に対して高度耐性であった。Flow cytometry で解析した α , β -tublin 量, および GST 活性も IC 50 値と有意に相関した。DOX 獲得高度多剤耐性細胞 (K 562/DOX) では *MDR1* の過剰発現が認められ、

TXT に対しても高度耐性であった。GP-170 はなんらかの形で TXT 耐性にかかわっている。しかしながら、図 6 に示すような非獲得性耐性ヒト消化器癌細胞では GP-170 の過剰発現は認められず、消化器癌の臨床では tublin 量, GST, その相互関係がより重要な意味をもつものと考えられる。また、エタクリン酸による GST 活性阻害により TXT の効果が有意に増強されることも確認された。

おわりに

消化器癌分子標的的化学療法の標的を抗癌剤耐性(効果規定)因子に求めた。その結果、① MMC では DTD と GST, ② CDDP では GST, ③ TXT では細胞の tublin 量と GST, が抗腫瘍効果を規定し、有用な標的となりうる事が明らかとなった。今後の詳細な検討が必要であるが、④ 5-FU では DPD, ⑤ CPT-11 では細胞膜電位差, がおのおの耐性(効果)に深くかかわっていることも示された。いずれもがなんらかの新知見を含む研究成果である。

また、各抗癌剤ともにそれら耐性(効果規定)

因子の機能的意義をみるために行った活性の阻害あるいは促進実験で抗腫瘍効果が増強されること示された。治療に直訳可能な結果であり、平成10年度にはこれらをまとめ具体的な分子標的治療のプロトコールを設定できると考えている。

文 献

- 1) 鶴尾 隆, 富田章弘. 薬剤耐性. これだけは知っておきたい癌治療の知識(阿部令彦監修), 篠原出版, 392-400, 1997.
- 2) Kim R, Hirabayashi N, Nishiyama M, Saeki T, Toge T, Okada K. Expression of MDR1, GST-pi, and topoisomerase II as an indicator of clinical response to adriamycin. *Anticancer Res*, 11 : 429-432, 1991.
- 3) Yanagihara K, Ito A, Toge T, Numoto M. Anti-proliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res*, 53 : 5815-5821, 1993.
- 4) Nishiyama M, Suzuki K, Kumazaki T, Yamamoto W, Toge T, Okamura T, Kurisu K. Molecular targeting of mitomycin C chemotherapy. *Int J Cancer*, 72 : 649-656, 1997.
- 5) Aogi K, Nishiyama M, Kim R, Hirabayashi N, Toge T, Mizutani A, Okada K, Sumiyoshi H, Fujiwara Y, Yamakido M, Kusano T, Andoh T. Overcoming CPT-11 resistance by using a biscolaurine alkaloid, cepharanthine, to modulate plasma membrane potential. *Int J Cancer*, 72 : 295-300, 1997.
- 6) Fischel JL, Etienne MC, Spector T, Formento P, Renee N, Milano G. Dihydropyrimidine dehydrogenase : A tumoral target for fluorouracil modulation. *Clin Cancer Res*, 1 : 991-996, 1995.