

分子標的薬の作用メカニズムと腫瘍細胞の個性

山 田 尚

東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所分子遺伝学研究部

SENSITIVITY TO MOLECULAR TARGETED DRUGS AND VARIATION OF CANCERS

Hisashi YAMADA

*Department of Molecular Genetics, Institute of DNA Medicine,
The Jikei University School of Medicine*

A better understanding of carcinogenesis has markedly changed cancer therapy. A representative advance is the appearance of molecularly targeted drugs that directly alter oncogenic signal pathways in cancer cells rather than cause random DNA damage as do conventional drugs. Investigating tumor characteristics is important to improve the efficacy of molecularly targeted drugs, which are intended to directly interrupt specific oncogenic signals. My colleagues and I have been studying the relationship between the molecular characteristics of cancer cells and their susceptibility to anticancer agents to improve treatment efficacy and reduce adverse effects. We have recently found that the effects of imatinib mesylate on tumor cell growth and differentiation are influenced by the activation status of the mitogen-activated protein kinase pathway. This finding suggests that a molecularly targeted drug must harmonize with conditions of critical signal pathways in cancers to have strong anticancer activity. If a pathway is altered, the drug may no longer be effective against the cancer. Moreover, molecularly targeted drugs, such as histone deacetylase inhibitors, that alter the transcription machinery may create drug resistance by changing the expression of genes, such as multidrug resistance gene 1. These findings demonstrate that studying variations in cancer cells before treatment is important for improving the efficacy of molecularly targeted drugs. Cooperation between research and clinical medicine is needed to treat patients in a multidisciplinary medical center.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2006; 121: 105-18)

Key words: molecularly targeted drug, signal transduction, imatinib mesylate, histone deacetylase inhibitor, drug resistance

I. はじめに

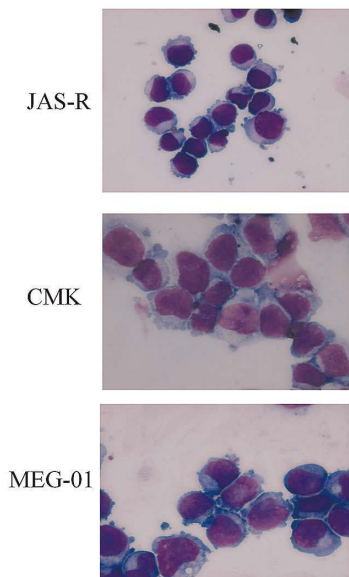
近年、細胞の増殖や分化に関する研究が進み正常細胞の腫瘍化に至る経路が詳細に明らかになりつつある。これに伴い抗腫瘍薬の開発が従来の DNA 損傷を誘導するタイプから、DNA 複製を含めた増殖にいたる情報伝達系の遮断へと変化してきている。このことは、従来型の抗腫瘍薬を用いた治療が腫瘍細胞の個性にさほど影響を受けな

かったこととは異なり、腫瘍細胞の個性こそが分子標的薬による治療の成否を決定する重要な要素となることを示している。そこで、腫瘍細胞の分子生物学的な特徴が抗腫瘍薬の効果にどのように影響するかを検証する。

II. 腫瘍細胞の個性

はじめに、腫瘍細胞の個性について考える。形態学的に識別できない腫瘍細胞間においても、分

子生物学的相違が著しく大きいことを示す。ここでは、我々が樹立した急性巨核芽球性白血病細胞株 JAS-R でその違いを示す¹⁾。ここに示す3つの細胞株はいずれも急性巨核芽球性白血病に分類されるもので、各細胞株の相違をメイ・ギムザ染色標本で指摘することは容易ではない (Fig. 1)。また、Table に示すように白血病細胞の表面マーカーによってその違いを明確に示すことも困難である。そこで、microarray を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、クラスター解析を行った。遺伝子発現パターンから、それぞれの白血病細胞の特性に大きな違いがあることが判明する (Fig. 2)。ここに示してある K562 と KU812 細胞は慢性骨髄性白血病の急性転化に由来する培養細胞株であり、その系統は巨核球・赤芽球系ではあるが、より赤芽球系への分化が決定づけられている細胞株である。MEG-01 も慢性骨髄性白血病の急性転化に由来するが、この細胞はより巨核芽球の性格が強い細胞株である。CMK は急性巨核芽球性白血病細胞株であり慢性骨髄性白血病で見られる ph^1 染色体は持っていない。各細胞株の上段に記してある系統図は性格がより近似しているかを示すも



Megakaryocytic leukemias

Fig. 1. Light microscopy of the megakaryocytic cells. Cells were stained using May-Grünwald-Giemsa (original magnification $\times 1,000$).

Table. Surface markers of each cell line

Antigen	Cell Lines		
	JAS-R	CMK	MEG-01
CD1	0.8	1	1.5
CD2	1.5	1.1	1.8
CD3	0.9	1.3	1.3
CD4	22	15.7	2.8
CD5	0.9	1.4	1
CD7	40.3	40	1.3
CD8	0.6	1.2	1.4
CD10	0.5	1.3	1.3
CD19	0.3	0.6	0.9
CD20	1	1.1	1.1
CD13	55.8	98.1	81.3
CD14	0.6	1.1	1.2
CD33	99.8	99.6	58.5
CD34	5.4	33.5	1.4
CD41	95.9	98.5	77.5
CD42b	1.1	2.7	0.7
CD56	2.2	1.5	17.9
CD61	90.7	96.9	86.5
GP-A	11.3	14.3	1.7
HLA-DR	93	1	1.3



Fig. 2. Microarray analysis of five cell lines. The result of cluster analysis is demonstrated. JAS-R cells had an expression profile distinct from other cells. (reprinted from ref. 1)

のである。一見して、JAS-R 細胞はここに示した 5 つの細胞株の中でもその性格が他の 4 つの細胞株とは大きく異なっていることが明瞭である。このような個性の相違が抗腫瘍薬に対する反応性に影響するであろうことは想像に難くない。

III. 在来型抗腫瘍薬の特徴と腫瘍細胞の個性

分子標的薬に話を進める前に、在来型の抗腫瘍薬について検討を加えてみる。Fig. 3 に在来型の抗腫瘍薬を列記する。多くの薬剤は直接的に核酸合成や DNA 複製を阻害したり、核内 DNA に直接的損傷を惹起するものである。この性質から、在来型抗腫瘍薬の大きな問題点の一つにその作用の非選択性を挙げることができる。Fig. 4 は腫瘍細胞に放射線を照射した場合の DNA 二重鎖切断を示している。放射線照射直後に 2.2 Mb の DNA 断片が出現している²⁾。基本的に、生体では照射されたすべての細胞においてこのような二重鎖 DNA 切断が誘導されている。これは、逆に考えると薬剤としての長所となるが、多くの場合は副反応でその短所が強調される。DNA 自体が最終的な標的であれば、抗腫瘍効果を期待した併用療法における副反応も相加相乗的に出現することになる。

我々は在来型の抗腫瘍薬の一つとして DNA Topoisomerase II 阻害薬である etoposide の殺細胞効果について検討してきた^{3,4)}。その結果、etoposide が腫瘍細胞の遺伝子発現に大きな変化を与えていることが判明したが、腫瘍細胞の個性もその効果に影響を与えていると考えた。そこで、腫瘍遺伝子 c-Myc とテロメアの維持に重要な働きをしているテロメラーズの触媒遺伝子である hTERT を例に、在来型抗腫瘍薬による腫瘍細胞

に対する殺細胞効果への影響を検討した。c-Myc は転写因子型の腫瘍遺伝子で肺癌や乳癌など多くの腫瘍において増幅により活性化されている遺伝子である。K562 細胞に c-Myc を異所性に導入し

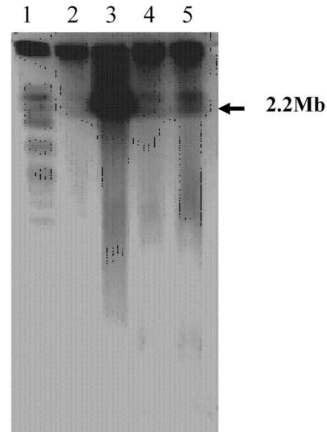


Fig. 4. DNA double strand breaks by irradiation. Breaks were immediately repaired. 1; marker, 2; control, 3; immediately after irradiation, 4; 24 h after irradiation, 5; 48 h after irradiation. (reprinted from ref. 2)

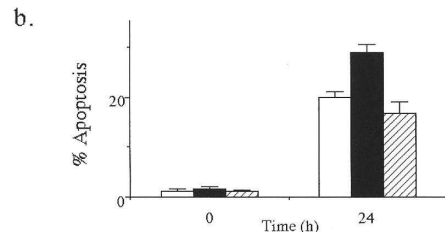
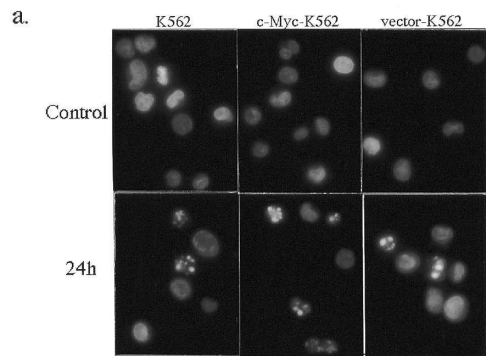


Fig. 5. Apoptosis by etoposide in c-Myc overexpressing K562 cells. The cells were treated with 200 μ M of etoposide for 24 h, and stained with PI and Hoechst 33342. Apoptosis was induced statistically significantly in c-Myc-K562 cells. open column; control, black column; c-Myc-K562, hatched column; vector. (reprinted from ref. 5)

Conventional chemotherapeutic agents

- Folate antagonists
- Pyrimidine and purine antimetabolites
- Alkylating agents
- Platinum antitumor compounds
- Anthracyclines and DNA intercalators
- DNA topoisomerase II inhibitors
- DNA topoisomerase I inhibitors
- Vinca alkaloids and taxanes
- Asparaginase
- Interferon

Fig. 3. Conventional chemotherapeutic agents.

て c-Myc の過剰発現細胞 (c-Myc-K562) を作成した。この細胞を用いて DNA topoisomerase II 阻害薬である etoposide の抗腫瘍効果を検討した⁵⁾。予想に反して、c-Myc-K562 細胞は親株に比べて、etoposide に対する感受性が亢進していた (Fig. 5)。腫瘍遺伝子 c-Myc の発現が強いほど etoposide に対する感受性が亢進しているわけであるから、一見すると矛盾に満ちた結果である。しかし、我々の研究を含めて複数のグループから c-Myc は細胞周期の抑制遺伝子である p21^{CIP1} の発現を抑制していることが報告された⁵⁾。p21^{CIP1} の発現は障害を受けた腫瘍細胞にとっては修復のための時間稼ぎとなり、細胞死から逃れる機会が増える結果になっているものと考えられる。

テロメアは染色体末端の DNA・タンパク質複合体で、その短縮は染色体の不安定性を惹起する。通常の体細胞ではテロメア長は DNA 複製に伴い短縮する⁶⁾。テロメア長の維持にはテロメラーゼという RNA を鋳型とした DNA 合成酵素の働きが必要である。このテロメラーゼ触媒活性を有するタンパク質が hTERT である。テロメラーゼ活性は通常の体細胞では認められないが生殖細胞や幹細胞ではその活性が維持されている。しかし、多くの腫瘍細胞はテロメラーゼ活性を有している。はじめに、我々は腫瘍細胞の増殖を抑制する濃度の抗腫瘍薬がテロメラーゼ活性に影響を与えているかを検討した。通常量の抗腫瘍薬ではテロメラーゼ活性はほとんど影響を受けなかった⁷⁾。そこで、テロメア・テロメラーゼ活性と薬剤の感受

性を検討するために、hTERT を導入した K562/hTERT 細胞を作成した⁸⁾⁻¹⁰⁾。この細胞ではテロメラーゼ活性の亢進とともにテロメア長が親株の 3 倍に伸長していた (Fig. 6)。この細胞を用いて様々な抗腫瘍薬の殺細胞効果を比較検討した。K562/hTERT 細胞では親株に比べて etoposide を含む二重鎖 DNA 切断に対する抵抗性が増していた (Fig. 7)。しかし、代謝拮抗薬や DNA polymerase 阻害薬によって誘導されるアポトーシスに対する抵抗性は認められなかった。最近の研究では DNA 修復に関連するタンパク質の一部

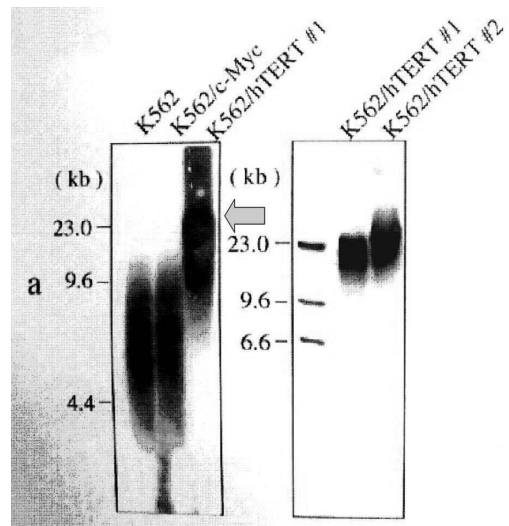


Fig. 6. Telomere length in hTERT ectopically expressing cells. Telomeres were elongated three to four times in hTERT introduced K562 cells. (reprinted from ref. 9)

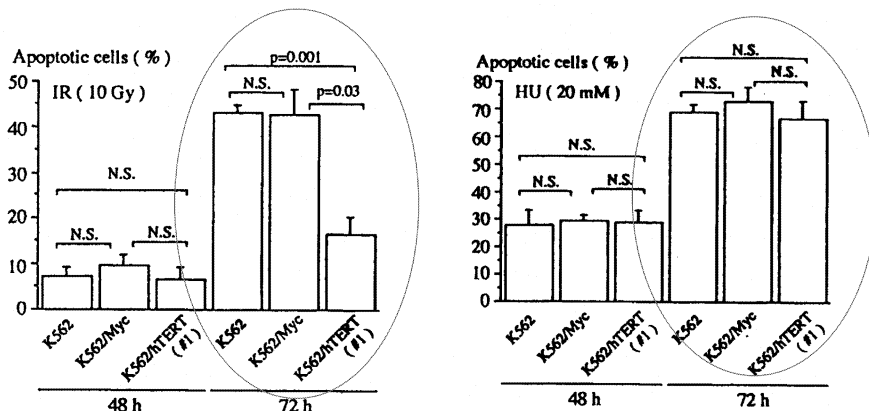


Fig. 7. Analysis of apoptosis in hTERT transfected cells. hTERT transfected cells showed resistant for irradiation-induced apoptosis, but not for hydroxyurea. (reprinted from ref. 9)

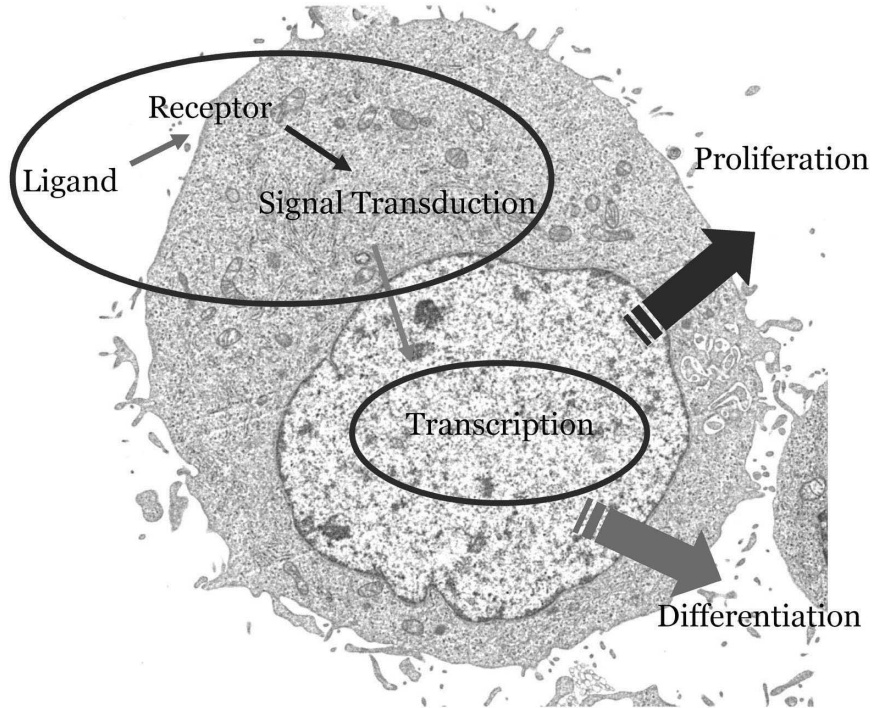


Fig. 8. Schematic drawing of signal transduction and biological responses.

がテロメアを構成していることが判明している。この点からもテロメア長・テロメラーゼ活性が二重鎖DNA損傷に対する抵抗性を付与しているのかもしれない。

この様に、腫瘍細胞の薬剤感受性については在来型の抗腫瘍薬においても、腫瘍細胞に内在する遺伝子活性化状態によって感受性が異なるのである。

IV. 悪性腫瘍治療薬としての分子標的薬

分子標的薬での腫瘍細胞の個性と薬剤感受性との関連は如何であろうか。ここでは悪性腫瘍治療薬としての分子標的薬を腫瘍細胞（正常細胞も含めて）の分化や増殖に直接的に結びつくような情報伝達を担うタンパク質の機能を修飾する薬剤と定義する (Fig. 8)。通常、細胞は増殖因子や細胞間の接着を通して刺激を受けている。この刺激は様々な種類の受容体によって受け取られ、細胞質にその刺激が送り込まれる。細胞質内では mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系や phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 系などの情報伝達系を介して受容体からの刺激を核に伝

Receptor tyrosine kinase inhibitors	VEGF-R, FLT-3, EGF-R (Gefitinib), HER2(herceptin)
Signal transduction inhibitors (Kinase inhibitors)	Non-Receptor Tyr-kinase (Imatinib mesylate)
	Ras (Lonafarnib)
	MAPK,
	PI3-K/AKT (LY294002)
Protease inhibitors	Hsp90, Proteasome (Bortezomib)
Transcription modulators	DNA Methylation (5-Azacytidine), HDAC (FK228)
Cell cycle inhibitors	Cdk, Mitosis
Antibody	CD20 (Rituximab)
	CD33

Fig. 9. Representative molecular targeting drugs.

達する。通常、この伝達はタンパク質リン酸化酵素によって担われている。最終的には転写因子が活性化を受け、情報の目的や種類に応じて標的となる遺伝子の転写が引き起こされ、細胞分裂や分化、細胞死の誘導などが惹起される。この様な情報の伝達に関与するタンパク質を標的とする低分子化合物、もしくは抗体などを悪性腫瘍の治療における分子標的薬と位置づけている。Fig. 9に代表的な分子標的とそれらに対する化合物もしくは抗体を示してある。

V. 慢性骨髄性白血病治療薬 Imatinib mesylate

代表的分子標的薬としての imatinib mesylate (開発名 STI571, 商品名 Gleevec) について考えてみたい。Imatinib mesylate は慢性骨髄性白血病の病因遺伝子産物である Bcr-Abl 融合たんぱく質を標的とする化合物である。もともと Abl は Src ファミリーに属する非受容体型チロシンキナーゼである。通常は細胞質に存在するが、活性型 Abl は核に移行して転写に重要な働きを担っている。Abl 遺伝子は 9 番染色体上にあり、これが 22 番染色体上の Bcr 遺伝子との間で相互転座を起し、Bcr-Abl 融合遺伝子を形成する。この融合タンパク質は細胞質内に留まり signal trans-

ducer and activator of transcription (STAT) 系, PI3K 系および MAPK 系に恒常的な増殖シグナルを発信し, 造血細胞の増殖を誘導して慢性骨髄性白血病の発症にいたる (Fig. 10, 11)。Imatinib mesylate は Abl の ATP 結合部位に ATP と競合する形で結合し, Bcr-Abl からの増殖シグナルを抑制する (Fig. 10)。我々は Bcr-Abl 融合遺伝子の標的である 3 つの情報伝達系のうち, MAPK 系に注目して, imatinib mesylate の効果がどのように修飾されるかを検討した。MAPK 系は受容体からの情報を低分子量 G タンパク質 RAS を介して受け取り, セリン・スレオニンキナーゼである RAF を介して MEK, ERK へのリン酸化反応を通して情報を伝達する。最終的には核内で転写因子を活性化し, 遺伝子発現を介して細胞増殖を調節している (Fig. 11)。

我々は慢性骨髄性白血病細胞株 K562 細胞を用いて実験を行った。K562 細胞は様々な刺激によって赤芽球系に分化することが知られているので, はじめに STI571 が K562 細胞を赤芽球系へと分化できるかを検討した。対照としてはすでに K562 細胞を赤芽球系に分化することが知られている herbimycin A を用いた¹¹⁾。赤芽球系への分化の指標は benzidine の陽性率および flow cytometry による glycoprotein A の陽性率から判定した。STI571 は herbimycin A よりも強い赤芽球への分化誘導能を示した¹²⁾ (Fig. 12A-C)。我々は herbimycin A による赤芽球系への分化誘導に際して cyclin D1 が一過性に抑制されることを見出している¹¹⁾。そこで, cyclin D1 の上流に位置する ERK の活性化を検討した。ERK の活性は STI571 処理直後より強く抑制されており, 12 時間で一過性に軽く抑制は解除されるが 24 時間では再び強く抑制されることが観察された (Fig. 12D)。STI571 処理による K562 細胞の赤芽球系への分化が Bcr-Abl 由来の MAPK 系を介した情報伝達系の抑制によっているかをさらに確認するために, ERK の活性化をその上流で調節しているタンパク質 MEK の活性を修飾することで検討した (Fig. 13)。MEK の 2 カ所のセリンをアスパラギン酸に置換し, 恒常的に活性化状況にある MEK を K562 細胞に導入した K562/MEK を作成した。この細胞を用いて, STI571 で分化誘導を

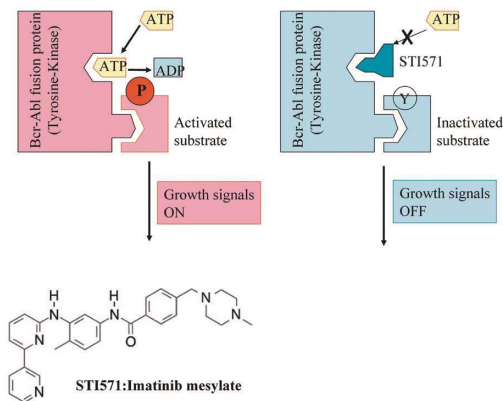


Fig. 10. Molecular structure of imatinib mesylate and the mechanism of inactivation of Bcr-Abl fusion protein.

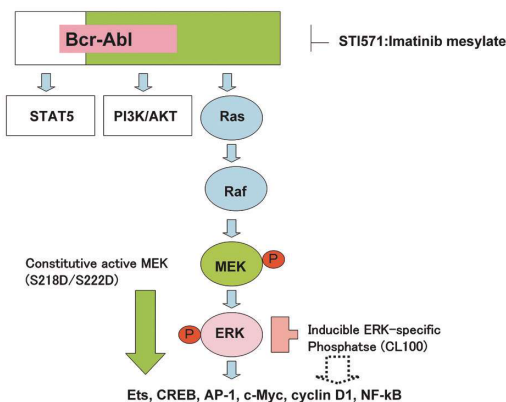


Fig. 11. Bcr-Abl fusion protein and signal pathways. Bcr-Abl fusion protein constitutively stimulates three major signal pathways. One of the signals is transmitted through MAPK system by phosphorylation of kinases.

STI571 Induced Erythroid Differentiation

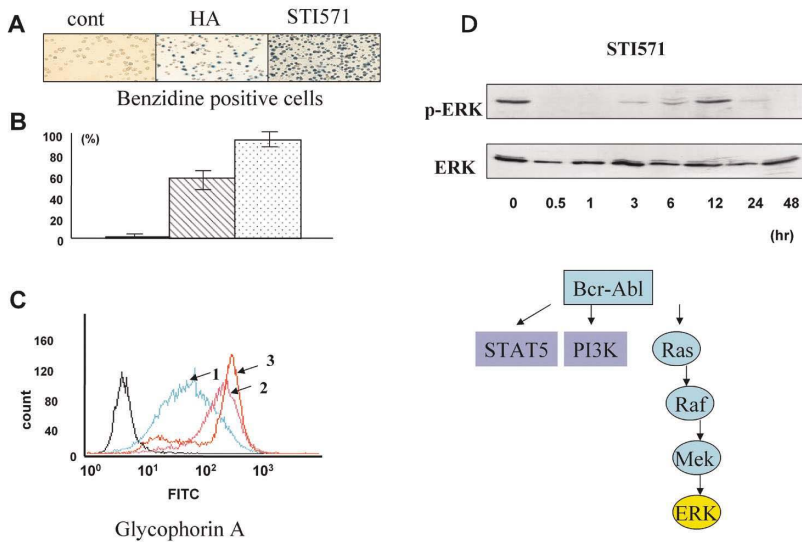


Fig. 12. Imatinib mesylate induces erythroid differentiation of K562 cells. A and B: Cytochemical analysis of benzidine-positive cells. K562 cells were treated with 800 nM of herbimycin A (HA) or 250 nM of imatinib mesylate (STI571) for 48 h, and cells were stained with benzidine. C: Flowcytometric analysis of glycophorin A. 1; control, 2; HA treated cells, 3; STI571 treated cells. D: STI571 inactivates ERK activity. (reprinted from ref. 12)

Activated-MEK1 blocks STI571-induced Erythroid Differentiation

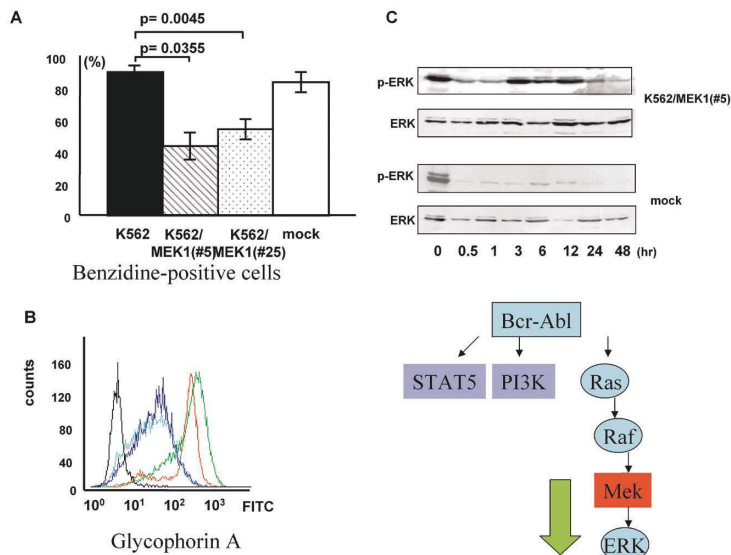


Fig. 13. Activated MEK1 transfected cells were resistant to STI571 induced erythroid differentiation. Erythroid differentiation was studied by benzidine-staining (A) and flow cytometry (B). C: Alteration of ERK activation during STI571 treatment in activated MEK1 transfected cells. (reprinted from ref. 12)

惹起すると、親株に比べて赤芽球系への分化誘導は明らかに抑制された (Fig. 13A, B). また、ERK の活性化を検討すると、親株では前述の実験と同様に早期よりその活性は抑制されているが K562/MEK においてはその抑制は軽度であった¹²⁾ (Fig. 13C). さらに、MEK/ERK の働きを確認するために、ERK の活性を外来性に抑制できる系を作成した。すなわち、ERK の活性化を抑制する phosphatase (CL100) の誘導可能な K562 細胞系を作成した。この系では IPTG を添加すると、ERK 特異的な phosphatase が誘導され、ERK 活性を抑制できる。この系では STI571 による K562 細胞の赤芽球系への分化が IPTG の投与によって非投与細胞に比べて強く誘導できることが判明した¹²⁾。

これらの結果より、STI571 によって誘導される赤芽球系への分化に Bcr-Abl 融合タンパク質由来のシグナル中でも MAPK が大きな働きを担っていることが判明した。MAPK 系の下流には cyclin D1 や c-Myc が存在するがこれらのタンパク質は分化誘導に影響を及ぼすのであろうか。そこで、K562 細胞にこれらの遺伝子を異所性に導入した細胞株、K562/D1 および K562/Myc を作成した。これらの細胞を用いて、STI571 で分化を誘導した。その結果、これらの細胞株では親

株に比べて明らかに STI571 による赤芽球系への分化に対して抵抗性を示した (Fig. 14)¹³⁾。このことは MAPK 系下流で K562 の赤芽球系への分化に対して抑制的に関与している標的遺伝子の一部が c-Myc や cyclin D1 遺伝子であることを示している。

この様に、分子標的薬の効果は標的遺伝子の活性化状態のみならず、標的遺伝子が関与する情報伝達系の状況に応じて、その効果が大きく左右されるものであることがわかる。このことは将来的に、分子標的薬の治療効果を増強させるための治療法の開発に際して極めて重要な点である。

VI. 白血病幹細胞

血球の産生は造血幹細胞からの増殖と分化によって調節されている。最近、白血病を含めた悪性腫瘍に関しても幹細胞の概念が導入されその存在が証明されつつある (総説 14 参照)。白血病細胞の病因となる遺伝子変異には大きく分けて二つの種類が存在する。一つは、相互転座に関する遺伝子異常に基づくもので、これらの変化に関与する遺伝子の多くは、転写やクロマチンの構造に関連した遺伝子である。他の、遺伝子異常としては情報伝達系に関する遺伝子である。本来、白血病細胞は上皮性腫瘍に比べるとその遺伝子異常は少

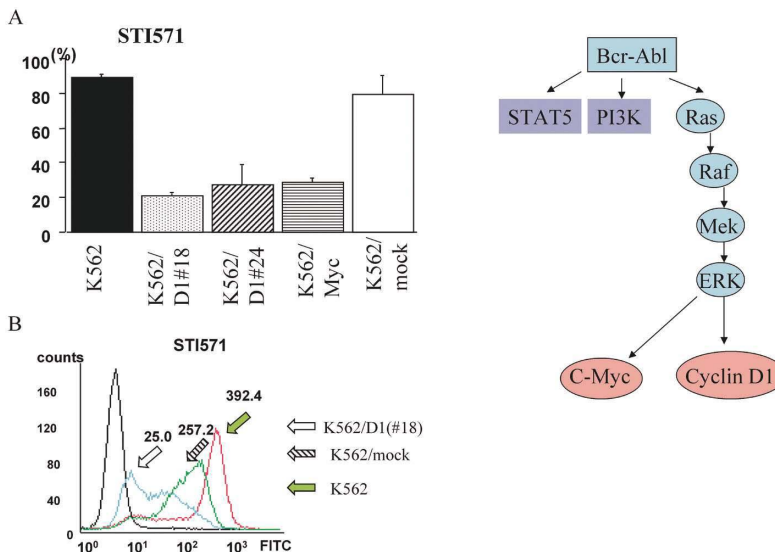


Fig. 14. Inhibition of erythroid differentiation by overexpression of c-Myc and cyclin D1. Cell were treated with STI571 and erythroid differentiation was studied by benzidine-staining (A) and flow cytometry (B). (reprinted from ref. 13)

なく、悪性度も高いとは考えられない。通常の化学療法に対する反応性も極めて高く、寛解導入療法で80-90%の患者に寛解が得られる。しかし、その再発率は高いことも知られている。これは、白血病幹細胞が治療に抵抗して残存し再発につながるためと考えられる。

白血病が通常の化学療法に抵抗性を示す背景には正常幹細胞としての性質を白血病幹細胞が保持しているためと考えられる。すなわち、MDR1に代表される薬剤排出に関与するATP-binding cassette (ABC) transporter 遺伝子群の発現やDNA修復能の亢進などである。これらの性質により、白血病幹細胞としての性質が治療抵抗性を前面に押し出しているものと思われる。このような白血病幹細胞としての性質や染色体転座に代表されるような遺伝子異常に対抗できる可能性を持つ薬剤としてヒストン脱アセチル化酵素阻害薬が注目を集めている。

VII. ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬

前述のように白血病に関連した遺伝子異常の多くは転写因子に関連したものである。クロマチン

リモデリングは転写の基本的調節にとって重要な機構である。クロマチンリモデリングとはDNA・タンパク質複合体が密な構造をとったり、疎な構造を呈することで転写に関するタンパク質複合体の機能を制御している状態である。その一つの方法としては、ヒストンのアセチル化がある。ヒストンのN端はリジン残基に富んでいる。このリジン残基がhistone acetylase (HAT)によってアセチル化を受けるとクロマチン構造が疎な状態とな

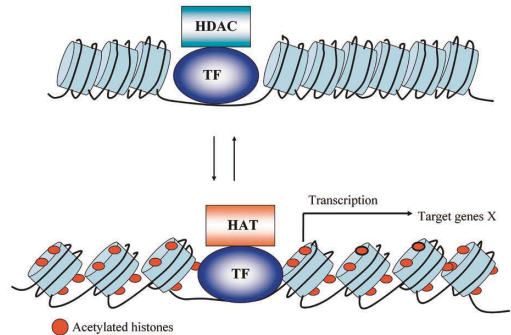


Fig. 15. Histone acetylation and chromatin remodeling. Recruitment of histone acetylase acetylates histones and initiates transcription of target genes.

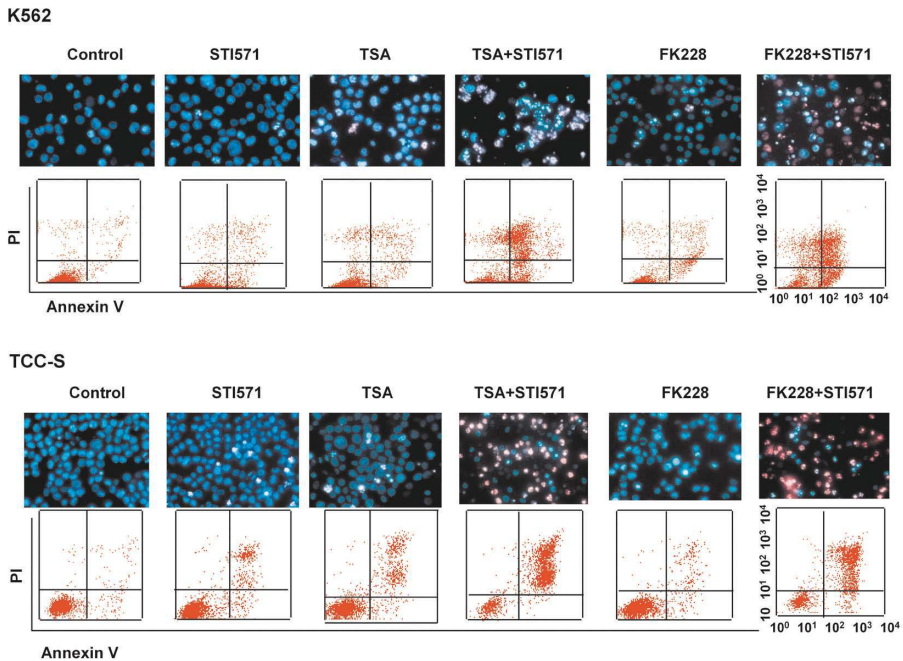


Fig. 16. The effect of combination between STI571 and each HDACI. K562 cells and TCC-S cells were treated with each drug for 48 h and apoptosis was examined by nuclear-morphology (upper panel) and flow cytometry (lower panel). (reprinted from ref. 15)

り、遺伝子の転写が容易なものになる (Fig. 15). Histone deacetylase (HDAC) はアセチル化ヒストンを脱アセチル化し、密なクロマチン構造に転帰させて転写を OFF とする。そこで、histone deacetylase の活性を低分子量化合物で抑制すると分化や細胞死に関する遺伝子の持続的な転写が誘導できるものと考えられる。また、histone deacetylase 阻害薬 (HDAC inhibitor: HDACI) は作用機序が従来の治療薬とは一致しないため、併用による相乗効果も期待できる。

そこで、我々は histone deacetylase 阻害薬と Imatinib mesylate の併用による効果を検討した。慢性骨髄性白血病由来の細胞株として K562 と TCC-S 細胞を用いた。Histone deacetylase 阻害薬としては tricostatin A (TSA) と depsipeptide (開発名 FK228) を用いて検討した¹⁵⁾。Fig. 16 に示すように、両者の併用は強い相乗効果を発

揮した (Fig. 16, 17)。前述のように Imatinib mesylate の効果は cyclin D1 や c-Myc の異所性発現によって減弱することがわかっていたので、この併用効果にも影響を及ぼすかを検討した。その結果、併用による相乗効果はこれらの細胞株では認められないことが判明した (Fig. 18)。

上述のように depsipeptide は少量で抗腫瘍効果を発揮し、臨床的にも期待が持たれる薬剤である。しかし、どのような薬剤にも耐性の問題は避けて通ることができない。そこで、KU812 細胞を低濃度の depsipeptide で持続的に処理し、徐々にその濃度を高くすることで耐性株細胞を作成した¹⁶⁾ (Fig. 19A)。この耐性細胞は 40 nM の depsipeptide でも安定した増殖が可能であった。また、耐性株細胞としての継代培養は 16 nM depsipeptide 存在下で行った。これらの耐性株が他の histone deacetylase 阻害薬との間で交差耐性を

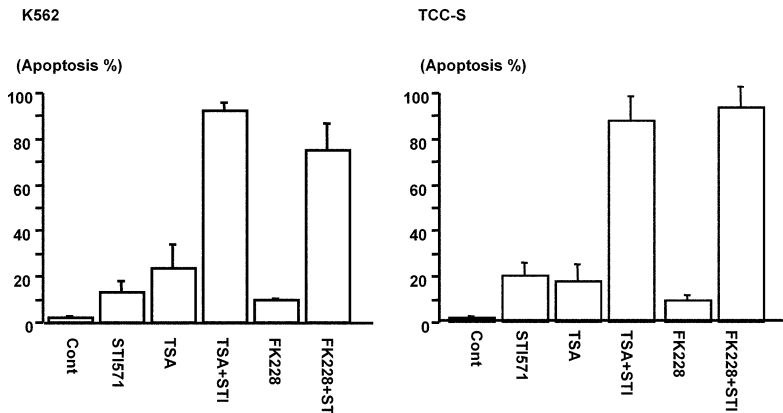


Fig. 17. The effect of combination between STI571 and each HDACI. The combination treatment was significant, statistically. (reprinted from ref. 15)

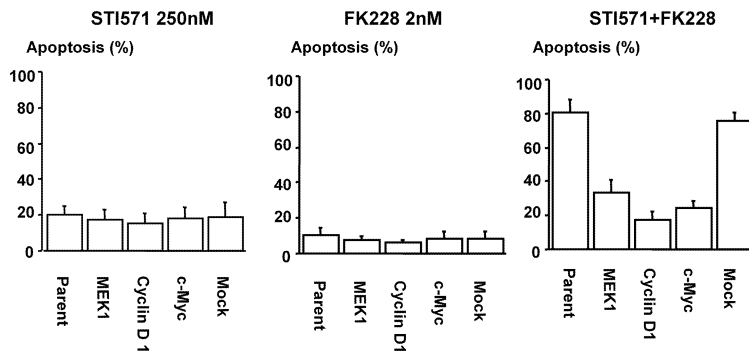


Fig. 18. The synergistic action of STI571 and FK228 was abrogated by overexpression of either cyclin D1, c-Myc or MEK1. (reprinted from ref. 15)

有するか TSA を用いて検討すると、TSA に対しては耐性を持たないことが判明した。また、他の抗腫瘍薬との交叉耐性を検討すると、Fig. 19B に示すように、Etoposide, Vincristin および doxorubicin に対して抵抗性を有していた。これらの薬剤に対する耐性は p-glycoprotein (MDR1) の過剰発現によることが多い。そこで、MDR1 の mRNA を reverse transcription-PCR (RT-PCR) で測定すると、耐性株では MDR1 が過剰に発現していることが判明した (Fig. 20A)。また、MDR1 の発現を Flow cytometry で測定すると、強発現を呈していた (Fig. 20B)。MDR1 による薬

剤排出は Verapamil によって解消されることが知られているので、5 μ M の Verapamil を先行暴露後、depsipeptide に対する感受性を測定すると depsipeptide に対する耐性は失われていた (Fig. 21)。これらの事実は depsipeptide に対する耐性は MDR1 によって担われている結果を示すものであった。次に、耐性株細胞で見られた MDR1 の過剰発現が depsipeptide による転写の修飾による結果かを検討した。耐性株細胞を depsipeptide を含まない培地で培養し、経時的に細胞を回収して MDR1 の発現を検討した。その結果、depsipeptide で誘導された MDR1 の発現は約 50 日で親

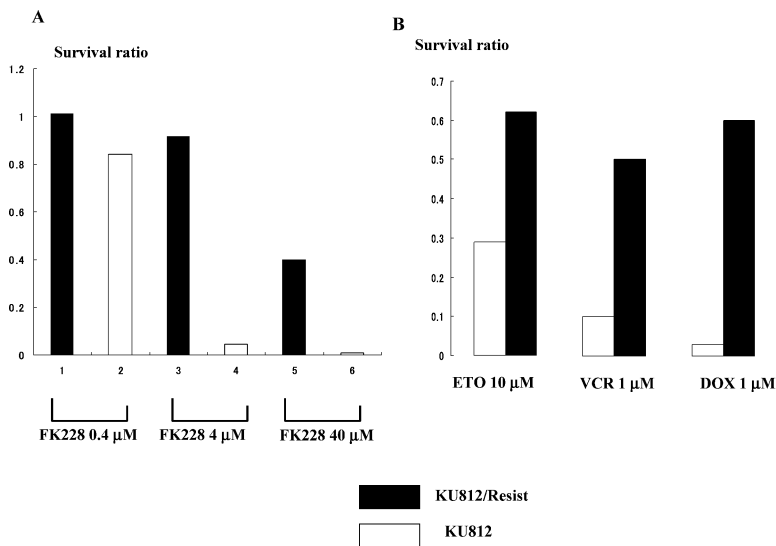


Fig. 19. Characterization of FK228 resistant KU812 cells. Cell growth was studied by MTS assay. FK228 resistant cells were co-resistant to vincristine and doxorubicin (B).

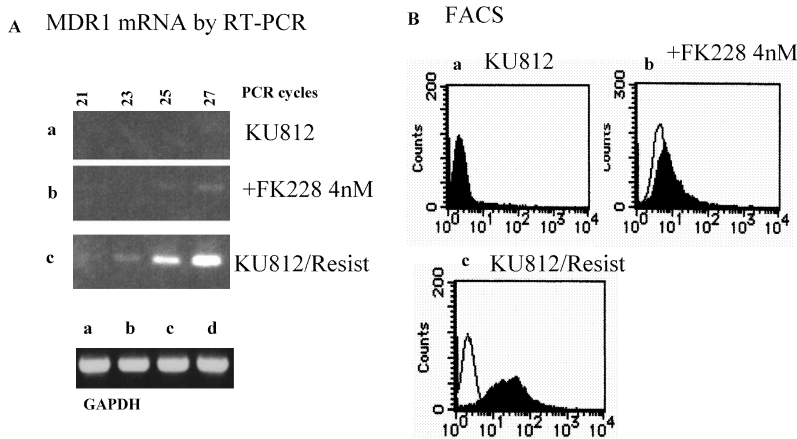


Fig. 20. FK228 resistant cells expressed MDR1 gene. Expression of MDR1 was studied by RT-PCR and flow cytometry. (reprinted from ref. 16)

株のレベルに低下していた (Fig. 22).

16 nM depsipeptide 存在下での耐性株の増殖は親株に比べて緩やかであった。これは耐性株細胞が獲得した耐性機構に MDR1 による薬剤排泄以外の何らかの機序が関与している可能性を示唆している。そこで、耐性株細胞におけるヒストンのアセチル化を検討した。耐性株ではヒストンは明らかにアセチル化を受けていた (Fig. 23)。このことは、16 nM depsipeptide の存在下で培養をし

ている耐性株細胞においては親株とは異なる遺伝子発現プロフィールを有する可能性を示唆するものである。そこで、① 親株、② 親株を 4 nM depsipeptide で 48 時間処理したもの、さらに③ 二つの耐性株を 16 nM depsipeptide 存在下で培養したものについて、8,500 遺伝子の microarray を用いて発現プロフィールの検討を行った。その結果、耐性株では親株と比べて 4 倍以上に発現の上昇している遺伝子が 28、4 分の 1 以下に低下している遺伝子が 3、存在していた。これらの遺伝子の中には核と細胞質間の輸送に関連した遺伝子や細胞周期の調節に関連した遺伝子が含まれていた¹⁶⁾。これらの遺伝子の腫瘍化や薬剤耐性に関する意義を明らかにすることで、さらに新たな治療法の開発につながるものと考えて、現在これらの遺伝子の薬剤感受性や耐性に対する働きを検討している。

VIII. ま と め

悪性腫瘍の治療においてテーラーメイド治療が叫ばれている。腫瘍細胞の個性化を網羅的遺伝子発現解析で分析し、予後因子と関連する遺伝子の抽出が盛んに行われてきたし、現在も行われてい

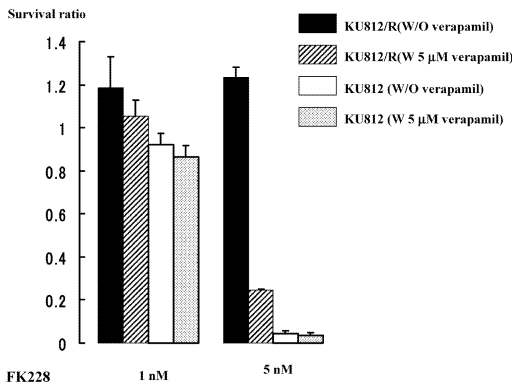


Fig. 21. FK228 resistance was abrogated by co-treatment with verapamil. (reprinted from ref. 16)

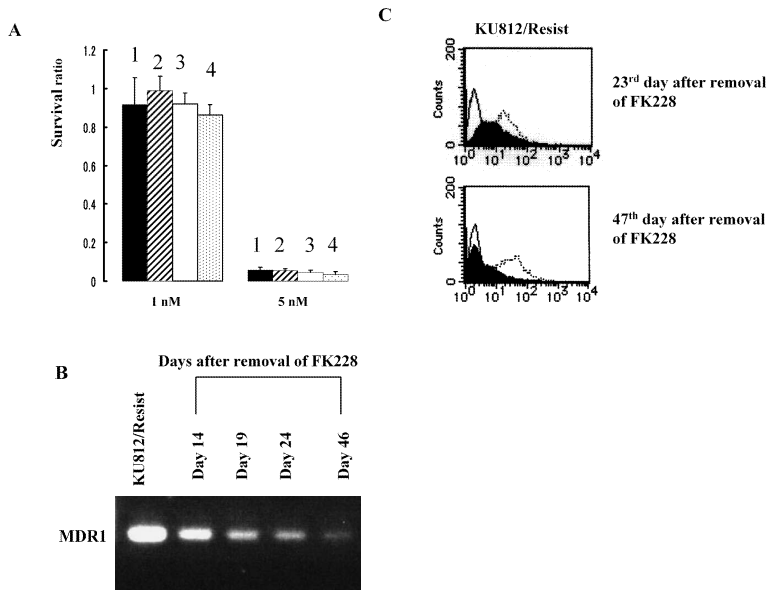


Fig. 22. Reversible expression of MDR1. FK228 resistant KU812 cells were cultured for 2 months without FK228, and then cells were treated with 5 nM of FK228 with or without verapamil. Cells were all sensitive to FK228 irrelevant to verapamil (A). Both RT-PCR (B) and flow cytometry (C) demonstrated that MDR1 expression was reversed to parental cell level. (reprinted from ref. 16)

る。多くの有用な情報が引き出されているが、この方法は定められた治療法に関して役立つ方法である。当然、治療法が異なればキーとなる遺伝子も異なってくるであろう。分子標的薬はもともと正常細胞の腫瘍化に対して重要な働きを担っている標的タンパク質に対してその機能を修飾するものであるから、あらかじめ検討をしなければいけない遺伝子は限られてくる。これらの遺伝子の変異や発現レベルを統合的に検討して治療法を組み立てることが今後の臨床上の重要な方向性を示している。

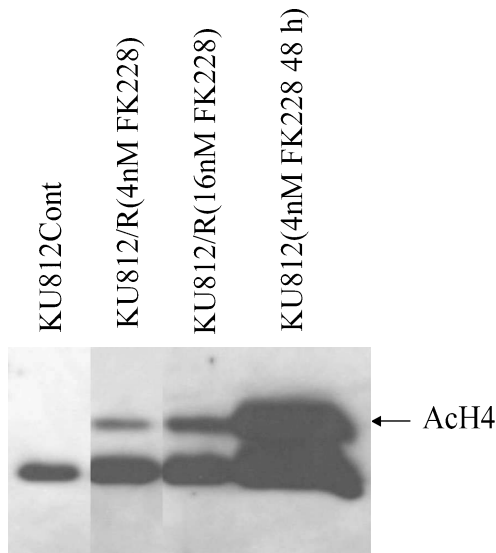


Fig. 23. Histone H4 was still acetylated in depsipeptide resistant cells cultured with 16 nM depsipeptide. (reprinted from ref. 16)

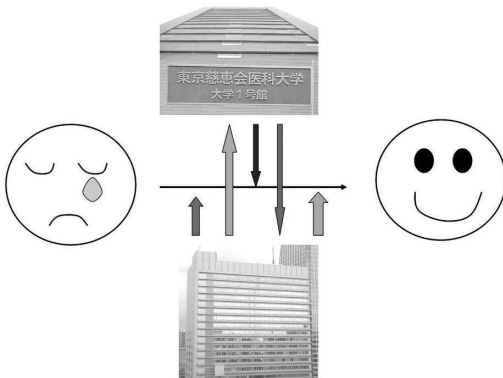


Fig. 24. The tight communication between basic and clinical fields is essential to conquer cancers.

分子標的薬のもう一つの大きな特徴は、薬剤の効果そのものをモニターできる点である。たとえば、histone deacetylase 阻害薬では薬物代謝上の測定のみでなく患者における活性を検討することが出来る。治療前に採取した白血球のヒストンアセチル化を基準として、治療中の白血球のアセチル化を測定することで、薬剤の実際の働きを検討することが出来るであろう。これは、個々の患者における思わぬ過剰反応を察知するのに有用であろうし、確実な薬剤効果を得るためには避けられないプロセスである。薬剤効果が不十分な場合にはさらに次のステップへと容易に踏み出すことが出来る。

患者さんは希望と不安を抱えて病院を受診する (Fig. 24)。患者さんの中には標準的な治療で十分に効果を得られなかった人もいるであろう。治療前に患者さん個々のがん細胞の特性を把握し、その特性に合わせた治療戦略を立て、治療を受けていただく。その至適投与量 (法) を科学的に裏付けながら治療を継続して治癒を目指す。今後は患者さん、臨床医、研究者、パラメディカルが一体となつてがん治療に取り組む必要がある。

本宿題報告の機会を与えてくださいました成医学会会長栗原敏学長、ならびに座長の労をおとりいただいた恩師永野允名誉教授に深謝いたします。

本研究は文部科学省の特定領域研究 C (平成 13 年度)、ハイテクリサーチセンター (平成 8 年度から平成 12 年度) およびバイオベンチャー (平成 12 年度から平成 16 年度) 研究助成事業の助成の下に行われた。また、車両競技公益資金記念財団の研究助成事業および三共生命科学研究振興財団よりの助成を受けて行われた。

本研究は DNA 医学研究所 (河野 毅, 斉藤 忍, 荒川泰弘, 中山律子, 阿川美幸, 山田順子, 福味禎子), 慈恵医大小児科 (秋山政晴), 青戸病院内科 (岩瀬さつき, 関川哲明), 自治医大 (古川雄祐), 栃木県立がんセンター (加納康彦), 東京女子医大 (山田 修) との共同研究である。

本論文に用いた図表の一部は文献に示した論文より出版社の許可を得て転載した。

文 献

- 1) Sekikawa T, Iwase S, Saito S, Arakawa Y, Agawa M, Horiguchi-Yamada J, et al. JAS-R, a new megakaryo-erythroid leu-

- kemic cell line that secretes erythropoietin. *Anticancer Res*, in press.
- 2) Horiguchi-Yamada J, Iwase S, Kawano T, Yamada H. Pretreatment of interferon- α radiosensitizes Daudi cells with modulating gene expression and biomarkers. *Anticancer Res* 2005 ; 25 : 2631-8.
 - 3) Fukumi S, Horiguchi-Yamada J, Nakada S, Nagai M, Ohno T, Yamada H. Differential responses of Bcl-2 family genes to etoposide in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Mol Cell Biochem* 2000 ; 206 : 43-50.
 - 4) Fukumi S, Horiguchi-Yamada J, Iwase S, Ohno T, Yamada H. Concentration-dependent variable effects of etoposide on the cell cycle of CML cells. *Anticancer Res* 2000 ; 20 : 3105-10.
 - 5) Horiguchi-Yamada J, Fukumi S, Saito S, Nakayama N, Iwase S, Yamada H. DNA topoisomerase II inhibitor, etoposide, induces p21^{WAF1/CIP1} through downregulation of c-Myc in K562 cells. *Anticancer Res* 2002 ; 22 : 3827-32.
 - 6) Akiyama M, Hoshi Y, Sakurai S, Yamada H, Yamada O, Mizoguchi H. Changes of telomere length in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998 ; 21 : 167-71.
 - 7) Akiyama M, Horiguchi-Yamada J, Saito S, Hoshi Y, Yamada O, Mizoguchi H, et al. Cytostatic concentrations of anticancer agents do not affect telomerase activity of leukemic cells in vitro. *Eur J Cancer* 1999 ; 35 : 309-15.
 - 8) Akiyama M, Yamada O, Akita S, Urashima M, Horiguchi-Yamada J, Ohno T, et al. Ectopic expression of c-myc fails to overcome downregulation of telomerase activity induced by herbimycin A, but ectopic hTERT expression overcomes it. *Leukemia* 2000 ; 14 : 1260-5.
 - 9) Akiyama M, Yamada O, Kanda N, Akita S, Kawano T, Ohno T, et al. Telomerase overexpression in K562 leukemia cells protects against apoptosis by serum deprivation and double-stranded DNA break inducing agents, but not against DNA synthesis inhibitors. *Cancer Lett* 2002 ; 178 : 187-97.
 - 10) Yamada O, Akiyama M, Kawauchi K, Adachi T, Yamada H, Kanda N, et al. Overexpression of telomerase confers a survival advantage through suppression of TRF1 gene expression while maintaining differentiation characteristics in K562 cells. *Cell Transplant* 2003 ; 12 : 365-77.
 - 11) Yamada H, Iwase S, Nagai M, Nemoto T, Sekikawa T, Takahara S, et al. Herbimycin A downregulates messengers of cyclin D1 and c-myc during erythroid differentiation of K562 cells. *Int J Hematol* 1996 ; 65 : 31-40.
 - 12) Kawano T, Horiguchi-Yamada J, Iwase S, Furukawa Y, Kano Y, Yamada H. Inactivation of ERK accelerates erythroid differentiation of K562 cells induced by herbimycin A and STI571 while activation of MEK1 interferes with it. *Mol Cell Biochem* 2004 ; 258 : 25-33.
 - 13) Kawano T, Horiguchi-Yamada J, Saito S, Iwase S, Furukawa Y, Kano Y, et al. Ectopic cyclin D1 expression blocks STI 571-induced erythroid differentiation of K562 cells. *Leukemia Res* 2004 ; 28 : 623-9.
 - 14) Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer* 2005 ; 5 : 311-21.
 - 15) Kawano T, Horiguchi-Yamada J, Iwase S, Akiyama M, Furukawa Y, Kano Y, et al. Depsipeptide enhances imatinib mesylate-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive cells and ectopic expression of cyclin D1, c-Myc or active MEK abrogates this effect. *Anticancer Res* 2004 ; 24 : 2705-12.
 - 16) Yamada H, Arakawa Y, Saito S, Agawa M, Kano Y, Horiguchi-Yamada J. Depsipeptide-resistant KU812 cells show reversible P-glycoprotein expression, hyper-acetylated histones, and modulated gene expression profile. *Leuk Res* 2005 Oct 27 ; [Epub ahead of print]