

薬剤抵抗性に関与する遺伝子の解析とその臨床応用

《研究の概要》

抗癌剤を用いた癌の化学療法は、外科手術、放射線治療と共に、癌の治療の大きな部分を占める。しかしながら現在の癌化学療法の有効性はまだ十分なものとは言えない。抗癌剤は、癌の種類によって、また個々の患者ごとに、その有効性が大きく異なっている。したがって、癌のどのような性質が抗癌剤抵抗性と結びついているかを調べることは、癌の化学療法の治療成績の向上に役立つと期待される。

細胞が抗癌剤耐性を獲得する機序を遺伝子レベルの変異としてとらえると、(A) 遺伝子発現の亢進、(B) 遺伝子発現の低下、(C) 遺伝子変異、の3種類が考えられる。本研究ではそれぞれの遺伝子変化に応じて、抗癌剤耐性の原因となりうる標的分子の研究を行った。

(A) 遺伝子発現の亢進、としては、細胞に高発現させると抗癌剤耐性になる遺伝子として ABC 輸送体に着目し、ヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 および新規 ABC 輸送体 BCRP (ABCP) を中心に研究を進めた。BCRP の種々の変異体を作製し、BCRP の5番目の膜貫通部位が抗癌剤の認識に重要であることを明らかにした。また、変異型 BCRP 遺伝子の導入により、野生型 BCRP による抗癌剤耐性が克服できることを示した。

(B) 遺伝子発現の低下、では、遺伝子の発現の低下によって細胞が抗癌剤耐性となるサプレッサー型耐性遺伝子として、3種の既知遺伝子、および Adriamycin 感受性に関与する新規遺伝子 TASP を単離した。ヒト、マウスの TASP は450 アミノ酸よりなり、細胞膜を7回貫通する G-protein 受容体と推定された。

(C) 遺伝子変異、では、camptothecin 耐性細胞より単離された変異型あるいは部分欠損型 DNA topoisomerase I の研究を進め、533番目のアミノ酸が Asp から Gly に変異した DNA topoisomerase I が dominant な抗癌剤耐性遺伝子であること、耐性細胞で exon3-9 を欠失した DNA topoisomerase I が発現することなどを示した。

また、本研究では、癌治療の新しい標的分子としてのテロメラーゼの研究を行い、テロメラーゼの構成分子である hTERT 蛋白質と特異的に結合する分子として 14-3-3 ファミリー蛋白質 (14-3-3theta および 14-3-3zeta) を同定した。hTERT と 14-3-3 蛋白質の結合を阻害すると hTERT の核移行が顕著に阻害されることが明らかになった。

抗癌剤耐性の研究の現時点における集大成というべきものが、抗癌剤耐性遺伝子を用いた遺伝子治療の臨床研究である。本臨床研究では、抗癌剤多剤耐性遺伝子を癌患者の正常骨髄細胞に導入して発現させることにより、患者の骨髄細胞を抗癌剤に抵抗性とし、抗癌剤の骨髄毒性を回避させることを目指している。本臨床研究は全ての準備と審査を終え、平成12年度より開始される予定である。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
杉本 芳一	(財) 癌研究会 癌化学療法センター部長	薬剤抵抗性に關与する遺伝子の解析と その臨床応用
清宮 啓之	(財) 癌研究会 癌化学療法センター研究員	ストレスと抗癌剤耐性
相羽 恵介	(財) 癌研究会 癌化学療法センター副部長	癌遺伝子治療

研究報告

I 研究目的

抗癌剤を用いた癌の化学療法は、外科手術、放射線治療と共に、癌の治療の大きな部分を占める。しかしながら現在の癌化学療法の有効性はまだ十分なものとは言えない。

抗癌剤は、癌の種類によって、また個々の患者ごとに、その有効性が大きく異なっている。たとえば小児のリンパ性白血病などには抗癌剤は非常な効果を示すが、大腸癌などの消化器系の固形癌に対しては、抗癌剤はあまり効かない。これは、大腸癌の細胞が元々抗癌剤が効きにくい性質を持っていることに由来する。これを癌の抗癌剤に対する自然耐性という。また、白血病の治療などでは、治療初期には有効であった抗癌剤がやがて効かなくなっていく例が多い。これを獲得耐性という。これまでの研究で、自然耐性と獲得耐性は同一のメカニズムによって起こることがわかってきた。

癌および正常細胞の抗癌剤感受性、耐性を規定する因子の分子生物学的研究は、抗癌剤の効果の予測、それらの因子を標的とした耐性克服法の開発などを通して癌化学療法の治療効果の向上に寄与すると期待される。しかしながらこれまでの経験では、臨床の抗癌剤耐性癌が既知の耐性遺伝子の機能発現で説明される例は少なく、まだ癌を抗癌剤耐性とする未知の因子は数多く存在すると考えられている。本研究は、細胞の抗癌剤に対する耐性・感受性を規定する因子を同定してその機能を明らかにするとともに、得られた成果をもとに、癌の化学療法の有効性をより向上させるための戦略を開発する事を目的とする。

細胞が抗癌剤耐性を獲得する機序としては、(A) 遺伝子発現の亢進、(B) 遺伝子発現の低下、(C) 遺伝子変異、の3種類がある。こうした抗癌剤の耐性・感受性に關与する遺伝子について、細胞への導入実験を通してこれらの遺伝子の機能を調べると共に、治療への応用について研究を行った。また、これらの遺伝子については、正常細胞、癌細胞及び抗癌剤治療後の抗癌剤抵抗性癌細胞での発現を調べ、癌治療の指標となるかを検討した。

(A) 遺伝子発現の亢進、としては、dominant に抗癌剤耐性の形質を発現させる遺伝子として ABC 輸送体に着目し、ヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 および新規 ABC 輸送体 BCRP (ABCP) を中心に研究を進めた。

(B) 遺伝子発現の低下、では、遺伝子の発現の低下によって細胞が抗癌剤耐性となるサ

プレッサー型耐性遺伝子の単離と解析を進めた。これまでの抗癌剤耐性の研究は、上記のMDR1 など、いわゆる抗癌剤耐性細胞で過剰発現している遺伝子を中心に行われてきた。しかし、癌抑制遺伝子の例にみられるように、細胞における形質発現が負の遺伝子制御を受けている例は多い。本研究では、こうした遺伝子発現の低下、抑制による抗癌剤耐性化に関わるサプレッサー型耐性因子を同定することを目的とし、antisense mRNA あるいは dominant-negative peptide を発現させる retrovirus expression library を用いて、遺伝子導入による抗癌剤耐性化を指標にスクリーニングを行った。得られた遺伝子産物の機能の解析を行い、抗癌剤感受性のメカニズムを明らかにした。

(C) 遺伝子変異、では、camptothecin 耐性細胞より単離された変異型あるいは部分欠損型 DNA topoisomerase I の研究を進めた。抗癌剤耐性の研究の現時点における集大成というべきものが、抗癌剤耐性遺伝子を用いた遺伝子治療の臨床研究である。本臨床研究では、抗癌剤多剤耐性遺伝子を癌患者の正常骨髄細胞に導入して発現させることにより、患者の骨髄細胞を抗癌剤に抵抗性とし、抗癌剤の骨髄毒性を回避させることを目指している。

また、本研究では、癌治療の新しい標的分子についての研究を行い、癌治療への応用について検討した。テロメラーゼは9割以上の癌で活性が検出され、殆どの正常体細胞では検出されないという意味で理想的な癌分子標的である。本研究ではテロメラーゼの活性を制御する触媒サブユニット hTERT についての研究を行った。

II 研究計画及び材料と方法

1 遺伝子発現の低下による抗癌剤耐性化に関与するサプレッサー型耐性遺伝子の単離と解析

この研究では、Genetic suppressor element (GSE) 法を用いて、その遺伝子の発現の低下あるいは機能の阻害によって細胞を抗癌剤耐性にする新しい抗癌剤感受性規定因子の検索を行った。得られた新規遺伝子について、その全長 cDNA を単離し、構造を決定した。この研究は以下の手順を踏んで行われた。

(1) antisense mRNA、dominant-negative peptide を発現させる retrovirus expression library の作成

ヒト HeLa 細胞、マウス NIH3T3 細胞より、それぞれ約 107 個の独立なクローンにより構成される retrovirus 発現 library の構築を行った。まず、細胞の mRNA を鋳型に cDNA library を合成した。これに ATG コドンを含む linker を結合させて pLNCX retrovirus vector plasmid に組み込み、library を作成した。

(2) 標的細胞への遺伝子導入

作成した retrovirus 発現 library を retrovirus packaging 細胞である PA317 に lipofectamine を用いて導入した。培養上清中に一過性に放出される retrovirus を約 2×10^7 個の標的細胞に加え、遺伝子導入を行った。遺伝子導入された細胞は G418 で選択した。通常 10-30% の細胞に 1 コピーの retrovirus が導入されるので、library あたり数回の遺伝子導入とスクリーニングを行った。

(3) 抗癌剤耐性細胞の選択

遺伝子導入された細胞を全体で G418 耐性コロニー数の 10 倍程度のなるようにまきなお

した細胞を 6 グループ作り、Adriamycin、paclitaxel、cisplatin、etoposide、mitomycin C あるいは camptothecin の各薬剤を加えて耐性細胞を選択した。この時に、薬剤処理による誘導型耐性細胞の出現を抑えるため、薬剤処理は最初の 3-4 日間のみ行った。やがて出現する耐性細胞を単離、培養した。

(4) 導入遺伝子が抗癌剤感受性に関与していることの確認

得られた耐性細胞に retrovirus の構成蛋白を発現する pSAM plasmid を導入し、培養上清中に再放出される retrovirus (この場合はクローン) を再度標的細胞にかけ、遺伝子導入された細胞が抗癌剤耐性を獲得するか否かを調べた。この試験では、抗癌剤誘導性に耐性を獲得したクローンあるいは retrovirus の insertional mutagenesis によって耐性を獲得したクローンからは抗癌剤耐性細胞が得られないので、最初に導入された retrovirus の発現が抗癌剤耐性に関与しているクローンのみを選び出すことが可能である。

(5) 導入遺伝子の回収と同定

得られた耐性細胞より DNA を抽出して PCR により retrovirus の insert を回収して塩基配列を決定した。この insert を再度 pLNCX に同じ方向で組み込み、細胞に導入して耐性化を確認した。

(6) 遺伝子の単離と解析

得られた遺伝子断片を元に、全長 cDNA を単離し、全構造を決定した。全長 cDNA を発現ベクターに組み込み、DNA transfection によって細胞で過剰発現させた。

2 Half-molecule 型 ABC 輸送体 BCRP/ABCP に関する研究

抗癌剤の細胞膜輸送に関与していると推定される新規 ABC 輸送体 BCRP についての研究を行った。

(1) ヒト BCRP の cDNA を単離し、翻訳領域の全長を含む cDNA をレトロウイルスベクターに組み込んで BCRP レトロウイルスを作成した。このレトロウイルスの導入による細胞の抗癌剤耐性化について調べた。

(2) BCRP と相互作用する蛋白の解析

BCRP は homodimer として存在すると考えられる。この証明のため、HA タグで標識した BCRP と Myc タグで標識した BCRP を作成し、これらをそれぞれ neomycin 耐性遺伝子あるいは methotrexate 耐性遺伝子 (DHFR) をもつ bicistronic retrovirus vector に組み込んで細胞に共導入する。HA タグで標識した BCRP と Myc タグで標識した BCRP の複合体の形成を免疫沈降法および Western blot 法で調べた。

(3) BCRP に対する抗体の作製

BCRP の第 5 膜貫通領域と第 6 膜貫通領域の間の細胞外ドメインのペプチドを合成し、これをウサギに免疫して BCRP に対する抗体を作成した。得られた抗血清は affinity chromatography で精製した。

(4) 変異体を用いた BCRP の機能の解析

複数の人由来の胎盤の cDNA から BCRP の cDNA の全長を PCR により単離して pHaL-IRESDHFR retrovirus vector に組み込んだ。この時、分子あたり 1 個から 3 個のアミノ酸変異が導入されるように PCR の条件を設定した。この組み換え retrovirus を細胞に導入し、methotrexate で選択して retrovirus の組み込まれた細胞の population を得た。

この mixed population の mitoxantrone と SN-38 に対する耐性を調べた。抗癌剤耐性の変化がみられたクローンについては、Adriamycin、paclitaxel などの他の抗癌剤に対する感受性が変化したかどうか調べた。

3 Retrovirus insertion mutagenesis による抗癌剤耐性に関する研究

マウス NIH3T3 細胞に LNCX retrovirus を導入したところ、ETOPOSIDE、paclitaxel に耐性な細胞が得られた。この耐性化の原因を調べた。

4 変異型 DNA topoisomerase I による抗癌剤耐性に関する研究

(1)533 番目のアミノ酸が Asp から Gly に変異した DNA topoisomerase I Camptothecin 耐性ヒト白血病細胞より得られた、533 番目のアミノ酸が Asp から Gly に変異した DNA topoisomerase I を発現させるレトロウイルスを作成して細胞への導入実験を行い、この変異 DNA topoisomerase I の発現による camptothecin 感受性の変化について調べた。

(2)部分欠失型 DNA topoisomerase I

Camptothecin 耐性ヒト大腸癌細胞では、野生型より約 700 塩基短い DNA topoisomerase I mRNA が発現していた。この mRNA を発現させるレトロウイルスを作成して細胞への導入実験を行い、遺伝子導入細胞における camptothecin 感受性の変化について調べた。

5 ASK1 の阻害による抗癌剤耐性に関する研究

アポトーシス情報伝達系は癌細胞の抗癌剤感受性を左右する一要因と考えられる。蛋白質リン酸化酵素 ASK1 は TNF 刺激によるアポトーシスに関与することが知られている。我々は ASK1 のドミナントネガティブ変異体が癌細胞の抗癌剤耐性を誘導することを見出している。この抗癌剤耐性がアポトーシス機能の低下によるものであることが。

6 テロメラーゼの研究

テロメラーゼは 9 割以上の癌で活性が検出され、殆どの正常体細胞では検出されないという意味で理想的な癌分子標的である。このテロメラーゼについての研究を行った。

(1)種々の微小環境ストレスが癌細胞のテロメラーゼ活性に及ぼす影響、およびこのときの活性変化の分子機構を解析した。

(2)テロメラーゼ触媒サブユニット hTERT の遺伝子発現変化に依存しないテロメラーゼ活性制御機構として翻訳後蛋白質相互作用の存在を仮定し、酵母ツー・ハイブリッド法によるテロメラーゼ結合蛋白質遺伝子の単離同定を試みた。ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット hTERT を bait とし、HeLa 細胞 prey cDNA ライブラリーより陽性クローンを単離した。さらに、これらの遺伝子産物が試験管内および細胞内において hTERT と結合するか検討した。

(3)テロメラーゼの機能に対するヒトテロメラーゼ触媒サブユニット (hTERT) とその結合蛋白質である 14-3-3 蛋白質の相互作用の生理的意義を明らかにすることを目的として、まず 14-3-3 非結合型 hTERT 変異体 (hTERT-3A) の作製を試みた。次に、同変異体蛋白質の細胞内局在およびテロメラーゼ活性を解析した。さらに、14-3-3 蛋白質の dominant negative 変異体を作製し、hTERT の細胞内局在に対する同変異蛋白質の影響を調べた。

7 多剤耐性遺伝子 MDR1 とアルキル化剤耐性遺伝子 MGMT の共発現に関する研究

多剤耐性遺伝子 MDR1 とアルキル化剤耐性遺伝子 MGMT を共発現させるレトロウイルス Ha-MDR-IRES-MGMT および Ha-MGMT-IRES-MDR をマウスの正常骨髄細胞に導入し、レトロウイルスの導入による骨髄細胞の抗癌剤耐性の獲得および抗癌剤誘導突然変異に対する抵抗性の獲得について調べた。

8 MDR1 伝子治療の臨床研究

進行乳癌患者に対する自己造血幹細胞移植併用超大量化学療法時に、患者に再移入する正常造血細胞にヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 を導入して患者の骨髄を抗癌剤に抵抗性とする MDR1 遺伝子治療の臨床研究の計画を進めた。

III 研究成果

1 遺伝子発現の低下による抗癌剤耐性化に関与するサブプレッサー型耐性遺伝子の単離と解析

(1) Genetic suppressor element (GSE) 法を用いて、その遺伝子の発現の低下あるいは機能の阻害によって細胞を抗癌剤耐性にする新しい抗癌剤感受性規定因子の検索を行った。ヒト HeLa 細胞の GSE retrovirus library をヒト HeLa 細胞に導入することにより樹立した Adriamycin 耐性細胞クローンより 1 種、CDDP 耐性細胞クローンより 4 種、Mitomycin C 耐性細胞クローンより 7 種、KRN5500 耐性細胞クローンより 4 種の合計 16 種の cDNA を単離した。得られた遺伝子断片のうち、rad21DNA double strand break repair protein が細胞の mitomycin C 感受性に関与していることを見いだした。同様にマウス NIH3T3 細胞した Adriamycin 耐性細胞クローンより 19 種、paclitaxel 耐性細胞クローンより 10 種、ETOPOSIDE 耐性細胞クローンより 13 種、CDDP 耐性細胞クローンより 2 種、camptothecin 耐性細胞クローンより 3 種、mitomycin C 耐性細胞クローンより 7 種の cDNA を単離した。これらのうち、NADH-ubiquinone oxidoreductase の chain5 および vacuolar assembly protein VPS41 が細胞の抗癌剤感受性に関与していることを見いだした。

(2) 同様にして Adriamycin 耐性細胞 Ac2 株よりとられた遺伝子は、その発現を阻害すると細胞が Adriamycin 耐性となる新規遺伝子であり、TASP と名付けられた。ヒト、マウスの TASP 全長 cDNA がコードする蛋白はともに 450 アミノ酸よりなり、細胞膜を 7 回貫通する構造をもつ G protein 受容体と推定される p40 と高い相同性を示した。TASP の発現は調べた全組織で見られたが、とりわけヒト、マウスとも testis で高い発現を示した。Ac2 株に組み込まれていた retrovirus は TASP の antisense を発現するものであったが、この retrovirus を新たに NIH3T3 細胞に導入して G418 で選択したところ、遺伝子導入細胞は Adriamycin 耐性と paclitaxel 耐性を同時に獲得した。よって TASP は細胞の Adriamycin 感受性と paclitaxel 感受性に関与していると推定された。

2 Half-molecule 型 ABC 輸送体 BCRP/ABCP に関する研究

抗癌剤の細胞膜輸送に関与していると推定される新規 half-molecule 型 ABC 輸送体 BCRP

の cDNA を単離し、翻訳領域の全長を含む cDNA をレトロウイルスベクターに組み込んで BCRP レトロウイルスを作成した。このレトロウイルスを導入された細胞は抗癌剤 mitoxantrone および SN-38 に耐性を獲得した。

1) BCRP の種々の変異体を作製して Ha-IRES-DHFR bicistronic retrovirus vector に組み込み、細胞に導入して methotrexate で選択することにより、multiclonal な遺伝子導入細胞を樹立し、抗癌剤耐性の変化を調べた。その結果、(1)Myc epitope あるいは HA epitope を N 末に付加した BCRP は野生型と同じ抗癌剤耐性を示した。(2)BCRP の ATP 結合部位の活性中心と推定される Lys に変異を導入すると、抗癌剤耐性は失われた。(3)BCRP の 5 番目の transmembrane region に変異を導入すると、mitoxantrone に対する耐性は変化せずに SN-38 に対する耐性のみが低下した。この部位は、BCRP の抗癌剤認識に関与すると推定された。(4)抗癌剤耐性を示さない BCRP 変異体の導入により、野生型 BCRP による抗癌剤耐性が失われた。不活性型 BCRP による dominant-negative な BCRP 機能の阻害は、BCRP による耐性の克服に応用可能であると考えられる。

3 Retrovirus insertion mutagenesis による抗癌剤耐性に関する研究

マウス NIH3T3 細胞に LNCX retrovirus を導入したところ、ETOPOSIDE、paclitaxel に耐性な細胞が得られた。ETOPOSIDE 耐性クローン VQ2、paclitaxel 耐性クローン TX1、TY1 の 3 種の耐性クローンについて、mdr1 遺伝子の発現を Western blot で調べたところ、ETOPOSIDE 耐性クローン VQ2 ではマウス mdr1a が、paclitaxel 耐性クローン TX1 および TY1 ではマウス mdr1b が高発現していた。これらのクローンでは、それぞれ mdr1a、mdr1b に特徴的な交差耐性パターンを示した。Southern blot 解析により、これら 3 種の細胞では、いずれも 1 分子の retrovirus がゲノムに組み込まれたことが明らかになった。PCR により得られた VQ2 細胞に組み込まれた provirus を含むゲノム断片の塩基配列を調べたところ、LNCX がマウス mdr1a 遺伝子上流に組み込まれていた。以上より、retrovirus の挿入変異により mdr1 遺伝子が活性化して抗癌剤耐性となる、という現象が示された。

4 変異型 DNA topoisomerase I による抗癌剤耐性に関する研究

(1)533 番目のアミノ酸が Asp から Gly に変異した DNA topoisomerase I を発現させるレトロウイルスを導入した細胞は camptothecin に約 2 倍の耐性を獲得した。この遺伝子導入細胞には野生型酵素と変異型酵素が共発現しているが、変異型酵素の発現により細胞の酵素活性は camptothecin に抵抗性を増した。野生型 DNA topoisomerase I は発現量が低下すると抗癌剤耐性になる遺伝子であり、DNA topoisomerase I の変異型遺伝子が dominant な抗癌剤耐性遺伝子であることを示したのはこの研究が初めてである。

(2)HT-29 細胞の camptothecin 耐性株 HT-29/CPT で発現している野生型より短い DNA topoisomerase I mRNA は、DNA topoisomerase I 遺伝子の exon3 から exon9 までが欠損したものであった。この欠損型 cDNA の全長を発現ベクターに組み込み、マウス NIH3T3 細胞に導入したが、遺伝子導入細胞の camptothecin 感受性は変化しなかった。よって、この耐性細胞では、DNA topoisomerase I 遺伝子の一方の allele の変異により、camptothecin に感受性な DNA topoisomerase I 蛋白の発現が減少し、耐性となっている、と推論された。

5 ASK1 の阻害による抗癌剤耐性に関する研究

ASK1 ドミナントネガティブ変異体を一過性に発現させた細胞の抗癌剤感受性、抗癌剤によるカスパーゼ活性化様式を解析し、ASK1 が CDDP、ETOPOSIDE などの抗癌剤によるアポトーシスに関与していることを見出した。

6 テロメラーゼの研究

(1) テロメラーゼ活性に対する種々の微小環境ストレスの影響を解析し、低酸素が固形癌細胞のテロメラーゼ活性を増強することを見出した。この活性増強には血清の存在、MEK1 から ERK/MAPK への情報伝達が必要であることもわかった。

(2) HeLa 細胞 cDNA ライブラリーを用いてテロメラーゼ結合蛋白質遺伝子のツー・ハイブリッドスクリーニングを実施し、hTERT 蛋白質と特異的に結合する分子として 14-3-3 ファミリー蛋白質 (14-3-3theta および 14-3-3zeta) を同定した。ツー・ハイブリッド法、および試験管内の検討により、hTERT と 14-3-3 は互いのカルボキシル末端を介して結合することが明らかになった。また、hTERT と 14-3-3 はヒト 293T 細胞内においても会合していることが明らかになった。

(3) hTERT と 14-3-3 蛋白質の結合を阻害すると hTERT の核移行が顕著に阻害されることが明らかになった。hTERT-3A は試験管内・細胞内いずれにおいても野生型 hTERT と同等のテロメラーゼ活性を有していた。従って、14-3-3 蛋白質はテロメラーゼの活性自体には必須でないが、hTERT の細胞内局在を制御することによってテロメラーゼの機能調節に関与している可能性が考えられた。14-3-3 蛋白質は増殖・アポトーシス・チェックポイント制御といった様々な細胞内情報伝達に機能する分子であることから、今回得られた知見は、テロメラーゼ翻訳後制御系の存在および細胞内情報伝達に対するテロメラーゼの機能的関与を示唆するものである。

7 多剤耐性遺伝子 MDR1 とアルキル化剤耐性遺伝子 MGMT の共発現に関する研究

多剤耐性遺伝子 MDR1 とアルキル化剤耐性遺伝子 MGMT を共発現させるレトロウイルス Ha-MDR-IRES-MGMT および Ha-MGMT-IRES-MDR をマウスの正常骨髄細胞に導入し、レトロウイルスを導入された骨髄細胞が異なる作用機序をもつ複数の抗癌剤に対して同時に耐性を獲得すること、ACNU が引き起こす DNA 傷害に対する抵抗性を獲得することを *in vitro* およびマウスの骨髄移植系を用いた *in vivo* の実験で証明した。

8 MDR1 遺伝子治療の臨床研究

4) 進行乳癌患者に対する自己造血幹細胞移植併用超大量化学療法時に、患者に再移入する正常造血細胞にヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 を導入して患者の骨髄を抗癌剤に抵抗性とする MDR1 遺伝子治療の臨床研究のプロトコールは、平成 10 年 2 月 24 日に癌研究会の遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会で承認され、平成 10 年 7 月 14 日に文部大臣、厚生大臣に臨床研究の申請された。遺伝子治療の臨床研究の審査をする文部省、厚生省の合同作業部会および文部省、厚生省の部会の審査を経て、平成 12 年 2 月 24 日に文部大臣、厚生大臣より、臨床研究を実施して差し支えないとの意見書が出された。国による遺伝子治療の臨床研究の正式な承認が得られたので、平成 12 年度より臨床研究を開始する。

IV 考察

1 遺伝子発現の低下による抗癌剤耐性化に関与するサプレッサー型耐性遺伝子の単離と解析

新たに抗癌剤感受性に関与する遺伝子として、rad21 DNA double strand break repair protein、NADH-ubiquinone oxidoreductase の chain5 および vacuolar assembly protein VPS41 が細胞の抗癌剤感受性に関与していることを見いだした。また、Adriamycin 感受性に関与する新規遺伝子 TASP を単離した。ヒト、マウスの TASP は 450 アミノ酸よりなり、細胞膜を 7 回貫通する G-protein 受容体と推定された。

G-protein 受容体が抗癌剤感受性に関与することを示したのはこの研究が初めてであり、細胞増殖のシグナル伝達と抗癌剤感受性、アポトーシス感受性との関連が示唆されて、興味深い。

2 Half-molecule 型 ABC 輸送体 BCRP/ABCP に関する研究

抗癌剤の細胞膜輸送に関与していると推定される新規 ABC 輸送体 BCRP の種々の変異体を作製し、細胞に導入して抗癌剤耐性の変化を調べた。その結果、(1)BCRP の ATP 結合活性は抗癌剤耐性の発現に必須である。(2)BCRP の 5 番目の transmembrane region は、BCRP の抗癌剤認識に関与する。(3)抗癌剤耐性を示さない BCRP 変異体の導入により、野生型 BCRP による抗癌剤耐性が克服できる、などの知見を得た。

BCRP は MORI、MRP などの過去に報告された抗癌剤耐性に関与する ABC 輸送体の半分の大きさであり、ABC 輸送体の抗癌剤排出機構を調べるのに適したモデルである。また、SN-38 (CPT-11 の活性化体)、mitoxantrone といった臨床上有用な抗癌剤の耐性に関与するという面からも、重要な分子である。

3 Retrovirus insertion mutagenesis による抗癌剤耐性に関する研究

マウス NIH3T3 細胞に LNCX retrovirus を導入したところ、retrovirus がマウス mdrla、あるいは mdrlb 遺伝子上流に挿入されることにより mdrl 遺伝子が活性化して抗癌剤耐性となる、という現象を明らかにした。virus の挿入変異は臨床の癌でも起こる現象であり、耐性遺伝子の転写制御機構の上からも興味深い。

4 変異型 DNA topoisomerase I による抗癌剤耐性に関する研究

533 番目のアミノ酸が Asp から Gly に変異した DNA topoisomerase I が dominant な抗癌剤耐性遺伝子であることを示した。DNA topoisomerase I は抗癌剤 CPT-11 の標的分子であり、今後、固形癌に効く抗癌剤を開発する上で有望なターゲットである。

5 ASK1 の阻害による抗癌剤耐性に関する研究

ASK1 の dominant-negative 変異体を一過性に発現させた細胞の抗癌剤感受性、抗癌剤によるカスパーゼ活性化様式を解析し、ASK1 が CDDP、ETOPOSIDE などの抗癌剤によるアポトーシスに関与していることを見出した。抗癌剤によるアポトーシスには多くの制御分子が働

いているが、ASK1 はその中でも比較的上流に位置する分子であり、ASK1 の活性の制御は抗癌剤の効果増強につながると考えられる。

6 テロメラーゼの研究

テロメラーゼ活性に対する種々の微小環境ストレスの影響を解析し、低酸素が固形癌細胞のテロメラーゼ活性を増強することを見出した。この活性増強には血清の存在、MEK1 から ERK/MAPK への情報伝達が必要であることもわかった。

テロメラーゼの構成分子である hTERT 蛋白質と特異的に結合する分子として 14-3-3 ファミリー蛋白質 (14-3-3theta および 14-3-3zeta) を同定した。hTERT と 14-3-3 蛋白質の結合を阻害すると hTERT の核移行が顕著に阻害されることが明らかになった。

テロメラーゼはほとんどの癌で発現しているが正常細胞ではほとんど発現がみられないということで、癌治療の理想的な標的である。こうした基礎研究の成果として癌細胞のテロメラーゼ活性を制御する方法を見つけることは、新しいがん治療の戦略の構築につながる。

7 多剤耐性遺伝子 MDR1 とアルキル化剤耐性遺伝子 MGMT の共発現に関する研究

多剤耐性遺伝子 MDR1 とアルキル化剤耐性遺伝子 MGMT を共発現させるレトロウイルス Ha-MDR-IRES-MGMT および Ha-MGMT-IRES-MDR をマウスの正常骨髄細胞に導入し、レトロウイルスを導入された骨髄細胞が異なる作用機序をもつ複数の抗癌剤に対して同時に耐性を獲得すること、ACNU が引き起こす DNA 傷害に対する抵抗性を獲得することを *in vitro* およびマウスの骨髄移植系を用いた *in vivo* の実験で証明した。

この技術は、2 種の耐性遺伝子の共発現のみならず、MDR1 遺伝子を薬剤選択マーカーとして用いてもうひとつの治療用遺伝子を発現する細胞を選択的に増幅させる技術としても応用可能である。

8 MDR1 遺伝子治療の臨床研究

進行乳癌患者に対する自己造血幹細胞移植併用超大量化学療法時に、患者に再移入する正常造血細胞にヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 を導入して患者の骨髄を抗癌剤に抵抗性とする MDR1 遺伝子治療の臨床研究を開始するための準備、審査を終えた。本臨床研究については、平成 12 年 2 月 24 日に文部大臣、厚生大臣より、臨床研究を実施して差し支えないとの意見書を受け取った。国による遺伝子治療の臨床研究の正式な承認が得られたので、平成 12 年度より臨床研究を開始する。

本臨床研究は我が国で初めての耐性遺伝子治療の臨床研究であり、乳癌に対する遺伝子治療として、また、造血幹細胞を標的とした遺伝子治療として、我が国で最初のものである。最近、欧米の遺伝子治療臨床研究で、造血幹細胞への高効率な遺伝子導入と遺伝子発現がみられた、という報告が相次いで出されており、本臨床研究の妥当性、有効性を示唆している。

V 研究成果の発表

1. Sugimoto, Y., Sato, S., Tsukahara, S., Suzuki, M., Okochi, E., Gottesman, M. M., and Tsuruo, T. Coexpression of a multidrug resistance gene (*MDR1*) and herpes simplex virus thymidine kinase gene in a bicistronic vector Ha-MDR-IRES-TK allows selective killing of *MDR1*-transduced human tumors transplanted in nude mice. *Cancer Gene Therapy*, 4:51-58, 1997.
2. Oshima, T., Murray, G. J., Swaim, W. D., Longenecker, G., Quirk, J. M., Cardarelli, C. O., Sugimoto, Y., Pastan, I., Gottesman, M. M., Brady, R. O., and Kulkarni, A. B. α -galactosidase A deficient mice: a model for Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:2540-2544, 1997.
3. Sugimoto, Y. and Tsuruo, T. In vivo drug-selectable markers in gene therapy. *Leukemia Res.*, 11: 551-556, 1997.
4. Suzuki, M., Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Okochi, E., Gottesman, M. M., and Tsuruo, T. Retroviral co-expression of two different types of drug-resistant genes for the chemoprotection of normal cells from combination chemotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 3: 947-954, 1997.
10. Seimiya, H., Mashima, T., Toho, M., and Tsuruo, T. c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of interleukin-1 β -converting enzyme/CED-3-like protease during anticancer drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 4631-4636, 1997.
16. Aiba K., Horikoshi N., Sasaki Y., et al. A phase II study of paclitaxel (BMS-181339) by 24 hours infusion in patients with advanced or metastatic breast cancer. *J New Remedies Clinics* 1997 46:467-475, 1997.
17. Fukushima, M., Murakami, Y., Suzuki, N. and Aiba, K. The analysis of the innate pathways of 5-fluorouracil phosphorylation in human gastrointestinal cancer cell lines in vitro and in vivo. *Oncology Reports*. 4:1188-1194, 1997.
- Suzuki, M., Sugimoto, Y., Tsuruo, T. Efficient protection of cells from the genotoxicity of nitrosoureas by the retrovirus-mediated transfer of human ϕ methylguanine-DNA methyltransferase using bicistronic vectors with human multidrug resistance gene 1. *Mutation Res.*, 410: 133-141, 1998.
- Sugimoto, Y., Gottesman, M. M., Pastan, I., and Tsuruo, T. Construction of *MDR1* Vectors for Gene Therapy. *Methods in Enzymology* 292: 523-537, 1998.
- Zhang, S., Sugimoto, Y., Shoshani, T., Pastan, I., and Gottesman, M. M. A pHaMDR-DHFR bicistronic expression system for mutation analysis of P-glycoprotein. *Methods in Enzymology* 292: 474-480, 1998
- Iwata, M., Nunoi, H., Matauda, I., Kanagasaki, S., Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. Drug-selected complete restoration of superoxide generation in Epstein-Barr virus-transformed B cells from p47^{phox}-deficient chronic granulomatous disease patients using a bicistronic retrovirus vector encoding a human multidrug

resistance gene (*MDR1*) and the *p47^{phox}* gene. Human Genetics 103: 419-423, 1998.

- Haga, N., Naito, M., Seimiya, H., Tomida, A., Dong, J., and Tsuruo, T. 2-Deoxyglucose inhibits chemotherapeutic drug-induced apoptosis in human monocytic leukemia U937 cells with inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1/stress-activated protein kinase activation. Int. J. Cancer. 76: 86-90, 1998.
- Seimiya, H. and Tsuruo, T. Functional involvement of PTP-U2L in apoptosis subsequent to terminal differentiation of monoblastoid leukemia cells. J. Biol. Chem. 273: 21187-21193, 1998.
- Naasani, I., Seimiya, H., and Tsuruo, T. Telomerase inhibition, telomere shortening and senescence of cancer cells by tea catechins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 249: 391-396, 1998.
- Mashima, T., Seimiya, H., Chen, Z., Kataoka, S., and Tsuruo, T. Apoptosis resistance in tumor cells. Cytotechnology. 27: 293-308, 1998.
- Shibata, J., Aiba, K., Shibata, H., Minowa, W., and Horikoshi, N. Detection and quantitation of thymidylate synthase mRNA in human colon adenocarcinoma cell line resistant to 5-fluorouracil by competitive PCR. Anticancer Res. 18:1457-1464, 1998.
- Kokudo, N., Seki, M., Ohta, H., Azekura, K., Ueno, M., Sato, T., Moroguchi, A., Matsubara, T., Takahashi, T., Nakajima, T., and Aiba, K. Effects of Systemic and Regional Chemotherapy After Hepatic Resection for Colorectal Metastases. Annals of Surgical Oncology 5:706-712, 1998.
- Yanase, K., Sugimoto, Y., Andoh, T., Tsuruo, T. Retroviral expression of a mutant (Gly-533) human DNA topoisomerase I cDNA confers a dominant form of camptothecin resistance. Int. J. Cancer, 81: 134-140, 1999.
- Hibino, H., Tani, K., Ikebuchi, K., Wu, M., Sugiyama, H., Nakazaki, Y., Tanabe, T., Takahashi, S., Tojo, A., Suzuki, S., Tanioka, Y., Sugimoto, Y., Nakahata, T., and Asano, S. The common marmosetts as a target preclinical primate model for cytokine and gene therapy studies. Blood 93: 2839-2848, 1999.
- Chen, Z., Seimiya, H., Naito, M., Mashima, T., Kizaki, A., Dan, S., Imaizumi, M., Ichijo, H., Miyazono, K., and Tsuruo, T. ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. Oncogene 18: 173-180, 1999.
- Dan, S., Naito, M., Seimiya, H., Kizaki, A., Mashima, T., and Tsuruo, T. Caspase-dependent activation of c-Abl tyrosine kinase enhances the apoptosis development in human monocytic leukemia U937 cells. Oncogene 18: 1277-1283, 1999.
- Seimiya, H., Tanji, M., Oh-hara, T., Tomida, A., Naasani, I., and Tsuruo, T. Hypoxia up-regulates telomerase activity via mitogen-activated protein kinase signaling in human solid tumor cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 260: 365-370, 1999.
- Naasani, I., Seimiya, H., Yamori, T., and Tsuruo, T. FJ5002: a potent telomerase inhibitor identified by exploiting the disease-oriented screening program with

COMPARE analysis. Cancer Res. 59: 4004-4011, 1999.

- Ito, Y., Mukaiyama, T., Ogawa, M., Mizunuma, N., Takahashi, S., Aiba, K., et al. Epirubicin-containing high-dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic progenitor cell transfusion for patients with chemotherapy-sensitive metastatic breast cancer: results of 5-year follow up. Cancer Chemother. Pharmacol. 43:8-12, 1999.
- Igarashi, T., Mammo, K., Onishi, T., Kobayashi, M., Aiba, K., Tsushima, T., Ozono, S., Tomita, Y., Terachi, T., Satomi, Y., Kawamura, J. and The Japanese Study Group Against Renal Cancer. Interferon-alpha and 5-fluorouracil therapy in patients with metastatic renal cell cancer: an open multicenter trial. Urology 53:53-59, 1999.
- Hirata, K., Horikoshi, N., Aiba, K., Okazaki, M., Denno, R., Sasaki, K., Nakano, Y., Ishizuka, H., Yamada, Y., Uno, S., Taguchi, T., and Shirasaka, T. Pharmacokinetic study of S-1, a novel oral fluorouracil antitumor drug. Clin. Cancer Res. 5: 2000-2005, 1999.
- Yanase, K., Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Oh-hara, T., Andoh, T., and Tsuruo, T. Identification and characterization of a deletion mutant of DNA topoisomerase I mRNA in a camptothecin-resistant subline of human colon carcinoma. Jpn. J. Cancer Res., 91: 551-559, 2000.
- Aiba, K., Horikoshi, N., Sasaki, Y. et al. Phase II study of paclitaxel (BMS-181339) by 24-hour infusion in patients with advanced or metastatic breast cancer. Breast Cancer, in press. • Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Pastan, I., and Gottesman, M. M. Bicistronic retrovirus vectors encoding drug-resistant genes. In: R. A. Aubin (ed.), Transgene Delivery and Expression in Mammalian Cells (a volume of Methods in Molecular Biology) Humana Press, in press