総 説

尿路性器癌の化学療法耐性の分子機構

京都大学医学部泌尿器科

寛 善 行

MOLECULAR MECHANISMS OF CHEMOTHERAPEUTIC
RESISTANCE IN GENITOURINARY CANCERS

Yoshiyuki Kakehi, MD

Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

はじめに

尿路性器癌の治療において化学療法の担う役割は、各腫瘍の抗癌剤に対する感受性により大きく異なる。いわゆる多剤耐性 (multidrug resistance: 以下 MDR) 現象の分子機構の解明は P 糖蛋白の発見以後急速に進展した。P 糖蛋白の分子構造や体内分布の研究は、MDR の機序の解明にとどまらず、広く生物一般の毒性物質除去機構やホルモン輸送に多くの新たな知見をもたらした。その一方で、P 糖蛋白のみでは説明のつかない MDR 現象が指摘され、臨床癌における MDR は P 糖蛋白発見当初の予想よりかなり複雑な機構であることが判明しつつある。分子機構の解明とともに、これらを克服するための新しい薬剤の開発や既存の薬剤の見直しが精力的に進んでいる。しかし、未だ既存の幾つかの確立された化学療法のレジメを変更させるほど有力な薬剤は登場していない。この点で、基礎的研究の臨床面へのさらなる feedback が今後の課題となっている。また、尿路性器癌の化学療法の大きな柱である cisplatin に対する耐性機序には P 糖蛋白は関与していないと考えられており、その分子機構の解明も急務である。

一般に抗癌剤耐性には、抗癌剤を投与しても初めから効果がみられない内因性耐性と、治療経過中に抗癌剤が効かなくなる獲得耐性に 2 大別される。また、耐性の原因としては宿主側の要因と癌細胞側の要因が関与していると考えられる。前者の例としては抗癌剤の肝での不活性化、代謝排泄の亢進などが挙げられる。本稿では主として後者の癌細胞側の要因について、これまでに明らかになりつつある分子機構を概説し、今後の展望について言及したい。

1. P 糖蛋白の発見と MDR

培養中の癌細胞に、各種の抗癌剤を低濃度から漸増しながら添加しつつ継代を重ねると、その抗癌剤に耐性な細胞クローンを得ることができる。初期に EMS (ethylmethane sulfonate) などの突然変異原を添加しておく、耐性細胞を得る確率が増すことから、抗癌剤耐性の成立に何らかの遺伝子変化が関与していることがわかる。抗癌剤による染色体の変化としては早くから、methotrexate 耐性細胞の染色体には均一に染色されるバンド (HSR: homogeneously staining region) や通常の染色体外に微小な染色体断片 (DM: double minute chromosome) が観察されていた。これは後に methotrexate の標的酵素であるジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR: dihydrofolate reductase) 遺伝子が 100 倍以上に増幅した結果であることがわかった¹⁾。

1970 年頃から、colchicine や vincristine などの vinca alkaloid 系抗癌剤や doxorubicin などの anthracyclin 系薬剤で選択した耐性細胞においては、選択薬剤と同系の他の薬剤だけでなく構造や作用機序の異なる dactinomycin などにも交差耐性を示すことが知られるようになった²⁾³⁾。さらに、これら MDR 細胞では薬剤の能動的排出が亢進していることが次々と報告されるようになった^{4)~6)}。1976 年カナダの Ling は抗癌剤耐性となったハムスターの培養細胞の細胞膜に約 170 キロダルトンの糖蛋白質が高発現していることを発見し、この物質が MDR 現象に関与しているとの予想をたて、permeability の “P” をとり P 糖蛋白質と命名した⁷⁾。

最も早くヒトの P 糖蛋白質の全アミノ酸配列の解

図1 アミノ酸の一次配列から予想される P 糖蛋白 (A), MRP (B) の二次構造。両者の間の homology は約15%と低い、細胞内に ATP 結合ドメインを 2 カ所有する ABC (ATP-binding cassette) スーパーファミリーに属する transporter 蛋白と推定される。

析に成功した Roninson らは、上述した methotrexate 耐性と同様に、この MDR 細胞では何らかの遺伝子の増幅があるはずとの仮説に基づいて、MDR 細胞でのみ増幅する遺伝子断片を独自の方法で単離し、これをプローブとして cDNA バンクをスクリーニングし、1986年に全長をコードする cDNA 断片 (mdr1) の単離に成功した⁸⁾⁹⁾。

2. P 糖蛋白の構造と基質認識機構

最終的に単離された cDNA 断片の解析から、この未知の蛋白は、1,280ケのアミノ酸が前半半分がほぼ繰り返した構造をとり、各々が膜貫通性部位と思われる 6 カ所ずつの疎水性配列を持つ糖蛋白質で、2 カ所に ATP 結合部位と思われるアミノ酸配列を有し、それまでに推定されていたような抗癌剤を細胞外へ排出するポンプが MDR 細胞に存在することが判明した (図 1A)。この糖蛋白は癌細胞だけではなく、消化管・肝や膵、腎や副腎といった臓器でも高い発現を示す¹⁰⁾、副腎では皮質に高い発現が認められ、副腎皮質ホルモンの分泌に関与している可能性がある。腎では近位尿細管の刷子縁で高い発現があり、体内に取り込まれた脂溶性毒素などを尿中に排泄する役割を担っていると推定されている。また、P 糖蛋白は脳や胎盤・精巣などの特殊な血管内皮細胞にも発現しており¹¹⁾、血液脳関門や血液精巣関門などでの構成因子の一つと考えられ興味を持たれている。実際、マウスの脳内毛細血管で発現している mdr1a 遺伝子をノックアウトすると、種々の薬剤の脳内蓄積量が増大する事が知られている¹²⁾。

P 糖蛋白の基質として先述した抗癌剤の他、digoxin や verapamil, cyclosporin など多くの物質が判明している。基質の特徴としては多環構造を有し脂溶性が高

いことがあげられる。それにしても P 糖蛋白の基質特異性の低さは従来の受容体ーリガンド型の輸送機序とは明らかに異なる。これまでの数々の知見から抗癌剤などの基質は直接 P 糖蛋白に結合して輸送されることは明らかとなっているが、正確な結合部位や輸送の形態は未だ明らかになっていない。

3. 尿路性器癌における P 糖蛋白の発現と役割

P 糖蛋白のクローニングは、それまで謎であった癌化学療法における多剤差耐性現象の機序を分子生物学的に説明したという点でまことに画期的であった。我々は尿路性器癌で P 糖蛋白の RNA レベルの発現を、1987年頃よりノザンプロット解析を用いて検討した¹³⁾。この解析では副腎皮質腫瘍と腎細胞癌では高い発現レベルを示したが他の癌種では検出限界以下であった。この頃ちょうど副腎および腎での P 糖蛋白の高い発現が報告されたこともあり、各々を発生母地とする 2 種の腫瘍での高い発現はある程度予想通りの結果であった。この腎細胞癌での高い発現レベルは果たして腎細胞癌の低い抗癌剤感受性に関与しているかを明らかにするため、腫瘍を採取後 stem cell culture を行い、P 糖蛋白に関連する vinblastine, doxorubicin などの薬剤への感受性と P 糖蛋白の mRNA レベルがある程度逆相関する事が判明した¹⁴⁾。Naito ら¹⁵⁾は腎細胞癌における P 糖蛋白の発現を免疫組織化学的に解析し、51.6%で明らかな発現を認め、感受性テストでは発現陽性群の adriamycin や vinblastine に対する感受性は有意に低かった。これらの結果は、高いレベルの P 糖蛋白の発現が腎細胞癌の抗癌化学療法剤に対するおしなべての低い感受性 (内因性 MDR) の一因であることを示唆している。

図2 膀胱癌細胞5637から doxorubicin を選択薬剤として得た多剤耐性細胞 DR5.5と DR50における *mdr1*, MRP 遺伝子の RT-PCR 法による mRNA レベル(A). 両者とも *mdr1* の発現は全く見られない (atypical MDR 細胞). 耐性度の強い DR50細胞においては, さらに DNA topoisomerase II の catalytic 活性 (Kinetoplast DNA の decatenation により検知) が著しく低下している (B). Int. J. Urol.より転載 (文献24)

その後, PCR の手法を微量の mRNA の検出にも応用し, かつ内因性コントロールを使うことにより定量性の点でも格段に進んだ定量的 RT-PCR 法¹⁶⁾により, ノザンでは検出感度以下であった尿路上皮癌や精巣腫瘍などについても解析が可能になり, これらの腫瘍組織でも弱いながらも P 糖蛋白 mRNA の発現が見られることが分かった¹⁷⁾. しかし, β_2 -microglobulin (以下 b2m) の 5 分の 1 以下の発現レベルのものがほとんどで (ちなみに腎細胞癌は半数が b2m の 0.3 倍から 1.2 倍¹⁸⁾), この程度の発現量が尿路上皮癌や精巣腫瘍の内因性耐性に関与している可能性は低いと思われる. ただし, 免疫組織化学的には, 膀胱癌で化学療法なしで膀胱全摘された 29 例の腫瘍サンプルで 75% に明らかな発現があったとする報告もあり¹⁹⁾, P 糖蛋白の転写後の発現調節のさらなる解析が待たれる. 一方, 尿路性

器癌化学療法開始後の獲得耐性に P 糖蛋白が関与しているかどうかは重要な問題だが, タイミングよい正確なサンプリングが難しいことから, 治療前後の *mdr1* mRNA レベルを評価した臨床研究はまだ少なく結論は出ていない現状である. しかし我々は 1 例ではあるが, 膀胱癌の傍大動脈リンパ節転移で, MVAC 化学療法後に治療前の原発巣の発現レベルの約 15 倍の発現上昇を示した症例を経験している¹⁷⁾. Nakagawa ら²⁰⁾は 33 例の化学療法を施行した膀胱癌組織を免疫組織化学的に解析し, 4 例 (14%) に P 糖蛋白の発現誘導があったとしている.

4. P 糖蛋白の関与しない MDR

カナダの Cole らは, 肺小細胞癌細胞株から doxorubicin を選択薬剤として得た MDR 細胞が, P 糖蛋白とは異なる分子量約 190 キロダルトンの細胞膜蛋白を

多量に発現していることを報告した²¹⁾²²⁾。彼らはこの膜蛋白を multidrug resistance-associated protein (MRP) と命名したが、1531 アミノ酸の配列から MRP は P 糖蛋白と相同性は約 15% と低いものの、ATP 結合部位を有し、P 糖蛋白や cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)、MHC class II-linked peptide transporter などと同じ ABC スーパーファミリーに属する分子であることが判明した。予想される構造は、図 1 B に示すように P 糖蛋白に類似し、膜に局在するチャンネル型トランスポーターとしての役割を有すると考えられている。しかし MRP は細胞膜以外にも細胞内の小胞体にも多量に発現しており、単に排出ポンプとしてだけでなく、薬剤の蓄積や細胞内分布に間接的に影響を与えている可能性も否定できない。

我々はヒト膀胱癌細胞 5637 から doxorubicin を選択薬剤として MDR 細胞 (5637/DR5.5 と命名) を得たところ、耐性細胞では *mdr1* の発現上昇を伴わず、MRP の著しい発現上昇を認めた²³⁾ (図 2A)。この耐性細胞での薬剤動態を解析したところ、細胞外への薬剤の排出の亢進が見られ、MRP 蛋白が P 糖蛋白と同様に癌細胞における薬剤排出ポンプとして機能することが示された。一連の選択過程でさらに耐性度の高いクローン (5637/DR50 と命名) を得たが²⁴⁾、耐性を示す薬剤スペクトラムは P 糖蛋白性の MDR 細胞に類似していたが、etoposide に対しては選択薬剤である doxorubicin より強い耐性獲得を示している点が特徴的であった。Hasegawa ら²⁵⁾もヒト膀胱癌株 T24 から doxorubicin を選択薬剤として MRP を高発現する耐性株を得ているが、やはり etoposide に対する強い耐性を認めている。一方、etoposide を選択薬剤として得られたヒト前立腺癌細胞において、MRP を高発現し、薬剤の排泄亢進が観察されている²⁶⁾。このようにこれまでに報告されている MRP を高発現する MDR 細胞は全て doxorubicin か etoposide を選択薬剤としており、特に etoposide に対する強い耐性を示す特徴があり、vinca alkaloid 系薬剤を選択薬剤とした時には P 糖蛋白の高発現した細胞が得られるのとは対照的である。これらの知見は MRP が薬剤の結合や輸送に関して P 糖蛋白とは異なる機構で機能している可能性を示唆していると思われる。

さて、報告されている MRP を高発現する耐性クローンは、doxorubicin や etoposide などの DNA topoisomerase II (以下 topo II) を標的とする薬剤を

選択薬剤としている。事実、MRP を高発現する MDR 細胞ではしばしば topo II の質的もしくは量的変化がみられる²⁷⁾²⁸⁾。我々の得た上述の耐性細胞でも DR5.5 では topo II の活性は低下していなかったが、さらに耐性度の強い DR50 では著しい低下が認められた²⁴⁾ (図 2B)。実際に topo II 構造遺伝子の突然変異が証明されている耐性クローンもあり、また、topo II の活性や DNA 切断複合体の低下などを有して MRP の発現量の増加を伴わない MDR 細胞も報告されており、topo II の質的・量的変化は単独もしくは MRP の発現上昇と連動して非 P 糖蛋白性 MDR に関与していると思われる²⁹⁾。

もう一つ、非 P 糖蛋白性 MDR として重要なものに、glutathione および glutathione s-transferase 系がある。glutathione (以下 GSH) は glutamate, cysteine, glycine の 3 アミノ酸から合成される非蛋白質性 SH で、好氣的生物では細胞内に広く存在し、多くの癌細胞でも高い発現が見られる。GSH の生理作用は多彩であるが、抗癌剤耐性の面でも大きな役割を担っていると思われる³⁰⁾³¹⁾。主な作用として、1) melphalan, chlorambucil といったアルキル化剤を抱合し不活化する。2) cisplatin, melphalan などの DNA と架橋を形成する薬剤と結合しそれを阻害する。3) doxorubicin や mitomycin などが生成するフリーラジカルを消去するスカベンジャーとしての機能を有する。glutathione s-transferase (以下 GST) は、抗癌剤などの外因性有機化合物と GSH との抱合、胆汁酸やステロイドホルモンとの直接結合、さらには自身の GSH ペルオキシダーゼ活性による過酸化脂質の還元といった極めて多機能を有する蛋白である。ヒトでは α 、 μ 、 π クラスの GST が存在するが、癌組織では π クラスが重要となる。肺癌・胃癌・子宮癌・膀胱癌などで GST- π の高い発現が見られるが³²⁾³³⁾、これはヒトの多くの癌が化学発癌剤や放射線・紫外線に起因することと関係が深いと思われる。上述の MRP は glutathione 抱合体を輸送するとの報告もあり³⁴⁾、glutathione 系の耐性機構も MRP 蛋白と関連して非 P 糖蛋白性 MDR の重要な構成要因になっていると考えられる。我々が樹立した膀胱癌 5637 の doxorubicin 耐性細胞株でも、先述の MRP の発現上昇や topo II の活性低下に加え、glutathione の濃度の上昇や transferase 活性、peroxidase 活性の上昇を認めている²⁴⁾。

これまでに尿路性器癌の多剤耐性の機構を解明する目的で多くの細胞株が報告されてきた。表 1 にその主

表1 多剤耐性を獲得した主なヒト尿路性器癌細胞株

細胞株		選択薬剤	遺伝子発現		topo II 活性	ref. #
			mdr1	MRP		
膀胱癌	T24/VCR	vincristine	(+)	(-)	mRNA ↓	25
膀胱癌	KK47/ADM	doxorubicin	(+)	(+)		25
膀胱癌	UM-UC-6dox	doxorubicin	P 糖蛋白(+)	?		84
膀胱癌	T24/ADM	doxorubicin	(-)	(+)		29
膀胱癌	5637/DR5.5	doxorubicin	(-)	(+)	→	23,24
	5637/DR50	doxorubicin	(-)	(+)	↓	24
前立腺癌	PC-3/VP20	etoposide	(-)	(+)	→	26

なものをまとめたが、選択薬剤により耐性機構に特徴はあるものの、同じ選択薬剤でも機序は個々の細胞株で異なることや、複合的機序の関与する可能性が高いことも示している。実際の臨床癌で優れた機構を解明するためには、これらの細胞株のさらに詳細な解析と同時に、低濃度で間欠的な薬剤の添加などによる、より臨床癌での獲得耐性に近いモデルを作成する必要がある。

5. 尿路性器癌における MDR 関連遺伝子群の発現

癌細胞の発癌過程と抗癌剤耐性に関連する分子群の発現とは密接な関係があるようだ。有名な Solt と Farber のラット肝化学発癌のモデルでは、前癌状態である hyperplastic nodule の段階ですでに酵素変化の一つとして、抗癌剤の耐性に関与すると考えられている glutathione S-transferase の酵素活性の上昇などが認められる³⁵⁾³⁶⁾。同モデルにおいて、さらに後期に発生する大型の hyperplastic nodule や hepatocellular carcinoma では P 糖蛋白の過剰発現が観察されている³⁷⁾。また、mdr1 遺伝子は heat shock や砒素により発現誘導される responsive element を有するし³⁸⁾³⁹⁾、変異 p53 癌抑制遺伝子産物は mdr1 の誘導活性があるとの報告もある⁴⁰⁾。また、大腸癌において癌病巣の辺縁の浸潤傾向の著しい部位やリンパ節転移巣に P 糖蛋白の発現が偏って見られるとの報告もある⁴¹⁾。これらは、癌細胞が発癌過程（特に化学発癌）や悪性進展する段階で、耐性に関与する遺伝子群の発現上昇も伴う可能性を示唆する⁴²⁾。

我々は、尿路性器癌の中でも化学発癌が主要因となっている尿路上皮癌や腎細胞癌における、mdr1, MRP, glutathione S-transferase π （以下 GST-p), topo II といった MDR 関連遺伝子群の発現を正常細胞と対比しながら解析した⁴³⁾。まず未治療の尿路上皮癌においてであるが、4 種の遺伝子の中では MRP と

GST-p が腫瘍組織において正常尿路上皮より高い発現傾向を示した。P 糖蛋白をコードする mdr1 は先述したように内因性コントロールである b2m 遺伝子の発現量の 1/5~1/10 と低いレベルであった。grade や stage と各遺伝子の発現量とは明らかな相関はなかった。遺伝子間相互の発現に関しては、MRP 遺伝子の発現量が GST-p や mdr1 遺伝子の発現量と正の相関を示した。一方、腎細胞癌では、すでに mdr1 遺伝子の発現レベルが高いことを報告したが¹³⁾¹⁴⁾、正常腎実質と比べた時 mdr1 はむしろ低い傾向にあり、逆に MRP は正常腎よりも癌組織で高い傾向を認めた¹⁸⁾。尿路上皮癌での結果とあわせ、MRP は発癌過程で発現が上昇する可能性が高く、この蛋白の機能を考える上でも興味深い。また、乳頭状と非乳頭状で腎細胞癌組織を区分したところ、MRP 遺伝子の発現は非乳頭状癌で高かった。4 種の MDR 関連遺伝子群の発現量は非乳頭状癌巣状癌では相互に正の相関を示したのに対し、乳頭状癌では mdr1 と MRP、MRP と topo II がそれぞれ強い負の相関を示した。これらは、細胞遺伝学的解析から、乳頭状と非乳頭状癌、clear cell type と non-clear cell type（特に chromophobe cell renal cancer）では発癌過程に関与する遺伝子変化がかなり異なることと照らし合わせ興味深い結果であった。精巣腫瘍では MRP 遺伝子の発現が mdr1 遺伝子の発現に比べ高い傾向が、seminoma, nonseminoma 双方で認められた (unpublished data)。最後に未治療の尿路上皮癌、腎細胞癌、精巣腫瘍組織サンプルにおける mdr1 および MRP 遺伝子の mRNA レベルの分布を図 3 に示す。尿路上皮癌、精巣腫瘍では全体的に MRP の steady state の mRNA レベルが mdr1 より高いこと、腎細胞癌では common type と papillary type では発現パターンが異なる傾向があること、sarcomatous type では MRP の発現が優位であることが

図3 尿路上皮腫瘍, 腎細胞癌, 精巣腫瘍の *mdr1* および MRP 遺伝子の発現レベルを $\beta 2$ microglobulin レベルとの比で表した箱ヒゲ図。

示されている。

6. 化学療法とアポトーシス耐性

doxorubicin, etoposide, cisplatin といった抗癌剤や放射線などによって DNA が障害された細胞は, ある一定以上障害が蓄積すると細胞死に至る。この細胞死は単純な「壊死」ではなく, 核の凝縮, 細胞の萎縮といった独特の形態変化を伴い, アポトーシス (apoptosis) と呼ばれる細胞死の経過をとるようである⁴⁴⁾。この過程には, 癌抑制遺伝子として有名な p53 などが関与すると考えられている⁴⁵⁾⁴⁶⁾。p53 の重要な役割として, 細胞周期を G1 期にとどめ, 抗癌化学療法剤で傷ついた DNA の修復の時間稼ぎをすることにあるが, 腫瘍細胞にある一定以上の修復不可能な DNA 障害の蓄積と, さらに癌遺伝子の活性化などの増殖刺激が加わるとアポトーシスを誘導して異常な細胞を死に至らしめると考えられる (いわゆる clash 仮説⁴⁷⁾—図 4)。一般に p53 遺伝子変異は浸潤性膀胱癌や低分化型

図4 抗癌剤や放射線による DNA 障害を惹起した正常細胞および腫瘍細胞での癌抑制遺伝子 p53 の機能。通常 p53 により細胞は休止期に入ろうとするが, 腫瘍細胞では癌遺伝子の活性化やその他の増殖因子による増殖刺激が加わっているため, 情報の“clash”が起こり, apoptosis の経路へ導かれやすいとする仮説 (Fisher⁴⁷⁾)。

前立腺癌を含め多くの癌腫で高率に変異が認められるが, 問題はこのような細胞では抗癌剤による DNA 障害によるアポトーシスが正常に誘導されない可能性 (アポトーシス耐性) がある。Lowe らは p53 を homozygous に不活化したマウス胎児性線維芽細胞およびこれに癌遺伝子などを導入した肉腫細胞を用いた in vitro, in vivo の実験から, p53 を欠損させた細胞では抗癌剤や放射線に対して低感受性であったとしている⁴⁶⁾⁴⁸⁾。臨床腫瘍組織サンプルでの p53 の異常と抗癌剤感受性に関しては肺癌・乳癌・リンパ腫などで低感受性であったとの報告がある⁴⁹⁾⁵⁰⁾。しかし一方で最近, p53 の変異の有無と抗癌剤に対する感受性に関して全く逆の in vitro 実験のデータが報告された。Waldman ら⁵¹⁾は, S/M uncoupling を招来する DNA 障害性抗癌剤に対して, p53 欠損やその下流の p21 を発現しない細胞では intact なものより感受性が高かったとし, その理由として checkpoint での制御が効かないため, G2-S 期細胞が過剰になるためと推論している。膀胱癌に関しては, 直接的なデータでは無いが, Sarkis ら⁵²⁾はネオアジュバント MVAC 療法を受けた浸潤性膀胱癌患者の予後は p53 変異を有する群で有意に不良であったとしている。しかし, Skinner ら⁵³⁾のグループは術後補助化学療法をうけた膀胱全摘施行患者を p53 免疫染色で層別化したところ, p53 異常のあった群では補助化学療法により再発率や生存率に益があったとし

ている。我々は、浸潤性尿路上皮癌で、1986～1996年の間にシスプラチンを基本にした化学療法を受けた60症例に関して retrospective に化学療法前の腫瘍細胞の p53 status と化学療法に対する反応性および予後を検討した⁵⁴⁾。その結果、化学療法をネオアジュバントとして術前に行った症例群 (32例) でのみ、p53異常の無い群で奏効率・予後共に有意に良好な結果を得た。遠隔転移巣や局所進展高度のため根治手術の施行し得なかった28例では全く相関を認めなかった。p53の不活化はその negative regulator である mdm2遺伝子の過剰発現でも起こるが、今回の解析では mdm2の過剰発現の有無は、p53自身の異常に相加する予測価値は与えなかった。p53の介在しないアポトーシスの可能性も指摘されており⁵⁵⁾、p53異常と抗癌剤感受性に関しては、さらに十分な症例数による prospective な解析が待たれる。

7. シスプラチン耐性の分子機構

cisplatin は尿路性器癌の化学療法においても中心的役割を果たしている。しかし、その耐性機構は単一ではなく、1. 細胞内への cisplatin 蓄積量の減少、2. 細胞内での glutathione, metallothionein などによる解毒機構の亢進、3. cisplatin により障害を受けた DNA 修復の亢進、4. アポトーシス誘導障害など複数の因子が複合して耐性が獲得されると考えられている。1に関して、cisplatin 耐性ヒト類上皮癌 KB 細胞⁵⁶⁾やヒト前立腺癌 PC-3細胞⁵⁷⁾など幾つかの cisplatin 耐性細胞では明らかに細胞内の cisplatin 濃度が親株の感受性細胞より低いことが報告されている。最近、cisplatin に関しても P 糖蛋白のような ATP 依存性の薬剤排出機構が存在する可能性が指摘されており⁵⁸⁾、今後の解析が待たれる。2に関連して、glutathione 以外の内因性還元物質の一つで、かつて ADF (adult T cell leukemia-derived growth factor) として単離された thioredoxin も cisplatin 耐性との関連で注目されている⁵⁹⁾。尿路上皮癌の内因性 cisplatin 耐性と metallothionein の発現の関連を指摘する報告もある⁶⁰⁾。我々は cisplatin 耐性の分子機構を解明する目的で、ヒト腎癌細胞 ACHN, CAKI-1細胞から cisplatin 耐性細胞を単離し、親株と耐性細胞の mRNA を比較し耐性細胞でのみ強く発現する分子のクローニング (differential display 法) を試みた。その結果、120ケの cDNA 断片を単離し、最終的に2種の耐性細胞株で共通して発現上昇している4クローンの塩基配列を決定した。このうち1つは actin 結合蛋白の一種として、

表2 現在臨床応用が進行中もしくは将来的に期待される主な MDR 克服薬

	標的とする分子		
	P 糖蛋白	MRP	GSH/GST- π
合成 Verapamil (R-verapamil など)	○		
新規キノリン剤 (MS-209 など)	○		
Cepharanthine	○		
シクロスポリン誘導体 (SDZPSC833 など)	○	?	
dihydropyridine 誘導体 (NIK250 など)	○	○	
カルモドゥリン拮抗薬 (W-77 など)	○		○
GSH 合成阻害剤 (BSO)		○	○
GST- π 阻害剤 (ケトプロフェン など)			○

すでに cisplatin 耐性細胞での過剰発現の報告のある T-plastin⁶¹⁾であった。もう一つのクローンは新規遺伝子で、432アミノ酸をコードし、RNA splicing に関連する蛋白によく見られる SR ドメインを有していた (第55回日本癌学会総会、第20回日本分子生物学会、投稿準備中)。この分子を組み込んだ発現ベクターの導入によって感受性株が cisplatin の感受性を低下させるかを現在検討中である。

このように幾つかの cisplatin 耐性に関連した分子機構が提出されつつあるが、臨床的な投与濃度での cisplatin 耐性にどの機構が主として関与するのかを解明することが今後の課題である。

8. 耐性の克服

これまでに概説してきた抗癌剤耐性に関与すると思われる分子機構を標的として、幾つかの耐性克服薬が開発され、一部はすでに臨床試験が行われている (表2)。特に、P 糖蛋白に結合し抗癌剤と拮抗的に細胞外へ排出されるタイプの薬剤は、わが国の鶴尾ら⁶²⁾⁶³⁾のグループが、世界に先駆け verapamil や diltiazem などの抗不整脈薬剤にその作用があることを報告して以来、数多く報告されてきた^{64)~67)}。表在性膀胱癌の治療として膀胱内に doxorubicin などの抗癌剤と verapamil を併用注入する試みも行われている⁶⁸⁾。臓器移植の際に頻用される cyclosporin A や FK-506などの免疫抑制剤の中にも P 糖蛋白を介した MDR を強力に克服する作用があることが証明されている⁶⁵⁾⁶⁹⁾⁷⁰⁾。

verapamil や cyclosporin はそのまま抗癌剤と併用投与すると、克服薬自身の副作用（心不全・免疫抑制など）が問題となるため⁶⁴⁾⁷¹⁾、光学異性体や誘導体の開発・臨床試験が行われている。P 糖蛋白質が本来、体内に取り込まれた植物アルカロイドなどの毒性物質の排出ポンプであることから、既存の植物アルカロイド系薬剤も MDR 克服薬としての可能性を秘めている。ムラサキツブツから抽出され、古くから抗アレルギー薬などとして用いられてきた cepharanthine もその一つである^{72)~75)}。

非 P 糖蛋白性 MDR を克服する薬剤に関しては、P 糖蛋白拮抗薬に比べてまだ報告が少ない。我々は、MRP を強く発現し P 糖蛋白を発現していない膀胱癌細胞株で、cyclosporin A が doxorubicin などの薬剤の排出を阻害することを見いだしている²³⁾。cyclosporin A より免疫抑制力の弱い誘導体として開発され、P 糖蛋白と拮抗する SDZPSC833⁶⁸⁾が、MRP を過剰発現する MDR 細胞でも抗癌剤感受性を高めるかどうかは結論が出ていない。MRP と P 糖蛋白の両者が発現している癌細胞も多いと考えられるため、両者を阻害する薬剤はより臨床的に意義があると思われる。そのほか、glutathione の生成阻害剤である buthionine sulfoximine は細胞株レベルでは明らかに doxorubicin などの耐性を克服する作用があり³¹⁾⁷⁶⁾、また MRP が glutathione 抱合体の transporter でもあるとされることから非 P 糖蛋白性 MDR では有力な薬剤といえるが、副作用の点で臨床应用到結びついていない⁷⁷⁾。また、ある種の Ca 拮抗剤は GST-p と P 糖蛋白

の両者をブロックする作用があると報告され⁷⁸⁾、臨床応用への期待が高い。

cisplatin 耐性に関しては上述のようにまだその機序の解明の段階で、克服薬に関する報告は少ない。しかし、cisplatin 耐性細胞では camptothecin 誘導体などの DNA topoisomerase I を標的とする抗癌剤に対して逆に感受性の上昇を示す collateral sensitivity という現象が観察されており⁷⁹⁾、今後、一次化学療法に再燃した症例への二次化学療法のレジメの構成へ影響を与えると思われる。

一方、遺伝子工学的手法を応用した MDR の克服も試みられようとしている。一つは、MDR の直接的な克服ではないが、化学療法に伴う骨髄抑制を回避する目的で、mdr1 遺伝子発現ベクターを外来性に導入された骨髄幹細胞を移植して、vinblastine や doxorubicin による高用量化学療法を行う試みが転移性膀胱癌などで始まっている⁸⁰⁾。また、ribozyme と呼ばれるある種の RNA 分子は、特定の標的 mRNA を切断して正常な翻訳を阻害する⁸¹⁾。P 糖蛋白の 2 カ所の ATP 結合部位の間を標的にした anti-MDR-1 ribozyme は in vitro で多剤耐性を克服することが報告されている⁸²⁾⁸³⁾。対象病巣の MDR 関連遺伝子群の発現を分子診断し、標的 mRNA に対し適切にデザインされた ribozyme を使った遺伝子治療も将来的に有望になる可能性が高い。

9. おわりに

抗癌化学療法剤に対する耐性の獲得は、進行癌の治療上もっとも問題となる現象だが、その分子機序は複

図5 複合的な抗癌剤耐性機構の模式図。いわゆる多剤耐性 (MDR) の機構も複合的であるが、P 糖蛋白や MRP と関係ない cisplatin などの白金化合物の耐性機構も MDR の分子機構に複雑に影響しあっていると考えられる。

数の機構が相互に作用しあう複合的なものと考えられる(図5)。耐性の克服には、どの機序が主因となっているかを個々の腫瘍で簡便に分子診断する必要性があると同時に、複数の機構に共通に作用しかつ副作用の少ない克服薬の開発が今後の課題である。

この稿を終えるにあたり、適切なご助言とご指導を頂いた京都大学医学部 吉田 修教授に深く感謝します。

文 献

- Alt, F.W., Kellems, R.E., Bertino, J.R. and Schimke, R.T.: Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *J. Biol. Chem.*, **253**, 1357—1370, 1978.
- Bech-Hansen, N.T., Till, J.E. and Ling, V.: Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells: cross-resistance and collateral sensitivity. *J. Cell Physiol.*, **88**, 23—32, 1976.
- Danø, K.: Cross resistance between vinca alkaloids and anthracyclines in Ehrlich ascites tumor *in vivo*. *Cancer Chemother. Rep.*, **56**, 701—708, 1972.
- Danø, K.: Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **323**, 466—483, 1973.
- Ling, V. and Thompson, L.H.: Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J. Cell Physiol.*, **83**, 103—116, 1974.
- Inaba, M., Kobayashi, H., Sakurai, Y. and Johnson, R.K.: Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Res.*, **39**, 2200—2203, 1979.
- Riordan, J.R. and Ling, V.: Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J. Biol. Chem.*, **254**, 12701—12705, 1979.
- Roninson, I.B., Chin, J.E., Choi, K., Gros, P., Housman, D.E., Fojo, A., Shen, D.-W., Gottesman, M.M. and Pastan, I.: Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 4538—4542, 1986.
- Chen, C.-J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M. and Roninson, I.B.: Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *MDR1*(P-glycoprotein)gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, **47**, 381—389, 1986.
- Fojo, A., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Gottesman, M.M. and Pastan, I.: Expression of a multidrug-resistance gene(*MDR1*) in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 265—269, 1987.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M. R. and Bertino, J.R.: Multidrug-resistance gene(P-glycoprotein)is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 695—698, 1989.
- Schinkel, A.h., Smit, J.J. v-Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., v-Deemter, L., Mol, C. A., v-d-Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C. t-Riele, H., Berns, A.J.M. and Borst, P.: Disruption of the mouse *mdrla* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, **77**, 491—502, 1994.
- Takehi, Y., Kanamaru, H., Yoshida, O., Ohkubo, H., Nakanishi, S., Gottesman, M.M. and Pastan, I.: Measurement of multidrug-resistance messenger RNA in urogenital cancers; elevated expression in renal cell carcinoma is associated with intrinsic drug resistance. *J. Urol.*, **139**, 862—865, 1988.
- Kanamaru, H., Takehi, Y., Yoshida, O., Nakanishi, S., Pastan, I. and Gottesman, M.M.: *MDR1* RNA levels in human renal cell carcinomas: correlation with grade and prediction of reversal of doxorubicin resistance by quinidine in tumor explants. *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 844—849, 1989.
- Naito, S., Sakamoto, N., Kotoh, S., Goto, K., Matsumoto, T. and Kumazawa, J.: Expression of P-glycoprotein and multidrug resistance in renal cell carcinoma. *Eur. Urol.*, **24**, 156—160, 1993.
- Noonan, K.E., Beck, C., Holzmeyer, T.A., Chin, J.E., Wunder, J.S., Andrulis, I.L., Gazdar, A.F., Willman, C.L., Groffith, B., von Hoff, D.D. and Roninson, I.B.: Quantitative analysis of *MDR1*(multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 7160—7164, 1990.
- Takehi, Y., Wu, W.-J., Kim, W.-J., Arao, S., Fukumoto, M. and Yoshida, O.: Comparison of multidrug resistance gene expression levels with malignant potentials and influence of chemotherapy in urothelial cancers. *Int. J.*

- Urol., 2, 309–315, 1995.
- 18) Kim W-J, Kakehi Y, Kinoshita, H., Arao, S., Fukumoto, M. and Yoshida, O.: Expression patterns of multidrug-resistance (MDR1), multidrug resistance-associated protein (MRP), glutathione-S-transferase- π (GST- π) and DNA topoisomerase II (topo II) genes in renal cell carcinomas and normal kidney. *J. Urol.*, **156**, 506–511, 1996.
 - 19) Park, J., Shinohara, N., Liebert, M., Noto, L., Flint, A. and Grossman, H.B.: P-glycoprotein expression in bladder cancer. *J. Urol.*, **151**, 43–46, 1994.
 - 20) Nakagawa, M., Emoto, A., Nasu, N., Hanada, T., Kuwano, M., Cole, S.P.C. and Nomura, Y.: Clinical significance of multi-drug resistance associated protein and P-glycoprotein in patients with bladder cancer. *J. Urol.*, **157**, 1260–1265, 1997.
 - 21) Cole, S.P.C., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A. J., Kurz, E.U., Duncan, A.M.V. and Deeley, R. G.: Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, **258**, 1650–1654, 1992.
 - 22) Grant, C.E., Valdimarsson, G., Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Cole, S.P.C. and Deeley, R.G.: Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.*, **54**, 357–361, 1994.
 - 23) Kim, W-J., Kakehi, Y., Hirai, M., Arao, S., Hiai, H., Fukumoto, M. and Yoshida, O.: Multidrug resistance-associated protein-mediated multidrug resistance modulated by cyclosporin A in a human bladder cancer cell line. *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 969–977, 1995.
 - 24) Kim, W-J., Kakehi, Y. and Yoshida, O.: Multifactorial involvement of MRP, DNA topoisomerase II and glutathione/glutathione-S-transferase in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human bladder cancer cells. *Int. J. Urol.*, **4**, 583–590, 1997.
 - 25) Hasegawa, S., Abe, T., Naito S., Kotoh, S., Kumazawa, J., Hipfner, D.R., Deeley, R.G., Cole, S.P.C. and Kuwano, M.: Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP), MDR1 and DNA topoisomerase II in human multidrug-resistant bladder cancer cell lines. *Brit. J. Cancer*, **71**, 907–913, 1995.
 - 26) Tasaki, Y., Nakagawa, M., Ogata, J., Kiue, A., Tanimura, H., Kuwano, M. and Nomura, Y.: Reversal by a dihydropyridine derivative of non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in etoposide-resistant human prostatic cancer cell line. *J. Urol.*, **154**, 1210–1216, 1995.
 - 27) Schneider, E., Horton, J., Yang, C-H., Nakagawa, M. and Cowan, K.H.: Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line. *Cancer Res.*, **54**, 152–158, 1994.
 - 28) Naito, S., Hasegawa, S., Yokomizo, A., Koga, H., Kotoh, S., Kuwano, M. and Kumazawa, J.: Non-P-glycoprotein-mediated atypical multidrug resistance in a human bladder cancer cell line. *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 1112–1118, 1995.
 - 29) 横溝 晃, 谷口 堅, 長谷川周二, 阿部竜也, 久保毅, 榎野好成, 和田守正, 河野公俊, 桑野信彦: Atypical MDR. *癌と化学療法*, **21**, 1123–1129, 1994.
 - 30) Redmond, S.M.S., Joncourt, F., Buser K., Ziemiecki, A., Altermatt, H-J., Fey, M., Margison, G. and Cerny, T.: Assessment of P-glycoprotein, Glutathione-based detoxifying enzymes and O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase as potential indicators of constitutive drug resistance in human colorectal tumors. *Cancer Res.* **51**, 2092–2097, 1991.
 - 31) Kramer, R., Zakher, J. and Kim, G.: Role of glutathione redox cycle in acquired and de novo multidrug resistance. *Science*, **241**, 694–697, 1988.
 - 32) Efferth, T., Mattern, J. and Volm. M.: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein, glutathione S transferase and DNA topoisomerase II in human tumors. *Oncology*, **49**, 368–375, 1992.
 - 33) Thomas, D.J., Birch, P.J., Vickers, J., Robinson, M., Clifford, S., Hall, A. and Neal, D.E.: Glutathione-S-transferase π expression in transitional cell carcinoma of the bladder. *Brit. J. Urol.*, **72**, 740–743, 1993.
 - 34) Versantvoort, C.H.M., Broxterman, H.J., Schepers, R.J., and Twentyman, P.R.: Regulation by glutathione of drug transport in multidrug-resistant human lung tumor cell lines overexpressing multidrug resistance-associated protein. *Brit. J. Cancer*, **72**, 82–89, 1995.
 - 35) Solt, D. and Farber, E.: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, **263**, 701–703, 1976.
 - 36) Farber, E.: Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G.

- H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.*, **44**, 5463–5474, 1984.
- 37) Bradley, G., Scharma, R., Rajalakshmi, S. and Ling, V.: P-glycoprotein expression during tumor progression in rat liver. *Cancer Res.*, **52**, 5154–5161, 1992.
 - 38) Kioka, N., Yamano, Y., Komano, T. and Ueda, K.: Heat-shock responsive elements in the induction of the multidrug resistance gene(*MDR1*). *FEBS Lett.*, **301**, 37–40, 1992.
 - 39) Chin, K-V., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I., Gottesman, M.M.: Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance(*MDR1*) gene in human renal cell carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **265**, 221–226, 1990.
 - 40) Chin, K-V., Ueda, K., Pastan, I. and Gottesman, M.M.: Modulation of activity of the promoter of the human *MDR1* gene by Ras and p53. *Science*, **255**, 459–462, 1992.
 - 41) Weinstein, R.S., Jakate, S.M., Dominguez, J.M., Leboviz, M.D., Koukoulis G.K., Kuszak, J.R., Klusens, L.F., Grogan, T.M., Saclarides, T.J. and Roninson, I.B.: Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Res.*, **51**, 2720–2726, 1991.
 - 42) Benchimol, S. and Ling, V.: P-glycoprotein and tumor progression (Editorial). *J. Natl. Cancer Inst.*, **86**, 814–816, 1994.
 - 43) Kim, W-J., Kakehi, Y., Fukumoto, M. and Yoshida, O.: Expression of multidrug resistance-related genes (*mdr1*, MRP, GST- π and DNA topoisomerase II) in urothelial cancers. *Brit. J. Urol.*, **78**, 361–368, 1996.
 - 44) Kaufmann, S.H.: Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptotecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res.*, **49**, 5870–5878, 1989.
 - 45) 鈴木文男: p53と癌とアポトーシス. アポトーシスの分子医学(羊土社), p114–125, 1995,
 - 46) Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T. and Housman, D.E.: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, **74**, 957–967, 1993.
 - 47) Fisher, D.E.: Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. (Minireview). *Cell*, **78**, 539–542, 1994.
 - 48) Lowe, S.W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H.E., Fisher, D.E., Housman, D. E. and Jacks, T.: p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*, **266**, 807–810, 1994.
 - 49) Rusch, V., Klimstra, D., Venkatraman, E., Oliver, J., Martini, N., Gralla, R., Kris, M. and Dmistrovsky, E.: Aberrant p53 expression predicts clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, **55**, 5038–5042, 1995.
 - 50) Koehli, O.R., Schaer, G.N., Seifert, B., Hornung, R., Haller, U., Eppenberger, U. and Mueller, H.: Mutant p53 protein associated with chemosensitivity in breast cancer specimens. *Lancet*, **344**, 1647–1648, 1994.
 - 51) Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B.: Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature*, **381**, 713–716, 1996.
 - 52) Sarkis, A.S., Bajorin, D.F., Reuter, V.E., Herr, H.W., Netto, G., Zhang, Z-F., Schultz, P.K., Cordon-Cardo, C. and Scher, H.I.: Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J. Clin. Oncol.*, **13**, 1384–1390, 1995.
 - 53) Cote, R.J., Esrig, D., Groshen, S., Jones, P.A. and Skinner, D.G.: p53 and treatment of bladder cancer. *Nature*, **385**, 123–124, 1997.
 - 54) Kakehi, Y., Özdemir, E., Habuchi, T., Yamabe, H., Hashimura, T., Katsura, Y. and Yoshida, O.: Absence of p53 overexpression and favorable response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in urothelial carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* in press
 - 55) Wu, G-S. and El-Deiry, W.S.: Apoptotic death of tumor cells correlates with chemosensitivity, independent of p53 or bcl-2. *Clin. Cancer Res.*, **2**, 623–633, 1996.
 - 56) Fujii, R., Mutoh, M., Niwa, K., Yamada, K., Aikou, T., Nakagawa, M., Kuwano, M. and Akiyama, S.: Active efflux system for cisplatin in cisplatin-resistant human KB cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 426–433, 1994.
 - 57) Nakagawa, M., Nomura, Y., Kohno, K., Ono, M., Mizoguchi, H., Ogata, J. and Kuwano, M.: Reduction of drug accumulation in cisplatin-resistant variants of human prostatic cancer PC-3 cell line. *J. Urol.*, **150**, 1970–1973, 1993.
 - 58) 和田守正, 内海 健, 桑野信彦: ヒト MRP サブファミリーの生理機能と抗癌剤耐性. 日本農芸化学

- 会誌, 71, 793—798, 1997.
- 59) Tagaya, Y., Maeda, Y., Mitsui, A., Kondo, N., Matsui, H., Hamuro, J., Brown, N., Arai, K., Yokota, T., Wakasugi, H. and Yodoi, J.: ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *E.M.B.O. J.*, **8**, 757—764, 1989.
 - 60) Kotoh, S., Naito, S., Sakamoto, N., Goto, K. and Kumazawa, J.: Metallothionein expression is correlated with cisplatin resistance in transitional cell carcinoma of the urinary tract. *J. Urol.*, **152**, 1267—1270, 1994.
 - 61) Hisano, T., Ono, M., Nakayama, M., Naito, S., Kuwano, M. and Wada, M.: Increased expression of T-plastin gene in cisplatin-resistant human cancer cells: identification by mRNA differential display. *F.E.B.S. Lett.*, **11**, 397, 101—107, 1996.
 - 62) Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine by verapamil. *Cancer Res.*, **41**, 1967—1972, 1981.
 - 63) Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.*, **42**, 4730—4733, 1982.
 - 64) Ozols, R.F., Cunnion, R.E., Klecker Jr., R.W., Hamilton, T.C., Ostchega, Y., Parrillo, J.E. and Young, R.C.: Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, **5**, 641—647, 1987.
 - 65) Sonneveld, P., Durie, B.G., Lokhorst, H.M., Marie, J-P., Solbu, G., Suciu, S., Zittoun, R., Löwenberg, B. and Nooter, K.: Modulation of multidrug-resistant multiple myeloma by cyclosporin. *Lancet*, **340**, 255—259, 1992.
 - 66) Miller, R.L., Bukowski, R.M., Budd, G.T., Purvis, J., Weick, J.K., Shepard, K., Midha, K.K. and Ganapathi, R.: Clinical modulation of doxorubicin resistance by the calmodulin-inhibitor, trifluoperazine: A phase I / II trial. *J. Clin. Oncol.*, **6**, 880—888, 1988.
 - 67) Isonishi, S., Kirmani, S., Kim, S., Plaxe, S.C., Braly, P.S., McClay, E.F. and Howell, S.B.: Phase I and pharmacokinetic trial of intraperitoneal etoposide in combination with the multidrug-resistance-modulating agent dipyr-idamole. *J. Natl. Cancer Inst.*, **83**, 621—626, 1991.
 - 68) Ohi, Y., Ohmori, H., Shirahama, T., Kawahara, M., Matsumura, Y., Tsushima, T. and Ohashi, Y.: Intravesical instillation of adriamycin in the presence or absence of verapamil for the treatment of superficial bladder cancer: preliminary report of a collaborative study. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **30**, s50—s54, 1992.
 - 69) Twentyman, P.R.: Cyclosporins as drug resistance modifiers. *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 109—117, 1992.
 - 70) Naito, M., Oh-hara, T., Yamazaki, A., Danki, T. and Tsuruo, T.: Reversal of multidrug resistance by an immunosuppressive agent FK-506. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **29**, 195—200, 1992.
 - 71) Miller, T.P., Grogan, T.M., Dalton, W.S., Spier, C.M., Scheper, R.J. and Salmon, S.E.: P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J. Clin. Oncol.*, **9**, 17—24, 1991.
 - 72) Kato, T. and Suzumura, Y.: Potentiation of antitumor activity of vincristine by the biscolaurine alkaloid cepharanthine. *J. Natl. Cancer Inst.*, **79**, 527—532, 1987.
 - 73) Shiraishi, N., Akiyama, S., Nakagawa, M., Kobayashi, M. and Kuwano, M.: Effect of bisbenzylisoquinoline (biscoclaurine) alkaloids on multidrug resistance in KB human cancer cells. *Cancer Res.*, **47**, 2413—2416, 1987.
 - 74) Hirai, M., Tanaka, K., Shimizu, T., Tanigawara, Y., Yasuhara, M., Hori, R., Kakehi, Y., Yoshida, O., Ueda, K., Komano, T. and Inui, K.: Cepharanthin, a multidrug resistant modifier, is a substrate for P-glycoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 73—78, 1995.
 - 75) 笥 善行, 橋村孝幸, 吉田 修, 清川岳彦, 兼松明彦: Bisbenzylisoquinoline による腎癌の多剤耐性の克服. 泌尿紀要, **39**, 1227—1232, 1993.
 - 76) Sieman, D.W. and Beyers, K.L.: In vivo therapeutic potential of combination thiol deletion and alkylating chemotherapy. *Brit. J. Cancer*, **68**, 1071—1079, 1993.
 - 77) O' Dwyer, P.J., Hamilton, T.C., Young, R.C., LaCreta, F.P., Carp, N., Tew, K.D., Padavic, K., Comis, R.L. and Ozols, R.F.: Deletion of glutathione in normal and malignant human cells in vivo by buthionine sulfoximine: clinical and biochemical results. *J. Natl. Cancer Inst.*, **84**, 264—267, 1992.

- 78) Maeda, O., Terasawa, M., Ishikawa, T., Oguchi, H., Mizuno, K., Kawai, M., Kikkawa, F., Tomoda, Y., Hidaka, H.: A newly synthesized bifunctional inhibitor, W-77, enhances adriamycin activity against human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.*, **53**, 2051—2056, 1993.
- 79) Kotoh, S., Naito, S., Yokomizo, A., Kumazawa, J., Asakuno, K., Kohno, K. and Kuwano, M.: Increased expression of DNA topoisomerase I gene and collateral sensitivity to camptothecin in human cisplatin-resistant bladder cancer cells. *Cancer Res.*, **54**, 3248—3252, 1994.
- 80) Mickisch, G.H. and Schroeder, F.H.: From laboratory expertise to clinical practice: multidrug-resistance-based gene therapy becomes available for urologists. *World J. Urol.*, **12**, 104—111, 1994.
- 81) Irie, A., Bouffard, D.Y. and Scanlon, K.J.: Ribozyme-mediated cancer gene therapy. *Int. J. Urol.*, **4**, 329—337, 1997.
- 82) Bouffard, D.Y., Ohkawa, T., Kijima, H., Irie, A., Suzuki, T., Curcio, L.D., Holm, P.S., Sassani, A. and Scanlon, K.J.: Oligonucleotide modulation of multidrug resistance. *Eur. J. Cancer*, **32A**, 1010—1018, 1996.
- 83) Kobayashi, H., Dorai, T., Holland, J.F. and Ohnuma, T.: Reversal of drug sensitivity in multidrug resistant tumor cells by MDR-1(PGY-1) ribozyme. *Cancer Res.*, **54**, 1271—1275, 1994.
- 84) Shinohara, N., Liebert, M., Wedemeyer, G., Chang, J.H.C. and Grossman, H.B.: Evaluation of multiple drug resistance in human bladder cancer cell lines. *J. Urol.*, **150**, 505—509, 1993.
-