

膀胱癌における抗癌剤投与による MDR1 遺伝子発現誘導の解析

岐阜赤十字病院泌尿器科 (部長: 藤広 茂)

根笹 信一, 藤広 茂

岐阜大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 河田幸道教授)

出口 隆, 河田 幸道

掛川市民病院泌尿器科 (部長: 蟹本雄右)

川 本 正 吾

トヨタ記念病院泌尿器科 (部長: 前田真一)

玉 木 正 義

岐阜県厚生連昭和病院泌尿器科 (部長: 山田伸一郎)

山 田 伸 一 郎

岐阜県厚生連養老中央病院泌尿器科 (部長: 岡野 学)

岡 野 学

ANALYSIS OF INDUCTION OF MDR1 GENE EXPRESSION BY ANTICANCER CHEMOTHERAPY IN BLADDER CANCER

Shinichi NEZASA and Shigeru FUJIIRO

From the Department of Urology, Gifu Red Cross Hospital

Takashi DEGUCHI and Yukimichi KAWADA

From the Department of Urology, Gifu University School of Medicine

Shogo KAWAMOTO

From the Department of Urology, Kakegawa City Hospital

Masayoshi TAMAKI

From the Department of Urology, Toyota Memorial Hospital

Shinichiro YAMADA

From the Department of Urology, Gifuken Kouseiren Showa Hospital

Manabu OKANO

From the Department of Urology, Gifuken Kouseiren Yourou Central Hospital

Using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)-based quantitative analysis method, we investigated MDR1 mRNA expression levels in 58 bladder cancer specimens to determine whether MDR1 gene expression was induced or enhanced in bladder cancers during chemotherapy.

In bladder cancer specimens which were obtained from patients treated with anticancer drugs, significantly higher expression levels of MDR1 mRNA were observed than in those from patients not treated with any anticancer drugs ($p=0.0134$, Mann-Whitney U test).

From 14 patients who had bladder cancer, clinical specimens were obtained before and after neoadjuvant intra-arterial chemotherapy. The expression levels of MDR1 mRNA were significantly higher in the post-treatment specimens than in the pre-treatment specimens ($p=0.0298$, Wilcoxon signed-rank test). Of these 14 patients, 7 patients exhibited increased levels of MDR1 mRNA expression after chemotherapy. In 6 patients, there were no changes in the MDR1 mRNA expression levels before and after chemotherapy. Only one patient exhibited decreased levels of MDR1 mRNA expression after chemotherapy. No significant correlations were observed, between MDR1 mRNA expression levels and effect of the chemotherapy determined microscopically, dosage of anticancer drugs, or patient outcome.

In conclusion, this study indicates that MDR1 gene expression in bladder cancers is induced and enhanced during chemotherapy. This overexpression of the MDR1 gene may contribute to resistance to anticancer drugs after repeated chemotherapy.

(Acta Urol. Jpn. 43 : 629-636, 1997)

Key words: Bladder cancer, MDR1, RT-PCR

結 言

癌治療における化学療法は、有効な治療法の一つとして重要視されているが、同時にいくつかの課題も残されている。そのひとつとして抗癌剤耐性化の問題が挙げられる。泌尿器科領域においても、抗癌剤に対する反応性が比較的良好いとされる膀胱癌でさえ化学療法を繰り返すと徐々にその反応が鈍化し、治療効果が低下するという問題をしばしば経験する。抗癌剤耐性化の機序について十分理解することは耐性化克服のための第一歩であり、膀胱癌を含め各種腫瘍に対する化学療法の成績向上のために不可欠であると考えられる。

癌細胞の抗癌剤耐性化については今日さまざまな耐性因子をもってその説明がなされているが、最も注目されているものの一つに multidrug resistant 1 (MDR1) gene により code されている P-glycoprotein (P-gp) がある。細胞膜に存在する 170 kD の糖蛋白であり、ホルモン、毒素の他、adriamycin (ADM) や vinblastin (VLB) などの抗癌剤を細胞内より細胞外へ送り出す働きを持つとされ、抗癌剤耐性と密接な関連があると考えられている^{1,2)}。尿路上皮腫瘍においても代表的な化学療法である M-VAC (methotrexate, vinblastin, adriamycin, cisplatin) 療法施行後に再発をきたした症例に対して、ADM, VLB を除き、代わりに VP-16 を加えた化学療法を施行して治療効果を認めたとする報告がみられ³⁾、尿路上皮腫瘍に対する化学療法の効果と MDR1 遺伝子発現との関連性が推察されている。

白血病、卵巣癌などの、他の臓器の腫瘍においては化学療法後に MDR1 遺伝子発現レベルの上昇が認められ、抗癌剤に対する耐性化との関連が報告されている^{4,5)}が、膀胱癌に関しては明らかにされていない。そこでわれわれは抗癌剤を投与された臨床治療例における膀胱癌の MDR1 遺伝子発現の誘導の可能性について検討を行った。

対 象 と 方 法

1. 培養細胞株、臨床材料

培養細胞株として膀胱癌細胞株 HT1376 と腎癌細胞株 ACHN およびその ADM 耐性株を使用した。ACHN の ADM 耐性株である ACHN/ADM は、10% 牛胎児血清加 MEM 培養液に添加する ADM の濃度を段階的に高くすることにより作成した⁶⁾。

臨床材料として、膀胱癌58例について検討し、それらの臨床的および病理学的背景を Table 1 および Table 2 に示した。

2. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法による MDR1 mRNA の検出

(1) 癌細胞からの mRNA 抽出

Table 1. Clinical specimens

Bladder cancers	58
Primary/Recurrent	
Primary	53
Recurrent	5
Treatment	
Untreated	34
Treated	24
Histology	
TCC	51
Grade 1	7
Grade 2	35
Grade 3	9
AC	2
SCC	4
Small cell carcinoma	1

TCC: transitional cell carcinoma,
AC: adenocarcinoma, Treated:
treated with anticancer drugs

培養細胞株は 250 cc フラスコに full growth させ、これを calcium magnesium free-phosphate buffered saline にて洗浄した後、癌細胞を剥離させ、遠沈後、回収した。これらの検体から Quick Prep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いて oligo (dT)-cellulose にて mRNA を抽出し、以後の処理を要するまで -70°C で凍結保存した。

(2) Complementary DNA (cDNA) 合成

凍結保存しておいた mRNA より First-Strand cDNA Synthesis kit (Pharmacia) を用いて、pd (N)₆ primer にて cDNA を合成した。

(3) Primer

MDR1 mRNA 増幅のための primer は、5'-GGA TGGATCTTGAAGGGGA-3', 5'-CCTCCA-GATTCATGAAGAACCC-3' とした⁷⁾。また内部コントロールとして用いる β -actin mRNA の増幅については、5'-ACAATGAGCTGCGTGTGGCT-3', 5'-TCTCCTTAATGTACGCACGA-3' を primer とした⁷⁾。なお sense primer と anti-sense primer は、それぞれ異なる exon に対応させ、genomic DNA からは目的とする大きさの PCR 産物が増幅されないようにした。

(4) PCR

mRNA 0.1 μg に相当する量の cDNA を template として 10 $\times$ PCR buffer 10 μl , dNTP 1 μl , Ampli TaqDNA polymerase 0.5 μl , MDR1 mRNA または β -actin mRNA 増幅用の primer 各 5 μl に蒸留水を加えて計 100 μl とし、PCR を施行した。1 サイクルが denaturation (95°C) 60 秒, annealing (55°C) 30 秒, extension (72°C) 30 秒で構成される PCR を施行

Table 2. Summary of clinical data and MDR1 mRNA expression levels of 14 bladder cancers

	Histo-pathological diagnosis	Neoadjuvant chemotherapy*	MDR1 mRNA expression level		Curative effect**	Recurrence	Patient outcome	Followup (months)
			before	after				
1. F.N. (♀ 60 y.o.)	TCC G3	MTX 30 mg×2 Epi-ADM 30 mg×2 CDDP 75 mg×2	0	0	1-a	+	cancer death	18
2. N. S. (♀ 74 y.o.)	TCC G3	MTX 30 mg Epi-ADM 30 mg CDDP 70 mg	0	0.36	1-a	(reduction surgery)	cancer death	21
3. S.M. (♂ 65 y.o.)	TCC G2	MTX 40 mg THP-ADM 40 mg CDDP 75 mg	0.21	0.58	2	—	NED	37
4. M.K. (♀ 73 y.o.)	TCC G2	Epi-ADM 30 mg CDDP 50 mg	0	0	1-a	—	NED	36
5. T.H. (♂ 55 y.o.)	TCC G1	MTX 50 mg Epi-ADM 40 mg CDDP 100 mg	0	0.21	1-a	—	NED	31
6. Y.M. (♀ 52 y.o.)	TCC G3	MTX 50 mg Epi-ADM 75 mg CDDP 75 mg	0	0.11	1-b	—	NED	31
7. J.F. (♂ 65 y.o.)	AC	MTX 50 mg THP-ADM 50 mg CDDP 100 mg	0.24	0.4	1-b	+	AWD	27
8. T.F. (♂ 59 y.o.)	TCC G2	MTX 50 mg Epi-ADM 40 mg CDDP 100 mg	0	0	2	—	NED	26
9. R.O. (♀ 54 y.o.)	TCC G2	MTX 50 mg THP-ADM 50 mg CDDP 75 mg	0	0	1-a	(reduction surgery)	cancer death	3
10. Y.Y. (♂ 46 y.o.)	TCC G2	MTX 50 mg THP-ADM 50 mg CDDP 100 mg	0	0	1-a	—	NED	12
11. H.K. (♀ 65 y.o.)	TCC G3	MTX 30 mg Epi-ADM 30 mg CDDP 30 mg	0.08	0.12	1-a	—	NED	12
12. T.K. (♂ 61 y.o.)	SCC	MTX 37.5 mg Epi-ADM 30 mg CDDP 75 mg	0.1	0.16	1-b	unknown	unknown	—
13. T.N. (♀ 63 y.o.)	TCC G2	MTX 50 mg Epi-ADM 40 mg CDDP 100 mg	0.12	0.12	1-a	—	NED	12
14. M.I. (♂ 68 y.o.)	TCC G2	MTX 50 mg Epi-ADM 40 mg CDDP 100 mg	0.25	0.19	1-b	—	NED	12

* MTX: intra-arterial or intra-venous infusion. ADM derivatives and CDDP: intra-arterial infusion. Only in case 1, neoadjuvant intra-arterial chemotherapy was done 2 times. ** effect of the chemotherapy determined microscopically.

した。

Positive control として, ACHN またはその ADM 耐性株を用い, 同時に PCR を行った。

(5) 電気泳動

MDR1 mRNA に対する PCR 産物 (327 bp) 4 μ l と β -actin mRNA に対する PCR 産物 (372 bp) 4 μ l に sample buffer 2 μ l を加え 10 μ l とした。この混合液を Nu Sieve 3:1 (FMC Bioproducts, Rockland, ME) を用い作成した 3 % アガロースゲルにて電気泳動させた後, ethidium bromide で染色し, densitometer で各バンドの輝度を測定した。

3. RT-PCR 法による MDR1 mRNA 定量のための基礎的検討

(1) PCR サイクル数の決定

各種培養細胞株 (HT-1376, ACHN, ACHN/ADM)

に対して上記の手順で MDR1 および β -actin mRNA についての RT-PCR 法を施行した。サイクル数を 25, 30, 35, 40 回と変化させ, バント輝度より各々の PCR 産物量を測定した。測定値はサイクル数 30 回での ACHN/ADM の MDR1 mRNA に対する PCR 産物量を 100 として換算した。

(2) PCR における定量性の検討

PCR サイクル数を 30 回に設定し, template には ACHN/ADM の cDNA を用いた。MDR1 については template として用いる cDNA の濃度を mRNA 相当量で 0.1 μ g からその 2⁻²⁰ 倍希釈まで変化させ, 一方 β -actin については cDNA を希釈することなく PCR を施行し, 両者の PCR 産物量の比を求め, cDNA 濃度との相関性について検討した。

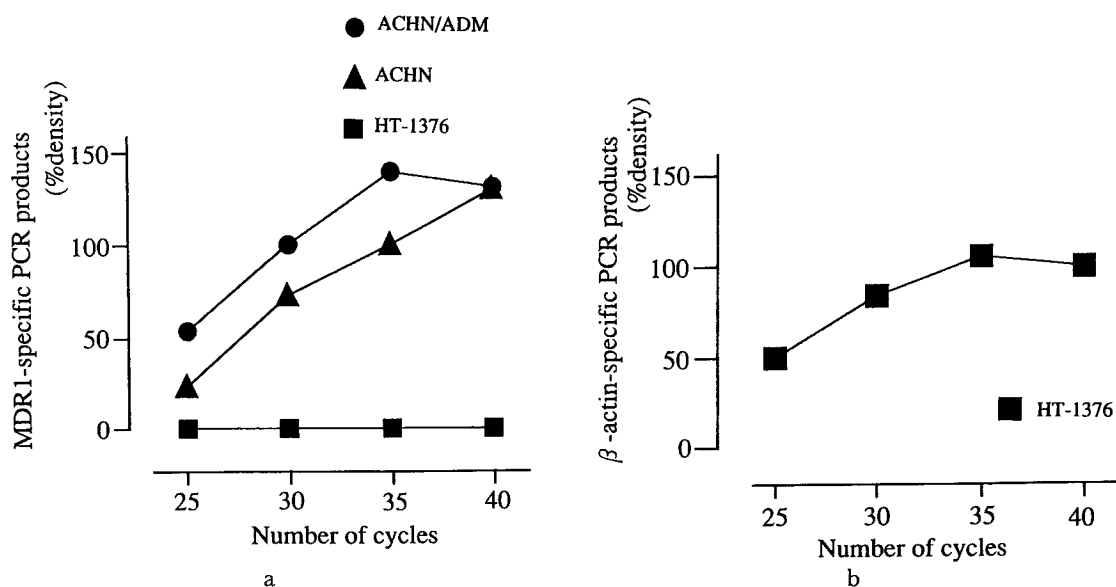


Fig. 1. Kinetics of PCR amplification. The quantity of PCR products was measured with a densitometer. % Density was calculated as [density of each PCR product/density of MDR1 mRNA-specific PCR product amplified from the mRNA of ACHN/ADM cells at 30 PCR cycles] $\times$ 100. a: Kinetics of PCR amplification for MDR1 mRNA. b: Kinetics of PCR amplification for β -actin mRNA.

4. 臨床材料に対する RT-PCR 法による MDR1 mRNA 発現レベルの測定とその検討

臨床材料は生検鉗子 3 カップ分を目安として採取した。前述の条件の下、PCR サイクル数を 30 回として RT-PCR 法を施行した。MDR1 mRNA および β -actin mRNA に対する PCR 産物を測定し、その比を MDR1 mRNA 発現レベルとして求め、臨床的背景との関連性についての検討を行った。

5. 組織学的治療効果の検討

化学療法後の組織学的効果は膀胱癌組織学的治療効果判定基準⁸⁾に基づき臨床経過を関知しない 1 人の病理医により判定された。

6. 統計学的解析

抗癌剤投与前後での MDR1 mRNA 発現レベルに関しては Wilcoxon signed-rank test を、また MDR1 mRNA 発現の陽性率に関しては Fisher の直接確率計算法を用いて比較検討した。他の比較については Mann-Whitney U test にて統計学的解析を行った。

結 果

1. MDR1 mRNA 定量のための基礎的検討

各培養細胞株における MDR1 mRNA および β -actin mRNA についての PCR kinetics を Fig. 1-a および 1-b に示した。

また PCR サイクル数を 30 回に設定し、template である ACHN/ADM の cDNA の濃度を変化させ、この cDNA 濃度と MDR1 mRNA に対する PCR 産物量と β -actin mRNA に対する PCR 産物量の比よ

り求められる MDR1 mRNA 発現レベルとの関係を Fig. 2 に示した。

2. 臨床材料における MDR1 mRNA 発現レベル

(1) 膀胱癌の異型度別、深達度別の比較

初発、未治療の膀胱癌を異型度別に grade 1, 2, 3 と分けて、MDR1 mRNA 発現レベルを比較した。G1, G2, G3 群の MDR1 mRNA 発現レベルの範囲はそれぞれ、0 から 0.21, 0 から 0.25, 0 から 0.08 で、中央値はいずれも 0 であり、群間に有意な差は認めなかった (G1 vs. G2, $p=0.5616$; G1 vs. G3, $p=0.7373$; G2 vs. G3, $p=0.8765$)。

また深達度が明らかな膀胱摘除症例 (全例 neoadjuvant 化学療法施行) については、深達度別に MDR1 mRNA 発現レベルを比較した。pT1 までの表在型と pT2 以上の浸潤型での MDR1 mRNA 発現レベルの範囲はそれぞれ、0 から 0.58, 0 から 0.40 で、中央値はそれぞれ、0.06, 0.055 であり、両群に有意差を認めなかった ($p=0.8166$)。

(2) 膀胱癌の未治療群と治療群との比較

初発膀胱癌の比較では、未治療群の MDR1 mRNA 発現レベルの範囲が 0 から 0.25 で中央値 0 であるのに対して、治療群では発現レベルの範囲は 0 から 0.58 で中央値 0.11 であり、両群の発現レベルの分布に有意差を認めた ($p=0.0134$) (Fig. 3)。さらに治療群に化学療法後の再発症例 5 例を加えて検討した場合、発現レベルの範囲は 0 から 0.58 で中央値 0 となるが、やはり両群の分布に有意差を認めた ($p=0.0288$)。

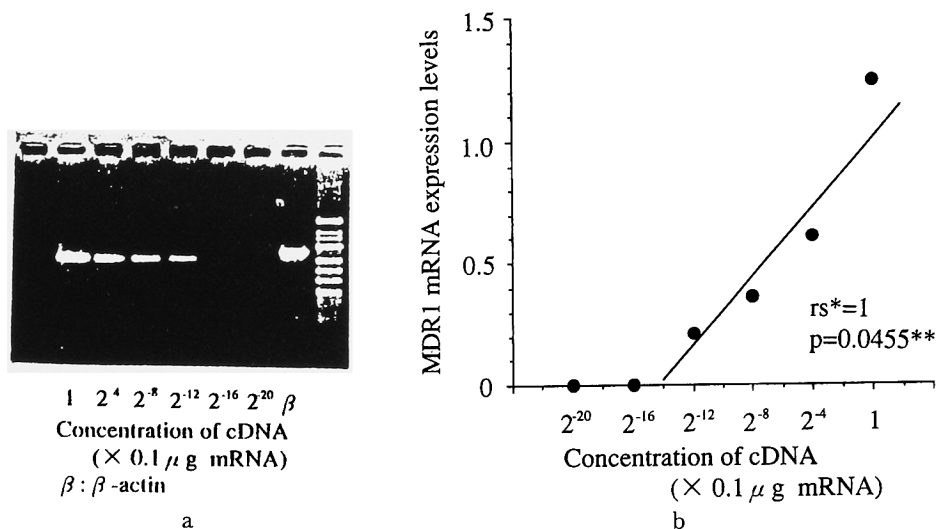


Fig. 2. Various concentrations of cDNA from ACHN/ADM cells and MDR1 mRNA expression. a: Electrophoresis of PCR products. b: Correlation between the concentration of cDNA and MDR1 mRNA expression levels. * Spearman's correlation coefficient, ** range: $2^{-16} \sim 1$ ($\times 0.1 \mu\text{g}$ mRNA)

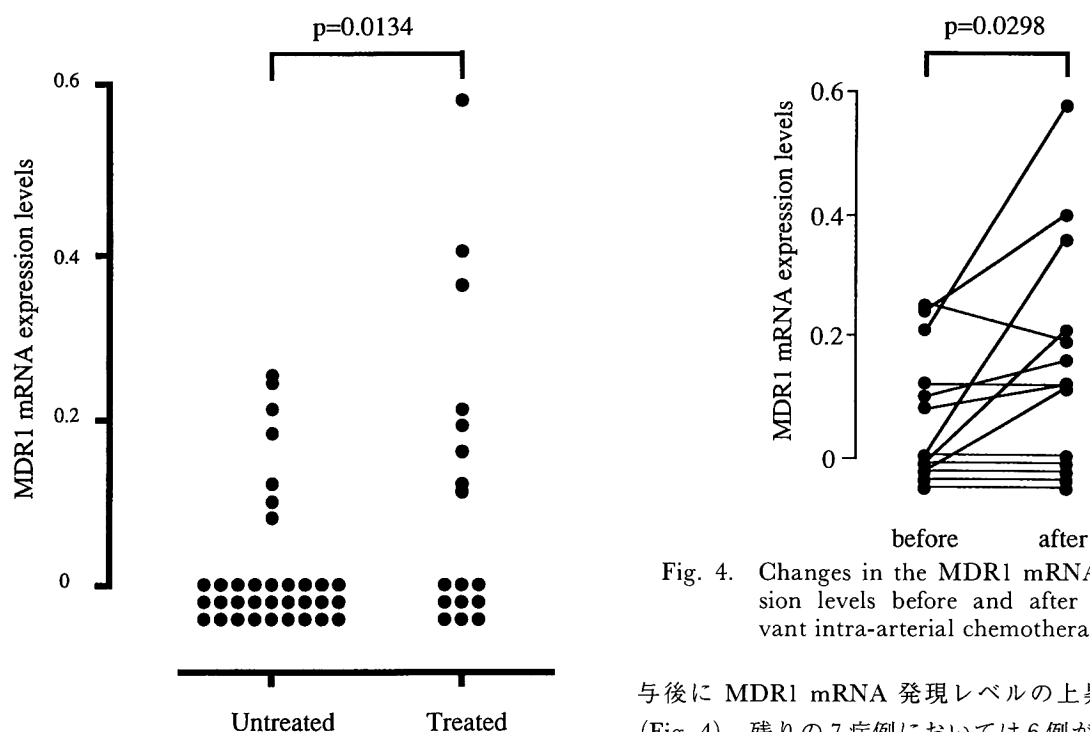


Fig. 3. MDR1 mRNA expression levels in untreated and treated bladder cancers with anticancer drugs.

また MDR1 mRNA 発現の有無での比較においても未治療群が34例中7例, 20.6%でMDR1 mRNA 発現を認めたのに対して治療群では19例中10例, 52.6%と高い陽性率を示し, 有意の差を認めた ($p=0.0302$).

(3) 膀胱癌における抗癌剤投与前後での比較

抗癌剤投与前後で癌細胞が採取できた膀胱癌患者14症例 (Table 2) においては14症例中7例で抗癌剤投

Fig. 4. Changes in the MDR1 mRNA expression levels before and after neoadjuvant intra-arterial chemotherapy.

与後にMDR1 mRNA 発現レベルの上昇を認めた (Fig. 4). 残りの7症例においては6例が不変, 1症例が減少していた. MDR1 mRNA 発現レベルは抗癌剤投与前より投与後において有意に高かった ($p=0.0298$).

14症例全例でneoadjuvant 化学療法としての動注化学療法を施行されているが, MDR1 mRNA 発現レベルの上昇を認めた7例と認めなかった7例において, ADM 誘導体, CDDP, MTX の各抗癌剤投与量に差を認めなかった (ADM 誘導体, $p=0.4254$; CDDP, $p=0.1387$; MTX, $p=0.1565$). また抗癌剤投与から手術 (臨床材料採取) までの期間 (日数) についても有意差を認めなかった ($p=0.9487$).

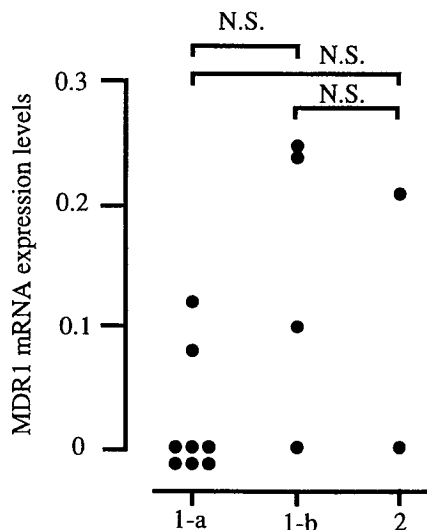


Fig. 5. MDR1 mRNA expression levels (before chemotherapy) and effect of the chemotherapy determined microscopically.

抗癌剤投与による組織学的効果は膀胱癌組織学的治療効果判定基準に従って, grade 1-a 8例, grade 1-b 4例, grade 2 2例の3群に分類されたが, 各群間に MDR1 mRNA 発現レベルに有意差は認められなかった (1-a vs. 1-b, $p=0.0582$; 1-a vs. 2, $p=0.3351$; 1-b vs. 2, $p=0.4811$) (Fig. 5).

またこれら膀胱癌14症例について再発を認めた群と認めなかった群との間で化学療法後の MDR1 mRNA 発現レベルに有意差を認めなかった ($p=0.9038$). 同様に予後調査において癌なし生存群と癌死群との間でも化学療法後の MDR1 mRNA 発現レベルに有意差を認めなかった ($p=0.6311$).

考 察

MDR1 遺伝子によって code されている P-gp は, ATP 依存性に薬剤を細胞内から細胞外へ輸送する能力を持ち, その発現量は ADM, VLB などのいわゆる P-gp 関連抗癌剤に対する耐性度と深く関連していると言われている. MDR1/P-gp 発現の検出には様々な方法が用いられてきたが, Northern blot, slot blot, *in situ* hybridization, immunohistochemistry などの他の手法と比較すると PCR 法は定量性に優れ, また感度も高い⁹⁻¹¹⁾ 今回使用した培養細胞株 ACHN も免疫組織化学染色では P-gp 発現を確認し得ないが RT-PCR 法ではわずか 100 pg の mRNA から MDR1 mRNA が検出可能であった⁷⁾ また Northern blot, slot blot に比べ, 必要とする組織量が少なく済むため, 生検材料からでも MDR1 mRNA の検出が可能であり, 治療の早期に腫瘍の MDR1 遺伝子発現についての情報を得ることができ

るという利点もある. また培養細胞株の中には MDR1 遺伝子の増幅により抗癌剤に対して耐性化するものがみられるが, 臨床においてはほとんどすべての症例が転写亢進というメカニズムをもって耐性を獲得すると考えられており¹²⁾, この点からも mRNA 定量が可能な RT-PCR 法が MDR1 遺伝子発現の検出に適当と思われた.

RT-PCR 法による測定においてその感度を上げると同時に定量性を持たせるためには1サイクルの構成(温度, 時間)や template の量, また PCR サイクル数などの適切な設定が必要不可欠である. われわれは各種培養細胞株を使用し, 本測定系における PCR 増幅の kinetics を調べた. 一般に PCR サイクル数が多いほどその測定感度は高くなる. しかし本測定系においてはサイクル数を40回まで増やすと本来 P-gp 発現に差のある ACHN と ACHN/ADM⁶⁾ との間に MDR1 mRNA に対する PCR 産物量の差異を認めなくなってしまう. これは ACHN/ADM において, PCR サイクル数35回付近で PCR 産物量が plateau に達するためと考えられる. MDR1/P-gp の発現の高い細胞でもその PCR 産物量が plateau に達することなく, なおかつ高い感度を維持できるように, 今回は PCR サイクル数を30回に設定した. そしてこの条件の下に, cDNA の希釈系列を template として用い PCR を施行することによって, その定量性を確認した. ACHN/ADM の2¹²分の1の MDR1 mRNA 発現量まで測定可能であり, Western blotting などの他の測定法に比べ, 高い感度を有していると考えられた.

また house keeping gene である β -actin の mRNA に対する PCR 産物量も測定したが, その PCR 増幅の kinetics からサイクル数は30回で適当と考えられた. β -actin mRNA の検出を同時に施行することにより臨床材料から mRNA が採取されているかの確認が可能であり, さらに MDR1 mRNA に対する PCR 産物量を β -actin mRNA に対する PCR 産物量で除して標準化することにより, ethidium bromide での染色の濃淡や densitometer への画像取り込み時のバンド輝度の誤差を補正でき, MDR1 mRNA 発現のより正確な定量が可能になると考えられ, この値を MDR1 mRNA 発現レベルとした.

膀胱癌(移行上皮癌)において, 異型度と MDR1 mRNA 発現量との関連を検討したが, どの群間にも有意差を認めなかった. 腺癌のようにその由来する組織に MDR1 遺伝子が強く発現しているものでは, 癌細胞が未分化になるにつれて本来の組織構造や機能が崩れ, 結果として MDR1 遺伝子の発現が弱まり, MDR1 遺伝子発現と異型度とに逆相関がみられることがある¹³⁾ しかし今回の検討において膀胱癌では

MDR1 mRNA 発現レベルと異型度との相関は認められなかった。

急性白血病, 慢性リンパ球性白血病などの血液疾患⁴⁾や卵巣腫瘍⁵⁾, 神経芽細胞腫, 褐色細胞腫¹⁴⁾, 肝細胞癌¹⁵⁾などの固形腫瘍において, 化学療法後に MDR1 遺伝子発現が亢進することが既に報告されている。これらの事実は抗癌剤投与により MDR1 遺伝子発現が誘導されることを示している。膀胱癌でも培養細胞株においては ADM 付加で MDR1 遺伝子発現が誘導されることが判明している^{16,17)}が, 臨床材料については明らかにされていない¹⁸⁾

今回のわれわれの検討では, 膀胱癌未治療群に比べ, P-gp 関連抗癌剤をふくむ化学療法を施行された治療群においては, MDR1 mRNA 発現レベルが有意に高く, その発現頻度も高かった。また同一症例における抗癌剤投与前後の比較においても同様に投与後に MDR1 mRNA 発現レベルの上昇が認められ, 臨床治療例においても抗癌剤投与により膀胱癌の MDR1 遺伝子発現が誘導されることが確認された。膀胱癌治療において, 初期の化学療法に対して良好な治療効果が得られたにもかかわらず, 化学療法を繰り返すことにより徐々にその効果が低下していくことを臨床上市しばしば経験するが, その抗癌剤耐性化の原因の一つとして膀胱癌における MDR1 遺伝子発現の誘導が推察される。

さらにこれらの結果は膀胱癌化学療法においても MDR1 遺伝子発現に基づく耐性の克服によって抗癌剤の増強効果が得られ, 治療成績が向上する可能性を示唆している。P-gp 耐性克服薬である verapamil の併用は ADM 膀胱腔内注入療法では有用でなかったとの報告もある¹⁹⁾が, 今回の検討において抗癌剤を投与された膀胱癌で MDR1 mRNA 発現レベルの有意な上昇が認められたことを考えると, P-gp 耐性克服薬の膀胱癌全身化学療法への応用も期待できると思われる。

今回の検討では MDR1 遺伝子発現誘導の有無と, ADM, CDDP, MTX 投与量やこれらの抗癌剤投与から癌細胞採取までの期間との間に関連性を認めず, MDR1 遺伝子発現誘導症例と非誘導症例との間の臨床的, 病理学的背景の違いを明らかにし得なかった。今後, 癌細胞が MDR1 遺伝子発現誘導を引き起こしやすい環境などについて明らかにしていくためには更なる症例の集積とその解析が必要と思われる。

同様に, MDR1 mRNA 発現レベルと組織学的効果, 再発の有無, 予後との間にも明らかな関連性を認めなかったが, これは MRP, Topo II, GST- π などの他の抗癌剤耐性因子の存在^{20,21)}や各症例の臨床病期の違いなどの各種の要因が複雑に影響しているためと考えられる。白血病をはじめ, いくつかの腫瘍にお

いては MDR1/P-gp 発現と化学療法の効果との関連性を示す報告がみられる²²⁻²⁵⁾のに対して, 膀胱癌に関しては否定的な報告が多い^{16,26,27)}。しかし山田ら²⁸⁾が報告しているように, 膀胱癌に対する動注化学療法においてその組織学的治療効果と最も関連性の強い因子は ADM に対する感受性であり, ADM 耐性に深く関与している MDR1 遺伝子発現レベルもまた膀胱癌化学療法における臨床効果を予測する有用な因子となり得ると考えられる。

また変異 p53 遺伝子と ras 遺伝子が MDR1 プロモーターを活性化し, 一方正常の p53 遺伝子は MDR1 遺伝子の活性化を抑制するとの報告もあり²⁹⁾, MDR1 遺伝子と癌遺伝子や癌抑制遺伝子とが関係している可能性も強い。膀胱癌においても p53 は potential marker として位置づけられているが³⁰⁾, 化学療法後に MDR1 遺伝子発現を示す clones が変異 p53 遺伝子を伴っていることも考えられ, この点において MDR1 遺伝子発現レベルは悪性度の指標になる可能性もある。今回は膀胱癌における抗癌剤投与による MDR1 遺伝子発現誘導を中心に検討を進めたが, 今後はこれらの遺伝子群や他の耐性因子を含めた包括的な検討が必要になると考えられる。

結 語

1. 膀胱癌において抗癌剤が投与された治療群は未治療群に比べ, 有意に高い MDR1 mRNA 発現レベルを示した。
2. 膀胱癌患者14例における neoadjuvant 動注化学療法前後の比較でも, 投与後に有意に高い MDR1 mRNA 発現レベルを認めた。
3. 以上より, 臨床治療例においても抗癌剤投与により膀胱癌の MDR1 遺伝子発現が誘導されることが示唆された。

文 献

- 1) Juliano RL and Ling V: A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**: 152-162, 1976
- 2) Roninson IB: The role of the MDR1 (P-glycoprotein) gene in multidrug resistance *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Pharmacol* **43**: 95-102, 1992
- 3) 瀬口利信, 中野悦次, 三木恒治, ほか: 進行性尿路上皮癌に対する MEP (Methotrexate, Etoposide, Cisplatin) 療法と M-VAC (Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, Cisplatin) 療法の臨床的検討。癌と化療 **21**: 59-65, 1994
- 4) Gekeler V, Frese G, Noller R, et al.: Mdr1/P-glycoprotein, topoisomerase, and glutathione-S-transferase π gene expression in primary and relapsed state adult and childhood leukaemias. *Br J Cancer*

- 66: 507-517, 1992
- 5) Bourhis J, Goldstein LJ, Riou G, et al.: Expression of human multidrug resistance gene in ovarian carcinomas. *Cancer Res* **49**: 5062-5065, 1989
 - 6) 岡野 学, 川本正吾, 根笹信一, ほか: 腎癌における制癌剤効果増強について. *日泌尿会誌* **87**: 1041-1047, 1996
 - 7) Kawamoto S, Deguchi T, Nezasa S, et al.: Detection of low-level expression of P-glycoprotein in ACHN renal adenocarcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* **87**: 475-479, 1996
 - 8) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会編: 膀胱癌取り扱い規約 (第2版). pp. 64-65, 金原出版, 東京, 1993
 - 9) Herzog CE, Trepel JB, Mickley LA, et al.: Various methods of mdrl/P-Glycoprotein in human colon cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* **84**: 711-716, 1992
 - 10) Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, et al.: Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7160-7164, 1990
 - 11) Murphy LD, Herzog CE, Rudick JB, et al.: Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of mdrl-1 gene expression. *Biochemistry* **29**: 10351-10356, 1990
 - 12) 高鳥登志郎, 小倉光雄: MDR1 遺伝子と発現調節; 下流プロモーターと結合タンパク質. *Mol Med* **30**: 704-711, 1993
 - 13) Rochlitz CF, Lobeck H, Peter S, et al.: Multiple drug resistance gene expression in human renal cell cancer is associated with the histologic subtype. *Cancer* **69**: 2993-2998, 1992
 - 14) Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, et al.: Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 265-269, 1987
 - 15) Huang C, Wu M, Xu G, et al.: Overexpression of the MDR1 gene and P-glycoprotein in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **84**: 262-264, 1992
 - 16) Pu Y-S, Tsai T-C, Cheng A-L, et al.: Expression of mdrl-1 gene in transitional cell carcinoma and its correlation with chemotherapy response. *J Urol* **156**: 271-275, 1996
 - 17) Hasegawa S, Abe T, Naito S, et al.: Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP), MDR1 and DNA topoisomerase II in human multidrug-resistant bladder cancer cell lines. *Br J Cancer* **71**: 907-913, 1995
 - 18) Kakehi Y, Wu W-J, Kim W-J, et al.: Comparison of multidrug resistance gene expression levels with malignant potentials and influence of chemotherapy in urothelial cancers. *Int J Urol* **2**: 309-315, 1995
 - 19) Ohi Y, Ohmori H, Shirahama T, et al.: 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** (suppl): S50-S54, 1992
 - 20) Naito S, Hasegawa S, Yokomizo A, et al.: Non-P-glycoprotein-mediated atypical multidrug resistance in a human bladder cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* **86**: 1112-1118, 1995
 - 21) Kim W-J, Kakehi Y, Wu W-J, et al.: Expression of multidrug resistance-related genes (mdrl, MRP, GST- π and DNA topoisomerase II) in urothelial cancers. *Br J Urol* **78**: 361-368, 1996
 - 22) Kuwazuru Y, Yoshimura A, Hanada S, et al.: Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein, in acute leukemia cells and correlation to clinical drug resistance. *Cancer* **66**: 868-873, 1990
 - 23) Pirker R, Wallner J, Geissler K, et al.: MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst* **83**: 708-712, 1991
 - 24) Chan HSL, Thorner PS, Haddad G, et al.: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* **8**: 689-704, 1990
 - 25) Holzmayer TA, Hilsenbeck S, Von Hoff DD, et al.: Clinical correlates of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* **84**: 1486-1491, 1992
 - 26) Sandlow J, Cohen MB, Robinson RA, et al.: DNA ploidy and P-glycoprotein expression as predictive factors of response to neoadjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer. *Urology* **43**: 787-791, 1994
 - 27) Park J, Shinohara N, Liebert M, et al.: P-glycoprotein expression in bladder cancer. *J Urol* **151**: 43-46, 1994
 - 28) 山田伸一郎, 藤本佳則, 磯貝和俊, ほか: 膀胱癌に対する動注治療の効果の予測因子の検討; ATP 法による抗癌剤感受性試験の有用性について. *日泌尿会誌* **85**: 1528-1533, 1994
 - 29) Chin K-V, Ueda K, Pastan I, et al.: Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* **255**: 459-462, 1992
 - 30) Debruyne F, Yoshida O, Olsson C, et al.: Basic research. *Int J Urol* **2** (suppl): 117-121, 1995

(Received on April 15, 1997)

(Accepted on July 11, 1997)

(迅速掲載)