

## シンポジウム1 卵巣がん化学療法の基礎と臨床

## 卵巣がんにおける薬剤耐性の分子生物学的解析および

## 耐性の in vitro 評価方法に関する研究

日本大学医学部産婦人科

坂元 秀樹

Molecular Biology of Multidrug Resistance (MDR) in Ovarian Cancers and  
Novel Method of Detecting Developing MDR in Vitro

Hideki SAKAMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology, Nihon University School of Medicine, Tokyo

Key words : Multidrug resistance · Survivin · c-erbB-2 · Ovarian cancer

## 緒言

卵巣癌の化学療法は、短期のQOLを改善し、無病期間を延長した。しかし長期予後・生存率は依然として不良である。その第一の理由は、化学療法に対する耐性にあり、再発卵巣癌に対する化学療法の奏効率は20~30%以下にとどまっている。この耐性は、(1) 量的耐性すなわち dose intensify により克服されうる耐性、(2) 薬剤を細胞外へ排出するポンプ機能を有する蛋白群の誘導による耐性、(3) 癌細胞における glutathione と glutathione S-transferase 増加による解毒作用亢進による耐性、(4) DNA 損傷の修復を効率化し、薬剤の影響を抑制する耐性などが、単独あるいは相互に作用し、より効率的な耐性を形作ると考えられる。しかし現在得られている知見の多くは in vitro での細胞株の成績から演繹されており、実際の in vivo の耐性の獲得は、卵巣癌の遺伝子の不安定化による random な選択の結果とも考えられている。このようなことを背景にして、多くの研究的・臨床的アプローチがなされている。大別すると、(a) 感受性試験による効果予測・個別化治療の研究、(b) 原発巣における遺伝子解析による効果予測研究、(c) CSF 製剤の併用による dose intensify

された投与の工夫・実施、(d) 化学療法剤の血中濃度維持を重視した AUC 基準による持続投与の実施などである。しかし多くの臨床的工夫と努力にもかかわらず、実際には患者は再発と薬剤耐性のために死亡してしまうのが現状である。卵巣癌は進行した状態で発見されることが多く、このような進行した症例はすでに全身疾患であり、治療戦略的には化学療法の重要性が極めて高い。有効な治療方法の確立には耐性の理解・制御が最も急がれる。このような背景にあって、本研究の目的を2点に定めた。(1) 薬剤耐性に関わる遺伝子発現、遺伝子不安定性を多数の症例で検討すること、特に同一症例の原発巣、転移巣、再発巣で検討することにより耐性獲得の実態とその chronology を理解する。(2) 化学療法施行中に耐性の発現を知ることは、治療指針の早期変更にも最も重要な情報を得ることにはほかならない。そこで耐性出現の早期指標の検索と検討を行った。

## 対象と方法

## 1. 対象

卵巣癌62症例(stage I=18, stage II=9, stage III=20, stage IV=15)を検討した。組織学的分類は漿液性腺癌26例、類内膜癌17例、明細胞癌10例、粘液性

表1 耐性因子を発現している細胞が示す抗腫瘍薬剤耐性

MDR-1	MRP	LRP	変異 p53
アドリアマイシン タキソール エトポシド	アドリアマイシン エトポシド シスプラチン	シスプラチン エトポシド	シスプラチン

多剤耐性

ある一つの薬剤で細胞を処理し、耐性を付与した結果、他の薬剤にも耐性をもってくること。

腺癌9例である。このうち stage III の7症例では原発巣(P)、転移巣(M)、再発巣(R)のすべてについて解析した。また19例ではPとRについて解析した。原発巣と転移巣は初回手術に際し切除、再発巣は2次的手術(初回術後0.5~3年)に際して切除した組織を用いた。

2. 耐性獲得の chronology の実態

(1) 現在のところ卵巣癌の耐性獲得に相関、ないしは関連するとされる発現遺伝子はMDR-1 (Multidrug Resistance), MRP (Multidrug resistance-associated protein), LRP (Lung resistance protein) の3者が最も有力であり(表1), glutathione や glutathione S-transferase などの遺伝子、蛋白に関しては臨床的意義は少ないと考えられている。そこでMDR-1, MRP, LRPをType 1の耐性因子とし(図1), RT-PCR法にて発現を検討した<sup>1)</sup>。次に化学療法により、腫瘍にはp53を介したアポト

シスが起るが、p53に変異があるとその系は働かず、耐性となる。またBcl-2はアポトーシスを抑制することで耐性獲得に関連している可能性が細胞株などで報告されている。また最近ではカスパーゼを抑制することでアポトーシスを抑制する survivin が報告された。そこで変異, p53, Bcl-2, survivin を Type 2 の耐性因子(図2)としてその発現を免疫組織染免, RT-PCR 又は Western blotting で検討した。最後に Type 3 の耐性因子として(図3), CDDP などによる DNA 損傷を切断・修復する DNA 修復酵素 ERCC-1 (excision-repair cross-complementing CHO mutant cell lines of complementation group-1), 遺伝子の不安定化と耐性獲得を microsatellite instability (MI) で解析した。MI 検出の効率化のため, Alu 配列を標的とした arbitrarily primed PCR<sup>2)</sup> を使用した。また腫瘍の増殖能力と耐性発現の関係を検討すべくその意義が卵巣癌にて最もよく認められている c-erbB-2 の増幅を検討した (INF $\gamma$  遺伝子に対する増幅比: なし = 0, 1~2倍 = 1, 2~4倍 = 2, 4倍以上 = 3)。臨床的パラメータとして生存期間, 非増悪期間を Kaplan-Meier 法で検討し, 有意差検定は log-rank test を行った。CR 症例においてマーカーが基準値の3倍を超えるもの, あるいは新たな病変の出現をもって再発と定義した。また初回治療で病変が残存した症例では, 腫瘍マーカーの再上昇あるいは

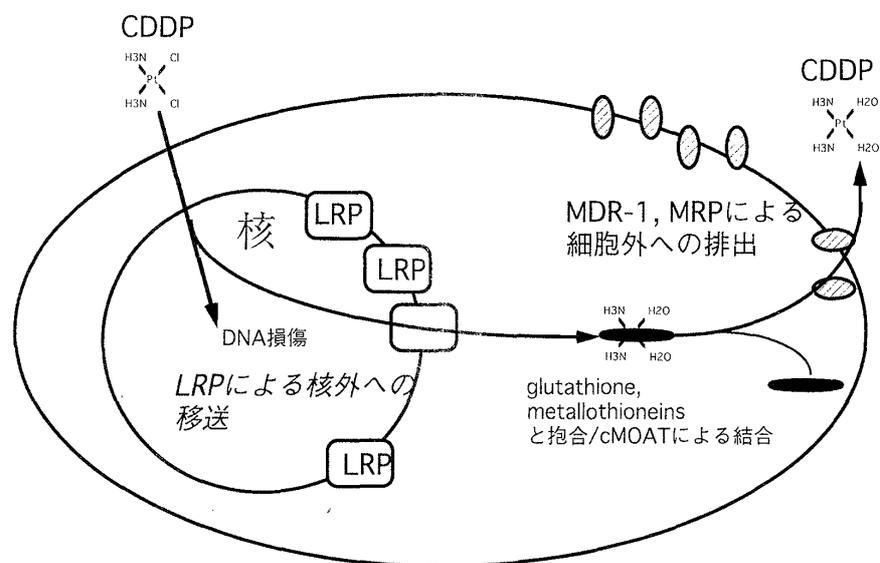


図1 Type 1耐性

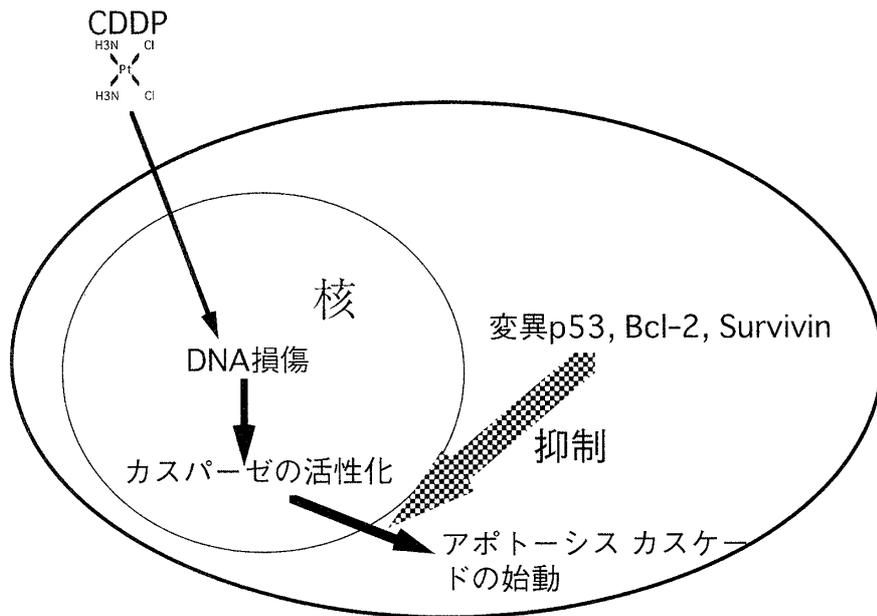


図2 Type 2耐性

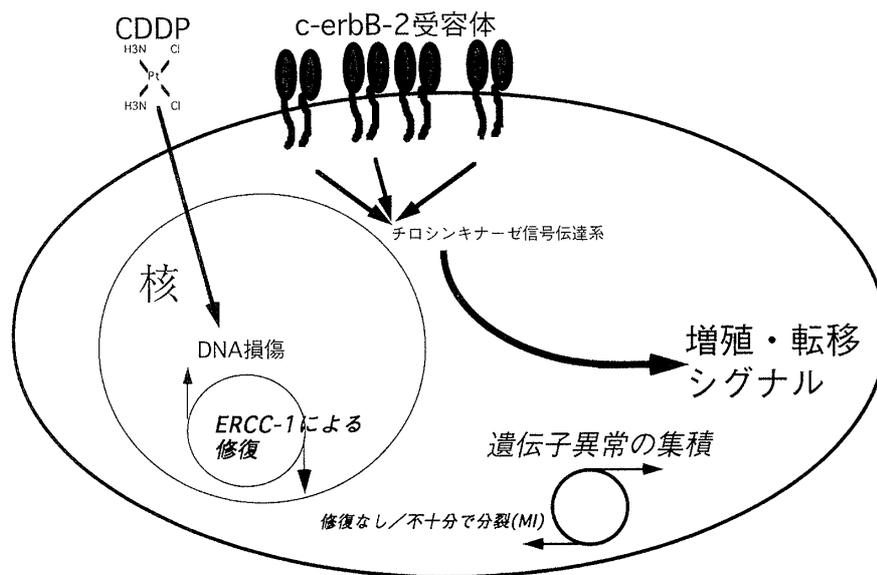


図3 Type 3耐性

評価病変の増大をもって増悪とした。耐性は、再発確認後に多剤併用化学療法を少なくとも3回以上行い、NC又はPDのものとした。生存、再発、増悪のリスク因子はCox比例ハザードモデルで検討した。解析にはSPSSパッケージ6.0をマッキントシュ上で使用した。

3. 耐性出現の早期指標の検討

耐性の発現を早期に有効に検出する方法は知られていない。臨床的には腫瘍マーカーの再上昇や

画像診断による腫瘍の容積の変化に頼らざるを得ない。しかしこれらの変化が起こる、はるか以前に耐性発現が開始していると考えられる。近年腫瘍由来のDNA断片が血中に検出されることが報告されていることから、卵巣癌において化学療法が有効である場合は腫瘍細胞のアポトーシスが進み、血中にFree DNA Fragments(FDF)が増加することが推定される。そこで腫瘍由来のTelomere(T)が正常細胞由来のTより短いことに着目し、

表2 進行期別に検討した耐性因子の発現頻度

		Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
Type 1	MDR-1 *	38.9 %	22.2 %	55.0 %	73.3 %
	MRP	44.4	66.7	50.0	60.0
	LRP *	38.9	44.4	65.0	86.7
Type 2	変異 p53	33.3	22.2	50.5	46.7
	Bcl-2	77.6	100.0	60.0	46.7
	Survivin	61.1	66.7	70.0	73.3
Type 3	ERCC-1	50.0	55.5	65.0	60.0
	MI	27.6	22.2	30.0	53.3
	c-erbB-2	22.2	66.7	55.0	13.3

\* p &lt; 0.05 Stage I + II vs III + IV

その検出を行った。対象はCAP療法中のstage III (n=25), stage IV (n=16)で化学療法中に末梢血を採取しtotal DNAを抽出し検討に供した。化学療法の奏効評価は最終治療後4週間以内に行った。

### 成績

#### 1) 組織別因子発現

原発巣におけるType 1因子のMDR-1, MRP, LRPの発現はそれぞれ漿液性癌が61.5, 61.5, 69.2%でLRPの発現頻度が最も高い。類内膜癌では

22.2, 55.6, 55.6%, 明細胞癌では35.5, 47.1, 47.4%, 粘液性癌では70.0, 40.0, 40.0%であった。Type 2因子であるp53, Bcl-2ならびにsurvivinはそれぞれ漿液性癌が53.8, 61.5, 65.3%, 類内膜癌では22.2, 77.8, 33.3%, 明細胞癌では35.3, 64.7, 82.3%, 粘液性癌では30.0, 80.0, 80.0%であった。Type 3因子のERCC-1, MI陽性率, c-erbB-2増幅はそれぞれ漿液性癌が53.8, 34.6, 73.1%, 類内膜癌では66.7, 0, 55.5%, 明細胞癌では58.8, 52.9, 29.4%, 粘液性癌では60.0, 30.0, 60.0%であった。いずれも組織型別の発現差はない。一方進行期でみると表2のように早期症例(n=27, stage I, II)と進行症例(n=35, stage III, IV)を比較すると, MDR-1とLRPの発現頻度が後者で有意に高かった(表2: MDR-1: 9/27 vs 22/35, p<0.02, LRP: 11/27 vs 26/35, p<0.002, Fisher exact test)。Type 2, 3の因子では進行期とは関連しなかった。

#### 2) 耐性因子発現と生存期間

MDR-1, MRP, LRPのそれぞれ発現陽性例と陰性例の生存期間は31±12 vs 63±10カ月(中央値±標準誤差), 67±20 vs 47±14, 31±19 vs 75±22であり, MDR-1陽性症例は陰性症例に比較して有意

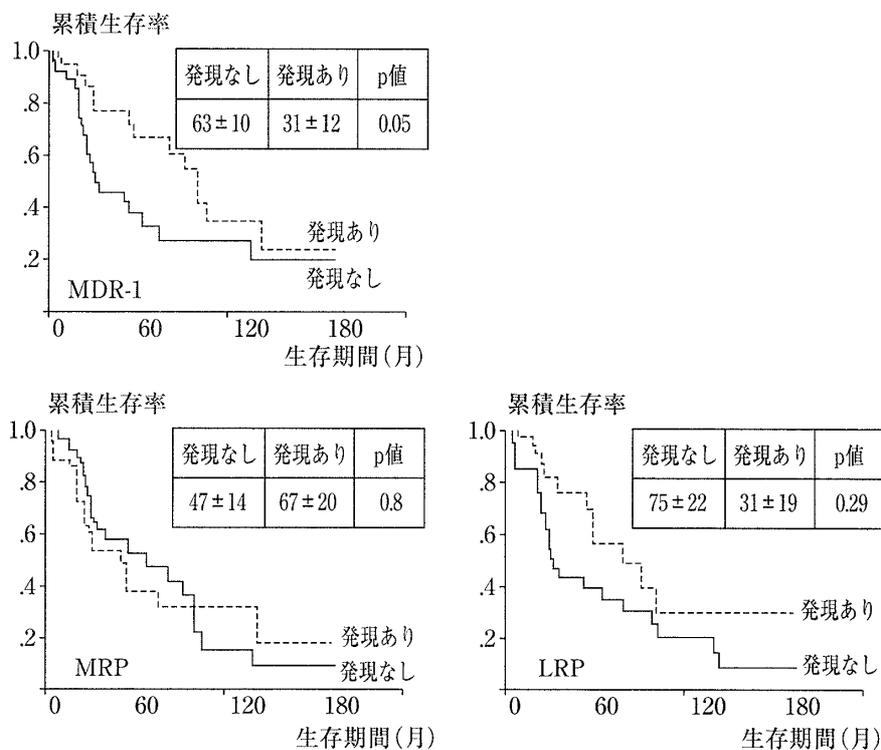


図4 Type 1耐性因子の発現の有無と累積生存率(中央値±標準誤差)

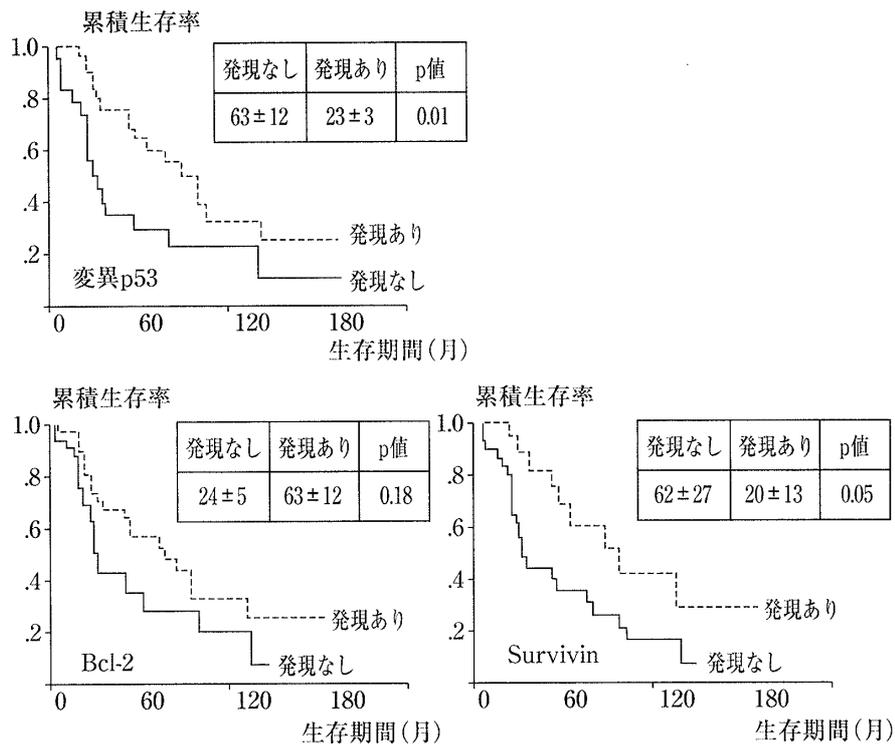


図5 Type 2耐性因子の発現の有無と累積生存率(中央値±標準誤差)

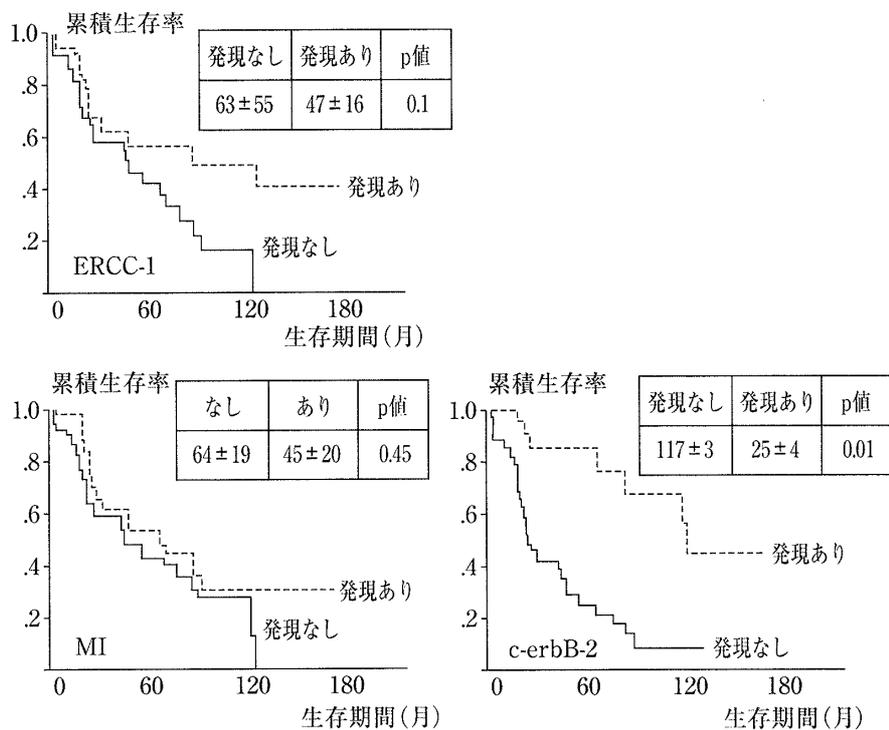


図6 Type 3耐性因子の発現の有無と累積生存率(中央値±標準誤差)

の生存期間の短縮がみられた(図4:  $p < 0.05$ , log-rank test). 一方 p53, Bcl-2, survivin では発現陽性例と陰性例の生存期間は  $23 \pm 3$  vs  $63 \pm 12$  カ月,

$\pm 12$  vs  $24 \pm 5$ ,  $20 \pm 13$  vs  $62 \pm 27$  で, 変異 p53 ならびに survivin 陽性例は陰性例より生存期間が短い(図5:  $p < 0.001$ ,  $p < 0.005$ ). Type 3 因子では

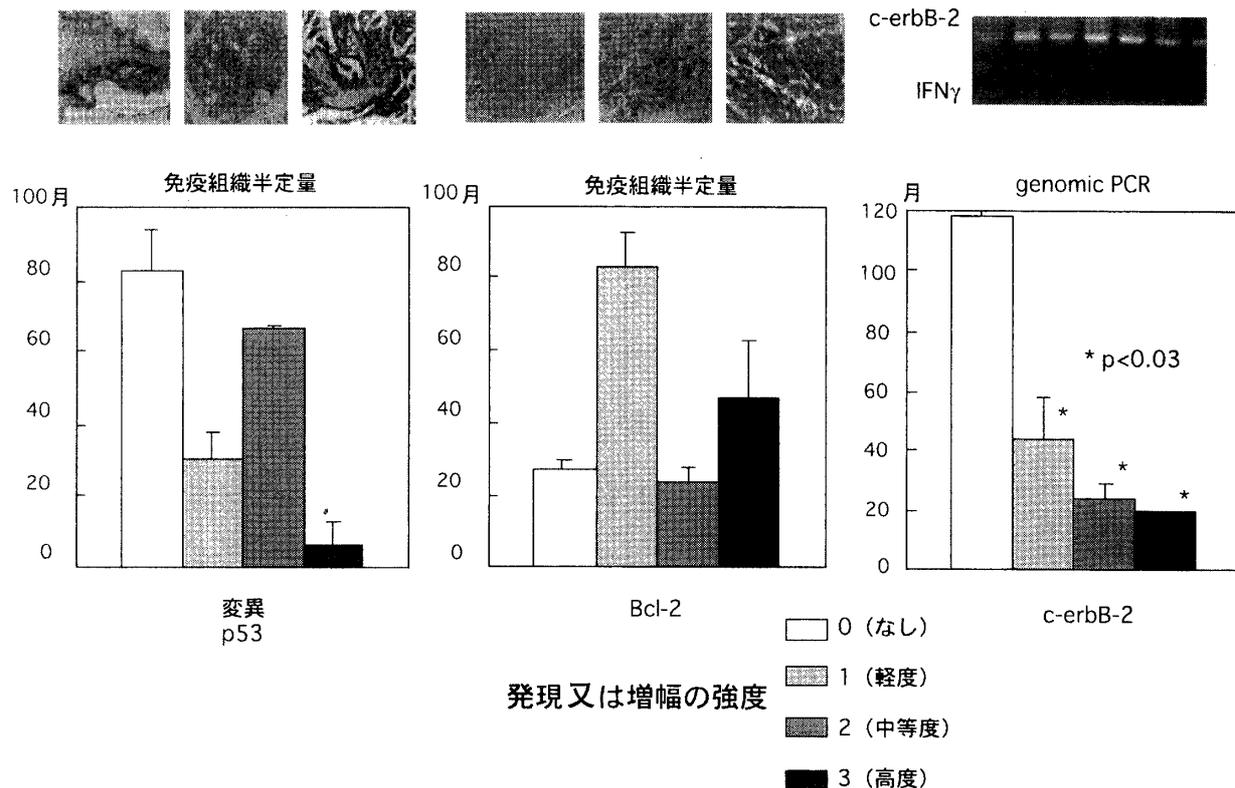


図7 遺伝子の定量的発現と生存

ERCC-1が $47 \pm 16$  vs  $63 \pm 55$ , MI が $45 \pm 20$  vs  $64 \pm 19$ , c-erbB-2増幅例が $25 \pm 4$  vs  $117 \pm 3$ と c-erbB-2増幅のある症例がないものに比較して短い(図6:  $p < 0.01$ ). なお変異 p53, Bcl-2および c-erbB-2増幅は定量的データであり, これを群として生存を比較した. その結果は図7のように, 変異 p53で若干の発現強度依存的短縮の傾向があり, c-erbB-2では有意の発現強度依存的短縮( $p < 0.03$ )がみられた.

### 3) 生存に対するリスク因子の検討

Type 1, 2, 3の諸因子ならびに Stage を Cox 比例ハザードモデルを用いて, それぞれが生存に關与するリスク因子であるか否かを検討した. 表3に示すごとく, 変異 p53発現の有無( $p < 0.006$ ), survivin 発現の有無( $p < 0.008$ )そして c-erbB-2の増幅の有無( $p < 0.01$ )が各々独立した生存に対するリスク因子であることが明らかとなった. ハザード比より, 変異 p53陽性は陰性に比較して3.3倍のリスクを, survivin 陽性は6.2倍のリスクを, c-erbB-2の増幅陽性は2.0倍のリスクである.

### 4) 非増悪期間(Progression free interval: PFI)

表3 多変量解析による生存に対する予後不良因子 (Cox 比例ハザードモデル)

	p 値	ハザード比
MDR-1	ns	—
MRP	ns	—
LRP	ns	—
変異 p53	0.006	3.3
Bcl-2	ns	—
Survivin	0.008	6.2
ERCC-1	ns	—
MI	ns	—
c-erbB-2	0.01	2.0
Stage	< 0.0001	5

PFI は stage II, III で検討した. MDR-1, MRP, LRP のそれぞれ発現陽性例と陰性例の生存期間は  $22 \pm 7$  vs  $67 \pm 31$  カ月(中央値  $\pm$  標準誤差),  $36 \pm 18$  vs  $32 \pm 8$ ,  $20 \pm 9$  vs  $55 \pm 0$  であり, MDR-1陽性, LRP 陽性例はそれぞれの陰性例より有意に早い再発がみられた(図8:  $p < 0.03$ ,  $p < 0.01$ , log-rank test). p53, Bcl-2, survivin では発現陽性例と陰

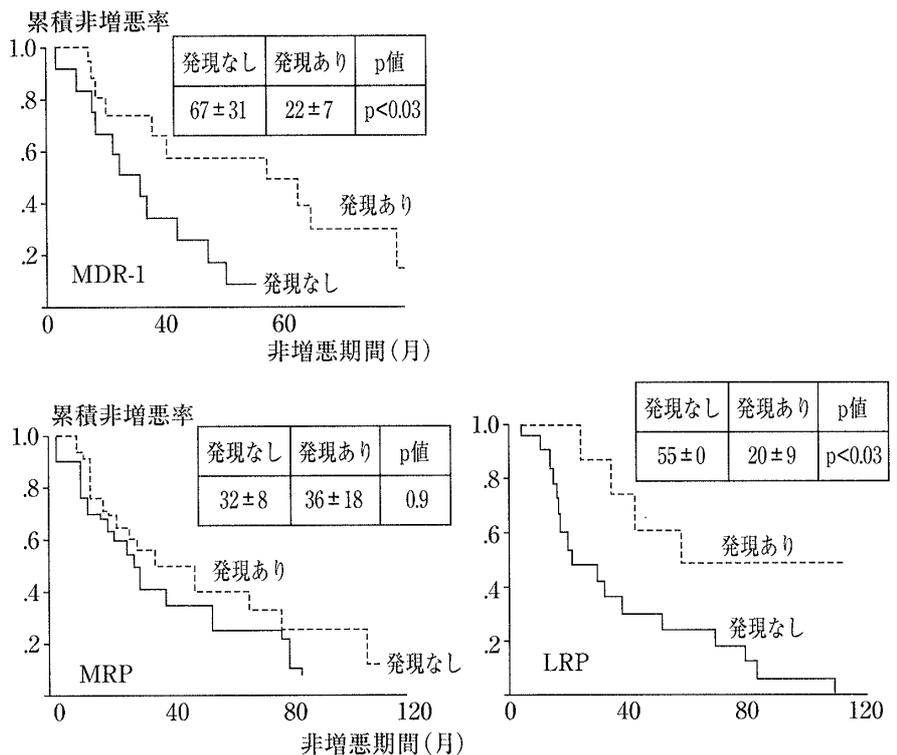


図8 非増悪期間 (progression free interval) と Type 1耐性因子発現の関連

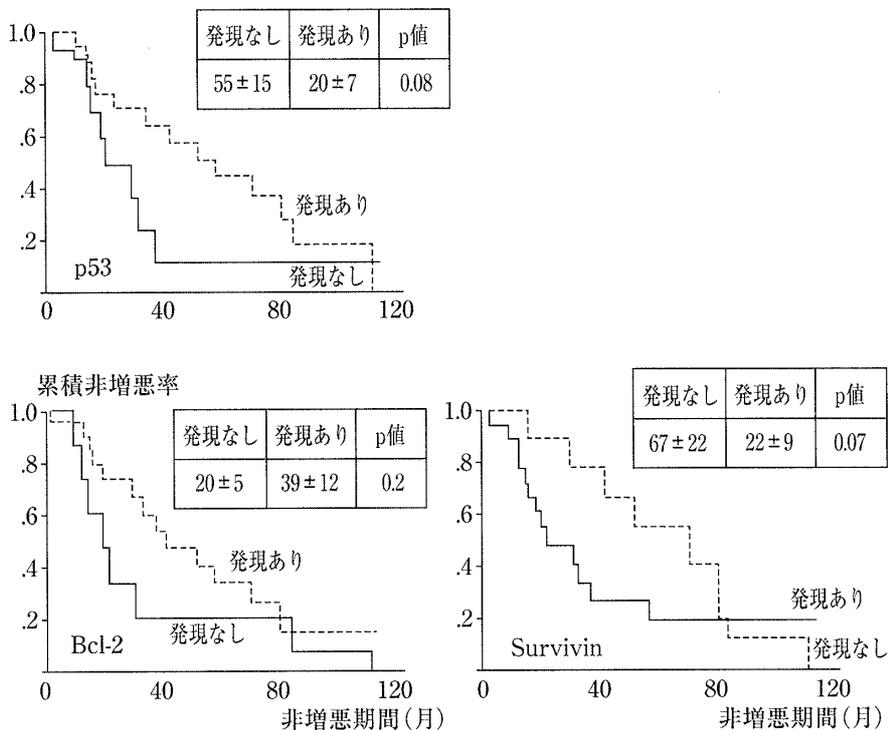


図9 非増悪期間と Type 2耐性因子発現の関連

性例の生存期間は20 ± 7 vs 55 ± 15カ月, 39 ± 12 vs 20 ± 5, 22 ± 9 vs 67 ± 22で, 変異 p53ならびに survivin 陽性例は陰性例で再発が早い傾向があった

が, 推計学的有意差は検出されなかった(図9 : p < 0.08, p < 0.07). また PFI は ERCC-1陽性, 陰性では22 ± 9 vs 67 ± 20, MI が32 ± 15 vs 36 ± 12, c-

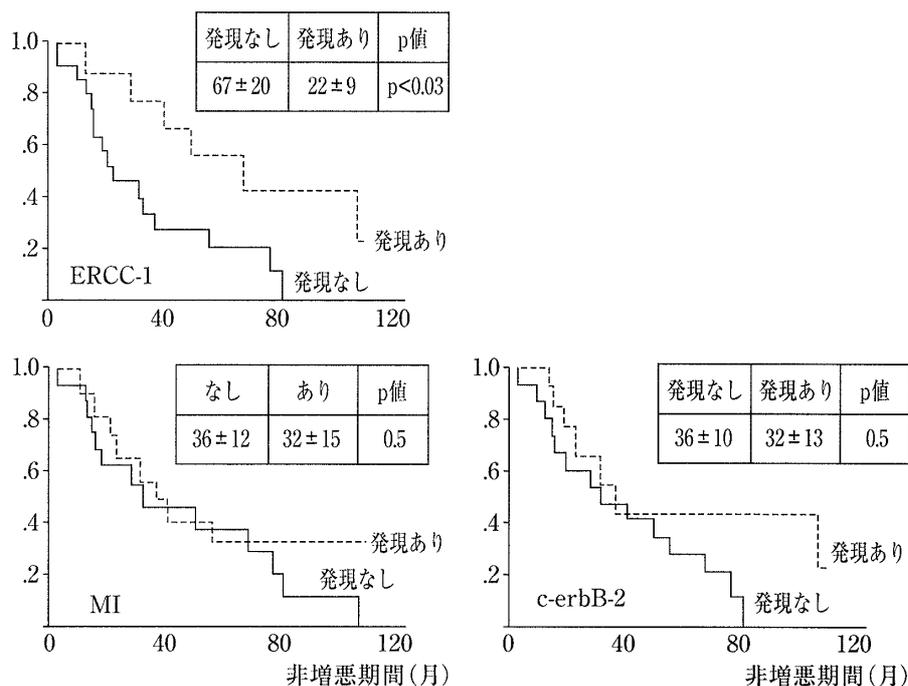


図10 非増悪期間と Type 3耐性因子の関連

erbB-2増幅例が $32 \pm 13$  vs  $36 \pm 10$ といずれにおいても差はなかった(図10)。

#### 5) 再発, 再燃に対するリスク因子

Stage II, III 症例における PFI 短縮に対するリスク因子の解析を Cox 比例ハザードモデルで検討した。その結果は表 4 で示すように, MDR-1 ( $p < 0.02$ ) と LRP ( $p < 0.004$ ) が独立した再発, 再燃に対するリスク因子であることが明らかとなった。それぞれのハザード比は 5.6 と 16.8 である。

#### 6) 原発巣における Type 1, 2, 3 因子と再発巣の耐性発現

原発巣における耐性因子発現の有無が, 再発巣における耐性発現と関連があるか否かをカイ自乗検定で行った。その結果 Type 1 では MDR-1 と LRP が各々有意の関連があり(表 5 :  $p < 0.03$ , 相対危険度(PR) = 2,  $p < 0.001$ , RR=3), Type 2 ではいずれも耐性発現に関連せず, Type 3 では ERCC-1(表 6 :  $p < 0.001$ , RR=2), MI ( $p < 0.05$ , RR=1.5), c-erbB-2 ( $p < 0.002$ , RR=2)であった。

#### 7) 原発巣, 転移巣における Type 1, 2, 3 因子の発現

初回手術時に得られた 7 組の原発巣組織ならびに転移巣組織において Type 1, 2, 3 のそれぞれの

表 4 多変量解析による増悪に対する予後不良因子 (Cox 比例ハザードモデル)

	p 値	ハザード比
MDR-1	0.02	5.6
MRP	ns	—
LRP	0.004	16.8
変異 p53	ns	—
Bcl-2	ns	—
Survivin	ns	—
ERCC-1	ns	—
MI	ns	—
c-erbB-2	ns	—

表 5 Type 1 耐性因子の発現の有無と臨床的耐性出現の相関

	発現	耐性を認めない	耐性を認める	p 値
MDR-1	(-)	21	10	$p < 0.03$ 相対危険度 = 2
	(+)	11	20	
MRP	(-)	16	13	ns
	(+)	16	17	
LRP	(-)	21	4	$p < 0.001$ 相対危険度 = 3
	(+)	11	20	

表6 Type 3 耐性因子の発現の有無と臨床的耐性出現の相関

発現	耐性を認めず	耐性を認める	p 値
ERCC-1 (-)	20	6	p < 0.01
(+)	12	24	相対危険度 = 2
MI (-)	23	14	p < 0.05
(+)	9	16	相対危険度 = 1.5
c-erbB-2 (-)	20	7	p < 0.002
(+)	12	23	相対危険度 = 2

表7 初回治療時に採取した原発巣と転移巣における耐性因子の発現の関係

	原発巣(n = 7)	転移巣(n = 7)
MDR-1	4(57.1%)	5(71.4%)
MRP	3(42.9%)	4(57.1%)
LRP	6(85.7%)	5(71.4%)
変異 p53	4(57.1%)	3(42.9%)
Bcl-2	5(71.4%)	6(85.7%)
Survivin	5(71.4%)	7(100%)
ERCC-1	5(71.4%)	5(71.4%)
MI	2(28.6%)	4(57.1%)
c-erbB-2	5(71.4%)	3(42.9%)

それぞれの間には有意差を認めない

因子の発現を検討した。表3のごとく、両者間では発現の頻度に差は認めなかった(表7)。

#### 8) 原発巣, 再発巣における Type 1, 2, 3 因子の発現

原発巣と再発巣の間では、両者とも発現陽性(PP:自然耐性), 原発巣陰性, 再発巣陽性(NP:獲得耐性), 両者共陰性(NN:薬剤感受性あり), 原発巣陽性, 再発巣陰性(PN:再発クローンは非耐性)の4通りが考えられる。19症例のうち, MDR-1ではPP=8, NN=3, NP=7, PN=1でMRPはPP=11, NN=1, NP=7, PN=0, LRPではPP=15, NN=2, NP=1, PN=0であった。次に変異 p53はPP=7, NN=7, NP=3, PN=2, Bcl-2はPP=5, NN=6, NP=5, PN=3でsurvivinはPP=14, NN=0, NP=5, PN=0であった。ERCC-1はPP=15, NN=0, NP=4, PN=0で, MIについてはPP=13, NN=0, NP=6, PN=0であった。c-erbB-2の増幅はPP=11, NN=3, NP=5, PN=0であった(図3, 4, 5)。

#### 9) 血中遊離テロメアの検出

化学療法中の血中遊離テロメア(telomeric fragment: TF)の検出には細胞破壊によるTF混入を避けるため、血清は遠心分離ではなく、フィルター法で行った。血中TFには二つの主なバンドを検出した。すなわち図12に示すように、5.5kb

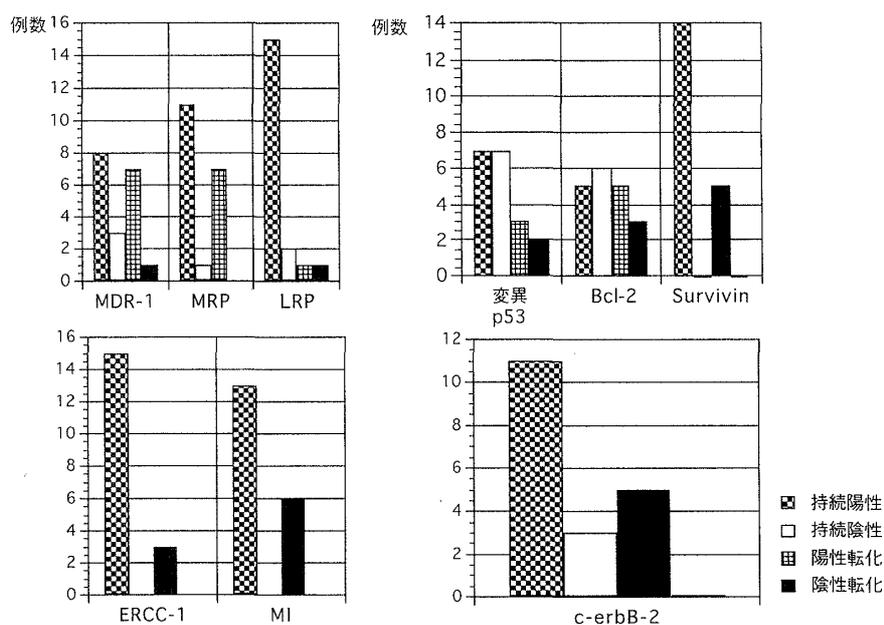


図11 同一症例の原発巣と再発巣における耐性因子発現

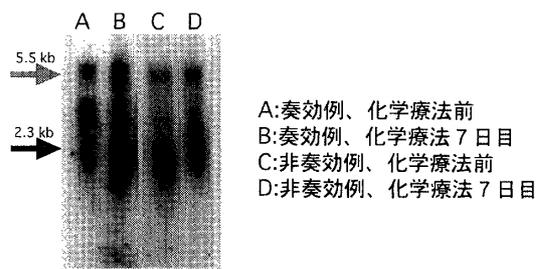


図12 化学療法前後におけるTFの変化

表8 マーカーとTF法の比較

	マーカー	TF
感度	0.50	0.80
特異性	0.88	0.63
陽性検出率	0.83	0.73
陰性検出率	0.58	0.71

および2.3kbのバンドであるか、前者は正常婦人でもみられている。一方後者は担癌患者にしか検出されず、しかも化学療法が奏効した場合は加療後にバンドが増強することが示された。腫瘍マーカー(CA125)が陽性例においてTF法との比較を行った。その結果表8のように感度、陰性検出率においてマーカーより優れた結果が得られた。

### 考 察

近年の白金製剤を含む多剤併用化学療法の導入により、卵巣癌治療の成績は大いに向上したが、長期予後は大きく改善はされていない。これは薬剤耐性により化学療法が無効となることによる。この耐性にはまず薬剤を細胞外へ排出するポンプ機能を有する蛋白群の誘導による耐性があり、7番染色体に位置するMDR-1、16番染色体にあるMRP 同様に16番染色体上のLRPが知られている。一方多くの化学療法剤は、腫瘍にアポトーシスを誘導することで殺腫瘍効果を引き起こす。したがって、このアポトーシスを回避する作用を癌細胞がもつと耐性となると考えられる。この点から変異p53、Bcl-2ならびにsurvivinが注目される。今一つの系はDNA損傷の修復を効率化し、薬剤の影響を抑制する耐性(ERCC-1)であり、さらには増殖に関与するc-erbB-2増幅そして卵巣癌の遺伝子の不安定化によるrandomな選択の指標(MI)を検討した。

これらの因子の原発巣での発現は概ね50~60%であり、組織型との関連はみられなかった。臨床的には組織型によっては化学療法に対する感受性に差があることが明らかであるが、Izuquierdo et al.も57例の臨床報告で漿液性あるいは粘液性癌について同様に差を認めていないと報告し、50~70%のMDR-1、MRP、LRPの発現陽性率を報告している<sup>3)</sup>。またMDR-1、MRPについてはKavallaris et al.も組織型との関連を認めていない<sup>4)</sup>。これらの薬剤排泄ポンプ蛋白の発現頻度に関しては組織型との関連は薄いと思われる。一方進行期からみるとIII、IV期においてMDR-1とLRPの発現が多くみられた。この発現の差は、これらの症例は未治療例であることから、薬剤による誘導とは考えられない。すなわち、腫瘍が経時的変化のなかで、MDR-1とLRPを発現することが示唆された。Type 2, 3因子については組織型、stageいずれにおいても差はないが、Type 2ではsurvivin発現が高い傾向を示し、この新しいアポトーシス回避因子もp53やBcl-2と同様、原発巣で、しかも早期から発現していることが示された。survivinはBcl-2と異なり、cytochrome-cを介さず直接カスパーゼを抑制することが知られ、より直接的に耐性に関わっている可能性がある<sup>5)</sup>。事実、単変量解析でMDR-1、p53、survivin、c-erbB-2陽性症例がそれぞれ陰性症例に比較して予後が不良であったが、Type 1, 2, 3因子にstageを加えた多変量解析を行うと、p53、survivinならびにc-erbB-2増幅がstageに対しても独立したリスク因子であることが明らかになった。特にsurvivinはそのハザード比6.2(95%信頼区間2.1~17.8)であり、予後に対して強い負の影響があると考えられる。一方stage II, IIIにおける再発についての単変量解析では、ERCC-1、MDR-1とLRPがその陽性例がPFI短縮の因子であった。さらにはMDR-1とLRPは多変量解析でも独立した重要なリスク因子であることが確認された。すなわち、それぞれのハザード比は5.6(95%信頼区間1.5~13.5)と16.8(95%信頼区間5.2~35.4)であった。MDR-1についてはPFIと関連することが報告されている<sup>6)</sup>。LRPは核膜、小胞体膜などにあり、核内からcisplatinなどの化学療法剤を細胞質側

へ排出する作用を担うと考えられている<sup>6)</sup>。さらにその後は細胞外への排出をMDR-1あるいはMRPが行うことが示唆されている<sup>7)8)</sup>(図6)。さらには *in vitro* の系において、LRPが最も薬剤耐性の指標であること、MRPやLRPなど複数のType 1耐性因子を発現している株はより耐性が強いことが報告されており<sup>9)</sup>、今回の臨床成績とも一致する。

薬剤耐性を有する再発病巣の治療は、臨床の大きな問題であるが、再発巣における耐性因子の発現は全く検討されていない。すなわち、耐性の獲得が *in vivo* でも起こっているのか明らかではない。そこで、同一患者の原発巣と転移巣ならびに再発巣を検討することで、この点を明らかにしようとして試みた。結果の評価はそれぞれの因子が持続的に発現していたか、あるいは陽性転化したかで、自然耐性クローンを含むものと獲得耐性クローンを含むものを区別した。その結果MDR-1, MRP, Bcl-2, survivin, ERCC-1, MIは原発巣でも発現しているが、再発巣での発現頻度が高くなること、これに比べLRPは原発巣から発現しており、再発までの間に発現は変らなかった。したがって、LRPは主として自然耐性における意義があるものと考ええる。Stage III, IVでMDR-1とLRP発現の頻度が高かったことを考え合わせると、MDR-1は獲得耐性を、LRPは腫瘍増殖にも関わっている可能性がある。

最後に我々は血中のFDFのうち、TFの検出が可能であることを報告した。基礎検討からは、この方法が臨床経過中に臨床的な耐性と相関することを示しており、本法を改良すれば化学療法の有効性を *in vivo* でモニターすること、あるいは他の化学療法レジメンへの変更にも応用が可能であると考ええる。

#### まとめ(図13)

腫瘍の発育はある一定の大きさに腫瘍が達して初めて診断が可能である。すなわち病変が評価可能限界を超えた大きさに達し、さらに診断までの時間が経過して初回治療(手術+化学療法)により腫瘍が取り除かれる。このとき *cytoextinction* として完全であれば真のCRである。ただし、評価可

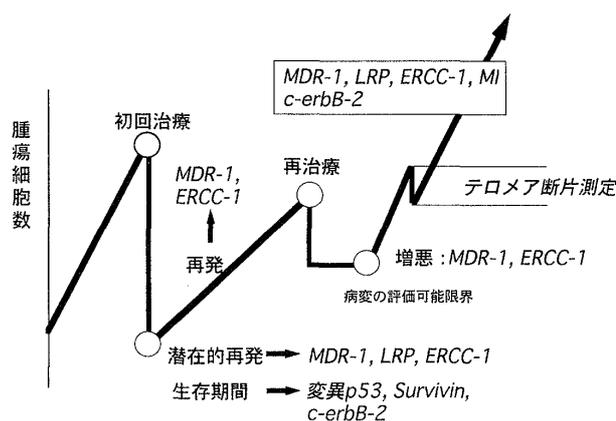


図13 卵巣癌進行の経過と Type1, 2, 3の遺伝子の関係とまとめ

表9 卵巣癌治療の展望：治療のターゲット

	生存期間	再発・増悪	再発巣での耐性	自然耐性	獲得耐性
MDR-1	○	◎	○		○
MRP					
LRP		◎	○	○	
変異 p53	◎	△			
Bcl-2					
Survivin	◎	△			
ERCC-1		○	○	○	△
MI			○	○	○
c-erbB-2	○		○	○	○

能限界以下までの *cytoreduction* であれば、見掛のCRでしかない。この場合では、いずれは潜在的再発を経て、再発が顕在化する。したがって再治療を受けることになる。再治療を受けることで、耐性のないサブクローンが減少する。縮小した腫瘍内の *population* は耐性のないサブクローンは除去できるが、むしろ耐性サブクローンの比率が高くなる。引き続きそれが増大し、増悪する。この間には薬剤による獲得耐性サブクローンが出現するであろうことは今回のデータが示している。さらに遺伝子の不安定化がすすみ、増殖因子の関与も加わることで、腫瘍の増殖は急速に進行し、*terminal stage* に至ると考える。このモデルにおいては、再治療後の有効な *cytoreduction* の程度がどれくらいであるかを知ることが重要であるが、

TF法がそのために有用である可能性があり、今後一層検討が必要であろう。今回の成績からそれぞれ Type 1, 2, 3の因子が重要な治療のターゲットにもなりうると考える(表9)。

#### 研究指導

佐藤和雄

#### 共同研究者

飯塚貞男, 寺本勝寛, 大谷 香, 高見雅司, 村田浩之, 高見毅司, 太田裕穂, 白川貴士, 木下和哉, 菊池 淳, 中山靖夫, 服部昌美, 松川高久, 出井知子, 位下幸子, 金沢浩, 井川俊彦

#### 謝 辞

今回の発表を与えて下さった佐藤和雄日本産科婦人科学会会長に深謝するとともに、座長の労をおとり下さった野澤志朗, 杉森 甫 両教授に感謝します。本研究の一部は文部省科学研究費ならびに日本大学医学部産婦人科同窓会研究助成金で行われており、これらの御支援に厚く感謝します。

#### 文 献

1. Sakamoto H, et al. Gene expression in primary, metastatic and recurrent lesions of endometrial cancer. *Obstet Gynecol Invest* 1999; in press
2. Sood AK, et al. Genomic instability in ovarian cancer: a reassessment using an arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Oncogene* 1996; 13:

2499—2504

3. Isquierdo, et al. Drugresistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognosis in advanced ovarian carcinoma. *J National Cancer Insititute* 1995; 87: 1230—1237
4. Kavallaris M, et al. MDR-1 and multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression in epithelial ovarian tumors. *Cancer Letters* 1996; 102: 7—16
5. Ambrosini G, et al. A novel antiapoptosis gene, survivin is expressed in cancers and lymphoma. *Nature Medicine* 1997; 3: 917—921
6. Scheffer GL, et al. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nature Medicine* 1995; 1: 578—582
7. Murase M, et al. Expression of MRP and mdr1 in human gastrointestinal cancer cell lines: A correlation with resistance against doxorubicin. *J Surgical Oncol* 1996; 61: 223—239
8. Breuninger LM, et al. Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multirug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Research* 1995; 55: 5342—5347
9. Izquierdo MA, et al. Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 1996; 65: 230—237

### Abstract

Acquisition of multidrug resistance (MDR) phenotype in ovarian cancers is the main obstacle in successful improvement of the treatment strategies. Currently, putative two MDR pathways have been proposed. First is membrane associated drug efflux pump such as MDR-1 and MRP or LRP (Type 1 MDR factor). Second is anti-apoptosis proteins such as p53, Bcl-2 and survivin (Type 2 MDR factor). In addition to these factors, we have studied DNA repair enzyme ERCC-1, microsatellite instability (MI) and c-erbB-2 amplification (Type 3 MDR factors) in 62 (stage I, II, III, IV=18, 9, 20, 15) ovarian cancer cases. Also plasma free telomere fragments are monitored before and after chemotherapy to test its diagnostic potential for early detection of MDR phenotype.

The expression of type 1, 2, 3 MDR factors are equally seen in serous, mucinous, endometrioid and clear cell cancers. The MDR-1 and LRP were more frequently seen in advanced stages (III + IV) than early stages (I + II). Survival analysis by the Cox proportional hazard model showed over expression of mutant p53 (RR=3.3,  $p < 0.006$ ), survivin (RR=6.2,  $p < 0.008$ ) and amplification of c-erbB-2 (RR=2.0,  $p < 0.01$ ) were stage-independent risk factors. On the other hand, the progression free intervals (PFI) were affected by MDR-1 (RR=5.6,  $p < 0.02$ ) and LRP (RR=16.8,  $p < 0.004$ ). Expression of MDR-1 and LRP positively correlated with later development of MDR phenotype whereas type 2 has no impact on the MDR. Type 3 factors all positively correlated with the MDR phenotype after recurrence (ERCC-1 : RR=2,  $p < 0.001$ , MI : RR=1.5,  $p < 0.05$ , c-erbB-2 : RR=2.0,  $p < 0.002$ ).

Chronology of MDR related factor expression was tested longitudinally in primary, early metastatic and late recurrent lesions of the same patients (n=19). The analysis showed frequency of MDR-1 expression, MI and c-erbB-2 amplification have been increased in late recurrent lesions whereas LRP and survivin have already been expressed in the primary lesions. These observation indicate that drug efflux pumps are related with recurrence and resistance but MDR-1 and MRP are associated with acquired resistance but LRP with primary resistance. The p53 and survivin are strong negative indicator for survival but have little impact on recurrence. ERCC-1, MI and c-erbB-2 do have relationship with recurrence and resistance.

Lastly free telomere fragments are successfully detected in the peripheral blood and the positive predictive value for discriminating chemotherapy responders from non-responders was 0.83 whereas serum tumor markers had that of 0.52.

This is the first report of chronology in MDR and MDR-related genes expressions in ovarian cancer. The distinct association of each MDR-related factors with clinical parameters indicates independent roles of these factors and thus potential use of the factors as target for molecular treatments of ovarian cancer.