

臨床病理レビュー 特集第 119 号

がんの薬剤耐性診断の新展開

—CGH とマイクロアレイ技術の耐性診断への応用—

目 次

序 文	菊池義公・竹村 譲	巻頭
I . 抗がん剤の種類と作用機序	菊池 義公	1
II . がんの薬剤耐性機序		
1. 蛋白機能からみた薬剤耐性機構	竹村 譲	9
2. 抗がん剤耐性の分子薬理機構	宮地 勇人	20
III . 注目される耐性機構とその検出		
1. 多剤耐性(multidrug resistance)とその検出検査法	小林 広幸, 他	29
2. 一塩基多型(アミノ酸変異)と薬剤耐性	古川 雄祐, 他	43
3. フローサイトメトリーの耐性診断への応用	西尾 和人, 他	52
4. アポトーシスと抗がん剤耐性	井上 勝一	60
5. シグナル伝達機構と薬剤耐性	鳥越 俊彦, 他	71
6. DNA 修復機構と抗がん剤感受性	前原 喜彦, 他	80
7. テロメア, テロメラーゼと抗がん剤感受性 - 新たな抗がん剤治療戦略の確立を目指して -	京 哲, 他	90
8. 急性前骨髄球性白血病におけるレチノイン酸耐性機構	木崎 昌弘	100
IV . CGH と cDNA マイクロアレイ技術の耐性診断への応用		
1. cDNA マイクロアレイ技術の原理 - cDNA マイクロアレイを用いたがん遺伝子発現情報解析 -	奥津 潤一, 他	111
2. cDNA マイクロアレイを用いた実験例とその検証 - 技術解説を中心に -	八木 研, 他	120
3. 薬理ゲノミクス分野におけるマイクロアレイの技術の利用	関 直彦, 他	132
4. プロテインチップ解析によるバイオマーカー蛋白質の発見	斎藤 賢治, 他	143
5. CGH の原理と, CGH によるシスプラチン耐性の診断	高野 政志, 他	157
6. CGH によるフッ化ピリミジン系抗がん剤耐性機構の解析	日高 重和, 他	164
7. cDNA マイクロアレイ法による卵巣がんの抗がん剤耐性診断	坂本 優, 他	171
8. オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いた卵巣がん遺伝子 発現プロファイル解析と薬剤耐性関連分子標的	今野 良	184
9. cDNA マイクロアレイを用いたドキシソルピシン耐性関連遺伝子 発現プロファイルの解析	工藤 一弥, 他	194
V . 抗がん剤感受性試験の現況	久保田哲朗	203
VI . 耐性診断とがん化学療法の個別化(オーダーメイド治療への展開)	菊池 義公	213
索引		巻末

がんの薬剤耐性診断の新展開

—CGH とマイクロアレイ技術の耐性診断への応用—

目 次

序 文	菊池義公・竹村 譲	巻頭
I. 抗がん剤の種類と作用機序	菊池 義公	1
. 抗がん剤に対する反応性の定義		2
. 腫瘍増殖の様式		2
. 細胞周期と抗がん剤		3
. 各種抗がん剤の DNA, RNA, 蛋白に対する関わりによる分類		4
. 化学療法を行うにあたっての一般的原則		5
A. 初回化学療法の考え方		5
. 薬剤併用療法の原則		6
. 最近使用されている抗がん剤の分類		7
A. 細胞周期非特異的薬剤		7
1. アルキル化剤		7
B. 細胞周期特異的薬剤		7
1. 代謝拮抗剤		7
2. 抗生物質		7
3. 植物アルカロイド		7
4. トポイソメラーゼ阻害剤		7
5. プラチナ製剤		7
C. その他		7
II. がんの薬剤耐性機序		
1. 蛋白機能からみた薬剤耐性機構	竹村 譲	9
. 細胞回転と抗がん剤感受性		10
. 抗がん剤耐性の細胞薬理学的・生化学的機構		11
A. 抗がん剤の標的における変化		11
B. 薬剤の細胞内輸送機構の障害		12
C. 細胞外への能動的薬剤排出の亢進		14
1. P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)を介した多剤耐性機構		14
2. MRP(multidrug resistance-associated protein)を介した多剤耐性機構		15
3. LRP(lung resistance-related protein)を介した抗がん剤耐性		16
D. 細胞内薬剤保持能の低下		16
E. 活性型薬剤代謝産物への変換障害		17
F. 薬剤の解毒化(detoxification), 非活性型薬剤への代謝の亢進		18

G. DNA 修復機構の亢進	18
. 腫瘍細胞の生物学的特性と自然耐性	18
2. 抗がん剤耐性の分子薬理機構	宮地 勇人 20
. 抗がん剤耐性の分子薬理機構	22
A. 遺伝子増幅による標的増加	22
B. 遺伝子変異による標的の変化	22
C. 薬剤の細胞内輸送機構の障害	23
1. Reduced folate carrier	23
D. 細胞外への薬剤の能動的排出の亢進	23
1. <i>MDR1</i>	23
2. その他の ATP 結合カセット蛋白	24
E. 薬剤の細胞内保持能の低下	24
F. 活性型薬剤代謝産物への変換障害	25
G. 薬剤の解毒化, 非活性型への代謝亢進	25
H. DNA 修復機構の亢進	25
I. ゲノム不安定性	25
. 生体内の薬物動態を決める遺伝子多型	26
III. 注目される耐性機構とその検出	
1. 多剤耐性 (multidrug resistance) とその検出検査法	小林 広幸, 他 29
. 多剤耐性の機序	30
A. 細胞膜トランスポーター由来の多剤耐性	30
1. ABC トランスポーター	30
2. Vault トランスポーター	31
B. 薬剤ターゲットの質的, 量的変化に由来する多剤耐性	31
C. 抗がん剤代謝の変化による多剤耐性	31
D. DNA 修復機構の活性亢進による多剤耐性	32
E. アポトーシス誘導系の変化由来の多剤耐性	32
. 多剤耐性の検出検査法	32
A. 蛋白レベルでの多剤耐性検出法	32
1. 免疫組織化学	32
2. フローサイトメトリー間接蛍光抗体法	32
3. ウェスタンブロット法	33
4. プロテオーム解析, プロテインチップ	33
B. RNA レベルの検出法	33
1. RNA <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法	33
2. RNA スロットブロット法	33
3. ノーザンブロット法	33
4. RNase プロテクションアッセイ	33
5. 定量的 RT-PCR 法 (競合 RT-PCR 法, Taqman PCR 法など)	33

- 目 次 -

6 . Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) 法	34
7 . Transcription-mediated amplification (TMA)	34
8 . Ligase chain reaction (LCR)	34
9 . Strand displacement amplification (SDA)	35
10 . Branched DNA 法	35
11 . Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法	35
12 . Isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids (ICAN) 法	35
13 . DNA チップ/アレイ技術	35
C . 機能を検出する方法	35
1 . 抗がん剤感受性試験	35
2 . 色素排泄能	36
3 . アイソトープ標識基質を用いた診断法	36
4 . ATPase 活性の測定	36
・各耐性因子の検出検査法の実際と注意点	36
A . P-glycoprotein / <i>MDR1</i>	36
B . MRP1 および MRP3	40
C . LRP	41
D . BCRP (ABCG2)	41
2 . 一塩基多型 (アミノ酸変異) と薬剤耐性	古川 雄祐, 他 43
・一塩基多型とは	43
A . 一塩基多型の定義とその意義	43
B . 一塩基多型の検出法	45
・薬物トランスポーターの一塩基多型と薬剤耐性	45
A . 薬物トランスポーターの分類	46
B . ABC トランスポーターの構造と機能	46
C . <i>MDR1</i> 遺伝子の SNPs と薬物代謝	46
・薬物代謝に関連する遺伝子の多型と薬剤耐性	49
A . 薬物代謝の基本的メカニズム	49
B . 薬物代謝関連酵素の遺伝子多型と抗がん剤	49
・標的蛋白の変異と薬剤耐性	49
A . チュブリンの変異による薬剤耐性	49
B . BCR/ABL の変異による STI571 耐性	50
C . その他の標的分子の変異による抗がん剤耐性	50
3 . フローサイトメトリーの耐性診断への応用	西尾 和人, 他 52
・細胞周期の解析	52
A . DNA ヒストグラム	53
・表面マーカーによる耐性診断	56
・細胞内薬物濃度の測定	56
・細胞内耐性関連物質の測定	57
・アポトーシスの検出	57

4 . アポトーシスと抗がん剤耐性	井上 勝一	60
. ミトコンドリアを介するアポトーシス		61
A . 導入期 induction phase		62
1 . p53		62
2 . p21 ^{WAF1} とその他の Cdk 抑制サブユニット		64
3 . プロテインチロシンキナーゼ		64
B . 作動因子期 effector phase		65
1 . Bcl-2 family		66
2 . Caspases		66
. ミトコンドリアを介さないアポトーシス		67
A . TNF , TNF 受容体系		67
B . FasL , Fas 受容体系		67
5 . シグナル伝達機構と薬剤耐性	鳥越 俊彦 , 他	71
. 増殖シグナル伝達と分子標的		72
. 受容体型チロシンキナーゼシグナルとその阻害剤		73
. Bcr-Abl チロシンキナーゼとその阻害剤		74
. Ras シグナルとファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤		75
. PI3K シグナルとその阻害剤		75
. 分子シャペロン阻害剤によるシグナル伝達の抑制		76
. シグナル伝達阻害剤に対する薬剤耐性		76
6 . DNA 修復機構と抗がん剤感受性	前原 喜彦 , 他	80
. 主要な DNA 修復機構		81
A . 損傷の可逆的な修復		81
B . 除去修復		81
1 . 塩基除去修復		81
2 . ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair, NER)		82
3 . ミスマッチ修復機構 (mismatch repair, MMR)		83
C . 二重鎖切断修復および組み換え修復		83
. 抗がん剤による DNA 損傷とこれに応答する DNA 修復機構		83
A . アルキル化剤		84
1 . 一価アルキル化剤		84
2 . 多価アルキル化剤		84
B . シスプラチン (CDDP)		85
C . 代謝拮抗剤		85
1 . 塩基アナログ		85
2 . 葉酸拮抗剤		86
D . トポイソメラーゼ阻害剤		86
1 . II 型トポイソメラーゼ阻害剤		87
2 . I 型トポイソメラーゼ阻害剤		87

7. テロメア, テロメラーゼと抗がん剤感受性

- 新たな抗がん剤治療戦略の確立を目指して -	京 哲, 他	90
. テロメアとは?		91
. テロメアの短縮がもたらす結果		91
. テロメアの短縮とゲノムの不安定性		92
. テロメラーゼの活性化と細胞のがん化		92
. テロメラーゼを構成するサブユニット		92
. 抗がん剤がテロメラーゼ活性に与える影響		93
. テロメラーゼ活性が抗がん剤の効果におよぼす影響		93
. テロメア長が抗がん剤の効果におよぼす影響		95
. テロメラーゼ活性の阻害法		96
A. hTR をターゲットにしたアンチセンス法によるテロメラーゼ活性阻害		96
B. hTERT をターゲットにしたテロメラーゼ阻害		96
C. G-quadruplex DNA interactive compound によるテロメラーゼ阻害		97
D. リボザイムによるテロメラーゼ阻害		97
. がん治療に向けての今後の展望と問題点		98

8. 急性前骨髄球性白血病におけるレチノイン酸耐性機構

. APL の発症機構	木崎 昌弘	100
. 核内ホルモン受容体による転写制御		103
. APL におけるヒストンアセチル化を介した ATRA の作用機構		104
. レチノイン酸耐性の分子機構		105
A. ATRA 耐性 APL 細胞における血清レチノイン酸濃度の低下		105
B. ATRA 耐性白血病細胞におけるレチノイン酸レセプターの異常		105
C. PLZF/RAR α を有する APL におけるレチノイン酸不応の原因		107
. 耐性克服へのアプローチ		107
A. ATRA と化学療法の併用		107
B. 新規レチノイド化合物		107
C. 亜ヒ酸 (As_2O_3)		107
D. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤		108

IV. CGH と cDNA マイクロアレイ技術の耐性診断への応用

1. cDNA マイクロアレイ技術の原理

- cDNA マイクロアレイを用いたがん遺伝子発現情報解析 -	奥津 潤一, 他	111
. cDNA マイクロアレイの原理		112
. データの補正		113
. がんの遺伝子発現パターン		113
. がん患者に共通する遺伝子発現変化		114
. 階層的クラスタリングによる分類		114
. 抗がん剤感受性との相関解析		115

2. cDNA マイクロアレイを用いた実験例とその検証

- 技術解説を中心に -	八木 研, 他	120
. オリゴヌクレオチドアレイと cDNA マイクロアレイ		121
. cDNA マイクロアレイの作製		121
. プローブの調製		122
. データの解析		123
A. シグナルの定量化		123
B. Normalization		123
C. データ前処理		123
D. データマイニング		123
E. 遺伝子発現情報解析システムと遺伝子発現パターン相同性検索		123
. cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析の実際		124
. 代謝経路関連遺伝子群の発現解析		126

3. 薬理ゲノミクス分野におけるマイクロアレイの

技術の利用	関 直彦, 他	132
. cDNA マイクロアレイの作製および解析		133
. 市販マイクロアレイを用いた解析		136
. マイクロアレイ解析のための遺伝子資源の整備		136
. In-house cDNA マイクロアレイを用いた解析例		136
A. cDNA マイクロアレイを用いた発がんターゲット遺伝子の探索		137
B. 大腸がん進展に関わるマーカー遺伝子の探索		138
C. クラスタ解析を用いた病型分類および診断		139

4. プロテインチップ解析によるバイオマーカー

蛋白質の発見	斎藤 賢治, 他	143
. 蛋白質マーカー		144
A. 蛋白質マーカーの探索		144
B. 蛋白質発現解析		144
. プロテインチップシステム		145
A. プロテインチップの特徴		145
B. プロテインチップを用いた実験の流れ		146
1. サンプルの調製		146
2. サンプルの添加とインキュベーション		146
3. 洗 浄		146
4. 測 定		147
C. 測定の原理		147
D. 結果の表示		147
. プロテインチップを用いたマーカー探索		147
. プロテインチップを用いたマーカー探索の実際例		149
A. 疾病マーカー探索例		149

B . 病気のステージに特有なマーカー	152
C . 化学療法の効果の確認	152
D . LCM により切り出したサンプルの発現解析	153
E . 相互作用解析のマーカー蛋白質研究への応用	154
. がんの薬剤耐性とプロテインチップ	154
5 . CGH の原理と, CGH によるシスプラチン耐性の診断 …… 高野 政志, 他	157
. CGH の原理	158
. CGH の実際の手技	158
. CGH 法によるシスプラチン耐性, パクリタキセル耐性ヒト卵巣がん株の検討	160
. 臨床例を用いたシスプラチン抵抗性の解析	161
6 . CGH によるフッ化ピリミジン系抗がん剤耐性機構の解析 …… 日高 重和, 他	164
. フッ化ピリミジン系抗がん剤の代謝経路	165
. 薬剤耐性機序解明への CGH 解析の応用	165
. フッ化ピリミジン系抗がん剤耐性機構とゲノム異常	167
7 . cDNA マイクロアレイ法による卵巣がんの抗がん剤耐性診断 …… 坂本 優, 他	171
. 方 法	172
A . 蛍光標識 cDNA プローブ調整	173
B . Hybridization	174
C . Washing	175
D . Scanning	175
. 結 果	175
. 考 察	179
. 結 論	182
8 . オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いた卵巣がん遺伝子発現プロファイル解析と薬剤耐性関連分子標的 …… 今野 良	184
. オリゴヌクレオチドマイクロアレイと cDNA マイクロアレイ	185
. オリゴヌクレオチドマイクロアレイによる卵巣がん臨床検体の遺伝子発現プロファイリング	186
. ヒト卵巣がん細胞株(KF28)およびそれから樹立されたシスプラチン耐性株(KFr13), タキソール耐性株(KF28TX, KFr13TX)の遺伝子発現プロファイルの比較	190
9 . cDNA マイクロアレイを用いたドキシソルピシン耐性関連遺伝子発現プロファイルの解析 …… 工藤 一弥, 他	194
. 実験方法	195
. 結 果	195
. 考 察	199

V . 抗がん剤感受性試験の現況	久保田哲朗	203
. 抗がん剤感受性試験の方法		204
. 臨床相関		205
. 分子生物学的手法を用いた抗がん剤感受性予測		206
. オリゴヌクレオチド・マイクロアレイによる解析		208
A . RNA の抽出と cDNA の合成		209
B . オリゴヌクレオチド・マイクロアレイ		209
C . マイクロアレイによる結果		209
VI . 耐性診断とがん化学療法の個別化		
(オーダーメイド治療への展開)	菊池 義公	213
. 卵巣がん化学療法の現時点での個別化の実際		214
. シスプラチン耐性に伴う遺伝子変化		215
. タキソール耐性に伴う遺伝子変化		216
. オーダーメイド治療への展望		216
索引		巻末