

テーラーメイド医療を目指した 5-Fluorouracil
(5-FU) の基礎研究

坂本 悦子

2007

目 次

略 語	1
第1章 序 論	4
第2章 Orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) の 5-fluorouracil (5-FU) 効果 予測因子としての可能性の検討	12
1. 緒 言	
2. 材料および方法	
3. 結 果	
4. 考 察	
5. 小 括	
第3章 Leucovorin (LV) による 5-fluorouracil (5-FU) の抗腫瘍作用増強効果を規 定する因子の探索	30
1. 緒 言	
2. 材料および方法	
3. 結 果	
4. 考 察	
5. 小 括	
第4章 総 合 考 察	48
引用文献	51
謝 辞	59

略号

本論文中では以下の略号を用いた。

10-CHO-THF	10-formyltetrahydrofolate
5,10-CH=THF	5,10-methenyltetrahydrofolate
5,10-CH ₂ -THF	5,10-methylenetetrahydrofolate
5-CH ₃ -THF	5-methyltetrahydrofolate
5-CHO-THF	5-formyltetrahydrofolate
5'-DFUR	5'-deoxy-5-fluorouridine
5-FU	5-fluorouracil
ACTB	beta actin
CDHP	5-chloro-2,4-dihydroxypyridine (gimeracil)
CI	confidence interval
DPD	dihydropyrimidine dehydrogenase
dRib1-P	deoxyribose-1-phosphate
FBS	牛胎児血清 (fetal bovine serum)
FDA	アメリカ食品医薬品局 (food and drug administration)
FDHU	fluorodihydrouracil
FdUDP	fluorodeoxyuridine diphosphate
FdUMP	fluorodeoxyuridine monophosphate
FdUrd	fluorodeoxyuridine
FdUTP	fluorodeoxyuridine triphosphate
FH ₂	dihydrofolate
FPGS	folylpolyglutamate synthase
FT	tegafur

FUDP	fluorouridine diphosphate
FUMP	fluorouridine monophosphate
FUrd	fluorouridine
FUTP	fluorouridine triphosphate
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GGH	γ -glutamyl hydrolase
GI ₅₀	50%細胞増殖抑制濃度 (50% growth inhibition concentration)
Glu	glutamic acid
HPMC	hydroxypropylmethylcellulos
HRP	horseradish peroxidase
LV	leucovorin
NCI	National Cancer Institute
ODC	orotidine 5'-monophosphate decarboxylase
OPRT	orotatephosphorybosyl transferase
Oxo	oteracil potassium
PRPP	phosphoribosylpyrophosphate
PVDF	polyvinylidene fluoride
Rib1-P	ribose-1-phosphate
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
RTV	relative tumor volume
siRNA	small-interfering RNA
TGI	tumor growth inhibition rate
THF	tetrahydrofolate
TP	thymidine phosphorylase

TS	thymidylate synthase
TV	腫瘍体積 (tumor volume)
UFT	tegafur-uracil
UMPS	uridine 5'-monophosphate synthase
UP	uridine phosphorylase

第 1 章 序論

癌は、日本において昭和 56(1981)年より死因の第1位を占めており、死亡者数は現在年間 30 万人以上に及ぶ [厚生労働省、2006]。また、厚生労働省研究班の推計によれば、生涯のうちに癌に罹る可能性は男性の 2 人に1人、女性の 3 人に 1 人とされている。さらに、癌は加齢により発症リスクが高まるため、今後ますます高齢化が進行することを踏まえると、その死亡者数は今後とも増加していくと推測される。従って、癌の制圧は日本人の健康上の最重要課題である。

癌の治療は外科的治療、放射線治療及び化学療法 of いずれか、または複数を組み合わせで行われる。早期の癌は原発部位に限局しているものの、次第に全身に転移する。化学療法は原発部位のみならず転移部位も根絶し得る唯一の治療法である。癌化学療法の近年の進歩はめざましく、有効な抗癌剤の出現や各種抗癌剤の併用療法により、急性白血病、悪性リンパ腫、絨毛癌等では化学療法のみで治癒に導けるまでに至っている。しかし一方で、多くの固形癌に対しては、抗癌剤の有効性はまだ低く、化学療法のみでは完全に治癒に至らないのが現状である。従って、癌の治療率を向上させるにはさらなる化学療法の進展が必須であり、臨床における腫瘍の大半を占めている固形腫瘍に対して有効な新規抗癌剤の開発が望まれている。

抗癌剤は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質、植物アルカロイド、白金錯体、ホルモン剤及び分子標的薬剤などに分類される。抗癌剤の中でもプリン代謝拮抗剤、ピリミジン代謝拮抗剤、葉酸代謝拮抗剤を含む代謝拮抗剤は長い歴史を持ち、癌化学療法において重要な一翼を担ってきた。その中でも、5-fluorouracil (5-FU) を代表とするフッ化ピリミジン系代謝拮抗剤は、大腸癌、頭頸部癌、胃癌、乳癌をはじめとする多くの固形癌の治療に用いられている。

5-FU は、ウラシルが腫瘍内に取り込まれやすいことから、1957 年に Heiderberger

らによって誘導体として合成されて以来（図1）[Dunchinsky et al., 1957]、大腸癌、乳癌、頭頸部癌などの各種固形腫瘍の治療に用いられている [Longley et al., 2003]。また、現在でもなお 5-FU の抗腫瘍効果増強と副作用の軽減を目指して、新しい誘導体の開発や、投与方法の改良、leucovorin (LV)（図2）などの biochemical modulator やシスプラチンなどの他の抗癌剤との併用療法などが試みられている。

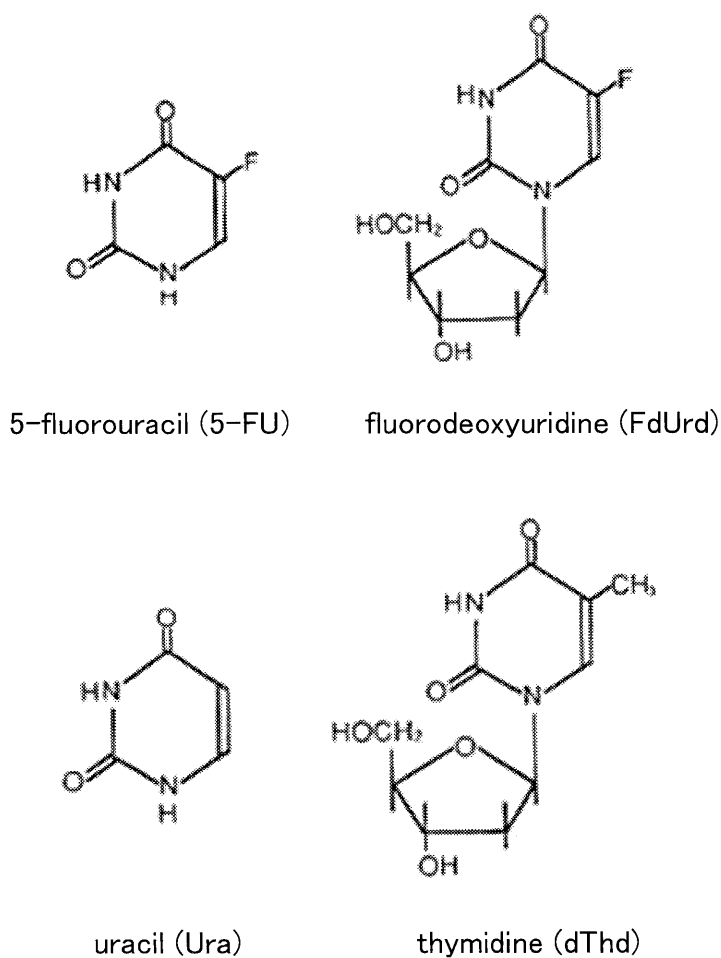


図1. 5-FU 及び関連化合物の構造

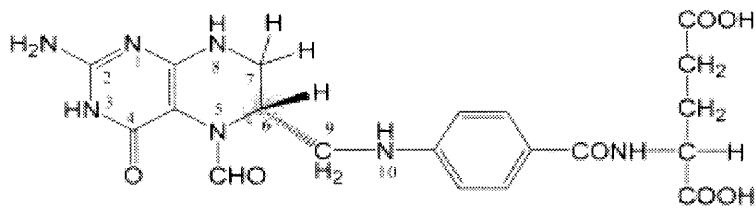
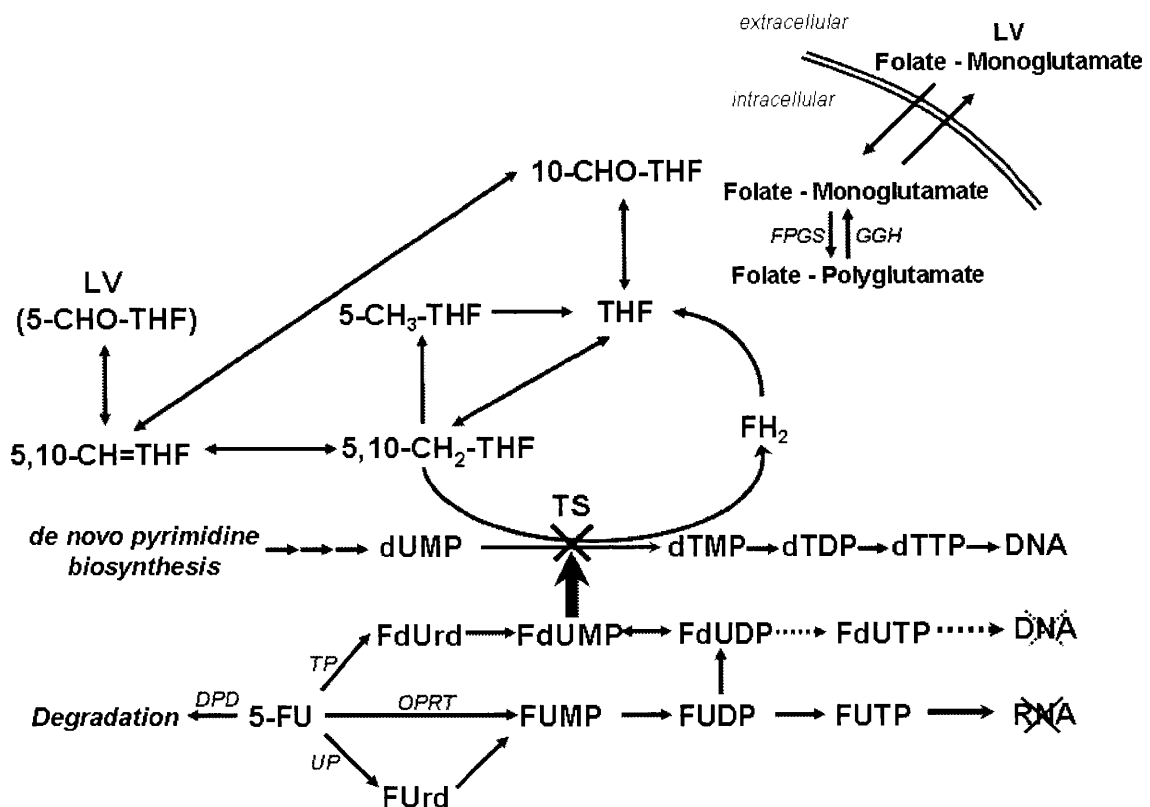


図 2. LV の構造

5-FU は主に 1) RNA への取り込み、2) thymidylate synthase (TS) 阻害により細胞毒性を発現することが知られている [Longley et al., 2003] (図 3)。前者において、5-FU は細胞内で fluorouridine triphosphate (FUTP) に代謝され、RNA に取り込まれた後 RNA 機能傷害を引き起こす。また後者において、5-FU は fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) に代謝され、還元型葉酸の一つである 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-CH₂-THF) と共に TS と共有結合し強固な三者共有結合体 (ternary complex、図 4) を形成し dTMP 及び dTTP を枯渇させ、その結果 DNA 合成を阻害する。この作用が強いフッ化ピリミジン系代謝拮抗剤として fluoro deoxy uridine (FdUrd) が知られている (図 1.3)。



LV; leucovorin, 5-CHO-THF; 5-formyltetrahydrofolate, 10-CHO-THF; 10-formyltetrahydrofolate, 5-CH₃-THF; 5-methyltetrahydrofolate, THF; tetrahydrofolate, 5,10-CH=THF; 5,10-methenyltetrahydrofolate, 5,10-CH₂-THF; 5,10-methylenetetrahydrofolate, FH₂; dihydrofolate, FdUrd; fluorodeoxyuridine, FdUMP; fluorodeoxyuridine monophosphate, FdUDP; fluorodeoxyuridine diphosphate, FdUTP; fluorodeoxyuridine triphosphate, 5-FU; 5-fluorouracil, FUMP; fluorouridine monophosphate, FUDP; fluorouridine diphosphate, FUTP; fluorouridine triphosphate, FUrd; fluorouridine, FPGS; folypolyglutamate synthase, GGH; γ -glutamyl hydrolase, TS; thymidylate synthase, DPD; dihydropyrimidine dehydrogenase, TP; thymidine phosphorylase, OPRT; orotate phosphoribosyltransferase, UP; uridine phosphorylase

図 3. 5-FU と LV の代謝

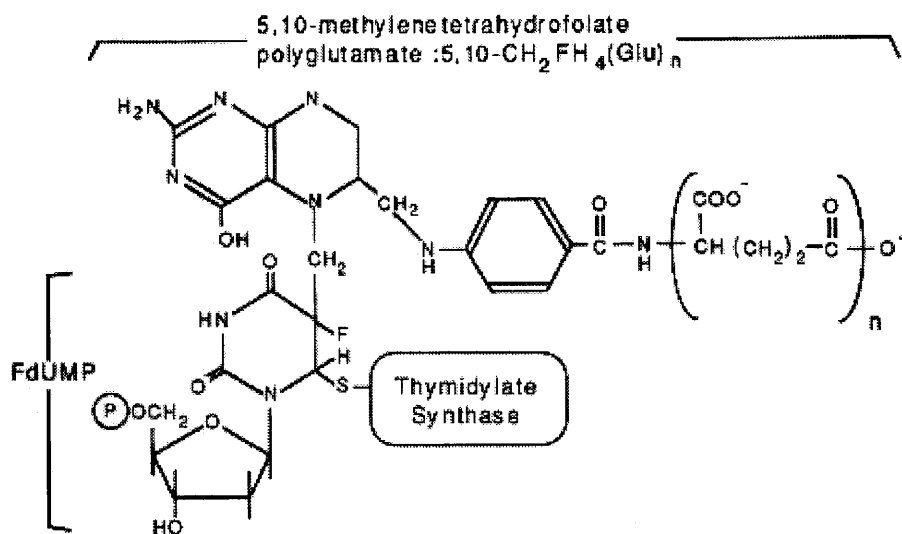


図 4. FdUMP, TS, 5,10-CH₂-THF 複合体 (ternary complex)

一方、5-FU はピリミジン異化経路で分解される。5-FU はまず 5-FU の分解反応の律速酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) により fluorodihydrouracil (FDHU) へ変換される (図 3)。ごくまれに DPD を欠損した患者が存在し、このような患者が 5-FU を投与された場合、投与初期に口内炎、下痢、血液傷害、神経障害などの重篤な副作用が発現したとの報告がなされている [van Kuilenburg et al., 2004]。

一方、5-FU は単剤で使用された場合、奏効率は 20%以下と比較的効力が弱いことが知られている [Longley et al., 2003]。このため、臨床効果を改善するべく、S-1, 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR), capecitabine などの誘導体が開発されてきた。S-1 は、5-FU の血中濃度を最大限に高め、かつそれに付随して増大する消化器毒性を軽減させるために、5-FU のプロドラッグである tegafur (FT) に、DPD 阻害剤である 5-chloro-2,4-dihydropyridine (gimeracil, CDHP) と orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) 阻害剤である oteracil potassium (Oxo) を配合した経口抗癌剤である (図 5) [Shirasaka et al., 1998]。

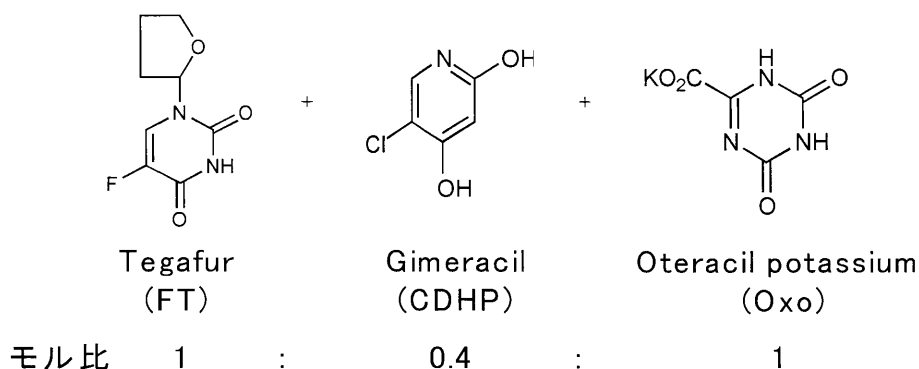


図5 S-1の組成比

FTは主として肝ミクロゾームP450(CYP2A6)により徐々に5-FUに変換されるという特徴を有している。CDHPは、主に肝臓に多く分布するDPDを可逆的に阻害することにより血中及び腫瘍中の5-FUを高濃度に持続させ、抗腫瘍効果を増強する。また、Oxoは主に消化管組織に分布してOPRTを阻害し、5-FUからfluorouridine monophosphate(FUMP)への生成を選択的に抑制する。その結果、S-1投与により5-FUの強い抗腫瘍効果を損なうことなく、消化管障害が軽減されると考えられている。現在、S-1は日本国内では胃癌、結腸・直腸癌、頭頸部癌、非小細胞肺癌、手術不能又は再発乳癌の適応症で使用されている。

また、5-FUの臨床効果を改善するべく、各種のbiochemical modulatorが研究されてきた。その中でも、還元型葉酸の一つであるleucovorin(LV)(図2)と5-FUの併用療法は大腸癌に対する臨床試験の結果、5-FU単剤に比較し有意に奏効率及び生存期間を改善したことが報告されており[Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project, 1992, Meta-Analysis Group in Cancer, 2004]、5-FU/LV併用療法は現在大腸癌に対する標準化学療法の一つである。LV自体には抗腫瘍作用はないが、5,10-CH₂-THFを供給しternary complexを安定化させることで5-FUの抗腫瘍効果を

増強する [Longley et al., 2003] (図 3)。LV は構造上、*d* 体と *l* 体が存在する。注射剤であるアイソボリンは *l* 体であり、経口剤であるUZEL 及びLV錠は等量の *d* 体と *l* 体を含有する。生物活性を有するのは natural isomer である *l* 体であり、*d* 体はほとんど代謝を受けずに尿中に排泄されることが知られている。

このように 5-FU の効果を高めるための様々な工夫にも関わらず、未だにこれら治療が無効である患者も多い。また、5-FU 系抗癌剤は、進行あるいは再発症例には奏功しにくいことも事実である [Oonuma et al., 2001]。しかし、癌患者における 5-FU 系抗癌剤の効果を投与前に予測することが出来れば、不要な投与による患者の不利益を軽減することが出来る。そのためには、薬剤投与前に薬剤に対する効果を予測する因子を同定することが重要となる。また、5-FU を含む抗癌剤は単剤で使用されることは少なく、複数の薬剤と組み合わせて使用されることが多い。患者の腫瘍が併用薬に対して感受性を持たない場合、患者は併用薬の投与により副作用や経済的負担といった不利益のみを受けると思われる。即ち、5-FU だけではなく併用薬剤に対する効果予測因子も同定する必要がある。

本研究では、まず 5-FU 療法の効果予測を実現化するために、5-FU の効果予測因子を探索した。これまで、5-FU の臨床効果と腫瘍中の TS と DPD の発現レベルに関連性があったことが多数報告されており、これらの因子は 5-FU の効果予測因子となりうる可能性がある [Longley et al., 2003, Johnston et al., 1995, Ichikawa et al., 2003]。しかし、これらの 2 因子の発現レベルに基づいた 5-FU の治療効果予測方法は未だに確立されておらず、また 2 因子のみを用いた予測方法では不十分である可能性も残されている。そこで我々は、5-FU 活性化酵素の一つである OPRT の 5-FU 効果予測因子としての可能性について、ヒト癌培養細胞を用いて検討した。

次に、5-F/LV 療法の効果予測を実現化するために、LV による 5-FU の抗腫瘍作用増強効果を予測する因子を探索した。LV による 5-FU の抗腫瘍作用に關与する

因子はこれまで報告されていない。葉酸はfolylpolyglutamate synthase (FPGS) によりグルタメート化される [Suh et al., 2001] (図 6)。ヒトの FPGS は cytosol と mitochondria に存在する [Lin et al., 1993, McGuire et al., 2000]。一方で、FPGS によりグルタメート化された葉酸は γ -glutamyl hydrolase (GGH) によりグルタミン酸が切断される [Suh et al., 2001] (図 6)。ヒトの GGH はリソソームに存在するが、癌培養細胞では培養液中にも見いだされている [Galivan et al., 2001]。ポリグルタメート型葉酸は細胞外へ排出されにくいいためモノグルタメート型葉酸よりも細胞内貯留性が高いことが知られている[Moran et al., 1999]。従って、FPGS 及び GGH は細胞内の葉酸レベルに重要な役割を担っていると考えられるが、この 2 つの酵素量が LV による 5-FU の抗腫瘍作用増強効果に影響を与えるかどうかは不明である。そこで、これら二つの酵素の発現量と LV による 5-FU の抗腫瘍作用増強効果との関連性についてヒト大腸癌培養細胞を用いて検討した。

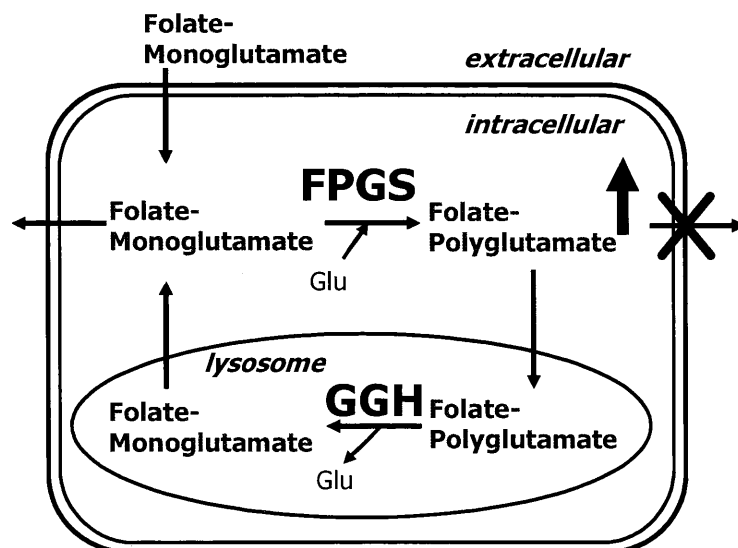


図 6 葉酸代謝における FPGS と GGH の役割

Glu; glutamic acid, FPGS; folylpolyglutamate synthase, GGH; γ -glutamyl hydrolase

第2章 Orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) の 5-fluorouracil (5-FU) 効果予測因子としての可能性の検討

1. 緒言

5-FU 系抗癌剤は古くから胃癌、大腸癌、乳癌、頭頸部癌などの治療に幅広く使用されており、固形腫瘍に対する化学療法の key drug の一つである。5-FU は次の二つの機構により抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。1 つ目の機序は、5-FU 代謝物である FdUMP が TS 及び 5,10-CH₂-THF と強固な三者共有結合体 (ternary complex) を形成し、その結果 DNA 合成阻害を引き起こすことによりもたらされる。もう一つは、5-FU 代謝物が RNA へ取り込まれ、RNA 機能障害を引き起こすことが挙げられる [Longley et al., 2003]。

TS は 5,10-CH₂-THF をメチル基供与体として dUMP をメチル化し、dTMP を生成する酵素である。TS の阻害は dTMP 及び dTTP を枯渇させ、その結果 DNA 合成を阻害する [Longley et al., 2003]。Johnston らは、9 人の大腸癌患者と 12 人の胃癌患者の腫瘍中 TS mRNA 及び蛋白発現量を調べ、5-FU の治療効果が認められた腫瘍の TS 発現は治療に抵抗性であった腫瘍に比べ有意に低かったことを報告している [Johnston et al., 1995]。一方、投与された 5-FU の 80% は、肝臓や腫瘍中の DPD により速やかに分解される [Longley et al., 2003]。従って、DPD 発現量は 5-FU の治療効果を規定する重要な因子であると考えられている。Ichikawa らは 37 人の大腸癌患者の腫瘍中 DPD と TS の mRNA 発現レベルを検討し、全患者に対する 5-FU 系抗癌剤の奏効率が 32.4% であったのに対し、TS と DPD 発現レベルが低い腫瘍を持つ患者のみを選択した場合の奏効率は 75% であったこと、さらに TS と DPD 発現レベルが低い腫瘍を持つ患者の生存期間中央値は、TS または DPD の発現が高い腫瘍を持つ患者よりも有意に長かったこと、を報告している [Ichikawa et al., 2003]。これらの報

告は、腫瘍中の TS と DPD の発現レベルは 5-FU の治療効果を規定していることを示唆しているが、これらの 2 因子の発現レベルに基づいた 5-FU の治療効果予測方法は未だに確立されておらず、また 2 因子のみを用いた予測方法では不十分である可能性も残されている。

5-FU は細胞内でリン酸化された後に抗腫瘍効果を発揮する。5-FU のリン酸化経路には以下の 3 つの経路が存在する(第 1 章 図 3)。一つ目の経路では、5-FU は phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) 存在化で OPRT により FUMP へ変換される。二つ目の経路では、ribose-1-phosphate (Rib1-P) 存在下で uridine phosphorylase (UP) により fluorouridine (FUrd) に一度変換された後、FUMP に変換される。三つ目の経路では、deoxyribose-1-phosphate (dRib1-P) 存在化で thymidine phosphorylase (TP) により FdUrd に一度変換された後、FdUMP に変換される。しかし、腫瘍ではこれら 3 つの経路の中で OPRT が関与する経路が主であることが報告されている [Peters et al., 1986, Peters et al., 1991]。OPRT と orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (ODC) は *de novo* のピリミジン合成において、オロト酸に ribose-5'-phosphate を付加する反応と、orotidine-5'-monophosphate の脱炭酸化に関わる酵素であり、両者で構成される uridine 5'-monophosphate synthase (UMPS) は両者の活性を有する二機能性酵素である [Evans et al., 2004]。OPRT と ODC は一つの mRNA にコードされており [Suttle et al., 1988]、OPRT の mRNA 発現量及び活性レベルは様々な癌で高発現していることが報告されている [Ochiai et al., 2001, Mizutani et al., 2004, Yoshitomi et al., 2006]。

腫瘍中の OPRT 発現レベルが 5-FU 感受性と関連したという報告が幾つかある [Ochiai et al., 2006, Ichikawa et al., 2003, Nakano et al., 2006]。術後補助化学療法として 5-FU 系抗癌剤を施行された 124 人の大腸癌患者において、高い OPRT 活性を示した腫瘍を有する 102 人の大腸癌患者は、低い活性を示した腫瘍を有する 22

人の患者より無病生存期間及び全生存期間が有意に長かったことが報告されている [Ochiai et al., 2006]。さらに、5-FU系抗癌剤である tegafur-uracil (UFT) に LV を併用した UFT/LV 併用療法を施行された 37 人の大腸癌患者において、治療が有効であった腫瘍は治療抵抗性であった腫瘍よりも腫瘍中の OPRT と DPD の mRNA 発現の比 (OPRT/DPD) が有意に高かったことも報告されている [Ichikawa et al., 2003]。しかしながら、Ishida らは 39 人の大腸癌患者の腫瘍中 OPRT mRNA 発現と 5-FU 系抗癌剤の治療効果に関連性が認められなかったことを報告している [Ishida et al., 2005]。従って、OPRT 発現と 5-FU の抗腫瘍効果との関連性には矛盾する報告が存在する。

5-FU は 40 年以上様々な固形癌に対して用いられているが、単剤で使用された場合、奏効率は 20%以下である [Longley et al., 2003]。そこで 5-FU の抗腫瘍効果を高めるため、これまで S-1 や 5'-DFUR, capecitabine といった 5-FU のプロドラッグが開発された。特に S-1 は、胃癌に対する奏効率が 46.5%と高い有効性を示す [Sakata et al., 1998]。しかし、これらの薬剤に対しても効果が認められない患者や副作用が強くなる患者が存在する。従って、薬剤の投与前に治療効果を予測する方法の確立が強く望まれている。

本研究では、ヒト癌細胞株を用いて、5-FU の抗腫瘍効果と OPRT 発現との関連性を検討した。また、small-interfering RNA (siRNA) を用いて癌培養細胞株の OPRT 発現をノックダウンし、5-FU の細胞毒性効果へ与える影響を検討した。

2. 材料および方法

2-1 公開データベースからのヒト癌細胞 60 株の遺伝子発現データ及び 5-FU に対する感受性データの入手

National Cancer Institute (NCI) が所有しているヒト癌細胞 60 株 (NCI60 細胞株) に対する 5-FU の 50%細胞増殖抑制濃度 (50% growth inhibition concentration; GI₅₀) の

データはNCIの公開データベース (<http://dtp.nci.nih.gov>) から入手し、解析に使用した。遺伝子発現データは、Broad Institute が公開している Affymetrix Hu6800 アレイで測定した NCI60 細胞株の遺伝子発現プロファイルデータ (<http://www.broad.mit.edu/tools/data.html>) を使用した [Staunton et al.,2001]。遺伝子発現データは Microarray Suite 5.0 ソフトウェア (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) のアルゴリズムを用いて標準化した。さらにデータを Genespring ソフトウェア (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) にインポート後、アレイ間の染色ムラを補正するため各々のアレイの中央値で補正した。

2-2 薬剤

5-FU は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。S-1 と CDHP は大鵬薬品工業 (Tokyo, Japan) で合成されたものを使用した。5'-DFUR は日本ロシュ株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。

2-3 動物及び飼育条件

4 週齢の雄のヌードマウス (BALB/cA Jcl-nu/nu, Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan) は、特定病原体感染防止条件 (specific-pathogen-free) 下で飼育した。また全ての実験は、大鵬薬品工業の動物実験指針に従って実施した。

2-4 細胞と培養法

使用したヒト癌細胞株とその入手先を表 1 に示す。細胞は牛胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) を 10% 添加した RPMI1640 培地にて、37°C、5%CO₂ のインキュベーター内で培養、継代したものを使用した。

癌腫	細胞株	入手先
乳癌	MC-5	実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan)
	H-31	大阪大学微生物病研究所
	MC-2	実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan)
	MX-1	(財) 癌研究会 癌研究所 (Tokyo, Japan)
	MDA-MB-435SHM	American Type Culture Collection (Rockville, MD)
	MDA-MD-231	大日本住友製薬株式会社 (Osaka, Japan)
大腸癌	KM12C	国立がんセンター 森川清先生
	HCT-15	大日本住友製薬株式会社 (Osaka, Japan)
	KM20C	国立がんセンター 森川清先生
	COL-1	実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan)
	KM12C/FU	国立がんセンター 森川清先生 5-FU耐性株は大鵬薬品工業株式会社で樹立
	CO-3	実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan)
肺癌	GT3TKB	理化学研究所 (Tokyo, Japan)
	LC-11	実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan)
	Lu-99	国立医薬品食品衛生研究所 細胞バンク (Osaka, Japan)
	LX-1	(財) 癌研究会 癌研究所 (Tokyo, Japan)
	LC-6	実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan)
	Lu-134	国立医薬品食品衛生研究所 細胞バンク (Osaka, Japan)
	Lu-130	国立相模原病院
	PC-9	東京医科大学
膵癌	PAN-3	大日本住友製薬株式会社 (Osaka, Japan)
	PAN-4	大日本住友製薬株式会社 (Osaka, Japan)
	PAN-12	実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan)
	H-48	大阪大学微生物病研究所
	MIAPaCa-2	American Type Culture Collection (Rockville, MD)
	BxPC-3	大日本住友製薬株式会社 (Osaka, Japan)
胃癌	AZ-521	ヒューマンサイエンス研究資源バンク (Tokyo, Japan)
	SC-2	実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan)
	ST-40	実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan)
	4-1ST	実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan)
	SC-4	実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan)
	OCUM-2MD3	大阪市立医科大学 平川弘聖先生
前立腺癌	DU145	American Type Culture Collection (Rockville, MD)
	TSU-Pr1	富山医薬大学 済木 育夫先生

表1. 実験に使用した培養癌細胞株

2-5 細胞増殖抑制試験

細胞を $1 - 2 \times 10^3$ cells/well となるように 96 穴プレートに 100 μ L の 10%FBS を含む RPMI1640 培養液で播種した。翌日、種々の濃度の 5-FU 及び 70 μ M (終濃度) の CDHP を 100 μ L 添加した。72 時間後、WST-8 試薬により細胞内脱水素酵素量を測

定することにより生細胞数を評価した (Cell counting kit-8; Dojindo, Kumamoto, Japan)。GI₅₀ はXLfitソフトウェア (ID Business Solutions, Guildford, UK) を用いて算出した。

2-6 ノードマウス皮下移植ヒト腫瘍株に対する S-1 と 5'-DFUR の効力試験

表 1 に示した癌細胞株のうち 31 株 (MC-5, H-31, MC-2, MX-1, MDA-MB-435SHM, MDA-MD-231, KM12C, HCT-15, KM20C, COL-1, KM12C/FU, CO-3, GT3TKB, LC-11, Lu-99, LX-1, LC-6, Lu-134, Lu-130, PAN-3, PAN-4, PAN-12, H-48, MIAPaCa-2, BxPC-3, AZ-521, SC-2, ST-40, 4-1ST, SC-4, OCUM-2MD3) を用いて、S-1 と 5'-DFUR の効力試験を実施した [Ooyama et al.,2006]。細胞をノードマウスの右側背部皮下に移植後、経時的に電子ノギスにより腫瘍径を測定して、以下の式で腫瘍体積 (Tumor volume; TV) を算出し、TV が 100 - 300mm³ になったマウスを選別した。

$$TV (mm^3) = [\text{直径}(mm) \times \text{短径}(mm)]^2 / 2$$

移植した腫瘍の体積がほぼ均等になるように各群に 6 - 8 匹ずつ割り付け (0 日目)、翌日より 14 日間、S-1 を FT として 10 mg/kg/day、5'-DFUR を 150 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回連日投与した。S-1 及び 5'-DFUR は 0.5% (w/v) hydroxypropylmethylcellulos (HPMC) 溶液で懸濁した。コントロール群には溶媒のみを投与した。効果判定は最終薬剤投与日の翌日 (15 日目) の各マウスの TV と投与開始前日 (0 日目) の TV を用いて以下の式で Relative tumor volume (RTV) を算出し、さらに Tumor growth inhibition rate (%) を以下の式で算出し評価指標とした。

$$RTV = (15 \text{ 日目の TV}) / (0 \text{ 日目の TV})$$

$$\text{Tumor growth inhibition rate (\%)} = (1 - \text{薬剤投与群の平均 RTV} / \text{コントロール群の平均 RTV}) \times 100$$

2-7 Real time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

TS、DPD および OPRT の mRNA 発現量の検討は real time RT-PCR 法により実施した。各細胞から total RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen, K.K., Tokyo, Japan)を用いて抽出し、total RNA より High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて cDNA を合成した。1 ng の total cDNA、プライマー・プローブ試薬である 20×TaqMan gene expression assays mix (Applied Biosystems) 及び TaqMan Universal PCR Master Mix (2×) (Applied Biosystems) 試薬の合計 20 μ L の反応液より real time PCR を実施した。PCR 装置には Applied Biosystems 7900HT (Applied Biosystems) を使用し、PCR 条件は 50°C 2分を 1 サイクル; 95°C 10分を 1 サイクル; 95°C 15秒と 60°C 1分を 40 サイクルとした。本実験に用いた各遺伝子に対する 20×TaqMan gene expression assays mix 試薬は次に示すアッセイ ID のものを使用した。TS,Hs00426591_m1; DPD,Hs00559278_m1; OPRT,Hs00165978_m1; beta actin (ACTB) , Hs99999903_m1 及び glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) , Hs99999905_m1。ヌードマウス皮下移植腫瘍における mRNA 発現量は、GAPDH と ACTB の幾何平均値で補正し、培養癌細胞株における mRNA 発現量は、GAPDH の発現量で補正した。

2-8 OPRT 遺伝子のサイレンシング

OPRT に対する siRNA 及び Control siRNA (siCONTROL RISC-free siRNA) は Dharmacon Research (Chicago, IL, USA) から購入した。細胞を 1.25×10^4 cells/cm² の密度で播種し、翌日、細胞に 250 pM の siRNA と Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) の複合体を添加し、24 時間インキュベートした。

2-9 イムノブロットイング

細胞を界面活性剤である M-PER 試薬 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) で可溶化後、 $14,000 \times g$ で 10 分遠心分離した。得られた上清から、Biorad Protein assay 試薬 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて Bradford 法で蛋白定量を行った。総蛋白量として $30 \mu\text{g}$ の蛋白抽出液に還元試薬 (NuPAGE Sample Buffer (4 \times); Invitrogen) を添加して還元処理を行い、NuPAGE 10% Bis-Tris ゲル (Invitrogen) と MOPS running buffer (Invitrogen) を用いて、還元条件下で 200V の定電圧で 45 分泳動した。泳動終了後、蛋白を Polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写した。転写後の PVDF 膜を ECL advance Western blotting detection kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) に含まれるブロッキング試薬を用いてブロッキング処理を行った後、一次抗体として 500 倍希釈したウサギ抗 OPRT ポリクローナル抗体 (Taiho Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) [Sakamoto et al., 2005] を室温で 1 時間作用させ、二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識抗体 (DakoCytomation Co., Kyoto, Japan) を 30 分反応させた。バンドの検出には ECL advance Western blotting detection kit (Amersham Biosciences) を用いてその化学発光シグナルをイメージアナライザー (LAS-3000 Mini; Fuji Film Co. Ltd., Tokyo, Japan) で検出した。

2-10 統計学的解析

遺伝子発現量と薬剤感受性の相関性を評価する際、遺伝子発現データはデータの分布を正規化するため中央値で補正した値を用いた。相関性はピアソン相関係数を用いて評価した。統計処理ソフトには JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用い、 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。

3. 結果

3-1 NCI60 細胞株における OPRT mRNA 発現量と 5-FU の細胞毒性効果との相関性

OPRT mRNA 発現量と 5-FU の細胞毒性効果との相関性を検討するため、NCI60 細胞株の遺伝子発現データと 5-FU に対する感受性データを公開データベースよりダウンロードした。OPRT 発現量は 5-FU の GI_{50} 値と有意に相関した ($P < 0.05$) が、相関係数は -0.255 であり、その相関性は弱かった (図 1A)。

TS と DPD による 5-FU の細胞毒性への影響を軽減するさせるために、TS または DPD の mRNA 発現量が中央値から上下 1.5 倍以内であった細胞株を選択した。TS の mRNA 発現量が中央値から上下 1.5 倍以内であった細胞株は 60 細胞株中 31 株であり、31 株における OPRT mRNA 発現量と 5-FU の GI_{50} 値には相関が認められなかった ($r = -0.246$, $P = 0.183$, 図 1B)。同様に、DPD の mRNA 発現量が中央値から上下 1.5 倍以内であった 20 細胞株における OPRT mRNA 発現量と 5-FU の GI_{50} 値には相関が認められなかった ($r = -0.248$, $P = 0.292$, 図 1C)。しかし、TS と DPD 両方の mRNA 発現量が中央値から上下 1.5 倍以内であった 11 細胞株を選択すると、OPRT mRNA 発現量と 5-FU の GI_{50} 値に有意な相関は認められなかった ($P = 0.102$) ものの、その相関係数は -0.519 であり、60 細胞株における相関係数に比べ高かった (図 1D)。

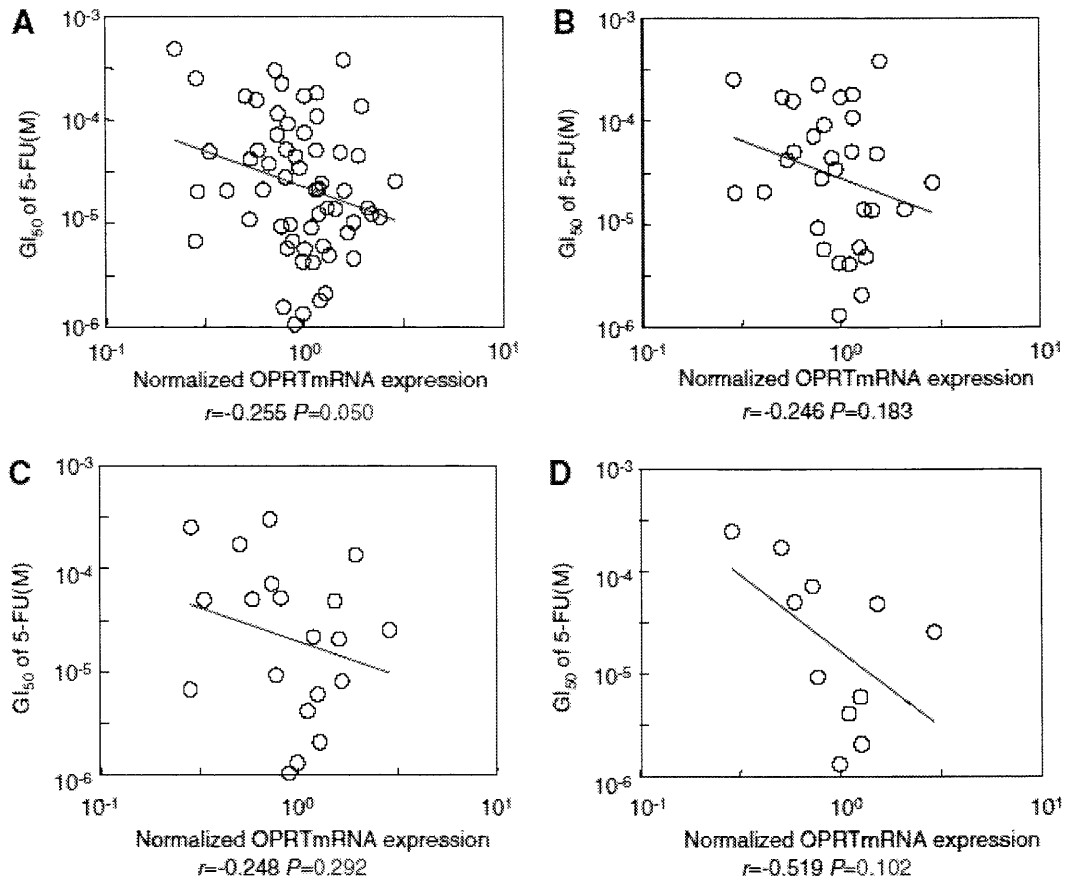


図 1 NCI60 細胞株における OPRT mRNA 発現量と 5-FU の細胞毒性効果との相関性
 (A) 60 細胞株 (B) TS mRNA 発現量で選択した 31 細胞株 (C) DPD mRNA 発現量で選択した 20 細胞株 (D) TS と DPD 両方の mRNA 発現量で選択した 11 細胞株。マイクロアレイで測定された OPRT mRNA 発現量は、アレイの中央値で補正後、さらに 60 細胞株における OPRT 発現量の中央値で補正した。

3-2 ノードマウス皮下移植腫瘍における OPRT mRNA 発現量と 5'-DFUR 及び S-1 の抗腫瘍効果との相関性

5-FU 系抗癌剤である 5'-DFUR 及び S-1 の抗腫瘍効果と腫瘍中 OPRT mRNA 発現量を比較検討するため、ノードマウス皮下移植 31 腫瘍株に対する 5'-DFUR 及び S-1 の効力試験を実施した。試験終了後のコントロール群の腫瘍組織から OPRT mRNA 発現量を測定し、5'-DFUR 及び S-1 の抗腫瘍効果との相関性を検討した。31 腫瘍株における OPRT mRNA 発現量と 5'-DFUR または S-1 による Tumor growth inhibition rate に有意な相関は認められなかった (5'-DFUR; $r = 0.104$, $P = 0.576$, 図 2A, S-1; $r = 0.281$ $P = 0.126$, 図 2C)。NCI60 培養癌細胞株の TS 及び DPD の mRNA 発現量は株間でそれぞれ 10 倍及び 58 倍差異があったのに対し、ノードマウス皮下移植 31 腫瘍株における TS 及び DPD mRNA 発現の株間の差異はそれぞれ 37 倍及び 1.4×10^5 倍と大きかった(data not shown)。そこで、TS と DPD 発現の差異による影響を軽減させるため、31 腫瘍株における TS 及び DPD の mRNA 発現量が中央値からそれぞれ上下 2 倍及び 7 倍以内であった 7 腫瘍株を選択した。7 腫瘍株における OPRT mRNA 発現量と 5'-DFUR による Tumor growth inhibition rate に有意な相関が認められた ($r = 0.759$ $P = 0.048$, 図 2B)。さらに、7 腫瘍株における OPRT mRNA 発現量と S-1 による Tumor growth inhibition rate には相関傾向が認められ ($P = 0.081$)、その相関係数 ($r = 0.699$, 図 2D) は 31 腫瘍株における相関係数に比べ高かった。

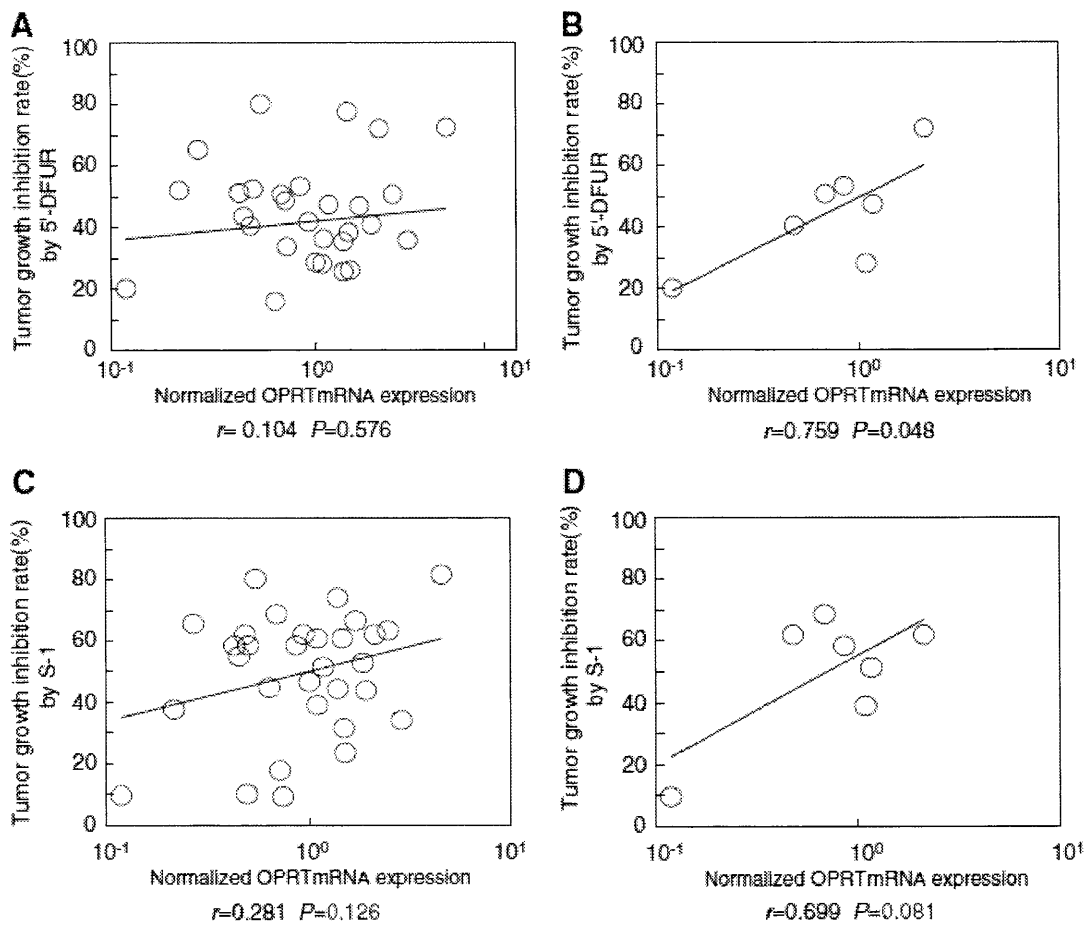


図 2 ノードマウス皮下移植腫瘍における OPRT mRNA 発現量と (A, C) 5'-DFUR 及び (B, D) S-1 の抗腫瘍効果との相関性
 (A, C) 31 腫瘍株 (B, D) TS と DPD 両方の mRNA 発現量で選択した 7 細胞株。OPRT mRNA 発現量は、real time RT-PCR で測定し、GAPDH と ACTB の mRNA 発現量の幾何平均値で補正後、さらに中央値で補正した。

3-3 OPRT mRNA 発現量と 5-FU の細胞毒性効果との相関性

OPRT mRNA 発現量と 5-FU の細胞毒性効果との相関性について、さらに詳細に *in vitro* で検討した。TS 発現による 5-FU の細胞毒性効果への影響を出来る限り除外するため、TS mRNA 発現量が同レベルである 5 つの細胞株 (MIAPaCa-2, OCUM2-MD3, TSU-Pr1, PC-9, DU145) を選定した。5 細胞株における TS、DPD 及び OPRT の mRNA 発現量はそれぞれ 0.11 - 0.32、0.05 - 1.29、0.25 - 1.98 であった (図 3A)。DPD 発現による 5-FU の細胞毒性効果への影響を軽減するため、DPD 阻害剤である CDHP を用いた。70 μ M の CDHP は細胞毒性を示すことなく、完全に DPD 活性を阻害する [Oie et al.,2007]。5 細胞株の内 DPD mRNA 発現量が最も高かった MIAPaCa-2 細胞において、5-FU 単剤及び CDHP を併用時の 5-FU の GI_{50} 値はそれぞれ 13 μ M 及び 7.2 μ M であり、CDHP は 5-FU の細胞毒性を 1.8 倍増強した (図 3B)。他の 4 細胞株において、CDHP は 5-FU の細胞毒性を 1.0 - 1.3 倍増強した (図 3B)。CDHP を併用時の 5-FU の GI_{50} 値は OPRT mRNA 発現量と有意に相関した ($r = -0.990$, $P = 0.001$, 図 3C)。

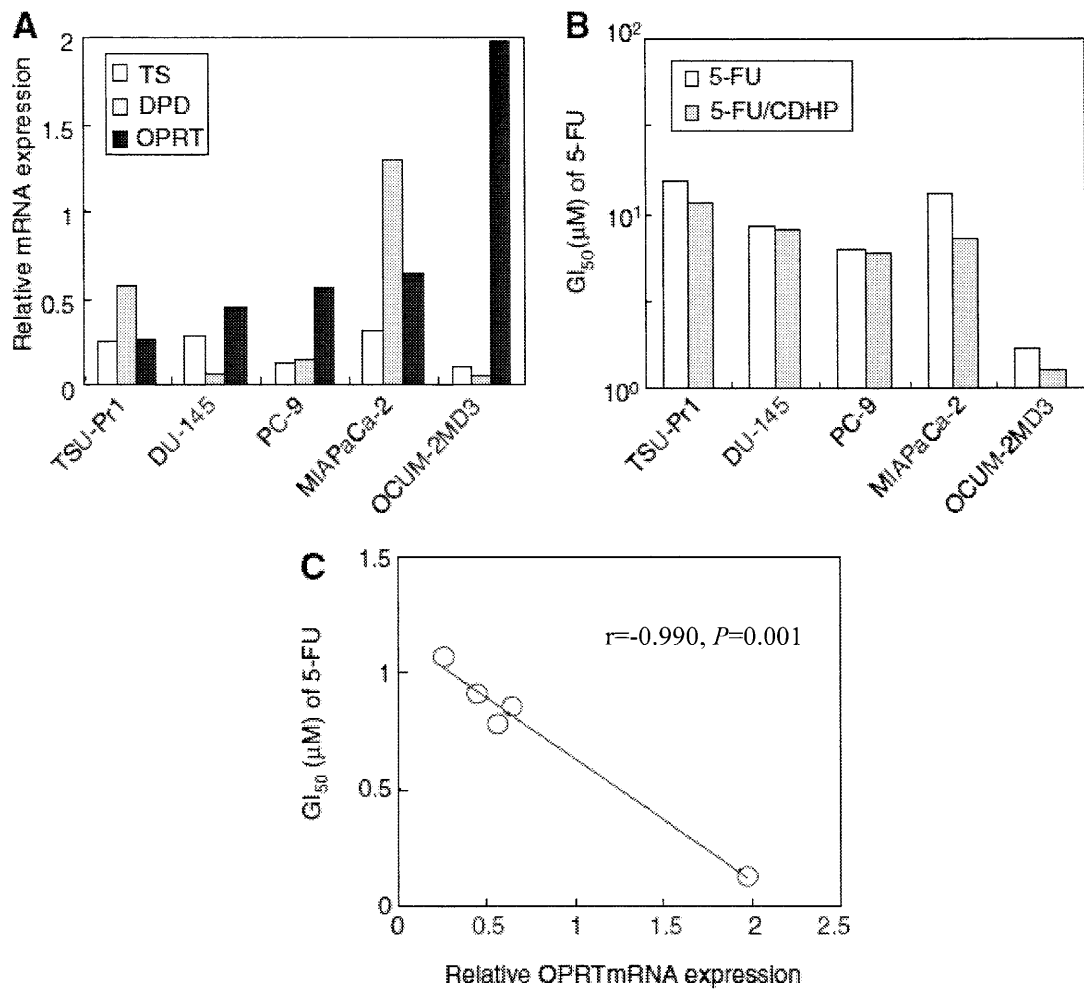


図 3 MIAPaCa-2, OCUM2-MD3, TSU-Pr1, PC-9 及び DU145 細胞における (A) TS, DPD, OPRT mRNA 発現量、(B) 5-FU 及び 5-FU/CDHP に対する感受性、及び (C) OPRT mRNA 発現量と 5-FU/CDHP の細胞毒性効果との相関性

(A, C) mRNA 発現量は real time RT-PCR 法で測定し、GAPDH mRNA 発現量で補正した。mRNA 発現量は 2 回の実験の平均値を示した。(B, C) GI₅₀ 値は 5-FU 単剤または 5-FU/70 μMCDHP を 72 時間接触させた細胞増殖抑制試験の結果 (n = 3) から算出した。

3-4 5-FU の細胞毒性作用に与える OPRT ノックダウンの効果

TS と DPD の影響を軽減させた条件下で、siRNA による OPRT 発現のノックダウンが 5-FU の細胞毒性効果へ与える影響を検討した。TS の影響を排除するため、同レベルの TS mRNA 発現を持つ MIAPaCa-2 及び OCUM-2MD3 細胞を選択し、さらに DPD の影響を排除するため、CDHP を用いた。細胞を 48 時間 siRNA で処理し、その後 72 時間 5-FU/70 μ M CDHP を接触させた。siRNA 処理後 48 時間後の MIAPaCa-2 及び OCUM-2MD3 細胞の OPRT mRNA 発現は、それぞれコントロール細胞の 11% 及び 7% に低下し (data not shown)、OPRT 蛋白レベルも低下した (図 4A)。siRNA 処理 120 時間後、MIAPaCa-2 細胞の OPRT の mRNA 及び蛋白レベルは、それぞれコントロール細胞の 48% (data not shown) 及び 22% (図 4A) に低下していたが、OCUM-2MD3 細胞の OPRT mRNA 発現量はコントロール細胞と同程度であり (data not shown)、OPRT 蛋白レベルもコントロール細胞の 82% にまでしか低下していなかった (図 4A)。OPRT ノックダウンは、トランスフェクション 48 時間後の TS や DPD の mRNA 及び蛋白レベルに影響を与えなかった (data not shown)。MIAPaCa-2 及び OCUM-2MD3 細胞における OPRT siRNA 処理は、5-FU の GI_{50} 値をそれぞれ 28 倍及び 4 倍増加させた。これらの結果は、OPRT 発現が癌細胞の 5-FU 感受性に関連していることを示唆するものである。

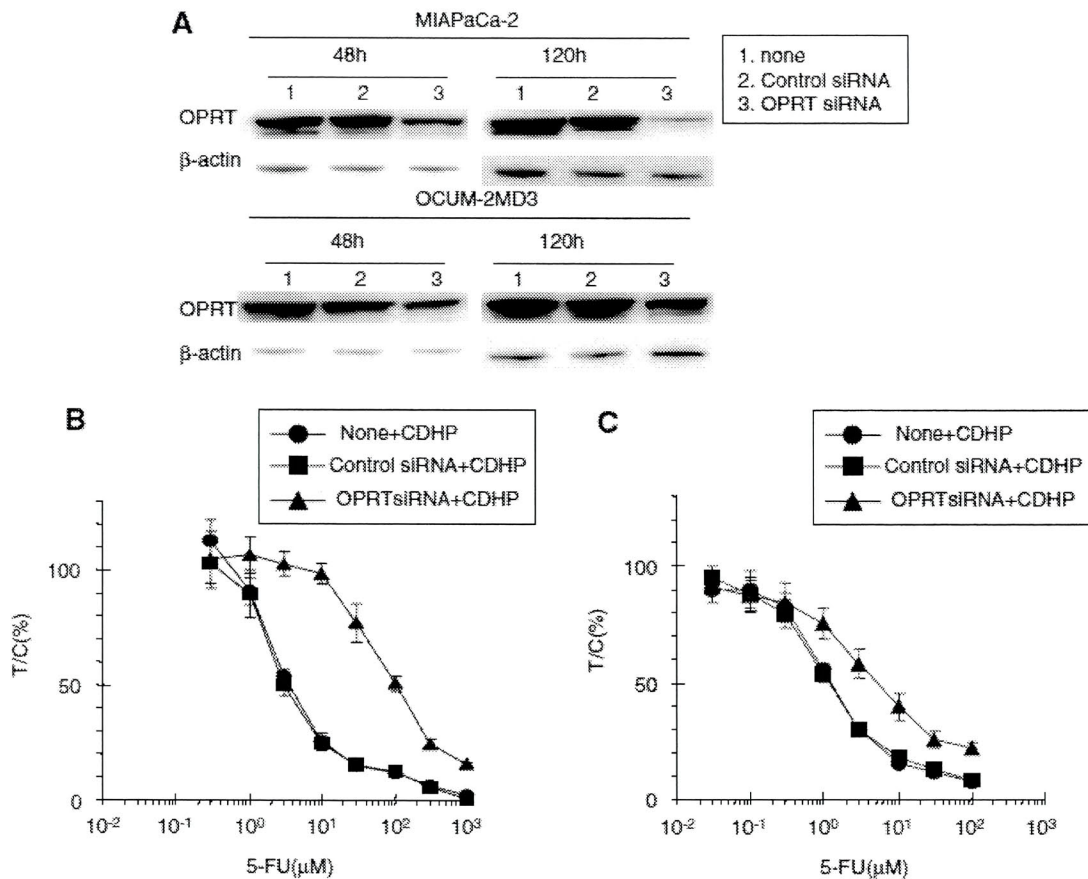


図 4 (A) MIAPaCa-2 及び OCUM2-MD3 細胞に対する OPRT siRNA 処置が OPRT 蛋白発現量に与える影響 (B, C) (B) MIAPaCa-2 細胞及び (C) OCUM2-MD3 細胞に対する OPRTsiRNA 処置が 5-FU/CDHP 感受性に与える影響
 (A) トランスフェクション 48 時間及び 120 時間後の OPRT 蛋白はイムノブロットング法により検出した。(B, C) siRNA 処置後の細胞を種々の濃度の 5-FU と 70 μ M の CDHP で 72 時間処理した。結果は、平均値 \pm 標準偏差 (n = 3) で示した。

4. 考察

5-FU が抗腫瘍効果を発揮するためには、OPRT などの酵素によりリン酸化を受ける必要がある。しかし、これまで OPRT の 5-FU の抗腫瘍効果規定因子としての重要性は十分わかっていない。本研究では、OPRT 発現と 5-FU の抗腫瘍効果との関連性を明らかにするため、5-FU 感受性に影響を与えられている TS 及び DPD の mRNA の発現量が株間で同程度である癌細胞株を選択し、これらの発現の影響を出

来るだけ排除した。これらの細胞株の OPRT mRNA 発現量と 5-FU の抗腫瘍効果は正に相関した。さらに我々は OPRT と 5-FU の抗腫瘍効果との関連性について *in vitro* で検証した。これらの結果は、TS 及び DPD に加え OPRT も 5-FU の抗腫瘍効果規定因子であることを示唆している。

本研究において、TS 及び DPD の mRNA 発現が株間で同程度であった細胞株における OPRT mRNA 発現と 5-FU の抗腫瘍効果の相関性は、全ての細胞株における相関性よりも強かった。Ishida らは、大腸腫瘍中の OPRT mRNA 発現量は 5-FU 系抗癌剤の抗腫瘍効果と関連しなかったことを報告している [Ishida et al., 2005]。これは、我々の結果を考慮すると、OPRT より他の因子の方が 5-FU 系抗癌剤の効果に強い影響を与えた可能性がある。実際 Ishida らは、腫瘍中 TS mRNA 発現量は 5-FU 系抗癌剤の抗腫瘍効果と関連したことを報告している [Ishida et al., 2005]。このように、我々の結果は 5-FU の抗腫瘍効果を正確に予測するためには、TS、DPD 及び OPRT の三者の発現レベルを検討する必要があることを示唆している。

CDHP は DPD 活性を競合的に阻害する [Tatsumi et al., 1987]。我々は、CDHP が癌細胞株の 5-FU 感受性を増強することを示した。これは、Takechi らの報告とも一致する [Takechi et al., 2002]。CDHP の効果は 5 つの癌細胞株のうち MIAPaCa-2 細胞で最も高く、また MIAPaCa-2 細胞は最も DPD 発現が高かった。この結果は、細胞内の DPD 発現は 5-FU の細胞毒性効果を軽減することを示唆している。我々は以前、ヌードマウス皮下移植ヒト腫瘍 31 株の腫瘍中 DPD mRNA 発現レベルは 5-FU 系抗癌剤の抗腫瘍効果と負相関を示すが、CDHP を配合している S-1 の抗腫瘍効果とは相関しないことを報告している [Ooyama et al., 2006]。本研究で我々は、ヌードマウスに皮下移植したヒト腫瘍株における OPRT mRNA 発現が S-1 の抗腫瘍効果と正相関することを示した。また、癌培養細胞株の OPRT 発現は、CDHP 併用時の 5-FU の細胞毒性効果と正相関した。これらの結果は、S-1 では CDHP により DPD の影響が排除さ

れるため、腫瘍中 OPRT 発現が S-1 の抗腫瘍効果の重要な規定因子であることを示唆する。

今後は臨床研究において、腫瘍中の TS や DPD に加え OPRT の発現を測定し、5-FU 系抗癌剤の抗腫瘍効果との関連性を明らかにする必要性がある。

5.小括

本研究では、NCI60 細胞株及びヌードマウス皮下移植ヒト腫瘍 31 株を用いて、OPRT 発現と 5-FU の抗腫瘍効果との関連性を検討した。TS 及び DPD による 5-FU の抗腫瘍効果への影響を軽減するため、TS 及び DPD 発現が同レベルである細胞株を選択したところ、それらの細胞株の OPRT 発現と 5-FU の抗腫瘍効果は正相関した。さらに、*in vitro* で OPRT 発現と 5-FU の抗腫瘍効果を詳細に検討した。TS 発現が同程度である 5 細胞株を用いることで TS の影響を軽減し、さらに DPD 阻害剤である CDHP を用いて DPD の影響を軽減した。その結果、5 細胞株の OPRT 発現と CDHP 併用時の 5-FU の細胞毒性効果は正相関した。さらに、MIAPaCa-2 と OCUM2-MD3 細胞株の OPRT 発現を、siRNA を用いてノックダウンしたところ、OPRT 発現のノックダウンは、両細胞株の 5-FU への感受性を低下させた。これらの結果は、腫瘍の OPRT 発現は 5-FU の抗腫瘍効果に影響を与えること示唆しており、OPRT が 5-FU の効果予測因子となりうる可能性がある。

第3章 Leucovorin (LV) による 5-fluorouracil (5-FU) の抗腫瘍作用増強効果を規定する因子の探索

1. 緒言

5-FU は主に、その活性代謝物である FdUMP が TS 及び 5,10-CH₂-THF と強固な三者共有結合体 (ternary complex) を形成して TS を阻害することにより抗腫瘍効果を発揮する [Longley et al., 2003]。TS は 5,10-CH₂-THF をメチル基供与体として dUMP をメチル化し、dTMP を生成する酵素であり、この酵素の阻害は dTMP 及び dTTP を枯渇させ、その結果 DNA 合成を阻害する。しかし、5-FU は単剤で使用された場合、奏効率は 20% 以下である [Longley et al., 2003]。そこで 5-FU の抗腫瘍効果を高めるため、バイオケミカルモデュレーターである LV と併用する 5-FU/LV 併用療法が開発された。LV は還元型葉酸製剤であり、LV 自体には抗腫瘍作用はないが、5,10-CH₂-THF を供給し ternary complex を安定化させることで 5-FU の抗腫瘍効果を増強する [Longley et al., 2003]。

Spears らは 37 人の大腸癌患者に 500 mg/ m² の 5-FU を静脈内投与し腫瘍中の TS 阻害率を調べた結果、30 人の患者の腫瘍は TS 阻害率が 85% 以下であり、そのうち 16 人 (53%) は 5,10-CH₂-THF 量の不足が不十分な TS 阻害を引き起こした原因である可能性を報告している [Spears et al., 1988]。この仮説は、大腸癌に対する 5-FU/LV 併用療法は 5-FU 単剤に比較し有意に奏効率及び生存期間を改善するというメタアナリシスの結果により裏付けられた [Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project, 1992, Meta-Analysis Group in Cancer, 2004]。5-FU/LV 併用療法は大腸癌に対する標準化学療法の一つである。

患者に最適な薬剤を処方する個別化医療を実現化するためには、患者に薬剤を投与する前に効果や副作用を予測できる因子を同定することが不可欠である。5-FU

に関しては、その抗腫瘍効果に TS や DPD などの因子が関与していることが報告されている [Longley et al., 2003, Johnston et al., 1995, Ichikawa et al., 2003]。しかし、LV による 5-FU の抗腫瘍効果増強効果に関与する因子に関してはこれまで報告されていない。

葉酸は血中ではモノグルタメート型で存在するが、細胞内では主にポリグルタメート型で存在する。細胞内葉酸は folylpolyglutamate synthase (FPGS) によりポリグルタメート化される一方で、 γ -glutamyl hydrolase (GGH) によりグルタミン酸が切断される [Suh et al., 2001]。ポリグルタメート型葉酸はモノグルタメート型葉酸よりも細胞内貯留性が高いことが知られている [Moran et al., 1999]。従って、FPGS 及び GGH は細胞内の葉酸レベルに重要な役割を担っていると考えられるが、この 2 つの酵素量が LV による 5-FU の抗腫瘍作用増強効果に影響を与えるかどうかは不明である。

本研究では、LV による 5-FU の抗腫瘍作用増強効果を規定している因子を探索するために、ヒト大腸癌細胞株を用いて LV の効果と FPGS の発現量と葉酸量との関連性を検討した。さらに、siRNA を用いて FPGS または GGH をノックダウンし、LV 効果へ与える影響を検討した。

2. 材料および方法

2-1 薬剤

S-1 と LV は大鵬薬品工業 (Tokyo, Japan) で合成されたものを使用した。FdUrd は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。 ^3H FdUMP (15 Ci/mmol) と (6S)-[3',5',7, 9- ^3H] LV (10 Ci/mmol) は Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA) から購入した。

2-2 細胞と培養法

5 種のヒト大腸癌細胞株を実験に使用した。COL-1 細胞は実験動物中央研究所 (kanagawa, Japan)、KM12C と KM20C 細胞は国立がんセンター森川清先生より分与された。HT-29 と DLD-1 細胞は American Type Culture Collection (Rockville, Md, USA) から入手した。細胞は牛胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) を 10% 添加した RPMI1640 培地にて、37°C、5%CO₂ のインキュベーター内で培養、継代したものを使用した。

2-3 動物及び飼育条件

4 週齢の雄のヌードマウス (BALB/cA Jcl-nu/nu, Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan) に、通常飼料 (CE-2, Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan) または低葉酸飼料 (AIN-93M-based folate-deficient rodent diet, Oriental Yeast Co., Lrd, Tokyo, Japan) を入荷時より試験終了まで自由摂取させた。マウスは、特定病原体感染防止条件 (specific-pathogen-free) 下で飼育した。また全ての試験は、大鵬薬品工業の動物実験指針に従って実施した。

2-4 細胞増殖抑制試験

細胞を 2×10^3 cells/well となるように 96 穴プレートに 100 μ L の 10%FBS を含む RPMI1640 培養液で播種した。翌日、種々の濃度の FdUrd 及び LV を 100 μ L 添加した。72 時間後、WST-8 試薬により細胞内脱水素酵素量を測定することにより生細胞数を評価した (Cell counting kit-8; Dojindo, Kumamoto, Japan)。50%細胞増殖抑制濃度 (GI₅₀) 及び 95% confidence interval (CI) は XLfit ソフトウェア (ID Business Solutions, Guildford, UK) を用いて算出した。

2-5 ヌードマウス皮下移植ヒト腫瘍株に対する S-1 と LV の効力試験

細胞をヌードマウスの右側背部皮下に移植後、経時的に電子ノギスにより腫瘍径を測定して、以下の式で腫瘍体積 (Tumor volume; TV) を算出し、TV が 100 - 300mm³になったマウスを選別した。

$$TV (\text{mm}^3) = [\text{直径}(\text{mm}) \times \text{短径} (\text{mm})]^3 / 2$$

移植した腫瘍の体積がほぼ均等になるように各群に 6 - 7 匹ずつ割り付け (0 日目)、翌日より 14 日間、S-1 を FT として 6.9 mg/kg/day、LV を 20 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回連日投与した。S-1 及び LV は 0.5% (w/v) hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) 溶液で懸濁した。コントロール群には溶媒のみを投与した。効果判定は最終薬剤投与日の翌日 (15 日目) の各マウスの TV と投与開始前日 (0 日目) の TV を用いて以下の式で Relative tumor volume (RTV) を算出し、さらに Tumor growth inhibition rate (TGI, %) を以下の式で算出し評価指標とした。

$$RTV = (15 \text{ 日目の TV}) / (0 \text{ 日目の TV})$$

$$TGI (\%) = (1 - \text{薬剤投与群の平均 RTV} / \text{コントロール群の平均 RTV}) \times 100$$

2-6 Real time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

FPGS,GGH の mRNA 発現量の検討は real time RT-PCR 法により実施した。各細胞から total RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen, K.K., Tokyo, Japan) を用いて抽出し、total RNA より High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて cDNA を合成した。1 ng の total cDNA、プライマー・プローブ試薬である 20×TaqMan gene expression assays mix (Applied Biosystems) 及び TaqMan Universal PCR Master Mix (2×) (Applied Biosystems) 試薬の合計 20 μL の反応液より real time PCR を実施した。PCR 装置には Applied Biosystems 7900HT (Applied Biosystems) を使用し、PCR 条件は 50°C 2 分を 1 サイクル; 95°C 10 分を 1 サイクル; 95°C 15 秒と 60°C 1 分を 40 サイクルとした。本実験に用いた各遺伝子に

対する 20×TaqMan gene expression assays mix 試薬は次に示すアッセイ ID のものを使用した。FPGS, Hs00191956_m1; GGH, Hs00608257_m1 及び beta actin (ACTB), Hs99999903_m1。mRNA 発現量は、ACTB の発現量で補正した。

2-7 FPGS 及び GGH 遺伝子のサイレンシング

FPGS 及び GGH に対する siRNA は Stealth Select RNAi (Invitrogen, Chicago, IL, USA) を使用した。Control siRNA (siCONTROL RISC-free siRNA) は Dharmacon Research (Chicago, IL, USA) から購入した。細胞を 1.25×10^4 cells/cm² の密度で播種し、翌日、細胞に 250 pM の siRNA と Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) の複合体を添加し、24 時間インキュベートした。

2-8 FPGS 及び GGH 抗体の調整

抗原を調整するため、FPGS は、219 - 238 番目のアミノ酸 (CSTNQIPMLIRRKETKDYGTKRL) に対してペプチドを合成した (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Gunma, Japan)。GGH は 94 - 110 番目のアミノ酸配列 (LFPGGSVDLRRSDYAKV) にシステイン残基を付加してペプチドを合成した (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.)。これらのペプチドにウシサイログロブリンを結合させ抗原を作製した。ウサギ (日本白色種) に抗原を 1 回あたり 100 µg、3 ヶ月間に合計 8 回免疫した。抗血清の力価が上昇していることを確認後、全血を採取し、遠心分離し血清を採取した。得られた血清を、抗原アフィニティーカラム (Activated Thiol Sepharose 4B, GE 130 Healthcare UK Ltd., England) を用いて精製し、FPGS 及び GGH 抗体としてイムノブロットングに用いた。

2-9 イムノブロットング

細胞を界面活性剤である M-PER 試薬 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) で可溶化後、 $14,000 \times g$ で 10 分遠心分離した。得られた上清から、Biorad Protein assay 試薬 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて Bradford 法で蛋白定量を行った。総蛋白量として $30 \mu\text{g}$ の蛋白抽出液に還元試薬 (NuPAGE Sample Buffer (4 \times); Invitrogen) を添加して還元処理を行い、NuPAGE 10% Bis-Tris ゲル (Invitrogen) と MOPS running buffer (Invitrogen) を用いて、還元条件下で 200V の定電圧で 45 分泳動した。泳動終了後、蛋白を Polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写した。転写後の PVDF 膜を ECL advance Western blotting detection kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) に含まれるブロッキング試薬を用いてブロッキング処理を行った後、一次抗体として 500 倍希釈したウサギ抗 FPGS または GGH ポリクローナル抗体を室温で 1 時間作用させ、二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識抗体 (DakoCytomation Co., Kyoto, Japan) を 30 分反応させた。バンドの検出には ECL advance Western blotting detection kit (Amersham Biosciences) を用いてその化学発光シグナルをイメージアナライザー (LAS-3000 Mini; Fuji Film Co. Ltd., Tokyo, Japan) で検出した。

2-10 還元型葉酸量の測定

還元型葉酸は、 $5,10\text{-CH}_2\text{-THF}$ と tetrahydrofolate (THF) の総和として、TS-FdUMP binding アッセイ法を用いて測定した [Priest et al., 1991]。LV 投与による還元型葉酸の増加量は以下の式を用いて評価した。

LV 投与による還元型葉酸の増加量 = (LV 投与群における還元型葉酸量) - (コントロール群における還元型葉酸量)

2-11 [^3H] LV 接触後の細胞内葉酸量の測定

細胞を 6×10^4 cells/well となるように 6 穴プレートに 2.5 mL の 10%FBS を含む RPMI1640 培養液で播種した。翌日、終濃度が $10 \mu\text{L}$ となるように [^3H]LV を 2.5mL 添加した。一定時間培養後、細胞を PBS で洗浄し 1 N の KOH で溶解した。細胞溶解液を 1N の HCl で中和後、Biorad Protein assay 試薬 (Bio-Rad Laboratories) を用いて Bradford 法で蛋白定量を行った。細胞に取り込まれたトリチウム量は、液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 2000CA; Packard Instruments, Meriden,CT,USA) で測定し、蛋白含量で補正した。

2-12 統計学的解析

2 群間の有意差の検定は、Student's *t*-test または Dunnett's multiple test を用いた。相関性はピアソン相関係数を用いて評価した。統計処理ソフトには JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用い、 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。

3. 結果

3-1 ノードマウス皮下移植ヒト大腸腫瘍に対する 5-FU の抗腫瘍作用に与える LV の効果

通常飼料及び低葉酸飼料で飼育したマウスに移植したヒト大腸腫瘍 COL-1 及び KM20C 株に対する S-1 及び S-1/LV の抗腫瘍効果を調べ表 1 に示した。通常飼料飼育条件下では、LV は COL-1 株に対する S-1 の抗腫瘍効果を有意に増強した ($P < 0.01$) が、KM20C 株に対しては増強しなかった。一方、低葉酸飼料飼育条件下では、LV は COL-1 及び KM12C 両株に対して S-1 の抗腫瘍効果を有意に増強した (COL-1; $P < 0.01$, KM20C; $P < 0.05$)。

Diet	Cell	Drug	RTV	TGI(%)
Normal diet	COL-1	Control	8.12 ± 0.85	
		S-1	3.55 ± 0.27 ***	56.2
		S-1/LV	2.84 ± 0.47 *** ##	65.0
	KM20C	Control	7.02 ± 0.68	
		S-1	3.46 ± 0.48 ***	50.8
		S-1/LV	3.37 ± 0.49 *** N.S	52.1
Low folate diet	COL-1	Control	8.29 ± 2.07	
		S-1	4.51 ± 0.36 ***	45.6
		S-1/LV	2.90 ± 0.54 *** ###	65.0
	KM20C	Control	8.60 ± 1.29	
		S-1	3.94 ± 1.10 ***	54.2
		S-1/LV	2.92 ± 0.44 *** #	66.1

表 1 ノードマウス皮下移植ヒト大腸腫瘍に対する S-1 の抗腫瘍作用に与える LV の効果
結果は、平均値±標準偏差 (n = 6 - 7) で示した。

*** $P < 0.001$ versus Control group by Dunnett's test.

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ versus S-1 group by Student's t -test, N.S., not significant, RTV: Relative tumor volume, TGI: Tumor growth inhibition rate

3-2 ノードマウス皮下移植ヒト大腸腫瘍中還元型葉酸量に与える LV の効果

COL-1 及び KM20C 株の Control 群における還元型葉酸量はそれぞれ 28.6、4.5 pmol/mg/protein であり、KM20C 株に比較し COL-1 株は有意に高い還元型葉酸量を有していた ($P < 0.001$, 図1A)。COL-1 及び KM20C 株の LV 投与群における還元型葉酸量はそれぞれ 66.5、14.6 pmol/mg/protein であり、LV 投与は二株の腫瘍中還元型葉酸量を有意に増強した (COL-1; $P < 0.01$, KM20C; $P < 0.01$, 図1A)。LV 投与による還元型葉酸の増加量は COL-1 株で 38.0 pmol/mg/protein、KM20C 株で 10.0 pmol/mg/protein であり、COL-1 株の方が大きかった。

3-2 ノードマウス皮下移植ヒト腫瘍組織中の FPGSmRNA 発現量

COL-1 株及び KM20C 株の FPGSmRNA 発現量はそれぞれ 0.032、0.015 であり、KM20C 株に比較し COL-1 株で有意に 2.1 倍高かった ($P < 0.001$, 図 1B)。

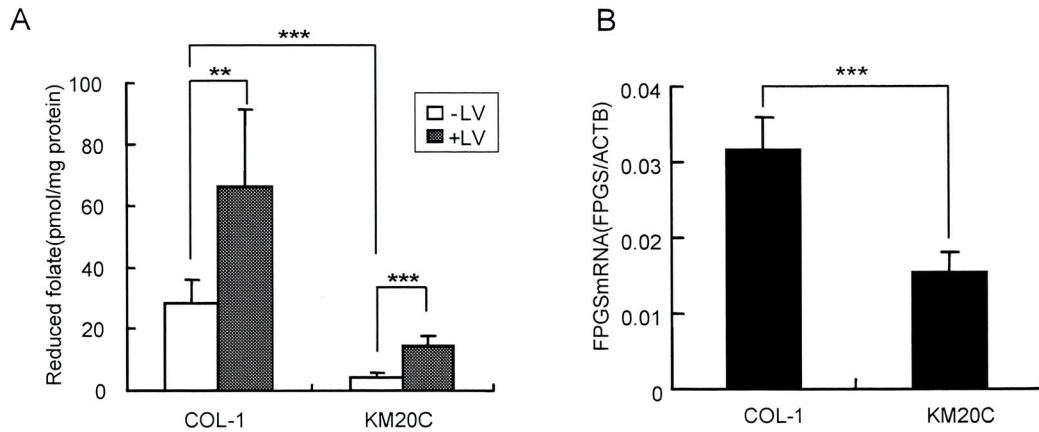


図 1 (A) LV 投与によるヌードマウス皮下移植ヒト大腸腫瘍における還元型葉酸量及び (B) ヌードマウス皮下移植大腸腫瘍における FPGS mRNA 発現量
 (A) 薬剤最終投与から 24 時間後の腫瘍中還元型葉酸量を TS-FdUMP binding アッセイ法で測定した。(B) Control 群における腫瘍中 FPGS mRNA 発現量は real time PCR 法で測定し、ACTB mRNA 発現量で補正した。結果は、平均値±標準偏差 (n = 6 - 7) で示した。* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3-3 ヒト大腸癌培養細胞内還元型葉酸量及び FdUrd 感受性に与える LV の効果

ヒト大腸癌培養細胞内の還元型葉酸量への LV 添加による影響を検討した。LV 非添加時の 4 種のヒト大腸癌培養細胞内還元型葉酸量は 1.1 - 7.7 pmol/mg/protein であった。10 μM の LV を 72 時間添加させた時の細胞内還元型葉酸量は 3.7 - 66.6 pmol/mg/protein であり、LV は全て株の細胞内還元型葉酸量を増加させた (図 2A)。また、LV 非添加時の細胞内還元型葉酸量 (Basal level of reduced folate) は LV による還元型葉酸の増加量と有意に正相関した ($r = 0.98$, $P = 0.018$, 図 2B)。

次に、LV による 5-FU の細胞毒性作用への影響をヒト大腸癌培養細胞で DLD-1 細胞を用いて検討した。5-FU の細胞毒性作用に対する LV の効果を適切に検討するため、5-FU の代わりに FdUMP の direct precursor である FdUrd を使用した。DLD-1 細胞に 0.1 μM の FdUrd を 72 時間接触させた時の細胞生存率は 64.8%であった (図

2C)。しかし、LV 0.1、1、10 μM を併用した時の細胞生存率はそれぞれ 49.9、48.0、44.4%であり、LV は FdUrd による殺細胞効果を有意に増強した ($P < 0.001$, 図 2C)。

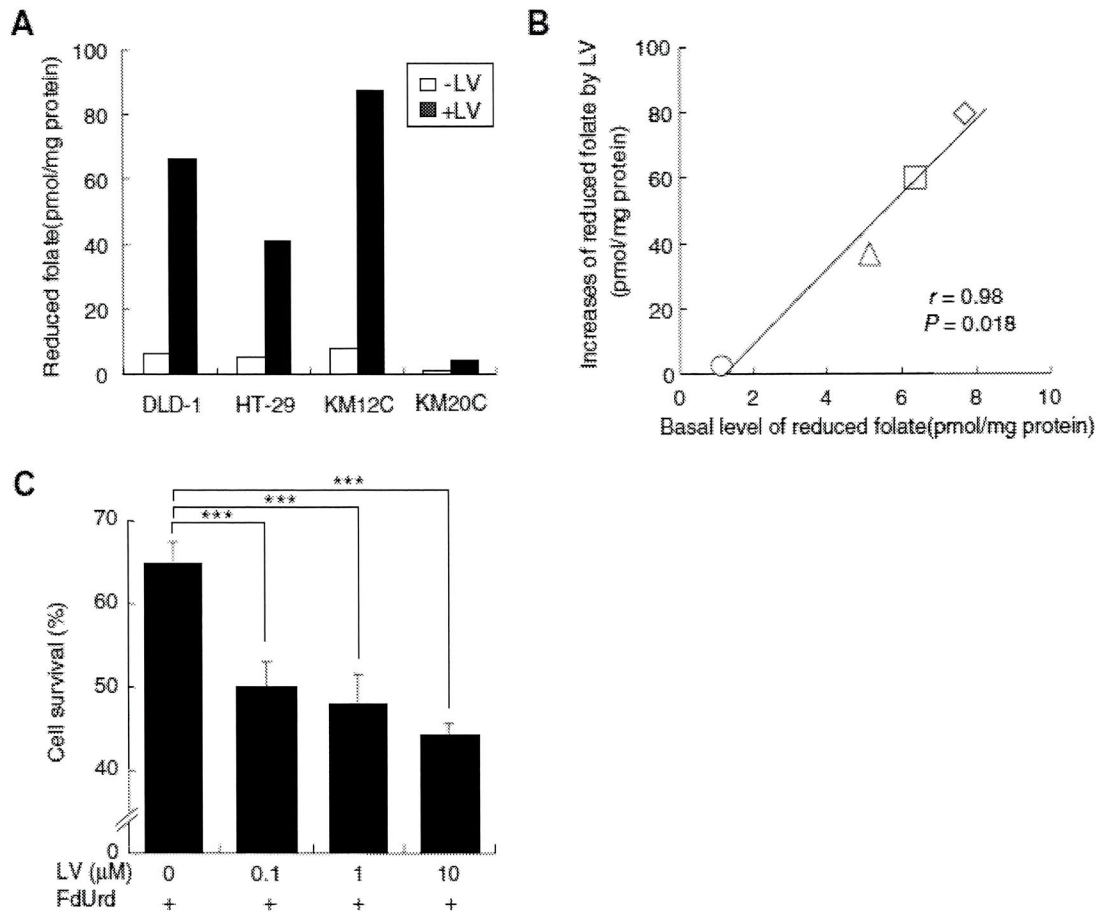


図 2 (A) ヒト大腸癌培養細胞 (DLD-1, HT-29, KM12C 及び KM20C) 内還元型葉酸量に与える LV の効果 (B) ヒト大腸癌培養細胞 (DLD-1, HT-29, KM12C 及び KM20C) における LV 非接触時の還元型葉酸量 (Basal level of reduced folate) と LV による還元型葉酸の増加量との関係 (C) FdUrd の細胞毒性作用に与える LV の効果 (A, B) 10 μM の LV を 72 時間接触させた後の細胞内還元型葉酸量を TS-FdUMP binding アッセイ法で測定した。結果は 2 回の実験の平均値を示した。(C) 細胞を 0.1 μM の FdUrd と 0.1, 1, 10 μM の LV で 72 時間処理した。結果は、平均値 \pm 標準偏差 ($n = 3$) で示した。*** $P < 0.001$

3-4 ヒト大腸癌培養細胞内還元型葉酸量に与える FPGS または GGH のノックダウンの効果

FPGS 及び GGH と細胞内還元型葉酸量の関連性を明らかにするために、FPGS 及

び GGH 発現を siRNA を用いてノックダウンした。DLD-1 細胞における FPGS または GGH の siRNA 処置は、それぞれの mRNA 発現量を有意に減少させた (data not shown)。また、FPGS または GGH の siRNA 処置はそれぞれの蛋白発現量を減少させた (図 3A)。DLD-1 細胞に対する FPGS siRNA 処置は、細胞内還元型葉酸量を Control siRNA 処置細胞の 38% に低下させた ($P < 0.05$, 図 3B)。一方、GGH siRNA 処置は細胞内還元型葉酸量に影響を与えなかった (図 3B)。

3-5 [^3H]LV 接触後のヒト大腸癌培養細胞内の葉酸量に与える FPGS または GGH のノックダウンの効果

siRNA による FPGS または GGH のノックダウンが [^3H]LV 接触後の細胞内葉酸量に与える影響を調べた。LV は細胞内で速やかに他の葉酸誘導体へ変換される [Girgis et al., 1997, Anguera et al., 2003]。従って、[^3H]LV 接触後の細胞内 [^3H]量は、LV と他の葉酸誘導体由来のものであると考えられる。FPGS siRNA を処置した DLD-1 細胞に [^3H]LV 10 μM を 72 時間接触させた時、[^3H]葉酸量は Control siRNA 処置細胞の 76% に低下した ($P < 0.05$, 図 3C)。GGH siRNA 処置細胞では Control siRNA 処置細胞に比べ [^3H]LV 接触後の細胞内 [^3H]葉酸量が高い傾向が認められた ($P = 0.072$, 図 3C)。

さらに、siRNA により FPGS または GGH をノックダウンした細胞に 10 μM の [^3H]LV を 12 時間接触させ、その後培地を [^3H]LV 非含有の新しい培地に取り替え、細胞内 [^3H]葉酸量を経時的に測定した。FPGS siRNA を処置した DLD-1 細胞は Control siRNA 処置細胞に比べ細胞内 [^3H]葉酸が速やかに消失したが、GGH siRNA 処置細胞では細胞内 [^3H]葉酸の消失は緩やかであった (図 3D)。

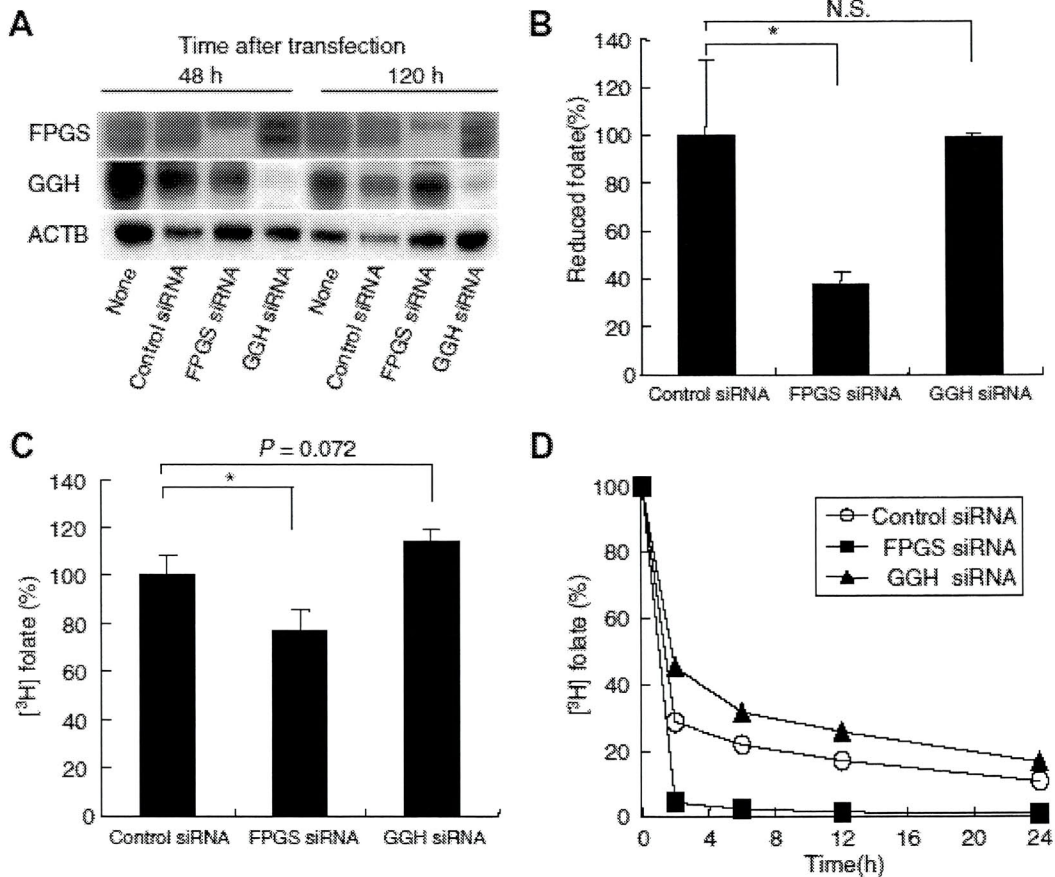


図 3 ヒト大腸癌培養細胞 DLD-1 細胞に対する FPGS または GGH siRNA 処置が (A) FPGS 及び GGH の蛋白発現量、(B) 細胞内還元型葉酸量、(C) [³H]LV 接触後の細胞内 [³H]葉酸量及び (D) 培地中 [³H]LV を除去した後の細胞内 [³H]葉酸量に与える影響

(A) siRNA 処置 48 及び 120 時間後の DLD-1 細胞から FPGS 及び GGH 蛋白をイムノブロッティング法で検出した。(B) siRNA 処置 48 時間後の DLD-1 細胞内の還元型葉酸量を TS-FdUMP binding アッセイ法で測定した。結果は、平均値±標準偏差 (n = 3) で示した。**P* < 0.05 (C) siRNA 処置 48 時間後の DLD-1 細胞に 10 μM の [³H]LV を 72 時間接触後細胞内 [³H]量をカウントした。結果は、平均値±標準偏差 (n = 3) で示した。**P* < 0.05 (D) siRNA 処置 48 時間後の DLD-1 細胞に 10 μM の [³H]LV を 12 時間接触後、培地を [³H]LV 非含有培地に取り替え、経時的に細胞内 [³H]量をカウントした。結果は 2 回の実験の平均値を示した。

3-6 ヒト大腸癌培養細胞における LV による FdUrd の細胞毒性増強作用に与える FPGS または GGH のノックダウンの効果

DLD-1 細胞における FPGS または GGH のノックダウンが、LV による FdUrd の細胞毒性増強効果に与える影響を検討した。DLD-1 細胞における FdUrd 及び FdUrd/1 μ MLV の GI₅₀ 値は 0.52 μ M, 0.29 μ M であり、LV は有意に FdUrd の細胞毒性効果を増強した (図4A、表 2)。Control siRNA 処置は、LV による FdUrd 細胞毒性増強作用に影響を与えなかった (図4B、表 2)。しかし、FPGS siRNA 処置細胞における FdUrd の GI₅₀ 値と FdUrd/LV の GI₅₀ 値はそれぞれ 0.42 μ M, 0.39 μ M と同程度であり、FPGS ノックダウンは LV 効果を消失させた (図4C、表 2)。一方、GGH siRNA 処置細胞における FdUrd 及び FdUrd/LV の GI₅₀ 値はそれぞれ 0.14 μ M, 0.08 μ M であり、GGH ノックダウンは両薬剤に対する感受性を上昇させた。以上の結果より、腫瘍中 FPGS 及び GGH 発現は FdUrd の細胞毒性作用に対する LV の増強効果を規定している可能性が示された。

	GI ₅₀ (μ M) of FdUrd	
	- LV (95%CI)	+ LV (95%CI)
None	0.52 (0.39 - 0.64)	0.29 (0.21 - 0.37) *
Control siRNA	0.49 (0.40 - 0.58)	0.24 (0.17 - 0.31) *
FPGS siRNA	0.42 (0.33 - 0.51)	0.39 (0.27 - 0.51)
GGH siRNA	0.14 (0.11 - 0.17) #	0.08 (0.05 - 0.10) * #

表 2 ヒト大腸癌培養細胞 DLD-1 細胞に対する FPGS または GGH siRNA 処置が FdUrd の GI₅₀ 値に与える影響

95% CIs showed no overlap with Control siRNA group.

* 95% CIs for + LV and - LV groups showed no overlap

GI₅₀: 50% growth inhibition concentration, CI; confidence interval

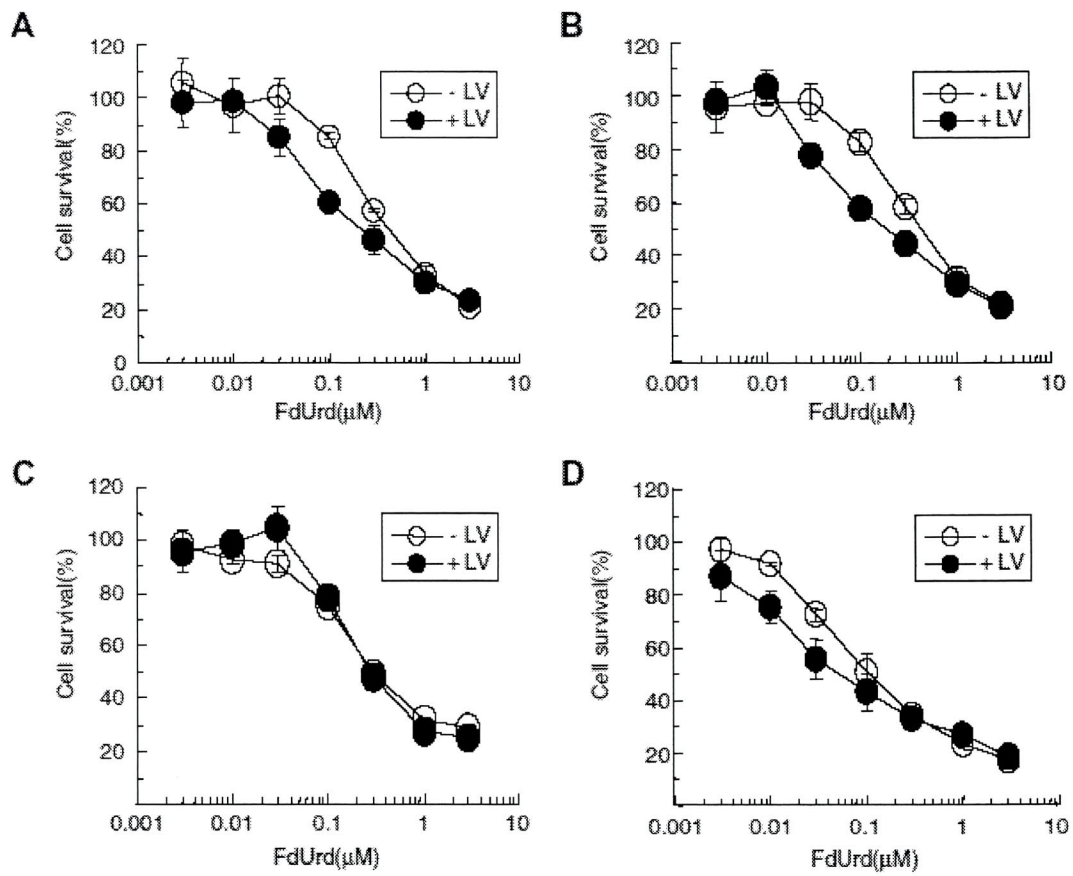


図 4 ヒト大腸癌培養細胞 DLD-1 細胞に対する FPGS または GGH siRNA 処置が FdUrd の細胞毒性作用に対する LV の増強効果に与える影響
 (A) siRNA 無処置、(B) Control siRNA、(C) FPGS siRNA 及び (D) GGH siRNA を 48 時間接触させた DLD-1 細胞に種々の濃度の FdUrd と 1 μM の LV を 72 時間接触させた。結果は、平均値±標準偏差 (n = 3) で示した。

4. 考察

癌患者に対するLVの効果を投稿前に予測することが出来れば、不要な投与による患者の不利益を軽減することができる。しかし、これまで5-FUの抗腫瘍作用に対するLVの増強効果を規定する因子は分かっていない。

本研究では、ヌードマウス皮下移植大腸癌腫瘍COL-1及びKM20C株にS-1及びS-1/LVを投与し、S-1の抗腫瘍作用に対するLVの効果を検討した。通常飼料飼育下で、LVはCOL-1株に対するS-1の抗腫瘍効果を有意に増強したが、KM20C株に対し増強効果を示さなかった。COL-1株の還元型葉酸量はKM20C株に比べ有意に高く、またLV投与は両株の腫瘍中還元型葉酸を有意に増加させたが、その増加量はKM20C株よりCOL-1株で大きかった。さらに、大腸癌培養細胞の還元型葉酸量はLVによる還元型葉酸の増加量と有意に正の相関を示した。これらの結果は、葉酸の蓄積能力が高い腫瘍は、もともと高い還元型葉酸量を有しており、LV投与による還元型葉酸の増加量も高いためにLVに感受性であった可能性を示唆している。

Cheradameらはヒト大腸癌培養細胞中のFPGS活性と細胞内還元型葉酸量が有意に正相関することを報告している [Cheradame et al., 1997]。我々の検討結果でも、KM20C株より高い還元型葉酸量を有するCOL-1株はKM20C株より高いFPGS mRNA発現量を有していた。さらに、siRNAによるFPGSのノックダウンは細胞内還元型葉酸量を低下させるとともに、LV接触後の細胞内葉酸量を低下させた。これらの結果は、FPGSは腫瘍中葉酸量を調節していることを示すものである。さらに、FPGSのノックダウンはFdUrdに対するLVの増強効果を低下させた。これは、腫瘍中のFPGS発現レベルはLV感受性を規定していることを示唆している。

GGHはFPGSによりポリグルタメート化された葉酸のグルタミン酸を切断する [Suh et al., 2001]。本研究において、GGHのノックダウン細胞ではLV接触後の細胞内葉酸量が増加している傾向が認められた。さらに、GGHのノックダウンは、細胞の

FdUrd/LV への感受性を有意に増加させた。これらの結果は、GGH が FPGS と同様に細胞内葉酸量を調節する結果、LV 感受性に影響を与えることを示唆する。従って、LV の有効性を正確に予測するためには、腫瘍中の FPGS と GGH 両方の発現レベルを調べる必要があり、FPGS 発現が高く、かつ GGH 発現が低い腫瘍が最も LV に対して感受性を有すると考えられる。

我々の実験条件下では、癌細胞は同じ葉酸レベルで維持されているため、細胞内還元型葉酸量は細胞の葉酸蓄積能力に依存している可能性がある。しかし、血漿や組織中還元型葉酸量は食餌中葉酸量や生活習慣、食生活などに影響を受けることが報告されており [Raghunathan et al., 1997, Schmitz et al., 1994, Ward et al., 1990, Hatzis et al., 2006]、ヒトの腫瘍中還元型葉酸量は細胞の葉酸の蓄積能力を反映していない可能性が高い。従って、腫瘍中還元型葉酸量よりも FPGS や GGH 発現量の方が 5-FU の抗腫瘍作用に対する LV の有効性予測因子として適していると考えられる。

Sohn らは、FPGS のセンス鎖 cDNA を導入させ FPGS を高発現させたヒト大腸癌培養細胞 HCT116 は 5-FU/LV 感受性となり、アンチセンス鎖 cDNA を導入させ FPGS 発現を低下させた HCT116 細胞は 5-FU/LV に耐性となったことを報告している [Sohn et al., 2004]。しかし、彼らはこれら細胞の 5-FU 単剤に対する感受性を検討していない。本研究において、FPGS のノックダウンは LV に対する感受性は低下させたが、FdUrd に対する感受性には影響を与えなかった。この結果を考慮すると、Sohn らの結果は、遺伝子導入による FPGS の発現変化が 5-FU よりも LV に対する感受性に影響を与えた可能性がある。

GGH のノックダウンは細胞の FdUrd/LV 感受性だけでなく、FdUrd に対する感受性も増加させた。これは腫瘍中 GGH 発現レベルが細胞の FdUrd 感受性に影響を与えることを示唆する。この原因は分からないが、2 つの可能性が考えられる。1 つ目と

して、GGH のノックダウンが細胞内 5,10-CH₂-THF 量に影響を与えた結果、FdUrd に対する感受性を変化させた可能性がある。一方、グルタミン鎖長が長い 5,10-CH₂-THF は、TS と FdUMP の結合体への親和性が高く、かつその三者複合体の安定性も高いことが報告されている [Radparvar et al., 1989]。従って、2 つ目として、GGH のノックダウンが 5,10-CH₂-THF のグルタミン鎖長を伸長させた結果、FdUrd に対する感受性が上昇した可能性がある。

今後臨床研究において、大腸癌患者の腫瘍中 FPGS 及び GGH の発現レベルと 5-FU/LV による治療効果との関連性を検証する必要があると思われる。

5. 小括

本研究では、LV による 5-FU の抗腫瘍作用増強効果を規定する因子を探索するために、ヌードマウス皮下移植ヒト大腸腫瘍 COL-1 及び KM20C 株を用いて、LV による 5-FU の抗腫瘍作用増強効果と腫瘍中還元型葉酸量及び腫瘍中 FPGS mRNA 発現量の関連性を検討した。COL-1 株は KM20C 株よりも LV に対する感受性が高く、さらに腫瘍中還元型葉酸量や LV 投与による腫瘍中還元型葉酸の増加量が高かった。また、COL-1 株は KM20C 株よりも有意に高い FPGS mRNA 発現量を有していた。大腸癌培養細胞を用いて *in vitro* で LV の効果を検討した結果、LV は有意に FdUrd の細胞毒性作用を増強した。また、4 種のヒト大腸癌培養細胞における細胞内還元型葉酸量は、LV による細胞内還元型葉酸の増加量と有意に正相関した。FPGS と GGH の細胞内葉酸量と LV 効果への役割を検討するため、ヒト大腸癌培養細胞 DLD-1 細胞の FPGS または GGH をノックダウンした。FPGS のノックダウンは、細胞内還元型葉酸量を低下させ、また [³H]LV 接触後の細胞内 [³H]葉酸量を低下させた。さらに、FPGS のノックダウンは FdUrd の細胞毒性作用に対する LV の増強効果を低下させた。一方、GGH のノックダウンは、細胞内還元型葉酸量には影響を与えなかったが、[³H]LV 接

触後の細胞内 [³H]葉酸量を増加させる傾向が認められた。さらに、GGH のノックダウンは FdUrd/LV に対する細胞の感受性を上昇させた。以上の結果より、FPGS 及び GGH は LV 投与後の細胞内葉酸量を調節することにより 5-FU の抗腫瘍効果に対する LV の増強効果に関与している可能性が示された。これらの結果は、腫瘍中 FPGS 及び GGH 発現が 5-FU の抗腫瘍効果に対する LV の増強効果の規定因子であることを示唆するものである。

第4章 総合考察

20 世紀の終わりにヒトの遺伝子配列の概要が解明され、テーラーメイド医療に関する議論が高まり、注目を集めている。テーラーメイド医療とは、遺伝子情報を活用して個人の体質の違いを解析し、それぞれの患者に応じた医薬品や治療法を選ぶ手法のことである。テーラーメイド医療が普及すれば、①患者の体質に合わせた医療を行うため、治療効果が高まるほか、医薬品の副作用が軽減されること、②これまで製品化が困難であった特定の体質の人にだけ効果のある医薬品についても開発の道が開けること、③無駄な医薬品の投与が減少するため、医療費の抑制にも繋がるとみられること、などが期待できる。特に、抗癌剤は副作用が重篤かつ治療域が狭い薬物であること、癌の病態が患者間で非常に異なることから、テーラーメイド医療の実現が最も必要とされる疾患の一つである。薬剤効果規定因子が明らかとなっており、治療前に診断を行ってから投与を行う抗癌剤の例として、ハーセプチンが挙げられる。癌細胞ではしばしば HER2 タンパク質が過剰に発現しているが、ハーセプチンは癌細胞の表面にある HER2 に結合して選択的に攻撃する。この HER2 受容体の過剰発現を確認するハーセプテストという診断薬が開発されており、この診断結果によりハーセプチンを投与するか否かを決定する。ハーセプテストは現在国内においても承認されている。また、抗癌剤の副作用を事前に予測する診断薬として、塩酸イリノテカンの副作用予測診断薬 UGT1A1 遺伝子多型診断キットがアメリカ食品医薬品局（food and drug administration; FDA）に承認されている。このように、一部の抗癌剤ではその効果及び副作用規定因子の遺伝子多型や遺伝子及び蛋白発現量などの情報に基づいた治療手法が確立されつつあるが、多くの薬剤については未だ探索研究段階にある。

本研究では、5-FU 及び 5-FU/LV 療法の効果予測を実現化するため、5-FU 効果

予測因子としての OPRT の可能性と、LV による 5-FU の抗腫瘍効果増強作用規定因子としての FPGS 及び GGH の重要性を基礎的に検討した。その結果、腫瘍中の TS や DPD に加え OPRT も 5-FU の抗腫瘍効果を規定していることが明らかになり、腫瘍中の TS や DPD 発現レベルに加えて OPRT 発現レベルも 5-FU の抗腫瘍効果予測因子となりうる可能性が示唆された。さらに、腫瘍中の FPGS と GGH は、LV 投与後の細胞内葉酸量を調節することにより 5-FU の抗腫瘍効果に対する LV の増強効果に関与していることが明らかとなり、腫瘍中 FPGS 及び GGH 発現レベルが LV の効果予測因子となりうる可能性が示唆された。しかし、これらは *in vitro* での検討結果であり、今後は臨床研究での検証が必要である。

46 人の大腸癌患者の腫瘍中 OPRT 活性は平均 0.387 ± 0.168 nmol/min/mg protein であり、20 人の胃癌患者の腫瘍部中 OPRT 活性は 0.120 ± 0.099 nmol/min/mg protein であったことが報告されている [Fujii et al.,2003, Ochiai et al.,2001]。また、我々は以前、458 人の胃癌患者の腫瘍中 TS 及び DPD 活性はそれぞれ 0.071 ± 0.087 pmol/mg/protein 及び 140.8 ± 94.9 pmol/min/mg protein であったことを報告している [Fukushima et al.,2003]。さらに、Kidd らは、大腸癌患者の腫瘍中 FPGS 及び GGH mRNA 発現量を調べ、患者間でこれらの発現量に大きな差異があったことを報告している [Kidd et al.,2005]。これらの報告は、今回抽出した 5-FU 及び LV 感受性規定因子の発現は患者間で差異があることを示しており、この差異が 5-FU 及び LV 感受性へ影響を与えている可能性がある。即ち、これらの因子の発現に基づいて患者を選択することにより、5-FU や 5-FU/LV 療法が有効である患者集団を選び出せる可能性がある。

5-FU は第 1 章図 3 に示すように、細胞内で TS,DPD,OPRT 以外の多くの酵素の基質となり、その代謝物が抗腫瘍効果を発揮する。また、FdUMP により TS が阻害された後、細胞死に至るまでの詳細なメカニズムは未だに解明されていない [Longley et al.,

2003]。従って、TS,DPD,OPRT 以外の因子が 5-FU の効果を規定している可能性は多分にあり、またそれらの因子がより優れた効果予測因子となり得る可能性も残されている。また本研究において、我々は LV 感受性規定因子として FPGS 及び GGH に注目して検討を行ったが、第 1 章 図 3 に示すように、LV が ternary complex 形成に必要な 5,10-CH₂-THF に変換される過程にも多くの酵素が関与している。よって、FPGS や GGH 以外の因子が LV 感受性に影響を与えている可能性がある。今後は、今回抽出した因子の臨床研究での検証に加え、他により優れた効果予測因子がないか探索的に検討する必要がある。

引用文献

Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. *J. Clin. Oncol.*, 10, 896–903, 1992.

Anguera MC, Suh JR, Ghandour H, Nasrallah IM, Selhub J and Stover PJ. Methenyltetrahydrofolate synthetase regulates folate turnover and accumulation. *J Biol Chem.*, 278, 29856–29862, 2003.

Cheradame S, Etienne MC, Chazal M, Guillot T, Fischel JL, Formento P and Milano G. Relevance of tumoral folylpolyglutamate synthetase and reduced folates for optimal 5-fluorouracil efficacy: experimental data. *Eur J Cancer*, 33, 950–959, 1997.

Dunchinsky R., Plevin E. and Heidelberger C. The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 4559–4560, 1957.

Evans DR and Guy HI. Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *J Biol Chem.*, 279, 33035–33038, 2004.

Fujii R, Seshimo A and Kameoka S. Relationships between the expression of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, and orotate phosphoribosyltransferase and cell proliferative activity and 5-fluorouracil sensitivity in colorectal carcinoma. *Int J Clin Oncol.*, 8, 72–78, 2003.

Fukushima M, Morita M, Ikeda K and Nagayama S. Population study of expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in patients with solid tumors. *Int J Mol Med.*, 12, 839–844, 2003.

Galivan J, Ryan TJ, Chave K, Rhee M, Yao R and Yin D. Glutamyl hydrolase. pharmacological role and enzymatic characterization. *Pharmacol Ther.*, 85, 207–215, 2000.

Girgis S, Suh JR, Jolivet J and Stover PJ. 5-Formyltetrahydrofolate regulates homocysteine remethylation in human neuroblastoma. *J Biol Chem.*, 272, 4729–4734, 1997.

Hatzis CM, Bertsiias GK, Linardakis M, Scott JM and Kafatos AG. Dietary and other lifestyle correlates of serum folate concentrations in a healthy adult population in Crete, Greece: a cross-sectional study. *Nutr J.*, 5, 5, 2006.

Ichikawa W, Uetake H, Shirota Y, Yamada H, Nishi N, Nihei Z, Sugihara K and Hirayama R. Combination of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase gene expressions in primary tumors as predictive parameters for the efficacy of fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.*, 9, 786–791, 2003.

Ichikawa W, Uetake H, Shirota Y, Yamada H, Takahashi T, Nihei Z, Sugihara K, Sasaki Y and Hirayama R. Both gene expression for orotate phosphoribosyltransferase and its

ratio to dihydropyrimidine dehydrogenase influence outcome following fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*, 89, 1486–1492, 2003.

Ishida H, Shirakawa K, Ohsawa T, Sobajima J, Hayashi Y, Nakada H, Yokoyama M and Hashimoto D. Expression of mRNA levels of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, and orotate phosphoribosyltransferase of colorectal cancer—relationships among mRNA levels in association with response to 5-FU based treatment. *Gan To Kagaku Ryoho.*, 32, 1929–1934, 2005.

Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV and Leichman L. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res.*, 55, 1407–1412, 1995.

Kidd EA, Yu J, Li X, Shannon WD, Watson MA and McLeod HL. Variance in the expression of 5-Fluorouracil pathway genes in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.*, 11, 2612–2619, 2005.

Lin BF, Huang RF and Shane B. Regulation of folate and one-carbon metabolism in mammalian cells. III. Role of mitochondrial folylpoly- γ -glutamate synthetase. *J Biol Chem.*, 268, 21674–21679, 1993.

Longley DB, Harkin DP and Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and

clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3, 330–338, 2003.

McGuire JJ, Russell CA and Balinska M. Human cytosolic and mitochondrial folypolyglutamate synthetase are electrophoretically distinct. Expression in antifolate-sensitive and -resistant human cell lines. *J Biol Chem*, 275, 13012–13016, 2000.

Meta-Analysis Group in Cancer. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. *J Clin Oncol*, 22, 3766–3775, 2004.

Mizutani Y, Wada H, Yoshida O, Fukushima M, Nakanishi H and Miki T. Significance of orotate phosphoribosyltransferase activity in renal cell carcinoma. *J Urol*, 171, 605–610, 2004.

Moran RG. Roles of folypoly-gamma-glutamate synthetase in therapeutics with tetrahydrofolate antimetabolites: an overview. *Semin Oncol*, 26, 24–32, 1999.

Nakano J, Huang C, Liu D, Masuya D, Nakashima T, Yokomise H, Ueno M, Wada H and Fukushima M. Evaluations of biomarkers associated with 5-FU sensitivity for non-small-cell lung cancer patients postoperatively treated with UFT. *Br J Cancer*, 95, 607–615, 2006.

Ochiai T, Sugitani M, Nishimura K, Noguchi H, Watanabe T, Sengoku H, Kihara A and

Okano M. Expression and pathophysiologic features of orotate phosphoribosyl transferase activity (OPRT) in gastric carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho.*, 28, 345–350, 2001.

Ochiai T, Nishimura K, Noguchi H, Kitajima M, Tsuruoka Y, Takahashi Y, Tsukada A, Watanabe E, Nagaoka I and Futagawa S. Prognostic impact of orotate phosphoribosyl transferase activity in resectable colorectal cancers treated by 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol.*, 94, 45–50, 2006.

Oie S, Ono M, Fukushima H, Hosoi F, Yano H, Maruyama Y, Kojiro M, Terada T, Hirano K, Kuwano M and Yamada Y. Alteration of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by IFN- α affects the antiproliferative effects of 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.*, 6, 2310–2318, 2007.

Ooyama A, Takechi T, Toda E, Nagase H, Okayama Y, Kitazato K, Sugimoto Y, Oka T and Fukushima M. Gene expression analysis using human cancer xenografts to identify novel predictive marker genes for the efficacy of 5-fluorouracil-based drugs. *Cancer Sci.*, 97, 510–522, 2006.

Peters GJ, Laurensse E, Leyva A, Lankelma J and Pinedo HM. Sensitivity of human, murine, and rat cells to 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in relation to drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.*, 46, 20–28, 1986.

Peters GJ, van Groeningen CJ, Laurensse EJ and Pinedo HM. A comparison of

5-fluorouracil metabolism in human colorectal cancer and colon mucosa. *Cancer*, 68, 1903–1909, 1991.

Priest, DG, Schmitz, JC, Bunni, MA and Stuart, RK. Pharmacokinetics of leucovorin metabolites in human plasma as a function of dose administered orally and intravenously. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83, 1806–1812, 1991.

Radparvar S, Houghton PJ and Houghton JA. Effect of polyglutamylation of 5,10-methylenetetrahydrofolate on the binding of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate to thymidylate synthase purified from a human colon adenocarcinoma xenograft. *Biochem Pharmacol.*, 38, 335–342, 1989.

Raghunathan K, Schmitz JC and Priest DG. Impact of schedule on leucovorin potentiation of fluorouracil antitumor activity in dietary folic acid deplete mice. *Biochem pharmacol.*, 53, 1197–1202, 1997.

Sakamoto K, Sugimoto Y, Miyadera K, Oka T and Fukushima M. Preparation of anti-urotate phosphoribosyltransferase antibody and its application to immunochemical detection in human tumor cells. *Int J Mol Med.*, 16, 245–249, 2005.

Sakata Y, Ohtsu A, Horikoshi N, Sugimachi K, Mitachi Y and Taguchi T. Late phase II study of novel oral fluoropyrimidine anticancer drug S-1 (1 M tegafur–0.4 M gimestat–1 M otastat potassium) in advanced gastric cancer patients. *Eur J Cancer*, 34, 1715–1720, 1998.

Schmitz JC, Grindey GB, Schultz RM and Priest DG. Impact of dietary folic acid on reduced folates in mouse plasma and tissues. Relationship to dideazatetrahydrofolate sensitivity. *Biochem pharmacol.*, 48, 319–325. 1994.

Shirasaka T, Shimamoto Y, Kato T and Fukushima M. Invention of a tumor-selective 5-fluorouracil derivative named S-1 by biochemical modulation of 5-fluorouracil. *Gan To Kagaku Ryoho.*, 25, 371–384, 1998.

Sohn KJ, Smirnakis F, Moskovitz DN, Novakovic P, Yates Z, Lucock M, Croxford R and Kim YI. Effects of folypolyglutamate synthetase modulation on chemosensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *Gut*, 53, 1825–1831, 2004.

Spears CP, Gustavsson BG, Berne M, Frösing R, Bernstein L and Hayes AA. Mechanisms of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil. *Cancer Res.*, 48, 5894–5900, 1988.

Staunton JE, Slonim DK, Collier HA, Tamayo P, Angelo MJ, Park J, Scherf U, Lee JK, Reinhold WO, Weinstein JN, Mesirov JP, Lander ES and Golub TR. Chemosensitivity prediction by transcriptional profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98, 10787–10792, 2001.

Suh JR, Herbig AK and Stover PJ. New perspectives on folate catabolism. *Annu Rev Nutr.*, 21, 255–282. 2001.

Suttle DP, Bugg BY, Winkler JK and Kanalas JJ. Molecular cloning and nucleotide sequence for the complete coding region of human UMP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 85, 1754–1758, 1988.

Takechi T, Fujioka A, Matsushima E and Fukushima M. Enhancement of the antitumour activity of 5-fluorouracil (5-FU) by inhibiting dihydropyrimidine dehydrogenase activity (DPD) using 5-chloro-2,4-dihydroxypyridine (CDHP) in human tumour cells. *Eur J Cancer*, 38, 1271–1277, 2002.

Tatsumi K, Fukushima M, Shirasaka T and Fujii S. Inhibitory effects of pyrimidine, barbituric acid and pyridine derivatives on 5-fluorouracil degradation in rat liver extracts. *Jpn J Cancer Res.*, 78, 748–755, 1987.

van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur. J. Cancer*, 40, 939–950, 2004.

Ward GJ and Nixon PF. Modulation of pteroylpolyglutamate concentration and length in response to altered folate nutrition in a comprehensive range of rat tissues. *J Nutr.*, 120, 476–484, 1990.

Yoshitomi I, Kawasaki G, Yanamoto S and Mizuno A. Orotate phosphoribosyl transferase mRNA expression in oral squamous cell carcinoma and its relationship with the dihydropyrimidine dehydrogenase expression and the clinical effect of

5-fluorouracil. *Oral Oncol.*, 42, 880–887, 2006.

大沼 尚夫, 竹村 譲. 癌の薬剤耐性とその克服 —基礎と臨床— 第一版. 宇宙堂八木書店, 2001.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、本研究を通じて終始ご懇篤なご指導とご助言を賜りました、鹿児島大学農学部獣医学科先端獣医学講座分子病態学分野、岡 達三教授、鹿児島大学農学部獣医学科基礎獣医学講座生理学分野、川崎 安亮助教授に深く感謝の意を捧げます。また、本研究を実施する機会を与えて頂きました大鵬薬品工業(株) 徳島研究センター長 山崎 泰英博士(当時)、徳島研究センター長 江島 清博士、研究部長 福島正和博士、テーラーメイド医療研究所所長 岡 俊範博士に感謝いたします。本研究を遂行するに辺り、多大なるご助言とご協力を賜りました、大鵬薬品工業(株)育薬研究所薬剤応答性解析研究グループリーダー 杉本 芳一博士(当時)、テーラーメイド医療研究所 薬剤応答性解析研究グループリーダー 小武内 尚氏、テーラーメイド医療研究所 岡山 佳弘氏、テーラーメイド医療研究所 大家 真治博士、テーラーメイド医療研究所 長瀬 英貴博士に深く感謝致します。本研究の遂行のため終始ご協力頂きました大鵬薬品工業(株)の皆様へ感謝致します。