

The c-MYC-ABCB5 axis plays a pivotal role in 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells

(大腸癌細胞の 5-FU 抵抗性において c-MYC-ABCB5 は中心的な役割を果たす)

氏名 釘宮 成二

所属 山口大学大学院医学系研究科  
応用医工学系専攻 器官制御医科学領域  
器官病態外科学（外科学第一）

平成 27 年 1 月

## 目次

|          |       |
|----------|-------|
| 1. 要旨    | 3     |
| 2. 研究の背景 | 4     |
| 3. 目的    | 4     |
| 4. 材料と方法 | 4-10  |
| 5. 結果    | 11-22 |
| 6. 考察    | 23-24 |
| 7. 結語    | 24    |
| 8. 謝辞    | 24    |
| 9. 参考文献  | 25-26 |

## 1. 要旨

c-MYC は、大腸癌を含めた様々な組織の癌で過剰発現しており、異常な細胞増殖、アポトーシス、ゲノム不安定性、不死化、薬剤耐性といった多くの細胞内での活動を制御している。しかしながら、c-MYC による薬剤耐性獲得機構は完全には解明されていない。本研究において我々は原発巣における c-MYC の発現レベルが 5-FU ベースでの術後補助化学療法後の再発率と相関していることを見出した。これを支持する様に、大腸癌細胞株において、c-MYC を過剰発現させると、5-FU 抵抗性が増強し、c-MYC を発現抑制すると 5-FU 抵抗性が減弱した。さらに、c-MYC 発現抑制により、5-FU 抵抗性に関わる ABC トランスポーターである ABCB5 の発現レベルが減少した。クロマチン免疫沈降により c-MYC が ABCB5 のプロモーター領域に結合することが明らかになった。さらに c-MYC 阻害薬である 10058-F4 で処理するとその結合が減弱し、ABCB5 の発現レベルも減少した。予想された様に ABCB5 の発現抑制により、5-FU 抵抗性は減弱し、樹立した 5-FU 抵抗性大腸癌細胞株では ABCB5 の発現レベルが上昇していた。さらに、大腸癌細胞株を皮下移植したマウスモデルにおいて、5-FU と c-MYC 阻害薬 10058-F4 との併用投与による腫瘍縮小効果を検討したところ、5-FU 単剤、10058-F4 単剤投与群と比較して、5-FU と 10058-F4 の併用投与群において有意な腫瘍縮小効果が認められた。また 10058-F4 投与により、マウス皮下に移植された大腸癌細胞において ABCB5 の発現レベルが減少する一方、5-FU 投与により ABCB5 の発現レベルが増加した。これらの結果は、大腸癌細胞において c-MYC は ABCB5 の発現を制御することにより、5-FU 抵抗性をもたらしていることを示唆している。

## 2. 研究の背景

大腸癌は、世界中で一般的な悪性腫瘍であり、癌関連死の主要な原因の1つである。5-fluorouracil (5-FU) は、大腸癌に対する抗癌剤治療の中心的役割を担っている。進行大腸癌患者においては、5-FU を用いた治療により、腫瘍縮小効果および生存期間の延長がもたらされている。しかしながら、根治術後に 5-FU を用いた補助化学療法を行ったにもかかわらず、5-FU に抵抗性を示す大腸癌細胞により、再発をきたしてしまうことがある。そのため、5-FU 抵抗性獲得の機構を解明することは、5-FU 治療における予後予測因子の同定を可能にし、大腸癌治療における新しい治療標的を明らかにすることにつながる。

*MYC* ファミリー遺伝子群は、細胞周期、細胞成長、分化、アポトーシス、ゲノム不安定性、血管形成を制御する転写因子をコードしている[1, 2]。特に、*c-MYC* の過剰発現は、大腸癌細胞[3, 4]を含む様々な癌細胞[2]で見受けられ、しばしば予後不良因子として報告されている[5]。さらに、*c-MYC* が薬剤耐性に関与しており、シスプラチン耐性を示す腫瘍細胞は *c-MYC* の発現レベルが高いこと[6]や *c-MYC* アンチセンス・オリゴヌクレオチドによって大腸癌細胞株の抗癌剤への感受性が上がること[7]などがこれまでに報告されている。最近の報告では、*c-MYC* が、bridging integrator 1 (BIN1) の発現レベルを低下させることで、poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) の活性を増加させ、シスプラチン抵抗性に寄与していることが明らかとなった[8]。しかしながら、*c-MYC* の薬剤耐性獲得機構は完全には解明されていないのが現状である。

ABC トランスポーターファミリーは、ATP の加水分解によるエネルギーを利用して、細胞内から細胞外へ様々な脂溶性化合物を能動的に排出する膜蛋白であり、薬剤耐性に関与していることが知られている。いくつかの ABC トランスポーターは抗癌剤を排出することで抗癌剤抵抗性の獲得に寄与しており[9, 10]、その発現レベルと術後補助化学療法後の無再発生存期間は相関関係にある[11]。興味深いことに、最近、神経芽細胞腫において、*MYCN* が、また慢性骨髄性白血病においては *c-MYC* がいくつかの ABC トランスポーターの発現レベルを制御していることが報告された[12, 13]。

本研究において、我々は ABC トランスポーターの一つである ABCB5 が *c-MYC* の新たな標的遺伝子であることを同定し、ヒト大腸癌の 5-FU 抵抗性における *c-MYC*-ABCB5 の役割を検討した。

## 3. 目的

大腸癌の 5-FU 抵抗性における *c-MYC*-ABCB5 の役割を明らかにすること。

## 4. 材料と方法

## 臨床検体

2012年4月から2012年9月までに山口大学医学部附属病院・第一外科並びに関連病院・外科で根治手術を施行された結腸・直腸癌患者のうち、摘出組織使用について同意が得られた患者を対象とした。患者の臨床病理学的背景は表1に示す。摘出組織は、速やかに $-80^{\circ}\text{C}$ で保存された。これらの検体は山口大学のガイドライン、ヘルシンキ宣言に従って取り扱われた。

|                      | Non-Recurrence | Recurrence | <i>p</i> |
|----------------------|----------------|------------|----------|
| No. of patients      | 13             | 7          |          |
| Gender               |                |            | N.S.     |
| Male                 | 7 (53.8%)      | 3 (42.9%)  |          |
| Female               | 6 (46.2%)      | 4 (57.1%)  |          |
| Age                  | 71.1 ± 8.1     | 75.0 ± 4.0 | N.S.     |
| Location             |                |            | N.S.     |
| Right                | 7 (53.8%)      | 2 (28.6%)  |          |
| Left                 | 2 (15.4%)      | 2 (28.6%)  |          |
| Rectum               | 4 (30.8%)      | 3 (42.8%)  |          |
| Histological grade   |                |            | N.S.     |
| Well                 | 1 (7.7%)       | 1 (14.3%)  |          |
| Moderate             | 12 (92.3%)     | 5 (71.4%)  |          |
| Poor                 | 0 (0%)         | 1 (14.3%)  |          |
| Invasion depth       |                |            | N.S.     |
| T2                   | 1 (7.7%)       | 0 (0%)     |          |
| T3                   | 12 (92.3%)     | 6 (85.7%)  |          |
| T4                   | 0 (0%)         | 1 (14.3%)  |          |
| Lymphatic metastasis |                |            | N.S.     |
| Positive             | 7 (53.8%)      | 5 (71.4%)  |          |
| Negative             | 6 (46.2%)      | 2 (28.6%)  |          |
| Lymphatic invasion   |                |            | N.S.     |
| Positive             | 13 (100%)      | 5 (71.4%)  |          |
| Negative             | 0 (0%)         | 2 (28.6%)  |          |
| Venous invasion      |                |            | N.S.     |
| Positive             | 8 (61.5%)      | 3 (42.8%)  |          |
| Negative             | 5 (38.5%)      | 4 (57.1%)  |          |
| Stage (UICC, 2009)   |                |            | N.S.     |
| IIA                  | 3 (23.1%)      | 0 (0%)     |          |
| IIB                  | 3 (23.1%)      | 2 (28.6%)  |          |
| IIIA                 | 1 (7.7%)       | 0 (0%)     |          |
| IIIB                 | 2 (15.4%)      | 3 (42.8%)  |          |
| IIIC                 | 4 (30.8%)      | 2 (28.6%)  |          |

表1 5-FU をベースとした術後補助化学療法を施行された大腸癌症例における臨床病理学的特徴と再発との関係

## RNA 抽出と定量的リアルタイム PCR

抽出腫瘍組織を lysis buffer である RLT Buffer (QIAGEN) で懸濁し、ステンレス製ビーズ (QIAGEN) と共に、ミキサーミル MM300 (QIAGEN) を用いて振盪させ、溶解した。腫瘍組織溶解液からの全 RNA 抽出は、RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて、添付されているプロトコールに従い、行った。全 RNA 抽出後、ナノドロップを用いて 260 nm の波長における吸光度を測定し、RNA 濃度を算出した。RNA から cDNA の合成は、PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて行った。逆転写反応により合成した cDNA を鋳型とし、QuantiTect SYBR Green PCR kit (QIAGEN) を用いて LightCycler software ver 3.5 (Roche Applied Science) による定量的リアルタイム PCR 解析を行った。95°C, 15 分間の変性反応を行った後、変性反応として 95°C, 10 秒間、アニーリング反応として 60°C, 30 秒間の一連の反応を 50 サイクル行った。使用したプライマー配列を以下に示す。

*c-MYC* : 5'-CACCAGCAGCGACTCTGA-3'; 5'-GATCCAGACTCTGACCTTTTGC-3',  
*ABC5* : 5'-CACAAAAGGCCATTCAGGCT-3', 5'-GCTGAGGAATCCACCCAATCT-3',  
*GAPDH* : 5'-TTGGTATCGTGGAAGGACTCA-3', 5'-TGTCATCATATTTGGCAGGTT-3'  
*GAPDH* の発現量に対する *c-MYC* の発現量比を  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法を用いて算出した[14]。

## ヒト大腸癌細胞株の細胞培養および 5-FU 抵抗性ヒト大腸癌細胞株の樹立

ヒト大腸癌細胞株である Caco-2, COLO-320, COLO205, LoVo は理化学研究所バイオリソースセンターより入手した。これらの細胞株は FBS (最終濃度 10%) を含んだ各種培養液 (RPMI1640 : COLO-320; COLO205, F-12 : LoVo, MEM : Caco-2) を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で継代・維持された。5-FU 抵抗性 Caco-2 細胞は、Caco-2 細胞を 5-FU (2 μM) を含んだ MEM (10% FBS) を用いて 12 週間培養し、樹立した。

## Small interfering RNA (siRNA) による標的遺伝子の発現抑制

*c-MYC* siRNA およびコントロールとなる scrambled siRNA は Thermo Scientific から、*ABC5* siRNA は Life Technologies から購入した。各々の siRNA は、以前我々が報告した方法[15]で COLO-320 細胞に導入され、各種実験に用いた。

## c-MYC の過剰発現

完全長のヒト *c-MYC* を含む pcDNA3 ベクター (pcDNA3-*c-MYC*) を Addgene から購入した。コントロールとなる pcDNA3 空ベクターは、山口大学遺伝子実験施設より提供された。各々のベクターは、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を用いて、添付されているプロトコールに従って COLO205 細胞に導入され、各種実験に用いた。

## タンパク質抽出とウェスタンブロット法

核抽出液は、Nuclear Complex Co-IP Kit (Active Motif) を用いて、添付されているプロトコールに従い、COLO205, COLO-320 細胞から調製した。全細胞からのタンパク質抽出は、1% NP-40 lysis buffer (50mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP40, 1x Protease Inhibitor Cocktail) を用いて、これまでに報告されている方法[16]により

COLO-320, Caco-2 および 5-FU 抵抗性 Caco-2 細胞から調製した。マウス異種移植モデルから摘出した腫瘍組織を RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1x Protease Inhibitor Cocktail) で懸濁し、ステンレス製ビーズ (QIAGEN) と共に、ミキサーミル MM300 (QIAGEN) を用いて振盪させてタンパク質抽出を行った。続いて、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis) を行い、SDS で負に荷電したタンパク質を分子量に従って分離した。タンパク質を PVDF メンブレンに電気的に転写した後、0.3% スキムミルクを用いてブロッキング反応を行った。さらに、1 次抗体としてマウス抗ヒト c-MYC モノクローナル抗体 (希釈倍率 1:1000, Santa Cruz Biotechnology)、ヤギ抗ヒト ABCB5 ポリクローナル抗体 (希釈倍率 1:1000, ProSci Inc.)、ヤギ抗ヒト MRP5 ポリクローナル抗体 (希釈倍率 1:1000, Abcam)、ラビット抗ヒト BCRP/ABCG2 モノクローナル抗体 (希釈倍率 1:1000, Abcam)、マウス抗ヒト PARP1 モノクローナル抗体 (希釈倍率 1:1000, Santa Cruz Biotechnology)、マウス抗ヒト  $\alpha$ -Tubulin モノクローナル抗体 (希釈倍率 1:1000, Santa Cruz Biotechnology) を用い、4°C にて一晚反応させた後に、2 次抗体としてホースラディッシュペルオキシターゼ標識されたヤギ抗マウス、ヤギ抗ラビット、ラビット抗ヤギイムノグロブリン (希釈倍率 1:5000, Dako) を反応させ、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて検出反応を行い、検出されたバンドを Image J ソフトウェア にて定量化した。

### 5-FU 抵抗性試験

96 ウェルプレートを用いて、1 ウェル当たり  $6 \times 10^3$  個の細胞を播き、FBS (最終濃度 10%) を含んだ各種培養液を用いて、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。48 時間培養後、培養液に 5-FU を添加し (最終濃度 : 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M)、さらに 48 時間培養した。各ウェルに Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque) を加えて、37°C で 90 分反応させた。反応後、マイクロプレートリーダーを用いて 450nm の波長における吸光度を測定した。

### 半定量的 RT-PCR

細胞からの RNA 抽出、cDNA 合成および PCR は、これまでの報告[15]と同様に行った。50°C, 30 分間、94°C, 2 分間の変性反応を行った後、変性反応として 94°C, 30 秒間、アニーリング反応として 54.5°C (*ABCB5*), 55°C (*GAPDH*), 57.5°C (*c-MYC*), 60°C (*MDRI*, *MRP1*, *ABCC4*, *ABCC5*), 30 秒間、伸長反応として 72°C, 30 秒間の一連の反応を 20 サイクル (*MDRI*, *GAPDH*), 24 サイクル (*c-MYC*, *ABCB5*), 25 サイクル (*ABCC4*, *ABCC5*), 27 サイクル (*MRP1*) 行った。使用したプライマー配列は表 2 に示す。エチジウムブロマイドを含む 1% アガロースゲルによる電気泳動を行い、UV トランスイルミネーターで検出されたバンドを Image J ソフトウェア にて定量化した。

| Primer name | Nucleotide sequence ( 5'→3' ) |
|-------------|-------------------------------|
| c-MYC (F)   | ACCAACAGGAACTATGACCTC         |
| c-MYC (R)   | AAGGACGTAGCGACCGCAAC          |
| MDR1 (F)    | CCTGTATTGTTTGCCACCACG         |
| MDR1 (R)    | ATCCACGGACACTCCTACGA          |
| MRP1 (F)    | AACCTGGACCCATTGAGCC           |
| MRP1 (R)    | GACTGGATGAGGTCGTCCGT          |
| ABCB5 (F)   | AGTGGGAAGAGTACGGTAGT          |
| ABCB5 (R)   | GCTCTCTCCATCTCTTCATC          |
| ABCC4 (F)   | GCTCAGGTTGCCTATGTGCT          |
| ABCC4 (R)   | CGGTTACATTTCTCCTCCA           |
| ABCC5 (F)   | CGAAGGGTTGTGTGGATCTT          |
| ABCC5 (R)   | GTTTCACCATGAAGGCTGGT          |
| GAPDH (F)   | GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC          |
| GAPDH (R)   | GAAGATGGTGATGGGATTC           |

(F): forward primer, (R): reverse primer

表 2 半定量的 RT-PCR に用いたプライマー配列

### クロマチン免疫沈降

クロマチン免疫沈降は、ChIP-ITTM Express Enzymatic (Active motif) を用いて、添付されているプロトコールに従い、行われた。クロマチン免疫沈降には、マウス抗ヒト c-MYC モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) および正常マウス IgG (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。クロマチン複合体を脱架橋させた後にゲノム DNA を精製し、*ABCB5* 遺伝子のプロモーター領域内の c-MYC 結合部位を含んだ各領域に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。変性反応として 94°C, 20 秒間、アニーリング反応として 54°C, 30 秒間、伸長反応として 72°C, 30 秒間の一連の反応を 28 サイクル行った。使用したプライマー配列は表 3 に示す。エチジウムブロマイドを含む 3% アガロースゲルによる電気泳動を行い、UV トランスイルミネーターで検出されたバンドを Image J ソフトウェアにて定量化した。



| Primer name | Nucleotide sequence ( 5'→3' ) |
|-------------|-------------------------------|
| ABCB5-1 (F) | CACAACCTTCAAGTGGTAGCATG       |
| ABCB5-1 (R) | CCATTCTACCCAGTGAAATG          |
| ABCB5-2 (F) | CACAGCTCTGAAGGCAGTATC         |
| ABCB5-2 (R) | CTAAGAGGTAAGATTTTCAGAGAG      |
| ABCB5-3 (F) | GGGAGTGCAACTCACCATGG          |
| ABCB5-3 (R) | CAGATTACACTTGATCTTAGCC        |
| ABCB5-4 (F) | TGACGCTGCCACCTGTTGGT          |
| ABCB5-4 (R) | TGGAGTACGATAAACTGCGTG         |

(F): forward primer, (R): reverse primer

表3 クロマチン免疫沈降に用いたプライマー配列

### ヒト大腸癌細胞を皮下移植したヌードマウスモデルと *in vivo* 動物実験

7週齢、雌のBALB/cヌードマウスを日本エスエルシー社から購入した。全身麻酔下にマウスの背中右側に $1 \times 10^6$ 個のCaco-2細胞とマトリゲル (BD Biosciences) の混合物を、皮下注射した。ノギスを用いて腫瘍サイズを計測し、その体積は長さ×幅×高さとして算出された。腫瘍サイズが約 $1000 \text{ mm}^3$ に達した後、4群にグループを分け、各々の薬剤を毎日腹腔内投与した。群分けは、① DMSO投与群 (対照群)、② 5-FU単独投与群 (10 mg/kg)、③ 10058-F4単独投与群 (20 mg/kg)、④ 5-FU (10 mg/kg) + 10058-F4 (20 mg/kg) 投与群とし、2週間連日投与した。薬剤投与後0, 3, 5, 7, 10, 14日目で腫瘍サイズを測定した。薬剤投与14日目に皮下より腫瘍組織を摘出し、免疫染色およびウェスタンブロット解析のために使用した。本研究における全ての動物実験は、山口大学 Animal Care and Use committee の承認を得て、ヘルシンキ宣言に従って行われた。

### 免疫蛍光染色

マウス皮下より摘出した腫瘍組織を10%中性緩衝ホルマリン液 (Wako) で室温にて24時間固定した後、10%, 20%, 30%スクロース溶液で6時間毎に振盪した。サンプルはOCT化合物で包埋され、 $5 \mu\text{m}$ の厚さで切断された。最初に1% Triton X-100を含んだブロッキング試薬を用いて室温で1時間処理した。次に、ウサギ抗ヒトKi67モノクローナル抗体 (希釈倍率 1:100, Abcam)、ヤギ抗ヒトABCB5ポリクローナル抗体 (希釈倍率 1:100, Abcam) を一次抗体として、 $4^\circ\text{C}$ で一晩反応させた。その後、ヤギ抗ウサギIgG (H + L) Alexa Fluor 555 F (ab')<sub>2</sub> fragment (Life Technologies) またはロバ抗ヤギIgG-TR (Santa Cruz Biotechnology) を用いて室温にて1時間反応させた。核染色はDAPIを用いて行われた。BZ-X710 All-in-One 蛍光顕微鏡 (KEYENCE) を用いて、 $360 \pm 20 \text{ nm}$  (青)、 $545 \pm 12.5 \text{ nm}$  (赤) の励起フィルターで画像を撮影した。

## TUNEL 染色

組織検体をパラフィン包埋し、4  $\mu\text{m}$  に薄切し、キシレンで脱パラフィン化した。プロテアーゼ K で 37°C, 30 分間、0.1% Triton X-100 を含んだ PBS で 2 分間処理した。TUNEL 染色は、*In situ* Cell Death Detection Kit (Roche Applied Science) を用いて、添付されているプロトコールに従い、行われた。核染色は DAPI を用いて行われた。BZ-X710 All-in-One 蛍光顕微鏡 (KEYENCE) を用いて、 $360 \pm 20 \text{ nm}$  (青)、 $545 \pm 12.5 \text{ nm}$  (赤) の励起フィルターで画像を撮影した。

## 統計学的分析

統計学的な分析は SPSS for Windows Ver. II を用いて行い、全てのデータは平均値  $\pm$  標準偏差で表された。2 群間の統計学的な比較は Student's *t* 検定で評価した。無再発生存率は Kaplan-Meier 法により算出し、生存分析は log-rank 検定にて行った。 $p < 0.05$  をもって統計学的に有意差ありとした。

## 5. 結果

### 原発巣における *c-MYC* の発現レベルと 5-FU ベースの術後補助化学療法後の再発率との相関性

大腸癌原発巣における *c-MYC* の発現レベルと 5-FU ベースの術後補助化学療法後の再発率との関連を検討するために、大腸癌に対する根治術後に 5-FU ベースの補助化学療法を施行された患者 20 人を選別した。全 RNA を原発巣摘出組織より抽出し、リアルタイム RT-PCR に使用した。患者の臨床病理学的背景は表 3 に示す。患者背景には、両群間に差はなかった。原発巣における *c-MYC* の発現レベルは、5-FU ベースの術後補助化学療法後に無再発の患者よりも、再発した患者において、有意に高かった (図 1A)。ROC 曲線分析を行い、原発巣における *c-MYC* の発現レベルの最適なカットオフ値を設定した。設定したカットオフ値によって、*c-MYC* 高発現群、低発現群に分け、術後補助化学療法後の再発率を、Kaplan-Meier 法を用いて検討した。高発現群は低発現群と比較して、再発率が有意に高かった (図 1B、表 4)。これらの結果は、原発巣における *c-MYC* の発現レベルと 5-FU ベースの補助化学療法後の再発率とが相関していることを示唆している。

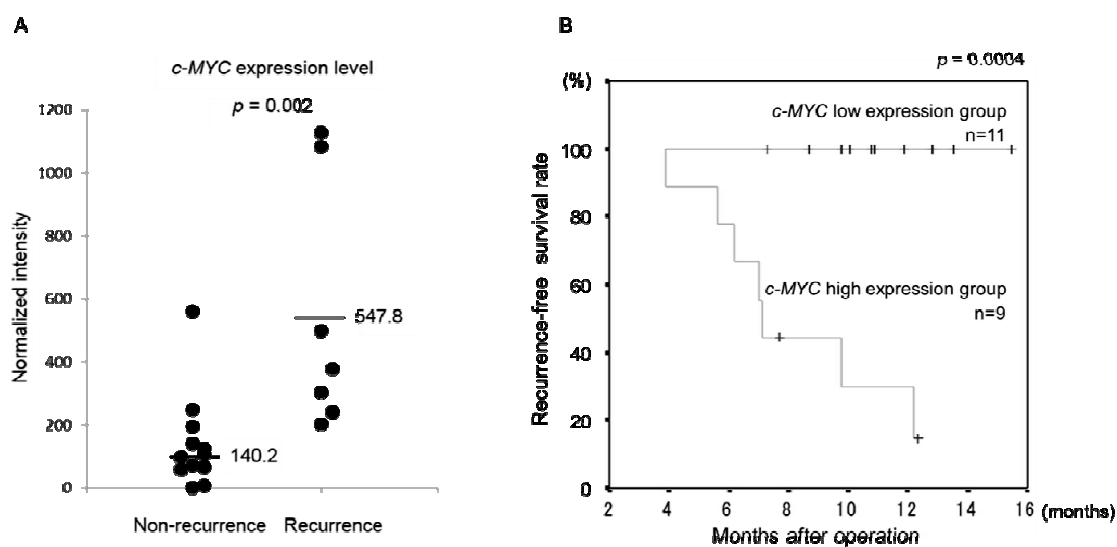


図 1. 外科的に切除された大腸癌原発巣における *c-MYC* の発現レベルと 5-FU をベースとした補助化学療法後の再発との関連性

- A. 5-FU をベースとした補助化学療法後の再発群と無再発群の大腸癌原発巣における *c-MYC* の発現レベル。各症例の *GAPDH* の発現量に対する *c-MYC* の発現量比は、無再発群においてその値が最も低い症例を基準として、補正された。横線は *c-MYC* の発現レベルの平均値を表す。
- B. *c-MYC* 高発現群と *c-MYC* 低発現群における 5-FU をベースとした補助化学療法後の無再発生存期間の Kaplan-Meier 法による解析。

| <i>c-MYC</i> expression | Low        | High      | <i>p</i> |
|-------------------------|------------|-----------|----------|
| No. of patients         | 11         | 9         |          |
| Gender                  |            |           | N.S.     |
| Male                    | 7 (63.6%)  | 3 (33.3%) |          |
| Female                  | 4 (36.4%)  | 6 (66.7%) |          |
| Age                     | 70.8±8.7   | 74.3±3.7  | N.S.     |
| Location                |            |           | N.S.     |
| Right                   | 6 (54.5%)  | 3 (33.3%) |          |
| Left                    | 1 (9.1%)   | 3 (33.3%) |          |
| Rectum                  | 4 (36.4%)  | 3 (33.3%) |          |
| Histological grade      |            |           | N.S.     |
| Well                    | 1 (9.1%)   | 1 (11.1%) |          |
| Moderate                | 10 (90.9%) | 7 (77.8%) |          |
| Poor                    | 0 (0%)     | 1 (11.1%) |          |
| Invasion depth          |            |           | N.S.     |
| T2                      | 0 (0%)     | 1 (11.1%) |          |
| T3                      | 11 (100%)  | 7 (77.8%) |          |
| T4                      | 0 (0%)     | 1 (11.1%) |          |
| Lymphatic metastasis    |            |           | N.S.     |
| Positive                | 6 (54.5%)  | 6 (66.7%) |          |
| Negative                | 5 (45.5%)  | 3 (33.3%) |          |
| Lymphatic invasion      |            |           | N.S.     |
| Positive                | 11 (100%)  | 7 (77.8%) |          |
| Negative                | 0 (0%)     | 2 (22.2%) |          |
| Venous invasion         |            |           | N.S.     |
| Positive                | 7 (63.6%)  | 4 (44.4%) |          |
| Negative                | 4 (36.4%)  | 5 (55.6%) |          |
| Stage (UICC, 2009)      |            |           | N.S.     |
| IIA                     | 2 (18.2%)  | 1 (11.1%) |          |
| IIB                     | 3 (27.3%)  | 2 (22.2%) |          |
| IIIA                    | 1 (9.1%)   | 0 (0%)    |          |
| IIIB                    | 2 (18.2%)  | 3 (33.3%) |          |
| IIIC                    | 3 (27.3%)  | 3 (33.3%) |          |
| Chemotherapy regimen    |            |           | N.S.     |
| UFT                     | 4 (36.4%)  | 4 (44.4%) |          |
| Xeloda                  | 2 (18.2%)  | 2 (22.2%) |          |
| TS-1                    | 5 (45.5%)  | 3 (33.3%) |          |
| Recurrence              |            |           | 0.0002   |
| +                       | 0 (0%)     | 7 (77.8%) |          |
| -                       | 11 (100%)  | 2 (22.2%) |          |

表4 大腸癌症例（表1と同一）における臨床病理学的特徴、化学療法レジメン、再発と *c-MYC* の発現量との関係

## 大腸癌細胞株における c-MYC 過剰発現および発現抑制による 5-FU 抵抗性の変化

5-FU 抵抗性における c-MYC の関与を検討するため、大腸癌細胞株を用いて、5-FU 抵抗性に対する c-MYC の過剰発現およびノックダウンの効果を検討した。過剰発現の実験には、核内 c-MYC の発現レベルが低い COLO205 を用いた。COLO205 に pcDNA3 空ベクターおよび pcDNA3-c-MYC をトランスフェクションし、ウェスタンブロットにより c-MYC の過剰発現を確認した (図 2A)。コントロールと比較して、c-MYC を過剰発現させた COLO205 では、5-FU 抵抗性が有意に増加した (図 2B)。c-MYC ノックダウンの実験には、核内 c-MYC の発現レベルが高い COLO-320 を用いた。COLO-320 に scrambled siRNA および c-MYC siRNA をトランスフェクションし、ウェスタンブロットにより c-MYC の発現抑制を確認した (図 2C)。コントロールと比較して、c-MYC をノックダウンさせた COLO-320 では、5-FU 抵抗性が有意に減弱した (図 2D)。以上の結果は、c-MYC の発現レベルが 5-FU 抵抗性に関与していることを示唆している。

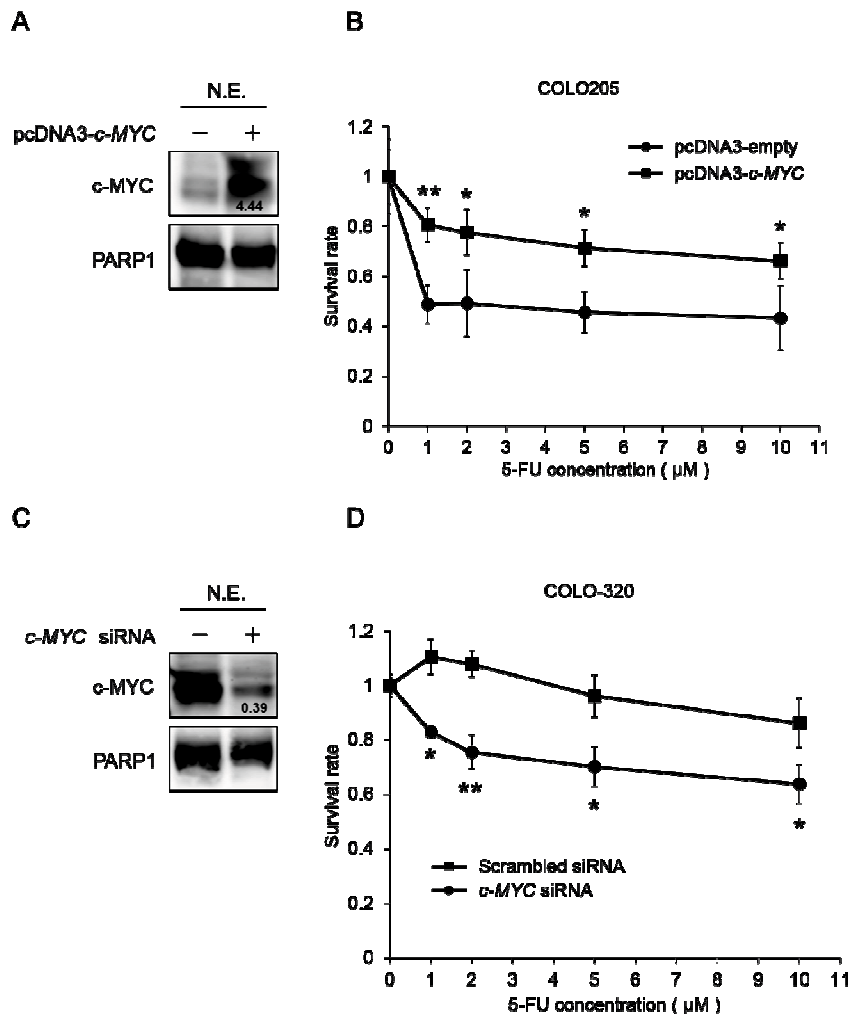


図 2. 5-FU 処理後の細胞生存率に対する c-MYC 過剰発現、c-MYC ノックダウンの影響

- A. pc-DNA3 空ベクターあるいは pc-DNA3-*c-MYC* を導入した COLO205 細胞の核抽出物における *c-MYC* および PARP1 蛋白質の発現をウェスタンブロットにより検出した。バンドの下の数値は、PARP1 の発現量に対する *c-MYC* の発現量比を pc-DNA3 空ベクター導入 COLO205 細胞におけるその値で補正したものである。
- B. pc-DNA3 空ベクターあるいは pc-DNA3-*c-MYC* を導入した COLO205 細胞を DMSO あるいは 5-FU (1, 2, 5, 10  $\mu$ M) で 48 時間処理し、WST-8 アッセイにより細胞生存率を算出した。各々の細胞生存率は、5-FU 処理後の吸光度を DMSO 処理後の吸光度で補正したものである。\* は  $p < 0.05$  を、\*\* は  $p < 0.01$  を表す。
- C. Scrambled siRNA あるいは *c-MYC* siRNA を導入した COLO-320 細胞の核抽出物における *c-MYC* および PARP1 蛋白質の発現をウェスタンブロットにより検出した。バンドの下の数値は、PARP1 の発現量に対する *c-MYC* の発現量比を scrambled siRNA 導入 COLO-320 細胞におけるその値で補正したものである。
- D. Scrambled siRNA あるいは *c-MYC* siRNA を導入した COLO-320 細胞を DMSO あるいは 5-FU (1, 2, 5, 10  $\mu$ M) で 48 時間処理し、WST-8 アッセイにより細胞生存率を算出した。各々の細胞生存率は、5-FU 処理後の吸光度を DMSO 処理後の吸光度で補正したものである。\* は  $p < 0.05$  を、\*\* は  $p < 0.01$  を表す。

### **c-MYC による *ABCB5* 発現レベルの制御**

大腸癌細胞株 COLO-320 に *c-MYC* siRNA を導入して、*c-MYC* の発現抑制を行い、5-FU を含む各種抗癌剤に対する抵抗性に関わる ABC トランスポーター5 種 (*ABCB5*, *MDR1*, *MRP1*, *ABCC4*, *ABCC5* [17-23]) の mRNA 発現レベルの変化を RT-PCR 法を用いて検討した。*c-MYC* の発現抑制により、*ABCB5*, *ABCC4*, *ABCC5* の発現レベルが減少した (図 3A)。*c-MYC* 発現抑制により、*ABCB5* の発現レベルが最も減少しており、我々は *ABCB5* に着目して検討を進めた。*ABCB5* プロモーター領域に直接 *c-MYC* が結合しているかを検討するために、クロマチン免疫沈降を行った。*ABCB5* プロモーター領域 (-5000 bp から +1500 bp) には、4 か所 (-3415 bp/-3410 bp, -1812 bp/-1807 bp, -87 bp/-82 bp, +1101 bp/+1106 bp) に *c-MYC* 結合部位 (CATGTG) が存在していた (図 3B)。他の *c-MYC* 結合部位 (CACGTG および CACGCG) は存在しなかった。クロマチン免疫沈降を行ったところ、*ABCB5* プロモーター領域内の 2 か所 (-3415 bp/-3410 bp, -87 bp/-82 bp) の *c-MYC* 結合部位に *c-MYC* の結合が確認された (図 3C)。これらの結果は、*ABCB5* が *c-MYC* の標的遺伝子であることを示唆している。

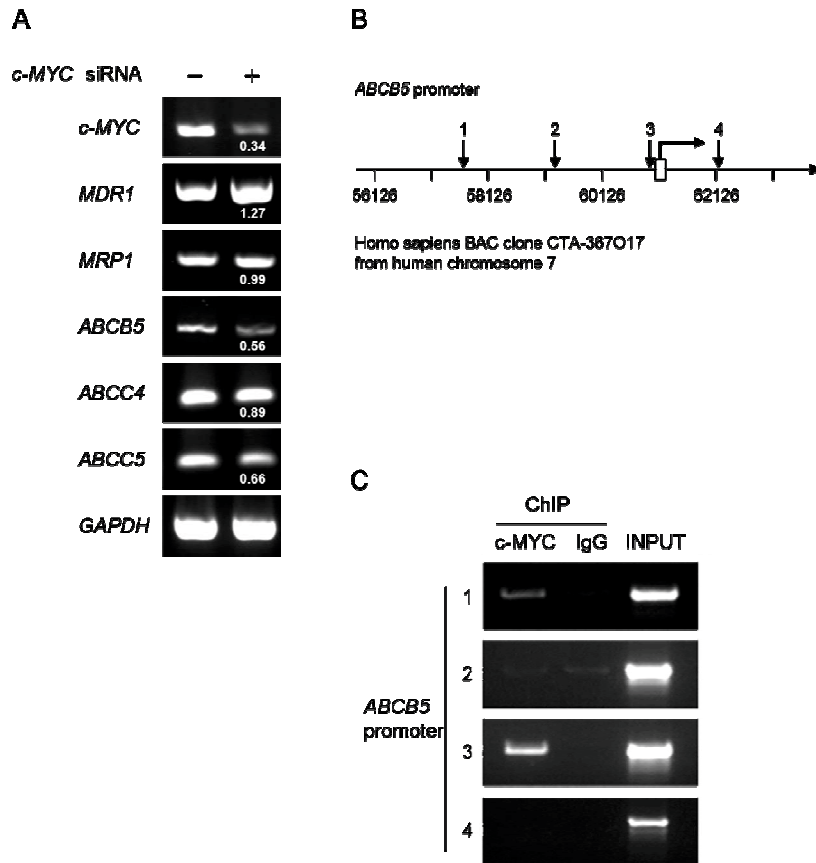


図 3. *ABCB5* プロモーター領域への c-MYC の結合を介した *ABCB5* の発現制御

- A. Scrambled siRNA あるいは c-MYC siRNA を導入した COLO-320 細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR により *c-MYC*, *MDR1*, *MRP1*, *ABCB5*, *ABCC4*, *ABCC5*, *GAPDH* の発現を検出した。バンドの下の数値は、*GAPDH* の発現量に対する各遺伝子の発現量比を scrambled siRNA 導入 COLO-320 細胞におけるその値で補正したものである。
- B. *ABCB5* プロモーター領域内の推定上の c-MYC 結合部位。番号付き矢印は推定上の c-MYC 結合部位を表し、矢印付きホワイトボックスは転写開始点を表す。図の下の番号は、ヒト 7 番染色体由来の BAC クローン CTA-367O17 上での座標を表す。
- C. 内在性の c-MYC を発現している COLO-320 細胞を用いて ChIP アッセイを行った。左側の番号は、図 3B の番号付き矢印に対応している。c-MYC, マウスモノクローナル抗 c-MYC 抗体; IgG, 正常マウス IgG; INPUT, ChIP アッセイに用いた 1/100 量のクロマチン DNA。

### c-MYC 阻害薬 10058-F4 による ABCB5 発現レベルの変化

c-MYC は MAX 蛋白と複合体を形成し、DNA に結合し、転写因子としての働きをもつタンパクとして知られている[24]。10058-F4 は、c-MYC-MAX のヘテロ二量体化を特異的に阻害し、c-MYC の標的 DNA 配列への結合を妨げる小分子化合物である[25]。DMSO あるいは 10058-F4 で 48 時間処理された COLO-320 細胞を用いて、クロマチン免疫沈降 (ChIP) を行ったところ、*ABCB5* プロモーター領域内の c-MYC 結合部位への c-MYC の結合が減少した (図 4A)。また、RT-PCR およびウェスタンブロットを行い、mRNA レベルでも蛋白レベルでも 10058-F4 処理により、*ABCB5* の発現が減少した (図 4B, C)。さらに他の 5-FU 抵抗性に関わる ABC トランスポーターである *ABCC5*, *ABCG2* [26] の発現に対する 10058-F4 処理の影響を検討した。10058-F4 処理は *ABCC5* の発現を減少させたが、COLO-320 細胞における *ABCC5* の発現レベルは非常に低かった (図 4D)。*ABCG2* は COLO-320 細胞において発現していたが、10058-F4 処理により *ABCG2* の発現レベルは減少しなかった (図 4D)。これらの結果は、c-MYC が *ABCB5* プロモーター領域内の c-MYC 結合部位に結合して *ABCB5* の発現を正に制御していることを示唆している。

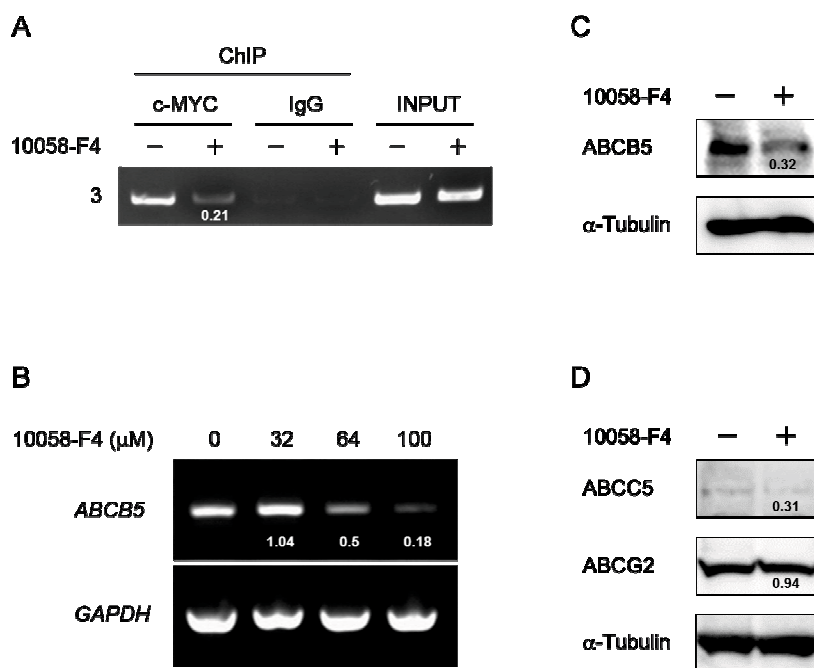


図 4. ABCB5 の発現における c-MYC 阻害薬 10058-F4 の効果



- A. DMSO あるいは 10058-F4 (64  $\mu$ M) で 48 時間処理された COLO-320 細胞を用いて ChIP アッセイを行った。左側の番号は、図 3B の番号付き矢印に対応している。左から 2 レーン目のバンドの下の数値は、INPUT 量に対する抗ヒト c-MYC 抗体で免疫沈降されたクロマチン DNA の量比をコントロール細胞におけるその値で補正したものである。c-MYC, マウスモノクローナル抗 c-MYC 抗体; IgG, 正常マウス IgG; INPUT, ChIP アッセイに用いた 1/100 量のクロマチン DNA。
- B. DMSO あるいは 10058-F4 (32, 64, 100  $\mu$ M) で 48 時間処理された COLO-320 細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR により *ABCB5* と *GAPDH* の発現を検出した。バンドの下の数値は、*GAPDH* の発現量に対する *ABCB5* の発現量比を DMSO 処理した COLO-320 細胞におけるその値で補正したものである。
- C. DMSO あるいは 10058-F4 (64  $\mu$ M) で 48 時間処理された COLO-320 細胞から whole cell lysates を準備し、*ABCB5*,  $\alpha$ -Tubulin の発現をウェスタンブロットにより検出した。バンドの下の数値は、 $\alpha$ -Tubulin の発現量に対する *ABCB5* の発現量比を DMSO 処理した COLO-320 細胞におけるその値で補正したものである。
- D. DMSO あるいは 10058-F4 (64  $\mu$ M) で 48 時間処理された COLO-320 細胞から whole cell lysates を準備し、*ABCC5*, *ABCG2*,  $\alpha$ -Tubulin の発現をウェスタンブロットにより検出した。バンドの下の数値は、 $\alpha$ -Tubulin の発現量に対する各蛋白質の発現量比を DMSO 処理した COLO-320 細胞におけるその値で補正したものである。

### 5-FU 抵抗性における *ABCB5* の関与

5-FU 抵抗性における *ABCB5* の関与を検討するために、大腸癌細胞株 COLO-320 を用いて *ABCB5* ノックダウンによる 5-FU 抵抗性の変化を検討した。*ABCB5* ノックダウンはウェスタンブロットで確認した (図 5A)。*ABCB5* ノックダウンにより、5-FU 処理後の細胞生存率は有意に減弱した (図 5B, 上のグラフ)。一方、*ABCB5* ノックダウンにより、シスプラチン処理後の細胞生存率は変化しなかった (図 5B, 下のグラフ)。さらに、低濃度の 5-FU 存在下で長期培養し、樹立された 5-FU 抵抗性 Caco-2 細胞を用いて同様の検討を行った。5-FU 抵抗性 Caco-2 細胞では親株 Caco-2 細胞に比べて、*ABCB5* の発現レベルおよび 5-FU 処理後の細胞生存率が増加していた (図 5C, D)。これらの結果は、ヒト大腸癌細胞において *ABCB5* が 5-FU 抵抗性に関与していることを示唆している。

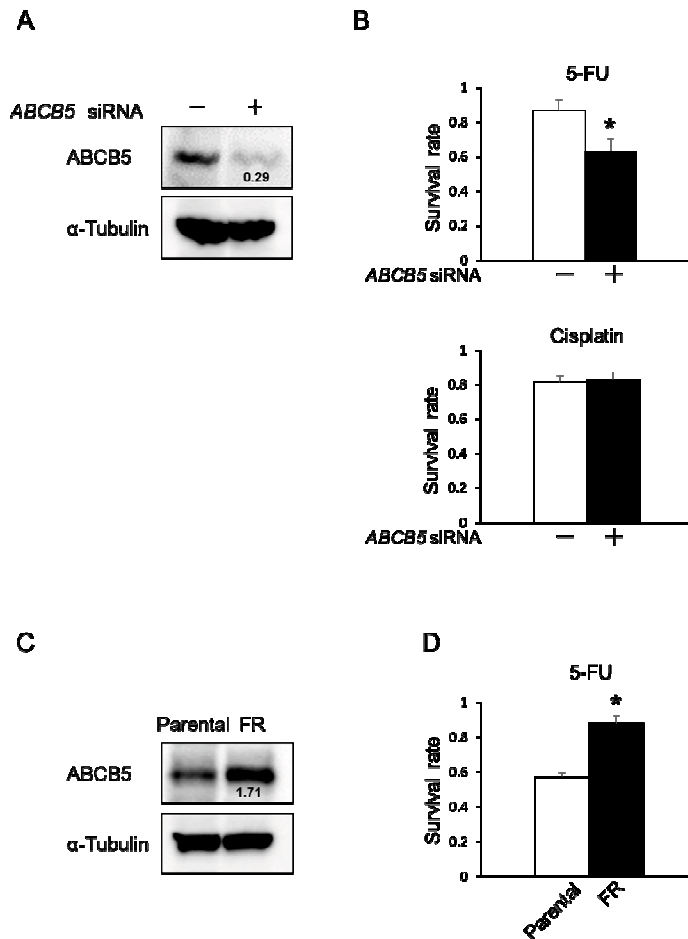


図 5. ABCB5 の発現レベルと 5-FU 抵抗性の関連性

- A. Scrambled siRNA あるいは *ABCB5* siRNA を導入した COLO-320 細胞から whole cell lysates を準備し、ABCB5,  $\alpha$ -Tubulin の発現をウェスタンブロットにより検出した。バンドの下の数値は、 $\alpha$ -Tubulin の発現量に対する ABCB5 の発現量比を scrambled siRNA を導入した COLO-320 細胞におけるその値で補正したものである。
- B. Scrambled siRNA あるいは *ABCB5* siRNA を導入した COLO-320 細胞を DMSO, 5-FU (5  $\mu$ M), 0.9% 塩化ナトリウム, cisplatin (5  $\mu$ M) で 48 時間処理し、WST-8 アッセイにより細胞生存率を算出した。各々の細胞生存率は、5-FU 処理後の吸光度を DMSO あるいは 0.9% 塩化ナトリウム処理後の吸光度で補正したものである。\* は  $p < 0.05$  を表す。
- C. 親株 Caco-2 細胞と 5-FU 抵抗性 Caco-2 細胞から whole cell lysates を準備し、ABCB5,  $\alpha$ -Tubulin の発現をウェスタンブロットにより検出した。バンドの下の数値は、 $\alpha$ -Tubulin の発現量に対する ABCB5 の発現量比を親株 Caco-2 細胞におけるその値で補正したものである。
- D. 親株 Caco-2 細胞と 5-FU 抵抗性 Caco-2 細胞を DMSO あるいは 5-FU (5  $\mu$ M) で 72 時間処理し、WST-8 アッセイにより細胞生存率を算出した。各々の細胞生存率は、5-FU 処理後の吸光度を DMSO 処理後の吸光度で補正したものである。\* は  $p < 0.05$  を表す。

## ヌードマウスに皮下移植された Caco-2 細胞の造腫瘍性に対する 5-FU と c-MYC 阻害薬 10058-F4 の併用効果

大腸癌細胞株を皮下移植されたヌードマウスを用いて、5-FU 単剤、10058-F4 単剤、5-FU + 10058-F4 の腫瘍縮小効果を検討した。5-FU 単剤および 10058-F4 単剤投与群では、コントロールと比較して腫瘍縮小効果が認められた。さらに 5-FU + 10058-F4 併用投与群では、各々の単剤投与群と比較して有意な腫瘍縮小効果が認められた (図 6A, B)。また各種薬剤処理後の摘出腫瘍組織における増殖能やアポトーシスを検討するために、Ki67 染色および TUNEL 染色を行った。5-FU 単剤、10058-F4 単剤、および 5-FU + 10058-F4 併用投与群において Ki67 陽性細胞率は有意に減少し (図 6C, D)、TUNEL 陽性細胞率は有意に増加していた (図 6E, F)。また、摘出腫瘍組織における ABCB5 の発現量を免疫蛍光染色およびウェスタンブロットで検討したところ、コントロールと比較して、5-FU 単剤投与群では ABCB5 の発現量が増加しており、10058-F4 単剤投与群および 5-FU + 10058-F4 併用投与群では減少していた (図 6G, H)。

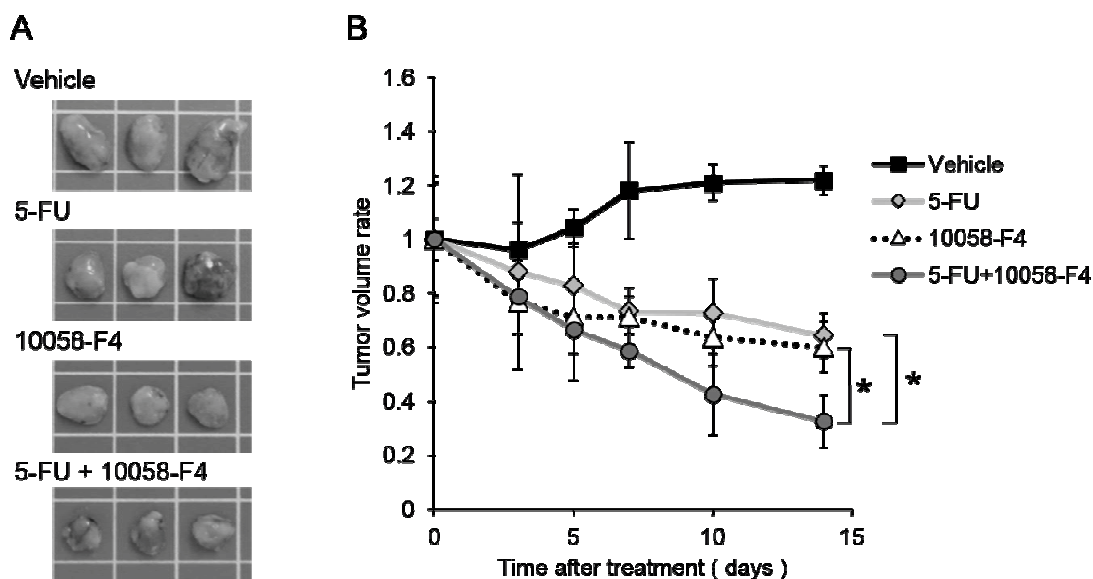


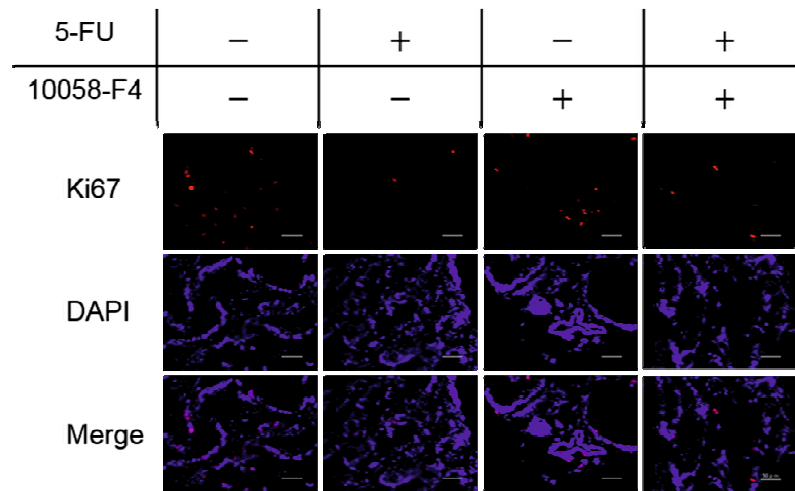
図 6. ヌードマウスに皮下移植されたヒト大腸癌細胞に対する 5-FU と 10058-F4 の併用効果

ヌードマウスの皮下に Caco-2 細胞を植え込み、腫瘍の容積が約 1000 mm<sup>3</sup> に達した後、DMSO, 5-FU (10 mg/kg), 10058-F4 (20 mg/kg), あるいは 5-FU (10 mg/kg) + 10058-F4 (20 mg/kg) を 2 週間、毎日腹腔内投与した。

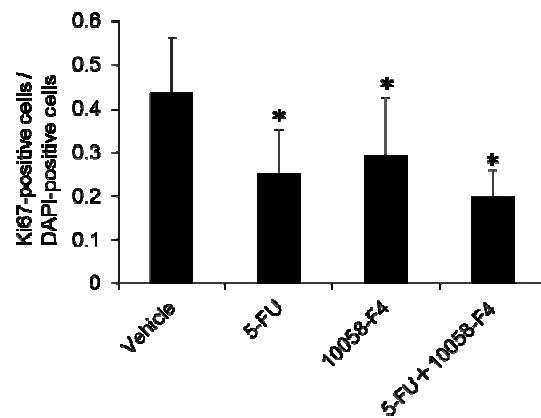
A. 各薬剤を 14 日間処理した後のマウス皮下に移植されたヒト大腸癌細胞の代表的な写真。

B. 各薬剤を 3, 5, 7, 10, 14 日間処理し、腫瘍の容積を計測した。腫瘍の容積は長さ×幅×高さで算出された。腫瘍容積率は、各薬剤処理後の腫瘍容積を各薬剤処理前の腫瘍容積 (約 1000 mm<sup>3</sup>) で補正したものである。\* は  $p < 0.05$  を表す。

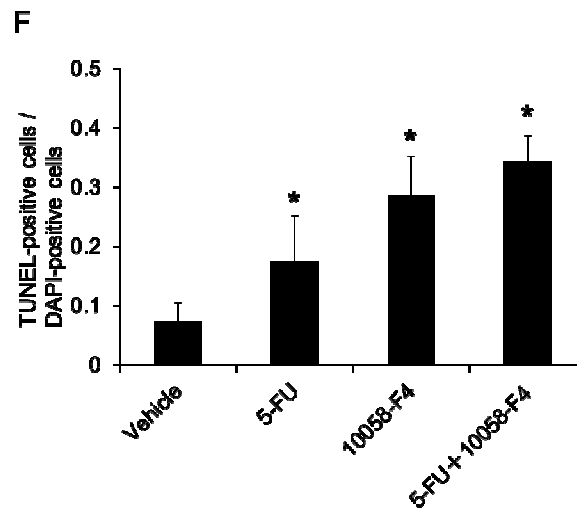
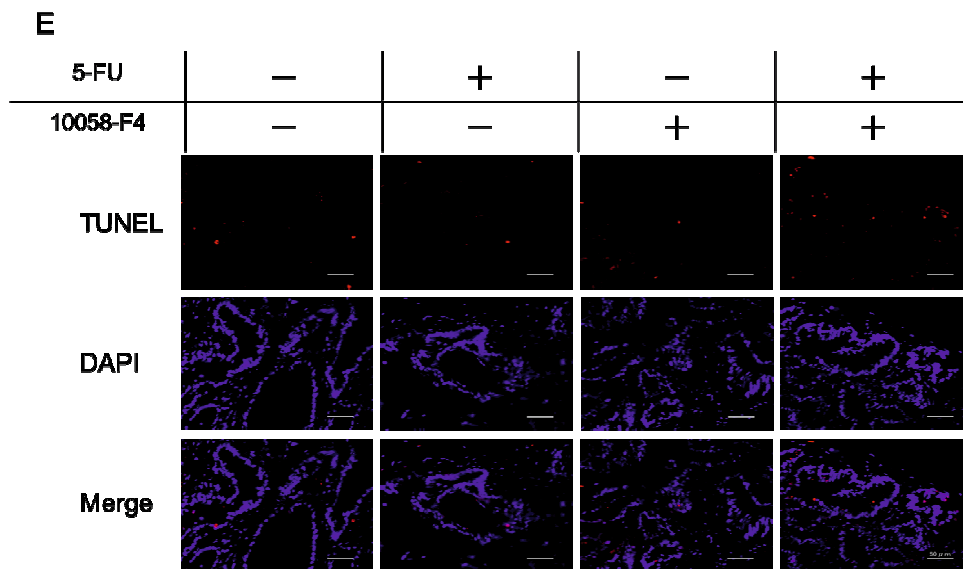
C



D

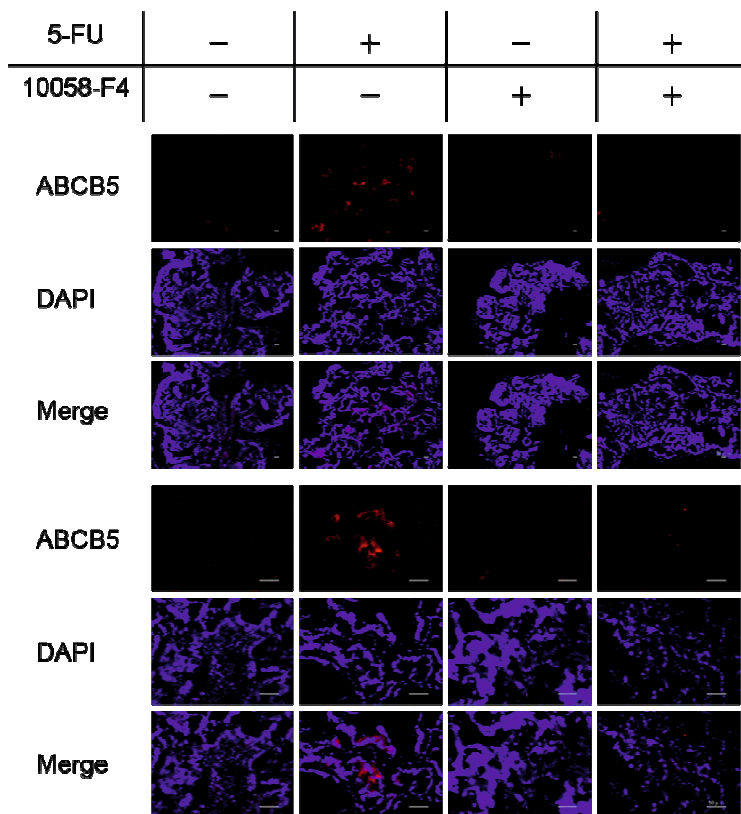
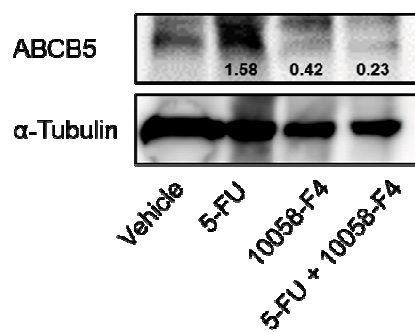


- C. 各薬剤を 14 日間処理した後のマウス皮下に移植されたヒト大腸癌細胞における蛍光免疫染色による Ki67, DAPI および Merge の代表的な写真。拡大倍率は 40 倍で、スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を表す。
- D. ランダムに選んだ 8 視野における DAPI 陽性細胞に対する Ki67 陽性細胞の比率。  
\* は  $p < 0.05$  を表す。



E. 各薬剤を 14 日間処理した後のマウス皮下に移植されたヒト大腸癌細胞における蛍光免疫染色による TUNEL, DAPI および Merge の代表的な写真。拡大倍率は 40 倍で、スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を表す。

F. ランダムに選んだ 8 視野における DAPI 陽性細胞に対する TUNEL 陽性細胞の比率。  
\* は  $p < 0.05$  を表す。

**G****H**

- G. 各薬剤を 14 日間処理した後のマウス皮下に移植されたヒト大腸癌細胞における蛍光免疫染色による ABCB5, DAPI および Merge の代表的な写真。拡大倍率は 10 倍(上半分の写真) 40 倍(下半分の写真)で、スケールバーは 50  $\mu$ m を表す。
- H. 各薬剤を 14 日間処理した後のマウス皮下に移植されたヒト大腸癌細胞から whole cell lysates を準備し、ABCB5,  $\alpha$ -Tubulin の発現をウェスタンブロットにより検出した。バンドの下の数値は、 $\alpha$ -Tubulin の発現量に対する ABCB5 の発現量比を DMSO 処理群におけるその値で補正したものである。

## 6. 考察

c-MYC は、様々な癌種で過剰に発現していることや薬剤耐性に関与していることがこれまでに報告されているが、いまだ大腸癌の 5-FU 抵抗性における c-MYC の役割は解明されておらず、我々は本研究において 5-FU 抵抗性における c-MYC の役割を明らかにすることを目的とした。最初に、我々は根治術後に 5-FU ベースの補助化学療法を施行された大腸癌患者（20 症例）の原発巣における c-MYC の発現レベルが補助化学療法後の再発率と有意に相関していることを明らかにした。症例数が少ないことや観察期間が短いことから、その意義は限定的ではあるが、 Kaplan-Meier 分析により、補助化学療法後の早期再発の予測因子となり得る可能性が示されている。最近の研究では、MYCN が神経芽細胞腫において、ABC トランスポーターの転写を制御していること[12] や、c-MYC が慢性骨髄性白血病において ABC トランスポーターの発現レベルを制御していることが報告されている[13]。ABC トランスポーターは、抗癌剤を排出することで、癌細胞に抗癌剤抵抗性をもたらすが、我々は大腸癌においても c-MYC が ABC トランスポーターの発現を制御することにより 5-FU 抵抗性をもたらしているのではないかという仮説を立てた。ヒト大腸癌細胞株における c-MYC の ABC トランスポーターの発現に対する効果を検討するために、抗癌剤抵抗性に関与している 5 種の ABC トランスポーター (*MDR1*, *MRP1*, *ABCB5*, *ABCC4* 及び *ABCC5* [17-23]) の発現レベルに対する c-MYC ノックダウンの効果を調べた。興味深いことに、c-MYC ノックダウンにより、5-FU 抵抗性に関わるトランスポーターである *ABCB5* の発現レベルが顕著に減少した。さらに、クロマチン免疫沈降により c-MYC が *ABCB5* プロモーター領域に結合することが明らかになった。また c-MYC 阻害薬である 10058-F4 処理により、*ABCB5* プロモーター領域への c-MYC の結合が減少し、*ABCB5* の発現が mRNA と蛋白質の両レベルにおいて減少することが明らかとなった。さらに他の 5-FU 抵抗性に関わる ABC トランスポーターである *ABCC5*, *ABCG2* [26] の発現に対する 10058-F4 処理の影響を検討した。10058-F4 処理は *ABCC5* の発現を減少させたが、COLO-320 細胞における *ABCC5* の発現レベルは非常に低かったため、5-FU 抵抗性には影響を及ぼさないと考えられた。予想された様に、*ABCC5* をノックダウンした COLO-320 細胞では、5-FU 処理後の細胞生存率はコントロール細胞のそれと比較して変化していなかった (data not shown)。*ABCG2* は COLO-320 細胞において発現していたが、10058-F4 処理により *ABCG2* の発現レベルは減少しなかった。また *ABCB5* をノックダウンした COLO-320 細胞では、5-FU 処理後の細胞生存率は減弱し、5-FU 抵抗性 Caco-2 細胞では親株 Caco-2 細胞に比べて、*ABCB5* の発現レベルおよび 5-FU 処理後の細胞生存率が増加していた。これらの結果より、c-MYC が *ABCB5* の発現レベルを制御することで 5-FU 抵抗性の獲得に寄与していることが示唆された。さらに、大腸癌細胞株を皮下移植したヌードマウスモデルを用いた実験により、5-FU + 10058-F4 併用投与群では 5-FU 単剤および 10058-F4 単剤投与群と比較して有意な腫瘍縮小効果が認められた。5-FU + 10058-F4 併用投与群では、Ki67 陽性細胞率の減少、TUNEL 陽性細胞率の増加が認められた。In vitro においても 5-FU + 10058-F4 併用処理群では、Annexin V および PI 陽性細胞が増加し、PCNA の発現レベルが減少した (data not shown)。また予想された様に、5-FU の存在の有無に関わらず

10058-F4 投与によって ABCB5 の発現レベルは抑制された。注目すべきことに、5-FU 単剤投与群で ABCB5 の発現レベルが有意に上昇していた。この結果は、5-FU 投与により ABCB5 の発現が増加するという最近の報告[21]と一致している。また我々の研究では、原発巣における ABCB5 の発現レベルは 5-FU ベースの補助化学療法後の再発率と相関せず、原発巣における ABCB5 と c-MYC との発現レベルの間にも相関性は示されなかった (data not shown)。大腸癌細胞株を皮下移植したヌードマウスモデルにおいて 5-FU 処理により ABCB5 の発現レベルが上昇すること、5-FU 抵抗性大腸癌細胞株で ABCB5 の発現レベルが増加していることから併せて考察すると、原発巣では ABCB5 が低発現であっても、5-FU ベースの補助化学療法によって再発巣における ABCB5 の発現が高くなるのではないかと考えられた。5-FU 処理によって ABCB5 の発現レベルが増加する機構は不明であるが、2つの可能性がある。1つは、腫瘍組織の中で元々 ABCB5 の発現が高い細胞集団が 5-FU 処理後も生存している可能性である。もう1つは、5-FU 処理によって ABCB5 の発現が増加する細胞集団があり、そのような細胞集団が生存しているという可能性である。最近、乳癌細胞を抗癌剤であるドキソルビシンで処理すると、HIF-1 $\alpha$ の発現量および活性が増加することが報告されており[27]、5-FU 処理によって c-MYC の活性が増強され、ABCB5 の発現誘導につながる可能性があると考えられる。5-FU 処理によって ABCB5 の発現レベルが増加するメカニズムを解明するために、今後さらなる研究が必要である。

## 7. 結語

本研究では、ヒト大腸癌において c-MYC が ABCB5 の発現を正に制御することによって 5-FU に対する抵抗性をもたらしていることが明らかになった。したがって、c-MYC-ABCB5 axis が大腸癌の 5-FU 抵抗性に対する治療標的となり得ると考えられる。

## 8. 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました山口大学大学院 器官病態外科学講座（第一外科）、濱野公一教授に深謝申し上げます。

また、実験のご指導を頂きました李桃生教授（長崎大学原爆後障害医療研究所 幹細胞生物学研究分野）、西本新先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）、細山徹先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）に感謝申し上げます。



## 9. 参考文献

- [1] Oster SK, Ho CS, Soucie EL, Penn LZ. The myc oncogene: Marvelously Complex. *Adv Cancer Res.* 2002; 84: 81-154.
- [2] Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol.* 2006; 16: 318–30.
- [3] Finley GG, Schulz NT, Hill SA, et al. Expression of the myc gene family in different stages of human colorectal cancer. *Oncogene.* 1989; 4: 963-71.
- [4] Smith DR, Myint T, Goh HS. Over-expression of the c-myc proto-oncogene in colorectal carcinoma. *Br J Cancer.* 1993; 68: 407–13.
- [5] Garte SJ. The c-myc oncogene in tumor progression. *Crit Rev Oncog.* 1993; 4: 435–49.
- [6] Walker TL, White JD, Esdale WJ, et al. Tumour cells surviving in vivo cisplatin chemotherapy display elevated c-myc expression. *Br J Cancer.* 1996; 73: 610-4.
- [7] Abaza MS, Al-Saffar A, Al-Sawan S, Al-Attayah R. c-myc antisense oligonucleotides sensitize human colorectal cancer cells to chemotherapeutic drugs. *Tumour Biol.* 2008; 29: 287–303.
- [8] Pyndiah S, Tanida S, Ahmed KM, et al. c-MYC suppresses BIN1 to release poly(ADP-ribose) polymerase 1: a mechanism by which cancer cells acquire cisplatin resistance. *Sci Signaling.* 2011; 4: ra19. DOI: 10.1126/scisignal.2001556.
- [9] Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist.* 2003; 8: 411–24.
- [10] Huang Y, Sadée W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer Lett.* 2006; 239: 168–82.
- [11] Hlavata I, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R, et al. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis.* 2012; 27: 187–96.
- [12] Porro A, Haber M, Diolaiti D, et al. Direct and coordinate regulation of ATP-binding cassette transporter genes by Myc factors generates specific transcription signatures that significantly affect the chemoresistance phenotype of cancer cells. *J Biol Chem.* 2010; 18: 19532–43.
- [13] Porro A, Iraci N, Soverini S, et al. c-MYC oncoprotein dictates transcriptional profiles of ATP-Binding cassette transporter genes in chronic myelogenous leukemia CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Mol Cancer Res.* 2011; 9: 1054–66.
- [14] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001; 25: 402-8.
- [15] Nishimoto A, Kugimiya N, Hosoyama T, et al. JAB1 regulates unphosphorylated STAT3 DNA-binding activity through protein-protein interaction in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 438: 513-8.
- [16] Nishimoto A, Kugimiya N, Hosoyama T, et al. HIF-1 $\alpha$  activation under glucose deprivation plays a central role in the acquisition of anti-apoptosis in human colon

- cancer cells. *Int J Oncol*. 2014; 44: 2077-84.
- [17] Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1989; 81: 116-24.
- [18] Park JG, Kramer BS, Lai SL, et al. Chemosensitivity patterns and expression of human multidrug resistance-associated MDR1 gene by human gastric and colorectal carcinoma cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82: 193-8.
- [19] Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 1992; 258: 1650-4.
- [20] Frank NY, Margaryan A, Huang Y, et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*. 2005; 65: 4320-33.
- [21] Wilson BJ, Schatton T, Zhan Q, et al. ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients. *Cancer Res*. 2011; 71: 5307–16.
- [22] Hagemann W, Jesnowski R, Faissner R, et al. ATP-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells. *Pancreatol*. 2009; 9: 136-44.
- [23] Pratt S, Shepard RL, Kandasamy RA, et al. The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol Cancer Ther*. 2005; 4: 855-63.
- [24] Amati B, Brooks MW, Levy N, et al. Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell*. 1993; 72: 233–45.
- [25] Huang MJ, Cheng YC, Liu CR, et al. A small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, induces cell-cycle arrest, apoptosis, and myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2006; 34: 1480–9.
- [26] Yuan J, Lv H, Peng B, et al. Role of BCRP as a biomarker for predicting resistance to 5-fluorouracil in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009; 63: 1103-10.
- [27] Cao Y, Eble JM, Moon E, et al. Tumor cells upregulate normoxic HIF-1 $\alpha$  in response to doxorubicin. *Cancer Res*. 2013; 73: 6230-42.