

Dclk1阻害は結腸直腸癌において5-FU誘導性の細胞周期の
停止を解除し細胞生存を減少させる

氏名 末廣 祐樹

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻

器官病態外科学講座

令和元年 11 月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4-5
3. 目的	5
4. 材料と方法	5-7
5. 結果	7-10
6. 考察	10-11
7. 結語	12
8. 謝辞	12
9. 参考文献	12-14

1. 要旨

結腸直腸癌に対する 5-Fluorouracil (5-FU) 併用化学療法は、標準的な第一選択の化学療法である。しかし、抗癌剤に対して耐性を獲得した腫瘍細胞が出現することにより、その抗腫瘍効果には限界がある。Doublecortin-like kinase1 (Dclk1) は生存促進性シグナル伝達を制御する癌幹細胞マーカーとして知られており、我々はこれまでに膵臓癌細胞において、gemcitabine (GEM) と Dclk1 阻害剤である LRRK2-IN-1 (LRRK) の併用処理は、checkpoint kinase1 (Chk1) のリン酸化の抑制を介して、S 期で細胞周期を停止させることなく、細胞周期を進行させ、細胞傷害性効果を増強させることを明らかにした。本研究の目的は、ヒト大腸癌細胞株である COLO-320 において、5-FU と LRRK を併用した際の細胞傷害性効果を明らかにすることである。Chk1 のリン酸化、細胞周期、DNA 損傷、アポトーシスおよび細胞生存に対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK 併用処理による影響を比較・検討したところ、5-FU と LRRK の併用処理は、5-FU 誘導性の Chk1 のリン酸化を有意に減少させ、S 期での細胞周期の停止を解除した。また、5-FU と LRRK の併用処理によりアポトーシスは誘導されなかったが、5-FU、LRRK 単剤に比べ、細胞生存率は減少する傾向にあった。本研究により、結腸直腸癌治療において、5-FU 併用化学療法として、Dclk1 を標的とする治療戦略が有用である可能性が示された。

2. 研究の背景

結腸直腸癌は、世界で癌による死亡のうち、3番目に多い癌種であり、人類の健康に対して、重大な脅威となっている(1)。ピリミジン類似体である 5-Fluorouracil (5-FU) は、チミジル酸合成酵素阻害を介して DNA 合成阻害を誘導し、また DNA および RNA に誤って取り込まれ、G1/S 期での細胞周期の停止を誘導する(2)。現在、FOLFIRI(3)と FOLFOX4(4)レジメンとして知られている、静脈注射での 5-FU/leucovorin (LV) にイリノテカンあるいはオキサリプラチンを加えた併用療法は、結腸直腸癌に対する標準的な第一選択の化学療法である。しかしながら、これらの薬剤に対して薬理的耐性を獲得した腫瘍細胞が出現することにより、これらの治療の抗腫瘍効果を限定的なものにしている。抗癌剤耐性を獲得した腫瘍細胞により転移が生じ、これは結腸直腸癌関連死亡の約 90%を占めている(5)。

5-FU 処理は、細胞周期チェックポイント蛋白である checkpoint kinase1 (Chk1) のリン酸化を誘導し、S 期で細胞周期の進行を停止させる(6, 7)。従って、5-FU と Chk1 阻害剤の併用は、S 期で細胞周期を停止させて損傷 DNA を修復することなく、細胞周期を進行させることによって致命的な染色体不安定性を引き起こし、細胞死を増加させると考えられる。5-FU と Chk1 阻害の併用効果は、以前より研究されており、Chk1 阻害により、細胞は 5-FU 誘導性の細胞傷害を受けやすくなり(6-8)、さらに 5-FU と Chk1 阻害剤の併用は、5-FU、Chk1 阻害剤単剤と比較して、結腸直腸癌細胞において細胞死を増加させることが明らかになっている(9)。しかしながら、Chk1 は正常細胞の細胞周期チェックポイントにおいても重要な役割を果たしており、それゆえ 5-FU と Chk1 阻害剤の併用は正常細胞を傷害し、重篤な副作用をもたらすと考えられる。重篤な副作用を引き起こさないために、癌細胞に特異的に発現し、5-FU の細胞傷害作用を制御している分子を標的とすることが必要である。

Doublecortin-like kinase1 (Dclk1) は、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ様ドメインをコードし、微小管重合を制御している(10)。Dclk1 の発現は腸管において、正常幹細胞と腫瘍幹細胞を区別させ(11)、腸管腫瘍細胞の生存促進性シグナル伝達と自己複製能を制御している(12)。Dclk1 は、結腸直腸癌において発現が増加しており、転移や予後に関連している(13)。Dclk1 の発現はまた、過形成性ポリープおよび腺腫においても認められており、異形成の悪性度が進むにつれて、Dclk1 の発現量は増加する傾向にある(14)。さらに、キナーゼ阻害剤 LRRK2-IN-1 (LRRK) は、Dclk1 活性を抑制し、アポトーシスや細胞周期停止の誘導だけでなく、癌細胞の増殖、遊走、および浸潤の阻害といった強力な抗癌活性を有していることが明らかになっている(15)。我々は最近、膵臓癌細胞において gemcitabine (GEM) と Dclk1 阻害剤である LRRK の併用が Chk1 のリン酸化の抑制を介して、S 期で細胞周期を停止させることなく細胞周期を進行させ、さらに、Dclk1 阻害によって GEM の細胞傷害性効果が増強されることを報告した(16)。しかしながら、結腸直腸癌細胞において 5-FU の細胞傷害性効果が Dclk1 阻害によって増強されるかどうかは明らかになっていない。

本研究の目的は、ヒト結腸直腸癌細胞株である COLO-320 における 5-FU と Dclk1 阻害剤と

の併用による細胞傷害性効果を明らかにすることであり、Chk1 のリン酸化、細胞周期、DNA 損傷、アポトーシス、および細胞生存に対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用による影響を検証した。

3. 目的

ヒト結腸直腸癌細胞株である COLO-320 において Chk1 のリン酸化、細胞周期、DNA 損傷、アポトーシス、および細胞生存に対する 5-FU、Dcl1 阻害剤単剤、5-FU と Dcl1 阻害剤との併用による細胞傷害性効果を明らかにすることを研究目的とする。

4. 材料と方法

使用した細胞株と培地

ヒト結腸直腸癌細胞株である COLO-320 を理研バイオリソースセンター (Tsukuba, Japan) から購入した。COLO-320 細胞は 10% 牛胎児血清を含む RPMI1640 培地を用いて、5%CO₂ を含む 37°C の加湿加温器内で培養された。

試薬

5-Fluorouracil (5-FU) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入され、dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解後、4°C で保管された。LRRK2-IN-1 (LRRK) は、ChemScene (Monmouth Junction, New Jersey, USA) から購入され、DMSO で溶解後、-80°C で保管された。

ウェスタンブロッティング解析

COLO-320 細胞は、コントロール (DMSO)、5-FU (10 μ M)、LRRK (50 μ M) 単剤、または 5-FU (10 μ M) と LRRK (50 μ M) の併用で 24 時間あるいは 48 時間処理された。細胞を回収した後、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、NP40 細胞溶解バッファー [50mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM NaCl, 1% NP40, 1 \times プロテアーゼ阻害剤] で溶解した。30 分間氷上で静置し、4°C で 20 分間、20,000 x g で遠心し、上清を蛋白質抽出液として回収した。等量の蛋白質抽出液 (30 μ g) をサンプルバッファー (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) と混合し、15 分間室温で反応さ

せた。ポリアクリルアミドゲルであるSuperSep Ace 10% (Wako, Osaka, Japan)を用いてドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行い、蛋白質を分離した。分離された蛋白質をImmobilon-P PVDF transfer membrane (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)に転写し、転写されたメンブレンを、ウシ血清アルブミン(5% w/v)を含んだTBST (Tris-buffered saline containing Tween-20)で室温にて1時間、反応させた。1:1000に希釈された目的蛋白質に対する1次抗体で4°Cにて一晩反応させ、メンブレンをTBSTで洗浄後、1:5000に希釈された2次抗体で室温にて1時間反応させた。TBSTで洗浄後、メンブレンにAmersham ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA)を反応させ、発色した抗原抗体複合体をAmersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences)で検出した。検出されたバンドの発光強度はImageJ ソフトウェア (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA)を用いて定量した。本研究で用いた1次抗体は、抗DCAMKL1抗体 (Abgent, San Diego, CA, USA)、抗Phospho-Chk1 (S317)抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、抗Chk1抗体 (Abcam, Cambridge, UK)、抗PARP-1 (F-2)抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、抗 α -チューブリン抗体 (Santa Cruz Biotechnology)であり、2次抗体は、マウスおよびウサギ免疫グロブリンを認識するhorseradish peroxidase (HRP)で標識されたヤギポリクローナル抗体 (Dako, Glostrup, Denmark)であった。

フローサイトメトリー解析

細胞周期のG0 / G1期でCOLO-320細胞を同調させるために、10%FBSを含むRPMI1640培地を無血清RPMI1640培地に置換した。24時間の血清飢餓後に、無血清RPMI1640培地をコントロール (DMSO)、5-FU (10 μ M)、LRRK (50 μ M)単剤、または5-FU (10 μ M)とLRRK (50 μ M)を含むRPMI1640 10%FBS培地に置換した。48時間培養した後、細胞を回収し、リン酸緩衝生理食塩水で再懸濁し、140 \times gにて5分間遠心分離して細胞を分離した。70%エタノールで懸濁し、-20°C、60分間固定した。固定された細胞をCell Staining Buffer (BioLegend, San Diego, CA, USA)で洗浄し、細胞をpropidium iodide (PI) / RNase (Immunostep, Salamanca, Spain)およびFITCで標識された抗H2A.X Phospho (Ser139)抗体 (Biolegend)で反応させ、BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を用いて解析した。

生細胞アッセイ

COLO-320細胞を96-wellのプレートに1 \times 10⁴個/100 μ l/wellの細胞密度で播いた。24時間培養した後、COLO-320細胞は、DMSO、5-FU (2 μ M)、LRRK (20 μ M)単剤、または5-FU (2 μ M)とLRRK (20 μ M)の併用で48時間処理された。Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque)を加えて、4時間インキュベーションし、450nmでの吸光度をiMarkマイクロプレートリーダー (Bio-Rad,

Hercules, CA, USA)で測定した。

統計解析

統計解析にはJMP Pro 13.1.0 software (SAS Institute Inc.)を使用した。群間の差異はTukey's testで評価した。P値 < 0.05を統計学的に有意差ありとした。

5. 結果

5-FUとLRRKの併用処理は、5-FU誘導性のChk1のリン酸化を有意に減少させた。

5-FUとDclk1阻害剤であるLRRKとの併用処理が、5-FU処理により誘導されるChk1のリン酸化を減少させるかどうかを調べるために、COLO-320細胞をコントロール(DMSO)、5-FU、LRRK単剤、または5-FUとLRRKの併用で24時間処理し、ウェスタンブロッティング解析を行った。COLO-320細胞において、5-FU処理はコントロールと比較して、Chk1のリン酸化を有意に誘導した(図1AおよびB)。5-FUとLRRKの併用処理は、5-FU単剤処理と比較して、5-FU誘導性のChk1のリン酸化を有意に減少させた(図1AおよびB)。Dclk1の発現はコントロール(DMSO)、5-FU、LRRK単剤、5-FUとLRRKの併用処理において同様に検出された(図1A)。

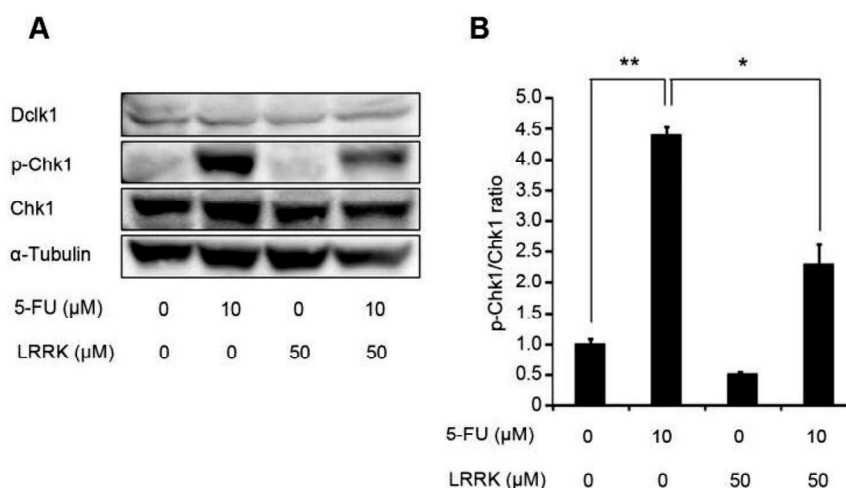


図 1. Chk1 のリン酸化に対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用処理による影響
(A)コントロール(DMSO)、5-FU(10μM)、LRRK(50μM)単剤、または5-FU(10μM)とLRRK(50μM)の併用で24時間処理されたCOLO-320細胞から蛋白質抽出液を作製し、Dclk1、p-Chk1、Chk1、α-チューブリンの発現をウェスタンブロッティング解析により検出した。α-チューブリンをローディングコントロールとして使用した。(B)ImageJソフトウェアを用いて各バンドの発色強度を定量した。コントロールにおけるChk1の発現量に対するp-Chk1の発現量比を基

準とした。各々の棒グラフは、3 回の実験での平均値±標準偏差を表している。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N.S., 有意差なし。

5-FU と LRRK の併用処理は、5-FU 誘導性の細胞周期の停止を解除した。

細胞周期の進行に対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用による影響を調べるために、フローサイトメトリー解析を行った。COLO-320 細胞を 24 時間、血清飢餓状態にして、G0/G1 期に同調させ、次に、無血清 RPMI1640 培地をコントロール (DMSO)、5-FU、LRRK 単剤、または 5-FU と LRRK を含む RPMI1640 10%FBS 培地に置換した。48 時間培養した後、細胞周期および DNA 損傷解析を行った。5-FU 単剤処理は、S 期での細胞周期の停止を誘導し、LRRK 単剤処理はコントロールと比較して G2/M 期における細胞の割合を増加させた (図 2、上部パネル)。注目すべきことに、5-FU と LRRK の併用処理は、5-FU 誘導性の S 期での細胞周期の停止を解除した (図 2、上部パネル)。さらに、DNA 損傷マーカーとして、 γ -H2A ヒストンファミリーメンバー X (γ -H2AX) 陽性細胞の割合を調べたところ、 γ -H2AX 陽性細胞の割合は、コントロールと比較して 5-FU 単剤処理後に増加したが、LRRK 単剤処理後にはほとんど変化しなかった (図 2、下部パネル)。予想に反して、5-FU 単剤処理と比較して、5-FU と LRRK の併用処理後は γ -H2AX 陽性細胞の割合が減少した (図 2、下部パネル)。

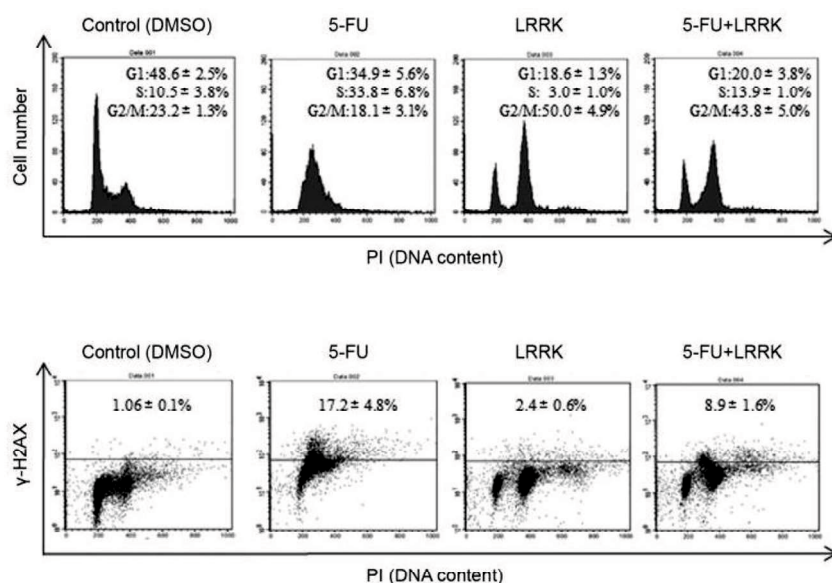


図 2. 細胞周期および DNA 損傷に対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用処理による影響 24 時間の血清飢餓の後、COLO-320 細胞をコントロール (DMSO)、5-FU (10 μ M)、LRRK (50 μ M) 単剤、または 5-FU (10 μ M) と LRRK (50 μ M) の併用で 48 時間処理し、FACS 解析を行った。横軸はヨウ化プロピディウム (PI) 染色強度を示す。縦軸は細胞数 (上部パネル)、 γ -H2AX の発現レベル (下部パネル) を示す。 γ -H2AX 陽性細胞は、DMSO で処理された COLO-320 細胞における γ -H2AX 陽性細胞の割合が約 1%となるラインを基準として決定され

た。各上部パネルおよび下部パネルの数値は、各々、各細胞周期における細胞の割合および γ -H2AX 陽性細胞の割合を表している。数値は 3 回の実験での平均値 \pm 標準偏差を示す。

5-FU と LRRK の併用処理では、poly (ADP-ribose) polymerase1 (PARP-1) の切断が誘導されなかった。

アポトーシスに対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用による影響を調べるために、COLO-320 細胞をコントロール(DMSO)、5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用で 48 時間処理した後、ウェスタンブロッティング解析を行った。5-FU と LRRK の併用処理は、5-FU または LRRK による単剤処理と比較して、PARP-1 切断を誘導しなかった(図 3A および B)。

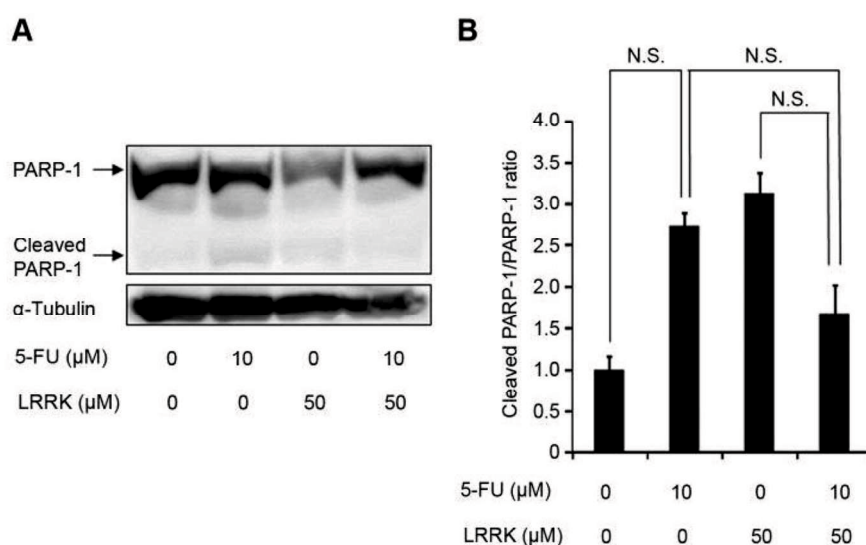


図 3. PARP-1 切断に対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用処理による影響
(A)コントロール(DMSO)、5-FU(10 μ M)、LRRK(50 μ M)単剤、または5-FU(10 μ M)とLRRK(50 μ M)の併用で48時間処理されたCOLO-320細胞から蛋白質抽出液を作製し、PARP-1、切断型PARP-1、 α -チューブリンの発現をウェスタンブロッティング解析により検出した。 α -チューブリンをローディングコントロールとして使用した。**(B)**ImageJソフトウェアを用いて各バンドの発色強度を定量した。コントロールにおけるPARP-1の発現量に対する切断型PARP-1の発現量比を基準とした。各々の棒グラフは、3回の実験での平均値 \pm 標準偏差を表している。N.S., 有意差なし。

5-FU と LRRK の併用処理は、5-FU または LRRK による単剤処理と比較して COLO-320 細胞の生存率を減少させる傾向があった。

細胞生存に対する 5-FU、LRRK 単剤、または 5-FU と LRRK の併用による影響を調べるために、COLO-320 細胞をコントロール(DMSO)、5-FU、LRRK 単剤、または 5-FU と LRRK の併

用で48時間処理した後、生細胞アッセイを行った。5-FU および LRRK の濃度(各々2 μ M および 20 μ M)は、5-FU または LRRK 単剤処理で 70-80%の細胞生存率を示した濃度に基づいて決定された。細胞生存率は、コントロールと比較して、5-FU (2 μ M) または LRRK (20 μ M) での単剤処理後に有意に減少し、5-FU と LRRK の併用処理は、5-FU または LRRK の単剤処理と比較して細胞生存率を減少させる傾向があった(図 4)。

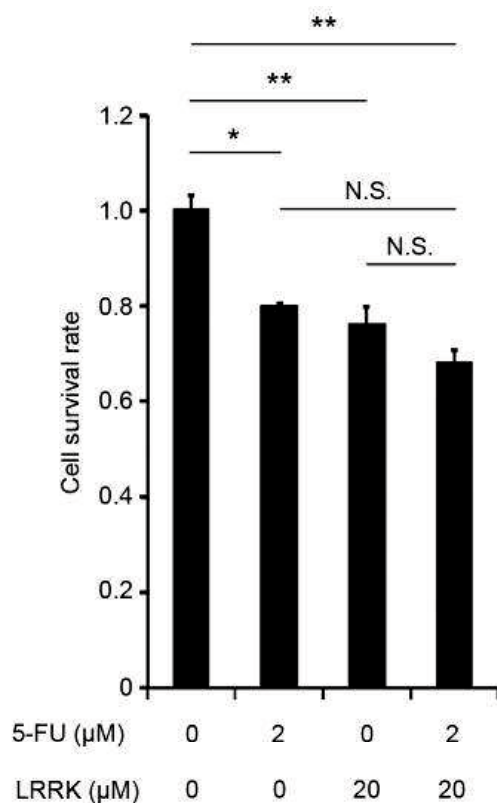


図 4. 細胞生存に対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用処理による影響

COLO-320 細胞をコントロール(DMSO)、5-FU (2 μ M)、LRRK (20 μ M) 単剤、または 5-FU (2 μ M) と LRRK (20 μ M) の併用で 48 時間処理し、生細胞アッセイを行った。コントロールにおける細胞生存率を基準とした。各々の棒グラフは、3 回の実験での平均値 \pm 標準偏差を表している。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N.S., 有意差なし。

6. 考察

我々は最近、膵臓癌細胞において、GEM の細胞傷害性効果が Dcl1 阻害によって Chk1 のリン酸化の抑制を介して増強されることを報告した(16)。GEM 単剤処理は、Chk1 のリン酸

化を介して S 期での細胞周期の停止を誘導し、そして γ -H2AX 陽性細胞の割合を増加させた。LRRK 単剤処理もまた、 γ -H2AX 陽性細胞の割合を増加させたが、細胞周期の進行は認められた。特に、GEM と LRRK の併用処理は、Chk1 のリン酸化の抑制を介して、S 期で停止させることなく、細胞周期を進行させ、GEM または LRRK 単剤処理と比較してより多くの γ -H2AX 陽性細胞を生じさせることが明らかになった (16)。

本研究において、COLO-320 細胞に対する 5-FU 単剤処理により、S 期での細胞周期の停止が誘導され、そして中程度に γ -H2AX 陽性細胞が生じた。LRRK 単剤処理は、G2/M 期における細胞の割合を増加させ、そしてほとんど γ -H2AX 陽性細胞を生じさせなかった。5-FU と LRRK の併用処理は、S 期で停止させることなく細胞周期を進行させたが、5-FU 単剤処理と比較して γ -H2AX 陽性細胞は減少した。観察された結果の違いは、GEM と 5-FU の作用機序が異なるためである可能性が考えられる。5-FU は細胞へ取り込まれた後、FdUTP、FUTP、および FdUMP に代謝される。各代謝産物の作用機序は異なっており、FdUTP は DNA 合成を阻害するとともに、誤って DNA に取り込まれる (17)。同様に、FUTP は RNA 合成を阻害するとともに、誤って RNA に取り込まれる (18、19)、FdUMP はチミジル酸合成酵素を阻害し、DNA 合成の阻害をもたらす (20)。一方、GEM はデオキシシチジン類似体であり、誤って DNA に取り込まれる (21-23)。このように、5-FU 代謝産物のうち、FdUTP のみが誤って DNA に取り込まれるのに対して、GEM はデオキシシチジンの代わりに誤って DNA に取り込まれる。それゆえ、DNA 損傷試薬と LRRK の併用効果を高めるためには、GEM のような、より多くの DNA 損傷を誘発する抗癌剤を選択することが有効であると考えられる。この可能性を検証するために、GEM と LRRK 併用処理後の COLO-320 細胞における細胞生存率が、5-FU と LRRK 併用処理と比較して減少するかどうかを検討するさらなる研究が必要である。

さらに、アポトーシス誘導に関して、LRRK (50 μ M、48 時間) または 5-FU のいずれかによる COLO-320 細胞の単剤処理は、PARP-1 切断を明確に誘導することができなかった。同様に、5-FU と LRRK による COLO-320 細胞の併用処理も、PARP-1 切断を増加させなかった。対照的に、GEM 処理により誘導されるアポトーシスに抵抗性を示すヒト膵臓癌細胞株 MIA Paca2 を用いた我々の以前の研究において、PARP-1 切断は LRRK 単剤処理 (10 μ M、48 時間) および GEM と LRRK の併用処理によって明らかに誘発された (16) ことから、COLO-320 細胞は LRRK 処理により誘導されるアポトーシスに対して抵抗性であったが、MIA Paca2 細胞はそうではなかったと考えられる。

5-FU と LRRK の併用処理は、COLO-320 細胞において PARP-1 切断を誘導することはできなかったが、5-FU または LRRK 単剤処理と比較した場合、細胞生存を減少させる傾向があった。我々は、これらの結果は用いた方法間での分析細胞の違いによるものではないかと考えている。ウェスタンブロッティング解析は、ウェル内の付着細胞の一部から調製された蛋白質抽出液を用いて行われた一方で、細胞生存アッセイは、ウェル内に存在する全ての付着細胞および浮遊した死細胞の両方を用いて行われたからである。この仮説を強化するためには、アポトーシスと細胞生存を同じ細胞集団を用いて同じ方法で分析することが必要である。

7. 結語

ヒト結腸直腸癌細胞株COLO-320に対する5-FUとLRRKの併用処理は、5-FU誘導性のChk1のリン酸化を有意に減少させ、S期での細胞周期の停止を解除し、細胞生存率を減少させる傾向に導くことが示された。したがって、我々の知見は、5-FUとの併用療法としてDcl1を標的とすることは、結腸直腸癌に対する将来の治療戦略となる可能性があることを示唆している。

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医学系研究科器官病態外科学講座、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、竹本圭宏先生(山口大学大学院医学系研究科器官病態外科学講座)、西本新先生(山口大学大学院医学系研究科医学教育学講座)、上野耕司先生(山口大学大学院医学系研究科器官病態外科学講座)に感謝申し上げます。水上洋一教授(山口大学遺伝子実験施設長)には細胞周期解析についてご指導頂き、感謝申し上げます。また、弘中紫氏には技術的協力を頂き、感謝致します。

9. 参考文献

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65: 87-108, 2015.
2. Johnson KR, Wang L, Miller MC, 3rd, Willingham MC and Fan W: 5-Fluorouracil interferes with paclitaxel cytotoxicity against human solid tumor cells. *Clin Cancer Res* 3: 1739-1745, 1997.
3. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L and Rougier P: Irinotecan combined

- with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355: 1041-1047, 2000.
4. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F and Bonetti A: Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18: 2938-2947, 2000.
 5. Christofori G: New signals from the invasive front. *Nature* 441: 444-450, 2006.
 6. Xiao, Z, Xue, J, Sowin TJ, Rosenberg SH and Zhang H: A novel mechanism of checkpoint abrogation conferred by Chk1 downregulation. *Oncogene* 24: 1403-1411, 2005.
 7. Robinson HMR, Jones R, Walker M, Zachos G, Brown R, Cassidy J and Gillespie DAF: Chk1-dependent slowing of S-phase progression protects DT40 B-lymphoma cells against killing by the nucleoside analogue 5-fluorouracil. *Oncogene* 25: 5359-5369, 2006.
 8. Fujinaka Y, Matsuoka K, Iimori M, Tuul M, Sakasai R, Yoshinaga K, Saeki H, Morita M, Kakeji Y, Gillespie DA, Yamamoto K, Takata M, Kitao H and Maehara Y: ATR-Chk1 signaling pathway and homologous recombinational repair protect cells from 5-fluorouracil cytotoxicity. *DNA repair* 11: 247-258, 2012.
 9. Martino-Echarri E, Henderson BR and Brocardo MG: Targeting the DNA replication checkpoint by pharmacologic inhibition of Chk1 kinase: a strategy to sensitize APC mutant colon cancer cells to 5-fluorouracil chemotherapy. *Oncotarget* 5: 9889-9900, 2014.
 10. Lin PT, Gleeson JG, Corbo JC, Flanagan L and Walsh CA: DCAMKL1 encodes a protein kinase with homology to doublecortin that regulates microtubule polymerization. *J Neurosci* 20: 9152-9161, 2000.
 11. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S and Chiba T: Dcl1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. *Nat Genet* 45: 98-103, 2013.
 12. Chandrakesan P, Yao J, Qu D, May R, Weygant N, Ge Y, Ali N, Sureban SM, Gude M, Vega K, Bannerman-Menson E, Xia L, Bronze M, An G and Houchen CW: Dcl1, a tumor stem cell marker, regulates pro-survival signaling and self-renewal of intestinal tumor cells. *Mol Cancer* 16: 30, 2017.
 13. Gao T, Wang M, Xu L, Wen T, Liu J and An G: DCLK1 is up-regulated and associated with metastasis and prognosis in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 142: 2131-2140, 2016.
 14. Takiyama A, Tanaka T, Kazama S, Nagata H, Kawai K, Hata K, Otani K, Nishikawa T, Sasaki K, Kaneko M, Emoto S, Muroto K, Takiyama H and Nozawa H: DCLK1

expression in colorectal polyps increases with the severity of dysplasia. *In vivo* 32: 365-371, 2018.

15. Weygant N, Qu D, Berry W, May R, Chandrakesan P, Owen DB, Sureban SM, Ali N, Janknecht R and Houchen CW: Small molecule kinase inhibitor LRRK2-IN-1 demonstrates potent activity against colorectal and pancreatic cancer through inhibition of doublecortin-like kinase 1. *Mol Cancer* 13: 103, 2014.
16. Kawamura D, Takemoto Y, Nishimoto A, Ueno K, Hosoyama T, Shirasawa B, Tanaka T, Kugimiya N, Harada E and Hamano K: Enhancement of cytotoxic effects of gemcitabine by Dclk1 inhibition through suppression of Chk1 phosphorylation in human pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 38: 3238-3244, 2017.
17. Ingraham HA, Tseng BY and Goulian M: Nucleotide levels and incorporation of 5-fluorouracil and uracil into DNA of cells treated with 5-fluorodeoxyuridine. *Mol Pharmacol* 21: 211-216, 1982.
18. Wilkinson DS, Tlsty TD and Hanas RJ: The inhibition of ribosomal RNA synthesis and maturation in Novikoff hepatoma cells by 5-fluorouridine. *Cancer Res* 35: 3014-3020, 1975.
19. Lu LW, Chiang GH, Tseng WC and Randerath K: Effects of 5-fluorouridine on modified nucleosides in mouse liver transfer RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 73: 1075-1082, 1976.
20. Hartmann KU and Heidelberger C: Studies on fluorinated pyrimidines. XIII. Inhibition of thymidylate synthetase. *J Biol Chem* 236: 3006-3013, 1961.
21. Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB and Plunkett W: Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 51: 6110-6117, 1991.
22. Bouffard DY, Laliberte J and Momparler RL: Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem Pharmacol* 45: 1857-1861, 1993.
23. Hui YF and Reitz J: Gemcitabine: a cytidine analogue active against solid tumors. *Am J Health-System Pharm* 54: 162-170, 1997.

本論文は、下記論文を和訳したものであり、下記論文のデータを引用している。

Dclk1 Inhibition Cancels 5-FU-induced Cell-cycle Arrest and Decreases Cell Survival in Colorectal Cancer., Suehiro Y, Takemoto Y, Nishimoto A, Ueno K, Shirasawa B, Tanaka T, Kugimiya N, Suga A, Harada E, Hamano K, *Anticancer Reserch*, 38, 11, 6225-6230, 2018.