

5-FU 系抗癌剤の代謝・活性化酵素遺伝子群の発現調節機構の解明と応用展開

谷本 圭司、下國 達志、右近 圭
野口 琢矢、檜山 桂子、西山 正彦

広島大学原爆放射線医科学研究所遺伝子診断・治療開発研究分野

1. はじめに

抗癌剤 5-fluorouracil (5-FU) は開発後40年以上を経過しているが、現在も消化器癌を中心とした各種固形癌治療の基本的薬剤として、癌化学療法で中心的な役割を果たしており¹⁻³⁾、5-FU やその誘導体に関し、様々な抗癌剤やバイオケミカルモジュレーター、分子標的治療薬および放射線療法との併用の試みが続けられている¹⁾。しかしながら、その効果、有害事象発現機構にはいまだ不明な点が多く、より効果が高く安全な治療の確立、そして個別化治療の実現には、詳細な分子機構の解明が必要不可欠である。

投与され腫瘍細胞内に到達した5-FU の抗腫瘍活性は、5-fluorouridine 5'-triphosphate (FUTP)、5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (FdUTP)、および 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-mono-phosphate (FdUMP) への代謝 (Anabolism) と fluoro-5, 6-dihydrouracil (FUH₂) や fluoro-β-alanine (FBAL) への分解 (Catabolism) のバランスにより制御されていると考えられている (図1)。これまでに、多くの施設、研究者によって5-FU の代謝酵素 dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) や標的分子 thymidylate synthase (TS) 等の遺伝子多型、遺伝子または蛋白発現量やその酵素活性が各種癌細胞株や臨床検体を用いて調べられ、抗癌剤の効果や有害事象との関連性が検討されてきた。その結果、それらの遺伝子発現量が5-FU 系抗癌剤の効果を規定する上で重要な因子であることが明らかにされてきた¹⁻³⁾。しかしながら、

関連酵素を含めた遺伝子群の発現動態、発現調節機構に関してはいまだ多くの点が不明のままである。我々は、5-FU または CDDP 処理による DPD 遺伝子 (*DPYD*) と TS 遺伝子 (*TYMS*) 発現変動と抗癌剤感受性について⁴⁾、*DPYD* プロモーター領域のメチル化と遺伝子発現および5-FU 感受性⁵⁾ さらに、転写因子 AP-1 による *DPYD* 転写活性化機構⁶⁾ 等、5-FU 代謝酵素遺伝子の発現調節による5-FU 感受性規定機構に注目し研究を進めてきた。

本研究では、5-FU 系抗癌剤の代謝・活性化に関わる酵素遺伝子群の発現調節機構、および代謝・活性化経路全体の動態を明らかにすることにより、分子生物学的機構を基盤としたFU系抗癌剤効果・副作用予測、さらには、効果増強・有害事象減弱を実現化する治療法の開発をめざした。

2. 方法

消化器癌・肺癌を含む39細胞株の5-FU 感受性 (IC₅₀ 値) を MTT 法にて測定した。これらの細胞株における5-FU 代謝・活性化酵素遺伝子群の発現を real-time RT-PCR 法にて測定した。さらに、5-FU、CDDP、CPT-11 処理後の大腸癌細胞株 HCC48、および、PMA と Ionomycin 処理後の胃癌細胞株 HSC42 細胞より total RNA を抽出し遺伝子発現変動解析を行った。転写制御機構の解析を行う為、大腸癌細胞株 HCC50 由来ゲノム DNA を template とし PCR 法にて *TYMS* プロ

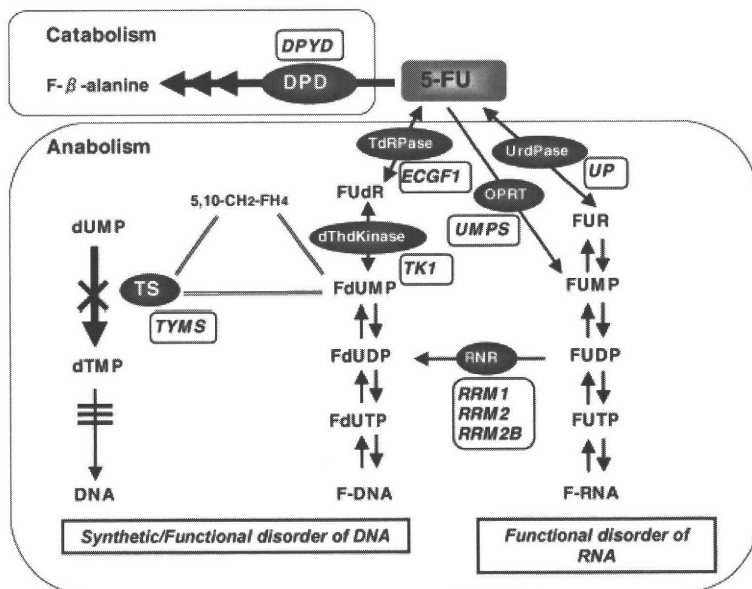


図1 5-FU代謝経路

腫瘍細胞内に到達した5-FUは様々な酵素に触媒され、その約80%は fluoro-5, 6-dihydrouracil (FUH₂) や fluoro-β-alanine (FBAL) へ分解 (Catabolism) され、残り約20%は5-fluorouridine 5'-triphosphate (FUTP)、5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (FdUTP)、および 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate (FdUMP) へ代謝 (Anabolism) され抗腫瘍効果を示す。主要な酵素をコードする遺伝子名を枠内に示した。

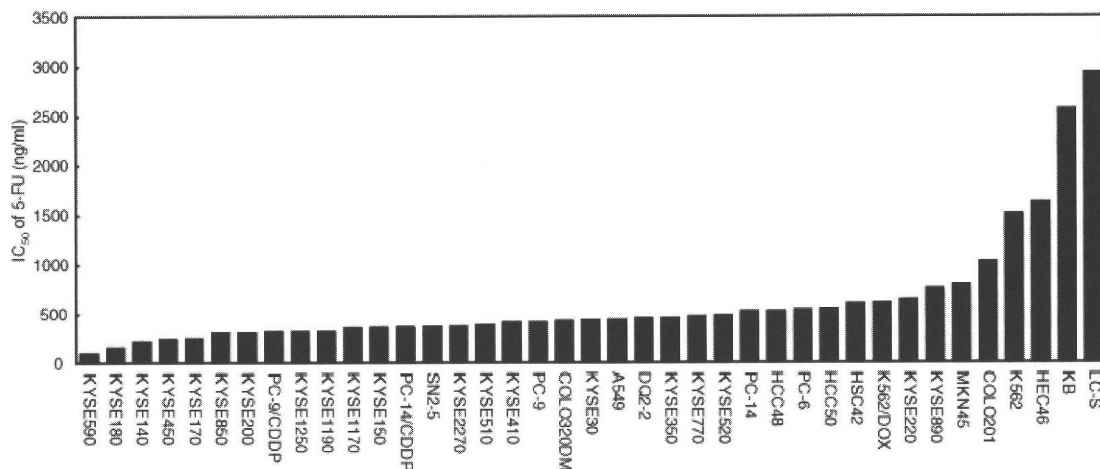


図2 39細胞株の5-FU感受性

消化器癌・肺癌を含む39細胞株の5-FU感受性をMTT法にてIC₅₀値として評価した。感受性の高い細胞から低い細胞まで、様々な細胞株の存在が示された。

モーター領域をクローニングした。さらに、同プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子と連結しレポーター遺伝子を作製し、遺伝子導入実験を行った。

3. 結果および考察

消化器癌・肺癌39細胞株の5-FU感受性をMTT法にて測定した結果、感受性は癌種によらず、細胞個々で大きく異なっていた (図2)。これらの

表1 5-FU代謝関連酵素遺伝子群発現量の相互関連性
 消化器癌・肺癌を含む39細胞株における5-FU代謝関連酵素遺伝子群の発現量をreal-time RT-PCR法にて測定した。各遺伝子発現量の相互関連性を回帰分析により検討した。表には $P < 0.05$ の相関性を示したもののみ表示した。

in vitro (39 cell lines)			
Gene1	Gene2	P	R
DPYD	-	-	-
TYMS	UMPS	0.001	0.502*
	RRM1	< 0.001	0.521*
	RRM2	< 0.001	0.567*
UMPS	UP	0.007	-0.427
	TK1	< 0.001	0.745*
	RRM1	< 0.001	0.858*
	RRM2	< 0.001	0.850*
	RRM2B	< 0.001	0.599*
UP	RRM1	0.011	-0.401
	RRM2	0.006	0.432
ECGF1	RRM2B	0.001	0.495
TK1	RRM1	0.001	0.559*
	RRM2	< 0.001	0.588*
	RRM2B	0.014	0.389
RRM1	RRM2	< 0.001	0.664*
	RRM2B	0.014	0.389
RRM2	RRM2B	< 0.001	0.533*

細胞株では、5-FUの感受性を規定する機構、特に代謝・活性化に関わる酵素遺伝子群の発現調節機構に著明な個体差があるものと考えられた。これらの細胞株における5-FU代謝・活性化酵素遺伝子群の発現をreal-time RT-PCR法にて測定したところ、UMPS、TK1、RRM1、RRM2、RRM2B、TYMS間で発現量に相関が認められた(表1)。以上の結果は、癌細胞において、5-FUの代謝に関わる遺伝子発現が協調的に行われている可能性を示唆するものと考えられる。一方、これらの遺伝子群において、単独でその発現量と5-FUのIC₅₀値に関連性を示す遺伝子は認められなかった。5-FUの感受性に強く関わると考えられる代謝経路は複数の経路、酵素の複合体であり(図1)、それらを協調的に制御する機構の全体像をとらえることの重要性を示す結果と考えられる。

我々は、これまでに、5-FU減勢酵素であるDPD遺伝子(DPYD)の発現制御に転写因子AP-1が関わっていることを報告してきた⁶⁾。す

なわち、AP-1を活性化することが知られているPMAおよびionomycin処理により処理濃度・時間依存的にHSC42細胞のDPYD発現量が増加すること、AP-1が活性化しDPYDプロモーターに直接結合しその転写を活性化することを示した(図3)。さらに、DPYD発現が増加する同条件下において、5-FUの代謝に関わる他の遺伝子発現も大きく変化することが明らかとなってきた。すなわち、PMA/ionomycin処理により、UMPS発現はほとんど変化しないが、UPとECGF1発現は増加、TYMS発現は減少することが示された(図4)。また、TYMSプロモーターレポーターの遺伝子導入実験により、PMA/ionomycin処理による発現低下は転写レベルで制御されている可能性も強く示唆された(図4)。以上の結果は、5-FUの代謝に関わる遺伝子群の協調的発現制御が転写レベルで行われている可能性を示すものといえる。

次に、5-FUと主な併用薬剤と考えられるCDDPやCPT-11処理によるこれら遺伝子群の発現変動について解析した。HCC48細胞をそれぞれの抗癌剤で処理後、12、24、48、72、96時間に回収した細胞よりtotal RNAを抽出し、real-time RT-PCR法にて発現解析を行った。その結果、抗癌剤処理により、これら遺伝子発現量は大きく変動することが明らかとなった(図5)。特に、TYMS発現は過去の報告⁴⁾と同様5-FU処理により著しく増加し、耐性獲得機構の一つと考えられた。興味深いことに、抗癌剤処理による遺伝子発現変動は5-FU、CDDPとCPT-11ではほぼ共通で、TYMS、UMPS、TK1、RRM1は発現誘導、ECGF1、UPは発現抑制されることも示された。これらの発現変動により、代謝経路の活性化が起こり、投与された5-FUから効果的にFdUMPが生成されるものと考えられるが、標的のTSも増加すると思われ、その総和がどの様に5-FU感受性へ反映されるのかについては現時点では不明である。また、以前の報告において、遺伝子発現変動には細胞特異性が示されていることから⁴⁾、そ

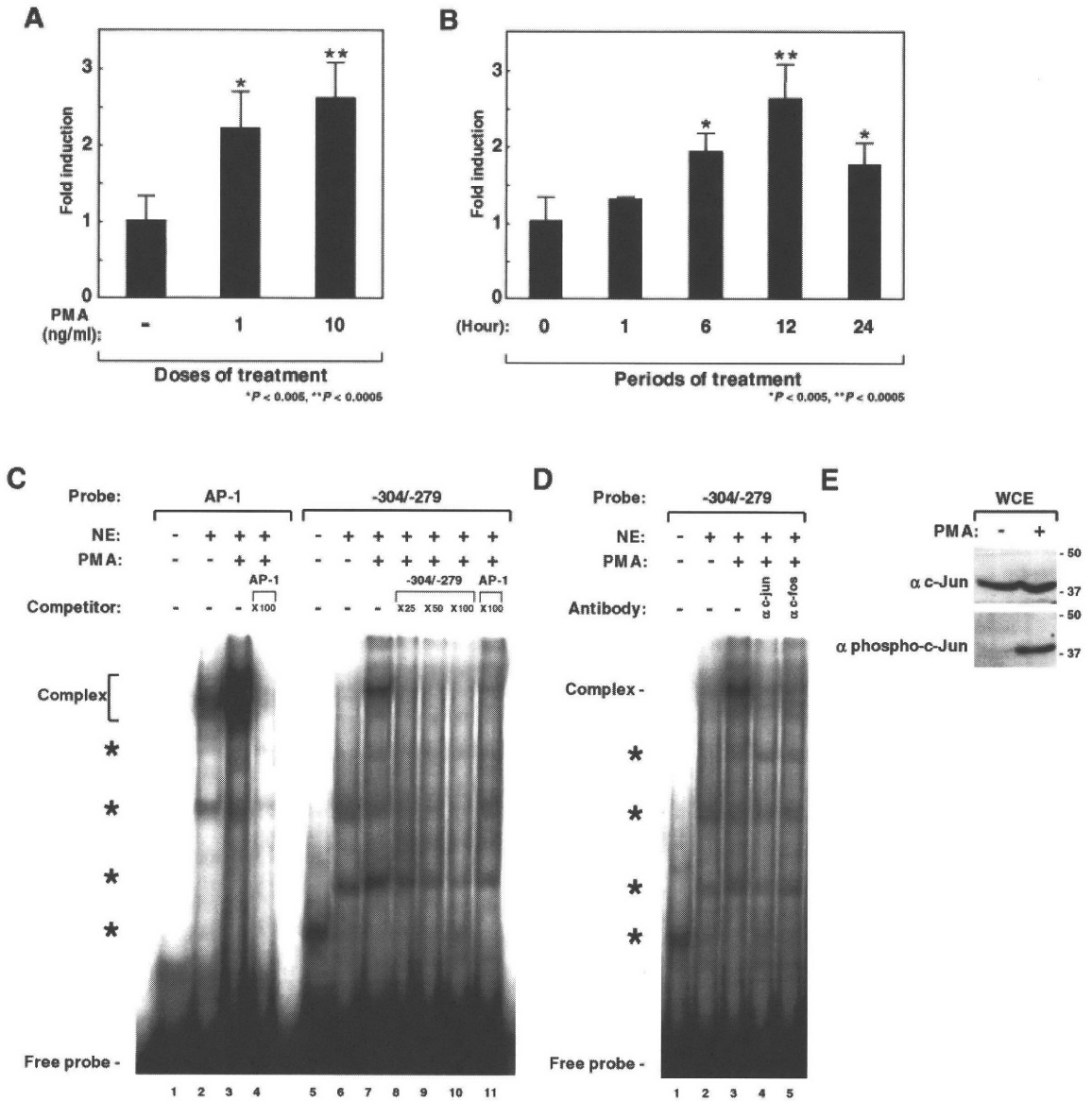


図3 PMA および ionomycin による転写因子 AP-1の活性化による DPYD 発現制御
 胃癌細胞株 HSC42を様々な濃度の PMA と0.5 μ M の ionomycin で処理後、total RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法にて DPYD 発現量を測定した。その結果、PMA の濃度依存的に (A)、処理時間依存的に (B) DPYD 発現量は増加した。同条件下の細胞核抽出液を用いた EMSA にて DPYD プロモーターに活性化した AP-1が直接結合して、転写を活性化していることが確認された (C、D、E)。(参考文献6より引用)

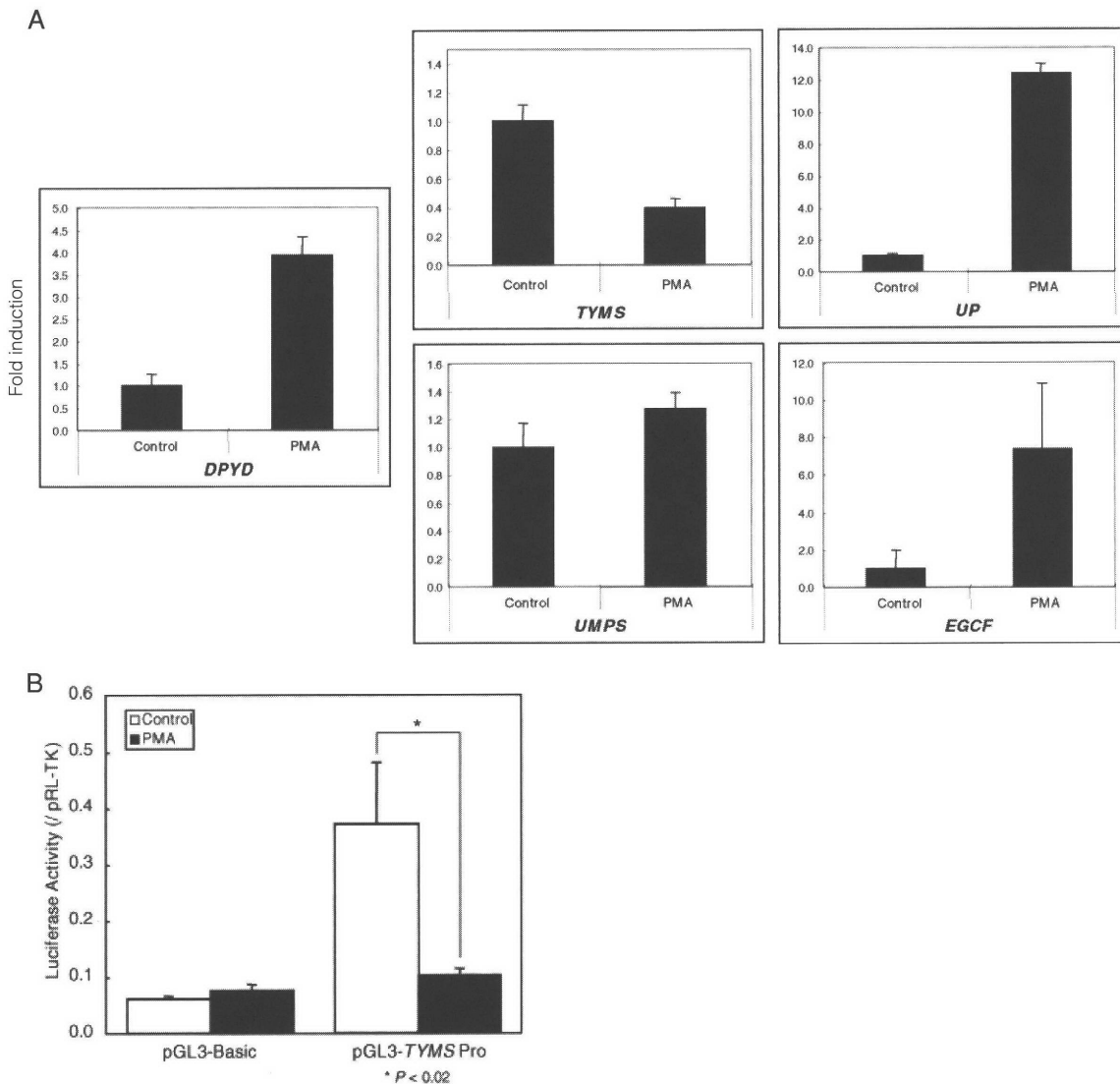


図4 PMA および ionomycin による5-FU 代謝関連酵素遺伝子発現量の変化
 胃癌細胞株 HSC42を10ng/ml の PMA と0.5 μ M の ionomycin 処理後、total RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法にて5-FU 代謝関連酵素遺伝子群の発現量を測定した。UP および ECGF1 は DPYD 同様に薬剤処理により発現量が増加したが、TYMS は逆に減少した (A)。さらに、TYMS 遺伝子プロモーターレポーターを HSC42細胞に遺伝子導入後、PMA / ionomycin 処理し、24時間後にレポーター活性を測定した。その結果、TYMS プロモーター活性は薬剤処理により有意に抑制されていた (B)。

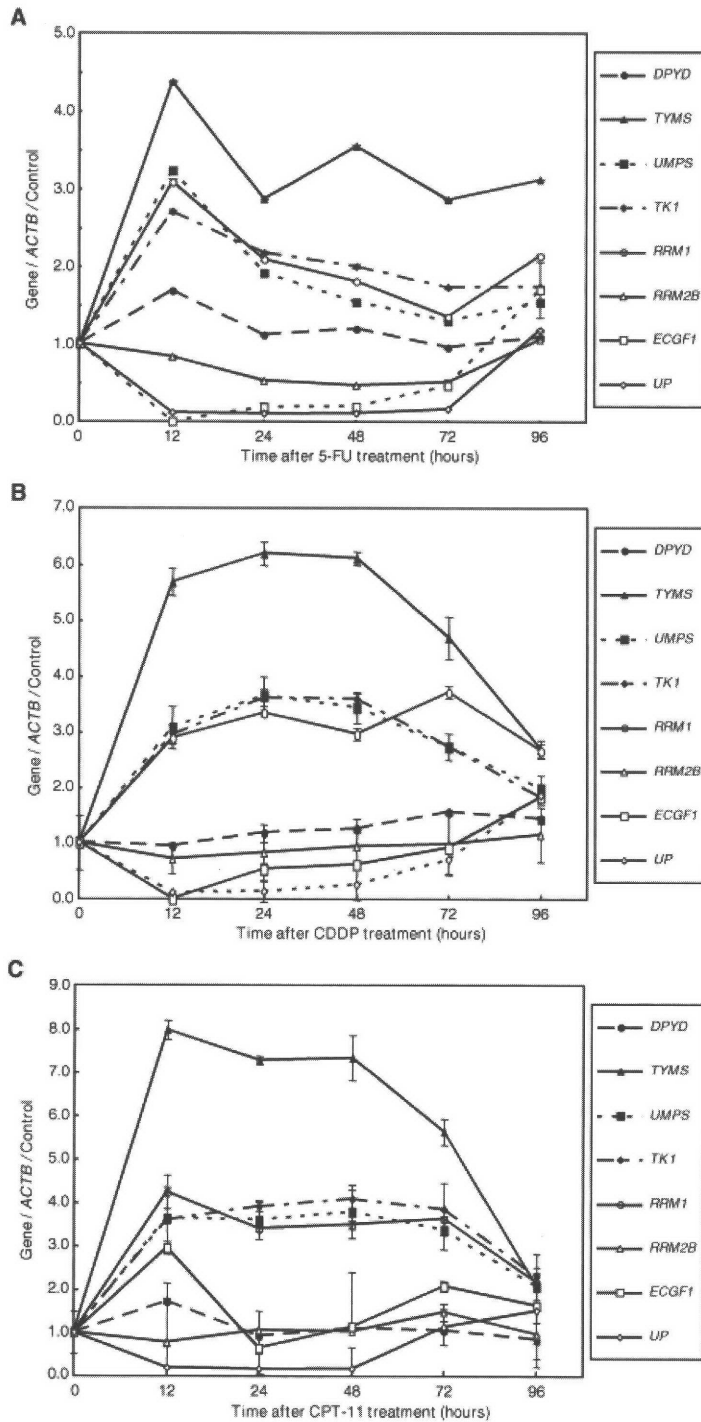


図5 抗癌剤処理による5-FU代謝関連酵素遺伝子発現量の変化
 大腸癌細胞株 HCC48を1.0µg/mlの5-FU (A)、0.3µg/mlのCDDP (B)、0.5µg/mlのCPT-11 (C)、処理後、12、24、48、72、96時間で細胞を回収、total RNAを抽出し、real-time RT-PCR法にて5-FU代謝関連酵素遺伝子群の発現量を測定した。その結果、抗癌剤処理による遺伝子発現量の大きな変動が示された。

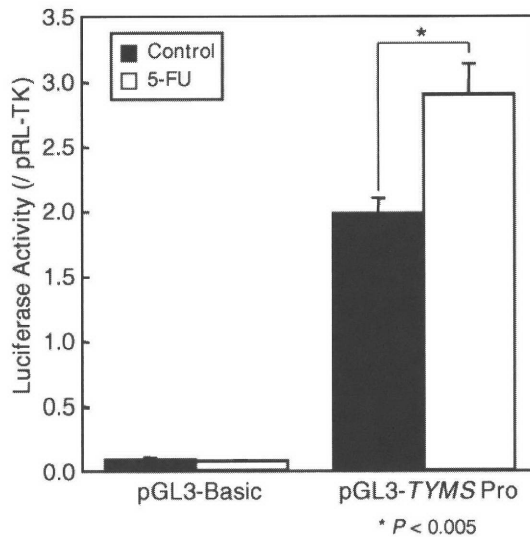


図6 5-FU 処理による *TYMS* 転写活性化
 大腸癌細胞株 HCC48 に *TYMS* プロモーターレポーターを遺伝子導入後、1.0 μ g/ml の5-FU で処理し、24時間後にルシフェラーゼレポーター活性を測定した。その結果、*TYMS* プロモーターは5-FU 処理により有意な活性化が示された。

これらの機構解明にも取り組む必要がある。

最後に、これら抗癌剤処理による発現変動が転写レベルで制御されている可能性を検討した。*TYMS* プロモーターレポーターを HCC48 細胞に遺伝子導入後、5-FU 処理を行い、プロモーター活性を測定した。その結果、5-FU 処理による *TYMS* 発現増加はそのプロモーターを介して転写レベルで調節されている可能性が示された(図6)。以上の結果より、*TYMS* プロモーター解析を通じて、5-FU 応答性の転写因子を同定し、5-FU 代謝経路の主要な制御因子を同定することが可能であると期待された。

4. まとめ

5-FU 代謝・活性化に関わる酵素遺伝子の発現解析により、これらの経路が様々な刺激に対して協調的に変動している可能性が示された。これらの発現変動は転写レベルで制御されている可能性が示されており、調節機構の解析が新しい診断・治療法開発に繋がるものと期待された。

参考文献

- 1) Rich T. A., Shepard R. C., Mosley S. T. Four Decades of Continuing Innovation With Fluorouracil: Current and Future Approaches to Fluorouracil Chemoradiation Therapy. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 2214-32.
- 2) van Kuilenburg A. B. P. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur. J. Cancer* 2004; 40: 939-50.
- 3) Adlard J. W., Richman S. D., Seymour M. T., Quirke P. Prediction of the response of colorectal cancer to systemic therapy. *Lancet Oncol.* 2002; 3: 75-82.
- 4) Nishiyama M., Yamamoto W., Park J. S., Okamoto R., *et al.* Low-Dose Cisplatin and 5-Fluorouracil in Combination Can Repress Increased Gene Expression of Cellular Resistance Determinants to Themselves. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 2620-8.
- 5) Noguchi T., Tanimoto K., Shimokuni T., Kei Ukon, *et al.* Aberrant Methylation of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene (*DPYD*) Promoter, *DPYD* Expression, and Cellular Sensitivity to 5-fluorouracil in Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 7100-7.
- 6) Ukon K., Tanimoto K., Shimokuni T., Noguchi T., *et al.* Activator Protein Accelerates Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene Transcription in Cancer Cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 1055-62.