

ヒト消化器癌における競合的PCR法による微量検体を用いたチミジル酸合成酵素mRNAの定量

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9308

ヒト消化器癌における競合的PCR法による 微量検体を用いたチミジル酸合成酵素 mRNA の定量

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

森 下 実

チミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) は、ピリミジンヌクレオチドの新たな合成系律速酵素であるとともにフッ化ピリミジン系抗癌剤の標的酵素である。本研究は、デジタル式画像解析装置 (digital image analyser, DIA) (FluorImager, Molecular Dynamics, California, USA) を用いた競合的 PCR (competitive PCR) 法による TS mRNA の定量法を確立することを目的とした。ヒト消化器癌由来継代細胞株9種、手術により摘出された胃癌15検体、大腸癌35検体、胃癌腹膜播種1検体を対象に本法による TS mRNA の定量および TS 蛋白量測定を行い、生検組織を用いた TS mRNA 定量の信頼性とその臨床的意義について検討した。なお、コントロールとして β -アクチン mRNA の定量も同様に行い、TS mRNA 量は TS mRNA/ β -アクチン mRNA 比 (TS/アクチン比) として表した。継代細胞株9種における TS/アクチン比と TS 蛋白量との間には有意な正の相関を認めた ($r = 0.85$, $p < 0.01$)。手術検体51例における TS/アクチン比は $1.63 \pm 1.57 \times 10^{-2}$ 、TS 蛋白量は 2.18 ± 1.73 pmol/g 組織重量であり、手術検体における TS/アクチン比と TS 蛋白量との間には有意な正の相関を認めた ($r = 0.57$, $p < 0.01$)。術前生検組織における TS/アクチン比と、同一症例における手術検体の TS/アクチン比との間には高い正の相関を認めた ($r = 0.94$, $p < 0.01$)。TS/アクチン比と臨床病理学的所見との比較検討では、組織学的脈管侵襲の程度別で v_3 症例が v_0 、 v_2 症例と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。また組織型別では、低分化型が高分化型と比較して有意に高い TS/アクチン比を示した ($p < 0.05$)。以上より、競合的 PCR 法を用いて測定した生検組織の TS mRNA 量は手術検体の TS mRNA 量および TS 蛋白量と高い正の相関を有することが判明した。さらに、競合的 PCR 法を用いて評価したヒト消化器癌生検標本の TS mRNA 量は、脈管侵襲などの程度を術前に予測する指標となる可能性が示唆された。

Key words human gastrointestinal cancer, thymidylate synthase, competitive PCR, digital image analyser, fluoropyrimidines

悪性腫瘍に対する化学療法は、分子生物学を中心とする基礎医学の進歩に裏付けられてその成績を着実に向上させている。とりわけ、5-フルオロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) は代謝過程とともに作用機序の解明が進み、その抗腫瘍効果の増強を目的とした生化学的調節 (biochemical modulation) の有用性が報告されている^{1,2)}。

5-FU は、1957年に Duschinsky ら³⁾ により抗腫瘍効果が確認されて以来、その誘導体も含めて消化器癌に対して広く臨床の場で使用され、現在なお最も頻用される抗癌剤の1つである。その抗腫瘍効果は、5-FU の生体内活性代謝物であるフルオロデオキシウリジン 1 燐酸 (5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate, FdUMP) とチミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) およびメチレンテトラヒドロ葉酸 (5, 10-methylenetetrahydrofolate, CH₂FH₄) の3者が安定した不活性三者結合体 (ternary complex) を形成することによる TS の阻害作

用に基づいた DNA 合成阻害^{4,5)}、フルオロウリジン 3 燐酸を介した RNA 障害^{6,7)}、5-FU がフルオロデオキシウリジン 3 燐酸に代謝され直接 DNA に取り込まれることによる DNA 機能障害⁸⁾ により発現するとされている。これらのうち臨床用量では、FdUMP による TS 阻害が細胞毒性を発揮する主たる機序であると考えられている^{9,10)}。このため TS は、臨床においてもフッ化ピリミジン系抗癌剤の標的酵素として注目されるに至っている。

FdUMP の前代謝物であるフルオロデオキシウリジン (5-fluorodeoxyuridine, FdUrd) を用いた研究では、TS 蛋白量が少ない腫瘍ほど FdUrd に対する感受性が高く¹¹⁾、逆に FdUrd 耐性を獲得した腫瘍細胞の TS 蛋白量は多い^{12,13)}。したがって、臨床例における癌組織の TS 蛋白量の測定は 5-FU に対する感受性予測と、腫瘍細胞内外の環境に応じた併用薬剤選択の指標になると考えられる。現在、腫瘍組織の TS 蛋白量の測定には、³H-

平成10年3月18日受付, 平成10年5月6日受理

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CDDP, cis-dichlorodiammineplatinum (II); CH₂FH₄, 5,10-methylenetetrahydrofolate; DIA, digital image analyser; DTT, dithiothreitol; FdUMP, 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate; FdUrd, 5-fluoro-2'-deoxyuridine; FH₄, tetrahydrofolate; 5-FU, 5-fluorouracil; LV, leucovorin; PBS,

FdUMPを用いたバインディングアッセイが広く行われている¹⁴⁾。しかし、バインディングアッセイには大量の組織を要するため、術前の生検組織を用いた評価は困難である。このため正確かつ簡便に微量検体からTS蛋白量を評価し得る方法の開発が望まれる。

近年、逆転写酵素によるcDNA合成反応とPCR法を組み合わせた逆転写酵素-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法が、微量検体のRNAの検出を可能とした¹⁵⁾¹⁶⁾。さらにこの手法を応用して様々な定量法が試みられているが、その中でも信頼性の高い定量的PCR法が、人工的に作成した内部コントロール (コンペティター) を用いた競合的PCR (competitive PCR) 法である¹⁷⁾¹⁸⁾。

本研究では、ヒト消化器癌由来継代細胞株、ヒト消化器癌組織および術前生検組織を用いて競合的PCR法によるTS mRNAの定量およびTS蛋白量の測定を行い、微量検体を用いて測定したTS mRNA量とTS蛋白量の相関性を検討した。さらに、臨床検体におけるTS mRNA量と臨床病理学的所見との関連性について検討した。

対象および方法

I. 細胞培養および臨床検体

1. 使用細胞とその培養条件

金沢大学癌研究所化学療法部 (佐々木琢磨教授) から供与を受けたヒト消化器癌由来継代細胞株MKN28, MKN45, NUGC3, TMK1, NKPS, Colo201, HT29, SW480, SW620の9種を、それぞれ75cm²のフラスコ内で培養した。培養液には、RPMI-1640培地 (Gibco, Grand Island, USA) に10%ウシ胎児血清 (Gibco), 100単位/mlペニシリン (コスモバイオ, 東京), 100 μg/mlストレプトマイシン (コスモバイオ) を添加したものを使用した。培養細胞は5%炭酸ガス通気の培養装置内において37℃で培養し、対数増殖期にある細胞を1×磷酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) にて2回洗浄後、トリプシンEDTA (0.05%トリプシン, 0.53mM EDTA) でハーベスト、遠心後、1×PBSにて1回洗浄をおこなった。遠沈させた細胞は解析に使用するまで-80℃に保存した。

2. 臨床検体

金沢大学医学部附属病院第一外科および関連病院にて手術により切除された術前化学療法を施行されていない胃癌15検体、

大腸癌35検体、胃癌腹膜播種1検体 (男性30例, 女性21例, 平均年齢65.8歳) および大腸癌35検体のうち術前に内視鏡的に採取した生検組織9検体を対象とした。

II. 総RNAの抽出

1. 継代細胞株および手術検体

継代細胞株および手術検体に対してはグアニジンフェノール・クロロフォルム法²⁰⁾を一部改変して総RNAを抽出した。すなわち、継代細胞株、胃癌組織、大腸癌組織、胃癌腹膜播種組織をD溶液 [4Mグアニジンチオシアン酸塩, 25mMクエン酸ナトリウム (pH7.0), 0.5%サルコシル, 0.1M 2-メルカプトエタノール] 4mlでホモジナイズした後、2M酢酸ナトリウム (pH 4.0) 600 μl, TE緩衝液飽和フェノール4ml, クロロフォルム1.2mlを順次加えながらそのつど攪拌し、15分間氷中に静置した。その後、3000rpm, 40分間遠心分離後その上清を回収し、2プロパノール4mlを加え混合後-20℃に1時間静置した。次に3000rpm, 40分間遠心分離しその上層を捨てベレットにD溶液400 μlを加え溶解した。2プロパノール400 μlを加え攪拌した後5000rpm, 10分間遠心分離し、RNAを沈澱として得た。沈澱は80%エタノールで洗い、減圧乾固させた後に300 μlの蒸留水に溶解した。260nmの吸光度を測定し総RNA濃度を算出した。

2. 生検組織

生検組織の総RNAの抽出については、アイソジェン (Isogen) (ニッポンジーン, 富山) を用いて行った。すなわち、組織100mgあたり1mlの割合でアイソジェンを加えホモジナイズ後、クロロフォルムを組織100mgあたり0.2mlの割合で加えて混和し、4℃, 12,000rpm, 10分間遠心分離した。上清を回収し、2プロパノール0.15mlを加え混合後、4℃, 10,000rpm, 20分間遠心分離し、RNAを沈澱として得た。沈澱は80%エタノールで洗い、減圧乾固させた後に30 μlの蒸留水に溶解した。

III. 競合的PCR法

1. TS競合鋳型DNA (TSコンペティター) の作成

TSコンペティターの作成はCeliら²¹⁾の方法に準じた。原理は鋳型DNA上でn塩基対外側のDNA配列を付加したプライマーでPCR反応を行うことにより、n塩基対短くなったコンペティターを作成することができるというものである。TSに対して特異的なPCRプライマーTS04, TS7およびTSコンペティタ

Table 1. Primers used for competitor construction, PCR of TS and β-actin gene

Primer designation	Length (base pairs)	Sequence 5'→3'
TS04	20	GCTAAAGAGCTGTCTTCCAA
TS7	20	ATGTCTCCCGATCTCTGGTA
TS14	40	ATGTCTCCCGATCTCTGGTAAACTGGCAGAGGGCATGGCA
ACT5	20	TTGAAGGTAGTTTCGTGGAT
ACT7	20	ACTGACTACCTCATGAAGAT
ACT14	40	ACTGACTACCTCATGAAGATGCGGAAATCGTGCGTGACA

TS04, TS gene-specific sense primer; TS7, TS gene-specific antisense primer; TS14, antisense primer for competitive template construction; ACT5, β-actin gene-specific sense primer; ACT7, β-actin gene-specific antisense primer; ACT14, antisense primer for competitive template construction.

phosphate-buffered saline; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; TCA, trichloroacetic acid; TK, thymidine kinase; TS, thymidylate synthase

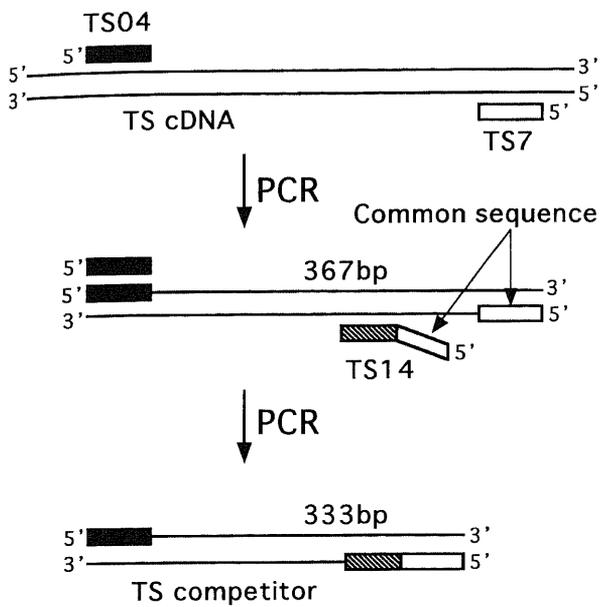


Fig. 1. Schema of the procedure of TS competitor construction. TS04, TS7 and TS14 primer are shown in Table 1.

一作用用プライマーTS14を設計した(表1)。プライマーの合成はバイオロジカ(名古屋)に委託した。国立遺伝学研究所瀬野博士から供与を受けたヒトTS cDNAをTS04, TS7プライマーでPCR反応にて増幅した。PCR反応液を低融点アガロースゲル(Agarose L, ニッポンジーン)で泳動し、367塩基対のDNAを切り出しフェノール・クロロホルム抽出した。抽出したDNAを次にTS04, TS14プライマーでPCR反応にて増幅した。PCR反応液を低融点アガロースゲルで泳動し、333塩基対のDNAを切り出しフェノール・クロロホルム抽出し、これをTSコンペティターとした(図1)。この方法によりTS mRNAより34塩基対短く、ほぼ同一の塩基配列を有するTSコンペティターが作成された。

2. β -アクチンコンペティターの作成

β -アクチンコンペティターは、TSコンペティターと同様の手順で作成した。 β -アクチンmRNAのRT-PCR産物が284塩基対、 β -アクチンコンペティターが245塩基対となるように β -アクチンに対して特異的なPCRプライマーACT5, ACT7および β -アクチンコンペティター作成用プライマーACT14を設計した(表1)。なお、 β -アクチンコンペティターの作成には手術検体のmRNAより逆転写酵素反応にて得たcDNAを用いた。

3. cDNA合成

継代細胞株、手術検体および生検組織より抽出したRNAを鋳型としてcDNA合成をおこなった。すなわち、RNA $5 \mu\text{l}$ ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$)にオリゴデオキシチミジンプライマー [Oligo (dT)¹²⁻¹⁸ Primer, Gibco] $100 \mu\text{l}/\text{mg}$ を $2.5 \mu\text{l}$ に加え、 68°C で15分間変性させた後、 4°C まで冷却した。引き続き10倍RT緩衝液 [50mM Tris-HCl (Sigma, St. Louis, USA) (pH8.3), 40mM 塩化カリウム, 8mM 塩化マグネシウム] $2 \mu\text{l}$, 0.5mM デオキシリボヌクレオチド三リン酸 $4 \mu\text{l}$, 225 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) $0.2 \mu\text{l}$, 1mM ジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT) $1 \mu\text{l}$, RNA分解酵素阻害因子 (RNasin, Promega, Madison, USA) 20単位 ($0.2 \mu\text{l}$)、さらに逆

転写酵素 (avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, Life Sciences Inc., St. Petersburg, USA) 8単位 ($0.2 \mu\text{l}$) を加え、滅菌蒸留水で総量 $12.5 \mu\text{l}$ とし、 42°C で60分間反応させcDNAを合成させた後、 95°C , 5分間で逆転写酵素を失活させた。

4. 競合的PCR反応

鋳型DNA $1 \mu\text{l}$ に対して段階希釈したコンペティター (TSは2倍希釈、 β -アクチンは3倍希釈) を $5 \mu\text{l}$ ずつと $10 \times$ PCR反応緩衝液 [100mM Tris-HCl (pH8.8), 500mM 塩化カリウム, 15mM 塩化マグネシウム, 1% トリトンX-100] $5 \mu\text{l}$, dATP, dGTP, dCTP, dTTP各8nmol, Taq DNAポリメラーゼ1単位 (いずれもニッポンジーン) および、プライマーTS04, TS7を20pmolずつに加え、滅菌蒸留水にて計 $40 \mu\text{l}$ とした。蒸発を防ぐためミネラルオイル (Sigma) $25 \mu\text{l}$ を重層し、Program Temp. Control System PC-800 (アステック, 福岡) を使用して、 94°C 3分間の初期変性の後、 94°C 40秒間の熱変性、 56°C 1分間のアニーリング、 72°C 1分間のDNA伸長反応を1サイクルとし、30サイクルの増幅を行った。競合的PCR反応終了後、各産物の $10 \mu\text{l}$ に対し $3 \mu\text{l}$ の色素緩衝液 (0.02% プロモフェノールブルー, 0.02% キシレンシアノール, 50% グリセロール, 1% ドデシル硫酸ナトリウム) を加え、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を含む、4% アガロースゲル (Agarose X, ニッポンジーン) にて電気泳動を行った。電気泳動装置はミュージッド-2 (アドバンス, 東京) を使用し、100V定電圧下で泳動した。

5. DIAによる解析定量

競合的PCR法による産物は、泳動後デジタル式画像解析装置 (digital image analyser, DIA) (FluorImager, Molecular Dynamics, California, USA) に取り込み、画像解析ソフトウェア (ImageQuant, Molecular Dynamics) によりエチジウムブロマイドにて発光させたバンドひとつひとつの強度を数値化し、解析定量を行った。すなわち、バックグラウンドで補正したコンペティターの強度とそれぞれに対応した目的遺伝子の強度の比を縦軸に、コンペティターの量を横軸にとり両対数グラフにプロットし、コンペティターとターゲットの強度の比が等しくなるコンペティターの量を、目的遺伝子の量とした。TS mRNA, β -アクチン mRNA をそれぞれ定量し、TS mRNA量はTS mRNA/ β -アクチン mRNA比 (以下TS/アクチン比) として表した。

IV. ^3H -FdUMPの調製

1. 吉田肉腫からのチミジン燐酸化酵素 (thymidine kinase, TK) 溶液の調整

吉田肉腫2gにTK用懸濁緩衝液 [0.25M 蔗糖, 50mM 塩化マグネシウム, 1mM DTT, 50mM Tris-HCl (pH 8.0)] を加え粗碎懸濁し、40,000rpm, 60分間遠心分離した。この上清を上述の緩衝液にて1晩透析後、12,000rpm, 20分間遠心分離し、上清をTK溶液とした。

2. 酵素反応による ^3H -FdUMPの生成と分離

^3H -FdUrd ($17.9\text{Ci}/\text{mmol}$, $1\text{mCi}/\text{ml}$, NEN, 東京) $500 \mu\text{Ci}$ をロータリーエバポレーターにて減圧乾固し、TK用補因子溶液 [0.1M 塩化マグネシウムを含む0.5M Tris-HCl (pH 8.0) 溶液, 100mM ATP溶液, 120mM α -グリセロール燐酸溶液の1:1:1混合液] 0.2ml を加え溶解した。これに上記のTK溶液 0.8ml を加え 37°C で1時間反応させた。その後蒸留水 1ml , 20% トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) 0.5ml を加え3000rpm,

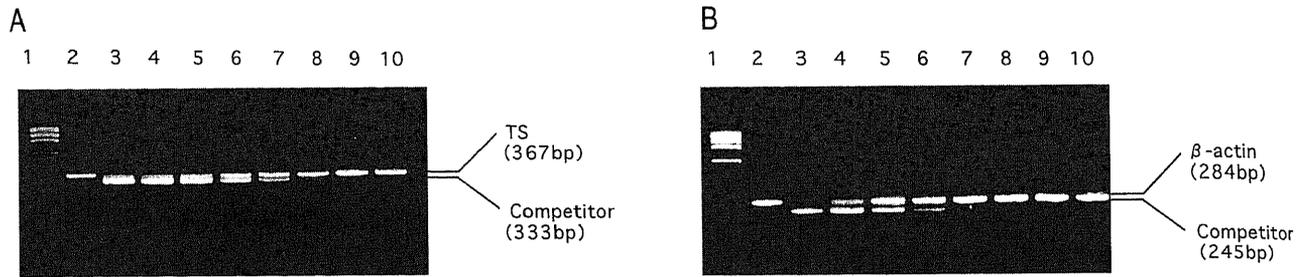


Fig 2. Photograph of ethidium bromide-stained gel of competitive PCR product. (A) Quantification of TS mRNA by competitive PCR. Size markers (ϕ X174DNA/Hae III) are shown in lane 1. The positive control is shown in lane 2. The amount of competitor was 1434×10^{-6} pmol (lane 3), 717×10^{-6} pmol (lane 4), 358.5×10^{-6} pmol (lane 5), 179.3×10^{-6} pmol (lane 6), 89.6×10^{-6} pmol (lane 7), 44.8×10^{-6} pmol (lane 8), 22.4×10^{-6} pmol (lane 9), 11.2×10^{-6} pmol (lane 10). (B) Quantification of β -actin mRNA by competitive PCR. Size markers (ϕ X174DNA/Hae III) are shown in lane 1. The positive control is shown in lane 2. The amount of competitor was 4145.3×10^{-5} pmol (lane 3), 1381.8×10^{-5} pmol (lane 4), 460.6×10^{-5} pmol (lane 5), 153.5×10^{-5} pmol (lane 6), 51.2×10^{-5} pmol (lane 7), 17.1×10^{-5} pmol (lane 8), 5.7×10^{-5} pmol (lane 9), 1.9×10^{-5} pmol (lane 10).

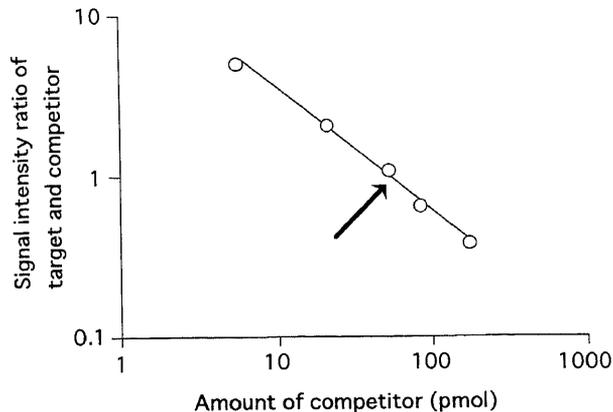


Fig 3. The method of the quantitative determination of TS mRNA by competitive PCR. The signal intensities of competitive PCR product stained by ethidium bromide were measured using a digital image analyser (FluorImager). The ratio of the amplified target to the amplified competitor were plotted against the amount of the competitor used for the assay. The equivalent of titration is shown as an arrow.

10分間遠心分離し上清にTCA除去剤(17.7% トリ-n-オクチラミンを含む1, 1, 2-トリクロロトリフクロエタン溶液) 2~3mlを加え10分間振盪し, 3000rpm, 5分間遠心分離した。この上清をセルロースプレート(Merck, フランクフルト, 独)にスポットし1M酢酸:1M塩化リチウム混液(1:1)で展開しFdUMP画分をかきとり0.2M蟻酸アンモニウム(pH 5.0) 2mlを加え抽出, ^3H -FdUMPを得た。

V. TS蛋白質量の測定

TS蛋白質量の測定はSpearsら²²⁾の方法に従った。すなわち, 臨床検体では腫瘍組織300~500mgを4倍量のTS用懸濁緩衝液[0.2M 2-メルカプトエタノール, 15mM CMP, 100mM フッ化ナトリウム]で組碎懸濁し, 40,000rpmで60分間遠心分離後, その上清を酵素溶液とした。この酵素溶液0.1mlに緩衝液A[0.6M炭酸水素アンモニウム(pH 8.0), 0.2Mメルカプトエタノール, 0.1Mフッ化ナトリウム, 15mM CMP] 0.1ml, ^3H -FdUMP 0.1ml, 補因子溶液B[2mM テトラヒドロ葉酸

(tetrahydrofolate, FH₄), 16mMアスコルビン酸塩, 9mMホルマリン, 15mM CMP, 20mMメルカプトエタノール, 100mMフッ化ナトリウム, 2% BSA, 50mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)] 0.05mlを順次加え覚拌し, 30°Cで20分間反応させTS, ^3H -FdUMP, CH₂FH₄の三者結合体を形成させた。この反応液に10% TCA 0.35mlを加え反応を停止させ遠心分離し, さらに沈澱を5% TCA 1mlで2回懸濁・遠心した。分離した沈澱に蟻酸0.5mlを加え, 全量をバイアルに入れACS-IIシンチレーター(アマシャム・ジャパン, 東京) 10mlを加えシンチレーションカウンター(アロカLSC-1000, アロカ, 東京)にて放射活性を測定し, 組織1gあたりのTS量を定量した。継代細胞株においては 1×10^7 細胞あたり1mlのTS用懸濁緩衝液にて組碎懸濁し酵素溶液を得た。臨床検体と同様に測定を行い, 酵素溶液中の単位蛋白量あたりのTS量を定量した。酵素溶液中の総蛋白量はバイオラッドプロテインアッセイキット(Bio-Rad, Richmond, USA)を用いて測定した。

VI. 統計処理

測定値はすべて平均値±標準偏差で示した。二群間の平均値の差の検定には, Studentのt検定を用い, 多群間の平均値の差の検定には一元配置分散分析法の後, ScheffeのF検定を用い, 危険率5%未満の場合に有意差ありとした。また, 相関の有意性の検定はPearsonの相関係数を求め行った。

なお胃癌, 大腸癌の所見の記載はそれぞれ胃癌取扱い規約²³⁾, 大腸癌取扱い規約²⁴⁾に従った。

成 績

I. 競合的PCR法によるTS mRNAの定量

1. 競合的PCR法とDIAによる定量

既知量のTSコンペティターを作成し, 実際に競合的PCRによる産物の電気泳動を行った(図2A)。電気泳動の結果, 1つのチューブ内で367塩基対のTS mRNAと333塩基対のTSコンペティターのそれぞれのバンドが検出された。段階希釈したコンペティターでは, エチジウムブロマイドによって発光したバンドの強度はその量と一致し次第に減弱した。一方, ターゲットとなるTS mRNAのバンドの強度は反対に次第に増強し, 両者のバンドの強度が等しくなるTSコンペティターの量は肉眼的にも概ね予測可能であった。初期実験結果より, TSコンペ

ィターの量は1/2倍ずつ7段階希釈で 1434×10^{-6} pmolから 11.2×10^{-6} pmolの範囲に設定した。また求めるTS mRNAの量がこの系列から外れた場合はコンペティターの量の範囲を変更し、再度競合的PCR法を行った。 β -アクチンの競合的PCR法による産物の電気泳動も同様の結果が得られた(図2B)。 β -アクチンコンペティターの量は1/3倍ずつ7段階希釈で 4145.3×10^{-5} pmolから 1.9×10^{-5} pmolの範囲に設定した。

電気泳動終了後、DIAに取り込み画像解析ソフトウェアによる解析を行った。画像解析ソフトウェアによりそれぞれのバンドの強度を数値化し、バックグラウンドの強度で補正した後、両対数グラフの縦軸をコンペティターの強度とそれぞれに対応した目的遺伝子の強度の比、横軸をコンペティターの量とし5点プロットした(図3)。プロットした5点はほぼ直線上に位置し

ていた。

2. 競合的PCR法によるTS mRNA定量の正確性

既知量のヒトTS cDNA (702.25 pmol) を用いて、希釈なし、2倍希釈、4倍希釈、8倍希釈に対して競合的PCR法による定量を行った。測定の結果はほぼ既知量と一致した(図4A)。既知量のヒトTS cDNAに対し、PCRのサイクル数を変更してそれぞれ競合的PCR法による解析定量を行った。25サイクル、30サイクル、35サイクル、40サイクルと異なったサイクル数においてもほぼ同一の定量結果であった(図4B)。

II. 継代細胞株におけるTS/アクチン比とTS蛋白量の検討

継代細胞株9検体におけるTS mRNA量は $354 \pm 240 \times 10^{-6}$ pmol/mg全RNA、 β -アクチンmRNA量は $258 \pm 78 \times 10^{-4}$ pmol/mg全RNA、TS/アクチン比は $1.37 \pm 0.69 \times 10^{-2}$ であった。

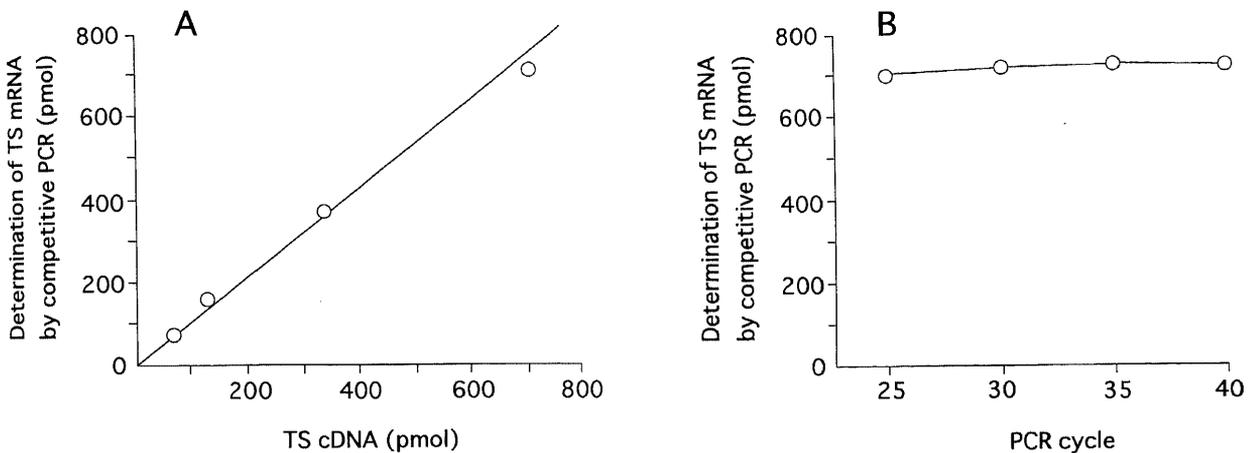


Fig 4. Study of the accuracy of quantification by competitive PCR. (A) Relationship between the amount of TS cDNA (705, 352, 176, 88 pmol) and the determination by competitive PCR. The expressed line is the liner regression line ($r = 0.99$, $p < 0.01$) formed from the data points between TS cDNA and its quantification by competitive PCR. (B) The TS cDNA (705 pmol) was quantified by competitive PCR with difference of PCR cycle (25, 30, 35 and 40 cycle). The amounts of TS cDNA by different competitive PCR cycle were nearly identical in all PCR cycles.

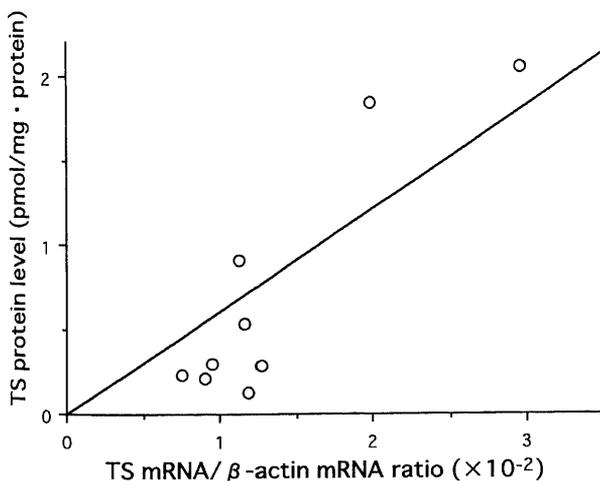


Fig 5. Relationship between TS protein level and TS mRNA/ β -actin mRNA ratio in cell lines. The liner regression line formed from the data points is shown in TS protein level versus TS mRNA/ β -actin mRNA ratio ($r = 0.85$, $p < 0.01$).

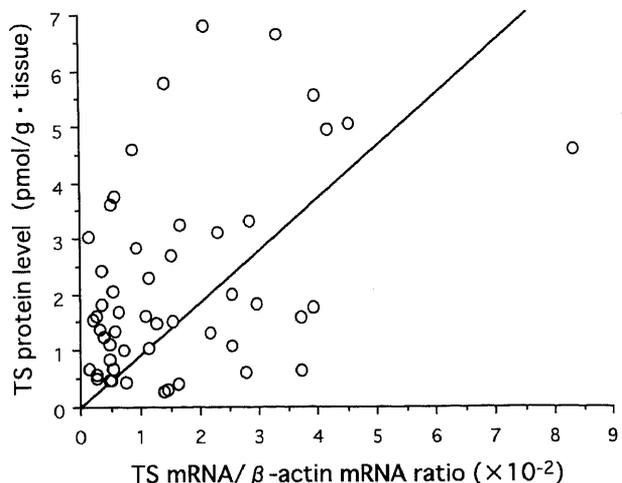


Fig 6. Relationship between TS protein level and the TS mRNA/ β -actin mRNA ratio in surgical specimens of colorectal and gastric cancers and peritoneal dissemination. The liner regression line formed from the data points is shown in TS protein level versus TS mRNA/ β -actin mRNA ratio ($r = 0.57$, $p < 0.01$).

た。またTS蛋白質量は 0.72 ± 0.73 pmol/mg蛋白質であった。継代細胞株におけるTS/アクチン比とTS蛋白質量との間には有意な正の相関がみられた($r = 0.85, p < 0.01$) (図5)。

Ⅲ. 手術検体におけるTS/アクチン比とTS蛋白質量の検討

手術検体51例におけるTS mRNA量は $31.8 \pm 54.7 \times 10^{-6}$

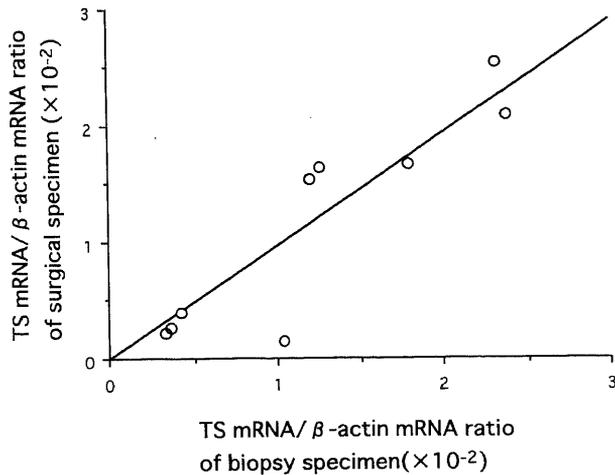


Fig 7. Relationship between TS mRNA/ β -actin mRNA ratio in surgical specimens and the TS mRNA/ β -actin mRNA ratio in biopsy specimens of colorectal cancer. The liner regression line formed from the data points is shown in TS mRNA/ β -actin mRNA ratio in surgical specimens versus TS mRNA/ β -actin mRNA ratio in biopsy specimens ($r = 0.94, p < 0.01$).

pmol/mg全RNA, β -アクチン mRNA量は $209 \pm 230 \times 10^{-5}$ pmol/mg全RNA, TS/アクチン比は $1.63 \pm 1.57 \times 10^{-2}$ であった。TS蛋白質量は 2.18 ± 1.73 pmol/g組織重量であった。手術検体におけるTS/アクチン比とTS蛋白質量との間には有意な正の相関がみられた($r = 0.57, p < 0.01$) (図6)。

Ⅳ. 術前生検組織と手術検体におけるTS/アクチン比の検討

術前生検組織におけるTS/アクチン比は $1.24 \pm 0.80 \times 10^{-2}$ であった。同一症例における手術検体のTS/アクチン比と生検組織におけるTS/アクチン比の間には有意な正の相関がみられた($r = 0.94, p < 0.01$) (図7)。

Ⅴ. 臨床病理学的検討

胃癌15例, 大腸癌35例について性別, 臓器別, 組織学的リンパ節転移の有無, 組織学的リンパ管侵襲の程度, 組織学的脈管侵襲の程度別, 組織型別について検討した。TS/アクチン比は性別, 臓器別, 組織学的リンパ節転移の有無, 組織学的リンパ管侵襲の程度別では有意な差を認めなかったが, 組織学的脈管侵襲の程度別では v_3 症例が v_0, v_2 症例に対して有意に高値を示した($p < 0.05$)。また組織型別では低分化型が高分化型と比較して有意に高いTS/アクチン比を示した($p < 0.05$)。TS蛋白質量は性別, 臓器別, 組織学的リンパ節転移の有無, 組織学的リンパ管侵襲の程度別, 組織学的脈管侵襲の程度別では有意な差を認めなかった。一方, 組織型別では低分化型が高分化型に対して有意に高いTS蛋白質量を示し($p < 0.01$)。中分化型と比較しても有意に高値であった($p < 0.05$)。組織型別にTS/アクチン比とTS蛋白質量を見ると, いずれも低分化型で最高値を, 高分化型で最低値を示し, 二者の間には強い類似性が認められた(表2)。

Table 2. Relationship of TS mRNA/ β -actin mRNA ratio, TS protein level and clinicopathologic factors

Variable	Classification	Number of cases	TS mRNA/ β -actin mRNA ratio ($\bar{x} \pm SD, \times 10^{-2}$)	TS protein level ($\bar{x} \pm SD, \text{pmol/g} \cdot \text{tissue}$)
Sex	Male	30	1.57 ± 1.67	2.18 ± 1.73
	Female	20	1.59 ± 1.39	2.01 ± 1.63
Sample	Stomach	15	2.13 ± 2.18	2.68 ± 2.12
	Colon	35	1.41 ± 1.23	2.02 ± 1.51
n ^{a)}	(-)	18	1.51 ± 1.12	2.44 ± 1.67
	(+)	32	1.69 ± 1.81	2.09 ± 1.77
ly ^{b)}	0	26	1.70 ± 0.33	2.22 ± 1.77
	1	13	1.55 ± 0.43	2.67 ± 1.90
	2	5	1.00 ± 0.45	1.81 ± 0.63
	3	6	1.85 ± 0.76	1.59 ± 1.83
v ^{c)}	0	40	1.56 ± 1.32	2.25 ± 1.74
	1	4	1.19 ± 1.07	1.20 ± 0.81
	2	3	0.45 ± 0.26	1.27 ± 0.26
	3	3	4.24 ± 3.62	4.06 ± 2.04
Histology ^{d)}	tub1	22	1.01 ± 0.79	1.71 ± 0.91
	tub2	18	2.00 ± 2.08	2.16 ± 1.98
	por	8	2.73 ± 1.41	3.95 ± 2.02

a) n, histological metastasis of lymph node. -, without metastasis; +, with metastasis.

b) ly, histological lymphoid invasion. 0, without invasion; 1, with slight invasion; 2, with moderate invasion; 3, with severe invasion.

c) v, histological vascular invasion. 0, without invasion; 1, with slight invasion; 2, with moderate invasion; 3, with severe invasion.

d) tub1, well differentiated adenocarcinoma; tub2, moderately differentiated adenocarcinoma; por, poorly differentiated adenocarcinoma.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p = 0.07$ by Scheffe's F test.

考 察

電子内視鏡に代表される消化管検査機器の進歩・普及は、消化器癌の早期発見、ひいてはその治療成績の向上をもたらした。しかし、高度進行癌や再発症例の予後は未だ不良である。また治療切除においても20～30%の症例に骨髄中に微小転移を認めると報告されている²⁵⁾。したがって、外科的切除のみでは治療が期待できない例や切除不能例の治療成績の向上には、化学療法が重要な役割を担うと考えられる。最近の癌化学療法法の課題は、腫瘍縮小効果のみならず延命やクオリティオブライフの改善を目標にするところにある。そのために、新規薬剤のみならず作用機序やその抗腫瘍効果に影響を及ぼす細胞内環境を考慮した化学療法の開発が精力的になされている。5-FUは、消化器癌を中心に広く臨床に用いられてきた。しかし、最近まで単剤はもちろん、他剤との併用でも十分な臨床効果を示さなかった。そのなかで、腫瘍細胞内のデオキシウリジン一燐酸やTS蛋白の高値が5-FUに対する低感受性につながる事が報告され²⁶⁾、5-FUの主たる作用機序はTS阻害にあることが広く認められるに至った。同時に、腫瘍組織内の還元型葉酸濃度を高めることが5-FUの抗腫瘍効果増強に帰結すると認識され²⁷⁾²⁸⁾、それを裏付けるように大腸癌に対する外因性葉酸(leucovorin, LV)と5-FUの併用療法の有用性が報告されている²⁹⁾。一方、シスプラチン(cis-dichlorodiammineplatinum (II), CDDP)と5-FUの併用療法が進行・再発消化器癌に高い奏効率を示すことが判明している³⁰⁾。Scanlonら³¹⁾は培養細胞を用いた実験で、CDDPの存在下では細胞膜におけるメチオニンの能動輸送が阻害され、その結果細胞内で FH_4 が生成されると報告した。 FH_4 は CH_2FH_4 の前駆体であり、CDDPと5-FUの相乗効果はCDDPによる還元型葉酸濃度上昇作用に由来していると解釈される。実際Shirasakaら³²⁾は、担癌ラットを用いた実験でCDDP投与による腫瘍組織内還元型葉酸濃度の上昇と、それに伴う5-FUの抗腫瘍効果増強を報告している。また、橋本³³⁾は担癌ラットを用いた実験で、CDDPおよびLV投与時の腫瘍組織内還元型葉酸の変化を経時的に観察し、5-FUと併用する際のCDDPは、低量を反復して投与すべきであると結論づけた。この実験結果が、現在多くの施設で行われている低量反復CDDP+5-FU療法の理論的背景になっている。このように、腫瘍細胞内の還元型葉酸濃度を上昇させTSを含む不活性三者結合体の形成率を高める試みは、臨床的にも成果をあげつつある³⁴⁾。かかる場合、標的酵素であるTSの絶対量が予め把握できれば理想的である。TS蛋白量が豊富な腫瘍細胞を死に至らしめるには、より高濃度の還元型葉酸が必要と予想されるからである。また川上³⁵⁾は、腫瘍の増殖を阻止しない程度の5-FU投与では、TS蛋白量がむしろ増加することを報告した。これらのことから、腫瘍組織内のTS蛋白量は5-FUと併用する薬剤の選択や化学療法法の効果判定に有用な情報であると考えられる。しかし、十分な検体量が得られない術前や切除不能例などでは、従来のバインディングアッセイでTS蛋白量を測定することは不可能であった。したがって、生検組織などの微量組織からTS蛋白量を評価し得る方法の確立が望まれていた。

近年、PCR法の出現により遺伝子工学は急速に発展し、TS遺伝子発現そのものを測定することが容易となった³⁶⁾。従来、ノーザンブロット法が様々な組織の遺伝子発現量を測定するための手段として用いられてきた。しかしながら、この方法は組

織からの多くのmRNA量の抽出が必要である³⁷⁾。逆転写酵素によるcDNA合成反応と組み合わせたRT-PCR法は、ノーザンブロット法などに比べてはるかに高感度であり、この手法によりこれまで検出が困難であった少量の組織や細胞中のmRNAの検出が可能となった³⁸⁾³⁹⁾。さらに、この手法を応用したmRNAの定量法として、内部標準物質を用いる方法³⁸⁾や競合的PCR法¹⁷⁾¹⁹⁾が開発された。Horikoshiら³⁸⁾は、TS mRNAを定量するために内部標準物質として β_2 ミクログロブリンを用いて別々にRT-PCR反応を実施し、各々の発現量を比較することによって、最終的なTS mRNAの発現量を測定した。さらに、消化器癌において化学療法前の腫瘍内TS mRNA量と5-FU感受性との相関を示した。RT-PCR法を用いたmRNAの定量を行う上での問題点は、mRNAの抽出効率および逆転写酵素反応の収率、PCRでの増幅効率の違い、PCRでのプラトー効果の違いである。今回、予備実験として β -アクチンmRNAを内部標準物質とし、1チューブ内でTS mRNAと同時に増幅させ、両者を比較することによりTS mRNAの定量を試みた。しかし、本研究の結果から明らかのように、 β -アクチンmRNA量に対してTS mRNA量は極めて微量である。そのため、両者がプラトーに達していないPCRサイクル数などの条件設定が極めて困難であり、すべての検体で測定可能な条件を設定することは不可能であった。またノーザンブロット法ではTS遺伝子の発現が極めて微量の場合、検出されない症例がいくつかみられた。競合的PCR法では最初にコンペティターを作成するという操作が必要となるが、一度作成すれば半永久的に多数の検体に対して使用可能である。さらに、段階希釈したコンペティターを使用することにより、プラトー効果の影響を受けず、広範囲のmRNAを定量可能であると考えられる。実際PCRサイクル数を変化させても競合的PCR法の定量結果に変化はなかった。一方、作成したコンペティターの塩基配列が目的遺伝子と大きく異なる場合、両者の増幅効率が異なる場合があり、プラトーに達する前の指数関数的増幅の時点で解析を行う必要があるという報告もみられる³⁹⁾。Diviaccoら⁴⁰⁾は、PCR反応を利用した簡便なn塩基対のDNAが挿入されたコンペティターの作成法を、Celiら²¹⁾は、同様にPCR反応を利用した、n塩基対欠失したコンペティターの作成法をそれぞれ開発した。これらの方法により、目的遺伝子とほぼ同一の塩基配列をもつコンペティターの作成が可能であり、増幅効率の問題がほぼ解消される。本研究では、Celiら²¹⁾の方法に準じてコンペティターを作成した。しかし、このコンペティターはDNAであり、RNAの抽出効率や逆転写酵素反応の収率の問題は依然として残る。したがって、正確なmRNAの定量を行うためには競合型RNAを作成⁴¹⁾するか、あるいは β -アクチンなどの内部標準物質について同様に競合的PCR法により定量を行い、目的mRNAについて行った結果と比較することが必要となる。本研究では後者を選択し、内部標準物質として β -アクチンのコンペティターをTSと同様な手技で作成し、定量を行った。この方法により先に述べた問題点が解決されたと考えられる。

初期の競合的PCR法における定量は泳動上のターゲットバンドとコンペティターバンドの強度が同一となるレーンを判定して行われていた²¹⁾。しかし、肉眼による判定は客観性に欠け誤差も大きい。このため、バンドの強度の比較にRIを用いた定量が行われ、誤差もより軽微なものとなった⁴²⁾。本研究では、電気泳動後の産物発現量の測定にDIAを使用した。その測定原

理は、暗箱内に置かれたプロットシートからの発光現象を超高感度ビデオカメラでとらえることである。発光は微弱なため、2次元のフォトンカウンティング撮像により、光子(フォトン)ひとつひとつを検出、蓄積して画像化していく。これにより、従来はRIを用いてはじめて可能であった高感度で高精度な定量法が可能となった。さらに、発現が非常に少なく肉眼的にも認識困難なバンドでも、コンピューターの設定を変えることで検出が可能である。したがって、ゲル上の産物の発現量を比較する競合的PCR法では、DIAは必要不可欠であるといえる。DIAを使用した競合的PCR法による解析では、ほぼ全例でコンペティター量とターゲット/コンペティター強度比との間には一定の関係が得られた。その際、目的遺伝子とコンペティター強度量が等しくなる点、すなわち、ターゲット/コンペティター=1となるコンペティター量を目的遺伝子の量とした。また、一定の関係が得られない場合、競合的PCR法が適切でないものと判断し、再度定量を行った。したがって、定量における誤差は非常に少ないものと考えられる。また、既知量のTS cDNAの定量においてはほぼ正確な値が得られ、かつPCRサイクル数を変えても値はほぼ一定であり、この手法の正確性、簡便性が確認された。

Johnstonら⁴³⁾は β -アクチンを内部標準物質としたRT-PCR法を用いた定量法で、胃癌、大腸癌組織のTS mRNA量とTS蛋白量との間に正の相関性を認めることを報告している。本研究でも継代細胞株9種を用い、競合的PCR法によるTS mRNAと β -アクチンmRNAの定量を行い、TS蛋白量との相関性について確認を行った。その結果、同様にTS/アクチン比とTS蛋白量との間には高い正の相関を認めた。また胃癌、大腸癌、胃癌腹膜播種からなる51手術検体についてもほぼ正の相関を認め、TS mRNAの定量によりTS蛋白量の評価が可能であることが確認された。しかしながら、手術検体では継代細胞株と比べてTS/アクチン比とTS蛋白量との相関に多少のばらつきがみられた。これらの原因としては、手術検体採取の条件が異なることが考えられる。正確なmRNAの定量を行うためには、摘出後の迅速な検体の凍結保存が必要であることは言うまでもない。また、TS遺伝子がそれ自身のmRNAに結合することにより、翻訳段階で制御される作用 (autoregulation)⁴⁴⁾も報告されており、翻訳調節の存在も一因となりうる。さらに最近になってTSとアンチセンス配列をとる遺伝子rTSが報告され、転写後調節に強く関与している可能性があることが示唆されている^{45,46)}。rTSはrTS α とrTS β の2種類があることが確認され、特にrTS β は抗癌剤耐性に関与しているとの報告がある⁴⁷⁾。今後この2種類の遺伝子の転写後調節、および抗癌剤耐性の作用機序の解明が期待される。

本研究の目的の一つである微量検体からのTS mRNA量の信頼性を確認するために、実際に術前内視鏡にて採取した生検組織よりmRNAを抽出し、競合的PCR法によるTS mRNAの定量を行った。同一症例で手術検体のTS/アクチン比と生検組織のTS/アクチン比を比較した結果、両者の間には有意な正の相関を認めた。このことから、競合的PCR法を用いた消化器癌の生検組織からのTS mRNA定量は十分な信頼性を有していると結論した。Hauzeら⁴⁸⁾は、少数例の検体ではあるが、競合的PCR法によって定量した生検組織のTS/アクチン比とTS蛋白量との相関性を報告している。

胃癌、大腸癌においてTS蛋白量が手術後の予後と関連する

ことがレトロスペクティブおよびプロスペクティブな臨床研究によって示されている^{49,50)}。本研究で胃癌、大腸癌50検体におけるTS蛋白量と臨床病理学的所見を比較検討した結果、分化度が低い症例ほどTS蛋白量が高かった。TS/アクチン比においてもほぼ同様の結果が得られ、加えて脈管侵襲の高度な症例ほどTS/アクチン比が有意に高値であった。このことから、TS mRNA量が悪性度の指標となる可能性が示唆された。

以上、本研究の結果から、競合的PCR法による微量検体を用いたTS mRNA量の信頼性が確認された、また、TS/アクチン比はTS蛋白発現量と有意な正の相関を示すことが判明した。TS mRNAやTS蛋白の定量には、従来大量の検体を必要としていたが、これらに代わる手技として競合的PCR法の有用性が示唆された。今後は、競合的PCR法によって評価したTS mRNA量、TS蛋白発現量と、5-FUを中心とする癌化学療法の奏効度を比較検討する必要があると思われる。

結 論

ヒト消化器癌由来継代細胞株9種およびヒト消化器癌組織51検体を対象として競合的PCR法によるTS mRNAの定量およびTS蛋白量の測定を行い、以下の結論を得た。

- 1) DIAを用いた競合的PCR法によるTS mRNAの定量が簡便かつ信頼性を有するものであることが示唆された。
- 2) 継代細胞株におけるTS/アクチン比とTS蛋白量との間には有意な正の相関がみられ、手術検体においても同様の相関性が認められたことより、TS/アクチン比の測定によってTS蛋白量を評価することは可能であると思われた。
- 3) 生検組織と手術検体におけるTS/アクチン比の間には有意な正の相関がみられ、競合的PCR法により生検組織(微量検体)からのTS mRNA定量は信頼性を有するものと思われた。
- 4) 臨床病理学的所見とTS/アクチン比では、脈管侵襲の高度な症例と分化度が低い症例ほどTS/アクチン比が高く、TS mRNA発現は抗癌剤感受性の指標のみならず、悪性度の指標にもなる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました金沢大学医学部外科学第一講座渡辺洋字教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究遂行に際し、御指導頂きました大村健二講師、ならびに川上和之助手に心から謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり御協力頂きました金沢大学医学部外科学第一講座の皆様へ感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は第56回日本癌学会総会(1997年、京都)、第51回日本消化器外科学会総会(1998年、東京)、第98回日本外科学会総会(1998年、東京)において発表した。

文 献

- 1) 白坂哲彦, 島本雄司, 大下英之, 木村彰男, 福島正和. 5-FU系抗癌剤とシスプラチンの併用による抗腫瘍効果増強とその作用機序—5-FUのBiochemical Modulationの立場から—. 癌と化学療法 18: 403-409, 1991
- 2) 塚越 茂. Biochemical Modulation—その歴史的背景—. 癌と化学療法 19: 941-945, 1992
- 3) Duschinsky R, Plevin E, Heidelberger C. The synthesis of 5-fluoropyrimidines. J Am Chem Soc 79: 4559-4560, 1957
- 4) Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. Biochemistry 13: 471-481, 1974

- 5) Danenberg PV, Lockshin A. Thymidylate synthetase-substrate complex formation. *Mol Cell Biochem* 43: 49-57, 1982
- 6) Cory JG, Breland JC, Carter GL. Effect of 5-fluorouracil on RNA metabolism in Novikoff hepatoma cells. *Cancer Res* 39: 4905-4913, 1979
- 7) Kufe DW, Major PP. 5-fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity. *J Biol Chem* 256: 9802-9805, 1981
- 8) Tanaka M, Kimura K, Yoshida S. Enhancement of the incorporation of 5-fluorodeoxyuridylate into DNA of HL-60 cells by metabolic modulations. *Cancer Res* 43: 5145-5150, 1983
- 9) Evans RM, Laskin JD, Hakala MT. Assessment of growth-limiting events caused by 5-fluorouracil in mouse cells and in human cells. *Cancer Res* 40: 4113-4122, 1980
- 10) Spears CP, Gustavsson BG, Mitchell MS, Spicer D, Berne M, Bernstein L, Danenberg PV. Thymidylate synthetase inhibition in malignant tumor and normal liver of patients given intravenous 5-fluorouracil. *Cancer Res* 44: 4144-4150, 1984
- 11) Washtien WL. Thymidylate synthetase levels as a factor in 5-fluorodeoxyuridine and methotrexate cytotoxicity in gastrointestinal tumor cells. *Mol Pharmacol* 21: 723-728, 1982
- 12) Rossana C, Rao LG, Johnson LF. Thymidylate synthetase overproduction in 5-fluorodeoxyuridine-resistant mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2: 1118-1125, 1982
- 13) Priest DG, Ledford BE, Doig MT. Increased thymidylate synthetase in 5-fluorodeoxyuridine resistant cultured hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* 29: 1549-1553, 1980
- 14) Santi DV, McHenry CS, Perriard ER. A filter assay for thymidylate synthetase using 5-fluoro-2'-deoxyuridylate as an active site titrant. *Biochemistry* 13: 467-70, 1974
- 15) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354, 1985
- 16) Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* 333: 858-860, 1988
- 17) Becker-Andre M, Hahlbrock K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATY). *Nucleic Acids Res* 17: 9437-9446, 1989
- 18) Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2725-2729, 1990
- 19) Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. *Nature* 359: 557-558, 1992
- 20) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 21) Celi FS, Zenilman ME, Shuldiner AR. A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Res* 21: 1047, 1993
- 22) Spears CP, Shahinian AH, Moran RG, Heidelberger C, Corbett TH. In vivo kinetics of thymidylate synthetase inhibition in 5-fluorouracil-sensitive and-resistant murine colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 42: 450-456, 1982
- 23) 胃癌取扱い規約(胃癌研究会編). 改訂第12版, 金原出版, 東京, 1993
- 24) 大腸癌取扱い規約(大腸癌研究会編). 改訂第5版, 金原出版, 東京, 1994
- 25) O'Sullivan GC, Collins JK, O'Brien F, Crowley B, Murphy K, Lee G, Shanahan F. Micrometastases in bone marrow of patients undergoing "curative" surgery for gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 109: 1535-1540, 1995
- 26) Spears CP, Gustavsson BG, Berne M, Frosing R, Bernstein L, Hayes AA. Mechanisms of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil. *Cancer Res* 48: 5894-5900, 1988
- 27) 白坂哲彦, 島本雄司, 福島正和. シスプラチンと弗化ピリミジン. *癌治療・今日と明日* 13: 23-28, 1991
- 28) 道伝研司, 田中基裕, 大村健二, 佐々木琢磨, 渡辺洋宇, 白坂哲彦. ternary complex (TC) の動的平衡と癌組織内還元型葉酸について. *日癌治* 26: 1687, 1991
- 29) Petrelli N, Herrera L, Rustum Y, Burke P, Creaven P, Stulc J, Emrich LJ, Mittelman A. A prospective randomized trial of 5-fluorouracil and high-dose leucovorin versus 5-fluorouracil and methotrexate in previously untreated patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 5: 1559-1565, 1987
- 30) 大村健二, 道伝研司, 宗本義則, 川上和之, 宮永太門, 橋本琢生, 石田文生, 渡辺洋宇. シスプラチン, 5-FU (UFT) 併用療法による消化器癌の治療. *癌と化学療法* 19: 723-725, 1992
- 31) Scanlon KJ, Newman EM, Lu Y, Priest DG. Biochemical basis for cisplatin and 5-fluorouracil synergism in human ovarian carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8923-8925, 1986
- 32) Shirasaka T, Shimamoto Y, Ohshimo H, Saito H, Fukushima M. Metabolic basis of the synergistic antitumor activities of 5-fluorouracil and cisplatin in rodent tumor models in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 32: 167-172, 1993
- 33) 橋本琢生. フッ化ピリミジン系抗がん剤の抗腫瘍効果増強に関する基礎的研究. *十全医会誌* 102: 658-670, 1993
- 34) 大村健二. 進行胃癌に対する5-FU+CDDP療法—その理論と実際— 進行胃癌に対する治療戦略—遺伝子診断から集学的治療まで—(宮崎逸夫, 米村 豊編), 第1版, 124-130, ソフトサイエンス社, 東京, 1995
- 35) 川上和之. ヒト大腸癌組織内チミジル酸合成酵素活性および葉酸プールの測定とユーエフティ投与によるその変動. *十全医会誌* 101: 975-986, 1992
- 36) Horikoshi T, Danenberg KD, Stadbauer THW, Volkenandt M, Shea LCC, Aigner K, Gustavsson B, Leichman L, Frösing R, Ray M, Gibson NW, Spears CP, Danenberg PV. Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer Res* 52: 108-116, 1992
- 37) Bouaboula M, Legoux P, Pességué B, Delpech B, Dumont X, Piechaczyk M, Casellas P, Shire D. Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. *J Biol Chem*

267: 21830-21838, 1992

- 38) Kinoshita T, Imamura J, Nagai H, Shimamoto K. Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 206: 231-235, 1992
- 39) Weisner RJ, Beinbrech B, Rüegg JC. Quantitative PCR. *Nature* 366: 416, 1993
- 40) Diviacco S, Norio P, Zentilin L, Menzo S, Clementi M, Biamonti G, Riva S, Falaschi A, Giacca M. A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene* 122: 313-320, 1992
- 41) Vanden Heuvel JP, Tyson FL, Bell DA. Construction of recombinant RNA templates for use as internal standards in quantitative RT-PCR. *Biotechniques* 14: 395-398, 1993
- 42) McCulloch RK, Choong CS, Hurley DM. An evaluation of competitor type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR. *PCR Methods Appl* 4: 219-226, 1995
- 43) Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, 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
- 44) Chu E, Koeller DM, Casey JL, Drake JC, Chabner BA, Elwood PC, Zinn S, Allegra CJ. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8977-8981, 1991
- 45) Dolnick BJ. Cloning and characterization of a naturally occurring antisense RNA to human thymidylate synthase mRNA. *Nucleic Acids Res* 21: 1747-1752, 1993
- 46) Black AR, Dolnick BJ. Expression of rTS correlates with altered growth regulation of thymidylate synthase. *Cancer Res* 56: 700-705, 1996
- 47) Dolnick BJ, Black AR. Alternate splicing of the rTS gene product and its overexpression in a 5-fluorouracil-resistant cell line. *Cancer Res* 56: 3207-3210, 1996
- 48) Hauze TA, Larsson L, Larsson PA, Hansson G, Asea A, Gustavsson B. Rapid detection of thymidylate synthase gene expression levels by semi-quantitative competitive reverse transcriptase polymerase chain reaction followed by quantitative digital image analysis. *Tumor Biol* 17: 306-319, 1996
- 49) Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake JC, Chabner BA, Allegra CJ. The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 12: 2640-2647, 1994
- 50) Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Groshen S, Cohen H, Laine L, Crookes P, Silberman H, Baranda J, Garcia Y, Li J, Leichman L. Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: A predictor for primary tumor response and overall survival. *J Clin Oncol* 14: 176-182, 1995

Quantification of Thymidylate Synthase mRNA by Competitive PCR Using Very Small Tissue Samples in Human Gastrointestinal Cancer Minoru Morishita, Department of Surgery (1), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 107, 193 — 202 (1998)

Key words: human gastrointestinal cancer, thymidylate synthase, competitive PCR, digital image analyser, fluoropyrimidines

Abstract

Thymidylate synthase (TS) is the target enzyme of fluoropyrimidines, which is also one of the rate-limiting enzymes for the de novo synthesis of the pyrimidine nucleotide. In this study, a quantification method of TS mRNA by competitive PCR using a digital image analyzer (DIA) was established. Using 9 cultured cell lines, 15 gastric cancer samples, 35 colorectal cancer samples, and 1 sample of gastric cancer seeding on the peritoneum excised during operation, quantification of TS mRNA by competitive PCR and measurement of the TS protein level was performed, and the reliability of mRNA quantification using tissue samples obtained by biopsy and its clinical importance were evaluated. As a control, β -actin mRNA was quantified. The amount of TS mRNA was expressed as the TS mRNA/ β -actin mRNA ratio (TS/actin ratio). There was a significant correlation between the TS/actin ratio and TS protein level in the 9 cell lines ($r=0.85$, $p < 0.01$). In the 51 samples collected during operations, the mean TS/actin ratio was $1.63 \pm 1.57 \times 10^{-2}$, and the mean TS protein level was 2.18 ± 1.73 pmol/g · tissue, showing a significant correlation between the mean TS/actin ratio and TS protein level ($r=0.57$, $p < 0.01$). There was a close correlation between the TS/actin ratios obtained by preoperative biopsy and those of the samples collected from the same patient during operation ($r=0.94$, $p < 0.01$). The TS/actin ratio was significantly higher in v_3 than in v_0 and v_2 according to the classification of histological invasion of vessels ($p < 0.05$). The TS/actin ratio in the low-differentiated tissues was significantly higher than that in the high-differentiated tissues ($p < 0.05$). These results suggest that competitive PCR in tissues obtained by biopsy is a useful method for evaluation of the production of TS protein, and that the measurement of TS mRNA is a potential preoperative predictor of the histology of vessels in human gastrointestinal cancer tissues.