

# Investigation into Biochemical Modulation of Chemotherapy for Gastrointestinal Carcinoma – Evaluation of Ternary Complex Formation and Reduced Folate Metabolism

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8571">http://hdl.handle.net/2297/8571</a>

## 消化管癌化学療法における生化学的修飾の研究

—とくに三者結合体形成と還元型葉酸代謝を中心に—

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

道 伝 研 司

近年, 消化管癌に高い奏効率を示す化学療法として, フッ化ピリミジンとその調節因子の併用が注目されている. 本研究では, フッ化ピリミジンの作用増強の条件を明らかにすることを目的とし, 腫瘍組織におけるフッ化ピリミジンの代謝関連酵素活性を測定するとともに, チミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) の阻害と酵素反応の補因子である還元型葉酸濃度との関係を検討した. 75例の臨床症例から得た胃癌, 大腸癌の新鮮組織87検体と正常粘膜14検体を用いた. 採取した組織は凍結保存し, TS 濃度, チミジンキナーゼ (thymidine kinase, TK) 活性, 5-フルオロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) のリン酸化と分解経路の酵素活性, 還元型葉酸であるメチレンテトラヒドロ葉酸 (methylenetetrahydrofolylglutamate,  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$ ) およびテトラヒドロ葉酸 (tetrahydrofolylglutamate,  $\text{H}_4\text{PteGlu}$ ) の濃度を測定した. さらに, トリチウムでラベルしたフッ化デオキシウリジン一リン酸 (fluorodeoxyuridine monophosphate, FdUMP) と TS および内因性葉酸によって形成される三者結合体 (ternary complex, TC) の安定性を観察した. 腫瘍組織の TS 濃度, TK 活性, 5-FU のリン酸化および分解経路活性, 2つの還元型葉酸の合計濃度, TC の半減期はそれぞれ,  $2.5 \pm 3.6 \text{ nM}$ ,  $2.6 \pm 1.3 \text{ nmol/g 組織/min.}$ ,  $4.5 \pm 3.9 \text{ nmol/g 組織/min.}$ ,  $1.4 \pm 1.0 \text{ nmol/g 組織/min.}$ ,  $1.9 \pm 1.0 \text{ nM}$ ,  $36 \pm 8$  分であった. また, TC の半減時間と試験管内の  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度とはよく相関した ( $y = 89.8x + 18.6$ ,  $r = 0.869$ ,  $p < 0.001$ ). 外因性の FdUMP と内因性還元型葉酸とで形成された TC の TS 濃度に対する百分率を意味する試験管内チミジル酸合成酵素阻害率 (thymidylate synthase inhibition rate in tube, TSIR in tube) は, TS 濃度と負の相関を呈した ( $y = -0.37x + 2.672$ ,  $r = 0.543$ ,  $p < 0.001$ ). 以上の研究結果から, 5-FU の分解はフッ化ピリミジンの抗腫瘍効果に影響を与え, そして腫瘍組織間にみられる TS 濃度や還元型葉酸濃度の相違はフッ化ピリミジン投与後の TS 阻害率や TS 阻害の持続に影響を与えたと考えられた.

**Key words** fluoropyrimidine, thymidylate synthase, ternary complex, reduced folate

消化管上皮由来の悪性腫瘍の治療において, 病巣の外科的切除がその中心であることに異論はない. しかし, 局所療法の限度を超えて進展した症例に遭遇することもまれではなく, 進行癌, 再発癌に対する有効な化学療法の開発は急務であると言える.

過去20年間で, 化学療法による白血病, 悪性リンパ腫, 卵巣癌などの治療成績は飛躍的に向上した. 一方, 胃癌, 大腸癌の予後向上に寄与したのは早期発見という診断技術の進歩であり, これらの癌腫には化学療法の効果は期待できないというのが通説であった.

近年の生化学的, 薬理的検索によって, 各種抗癌剤の作用機序の解明とともに, 腫瘍細胞が抗癌剤に対し低感受性となる機序も明らかにされつつある. かかる知見に基づいて, 腫瘍細胞内での抗癌剤の代謝を調整しその効果増強を図る, いわゆる生化学的調節 (biochemical modulation) の理論を導入した化学療法が最近注目されている. なかでも, 消化管原発の癌腫に対しては, 5-フルオロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) を作用因子 (effector) として使用する多剤併用療法が注目を浴び, 基礎的,

臨床的検討がなされている. すなわち, ロイコボリンやシスプラチン<sup>1)</sup>, メチオニン欠乏輸液<sup>2)</sup>を調節因子 (modulator) とした 5-FU 系抗癌剤の生化学的調節の基礎的検討がなされ, 臨床でもその効果が認められている<sup>3)-6)</sup>.

5-FU の主たる作用機序は, 5-FU が 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン一リン酸 (5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate, FdUMP) に代謝された後, ピリミジンの新合成系律速酵素である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 (methylenetetrahydrofolylglutamate,  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$ ) とともに三者結合体 (ternary complex, TC) を形成し, TS を不活化することによる<sup>7)</sup>. したがって, 腫瘍細胞内での 5-FU の代謝障害や異化, TS に対する葉酸の相対的不足は 5-FU に対する低感受性に帰結すると考えられる<sup>8)</sup>.

ロイコボリンやシスプラチンを調節因子として 5-FU とともに用いる場合, その目的は腫瘍細胞内の還元型葉酸濃度の増加である. しかし, ヒト新鮮腺癌組織を用いた腫瘍組織内の 5-FU 代謝に関する検討は少なく, 加えて FdUMP の存在下で形成される TC と細胞内還元型葉酸との関係についてはこれまで

平成6年5月24日受付, 平成6年7月27日受理

Abbreviations: DEAE, diethylaminoethyl; FUMP, fluorouridine monophosphate;  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$ , methylenetetrahydrofolylglutamate;  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}_n$ , methylenetetrahydrofolylpolyglutamate; d-Rib1P, 2-deoxy-a-D-ribose 1-phosphate; FdUMP, 5-fluoro-2'-deoxy uridine 5'-monophosphate; FdUrd, fluorodeoxyuridine;

で全く研究されていない。抗癌剤の効果に影響を与える腫瘍組織内の生化学的因子の検討は、採取した腫瘍の抗癌剤に対する感受性の予測<sup>10)</sup>と同様、臨床に極めて重要なことであると思われる。

本研究では、ヒトの胃癌および大腸癌の新鮮切除材料を用いて 5-FU の代謝、異化に関わる酵素の活性、5-FU の標的酵素である TS 濃度、および形成された TC と癌組織内還元型葉酸の関係について検討した。

## 対象および方法

### I. 対 象

1990年1月より1991年5月までに金沢大学第一外科および関連施設において病理組織学的に胃癌または大腸癌と診断された症例のうち75例を対象とし、その生検および切除がなされた材料計87検体を用いた。内訳は、胃癌原発巣52検体、胃癌転移リンパ節9検体、大腸癌原発巣25検体、大腸癌転移リンパ節1検体であった。また、胃癌原発巣から5cm以上離れた部の正常胃粘膜14検体を採取し測定に供した。さらに、肝切除時に得られた正常肝組織2検体についても、酵素活性の測定に供した。採取した検体は直ちに液体窒素で凍結し、その後-80℃で保存した。

### II. 研究方法

#### 1. 投与薬剤および投与方法

87検体のうち胃癌11例、大腸癌5例にはテガフルに換算して600mg/日の UFT (テガフルとウラシルのモル比 1:4 の合剤)を一週間投与し、最後の内服の4~5時間後に標本を採取した。

#### 2. 検査法

##### 1) 試薬の調製

5-[6-<sup>3</sup>H]-フルオロデオキシウリジン (fluorodeoxyuridine, FdUrd) (New England Nuclear, Boston, USA) からの <sup>3</sup>H-FdUMP の調製には、吉田肉腫細胞由来のチミジンキナーゼ (thymidine kinase, TK) を用いた。吉田肉腫細胞由来の TK の調整は以下のように行った。すなわち、生後5週の雄ドブレットの腹腔内にて3世代継代培養した吉田肉腫細胞を半分に希釈した生理食塩水で2回洗浄した後、この細胞沈渣1gに酵素液調製液A (5mM 塩化マグネシウム, 25mM 塩化カリウム, 10mM 2-メルカプトエタノールを含む, pH8 の50mM トリス塩酸緩衝液) を4倍量加えて1分間粉砕した。これを4℃, 105,000×g, 60分間の超遠心の後、上清を酵素調整液Aで12時間透析した。透析後、4℃, 10,000×g, 20分間遠心し、その上清を<sup>3</sup>H-FdUMP 調製用酵素 (TK) 液とした。この吉田肉腫細胞由来の TK を用いて、5-[6-<sup>3</sup>H]-FdUrd から<sup>3</sup>H-FdUMP を調製した。すなわち、まず、0.1M 塩化マグネシウムを含む0.5M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0), 100mM ATP 水溶液, 120mMα-グリセロフォスフェート水溶液をおのおの1容量ずつ混合した溶液0.2ml中に、5-[6-<sup>3</sup>H]-FdUrd 0.5ml を40℃, 10分間減圧乾固を行ったものを溶かして基質溶液とした。この基質溶液0.2mlに、吉田肉腫細胞由来の TK 液 (上述) 0.8ml を加え、37℃, 1時間反応させた。氷冷後、蒸留水1.0ml, 20%ト

リクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) 0.5ml を加え反応を止めた。4℃, 3,000rpm, 10分間の遠心後、上清に当量の TCA 除去剤を加え10分間振盪し、さらに 3,000rpm, 10分間遠心した。TCA 除去剤はトリ-n-オクタリルアミン (tri-n-octylamine) 17.7g に 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン (1, 1, 2-trichlorotrifluoro-ethane) を加えて 100g としたものを使用した。4枚の PEI セルロースプレート (PEI-cellulose plate) に遠心上清を1/4量ずつ吸着させ、1M 酢酸と1M 塩化リチウムを等量ずつ含む展開液にて展開した。その際、各 PEI セルロースプレートの両側に幅 2cm の PEI セルロースプレートを1枚ずつ並べて、これらに 10mM の非標識 FdUMP を 10μl ずつ吸着させ、同時に展開した。紫外線灯で非標識 FdUMP の位置を確認し、これをマーカーとして<sup>3</sup>H-FdUMP が展開されている部分の PEI セルロースをかきとり、試験管内に移した。そして、この中に 0.2M ギ酸アンモニウム 4ml を加え、十分に振盪後、3,000rpm, 10分間の遠心を行った。その上清を<sup>3</sup>H-FdUMP 溶液とし、残りの沈渣にはさらに 0.2M ギ酸アンモニウム 2ml を加え、同様にして<sup>3</sup>H-FdUMP の溶出、分離を行った。この操作を繰り返し、得られた<sup>3</sup>H-FdUMP 溶液の比活性が 3.7×10<sup>7</sup>dpm/ml 以上のもののみ凍結保存し、酵素活性測定に使用した。

#### 2) 切除検体からの酵素の抽出

手術による切除後1時間以内に液体窒素にて凍結し、測定まで-80℃にて保存した。測定は凍結処理後10日以内に行った。測定に際し、以下のような凍結検体の処理を行った。

##### i. TK, ジヒドロウラシルデヒドロゲナーゼおよび5-FU リン酸化経路の酵素活性測定のための検体処理

検体1.0gに4mlの酵素作成液Aを加え、1分間粉砕した後、4℃, 105,000×g, 65分間の超遠心を行った。遠心後の上清を各検体の酵素液とした。

ii. TS 濃度、および還元型葉酸濃度測定のための検体処理  
各検体2.0gを1.0gずつにわけ、それぞれに酵素液調製液B (15mM CMP, 20mM メルカプトエタノール, 0.1M フッ化ナトリウム0.2M トリス塩酸緩衝液, pH7.4) を4mlずつ加え、1分間粉砕した後、4℃, 105,000×g, 65分間の超遠心を行い、上清を各検体の酵素液とした。

##### iii. TC の半減期測定のための検体処理

検体3.0gを7mlの酵素液調製液Bで粉砕した以外は2)-iiと同様にして行った。

#### 3) 酵素活性の測定

##### i. TK の活性測定

0.1M 塩化マグネシウムを含む0.5M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0), 120mMα-グリセロフォスフェート水溶液, 1μCi/ml の<sup>14</sup>C-チミジン (New England Nuclear) を含む1mM チミジン, および100mM ATP 水溶液をそれぞれ等量ずつ混合し、これを基質液とした。この基質液0.05mlに2)-iで作成した酵素液0.2mlを加え、37℃, 20分間反応させた。沸騰水に3分間浸した後、3,000rpm, 10分間の遠心を行い、その上清0.1mlを3×3cmのDEAEセルロース紙 (TOYO 濾紙, 東京) に滴下し、これを1mM ギ酸アンモニウム液で10分間洗浄後、蒸留水で洗浄した。ギ酸アンモニウム液と蒸留水による洗浄を2度繰

5-FU, 5-fluorouracil; *L. casei*, *Lactobacillus casei*; H<sub>4</sub>PteGlu, tetrahydrofolylglutamate; H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub>, tetrahydrofolylpolyglutamate; TC, ternary complex; TCA, trichloroacetic acid; TK, thymidine kinase; TS, thymidylate synthase; TSIR, thymidylate synthase inhibition rate

り返した後、DEAE セルロース紙を風乾した。風乾後、DEAE セルロース紙をバイアルに移し、トルエンにて希釈した 5 倍濃縮シンチブレンドー-I を 10ml 加え、DEAE セルロース紙上に残った<sup>14</sup>C-チミジン-リン酸を液体シンチレーションカウンターにて測定した。なお、放射活性はすべて (dpm) として測定した (以下同じ)。一方、一部の DEAE セルロース紙は洗浄を行わずにそのままバイアルに移し、DEAE セルロース紙上の<sup>14</sup>C-チミジンと<sup>14</sup>C-チミジン-リン酸の総和を測定した。測定値から 1g あたりの組織が 1 分間に生成したチミジン-リン酸量を計算し、この値をその癌組織の有する TK 活性とした。

#### ii. ジヒドロウラシルデヒドロゲナーゼ活性の測定

0.1M 塩化マグネシウムを含む 0.5M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0), 250mM フッ化ナトリウム, 500mM ニコチン酸アミド, 10mM ジヒドロニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート (dihyronicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH), 20 $\mu$ Ci/ml の<sup>3</sup>H-FU (New England Nuclear) を含む 0.1mM 5-FU, および 50mM ATP を等量ずつ混合し基質液とした。この基質液 0.15ml に 2)-i で作成した酵素液 0.1ml を加え、37 $^{\circ}$ C, 30分間反応させた。氷冷後、2M の過塩素酸 0.05ml にて反応を止め、4 $^{\circ}$ C, 3,000rpm, 5分間遠心した。その上清の 0.2ml を試験管にとり、2M の水酸化カリウム 0.06ml を添加して攪拌後、3,000rpm, 5分間遠心した。遠心後、上清 0.02ml をマイクロピペットでとり、TLC プレート (Merck, Frankfurt, Deutschland) を使い展開した。展開液は 17:3:1 の容量比のクロロホルム, メタノール, 酢酸から成るものを用いた。15~20分間の展開の後、TLC プレートを乾燥させ、紫外線灯で照らしながら原点部分をかきとりバイアルに入れた。これに 4N HCl 0.1ml を加えた後、ACS-II 10ml を加え、液体シンチレーションカウンターにて測定した。一方、一部は展開せずに総カウント数を求めた。得られた測定値より 1g の癌組織が単位時間 (分) 当たり分解した 5-FU 量を算出し、本酵素活性とした。

#### iii. ピリミジンフォスホリボシルトランスフェラーゼ (経路 1) の活性測定

5-FU を直接フッ化ウリジン-リン酸 (fluorouridinemonophosphate, FUMP) に変換する本酵素活性の測定を行った。すなわち、等量ずつの 0.5mM トリス塩酸 (pH8.0), 0.05mM 塩化マグネシウム, 0.1mM フッ化ナトリウム, 0.04mM フォスホリボシルピロリン酸, 蒸留水, および 20 $\mu$ Ci/ml の<sup>3</sup>H-FU を含む 0.1mM 5-FU から成る基質液を調製し、この 0.15ml と 2)-i で調整した酵素液 0.1ml を混ぜ 37 $^{\circ}$ C, 30分間反応させた。30分後直ちに氷冷し、2M の過塩素酸を加えて反応を止めた。続いて 4 $^{\circ}$ C, 3,000rpm, 5分間の遠心を行い、その上清 0.2ml を小試験管にとり、0.2M の水酸化カリウムを加えて攪拌した。さらに、3,000rpm, 5分間の遠心の後、上清 0.02ml を 3)-ii の測定時と同様にして TLC プレートをを用いて展開し、原点部分をカウントした。一方、一部は展開せずに総カウント数を求めた。得られた測定値から 1g の癌組織が単位時間 (分) 当たりリン酸化した 5-FU 量を算出し本酵素活性とした。

#### iv. ウラシルリボシルトランスフェラーゼ+ウリジンキナーゼ (経路 2) の活性測定

5-FU から FUrd を経て FUMP に至る本経路の活性の測定は、基質液が一部異なる以外は 3)-iii と同様にして行った。すなわち、基質液として蒸留水の代わりに 0.1M ATP を、フォス

フォリボシルピロリン酸のかわりに 40mM のリボース-1-リン酸を用いて測定した。得られた測定値から 1g の癌組織が単位時間 (分) 当たりリン酸化した 5-FU 量を算出し、本経路の酵素活性とした。

#### v. ウラシルデオキシリボシルトランスフェラーゼ+チミジンキナーゼ (経路 3) の活性測定

5-FU から FdUrd を経て FdUMP に至る本経路の活性の測定は、基質液が一部異なる以外は 3)-iii と同様にして行った。すなわち、基質液として蒸留水の代わりに 0.1M ATP を、フォスフォリボシルピロリン酸のかわりに 40mM のデオキシリボース-1-リン酸を用いて測定した。得られた測定値より 1g の癌組織が単位時間 (分) 当たりリン酸化した 5-FU 量を算出し、本経路の酵素活性とした。

#### vi. 癌組織内 TS 濃度および TS 阻害率の測定

Spears ら<sup>1112)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、試験管内に 2)-ii の操作により作成した酵素液 0.2ml を入れ、続いて緩衝液 A (0.6M 重炭酸アンモニウム, 0.1M メルカプトエタノール, 0.1M フッ化ナトリウムおよび 15mM CMP から成る) を 0.2ml, <sup>3</sup>H-FdUMP (50mM リン酸カリウム緩衝液にて 3.7 $\times$ 10<sup>6</sup>dpm/ml に調整) を 0.2ml, 最後に補因子溶液 B (2mM dl-L-テトラヒドロ葉酸, 16mM アスコルビン酸, 9mM フォルムアルデヒド, 15mM CMP, 20mM メルカプトエタノール, 0.1M フッ化ナトリウム, 2% 牛血清アルブミンを含む, 50mM リン酸カリウム緩衝液, pH7.4) を 0.1ml 添加し、30 $^{\circ}$ C, 20分間反応させた。そして直ちに冷却後、10% TCA 0.7ml を加え反応を止めた。4 $^{\circ}$ C, 2,000rpm, 5分間の遠心後、上清を吸引除去し、沈渣を 5% TCA 2ml で 2回洗浄した。洗浄後、沈渣にギ酸 0.5ml を加え溶解させた。この全量をバイアルに移し、ACS-II 10ml を加えて液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。測定値よりブランクを差し引いた値を、使用した<sup>3</sup>H-FdUMP の比放射活性で除し、これから癌組織 1g 当たりの TS 量を求めた。一方、これとは別にフッ化ピリミジン系抗癌剤による術前化学療法を施行した症例に対しては、酵素液を緩衝液 A で 25 $^{\circ}$ C, 3時間処理した後、上記の方法で総 TS 濃度を測定した。緩衝液 A による前処置施行後に得られた値を総 TS 量 (TS<sub>total</sub>)、緩衝液 A による前処置を施行せずに得られた値を近似遊離 TS 量 (approximate TS<sub>free</sub>) とし、Spears ら<sup>1112)</sup>の理論により真の遊離 TS 濃度 (TS<sub>free</sub>) を次の式で求めた。

$$TS_{free} = (\text{approximate } TS_{free} - 0.13 \times TS_{total}) / 0.87$$

さらに TS 阻害率 (%) を次の式で求めた。

$$TS \text{ 阻害率} = 100 \times (TS_{total} - TS_{free}) / TS_{total}$$

#### 4) 外因性の FdUMP と内因性還元型葉酸のみの存在下での TC 形成量の TS 濃度に対する百分率 (thymidylate synthase inhibition rate in tube, TSIR<sub>in tube</sub>) の測定

使用する補因子溶液 B の違い以外は TS 濃度の測定と同様にして行った。すなわち、内因性のメチレンテトラヒドロ葉酸 (methylene tetrahydrofolate, CH<sub>2</sub>H<sub>4</sub>PteGlu) のみの存在下での TC 形成量は、dl-L-テトラヒドロ葉酸とフォルムアルデヒドの両者を含まない補因子溶液 B' を用いて測定した。また、内因性の H<sub>4</sub>PteGlu を CH<sub>2</sub>H<sub>4</sub>PteGlu に変えた状況下での TC 形成量は、dl-L-テトラヒドロ葉酸のみを含まない補因子溶液 B' を

用いて測定した。補因子溶液 B' を用いて測定された TC 形成量の TS 濃度に対する百分率  $TSIR_{in\ tube}$  (%) は次の式によった。

$$TSIR_{in\ tube} = [TC\ 形成量/g\ 組織] / [TS\ 量/g\ 組織] \times 100$$

#### 5) 癌組織内 $CH_2H_4PteGlu$ および $H_4PteGlu$ 濃度の測定

D. V. Santi 博士 (カリフォルニア大学, U.S.A.), 綿矢有佑博士 (岡山大学) より供与をうけた *Lactobacillus casei* (*L. casei*) の TS を用い,  $CH_2H_4PteGlu$ , またはフォルムアルデヒドにて  $CH_2H_4PteGlu$  に変換した  $H_4PteGlu$  を,  $^3H$ -FdUMP を用いて TC として補足する方法<sup>13)</sup>をとった。すなわち, 20% または 10% に調整された TS 測定用の酵素液 0.2ml, 50nM  $^3H$ -FdUMP 0.2ml, 補因子溶液 B' または B'' 0.1ml, および測定直前に調整した 70nM の *L. casei* TS 入り緩衝液 A 0.2ml からなる反応液を 30°C, 20 分間インキュベーションを行った後, 10% TCA 0.7ml にて反応を止めた。そして, 沈渣中の  $^3H$ -FdUMP を測定した。補因子溶液 B'' を使用して得られた測定値を癌組織内の  $CH_2H_4PteGlu$  濃度とし, また補因子溶液 B' を使用したときに得られた値よりこの値を差し引いた値を癌組織の  $H_4PteGlu$  濃度とした。

#### 6) 30%粗酵素液中で $^3H$ -TC (TS- $^3H$ -FdUMP- $CH_2H_4PteGlu$ ) の半減期の測定

初めに,  $^3H$ -FdUMP にて標識された TC を形成させ, 続いて過剰の FdUMP を加え, 標識された TC の減衰曲線を求めた。すなわち,  $TSIR_{in\ tube}$  の測定方法を用い, 癌組織内の内因性の  $CH_2H_4PteGlu$  および  $H_4PteGlu$  のみの存在下で標識された TC を形成させた。37°C, 3 分間のインキュベーションに続いて, 反応液中で  $^3H$ -FdUMP の初期濃度の 2,000 倍にあたる濃度になる FdUMP を加え, この時点より標識された TC の解離時間の測定を開始した。時間毎 (0 分と 10, 20 および 30 分の 3 点) に反応液中の 0.7ml を採取し, これを氷冷した 10% TCA (0.7ml) 入りの試験管内に加えた。引き続き, TS 濃度の測定と同様に沈渣を 5% TCA にて洗浄後, 可溶化させ放射活性を測定した。標識された TC の残存率の対数を縦軸にとり, 時間を

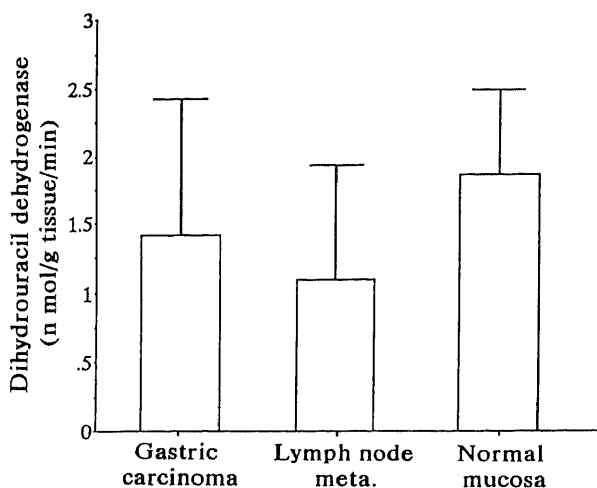


Fig. 1. The activity of dihydrouracil dehydrogenase in the primary gastric carcinoma (gastric carcinoma), metastatic lymph node of the gastric carcinoma (lymph node meta.), and normal gastric mucosa (normal mucosa). Vertical bars represent mean  $\pm$  S.D..

横軸にとって残存率が 50% になる時間 (分) を半減期とした。

#### 3. 病理組織診断

切除標本のうち, 検体採取部分に近接する癌組織型をヘマトキシリン-エオジン染色にて診断した。病理組織学的診断は胃癌取り扱い規約および大腸癌取り扱い規約によった<sup>14)15)</sup>。

#### 4. 統計学的処理

異なる 2 群の平均値の差の検定は Student の t 検定を用いて, 異なる 3 群以上の平均値の差の検定は ANOVA 法を用いて行い, 危険率 5% 以下をもって有意とした。また, 回帰は最小 2 乗法による直線回帰で示し, 2 変数の相関は相関係数 (r) で表した。

### 成 績

#### 1. 各種酵素活性値

##### 1. 5-FU の分解経路の律速酵素活性

5-FU の分解経路の律速酵素であるジドロウラシルデヒドロゲナーゼの活性は胃癌原発巣 (n=37), 胃癌転移リンパ節 (n=9), 胃正常粘膜組織 (n=16) でそれぞれ  $1.4 \pm 1.0$ ,  $1.1 \pm 0.8$ ,  $1.8 \pm 0.7$  n mol/g 組織/min. であった。胃癌原発巣の 5-FU の異化活性は正常胃粘膜に近似していた (図 1)。

一方, 2 例の肝組織での本酵素活性は, それぞれ 10.2, 16.1 n mol/g 組織/min. と極めて高値を呈していた。

##### 2. 5-FU のリン酸化経路の酵素活性

胃癌原発巣 (n=22) における経路 1, 経路 2, および経路 3 の酵素活性はそれぞれ  $0.51 \pm 0.70$ ,  $4.50 \pm 3.90$ ,  $9.00 \pm 4.70$  n mol/g 組織/min. であり, 最大の活性値を示したのは経路 3 であった (図 2)。胃正常粘膜 (n=8) における経路 1, 2 および 3 の酵素活性はそれぞれ  $0.24 \pm 0.17$ ,  $2.60 \pm 3.20$ ,  $4.40 \pm 3.40$  n mol/g 組織/min. であり, 胃癌転移リンパ節 (n=5) ではそれぞれ  $0.20 \pm 0.20$ ,  $1.60 \pm 0.50$ ,  $8.30 \pm 4.80$  n mol/g 組織/min. であった。

経路 1, 2 および 3 において, 胃癌原発巣は胃正常粘膜より有意に高い活性を有していた ( $P < 0.05$ )。

##### 3. TK 活性

胃癌原発巣 (n=28), 胃癌転移リンパ節 (n=6) および胃正常

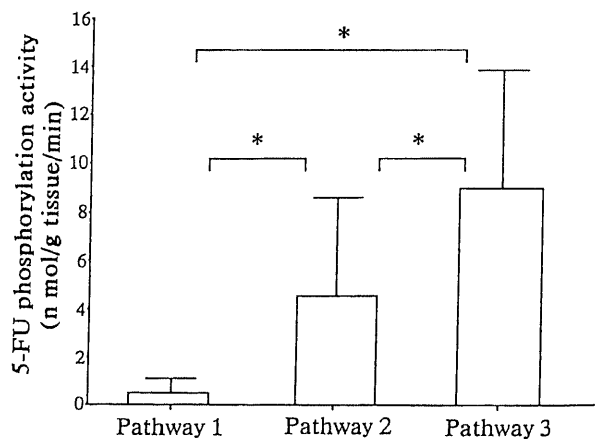


Fig. 2. The activities of 5-FU phosphorylation pathways in primary gastric carcinoma. Pathways 1, 2 and 3 mean the pathway of pyrimidine phosphoribosyl transferase, the pathway of uracil ribosyltransferase plus uridine kinase, and the pathway of uracil deoxyribosyltransferase plus thymidine kinase, respectively. \* $P < 0.05$ . Vertical bars represent mean  $\pm$  S.D..

粘膜 (n=12) の TK 活性はそれぞれ  $2.60 \pm 1.30$ ,  $2.30 \pm 1.30$ ,  $1.10 \pm 0.90$  n mol/g 組織/min. であり, 胃癌原発巣は胃正常粘膜に比べ有意に高値を呈していた ( $P < 0.05$ ), (図 3).

4. TS 濃度

胃癌原発巣 (n=50), 胃正常粘膜 (n=14) および大腸癌原発巣 (n=25) の TS 濃度はそれぞれ  $2.50 \pm 3.60$ ,  $0.70 \pm 0.70$ ,  $3.80 \pm 3.40$  nM であり, 胃癌原発巣は胃正常粘膜に比べ有意に高値を呈していた ( $P < 0.05$ ), (図 4).

5. TK 活性と 5-FU のリン酸化経路との関係

TK 活性と経路 1 または 2 の間に有意な相関はみられなかったが ( $r = 0.277$ ,  $p = 0.266$ ;  $r = 0.350$ ,  $p = 0.154$ ), TK 活性と経路 3 との間に有意な相関が認められた ( $r = 0.628$ ,  $p < 0.01$ ), (図

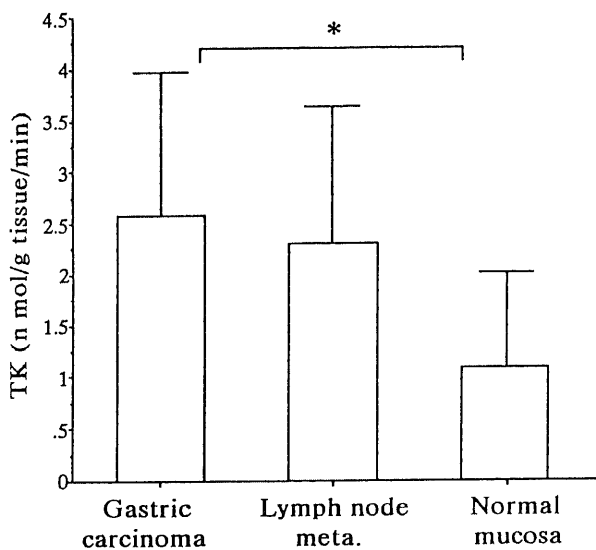


Fig. 3. The activity of thymidine kinase (TK) in the primary gastric carcinoma (gastric carcinoma), metastatic lymph node of the gastric carcinoma (lymph node meta.), and normal gastric mucosa (normal mucosa). \*  $P < 0.05$ . Vertical bars represent mean  $\pm$  S.D..

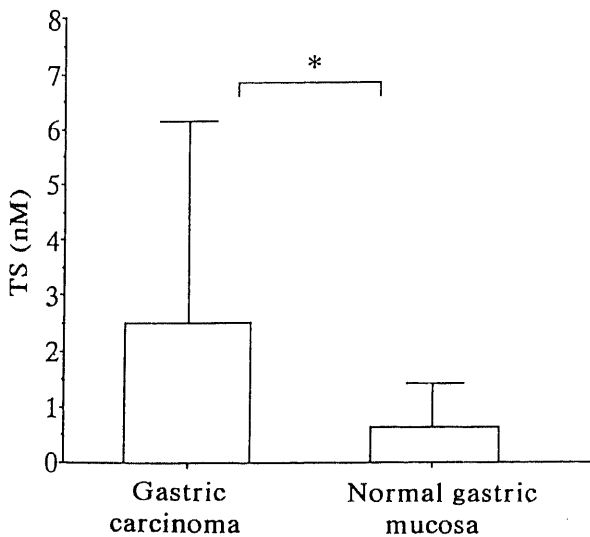


Fig. 4. The activity of thymidylate synthase (TS) in the primary gastric carcinoma and normal gastric mucosa. \*  $P < 0.05$ . Vertical bars represent mean  $\pm$  S.D..

5).

6. 外因性の FdUMP と内因性還元型葉酸のみの存在下での TC 形成量とその TS 濃度に対する百分率 ( $TSIR_{in\ tube}$ ) の測定  
胃癌および大腸癌計 49 検体の  $TSIR_{in\ tube}$  は  $25.1 \pm 17.2\%$  であり, この値は TS 濃度が大きくなるにつれ小さくなる傾向を呈した ( $r = 0.431$ ,  $p < 0.01$ ), (図 6).

7. TSIR

術前に UFT を投与された 12 検体における TS 阻害率 (TSIR) は,  $TSIR_{in\ tube}$  とは異なり TS 濃度が大きくなって小さくなる傾向はみられなかった (図 7).

8. 癌組織内  $CH_2H_4PteGlu$  濃度および  $H_4PteGlu$  濃度の測定

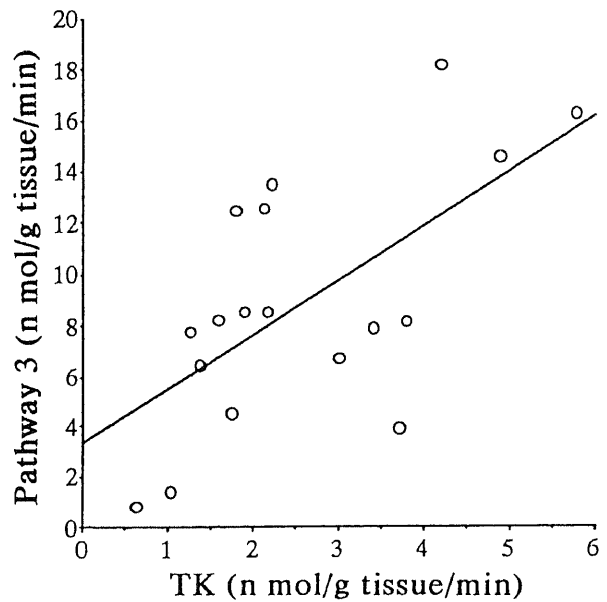


Fig. 5. Correlation between thymidine kinase (TK) activities and 5-FU phosphorylation pathway 3 activities in primary gastric carcinoma. Significant correlation was observed between them ( $r = 0.628$ ,  $p < 0.01$ ).

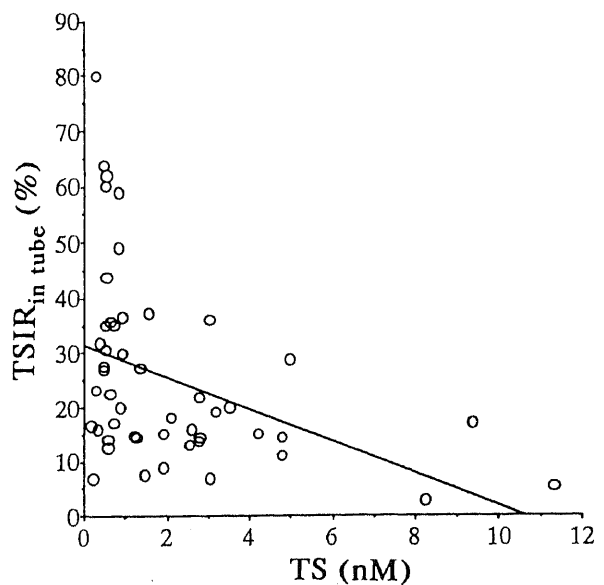


Fig. 6. Correlation between thymidylate synthase levels (TS) and  $TSIR_{in\ tube}$  values. Significant negative correlation was observed between them ( $r = 0.431$ ,  $p < 0.01$ ).

胃癌および大腸癌35例における、2つの葉酸の合計濃度は  $1.90 \pm 1.00 \text{ nM}$  であり、 $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度、 $\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度はそれぞれ  $0.69 \pm 0.54$ ,  $1.25 \pm 0.69 \text{ nM}$  であった。 $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度と  $\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度との間には有意な相関が認められた ( $r=0.356$ ,  $p<0.05$ ), (図 8).

9.  $^3\text{H}$ -TC ( $\text{TS}\text{-}^3\text{H}\text{-FdUMP}\text{-CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$ ) の半減期、およびそれと  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度との関係

30%酵素液にて得られた $^3\text{H}$ -TC の半減期は  $36 \pm 8$  分であり ( $n=18$ ), 最大値55分, 最小値23分であった。さらに, $^3\text{H}$ -TC の

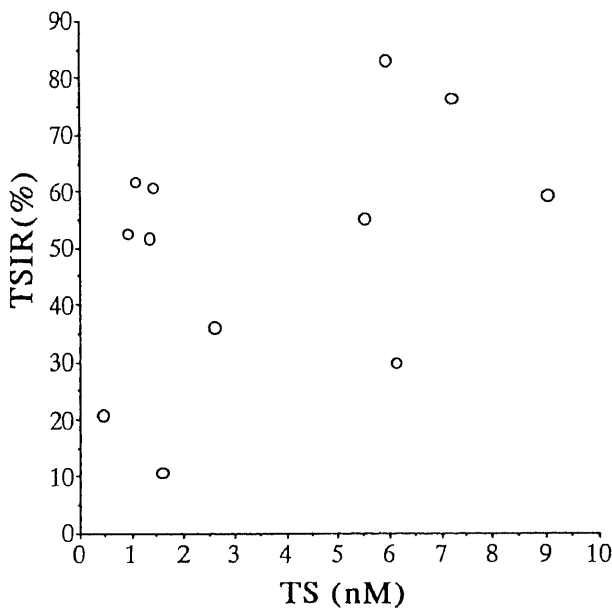


Fig. 7. Correlation between thymidylate synthase levels (TS) and TSIR values. No correlation was observed between them ( $r=0.429$ ,  $p=0.164$ ).

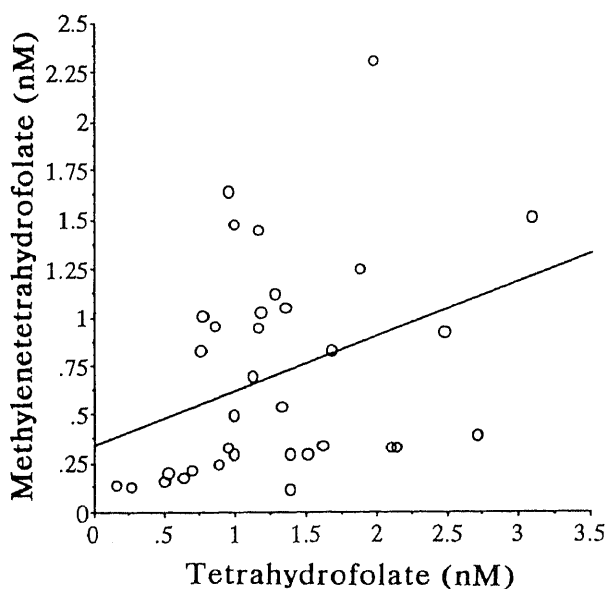


Fig. 8. Correlation between tetrahydrofolate and methylenetetrahydrofolate levels. Significant correlation was observed between these two folate levels ( $r=0.356$ ,  $p<0.05$ ).

半減期は測定した試験管中の  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度と正の相関を呈した ( $r=0.869$ ,  $p<0.001$ ), (図 9).

10. 癌組織内還元型葉酸活性と TS 濃度との関係

癌組織内のTS 濃度と  $\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度との間、および TS 濃度と2つの還元型葉酸の合計濃度との間には正の相関が認められたが(図10,11), TS 濃度と  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度との間には有意の相関はみられなかった ( $r=0.176$ ,  $p=0.312$ ).

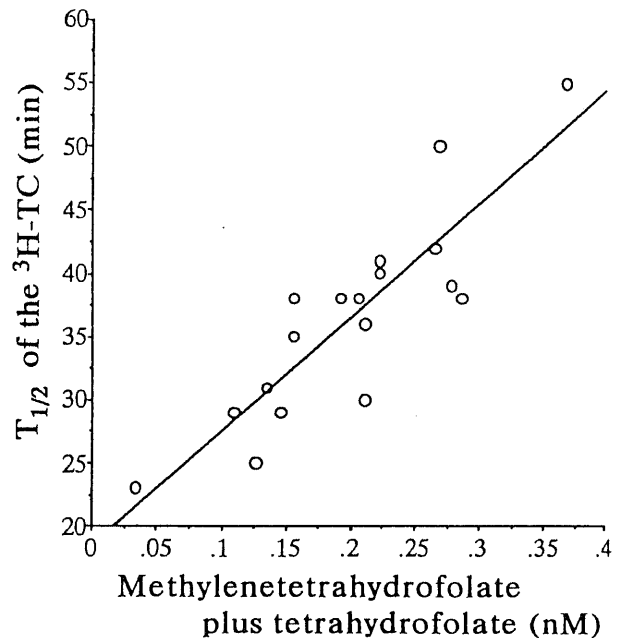


Fig. 9. Correlation between methylenetetrahydrofolate levels in tube and the half-life of the tritium labeled TC. Significant correlation was observed between them ( $r=0.869$ ,  $p<0.001$ ).

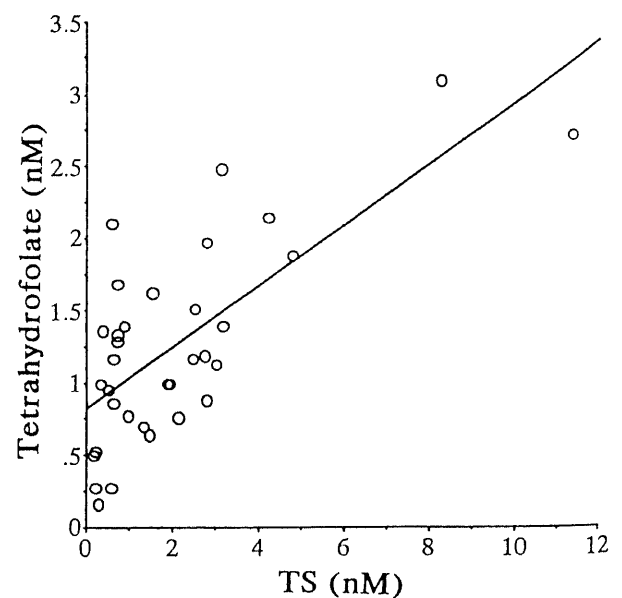


Fig. 10. Correlation between thymidylate synthase and tetrahydrofolate levels. Significant correlation was observed between them ( $r=0.721$ ,  $p=0.0001$ ).

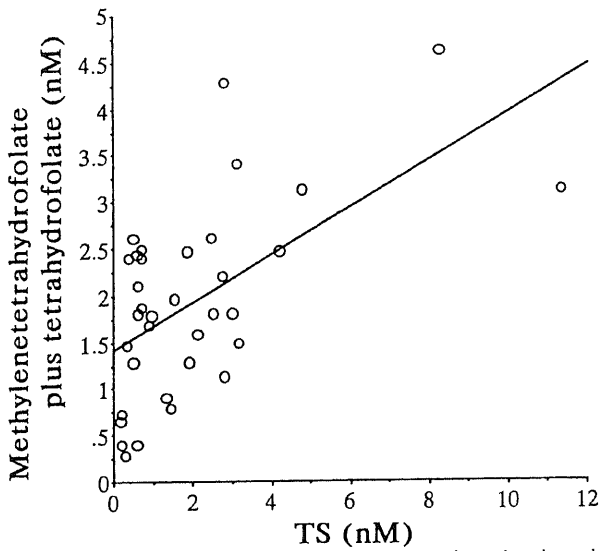


Fig. 11. Correlation between thymidylate synthase levels and the sum of tetrahydrofolate and methylenetetrahydrofolate levels. Significant correlation was observed between them ( $r=0.581$ ,  $p<0.001$ ).

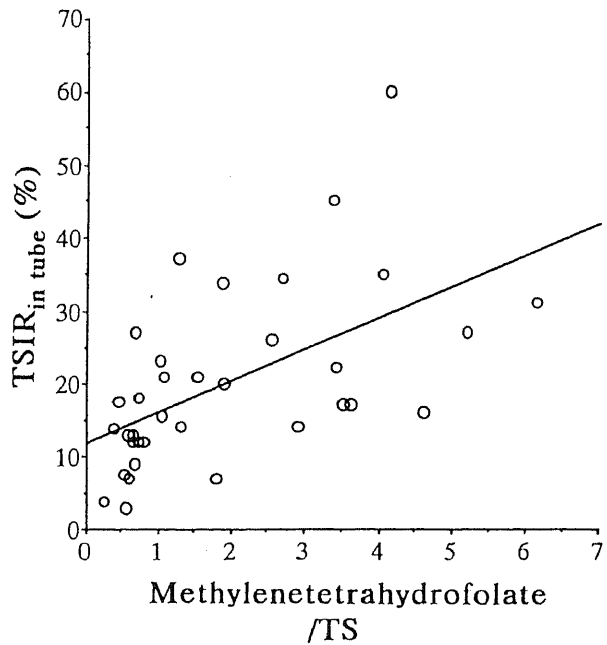


Fig. 13. Correlation between the ratio of methylenetetrahydrofolate level to TS level and  $TSIR_{in\ tube}$  values. Significant correlation was observed between them ( $r=0.553$ ,  $p<0.001$ ).

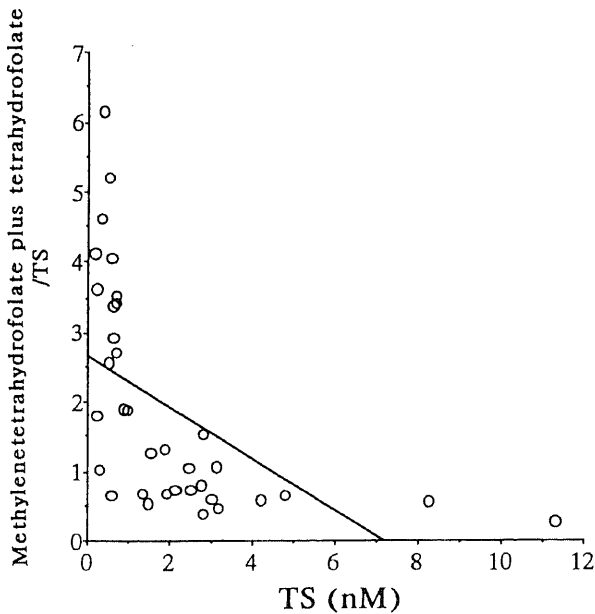


Fig. 12. Correlation between thymidylate synthase levels and the ratio of the sum of tetrahydrofolate and methylenetetrahydrofolate levels to TS level. Significant negative correlation was observed between them ( $r=0.543$ ,  $p<0.001$ ).

一方、TS 濃度に対する還元型葉酸濃度の比は、TS 濃度が大きくなるにつれ有意に減少した ( $r=0.543$ ,  $p<0.001$ )、(図12)。

11. 癌組織内還元型葉酸濃度と  $TSIR_{in\ tube}$  との関係

試験管中の  $CH_2H_4PteGlu$  濃度と  $TSIR_{in\ tube}$  との間には有意な相関はみられなかったが ( $r=0.041$ ,  $p=0.815$ )、試験管中の  $CH_2H_4PteGlu$  濃度を TS 濃度で除した値と  $TSIR_{in\ tube}$  との間には有意な正の相関が得られた ( $r=0.553$ ,  $p<0.001$ )、(図13)。

考 察

いくつかの抗癌剤は作用機序の解明が進み、腫瘍が示す低感受性に関与する因子が判明しつつある。とりわけフッ化ピリミジン系抗癌剤は、その代謝過程とともに作用機序がほぼ明らかにされている数少ない薬剤の一つといえる。5-FU はこれまで消化器癌に最も頻回かつ大量に使用された薬剤であるが、単剤はもちろん他剤との併用でも満足できる臨床効果を示さなかった。その原因は、5-FU が抗腫瘍効果を発揮する際に必須である葉酸の代謝を無視した用法にあった<sup>7)</sup>。また、腫瘍組織内で5-FU が受ける代謝の実際も解明されていない。かかる事象を明らかにすることは、理論的な薬剤の併用法の開発、癌の化学療法の成績向上に結びつくと考えられる。

最初に、ヒトの腺癌組織内でのフッ化ピリミジン代謝を検討した。ある種の培養細胞では、TK は5-FU リン酸化経路の律速酵素である<sup>10)</sup>。また、5-FU をFdUMP に変換する経路においてTK 活性はチミジンフォスホリラーゼ活性よりもはるかに小さいとされてきた<sup>11)</sup>。以上のことは、本研究でTK 活性と、5-FU のリン酸化経路のうち経路3との間に有意な相関がみられたことからもうかがわれる。しかし、ヒトの癌組織では補酵素であるデオキシリボース-1-リン酸 (2-deoxy-a-D-ribose 1-phosphate, d-Rib 1 P) が少なく、FdUrd が速やかに5-FU に変換されてしまうとされ、5-FU のリン酸化に占める経路3の重要性に疑問がある。本研究の成績から、ヒトでは経路2が主たる5-FU のリン酸化経路であると考えられた。また、本研究によりこれら5-FU のリン酸化経路活性と比較して、5-FU の分解酵素活性も無視しうる値ではないことが判明した。本酵素活性の抑制によってフッ化ピリミジン系抗癌剤の抗癌効果が増強されることはすでに認められており<sup>10)12)</sup>、本酵素の存在が腫



瘍によるフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する低感受性の一因になっているものと思われた。

一方組織内では、還元型葉酸はポリグルタミン酸塩として存在するため<sup>20</sup>、今回測定した  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  や  $\text{H}_4\text{PteGlu}$  はそれぞれポリグルタミン酸塩型メチレンテトラヒドロ葉酸 (methylenetetrahydrofolylpolyglutamate,  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}_n$ ) およびポリグルタミン酸塩型テトラヒドロ葉酸 (tetrahydrofolylpolyglutamate,  $\text{H}_4\text{PteGlu}_n$ ) と考えられた。本研究の成績では、TS 高濃度の癌組織では  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  および  $\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度も高く、TS 高濃度の癌組織では葉酸代謝が活発であると推測された。また、高濃度の葉酸を含む培養液中で培養された培養細胞内の還元型葉酸濃度 ( $0.5\sim 2.7\mu\text{M}$ )<sup>21,22</sup> と比較し、本研究で得られた臨床検体の還元型葉酸濃度ははるかに低く、ヒトの血清での低い還元型葉酸濃度<sup>23</sup> がその一因と考えられた。

高い TS 濃度を持つヒトの腺癌組織では、 $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  や  $\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度は TC 形成に十分なだけ存在するのであろうか。今回の  $\text{TSIR}_{\text{in tube}}$  の検討より以下の推論が成立する。

TC の形成過程から次の式が成り立つ。すなわち、反応開始後の試験管内の TS 濃度、FdUMP 濃度、および TS と FdUMP の二者結合体 (TS·FdUMP) の濃度をそれぞれ、 $[\text{TS}]_{\text{in tube}}$ 、 $[\text{FdUMP}]_{\text{in tube}}$ 、 $[\text{TS}\cdot\text{FdUMP}]_{\text{in tube}}$  とし、反応速度定数を  $K_3$ 、 $K_4$  で表すと、

$$[\text{TS}\cdot\text{FdUMP}]_{\text{in tube}} / \{[\text{TS}]_{\text{in tube}} \times [\text{FdUMP}]_{\text{in tube}}\} = K_4 / K_3$$

さらに、試験管内の TC 濃度、 $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度をそれぞれ、 $[\text{TC}]_{\text{in tube}}$ 、 $[\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}]_{\text{in tube}}$  とし、反応速度定数を  $K_1$ 、 $K_2$  で表すと、

$$[\text{TC}]_{\text{in tube}} / \{[\text{TS}\cdot\text{FdUMP}]_{\text{in tube}} \times [\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}]_{\text{in tube}}\} = K_2 / K_1$$

また、試験管内での TS の初期濃度を  $[\text{TS}]_0$  in tube とすると、

$$\text{TSIR}_{\text{in tube}} (\%) = 100 \times [\text{TC}]_{\text{in tube}} / [\text{TS}]_0 \text{ in tube}$$

試験管内での  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  および FdUMP の初期濃度 ( $[\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}]_0$  in tube,  $[\text{FdUMP}]_0$  in tube) が、ともに TS の初期濃度に比べてはるかに大きいときには、 $[\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}]_{\text{in tube}}$  と  $[\text{FdUMP}]_{\text{in tube}}$  はそれぞれ初期濃度に等しい。この時には、 $\text{TSIR}_{\text{in tube}}$  は次の式で表される。

$$\begin{aligned} \text{TSIR}_{\text{in tube}} (\%) = & 100 \times K_2 \cdot K_1 \cdot [\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}]_0 \text{ in tube} [\text{FdUMP}]_0 \text{ in tube} / \\ & \{K_1 \cdot K_3 + K_1 \cdot K_4 \cdot [\text{FdUMP}]_0 \text{ in tube} + K_2 \cdot K_4 \cdot \\ & [\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}]_0 \text{ in tube} \cdot [\text{FdUMP}]_0 \text{ in tube}\} \end{aligned}$$

すなわち、FdUMP および  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  の初期濃度がともに TS の初期濃度に比べてはるかに大きいとき、 $\text{TSIR}_{\text{in tube}}$  は TS の初期濃度とは関係なく決定される。

したがって、今回 FdUMP 過剰の条件下で TS 高濃度の検体にみられた  $\text{TSIR}_{\text{in tube}}$  の低値傾向は、TS 高濃度の癌組織では  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  や  $\text{H}_4\text{PteGlu}$  が TS に対し相対的に不足していることを示している。

$\text{TSIR}_{\text{in tube}}$  と異なり、切除前に UFT が投与された検体における TS 阻害率 (TSIR) には TS 低濃度の組織と TS 高濃度の組織の間に差を認めなかった。以上より、TS 高濃度の癌組織ではフッ化ピリミジンへの反復暴露によって、他の還元型葉酸から  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  や  $\text{H}_4\text{PteGlu}$  への転換が促進された可能性が示

唆された。このような葉酸代謝は、TS 濃度に対する  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  や  $\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度の比とともに、TS が高濃度の癌組織においては TS 阻害に影響を及ぼすものと思われる。これに対し、低い TS 濃度を示す癌組織では、TS 濃度に対する  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  や  $\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度の比が TS 阻害を左右する最も重要な因子と考えられた。

1 種類のグルタミン残基を持つ  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  を用いた測定では、TC の安定性は試験管内の TS 濃度や FdUMP 濃度には左右されず、試験管内の遊離の  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度のみで左右されることが報告されている<sup>24-26</sup>。 $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}_n$  は、モノグルタミン酸塩型の  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  (methylenetetrahydrofolylmonoglutamate,  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}_1$ ) よりも200倍以上の TC 安定化作用を有しており、グルタミン残基数が3以上ならば、その安定化作用は一定であると報告されている<sup>25</sup>。組織内の還元型葉酸はほとんど残基数が3以上のポリグルタミン酸塩型であるので、TC の安定性は、組織内の  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度のみで依存することになる。今回の測定結果からも、癌組織間に存在する  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度の差が TC の安定性に大きく影響していることが判明した。したがって、たとえ TS 濃度が同じでも、同等の TS 阻害率を得るのに必要な FdUMP 濃度が癌組織間で異なるものと推測された。TS 高濃度の癌組織ほどフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する感受性が高いとする Maehara ら<sup>9</sup> の報告がある。しかし、一方で TS が高濃度であると、同程度の TS 阻害をもたらすのに必要な FdUMP や  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  をより多く必要とするため、フッ化ピリミジン系抗癌剤が効きにくいとする報告もある<sup>9</sup>。この二つの考えは一見矛盾しているようであるが、十分な FdUMP や  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  を補うことにより、TS 高値の癌組織には、フッ化ピリミジン系抗癌剤に対する高い感受性が期待できることを意味している。ヒト腺癌組織内の TS 濃度は正常粘膜と比較すると総じて高く、癌組織内還元型葉酸濃度を高める 5-FU の生化学的修飾は今後はより大きな意味を持つてくるものと思われる。

## 結 論

作用機序が明らかにされている既知の抗癌剤を対象に、その作用増強の条件を明らかにする目的で、ヒトの胃癌組織61例、大腸癌組織26例を用いピリミジン代謝、および三者結合体と還元型葉酸代謝との関係を検討した。その結果以下の結論を得た。

1. 癌組織の TS 濃度、TK 活性、5-FU のリン酸化および分解経路活性、還元型葉酸濃度 ( $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  および  $\text{H}_4\text{PteGlu}$  の合計濃度)、TC の半減期はそれぞれ、 $2.5 \pm 3.6\text{nM}$ 、 $2.6 \pm 1.3\text{n mol/g組織/min.}$ 、 $4.5 \pm 3.9\text{n mol/g組織/min.}$ 、 $1.4 \pm 1.0\text{n mol/g組織/min.}$ 、 $1.9 \pm 1.0\text{nM}$ 、 $36 \pm 8$  分であった。

2. 外因性の FdUMP と内因性還元型葉酸のみの存在下での TC 形成量の TS 濃度に対する百分率を測定し、これを  $\text{TSIR}_{\text{in tube}}$  として、TS 濃度との関係をみてみると、両者の間には、負の相関が得られた ( $y = -0.37x + 2.672$ ,  $r = 0.543$ ,  $p < 0.001$ )。

3. 術前にフッ化ピリミジンを投与された検体の TS 阻害率 (TSIR) と TS 濃度との間に相関関係はみられなかった。

4. トリチウムで標識された TC の半減時間は試験管内の還元型葉酸濃度 ( $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度) とよく相関した ( $y = 89.9x + 18.6$ ,  $r = 0.869$ ,  $p < 0.001$ )。

5. TS 濃度に対する還元型葉酸濃度の比は, TS 濃度が高くなるにつれ有意に減少した ( $r=0.543$ ,  $p<0.001$ ).

6. 試験管内の  $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$  濃度を TS 濃度で除した値と  $\text{TSIR}_{\text{in tube}}$  との間には有意な正の相関関係がみられた ( $r=0.553$ ,  $p<0.001$ ).

以上の結果から, 5-FU のリン酸化経路活性と比べて, 5-FU の分解経路活性は無視し得る値ではなく, フッ化ピリミジンの抗腫瘍効果に影響を及ぼすと考えられた. また, 腫瘍組織間にみられる TS 濃度や還元型葉酸濃度の相違がフッ化ピリミジン投与後の TS 阻害率を左右することが明らかになった.

## 謝 辞

稿を終るに臨み, 御指導, 御校閲を賜りました恩師渡辺洋学教授に深甚なる謝意を表します. また, 本研究遂行に際し, 御指導戴きましたがん研究所化学療法部佐々木琢磨教授, 越村三郎名誉教授に心から謝意を表します. 本研究に際し, 貴重な *Lactobacillus casei* の TS を提供してくださった米国カリフォルニア大学 Daniel V. Santi 教授ならびに岡山大学薬学部薬品化学綿矢有佑助教授, 各種酵素活性の測定を御指導下さいました大阪基礎医学研究奨励会白坂哲彦幹事, 吉田肉腫細胞株を提供してくださった佐々木研究所の各位に深く感謝致します. さらに, 本研究遂行に際し終始御指導を賜りましたがん研究所化学療法部田中基裕助教授, 第一外科科学教室の大村健二講師ならびに教室員の皆様に厚く御礼申し上げます.

なお, 本論文の一部は, 第50回日本癌学会総会, 第29回日本癌治療学会総会パネルディスカッション, 第30回日本癌治療学会総会ワークショップ, 第78回日本消化器病学会総会, 第36回, 第37回日本消化器外科学会総会, 第27回, 第28回日本外科代謝栄養学会において発表した.

## 文 献

- 1) Scanlon, K. J., Newman, E. M., Lu, Y. & Priest, D. G.: Biochemical basis for cisplatin and 5-fluorouracil synergism in human ovarian carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8923-8925 (1986).
- 2) 大村健二, 川浦幸光, 道伝研司, 服部和伸, 岩 喬, 白坂哲彦: アミノ酸インバランス輸液と抗癌剤の併用による抗腫瘍効果. *KARKINOS*, 3, 921-929 (1990).
- 3) Scheithauer, W., Rosen, H., Schiessel, R., Schuller, J., Karall, M., Ernst, F., Sebesta, C., Kornek, G., Hentschel, E., Marzell, A. & Depisch, D.: Treatment of patients with advanced colorectal cancer with cisplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin. *Cancer*, 67, 1294-1298 (1991).
- 4) LoRusso, P., Pazdur, R., Redman, B. G., Kinzie, J. & Vaitkevicius V.: Low-dose continuous infusion 5-fluorouracil and cisplatin: Phase II evaluation in advanced colorectal carcinoma. *Am J. Clin. Oncol.*, 12, 486-490 (1989).
- 5) Petrelli, N., Douglass, H. O. Jr., Herrera, L., Russell, D., Stablein, D. M., Bruckner, H. W., Mayer, R. J., Schinella, R., Green, M. D., Muggia, F. M., Megibow, A., Greenwald, E. S., Bukowski, R. M., Harris, J., Levin, B., Gaynor, E., Loutfi, A., Kalsner, M. H., Barkin, J. S., Benedetto, P., Woolley, P. V., Nauta, R., Weaver, D. W. & Leichman, L. P.: The modulation of fluorouracil with leucovorin in metastatic colorectal carcinoma: A prospective randomized phase III trial. *J. Clin. Oncol.*, 7, 1419-1426 (1989).
- 6) Machover, D., Goldschmidt, E., Chollet, P., Metzger, G., Zittoun, J., Marquet, J., Vandenbulcke, J. M., Misset, J. L., Schwartzberg, L., Fourtillan, J. B., Gaget, H. & Mathe, G.: Treatment of advanced colorectal and gastric adenocarcinomas with 5-fluorouracil and high-dose folinic acid. *J. Clin. Oncol.*, 4, 685-696 (1986).
- 7) 白坂哲彦: 5FU は DNA, RNA のいずれに作用するのか. *癌化学療法 up date*, 17, 42-47 (1991).
- 8) Maehara, Y., Kusumoto, T., Kusumoto, H., Anai, H., Sakaguchi, Y., Kido, Y., Okamura, T., Korenaga, D. & Sugimachi, K.: 5-fluorouracil and UFT-sensitive gastric carcinoma has a high level of thymidylate synthase. *Cancer*, 63, 1693-1696 (1989).
- 9) Baskin, F., Carlin, S. C., Kraus, P., Friedkin, M. & Rosenberg, R. N.: Experimental chemotherapy of neuroblastoma; II. increased thymidylate synthetase activity in a 5-fluorodeoxyuridine-resistant variant of mouse neuroblastoma. *Mol. Pharmacol.*, 11, 105-117 (1975).
- 10) 佐々木琢磨: 鶏卵法による癌悪性度の判定と薬剤感受性試験. *ファルマシア*, 23, 58-62 (1987).
- 11) Spears, C. P., Shahinian, A. H., Moran, R. G., Heidelberger, C. & Corbett, T. H.: In vivo kinetics of thymidylate synthetase inhibition in 5-fluorouracil-sensitive and-resistant murine colon adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 42, 450-456 (1982).
- 12) Spears, C. P., Gustavsson, B. G., Mitchell, M. S., Spicer, D., Berne, M., Bernstein, L. & Danenberg, P. V.: Thymidylate synthetase inhibition in malignant tumors and normal liver of patients given intravenous 5-fluorouracil. *Cancer Res.*, 44, 4144-4150 (1984).
- 13) 綿矢有佑: チミジル酸合成酵素のアフィニティラベル. *蛋白質 核酸 酵素*, 22, 190-196 (1980).
- 14) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 改訂第11版, 46-59頁, 金原出版, 東京, 1985.
- 15) 大腸癌研究会編: 臨床・病理, 大腸癌取扱い規約. 改訂第4版, 33-37頁, 金原出版, 東京, 1985.
- 16) Wilkinson, D. S. & Crumley, J.: Metabolism of 5-fluorouracil in sensitive and resistant Novikoff hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, 252, 1051-1056 (1977).
- 17) Maehara, Y., Nakamura, H., Nakane, Y., Kawai, K., Okamoto, M., Nagayama, S. & Fujii, S.: Activities of various enzymes of pyrimidine nucleotide and DNA syntheses in normal and neoplastic human tissues. *Gann*, 73, 289-298 (1982).
- 18) Fujii, S., Ikenaka, K., Fukushima, M. & Shirasaka, T.: Effect of uracil and its derivatives on antitumor activity of 5-fluorouracil and 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil. *Gann*, 69, 763-772 (1978).
- 19) Ikenaka, K., Shirasaka, T., Kitano, S. & Fujii, S.: Effect of uracil on metabolism of 5-fluorouracil in vitro. *Gann*, 70, 353-359 (1979).
- 20) Steinberg, S. E.: Mechanisms of folate homeostasis. *Am. J. Physiol.*, 246, G319-G324 (1984).
- 21) Houghton, J. A., Schmidt, C. & Houghton P. J.: The effect of derivatives of folic acid on the fluorodeoxyuridylate-thymidylate synthetase covalent complex in human

colon xenografts. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **18**, 347-354 (1982).

22) Houghton, J. A., Williams, L. G., Radparvar, S. & Houghton, P. J.: Characterization of the pools of 5, 10-methylenetetrahydrofolates and tetrahydrofolates in xenografts of human colon adenocarcinoma. *Cancer Res.*, **48**, 3062-3069 (1988).

23) Kang, S. S., Wong, P. W. K. & Norusis, M.: Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism*, **36**, 458-462 (1987).

24) Danenberg, P. V. & Lockshin, A.: Fluorinated pyrimidines as tight-binding inhibitors of thymidylate

synthetase. *Pharmac. Ther.*, **13**, 69-90 (1981).

25) Radparvar, S., Houghton, P. J. & Houghton, J. A.: Effect of polyglutamylated 5, 10-methylenetetrahydrofolate on the binding of 5-fluoro-2'-deoxyuridylylate to thymidylate synthase purified from a human colon adenocarcinoma xenograft. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 335-342 (1989).

26) Danenberg, P. V. & Danenberg, K. D.: Effect of 5, 10-methylenetetrahydrofolate on the dissociation of 5-fluoro-2'-deoxyuridylylate from thymidylate synthetase: evidence for ordered mechanism. *Biochemistry*, **17**, 4018-4024 (1978).

**Investigation into Biochemical Modulation of Chemotherapy for Gastrointestinal Carcinoma -Evaluation of Ternary Complex Formation and Reduced Folate Metabolism** Kenji Dohden, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **103**, 721—730 (1994)

**Key words** fluoropyrimidine, thymidylate synthase, ternary complex, reduced folate

#### Abstract

The combined administration of fluoropyrimidine and its regulatory factors have recently attracted attention because of the higher efficacy on gastric or colorectal cancer. In this study, various enzymatic activities participating in the pyrimidine metabolism of tumor tissues were measured, and interactions between the levels of thymidylate synthase and reduced folate, which is the cofactor of the enzyme reaction, were studied to make clear the conditions for enhancement of the effect of the chemotherapy with fluoropyrimidines. Eighty-seven fresh samples of gastric or colorectal carcinoma tissue and 14 samples of normal gastric mucosa were obtained from 75 clinical cases. These samples were frozen and stored until use. Measured items were the thymidylate synthase (TS) level, activities of thymidine kinase (TK), 5-fluorouracil phosphorylation and degradation pathways, and the concentration of methylenetetrahydrofolate ( $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$ ) and tetrahydrofolate ( $\text{H}_4\text{PteGlu}$ ) which are reduced folates. Moreover, the stability of the ternary complex consisting of tritium-labeled fluorodeoxyuridine monophosphate ( $^3\text{H-FdUMP}$ ), TS and endogenous reduced folate were studied. The mean values plus or minus standard deviations (means $\pm$ SD) of the TS level, TK activity, the anabolic activity of 5-fluorouracil, the catabolic activity of 5-fluorouracil, the sum of the two reduced folates, and the half-life of tritium-labeled ternary complex in carcinoma tissues were  $2.5\pm 3.6$  nM,  $2.6\pm 1.3$  n mol/g tissue/min.,  $4.5\pm 3.9$  n mol/g tissue/min.,  $1.4\pm 1.0$  n mol/g tissue/min.,  $1.9\pm 1.0$  nM, and  $36\pm 8$  min., respectively. The half-life of tritium-labeled ternary complex and the concentration of the methylenetetrahydrofolate in test tube were correlated well ( $y=89.8X+18.6$ ,  $r=0.869$ ,  $p<0.001$ ). A negative correlation ( $y=-0.37X+2.67$ ,  $r=0.543$ ,  $p<0.001$ ) was observed between the TS level and  $\text{TSIR}_{\text{in tube}}$ , which indicates the percentage of TS forming the ternary complex with FdUMP added exogenously and endogenous reduced folates. These results show that degradation of 5-fluorouracil has an influence on the anti-tumor activity of fluoropyrimidines, and that the differences in the levels of TS or reduced folate among tumor tissues influence the thymidylate synthase inhibition rate and the duration of thymidylate synthase inhibition after administration of fluoropyrimidines.