

# 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

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 川上, 和之 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8406">http://hdl.handle.net/2297/8406</a>

## 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

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

川 上 和 之

(平成4年11月18日受付)

チミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) はフッ化ピリミジン系抗癌剤の標的酵素であり, 抗癌剤の代謝産物であるフロロデオキシウリジン1 磷酸 (5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate, FdUMP) と TS およびメチレンテトラヒドロ葉酸 (5,10-methylenetetrahydrofolate,  $\text{CH}_2\text{FH}_4$ ) の3者間で強力な3重結合体 (ternary complex) を形成することにより酵素活性が阻害される. 本研究ではヒト大腸癌手術により摘出された50検体を対象として, TS 活性,  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  および  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  の前代謝物であるテトラヒドロ葉酸 (tetrahydrofolate,  $\text{FH}_4$ ) を測定し, 癌化学療法における TS 活性測定の意義および今後の化学療法の方向性を検討した. 大腸癌症例50例中14例には術前にユーエフティ (UFT, テガフルとウラシルのモル比が1:4の複合製剤) を投与し, 残りの36例には UFT 投与を行わなかった. UFT 非投与例の TS 活性は  $1.83 \pm 1.46 \text{ pmol/g}$  (mean  $\pm$  SD) であり, その変動係数 (CV) は79.9%でフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する感受性の多様性が予測され, TS 活性は感受性の指標になると考えられた. 一方, UFT 投与例の TS 活性は総 TS 活性 (総 TS) が  $6.30 \pm 5.39 \text{ pmol/g}$ , 遊離 TS 活性 (遊離 TS) が  $2.58 \pm 2.09 \text{ pmol/g}$  であり, TS 阻害率 [(総 TS - 遊離 TS)/総 TS] は  $56.3 \pm 12.9\%$  であった. 総 TS は UFT 投与例で有意に高値を示し ( $p < 0.0001$ ), UFT の投与により TS 産生が増加しており, これが抗癌剤耐性のメカニズムとなっていることが示唆された. UFT 非投与例で内因性の  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  による最大可能 TS 阻害率を予測すると  $8.3 \pm 9.3\%$  であった. また, UFT 投与例で遊離葉酸量と TS 阻害率の関係を検討すると  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  ( $r = 0.70$ ,  $p < 0.01$ ),  $\text{FH}_4$  ( $r = 0.61$ ,  $p < 0.05$ ) のいずれも, 高値をとるほど TS 阻害率は高かった. これらのことから, フッ化ピリミジン系抗癌剤投与時の葉酸補給が抗腫瘍効果の発現に不可欠であると考えられた. さらに, UFT 投与時の TS 誘導のメカニズムを遺伝子レベルで検討したが, DNA レベルでは UFT 投与に関わらず TS 遺伝子の増幅は認められなかった. TS mRNA 転写量に関しても UFT 投与例と非投与例で有意な差は認められず, TS 誘導は mRNA から蛋白への翻訳段階で起こっていると考えられた.

**Key words** human colorectal cancer, thymidylate synthase, folate pool, fluoropyrimidines, drug resistance

チミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) はメチレンテトラヒドロ葉酸 (5,10-methylenetetrahydrofolate,  $\text{CH}_2\text{FH}_4$ ) をメチル基供与体としてデオキシウリジン1 磷酸 (deoxyuridine 5'-monophosphate, dUMP) からデオキシチミジン1 磷酸 (deoxythymidine 5'-monophosphate, dTMP) を合成する酵素であり, 核酸新生経路の dTMP 合成に関与する唯一の酵素である. TS は核酸代謝上特異的な位置をしめ, 核酸合成の律速酵素であることから抗癌剤の恰好のターゲットになっており<sup>1)</sup>, 現在もより有効な TS 阻害剤の開発が積極的に行われている<sup>2)-4)</sup>.

5-フロロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) は, 1957年, Heidelberger ら<sup>5)</sup>により抗腫瘍効果の確認が行われてから今日に至るまで消化器癌を中心として広く固形癌の化学療法に用いられている. その作用機序に関しても多くの研究がなされており, 主として以下の3つが考えられている<sup>6)</sup>: 1) 5-FU の代謝産物であるフロロデオキシウリジン1 磷酸 (5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate, FdUMP) と TS および  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  の3

者が安定した三重結合体 (ternary complex) を形成することにより TS を不可逆的に不活性化し, その結果としてチミジル酸が減り, DNA 合成が阻害される<sup>7a)</sup>. 2) 5-FU が活性型のフロロウリジン3 磷酸 (5-fluorouridine 5'-triphosphate, FUTP) に代謝され直接 RNA に取り込まれ, 正常でない RNA がつくられ, 細胞障害が発揮される<sup>8,9)</sup>. 3) 5-FU がフロロデオキシウリジン3 磷酸 (5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate, FdUTP) に代謝され直接 DNA に取り込まれ, DNA の機能障害を起こす<sup>10)</sup>. 近年 5-FU との三重結合体の安定性に関与する leucovorin の併用が進行大腸癌に高い奏効率を示すことが報告されている<sup>12,13)</sup>. この事実は 5-FU の作用機序のうちでも TS 阻害がその主要なメカニズムとなっていることを示唆するものである. 以上より, フッ化ピリミジン系抗癌剤に対する感受性の度合いは三重結合体を形成する FdUMP, TS,  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  の濃度によって規定される可能性が考えられる. FdUMP の前代謝物であるフロロデオキシウリジン (5-fluoro-2'-deoxyuridine, FdUrd) を

Abbreviations: ADR, adriamycin; bp, base pair; BSA, bovine serum albumin; CDDP, cisplatin;  $\text{CH}_2\text{FH}_4$ , 5,10-methylenetetrahydrofolate; CMP, cytidine 5'-monophosphate; CV, coefficient of variation; dCTP, deoxycytidine 5'-triphosphate; dUMP, deoxyuridine 5'-monophosphate; dTMP, deoxythymidine 5'-

用いた研究では、TS 活性が低い腫瘍ほど FdUrd に対する感受性が高く<sup>14)</sup>、逆に FdUrd 耐性を獲得した腫瘍細胞の TS 活性は高いことから<sup>15,16)</sup>、臨床での癌組織においても TS 活性がフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する感受性の指標となるものと考えられる。一方、CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>をはじめとした腫瘍内の葉酸プールは三重結合体の安定性に関与することが知られており<sup>17,18)</sup>、フッ化ピリミジン系抗癌剤投与時の葉酸プール増加の必要性が強調されている。しかしながら、現在まで臨床検体での TS 活性、葉酸プールの測定はほとんどなされておらず、抗癌剤投与時の両者の変動に関しても不明な点が多い。

本研究ではヒト大腸癌の検体を用いて腫瘍組織内の TS 活性および葉酸プールの代表値として CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub> とその前代謝物であるテトラヒドロ葉酸 (tetrahydrofolate, FH<sub>4</sub>) を測定し、感受性規定因子としての可能性およびフッ化ピリミジン系抗癌剤投与時の外因性葉酸投与の必要性を検討した。さらにユーエフティ (UFT) 投与後の大腸癌組織を用いて TS 活性に及ぼすフッ化ピリミジン系抗癌剤の影響を観察し、その変動機序を遺伝子レベルで検討した。

#### 対象および方法

当科および関連病院にて手術により切除された大腸癌50症例 (50検体 (男性32例, 女性18例, 平均年齢64.2歳)) を対象とした。このうち14例には術前に UFT (大鵬薬品, 東京) を経口投与し、残りの36例には投与しなかった。UFT の1日投与量は300mg が2例, 400mg が9例, 600mg が3例であった。平均投与期間は11.7日, 平均総投与量は4936mg であった。

TS 酵素活性, 内因性葉酸による三重結合体形成能, CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>, FH<sub>4</sub> はいずれも <sup>3</sup>H-FdUMP, TS, CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub> の三者による三重結合体形成を利用して測定した。

##### 1. <sup>3</sup>H-FdUMP の調整

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

吉田肉腫 2g に4倍量の TK 用ホモジナイズ緩衝液 [0.25 M 蔗糖, 5 mM 塩化マグネシウム, 1 mM ジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT), 50mM Tris-HCl (pH 8.0)] を加えホモジナイズし, 105,000G, 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, 10,000G, 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 <sup>3</sup>H-FdUMP の生成と分離

<sup>3</sup>H-FdUrd (NEN, 東京, 17.9Ci/mmol, 1 mCi/ml) 500 $\mu$ 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 1 容, 100mM ATP 溶液 1 容, 120mM  $\alpha$ -Glycerolphosphate 溶液 1 容) 0.2ml を加え溶解した。これに上記の TK 溶液 0.8 ml を加え37°C で1時間反応させた。その後蒸留水 1 ml, 20% トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) 0.5ml を加え3000回転, 10分間遠心分離し上清に TCA 除去剤 (17.7% Tri-n-octylamine を含む 1,1,2-Trichlorotrifluoroethane 溶液) 2~3 ml を加え10分間振盪し, 3000回転, 5分間遠心分離した。この上清をセルロースプレート (MERCK 社, フランクフ

ルト, ドイツ) 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, 遠心分離し <sup>3</sup>H-FdUMP を得た。

##### II. TS 活性の測定

TS 活性の測定は spears ら<sup>19)</sup> の方法に従った。すなわち, 腫瘍組織 300~500mg を4倍量の TS 用ホモジナイズ緩衝液 [0.2M Tris-HCl (pH 7.4), 20mM 2-メルカプトエタノール, 15mM cytidine 5'-mono-phosphate (CMP), 100mM フッ化ナトリウム] でホモジナイズし, 105,000G で60分間遠心分離後, その上清を酵素溶液 (20% homogenate) 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, <sup>3</sup>H-FdUMP 0.1ml, 補因子溶液 B [2 mM テトラヒドロ葉酸, 16mM アスコルビン酸塩, 9 mM 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% 仔牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA), 50mM 磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)] 0.05ml を順次加え攪拌し, 30°C で20分間反応させ TS, <sup>3</sup>H-FdUMP, CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub> の三重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, さらに沈殿を5% TCA 2ml で2回懸濁・遠心した。分離した沈殿に蟻酸 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, 東京) にて放射活性を測定し TS 量を定量した。

手術前に化学療法を行っている症例の組織においては, TS の総量 (総 TS) と FdUMP に結合していない遊離の TS 量 (遊離 TS) に分けて測定した。すなわち上記と同様にして測定した TS 活性を実測遊離 TS 活性 (実測遊離 TS) とし, 総 TS 活性の測定は酵素溶液 0.1ml に緩衝液 A 0.1ml を加え, 25°C で3時間反応させ TS に結合している FdUMP をあらかじめ遊離させた後, <sup>3</sup>H-FdUMP, 補因子溶液 B を加え測定をおこなった。実測遊離 TS にはすでに酵素溶液内に存在した三重結合体中の FdUMP と <sup>3</sup>H-FdUMP とが反応中に入れ替わったものが含まれているため, Spears ら<sup>19)</sup> の理論にしたがって次式により真の遊離 TS 活性を算出した。

$$\text{遊離 TS} = (\text{実測遊離 TS} - 0.13 \times \text{総 TS}) / 0.87$$

##### III. 内因性葉酸による三重結合体形成能の測定

TS 活性測定の補因子溶液 B からテトラヒドロ葉酸をのぞいたものを新しく補因子溶液として用い, TS 活性の測定と同様に測定を行い, 内因性の葉酸のみから形成される三重結合体量を定量した。

##### IV. 還元型葉酸プール (CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>, FH<sub>4</sub>) の測定

###### 1. 組織からの遊離葉酸の抽出

腫瘍組織 0.2~0.4g に4倍量の5% TCA を加えホモジナイズし (20% homogenate), 3000回転, 5分間遠心後, 上清に1 ml の TCA 除去剤を加え10分間振盪した。これを3000回転, 5分間遠心しその液層を分取し測定に使用した。

monophosphate; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FdUMP, 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate; FdUTP, 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate; FdUrd, 5-fluoro-2'-deoxyuridine; FH<sub>4</sub>, tetrahydrofolate; FUTP, 5-fluorouridine 5'-triphosphate; 5-FU, 5-fluorouracil; PCR, polymerase chain

## 2. 吉田肉腫よりの TS 酵素溶液の調整

吉田肉腫細胞に等量の TS 用ホモジナイズ緩衝液を加え、ホモジナイズし、超音波処理した後 105,000G, 60分遠心分離した。えられた上清を TS ホモジナイズ緩衝液で2晩透析し、前述の内因性葉酸プール測定法にて内因性葉酸が完全に除去されたことを確認したものを TS 酵素溶液として使用した。

## 3. $\text{CH}_2\text{FH}_4$ , $\text{FH}_4$ の測定

$\text{CH}_2\text{FH}_4$ ,  $\text{FH}_4$  は Priest ら<sup>20</sup>の方法を一部改変して測定した。すなわち、組織より抽出したサンプル溶液 0.05ml に TS 酵素溶液 0.05ml, 2% BSA 0.05ml, 26mM ホルマリン 0.05ml, 500nM  $^3\text{H}$ -FdUMP 0.05ml を加え30℃で20分間反応させ、形成された三重結合体量を TS 活性の測定と同様にして測定し  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  と  $\text{FH}_4$  の合計量を定量した。つづいて、 $\text{CH}_2\text{FH}_4 + \text{FH}_4$  測定法の 26mM ホルマリンを蒸留水に変え、同様に測定を行い  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  を定量した。 $\text{CH}_2\text{FH}_4 + \text{FH}_4$  から  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  を減算して  $\text{FH}_4$  をもとめた。

## V. TS 遺伝子増幅および TS mRNA 転写量の解析

### 1. プローブの作成と標識

#### 1) TS プローブの作成

国立遺伝学研究所瀬野博士から供与を受けたヒト TS cDNA を鋳型として特異的 DNA 増幅反応 (polymerase chain reaction, PCR)<sup>21</sup>にて DNA を増幅した。プライマーとして、ヒト TS cDNA の遺伝子配列<sup>22</sup>より TS1 (AGAGATGAATTCCTCTGCT), TS2 (CTGACAATATCCTTCAAGCT) の20塩基からなる2種類のオリゴヌクレオチドを合成し使用した。PCR 反応液を低融点アガロースで泳動し、目的とする775塩基対 (base pair, bp) の DNA を切り出しフェノール・クロロホルム抽出し TS プローブとして用いた。

#### 2) ヒト $\beta$ -グロビンプローブの作成

PCR 法に用いるプライマーとしてヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子配列<sup>23</sup>より  $\text{H}\beta\text{-gl1}$  (AGAGCCATCTATTGCTTACA),  $\text{H}\beta\text{-gl2}$  (TATGACATGAACTTAACCAT),  $\text{H}\beta\text{-gl3}$  (AGGCAGAA-TCCAGATGCTCA) の20塩基からなる3種類のオリゴヌクレオチドを合成した。ヒト胎盤 DNA を鋳型として  $\text{H}\beta\text{-gl1}$ ,  $\beta\text{-gl3}$  をプライマーに用いて PCR 反応を行った。反応液を低融点アガロースで泳動し目的とする 1578bp の DNA を切り出しフェノール・クロロホルム抽出した。さらにこの DNA を鋳型として  $\text{H}\beta\text{-gl1}$ ,  $\text{H}\beta\text{-gl2}$  をプライマーとして用いて再度 PCR 反応を行った。反応液を低融点アガロースで泳動し目的とする 576bp の DNA を切り出しフェノール・クロロホルム抽出しプローブとして用いた。

#### 3) PCR 反応

鋳型 DNA 1 $\mu\text{g}$  に対し PCR 反応緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM 塩化カリウム, 1.5mM 塩化マグネシウム], デオキシリボヌクレオチド混合液 [deoxyadenosine 5'-triphosphate (dATP), deoxyguanosine 5'-triphosphate (dGTP), deoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP), deoxythymidine 5'-triphosphate (dTTP) 各 200 $\mu\text{M}$ ], *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus 社, Norwalk, USA) 2.5単位, (+) 鎖および (-) 鎖プライマー各 1 $\mu\text{M}$  を加

え、滅菌蒸留水により全量 100 $\mu\text{l}$  に調整した。加熱による反応液の蒸発を防ぐため、100 $\mu\text{l}$  のミネラルオイル (Sigma 社, St. Louis, USA) を重層した。反応には DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus 社) を使用し、熱変性を94℃, 2分間, アニリングを55℃, 2分間, DNA の伸長を72℃, 2分間としこれらを1サイクルとして26サイクル繰り返した。反応終了後、上層のミネラルオイルを除去し、クロロホルム 100 $\mu\text{l}$  を加え振とうし、上層に増幅後の DNA 溶液を得た。

#### 4) プローブの標識

すべてのプローブはそれぞれ 25ng ずつをマルチプライム・ラベリング<sup>24</sup>・キット (アマシャム・ジャパン) を用いて [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (アマシャム・ジャパン) で標識した。なお、 $\beta$ -アクトチン プローブはコスモバイオ (東京) より購入した。

## 2. 高分子 DNA の抽出

各大腸癌組織を 6 ml のホモジナイズ緩衝液 [20mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1M 塩化ナトリウム, 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ ] 中でホモジナイズし、ホモジネートをファルコン2059チューブに入れ、1500回転, 5分間遠心分離した。上清を捨てペレットに水冷 TNE 溶液 [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1M 塩化ナトリウム, 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)] 4 ml を加え懸濁し、10%ドデシル硫酸ナトリウム (sodium-dodecyl-sulfate, SDS) を 200 $\mu\text{l}$ , 10mg/ml のプロテイナーゼ K 溶液を 60 $\mu\text{l}$  加え、混合後50℃で一晩加温した。TrisEDTA (TE) 緩衝液飽和フェノール 4 ml を加え4時間穏やかに攪拌し、3000回転, 30分間遠心分離し、DNA を抽出した。液層を分取し、クロロホルム 2 ml, TE 緩衝液飽和フェノール 2 ml を加え攪拌後、3000回転, 20分間遠心分離し DNA を抽出した。再度クロロホルム 4 ml において抽出を行った後 DNA 溶液にリボヌクレアーゼ A (Sigma 社) 200 $\mu\text{g}$  を加え 37℃, 30分間反応させた。その後、TE 緩衝液飽和フェノール 4 ml にて1回 (3000回転, 30分), TE 緩衝液飽和フェノール・クロロホルム (1:1) 4 ml にて1回 (3000回転, 20分), クロロホルム 4 ml にて1回 (3000回転, 10分) 抽出を行った。分取した液層に 400 $\mu\text{l}$  の 3M 酢酸ナトリウム, 8 ml のエタノールを加え3000回転, 30分間遠心分離しエタノール沈澱を行った。沈澱させた DNA は80%エタノール 4 ml で洗浄し、減圧乾燥させた後、TE 緩衝液に溶解した。

### 3. サザンプロットハイブリダイゼーション

TE 緩衝液中に溶解した DNA は、260nm における吸光度を測定して DNA 濃度を求めた後 (10. D. = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), その 20 $\mu\text{g}$  を制限酵素 EcoRI (宝酒造, 京都) にて完全消化した。DNA 溶液 10 $\mu\text{l}$  (5 $\mu\text{g}$ ) に 0.25% ブロムフェノールブルー, 0.25% キシレンシアノールおよび 30% グリセロールを含む TE 緩衝液 3 $\mu\text{l}$  を加え混合し、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  エチジウムブロマイドを含んだ泳動緩衝液 (40mM Tris 酢酸 (pH 8.0), 2 mM EDTA) を用いて定電圧 100V において 1.0% アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後サザン法<sup>25</sup>に準じてトランスファーを行った。すなわち、泳動後のゲルをアルカリ変性液 (0.5M 水酸化ナトリウム, 1.5M 塩化ナトリウム) に浸し30分間室温にてゆっくり振盪し DNA を変性させた後、中和液 [3M 塩化ナト

reaction; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, saline sodium citrate; TCA, trichloroacetic acid; TE, Tris EDTA; TK, thymidine kinase; TS, thymidylate synthase

リウム, 0.5M Tris-HCl (pH 7.2)] に浸し15分間室温にてゆっくり振盪した。中和操作を2回繰り返した後, DNA はナイロンメンブレンフィルター Hybond-N (アマシャム・ジャパン) に  $20\times$  saline sodium citrate [(0.9M 塩化ナトリウム, 0.09M クエン酸ナトリウム), SSC] を用いてトランスファーした。ナイロンメンブレンフィルターは10分間紫外線照射を行い, DNA をフィルターに固定した。フィルターはハイブリダイズ緩衝液 [ $6\times$  SSC,  $5\times$  デンハルト液<sup>26)</sup> (0.1%ポリビニルピロリドン, 0.1% BSA, 0.1% フィコール400), 5 mM EDTA, 0.5% SDS, 50 $\mu$ g/ml 変性サケ精子 DNA] 中65°Cの恒温水層において2時間のプレハイブリダイゼーションを行った。その後, ハイブリダイゼーション緩衝液に0.1% (v/v)<sup>32</sup>P 標識 TS プローブを加え65°Cにおいて16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズさせたフィルターは  $2\times$  SSC および0.1% SDS を含む溶液中で65°C 15分間の洗浄を2回行い, 引き続き  $0.2\times$  SSC および0.1% SDS を含む溶液中で65°C, 1時間の洗浄を行った。洗浄後 Hyperfilm-MP (アマシャム・ジャパン) を用いて-80°Cにてオートラジオグラフィを行った。同じフィルターを  $0.1\times$  SSC および0.1% SDS を含む溶液中で95°C 10分間, 2回洗浄し TS プローブをはずした後, 同様の条件で  $\beta$ -グロビンプローブとハイブリダイズおよび洗浄を行い, -80°Cでオートラジオグラフィを施行した。

#### 4. 総 RNA の抽出

グアニジンフェノール・クロロホルム法<sup>27)</sup>にて総 RNA を抽出した。すなわち, 各大腸癌組織を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 (pH 7.0), 0.5% サルコシル, 0.1M 2-メルカプトエタノール] 4 ml でホモジナイズした後, 2M 酢酸ナトリウム (pH 4) 600 $\mu$ l, TE 緩衝液飽和フェノール 4 ml, クロロホルム 1.2ml を順次加えながらそのつど攪拌し, 続いて15分間水中に静置した。その後, 5000回転, 20分間遠心分離しその上清を回収した。再び2M 酢酸ナトリウム (pH 4) 500 $\mu$ l, TE 緩衝液飽和フェノール 4 ml, クロロホルム 1 ml を順次加えながらそのつど攪拌し, 15分間水中に静置した。5000回転, 20分間遠心分離後その上清を回収し, 2プロパノール 4 ml を加え混合後-20°Cに2時間静置した。次に7000回転, 20分間遠心分離しその上層を捨てペレットにD溶液 400 $\mu$ l を加え溶解した。2プロパノール 400 $\mu$ l を加え攪拌した後5000回転, 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 $\mu$ l の蒸留水に溶解した。

#### 5. ノーザンブロットハイブリダイゼーション

総 RNA 20 $\mu$ g をエタノール沈澱させ, 50%ホルムアミド, 2.2M のホルマリンを含む  $1\times$  MOPS 溶液 [20mM 3-N-Morpholino-propanesulfonic acid (pH 7.0), 5 mM 酢酸ナトリウ

ム, 1 mM EDTA] に溶解し, 65°Cで5分間反応させて RNA の高次構造を壊した後, 1.0%アガロースゲルにて  $1\times$  MOPS 中で電気泳動を行った。泳動終了後のゲルは  $10\times$  SSC に浸し20分間ゆっくり振盪させた後,  $20\times$  SSC を使用してナイロンメンブレンフィルター Hybond-N にトランスファーした。ナイロンメンブレンフィルターは10分間紫外線照射を行い, RNA をフィルターに固定した。フィルターは50%ホルムアミド,  $5\times$  SSC, 50mM 磷酸ナトリウム, 0.1% SDS, 100 $\mu$ g/ml 変性サケ精子 DNA,  $4\times$  デンハルト液からなるプレハイブリダイゼーション液中で42°C 4時間反応させた。続いてこのプレハイブリダイゼーション液を捨て, 新しくハイブリダイゼーション液 (プレハイブリダイゼーション液に20% (w/v) 硫酸デキストランを加えたもの) を入れ, 0.2% (v/v)<sup>32</sup>P 標識 TS プローブを加え, 42°Cで16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズさせたフィルターは  $2\times$  SSC および0.1% SDS を含む溶液中で42°C, 15分間の洗浄を2回行い, 引き続き  $0.2\times$  SSC および0.1% SDS を含む溶液中で42°C, 1時間の洗浄を行った。洗浄後 Hyperfilm-MP を用いて-80°Cでオートラジオグラフィを施行した。同じフィルターを  $0.1\times$  SSC および0.1% SDS を含む溶液中で95°C 10分間, 2回洗浄し TS プローブをはずした後, 同様の条件で, <sup>32</sup>P-dCTP で標識した  $\beta$ -アクチンプローブとハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせたフィルターは  $2\times$  SSC および0.1% SDS を含む溶液中で60°C 15分間の洗浄を2回行い, 引き続き  $0.2\times$  SSC および0.1% SDS を含む溶液中で60°C, 1時間の洗浄を行った後-80°Cでオートラジオグラフィを行った。

#### 6. オートラジオグラフィの解析

オートラジオグラフィ上のバンドの黒化度をデンストメーター (島津 CS-9000, 京都) にて定量した。サザン解析においては,  $\beta$ -グロビン DNA を内部コントロールとして TS DNA の遺伝子増幅の有無を検討した。ノーザン解析においては,  $\beta$ -アクチン mRNA を内部コントロールとして TS mRNA 転写量を定量した。

#### VI. 統計処理

測定値はすべて平均値 $\pm$ 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,  $p < 0.05$  を有意とした。また, 相関の有意性の検定は Pearson の相関係数を求めを行った。

なお大腸癌の記載は大腸癌取扱い規約<sup>28)</sup>に従った。

### 成 績

#### I. 腫瘍組織内 TS 活性

##### 1. UFT 非投与例における腫瘍組織内 TS 活性

術前 UFT 投与を行っていない36例の腫瘍組織内 TS 活性

Table 1. TS activity and TS inhibition rate of the colon cancer tissues treated with or without UFT

	Number of cases	TS total (pmol/g)	TS free (pmol/g)	TSI (%)
UFT (-)	36	1.83 $\pm$ 1.46	1.83 $\pm$ 1.46	
UFT (+)	14	6.30 $\pm$ 5.39*	2.58 $\pm$ 2.09	56.3 $\pm$ 12.9

Results are expressed as mean $\pm$ SD.

TS, thymidylate synthase; TSI, TS inhibition rate

\* $P < 0.0001$  compared with UFT (-) group.

Table 2. Relationship of TS activity and clinicopathologic factors

		Number of cases	TS activity (pmol/g)	
Sex	male	21	1.81±1.56	N.S.
	female	15	1.85±1.31	
Histology	w	18	1.61±0.98	N.S.
	m	15	2.13±1.93	
	muc	3	1.57±0.60	
ly	(-)	20	1.42±0.90	N.S.
	(+)	16	2.33±1.82	
v	(-)	28	2.12±1.52	P<0.01
	(+)	8	0.81±0.42	
n	(-)	15	1.67±1.00	N.S.
	(+)	21	1.94±1.71	

Results are expressed as mean±SD.

N.S., not significant; ly, histological lymphoid invasion; v, histological vascular invasion; n, histological metastasis of lymph node; Histological classification is as follows, w: well differentiated adenocarcinoma, m: moderately differentiated adenocarcinoma, muc: mucinous adenocarcinoma.

(mean±SD) は 1.83±1.46pmol/g 腫瘍重量 (以下略) であり, その変動係数 (CV) は79.9%であった (表1). 性別, 組織型別, 組織学的リンパ管侵襲の有無, 組織学的静脈侵襲の有無, 組織学的リンパ節転移の有無別に検討すると, TS 活性は性別, 組織型別, 組織学的リンパ管侵襲の有無, 組織学的リンパ節転移の有無別で有意な差を認めなかったが, 組織学的静脈侵襲陰性例では陽性例に比較して TS 活性は有意に高値を示した (p<0.01) (表2).

2. UFT 投与例における腫瘍組織内 TS 活性

術前 UFT 投与例14例の TS 活性は総 TS が 6.30±5.39 pmol/g, 遊離 TS が 2.58±2.09pmol/g であった (表1). 腫瘍組織型による TS 活性の差は認められなかった. 一方, UFT 投与例における TS 阻害率は56.3±12.9%であった. 術前の UFT 投与日数, 総投与量と TS 阻害率との関連は認められなかった (図1).

II. 腫瘍組織内葉酸プール

1. UFT 非投与例における葉酸プール

術前 UFT 非投与例中採取組織量に余裕があった30例での組織内葉酸プールの測定した結果, CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub> が 0.91±0.88pmol/g, FH<sub>4</sub> が 0.80±0.80pmol/g であった (表3). 性別, 組織型別, 組織学的リンパ管侵襲の有無, 組織学的静脈侵襲の有無, 組織学的リンパ節転移の有無別に検討すると, 組織学的リンパ節転移陰性例に比較して陽性例で有意に CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub> が高値を示した (p<0.05) が, それ以外は有意な差を認めなかった (表4).

2. UFT 投与例における葉酸プール

術前 UFT 投与例14例での遊離葉酸は CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub> が 1.69±0.94pmol/g, FH<sub>4</sub> が 1.07±0.83pmol/g であった (表3). 遊離葉酸量と TS 阻害率の関係をみると CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>, FH<sub>4</sub> のいずれもその量が増加するにつれ組織内の TS 阻害率が高値を取る関係が認められた (図2).

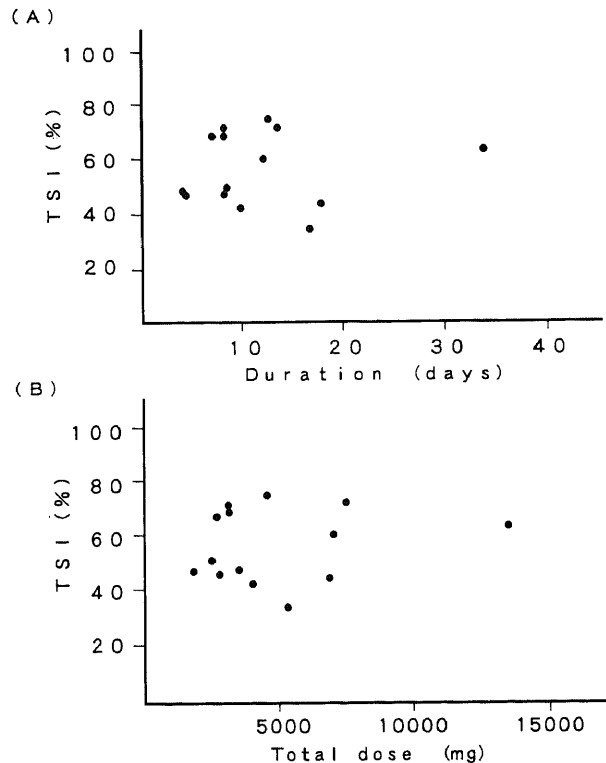


Fig. 1. Relationship between Thymidylate synthase inhibition rate (TSI) in colon cancer tissue and duration of UFT exposure (A). Relationship between TSI in colon cancer tissue and total dose of UFT exposure (B). Fourteen patients received the chemotherapeutic agent UFT preoperatively and TS activities in their resected colon cancer tissues were measured. Correlation coefficient (r) is 0.009 (A) and 0.155 (B). TSI=[TS total-TS free]/TS total×100 (%)

Ⅲ. 内因性葉酸による最大可能 TS 阻害率

術前 UFT 非投与例においてすでに組織中に存在する内因性葉酸のみでの三重結合体形成能を検討した。すなわち、外因性葉酸を加えずに TS 活性の測定を行なったところ、FdUMP 結合能は  $0.13 \pm 0.12 \text{ pmol/g}$  であった。この結合能は内因性葉酸のみでの最大可能 TS 阻害量を表すと考えられ、TS 活性との比を取ることにより内因性葉酸による最大可能 TS 阻害率の理論値が算出される。その理論値は  $8.3 \pm 9.3\%$  であり最大でも 50% を越えなかった。

Ⅳ. UFT 投与による TS 活性、葉酸プールの変化

UFT 投与例における TS 活性、および葉酸プールの変化を非投与例と比較した。総 TS は UFT 投与例で有意に高値を示し、遊離 TS では UFT 投与群で高値を取る傾向が認められたが有意な差ではなかった(表 1)。葉酸プールに関しては  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  が UFT 投与例で有意に高値を示したが、 $\text{FH}_4$  では有意な差を認めなかった(表 3)。

Ⅴ. TS 誘導のメカニズムに関する検討

1. TS 遺伝子増幅の有無(図 3)

50例全例の DNA を抽出し、 $\beta$  グロビン遺伝子量を内部コントロールとして TS 遺伝子量を測定した。さらに TS 遺伝子量

Table 3.  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  and  $\text{FH}_4$  contents of the colon cancer tissues treated with or without UFT

	Number of cases	$\text{CH}_2\text{FH}_4$ (pmol/g)	$\text{FH}_4$ (pmol/g)
UFT (-)	30	$0.91 \pm 0.88$	$0.80 \pm 0.80$
UFT (+)	14	$1.69 \pm 0.94^*$	$1.07 \pm 0.83$

Results are expressed as mean  $\pm$  SD.  
\* $P < 0.05$  compared with UFT (-) group.

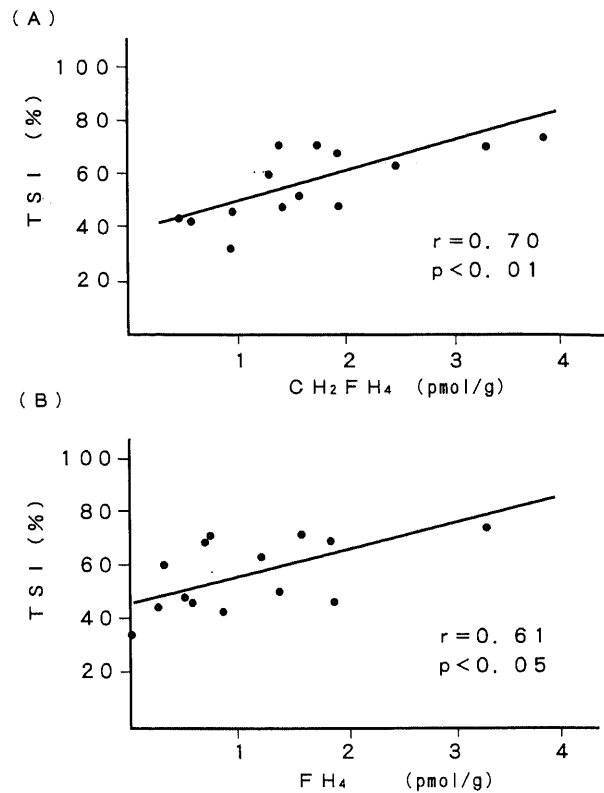


Fig. 2. Relationship between TS inhibition rate (TSI) and doses of  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  (A) and  $\text{FH}_4$  (B) in colon cancer tissues treated with UFT. Fourteen patients received the chemotherapeutic agent UFT preoperatively and TS activities and doses of  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  and  $\text{FH}_4$  in their resected colon cancer tissues were measured. The linear regression line formed from the data points is shown in TSI versus  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  ( $r=0.70$ ,  $p<0.01$ ) and TSI versus  $\text{FH}_4$  ( $r=0.61$ ,  $p<0.05$ ).  $\text{TSI} = [\text{TS total} - \text{TS free}] / \text{TS total} \times 100 (\%)$

Table 4. Relationship of folate content and clinicopathological factors

		Number of cases	$\text{CH}_2\text{FH}_4$ (pmol/g)	$\text{FH}_4$ (pmol/g)
Sex	male	16	$0.70 \pm 0.85$	$0.70 \pm 0.88$
	female	14	$1.16 \pm 0.85$	$0.91 \pm 0.67$
Histology	w	15	$0.91 \pm 0.97$	$0.78 \pm 0.85$
	m	12	$0.81 \pm 0.83$	$0.72 \pm 0.74$
	muc	3	$1.36 \pm 0.18$	$1.17 \pm 0.63$
ly	(-)	18	$0.95 \pm 0.82$	$0.80 \pm 0.91$
	(+)	12	$0.85 \pm 0.96$	$0.80 \pm 0.58$
v	(-)	24	$0.78 \pm 0.79$	$0.74 \pm 0.77$
	(+)	6	$1.45 \pm 1.02$	$1.04 \pm 0.85$
n	(-)	15	$0.55 \pm 0.65$	$0.62 \pm 0.61$
	(+)	15	$1.28 \pm 0.93^*$	$0.98 \pm 0.91$

Results are expressed as mean  $\pm$  SD.  
ly, histological lymphoid invasion; v, histological vascular invasion; n, histological metastasis of lymph node; Histological classification is as follows, w: well differentiated adenocarcinoma, m: moderately differentiated adenocarcinoma, muc: mucinous adenocarcinoma.  
\* $P < 0.05$  compared with n (-) group.

が最低値を示した DNA を 1 として各癌組織の TS 遺伝子量を数量化すると、TS 遺伝子量の最大値は 3.73 であった。しかし、癌組織において TS 遺伝子の存在する 17 番染色体の欠失あるいは重複の頻度が高いことが知られ、この程度の遺伝子量の違いを遺伝子増幅と結論づけることはできない。少なくとも試験管内の 5-FU 耐性癌細胞で認められるような数 10 倍程度の TS 遺伝子増幅は化学療法剤投与の有無に関わらず認められなかつ

た。UFT 投与の有無で TS 遺伝子量を比較したが有意な差は認められなかった (図 4)。また、化学療法施行例において UFT 投与日数、総投与量と TS 遺伝子量との関連を検討したがいずれも関連性を認めなかった (図 5)。

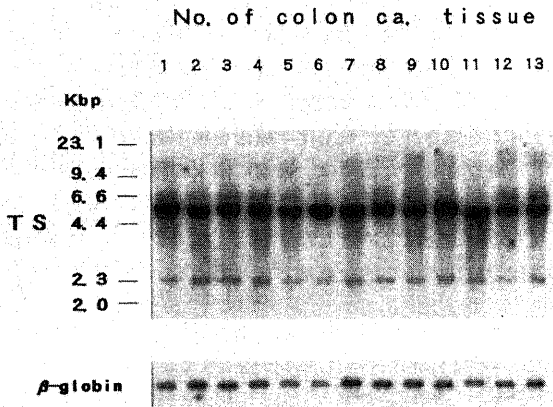


Fig. 3. Southern blot analysis of TS and  $\beta$ -globin gene. The 5  $\mu$ g of DNA isolated from colon cancer tissue was digested with restriction endonuclease EcoRI and transferred to nylon membrane after electrophoresis in 1.0% agarose gel. A membrane filter was hybridized with a  $^{32}$ P-labeled TS and  $\beta$ -globin probe. Size markers are indicated to the left.  $\beta$ -globin was used as an internal control. ca.; cancer

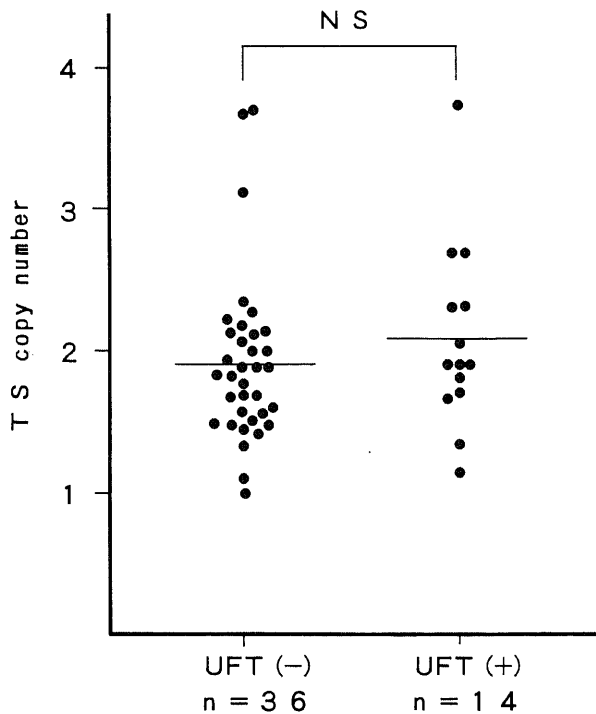


Fig. 4. TS copy number in colon cancer tissues treated with or without UFT. TS specific signals from Southern blot were quantitatively analyzed by densitometric scanning. TS copy number was normalized to the lowest one which was set at 1.0. Each horizontal bar represents geometric mean value.

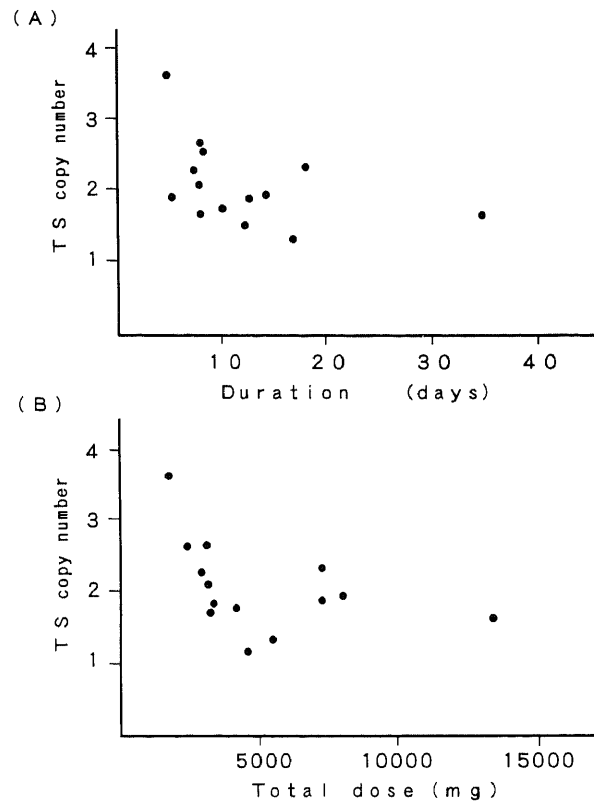


Fig. 5. Relationship between TS copy number in colon cancer tissue and duration of UFT exposure (A). Relationship between TS copy number in colon cancer tissue and total dose of UFT exposure (B). Fourteen patients received chemotherapeutic agent UFT preoperatively and TS copy number in their resected colon cancer tissue was analyzed. Correlation coefficient ( $r$ ) is  $-0.429$  (A) and  $-0.427$  (B).

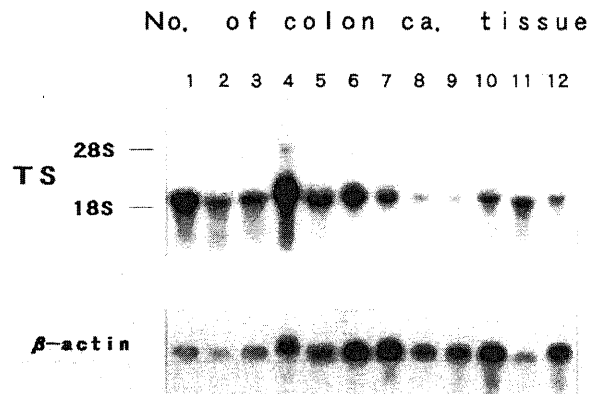


Fig. 6. Northern blot analysis of TS and  $\beta$ -actin mRNA. The 20  $\mu$ g of total RNA isolated from colon cancer tissue was electrophoresed and transferred to nylon membrane. A membrane filter was hybridized with a  $^{32}$ P-labeled TS and  $\beta$ -actin probe. 18S and 28S ribosomal RNA was used as a size marker.  $\beta$ -actin was used as an internal control. ca.; cancer

## 2. TS mRNA 転写活性の変化 (図6)

組織量に余裕のあった30例の TS mRNA 転写量を検討した。βアクチン mRNA 転写量を内部コントロールとして TS mRNA 転写量を定量した。さらに TS mRNA 転写量が最低のものを1として各組織中の mRNA 量を数量化した。UFT 投与の有無別に TS mRNA 転写量をみると、酵素活性の増加にも関わらず mRNA 量に関しては両者に有意な差を認めなかった (図7)。

## VI. TS mRNA からの翻訳調節に関する検討

### 1. UFT 非投与例における TS mRNA 転写量と TS 活性の関連性

術前 UFT 非投与例において TS mRNA 量と TS 活性の関連をみると、TS mRNA 転写量が20以上の4例において、他の組織と比較して転写量が高値であるにも関わらず TS 活性は低値を示した。一方この4例を除いて検討すると、TS mRNA 量と TS 活性にはほぼ一次の相関関係が求められた (図8)。

### 2. UFT 投与例の TS mRNA 転写量と遊離 TS 活性

UFT 非投与例における TS mRNA と TS 活性の関係よりえられた1次直線上に UFT 投与例の TS mRNA 量と遊離 TS の関係をプロットしてみると、12例中9例では UFT 投与にも関わらず組織中には TS mRNA 量に対応するだけの遊離 TS 活性が残存していると考えられた (図9)。

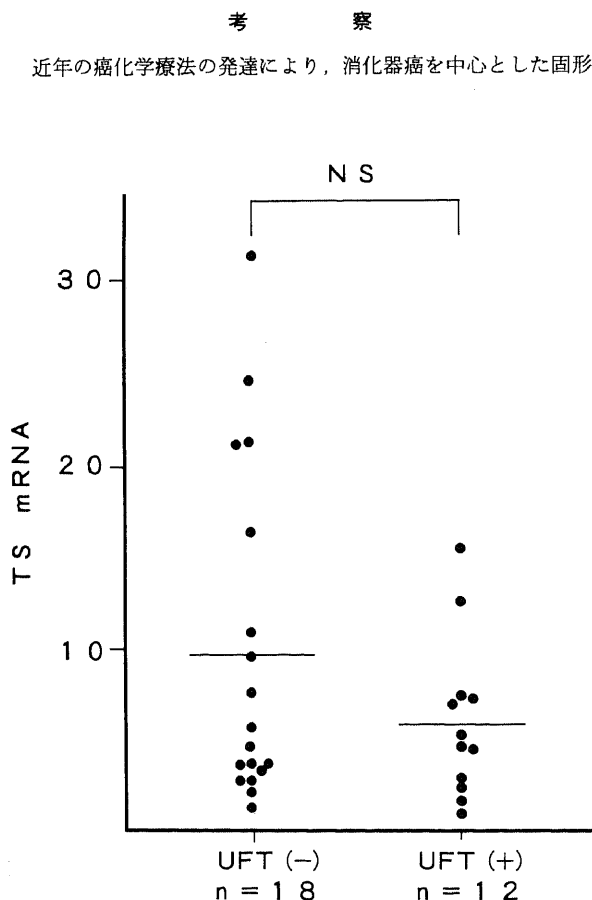


Fig. 7. TS mRNA transcriptional activity in colon cancer tissue treated with or without UFT. TS specific signals from Northern blot were quantitatively analyzed by densitometric scanning. TS mRNA transcriptional activity was normalized to the lowest one which was set at 1.0. Each horizontal bar represents geometric mean value.

癌においてもその有効例が報告されている。しかし、現在臨床で行われている癌化学療法は、多くの症例に画一的なプロトコルを用いてもっとも奏効率の高い化学療法剤を選択することにより効果を上げてきた。しかし、癌の発生が遺伝子の多段階変化によることが明らかとなり、個々の腫瘍の生物学的悪性度が異なることを考えれば、それぞれの腫瘍に最適な化学療法もおのずから異なると考えられる。したがって、今後癌化学療法でその奏効率をより高めるためには個々の症例で最適な薬剤、あるいはその組み合わせを選択することが必要になると考えられる。特に外科的治療前に行う化学療法においては抗癌剤に耐性を示す癌種を対象とした場合、その効果がえられないばかりでなく、患者の全身状態の悪化により術後合併症の発生率の上昇が危惧される。術前化学療法を癌手術成績向上の一手段として確立させるためには、術前に個々の腫瘍の各抗癌剤に対する感受性を正確に把握することが重要であると考えられる。

現在 5-FU をはじめとしたフッ化ピリミジン系抗癌剤は消化器癌化学療法の中心的な薬剤となっている。TS はフッ化ピリ

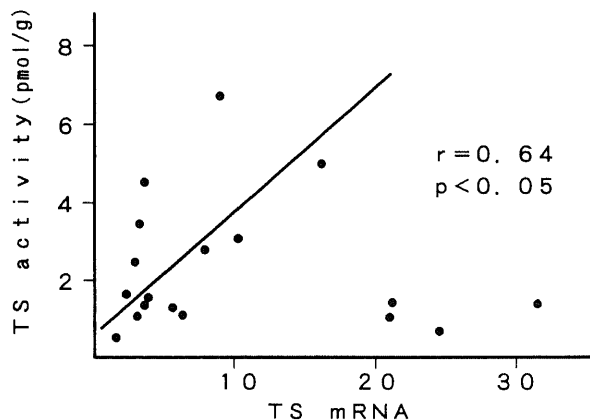


Fig. 8. Relationship between TS mRNA transcriptional activity and TS enzymatic activity in non-UFT group. The expressed line is the linear regression line ( $r=0.64$ ,  $p<0.05$ ) formed from the data points with the exception of 4 cases in which TS mRNA transcriptional activities were higher than 20.

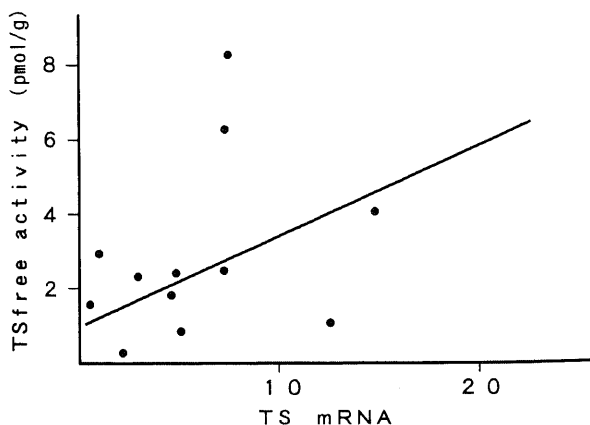


Fig. 9. Relationship between TS mRNA transcriptional activity and TS free activity in UFT group. The expressed line is the linear regression line formed from the data of relationship between TS mRNA transcriptional activity and TS enzymatic activity in non-UFT group.

ミジン系抗癌剤の標的酵素であり、その腫瘍組織内の濃度は感受性の指標になると考えられる。また、TS はフッ化ピリミジン系抗癌剤のみならずスプラチン (cisplatin, CDDP) やアドリアシン (adriamycin, ADR) 耐性癌においてもその活性が上昇していることが示されており<sup>29,30)</sup>、現在臨床応用されている他の抗癌剤に対する耐性にも関与していると推測される。

本研究において大腸癌組織の TS 活性は個々の腫瘍で活性値が大きく異なることが判明した。試験管内の実験では TS 活性が高い細胞ほど 5-FU への感受性が低い関係が認められているが<sup>31)</sup>、臨床においても TS 活性値が抗癌剤感受性の指標となることが示唆された。

三山ら<sup>32)</sup>は胃癌においてその組織型と TS 活性が関連性を持つことを報告しており、これにより組織型別に化学療法の使用薬剤を選択することが可能であるとしている。このように臨床でえられるデータから TS 活性値が予測できればそのデータが化学療法剤選択の指標となりうる。本研究では組織学的に静脈侵襲が陰性の大腸癌組織で TS 活性が高値を示し、かかる指標の候補となりうると考えられた。

試験管内における TS 活性と抗癌剤感受性の関係を臨床症例においても評価することが必要と考えられるが、実際に化学療法施行前に TS 活性を知ることはその測定に必要とする組織量がえられないため不可能である。本研究で対象とした癌組織も手術により切除されたものであり、化学療法に対する感受性を直接知ることはできない。しかし、近年の遺伝子工学の発達により逆転写酵素-PCR 法 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) を用いて、微量の検体から腫瘍組織中の TS mRNA 量を定量することが可能となった<sup>33)</sup>。Horikoshi ら<sup>34)</sup>はこの手法を用いて臨床例での TS mRNA 量と 5-FU への感受性が関連していることを報告している。彼らの報告では TS mRNA 量と TS 活性の関連を十分に検討していないが、本研究の結果からは TS mRNA 量と TS 活性とはほぼ一次の相関関係にあると考えられ、今後臨床へのさらなる応用が期待される。また、本研究で認められたように腫瘍組織の TS mRNA 量が非常に高いにもかかわらず TS 活性が低い症例がわずかにみられ、その機序の解明が期待される。

TS がフッ化ピリミジン系抗癌剤による三重結合体形成に関与し、その結果、抗癌剤感受性の指標となると同時に、腫瘍内の葉酸プールは三重結合体形成とその安定性に関与し抗癌剤感受性に影響を与えることが知られている<sup>35,36)</sup>。道伝ら<sup>37)</sup>はヒト癌組織の TS を用いて反応液に含まれる葉酸の濃度が高いほど形成される三重結合体の安定性が増すことを証明している。本研究においても UFT を投与した症例の癌組織では、CH<sub>2</sub>FH<sub>2</sub> および FH<sub>2</sub> の濃度が高い腫瘍ほど TS 阻害率も高く、臨床例でも同様の関連が証明された。

このように、腫瘍内の葉酸プールは TS 活性と同様に抗癌剤感受性を検討する場合の重要な因子となり、フッ化ピリミジン系抗癌剤投与時の葉酸補給の必要性およびその投与量の指標となると考えられた。さらに、本研究において組織学的リンパ節転移を伴わない癌組織では CH<sub>2</sub>FH<sub>2</sub> は有意に低値を示し、葉酸補給の指標となりうると考えられた。

フッ化ピリミジン系抗癌剤と葉酸プールを増加させる生化学的効果修飾剤である leucovorin の併用が臨床例で高い有効性を示していることから、臨床例の癌組織には十分な TS 阻害をえるだけの葉酸プールがなく、多くの癌組織ではその補給が必

要と考えられていた。本研究において組織中に存在する内因性の葉酸のみで三重結合体を形成させたところ、その TS 阻害率はわずかに10%前後であり葉酸補給の必要性が確認された。また、UFT 投与例においては総 TS 活性の増加が認められたが、これに対し葉酸プールの増加率は低く相対的な葉酸プール欠乏に陥っていると予想された。このようなフッ化ピリミジン系抗癌剤投与後の TS 誘導は腫瘍の抗癌剤に対する耐性獲得機序の一つと考えられ、高い TS 阻害率をえるためには腫瘍内の葉酸プールの増加が不可欠と考えられた。最近フッ化ピリミジン系抗癌剤と CDDP の相乗効果発現のメカニズムとして CDDP による葉酸プール増加が示されており<sup>38-40)</sup>、leucovorin と同様に生化学的効果修飾剤としての CDDP 併用をより積極的に行うことが必要であると考えられ、臨床における効果が期待される<sup>41)</sup>。

フッ化ピリミジン系抗癌剤投与後の TS 誘導はこれまでも乳癌などで観察されており、抗癌剤耐性のメカニズムとも関連していると考えられている<sup>42,43)</sup>。このような TS 誘導のメカニズムとして、TS の遺伝子レベルでの変化が試験管内の実験で証明されている。すなわち TS 遺伝子座における遺伝子増幅<sup>44)</sup>や、TS 遺伝子から TS mRNA への転写活性の増加<sup>45)</sup>が 5-FU 耐性細胞で認められている。しかし、臨床検体で同様の現象が起こっているか否かについては報告がない。最近ヒト TS 遺伝子の全塩基配列が決定され<sup>46)</sup>、ヒト臨床検体においても DNA, mRNA レベルでの変化を検討することが可能になった。TS 遺伝子増幅に関しては Clark ら<sup>46)</sup>が臨床例で 5-FU 耐性となった腫瘍組織で認められたと報告している。しかし、本研究では化学療法の有無にかかわらず TS 遺伝子増幅はみとめられなかった。その理由として今回対象とした UFT 投与例での投与期間が平均11.7日と短いことが考えられる。試験管内の実験で認められる TS 遺伝子増幅は、腫瘍細胞を 5-FU 下に長期間培養してえられるものであり、1～2週間程度の投与期間では遺伝子増幅は起こらないものと考えられる。今後、さらに長期の化学療法施行例あるいは補助化学療法後の再発例について検討する必要がある。

一方、TS mRNA への転写活性に関しても UFT 投与後で変化は認められなかった。Chu ら<sup>47)</sup>は試験管内の実験で 5-FU 投与後に TS 活性の増加が認められるが TS mRNA レベルでの変化は認められず、TS 誘導が mRNA から蛋白への翻訳レベルで起こっていると報告している。本研究における TS 酵素活性、TS 遺伝子の変化の検討結果から、臨床の腫瘍においても同様に TS 誘導が翻訳レベルで起こっていると考えられ、このような翻訳レベルでの TS 誘導がフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する腫瘍の耐性獲得機序となっているものと思われる。

現在フッ化ピリミジン系抗癌剤投与後の TS 阻害の程度を表す数値として TS 阻害率が主に用いられているが、総 TS 中には三重結合体を形成して長期間分解を逃れた TS が含まれているため、みかけ上実際よりも高い阻害率として評価される可能性がある。実際に dTMP 合成に預かっている総 TS 量は mRNA 量に合わせて合成される蛋白量と考えられる。この総 TS 量のうち三重結合体を形成しているものが真の TS 阻害量と考えられ、より動的な TS 阻害の指標が必要とされる。このように、より動的な変化として TS 阻害を考えると、翻訳レベルでの TS 誘導は抗癌剤投与後の遊離 TS 活性の減少から酵素量を回復させる巧妙な機構をなしていると考えられる。実際、

本研究において化学療法例における TS mRNA 量と TS 活性の関係を見ると、UFT 投与にもかかわらずほとんどの腫瘍組織中には TS mRNA 量にみあうだけの遊離 TS 活性があり、TS 活性がまったく阻害されていないとも考えられる。このような遊離 TS 活性の急速な回復により腫瘍細胞が細胞死からのがれていると推測される。

最近 Chu ら<sup>48)</sup>は TS 酵素量が TS 酵素自体で自動調節されており、さらに 5-FU による翻訳段階での TS 誘導がインターフェロンによって抑制されると報告している。この事実は、遊離 TS 量の低下が TS mRNA に対し翻訳活性の増加のシグナルとして伝えられ、その結果遊離 TS 量が増加し、一定に調節されることを示しており、またこのような自動調節がインターフェロンにより抑制されることを示唆している。本研究で認められた翻訳段階での TS 誘導は、このメカニズムに一致するものである。今後、フッ化ピリミジン系抗癌剤の効果をより高めるためには、この TS の自動調節を抑制するような効果修飾剤の開発と臨床応用が不可欠であると考えられる。

### 結 論

ヒト大腸癌組織50検体を対象として組織内 TS 活性、葉酸プールを測定し、さらに UFT 投与後の TS 誘導につき遺伝子レベルでの検討を行い、以下の結論を得た。

1. TS 活性は各大腸癌組織で大きく異なり、フッ化ピリミジン系抗癌剤に対する感受性の指標となる可能性を示している。
  2. UFT 投与例での TS 阻害率は腫瘍内の葉酸プールが高いほど高値を示し、フッ化ピリミジン系抗癌剤投与時における葉酸補給の必要性を確認した。
  3. TS 活性は UFT 投与例において有意に高値を示し、TS 誘導が抗癌剤耐性のメカニズムとなっていることを示唆する。
  4. このような TS 誘導は TS 遺伝子増幅、TS mRNA 転写誘導によらず、翻訳段階での誘導である可能性を示唆する。
- 以上の結果より、フッ化ピリミジン系抗癌剤投与時の葉酸補給の必要性と感受性指標としての TS 活性測定の意義が確認された。また翻訳段階での TS 誘導が抗癌剤耐性と深く関わることを示唆され、今後の生化学的効果修飾として TS 誘導を抑制する効果修飾剤の開発および臨床応用が必要であると考えられる。

### 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第一外科学教室渡辺洋宇教授、金沢大学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授に深甚なる謝意を表します。また本研究に御協力をいただいた金沢大学がん研究所化学療法部遠藤良夫博士、大鵬薬品病態医化学研究所白坂哲彦所長、福島正和博士に深謝します。さらに、ヒト TScDNA を供与下さいました国立遺伝学研究所瀬野惇二教授に厚く御礼申し上げます。また、終始御指導を賜りました大村健二講師をはじめ金沢大学第一外科学講座の諸先生方に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は第40回日本消化器外科学会総会(1992, 横浜)において発表した。

### 文 献

- 1) Danenberg, P. V.: Thymidylate synthetase-a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochem. Biophys. Acta*, **473**, 73-92 (1977).
- 2) Cheng, Y. C., Dutschman, G. E., Starnes, M. C.,

Fisher, M. H., Nanavathi, N. T. & Nair, M. G.: Activity of the new antifolate N<sup>10</sup>-propargyl-5,8-dideazafolate and its polyglutamates against human dihydrofolate reductase, human thymidylate synthetase and KB cells containing different levels of dihydrofolate reductase. *Cancer Res.*, **45**, 598-600 (1985).

3) Jackman, A. L., Taylor, G. A., Gibson, W., Kimbell, R., Brown, M., Calvert, A. H., Judson, I. R. & Hughes, L. R.: ICI D1694, a quinazoline antifolate thymidylate synthase inhibitor that is a potent inhibitor of L1210 tumor cell growth in vitro and in vivo: a new agent for clinical study. *Cancer Res.*, **51**, 5579-5586 (1991).

4) Khandan, K. & Moran, R. G.: Quinazoline folate analogs inhibit the catalytic activity of thymidylate synthase but allow binding of 5-fluorodeoxyuridylate. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19163-19169 (1990).

5) Duschinsky, R., Pleben, E. & Heidelberger, C.: The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4559-4560 (1957).

6) Pinedo, H. M. & Peters, G. F. J.: Fluorouracil: Biochemistry and pharmacology. *J. Clin. Oncol.*, **6**, 1653-1664 (1988).

7) Santi, D. V., McHenry, C. S. & Sommer, H.: Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry*, **13**, 471-481 (1974).

8) Danenberg, P. V. & Lockshin, A.: Thymidylate synthetase-substrate complex formation. *Mol. Cell. Biochem.*, **43**, 49-57 (1982).

9) Cory, J. G., Breland, J. C. & Carter, G. L.: Effect of 5-fluorouracil on RNA metabolism in Novikoff Hepatoma cells. *Cancer Res.*, **39**, 4905-4913 (1979).

10) Kufe, D. W. & Major, P. P.: 5-fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, **256**, 9802-9805 (1981).

11) 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).

12) Petrelli, N., Herrera, L., Rustum, Y., Burke, P., Creaven, P., Stulc, J., Emrich, L. J. & Mittelman, A.: A prospective randomized trial of 5-fluorouracil versus 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).

13) Laufman, L. R., Kreczowski, K. A. & Roach, R.: Leucovorin plus 5-fluorouracil: An effective treatment for metastatic colon cancer. *J. Clin. Oncol.*, **5**, 1394-1400 (1987).

14) Washtien, W. L.: Thymidylate synthetase levels as a factor in 5-fluorodeoxyuridine and methotrexate cytotoxicity in gastrointestinal tumor cells. *Mol. Pharmacol.*, **21**, 723-728 (1982).

15) Rossana, C., Rao, L. G. & Johnson, L. F.: Thymidylate synthetase overproduction in 5-fluorodeoxyuridine-resistant mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1118-1125

- (1982).
- 16) Priest, D. G., Ledford, B. E. & Doig, M. T.: Increased thymidylate synthetase in 5-fluorodeoxyuridine resistant cultured hepatoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1549-1553 (1980).
- 17) Keyomarsi, K. & Moran, R. G.: Mechanism of the cytotoxic synergism of fluoropyrimidines and folic acid in mouse leukemic cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 14402-14409 (1988).
- 18) Lockshin, A. & Danenberg, P. V.: Biochemical factors affecting the tightness of 5-fluorodeoxyuridylate binding to human thymidylate synthetase. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 247-257 (1981).
- 19) 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).
- 20) Priest, D. G., Veronee, C. D., Mangum, M., Bednarek, J. M. & Doig, M. T.: Comparison of folylpolyglutamate hydrolase of mouse liver, kidney, muscle and brain. *Mol. Cell. Biochem.*, **43**, 81-87 (1982).
- 21) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N.: Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354 (1985).
- 22) Takeishi, K., Kaneda, S., Ayusawa, D., Shimizu, K., Gotoh, O. & Seno, T.: Nucleotide sequence of a functional cDNA for human thymidylate synthase. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 2035-2043 (1985).
- 23) Lawn, R. M., Efstratiadis, A., O'Connell, C. & Maniatis, T.: The nucleotide sequence of the human  $\beta$ -globin gene. *Cell*, **21**, 647-651 (1980).
- 24) Feinberg, A. P. & Vogelstein, B.: A technique for radorabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13 (1983).
- 25) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 26) Denhardt, D. T., Efstratiadis, A., O'Connell, C. & Maniatis, T.: Biochemical and biophysical research communications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 641-646 (1966).
- 27) Chomczynski, P. & Sacchi, N.: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159 (1987).
- 28) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約. 改訂5版, 32-33頁, 金原出版, 東京, 1985.
- 29) Scanlon, K. J. & Kashani-Sabet, M.: Elevated expression of thymidylate synthase cycle genes in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma A2780 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 650-653 (1988).
- 30) Chu, E., Drake, J. C., Koeller, D. M., Zinn, S., Jamis-Dow, C. A., Yeh, G. C. & Allegra, C. J.: Induction of thymidylate synthase associated with multidrug resistance in human breast and colon cancer cell lines. *Mol. Pharmacol.*, **39**, 136-143 (1991).
- 31) Berger, S. H. & Hakala, M. T.: Relationship of dUMP and free FdUMP pools to inhibition of thymidylate synthase by 5-fluorouracil. *Mol. Pharmacol.*, **25**, 303-309 (1984).
- 32) 三山健司, 小西敏郎, 平田 泰, 出月康夫, 坂本 忍, 田中洋一, 須田雅夫: 胃癌組織型と thymidylate synthetase, thymidine kinase 両酵素活性一切除標本と内視鏡下生検標本組織一. *日癌治*, **26**, 2006 (1991).
- 33) Kashani-Sabet, M., Rossi, J. J., Lu, Y., Ma, J. X., Chen, J., Miyachi, H. & Scanlon, K. J.: Detection of drug resistance in human tumors by in vitro enzymatic amplification. *Cancer Res.*, **48**, 5775-5778 (1988).
- 34) Horikoshi, T., Danenberg, K. D., Stadlbauer, T. H. W., Volkenandt, M., Shea, L. C. C., Aigner, K., Gustavsson, B., Leichman, L., Frosing, R., Ray, M., Gibson, N. W., Spears, C. P. & Danenberg, P. V.: Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diphorase gene expression on human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer Res.*, **52**, 108-116 (1992).
- 35) Keyomarsi, K. & Moran, R. G.: Folic acid augmentation of the effects of fluoropyrimidines on murine and human leukemic cells. *Cancer Res.*, **46**, 5229-5235 (1986).
- 36) Houghton, J. A., Maroda, S. J., Phillips, J. O. & Houghton, P. J.: Biochemical determinants of responsiveness to 5-fluorouracil and its derivatives in xenografts of human colorectal adenocarcinomas in mice. *Cancer Res.*, **41**, 144-149 (1981).
- 37) 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).
- 38) 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).
- 39) 白坂哲彦, 島本雄司, 木下英之, 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).
- 40) 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).
- 41) 大村健二, 道伝研司, 宗本義則, 川上和之, 宮永木門, 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).
- 42) Washtien, W. L.: Increased level of thymidylate synthetase in cells exposed to 5-fluorouracil. *Mol. Pharmacol.*, **25**, 171-177 (1984).
- 43) Swain, S. M., Lippman, M. E., Egan, E. F., Drake, J. C., Steinberg, S. M. & Allegra, C. J.: Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously treated patients with

- metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 7, 890-899 (1989).
- 44) Berger, S. H., Jenh, C. H. & Johnson, L. F.: Thymidylate synthase overproduction and gene amplification on fluorodeoxyuridine-resistant human cells. *Mol. Pharmacol.* 28, 461-467 (1985).
- 45) Kaneda, S., Nalbantoflu, J., Takeishi, K., Shimizu, K., Gotoh, O., Seno, T. & Ayusawa, D.: Structural and functional analysis of the human thymidylate synthase gene. *J. Biol. Chem.* 265, 20277-20284 (1990).
- 46) Clark, J. L., Berger, S. H., Mittelman, A. & Berger, F. G.: Thymidylate synthase gene amplification in a colon tumor resistant to fluoropyrimidine chemotherapy. *Cancer Treat. Rep.* 71, 261-265 (1987).
- 47) Chu, E., Zinn, S. & Allegra, C.: Translational

- regulation of thymidylate synthase in response to 5-fluorouracil and gamma-interferon in a human colon cancer cell line (H630). *Proc. Am. Assoc. cancer Res. Annu. Meet.*, 32, 416 (1991).
- 48) Chu, E., Koeller, D. M., Casey, J. L., Drake, J. C., Chabner, B. A., Elwood, P. C., Zinn, S. & Allegra, C. J.: Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 8977-8981 (1991).
- 49) Chu, E., Zinn, S., Boarman, D. & Allegra, C. J.: Interaction of  $\gamma$  interferon and 5-fluorouracil on the H630 human colon carcinoma cell line. *Cancer Res.* 50, 5834-5840 (1990).

**The Levels of Thymidylate Synthase and Folate Pool in Human Colorectal Carcinoma Tissues and Changes of Thymidylate Synthase Activity Following UFT Exposure** Kazuyuki Kawakami, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, 101, 975—986 (1992)

**Key words** human colorectal carcinoma, thymidylate synthase, folate pool, fluoropyrimidines, drug resistance

#### Abstract

Thymidylate synthase (TS) is a target enzyme for antitumor fluoropyrimidines. 5-Fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate (FdUMP), which is metabolized from fluoropyrimidines, directly inhibits the enzymatic activity of TS through the formation of a ternary complex with the enzyme and 5, 10-methylenetetrahydrofolate ( $\text{CH}_2\text{FH}_4$ ). In this study, we measured the enzymatic activity of TS and folate pool substances in 50 human colorectal carcinoma tissues to investigate their role in this cancer and to consider their implications in the cancer chemotherapy. Fourteen patients received the chemotherapeutic agent UFT preoperatively (UFT group), while other 36 did not receive any chemotherapeutic agent (non-UFT group). In the non-UFT group, the mean TS activity was  $1.83 \pm 1.46$  pmol/g (mean  $\pm$  SD), and the coefficient of variation was 79.9%. This wide variation suggests that TS activity may be useful as a clinical parameter reflecting the response to fluoropyrimidines. In the UFT group, total TS activity (TS-total), free TS activity (TS-free), and TS inhibition rate (TSI) were  $6.30 \pm 5.39$  pmol/g,  $2.58 \pm 2.09$  pmol/g, and  $56.3 \pm 12.9\%$ , respectively. The TS-total value in the UFT group was significantly increased compared to that in the non-UFT group ( $p < 0.0001$ ), suggesting that an induction of TS takes place with the UFT treatment. In the non-UFT group, the predicted TSI, which was calculated from TS activity and TS capacity to bind to intracellular folate, was only  $8.3 \pm 9.3\%$ . In the UFT group, TSI was correlated with the levels of both  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  ( $r = 0.70$ ,  $p < 0.01$ ) and  $\text{FH}_4$  ( $r = 0.61$ ,  $p < 0.05$ ). These results indicate that folate pool replenishment is necessary for the expression of the antitumor activity of fluoropyrimidines. Further studies were performed to investigate the mechanism of TS induction following UFT exposure. Southern blot analysis revealed no TS gene amplification in either the UFT or non-UFT group. On Northern blot analysis no significant difference was observable between the UFT and non-UFT groups in the level of TS mRNA. These results suggest that the induction of TS following UFT exposure is controlled at the translational level.