

ヒト大腸癌培養株 DLD-1 細胞と

その 5-FU 耐性株の比較

学位論文内容の要旨

大腸癌に対する治療の第一選択は外科的切除であるが、進行癌、特に転移を来たした癌に関しては切除後の抗癌剤による化学療法 (Adjuvant chemotherapy) を併用するのが一般的である。フルオロウラシル (5-FU) は大腸癌に対する化学療法に広く用いられている代表的な抗癌剤である。5-FU 単剤および他の抗癌剤併用による化学療法によってある程度生存率が上昇すると報告されているものの、多数の患者が利益のない抗癌剤の投与を受けている側面も否定できない。5-FU の抗腫瘍作用は dUMP を dTMP、dTTP へと変換する Thymidylate synthetase (以下 TS と略す) を阻害することにより DNA 合成が阻害され、ひいては apoptosis の誘導により細胞は死に至るという機序によっている。5-FU を投与すると腫瘍の縮小が期待されるが、合成阻害作用により正常組織の細胞増殖にも悪影響が及び、胃腸障害などの副作用が起こる。

本研究は、ヒト大腸癌株 DLD-1 を 5-FU 添加培地で培養することにより樹立した 5-FU 耐性株をモデルとして、その生物学的特徴を解析するとともにその背景にある遺伝子発現の変化を cDNA アレイ法により元株と比較解析し、大腸癌の 5-FU 耐性獲得に関与する遺伝子を含めた特性を明らかにすることを目的として行った。

ヒト大腸癌 DLD-1 は基本的に 5-FU に対して感受性を有するが、 $5\mu\text{M}$ を初期濃度として段階的に 5-FU 濃度を増加することにより、5-FU 耐性細胞株を選択培養した。この耐性株は 5-FU に対する *in vitro* での IC₅₀ 値で、元株である DLD-1 より 10 倍以上の耐性を獲得していた。この 5-FU に対する耐性はヌードマウス皮下への移植腫瘍に対する micro-osmotic pump を用いた *in vivo* の実験でも確認された。しかも、この獲得した耐性能は 5-FU を約 2 ヶ月除去した状態でも維持されており、不可逆的であると考えられた。この耐性株では 5-FU に対する抵抗性のほか、*in vitro* および *in vivo* での増殖能の低下、染色体核型の変化が見られた。次に、これらの細胞生物学的変化がどのような遺伝子発現の変化と関係しているかを検討する目的で、元株と 5-FU 耐性株間の遺伝子発現の変化を cDNA アレイにて解析し、発現量に違いが見られた遺伝子の一部について半定量的なリアルタイム RT-PCR による確認を行った。

cDNA アレイ法による解析では、5-FU 耐性株で発現の増加を示す遺伝子数と発現の減少する遺伝子数はほぼ同数であったが、細胞周期や転写に関わる遺伝子の多くは

発現が抑制されていた。細胞周期関連では Cdk および cyclin 系が広範に低下、Cdc25B や Cdc25C の発現の減弱が認められ、G2 期で細胞周期が止まる傾向にあると考えられた。一方、DNA 障害時に DNA 修復のため細胞周期を停止させ DNA の修復に関わる遺伝子群の発現に増加が見られた。このことは 5-FU 耐性株では細胞周期に異変を来たしているものの、DNA ダメージを修復する遺伝子群の発現亢進により細胞周期にブレーキをかけ細胞増殖能を低下させている可能性を示唆した。転写因子関連では c-jun、STAT および NF κ B ファミリーなど発現に変化のあった遺伝子のうち約 75% に発現の減弱を認めたが、E2F-1、Smad3 など発現の亢進を示す遺伝子もあった。

一方、アポトーシス関連では cDNA アレイ解析で発現亢進と低下を示す遺伝子数はほぼ同数であったが、アポトーシスを抑制する Bcl-2、Bcl-xL、FLIP、RIP の発現が亢進し、FADD や Bad などアポトーシスを誘導する遺伝子の発現低下が見られた。したがって、5-FU 耐性株では複数のアポトーシス経路が阻害され、アポトーシス抑制方向に変化しているものと考えられた。

5-FU は体内で thymidine phosphorylase (TP)、uridine phosphorylase (UP)、orotate phosphoribosyltransferase (OPRT)、および DPD によって代謝を受ける。このうち DPD によって代謝されると TCA cycle へ組み込まれ細胞障害を起こさない。したがって、5-FU の律速酵素である DPD の発現量と 5-FU 耐性能が相関することが想定され、実際にも DPD の発現量と 5-FU 耐性の相関が示されている。しかし、本研究に用いた DLD-1 では、元株と 5-FU 耐性株の両者での DPD 発現量は cDNA アレイおよびリアルタイム RT-PCR のどちらの結果でも変化が認められなかった。5-FU が阻害する酵素である TS の発現量と 5-FU 耐性能が相関するとの報告もあるが、この TS の発現量も両者で有意な変化は認めなかった。したがって、本研究で用いた DLD-1 の 5-FU 耐性株では、細胞周期促進関連遺伝子の発現を抑制し、細胞増殖抑制を介して結果的に 5-FU が作用する S 期にある細胞を減らし、5-FU の抗腫瘍作用から逃れている可能性が示唆された。加えて、アポトーシス経路自体を抑制しているため 5-FU に曝露されても細胞死が起こりにくくなっていると考えられた。

本研究では、DLD-1 の 1 株のみの比較であるため、5-FU に対して抵抗性を有するヒト大腸癌全てに上記の遺伝子発現変化が起こっていると見なすことは出来ないが、5-FU 抵抗性腫瘍の一部には DPD や TS など 5-FU 関連酵素の遺伝子発現の変化を介さずに 5-FU 耐性を獲得している場合がある可能性を示唆している。今後、複数の 5-FU 耐性株を樹立して元株との比較を行い、各株に共通して発現変化が見られる遺伝子群の存在の有無など検討していく必要がある。

さらに、この 5-FU 耐性株をモデルとした実験系での成果を用いることにより 5-FU 耐性腫瘍の特性をさらに解明し、将来 5-FU 耐性腫瘍に対する無効な 5-FU の全身投与によって引き起こされる副作用などの不利益を避ける上に有用な情報を提供することができると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

ヒト大腸癌培養株 DLD-1 細胞と

その 5-FU 耐性株の比較

大腸癌に対する治療の第一選択は外科的切除である。しかし、進行癌、特に転移を来たした癌に関しては切除後の抗癌剤による化学療法を併用するのが一般的であるものの、多くの患者が利益のない抗癌剤の投与を受けている側面も否定できない。フルオロウラシル (5-FU) は大腸癌に対する化学療法に広く用いられている代表的な抗癌剤で、その抗腫瘍作用は DNA 合成を阻害し、ひいてはアポトーシスの誘導により細胞を死に至らしめるという機序によっている。したがって 5-FU を投与すると腫瘍の縮小が期待される反面、胃腸障害などの副作用が起こる。

本研究では、ヒト大腸癌株 12 株を 5-FU 添加培地で *in vitro* で培養することにより 5-FU 耐性株の樹立を試みた。5-FU 耐性株が樹立できたのは 12 株中 3 株で、その他の株では樹立できなかった。樹立できた 3 株のうち DLD-1 大腸癌株について、元株と 5-FU 耐性株間の遺伝子発現の変化を比較解析し、5-FU 耐性に関与する遺伝子の候補を列挙した。樹立した DLD-1 の 5-FU 耐性株は、*in vitro*, *in vivo* での 5-FU 抵抗性を有していた。5-FU 耐性株では 5-FU に対する抵抗性のほか、増殖能の低下、染色体核型に変化が見られた。これらの変化がどのような遺伝子発現の変化と関係しているかを検討する目的で、元株と 5-FU 耐性株間の遺伝子発現の変化を cDNA アレイ法にて解析し、発現量に違いが見られた遺伝子の一部について半定量的なリアルタイム RT-PCR によって確認を行った。cDNA アレイ法による解析で 5-FU 耐性株では細胞周期に異変を来たしているものの、DNA ダメージを修復する遺伝子群の発現亢進により細胞周期にブレーキをかけ細胞増殖能を低下させている可能性が示唆された。またアポトーシス関連では、複数のアポトーシス経路が阻害され、全体としてアポトーシス抑制方向に変化しているものと示唆された。現在 5-FU 抵抗性に関与すると報告

されている DPD (dihydropyrimidine dehydrogenase)、および TS (thymidilate synthetase) の発現量に有意な変化は認められなかった。したがって、本研究で用いた DLD-1 の 5-FU 耐性株では、細胞周期促進関連遺伝子の発現抑制とそれによる細胞増殖抑制によって結果的に 5-FU が作用する S 期にある細胞を減らし 5-FU の抗腫瘍作用から逃れている可能性が示唆された。加えて、アポトーシス経路自体を抑制しているため 5-FU に曝露されても細胞死が起こりにくくなっている可能性を指摘した。

公開発表において、副査の加藤紘之教授より 5-FU 耐性株が樹立できなかつた 9 株について樹立できた 3 株との違いにはどのようなことが考えられるのか、癌には多型があり細胞株を用いた実験でどこまで反映できるのか、薬剤耐性株で細胞増殖能が低下するのは理にかなっているのかについて質問があった。これらの質問に対して、申請者は自らの実験結果や既報の成績を踏まえ、今のところ 1 株のみで元株との比較であり現時点で確定することは困難であること、*in vivo* の状態で遺伝子発現を解析することが必要であること、樹立した 3 株に関してはいずれも細胞増殖能の低下が認められたとの概ね妥当な回答をした。次いで、守内哲也教授より DLD-1 はもともと p53 の変異株でアポトーシスに関して異常があるので、wild type の p53 を有する株についても解析を行うべきであること、*in vivo* での遺伝子発現の状態を解析した方がより生体内の状況を反映しているのではないかと、DPD および TS の発現量に関しては 5-FU を投与した際の状態も見るとの助言を受けた。最後に、主査の吉木 敬教授より 5-FU 耐性の遺伝子を抽出するためには今後の課題として本人が挙げた検討を引き続き行うべきであること、また p53 に加えて APC についても考慮に入れた補足をするよう助言を受けた。

この論文は、ヒト大腸癌の 5-FU 耐性に関わる遺伝子の候補を示すものとして高く評価され、今後種々の条件でより多くの株について検討するとともに、*in vivo* の状態での解析をすすめることにより、5-FU 耐性腫瘍の特性を解析する上でのモデルとなることが期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。