

抗腫瘍性代謝拮抗剤trifluorothymidineのDNA断片化および複製・修復機構に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

現在世界中で最も広く使用されている制癌剤、5-Fluorouracil (5FU)の主な作用機構は thymidylate synthase (TS)の阻害と考えられている。新規抗腫瘍薬 TAS-102 は主成分を trifluorothymidine (TFT)とし、その生体内分解酵素を阻害する thymidine phosphorylase inhibitorを配合した制癌剤である。TAS-102はTSを阻害するよりも、TFTがトリリン酸体まで代謝されDNAに多く取り込まれることでDNAの一本鎖切断を引き起こすことから、TSが高発現した5FU耐性株に対しても強い抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。しかしながら、TFTがどのようにDNAへ取り込まれ、取り込まれたTFTがどのように除去されるのか、それらの一連の過程で生じると考えられるDNAの断片化に関する機序は充分には明らかにされていない。本学位論文ではこの点に焦点を当て、TFTのDNA断片化および複製・修復機構に及ぼす影響について以下の検討を行った。

ヌードマウスにヒト大腸癌株由来 CO-3 細胞を移植した腫瘍モデルに対して TAS-102 投与は、5FU系薬剤である Capecitabine 投与と同等あるいはそれ以上の効力を持って抗腫瘍効果を示した。また腫瘍細胞のDNAは両薬剤の投与で傷害を受け、その指標であるapurinic and apyrimidinic サイト数が増加した。Capecitabine 投与ではDNA二本鎖切断は観察されなかったが、TAS-102 投与ではDNA二本鎖切断が有意に増加した。ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞に TFT を暴露すると、DNAの傷害に伴って誘導される ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein のリン酸化とその下流で細胞周期を調節する checkpoint kinase 1 の活性化が暴露 24 時間で観察された。さらに 48 時間目以降ではDNAの二本鎖切断により活性化する ataxia-telangiectasia mutated やその下流で相同組み換え修復に関与する breast cancer susceptibility gene 2 のリン酸化が認められた。処理後 72 時間目におけるDNAの傷害の程度は対照の倍以上となった。

次に HeLa 細胞にトリチウムラベルした TFT を与え DNA への取り込み量を測定したところ、4 時間で $62.2 \text{ pmol}/10^6 \text{ cells}$ であり、5FU の取り込み量の約 300 倍であった。DNA polymerase α を用いた DNA の伸張反応を *in vitro* で調べたところ、TFT のトリリン酸化体は dTTP と同様に鋳型 DNA の adenine (A) に対して速度は低下するものの新生 DNA に取り込まれ、また dTTP との競合阻害活性は低いことが示された。さらに TFT を含む DNA を 1 塩基 DNA 伸長反応とリガーゼ反応を組み合わせて作製し、これを鋳型としても DNA polymerase α による DNA の伸張反応が見られた。つまり、TFT は 5FU とは異なり、その代謝産物が DNA polymerase α の基質となって細胞内 DNA に効率的に取り込まれ、複製の鋳型ともなりうるということが明らかとなった。

次に TFT を含む DNA を作製し、DNA 除去修復に関わる酵素 (DNA グリコシラーゼ) についてその作用を検討した。5FU を含む二本鎖 DNA では反対側が A あるいは Guanine (G) でも uracil-DNA glycosylase や single-stranded selective monofunctional

uracil-DNA glycosylase 1 で切断され、反対側が G のときは thymine-DNA glycosylase (TDG)あるいは methyl CpG binding domain (MBD4) での切断が認められた。しかし TFT を含む二本鎖 DNA では反対側が A の時は何れの酵素によっても切断が見られず、反対側が G の時は 5FU よりも切断活性は弱いものの TDG および MBD4 で切断された。この TDG 及び MBD4 の切断活性が殺細胞効果に影響するかを調べるため HeLa 細胞からこれらの DNA グリコシラーゼのノックダウン細胞を樹立したところ、5FU にデオキシリボースが結合した 5-fluoro-2'-deoxyuridine による殺細胞効果は明らかに減弱した。一方、TFT の殺細胞効果は TDG あるいは MBD4 をノックダウンしても影響されなかった。

以上の結果は TFT が 5FU とは異なり、腫瘍細胞の DNA に多く取り込まれ、取り込まれた TFT 残基は容易には除去されず、TFT を含む DNA は鋳型として複製されうることを示しており、未解明の何らかのメカニズムで DNA の一本鎖および二本鎖切断を生じることが考えられた。TFT の DNA 傷害機構の完全解明は今後の課題であるが、DNA への取り込みと、DNA 修復系に抵抗することが TFT の有する抗腫瘍効果の一因であることが示され、従来の 5FU 治療などに耐性となった腫瘍に対して TFT 固有の作用機構で効果を発揮することを示唆している。

学位論文審査の要旨

主査	教授	木村和弘
副査	教授	稲波修
副査	准教授	山盛徹
副査	准教授	寺尾晶

学位論文題名

抗腫瘍性代謝拮抗剤trifluorothymidineのDNA断片化および複製・修復機構に及ぼす影響

制癌剤 5-Fluorouracil (5FU)は世界中で最も広く使用されているが、5FU 耐性あるいは抵抗性を示す癌患者がいることが問題となっている。新規抗腫瘍薬 TAS-102 は主成分を trifluorothymidine (TFT)とし、その生体内分解酵素を阻害するチミジンホスホリラーゼインヒビターを配合した制癌剤である。TAS-102 は 5FU 耐性あるいは抵抗性を示す癌にも効果を示すが、その作用機構は不明な点が多く、学位論文提出者は TFT の DNA 断片化および複製・修復機構に及ぼす影響について検討を行った。

TAS-102 投与は *in vivo* および *in vitro* の腫瘍モデルに対して抗腫瘍効果を示し、腫瘍細胞 DNA の障害が増加した。特に TAS-102 投与では DNA 二本鎖切断が有意に増加し、その修復機構の発動が観察された。次に TFT の DNA への取り込み量を測定したところ、4 時間で $62.2 \text{ pmol}/10^6 \text{ cells}$ であり、5FU の取り込み量の約 300 倍であった。また TFT のトリリン酸化体は thymidine-5'-triphosphate と同様に DNA polymerase α に認識され、DNA に取り込まれた後も複製の鋳型となりうることが明らかとなった。さらに DNA 除去修復系について検討したところ、5FU を含む 2 本鎖 DNA は少なくとも 4 種の DNA グリコシラーゼで容易に切断されるのに対し、TFT を含む 2 本鎖 DNA は 4 種の酵素に抵抗性を示した。このうち、thymine-DNA glycosylase (TDG)あるいは methyl CpG binding domain (MBD4) は弱いながらも TFT を含む 2 本鎖 DNA の切断活性を示したが、TDG あるいは MBD4 による除去修復系は TFT の殺細胞効果には関与していなかった。

以上の結果は TFT が 5FU とは異なり、腫瘍細胞の DNA に多く取り込まれ、取り込まれた TFT 残基は容易には除去されないことを示しており、それらが DNA の二本鎖切断を誘導することが示唆された。したがって本研究は腫瘍に対して TFT が、5FU とは異なる固有の作用機構で効果を発揮することを示しており、臨床腫瘍学の進展に大きく寄与するものである。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者、鈴木則彦氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。