

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590355
 研究課題名 (和文) 大腸癌における葉酸代謝酵素および 5-FU 標的酵素の発現と化学療法の効果の関連
 研究課題名 (英文) Association between expression of folate-metabolizing and 5-FU target enzymes and effects of chemotherapy in colorectal cancer
 研究代表者
 鴨志田 伸吾 (KAMOSHIDA SHINGO)
 神戸大学・保健学研究科・教授
 研究者番号：70351020

研究成果の概要 (和文)：ルーチンの病理組織標本を対象として葉酸代謝関連蛋白の発現を再現性よく検出するのは困難であった。しかし、①免疫染色はピリミジン合成酵素や細胞死マーカーの発現を解析できる有用な方法である、②胃癌、大腸癌および子宮頸癌はチミジンキナーゼ 1、チミジル酸合成酵素をともに高発現する、③S-1 投与前の活性型カスパーゼ 8 発現レベルが治療効果を反映する、④活性型カスパーゼ 9 発現は胃癌に、LC3 発現は大腸癌に優位であることが証明された。

研究成果の概要 (英文)：Reproducible detection of folate metabolism-related proteins in routine and pathological samples presented difficulties. However, immunostaining was useful for analyzing expression of pyrimidine-synthesizing enzymes and cell death markers. High expression of thymidine kinase-1 and thymidylate synthase was detected prominently in gastrointestinal and uterine carcinomas. Spontaneous levels of cleaved (active) caspase-9 (CC9) correlated with antitumor effect of S-1, an oral fluoropyrimidine. Gastric carcinomas outnumbered in CC9-positive tumors while colorectal carcinomas in LC3-positive tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：腫瘍病理学、免疫組織化学、臨床細胞学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：胃癌、大腸癌、葉酸代謝酵素、ピリミジン合成酵素、細胞死、p53 遺伝子、薬剤効果予測、免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

個別化癌化学療法において、治療効果を予測するためには、投与薬剤に対する感受性規定因子を化学療法施行前に検索することが必須である。現在、5-fluorouracil (5-FU) およびそのプロドラッグからなるフッ化ピ

リミジンは、消化器癌、乳癌などに最も汎用されている抗癌剤である。フッ化ピリミジンの抗腫瘍効果を高めるには、多グルタミン酸化を受けた還元型葉酸、thymidylate synthase (TS; 5-FU の標的酵素) および fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP、5-FU の活性体) からなる三重複合体の効率的

な形成と安定化が必要である。葉酸および葉酸代謝拮抗剤は、細胞膜に局在する folate transporter-1 (FT-1)によって細胞内に取り込まれる。その後、folylpolyglutamyl synthase (FPGS)によりポリグルタミン酸化を受けると、細胞内での滞留性が高まる。ポリグルタミン酸化を受けた葉酸塩や葉酸代謝拮抗剤は、 γ -glutamyl hydrolase (GGH)によりポリグルタミン酸残基が外れて元の状態に戻る(単グルタミン酸化される)。したがって、FPGS と FT-1 の発現増加および GGH 発現の減少がフッ化ピリミジン感受性に関与することが示唆される。われわれはこれまで、TS の免疫組織化学的検出(免疫染色)における至適条件を確立し、胃癌および大腸癌のフッ化ピリミジン化学療法において TS 高発現が治療抵抗性の重要な指標であることを発表してきた。しかし、TS 低発現が正確にフッ化ピリミジン感受性を意味するものではなく、効果予測の精度をより高めることが望まれていた。一方、FPGS、GGH および FT-1 発現の免疫組織化学的検討に関する論文はわれわれの知る限りではほとんどない。こうした背景から、免疫染色を用いて FPGS、GGH、FT-1 および TS の発現を総合的に評価することにより、フッ化ピリミジンの効果を正確に予測できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

申請時における当初の研究目的は以下の内容であった。まず抗 FPGS 抗体、抗 GGH 抗体および抗 FT-1 抗体を作製する。次いで、FPGS、GGH および FT-1 に対する免疫染色の至適条件を確立する。そして、胃癌・大腸癌の生検材料および手術切除標本における FPGS、GGH および FT-1 の発現を TS の発現と比較しながら検索する。その上で、フッ化ピリミジンによる術前化学療法の効果、術後補助化学療法施行例における再発率や生存率との関連性を明らかにする。すなわち、フッ化ピリミジン耐性因子であることが明らかな TS と FPGS、GGH および FT-1 を組み合わせることにより、免疫染色による高精度なフッ化ピリミジン効果予測の可能性を追究・評価する。

しかしながら、4. 研究成果の(1)で述べるとく、FPGS、GGH および FT-1 の免疫染色を病理組織検体へ応用するのは困難であるという結論に至った。そこで、研究計画には含まれていなかったが、以下を目的とする研究を実施することになった。いずれも申請時の研究テーマと関連性をもった独創的研究である。研究の方法と成果についてはテーマごとに記載する。

・TS とともにピリミジン合成に関わる thymidine kinase-1 (TK-1) について、諸臓器の癌および非癌組織における発現の特徴

を明らかにし、TK 阻害剤 TAS-102 (臨床試験中)の有効性を考察する。

・*p53* 遺伝子解析とアポトーシス実行酵素 caspases の免疫染色によってフッ化ピリミジン系抗癌剤 S-1 の感受性を予測することが可能かを検討する。

・胃癌および大腸癌における細胞死経路の特徴を免疫組織化学的に解析し、抗癌剤治療の視点からアポトーシスとオートファジーの関わりを考える。

3. 研究の方法

(1) FPGS、GGH および FT-1 の至適免疫染色条件の確立と特異性の確認

FPGS、GGH、FT-1それぞれに特異的なアミノ酸配列からペプチドを合成した。得られた合成ペプチドについて、ウシサイログロブリンをキャリア蛋白とし、それぞれ2羽のウサギに接種した。十分な力価に達したことを確認した後、採血し、抗血清を得た。そして、それらの抗血清をアフィニティー精製した。

すべてのアフィニティー精製抗体について、パラフィン切片への応用の可否を検討すると同時に至適染色条件を確立すべく、諸工程における条件を比較検討した。すなわち、まず、活性ないし mRNA レベルが高い xenograft 腫瘍組織を対象として、抗原賦活化処理(加熱処理、蛋白分解酵素処理および蟻酸処理)、抗体の反応時間、固定液の種類や固定時間の影響などを検討した。発色には 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 溶液を、核染色にはマイヤーのヘマトキシリン液を用いた。ルーチンで使用している検出法であるアミノ酸ポリマー法ではパラフィン切片への応用が不可能と判断された場合は、超高感度法である catalyzed signal amplification (CSA) 法を実施した。なお、TS の染色条件はすでに確定している。

免疫染色の特異性を確認するため、免疫に使用した抗原ペプチドを用いて免疫吸収試験を行った。さらに、免疫組織化学的発現と活性値との相関性を評価した。

(2) 諸臓器の癌および非癌組織におけるピリミジン合成酵素の発現

対象は、計 175 例の進行癌手術切除標本(舌癌 12 例、甲状腺癌 12 例、肺癌 23 例、乳癌 14 例、食道癌 12 例、胃癌 18 例、大腸癌 14 例、肝癌 12 例、胆嚢癌 15 例、膵癌 10 例、腎癌 10 例、膀胱癌 13 例および子宮頸癌 10 例)のホルマリン固定パラフィン切片である。アミノ酸ポリマー法を用いて、TK-1 および TS に対する免疫染色を実施した。予備実験の結果によって選択された最適な抗原性賦活化処理、すなわち、1 mM EDTA 溶液 (pH 8.0) 中での加熱処理を実施した。使用した一次抗体は抗 TK マウスモノクローナル

抗体（クローン F12）および抗 TS ウサギポリクローナル抗体で、いずれも室温にて一晩インキュベートさせた。

全癌細胞のうちの 30%以上の癌細胞が陽性を示した場合を高発現、陰性を含め陽性細胞が 30%未満であった場合を低発現に分類した。

(3) *p53* 遺伝子解析とアポトーシス実行酵素 caspases の免疫染色によるフッ化ピリミジン系抗癌剤 S-1 の感受性予測

計 22 例のヒト癌細胞株（肺癌 6 例、胃癌 6 例、大腸癌 2 例、膵癌 2 例、乳癌 6 例）について、ダイレクトシーケンス法により *p53* 遺伝子解析を行った。次いで、癌細胞をヌードマウスに移植し、xenograft 腫瘍モデルを作製した。S-1 を 14 日間経口投与し、腫瘍成長抑制率（tumor growth inhibition rate ; TGIR）を求めた。

非投与群の腫瘍を摘出し、ホルマリン固定パラフィンブロックを作製した。それらの薄切切片に対し、cleaved (activated) caspase-8 (CC8)、cleaved caspase-9 (CC9) および cleaved caspase-3 (CC3) の免疫染色を行った。CC8 および CC9 はそれぞれアポトーシスのレセプター経路およびミトコンドリア経路における誘導型 caspases であり、CC3 は両経路に共通した実行型 caspase である。あらかじめ選択した最適な加熱溶液 (CC8 および CC3 に対しては 1 mM EDTA 溶液、pH 8.0; CC9 に対しては 10 mM クエン酸緩衝液、pH 7.0) に浸漬し、加熱による抗原性賦活化処理を行った。使用した一次抗体は抗 CC8 ウサギモノクローナル抗体 (クローン 18C8)、抗 CC9 ウサギポリクローナル抗体および抗 CC3 ウサギポリクローナル抗体で、室温にて一晩反応させた。CC8 と CC3 に対してはアミノ酸ポリマー法を、CC9 に対しては超高感度 CSA 法を用いて陽性反応を検出した。

光学顕微鏡下で癌細胞をカウントし、各マーカーの陽性細胞率を求め、それぞれ CC8 labeling index (LI)、CC9 LI および CC3 LI とした。*p53* 変異型群と *p53* 野生型群に分けて、各 LI と S-1 腫瘍成長抑制率との相関性を解析した。

(4) 胃癌および大腸癌における細胞死経路の免疫組織化学的解析

胃癌 80 例および大腸癌 75 例のホルマリン固定パラフィンブロックから薄切切片を作製した。(3)の研究でも検出対象とした CC8 および CC9 に加え、apoptosis-inducing factor (AIF ; caspase 非依存性アポトーシスのマーカー) および LC3 (オートファジーのマーカー) も免疫染色により検出した。あらかじめ選択した最適な加熱溶液に浸漬し、抗原性賦活化処理を行った。使用した加熱溶

液は、CC8、CC3 および LC3 に対しては 1 mM EDTA 溶液 (pH 8.0)、CC9 に対しては 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0)、AIF に対しては 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) である。使用した一次抗体は、抗 CC8 ウサギモノクローナル抗体 (クローン 18C8)、抗 CC9 ウサギポリクローナル抗体、抗 AIF ウサギポリクローナル抗体および抗 LC3 ウサギポリクローナル抗体であり、それぞれを室温で一晩反応させた。CC8、AIF および LC3 に対してはアミノ酸ポリマー法を、CC9 に対しては超高感度 CSA 法を用いて陽性反応を検出した。

CC8、CC9 および LC3 の陽性細胞がそれぞれ >15%、>5%、>10% の場合を陽性とした。AIF については、核に局在する場合のみ (caspase 非依存性アポトーシスの指標) を陽性と判断した。多数の陽性細胞が確認された代表的症例については、連続切片法を用いて複数マーカーの同一細胞内発現も検索した。

4. 研究成果

(1) FPGS、GGH および FT-1 の至適免疫染色条件の確立と特異性の確認

アフニティー精製ポリクローナル抗体 (FPGS は A、B、C および 219 の 4 種、GGH は A、B および C の 3 種、FT-1 は 52 の 1 種) が作製された。10%ホルマリン固定ないし 4%パラホルムアルデヒド (PFA) 固定パラフィン切片を対象とした FPGS 免疫染色は、加熱処理、蛋白分解酵素や蟻酸による抗原性賦活化処理を加えても不可能であった (図 1)。

一方、EDTA 液中での熱処理を加えることによりパラフィン切片を対象とした GGH 免疫染色が可能であったが、ホルマリン固定よりも PFA 固定の方が染色性に優れていた。3 時間固定と 24 時間固定の間には、GGH 染色性に顕著な差はみられなかった。GGH-A 抗体を用いた場合が最も陽性反応が強く、コントラストも良好であった。PFA 固定腫瘍組織に対する GGH 免疫染色の特異性は免疫吸収試験により確認された。また、大腸癌 xenograft における GGH 免疫反応性は GGH 活性と相関していた。すなわち、GGH 活性が高い腫瘍では比較的多くの陽性細胞が認められたが、低い腫瘍では陰性ないしごく弱い染色性を示すのみであった (図 2)。

FT-1 の免疫染色は、ホルマリン固定パラフィン切片では不可能であった。しかし、PFA 固定標本では EDTA 液中での加熱処理により FT-1 抗原性が賦活化された (図 3)。PFA 固定腫瘍組織に対する FT-1 免疫染色の特異性は免疫吸収試験により確認された。

以上の検討結果から、FPGS、GGH および FT-1 の免疫染色をルーチンの (ホルマリン固定パラフィン包埋された) 病理組織検体へ応用す

る後向き研究の実施は残念ながら困難であると判断される。

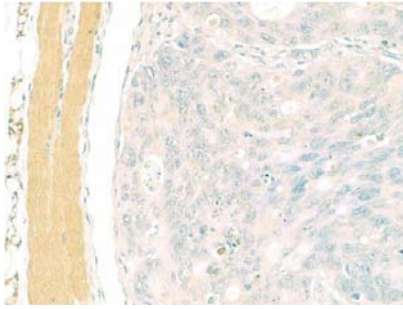


図1 ホルマリン固定大腸癌 xenograft 腫瘍に対するFPGS免疫染色。抗原性賦活化処理なし。

癌細胞に陽性反応は認められない。帯状の着色部分はマウス骨格筋に対する非特異反応による。

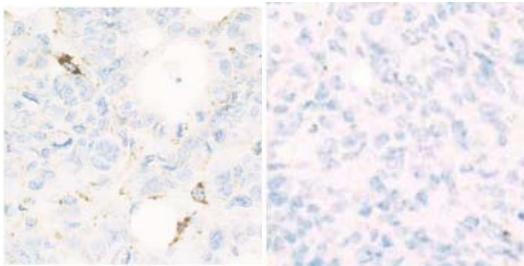


図2 ホルマリン固定大腸癌 xenograft に対するGGH免疫染色。EDTA液中での加熱処理。

GGH活性が高い腫瘍(左)では細胞質に陽性反応が確認されるが、低い腫瘍(右)では陰性である。

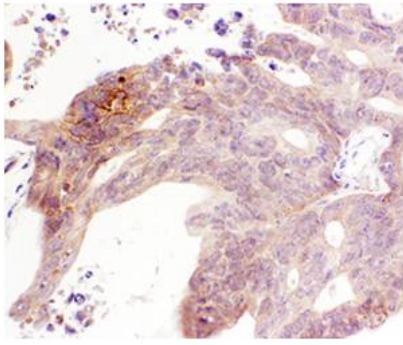


図3 PFA固定大腸癌 xenograft に対するFT-1免疫染色。EDTA液中での加熱処理。

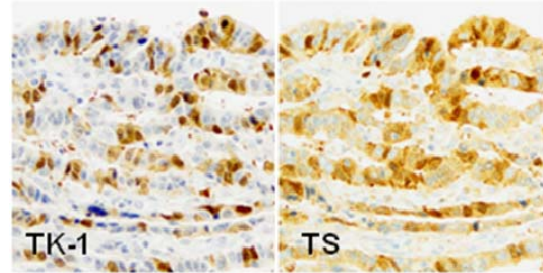
一部の癌細胞に陽性反応が観察される。

(2) 諸臓器の癌および非癌組織におけるピリミジン合成酵素の発現

TK-1およびTSの発現パターンは癌種によって大きく異なっていた。すなわち、TK-1高発現は、胃癌、大腸癌(図4)、食道癌および子宮頸癌にしばしば認められた。胃癌、大腸癌および子宮頸癌ではTSの高発現も伴っており、salvage経路とde novo経路の両者を介してピリミジン合成が活性化されていることが示唆された。対照的に、甲状腺癌、肝細胞癌、膵癌

および腎細胞癌の大部分はTK-1、TSともに陰性であった。

現在、胃癌および大腸癌を対象とした第II相臨床試験中にあるTAS-102の主成分であるtrifluorothymidine (TFT) は、TK-1によって活性体TFT monophosphateに変換される。そのため、癌組織内TK-1レベルがTAS-102の効果を決定する上で重要である。一方、冒頭で述べたように、TSの発現レベルが高いとフッ化ピリミジンに対する抵抗性の原因になることが示唆されている。TAS-102は、TS発現の程度に関わらず、胃癌および大腸癌に加えて、食道癌や子



宮頸癌に対しても有効かもしれない。

図4 大腸癌におけるTK-1およびTSの発現

TK-1およびTS陽性癌細胞が多数観察される。

(3) p53遺伝子解析とアポトーシス実行酵素caspasesの免疫染色によるフッ化ピリミジン系抗癌剤S-1の感受性予測

p53遺伝子変異(mt p53)は22例中18例の癌細胞株に認められ、うち16例が点突然変異、2例が欠失変異であった。すべての変異がエクソン4~8に局在していた。残りの4例はp53野生型(wt p53)であった。mt p53群とwt p53群の間にS-1 TGIRの有意差はなかった。

全xenograft腫瘍において、S-1 TGIRはCC8 LIと相関していたが($r = 0.56, p = 0.01$)、CC9 LIやCC3 LIとの間には相関関係はなかった。mt p53腫瘍に限定した場合においてもS-1 TGIRとCC8 LIとの相関が証明され、その相関係数は全腫瘍を対象とした場合よりも高かった($r = 0.62, p = 0.02$; 図5および図6)。しかし、CC9 LIおよびCC3 LIはS-1 TGIRとの有意な相関を示さなかった。一方、wt p53腫瘍に限定した場合は、いずれのLIもS-1 TGIRと相関を示さなかったが、サンプル数が少なかった(4例)。

S-1の感受性を正確に予測でき、臨床的にも受け入れられるバイオマーカーは見出されていない。抗癌剤のほとんどは主にcaspase依存性アポトーシスを誘導することによって抗腫瘍効果を発揮する。また、p53遺伝子の機能を欠いた癌細胞ではレセプター経路でアポトーシスが誘導されることが報告されている。したがって、p53遺伝子型がS-1誘導性細胞死の経路を決定していると考えられる。われわれの結果は、固形癌(とくにmt p53を有する

腫瘍)における自発性の CC8 発現レベルが S-1 によるアポトーシスの誘導能力をよく反映しており、CC8 免疫染色が S-1 化学療法の効果予測に有用であることを示唆している。しかし、対象数(とくに wt *p53* 腫瘍のサンプル数)を拡大した追加研究を実施して、本研究で得られた結果を確認する必要がある。

この研究成果について、論文投稿準備中であり、また臨床検体(術前化学療法施行大腸癌)への応用を計画中である。

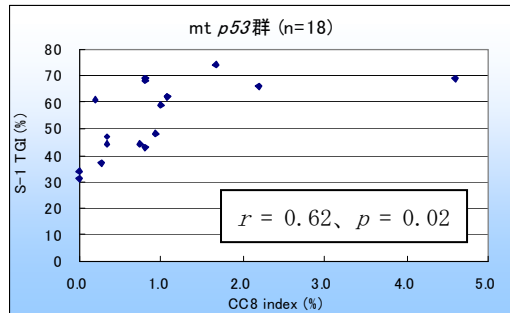


図5 *p53* 変異を有する xenograft における CC8 LI と S-1 TGIR との相関性

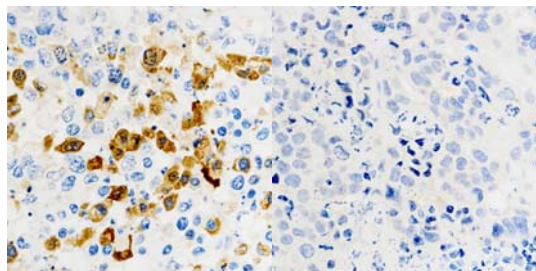


図6 S-1 反応性の胃癌 xenograft (左) および S-1 抵抗性の乳癌 xenograft (右) に対する CC8 免疫染色。いずれも *p53* 遺伝子に変異あり。

S-1 TGIR が 69%であった腫瘍(左)では多数の CC8 陽性癌細胞が観察されるが、S-1 TGIR が 34%であった腫瘍(右)は CC8 陰性を示している。

(4) 胃癌および大腸癌における細胞死経路の免疫組織化学的解析

AIF のアポトーシスへの関与を表す核内陽性像は極めてまれであり、全症例が陰性と評価された。胃癌、大腸癌の間で CC8 発現の有意な差はなかったが、胃癌の CC9 陽性率は大腸癌よりも明らかに高かった ($p < 0.0001$)。また、胃および大腸の非癌部粘膜上皮は CC8 および CC9 に陽性であった。一方、リンパ球およびマクロファージの一部は CC9 を発現していたが、CC8 は陰性であった。これらの結果から、アポトーシス経路は癌の原発部位や細胞種によって異なることが強く示唆される。さらに、胃癌では CC8 と CC9 がときに同一細胞に発現することが確認された(図7; 矢印)。この所見から、胃癌におけるアポトーシスで

はレセプター経路とミトコンドリア経路が相互に活性化されていると考えられる。

CC9 に関する結果とは対照的に、LC3 高発現は胃癌よりも大腸癌に優位であった ($p < 0.0001$)。また、LC3 陽性大腸癌細胞は例外なく CC8 陰性であった(図8)。Caspase 依存性アポトーシスを回避できる癌細胞は抗癌剤に抵抗性を示す。また、オートファジーは、高レベルの傷害下では細胞死につながる一方で、抗癌剤や放射線によるストレス状態に対しては細胞を適応させることによって防御機構として働くことが報告されている。われわれが得た所見はこの報告を裏付けるものである。

この研究の成果は、英文論文として海外の雑誌に投稿中である。

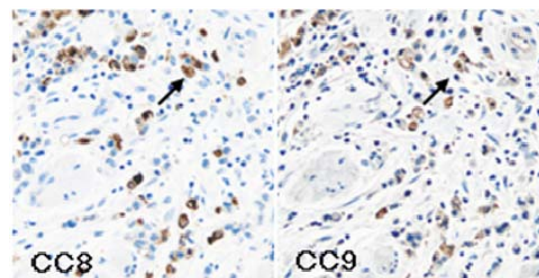


図7 胃癌における CC8 および CC9 の発現。CC8 および CC9 陽性細胞が多数観察される。一部の癌細胞は両者を同時発現している。

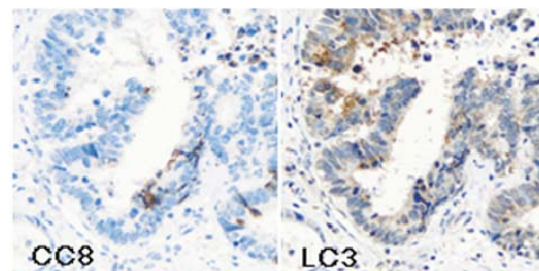


図8 大腸癌における CC8 および LC3 の発現。CC8 陽性癌細胞と LC3 陽性癌細胞はまったく一致していない。

以上の研究成果を要約すると、まず、ホルマリン固定パラフィン切片を対象として葉酸代謝関連蛋白の発現を体系的に検索するのは、残念ながら困難であった。しかし、本研究の軌道に若干の修正を加えることによって、1) 免疫染色はピリミジン合成酵素や細胞死マーカーの発現を解析できる有用な方法であること、2) TK-1 および TS の発現パターンは癌種によって大きく異なっており、胃癌、大腸癌および子宮頸癌では TK-1、TS ともに高発現を示すこと、3) 自発性の CC8 発現レベルが S-1 化学療法の効果をよく反映すること、および 4) CC9 発現は胃癌に優位で、逆に LC3 発現は大腸癌に優位であることを証明することができた。

最後に、日本学術振興会科学研究費補助金によるご援助に厚くお礼を申し上げたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Shintani M, Urano M, Takakuwa Y, Kuroda M, Kamoshida S: Immunohistochemical characterization of pyrimidine synthetic enzymes, thymidine kinase-1 and thymidylate synthase, in various types of cancer. *Oncology Reports* 23: 1345-1350, 2010 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 新谷路子、諸臓器の正常および癌組織における thymidine kinase の発現、第 98 回日本病理学会総会、平成 21 年 5 月 3 日、京都国際会議場 (京都府)
- ② 鴨志田伸吾、細胞回転からみた抗がん剤感受性—免疫組織化学的考察—、第 22 回泌尿器病理勉強会、平成 22 年 7 月 24 日、東京慈恵会医科大学 (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鴨志田 伸吾 (KAMOSHIDA SHINGO)
神戸大学・保健学研究科・教授
研究者番号：70351020

(2) 研究分担者

新谷(田中) 路子 (SHINTANI (TANAKA) MICHIKO)
神戸大学・保健学研究科・助教
研究者番号：40207147

(3) 連携研究者

堤 寛 (TSUTSUMI YUTAKA)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：80138643

松岡 宏 (MATSUOKA HIROSHI)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：40367719

(4) 研究協力者

坂本 一樹 (SAKAMOTO KAZUKI)
大鵬薬品工業株式会社・徳島研究センター・研究員

寒川 彰子 (SANGAWA AKIKO)
大阪赤十字病院・病理部・臨床検査技師