

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659305

研究課題名(和文) thymidylate synthase を標的とした「分子標的癌予防法」の開発

研究課題名(英文) Screening for the suppressor of the expression of thymidylate synthase

研究代表者

曾和 義広 (Sowa, Yoshihiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70315935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：発癌は無秩序な細胞増殖であり、その細胞増殖には thymidylate synthase (TS) の活性が必要である。多くの癌で TS 発現が上昇していることから、本研究では、この TS の発現を抑制することが発癌予防に有効ではないかと考え、TS の発現を抑制する成分の探索を実施した。

その結果、脂質降下剤として使用されている fenofibrate や PI3K 阻害剤である LY294002 に、TS の発現抑制作用効果があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Since the activity of thymidylate synthase (TS) is essential for cell proliferation, the expression of TS is higher in various cancer cells than in normal cells. Therefore, we tried to find the suppressors of the expression of TS for cancer prevention. As the results, we found that fenofibrate, which is used to reduce cholesterol levels, reduced the expression of TS in human colon cancer HT-29 cells and that LY294002, a PI3K inhibitor, also reduced it in human colon cancer HCT15 cells. These results raise a possibility that these compounds might be useful for the treatment and prevention against colon cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：thymidylate synthase fenofibrate PI3K 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

発癌の本質である細胞増殖の促進が起こるには、DNA複製に必要な酵素の活性化が必要となる。実際に、代表的なDNA複製に必要な酵素である thymidylate synthase (TS) は、多くの癌で発現が上昇していることが明らかとなっている。またTSの過剰発現により正常細胞が癌化することから、TSの発現上昇が発癌の主要原因であることが近年になり明らかにされてきた(Cancer Cell 5, 341, 2004, Oncogene 26, 4817, 2007)。

2. 研究の目的

上述のように、TSは多くの癌で発現が上昇していることが明らかとなっており、また発現の上昇が発癌の原因とも考えられることから、私達は、このTSの発現を抑制することが発癌予防や治療に有効ではないかと考えた。

そこで、TS発現を抑制する化合物の探索を、大腸癌細胞を用いて検討することとした。

3. 研究の方法

細胞増殖は細胞内シグナル伝達経路の活性化によるとされており、その主要な経路としてはMAPK経路とPI3K/Akt経路がある。そこで、MAPK経路が活性化されている大腸癌細胞であるHT-29細胞と、PI3K/Akt経路が活性化されているHCT15細胞を用いて、TS発現の抑制を検討した。

4. 研究成果

B-RAFに活性型変異を有することでMAPK経路が活性化している大腸癌細胞HT-29細胞において、TSの発現を低下させる化合物として、脂質降下剤として広く使用されているfenofibrateを見出した。

fenofibrateは、HT-29細胞に対して、50 microM以上で増殖抑制を示し(図1)、100 microM以上で細胞周期をG1期で停止させた(図2)。

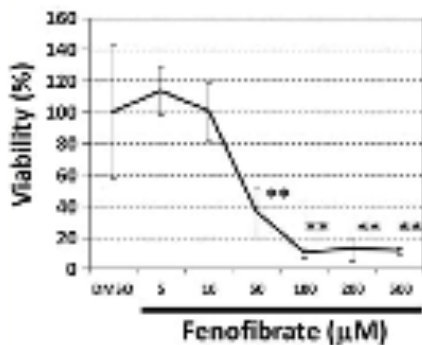


図1: fenofibrateによる大腸癌細胞HT-29に対する増殖抑制効果

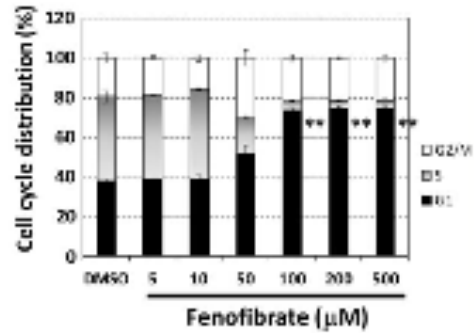


図2: fenofibrateによる大腸癌細胞HT-29に対する細胞周期停止効果

そこで、細胞増殖をcytostaticに停止させる濃度である100 microMにおける蛋白質発現への影響を検討したところ、MAPK経路の活性化を反映するリン酸化ERKが消失しており、またcyclin Dも消失していた(図3)。さらに、リン酸化RBの消失とTSの抑制が認められた(図4)。

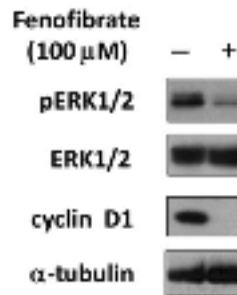


図3: fenofibrateによる大腸癌細胞HT-29におけるMAPK経路分子リン酸化ERKおよびcyclin Dへの影響

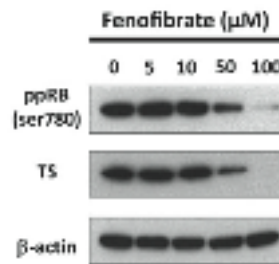


図4: fenofibrateによる大腸癌細胞HT-29におけるリン酸化RBおよびTSへの影響

またfenofibrateによるTSの発現は、蛋白質発現だけでなく、mRNAレベルでも発現抑制されていることが確認された(図5)。

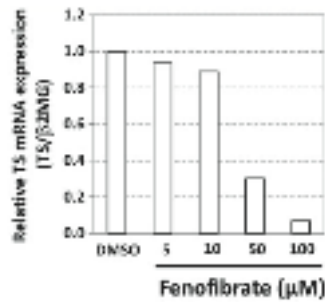


図5:fenofibrate による大腸癌細胞 HT-29 における TS mRNA への影響

HT-29 細胞は B-RAF に活性型変異を有している細胞であり、その結果、MAPK 経路が活性化されている。fenofibrate によりリン酸化 ERK が消失していることから、fenofibrate は MAPK 経路を阻害していると考えられ、その結果、cyclin D が抑制され、RB の再活性化が生じ、最終的に TS の発現が抑制されていると考えられた。

次に PIK3CA に活性型変異を有することで PI3K/Akt 経路が活性化している大腸癌細胞株 HCT15 において、TS の発現を低下させる化合物として、PI3K 阻害剤として知られる LY294002 を見出した。

LY294002 は、HCT15 細胞に対して、12.5 microM 以上で細胞周期を G1 期で停止させた(図6)。

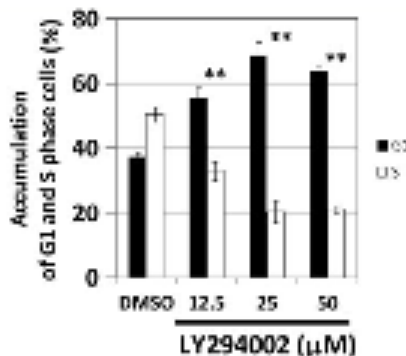


図6:LY294002 による大腸癌細胞 HCT15 に対する細胞周期停止効果

そこで、G1 期における細胞周期が観察される 12.5、25、50 microM における LY294002 の蛋白質発現への影響を検討したところ、PI3K/Akt 経路の活性化を反映するリン酸化 Akt (Ser473) が消失しており、CDK 抑制因子である p27 の発現が誘導されていた。さらに、リン酸化 RB の消失と TS の抑制が認められた(図7)。

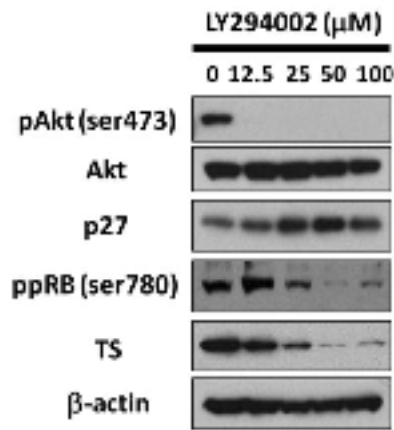


図7:LY294002 による大腸癌細胞 HCT15 における PI3K/Akt 経路分子リン酸化 Akt (Ser473)、p27、リン酸化 RB および TS への影響

HCT15 細胞は PIK3CA に活性型変異を有している細胞であり、その結果、PI3K/Akt 経路が活性化されている。LY294002 によりリン酸化 Akt (Ser473) が消失していることから、LY294002 は PI3K/Akt 経路を阻害していると考えられ、その結果、p27 が誘導され、RB の再活性化が生じ、最終的に TS の発現が抑制されていると考えられた。

これらの結果、MAPK 経路活性化時には脂質降下剤である fenofibrate が、PI3K/Akt 活性化時には PI3K 阻害剤である LY294002 が、TS 発現の抑制を示すことが明らかとなった。

fenofibrate は脂質降下剤として従来使用されている医薬品であり、また LY294002 は医薬品ではないが、現在、同様の PI3K 阻害剤が臨床試験されていることから、MAPK 経路や PI3K/Akt 経路の活性が生じている患者やハイリスク群に対して、それぞれの活性化経路に応じたテーラーメイド治療法、テーラーメイド予防法の提案が将来的には可能となるかもしれない。

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)

Motoki Watanabe, Yoshihiro Sowa, Mayumi Yogosawa, Toshiyuki Sakai

Novel MEK inhibitor trametinib and other retinoblastoma gene (RB)-reactivating agents enhance efficacy of 5-fluorouracil on human colon cancer cells

Cancer Science, 104 (2013) 687-693

DOI: 10.1111/cas.12139

[学会発表](計2件)

渡邊元樹、曾和義広、酒井敏行

新規 MEK 阻害剤 trametinib などによる RB 再活性化により大腸癌細胞に対する 5-FU 感受性が
増強される

日本がん分子標的治療学会学術集会

2013 年 6 月 14 日 京都

Motoki Watanabe, Yoshihiro Sowa, Toshiyuki Sakai

Novel MEK inhibitor trametinib and other RB-reactivating agents enhance efficacy of 5-fluorouracil on human colon cancer cells

日本癌学会学術集会

2013 年 10 月 03 日 横浜

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pubmed/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

曾和 義広 (SOWA YOSHIHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号:70315935