

機関番号：82504

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20591562

研究課題名 (和文) 胃癌細胞における 5-FU 接触時のチミジル酸合成酵素制御機構と感受性への関与の解明

研究課題名 (英文) Mechanism of the regulation of thymidylate synthase levels associated with response to 5-fluorouracil in human gastric cancer cells

研究代表者

鍋谷 圭宏 (NABEYA YOSHIHIRO)

千葉県がんセンター (研究所)・医療局・消化器外科 主任医長

研究者番号：40322028

研究成果の概要 (和文)：チミジル酸合成酵素(TS)は 5-FU の代謝産物 5-フルオロデオキシウリジン 1 リン酸(FdUMP)と直接結合して阻害を受ける主要な作用標的のため、TS の発現量や活性が胃癌細胞の 5-FU 感受性予測因子の一つとされる。しかし、胃癌細胞では TS の蛋白レベルが 5-FU 投与中に変化し、感受性に影響する可能性がある。そこで、6 種類のヒト胃癌細胞株を用いて、5-FU 接触中の TS レベルの変化とその制御機構を検討した。その結果、5-FU 接触後早期に形成される TS-FdUMP 複合体がカルパインにより分解され、その分解程度が高い細胞は 5-FU 低感受性であった。従って、胃癌細胞に対して 5-FU 投与時にカルパイン阻害剤を併用すると、効果を担う TS-FdUMP 複合体の分解が抑制され、5-FU 感受性が高まる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) :Thymidylate synthase (TS) plays a major role in the response to 5-fluorouracil (5-FU) by binding directly to the 5-FU metabolite, 5-fluoro-dUMP (FdUMP). The change in the TS expression levels after 5-FU administration was examined in parallel to 5-FU responsiveness in six human gastric adenocarcinoma cell lines to elucidate the source of variability of 5-FU sensitivity. MKN-1, SH-10-TC and MKN-74 cells were more resistant to 5-FU than MKN-28, KATO III and MKN-45 cells. Western-blotting analysis revealed that the 5-FU sensitivity of these cells did not correlate with the basal TS expression levels but did correlate with rapid detection of the TS-FdUMP complex after exposure to 5-FU. In 5-FU-resistant cells, very low levels of the TS-FdUMP complex early after 5-FU exposure were elevated by pretreatment with calpain inhibitors such as benzyloxycarbonyl-leucyl-leucinal (ZLLH) and benzyloxycarbonyl-leucyl-leucyl-leucinal (ZLLLH), but not by other protease inhibitors. In contrast, ONO-3403, which causes calpain activation, stimulated downregulation of the TS-FdUMP complex in 5-FU-sensitive cells. The expression levels of calpastatin, an endogenous calpain inhibitor, were higher in 5-FU-sensitive cells than in 5-FU-resistant cells. ZLLH increased the 5-FU sensitivity of 5-FU-resistant cells, whereas ONO-3403 decreased the sensitivity of 5-FU-sensitive cells. In addition, knockdown of m-calpain by siRNA increased the 5-FU sensitivity in 5-FU-resistant cells, while knockdown of calpastatin reduced the sensitivity in 5-FU-sensitive cells. These results suggest that calpain might reduce the chemosensitivity of human gastric cancer cells to 5-FU possibly by rapid degradation of the TS-FdUMP complex, a finding that is considered to have novel therapeutic implications.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400	420	1,820
2009 年度	1,000	300	1,300
2010 年度	800	240	1,040
総計	3,200	960	4,160

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃癌、化学療法、5-FU、チミジル酸合成酵素、TS-FdUMP 複合体、カルパイン、カルパスタチン、ノックダウン

1. 研究開始当初の背景

(1)胃癌化学療法の中心を担う薬剤は 5-フルオロウラシル (5-FU) 系抗癌剤である。しかし、胃癌細胞は heterogeneity が強く、5-FU 感受性の個体差も大きい。従って、5-FU に感受性のない腫瘍にはその効果は期待できない。
 (2) *p53* 変異陽性の胃癌細胞では 5-FU などの抗癌剤に対する感受性が低い可能性がある。
 (2)5-FU の代謝酵素であるチミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase: TS) 及び ジヒドロピリミジン脱水素酵素 dihydropyrimidine dehydrogenase: DPD)、あるいはオロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (orotate phosphoribosyl transferase: OPRT) の活性が 5-FU に対する感受性予測因子あるいは予後因子として注目されてきた。しかし、これらの酵素活性や蛋白レベルが 5-FU 投与中に変化して感受性に影響を与える可能性とその機序については検討されていない。特に、5-FU 接触中の TS の制御機構についてはこれまで全く明らかにされていない。
 (4)ヒト食道癌細胞において Ca^{2+} -依存性プロテアーゼであるカルパインあるいは内因性カルパイン阻害剤であるカルパスタチンの発現レベルが抗癌剤感受性予測因子になる。

2. 研究の目的

(1)ヒト胃癌細胞において、5-FU 接触中の TS レベルの変化が 5-FU 感受性 (細胞増殖抑制効果) と関連するの否か、*p53* status との関連も併せ検討して、胃癌細胞の 5-FU 感受性決定における TS の意義を明らかにする。
 (2)カルパインなどのプロテアーゼによる TS レベルの制御の可能性を検索し、5-FU 感受性との関連を明らかにする。
 (3)プロテアーゼなどによる TS の制御機構が判明すれば、これを修飾することで胃癌細胞の 5-FU 感受性を高めることが可能であり、臨床応用の可能性を検討する。

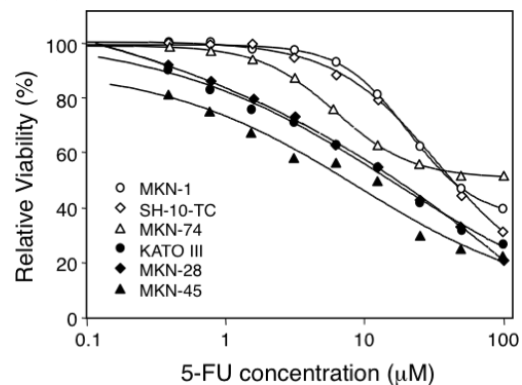
3. 研究の方法

(1)*p53* status の異なる 6 種類のヒト胃癌細胞株を用いて、5-FU 感受性を MTT assay で、TS (OPRT, DPD) レベルを抗 TS (抗 OPRT, 抗 DPD) polyclonal 抗体 (大鵬薬品工業 (株) より供与) を用いた Western blotting にて、5-FU 接触後経時的に測定した。
 (2)内因性のカルパインとカルパイン阻害剤カルパスタチンの発現レベルも Western blotting で測定し、感受性との関連を検討。
 (3)カルパイン阻害剤と活性化剤で細胞を前処理、あるいは siRNA 導入によりカルパイン/カルパスタチン遺伝子をノックダウンして、TS レベルと 5-FU 感受性の変化を検討した。

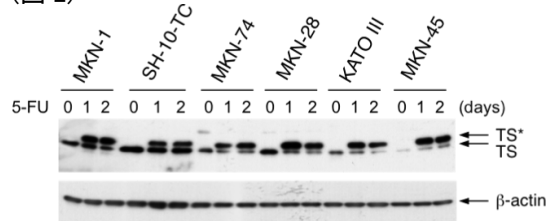
4. 研究成果

(1)MKN-1, SH-10-TC, MKN-74 は MKN-28, KATO-III, MKN-45 に比べて 5-FU に低感受性であった (図 1)。細胞の *p53* status (MKN-45 と SH-10-TC のみ wild type で、他の 4 種は変異あり) も、5-FU 接触前の定常状態の TS レベルも、5-FU 接触 24 時間以後の TS-FdUMP 複合体 (*) レベルも 5-FU 感受性とは関係しなかった。

(図 1)

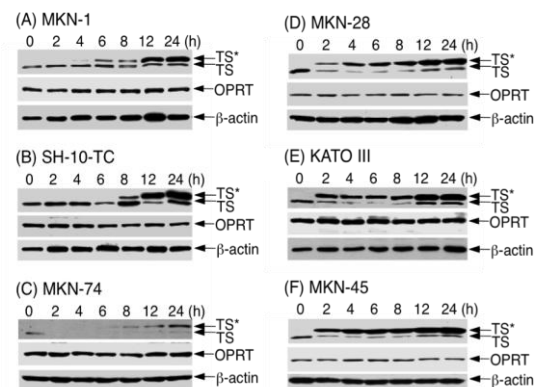


(図 2)



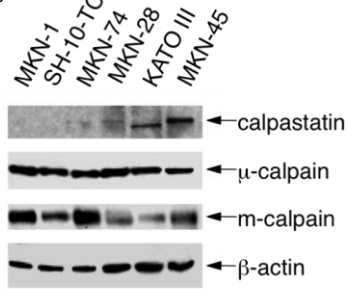
(2)5-FU 高感受性細胞では 5-FU 接触後すぐに TS-FdUMP 複合体 (*) が検出された (図 3A-C) が、低感受性細胞ではしばらく検出されなかった (図 3D-F)。5-FU 接触中に DPD (図略) や OPRT のレベルはどの細胞でも変化しなかった (図 3A-F)。

(図 3)



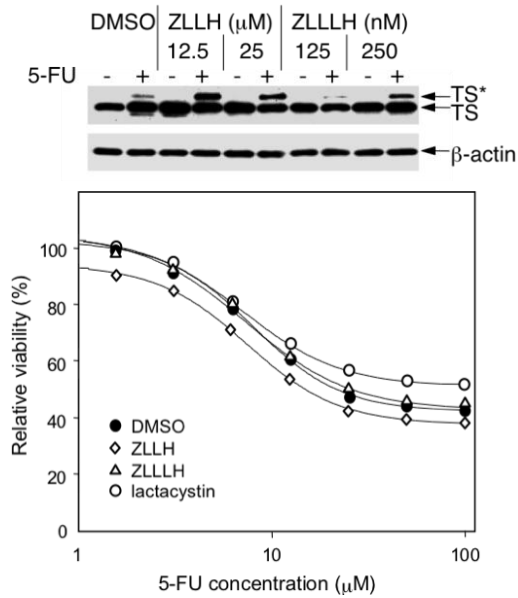
(3)内因性のm-カルパインは5-FU 低感受性細胞で、カルパイン阻害剤カルパスタチンは高感受性細胞で高発現していた (図4)。

(図4)

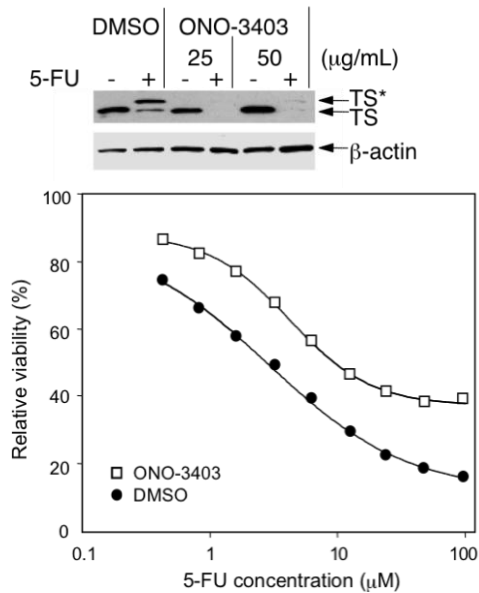


(図5)

(A) MKN-1



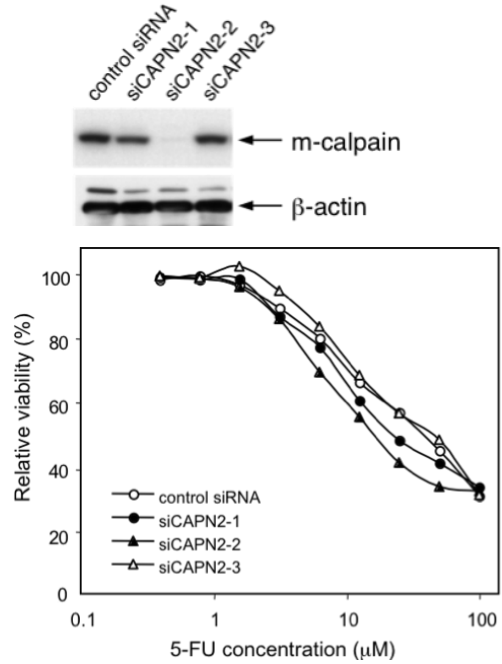
(B) KATO III



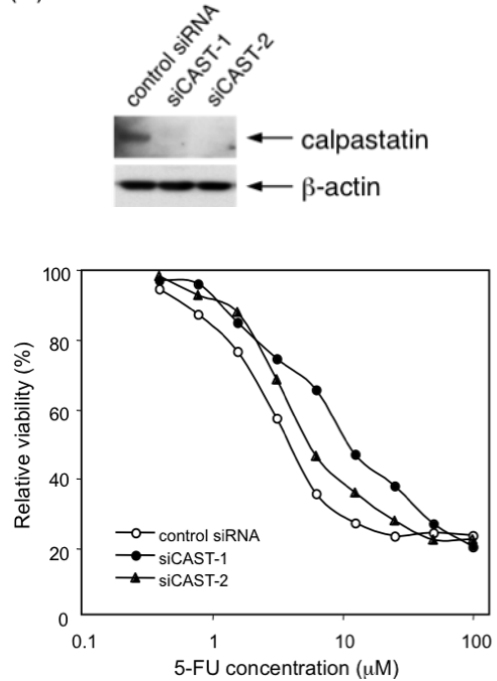
(4)カルパイン阻害剤 benzyloxycarbonyl-leucyl-leucinal (ZLLH) / benzyloxycarbonyl-leucyl-leucyl-leucinal (ZLLLH)で5-FU 低感受性細胞を前処理すると、TS-FdUMP 複合体 (*) のレベルが上昇し高感受性化した (図5A: MKN-1)。カルパイン活性化剤 ONO-3403で5-FU 高感受性細胞を前処理すると、TS-FdUMP 複合体 (*) のレベルが低下し低感受性化した (図5B: KATO-III)。

(図6)

(A) MKN-1



(B) MKN-45



(5)5-FU 低感受性細胞に siRNA (siCAPN2-1,2, 3) を導入して m-カルパイン (large subunit) をノックダウンすると、その程度に応じて高感受性化した (図 6A: MKN-1)。5-FU 高感受性細胞に siRNA (siCAST-1, 2) を導入してカルパスタチンをノックダウンすると、高感受性化した (図 6B: MKN-45)。

(6)以上より、5-FU 接触後早期に形成される TS-FdUMP 複合体がカルパインにより分解され、その分解程度が高い細胞は 5-FU 低感受性と考えられる。従って、胃癌細胞に対して 5-FU 投与時にカルパイン阻害剤を併用すると、効果を担う TS-FdUMP 複合体の分解が抑制され、5-FU 感受性を高める可能性がある。また、内因性のカルパスタチンレベルは、胃癌細胞の 5-FU 感受性を予測する全く新しい指標となる可能性が示唆された。

(7)本研究は、ヒト胃癌細胞において 5-FU 感受性を規定し得る機序の一つと、治療前の 5-FU 感受性予測の可能性を初めて明らかにした。この研究成果が、胃癌に対する化学療法個別化や 5-FU 系抗癌剤の新たな臨床応用に寄与することを期待したい。

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 Nabeya Y, Suzuki T, Furuya A, Koide N, Ohkoshi M, Takiguchi M, Ochiai T, Matsubara H, Hiwasa T. Calpain regulates thymidylate synthase-5-fluoro-dUMP complex levels associated with response to 5-fluorouracil in gastric cancer cells. *Cancer Sci* (査読有) 2011、*in press*

[学会発表] (計 4 件)

- ① Nabeya Y, et al. Down-regulation of Thymidylate synthase-5-fluoro-dUMP complex levels by calpain is implicated in the sensitivity to 5-fluorouracil in human gastric cancer cells. 8th International Gastric Cancer Congress, 2009. 6. 11, Krakow, Poland.
- ② 日和佐隆樹ほか. 胃癌細胞におけるチミジル酸合成酵素の分解と 5-フルオロウラシル感受性の関係. 第 14 回日本病態プロテアーゼ学会. 2009. 8. 21 大阪
- ③ Nabeya Y, et al. Inhibition of calpain activity may increase the response to 5-fluorouracil in human gastric cancer: possible modulation of thymidylate synthase-5-fluoro-dUMP complex levels. 20th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (IASGO), 2010. 10. 22,

Cairo, Egypt.

- ④ 鍋谷圭宏ほか. カルパインによる TS-FdUMP の分解調節を標的とした胃癌細胞の 5-FU 高感受性化の可能性. 第 48 回日本癌治療学会学術集会. 2010. 10. 29 京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍋谷 圭宏 (NABEYA YOSHIHIRO)
千葉県がんセンター (研究所)・医療局・
消化器外科 主任医長
研究者番号: 4 0 3 2 2 0 2 8

(2) 研究分担者

日和佐 隆樹 (HIWASA TAKAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・
遺伝子生化学 准教授
研究者番号: 3 0 2 6 0 2 5 1

松原 久裕 (MATSUBARA HISAHIRO)
千葉大学・大学院医学研究院・
先端応用外科学 教授
研究者番号: 2 0 2 8 2 4 8 6

(3) 連携研究者

なし