

研 究 速 報

抗癌剤 5-FU 感受性遺伝子群の探索

内田 麻里恵^{*1}, 久富 寿^{*2}

5-fluorouracil-inducible mRNAs in a colorectal cancer cell line

Marie UCHIDA^{*1}, Hisashi HISATOMI^{*2}

(Received September 26, 2007)

1. 背景

代表的な抗癌剤であるフルオロウラシル(5-FU)は、腫瘍細胞内でウラシルと同じ経路でフルオロデオキシウリジル酸(F-dUMP)に転換される¹⁾。F-dUMP は dUMP とチミジル酸合成酵素(TS)からデオキシチミジル酸(dTMP)に合成される反応と拮抗して、DNA 合成を阻害する。また、同時に RNA の合成も阻害する。しかし、正常細胞の DNA および RNA 合成も阻害してしまうため、吐き気、めまい、全身倦怠感などの重篤な副作用が誘発される。これら作用機序で機能するいくつかの因子を標的にし、その活性を抑制または促進させる事ができれば副作用の軽減や投薬効果の向上への道が開かれる。テーラーメード医療の第一歩は既存の薬剤の投与量や投与期間を患者ごとに細かく設定することであるため、既存薬が誘導する細胞内シグナルを同定することは極めて重要な研究対象である。現在、TS を含む多くの薬剤の標的となる細胞内シグナルの解析研究が盛んに行われている²⁻⁵⁾。このような状況下で我々は 5-FU によって発現量が変動するタンパク質を 4 種類 (heat shock 60 kDa protein 1(Hsp60), heat shock 70 kDa protein 5 (Hsp70), thyroid hormone binding protein precursor (P4HB), Lactate dehydrogenase A(LDH-A))同定し、本研究報告で発表した⁵⁾。報告では Hsp60, Hsp70, P4HB タンパク質は 5-FU への暴露時間の経過とともに増加する傾向があり、逆に LDH-A タンパク質は時間経過に伴い減少傾向が確認された。これら 4 種類のタンパク質は 5-FU の代謝経路には関与しない因子であるため、薬剤投与による治療効果を伴った細胞内変動とは別の影響を誘導している可能性がある。本報告は、これら 5-FU 投与により発現が誘導されたタンパク質における転写活性の調査を目的とした。そのため、

各タンパク質を翻訳する mRNA の発現量を測定し、タンパク質発現量との比較をおこなった。

2. 材料と方法

1.0 μ M の 5-FU(協和醗酵)に 24, 48, 72 時間暴露したヒト大腸癌細胞株 WiDr (約 10^6 個)を -20°C の 70 %エタノールで固定し、Propidium iodide(PI)染色後、フローサイトメトリー (Epics XL / XL-MCL SystemIIv3.0 BECKMAN COULTER)にて細胞周期を測定した(Fig.1)。また、同様な培養条件で得られた 120 μ L の細胞懸濁液 (ヒト大腸癌細胞株 WiDr 約 10^6 個)に ISOGEN 700 μ L,

Table1. Primers for semi-quantification of each mRNA.

mRNA	exon	sequence	bp
Hsp60	6	5'-CTCTAAGTACACTCGTCTTGAATA-3'	149
	8	5'-GGTCAATCCCTCTTCTCCAAAC-3'	
Hsp70	6	5'-TGTGCTCTCTCTGGTGATCAAGATA-3'	224
	8	5'-GATGATTGTCTTTTGTTCAGGGGTC-3'	
P4HB	1	5'-AAGTACCTGCTGGTGGAGTTCT-3'	228
	2	5'-TGTATATTCCTTGGGGGAAGCC-3'	
LDH-A	5	5'-TTCACAAGCAGGTGGTTGAGAG-3'	175
	7	5'-AAGACATCATCCTTTATCCGTAAA-3'	
GAPDH	6-7	5'-AACAGCCTCAAGATCATCAGCAA-3'	313
	8	5'-TCAGGTCCACCACTGACACGTT-3'	

クロロホルム 120 μ L を添加後、撹拌した。その後 4°C , 12000 rpm, 15 分間遠心分離し、上澄み液を 700 μ L イソプロパノールに添加し、total RNA をエタノール沈殿にて析出させた。析出した total RNA を 70 %エタノールで洗浄し、精製した。random primer にて cDNA を合成後、30 μ L の PCR Mixture(10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.25 mM dNTP, 0.02 U/ μ L Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Germany), 0.67 pM Forward Primer, 0.67 pM Reverse Primer)用いて PCR 反応を 40 サ

^{*1}: 工学研究科応用化学専攻博士前期課程

^{*2}: 物質生命理工学科准教授

イクル行った(94°C/25 秒, 60°C/30 秒, 72°C/25 秒)。反応終了後, PCR 増幅産物を 2 %アガロースゲルに供し, 電気泳動を行った(Fig.2)。なお, PCR primer の塩基配列は, National Center for Biotechnology Information(NCBI) から各 mRNA の完全長配列を得た後, 各 mRNA に特異的な配列を BLAST Search の結果を考慮して決定した(Table 1)。なお, 内部標準物質として *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* mRNA を検出した。

3. 結 果

1.0 μ M 5-FU の投与により, 細胞の G2/M 期への同調が確認された(Fig. 1)。また, いずれの投与時間でも Apoptosis は確認されなかった。また, *Hsp60*, *Hsp70*, *P4HB* および *LDH-A* mRNA の 5-FU 投与による量の変化を Fig.2 に示した。5-FU 投与からの時間経過に伴い *Hsp60* mRNA 量のみが減少傾向を示した。一方, *LDH-A* mRNA 量は時間経過に伴い増加傾向を示した。*Hsp70* および *P4HB* mRNA 量に顕著な差異は確認されなかった(Table 2)。同様の実験を PCR 反応 25 サイクルで確認したところ, 同じ傾向の結果が得られた(data not shown)。なお, 内部標準物質である *GAPDH* mRNA は全てのサンプルからほぼ等量検出された(data not shown)。

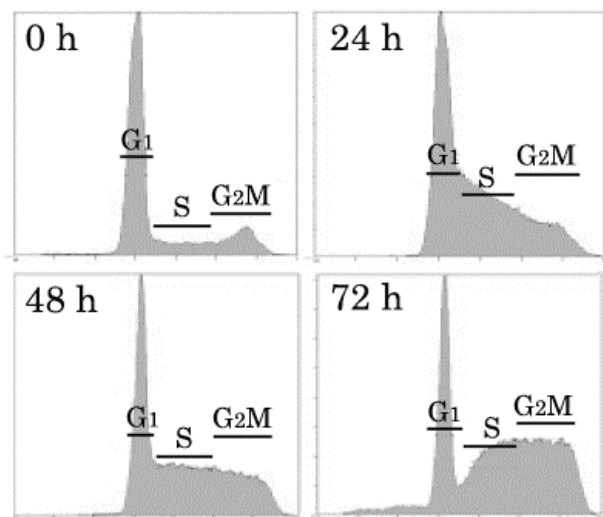


Fig.1. Cell cycle analysis of WiDr cells after 5-FU treatment. WiDr cells were treated with 1.0 μ M 5-FU for 0, 24, 48 or 72 h. The cells arrest in G2/M following 5-FU treatment.

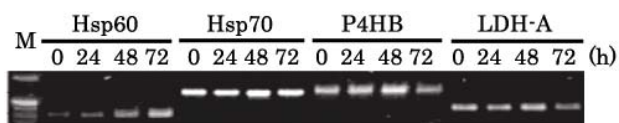


Fig.2. Time course of several mRNA expression. Detection of mRNA for *Hsp60*, *Hsp70*, *P4HB* and *LDH-A* using RT-PCR analysis. At time points, cells were treated with 1.0 μ M 5-FU. M, molecular weight marker.

Table2. Up-or down-regulated factors after 5-FU treatment.

	Hsp60	Hsp70	P4HB	LDH-A
protein	up	up	up	down
mRNA	up	no change	no change	down

4. 考 察

本実験における 5-FU 投与量および投与期間の妥当性は, アポトーシスが誘導されずに細胞周期が停止していることから証明された。5-FU によって細胞内の DNA 合成が阻害され, S 期に十分量の DNA が複製されないまま G2/M 期に移行し, 細胞増殖の停止が誘導されたことが示唆された。

本実験では, 5-FU 投与によりタンパク質の発現量と mRNA の発現量の変動に差異が確認されたものが発見された。*Hsp60* および *LDH-A* では mRNA 量の変動が, そのままタンパク質量の変動に直結しているが, *Hsp70* および *P4HB* では mRNA 量に依存しない経路でタンパク質量が増加している。つまり, この結果は転写レベルでの変動と翻訳レベルでの変動に差異がある因子が存在することを意味する。本研究結果は, 各々の因子の発現量変化が転写レベルだけで行われていない事を明らかにし, 5-FU による細胞内シグナル伝達が多様性が推測された。また, 同じ種類のストレス応答タンパク質である *Hsp60* および *Hsp70* が, 一方は転写レベルで, 他方は翻訳レベルで発現量を調節していることは興味深い。ストレス応答タンパク質は, その緊急性⁷⁾から翻訳レベルの発現量調節が一般的と考えられているが, *Hsp60* に関しては転写レベルの発現調節機構も存在することが明らかとなった。

現時点では, 本実験で対象とした 4 種類の因子の 5-FU 投与による副作用への影響は不明である。しかし, 本実験のように, 投薬による細胞内シグナル因子の発現調節の解明により, 副作用の軽減をはじめとする新たな目的を伴った薬の使用方法が可能となる。それはまさに, テーラーメイド医療への応用に他ならない。今後は遺伝子導入法や RNAi^{8,9)} などを用いて *Hsp60*, *Hsp70*, *P4HB* および *LDH-A* の発現を調節し, 5-FU 投与による細胞内変化を調査する必要がある。さらにこれら因子の挙動が細胞周期の停止に依存しているわけではないことを証明するために, これら 4 種類のタンパク質や mRNA の発現量の変化を別の薬剤で細胞周期を停止させて測定する必要がある。

本実験で明らかとなった, 抗癌剤 5-FU 投与における転写あるいは翻訳レベルでの発現調節の存在は, 同時にこ

れら因子の発現を促進あるいは抑制する場合において、ただ単純に転写のみを促進あるいは抑制すれば良いわけではないことを意味する。従来の概念に基づいた発現調節では細胞内シグナルの変動を再現できないことを、実験データとして示したことも本研究の意義であると考え

参考文献

- 1) Pinedo HM, Peters GF : Fluorouracil : biochemistry and pharmacology. J Clin Oncol 10:1653-1664, 1988.
- 2) Sampath D, Rao VA, Plunkett W : Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. Oncogene : 22, 9063-9074, 2003.
- 3) Peters GJ, Backus HH, Freemantle S, *et al.* : Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. Biochim Biophys Acta 1587: 194-205, 2002.
- 4) Maxwell PJ, Longley DB, Latif T, *et al.* : Identification of 5-fluorouracil-inducible target genes using cDNA microarray profiling. Cancer Res 63: 4602-4606, 2003.
- 5) Audic Y, Hartley RS : Post-transcriptional regulation in cancer. Biol Cell 96: 479-498, 2004.
- 6) Hisatomi H, Tada S, Egashira S: 5-fluorouracil-inducible proteins in a colorectal cancer cell line. 成蹊大学理工学研究報告 Vol43, no.2, 15-19, 2006.
- 7) Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G : Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. Biochem Biophys Res Commun 286: 433-442, 2001.
- 8) Montalvetti A, Fernandez A, Sanders JM, *et al.* : Farnesyl pyrophosphate synthase is an essential enzyme in Trypanosoma brucei. In vitro RNA interference and in vivo inhibition studies. J Biol Chem 278, 17075-17083, 2003.
- 9) Chiu YL, Rana TM : siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. RNA 9: 1034-1048, 2003.