

氏名（本籍）	末次智成	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1189号	
学位授与日付	令和4年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Mechanism of acquired 5FU resistance and strategy for overcoming 5FU resistance focusing on 5FU metabolism in colon cancer cell lines	
審査委員	（主査）教授	小川 武則
	（副査）教授	小澤 修
		教授 森重 健一郎

## 論文内容の要旨

### 【目的、緒言】

5-Fluorouracil (5FU) およびその誘導体は、大腸癌を始め多くの固形癌の術後補助化学療法あるいは切除不能進行症例に対する化学療法の key drug の1つであり、長期間使用されることが多い。一方、5FUの長期使用に伴う5FU耐性の獲得によって、その後の治療に難渋することが多々ある。従って、5FUの耐性獲得の機序の解明、ならびに克服方法の開発は極めて重要である。

我々はこれまで、5FU耐性機序を代謝経路の面から検討してきた。5FUの作用機序として(1)RNAへの取り込みによる核酸合成障害、(2)DNAへの取り込みによる核酸合成障害、(3)活性体 fluoro-deoxyuridine monophosphate (FdUMP) によるDNA合成阻害の3つの機序が考えられるが、主な作用点は活性体 FdUMP の thymidine synthase (TS) 阻害によるDNA合成阻害と考えられている。5FUが活性体 FdUMP となる代謝経路には、チミジル酸生合成の *de novo* 経路由来である orotate phosphoribosyl transferase-ribonucleotide reductase (OPRT-RR) 経路と salvage 経路由来である thymidine phosphorylase-thymidine kinase (TP-TK) 経路があることから、5FUの代謝経路に注目して5FU耐性獲得機序の解明と5FU耐性の克服法を検討した。

### 【対象と方法】

大腸癌細胞株 SW48, LS174T およびそれらの5FU耐性株 SW48/5FUR, LS174T/5FUR を使用した。

#### 1. 細胞株の5FU感受性の評価と耐性獲得後のFdUMP生成量の変化

細胞株ごとの5FU感受性を crystal violet staining assay (CVS assay) にて観察した。さらに5FU処理に伴う FdUMP の変化と耐性の関係を Western blot 法にて検討した。

#### 2. 細胞株別の5FU代謝経路と5FU耐性獲得後の代謝経路の変化

5FUから FdUMP が生成される経路として、5FUにRR阻害薬(hydroxyurea, HU)を併用して FdUMP 量が減少した場合は OPRT-RR 経路、TP阻害薬(tipiracil, TPI)を併用して FdUMP 量が減少した場合は TP-TK 経路と考え、5FUとHUあるいはTPIを同時処理した細胞株の FdUMP 生成量を Western blot 法にて比較検討した。同様に各代謝酵素の発現量も Western blot 法にて評価した。

#### 3. 耐性株のFdUMP感受性の評価と別のヌクレオシド誘導体の感受性評価

FdUMP 感受性に関して TS 特異的阻害剤(raltitrexed)および fluoro-deoxyuridine (FdU)を用いて CVS assay にて細胞傷害性を観察した。また trifluorothymidine (FTD)と TPIを用いて CVS assay にて細胞傷害性を評価した。

## 【結果】

### 1. 細胞株の 5FU 感受性の評価と耐性獲得後の FdUMP 生成量の変化について

親株 SW48 の 50% inhibition concentration(IC50)は 2.98  $\mu\text{M}$  で、その 5FU 耐性株 SW48/5FUR の IC50 は 58.95  $\mu\text{M}$  であった。また FdUMP 生成量は 5FU (1  $\mu\text{M}$ ) 処理の場合、SW48/5FUR で SW48 と比較して 87%減少した。一方親株 LS174T の IC50 は 3.436  $\mu\text{M}$  で 5FU 耐性株 LS174T/5FUR の IC50 は 91.88  $\mu\text{M}$  であった。また FdUMP 生成量は LS174T/5FUR で LS174T と比較して 27%の減少にとどまった。

### 2. 細胞株別の 5FU 代謝経路と 5FU 耐性獲得後の代謝経路の変化

SW48 では、5FU に HU を併用すると FdUMP は低下し、主な FdUMP 生成経路は OPRT-RR 経路であった。SW48/5FUR では OPRT-RR 経路、TP-TK 経路の両方で FdUMP の生成を認めたが、いずれの経路も少量であった。また SW48/5FUR は OPRT 低発現、TP 低発現であった。

LS174T では、5FU に HU と TPI を併用すると FdUMP は低下し、OPRT-RR 経路と TP-TK 経路の両方で FdUMP が生成された。LS174T/5FUR では 5FU と TPI の併用で FdUMP 生成が低下し、TP-TK 経路で FdUMP が生成された。また LS174T/5FUR は OPRT 低発現、RR 低発現であった。

### 3. 耐性株の FdUMP 感受性の評価と別のヌクレオシド誘導体の感受性評価

SW48/5FUR は raltitrexed に対して交差耐性を持たなかった。また TK 高発現であり、TK で代謝され FdUMP となる FdU に対しても交差耐性を持たず、FdUMP 感受性は維持されていた。

LS174T/5FUR では raltitrexed への交差耐性に加え、TK 高発現にもかかわらず FdU への交差耐性を示し、FdUMP 感受性が低下していた。また FTD には LS174T と同等の感受性を示した。

## 【考察】

細胞株ごとに 5FU への反応性は異なるが、5FU の代謝変化が 5FU 獲得耐性に少なからず寄与していると考えられる。SW48/5FUR のように、FdUMP の生成が低下するのみで FdUMP 感受性が維持されている 5FU 耐性の場合、TK 発現が維持されていれば、FdUMP へ代謝される FdU などの薬剤が有効であると考えられた。一方 LS174T/5FUR では dTMP のほとんどの生成を salvage 経路のみに依存した状態と考えられるため、FdUMP で TS を阻害しても DNA 合成阻害にはつながらず、5FU 耐性克服には FTD など別のヌクレオシド誘導体を使用すべきと考えられた。また我々の過去の胃癌細胞株 (MKN45) の研究でも TP 高発現により 5FU 耐性を示し、5FU と TPI の併用で耐性が解除されることを明らかにした。以上の事から、癌腫ごとに異なる 5FU 耐性機序の解明と克服のためには 5FU 代謝に着目し、5FU 代謝障害の解除や別代謝経路への誘導が有用であると考えられる。

## 【結論】

5FU 獲得耐性は 5FU 代謝経路の変化と密接に関わっており、代謝経路を検討することで 5FU 耐性を克服、あるいは適切な別のヌクレオシド誘導体を選択できる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 末次 智成は、大腸がん細胞株における 5FU 耐性メカニズムについて詳細に検討し、細胞株によって 5FU 代謝経路が異なり、酵素発現の変化により耐性経路も異なる特徴があることを示した。これらは、大腸がんにおける薬物療法の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表誌] Tomonari Suetsugu, Ryutaro Mori, Manabu Futamura, Masahiro Fukada, Hideharu Tanaka, Itaru Yasufuku, Yuta Sato, Yoshinori Iwata, Takeharu Imai, Hisashi Imai, Yoshihiro Tanaka, Naoki Okumura, Nobuhisa Matsushashi, Takao Takahashi, Kazuhiro Yoshida: Mechanism of acquired 5FU resistance and strategy for overcoming 5FU resistance focusing on 5FU metabolism in colon cancer cell lines. Oncology Reports. 45, 27 (2021).