



MBD4 frameshift mutation caused by DNA mismatch repair deficiency enhances cytotoxicity by trifluridine, an active antitumor agent of TAS-102, in colorectal cancer cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-05-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 聡 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3348

博士(医学) 鈴木 聡

論文題目

MBD4 frameshift mutation caused by DNA mismatch repair deficiency enhances cytotoxicity by trifluridine, an active antitumor agent of TAS-102, in colorectal cancer cells

(大腸がん細胞において DNA ミスマッチ修復機能欠損による MBD4 フレームシフト変異は TAS-102 の抗がん活性成分であるトリフルリジンに対する細胞毒性を増強する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

DNA ミスマッチ修復機構(MMR)の異常により発生するマイクロサテライト不安定性(MSI) 陽性の大腸がん患者では MSI 陰性大腸がん患者と比較し fluorouracil(5-FU)による十分な有益性は得られないことが知られている。これまでに我々は 5-FU に関して MSI の影響について研究してきた。MSI 標的遺伝子 *MBD4* は DNA glycosylase であり、DNA に取り込まれた 5-FU を認識除去する。また exon 3 に存在するアデニンの 10 回繰り返し領域(A10)が、MMR 異常により 9 回に減ること(A9)でフレームシフト変異が起こり、短縮型の変異型 *MBD4* が産生される。我々は以前、大腸がん細胞株において MSI の有無にかかわらず、変異型 *MBD4* の発現により 5-FU の感受性が高まることを報告した(Cancer Biol Ther 17: 760-768, 2016)。TAS-102 は T(チミン)の代わりに DNA に取り込まれることで抗腫瘍効果を発揮する Trifluorothymidine(トリフルリジン/FTD)と FTD の分解を阻害する thymidine phosphorylase inhibitor (TPI)の合剤である。FTD は 5-FU と作用機序の一部が類似しており、今回我々は MSI 並びに変異型 *MBD4* が大腸がん細胞株における FTD 感受性に及ぼす影響を検討した。

[材料ならびに方法]

MMRを欠損した大腸がん細胞株 HCT116(hMLH1-deficient)に hMLH1 を回復した HCT116+ch3 と通常の HCT116 に 5-FU、FTD を持続的に曝露し、clonogenic assay で細胞障害度を比較した。また HCT116 に 5-FU を持続的に曝露して 5-FU 耐性を獲得させた大腸がん細胞株 HCT116-R に 5-FU、FTD を持続的に曝露し、clonogenic assay で細胞障害度を比較した。

HCT116 に変異型ヒト *MBD4* 発現プラスミド(pcDNA3.1(+)-*MBD4*A9)を導入した変異型 *MBD4* 発現 HCT116(HCT116-*MBD4*A9) と空ベクターを導入した HCT116(HCT116-control)を樹立後、FTD を持続的に曝露し、clonogenic assay で細胞障害度を比較した。同様に大腸がん細胞株 DLD-1(hMSH6-deficient)でも変異型 *MBD4* 発現細胞株(DLD-1-*MBD4*A9)を作成し、FTD 曝露による細胞障害度を clonogenic assay で比較した。またフローサイトメトリーにて FTD 投与前後の細胞周期解析を行った。

本研究は浜松医科大学倫理委員会の承認を得て行った(承認番号 16-084)。

[結果]

既報の通り 5-FU を投与した HCT116+ch3 と HCT116 の細胞障害度の比較では、clonogenic assay による生存率の比較で HCT116+ch3(5.8%) : HCT116(54.0%)と HCT116+ch3 で高い感受性を認めた。一方で FTD を投与した HCT116+ch3 と HCT116 の細胞障害度の比較では有意差を認めなかった(HCT116+ch3(79.0%) : HCT116(86.0%))。一方で 5-FU 耐性 HCT116 は FTD に対しては感受性を示した。HCT116-MBD4A9 と HCT116-control、DLD-1-MBD4A9 と DLD-1-control での比較では変異型 MBD4 発現細胞株で細胞障害度が有意に高かった(HCT116-MBD4A9 (38.5%) : HCT116-control (70.7%)、DLD-1-MBD4A9 (44.1%) : DLD-1-control (79.0%))。また細胞周期の比較では変異型 MBD4 発現細胞株で FTD 投与後の G2/M 期の増加の割合が大きかった。

[考察]

5-FU と FTD は似た構造を持った T(チミン)/U(ウラシル)の誘導体であり、チミン合成酵素(TS)の阻害、DNA への誤取り込みといった類似した作用機序を持っている。5-FU が MMR 依存性に効果を発揮することが報告されている一方で、FTD と MMR の関係を検討した報告は無い。我々は今回大腸がん細胞株を用いて、FTD は MMR 欠損下でも同等の細胞障害性を持つこと、5-FU 耐性を持つ細胞にも効果を示すこと、変異型 MBD4 高発現が G2/M 期の停止により FTD の効果を増強することを示した。

臨床的に MSI 陽性の大腸がん症例では 5-FU ベースの術後化学療法で有益性が得られないことが報告されており、MSI の検索が推奨され始めている。今回の研究により MSI 陽性大腸がん症例において TAS-102 は術後化学療法の際の有用な選択肢となる可能性が示された。

FTD は 5-FU の代謝産物 FdUrd と類似した構造を持っており、それらの 1 リン酸化産物が TS を阻害し、3 リン酸化産物が DNA に誤取り込みされる。FdUrd の 3 リン酸化産物は 1 リン酸化産物へのサルベージ経路を持っているため、1 リン酸化産物は FdUrd 由来のものが多くなり、3 リン酸化産物は FTD 由来のものが多くなると考えられる(Int J Oncol 46:2327-2334, 2015)。MMR 欠損下でも FTD の効果が保たれるという我々の研究結果と合わせると DNA 誤取り込みの作用機序は MMR と関わりが少ないと考えられる。また 5-FU 持続投与により耐性を獲得した胃がん細胞株では TS の高発現を示すことが報告されており(Gastric Cancer 17:188-195, 2014)、我々の樹立した 5-FU 耐性大腸がん細胞株でも同様だとすれば、やはり MMR 欠損下で作用を示す FTD においては DNA 誤取り込みが主要な作用機序であると考えられる。

我々は以前に大腸がん細胞株において変異型 MBD4 高発現下で 5-FU 感受性が増強することを報告し、今回 FTD で同様の結果を得た。一方で MBD4 を欠損した大腸がん細胞株では FTD の効果は変わらないことが報告されている(Int J Oncol 39: 263-270, 2011)。細胞周期解析から変異型 MBD4 による感受性の増強には G2/M 期停止が重要であることが分かっているが、詳細な機序については更なる検討が必要で

ある。

〔結論〕

大腸がん細胞株の FTD 感受性は MMR に依存せず、5-FU 耐性下でも効果を発揮し、また変異型 MBD4 の高発現が FTD 感受性を増強させることが示された。