

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	渡 邊 隆 之
論文審査担当者	主 査 山田充彦 副 査 平塚佐千枝 ・ 小泉知展 ・ 石川 孝
<p>論文題目</p> <p><b>Tamoxifen resistance alters sensitivity to 5-fluorouracil in a subset of estrogen receptor-positive breast cancer</b>                  (タモキシフェン耐性は一部のエストロゲン受容体陽性乳癌の5-フルオロウラシル感受性を変化させる)</p> <p>(論文の内容の要旨)</p> <p><b>【背景と目的】</b> エストロゲン受容体(ER)陽性再発乳癌の治療では、内分泌療法または化学療法による逐次治療が行われる。しかし、ER陽性乳癌に対する長期間の内分泌療法が、その後に用いられる化学療法剤に対する感受性にどの様に影響するかを調べた研究は少ない。先行して行なった内分泌療法が化学療法剤に対する感受性を変化させるかを解析し、内分泌療法抵抗性乳癌の個別化治療に有用なバイオマーカーを探索するために、3種類のER陽性乳癌細胞株(T47D、MCF7、BT474)でタモキシフェン(TAM)耐性株(T47D/T、MCF7/T、BT474/T)を樹立し、化学療法剤に対する感受性を <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> で解析した。</p> <p><b>【方法と結果】</b> ER陽性乳癌細胞株(T47D、MCF7、BT474)からTAM耐性株(T47D/T、MCF7/T、BT474/T)を樹立し、これらの細胞の5-フルオロウラシル(5-FU)、パクリタキセル、ドキソルビシンに対する感受性をWSTアッセイを用いて解析した。また、薬剤により誘導されるアポトーシスの定量的解析をCell Death Detection ELISA plusを用いて行なった。これらの解析で、親株に比べMCF7/Tでは5-FU感受性の15倍の増加を認めた。そこで、5-FUの代謝経路に関与する酵素に着目し、それぞれの細胞株のチミジンシンターゼ(thymidine synthase, TS)、チミジンホスホリラーゼ(thymidine phosphorylase, TP)、およびジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ(dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD/<i>DPYD</i> gene)のmRNA発現をRT-PCR法で解析したところ、各細胞株のTAM耐性株では親株に比しTS mRNA発現の有意な上昇を認め、またMCF7ではTAM耐性株で<i>DPYD</i> mRNA発現の有意な低下を認めた。MCF7の5-FU感受性にTSおよびDPDが関与していることを確認するために、MCF7のTSと<i>DPYD</i>をsiRNAでノックダウンすると、<i>DPYD</i>のノックダウンによりMCF7の5-FU感受性は増加した。また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)を用いてTSの代謝産物を定量したところ、MCF7/Tでは親株に比し5-FUの活性代謝物であるフルオロデオキシウリジン(FdUrd)が増加し、DPDにより産生される2-フルオロ-β-アラニン(FBAL)が減少しており、TSの代謝経路が活性化されていることが確認できた。</p> <p>続いて、<i>DPYD</i> mRNA発現低下の機序を解析するため、<i>DPYD</i>遺伝子のプロモーター活性をluciferase reporter assayを用いて解析したところ、<i>DPYD</i> mRNAのプロモーター活性は、MCF7に比べMCF7/Tで有意に上昇していた。そこで、<i>DPYD</i> mRNAのプロモーター活性の調節にメチル化が関与している可能性を考え、脱メチル化剤5-アザシチジンでMCF7とMCF7/Tを処理した後、<i>DPYD</i> mRNA発現を解析したところ、MCF7では1.2倍、MCF7/Tでは8.6倍の<i>DPYD</i> mRNA発現の増加が認められた。さらに、5-アザシチジン処理によりMCF7/Tの5-FU感受性の低下が認められたことから、MCF7/Tでは<i>DPYD</i> mRNAのプロモーター領域のメチル化が亢進しており、これが5-FU感受性増加に部分的に関与していると考えられた。また、3' -UTR luciferase assayを用いた解析で、MCF7/Tでは親株に比し<i>DPYD</i> 3' -UTR luciferase活性が有意に低下しており、miRNAによる転写後調節もMCF7/Tの<i>DPYD</i> mRNA発現の低下に関与している可能性が示唆された。</p> <p>さらに、MCF7とMCF7/Tを17β-エストロジオールを投与したヌードマウスの皮下に移植し xenograft model を作成し、5-FUのプロドラッグであるカペシタピンの経口投与を行ったところ、MCF7/TではMCF7親株に比べ有意な腫瘍縮小が認められ、5-FU感受性上昇が <i>in vivo</i> でも認められた。また、マウス皮下で形成された腫瘍の免疫組織染色で、MCF7腫瘍に比べMCF7/T腫瘍でのDPD発現の低下が確認できた。</p> <p><b>【考察】</b> 今回の結果から、一部のER陽性乳癌細胞株では、内分泌療法により化学療法剤感受性が変化する可能性と、TAM耐性になった乳癌に対して5-FUが有効である可能性が示された。</p> <p style="text-align: right;">研究指導者 信州大学医学部教授 伊藤 研一                  研究場所 信州大学医学部 外科学教室 乳腺内分泌外科学分野</p>	