

# 乳癌個別化化学療法への基礎的研究：チミジル酸合成酵素遺伝子多型と酵素蛋白発現の解析から

藤 島 成 乾 浩 己 綿 谷 正 弘

近畿大学医学部外科学教室

## 抄 録

フッ化ピリミジン系薬剤はチミジル酸合成酵素 (TS) を阻害し DNA 合成障害を引き起こす。TS 遺伝子には 5'-非翻訳領域 (UTR) の28塩基反復配列多型 (3R, 2R) と, 3'-UTR で6塩基 (bp) の欠失を認める遺伝子多型 (-6 bp) および欠失を認めない (+6 bp) 遺伝子多型が存在する。リンパ節転移陽性乳癌49例を対象に正常組織および腫瘍組織における TS 遺伝子多型と TS 発現を解析し, それらの関連性を検討した。TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型が正常組織で 3R/3R は8例, 2R/3R は36例, 正常組織で 2R/3R で癌組織でも 2R/3R は36例中14例で, 22例は 2R のアレルが欠失する loss/3R であった。正常組織と癌組織で TS 遺伝子 3'-UTR の+6 bp/+6 bp 遺伝子型は, それぞれ25例, 7例, -6 bp/+6 bp は22例, 13例, -6 bp/-6 bp は2例, 29例であった。正常・癌組織のいずれにおいても TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型と TS 発現に関連は認められなかった。しかし, 正常組織で+6 bp/+6 bp 25例の TS 発現は $9.5 \pm 9.8$  ng/mg 蛋白で, -6 bp/+6 bp 22例の TS 発現と比べ有意に高値であった。また癌組織においても+6 bp/+6 bp 7例の TS 発現は $29.2 \pm 17.4$  ng/mg 蛋白で, -6 bp/+6 bp 29例の TS 発現と比べ高く, 13例の-6 bp/-6 bp の TS 発現と比べ有意に高値であった。TS 遺伝子 3'-UTR の6塩基欠失を認める遺伝子多型および欠失を認めない遺伝子多型は, 乳癌組織と正常組織のいずれにおいても TS 発現に影響を及ぼしていると考えられ, TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子多型はフッ化ピリミジン系薬剤による乳癌個別化化学療法の選択因子としての可能性が示唆される。

**Key words:** チミジル酸合成酵素, チミジル酸合成酵素遺伝子多型, チミジル酸合成酵素遺伝子多型と酵素蛋白発現, フッ化ピリミジン系薬剤, 乳癌, 化学療法

## 結 言

乳癌手術後の初期治療や転移・再発治療において, 化学療法の有効性が EBM (Evidence Based Medicine) から明らかとなっている<sup>1</sup>。乳癌化学療法剤の中でも, フッ化ピリミジン系薬剤は初期治療だけでなく再発治療においても重要な key drug として汎用されている。フッ化ピリミジン系薬剤は, 代謝過程で thymidine phosphorylase と thymidine kinase を介して fluorodeoxyuridine-5'-monophosphate (FdUMP) に変換される。そして活性体の FdUMP がチミジル酸合成酵素 (TS: thymidylate synthase) の本来の基質である dUMP と競合的に TS と結合し, 還元型葉酸の存在下に TS と三元共有結合複合体を形成することで DNA

合成阻害を引き起こす<sup>2-4</sup>。それゆえ腫瘍だけでなく宿主の TS 発現および TS 活性が, 5-fluorouracil (5-FU) を中心としたフッ化ピリミジン系薬剤の薬剤感受性因子および副作用規程因子として研究されている<sup>5-7</sup>。

TS 遺伝子には 5'-非翻訳領域 (UTR) と 3'-UTR の2つの遺伝子多型が報告されている。TS 遺伝子 5'-UTR のプロモーターのエンハンサー領域で28塩基の3回 (3 repeats; 3R) ないし2回 (2 repeats; 2R) 繰り返し配列が存在し, その結果 3R/3R, 2R/3R, 2R/2R の遺伝子多型が出現する。大腸癌で TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型と TS 発現の関連が検討され, TS 遺伝子 5'-UTR の28塩基反復配列多型 (VNTR) は TS 発現とともに治療効果予測因子と報告されている<sup>8</sup>。また近年, TS 遺伝子 3'-UTR

における6塩基の欠失(TS 3'-UTR 1494del6)による遺伝子多型が報告され、この欠失はTS mRNAの二次構造の安定性に関わり、TSの翻訳に影響を及ぼすことが明らかとなった<sup>9</sup>。乳癌においてTS mRNAや蛋白発現、酵素活性が精力的に検討されているが、TS遺伝子多型とTS発現の関連は未だ明らかとなっていない。

乳癌化学療法にフッ化ピリミジン系薬剤が用いられているが、確実に治療効果が得られ、かつ副作用の少ない患者を選別して投与することが重要である。本論文はフッ化ピリミジン系薬剤を用いた乳癌化学療法の個別化治療を確立するための基礎研究として、化学療法の適応となるリンパ節転移陽性乳癌を対象に正常組織および腫瘍組織におけるTS遺伝子5'-UTRならびに3'-UTRの遺伝子多型を解析するとともに、それぞれの組織におけるTS発現を測定し、TS遺伝子多型とTS発現の関連性を検討した。

## 方 法

### 1. 対象

2006年1月から07年8月までに、近畿大学医学部外科学教室で手術が施行されたリンパ節転移を伴う原発性乳癌49例から、患者に十分な研究要旨の説明の書面による同意を得て、癌組織ならびに正常乳腺組織を採取し、解析対象者とした。対象患者からの標本採取および遺伝子解析を含む研究計画は、当院倫理委員会の承認を受けた(承認番号18-01)。対象患者の正常組織および癌組織は採取後直ちに液体窒素で凍結し、解析まで-80度で保存した。正常組織は癌組織の端から少なくとも2 cm以上離れた肉眼的に健常と思われる部位より採取し、癌組織は中心部分の壊死部を避け腫瘍辺縁部から採取した。

### 2. TS遺伝子多型

採取した癌組織および正常組織を粉碎後、DNA ZOL Reagent (Invitrogen 社)を用いてDNAを抽出した。TS遺伝子5'-UTRの遺伝子多型は、Horieらの報告に従い(sense) 5'-GTGGCTCCTGC-GTTTCCCC-3', (anti sense) 5'-CCAAGCTTGG-CTCCGAGCCGGCACAGGCATGGCGCGG-3'のprimer (Invitrogen 社)を作成し、PCR増幅後のアレルサイズの違いを電気泳動にて検出した<sup>10</sup>。すなわち、20 ng/ $\mu$ lに希釈したgenomic DNA 4  $\mu$ l, 2x Advantage GC-melt LA 緩衝液 (Clontech 社) 12.5  $\mu$ l, sense primer (0.1  $\mu$ M/ $\mu$ l) 4  $\mu$ l, anti sense primer (0.1  $\mu$ M/ $\mu$ l) 4  $\mu$ l, dTNP (10 mM) 1  $\mu$ l, Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l, 滅菌蒸留水24  $\mu$ lを加えた50  $\mu$ lのPCR反応液を作成し、熱

変性94°C 1分, アニーリング60°C 1分, 伸長反応72°C 2分のサイクルを30回繰り返した後、伸長反応を72°C 5分を行うPCR条件とした。PCR産物は4%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し248 bp (3R)と220 bp (2R)のアレルサイズを識別した。

TS遺伝子3'-UTRの遺伝子解析には、Ulrichらの報告に従い(sense) 5'-CAAATCTGAGGGAG-CTGAGT-3'と(anti sense) 5'-CAGATAAGTGG-CAGTACAGA-3'のprimer (Invitrogen 社)を作成しPCR増幅を行った。genomic DNA (80 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, sense primer (0.2  $\mu$ M/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l, anti sense primer (0.2  $\mu$ M/ $\mu$ l) 2  $\mu$ lにPCR SuperMix (Invitrogen 社) 45  $\mu$ lを加えた50  $\mu$ lのPCR反応液を作成し、94°C 5分の熱処理後、熱変性94°C 30秒, アニーリング58°C 45秒, 伸長反応72°C 45秒のサイクルを30回繰り返し、72°C 5分伸長反応を行うPCR条件とした。PCR産物を制限酵素Dra I (TaKaRa 社)と37°Cで1時間反応させ、4%アガロースゲルで電気泳動後、制限酵素多型からTS遺伝子3'-UTRの遺伝子多型を解析した<sup>9</sup>。

### 3. TS測定

凍結保存された正常あるいは癌組織に4倍量の蛋白抽出用緩衝液(0.1% Tween 20)を含んだ20 mM Tris-buffered saline (TBS, PH 7.5)を加えホモジナイズ後、ホモジネートを超遠心分離(10500x g, 4°C 1時間)し、その上清を0.1% Tween 20を含む20 mMのTBS (PH 7.5)で10  $\mu$ g/mlになるように希釈し蛋白抽出液とした。TS測定は2ステップサンドイッチELISA法で行った<sup>11</sup>。まず初めにTS抗体固相化プレートを作成した。すなわち、50 mM炭酸緩衝液pH 9.5で2  $\mu$ g/mlに調整した抗TSモノクローナル抗体(RTSMA1)を96穴のELISA用プレートに0.1 ml分注し、37°Cで2時間コーティングを行った。TS抗体が固相化されたプレートを2回洗浄後(0.05% Tween 20を含む生理食塩水)、前述の方法で調整した蛋白抽出液0.1 mlずつを抗体固定化プレートに分注し37°Cで1時間反応させた。その後2回洗浄し、1  $\mu$ g/mlに希釈されたパーオキシダーゼ標識抗TSモノクローナル抗体(NTSMA1)を0.1 ml分注後、37°Cで1時間反応させた。そして4回洗浄後、3 mg/ml オルトフェニレンジアミンと0.75 mM 過酸化水素水を含む0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.5) 0.1 mlを加え、室温暗所にて30分間静置し発色させた。0.1 M 硫酸0.1 mlを加えて発色反応を停止させ、490 nmに測定波長を設定したELISA用プレートリーダーにて発色強度を測定した。正常組織および癌組織でのTS発現は、8~0.125 ng/well

に段階希釈したりコンピナントヒト TS (rhTS) を用いて 2 ステップサンドイッチ ELISA 法から作成した標準曲線に基づき、タンパク 1 mg あたりの TS 量として求めた。rhTS および抗 TS モノクローナル抗体 (RTSMA1 と NTSMA1) は、大鵬薬品工業 (東京) から供与された。

#### 4. 統計解析

正常組織および癌組織における TS 発現と遺伝子多型の関連は Mann-Whitney U-test にて検討し、 $p < 0.05$  を統計的有意とした。すべての統計処理は SPSS II (Ver. 11.0, エス・ピー・エス・エス株式会社) を用いて行った。

## 結 果

### 1. 正常組織と癌組織における TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型

TS 遺伝子には 5'-UTR に縦列繰り返し配列 (tandem repeat) があり、主に 3 回反復 (3R) と 2 回反復 (2R) がみられる。49 例の正常組織での TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型解析から、両アレルに 3R の繰り返し配列が存在する 3R ホモ接合型 (3R/3R) は 8 例 (16%) で、2R/3R のヘテロ接合型は 36 例 (74%) であった。残りの 5 例のうち 3 例 (6%) は 3R/4R のヘテロ接合型で、2 例 (4%) は 3R/5R のヘテロ接合型であった。正常組織で 2R/3R を示した 36 例のうち、癌組織でも 2R/3R のヘテロ接合型は 14 例 (39%) で、22 例 (61%) は 2R の存在するアレルの欠失 (loss/3R) が認められた (図 1)。正常組織で 3R/4R、あるいは 3R/5R であった症例の癌組織では対立遺伝子欠失は認められなかった。

### 2. TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型と TS 発現

49 例の正常組織での TS 発現は  $6.8 \pm 8.7$  ng/mg

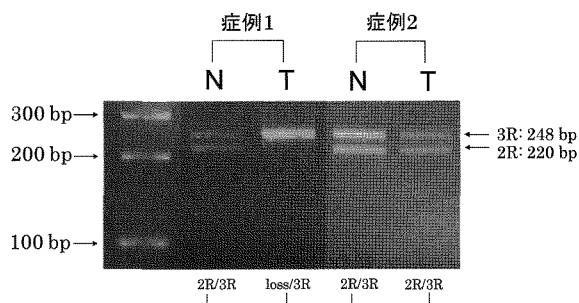


図 1 5'-UTR における遺伝子多型。増幅した断片を 4% アガロースゲルで電気泳動。220 bp を 2R, 248 bp を 3R として示す。症例 1: 正常組織 (N) で 2R/3R の遺伝子多型であったが、癌組織 (T) で 2R の欠失が認められる。症例 2: 正常組織 (N) と癌組織 (T) のいずれでも 2R/3R の遺伝子多型。molecular weight marker として 100 bp DNA ladder を用いた。

蛋白であった。TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型の検討から、正常組織で 2R/3R のヘテロ接合型の TS 発現は  $7.8 \pm 8.5$  ng/mg 蛋白で、3R/3R のホモ接合型では  $6.2 \pm 12.0$  ng/mg 蛋白で、正常組織での TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型と TS 発現に関連は認められなかった。癌組織での TS 発現は  $18.0 \pm 11.0$  ng/mg 蛋白で、正常組織における TS 発現と比べ有意に高値 ( $p < 0.05$ ) であった。癌組織における TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子不安定性と TS 発現の関連は、正常組織で 2R/3R のヘテロ接合型を示した 36 例の癌組織で検討可能であった。癌組織における TS 発現は正常組織で 2R/3R で癌組織でも 2R/3R のヘテロ接合型であった 14 例は、 $19.8 \pm 14.9$  ng/mg 蛋白で、癌組織で 2R の対立遺伝子欠失が認められた 22 例 (loss/3R) は、 $16.3 \pm 8.0$  ng/mg 蛋白であった。癌組織における TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型と TS 発現に関連は認められなかった。

### 3. 正常組織と癌組織における TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子多型

本実験の PCR 条件では、TS 遺伝子 3'-UTR に 6 bp の欠失を認めない場合には、制限酵素 Dra I による制限酵素多型がみられる。すなわち Dra I の作用にて 88 bp と 70 bp に切断された断片が出現するが、6 bp の欠失を認める場合には Dra I の認識部位がないため切断されず 152 bp の断片となる (図 2)。49 例の正常組織では、TS 遺伝子 3'-UTR に 6 bp の

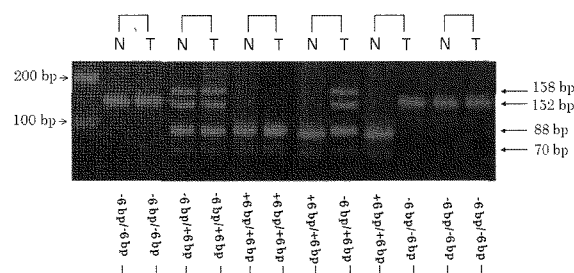


図 2 3'-UTR における遺伝子多型。正常組織 (N)、癌組織 (T)。増幅した断片を制限酵素 Dra I を用いて切断し、4% アガロースゲルで電気泳動。6 bp の欠失を認めない場合 Dra I により 70 bp と 88 bp の band に切断される。6 bp の欠失を認めた場合 Dra I により切断されないため 152 bp の band を示す。molecular weight marker として 100 bp DNA ladder を用いた。

表 1 乳癌患者における TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子多型頻度

遺伝子型	正常組織	癌組織
-6 bp/-6 bp	2 (4%)	13 (27%)
-6 bp/+6 bp	22 (45%)	29 (59%)
+6 bp/+6 bp	25 (51%)	7 (14%)

欠失を認めないホモ接合型 (+6 bp/+6 bp) は25例 (51%) であった (表1). そして22例 (45%) は片方のアレルで6 bpの欠失を認め、その対立アレルでは6 bpの欠失を認めないヘテロ接合型 (-6 bp/+6 bp) で、残り2例 (4%) は両アレルに6 bpの欠失を認めるホモ接合型 (-6 bp/-6 bp) であった. 一方、癌組織では+6 bp/+6 bp ホモ接合型は49例中7例 (14%) に、-6 bp/-6 bp のホモ接合型は13例 (27%) に、また-6 bp/+6 bp のヘテロ接合型は29例 (59%) に認められた.

#### 4. 癌組織における TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子不安定性

正常組織で+6 bp/+6 bp のホモ接合型を示した25例中7例は、癌組織でも+6 bp/+6 bp のホモ接合型であった (表2, F群). しかし残りの18例は癌組織で TS 遺伝子 3'-UTR の6 bpの欠失が認められた. 18例中16例は1つのアレルに (-6 bp/+6 bp), また2例は両アレルに6 bpの欠失 (-6 bp/-6 bp) が認められた (表2, C群, E群). 正常組織で-6 bp/+6 bp のヘテロ接合型であった22例では、13例が癌組織でも同様のヘテロ接合型であったが、9例では1つのアレルに6 bpの欠失が出現し-6 bp/-6 bp のホモ接合型へと変化した (表2, D群, B群). 正常組織で両アレルに6 bpの欠失を示した

2例は、癌組織においても-6 bp/-6 bp のホモ接合型であった (表2, A群). 乳癌への進行とともに TS 遺伝子 3'-UTR における6 bpの欠失は47例中27例 (57%) に認められた.

#### 5. TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子多型と TS 発現

正常組織ならびに癌組織における TS 発現の比較では、TS 遺伝子 3'-UTR の+6 bp/+6 bp, -6 bp/+6 bp, -6 bp/-6 bp のいずれの遺伝子型であっても正常組織と比べて癌組織で TS 発現は高値であった (表3). さらに、正常組織ならびに癌組織のいずれにおいても TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子多型で TS 発現に差が見られ、正常組織で+6 bp/+6 bp のホモ接合型であった25例の TS 発現は  $9.5 \pm 9.8$  ng/mg 蛋白で、-6 bp/+6 bp ヘテロ接合型22例の TS 発現  $3.8 \pm 6.9$  ng/mg 蛋白と比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ ) (表3). また癌組織においても TS 遺伝子 3'-UTR で+6 bp/+6 bp のホモ接合型7例の TS 発現は  $29.2 \pm 17.4$  ng/mg 蛋白であり、-6 bp/+6 bp のヘテロ接合型29例の TS 発現  $16.8 \pm 9.0$  ng/mg 蛋白と比べ有意差はなかったものの高値で、13例の-6 bp/-6 bp のホモ接合型との比較では有意に高値であった ( $p < 0.05$ ) (表3).

#### 6. 癌組織における TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子不安定性と TS 発現

正常組織と癌組織の TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子不安定性から、49例は表2に示すように6つのグループに分類された (A-F群). 正常組織で+6 bp/+6 bp のホモ接合型で癌組織では-6 bp/-6 bp のホモ接合型に変化したC群、および正常組織では-6 bp/-6 bp のホモ接合型であり癌組織でも-6

表2 癌組織における TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子不安定性

群	正常組織	癌組織	症例数
A	-6 bp/-6 bp	-6 bp/-6 bp	2
B	-6 bp/+6 bp	-6 bp/-6 bp	9
C	+6 bp/+6 bp	-6 bp/-6 bp	2
D	-6 bp/+6 bp	-6 bp/+6 bp	13
E	+6 bp/+6 bp	-6 bp/+6 bp	16
F	+6 bp/+6 bp	+6 bp/+6 bp	7

表3 正常組織と癌組織における TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子多型と TS 発現

遺伝子型	TS 発現		$p^*$
	正常組織	癌組織	
-6 bp/-6 bp	6.3(2)	$14.6 \pm 7.0(13)^{***}$	n.s.
-6 bp/+6 bp	$3.8 \pm 6.9(22)^{**}$	$1.8 \pm 9.0(29)$	$< 0.01$
+6 bp/+6 bp	$9.5 \pm 9.8(25)^{**}$	$29.2 \pm 17.4(7)^{***}$	$< 0.01$

( ): 症例数

TS: ng/mg 蛋白

\*: 各遺伝子型における正常組織 v.s. 癌組織

\*\* :  $p < 0.05$  (正常組織: -6 bp/+6 bp v.s. +6 bp/+6 bp)

\*\*\* :  $p < 0.05$  (癌組織: -6 bp/-6 bp v.s. +6 bp/+6 bp)

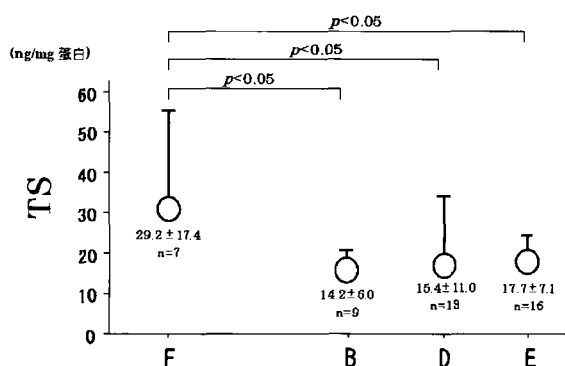


図3 癌組織における 3'-UTR の遺伝子多型と TS 発現の関連. F群: 正常組織; +6 bp/+6 bp → 癌組織; +6 bp/+6 bp, B群: 正常組織; -6 bp/+6 bp → 癌組織; -6 bp/-6 bp, D群: 正常組織; -6 bp/+6 bp → 癌組織; -6 bp/+6 bp, E群: 正常組織; +6 bp/+6 bp → 癌組織; -6 bp/+6 bp. F群はB, D, E群より有意に TS 発現が高い. ( $p < 0.05$ )

bp/-6 bp の遺伝子型であった A 群はそれぞれ 2 例であることから本解析から除外した。正常組織で +6 bp/+6 bp の遺伝子型で癌組織でも +6 bp/+6 bp の遺伝子型であった 7 例 (F 群) の癌組織における TS 発現は、癌組織で -6 bp/+6 bp へと遺伝子変化を示した 13 例 (E 群) の TS 発現と比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ ) (図 3)。また F 群の TS 発現は、正常組織で -6 bp/+6 bp のヘテロ接合型で癌組織でも同様のヘテロ接合型であった D 群、および癌組織で -6 bp/-6 bp の遺伝子型へと変化した B 群の TS 発現と比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ ) (図 3)。しかし B, D, E 群の癌組織における TS 発現には有意な差は認められなかった。

### 考 察

TS 遺伝子は 5'-UTR と 3'-UTR に遺伝子多型が報告されているが、TS 遺伝子 5'-UTR の 2R/2R, 2R/3R, 3R/3R の VNTR 遺伝子多型頻度は人種間でバラツキが認められる。欧米人の大腸癌患者を対象とした TS 遺伝子 5'-UTR の VNTR 多型解析から、患者の正常組織での 2R/2R, 2R/3R, 3R/3R はそれぞれ、16-21%, 51-52%, 26-32% 程度<sup>9,12</sup>と報告されているが、日本人の大腸癌患者の正常組織を対象とした解析では、2R/2R, 2R/3R, 3R/3R はそれぞれ、4-8%, 24-33%, 61-63% であった<sup>13,14</sup>。一方、乳癌患者を対象とした TS 遺伝子 5'-UTR の VNTR 多型解析の報告は無く、著者らの日本人における研究が唯一の報告である。大腸癌患者と乳癌患者の正常組織における遺伝子多型頻度は同じ日本人であっても異なり、乳癌患者の正常組織では 2R/3R の頻度が 74% と高く、逆に 3R/3R が 16% と低かった。近年、102 人の健常日本人を対象に TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型頻度が検討され、2R/2R, 2R/3R, 3R/3R はそれぞれ、5%, 22%, 74% と報告された<sup>15</sup>。健常人における TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型と乳癌および大腸癌患者の正常組織における遺伝子多型頻度の違いが、それぞれの腫瘍の分子生物学的発症リスクを反映しているかは明らかでない。中国人を対象に case-control study から TS 遺伝子多型と乳癌罹患リスクが検討されているが<sup>16</sup>、日本人 20 人に 1 人が乳癌に罹患するようになった現在、日本人の TS 遺伝子多型に基づく乳癌リスクを評価すべきであると考え。

TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子多型は、停止コドンから 447 塩基下流 (position 1494) の 6 塩基の欠失を認める遺伝子多型、あるいは欠失を認めない遺伝子多型である。井上らは 51 人の健常日本人女性を対象とした末梢血を用いた TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝

子多型の解析から、+6 bp/+6 bp, -6 bp/+6 bp, -6 bp/-6 bp の遺伝子型をそれぞれ 24%, 51%, 25% と報告し、石川らは健常男性 132 人を対象とした解析で +6 bp/+6 bp, -6 bp/+6 bp, -6 bp/-6 bp の遺伝子型はそれぞれ 11%, 55%, 34% と報告した<sup>15,17</sup>。一方、人種は不明であるが 1085 人の健常アメリカ人における解析では、+6 bp/+6 bp, -6 bp/+6 bp, -6 bp/-6 bp の遺伝子型はそれぞれ 48%, 41%, 11% と報告されている<sup>18</sup>。著者らは井上と違って、乳癌組織から少なくとも 2 cm 以上離れた肉眼的健常乳腺組織を採取し、正常乳腺組織として TS 遺伝子多型解析を行った。その結果、乳癌患者の正常組織では、+6 bp/+6 bp, -6 bp/+6 bp, -6 bp/-6 bp の遺伝子型はそれぞれ 51%, 45%, 4% で、井上らの健常日本人女性を対象とした場合より健常アメリカ人における遺伝子多型分布に近似していた。著者らと石川らの TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子多型分布と井上らの報告による遺伝子多型分布の違いの原因は明らかでない。著者や井上そして石川らの解析人数は少ないことから、今後は日本人女性を対象に、TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子多型を含んだ大規模な遺伝子多型解析が望まれる。

乳癌は進行するとともに多くの染色体上で遺伝子不安定性が生じ、遺伝子変異が蓄積してくる<sup>19</sup>。TS 遺伝子は第 18 番染色体短腕 (18p11.32) に局在するが、18p11 のアレル欠失は乳癌の 20%-63% に認められている<sup>20,21</sup>。本研究でも正常と腫瘍組織における TS 遺伝子 5'-UTR の informative 症例における解析から、2R のアレル欠失が 61% の乳癌に見られ、また TS 遺伝子 3'-UTR での 6 塩基の欠失は 47 例中 27 例 (57%) に認められた。第 18 番染色体短腕の対立遺伝子欠失は乳癌再発に関連するという報告もあれば、56% の非浸潤癌に認められることから乳癌発生の比較的早期から関与しているとの報告もある<sup>20,22</sup>。著者らはリンパ節転移陽性乳癌の原発巣で、18p11.3 領域の遺伝子欠失が高頻度に出現していることを明らかにしたが、今後リンパ節転移陽性乳癌の原発巣ならびに転移リンパ節巣で TS 遺伝子 locus を含めた 18p の対立遺伝子欠失の解析を行い、第 18 番染色体短腕の乳癌進展における生物学的役割を明らかにする予定である。

TS は生体内で dUMP (2'-deoxyuridine 5'-monophosphate) から dTMP (thymidine 5'-monophosphate) への反応を触媒するピリミジン生合成経路の律速酵素で、細胞周期と細胞増殖の状態に依存して発現する。福井らは 1705 例の乳癌を含むさまざまな領域由来の腫瘍組織を対象に TS mRNA 発現、蛋白発現、酵素活性を検討し、ELISA 法を用い

た測定から乳癌では15.5 ng/mg 蛋白 (中央値) 程度の TS 蛋白が発現していると報告している<sup>23</sup>。本研究でもリンパ節転移陽性乳癌49例を対象に ELISA 法で TS 発現を解析したが、腫瘍組織における TS 量は平均18 ng/mg 蛋白で、福井らの報告と同じ程度の TS 量が検出された。また正常組織に比べ腫瘍組織では多くの酵素の発現が亢進していることが知られているが、本研究でも正常組織と比べ腫瘍組織で TS 発現は有意に高値であった。

TS 遺伝子多型と TS 発現の関連性が消化器癌を中心に研究されている。TS 遺伝子 5'-UTR の 3R/3R 遺伝子型は 2R/2R の遺伝子型と比べ TS mRNA や TS 発現が高く、また 3R/3R 遺伝子型は 2R/3R の遺伝子型より TS 発現が高いことが報告されている<sup>10,24</sup>。Kawakami らは 2R/3R の informative 大腸癌を対象とした検討から、2R/loss の遺伝子型は他の遺伝子型と比べ有意に TS 発現が低く、3R の RNA は 2R の RNA より効率良く翻訳されることを示した<sup>14,25</sup>。また TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子多型の検討では、6 塩基欠失型は転写後の TS mRNA の分解速度が速まり TS mRNA 発現が低下することが示されている<sup>26,27</sup>。著者らの研究では、TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型と TS 発現に関連性が見られなかったが、この結果が直ちに乳癌では TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型が TS 発現に影響しないという結論に至らない。なぜなら、本研究の対象乳癌では 2R の欠失が高頻度に認められたが、効率の良い翻訳機能を示すと考えられている 3R の欠失する症例が出現しなかったことがその理由の 1 つとして挙げられる。一方、TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子多型と TS 発現の検討では、乳癌患者の正常組織において -6 bp/+6 bp の遺伝子型と比べ、+6 bp/+6 bp の遺伝子型の TS 発現は有意に高く、また癌組織においても +6 bp/+6 bp の遺伝子型が -6 bp/+6 bp や -6 bp/-6 bp の遺伝子型と比べ TS 発現が高いことが明らかとなった。乳癌においても TS 遺伝子 3'-UTR の 6 塩基の欠失を認める遺伝子多型、または欠失を認めない遺伝子多型が、腫瘍組織だけでなく正常組織においても TS 発現に影響を及ぼしていると考えられる。今後は本研究で対象としたリンパ節転移陽性乳癌以外にも解析対象を広げ、TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型が TS mRNA 発現や TS 発現に及ぼす影響を検討するとともに、TS 遺伝子 5'-UTR と 3'-UTR の 2 つの遺伝子多型がどのような関連を持ちながら TS 発現に関与しているかを検討する必要がある。

Pullarkat らは 5-FU が投与された転移性大腸癌を対象に、TS 遺伝子 5'-UTR の遺伝子多型と 5-

FU の治療効果および副作用発現を検討し、TS 遺伝子多型解析の薬剤感受性因子ならびに副作用規程因子としての有用性を示唆した<sup>28</sup>。本研究では、TS 遺伝子 3'-UTR の +6 bp/+6 bp の遺伝子型は、腫瘍組織だけでなく正常組織でも TS が高発現していることが明らかとなり、TS 遺伝子 3'-UTR の遺伝子多型が乳癌におけるフッ化ピリミジン系薬剤の感受性因子となりうる可能性が示唆された。フッ化ピリミジン系薬剤の抗腫瘍効果と副作用を考えた場合、腫瘍内 TS だけでなく 5-FU を分解する Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) 活性も重要である<sup>29</sup>。今後は TS 発現だけでなく DPD 発現も測定し、フッ化ピリミジン系薬剤が投与された乳癌患者の短期・長期の観察から、TS 遺伝子多型の治療効果予測因子ならびに副作用規程因子としての有用性を明らかにしたい。

#### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りました近畿大学医学部外科学教室塩崎均教授に深甚な謝意を捧げますとともに、ご協力いただいた外科学教室の各位に心から感謝いたします。

#### 文 献

1. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; 10th St. Gallen conference (2007) Progress and promise: highlights of the international experts consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 18: 1133-1144
2. Carreras CW, Santi DV (1995) The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu Rev Biochem* 64: 721-762
3. Danenberg PV (1977) Thymidylate synthetase-a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 473: 73-92
4. Pinedo HM, Peters GF (1988) Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 6: 1653-1664
5. 上原正弘, 藤田益嗣, 松村博臣, 飯塚亮二, 宮田圭悟, 井川理, 藤井宏二, 高橋 滋, 泉 浩, 竹中 温 (2000) 乳癌における thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase 活性の検討. *日臨外会誌* 61: 2858-2863
6. 森本 健, 洪 晶恵 (2004) 乳癌原発巣転移巣における Thymidine Phosphorylase, Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Thymidylate Synthase 発現. *癌と治療* 31: 529-538
7. 黒住昌史 (2003) 乳癌の治療効果予測因子としての TS, DPD, TP の発現状況に関する免疫組織化学的判定の重要性. *乳癌の臨* 18: 419-427
8. Adlard JW, Richman SD, Seymour MT, Quirke P (2002) Prediction of the response of colorectal cancer to systemic therapy. *Lancet Oncol* 3: 75-82
9. Ulrich CM, Bigler J, Bostick R, Fosdick L, Potter JD (2002) Thymidylate synthase promoter polymorphism,

- interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res* 62: 3361-3364
10. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K (1995) Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 20: 191-197
  11. Kurebayashi J, Yamamoto Y, Udagawa K, Okubo S, Fukushima M, Sonoo H (2004) Establishment of enzyme-linked immunosorbent assays for thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer tissues. *Oncol Rep* 11: 973-979
  12. Lecomte T, Ferraz JM, Zinzindohoué F, Lorient MA, Tregouet DA, Landi B, Berger A, Cugnenc PH, Jian R, Beaune P, Laurent-Puig P (2004) Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 10: 5880-5888
  13. Tsuji T, Hidaka S, Sawai T, Nakagoe T, Yano H, Haseba M, Komatsu H, Shindou H, Fukuoka H, Yoshinaga M, Shibasaki S, Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T, Tagawa Y (2003) Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region is not an efficacious marker for tumor sensitivity to 5-fluorouracil-based oral adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 9: 3700-3704
  14. Kawakami K, Ishida Y, Danenberg KD, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV (2002) Functional polymorphism of the thymidylate synthase gene in colorectal cancer accompanied by frequent loss of heterozygosity. *Jpn J Cancer Res* 93: 1221-1229
  15. Inoue S, Hashiguchi M, Chiyoda T, Sunami Y, Tanaka T, Mochizuki M (2007) Pharmacogenetic study of methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase in Japanese and assessment of ethnic and gender differences. *Pharmacogenomics* 8: 41-47
  16. Zhai X, Gao J, Hu Z, Tang J, Qin J, Wang S, Wang X, Jin G, Liu J, Chen W, Chen F, Wang X, Wei Q, Shen H (2006) Polymorphisms in thymidylate synthase gene and susceptibility to breast cancer in a Chinese population: a case-control analysis. *BMC Cancer* 6: 138
  17. Ishikawa H, Ishikawa T, Miyatsu Y, Kurihara K, Fukao A, Yokoyama K (2006) A polymorphism of the methionine synthase reductase gene increases chromosomal damage in peripheral lymphocytes in smokers. *Mutat Res* 599: 135-143
  18. Zhang Z, Shi Q, Sturgis EM, Spitz MR, Hong WK, Wei Q (2004) Thymidylate synthase 5'- and 3'-untranslated region polymorphisms associated with risk and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 10: 7903-7910
  19. Nagahata T, Hirano A, Utada Y, Tsuchiya S, Takahashi K, Tada T, Makita M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Nakamura Y, Emi M (2002) Correlation of allelic losses and clinicopathological factors in 504 primary breast cancers. *Breast Cancer* 9: 208-215
  20. Kittiniyom K, Gorse KM, Dalbague F, Lichy JH, Taubenberger JK, Newsham IF (2001) Allelic loss on chromosome band 18p11.3 occurs early and reveals heterogeneity in breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 3: 192-198
  21. Regitnig P, Moser R, Thalhammer M, Luschin-Ebengreuth G, Ploner F, Papadi H, Tsybrovskyy O, Lax SF (2002) Microsatellite analysis of breast carcinoma and corresponding local recurrences. *J Pathol* 198: 190-197
  22. Climent J, Martinez-Climent JA, Blesa D, Garcia-Barchino MJ, Saez R, Sánchez-Izquierdo D, Azagra P, Lluch A, Garcia-Conde J (2002) Genomic loss of 18p predicts an adverse clinical outcome in patients with high-risk breast cancer. *Clin Cancer Res* 8: 3863-3869
  23. 福井陽介, 近本順子, 岡山佳弘, 杉本芳一, 岡 俊範, 永山績夫, 福島正和, 尾上きよみ (2005) ヒト腫瘍組織におけるピリミジン代謝関連酵素の母集団解析. *日癌治療誌* 40: 497
  24. Kaneda S, Takeishi K, Ayusawa D, Shimizu K, Seno T, Altman S (1987) Role in translation of a triple tandemly repeated sequence in the 5'-untranslated region of human thymidylate synthase mRNA. *Nucleic Acids Res* 15: 1259-1270
  25. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV (2001) Different lengths of polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res* 7: 4096-4101
  26. Grzybowska EA, Wilczynska A, Siedlecki JA (2001) Regulatory functions of 3'UTRs. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 291-295
  27. Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu MC, Iqbal S, Lenz HJ, Ladner RD (2004) A 6bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics* 14: 319-327
  28. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ (2001) Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics* 1: 65-70
  29. Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB (1987) Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* 47: 2203-2206