

## 論 文 要 旨

**Down regulation of *c-Myc* and induction of an angiogenesis inhibitor,****thrombospondin-1, by 5-FU in human colon cancer KM12C cells**

〔 ヒト大腸癌における 5-FU の血管新生阻害因子 TSP-1 誘導作用の解析 〕

趙 紅業

## 【序論および目的】

化学療法剤のメトロノーム型投与法は内皮細胞の増殖を抑えて血管新生を抑制することにより抗腫瘍効果を上げる。血管内皮細胞に抗腫瘍剤の BAL-9504 を添加すると血管新生抑制因子である TSP-1 遺伝子の発現量が上昇することが 2003 年 Kerbel たちの研究グループにより報告された。TSP-1 は、レセプターである CD36 に結合して内皮細胞の遊走能を抑制しアポトーシスを誘導する。この他にも、MMP9 の活性を抑制することにより、細胞外マトリクスから放出される VEGF の量を減少させる。また、TGFβ を活性化して腫瘍細胞の増殖を抑制する。

これまでに私たちは抗癌剤 TS-1 をメトロノーム型投与法でマウスに投与した場合に抗腫瘍効果や TSP-1 の発現上昇などの効果があることを確認している。本研究では TS-1 に含まれるテガフルールの活性代謝物である 5-FU により TSP-1 の発現が誘導されるかを調べ、その分子機構を明らかにすることを目的とする。

## 【材料および方法】

5-FU を培養大腸癌細胞(KM12C と LOVO)の培地に加え、TSP-1 蛋白質発現レベルをウエスタンブロットで定量した。KM12C 細胞中の *TSP-1* mRNA 発現レベルは定量 RT-PCR で解析した。TSP-1 の発現制御機構については、変量 *TSP-1* プロモーターを作製してルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。KM12C 細胞内での Egr-1 の *TSP-1* プロモーターへの結合は CHIP アッセイ法により解析した。Egr-1 の細胞内局在は Immunofluorescence 染色法により調べた。5-FU による TSP-1 の誘導への Egr-1 の関与を調べるため、*Egr-1* siRNA で Egr-1 をノックダウンした。ストレスと関連する p38MAPK が 5-FU による活性化されるかどうかを調べるために、p38MAPK の発現とリン酸化のレベルをウエスタンブロットで調べた。p38MAPK 経路の阻害剤 SB203580 が、5-FU による Egr-1 と TSP-1 の誘導に与える影響を RT-PCR、半定量 RT-PCR およびウエスタンブロットで調べた。5-FU による TSP-1 の発現増加に関与する因子を同定するために、Genechip を用いて 5-FU 処理により誘導される遺伝子群を探索した。5-FU 処理による、*MicroRNA17-92* cluster の primary mRNA の発現レベルの変化を定量 RT-PCR で調べた。

## 【結 果】

5-FU で培養大腸癌細胞を 4 日間 (96h) 処理すると、KM12C 細胞中の TSP-1 蛋白質は非処理群と比べ約 3 倍上昇した、LOVO 細胞でも 1μM の 5-FU 処理で TSP-1 の発現レベルが上昇した。KM12C 細胞中の *TSP-1* mRNA 発現レベルは 5-FU による処理時間に依存して上昇した。TSP-1 の

発現制御機構について *TSP-1* プロモーター領域の deletion mutants を用いて解析を行った結果、Egr-1 結合部位が欠損した mutant では 5-FU を添加しても *TSP-1* プロモーター活性の上昇が起こらなかった。これらの結果より Egr-1 は 5-FU 処理による *TSP-1* の発現増加に重要であることが分かった。次に、CHIP アッセイ分析を行った。5-FU 処理によって、Egr-1 の *TSP-1* プロモーターへの結合が時間依存および濃度依存的に増加することが判明した。また、5-FU で KM12C 細胞を処理すると、核に Egr-1 が蓄積することを Immunofluorescence 染色法による確認した。さらに、Egr-1 siRNA により、5-FU で誘導される *TSP-1* の発現が mRNA と蛋白質レベルで抑制された。

KM12C 細胞に 5-FU を添加することにより Egr-1 の発現が亢進する分子機構を詳細に検討した。5-FU は DNA 傷害薬剤なので、ストレスと関連する p38MAPK に注目した。5-FU 処理により p38 経路が活性化されるのか、5-FU による Egr-1 と *TSP-1* の発現に p38 経路に関与する蛋白質のリン酸化がどのような影響を与えるかを調べるために、p38MAPK 経路阻害剤を用いて実験を行った。その結果、5-FU により p38MAPK が活性化されること、p38MAPK 阻害剤を添加すると、5-FU で誘導される Egr-1、*TSP-1* の発現が低下することを見出した。さらに、5-FU による *TSP-1* の発現増加に関与するその他の因子を同定するために、5-FU 処理により誘導される遺伝子群を Genechip による探索した。その結果、*c-Myc* mRNA が減少することが判明した。*c-Myc* は *TSP-1* の発現制御に重要な役割を持つことが示唆されている。*c-Myc* mRNA とタンパク質の発現は 5-FU による処理時間に依存して減少することを確認した。*c-Myc* が *miR-17-92* の発現を亢進して、*TSP-1* mRNA の半減期を抑制することが知られているので、5-FU 添加による *TSP-1* の転写亢進に *miR-17-92* が関与するかを調べた。その結果、*c-Myc* と同様に、*miR-17-92* の発現は 5-FU の濃度と処理時間に依存して減少した。

#### 【結論及び考察】

ヒト大腸癌 KM12C 細胞において、5-FU 処理により、p38MAPK が活性化され、転写因子である Egr-1 の発現が亢進した。Egr-1 は *TSP-1* のプロモーターと結合して、*TSP-1* の発現を亢進した。一方、5-FU 処理により *Myc* の発現とリン酸化が減少して *miR-17-92* の発現が抑制され、その結果 *TSP-1* mRNA の半減期が延長することにより *TSP-1* の発現が亢進する可能性が示唆された。

(*Cancer Letters* 2008 年 in press)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 43 号	学位申請者	趙 紅業
審査委員	主査	小澤 政之	学位
	副査	宮田 篤郎	副査
	副査	高尾 尊身	副査
			博士 (医学・歯学・学術)
			山田 勝士
			金蔵 拓郎

**Down regulation of *c-Myc* and induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU in human colon cancer KM12C cells**

(ヒト大腸癌における 5-FU の血管新生阻害因子 TSP-1 発現誘導機構解析)

がん化学療法の障害は、薬剤の副作用と耐性化である。これらの問題点を克服するために、抗がん剤を低用量で繰り返し投与する metronomic chemotherapy が注目されている。metronomic chemotherapy による治療効果発現のメカニズムの一つとして、血管新生抑制因子 TSP-1(thrombospondin-1)発現の誘導が考えられている。学位申請者とその研究グループは、抗がん剤である TS-1(1M teagaful, 0.4M 5-chloro-2,4-dihydropyridine and 1M potassium oxonate)をメトロノーム型投与法でマウスに投与し、抗腫瘍効果と TSP-1 の発現上昇および微小血管の減少などの効果があることを観察した。しかしながら、TS-1 の代謝物である 5-FU により TSP-1 の発現が誘導される分子機構は不明のままである。そこで、大腸癌細胞を用いて、5-FU により TSP-1 の発現が誘導される分子機構を明らかにしようとした。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 培養大腸癌細胞において 5-FU の添加により TSP-1 の発現が mRNA と蛋白質レベルで上昇した。その発現は 5-FU の濃度と処理時間に依存していた。
- 2) 5-FU 処理により変化する遺伝子群をジーンチップアッセイで探索した。その結果 460 遺伝子が上昇し、924 遺伝子が減少した。その中で、*c-myc* は 70%減少した。*c-myc* は TSP-1 遺伝子の転写抑制因子として働いているのではなく、5-FU による *c-myc* の低下と *miR-17-92* cluster の発現低下が TSP-1 mRNA の発現量増加に関与することが示唆された。
- 3) 5-FU 添加により誘導される TSP-1 の発現には、そのプロモーターの-230~-219 に位置する Egr-1 結合領域が重要であることがわかった。5-FU 処理で、核に Egr-1 蛋白質の蓄積することおよび TSP-1 遺伝子プロモーターに結合する Egr-1 が増加することを確認した。また、Egr-1 siRNA により、5-FU で誘導される TSP-1 の発現が抑制された。さらに、5-FU により p38MAPK が活性化し、p38MAPK 阻害剤を添加すると、5-FU で誘導される Egr-1、TSP-1 の発現が低下した。

本研究は、5-FU による TSP-1 発現誘導の分子機構についての初めての報告である。5-FU 処理により *c-myc* とリン酸化 *c-Myc* が減少して *miR-17-92* の発現が抑制され、その結果 TSP-1 mRNA の半減期が延長することにより TSP-1 遺伝子の発現が亢進する可能性を示唆した。さらに、5-FU 処理により、p38MAPK が活性化され、転写因子である Egr-1 の発現が亢進し、Egr-1 は TSP-1 遺伝子のプロモーターと結合して、TSP-1 の発現を亢進することを明らかにしている。これらの知見は今後の癌化学療法の進展に役立つものと考えられる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 43 号		学位申請者	趙 紅業
審査委員	主査	小澤 政之	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	宮田 篤郎	副査	山田 勝士
	副査	高尾 尊身	副査	金蔵 拓郎

主査および副査の5名は、平成20年5月22日、学位申請者趙 紅業さんに学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 5-FU には c-Myc を減少させる効果と Egr-1 を上昇させる効果があります。二つの機序のうち、どちらがより重要ですか？

回答) 現在のデータだけで結論するのは困難です。今後の実験で検討します。

質問2) 5-FU 以外の抗がん剤で TSP-1 の発現を上げることが示唆されていますが、5-FU 以外の抗癌剤でも血管新生抑制効果が期待できますか？

回答) IC<sub>50</sub> より少ない濃度の CTX、SN38、Vincristine、Taxol、VP16 を KM12C 細胞に添加して、5日間処理すると TSP-1 の発現が上昇しました。血管新生抑制効果は今後の実験で詳細に検討していく予定です。

質問3) 5-FU は TSP-1 を上げる作用がありますが、VEGF を下げるというデータもあります。どちらが重要ですか？

回答) 血管新生は、血管新生を抑制する因子と血管新生を促進する因子のバランスにより調節されていますので、両方とも重要ですが、今後の実験で 5-FU による VEGF 発現の亢進が血管新生に与える影響についても検討します。

質問4) TSP-2 はどのような機能を持った遺伝子ですか？

回答) TSP-2 は TSP ファミリーの一つであり、TSP-1 と同じように血管新生を抑制するという報告があります。私たちの実験では 5-FU 処理により、TSP-2 の発現は低下しました。

質問5) マイクロアレイの結果で 5-FU 処理によって、5倍以上発現が増加した遺伝子にはどのようなものがありましたか？

回答) 5-FU 処理によって5倍以上発現が増加した遺伝子は AQP3(7.47倍)、KIAA1961(6.50倍)、AFFX-M27830(6.14倍)、HIST1H2BG(5.82倍)、FLJI6641(5.21倍)と MSMB(5.06倍)です。

質問6) マイクロアレイの中で Egr-1 は何倍ぐらい上昇しましたか？

回答) 227404-s-at と 201694-s-at という Egr-1 に対するプローブでは、5-FU 処理により Egr-1 の発現がそれぞれ3倍と2.6倍上昇しました。

質問7) マイクロアレイの中で上昇した遺伝子群で IL-8 の上昇も確認されているようですが、この場合どのようなことが予測されますか？

回答) IL-8 は種々の炎症性疾患や悪性腫瘍において内皮細胞分裂促進因子や生存因子として働き、またマトリックス分解酵素 (MMP) 産生誘導などを引き起こし、血管新生に関わることが報告されています。5-FU 処理によって IL-8 は上昇しましたが、TSP-1 など血管新生抑制因子の効果の方が優勢だったと考えています。

質問8) low dose で実験されたということですが、low dose の定義をお答えください。

回答) ここでいう low dose は IC<sub>50</sub> より低い濃度です。low dose の定義については Bocci G.らの論文を参考にしました (PNAS 2003 (28) 100: 12917-22)。Bocci G.らは、内皮細胞にほぼ IC<sub>50</sub> の濃度の抗がん剤を 144時間処理すると TSP-1

の発現が誘導されることを報告しています。

質問 9) 5-FU 処理による正常細胞やストローマ、間質細胞に対する TSP-1 の関与についてどのように考えますか？

回答) 今回の実験では、主にがん細胞への 5-FU の影響について調べました。血管内皮細胞でも調べましたが、癌細胞と同様 TSP-1 の発現が亢進しました。腫瘍線維芽細胞については調べていません。

質問 10) MCF7 では 5-FU は Egr-1 上昇と c-Myc 減少どちらの機構で働いていますか？

回答) MCF7 細胞について、5-FU 処理による、Egr-1 と TSP-1 の蛋白質の上昇を確認しましたが、c-Myc については調べていません。KM12C 細胞の場合と同様の機構で TSP-1 が誘導されると考えていますが、現時点では十分なデータを持っていません。

質問 11) *miR-17-92* の発現は大腸癌に特異的ですか？

回答) *miR-17-92* は癌遺伝子として働き、大腸癌、肺癌および血液癌である B リンパ腫には発現が高いことが知られています。5-FU 処理により大腸癌 KM12C 細胞で *miR-17-92* の発現が低下しましたが、他の癌細胞ではまだ調べていません。

質問 12) E-box-like site を欠失させた mutant コンストラクトは GCbox と Egr1 サイトが残っており、このコンストラクトはプロモーター活性が残っていることから、やはり Egr-1 が重要ですか？

回答) Egr-1 は 5-FU 処理による TSP-1 の亢進には大切です。

質問 13) Egr-1 の deletion mutant は作らなかったのですか？Egr-1 のゲルシフトはやりましたか？

回答) Egr-1 結合サイトだけ欠損する mutant について、作製がうまくいきませんでした。Egr-1 のゲルシフトについては行っていません。

質問 14) マイクロアレイの結果で 5-FU 処理によって TSP-1 の上昇が認められなかった理由を教えてください。

回答) 5-FU 処理によって TSP-1 が 215775.at.s プローブにより 2 倍ぐらい上昇しましたが、シグナリングが弱かったため、マイクロアレイの結果を示しませんでした。代わりに、半定量 RT-PCR の結果を示しています。

質問 15) 5-FU が c-Myc を減少させること、5-FU が *miR-17-92* を減少させるデータはありますが、c-Myc が直接 *miR-17-92* を減少させるデータをお持ちですか？

回答) c-Myc が直接 *miR-17-92* を減少させるデータはありません。c-Myc が *miR-17-92* の発現を亢進させることを報告している参考文献を引用しています。

質問 16) *miR-17-92* が TSP-1 の半減期を伸ばすと書かれていますか、どういう方法で半減期が延びることを確かめていますか？

回答) *miR-17-92* をノックダウンすることにより TSP-1 mRNA の発現レベルが高くなるという参考文献を引用しています。*miR-17-92* の作用は mRNA の崩壊か mRNA からの翻訳の阻害ですので、TSP-1 mRNA の半減期を延長したことが考えられます。

質問 17) c-Myc を強制発現させた時の TSP-1 発現量に変化が見られると考えられますが、実験を行っていますか？

回答) c-Myc を強制発現させた時の TSP-1 発現量の変化については、調べていません。今後検討したいと思います。

質問 18) Egr-1 を強制発現させた時の TSP-1 発現量の変化を調べていますか？

回答) Egr-1 を強制発現させ時の TSP-1 発現量については調べていません。

質問 19) TSP-1 は様々な機能があるが、KM12C 細胞の中でもスライドで示したようなことが起きていますか？例えば MMP9 の活性化など。

回答) 今回の研究目的は 5-FU が TSP-1 の発現を亢進する分子機序の解明でした。5-FU により発現亢進した TSP-1 の作用については、TSP-1 が 5-FU の治療効果にどの程度関与しているのかということも含めて解析を行って行く予定です。

質問 20) 5-FU 処理による JNK のリン酸化は調べていますか？

回答) 調べましたが、抗体があまりよくなくて、明確なバンドが得られませんでした。JNK MAPK 経路はストレスにより活性化するので、5-FU 処理によりリン酸化することが予想されます。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。