

Thesis

大腸癌における orotate phosphoribosyltransferase 発現に関する検討

埼玉医科大学消化器一般外科(II)部門

(指導：平山 廉三教授)

高橋 威洋

Expression of orotate phosphoribosyltransferase in colorectal cancer

Takehiro Takahashi (Department of digestive and general surgery, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Background: Activation of 5-fluorouracil (5-FU) into nucleotides requires phosphorylation by orotate phosphoribosyltransferase (OPRT). In this study, we investigated the correlation between enzymatic activity and gene expression of OPRT in colorectal cancer tissues, and the association between OPRT gene expression and anti-tumor effect.

Materials and Methods: Enzymatic activity and gene expression of OPRT were measured by radioassay method and a real-time reverse transcriptional-polymerase chain reaction method, respectively, in 20 primary colorectal cancer tissues. In 37 patients treated with tegafur-uracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer, OPRT gene expressions were analyzed by the same method.

Results: There was a positive correlation between enzymatic activity and gene expression of OPRT ($r=0.788$, $P<0.0001$). Responding tumors had statistically higher OPRT gene expression than nonresponding tumours ($P=0.0008$), and patients with a high OPRT mRNA expression survived longer than those with a low OPRT mRNA expression ($P=0.0019$).

Conclusion: The expression of OPRT gene might be useful as predictive parameter for the efficacy of fluoropyrimidine-based chemotherapy.

Keywords: orotate phosphoribosyltransferase, colorectal cancer, 5-fluorouracil

緒言

5-fluorouracil (5-FU) 系抗癌剤は消化器癌、とりわけ、大腸癌化学療法に広く使用されている重要な抗癌剤である¹⁾。腫瘍内に取り込まれた5-FUは速やかに律速段階の分解酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) により2-fluoro- β -alanine に分解される²⁾。分解を受けなかった5-FUは細胞内でリン酸化をうけ活性代謝体に変化し、殺細胞効果を発揮する。活性代謝体の5-fluoro-deoxyuridine monophosphate (FdUMP)^{3,4)}は、還元型葉酸補酵素の5, 10-methylene tetrahydrofolateの存在下に、DNA de

novo系酵素の thymidylate synthase (TS) と三元共有結合複合体 (ternary complex) を形成し、TSの酵素活性を阻害する⁵⁾。これにより、DNAのde novo合成系は抑制され、DNA障害が時間依存性に惹起される⁶⁾。

以上のような5-FUの作用機序から考えると、標的酵素のTSおよび分解酵素のDPDの多寡により、抗腫瘍効果が決定される可能性が推測される。転移性大腸癌におけるTS・DPD遺伝子発現とフッ化ピリミジン系抗癌剤の治療効果を検討したところ、TS低発現かつDPD低発現の腫瘍の奏効率は75%であり全ての腫瘍で奏効が得られたわけではなかった⁷⁾。このことは、5-FUの効果予測はTS・DPD以外にも感受性を規定する因子が存在する可能性を示唆している⁸⁾。

(Taqman); Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)²⁰⁻²²を用いた. 表1に用いた primer/probe の塩基配列を示す. OPRT mRNA 遺伝子発現は, OPRT mRNA と GAPDH mRNA の発現量の比 (OPRT/GAPDH) により算出した.

2. OPRT 活性と OPRT mRNA 発現量との関連

腫瘍部における OPRT 活性と OPRT mRNA 発現量との関連については Pearson の相関係数を用い検討した. $p < 0.05$ を有意差ありとした.

III. 結果

OPRT 活性と OPRT mRNA 発現量の関係を図2に示す. OPRT 活性と OPRT mRNA の発現量の間には正の相関関係を認めた (相関係数 0.788, $p < 0.0001$).

検討2: 大腸癌組織の OPRT mRNA 発現量と転移性大腸癌に対するフツ化ピリミジン系抗癌剤の治療効果

I. 対象

1998年7月から2000年12月までの期間に東京医科大学歯科大学消化器外科において切除不能転移性大腸癌に対してテガフル・ウラシル (UFT)・ロイコボリン (LV) の経口治療が行われた37症例を対象とした⁷. 全例が原発巣を切除後に, 転移性病巣に対して first-line 化学療法として治療が行われた症例であり, (1) PS score が2以上であること²³, (2) 計測可能な病変が少なくとも1つあること, (3) 血液学的検査によって十分な肝・腎機能が確認されていること, (4) 3ヶ月以上の余命が期待できることを適格基準として満たしていた. 平均年齢は62歳 (38~80歳) で, 同時性転移9症例, 異時性転移28症例であった.

II. 方法

1. 治療法と治療効果判定

化学療法は, UFT 400 mg/m²/day および LV 15 mg/body の5日間経口投与のあと2日間休薬した. これを4回 (28日間) 繰り返し1サイクルとした^{7,24}. 治療前および2サイクル (8週) の治療毎に CT による計測可能病変の評価を行い, UICC ガイドライン²⁵に基づいて治療効果判定を行った. 2症例は CR, 10症例は PR, 16症例は NC, 9例は PD であり, 奏効率は32.4% (12/37) であった.

2. 検体採取と OPRT mRNA 発現量の測定法

原発巣切除術時に大腸癌より約20 mg の検体を採取し, 速やかに液体窒素で迅速凍結し -80℃ で保存した. 術前化学療法を行った症例はなかった. OPRT mRNA 発現量の測定法は, 先に述べた蛍光を用いたリアルタイム検出法により, OPRT mRNA と GAPDH mRNA の発現量の比 (OPRT/GAPDH) を算出した.

3. 統計学的推計

奏効例と非奏効例の遺伝子発現量の比較には, Mann-Whitney U test, 奏効率の比較には two sided Fisher's exact test を用いた. 生存曲線は Kaplan-Meier 法により描出し, log-rank test により差を検定した. $p < 0.05$ を有意差ありとした.

III. 結果

1. 奏効例と非奏効例における OPRT mRNA 発現

37例全例で OPRT mRNA 発現量の測定は可能であり, 中央値1.01 (0.42~3.94) であった. UFT・LV療法に対する治療効果を奏効例と非奏効例に分けると, 奏効例における OPRT mRNA の中央値は1.39 (1.02~3.04) であり, 非奏効例における OPRT mRNA の中央値0.85 (0.42~2.57) に比較して, 有意に高値を示した ($P = 0.0008$) (図3).

2. OPRT mRNA 発現の程度別にみた奏効率

OPRT mRNA の中央値である1.0を cut-off 値として, OPRT mRNA が1.0以上の症例を OPRT 高発現, 1.0未満の症例を OPRT 低発現と分類した. OPRT 高発現例の奏効率は63% (12/19) であったが, OPRT 低発現例には奏効例が認められなかった ($P < 0.0001$).

3. OPRT mRNA 発現の程度別にみた生存期間

OPRT 高発現例の50%生存期間は12.5ヶ月 (4.1~28.3ヶ月) に対して, OPRT 低発現例の50%生存期間は8.5ヶ月 (3.0~17.3ヶ月) と, OPRT 高発現例で生存期間の延長が認められた ($P = 0.0019$) (図4).

考案

5-FU が活性代謝体の FdUMP に代謝されるためにはリン酸化の過程が必須である. 第一段階のリン酸化に関与する酵素として, OPRT, UP, TP, 第二段階のリン酸化に関与する酵素として uridine kinase (UK), ribonucleotide reductase, thymidine kinase (TK) が報

表1. The primers and probe sequences for GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), and OPRT (orotate phosphoribosyltransferase)

Gene	Forward primer	Reverse primer	Probe
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGTATGGGATTTTC	CAAGCTTCCCCTTCTCAGCC
OPRT	TCCTGGGCAGATCTAGTAAATGC	TGCTCCTCAGCCATTCTAACC	CTCCTTATTGCGAAATGAGCTCCACC

告されている(図1). リン酸化経路は, 経路(1): 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP)の存在下でOPRTによって直接FUMPとなる^{9,10}, 経路(2): Rib-1-Pの存在下でUPによりFURにリン酸化され, さらにUKによるリン酸化により間接的にFUMPとなる^{11,12}, 経路(3): dRib-1-Pの存在下でTPによりリン酸化されたFUdRを経てTKによるリン酸化の後間接的にFdUMPとなる¹³, という3つの経路に分類される.

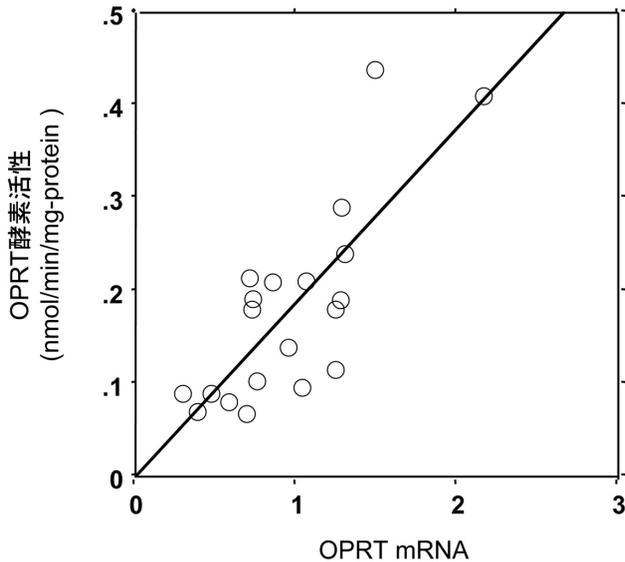


図2. OPRT mRNA expression plotted against enzymatic activity of OPRT. OPRT mRNA shows a positive correlation against enzymatic activity of OPRT (correlation coefficient=0.788, $p < 0.0001$).

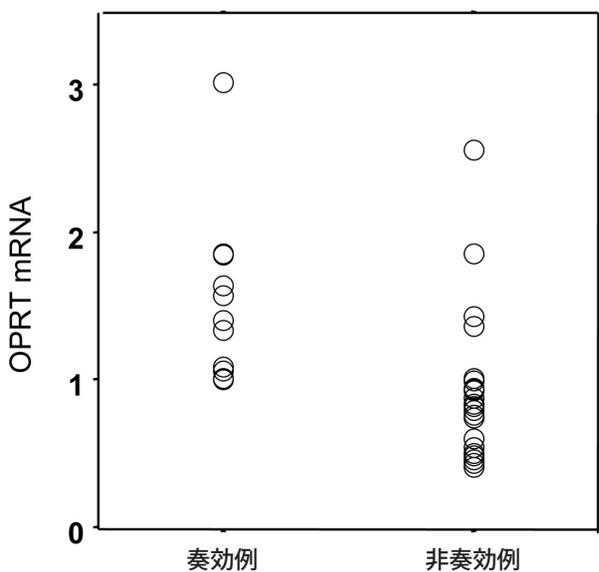


図3. OPRT gene expression in terms of response. Responding tumors statistically had higher OPRT gene expression than nonresponding tumors ($P=0.0008$).

ヒト株化癌細胞を用いた検討では, 5-FUのリン酸化が5-FUによる抗腫瘍効果発現の律速段階のひとつであり, またOPRTによる経路(経路(1))が5-FUリン酸化の主たる経路であることが示されている^{9,10}. Inabaらは, ヒト胃癌株化細胞から5-FU耐性株を誘導し, 耐性株ではOPRT活性が有意に低下することを報告した²⁶. 最近, Fujiiらは, 54例のヒト大腸癌組織を用いた *in vitro* 抗癌剤感受性試験において, 5-FU感受性組織は非感受性組織に比較して有意に高いOPRT酵素活性を呈することを示した¹⁶.

本来であれば, OPRTの酵素活性を直接測定することが望ましい. しかし, 酵素活性測定には数100 mg単位の腫瘍組織が必要であり, 全例からの採取は困難である. また, 酵素活性の測定には放射性同位元素を用いた煩雑な手技が必須となる. 今回の研究では, 10 mg単位の腫瘍組織で測定が可能なmRNAレベルでのOPRT遺伝子発現とOPRT酵素活性に正の相関を認めた. このことは, OPRT遺伝子発現測定がOPRT酵素活性測定の代用となるうる可能性を示唆するものである. Uetake, Ichikawaらは, 大腸癌組織においてRT-PCR法によるDPD mRNAレベルでの遺伝子発現とDPD酵素活性が正の相関を認めることを報告している²⁷. 今回, われわれの用いた蛍光を用いたりアルタイム検出法による遺伝子発現は, RT-PCR法に比較して, 感度と精度が高くより少ない検体量での測定が可能である.

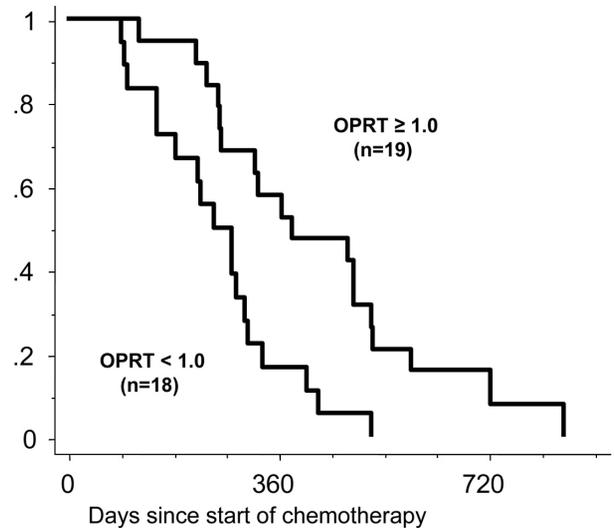


図4. Survival curves in terms of OPRT gene expression. The median survival time was 12.5 months in patients with high OPRT mRNA expression (range:4.1~28.3 months), but 8.5 months (range:3.0~17.3 months) in patients with low expression ($P=0.0019$). Patients with a high OPRT mRNA expression survived longer than those with a low OPRT mRNA expression.

さらに、今回の研究では、転移性大腸癌に対するフッ化ピリミジン系抗癌剤の治療効果と大腸癌組織のOPRT mRNA発現量との関連についても検討を行った。原発巣におけるOPRT mRNAが高発現の腫瘍では、UFT・LV療法により転移巣の腫瘍縮小が得られやすく、生存期間が有意に延長することが示された。OPRT酵素活性がin vitroの5-FU感受性と関連することは既に示されていたが^{15, 16)}、臨床検体におけるOPRT遺伝子発現がin vivoの5-FU感受性と関連することを示した報告は、文献を検索し得た範囲でわれわれの本研究がはじめてと思われる。

Ichikawaらは、UFT・LV療法を行った37症例を対象に、標的酵素のTS、分解酵素のDPDに加え⁷⁾、今回のOPRTを含む第一段階のリン酸化に関与する酵素のUP、TPの合計5遺伝子の発現を検討しているが¹⁴⁾、症例数が不十分なため多変量解析を行うに至っていない。今後の展開としては、さらに多数の遺伝子発現を包括的に検討するDNAアレイなどの新規測定法を積極的に大規模臨床試験に前向き研究として導入していくことが必要であろう。

要約

今回、我々は、大腸癌組織のOPRT活性とOPRT mRNA発現量の関係を検討した。OPRT活性の測定にはradioassay法、OPRT mRNA発現の半定量化には、蛍光を用いたリアルタイム検出法をそれぞれ用いた。結果は、OPRT活性とOPRT mRNA発現量には、正の相関関係を認めた。このことから、OPRT mRNA発現量とUFT・LV療法を行った大腸癌37症例の治療効果について検討した。OPRT mRNA発現量は、奏効例では中央値1.39、非奏効例中央値0.85であり、奏効例で有意に高値を示した(P=0.0008)。OPRT遺伝子発現の程度別に比較すると、OPRT mRNA発現の中央値1.0をcut-off値とした場合、1.0以上の高発現例での奏効率は63%、低発現例では奏効例はなかった。また、高発現例に生存期間の延長を認めた(P=0.0019)。今後、OPRT遺伝子発現のフッ化ピリミジン系抗癌剤の抗腫瘍効果予測における意義につき、前向きの臨床試験で検討する必要がある。

謝辞

稿を終えるにあたり、埼玉医科大学 外科学(消化器一般外科(II)部門) 平山廉三教授の御高聞ならびに市川 度講師の御指導に心から感謝いたします。埼玉医科大学 生化学 菰田二一教授、大鵬薬品工業創薬センター 武知貞士主任研究員の御教導に深謝致します。実験助手、三吉さおり様に感謝致します。

引用文献

1) Moertel CG. Chemotherapy for colorectal cancer. N

Engl J Med 1994;330:1136-42.

- 2) Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* 1987;47:2203-6.
- 3) Langenbach RJ, Danenberg PV, Heidelberger C. Thymidylate synthase: mechanism of inhibition by 5-fluoro-2[prime]-deoxyuridylate. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;48:1565-71.
- 4) Peters GJ, van der Wilt CL, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, Johnstone PG, van Groeningen CJ, et al. Thymidylate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer* 1995;31A:1299-305.
- 5) 市川 度, 仁瓶善郎, 杉原健一. 癌の化学療法レビュー: 多剤併用療法, *Biochemical Modulation*. *臨床外科* 1998;53:897-900.
- 6) 市川 度, 仁瓶善郎, 平山廉三. 制癌剤感受性規定酵素5-fluorouracilの感受性規定酵素からみた治療の個別化. *Surgery Frontier* 2003;10(1):87-91.
- 7) Ichikawa W, Uetake H, Shirota Y, Yamada H, Nishi N, Nihei Z, et al. Combination of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase gene expressions in primary tumors as predictive parameters for the efficacy of fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:786-91.
- 8) Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000;6:1322-7.
- 9) Peters GJ, Laurensse E, Leyva A, Lankelma J, Pinedo HM. Sensitivity of human, murine, and rat cells to 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in relation to drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res* 1986;46:20-8.
- 10) Peters GJ, van Groeningen CJ, Laurensse EJ, Pinedo HM. A comparison of 5-fluorouracil metabolism in human colorectal cancer and colon mucosa. *Cancer* 1991;68:1903-9.
- 11) Schwartz PM, Moir RD, Hyde CM, Turek PJ, Handschumacher RE. Role of uridine phosphorylase in the anabolism of 5-fluorouracil. *Biochem Pharmacol* 1985;34:3585-9.
- 12) Cao D, Russell RL, Zhang D, Leffert JJ, Pizzorno G. Uridine phosphorylase (-/-) murine embryonic stem cells clarify the key role of this enzyme in the regulation of the pyrimidine salvage pathway and in the activation of fluoropyrimidines. *Cancer Res*

- 2002;62:2313-7.
- 13) Metzger R, Danenberg K, Leichman CG, Salonga D, Schwartz EL, Wadler S, et al. High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1998;4:2371-6.
 - 14) Ichikawa W, Uetake H, Shirota Y, Yamada H, Takahashi T, Nihei Z, et al. Both gene expression for orotate phosphoribosyltransferase and its ratio to dihydropyrimidine dehydrogenase influence outcome following fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2003;89:1486-92.
 - 15) Isshi K, Sakuyama T, Gen T, Nakamura Y, Kuroda T, Katuyama T, et al. Predicting 5-FU sensitivity using human colorectal cancer specimens: comparison of tumor dihydropyrimidine dehydrogenase and orotate phosphoribosyltransferase activities with in vitro chemosensitivity to 5-FU. *Int J Clin Oncol* 2002;7:335-42.
 - 16) Fujii R, Seshimo A, Kameoka S. Relationships between the expression of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, and orotate phosphoribosyltransferase and cell proliferative activity and 5-fluorouracil sensitivity in colorectal carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2003;8:72-8
 - 17) Laskin JD, Evans RM, Slocum HK, Burke D, Hakala MT. Basis for natural variation in sensitivity to 5-FU in mouse and human cell in culture. *Cancer Res* 1979;39:383-90.
 - 18) 安江慶二, 宇佐見好子, 橋爪博隆, 須賀昭二, 伊奈研次, 堀内 洋, 他. 癌患者におけるフッ化ピリミジン化合物の代謝(その2). *臨床薬理* 1987;18(4):689-97.
 - 19) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
 - 20) Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995-1001.
 - 21) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-94.
 - 22) Farrugia DC, Ford HE, Cunningham D, Danenberg KD, Danenberg PV, Brabender J, et al. Thymidylate synthase expression in advanced colorectal cancer predicts for response to raltitrexed. *Clin Cancer Res* 2003;9:792-801.
 - 23) Zubrod C, Schneiderman M, Frei J. Appraisal of methods for study of chemotherapy of cancer in man: comparative therapeutic trial of nitrogen mustard thiethylene thiophosphoramidate. *J Chron Dis* 1960;11:7-13.
 - 24) Ichikawa W, Nihei Z, Uetake H, Yamada H, Shirota Y, Sugihara K. UFT plus leucovorin for metastatic colorectal cancer: Japanese experience. *Oncology (Huntington)* 2000;14:41-3.
 - 25) Hayward JL, Carbone PP, Heusen JC, Kumaoka S, Segaloff A, Rubens RD. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1997;35:292-8.
 - 26) Inaba M, Mitsunashi J, Sawada H, Miike N, Naoe Y, Daimon A, et al. Reduced activity of anabolizing enzymes in 5-fluorouracil-resistant human stomach cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:212-20.
 - 27) Uetake H, Ichikawa W, Takeuchi T, Fukushima M, Nihei Z, Sugihara K. Relationship between intratumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity and gene expression in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:2836-9.