

平成22年 3月26日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17016058

研究課題名（和文）：浸潤・転移を標的とした分子標的薬剤

研究課題名（英文）：Molecular targeting agents that suppress invasion and metastasis of cancer cells

研究代表者

秋山 伸一（AKIYAMA SHINICHI）

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60117413

研究成果の概要（和文）：チミジンホスホリラーゼ（TP）は、血管新生活性を有する酵素である。TPがチミジンを分解することで生じる2-デオキシ-D-リボースは血管新生活性を有する。2-デオキシ-D-リボースの立体異性体である2-デオキシ-L-リボースは、TPの酵素活性阻害剤であるTPIと同様、TP発現腫瘍の増殖、浸潤、転移を抑制した。2-デオキシ-D-リボースは、細胞内でROSを産生させ、ROSがNFκBを活性化して血管新生活性をもつIL-8やマトリックスメタロプロテイナーゼの発現を亢進させた。

研究成果の概要（英文）：Thymidine phosphorylase is an enzyme that has an angiogenic activity. 2-Deoxy-D-ribose, one of the degradation products of thymidine produced by TP also has an angiogenic activity. As well as the inhibitor of TP, 2-deoxy-L-ribose, an stereoisomer of 2-deoxy-D-ribose, suppressed the growth, invasion and metastasis of the TP-expressing tumors. ROS was produced by TP and 2-deoxy-D-ribose, and the ROS activated NFκB. The activated NFκB enhanced the expression of IL-8 and MMPs that are involved in angiogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,000,000	0	9,000,000
2006年度	8,700,000	0	8,700,000
2007年度	8,700,000	0	8,700,000
2008年度	8,700,000	0	8,700,000
2009年度	8,700,000	0	8,700,000
総計	43,800,000	0	43,800,000

研究分野：がん研究に関わる特定領域

科研費の分科・細目：がん治療

キーワード：thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose, IL-8, ROS, NFκB, TSP-1, 5-FU

1. 研究開始当初の背景

チミジンホスホリラーゼ（TP）はピリミジンヌクレオシド代謝に関与する酵素である。TPはチミジンから2-デオキシリ-D-リボース-1リン酸化への可逆的な変換を触媒する酵素であり、

フッ化ピリミジン系抗がん剤5-フルオロウラシル（5-FU）のプロドラッグの活性化酵素としても知られている。胃がん、大腸がん、卵巣がん、乳がん、膀胱がんなど多くの固形腫瘍でTPの発現が隣接非がん部での発現に

比べ高くなっている。TP が血小板由来血管内皮細胞増殖因子 (PD-ECGF) と同一であることを明らかにした。さらに TP が血管新生活性を有すること、TP による血管新生には TP の酵素活性が必須であることも確認した。TP によるチミジンの分解産物のなかでは、2-デオキシリ-D-リボースに血管新生活性が認められなかった。

我々は、2-デオキシリ-D-リボースが TP の機能の down stream mediator であると考え、2-デオキシリ-D-リボースの作用機構に興味を持つようになった。同時に TP の分子自身にも、酵素活性とは関係なく何らかの生理機能があることを示唆する実験結果を得た。

2. 研究の目的

癌の発生や進展における TP の役割とその作用の分子機構を解明することにより、TP の高発現した癌の革新的な治療法を開発する。具体的には、

(1) 2-deoxy-D-ribose の標的分子を探索して見出すこと、(2) その標的分子からどのような情報伝達経路を経て、内皮細胞の遊走性を亢進させているのか、癌細胞にアポトーシス耐性を賦与しているのか、浸潤に関与している MMP9 などの発現を亢進させているのか、などを明らかにする、(3) 2-deoxy-L-ribose やその誘導体が動物実験系で癌の浸潤、転移を抑制できるのか、また同実験で TPI や抗癌剤と併用した時相乗的な治療効果が得られるのか、(4) TP はその酵素活性以外にも分子そのものがアポトーシス抑制に働くのでその分子機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞への TPcDNA のトランスフェクション

TPcDNA 発現ベクター (RSV/TP) またはエンブティーベクター (RSV) をヒト類表皮癌 KB-3-1 細胞、ヒト前立腺癌 PC-3 細胞にトランスフェクトした。ジェネティシンを含む選択培地で培養し、生き残った各々のクローンについて TP の発現を TP に対するモノクローナル抗体を用いてイムノブロット法で調べた。TP 高発現クローン (KB/TP, PC/TP 細胞) と TP を発現していないクローン (KB/CV, PC/CV) を実験に用いた。

(2) ノードマウスへの KB 細胞の移植

6 週令のオス BALB/C ノードマウスをクレアジャパンから購入した。KB/TP, KB/CV 細胞を腹腔内に移植し、移植後 3 日目から TPI, 2-deoxy-L-ribose を経口投与した。

(3) RT-PCR による遺伝子発現の測定

摘出した腫瘍は TRIzol 試薬を入れたプラスチックチューブに移し-80°C で保存した。腫瘍

組織をホモジェナイズし全 RNA を抽出した。1 μ g RNA を first-strand cDNA 合成キット (東洋紡、東京) を用いて逆転写した。遺伝子の発現をリアルタイム PCR

(PRISM 7900HT, アプライドバイオシステムズ) で測定した。

(4) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

細胞(3 \times 10⁵/well in 6 well plates)を 1 μ g のルシフェラーゼレポータープラスミド

(pGL3, Promega) でトランスフェクトした。指定された時間培養後、トランスフェクト細胞を採取し、ルシフェラーゼ活性を測定した (Promega)。

(5) クロマチン免疫沈降法

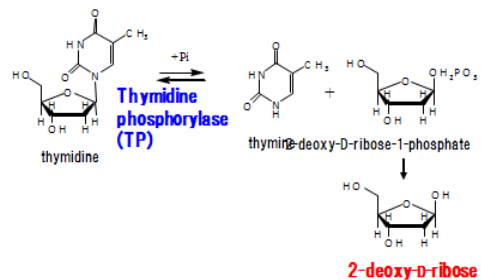
5-FU で処理した細胞は 1%ホルムアルデヒドで 37°C 10 分間固定した。クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイは ChIP アッセイキット (Upstate Biotechnology) を用いて行った。

溶解した DNA 画分は、抗 Egr-1 抗体またはマウス IgG と混合し、沈降した DNA を TSP-1 プロモーターのプライマーで PCR を行い増幅した。

4. 研究成果

(1) TP は、ピリミジンヌクレオシドの代謝に関与する酵素であるが、

TP function in thymidine metabolism

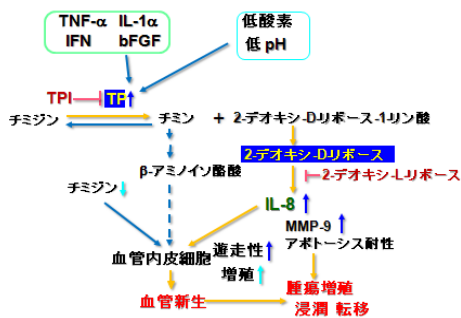


Thymidine phosphorylase (TP) は thymidine から thymine と 2-deoxy-D-ribose-1-phosphate への変換を触媒する酵素である。(Biochemistry, 1985, M. H. Iltzsch *et al.*)

同時に血管新生作用を有する。TP は thymidine を分解するが、分解産物である 2-deoxy-D-ribose が、TP の機能の down stream mediator であることを解明した。

また、TP 発現細胞は転移能が亢進しているが、TP の酵素活性阻害剤、TPI が転移と浸潤を抑制することを明らかにし、2-deoxy-D-ribose の立体異性体である 2-deoxy-L-ribose も TP 発現腫瘍の血管新生、転移と浸潤を抑制することを示した。

TPと癌の病態

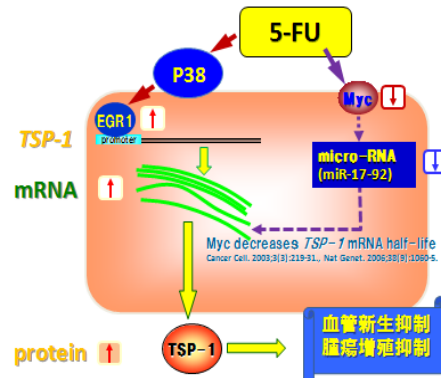


- (2) 2-deoxy-D-ribose をヒト白血病 HL-60 細胞に加えると、同細胞が低酸素下でのアポトーシスに耐性になった。低酸素下で引き起こされる Bcl-2/Bcl-X_L の発現の低下、チトクロム c の細胞質への放出、カスパーゼ 3、9 の活性化を 2-deoxy-D-ribose が抑制した。また、低酸素により誘導される HIF-1α の発現を 2-deoxy-D-ribose が低下させること、さらにこの作用が HIF-1α のユビキチン化の促進に基づいていることを証明した。2-deoxy-L-ribose は、これらの 2-deoxy-D-ribose の作用を阻害した。HIF-1α は、アポトーシスを引き起こす因子である BNIP3 を誘導し、低酸素下で BNIP3 の発現は亢進するが、TP、2-deoxy-D-ribose が BNIP3 の発現を抑制した。さらに 2-deoxy-D-ribose の立体異性体 2-deoxy-L-ribose は BNIP3 の発現を亢進した。
- (3) TP には、DNA 傷害作用を有する抗癌剤に対して細胞を耐性にする作用がある。この作用には TP の酵素活性は必要ではない。TP 発現細胞の DNA 傷害剤に対する耐性の機構として、TP が PI3-kinase/Akt 経路を活性化して生存シグナルを増加させている可能性を示唆した。TP 高発現細胞は、これらの抗癌剤によって誘導されるアポトーシスに対して抵抗性を示し、チトクロム C の放出、カスパーゼ 3、9 の活性化が抑制された。このような TP によるアポトーシス耐性の賦与に、TP の酵素活性は不要であった。TP に結合する分子を、酵母 Two-Hybrid 法を用いて検索し、18 個の陽性クローンを得た。どの分子が抗癌剤耐性に重要なかを解析しようとしている。
- (4) TP を高発現している KB/TP 細胞と、TP を発現していない KB/CV 細胞をヌードマウスの腹腔内に移植すると、KB/TP 細胞を移植したヌードマウスの生存期間は、KB/CV 細胞を移植したヌードマウスに比べ短かった。KB/TP 細胞からなる腫瘍は KB/CV 腫瘍に比べ浸潤能が高く、MMP-9 の発現が亢進していることを見出した。また TP 阻害剤 TPI と、2-deoxy-L-ribose が KB/TP 細胞を移植したヌードマウスの生存期間を延長させるこ

とを明らかにした。

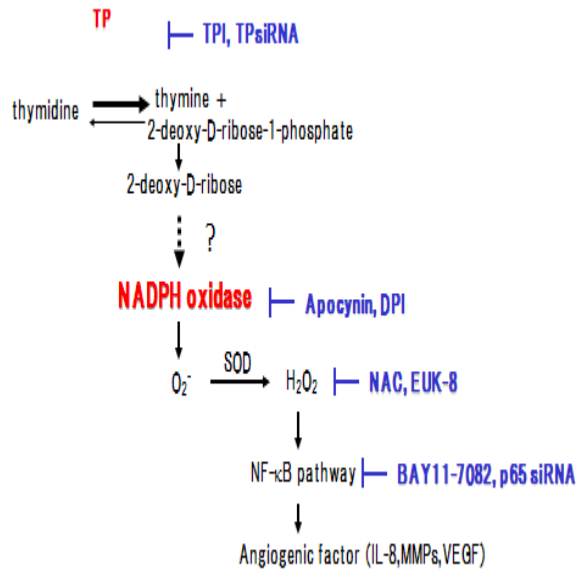
- (5) 5-FU がヒト大腸癌細胞株 KM12C で血管新生阻害因子 TSP-1 を誘導することを発見した。同細胞で、5-FU が p38MAPK の経路を活性化して EGR-1 の発現を増加させ TSP-1 の転写を亢進させること、c-Myc の発現を低下させることにより micro-RNA (mir17-92 cluster) が低下し、TSP-1 mRNA が安定化して TSP-1 の発現が増加することを明らかにした。

5-FUによるTSP-1誘導の機構



- (6) 腫瘍内の活性化 fibroblast は、腫瘍細胞の増殖、血管新生、転移、などに関与する。培養ヒト fibroblast (WI-38) を低酸素下に培養した時の遺伝子発現の変化をジーンチップを用いて網羅的に解析した。線維芽細胞を低酸素下で培養することにより VEGF や SDF-1 だけでなく、FGF を含む複数の血管新生に関与する因子の発現が上昇することを見出した。TP の機能の down stream mediator である 2-deoxy-D-ribose を fibroblast に作用させた時の遺伝子発現の変化も調べ、2-deoxy-D-ribose により MMP9 以外にも血管新生に関与する複数の遺伝子の発現が亢進することを見出している。
- (7) TP による活性酸素種 (ROS) 産生の機構：TP による ROS の産生機構について検討を行なった。ヒト類表皮癌細胞 (KB-3-1) に TP cDNA を導入すると、ROS の指標となるヘムオキシゲナーゼ (HO-1) の発現が亢進した。次に NADPH オキシダーゼ (Nox) 由来の ROS に注目し、Nox 阻害剤である Apocynin および Diphenyleneiodonium を用いて検討を行なった。その結果、Nox 阻害剤は TP による HO-1 の発現亢進を抑制した。KB-3-1 における Nox ファミリーの発現を調べた結果、Nox2 の発現が他のメンバーと比較して顕著に高かった。このことより TP を安定発現させた KB-3-1 を Nox2 siRNA で処理する

と、TPによるHO-1の発現亢進が抑制された。これらの結果より、TPはNoxを介してROSの産生を亢進することが明らかになった。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計35件)

- ① Chun-Lei Zheng, Xiao-Fang Che, Shin-ichi Akiyama, and Akio Tomoda (他1名3番目): 2-Aminophenoxazine-3-one induces cellular apoptosis by causing rapid intracellular acidification and generating reactive oxygen species in human lung adenocarcinoma cells. *Int. J. Oncol.*, (査読有) 36: 641-650, 2010.
- ② Ying Zhou, Tatsuhiko Furukawa, Shin-ichi Akiyama, Zhe-Sheng Chen (他9名8番目): Cepharanthine is a potent reversal agent for MRP7 (ABGG10)-mediated multidrug resistance. *Biochem. Pharmacol.*, (査読有) 77: 993-1001, 2009.
- ③ Chun-ling Dai, Shin-ichi Akiyama, Zhe-sheng Chen and Li-wu Fu. (他9名10番目): Sensitization of ABCB1 overexpressing cells to chemotherapeutic agents by FG020326 via binding to ABCB1 and inhibiting its function. *Biochem. Pharmacol.*, (査読有) 78: 355-364, 2009.
- ④ Shigeto Matsushita, Tatsuhiko Furukawa, Masatatsu Yamamoto, and Shin-ichi Akiyama. (他13名17番目): The role of thymidine phosphorylase in the induction of early growth response protein-1 and thrombospondin-1 by 5-fluorouracil in human carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* (査読有) (in press)
- ⑤ Ken-ichi Iwashita, Tatsuhiko Furukawa, Shin-ichi Akiyama and Katsushi Yamada. (他4名7番目): Major vault protein forms complexes with hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and reduces HIF-1 level in ACHN human renal adenocarcinoma cells. *Cancer Sci.* (査読有) (in press)
- ⑥ Hiroaki Nakagawa, Shin-ichi Akiyama, and Shin-ichiro Nishimura. (他10名番11目): Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells are caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cancer Lett.*, (査読有) 270: 295-301, 2008.
- ⑦ Ryuji Ikeda, Tatsuhiko Furukawa, Masatatsu Yamamoto, Katsushi Yamada and Shin-ichi Akiyama. (他14名19番目): Hyperosmotic stress up-regulates the expression of major vault protein in SW620 human colon cancer cells. *Exp. Cell Res.*, (査読有) 314: 3017-3026, 2008.
- ⑧ Hong-Ye Zhao, Masatatsu Yamamoto, Tatsuhiko Furukawa, Michihiko Kuwano and Shin-ichi Akiyama (他10名15番目): Molecular basis for the induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU. *Cancer Res.*, (査読有) 68: 7035-7041, 2008.
- ⑨ Hong-Ye Zhao, Masatatsu Yamamoto, Tatsuhiko Furukawa, Michihiko Kuwano and Shin-ichi Akiyama (他10名15番目): Down regulation of c-Myc and induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU in KM12C cells. *Cancer Lett.*, (査読有) 270: 156-163, 2008.
- ⑩ Akio Ooyama, Masatatsu Yamamoto, Shin-ichi Akiyama and Masakazu Fukushima (他2名5番目): Anti-angiogenic effect of 5-fluorouracil-based drugs against human colon cancer xenografts. *Cancer Lett.*, (査読有) 267: 26-36, 2008
- ⑪ Ken Shirato, Shin-ichi Akiyama and Akio Tomoda: (他5名7番目): Apoptosis induction preceded by mitochondrial depolarization in multiple myeloma cell

- line U266 by 2-aminophenoxazine-3-one. Biol. Pharm. Bull., (査読有)31: 62-67, 2008
- ⑫Xiao-Fang Che, Shin-ichi Akiyama and Akio Tomoda. Suppression of the proliferation of cancer cell lines, KB-3-1 and K562 cells preceded by a decrease in intracellular pH caused by phenoxazine derivatives. Oncol. Rep., (査読有)19: 1253-1258, 2008.
- ⑬Ryuji Ikeda, Tatsuhiko Furukawa, Masatatsu Yamamoto, Shin-ichi Akiyama and Katsushi Yamada(他 11 名 15 番目): Thymidine phosphorylase inhibits the expression of proapoptotic protein BNIP3. Biochem. Biophys. Res. Commun., (査読有)370: 220-224, 2008.
- ⑭Tokushi Tachiwada, Tatsuhiko Furukawa, Masatatsu Yamamoto, Masayuki Nakagawa and Shin-ichi Akiyama: (他 8 名 13 番目): Isolation and characterization of arsenite-resistant human epidermoid carcinoma KB cells. Oncol. Rep., (査読有)8: 721-727, 2007.
- ⑮Lin Wang, Zhe-Shen Chen, Shin-ichi Akiyama and Li-Jian Xian: (他 2 名 5 番目): Reversal effect of BM-cyclin1 on multidrug resistance in C-A120 cells. Anticancer Drug, (査読有) 18: 1015-1021, 2007.
- ⑯Jill K. Paterson, Shin-ichi Akiyama and Michael M Gottesman: (他 10 名 12 番目): ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. Biochemistry, (査読有)33: 9443-9452, 2007.
- ⑰Masaharu Komatsu, Tatsuhiko Furukawa, Shin-ichi Akiyama and Toru Takeuchi. (他 5 名 7 番目): Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3. Toxicol. Sci., (査読有)97: 407-416, 2007.
- ⑱Sandeep Jain, Shin-ichi Akiyama, Zhe-Sheng Chen, and Khalid A. El Sayed. (他 5 名 5 番目): Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by sipholane triterpenoids. (査読有)J. Nat. Prod., 70: 928-931, 2007.
- ⑲Saruski Owatari, Masatatsu Yamamoto, Shin-ichi Akiyama and Tatsuhiko Furukawa(他 11 名 14 番目): Copper-Transporting P-type ATPase, ATP7A, confers multidrug resistance and its expression is related to resistance to SN-38 in clinical colon cancer. Cancer Res., (査読有)67: 4860-4868, 2007.
- ⑳Yuichi Shimamoto, Tatsuhiko Furukawa, Ryuzo Sakata and Shin-ichi Akiyama: (他 4 名 8 番目): Direct activation of the human major vault protein gene by DNA-damaging agents. Oncol Rep., (査読有)15: 645-652, 2006.
- ㉑Xiao-Qin Ren, Tatsuhiko Furukawa, Masatatsu Yamamoto, and Shin-ichi Akiyama: (他 3 名 7 番目): A functional role of intracellular loops of human multidrug resistance protein 1. J. Biochem (Tokyo), (査読有)140: 313-318, 2006.
- ㉒Syunji Hayashi, Shin-ichi Akiyama and Akira Nakagawara. (他 4 名 6 番目): p73 and MDM2 confer the resistance of epidermoid carcinoma to cisplatin by blocking p53. Biochem. Biophys. Res. Commun., (査読有) 347: 60-66, 2006.
- ㉓Yixiang Zhang, Shin-ichi Akiyama and Hiroto Tsubouchi: (他 8 名 10 番目): Apolipoprotein E regulates primary cultured human mesangial cell proliferation. Nephron Exp. Nephrol., (査読有) 102: e62-70, 2006.
- ㉔Seiko Kato, Shin-ichi Akiyama, Akihisa Abe and Akio Tomoda. (他 6 名 8 番目): Anticancer effects of phenoxazine derivatives combined with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand on pancreatic cancer cell lines, KLM-1 and MIA-PaCa-2. Oncol Rep., (査読有) 15: 843-848, 2006.
- ㉕Yuichi Nakajima, Tatsuhiko Furukawa, Masatatsu Yamamoto, and Shin-ichi Akiyama. (他 3 名 7 番目): 2-Deoxy-L-ribose inhibits the invasion of thymidine phosphorylase-overexpressing tumors by suppressing matrix metalloprotease-9. Int. J. Cancer, (査読有) 119: 1710-1716, 2006.
- ㉖Takenari Gotanda, Tatsuhiko Furukawa, Shin-ichi Akiyama and Masayuki Nakagawa. (他 10 名 13 番目): Molecular basis for the involvement of thymidine phosphorylase in cancer invasion. Int. (査読有)J. Mol. Med., 17: 1085-1091, 2006.
- ㉗Xiao-Fang Che, Tatsuhiko Furukawa, Masatatsu Yamamoto, and Shin-ichi Akiyama. (他 8 名 12 番目): Overexpression of survivin in primary ATL cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in ATL cell lines. Blood, (査読有)15: 4880-4887, 2006.
- ㉘Kengo Tsuneyoshi, Tatsuhiko Furukawa,

- Shin-ichi Akiyama and Masayuki Nakagawa. (他 6 名 9 番目): Induction of thymidine phosphorylase expression by AZT contributes to enhancement of 5'-DFUR cytotoxicity. *Cancer Lett.*, (査読有) 244: 239-246, 2006.
- ②⑨ Hei-Cheul Jeung, Tatsuhiko Furukawa, and Shin-ichi Akiyama. (他 10 名 13 番目): Protection against DNA damage-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase. *FEBS Lett.*, (査読有) 580: 1294-1302, 2006.
- ③⑩ Ryuji Ikeda, Tatsuhiko Furukawa, Masatatsu Yamamoto, and Shin-ichi Akiyama: (他 10 名 14 番目): 2-Deoxy-D-ribose inhibits hypoxia-induced apoptosis by suppressing the phosphorylation of p38 MAPK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (査読有) 342: 280-285, 2006.
- ③⑪ Tomohiro Noguchi, Shin-ichi Akiyama and Tatsuhiko Furukawa. (他 14 名 16 番目): MRP1 mutated in the L₀ region transports SN-38 but not leukotriene C₄ or estradiol-17 (β-D-glucuronate). *Biochem. Pharmacol.*, (査読有) 70: 1056-1065, 2005.
- ③⑫ Hei-Cheul Jueng, Tatsuhiko Furukawa, and Shin-ichi Akiyama. (他 6 名 9 番目): Thymidine phosphorylase suppresses apoptosis induced by microtubule-interfering agents. *Biochem. Pharmacol.*, (査読有) 70: 13-21, 2005.
- ③⑬ Ryuji Ikeda, Tatsuhiko Furukawa, Shin-ichi Akiyama and Katsushi Yamada: (他 11 名 14 番目): Cepharanthine potently enhances the sensitivity of anticancer agents in K562 cells. *Cancer Sci.*, (査読有) 96: 327-376, 2005.
- ③⑭ Gen Fukuda, Shin-ichi Akiyama, Subrata Chakarabarti and Masato Oodawara. (他 6 名 7 番目): 2-Amino-phenoxazine-3-one attenuates glucose-induced augmentation of embryonic form of myosin heavy chain, endothelin-1 and plasminogen activator inhibitor-1 in human umbilical vein endothelial cells. *Biol. Pharm Bull.*, (査読有) 28: 797-801, 2005.
- ③⑮ Xiao-Qin Ren, Tatsuhiko Furukawa, and Shin-ichi Akiyama. (他 7 名 10 番目): GSH suppresses a tryptic site in the C-terminal half of human MRP1. *J. Biol. Chem.*, (査読有) 280: 6231-6237, 2005.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 伸一 (AKIYAMA SHINICHI)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
 研究者番号: 60117413

(2) 研究分担者

古川 龍彦 (FURUKAWA TATSUHIKO)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
 研究者番号: 40219100

山本 雅達 (YAMAMOTO MASATATSU)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
 研究者番号: 40404537