

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：16101  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22501048  
 研究課題名（和文） チミジンホスホリラーゼの作用機構の解析と阻害剤 T P I の前臨床試験  
 研究課題名（英文） Molecular basis for the functions of thymidine phosphorylase and preclinical study of an inhibitor of thymidine phosphorylase , TPI  
 研究代表者 秋山 伸一（AKIYAMA SHIN-ICHI）  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・客員教授  
 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、血小板由来血管内皮細胞（PD-ECGF）と同一蛋白質である。TP は、血管新生活性を有し、腫瘍の進展に重要な役割を担っていることを多くの報告が示しているが、TP の機能の分子機序についてはよく分かってない。我々は、TP 機能の分子機構について調べた。TP は、NADPH oxidase の基質である NADPH の細胞内レベルを高めることで ROS の産生を増加させた。その ROS は NFκB を活性化し、活性化した NFκB が *IL-8* のプロモーター活性を高め *IL-8* 発現を亢進した。我々はさらに、チミジン由来の代謝産物が解糖経路とペントースリン酸経路に入ることを初めて明らかにした。ATP と NADPH が、その結果として TP 発現細胞で増加した。これらの知見は、チミジンの異化が、栄養状態が十分でない腫瘍の微小環境下で、癌細胞の生存と増殖に重要な役割を演じていることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Thymidine phosphorylase (TP) is identical to platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF). Although many reports indicate that TP has angiogenic activity and plays pivotal role in tumor progression, the mechanism of the TP functions is not fully understood. We therefore investigated the molecular basis for the TP functions. TP augmented the production of ROS by increasing the intracellular level of NADPH, a substrate for NADPH oxidase. The ROS induced by TP activated NFκB, which subsequently enhanced the promoter activity and expression of *IL-8*. Furthermore, we demonstrated for the first time that thymidine-derived metabolites entered the glycolytic pathway and the pentose phosphate pathway. Production of ATP and NADPH was consequently augmented in TP-expressing cells. These findings suggest that catabolism of thymidine plays an important role in the survival and growth of cancer cells in a microenvironment where nutrients are insufficient.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

チミジンホスホリラーゼ (TP) は、血小板由来血管内皮細胞増殖因子 (PD-ECGF) と同一蛋白質であり、血管新生活性を有する。TP は、多くの腫瘍で発現が亢進しており、腫瘍の増殖、浸潤、転移、アポトーシス耐性など、腫瘍の進展に重要な役割を担っていると考えられるが (図 1)、その作用機構については不明の点が多い。

## 2. 研究の目的

TP が活性酸素 (ROS) の産生を増加させ、その ROS が転写因子 NF $\kappa$ B を活性化し IL-8 の発現を亢進することを見出した (図 2)。そこで、TP による ROS 産生の機構について解析し、以下の研究成果を得た。

## 3. 研究の方法

TP 発現ヒト癌 KB 細胞 (KB/TP)、TP 非発現ヒト癌 KB 細胞 (KB/CV) の培地に、チミジンまたはその同位体である  $^{13}\text{C}_5$ -チミジンを付加して、チミジンの異化を CE-MS により解析した。

## 4. 研究成果

(1) TP は、NADPH オキシダーゼを介した ROS 産生を亢進する。

(2) TP は、NADPH オキシダーゼの基質である NADPH レベルを上昇させることで ROS 産生を亢進する (図 3)。

(3) TP によりチミジンが分解されて生じる 2-deoxy-D-ribose は、2-deoxy-D-ribose 5-phosphate (dR5P) に変換された後 (図 4)、dR5P アルドラーゼ (DERA) によって解糖経路の中間代謝産物である glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) になり、解糖経路、ペントースリン酸経路に入ることにより、NADPH や ATP レベルの産生を亢進する (図 5)。

### (4) 考察

今回の研究から、チミジンの異化が、癌の進行に大きく関与していることが示唆された。癌は無秩序な増殖を繰り返す一方で、低酸素および低栄養などの厳しい環境下で細胞死に至る。細胞死を引き起こした癌細胞の DNA は、チミジンの供給源となり TP 発現細胞のエネルギー源として利用されるのではないかと考えている。腫瘍組織内における TP の分布を調べると、ネクローシス周辺に発現が高くなっていることもこの考えを支持している。また、胃癌、大腸癌では、正常組織に比べ腫瘍内グルコース濃度が顕著に低下していることが知られている。グルコースが枯渇した環境下で癌細胞が増殖するには、グル

コース以外のエネルギー供給源が必要である。チミジン由来の糖は、グルコースの代替エネルギー源として、癌細胞の生存や増殖に寄与することが考えられる。今後、癌のエネルギー源を標的とした抗癌剤の開発を行ううえで、癌のヌクレオシド代謝に関与する酵素が重要な分子標的となる可能性がある。

大鵬薬品工業との共同研究により開発した、新しい TP の酵素活性阻害剤、TPI は、腫瘍の増殖、血管新生、浸潤、転移を抑制する。近年 TPI と trifluorothymidine (FTD) の合剤である TAS-102 の第 II 相臨床試験が行われ、切除不能の進行・再発大腸癌において、TAS-102 は、全生存期間の中央値を有意に延長させた。サブ解析では、KRAS 遺伝子変異型の症例に対してより強い治療効果を示し注目を集めた。FTD は、チミジル酸合成酵素 (TS) 阻害に加え、DNA に取り込まれることで、TS の阻害とは別の抗腫瘍メカニズムを持っている。FTD は、TP によって不活性化されるため、TPI との合剤にすることで FTD の抗腫瘍効果を高めている。TPI は、それ自体で抗腫瘍効果を示す可能性がある。現在、TAS-102 のグローバル第 III 相試験が行われている。

## (5) 今後の課題

- ①チミジン由来の糖は、グルコースの代替エネルギー源として、腫瘍の増殖に関与しているか。
- ②2-デオキシグルコースと TP 阻害剤 TPI の併用の抗腫瘍効果について。
- ③TP 以外のチミジン異化に関する酵素の阻害剤が、抗腫瘍効果を有しているか。

図 1

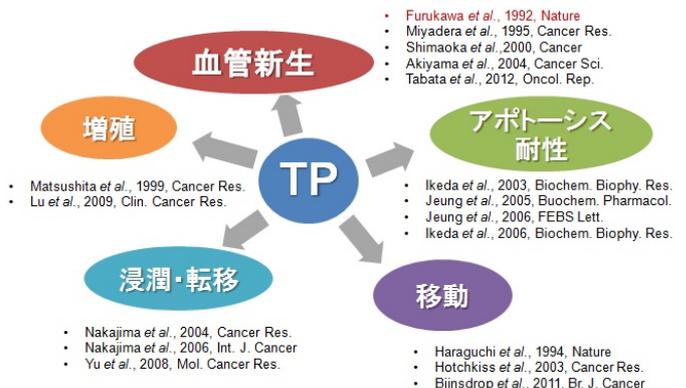


図 2

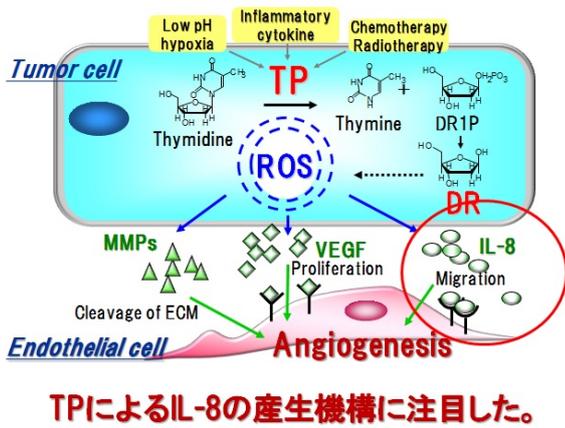
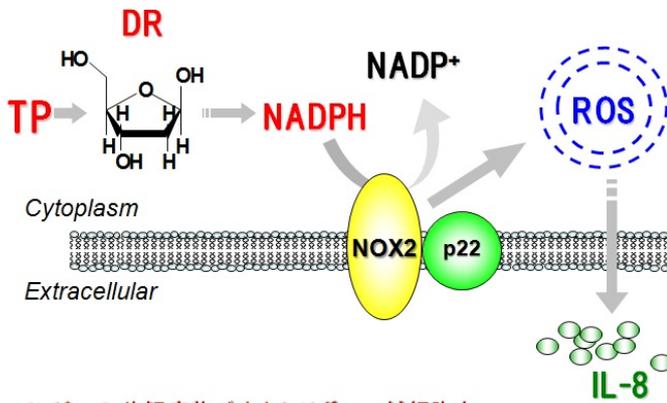
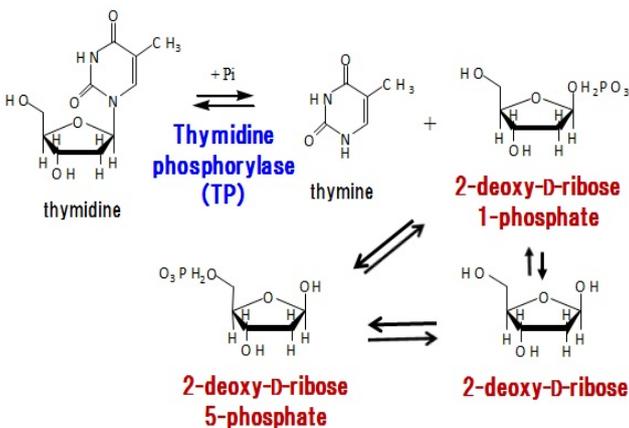


図 3



チミンの分解産物デオキシリボースが細胞内 NADPHを増加させ、その結果NADPH oxidaseによる ROSの産生が亢進することが考えられる

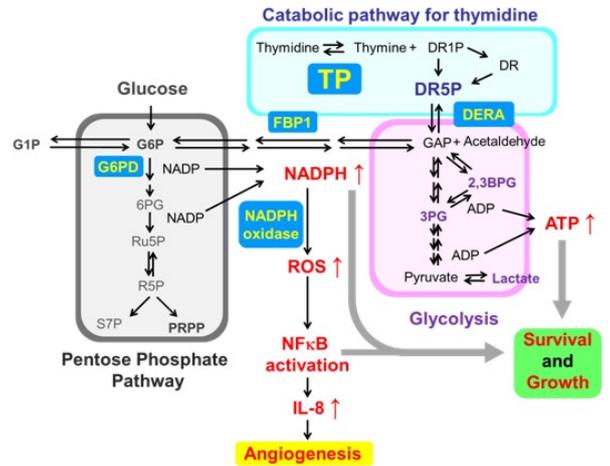
図 4



Biochemistry, 1985, M. H. Iltzsch *et al.*

図 5

## 癌細胞におけるTP機能の分子機構



### 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 7 件)

①Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y, A Novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody, J Immunol, 査読有, Epub ahead of print, 2013, <http://www.jimmunol.org/content/early/2013/05/19/jimmunol.1300448>

②Sato S, Hanibuchi M, Kuramoto T, Yamamori N, Goto H, Ogawa H, Mitsuhashi A, Van TT, Kakiuchi S, Akiyama S, Nishioka Y, Sone S, Macrophage stimulating protein promotes liver metastases of small cell lung cancer cells by affecting the organ microenvironment, Clin Exp Metastasis, 査読有, 30(3), 2013, 333-344, DOI: 10.1007/s10585-012-9540-y.

③Kuramoto T, Goto H, Mitsuhashi A, Tabata S, Ogawa H, Uehara H, Saijo A, Kakiuchi S, Maekawa Y, Yasutomo K, Hanibuchi M, Akiyama S, Sone S, Nishioka Y, D114-Fc, an inhibitor of D114-notch signaling,

suppresses liver metastasis of small cell lung cancer cells through the downregulation of the NF- $\kappa$ B activity, Mol Cancer Ther, 査読有, 11(12), 2012, 2578-2587, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0640.

④Tabata S, Ikeda R, Yamamoto M, Furukawa T, Kuramoto T, Takeda Y, Yamada K, Haraguchi M, Nishioka Y, Sone S, Akiyama S, Thymidine phosphorylase enhances reactive oxygen species generation and interleukin-8 expression in human cancer cells, Oncol Rep, 査読有, 28(3), 2012, 895-902, DOI: 10.3892/or.2012.1887.

⑤Van TT, Hanibuchi M, Goto H, Kuramoto T, Yukishige S, Kakiuchi S, Sato S, Sakaguchi S, Dat le T, Nishioka Y, Akiyama S, Sone S, SU6668, a multiple tyrosine kinase inhibitor, inhibits progression of human malignant pleural mesothelioma in an orthotopic model, Respiriology, 査読有, 17(6), 2012, 984-990, DOI: 10.1111/j.1440-1843.2012.02193.x.

⑥Van TT, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Sato S, Kuramoto T, Goto H, Mitsuhashi A, Nishioka Y, Akiyama S, Sone S, The therapeutic efficacy of S-1 against orthotopically implanted human pleural mesothelioma cells in severe combined immunodeficient mice, Cancer Chemother Pharmacol, 査読有, 68(2), 2011, 497-504, DOI: 10.1007/s00280-010-1503-x.

⑦田畑祥、秋山伸一、チミジン代謝とがん、実験医学、査読無、Vol. 30、No. 15 (増刊)、2012、87-93

[学会発表] (計6件)

①田畑祥、秋山伸一、チミジンホスホリラーゼによる活性酸素の産生機構、第14回日本がん分子標的治療学会、2010.7.6-8、タワーホール船堀 (東京都)

②田畑祥、秋山伸一、Molecular basis for the production of reactive oxygen species by thymidine phosphorylase、第69回日本癌学会学術総会、2010.9.22-24、大阪国際会議場 (大阪市)

③田畑祥、秋山伸一、チミジンホスホリラーゼによってチミジンから派生した糖の解糖

系への移行、第15回日本がん分子標的治療学会、2011.6.22-24、ホテル日航東京 (東京都)

④田畑祥、秋山伸一、Thymidine-derived sugars generated by thymidine phosphorylase entered glycolytic pathway、第69回日本癌学会学術総会、2011.10.3-5、パシフィコ横浜 (横浜市)

⑤田畑祥、秋山伸一、ヒト癌細胞のROS産生および生存におけるチミジン異化作用の役割、第16回日本がん分子標的治療学会、2012.6.27-29、西日本総合展示場 (北九州市)

⑥田畑祥、秋山伸一、Role of Thymidine catabolism in survival of human cancer cells、第70回日本癌学会学術総会、2012.9.19-21、ロイトン札幌 (札幌市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山 伸一 (AKIYAMA SHIN-ICHI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・客員教授  
研究者番号：60117413

### (2) 研究分担者

曾根 三郎 (SONE SABURO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・客員教授  
研究者番号：40145024

西岡 安彦 (NISHIOKA YASUHIKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：70274199

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

