

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870576

研究課題名(和文) ヒトがん細胞における thymidine 異化代謝の役割

研究課題名(英文) Role of Thymidine Catabolism in Human Cancer Cells

研究代表者

田畑 祥 (Tabata, Sho)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・特任助教

研究者番号：30708342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Thymidine phosphorylase (TP) は癌の悪性化に関与することが知られるが、その分子メカニズムは不明な点が多い。TP発現癌細胞における thymidine 異化機構を調べた結果、thymidine から生じた 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate が解糖系の中間代謝物質に変換し、細胞内の ATP および NADPH レベルを上昇させることが明らかになった。また、胃癌組織のメタボローム解析で thymidine 異化がエネルギー代謝を亢進していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Thymidine phosphorylase (TP), a rate-limiting enzyme in thymidine catabolism, plays a pivotal role in tumor progression; however, the mechanisms underlying this role are not fully understood. Here, we found that TP-mediated thymidine catabolism could supply the carbon source in the glycolytic pathway and thus contribute to cell survival under conditions of nutrient deprivation. In TP-expressing cells, thymidine was converted to metabolites including glucose 6-phosphate, lactate and 5-phosphoribosyl 1'-diphosphate via the glycolytic pathway both in vitro and in vivo. These thymidine-derived metabolites were required for the survival of cells in low glucose conditions. Furthermore, energy metabolism activated by thymidine catabolism was observed in human gastric cancer. These findings demonstrate that thymidine can serve as a novel energy source in human cancer cells.

研究分野：がん代謝

キーワード：thymidine catabolism

### 1. 研究開始当初の背景

Thymidine phosphorylase (TP) は、ピリミジンヌクレオシド代謝に関与する酵素で、thymidine から thymine と 2-deoxy-D-ribose-1-phosphate (DR1P) への変換を触媒する(図1)(1)。また、抗がん剤の 5-fluorouracil (5-FU) の活性化に関与する酵素としても知られる。

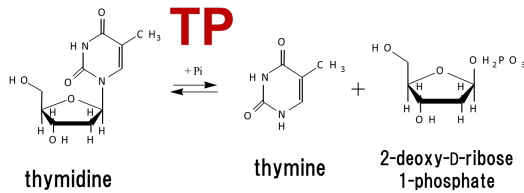


図1 TP の酵素反応

TP は、血管新生因子である血小板由来血管内皮細胞増殖因子 (PD-ECGF) と同一のタンパク質で、癌の血管新生をはじめ、増殖、浸潤、転移およびアポトーシス耐性に関与する(2, 3)。広範な腫瘍で TP は高発現しており、胃癌、大腸癌、膀胱癌および腎癌などでは独立した予後規定因子であると考えられている(2)。これらのことは、TP が血管新生だけではなく、多様な機構で腫瘍の増殖を促進していることを示唆する。しかしながら、TP が癌の進行にどのように貢献するのか、その分子メカニズムには不明な点が多い。

一方、大腸菌およびサルモネラ菌において 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate (DR5P) は解糖系の中 間 代 謝 産 物 である glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) に変換されることが報告されている(4)。Thymidine から生じる DR1P はリン酸転移酵素によって DR5P に変換されることから、TP による thymidine の異化作用は解糖系およびペントースリン酸経路 (PPP) を亢進する可能性がある(図2)。

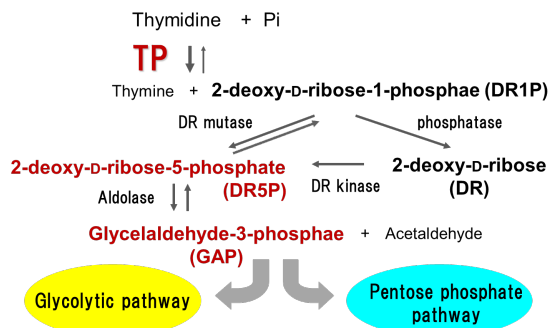


図2 サルモネラ菌および大腸菌における DR5P の代謝経路

これまでの我々の解析で、TP は解糖系およびペントースリン酸経路を亢進することで、がんのエネルギー産生に関与することが示唆された。本研究では、TP によるがん特異的な代謝機構に注目し、詳細な分子機構を明らかにする。

### 2. 研究の目的

(1) TP は、がんの血管新生、増殖および浸潤を亢進することが報告されている。我々の解析で、TP によって thymidine から産生された deoxyribose 類 (DDR) は、解糖系およびペントースリン酸経路に移行し、がんのエネルギー代謝に貢献することが示唆された。この代謝機構をさらに詳細に調べ、TP の上記機能と関与するのかが明らかにする。

(2) 臨床胃癌検体を用いて、thymidine および DDRs が解糖系およびペントースリン酸経路を亢進しているか検討する。さらに、TP による thymidine の異化代謝が胃癌の血管数、腫瘍の大きさ、転移および予後に関与するかが明らかにする。

(3) TP 発現がん細胞において、2-deoxy-L-ribose (DLR) が thymidine の異化代謝に対してどのような作用を示すのか検討する。

### 3. 研究の方法

代謝物質の解析はキャピラリー電気泳動/質量分析法 (CE-MS) を用いた。CE-MS 法は、代謝物質のほとんどがイオン性であることから、イオン性化合物に対して高分離能を有するキャピラリー電気泳動 (CE) と高感度、高選択的検出器である質量分析計 (MS) を組み合わせた測定技術であり、数千種類のイオン性代謝物質の測定が可能である(5)。

### 4. 研究成果

(1) ヒト類表皮がん細胞 (KB3-1) に TP 遺伝子を導入した TP 安定発現細胞 (KB/TP) をラベル化 thymidine (deoxyribose 部位に炭素の同位体 <sup>13</sup>C を有する thymidine) で処理して、詳細な thymidine の異化代謝経路について調べた。継時的な代謝変化について調べた結果、thymidine 由来の DDRs は解糖系およびペントースリン酸経路に短時間 (10-30 分) で、移行していることが判明した。また、fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBP1: 糖新生の律速酵素) を siRNA でノックダウンした結果、DDRs からのペントースリン酸経路への異化代謝が阻害された。DDRs は糖新生経路を介してペントースリン酸経路に移行することが明らかとなった。

(2) TP および thymidine がエネルギー代謝関連遺伝子 (解糖系、ペントースリン酸経路および TCA 回路の代謝酵素) の発現に影響を

与えるか、PCR アレイを用いて検討を行った。その結果、TP は pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) の発現を亢進し、さらに thymidine はその作用を増強させた。PDK は pyruvate dehydrogenase を阻害することで、解糖系からクエン酸回路への代謝を抑制する。TP は PDK4 の発現を亢進し、クエン酸回路の代謝を抑制することが示唆された。

(3) DLR が DDRs の代謝を阻害するのか、検討を行った。その結果、( thymidine 由来の ) DDR s の異化代謝経路に対して、DLR は影響を与えなかった。

(4) 胃癌組織を用いて、thymidine およびリン酸化された DDRs レベルを調べた。Thymidine は、( 隣接した非腫瘍組織と比較して ) 腫瘍組織で減少しており、DDRs は逆に増加していた。また、DDRs レベルが亢進している腫瘍組織において、エネルギー代謝が亢進していた。

(5) TP 発現がん細胞において、thymidine が glucose の代替エネルギー源として細胞の生存に貢献するか調べた。解糖系の阻害剤 2-deoxy-D-glucose を処理して colony formation assay を行った結果、TP 発現細胞はグルコース飢餓状態において生存に有利であることが判明した。

(6) Thymidine と同様に、2-deoxy-D-ribose (DDR) が解糖系の炭素源になるか検討した。TP を発現していないがん細胞を 13C-DDR で処理した結果、DDR が解糖系の中間代謝物質に変換することが明らかになった。

#### < 引用文献 >

Iltzsch MH, el Kouni MH, Cha S. Kinetic studies of thymidine phosphorylase from mouse liver. *Biochemistry* 24:6799-6807. 1985

Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T, Haraguchi M, Akiyama S, Fukui K, Ishizawa M, Yamada Y. Angiogenic factor. *Nature* 356:668. 1992

Akiyama S, Furukawa T, Sumizawa T, Takebayashi Y, Nakajima Y, Shimaoka S, Haraguchi M. The role of thymidine phosphorylase, an angiogenic enzyme, in tumor progression. *Cancer Sci.* 95:851-857. 2004

Hoffee P.A. 2-deoxyribose gene-enzyme complex in *Salmonella typhimurium*. I. Isolation and enzymatic characterization of 2-deoxyribose-negative mutants. *J.*

*Bacteriol.* 95:449-457. 1968

Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2:488-494. 2003

#### 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 6 件 )

Mitsuhashi A, Goto H, Saijo A, Trung VT, Aono Y, Ogino H, Kuramoto T, Tabata S, Uehara H, Izumi K, Yoshida M, Kobayashi H, Takahashi H, Gotoh M, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Yano S, Yokomise H, Sakiyama S, Nishioka Y. Fibrocyte-like cells mediate acquired resistance to anti-angiogenic therapy with bevacizumab. *Nat. Commun.* 6:8792 2015 ( 査読有 )

Uetaki M, Tabata S\*, Nakasuka F, Soga T, Tomita M. Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. *Sci Rep.* 5:13896. 2015 ( 査読有 )\*: corresponding author

Minami K, Shinsato Y, Yamamoto M, Takahashi H, Zhang S, Nishizawa Y, Tabata S, Ikeda R, Kawahara K, Tsujikawa K, Chijiwa K, Yamada K, Akiyama S, Torras SP, Anglada MP, Furukawa T, Takeda Y. Ribonucleotide reductase is an effective target to overcome gemcitabine resistance in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells with dual resistant factors. *J Pharmacol Sci.* 127:319-25 2015 ( 査読有 )

Hayashi K, Tabata S, Piras V, Tomita M, Selvarajoo K. Systems Biology Strategy Reveals PKC is Key for Sensitizing TRAIL-Resistant Human Fibrosarcoma. *Front Immunol.* 5:659 2015 ( 査読有 )

Tabata S, Ikeda R, Yamamoto M, Shimaoka S, Mukaida N, Takeda Y, Yamada K, Soga T, Furukawa T, Akiyama S. Thymidine phosphorylase activates NF B and stimulates the expression of angiogenic and metastatic factors in human cancer cells. *Oncotarget* 15:10473-85 2014 ( 査読有 )

Minami K, Kamijo Y, Nishizawa Y, Tabata S, Horikuchi F, Yamamoto M, Kawahara K, Shinsato Y, Tachiwada T, Chen ZS, Tsujikawa K, Nakagawa M, Seki N, Akiyama S, Arima K, Takeda Y, Furukawa T. Expression of ABCB6 Is Related to Resistance to 5-FU, SN-38 and Vincristine. Anticancer Res. 34:4767-73. 2014 (査読有)

[学会発表](計1件)

Sho Tabata, Masatatsu Yamamoto, Hisatsugu Goto, Yasuhiko Nishioka, Masaru Tomita, Tomoyoshi Soga, Tatsuhiko Furukawa and Shin-ichi Akiyama. Novel Thymidine Catabolism for ROS Generation and Survival in Human Cancer Cells Tenth AACR-JCA joint Conference on Breakthroughs in Cancer, 2016.2.16-20, Maui Hawaii (USA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田畑 祥 (Tabata Sho)

慶應義塾大学・政策メディア研究科・特任  
助教

研究者番号：30708342