

平成21年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19790292
 研究課題名 (和文) 腫瘍内微小環境における2-デオキシ-D-リボースの影響
 研究課題名 (英文) Effect of 2-deoxy-D-ribose in cancer microenvironments
 研究代表者
 中島 融一 (NAKAJIMA YUICHI)
 宮崎大学・医学部・准教授
 研究者番号： 80372796

研究成果の概要： 癌や創傷治癒などの微小環境下でのデオキシ-D-リボース (D-dRib) の間質細胞に対する影響を調べた。その結果、細胞および動物実験において、D-dRib は線維芽細胞を活性化し、その線溶活性や運動能を亢進させることが明らかとなった。その機序として、D-dRib は細胞の運動能への関与以外に微小環境下での細胞の代謝経路にも影響し、細胞の生存・活性化に関与し、腫瘍組織内では癌細胞の浸潤・転移を手助けしている可能性を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍 微小環境 2-デオキシ-D-リボース

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍の形成には腫瘍細胞だけではなく、腫瘍細胞により刺激を受けたマクロファージ (tumor-associated macrophage; TAM) や、線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast; CAFs) などの間質細胞が重要な役割を持つことが明らかとなってきた。2-デオキシ-D-リボース (D-dRib) は、チミジンホスホリラーゼ (TP) が関与するヌクレオチド代謝において、チミジンからチミンへの分解過程において生じる 2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸から、非酵素的に産生される。

D-dRib は還元糖の1種であり、低酸素条件下で細胞のエネルギー代謝に使われるとの報告もある (Vobel et al. J Cell Physiol 1993.)。我々は、D-dRib が *in vitro* および *in vivo* において強力な血管新生作用を持つことを明らかにした (Uchimiyama H. et al. Cancer Res 2002.)。

さらに、我々を含むいくつかの研究グループにより、腫瘍組織への浸潤部に TP が発現している TAM や CAFs が存在し、癌細胞の浸潤や転移に TP もしくは D-dRib の関与を示唆する報告があった (Shimaoka et al. Cancer

2000., Sato J. et al. Int J Cancer 2003.)。このことから研究を進め、我々は、D-dRib が癌細胞に対して血管新生因子や MMPs の分泌亢進を促し、癌転移を亢進させることを見出した (Nakajima Y. et al. Cancer Res 2004., Nakajima Y. et al. Int J Cancer 2006.)。しかし、腫瘍が形成する微小環境に関して、TAM や CAFs が発現している TP を介した細胞間の相互作用の研究は、未だ行われていなかった。その詳細な機構については不明の部分が多く、どのようにして D-dRib が腫瘍の progression に関わっているのかは、解明されていなかった。

2. 研究の目的

腫瘍が形成する微小環境に関して、癌細胞から刺激を受けたマクロファージ (TAM) が発現している TP を介した癌細胞や他の (線維芽細胞 (CAF) などの間質細胞との相互関係作用を調べ、これらの間質細胞が腫瘍増殖にどのように関与しているのかを明らかにし、腫瘍の間質細胞を標的とした癌治療の新たな開発に資する成果を得る。

3. 研究の方法

(1) デオキシ-D-リボースによる線維芽細胞の活性化

①RT-PCR 法

In vitro において、ヒト正常線維芽細胞 (TIG 3-20) を D-dRib 存在下で培養し、得られた Total RNA を用いて、線溶系酵素ウロキナーゼ型プラスミノゲン・アクチベータ (uPA)、プラスミノゲン・アクチベータ・インヒビター-1 (PAI-1) の mRNA 発現レベルを RT-PCR 法にて確認する。

②Western blot 法

TIG 3-20 を D-dRib 存在下で培養し、uPA および PAI-1 などの蛋白質量を Western blot 法にて確認する。

③フィブリン平板法

In vitro において、TIG 3-20 細胞を D-dRib 存在下で培養し、培養上清を、人工血栓を模したフィブリン平板上に添加し、フィブリンの溶解 (線溶) 度にて線維芽細胞から分泌された線溶系酵素の活性を調べる。

④ *In vitro* wound healing assay

TIG 3-20 をコンフルエントに培養し、そのプレート上の細胞の一部をスクラッチしてその間隙に遊走する細胞の移動度を測定す

る。

(2) 創傷治癒モデルマウスでのデオキシ-D-リボースの効果

創傷修復過程の組織微小環境は、癌組織と類似した点が多い。創傷治癒の初期段階には、線維芽細胞の増殖・遊走が認められている。そこで、線維芽細胞の活性化に対する D-dRib の効果を *in vivo* で確認するために、背部皮下にパンチ創を作成したマウスに D-dRib を経口投与し、その効果を観察した。

(3) 微小環境下での D-dRib による線維芽細胞の遺伝子発現変化の解析

多くの固形腫瘍は脆弱な血管連絡と無秩序な細胞増殖により低酸素・低栄養状態にあり、これらが刺激となって、血管新生因子や生存・増殖因子に富み、癌細胞は癌代謝とも呼べる自己の生存に有利に働く代謝経路を兼ね備えているとされている。この環境下の刺激は癌細胞以外の間質細胞にも影響していると考え、微小環境を模した細胞培養条件として、低酸素 (1% O₂) およびグルコース飢餓培地で TIG 3-20 を培養し、これに D-dRib を添加した際の遺伝子発現変化を、cDNA アレイにより網羅的に検索した。

4. 研究成果

癌や創傷治癒などの微小環境下での D-dRib の間質細胞に対する影響を調べた結果、以下のことが明らかとなった。

(1) D-dRib は線維芽細胞を活性化し、uPA の mRNA レベル、蛋白質の発現量および uPA 活性 (線溶活性) を亢進させた。D-dRib は TIG 3-20 の運動能を亢進させた。この D-dRib による線維芽細胞の運動能の亢進は、uPA の活性阻害剤アミロライドの添加または siRNA により uPA をノックダウンさせた TIG 3-20 において有意に抑制された (図 1)。このことから、D-dRib による線維芽細胞の運動能亢進に、uPA が重要な役割をしていることが示唆された。

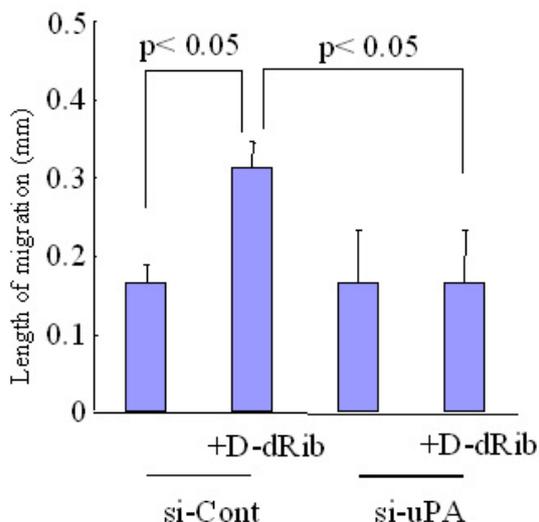


図1 D-dRib による線維芽細胞の運動能の亢進作用 (si-Cont; コントロール siRNA を細胞導入した TIG 3-20, si-uPA; uPA をノックダウンした TIG 3-20)

また、TP/D-dRib は、癌細胞に働きかけ、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) やマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) の発現亢進作用があることを、我々を含むいくつかのグループにより報告されている。この VEGF は直接的に血管内皮細胞の生存・増殖に関与するだけでなく、血管内皮細胞の uPA の発現を調節し、また、この uPA はセリンプロテアーゼとして pro-MMP を MMP へと活性化し、uPA 自体と併せて MMPs が細胞外基質を溶解して細胞運動 (血管新生) を促進させる。また、血管内皮細胞は uPA のオートクライン作用として uPA/uPA 受容体 (uPAR) により細胞運動を亢進させることが、多くの研究者により報告されている。これらを参考に、uPA の線溶酵素としての働き以外に、D-dRib の線維芽細胞の運動能への作用機序の一つとして uPA のオートクライン作用を調べた。その結果、D-dRib 刺激は uPA/uPA 受容体 (uPAR) からの細胞内シグナルとして、mTOR シグナルを介した細胞運動に重要な Rho-GTPase (Cdc42 および Rac1) の活性化を促すことを確認した。

(2) マウス創傷治癒モデルにおいて、D-dRib は創傷治癒初期で治癒促進効果が認められ、対象群 (生理食塩水投与群、グルコース投与群) に比較し創傷治癒効果に一定の効果が認められた (図2)。

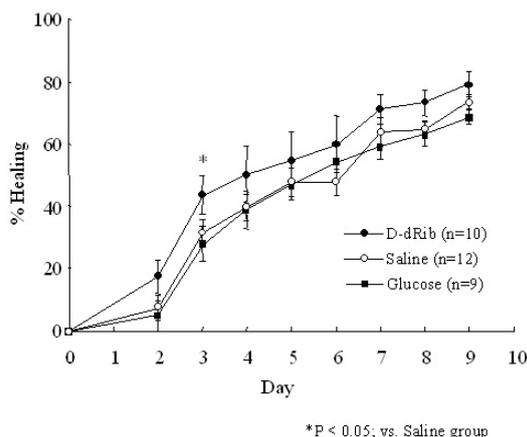


図2 D-dRib による創傷治癒効果

(3) 低酸素・グルコース飢餓条件下 (微小環境モデル) において、D-dRib 刺激による TIG 3-20 の遺伝子の発現変化について、cDNA アレイを用いて探索した。

その結果、グルコース飢餓により発現減少した遺伝子群の中で、D-dRib 添加により発現量が回復した遺伝子群 (約 400) が確認された。このなかで、FGF2、FGFR1、integrin サブユニット ($\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 αV および $\beta 1$)、IL-6、IL-6 receptor および JAK (Janus Kinase) 1/2 などの細胞の増殖・生存や運動能に関与するいくつかの遺伝子を見出した。特に、IL-6/IL-6 Receptor-JAK 経路は、gp130 のリン酸化チロシン残基が STAT1/3 分子の SH2 ドメインとの結合部位となる。転写因子である STAT1/3 は SH2 ドメインを介して転写因子として、癌や炎症、創傷治癒といった微小環境で活性化され、近年この IL-6 を介した線維芽細胞 (CAF) と癌細胞との相互作用による progression も注目されている (Studebaker AW et al. Cancer Res. 2008)。現在、この因子に対する D-dRib の影響について、さらなる検討を行っている。

また、D-dRib の取り込みに影響するのではないかとみられる GLUT のサブタイプ (GLUT-10) や糖代謝に関する遺伝子の発現変化を認め、D-dRib が微小環境下での細胞内の代謝経路にも影響する可能性を見出した。この GLUT-10 は D-dRib と同様に還元糖の 1 種である 2-デオキシ-D-グルコースを基質としており、D-dRib の細胞内取り込みに関して有力な候補であると考えている。さらに、実験条件を変化させて、D-dRib 刺激による線維芽細胞の遺伝子発現の変化を検討した結果、低酸素刺激により発現が亢進するとされている GLUT-1 について調べた結果、グルコ

ース飢餓による mRNA レベル低下を D-dRib が回復させることを確認した。D-dRib による mRNA レベルの発現変化は、他の GLUT ファミリーには影響なく、この GLUT-1 および-10 に関しても、D-dRib との関連を調べている。

この実験過程において、ヒト癌細胞 (KB 3-1、PC3)、血管内皮細胞 (HUVEC) および TIG 3-20 は、一般的な培養条件下 (20% O₂、5% CO₂) ではグルコース飢餓に細胞は耐え切れなかったが、同じグルコース飢餓状態であっても、低酸素条件 (1% O₂、5% CO₂) では、細胞の生存率が上昇した。この現象については、現在も癌代謝として有名なワールブルグ効果 (Warburg effect) による糖代謝 (解糖系) の亢進と D-dRib との効果について研究を継続している。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 中島融一、Harish Kumar Madhystha、Radha Kalavar、丸山真杉、2-Deoxy-D-ribose による線維芽細胞の活性化、第 30 回日本血栓止血学会学術集会、2007 年 11 月 17 日、三重県、志摩市

(7) ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

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 10 件)
- ① 学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年 (西暦)、査読の有無
 - ② 学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年 (西暦)、査読の有無
 - ③ 学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年 (西暦)、査読の有無

- [学会発表] (計 5 件)
- ①
 - ②
 - ③

- [図書] (計 2 件)
- ①
 - ②

[産業財産権]

○出願状況 (計□件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

6. 研究組織

(1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：