

平成22年 5月13日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790139  
 研究課題名（和文）：低酸素で誘導されるアポトーシスのチミジンホスホリラーゼによる抑制機構  
 研究課題名（英文）：Molecular basis for the inhibition of hypoxia-induced apoptosis by thymidine phosphorylase  
 研究代表者  
 池田 龍二（IKEDA RYUJI）  
 鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・薬剤師  
 研究者番号：50398278

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）と同一で、血管内皮細胞の遊走刺激活性を有し、低酸素で誘導されるアポトーシスに対し抵抗性を賦与する。これまでに我々は、TP およびその基質であるチミジンの分解産物の2-デオキシ-D-リボースが、低酸素下で hypoxia-inducible factor 1 alpha（HIF-1 $\alpha$ ）のユビキチン化を促進することにより発現レベルを低下させることを見出している。本研究では、低酸素下での2-デオキシ-D-リボースによる HIF-1 $\alpha$  の分解促進反応の分子機構を明らかにすることを目的として実験を行った。HIF-1 $\alpha$  と von-Hippel Lindau 癌抑制遺伝子（pVHL）の結合に2-デオキシ-D-リボースが与える影響を調べるために細胞に HIF-1 $\alpha$  と pVHL を強制発現させた後、細胞抽出液を採取し、pVHL の抗体で免疫沈降後、HIF-1 $\alpha$  の抗体でイムノブロット解析を行ったところ、2-デオキシ-D-リボースは、低酸素下での HIF-1 $\alpha$  と pVHL の結合を強めていることが判明した。さらに、プロリン水酸化酵素（PHD）は、主に3種類（PHD1/2/3）存在しており、2-デオキシ-D-リボースが PHD1/2/3 の発現に与える影響を RT-PCR 法で検討したところ、PHD1/2/3 の発現には影響を与えていなかった。次に、HIF-1 $\alpha$  と PHD2 の結合に2-デオキシ-D-リボースが与える影響を調べるために、HL-60 細胞を2-デオキシ-D-リボースで処理し、正常酸素下および低酸素下で培養し、HIF-1 $\alpha$  の抗体で免疫沈降後、PHD2 の抗体でイムノブロット解析を行ったところ、2-デオキシ-D-リボースは、低酸素下での HIF-1 $\alpha$  と PHD2 のタンパク質の結合を強めていることが判明した。HIF-1 $\alpha$  と pVHL、HIF-1 $\alpha$  と PHD2 との結合を2-デオキシ-D-リボースがどのような分子機序で亢進するのか、さらなる探求が必要である。

研究成果の概要（英文）：An angiogenic factor, platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase (PD-ECGF/TP), stimulates the chemotaxis of endothelial cells and confers resistance to apoptosis induced by hypoxia. TP and 2-deoxy-D-ribose, a degradation product of thymidine generated by TP enzymatic activity, inhibited the upregulation of hypoxia-inducible factor (HIF) 1 $\alpha$  induced by hypoxia. We investigated the molecular basis for the suppressive effect of TP and 2-deoxy-D-ribose on the upregulation of HIF-1 $\alpha$ . 2-Deoxy-D-ribose enhanced interaction of HIF-1 $\alpha$  and pVHL under hypoxic condition. 2-Deoxy-D-ribose did not affect the expression of *HIF-1 $\alpha$* , *prolyl hydroxylase (PHD)1/2/3* and *VHL* mRNA. 2-Deoxy-D-ribose also enhanced interaction of HIF-1 $\alpha$  and PHD2 under hypoxic condition. Further study is needed to elucidate the mechanism about the augmented interaction of HIF-1 $\alpha$  with pVHL and PHD2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			

2006年度			
2007年度			
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：Thymidine Phosphorylase, 2-Deoxy-D-ribose, Hypoxia-inducible factor -1

### 1. 研究開始当初の背景

チミジンホスホリラーゼ (TP) は、ピリミジンスクレオシド代謝に関与する酵素であり、チミジンとチミンの間の変換を触媒する酵素である (図 1)。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) と同一であり、その血管新生には TP の酵素活性が必須であることが判明している。また、TP は広範な腫瘍で隣接正常組織と比較して発現が亢進しており、その発現のメカニズムや TP の腫瘍増殖への関与については不明な点が多い。最近、我々は、TP が低酸素で誘導されるアポトーシスを抑制することを見出している (図 2)。また、TP の基質であるチミジンの分解産物中の 2-デオキシ-D-リボースは低酸素で誘導されるアポトーシスに対して抵抗性を賦与する。さらに、腫瘍における TP の発現は、血管新生とは独立した予後因子と考えられており、このことは TP が血管新生以外の働きを有することを意味する。しかしながら、TP が低酸素で誘導される詳細な機構および TP や 2-デオキシ-D-リボースが低酸素誘導性のアポトーシスを回避する機構については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

低酸素誘導性のアポトーシス機構を解明するとともに、TP および 2-デオキシ-D-リボースが低酸素で誘導されるアポトーシスを回避するメカニズムの解明を目指す。我々は、TP およびその基質であるチミジンの分解産物の 2-デオキシ-D-リボースが低酸素下で hypoxia-induced factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) のユビキチン化を促進することにより発現レベルを抑制すること、および HIF-1 の下流のアポトーシス促進に関わる BNIP-3 の発現を抑制することを見出している。HIF-1 $\alpha$  の分解は、プロリン水酸化酵素 (PHD) によって、HIF-1 $\alpha$  の酸素依存性分解ドメインのプロリンが水酸化することに基づく。プロリンが水酸化された HIF-1 $\alpha$  は、E3 ユビキチンリガーゼの構成分子である von-Hippel Lindau 癌抑制遺

伝子 (pVHL) と結合して、ユビキチンプロテアソームのシステムで速やかに分解される。2-デオキシ-D-リボースが HIF-1 $\alpha$  と pVHL の結合、PHD 活性に及ぼす影響を調べることによって、HIF-1 $\alpha$  のユビキチン化促進反応の分子機構を明らかにできる可能性が高い。

### 3. 研究の方法

- (1) ヒト白血病 HL-60 細胞に 2-デオキシ-D-リボースを加えて、低酸素下での HIF-1 $\alpha$  タンパク質レベルをイムノブロット法で解析した。
- (2) HL-60 細胞に 2-デオキシ-D-リボースを加えて、正常酸素下および低酸素下での HIF-1 $\alpha$ 、PHD および VHL の発現を RT-PCR 法で解析した。
- (3) 正常酸素および低酸素下で HIF-1 $\alpha$  と pVHL を癌細胞に強制発現させた後、プロテアソーム阻害剤である MG-132 を加え、2-デオキシ-D-リボース存在下、非存在下で培養する。培養後、HIF-1 $\alpha$  の抗体で免疫沈降し、pVHL の抗体でイムノブロット解析を行い、2-デオキシ-D-リボースが、HIF-1 $\alpha$  と pVHL の結合に与える影響を調べた。
- (4) 正常酸素および低酸素下で、2-デオキシ-D-リボース存在下、非存在下で培養した。24 時間培養後、細胞の抽出液を用い HIF-1 $\alpha$  の抗体で免疫沈降し、PHD2 の抗体でイムノブロット解析を行った。

### 4. 研究成果

HL-60 細胞を低酸素条件下で培養すると HIF-1 $\alpha$  が誘導され HIF-1 $\beta$  とヘテロ二量体 (HIF-1) を形成する。この HIF-1 は低酸素下におけるアポトーシスの誘導や血管新生因子 VEGF や解糖系酵素などの標的遺伝子の発現を介して細胞や組織の低酸素応答において中心的役割を果たしている。

我々は、チミジンホスホリラーゼおよびその分解産物である 2-デオキシ-D-リボースが低酸素下で HIF-1 $\alpha$  のユビキチン化を促進

することにより HIF-1 $\alpha$ 発現レベルを低下させることを見出している。HIF-1 $\alpha$ の分解は、PHDによって、HIF-1 $\alpha$ の酸素依存性分解ドメインのプロリンが水酸化することに基づく。プロリンが水酸化された HIF-1 $\alpha$ は、ユビキチンリガーゼである pVHL と結合して、ユビキチンプロテアソームのシステムで速やかに分解される。低酸素下での 2-デオキシ-D-リボースによる HIF-1 $\alpha$ のユビキチン化促進反応の分子機構を明らかにすることを目的として実験を行った。HL-60 細胞を 2-デオキシ-D-リボースで処理後、低酸素下での HIF-1 $\alpha$ タンパク質レベルをイムノブロット法で検討したところ 2-デオキシ-D-リボースの添加によって HIF-1 $\alpha$ の発現が減少した(図3)。次に、HL-60 細胞を 2-デオキシ-D-リボースで処理して、正常酸素下および低酸素下での HIF-1 $\alpha$  mRNA の発現を RT-PCR 法で検討したところ HIF-1 $\alpha$ の発現には影響を与えていなかった(図4)。また、HIF-1 $\alpha$ と pVHL の結合に 2-デオキシ-D-リボースが与える影響を調べるために、COS 細胞に、HIF-1 $\alpha$ と pVHL を強制発現させた後、プロテアソーム阻害剤である MG-132 を添加し、2-デオキシ-D-リボース存在下、低酸素下で5時間培養した。細胞抽出液を採取し、pVHL の抗体で免疫沈降後、HIF-1 $\alpha$ の抗体でイムノブロット解析を行ったところ、2-デオキシ-D-リボースは HIF-1 $\alpha$ と pVHL の結合を強めていることが判明した(図5)。さらに、2-デオキシ-D-リボースが VHL の発現に影響を与えるかどうか RT-PCR 法で検討したところ、VHL の発現には影響を与えていなかった(図6)。

PHD は、主に3種類 (PHD1/2/3) 存在しており、2-デオキシ-D-リボースが PHD1/2/3 の発現に影響を与えるかどうか RT-PCR 法で調べたところ、PHD1/2/3 の発現には影響を与えていなかった(図6)。次に、HIF-1 $\alpha$ と PHD2 の結合に 2-デオキシ-D-リボースが与える影響を調べるために、HL-60 細胞を 2-デオキシ-D-リボースで処理し、正常酸素下および低酸素下で培養した。細胞抽出液を採取し、HIF-1 $\alpha$ の抗体で免疫沈降後、PHD2 の抗体でイムノブロット解析を行った。その結果、2-デオキシ-D-リボースは、低酸素下での HIF-1 $\alpha$ と PHD2 の結合を強めていることが判明した(図7)。

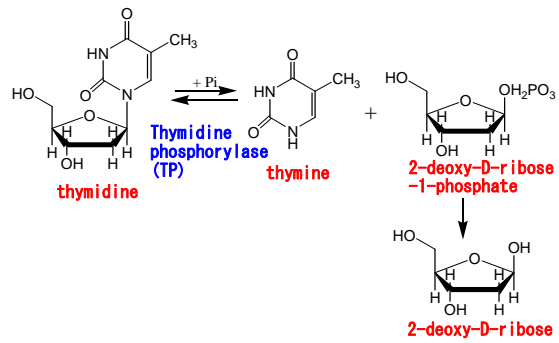


図1(TP はチミジンからチミンへの変換を触媒する)

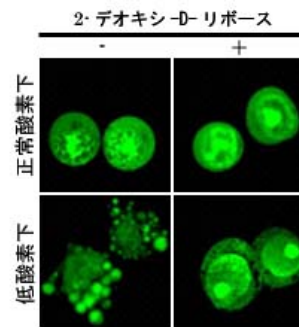


図2(低酸素下での細胞の形態変化)

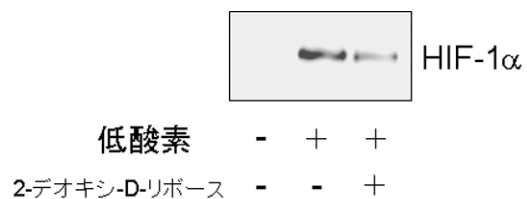


図3(2-デオキシ-D-リボースの HIF-1 $\alpha$  タンパク質レベルに及ぼす影響)

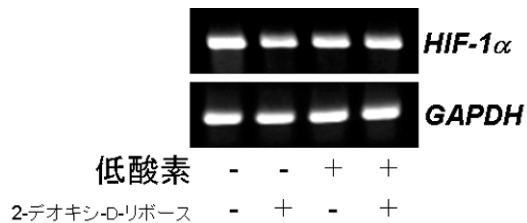
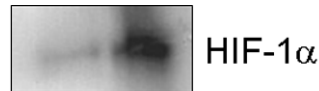


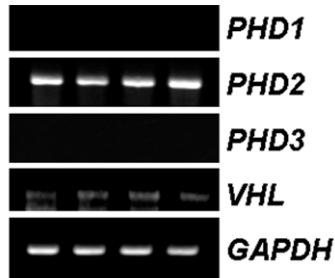
図4(2-デオキシ-D-リボースの HIF-1 $\alpha$  mRNA の発現に及ぼす影響)



低酸素 + +

2-デオキシ-D-リボース - +

図 5 (2-デオキシ-D-リボースの pVHL と HIF-1αの結合に及ぼす影響)



低酸素 - - + +

2-デオキシ-D-リボース - + - +

図 6 (2-デオキシ-D-リボースの PHD1, PHD2, PHD3, VHL mRNA の発現に及ぼす影響)



低酸素 - - + +

2-デオキシ-D-リボース - + - +

図 7 (2-デオキシ-D-リボースの PHD2 と HIF-1αの結合に及ぼす影響)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

(1) Miyawaki, A., Ikeda, R., Hijioka, H., Ishida, T., Ushiyama, M., Nozoe, E., Nakamura, N., SUVmax of FDG-PET correlates with the effects of neoadjuvant chemoradiotherapy for oral squamous cell carcinoma, *Oncol. Rep.*, **23**, 1205-1212, 2010.

(2) Matsushita, S., Ikeda, R., Nishizawa Y., Che X. F., Furukawa T., Miyadera K., Tabata S., Ushiyama M., Tajitsu Y., Yamamoto M., Takeda Y., Minami K., Mataka H., Kanzaki, T., Yamada K., Kanekura T., Akiyama S., The role of thymidine phosphorylase in the induction of early growth response protein-1 and thrombospondin-1 by 5-fluorouracil in human cancer carcinoma cells, *Int. J. Oncol.*, **36**, 1193-1200, 2010.

(3) Iwashita K., Ikeda R., Takeda Y., Sumizawa T., Furukawa T., Yamaguchi T. and Akiyama S.,

Yamada K., Major vault protein forms complexes with hypoxia-inducible factor (HIF)-1α and reduces HIF-1α level in ACHN human renal adenocarcinoma cells, *Cancer Sci.*, **101**, 920-926, 2010.

(4) Ushiyama, M., Ikeda, R., Yamaguchi, H., Miyawaki, A., Nitta, T., Yamaguchi, T., Matsumoto, K., Shimodouzono, Y., Furukawa, T., Akiyama, S., Nakamura N., Yamada, K., Adverse effects of superselective intra-arterial infusion chemotherapy in patients with oral cancer, *Journal of Applied Therapeutic Research*, **7**, 58-64, 2009.

(5) Ushiyama, M., Ikeda, R., Nitta, T., Tazitsu, Y., Miyawaki, A., Nishizawa, Y., Yamaguchi, T., Yamaguchi, H., Akatsuka, C., Shimodouzono, Y., Ushinohama, K., Sugawara, H., Sugihara, K., Nakamura, N., Takeda, Y., Yamada, K., Stability of hospital preparations of Azunol Water Gargles for pain relief in oral cancer patients with oral mucositis, *Cancer Therapy*, **7**, 277-281, 2009.

(6) Ayukawa, O., Nakamura, K., Kariyazono, H., Ikeda, R., Arima, J., Shinkawa, T., Iwase, H., Sakata, R., Yamada, K., Enhanced platelet responsiveness due to chilling and its relation to CD40 ligand level and platelet-leukocyte aggregate formation, *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **20**, 176-184, 2009.

(7) Oiso, S., Takeda, Y., Futagawa, T., Miura, T., Kuchiiwa, S., Nishida, K., Ikeda, R., Kariyazono, H., Watanabe, K., Yamada, K., Contactin-associated protein (Caspr) 2 interacts with carboxypeptidase E in the CNS, *J. Neurochem.*, **109**, 158-167, 2009.

(8) Furukawa, T., Komatsu, M., Ikeda, R., Tsujikawa, K., Akiyama, S., Copper transport systems are involved in multidrug resistance and drug transport, *Curr. Med. Chem.*, **15**, 3268-3278, 2009.

(9) Zhao, H.Y., Ooyama, A., Yamamoto, M., Ikeda, R., Haraguchi, M., Tabata, S., Furukawa, T., Che, X.F., Iwashita, K., Oka, T., Fukushima, M., Nakagawa, M., Ono, M., Kuwano, M., Akiyama, S., Down regulation of c-Myc and induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU in human colon cancer KM12C cells, *Cancer Lett.*, **270**, 156-163, 2008.

(10) Zhao, H.Y., Ooyama, A., Yamamoto, M., Ikeda, R., Haraguchi, M., Tabata, S., Furukawa,

T., Che, X.F., Zhang, S., Oka, T., Fukushima, M., Nakagawa, M., Ono, M., Kuwano, M., Akiyama, S., Molecular basis for the induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-fluorouracil, *Cancer Res.*, **68**, 7035-7041, 2008.

(11) Ikeda, R., Iwashita, K., Sumizawa, T., Beppu, S., Tabata, S., Tajitsu, Y., Shimamoto, Y., Yoshida, K., Furukawa, T., Che, X.F., Yamaguchi, T., Ushiyama, M., Miyawaki, A., Takeda, Y., Yamamoto, M., Zhao, H.Y., Shibayama, Y., Yamada, K., Akiyama, S., Hyperosmotic stress up-regulates the expression of major vault protein in SW620 human colon cancer cells, *Exp. Cell Res.*, **314**, 3017-3026, 2008.

〔学会発表〕(計 16 件)

(1) 西澤由紀彦、池田龍二、田實裕介、俣木博徳、武田泰生、古川龍彦、牛山美奈、山口辰哉、車暁芳、山本雅達、松下茂人、秋山伸一、山田勝士、チミジンホスホリラーゼ発現腫瘍での5-fluorouracil (5-FU) によるearly growth response factor-1 (EGR-1)発現誘導、第26回日本薬学会九州支部大会、2009年12月12日、九州大学大学院薬学研究院(福岡市)

(2) 田實裕介、池田龍二、岩下健一、田畑祥、西澤由紀彦、山口辰哉、牛山美奈、山本雅達、車暁芳、古川龍彦、武田泰生、秋山伸一、山田勝士、高浸透圧によって誘導される major vault protein (MVP) の発現亢進機構の解明、第62回日本薬理学会西南部会、2009年11月27日、リジェール松山(松山市)

(3) 岩下健一、池田龍二、武田泰生、住澤知之、古川龍彦、山口辰哉、秋山伸一、山田勝士、RNA-タンパク質複合体vaultはヒト腎癌由来細胞株ACHN細胞においてhypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )と結合し、そのユビキチン依存的な分解を促進する、第62回日本薬理学会西南部会、2009年11月27日、リジェール松山(松山市)

(4) 古川龍彦、池田龍二、小松正治、秋山伸一、Gemcitabine 耐性細胞でのCNT1、RRM1の発現変化、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月3日、パシフィコ横浜(横浜市)

(5) 田畑祥、山本雅達、池田龍二、古川龍彦、車暁芳、新里能成、南謙太郎、向田直史、武田泰生、山田勝士、秋山伸一、チミジンホスホリラーゼによるNF- $\kappa$ Bの活性化機構、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月3日、パシフィコ横浜(横浜市)

(6) 大磯茂、池田龍二、中村和男、武田泰生、秋山伸一、山田勝士、咽頭がん細胞KCP-4のシスプラチン耐性機序の解明、日本薬学会第129回年会、2009年3月28日、国立京都国際会館(京都市)

(7) 牛山美奈、池田龍二、宮脇昭彦、田實裕介、西澤由紀彦、山口辰哉、中村典史、武田泰生、山田勝士、口腔癌治療における抗がん剤感受性試験の取り組み、日本薬学会第129回年会、2009年3月28日、国立京都国際会館(京都市)

(8) 田實裕介、池田龍二、岩下健一、武田泰生、田畑祥、西澤由紀彦、牛山美奈、山口辰哉、山本雅達、車暁芳、古川龍彦、秋山伸一、山田勝士、高浸透圧によるMajor Vault Protein (MVP) の発現亢進機構、第82回日本薬理学会年会、2009年3月17日、パシフィコ横浜(横浜市)

(9) 古川龍彦、池田龍二、小松正治、秋山伸一、銅輸送体ATP7A・核酸輸送体CNTの関する抗癌剤耐性、第82回日本薬理学会年会、2009年3月16日、パシフィコ横浜(横浜市)

(10) 池田龍二、吉田健一、武田泰生、井ノ上逸朗、山田勝士、骨芽細胞分化におけるPLZFの機能的関与、第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2008年12月20日、京都大学薬学部記念講堂(京都市)

(11) 松下茂人、池田龍二、奥村浩、秋山伸一、金蔵拓郎、P53R2標的siRNAは悪性黒色腫の腫瘍増殖を抑制して抗癌剤感受性を高める、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月28日、名古屋国際会議場(名古屋市)

(12) 田畑祥、山本雅達、池田龍二、古川龍彦、車暁芳、趙紅業、王嘉、向田直史、武田泰生、山田勝士、秋山伸一、チミジンホスホリラーゼ発現腫瘍細胞におけるNF- $\kappa$ Bを介したIL-8の発現亢進機構、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月29日、名古屋国際会議場(名古屋市)

(13) 趙紅業、大山明雄、山本雅達、池田龍二、原口みさ子、田畑祥、古川龍彦、車暁芳、岡俊範、福島正和、小野真弓、桑野信彦、秋山伸一、ヒト大腸癌における5-FUによる血管新生阻害因子TSP-1の誘導、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月29日、名古屋国際会議場(名古屋市)

(14) 古川龍彦、小松正治、池田龍二、秋山伸一、膀胱癌細胞株 MIAPaCa-2 由来 Gemcitabine 耐性細胞の耐性機構の解析、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋国際会議場（名古屋市）

(15) 車暁芳、鄭春雷、古川龍彦、山本雅達、王嘉、池田龍二、有馬直道、秋山伸一、survivin ペプチド(89-104 アミノ酸) による ATL 細胞のアポトーシス誘導、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋国際会議場（名古屋市）

(16) 王嘉、車暁芳、大山明雄、山本雅達、古川龍彦、池田龍二、鄭春雷、蓮井和久、岡俊範、秋山伸一、低酸素によるヒト線維芽細胞での PGIS の高発現、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋国際会議場（名古屋市）

〔図書〕（計 1 件）

(1) Ikeda, R., Yoshida, K., Inoue, I., Roles of PLZF and FAZF in osteoblast differentiation, Focus on Zinc Finger Protein Research, 293-301, 2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 龍二 (IKEDA RYUJI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・薬剤師

研究者番号：50398278