

論文要旨

Molecular basis for the involvement of thymidine phosphorylase in cancer invasion

〔 癌の浸潤における *thymidine phosphorylase* の分子生物学的役割 〕

五反田 丈徳

【序論および目的】 癌の浸潤にはさまざまな因子が複雑に絡み合っており、*matrix metalloproteinase family* (MMPs)も、その一つである。MMP-1,MMP-2,MMP-3,MMP-9 は膀胱癌での浸潤や悪性度、予後との相関があり、MMP-2 の前駆体を活性化する MT1-MMP もまた、その関与を指摘されている。uPA も基底膜や細胞外膜での蛋白分解酵素として、病期等との相関があり、VEGF は血管新生因子の重要な mediator として知られている。TP の発現レベルは、さまざまな癌での浸潤への関与を指摘されている。今回我々は、TP が、浸潤に影響を与える遺伝子の発現レベルを制御するかどうかを、72 の膀胱癌症例において 10 個の浸潤関連遺伝子とその他の 2 個の遺伝子について real-time PCR を用いて検索し、TP の発現レベルが uPA,MMP-1,MMP-9,PAI-1,そして VEGF と相関し、膀胱癌のセルラインにおいて、TP 高発現株がハイポキシックな環境で MMP-7 と MMP-9 を強発現していることを提示した。

【材料および方法】

患者背景；1996年3月から2000年の4月までに経尿道的膀胱腫瘍切除術、または膀胱全摘除術を施行された72症例。

RNA抽出；Total RNAをTrizolのプロトコールに従い抽出。抽出されたRNAはRNeasy kitを用いて精製し50 μ lのRNase-freeの蒸留水に溶出した。RNA量は光学的に定量を行った。

Real-time PCRによる定量；全ての定量は、ABI PRISM-7900HTを用いて行った。プローブの蛍光標識のemissionをとらえることで定量化した。mRNAのハウスキーピングジーンとしてGAPDHによるノーマライゼーションも同時に行った。

細胞株と低酸素；ATCCにて購入した前立腺癌株PC-3にTP/PD-ECGFを強制発現させたPC/TPとコントロールのPC/CV株を樹立。膀胱癌株KK47の強制発現株KK/TPとKK/CVも同様に樹立した。

TP活性；酵素活性に関しては分光測光法と放射線測光法にて測定した。分光測光法では、セルライセートをthymidineと1時間インキュベーションして300nmの吸光度計にて定量。放射線測光法は[¹⁴C]-thymidineから[¹⁴C]-thymineへの変換を測定する。

【結果】

膀胱癌におけるTPとその他の遺伝子発現；72例の膀胱癌のmRNAレベルでの発現比較を浸潤癌と表在癌で行った。表在癌と比較して浸潤癌ではTP,MMP-2,MMP-9,uPAが有意に高値で、単変量のロジスティック解析でも意差を認めた。しかしながら、多変量を解析を行うと、TPのみが有意に浸潤癌で高値であると思われた。

TP とその他の遺伝子発現比較 ; それぞれの遺伝子と TP とを Spearman's test で比較したところ、uPA, MMP-1, MMP-9, MMP-7, PAI-1, DPD, VEGF に相関を認めた。TS との相関は認めなかった。

TP 強制発現による膀胱癌株 KK47 での浸潤関連因子 ; TP により他の浸潤関連因子の変化が付与される可能性が提起されたため、膀胱癌株 KK47 に TP を強制発現させた株を樹立した。KK/TP1, KK/TP2 は、コントロールベクターの KK/CV1, KK/CV2 に比べて発現とその TP 活性は有意に高値であった。低酸素下での CV 株と TP 発現株の浸潤関連因子を real-time PCR で比較したところ、MMP-7 (Fig. 3a) と MMP-9 において TP 発現株のほうが発現誘導されていた。MMP-2 に関しては、低酸素下・正常濃度酸素下でも誘導を認めなかった。TP 活性と浸潤関連因子発現レベル ; 次に我々は、遺伝子発現誘導に TP 活性が必要かどうかをチェックするため、TP のインヒビターである TPI による影響をみた。KK/TP2 を TPI 100 μ M で 24 時間インキュベーションしたところ、CV 株と比較しても TP 活性は大いに抑えられた。そこで、MMP-9 の発現を TPI 処理のものと比較定量したが、低酸素下・正常酸素濃度下とも変化はなかった。前立腺癌株 PC-3 での浸潤関連因子の誘導 ; 前立腺癌はホルモン依存性の腺癌で、膀胱癌とはその性質を異にするものである。そこで、我々は前立腺癌株 PC-3 を用いて、発現誘導を比較した。PC-3 においては、MMP-1 と MMP-7 の発現レベルに CV 株との有意差を認めた。

【結論及び考察】膀胱癌の浸潤はいくつかの因子により調節されていることが最近の文献で報告されている。これらの因子は癌の悪性度や、望まざる予後を引き起こす原因となっている。さまざまな浸潤関連遺伝子が、ユビキタスに発現していることは、多くのステップを踏んで膀胱癌が浸潤していくであろうことを提起している。しかしながら、それら個々の因子がそれぞれどういった関連性を持ってその役割を果たしているのかははっきりしていない。以前の文献で報告されているように我々の結果でも、いくつかの因子が浸潤性の膀胱癌で強発現していた。それらの因子を複数の発現レベルで比較したところ、TP が最も浸潤度との相関をみるものであった。これは、膀胱癌において TP が浸潤のリスクファクターとして大きな役割を果たしていることを示唆するものであり、他の因子とも有意に相関を認めていた。

我々のデータでは、低酸素下ではあるが TP が MMP-7 や MMP-9 の発現誘導を行っていることが、その一つのメカニズムとして浸潤を制御する可能性を示唆しており、多くの癌の微小環境で起こる低酸素条件下で TP が大きな役割を果たしているものと思われた。今回提示していないが、TP 発現株は Akt 活性がモックと比較して増強していた。PI-3K や Akt は AP-1 のメディエーターであり、MMP-7, MMP-9, MMP-1 の転写開始点の上流には AP-1 サイトがあり、AP-1 サイトは uPA や VEGF の転写開始点の上流にも存在している。しかしながら、MMP-2 にはそれが欠如していることが知られている。活性型 Akt により誘導された AP-1 は浸潤関連因子に影響を与えると思われる、もしくは Akt が転写因子である NF- κ B を活性化してワイドレンジな遺伝子を調節している可能性もある。MMP-9 は NF- κ B のバインディングサイトをそのプロモーター領域に持ち、NF- κ B 依存的に発現すると言われている。したがって、TP は Akt を通じて MMP 群を調節しているのかもしれない。低酸素状態では、ハイポキシアレスポンスシグナルが活性化される。これらは、VEGF や HIF-1 α といった遺伝子産物を介して周辺環境によるアポトーシスに対するサバイブに寄与している。TP が癌の浸潤において果たす正確な役割はまだまだ解明されたわけではないが、個々の癌で MMP 群の発現を上昇させているらしく、TP の発現を抑えることで抗がん剤としての可能性がひらけるものと考えられる。

今回我々は、膀胱癌での浸潤関連因子を RNA レベルで測定し、TP 発現株での遺伝子発現を調べた。TP シグナルの謎を解明していくことで、癌治療への応用への道が開けていくことが今後期待される。

論文審査の要旨

報告番号	医研第 658 号	氏名	五反田 丈徳
審査委員	主査	竹内 亨	
	副査	小賤 健一郎	出雲 周二

Molecular basis for the involvement of thymidine phosphorylase in cancer invasion

(癌の浸潤における thymidine phosphorylase の分子生物学的役割)

癌の浸潤にはさまざまな因子が複雑に絡み合っており、浸潤の過程において細胞外マトリックスの分解を行う matrix metalloproteinase family (MMPs) や vascular endothelial growth factor (VEGF) などの血管新生因子も重要な mediator として知られている。

今回著者らは、thymidine phosphorylase (TP) が浸潤関連遺伝子の発現レベルに影響を与えるかどうかを、膀胱癌 72 症例の摘出癌組織において 10 種類の浸潤関連遺伝子とその他 2 種類の遺伝子について real-time PCR を用いて検索した。さらに TP 高発現膀胱癌細胞株での浸潤関連因子の発現誘導の有無についても解析した。

72 例の膀胱癌において各遺伝子の mRNA レベルでの発現比較を浸潤癌と表在癌で行った。表在癌と比較して浸潤癌では TP, MMP-2, MMP-9, urokinase-type plasminogen activator (uPA) が有意に高値で、単変量のロジスティック解析でも有意差を認めた。しかしながら、多変量を解析を行うと、TP のみが有意に浸潤癌で高値であった。

それぞれの遺伝子と TP との関連性を Spearman's test で解析したところ、uPA, MMP-1, MMP-9, MMP-7, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), VEGF に相関を認めた。

TP による浸潤関連因子の制御の有無を確認するため、膀胱癌株 KK47 に TP を強制発現させた株を樹立した。低酸素条件下で control vehicle KK47 (CV) 株と TP 発現 KK47 株の浸潤関連因子を real-time PCR で定量比較したところ、TP 発現株において MMP-7 と MMP-9 が発現誘導されていた。一方、MMP-2 に関しては、低酸素条件下・正常濃度酸素条件下でもそれらの発現誘導を認めなかった。

次に著者らは、遺伝子発現誘導に TP 活性が必要か否かを検討するため、TP のインヒビターである TPI による影響をみた。MMP-9 の発現を TPI 処理及び非処理で定量比較したところ、低酸素下・正常酸素濃度下とも変化を認めず、TPI 500 μ M でも同様の結果であった。

さらにさまざまな細胞系において TP が発現を調節している可能性を確認するため、前立腺癌株 PC-3 を用いて、TP を強制発現させた PC-3/TP と CV 株で発現誘導を比較した。PC-3/TP においては、MMP-1 と MMP-7 の発現レベルが CV 株に比べ有意に上昇していた。

本研究は、TP が複数の浸潤関連遺伝子の中でも膀胱癌の浸潤に強く関与することを示し、さらに TP が有用な予後規定因子となり得ることを明らかにしたもので臨床的にも意義深いものと考えられる。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 658 号	氏名	五反田 丈徳
審査委員	主査	竹内 亨	
	副査	小賤 健一郎	出雲 周二
<p>主査および副査の3名は、平成19年3月8日、学位請求者 五反田 丈徳 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) thymidine phosphorylase (以下 TP) の強制発現株における浸潤能を invasion assay などで確認したか？ 回答) 共同研究者である中島らの論文にてマウスを使った in vivo の系で、contral vehicle 株の KB/CV と強制発現株である KB/TP の腫瘍増殖能の差を認めている。また今回発表していないが、前立腺癌の強制発現株では invasion assay において浸潤度に差を認めている。</p> <p>質問2) TP は autocrine でがん細胞自体から出されているのか？ (回答) 以前の論文で、tumor-associated macrophage (以下 TAM) での強発現が免疫染色で確認されている。もちろんがん細胞自体からの発現も認められる。頸部腫瘍・前立腺癌・膀胱癌・胃癌等の cell line において免疫染色での発現が確認されている。</p> <p>質問3) 臨床検体では、腫瘍自体の TP 発現を反映していないのではないかと？ 回答) TAM での発現を一部反映している可能性はある。しかしながら検体は大部分が腫瘍組織であるので、腫瘍自体の TP 発現を反映しているものと考え。また臨床の場で検体の保存法などを考慮すると、laser micro dissection 等を使用するよりも今回のような採取方法が現実にはしているものと考え。</p> <p>質問4) 本論文では、TP 発現株での MMP の誘導を mRNA で確認しているが、活性等での確認はされているか？ 回答) 我々の過去の論文で MMP-9 等の誘導を ELISA で確認している。</p> <p>質問5) 検体の組織は、サンプル内の間質組織の影響を大きく受けていないか？ 回答) 表在癌の場合は間質組織が少なく腫瘍組織以外の影響は受けにくいと考えられるが、浸潤癌の場合は指摘の通り間質組織の影響を受ける可能性はある。</p> <p>質問6) TP が浸潤に関与しているのは angiogenesis によるものなのか。それとも、他の機序として具体的なものが考えられるか？ 回答) 浸潤には、血管新生やアポトーシス耐性・細胞外基質の関与など複雑に絡み合った要因が予想されるため、そのいずれもが寄与している可能性はあると考える。</p> <p>質問7) TP の酵素活性を inhibitor で抑えても、MMP の発現が control されないのはどういうメカニズムなのか？ 回答) 酵素活性以外の機序があると考えのが妥当だが、いくつかの inhibitor での検索を今後検討したい。</p> <p>質問8) TP の血管新生以外の役割は？ 回答) 最近、ミトコンドリア脳筋症の1つの type において、TP 活性が下がっていることが報告されており、ミトコンドリアの遺伝子異常に関与している可能性が示唆される。また、我々の教室にて hypoxia に対するアポトーシス耐性や、irradiation に対する耐性への関与等も確認されており、今後さらなる検討が必要と思われる。</p> <p>質問9) Real-time PCR を用いた data では、TP の発現が最も関与の強いものとなっているが、primer の設計による効率の差等の影響は考えられないか。 回答) 実際に検体を用いた測定の前に、検量線を用いてそれぞれの primer/molecule での効率を比較して、補正をかけている。また内因性コントロールとして GAPDH での normalization を施行した。</p>			

質問 10) microarray 等での発現の差などで、TP と浸潤との関連の報告はあるか？

回答) 我々の教室で行った microarray での検討では TP は上位に上がってきていない。しかしながら、それぞれの実験系には定量性や target の豊富さにおいて一長一短があり、両面からの検討が必要と考える。

質問 11) TP 以外に deoxy-D-ribose を生成する酵素は存在しないか？

回答) デオキシウリジンから、ウラシル・deoxy-D-ribose への変換を、デオキシウリジンホスホリラーゼが介することが報告されているが、癌での強発現の報告は無い。

質問 12) TP の活性測定を、吸光度 300nm で確認しているが、thymine を確認するには適さないのではないか？

回答) Deoxy-D-ribose が ROS との反応により、thiobarbituric acid (TBA) となる現象を利用した活性測定を用いており、吸光度 300nm での確認は妥当と考える。

質問 13) Multivariate で統計処理をした意義は？

回答) 今回 real-time PCR で測定した molecule は、膀胱癌において既に浸潤との関与が示唆されたものを選択しているが、MMP-2 を MMP-14 が active form に変換するのに代表されるように、個々の molecule がそれぞれ、影響（協調的に）している事が予想されるため、それぞれの factor への影響を除外して検索する事を目的とした。

質問 14) TP は、もともとがん細胞に強発現しているものなのか、それとも、浸潤の過程で獲得していく形質の一部なのか？

回答) 病理学的には TP 発現の低い腫瘍は高いものと比較して、浸潤性の膀胱癌へと進行する割合が有意に低いことが報告されており、TP は獲得された形質ではなく、もともと強発現しているものが浸潤性の膀胱癌に移行するものと考え。今後、今回の研究の対象となった症例を prospective に検討していきたい。

質問 15) In vitro の系で、hypoxia 下に実験しているのはなぜか？

回答) 腫瘍の中心部は pH が 5.0 程度まで下がっていることや、かなりの hypoxia になっていることが報告されている。本実験では通常培養での実験も行っているが、嫌氣的条件での TP 誘導が確認された。機序としては、他の酵素が pH 7.4 程度で最も酵素活性を持つのに比較して、TP 活性が in vitro の系では pH 5.0 に近い条件で最も酵素活性が高いことがあげられる。

質問 16) パウチによる嫌氣的条件での培養では、どの程度の低酸素状態となるか？

回答) 酸素濃度 1% 以下で、二酸化炭素濃度 5% 前後という低酸素状態に 1 時間以内に到達することがプロトコルに記載されている。

質問 17) TP の強制発現を knock down したものでの実験系は検討したか？

回答) 大変興味のある suggestion であり今後の課題としたい。

質問 18) TP の receptor は存在するのか？

回答) 当研究室で two-hybrid assay での検討も試みたが、現在のところ見つかっていない。基本的に血管新生に関しては、その代謝産物である deoxy-D-ribose が主体となっており TP 自体の receptor は関与していないものと考えている。

質問 19) AP-1 等の binding site への結合を、gel shift assay などで確認はしたか？

回答) 大変興味のある suggestion であり今後の検討としたい。

質問 20) TP の血中レベルでの測定は可能か？また、腫瘍マーカーとしての可能性は？

回答) TP は、platelet derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) と同一であることが報告されており、血小板中やマクロファージを含んだ血中で測定するのは難しいと思われる。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。