

論文要旨

Induction of thymidine phosphorylase expression by AZT contributes to enhancement of 5'-DFUR cytotoxicity

〔 AZT によるチミジン・ホスホリラーゼ発現の誘導は
5'-DFUR の細胞毒性の増強に寄与する 〕

恒吉研吾

【序論および目的】

Thymidine phosphorylase (TP)はthymidineをthymineと2'-deoxy-D-ribose-1-phosphateにリン酸エステル化する酵素でその代謝産物である2-deoxy-D-ribose は血管新生を有することで知られている。またTPは5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR)を5-fluorouracil (5FU)と5'-deoxy-D-ribose-1-Pに変換し、さらに2'-deoxyribose-1-Pを5FUに移行し5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdUrd)を産生する酵素として重要な働きをしているため、TPが強く発現している腫瘍では、カペシタビン、テガフル、5'DFURなどのfluoropyrimidine系の抗癌剤の感受性が増加することが報告されている。TPはまた、mitomycin C (MMC), cyclophosphamide (CPM), tamoxifen, paclitaxel, docetaxelなどの抗腫瘍薬、X-ray、またはIL-1 α , TNF- α , IFN- α , IFN- γ などのサイトカインにより発現が増加することが知られ、それらのagentはfluoropyrimidine系抗癌剤の細胞毒性を増加させることが報告されている。また抗HIV薬であるAZT (3'-Azido 3'-deoxy thymidine)はthymidine analogで元来は抗腫瘍薬として開発され、ヒトリンパ球でthymidine kinase (TK)を阻害しdeoxythymidine triphosphate (dTTP)の細胞内プールを減少させることがわかっている。5FUはTSを阻害することによりde novo 経路でのdTTP合成を阻害するため、AZTと5FUの併用は相乗的に細胞毒性を増加させることが知られている。以前、我々はthymidineによるTP誘導を報告しており、抗HIV剤であるAZT (3'-Azido 3'-deoxythymidine), d4T(2',3'-Didehydro-3'-deoxythymidine), 3TC (β -L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine), ddC(2',3'-dideoxycytidine)などのpyrimidine nucleoside analogが同様にTPを誘導するかどうか、また誘導された場合5'DFURとの併用でより強い細胞毒性を生じるかどうか検討した。

【材料および方法】

1. 細胞株：ヒト単球様細胞株 U937 は 10% FBS を添加した RPMI1640 培地で培養した。
2. イムノブロット法：thymidine analog 添加による TP 発現実験では 1×10^7 個の U937 cell を dish に撒き、各薬剤添加 48h 後、蛋白分画を抽出し SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後 PVDF 膜に転写し、3% skim milk でブロックした。1000 倍希釈の抗 TP 抗体と overnight で反応させた後、二次抗体 (rabbit polyclonal IgG) を室温 1h で反応させ、TP 発現を検出した。TP 酵素活性測定法:抽出蛋白と tris-HCL, Sodium phosphate, ^{14}C -thymidine, cold-Thymidine を混合し 37°C 1 時間 incubation 行い、Scintirator counter にて測定した。
4. プロモーターアッセイ法：AZT による転写レベルでの TP gene の発現は、luciferase gene の上流に TP-promoter を融合させた TP-luciferase reporter gene 5 μ M と、pRL-CMV

vector 10 ng を U937 に co-transfect し AZT 添加 12h 後 ルミノメーターで測定した。INF- γ は positive control として用いた。

5. real-time RT-PCR 法 : AZT 添加による TP, thymidylate synthase (TS), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の mRNA レベルでの発現は PRISM 7900HT を用いて測定した。 1×10^7 個に調整した U937 cell を dish に撒き、AZT (0, 20, 100, 300 μ M) を 24h 添加したあと total RNA を TRIzol reagent キットを用いて抽出した。1 μ g の RNA を cDNA に逆転写し PCR を行った。ヒト GAPDH を基準に定量化した。
6. 細胞傷害実験 : U937 を 2×10^6 個に調整 AZT (20, 100, 300 μ M), 5'-DFUR (10, 30 μ M), TP inhibitor (200 μ M) をそれぞれ添加または非添加の状態、48 時間培養した。Annexin V, PI 染色したものを FACS caliber flow cytometer を用いて apoptosis cell を測定した。
7. MTT アッセイ法 : U937 を 4×10^4 個に調整し、AZT, 5'-DFUR, TP inhibitor をそれぞれ添加または非添加の状態、48 時間培養した。その後、MTT を添加し生成された formazan を Micro Plate Reader で解析した。

【結果】

まず始めに抗 HIV 剤である AZT, d4T, 3TC, ddc などの pyrimidine nucleoside analog が U937cell において蛋白レベルで TP 発現を高めるかどうか western blot を行ったところ、無添加のコントロールと比べ、AZT (386%)、d4T (435%)、ddc (175%) で TP の誘導を認めた。それに対し 3TC は TP を誘導しなかった。次に 20, 100, 300 μ M の濃度で AZT を添加したところ濃度依存性に TP 蛋白発現の増加を認めた。同様に 20, 100, 300 μ M の濃度で AZT を添加、¹⁴C-thymidine を使用しオートラジオグラフィーを用いて TP の enzyme 活性を調べたところ TP 活性は AZT の濃度依存性に上昇しており AZT 300 μ M 添加においては control に比べ 3.23 倍の上昇を示した。このことから AZT によって誘導された TP は酵素活性を有していることが示唆された。次に mRNA レベルでの TP の誘導はどうか、U937 に AZT 20, 100, 300 μ M 添加 24h 後 real-time RT-PCR を用いて調べたところ、control に比べそれぞれ 1.43, 1.94, 2.41 倍の上昇を示した。AZT 20, 100, 300 μ M 添加による転写レベルでの TP gene の発現は濃度依存性に上昇しており、AZT 300 μ M 添加においては control に比べ 2.15 倍と有意に上昇を認めた。次に AZT (0, 20, 100, 300 μ M) と 5'-DFUR (0, 10 μ M) をそれぞれ併用して添加し、48H 後、apoptosis cell の割合を flowcytometer を用いて検討したところ、5'-DFUR 10 μ M 単独ではほとんど細胞毒性は認めないが、AZT (100, 300 μ M) との併用では apoptosis cell の割合が上昇した。5'-DFUR (300 μ M), AZT (80 μ M) それぞれ単独での cell 生存率は 81%, 80% であったが、併用することで 46% まで減少した。

【結論及び考察】

AZT はフルオロピリミジン系抗癌剤の de novo 経路阻害により、それらの agent との併用で抗腫瘍効果の増強があると言われている。今回 U937cell において AZT 添加により TP プロモーターの活性、TP の mRNA、TP 蛋白、TP 蛋白の酵素活性の上昇を認めた。AZT の TP プロモーター活性上昇のメカニズムは明らかでないが、STATs, NF- κ B, p53 などの転写因子などの可能性が考えられ、さらなる研究を必要とする。今回、AZT が TP 発現を誘導することが明らかになり、そのことが 5'-DFUR の細胞毒性を高めるメカニズムの 1 つである可能性が示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	医研第	646	号	氏名	恒吉 研吾
審査委員	主査	丸山 征郎			
	副査	米澤 傑		金蔵 拓郎	

Induction of thymidine phosphorylase expression by AZT contributes to enhancement of 5'-DFUR cytotoxicity

(AZTによるチミジン・ホスホリラーゼ発現の誘導は5'-DFURの細胞毒性の増強に寄与する)

Thymidine phosphorylase (TP)が強く発現している腫瘍では、カペシタビン、テガフル、5'-DFUR、5-FUなどの fluoropyrimidine 系の抗癌剤の感受性が増加することが知られている。また TP inducers と fluoropyrimidine 系の抗癌剤を組み合わせることで、抗腫瘍効果が増強することも知られている。本研究は、まず抗 HIV 薬である pyrimidine nucleoside analogue (AZT, d4T, 3TC, ddC)が TP を誘導するかどうか、また誘導した場合、fluoropyrimidine 系抗癌剤の細胞毒性が増強するかどうかを明らかにすることを目的としている。

ヒト単球様細胞株 U937 を使用し、AZT (20, 100, 300 μ M)添加後の TP 蛋白の発現をイムノブロット法で測定した。また、抽出蛋白と tris-HCL, sodium phosphate, 14C-thymidine, cold-thymidine を混合し 37 $^{\circ}$ C 1 時間 incubation 行った後、生成された 14C-thymine を薄層クロマトグラフィーによって分離し、その放射能をシンチレーションカウンターによって定量することにより、TP 活性を測定した。また AZT 添加 24h 後、real-time RT-PCR 法で TP の mRNA 発現を測定した。AZT による転写レベルでの TP gene の発現は、ホタル ルシフェラーゼ遺伝子上流に TP-promoter を組み込んだ TP-luciferase reporter gene 5 μ M と、ウミシイタケ ルシフェラーゼを発現する pRL-CMV vector 100 ng を U937 に共に遺伝子導入し、AZT 添加 12h 後 ルミノメーターで測定した。AZT と 5'-DFUR 併用実験では、Annexin V, PI 染色したものを FACS caliber flow cytometer を用いて apoptosis を起こしている細胞を定量した。また、細胞増殖能は MTT アッセイで解析した。

本研究で得られた新知見は次の3点である。

- ① U937 cell で、AZT による、酵素活性を有する TP 蛋白誘導を認めた。
- ② U937 cell で、AZT による、TP プロモーター活性の増強、転写レベルでの TP 発現増加を認めた。
- ③ AZT と、5'-DFUR の併用で抗腫瘍効果の増強を認めた。

以上から、5'-DFUR と AZT の抗腫瘍効果増強のメカニズムは、これまで知られているように、「AZT の salvage 経路の阻害と、fluoropyrimidine 系抗癌剤の de novo 経路の抑制のため、DNA 合成を相乗的に阻害する」ということの他に、「AZT による TP 酵素活性誘導」も、そのメカニズムの1つである可能性が示唆された。

本研究は、AZT による TP 酵素活性誘導を見出し、5'-DFUR との併用で抗腫瘍効果が増強することを明らかにした。他の pyrimidine nucleoside analog と fluoropyrimidine 系抗癌剤の併用でより多くの抗腫瘍効果を見出せる可能性を示し、癌化学療法の今後に大きく寄与する可能性がある。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	646	号	氏名	恒吉 研吾
審査委員	主査	丸山 征郎			
	副査	米澤 傑		金蔵 拓郎	
<p>主査および副査の3名は、平成19年2月2日、学位請求者 恒吉研吾 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 (TP)を発現している腫瘍は予後が悪いことで知られているが、TPは腫瘍細胞だけに発現しているのか？それとも細胞外基質にも発現しているのか？</p>					
<p>回答) TPは腫瘍細胞の他に、腫瘍関連マクロファージやリンパ球にも発現している。</p>					
<p>質問2) 正常のマクロファージのTP発現は？</p>					
<p>回答) 腫瘍組織に浸潤しているマクロファージで、炎症性サイトカインや微小環境因子によって、TPの発現が高くなる。</p>					
<p>質問3) 血管新生活性を有するTPは予後不良因子のため、一方ではTPを抑制する治療が存在し、また一方では5FU系抗癌剤の感受性を増強させるためにTP発現を上昇させる治療とあるが、相反する理論をどのように整理し考えればよいか？</p>					
<p>回答) 指摘の通り相反する可能性があるため、対象の腫瘍の特性を考えて治療計画を考える必要があると思われる。TP活性の直接的な阻害剤に関しては、血中のthymidine濃度を上昇させ、それ自体毒性を示し、5FU系抗癌剤の感受性を下げることが知られている。一方TPの触媒するthymidineの代謝産物である2-deoxy-D-riboseが血管新生を引き起こすため、TP自体を阻害するよりも2-deoxy-D-riboseなどをターゲットにすることで(2-deoxy-L-riboseの使用等)、その点を解決できる可能性がある。</p>					
<p>質問4) TPを多く発現している腫瘍に5FU系抗癌剤を使用することは実際おこなわれているか？そしてその際TPの測定手段は？</p>					
<p>回答) 研究段階であるが、TP活性をELISA法で測定したり、免疫染色でTPの発現をassayすることにより、発現の高いほうで5-FU系抗癌剤の治療成績が良好であると多くの報告がある。</p>					
<p>質問5) AZT添加後、mRNAの測定は24時間後、蛋白の測定は48時間後と通常より長い、何か理由があるのか？またtime courseは検討したか？</p>					
<p>回答) サイトカインなどはもっと短時間でRNA、タンパクレベルの変化をみるが、抗癌剤などの試薬添加の場合24時間後でmRNA測定、48時間後に蛋白測定というのは通常行われる範囲だと考えている。</p> <p>TPタンパクの誘導実験のタイムコースはAZTでは行っていないが他の刺激では行っておりUV、VP16、低酸素刺激などでは刺激後48時間でタンパク誘導が最大になっている。</p>					
<p>質問6) AZT 20 μM添加でTP蛋白発現は増加しているが、TP酵素活性はcontrolとあまりかわらない。その解離はなぜか？</p>					
<p>回答) 酵素活性測定は反応系に¹⁴C-チミジンを基質として加え生成した¹⁴C-チミンを薄層クロマトグラフィーにて分離し、コールドのチミンを対照として、チミンに対応する部分をかきとってRIを測定するというステップの多い手技をとっているため、TPを内在性に発現しているU937のような細胞では、TP酵素活性の誘導は顕著でなく、その差を感知しにくい。</p>					

- 質問 7) AZT の濃度勾配が、20, 100, 300 μM と密であるが、何か理由があるのか？
- 回答) 事前の実験で 500 μM 以上の濃度の AZT を添加するとほとんどの細胞がアポトーシスを引き起こし、20 μM 以下だと蛋白誘導に乏しかったのを確認した。したがって数十～数百 μM の幅に絞って蛋白誘導実験以下の実験を行った。
- 質問 8) アポトーシスをみる実験と細胞増殖能をみる MTT アッセイとでは AZT、5'DFUR 濃度を同じ条件とすべきではないか？
- 回答) 同じ濃度条件を含め様々な濃度の組み合わせで実験を行った中で、最大の効果が得られたものを報告した。
- 質問 9) TP 活性阻害薬は元々、抗血管新生薬として開発されたのか？
- 回答) TP が引き起こす血管新生を阻害する目的で開発された。本研究で使用した TP 活性阻害薬はマウスを用いた実験で TP を強制発現させた腫瘍の増殖を部分的に抑制し、マウス dorsal air sac assay で TP 強制発現細胞株が引き起こす血管新生を完全に抑制した。
- 質問 10) U937 を使用した理由は？
- 回答) U937 は通常の状態でも TP 蛋白を発現していたことや、AZT を用いた実験が血球系の細胞株、特に U937 での報告が多く参考にしやすかったという側面があった。
- 質問 11) AZT を、数十～数百 μM の濃度で使用しているが、これは in vivo では高濃度と思われるが、血中濃度はどのくらいになるのか？
- 回答) AZT は分子量 267.24 で (20, 100, 300 μM) がそれぞれ(5.34, 26.72, 80.17 $\mu\text{g/ml}$)に相当する。製薬会社の組織傷害性を測定する試験で、正常細胞であるヒト線維芽細胞株、ヒトリンパ球細胞株での IC₅₀ は 53.4 $\mu\text{g/ml}$ (200 μM)以上であることが確認されている。AZT+5FU の臨床試験では AZT は(0.5～10 g/m^2)の濃度で使用されておりそのときの C_{max} は(21.9～995.6 μM)であった。治療効果、副作用の点から 8 g/m^2 の使用 (C_{max} 661 μM) が推奨された。
- 質問 12) HIV 感染症が進行すると悪性腫瘍を合併することが多いが、そのようなケースで AZT を使用し、抗腫瘍効果があったなどの報告はないのか？
- 回答) AZT はもともと、抗腫瘍薬として開発されたが、AZT のウイルス逆転写酵素に対する親和性は、細胞性 DNA ポリメラーゼより約 100 倍強いので、正常細胞に比し、選択性の高い抗ウイルス作用を示すことがわかり、その後、抗 HIV 薬として開発された。AIDS 関連悪性腫瘍として、カポジ肉腫、非ホジキンリンパ腫、子宮頸部癌などがあるが、AZT によるものと思われる抗腫瘍効果のエビデンスはない。
- 質問 13) 癌細胞は血小板凝集を引き起こすが、PD-ECGF と同一物質である TP の血小板での働きは？
- 回答) 組織に損傷が起こると血小板が凝集し、様々な血小板由来増殖因子を放出する。なかでも TP は内皮細胞に作用して血管新生を促す。癌細胞と血小板が aggregation することによっての TP の働きは血管新生能や癌細胞の浸潤・遊走能を増強させることが予想されるが、まだ詳しくは解明されていない。
- 質問 14) 3TC だけが TP 蛋白誘導を引き起こさなかったが構造的なものが関係しているのか？
- 回答) AZT と d4T は TP が基質で 3TC ($\beta\text{-L-2'}$ -, 3'-Dideoxy-3'-thia cytidine)はそうではない。分子構造が TP 発現に寄与しなかった可能性は高いと考えられる。

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。