

論 文 要 旨

Thymidine phosphorylase activity is involved in augmented reactive oxygen species and interleukin-8 production in human cancer cells

ヒト癌細胞において、チミジンホスホリラーゼ活性は
活性酸素種およびインターロイキン-8 産生の増加に関与する

田畑 祥

【序論および目的】

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 への変換を触媒する。また TP は血小板由来血管内皮細胞増殖因子 (PD-ECGF) と同一の分子であり、多くの腫瘍において高発現し血管新生をはじめ、増殖、浸潤、転移およびアポトーシス耐性に関与することが報告されている。TP の血管新生機構としては、チミジンの代謝産物である 2-deoxy-D-ribose が活性酸素種 (ROS) の産生を介して Vascular endothelial growth factor (VEGF)、Matrix metalloproteinase (MMPs)、Interleukin-8 (IL-8) などの血管新生に関与する因子を発現亢進することが示唆されている。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは明らかとなっていない。そこで、TP による ROS の産生およびその機構、さらには TP による ROS の産生が血管新生関連因子に及ぼす影響について検討を行った。

【材料および方法】

ヒト咽頭癌細胞株 KB3-1 およびヒト膀胱癌細胞株 EJ に TP cDNA を導入して ROS および IL-8 の産生について解析を行った。また、内在性の TP を発現する子宮頸癌細胞株 YUMOTO、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 およびヒト単球細胞株 THP-1 を TPsiRNA あるいは TP 酵素阻害剤 TPI で処理して ROS および IL-8 の産生について解析を行った。mRNA の発現は Real-Time PCR 法を用いて、タンパク質の発現は immunoblot 法および ELISA 法を用いて定量した。ROS レベルは ROS 検出プローブ (H2DCF-DA) を培養細胞に処理し、flow cytometry 法で測定した。Glutathione の細胞内レベルは total glutathione quantification kit を用いて解析を行った。

【結 果】

KB3-1 および EJ に TP を強制発現させると、IL-8 の発現が亢進した。また内在性の TP を発現する子宮頸癌細胞株 YUMOTO を TPsiRNA で処理すると IL-8 の発現が減少した。TP による IL-8 の発現は thymidine によって亢進し、TPI によって抑制された。次に、TP による ROS の産生について調べた結果、TP は ROS の産生を増加させた。一方で TP の酵素活性を欠失させた変異 TP は ROS の産生を増加させなかった。TP 発現細胞を抗酸化剤で処理すると、TP による IL-8 の発現亢進が抑制された。TP による ROS の産生機構を調べるために細胞内 glutathione レベルを調べた結果、TP は細胞内 glutathione レベルを減少させ、さらに γ -GCS の発現を抑制した。変異 TP は細胞内 glutathione レベルおよび γ -GCS の発現に影響を与えなかった。

【結論及び考察】

本研究により、TP は ROS の産生を介して IL-8 の発現を亢進することが証明された。また、その TP による ROS 産生および IL-8 の発現亢進は TP の酵素活性が必須であることが明らかになった。さらに、TP による ROS の産生メカニズムとして、TP が γ -GCS の発現を抑制することで細胞内 glutathione が減少し、ROS を増加させることが示唆された。

(Oncology Reports 2012 年 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 173 号	学位申請者	田畑 祥
審査委員	主査	夏越 祥次	学位
	副査	宮田 篤郎	副査
	副査	西山 賢龍	副査
			博士 (医学)
			金蔵 拓郎
			堀内 正久

Thymidine phosphorylase activity is involved in augmented reactive oxygen species and interleukin-8 production in human cancer cells

(ヒト癌細胞において、チミジンホスホリラーゼ活性は活性酸素種およびインターロイキン-8 産生の増加に関与する)

チミジンホスホリラーゼ (TP) は、チミジンからチミンと 2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸への変換を触媒する酵素である。TP は多くの腫瘍において高発現しており、癌の血管新生、転移、浸潤およびアポトーシス耐性に関与する。チミジンの代謝産物である 2-デオキシ-D-リボース (DR) は活性酸素種 (ROS) を介した血管新生因子を発現亢進することが示唆されている。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは明らかとなっていない。そこで学位申請者らは、TP および DR が ROS の産生および血管新生因子に及ぼす影響について検討を行った。TP 強制発現細胞および内在性の TP 発現細胞を用いて IL-8 および ROS の測定を行った。mRNA の発現は real-time PCR 法を用いて、タンパク質の発現は immunoblot 法および ELISA 法を用いて定量した。ROS レベルは ROS 検出プローブ (H₂DCF-DA) を用い、flow cytometry 法で測定した。グルタチオンレベルは total glutathione quantification kit を用いて解析を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

1. KB3-1 および EJ 細胞に TP を強制発現させると、IL-8 の発現が亢進した。また内在性の TP を発現する YUMOTO 細胞を TPsiRNA で処理すると IL-8 の発現が減少した。
2. TP による IL-8 の発現はチミジンによって亢進し、TP の酵素活性阻害剤 (TPI) によって抑制された。
3. TP は ROS の産生を増加させる一方で、TP の酵素活性を欠失させた変異 TP は ROS の産生を増加させなかった。
4. TP 発現細胞を抗酸化剤で処理すると、TP による IL-8 の発現亢進が抑制された。
5. TP は細胞内グルタチオンレベルおよび gamma-glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) の発現を抑制したが、変異 TP はいずれにも影響を与えなかった。

TP は ROS の産生を介して IL-8 の発現を亢進することが証明された。また、その TP による ROS 産生および IL-8 の発現亢進には TP の酵素活性が必須であることが明らかになった。さらに、TP による ROS の産生メカニズムとして、TP が γ -GCS の発現を抑制することで細胞内グルタチオンレベルが減少し、ROS を増加させることが示唆された。

本研究により、TP の詳細な血管新生の分子機構が明らかとなり、癌の増殖の分子レベルでの理解および治療に貢献することが期待される。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	総研第 173 号		学位申請者	田畑 祥
審査委員	主査	夏越 祥次	学位	博士 (医学)
	副査	宮田 篤郎	副査	金蔵 拓郎
	副査	西山 賢龍	副査	堀内 正久

主査および副査の 5 名は、平成 24 年 2 月 20 日、学位申請者田畑祥君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、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。

質問 1) 活性酸素種のどの分子を測定しているか？

(回答) H_2O_2 を測定している。

質問 2) KB 細胞の特徴は何か？

(回答) KB 細胞はヒト咽頭癌細胞で、HeLa 細胞とよく類似していることが報告されている。

質問 3) Fig. 2 で Condition Medium (CM) を入れて実験しているが、CM に含まれる成分について検討したか？

(回答) 本研究では検討しなかった。今後の検討課題にしたい。

質問 4) TP は種々の腫瘍で発現が高いということであったが、本研究で用いられた細胞株では発現しているものと発現していないものがある。組織型の違いなど何か理由があるか？

(回答) 低酸素、低 pH および炎症性サイトカインなどによって TP は発現誘導されるため、腫瘍組織の環境下では発現が高いのに対し、細胞株にすると TP の発現が減少することが考えられる。

質問 5) Fig. 2C で、TPI が TP 活性を完全に阻害しても IL-8 の発現は 3 割ぐらいしか抑制されていないが、その理由は何か？

(回答) IL-8 の発現に TP 以外の因子が関与していることが考えられる。

質問 6) 細胞の培養上清に含まれる DR の濃度は測定可能であるか？

(回答) GC-MS によって測定することが可能である。

質問 7) NAC を抗酸化剤として使用しているが、他の抗酸化剤でも実験をしたか？

(回答) EUK-8 を用いて検討した結果、NAC と同様な結果が得られた。

質問 8) HO-1 および γ -GCS はいずれも Nrf2 系の分子であるが、両者の発現には逆の効果がみられている。このことについてどのように考えるか？

(回答) Nrf2 以外の因子による関与が考えられる。今後の検討課題と思われる。

質問 9) TP によって誘導される IL-8 は、TP の血管新生にどの程度寄与しているか？ (動物実験等で証明されているか？)

(回答) 今回の研究では検討していない。今後の検討課題と思われる。

最終試験の結果の要旨

質問 10) DR のソースは、チミジンのみであるか？

(回答) 他のデオキシリボヌクレオシドの可能性もあるが、TP が腫瘍で高発現することから、主に DR のソースはチミジンからと考えている。

質問 11) Fig. 3F で DR の濃度は mM レベルと高いように思うが、どうか？

(回答) これまでの報告で mM レベルの DR が用いられていることから、我々も同様な濃度で検討を行った。生体内での DR 濃度に準じた検討が、今後の検討課題と考えている。

質問 12) DR の光学異性体である 2-デオキシ-L-リボース (DLR) は今回の経路を抑制するか？

(回答) これまでの報告で、DLR は TP による IL-8 発現を抑制することが報告されている。

質問 13) TP の細胞内局在はどうであったか？

(回答) 核と細胞質両方に局在していた。

質問 14) TP が核と細胞質に発現しているのであれば、局在の違いで機能が変化するか？

(回答) 今回は検討していない。今後の検討課題と思われる。

質問 15) TP は、チミンからチミジンへの変換にも関与するか？

(回答) TP は相互の反応に関与する。

質問 16) TPI の TP の阻害形式はどのような機序か？またチミジンに対する TP の K_m 値は？

(回答) チミジンと競合的に作用する。 K_m 値は $1.32 \times 10^{-1} M$ の報告がされている。

質問 17) 細胞内の ROS レベルが増加しているのに、細胞内の酸化・還元グルタチオン比に差がないのはなぜか？

(回答) 細胞外に排出されるなどの他の制御機構の関与が考えられる。詳細は今後の検討課題としたい。

質問 18) IL-8 に着目した理由は何か？

(回答) 複数の細胞株で TP との相関性が高かったので、IL-8 に着目した。

質問 19) γ -GCS のレベルを腫瘍組織で調べた報告はあるか？

(回答) 私が調べる限りでは、腫瘍組織における γ -GCS のレベルを調べた報告はみられていない。

質問 20) 活性酸素の濃度と IL-8 の発現には、正の相関があるか？

(回答) H_2O_2 を細胞に処理し、IL-8 の発現について調べた結果、濃度依存的に IL-8 の発現が亢進していることが確認された。

質問 21) TP と Cancer Stem Cell とは関係があるか？

(回答) 調べた限りこれまでの報告では、TP と Cancer Stem Cell の関係についてはみられていない。今後の検討課題の一つと考えられる。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。