

抗がん剤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

池田 龍二

Molecular Basis for the Inhibition of Anticancer Agents-induced Apoptosis by Thymidine Phosphorylase

Ryuji IKEDA

Department of Clinical Pharmacy, Kagoshima University Hospital, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima City 890-8520, Japan

(Received April 10, 2007)

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. 2-Deoxy-D-ribose, a degradation product of thymidine generated by TP enzymatic activity, partially prevented hypoxia-induced apoptosis. TP was expressed at higher levels in tumor tissues compared to the adjacent non-neoplastic tissues in a variety of human carcinomas. High expression of TP is associated with an unfavorable prognosis. To investigate the effect of TP on cisplatin-induced apoptosis, human leukemia Jurkat cells were transfected with wild-type or mutant (L148R) TP cDNA. Jurkat cells transfected with TP cDNA (Jurkat/TP) and mutant TP cDNA (Jurkat/TPMu) expressed high levels of TP, while Jurkat/CV cells which were transfected with a control vector did not express TP. A high TP enzyme activity was detected in Jurkat/TP cells, but not in Jurkat/CV and Jurkat/TPMu cells. Sensitivities to cisplatin of these cells were determined by MTT assay. IC_{50} values for cisplatin of Jurkat/CV, Jurkat/TP, and Jurkat/TPMu cells were 4.50, 14.08, 13.40 μ M, respectively. Jurkat/TP and Jurkat/TPMu cells were about three times more resistant to cisplatin than Jurkat/CV cells. TP inhibited activation of caspase 3, 9 and mitochondrial cytochrome c release induced by cisplatin. These findings suggest a mechanism by which TP confers the resistance to cisplatin-induced apoptosis. Moreover, mutant TP that has no enzymatic activity also suppressed the cisplatin-induced apoptosis. These suggest that TP molecules have cytoprotective functions against cytotoxic agents.

Key words—thymidine phosphorylase; apoptosis; cisplatin; cytochrome c; caspase

1. はじめに

抗がん剤耐性の機序としては、がん細胞の薬剤排出の亢進、アポトーシスの減少、増殖因子などによる生存シグナル経路の活性化、DNA修復能の亢進などの関与が知られている。抗がん剤耐性は、治療の大きな障害であり、耐性機序を解明し実用的な耐性克服方法を開発することは重要である。

チミジンホスホリラーゼ (TP) は血小板由来血管内皮細胞増殖因子 (PD-ECGF)、グリオスタチン (Gliostatin) と同一の分子である。TP は血管新生作用を有しその血管新生には酵素活性が必要であ

ることが判明している。また TP は多くの悪性腫瘍において高発現しており、TP の発現はがんの独立した予後因子と考えられている。TP は血管新生作用のほかに、低酸素で誘導されるアポトーシスに対し細胞を耐性にする。さらにチミジンの分解産物である 2-デオキシ-D-リボースで処理した細胞も低酸素で誘導されるアポトーシスに対して耐性となった。一方、TP はシスプラチン耐性株である KCP-4 細胞でも発現亢進が確認された。そこで今回、TP の発現が抗がん剤によるアポトーシス誘導に及ぼす影響を検討したところ、TP の高発現細胞はシスプラチンに対して耐性を示した。また同細胞はシスプラチンによって誘導されるアポトーシスに対して耐性を示した。さらに同細胞では、シスプラチンによって誘導されるチトクロム c の放出、カスパーゼ 3, 9 の活性化が抑制された。これらの TP によるア

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院薬剤部 (〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1)

e-mail: ikeda@m.kufm.kagoshima-u.ac.jp

本総説は、平成 18 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞を記念して記述したものである。

ポトーシス耐性の賦与と TP の酵素活性には関係が認められなかった。以上の結果から、TP の酵素活性ではなく、TP 分子の別の機能によってこのアポトーシス耐性に関与しているものと考えられた。本稿ではこれら研究内容について概説し、最近のわれわれの知見についても併せて紹介する。

2. 薬剤耐性に関与する因子について

抗がん剤に対する耐性の機構は多様である。抗がん剤の体内への吸収が低下すると、腫瘍へ十分量の抗がん剤が輸送されない。抗がん剤を体内で代謝する酵素の活性の変化により、抗がん剤の細胞毒性が変化する。また、腫瘍内の血流量の変化、血管新生の程度、酸素分圧濃度、pH なども抗がん剤の感受性に影響を及ぼすことが知られている。がん細胞レベルでは、薬剤排出の亢進、薬剤代謝酵素の変異、アポトーシスの減少、増殖速度の低下、生存シグナル経路の活性化、DNA 修復能の上昇などが抗がん剤耐性に関与している。

抗がん剤を細胞の中から外へ排出する膜輸送蛋白質 ABC トランスポーターとして、P-糖蛋白質、multidrug resistance-associated protein (MRP) 1 などが存在する。現在までに 49 種類のヒト ABC トランスポーターの存在が知られているが、その中で薬剤耐性に関与することが報告されているのは、P-糖蛋白質、MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, MRP7, breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), ABCA2/ABC2 の 9 種類である。それら

の中でも P-糖蛋白質、MRP1, BCRP は広範な抗がん剤耐性と関係しており、多種類の腫瘍で発現亢進が確認されていることから、臨床における抗がん剤耐性に重要な役割を担っていると考えられている。¹⁾ また、抗がん剤が DNA に損傷を与えたあとの細胞の反応が化学療法の効果に関連することが知られている。特に、アポトーシスに対する耐性は、抗がん剤に対する耐性出現に重要な役割を担っている。腫瘍の進行過程でアポトーシス経路が抑制されると、それらの細胞は抗がん剤に耐性になる。

3. チミジンホスホリラーゼ (TP) の構造と機能

TP は染色体 22q13.33 に存在し、10 個のエクソンから構成される。そのプロモーター領域には、TATA box や CCAAT box は存在せず、転写開始点より上流には、6 個の Sp-1, STAT1 の結合サイトである gamma-activated sequences (GAS), interferon stimulated response element (ISRE) が存在する。²⁾ ヒト白血病細胞株である U937 細胞を UV 照射、シスプラチン添加あるいは低酸素状態で培養すると TP プロモーター活性の上昇及び TP の発現が誘導される。³⁾

TP は、分子量約 55 kDa で血小板由来血管内皮細胞増殖因子 (PD-ECGF) と同一の分子である。⁴⁾ TP はチミジンをチミンと 2 デオキシ-D-リボース-1-リン酸に可逆的に変換する酵素である (Fig. 1)。⁵⁾ TP は血管新生作用を有しその血管新生には酵素活性が必要であることが判明している。⁶⁾ また、

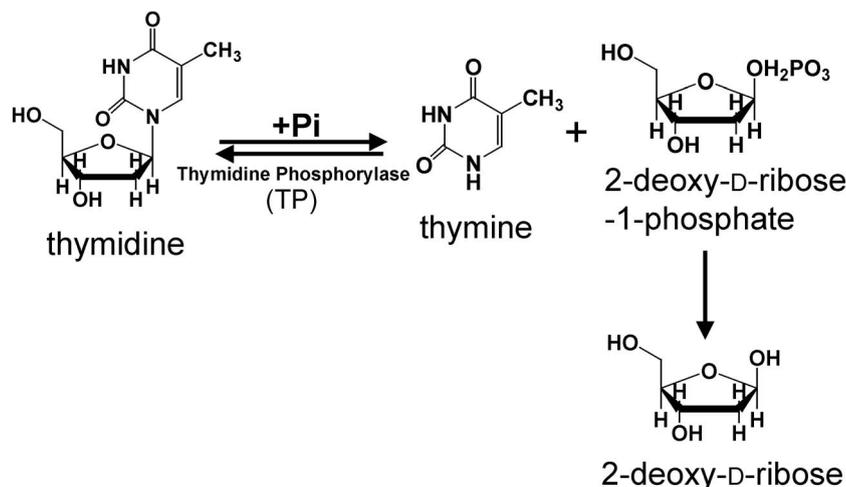


Fig. 1. Thymidine Phosphorylase (TP) Catalyzes the Reversible Conversion of Thymidine to Thymine and 2-Deoxy-D-ribose-1-phosphate

2-deoxy-D-ribose is a dephosphorylated product derived from 2-deoxy-D-ribose-1-phosphate.

TPは多くの悪性腫瘍において高発現しており、TPの発現はがんの独立した予後因子と考えられている。⁷⁾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。TPは低酸素で誘導されるアポトーシスに対し細胞を耐性にした。⁸⁾さらにチミジンの分解産物である2-デオキシ-D-リボースで処理した細胞も低酸素で誘導されるアポトーシスに対して耐性となった。^{9,10)}

4. TPの発現が抗がん剤による細胞増殖抑制効果に及ぼす影響

TPはシスプラチン耐性株であるKCP-4細胞においても親株であるヒト咽頭がん(KB)細胞と比較して、その発現亢進が確認された。このことは、TPが抗がん剤耐性となんらかの係わりを持つことを示唆している。そこでTPの機能解析を行う目的でTP高発現細胞株を作製した。ヒト白血病細胞(Jurkat cell)にTP cDNA, TPの活性を有しない変異体TP(L148R)のcDNA(TPMu cDNA)を導入し、イムノブロット分析を行った。その結果、Jurkat/TP細胞及びJurkat/TPMu細胞には、高いTPの発現が確認された(Fig. 2(A))。一方、ベクターのみを導入したコントロール細胞株(Jurkat/CV)には、TPの発現は認められなかった。また、TPの酵素活性を測定したところ、Jurkat/TP細胞は、高いTPの酵素活性を有していたが、Jurkat/TPMu細胞やJurkat/CV細胞には、TPの酵素活性

は認められなかった(Fig. 2(B))。

TPの発現が抗がん剤耐性に及ぼす影響を検討するために、これらの細胞の抗がん剤(シスプラチン, ドキソルビシン)感受性試験をMTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]法にて行った。

その結果、シスプラチンに対する50%細胞増殖抑制作用(IC₅₀)は、Jurkat/CV細胞で4.50 μM, Jurkat/TP細胞で14.08 μM, Jurkat/TPMu細胞で13.40 μMであり、TPが高発現した細胞は、シスプラチンに対して約3倍の耐性を獲得した(Fig. 3(A))。

さらに、トポイソメラーゼIIの阻害剤であるドキソルビシンを用いてMTTアッセイを行った。ドキソルビシンに対するIC₅₀は、Jurkat/CV細胞で0.05 μM, Jurkat/TP細胞で0.49 μM, Jurkat/TPMu細胞で0.41 μMであり、TPが高発現した細胞は、ドキソルビシンに対して約10倍の耐性を獲得した(Fig. 3(B))。

5. TPの発現が抗がん剤(シスプラチン, ドキソルビシン)によって誘導されるアポトーシスに及ぼす影響

抗がん剤は、細胞に損傷を与えアポトーシスを誘導することが知られている。そこで、抗がん剤によってアポトーシスが誘導された細胞の比率をフローサイトメトリーで解析したところ、TPを高発現す

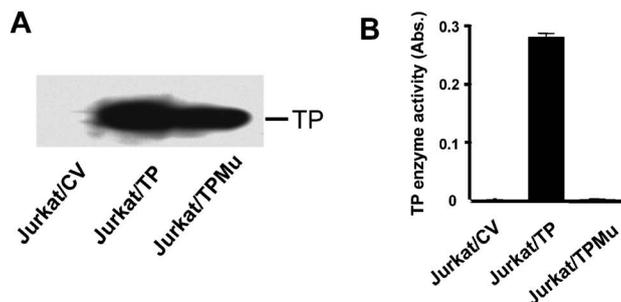


Fig. 2. Expression and Enzymatic Activity in Jurkat/CV, Jurkat/TP, and Jurkat/TPMu Cells

(A): Immunoblot analysis of TP expression in Jurkat/CV, Jurkat/TP, and Jurkat/TPMu cells. Cytosolic fractions (50 μg protein) from Jurkat/CV, Jurkat/TP and Jurkat/TPMu cells were separated by SDS/PAGE and transferred onto PVDF membranes. TP levels in the cytosol were determined by using an anti-TP monoclonal antibody. High levels of TP expression were detected in Jurkat/TP and Jurkat/TPMu cells. (B): TP enzyme activity in Jurkat/CV, Jurkat/TP, and Jurkat/TPMu cells. Cell lysates were incubated with 0.2 M Tris-arsenate buffer (pH 7.5) containing 0.1 M thymidine in a total volume of 0.1 ml for 1 h at 37°C. The reaction was then stopped by adding 1 ml of 0.2 M NaOH and the thymine formed was determined from its absorbance at 300 nm.

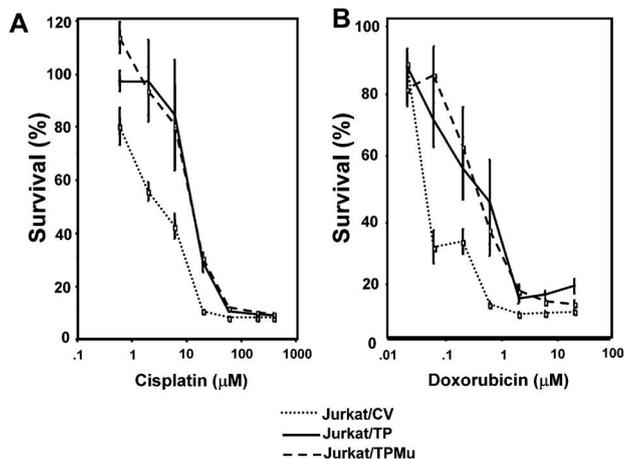


Fig. 3. Inhibitory Effects of TP on the Cytotoxicity of Cisplatin and Doxorubicin

Cell survival was determined by MTT assay. Relative resistance was determined by the IC₅₀ value of Jurkat/TP and Jurkat/TPMu cells for cisplatin, and doxorubicin divided by the IC₅₀ value of Jurkat/CV cells for cisplatin, and doxorubicin.

る Jurkat/TP 細胞は、シスプラチンで誘導されるアポトーシス細胞の比率が Jurkat/CV 細胞より低かった (Fig. 4).

カスパーゼは、その基質特異性から大きく 3 つに分類される。I 群はカスパーゼ 1 に代表され、サイトカインのプロセッシングと細胞死に、II 群はカスパーゼ 3 に代表され、細胞死の実行に関与する。一方、III 群はカスパーゼ 8 や 9 に代表され、蛋白質分解カスケードに位置しており、細胞のシグナルを下流に伝える働きを有する。¹²⁾

TP の発現が、抗がん剤で誘導されるアポトーシスを抑制するメカニズムを検討するためにカスパーゼ 3, 9, 8 の活性化を調べた。その結果、Jurkat/CV 細胞は、シスプラチンによってカスパーゼ 3 及びカスパーゼ 9 が活性化された。一方、Jurkat/TP 細胞では、シスプラチンによって誘導されるカスパーゼ 3, 9 の活性化が抑制された (Fig. 5)。カスパーゼ 8 の活性化は、シスプラチンでは生じなかった (Fig. 5)。

細胞死のシグナル伝達は、ミトコンドリアの寄与するところが大きい。アポトーシスのシグナルは、ミトコンドリアに伝えられ、その結果ミトコンドリアから細胞質にチトクロム c が放出される。放出されたチトクロム c は、ATP と共同し、Apaf-1 を経由してカスパーゼ 9 を活性化する。

Jurkat/TP 細胞は、シスプラチンで誘導されるカ

スパーゼ 3, 9 の活性化を抑制したこと、またカスパーゼ 8 は、シスプラチンで活性化されなかったことから、ミトコンドリアから放出されるチトクロム c とその制御因子について調べた。Jurkat/CV 細胞にシスプラチンを添加すると細胞質にチトクロム c

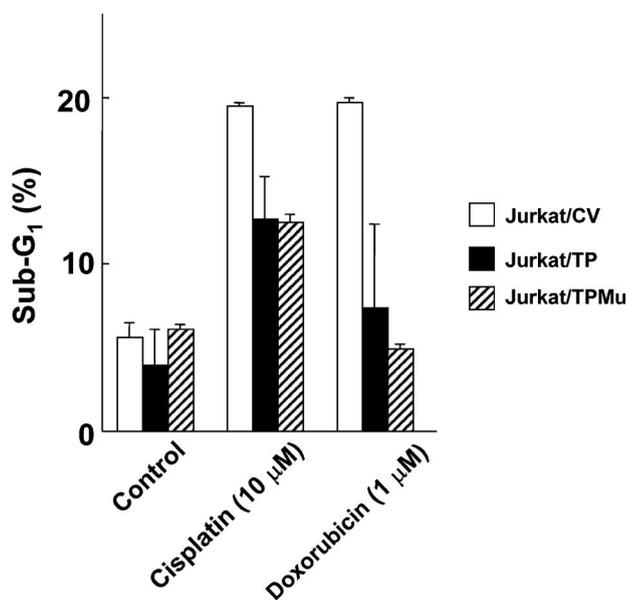


Fig. 4. Effects of Cisplatin and Doxorubicin on the Proportion of Sub-G₁ Fraction of Jurkat/CV, Jurkat/TP, and Jurkat/TPMu Cells

Flow cytometry of propidium iodide-stained Jurkat/CV, Jurkat/TP, and Jurkat/TPMu cells was performed in the presence of 10 μM cisplatin or 1 μM doxorubicin for 24 h. The sub-G₁ fraction of Jurkat/TP and Jurkat/TPMu cells was less than that of Jurkat/CV cells. The numbers in the figure indicate the proportion of cells in the sub-G₁ fraction.

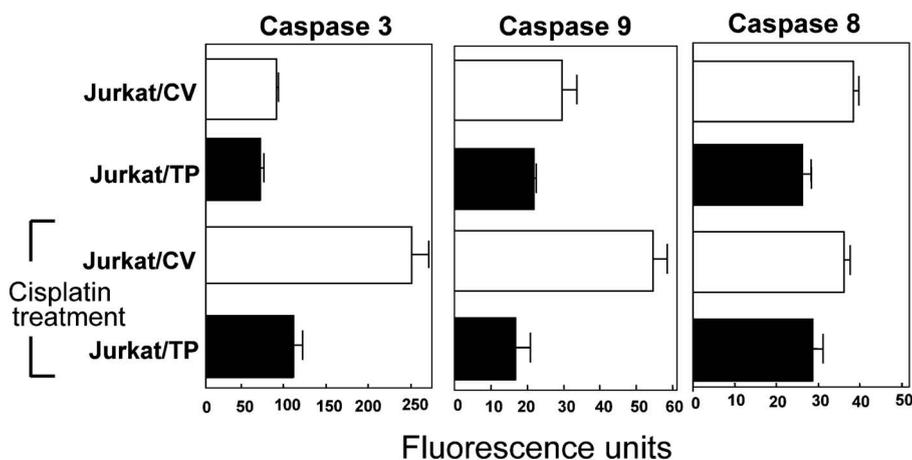


Fig. 5. Activities of Caspases in Jurkat/CV and Jurkat/TP Cells Treated with Cisplatin

Cells were lysed in buffer A [25 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 2 mM *p*-aminophenylmethanesulfonylfluoride (APMSF), 10 μg/ml pepstatin A, and 10 μg/ml leupeptin]. The lysates were clarified by centrifugation and the supernatants were used for enzyme assays. Enzyme reactions were carried out in buffer A containing 100 μg protein and 50 μM Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin (AMC), 50 μM Ac-LEHD-AMC or Ac-IETD-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC) as substrates for caspase 3, 9 and 8, respectively. The reaction mixtures were incubated at 30°C for 60 min. Activities of caspases 3, 9 and 8 were determined by measuring the fluorescence intensity of AMC and AFC using a fluorescence reader. The effect of cisplatin on the activity of caspase 3, 9, and 8 in cells in Jurkat/CV and Jurkat/TP cells is shown.

が放出される一方, Jurkat/TP 細胞では, シスプラチンで誘導されるチトクロム c の放出が抑制されていた (Fig. 6).

Bcl-2 ファミリーは, Bcl-2 に代表されるアポトーシス抑制因子と Bax に代表されるアポトーシス促進因子に分類される. Bax と Bcl-2 は, お互いにヘテロダイマーを形成しチトクロム c の放出を制御していると考えられている. そこで, Bcl-2 と Bax のミトコンドリア上の蛋白質量をシスプラチン存在下, 非存在下で, Jurkat/CV 細胞, Jurkat/TP 細胞及び Jurkat/TPMu 細胞で比較検討した. その結果, これらの細胞間で Bcl-2, Bax の蛋白質量には, 大きな変化は確認できなかった (Fig. 6).

6. おわりに

TP の高発現細胞はシスプラチン, ドキソルビシンに対して耐性を示した. また同細胞はこれらの抗がん剤によって誘導されるアポトーシスに対して耐性を示した. さらに同細胞は, シスプラチンによって誘導されるチトクロム c の放出, カスパーゼ 3, 9 の活性化を抑制した. この TP によるアポトーシス耐性の賦与は, TP の酵素活性とは関係がなかった. ミトコンドリアからのチトクロム c の放出は, Bax や Bcl-2 によって制御されていることが知られている. そこで, ミトコンドリア上の Bax や Bcl-2 の蛋白質量を比較したが, 大きな変化は確認できなかった.

一方, 広範な腫瘍で強く活性化されているシグナ

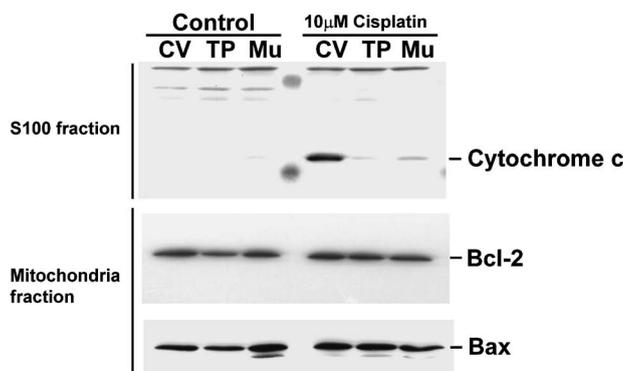


Fig. 6. Effects of TP on Cisplatin-induced Cytochrome c Release and on Mitochondria-associated Proteins

Jurkat/CV, Jurkat/TP, and Jurkat/TPMu cells were incubated in the presence of 10 μ M cisplatin for 36 h. To determine the release of cytochrome c from mitochondria to cytosol, cytosolic fractions were prepared and subjected to immunoblot analysis using a specific antibody against cytochrome c. To determine the levels of proteins attached to the mitochondrial membranes, mitochondrial fractions were prepared and subjected to immunoblot analysis using specific antibodies against Bcl-2 and Bax.

ルの 1 つに phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) による phosphatidylinositol (3, 4, 5) triphosphate (PIP3) の産生がある. PIP3 の産生により AKT が活性化され, 腫瘍の進行に関与する反応が生じる. 抗がん剤に対するがん細胞の感受性にも PI3K-AKT 経路の関与が示唆されている. TP の発現が高い KB/TP 細胞をドキソルビシン存在下で培養すると AKT の活性化が, KB/CV 細胞より高くなる. しかしながら, この効果は TP の酵素活性に依存しなかった.³⁾ さらに, 細胞内の酸化やミトコンドリアの膜電位の過分極が AKT によって抑制されることが判明している.¹¹⁾ このとき AKT がチトクロム c の放出及びアポトーシスを抑制するが, その抑制にはグルコース代謝が関連しており, ミトコンドリアでのヘキソキナーゼ活性が重要であると考えられている. AKT はヘキソキナーゼ -VDAC (voltage dependent anion channel) の結合を促進しミトコンドリア外膜での permeability transition pore (PTP) の開閉を制御している.¹¹⁾

TP の発現は, その酵素活性の有無に係わらず抗がん剤に対して耐性を賦与した. したがって, TP は, 酵素活性ではなく TP 分子の別の機能によって抗がん剤のアポトーシス耐性に深く関与していると考えられる. さらに, TP の高発現細胞は, シスプラチンによって誘導されるチトクロム c の放出を抑制していたことから, TP 分子が直接あるいは間接的にシスプラチンによって誘導されるチトクロム c の放出を抑制しているものと推察されるが, 今のところ詳細なメカニズムは不明である. これらの結果から TP に結合する分子の存在が推察されるので, TP 分子と結合する分子を検索している. TP は多くの悪性腫瘍において高発現しており, 腫瘍の増殖や抗がん剤耐性に関して重要な役割を担っていると考えられる.

謝辞 本研究は, 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院薬剤部及び鹿児島大学大学院医歯学総合研究科分子腫瘍学分野にて行われた研究であり, ご指導ご鞭撻を賜りました薬剤部 山田勝士教授, 武田泰生准教授, 分子腫瘍学分野 秋山伸一教授, 古川龍彦准教授, 並びに鹿児島大学医学部・歯学部附属病院薬剤部の皆様に深く感謝申し上げます.

REFERENCES

- 1) Akiyama S., *Gan To Kagaku Ryoho*, **30**, 1–8 (2003).
- 2) Goto H., Kohno K., Sone S., Akiyama S., Kuwano M., Ono M., *Cancer Res.*, **61**, 469–473 (2001).
- 3) Jeung H. C., Che X. F., Haraguchi M., Zhao H. Y., Furukawa T., Gotanda T., Zheng C. L., Tsuneyoshi K., Sumizawa T., Roh J. K., Akiyama S., *FEBS Lett.*, **580**, 1294–1302 (2006).
- 4) Furukawa T., Yoshimura A., Sumizawa T., Haraguchi M., Akiyama S., Fukui K., Ishizawa M., Yamada Y., *Nature*, **356**, 668 (1992).
- 5) Iltzsch M. H., Kouni M. H., Cha S., *Biochemistry*, **24**, 6799–6807 (1985).
- 6) Miyadera K., Sumizawa T., Haraguchi M., Yoshida H., Konstanty W., Yamada Y., Akiyama S., *Cancer Res.*, **55**, 1687–1690 (1995).
- 7) Takebayashi Y., Akiyama S., Akiba S., Yamada K., Miyadera K., Sumizawa T., Yamada Y., Murata F., Aikou T., *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 1110–1117 (1996).
- 8) Kitazono M., Takebayashi Y., Ishitsuka K., Takao S., Tani A., Furukawa T., Miyadera K., Yamada Y., Aikou T., Akiyama S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 797–803 (1998).
- 9) Ikeda R., Furukawa T., Kitazono M., Ishitsuka K., Okumura H., Tani A., Sumizawa T., Haraguchi M., Komatsu M., Uchimiya H., Ren X. Q., Motoya T., Yamada K., Akiyama S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**, 806–812 (2002).
- 10) Ikeda R., Che X. F., Ushiyama M., Yamaguchi T., Okumura H., Nakajima Y., Takeda Y., Shibayama Y., Furukawa T., Yamamoto M., Haraguchi M., Sumizawa T., Yamada K., Akiyama S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 280–285 (2006).
- 11) Gottlob K., Majewski N., Kennedy S., Kandel E., Robey R. B., Hay N., *Genes Dev.*, **15**, 1406–1418 (2001).
- 12) Thornberry N. A., Rano T. A., Peterson E. P., Rasper D. M., Timkey T., Garcia-Calvo M., Houtzager V. M., Nordstrom P. A., Roy S., Vaillancourt J. P., Chapman K. T., Nicholson D. W., *J. Biol. Chem.*, **272**, 17907–17911 (1997).