

# チミンホスホリラーゼの血管新生活性について

## Angiogenic activity of thymidine phosphorylase

代表研究者 原口みさ子 Misako Haraguchi

鹿児島大学・医学部・附属腫瘍研究施設・助手

Institute for Cancer Research, Faculty of Medicine, Kagoshima University, Instructor

### Abstract

We have previously reported that the enzymatic activity of thymidine phosphorylase is indispensable for the angiogenic activity of thymidine phosphorylase. To investigate the mechanism of angiogenic activity of thymidine phosphorylase, we examined angiogenic activity of enzymatic products of thymidine phosphorylase including 2-deoxy-D-ribose. Angiogenic activity of 2-deoxy-D-ribose was observed in the chick chorioallantoic membrane (CAM) but not in the implanted gelatin sponge. We transfected thymidine phosphorylase cDNA into KB cells and cloned subclones with high thymidine phosphorylase activity. The doubling time of these subclones in vitro were similar to that of KB cells. However, the growth of the cloned subclones was significantly faster when xenografted into nude mice than those of KB cells with no thymidine phosphorylase activity. We are now trying to make mouse in which the thymidine phosphorylase gene is knock out to know the physiological function of thymidine phosphorylase.

### 4-1 研究目的

現在癌は死亡原因の第1位を占め社会的問題となっている。腫瘍における血管新生は腫瘍の発育には必須の条件と考えられている。そこで血管新生阻害剤が新しいメカニズムの抗癌剤として注目されてきた。

チミンホスホリラーゼはチミンを2-deoxy-D-ribose-1-phosphateに可逆的に分解する酵素であり癌細胞ではその活性が正常細胞に比べて高いと報告されている。最近、我々はこのチミンホスホリラーゼがin vitro、in vivoにおいて血管新生活性をもつことを血管内皮細胞に対する遊走刺激活性の測定(chemotaxis assay)、鶏卵漿尿膜上での血管新生活性の検討(CAM assay)、ゼラチンスポンジマウス皮下移植法を行なって証明した。また、チミンホスホリラーゼの活性阻害剤やチミンホスホリラーゼ活性を欠失した変異型チミンホスホリラーゼを用いた実験よりチミンホスホリラーゼの血管新生活性にはチミンホスホリラーゼ活性が必須であることも確認した。そこで次に(1)チミンホスホリラーゼの血管新生活性にはなぜチミンホスホリラーゼ活性が必須であるのかチミンホスホリラーゼによるチミンの代謝産物に着目して検討したい。すなわちチミンホスホリラーゼによるチミンの代謝産物に血管新生活性があるか否か検討する。(2)チミンホスホリラーゼがいかなる機構で血管新生をおこすのか検討したい。チミンホスホリラーゼは血管内皮細胞の増殖刺激活性はなく何らかの因子を介して間接的に血管新生をおこすと考えられる。そこで

FGF1によるFGF1の代謝産物がどのような細胞に働くのか、いかなる因子を放出、あるいは保持、あるいは因子に対する感受性調節を行なって血管新生をおこすのか調べたい。(3) FGF1の血管新生活性が実際に生体内の血管新生に寄与しているか否かジーンターゲティングを行なって調べたい。

#### 4-2 研究経過

まず、FGF1が血管新生活性をもつメカニズムを探ろうと考えた。FGF1の血管新生活性にはFGF1活性が必須であることから、FGF1のFGF1による代謝産物に着目し、鶏卵漿尿膜法、マウス皮下移植法などでin vivoでの血管新生活性を調べた。鶏卵漿尿膜法においては2-デオキシリボースのみ血管新生活性が見られたが、マウス皮下移植法では血管新生活性が認められなかった。そこで、in vitroでの血管新生活性を調べた。マクロファージはある種の刺激を受けるとTNFなどの血管新生因子を放出することが報告されている。我々はFGF1のFGF1による代謝産物がマクロファージを刺激しているのではないかと予想し、検討したが、コントロールとの間に有意の差はみられなかった。細胞の増殖に与える影響についても調べたがコントロールとの間に有意の差はみられなかった。血管が新生する際には既存の血管が枝分かれする必要がある。FGF1、2-デオキシリボース、その他のFGF1による代謝産物が血管内皮細胞の開裂を促進しているのではないかと考え検討したところ、FGF1は血管内皮細胞の開裂を促進していた。2-デオキシリボース、その他のFGF1による代謝産物については現在検討中である。以上のようにFGF1が血管新生活性をもつメカニズムは未だ不明であるが、別のいくつかの新しい知見がえられた。FGF1が実際に腫瘍血管新生に関与していることをヌードマウスにKB細胞、FGF1遺伝子を導入したトランスフェクタント細胞を移植して形成した腫瘍中の血管量を比較することによって確認できた。また我々はFGF1の生理活性を探索する目的でFGF1のジーンターゲティングを行おうと考えている。今までにマウスのFGF1の遺伝子配列の一部がわかった。

#### 4-3 研究成果

1) FGF1の血管新生活性にはFGF1活性が必須であることから、FGF1のFGF1による代謝産物に血管新生活性があるか否かを鶏卵漿尿膜法、マウス皮下移植法にて検討した。鶏卵漿尿膜法においては2-デオキシリボースのみ血管新生活性が見られた。そこで、次に2-デオキシリボースについてマウス皮下移植法で血管新生活性が認められるか否か調べた。ゼラチンスポンジを担体として用いた場合はコントロール群との間に有意の差はみられなかった。2-デオキシリボースは分子量が低く水溶性であるため体内での保持が困難である。そこで徐放性の担体を用いて実験を行った。しかしながらアルギン酸ナトリウム、マトリゲル、乳酸ポリマー、コラーゲンゲル、コレステロールペレットなどの担体を用いた場合もコントロール群との間に有意の差はみられなかった。またアルザインフュージョンポンプを用いて持続点滴した場合もコントロール群との間に有意の差はみられなかった。

2) マクロファージはある種の刺激を受けるとTNFなどの血管新生因子を放出することが報告されている。我々はチミジンのチミジンホスホリブゼによる代謝産物がマクロファージを刺激しているのではないかと予想し、検討した。まず、ヒト新鮮血より単核球を単離した。用いる器具はすべてエンドトキシンフリーのものを用いた。また単核球を単離操作する段階でマクロファージを刺激しないことを確認してから、マクロファージが2-デオキシリボースによってTNF、IL-1、IL-6、bFGFを放出するか否かを調べた。まず単核球を2-デオキシリボースとともに24時間培養し、その培養上清をマウス繊維肉腫細胞L929の培地に加えた。24時間後、L929細胞の生存率を測定することにより、TNFの放出量を調べた。次に単核球を2-デオキシリボースとともに24時間培養し、その培養上清をIL-1依存性のA375S2細胞の培地に加えた。24時間後、A375S2細胞の生存率を測定することにより、IL-1の放出量を調べた。さらに単核球を2-デオキシリボースとともに24時間培養し、その培養上清をIL-6依存性のMH60BSF2細胞の培地に加えた。24時間後、MH60BSF2細胞の増殖率を測定することにより、IL-6の放出量を調べた。bFGFの放出量は単核球を2-デオキシリボースとともに24時間培養し、その培養上清をbFGF ELIZAキットに加えイムノアッセイした。いずれの場合もコントロールとの間に有意の差はみられなかった。

3) チミジンのチミジンホスホリブゼによる代謝産物が細胞のDNA合成に与える影響について調べた。血清飢餓させたヒト口腔内類表皮癌細胞KB細胞の培地に2-デオキシリボースを加え24時間培養後、 $^3\text{H}$ チミジンの取り込みを測定する。コントロールとの間に有意の差はみられなかった。

4) チミジンのチミジンホスホリブゼによる代謝産物が細胞の増殖に与える影響について調べた。血清飢餓させたウシ大動脈血管内皮BAE細胞、ヒト口腔内類表皮癌KB細胞の培地に種々の濃度の2-デオキシリボース、その他のチミジンホスホリブゼによる代謝産物を加え4日後に細胞数を測定した。また、培地中の低分子物質を透析により除去したウシ大動脈血管内皮BAE細胞、マウス繊維芽細胞NIH3T3に種々の濃度の2-デオキシリボース、その他のチミジンホスホリブゼによる代謝産物およびヒポキサンチンを加え4日後に細胞数を測定した。コントロールとの間に有意の差はみられなかった。

5) ヘパリン、ヘパリン硫酸はbFGFのような血管新生因子の保持に関与しておりヘパリン非存在下では血管新生が低下する。そこで我々はヘパリン、ヘパリン硫酸を分解する種々のヘパリナーゼの活性を2-デオキシリボース、その他のチミジンホスホリブゼによる代謝産物が抑制しているのではないかと考え検討している。

6) 血管が新生する際には既存の血管が枝分かれする必要がある。我々はチミジンホスホリブゼ2-デオキシリボース、その他のチミジンホスホリブゼによる代謝産物が新生血管の枝分かれすなわち血管内皮細胞の開裂を促進しているのではないかと考えた。細胞をウエルにまき上層にFITCを加え下層に移行したFITC量を測定する。チミジンホスホリブゼは血管内皮細胞の開裂を促進していた。

7) チミジンホスホリブゼ、2-デオキシリボース、その他のチミジンホスホリブゼによる代謝産物が癌の転移に関与しているかどうか調べるために癌細胞の浸潤能刺激活性を調べた。腸間膜細胞の上に癌細胞を重層培養する。血清飢餓させた培地中にチミジンホスホリブゼ、2-デオキシリボースを加えた場合に癌細胞の浸潤能が促進されるか否かを腸間膜細胞下に浸潤してくる癌細胞数を計測することにより調べた。コントロールとの間に有意の差はみられなかった。

8) 我々はヒト口腔内類表皮癌 (KB) 細胞に PD-ECGF の cDNA を組み込みなおして新しくトランスフェクタント細胞を得た。ヌードマウスに KB 細胞、トランスフェクタント細胞を移植して形成した腫瘍中の血管量を比較したところトランスフェクタント細胞由来の腫瘍の方が有意に血管量が多かった。このことはチミジンホスホリラーゼが実際に腫瘍血管新生に関与していることを示している。

9) 我々はチミジンホスホリラーゼの生理活性を探索する目的でチミジンホスホリラーゼのジーンターゲティングを行おうと考えている。現在マウスのチミジンホスホリラーゼ遺伝子のクローニングをしており遺伝子配列の一部がわかった。

#### 4-4 今後の課題と発展

血管新生は腫瘍の増殖には必須の条件と考えられており、それを抑えることは癌の抑制につながると考えられている。最近フォルクマンらは血管新生阻害剤が *in vivo* で腫瘍の増殖を顕著に抑えたという結果を報告している。チミジンホスホリラーゼは実際に生体内の血管新生に関与することが確認されたので、チミジンホスホリラーゼ活性阻害剤を血管新生阻害剤として利用できないか検討したい。さらにチミジンホスホリラーゼの他の生理活性をジーンターゲティングによって把握し、チミジンホスホリラーゼ活性阻害剤の副作用も予測したい。

#### 4-5 発表論文リスト

Miyadera, K., Haraguchi, M. et. al. Structural characterization of thymidine phosphorylase purified from human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212, 1040-1045, 1995

Miyadera, K., Haraguchi, M. et. al. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res.*, 55, 1687-1690, 1995