

論文の内容の要旨

氏名：諏訪部 陽子

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：イヌメラノーマ細胞の増殖に関わる糖代謝と糖輸送体に関する研究

メラノーマはメラニン色素を作り出すメラノサイトががん化する悪性腫瘍である。イヌの口腔内メラノーマは全口腔内悪性腫瘍の中で最も多く認められ、特に老齢の小型犬、ダックスフンド、プードル、スコティッシュテリア、ゴールデンレトリバーでの発症が多い。局所浸潤、リンパ節転移や主に肺への遠隔転移も早い。様々な化学療法剤が用いられているが、明らかな有効性は認められておらず、放射線治療や顎骨切除などの侵襲的な外科手術を行っても中央生存期間は1年未満であり、非常に短い。そのため、イヌ口腔内メラノーマは予後が非常に悪い腫瘍とされており、獣医療において、イヌメラノーマ治療に対する新たな戦略が必要である。

哺乳類の細胞にとってグルコースは主要なエネルギー源である。グルコースは細胞内に取り込まれ、解糖系により細胞質でピルビン酸に代謝される。正常細胞では、解糖系経由のピルビン酸は好气的環境下において、ミトコンドリア内に輸送され、アセチルコエンザイム A (CoA) に酸化され、ATP 産生の基質として代謝される。一方、腫瘍細胞では、酸素が十分存在している条件下においても、解糖系からエネルギーを得るグルコース代謝にシフトする。このように正常細胞とは異なるグルコース代謝は、ワールブルグ効果として知られており、腫瘍細胞の生存や増殖を助長すると考えられている。

グルコースの細胞内への輸送には細胞膜タンパク質であるグルコース輸送体が必要である。GLUT は糖輸送に関わる輸送体ファミリーの1つであり、様々な細胞に発現が認められている。哺乳類には14種類の GLUT タンパク質が存在し、アミノ酸配列の相同性や構造から3クラスに分類されている。クラス I には GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 および GLUT14 が含まれ、グルコースに対して高い選択性がある。クラス II には GLUT5, GLUT7, GLUT9 および GLUT11 が含まれ、グルコースとフルクトースに選択性がある。クラス III には、GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 および GLUT13 (HMIT としても知られている) が含まれるが、まだ機能が十分解明されていない部分もある。

本研究では、イヌメラノーマ治療に対する有効な治療法の開発を目的とし、イヌ口腔内メラノーマ細胞の細胞増殖能に対するグルコース代謝と GLUT の関与を検討した。

1. グルコースアナログによるイヌメラノーマ細胞の増殖抑制

2-deoxy-D-glucose (2-DG) は、グルコースの2-ヒドロキシ基が水素原子に置換されたグルコースアナログである。2-DG は、GLUT を利用して細胞内に取り込まれると、解糖系酵素のヘキソキナーゼにより 2-DG-6-リン酸 (2-DG-6-P) にリン酸化される。2-DG-6-P は非代謝物なので、細胞内に蓄積され、解糖系の代謝は停止する。このことから、2-DG は解糖系阻害剤として代謝研究に用いられている。そこで、イヌメラノーマ細胞の増殖におけるグルコース代謝の関与を明らかにすることを目的とし、細胞増殖能に対する 2-DG の効果を検討した。

イヌメラノーマ MCM-N1 細胞を3日間培養すると、時間依存的な細胞増殖が MTT assay にて認められた。培養液中に 0-20 mM の 2-DG を加えると、用量依存的にイヌメラノーマ細胞の増殖は有意に抑制された。2-DG の細胞増殖抑制効果は異なるイヌメラノーマ細胞株である KMeC および CMec-1 細胞においても認められた。

5 mM 2-DG 存在下で3日間培養した MCM-N1 細胞におけるグルコース消費を 2-DG 非存在下で培養した細胞と比べると、2-DG による有意なグルコース消費の抑制が認められた。さらに、細胞内へ輸送されたグルコースの解糖系代謝物である乳酸分泌について検討したところ、5 mM 2-DG 存在下で培養した MCM-N1 細胞において有意な抑制が認められた。この 2-DG によるグルコース消費と乳酸分泌に対する抑制効果は、KMeC および CMec-1 細胞においても認められた。

以上の結果から、イヌメラノーマ細胞において、グルコース代謝、特に解糖系が細胞増殖に重要な役割を担うことが示唆された。

2. GLUT 阻害剤によるイヌメラノーマ細胞の増殖抑制とグルコース代謝

グルコースは極性を持っているため細胞内外に濃度差があっても細胞膜を通過できない。そのため、細胞外のグルコースは、細胞膜に存在する膜タンパク質であるグルコース輸送体を介して細胞内へ輸送される。多くの腫瘍細胞においては、GLUT が細胞内へのグルコース輸送に関わり、腫瘍の生存や増殖に関わることが報告されている。イヌメラノーマ細胞において、グルコースアナログである 2-DG を用いて、細胞増殖にグルコース代謝、特に解糖が重要であることが示されたことから、次にイヌメラノーマ細胞の増殖における GLUT の役割を明らかにすることを目的とし、GLUT 阻害剤である WZB-117 のイヌメラノーマ細胞の増殖能に対する効果を検討した。

イヌメラノーマ MCM-N1 細胞を 60 μ M WZB-117 存在下で 3 日間培養すると、有意な細胞増殖の抑制が認められた。WZB-117 の濃度を 0-60 μ M と変化をさせて培養すると、用量依存的に MCM-N1 細胞の増殖は抑制された。WZB-117 による細胞増殖の抑制は異なるイヌメラノーマ細胞株である KMeC および CMec-1 細胞においても認められた。

60 μ M WZB-117 存在下で 3 日間培養した MCM-N1 細胞では、グルコース消費および乳酸分泌は有意に抑制された。KMeC および CMec-1 細胞においても WZB-117 によるグルコース消費および乳酸分泌の抑制が認められた。さらに、グルコースに蛍光分子が結合した 2-NBDG (2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose) を用いてグルコースの取り込みを検討したところ、WZB-117 処理した MCM-N1, KMeC および CMec-1 細胞において、非処理細胞と比較して、グルコース取り込みの有意な減少が確認された。

以上の結果より、イヌメラノーマ細胞へのグルコースの取り込みに GLUT が関わり、増殖に関わることが明らかとなった。

3. イヌメラノーマ細胞における GLUT アイソフォーム発現とグルコース代謝

GLUT は、促進拡散型輸送を行うタンパク質のスーパーファミリーに属し、グルコースを含む糖輸送を担っている。ヒトにおいては、GLUT には現在 14 種類のアイソフォームが知られており、大きくクラス I からクラス III の 3 つに分類されているが、クラス I に含まれる GLUT1, GLUT2, GLUT3 および GLUT4 については、発現臓器とグルコース代謝調節との関連が報告されている。GLUT 阻害剤を用いて、GLUT の機能がイヌメラノーマ細胞の増殖に関わることが示されたことから、イヌメラノーマ細胞に発現するクラス I に属する GLUT1, GLUT2, GLUT3 および GLUT4 発現とグルコース代謝および細胞増殖との関連について検討した。

イヌメラノーマ MCM-N1, KMeC および CMec-1 細胞におけるクラス I に属する GLUT アイソフォームの mRNA 発現を RT-PCR により検討したところ、GLUT1 と GLUT3 の mRNA 発現が認められたが、GLUT2 と GLUT4 mRNA の発現は認められなかった。さらに、MCM-N1 細胞においては、GLUT1 および GLUT3 タンパク質発現が western blotting により確認された。

次に、GLUT1 と GLUT3 のイヌメラノーマ細胞機能との関与を解明するために、GLUT1 および GLUT3 の siRNA を MCM-N1 細胞に導入し、ノックダウン細胞を作成して検討した。GLUT1 または GLUT3 の siRNA 導入細胞では、GLUT1 または GLUT3 タンパク質発現は、対照とした scramble RNA 導入細胞と比較すると、有意に抑制されたことを western blotting にて確認した。GLUT1 および GLUT3 ノックダウン MCM-N1 細胞においては、2-NBDG の取り込み、グルコース消費および乳酸分泌は、対照とした scramble RNA 導入細胞と比較して、有意な抑制が認められた。さらに、細胞増殖能の有意な低下が MMT assay により確認された。

以上の結果より、イヌメラノーマ細胞では GLUT1 および GLUT3 を介して細胞内へのグルコース輸送が行われること、細胞内輸送されたグルコースの代謝が細胞増殖に深く関わることを明らかとなった。

4. 結論

哺乳類の細胞において、グルコースは主要なエネルギー源である。正常細胞においては、グルコースはグルコース輸送体により細胞内に輸送され、解糖系にて嫌氣的に代謝された後にミトコンドリアに取り込まれ、好氣的代謝系にて ATP 産生の基質となって機能する。一方、腫瘍細胞においては、グルコースの取り込みが促進され、好氣的な条件下においても解糖系からエネルギーを獲得する代謝に利用され、腫瘍細胞の生存や増殖を助長するワールブルグ効果が認められる。

本研究は、イヌ口腔内メラノーマ細胞 (MCM-N1, KMeC および CMec-1 細胞株) の増殖能におけるグルコース代謝およびグルコース輸送体との関与を検討した。

イヌメラノーマ細胞におけるグルコース代謝を、グルコース取り込み、グルコース消費、乳酸分泌を測定し、解糖系阻害剤として知られるグルコースアナログがそれらを阻害することから解糖系の関与を明らかにした。また、グルコース輸送体の1つである GLUT の阻害剤によりグルコース代謝が抑制されることから、GLUT の関与を明らかにした。さらに、siRNA 導入によりノックダウン細胞を作成し、GLUT のアイソフォームである GLUT1 および GLUT3 がグルコース輸送とグルコース代謝調節に関わることを明らかにした。それぞれのグルコース輸送と代謝の阻害は、同時にイヌメラノーマ細胞の増殖を抑制することから、グルコース輸送とグルコース代謝がイヌメラノーマ細胞の増殖に関わることを明らかにした。

以上の知見は、悪性度が極めて高く、予後が極めて悪いとされるイヌ口腔内メラノーマの治療法や増殖メカニズムの解明に大きく貢献すると考えられる。