

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

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻
博士課程

諏訪部陽子

2023

目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	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	5
2.1	緒言	6
2.2	材料と方法	7
2.2.1	材料	7
2.2.2	細胞培養	8
2.2.3	M TT assay	8
2.2.4	グルコースおよび乳酸測定	8
2.2.5	統計学的解析	9
2.3	結果	9
2.3.1	イヌメラノーマ細胞の増殖における 2-DG の効果	9
2.3.2	2-DG によるイヌメラノーマ細胞におけるグルコース消費 と乳酸分泌の抑制	10
2.4	考察	10
第 3 章	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	16
3.1	緒言	17
3.2	材料と方法	18
3.2.1	材料	18
3.2.2	細胞培養	18

3.2.3	MTT assay	19
3.2.4	グルコースおよび乳酸測定	19
3.2.5	2-NBDG uptake assay	19
3.2.6	統計学的解析	20
3.3	結果	20
3.3.1	イヌメラノーマ細胞の増殖における GLUT 阻害剤の効果	20
3.3.2	GLUT 阻害剤 WZB-117 によるイヌメラノーマ細胞 のグルコース消費と乳酸分泌の抑制	21
3.3.3	イヌメラノーマ細胞におけるグルコース取り込みの WZB- 117 による抑制	21
3.4	考察	22
第 4 章	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	30
4.1	緒言	31
4.2	材料と方法	32
4.2.1	材料	32
4.2.2	細胞培養	33
4.2.3	RT-PCR	34
4.2.4	Western blotting	34
4.2.5	siRNA 導入	35
4.2.6	MTT assay	35
4.2.7	グルコースおよび乳酸測定	36
4.2.8	2-NBDG uptake assay	36

4.2.9	統計学的解析	36
4.3	結果	
4.3.1	イヌメラノーマ細胞における GLUT アイソフォーム mRNA の発現	37
4.3.2	イヌメラノーマ 細胞の GLUT1 と GLUT3 によるグル コースの細胞内への輸送	37
4.3.3	イヌメラノーマ細胞におけるグルコース消費と乳酸分泌へ の GLUT1 と GLUT3 の関与	38
4.4	考察	39
		47
第 5 章	総括	
謝辞		50
参考文献		51

第 1 章

序 論

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 14.4-45.5% と最も多く認められ、特に老齢の小型犬、ダックスフント、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 (Bergman et al., 2013)。局所浸潤、リンパ節転移や主に肺への遠隔転移も早く、遠隔転移の割合は 59-74% がリンパ節、17-51%は肺に認められたと報告されている (Bostock et al., 1979)。また、無治療の生存期間は 2 ヶ月未満と報告されている (Isabelle et al., 2013) ため、治療には化学療法、放射線療法、外科手術などが施されているが、放射線治療での中央生存期間は約 5.3 ヶ月～11.9 ヶ月であり、顎骨切除などの侵襲的な外科手術を行っても約 9 ヶ月と非常に短い (Todoroff et al., 1979)。外科治療単独では術後の 1 年生存率は 25% 未満である (Tuohy et al., 2014)。化学療法は奏率が約 30%であり、カルボプラチンと放射線療法の併用で中央生存期間は 286 日であると報告されている (Rassnick et al., 2001)。他に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いない。アメリカでは、効果は限定的であるが、ステージII とIII の口腔内メラノーマへの DNA ワクチンを用いた治療が行われているが、日本では認可されていない。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いる。そのため、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、解糖系経路のピルビン酸は好氣的環境下において、ミトコンドリア内に輸送され、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体によって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 (Pelicano et al., 2006; Koppenol et al., 2011; Lu et al., 2015)。

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。Glucose transporter (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 (Mueckler et al., 2013; Long et al., 2015)。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。Class 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 (Thorens et al., 2010)。

本研究では、イヌメラノーマ治療に結び付けることを目的とし、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。

第2章は、グルコースアナログである 2-deoxy-D-glucose (2-DG) を用いて、イヌメラノーマ細胞における細胞増殖能に対するグルコース代謝の関与を検討した。2-DG 処理をしたイヌメラノーマ細胞において、グルコース消費、乳酸分泌およびグルコースの取り込みを測定し、細胞増殖能との関連を検討した。

第3章は、GLUT 阻害剤である WZB-117 を用いて、イヌメラノーマ細胞における細胞増殖能に対するグルコース輸送の関与を検討した。WZB-117 処理をしたイヌメラノーマ細胞において、グルコース消費、乳酸分泌およびグルコースの取り込みを測定し、細胞増殖能との関連を検討した。

第4章は、第3章で得られた GLUT 阻害剤である WZB-117 の結果を基に、イヌメラノーマ細胞における GLUT アイソフォーム発現とその機能の検討を行った。イヌメラノーマ細胞における GLUT アイソフォームの mRNA 発現を Real-time PCR で検討し、また、タンパク質発現を、特異抗体を用いた western blot 法により検討した。さらに、イヌメラノーマ細胞に発現する GLUT アイソフォーム発現を siRNA 導入により抑制し、グルコース消費、乳酸分泌およびグルコースの取り込みを測定し、GLUT との機能と細胞増殖能との関連を検討した。

第2章

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

2.1 緒言

イヌ口腔内メラノーマは犬の口腔内で最も多く発生し、最も悪性度や死亡率の高い腫瘍の1つである。高齢犬に多く認められ、罹患した犬の平均年齢は約9-12歳である (Putnová et al., 2020)。現在、イヌ口腔内メラノーマは有効な治療法が無く、予後不良であることが知られている。メラノーマは腫瘍の中でも細胞増殖の速度が早く、高頻度に転移する特徴がある。外科手術で1 cm のマージンで切除を行ったところ、7-10ヶ月の生存期間であると報告されている (Kosovsky et al., 1991; Sarowitz et al., 2017)。また、再発率は22-48%と報告されている (Kosovsky et al., 1991; Wallace et al., 1992; Sarowitz et al., 2017)。

グルコースは正常細胞においても、また、腫瘍細胞においても重要なエネルギー源である。正常細胞においては、細胞内に輸送されたグルコースは解糖系において嫌氣的にピルビン酸にまで代謝される。解糖系においては1分子のグルコースから2分子のATPが産生される。好氣的条件下で、ピルビン酸は続いてミトコンドリア内に輸送され、アセチル CoA に代謝され、クエン酸回路を経て電子伝達系に入り、酸化リン酸化によるATP産生に利用され、最終的には1分子のグルコースから30分子のATPが産生される (Vander Heiden et al., 2009; Wilson, 2017)。

一方、腫瘍細胞では正常細胞とは異なるグルコース代謝が認められる。腫瘍細胞では好氣的環境下においても解糖系が亢進し、グルコースを多く消費し乳酸産生を行う特異的なグルコース代謝が亢進する (Pelicano et al., 2006)。これはワールブルグ効果といわれるものであるが、腫瘍の急速な進行はワールブルグ効果と関連があると考えられている (Pelicano et al., 2006; Koppenol et al., 2011; Lu et al., 2015)。

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

されたグルコース誘導体である。2-DG は、グルコーストランスポーター (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、細胞内に蓄積される (Wick et al., 1957; Chen et al., 1992)。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 (Bertoni, 1981; Kurtoglu et al., 2007a; 2007b; Ralser et al., 2008; Giammarioli et al., 2012; Zhang et al., 2014)。

本章では、イヌメラノーマ細胞の細胞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。

2.2 材料と方法

2.2.1 材料

イヌメラノーマ細胞 (MCM-N1 細胞株) は DS ファーマバイオメディカル (Osaka, Japan) から購入した。また、KMeC および CMec-1 細胞株 (Inoue et al., 2004; Yoshitake et al., 2017; Endo et al., 2019) は中川貴之先生 (東京大学大学院農学生命科学科) からの御厚意で提供された。Dulbecco's modified Eagle medium with 1 g/L glucose (DMEM-LG), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 測定試薬, グルコース測定キット (glucose assay kit-WST), 乳酸測定キット (lactate assay kit-WST) は Dojindo (Tokyo, Japan) から購入した。2-DG は Merck (Darmstadt, Germany) から購入した。StatMate IV は ATMS (Tokyo, Japan) から購入した。trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液は Roche (Mannheim, Germany) から購入した。CELLBANKER は Nippon Zenyaku Kogyo (Fukushima, Japan) から購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。

2.2.2 細胞培養

イヌメラノーマ細胞は 37 °C, 5% の二酸化炭素下において 10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加した DMEM-LG に静置培養した。培養液は 1 週間に 1 回新鮮なものに交換した。90-95%の細胞培養密度に到達後, 0.25% trypsin-EDTA 処理にて採取し, 2×10^6 cells/500 μ L の濃度で CELLBANKER 1 plus medium に浮遊させて, 冷凍貯蔵庫 (BICELL) にて-80 °C で保存した。実験前に容器は BICELL から移動し, 37 °C のウォーターバスに浸した。解凍された細胞懸濁液は遠心管に 10% FBS を含む DMEM-LG と遠心分離器で 300 g 3 分遠心分離した。得られたペレットは 10%FBS を含む DMEM-LG に懸濁し, 75 cm² の培養フラスコに移し, フラスコ当たり 1×10^6 個となるよう播種し, 凍結保存前と同じ条件で静置培養した。細胞は約 90%まで細胞を増殖させ, 0.25% trypsin-EDTA を使用し回収した。

2.2.3 MTT assay

細胞密度を 96 ウェルのプレートに 3,000 cells/200 μ L になるように播種した。MTT assay 試薬は濃度が 5 mg/mL になるようリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶 8 解し, 各 well に 20 μ L ずつ加え, 37 °C, CO₂ 5%の条件下で 1 時間培養した。培養後 PBS にて洗浄し, 生成されたホルマザンを 0.04 M 塩酸を含む 2 プロパノール 200 μ L にて溶解した。その後, 波長 570 nm の吸光度をプレートリーダー (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific K.K, Kanagawa, Japan) にて検出した。

2.2.4 グルコースおよび乳酸測定

細胞は 6 ウェルプレートに 3×10^5 cells/mL の密度で播種した。細胞を 5 mM 2-DG 存在下で 72 時間培養し、上清を回収した。培養上清中のグルコース濃度および乳酸濃度をグルコース測定キット (glucose assay kit-WST, Dojindo) および乳酸測定キット (lactate assay kit-WST, Dojindo) を用いて測定した。

2.2.5 統計学的解析

実験データは平均 \pm 標準誤差として算出した。統計解析は、StatMate IV を用いて実施した。タイムコースの実験データは二元配置分散分析を用いて解析し、その他の実験データは paired t test を用いて解析した。P 値が 0.05 よりも少ない場合を統計的に有意とした。

2.3 結果

2.3.1 イヌメラノーマ細胞の増殖における 2-DG の効果

最初に、イヌメラノーマ細胞の細胞増殖に対する 2-DG の効果を検討した。図 2-1a に示すように、イヌメラノーマ MCM-N1 細胞を 3 日間培養すると、2-DG 非存在下で認められた時間依存的な細胞増殖は、5 mM 2-DG 存在下の培養では有意に減少した。

次に、イヌメラノーマ細胞の細胞増殖に対する 2-DG の効果の用量依存性を検討した。2-DG の濃度を 0 から 20 mM まで変化をさせてイヌメラノーマ細胞を 3 日間培養すると、図 2-1b に示すように、細胞増殖は 1.25 mM から 20 mM まで 2-DG の用量に依存した抑制が認められた。イヌメラノーマの異なる細胞株である KMeC および CMec-1 細胞においても、5 mM 2-DG は細胞増殖を有意に抑制した (図 2-2)。

以上の結果から、イヌメラノーマ細胞の細胞増殖にはグルコース代謝が関わることが示唆された。

2.3.2 2-DG によるイヌメラノーマ細胞におけるグルコース消費と乳酸分泌の抑制

2-DG 存在下で培養したイヌメラノーマ細胞において細胞増殖が抑えられたことから、2-DG によるグルコース代謝の抑制が細胞増殖を抑制したと考えられる。そこで、イヌメラノーマ細胞におけるグルコース消費と乳酸分泌に対する 2-DG の効果を検討した。

5 mM 2-DG 存在下で 3 日間培養したイヌメラノーマ 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、図 2-3a に示すように 2-DG による有意なグルコース消費の抑制が認められた。

細胞内へ輸送されたグルコースは、最初に解糖系により代謝される。そこで、解糖系の代謝物である乳酸分泌について検討した。図 2-3b に示すように、乳酸分泌においてもグルコース消費と同様に、5 mM 2-DG 存在下で 3 日間培養した MCM-N1 細胞において、2-DG 非存在下で培養した細胞と比べると、2-DG による有意な抑制が認められた。イヌメラノーマの異なる細胞株である KMeC および CMec-1 細胞においても、5 mM 2-DG は細胞増殖を有意に抑制した (図 2-4)。

以上の結果より、2-DG によるグルコース代謝の抑制がイヌメラノーマ細胞の増殖抑制の原因となることが示唆された。

2.4 考察

グルコースアナログの 1 つである 2-DG は、グルコースと同じように GLUT を介して細胞内に取り込まれる。細胞内に取り込まれた 2-DG は、hexokinase に

よって 2-DG-6-リン酸 (2-DG-6-P) にリン酸化される。グルコースが細胞内に輸送されると、hexokinase によりグルコース 6-リン酸 (G-6-P) にリン酸化され、G-6-P はさらに、ホスホグルコースイソメラーゼにより異性化されてフルクトース 6-リン酸に代謝される (Wick et al., 1957; Chen et al., 1992)。しかし、2-DG-6-P は異性化の基質になるための 2-ヒドロキシ基を持たないため代謝されず、細胞内に蓄積することになる。また、2-DG はホスホグルコースイソメラーゼを競合的に、ヘキソキナーゼを非競合的に阻害することも報告されており、解糖系やグルコース代謝系阻害剤として広く用いられている (Bertoni, 1981; Kurtoglu et al., 2007a; 2007b; Ralser et al., 2008; Giammarioli et al., 2012; Zhang et al., 2014)。

本章で示されたように、2-DG はイヌメラノーマ細胞の増殖を有意に抑制した。さらに、2-DG 処理されたイヌメラノーマ細胞においては、グルコース消費および乳酸分泌が減少していた。これらのことから、イヌメラノーマ細胞において、グルコース代謝、特に解糖系が多く腫瘍細胞と同様に亢進しており、細胞増殖に関わるものと考えられる。

これまでに 2-DG は、種々のがん細胞におけるタンパク質の N-結合化グリコシル化 (N-linked glycosylation) を干渉し、小胞体ストレスとアポトーシスを引き起こすことも報告されている (Kurtoglu et al., 2007a)。また、2-DG は正常細胞と比べてグルコースの取り込みが旺盛となったがん細胞に優位に取り込まれることから、動物やヒトにおいて比較的安全で、毒性が低い薬物と考えられている (Kurtoglu et al., 2007b; Ralser et al., 2008; Stein et al., 2010; Giammarioli et al., 2012; Zhang et al., 2014)。これらのことから、2-DG はイヌメラノーマにおける治療薬としての利用も可能性として考えられるが、使用する濃度が高いため、より強力かつ安全性の高いグルコースアナログの開発も必要と思われる。

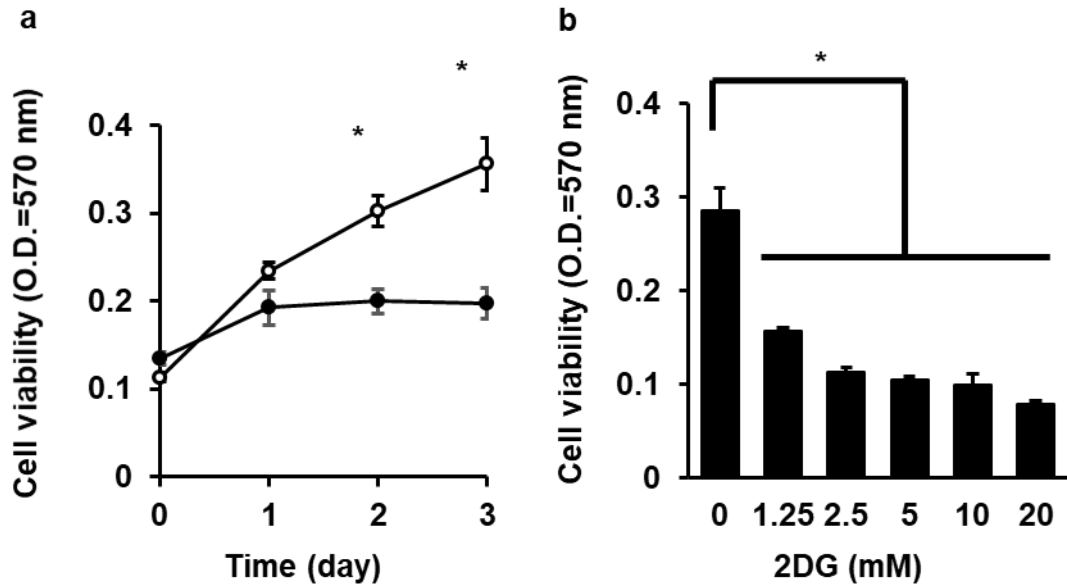


図 2-1. イヌメラノーマ細胞 (MCM-N1 細胞株) の細胞増殖における 2-デオキシ-D-グルコースの効果

(a) イヌメラノーマ MCM-N1 細胞の細胞増殖の時間依存変化。MCM-N1 細胞を 5 mM 2-deoxy-D-glucose (2-DG) の存在下 (closed circle) または非存在下 (open circle) で 0-3 日間培養した。2-DG 存在下で、細胞増殖は有意に抑制された。

(b) イヌメラノーマ MCM-N1 細胞の細胞増殖に対する 2-DG の用量依存変化。MCM-N1 細胞を 0-20 mM 2-DG の存在下で 3 日間培養した。細胞増殖は 2-DG の用量に依存して有意に抑制された。

結果は、3 回の独立した実験結果の平均±標準誤差を示す。* 0 日 (a) または 0 mM (b) の結果と比較して $P < 0.05$ 。

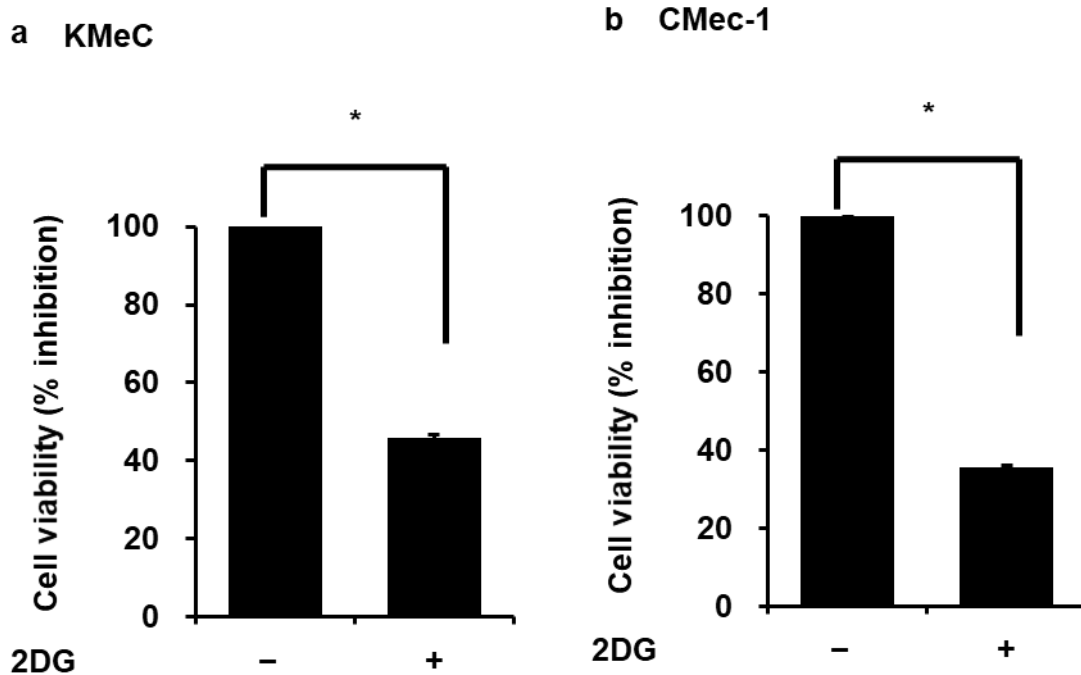


図 2-2. イヌメラノーマ KMeC および CMec-1 細胞 の細胞増殖における 2-デオキシ-D-グルコースの効果

イヌメラノーマ KmeC 細胞 (a) および CMec-1 細胞 (b) を 5 mM 2-deoxy-D-glucoose (2-DG) の存在下または非存在下で 3 日間培養した。2-DG 存在下で、細胞増殖は有意に抑制された。

結果は、3 回の独立した実験結果の平均±標準誤差を示す。* 0 日 の結果と比較して $P < 0.05$ 。

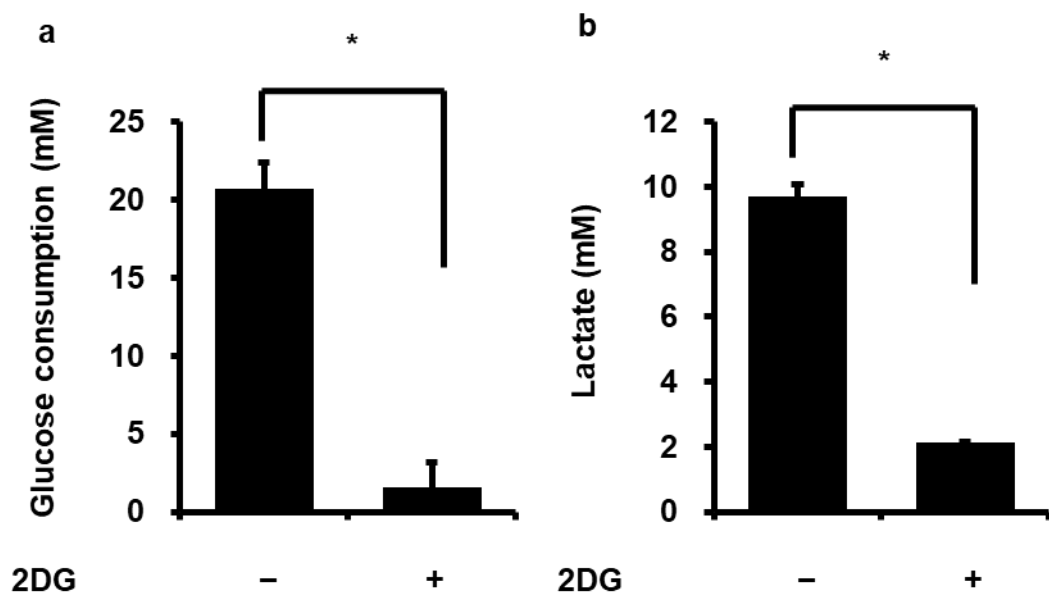


図 2-3. イヌメラノーマ MCM-N1 細胞におけるグルコース消費と乳酸分泌に対する 2-デオキシ-D-グルコースの抑制効果

MCM-N1 細胞を 5 mM 2-deoxy-D-glucose (2-DG) の存在下または非存在下 3 日間培養し,グルコース消費 (a) および乳酸分泌 (b) を比較した。2-DG 存在下で培養した細胞においては, グルコース消費および乳酸分泌共に有意に抑制された。結果は, 3 回の独立した実験結果の平均±標準誤差を示す。* $P < 0.05$ 。

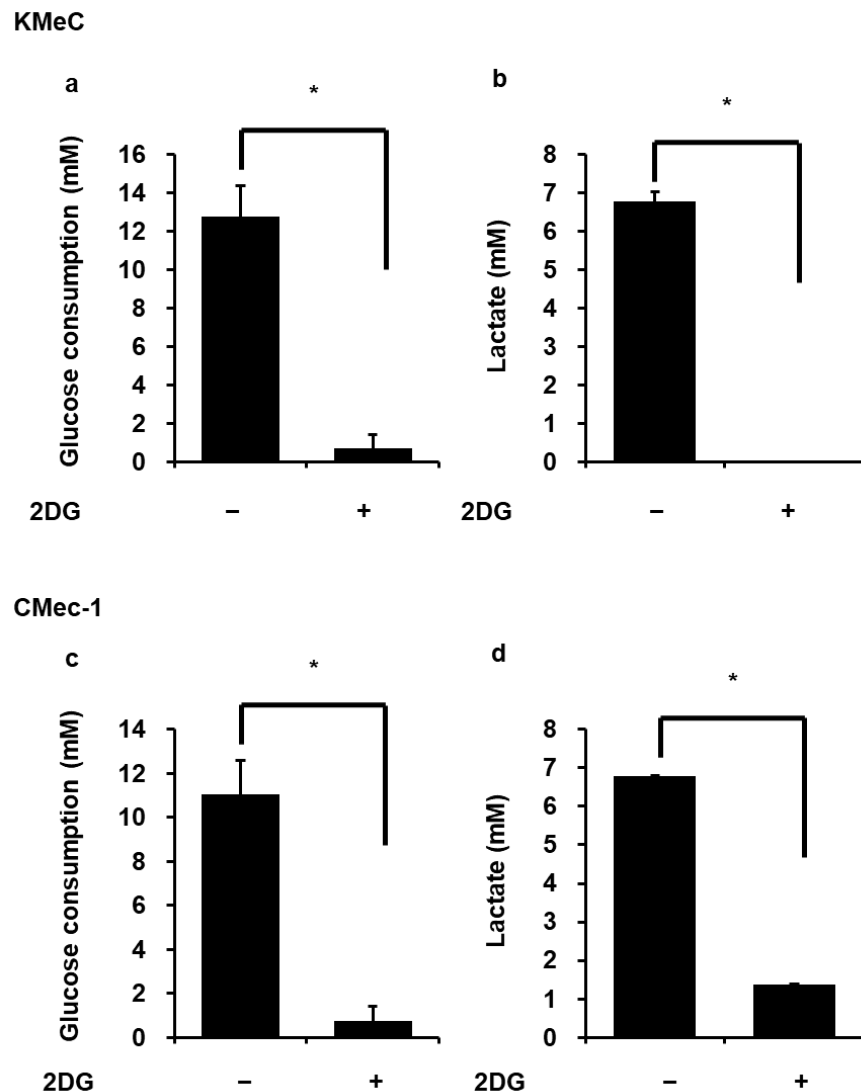


図2-4. イヌメラノーマ KMeC および CMec-1 細胞 におけるグルコース消費と乳酸分泌に対する 2-デオキシ-D-グルコースの抑制効果

KMeC および CMec-1 細胞 を 5 mM 2-deoxy-D-glucose (2-DG) の存在下または非存在下 3 日間培養し、グルコース消費 (a, c) および乳酸分泌 (b, d) を比較した。KMeC および CMec-1 細胞 において、2-DG 存在下で培養した細胞においては、グルコース消費および乳酸分泌共に有意に抑制された。結果は、3 回の独立した実験結果の平均±標準誤差を示す。 * $P < 0.05$ 。

第3章

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

3.1 緒言

グルコースは哺乳類において重要なエネルギー源である。生体を構成する様々な細胞は、グルコースを取り込み、好気的環境下において酸化的リン酸化によりたくさんの ATP を産生し、それを利用して機能を営んでいる (Mitchell et al., 1961)。一方、腫瘍細胞では、好気的環境下においても、細胞内に取り込まれたグルコースは嫌氣的代謝経路である解糖系により必要な ATP 産生を行う。この腫瘍細胞に特有な好氣的な解糖はワールブルク効果と呼ばれ、解糖系の代謝産物である乳酸産生が亢進する (Adekola et al., 2012)。

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、細胞内へのグルコース輸送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外のグルコースを細胞内へ輸送する。哺乳類においてグルコースを含む糖の輸送体は促進性グルコーストランスポーターファミリーである GLUT と、ナトリウムイオンの濃度勾配を利用しグルコースとナトリウムを能動的に同時輸送する共輸送体である SGLT ファミリーの 2 つのタイプに分類される (Thorens et al., 2010; Mueckler et al., 2013)。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 (Calvo et al., 2010)。

第 2 章では、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-deoxy-D-glucose (2-DG) を用いて、イヌメラノーマ細胞の増殖にグルコース代謝が必須であることを明らかにした。本章では、イヌメラノーマ細胞の増殖におけるグルコーストランスポーターの役割を明らかにすることを目的とし、イヌメラノーマ細胞の増殖能に対する GLUT 阻害剤である WZB-117 の効果を検討した。

3.2 材料と方法

3.2.1 材料

イヌメラノーマ細胞 (MCM-N1 細胞株) は DS ファーマバイオメディカル (Osaka, Japan) から購入した。また, KMeC および CMec-1 細胞株 (Inoue et al., 2004; Yoshitake et al., 2017; Endo et al., 2019) は中川貴之先生 (東京大学大学院農学生命科学科) からの御厚意で提供された。The Dulbecco's modified Eagle medium with 1 g/L glucose (DMEM-LG), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 測定試薬, グルコース測定キット(glucose assay kit-WST), 乳酸測定キット(lactate assay kit-WST)は Dojindo (Tokyo, Japan) から購入した。WZB-117 は Merck (Darmstadt, Germany) から購入した。StatMate IV は ATMS (Tokyo, Japan) から購入した。2-NBDG (2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose) は Peptide Institute Inc (Osaka, Japan) から購入した。trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液は Roche (Mannheim, Germany)から購入した。CELLBANKER は Nippon Zenyaku Kogyo (Fukushima, Japan) から購入した。

3.2.2 細胞培養

第 2 章での記載と同様に, イヌメラノーマ細胞は 37 °C, 5%の二酸化炭素下において 10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加した DMEM-LG に静置培養した。培養液は 1 週間に 1 回新鮮なものに交換した。90-95%の細胞培養密度に到達後, 0.25% trypsin-EDTA 処理にて採取し, 2×10^6 cells/500 μ L の濃度で CELLBANKER 1 plus medium に浮遊させて, 冷凍貯蔵庫(BICELL) にて-80 °C で保存した。実験前に容器は BICELL から移動し, 37 °C のウォーターバスに浸した。解凍された細胞懸濁液は遠心管に 10% FBS を含む DMEM-LG と遠心分離器で 300 g 3 分

遠心分離した。得られたペレットは 10%FBS を含む DMEM-LG に懸濁し、75 cm² の培養フラスコに移し、フラスコ当たり 1×10^6 個となるよう播種し、凍結保存前と同じ条件で静置培養した。細胞は約 90%まで細胞を増殖させ、0.25% trypsin-EDTA を使用し回収した。

3.2.3 MTT assay

細胞増殖能も第 2 章と同様に MTT assay を用いて測定した。細胞密度を 96 ウェルのプレートに 3,000 cells/200 μ L になるように播種した。MTT assay 試薬は濃度が 5 mg/mL になるようリン酸緩衝生理食塩水(PBS) に溶解し、各 well に 20 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C, CO₂ 5%の条件下で 1 時間培養した。培養後 PBS にて洗浄し、生成されたホルマザンを 0.04 M 塩酸を含む 2 プロパノール 200 μ L にて溶解した。その後、波長 570 nm の吸光度をプレートリーダー (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific K.K, Kanagawa, Japan) にて検出した。

3.2.4 グルコースおよび乳酸測定

細胞は 6 ウェルプレートに 3×10^5 cells/mL の密度で播種した。細胞を 60 μ M WZB-117 存在下で 3 日間培養し、上清を回収した。培養上清中のグルコース濃度および乳酸濃度は第 2 章と同様に市販のキットを用いて測定した。

3.2.5 2-NBDG uptake assay

グルコースの細胞内への取り込みは蛍光指示薬である 2-NBDG を用いて測定した。細胞は 35 mm のガラス底面容器に 3×10^5 cells/mL の密度で播種した。細胞を 60 μ M WZB-117 存在下で 24 時間培養した。2-NBDG は 10%FBS を含む PBS で溶解し、50 μ M の濃度に調整した。1 mL の 2-NBDG 試薬にて細胞を

37 °C, CO₂ 5% の条件下で 30 分培養した。培養後に細胞を PBS で洗浄し, 4% パラフォルムアルデヒドにて 15 分間固定した。蛍光シグナルは共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) を使用し, 励起波長と蛍光波長はそれぞれ 465 nm と 540 nm を用いて視覚化した。

3.2.6 統計学的解析

実験データは平均 ± 標準誤差として算出した。統計解析は, StatMate IV を用いて実施した。時間依存性の実験データは二元配置分散分析を用いて解析し, その他の実験データは *paired t test* を用いて解析した。P 値が 0.05 よりも少ない場合を統計的に有意とした。

3.3 結果

3.3.1 イヌメラノーマ細胞の増殖における GLUT 阻害剤の効果

好氣的環境下において, 解糖系による ATP 産生 (ワールブルグ効果) はがん細胞の細胞増殖において重要であり, 細胞膜における GLUT を介して輸送するグルコースは解糖系の律速段階と考えられている。そこで, イヌメラノーマの細胞増殖に対する GLUT 阻害剤である WZB-117 の効果を検討した。イヌメラノーマ MCM-N1 細胞を WZB-117 60 μM で処理し, 3 日間培養したところ, 図 3-1a に示すように, 2 から 3 日目に WZB-117 で処理した MCM-N1 細胞の細胞増殖に有意な抑制が認められた。WZB-117 の濃度を 0-60 μM と変化をさせた 3 日間培養したところ, MCM-N1 細胞の増殖に対する WZB-117 の抑制効果は用量に依存していた (図 3-1b)。イヌメラノーマの異なる細胞株である KMeC および CMec-

1 細胞においても、WZB-117 による細胞増殖の有意な抑制が認められた (図 3-2)。

以上の結果より、GLUT 阻害剤 WZB-117 はイヌメラノーマ細胞の細胞増殖抑制効果を有することが確認された。

3.3.2 GLUT 阻害剤 WZB-117 によるイヌメラノーマ細胞のグルコース消費と乳酸分泌の抑制

前節で観察された WZB-117 による増殖抑制は、WZB-117 によるグルコースの細胞内への輸送の抑制が考えられることから、イヌメラノーマ細胞におけるグルコース消費と乳酸分泌に対する WZB-117 の効果を検討した。

イヌメラノーマ MCM-N1 細胞を WZB-117 60 μ M 3 日間処理した後に細胞のグルコース消費を測定すると、図 3-3a に示すように、WZB-117 は有意にグルコース消費を抑制した。同時に、解糖系の代謝物である乳酸の分泌を測定すると、図 3-3b に示すように、WZB-117 処理した MCM-N1 細胞では非処理細胞に比べ、乳酸分泌は有意に抑制された。イヌメラノーマの異なる細胞株である KMeC および CMec-1 細胞においても、図 3-4 に示すように、60 μ M WZB-117 はグルコース消費 (a, c) および乳酸分泌 (b, d) を有意に抑制した。

以上のことから、イヌメラノーマ細胞において GLUT 阻害剤 WZB-117 によりグルコースの取り込みが減少し、基質の不足により解糖系による代謝が抑制され、乳酸分泌が減少したと考えられる。

3.3.3 イヌメラノーマ細胞におけるグルコース取り込みの WZB-117 による抑制

WZB-117 による効果が細胞へのグルコースの取り込み阻害によるものであることを確認するため、グルコースに蛍光分子が結合した 2-NBDG (Yoshioka et

al.,1996)を用いて、イヌメラノーマ MCM-N1 細胞へのグルコースの取り込みを検討した。図 3-5 に示すように、WZB-117 処理した細胞においては、非処理細胞と比較して、グルコース取り込みが有意に減少することが確認された。イヌメラノーマの異なる細胞株である KMeC および CMec-1 細胞においても、WZB-117 によるグルコース取り込みの有意な抑制が認められた (図 3-6)。

以上の結果より、GLUT 阻害剤 WZB-117 はイヌメラノーマ細胞へのグルコースの取り込みを抑制することが確認された。

3.4 考察

WZB-117 は細胞膜表面の糖結合部位に可逆的に結合し、糖の輸送を阻害する GLUT の阻害剤である (Liu et al., 2012; Pliszka et al., 2021)。本章では、WZB-117 で処理したイヌメラノーマ細胞では細胞増殖が抑制されることを示した。以前に、肉腫ウイルスに感染させた線維芽細胞が悪性に細胞変化する過程において、グルコースの取り込みが上昇することが報告されており、このようなグルコース輸送の増加は GLUT の過剰発現によるものと考えられている (Hatanaka, 1974)。WM3221, Mel-IM, SbCl₂ などのヒトメラノーマ細胞では、GLUT 阻害剤の処理により用量依存的にグルコース消費に伴って細胞増殖が抑制されたと報告されている (Koch et al., 2015)。本研究においても、実際に WZB-117 はグルコースの輸送を抑止し、WZB-117 処理をした細胞においては、グルコース消費および乳酸分泌が減少した。第 2 章で明らかにされたように、イヌメラノーマ細胞の増殖には解糖系におけるグルコース代謝が重要であることから、GLUT の阻害が基質としてのグルコース供給を抑えた結果、解糖系が抑制され、細胞増殖抑制効果がもたらされたと考えられる。また、WZB-117 の効果は、GLUT を介した細

胞膜におけるグルコース輸送が、解糖系へのグルコース供給系としての律速段階にあることを示唆している。これらの結果は、イヌメラノーマにおいて GLUT は抗腫瘍治療のターゲットになる可能性があると考えられる。

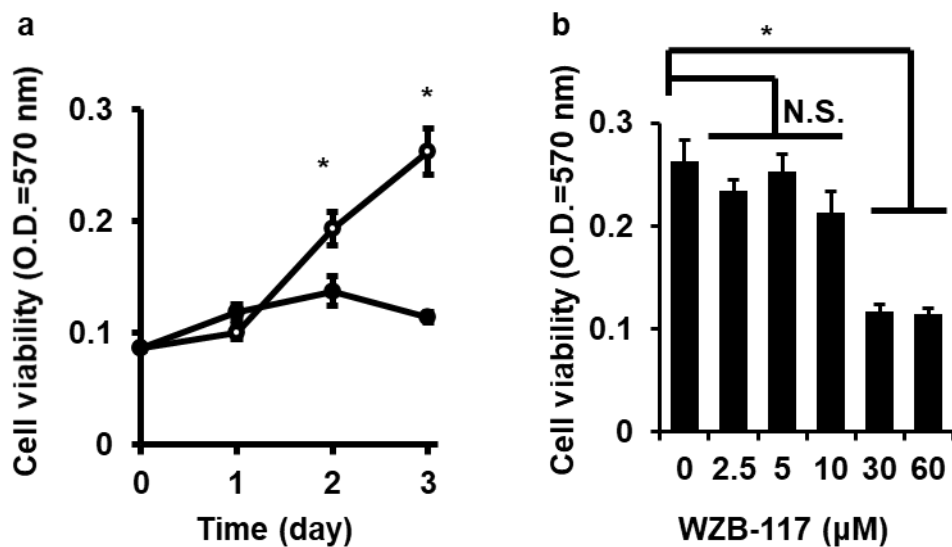


図 3-1. イヌメラノーマ細胞 (MCM-N1 細胞株) の細胞増殖における GLUT 阻害剤 WZB-117 の効果

(a) イヌメラノーマ MCM-N1 細胞の細胞増殖の時間依存変化。MCM-N1 細胞を 60 μM WZB-117 の存在下 (closed circle) または非存在下 (open circle) で 0-3 日間培養した。WZB-117 存在下で、細胞増殖は有意に抑制された。

(b) イヌメラノーマ MCM-N1 細胞の細胞増殖に対する WZB-117 の用量依存変化。MCM-N1 細胞を 0-60 μM WZB-117 の存在下で 3 日間培養した。細胞増殖は WZB-117 の用量に依存して有意に抑制された。

結果は、3 回の独立した実験結果の平均±標準誤差を示す。* 0 日 (a) または 0 mM (b) の結果と比較して $P < 0.05$ 。

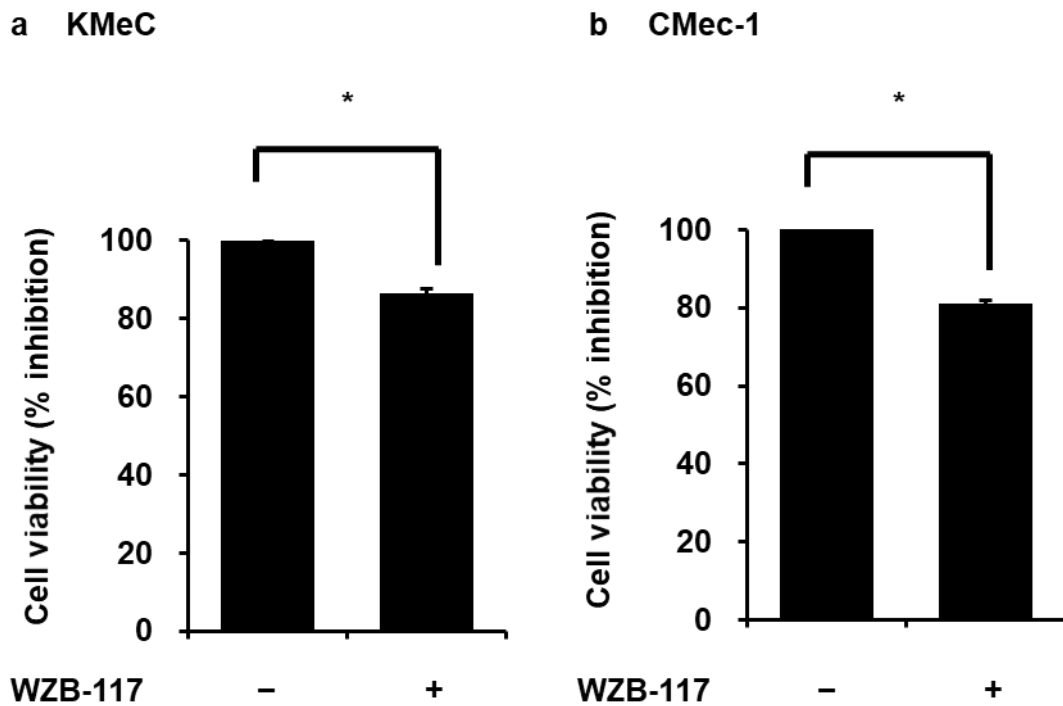


図 3-2. イヌメラノーマ KMeC および CMec-1 細胞の細胞増殖における GLUT 阻害剤 WZB-117 の効果

イヌメラノーマ KMeC 細胞 (a) および CMec-1 細胞 (b) を 60 μ M WZB-117 の存在下または非存在下で 3 日間培養した。WZB-117 存在下で、細胞増殖は有意に抑制された。

結果は、3 回の独立した実験結果の平均 \pm 標準誤差を示す。* 0 日 の結果と比較して $P < 0.05$ 。

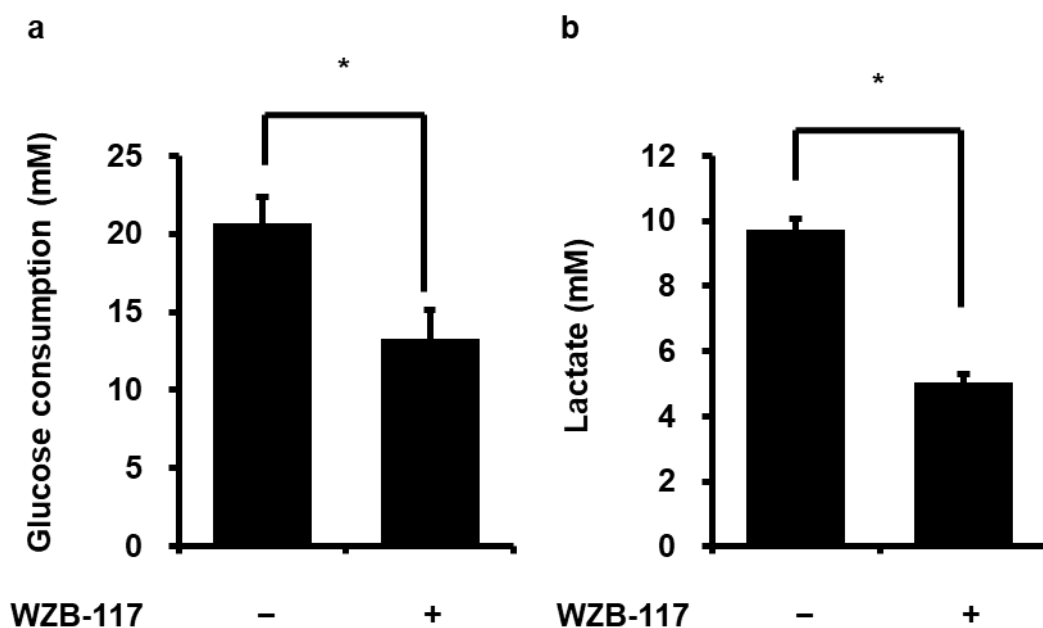


図 3-3. イヌメラノーマ MCM-N1 細胞におけるグルコース消費と乳酸分泌に対する GLUT 阻害剤 WZB-117 の抑制効果

MCM-N1 細胞を 60 μ M WZB-117 の存在下または非存在下 3 日間培養し、グルコース消費 (a) および乳酸分泌 (b) を比較した。WZB-117 存在下で培養した細胞においては、グルコース消費および乳酸分泌共に有意に抑制された。結果は、3 回の独立した実験結果の平均 \pm 標準誤差を示す。* $P < 0.05$ 。

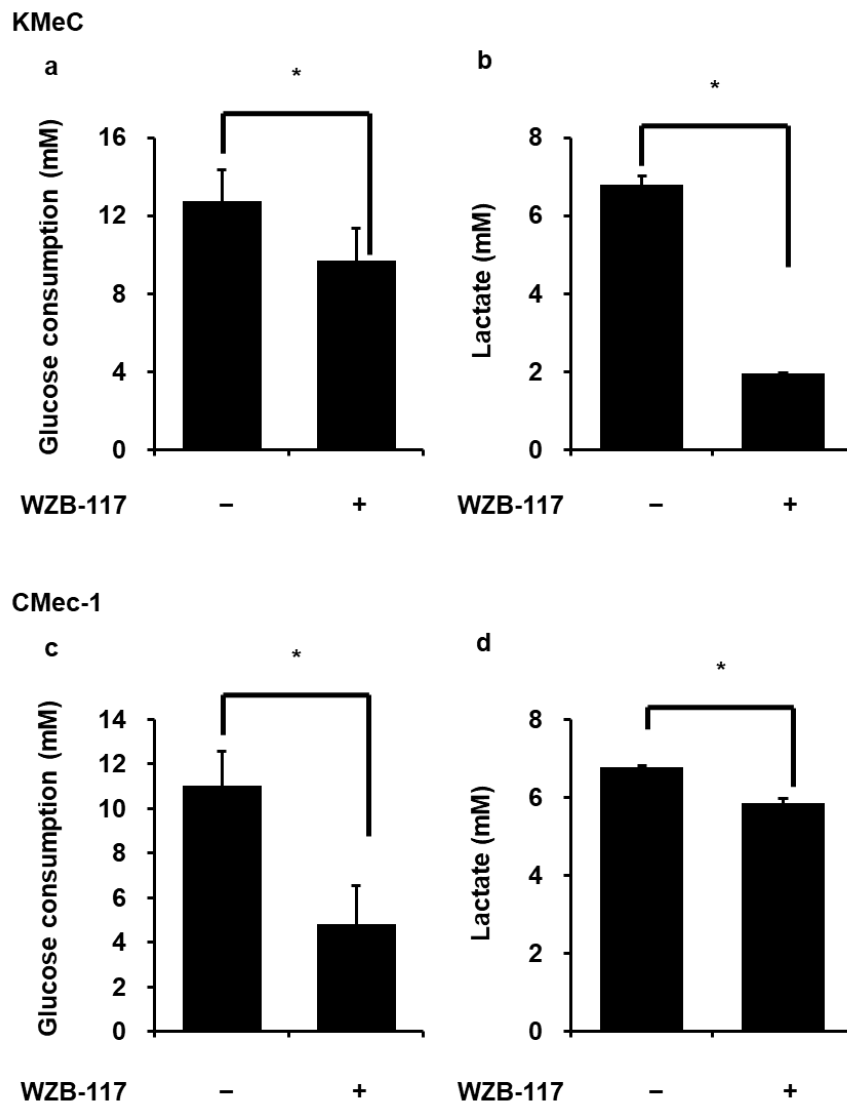


図3-4. イヌメラノーマ KMeC および CMec-1 細胞 におけるグルコース消費と乳酸分泌に対する WZB-117 の抑制効果

KMeC および CMec-1 細胞 を $60 \mu\text{M}$ WZB-117 の存在下または非存在下 3 日間培養し、グルコース消費 (a, c) および乳酸分泌 (b, d) を比較した。KMeC および CMec-1 細胞 において、WZB-117 存在下で培養した細胞においては、グルコース消費および乳酸分泌共に有意に抑制された。結果は、3 回の独立した実験結果の平均 \pm 標準誤差を示す。 * $P < 0.05$ 。

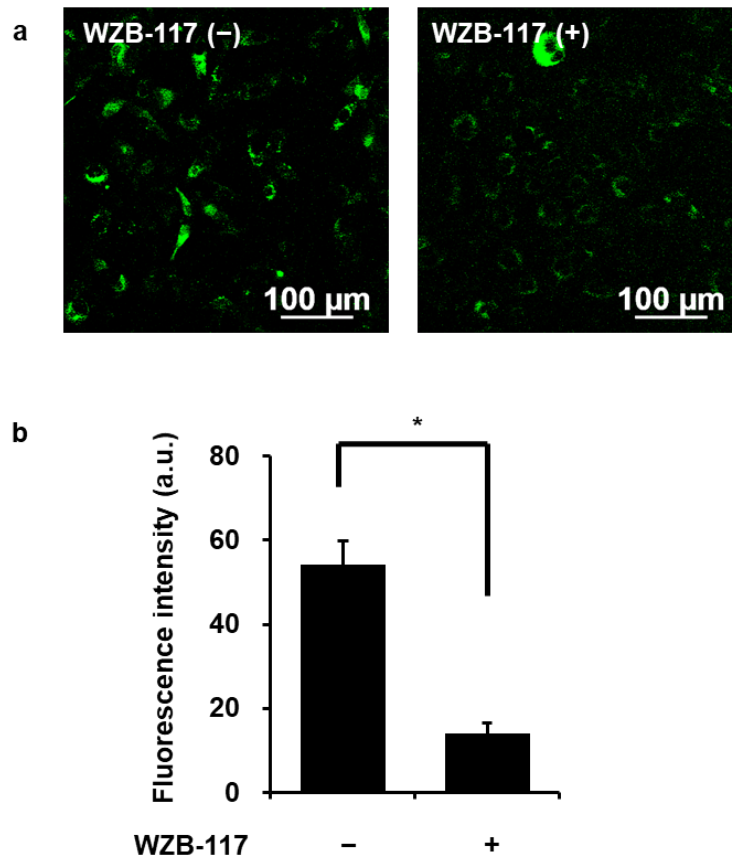


図 3-5. イヌメラノーマ MCM-N1 細胞におけるグルコース (2-NBDG) 取り込みに対する WZB-117 による抑制

MCM-N1 細胞 を 60 μM WZB-117 の存在下または非存在下で 24 時間培養後、2-NBDG を 30 分間取り込ませ、蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡にて測定した。WZB-117 の存在下または非存在下での代表的な蛍光画像(a)と、画像より得られた蛍光強度を数値化した結果(b)を示す。WZB-117 存在下で培養した細胞においては、グルコースの取り込みは有意に抑制された。(b) 結果は、3 回の独立した実験結果の平均 ± 標準誤差を示す。 * $P < 0.05$ 。

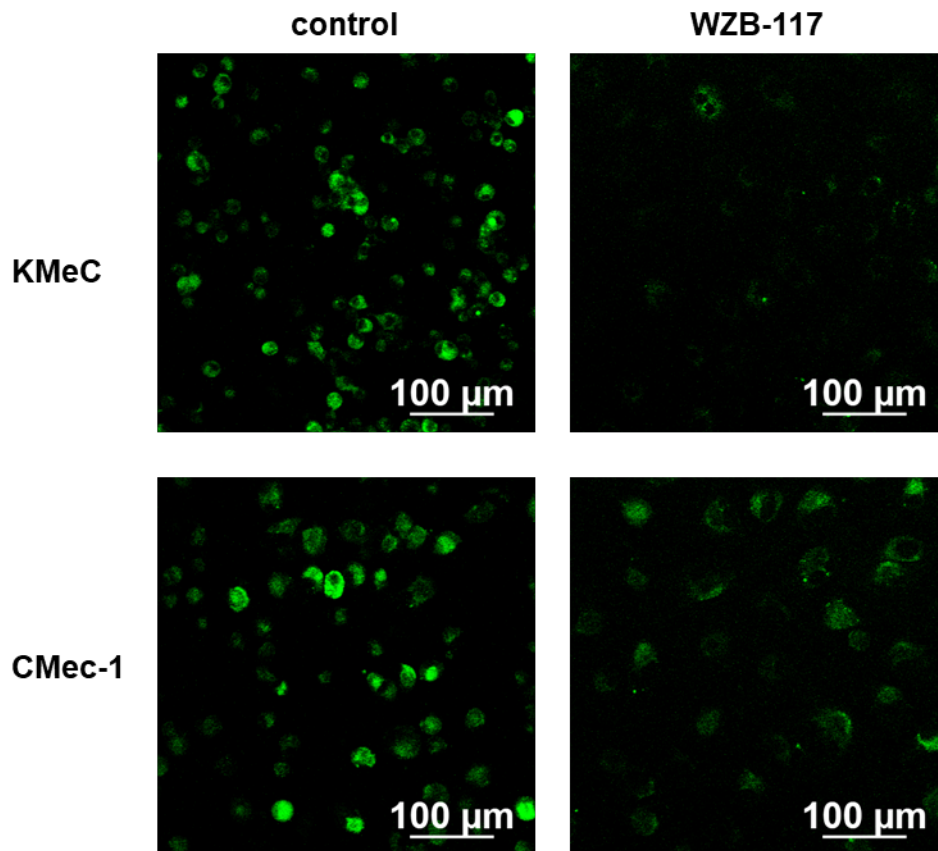


図 3-6. イヌメラノーマ KMeC および CMec-1 細胞 におけるグルコース (2-NBDG) 取り込みに対する WZB-117 による抑制

KMeC および CMec-1 細胞を 60 μM WZB-117 の存在下または非存在下で 24 時間培養後、2-NBDG を 30 分間取り込ませ、蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡にて測定した。WZB-117 存在下で培養した細胞においては、グルコースの取り込みは有意に抑制された。

第4章

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

4.1 緒言

グルコーストランスポーター (GLUT) は、12 回膜貫通型のタンパク質である。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 (Karlsh et al., 1972; Uldry et al., 2004; Thorens et al., 2010)。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、SLC2A1~SLC2A14 の遺伝子によりそれぞれエンコードされる (Karlsh et al., 1972)。14 種類の GLUT は大きく Class I ~ III の 3 つに分類されている (Karlsh et al., 1972; Basketter et al., 1978)。Class I には GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 および GLUT14 が、Class II には GLUT5, GLUT7 および GLUT9 が、Class III には GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 および GLUT13 がそれぞれ含まれるが、Class II と Class III の GLUT に関してはまだ余り研究が進んでいない。

Class II 分類される 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。GLUT1 は全身の組織に広く発現が認められ、グルコースの流入の K_m 値は低い (~2 mM) ことからすべての細胞における基本的なグルコース輸送や貯蔵に関与すると考えられている (Sen et al., 1962; Karlsh et al., 1972; Basketter et al., 1978)。GLUT2 は膵臓、肝臓、腎臓および小腸に発現しており、グルコースに対する K_m 値が 20 mM と高く、インスリン依存性のグルコース取り込みに関与している (Mueckler et al., 2013)。GLUT3 は主に脳、精巣、胎盤に発現し、 K_m 値が 1-2 mM と低く、グルコース代謝に関わる (Maher et al., 1992; Burant et al., 1994; Boileau et al., 1995; Hauguel-de Mouzon et al., 1997)。GLUT4 は脂肪組織、心臓や横紋筋に発現し、インスリンに依存して速やかなグルコース輸送調節がなされる (Bell et al., 1990; Mueckler, 2001; Xing et al., 1998)。GLUT14 は GLUT3 のバリエントで、ゲノム重複が認められ、機能も類似していると推測されているが、詳細については不明な点が多い。

グルコースは哺乳動物の細胞にとって重要なエネルギー源である。正常細胞では細胞内に輸送されたグルコースは、解糖系からクエン酸回路を経て電子伝達系に入り、酸化リン酸化により十分な ATP が産生され、これにより機能が賄われる。一方、腫瘍細胞では、解糖系で産生される ATP が用いられるが、1分子のグルコースからは2分子の ATP しか産生されない。そのため、十分なグルコースの供給のためには輸送系の役割が重要となる。実際、腫瘍細胞においては GLUT の発現が促進されている (Barron et al., 2016; Ancy et al., 2018)。

第3章では、イヌメラノーマ細胞において、GLUT 阻害剤を用いて、GLUT の機能が細胞増殖に関わることを明らかにした。本章においては、イヌメラノーマ細胞に発現する Class I に属する GLUT 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。

4.2 材料と方法

4.2.1 材料

イヌメラノーマ細胞 (MCM-N1 細胞株) は DS ファーマバイオメディカル (Osaka, Japan) から購入した。また、KMeC および CMec-1 細胞株 (Inoue et al., 2004; Yoshitake et al., 2017; Endo et al., 2019) は中川貴之先生 (東京大学大学院農学生命科学科) からの御厚意で提供された。Dulbecco's Modified Eagle medium with 1 g/L glucose (DMEM-LG), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 測定試薬, グルコース測定キット (glucose assay kit-WST), 乳酸測定キット (lactate assay kit-WST) は Dojindo (Tokyo, Japan) から購入した。Lipofectamine 2000 と TRIzol は Life Technologies Co. (Carlsbad, CA) から入手した。PrimeScript RT Master Mix and Ex Taq は TaKaRa Bio Inc. (Shiga, Japan)

から入手した。Rabbit monoclonal anti-GLUT1 (EPR3915) および anti-GLUT3 [EPR10508(N)] 抗体は Abcam (Cambridge, UK) から, mouse monoclonal anti-mouse β -actin antibody (AC74) と scramble RNA, GLUT1 および GLUT3 small-interfering RNA (siRNA)は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO) から入手した。Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG と anti-mouse IgG antibodies, ECL Western Blotting Analysis System, ImageQuant LAS 4000 mini は GE Healthcare (Piscataway, NJ) から購入した。Mini-PROTEAN TGX gel と polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes は Bio-Rad (Hercules, CA)から, Block Ace と complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture は Roche (Mannheim, Germany) から購入した。Dulbecco's Modified Eagle medium (1 g/L glucose 含有, DMEM-LG), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), sodium fluoride, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)から購入した。2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG) は Peptide Institute Inc (Osaka, Japan) から購入した。StatMate IV は ATMS (Tokyo, Japan) から購入した。

4.2.2 細胞培養

前章までと同様に, イヌメラノーマ細胞は 37°C, 5%の二酸化炭素下において 10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加した DMEM-LG に静置培養した。培養液は 1 週間に 1 回新鮮なものに交換した。90-95%の細胞培養密度に到達後, 0.25% trypsin-EDTA 処理にて採取し, 2×10^6 cells/500 μ L の濃度で CELLBANKER 1 plus medium に浮遊させて, 冷凍貯蔵庫(BICELL) にて-80°C で保存した。実験前に容器は BICELL から移動し, 37°C のウォーターバスに浸した。解凍された細胞懸濁液は遠心管に 10% FBS を含む DMEM-LG と遠心分離器で 300 g 3 分遠心分

離した。得られたペレットは 10%FBS を含む DMEM-LG に懸濁し、75 cm² の培養フラスコに移し、フラスコ当たり 1×10^6 個となるよう播種し、凍結保存前と同じ条件で静置培養した。細胞は約 90%まで細胞を増殖させ、0.25% trypsin-EDTA を使用し回収した。

4.2.3 RT-PCR

TRIzol 試薬 (Life Technologies Co.) を用い、メーカーの説明に従ってイヌメラノーマ細胞から total RNA を抽出した。RNA 濃度は 260 nm/280 nm の吸光度で分光光度計により測定された。PrimeScript® RT Master Mix (TaKaRa Bio Inc.) を用いて、500 ng の total RNA から一本鎖 cDNA を合成した。Real-time RT-PCR は、一本鎖 cDNA 10 μ L の GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 と Ex Taq のプライマーの中の 2 μ L を使用した。PCR は以前報告した方法 (Nakano et al., 2015; 2018; Kitanaka et al., 2018) に従って、iCycler (Bio-Rad) を使用して行った。サーマルサイクラーは 94°C 2 分で初期変性、94 °C 30 秒で変性、55 °C 30 秒のプライマーアニーリング、72 °C 30 秒のプライマー伸長 25 サイクルにプログラムされた。PCR 産物は 2%アガロースゲルの電気泳動で分離され、臭化エチジウムで染色された後、UV ライトで視覚化された。同量の cDNA 量から TATA box-binding protein (TBP) を増幅し、内因性コントロールとして適用した。使用したプライマーの配列は表 4-1 に示す。

4.2.4 Western blotting

サンプルバッファー (20 mM HEPES, 1 mM PMSF, 10 mM sodium fluoride および complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, pH 7.4) を用いて細胞の lysate を作成した。タンパク質濃度を Bradford 法 (Bradford, 1976) にて定量

した後, dithiothreitol (DDT) 添加 sodium dodecyl sulfate (SDS) バッファーを加えて 98 °C で 5 分間煮沸した。サンプルを 10 µg ずつ 7.5%または 12% Mini-PROTEAN TGX gel に添加し, 電気泳動を行った。タンパク質を分画後, PVDF 膜へ転写し, Block Ace にて 50 分間室温にてブロッキングを行った。その後, PVDF 膜を一次抗体 [GLUT1 (1:1000), GLUT3 (1:1000) および β-actin (1 : 10,000)] を用いて, 室温で 120 分間インキュベートした。洗浄後, 膜を HRP-conjugated anti-rabbit IgG または HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:10,000) を用いて, 室温で 90 分間インキュベートした。免疫反応は ECL Western Blotting Analysis System を用いて検出した。PVDF 膜の化学発光シグナルは ImageQuant LAS 4000 mini を用いて測定した。

4.2.5 siRNA 導入

以前に報告された方法 (Nakano et al., 2018; Kitanaka et al., 2018) に従い siRNA を細胞に導入した。イヌメラノーマ細胞を 35 mm のディッシュに 1×10^5 個, または 90 mm ディッシュに 5×10^5 個の密度に播種し, 5 µL/mL の Lipofectamine 2000 と 100 nM の GLUT1 siRNA, GLUT3 siRNA または scramble RNA を含む Opti-MEM を使用して 6 時間インキュベートして導入した。導入後, medium は 10%FBS を含む DMEM-LG に交換した。siRNA の効果は western blotting により確認した。使用した siRNA の配列は表 4-2 に示す。

4.2.6 MTT assay

細胞増殖能も前章までと同様に MTT assay を用いて測定した。細胞密度を 96 ウェルのプレートに 3,000 cells/200 µL になるように播種した。MTT assay 試薬は濃度が 5 mg/mL になるようリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解し, 各 well に

20 μL ずつ加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 5%の条件下で1時間培養した。培養後 PBS にて洗浄し、生成されたホルマザンを 0.04 M 塩酸を含む 2 プロパノール 200 μL にて溶解した。その後、波長 570 nm の吸光度をプレートリーダー (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific K.K, Kanagawa, Japan) にて検出した。

4.2.7 グルコースおよび乳酸測定

細胞は 6 ウェルプレートに 3×10^5 cells/mL の密度で播種した。培養した後、上清を回収した。培養上清中のグルコース濃度および乳酸濃度は第 2 章および第 3 章と同様に市販のキットを用いて測定した。

4.2.8 2-NBDG uptake assay

前章と同様に、グルコースの細胞内への取り込みは蛍光指示薬である 2-NBDG を用いて測定した。細胞は 35 mm のガラス底面容器に 3×10^5 cells/mL の密度で播種した。細胞を 60 μM WZB-117 存在下で 24 時間培養した。2-NBDG は 10%FBS を含む PBS で溶解し、50 μM の濃度に調整した。1 mL の 2-NBDG 試薬にて細胞を 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 5% の条件下で 30 分培養した。培養後に細胞を PBS で洗浄し、4% パラフォルムアルデヒドにて 15 分間固定した。蛍光シグナルは共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) を使用し、励起波長と蛍光波長はそれぞれ 465 nm と 540 nm を用いて視覚化した。

4.2.9 統計学的解析

実験データは平均 \pm 標準誤差として算出した。統計解析は、StatMate IV を用いて実施した。時間依存性の実験データは二元配置分散分析を用いて解析し、その他の実験データは paired t test を用いて解析した。P 値が 0.05 よりも少ない場

合を統計的に有意とした。

4.3 結果

4.3.1 イヌメラノーマ細胞における GLUT アイソフォーム mRNA の発現

イヌメラノーマ MCM-N1 細胞における GLUT アイソフォームの mRNA 発現を RT-PCR により検討した。図 4-1a に示すように、MCM-N1 細胞では、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。他のイヌメラノーマ細胞株 KMeC および CMec-1 においても、図 4-1b に示すように、GLUT1 および GLUT3 mRNA の発現は認められたが、GLUT2 および GLUT4 の mRNA 発現は認められなかった。

MCM-N1 細胞においては、さらに、GLUT1 および GLUT3 タンパク質発現について、それぞれの特異抗体を用いて western blotting にて検討した。図 4-2a (scramble) に示すように、イヌメラノーマ MCM-N1 細胞において、GLUT1 および GLUT3 の発現が確認された。

4.3.2 イヌメラノーマ 細胞の GLUT1 と GLUT3 によるグルコースの細胞内への輸送

GLUT1 と GLUT3 のイヌメラノーマ細胞増殖への関与を解明するために、GLUT1 および GLUT3 の siRNA 導入によりノックダウン細胞を作成して検討した。

最初に、図 4-2 に示すように、対照とした scramble RNA 導入細胞と比較すると、GLUT1 または GLUT3 の siRNA 導入した細胞においては GLUT1 または GLUT3 タンパク質の発現はそれぞれ有意に抑制されたことが western blotting に

て確認された。

第 2 章および第 3 章で明らかにしたように、イヌメラノーマ細胞の増殖は GLUT により細胞に取り込まれたグルコースの代謝により維持される。そこで、siRNA 導入により GLUT1 または GLUT3 のノックダウンされた細胞における 2-NBDG を用いてグルコースの取り込みについて検討した。図 4-3 に示すように、GLUT1 と GLUT3 を siRNAs 導入された 3 日後のイヌメラノーマ細胞において、グルコースの取り込みは有意に抑制された。

4.3.3 イヌメラノーマ細胞におけるグルコース消費と乳酸分泌への GLUT1 と GLUT3 の関与

続いてグルコース消費および乳酸分泌について検討した。図 4-4 に示すように、GLUT1 と GLUT3 siRNA 導入 3 日後の細胞において、対照とした scramble RNA 導入細胞と比較して、グルコース消費 (図 4-4a) および乳酸分泌 (図 4-4b) は有意に抑制された。

最後に、GLUT1 と GLUT3 siRNA 導入 3 日後の細胞における細胞増殖能を細胞生存率により確認すると、図 4-4c に示すように、GLUT1 と GLUT3 ノックダウン細胞における細胞増殖能は対照とした scramble RNA 導入細胞と比較して有意に低下していた。以上の結果より、GLUT1 と GLUT3 siRNA 導入細胞においては GLUT1 および GLUT3 のタンパク質発現が減少したことでグルコースの取り込みが減少し、その結果としてグルコース消費および乳酸分泌が減少したことを示している。

4.4 考察

本章では、イヌメラノーマ細胞における GLUT アイソフォームについて RT-PCR および western blotting により検討し、GLUT1 と GLUT3 の発現を明らかにした。また、GLUT1 および GLUT3 のノックアウトイヌメラノーマ細胞においては、GLUT1 および GLUT3 を介したグルコースの細胞内への取り込みが抑えられ、グルコース消費や乳酸分泌が低下し、それに伴って細胞増殖が抑えられることから、GLUT1 および GLUT3 の機能がイヌメラノーマ細胞増殖に関わることを明らかにした。

GLUT1 と GLUT3 の特徴として共にグルコースに対して高親和性であり、それぞれのミカエリス定数 K_m 値は 3 および 1.4 mM と低い (Thorens et al., 2010) ことから、細胞へのグルコース供給が非常に速く、腫瘍細胞にとってエネルギー源として利点となっている可能性がある (Colville et al., 1993; Uldry et al., 2002)。ヒトの肺、脳、乳腺、食道、肝臓、膀胱、腎臓、卵巣、膵臓、前立腺など多くの腫瘍において GLUT1 と GLUT3 の発現が高まることが報告されている (Yamamoto et al., 1990; Younes et al., 1996; Barron et al., 2016)。また、ヒト非小細胞肺癌、口腔扁平上皮癌、乳癌、甲状腺癌、喉頭癌では GLUT1 と GLUT3 の遺伝子発現やタンパク質の過剰発現と生存率の低下が報告されている (Younes et al., 1997; Ayala et al., 2010; Józwiak et al., 2012; Krzeslak et al., 2012; Starska et al., 2015)。これらの報告から、GLUT1 や GLUT3 の発現調節の異常と腫瘍の悪性度と関連性も示唆されている (Chen et al., 2017)。ヒトのメラノーマに関しても、良性と悪性の両メラニン色素細胞周辺に GLUT1 および GLUT3 の発現が認められている (Parente et al., 2008)。GLUT1 の発現がメラノーマの悪性化に伴って低下するという報告もある (Parente et al., 2008) が、一方では GLUT1 および GLUT3 に陽性のメラノーマを有する患者の生存率が両 GLUT 陰性患者に比べて有意に低いことから、GLUT1 と GLUT3 は色素性母斑からメラノーマへの分

化の有力なマーカーとしても考えられてもいる (Yan et al., 2016; Dura et al., 2019; Ruby et al., 2019)。他の腫瘍における報告も参考にすると、GLUT1 および GLUT3 の発現増加はメラノーマの悪性化と関連すると考えることが妥当と思われる。しかしながら、メラノーマ細胞における GLUT1 および GLUT3 の生物学的な機能は未だ不明である。

ポジトロン断層法 (PET) で用いられるグルコースアナログ 2-deoxy-2-[¹⁸F]-fluoro-D-glucose の取り込みは、悪性メラノーマにおける GLUT1 と GLUT3 発現と関連することが報告されている (Park et al., 2012)。マウス B16 メラノーマ細胞においては、GLUT1 の siRNA の導入は細胞の生存率を低下させることが知られている (Koch et al., 2015)。本研究で示したように、イヌメラノーマ細胞においては、GLUT1 および GLUT3 の siRNA の細胞導入は細胞増殖を有意に抑えた。これらのことから、GLUT1 と GLUT3 は、種に限らず、メラノーマ細胞の増殖に必要なグルコースの細胞内への輸送に関わっていると考えられる。

GLUT1 と GLUT3 を siRNA 導入した口腔扁平上皮癌細胞や急性骨髄性白血病細胞においては、アポトーシスが促進されたという報告がある (Shimanishi et al., 2013; Zhuang et al., 2018)。本研究ではアポトーシスについての検討は行っていないが、細胞の増殖を抑えることから、GLUT1 と GLUT3 の siRNA 干渉はイヌにおいてもメラノーマの有効な治療の 1 つになる可能性が考えられる。また、ヒトにおいて、GLUT1 は全ての組織に広く発現しているが、GLUT3 は主に神経細胞、胎盤、精巣、心筋、血小板など限られて発現している (Bell et al., 1993; Craik et al., 1995; Grover-McKay et al., 1999; Barron et al., 2016)。このことから、副作用について考えると GLUT3 の方がメラノーマの抗腫瘍薬ターゲットとして期待できると考えられる。

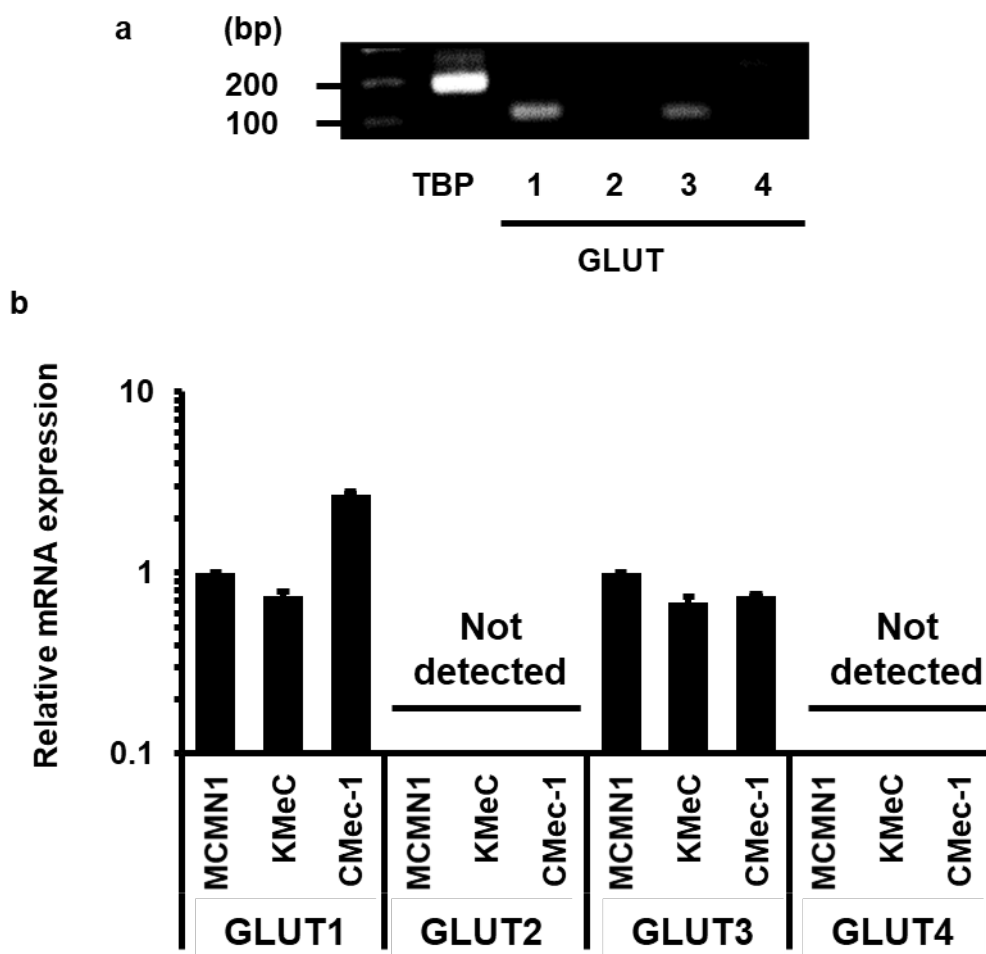


図 4-1. イヌメラノーマ細胞における GLUT アイソフォーム mRNA 発現

- (a) イヌメラノーマ MCM-N1 細胞における GLUT1~4 の mRNA 発現を RT-PCR により検出した。GLUT1 および GLUT3 mRNA 発現が認められた。
- (b) イヌメラノーマ MCM-N1, KMeC および CMec-1 細胞 における GLUT1~4 の mRNA 発現を RT-PCR により検出した。GLUT1 および GLUT3 mRNA 発現が認められた。結果は、MCM-N1 細胞における GLUT1 および GLUT3 mRNA 発現をそれぞれ 1 として示した。

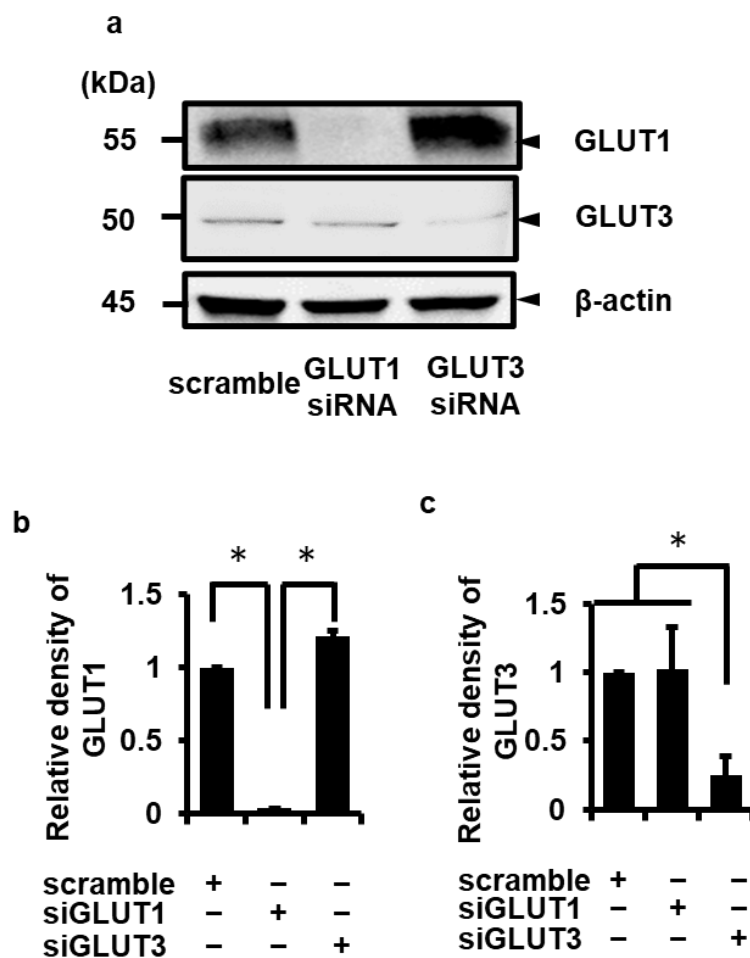


図 4-2. siRNA 導入によるイヌメラノーマ MCM-N1 細胞 における GLUT1 および GLUT3 ノックダウン

イヌメラノーマ MCM-N1 細胞に GLUT1 および GLUT3 の siRNA または scramble RNA を導入した。それぞれの導入細胞における GLUT1 または GLUT3 タンパク質発現を western blotting にて確認した (a)。 β -actin を内在性コントロールとして用いた。GLUT1 siRNA 導入細胞 (b) または GLUT3 siRNA 導入細胞 (c) におけるそれぞれのタンパク質発現の低下を、scramble RNA 導入細胞における発現を 1 として数値化した。結果は、3 回の独立した実験結果の平均 \pm 標準誤差を示す。* $P < 0.05$ 。

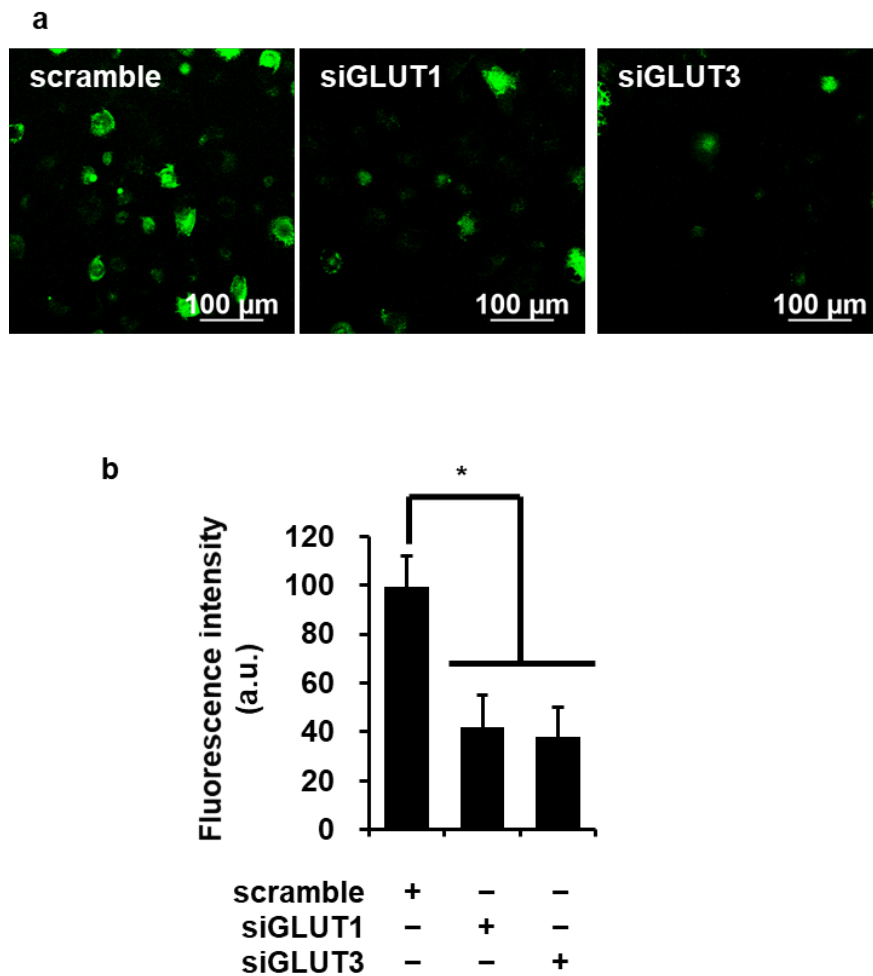


図 4-3. GLUT1 および GLUT3 siRNA 導入イヌメラノーマ MCM-N1 細胞におけるグルコース (2-NBDG) の取り込みの減少

GLUT1 siRNA, GLUT3 siRNA または scramble RNA (対照) を導入し, 3 日間培養した MCM-N1 細胞に 2-NBDG を 30 分間取り込ませ, 蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡にて測定した。代表的な蛍光画像(a)と, 画像より得られた蛍光強度を対照の scramble RNA 導入細胞での値を 100% として数値化した結果(b)を示す。GLUT1 siRNA および GLUT3 siRNA 導入細胞においてグルコース (2-NBDG) の取り込みは有意に減少した。結果は, 3 回の独立した実験結果の平均 ± 標準誤差を示す。 * $P < 0.05$

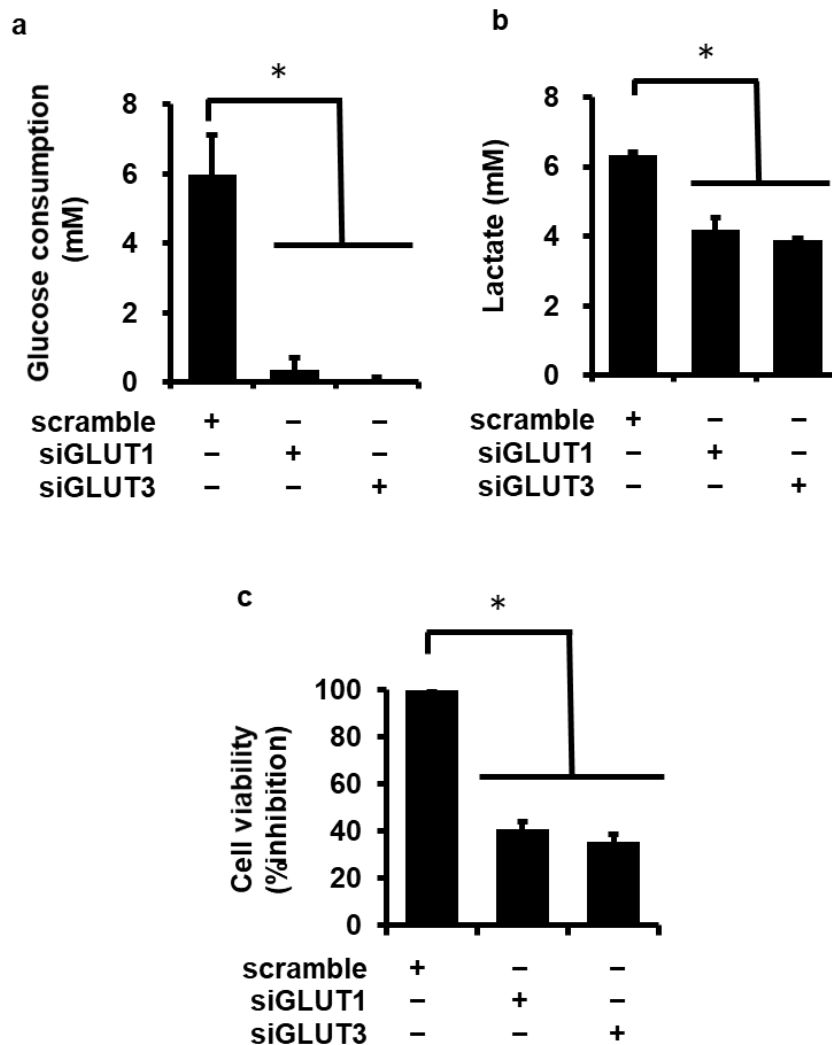


図 4-4. GLUT1 および GLUT3 siRNA 導入イヌメラノーマ MCM-N1 細胞における細胞増殖能，グルコース消費および乳酸分泌の減少

GLUT1 siRNA, GLUT3 siRNA または scramble RNA (対照)を導入し，3 日間培養した MCM-N1 細胞におけるグルコース消費 (a) ，乳酸分泌 (b) および細胞増殖能 (c)，を比較した。細胞増殖能は対照である scramble RNA 導入細胞の生存率を 100%として示した。siRNA 導入により GLUT1 および GLUT3 ノックダウン細胞においては，細胞増殖能，グルコース消費および乳酸分泌は対照と比べ有意に減少した。結果は，3 回の独立した実験結果の平均 ± 標準誤差を示す。* $P < 0.05$ 。

表4-1. RT-PCRに使用したprimers.

Gene Name	GenBank ID	Primer sequences	size (bp)
<i>SLC2A1</i> (GLUT1)	NM_001159326.1	F: 5'-AGCTGCCATTGCTGTTGCTG-3' R: 5'-CACGGTGAAGATGATGAAGACGTA-3'	115
<i>SLC2A2</i> (GLUT2)	XM_005639915.1	F: 5'-TGTGTGTGCCATCTTCATGTCC-3' R: 5'-AGAACTCTGCCACCATGAACCA-3'	149
<i>SLC2A3</i> (GLUT3)	NM_001003308.1	F: 5'-CTTCAGATCGCGCAGCTACC-3' R: 5'-TGCATCTTTGAAGATTCCTGTTGAG-3'	118
<i>SLC2A4</i> (GLUT4)	NM_001159327.1	F: 5'-GCTTCTGCAACTGGACAAGCAA-3' R: 5'-AAGTCAGCCGAGATCTGGTCAA-3'	178
<i>TBP</i>	XM_863452	F: 5'-ACTGTTGGTGGGTCAGCACAAG-3' R: 5'-ATGGTGTGTACGGGAGCCAAG-3'	184

表4-2. 細胞導入したsiRNA 配列

Gene Name	Gene bank ID	siRNA sequences
<i>SLC2A1</i> (GLUT1)	NM_001159326.1	GCUGUCUUCUAUUACUCCA
<i>SLC2A3</i> (GLUT3)	NM_001003308.1	GCUGUUUGUCCAUCCUUA

第5章

総括7

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。

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。特にイヌにおいて、口腔内メラノーマは悪性度が高く、予後が極めて悪いとされる腫瘍である。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、次の結果を得た。

第 2 章において、メラノーマ細胞増殖能に対するグルコースアナログの 1 つである 2-deoxy-D-glucose (2-DG) の効果を検討した。2-DG はイヌメラノーマ細胞の増殖を有意に抑制し、さらに、2-DG 処理されたイヌメラノーマ細胞においては、グルコース消費および乳酸分泌が減少していた。これらの結果より、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。

第 3 章においては、グルコースを細胞内へ輸送する細胞膜タンパク質であるグルコース輸送体の阻害剤 WZB-117 のメラノーマ細胞増殖能への効果を検討した。WZB-117 はメラノーマ細胞増殖を有意に抑制した。さらに、WZB-117 処理をした細胞においては、グルコース消費および乳酸分泌が減少した。これらの結果より、GLUT 阻害が基質としてのグルコース供給を抑えた結果、解糖系が抑制され、細胞増殖抑制効果がもたらされたと考えられた。また、WZB-117 の効果

は、GLUT を介した細胞膜におけるグルコース輸送が、解糖系へのグルコース供給系としての律速段階にあることを示唆している。

第4章では、イヌメラノーマ細胞における GLUT アイソフォームについて RT-PCR および western blotting により検討し、GLUT1 と GLUT3 の発現を明らかにした。また、GLUT1 および GLUT3 のノックアウトイヌメラノーマ細胞においては、GLUT1 および GLUT3 を介したグルコースの細胞内への取り込み抑えられ、グルコース消費や乳酸分泌が低下し、それに伴って細胞増殖が抑えられることから、GLUT1 および GLUT3 の機能がイヌメラノーマ細胞増殖に関わることを明らかにした (Suwabe et al., 2021)。

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ことが期待される。

謝辞

本研究を纏めるにあたり、終始ご指導ご鞭撻いただきました日本大学獣医放射線学研究室教授 中山智宏先生、生物資源科学部名誉教授 杉谷博士先生、理学研究所 中野令先生には深謝いたします。また、たくさんのご助言を賜りました日本大学獣医学研究科の山崎純教授、小川健司教授に謹んで感謝致します。さらに、一緒に研究の遂行やご協力をいただいた研究員 北中菜菜子先生、大学院生の成毛淳人先生と布村順一先生、研究生の岡田純一先生、実験補助員の中野真澄氏、獣医放射線学研究室の皆様は厚くお礼申し上げます。そして、社会人大学院生の機会を与えていただき、常に温かい励ましや、勇気づけのお言葉を賜りました今野動物病院長 今野忠好先生には心より感謝申し上げます。

参考文献

- Adekola K, Rosen ST, Shanmugam M. Glucose transporters in cancer metabolism. *Curr Opin Oncol.* 2012; 24: 650–654.
- Ancey PB, Contat C, Meylan E. Glucose transporters in cancer—from tumor cells to the tumor microenvironment. *FEBS J.* 2018; 285: 2926–2943.
- Ayala FR, Rocha RM, Carvalho KC, Carvalho AL, da Cunha IW, Lourenço SV, Soares FA. GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecules* 2010; 15: 2374–2387.
- Barron CC, Bilan PJ, Tsakiridis T, Tsiani E. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism* 2016; 65: 124–139.
- Basketter DA, Widdas WF. Asymmetry of the hexose transfer system in human erythrocytes. Comparison of the effects of cytochalasin B, phloretin and maltose as competitive inhibitors. *J Physiol.* 1978; 278, 389–401
- Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem.* 1993; 268: 19161–19164.
- Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 1990; 13, 198–208.
- Bergman PJ, Kent MS, Farese JP. Melanoma, In: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th Edition* (Withrow SJ, Vail DM, Page RL), Elsevier Health Sciences, 2013; 321-334.
- Bertoni JM. Competitive inhibition of rat brain hexokinase by 2-deoxyglucose, glucosamine, and metrizamide. *J Neurochem.* 1981; 37: 1523–1528.
- Boileau P, Mrejen C, Girard J, Hauguel-de Mouzon S. Overexpression of GLUT3

- placental glucose transporter in diabetic rats. *J Clin Invest.* 1995; 96, 309–317.
- Bostock DE. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Vet Pathol.* 1979; 16: 32-40.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248–254.
- Burant CF, Davidson NO. GLUT3 glucose transporter isoform in rat testis: localization, effect of diabetes mellitus, and comparison to human testis. *Am J Physiol.* 1994; 267, R1488–R1495.
- Calvo MB, Figueroa A, Pulido EG, Campelo RG, Aparicio LA. Potential role of sugar transporters in cancer and their relationship with anticancer therapy. *Int J Endocrinol.* 2010; 2010. pii: 205357.
- Chen W, Guéron M. The inhibition of bovine heart hexokinase by 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate: characterization by ³¹P NMR and metabolic implications. *Biochimie* 1992; 74: 867–873.
- Chen X, Lu P, Zhou S, Zhang L, Zhao JH, Tang JH. Predictive value of glucose transporter-1 and glucose transporter-3 for survival of cancer patients: A meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8: 13206–13213.
- Colville CA, Seatter MJ, Jess TJ, Gould GW, Thomas HM. Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in *Xenopus* oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. *Biochem J.* 1993; 290: 701–706.
- Craik JD, Stewart M, Cheeseman CI. GLUT-3 (brain-type) glucose transporter polypeptides in human blood platelets. *Thromb Res.* 1995; 79: 461–469.

- Důra M, Němejcová K, Jakša R, Bártů M, Kodet O, Tichá I, Michálková R, Dundr P. Expression of Glut-1 in malignant melanoma and melanocytic nevi: an immunohistochemical study of 400 cases. *Pathol Oncol Res.* 2019; 25: 361–368.
- Endo Y, Watanabe M, Miyajima-Magara N, Igarashi M, Mochizuki M, Nishimura R, Sugano S, Sasaki N, Nakagawa T. DNA aneuploidy and centrosome amplification in canine tumor cell lines. *Tissue Cell* 2019; 61: 67–71.
- Giammarioli AM, Gambardella L, Barbati C, Pietraforte D, Tinari A, Alberton M, Gnessi L, Griffin RJ, Minetti M, Malorni W. Differential effects of the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose on the activity of pro-apoptotic agents in metastatic melanoma cells, and induction of a cytoprotective autophagic response. *Int J Cancer* 2012; 131: E337– E347.29.
- Grover-McKay M, Walsh SA, Thompson SA. Glucose transporter 3 (GLUT3) protein is present in human myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1416: 145–154.
- Hatanaka M. Transport of sugars in tumor cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1974; 355: 77–104.
- Hauguel-de Mouzon S, Challier JC, Kacemi A, Caüzac M, Malek A, Girard J. The GLUT3 glucose transporter isoform is differentially expressed within human placental cell types. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82, 2689–2694.
- Inoue K, Ohashi E, Kadosawa T, Hong SH, Matsunaga S, Mochizuki M, Nishimura R, Sasaki N. Establishment and characterization of four canine melanoma cell lines. *J Vet Med Sci.* 2004; 66: 1437–40.
- Isabelle D. Canine oral melanoma. *Vet Ireland J.* 2013; 3: 398-401.
- Józwiak P, Krześlak A, Pomorski L, Lipińska A. Expression of hypoxia-related glucose transporters GLUT1 and GLUT3 in benign, malignant and non-neoplastic thyroid

lesions. *Mol Med Rep.* 2012; 6: 601–606.

Karlish SJ, Lieb WR, Ram D, Stein WD. Kinetic parameters of glucose efflux from human red blood cells under zero-trans conditions. *Biochim. Biophys. Acta* 1972; 255, 126–132.

Kitanaka N, Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Konno T, Nakayama T, et al. NF- κ B p65 and p105 implicate in interleukin 1 β -mediated COX-2 expression in melanoma cells. *PLoS One* 2018; 13: e0208955.

Koch A, Lang SA, Wild PJ, Gantner S, Mahli A, Spanier G, Berneburg M, Muller M, Bosserhoff AK, Hellerbrand C. Glucose transporter isoform 1 expression enhances metastasis of malignant melanoma cells. *Oncotarget* 2015; 6: 32748–32760.

Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 325–337.

Kosovsky JK, Matthiesen DT, Marretta SM, Patnaik AK. Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 dogs. *Vet Surg.* 1991; 20: 397-401.

Krzyslak A, Wojcik-Krowiranda K, Forma E, Jozwiak P, Romanowicz H, Bienkiewicz A, et al. Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers. *Pathol Oncol Res.* 2012; 18: 721–728.

Kurtoglu M, Gao N, Shang J, Maher JC, Lehrman MA, Wangpaichitr M, Savaraj N, Lane AN, Lampidis TJ. Under normoxia, 2-deoxy- D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N- linked glycosylation. *Mol Cancer Ther.* 2007a; 6: 3049–3058.

Kurtoglu M, Maher JC, Lampidis TJ. Differential toxic mechanisms of 2-deoxy-D-

- glucose versus 2-fluorodeoxy-D-glucose in hypoxic and normoxic tumor cells. *Antioxid Redox Signal*. 2007b; 9: 1383–1390.
- Liu Y, Cao Y, Zhang W, Bergmeier S, Qian Y, Akbar H, Colvin R, Ding J, Tong L, Wu S, Hines J, Chen X. A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cell growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2012; 11: 1672–1682.
- Long W, Cheeseman CI. Structure of, and functional insight into the GLUT family of membrane transporters. *Cell Health and Cytoskeleton* 2015; 7: 167–183.
- Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett*. 2015; 356: 156–164.
- Maher F, Vannucci S, Takeda J, Simpson IA. Expression of mouse GLUT3 and human GLUT3 glucose transporter proteins in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 182, 703–711.
- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961; 191: 144-148.
- Mueckler M. Insulin resistance and the disruption of GLUT4 trafficking in skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2001; 107, 1211–1213.
- Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*. 2013; 34, 121–138.
- Nakano R, Edamura K, Nakayama T, Narita T, Okabayashi K, Sugiya H. Fibroblast Growth Factor Receptor-2 Contributes to the Basic Fibroblast Growth Factor-Induced Neuronal Differentiation in Canine Bone Marrow Stromal Cells via Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling Pathway. *PLoS One* 2015; 10: e0141581.
- Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Sugiya H. Protein kinase C ϵ regulates

nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase, which contributes to bradykinin-induced cyclooxygenase-2 expression. *Sci Rep.* 2018; 8: 8535.

Parente P, Coli A, Massi G, Mangoni A, Fabrizi MM, Bigotti G. Immunohistochemical expression of the glucose transporters Glut-1 and Glut-3 in human malignant melanomas and benign melanocytic lesions. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008; 27: 34.

Park SG, Lee JH, Lee WA, Han KM. Biologic correlation between glucose transporters, hexokinase-II, Ki-67 and FDG uptake in malignant melanoma. *Nucl Med Biol.* 2012; 39: 1167–1172.

Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; 25: 4633–4646.

Pliszka M, Szablewski L. Glucose transporters as a target for anticancer therapy. *Cancers* 2021; 13: 4184.

Putnová B, Václavíková JB, Georgiou M, Fichtel T, Stehkik L, Frgelecová L, Škorič M. Occurrence site of canine oral lesions: a retrospective study of 659 cases. *Acta Veterinaria Brno* 2020; 89: 179–187.

Ralser M, Wamelink MM, Struys EA, Joppich C, Krobitsch S, Jakobs C, Leharach H. A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 17807–17811.

Rassnick KM, Ruslander DM, Cotter SM, Al-Sarraf R, Bruyette DS, Gamblin RM, Meleo KA, Moore AS. Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989-2000) *J Am Vet Med Assoc.* 2001; 218: 1444-1448.

Ruby KN, Liu CL, Li Z, Felty CC, Wells WA, Yan S. Diagnostic and prognostic value of glucose transporters in melanocytic lesions. *Melanoma Res.* 2019; 29: 603–611.

Sarowitz BN, Davis GJ, Kim S. Outcome and prognostic factors following curative-intent

- surgery for oral tumours in dogs: 234 cases (2004 to 2014). *J Small Anim Pract.* 2017; 58: 146-153.
- Sen AK, Widdas WF. Determination of the temperature and pH dependence of glucose transfer across the human erythrocyte membrane measured by glucose exit. *J Physiol.* 1962; 160, 392–403
- Shimanishi M, Ogi K, Sogabe Y, Kaneko T, Dehari H, Miyazaki A, Hiratsuka H. Silencing of GLUT-1 inhibits sensitization of oral cancer cells to cisplatin during hypoxia. *J Oral Pathol Med.* 2013; 42: 382–388.
- Starska K, Forma E, Józwiak P, Bryś M, Lewy-Trenda I, Brzezińska-Błaszczyk E, Krześlak A. Gene and protein expression of glucose transporter 1 and glucose transporter 3 in human laryngeal cancer-the relationship with regulatory hypoxia-inducible factor-1 α expression, tumor invasiveness, and patient prognosis *Tumour Biol.* 2015; 36: 2309–2321.
- Stein M, Lin H, Jeyamohan C, Dvorzhinski D, Gounder M, Bray K, Eddy S, Goodin S, White E, Dipaola RS. Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies. *Prostate* 2010; 70: 1388-1394.
- Suwabe Y, Nakano R, Namba S, Yachiku N, Kuji M, Sugimura M, Kitanaka N, Kitanaka T, Konno T, Sugiya H, Nakayama T. Involvement of GLUT1 and GLUT3 in the growth of canine melanoma cells. *PLoS One* 2021; 16: e0243859.
- Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 298: E141–E145.
- Todoroff RJ, Brodey RS. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1979; 175: 567-571.

- Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett.* 2002; 524: 199–203.
- Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflügers Arch.* 2004; 447: 480–489.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324: 1029–1033.
- Wallace J, Matthiesen DT, Patnaik AK. Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumors in 69 dogs. *Vet Surg.* 1992; 21: 337-341.
- Wick AN, Drury DR, Nakada HI, Wolfe JB. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem.* 1957; 224: 963–969.
- Wilson DF. Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. *J Physiol.* 2017; 595: 7023–7038.
- Xing AY, Challier JC, Lepercq J, Caüzac M, Charron MJ, Girard J, Hauguel-de Mouzon S. Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83, 4097–4101.
- Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y, Inoue K, Manabe T, Imura H. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 170: 223–230.
- Yan S, Coffing BN, Li Z, Xie H, Brennick JB, Beg HA, Froehlich HM, Wells WA. Diagnostic and prognostic value of ProEx C and GLUT1 in melanocytic lesions. *Anticancer Res.* 2016; 36: 2871-2880.
- Yoshioka K, Saito M, Oh KB, Nemoto Y, Matsuoka H, Natsume M, Abe H., Biosci Biotechnol Biochem. Intracellular fate of 2-NBDG, a fluorescent probe for glucose uptake activity, in *Escherichia coli* cells. 1996; 60, 1899-1901.

- Yoshitake R, Saeki K, Watanabe M, Nakaoka N, Ong SM, Hanafusa M, Choisunirachon N, Fujita N, Nishimura R, Nakagawa T. Molecular investigation of the direct anti-tumour effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in a panel of canine cancer cell lines. *Vet J.* 2017; 221: 38–47.
- Younes M, Brown RW, Stephenson M, Gondo M, Cagle PT. Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* 1997; 80: 1046–1051.
- Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res.* 1996; 56: 1164–1167.
- Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S, Sun Y. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Lett.* 2014; 355: 176–183.
- Zhuang Y, Zhao J, Xu X, Bi L. Downregulation of GLUT3 promotes apoptosis and chemosensitivity of acute myeloid leukemia cells via EGFR signaling. *Arch Iran Med.* 2018; 21: 73–78.