

【博士学位論文】

神経膠芽腫幹細胞を標的とした新規治療分子としての
イオン輸送関連分子の可能性

2015 年度

高田 哲也

目次

略語表	3
序章	4
第1章. 神経膠芽腫がん幹細胞でのイオン輸送関連分子の発現量解析	
1-1. はじめに	6
1-2. 実験方法	7
1-2-1. 細胞培養	7
1-2-2. CSC 調製	7
1-2-3. 免疫蛍光染色	7
1-2-4. real-time RT-PCR	8
1-2-5. 統計解析	9
1-3. 実験結果	10
1-3-1. Sphere 形成法を用いたがん幹細胞の獲得	10
1-3-2. Sphere 化による低酸素環境の獲得	10
1-3-3. イオン輸送関連分子の発現量変化	12
1-4. 考察	15
第2章. 神経膠芽腫がん幹細胞に対する MCT 阻害剤による影響	
2-1. はじめに	17
2-2. 実験方法	18
2-2-1. 細胞培養	18
2-2-2. CSC 調製	18
2-2-3. 阻害剤調製および保存	18
2-2-4. WST-8 assay	18
2-2-5. CellTiter-Glo [®] 3D cell viability assay	18
2-2-6. 細胞内乳酸測定	18
2-2-7. 統計解析	19
2-3. 実験結果	20
2-3-1. MCT1,4 阻害剤である pHMBS の GBM の細胞増殖に及ぼす影響	20
2-3-2. pHMBS の GBM の乳酸排出に及ぼす影響	20
2-3-3. pHMBS の astrocyte の細胞増殖に及ぼす影響	21
2-3-4. MCT1 選択的阻害剤である AR-C117977 の GBM の細胞増殖に及ぼす影響	22
2-3-5. AR-C117977 の GBM の乳酸排出に及ぼす影響	22
2-3-6. AR-C117977 の astrocyte の細胞増殖に及ぼす影響	24
2-4. 考察	25
第3章. DJ-1 結合化合物のドパミン神経保護作用	
3-1 はじめに	27
3-2. 実験方法	28
3-2-1. 細胞培養	28
3-2-2. CSC 調製	28
3-2-3. 阻害剤調製および保存	28
3-2-4. WST-8 assay	28
3-2-5. CellTiter-Glo [®] 3D cell viability assay	28
3-2-6. 統計解析	28
3-3. 結果	29
3-3-1. CA 阻害剤である U104 の GBM の細胞増殖に及ぼす影響	29

3-3-2. U104 の astrocyte の細胞増殖に及ぼす影響	29
3-4. 考察	31
第4章. 総括	32
第5章. 謝辞	33
第6章. 参考文献	34

略語集

CSC	cancer stem cell
GBM	glioblastoma
MCT	monocarboxylate transporter
CA	carbonic anhydrase
NHE	Na ⁺ -H ⁺ exchanger
GSC	glioblastoma cancer stem cell
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	fetal bovine serum
PC/SM	penicillin/streptomycin
EGF	epidermal growth factor
b-FGF	basic fibroblast growth factor
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
NGS	normal goat serum
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SEM	standard error of the mean
HA	hypoxia-adapted
GLAST	glutamate aspartate transporter
pHMBS	p-hydroxymercuribenzoic acid sodium salt
DMSO	dimethyl sulfoxide

序章

がんは日本において 1981 年から死因の第 1 位であり、近年では総死亡率のおよそ 3 割を占め、現在も増加傾向にある。年に 60~70 万人ががんと診断され、約 34 万人が死亡している。また治療をしたとしても再発する可能性があり、根治が難しい疾患である。様々な抗がん剤が開発されてきたがまだまだ未充足な部分が多く存在しており、今もなお新薬の研究開発が進められている。

がん細胞の中には、正常の幹細胞と同様の性質、つまり自らと同じ細胞を作り出す自己複製能と多種類の細胞に分化しうる多分化能をもつがん幹細胞 (Cancer stem cell: CSC) というものが存在し、がん組織中で自己複製によって細胞を維持しながら、分化により周辺の細胞を生み出すもととなっている。よって、放射線治療や化学療法を行ってもこの CSC が残存していると、再度腫瘍を形成し、再発・転移を引き起こすとされている¹⁻⁴⁾。そのため、がん幹細胞を標的とした治療法の研究開発は、がん治療における重要課題の一つである。

神経膠芽腫 (Glioblastoma: GBM) は原発性脳腫瘍の約 30% を占める神経膠腫の中で最も悪性度が高い疾患である⁵⁾。治療としては、外科的処置後に放射線治療と化学療法の併用療法が行われている。しかし、予後が極めて悪く、この予後の悪さと CSC が関連しているという報告もある⁶⁻⁹⁾。つまり脳腫瘍の外科的処置は拡大手術が難しいためがん細胞が残存しやすく、さらに CSC は治療抵抗性を持つことから化学療法などを行っても残存しやすい。よって残存した CSC が再度腫瘍を形成するリスクが高くそれが予後不良につながるのである。

がん細胞は、遺伝子異常により増殖シグナルが停止せず細胞増殖が続くため、大量の ATP を必要とする。大量の ATP を得るためにはミトコンドリアを介した ATP 産生を行えばよいと考えられるが、がん細胞はミトコンドリアを介さない解糖系を用いて ATP を産生している。なぜなら、取り込んだグルコースの一部を解糖系から派生するペントース・リン酸回路にまわして、細胞の構成成分である核酸や細胞膜やたんぱく質をグルコースから作る必要があるからである。このように、がん細胞は、酸素が十分にある環境下においてもミトコンドリアを介さない解糖系を用いて ATP の産生を行う。この現象を Warburg 効果と呼ぶ^{10,11)}。GBM 細胞もこの Warburg 効果を介した ATP 産生を行っていることが報告されている¹²⁾。この現象により細胞内には乳酸や二酸化炭素といった多くの酸性物質が産生され、大量の H⁺ が作られる。しかし、細胞機能の恒常性維持のため、細胞質内は弱アルカリに保たれている。そのため、がん細胞には正常細胞に比べて、それら大量の H⁺ や代謝産物を細胞外に排出したり、酸性顆粒内に取り込んだりする機構が発達していると考えられる。すなわち pH 調節に働くイオン輸送関連分子の発現が高いことが推察される (Figure 1)。これらの代謝機能は低酸素環境に多く存在し、G₀ 期にいるといわれる CSC においても機能していると考えられるが、どのようなイオン輸送関連分子が主に関与しているかは不明である。

このような背景のもと、本研究では神経膠芽腫幹細胞を標的とした新規治療分子としてのイオン輸送関連分子の可能性を探るため、神経膠芽腫幹細胞において発現が亢進しているイオン輸送関連分子の解析と、それらを阻害した際の細胞への影響について解析した。第 1 章では、神経膠芽腫細胞株からの CSC の調製と、CSC や低酸素環境 (1% O₂) でのイオン輸送

関連分子の発現量変化について解析した。第 2 章では、変化が見られた乳酸輸送担体 (Monocarboxylate transporter: MCT) を阻害した時の細胞への影響について解析した。さらに第 3 章では、MCT と同様に変化が見られた炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase: CA) を阻害した時の細胞への影響について解析した。

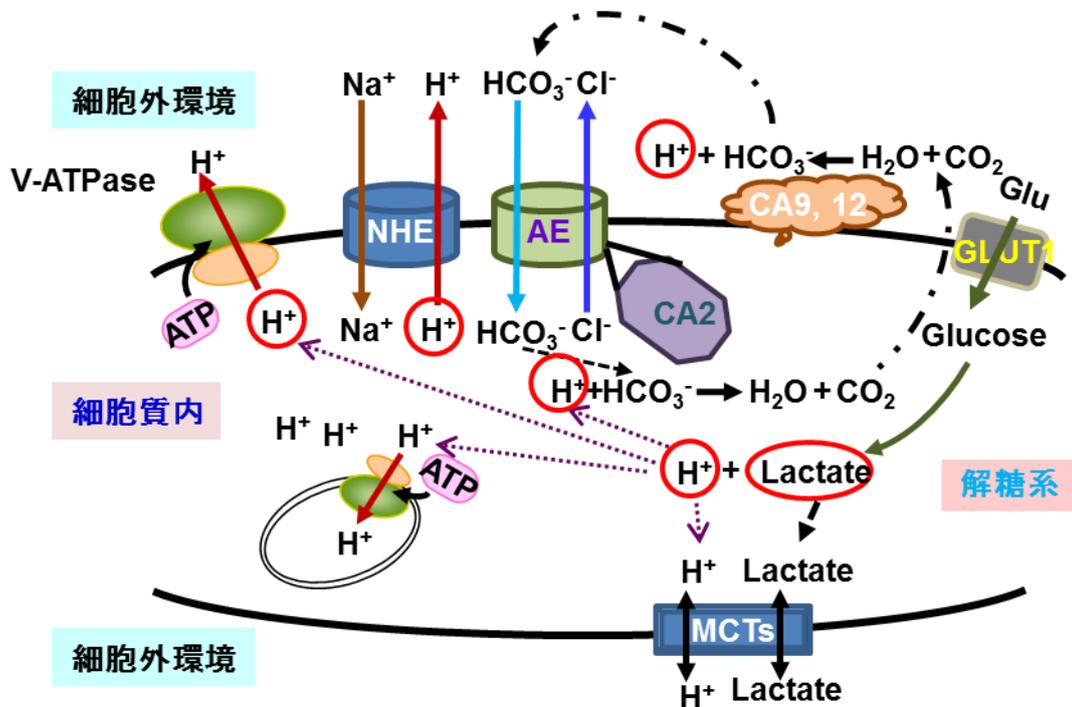


Figure1: Ion transport-related molecules.

AE: anion exchanger, CA: carbonic anhydrase, GLUT: glucose transporter, MCT: monocarboxylate transporter, NHE: Na^+ - H^+ exchanger, V-ATPase: vacuolar H^+ -ATPase

第1章. 神経膠芽腫がん幹細胞でのイオン輸送関連分子の発現量解析

1-1. はじめに

GBM は原発性脳腫瘍の約 30% を占め、神経膠腫の中で最も悪性度が高い疾患である。脳腫瘍であるため病変部位をすべて取り除くことができる拡大手術が難しく、治療としては、病変部位をできるだけ摘出する外科的処置をした後に、放射線治療と化学療法の併用療法が行われている。しかし、5 年生存率は 10% と低く、予後不良の疾患である⁵⁾。この予後不良の原因として CSC が関連しているという報告もある⁶⁻⁹⁾。よって、現在の治療技術をもってしてもなお治癒が困難な腫瘍である。つまり脳腫瘍の外科的処置は拡大手術が難しいためがん細胞が残存しやすく、さらに CSC は治療抵抗性を持つことから化学療法などを行っても残存しやすい。よってこの残存した CSC が再度腫瘍を形成するリスクが高く、それが予後不良につながる可能性が指摘されている。

がん組織を構成するがん細胞の中には少数であるが CSC という細胞集団が存在する。これは細胞株にも少ないながら存在していることが報告されている¹³⁾。CSC は正常の幹細胞と同様の性質（自己複製能や多分化能）を持つがん細胞である。また、CSC は血管から離れた部位で酸素濃度が 1% と低い低酸素領域に存在し、G₀ 期にいるため細胞周期が進行していない休眠状態にあるという報告がなされている¹⁴⁾。そのため、通常の抗がん剤に対する治療抵抗性が高く、この細胞により再発・転移がもたらされると考えられている。

イオン輸送関連分子とは、CA や Na⁺/H⁺ 交換輸送体 (Na⁺-H⁺ exchanger: NHE) や MCT などの細胞膜や細胞質内などに存在する細胞内外のイオン輸送に関連する輸送体や酵素を指す。これらにより細胞質内の pH は弱アルカリに保たれており恒常性が維持されている。

現在までにさまざまながんでこれらのイオン輸送関連分子が過剰発現しているとの報告がされている¹⁵⁻²¹⁾が、CSC での報告は少ない。そこで本章では、GBM 細胞株を用いて CSC (glioblastoma stem cell: GSC) を作製し、GSC におけるイオン輸送関連分子の発現量について real-time RT-PCR を用いて解析した結果について論じる。

1-2. 実験方法

1-2-1. 細胞培養

ヒト GBM 細胞株である U-251 MG および U-87 MG は American Type Culture Collection より購入した。ヒトアストロサイト (astrocyte) は DS ファーマバイオメディカル株式会社 (Osaka) より購入した。培養は、U-251 MG および U-87MG では 10% のウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を低グルコースの Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM/low; Wako, Osaka) と混合した培養液で培養し、astrocyte では 10% の FBS を高グルコースの DMEM (DMEM/high; Wako) と混合した培養液で培養を行った。このとき両培地には、液量に対して 1% のペニシリン/ストレプトマイシン (PC/SM; Wako) を添加した。通常培養には CO₂ インキュベーター [MCO-18AIC (UV); SANYO Electric, Osaka] を用い、37°C, 5% CO₂ の条件下で培養を行った。低酸素培養には O₂/CO₂ インキュベーター (WKN-9200EX; Waken Btech, Kyoto) を用い、37°C, 5% CO₂ でかつ 1% O₂ の条件下で培養を行った。継代は 72 時間もしくは 96 時間で行い、細胞剥離には 0.25w/v% トリプシン-1 mmol/l EDTA・4Na 溶液 (フェノールレッド含有) (Wako) を用い、5 分間 37°C でインキュベートすることにより剥離した。トリプシンの中和には同量の 10% FBS 含有培地を用いた。細胞播種数は 5.0×10^4 cells/ml で行った。実験には少なくとも細胞解凍後 3 回以上継代を行ったものを用いた。低酸素適応細胞株は少なくとも低酸素環境で 1 か月以上培養したものを用いた。ただし、継代は低酸素環境下で行うことが不可能であったため、通常酸素濃度下で行った。以下の実験では通常酸素濃度条件で接着培養を行った GBM 細胞株を non-CSCs normoxia、低酸素条件で接着培養を行った GBM 細胞株を non-CSCs hypoxia と定義した。

1-2-2. CSC 調製

CSC は Sphere 形成法を用いて調製した^{22,24,26}。培養は Ultra-Low attachment 6-well plate (Corning International, Corning, NY) 上で 3 ml の DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて 7 日間行った。このとき培地には 1% の PC/SM、2% の B-27 [B-27[®] Serum-Free Supplement (50×): Thermo Fisher Scientific]、20 ng/ml の上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF; Peprotech, Rocky Hill, NJ)、20 ng/ml の塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor: b-FGF; Peprotech) を添加した。EGF と b-FGF は培養 3 日目にさらに 20 ng/ml ずつ添加した。細胞播種数は U-251 MG で 1.0×10^5 cells/ml、U-87 MG で 6.7×10^4 cells/ml で行った。以下の実験では通常酸素濃度条件で浮遊培養を行ったものを CSCs normoxia、低酸素条件で浮遊培養を行ったものを CSCs hypoxia と定義した。

1-2-3. 免疫蛍光染色

接着細胞は、Glass Bottom Microwell Dishes (P35G-1.5-14-C: MatTek Corporation, Ashland, MA) に 3.3×10^4 cells/ml 濃度で細胞を播種し、DMEM/low 3 ml で 3 日間培養を行ったものを用いた。培養後、上清を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) にて 2 回洗浄を行った。その後、4% のパラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA: Nacalai Tesque, Kyoto) を用いて 4°C で 30 分固定を行った。次に PBS で洗浄を 5 回行ったのち、1 次抗体 [ラビット

由来抗ヒト Nanog ポリクローナル抗体 (1:500) (Merck Millipore, Billerica, MA)、ラビット由来抗ヒト Nestin モノクローナル抗体 (1:100) (Abcam, Cambridge, Cambridgeshire, UK)、マウス由来抗ヒト CD133/1 (W6B3C1) モノクローナル抗体 (1:50) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)] を PBS-T (0.1 % Triton X-100) 中にそれぞれ希釈したものをを用いて室温オーバーナイトで反応させた。その後洗浄を 2 度行い 2 次抗体 (1:500) (Alexa 488 標識抗ラビット IgG 抗体もしくは Alexa 488 標識抗マウス IgG 抗体, Thermo Fisher Scientific) を PBS-T 中にそれぞれ希釈したものをを用いて 4°C で 2 時間反応させた。このときブロッキング剤として正常ヤギ血清(1:100) (Normal goat serum: NGS; wako) を添加し、核を染色するために Hoechst33342 (1:10000) (Thermo Fisher Scientific) を用いた。その後、PBS による洗浄を 2 度行い PBS に満たされた状態で観察を行った。

CSC サンプルは、Sphere 形成法によりできた sphere を回収し、遠心 (200 ×g, 5 分間) にて沈殿させた後、PBS で懸濁させ再度遠心を行うことで 1 度洗浄を行った。その後、PBS-T とメタノールを 1:1 で混合したもので 10 分間攪拌 (60 rpm) し、その後遠心 (200 ×g, 3 分間) を行い、2%PFA に置換し 20 分攪拌 (60 rpm) を行うことで固定を行った。次に PBS で 4 回遠心することで洗浄を行った。次に 1% BSA で 20 分攪拌 (60 rpm) することでブロッキングを行った。遠心後、1 次抗体 (前述と同じ) に置換し室温オーバーナイトで反応させた。その後遠心し、PBS に置換し一度洗浄を行ったのち、再度遠心し対応する 2 次抗体に置換し 4°C で 2 時間攪拌 (60 rpm) させ反応させた。このとき接着細胞のときと同様に NGS (1:100) と Hoechst33342 (1:10000) を加えた。反応後 PBS で 3 回遠心することで洗浄を行った。洗浄後ベクターシールド (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 中に懸濁させ、スライドガラス上に載せ、カバーガラス (CoverWell™ Imaging Chambers PCI-A-0.5: Grace Bio-Labs, Bend, OR) にて封じた。

低酸素状態を確認する際には、回収 2 時間前にピモニダゾール 200 μM を添加し、マウス由来抗ピモニダゾール IgG₁ モノクローナル抗体 (clone 4.3.11.3) (1:50) (Hypoxyprobe™-1 Kit: Hypoxyprobe, Burlington, MA) を用いて染色を行った。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510 META: Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) を用いた。また画像編集には ImageJ を用いた。

1-2-4. real-time RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

Total RNA の抽出には Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) を用い、添付のプロトコルに従って抽出作業を行った。RNA 量は NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。cDNA 合成には High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、添付のプロトコルに従い合成作業を行った。cDNA の濃度は 20 ng/μl (total RNA 換算) になるよう調製した。検出にはプローブ法を用い、試薬は FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) を用いた。解析機器としては 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を使用した。内在性コントロールとしては 18S rRNA を使用した。1 穴あたり各プライマー濃度が 200 nM、プローブ濃度が 100 nM となるよう混合し全量を 20 μl とした。サン

プル量としては1穴あたり5 ngのcDNA (total RNA 換算) を使用した。反応プロトコルは、95°C 10分1サイクル、95°C 15秒と60°C 1分を40サイクルとした。プライマー (Thermo Fisher Scientific) とプローブ (Roche Applied Science) の組み合わせ等は以下の表に示した通りである (Table 1-1)。プライマーの配列とプローブはユニバーサルプローブライブラリーアッセイデザインセンター (<https://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>) を用いて決定した。

Gene	Accession number	primer (5'-3')	Sequence	Tm (°C)	%GC	Amplicon (nt)	Probe ID
18S rRNA	NR_003286.2	Forward	GCAATTATCCCCATGAACG	60	45	68	#48
		Reverse	GGGACTTAATCAACGCAAGC	59	50		
CD133	NM_006017.2 NM_001145848.1 NM_001145849.1 NM_001145850.1 NM_001145851.1 NM_001145852.1 NM_001145847.1	Forward	GGAAACTAAGAAGTATGGGAGAACA	59	40	91	#86
		Reverse	CGATGCCACTTTCTCACTGAT	60	48		
nestin	NM_006617.1	Forward	TGCGGGCTACTGAAAAGTTC	60	50	64	#76
		Reverse	TGTAGGCCCTGTTTCTCCTG	60	55		
Nanog	NM_024865.2	Forward	AGATGCCTCACACGGAGACT	59	55	127	#31
		Reverse	TTTGGGACACTTCTCTGC	59	50		
Sox-2	NM_003106.2	Forward	TGCTGCCTCTTAAGACTAGGAC	59	48	75	#35
		Reverse	CCTGGGGCTCAAACCTCTCT	60	55		
Oct-4	DQ486513.1	Forward	GAAACCCACACTGCAGATCA	59	50	81	#3
		Reverse	CGGTTACAGAACCACACTCG	59	50		
CA9	NM_001216.2	Forward	CCTTTGCCAGAGTTGACGAG	60	55	105	#25
		Reverse	GCAACTGCTCATAGGCACTG	59	55		
CA12	NM_001218.3 NM_206925.1	Forward	GTTTCTCCTGACCAACAATGG	59	48	91	#81
		Reverse	CGTGGCACTGTAGCGAGAC	60	63		
NHE1	NM_003047.3	Forward	TCTTACCGTCTTTGTGCAG	60	50	88	#76
		Reverse	ATGGAGCGCTTCGTCTCTT	60	53		
NHE2	NM_003048.3	Forward	CGACACAGTTTGCAGAAAG	59	50	76	#56
		Reverse	GGGAGGTTGAAGTGGAAGC	59	58		
MCT1	NM_001166496.1 NM_003051.3	Forward	GTGACCATTTGTGGAATGCTG	59	50	66	#49
		Reverse	CATGTCATTGAGCCGACCTA	59	50		
MCT4	NM_001042422.2 NM_004207.3 NM_001042423.2 NM_001206950.1 NM_001206951.1 NM_001206952.1	Forward	GAGTTTGGGATCGGCTACAG	59	55	98	#18
		Reverse	CGGTTACGCACACACTG	60	61		

Table 1-1. Primer sets and probes (出典: Tetsuya Takada *et al.*: Inhibition of monocarboxylate transporter 1 suppresses the proliferation of glioblastoma stem cells. *J. Physiol. Sci.* in press)

1-2-5. 統計解析

non-CSCs と CSCs の幹細胞マーカーの mRNA 発現量の違いは Student の t 検定を用いて解析を行った。一方、non-CSCs normoxia と non-CSCs hypoxia と CSCs normoxia におけるイオン輸送関連分子の mRNA 発現量の違いは Tukey-Kramer 法を用いて解析を行った。このとき Smirnov-Grubbs の棄却検定を用いて外れ値を棄却した。得られた実験結果は平均値±標準誤差 (standard error of the mean; SEM) で表示した。危険率 5%以下を統計学的に有意な差があると判定し、次のように表示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ 。これらの統計解析は Statview software for Windows (SAS Institute Inc, Cary, NC)を用いた。

1-3. 実験結果

1-3-1. Sphere 形成法を用いたがん幹細胞の獲得

神経膠芽腫細胞株を用いて Sphere 形成法を行った。その結果、U-251 MG、U-87 MG ともに sphere の形成を倒立顕微鏡 (IX70: Olympus Corporation, Tokyo) にて確認した (Fig. 1-1a.)。次に U-251 MG および U-87 MG の non-CSCs と CSCs から抽出したサンプルを用いて幹細胞マーカーの発現量を検討したところ、CSCs での発現量が上昇した。特に U-251 MG では *Nestin* が、U-87 MG では *Nestin* と *CD133* が有意に増加していた (Fig. 1-1b)。また、免疫蛍光染色においても幹細胞マーカーである *Nestin* や *Nanog* や *CD133* の発現が上昇していた (Fig. 1-1c)。よって sphere を形成している細胞が CSC を多く含んでいることが示唆された。

1-3-2. sphere 化による低酸素環境の獲得

作製した sphere に対して低酸素環境にとどまるピモニダゾールを作用させると sphere 内部の細胞に蓄積していることが明らかとなった (Fig. 1-1d)。よって sphere 内部の細胞が低酸素状態にあることが示唆された。

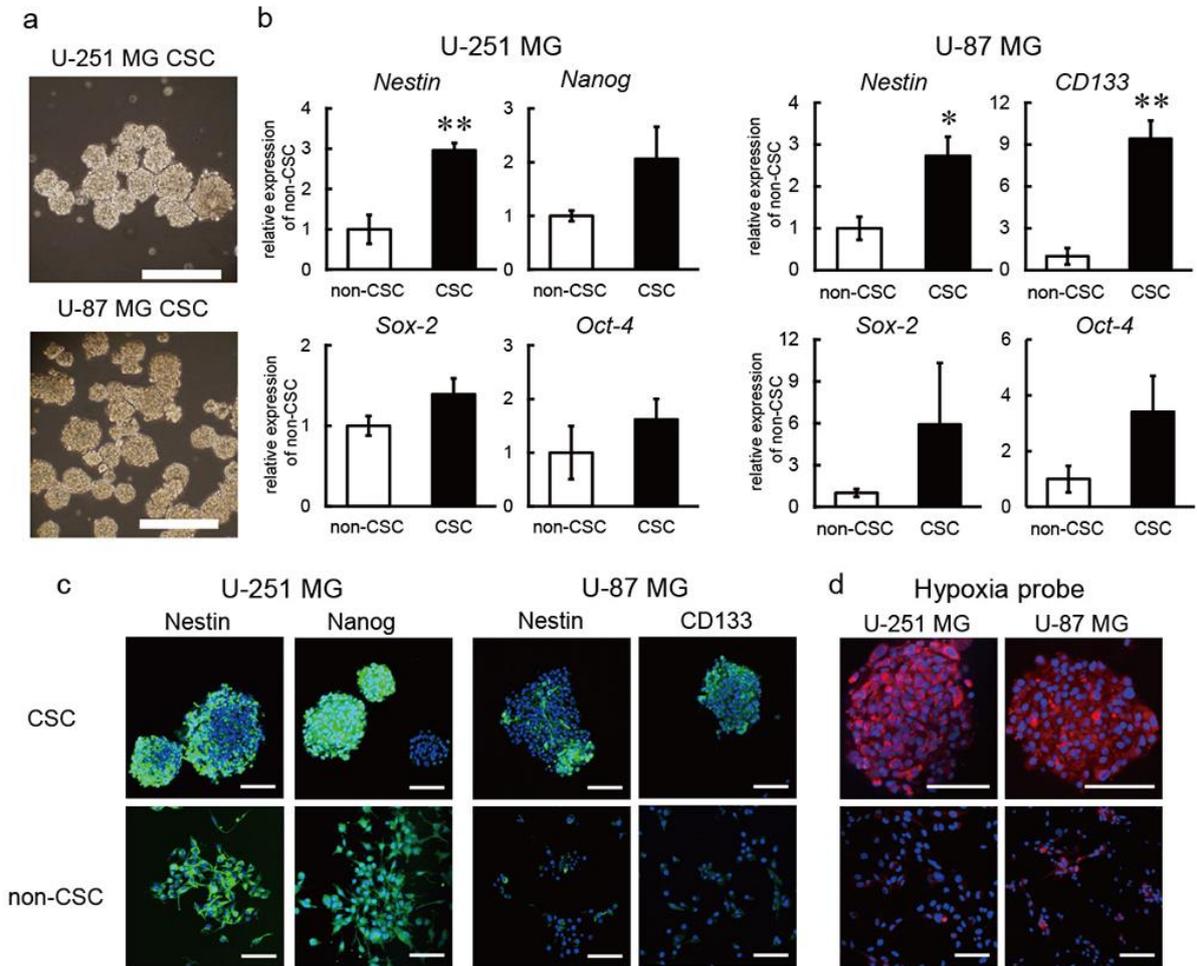


Fig. 1-1. Generation of CSCs by the sphere formation assay. (a) Glioblastoma cell lines (U-251 MG and U87-MG) formed spheres by the sphere formation assay (scale bars: 200 μ m). (b) Stem cell marker (*Nestin*, *Nanog*, *CD133*, *Sox-2*, and *Oct-4*) mRNA expression levels were increased in CSCs. 18S rRNA was used as an internal control (n=3, mean \pm SEM, p-values: *p < 0.05, **p < 0.01 vs. non-CSC). (c, d) Immunofluorescence analysis shows that the expression of stem cell markers was increased in spheres. Pimonidazole, a hypoxia probe, accumulated in spheres (scale bars: 100 μ m). CSC; cancer stem cell. (出典: Tetsuya Takada *et al.*: Inhibition of monocarboxylate transporter 1 suppresses the proliferation of glioblastoma stem cells. *J. Physiol. Sci.* in press)

1-3-3. イオン輸送関連分子の発現量変化

non-CSCs normoxia、non-CSCs hypoxia、CSCs normoxia でイオン輸送関連分子の発現量にどのような変化があるか解析するために、real-time RT-PCR を用いてイオン輸送関連分子の mRNA 発現量を non-CSC と CSCs の normoxia と hypoxia の各条件下で解析を行った。今回調べたイオン輸送関連分子としては、炭酸脱水酵素である CA9 と CA12、Na⁺/H⁺交換輸送体である NHE1 と NHE2、乳酸輸送担体である MCT1、MCT4 の 6 種類を使用した。その結果、CA9 や CA12 の mRNA 発現量はどちらの細胞株においても non-CSCs hypoxia や CSCs normoxia にすることで上昇した (U-251 MG; CA9 in non-CSCs hypoxia: 26.12 ± 2.34 , CA9 in CSCs normoxia: 38.91 ± 5.84 , CA12 in non-CSCs hypoxia: 3.30 ± 1.20 , CA12 in CSCs normoxia: 44.58 ± 4.95 , U-87 MG; CA9 in non-CSCs hypoxia: 21.47 ± 2.27 , CA9 in CSCs normoxia: 23.42 ± 5.20 , CA12 in non-CSCs hypoxia: 1.61 ± 0.18 , CA12 in CSCs normoxia: 3.61 ± 0.70) (n=3-5)。NHE の発現量は、U-251 MG では NHE1, NHE2 とともに non-CSCs hypoxia, CSC normoxia にすることで低下していた。一方、U-87 MG では CSCs normoxia にすることで NHE2 が上昇していた (U-251 MG; NHE1 in non-CSCs hypoxia: 0.66 ± 0.10 , NHE1 in CSCs normoxia: 0.22 ± 0.01 , NHE2 in non-CSCs hypoxia: 0.13 ± 0.07 , NHE2 in CSCs normoxia: 0.15 ± 0.04 , U-87 MG; NHE1 in non-CSCs hypoxia: 0.67 ± 0.06 , NHE1 in CSCs normoxia: 1.09 ± 0.18 , NHE2 in non-CSCs hypoxia: 0.99 ± 0.04 , NHE2 in CSCs normoxia: 2.38 ± 0.71) (n=3-5)。MCT の発現量は、MCT1 は U-251 MG、U-87 MG とともに CSCs normoxia にすることで上昇していた。MCT4 は U-251 MG、U-87 MG とともに non-CSCs hypoxia で上昇し、U-87 MG ではさらに CSC normoxia でも上昇していた (U-251 MG; MCT1 in HA cells: 1.14 ± 0.27 , MCT1 in CSCs: 2.30 ± 0.03 , MCT4 in HA cells: 1.43 ± 0.17 , MCT4 in CSCs: 1.04 ± 0.05 , U-87 MG; MCT1 in HA cells: 0.95 ± 0.09 , MCT1 in CSCs: 1.55 ± 0.43 , MCT4 in HA cells: 1.37 ± 0.06 , MCT4 in CSCs: 1.71 ± 0.29) (n=3-5) (Fig. 1-2)。また、CSCs hypoxia に関しても同様の解析を行ったところ、U-251 MG の CA9 の発現量は CSCs normoxia より上昇していたが、他のイオン輸送関連分子は CSCs normoxia と比べ明らかな変化がなかった (Fig. 1-3)。また、astrocyte におけるイオン輸送関連分子の発現量も調べた。その結果、astrocyte の CA9, CA12, MCT1 の発現量は両 GBM 細胞株より低値を示し、MCT4 の発現量は U-251 MG より低値を示した (Fig. 1-4)。

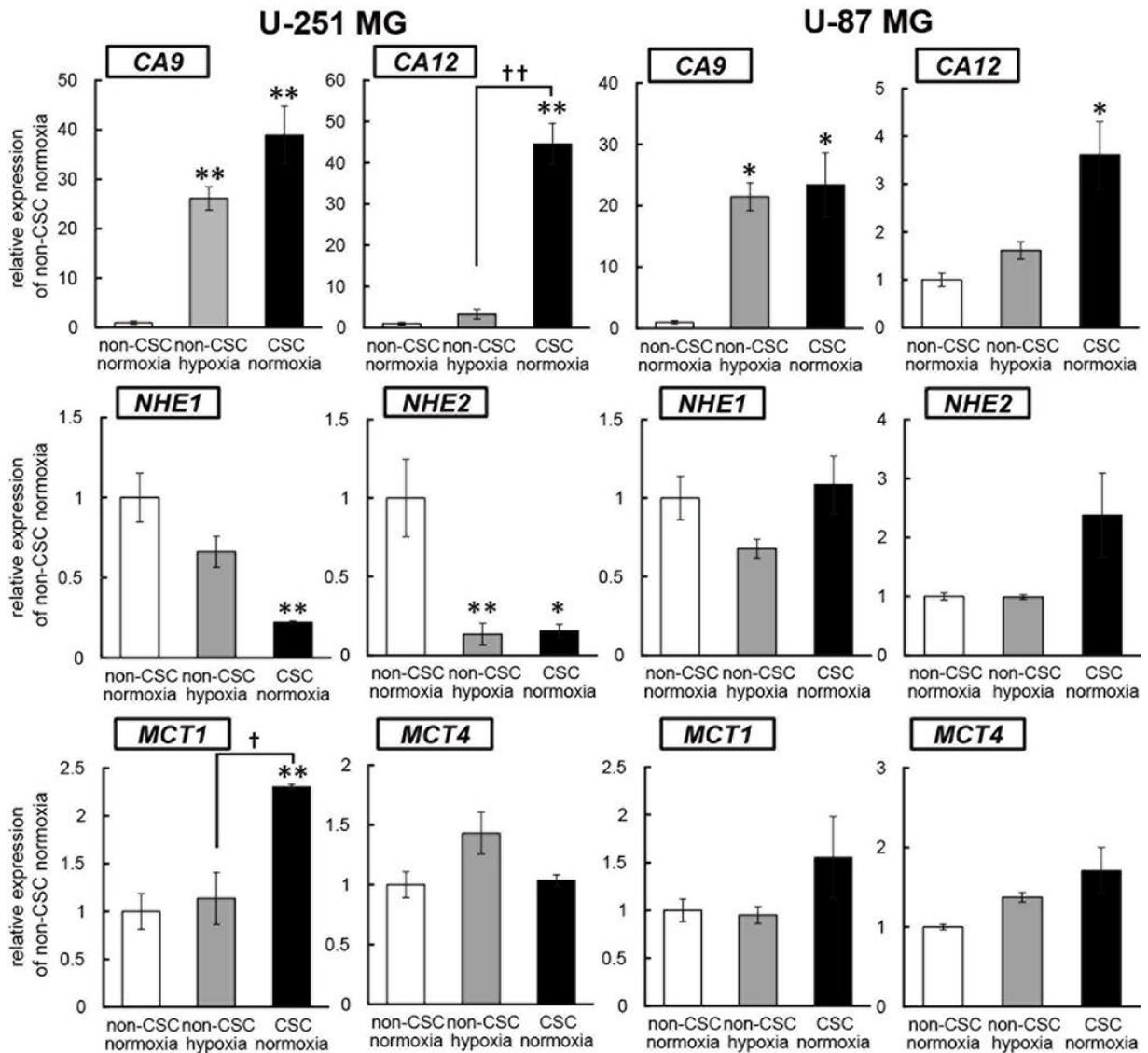


Fig. 1-2. mRNA expression of ion transport-related molecules in non-CSCs normoxia (white bars), non-CSCs hypoxia (gray bars), and CSCs normoxia (black bars). *CA9* and *CA12* transcripts were upregulated by hypoxia in U251-MG and U87-MG cell lines. *CA9*, *CA12*, and *MCT1* transcripts were upregulated by CSCs in these cell lines ($n=3-5$, mean \pm SEM, p -values: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ vs. non-CSC normoxia. $^{\dagger}p < 0.05$, $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs. non-CSC hypoxia). CSC; cancer stem cell. CA; carbonic anhydrase. NHE; $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger. MCT; monocarboxylate transporter. (出典: Tetsuya Takada *et al.*: Inhibition of monocarboxylate transporter 1 suppresses the proliferation of glioblastoma stem cells. *J. Physiol. Sci.* in press)

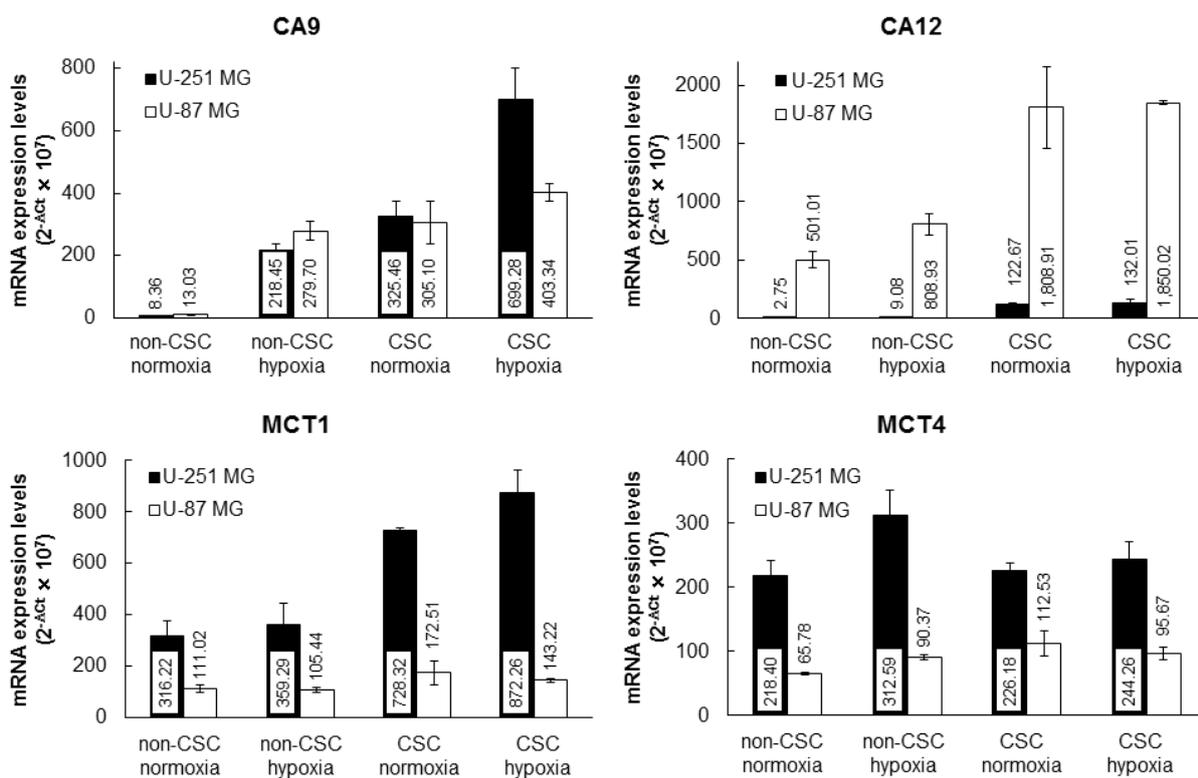


Fig. 1-3. mRNA expression levels of ion transport-related molecules. Changes of mRNA expression levels ($2^{-\Delta Ct} \times 10^7$) in non-CSCs or CSCs under normoxic or hypoxic conditions in U-251 MG and U-87 MG cells. We defined that CSCs hypoxia were spheres incubated under hypoxic conditions. CSC; cancer stem cell. CA; carbonic anhydrase. MCT; monocarboxylate transporter. (出典: Tetsuya Takada *et al.*: Inhibition of monocarboxylate transporter 1 suppresses the proliferation of glioblastoma stem cells. *J. Physiol. Sci.* in press)

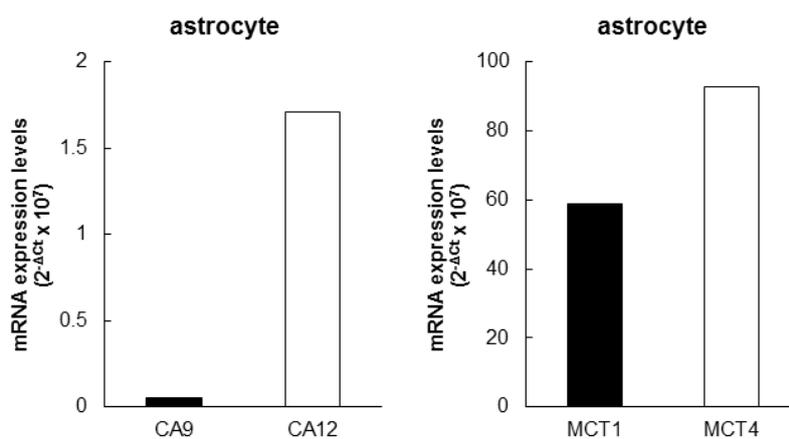


Fig. 1-4. mRNA expression levels of ion transport-related molecules. CAs (the left panel) and MCTs (the right panel) mRNA expression levels ($2^{-\Delta Ct} \times 10^7$) in astrocyte. CA; carbonic anhydrase. MCT; monocarboxylate transporter.

1-4. 考察

本章では、既に論文で Sphere 形成法により CSC の作製が可能であることが報告されている GBM 細胞株を用いて CSC を作製した^{23,25)}。実際に複数の幹細胞マーカーの発現が上昇している sphere を得ることができたため、本研究ではこの sphere を CSC と定義した。

real-time RT-PCR の解析結果より、GBM 細胞株由来の低酸素適応 (hypoxia adapted: HA) 細胞や CSC は、通常酸素濃度条件で培養した接着細胞と比べて様々なイオン輸送関連分子が変動することが明らかとなった。特に CSC にすることで CA9 や CA12 や MCT1 が上昇した。また低酸素状態では CA9 が大きく上昇し、CA12 や MCT4 も軽度上昇した。この低酸素による発現誘導は既報と同様の結果であった²⁷⁾。一方、NHE はいずれの条件でも変化がないか、低下した。NHE は、Na⁺を細胞内へ運び細胞内 pH や浸透圧の調整など生物の生存に必須の機能を担っている輸送体である。よって、CSC においても発現が上昇していると私は当初考えていた。しかし実際には上昇しなかった。Na⁺の細胞内への輸送には他の Na⁺/HCO₃⁻共輸送体 (Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter: NBC) や Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体 (Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter: NKCC) や Na⁺/Ca₂⁺交換輸送体 (Na⁺/Ca₂⁺ Exchanger: NCX) といった輸送体の関与が大きく、また H⁺の細胞外排出には MCT1 などが大きく関与していたために NHE は代償的に低下したと推察される。本研究では、EGF や b-FGF を用いて CSC を作製した。これらの因子が今回調べたイオン輸送関連分子に及ぼす影響については詳細なメカニズムは明確ではない。しかし、EGF や b-FGF がグリア型グルタミン酸トランスポーター (glutamate aspartate transporter: GLAST) の発現を上昇させグルタミン酸の取り込みを促進させるという報告があるため、EGF や b-FGF が今回調べたイオン輸送関連分子に何らかの影響を及ぼしている可能性は考えられる²⁸⁾。

CSC に対する新規治療ターゲットになりうるイオン輸送関連分子を考えた場合、HA 細胞ではなく CSC によって上昇するイオン輸送関連分子を標的にするべきであると考え。免疫蛍光染色において U-251 MG や U-87 MG から作製した sphere 内の細胞にピモニダゾールが蓄積していたことから、通常酸素濃度で培養を行っていたにもかかわらず sphere 内部が低酸素状態にあったことが示唆された。CA9 は HA 細胞、CSC ともに大きく上昇しており、HA 細胞と CSC を比べると軽度の上昇であったこと、HA 細胞を用いた CSC (CSCs hypoxia) でさらに上昇していたことから、CA9 の上昇は sphere 内部が低酸素状態であったことが大きな要因であり、幹細胞状態との本質的関連は低い可能性が示唆された。また、CSC にて発現が上昇していた CA や MCT の発現を astrocyte において検討したところ、non-CSC と比べて低かった。つまり astrocyte の恒常性の維持への CA や MCT の寄与は低い可能性が示唆された。

以上の結果より、CA12 と MCT1 は CSC に対する新規治療ターゲットとして有用なイオン輸送関連分子である可能性が示唆された。

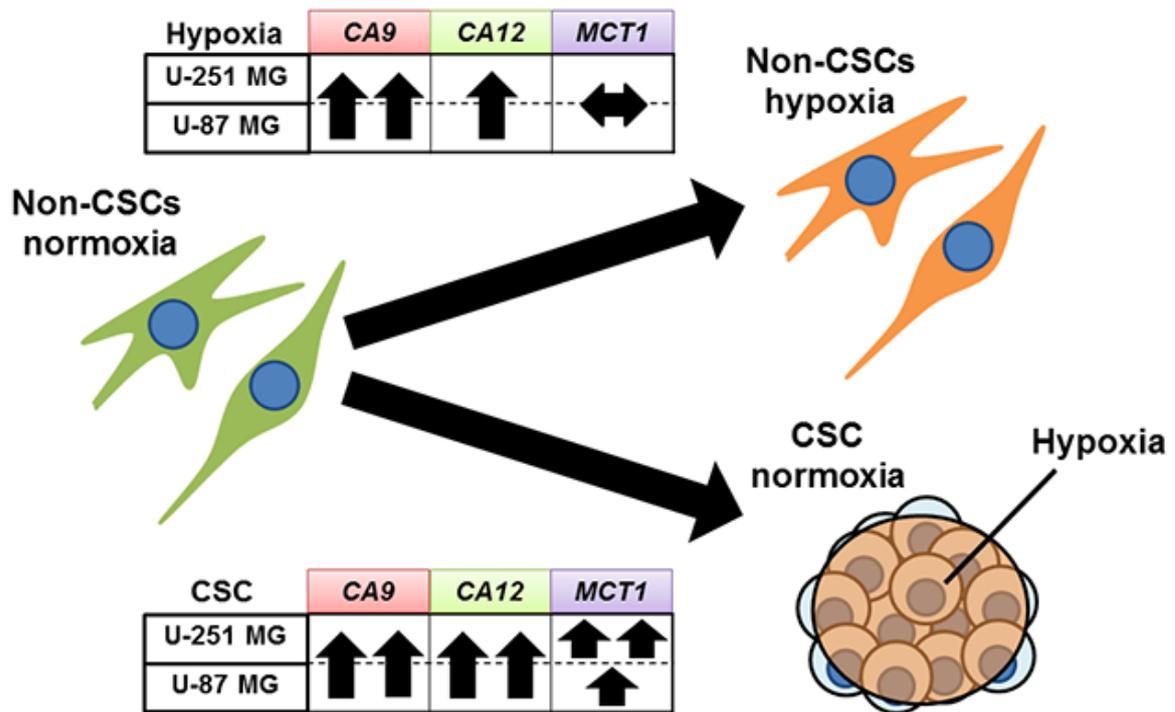


Fig. 1-5. Scheme of the alternation of mRNA expression levels of ion transport-related molecules. Hypoxia induced the increases of *CA9* and *CA12* transcripts. On the contrary, the formation of CSC spheres induced the increases of *CA9*, *CA12*, and *MCT1* transcripts. CSCs normoxia have a hypoxic environment in the spheres. CSC; cancer stem cell. CA; carbonic anhydrase. MCT; monocarboxylate transporter. (出典: Tetsuya Takada *et al.*: Inhibition of monocarboxylate transporter 1 suppresses the proliferation of glioblastoma stem cells. *J. Physiol. Sci.* in press)

第2章. 神経膠芽腫がん幹細胞に対する MCT 阻害剤による影響

2-1. はじめに

MCT は細胞質内外の乳酸と H^+ の共輸送に関与している輸送体である。多くのサブタイプが存在し、組織分布などによって区別される。近年、MCT1,3,4 は主となる α サブユニットとそれに付随する β サブユニットからなり、その β サブユニットは細胞外 MMP の発現を誘導することが知られる CD147 (basigin) であることが報告されている¹⁵⁾。とくに MCT1 は最も広く発現しているサブタイプであり、伸筋や遅筋線維を豊富に含む赤筋や心筋に多く分布していることが知られている。近年、神経芽細胞腫や結腸直腸がんなど様々ながん種においても発現が上昇していることが報告されている¹⁸⁾。一方、MCT4 は速筋線維が豊富な白筋や白血球、神経網膜などで主に発現しており、MCT4 は HIF-1 によって発現が亢進する¹⁵⁾。また、脳においても MCT の発現が確認されており、MCT1 はアストロサイトや毛細血管の内皮細胞やオリゴデンドロサイトに、MCT4 は主にアストロサイトに発現しており、一方、MCT2 はニューロンに発現しており²⁹⁾、MCT1 と MCT4 はアストロサイトからの乳酸の放出を制御し、MCT2 はニューロンへの乳酸の取り込みを制御していることが報告されている²⁹⁾。

がん研究においては、MCT1 においてはヒト結腸腺がん細胞株を用いた研究において MCT1 阻害剤を用いることで細胞の増殖を抑制することができ、MCT4 を阻害することで CD147 の機能を抑制し、転移を抑制する可能性があることが示唆されている¹⁵⁾。しかし、CSC に対する効果は現在明らかになっていない。本章では、第一章において GSC にすることで低酸素非依存的に MCT1 が上昇したことから、MCT1 が GSC の恒常性の維持に強く関与すると考え、MCT1,4 阻害剤や MCT1 選択的阻害剤を用いたときの細胞に与える影響について論じる。

2-2. 実験方法

2-2-1. 細胞培養

細胞培養は 1-2-1.と同様の方法を使用した。

2-2-2. CSC 調製

CSC は 1-2-2.と同様、Sphere 形成法を用いて調製した。

2-2-3. 阻害剤調製および保存

4-(ヒドロキシ水銀)安息香酸ナトリウム塩 (*p*-hydroxymercuribenzoic acid sodium salt: pHMBS; Sigma-Aldrich) は使用時に滅菌 milliQ で溶解し 15 mM に調製した。その後、処置濃度まで各細胞に対応する培養液を用いて段階希釈を行った。AR-C117977 はジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide: DMSO; Wako) で溶解し 100 mM に調製し、 -30°C で保存した。使用時は、処置濃度まで DMSO で希釈段階した後、DMSO 濃度が 2%になるよう各細胞に対応する培養液で希釈した。

2-2-4. WST-8 assay

接着細胞である non-CSCs や astrocyte に対する阻害剤の細胞増殖抑制効果を調べるために WST-8 assay を用いた。細胞は 96-well cell culture plates (Corning International) に 1 well あたり 3.0×10^3 cells/90 μl で播種した。阻害剤は各終濃度と比較して 10 倍濃いものを 2-2-3.の方法で調製し播種後 24 時間後に 1 well あたり 10 μl 加えた (DMSO 終濃度: 0.2%)。72 時間培養を行ったのち、生細胞数測定試薬 SF (Nacalai Tesque) を 1 well あたり 10 μl 加え、3 時間 37°C で培養し反応させた。そしてマイクロプレートリーダー (Model 680 Microplate Reader: Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて 450 nm (参照波長: 630 nm) の吸光度を測定した。

2-2-5. CellTiter-Glo[®] 3D cell viability assay

浮遊状態の sphere である CSCs に対する阻害剤の細胞増殖抑制効果を調べるために CellTiter-Glo[®] 3D cell viability assay を用いた。細胞は Ultra-Low attachment 96-well plates (Corning International) に 1 well あたり 3.0×10^3 cells/90 μl で播種した。阻害剤は各終濃度と比較して 10 倍濃いものを 2-2-3.の方法で調製し播種後 24 時間後に 1 well あたり 10 μl 加えた (DMSO 終濃度: 0.2%)。6 日間培養を行った後、各 well の細胞を培養液ごと白色マイクロプレート (96F Nunclon Delta White Microwell SI; Thermo Fisher Scientific) に移し替えた。そこに CellTiter-Glo[®] 3D Reagent (Promega, Madison, WI) を 1 well あたり 100 μl 加え、5 分間攪拌することで混ぜ、室温で 25 分反応させた。そして、ルミノメーター (GloMax[®] Discover System: Promega) を用いて発光量を測定した。

2-2-6. 細胞内乳酸測定

細胞は 96-well cell culture plates もしくは Ultra-Low attachment 96-well plates にそれぞれ 1 well あたり 3.0×10^3 cells/90 μl で播種した。阻害剤は各終濃度と比較して 10 倍濃いものを 2-2-3.

の方法で調製し播種後 24 時間後に 1 well あたり 10 μ l 加えた (DMSO 終濃度: 0.2%)。そして non-CSCs は 72 時間培養し、上清および細胞を回収した。細胞剥離にはトリプシンを用いた。このとき、洗浄した廃液もすべて回収した。回収後、200 \times g で遠心し上清を取り除いた。そこに PBS を入れ洗浄した。その後、再度この洗浄作業を行った。一方、CSCs は 6 日間培養を行ったのち、上清および細胞を回収した。このとき PBS で洗浄しすべての細胞を回収した。回収後、200 \times g で遠心し上清を取り除いた。PBS で洗浄後、再度この洗浄作業を行った。PBS を除去し、sphere を分散させるために accumax (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA) を加え 30 分間室温で反応させた。反応後、ピペッティングにより sphere を単一の細胞にした。その後、non-CSCs, CSCs とともにビルケルチュルク血球計算盤 (ERMA Inc, Tokyo) を用いてセルカウントを行った。次にこれらの細胞懸濁液を超音波ホモジナイザー (UR-20P: Tomy Seiko Inc, Tokyo, Japan) を用いて破碎し、細胞内乳酸サンプルとした。測定には、Lactate Assay Kit II (BioVision, Milpitas, CA) を用い、添付のプロトコルに従い行った。そしてマイクロプレートリーダー (GloMax[®] Discover System) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

2-2-7. 統計解析

non-CSCs と CSCs における阻害剤による細胞増殖抑制効果の違いは Student の t 検定を用いて解析を行った。得られた実験結果は平均値 \pm SEM で表示した。危険率 5 % 以下を統計学的に有意な差があると判定し、次のように表示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。これらの統計解析は Statview software for Windows を用いた。

2-3. 実験結果

2-3-1. MCT1,4 阻害剤である pHMBS の GBM の細胞増殖に及ぼす影響

MCT を阻害したときの GBM に及ぼす影響を検討するために、U-251 MG および U-87 MG の non-CSCs, CSCs に対して pHMBS を作用させた。細胞生存率を検討したところ、U-251 MG では IC_{50} が non-CSC で約 260 μ M, CSC で 200 μ M, U-87 MG では non-CSC で約 150 μ M, CSC で約 100 μ M という結果となった。つまり pHMBS は CSC のほうが低濃度で細胞生存率の低下を示すことが明らかとなった。しかし完全に抑制効果を示すためには U-87 MG では non-CSC より CSC のほうが高濃度を必要とした (Fig.2-1a)。このとき各濃度における sphere の大きさを確認したところ、pHMBS は濃度依存的に U-251 MG, U-87 MG 由来の sphere の最大径を低下させた (Fig.2-1b)。

2-3-2. pHMBS の GBM の乳酸排出に及ぼす影響

MCT を阻害したときの乳酸の排出に及ぼす影響を検討するために、細胞内乳酸量の定量を行った。その結果、pHMBS を作用させることで細胞内の乳酸量が増加していることが明らかとなった。また non-CSCs に比べて CSCs のほうがより乳酸を細胞内に蓄積させられていることが明らかとなった (Fig.2-1c)。U-251 MG では、pHMBS により CSCs において約 4.7 倍に増加していたが、non-CSCs においては約 1.3 倍であった。U-87 MG では、pHMBS により CSCs において約 1.7 倍に増加していたが、non-CSCs においては約 1.1 倍であった。

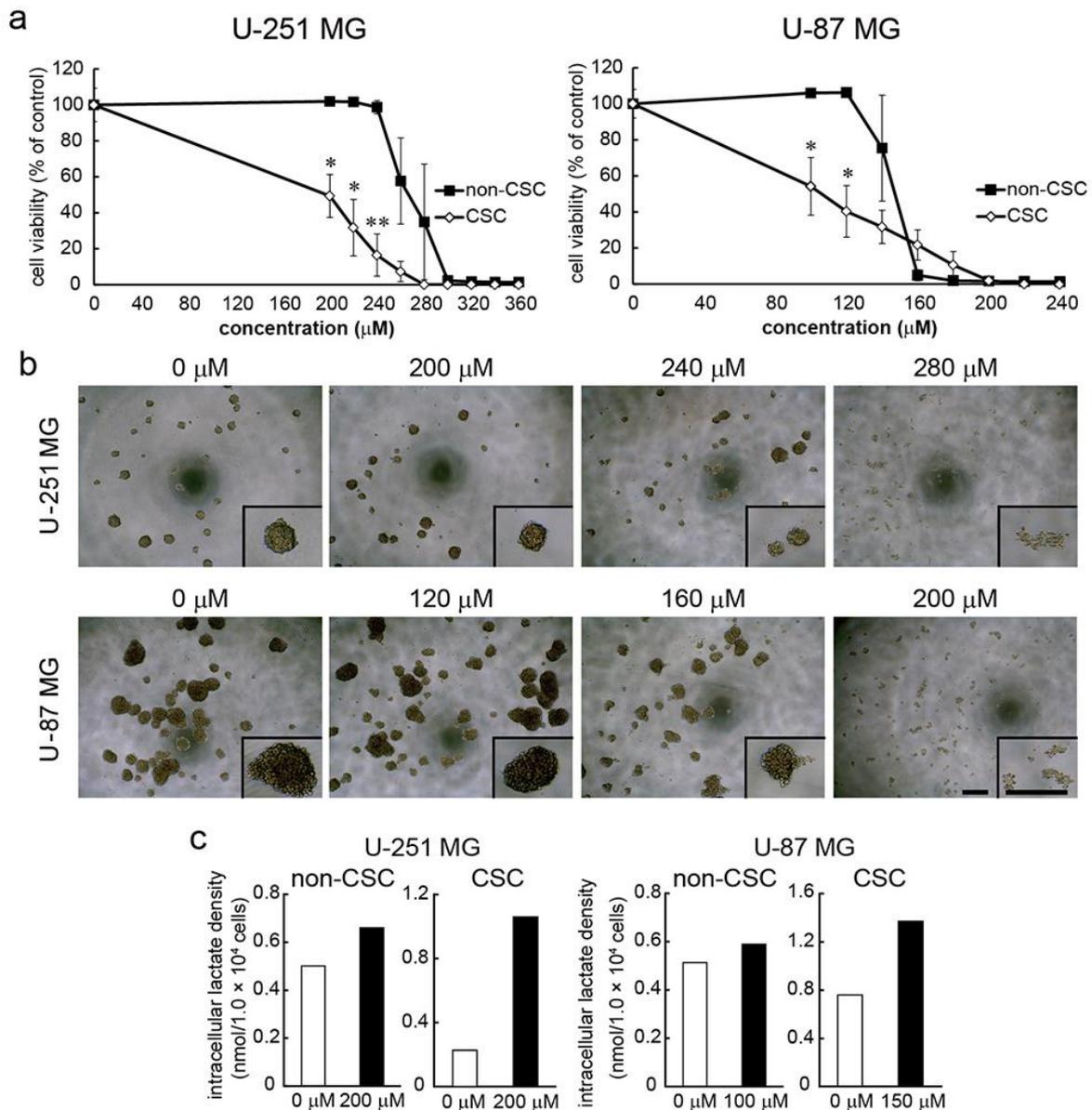


Fig. 2-1. Effect of pHMBS on non-CSCs and CSCs. (a) Cells were treated with pHMBS (U-251 MG: 200–360 μM, U-87 MG: 100–260 μM) or vehicle for 72h (n=3, mean ± SEM, p-values: *p < 0.05, **p < 0.01 vs. non-CSC of each concentration). (b) Images show the number and size of spheres treated for 6 days with various concentrations of pHMBS. Scale bars: 300 μm. (c) Bars show the intracellular lactate density (nmol/1.0 × 10⁴ cells) of non-CSCs or CSCs treated with pHMBS for 72h (non-CSCs) or 6 days (CSCs). This data is representative of two independent experiments. CSC; cancer stem cell. (出典: Tetsuya Takada *et al.*: Inhibition of monocarboxylate transporter 1 suppresses the proliferation of glioblastoma stem cells. *J. Physiol. Sci.* in press)

2-3-3. pHMBS の astrocyte の細胞増殖に及ぼす影響

MCT を阻害したときの正常細胞に及ぼす影響を検討するために、astrocyte に対して pHMBS を作用させた。細胞生存率を検討したところ、IC₅₀ が約 120 μM で完全に抑制効果を示すのは

約 140 μM であった (Fig.2-2)。

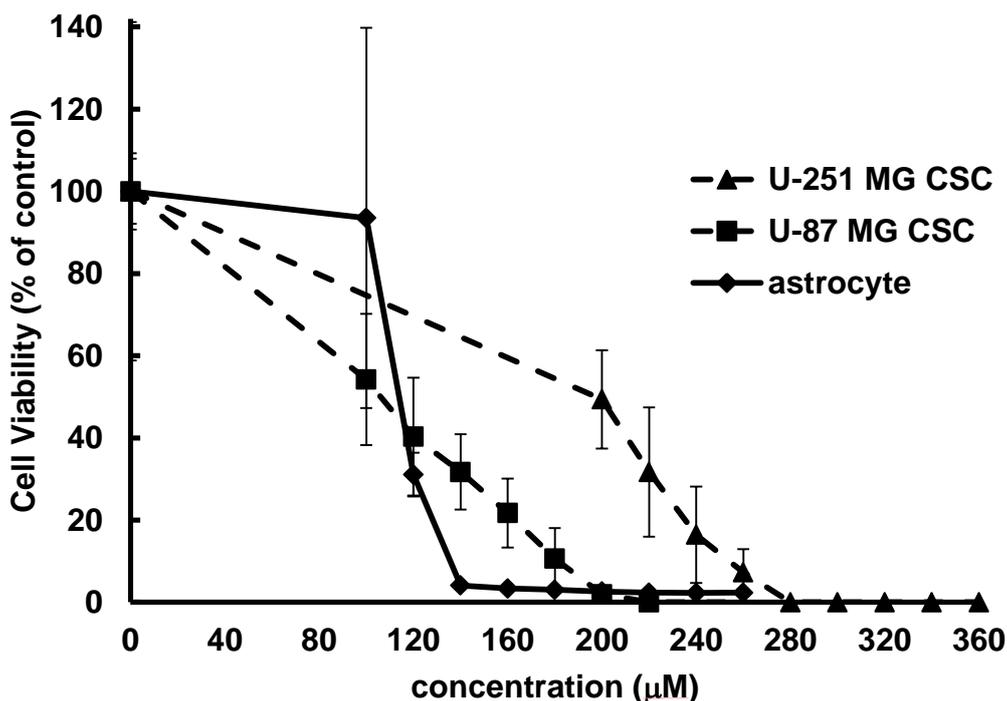


Fig. 2-2. Effect of pHMBS on astrocytes. Cells were treated with pHMBS (100–260 μM) or vehicle for 72h (n=3, mean \pm SEM). The solid line with closed diamonds shows cell viability of astrocytes. The dashed lines show cell viability of U-251 MG CSC (closed triangles) or U-87 MG CSCs (closed squares).

2-3-4. MCT1 選択的阻害剤である AR-C117977 の GBM の細胞増殖に及ぼす影響

MCT1 を選択的に阻害したときの GBM に及ぼす影響を検討するために、U-251 MG および U-87 MG の non-CSCs, CSCs に対して AR-C117977 を作用させた。細胞生存率を検討したところ、U-251 MG では IC_{50} が non-CSC で約 10 μM 、CSC で 2.5 μM 、U-87 MG では non-CSC で約 15 μM 、CSC で約 10 μM という結果となった。つまり AR-C117977 も pHMBS 同様 CSC のほうが低濃度で細胞生存率の低下を示すことが明らかとなった。しかし、完全に抑制効果を示すために U-251 MG, U-87 MG ともに non-CSC の濃度より高濃度を必要とはしなかった (Fig.2-3a)。このとき各濃度における sphere の大きさを確認したところ、AR-C117977 は濃度依存的に U-251 MG, U-87 MG 由来の sphere の最大径を低下させた (Fig.2-3b)。

2-3-5. AR-C117977 の GBM の乳酸排出に及ぼす影響

MCT1 を選択的に阻害したときの乳酸の排出に及ぼす影響を検討するために、細胞内乳酸量の定量を行った。その結果、AR-C117977 を作用させたことで細胞内の乳酸量が増加していることが明らかとなった。また non-CSCs に比べて CSCs のほうがより乳酸を細胞内に蓄積させられていることが明らかとなった (Fig.2-3c)。U-251 MG では、AR-C117977 により CSCs において約 2.4 倍に増加していたが、non-CSCs においては約 1.3 倍であった。U-87 MG では、

AR-C117977により CSCs において約 1.2 倍に増加していたが、non-CSCs においては約 1.1 倍であった。

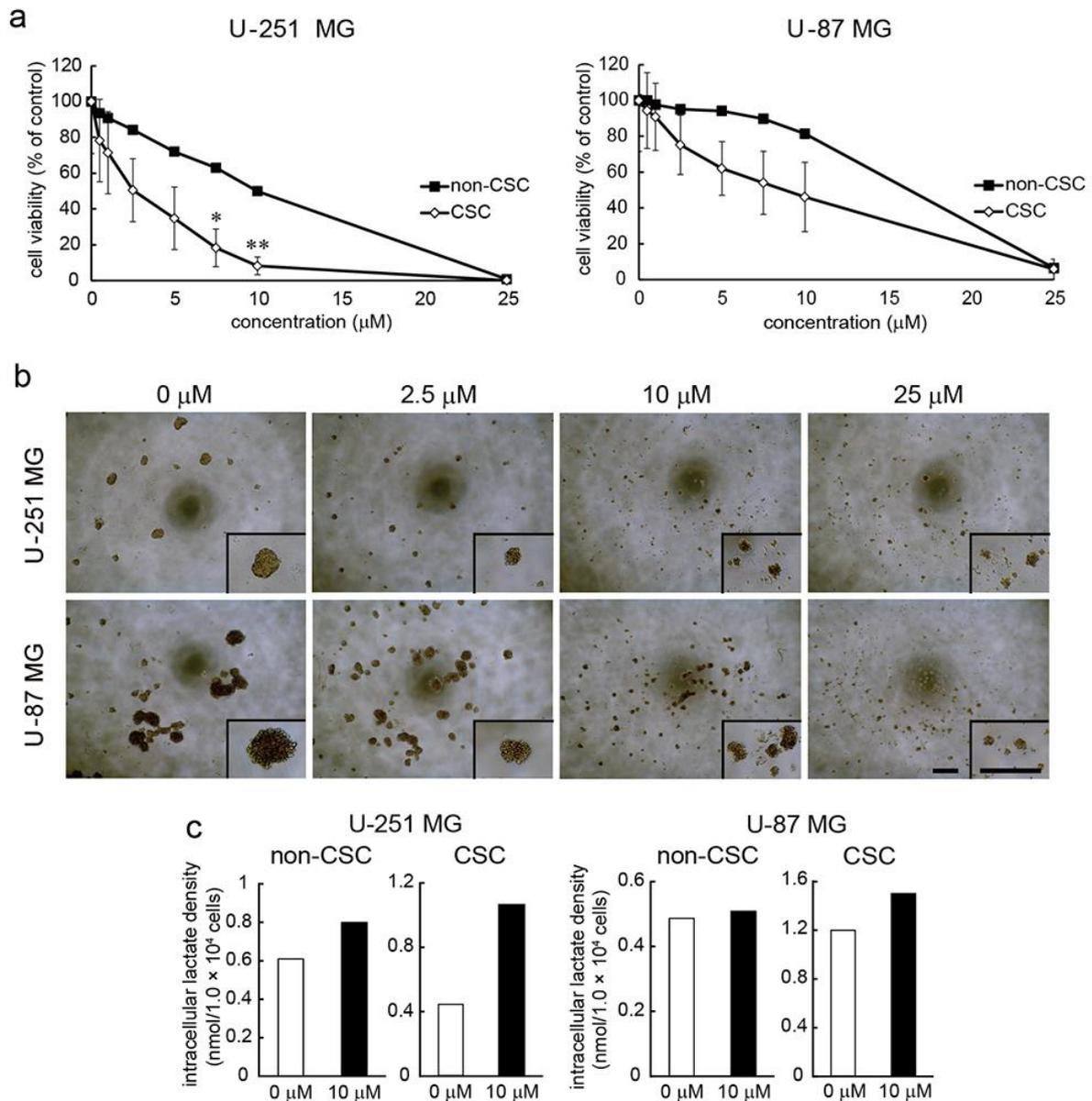


Fig. 2-3. Effects of AR-C117977 on non-CSCs and CSCs. (a) Cells were treated with AR-C117977 (0.5–25 μM) or 0.2% DMSO (vehicle) for 72h (n=3, mean ± SEM, p-values: *p < 0.05, **p < 0.01 vs. non-CSC of each concentration). (b) Images show the number and size of spheres treated for 6 days with various concentrations of AR-C117977. Scale bars: 300 μm. (c) Bars show the intracellular lactate density (nmol/1.0 × 10⁴ cells) of non-CSCs or CSCs treated with AR-C117977 for 72h (non-CSC) or 6 days (CSC). This data is representative of two independent experiments. CSC; cancer stem cell. (出典: Tetsuya Takada *et al.*: Inhibition of monocarboxylate transporter 1 suppresses the proliferation of glioblastoma stem cells. *J. Physiol. Sci.* in press)

2-3-6. AR-C117977 の astrocyte の細胞増殖に及ぼす影響

MCT1 を選択的に阻害したときの正常細胞に及ぼす影響を検討するために、astrocyte に対して AR-C117977 を作用させた。細胞生存率を検討したところ、 IC_{50} が約 $15 \mu\text{M}$ で完全に抑制効果を示すのは $25 \mu\text{M}$ 以上であった (Fig.2-4)。

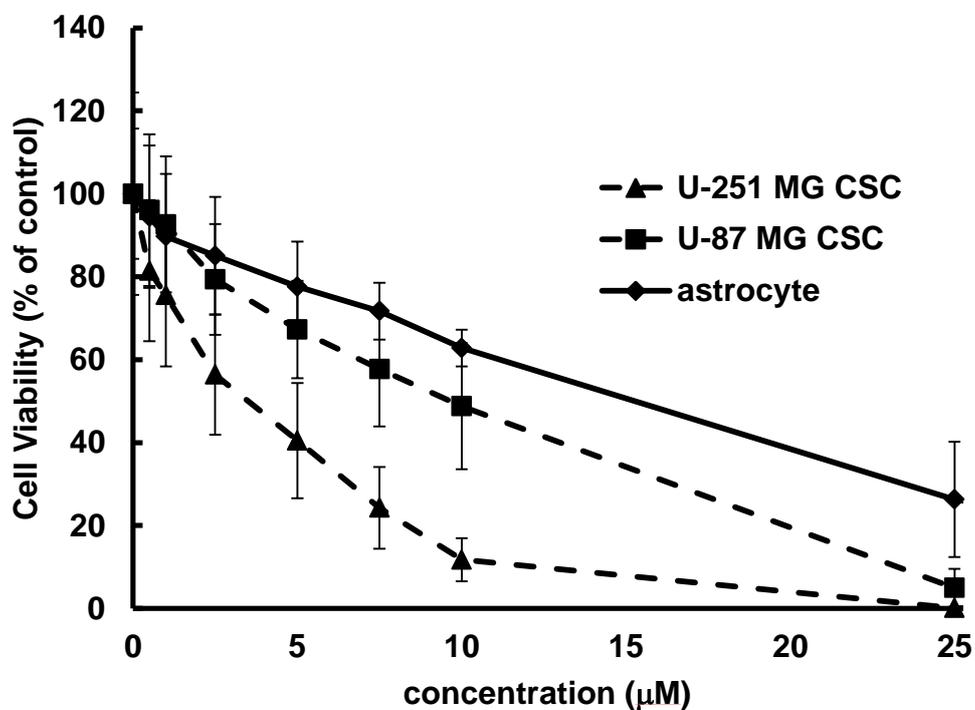


Fig. 2-4. Effect of AR-C117977 on astrocytes. Cells were treated with AR-C117977 ($0.5\text{--}25 \mu\text{M}$) or vehicle for 72h ($n=3$, mean \pm SEM). The solid line with closed diamonds shows cell viability of astrocytes. The dashed lines show cell viability of U-251 MG CSC (closed triangles) or U-87 MG CSCs (closed squares).

2-4. 考察

はじめにMCT阻害剤であるpHMBSをGBM細胞株由来のnon-CSCsやCSCsに作用させた。pHMBSはMCT1やMCT4の補助因子であるCD147に結合することで阻害効果を示す³⁰⁻³³⁾。MCTを阻害した結果、non-CSCやCSCは乳酸の細胞外への排出が抑制され恒常性を維持できなくなり細胞増殖が抑制された^{34,35)}。またCSCではsphere形成能がpHMBSの濃度依存的に低下した。またCSCではnon-CSCより早期に増殖抑制が誘導された。しかし、U-87 MG由来CSCの細胞増殖を完全に抑制するためには、pHMBSはnon-CSCのときより高濃度を必要とした。またU-251 MG細胞に対して増殖抑制を誘導するためには、pHMBSはU-87 MGの時より約100 μ M多く必要であった。さらにastrocyteに対してpHMBSを作用させたところ、pHMBSはU-251 MGやU-87 MGのCSCsに対して効果を示した濃度より低濃度で細胞増殖抑制効果を示した。これらの原因として、MCT1やMCT4の発現量がU-87 MGの方がU-251 MGと比べ約半分で (Fig. 1-3)、astrocyteではさらに低い (Fig. 1-3) ことが推察される。以上の結果よりCD147を介したMCT阻害は正常なastrocyteに障害をもたらす危険性があり、また神経膠芽腫の種類によって効果にばらつきが出る可能性が示された。

次にMCT1選択的阻害剤であるAR-C117977をGBM細胞株由来のnon-CSCsやCSCsに作用させた。AR-C117977は近年、アストラゼネカ社が免疫抑制剤として開発を進めていたMCT1阻害剤で、MCT1に直接結合し阻害効果を発揮する^{36,37)}。MCT1を選択的に阻害した結果、pHMBSと同様にnon-CSCやCSCでは乳酸の細胞外への排出が抑制され恒常性を維持できなくなり細胞増殖が抑制された。またCSCではsphere形成能もAR-C117977の濃度依存的に低下した。またCSCではnon-CSCよりすべての濃度域で強い細胞増殖抑制効果がみられた。さらにastrocyteに対してAR-C117977を作用させたところ、AR-C117977はU-251 MGやU-87 MGのCSCsに対して効果を示した濃度より低濃度で細胞増殖抑制効果を示した。これらの結果はMCT1の発現量と逆の相関を示した。つまりMCT1の発現量が高く寄与度が高いものほどAR-C117977が効果を示し細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

MCTが細胞膜上に表出されるには、MCTはCD147やgp70 (embigin)を補助因子として必要とする。特にMCT1は通常CD147を補助因子とするが、CD147がないときはgp70を補助因子としている³⁸⁾。つまりpHMBSはCD147を補助因子としたMCT1のみしか阻害できないために、gp70を補助因子としたMCT1には阻害効果が弱いと推察される。pHMBS処置群はnon-CSCではMCT1の発現量の高いU-251 MGに対して細胞増殖抑制効果を示すにも関わらず、発現量の低いU-87MGより高濃度を必要とし、発現量が高いCSCsに対しては、non-CSCsより低濃度で効果を示すという発現量と効果の相関が逆となった。この原因として、GSCの恒常性の維持にMCT1とともにCD147も強く関連していることが推定される。しかし、non-CSCsにおいてMCT1の恒常性維持に対する寄与度が高いと考えられるU-251 MGのほうが高濃度を必要としたのは、可能性としてU-251MGではCD147よりgp70の寄与度が高かったために、MCT1が高発現しているにもかかわらず効果を示すのに高濃度を必要としたことが推測される。一方AR-C117977は直接MCT1を阻害するため、より低濃度で阻害効果を示したと推察される。これらのMCT1阻害による増殖抑制については、細胞内に乳酸が貯留すると同時に共輸送イオンであるH⁺も貯留し、細胞の遊走やオートファジーなどの細胞機能に

関与する H^+ のカウンターイオンである Cl^- の増加が細胞質内で起こることで、細胞周期の停止を誘導したと推察する³⁹⁻⁴¹⁾。astrocyte が MCT1 選択的阻害剤で効果が低かったのは、乳酸排出に対して MCT1 より MCT4 の寄与度が高かったことが原因であると推察される。

pHMBS や AR-C117977 はいくつかの論文で *in vivo* 実験に使用されており、大きな副作用は報告されていない^{30,31,33,36)}。しかし臨床を考えた場合、pHMBS は水銀を含むため不適切であると考えられる。一方 MCT1 選択的阻害剤については、AZD3965 を用いて非小細胞肺癌に対する臨床研究⁴⁵⁾や進行がんに対する臨床試験 (NCT01791595) の phase I が現在実施されており、臨床的に安全である可能性が高い。

以上のことより、MCT1 を選択的に阻害することは正常な神経膠細胞には低毒性で、GSC に対する治療標的分子として期待できる。

第3章. 神経膠芽腫がん幹細胞に対する CA 阻害剤による影響

3-1. はじめに

CA は様々な動物や植物で発現が確認されている活性中心に亜鉛を含むタンパク質である。複数のファミリーが存在し、哺乳類に存在するものとしては、 α -CA がある。作用としては H^+ 、 HCO_3^- と水、二酸化炭素の可逆的な変換の促進に寄与する。CA は膜結合型、細胞質型、ミトコンドリア型、分泌型の4つのグループに分類される。特に CA9 や CA12 は膜結合型の炭酸脱水酵素に分類され、通常 CA9 は主に消化管に発現し、CA12 は腎臓、結腸、膵臓といった正常組織において高発現している。

がん細胞においては、細胞外が酸性環境になるにもかかわらず、この CA の作用により酸性、低酸素ストレスに適応し、細胞生存に寄与していることが知られている²⁷⁾。また CA9、CA12 はヒトの多種多様な腫瘍で過剰発現しており、乳がんや膀胱がんなどの多くのがん種において予後の不良と関連していると報告されている¹⁷⁾。そして CA9 高発現株であるヒト子宮頸部がん細胞株 HeLa、ヒト腎細胞がん細胞株 768-O に対して CA 阻害剤を作用させると細胞生存率の低下を引き起こすという報告がある¹⁷⁾。しかし、CSC に対する効果は現在明らかになっていない。

CA の発現は脳においても確認されており、また GBM で発現していることも報告されている⁴²⁾。本章では、第一章において GSC では、低酸素にすることより優位に CA12 が上昇したことから、CA12 が GSC の恒常性の維持に強く関与していると考え、CA 阻害剤を用いたときの細胞増殖に与える影響について論じる。

3-2. 実験方法

3-2-1. 細胞培養

細胞培養は 1-2-1.と同様の方法を使用した。

3-2-2. CSC 調製

CSC は 1-2-2.と同様、Sphere 形成法を用いて調製した。

3-2-3. 阻害剤調製および保存

U104 (Sigma) は DMSO で溶解し 100 mM に調製し、4°C で保存した。使用時は、処置濃度まで DMSO で希釈段階した後、DMSO 濃度が 5%になるよう各細胞に対応する培養液で希釈した。

3-2-4. WST-8 assay

接着細胞である non-CSCs や astrocyte に対する阻害剤の細胞増殖抑制効果を調べるために WST-8 assay を用いた。方法は 2-2-4.と同様の方法で行った。

3-2-5. CellTiter-Glo[®] 3D cell viability assay

浮遊状態の sphere である CSCs に対する阻害剤の細胞増殖抑制効果を調べるために CellTiter-Glo[®] 3D cell viability assay を用いた。方法は 2-2-5.と同様の方法で行った。

3-2-6. 統計解析

non-CSCs と CSCs における阻害剤による細胞増殖抑制効果の違いは Student の t 検定を用いて解析を行った。得られた実験結果は平均値±SEM で表示した。危険率 5 %以下を統計学的に有意な差があると判定し、次のように表示した。* $p < 0.05$ 。これらの統計解析は Statview software for Windows を用いた。

3-3. 実験結果

3-3-1. CA 阻害剤である U104 の GBM の細胞増殖に及ぼす影響

CA を阻害したときの GBM に及ぼす影響を検討するために、U-251 MG および U-87 MG の non-CSCs, CSCs に対して U104 を作用させた。細胞生存率を検討したところ、U-251 MG では IC₅₀ が non-CSCs で約 100 μ M, CSCs で 150 μ M, U-87 MG では non-CSCs で約 200 μ M, CSC で約 100 μ M という結果となった。つまり U104 は U-87 MG では CSC のほうが低濃度で細胞生存率の低下を示すが、U-251 MG では高濃度を必要とすることが明らかとなった。しかし完全に抑制効果を示すのはともに CSCs のほうが先であり、U-251 MG では 40%以上の細胞増殖抑制を示さなかった。(Fig.3-1a)。このとき各濃度における sphere の大きさを確認したところ、U104 は濃度依存的に U-251 MG, U-87 MG 由来の sphere の最大径を低下させた (Fig.3-1b)。

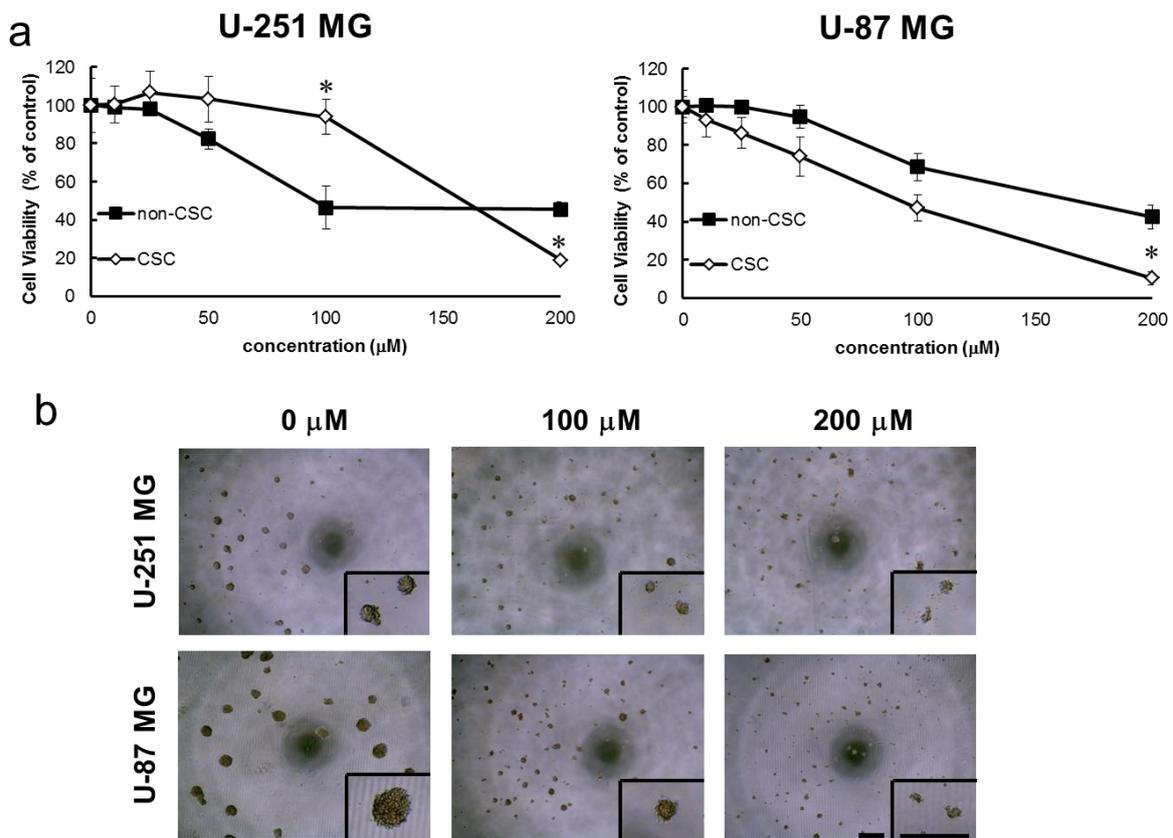


Fig. 3-1. Effect of U104 on non-CSCs and CSCs. (a) Cells were treated with U104 (10–200 μ M) or vehicle for 72h (n=3, mean \pm SEM, p-values: *p < 0.05 vs. non-CSC of each concentration). (b) Images show the number and size of spheres treated for 6 days with various concentrations of U104. Scale bars: 300 μ m. CSC; cancer stem cell.

3-3-3. U104 の astrocyte の細胞増殖に及ぼす影響

CA を阻害したときの正常細胞に及ぼす影響を検討するために、astrocyte に対して U104 を作用させた。細胞生存率を検討したところ、今回使用した濃度域では変化がなかった。(Fig.3-2)。

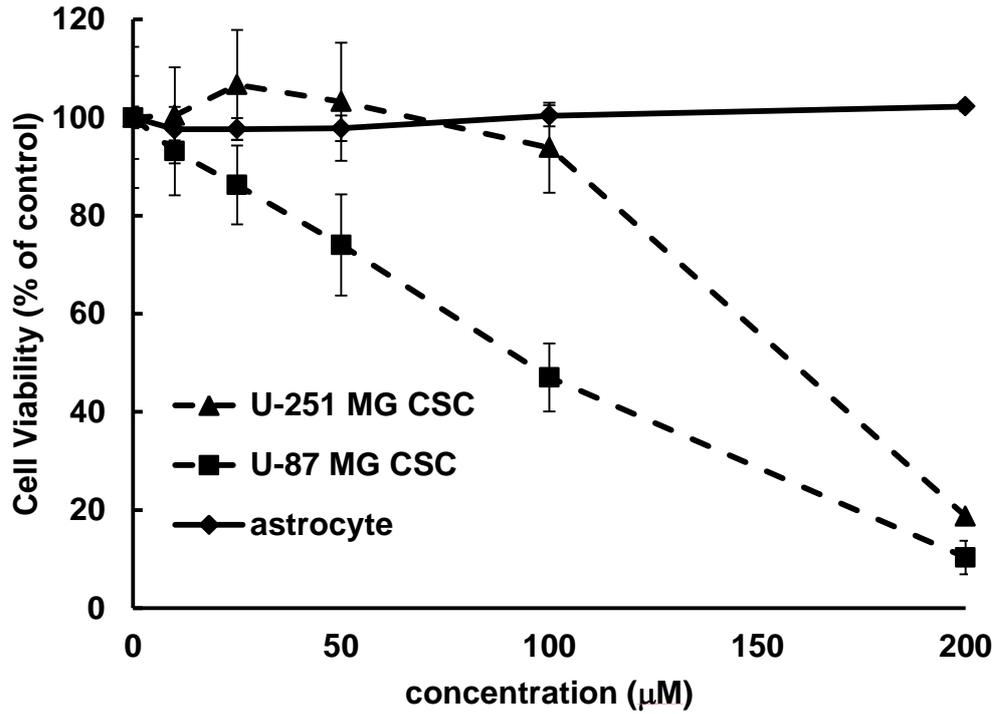


Fig. 3-2. Effect of U104 on astrocytes. Cells were treated with U104 (10–200 µM) or vehicle for 72h (n=3, mean ± SEM). The solid line with closed diamonds shows cell viability of astrocytes. The dashed lines show cell viability of U-251 MG CSC (closed triangles) or U-87 MG CSCs (closed squares).

3-4. 考察

本章では、スルホンアミド部位をもつ CA 阻害剤である U104 を GBM 細胞株由来の non-CSCs や CSCs に作用させた。U104 は、スルホンアミド部位が CA の亜鉛に配位することで阻害効果を示す。CA を阻害した結果、non-CSC や CSC は恒常性を維持できなくなり細胞増殖が抑制された。また CSC では sphere 形成能も U104 の濃度依存的に低下した。特に U-87 MG では、U104 は CSCs の増殖抑制を non-CSCs に対して効果を示す濃度より低濃度で引き起こした。しかし U-251 MG では、U104 は増殖を抑制するためには non-CSCs に対して効果を示す濃度より高濃度を必要とした。一方 astrocyte に対しては、U104 は増殖抑制効果を示さなかった。CA9 の発現量を考えた場合、non-CSCs の U-251 MG では astrocyte の発現量に比して約 80 倍高く、また U-87 MG では約 130 倍高かった。さらに CSCs にすることで U-251 MG は約 3300 倍 (non-CSCs と比べると約 40 倍) 高く、U-87 MG では約 3000 倍 (non-CSCs と比べると約 25 倍) 高くなった (Fig. 1-3,1-4)。一方 CA12 の発現量は、non-CSCs の U-251 MG では astrocyte の発現量に比して約 2 倍高く、U-87 MG では約 330 倍高かった。さらに CSC にすることで U-251 MG は約 80 倍 (non-CSCs と比べると約 40 倍) 高く、U-87 MG では約 1200 倍 (non-CSCs と比べると約 4 倍) 高くなった (Fig. 1-3,1-4)。U104 は CA9 と CA12 を主に阻害するが CA12 に対する阻害活性が高い CA 阻害剤である⁴³⁾。以上のことより、今回 U-251 MG の non-CSCs が完全な細胞増殖抑制効果を起こさなかったのは CA12 の寄与度が低かったことが原因と推察される。しかし CSCs にすることで発現量が約 40 倍高くなり CA12 の寄与度も上昇したため、CA9 の阻害に一定の濃度を要するが、十分な阻害効果が得られたと推察される。U-87 MG はもともと non-CSCs で CA9 だけでなく CA12 の発現が高く、CSCs でさらに発現が亢進し恒常性の維持に対する寄与度が増加したため、より低濃度で効果が得られたと推察される。astrocyte で阻害効果をほとんど示さなかったのは CA9 や CA12 の発現量が低く、astrocyte の恒常性の維持への寄与が低かったためであると示唆される。

今回の U104 による阻害効果は、CA を阻害することで細胞外における水と二酸化炭素から H^+ と HCO_3^- への変換が抑制され、細胞外での HCO_3^- が減少し細胞内へ流入しなくなり、その結果、細胞内で H^+ を水と二酸化炭素に変換する HCO_3^- が枯渇したことが原因であると推察される⁴⁴⁾。それにより MCT 阻害剤と同様に細胞内に H^+ が貯留し、細胞内の pH が低下し恒常性が維持できなくなり増殖が抑制されたと推察される。

U104 は *in vivo* 実験に使用されているが、大きな副作用は報告されていない⁴³⁾。さらに緑内障やてんかんに用いられるアセタゾラミドなどのスルホンアミド誘導体が実際に臨床現場において使われていることから、CA 阻害剤は重大な副作用を示さない GSC に対する抗がん剤になりうると考えられる。

以上のことより、CA を阻害することは正常な神経膠細胞には無毒性で、GSC に対する治療標的分子として期待できる。

第4章. 総括

本研究において、以下の成績を得た。

1. GBM 細胞株である U-251 MG や U-87 MG を用いて Sphere 形成法により作製した CSCs は non-CSCs に比べてイオン輸送関連分子である *MCT1* や *CA12* の発現が hypoxia 非依存的に高くなることを明らかにした。
2. *MCT1,4* 阻害剤 pHMBS を GSCs に作用させたところ、乳酸の細胞内貯留が誘導され、sphere 形成能が阻害され、細胞増殖が抑制されることを明らかにした。さらに、ヒトアストロサイトへの影響が大きいことも明らかとなった。
3. *MCT1* 選択的阻害剤 AR-C117977 を GSCs に作用させたところ、乳酸の細胞内貯留が誘導され、sphere 形成能が阻害され、細胞増殖が抑制されることを明らかにした。さらに、ヒトアストロサイトへの影響が小さいことが明らかとなった。
4. CA 阻害剤である U104 を GSCs に作用させたところ、sphere 形成能が阻害され、細胞増殖を抑制することを明らかにした。さらに、ヒトアストロサイトへの影響がないことが明らかとなった。

現在、がんに対する治療は異常細胞増殖に対して、それを抑えることで効果を示す抗がん剤を用いた治療がほとんどであり、休眠状態にあるといわれる CSC にはほとんど効果を示さないといわれている。そのため治療を行ったとしても CSC が残存し再発・転移の原因となる。よって、この CSC を標的とした抗がん剤の開発が急務である。

本研究では、がんの代謝に着目し、GSC のイオン輸送関連分子の発現量を調べたところ、炭酸脱水酵素である *CA12* や乳酸輸送担体である *MCT1* が hypoxia 非依存的に CSC にすることで上昇することを明らかにした。さらに *CD147* を介した *MCT1,4* 阻害でも GSC の増殖を抑制できるがアストロサイトへの影響が大きく、一方 *MCT1* 選択的阻害剤はアストロサイトへの影響が小さいままに GSC の増殖を抑制できることが示唆され、*MCT1* を選択的に阻害することで GSC の増殖を十分抑制できることが明らかとなった。また CA 阻害剤はアストロサイトに影響なく GSC 特異的に細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

以上のように、本研究は神経膠芽腫幹細胞を標的とした新規治療分子としてのイオン輸送関連分子の可能性を示唆し、副作用の少ない新規抗がん剤の開発に寄与できるものと期待する。

第5章. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました京都薬科大学生命薬科学系病態生理学分野教授・芦原英司博士ならびに同分野准教授・高田和幸博士ならびに立命館大学薬学部創薬科学科薬効解析科学研究室教授・北村佳久博士に深謝致します。

本論文をご校閲賜りました京都薬科大学病態薬科学系薬理学分野教授・大矢進博士、京都薬科大学病態薬科学系臨床腫瘍学分野教授・吉貴達寛博士に深く感謝いたします。

最後に本研究の遂行に際して大いなる御教示と御協力をいただきました河崎由華様、清水輝記先生、戸田侑紀学士、今井悠莉学士、河西翔平学士、上野貴紀、福田浩紀、山田佳菜枝、井上樹、今吉菜月、入江竜太、川上光、川幡尚平、佐分利智子、藤岡周助、溝口浩晃、吉村亮介、若林亮介、甘利圭悟、磯村拳一、友金眞光、瀧本千穂、樫本美久の諸氏ならびに本教室員の方々に心から感謝し、厚く御礼申し上げます。

末筆ながら、著者が研究に専念できるよう経済的、精神的協力を惜しまなかった祖母・高田美恵子、母・高田晃子、父・高田雅弘に感謝致します。

第6章. 参考文献

- 1) Singh S. K., Hawkins C., Clarke I. D., Squire J. A., Bayani J., Hide T., Henkelman R. M., Cusimano M. D., Dirks P. B., *Nature*, **432**, 396–401 (2004).
- 2) Singh S. K., Clarke I. D., Terasaki M., Bonn V. E., Hawkins C., Squire J., *Pathobiology*, 5821–5828 (2003).
- 3) Bonnet D., Dick J. E., *Nat. Med.*, **3**, 730–737 (1997).
- 4) Hemmati H. D., Nakano I., Lazareff J. a, Masterman-Smith M., Geschwind D. H., Bronner-Fraser M., Kornblum H. I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 15178–15183 (2003).
- 5) Ohgaki H., *Methods Mol Biol*, **472**, 323–342 (2009).
- 6) Furnari F. B., Fenton T., Bachoo R. M., Mukasa A., Stommel J. M., Stegh A., Hahn W. C., Ligon K. L., Louis D. N., Brennan C., Chin L., DePinho R. a., Cavenee W. K., *Genes Dev.*, **21**, 2683–2710 (2007).
- 7) Sunayama J., Matsuda K.-I., Sato A., Tachibana K., Suzuki K., Narita Y., Shibui S., Sakurada K., Kayama T., Tomiyama A., Kitanaka C., *Stem Cells*, **28**, 1930–9 (2010).
- 8) Sorensen M. D., Fosmark S., Hellwege S., Beier D., Kristensen B. W., Beier C. P., *Adv Exp Med Biol*, **853**, 111–138 (2015).
- 9) Kalkan R., *Clin. Med. Insights. Oncol.*, **9**, 95–103 (2015).
- 10) Koppenol W. H., Bounds P. L., Dang C. V., *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 325–337 (2011).
- 11) Lindner D., Raghavan D., *Br. J. Cancer*, **100**, 1287–1291 (2009).
- 12) Yang W., Zheng Y., Xia Y., Ji H., Chen X., Guo F., Lyssiotis C. A., Aldape K., Cantley L. C., Lu Z., *Nat. Cell Biol.*, **14**, 1295–304 (2012).
- 13) Ho M. M., Ng A. V., Lam S., Hung J. Y., *Cancer Res.*, **67**, 4827–4833 (2007).
- 14) Kamohara Y., Haraguchi N., Mimori K., Tanaka F., Inoue H., Mori M., Kanematsu T., *Surgery*, **144**, 119–124 (2008).
- 15) Gallagher S. M., Castorino J. J., Wang D., Philp N. J., *Cancer Res.*, **67**, 4182–4189 (2007).
- 16) Guan B., Hoque A., Xu X., *Front. Biol. (Beijing)*, **9**, 75–81 (2014).
- 17) Cianchi F., Vinci M., Supuran C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **334**, 710–719 (2010).
- 18) Sonveaux P., Végran F., *J. Clin. Invest.*, **118**, 3930–3942 (2008).
- 19) Hosogi S., Miyazaki H., Nakajima K. I., Ashihara E., Niisato N., Kusuzaki K., Marunaka Y., *Cell. Physiol. Biochem.*, **30**, 1241–1253 (2012).
- 20) Supuran C. T., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 168–81 (2008).
- 21) Doyen J., Trastour C., Ettore F., Peyrottes I., Toussant N., Gal J., Ilc K., Roux D., Parks S. K., Ferrero J. M., Pouysségur J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **451**, 54–61 (2014).
- 22) Pan J., Zhang Q., Wang Y., You M., *PLoS One*, **5**, e13298 (2010).
- 23) Inoue A., Takahashi H., Harada H., Kohno S., Ohue S., Kobayashi K., Yano H., Tanaka J., Ohnishi T., *Int J Oncol*, **37**, 1121–1131 (2010).
- 24) Fan H., Guo H., Zhang I. Y., Liu B., Luan L., Xu S., Hou X., Liu W., Zhang R., Wang X.,

- Pang Q., *Brain Res.*, **1384**, 9–14 (2011).
- 25) Yu S.-C., Ping Y.-F., Yi L., Zhou Z.-H., Chen J.-H., Yao X.-H., Gao L., Wang J. M., Bian X.-W., *Cancer Lett.*, **265**, 124–134 (2008).
 - 26) Louie E., Nik S., Chen J.-S., Schmidt M., Song B., Pacson C., Chen X. F., Park S., Ju J., Chen E. I., *Breast cancer Res.*, **12**, R94 (2010).
 - 27) Chiche J., Ilc K., Laferrière J., Trotter E., Dayan F., Mazure N. M., Brahimi-Horn M. C., Pouyssegur J., *Cancer Res.*, **69**, 358–368 (2009).
 - 28) Suzuki K., Ikegaya Y., Matsuura S., Kanai Y., Endou H., Matsuki N., *J. Cell Sci.*, **114**, 3717–25 (2001).
 - 29) Pierre K., Pellerin L., *J. Neurochem.*, **94**, 1–14 (2005).
 - 30) Manning Fox J. E., Meredith D., Halestrap a. P., *J. Physiol.*, **529**, 285–293 (2000).
 - 31) Kirat D., Masuoka J., Hayashi H., Iwano H., Yokota H., Taniyama H., Kato S., *J Physiol*, **576**, 635–647 (2006).
 - 32) Wilson M. C., Meredith D., Fox J. E. M., Manoharan C., Davies A. J., Halestrap A. P., *J. Biol. Chem.*, **280**, 27213–27221 (2005).
 - 33) Iwata K., Kinoshita M., Yamada S., Imamura T., Uenoyama Y., Tsukamura H., Maeda K. I., *J. Physiol. Sci.*, **61**, 103–113 (2011).
 - 34) Webb B. A., Chimenti M., Jacobson M. P., Barber D. L., *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 671–677 (2011).
 - 35) Baba M., Inoue M., Itoh K., Nishizawa Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **374**, 111–116 (2008).
 - 36) Pålman C., Qi Z., Murray C. M., Ferguson D., Bundick R. V., Donald D. K., Ekberg H., *Transpl. Int.*, **26**, 22–9 (2013).
 - 37) Bueno V., Binet I., Steger U., Bundick R., Ferguson D., Murray C., Donald D., Wood K., *Transplantation*, **84**, 1204–7 (2007).
 - 38) Ovens M. J., Manoharan C., Wilson M. C., Murray C. M., Halestrap A. P., *Biochem. J.*, **431**, 217–225 (2010).
 - 39) Miyazaki H., Marunaka Y., *J Physiol Sci.*, **65** (Suppl-1), 72 (2015).
 - 40) Miyazaki H., Marunaka Y., *J Physiol Sci.*, **64**(Suppl-1), 267 (2014).
 - 41) Hosogi S., Marunaka Y., Niisato N., Kusuzaki K., Miyazaki H., *J Physiol Sci.*, **64**(Suppl-1), 215 (2014).
 - 42) Ivanov S., Liao S.-Y., Ivanova A., Danilkovitch-Miagkova A., Tarasova N., Weirich G., Merrill M. J., Proescholdt M. A., Oldfield E. H., Lee J., Zavada J., Waheed A., Sly W., Lerman M. I., Stanbridge E. J., *Am. J. Pathol.*, **158**, 905–919 (2001).
 - 43) Lou Y., McDonald P. C., Oloumi A., Chia S., Ostlund C., Ahmadi A., Kyle A., Auf dem Keller U., Leung S., Huntsman D., Clarke B., Sutherland B. W., Waterhouse D., Bally M., Roskelley C., Overall C. M., Minchinton A., Pacchiano F., Carta F., Scozzafava A., Touisni N., Winum J.-Y., Supuran C. T., Dedhar S., *Cancer Res.*, **71**, 3364–76 (2011).
 - 44) Mehta V. H. & K., *J. Young Investig.*, (2014).

- 45) Polański R., Hodgkinson C. L., Fusi A., Nonaka D., Priest L., Kelly P., Trapani F., Bishop P. W., White A., Critchlow S. E., Smith P. D., Blackhall F., Dive C., Morrow C. J., *Clin. Cancer Res.*, **20**, 926–37 (2014).