

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08581

研究課題名(和文) MCTの機能・発現阻害に基づいたがん細胞の転移・浸潤の抑制効果の検証

研究課題名(英文) verification of suppressive effect by MCT inhibition on tumor cell growth and invasion

研究代表者

小林 正紀 (Kobayashi, Masaki)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：70431319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん細胞におけるMCT1, 4の発現・機能解析、MCT1, 4ノックダウン時のがん細胞の生存・運動能との関連性、MCT1, 4選択的な阻害剤の探索の3点について行ってきた。最初の検討によりがん細胞においてMCT1あるいは4が機能的に発現している細胞を各々見出した。またMCT1あるいは4の発現を抑制することにより、これらがん細胞の生存率・運動能を低下させることを見出した。最後にMCT1, 4選択的な阻害剤の検討を行ったところ、MCT1と比較してMCT4への選択性が高い阻害剤を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the association between monocarboxylate transporter (MCT) 1, 4 and tumor cell growth and invasion and to identify the selective inhibitor of MCT1 or 4. This study summarizes our findings:1)At first, MCT1 or 4 is a pH-dependent transporter, is functional expressed in MCF7 or MDA-MB231 cells such as breast cancer cells. 2)MCT1 or 4 knockdown induces the reduction of these cells viability and migration compared with negative control-treated cells. 3)Fibrates and bindarit exhibit selective inhibitory effects against MCT4 compared with MCT1. These results suggest that MCT1 and 4 are associated with tumor cell viability and migration.

研究分野：医療薬学

キーワード：モノカルボン酸輸送担体(MCT)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞はエネルギー獲得を解糖系に依存しており、細胞外に解糖系産物である乳酸やケトン体を輸送することで細胞の恒常性を維持している。近年この細胞内からの乳酸排出を担う monocarboxylate transporter 4 (MCT4)がトリプルネガティブ乳がんをはじめとした様々ながん種において高発現し、予後不良因子の1つであるとともにハイリスクがんのバイオマーカーとして国内外問わず注目されている。このような背景から MCT4 の機能・発現を阻害する化合物が、がん細胞の浸潤・転移を抑制するターゲットとして期待されてはいるものの、MCT4 の発現調節による機能変化についての情報は少ないのが現状である。一方で MCT4 とともに乳酸を輸送する MCT1 についても機能を抑制することで腫瘍の容積を縮小させることが報告されている。MCT1 の機能および発現メカニズムについても MCT4 と比較すると解明されてはいるものの未だ十分とは言い難い。我々はこれまでに細胞の増殖に関わる protein kinase C の活性化が、MCT1, 4 の発現を調節していることを報告している。またがん組織は正常組織と比較して細胞質の pH が酸性に傾いていることから酸性条件下において MCT の機能を検討した結果、pH の低下

に伴い MCT1, 4 の輸送活性が上昇することを示している。このような背景から我々はがん細胞の生存・運動能に MCT1, 4 の機能・発現が関連しているとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では MCT1, 4 の発現・機能変化とがん細胞の生存・運動能との関連性を明らかにするとともに、抗がん薬として期待される MCT 阻害剤の探索のための基礎的知見を得ることを目的とした。具体的な検討項目は、がん細胞における MCT1, 4 の発現・機能を解析するとともに、MCT1, 4 の強制発現あるいは発現抑制が、がん細胞の生存・運動能に及ぼす影響を明らかにする。最終的に MCT1, 4 の選択的阻害剤の探索を目的に MCT 機能を強力に阻害する化合物を基質輸送の阻害の観点から評価した。本検討により MCT を指標とした新たながんの進展予防・治療に向けた新規戦略の開発の一助となることが期待される。

3. 研究の方法

がん細胞における MCT1, 4 の発現・機能解析において機能面は MCT1, 4 の基質である乳酸の輸送実験により評価し、発現解析は RT-PCR およびウエスタンブロットにより行

った。MCT1, 4 強制発現・ノックダウン時のがん細胞の生存・運動能との関連性については、MCT1 あるいは 4 の強制発現あるいは siRNA を用いて MCT1, 4 をノックダウンしたがん細胞を用いて生存率を MTT assay により、運動能を wound healing assay により評価した。さらに MCT1, 4 選択的な阻害剤の探索においては MCT1, 4 を一過性に発現させたアフリカツメガエル卵母細胞への乳酸の取り込みに対する阻害強度を指標に阻害剤の特定を試みた。

4 . 研究成果

本研究ではがん細胞の生存・運動能に MCT 1, 4 の機能・発現が関連しているとの仮説を立て下記の項目について種々検討を行った。

- ・がん細胞における MCT1, 4 の発現・機能解析
- ・ MCT1, 4 強制発現・ノックダウン時のがん細胞の生存・運動能との関連性
- ・ MCT1, 4 選択的な阻害剤の探索

がん細胞における MCT1, 4 の発現・機能解析

がん細胞における MCT1, 4 発現・機能解析においては大腸がん由来ならびに乳がん由来細胞を用いて検討を行った。大腸がん由来細胞においては MCT1 が機能的に発現してい

る細胞 (Lovo 細胞) と MCT4 が機能的に発現している細胞 (Caco-2 細胞) を見出した。また乳がん由来細胞においては MCT1, 4 の発現プロファイルを検討したところ、MCF-7 細胞において MCT4 発現が極めて少ないこと、一方で MDA-MB-231 細胞では MCT1 の発現レベルが低いことを見出した。以上の検討から発現プロファイルの異なる MCF-7 および MDA-MB-231 細胞を用いて種々検討を行うこととした。

MCT1, 4 強制発現・ノックダウン時のがん

細胞の生存・運動能との関連性

前述の細胞を用いて MCT1, 4 強制発現あるいはノックダウン時の細胞の生存・運動能との関連性を評価した。MCF-7 細胞への MCT1 siRNA を導入した結果、トランスフェクションから 72 時間後に MCT1 mRNA ならびにタンパク質の発現が顕著に低下した。同様に MDA-MB-231 細胞へ MCT4 siRNA を導入した場合には MCT4 mRNA およびタンパク質の発現が顕著に抑制された。続いて MDA-MB-231 細胞に MCT1 を強制発現させた MDA-MB-231/MCT1 細胞を樹立し、mock と比較して MCT1 mRNA およびタンパク質の発現が上昇していることを確認した。一方で MCF-7 細胞に MCT4 を強制発現させた

MCF-7/MCT4 細胞も樹立し、mock と比較して MCT4 mRNA およびタンパク質の発現が上昇していることを確認した。そこで次にこれらの細胞を用いて MCT1 発現変動が、がん細胞の生存に関与しているかを検証した。その結果、MCT1 ノックダウン時に MCF-7 細胞の生存率は有意に低下した。さらに MDA-MB-231/MCT1 細胞において mock と比較して生存率の上昇が認められた。またこれらの細胞の運動能を評価したところ MCT1 ノックダウン時および MCT1 強制発現時のいずれにおいても、コントロール細胞と比較して運動能に差は見られなかった。以上の結果より MCT1 はがん細胞の生存に関与する一方で、運動能には影響しないことが示唆された。

次に MCT4 の発現変動が、がん細胞の生存能に関与しているかを検証するため、MCT4 ノックダウン時における MDA-MB-231 細胞および MCF-7/MCT4 細胞を用いて生存率の検討を行った。その結果、MCT4 ノックダウン時に MDA-MB-231 細胞の生存率は有意に低下した。さらに MCF-7/MCT4 細胞においては mock と比較して生存率の上昇が認められた。また同様に運動能への関与を検証した結果、MCT4 ノックダウン時において MDA-MB-231 細胞の運動能は有意に低下した。さらに MCT4 強制発現時には運動能は上

昇した。以上の結果より、MCT4 の発現が、がん細胞の生存および運動能に關与する可能性が示された。

MCT1, 4 選択的な阻害剤の探索

最後に MCT1, 4 選択的な阻害剤の探索を行った。アフリカツメガエル卵母細胞に MCT1, 4 を発現させ、乳酸取り込み量に対する種々の阻害剤の阻害強度を算出し、MCT1, 4 に対する阻害効果を比較した。その結果、MCT1 と比較して MCT4 へ選択性の高い阻害剤として既存の薬物としてフィブラート系薬を見出した。さらにより特異性の高い阻害剤として Bindarit を新たに見出した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Futagi Y, Kobayashi M (Corresponding author), Narumi K, Furugen A, Iseki K. Identification of a selective inhibitor of human monocarboxylate transporter 4. *Biochem Biophys Res Commun.* 495(1), 427-432. 2018. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.10.025.

Futagi Y, Sasaki S, **Kobayashi M** (**Corresponding author**), Narumi K, Furugen A, Iseki K. The flexible cytoplasmic loop 3 contributes to substrate affinity of human monocarboxylate transporters. *Biochim Biophys Acta.* 1859(10), 1790-1795. 2017. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.

Sasaki S, Futagi Y, Ideno M, **Kobayashi M**, Narumi K, Furugen A, Iseki K. Effect of diclofenac on SLC16A3/MCT4 by the Caco-2 cell line. *Drug Metab Pharmacokinet.* 31, 218-223. 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.dmpk.2016.03.004.

Ideno M, Sasaki S, **Kobayashi M**, Futagi Y, Narumi K, Iseki K. Influence of high glucose state on bromopyruvate-induced cytotoxicity by human colon cancer cell lines. *Drug Metab Pharmacokinet.* 31, 67-72. 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.dmpk.2015.10.006.

[学会発表](計 2 件)

二木悠哉、佐々木将太郎、小林正紀、井

関健. hMCT1, 4 を介した基質輸送における細胞内ループの役割. 第 136 回日本薬学会年会、2016 年 3 月 26 日～29 日、パシフィコ横浜(神奈川県 横浜)

小林正紀、佐々木将太郎、二木悠哉、関口穂乃佳、鳴海克哉、高橋夏子、井関健. 大豆イソフラボンによるモノカルボン酸輸送担体の阻害効果を利用したがん細胞増殖の回避戦略. 第 22 回日本未病システム学会学術総会. 2015 年 10 月 11 日～12 日、北海道大学 学術交流館(北海道 札幌)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

研究者番号：

名称：

(4)研究協力者 なし

発明者：

()

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 小林 正紀

(KOBAYASHI MASAKI)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：70431319

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし

()