

平成21年4月30日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592055

研究課題名（和文）：アミノ酸細胞膜トランスポートを標的とした小児固形腫瘍に対する治療法の開発

研究課題名（英文）：Hypoxia up-regulates amino acid transport in a human neuroblastoma cell line.

研究代表者

和佐 勝史 (WASA MASAFUMI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10240467

研究成果の概要：神経芽細胞腫において低酸素状態が細胞膜アミノ酸トランスポート活性に及ぼす影響：ヒト神経芽腫細胞 cell line、SK-N-SH を用い、低酸素状態が細胞膜アミノ酸トランスポート活性に及ぼす影響を検討した。8時間低酸素後のグルタミン Gln、グルタミン酸 Glu およびロイシン Leu トランスポートは control と有意差を認めなかったが、16時間および24時間低酸素後の Gln および Leu トランスポートは control に比し有意に上昇した ( $p < 0.01$ )。この上昇は、細胞膜のアミノ酸トランスポーターの数の増加によるものであった ( $V_{max}$  効果)。神経芽細胞腫アミノ酸トランスポートは、低酸素条件下で up-regulate することが明らかとなり、本メカニズムが低酸素下での腫瘍の増殖に関与する可能性が示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：小児癌、アミノ酸トランスポート、低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍細胞増殖の特徴はその無秩序性にある。小児固形腫瘍の増殖速度は成人の腫瘍と比較してはるかに大きい。この活発な細胞分裂を支えるために、癌細胞は機能的かつ有効な細胞膜トランスポートシステムによりアミノ酸を細胞内に取り込むことで、核酸および蛋白合成、エネルギー産生を支えている。例えば、肝芽腫細胞は正常肝細胞と比較して

約30倍のグルタミン細胞内輸送速度を有する。これらより、小児腫瘍の増殖機序を解明し、治療に応用するためには、そのアミノ酸トランスポートの特徴を明らかにすることは有効な手段となる可能性がある。

(2) 一般に固形腫瘍の中心部は血流に乏しく、低酸素状態および栄養素の欠乏状態にあり、臨床的にも腫瘍中心部の壊死 (central necrosis) が観察される。こういった条件下

にもかかわらず、腫瘍細胞の一部は生存し、増殖をすることが可能であり、抗癌剤などの治療抵抗性である可能性がある。従って、これらの癌細胞のメカニズムを解明することは、将来の治療法の開発に有力な手段となり得る可能性がある。

(3) これまでに、小児固形腫瘍であるヒト神経芽細胞 SK-N-SH において、グルタミンは System ASC、グルタミン酸は System X-AG、ロイシンは System L の細胞膜トランスポートシステムを介して細胞内に移行することを報告している。また、低栄養状態モデルとしてのグルタミン欠乏状態において、グルタミントランスポートは抑制されるが、グルタミン酸トランスポート、ロイシントランスポート活性が up-regulate されることを和佐らは報告している。

## 2. 研究の目的

今回の研究は、代表的な神経芽細胞腫 cell line である SK-N-SH において、低酸素条件下における細胞膜アミノ酸トランスポート活性を測定することで、このようなストレス下における腫瘍細胞増殖のメカニズムを、アミノ酸トランスポート活性の面から検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト神経芽腫細胞 cell line、SK-N-SH を用い、低酸素状態が細胞膜アミノ酸トランスポート活性に及ぼす影響を検討した。細胞培養は、DMEM (4mM グルタミンを含む) +10% FBS の培養液、5%CO<sub>2</sub> - 95% air, 37°C の条件下で行った。低酸素条件は、1% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> - 94% N<sub>2</sub> とした。細胞が 24-well の中で 100% confluent になった段階で、以下の測定を行った。測定項目は、1) 低酸素状態におけるアミノ酸トランスポート活性の変化、2) 低酸素状態における細胞内での DNA と蛋白合成、3) RNA 合成阻害剤、蛋白合成阻害剤の影響、4) 他の神経芽細胞腫 Cell Line (NB-1) での同様の検討、である。

低酸素状態におけるアミノ酸トランスポート活性の変化は、低酸素の状態が発生した 8、16 および 24 時間後に細胞膜アミノ酸トランスポートを測定した。アミノ酸トランスポートの測定は Gazzola らの方法、cluster tray 法を用いた。すなわち、10 μM のアミノ酸バッファーに 5 μCi /mL のトリチウムでラベルしたアミノ酸を加えた反応液を 37°C の条件で 1 分間反応させた後、細胞内に

取り込まれたアミノ酸のシンチレーションをカウントした。また、蛋白は BCA 法にて測定した。

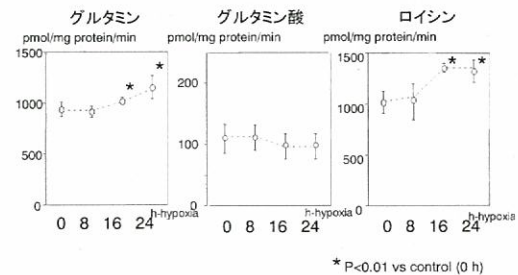
タンパク、DNA 合成能は、3 H-チミジン、3 H-ロイシンの incorporation を測定することで評価した。0 時間 (コントロール) および、8 時間、16 時間の低酸素の条件にて培養した細胞に、トリチウムでラベルしたチミジン、ロイシンを加え、2 時間半 incubate した後、細胞内に取り込まれたチミジン、ロイシンをシンチレーションでカウントした。蛋白は BCA 法にて測定した。

## 4. 研究成果

### (結果-1)

8 時間低酸素後のグルタミン、グルタミン酸およびロイシントランスポートは control と有意差を認めなかったが、16 時間および 24 時間低酸素後のグルタミンおよびロイシントランスポートは control に比し有意に上昇した (p<0.01)。

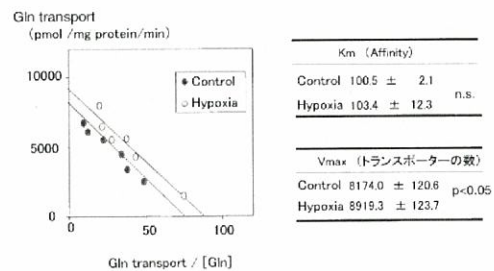
### 結果①: 低酸素条件下におけるアミノ酸トランスポート活性の変化



### (結果-2)

Eadie-Hofstee plot を用いてグルタミントランスポートの Kinetics を検討した。低酸素条件により、直線の傾き (Km) は変化せず、Y 切片つまり Vmax が優位に上昇した (Vmax 効果)。

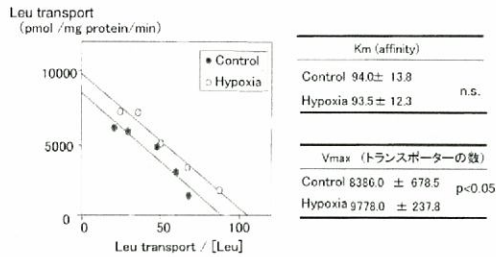
### グルタミントランスポートの Kinetics



(結果-3)

ロイシントランスポートも、低酸素状態により、Kmは変化せず、Vmaxが優位に上昇した。つまり、低酸素によるグルタミンおよびロイシントランスポートの up-regulate は、トランスポーターの親和性の変化ではなく、細胞膜にあるトランスポーターの数の増加によってもたらされたものと考えられた。

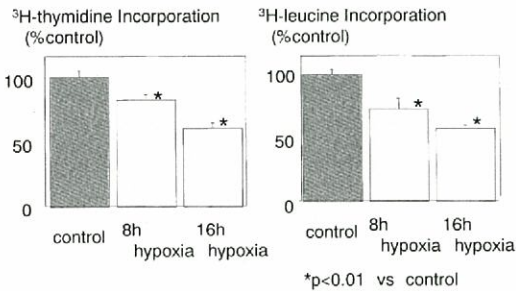
ロイシントランスポートの Kinetics



(結果-4)

低酸素下での DNA 合成、蛋白合成の変化を検討したところ、低酸素条件でこれらはいずれも有意に低下した。

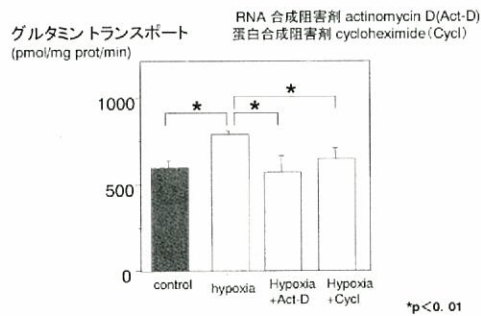
低酸素がDNA合成、蛋白合成に及ぼす影響



(結果-5)

グルタミンのトランスポート活性の低酸素下での up-regulate が、RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D、および蛋白合成阻害剤であるシクロヘキサミドで優位に抑制された。

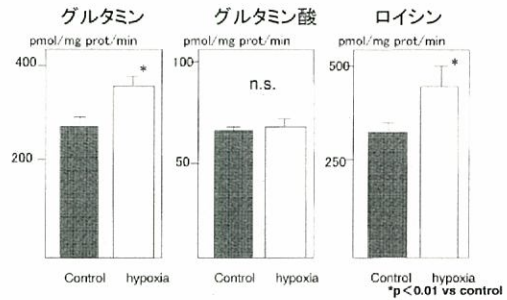
RNA合成阻害剤、蛋白合成阻害剤の影響①



(結果-6)

SK-N-SH とは腫瘍特性が異なるヒト神経芽細胞である NB-1 において、低酸素条件でのアミノ酸トランスポート活性の変化を測定した。低酸素条件で、グルタミンおよびロイシントランスポート活性が有意に上昇した。

NB-1 (MYCN増幅あり)における低酸素下でのアミノ酸トランスポート活性の変化



(まとめ)

神経芽細胞腫 cell line, SK-N-SH 細胞において、低酸素条件によりグルタミン、ロイシントランスポート活性は up-regulate された。このメカニズムは、Vmax の上昇、即ち、細胞膜のトランスポーター数が増加することによることが明らかとなった。さらに、この up-regulate は、RNA 合成阻害剤および蛋白合成阻害剤により完全に抑制された。以上の結果より、本メカニズムが低酸素下での神経芽細胞腫の増殖に関与する可能性が示された。

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 2 件)

1. Soh H, Wasa M, Fukuzawa M. Hypoxia up-regulates amino acid transport in a human neuroblastoma cell line. *J Pediatr Surg* 42 (4): 608-612, 2007 査読有り

2. 和佐勝史; Immunonutrition としてのグルタミン、小児外科 40 (8): 903-907, 2008 査読なし

[学会発表] (計 1 件)

1. 和佐勝史: 抗癌剤によるラット腸管粘膜障害に対するグルタミンの投与効果、日本外科代謝栄養学会、平成20年7月11日、仙台

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和佐 勝史 (WASA MASAFUMI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 10240467

(2) 研究分担者

福澤 正洋 (FUKUZAWA MASAHIRO)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 60165272

(3) 連携研究者

米田 光宏 (YONEDA AKIHIRO)

大阪府立母子保健総合医療センター・

研究員

研究者番号: 30372618