

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヌクレオシドは、がん細胞の増殖やエネルギー産生に必須であるヌクレオチドの前駆体である。しかしながら、ヌクレオチドはヌクレオシドのリン酸化以外の他の複数の経路によっても合成されるため、がん細胞でのヌクレオシドの重要性はこれまであまり認識されてこなかった。アデノシン、ウリジンなどのヌクレオシドは生体内で種々の生理作用を示すが、これらはヌクレオシド輸送体で細胞に取り込まれたのちリン酸化を受けることでヌクレオチドに変換される(ヌクレオチド合成の salvage 経路)。一方、プリンヌクレオチドはグルコースからペントース経路を経て合成されることも知られている(ヌクレオチド合成の de novo 経路)。したがって、ヌクレオチド合成の salvage 経路が利用できなくなると、de novo 経路を活性化するために代謝リプログラミングが起こり、グルコースなどをがん細胞内に多く取り込む可能性が極めて高くなると考えられる。

(2) がんのホールマークの一つとされる代謝リプログラミングは、様々な要因で引き起こされ、がんの悪性進展に大きな影響を及ぼすことが近年明らかとなってきた。アデノシンやウリジンの細胞内取り込みを担っている促進拡散型ヌクレオシド輸送体 equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) をノックダウンした膵臓がん細胞にて上皮間葉転換が生じること、また、上皮間葉転換を引き起こしたがん細胞において代謝リプログラミングが生じていることが報告された。一方で、膵臓がん患者から得られたがん組織中の ENT1 発現量については、患者予後と相関するとの報告と相関しないとの報告が混在しているのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、がんの代謝リプログラミングに及ぼすヌクレオシドの影響を明確化するとともに、その結果として引き起こされるがんの悪性進展への影響についても明らかにすることを目的とする。

(2) 抗がん薬の抗がん効果に及ぼすヌクレオシドの影響についても明らかにする。さらに、得られた結果をもとに、ヌクレオシドを用いた新たな治療戦略もしくは補助療法の開発につなげることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 種々の検討には、ヒト大腸がん細胞株を用いた。ENT ノックダウン細胞は、ENT1 siRNA を Lipofectamine で処置することにより作成した。細胞内のグルコース取り込み量や乳酸産生量については、市販のキットなどを用いて測定した。さらに、グルコーストランスポーターや解糖系酵素などの発現量に及ぼす影響については、細胞より total RNA を抽出したのち、RT-PCR 法にて mRNA 量を測定することにより検討した。細胞増殖については WST-8 法にて、遊走・浸潤能については Boyden chamber 法、マトリゲルを用いた Boyden chamber 法にて検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト大腸がん HCT116 細胞を、ENT を阻害または ENT1 をノックダウンしたところ、コントロールと比較してグルコース取り込み量、乳酸産生量ともに増加し、解糖系が亢進した。しかしながら、細胞培養時に添加する牛胎児血清(FBS)を、低分子を透析にて除去した牛胎児血清(透析 FBS)に置き換えたときには、グルコース取り込み量、乳酸産生量は変化しなかった。一方、遊走能・浸潤能は、ENT1 阻害や ENT1 ノックダウン、透析 FBS 含有培地使用時のいずれにおいても亢進した。以上より、代謝リプログラミングと遊走能・浸潤能の亢進が異なる機序で生じている可能性が示唆された。

(2) ENT 阻害や ENT1 ノックダウン時に、解糖系に関わる酵素やトランスポーターのうち、グルコーストランスポーター 1 (GLUT1)、ヘキソキナーゼ 2 (HK2)、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)などをコードする mRNA の発現量が増大していることが確認できた。そこで、解糖系亢進のメカニズムを解明する目的で、細胞外アデノシン受容体アゴニスト、アンタゴニストが細胞増殖、解糖系に及ぼす影響を検討したが、ともに変化が認められなかった。また、解糖系に影響することが知られている AMPK の活性化剤アデカシン(AICAr)添加時には細胞増殖が抑制され、グルコース取り込み量が増加したが、これらの変化は AMPK 阻害剤ドルソモルフィンによって消失しなかったことから、ENT 阻害等による解糖系の亢進が AMPK の活性化によるものと結論づけることはできなかった。

(3) ENT 阻害または ENT1 ノックダウン時に細胞内ヌクレオシド、ヌクレオチド濃度が変化している可能性について検討する目的で、ヌクレオチド合成に関与する酵素、トランスポーターの mRNA 発現量について検討したところ、グルタミントランスポーター、アミノ酸トランスポーター

ーなどの mRNA 発現量の増加が認められた。さらに、細胞内ヌクレオチド量の定量を試みたが、機器の移設や不具合、研究代表者の学内での異動による研究環境の変化、体調不良等により検討を進めることができなかった。

(4) 抗がん薬の抗がん効果に及ぼすヌクレオシドの影響についてや、動物を用いた検討についても、研究代表者の学内での異動による研究環境の変化、体調不良等により検討できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大河原 賢一 (Ogawara Ken-ichi) (30291470)	神戸薬科大学・薬学部・教授 (34512)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関