

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06706

研究課題名(和文)がん細胞の増殖・薬物耐性における血小板の役割解明

研究課題名(英文)The role of platelets in cancer cell proliferation and drug resistance

研究代表者

柏木 仁(Kashiwagi, Hitoshi)

北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：60510609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラット血小板を活性化させた際の上清でヒト肝がん由来HuH-7細胞を刺激した結果、アミノ酸トランスポーターSNAT4の輸送活性を減弱させることを見出した。活性化血小板上清によるSNAT4の輸送活性減弱は、SNAT4の基質に対する親和性が減少することによるものであることが示唆された。一方、血小板そのものによるHuH-7細胞への直接的な作用はほとんど認められなかった。

以上の結果より、血小板は生理活性物質を放出することで肝細胞におけるアミノ酸トランスポーターの輸送活性を間接的に変動させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血小板は、止血機構や病的な血栓形成以外にも生体内で多彩な作用を持つことが注目されている。本研究により、血小板がトランスポーターの輸送活性を変動させるという新規の作用が明らかとなった。

血小板ががん細胞によって活性化され、種々の増殖因子を放出することが報告されている。これらの増殖因子はがん細胞の増殖を促進する一方、血小板はがん細胞へのアミノ酸の取り込みを阻害することで、増殖を抑制しようとしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Activated platelet supernatants (APS) including the granule contents released from platelets downregulated the transport activity of the amino acid transporter SNAT4 in HuH-7 human hepatoma cells. The downregulation was due to a decrease in the affinity of SNAT4 for its substrate and not a decrease in the SNAT4 abundance on the plasma membrane. On the other hand, platelets did not affect SNAT4 activity when the platelet suspension was added to HuH-7 cells.

In conclusion, platelets indirectly affect the transport activity of system A by releasing bioactive substances but do not directly affect it by binding to HuH-7 cells.

研究分野：薬物動態

キーワード：血小板 活性化血小板上清 肝細胞 アミノ酸トランスポーターSNAT4 輸送活性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 血小板は、がん細胞の成長や転移を促進する。

血小板は、生理的な止血機構で中心的な役割を果たす一方、病理的な血栓形成の一翼を担う血球成分である。近年、血小板の生体内での多彩な作用が報告されており、血小板とがん細胞との相互作用に関しては従来多くの検討が行われてきた。がん細胞は血小板の産生を促進し、これを活性化させる一方、血小板は活性化に伴い凝集すると共に自身の顆粒中の物質を放出する。血小板顆粒中には様々な成長因子やサイトカイン、マトロプロテアーゼが含まれており、これらによりがん細胞の成長や運動能が促進される。また、活性化した血小板はがん細胞に接着し、血中で不慮の応力や免疫細胞の攻撃から守ることでがん細胞の転移に促進的に作用する。

(2) TGF- $\beta$  や IGF- I は、アミノ酸やグルコースの取り込みを促進する。

細胞の増殖にはグルコースやアミノ酸が重要であり、特にがん細胞の増殖にはアミノ酸を必要とすることが知られている。グルコースやアミノ酸はトランスポーターによって選択的に細胞内に取り込まれるが、トランスポーターの活性や発現は様々な因子によって調節されている。これまでにグルコーストランスポーター GLUT1 の発現がインスリン様成長因子 (IGF- I) によって上昇し、アミノ酸トランスポーター SNAT2 の活性がトランスフォーミング成長因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) によって増大すると報告されている。一方、TGF- $\beta$  や IGF- I は血小板顆粒中にも含まれており、血小板の活性化と共に放出される。

## 2. 研究の目的

血小板は、活性化により顆粒中の物質を放出する。多様な生理活性を持つこれらの物質が栄養の取り込みに関与するトランスポーターの活性を調節することで、血小板ががん細胞の増殖に関与するののかについてはこれまでほとんど検討されていない。また、血小板から放出される物質が排出トランスポーターの活性を調節することで、血小板ががん細胞の薬物耐性に関与する可能性も考えられる。

本研究では、血小板から放出された物質によりがん細胞の取り込みおよび排出トランスポーターの活性が変動しているかを検討し、血小板とがん細胞との新たな相互作用を明らかにする。

## 3. 研究の方法

ラットから調製した血小板をアデノシン二リン酸 (ADP) で活性化し、血小板の顆粒内物質を含むと考えられる活性化血小板上清 (APS) を調製した。ラット血中の血小板濃度を考慮し、 $5 \times 10^5$  個/ $\mu\text{L}$  の血小板から調製した APS を 100% とした。APS でヒト肝がん由来 HuH-7 細胞および HepG2 細胞を刺激し、RI で標識されたアミノ酸の取り込みによりトランスポーターの活性が変動するか否かを検討した。栄養取り込みのトランスポーターとしてはアミノ酸トランスポーターシステム A に着目し、RI 標識のアミノ酸としてはシステム A の特異的基質である Me-AIB を使用した。また、APS でシステム A の mRNA 量が変動するか否かをリアルタイム PCR により評価した。

## 4. 研究成果

(1) HuH-7 細胞における Me-AIB は、システム A のサブタイプである SNAT4 によって輸送される。

肝臓には、システム A のサブタイプの中で SNAT2 と SNAT4 が発現していることが知られている。ヒト肝がん由来である HuH-7 細胞へのアミノ酸取り込みに対する SNAT2 と SNAT4 の寄与を評価するために、Me-AIB の pH 依存性を観察した。Me-AIB に対して SNAT2 は高親和性、SNAT4 は低親和性であり、SNAT2 は pH 8.0、SNAT4 は pH 8.5 で取り込みが最大となることが報告されている。HuH-7 細胞において、Me-AIB は低濃度、高濃度いずれにおいてもその取り込みは pH 8.5 で最大となり、HuH-7 細胞での Me-AIB 取り込みは主に SNAT4 が関与していることが示唆された。

(2) SNAT4 の輸送活性は、活性化した血小板から放出される物質により変動する。

APS により SNAT4 の輸送活性が変動するかを検討したところ、100% の APS で 24 時間刺激後の HuH-7 細胞において Me-AIB の取り込み量が有意に減少した (図 1)。APS 刺激による Me-AIB の取り込み量減少は、HuH-7 細胞と同様に HepG2 細胞においても認められた。一方、HuH-7 細胞を APS で刺激しても有機カチオントラン

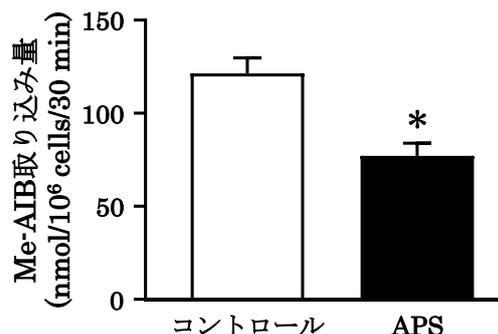


図 1 APS 刺激による Me-AIB 取り込み量の減少

スポンター-OCTN2 の基質であるカルニチンの取り込み量はほとんど変化しなかったことから、APS によるトランスポーターの輸送活性変動は SNAT4 に特異的であることが示唆された。続いて、APS の刺激時間を変化させて Me-AIB の取り込み量を測定したところ、SNAT4 の輸送活性は APS の刺激時間依存的に減弱し、刺激時間が 8 時間と 24 時間の時点において有意差が認められた (図 2)。また、APS の濃度を振って HuH-7 細胞を 24 時間刺激し、Me-AIB の取り込み量を測定したところ、SNAT4 の輸送活性は 100% までは APS の濃度依存的に減弱し、その後増大するという非常に興味深い結果が得られた (図 3)。

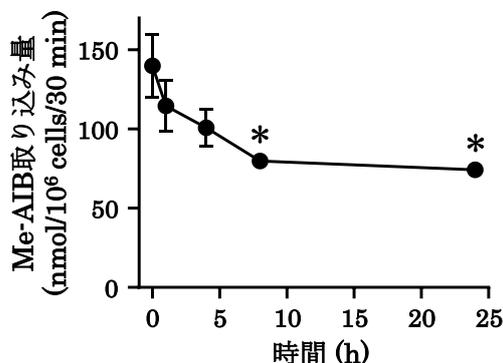


図 2 APS 刺激時間による Me-AIB 取り込み量の減少

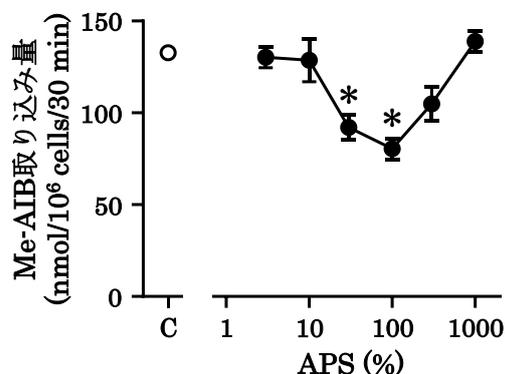


図 3 APS の濃度依存的な Me-AIB 取り込み量の変動

(3) Me-AIB に対する SNAT4 の親和性は、活性化した血小板から放出される物質により低下する。

APS による SNAT4 の輸送活性減弱を詳細に解析するため、SNAT を介した Me-AIB の輸送パラメーターを算出したところ、APS 刺激により SNAT4 の Me-AIB に対する  $K_m$  値は減少したが、 $V_{max}$  値はほとんど変化しなかった (図 4)。したがって、APS 刺激による SNAT4 の輸送活性減弱は、細胞膜表面の SNAT4 発現量の減少ではなく Me-AIB に対する親和性が減少するためであることが示唆された。

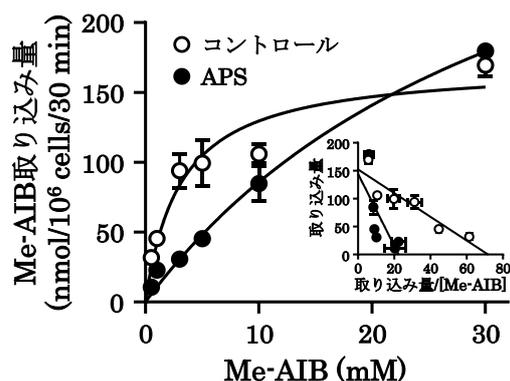


図 4 APS 刺激による Me-AIB 輸送パラメーターの変動

(4) SNAT4 の mRNA 発現量は、活性化した血小板から放出される物質によって変動しない。

輸送パラメーターの解析より細胞膜表面の SNAT4 発現量は APS により変化しないことが示唆されたため、SNAT4 の mRNA 発現量の変動についてリアルタイム PCR によりさらなる検討を行った。その結果、APS で 6 時間もしくは 24 時間 HuH-7 細胞を刺激しても SNAT4 の mRNA 量はほとんど変化しないことが明らかとなった。また、HuH-7 細胞における SNAT2 の mRNA 発現量が非常に少ないことも明らかとなり、pH 依存性の結果と一致した。

(5) 血小板は、SNAT4 の輸送活性に直接的には作用しない。

前述のように、血小板は生体内で多彩な作用を示すことが知られており、血小板が他の細胞に結合する直接的な作用と、血小板が顆粒内の生理活性物質を放出して効果を示す間接的な作用が報告されている。血小板が HuH-7 細胞に結合して APS と同様の作用を示すかを検討するため、血小板懸濁液で細胞を刺激後に Me-AIB の取り込み量を測定したところ、APS 刺激時のような SNAT4 の輸送活性変動はほとんど認められなかった。

以上の結果より、血小板から放出される生理活性物質により肝細胞におけるアミノ酸トランスポーターシステム A の基質に対する親和性が低下し、輸送活性が減弱することが示唆された。本研究により、血小板がトランスポーターの輸送活性を変動させるという新規の作用が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kashiwagi Hitoshi, Sato Yuki, Nashimoto Shunsuke, Imai Shungo, Takekuma Yoh, Sugawara Mitsuru	4. 巻 47
2. 論文標題 Platelets affect the activity of amino acid transporter SNAT4 in HuH-7 human hepatoma cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 652 ~ 659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b23-00904	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------