



Title	神経膠芽腫モデル細胞における抗てんかん薬バルプロ酸の輸送機構と新規作用に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	石黒, 由梨
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13618号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73838
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuri_Ishiguro_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(臨床薬学) 氏 名 石黒 由梨

学 位 論 文 題 名

神経膠芽腫モデル細胞における
抗てんかん薬バルプロ酸の輸送機構と新規作用に関する研究

我が国において、脳腫瘍は年間2万人が罹患するといわれている。脳腫瘍の一つに位置づけられる神経膠芽腫(GBM)は、支持組織であるグリア細胞から発生する原発性脳腫瘍である。増殖能と浸潤性が高く、化学療法に強い抵抗性を示すことから、悪性脳腫瘍の中でも、最も悪性度が高い。既存の治療は外科的療法、化学療法、ならびに放射線療法の集学的治療が行われるが、治療効果は不十分であり、予後は極めて悪い。したがって、GBM治療の改善は急務であり、新規治療戦略が求められている。

バルプロ酸(VPA)は、てんかんの治療薬として汎用されている薬剤であり、双極性障害や片頭痛など臨床での適用が拡大されている。昨今の研究により、VPAは既存の抗悪性腫瘍薬が有する抗腫瘍効果を高め、患者の生存率を延長させるという知見もある。以上のことから、VPAはGBMの治療に有効である可能性があるが、GBMにおけるVPAの作用や輸送に関する報告は少ないのが現状である。

本研究では、GBMモデル細胞として、ヒトグリア芽細胞腫由来T98G細胞を使用し、T98G細胞におけるVPAの輸送特性を明らかにすること、ならびにVPAの有用性について検討することを目的とした。検討内容として、まず、T98G細胞におけるVPAの輸送解析を行った。次に、T98G細胞における新規抗悪性腫瘍薬3-ブロモピルビン酸(3-BrPA)の抗腫瘍効果に対するVPAの影響について検討した。

(1) GBMモデルT98G細胞におけるVPAの輸送機構解析

VPAはモノカルボン酸構造を有しており、短鎖脂肪酸に分類される。その構造的特徴とプロトン依存的な輸送機構から、Monocarboxylate transporter(MCT)が輸送に関与することが示唆されてきたが、詳細は明らかではない。本検討では、放射線標識されたVPAを用いて、放射活性を測定することによりVPAの輸送解析を行った。

VPAの取り込みは、pH 5.5-7.5において、プロトン濃度の増加に伴い増大した。pH 5.5における基質濃度依存的な取り込みは、飽和性を示し、 K_m 、 V_{max} 、 K_d はそれぞれ、 0.26 ± 0.16 mM、 5.2 ± 1.2 nmol/mg protein/10 min、 0.17 ± 0.24 μ L/mg protein/10 minと算出された。Eadie-hofsteeプロット解析を行ったところ、そのプロットは一相性を示したことから、T98G細胞におけるVPAの取り込みに寄与するトランスポーターは、単一であることが示された。

VPAの輸送に寄与するトランスポーターの駆動力を明らかにするため、各種イオンの影響を評価したところ、VPAの輸送にはプロトン勾配を駆動力とするトランスポーターが関与していることが示唆された。

そこで、モノカルボン酸を基質とし、プロトン濃度依存的な輸送機構を有するMCTの発現を確認することとした。T98G細胞において、MCT1, 2, 4, 6の発現が認められた。発現を確認した各MCTアイソフォームの基質または阻害剤であるL-Lactate(MCT1-4の基質)、5-Oxoproline(MCT1の基質)、Pyruvate(MCT1-4の阻害剤)、Bindarit(MCT4の阻害剤)、Bumetanide(MCT6の基質)のうち、L-LactateはVPAの取り込みを阻害したが、その他の阻害剤では阻害効果は認められなかったことから、VPAの取り込みにMCT1, 2, 4, 6は寄与しない可能性が示唆された。

一方、VPA と構造が類似しているモノカルボン酸で、VPA と同様にトランスポーターが明らかになっていない Butyrate は、VPA の取り込みを Butyrate 濃度依存的に阻害し、 IC_{50} は $0.43 \pm 0.08 \text{ mM}$ と算出された。さらに、VPA の取り込みに対する Butyrate の阻害様式は、競合阻害であったことから、VPA は Butyrate と同一のトランスポーターの基質結合部位に結合する可能性が示された。

(2) GBM モデル T98G 細胞における新規抗悪性腫瘍薬候補 3-BrPA に対する VPA の併用効果

一般に、腫瘍細胞は好气的環境においても、解糖系に偏ったエネルギー代謝によって ATP を獲得し、細胞の生存や増殖に利用する。腫瘍細胞のエネルギー代謝に着目すると、解糖系は抗腫瘍薬の重要なターゲットとなる。

3-BrPA は、新しい抗腫瘍薬の候補として昨今盛んに研究が進められている。腫瘍細胞のエネルギー代謝をターゲットとした作用機序を有しており、GBM に対して抗腫瘍効果を発揮することが、*in vitro* および *in vivo* 研究において示されている。3-BrPA の作用機序は、解糖系において Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) を阻害し、細胞内 ATP の産生を抑制することで、細胞内 ATP の枯渇を引き起こし、抗腫瘍効果を発揮する。

臨床において、VPA は脳腫瘍に合併するてんかんの第一選択薬として位置づけられる。したがって、将来 3-BrPA による GBM 治療が実現した場合には、3-BrPA と VPA は併用されることが想定される。本検討では、3-BrPA と VPA を併用した場合に、抗腫瘍効果は増大するか、という問いを起点として、3-BrPA と VPA の併用が抗腫瘍効果に及ぼす影響を検証し、VPA の作用に関する新規知見を得ることを試みた。

まず、3-BrPA と VPA の併用が抗腫瘍効果に及ぼす影響を検証した。T98G 細胞において、3-BrPA と VPA を同時曝露させると、3-BrPA 単独処理時に比べて、細胞生存率は著しく低下することを見出した。

ATP の加水分解によって得られるエネルギーを駆動力とする ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの過剰発現は、細胞内 ATP の枯渇を促進するため、3-BrPA は高い抗腫瘍効果を示すことが明らかになっている。そこで 3-BrPA と VPA 併用時の細胞死と ABC トランスポーターの関連を検証したところ、T98G 細胞において、VPA の曝露により Multidrug resistance-associated protein (MRP) 2 ならびに Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) の発現が顕著に増大していることを見出した。

MRP2 および BCRP の発現増大が 3-BrPA と VPA 併用時の抗腫瘍効果増大と関連しているか明らかにするため、MRP の阻害剤 (MK571) および BCRP の阻害剤 (Ko143) 曝露時の細胞生存率を評価した。その結果、MK571 または Ko143 存在下において、3-BrPA と VPA 併用による細胞生存率の低下は抑制された。

さらに、同条件下で細胞内 ATP 量を測定したところ、3-BrPA と VPA 併用時には細胞内 ATP 量は顕著に低下していたが、MK571 または Ko143 の共存下で、細胞内 ATP 量の低下は抑制された。したがって、3-BrPA と VPA 併用による抗腫瘍効果増大は、MRP2 ならびに BCRP の発現増大によって引き起こされる細胞内 ATP 量の枯渇に起因することが示唆された。

本研究の遂行により、GBM モデル T98G 細胞における VPA の輸送機構を明らかにした。また、T98G 細胞において発現が確認されたプロトン依存的な輸送機構を有する MCT1, 2, 4, 6 は VPA の輸送に寄与しないが、Butyrate を基質として認識するトランスポーターによって輸送される可能性が示された。

さらに、T98G 細胞において、VPA は 3-BrPA 濃度依存的に抗腫瘍効果を増大させた。3-BrPA と VPA の抗腫瘍効果増大には、3-BrPA の ATP 枯渇作用に加えて、MRP2 および BCRP の発現増大に起因する細胞内 ATP 量の消費が増大したことが機序である可能性が示された。