HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13618
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73839
Type	doctoral thesis
File Information	Yuri_Ishiguro.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

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

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

臨床薬剤学研究室

石黒　由梨

2019 年 **3** 月

目次

目次

略語表

序章 **1**

第 1 章　神経膠芽腫モデル T98G 細胞における VPA の輸送機構解析

第 1 章　緒言 **3**

第 2 節　材料と方法 **5**

　第 1 項　使用試薬 **5**

　第 2 項　使用細胞 **5**

　第 3 項　基質輸送の測定 **5**

　第 4 項　Total RNA の抽出 **7**

　第 5 項　RT-PCR **8**

　第 6 項　データ解析 **9**

第 3 節　結果 **10**

　第 1 項　T98G 細胞における VPA 取り込みのプロトン濃度依存性 **10**

第 2 項　T98G 細胞における VPA 取り込みに対する基質濃度依存性 **11**

第 3 項　T98G 細胞における駆動力の推定 **12**

第 4 項　T98G 細胞における MCT の発現 **14**

第 5 項　T98G 細胞における VPA 取り込みに対する基質特異性 **15**

第 6 項　T98G 細胞における VPA 取り込みに対する Butyrate の
阻害強度 **17**

第 7 項　T98G 細胞における VPA 取り込みに対する Butyrate の
阻害様式 **18**

第 4 節　考察 **19**

第 5 節　結論 **23**

第 2 章　神経膠芽腫モデル T98G 細胞における新規抗悪性腫瘍薬候補

3-ブロモピルビン酸に対する VPA の有用性に関する研究

第 1 章　緒言 **24**

第 2 節　材料と方法 **26**

第 1 項　使用試薬 **26**

第 2 項　使用細胞 **26**

第 3 項　細胞生存率 **26**

第 4 項　細胞毒性 **27**

第 5 項　基質輸送の測定 **27**

第 6 項　Total RNA の抽出 **28**

第 7 項　RT-PCR **28**

第 8 項　Real-time PCR **28**

第 9 項　タンパク質発現量 **29**

第 10 項　ATP 量測定 **30**

第 11 項　統計処理 **30**

第 3 節　結果 **31**

第 1 項　3-BrPA の抗腫瘍効果に及ぼす VPA の影響 **31**

第 1　T98G 細胞の生存率に対する 3-BrPA (0–100 μM) と VPA 併用の影響 **31**

第 2　T98G 細胞の生存率に対する VPA (0.1–5 mM) と 3-BrPA 併用の影響 **33**

第 3　3-BrPA および VPA の併用による T98G 細胞に及ぼす細胞毒性 **34**

第 4　T98G 細胞における VPA のプレトリートメントが 3-BrPA 誘発性の抗腫瘍効果に及ぼす影響 **35**

第 2 項　VPA が MCT1 の発現量と 3-BrPA の細胞内蓄積量に及ぼす影響 **36**

第 1　VPA が MCT1 の発現量に及ぼす影響 **36**

第 2　VPA が 3-BrPA の細胞内蓄積量に及ぼす影響 **37**

第 3 項　VPA と 3-BrPA が ABC トランスポーターの発現に及ぼす影響 **38**

第 1　T98G 細胞における ABC トランスポーターの発現 **39**

第 2　T98G 細胞における VPA 曝露による mRNA レベルの変動 **40**

第 4 項　MRP2 および BCRP の阻害が 3-BrPA と VPA 併用時の
細胞生存率に及ぼす影響 **41**

第 1　MK571 による MRP2 阻害が細胞生存率に及ぼす影響 **41**

第 2　Ko143 による BCRP 阻害が細胞生存率に及ぼす影響 **41**

第 5 項　MRP2 および BCRP の発現増大による細胞内 ATP 量の変化 **43**

第 4 節　考察 **45**

第 5 節　結論 **51**

総括 **52**

参考文献 **54**

謝辞 **63**

略語表

本論文においては以下の略語を用いた。

ABC	ATP-binding cassette; ATP 結合カセット輸送担体
ATP	Adenosine triphosphate; アデノシン三リン酸
BCA	Bicinchoninic acid; ビシンコニン酸
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein; 乳がん耐性タンパク質
3-BrPA	3-Bromopyruvate; 3-ブロモピルビン酸
DNA	Deoxyribonucleic acid; デオキシリボ核酸
FBS	Fetal Bovine Serum; ウシ胎児血清
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ; グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ
GBM	Glioblastoma; 神経膠芽腫
HDAC	Histone Deacetylase: ヒストン脱アセチル化酵素
HGNC	HUGO Gene Nomenc1ature Committee
IC_{50}	Half maximal (50%) inhibitory concentration; 50% 阻害濃度
K_d	Coefficient of passive diffusion; 受動拡散係数
K_m	Michaelis–Menten constant; ミカエリス・メンテン定数

LDH	Lactate Dehydrogenase; 乳酸脱水素酵素
MCT	Mnocarboxylate transporter ; モノカルボン酸トランスポーター
MRP	Multidrug resistance-associated protein ; 多剤耐性関連タンパク質
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate ; デオキシリボヌクレオチド 3 リン酸
5-OP	5-Oxoproline; 5-オキソプロリン
PBS	Phosphate Buffered Saline; リン酸緩衝生理食塩水
PCR	Polymerase chain reaction; ポリメラーゼ連鎖反応
P-gp	P-glycoprotein; P 糖タンパク質
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride ; フェニルメチルスルホニルフルオリド
RNA	Ribonucleic acid; リボ核酸
RNase	Ribonuclease; リボヌクレアーゼ
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction ; 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

S.E.	Standard error; 標準誤差
SLC	Solute carrier
SMCT	Sodium-coupled monocarboxylate transporter ; ナトリウム依存性モノカルボン酸トランスポーター
TAE	Tris, Acetate, ETDA; トリス、酢酸塩、EDTA
V_{max}	Maximum velocity; 最大取り込み速度
VPA	Valproate; バルプロ酸

序論

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 [1, 2]、悪性脳腫瘍の中でも、最も悪性度が高い。

治療は、外科的療法、化学療法、放射線療法の集学的治療が行われ、既存の治療薬として、テモゾロミドなどのアルキル化薬が使用される。しかしながら、その効果は不十分であり、治療成果の一つの目安となる 5 年生存率は、脳腫瘍全体では 75%であるのに対し、GBM においては 10%以下である [3]。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るが、双極性障害や片頭痛など臨床における適用が拡大されていることに加え、近年では、神経保護作用を示すことが報告されている [4, 5]。また、ゲフィチニブやシスプラチンなど、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 [6-8]。以上のことから、VPA は GBM の薬物治療に有効である可能性があるが、GBM における VPA の作用に関する情報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 T98G 細胞を使用し、T98G 細胞における VPA の輸送機構を明らかにすること、ならびに、VPA による新規 GBM 治療における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、第 1 章ではこれまで VPA の輸送特性に関する報告がない GBM モデル T98G 細胞における VPA の輸送機構解析を行った。第 2 章では、GBM モデル T98G 細胞における新規抗悪性腫瘍薬候補 3-ブロモピルビン酸 (3-BrPA) の抗腫瘍効果に対する VPA の有用性について検討した。

第 1 章　GBM モデル T98G 細胞における VPA の輸送機構解析

第 1 節　緒言

VPA はモノカルボン酸構造を有し、短鎖脂肪酸に分類される (Fig. 1.1)。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。

MCT は、SLC16A ファミリーに属し、推定 12 回膜貫通型のトランスポーターである。これまでに 14 種類のアイソフォームが同定されており、機能解析されたアイソフォームのうち、プロトン依存的な輸送機構を有するのは、MCT1、MCT2、MCT4、ならびに MCT6 である [9]。

VPA 輸送に MCT の寄与が報告されているが、各アイソフォームの寄与に関する報告はなされていないことから、当研究室において、ヒト胎盤絨毛がん由来 JEG-3 細胞における VPA の輸送に関する研究を行ってきた [10]。

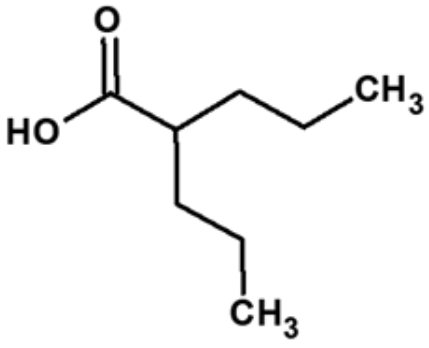


Fig. 1.1 Structure of VPA .

JEG-3 細胞における VPA 輸送には、プロトン依存的なトランスポーターが関与していたが、MCT1-4 は輸送に寄与しないことを明らかにした (Fig. 1.2)。

一方、VPA の酸解離定数である pKa は 4.6 であることから、VPA は、生理的条件において主にアニオンで存在する。アニオン交換輸送体である Anion Exchanger 2 が輸送に寄与する可能性も示唆されている [11]。

しかしながら、VPA 輸送の詳細は明らかではなく、GBM モデル細胞における VPA の輸送に関する報告はほとんどない。本章では、T98G 細胞における VPA の輸送機構解析を行った。

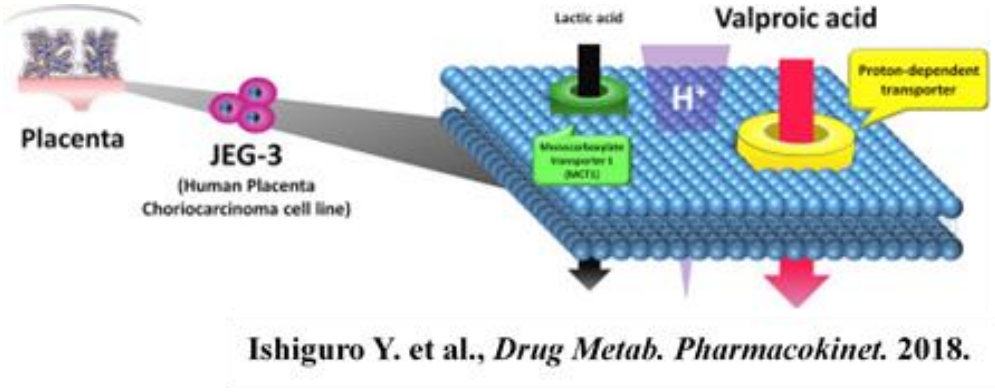


Fig.1.2 Graphical abstract of research conducted by Ishiguro et al, titled "Valproic acid transport in the choriocarcinoma placenta cell line JEG-3 proceeds independently of the proton-dependent transporters MCT1 and MCT4 [10] ".

2 節　材料と方法

第 1 項　使用試薬

[^{3}H] VPA は Moravek より購入した。その他の試薬は東京化成工業株式会社、シグマ、Wako の特級または生化学用のものを使用した。

第 2 項　使用細胞

ヒトグリア芽細胞腫由来 T98G 細胞を使用した。T98G 細胞は RIKEN より購入した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma) に 10％FBS、1％ペニシリン-ストレプトマイシンを添加したものを培養液とし、37℃、5％CO_2 の条件下で培養した。

第 3 項　基質輸送の測定

T98G 細胞を 5×10^4 cells/mL で 24 well プレートに播種し、コンフルエントになるまで培養した。37℃に保った水浴上で培養液を除去した後、uptake buffer (Table 1.1) 0.5 mL で 2 回洗浄し、10 分間プレインキュベートした。Uptake buffer を除去した後、基質溶液 ([^{3}H] VPA) を 0.25 mL 添加し、インキュベートして細胞内に基質を取り込ませた。基質溶液を除去した後、氷冷した uptake buffer 1 mL

で細胞を 3 回洗浄し、取り込みを停止させた。続いて 0.5N NaOH 溶液を 0.5 mL 加えて細胞を溶解させた。これに、Ultima Gold™ シンチレーションカクテル (Perkin Elmer) を加え、放射性同位体標識した基質の放射活性を測定することにより、基質の定量を行った。また、タンパク質の定量は BSA を標識タンパク質とし、Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo) を用いて行った。

なお Cl^-が VPA 取り込みに及ぼす影響の評価は、uptake buffer の Cl^-をグルコン酸に置換して使用した。プロトノフォアである CCCP 処理は、uptake buffer に CCCP を溶解した溶液で、プレインキュベートとインキュベートを行った。

Table1.1 Component of uptake buffer.

Component	Concentration (mM)
$CaCl_2$	1
$MgCl_2$	1
KCl	3
NaCl	140
Glucose	10
Good's buffer	5

第 4 項　Total RNA の抽出

Total RNA は ISOGEN (Nippon Gene) を使用して抽出した。RNA は ReverTra Ace (Toyobo) を使用して逆転写反応を行った。Total RNA は、Nuclease-Free Water に溶解させ、その一部を用いて 260 nm における濃度を超微量分光光度計 NanoDrop を用いて測定した。逆転写反応液は Table1.2 のように調製した。逆転写反応には iCycler^{TM} (BIO-RAD) を使用し、30℃で 10 分、42℃で 60 分、99℃で 5 分の順に反応させた。

Table1.2　Components of reaction solution for reverse transcription.

Component	Volume
5×RT buffer	4 µL
10 mM dNTP mix	2 µL
150 ng/µL Random primer	1 µL
Rever Tra Ace	1 µL
Template RNA	Variable (50 ng 分)
RNase-free water	Variable
Total Volume	20 µL

第 5 項　RT-PCR

PCR には KAPA Taq Extra PCR kit を使用した。使用したプライマーを Table1.3 に示す。PCR 産物は 2%アガロースゲルを用い、100 V、40 min、TAE buffer 中にて電気泳動により分離した。エチジウムブロマイド染色を行い、LAS-1000 UV min (FUJIFILM) にて可視化し、バンドを観察した。

Table1.3 Primer sequences of RT-PCR.

Name	HGNC name	Primer sequence	Product size (bp)
MCT1	SLC16A1	Forward 5'-ccattgtggaatgctgtcct-3′ Reverse 5'-cctacttctttcccccatcc-3′	540
MCT2	SLC16A7	Forward 5'-gcccaaagaaaatcaaaacg-3′ Reverse 5'-aatccaccaatttacctgcaa-3′	540
MCT4	SCL16A3	Forward 5'-atcctgggcttcattgacat-3′ Reverse 5'-cttcaggaaatgctccacct-3′	540
MCT6	SLC16A5	Forward 5'-ggtgctgggcttctactttg-3′ Reverse 5'-gcagcagtggagaaagatcc-3′	169
GAPDH	-	Forward 5'-aaggtcatccctgagctgaa-3′ Reverse 5'-ttctagacggcaggtcaggt-3′	96

第 7 項　データ解析

実験結果はすべて平均 ± 標準誤差で示した。また、有意差の検定は、2 群比較では Student’s t-test、多群比較では Dunnett’s test を用いた。

非線形回帰は Sigma plot 12.5 (HULINKS) を用いてフィッティングした。

速度論的パラメーター (K_m, V_{max}, K_d) は、以下に示すミカエリス・メンテン速度式によって導出した。

$$V = V_{max}\,[S] / (K_m + [S]) + K_d\,[S]$$

V: 反応速度, V_{max}: 最大速度, [S]: 基質濃度,

K_m: ミカエリス・メンテン定数, K_d: 受動拡散係数

第 3 節　結果

第 1 項　T98G 細胞における VPA 取り込みの細胞外プロトン濃度依存性

T98G 細胞における細胞外プロトン濃度依存性を調べた。pH 5.5–7.5 において、プロトン濃度の増加に伴い、T98G 細胞における VPA 取り込みは増大した（Fig. 1.3）。

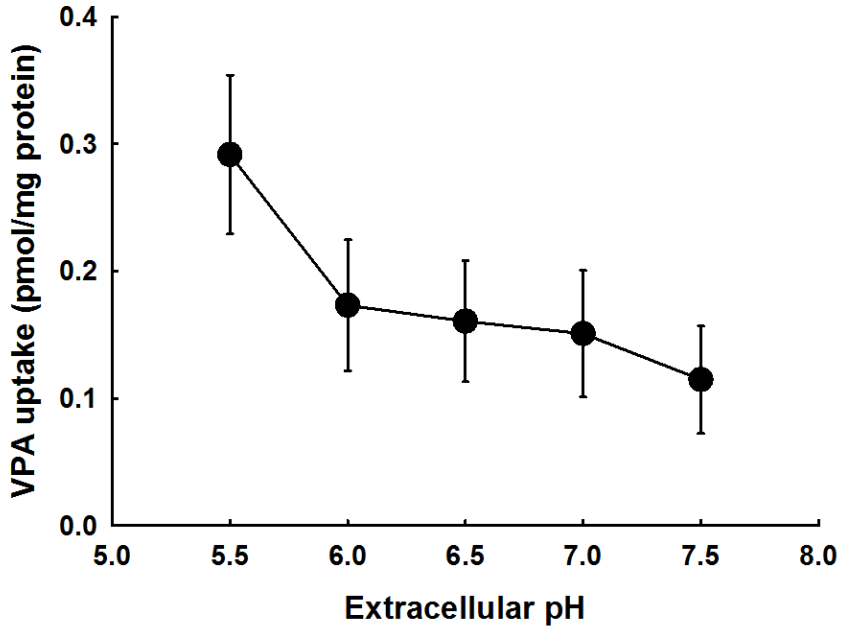


Fig. 1.3 pH-dependent uptake of VPA in T98G cells.

The uptake of [^{3}H] VPA was measured in various pH between pH 5.5–pH 7.5 buffer at 37℃. Data represent the means with standard error (S.E.) of four independent experiments.

第 2 項　T98G 細胞における VPA 取り込みに対する基質濃度依存性

T98G 細胞における VPA 取り込みの基質濃度依存性から速度論的解析を行った (Fig. 1.4)。VPA の取り込み初速度は VPA を高濃度にした時に飽和した。Eadie-Hofstee plot は一相性を示し、VPA が単一の輸送担体を介して取り込まれることを示している。算出された速度論的パラメーターを Table1.4 に示す。輸送クリアランス (V_{max}/K_m) は、20 μL/mg protein/10 min と算出された。

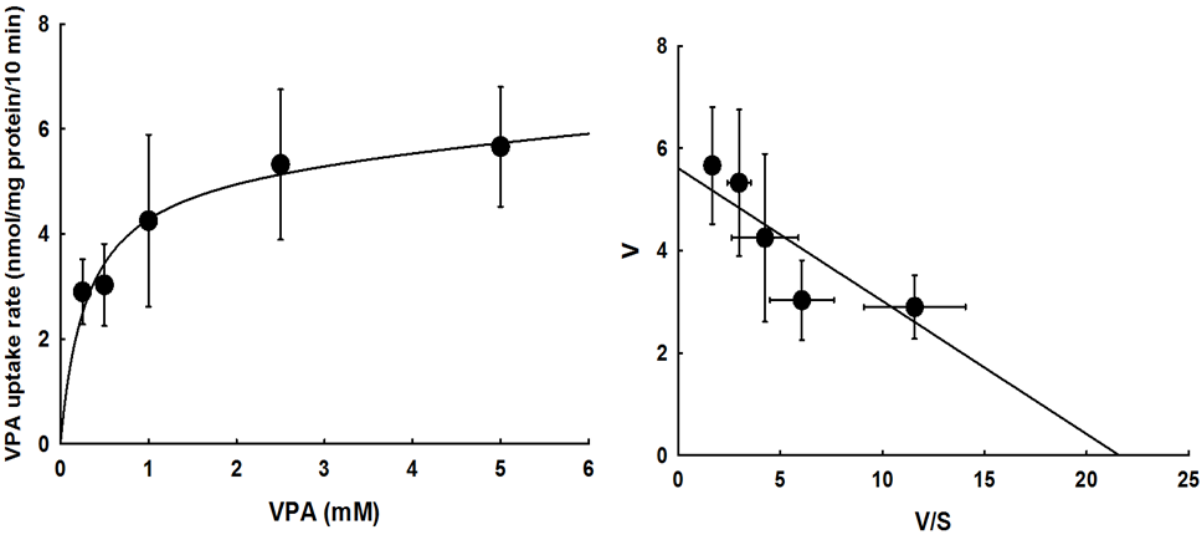


Fig. 1.4　Kinetics of VPA transport in T98G cells.

Uptake of VPA (0–5 mM) was measured in MES buffer at 37℃. Figure in left represents concentration-dependent uptake of [^{3}H]VPA in the presence of increasing concentrations of unlabeled VPA. Figure in right represents the Eadie-Hofstee plot of VPA uptake. V represents the uptake rate of substrate; S, concentration of the substrate in buffer. Data are means with S.E. of four independent experiments.

Table1.4　Kinetic parameters of VPA uptake in T98G cells.

K_m (mM)	V_{max} (nmol/mg protein/10min)	K_d (μL/mg protein/10 min)	V_{max}/K_m (μL/mg protein/10 min)
0.26 ± 0.16	5.2 ± 1.2	0.17 ± 0.24	20

第 3 項　T98G 細胞における駆動力の推定

VPA の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 (Fig. 1.5)。pH 7.5 とは、コントロールである pH 5.5 (細胞外プロトン濃度 3.2 μM) に対して、細胞外プロトン濃度を 1/100 にした pH 7.5 (細胞外プロトン濃度 0.032 μM) の条件を示す。CCCP とは、プロトノフォアである CCCP 20 μM で細胞をプレトリートメントし、VPA 取り込みを評価した条件を示す。pH 7.5 において、VPA の取り込みは有意に減少した。さらに、CCCP において、VPA の取り込みが大きく減少した。

Cl^--free 条件とは、Cl^-をグルコン酸で置換した buffer で取り込み実験を行うことで評価した。Cl^--free 条件において、T98G 細胞における VPA の取り込みに変化は認められなかった。

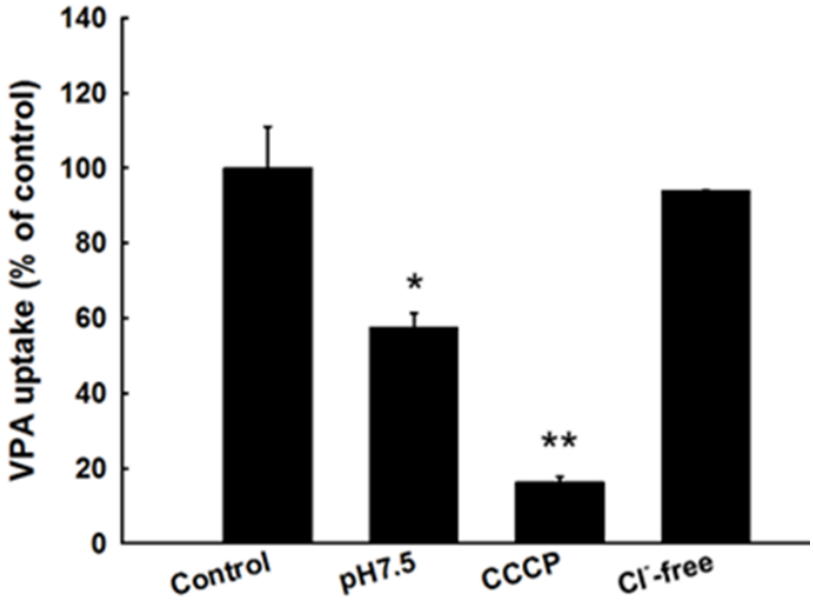


Fig. 1.5 Effects of various condition on [^{3}H] VPA transport.

Uptake of VPA was measured in the presence of CCCP and measured under the condition of Cl^--free buffer or pH 7.5. Data are means with S.E. of four independent experiments. *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$

第 4 項　T98G 細胞における MCT の発現

T98G 細胞における VPA の取り込みに、プロトン濃度依存的なトランスポーターが寄与している可能性が示唆されたことから、MCT の寄与を検証することとした。

同定されている 14 種類のアイソフォームのうち、輸送機構が明らかになっており、基質輸送の駆動力としてプロトン勾配を利用する MCT 1、MCT2、MCT4 ならびに MCT6 について、RT-PCR にて T98G 細胞における発現を確認した。

T98G 細胞において、MCT1、MCT2、MCT4、ならびに MCT6 の発現が認められた (Fig. 1.6)。

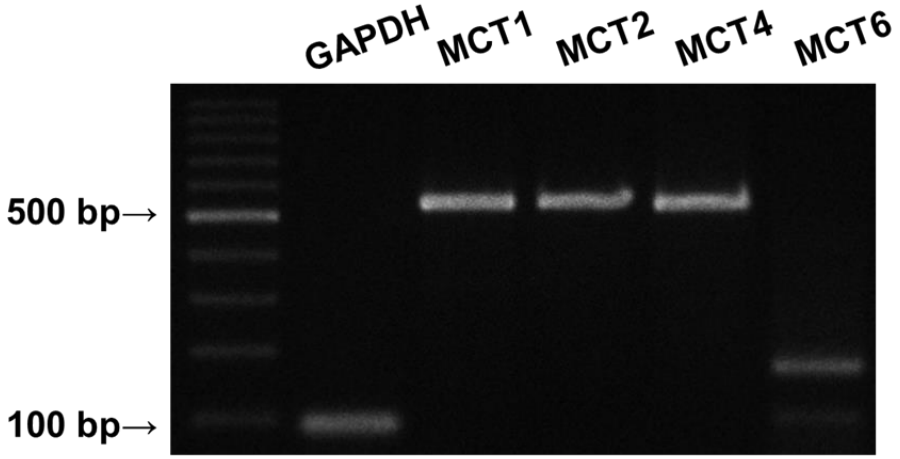


Fig.1.6　mRNA expression of proton-dependent MCT in T98G cells.

mRNA was determined by RT-PCR. GAPDH was used as a housekeeping gene.

第 5 項　T98G 細胞における VPA 取り込みに対する基質特異性

VPA がプロトン濃度依存的な輸送機構を有する MCT によって細胞内に取り込まれるか否かを判定するために、MCT の基質または阻害剤を使用して、T98G 細胞における VPA 輸送に及ぼす影響を検証した。

阻害実験には、L-Lactate、5-Oxoproline (5-OP)、Pyruvate、Bindarit、ならびに、Bumetanide を用いた (Table1.5)。また、VPA と構造が類似している Butyrate も阻害剤として使用した (Fig. 1.7)。

Table1.5　Substrates and inhibitors for MCT1–6.

	Substrate	Inhibitor
MCT1	L-lactate 5-Oxoproline Pyruvate	
MCT2	L-lactate Pyruvate	
MCT4	L-lactate	Bindarit
MCT6	Bumetanide	

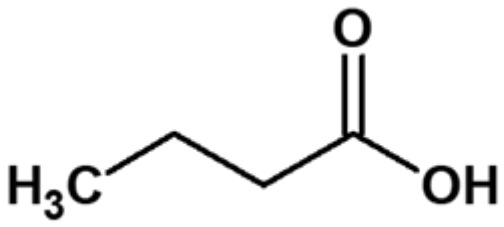


Fig. 1.7 Structure of Butyrate.

その結果、MCT1、2、4 の基質である L-Lactate によって、細胞内への VPA の取り込みが阻害された (Fig. 1.8)。一方で、Pyruvate、5-OP、Bindarit ならびに Bumetanide は、VPA の細胞内への取り込みを阻害しなかった (Fig. 1.8)。

一方で、Butyrate によって、細胞内への VPA の取り込みが強く阻害された。

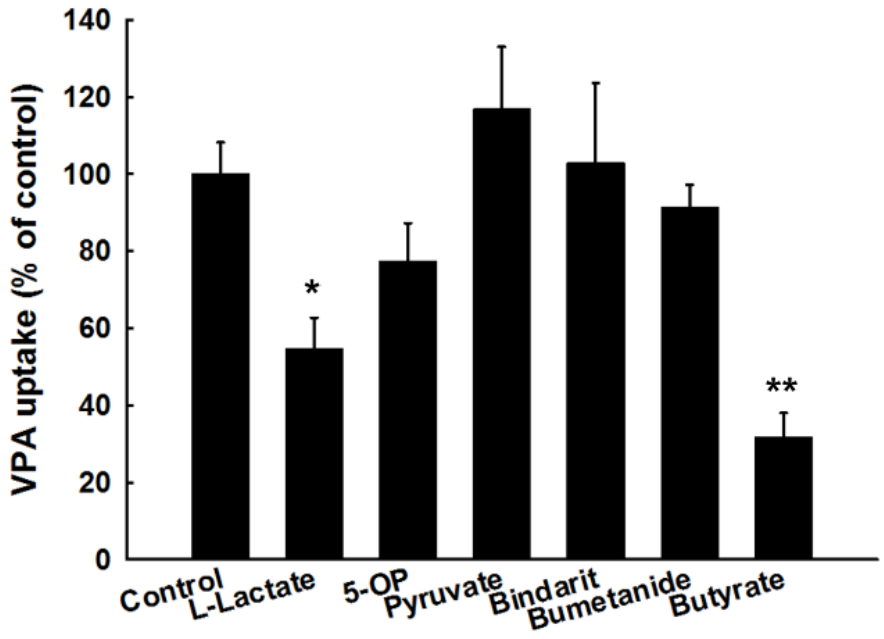


Fig. 1.8 Substrate specificity of [^{3}H] VPA uptake in T98G cells.

Uptake of VPA was measured in MES buffer (pH 5.5) for 10 min at 37°C in the presence of L-lactate (10 mM), 5-OP (10 mM), Pyruvate (10 mM), Bindarit (100 μM), Bumetanide (1 mM) and Butyrate (10 mM). Data are represented means with S.E. of 3–6 independent experiments. *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$

第 6 項　T98G 細胞における VPA の取り込みに対する Butyrate の阻害強度

T98G 細胞において、細胞内への VPA の取り込みを Butyrate が強く阻害したことから、VPA の取り込みに対する Butyrate の阻害強度を評価した (Fig. 1.9)。Butyrate (0.1–10 mM) は、Butyrate 濃度依存的に VPA の取り込みを阻害し、IC_{50} は、0.43 ± 0.08 mM と算出された。

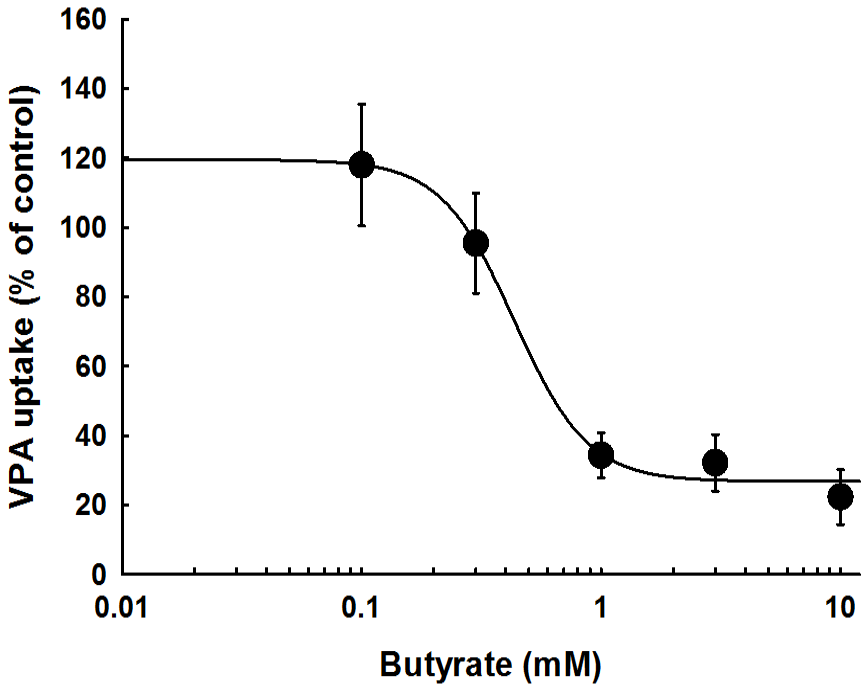


Fig. 1.9 Inhibitory effect of Butyrate on VPA uptake in T98G cells. Concentration of Butyrate was 0.1–10 mM. Each point represents the mean ± S.E. of three independent experiments.

第 7 項　T98G 細胞における VPA 取り込みに対する Butyrate の阻害様式

Butyrate (1 mM) の VPA (0.05–5 mM) の取り込みに対する阻害様式を調べた (Fig. 1.10)。その結果、速度論的パラメーターは、V_{max} には有意な変化は認められず、K_m は増大した。速度論的パラメーターを Table1.6 に示す。

Eadie-Hofstee プロット解析を行ったところ、阻害様式は競合阻害であった。

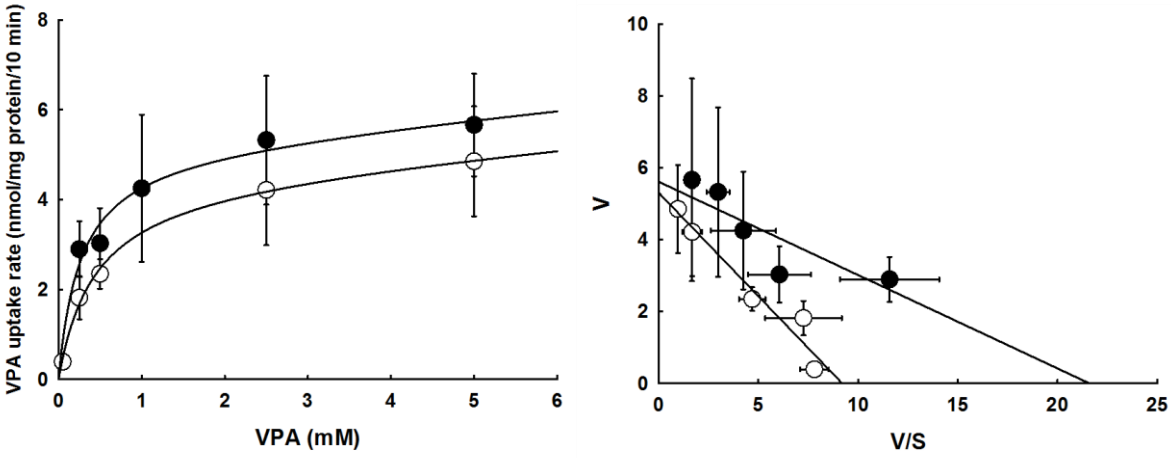


Fig. 1.10

The uptake of VPA in the absence or presence of Butyrate.

The VPA uptake in T98G cells was measured in the absence or presence of Butyrate (1 mM). Figure in left represents Michaelis-Menten equations and in right represents Eadie-Hofstee plots. Each point represents the mean ± S.E. of four independent experiments.

Table1.6　Kinetic parameters of VPA uptake in the absence or presence of Butyrate.

	K_m (mM)	V_{max} (nmol/mg protein/10min)	K_d (μL/mg protein/10 min)
Control	**0.26 ± 0.16**	**5.2 ± 1.2**	**0.17 ± 0.24**
Butyrate	**0.43 ± 0.11**	**4.4 ± 0.61**	**0.16 ± 0.11**

第 4 節　考察

T98G 細胞において、細胞外のプロトン濃度をコントロール (pH 5.5) の 1/100 (pH 7.5) にすると、VPA の取り込みは大きく減少した (Fig. 1.5)。さらに、プロトノフォアである CCCP で処理したところ、VPA の取り込み活性は大きく減少した。T98G 細胞における VPA のトランスポーターは、プロトン勾配を駆動力とすることが示された。

また、プロトン濃度依存性を調べたところ、細胞外プロトン濃度の増加に伴い、VPA の取り込みは増加した (Fig. 1.3)。したがって、VPA の取り込みにプロトンが関与している可能性が示された。

また、T98G 細胞における VPA の取り込みには基質濃度依存性があり、取り込みは飽和性を示した (Fig. 1.4)。さらに輸送クリアランスは、受動拡散定数と比べて十分に大きく (Table 1.4)、T98G 細胞における VPA 取り込みにトランスポーターが寄与することが示唆された。Eadie-Hofstee plot 解析を行ったところ、Eadie-Hofstee プロットは一相性を示し、T98G 細胞における VPA の取り込みには単一のトランスポーターが寄与していることが示唆された。

次に、VPA の輸送に寄与するトランスポーターの駆動力を推定すべく、T98G 細胞における VPA 輸送に対する各種イオンの影響を検討した (Fig. 1.5)。

Cl^--free 条件において、VPA の取り込みに変化が認められなかったことから、輸送に Cl^-イオンが関与する Anion Exchanger 2 は VPA の輸送に寄与しないことが示唆された。

Sodium-coupled monocarboxylate transporter (SMCT) は Na^+勾配を駆動力とするモノカルボン酸トランスポーターである。MCT と同様に、L-Lactate や Pyruvate などのモノカルボン酸を基質とする [12]。げっ歯類のグリア細胞において、SMCT1 の発現が確認されているものの [13]、T98G 細胞において SMCT の発現は認められなかった（データは示さない）。また、当研究室の報告によると Normal human astrocyte においても SMCT の発現は認められなかった [14] 。したがって、SMCT もまた、T98G 細胞における VPA の取り込みに寄与していないことが示唆された。

T98G 細胞において、基質輸送に pH 依存性が認められる MCT1、MCT2、MCT4、ならびに MCT6 の発現が認められたことから (Fig. 1.6)、次に T98G 細胞における VPA の取り込みに MCT が寄与しているかを検証するため阻害実験を行った (Fig. 1.8)。検討には、MCT1、2、4 の基質となる L-lactate、MCT1 の特異的な基質である 5-OP [15]、MCT2 の基質となる Pyruvate、MCT4 の選択的阻害剤である Bindarit [16]、MCT6 の基質である Bumetanide を用いた (Table 1.5)。

L-Lactate によって、細胞内への VPA の取り込みが阻害されたことから、VPA

の取り込みに MCT1、2、4 が寄与している可能性が示唆された。一方、5-OP、Pyruvate、ならびに Bindarit は VPA の取り込みを阻害しなかった。5-OP は MCT1 の選択的基質であり [15]、Pyruvate は MCT2 に高親和性の基質であり [9]、さらに Bindarit は MCT4 選択的阻害剤である。したがって、MCT1、2、4 は T98G 細胞における VPA の取り込みに寄与しないことが示された。さらに、MCT6 の基質である Bumetanide [17, 18] は、T98G 細胞における VPA の取り込みを阻害しなかったことから、T98G 細胞において MCT6 もまた VPA の取り込みに寄与しない可能性が示された。

また、構造の類似性に着目し、Butyrate を用いた阻害実験も行った。Butyrate は、腸内フローラが食物繊維を分解する際に産生される物質として広く知られており、VPA と類似構造を有する一価のカルボン酸である (Fig. 1.7)。腸内においてプロトン依存的に細胞内に輸送されることが報告されているが、輸送に寄与するトランスポーターは明らかになっていない。また、Butyrate は構造だけではなく、HDAC 阻害作用を有する点においても [19]、VPA の特徴と一致している。

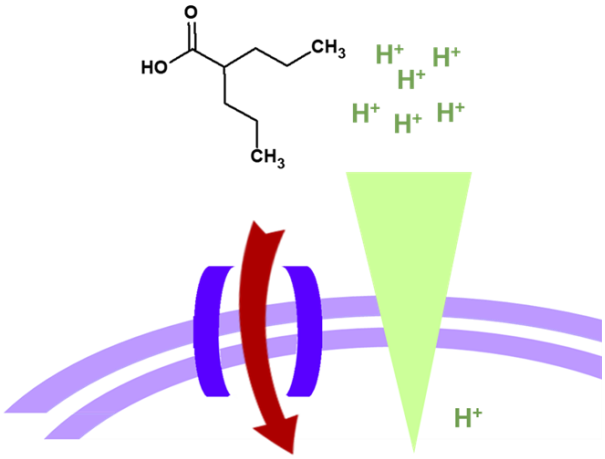
T98G 細胞において、Butyrate により VPA の取り込みに顕著な阻害が認められたことから、T98G 細胞における VPA 輸送に及ぼす Butyrate の阻害について詳細に調べることとした。VPA の取り込みは、Butyrate 濃度依存的に阻害された

(Fig. 1.9)。阻害様式を調べたところ、速度論的パラメーターは V_{max} には有意な変化はなかったが、K_m は増大した。Eadie-Hofstee plot 解析を行ったところ、阻害様式は競合阻害であった (Fig. 1.10)。

この結果は、VPA と Butyrate は同一のトランスポーターの同じ基質結合部位に結合することを意味しており、VPA は、Butyrate を基質として認識するトランスポーターと同一のトランスポーターによって輸送される可能性が高いことが示された。本検討から、T98G 細胞に発現している MCT のうち、依然として機能解析されていないプロトン依存的な輸送機構を有するオーファントランスポーターによって輸送される可能性が考えられる。

第 5 節　結論

T98G 細胞において、VPA の輸送にはプロトン依存的なトランスポーターが関与していた。T98G 細胞において、発現が確認された MCT1、MCT2、MCT4、ならびに MCT6 は、輸送に関与する可能性は低いことが示された。一方、VPA は Butyrate を基質として認識するトランスポーターと同一のトランスポーターで輸送される可能性が示された。本検討で明らかとなった VPA の輸送に関する知見は、今後 VPA のトランスポーターを特定するうえで重要な知見となることが期待される。



第 2 章　神経膠芽腫モデル T98G 細胞における新規抗悪性腫瘍薬候補 3-BrPA に対する VPA の有用性に関する研究

第 1 節　緒言

一般に、腫瘍細胞は好気的環境においても、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 (Fig. 2.1) は、新しい抗腫瘍薬の候補として近年盛んに研究が進められており、GBM に対して抗腫瘍効果を示すことが、*in vitro* および *in vivo* 研究において示されている [20, 21]。

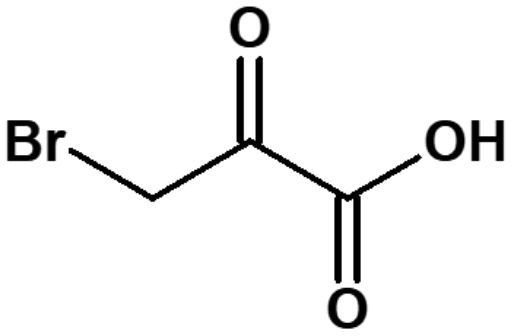


Fig. 2.1 Structure of 3-BrPA.

3-BrPA の作用機序は、解糖系の Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) を阻害することで、細胞内の ATP 産生を抑制し、細胞内の ATP を枯渇させることにより、細胞死が引き起こされる (Fig. 2.2)。がん細胞は、エネルギー供給の大部分を解糖系に依存しているため、解糖系の GAPDH の阻害がターゲットである 3-BrPA は、がん細胞特異的な抗腫瘍効果を発揮することが期待される。また、3-BrPA は p53 を脱リン酸化または分解することで、

不可逆的なオートファジーを引き起こし [20]、解糖系酵素やストレス関連タンパク質の発現を変化させる作用も有する [22]。

臨床において、脳腫瘍はてんかんを合併する場合が多く [23]、VPA は脳腫瘍と合併するてんかん発作に対して、第一選択薬として位置づけられる [24]。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。前述のとおり、VPA は既存の抗腫瘍薬の抗腫瘍効果を増大させることが近年の研究において見出されている [5–7]。

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、GBM に対する新規抗悪性腫瘍薬候補 3-BrPA と VPA の併用が抗腫瘍効果に及ぼす影響を検証し、VPA の新規有用性に関する新規知見を得ることを試みた [25]。

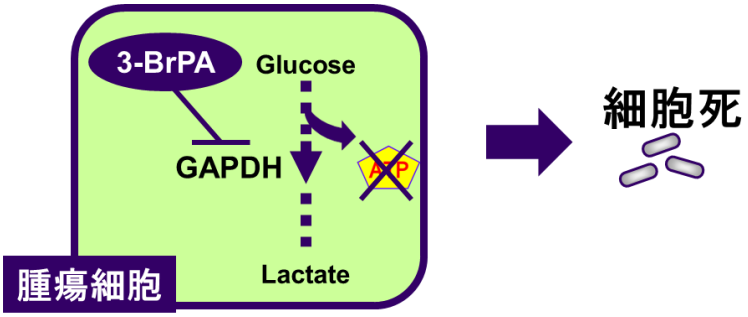


Fig. 2.2 Mechanism of 3-BrPA action.

第 2 節　材料と方法

第 1 項　使用試薬

[^{14}C] 3-BrPA は Moravek より購入した。その他の試薬は東京化成工業株式会社、シグマ、Wako の特級または生化学用の試薬を使用した。

第 2 項　使用細胞

第 1 章と同様、ヒトグリア芽細胞腫由来 T98G 細胞を使用した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma) に 10％FBS、1％ペニシリン-ストレプトマイシンを添加したものを培養液とし、37℃、5％CO_2 の条件下で培養した。

第 3 項　細胞生存率

細胞生存率測定は 24 well プレートに播種した細胞を用いた。メディウムを除去した後、トリプシン溶液にて細胞をはく離した。その後メディウムによってトリプシンの反応を停止させ、細胞懸濁液とした。細胞懸濁液に Trypan Blue Dye (BIO-RAD) を混和し、測定用プレートおよび TC20^{TM} Automated Cell Counter (BIO-RAD) にて測定した。

第 4 項　細胞毒性

T98G 細胞を 5×10^4 cells/mL で 96 well プレートに播種した細胞を用い、Cytotoxicity LDH Assay Kit (Wako) のプロトコールに倣い、LDH をプレートリーダーで測定した。各種薬液は、血清を除いたメディウムで調製し 48 時間作用させた。0.2 % Tween 20 メディウム溶液を、細胞に 48 時間曝露させた際の LDH 放出レベルをポジティブコントロール (100%) とした。

第 5 項　基質輸送の測定

T98G 細胞を 5×10^4 cells/mL で 24 well プレートに播種し、コンフルエントになるまで培養した。37℃に保った水浴上で、培養液を除去し、uptake buffer 0.5 mL で 2 回洗浄し、10 分間プレインキュベーションした。Uptake buffer の組成は第 1 章第 2 節第 3 項で述べた。Uptake buffer を除去した後、基質溶液 ($[^{14}C]$ 3-BrPA) を 0. 5 mL 添加し、インキュベートして細胞内に基質を取り込ませた。基質溶液を除去した後、氷冷した uptake buffer 1 mL で細胞を 3 回洗浄し、取り込みを停止させた。続いて 0.5N NaOH 溶液を 0.5 mL 加えて細胞を溶解した。これに、Ultima Gold™ シンチレーションカクテル (Perkin Elmer) を加え、放射性同位体標識した基質の放射活性を測定することにより、基質の定量を行った。また、タンパク質の定量は BSA を標識タンパク質とし、Pierce® BCA Protein Assay Kit

(Thermo) を用いて行った。

第 6 項　Total RNA の抽出

第 1 章第 2 節第 4 項で述べた。

第 7 項　RT-PCR

RT-PCR の方法は、第 1 章第 2 節第 5 項で述べた。使用したプライマーの配列を Table2.1 に示す。

Table2.1 Primer sequences of RT-PCR and real-time PCR.

Name	HGNC name	Primer sequence		Product size (bp)
P-gp	ABCB1	Forward	5'- tgctcagacaggatgtgagttg -3'	122
		Reverse	5'- aattacagcaagcctggaacc -3'	
MRP2	ABCC2	Forward	5'- acagaggctggtggcaacc -3'	227
		Reverse	5'- accattaccttgtcactgtccatga -3'	
MRP3	ABCC3	Forward	5'- ggcgtctatgctgctttagg -3'	187
		Reverse	5'- ccttggagaagcagttcagg -3'	
BCRP	ABCG2	Forward	5'- ttatccgtggtgtgtctgga -3'	243
		Reverse	5'- ttcctgaggccaataaggtg -3'	
β-Actin	-	Forward	5'- tggcacccagcacaatgaa -3'	186
		Reverse	5'- ctaagtcatagtccgcctagaagca -3'	

第 8 項　Real-time PCR

Real-time PCR には、KAPA SYBR Fast qPCR kit を使用した。反応液を Table2.2 のように調製し、反応に用いた。反応および検出には LightCycler®480 (Roche) を

使用した。用いたプライマーの配列は Table2.1 に示した。

Table2.2 Components of reaction solution for reverse transcription.

Component	Volume/ Reaction
2×KAPA SYBR	5 µL
Primer mix (10 µM)	0.4 µL
Template DNA	3 µL
RNase-free water	1.6 µL
Total Volume	10 µL

第 9 項　タンパク質発現

Total タンパク質を T98G 細胞より抽出した。T98G 細胞は 1 mM PMSF を含んだタンパク質抽出用の緩衝液 RIPA buffer (Cell Signaling Technology) で可溶化し、タンパク質を抽出した。タンパク質は、10% SDS-PAGE で分離し、15V の電圧を 90 分かけ、ニトロセルロースメンブレンに転写した。0.05%になるように Tween 20 を添加した PBS にスキムミルクを 1%となるように添加したものをブロッキング剤とし、室温で 1 時間ブロッキングした。1 次抗体は、マウス MCT1 抗体 (H-1: sc-365501, Santa Cruz Biotechnology) を 500 倍希釈して一晩室温でインキュベートした。Horseradish peroxidase (HRP) 標識 2 次抗体は、goat anti-mouse IgG_1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を 2000 倍希釈して、1 時間室温でインキュベートした。蛍光検出用試薬 ECL (GE Healthcare) を用いて化学発光させ、画像

解析装置 ImageQuant LAS 4000 システム (GE Healthcare) を用いて可視化した。また、タンパク質の定量はBSAを標識タンパク質とし、Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo) を用いて行った。

第 10 項　ATP 量測定

細胞は 96 well プレートに播種して使用した。IntraCellular ATP 測定キット (TOYO) のプロトコールに倣い、比色法にて細胞内の ATP 量を測定した。発光の測定には、マイクロプレートリーダー (Infinite M200, TECAN) を使用した。

第 11 項　統計処理

実験結果はすべて平均±標準誤差で示した。また、有意差の検定は、2 群比較では Student’s t-test、多群比較では Turkey’s Kramer test および Dunnett’s test を用いた。

第 3 節　結果

第 1 項　3-BrPA の抗腫瘍効果に及ぼす VPA の影響

第 1　T98G 細胞の生存率に対する 3-BrPA (0–100 μM) と VPA 併用の影響

検討に先立ち、3-BrPA の曝露が T98G 細胞に及ぼす影響を確認した。3-BrPA (0, 100, 500 μM) を 48 時間曝露させると、細胞生存率は、3-BrPA の濃度が 100 μM では有意な変化は認められず、500 μM では有意に低下した (Fig. 2.3)。

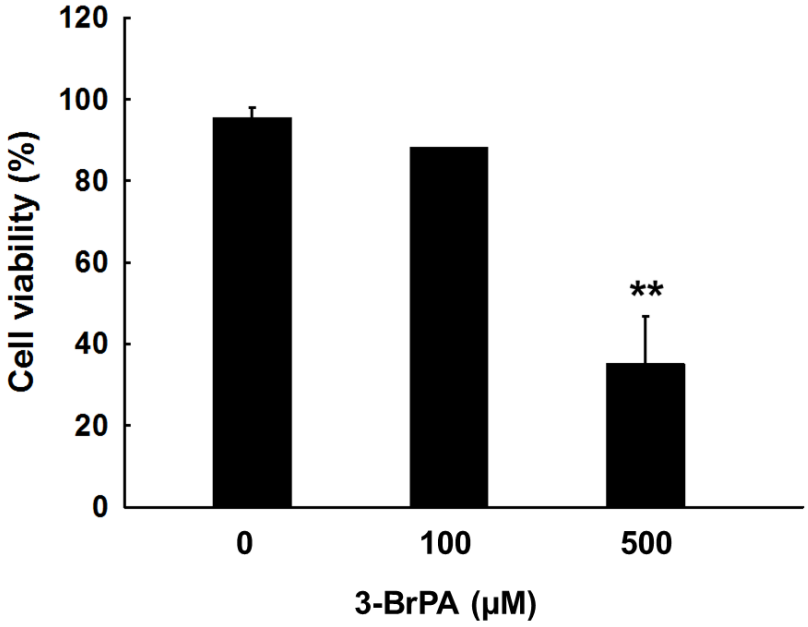


Fig. 2.3　3-BrPA induced T98G cell death.
T98G cells were cultured with 3-BrPA (0, 100, 500 μM) for 48 h. Data represent the means with standard deviation of single experiment.

T98G 細胞に 3-BrPA (0–100 μM) および VPA (5 mM) を 48 時間曝露させた際の細胞生存率を測定した (Fig. 2.4)。

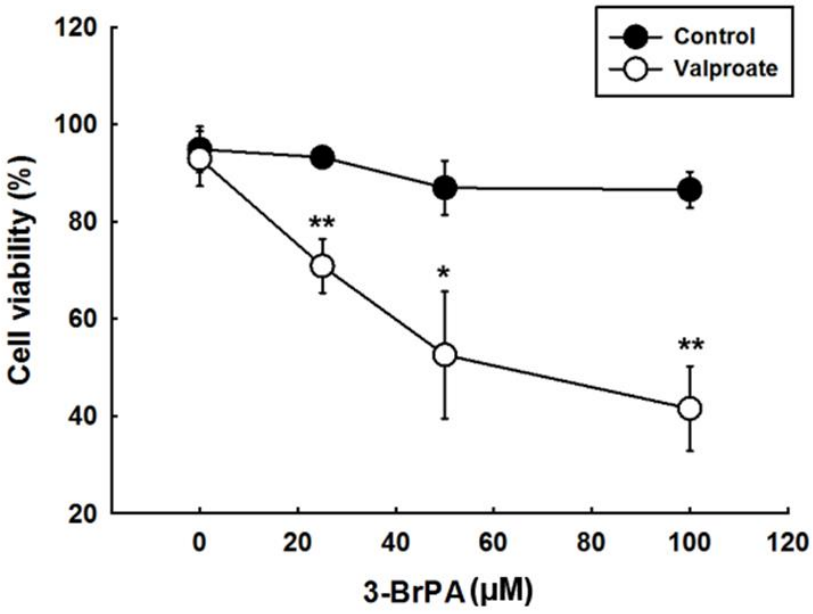


Fig. 2.4　3-BrPA induced T98G cell death in the absence or presence of valproate.

T98G cells were cultured with 3-BrPA (0–100 μM) in the absence or presence of valproate (5 mM). Data represent the means with S.E. of three independent experiments.
*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$

その結果、3-BrPA (0–100 μM) を単独曝露させたところ、細胞生存率にほとんど影響を及ぼさなかった。一方、3-BrPA と VPA を同時曝露させると、3-BrPA 濃度依存的な細胞生存率の低下が認められた。

第 2　T98G 細胞の生存率に対する VPA (0.1–5 mM) と 3-BrPA 併用の影響

T98G 細胞に様々な濃度の VPA (0.1–5 mM) および 3-BrPA (100 μM) を 48 時間曝露させた際の細胞生存率を測定した (Fig. 2. 5)。

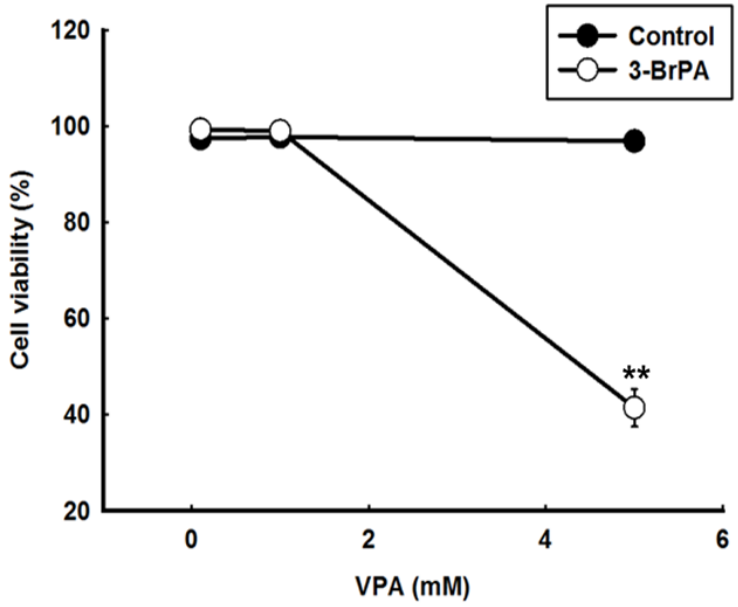


Fig. 2.5　3-BrPA induced T98G cell death in the absence of valproate (0.1–5 mM).

T98G cells were cultured with 3-BrPA (100 μM) in the absence or presence of valproate (0.1–5 mM). Data represent the means with S.E. of three independent experiments.
**; $p < 0.01$

その結果、VPA 単独曝露は細胞生存率に影響を及ぼさなかった。VPA と 3-BrPA を同時曝露した場合、VPA 0.1 mM および 1 mM において T98G 細胞の生存率に影響を及ぼさなかったが、VPA 5 mM において細胞生存率の顕著な低下が認められた。

第 3　3-BrPA および VPA の併用による T98G 細胞に及ぼす細胞毒性

3-BrPA と VPA の併用により T98G 細胞に及ぼす細胞毒性を評価するため、LDH アッセイを行った。3-BrPA (100 μM) および VPA (5 mM) を 48 時間同時曝露させた際に放出される LDH レベルを測定した (Fig. 2.6)。

3-BrPA 単独曝露させた群と 3-BrPA と VPA を同時に曝露させた群において、LDH レベルは増大した。

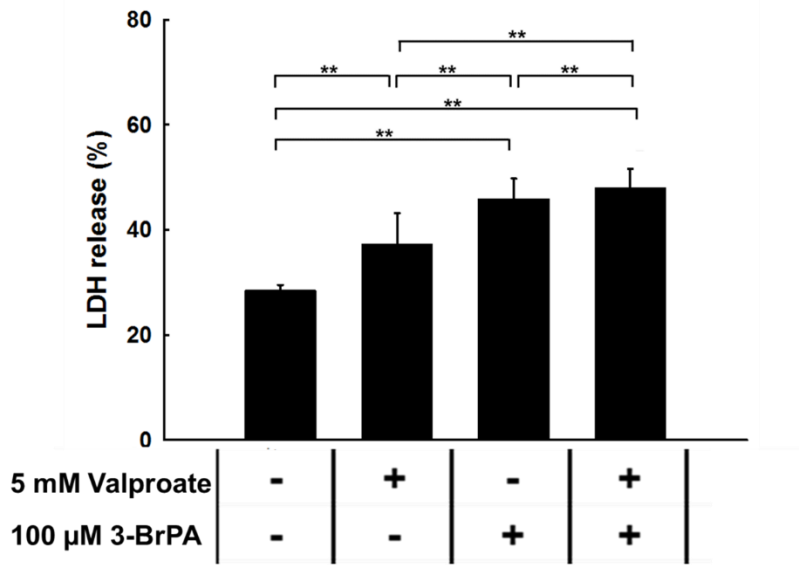


Fig. 2.6　Cytotoxicity of 3-BrPA enhanced by valproate in T98G cells

T98G cells were cultured with or without 100 μM 3-BrPA and 5 mM valproate for 48 h. Cytotoxicity are showed as LDH leaking levels. 0.2 % Tween 20 was used as a positive control and calculated as 100 %. Data represent the means with S.E. of four independent experiments. **; $p<0.01$.

第 4　T98G 細胞における VPA のプレトリートメントが 3-BrPA 誘発性の抗腫瘍効果に及ぼす影響

5 mM VPA を 48 時間単独曝露した後、PBS で 1 回洗浄し、100 μM 3-BrPA を 48 時間単独曝露させたときの細胞生存率を評価した。

その結果、VPA をプレトリートメントした後、3-BrPA を曝露させても、細胞生存率に影響を及ぼさなかった (Fig. 2.7)。T98G 細胞において、抗腫瘍効果増大作用を得るためには、VPA と 3-BrPA は同時に曝露させることが重要であると示唆された。

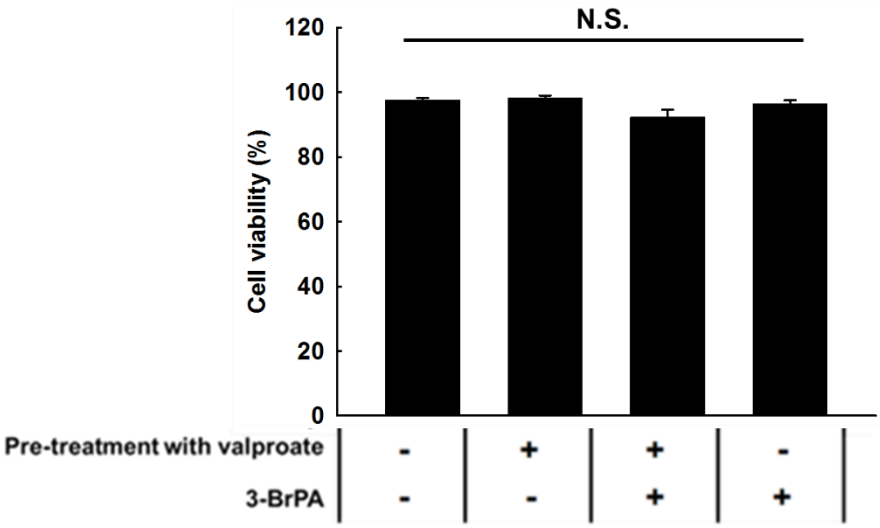


Fig. 2.7　The effect of pre-treatment with valproate on T98G cell viability.

T98G cells were treated with valproate (5 mM) for 48 h. T98G cells were washed prior to addition of 3-BrPA (100 μM) for 48 h. Data represent the means with S.E. of three independent experiments.

第 2 項　VPA が MCT1 の発現量と 3-BrPA の細胞内蓄積量に及ぼす影響

T98G 細胞において、VPA は 3-BrPA の抗腫瘍効果を増大せることが明らかとなったことから、抗腫瘍効果増大の機序を明らかにすることとした。

当研究室において、3-BrPA の細胞毒性と細胞内蓄積量は相関し、3-BrPA の細胞内蓄積量が増加するほど、細胞毒性が増強することを明らかにしている。また、MCT1 が 3-BrPA を輸送することが報告されている [26]。本検討において、T98G 細胞に VPA を曝露したとき、MCT1 の発現量増大により 3-BrPA の細胞内蓄積量が増加し、抗腫瘍効果が増強されたと仮説を立て、VPA 曝露時の MCT1 の発現量、ならびに、3-BrPA の細胞内蓄積量を評価した。

第 1　VPA が MCT1 の発現量に及ぼす影響

5 mM VPA を 48 時間曝露した際、MCT1 のタンパク質発現量に変化は認められなかった (Fig. 2.8A)。

第 2　VPA が 3-BrPA の細胞内蓄積量に及ぼす影響

T98G 細胞における 3-BrPA の細胞内蓄積量は、取り込み時間 3 分まで直線的に増加した (データは示さない)。したがって、取り込み時間は 2 分で行うこととした。5 mM VPA を 48 時間曝露したときの 3-BrPA の細胞内蓄積量には、有意な変化は認められなかった (Fig. 2.8B)。

(A)　　(B)

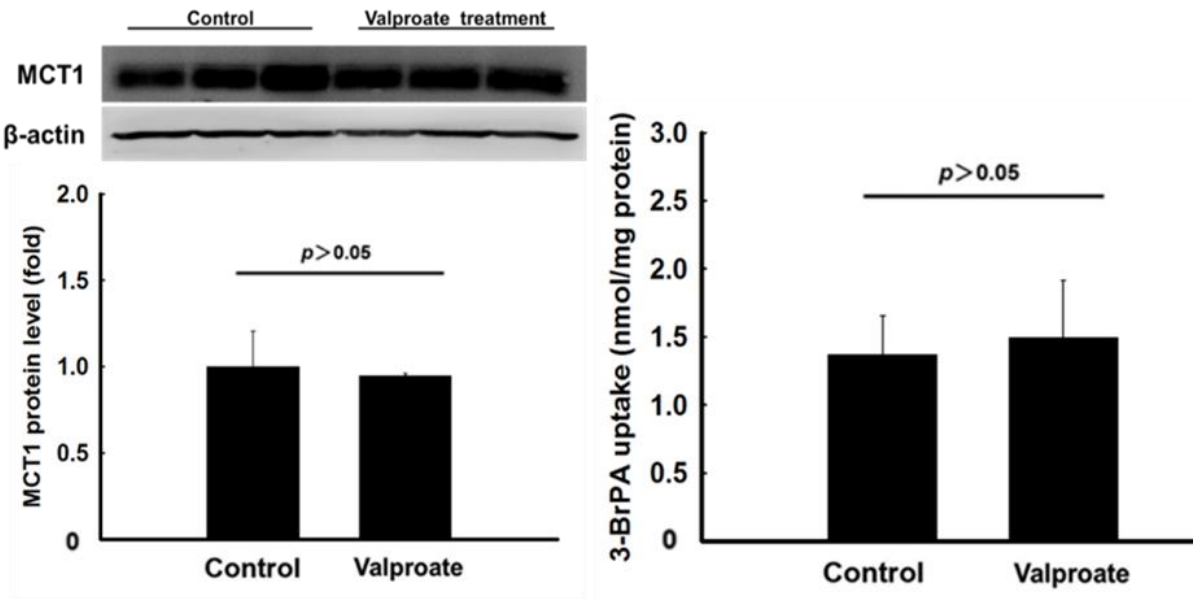


Fig. 2.8　Effects of 48-h incubation with valproate (5 mM) on MCT1 protein level and 3-BrPA accumulation in T98G cells.

(A) MCT1 protein level was determined by western blot analysis. β-actin was used as a universal control. Data represent the means with S.E. of three blots. (B) Uptake of 10 μM [^{14}C] 3-BrPA was measured in MES buffer (pH 5.5) for 2 min at 37 °C. Data represent the means with S.E. of eight independent experiments.

第 3 項　VPA と 3-BrPA が ABC トランスポーターの発現に及ぼす影響

3-BrPA と VPA 併用時の抗腫瘍効果増大は、3-BrPA の細胞内蓄積量の増大によるものではないことが示唆されたことから、ABC トランスポーターに着目した。

ABC トランスポーターは ATP の加水分解によって得られるエネルギーを利用して細胞内から細胞外へ物質を排出するトランスポーターであり、P-glycoprotein (P-gp: ABCB1)、Breast cancer resistance protein (BCRP: ABCG2)、Multidrug resistance-associated protein (MRP: ABCC) などがこのファミリーに属する。

P-gp 発現細胞に 3-BrPA を作用させると、細胞内の ATP の枯渇が促進されることで、高い抗腫瘍作用を示すことが明らかになっている [27]。そこで、3-BrPA および VPA 併用時の細胞死と ABC トランスポーターとの関連を検証することとした。

第 1　T98G における ABC トランスポーターの発現

典型的な ABC トランスポーターであり、がん化学療法において抗がん剤を排出するなど、治療上障害となる P-gp、MRP2 (ABCC2)、MRP3 (ABCC3) ならびに BCRP について T98G 細胞における発現を調べた (Fig. 2.9)。T98G 細胞において、MRP2、MRP3 および BCRP の発現が認められた。

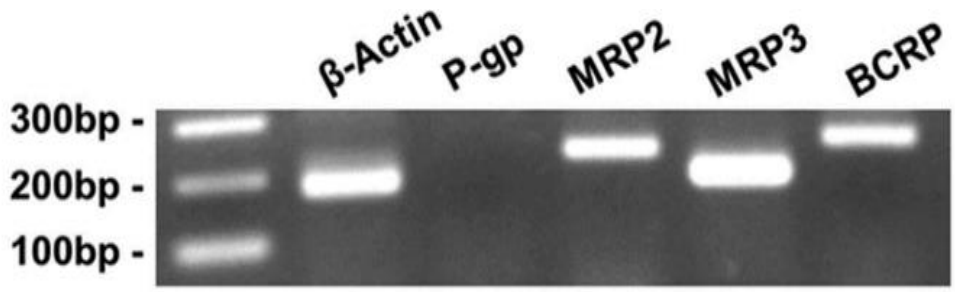


Fig. 2.9　mRNA expression of P-gp, MRP2, MRP3, and BCRP.

mRNA was determined by RT-PCR. *β*-actin was used as a housekeeping gene.

第 2　T98G 細胞における VPA 曝露による mRNA レベルの変動

T98G 細胞において発現が確認された MRP2、MRP3、ならびに BCRP について、VPA 曝露時の発現変動を評価した (Fig. 2.10)。

その結果、VPA 単独の曝露により、MRP2 および BCRP の発現量は有意に増大し、MRP3 の発現量はわずかに減少した。3-BrPA と VPA を 48 時間曝露させたとき、MRP2 および BCRP の発現量は有意に増大し、MRP3 の発現量はわずかに減少した。これらの増減は VPA 単独曝露と同程度であった。

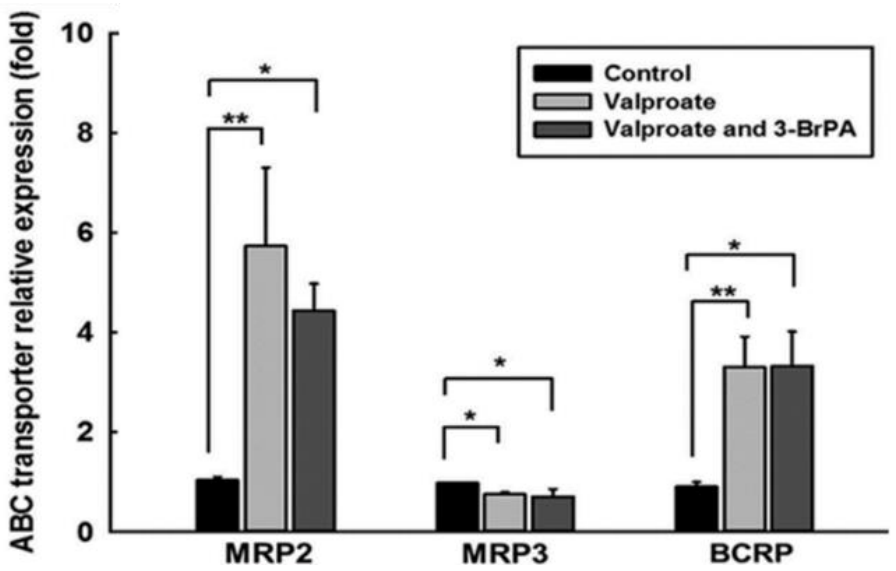


Fig. 2.10　Effects of 48-h incubation with valproate (5 mM) and 3-BrPA (100 μM) on ABC transporter mRNA levels.

Data represent the means with S.E. of three independent experiments.

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$

第 4 項　MRP2 および BCRP の阻害が、3-BrPA と VPA 併用時の細胞生存率に及ぼす影響

T98G 細胞において認められた 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、MRP2 ならびに BCRP の阻害が細胞生存率に及ぼす影響を検証することとした。

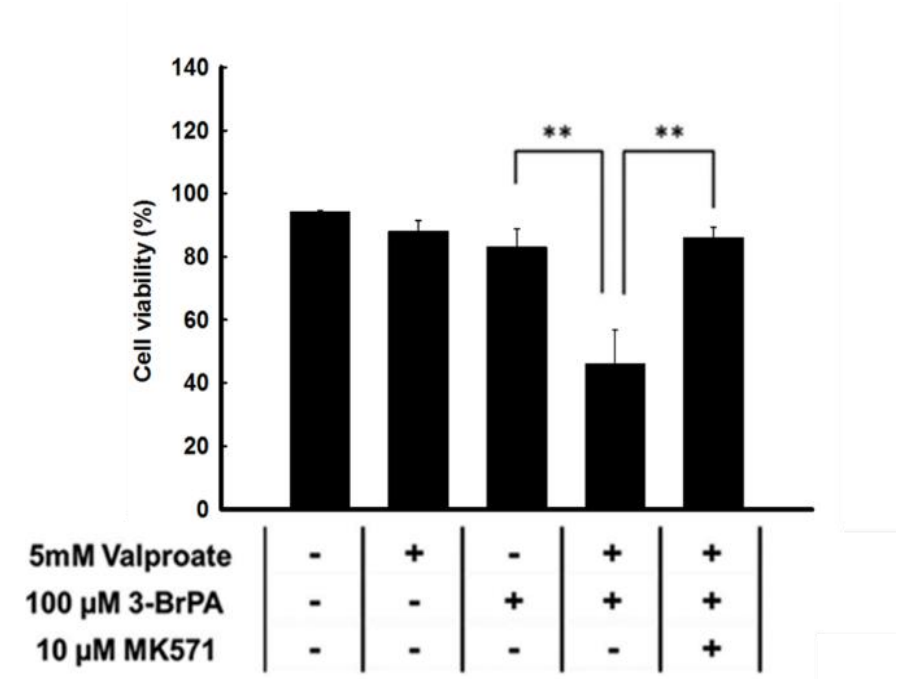
第 1　MK571 による MRP2 の阻害が細胞生存率に及ぼす影響

MRP の阻害剤として MK571 (10 μM) を使用した。3-BrPA と VPA を同時曝露すると、T98G 細胞の生存率は有意に低下し、さらに MK571 を併用することで、細胞生存率の低下は抑制された (Fig. 2.11A)

第 2　Ko143 による BCRP の阻害が細胞生存率に及ぼす影響

BCRP の阻害剤として Ko143 (10 μM) を使用した。3-BrPA と VPA を同時曝露すると、T98G 細胞の生存率は有意に低下し、さらに Ko143 を併用することで、細胞生存率の低下は抑制された (Fig. 2.11B)。

(A)



(B)

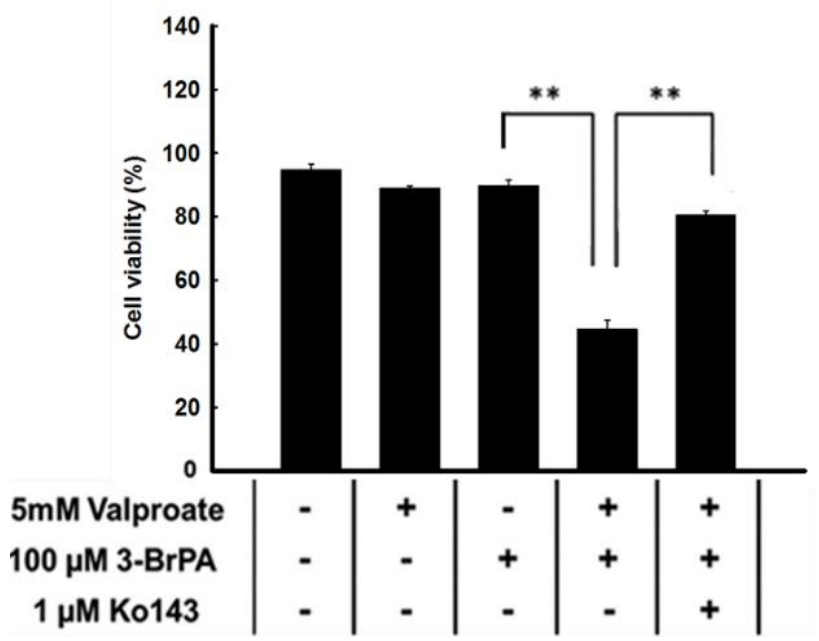


Fig. 2.11 Effects of MK571 (A) and Ko143 (B) on 3-BrPA- and valproate-induced reduction of cell viability in T98G cells.

T98G cells were cultured with 3-BrPA (100 μM) and valproate (5 mM) in the absence or presence of 10 μM MK571 or 1 μM Ko143. **; $p < 0.01$

第 5 項　MRP2 および BCRP の発現増大による細胞内 ATP 量の変化

MRP2 ならびに BCRP の発現増大と、3-BrPA ならびに VPA 併用による細胞生存率の低下に関連が認められたことから、MRP2 および BCRP の発現増大が細胞内 ATP 量に及ぼす影響を検証した。

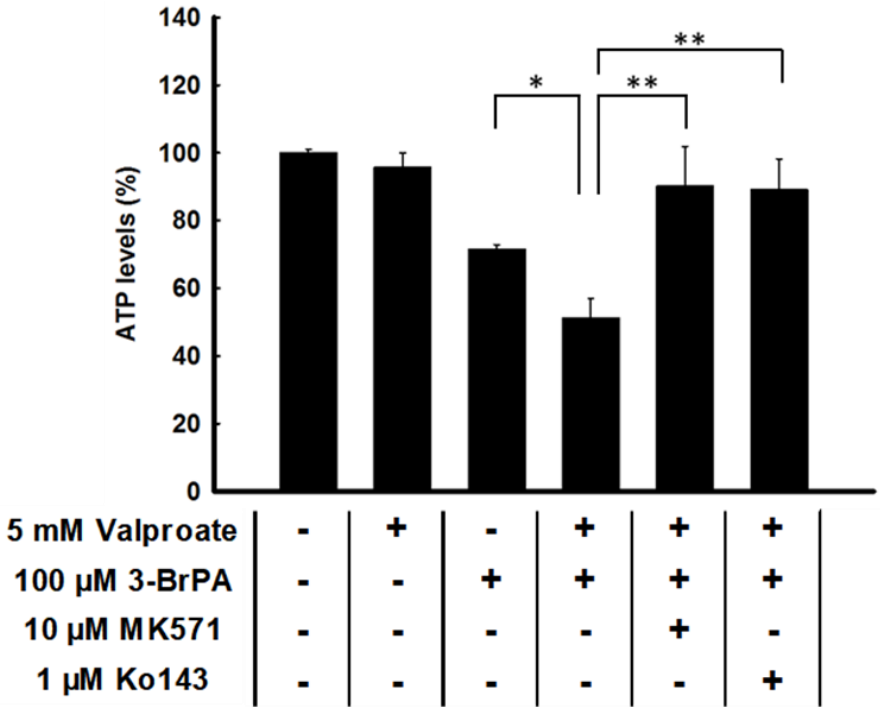


Fig. 2.12　Cellular ATP levels treated with 3-BrPA, VPA, and MK571 or Ko143.

T98G cells were cultured with 3-BrPA (100 μM) and valproate (5 mM) in the absence or presence of 10 μM MK571 (A) or 1 μM Ko143 (B) for 48 h. Data represents the means ± S.E. of four independent experiments. *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$

その結果、3-BrPA を単独曝露すると、細胞内 ATP 量は低下した。VPA と 3-BrPA を同時曝露させることにより、細胞内 ATP 量は顕著に低下した。さらに MK571 あるいは Ko143 を併用すると、細胞内 ATP 量の低下は抑制された (Fig. 2.12)。

第 4 節　考察

GBM は脳腫瘍の中で最も悪性の腫瘍であり、増殖能が高く化学療法への抵抗性を有するため、予後が極めて悪い。GBM を含め腫瘍細胞は、解糖系によるエネルギー産生経路をアップレギュレートしているため、解糖系を阻害することは抗悪性腫瘍の治療において重要かつ効果的な標的となる。

3-BrPA は、腫瘍細胞において亢進している解糖系を標的とすることから、腫瘍細胞特異的な効果が期待される薬剤である。また、抗腫瘍薬のなかには、その抗腫瘍効果を増大させるために、VPA のような異なる薬剤と組み合わせて相乗効果を求めるものがある。本検討にて GBM モデルとして使用した T98G 細胞において、VPA は 3-BrPA による抗腫瘍効果を増強させることを見出した (Fig. 2.4)。

3-BrPA 単独処理では細胞毒性は極めて小さい一方で、3-BrPA (0–100 μM) に VPA (5 mM) を併用すると、細胞生存率は顕著に低下した (Fig. 2.4)。3-BrPA は、低グルコース条件では強い細胞毒性を示すが、高グルコース条件では 3-BrPA の輸送担体である MCT1 の発現量が低下するため、3-BrPA の細胞毒性は極めて小さくなる [28]。本検討において、T98G 細胞は高グルコース条件で培養されており、既報と同様、3-BrPA (0-100 μM) 単独曝露による細胞毒性は極めて小さいことが示された (Fig. 2.3)。しかし、VPA を併用すると 3-BrPA の効果は、高グルコ

ース条件下においても強い細胞毒性を示した (Fig. 2.4)。

一方、VPA は 0.1–5 mM の濃度域で単独曝露させても、細胞毒性に影響を及ぼさなかった (Fig. 2.5)。100 μM 3-BrPA と VPA を併用した場合、VPA の濃度が 0.1 mM および 1 mM では細胞生存率に変化は認められなかったが、VPA の濃度が 5 mM の場合、細胞生存率の顕著な低下が認められた (Fig. 2.5)。これらの結果から、5 mM VPA と 100 μM 3-BrPA が *in vitro* の系において併用効果が最大となる濃度であることが示唆された。

さらに、3-BrPA (100 μM) および VPA (5 mM) を 48 時間同時曝露させた際の LDH レベル、ならびに 3-BrPA を 48 時間単独曝露させた際の LDH レベルは増大した (Fig. 2.6)。細胞毒性の結果もまた、細胞生存率の結果と同様、3-BrPA と VPA の組み合わせは、抗腫瘍効果を増大させる可能性を示した。

また、VPA (5 mM) を 48 時間曝露させた後、VPA を除去し、その後 3-BrPA (100 μM) を 48 時間曝露させても抗腫瘍効果の増大が認められなかった (Fig. 2.7)。VPA のプレトリートメントにより、クロマチンの構造維持関連タンパク質、DNA メチルトランスフェラーゼ、ならびにヘテロクロマチンタンパク質のダウンレギュレーションが起こることにより、クロマチンの脱凝縮が生じ、アントラサイクリン系の抗腫瘍薬であるエピルビシンの抗腫瘍効果を増大させることが報告されている [29]。本検討において、VPA をプレトリートメントすることにより、

VPA による 3-BrPA の抗腫瘍効果増大は認められないが、3-BrPA と同時に曝露させる場合において、3-BrPA の抗腫瘍効果を増大させる可能性が示された。VPA をプレトリートメントした際に、3-BrPA の抗腫瘍効果増大に関連する遺伝子が発現変動しているか否か検討する必要がある。

本知見は、3-BrPA と VPA の組み合わせが GBM 治療において良好な治療成績をもたらす可能性を示している。多くの *in vitro* 研究では、VPA の濃度を 1–10 mM に設定するため [7, 30, 31]、本研究における濃度設定は VPA による最大効果を検証するうえで適切であると考える。しかし、VPA 5 mM は臨床濃度を大きく上回っているため、臨床効果に関する考察は本研究の限界であり、更なる研究が必要である。VPA は様々な作用点を有するが、3-BrPA の抗腫瘍効果を増大させる VPA の作用に関して、その分子メカニズムが明らかになれば、5 mM VPA と同等の効果を得る治療薬の開発に有益な知見となる。

3-BrPA の細胞内蓄積量の増大と 3-BrPA の作用は相関するが [28]、3-BrPA を輸送する MCT1 の発現量ならびに 3-BrPA の細胞内蓄積量に変化は認められなかった (Fig. 2.8)。したがって、VPA による 3-BrPA の抗腫瘍効果促進は、MCT1 のアップレギュレーションに起因する 3-BrPA の細胞内蓄積量の増大とは別の機序によって引き起こされていることが示唆された。

P-gp 発現細胞に 3-BrPA を作用させると、細胞内 ATP の枯渇が促進され、高

い抗腫瘍作用を示すことが明らかになっている [27]。そこで、3-BrPA および VPA 併用時の細胞死と ABC トランスポーターとの関連を検証することとした。

T98G 細胞において MRP2、MRP3 および BCRP の発現が認められた (Fig. 2.9)。T98G 細胞において P-gp の発現が認められないことは、過去の報告と一致した [32, 33]。発現が確認された ABC トランスポーターのうち、VPA の曝露により、MRP2 と BCRP の発現が有意に増大した (Fig. 2.10)。3-BrPA と VPA を同時に添加した場合においても、MRP2 および BCRP の発現量は有意に増大し、VPA 単独曝露と同程度の増大が認められた (Fig. 2.10)。したがって、MRP2 ならびに BCRP の発現増大は、主に VPA の作用によるものであることが示唆された。

VPA は HDAC 阻害作用を有し、ヒストンの H3 をアセチル化することが報告されている [34]。Hauswald らは、VPA が HDAC 阻害作用によって、BCRP の発現増大を誘導することを報告している [35]。T98G 細胞における MRP2 および BCRP の発現増大が HDAC 阻害作用によるものであるかに関しては、更なる検討が必要であるが、本検討において VPA は HDAC 阻害剤として作用するのに十分な濃度であり、T98G 細胞においても VPA が HDAC 阻害剤として寄与している可能性が高い。

MRP2 ならびに BCRP の発現増大と 3-BrPA の抗腫瘍効果増大が関連するかを明らかにするため、MRP2 または BCRP を阻害した際の細胞生存率に及ぼす影

響を評価した (Fig. 2.11)。過去の報告に基づき [36]、本検討では、MK571 の濃度を 10 μM、Ko143 の濃度を 1 μM に設定し、それぞれ MRP の阻害剤ならびに BCRP の阻害剤として使用した。

VPA は 3-BrPA 誘因性細胞死を促進したが、MK571 あるいは Ko143 存在下において、細胞死の促進が有意に抑制されたことは、MRP2 および BCRP の発現増大が、3-BrPA 誘因性細胞死の促進に関与することを示唆した。

3-BrPA および VPA に MK571 を曝露した場合においても、Ko143 を曝露した場合においても、細胞生存率はコントロールレベルまで回復した (Fig. 2.11)。したがって本検討において、細胞生存率の回復レベルの違いから、MRP2 と BCRP の抗腫瘍効果増大に対する寄与の大きさに関する情報を得ることができなかった。その理由として、本検討で使用した MK571 ならびに Ko143 は、特異性が高い阻害剤ではないことが考えられる。MK571 ならびに Ko143 は、濃度を設定することで、各 ABC トランスポーターに対する選択的な阻害剤として使用することができるが、標的とした MRP2 ならびに BCRP 以外の ABC トランスポーターも阻害する可能性がある。そのため、MRP2 を阻害した場合においても、Ko143 を阻害した場合においても、細胞生存率はコントロールレベルまで回復し、MRP2 ならびに BCRP の抗腫瘍効果増大に対する寄与度は明らかにならなかったと考える。

MRP2 および BCRP の発現量が 3-BrPA の抗腫瘍効果増大と関連することが明らかとなったことから、3-BrPA と VPA の同時曝露による抗腫瘍効果増大は、3-BrPA による細胞内 ATP 枯渇作用に加えて、発現増大した MRP2 および BCRP が基質輸送によって ATP を消費することで、細胞内の ATP の消費が増加するためであると仮説を立て、細胞内の ATP 量を調べた (Fig. 2.12)。

T98G 細胞に 3-BrPA と VPA を曝露すると、細胞内の ATP レベルは 3-BrPA 単独曝露時より更に低下し、さらに MK571 または Ko143 の併用で細胞生存率は 3-BrPA 単独曝露時と同程度まで回復した。VPA 単独曝露において、MRP2 ならびに BCRP の発現が増大したものの、細胞内 ATP 量の低下は認められなかった。

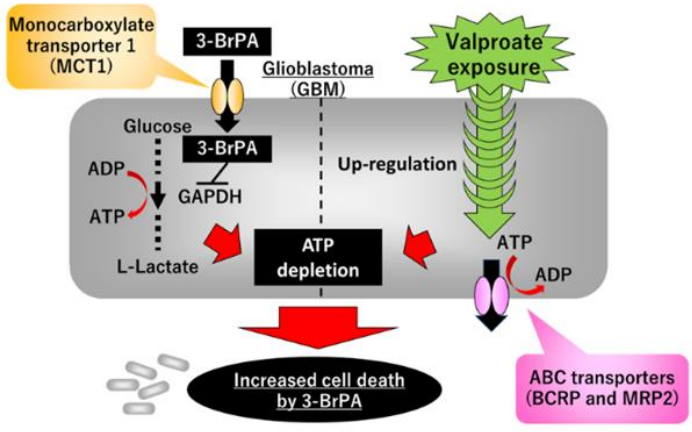
一方、3-BrPA と VPA を同時曝露すると、細胞内の ATP 量に顕著な低下が認められた。3-BrPA を細胞に曝露させると、細胞内において代謝物の組成が変化することが明らかとなっている [37]。これらの結果は、MRP2 ならびに BCRP が、3-BrPA の曝露によって生じた代謝物を基質として輸送し、ATP を消費した可能性を示唆している。

T98G 細胞において、3-BrPA に VPA を同時曝露させると、3-BrPA の ATP 枯渇作用に加えて、MRP2 および BCRP の基質輸送に起因する ATP の消費が増大し ATP が枯渇することで細胞死が増強することが機序である可能性が示された。

第 5 節　結論

本研究は、GBM において 3-BrPA 誘因性細胞死を VPA が促進することを示した。3-BrPA の細胞毒性は細胞蓄積量と相関するが、MCT1 の発現増大に起因する 3-BrPA の細胞内蓄積量増大は、その機序でないことを明らかにした。VPA は ABC トランスポーターである MRP2 および BCRP の発現量を増大させ、それら ABC トランスポーターによる ATP の消費が 3-BrPA 誘因性細胞死を促進している可能性が強く示唆された。

本研究では、VPA 曝露 48 時間時点にて検討を行っているが、臨床において VPA は長期に渡って投与されることが想定される。GBM に対する VPA の長期的な作用が 3-BrPA の抗腫瘍効果を促進させるか、更なる研究が必要とされる。本研究が、3-BrPA の実用化と GBM 治療の新規治療戦略の一助となることを期待する。



Ishiguro Y. et al. *Int. J. Pharm.*, 2018.

総括

本研究で得られた結果は以下のとおりである。

VPA の輸送に関する研究

T98G 細胞における VPA の取り込みには、プロトン依存性を有する単一のトランスポーターが寄与していた。T98G 細胞において、VPA の取り込みには MCT1、2、4、6 は寄与しない可能性が示されたが、Butyrate と同一のトランスポーターで輸送される可能性が示された。

VPA の有用性に関する研究

T98G 細胞において、VPA は 3-BrPA の濃度依存的に抗腫瘍効果を増大させた。T98G 細胞に VPA を曝露させると、3-BrPA の細胞内蓄積量は変化しなかったが、MRP2 および BCRP の mRNA レベルは増大した。VPA と 3-BrPA を同時曝露させた際に生じた細胞生存率の低下は、MK571 または Ko143 の併用により回復した。さらに、T98G 細胞において、VPA と 3-BrPA を同時曝露させた際に生じた細胞内 ATP レベルの低下は、MK571 または Ko143 の併用により回復した。VPA と 3-BrPA 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。

参考文献

[1] C. Adamson, O. Kanu, A. Mehta, C. Di, N. Lin, A. Mattox, D. Bigner, Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin. Invest. Drugs*, 18 (2009), pp. 1061-1083

[2] E.C. Holland. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat. Rev. Genet*., 2 (2001), pp. 120-129

[3] Report of Brain Tumor Registry of Japan (2001—2004), *Neurol. Med. Chir*. 54 (2004), pp. 1-102

[4] A. Kimura, K. Namekata, X. Guo, T. Noro, C. Harada, T. Harada. Valproic Acid Prevents NMDA-Induced Retinal Ganglion Cell Death via Stimulation of Neuronal TrkB Receptor Signaling. *Am. J. Pathol*. 185 (2015), pp. 756-764

[5] J.Y. Lee, H.S. Kim, H.Y. Choi, T.H. Oh, B.G. Ju, T.Y. Yune. Valproic acid attenuates blood-spinal cord barrier disruption by inhibiting matrix metalloprotease-9 activity and

improves functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurochem*. 121 (2012), pp. 818–829

[6] S. Fushida, J. Kinoshita, M. Kaji, K. Oyama, Y. Hirono, T. Tsukada, T. Fujimura, T. Ohta. Paclitaxel plus valproic acid versus paclitaxel alone as second- or third-line therapy for advanced gastric cancer: a randomized Phase II trial. *Drug Des. Devel. Ther*., 10 (2016), pp. 2353-2358

[7] C. Chang, J. Li, C. Wu, Y. Ou, W. Chen, Y. Kuan, W. Wang, C. Chen. Valproic acid sensitizes human glioma cells to Gefitinib-induced autophagy. *IUBMB Life*, 67 (2015), pp. 869–849

[8] M. Catalano, R. Poli, M. Pugliese, N. Fortunati, G. Boccuzzi. Valproic acid enhances tubulin acetylation and apoptotic activity of paclitaxel on anaplastic thyroid cancer cell lines. *Endocr. Relat. Cancer*, 14 (2007), pp. 839-845

[9] A.P.Halestrap. The SLC16 gene family – Structure, role and regulation in health and disease. *Mol Aspect Med*, 34 (2013), pp. 337-349

[10] Y. Ishiguro, A. Furugen, K. Narumi, A. Nishimura, T. Hirano, M. Kobayashi, K. Iseki. Valproic acid transport in the choriocarcinoma placenta cell line JEG-3 proceeds independently of the proton-dependent transporters MCT1 and MCT4. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 33 (2018), pp. 270–274

[11] H. Yabuuchi, I. Tamai, Y., Sai, A. Tsuji, Possible Role of Anion Exchanger AE2 as the Intestinal Monocarboxylic Acid/Anion Antiporter. *Pharm. Res.*, 15 (1998), pp. 411-416

[12] N. Vijay and M. E. Morris. Role of Monocarboxylate Transporters in Drug Delivery to the Brain. *Curr. Pharm. Des.*, 20 (2014), pp.1487–1498

[13] C. Rae, A.D. Fekete, M.A. Kashem, F.A. Nasrallah, S. Bröer. Metabolism, compartmentation, transport and production of acetate in the cortical brain tissue slice. *Neurochem. Res.*, 11 (2012), pp. 2541-2553

[14] M. Ideno, M. Kobayashi, S. Sasaki, Y. Futagi, K. Narumi, A. Furugen, K. Iseki. Involvement of monocarboxylate transporter 1 (SLC16A1) in the uptake of l-lactate in

human astrocytes. *Life Sci.*, 192 (2018), pp. 110-114

[15] S. Sasaki, Y. Futagi, M. Kobayashi, J. Ogura, K. Iseki. Functional characterization of 5-oxoproline transport via SLC16A1/MCT1. *J. Biol. Chem.*, 290 (4) (2015), pp. 2303-2311

[16] Y. Futagi, M. Kobayashi, K. Narumi, A. Furugen, K. Iseki. Identification of a selective inhibitor of human monocarboxylate transporter 4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 495 (2018), pp. 427-432

[17] R.S. Jones, M.D. Parker, M.E. Morris. Quercetin, Morin, Luteolin, and Phloretin Are Dietary Flavonoid Inhibitors of Monocarboxylate Transporter 6. *Mol. Pharm.*, 14 (2017), pp. 2930-2936

[18] Y. Murakami, N. Kohyama, Y. Kobayashi, M. Ohbayashi, H. Ohtani, Y. Sawada, T. Yamamoto. Functional characterization of human monocarboxylate transporter 6 (SLC16A5). *Drug Metab. Dispos.*, 33 (2005), pp. 1845-1851

[19] M.W. Bourassaa, I. Alim, S. J. Bultman. R.R. Ratana, Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? *Neuroscience Lett.*, 652 (2016), pp. 56-63

[20] M. Davidescu, L. Macchioni, G. Scaramozzino, M. Cristina Marchetti, G. Migliorati, R. Vitale, A. Corcelli, R. Roberti, E. Castigli, L. Corazzi. The energy blockers bromopyruvate and lonidamine lead GL15 glioblastoma cells to death by different p53-dependent routes. *Sci. Rep*., 5 (2015), 14343

[21] R. Wicks, J. Azadi, A. Mangraviti, I. Zhang, L. Hwang, A. Joshi, H. Bow, M. Hutt-Cabezas, K. Martin, M. Rudek, M. Zhao, H. Brem, B. Tyler. Local delivery of cancer-cell glycolytic inhibitors in high-grade glioma. *Neuro. Oncol.*, 17 (2015), pp. 70-80

[22] D. Chiasserini, M. Davidescu, P.L. Orvietani, F. Susta, L. Macchioni, M. Petricciuolo, E. Castigli, R. Roberti, L. Binaglia, L. Corazzi, 3-Bromopyruvate treatment induces alterations of metabolic and stress-related pathways in glioblastoma cells. *J. Proteomics*, 152 (2017), pp. 329-338

[23] G. Huberfeld, C.J. Vecht. Seizures and gliomas--towards a single therapeutic approach. Seizures and gliomas--towards a single therapeutic approach. *Nat. Rev. Neurol.*, 12 (2016), pp. 204-216

[24] M.S. van Breemen, E.B. Wilms, C.J. Vecht. Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management. *Lancet Neurol.*, 6 (2007), pp. 421-430

[25] Y. Ishiguro, M. Kobayashi, M. Ideno, K. Narumi, A. Furugen, K. Iseki, Valproate sensitizes human glioblastoma cells to 3-bromopyruvate-induced cytotoxicity. *Int. J. Pharm.*, 551 (2018), pp. 97–102

[26] K. Birsoy, T. Wang, R. Possemato, O. lmaz, C. Koch, W. Chen, A. Hutchins, Y. Gultekin, T. Peterson, J. Carette, T. Brummelkamp, C. Clish, D. Sabatini, MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors. *Nat. Genet.*, 45 (2013), pp. 104-108

[27] I. Sadowska-Bartosz, J. Grebowski, E. Kępka, M. Studzian, G. Bartosz, L. Pulaski. ABCB1-overexpressing MDCK-II cells are hypersensitive to 3-bromopyruvic acid. *Life*

Sci., 162 (2016), pp. 138-144

[28] M. Ideno, S. Sasaki, M. Kobayashi, Y. Futagi, K. Narumi, K. Iseki. Influence of high glucose state on bromopyruvate-induced cytotoxity by human colon cancer cell lines. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 31 (2016), pp. 67-72

[29] D.C. Marchion, E. Bicaku, A. I. Daud, D. M. Sullivan, P. N. Munster, Valproic Acid Alters Chromatin Structure by Regulation of Chromatin Modulation Proteins, *Cancer Res.*, 65 (2005), pp. 3815-3822

[30] K.A. van Nifterik, J. van den Berg, B.J. Slotman, M.V. Lafleur, P. Sminia, L.J. Stalpers. Valproic acid sensitizes human glioma cells for temozolomide and γ-radiation. *J. Neurooncol.*, 107 (2012), pp. 61-67

[31] Y.L. Chang, L.C. Huang, Y.C. Chen, Y.W. Wang, D.Y. Hueng, S.M. Huang. The synergistic effects of valproic acid and fluvastatin on apoptosis induction in glioblastoma multiforme cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol*., 92 (2017), pp. 155-163

[32] S. Choudhury, S. Karmakar, N. Banik, S. Ray. Valproic acid induced differentiation and potentiated efficacy of taxol and nanotaxol for controlling growth of human glioblastoma LN18 and T98G cells. *Neurochem. Res.*, 36 (2011), pp. 2292-2305

[33] T. Abe, K. Koike, T. Ohga, K. Kubo, M. Wada, K. Kohno, T. Mori, K. Hidaka, M. Kuwano, Chemosensitisation of spontaneous multidrug resistance by a 1,4-dihydropyridine analogue and verapamil in human glioma cell lines overexpressing MRP or MDRI. *Br. J. Cancer*, 72 (1995), pp. 418-423

[34] A. Chavez-Blanco, B. Segura-Pacheco, E. Perez-Cardenas, L. Taja-Chayeb, L. Cetina, M. Candelaria, D. Cantu, A. Gonzalez-Fierro, P. Garcia-Lopez, P. Zambrano, C. Perez-Plasencia, G.Cabrera, C. Trejo-Becerril, E. Angeles, A. Duenas-Gonzalez, Histone acetylation and histone deacetylase activity of magnesium valproate in tumor and peripheral blood of patients with cervical cancer. A phase I study. *Mol. Cancer*, 22 (2005)

[35] S. Hauswald, J. Duque-Afonso, M.M. Wagner, F.M. Schertl, M. Lübbert, C. Peschel, U. Keller, T. Licht. Histone deacetylase inhibitors induce a very broad, pleiotropic anticancer drug resistance phenotype in acute myeloid leukemia cells by modulation of

multiple ABC transporter genes. *Clin. Cancer Res*., 15 (2009), pp. 3705-3715

[36] P. Matsson, J. Pedersen, U. Norinder, C. Bergstrom, P. Artursson. Identification of Novel Specific and General Inhibitors of the Three Major Human ATP-Binding Cassette Transporters P-gp, BCRP and MRP2. *Pharm. Res*., 26 (2009), pp. 1816-1831

[37] D. Chiasserini, M. Davidescu, PL. Orvietani, F. Susta, L. Macchioni, M. Petricciuolo, E. Castigli, R. Roberti, L. Binaglia, L. Corazzi, 3-Bromopyruvate treatment induces alterations of metabolic and stress-related pathways in glioblastoma cells. *J. Proteomics.*, (2017), pp. 329–338

謝辞

指導教官として本研究を実施する機会を与えていただき、その遂行にあたって終始ご懇切なるご指導・ご鞭撻を賜りました　北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室　井関　健教授に謹んで深謝いたします。

また、本論文の副査としてご助言をいただくとともに本論文の細部にわたりご指導いただいた北海道大学大学院薬学研究院臨床薬物動態解析学研究室　菅原　満教授、同研究室　武隈　洋准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり直接のご指導をいただき、本論文作成においては副査としてご指導を賜りました北海道大学病院薬剤部　小林　正紀准教授に謹んで深謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり有益なご指導、ご助言をいただきました北海道大学大学院臨床薬剤学研究室　鳴海　克哉助教、同研究室　古堅　彩子助教、北海道大学病院薬剤部　山田　武宏准教授に感謝申し上げます。日頃より有益なご討論、ご助言をいただいた北海道大学臨床薬剤学研究室の各位に感謝申し上げます。

最後に、4 年間の大学院生活を支え見守ってくれた家族に感謝いたします。

2019 年 3 月