

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	脳神経科学領域 神経・脳代謝制御学教育研究分野 氏名 佐々木綾子
<p>(論文題目)</p> <p>Uptake of a fluorescent L-glucose derivative 2-NBDLG into three-dimensionally accumulating insulinoma cells in a phloretin-sensitive manner (三次元的に集積したインスリノーマ細胞への蛍光 L-グルコース誘導体 2-NBDLG のフロレチン感受性取り込み)</p>	
<p>(内容の要旨：和文で 2,000 字程度)</p> <p>生物の重要なエネルギー源 D-グルコースに緑色蛍光基 NBD を結合した 2-NBDG は、ほ乳動物細胞のグルコーストランスポーター GLUT を介して D-グルコースと同様のキネティクスで細胞内に取り込まれることから、D-グルコーストレーサーとして広く使用されている(Yamada 他 Nat Protoc. 2007)。海外ではがんの疑いのあるヒトの生検組織にも適用され、診断への応用が期待されている。しかし、2-NBDG は損傷細胞にも取り込まれる上、蛍光計測は相対値のみを与える為、定量化には対照が必要である。</p> <p>そこで自然界に存在しない L-グルコースを NBD で標識した 2-NBDLG が教室で開発された(Yamamoto 他 Tetrahedron Lett. 2008; Yamada 他 2015 日米欧特許登録)。GLUT に認識されない L-グルコースを母核とする 2-NBDLG は正常細胞に取り込まれないと予想されたが、実際に正常神経細胞に適用すると、2-NBDG は取り込まれたが、その鏡像異性体 2-NBDLG は取り込まれなかった。一方、損傷した神経細胞には 2-NBDLG が取りこまれた。従って、2-NBDG の取り込みと 2-NBDLG の取り込みを比較することにより、GLUT を介する取り込みおよび膜損傷の評価が可能になると考えられた(副論文：Yamamoto 他 Bioorg Med Chem Lett. 2011)。</p> <p>しかし、2-NBDLG は 2-NBDG と蛍光色が同一で、両者を同じ細胞に使用すると区別できない。そこで、二つのストラテジーを導入した。まず、2-NBDG と蛍光色の異なる赤色の大型蛍光基 Texas Red を L-グルコースに結合することで細胞膜不透過性とした誘導体 2-TRLG を開発した。2-TRLG を 2-NBDG、あるいは 2-NBDLG と混合して神経細胞に適用した結果、正常神経細胞には、D 型で緑色の 2-NBDG が取り込まれ L 型で赤色の 2-TRLG は取り込まれず、細胞は緑色に光った。一方、損傷神経細胞には、緑色の 2-NBDLG と赤色の 2-TRLG が共に取り込まれて黄色の合成色を示し、損傷による取り込みの発生を裏付けた。従って、2-TRLG は、2-NBDG の GLUT を介する取り込みを評価する際、膜損傷による取り込みでないことを示す上で有効と考えられた (Yamamoto 他 <i>ibid</i>)。</p> <p>一方、第二のストラテジーとして、96 穴マルチウエルディッシュで同一種の細胞を多量に培養し、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて 2-NBDG の取り込みと 2-NBDLG の取り込みを直接統計的に比較する実験系を構築した。細胞にはマウスインスリノーマ細胞 MIN6 を選んだ。結果は予想外にも MIN6 細胞が D 型である 2-NBDG のみならず、L 型である 2-NBDLG も、D 型の 40%程度取り込むことを示唆した。</p> <p>共焦点顕微鏡解析の結果、2-NBDLG は MIN6 細胞が立体的に増殖して大小不同の核態様や細胞形態を示す細胞塊(スフェロイド)を形成した段階で、一部の細胞内に</p>	

取り込まれた。こうした特徴は、がんの悪性度を示す重要な指標でもあることから、当初目的としていた「D型の2-NBDGのGLUTを介する取り込みの評価」から、「L型の2-NBDLGのがん細胞への取り込みの解析」に目標を変更した。

2-NBDLGを2-TRLGと混合してMIN6細胞スフェロイドに適用した結果、スフェロイドの中心部では2-NBDLGと共に2-TRLGが取り込まれ、非特異的取り込みの発生が裏付けられたが、中心部を囲むドーナツ状の周辺領域では、2-TRLGを取り込まず2-NBDLGを選択的に取り込む細胞が認められた。ただし、2-NBDLGを取り込むスフェロイドの事前予測は難しく、また、2週間程度をかけて2-NBDLGを取り込む状態に至ったスフェロイドは数時間のうちに崩壊し、更なる解析は困難を極めた。

そこで、蛍光マイクロプレートリーダーを用いた統計解析を実施した。哺乳動物細胞のグルコーストランスポーターには、GLUTの他、Na<sup>+</sup>イオンとグルコースを共輸送により取り込むSGLT類があり、前者はサイトカラシンBを低濃度で短時間作用させることで選択的に阻害され、後者はNa<sup>+</sup>-free条件で阻害される。実験の結果、2-NBDLGのMIN6細胞内への取り込みは、サイトカラシンBによってもNa<sup>+</sup>-free条件によってもほとんど阻害されず、未知の機構の関与が疑われた。

興味深いことに、2-NBDLGのMIN6への輸送は、リンゴやサクラの樹皮に多量に含まれ、GLUTの他、水チャネル等種々の輸送機構を広範に阻害するフロレチンにより強く阻害された。更に、2-NBDLGの取り込みは、大過剰のL-グルコースやD-グルコースにより競合的に阻害されなかった。従って、L-グルコース誘導体である2-NBDLGのがん細胞株MIN6への取り込みは、フロレチン感受性で、かつ競合阻害を伴わない例えばチャネル様機構を介している可能性が示唆された (Sasaki 他 Human Cell 2015)。

2-NBDLGのようなL-グルコース誘導体は、GLUTとの相互作用が小さく、非がん細胞への取り込みや副作用を低減できるものと期待され、現在臨床試験が進められている。今後、2-NBDLGの細胞内運命や輸送の分子機構を明らかにする更なる研究が求められる。