

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	機能再建・再生科学領域運動機能病態修復学教育研究分野 氏名 小川哲也
<p>(論文題目)</p> <p>Uptake of fluorescent D- and L-glucose analogues, 2-NBDG and 2-NBDLG, into human osteosarcoma U2OS cells in a phloretin-inhibitable manner (ヒト骨肉腫 U2OS 細胞への蛍光 D-および L-グルコース, 2-NBDG および 2-NBDLG のフロレチン阻害性取り込み)</p>	
<p>(内容の要旨) (2000 字程度)</p> <p><b>【緒論】</b></p> <p>グルコースには D 体とその鏡像異性体である L 体があるが、生物は専ら D 体のみをエネルギー源・炭素源として細胞内に取り込み利用する。特に哺乳動物細胞は、D 体すなわち D-グルコースをグルコーストランスポーター GLUT および Na<sup>+</sup>イオンと共輸送する SGLT を介して細胞内に取り込むことが知られる。このような D-グルコースの細胞内への取り込みの研究には、放射性標識 D-グルコース誘導体が使われているが、低い空間解能と放射線被曝に難点がある。これに対して、蛍光標識 D-グルコース誘導体を利用するのも一つの方法である。我々は D-グルコースの 2 位に蛍光基 NBD を付加した 2-[N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) が単一細胞のグルコース取り込みをモニターする上で有効である事を示し、2-NBDG は世界で広く使用されている (Yamada et al, Nat Protoc 2007)。しかし、細胞内への D-グルコースの取り込みには様々な経路の関与が考え得るため、L-グルコースの 2 位に NBD を結合した 2-NBDLG を陰性対照として開発した。通常のマウスインスリノーマ MIN6 に適用したところ、2-NBDLG は 2-NBDG と比較してわずかな取り込みしか示さなかったが、驚いたことに、立体的に集積し、核異型を示すごく一部の MIN6 細胞に 2-NBDLG を強く取り込む例を認めた (Sasaki et al, Hum Cell 2016)。この取り込みは、りんごポリフェノールフロリジンのアグリコンであるフロレチンにより消失したことから、特異的な取り込みと推定されたが、その後、同様の 2-NBDLG の取り込みを示すセルラインを見出すことができなかった。今回、2-NBDLG がヒト骨肉腫 U2OS 細胞に取り込まれ、この取り込みがフロレチンで阻害されることを見出したので報告する。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>U2OS への 2-NBDLG の取り込みは、細胞単位でのリアルタイムイメージングが可能な共焦点顕微鏡を用いた灌流法 (Yamada 2007) と、多数の細胞を用いた薬理的評価が容易な蛍光マイクロプレートリーダーを用いた樹立済みの方法 (Sasaki 2016) で解析した。U2OS 細胞は公知の方法で培養し、2-NBDG を対照として用いた。特に断らない限り 2-NBDLG/2-NBDG は終濃度 200 μM で 5.6 mM D-グルコースを含む Krebs-Ringer バッファーに溶解し、37 °C で細胞に適用した。Gap 結合/Hemichannel を介した取り込みを除外するためカルベノキソロンを全実験で添加し、食作用やインターナリゼーションによる非特異取り込みを除外する為、投与時間は最大でも 15 分以内とした。その他、非特異取り込みの発生した細胞は、電荷をもつ巨大蛍光基 Texas Red を結合した細胞膜不透過性の L-グルコース誘導体 2-TRLG を同時に使用することで同定し、検討から除外した。</p> <p><b>【結果】</b></p> <p>共焦点顕微鏡実験において、U2OS 細胞の蛍光強度は、2-NBDG の投与前後のみならず、2-NBDLG の投与前後でも平均強度が 2 倍以上と有意な増加を示した。3 回の独立した実験の平均は、2-NBDLG の細胞内への取り込みが 2-NBDG の取り込みの 81.1 ± 9.8 % (mean ± SD, p &lt; 0.05, unpaired t-test) となり、わずかに小さかった。2-NBDLG の投与によ</p>	

る U2OS 細胞の蛍光強度の有意な増加は、蛍光マイクロプレートリーダーを用いた実験でも同様に確認された。3 回の独立した実験の平均は、2-NBDLG の細胞内への取り込みが 2-NBDG の取り込みの  $78.7 \pm 2.0\%$  ( $p < 0.0001$ ) で共焦点顕微鏡の結果とよく符号した。

そこで、取り込みの薬理的性質について更に検討を加えた。GLUT の特異的阻害薬サイトカラシン B ( $10 \mu\text{M}$ ) は、2-NBDG の取り込みを  $84.6 \pm 24.2\%$  まで有意に阻害したのに対して ( $p < 0.005$ )、サイトカラシン B は 2-NBDLG の取り込みには有効でなかった。2 回の独立した実験を行ったところ、2-NBDG の取り込みはサイトカラシン B 存在下において非存在下の平均  $77.5 \pm 10.1\%$  であったのに対し、2-NBDLG の取り込みは平均  $99.2 \pm 9.0\%$  であった。また、SGLT 阻害薬フロリジン ( $150 \mu\text{M}$ ) は、2-NBDG および 2-NBDLG いずれの取り込みも阻害しなかった。このことから、2-NBDLG の U2OS 細胞への取り込みには GLUT や SGLT 以外の機構が関与する可能性が示唆される。この仮説に一致して、大過剰 ( $50 \text{ mM}$ ) の D-グルコースは 2-NBDG の U2OS 細胞内への取り込みをわずかながら有意に阻害したのに対し ( $p = 0.011$ )、2-NBDLG の U2OS 細胞内への取り込みにはこのような有意な取り込み阻害を認めなかった ( $p = 0.509$ )。また、大過剰 ( $50 \text{ mM}$ ) の L-グルコースも、2-NBDG および 2-NBDLG の取り込みに影響しなかった。以上の結果は、2-NBDLG の U2OS 細胞への取り込みに、非 GLUT/非 SGLT、恐らく輸送タンパクへの基質の結合を必要としない非トランスポーター型の機構が関与しているという仮説を支持する。

MIN6 細胞内への 2-NBDLG の取り込みは、GLUT や水チャネルなど多様な膜輸送を阻害するフロレチン ( $150 \mu\text{M}$ ) によりほぼ消失した。そこで、U2OS 細胞についてもフロレチンの効果を調べたところ、フロレチン存在下では非存在下と比較して 2-NBDLG の取り込みが有意 ( $p < 0.0001$ ) に減弱した。3 回の独立した実験を行い、フロレチン非存在下の 2-NBDG の取り込みを対照として相対比で評価すると、2-NBDLG を投与した場合は平均  $28.9 \pm 1.1\%$  ( $p < 0.0001$ )、2-NBDG を投与した場合は平均  $26.0 \pm 0.4\%$  ( $p < 0.0001$ ) となり、フロレチンにより 2-NBDLG、2-NBDG いずれの取り込みもほぼ同様の低いレベルにまで大きく減弱した。

#### 【考察】

当グループは、マウスのインスリノーマに由来し、大小不同の核異型を呈する MIN6 細胞の一部が、蛍光標識 L-グルコース誘導体 2-NBDLG をフロレチンで阻害される経路を介して細胞内に豊富に取り込むこと、この取り込みは 2-NBDLG と 2-NBDG を区別しない非立体選択的な取り込みであることを以前報告した (Sasaki 2016)。2-NBDLG は、発癌物質の持続投与によりがんを自然発症したハムスターの胆管に *in vivo* で適用した場合も、病理組織像とよく対応した取り込みを示したが (Yokoyama et al, Hum Cell 2016)、これまで市販セルラインで同様の取り込みを示す例を見出せなかった。今回、種も組織も異なるヒトの骨肉腫に由来し、広く利用されている U2OS 細胞にも、フロレチンで特異的に阻害される経路を介した 2-NBDLG の取り込みが認められることを初めて示した。

一方、両者には違いもある。マウスインスリノーマ MIN6 細胞に対する 2-NBDLG 取り込みは、2-NBDG の取り込みの 40-50% であったのに対して、今回 U2OS 細胞ではおよそ 80% と大きかった。2-NBDLG は、立体的に成長した MIN6 細胞塊のごく一部が取り込むことから、腫瘍セルラインに 2-NBDLG を取り込む細胞のサブポピュレーションが含まれており、このような細胞の割合が MIN6 と U2OS で異なる可能性もある。一部のがん幹細胞が発達して悪性腫瘍が形成されるという考え方もあり、2-NBDLG がそのような細胞のマーカーとなりうるか興味深い。その意味でも 2-NBDLG が細胞内に取り込まれる分子機構を明らかにすることは重要である。グルコースの悪性腫瘍への取り込みに、従来知られていなかった未知の非トランスポーター型輸送機構が関与するとすれば、診断や治療の新たな標的となる可能性もあり、さらなる研究の結果が期待される。