

Title	Hypoxia Up-Regulates Amino Acid Transport in a Human Neuroblastoma Cell Line
Author(s)	曹, 英樹
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48926">https://hdl.handle.net/11094/48926</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	曹 英 樹
博士の専攻分野の名称	博士 (医 学)
学位記番号	第 2 1 4 6 4 号
学位授与年月日	平成 19 年 4 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Hypoxia Up-Regulates Amino Acid Transport in a Human Neuroblastoma Cell Line (ヒト神経芽細胞腫 cell line において、低酸素状態でアミノ酸トランスポート活性は上昇する)
論文審査委員	(主査) 教授 福澤 正洋  (副査) 教授 大菌 恵一 教授 宮崎 純一

#### 論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕 小児腫瘍の増殖速度は成人の腫瘍と比較してはるかに大きい。この活発な細胞増殖を支えるために、腫瘍細胞は機能的なアミノ酸トランスポートシステムによりアミノ酸を細胞内に取り込むことで、核酸及びタンパクの合成、エネルギー産生を維持する。一方、固形腫瘍の中心部では一般に血流が乏しく、その結果酸素の供給が制限され低酸素状態に陥る。その条件下においても、一部の細胞は生存し増殖することが可能である。そのメカニズムを解明する目的で、われわれは小児悪性固形腫瘍のひとつである神経芽細胞腫細胞において、低酸素下での腫瘍細胞増殖のメカニズムをアミノ酸細胞膜トランスポートの面から検討した。

〔方法〕 ヒト神経芽細胞腫 cell line として SK-N-SH を用いた。37°C、5% CO<sub>2</sub>-95% air の条件下で 10% FBS、2 mM グルタミンを含む DMEM を培養液として細胞培養をおこなった。低酸素モデルは、培養条件を低酸素状態 (1% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>-94% N<sub>2</sub>) 下にすることで作成した。細胞が 100% confluent になった段階で低酸素状態とし、0、8、16、24 時間後にグルタミン (Gln: System ASC)、グルタミン酸 (Glu: System X-AG) およびロイシン (Leu: System L) の細胞膜トランスポートを測定した。アミノ酸トランスポートは <sup>3</sup>H-アミノ酸を用いて Gazzola の方法によって、蛋白は BCA 法により測定した。また、8 時間、16 時間低酸素条件にしたときの DNA および蛋白の合成能 (<sup>3</sup>H-thymidine and <sup>3</sup>H-leucone incorporation) を測定した。

〔成績〕 細胞膜アミノ酸トランスポートは、8 時間低酸素では control (Gln 937±87、Glu 104±23、Leu 1016±107 pmol/mg protein/min) に比し有意の変化を認めなかったが、16 時間低酸素で Gln 1008±32、Glu 92±30、Leu 1355±42 pmol/mg protein/min、24 時間低酸素で Gln 1167±111、Glu 119±19、Leu 1321±110 pmol/mg protein/min と、Gln、Leu で有意に上昇した (p<0.01)。Glu では変化を認めなかった。アミノ酸トランスポートの kinetics を検討したところ、Gln および Leu トランスポートにおいて、transport affinity (Km) は変化を認めなかったが、maximum transport velocity (Vmax) が有意に増加した (p<0.01)。これは、低酸素下での Gln および Leu トランスポートの上昇は、細胞膜アミノ酸トランスポーターの数の増加によることが明らかとなった。次に、培養液中に RNA 合成阻害剤 actinomycin D (0.4 μM) および蛋白合成阻害剤 cycloheximide (10 μM) を投与し、24 時間低酸素状態後の Gln および Leu トランスポートを測定した。その結果、低酸素によって誘導される Gln および Leu トランスポートの up-regulation は、これらの投与により有意に抑制され、ほぼ control のレベルまで低下した (p<0.01)。

DNA および蛋白合成は、8時間低酸素でそれぞれ  $84.0 \pm 4.5$ 、 $72.8 \pm 7.4\%$  control、16時間低酸素で  $60.3 \pm 4.4$ 、 $57.6 \pm 2.1\%$  control と、いずれも有意に低下した ( $p < 0.01$ )。最後に、SK-N-SH の細胞特異性を調べる目的で、他の神経芽細胞腫 cell line である NB-1 細胞において同様の検討を行ったところ、SK-N-SH と同様に、8時間の低酸素で Leu、Gln トランスポートは control に比し有意に上昇し ( $p < 0.01$ )、Glu トランスポートは有意の変化を示さなかった。

〔総括〕ヒト神経芽細胞腫 cell line、SK-N-SH において、低酸素下でアミノ酸トランスポートは up-regulation することが明らかとなった。これが、低酸素下での固形腫瘍の生存と増殖に関与するメカニズムの一つである可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、小児固形腫瘍である神経芽腫細胞を用い、その増殖メカニズムを細胞膜アミノ酸トランスポートの面から解明しようとしている。

固形腫瘍の中心部は低酸素の条件でもあるが腫瘍細胞はそれでも増殖している。その増殖を維持するメカニズムの一つとしてアミノ酸トランスポートシステムに注目した。

実験的に低酸素条件で腫瘍細胞を培養した後、アミノ酸トランスポート活性を測定し、これが upregulate されることを証明した。

またその upregulate のメカニズムは、それぞれのシステムの親和性ではなく、アミノ酸と輸送蛋白の数を増やすことによって起こされていることが解明された。

これらの upregulation は RNA 合成阻害剤、蛋白合成阻害剤で抑制されることがわかった。

以上により、本研究によりヒト神経芽細胞腫 cell line、SK-N-SH において、低酸素下でアミノ酸トランスポートは up-regulation することが明らかになった。本研究の結果は低酸素下での固形腫瘍の生存と増殖に関与するメカニズムの一つである可能性を示したもので、学位の授与に値すると考える。