

ヒト由来骨肉腫細胞の転移能における グルタチオン合成制御系の役割

久住亮介*[§] 加藤成祥* 白井綾樹*
柿原奈保子* 佐藤英世*

I. 研究の概要

【背景および目的】

x_c-系は哺乳類細胞の細胞膜上に発現するアミノ酸輸送体であり、細胞外のシスチンと細胞内のグルタミン酸とを 1:1 で交換輸送する機能を持つ。このアミノ酸輸送機能は xCT という構成タンパクが担っており、細胞内に取り込まれたシスチンはシステインへ還元され、細胞内の主要な抗酸化物質の 1 つである還元型グルタチオン (GSH) 合成に利用されることで細胞内 GSH レベルが維持されている。細胞内の GSH が枯渇すると細胞死が起きることから xCT は酸化ストレスからの細胞保護に重要と考えられている。近年多くの癌細胞で xCT が高発現していることが明らかとなり、癌の転移に関連するという報告もされ始めてきたが、特にヒト由来の癌細胞における影響は不明な部分が多い。そこで本研究ではヒト骨肉腫由来細胞株で、低転移性と高転移性を示すことが知られている HOS および 143B を用いて、xCT および GSH の動態がヒト由来の癌細胞の転移に与える影響を明らかにすることを目的として解析を行った。

【方 法】

・細胞内 GSH 測定

酵素リサイクリング法により 30 秒と 5 分での吸光度 (412 nm) を測定した。細胞内 GSH 量は細胞タンパク mg あたりの量 (n mol/mg protein) で表した。

・シスチン取り込み活性測定

細胞に uptake 液 (PBS (+) に [¹⁴C] でラベルした 0.1 μCi/mL Cyss と未標識の 5 mM Cyss (終濃度 0.05 mM) の混合液) を加え、2 分放置した後、¹⁴C-Cyss の取り込み活性をシンチレーションカウンターで測定した。

・浸潤能の測定

トランスウェルを用い、上層のウェルに 0.2 mg/mL の条件で調製した Matrigel[®] をコートし、その上に細胞を播種し、下層のウェルには血清等の誘引物質を入れた。下層に移動できた細胞の個数を数え、浸潤能を評価した。

・スフェロイド形成能の測定

96 穴 U 字プレートによりスフェロイドを作製し、CellTiter-Glo[®] 3D Cell Viability Assay kit を用いて ATP 量を測定することでスフェロイド形成能を評価した。

【結 果】

通常の培養条件では 143B の方が HOS よりも

* 新潟大学大学院保険学研究科 [§] b23c504h@mail.cc.niigata-u.ac.jp

細胞内 GSH 量が有意に多かったが、シスチンの細胞内取り込み活性に有意な差は認められなかった。一方 xCT の誘導剤であるジエチルマレイン酸 (DEM) を添加すると両細胞ともシスチンの取り込み活性は上昇したが、その上昇は 143B の方が大きかった。この時、細胞内 GSH 量も 143B の方が有意に高かった。マトリゲルを用いた浸潤アッセイでは、通常の培養条件下において 143B の浸潤能は HOS よりも僅かに高い程度であったが、DEM 存在下では 143B の浸潤能は HOS よりも有意に増大した。しかし、GSH 合成の阻害剤であるブチオニンスルホキシミン (BSO) 存在下では、両細胞株とも通常状態と比較して差はなかった。3 次元培養モデルであるスフェロイドの形成能評価では、通常の培養条件において 143B の方が HOS よりもスフェロイド形成能が高かった。また、スフェロイド形成能は DEM 存在下で上昇し、BSO 存在下で低下した。

【考 察】

DEM による細胞内 GSH やシスチン取り込みの増加は HOS よりも 143B で大きく、DEM による xCT の誘導刺激に対する応答性が 143B で高いことがわかった。浸潤能は HOS よりも 143B で高い傾向にあり、両細胞株とも DEM を加えると浸潤能が増加したが、BSO を加えた条件下では通常状態と同程度であったことから、DEM により誘導された xCT が細胞外微小環境の形成などを通して浸潤能に影響を与えた可能性が示唆された。スフェロイド形成能は HOS よりも 143B で高く、両細胞株のスフェロイド形成能とも DEM 存在下で増加し、BSO 存在下で減少したことから、細胞内 GSH 量とスフェロイド形成能の

間には正の相関があることが示唆された。これらのことから xCT のような GSH 合成制御系の誘導刺激に対する応答性が高いことが浸潤能やスフェロイド形成能の上昇を通して 143B の高転移能に寄与している可能性が示唆された。

II. 受賞の感想

この度、第 18 回日本臨床検査学教育学会学術大会におきまして優秀発表賞受賞の榮譽にあずかりました。誠にありがとうございます。これまで研究してきた内容がこのような形で結果に結びついたことを嬉しく思っております。今回の受賞に際し、ご指導いただきました佐藤先生をはじめ、共同研究者の皆様、学会発表の機会を与えて下さった皆様には心より感謝申し上げます。これを励みに今後一層の努力を重ねて研究を深めて参りたいと思います。

III. 将来への抱負

今回の学会のテーマは「多様化する医療現場を見据えた知技の学び」であり、様々な教育についての発表がありました。私は社会人大学院生で、日中は大学病院で検査技師として働いています。大学病院は医療人養成のための教育機関としての側面もあり、これら発表から得た刺激、アイデアを今後の教育活動に活かしていきたいです。また、大学院での活動を通して自らが卒後教育の 1 つのロールモデルを示すことで、検査技師の幅広い活躍に繋がるのではないかと考えています。様々な教育の在り方を通して医療の未来に貢献していければと思っています。