

氏名	よしだ かよこ 吉田 佳代子
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士甲第 4834 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	細胞内糖代謝に対するエベロリムスの影響に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 望月 眞弓 (医学博士) (副査) 教授 杉本 芳一 (薬学博士) 教授 三澤 日出巳 (博士(薬学))

論文内容の要旨

【背景】

エベロリムス(EVE)は抗がん薬及び移植時の免疫抑制薬として用いられている。細胞内 FK506 結合タンパク質 12(FKBP12)と複合体を形成した EVE は、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ(PI3K)/Akt 経路の下流に位置する哺乳類標的ラパマイシン蛋白(mammalian target of rapamycin: mTOR)を阻害する。EVE は mTOR 複合体のうち mTORC1 を選択的に阻害することでがん細胞の生存および増殖を抑えることから、本邦では乳癌、腎細胞癌、神経内分泌腫、結節性硬化症に伴う腎血管筋脂肪腫及び上衣下巨細胞性星細胞腫の治療に用いられている。

EVE の特徴的な副作用には間質性肺炎、感染症、口内炎、皮膚障害、脂質異常症そして高血糖及び糖尿病がある。その中で高血糖及び糖尿病は自覚症状が乏しい副作用であり、初期兆候の発見が難しい。また、発症時の治療として用いる糖尿病治療薬により、本来のがん治療におけるリスク以外に低血糖リスクも付加されることとなる。従って、EVE 起因性の高血糖発現機序を解明することが、今後効果的な予防及び治療を検討する上で必要である。

本研究では、検討 1 において EVE による細胞内代謝の変動を網羅的に研究する手法としてメタボローム解析法を確立した。また、インスリン非存在下での糖代謝に対する EVE の影響について新たな知見を得ることを目的として、糖尿病の基礎研究に汎用されているマウス筋管細胞を用い、検討 2 では EVE を単一時間(48h)曝露した際の細胞内糖代謝変動について、検討 3 では EVE 曝露後 72h までの経時的な細胞内糖代謝変動について、それぞれ網羅的メタボローム解析を行った。

検討 1：網羅的メタボローム解析実験系の確立

検討 1 では、培養細胞に EVE を曝露したときの影響について網羅的メタボローム解析によって検討するための実験手法を確立した。ヒト腎癌細胞(ACHN 細胞) に対して EVE を曝露し、EVE 取り込み量(HPLC-UV 法)、細胞外・細胞内グルコース濃度(比色

法)、細胞内代謝物濃度(CE-TOFMS 法)、関連遺伝子発現量(Real time RT-PCR 法)を測定した。

検討1により、各代謝物の変動を代謝経路全体の変化としてダイナミックにとらえることが出来た。また、代謝物量の変動に加えて酵素などの遺伝子発現と組み合わせることで、より詳細な考察が可能となった。網羅的メタボローム解析は、薬物曝露後に細胞内で生じる代謝変動を総合的に示すことができ、注視すべき現象やターゲット経路の明確化に有用な実験手法であることを示した。

検討2：EVEの細胞内糖代謝への影響の検討

検討2では細胞内糖代謝に対するEVEの影響を、メタボローム解析を用いて示すことを目的とした。実験にはマウス骨格筋筋芽細胞(C2C12)を筋管細胞に分化させて用いた。EVE曝露群にはEVE濃度が500ng/mLとなるように調製したEVE曝露用培地を用い、コントロール群にはMeOHが0.01 v/v%含まれるように調製したコントロール用培地を使用して48h培養を行った。48h後の、細胞内EVE取り込み量、細胞外・細胞内グルコース濃度、細胞内代謝物濃度、関連遺伝子発現量を測定し比較した。また、遺伝子発現解析の結果を元に蛋白質発現量及び関連酵素活性を測定した。

検討2により、EVE曝露48h後の細胞外グルコース濃度はコントロールと比較して高値となることが示された。このときグルコーストランスポーター(GLUT)-1の遺伝子発現量及び蛋白質発現量がEVE曝露により低下傾向を示したことから、GLUT1発現低下に伴う細胞内へのグルコース取り込み量の減少が示唆された。一方で、EVE曝露48h後の細胞内グルコース濃度もコントロールと比較して高値を示したことから、グルコース取り込み量の低下だけでなく細胞内での消費低下の影響もあると考えられた。

細胞内糖代謝のうち解糖系代謝物において、EVE曝露によるF6PとF1,6Pの変動に対しホスホフルクトキナーゼ(PFK)-MのmRNA(Pfkm)の発現の低下が影響を及ぼしている可能性が示された。また、PyruvateからLactateの不可逆的な産生反応に関与する代謝酵素乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)-AのmRNA(Ldha)の発現がEVEにより低下しており、EVE曝露によるPyruvateとLactateの変動にLdhaが関与している可能性が考えられた。PFKM及びLDHAは蛋白質発現解析ではいずれもEVE曝露により発現量がわずかに減少する傾向が示され、酵素活性測定では、EVE曝露により活性が低下し、統計学的に有意であった。本検討結果から、EVE曝露により解糖系反応の一部が低下することが示唆された。

ペントースリン酸経路(PPP)で測定したグルコース関連代謝物は、いずれもEVE曝露により低値を示し、ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ(PGD)のmRNA(Pgd)の発現低下がEVE曝露により引き起こされた。PGDの酵素活性測定を行った結果、EVE曝露によりコントロールと比較して活性が減弱することが示された。本実験により、EVEによりPPP関連酵素遺伝子の発現低下を伴うグルコース代謝反応の低下がPPP

において生じた可能性が示された。

一方、クエン酸回路(TCA 回路)関連代謝物や遺伝子発現については EVE 曝露による影響はほとんど見られなかった。

以上より、検討 2 から EVE による高血糖の一因として、末梢糖消費組織である筋肉における GLUT1 低下に伴うグルコース取り込み低下及びインスリン非依存的な細胞内糖代謝、特に解糖系及び PPP におけるグルコース消費の低下が関与している可能性が示唆された。

検討 3 : 細胞内代謝動態の経時的変化

検討 3 では EVE 曝露後の C2C12 細胞内における糖代謝変動を経時的に測定することで新たな情報を得て、EVE によるインスリン非依存的な糖代謝の低下に関する考察を深めることを目的とした。EVE 曝露後 6、12、24、48、72h 時点における経時的なサンプリングを行い、細胞外及び細胞内グルコース濃度、細胞内代謝物濃度、遺伝子発現量および蛋白質発現量の変化を測定した。

検討 3 において、細胞外グルコース濃度の経時的な減少が確認された。細胞外グルコース濃度の減少は測定開始時点から 12h 時点までは EVE 曝露群とコントロール群との間に差は見られなかったが、24h 以降ではコントロール群と比較して EVE 曝露群では細胞外グルコース濃度が高値となり統計学的に有意であった。遺伝子発現解析結果において、GLUT1 遺伝子(Slc2a1)発現量が EVE 曝露後 6h から低値を示し、Western Blot 法により GLUT1 蛋白質発現の変動を確認したところ、24h 時点で EVE 曝露群の GLUT1 発現が低下し、その後 72h まで同程度の発現低下状態が持続した。24h 以降において細胞外グルコース濃度がコントロール群と比較して EVE 曝露群で高値を示したのは、EVE の mTORC1 阻害作用による GLUT1 発現低下によりコントロール群に比べて細胞外グルコースの取り込み量が低下したことが一因として考えられた。

細胞内グルコース濃度も曝露後経時的な減少を示した。EVE 曝露群では曝露後 24h 以降においてコントロール群と比較してグルコース濃度が高値となった。EVE 曝露後 24h 以降においては、コントロールに比べて EVE 曝露により細胞内、細胞外両方のグルコース濃度が共に高値となったため、EVE 曝露後 24h 以上経過した筋肉細胞においては、GLUT1 発現低下によるグルコース取り込み低下だけでなく、細胞内でのグルコース消費の低下が生じていることが示された。

以上より検討 3 では、経時的な考察を加えることで EVE の作用が時間依存的に現れることが示され、特に EVE 曝露後 24h 以降において、細胞外グルコースの取り込み低下と細胞内グルコースの消費低下の両面からの糖代謝異常が筋肉細胞において引き起こされることが示された。

【総括】

本研究では、マウス筋管細胞 C2C12 を用いた網羅的メタボローム解析により、インスリン非存在下の細胞内糖代謝とグルコース取り込みに対する EVE の影響を検討した。その結果、EVE は GLUT1 発現低下に伴うグルコースの細胞内への取り込み低下と共に、細胞内における解糖系および PPP における細胞内糖代謝低下により、細胞内グルコース消費の低下を引き起こすことが示された。また、細胞外グルコースの取り込み低下や細胞内グルコース消費低下は EVE 曝露後 24h 以降で示されたことから、実際に EVE を服用した患者の筋肉においても本研究と同様の変動が起こる可能性が考えられた。今後は、本研究で得られた知見に基づき、EVE 起因性高血糖に対する臨床的な支持療法についての検討を進めていきたい。

論文審査結果の要旨

論文発表の後、副査 2 名と研究科委員からの諮問ならびに質疑応答が行われた。発表者は研究の背景、研究の目的・意義および研究内容について、専門外の研究科委員に対しても分かり易く説明した。

主な質問として、1) 48h 曝露実験で極端な濃度低下を起こしている代謝物(F1,6P)があるが、何故その代謝物は他と比べ大きく変化していると考えられるか。2) 経時の変化で EVE 曝露群の細胞外グルコース濃度が曝露後早期は Control 群よりも低濃度で推移したのはどうしてか。3) 細胞外からの糖取り込みと細胞内での糖代謝を分けて考え実験するためにはどのような実験方法が提案できるか。4) 臨床面を考えた際、提示した症例では不可逆的な副作用のように見えたが、どう考えられるか。5) 先行研究で Rapamycin を用い肝 mTORC2 阻害について示したものがあるが、なぜ今回 mTORC1 阻害を対象とした検討を実施したのか。6) 本実験は細胞内の ATP 産生能の低下を示していると考えられるが、提案した指示療法薬はこれを改善できるか。7) インスリン療法はむしろ不適切のように見えるが、どうか。8) 何故筋肉細胞を用いているにも関わらず GLUT4 についての検討は行っていないのか。9) 不可逆的な副作用のように見えるが、提案した支持療法薬で治療可能か。10) 細胞内糖代謝能の低下がはっきりわかる実験だと思うが、わざわざ GLUT1 についての検討を入れる必要があるのか。などの質問が出された。これに対して発表者は、自己のデータとともに他の研究者の情報も引用しつつ、明快に説明し的確に応答した。

発表者は、薬学が専修コースで病院研修中に経験したエベロリムスによる糖代謝異常の副作用をテーマとして、その発生機序を明らかにし、適切な副作用対策を考える上で重要な情報を創出した。今回の研究の限界や残された課題についても発表者は認識しており、今後、研究者としての発展が期待される。その後の判定会議で、本論文の内容は本学の博士（薬学）の学位に値するものと判定された。

論文目録

【主論文に関わる原著論文】

K. Yoshida, C. K. Imamura, K. Hara, M. Mochizuki, Y. Tanigawara: Effect of everolimus on the glucose metabolic pathway in mouse skeletal muscle cells (C2C12); *Metabolomics*. 2017;13(8):98