

グルコース飢餓におけるアミノ酸
トランスポーターxCTを介したEphA2リガンド
非依存的シグナルの制御

2021

寺本 昂司

目次

要旨	2
第1章 序文	4
第2章 結果	10
第3章 考察	20
第4章 結語	24
実験方法	25
参考文献	28
略語表	35
謝辞	36

要旨

神経膠芽腫（グリオブラストーマ）は、脳腫瘍の中でも悪性度が最も高いグレードIVに分類されている。外科的切除、放射線療法、化学療法などによる治療が行われているが、現在も効果的な治療法が未だ確立されていないのが現状であり、5年生存率は10%以下と予後が非常に悪い疾患である。また、神経膠芽腫においてエフリン受容体（Eph）ファミリーに属するEphA2が過剰に発現していることが報告されており、薬物治療における新規ターゲット分子として期待されている。Eph受容体は、受容体型チロシンキナーゼの中でも最大のファミリーを構成しており、細胞膜においてリガンドであるephrinと結合することで、発生過程における細胞の位置決定や恒常性の維持に関わっている。一方、EphA2は脳腫瘍をはじめとする様々ながんにおいて過剰に発現しており、その発現量とがんの悪性度には密接な関係があることが報告されている。正常な細胞では、EphA2はリガンドであるephrinA1に結合するとチロシンキナーゼの活性が亢進する。一方、がん細胞においてEphA2は、リガンド非依存的に897番目のセリン（S897）がリン酸化されると、細胞の増殖や運動性を促進することが報告されている。しかし、様々なストレス環境下におかれた時に、EphA2が関わるシグナル伝達がどのように変化し、ストレスに対する適応性をどのように獲得するのかはわかっていない。そこで本研究では、がん細胞にとってストレスになりうるグルコース飢餓の環境においてEphA2を含めたEph受容体シグナル伝達の変化に着目し、その役割の解明をめざした。本研究では、EphA2が高発現している神経膠芽腫細胞をモデルとして用い、がん細胞におけるEphA2シグナルの指標となるS897のリン酸化を調べるとともに、CRISPR/Cas9システムを利用してEphA2欠損細胞を樹立して、グルコース飢餓時のEphA2の役割について検討した。

3種類の神経膠芽腫細胞（U251、T98G、LN229細胞）を用いて、グルコース飢餓によるEphA2のS897のリン酸化に対する影響を調べた結果、グルコース飢餓においてEphA2のS897のリン酸化が亢進していることが明らかになった。これまでの報告から、グルコース飢餓によって活性酸素種（ROS）が産生され、プロテインホスファターゼ2A（PP2A）に代表されるプロテインホスファターゼが可逆的に抑制されることが知られている。そこで、ROS分解酵素であるカタラーゼで処理したところ、グルコース飢餓によるEphA2のリン酸化が抑制された。一方、ホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸で単独処理すると、EphA2のS897のリン酸化が亢進した。以上の結果から、グルコース飢餓時にROSの産生が起これば、ホスファターゼの活性が抑制されることによって、EphA2のS897の

リン酸化が亢進する可能性が示唆された。また、これまでの報告から、少なくとも Akt、RSK、PKA が EphA2 の S897 をリン酸化することが明らかになっている。そこで、各種キナーゼ阻害剤を用いて調べたところ、RSK 阻害剤、及びその上流のキナーゼである MEK、ERK の阻害剤によってグルコース飢餓による EphA2 の S897 のリン酸化は抑制された。以上のことから、グルコースの飢餓時に起こる EphA2 の S897 のリン酸化には、MEK/ERK/RSK 経路が関与していることが示唆された。申請者の所属する研究室ではこれまでに、グルコース飢餓における ROS の産生にアミノ酸トランスポーターである xCT の活性が必要であることを明らかにしている。xCT は、シスチンを細胞外から取り込んで、グルタミン酸を細胞外へ放出する交換輸送を行うアミノ酸トランスポーターであり、神経膠芽腫を含め、様々ながん細胞においてその発現が上昇していることが報告されている。申請者は本研究で、xCT 阻害剤および xCT 欠損神経膠芽腫細胞を用いることで、グルコース飢餓による EphA2 の S897 のリン酸化に xCT の活性が必要であることを明らかにした。さらに、U251 細胞の EphA2 欠損細胞を CRISPR/Cas9 システムによって樹立し、グルコース飢餓に対する EphA2 の役割を検討した。その結果、グルコース飢餓時において EphA2 欠損細胞は、コントロール細胞と比較して有意に細胞生存率が低いことが明らかになった。

以上の結果から、EphA2 はグルコース飢餓状態における神経膠芽腫細胞の生存に関わることが示唆された。そして、グルコース飢餓のような環境下においては、EphA2 の S897 のリン酸化が起こる分子メカニズムを初めて見出し、神経膠芽腫細胞における栄養飢餓ストレスと Eph 受容体シグナルとの関係の一端を明らかにした。

第1章 序文

がん細胞は、その生存や増殖の過程において、低酸素状態や低栄養状態など様々なストレス環境にさらされている。正常細胞の場合には、このようなストレスにさらされると細胞死が誘導される。一方、がん細胞はストレス環境にさらされても細胞死を起こさずに生存して増殖する。しかし、がん細胞が様々なストレス環境でも耐性を獲得して生存するメカニズムについては、未だ不明な点が多い。がん細胞を取り巻く環境のひとつに栄養飢餓がある。栄養飢餓状態でも、がん細胞では、生存のためにグルコースの取り込みの促進、グルコース代謝の亢進が起こる。そのため、グルコースの取り込みに関与するトランスポーターや代謝に関与する酵素は、多くのがんの場合に治療標的として考えられている (Hanahan and Weinberg, 2011)。

Eph 受容体は、受容体型チロシンキナーゼの中で最大のファミリーを構成している。そして、リガンドの ephrinA と ephrinB は、それぞれ受容体の EphA と EphB と結合する。その結果、受容体の細胞質領域のチロシンキナーゼが活性化されてシグナルが伝達される (Fig. 1-1)。この Eph/ephrin シグナルによって、発生過程における細胞運動、血管形成、神経軸索ガイダンスが制御されていることが報告されている (Pasquale, 2010)。

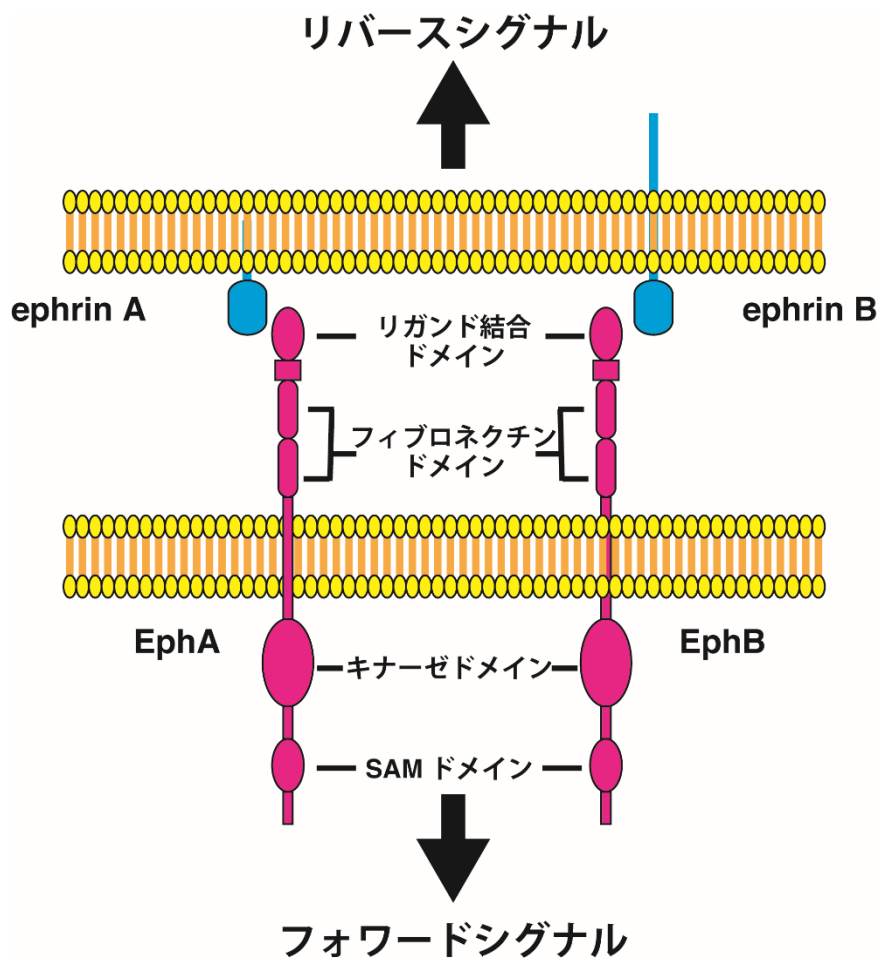


Fig. 1-1 Eph 受容体の構造

受容体の EphA と EphB は、リガンドの ephrinA と ephrinB とそれぞれ結合することによって細胞内にシグナルを伝達する。

EphA2 は、神経膠芽腫を含む様々なヒトのがんにおいて高発現している (Pasquale, 2010; Boyd et al., 2014; Wykosky and Debinski, 2008; Nakada et al., 2011; Day et al., 2014)。そして、EphA2 の発現レベルと神経膠芽腫のグレード、患者の予後の悪さに関連があることが報告されている (Wykosky et al., 2005; Liu et al., 2006; Wang et al., 2008)。正常細胞では、EphA2 はリガンドである ephrinA1 と結合するとチロシンキナーゼ活性が上昇し (Fig. 1-2 A)、発生過程における細胞の位置決定や神経軸索ガイダンスの制御に寄与する。一方、神経膠芽腫における EphA2 は、細胞の増殖、生存、運動、浸潤の促進やがん幹細胞の維持に関与していることが知られている (Miao et al., 2009; Binda et al., 2012; Miao et al., 2014; Hamaoka et al., 2016)。がん細胞における EphA2 のこれらの機能には、ephrin 依

存在的な Eph 受容体のチロシンキナーゼの活性化とは異なり、キナーゼドメインと SAM ドメインの間のリンカー領域に存在する 897 番目のセリン残基 (S897) のリガンド非依存的なリン酸化が必要である (Fig. 1-2 B)。EphA2 の S897 のリン酸化は、成長因子、サイトカイン、 β -アドレナリン受容体アゴニスト、そして X 線の暴露などの刺激により、RSK、Akt、PKA が直接作用することによって促進される (Miao et al., 2009; Miao et al., 2014; Hamaoka et al., 2016; Zhou et al., 2015; Harada et al., 2015; Barquilla et al., 2016; Graves et al., 2017)。さらに、EphA2 の過剰発現によって、EphA2 自体のチロシンキナーゼ活性が S897 のリン酸化を促進することが知られている (Hamaoka et al., 2018)。

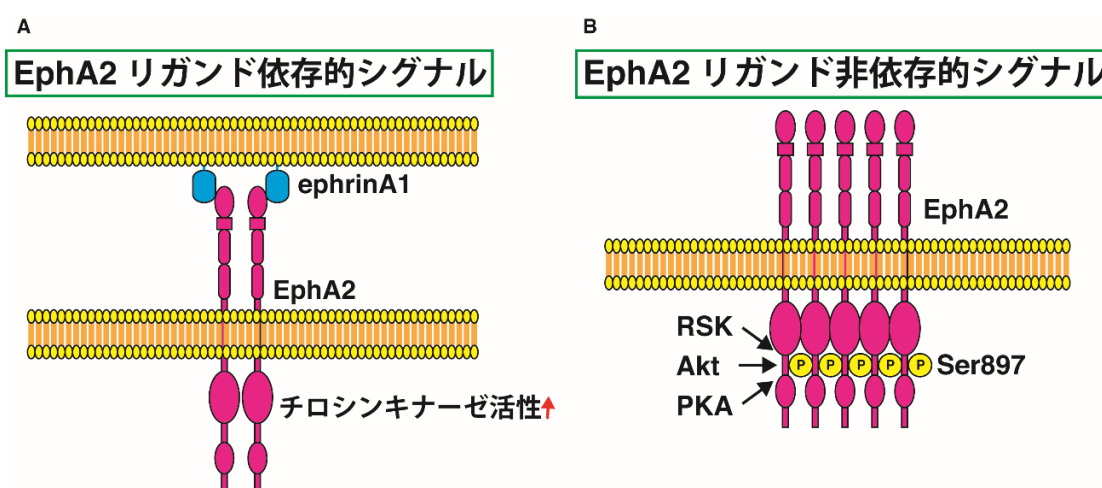


Fig. 1-2 EphA2 受容体のシグナル伝達経路

(A) 正常細胞において、EphA2 はリガンドである ephrinA1 と結合し、細胞内のチロシンキナーゼ活性が上昇する。(B) がん細胞において、EphA2 の S897 のリン酸化は、RSK、Akt、PKA が直接作用することによって、リガンド非依存的に亢進する。

活性酸素種 (ROS) は、細胞内での酸化的代謝などの多くの過程で産生される。ROS は、タンパク質、脂質、DNA などの多様な生体分子の酸化反応に関与する。これらの分子が過剰な ROS によって酸化的なダメージを受けることによって細胞死が引き起こされる。しかし、適度なレベルの ROS はシグナル伝達経路において重要な役割を担う。また、ROS は、レドックス感受性酵素にみられるシステイン残基を可逆的に酸化する。例えば、 H_2O_2 は PP2A に代表されるプロテインホスファターゼのシステイン残基のチオールをスルフェン酸に酸化す

ることで、ホスファターゼを不活性化する (Hamanaka and Chandel, 2010; Finkel, 2011; Holmström and Finkel, 2014)。がん細胞では、ROS は変異の蓄積を加速して腫瘍形成能を増幅する。また、がん細胞では、正常細胞よりも ROS が高レベルであることが知られている。そのために、がん細胞は過剰な ROS と有害な酸化ストレスを回避するための抗酸化システムを備えている (Cairns et al., 2011; Sabharwal and Schumacker, 2014)。

シスチン／グルタミン酸アンチポーターxCT (SLC7A11) は、重鎖サブユニット CD98 (4F2hc, SLC3A2) と結合して細胞膜に存在する。xCT の役割は、シスチンを細胞内に取り込むと同時に、グルタミン酸を細胞外に放出することである (Conrad and Sato, 2012; Lewerenz et al., 2013; Zhang et al., 2017)。取り込まれたシスチンは、システインに変換されてグルタチオン合成に利用される。神経膠芽腫を含む多くの種類のがん細胞において、グルタチオンは最も重要な抗酸化物質のひとつである (Fig. 1-3)。xCT は神経膠芽腫の患者や細胞で高発現しており、その発現と腫瘍成長、薬剤耐性、予後の不良には相関がある (Chung et al., 2005; Savaskan et al., 2008; Takeuchi et al., 2013; Sleire et al., 2015; Tsuchihashi et al., 2016; Polewski et al., 2016)。数種類のがん細胞では、xCT 阻害剤は鉄依存的な ROS の蓄積を引き起こし、フェロトーシスと呼ばれる細胞死を引き起こす (Dixon et al., 2012; Stockwell et al., 2017; Conrad et al., 2018)。一方、がん細胞の xCT の阻害は、グルコース飢餓後の細胞生存率を改善することが報告されている (Shin et al., 2017; Koppula et al., 2017; Goji et al., 2017; Koppula et al., 2018)。また、グルコース飢餓時に xCT がシスチンを取り込むことで、NADPH の枯渇及び ROS の蓄積を引き起こし、細胞死が誘導される (Goji et al., 2017、Fig. 1-4)。

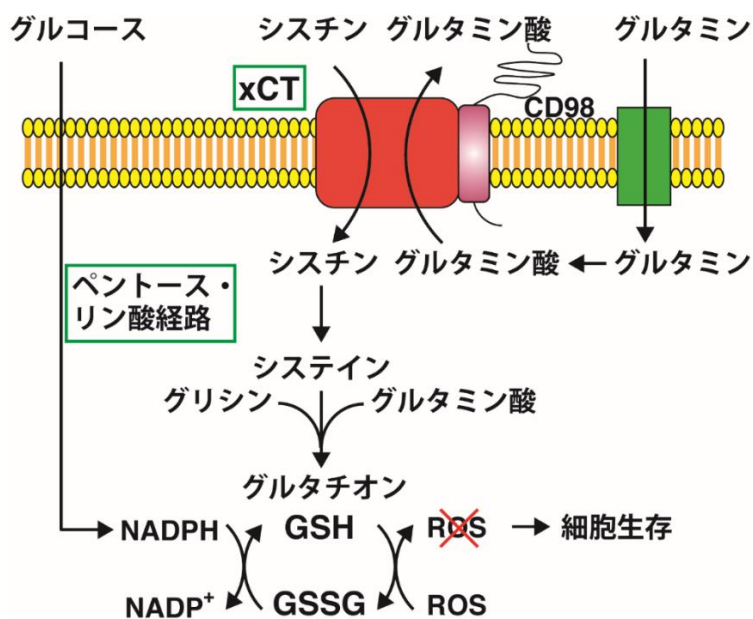


Fig. 1-3 グルコース存在時のグルタチオン合成による ROS の除去

xCT により取り込まれたシスチンはシステインに変換される。システイン、グリシン、グルタミン酸は、グルタチオン合成に利用される。NADPH は、グルコースに由来するグルコース-6-リン酸から、ペントース・リン酸経路を介して産生される。そして、還元型グルタチオンが ROS を分解し、細胞生存を促進する。

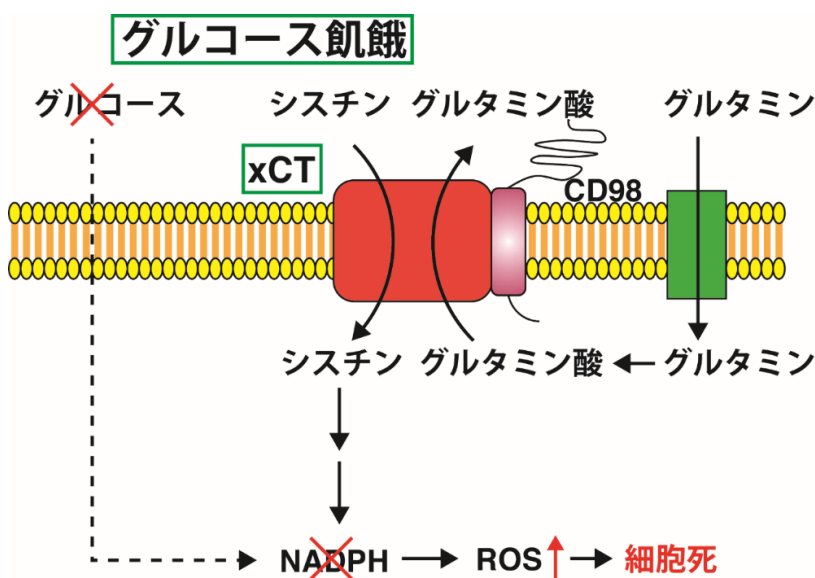


Fig. 1-4 グルコース飢餓時のシスチン取り込みによる ROS の増加

グルコース飢餓時に、xCT を介したシスチンの細胞内への取り込みが、NADPH 枯渇を引き起こす。そして、蓄積した ROS が細胞死を誘導する。

私が所属する研究室のこれまでの研究成果から、神経膠芽腫細胞における EphA2 の S897 のリン酸化は、Ras/Raf/MEK/ERK/RSK 経路を介して起こることが明らかになっている (Hamaoka et al., 2016)。一方、ROS の蓄積が ERK の活性化を亢進させることも知られている (Bhagatte et al., 2020)。そこで、グルコース飢餓時に xCT を介したシスチンの取り込みによって ROS の蓄積が起こり、その結果 ERK と RSK の活性化が起こり、さらにはその下流に存在する EphA2 の S897 のリン酸化が亢進することによって、細胞の増殖や生存に何らかの影響が出る可能性が考えられた。本研究において私は、グルコース飢餓時における EphA2 の S897 のリン酸化、及び神経膠芽腫細胞の生存における EphA2 の関与について検討を行った。

第2章 結果

神経膠芽腫においてグルコース飢餓時に EphA2 の S897 はリン酸化される

グルコース飢餓により、神経膠芽腫を含む様々ながん細胞において ERK の活性化が引き起こされる (Lee et al., 1998; Eckert et al., 2008; Kim et al., 2010; Graham et al., 2012)。また、私の所属する研究室のこれまでの研究成果から、神経膠芽腫細胞では、ERK の活性化により EphA2 の S897 がリン酸化されることが明らかになっている (Hamaoka et al., 2016; Hamaoka et al., 2018)。そこで私は、グルコース飢餓により神経膠芽腫細胞における EphA2 の S897 のリン酸化レベルに変化があるのかどうかについて検討した。EphA2 が高発現している神経膠芽腫細胞株である U251 細胞に関して (Hamaoka et al., 2016)、グルコースを除去した条件で培養した後、細胞溶解液を回収し、EphA2 の抗 S897 リン酸化抗体を用いてイムノブロット法により解析した。その結果、グルコース飢餓により、U251 細胞において EphA2 の S897 リン酸化の亢進が観察された (Fig. 2-1 A)。また、ERK のリン酸化もグルコース飢餓により亢進していた。U251 細胞における EphA2 の S897 リン酸化は、EGF で処理することによって亢進することが明らかになっている (Miao et al., 2009; Miao et al., 2014; Hamaoka et al., 2016; Zhou et al., 2015; Harada et al., 2015)。EGF 刺激による EphA2 の S897 リン酸化も、グルコース飢餓時と同程度に亢進することが観察された (Fig. 2-1 B)。また、他の神経膠芽腫細胞株である T98G 細胞 (Fig. 2-1 C)、LN229 細胞 (Fig. 2-1 D) においても、グルコース飢餓による EphA2 の S897 リン酸化の亢進が観察された。グルコース飢餓により ROS の蓄積が起こるので (Goji et al., 2017; Lee et al., 1998; Graham et al., 2012)、次にグルコース飢餓による EphA2 の S897 リン酸化における ROS について調べた。U251 細胞を H₂O₂ のスカベンジャーであるカタラーゼを処理すると、グルコース飢餓による EphA2 の S897 リン酸化の亢進が抑制された (Fig. 2-1 E)。これらの結果から、グルコース飢餓によって、神経膠芽腫細胞における ROS 依存的な EphA2 の S897 リン酸化の亢進が確認された。細胞内の ROS の増加によって、PP2A に代表されるプロテインホスファターゼのシステイン残基のチオールがスルフェン酸に酸化されるために、ホスファターゼが不活性化されることが知られている (Hamanaka and Chandel, 2010; Finkel, 2011; Holmström and Finkel, 2014)。そこで、U251 細胞をプロテインホスファターゼ阻害剤のオカダ酸で処理したところ、EphA2 の S897 リン酸化の亢進が観察された (Fig. 2-1 F)。

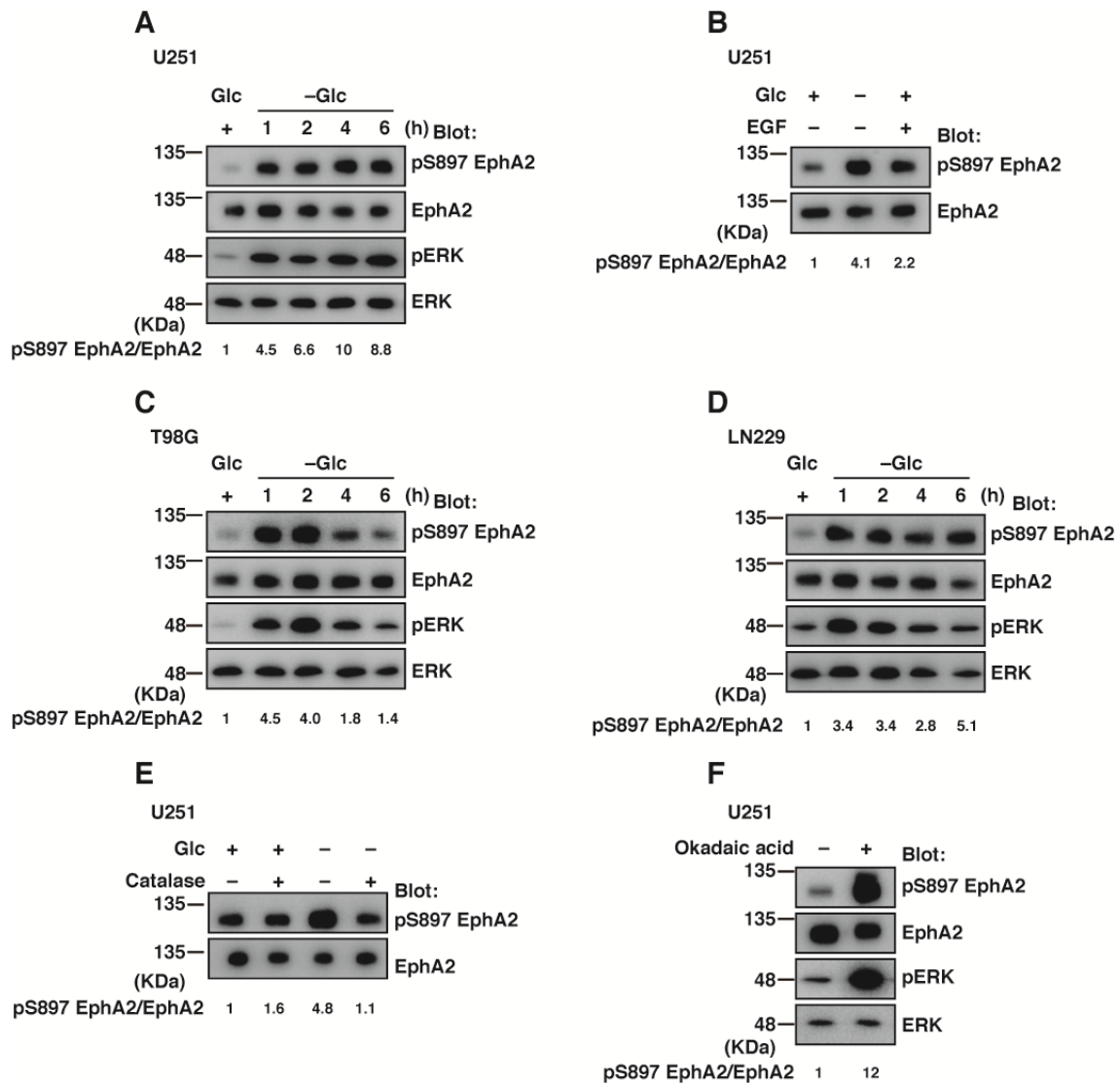


Fig. 2-1 グルコース飢餓条件下での神経膠芽腫細胞における EphA2 の S897 リン酸化 (A) U251 細胞に関して、グルコースを除去した培地にグルコースを 5 mM になるように添加して、記述した時間が経過した後に細胞を回収し、イムノブロット法により EphA2 と ERK の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化と ERK のリン酸化レベルを解析した。(B) U251 細胞に関して、グルコースを除去した培地 (レーン 2) にグルコースを 5 mM (レーン 1)、グルコースを 5 mM と EGF を 100 ng/ml (レーン 3) になるように添加して 2 時間処理した後に細胞を回収し、イムノブロット法により EphA2 の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化レベルを解析した。(C, D) T98G 細胞 (C)、LN229 細胞 (D) に関して、(A) と同様の処理をしたのちに、イムノブロット法により EphA2 と ERK の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化と ERK のリン酸化レベルを解析した。(E) U251 細胞に関して、グルコースを除去した培地 (レーン 3) にグルコースを 5 mM (レーン 1)、グルコ

ースを 5 mM とカタラーゼを 250 U/ml (レーン 2)、カタラーゼを 250 U/ml (レーン 4) になるように添加して 2 時間処理した後に細胞を回収し、イムノブロット法により EphA2 の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化レベルを解析した。(F) U251 細胞に関して、500 nM のオカダ酸存在下、または非存在下で 2 時間処理した後に細胞を回収し、イムノブロット法により EphA2 と ERK の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化と ERK のリン酸化レベルを解析した (図の下の数値は、pS897-EphA2 と EphA2 のバンドの濃度比)。

グルコース飢餓による EphA2 の S897 リン酸化の亢進には ERK と RSK の活性が必要である

U251 細胞において、EGF による刺激は MEK/ERK/RSK 経路を通して EphA2 の S897 リン酸化を引き起こすことが明らかになっている (Hamaoka et al., 2016)。そこで私は、グルコース飢餓による EphA2 の S897 リン酸化に MEK/ERK/RSK 経路が関与しているのかどうかを、様々な阻害剤を用いて調べた。RSK 阻害剤の BI-D1870、あるいは MEK 阻害剤の U0126 で U251 細胞を処理すると、グルコース飢餓による EphA2 の S897 リン酸化の亢進が抑制された (Fig. 2-2 A)。この結果から、グルコース飢餓による EphA2 の S897 のリン酸化の亢進には MEK/ERK/RSK 経路の関与が示唆された。U251 細胞では、RSK メンバーの中で主に RSK2 が発現しており (Hamaoka et al., 2016)、RSK2 のセリン 227 (S227) のリン酸化の亢進がその活性にとって必須であることが報告されている (Anjum and Blenis, 2008)。U251 細胞のグルコース飢餓処理によっても、RSK2 の S227 リン酸化の亢進が観察された (Fig. 2-2 B)。また、EphA2 の S897 リン酸化と同様に、グルコース飢餓による RSK2 の S227 リン酸化の亢進はカタラーゼ処理により抑制され (Fig. 2-2 C)、オカダ酸処理により亢進した (Fig. 2-2 D)。

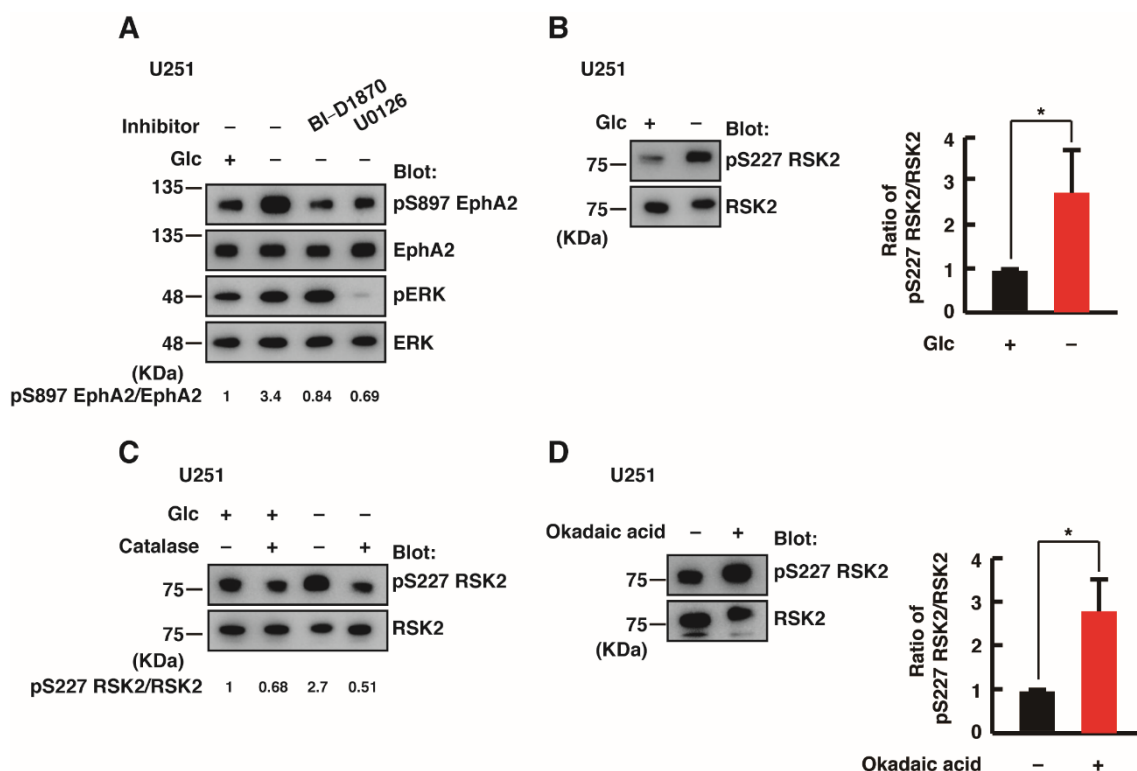


Fig. 2-2 グルコース飢餓による EphA2 の S897 リン酸化には RSK の活性が必要

(A) U251 細胞に関して、グルコースを除去した培地 (レーン 2) にグルコースを 5 mM (レーン 1)、BI-D1870 を 10 μ M (レーン 3)、U0126 を 20 mM (レーン 4) になるように添加して 2 時間処理した後に細胞を回収し、イムノブロット法により EphA2 と ERK の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化と ERK のリン酸化レベルを解析した (図の下の数値は、pS897-EphA2 と EphA2 のバンドの濃度比)。(B) U251 細胞に関して、グルコースを除去した培地にグルコースを 5 mM になるように添加して 2 時間処理した後に細胞を回収し、イムノブロット法により RSK2 の発現量と RSK2 の S227 のリン酸化レベルを解析した。右のグラフは、pS227-RSK2 と RSK2 のバンドの濃度比を算出したものであり、独立して行った 4 回の実験から得られた結果の平均値 \pm 標準偏差を示している (*, $p < 0.05$, t-test)。(C) U251 細胞に関して、グルコースを除去した培地 (レーン 3) にグルコースを 5 mM (レーン 1)、グルコースを 5 mM とカタラーゼを 250 U/ml (レーン 2)、カタラーゼを 250 U/ml (レーン 4) になるように添加して 2 時間処理した後に細胞を回収し、イムノブロット法により RSK2 の発現量と RSK2 の S227 のリン酸化レベルを解析した (図の下の数値は、pS227-RSK2 と RSK2 のバンドの濃度比)。(D) U251 細胞に関して、500 nM のオカダ酸存在下、または非存在下で 2 時間処理した後に細胞を回収し、イムノブロット法により RSK2 の発現量と RSK2 の S227 のリン酸化レベルを解析した。右のグラフは、pS227-RSK2 と RSK2 のバンドの濃度比を算出したものであり、独立して

行った3回の実験から得られた結果の平均値±標準偏差を示している (*, p<0.05, t-test)。

シスチン/グルタミン酸アンチポーターxCTはグルコース飢餓によるEphA2のS897リン酸化の亢進に関与している

グルコース飢餓によるROSの蓄積は、シスチン/グルタミン酸アンチポーターxCTを介して引き起こされることが以前に明らかになっている (Goji et al., 2017)。そこで、グルコース飢餓によるEphA2のS897リン酸化の亢進にxCTが関与しているのかを調べるために、xCT阻害剤のサルファサラジン (SSZ) の処理を行った。その結果、グルコース飢餓によるEphA2のS897リン酸化がSSZによって抑制されることが明らかになった (Fig. 2-3 A)。同様の結果がT98G細胞 (Fig. 2-3 B)、LN229細胞 (Fig. 2-3 C) でも観察された。さらにxCTの関与を確かめるため、xCT欠損U251細胞 (xCT KO) を用いてEphA2のS897リン酸化レベルについて調べた。EGF刺激によるEphA2のS897リン酸化の亢進はコントロール細胞とxCT欠損細胞の両方で観察されたが (Fig. 2-3 E)、グルコース飢餓によるEphA2のS897リン酸化亢進はxCT欠損細胞では観察されなかった (Fig. 2-3 D)。また、グルコース飢餓によるRSK2のS227リン酸化亢進もxCT欠損U251細胞では見られなかった。これらの結果から、神経膠芽腫細胞において、グルコース飢餓時のEphA2のS897リン酸化の亢進にはxCTの高発現が必要であることが示唆された。

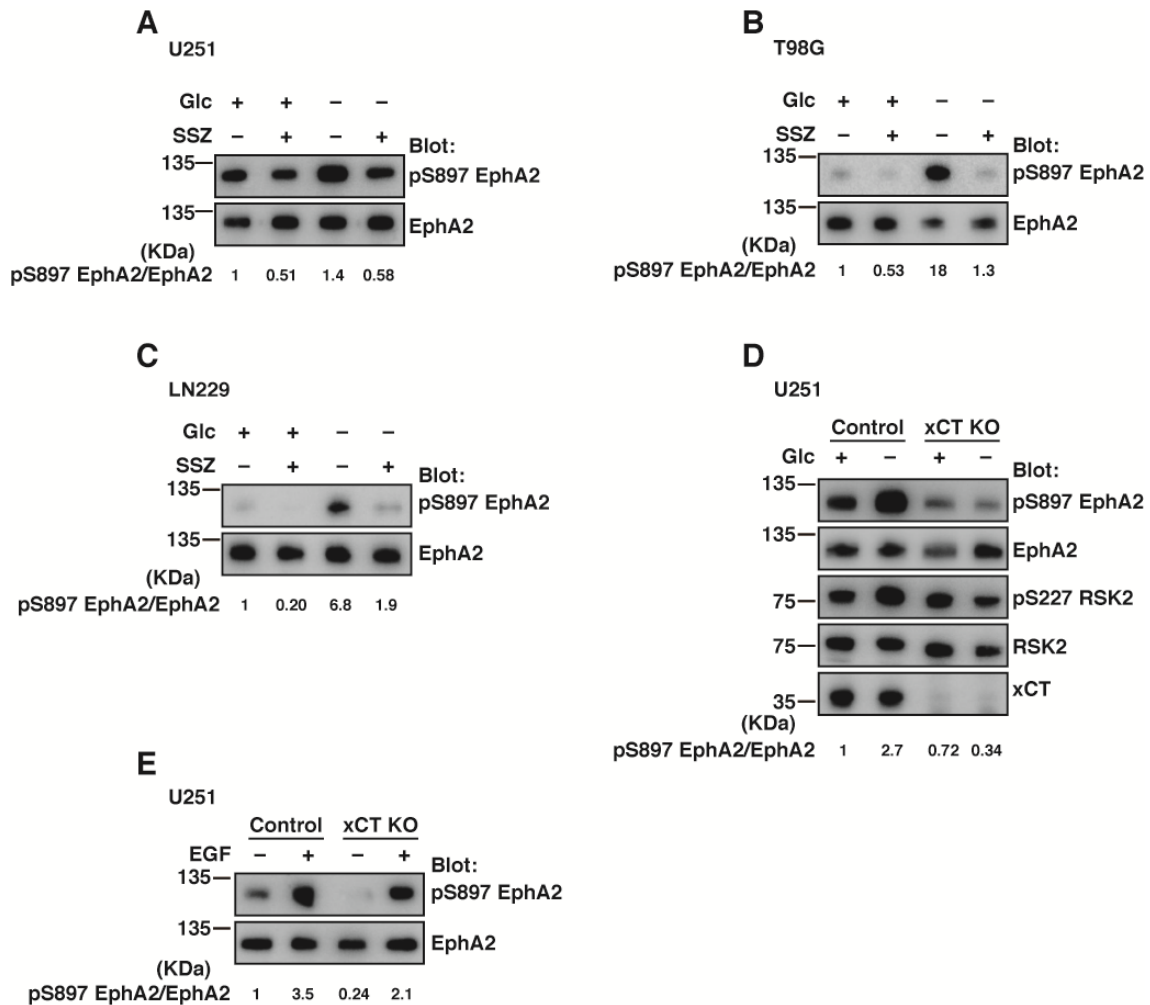


Fig. 2-3 シスチン/グルタミン酸アンチポーターxCTのグルコース飢餓による EphA2 の S897 のリン酸化亢進への関与

(A-C) U251 細胞 (A)、T98G 細胞 (B)、LN229 細胞 (C)に関して、グルコースを除去した培地 (レーン 3) にグルコースを 5 mM (レーン 1)、グルコースを 5 mM と SSZ を 250 μ M (レーン 2)、SSZ を 250 μ M (レーン 4)になるように添加して 2 時間処理した後に細胞を回収し、イムノブロット法により EphA2 の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化レベルを解析した。(D) コントロール U251 細胞と xCT 欠損 U251 細胞に関して、グルコースを除去した培地にグルコースを 5 mM になるように添加して 2 時間処理した後に細胞を回収し、イムノブロット法により EphA2、RSK2、xCT の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化と RSK2 の S227 リン酸化レベルを解析した。(E) コントロール U251 細胞と xCT 欠損 U251 細胞に関して、100 ng/ml の EGF 存在下、または非存在下で 2 時間処理した後に細胞を回収し、イムノブロット法により EphA2 の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化レベルを解析した (図の下の数値は、pS897-EphA2 と EphA2 のバンドの濃度

比)。

シスチンとグルタミンはグルコース飢餓時に xCT を介して EphA2 の S897 リン酸化を亢進する

U251 細胞における、xCT のアミノ酸輸送活性を調べるために、グルコースとアミノ酸を除去した培地中へのグルタミン酸の放出を測定した。グルコースとアミノ酸を除去した培地にシスチンまたはグルタミンを単独で添加した場合と比べて、シスチンとグルタミンの両方を添加すると、培地中へのグルタミン酸の顕著な放出が観察された (Fig. 2-4 A)。また、xCT 阻害剤の SSZ で細胞を処理すると、シスチンとグルタミンに依存するグルタミン酸の放出が抑制された (Fig. 2-4 B)。これらの結果から、xCT を介する輸送には培地中にシスチンとグルタミンが存在する必要があることが示唆された。次に、xCT によるアミノ酸の輸送に EphA2 の S897 リン酸化が必要かどうかを調べた。グルコースとアミノ酸を除去した培地にシスチンとグルタミンを添加すると、EphA2 の S897 リン酸化の亢進が観察された (Fig. 2-4 C)。一方、グルタミン酸を単独で培地に添加した場合には EphA2 の S897 リン酸化が見られなかった (Fig. 2-4 D)。このことから、EphA2 の S897 リン酸化の亢進には、xCT を介して培地中に放出されたグルタミン酸が必要なわけではないことが示唆された。シスチンとグルタミンに依存する EphA2 の S897 リン酸化の亢進は T98G 細胞 (Fig. 2-4 E) や LN229 細胞 (Fig. 2-4 F) の場合にも観察されたが、xCT 欠損 U251 細胞では観察されなかった (Fig. 2-4 G)。これらの結果から、グルコース飢餓時の EphA2 の S897 リン酸化亢進は、xCT を介するシスチンの取り込みに依存することが示唆された。

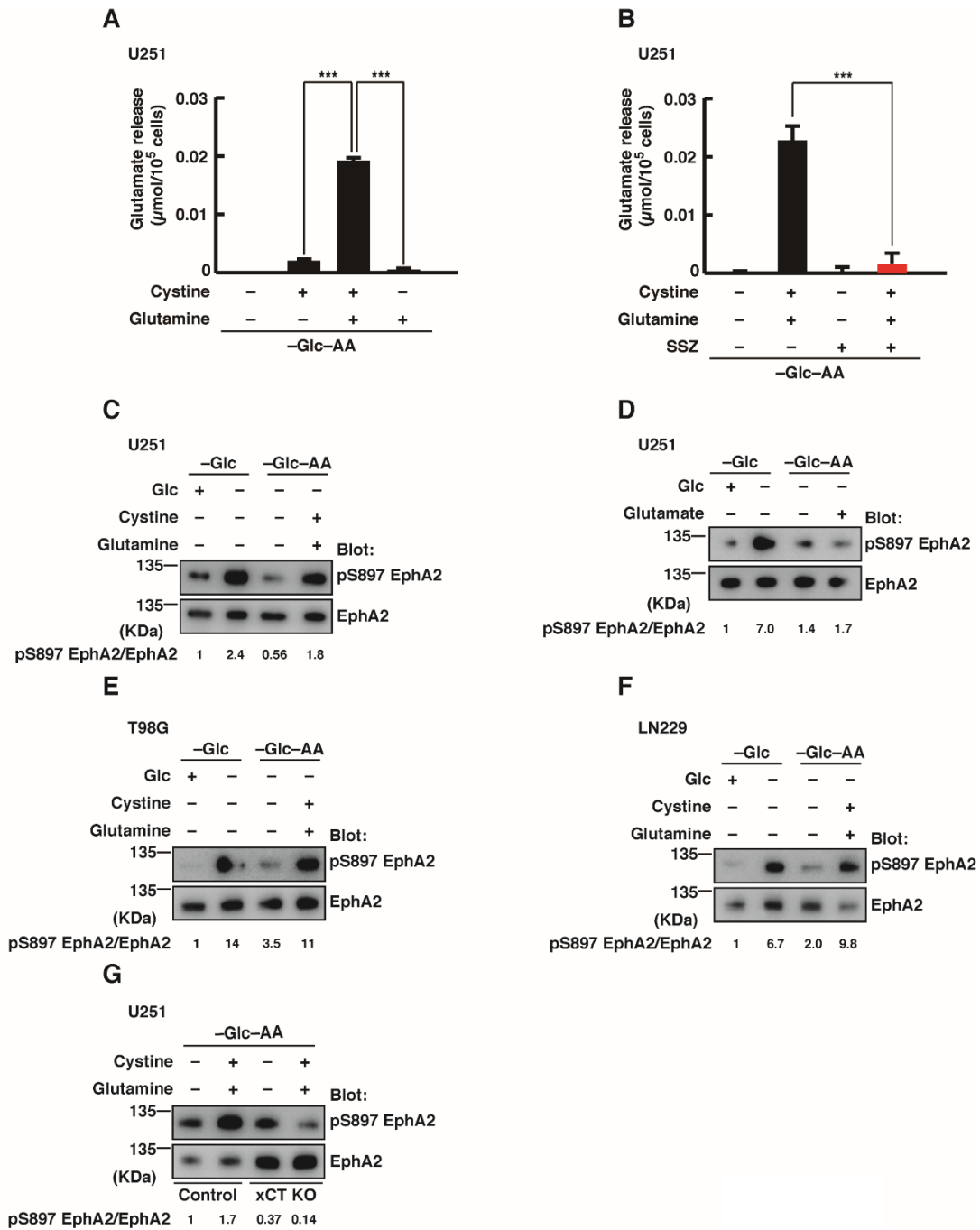


Fig. 2-4 グルコース飢餓時における、xCT を介するシスチンの取り込みに依存する EphA2 の S897 リン酸化の亢進

(A) U251 細胞に関して、グルコースとアミノ酸を除去した培地 (バー1) にシスチンを 0.2 mM (バー2)、シスチンを 0.2 mM とグルタミンを 2 mM (バー3)、グルタミンを 2 mM (バー4) になるように添加して 4 時間処理した後に培地中に放出されたグルタミン酸を

測定した。グラフは独立して行った 3 回の実験から得られた結果の平均値±標準偏差を示している (***, $p < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。 (B) U251 細胞に関して、グルコースとアミノ酸を除去した培地 (バー1) にシスチンを 0.2 mM とグルタミンを 2 mM (バー2)、SSZ を 250 μ M (バー3)、シスチンを 0.2 mM、グルタミンを 2 mM、SSZ を 250 μ M (バー4) になるように添加して 4 時間処理した後に培地中に放出されたグルタミン酸を測定した。グラフは独立して行った 3 回の実験から得られた結果の平均値±標準偏差を示している (***, $p < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。 (C) U251 細胞に関して、グルコースを除去した培地 (レーン 2) にグルコースを 5 mM (レーン 1)、グルコースとアミノ酸を除去した培地 (レーン 3) にシスチンを 0.2 mM とグルタミンを 2 mM (レーン 4) になるように添加して 2 時間処理した後に細胞を回収し、イムノブロット法により EphA2 の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化レベルを解析した。 (D) U251 細胞に関して、グルコースを除去した培地 (レーン 2) にグルコースを 5 mM (レーン 1)、グルコースとアミノ酸を除去した培地 (レーン 3) にグルタミン酸を 0.1 mM (レーン 4) になるように添加して 2 時間処理した後に細胞を回収し、記述した抗体を使用しイムノブロット法により EphA2 の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化レベルを解析した。 (E, F) T98G 細胞 (E)、LN229 細胞 (F)に関して、(C) と同様の処理をしたのちに、イムノブロット法により EphA2 の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化レベルを解析した。 (G) コントロール U251 細胞と xCT 欠損 U251 細胞に関して、グルコースとアミノ酸を除去した培地にグルコースを 5 mM とシスチンを 0.2 mM になるように添加して 2 時間処理した後に細胞を回収し、イムノブロット法により EphA2 の発現量と EphA2 の S897 のリン酸化レベルを解析した (図の下の数値は、pS897-EphA2 と EphA2 のバンドの濃度比)。

EphA2 はグルコース飢餓時の細胞の生存に寄与する

最後に、グルコース飢餓時に EphA2 が細胞の生存に関与するのかどうかを調べるために、CRISPR/Cas9 システムを利用して EphA2 欠損 U251 細胞 (EphA2 KO) を樹立した (Fig. 2-5 A)。2 つの異なる標的配列に対して樹立した EphA2 欠損細胞に関して、グルコースを除去した培地にグルコースを添加、あるいは無添加の条件で 12 時間培養した後に、培地中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の量を測定して細胞死の割合を評価した。その結果、グルコース飢餓による細胞死の割合が、EphA2 欠損細胞で有意に増加することが明らかになった (Fig. 2-5 B)。したがって、EphA2 の存在はグルコース飢餓時に細胞の生存に寄与することが示唆された。

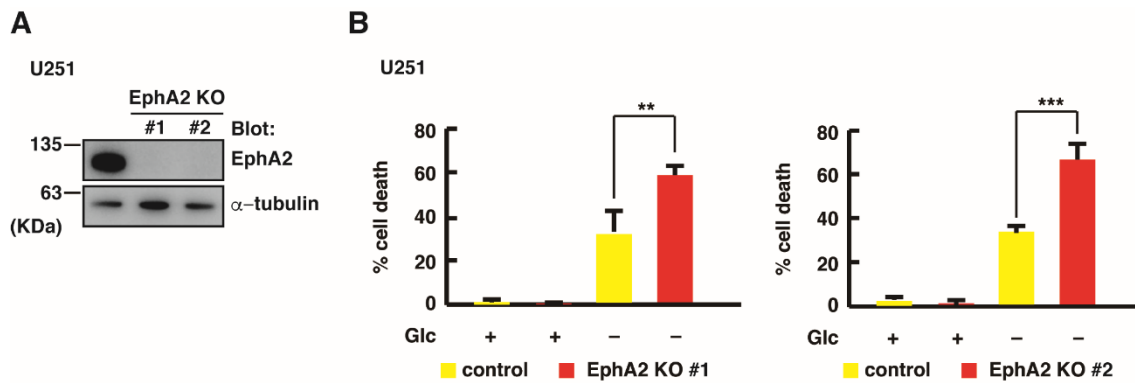


Fig. 2-5 EphA2 欠損によるグルコース飢餓時の細胞生存率の低下

(A) U251 細胞と EphA2 欠損 U251 細胞 (#1、#2) に関して、細胞を回収し、免疫ブロット法により EphA2 と α -tubulin の発現量を解析した。(B) U251 細胞と EphA2 欠損 U251 細胞 (#1、#2) に関して、グルコースを除去した培地にグルコースを 5 mM になるように添加して 12 時間処理した後に LDH 放出アッセイにより細胞死の割合を評価した。グラフは独立して行った 3 回の実験から得られた結果の平均値 \pm 標準偏差を示している (***, $p < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。

第3章 考察

がん細胞は、増殖や生存のために細胞自体の代謝を変化させる。がん細胞の最も重要な特徴に、グルコースの取り込みとグルコース代謝の亢進がある (Lunt and Vander Heiden, 2011; Hay, 2016)。グルコースは、エネルギーの産生と生合成中間体の供給のためだけでなく、がん細胞における主要な抗酸化物質であるグルタチオンと還元型チオレドキシンの生成にとって必要な NADPH の産生にとっても重要である (Hay, 2016; Jeon et al., 2012)。したがって、グルコースが不十分な環境で生き残るために、がん細胞は代謝ストレスに適応する必要がある。本研究によって、グルコース飢餓時の神経膠芽腫細胞において、xCT によるシスチンの取り込みが ROS の蓄積の引き金になり、RSK のリン酸化による活性化を引き起こし、最終的に EphA2 の S897 リン酸化の亢進につながることを示された。また、EphA2 の存在がグルコース飢餓時の細胞の生存に寄与することも明らかになった (Fig. 3)。さらに本研究によって、グルコース飢餓時の神経膠芽腫細胞において、xCT が EphA2 のリガンド非依存的なシグナル伝達経路の重要な制御因子であることが示された。

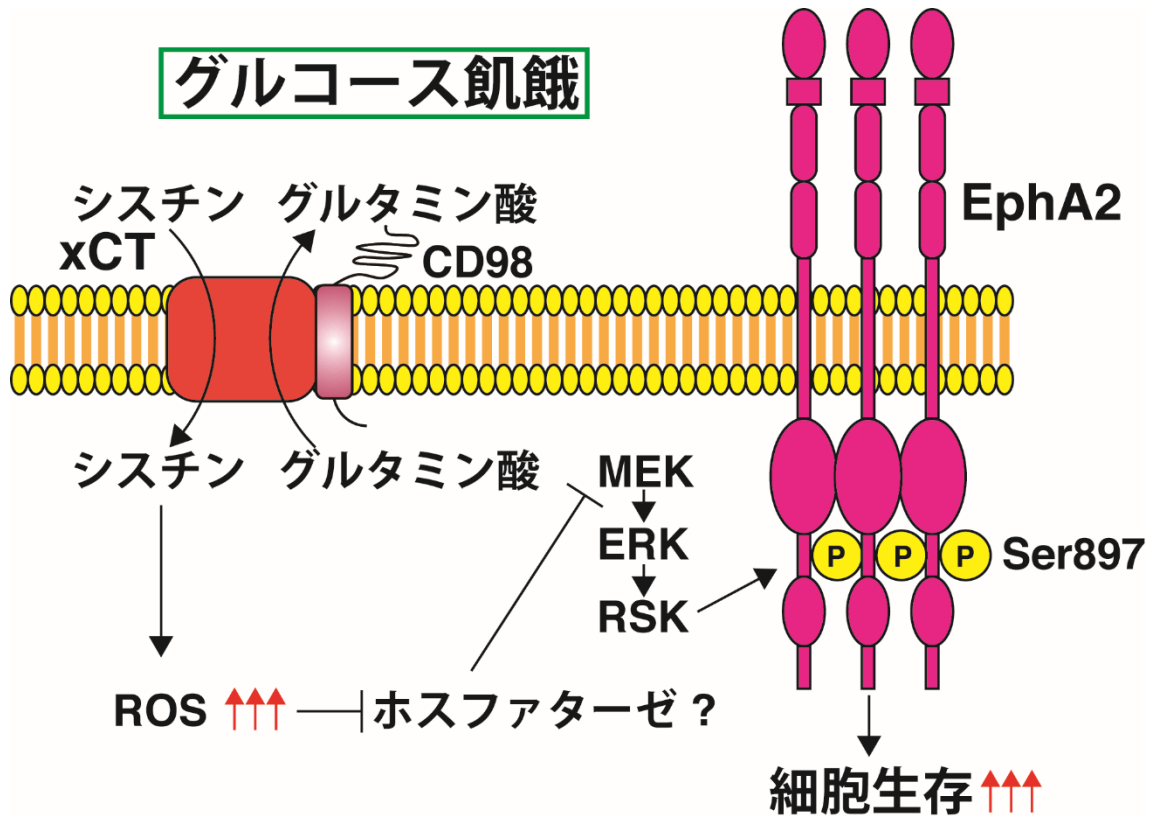


Fig.3 神経膠芽腫細胞における、グルコース飢餓時の xCT を介する EphA2 のリガンド非依存的なシグナル伝達経路

グルコース飢餓時に、xCT を介するシスチンの細胞内への取り込みが ROS の蓄積を引き起こす。次に、ホスファターゼの活性の抑制によって、MEK/ERK/RSK 経路を介する EphA2 の S897 のリン酸化の亢進が起こる。

がん細胞は、他の栄養素とともにアミノに対する要求性が高いので、xCT などのアミノ酸トランスポーターを高発現している (Conrad and Sato, 2012; Lewerenz et al., 2013)。がん細胞での xCT の重要な役割は、抗酸化作用のあるグルタチオンを合成するために必要なシスチンを取り込むことである。以前の研究において、xCT の輸送活性を阻害するとがん細胞の運動能や浸潤能が抑制されることが報告されている (Tsuchihashi et al., 2016; Lyons et al., 2007; Dornier et al., 2017)。この役割の分子メカニズムに関して、xCT による細胞からのグルタミン酸の放出と代謝型グルタミン酸受容体の活性の関与が示唆されている (Dornier et al., 2017)。一方当研究室において、グルコース飢餓時に xCT によりシスチンが取り込まれると、細胞内の NADPH が低下して ROS が蓄積する結果として、細胞死が起こることが示されていた (Goji et al., 2017)。グルコースが十分に存在する状態では、細胞内に取り込まれたグルコースはペントースリン酸経路を介して代謝され、その過程で NADPH が産生される。一方、グルコース飢餓の状態では、ペントースリン酸経路を介する NADPH の産生が抑えられることに加えて、細胞外からシスチンが取り込まれることによって NADPH の枯渇が起こり、細胞内に ROS が蓄積すると考えられる。

本研究では、ROS の蓄積が EphA2 の S897 リン酸化に関与していることを示すために、 H_2O_2 のスカベンジャーであるカタラーゼを使用した。カタラーゼは、培地中の ROS を減少させることによって細胞内の ROS も減少させると考えられる (Tan et al., 2008)。しかし本研究では、細胞をカタラーゼで処理することによって実際に細胞内の ROS 量が減少しているのかどうかについては明確にできていない。したがって今後は、細胞内の ROS レベルの測定が可能な蛍光色素を用いることによって、カタラーゼ処理後に細胞内の ROS レベルを確認する必要がある。グルコース飢餓条件下での細胞内の ROS レベルをカタラーゼ未処理の細胞と比較することによって、カタラーゼにより細胞内の ROS が減少した結果として EphA2 の S897 リン酸化が抑えられたことを明確にできると考えられる。

本研究によって、グルコース飢餓時の RSK と EphA2 のリン酸化の亢進には、

xCT を介するシスチンの取り込みの関与が明らかになった。したがって、xCT はがん細胞におけるアミノ酸代謝だけでなく、細胞生存を促進するシグナル伝達にも寄与する可能性が示唆された。さらに本研究では、グルコース飢餓時に EphA2 の存在は細胞の生存に寄与することも示された。しかし、EphA2 のリガンド非依存的シグナルが、神経膠芽腫細胞の生存につながるのかどうかは明らかにできていない。そこで、野生型の EphA2 あるいは EphA2 の S897 をアラニンに置換したリン酸化を受けない EphA2-S897A 変異体を EphA2 欠損 U251 細胞に発現させて、グルコース飢餓時の細胞生存率を野生型と S897A 変異体の発現細胞で比較する必要がある。グルコース飢餓時に EphA2-S897A 変異体を発現させた細胞の生存率の低下が観察されると、EphA2 の S897 リン酸化がグルコース飢餓時の細胞生存に寄与することが明らかになると考えられる。また、私が所属する研究室では以前に、EphA2 の S897 リン酸化の亢進によって、EphA2 が低分子量 G タンパク質 RhoG のグアニンヌクレオチド交換因子である Ephexin4 と結合することを明らかにしている。さらに、Ephexin4 を介する RhoG の活性化がアノキス耐性の獲得に寄与することを報告している (Kawai et al., 2013)。したがって、グルコース飢餓時に Ephexin4 による RhoG の活性化が EphA2 の下流で起こり、細胞生存の促進につながる可能性も考えられる。今後、神経膠芽腫細胞の生存を制御する EphA2 のリガンド非依存的シグナルのさらなる解明が研究課題である。

EphA2 の S897 リン酸化は、神経膠芽腫を含む多くのがん細胞の悪性化と相関があることが知られている (Zhou and Sakurai, 2017)。また、X線照射により EphA2 の S897 リン酸化が亢進し、細胞の生存率が上昇することが報告されている (Graves et al., 2017)。さらに、EphA2 の発現と S897 リン酸化は、EGFR 阻害剤に耐性がある肺がん細胞で亢進し、EphA2 の欠損が細胞の生存率を低下させることが報告されている (Amato et al., 2016)。私が所属する研究室においても、EphA2 の発現と S897 リン酸化の亢進が、浮遊条件下での細胞の生存を促進することを明らかにしている (Kawai et al., 2013; Akada et al., 2014)。これらのことから、がん細胞にとって好ましくない条件での細胞生存に、EphA2 の発現及びその S897 のリン酸化が大きく寄与していると考えられる。

グルコース飢餓が、ROS 依存的な ERK と RSK の活性化による EphA2 の S897 リン酸化を引き起こす。また、細胞内の ROS は、PP2A に代表されるプロテインホスファターゼのシステイン残基のチオールをスルフェン酸に酸化することで、その働きを不活性化する (Hamanaka and Chandel, 2010; Finkel, 2011; Holmström and Finkel, 2014)。U251 細胞をホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸で処理すると、ERK と RSK のリン酸化、そして EphA2 の S897 リン酸化の亢進が観察された。したがって、ROS によるホスファターゼの不活性化が、EphA2 の

S897 リン酸化の亢進につながったと考えられる。しかし、本研究ではオカダ酸処理による検討しか行っていないので、グルコース飢餓時に ROS が蓄積することで不活性化されるホスファターゼを特定できていない。グルコース飢餓時の EphA2 の S897 リン酸化に、ERK のリン酸化の亢進がみられることから、ERK のホスファターゼである DUSP6 が ROS の蓄積により阻害されている可能性が考えられる (Bermudez et al., 2017)。今後は、MEK、ERK、RSK に特異的なホスファターゼについて検討する必要がある。

本研究では、神経膠芽腫細胞において、グルコース飢餓時に xCT を介するシスチンの取り込みに依存する ROS の蓄積が、MEK/ERK/RSK 経路を活性化することで EphA2 の S897 リン酸化を亢進することを示した。EphA2 や xCT は、神経膠芽腫以外のがん細胞においても高発現することが報告されている (Pasquale, 2010)。しかし、このシグナル伝達経路が神経膠芽腫以外のがん細胞でも見られるのかは明らかにできていない。したがって、他のがん細胞についても本研究で明らかにしたシグナル伝達経路が存在するのかどうかについて検討する必要がある。一方、神経膠芽腫細胞の三次元培養、あるいはマウス生体内において、EphA2 の発現低下が細胞の増殖や腫瘍形成能を抑制することが報告されている (Binda et al., 2012; Miao et al., 2014)。今後、xCT から EphA2 へ至る経路が、三次元培養やマウス生体内で神経膠芽腫細胞の生存に寄与するのかどうかを調べる必要がある。

第4章 結語

いかに本研究結果によって得られた知見をまとめる。

- ・グルコース飢餓により、MEK/ERK/RSK 経路を介する EphA2 の S897 リン酸化が亢進する。
- ・グルコース飢餓による EphA2 の S897 リン酸化には、アミノ酸トランスポーター-xCT によるシスチンの取り込みが必要である。
- ・EphA2 の存在は、グルコース飢餓条件下での神経膠芽腫細胞の生存に寄与する。

本研究により、栄養飢餓状態における細胞生存に対するがん細胞特有の新規シグナル伝達経路を発見することができた。

実験方法

試薬と抗体

本研究では、以下に記述する試薬を使用した。U0126 は Merck Millipore から、BI-D1870、sulfasalazine (SSZ)、catalase、epidermal growth factor (EGF, E9644) は Sigma-Aldrich から、okadaic acid は Alomone labs より購入した。

本研究では、以下に記述する抗体を使用した。ラビットモノクローナル anti-EphA2 (D4A2) 抗体、anti-S897 phospho-EphA2 (D9A1) 抗体、anti-ERK (137F5) 抗体、anti-T202/Y204 phospho-ERK (D13.14.4E) 抗体、anti-RSK2 (D21B2) 抗体、anti-S227 phospho-RSK2 (D53A11) 抗体、anti-xCT/SLC7A11 (D2M7A) 抗体は Cell Signaling Technology より購入した。マウスモノクローナル anti- α tubulin (T5168) 抗体は Sigma-Aldrich より購入した。HRP (セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼ) 標識二次抗体は DAKO より購入した。

細胞培養とトランスフェクション

本研究では、3種類の神経膠芽腫細胞株 (U251 細胞、T98G 細胞、LN229 細胞) を使用した。培養細胞は、10% ウシ胎児血清 (FBS)、4 mM のグルタミン、100 unit/ml のペニシリン、0.1 mg/ml のストレプトマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いて、5% CO₂、37 °C の条件下で培養した。グルコースとアミノ酸を除去した培地は、0.2 g CaCl₂、0.1 mg Fe (NO₃)₃ · 9H₂O、97.67 mg MgSO₄、0.4 g KCl、3.7 g NaHCO₃、6 g NaCl、0.109 g NaH₂PO₄、40 mL MEM Vitamin Solution (100X) liquid (Thermo Fisher Scientific) を H₂O に溶かして全量 1 mL として作製した。グルコースを除去した培地は、上記のグルコースとアミノ酸を除去した培地中に以下に記述したアミノ酸を加えて作製した。: L-Arg · HCl (0.4 mM)、L-Cys · HCl (0.2 mM)、L-His · HCl · H₂O (0.2 mM)、L-Iso (0.8 mM)、L-Leu (0.8 mM)、L-Lys · HCl (0.08 mM)、L-Met (0.2 mM)、L-Phe (0.4 mM)、L-Thr (0.8 mM)、L-Trp (0.08 mM)、L-Tyr · 2Na · 2H₂O (0.4 mM)、L-Val (0.8 mM)、L-Gln (2 mM)

EphA2 欠損 U251 細胞は、CRISPR/Cas9 システムを利用して作製した (Kato et al., 2017)。single guide RNA (sgRNA) は、EphA2 の配列 (5'-cgcctgcttcgccctgctgt-3') を標的にし、ベクターは peSpCAS9(1.1)-2xsgRNA (Addgene plasmid 80768) を使用した。U251 細胞を 2 つの 6-cm ディッシュ (細胞数: 2.5 × 10⁵ cells/dish) にまき、Lipofectamine 2000 (Life Technologies 社) を使用し、添付文書に記述された手順に従ってトランスフェクションを行った。2 日間培養した後、250 µg/ml

の G418 (WAKO) を培地中に加えてセレクションを行った。セレクションの後 10 日間培養した後、シングルセルからコロニー形成をしたものを分離し、anti-EphA2 抗体を使用してスクリーニングを行った。コントロール細胞と xCT 欠損 U251 細胞は以前の報告 (Goji et al., 2017) のとおり作製した。

イムノブロット法

細胞を 35-mm ディッシュ (細胞数: 1×10^5 cells/dish) にまき、24 時間培養する。次に、PBS で 2 回洗浄し、グルコースを除去した培地、またはグルコース、アミノ酸を除去した培地に 5 mM のグルコース、0.2 mM のシスチン、2 mM のグルタミンまたは 0.1 mM のグルタミン酸をそれぞれ加え、各時間培養した後、Laemmli sample buffer で細胞を回収した。その後、SDS-PAGE 法によりタンパク質を分離し、PVDF 膜 (Millipore) へ転写した。3% low-fat milk を含んだ TBS で PVDF 膜をブロッキングした後、特異的な一次抗体と反応させた。次に、PVDF 膜を HRP 標識された二次抗体と反応させた。タンパク質の検出および可視化は、ECL 検出キット (GE Healthcare Life Sciences) を用いて行い、Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences) を使用してバンド画像を取得した。なお、各抗体は Can Get Signal (TOYOBO) またはブロッキング溶液を用いて希釈した。

グルタミン酸放出アッセイ

U251 細胞を 48-well plate (Greiner Bio-One, No. 677180) にまき (2.0×10^4 cells/well)、24 時間培養する。次に、PBS で 2 回洗浄し、グルコース、アミノ酸を除去した培地に 0.2 mM のシスチンまたは 2 mM のグルタミンをそれぞれ加え、4 時間培養する。その後、培地中に放出されたグルタミン酸は、L-Glutamate Assay Kit YAMASA NEO (Yamasa Corporation) を用いて、595 nm の波長の吸光度をマイクロプレートリーダー (Tecan, GENious) によって測定した。

LDH アッセイ

U251 細胞を 48-well plate (Greiner Bio-One, No. 677180) にまき (1.0×10^4 cells/well)、24 時間培養する。次に、PBS で 2 回洗浄し、グルコースを除去した培地に 5 mM のグルコースを加え、12 時間培養する。細胞死は、MTX LDH kit (Kyokuto Pharmaceutical Industrial) を用いて、595 nm の波長の吸光度をマイクロプレートリーダー (Tecan, GENious) によって測定した。0.1% Tween 20 を加えた well では 100 % 細胞死が生じているとみなして、その吸光度を基準として細胞死の割合を算出した。

データ解析

各実験における統計学的な有意差検定は、KaleidaGraph (Synergy Software) を使用し、Student's t-test、あるいは analysis of variance (ANOVA) と Tukey HSD post hoc test で解析した。P<0.05 となった実験結果を統計学的な有意差ありと判定した。

参考文献

Akada M, Harada K, Negishi M, Katoh H. (2014) EphB6 promotes anoikis by modulating EphA2 signaling. *Cell. Signal.*, **26**, 2879–2884.

Amato KR, Wang S, Tan L, Hastings AK, Song W, Lovely CM, Meador CB, Ye F, Lu P, Balko JM, Colvin DC, Cates JM, Pao W, Gray NS, Chen J. (2016) EPHA2 blockade overcomes acquired resistance to EGFR kinase inhibitors in lung cancer. *Cancer Res.*, **76**, 305–318.

Anjum R, Blenis J. (2008) The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 747–758.

Barquilla A, Lamberto I, Noberini R, Heynen-Genel S, Brill LM, Pasquale EB. (2016) Protein kinase A can block EphA2 receptor-mediated cell repulsion by increasing EphA2 S897 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell*, **27**, 2757–2770.

Bermudez O, Marchetti S, Pagès G, Gimond C. (2008) Post-translational regulation of the ERK phosphatase DUSP6/MKP3 by the mTOR pathway. *Oncogene*, **27**, 3685–3691

Bhagatte Y, Lodwick D, Storey N. (2012) Mitochondrial ROS production and subsequent ERK phosphorylation are necessary for temperature preconditioning of isolated ventricular myocytes. *Cell Death Dis.*, **3**, e345

Binda E, Visioli A, Giani F, Lamorte G, Copetti M, Pitter KL, Huse JT, Cajola L, Zanetti N, DiMeco F, De Filippis L, Mangiola A, Maira G, Anile C, De Bonis P, Reynolds BA, Pasquale EB, Vescovi AL. (2012) The EphA2 receptor drives self-renewal and tumorigenicity in stem-like tumor-propagating cells from human glioblastomas. *Cancer Cell*, **22**, 765–780.

Boyd AW, Bartlett PF, Lackmann M. (2014) Therapeutic targeting of EPH receptors and their ligands. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **13**, 39–62.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW. (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 85–95.

- Chung WJ, Lyons SA, Nelson GM, Hamza H, Gladson CL, Gillespie GY, Sontheimer H. (2005) Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. *J. Neurosci.*, **25**, 7101–7110.
- Conrad M, Sato H. (2012) The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system xc⁻: cystine supplier and beyond. *Amino Acids*, **42**, 231–246.
- Conrad M, Kagan VE, Bayir H, Pagnussat GC, Head B, Traber MG, Stockwell BR. (2018) Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. *Genes Dev.*, **32**, 602–619.
- Day BW, Stringer BW, Boyd AW. (2014) Eph receptors as therapeutic targets in Glioblastoma. *Br. J. Cancer*, **111**, 1255–1261.
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison III B, Stockwell BR. (2012) Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, **149**, 1060–1072.
- Dornier E, Rabas N, Mitchell L, Novo D, Dhayade S, Marco S, Mackay G, Sumpton D, Pallares M, Nixon C, Blyth K, Macpherson IR, Rainero E, Norman JC. (2017) Glutaminolysis drives membrane trafficking to promote invasiveness of breast cancer cells. *Nat. Commun.*, **8**, 2255.
- Eckert A, Böck BC, Tagscherer KE, Haas TL, Grund K, Sykora J, Herold-Mende C, Ehemann V, Hollstein M, Chneiweiss H, Wiestler OD, Walczak H, Roth W. (2008) The PEA-15/PED protein protects glioblastoma cells from glucose deprivation-induced apoptosis via the ERK/MAP kinase pathway. *Oncogene*, **27**, 1155–1166.
- Finkel T. (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.*, **194**, 7–15.
- Goji T, Takahara K, Negishi M, Katoh H. (2017) Cystine uptake through the cystine/glutamate antiporter xCT triggers glioblastoma cell death under glucose deprivation. *J. Biol. Chem.*, **292**, 19721–19732.
- Graham NA, Tahmasian M, Kohil B, Komisopoulou E, Zhu M, Vivanco I, Teitell MA,

Wu H, Ribas A, Lo RS, Mellinshoff IK, Mischel PS, Graeber TG. (2012) Glucose deprivation activates a metabolic and signaling amplification loop to cell death. *Mol. Syst. Biol.*, **8**, 589.

Graves PR, Din SU, Ashamalla M, Ashamalla H, Gilbert TSK, Graves LM. (2017) Ionizing radiation induces EphA2 S897 phosphorylation in a MEK/ERK/RSK-dependent manner. *Int. J. Radiat. Biol.*, **93**, 929–936.

Hamanaka RB, Chandel NS. (2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 505–513.

Hamaoka Y, Negishi M, Katoh H. (2016) EphA2 is a key effector of the MEK/ERK/RSK pathway regulating glioblastoma cell proliferation. *Cell. Signal.*, **28**, 937–945.

Hamaoka Y, Negishi M, Katoh H. (2018) Tyrosine kinase activity of EphA2 promotes its S897 phosphorylation and glioblastoma cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **499**, 920–926.

Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646–674.

Harada K, Negishi M, Katoh H. (2015) HGF-induced serine 897 phosphorylation of EphA2 regulates epithelial morphogenesis of MDCK cells in 3D culture. *J. Cell Sci.*, **128**, 1912–1921.

Hay N. (2016) Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat. Rev. Cancer*, **16**, 635–649.

Holmström KM, Finkel T. (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 411–421.

Jeon SM, Chandel NS, Hay N. (2012) AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*, **485**, 661–665.

Katoh Y, Michisaka S, Nozaki S, Funabashi T, Hirano T, Takei R, Nakayama K. (2017) Practical method for targeted disruption of cilia-related genes by using CRISPR/ Cas9-

mediated homology-independent knock-in system. *Mol. Biol. Cell*, **28**, 898–906.

Kawai H, Kobayashi M, Hiramoto-Yamaki N, Harada K, Negishi M, Katoh H. (2013) Ephexin4-mediated promotion of cell migration and anoikis resistance is regulated by serine 897 phosphorylation of EphA2. *FEBS Open Bio*, **3**, 78–82.

Kim MJ, Park IJ, Yun H, Kang I, Choe W, Kim SS, Ha J. (2010) AMP-activated protein kinase antagonizes pro-apoptotic extracellular signal-regulated kinase activation by inducing dual-specificity protein phosphatases in response to glucose deprivation in HCT116 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **285**, 14617–14627.

Koppula P, Zhang Y, Shi J, Li W, Gan B. (2017) The glutamate/cystine antiporter SLC7A11/xCT enhances cancer cell dependency on glucose by exporting glutamate. *J. Biol. Chem.*, **292**, 14240–14249.

Koppula P, Zhang Y, Zhuang L, Gan B. (2018) Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. *Cancer Commun.*, **38**, 12.

Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Chen JC, Davis BH, Sim JE, Corry PM, Spitz DR. (1998) Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogenactivated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrugresistant human breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5294–5299.

Lewerenz J, Hewett SJ, Huang Y, Lambros M, Gout PW, Kalivas PW, Massie A, Smolders I, Methner A, Pergande M, Smith SB, Ganapathy V, Maher P. (2013) The cystine/glutamate antiporter system xc⁻ in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.*, **18**, 522–555.

Liu F, Park PJ, Lai W, Maher E, Chakravarti A, Durso L, Jiang X, Yu Y, Brosius A, Thomas M, Chin L, Brennan C, DePinho RA, Kohane I, Carroll RS, Black PM, Johnson MD. (2006) A genome-wide screen reveals functional gene clusters in the cancer genome and identified EphA2 as a mitogen in glioblastoma. *Cancer Res.*, **66**, 10815–10823.

Lunt SY, Vander Heiden MG. (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**, 441–464.

Lyons SA, Chung WJ, Weaver AK, Ogunrinu T. (2007) Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer Res.*, **67**, 9463–9471.

Miao H, Li DQ, Mukherjee A, Guo H, Petty H, Cutter J, Basilion JP, Sedor J, Wu J, Danielpour D, Sloan AE, Cohen MI, Wang B. (2009) EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer Cell*, **16**, 9–20.

Miao H, Gale NW, Guo H, Qian J, Petty A, Kaspar J, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos G, Hambarzumyan D, Lathia JD, Rich JN, Wang B. (2014) EphA2 promotes infiltrative invasion of glioma stem cells in vivo through cross-talk with Akt and regulates stem cell properties. *Oncogene*, **34**, 558–567.

Nakada M, Hayashi Y, Hamada J. (2011) Role of Eph/ephrin tyrosine kinase in malignant Glioma. *Neuro-Oncology*, **13**, 1163–1170.

Pasquale EB. (2010) Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 165–180.

Polewski MD, Reveron-Thornton RF, Cherryholmes GA, Marinov GK, Cassady K, Aboody KS. (2016) Increased expression of system xc- in glioblastoma confers an altered metabolic state and temozolomide resistance. *Mol. Cancer Res.*, **14**, 1229–1242.

Sabharwal SS, Schumacker PT. (2014) Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer*, **14**, 709–721.

Savaskan NE, Heckel A, Hahnen E, Engelhorn T, Doerfler A, Ganslandt O, Nimsky C, Buchfelder M, Eyüpoglu IY. (2008) Small interfering RNA-mediated xCT silencing in gliomas inhibits neurodegeneration and alleviates brain edema. *Nat. Med.*, **14**, 629–632.

Shin CS, Mishra P, Watrous JD, Carelli V, D'Aurelio M, Jain M, Chan DC. (2017) The glutamate/cystine xCT antiporter antagonizes glutamine metabolism and reduces nutrient flexibility. *Nat. Commun.*, **8**, 15074.

Sleire L, Skeie BS, Netland IA, Førde HE, Dadoo E, Selheim F, Leiss L, Heggdal JI,

Pedersen PH, Wang J, Enger PØ. (2015) Drug repurposing: sulfasalazine sensitizes glioma to gamma knife radiosurgery by blocking cystine uptake through system Xc-, leading to glutathione depletion. *Oncogene*, **34**, 5951–5959.

Stockwell BR, Angeli JPF, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, Fulda S, Gascón S, Hatzios SK, Kagan VE, Noel K, Jiang X, Linkermann A, Murphy ME, Overholtzer M, Oyagi A, Pagnussat GC, Park J, Ran Q, Rosenfeld CS, Salnikow K, Tang D, Torti FM, Torti SV, Toyokuni S, Woerpel KA, Zhang DD. (2017) Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell*, **171**, 273–285.

Takeuchi S, Wada K, Toyooka T, Shinomiya N, Shimazaki H, Nakanishi K, Nagatani K, Otani N, Osada H, Uozumi Y, Matsuo H, Nawashiro H. (2013) Increased xCT expression correlates with tumor invasion and outcome in patients with glioblastoma. *Neurosurgery*, **72**, 33–41.

Tan WQ, Wang K, Lv DY, Li PF. (2008) Foxo3a inhibits cardiomyocyte hypertrophy through transactivating catalase. *J. Biol. Chem.*, **283**, 29730-29739

Tsuchihashi K, Okazaki S, Ohmura M, Ishikawa M, Sampetean O, Onishi N, Wakimoto H, Yoshikawa M, Seishima R, Iwasaki Y, Morikawa T, Abe S, Takao A, Shimizu M, Masuko T, Nagane M, Furnari FB, Akiyama T, Suematsu M, Baba E, Akashi K, Saya H, Nagano O. (2016) The EGF receptor promotes the malignant potential of glioma by regulating amino acid transport system xc(-). *Cancer Res.*, **76**, 2954–2963.

Wang LF, Fokas E, Bieker M, Rose F, Rexin P, Zhu Y, Pagenstecher A, Engenhart-Cabillic R, An HX. (2008) Increased expression of EphA2 correlates with adverse outcome in primary and recurrent glioblastoma multiforme patients. *Oncol. Rep.*, **19**, 151–156.

Wykosky J, Debinski W. (2008) The EphA2 receptor and ephrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting. *Mol. Cancer Res.*, **6**, 1795–1806.

Wykosky J, Gibo DM, Stanton C, Debinski W. (2005) EphA2 as a novel molecular marker and target in glioblastoma multiform. *Mol. Cancer Res.*, **3**, 541–551.

Zhang J, Pavlova NN, Thompson CB. (2017) Cancer cell metabolism: the essential role

of the nonessential amino acid, glutamine. *EMBO J.*, **36**, 1302–1315.

Zhou Y, Yamada N, Tanaka T, Hori T, Yokoyama S, Hayakawa Y, Yano S, Fukuoka J, Koizumi K, Saiki I, Sakurai H. (2015) Crucial roles of RSK in cell motility by catalyzing serine phosphorylation of EphA2. *Nat. Commun.*, **6**, 8679.

Zhou Y, Sakurai H. (2017) Emerging and diverse functions of the EphA2 noncanonical pathway in cancer progression. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 1616–1624.

略語表

本論文中で使用した略語は以下のとおりである(アルファベット順)。

AA, amino acid

ANOVA, analysis of variance

EGF, epidermal growth factor

EPH, erythropoietin-producing hepatocellular receptor

ERK, extracellular signal-regulated kinase

FBS, fetal bovine serum

HRP, horseradish peroxidase

KO, knockout

LDH, lactate dehydrogenase

NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

PBS, phosphate-buffered saline

PKA, protein kinase A

PP2A, protein phosphatase 2A

PVDF, polyvinylidene difluoride

ROS, reactive oxygen species

RSK, ribosomal s6 kinase

SAM, sterile alpha motif

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

sgRNA, single guide RNA

SSZ, sulfasalazine

TBS, Tris-buffered saline

謝辞

本研究に際し、研究実施の機会を与えて頂き、終始有益な御指導ならびに御助言を賜りました、京都大学大学院 薬学研究科 神経機能制御学分野・教授 木村 郁夫 先生 に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、直接の御指導とご鞭撻を頂きました、京都大学大学院 薬学研究科 神経機能制御学分野・准教授 加藤 裕教 先生 に深く感謝いたします。

本研究に際し、的確な御助言を頂きました、京都大学大学院 薬学研究科 神経機能制御学分野・助教 大植 隆司 先生 に心より感謝いたします。

本研究を通じて、有益な御助言を頂きました、京都大学大学院 薬学研究科 神経機能制御学分野・特定助教 池田 貴子 先生 に心より感謝いたします。

本研究に際し、実験のご協力を頂き、研究を通じて議論を交わして頂いた、京都大学大学院 薬学研究科 神経機能制御学分野の皆様 に深く感謝いたします。

本研究は、藤多仁生奨学金の助成を受け遂行いたしました。故 藤多 哲朗 先生 およびご遺族、関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

最後に、長年にわたる私の学生生活を温かく見守り励まし続けてくれた家族に、心から感謝いたします。

以下の学術論文の内容に基づき本学位論文は書かれたものである。

The cystine/glutamate antiporter xCT is a key regulator of EphA2 S897 phosphorylation under glucose-limited conditions

Koji Teramoto, Hironori Katoh

Cellular Signalling 62 (2019) 109329