

神経膠芽腫細胞におけるグルコース依存性及び

SLC7A11/xCT 発現制御に対する

細胞密度の影響と分子機構の研究

山口 一樹

目次

要旨	4
緒論	7
第一章 高密度状態の神経膠芽腫細胞は mTOR の活性抑制及びリソソームにおける SLC7A11/xCT の分解を介してグルコース欠乏下での生存性を獲得する	13
【第一章の実験方法】	15
【第一章の実験結果】	19
第一節 …… 神経膠芽腫細胞は高密度状態において SLC7A11 の発現量が減少しグルコース欠乏による細胞死が抑制される	19
第二節 mTOR の活性阻害により SLC7A11 発現及びグルコース欠乏による細胞死が抑制される	22
第三節 高密度状態は mTOR 活性を抑制して神経膠芽腫細胞における SLC7A11 のリソソーム分解を誘導する	25
第四節 神経膠芽腫細胞の低密度状態と高密度状態では SLC7A11 およびリソソームの細胞内局在が変化する	28
第五節 高密度の神経膠芽腫細胞においてリソソーム阻害により発現増加した SLC7A11 はグルコース欠乏下での細胞死を誘導する	30
【第一章の考察】	33
第二章 NF2/Merlin は神経膠芽腫細胞における高細胞密度での SLC7A11/xCT 発現とグルコース欠乏下での細胞生存性を制御する	35
【第二章の実験方法】	36
【第二章の実験結果】	40

第一節 Merlin の欠損は高密度培養条件下の神経膠芽腫細胞における SLC7A11 の発現低下を抑制する	40 -
第二節 Merlin の欠損は高密度状態における SLC7A11 アミノ酸輸送活性と グルコース欠乏下での細胞死を促進する	42 -
第三節 N-Cadherin 発現抑制は SLC7A11 発現にほとんど影響しない	47 -
第四節 Merlin の欠損により高密度状態における SLC7A11 mRNA 発現が 増加する	49 -
【第二章の考察】	53 -
結語	56 -
参考文献	59 -
謝辞	69 -

要旨

多くのがん細胞は、グルコースに対する輸送体や代謝酵素の発現量増加が見られ、取り込まれたグルコースはがん細胞の増殖と生存に必要なエネルギーと生合成中間体を供給するために利用される。さらに、ペントースリン酸経路などのグルコース代謝経路によって産生されたニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate : NADPH) は、がん細胞の主要な抗酸化システムであるグルタチオンシステムにおける重要な電子供給体としての機能を持つ。そのため、多くのがん細胞は、グルコース欠乏環境下では、酸化ストレスを要因とした急速な細胞死を引き起こす。アミノ酸交換輸送体 SLC7A11/xCT は、細胞内グルタミン酸との交換により細胞外シスチンを細胞内に輸送する。SLC7A11 を介して細胞内に輸送されたシスチンは細胞内でシステインに還元され、還元型グルタチオン (GSH) の生成に利用される。がん細胞における高いレベルの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) は、生存性や増殖能向上に寄与する一方で、細胞内 ROS が過剰に存在すると細胞死を引き起こす。そのため、がん細胞は細胞内 ROS レベルを一定に調整するための抗酸化システムを増強させている。そのひとつである GSH 抗酸化システムに寄与する SLC7A11 は、神経膠芽腫を含む様々ながん細胞で高発現していることが報告されている。申請者が所属する研究室では以前に、SLC7A11 の発現が神経膠芽腫細胞のグルコース依存性を決定していることを報告した。これまでの報告では、グルコース欠乏ががん細胞の細胞死の引き金であると考えられていた。ところが、SLC7A11 を高発現している神経膠芽腫細胞において取り込まれたシスチンが、グルコース欠乏環境下では NADPH の枯渇及び ROS 蓄積を伴った細胞死を誘導することが明らかになった。さらに最新の報告では、このグルコース欠乏環境下にシスチンの取り込みによって誘導される細胞死が、異常なジスルフィド結合に伴ったアクチンネットワーク崩壊により誘導される細胞死として "Disulfidptosis" と名付けて報告された。本研究では、神経膠芽腫細胞が高密度で存在すると、グルコース欠乏環境下でも細胞死が回避されることを偶然発見した。これは、グルコース飢餓状態に対して、がん細胞が生存性を獲得するシステムの 1 つとして考えられた。そこで、神経膠芽腫細胞の細胞培養状態と、SLC7A11/xCT

の発現を制御するメカニズム及びグルコース欠乏下での細胞死との関与を解明することを目的とし、本研究を行なった。

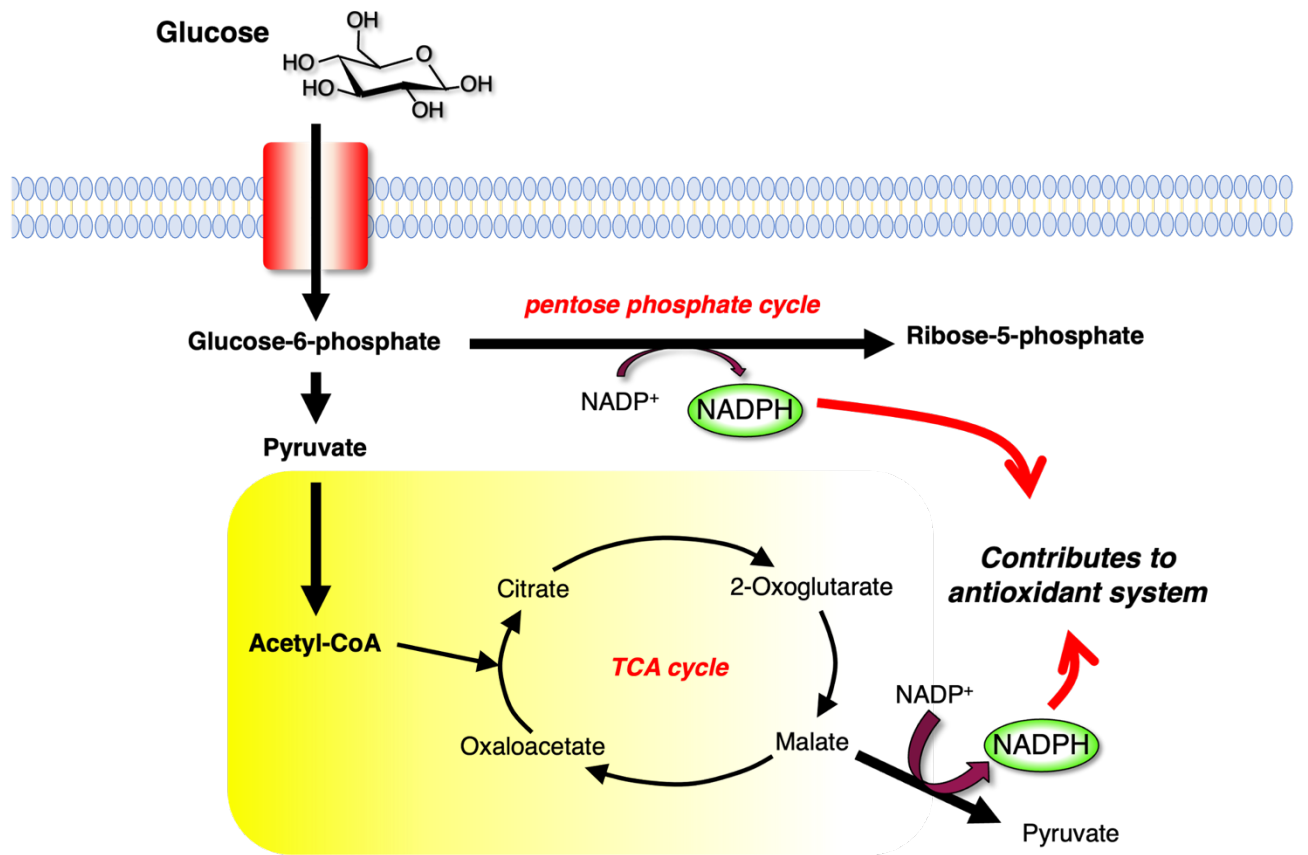
神経膠芽腫細胞株を低密度状態 (1.0×10^4 cells/cm²) と高密度状態 (1.0×10^5 cells/cm²) で培養し、SLC7A11 の発現量とグルコース欠乏下で誘導される細胞死を評価した。低密度状態では、SLC7A11 が高発現しており、グルコース欠乏下では細胞死が生じる。対して高密度状態では、SLC7A11 の発現レベルが低下しており、グルコース欠乏下での細胞死が認められなかった。次に、低密度状態及び高密度状態でのタンパク質発現制御に関与する細胞内シグナル分子を比較したところ、mTOR の活性指標である p70 S6 キナーゼのリン酸化レベルが高密度状態で減少していることを見出した。mTOR 阻害薬 Torin 1 を用いたところ、低密度状態における SLC7A11 発現が減少し、グルコース欠乏下での細胞死も抑制された。一方で、mTOR の活性化がリソソームによるタンパク質分解を含む、種々の異化機能を抑制することが報告されている。そこで、リソソーム機能阻害薬 Bafilomycin A1 を用いたところ、高密度状態における SLC7A11 発現が増加し、グルコース欠乏下での細胞死が誘導された。以上の結果より、高密度状態では mTOR 活性の低下に伴ったリソソームにおける SLC7A11 の分解が、グルコース欠乏下での細胞生存に寄与することが明らかとなった。多くのがん細胞において細胞の高密度状態により Hippo シグナル伝達経路が活性化されることが報告されている。そこで、Hippo シグナル伝達経路で上流因子とされる神経線維腫症 2 型遺伝子 NF2/Merlin (Moesin-ezrin-radixin-like protein, schwannomin) に着目した。NF2/Merlin を CRISPR-Cas9 で欠損させた遺伝子欠損細胞株 (NF2 KO 細胞) を樹立し、高密度状態における SLC7A11 の発現抑制及びグルコース欠乏下での細胞生存に対する影響を評価した。その結果、NF2 KO 細胞は高密度状態にも関わらず、Control 細胞でみられた SLC7A11 の発現低下が認められず、グルコース欠乏下での細胞死が増加した。一方で、NF2 KO による SLC7A11 タンパク質の発現低下の抑制は、mTOR 活性の阻害では影響されなかった。また、高密度状態では SLC7A11 mRNA レベルが低下することに対して、NF2 KO 細胞の高密度状態においては SLC7A11 mRNA レベルの増加が確認された。以上、高密度状態では mTOR 活性に依存しない NF2/Merlin を介した転写レベルでの SLC7A11 発現制御機構の存在が明らかになった。

以上本研究は、神経膠芽腫細胞における細胞密度状態に応じたグルコース欠乏下での細胞死回避システムの存在と、その分子機構の一端を解明した。

緒論

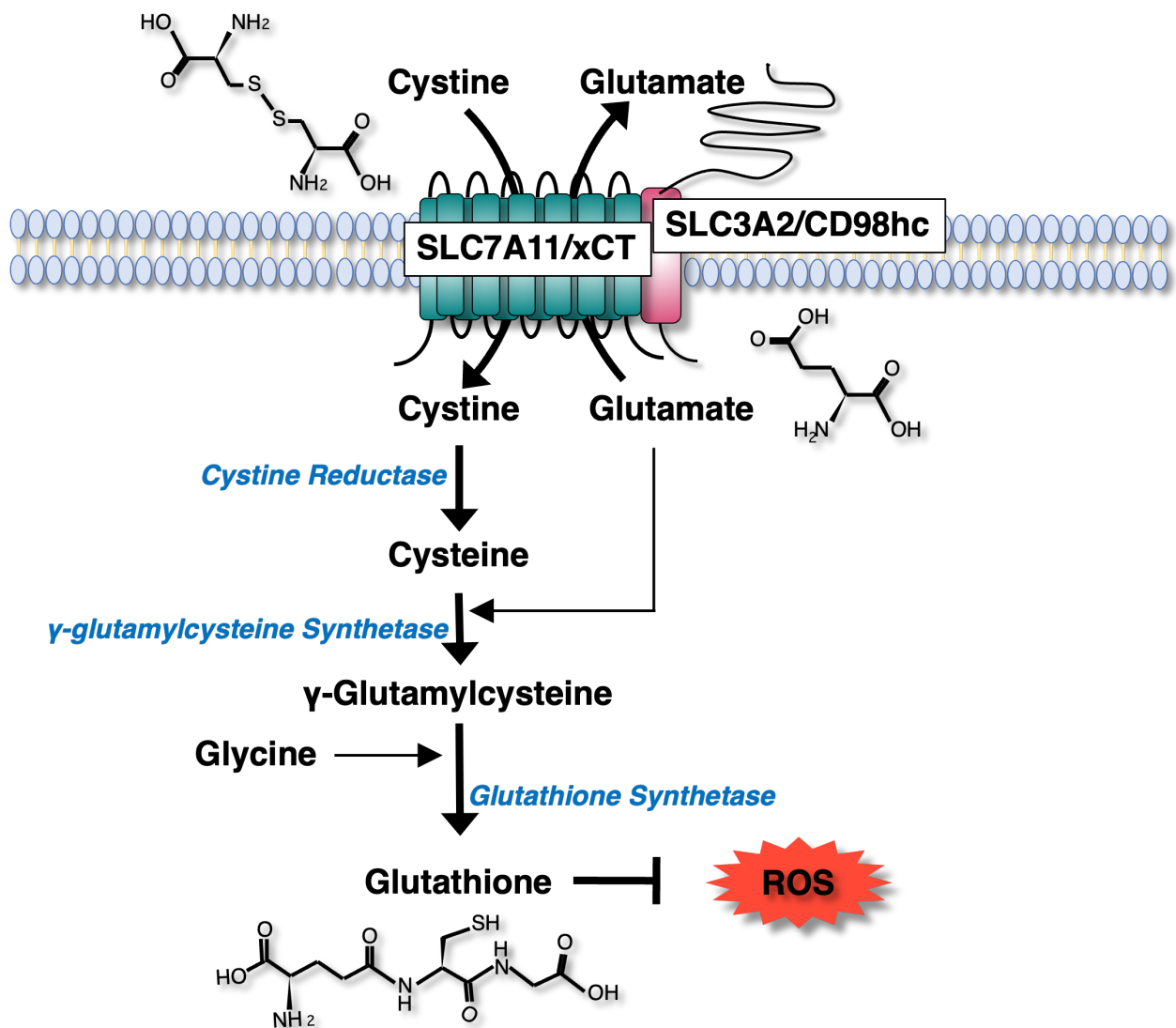
ヒト脳内において神経細胞及び神経線維細胞の支持をする神経膠細胞が腫瘍化することで発生する神経膠腫 (Glioma)は、脳における原発腫瘍のなかでも 25%を占めており、さらに病理診断上の悪性度により 4つのグレードに分類される。神経膠芽腫 (Glioblastoma) は、中でも最も悪性度の高いグレードIVに分類され、神経膠腫の 40%ほどで生じる最も発症頻度の高い神経膠腫である^{1, 2}。現状の治療方法としては、初期治療法として放射線療法、テモゾロミドやベバジズマブ、ニムスチンを用いた化学療法が主に行われている。加えて、外科的手術による腫瘍組織の切除が行われるが、神経膠腫は浸潤性が高く、正常脳組織との境界は非常にわかりづらいため、完全に切除することが大変困難である。さらに、術後再発の予防としても放射線療法、化学療法が行われる。しかしながら、残存腫瘍による再発率が高く、再発した神経膠芽腫の効果的な治療法は確立されていないことから、未だ致死性は 100%、5年生存率は僅か 5%程度、生存期中央値は未だ 10ヶ月程度と、極めて予後が悪いのが現状である^{3, 4, 5}。そのため、神経膠芽腫の新たな標的分子による薬物治療が期待されている。

神経膠芽腫を含む多くのがん細胞においては、グルコース輸送体やグルコース代謝酵素の発現量増加が見られ、取り込まれたグルコースはがん細胞の増殖と生存に必要なエネルギーと生合成中間体を供給するために利用される^{6, 7}。さらに、ペントースリン酸経路などのグルコース代謝経路によって産生された還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH) は、がん細胞の主要な抗酸化システムであるグルタチオンやチオレドキシニンシステムにおける重要な電子供給体としての機能を持つ⁸⁻¹⁰。そのため、多くのがん細胞は、グルコースが欠乏した環境下では、酸化ストレスを要因とした急速な細胞死を引き起こすことが知られている (Figure.0-1)。



【Figure.0-1 がん細胞におけるグルコース代謝】

細胞外シスチンを細胞内グルタミン酸との交換により細胞内に輸送するアミノ酸交換輸送系として知られている system xc⁻は、軽鎖サブユニット、SLC7A11/xCTと重鎖サブユニット、SLC3A2/CD98/4F2hc の 2 種のタンパク質により構成されている¹¹ (Figure.0-2)。



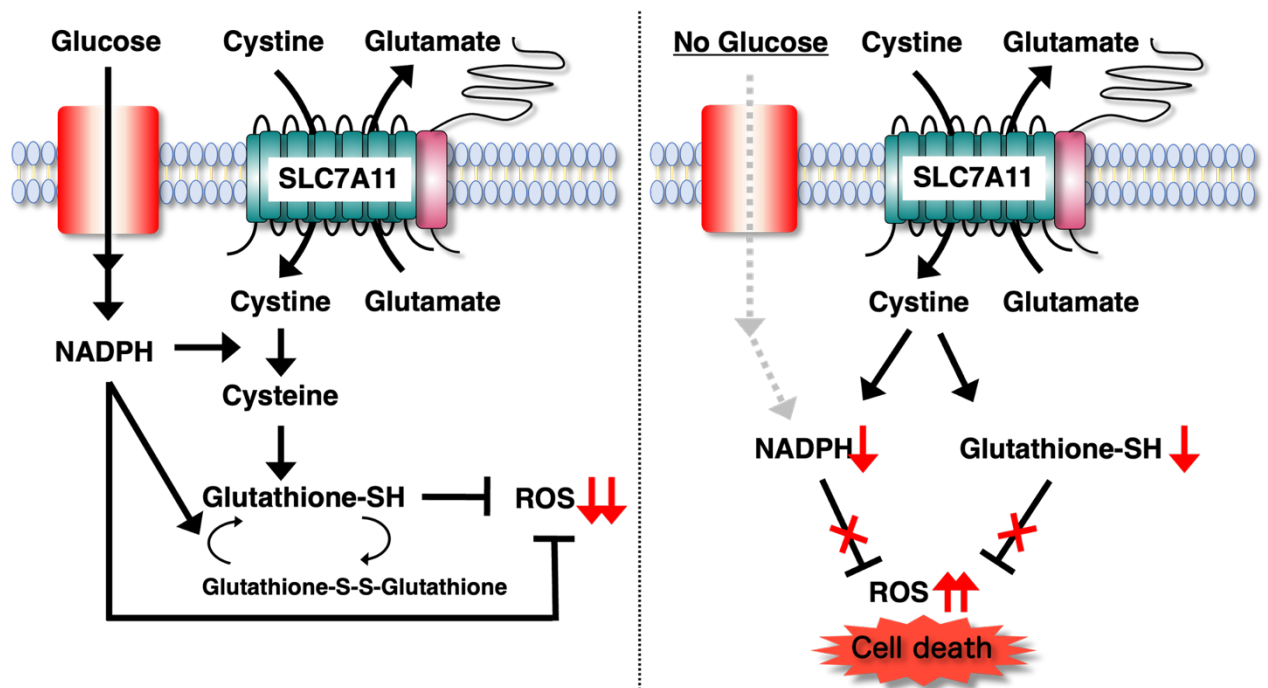
【Figure.0-2 アミノ酸交換輸送系System xC⁻】

system xC⁻におけるアミノ酸に対する特異性及び輸送活性は、SLC7A11/xCT に依存しており、SLC7A11/xCT の発現量とシスチン/グルタミン酸の交換輸送能は比例する。SLC7A11/xCT を介して細胞内に輸送されたシスチンは、細胞内でシステインに還元され、主要な抗酸化システムとして機能する還元型グルタチオン (GSH) の生合成に利用されている。還元型グルタチオンは、グリシン、グルタミン酸、システインの三つのアミノ酸から合成され、システイン由来のチオール基が還元作用を有する^{12, 13}。GSH は、細胞内の活性酸素種を還元することで酸化ストレスを抑制すると同時に、自身は酸化されて酸化型グルタチオン (GSSG) となる。そして GSSG は、グルコース代謝のひとつであるペントースリン酸経路で生成される

NADPH を補酵素とする酵素、グルタチオンレダグダーゼにより還元されて GSH となり、再度抗酸化物質として機能する¹⁴。また近年、SLC7A11/xCT の輸送活性阻害は、ペルオキシダーゼ活性を GSH に依存するグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) の活性低下が引き起こり、その結果、鉄イオン依存的なリン脂質の過剰酸化損傷により生じる細胞死、フェロトーシスが誘導されることが報告された¹⁵⁻¹⁸。故に、SLC7A11/xCT は創薬標的として一層の研究がなされている。

がん細胞における高いレベルの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) は、がん細胞の生存性や増殖能向上に寄与している。また高いレベルの ROS は炎症反応や DNA 損傷の誘発、遺伝子の突然変異を引き起こし、がんの発症や悪性化、さらには化学療法に対する耐性の獲得に寄与していることが知られている。一方で、細胞内の過剰な活性酸素種の産生は、DNA やタンパク質、脂質に損傷を与え、最終的には細胞死を引き起こす^{19,20}。そのため、がん細胞では細胞内活性酸素種レベルを一定に調整するための抗酸化システムが増強されている。一例として、シスチンの取り込みを担い、GSH による抗酸化システムに寄与する SLC7A11/xCT は、神経膠芽腫を含む様々ながん細胞で高発現していることが報告されている^{15, 21, 22}。

近年、SLC7A11/xCT の発現が、がん細胞のグルコース依存性を決定しているという研究成果が、所属研究室を含めた 3 つのグループから報告された²³⁻²⁶ (Figure.0-3)。これまでの報告では、グルコースの欠乏ががん細胞の細胞死の引き金であると考えられていた。ところが、グルコース欠乏環境下で SLC7A11 を介して取り込まれたシスチンが引き金となって、NADPH の枯渇及び活性酸素種の蓄積を伴った細胞死が誘導されることが明らかになった²⁵。



【Figure.0-3 がん細胞のグルコース依存性における SLC7A11/xCT の関与】

最新の報告では、SLC7A11/xCT の発現が高いがん細胞においてグルコース欠乏環境下で生じる細胞死が”Disulfidptosis” と名付けて報告された^{27, 28}。グルコース欠乏環境下において NADPH 供給が低下している状態で、SLC7A11/xCT によりシスチンが取り込まれることで、細胞内シスチンやジスルフィド分子の蓄積が生じる。これにより、アクチン細胞骨格タンパク質での異常なジスルフィド結合誘導に伴うアクチンネットワークの崩壊が引き起こされ、急速に細胞死が誘導されることが明らかになった²⁷⁻²⁹。これらの研究成果から、SLC7A11/xCT の発現が高いがん細胞では、グルコースの取り込みや代謝を阻害することで、シスチン依存的な細胞死を誘導する有効な治療法につながることを考えられた。しかし、これまでにグルコース輸送体や代謝酵素の阻害薬が、がん治療に有効であるとの報告はあまりされておらず、グルコースが欠乏する状態で、がん細胞が細胞死を回避している何らかの要因が考えられた。そこで本研究では、SLC7A11/xCT を介したグルコース欠乏下での細胞死を回避するメカニズムを、SLC7A11/xCT タンパク質の発現制御機構に着目して検討した。

第一章では、神経膠芽細胞が高密度で存在する際に、リソソームにおける SLC7A11 の分解が生じ、これによりグルコースが欠如した環境でも細胞死を回避していることを明らかにした。第二章では、神経線維腫症 2 型遺伝子 *NF2* によりコードされる腫瘍抑制タンパク質 Merlin (Moesin-ezrin-radixin-like protein、also known as schwannomin) が、高密度状態においては mRNA レベルで SLC7A11 の発現量を制御することを明らかにした。これらの研究成果について、以下に論述する。

第一章

高密度状態の神経膠芽腫細胞は mTOR の活性抑制及び リソソームにおける SLC7A11/xCT の分解を介して グルコース欠乏下での生存性を獲得する

細胞密度が、がん細胞の細胞特性や細胞生存に影響を与えることはよく知られている。例えば、がん細胞が高密度状態で存在すると抗がん剤感受性が低下する³⁰⁻³²。また高密度培養によって、PVRL4 や E-cadherin 含む細胞間接着シグナルタンパク質や Hippo シグナル経路を介して、フェロトーシスが抑制される報告もされている³³⁻³⁶。このように、がん細胞は様々なストレスに対して適応、あるいは回避するシステムを獲得していると考えられる。

Mechanistic target of rapamycin (mTOR) は、細胞成長と細胞増殖における中心的な調節因子の一つである。mTOR の活性は、成長因子と環境栄養状態に応じて調節されることが知られている³⁷⁻⁴⁰。また、mTOR シグナル伝達はがん細胞において高頻度で活性化されており、腫瘍成長とがんの進行に寄与している^{41,42}。mTOR の活性化は、同化プロセス (タンパク質、脂質、ヌクレオチドの合成) の促進、及び異化プロセス (オートファジー - リソソーム システムおよびユビキチン - プロテアソーム システム) の抑制を引き起こす⁴³⁻⁴⁸。mTOR シグナル伝達は、グルコース、アミノ酸、脂肪酸の代謝に関与する主要な酵素発現と酵素活性を調節することにより、がん細胞の代謝リプログラミングにも機能することが報告されている⁴²。

本章では、神経膠芽腫細胞におけるグルコース欠乏状態での生存性獲得において、細胞密度に依存した mTOR 活性の変化および SLC7A11 の発現量変化について検討

を行い、リソソームにおける SLC7A11 の分解が、細胞密度及び mTOR の活性の変化により制御をされていることを示す。

【第一章の実験方法】

細胞培養

実験には3種類の神経膠芽腫細胞株、U251細胞 (ECACC (No. EC09063001) から購入)、LN229細胞 (ATCC (No. CRL-2611) から購入)、T98G細胞 (文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクト (No. RCB1954) を通じて理研 BRC から提供) を利用した。培養細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)、4.0 mM glutamine、100 units/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて、5% CO₂、37 °C の条件下で培養した。

培養培地

無血清培地として、4 mM glutamine を含む DMEM を用いた。また、グルコースを含まない培地は 0.1 g CaCl₂、0.05 mg Fe (NO₃)₃ · 9H₂O、48.98 mg MgSO₄、0.2 g KCl、1.85 g NaHCO₃、3.03 g NaCl、0.0545 g NaH₂PO₄、0.5 g Glu、0.042 g L-Arg · HCl、0.015 g Gly、0.021 g L-His · HCl · H₂O、0.0525 g L-Iso、0.0525 g L-Leu、0.073 g L-Lys · HCl、0.015 g L-Met、0.033 g L-Phe、0.021 g L-Ser、0.0475 g L-Thr、0.008 g L-Trp、0.051895 g L-Tyr · 2Na · 2H₂O、0.047 g L-Val、20 mL MEM Vitamin Solution (100X) liquid (Thermo Fisher Scientific 社) を H₂O に溶かして全量 500 mL として作製した。

グルコース欠乏条件と細胞死の測定

U251細胞、LN229細胞、T98G細胞を 48 well plate (Greiner Bio-One、No.677180) に低密度状態 (LD、 1.0×10^4 cells/cm²) または高密度状態 (HD、 1.0×10^5 cells/cm²) で播種した。播種 48 時間後、培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、培養培地を 10% の透析除去処理済み FBS (HyClone) を含むグルコース欠乏培地に交換し、さらに 24 時間培養した。細胞死は、製造元の指示に従って、MTX LDH キット (Kyokuto Pharmaceutical Industrial) を使用して培地中に放出された lactate dehydrogenase (LDH) 量を測定することにより評価した。吸光度は、マイクロプレートリーダー (Tecan、GENious) を使用して 595 nm で測定した。測定値の評価は、

0.1% Tween 20 で処理した後の LDH 放出の値を 100% の細胞死として定義し行った。

Immunoblotting と使用抗体

U251、LN229、T98G を 48 well plate に低密度状態または高密度状態で播種し、10% FBS を含む上記培地で 24 時間培養した。その後、Torin 1 あるいは Bafilomycin A1 で 24 時間処理した。細胞を PBS で洗浄した後、Sample buffer (2% SDS、0.87M Tris-HCl (pH 6.8)、10% glycerol、1% BPB/EtOH、2-mercaptoethanol) 50 μ l/well で溶解し、1.5 ml エッペンチューブに回収した。回収したサンプル中 5.0 μ L を 12.5% SDS-polyacrylamide gel を用いて電気泳動によりタンパク質を分離させた。分離させたタンパク質を PVDF 膜へ転写し、それぞれの一次抗体を、blocking buffer (TBS、5% w/v non-fat dry milk) 中で希釈して 4 °C で一晩反応させた。次に、二次抗体を blocking buffer で希釈し、室温で 60 分間反応させ、Chemi Lumi One あるいは Chemi Lumi One Super (ナカライテスク社)、ECL あるいは ECL Prime (GE Healthcare 社) で 1 分間反応させて発光させることにより、Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences) で検出した。各タンパク質のバンドは Amersham Imager 600 の定量化処理方法に従って定量化した。

本章で用いた抗体は、一次抗体として SLC7A11 (#12691、1:1500)、CD98/4F2hc (#47213、1:2000)、phospho-p70 S6 kinase (Thr389) (#9234、1:2000)、p70 S6 kinase (#9202、1:2000)、T202/Y204 phospho-ERK (#4370、1:2000)、p44/42 MAPK (#4695、1:2000)、T308 phospho-Akt (#2965、1:2000)、Akt (#9272、1:2000) (以上、Cell Signaling Technology)、 α -tubulin (T5168、1:2000)、anti-Flag antibody (M2、F1804、1:2000) (以上、Sigma-Aldrich) を括弧内の倍率で希釈して用いた。二次抗体として mouse IgG (P0447、1:3000) および rabbit IgG (P0448、1:3000) horseradish peroxidase (HRP) 共役二次抗体 (以上、DAKO) を括弧内の倍率で希釈して用いた。

免疫染色法による SLC7A11 およびリソソームの局在変化の検討

カバーガラスを入れた 24 well plate (Greiner Bio-One、No.662160) に 10% FBS を含む上記培地を 2.0 ml/well 入れ U251 細胞を低密度状態または高密度状態で播種し

た。24 時間の培養後、Bafilomycin A1 で 24 時間処理した後に、PBS に溶解した 4% paraformaldehyde 溶液により 20 分間固定した。PBS で 5 回洗浄した後、PBS に溶解した 0.2% Triton X-100 溶液で 10 分間透過処理し、PBS に溶解した 10% FBS 溶液を用いて 30 分間ブロッッキングを行った。先と同様、PBS で 5 回洗浄後、細胞を括弧内の倍率で希釈した anti-SLC7A11 antibody (1:1000) および anti-LAMP-2 antibody (#18822、Santa Cruz Biotechnology) (1:200) とともに PBS で 24 時間反応させた。PBS で 5 回洗浄した後、二次抗体として anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (A11029、ThermoFisher Scientific) 、 anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 594 (A11037、ThermoFisher Scientific) 、を 1 時間反応させた。その後 PBS で洗浄し、Hoechst 33258 (H1398、ThermoFisher Scientific、250 ng/ml) を 5 分反応させた。PBS で 5 回洗浄した後、PBS に 0.1 % *p*-phenylenediamine 二塩酸塩を含む 90% glycerol を溶解した封入剤により封入し、風乾後、60 倍の PLAPON 対物レンズ (Olympus Co Ltd.) を備えた共焦点顕微鏡 FV3000 で観察した。なお、一次抗体を反応させてからの作業は遮光にて行った。

Glutamate release assay

低密度状態または高密度状態で播種した U251 細胞を 48 well plate に 24 時間培養した。その後、Bafilomycin A1 で 24 時間処理し、PBS で 2 回洗浄した後、培養培地を 0.2 mM シスチンおよび 2.0 mM グルタミンを添加した上記培養培地、またはアミノ酸を含まない培養培地に交換し、4 時間培養した。培地へのグルタミン酸放出量は、L-Glutamate Assay Kit YAMASA NEO (Yamasa Corporation) を製造元の指示に従って使用して測定した。細胞数を正規化するために、bicinchoninic acid protein assay kit (Protein Assay BCA kit、Nacalai Tesque) を使用して、各 well のタンパク質量を定量した。

使用プラスミドと遺伝子導入

発現プラスミドは pCXN2 ベクター (宮崎純一 教授 (大阪大学) からの提供) を使用した。ヒト SLC7A11 のコード配列は、HeLa 細胞から、逆転写 PCR 法によって増幅させ、C 末端に Flag タグ配列を付加した pCXN2 にサブクローニングした。

U251 細胞へのトランスフェクションは、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を使用した。SLC7A11-Flag を安定して発現する U251 細胞を生成するために、U251 細胞を 6 cm² dish に 2.5×10⁵ cells/dish で播種し、24 時間後に pCXN2-SLC7A11-Flag を遺伝子導入した。48 時間後、培養細胞を収集し、培養培地に G418 (250 µg/ml) (Wako) を含む 2 つの 10 cm dish (Greiner Bio-One、No.627160) に播種して、遺伝子導入されていない細胞を除去した。選択除去の 10 日後、単一細胞から増殖したコロニーを単離した。これらのクローンは、抗 SLC7A11 および抗 Flag 抗体を用いたイムノブロットティングによって拡大およびスクリーニングした。

統計処理

得られた実験値は、平均値±標準偏差で示した。パラメトリックデータの有意差の検定には、3 群以上で Tukey HSD 法による分散分析 (ANOVA) を使い、P<0.05 で有意差ありとした。

【第一章の実験結果】

第一節 神経膠芽腫細胞は高密度状態において SLC7A11 の発現量が減少し グルコース欠乏による細胞死が抑制される

神経膠芽腫細胞において、グルコース欠乏環境は急速に細胞死を誘導する。この細胞死が、高密度状態では有意に抑制されることを明らかにした。細胞密度は、がん細胞の細胞特性や細胞生存に影響を与えることは知られており、特に高密度培養は、細胞の生存や増殖に影響を与える³¹⁻³⁷。神経膠芽腫細胞株である U251、T98G、LN229 細胞に対して、低細胞密度 (LD、 1.0×10^4 cells/cm²) および高細胞密度 (HD、 1.0×10^5 cells/cm²) で播種し、48 時間培養した。次に、グルコース欠乏の条件下で 24 時間培養し、培地中に放出された LDH 量を測定して細胞死を評価した。その結果、低密度状態で有意に生じたグルコース欠乏による細胞死は高密度状態では認められなかった (Figure.1-1 A-C)。

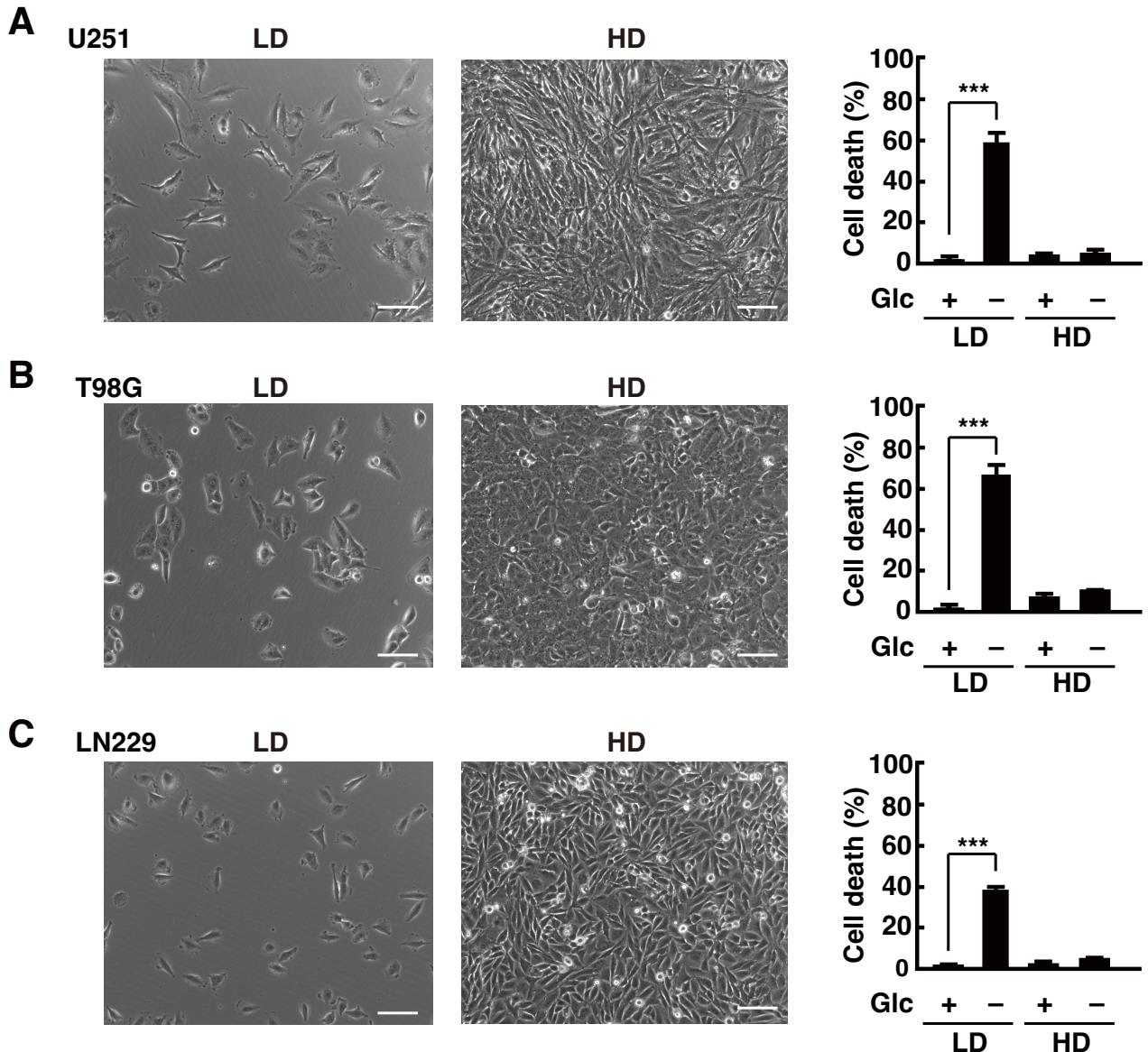


Figure.1-1 神経膠芽腫細胞は高密度状態においてグルコース欠乏による細胞死が抑制される

(A-C) 神経膠芽腫細胞株 (A) U251 (B) T98G (C) LN229 細胞を低密度状態 (LD、 1.0×10^4 cells/cm²)あるいは高密度状態 (HD、 1.0×10^5 cells/cm²)で48時間培養した。48時間後、グルコース非含有培地あるいは5mMのグルコースを含む培養培地で24時間培養した。スケールバーは100 μ mを示す。細胞死の定量はLDH release assay法を用いて、0.1% Tween 20での細胞死割合を100%とし、相対割合を評価した。グラフは3回の実験の平均値 \pm 標準誤差で表記した (***) $P < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。

著者が所属する研究室では以前に、シスチン/グルタミン酸交換輸送体、SLC7A11 を介したシスチンの取り込みが、神経膠芽腫細胞におけるグルコース欠乏による細胞死を誘起することを報告している²⁵。そこで、低密度、及び高密度培養における SLC7A11 のタンパク質発現量を Western Blot 法により検討した。その結果、低密度状態で認められる SLC7A11 タンパク質発現量が、高密度状態では明らかに減少していた (Figure.1-2)。これらの結果は、高密度条件が何らかの経路を介して SLC7A11 発現を低下させることで、神経膠芽腫細胞におけるグルコース欠乏下での細胞死を抑制していることを示唆する。

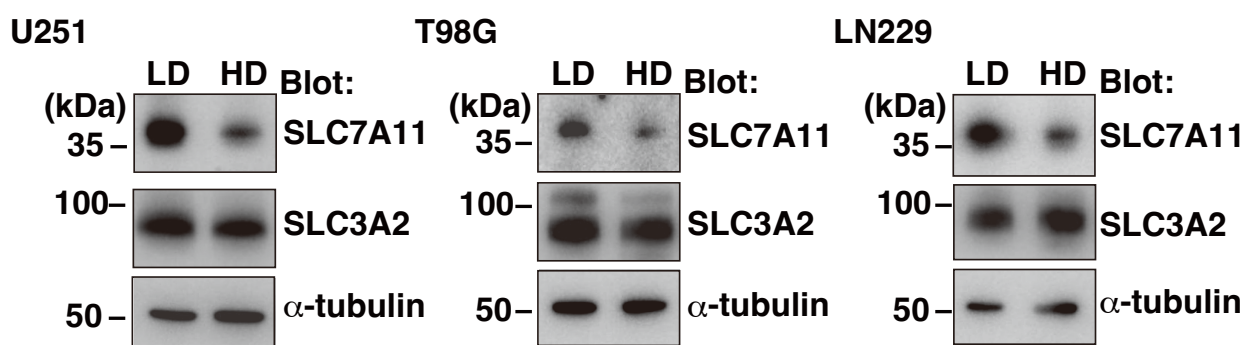


Figure.1-2 神経膠芽腫細胞は高密度状態において SLC7A11 の発現量が減少する

U251、T98G、LN229 細胞を低密度状態あるいは高密度状態で 5mM のグルコースを含む培養培地にて 48 時間培養し、細胞溶解液により回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。

第二節 mTOR の活性阻害により SLC7A11 発現及びグルコース欠乏による細胞死が抑制される

高密度状態で培養することにより、SLC7A11 の発現レベル低下に伴ったグルコース欠乏状態での細胞死の抑制が生じることを確認したため、次に、神経膠芽腫細胞における細胞密度依存的な SLC7A11 の発現調節メカニズムを検討した。高密度状態により、mTOR シグナル伝達経路が阻害されることが以前報告されていた^{49, 50}。これと一致して、mTOR の下流標的である p70 S6 キナーゼ (p-S6K) のリン酸化レベルは、TPEN 変異である U251 細胞、TPEN 野生型である T98G 細胞、TPEN 野生型 p53 変異である LN229 細胞の異なる遺伝子型の神経膠芽腫細胞において、高密度状態で培養した場合に共通して抑制されていた。一方で、Akt のリン酸化 (スレオニン 308) レベルもわずかに減少していたが、ERK のリン酸化レベルにはほとんど影響がなかった (Figure.1-3 A)。

これらの結果を受け、SLC7A11 発現に対する mTOR 阻害薬の効果を検討した。低密度状態の神経膠芽腫細胞を mTOR 阻害薬 Torin1 (250 nM) で処理したところ、U251、T98G、LN229 細胞の SLC7A11 のタンパク質レベルが明らかに低下した (Figure.1-3 B)。次に、Torin 1 で処理した際のグルコース非存在下での細胞死を評価したところ、低密度状態で有意な細胞死の抑制が確認された (Figure.1-3 C)。

これらの結果は、mTOR の活性化が SLC7A11 発現低下とグルコース欠乏下での細胞生存率の上昇に重要であることを示唆する。

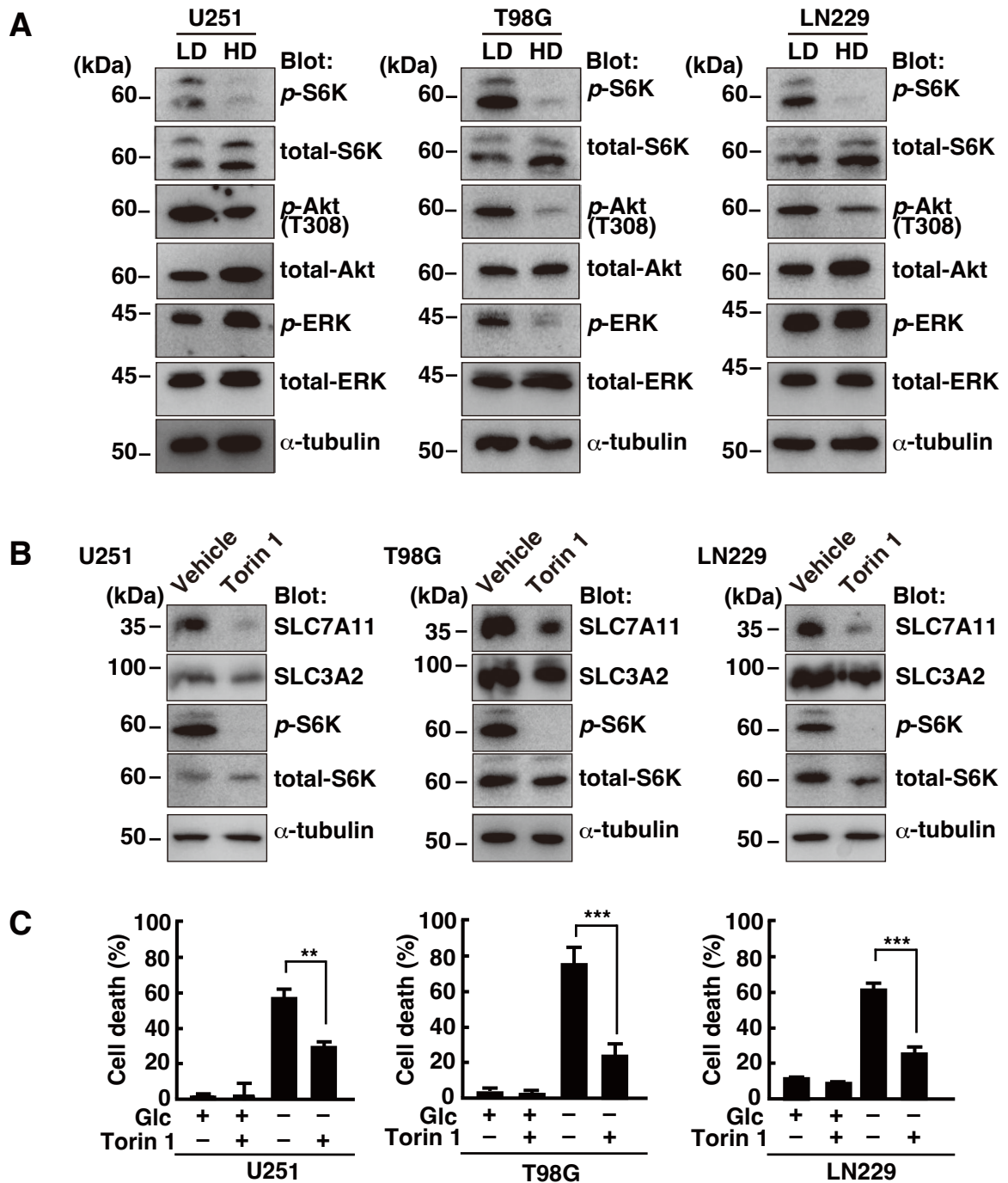


Figure.1-3 mTOR の活性阻害により SLC7A11 発現及びグルコース欠乏による細胞死が抑制される

(A) U251、T98G、LN229 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて低密度状態あるいは高密度状態で 48 時間培養し、細胞溶解液により回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。(B) U251、T98G、LN229 細胞を低密度状態で 24 時間培養後 Torin 1 (250 nM) で 24 時間処理し、細胞溶解液により回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。対照群には Dimethyl sulfoxide (DMSO) を使用した。(C) U251、T98G、LN229 細胞を低密度状態あるいは高密度状態で 48 時間培養した。48 時間後、グルコース非含有培地あるいは 5mM のグルコースを含む培養培地を、Torin 1 (250

nM) で処理し 24 時間培養した。対照群には DMSO を使用した。細胞死の定量は LDH release assay 法を用いて、0.1% Tween 20 での細胞死割合を 100% とし、相対割合を評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。

mTOR は、正常な上皮細胞の細胞培地が枯渇すると不活化されることが報告されている⁵¹。そこで、高密度状態の培養培地が低密度状態でのグルコース欠乏の細胞死を抑制するか否かを検討した。その結果、高密度状態での U251 細胞培養からの培地 (conditioned medium、CM) は、低密度状態でのグルコース非存在下の細胞死にほとんど影響を与えなかった。さらに、培養培地を未使用の DMEM 培地 (fresh medium、FM) に交換しても、U251 細胞高密度状態におけるグルコース欠乏下での細胞生存に影響は認められなかった (Figure. 1-4)。この結果より、高密度状態でのグルコース欠乏による細胞死の抑制は、栄養枯渇あるいは放出された液性因子によるものではないことが示唆される。

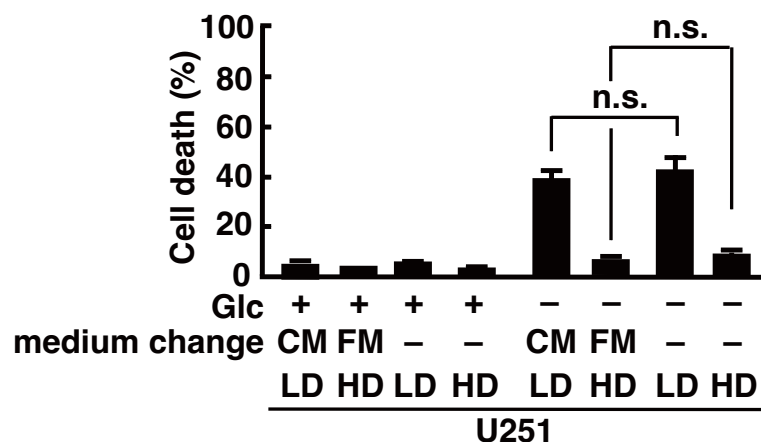


Figure.1-4 培養培地の枯渇はグルコース欠乏による細胞死に影響しない

低密度状態あるいは高密度状態で 24 時間培養した U251 細胞を、fresh medium (FM) あるいは 高密度状態で 24 時間細胞を培養した conditioned medium (CM) で 24 時間培養した。24 時間後、グルコース非含有培地あるいは 5mM のグルコースを含む培養培地で 24 時間培養した。細胞死の定量は LDH release assay 法を用いて、0.1% Tween 20 での細胞死割合を 100% とし、相対割合を評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した (n.s., not significant, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.)。

第三節 高密度状態は mTOR 活性を抑制して神経膠芽腫細胞における SLC7A11 のリソソーム分解を誘導する

以前に、SLC7A11 タンパク質量が、脱ユビキチン化酵素 OTUB1 によってプロテアソーム分解依存的に調節を受けるという報告がなされた^{52,53}。また、mTOR の活性とプロテアソーム分解制御の関係も報告されている^{46,47}。そこで、神経膠芽腫細胞の SLC7A11 発現に対するプロテアソーム分解の関与を検討したところ、プロテアソーム阻害剤 MG132 (10 μ M) により U251、LN229 細胞の低密度状態と高密度状態の両方で SLC7A11 の発現量が有意に増加した (Figure.1-5)。T98G 細胞では、プロテアソーム阻害による SLC7A11 発現増加傾向は観察されたが優位な差は認められなかった。このことから、U251、LN229 細胞においてプロテアソームにおける SLC7A11 の分解は、細胞密度に依存せず恒常的に行われている可能性が考えられる。

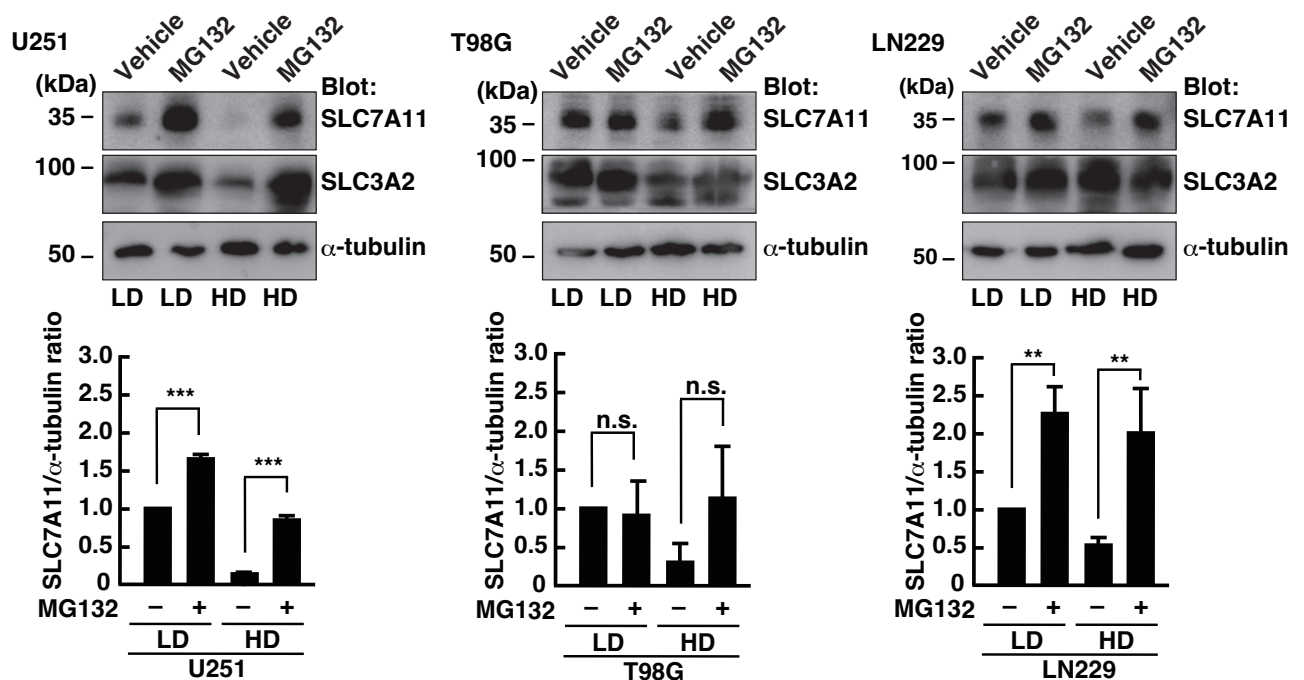


Figure.1-5 プロテアソーム阻害剤は神経膠芽腫細胞の細胞密度に関わらず SLC7A11 発現量及びグルコース欠乏下での細胞死を増加させる。

U251、T98G、LN229 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて低密度状態あるいは高密度状態で 24 時間培養後 MG132 (10 μ M) で 24 時間処理し、細胞溶解液により回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。対照群には DMSO を使用した。

SLC7A11/ α -tubulin の割合は、低密度状態の対照群に対する相対割合で評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差で表記した (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, n.s., not significant, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.)。

一方、mTOR の活性化が、リソソームによるタンパク質分解を含む、種々の異化機能を抑制することが報告されているため⁴⁴⁻⁴⁹、リソソーム阻害薬 Bafilomycin A1 (Baf A1) の効果を検討した。その結果、リソソーム阻害により、U251、T98G、LN229 細胞の高密度状態における SLC7A11 発現量が有意に増加した (Figure.1-6 A)。また、低密度状態における SLC7A11 発現に Baf A1 はほとんど影響しなかった。これらの結果から、高密度状態ではリソソーム依存的に SLC7A11 の分解が促進されていることが示唆された。次に、リソソームによる SLC7A11 分解における mTOR の関与を検討した。その結果、U251、T98G、LN229 細胞の低密度状態において、mTOR の阻害薬により抑制された SLC7A11 の発現は、リソソーム阻害薬の併用により有意に増加した (Figure.1-6 B)。これらの結果は、がん細胞の細胞密度で変化する SLC7A11 発現量制御には、mTOR 活性により調節されたリソソームによるタンパク質分解が重要な役割を担っていることを示唆する。

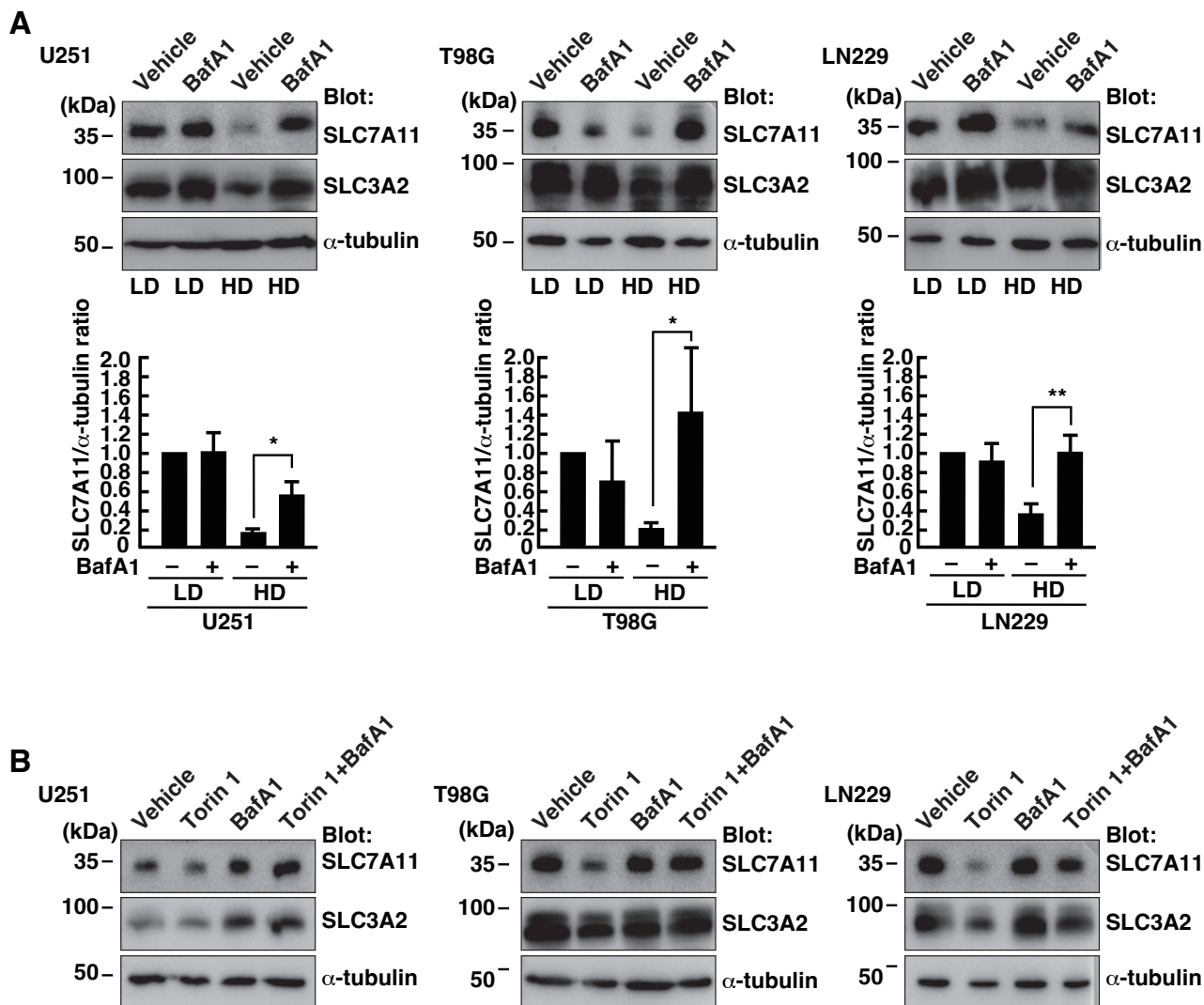


Figure.1-6 高密度状態は mTOR の活性を抑制して神経膠芽腫細胞における SLC7A11 のリソソーム分解を誘導する

(A) U251、T98G、LN229 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて低密度状態あるいは高密度状態で 24 時間培養後 BafA1 (1 μ M) で 24 時間処理し、細胞溶解液により回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。対照群には DMSO を使用した。SLC7A11/ α -tubulin の割合は、低密度状態の対照群に対する相対割合で評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差で表記した (* $P < 0.01$, * $P < 0.05$, n.s., not significant, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.)。 (B) U251、T98G、LN229 細胞を低密度状態あるいは高密度状態で 24 時間培養後 Torin 1 (250 nM) あるいは BafA1 (1 μ M) で 24 時間処理し、細胞溶解液により回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。対照群には DMSO を使用した。

第四節 神経膠芽腫細胞の低密度状態と高密度状態では SLC7A11 およびリソソームの細胞内局在が変化する

神経膠芽腫細胞の高密度状態において、リソソームによる SLC7A11 の分解が mTOR の活性により調節されることが示唆されたため、U251 細胞の培養密度における SLC7A11 およびリソソームの局在変化について比較検証した。低密度状態の U251 細胞では、SLC7A11 が細胞全体に確認できる (Figure.1-7 A)。対して、高密度状態では Western blot の結果と一致して、SLC7A11 の発現が明らかに減少していた (Figure.1-7 B)。さらに、高密度状態において、リソソーム阻害薬 Baf A1 で処理した結果、SLC7A11 の発現は小胞構造で見られ、LAMP-2 と共局在していることが確認された (Figure.1-7 C)。LAMP-2 はリソソームの膜標識であることから、リソソーム阻害薬の作用で SLC7A11 を含めたタンパク質が分解されず小胞内で備蓄していることにより、リソソームが肥大していると考えられる。

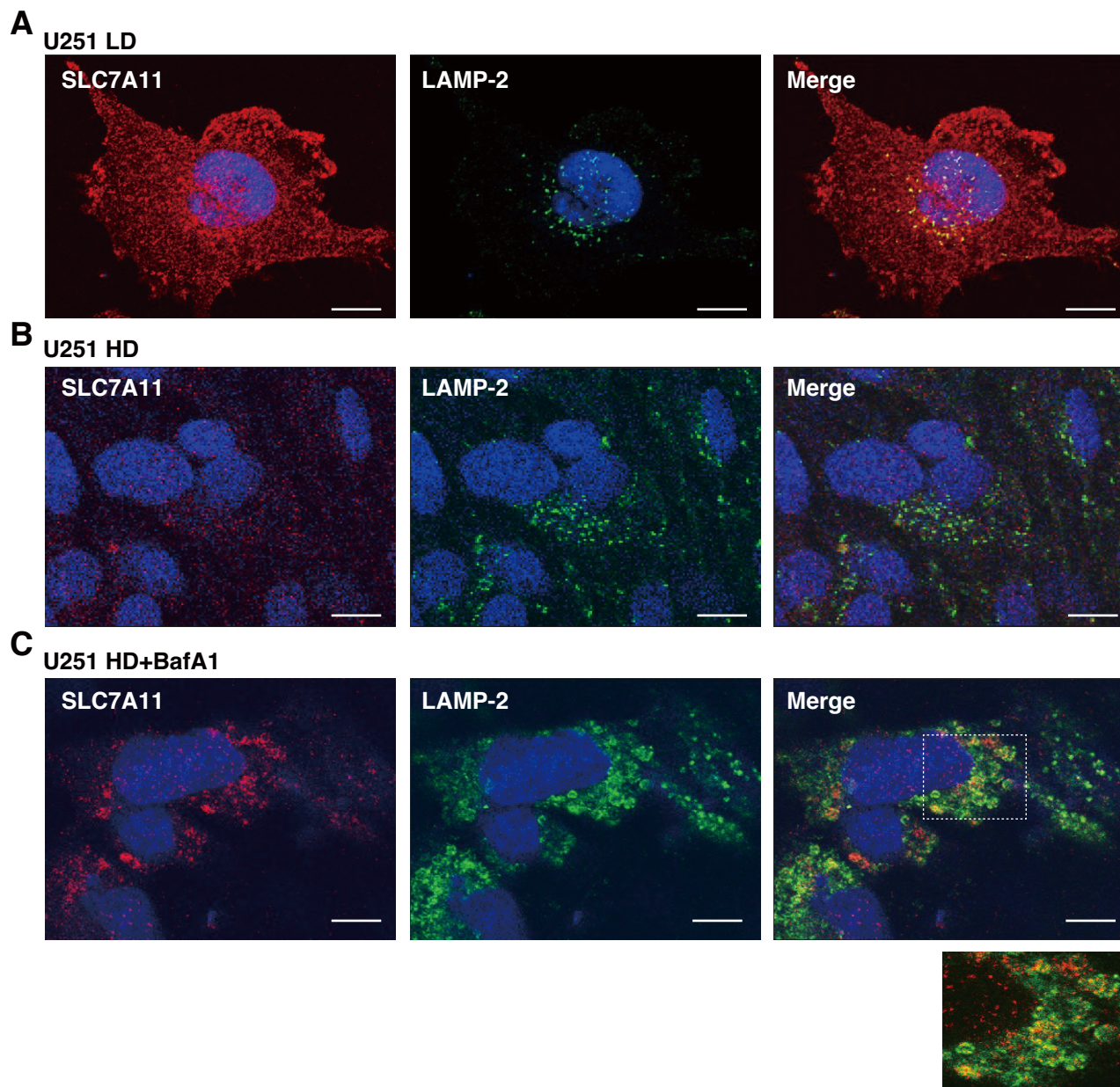


Figure.1-7 低密度と高密度の神経膠芽腫細胞における SLC7A11 およびリソソームの細胞内局在変化

U251 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて低密度状態 (A) 及び高密度状態 (B-C) で 24 時間培養した。24 時間後、BafA1 (1 μ M) で 24 時間処理した後 (C)、細胞を anti-SLC7A11 antibody (赤)、anti-LAMP2 antibody (緑) で染色した。核は Hoechst 33258 (青) で染色した。画像解析は共焦点顕微鏡で行った。スケールバーは 10 μ m を示す。

第五節 高密度の神経膠芽腫細胞においてリソソーム阻害により発現増加した SLC7A11 はグルコース欠乏下での細胞死を誘導する

培地中へのグルタミン酸放出量を測定することで、高密度状態でのリソソーム阻害による SLC7A11 の発現増加が、シスチン/グルタミン酸の交換輸送を増加させるかを検討した。アミノ酸を含まない培養培地にシスチンとグルタミンを添加し、U251 細胞を培養したところ、先行研究と同様に低密度状態ではグルタミン酸の放出が確認できた。これに対し、高密度状態では、グルタミン酸の放出が有意に減少した (Figure.1-8 A)。さらに高密度状態におけるグルタミン酸放出量は、リソソーム阻害により有意に増加した (Figure.1-8 B)。この結果から、高密度状態においてリソソーム阻害で増加した SLC7A11 は、アミノ酸輸送活性を保持していることが確認できた。次に、高密度で抑制されるグルコース欠乏状態での細胞死は、リソソーム阻害で上昇することが予想されたため、神経膠芽腫細胞におけるグルコース非存在下での細胞死に対するリソソーム阻害の効果を検討した。その結果、U251 細胞の高密度状態において、リソソーム阻害薬 Bafilomycin A1 の処理によりグルコース欠乏下での細胞死は有意に増加した (Figure.1-8 C)。

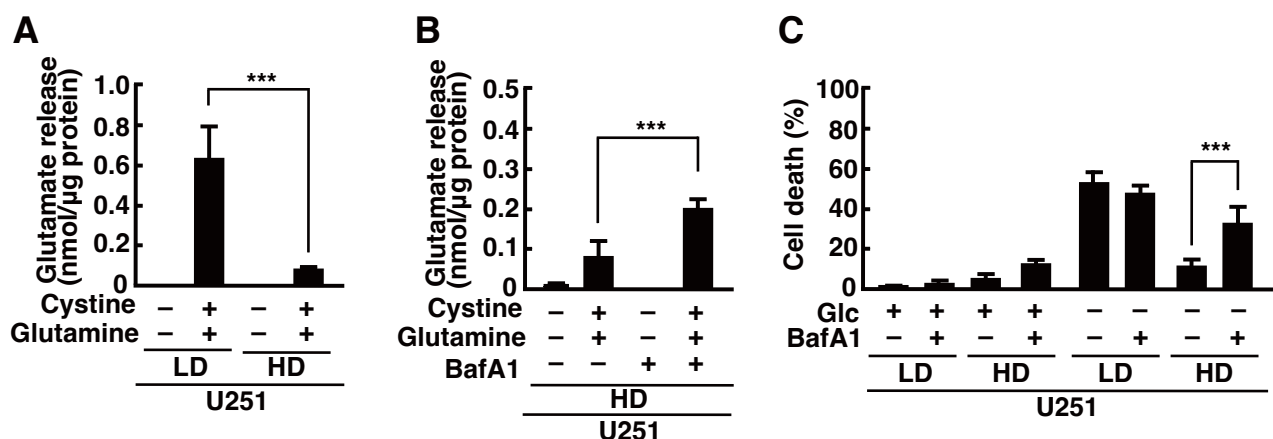


Figure.1-8 高密度の神経膠芽腫細胞においてリソソーム阻害によりグルコース欠乏下での細胞死を誘導する

(A) U251 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて低密度状態あるいは高密度状態で 48 時間培養後、5mM のグルコース含有及びシスチンを含まないアミノ酸非含有培地あ

るいは 5mM のグルコース及び 0.2 mM のシスチン、2 mM のグルタミンを含むアミノ酸非含有培地に交換した。4 時間後、培地中に放出されたグルタミン酸量を評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した (***) $P < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.)。 (B) 5mM のグルコースを含む培養培地にて U251 細胞を高密度状態で 24 時間培養後 BafA1 (1 μ M) で 24 時間処理した。対照群には DMSO を使用した。24 時間後、5mM のグルコース含有及びシスチンを含まないアミノ酸非含有培地あるいは 5mM のグルコース及び 0.2 mM のシスチン、2 mM のグルタミンを含むアミノ酸非含有培地に交換した。4 時間後、培地中に放出されたグルタミン酸量を評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した (***) $P < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.)。 (C) U251 細胞を低密度状態あるいは高密度状態で 48 時間培養した。48 時間後、グルコース非含有培地あるいは 5mM のグルコースを含む培地に、BafA1 (1 μ M) で処理し 24 時間培養した。対照群には DMSO を使用した。細胞死の定量は LDH release assay 法を用いて、0.1% Tween 20 での細胞死割合を 100% とし、相対割合を評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した (***) $P < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。

SLC7A11 発現量の増加が、グルコース欠乏下における高密度状態による細胞生存率の促進に関与していることを確認するために、SLC7A11 を安定に発現する U251 細胞 (U251-SLC7A11-Flag 細胞) を確立した。この細胞では、高密度状態においても SLC7A11 の高い発現量が観察された。SLC7A11 の過剰発現は、高密度状態で培養した U251 細胞におけるグルコース欠乏性細胞死を誘導した (Figure.1-9)。以上の結果より、高密度状態でのリソソーム分解による SLC7A11 の発現量抑制が、神経膠芽腫細胞におけるグルコース欠乏下での細胞生存性向上に寄与することが明らかになった。

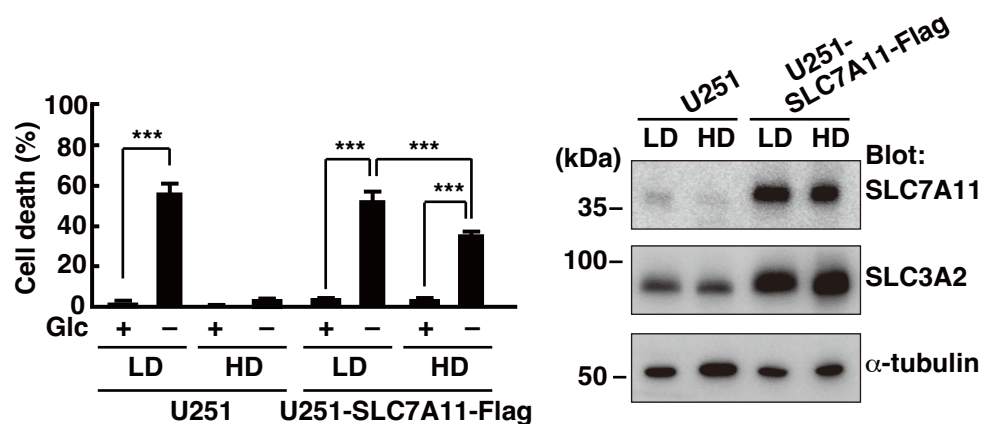
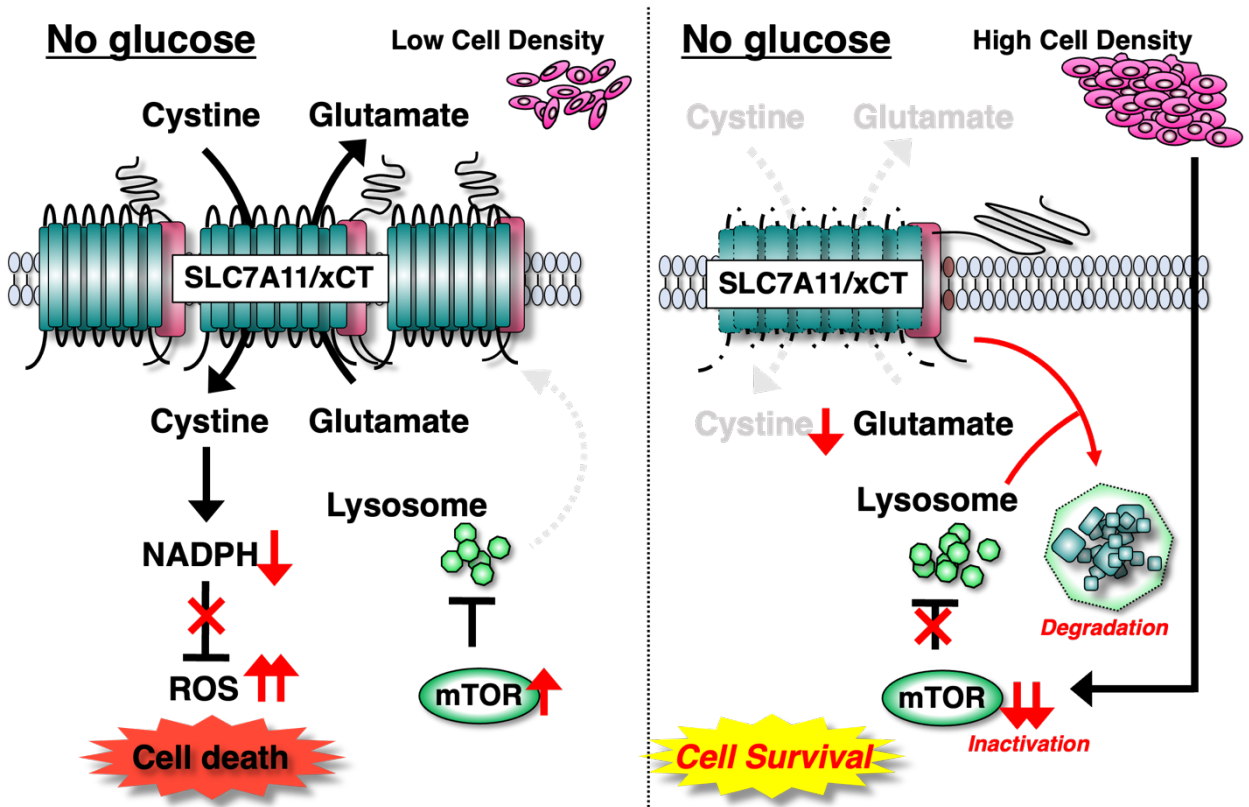


Figure.1-9 高密度の神経膠芽腫細胞において発現増加した SLC7A11 はグルコース欠乏下での細胞死を誘導する

U251 細胞及び Flag-tagged SLC7A11 を発現させた U251 細胞 (U251-SLC7A11-Frag) を低密度状態あるいは高密度状態で 48 時間培養した。48 時間後、グルコース非含有培地あるいは 5mM のグルコースを含む培地で 24 時間培養した。細胞死の定量は LDH release assay 法を用いて、0.1% Tween 20 での細胞死割合を 100%とし、相対割合を評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した (** $P < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。

【第一章の考察】

本章では、SLC7A11 発現及び SLC7A11 を介したグルコース依存性において、がん細胞の細胞密度による調節機構の一端を明らかにした (Figure.1-10)。



【Figure.1-10 細胞密度による mTOR - リソソーム を介した SLC7A11/xCT 発現制御】

がん細胞の生存性と細胞密度状態の関連に関しては、高密度状態が薬剤耐性を誘導することでがん細胞の生存率に寄与していること³⁰⁻³²、Hippo シグナル経路及び Cadherin を含む細胞間相互作用がフェロトーシスを回避することが報告されている³³⁻³⁶。本章では、高密度状態の神経膠芽腫細胞において、mTOR の不活性化によって誘導されるリソソームにおける SLC7A11 のタンパク質分解が、SLC7A11 の発現量を減少させることでグルコース欠乏下での細胞死を抑制することを見出した。mTOR の活性は、成長因子、細胞外栄養素、細胞内エネルギー状態、および細胞外酸素レベルによって制御されている³⁷⁻⁴⁰。しかし、神経膠芽腫細胞を高密度状態で培養した後の培地 (condition medium) は、SLC7A11 発現にほとんど影響を与えな

かったことから、細胞から分泌された液性因子または培養培地の栄養枯渇状態が、mTORの不活性化あるいはSLC7A11の分解に関与する可能性は低いと考えられる。神経膠芽腫における細胞密度による mTOR 活性の制御機序に関しては更なる検証が必要である。

mTOR活性とリソソームの機能は密接に関与していることが報告されている^{47,48}。転写因子TFEBは、リソソーム機能に関与するタンパク質をコードする遺伝子の発現を誘導し、mTORは細胞質内のTFEBをリン酸化および核移行の抑制することで、リソソームの機能に関与する遺伝子発現を阻害する⁵⁴⁻⁵⁶。また、mTORの活性化は、ATP感受性Na⁺チャンネルを介してリソソーム機能も調整する⁴⁸。しかし、高密度状態でSLC7A11がリソソームにどのように集積あるいは分解されるかについては今後の重要な研究課題である。

これまでの研究において、種々の刺激応答がSLC7A11の発現に関与することが報告されている。例えば、SLC7A11発現はp53腫瘍抑制タンパク質によって抑制されることが知られている⁵⁷。また、細胞外マトリクスへの接着分子であるCD44変異体は、SLC7A11に結合することで細胞膜上での発現を安定化させる⁵²。加えて、結合したCD44により、脱ユビキチン化酵素OTUB1との相互作用を促進することによって、タンパク安定性を高めるという報告がある⁵³。一方、リソソームによるタンパク分解と、プロテアソーム分解にクロストークが示唆されている^{58,59}。例えば、プロテアソーム阻害剤は、オートファジーとリソソーム分解を引き起こす代償機構を誘発する⁶⁰⁻⁶²。また、リソソーム阻害はプロテアソーム活性を変動させることが発見されており、リソソームによる分解経路とプロテアソーム経路は複雑に関与していることが考えられる^{63,64}。本章において、プロテアソーム阻害剤は高密度状態のみならず低密度状態においてもSLC7A11発現を増加させた。対して、リソソーム阻害剤は高密度状態でのみSLC7A11発現を増加させた。従って、今回明らかにした高密度状態でのリソソームによるSLC7A11タンパク質の分解は、プロテアソーム経路と独立して行われていると推測される。

第二章

NF2/Merlin は神経膠芽腫細胞における高細胞密度での SLC7A11/xCT 発現とグルコース欠乏下での 細胞生存性を制御する

細胞間接触と高密度状態培養が細胞の生存と増殖に影響を与えることはよく知られており、接触阻害を制御する重要なメカニズムの一つが Hippo シグナル伝達経路である。高密度状態は Hippo シグナル伝達経路を活性化し、Yes-associated protein (YAP) /transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) が核から細胞質へ移動、リン酸化されることで不活性化と分解が誘導される。その結果、細胞の増殖が停止することが知られている⁶⁵⁻⁶⁷。

Hippo シグナル伝達経路の活性化因子であり、YAP/TAZ の上流因子であることも知られている Merlin (Moesin-ezrin-radixin-like protein、schwannomin) は、神経線維腫症 2 型遺伝子 *NF2* によりコードされる腫瘍抑制タンパク質である。*NF2* 遺伝子変異および遺伝子欠損により、神経系の腫瘍性疾患である神経線維腫症 2 型が発症する。多くの神経膠芽腫で、Merlin のタンパク質発現量および mRNA 発現量が低下しており、Merlin の再発現が細胞増殖を抑制することが報告されている⁶⁸⁻⁷¹。Merlin の腫瘍抑制と細胞接触との関連について、低密度状態と比較して高密度状態で Merlin の発現量が 2-3 倍に増加していることも知られている⁷²。また、Merlin は CD44 に結合し、細胞外マトリックス成分であるヒアルロン酸との相互作用を阻害することによって、細胞増殖を抑制することが報告されている^{73, 74}。

本章では、Merlin が SLC7A11 発現を mRNA レベルで制御することで、神経膠芽腫細胞の高密度状態におけるグルコース欠乏下の細胞生存性向上に寄与することを示す。

【第二章の実験方法】

プラスミドと試薬

以下のオリゴヌクレオチドを用いて、NF2 遺伝子に対する single-guide RNA (sgRNA) を peSpCAS9 (1.1) -2xsgRNA (Addgene plasmid #80768) にクローニングした：

sgNF2 - 1 F、CACCGAACTCCATCTCGGCGTCCA;

sgNF2 - 1 R、AAACTGGACGCCGAGATGGAGTTC;

sgNF2 - 2 F、CACCGGCCACAGCGATTCGCACGG;

sgNF2 - 2 R、AAACCCGTGCGAATCGCTGTGGCC.

NF2 に対する sgRNA の配列は、オンラインツール CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/crispor.py>) を用いて設計した⁷⁵。

グルコースやアミノ酸を含まない培地は、第一章に記載した方法と同様に調製した。阻害剤は以下の濃度で使用した： Sulfasalazine (SSZ) (Sigma) 、250 μ M; Torin 1 (Merck) 、250 nM。

細胞培養と遺伝子導入

実験には神経膠芽腫細胞株 U251 細胞と T98G 細胞を利用した。細胞培養は第一章に記載した条件及び方法と同様に行なった。NF2 遺伝子欠損 (KO) U251 細胞株の樹立には、CRISPR/Cas9 を用いたホモロジー非依存型ノックインシステムを用いた⁷⁶。U251 細胞に、NF2 を標的とする sgRNA を含む peSpCAS9 (1.1) -2xsgRNA と pDonor-tBFP-NLS-Neo (Addgene プラスミド#80766) を共導入した。U251 細胞を 6 cm dish に播種し (2.5×10^4 細胞/dish) 、24 時間後に Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後、培養細胞を収集し、培養培地に G418 (250 μ g/ml) (Wako) を含む 2 つの 10 cm dish に播種して、遺伝子導入されていない細胞を除去した。選択除去後、単一細胞から増殖したコロニーを単離した。これらのクローンを拡大し、抗 Merlin 抗体による免疫ブロッティングでスクリーニングした。Control sgRNA、Control shRNA、および N-カドヘリンに対

する shRNA を発現する U251 細胞は、先行研究により作製した細胞株を利用した 25, 77, 78。

グルコース欠乏条件と細胞死の測定

第一章に記載した条件及び方法と同様に測定した。

Immunoblotting と使用抗体

第一章に記載した条件及び方法で同様に解析した。

第二章で新たに用いた抗体は、一次抗体として NF2/Merlin (#12888、Cell Signaling Technology) (1:2000)、LATS1 (#3477、Cell Signaling Technology) (1:2000)、LATS2 (#5888、Cell Signaling Technology) (1:2000)、phosphor-YAP (#13008、Cell Signaling Technology) (1:2000)、YAP (#14074、Cell Signaling Technology) (1:2000)、TAZ antibody (#18822、Santa Cruz Biotechnology) (1:2000)、N-cadherin (#610920、BD Biosciences) (1:2000)、E-Cadherin (#610182、BD Biosciences) (1:2000)、 β -Catenin (#610154、BD Biosciences) (1:2000)、LAMP2 (#18822、Santa Cruz Biotechnology) (1:2000) を括弧内の倍率で希釈して用いた。

蛍光免疫染色法による TAZ の局在変化の検討

第一章に記載した方法と同様に評価した。用いた抗体は、一次抗体として anti-TAZ antibody (#18822、Santa Cruz Biotechnology) (1:200)、二次抗体として anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (A11029、ThermoFisher Scientific)を用いた。また第一章と同様に、Hoechst 33258 (H1398、ThermoFisher Scientific、250 ng/ml) により核酸染色を行った。画像は、NIS Elements ソフトウェア (Nikon) と Nikon Eclipse Ti 蛍光顕微鏡、DS-Qi1Mc Nikon デジタルカメラを使用して取り込んだ。

Glutamate release assay

第一章に記載した条件及び方法で同様に解析した。

Cystine uptake assay

高密度状態で播種した U251 細胞を 96 well plate に 72 時間培養した。その後、PBS で 1 回洗浄し、培養培地を、2 mM グルタミンを含むシスチン欠失培地に交換し、5 分間静置した。その後、シスチンアナログと 250 μ M Sulfasalazine (SSZ) を、2 mM グルタミンを含むシスチン欠乏培地に添加し、細胞を 37°C で 30 分間インキュベートした。細胞内に取り込まれたシスチンの量は、Cystine Uptake Assay Kit (同仁化学研究所) を製造元の指示に従って使用して測定した。

RNA の抽出及び逆転写反応

U251 細胞を 24 well plate に 72 時間培養した。その後、PBS で 2 回洗浄し、RNA iso Plus (TAKARA) 400 μ L を使用して細胞溶解液を回収した。RNA iso Plus 溶液にクロロホルム 80 μ L を添加混和し、遠心 ($\times 1200G$ 、10 分、4°C) により 3 層に分離後、RNA を含む上水層を回収した。RNA を含む上水層にイソプロパノール 200 μ L を添加混和し、遠心 ($\times 1200G$ 、10 分、4°C) により RNA 沈殿を回収した。イソプロパノール RNA 沈殿を回収後、75% エタノール 400 μ L を添加混和し、遠心 ($\times 8000G$ 、10 分、4°C) により精製した RNA 沈殿を回収した。cDNA は、鋳型として抽出した RNA および Moloney Murine Leukemia Virus (Invitrogen) 逆転写酵素を使用して逆転写した。

リアルタイム定量 PCR

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) 及び StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems) あるいは Thermal Cycler Dice Real Time System III (タカラバイオ) を用いて行った。cDNA を含むサンプルを 42°C で 5 分間加熱し、95°C で 10 秒間および 60°C で 34 秒間を 40 サイクル繰り返し、続いて 95°C で 15 秒間、60°C で 1 時間加熱することで増幅した。1 分間、95 °C で 15 秒間。各サンプルを 2 回繰り返し平均 Ct 値を評価した。相対的な mRNA 発現は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を使用して 18S mRNA 参照遺伝子に対して正規化した後に計算した。各遺伝子の増幅には以下のプライマーを用いて行った。

SLC7A11/xCT - F、5'- GCTGGCTGGTTTTACCTCAAC-3';

SLC7A11/xCT - R、5'- AGTAGGCCACATTTGTCAGCAC-3';

SLC3A2/CD98/4F2hc - F、5'- CCAGAAGGATGATGTCGCTCAG-3';

SLC3A2/CD98/4F2hc - R、5'- GAGTAAGGTCCAGAATGACACGG-3';

18S - F、5'- AAACGGCTACCACATCCAAG-3';

18S - R、5'- CGCTCCCAAGATCCAACACTAC -3';

統計処理

第一章に記載した条件と同様に処理した。

【第二章の実験結果】

第一節 Merlin の欠損は高密度培養条件下の神経膠芽腫細胞における SLC7A11 の発現低下を抑制する

第一章で、高密度状態が神経膠芽腫細胞における SLC7A11 の分解を促進することを明らかにした。そこで、接触阻害を制御する Hippo シグナル伝達経路の関与について検証をしたところ、U251 細胞の高密度状態では、リン酸化 YAP の増加及びタンパク質発現の低下を確認した。一方で、YAP と TAZ の上流因子である Merlin と LATS1/2 のタンパク質発現量は、細胞密度にかかわらず一定であった (Figure. 2-1A)。次に、Merlin をコードする NF2 遺伝子の異なる配列に対する guide RNA (#1、#2) を用いた CRISPR-Cas9 システムによって NF2 欠損 (NF2 KO) U251 細胞を樹立した (Figure. 2-1B)。Merlin の不活性化は、がん細胞の増殖を促進することが報告されている⁶⁹⁻⁷²。これと一致して、U251 Control 細胞及び U251 NF2 KO 細胞を播種後 4、8、12 日間培養すると、NF2 KO 細胞は Control 細胞と比較して細胞数の著しい増加を示した (Figure. 2-1C)。

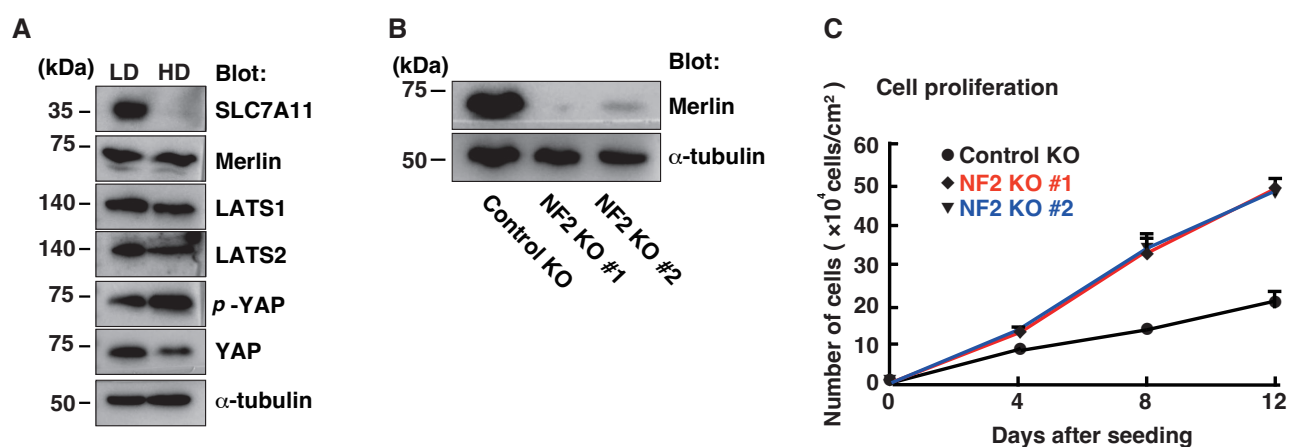


Figure.2-1 NF2/Merlin 欠損細胞株の樹立

(A) U251 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて低密度状態あるいは高密度状態で 72 時間培養し、細胞溶解液を用いて回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。(B) U251 Control 細胞及び NF2 遺伝子を欠損した U251 細胞 (U251 NF2 KO 細胞) を 5mM のグルコースを含む培養培地にて 72 時間培養し、細胞溶解液を用いて回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。(C) U251 Control 細胞及び

U251 NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて 1.0×10^4 cells/cm² で播種し、4、8、12 日後に細胞数を測定した。

Merlin の欠損が SLC7A11 の分解に影響するかを検証するため、高密度状態での播種後 24、48、72 時間における SLC7A11 タンパク質発現量を比較した。Control 細胞は、播種後 72 時間で SLC7A11 タンパク質量の減少を示したが、NF2 KO 細胞では播種後 72 時間でも SLC7A11 タンパク質量の減少が認められなかった。一方で、xc-系の重鎖サブユニットである SLC3A2/CD98/4F2hc のタンパク質量は、NF2 KO 細胞では大きく変化しなかった (Figure. 2-2)。この結果は、Merlin が YAP を介さずに神経膠芽腫細胞における高密度状態での SLC7A11 発現量の制御に関与していることを示唆する。

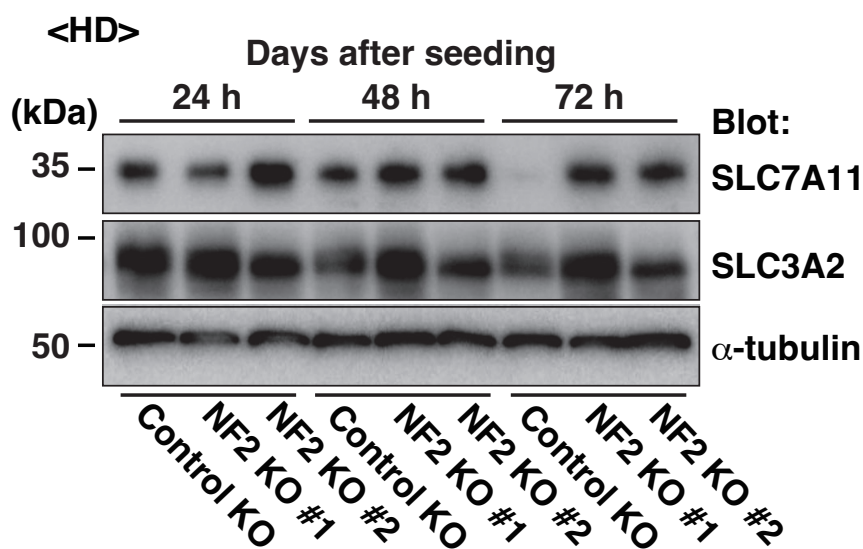


Figure.2-2 Merlin の欠損は高密度培養条件下の神経膠芽腫細胞における SLC7A11 の発現低下を抑制する

(A) U251 Control 細胞及び U251 NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて高密度状態で 24 時間、48 時間、72 時間培養し、細胞溶解液を用いて回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。

第二節 Merlin の欠損は高密度状態における SLC7A11 アミノ酸輸送活性とグルコース欠乏下での細胞死を促進する

U251 細胞への細胞内シスチン取り込みと細胞外グルタミン酸放出量を測定することで、Merlin の欠損による SLC7A11 タンパク質発現の増加が、シスチン/グルタミン酸交換輸送能の増加につながるか検討した。その結果、高密度状態において、細胞外シスチンの取り込みは、NF2 KO 細胞では Control 細胞と比較して有意に増加した (Figure. 2-3A)。また、シスチンとグルタミンを添加したアミノ酸非含有培地で U251 NF2 KO 細胞を高密度状態で培養すると、グルタミン酸の放出量も有意に増加することが確認された (Figure. 2-3B)。このことから、Merlin の欠損で発現増加した SLC7A11 は、正常のアミノ酸交換輸送活性を有することが確認できた。次に、Control 細胞および NF2 KO 細胞において、グルコース欠乏下での細胞死の誘導を検証した。第一章では、高密度状態は SLC7A11 の発現を抑制し、U251 細胞におけるグルコース欠乏下での細胞死を抑制した。第一章の結果と同様に、Control 細胞の高密度状態ではグルコース欠乏下での細胞死率は低く、その一方で、NF2 KO 細胞の高密度状態ではグルコース欠乏下での細胞死が有意に増加していた。また、これは SSZ による SLC7A11 の薬理的阻害で有意に抑制された (Figure. 2-3C)。対して、低密度状態でのグルコース欠乏下では、Control 細胞と NF2 KO 細胞における細胞死率に変化は認められなかった (Figure. 2-3D)。これらの結果から、高密度状態の神経膠芽腫細胞において Merlin は、グルコース欠乏下での SLC7A11 を介した細胞内へのシスチン/グルタミン酸交換輸送及び細胞死を抑制することが示唆された。

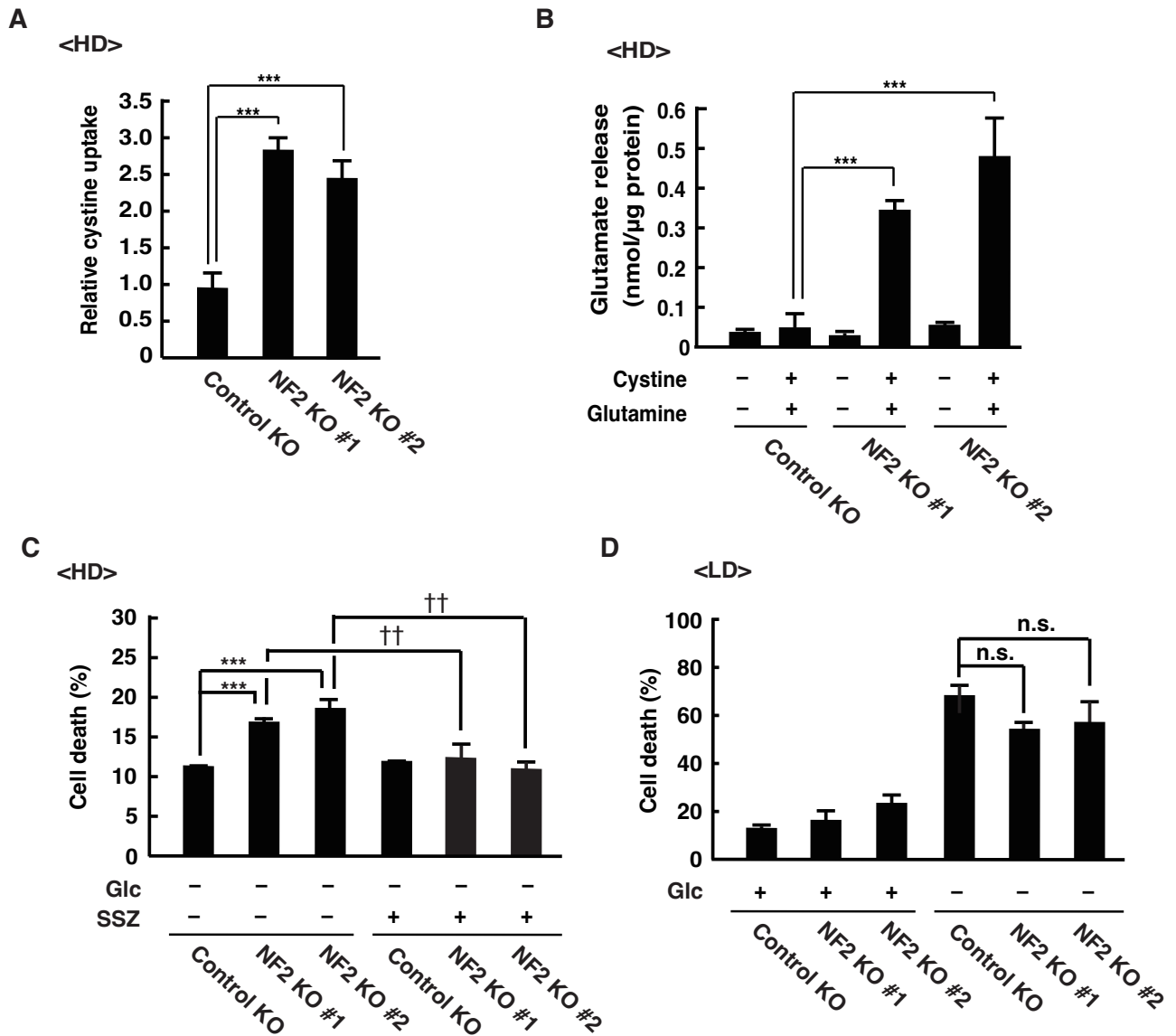


Figure.2-3 Merlin の欠損は高密度状態における SLC7A11 アミノ酸輸送活性とグルコース欠乏下での細胞死を促進する

(A) U251 Control 細胞及び U251 NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて 1×10^4 cells/cm² で 72 時間培養した。72 時間後、培養培地を 5mM のグルコース及び 2 mM グルタミンを含むシスチン非含有培地に交換し、5 分間静置した。その後 5mM のグルコース及び 2 mM グルタミンを含むシスチン非含有培地に Cystine analog を添加し 30 分間 37°C で静置した。Cystine Uptake Assay キット (同仁化学研究所) を用いて規定のプロトコルに従い、細胞内に取り込まれたシスチン量を測定した。シスチン取り込み量は、U251 Control 細胞に対する相対値で評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差で表記した (***P* < 0.001, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。 (B) U251 Control 細胞及び U251 NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて高密度状態で 48 時間培養後、5mM のグルコース含有及びシスチンを含まないアミノ酸非含有培地あるいは 5mM のグルコース及び 0.2 mM のシスチン、2 mM のグルタミンを含むアミノ酸非含有培地に交換した。4 時間後、培養培地中に放出されたグルタミン酸量を評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差で表記した (***P* < 0.001, one-way ANOVA with Tukey's post

hoc test.)。 (C) U251 Control 細胞及び U251 NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて高密度状態で 48 時間培養した。48 時間後、グルコース非含有培地あるいは 5mM のグルコースを含む培養培地に、SSZ (250 μ M) で処理し 24 時間培養した。対照群には DMSO を使用した。細胞死の定量は LDH release assay 法を用いて、0.1% Tween 20 での細胞死割合を 100%とし、相対割合を評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差で表記した (** $P < 0.001$, $^{\dagger}P < 0.01$ one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。 (D) U251 Control 細胞及び U251 NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて低密度状態で 48 時間培養した。48 時間後、グルコース非含有培地あるいは 5 mM のグルコースを含む培養培地で 24 時間培養した。細胞死の定量は LDH release assay 法を用いて、0.1% Tween 20 での細胞死割合を 100%とし、相対割合を評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差で表記した (n.s., not significant, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.)。

次に、別の神経膠芽腫細胞株 T98G を使用して、Merlin による SLC7A11 発現制御及びグルコース欠乏下での細胞死誘導が U251 細胞に限定されないことを検証した。CRISPR-Cas9 により NF2 遺伝子を欠損した T98G 細胞を樹立した (Figure. 2-4A)。また、T98G Control 細胞及び NF2 KO 細胞を播種後 4、8、12 日間培養すると、U251 細胞と同様に NF2 KO 細胞は Control 細胞と比較して細胞数の著しい増加を示した (Figure. 2-4B)。Merlin の欠損が T98G 細胞における SLC7A11 発現に影響を与えるかどうかも検討した。その結果、Control 細胞は播種後 48 時間で SLC7A11 タンパク質レベルの減少を示したが、NF2 KO 細胞では SLC7A11 の減少が抑制された (Figure. 2-4C)。さらに、NF2 KO 細胞は、Control 細胞と比較して、高密度状態でのグルコース欠乏下での細胞死の有意な増加を示した (Figure. 2-4D)。

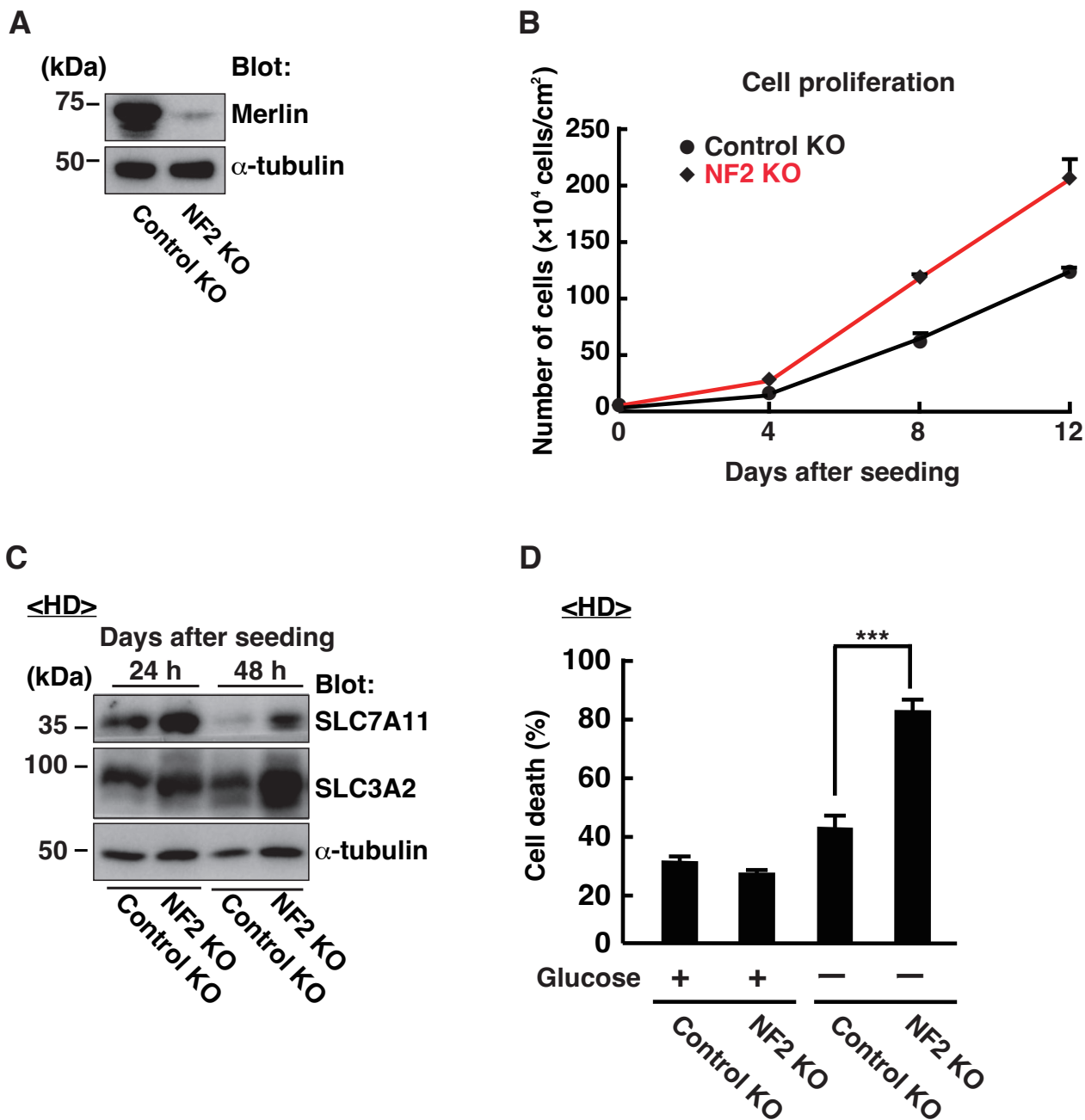


Figure.2-4 T98G 細胞における Merlin の欠損は高密度培養での SLC7A11 の発現低下を抑制しグルコース欠乏下での細胞死を誘導する

(A) T98G 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて 72 時間培養し、細胞溶解液を用いて回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した (B) T98G Control 細胞及び T98G NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて 1.0×10^4 cells/cm² で播種し、4、8、12 日後に細胞数を測定した。(C) T98G Control 細胞及び T98G NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて高密度状態で 24 時間、48 時間培養し、細胞溶解液を用いて回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。(D) T98G Control 細胞及び T98G NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて低密度状態で 48 時間培養した。48 時間後、グルコース非含有培地あるいは 5mM のグルコースを含む培養培地で 24 時間培養した。細胞死の定量は LDH release assay 法を用いて、0.1% Tween

20 での細胞死割合を 100%とし、相対割合を評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した (** $P < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.)。

第三節 N-Cadherin 発現抑制は SLC7A11 発現にほとんど影響しない

これまでの研究で、Merlin を介した接触依存性の増殖抑制は、Cadherin 依存性の細胞間接着によって制御されていることが報告されている⁷⁹⁻⁸¹。

所属する研究室では以前、N-Cadherin が U251 細胞に発現し、懸濁培養において細胞凝集を促進することを報告した。一方、E-Cadherin の発現は U251 細胞では検出されなかった⁷⁷。そこで、ヒト N-Cadherin に対する shRNA を導入して樹立した U251 shN-Cadherin 細胞を用いて、N-Cadherin が高密度状態での SLC7A11 タンパク質レベルとグルコース欠乏下での細胞死誘導を制御しているかどうかを調べた。その結果、SLC7A11 のタンパク質レベルは、U251 shControl 細胞と shN-Cadherin 細胞を高密度状態で 72 時間培養しても変わらなかった (Figure. 2-5A)。さらに N-Cadherin の発現抑制は、Merlin を含む Hippo シグナル経路には、ほとんど影響を与えなかった (Figure. 2-5B)。次に、グルコース欠乏下での細胞死誘導に対する N-Cadherin ノックダウンの効果を調べた結果、N-Cadherin の発現抑制は、低密度状態では細胞生存率にほとんど影響を与えなかったが、高密度状態では細胞死を有意に増加させた (Figure. 2-5C)。従って、N-Cadherin は SLC7A11 の発現調節以外の機序で、神経膠芽腫細胞の高密度状態におけるグルコース欠乏下での細胞生存率に影響する可能性が示唆された。

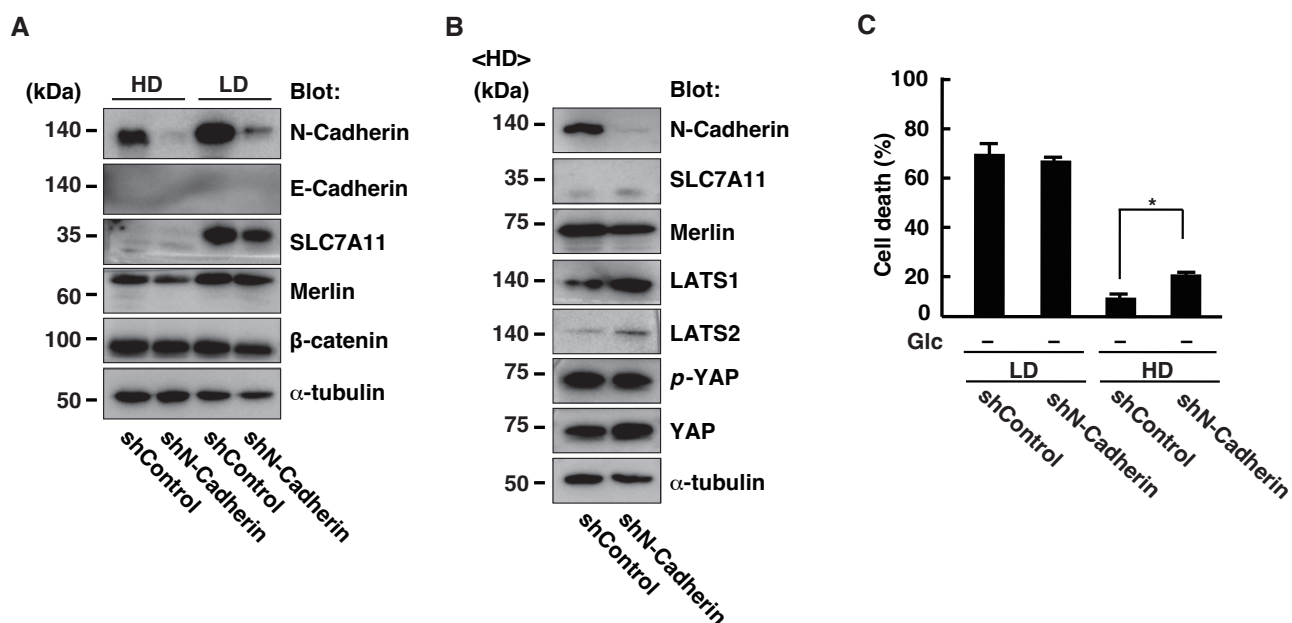


Figure.2-5 N-Cadherin 発現抑制は SLC7A11 発現にほとんど影響しない

(A) U251 control shRNA 細胞 (U251 shControl 細胞) 及び N-cadherin に対する shRNA を発現させた U251 細胞 (U251 shN-cadherin 細胞) を 5mM のグルコースを含む培養培地にて低密度状態あるいは高密度状態で 72 時間培養し、細胞溶解液を用いて回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。(B) U251 shControl 細胞及び U251 shN-cadherin 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて高密度状態で 72 時間培養し、細胞溶解液を用いて回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。(C) U251 shControl 細胞及び U251 shN-cadherin 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて高密度状態で 48 時間培養した。48 時間後、グルコース非含有培地あるいは 5mM のグルコースを含む培養培地で 24 時間培養した。細胞死の定量は LDH release assay 法を用いて、0.1% Tween 20 での細胞死割合を 100%とし、相対割合を評価した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した (* $P < 0.05$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.)。

第四節 Merlin の欠損により高密度状態における SLC7A11 mRNA 発現が増加する

第一章では、高密度状態による mTOR 活性の低下が神経膠芽腫細胞における SLC7A11 のリソソームによる分解の促進に関与していることを明らかにした。従って、U251 Control 細胞および NF2 KO 細胞における mTOR の下流基質である p70 S6 キナーゼ (S6K) のリン酸化レベルの検討を行った。低密度状態で培養した場合、Control 細胞と NF2 KO 細胞の間でリン酸化 S6K (*p*-S6K) のレベルに差は見られなかった (Figure. 2-6A)。一方で、*p*-S6K レベルは、高密度状態の NF2 KO 細胞で増加していたが、mTOR 阻害剤 Torin 1 による処理は高密度状態時の NF2 KO 細胞の SLC7A11 タンパク質レベルにほとんど影響しなかった (Figure. 2-6B)。この結果から、Merlin が mTOR 活性とは独立して高密度状態における SLC7A11 発現を調節していることが示唆された。

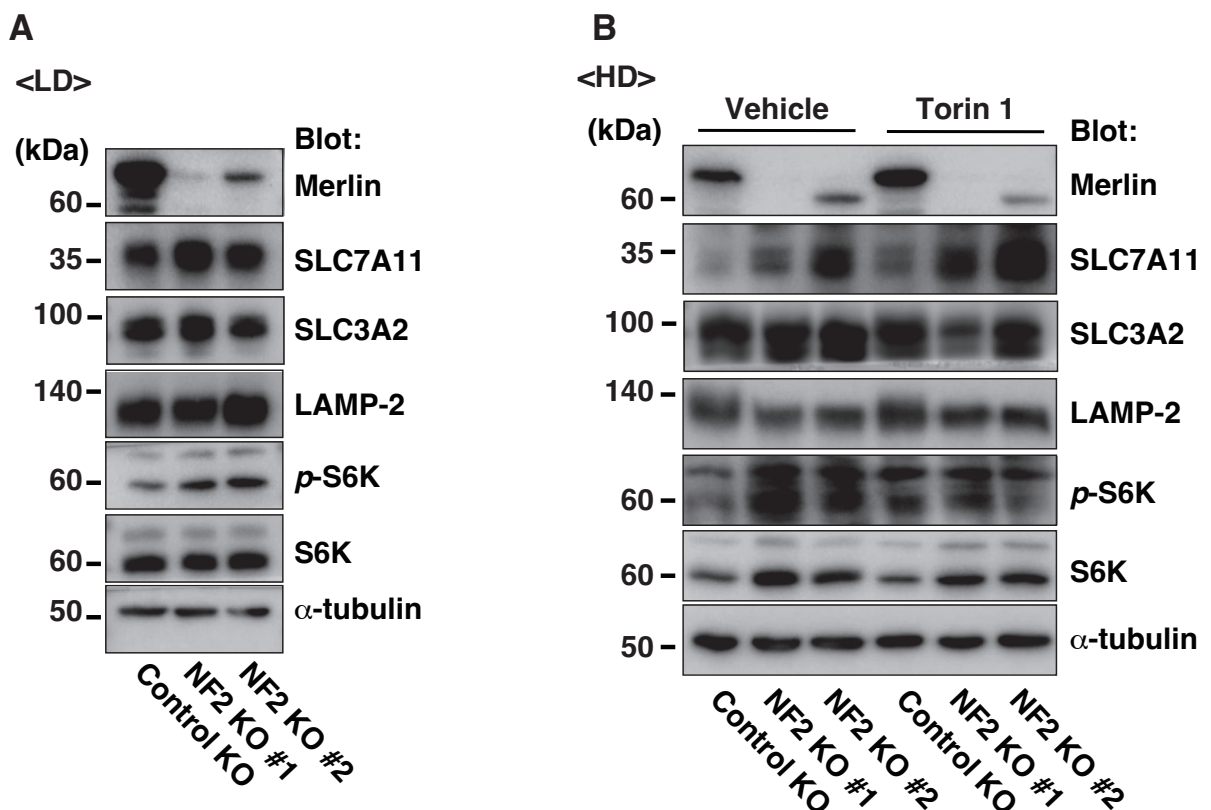


Figure.2-6 mTOR の活性と独立して Merlin の欠損により高密度状態における SLC7A11 発現量が増加する

(A) U251 Control 細胞及び U251 NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて低密度状態で 72 時間培養し、細胞溶解液を用いて回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。(B) U251 Control 細胞及び U251 NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて高密度状態で 24 時間培養後 Torin 1 (250 nM) で 48 時間処理し、細胞溶解液を用いて回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。対照群には DMSO を使用した。

次に、Control 細胞および NF2 KO 細胞における Hippo シグナル経路分子 YAP/TAZ の発現変動を検討した。その結果、Merlin の欠損はリン酸化 YAP および YAP タンパク質のレベルにはほとんど影響しなかったが、TAZ 発現は NF2 KO 細胞で明らかに増加していた (Figure. 2-7A)。転写共役因子である YAP/TAZ は、核内において様々な転写因子を介して遺伝子発現を制御する⁸²⁻⁸⁴。

そこで、Control 細胞及び NF2 KO 細胞における TAZ の細胞内局在を観察した。TAZ は、Control 細胞の低密度状態では主に細胞の核に局在していたが、高密度状態ではほとんどが細胞質に局在していた。しかし、NF2 KO 細胞は高密度状態でも TAZ の核局在を示した (Figure. 2-7B)。

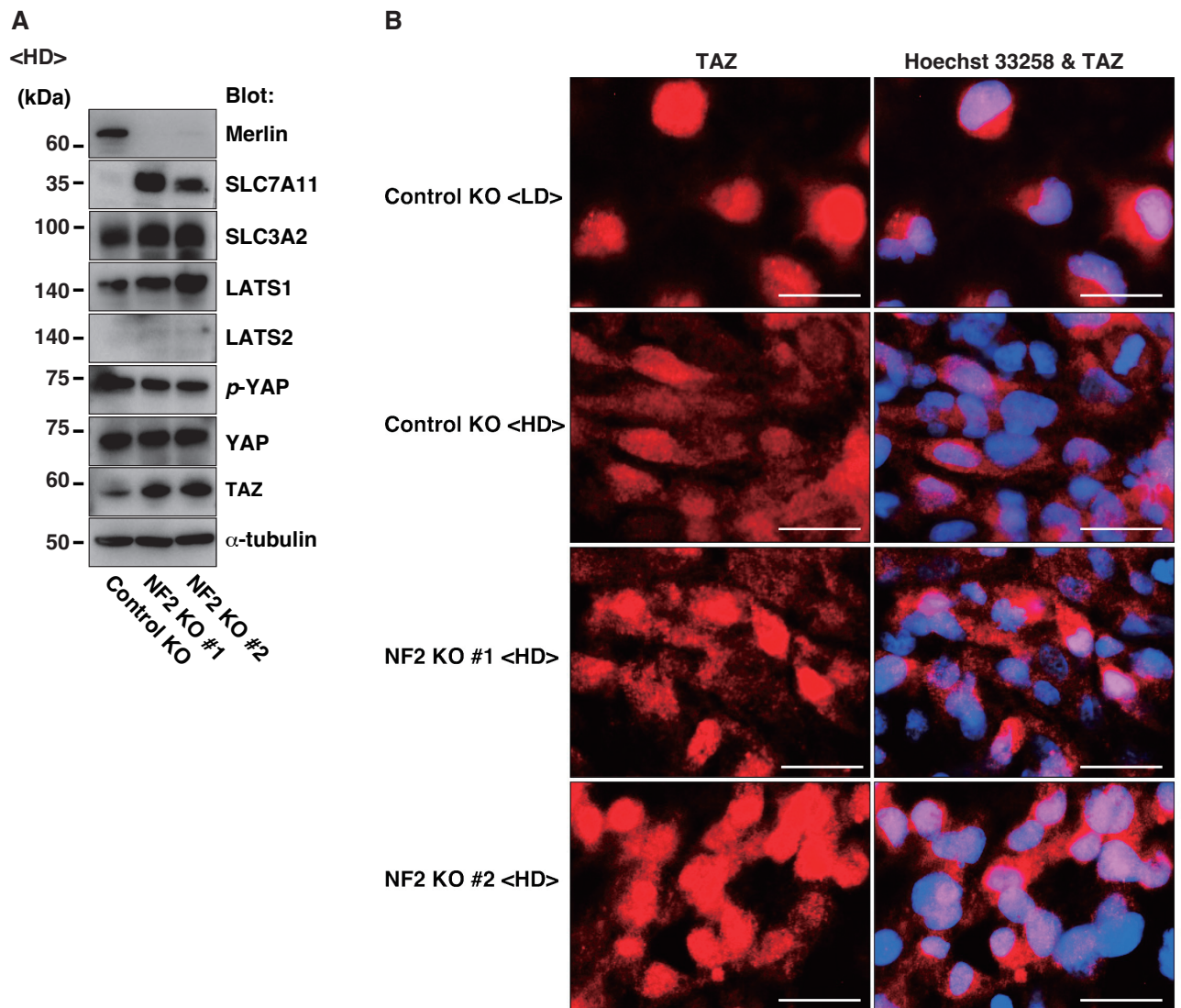


Figure.2-7 Merlin の欠損により高密度状態における TAZ の発現と核内局在が増加する

U251 Control 細胞及び U251 NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて高密度状態で 72 時間培養し、細胞溶解液を用いて回収した後、タンパク質発現量を Immunoblot 法にて評価した。(B) U251 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて低密度状態及び高密度状態で 72 時間培養し、細胞を anti-TAZ antibody (赤)で染色した。核は Hoechst 33258 (青) で染色した。画像解析は蛍光顕微鏡で行った。スケールバーは 10 μ m を示す。

SLC7A11 は、TAZ を含むいくつかの転写因子によって転写調節されているため、次に Control 細胞及び NF2 KO 細胞における SLC7A11 及び SLC3A2 の mRNA レベルを定量的 PCR で比較した⁸⁵。高密度状態は Control 細胞における SLC7A11 mRNA レベルを減少させたが、Merlin 欠損により SLC7A11 の mRNA 発現が上昇した(Figure. 2-8A)。一方で、Merlin 欠損による SLC3A2 mRNA 発現レベルには有意

な差が見られなかった (Figure. 2-8B)。したがって、Merlin が神経膠芽腫細胞の高密度状態において転写レベルで SLC7A11 発現を抑制することが示唆された。

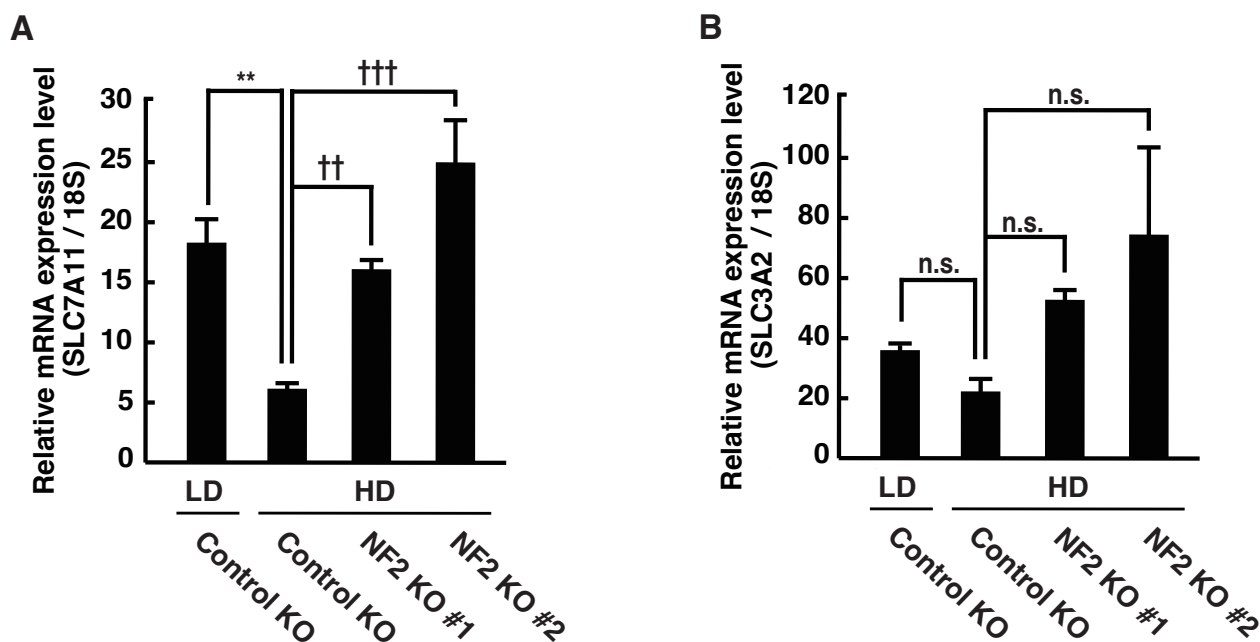
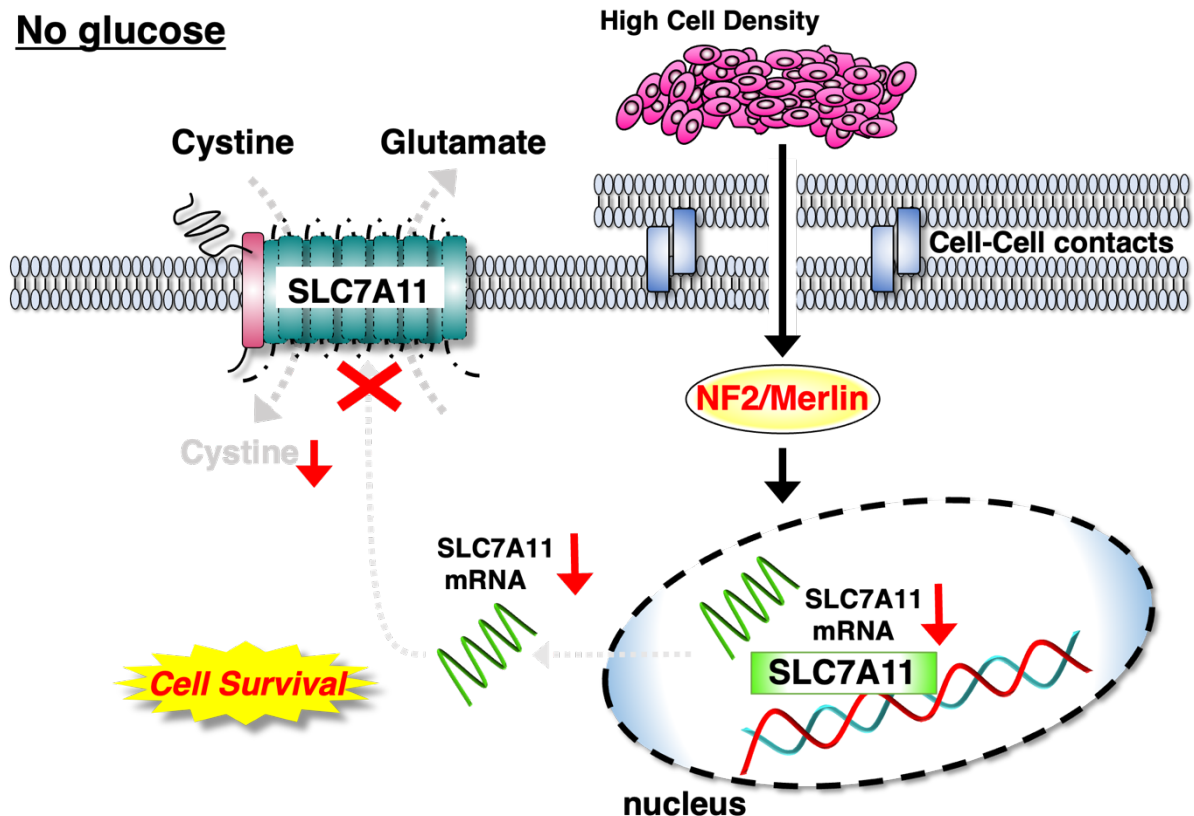


Figure.2-8 Merlin の欠損により高密度状態における SLC7A11 mRNA 発現が増加する

(A, B) U251 Control 細胞及び U251 NF2 KO 細胞を 5mM のグルコースを含む培養培地にて低密度状態あるいは高密度状態で 72 時間培養し、RNA iso Plus を用いて RNA を回収した。抽出した RNA を鋳型として Moloney Murine Leukemia Virus (Invitrogen) を用いて逆転写して得た cDNA により、RT-リアルタイム定量 PCR 法で mRNA 量を評価した。グラフは 7 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した (** $P < 0.01$; †† $P < 0.01$; ††† $P < 0.001$, n.s., not significant, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.)。

【第二章の考察】

本章では、神経膠芽腫細胞の高密度状態では、NF2/Merlin による転写レベルでの SLC7A11 発現抑制及び SLC7A11 を介したグルコース非依存性の制御機構が明らかとなった (Figure.2-9)。



【Figure.2-9 NF2/Merlin を介した高密度状態での SLC7A11/xCT 発現抑制機構】

第一章で明らかにした、神経膠芽腫細胞の高密度状態で mTOR の活性が抑制されることは、他の種類のがん細胞においても報告されている^{86,87}。さらに、Hippo シグナル伝達経路のキナーゼである LATS1/2 が mTORC1 複合体分子 Raptor を直接リン酸化することで mTORC1 活性を抑制することが報告された⁸⁸。このことから、本研究では神経膠芽腫細胞で LATS1/2 遺伝子欠損細胞株の樹立を試みた。しかし、LATS1/2 遺伝子欠損により細胞の生存性が大きく低下しており、正常な細胞株培養が困難であった。従って、神経膠芽腫細胞における LATS1/2 による mTOR 活性の

抑制機序及び LATS1/2 による SLC7A11 タンパク質発現制御の関与は RNAi を用いた遺伝子抑制あるいは LATS1/2 の阻害により検証する必要性がある。

一方で、本章において、Hippo シグナル伝達経路で LATS1/2 の上流分子である NF2/Merlin の遺伝子欠損は、mTOR の下流標的である p70 S6 kinase (S6K) のリン酸化レベルに影響を示さなかった。Merlin は、PI3K に結合して活性化する GTPase である 3-kinase enhancer-L (PIKE-L) に結合し、PI3K 活性を阻害することが知られている^{89,90}。対して Merlin の欠損は、PI3K-Akt および MAPK/ERK シグナル伝達経路とは独立して、mTORC1 を活性化することも報告されている⁹¹。このように、Merlin は Hippo 経路以外の様々な経路に関与していることから、Merlin による SLC7A11 mRNA 発現制御に関しても、Hippo 経路以外の関与が考えられる。

本章では、神経膠芽腫細胞における細胞密度状態で転写共役因子である TAZ の発現局在の変動を確認した。以前の研究では、Merlin が Rac の細胞膜への動員を抑制することが報告されており、Merlin の細胞内局在への機能が推測される⁹²。このことから、細胞密度状態に応じて、Merlin により TAZ の局在が制御されている可能性が示唆される。また種々の刺激応答が SLC7A11 の転写レベルでの発現に関与することが報告されている。NRF2 及び ATF4 転写因子が、酸化ストレス条件下で SLC7A11 mRNA の発現を誘導するのに対して、SLC7A11 発現は p53 腫瘍抑制タンパク質によって抑制されることが知られている^{15, 22-24, 52}。

さらに、SLC7A11 は YAP/TAZ により転写調節されることも報告されている⁸⁵。本研究の結果から、高密度状態での神経膠芽腫細胞における Merlin の SLC7A11 mRNA レベルでの発現制御において TAZ の関与が示唆される。従って、高密度状態による SLC7A11 mRNA 転写活性における TAZ の関与及び結合領域、共役する他の転写因子の関与についてはさらなる検証が必要である。

NF2 遺伝子を欠損した神経膠芽腫細胞では、高密度状態での SLC7A11 発現の減少がみられず、グルコース欠乏下でも細胞死が誘導された。しかし、Control 細胞の低密度状態において認められる細胞死の割合と同等までは誘導されなかった。こ

のことは、神経膠芽腫細胞の高密度状態におけるグルコース欠乏下での細胞生存性獲得には、NF2/Merlin による SLC7A11 発現制御以外での機序が関与している可能性が考えられる。

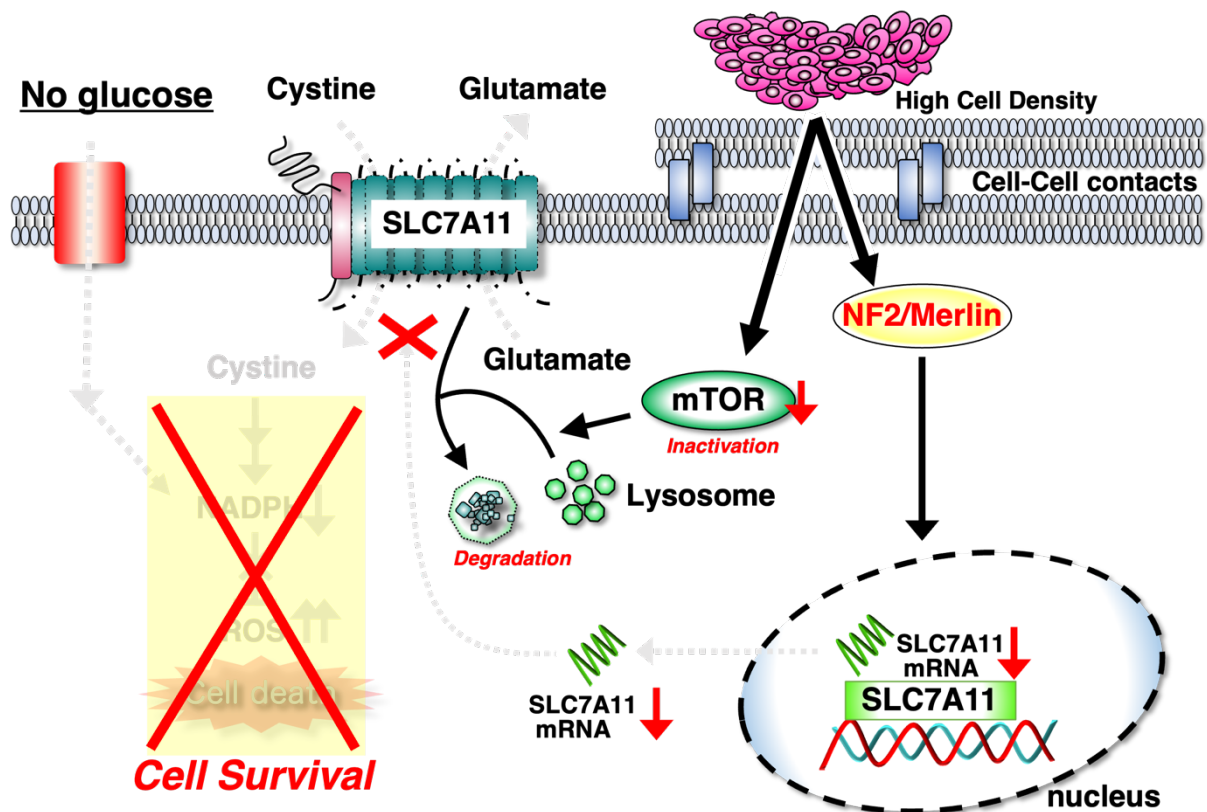
細胞の接着においては、細胞間接着を担う分子の一つである Cadherin に代表される、いくつかの分子の関与が知られている。以前の研究で、Cadherin が、NF2/Merlin の活性を制御することが報告されている⁷⁹⁻⁸¹。本章では N-Cadherin をノックダウンした細胞では、細胞の密度状態で Merlin の発現量及び SLC7A11 タンパク質発現量には変化が生じなかった。一方で、N-Cadherin 遺伝子抑制により高密度状態ではグルコース欠乏下での細胞死の誘導が生じた。神経膠芽腫細胞における N-Cadherin の過剰発現はアポトーシス抵抗性獲得に寄与することが報告されていることから、N-Cadherin は NF2/Merlin の活性には関与なく、細胞生存性を制御することが考えられる⁹³。従って、神経膠芽腫細胞の密度状態における NF2/Merlin の活性制御は、N-Cadherin 以外の上流制御因子が存在すると推測される。

NF2/Merlin はアクチン骨格に連結し、アクチン-膜貫通型受容体-受容体チロシンキナーゼ (RTK)、低分子 GTPase、mTOR、PI3K/Akt、Hippo シグナル伝達経路などの細胞内シグナルを間接的に繋ぐことが知られている⁶⁸。さらに、NF2 欠損のヒト神経鞘腫においてはアクチン細胞骨格の異常が報告されている^{94, 95}。

SLC7A11 が関与する新規の細胞死概念、Disulfidptosis で認められる分子機序のひとつに、アクチン細胞骨格タンパク質での異常なジスルフィド結合誘導に伴うアクチンネットワークの崩壊が報告されている^{27, 28}。SLC7A11 が高発現するがん細胞において、グルコース欠乏環境下で SLC7A11 を介してシスチンが細胞内に取り込まれることで、細胞内シスチンやジスルフィド分子の蓄積が生じる。その結果、アクチン細胞骨格タンパク質のジスルフィド結合形成を誘発し、アクチン収縮といったアクチンネットワークの崩壊が生じることで細胞死が誘導される。従って、NF2/Merlin のアクチン細胞骨格タンパク質への影響、及び本章で明らかにした高密度状態による NF2/Merlin を介した SLC7A11 発現制御と Disulfidptosis の制御の関与についても今後の重要な検証課題である。

結語

本章では、神経膠芽腫におけるアミノ酸交換輸送体 SLC7A11/xCT の発現制御、及びグルコースに対する依存性に関して検討を行い、下記の知見を得た。第一章では、神経膠芽腫細胞の培養密度状態に依存し、mTOR の活性が変化することで、リソソームによる SLC7A11/xCT のタンパク質分解機序が制御されていること、特に、高密度状態においては mTOR の活性抑制に伴いリソソームによる SLC7A11/xCT の分解が誘導されることで、グルコース欠乏でも生存性を獲得していることが明らかとなった。第二章では、NF2/Merlin により、高密度状態では SLC7A11/xCT の mRNA レベルでの発現が制御されていること、またその発現制御がグルコース欠乏に対する生存性にも影響することが明らかとなった (Figure.3)。



【Figure.3 高密度状態での SLC7A11/xCT 発現抑制とグルコース欠乏下での生存性獲得】

SLC7A11/xCT の発現量と神経膠芽腫患者に関しては、腫瘍進行や予後と相関することが多く報告なされている⁹⁶⁻¹⁰⁰。また SLC7A11/xCT の輸送活性あるいは薬理

学阻害、及び SLC7A11 遺伝子欠損により、腫瘍細胞の他組織への転移が抑制されることが報告されている¹⁰¹⁻¹⁰⁴。これらのことから、SLC7A11/xCT の発現制御機構を明らかにすることは、神経膠芽腫をはじめとする種々のがんに対する悪性化メカニズム及び細胞生存性獲得機構の解明に加え、新規の細胞死概念、Disulfidptosis における未解明な分子機序の解明にも繋がると言える。

多くのがん細胞は、グルコースに対する依存性が高いため、グルコース輸送体阻害や代謝阻害ががん細胞に対する有効な治療に繋がると考えられていた。しかし、グルコース輸送体阻害や代謝阻害の、がん治療への有効性はあまり報告がされていない。本研究では、この要因として、グルコース欠乏下でも細胞生存性を獲得する機構の存在を予想した。第一章では、神経膠芽腫細胞の細胞密度状態により SLC7A11/xCT の発現量が制御されており、特に高密度状態では mTOR の活性低下に伴うリソソームによる SLC7A11/xCT の分解による発現抑制が、SLC7A11/xCT を介したグルコース欠乏下での細胞死の回避に寄与していることを明らかにした。しかしながら第二章では、NF2/Merlin を欠損させた神経膠芽腫細胞の高密度状態においては、SLC7A11/xCT の発現が低密度程度ではないが回復しており、Merlin を介した mRNA レベルでの発現制御の存在を明らかにした。さらに、Merlin の発現はヒト神経膠芽腫の 60%以上で減少していることが報告がされており¹⁰⁵、高密度状態の神経膠芽腫では、ある程度の SLC7A11/xCT 発現が保持されている可能性が示唆される。

これらの研究結果から、神経膠芽腫における NF2 遺伝子の発現量評価や、神経膠芽腫細胞同士の凝集阻害とグルコース輸送体阻害や代謝阻害との併用が、効果的な治療法に繋がる可能性が考えられる。また、これまでも、がん細胞が高密度で存在すると、抗がん剤に対する感受性が低下するとの報告がされているため³⁰⁻³²、がん細胞が高密度状態で存在する場合にのみ引き起こされる分子機構の解明は、グルコース飢餓に対する生存性獲得のみならず、様々な抗がん剤に対する感受性の変化に対しても、有用な情報が提供できると考える。

以上、本研究結果は、神経膠芽腫のグルコース依存性において、細胞の密度状態と SLC7A11/xCT 発現制御が重要な役割を果たすことを示すものであり、神経膠芽腫がグルコース飢餓状態における生存性を獲得する機構の一端を明らかにしたものである。

参考文献

1. Dolecek, Therese A et al. "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009." *Neuro-oncology* vol. 14 Suppl 5,Suppl 5 (2012): v1-49.
2. Tan, Sze Kiat et al. "Drug Repositioning in Glioblastoma: A Pathway Perspective." *Frontiers in pharmacology* vol. 9 218. 16 Mar. 2018,
3. Nørøxe, Dorte Schou et al. "Hallmarks of glioblastoma: a systematic review." *ESMO open* vol. 1,6 e000144. 22 Feb. 2017
4. Stupp, Roger et al. "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." *The New England journal of medicine* vol. 352,10 (2005)
5. Dolecek, Therese A et al. "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009." *Neuro-oncology* vol. 14 Suppl 5,Suppl 5 (2012): v1-49.
6. Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* vol. 144,5 (2011): 646-74.
7. Ward, Patrick S, and Craig B Thompson. "Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate." *Cancer cell* vol. 21,3 (2012): 297-308.
8. Hay, Nissim. "Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy?." *Nature reviews. Cancer* vol. 16,10 (2016): 635-49.
9. Galadari, Sehamuddin et al. "Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?." *Free radical biology & medicine* vol. 104 (2017): 144-164.
10. Hayes, John D et al. "Oxidative Stress in Cancer." *Cancer cell* vol. 38,2 (2020): 167-197.
11. Sato, H et al. "Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins." *The Journal of biological chemistry* vol. 274,17 (1999): 11455-8.
12. Koppula, Pranavi et al. "Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of

- regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer.” *Cancer communications (London, England)* vol. 38,1 12. 25 Apr. 2018
13. Liu, Jinyun et al. “xCT: A Critical Molecule That Links Cancer Metabolism to Redox Signaling.” *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 28,11 (2020): 2358-2366.
 14. Cheung, Eric C, and Karen H Vousden. “The role of ROS in tumour development and progression.” *Nature reviews. Cancer* vol. 22,5 (2022): 280-297.
 15. Conrad, Marcus, and Hideyo Sato. “The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond.” *Amino acids* vol. 42,1 (2012): 231-46.
 16. Badgley, Michael A et al. “Cysteine depletion induces pancreatic tumor ferroptosis in mice.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 368,6486 (2020): 85-89..
 17. Dixon, Scott J et al. “Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death.” *Cell* vol. 149,5 (2012): 1060-72.
 18. Stockwell, Brent R et al. “Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease.” *Cell* vol. 171,2 (2017): 273-285.
 19. Sies, Helmut et al. “Oxidative Stress.” *Annual review of biochemistry* vol. 86 (2017): 715-748.
 20. Cheung, Eric C, and Karen H Vousden. “The role of ROS in tumour development and progression.” *Nature reviews. Cancer* vol. 22,5 (2022): 280-297.
 21. Takeuchi, Satoru et al. “Increased xCT expression correlates with tumor invasion and outcome in patients with glioblastomas.” *Neurosurgery* vol. 72,1 (2013): 33-41; discussion 41.
 22. Lewerenz, Jan et al. “The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities.” *Antioxidants & redox signaling* vol. 18,5 (2013): 522-55.
 23. Shin, Chun-Shik et al. “The glutamate/cystine xCT antiporter antagonizes glutamine metabolism and reduces nutrient flexibility.” *Nature communications* vol. 8 15074. 21 Apr. 2017,

24. Koppula, Pranavi et al. "The glutamate/cystine antiporter SLC7A11/xCT enhances cancer cell dependency on glucose by exporting glutamate." *The Journal of biological chemistry* vol. 292,34 (2017): 14240-14249.
25. Goji, Takeo et al. "Cystine uptake through the cystine/glutamate antiporter xCT triggers glioblastoma cell death under glucose deprivation." *The Journal of biological chemistry* vol. 292,48 (2017): 19721-19732.
26. Koppula, Pranavi et al. "Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer." *Cancer communications (London, England)* vol. 38,1 12. 25 Apr. 2018
27. Liu, Xiaoguang et al. "Disulfidptosis: disulfide stress-induced cell death." *Trends in cell biology*, S0962-8924(23)00141-1. 12 Aug. 2023
28. Liu, Xiaoguang et al. "Actin cytoskeleton vulnerability to disulfide stress mediates disulfidptosis." *Nature cell biology* vol. 25,3 (2023): 404-414.
29. Yan, Yuelong et al. "SLC7A11 expression level dictates differential responses to oxidative stress in cancer cells." *Nature communications* vol. 14,1 3673. 21 Jun. 2023
30. Kobayashi, H et al. "Relationship between tumor cell density and drug concentration and the cytotoxic effects of doxorubicin or vincristine: mechanism of inoculum effects." *Cancer chemotherapy and pharmacology* vol. 31,1 (1992): 6-10.
31. Westhoff, M A et al. "Identification of a novel switch in the dominant forms of cell adhesion-mediated drug resistance in glioblastoma cells." *Oncogene* vol. 27,39 (2008): 5169-81.
32. Gujral, Taranjit S, and Marc W Kirschner. "Hippo pathway mediates resistance to cytotoxic drugs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 114,18 (2017): E3729-E3738.
33. Brown, Caitlin W et al. "Cell clustering mediated by the adhesion protein PVRL4 is necessary for $\alpha 6\beta 4$ integrin-promoted ferroptosis resistance in matrix-detached cells." *The Journal of biological chemistry* vol. 293,33 (2018): 12741-12748.
34. Wu, Jiao et al. "Intercellular interaction dictates cancer cell ferroptosis via NF2-YAP

- signalling.” *Nature* vol. 572,7769 (2019): 402-406.
35. Yang, Wen-Hsuan et al. “The Hippo Pathway Effector TAZ Regulates Ferroptosis in Renal Cell Carcinoma.” *Cell reports* vol. 28,10 (2019): 2501-2508.e4.
 36. Yang, Wen-Hsuan et al. “A TAZ-ANGPTL4-NOX2 Axis Regulates Ferroptotic Cell Death and Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer.” *Molecular cancer research : MCR* vol. 18,1 (2020): 79-90.
 37. Saxton, Robert A, and David M Sabatini. “mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease.” *Cell* vol. 168,6 (2017): 960-976.
 38. Mossmann, Dirk et al. “mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer.” *Nature reviews. Cancer* vol. 18,12 (2018): 744-757.
 39. Inoki, Ken et al. “TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival.” *Cell* vol. 115,5 (2003): 577-90.
 40. Liu, Liping et al. “Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth.” *Molecular cell* vol. 21,4 (2006): 521-31.
 41. Saxton, Robert A, and David M Sabatini. “mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease.” *Cell* vol. 168,6 (2017): 960-976.
 42. Mossmann, Dirk et al. “mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer.” *Nature reviews. Cancer* vol. 18,12 (2018): 744-757.
 43. Puertollano, Rosa. “mTOR and lysosome regulation.” *F1000prime reports* vol. 6 52. 8 Jul. 2014,
 44. Cang, Chunlei et al. “mTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na(+) channels to adapt to metabolic state.” *Cell* vol. 152,4 (2013): 778-790.
 45. Jung, Chang Hwa et al. “mTOR regulation of autophagy.” *FEBS letters* vol. 584,7 (2010): 1287-95.
 46. Kim, Joungmok et al. “AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1.” *Nature cell biology* vol. 13,2 (2011): 132-41.
 47. Zhao, Jinghui et al. “mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 112,52 (2015): 15790-7.

48. Rousseau, Adrien, and Anne Bertolotti. "An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis." *Nature* vol. 536,7615 (2016): 184-9.
49. Leontieva, Olga V et al. "Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 111,24 (2014): 8832-7.
50. Trajkovic, Katarina et al. "Fluctuations in cell density alter protein markers of multiple cellular compartments, confounding experimental outcomes." *PloS one* vol. 14,2 e0211727. 4 Feb. 2019,
51. Leontieva, Olga V et al. "Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 111,24 (2014): 8832-7.
52. Jiang, Le et al. "Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression." *Nature* vol. 520,7545 (2015): 57-62.
53. Liu, Tong et al. "The Deubiquitylase OTUB1 Mediates Ferroptosis via Stabilization of SLC7A11." *Cancer research* vol. 79,8 (2019): 1913-1924.
54. Lamming, Dudley W, and Liron Bar-Peled. "Lysosome: The metabolic signaling hub." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* vol. 20,1 (2019): 27-38.
55. Settembre, Carmine et al. "A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB." *The EMBO journal* vol. 31,5 (2012): 1095-108.
56. Roczniak-Ferguson, Agnes et al. "The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis." *Science signaling* vol. 5,228 ra42. 12 Jun. 2012
57. Wenz, Christine et al. "Cell-cell contacts protect against t-BuOOH-induced cellular damage and ferroptosis in vitro." *Archives of toxicology* vol. 93,5 (2019): 1265-1279.
58. Dikic, Ivan. "Proteasomal and Autophagic Degradation Systems." *Annual review of biochemistry* vol. 86 (2017): 193-224.

59. Ji, Chang Hoon, and Yong Tae Kwon. "Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy." *Molecules and cells* vol. 40,7 (2017): 441-449.
60. Matsumoto, Gen et al. "Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins." *Molecular cell* vol. 44,2 (2011): 279-89.
61. Gu, Dongmin et al. "Inhibition of the MDM2 E3 Ligase induces apoptosis and autophagy in wild-type and mutant p53 models of multiple myeloma, and acts synergistically with ABT-737." *PloS one* vol. 9,9 e103015. 2 Sep. 2014
62. Lagunas-Martínez, Alfredo et al. "MG132 plus apoptosis antigen-1 (APO-1) antibody cooperate to restore p53 activity inducing autophagy and p53-dependent apoptosis in HPV16 E6-expressing keratinocytes." *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* vol. 22,1 (2017): 27-40.
63. Wang, Xiao J et al. "A novel crosstalk between two major protein degradation systems: regulation of proteasomal activity by autophagy." *Autophagy* vol. 9,10 (2013): 1500-8.
64. Qiao, Liyan, and Jianhua Zhang. "Inhibition of lysosomal functions reduces proteasomal activity." *Neuroscience letters* vol. 456,1 (2009): 15-9.
65. Liu, Jiao et al. "Autophagy-Dependent Ferroptosis: Machinery and Regulation." *Cell chemical biology* vol. 27,4 (2020): 420-435.
66. Kabeya, Y et al. "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." *The EMBO journal* vol. 19,21 (2000): 5720-8.
67. Mizushima, Noboru, and Tamotsu Yoshimori. "How to interpret LC3 immunoblotting." *Autophagy* vol. 3,6 (2007): 542-5.
68. Petrilli, A M, and C Fernández-Valle. "Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology." *Oncogene* vol. 35,5 (2016): 537-48.
69. Lau, Ying-Ka Ingar et al. "Merlin is a potent inhibitor of glioma growth." *Cancer research* vol. 68,14 (2008): 5733-42.
70. Morales, Fabiana C et al. "Overexpression of ezrin inactivates NF2 tumor suppressor

- in glioblastoma.” *Neuro-oncology* vol. 12,6 (2010): 528-39.
71. Zheng, Yonggang, and DuoJia Pan. “The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease.” *Developmental cell* vol. 50,3 (2019): 264-282.
72. Morrison, H et al. “The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44.” *Genes & development* vol. 15,8 (2001): 968-80.
73. Sainio, M et al. “Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein colocalizes with ezrin and CD44 and associates with actin-containing cytoskeleton.” *Journal of cell science* vol. 110 (Pt 18) (1997): 2249-60.
74. Herrlich, P et al. “CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor.” *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 910 (2000): 106-18; discussion 118-20.
75. Concordet, Jean-Paul, and Maximilian Haeussler. “CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens.” *Nucleic acids research* vol. 46,W1 (2018): W242-W245.
76. Katoh, Yohei et al. “Practical method for targeted disruption of cilia-related genes by using CRISPR/Cas9-mediated, homology-independent knock-in system.” *Molecular biology of the cell* vol. 28,7 (2017): 898-906.
77. Toyama, Moe et al. “EphA3 is up-regulated by epidermal growth factor and promotes formation of glioblastoma cell aggregates.” *Biochemical and biophysical research communications* vol. 508,3 (2019): 715-721.
78. Hayashima, Kazuki et al. “Role of ferritinophagy in cystine deprivation-induced cell death in glioblastoma cells.” *Biochemical and biophysical research communications* vol. 539 (2021): 56-63.
79. Beltrami, Sarah et al. “Neurofibromatosis type 2 protein, NF2: an unconventional cell cycle regulator.” *Anticancer research* vol. 33,1 (2013): 1-11.
80. Bao, Zhongyuan et al. “MEF2C silencing downregulates NF2 and E-cadherin and enhances Erastin-induced ferroptosis in meningioma.” *Neuro-oncology* vol. 23,12 (2021): 2014-2027.

81. Wu, Jiao et al. "Intercellular interaction dictates cancer cell ferroptosis via NF2-YAP signalling." *Nature* vol. 572,7769 (2019): 402-406.
82. Piccolo, Stefano et al. "The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond." *Physiological reviews* vol. 94,4 (2014): 1287-312.
83. Kodaka, Manami, and Yutaka Hata. "The mammalian Hippo pathway: regulation and function of YAP1 and TAZ." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* vol. 72,2 (2015): 285-306.
84. Barron, Daniel A, and Jacob D Kagey. "The role of the Hippo pathway in human disease and tumorigenesis." *Clinical and translational medicine* vol. 3 25. 18 Jul. 2014
85. Gao, Ruize et al. "YAP/TAZ and ATF4 drive resistance to Sorafenib in hepatocellular carcinoma by preventing ferroptosis." *EMBO molecular medicine* vol. 13,12 (2021): e14351.
86. Leontieva, Olga V et al. "Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 111,24 (2014): 8832-7.
87. Trajkovic, Katarina et al. "Fluctuations in cell density alter protein markers of multiple cellular compartments, confounding experimental outcomes." *PloS one* vol. 14,2 e0211727. 4 Feb. 2019
88. Gan, Wenjian et al. "LATS suppresses mTORC1 activity to directly coordinate Hippo and mTORC1 pathways in growth control." *Nature cell biology* vol. 22,2 (2020): 246-256.
89. Rong, Rong et al. "Neurofibromatosis 2 (NF2) tumor suppressor merlin inhibits phosphatidylinositol 3-kinase through binding to PIKE-L." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 101,52 (2004): 18200-5.
90. Ye, Keqiang. "Phosphorylation of merlin regulates its stability and tumor suppressive activity." *Cell adhesion & migration* vol. 1,4 (2007): 196-8.

91. James, Marianne F et al. "NF2/merlin is a novel negative regulator of mTOR complex 1, and activation of mTORC1 is associated with meningioma and schwannoma growth." *Molecular and cellular biology* vol. 29,15 (2009): 4250-61.
92. Kissil, Joseph L et al. "Merlin, the product of the Nf2 tumor suppressor gene, is an inhibitor of the p21-activated kinase, Pak1." *Molecular cell* vol. 12,4 (2003): 841-9.
93. Osuka, Satoru et al. "N-cadherin upregulation mediates adaptive radioresistance in glioblastoma." *The Journal of clinical investigation* vol. 131,6 (2021): e136098.
94. Bashour, Anne-Marie et al. "The neurofibromatosis type 2 gene product, merlin, reverses the F-actin cytoskeletal defects in primary human Schwannoma cells." *Molecular and cellular biology* vol. 22,4 (2002): 1150-7.
95. Pelton, P D et al. "Ruffling membrane, stress fiber, cell spreading and proliferation abnormalities in human Schwannoma cells." *Oncogene* vol. 17,17 (1998): 2195-209.
96. Chung, Wook Joon et al. "Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 25,31 (2005): 7101-10.
97. Savaskan, Nicolai E et al. "Small interfering RNA-mediated xCT silencing in gliomas inhibits neurodegeneration and alleviates brain edema." *Nature medicine* vol. 14,6 (2008): 629-32.
98. Sleire, L et al. "Drug repurposing: sulfasalazine sensitizes gliomas to gamma knife radiosurgery by blocking cystine uptake through system Xc-, leading to glutathione depletion." *Oncogene* vol. 34,49 (2015): 5951-9.
99. Polewski, Monika D et al. "Increased Expression of System xc- in Glioblastoma Confers an Altered Metabolic State and Temozolomide Resistance." *Molecular cancer research : MCR* vol. 14,12 (2016): 1229-1242.
100. Robert, Stephanie M et al. "SLC7A11 expression is associated with seizures and predicts poor survival in patients with malignant glioma." *Science translational medicine* vol. 7,289 (2015): 289ra86.
101. Tsuchihashi, Kenji et al. "The EGF Receptor Promotes the Malignant Potential of Glioma by Regulating Amino Acid Transport System xc(-)." *Cancer research* vol.

- 76,10 (2016): 2954-63.
102. Lyons, Susan A et al. "Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion." *Cancer research* vol. 67,19 (2007): 9463-71.
103. Dornier, Emmanuel et al. "Glutaminolysis drives membrane trafficking to promote invasiveness of breast cancer cells." *Nature communications* vol. 8,1 2255. 21 Dec. 2017
104. Sato, Mami et al. "Loss of the cystine/glutamate antiporter in melanoma abrogates tumor metastasis and markedly increases survival rates of mice." *International journal of cancer* vol. 147,11 (2020): 3224-3235.
105. Lau, Ying-Ka Ingar et al. "Merlin is a potent inhibitor of glioma growth." *Cancer research* vol. 68,14 (2008): 5733-42.

謝辞

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました京都大学 大学院生命科学研究科 生体システム学分野 木村郁夫 教授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、直接のご指導とご鞭撻を賜りました大阪公立大学 大学院理学研究科 生物化学専攻 機能生化学研究室 加藤裕教 教授に心から感謝の意を表します。

また、多くの有益な御助言を頂きました、京都大学 大学院生命科学研究科 北野(大植) 隆司 助教、池田貴子 助教、渡辺啓太 特定助教に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、一部データ (Figure.1-4) のご協力をいただきました京都大学大学院 生命科学研究科 分子情報解析学分野 吉村成弘 准教授に深く感謝いたします。

本研究を通じて実験実施のご協力を頂き、研究の進捗に応じてご議論をして頂いた京都大学 大学院生命科学研究科 生体システム学分野、京都大学 大学院薬学研究科 神経機能制御学分野、大阪公立大学 大学院理学研究科 生物化学専攻 機能生化学研究室内の皆様に感謝いたします。

本研究の遂行に関しまして御援助をいただきました日本学術振興会に深く感謝いたします。

最後に、私の研究生活を温かく見守り、支えていただきました家族に、心より感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Itsuki Yamaguchi, Shige H Yoshimura and Hironori Katoh

High cell density increases glioblastoma cell viability under glucose deprivation via degradation of the cystine/glutamate transporter xCT (SLC7A11)

The Journal of biological chemistry, 295(20), 6936–6945, 2020

Itsuki Yamaguchi and Hironori Katoh

Merlin/NF2 regulates SLC7A11/xCT expression and cell viability under glucose deprivation at high cell density in glioblastoma cells.

The Journal of Biochemistry, 2024, doi:10.1093/jb/mvad105