

In vivo および *in vitro* の解析方法を用いた
動物腫瘍の性状に関する病理学的研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

荻原 喜久美

2015 年 9 月

目 次

第1章 イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における中性アミノ酸輸送に係わるL型アミノ酸トランスポーター1の発現とロイシン輸送能

緒言 1

材料および方法 3

結果 7

考察 9

第2章 マウスおよびイヌのメラノーマ由来樹立細胞株におけるルパン型トリテルペン化合物ルペオールの抗増殖および分化誘導効果

第1節 マウスメラノーマ由来細胞株におけるルペオールによる形態および機能面での分化誘導作用

緒言 23

材料および方法 24

結果	26
考察	27
第2節 イヌメラノーマ由来樹立細胞株におけるルパン型トリテルペン化合物 ルペオールの抗増殖および分化誘導効果	
緒言	33
材料および方法	34
結果	37
考察	39
総括	53
引用文献	56
謝辞	69

第1章

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における中性アミノ酸輸送に係わるL型アミノ酸トランスポーター1の発現とロイシン輸送能

緒言

多くのアミノ酸トランスポーターの輸送機構は、物質の濃度勾配によって基質の輸送を行う二次性能動輸送である。細胞内外のナトリウムイオンの濃度勾配を利用し、アミノ酸を共輸送するナトリウムイオン依存性のものおよびナトリウム以外の物質の濃度勾配を利用して基質を輸送するナトリウムイオン非依存性のものに大きく2つに分類される。現在までいくつかのアミノ酸輸送システムの存在がその基質選択性、pHの影響などのキネティクス解析より明らかになった[9, 10, 42]。エールリツヒ腹水腫瘍細胞を用いた研究において、アミノ酸輸送システムLは、2環性アミノ酸であるヘプタン-2-カルボン酸 (2-aminobicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylic acid (BCH)) によって特異的に阻害されるナトリウムイオン非依存性の中性アミノ酸輸送システムとして報告された [46, 47]。その後、基質親和性、基質選択性、および輸送特性に関して識別され、システムLは、システムL1 およびシステムL2 と2つのサブタイプに分類された[1, 4, 62]。最初にクローニングされたアミノ酸トランスポーターは、システムL1に属するL型アミノ酸トランスポーター (L-type amino acid transporter (LAT)) 1 および LAT2[49, 51]で、solute carrier (SLC) 7 ファミリーに属すると報告された[31, 37, 57, 60]。いずれもナトリウムイオン非依存性であるが、LAT1は基質として多様な大型の中性アミノ酸分子を[58]、LAT2は小さな中性アミノ酸分子を認識する[49, 51, 56]。システムL1は膜貫通タンパク質であるが、単独では輸送活性を持たず、細胞膜で

の活性の発現には1回膜貫通型である糖タンパク 4F2 heavy chain (4F2hc) の共局在が必須である。システム L1 は、ヘテロ2量体型の構造を持つアミノ酸トランスポーターであり、12回膜貫通型の主サブユニット LAT1 および LAT2 と1回膜貫通型の補助サブユニット 4F2hc が、各ジスルフィド結合により連結することによって形成される。一方、システム L2 はシステム L1 と同様に12回膜貫通タンパクであるが、その機能発現には4F2hc を必要としない。システム L2 の2つのサブタイプである LAT3 と LAT4 は生体内分布が異なり、LAT3 は胎盤および腎臓で、LAT4 は膵臓および骨格筋で強い発現がみられることがノーザンブロット解析により報告されている [1, 5]。

LAT1 は、分子量 40kDa のナトリウムイオン非依存性のアミノ酸トランスポーターであり、胎児および腫瘍組織で確認される腫瘍胎児性タンパク質の一つである。膜小胞標本および培養細胞を用いた実験で、それらの輸送基質選択性、イオン依存性等の特性が異なることが確認されている [9, 10]。LAT1 の機能は、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシン等のアミノ酸を細胞内に輸送することである。正常な細胞と比較して、腫瘍細胞や胎児では細胞が活発に増殖するため、活発なアミノ酸輸送が必要である。LAT1 は、ヒトの乳癌、卵巣腫瘍、肺の非小細胞癌、大腸癌、胃癌、前立腺癌、食道癌、膵臓癌および星状膠細胞腫など広範囲にわたる腫瘍で強い発現が認められ [4, 25, 28, 29, 32, 38, 40, 52]、腫瘍診断マーカーおよび治療標的分子の候補として研究が行われている。膵臓癌をはじめとする多くの癌で、LAT1 の高発現群は予後不良であることが報告されている [29, 30]。

近年、獣医学領域においても、イヌの脳等の正常な組織および腫瘍組織における LAT1 の分布ならびに cDNA 配列 [44] と、また、イヌの乳腺腫瘍および黒色腫における LAT2 の発現が報告されている [16, 17, 18]。しかし、イヌの肝細胞癌由来

樹立細胞株における LAT 発現に関する詳細な報告はほとんどない。イヌの肝細胞癌は最も一般的な原発性肝腫瘍である。また、ヒトでは B 型および C 型肝炎ウイルスと肝細胞癌の関係が確認されているが、イヌの肝細胞癌においてウイルスの関与がないことが大きな相違点といえる。

本研究において、LAT 活性の機能を分析し、まだ、明らかにされていないイヌの LAT2、LAT3 および LAT4 の分子構造を決定するとともに、リアルタイム RT-PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて LAT の 4 つのアイソタイプの発現、ならびに肝細胞癌由来樹立細胞株における LAT1 の発現量およびロイシン輸送能について解析を行った。

材料および方法

動物および細胞

11 歳、雌、ヨークシャーテリアの肝臓に発生した腫瘍を外科的に摘出し、腫瘍塊を 1mm³ 角に細切し、ヌードマウス（日本クレア、東京、日本）の背部皮下に無菌的に移植した。生着した腫瘍を摘出し、腫瘍塊を Dulbecco' s リン酸緩衝液 (PBS (-)) で 2~3 回洗浄し、0.2% トリプシン・PBS (-) で 32°C、30 分間消化後、ガーゼで濾過し細胞を回収し初代培養を行った。3~4 日に 1 度培養液を交換し、増殖してきた細胞の継代培養を行い、細胞株を樹立した。培養液は、10% ウシ胎児血清、6.6mg/l スペクチノマイシン、2mM グルタミンを添加した Eagle' s MEM (Gibco, Carlsbad, CA, U. S. A.) を用いた。樹立した細胞株に抗ヒト肝細胞抗体 (M7158) (Dako, Copenhagen, Denmark) を用いて免疫染色を実施した。イヌおよびヌードマウス腫瘍塊の一部を 20% 中性緩衝ホルマリンで固定し、常法に従い、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。また、肝細胞癌由来樹立細胞株と比較するために、シバ犬、5 歳、雄の正常肝臓組織を用い

た。すべての実験は麻布大学の実験動物委員会のガイドラインに従って行った。

イヌ LAT の cDNA シーケンスの決定

シバ犬、5歳、雄の肝臓から RNA 抽出試薬（イソゲン、ニッポンジーン、東京、日本）を用いて、Total RNA を分離し cDNA 配列を決定した[44]。本研究で用いたプライマーは、ヒトおよびマウスの保存配列領域を用い、ヒト LAT2 は AF171669、マウス LAT2 は AF171668、ヒト LAT3 は AB103033、マウス LAT3 は AB103034、ヒト LAT4 は AB120364、マウス LAT4 は AB120363 の各々 DDBJ アクセス No. を用いた。Hot start Ex RT-PCR 法による遺伝子の増幅は、Taq DNA polymerase（タカラ、京都、日本）および Super Script III First-Strand Synthesis System kit（Invitrogen, California, U. S. A.）を用いて行った。電気泳動後のバンドの部分のアガロースゲルを切りだし、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System（プロメガ、東京、日本）を用いて精製した。精製 DNA は、pCR II-TOPO クローニングベクター（Invitrogen, California, U. S. A.）を用い、クローニング後、BigDye ターミネーターキット ver. 3.1 サイクルシーケンシングキット（Applied Biosystems, California, U. S. A.）で塩基配列を決定した。cDNA の 3' 末端と 5' 末端を決定するために、SMARTer RACE cDNA Amplification キット（Clontech, California, U. S. A.）およびイヌ LAT の解析された配列を用い、RACE 法を実施した。

ロイシン輸送の測定

(³H-)L-ロイシンは、American Radiolabeled Chemicals 社 (Missouri, U. S. A.) から購入し、ナトリウムイオン非依存性ロイシンの取り込み量を測定した[36]。ナトリウムイオンを含有する緩衝液を N メチル-D グルカミンに替え、6 穴プレー

トに1ウェルあたり肝細胞癌由来樹立細胞株を 5×10^5 個播き込み、24時間後に細胞を洗浄し、放射性同位元素でラベルされたロイシン $10\mu\text{M}$ を加え、 37°C で培養した。また、LAT1の抑制剤であるBCHを 1mM 添加し、同様に培養を行った。氷冷したPBSで洗浄し、1%のSDSで細胞を可溶化した後に、液体シンチレーションカウンターで測定し、タンパク質含有量はMicro bicinchoninic acid (BCA)法で測定した。実験を4回繰り返して、平均値および標準偏差を算出した。

BCH添加によるイヌ肝細胞癌由来樹立細胞株の細胞増殖抑制

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株を生細胞数 1×10^5 個/mlに調整し、60mmシャーレに各5mlずつ播き込み、LAT1の抑制剤であるBCH 1mM 添加および未添加の細胞を24時間培養した。24時間後にトリパンブルーで染色し、生細胞数を5回ずつ算定し、評価した。

RT-PCR法によるイヌ肝細胞癌由来樹立細胞株および正常肝細胞におけるLAT1～LAT4遺伝子発現の解析

LAT1～LAT4遺伝子発現について、LAT1～LAT4に各々特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いてRT-PCR法を行った。反応サイクルは 94°C 、30秒間熱処理後、熱変性を 94°C 、15秒間、アニーリングを 68°C 、15秒間、伸張を 72°C 、20秒間で1サイクルとして25サイクル行った。プライマーは表1に示した。得られたPCR産物を2%アガロースゲル電気泳動により評価した。

リアルタイムRT-PCR法によるLAT1遺伝子発現の解析

リアルタイムRT-PCR法を行うために設計したLAT1のプライマーセット(表1)はタカラ(京都、日本)から購入した。ハウスキーピング遺伝子はRP19を用いた。

リアルタイム RT-PCR は、サーマルサイクラー (Dice®リアルタイム・システム II) (タカラ、京都、日本) を用い測定した。検体は、10 μ M の各プライマー1 μ l、cDNA テンプレートを 2 μ l および SYBR®Premix Ex Taq™II (タカラ、京都、日本) で 25 μ l にした。反応サイクルは 95°C、10 秒間熱処理後、熱変性を 95°C、5 秒間、アニーリングと伸張を 60°C、20 秒間で 1 サイクルとし、40 サイクル行った。目的の LAT1 遺伝子の発現量はハウスキーピング遺伝子である RP19 に対する相対発現量で表した。

ウェスタンブロット法による LAT タンパクの解析

ウェスタンブロット解析に用いる細胞膜の精製は、Denker 等[11]の方法を用いた。0.1M KCl、5mM Na₂HPO₄ (pH7.5)、0.75mM Na-EGTA (pH7.5)、1mM DDT、5mM MgCl₂、200 μ g/ml フッ化フェニルメチルスルホニルおよび 4 μ g/ml ロイペプチンを添加した緩衝液を用い、4°Cで細胞を破碎した。破碎後に、10 分間遠心分離し、2mM Na-EGTA を添加した 0.8mM スクロース溶液 5ml に破碎した細胞上清 1ml を入れ、32,000g で 40 分間遠心分離した。Bicinchoninic Acid (BCA) 法によって沈渣のタンパク濃度の測定を行った。12%のポリアクリルアミドゲルを用いて溶解した細胞膜の電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体として、イヌ LAT1 の C 末端に対するウサギポリクローナル抗体を 2,000 倍で用い[43]、次いで、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (生化学工業、東京、日本) を 100,000 倍で用いた。LAT1 タンパクの検出は ECL プラス化学ルミネセンス発光システム (GE Healthcare Bioscience、Chalfont, U.K.) を用い、X線フィルムで検出した。

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における抗 LAT1 抗体による免疫染色

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株を2穴スライド・チャンバー (Thermo Scientific Nunc, New York, U.S.A.) に播き込み、固定後、一次抗体として、イヌ LAT1 のC末端に対するウサギポリクローナル抗体を200倍、4°C、1晩反応させ、次いで、二次抗体として EnVision+System ペルオキシダーゼ標識抗ウサギポリマー抗体 (Dako, California, U.S.A.) を用い3,3'-ジアミノベンチジンで発色させた。核染色にはヘマトキシリンを用いた。

結 果

病理組織学的所見

イヌ肝臓癌の病理組織学的所見では、腫瘍は2つの異なる腫瘍細胞から構成され、肝細胞癌および小葉間胆管様の構造を持つ細胞が混在していた (図 1A)。肝細胞癌は、明瞭な核小体を持ち、N/C比が大きく、核の大小不同が認められた。胆管様の構造を示す細胞は、核小体が明瞭で核の重積性が認められた。また、腫瘍組織に隣接して、N/C比が比較的小さく、好酸性の細胞質を持った正常に近い索状構造の肝細胞が認められた (図 1B)。イヌの腫瘍組織をヌードマウスに移植し、生着した腫瘍組織の病理組織学的所見は、原発腫瘍組織と比較すると、細胞質が大きく好酸性で、大小不同であった。2核を持つ腫瘍細胞が頻繁に認められ、索状構造は観察されなかった (図 1C, 1D)。ヌードマウスに移植した腫瘍組織から樹立したイヌ肝細胞癌由来樹立細胞株の形態的特徴は紡錘形で、シート状に増殖し、抗ヒト肝細胞抗体による免疫染色で陽性を呈した。

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株のロイシン輸送能

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株のロイシン輸送能は、 0.628 ± 0.018 nmol/mg protein/minであった。一方、1mM BCH を添加したイヌ肝細胞癌由来樹立細胞株に

おいては、ロイシン輸送能が約 90%減少した (図 2)。

BCH 添加によるイヌ肝細胞癌由来樹立細胞株の細胞増殖抑制の評価

BCH 未添加のイヌ肝細胞癌由来樹立細胞株は、24 時間後に生細胞数 9.1×10^4 個/ml であったが、LAT1 の抑制剤である BCH を 1mM 添加したものは、生細胞数 6.0×10^4 個/ml であった (図 3)。

イヌ LAT2~LAT4 のアミノ酸配列におけるヒトおよびマウスの相同性

イヌの LAT2~4 のアミノ酸配列を調べ、他の哺乳類との相同性について比較した。イヌ LAT2 は、マウスの LAT2 と比較すると 1 アミノ酸長く、ヒトと比較すると 3 アミノ酸短かった (図 4)。イヌ LAT3 は、ヒトの LAT3 と比較すると 1 アミノ酸短く、マウスの LAT3 は、イヌおよびヒトのアミノ酸配列と比較すると 5 および 14 アミノ酸が挿入されていた (図 5)。イヌの LAT4 は、ヒトの LAT4 と同数のアミノ酸から構成されていたが、マウスの LAT4 は 5 アミノ酸が挿入されていた (図 6)。イヌの LAT2、LAT3 および LAT4 は、ヒトと 89%、88% および 77% の相同性が認められた。イヌ LAT1 とイヌ LAT2 の間は 54%、イヌ LAT3 とイヌ LAT4 の間は 58% の相同性が認められた。一方、イヌシステム L1 (LAT1 および LAT2) とシステム L2 (LAT3 および LAT4) との間に有意な相同性は認められなかった (図 7)。

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株および正常肝細胞における RT-PCR 法による LAT1~LAT4 の遺伝子発現の解析

LAT1 の遺伝子発現は、イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株には認められたが、正常な肝細胞には認められなかった。また、LAT2 および LAT4 の遺伝子発現は、正常な肝細胞には認められたが、肝細胞癌由来樹立細胞株においては認められなかった (図

8A)。正常な腎臓でLAT2およびLAT4が、膵臓でLAT3の遺伝子発現が認められた（図8B）。

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株および正常肝細胞におけるリアルタイムRT-PCR法によるLAT1の遺伝子発現の解析

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株は、正常な肝細胞と比較すると、LAT1のmRNAの発現量が28倍高値を示した（図9A）。

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株および正常肝細胞におけるウエスタンブロット法によるLAT1のタンパク質発現の解析

正常な肝細胞にはLAT1のバンドが全く検出されなかったが、イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株においては、40kDaにバンドが確認された（図9B）。

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における抗LAT1抗体による免疫染色の解析

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株にLAT1のC末端に対するウサギ抗LAT1ポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った結果、細胞質が陽性を呈した（図10）。

考 察

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株についてナトリウムイオン非依存性LAT1のロイシン輸送能、およびLAT1抑制剤であるBCHに対する強い感受性を確認した。4種類のLAT1～LAT4の体内における組織特異性を解析するために、LAT2、LAT3およびLAT4のcDNAの塩基配列を決定し、RT-PCR法によりLAT1～LAT4の遺伝子発現を解析した。LAT1は、正常な組織では弱い発現がみられるか、発現が全く認められないが、イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株においては強い発現が認められた。リア

ルタイム RT-PCR の結果から、正常なイヌ肝細胞と比較して、肝細胞癌由来樹立細胞株では LAT1 の発現が 28 倍高値であることが確認され、C 末端に対する抗 LAT1 抗体を用いたウエスタンブロットおよび免疫染色の結果から肝細胞癌由来樹立細胞株における LAT1 タンパク質の強い発現が確認された。

以上のことから、イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株の強力なロイシン輸送活性は LAT1 の強発現に起因することが明らかになった。LAT1 の発現は、腫瘍もしくは細胞増殖と密接に関係しており、LAT1 が腫瘍細胞株や活発に増殖するヒト原発性腫瘍細胞で高度に発現することが報告されている [32, 40, 63]。ヒトの様々な腫瘍において、LAT1 の高発現を示す腫瘍は予後不良な場合が多く、LAT1 の発現が予後予測する重要な因子であることが報告されている [25, 28, 34, 38, 39]。癌細胞は、急速な増殖および細胞分裂のため、正常な細胞と比較して多くの栄養を必要とする。従って、腫瘍細胞においては、アミノ酸輸送の亢進、特に多くの必須アミノ酸を含む大型の中性アミノ酸を供給する L 型アミノ酸輸送システムの亢進が報告されている [14]。LAT1 の small hairpin RNA 干渉による遺伝子制御、もしくは BCH 治療により、胆管癌において浸潤および転移が抑制されたことは注目すべきである [27]。肝細胞癌はイヌにおいて最も一般的な肝臓原発の腫瘍であり、肝細胞の異常増殖によって起こる。慢性炎症、過形成および異形成から、最終的には悪性転換という連続的な多段階の過程を経て、肝細胞癌が生じることが報告されている [2]。いくつかの遺伝子の発現および変化が肝細胞癌に関与し、最終的には分子的な経路により発癌が起こる。イヌ肝細胞癌において、LAT1 の強発現がアミノ酸代謝の促進を引き起こすことから、LAT1 の発現亢進がみられたイヌ肝細胞癌において LAT1 が治療標的になる可能性が示唆された。

本研究において、イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株 1 株について解析を行い、ロイシン輸送に LAT1 が重要な役割を果たしていることが確認された。今後は、より多

くのイヌ肝細胞由来樹立細胞株もしくは他の腫瘍細胞株について解析を行う必要がある。本研究の結果から、LAT1 が腫瘍細胞の新たな治療標的となり、BCH がイヌの肝臓癌および他の悪性腫瘍の新たな治療薬となり得ることが示唆された。

表1 RT-PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法に用いたプライマー

Primer	Sequence (5' -3')		Product (bp)
<u>Oligonucleotides for RT-PCR</u>			
<u>Transcript</u>			
LAT1 (AB636469)	Sense	TGTACGGCTCGCTGCCCGCCTTCT	468
	Antisense	GATGGCCAGGGGCAGGTTTCTGTAGGG	
LAT2 (AB923978)	Sense	GGTGGGCCACCCGGGTTCAAGACATTT	609
	Antisense	TGTCGCTGGTGACCAGCATCAGCAGGG	
LAT3 (AB924118)	Sense	GGTCGGGACTGGCCTGTCTCATCTTTC	624
	Antisense	AGCGTGGTCTGGCAGACTTGGTGGCCG	
LAT4 (AB924119)	Sense	GCCATCACCTGCCTCTAGGCATCGTC	578
	Antisense	TTATGGCCCTCCTGCAGTGCCGCTTGC	
GAPDH (AB038240)	Sense	ATC ACC ATC TTC CAG GAG CGA GA	192
	Antisense	GTC TTC TGG GTG GCA GTG ATG G	
<u>Oligonucleotides for real-time RT-PCR</u>			
LAT1 (AB636469)	sense	CCTGGTGTACGTGCTGACGAA	106
	Antisense	TCCCAGGTGATAGGTCCCAAAG	
RP19 (XM538673)	sense	CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG	95
	Antisense	CTTCTCATCGTAGGGACGAAG	

Accession numbers are indicated in parentheses.

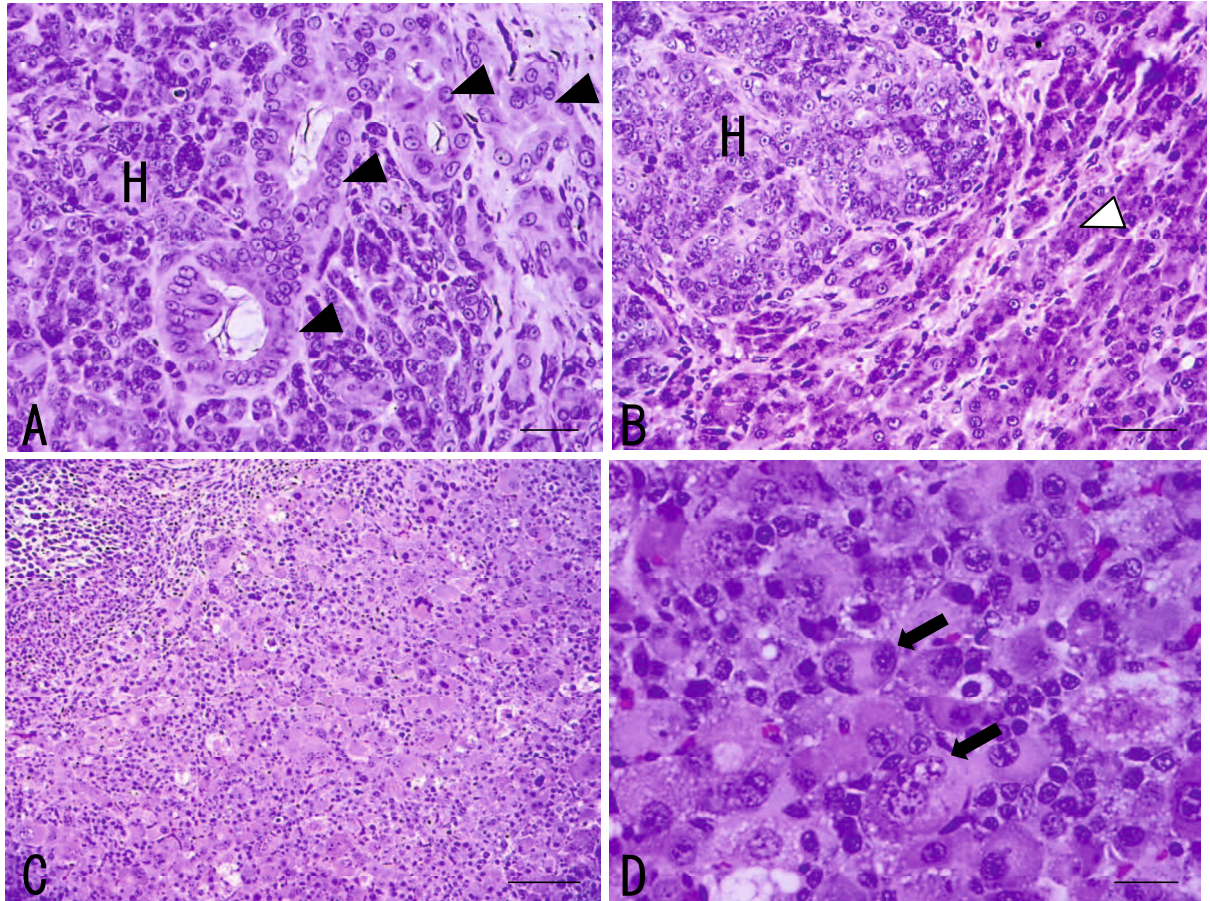


図1 イヌ肝臓およびヌードマウスの腫瘍の病理組織像 (HE 染色)

イヌの肝臓から発生した腫瘍は、肝細胞癌(H)内に胆管癌様(◄)の管腔構造が認められた。管腔構造の部分の核は核小体明瞭で核の重積性が認められた(A)。腫瘍組織に隣接して、N/C比が比較的小さく、好酸性の細胞質を持つ正常に近い索状構造の肝細胞(◁)が認められた(b)。原発腫瘍をヌードマウスに移植し、生着した腫瘍組織の病理組織学的所見は、細胞質が大きく好酸性で、大小不同であった。2核を持つ腫瘍細胞(◄)が頻繁に認められ、索状構造は観察されなかった(C,D)。A:Bar=50 μ m、B:Bar=50 μ m、C:100 μ m、D:20 μ m。

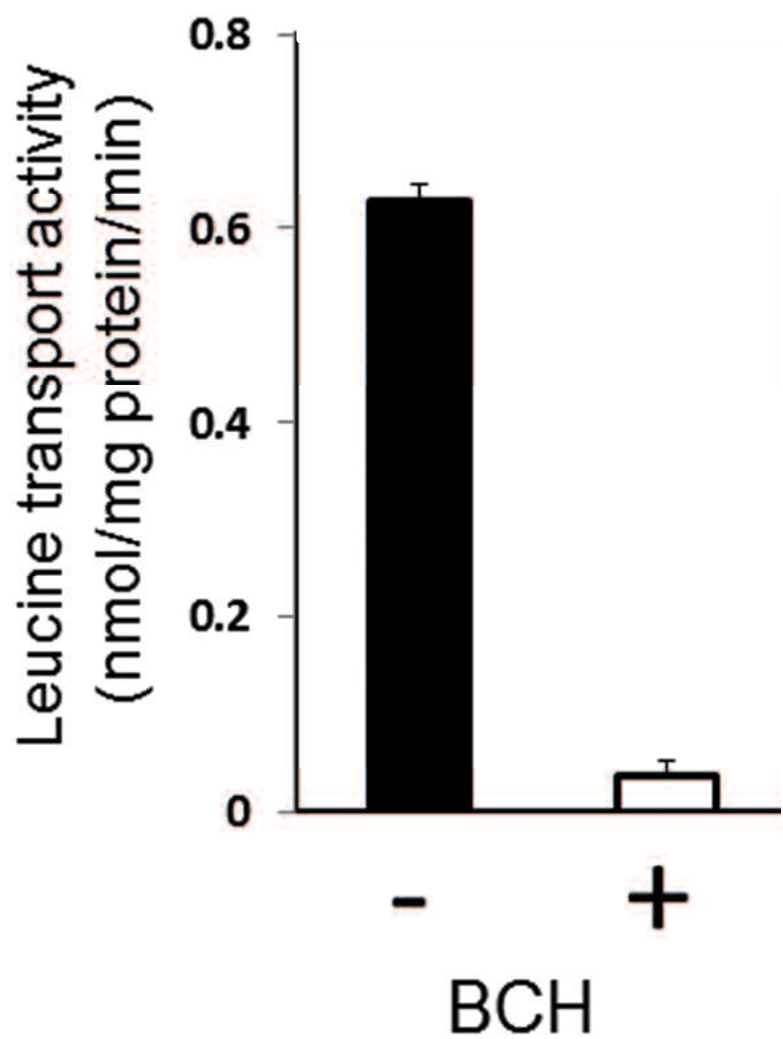


図2 イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における BCH 未添加および 1mM 添加後のロイシンの輸送能

4 回実験を行い、平均値および標準偏差を算出した。

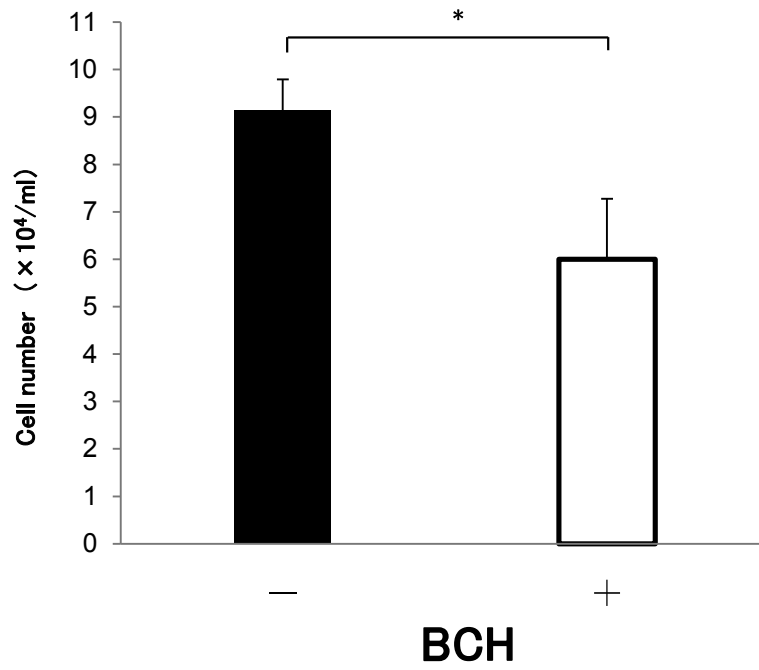


図3 イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株におけるBCH未添加および1mM添加後の生細胞数の比較

5回実験を行い、平均値および標準偏差を算出した。

```

dLAT2_aa 1:MEKGRHRNNAEKXHPGGELEASQETTS TGGGVALKEKEI GIVSACGII IVGNI IGSGI FVSPKGVLENAGSVGLAL IWWIVTGII TWAGALCYAELGVTI 100
hLAT2_aa 1:MEEGARHRNNT EKKHPGGGSDASPEAGS GGGGVALEKEI GIVSACGII IVGNI IGSGI FVSPKGVLENAGSVGLAL IWWIVTGII TWAGALCYAELGVTI 100
mLAT2_aa 1:MEKGRQRNNTAKXHP-GSDTSFEAEASSGGGVALEKEI GIVSACGII IVGNI IGSGI FVSPKGVLENAGSVGLAL IWWIVTGII TWAGALCYAELGVTI 99
   *.**.*.***.***.***.***..*.*.*****

dLAT2_aa 101:PKSGGDYSVVKDIFGGLAGFLRLWI AVLVIIYPTNQAVI ALTFSHYVLQPL EPTCFPPESGLRLLAAIC LLLLTWMCSSVWATRVDIF TAGKLLALAL 200
hLAT2_aa 101:PKSGGDYSVVKDIFGGLAGFLRLWI AVLVIIYPTNQAVI ALTFSHYVLQPL EPTCFPPESGLRLLAAIC LLLLTWMCSSVWATRVDIF TAGKLLALAL 200
mLAT2_aa 100:PKSGGDYSVVKDIFGGLAGFLRLWI AVLVIIYPTNQAVI ALTFSHYVLQPL EPTCFPPESGLRLLAAIC LLLLTWMCSSVWATRVDIF TAGKLLALAL 199
   *****

dLAT2_aa 201:IIINGIIVQICKGEYFWLEPKNATENFQSPDIGLVALF LQGSAFYGWGF INYVTEELVDPYKLLPRAIF IISIPI DVTFVVFANVAWTAMS PQE LLASN 300
hLAT2_aa 201:IIINGIIVQICKGEYFWLEPKNATENFQSPDIGLVALF LQGSAFYGWGF INYVTEELVDPYKLLPRAIF IISIPI DVTFVVFANVAWTAMS PQE LLASN 300
mLAT2_aa 200:IIINGIIVQICKGEYFWLEPKNATENFQSPDIGLVALF LQGSAFYGWGF INYVTEELVDPYKLLPRAIF IISIPI DVTFVVFANVAWTAMS PQE LLASN 299
   ****.*****

dLAT2_aa 301:AVVNTFGKELLGAMAWINPI SVALSTFGVNGSLFTSSRLFFAGAREGH LPSVLNIHVGRCTP IPALLETCS TLMLVTSDMYT LIHYVGFNIYLFYQ 400
hLAT2_aa 301:AVVNTFGKELLGAMAWINPI SVALSTFGVNGSLFTSSRLFFAGAREGH LPSVLNIHVGRCTP IPALLETCS TLMLVTSDMYT LIHYVGFNIYLFYQ 400
mLAT2_aa 300:AVVNTFGKELLGAMAWINPI SVALSTFGVNGSLFTSSRLFFAGAREGH LPSVLNIHVGRCTP IPALLETCS TLMLVTSDMYT LIHYVGFNIYLFYQ 399
   *****

dLAT2_aa 401:VTIAGQIVLRWKXKPDIP EPIKINLLEFP IYLLFWAFLL IFSWSEPVWCGIGLAINLTGVVYF LGVYVQHRKPCFENNF IESLTLVTSQEMCVAVY FEMDA 500
hLAT2_aa 401:VTIAGQIVLRWKXKPDIP EPIKINLLEFP IYLLFWAFLL IFSWSEPVWCGIGLAINLTGVVYF LGVYVQHRKPCFENNF IESLTLVTSQEMCVAVY FEMDA 500
mLAT2_aa 400:VTIAGQIVLRWKXKPDIP EPIKINLLEFP IYLLFWAFLL IFSWSEPVWCGIGLAINLTGVVYF LGVYVQHRKPCFENNF IESLTLVTSQEMCVAVY FEMDA-EC 498
   *.*****

dLAT2_aa 501:GSRTEETNEDTEEQRP IYHPTASKDQE---QPOQ 532
hLAT2_aa 501:GSGTEEANEDMEEQQOPHYQPTPTKDRVAGGQPOQ 535
mLAT2_aa 499:NSGAEETTDLEEQHKP IFRPTVVKD FQSEE--QP 531
   *.***.* ** * . ** . ** . **

```

図4 イヌ、ヒトおよびマウスのLAT2におけるアミノ酸配列の比較

*印は相同性がみられるアミノ酸配列、および.は相同性がみられないアミノ酸配列を示す。イヌLAT2のcDNA配列データは、日本DNAデータベース（アクセスNo. AB923978）に登録された。

```

dLAT3 1: MAPT LQAYRRRWMMACTAVLENLFFSAVLLGWGSLIIMLKKEGFYSSLCPA-NITNATRDEQRKWLSCDRQEIMLNLGFTIGSFVLSATTLP LGI LMDR 99
hLAT3 1: MAPT LQAYRRRWMMACTAVLENLFFSAVLLGWGSLIIMLKKEGFYSSLCPAESSTNTTQDEQRKWPQCDQDDIMLNLGFTIGSFVLSATTLP LGI LMDR 100
mLAT3 1: MAPT LQAYRRRWMMACTAVLENLFFSAVLLGWASLLIMLKKEGFYSSLCPAENRNTTQDEQRQWTSQDQEQEIMLNLGFTIGSFVLSATTLP LGI LMDR 100
*****

dLAT3 100: FGPRPRLRVGVSASFAASCTLMLASRDETVLSPLIFLALS LINGFGGICLTFSSLTLPNMTGNLRSTFMALMIGSYASSAITFFG I KLIYDAGVSPVWIMF 199
hLAT3 101: FGPRPRLRVGVSACFTASCTLMLASRDETVLSPLIFLALS LINGFGGICLTFSSLTLPNMTGNLRSTFMALMIGSYASSAITFFG I KLIYDAGVSPVWIMF 200
mLAT3 101: FGPRPLRVGVSACFAASCTLMLASRDETVLSPLIFLALS LINGEAGICLTFSSLTLPNMTGNLRSTFMALMIGSYASSAITFFG I KLIYDAGVSPVWIMF 200
*****

dLAT3 200: TWSGLACLIIFLNCALNWPSEATPAPEIVNYTKIKLSGLADHKVTDGRFYTHVIVGQRLSQKAPSLGEGADVFISDDVVRGASGSPPEKSI PFROSLC 299
hLAT3 201: TWSGLACLIIFLNCALNWPSEATPAPEIVNYTKIKLSGLADHKVTDGRFYTHVIVGQRLSQKAPSLGEGADVFISDDVVRGASGSPPEKSI PFROSLC 300
mLAT3 201: TWSGLACLIIFLNCALNWPSEATPAPEIVDYTKIKLIGLADHKVTDGRFYTHVIVGQRLSQKAPSLGEGADVFISDDVVRGASGSPPEKSI PFROSLC 300
*****

dLAT3 300: SPIFLWSLLTMGHTQLMVI FYHAAMNEMLEIVTCCQEHETDILRQDAETVGFYSSIFGAMQLLCLLTCPLIGYIMDWRIKDCVDAFTEGT----ALG 394
hLAT3 301: SPIFLWSLLTMGHTQLMVI FYHAAMNEMLEIVTGGQEHETNEQQQVAETVGFYSSVFGAMQLLCLLTCPLIGYIMDWRIKDCVDAFTEGT----VLG 395
mLAT3 301: SPIFLWSLVTMGHTQLMVI FYHGAMNILEIVTGGKERETNEQRQVAETVGFYSSIFGAMQLLCLLTCPLIGYIMDWRIKDCVDAFTEGTLENASFG 400
*****

dLAT3 395: DAEGGAATKSARPEYRRIQELTNAI NAFTLTNHLVNGFGITCLINLHLQFVTFVLTIVRGEFYSACGSLYAVMPSNHF GTLTGLQSLISAVFALLQQ 494
hLAT3 396: DARDGASVTKFTRPEYRRIQELTNAI NAFTLTNHLVNGFGITCLINLHLQFVTFVLTIVRGEFYSACGSLYAVMPSNHF GTLTGLQSLISAVFALLQQ 495
mLAT3 401: DARDGASVTKFTRPEYRRIQELTNAI NAFTLTNHLVNGFGITCLINLHLQFVTFVLTIVRGEFYSACGSLYAVMPSNHF GTLTGLQSLISAVFALLQQ 500
*****

dLAT3 495: PLFMAMVSP LKGE PFWM LGL L LFS LLGFL LPSY LFYYRRLQREYVA YWGPKV LGS -----EVT A 558
hLAT3 496: PLFMAMVSP LKGE PFWM LGL L LFS LLGFL LPSY LFYYRRLQREYVA YWGPKV LGS -----EVT A 559
mLAT3 501: PLFMAMVSP LKGD PFWM LGL L LFS LLGFL LPSY LFYYRRLQREYVA YWGPKV LGS -----EVT A 578
*****

```

図5 イヌ、ヒトおよびマウスのLAT3におけるアミノ酸配列の比較

*印は相同性がみられるアミノ酸配列、および. は相同性がみられないアミノ酸配列を示す。イヌLAT3のcDNA配列データは、日本DNAデータバンク（アクセスセッションNo. AB924118）に登録された。

```

dLAT4 1: MAPTLATAHRERWRWMACTAVLENL LFSAVL LGWGSLL IMLKSEGFYSYLCTESEMVSNGTVGGTAEPEHEEMS LMNGWLSCQAQDEH LNLAFIVGSEFLLS 100
mLAT4 1: MAPTLATAHRERWRWMACTAVLENL LFSAVL LGWGSLL IMLKSEGFYSYLCTESEMVSNGTVGGTAEPEPEELS LMNGWLSCQAQDEH LNLAFIVGSEFLLS 100
hLAT4 1: MAPTLATAHRERWRWMACTAVLENL LFSAVL LGWGSLL IMLKSEGFYSYLCTEPEMVTNGTVGGTAEPEHEEMVSMNGWLSCQAQDEH LNLAFIVGSEFLLS 100
*****

dLAT4 101: AITLPLGIVMEKYGPEKLRLLGSACFAVSCLLIAYGASNPNS LSVLIFVSLALNGFGGMCMTFTSLTLPNMFDDLSTFIALMI GSYASSAVTFPGI KVI 200
mLAT4 101: AITLPLGIVMEKYGPEKLRLLGSACFAVSCLLIAYGASNPNS LSVLIFVSLALNGFGGMCMTFTSLTLPNMFDDLSTFIALMI GSYASSAVTFPGI KLI 200
hLAT4 101: AITLPLGIVMEKYGPEKLRLLGSACFAVSCLLIAYGASKPNA LSVLIFVSLALNGFGGMCMTFTSLTLPNMFDDLSTFIALMI GSYASSAVTFPGI KLI 200
*****

dLAT4 201: YDFGVSFIIIDVWVASCSGDVFLNCFNWFLEFPFGPEMDYSVKI KFSWLGFDH KITGKQFYKQMTVIGRRLSVGSMSRSAKEQAALQEGHKLCISLTD 300
mLAT4 201: YDAGASFIGIDVWVAGCSGDVFLNCFNWFLEFPFGSEMDYSVKI KFSWLGFDH KITGKQFYKQMTVIGRRLSVGSMSRMTAKEQAALQEGHKLCISLTD 300
hLAT4 201: YDAGVSFIVVWVWAGCSGDVFLNCFNWFLEFPFGPEMDYSVKI KFSWLGFDH KITGKQFYKQMTVIGRRLSVGSMSRSAKEQAALQEGHKLCISLTD 300
*****

dLAT4 301: LNVKCKPDAAJAPSFHRSVFSPI LLSLVIMCITQLRLIFVYMGMINNI LKFLVSGDQ---DMVGLYTSIFGVLLQLICLLTAPVI GYIMDWLKECEDAS 396
mLAT4 301: LNVKCPDAAAAPSFHRSVFSPI LLSLVIMCVTQLRLIFVYMGMINNI LKFLVSGDQ---KTMALYTSIFGALQLICLLTAPVI GYIMDWLKECEDTS 396
hLAT4 301: LNVKCPDAAANAPSFHRSVFSPI LLSLVIMCITQLRLIFVYMGMINNI LKFLVSGDQETVMATVGLYTSIFGVLLQLICLLTAPVI GYIMDWLKECEDAS 400
*****

dLAT4 397: EEP EERDANQGE-KKIKRDRQIQKVTNAMBFAFATNLLVGFVNTCLIPNLPLQILSFLHTIVRGFHSRAGGLYAAVYPS TQFGSLTG LQS LVA LFA 495
mLAT4 397: EEP EERKGTQGE-KKQKRDQIQKVTNAMBFAFATNLLVGFVNTCLIPNLPLQILSFLHTIVRGFHSRAGGLYAAVYPS TQFGSLTG LQS LVA LFA 495
hLAT4 401: EEP EERDANQGEKKIKRDRQIQKVTNAMBFAFATNLLVGFVNTCLIPNLPLQILSFLHTIVRGFHSRAGGLYAAVYPS TQFGSLTG LQS LISA LFA 500
*****

dLAT4 496: LLQQPLFLAMNGPLQGDPLWVNVGLLGLSMLGFC LP LYLI CYRQ LERQLQQREDDKFLKINGSSREAFV 568
mLAT4 496: LLQQPLYLAMNGPLQGDPLWVNVGLLGLSMLGFC LP LYLI CYRQ LERQLQQREDDKFLKINGSSREAFV 568
hLAT4 501: LLQQPLFLAMNGPLQGDPLWVNVGLLGLSMLGFC LP LYLI CYRQ LERQLQQREDDKFLKINGSSREAFV 573
*****

```

図6 イヌ、ヒトおよびマウスのLAT4におけるアミノ酸配列を比較

*印は相同性がみられるアミノ酸配列、および. は相同性がみられないアミノ酸配列を示す。イヌLAT4のcDNA配列データは、日本DNAデータバンク（アクセスセッションNo. AB924119）に登録した。

```

dLAT1 0:-----0
dLAT2 0:-----0
dLAT3 1:MAPTLQQAAYRRRWMACTAVLENLFFSAVLCWVGSLLIMLKEEGFYSSLC-----PANTTNAIRDE--QRKWLSCDRQEEMLNIGFTIGSEVLS 87
dLAT4 1:MAPTLATAHRRRWMACTAVLENLFFSAVLCWVGSLLIMLKEEGFYSLCTESEMVSNGVGGTAEPEHEMSIMNGWLSCKKRODEMNLAFVGSFLLS 100

dLAT1 0:-----0
dLAT2 0:-----0
dLAT3 88:ATTLPLGGLMDDFGPRPFRVMSASFAASCTLMA LASEDTMPLSPLIFALS LMGFGGICLTFSSLTLPNMFQDLRSTFMALMIGSYASSAIFPGIKLI 187
dLAT4 101:AITLPLGNMDDKYGPRKRLRLGSAACFAVSCLLIAYGASNPFSLSVLFVSLALNGFGGMCTFTSLTLPNMFQDLRSTFIALMIGSYASSAVFPGIKVI 200

dLAT1 0:-----0
dLAT2 0:-----0
dLAT3 188:YDAGVSPWVIMFTWSGLACLIFLNCALNWPSEAFPAPEEVYTKKIKLSGLALDHVMTGDRFYTAVTVNGQRLS-----CKAPSLEEGLAVFISQD 279
dLAT4 201:YDGVSPFIIIDVWASCSGLVTLNCFNWPLEFPQPEDMVYVKIKFSWLGFDHKTGQFYKQVTVGRRLVNGSSMRSAREQAAIQEGHCLCLSTID 300

dLAT1 1:-----MIAGKRADGGDGGDGGDGAEGVTLQSSITLFGVVAIVGTHIGSGIVTFTGVLEAGSPGLALVWVAVCGVTSVWGLCYAELG 85
dLAT2 1:---MEKGARHNNNAEKHPGGSELEASQETGSTGGVALKKEIGLVSAAGIIVGHIIGSGIVVSPKGVLENAGVGLALVWVAVTGLITAVGALCYAELG 97
dLAT3 280:VRGASGSPPEKSIIFRCSLCSPIFLWSLTMGTMLQLEVI FYMAAMNKLLEYLVVGGQEHETDI LRKDAAEVGVFYSIFGAMCLLCLITCPLI GYIMDWR 379
dLAT4 301:LVKCKPMAAAPSPMHSVFSPIILLLSLVTMCI TQLRLI FYMGAMNII LEEVLSG-----DQVWGLYTSIFGVQLLCLLTA PVI GYIMDWR 388
* *

dLAT1 86:TTITKSGDYYAYMLEVYGS LPAFLRLVIELLII RPSQYIVAVLVEFATY LKPLFPTCPVPE SAAKLVACLVL LITVWICYSVKAATEVQDAFAAAKLLA 185
dLAT2 98:VTIPIKSGDYYAYVSDIEGGLAGFLRLVIMVMI YPTNQAVIALTFSNVQLP LFPFCFPPEGLRL LAAICLLLTWAVCA SWWATMQDIP TACKLLA 197
dLAT3 380:IKDCVDAPEEGTALGDAREGALTKSAPRYRKI QKLTNA INAFPLNPLVGVGPI TCLIBSLH LQVTVTVLH TMRGFTYSACGS LYAVVPSNHFGLT 479
dLAT4 389:LEKCEDASEEPEE---KDAHQGEKKKKEDRQIQKVTNAMBFAFTNLLVGVGVTCLIPNLP LQI LSEI LRTVNRGFIHSVGGLYAVVPSYQFGLT 484
* * * * *

dLAT1 106:LALIILLGF IQIGEDVSNLD PEFSEEG-TKLDVGHIVLALYSGLFAYGGWVFLNFTVTEEMINPYRNLP LAI IISLPVTVLVWVLTN LAYFTLSTEQML 204
dLAT2 198:LALI IIMQVWQIQKGEYFWLEPKNAFENFQEPD IGLIALAFLQGSFAYGGWVFLNFTVTEELVD PYKNLPRAIFIS IPLVTVVWFANVAVTAMSPQELL 297
dLAT3 480:GLQSLI SAVFALLOP I FMANVGPLKEE PFWNLGLL LFSLLGFLPSYIFVYRRLQREYVA YWEGPKVLSSEVTA-----558
dLAT4 485:GLQS LVSALFALLQPP LFLAMNGPLQSD PLWVAVGLLGLSHLGFCLPLYLI CYRQLERQLQKREDDKFLKINGSSHREAV-----568
* * * * *

dLAT1 285:TSEAVAVDFGTYR LQVPSWII I PVEVLS CPGSVNGS LFTSRLFFVGSREGLPS ILSMHPQLLTPMPSLVFTCI MTLVYASRDI FSVINFFSFFNWL 384
dLAT2 298:ASNANAVTFCEKLLQVNAWIMPISVALSTEGVNGSLFTSRLFFACAREGLPSVLA MIVKRCPTIPALLFTCI STLIMLVTSIMVTLINPVGFINVYL 397
dLAT3 558:-----558
dLAT4 568:-----568

dLAT1 385:CVSLAIAAGILWLRVYKKELEEFIKVNLALPVTF I LACLFLI AVSEWKT PVECGI GET I ILSGLFVYI LGVWVKEKPNWLGQIFSTTVLCQKLMQVQPE 484
dLAT2 398:FYGVTIAGQIVLRWKKED I PRPIKINL LFP I IYLLFWAFLLIFLSWSEFWCGTGLA IMLTGVVWF LGVWVQKPKPCPNHFIESLTVS QKMCVAVPE 497
dLAT3 558:-----558
dLAT4 568:-----568

dLAT1 485:T-----485
dLAT2 498:MDAGSRTEETNEDTECROPIYRPTASKDOEPOPOP 532
dLAT3 558:-----558
dLAT4 568:-----568

```

図7 イヌ LAT1~4 の4アイソタイプのアミノ酸配列の比較

アミノ酸配列の決定は、GENETYX プログラム（バージョン 10）を使用した。

*印は相同性がみられるアミノ酸配列、および、.は相同性がみられないアミノ酸配列を示す。

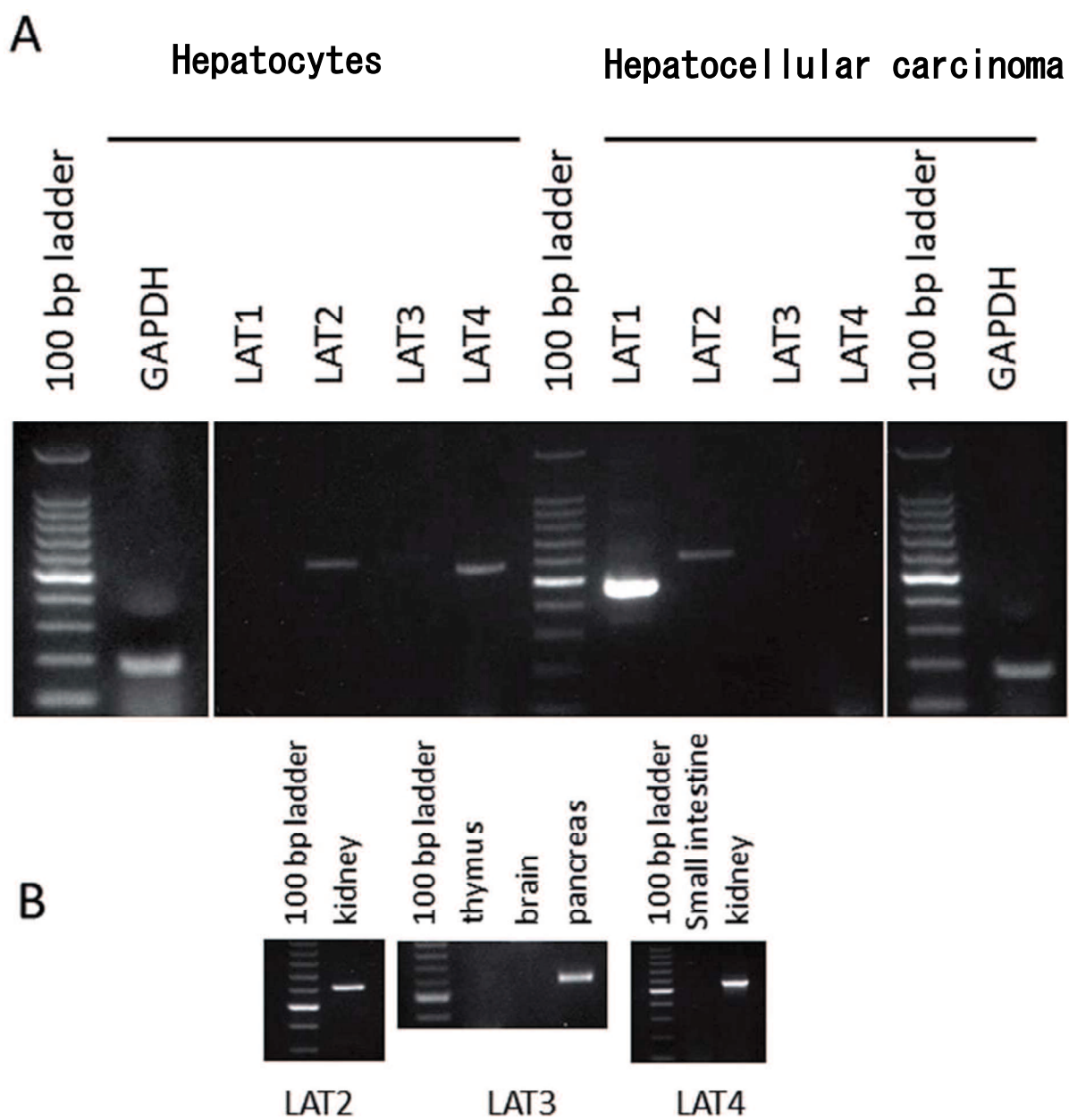


図8 イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株および正常肝細胞におけるLAT1～LAT4のアイソタイプのRT-PCR法による解析
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNAを用いた (A)。
また、LAT2、LAT3およびLAT4の対照実験を行った (B)。

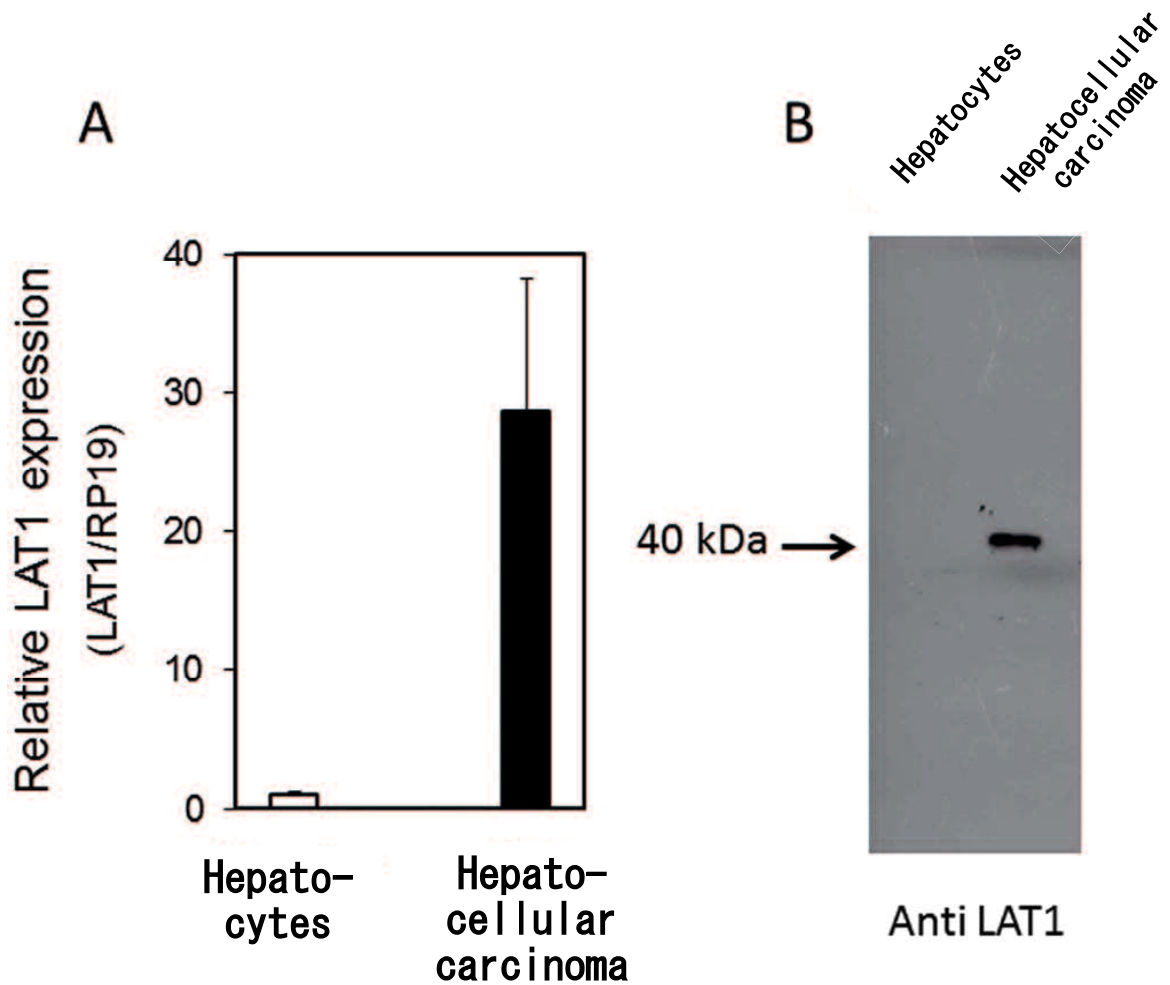


図9 イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株および正常肝細胞におけるLAT1のリアルタイムRT-PCR法(A)、およびLAT1ペプチドのC末端に対する抗血清を用いたウエスタンブロット法による解析(B)

イヌ正常肝細胞と比較すると肝細胞癌由来樹立細胞株におけるLAT1の発現量は約28倍高値を示した。イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株は40kDaにバンドが検出された。

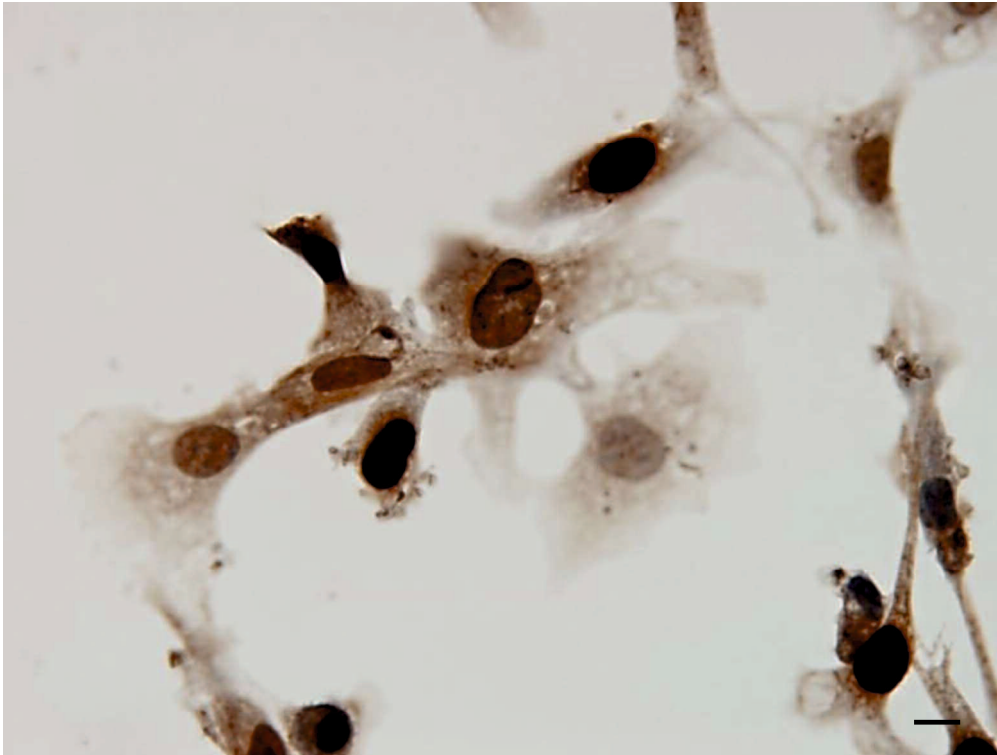


図 10 イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における抗 LAT1 抗体による免疫染色像

LAT1のC末端に対するウサギ抗LAT1抗体を用いて免疫染色を行った結果、イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株の細胞質が陽性を呈した。Bar=10 μ m。

第2章 マウスおよびイヌのメラノーマ由来樹立細胞株におけるルパン型トリテルペン化合物ルペオールの抗増殖および分化誘導効果

第1節 マウスメラノーマ由来細胞株のルペオール添加による形態および機能面での分化誘導作用

緒言

メラニン細胞は、外胚葉由来、神経堤細胞から分化した色素細胞で、メラノソームと呼ばれる細胞内小器官を多数有している。メラノソームは、チロシナーゼ等のメラニン生合成に必要な構成要素を含み、ある種のホルモン、活性酸素および紫外線照射などの刺激により活発にメラニン色素を産生する。この活性化したメラノソームは、樹状突起の先端より、角化細胞の周囲に分泌され（所謂“日焼け”と言う現象）、紫外線照射等から皮膚が保護される[61]。細胞質において、メラノソームは前方に輸送するキネシンおよび後方に輸送するダイニンを介して微小管のネットワーク上を移動することが確認されている[8, 59]。細胞の末端においては、図11で示すように、メラノソームはミオシン-Vaによってアクチンフィラメントのネットワーク上を輸送され、ミオシン-VaはRat brain (Rab) 27a/Slp homologue lacking C2 domains-a (Slac2-a) 複合体により、メラノソームに結合する[15, 33]。*in vitro*では、メラノサイトやメラノーマ細胞の分化過程において、メラニン形成酵素の誘導や樹状突起の伸張が観察されることが報告されている[6, 7]。近年、cyclic adenosine monophosphate (cAMP) の発現が上昇することによりメラノーマ細胞が分化し、Rab27aおよびミオシン-Vaの発現量が上昇することが確認された[48]。

ルペオールは、キク科、シソ科の植物に含まれる物質で、ルパン型トリテルペ

ンの一種である。ルペオールをはじめとしたルパン型トリテルペンの色素産生誘導能については、畠らがすでに報告している[22]。ルペオールがマウスメラノーマ由来細胞株（B16 2F2 細胞）において、メラニン形成と樹状突起の形成を誘導することが報告されている[23]。しかしながら、メラノソーム輸送に関与する種々のタンパク複合体の応答に対するルペオールの効果は確認されていない。本研究では、ルペオールがメラニン形成酵素や樹状突起の形成を誘導するだけでなく、Rab27a およびミオシン-Va などのメラノソーム輸送に関わるタンパク発現に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

材料および方法

透過型電子顕微鏡による解析

B16 2F2 細胞を 2×10^6 個/ml に調整し、ルペオール $10 \mu\text{M}$ を添加したもの、および未添加のものをそれぞれ 48 時間培養後、細胞を回収し、2.5%グルタルアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液(PB)で固定し、PBで洗浄した。4% agar noble(Difco, Michigan, U. S. A.) を用いて細胞を収集し、2%四酸化オスミウムで後固定を行った。細胞は常法に従いエタノールで脱水した。ブチルグリシジルエーテル(QY-1)で置換し、エポキシ樹脂で包埋した。ウルトラミクロトームにて超薄切片を作製後、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色を行い、電子顕微鏡(JEM-1210、日本電子、東京、日本)で観察した。

蛍光顕微鏡によるストレスファイバーの観察

0.1%トリプシン・0.02%EDTA溶液で回収したB16 2F2細胞を、ファイブロネクチンでコーティングしたカバーガラス(旭テクノグラス、東京、日本)上に接着させ、24時間培養した。ルペオール添加時を0時間とし、ルペオール $10 \mu\text{M}$ 添加およ

び未添加の細胞をそれぞれ4時間、8時間、12時間と経時的に回収した。細胞を Dulbecco' s PBSリン酸緩衝液 (PBS(-)) で2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.1%トライトンXで10分間処理した。ストレスファイバーを検出するためにAlexa-488標識ファロイジン (Molecular Probes, Oregon, U. S. A.) で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

ウェスタン・ブロット法によるチロシナーゼ関連タンパクの検出

B16 2F2 細胞を 1×10^5 /ml に調整し、ルペオール 10 μ M 添加および未添加の細胞を、それぞれ 8 時間および 48 時間培養した。消化後、ピペッティングにより細胞を回収し、PBS (-) で 2 回洗浄した。5mM トリス塩酸緩衝液 (pH6.8)、1mM EDTA、10%シュークロースを含んだ 1%SDS で細胞を溶解後、10–20%ゲル (PAGEL 1020 N; アトー、東京、日本) を用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により 10 μ g のタンパク質を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。5%スキムミルク、0.15M 塩化ナトリウム、0.05%ツィーン 20 を含む 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) (TBST) にニトロセルロース膜を 30 分間浸しブロッキング処理を行った。次いで、マウス抗アクチンモノクローナル抗体 (A4700) (Sigma-Aldrich, St. Louis, U. S. A.)、ヤギ抗チロシナーゼ抗体 (M-19) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, U. S. A.)、ウサギ抗小眼球症関連転写因子 (MITF) 抗体 (H-50) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, U. S. A.)、ウサギ抗 Rab27a 抗体 (H-60) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, U. S. A.)、ヤギ抗ミオシン-V a 抗体 (N-20) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, U. S. A.) およびウサギ抗 Slac2-a 抗体 (E-14) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, U. S. A.) を用い、室温で 2 時間反応後、TBST で 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体を加えて室温で 1 時間反応させた。ニトロセルロース膜は TBST で 3 回洗浄後、化学発光試薬 (Amersham Place, Buckinghamshire,

UK) を用いてバンドを可視化した。

結 果

透過型電子顕微鏡によるメラノソームの解析

ルペオール未処理の B16 2F2 細胞の細胞質には、Ⅲ型およびⅣ型のメラノソームが 1~数個散在するのみであったが（図 12a）、ルペオール 10 μ g/ml を添加し、48 時間培養した B16 2F2 細胞の細胞質には、成熟したⅣ型メラノソームが多数観察された（図 12b）。

蛍光抗体法によるストレスファイバーの観察

ルペオール添加前の B16 2F2 細胞のストレスファイバーは、細胞質の周囲に集合して束状に認められ、細胞質内も陽性を呈した（図 13a）。ルペオール 10 μ g/ml 添加後、4 時間経過した B16 2F2 細胞は、形態的にやや不整形を示す細胞が観察されたが、樹状突起の形成は認められず、ストレスファイバーは細胞質に残存していた（図 13b）。さらにルペオール 10 μ g/ml を添加し、8 時間培養した B16 2F2 細胞には、樹状突起が形成され、ストレスファイバーが分解され、樹状突起の先端にのみ認められた（図 13c）。

ウェスタン・ブロット法によるメラノソーム関連タンパクの検出

ルペオール未添加および 10 μ M 添加した B16 2F2 細胞について、メラノソーム関連タンパクのバイオマーカーを用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ウェスタン・ブロッティングを行った結果、ルペオール 10 μ M を添加後 8 時間培養した細胞では、チロシナーゼ、MITF、Rab27a およびミオシン-Va の発現は認められなかったが、48 時間培養後の B16 2F2 細胞では、ルペオール未添加の B16 2F2

細胞と比較して、チロシナーゼ、MITF、Rab27a およびミオシン-Va のタンパク発現が認められた。また、アクチンおよびSlac2-a に関しては、ルペオール添加による発現の変化は認められなかった（図 14）。

考 察

B16 2F2 細胞におけるメラノソームの成熟に関するタンパク発現について、ルペオールを添加した細胞および未添加の細胞を比較し、ルペオールの効果について解析を行った。電子顕微鏡による解析の結果、ルペオールを添加した B16 2F2 細胞では、48 時間後に成熟したIV型メラノソームの明らかな増加が認められたことから、メラノーマ細胞内のメラノソームが分化誘導されたことが確認された。

また、ルペオール添加による樹状突起の形成について解析した結果、ルペオール添加 4 時間後では B16 2F2 細胞に樹状突起が観察されなかったが、8 時間後には樹状突起の先端にストレスファイバーが存在したことから、Rho カスケードの発現阻害により、細胞骨格のアクチンフィラメントの再構成が行われ、それを起点として B16 2F2 細胞において樹状突起の形成が誘発されることが考えられた [7, 23, 55]。過去の実験結果から、ルペオール添加 8 時間後の B16 2F2 細胞において、Rho シグナルを抑制する働きがあるアクチン脱重合酵素コフィリンの活性化が認められたことから、メラノーマ細胞の分化誘導を確認した [22]。メラノーマ細胞の分化の特徴は、メラニン産生および樹状突起形成であるが、mitogen-activated protein kinase p38 シグナルとコフィリンの活性化により、それぞれ単独で調節されていることが報告されている [48]。今回の結果から、Rho シグナルの抑制によってルペオール添加 4~8 時間でアクチンフィラメントの重合が抑制され、その結果として B16 2F2 細胞において樹状突起形成の誘導が生じたと考えられた。

ルペオールによる色素細胞の分化誘導効果について、メラノソーム輸送に関わるタンパク質（ミオシン-V a、Rab27a、Slac2-a）の発現レベルでの解析を行った結果、B16 2F2 細胞において、チロシナーゼ等のメラノソーム輸送に関わるタンパク質は、ルペオール添加 8 時間後では発現に変化はみられなかったが、より長期間の 48 時間曝露により、Rab27a およびミオシン-V a が顕著に上昇し、チロシナーゼの上昇が認められた。この結果から、Rab27a およびミオシン-V a は、B16 2F2 細胞においてフォスコリンにより分化誘導され、一方、Slac2-a は分化誘導されないことが示唆された。B16 2F2 細胞における樹状突起の形成と細胞骨格であるアクチンフィラメントの再構成がルペオール添加 8 時間の短期曝露で起こり、チロシナーゼおよび Rab27a といった色素細胞の分化に関するタンパク質は、ルペオール添加 48 時間と長期曝露したときに発現することが明らかとなった。以上より、ルペオール添加によるメラノーマ細胞の分化は、2 つのステージに分かれて出現することが確認された。

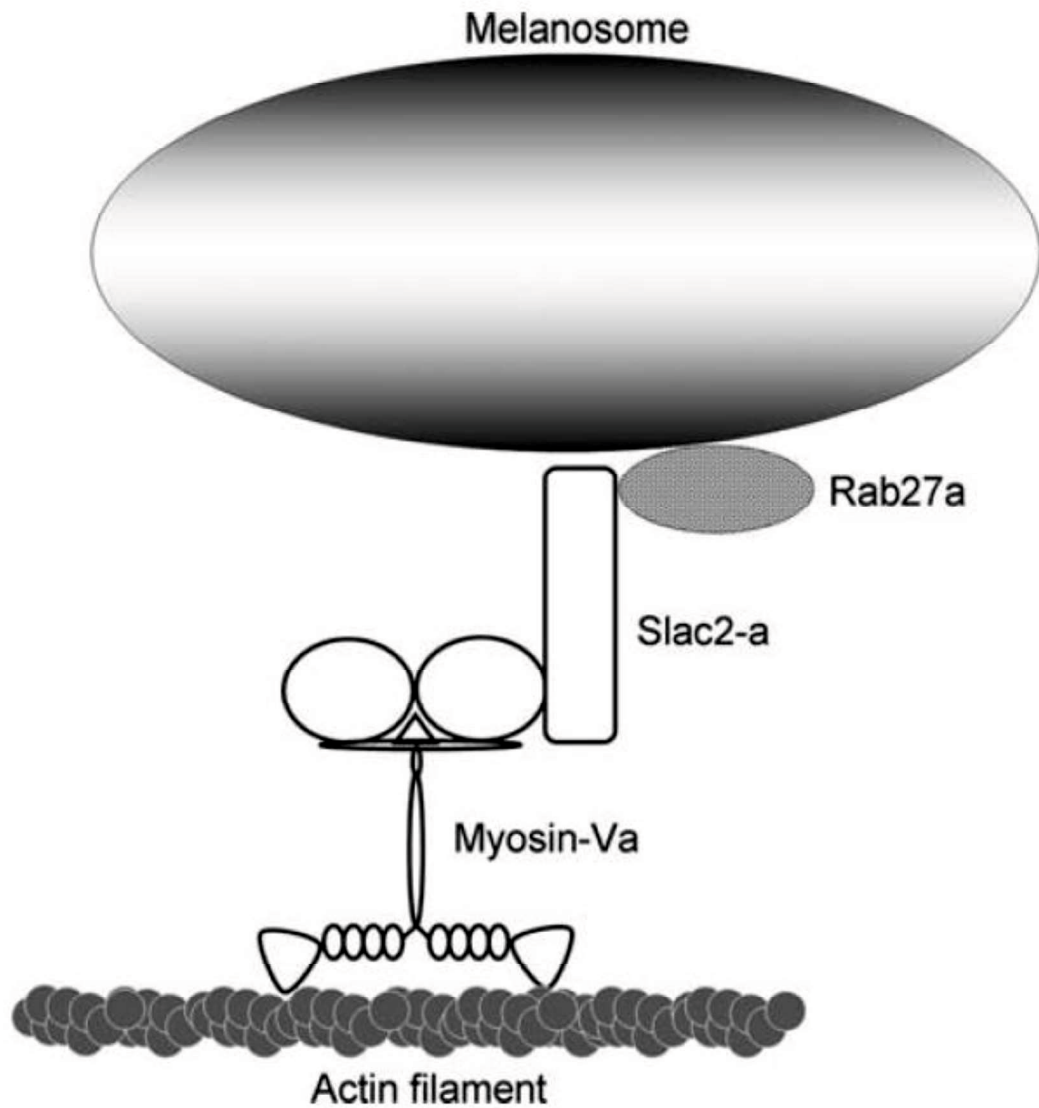


図 11 メラノソーム輸送に関わるタンパク複合体

メラノソームは、アクチンフィラメント上を輸送される。ミオシン-Va、Slac2-a および Rab27a がタンパク複合体としてメラノソームの輸送に関わる。

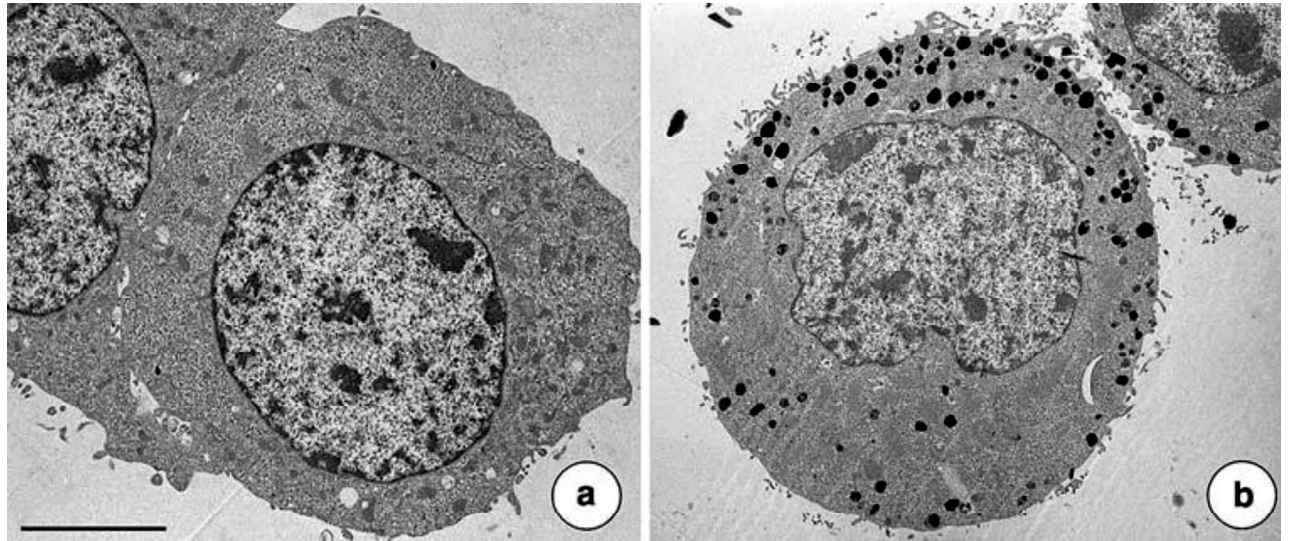


図 12 ルペオール添加 B16 2F2 細胞の電子顕微鏡像

ルペオール未添加 (a) と比較すると、ルペオール 10 μ M 添加 48 時間後 (b) の B16 2F2 細胞の細胞質には、メラノソームが多数観察された (bar : 5 μ m)。

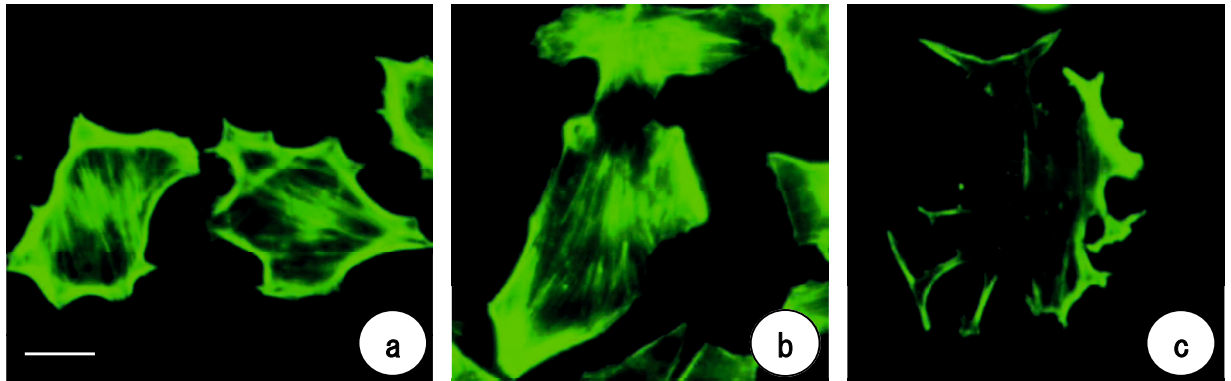


図 13 ルペオール添加 B16 2F2 細胞のアクチンフィラメントの蛍光顕微鏡像

ルペオール 10 μ M 添加 0 (a) 、4 (b) 、8 時間後 (c) に、B16 2F2 細胞の細胞質に存在するアクチンフィラメントの分布を観察した。ルペオール添加 8 時間後には、樹状突起の形成とアクチンフィラメントの分解が認められた (bar : 40 μ m) 。

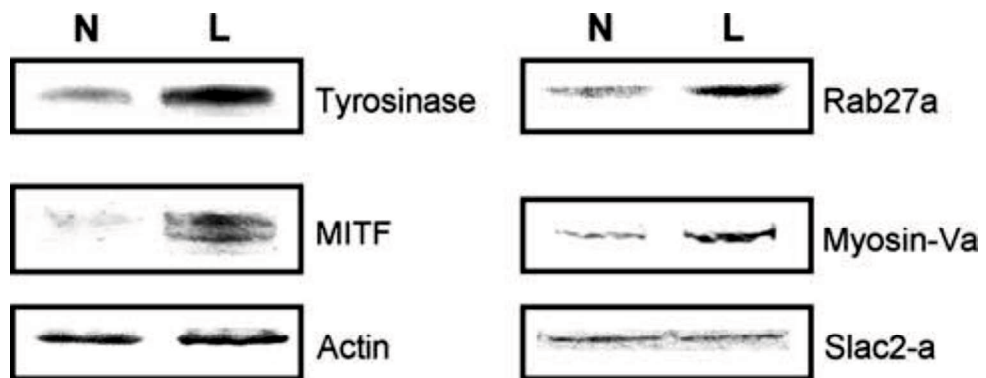


図 14 B16 2F2 細胞のメラノソーム輸送に関わるタンパク質のウエスタン・ブロット法による解析

ルペオール未添加 (N) およびルペオール 10 μ M 添加 (L) 48 時間後に SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ウエスタンブロットを行った。ルペオール添加 48 時間後に、MITF、Rab27a およびミオシン-Va の発現が上昇した。

第2節 イヌメラノーマ由来樹立細胞株におけるルパン型トリテルペン化合物 ルペオールの抗増殖および分化誘導効果

緒言

メラノーマは、皮膚から発生する最も悪性度の高い、侵襲性の強い腫瘍で、上皮細胞であるメラニン形成細胞の紫外線等による刺激、もしくは遺伝子異常により発生する[45]。ヒトのメラノーマは転移率が高く、ダカルバジン、テモゾロミド等の抗癌剤には著しい抵抗性を示すことが知られている。獣医学領域におけるイヌメラノーマは、口腔内に発生する悪性腫瘍のうち最も一般的な腫瘍である[3]。カルボプラチンを用いた抗癌剤治療によって、メラノーマに罹患したイヌの28%で腫瘍の縮小が認められたとの報告がある[50]が、完治することはほとんどない。

ルパン型トリテルペンであるルペオールは、抗炎症作用[12, 13]、抗癌作用[21, 53]、抗メタボリック作用[24, 26, 54]等、様々な生物活性を有している。著者らは *in vitro* において、ルペオールを添加したマウスメラノーマ由来細胞株 B16 2F2 細胞において、メラニン形成およびメラノソーム輸送関連タンパクの誘導効果により、腫瘍細胞の増殖を抑制すること、およびルペオールがメラノーマ細胞を成熟したメラノサイト様細胞に分化させることを明らかにした[23]。また、ルペオールを添加したメラノーマ細胞でアポトーシス誘導促進を確認している[23]。著者らの最近の研究から、ルペオールを投与されたメラノーマ担癌マウスにおいて、腫瘍の増殖マーカーである増殖細胞核抗原 (PCNA) および ki67 が減弱し、*in vivo* においても腫瘍の増殖抑制を確認している[41]。しかしながら、イヌのメラノーマの治療にルペオールが有効であるかは未だ不明である。

本研究の目的は、臨床的にイヌのメラノーマの治療に用いる前段階として、*in*

vitro でイヌメラノーマ由来樹立細胞株 4 株に対するルペオールの分化誘導能、*in vivo* でメラノーマに対する腫瘍増殖抑制効果について解析することである。

材料および方法

細胞培養

イヌの畜主に同意を得た上で、口腔内から発生したメラノーマを外科的に摘出し、腫瘍塊を PBS (-) で 5~6 回洗浄し、0.2%トリプシン・PBS (-) で 32°C、1 時間消化後、ガーゼで濾過し、細胞を回収して初代培養を行った。3~4 日に 1 度培養液を交換し、増殖した細胞を継代培養し、4 つの細胞株を樹立した。細胞株は、それぞれ cMEL-1、cMEL-2、cMEL-3 および cMEL-4 と命名した。cMEL-1、cMEL-3 および cMEL-4 は、ウシ胎児血清 (FBS) 15%、Tryptos Phosphate Broth 0.295%、7% NaHCO₃ 1% を添加した Eagle's MEM (GIBCO, New York, USA) で、cMEL-2 は、FBS10%、0.1% L-Glutamine、1mM Sodium Pyruvate、0.1% Spectinomycin、7% NaHCO₃ 0.5% を添加した RPMI1640 (GIBCO, New York, USA) でそれぞれ継代維持した。

光学顕微鏡および電子顕微鏡による形態学的観察

cMEL-1~4 の腫瘍塊は、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、常法に従い、包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびフォンタナ・マッソン染色を行った。カバーガラス上に樹立細胞を増殖させ、May-Grünwald-Giemsa 染色を施した。また、電子顕微鏡による観察を目的に、腫瘍の一部を 1mm³ に細切し、2.5% グルタル・アルデヒドで 4°C、12 時間固定後、0.1MPB で洗浄し、1%四酸化オスミウムで後固定を行った。細胞は常法に従い、エタノールで脱水し、ブチルグリシジルエーテル (QY-1) で置換し、エポン樹脂で包埋した。ウルトラミクロト

ームにて超薄切片を作製後、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色を行い、電子顕微鏡（JEM-1400、日本電子、東京、日本）で観察した。

ルペオール添加によるイヌメラノーマ由来樹立細胞株におけるメラニン色素産生の誘導

cMEL-1 および cMEL-2 を各々 1.0×10^5 /ml に調整し、4 穴スライド・チャンバー（Thermo Scientific Nunc, New York, U. S. A.）に播き込み、ルペオール $5\mu\text{M}$ 添加および未添加で 7 日間培養後、フォンタナ・マッソン染色を施した。

電子顕微鏡によるイヌメラノーマ由来樹立細胞株のメラノソームの観察

cMEL-1 および cMEL-2 を各々 1.0×10^5 /ml に調整し、4 穴スライド・チャンバー（Thermo Scientific Nunc, New York, U. S. A.）に播き込み、ルペオール $5\mu\text{M}$ 添加および未添加で 7 日間培養後、2.5%グルタル・アルデヒドで 4°C 、1 時間固定後、0.1MPB で洗浄し、2%四酸化オスミウムで後固定を行った。細胞は常法に従い、エタノールで脱水し、エポン樹脂で包埋した。ウルトラミクロームにて超薄切片を作製後、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色を行い、電子顕微鏡（JEM-1400、日本電子、東京、日本）で観察した。

ルペオール添加によるイヌメラノーマ由来樹立細胞株の増殖抑制作用と CI_{50} 値

cMEL-1~4 を各々 1.0×10^4 /ml に調整し、ルペオール $10\mu\text{M}$ 添加および未添加で 4 日間培養後、トリパンブルーで染色し、生細胞数を算定した。ルペオールの濃度を段階的に希釈し、同様に培養を行い、 CI_{50} 評価を行った。 CI_{50} は、メラノーマ細胞の増殖が 50%抑制された濃度と定義した。

RNA 発現および DNA 合成

直径10cmのシャーレに培養液10mlを入れ、cMEL-1~4をルペオール10 μ M添加および未添加で2日間培養した。総RNAは、QuickGene RNA cultured cell kit S（富士フィルム、東京、日本）を用いて回収した。鋳型cDNA合成は、総RNA 5 μ gを用い、PrimeScript RT Reagent Kit（タカラバイオ、東京、日本）を用いて行った。

リアルタイム RT-PCR 法によるメラノソーム輸送関連タンパク質の発現解析

サーマル・サイクラー（Chromo4; Bio-Rad Laboratories, California, U. S. A.）を用い、2.5%RT 反応液に各プライマー0.2 μ M を入れ、1 \times SYBR Premix Ex Taq（タカラバイオ、東京、日本）にて 25 μ l とし、遺伝子を増幅させた。材料は最初に 95 $^{\circ}$ Cで 10 秒間変性させた。次いで 95 $^{\circ}$ Cで 5 秒、60 $^{\circ}$ Cで 30 秒を 40 サイクル行った。使用したオリゴヌクレオチドプライマーを表 2 に示した。目的の遺伝子の発現量は、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に対する相対発現量で表した。

イヌメラノーマ担癌マウスにおけるルペオールの皮下接種

In vitro においてルペオールによる細胞増殖抑制効果が最も顕著であるメラノーマ由来樹立細胞株 cMEL-2 を、6 週齢の雄、SCID (severe combined immune deficiency) マウス（日本クレア、東京、日本）15 匹の背部皮下に 1×10^7 個ずつ接種した。15 匹の SCID マウスを 5 匹ずつ無作為に 3 群に分けて実験に供した。腫瘍の長径が 10mm に達した時点を 0 日目とし、0 日目に、5 匹の SCID マウスの背部皮下から麻酔下で腫瘍を摘出し腫瘍の重量を測定した。オリーブオイル 0.1ml を単回接種した群をルペオール未接種群、ルペオール 0.5mg をオリーブオイル 0.1ml に溶解して単回接種した群をルペオール接種群とし、各群 5 匹の SCID マウ

スの腫瘍組織周囲の皮下に接種した。ルペオール未接種群およびルペオール接種群は、接種 10 日目に麻酔下で腫瘍を摘出し、重量を測定した。すべての実験は麻布大学の実験動物委員会のガイドラインに従って行った。腫瘍組織から病理組織標本を作製し、HE 染色、フォンタナ・マッソン染色および抗 PCNA 抗体 (ONCOGENE RESEARCH PRODUCTS, California, U.S.A.) を用いた免疫染色を施した。

統計処理

すべての測定値は平均値±標準偏差 (SD) で示した。有意差検定には、*t* 検定ならびに Tukey 法の多重比較検定を行い、有意水準を 5%以下とした。

結 果

光学顕微鏡および電子顕微鏡所見

cMEL-1~4 の原発腫瘍は、肉眼的に黒色から灰色を呈し、HE 染色においてはメラニン顆粒が散見され、フォンタナ・マッソン染色においてはすべての腫瘍塊に黒色のメラニン顆粒が観察された (図 15A~15H)。電子顕微鏡学的所見から、cMEL-1 の腫瘍組織にはメラノソームを多数認めしたが、cMEL-2~4 は cMEL-1 に比較するとメラノソームが少数であった。樹立した細胞株 cMEL-1~4 の形態は、いずれも紡錘形ないし多稜形で樹枝状の突起が認められた (図 16A、16C)。継代数 60 代目の cMEL-1 は、フォンタナ・マッソン染色において細胞質に多数のメラニン顆粒が認められたが (図 16B)、cMEL-2~4 では、メラニン顆粒の確認はできなかった (図 16C、16D)。cMEL-1 の電子顕微鏡所見では細胞質にⅢ~Ⅳ型メラノソームが多数認められた (図 17)。

ルペオール添加によるイヌメラノーマ由来樹立細胞株のメラニン色素の誘導

フォンタナ・マッソン染色において、cMEL-1 は、ルペオール未添加の細胞においてもメラニン顆粒が認められたが(図 18A)、ルペオールを添加した cMEL-1 は、メラニン顆粒が細胞質に密集し強陽性を呈した(図 18B)。ルペオール未添加の cMEL-2 はメラニン顆粒が認められなかったが(図 18C)、ルペオール添加後 7 日間培養した細胞の細胞質にメラニン顆粒が軽度に認められた(図 18D)。電子顕微鏡学的所見において、ルペオール未添加の cMEL-1 は、細胞質にメラノソームが散在していたが(図 19A、19B)、ルペオール添加後は、細胞質にIV型の大きなメラノソームが豊富に認められた(図 19C、19D)。ルペオール未添加の cMEL-2 は、細胞質にメラノソーム様の顆粒が少数認められたが(図 19E)、添加後には小胞体内にメラノソームが中程度に確認された(図 19F)。

ルペオール添加によるイヌメラノーマ由来樹立細胞株の増殖抑制作用と CI_{50} 評価

cMEL-1~4 のすべての細胞株において、ルペオール 10 μ M 添加により、細胞の増殖が抑制された。cMEL-1 および cMEL-2 では、ルペオール未添加と比較して、添加したものでは約 1/4 と著しい増殖抑制が認められた(図 20)。メラノーマ細胞におけるルペオールの CI_{50} 値は、cMEL-1 で 5.6 μ M、cMEL-2 で 2.3 μ M、cMEL-3 および cMEL-4 で 15.7 μ M であった。しかし、cMEL-1~4 すべてのメラノーマ細胞は付着した状態で 95%以上が生存していた。

リアルタイム RT-PCR 法によるメラノソーム輸送関連タンパク質および細胞増殖マーカーの発現の確認

cMEL-1~4のすべての細胞株において、MITF遺伝子の発現量はGAPDH遺伝子の発現量と比較して、ルペオール5 μ M添加により、cMEL-1およびcMEL-3においては1.5倍、cMEL-2は3.1倍を示した。チロシナーゼ遺伝子は、ルペオール5 μ M添加により、

最も低いcMEL-1が1.8倍を示し、最も発現量が高かったcMEL-2で約5.7倍を示した。チロシナーゼ関連タンパク-2 (TRP-2) 遺伝子は、ルペオール5 μ M添加により、1.9-3.9倍増加した (図21)。

また、ルペオール5 μ M添加した細胞とルペオール未添加の細胞の比較では、ルペオールを添加したcMEL-1~4すべての細胞株においてPCNAおよびKi67の遺伝子発現量の低下が認められた。PCNAの発現量に基づく細胞増殖の評価では、cMEL-2が47.4%と、4株の中で最も増殖抑制が認められ、増殖抑制が最も顕著でなかったcMEL-1は68.4%であった。Ki67についても同様にすべての細胞株で43.4~62.5%と遺伝子発現の低下が認められた (図22)。

イヌメラノーマ担癌マウスにおけるルペオールの皮下接種による腫瘍増殖抑制効果

cMEL-2 を移植したルペオール未接種群の担癌 SCID マウスの腫瘍重量は、10日間で5.7倍の増加を示した。一方、ルペオール接種群では、ルペオール未接種群と比較して78.7%の重量を示し、腫瘍の増殖抑制が認められた (図23)。有意差は1%以下であった。ルペオール接種群の腫瘍塊のHE染色像は、ルペオール未接種群 (図24A) と比較すると腫瘍の中心部の壊死が認められ (図24B)、核分裂像の頻度が50%以下となった (図24C、24D)。また、抗PCNA抗体を用いた免疫染色の結果、ルペオール接種群は、ルペオール未接種群と比較するとPCNA陽性細胞の出現頻度が低下していた (図24E、24F)。

考察

本実験に用いた4種類のイヌメラノーマ由来樹立細胞株は、細胞質内にメラノソームを有するcMEL-1と、細胞株を樹立する過程でメラノソームが消失した

cMEL-2~4 の 2 種類に分類された。cMEL-1 および cMEL-2 の電子顕微鏡学的所見より、ルペオール添加した細胞はいずれも細胞質に成熟したメラノソームが出現したことより、マウスメラノーマ由来細胞株と同様にイヌメラノーマ由来樹立細胞株における分化誘導を確認した。リアルタイム RT-PCR 法により、メラノソーム輸送に関わる分化マーカーについて評価することにより、イヌの口腔内から発生したメラノーマ由来樹立細胞株に対するルペオールの分化誘導効果の解析を行った。その結果、cMEL-1~4 のすべての細胞株において、ルペオール 5 μ M 添加により、MITF、チロシナーゼおよび TRP-2 遺伝子の発現が上昇したことから、メラノソームの有無に関わらず、マウスメラノーマ由来細胞株と同様に、イヌメラノーマ由来樹立細胞株も分化誘導されることが確認された。

cMEL-1~4 のすべての細胞株において、ルペオール添加による細胞増殖抑制を認めたが、細胞は死滅せず 95%以上が生存していたことから、ルペオールが細胞壊死を引き起こすのではなく、単に細胞の増殖を抑制し、分化誘導に作用することが強く示唆された。PCNA 発現の程度は、腫瘍の進行ならびにグレードと強く関連する [20, 35, 64]。Ki67 もまた、PCNA と同様の細胞増殖マーカーであり、メラノーマにおいては悪性度および予後と関連することが報告されている [19]。著者らは、マウスメラノーマ由来細胞株である B16 2F2 細胞において、*in vivo* および *in vitro* においてルペオールが PCNA および Ki67 の発現を抑制することを報告した [41]。

In vitro の実験から、イヌメラノーマ由来樹立細胞株においても、マウスメラノーマ由来細胞株と同様にルペオール添加によって PCNA および Ki67 の発現抑制が認められたことから、SCID マウスにイヌメラノーマ由来樹立細胞株の移植を行い、*in vivo* における解析を行うこととした。ルペオールの効果が大きかった cMEL-2 を SCID マウスに移植し、担癌 SCID マウスを作製し、腫瘍組織におけるルペオール

の抗腫瘍効果の解析を行った。本実験では、cMEL-2の担癌マウスにルペオールを1回接種したのみであったが、腫瘍細胞の増殖はルペオール未接種群と比較すると、約20%の腫瘍増殖抑制が認められた。また、SCIDマウスの腫瘍組織において、核分裂像の頻度および抗PCNA抗体を用いた免疫染色の結果から腫瘍の増殖抑制効果が認められた。しかし、ルペオール接種群では腫瘍が10日間で約4倍に増殖し、腫瘍の縮小効果は認められなかった。ルペオールの1回接種量および接種回数の増加によりさらなる腫瘍の増殖抑制が期待できる。

4種類のイヌメラノーマ由来樹立細胞株について、*in vivo* および *in vitro* でルペオールの分化誘導能ならびに増殖抑制能を明らかにした。これらの結果に基づき、臨床的にルペオールがイヌのメラノーマに対する非外科的治療を確立する一助となることが示唆された。

表2 リアルタイム RT-PCR法に用いたプライマー

Primer		sequence (5' -3')
GAPDH	Sense	GCCAAGAGGGTCATCATCTC
	Antisense	GGCCCGTCCACGGTCTTCT
MITF	Sense	GGGATTGATGGATCCTGCTTTG
	Antisense	GGCTGGACAGGAGTTGCTGA
TYR	Sense	TTGGCAGATTGTCTGTAGCC
	Antisense	AGGCATTGTGCATGCTGCTT
TRP-2	Sense	ACACAACACTGGCTGGGCCT
	Antisense	GAGATCTCTTCCAGACACAAC
PCNA	Sense	AGTCACATCGGAGATGCTGTTGTA
	Antisense	AGCTGAACTGGCTCATTCATCTCTA
Ki67	Sense	AATCTCTGCTTCGGGTCTCCA
	Antisense	ACTCCGGTTTCAGACGACCAC

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,
MITF: microphthalmia-associated transcription factor,
TYR: tyrosinase,
TRP-2: tyrosinase-related protein2,
PCNA: proliferating cell nuclear factor.

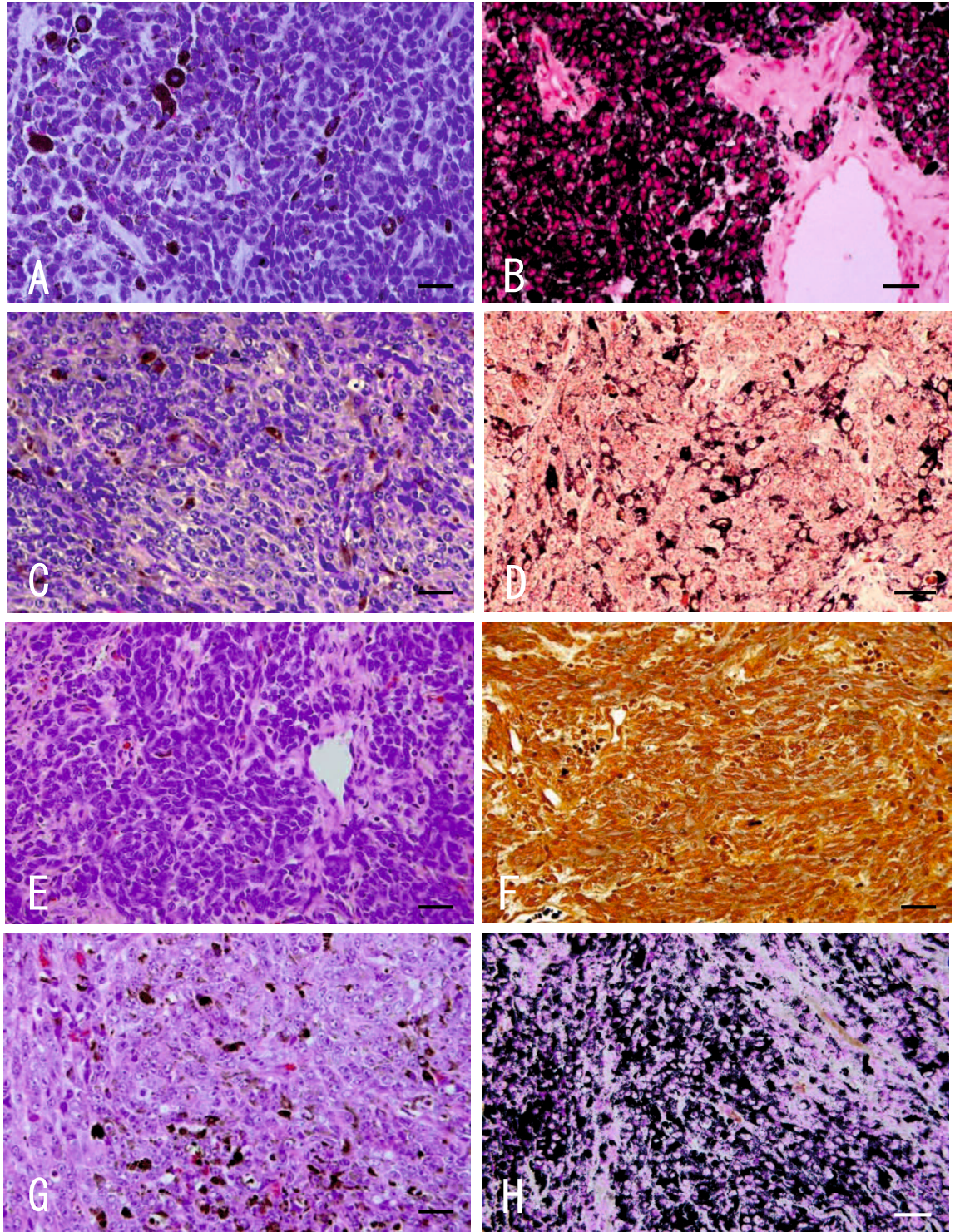


図 15 イヌメラノーマの cMEL-1~4 の病理組織像

cMEL-1 A: HE 染色、B: フォンタナ・マッソン染色。

cMEL-2 C: HE 染色、D: フォンタナ・マッソン染色。

cMEL-3 E: HE 染色、F: フォンタナ・マッソン染色。

cMEL-4 G: HE 染色、H: フォンタナ・マッソン染色。

cMEL-1~4 の腫瘍組織にメラニン顆粒が確認された。Bars=50 μ m。

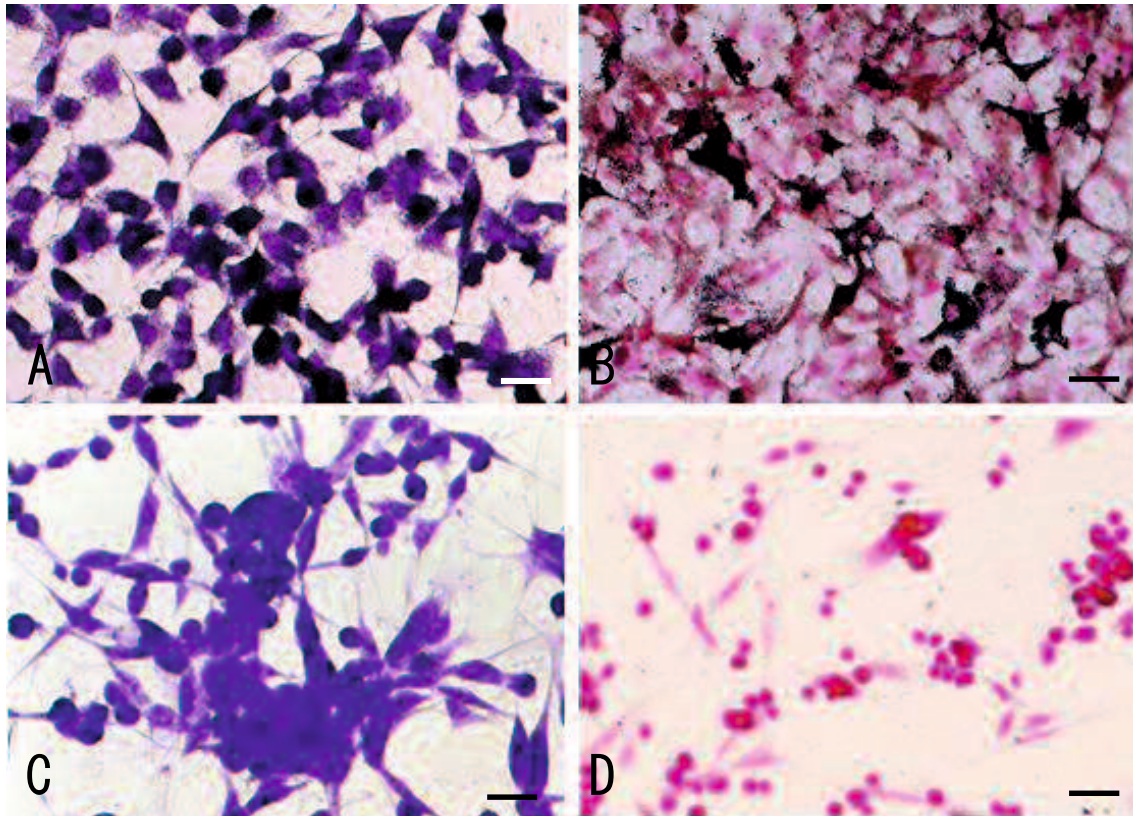


図 16 cMEL-1 および cMEL-2 のギムザ染色およびフォンタナ・マッソン染色像

cMEL-1 A:ギムザ染色、B:フォンタナ・マッソン染色。

cMEL-2 C:ギムザ染色、D:フォンタナ・マッソン染色。

cMEL-1 はフォンタナ・マッソン染色で細胞質に陽性顆粒が認められたが、
cMEL-2 は陽性顆粒が認められなかった。Bars=20 μ m。

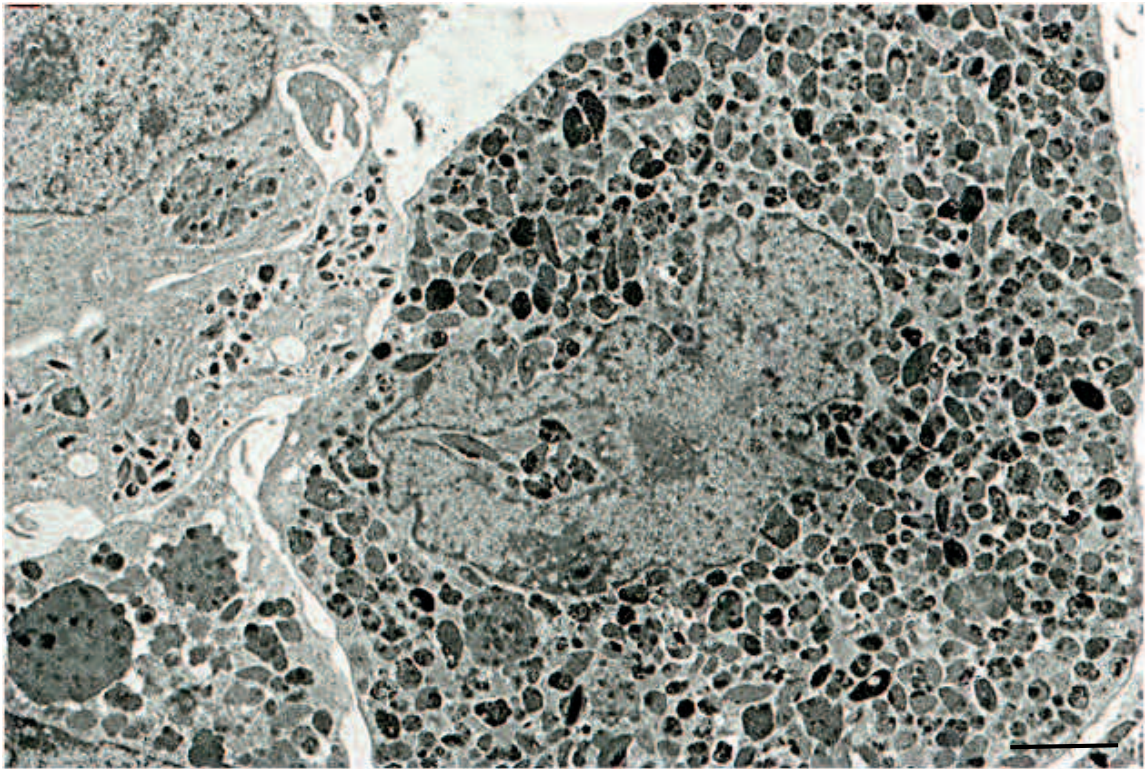


図 17 cMEL-1 の腫瘍組織の電子顕微鏡像

腫瘍細胞は、核に切れ込みがみられ、細胞質にはⅢ～Ⅳ型メラノソームが豊富に観察された。Bar=2 μ m。

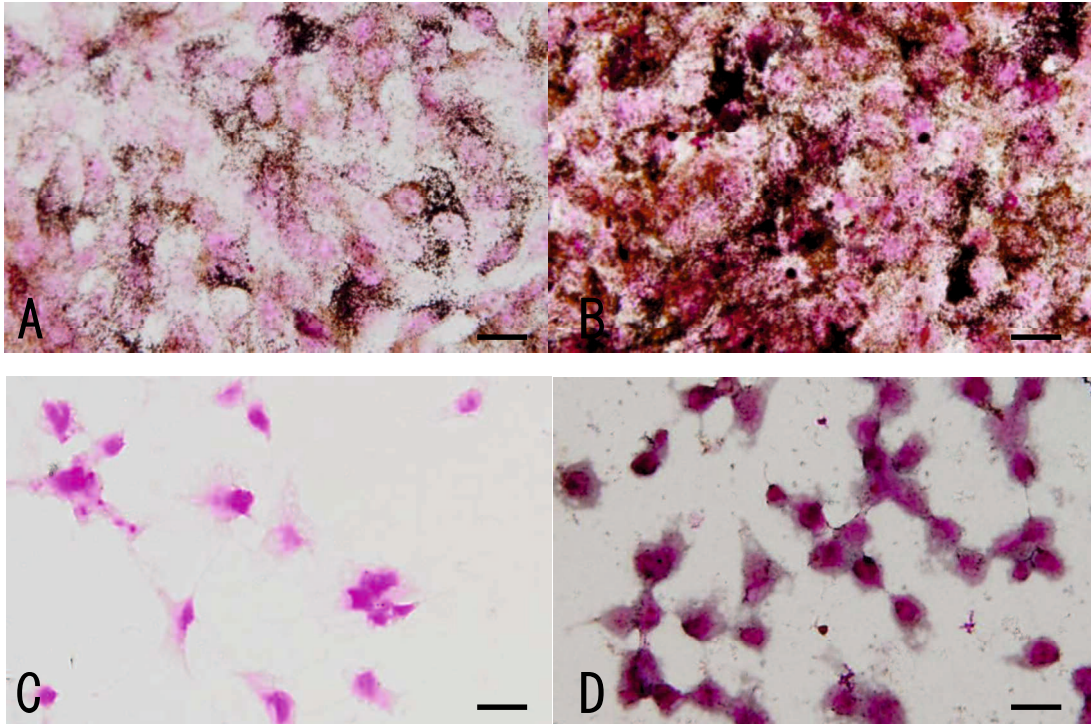


図 18 ルペオール未添加および添加 7 日後の cMEL-1 および cMEL-2 のフォンタナ・マッソン染色

cMEL-1 A: ルペオール未添加、B: ルペオール添加 7 日後。

cMEL-2 C: ルペオール未添加、D: ルペオール添加 7 日後。

cMEL-1 および cMEL-2 はいずれも、ルペオール添加 7 日後は、細胞質にフォンタナ・マッソン染色で陽性顆粒が認められた。Bars=10 μ m。

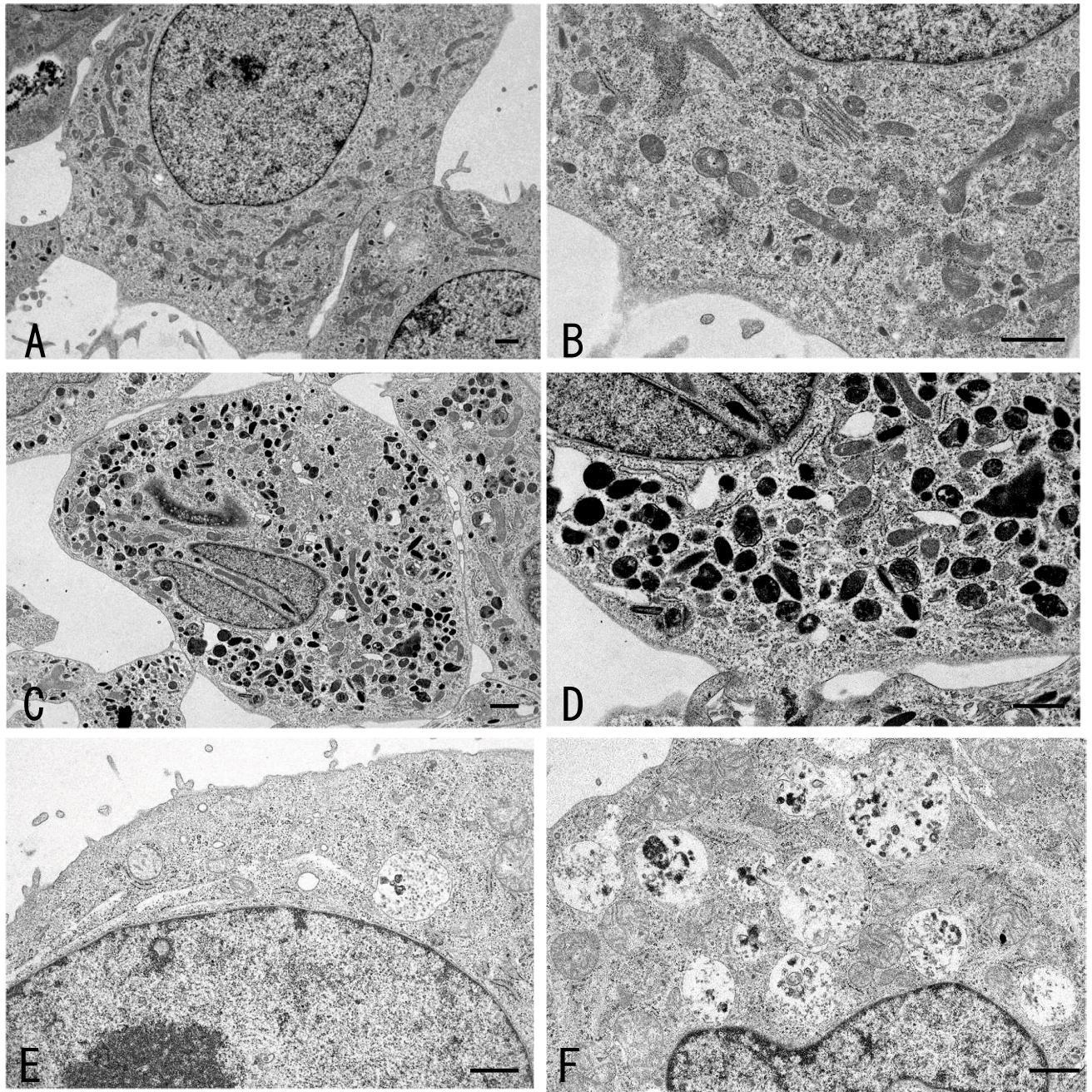


図 19 ルペオール未添加および添加 7 日後の cMEL-1 および cMEL-2 の電子顕微鏡像

cMEL-1 A、B:ルペオール未添加、C、D:ルペオール添加 7 日後。

cMEL-2 E:ルペオール未添加、F:ルペオール添加 7 日後。

cMEL-1 は、ルペオール添加 7 日後、細胞質に豊富なIV型メラノソームの誘導が確認された。cMEL-2 は、ルペオール添加 7 日後、細胞質の小胞体内にメラノソーム様の物質が認められた。Bars=1 μ m。

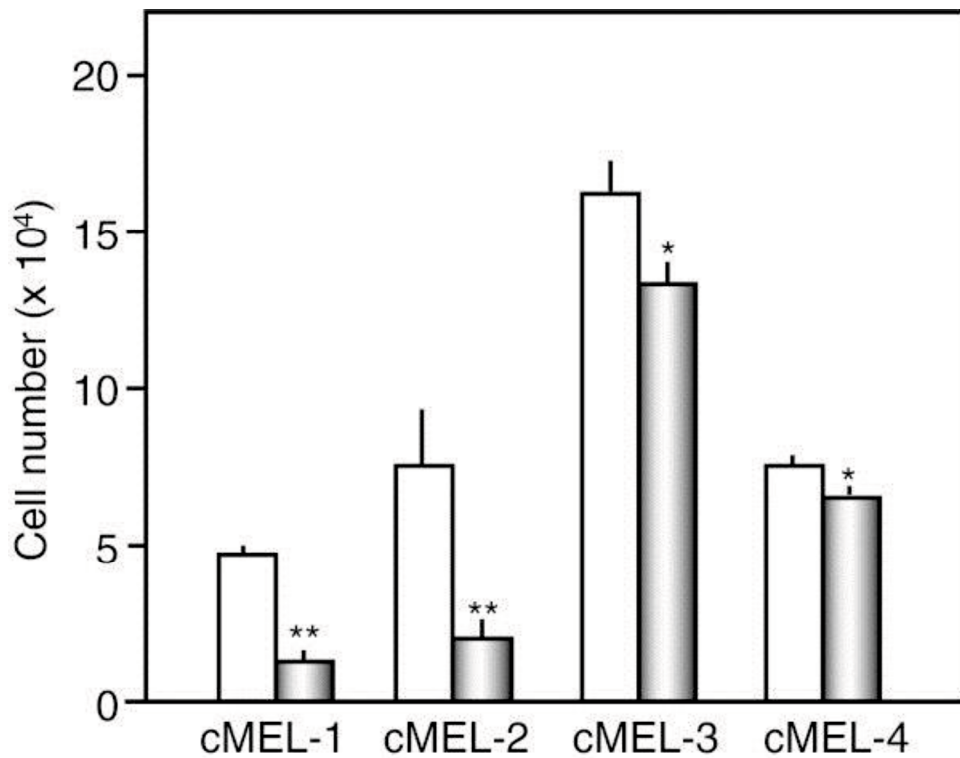


図 20 イヌメラノーマ由来細胞株 4 種類のルペオール未添加および添加による生細胞数の比較

cMEL-1~cMEL-4 の各細胞株にルペオール未添加および 10μM 添加したものの生細胞数を比較した。白いカラムは未添加、灰色のカラムはルペオール添加した生細胞数を示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs ルペオール未添加

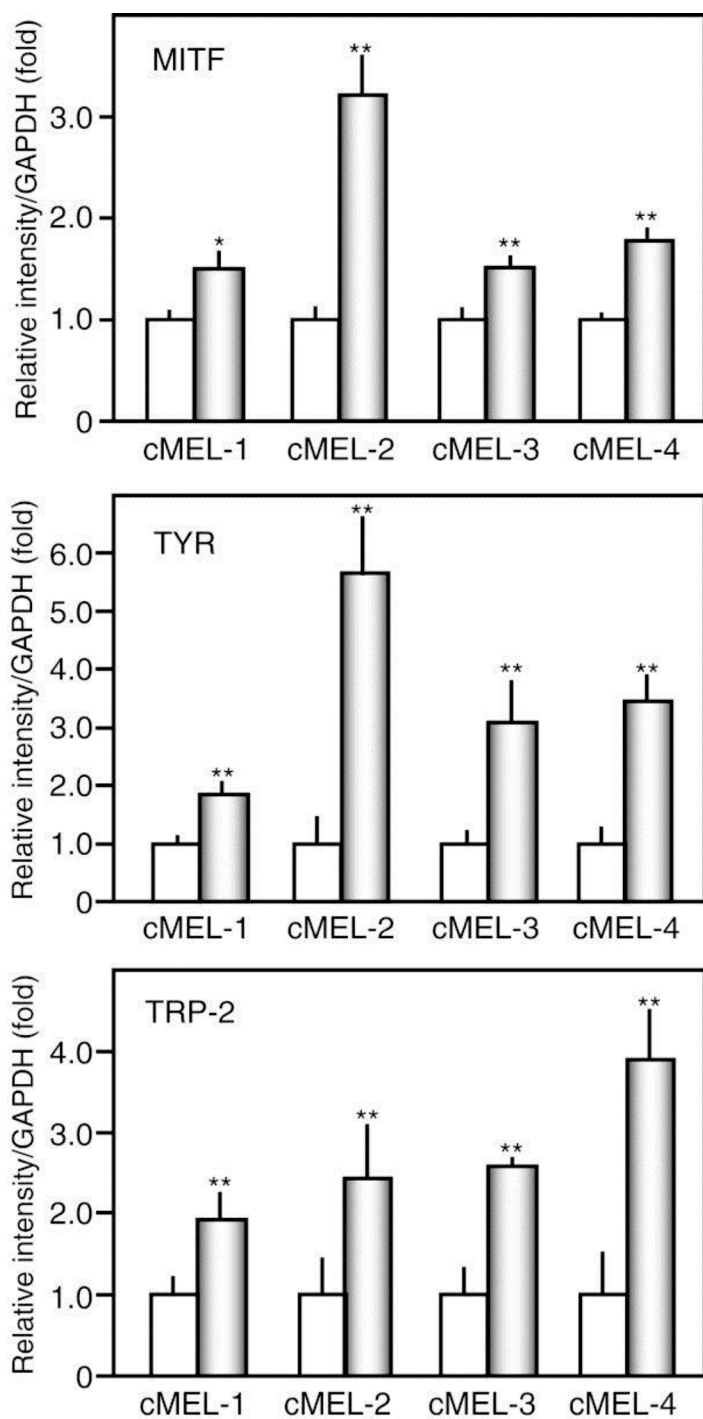


図 21 リアルタイム RT-PCR 法によるメラノソーム輸送タンパクの発現の確認

イヌメラノーマ由来樹立細胞株におけるルペオール 5µM 添加および未添加によるメラノソーム輸送タンパクの発現を比較した。白いカラムはルペオール未添加、灰色のカラムはルペオール添加を示す。

* p < 0.05, ** p < 0.01 vs ルペオール未添加

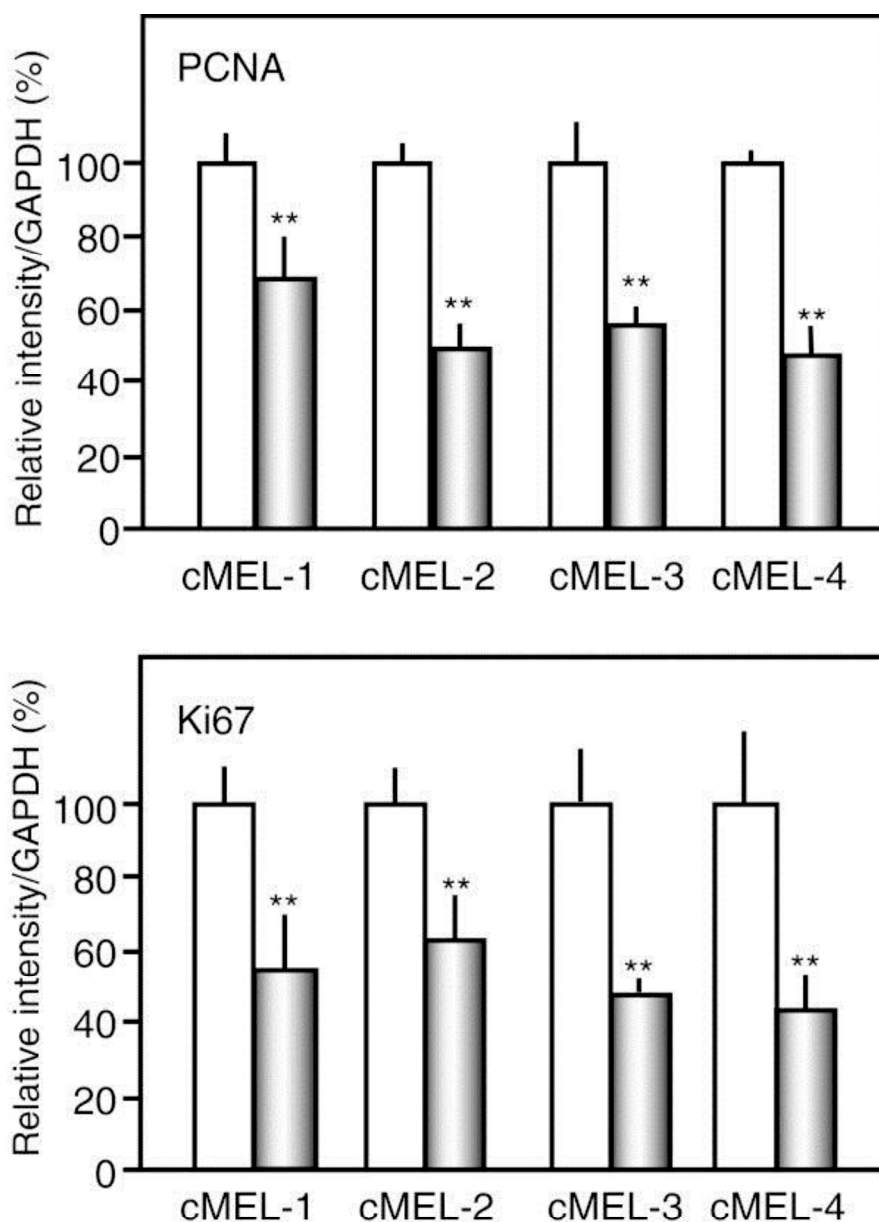


図 22 リアルタイム RT-PCR 法による細胞増殖マーカーの発現の確認

cMEL-1~4 におけるルペオール 5 μ M 添加および未添加による細胞増殖マーカーの発現を比較した。白いカラムはルペオール未添加、灰色のカラムはルペオール添加を示す。

** p < 0.01 vs ルペオール未添加

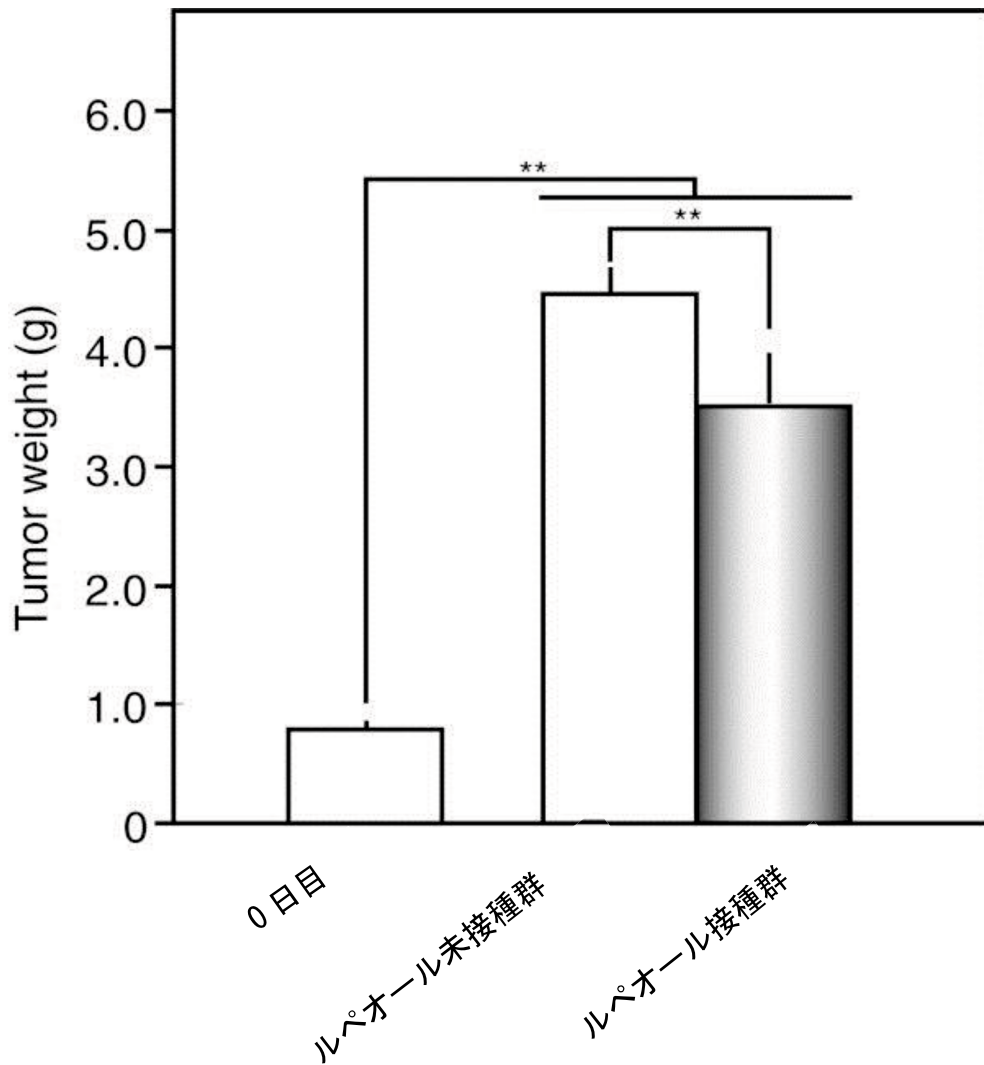


図 23 イヌメラノーマ担癌マウスにおけるルペオールの皮下接種による腫瘍増殖抑制効果

cMEL-2 をヌードマウスの背部皮下に移植し、直径 10mm に達した時点で 0 日目とした。ルペオール未接種群はオリーブオイルのみ、ルペオール接種群はルペオールを腫瘍の周囲に 1 回のみ接種し、各腫瘍の重量を測定した。

** $p < 0.01$

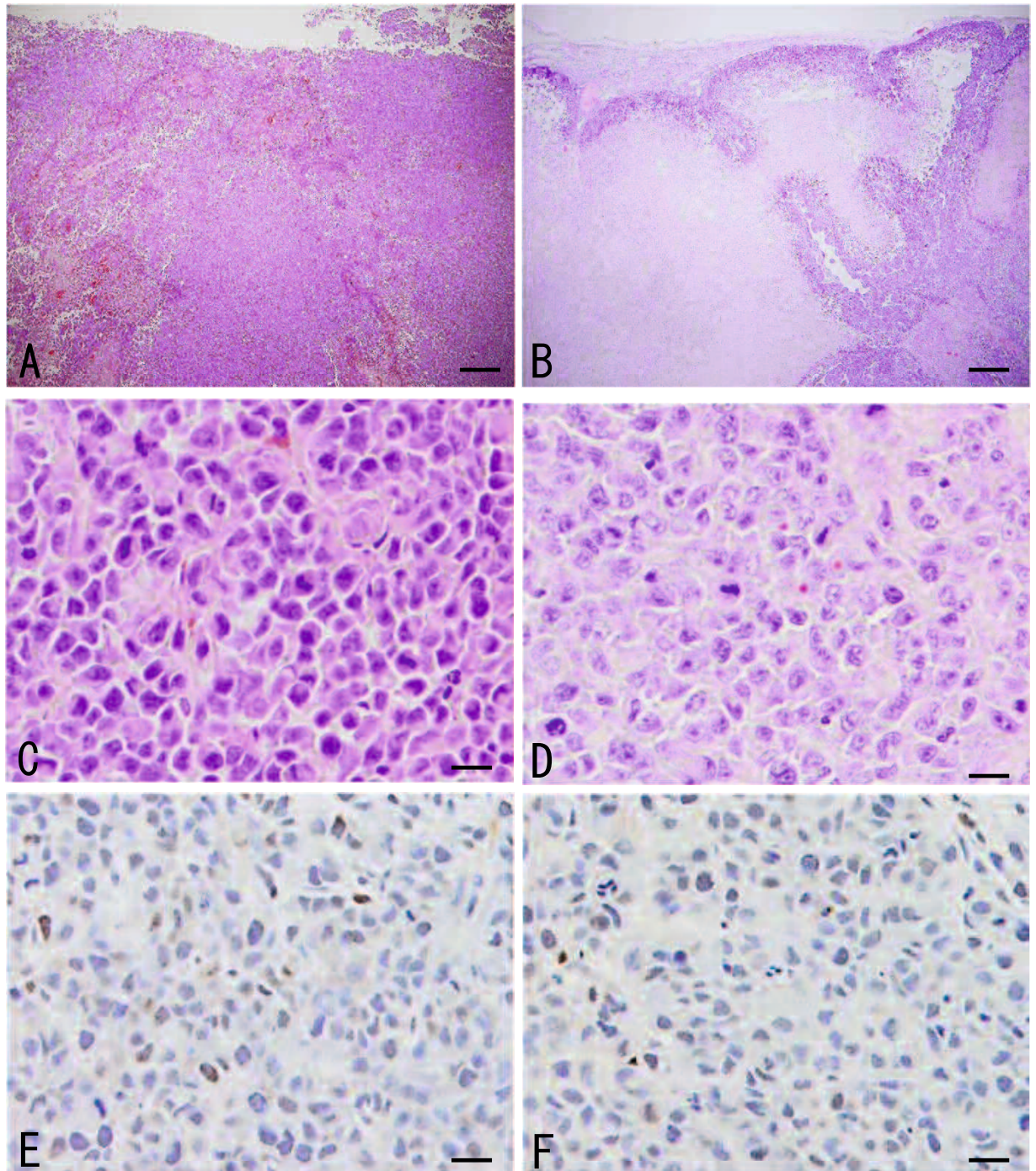


図 24 イヌメラノーマ担癌マウスにおけるルペオール未接種群およびルペオール接種群の HE 染色像および抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色像

ルペオール未接種群 A、C:HE 染色、E:抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色。

ルペオール接種群 B、D:HE 染色、E:抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色。

Bars=100 μ m (A、B)。Bars=20 μ m (C~F)。

ルペオール接種群は皮下に壊死が認められ、核分裂像および PCNA 陽性像が減少した。

総 括

本研究は、腫瘍の基本的性状を明らかにすることにより、新たな治療法の開発に役立つ情報を得ることを目的とし、イヌの肝細胞癌およびメラノーマについて、*in vivo* および *in vitro* の様々な技術を用いて病理学的並びに分子生物学的に解析を試みたものである。本研究では、1. イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における中性アミノ酸輸送に係わる L 型アミノ酸トランスポーター1 の発現とロイシン輸送能、2. マウスおよびイヌのメラノーマ由来樹立細胞株におけるルパン型トリテルペン化合物ルペオールの抗増殖および分化誘導効果について解析した。

近年、病理組織診断結果に基づいた特定の組織型の動物腫瘍に対し、遺伝子治療をはじめとする新たな治療法が開発されつつある。新たな治療の標的となりうる腫瘍細胞の代謝・増殖についての基本的性状に関する知見を基にした、副作用の少ない新規治療薬の開発が望まれている。

第 1 章ではイヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における中性アミノ酸輸送に係わる L 型アミノ酸トランスポーター1 の発現とロイシン輸送能について解析した。腫瘍細胞は、急速に増殖するためアミノ酸の要求量が高く、中性アミノ酸輸送に係わる役割を担う L 型アミノ酸トランスポーター1 の発現量が高い。L 型アミノ酸トランスポーター1 は、腫瘍細胞に特異性が高く、腫瘍診断マーカーおよび治療の標的分子の候補として研究が行われている。膵臓癌をはじめとする多くの癌で、L 型アミノ酸トランスポーター1 の高発現群は予後不良であることが報告されている。

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における L 型アミノ酸トランスポーター1 遺伝子の発現量について、リアルタイム RT-PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて解析した。イヌの正常肝細胞と比較して、イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株の L 型アミノ酸トランスポーター1 遺伝子の発現量は 28 倍高値を示した。L 型アミノ酸ト

ランスポーター1の抑制剤であるヘプタン-2-カルボン酸を添加した細胞では、ロイシン輸送能が90%減少した。これらの結果から、ヘプタン-2-カルボン酸がイヌの肝細胞癌の新たな治療薬となり得ることが示唆された。

第2章では、マウスおよびイヌのメラノーマ由来樹立細胞株におけるルパン型トリテルペン化合物ルペオールの抗増殖および分化誘導効果について解析した。口腔内に発生するイヌのメラノーマは、進行が早く再発率も高いため、外科手術単独で完治することが困難な腫瘍である。抗癌剤としてタキソールなどが用いられるが、毒性が強く副作用が多い。そこで、メラノーマ細胞の増殖メカニズムに基づき、分化誘導効果のあるキク科植物より抽出したルパン型トリテルペン化合物ルペオールが抗腫瘍効果を示すかどうかを、マウスおよびイヌのメラノーマ由来樹立細胞株を用いて解析した。

第1節では、マウスメラノーマ由来細胞株 B16 2F2 細胞にルペオール 10 μ M を添加したところ、添加後8時間でストレスファイバーの脱重合を引き起こし、樹状突起の伸長が誘導された。また、ルペオール添加48時間後に電子顕微鏡観察を行ったところ、ルペオールを添加したマウスメラノーマ由来細胞株 B16 2F2 細胞の細胞質には成熟したIV型メラノソームが多数観察されるとともに、チロシナーゼやメラノソーム輸送関連タンパクの発現亢進が認められた。ルペオール添加によるメラノーマ細胞の分化は、2つのステージに分かれて出現することが確認された。

第2節では、イヌのメラノーマ由来樹立細胞株4株(cMEL-1~4)にルペオールを添加し、腫瘍細胞に対するルペオールの分化誘導能について *in vivo* および *in vitro* の手法を用いて解析した。ルペオール添加後、いずれの細胞株でも小眼球症関連転写因子、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連蛋白2の発現の増加がみられた。次に、ルペオール添加によりチロシナーゼの発現が高かった細胞株 cMEL-2

を SCID マウスに移植し、10 日後にルペオール接種群とルペオール未接種群で腫瘍の重量を比較したところ、ルペオール接種群で有意な腫瘍増殖抑制が確認された。以上のことから、ルペオールは *in vivo* および *in vitro* でメラノーマ細胞の分化誘導能並びに増殖抑制能を有し、ルペオールがイヌのメラノーマの新たな治療薬になり得ることが示唆された。

以上のごとく、L 型アミノ酸トランスポーター1 遺伝子の発現が高いイヌ肝細胞癌由来樹立細胞株にヘプタン-2-カルボン酸を添加することで、ロイシン輸送能が低下すること、およびキク科植物より抽出したルパン型トリテルペン化合物であるルペオールがメラノーマ細胞の分化誘導能並びに増殖抑制能を有することを示した。これらの情報はイヌの肝細胞癌・メラノーマに留まらず、獣医学領域における完治が困難な腫瘍に対する新たな治療薬の応用・開発に役立つことが期待される。さらに、L 型アミノ酸トランスポーター1 遺伝子の高発現がみられる腫瘍は予後が悪いことから、腫瘍の悪性度を決定する因子としても有用であると考えられる。

今回、*in vivo* および *in vitro* の様々な病理学的並びに分子生物学的解析によって明らかにされたイヌの肝細胞癌・メラノーマの腫瘍細胞の代謝・増殖についての基礎的性状に関する研究成果は、動物腫瘍の新たな治療標的に基づく今後の新規治療薬の開発に貢献するものと考えられる。

引用文献

- [1] Babu, E., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Iribe, Y., Tangtrongsup, S., Jutabha, P., Li, Y., Ahmed, N., Sakamoto, S., Anzai, N., Nagamori, S. and Endou, H. 2003. Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. *J. Biol. Chem.* 278: 43838–43845.
- [2] Bartlett, D. L., DiBisceglie, A. M. and Dawson, L. A. 2011. Cancer of the liver. pp.997–1018. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 9th ed. (De-Vita, V. T., Lawrence, T. S. and Rosenberg, S. A. eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- [3] Bergman, P. J. 2007. Canine oral melanoma. *Clin. Tech. Small. Anim. Pract.* 22: 55-60.
- [4] Betsunoh, H., Fukuda, T., Anzai, N., Nishihara, D., Mizuno, T., Yuki, H., Masuda, A., Yamaguchi, Y., Abe, H., Yashi, M., Fukabori, Y., Yoshida, K. and Kamai, T. 2013. Increased expression of system large amino acid transporter (LAT)-1 mRNA is associated with invasive potential and unfavorable prognosis of human clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 13: 509–2407–13–509.
- [5] Bodoy, S., Martin, L., Zorzano, A., Palacin, M., Estevez, R. and Bertran, J. 2005. Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with

- system L activity. *J. Biol. Chem.* 280: 12002–12011.
- [6] Busca, R., Bertolotto, C., Abbe, P., Englaro, W., Ishizaki, T., Narumiya, S., Boquet, P., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. 1998. Inhibition of Rho is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation. *Mol. Biol. Cell* 9: 1367–1378.
- [7] Busca, R., Bertolotto, C., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. 1995. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70S6-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 271: 31824–31830.
- [8] Byers, H. R., Yaar, M., Eller, M. S., Jalbert, N. L. and Gilchrist, B. A. 2000. Role of cytoplasmic dynein in melanosome transport in human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 114: 990–997.
- [9] Christensen, H. N. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* 70: 43–77.
- [10] Christensen, H. N., Handlogten, M. E., Lam, I., Tager, H. S. and Zand, R. 1969. A bicyclic amino acid to improve discriminations among transport systems. *J. Biol. Chem.* 244: 1510–1520.
- [11] Denker, B. M., Smith, B. L., Kuhajda, F. P. and Agre, P. 1988.

Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J. Biol. Chem.* 263: 15634–15642.

- [12] Fernández, M. A., Alvarez, A., García, M. D. and Sáenz, M. T. 2001. Anti-inflammatory effect of *Pimenta racemosa* var. *ozua* and isolation of the triterpene lupeol. *Farmaco* 56: 335-338.
- [13] Fernández, M. A., Heras, B., García, M. D., Sáenz, M. T. and Villar, A. 2001. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J. Pharm. Pharmacol.* 53: 1533-1539.
- [14] Fuchs, B. C. and Bode, B. P. 2005. Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin. Cancer Biol.* 15: 254–266.
- [15] Fukuda, M., Kuroda, T. S. and Mikoshiba, K. 2002. Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J. Biol. Chem.* 277: 12432–12436.
- [16] Fukumoto, S., Hanazono, K., Fu, D. R., Endo, Y., Kadosawa, T., Iwano, H. and Uchide, T. 2013. A new treatment for human malignant melanoma targeting L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a pilot study in a

canine model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439: 103–108.

- [17] Fukumoto, S., Hanazono, K., Komatsu, T., Iwano, H., Kadosawa, T. and Uchide, T. 2013. L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in canine mammary gland tumors. *J. Vet. Med. Sci.* 75: 431–437.
- [18] Fukumoto, S., Hanazono, K., Komatsu, T., Ueno, H., Kadosawa, T., Iwano, H. and Uchide, T. 2013. L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a new therapeutic target for canine mammary gland tumour. *Vet. J.* 198: 164–169.
- [19] Gould Rothberg, B. E., Bracken, M. B. and Rimm, D. L. 2009. Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 101: 452–474.
- [20] Hall, P. A., Levison, D. A., Woods, A. L., Yu, C. C., Kelloff, D. B., Watkins, J. A., Barnes, D. M., Gillett, C. E., Camplejohn, R. and Dover, R. 1990. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.* 162: 285–294.
- [21] Hata, K., Ogawa, S., Makino, M., Mukaiyama, T., Hori, K., Iida, T. and Fujimoto, Y. 2008. Lupane triterpenes with a carbonyl group at C-20 induce cancer cell apoptosis. *J. Nat. Med.* 62: 332–335.

- [22] Hata, K., Hori, K., Murata, J. and Takahashi, S. 2005. Remodeling of actin cytoskeleton in lupeol-induced B16 2F2 cell differentiation. *J. Biochem.* 138: 467–472.
- [23] Hata, K., Mukaiyama, T., Tsujimura, N., Sato, Y., Kosaka, Y., Sakamoto, K. and Hori, K. 2006. Differentiation-inducing activity of lupane triterpenes on a mouse melanoma cell line. *Cytotechnology* 52: 151–158.
- [24] Hata, K., Hiwatashi, K., Itoh, M., Suzuki, N., Watanabe, T., Takahashi, J. and Sasaki, H. 2008. Inhibitory effects of lupeol on 3 T3-L1 preadipocyte differentiation. *Phytochem. Lett.* 1: 191–193.
- [25] Ichinoe, M., Mikami, T., Yoshida, T., Igawa, I., Tsuruta, T., Nakada, N., Anzai, N., Suzuki, Y., Endou, H. and Okayasu, I. 2011. High expression of L-type amino-acid transporter 1 (LAT1) in gastric carcinomas: comparison with non-cancerous lesions. *Pathol. Int.* 61: 281–289.
- [26] Itoh, M., Hiwatashi, K., Abe, Y., Kimura, F., Toshima, G., Takahashi, J., Sasaki, H. and Hata K 2009. Lupeol reduces triglyceride and cholesterol synthesis in human hepatoma cells. *Phytochem Lett* 2: 176–178

- [27] Janpipatkul, K., Suksen, K., Borwornpinyo, S., Jearawiriyapaisarn, N., Hongeng, S., Piyachaturawat, P. and Chairoungdua, A. 2014. Downregulation of LAT1 expression suppresses cholangiocarcinoma cell invasion and migration. *Cell. Signal.* 26: 1668–1679.
- [28] Kaira, K., Oriuchi, N., Imai, H., Shimizu, K., Yanagitani, N., Sunaga, N., Hisada, T., Tanaka, S., Ishizuka, T., Kanai, Y., Endou, H., Nakajima, T. and Mori, M. 2008. Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 expression in resectable stage I–III nonsmall cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 98: 742–748.
- [29] Kaira, K., Oriuchi N, Takahashi, T., Nakagawa, K., Ohde, Y., Okumura, T., Murakami, H., Shukuya, T., Kenmotsu, H., Naito, T., Kanai, Y., Endo, M., Kondo, H., Nakajima, T. and Yamamoto, N. 2011. LAT1 expression is closely associated with hypoxic markers and mTOR in resected non-small cell lung cancer. *Am. J. Transl. Res.* 3: 468–478.
- [30] Kaira, K., Sunose, Y., Arakawa, K., Ogawa, T., Sunaga, N., Shimizu, K., Tominaga, H., Oriuchi N., Itoh, H., Nagamori, S., Kanai, Y., Segawa, A., Furuya, M., Mori, M., Oyama, T. and Takeyoshi, I. 2012. Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in surgically resected pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 107:632–638.
- [31] Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E. and Endou,

- H. 1998. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* 273: 23629–23632.
- [32] Kobayashi, H., Ishii, Y. and Takayama, T. 2005. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in esophageal carcinoma. *J. Surg. Oncol.* 90: 233–238.
- [33] Langford, G. M. 2002. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic* 3: 859–865.
- [34] Li, J., Qiang, J., Chen, S. F., Wang, X., Fu, J. and Chen, Y. 2013. The impact of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in human hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 34: 2977–2981.
- [35] Malhan, P., Husain, N., Bhalla, S., Gupta, R. K. and Husain, M. 2010. Proliferating cell nuclear antigen, p53 and micro vessel density: Grade II vs. Grade III astrocytoma. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 53: 20–23.
- [36] Maruo, T., Kanemaki, N., Onda, K., Sato, R., Ichihara, N. and Ochiai, H. 2014. Canine amino acid transport system Xc(-): cDNA sequence, distribution and cystine transport activity in lens epithelial cells. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 523–530.

- [37] Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P. J., Loffing, J., Shoemaker, C. B. and Verrey, F. 1998. Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395: 288–291.
- [38] Nakanishi, K., Ogata, S., Matsuo, H., Kanai, Y., Endou, H., Hiroi, S., Tominaga, S., Aida, S., Kasamatsu, H. and Kawai, T. 2007. Expression of LAT1 predicts risk of progression of transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch.* 451: 681–690.
- [39] Namikawa, M., Kakizaki, S., Kaira, K., Tojima, H., Yamazaki, Y., Horiguchi, N., Sato, K., Oriuchi, N., Tominaga, H., Sunose, Y., Nagamori, S., Kanai, Y., Oyama, T., Takeyoshi, I. and Yamada, M. 2014. Expression of amino acid transporters (LAT1, ASCT2 and xCT) as clinical significance in hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.* Oct 9. doi: 10.1111/hepr.12431.
- [40] Nawashiro, H., Otani, N., Shinomiya, N., Fukui, S., Ooigawa, H., Shima, K., Matsuo, H., Kanai, Y. and Endou, H. 2006. L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors. *Int. J. Cancer* 119: 484–492.
- [41] Nitta, M., Azuma, K., Hata, K., Takahashi, S., Ogiwara, K., Tsuka, T.,

- Imagawa, T., Yokoe, I., Osaki, T., Minami, S. and Okamoto, Y. 2013. Systemic and local injections of lupeol inhibit tumor growth in a melanoma-bearing mouse model. *Biomed. Rep.* 1: 641–645.
- [42] Novak, D. A., Kilberg, M. S. and Beveridge, M. J. 1994. Ontogeny and plasma-membrane domain localization of amino acid transport system L in rat liver. *Biochem. J.* 301: 671–674.
- [43] Ochiai, H., Kanemaki, N., Kamoshida, S., Murakami, M., Ichihara, N., Asari, M. and Nishita, T. 2009. Determination of full-length cDNA nucleotide sequence of equine carbonic anhydrase VI and its expression in various tissues. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 1233–1237.
- [44] Ochiai, H., Morishita, T., Onda, K., Sugiyama, H. and Maruo, T. 2012. Canine Lat1: molecular structure, distribution and its expression in cancer samples. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 917–922.
- [45] Oliveria, S., Dusza, S. and Berwick, M. 2001. Issues in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 1: 453–459.
- [46] Oxender, D. L. and Christensen, H. N. 1963. Distinct Mediating Systems for the Transport of Neutral Amino Acids by the Ehrlich Cell. *J. Biol. Chem.* 238: 3686–3699.

- [47] Oxender, D. L. and Christensen, H. N. 1963. Evidence for two types of mediation of neutral and amino-acid transport in Ehrlich cells. *Nature* 197: 765-767.
- [48] Passeron, T., Bahadoran, P., Bertolotto, C., Chiaverini, C., Busca, R., Valony, G., Bille, K., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. 2004. Cyclic AMP promotes a peripheral distribution of melanosomes and stimulates melanophilin/Slac2-a and actin association. *FASEB J.* 18: 989-991.
- [49] Pineda, M., Fernandez, E., Torrents, D., Estevez, R., Lopez, C., Camps, M., Lloberas, J., Zorzano, A. and Palacin, M. 1999. Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J. Biol. Chem.* 274: 19738-19744.
- [50] Rassnick, K. M., Ruslander, D. M., Cotter, S. M., Al-Sarraf, R., Bruyette, D. S., Gamblin, R. M., Meleo, K. A. and Moore, A. S. 2001. Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218: 1444-1448.
- [51] Rossier, G., Meier, C., Bauch, C., Summa, V., Sordat, B., Verrey, F. and Kuhn, L. C. 1999. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J. Biol. Chem.* 274: 34948-34954.

- [52] Sakata, T., Ferdous, G., Tsuruta, T., Satoh, T., Baba, S., Muto, T., Ueno, A., Kanai, Y., Endou, H. and Okayasu, I. 2009. L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. *Pathol. Int.* 59: 7–18.
- [53] Saleem, M. 2009. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett.* 285: 109–115.
- [54] Sasaki, H., Kawarasaki, S., Sugawara, M. and Hata, K. 2008. Effects of lupeol on visceral fat weights and serum lipoprotein profiles in high-fat diet mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 43: 422–424.
- [55] Scott, G. and Leopardi, S. 2003. The cAMP signaling pathway has opposing effects on Rac and Rho in B16F10 cells: implications for dendrite formation in melanocytic cells. *Pigment Cell Res.* 16: 139–148.
- [56] Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H. and Kanai, Y. 1999. Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.* 274: 19745–19751.
- [57] Torrents, D., Estevez, R., Pineda, M., Fernandez, E., Lloberas, J., Shi, Y. B., Zorzano, A. and Palacin, M. 1998. Identification and

characterization of a membrane protein (γ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J. Biol. Chem.* 273: 32437–32445.

- [58] Uchino, H., Kanai, Y., Kim, D. K., Wempe, M. F., Chairoungdua, A., Morimoto, E., Anders, M. W. and Endou, H. 2002. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol. Pharmacol.* 61: 729–737.
- [59] Vancoillie, G., Lambert, J., Mulder, A., Koerten, H. K., Mommaas, A. M., Van Oostveldt, P. and Naeyaert, J. M. 2000. Kinesin and kinectin can associate with the melanosomal surface and form a link with microtubules in normal human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 114: 421–429.
- [60] Verrey, F. 2003. System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflugers Arch.* 445: 529–533.
- [61] Virador, V. M., Muller, J., Wu, X., Abdel-Malek, Z. A., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Kobayashi, N., Wakamatsu, K., Ito, S., Hammer, J. A. and Hearing, V. J. 2002. Influence of alpha-melanocyte-stimulating

hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. *FASEB J.* 16: 105–107.

[62] Weissbach, L. and Kilberg, M. S. 1984. Amino acid activation of amino acid transport System N early in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* 121: 133–138.

[63] Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S. H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., Tani, Y., Taketani, Y., Uchino, H., Kim, J. Y., Inatomi, J., Okayasu, I., Miyamoto, K., Takeda, E., Goya, T. and Endou, H. 2001. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1514: 291–302.

[64] Zeng, H. and Davis, C. D. 2003. Down-regulation of proliferating cell nuclear antigen gene expression occurs during cell cycle arrest induced by human fecal water in colonic HT-29 cells. *J. Nutr.* 133: 2682–2687.

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に対し、始終適切なる御指導、ご助力を賜りました鳥取大学農学部共同獣医学科 獣医病理学教育研究分野 森田剛仁教授、麻布大学生命・環境科学部臨床検査技術学科 病理学研究室 島田章則教授、鳥取大学農学部共同獣医学科 獣医外科学教育研究分野 岡本芳晴教授、獣医画像診断学教育研究分野 今川智敬教授、獣医臨床検査学教育研究分野 竹内崇教授、鹿児島大学 共同獣医学部 獣医学科 組織病理学分野 三好宣彰教授、麻布大学附属生物科学総合研究所 落合秀治准教授、秋田県総合食品研究センター 主任研究員 畠恵司先生を始め、山口大学大学院連合獣医学研究科の諸先生方に謹んで謝意を表します。

研究に際し、貴重な症例を賜りました麻布大学附属動物病院 小動物臨床研究室 斑目広郎教授、麻布大学獣医学部獣医学科 病理学研究室 代田欣二教授、研究に協力して下さった麻布大学生命・環境科学部臨床検査技術学科 病理学研究室 納谷裕子氏に深謝致します。