

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	単一細胞内アミノ酸プロファイル解析に基づくがん細胞の環境応答性評価				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	古庄 仰
	研究分担者	所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	古庄 仰

講演題目
単一細胞内アミノ酸プロファイル解析に基づくがん細胞の環境応答性評価
研究の目的、成果及び今後の展望
がん細胞は急速な成長や増殖、また周辺環境に対する高い感受性から、細胞個々の遺伝子発現や代謝状態が異なることが知られている。細胞ごとの個性は薬剤に対する応答の差異を生み出し、耐性を持った細胞の出現が根治の困難さや再発・転移を引き起こすとして治療上の課題となっている。がんの基礎研究や創薬段階では、培養細胞に薬剤を投与し、大量の細胞から調製した抽出液を解析する手法が汎用されている。しかし、この方法では個々の細胞が持つ性質は平均化され、薬剤耐性獲得の起点となるような一部の細胞の変化を捕捉することが難しい。そのため、細胞ごとに解析を実施する一細胞分析が期待されている。我々はこれまでに主要な代謝物であるアミノ酸について、単一細胞レベルで測定する手法を開発してきた。本研究では、開発した分析法を用いて、薬剤の投与や異なる条件下での培養によるアミノ酸含量の変化について解析を実施した。 ヒトバーキットリンパ腫由来細胞株である Raji 細胞を $^{13}\text{C}_5\text{-Gln}$ を含む培地で培養し、グルタミナーゼ阻害作用のある 6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシンを投与して $^{13}\text{C}_5\text{-Gln}$ および $^{13}\text{C}_5\text{-Glu}$ の含量変動を解析した。初期検討として大量細胞から抽出液を調製し、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法で測定した結果、Gln から Glu への変換が阻害されるはずの投与群において $^{13}\text{C}_5\text{-Glu}$ が増加し、薬剤投与効果が認められなかった。一細胞分析においても同様に阻害効果は認められなかった。今後、投与量および投与時間の検討や他のアミノ酸を含めた解析等を実施し、大量細胞レベルでアミノ酸変動を観測可能な系の確立を目指す。 また、Raji 細胞培養液中のウシ血清アルブミン (FBS) 濃度を 10%または 20%に調整してそれぞれ培養し、細胞抽出液の測定および一細胞分析を実施した。細胞抽出液の測定では、各濃度について抽出液をそれぞれ 4 回調製して LC-MS/MS 法で測定した。その結果、20%濃度で培養した細胞の方がアミノ酸量が少なく、Gly、Ala、Ser、Leu など 8 種のアミノ酸で有意差が認められた。一細胞分析ではナノエレクトロスプレーイオン化-タンデム質量分析 (nanoESI-MS/MS) 法を使用し、各濃度について 4 細胞ずつ測定した。その結果、異なる FBS 濃度で培養した細胞間で含量に有意な差は認められなかったものの、抽出液と同様に 20%濃度で培養した細胞の方がアミノ酸量が少ない傾向を示し、一細胞レベルで環境の変化に伴うアミノ酸変動を捕捉できる可能性が示された。今後は、有意な差が得られなかった原因が細胞個々の性質によるものであるかを確認すべく、測定細胞数を増やした検討や苛烈な条件下で培養した細胞の分析を進める。さらに、様々な種類の培養細胞について測定を実施し、分析法の汎用性を評価すると共に、薬剤耐性獲得メカニズムの解明に向けた検討を行う。