

Ⅲ-1 細胞内ナトリウムポンプを標的とした新規血中循環腫瘍細胞抑制機構の解明

学術研究部薬学・和漢系 助教 藤井 拓人

【研究背景・目的】

植物由来の強心配糖体が血中循環腫瘍細胞 (CTC) の悪性化に関与するクラスター化を阻害することが報告され、ナトリウムポンプ (Na^+, K^+ -ATPase) が、CTC の病態生理機構に関与する可能性が示唆されているが、その分子機構の詳細は不明である。本研究では、強心配糖体を多数含むヒキガエル毒素由来生薬成分による CTC 抑制効果、および抑制機構の分子メカニズムを解明することで、ナトリウムポンプを標的とした新規 CTC 治療薬の開発につながる研究基盤を構築することを目的としている。前年度の研究において、ほぼすべての細胞の原形質膜に普遍的に存在する Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 1$ -isoform ($\alpha 1\text{NaK}$) に加えて、 Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 3$ -isoform ($\alpha 3\text{NaK}$) が様々な癌細胞の細胞内小胞に異常に発現していること、癌細胞が剥離する際に $\alpha 3\text{NaK}$ が原形質膜へ移行することで剥離 (転移) 癌細胞の生存に関与することを明らかにし (Fujii, Okumura et al., iScience, 2021)、 $\alpha 3\text{NaK}$ が CTC 抑制の標的候補分子である可能性を見出した。また強心配糖体 (ouabain) を肝癌由来 HepG2 細胞に処理し、変化する遺伝子をマイクロアレイにおいて網羅的に解析したところ、癌細胞のグルコース取込みの主要なグルコース輸送体である GLUT1 が著しく減少することを見出した。本年度は、強心配糖体による GLUT1 発現抑制機構について検討を行い、癌細胞内 $\alpha 3\text{NaK}$ を起点とする新規抗癌メカニズムを明らかにした (論文投稿中)。また、ヒキガエル由来の強心配糖体による Na^+, K^+ -ATPase を標的とした抗癌機構について検討を行った。

【方法】

細胞培養およびトランスフェクション

ヒト肝癌由来 HepG2、大腸癌由来 HT-29、胃癌由来 MKN45、口腔がん由来 KB 細胞およびラット肝癌由来 dRLH-84 細胞を実験に用いた。HepG2 細胞、KB 細胞および dRLH-84 細胞は Eagle's Minimum Essential Medium (和光純薬)、HT-29 細胞は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (和光純薬)、MKN45 細胞は RPMI 1640 (和光純薬) に、100 units/mL penicillin (和光純薬)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (和光純薬)、10% FBS を加えた培地を用いて 37°C、5% CO_2 存在下で培養した。dRLH-84 細胞へのヒト $\alpha 3\text{NaK}$ のトランスフェクションは、PEI-Max (Polysciences)を用いて行った。

ウェスタンブロット

細胞のトータルライセートを、SDS-PAGE sample buffer (2% SDS、10% glycerol、65 mM Tris-HCl (pH6.8)) および 5% β -mercaptoethanol で処理した。全量を SDS-polyacrylamide gel にアプライし、泳動した。SDS-PAGE で分離後、48 mM Tris および 39 mM glycine を含んだ溶液中で PVDF 膜に転写 (100 V で 60 分間) した。転写した PVDF 膜を 5% スキムミルクを含む TBS-T (150 mM NaCl、0.1% Tween20、25 mM Tris-HCl (pH7.4)) を用いて、室温で 1 時間ブロッキングした。一次抗体として、抗 GLUT1 抗体、抗 α 1NaK 抗体、抗 α 3NaK 抗体、抗 Xpress-tag 抗体、抗 β -actin 抗体をいずれも 1:5,000 希釈で使用した (4°C、15 時間)。二次抗体として HRP 標識した抗マウス IgG 抗体および抗ウサギ IgG 抗体を 1:5,000 希釈で使用し、室温で 1 時間インキュベーションした。Western Lightning ECL pro (PerkinElmer) を用いて化学発光させ、LAS-4000 plus system (富士フィルム) により検出した。

免疫細胞染色

24-well plate にカルチャーカバーガラス (松浪硝子) を入れ、カバーガラス上で細胞を培養した。GSDB (17% goat serum、450 mM NaCl、0.3% TritonX-100 含有 20 mM phosphate buffer pH 7.4) を用いて、室温で 1 時間インキュベーションしてブロッキングし、一次抗体を 4°C にて 16 時間反応した。洗浄した後、二次抗体を遮光状態で室温にて 1 時間反応した。DAPI 溶液 (1:1,000) 希釈で室温にて 15 分間反応させた。蛍光を観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM 700) を用いた。なお、一次抗体として、抗 GLUT1 抗体、抗 α 3NaK 抗体および抗 Xpress-tag 抗体を 1:100 希釈で用いた。二次抗体として、Alexa 488 標識抗マウス IgG 抗体または Alexa 546 標識抗ウサギ IgG 抗体を 1:100 希釈で用いた。

[³H]2-Deoxy-D-glucose (DOG) 取込み測定

HepG2 細胞を HEPES buffer (140 mM NaCl、25 mM MgSO₄、5 mM KCl、1 mM CaCl₂、20 mM HEPES-Tris (pH 7.4)) で 1 回洗浄した。HEPES buffer で 3 回洗浄し、37°C で 10 分間プレインキュベーションした後、反応溶液 (300 μ M 2-deoxy-D-glucose (2-DOG)、6 μ M [³H]-2-DOG を含む HEPES buffer) に置換し、室温にて 10 分間インキュベーションした。氷冷した洗浄溶液 (10 mM 2-DOG を含む HEPES buffer) で 1 回洗浄した。氷上において、氷冷した HEPES buffer で 2 回洗浄した。Lysis buffer を加え、室温にて 5 分間処理し可溶化した。十分に懸濁した後、液体シンチレーションカウンターにおいて β 線の測定を行った。測定したカウント数は、各サンプルにおいて同様に処理を行った細胞の細胞数で補正した。

乳酸濃度の測定

96-well plate で培養した HepG2 細胞に強心配糖体を加えて 24 時間培養した。新しいメディアウムで置換し 2 時間インキュベーションした後にメディアウム中の乳酸濃度を Lactate Assay kit-WST (同仁化学) および乳酸標準溶液 (0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 1, and 2 mM)を用いて測定した。

パッチクランプ法を用いた膜容量の測定

Patch master software (HEKA Elektronik)および EPC-10 patch-clamp amplifier (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany)を用いて HT-29 細胞のホールセル電流を測定した。ピペット溶液 (細胞内) は、110 mM CsCl, 2 mM MgSO₄, 1 mM 2Na-ATP, 1 mM EGTA, 10 mM Hepes, 15 mM NaHepes, and 50 mM mannitol (pH 7.3)、バス溶液 (細胞外; 305 mOsmol/kg H₂O) は 110 mM CsCl, 5 mM MgSO₄, 7 mM Tris, 12 mM Hepes, and 75 mM mannitol (pH 7.5) を用いた。

Na⁺,K⁺-ATPase 活性測定

Na⁺,K⁺-ATPase 活性は ATPase が ATP を加水分解して生じる無機リン酸を 320nm の比色定量し、100 μM ouabain 非存在下の活性から存在下の活性を差し引いた比活性として求めた。HT-29 細胞膜画分を、反応溶液 (115 mM NaCl, 15 mM KCl, 3 mM MgSO₄, 1 mM ATP, 5 mM NaN₃, and 40 mM Tris-HCl (pH 7.4)) で 37°C、10 分間プレインキュベーションした。20 mM Na⁺条件の際には 115 mM NaCl を、15 mM NaCl および 100 mM NMDG-Cl に置換した。3 mM ATP および 3 mM MgSO₄ を加えることにより反応を開始させ、37°C で 30 分間反応させた。反応停止液 (12% 過塩素酸, 3.6% モリブデン酸アンモニウム) を加え氷中で反応を停止し、n-butyl acetate を加え 20 秒間振とう混和後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。n-butyl acetate 層を石英セルに取り、320 nm での吸光度を測定した。

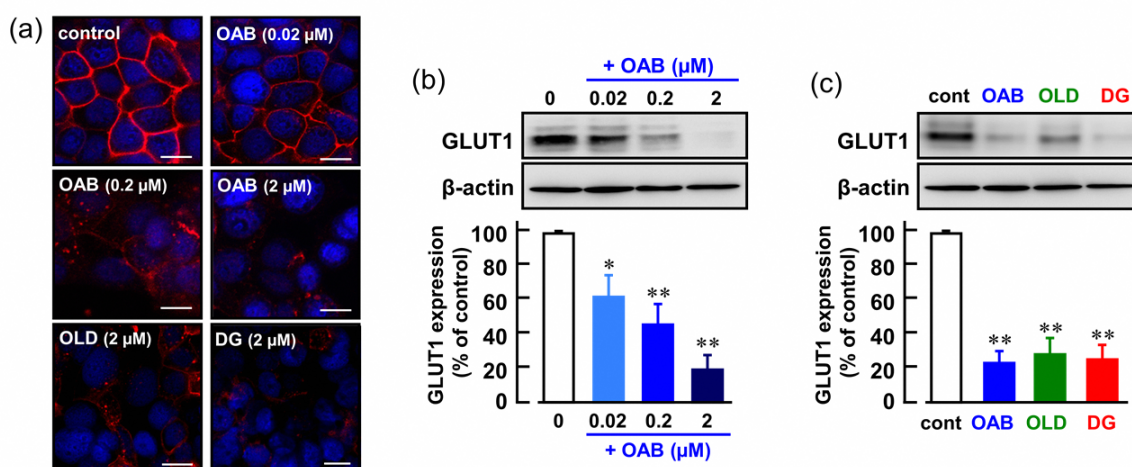
細胞増殖能測定

24-well plate 上の全細胞数をカウントすることで細胞増殖能を測定した。それぞれの well に HepG2 細胞 (2.5×10⁵ 個) を播き、2% FBS-MEM を用いて 37°C で 24 時間培養した。その後、各種強心配糖体を含む 2% FBS-MEM を用いて 37°C にて 24 時間インキュベーションし、薬物処理前と処理後の細胞数をカウントし、増殖能を評価した。

【結果】

強心配糖体によるヒト癌細胞の GLUT1 発現抑制

ヒト肝癌 HepG2 細胞において、GLUT1 の発現量に対する強心配糖体 (ouabain、oleandrin、digoxin) の影響を検討した。免疫細胞染色において、ouabain (0.02-2 μM) 処理により原形質膜における GLUT1 の発現レベルが濃度依存的に低下した (図 1a)。また、ウェスタンブロットにおいても、GLUT1 発現が ouabain の濃度依存的に低下した (図 1b)。有意な効果は低濃度の ouabain (0.02-0.2 μM) において認められた (図 1b)。また、oleandrin (2 μM) と digoxin (2 μM) 処理も GLUT1 の発現量を有意に低下させた (図 1a,c)。



HepG2 細胞における強心配糖体の GLUT1 発現に対する効果

OAB; ouabain, OLD; oleandrin, DG; digoxin, cont; control

また、強心配糖体による GLUT1 発現抑制は、他のがん細胞 (ヒト大腸癌 HT-29 細胞、胃癌 MKN45 細胞、口腔表皮がん KB 細胞) においても観察された (図 2)。

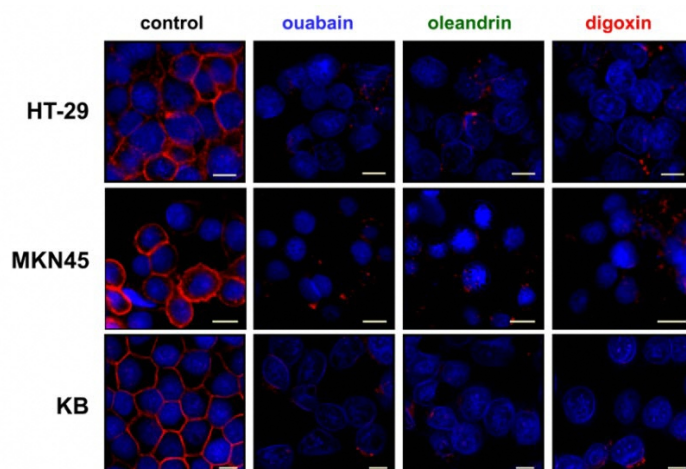


図 2. 各種ヒト癌細胞における強心配糖体の GLUT1 発現に対する効果

HepG2 細胞において、ouabain による GLUT1 発現量の減少は、エンドサイトーシスに関する dynamin の阻害剤である dynasore (150 μ M) により有意に抑制された (図 3a,b)。また、リソソーム中の液胞 H⁺-ATPase 阻害剤である bafilomycin A1 (10 nM) 処理によっても ouabain による GLUT1 発現低下は有意に抑制されたが、プロテアソーム阻害剤である MG-132 (1 μ M) では抑制されなかった (図 3c,d)。また、bafilomycin A1 処理した HepG2 細胞では、GLUT1 の細胞内での集積が観察された (図 3c)。従って、強心配糖体は、GLUT1 の dynamin 依存性のエンドサイトーシスおよびリソソームにおける分解を誘導することが示唆された。

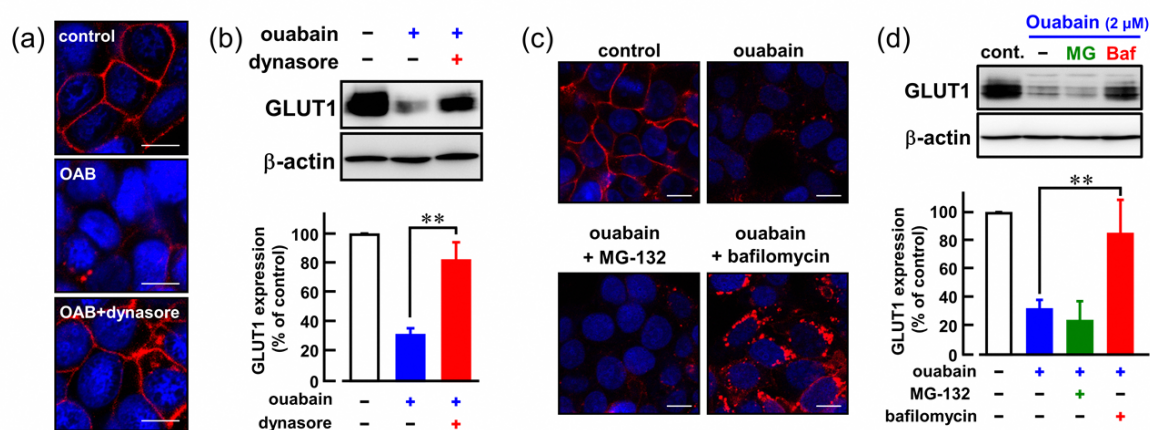


図 3. Ouabain による GLUT1 発現抑制に対する dynasore および bafilomycin A1 の効果

強心配糖体によるがん細胞のグルコースの取込みおよび解糖系の阻害

強心配糖体により原形質膜における GLUT1 発現が低下することから、次に HepG2 細胞におけるグルコース取込みに対する強心配糖体の効果を [³H] 2-deoxy-D-glucose (2-DOG)を用いて検討した。ouabain (0.02-2 μ M) は、濃度依存的に [³H]2-DOG の取込みを阻害し、低濃度 (0.02-0.2 μ M) において有意な効果が認められた (図 4a)。また oleandrin (2 μ M) と digoxin (2 μ M) も [³H]2-DOG の取込みを顕著に阻害した (図 4a)。

がん細胞の好気性解糖では最終的に乳酸が産生される。Ouabain (0.02-2 μ M) 処理により、HepG2 細胞の培養液中の乳酸濃度が濃度依存的に低下し、低濃度 (0.02-0.2 μ M) において有意な効果が観察された (図 4b)。また、oleandrin (2 μ M) と digoxin (2 μ M) も培地中の乳酸濃度を有意に抑制した (図 4b)。さらに、ouabain (0.02-2 μ M) により、HepG2 細胞の増殖が有意に抑制された (図 4c)。Oleandrin (2 μ M) と digoxin (2 μ M) 処理においても増殖が有意に抑制された (図 4c)。

従って、強心配糖体による GLUT1 エンドサイトーシスは、癌細胞におけるグルコース取込みと解糖系が抑制され増殖が阻害されることが示唆された。

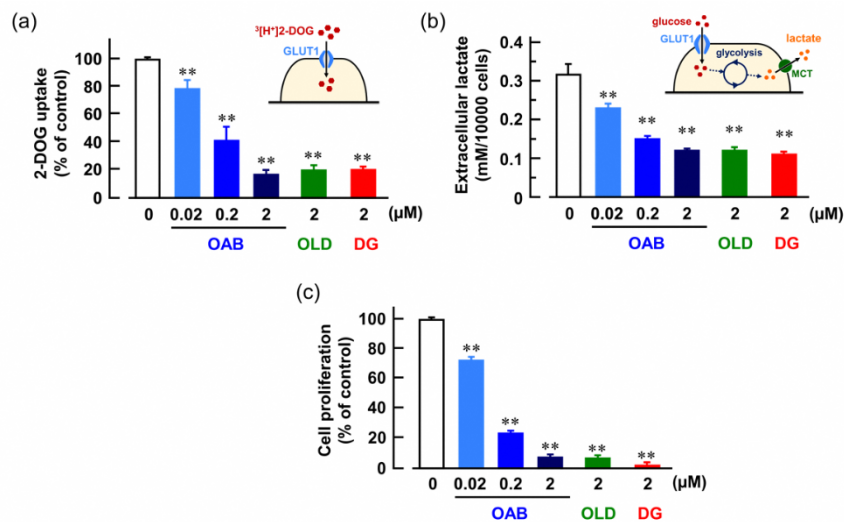


図 4. HepG2 細胞のグルコース取込み、乳酸産生および増殖に対する強心配糖体の効果

強心配糖体の GLUT1 発現抑制における $\alpha 3\text{NaK}$ の関与

$\alpha 3\text{NaK}$ の ATPase 活性は Na^+ 親和性が低く、20 mM Na^+ での活性は 100 mM Na^+ での活性の約 15% である。他方、 $\alpha 1\text{NaK}$ 活性の Na^+ 親和性は高く、20 mM Na^+ での活性は 100 mM Na^+ での活性と同程度を示す (Crambert et al, JBC, 2000)。そこで、HepG2 細胞の膜画分における Na^+, K^+ -ATPase 活性を 20 mM および 120 mM の Na^+ 条件下で測定し、GLUT1 発現抑制を示す低濃度 ouabain (0.2 μM) の効果を検討した (図 5)。 Na^+, K^+ -ATPase 活性は、20 mM Na^+ 条件下では主に $\alpha 1\text{NaK}$ によるもの、120 mM Na^+ 条件下では $\alpha 1\text{NaK}$ と $\alpha 3\text{NaK}$ の両者の活性であると考えられる。興味深いことに、0.2 μM ouabain は 20 mM Na^+ 条件下では有意な効果を示さなかったが、120 mM Na^+ 条件下において有意な抑制効果を示した (図 5)。従って、HepG2 細胞における低濃度 ouabain の効果には、 $\alpha 1\text{NaK}$ ではなく $\alpha 3\text{NaK}$ が関与している可能性が示唆された。

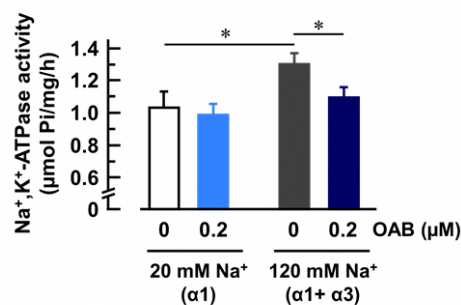


図 5. HepG2 細胞の Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する 0.2 μM ouabain の効果

次に、HepG2 細胞とは異なり $\alpha 3\text{NaK}$ の有意な発現が認められないラット肝癌 dRLH-84 細胞を用いた検討を行った (図 6a)。この細胞では $\alpha 1\text{NaK}$ と GLUT1 は HepG2 細胞

と同様に発現している (図 6a)。興味深いことに、HepG2 細胞とは異なり、dRLH-84 細胞では 2 μM の強心配糖体 (ouabain、oleandrin、digoxin) によって GLUT1 の発現量に有意な変化は見られなかった (図 6b)。

次に、dRLH-84 細胞にヒト $\alpha 3\text{NaK}$ 発現ベクターをトランスフェクションし、外因的にヒト $\alpha 3\text{NaK}$ を過剰発現させた (図 6c)。 $\alpha 3\text{NaK}$ は dRLH-84 細胞の細胞質内に局在していた (図 6d,e)。 $\alpha 3\text{NaK}$ 発現細胞と隣接する非発現細胞との GLUT1 発現量を比較したところ、ouabain 非存在下 (control) では、 $\alpha 3\text{NaK}$ 発現細胞の GLUT1 の発現量は、隣接する非発現細胞と有意な変化は観察されなかった (図 6d,f)。しかし興味深いことに、ouabain (2 μM) 処理により、 $\alpha 3\text{NaK}$ 発現細胞における GLUT1 の発現レベルが有意に減少したが、非発現細胞では減少しなかった (図 6e,f)。以上の結果より、強心配糖体による GLUT1 エンドサイトーシスに、がん細胞内に異常発現する $\alpha 3\text{NaK}$ が関与することが示唆された。

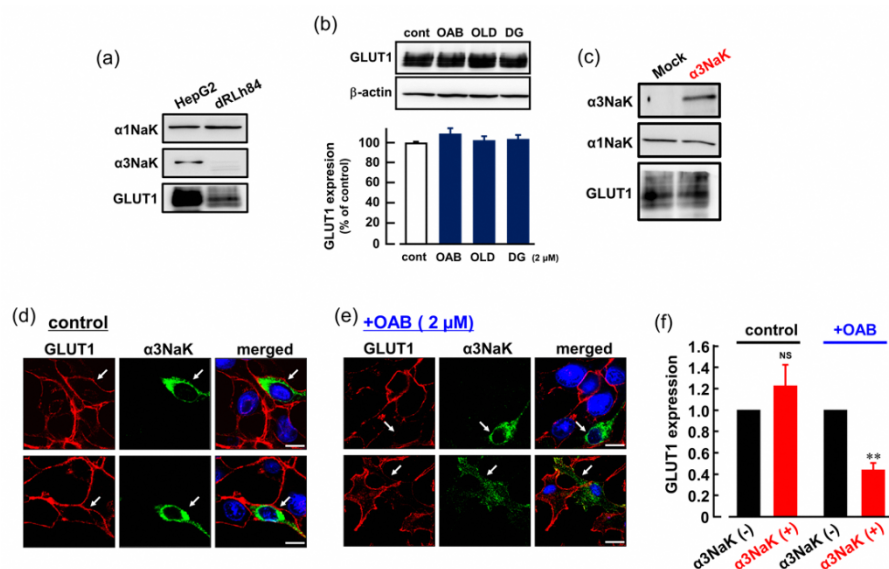


図 6. dRLH-84 細胞における $\alpha 3\text{NaK}$ の発現と GLUT1 発現に対する ouabain の効果

Ouabain による GLUT1 発現抑制における細胞内 Ca^{2+} および PI3K の関与

前年度の研究において、 $\alpha 3\text{NaK}$ はがん細胞の細胞内小胞に存在し、その小胞に SERCA3 Ca^{2+} -ATPase が存在していることを見出した (Fujii et al, iScience, 2021)。また、HepG2 細胞において $\alpha 3\text{NaK}$ は、 Ca^{2+} 放出チャネルとして機能する TPC1 と共局在していた (図 7a) ことから、 $\alpha 3\text{NaK}$ 発現小胞は Ca^{2+} ストアとして機能する可能性が示唆された。そこで、強心配糖体による GLUT1 発現抑制における細胞内 Ca^{2+} 動態変化の関与について検討した。Ouabain による GLUT1 発現抑制は、 Ca^{2+} キレート剤の BAPTA-AM (25 μM) および SERCA 阻害剤の thapsigargin (50 nM) 処理により有意に阻害された (図 7b-d)。他方、小胞体の IP3 受容体からの Ca^{2+} 輸送を阻害する 2-APB (50 μM) では、ouabain による GLUT1 発現抑制は阻害されなかった (図 7b)。従って、強心配糖体

による GLUT1 エンドサイトーシスには、 $\alpha 3\text{NaK}$ 発現小胞からの Ca^{2+} 放出が関与する可能性が示唆された。

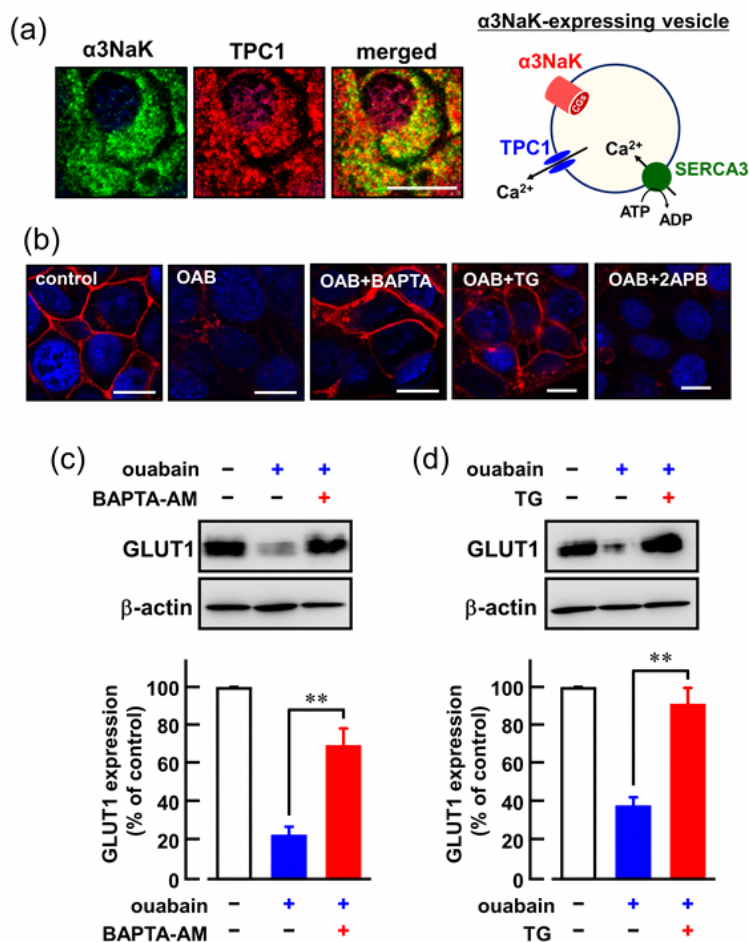


図 7. Ouabain の GLUT1 発現抑制に対する BAPTA-AM および thapsigargin (TG) の効果

また、強心配糖体による GLUT1 発現抑制機構に関与する細胞内シグナルについて薬理的解析を行ったところ、ouabain による GLUT1 発現抑制は、PI3K 阻害剤である wortmannin (50 nM および 1 μM ; 図 8a,b) および LY294002 (100 μM ; 図 8a,c) により有意に阻害された。他方、20 μM PP2 (Src 阻害剤)、20 μM PD98059 (MEK/ERK 阻害剤)、10 μM U-73122 (ホスホリパーゼ C 阻害剤)、100 nM GF109203X (プロテインキナーゼ C 阻害剤)、20 μM EUK134 (活性酸素除去剤)、10 μM genistein (プロテインチロシンキナーゼ阻害剤) では ouabain による GLUT1 のエンドサイトーシスに有意な効果は観察されなかった。(図 8a)。

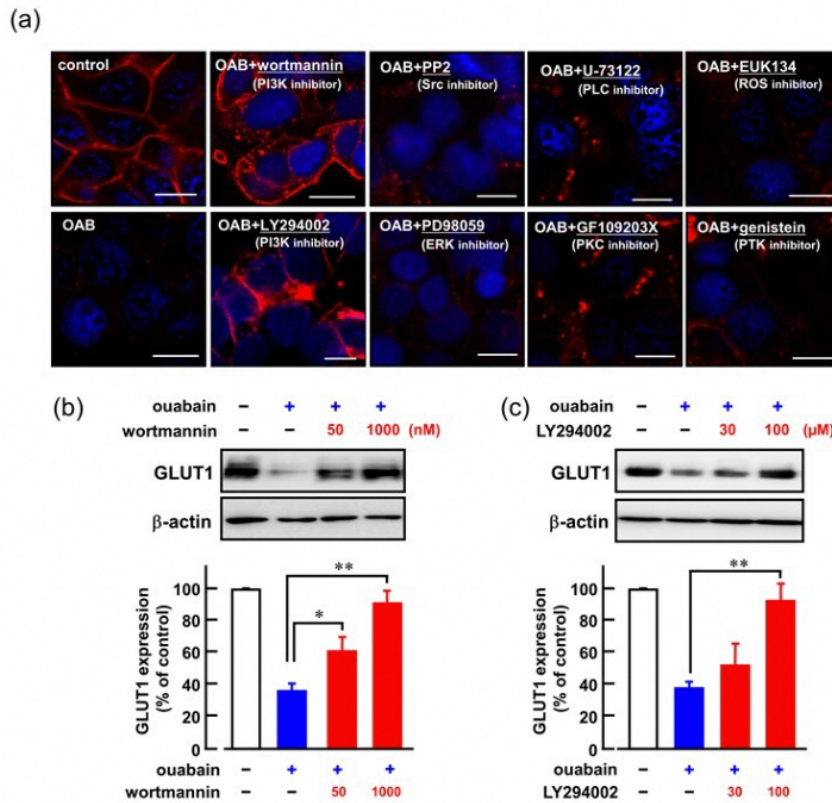


図 8. Ouabain の GLUT1 発現抑制に対する各種シグナル阻害剤の効果

以上の結果より、強心配糖体は癌細胞の細胞内小胞に存在する $\alpha 3\text{NaK}$ に作用し、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇および PI3K の活性化を惹起することで、GLUT1 の dynamin 依存的なエンドサイトーシスおよびリソソームでの分解を誘導し、癌細胞のグルコース取込み、乳酸産生および増殖を抑制するという新規癌抑制機構が明らかとなった (図 9)。

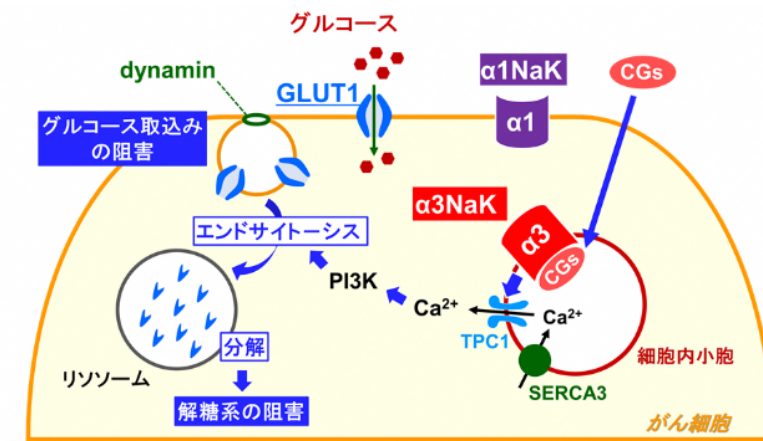


図 9. 強心配糖体による $\alpha 3\text{NaK}$ を標的とした GLUT1 発現抑制機構のモデル図

ヒキガエル毒素由来の強心配糖体による抗癌機構の解明

前年度の研究において、ヒキガエル毒素由来の強心配糖体 (bufalin、gamabufotalin、telocinobufagin、cinobufagin、cinobufotalin、resibufogenin、desacetylcinobufagin) のヒト大腸癌 HT-29 細胞の増殖能に対する効果を検討したところ、低濃度 (30 nM) において、bufalin と gamabufotalin が増殖を有意に抑制したが、他の強心配糖体は有意な効果を示さないことを見出した。300 nM では bufalin と gamabufotalin に加えて、telocinobufagin、cinobufagin、cinobufotalin が HT-29 細胞の増殖を有意に抑制したが、resibufogenin および desacetylcinobufagin では有意な効果は見られなかった。

そこで、ヒキガエル毒素由来強心配糖体の HepG2 細胞における GLUT1 の発現に対する効果を検討した。増殖抑制効果を示した bufalin、gamabufotalin および telocinobufagin を 2 μ M で処理することで GLUT1 発現抑制効果が観察されたが、2 μ M 以下では有意な抑制効果は見られなかった (図 10)。

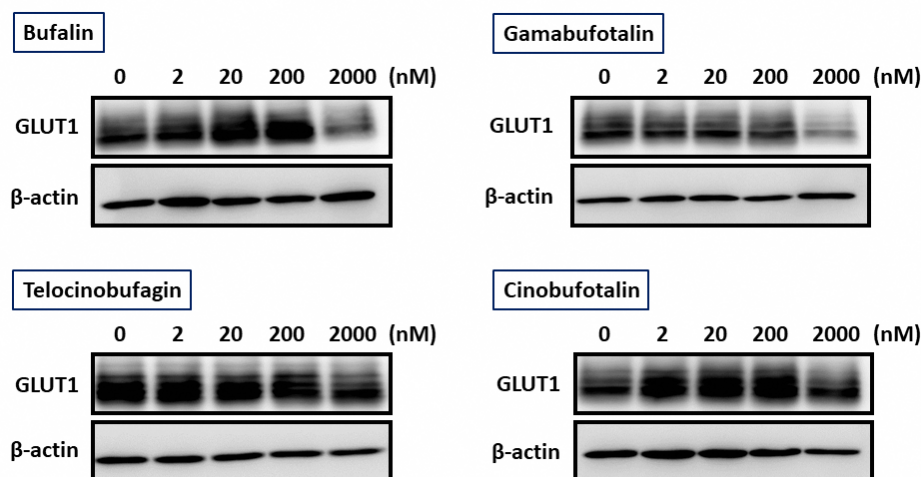


図 10.ヒキガエル毒素由来強心配糖体による GLUT1 発現に対する効果

他方、我々は低濃度 (nM レベル) の植物性強心配糖体が癌細胞の原形質膜のコレステロールに富む特殊な膜マイクロドメインに存在する α 1NaK に作用することで容積感受性アニオンチャネル (VRAC) が活性化され、抗がんシグナルが惹起されることを報告した (Fujii et al., BBA-Mol. Basis Dis., 2018)。HT-29 細胞において、ヒキガエル毒素由来強心配糖体の VRAC チャネル電流への効果についてホールセルパッチクランプ法で検討した。増殖抑制効果を示した bufalin (50 nM) および gamabufotalin (50 nM) においてチャネル電流の活性化が観察されたが他の強心配糖体では活性化は見られなかった (図 11 a)。Bufalin により活性化されたチャネル電流は、VRAC 阻害剤である DCPIB (2 μ M) により阻害された (図 11 b)。また、bufalin による VRAC 電流の活性化に対する EC₅₀ 値は約 11 nM と算出された (図 12 a,b)。

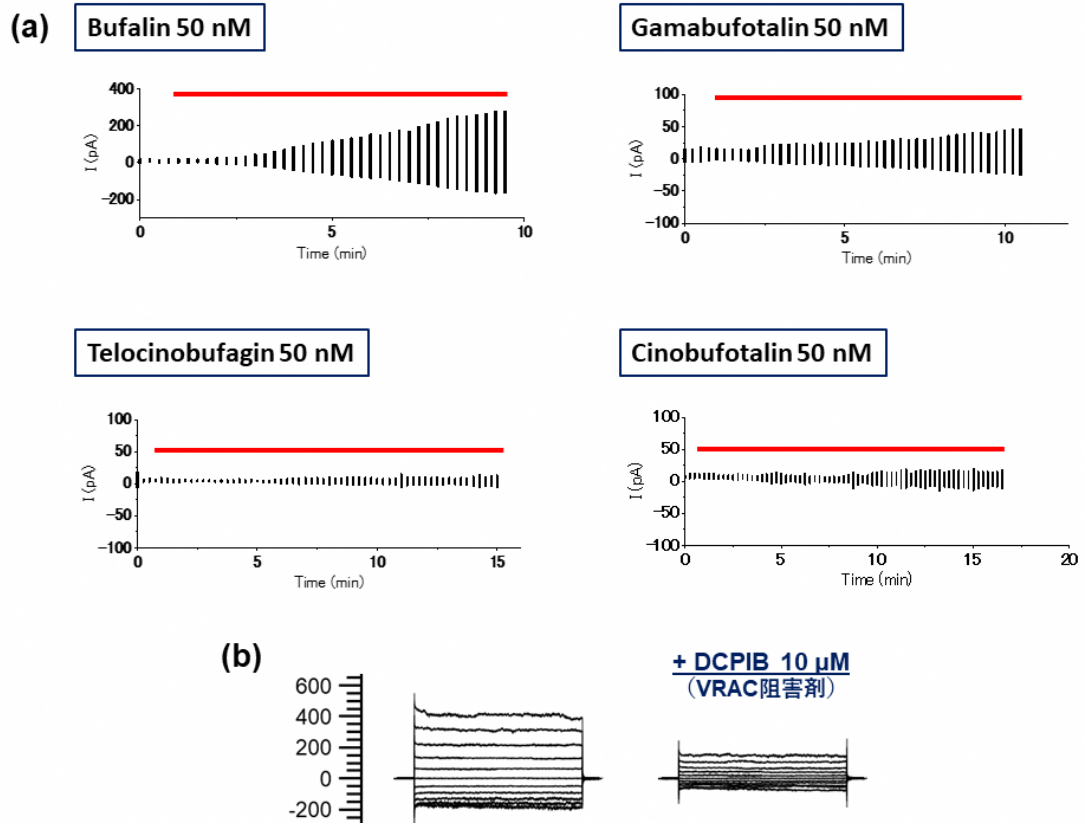


図 11. ヒキガエル毒素由来強心配糖体の HT-29 細胞の VRAC 電流に対する効果

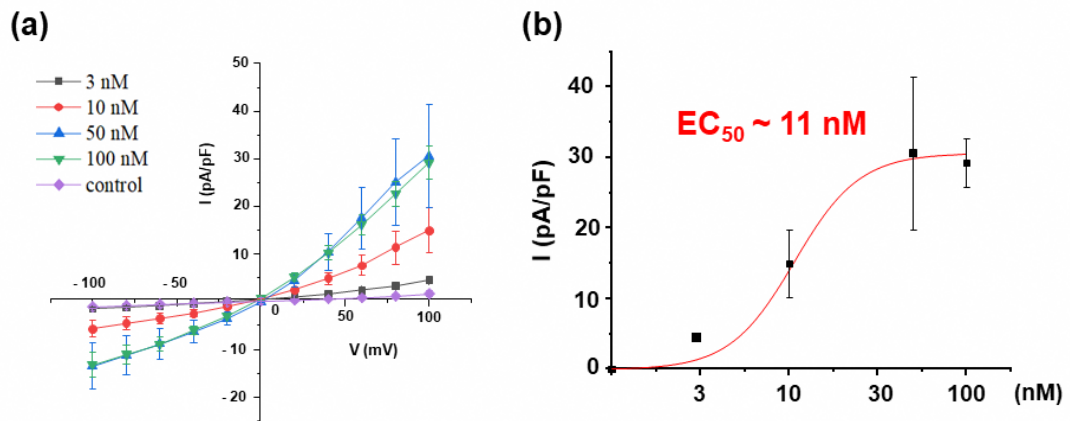


図 12. Bufalin による VRAC 電流の活性化に対する濃度依存性

【まとめと今後の展望】

本年度の研究により、CTC抑制の標的候補分子である細胞内 $\alpha 3\text{NaK}$ に強心配糖体が作用することで、癌細胞のGLUT1のエンドサイトーシスを誘導し、グルコース取込みおよび解糖系を阻害し増殖抑制を引き起こすことを見出した (Fujii et al., *J. Cell. Physiol.* リバイス中)。また、ヒキガエル毒素由来の強心配糖体であるbufalinおよびgamabufotalinが低濃度で癌細胞の膜マイクロドメインに存在する $\alpha 1\text{NaK}$ に作用することで抗癌シグナルの起点となる容積感受性アニオンチャネルの活性化を引き起こすことを見出した。

次年度の研究では、剥離(浮遊)がん細胞、奥村らが作成したCTCバイオアッセイモデルおよび癌患者の血液から単離したCTCに対するヒキガエル毒素由来強心配糖体の効果を検討し、その分子メカニズムを明らかにすることで、ナトリウムポンプが関与する新規CTC制御機構の解明および新規CTC治療法の開発につなげる。

【発表論文】

Fujii T., Shimizu T., Katoh M., Nagamori S., Koizumi K., Fukuoka J., Tabuchi Y., Sawaguchi A., Okumura T., Shibuya K., Fujii T., Takeshima H., Sakai H. Survival of detached cancer cells is regulated by movement of intracellular Na^+, K^+ -ATPase. *iScience* 24:102412, 2021.

【学会発表】

藤井 拓人, 清水 貴浩, 加藤 瑞希, 永森 收志, 小泉 桂一, 奥村 知之, 藤井 努, 竹島 浩, 酒井 秀紀. 細胞内 Na^+, K^+ -ATPase の動態変化が関与する剥離がん細胞の細胞死回避メカニズム. 生理研研究会 2021「上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出」2021年9月9日-10日.

藤井 拓人, 清水 貴浩, 加藤 瑞希, 永森 收志, 小泉 桂一, 奥村 知之, 藤井 努, 竹島 浩, 酒井 秀紀. がん細胞内小胞の Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 3$ -isoform の局在変化が関与するアノイキス回避機構. 第68回中部日本生理学会. 2021年10月15日-16日.

藤井 拓人, 加藤瑞希, 清水 貴浩, 永森 收志, 小泉 桂一, 福岡 順也, 田淵 圭章, 奥村 知之, 渋谷 和人, 藤井 努, 竹島 浩, 酒井 秀紀. Localization and function of Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 3$ -isoform in the attached and detached cancer cells. 第95回日本薬理学会年会. 2022年3月7日-9日.

藤井 拓人, 加藤瑞希, 清水 貴浩, 永森 收志, 小泉 桂一, 福岡 順也, 田淵 圭章, 奥村 知之, 渋谷 和人, 藤井 努, 竹島 浩, 酒井 秀紀. Inhibition of translocation of intracellular Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 3$ -isoform by cardiac glycosides in cancer cells. 第99回日本生理学会大会. 2022年3月16日-18日.

藤井 拓人, Oanh Nguyen Thi Tu, 清水 康晴, 清水 貴浩, 酒井 秀紀. ヒキガエル毒素由来強心配糖体のがん細胞 Na^+, K^+ -ATPase に対する効果. 日本薬学会第 142 年会. 2022 年 3 月 25 日 - 28 日.

【謝辞】

ヒキガエル毒素由来の強心配糖体をご供与頂きました救心製薬株式会社 清水 康晴様に厚く御礼申し上げます。