

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06379

研究課題名(和文)放射線抵抗性頭頸部癌に対する解糖系を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文)A novel strategy, targeting glycolytic system for radiation resistant head and neck cancer

研究代表者

宮部 淳二 (Junji, Miyabe)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60756831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌培養細胞株を用いて乳酸トランスポーターであるMCT4の発現を確認し、それらの発現を抑制することで細胞増殖能が低下することを確認した。この細胞増殖能の低下は低酸素環境下でより顕著であった。低酸素環境下でMCT4の発現上昇を認めた細胞株について、正常酸素下と低酸素下で細胞増殖能の比較を行った。MCT4の発現が低下した細胞株では低酸素環境下での細胞増殖能が低下していた。これは低酸素環境下で増大する細胞増殖能をMCT4ノックダウンにより抑制できることを示唆していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) is a transporter of lactate. I confirmed the expression of MCT4 in head and neck cancer cell lines (Fadu, Detroit562, BICR6). I used small-interfering RNA to silence its expression. I demonstrated that knock-down of MCT4 decreased cell proliferation. Hypoxic condition induced the cell proliferation in Fadu cell line. Knock-down of MCT4 suppressed the cell proliferation in hypoxic condition. It is reported that hypoxia induces radioresistance. These results suggest that knock down of MCT4 may suppress the cell proliferation of hypoxia-induced radioresistant cancer.

研究分野：頭頸部外科

キーワード：頭頸部癌 放射線抵抗性 解糖系 MCT4

1. 研究開始当初の背景

局所進行頭頸部扁平上皮癌において臓器温存を目指す標準治療はシスプラチンと放射線を併用する化学放射線療法である。しかし、低酸素環境下で生存する癌細胞は放射線抵抗性を示し遺残・再発の原因となり、その治療成績は十分に満足のものではない。治療成績の向上のためには、低酸素環境を生き延びる癌細胞を制御する新規治療法の開発が望まれる。

我々はこれまでに行った治療前 ^{18}F -FDG PET/CT を用いた化学放射線療法の予後予測の研究(図 1)から、糖代謝活性が高い腫瘍は化学放射線に対し抵抗性であるということを見いだした。放射線治療抵抗性を示す頭頸部癌に対して解糖系をターゲット(図 2)とした新規治療法の開発を目指すこととした。

図 1

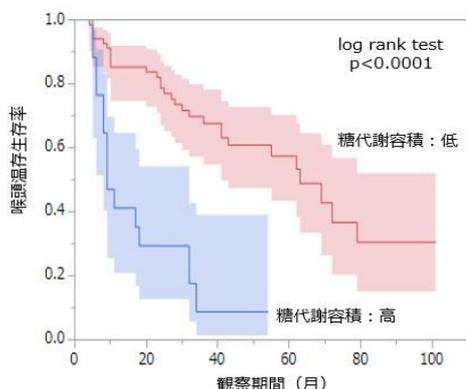
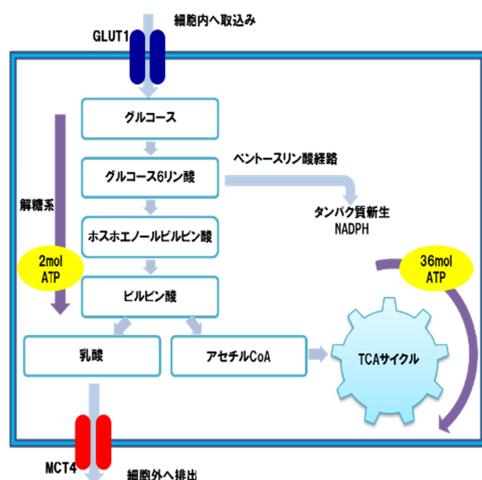


図 2



低酸素環境下の頭頸部扁平上皮癌において発現が増大する分子群をプロテオーム解析により同定し、糖代謝が予後と強く関連することから、その中で glucose を細胞内に取込むトランスポーターである glucose transporter 1 (GLUT1)に着目した。GLUT1

に関して頭頸部扁平上皮癌培養細胞株を用いた実験から、低酸素環境下でグルコースの取り込みを抑制すると放射線の効果が増強する可能性が示唆された。一方、GLUT1 は脳組織などで強く発現しており、その標的治療は重篤な合併症が生じることが懸念された。そこで今回、解糖系におけるグルコースの最終代謝産物である乳酸を細胞外に排出するトランスポーターである monocarboxylate transporter 4 (MCT4)に着目した。通常の好気性条件下の正常組織ではピルビン酸は乳酸ではなくアセチルCoAとなりTCAサイクルに入るため、MCT4の機能を抑制しても重篤な障害は生じないと考えたからである。一方、癌組織では好気性・嫌気性条件下にかかわらず解糖系が亢進している(Warburg効果)ため、MCT4の機能を抑制すると解糖系の亢進が障害され致死すると考えられた。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌の局所進行例に対する従来の標準治療は手術であるが、喉頭などの臓器が摘出されQOLが著しく低下する。そこで近年では、臓器温存を目指す標準治療としてシスプラチンと放射線を併用する化学放射線療法が汎用されている。しかし、低酸素環境下で生存する癌細胞は放射線抵抗性を示し遺残・再発の原因となり、その治療成績は満足のものではない。本研究では、低酸素環境下で亢進する糖代謝、特に解糖系に着目し、グルコースの最終代謝産物である乳酸を細胞外に排出するトランスポーターである monocarboxylate transporter 4 を標的とした新規治療法開発のための基礎研究を行い、放射線抵抗性頭頸部癌の制御を目指す。

3. 研究の方法

頭頸部扁平上皮癌培養細胞株 Fadu, Detroit562, BICR6, BICR18 およびそのシスプラチン耐性株を用い si-RNA による MCT4 の遺伝子発現ノックダウンを行い、ノックダウンによる抗腫瘍効果、放射線増感効果を評価した。また正常酸素環境下および低酸素環境下においても MCT4 ノックダウンによる抗腫瘍効果について検討を行った。

細胞生存率の評価については、MTT アッセイおよび CyQUANT Cell Proliferation Assay によりおこなった。

放射線照射による細胞の放射線感受性の評価は細胞生存率および colony formation assay により行った。アポトーシスの評価も同時に行い、これらは TUNEL 法および Caspase3 活性アッセイにより行った。

MCT4 ノックダウンが細胞周期に与える影響を検討するため、Propidium iodide を用いた核酸染色後にフローサイトメトリー解析を行い検討した。

4. 研究成果

頭頸部扁平上皮癌培養細胞株 Fadu、Detroit562、BICR6、BICR18 を用いて、MCT4 の発現の有無をウェスタンブロッティングにより確認した。上記 4 細胞株のうち 3 細胞株 (Fadu、Detroit562、BICR6) において MCT4 の発現が確認できた。また siRNA を用いることによって MCT4 の発現がノックダウンできることをウェスタンブロッティングにより確認した。

続いて Fadu について MCT4 ノックダウンによる細胞増殖能への影響を検討した。MCT4 ノックダウンにより細胞増殖能が低下すること、低酸素環境下ではより顕著な増殖能の低下を認めることを確認した。

MCT4 ノックダウンにより乳酸の細胞外への排出が低下すると考えられたが、細胞内の乳酸濃度はコントロールと比し有意差を認めなかった。細胞外の乳酸濃度はノックアウト群で有意に低下していた。

正常酸素下と低酸素下での細胞増殖の違いについて検討を行った。Fadu において低酸素下で有意な細胞増殖能の上昇を認めた。MCT4 をノックダウンして比較した結果、低酸素下で認めた細胞増殖能の増大は認めなかった。これは低酸素環境下で増大する細胞増殖能を MCT4 ノックダウンにより抑制できることを示唆していると考えられる。

頭頸部癌細胞株の放射線感受性についても検討を行った。放射線照射に MCT4 ノックダウンを併用すると放射線単独の場合と比べ有意な細胞生存率の低下が認められると考えられたが、放射線照射のみで死滅してしまう細胞が多く十分な評価ができないため、今後は詳細な条件設定が必要と考えられた。TUNEL 法および Caspase3 活性アッセイによるアポトーシスについての評価も行うことができなかった。

MCT4 ノックダウンが細胞周期に与える影響を検討するため、Propidium iodide を用いた核酸染色後にフローサイトメトリー解析を行った。MCT4 ノックダウンが与える影響を細胞周期の観点から検出することはできなかった。これは siRNA によるノックダウンの効果が不十分であった可能性が考えられた。

本研究の問題点は、siRNA により MCT4 以外の遺伝子の発現が抑制される可能性があること、即ちオフターゲット効果である。オフターゲット効果をできる限り回避するため、siRNA を複数設計し同様の結果が得られるかどうかを今後検討する必要があると考えられた。

本研究のもう一つの問題点は、siRNA を用いた MCT4 発現抑制の実験系であることである。siRNA を用いた遺伝子発現抑制の実験系では、目的遺伝子の存在を 100% 消失させることはできず、またその発現抑制も一時的なものである。今回の MCT4 ノックダウンによる細胞生存率の評価においても、siRNA による遺伝子ノックダウン後、おおよそ 48 時間

から 72 時間までの間は、ノックダウンによると思われる細胞生存率の抑制が認められたが、72 時間以降は抑制効果が低下しているという結果が得られた。これらの結果は、siRNA による遺伝子発現効果が一時的であることのみから生じたとするには、検討が不十分な状況であるが、可能性としては十分に考えられる。

今後は、MCT4 を遺伝子ノックアウトする実験系を検討している。具体的には CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR-associated Proteins 9) システムを用いて遺伝子ノックアウトを行うことを検討している。今後導入を検討している CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子ノックアウトは、siRNA と異なりそのノックアウト効果が完全かつ永続的である。従って、MCT4 ノックアウトにより生じる一連の遺伝子発現変化や代謝産物の変化をより正確に評価することができると考えられる。

本研究で、頭頸部扁平上皮癌培養細胞株 (Fadu、Detroit562、BICR6) で MCT4 の発現を確認し、siRNA による遺伝子ノックダウンにより細胞増殖能が低下することを確認した。また MCT4 ノックダウンによる細胞増殖能抑制効果は、正常酸素環境下より低酸素環境下でより強く生じる可能性が示された。また MCT4 ノックダウンにより癌細胞の放射線感受性が高まる可能性が示唆された。一方で、siRNA を用いた遺伝子ノックダウンの実験系では、MCT4 を標的とした新規治療法の基礎的研究に必要なとされる十分な評価および検討ができない可能性が示され、今後施行していく研究の指針や問題点を本研究により得ることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮部 淳二 (Junji Miyabe)
大阪大学医学部附属病院 医員
研究者番号：60756831