

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15720

研究課題名(和文) 解糖系を標的とした頭頸部癌に対する新規治療法の実現可能性の検証

研究課題名(英文) Development of MCT4-targeted therapy

研究代表者

猪原 秀典 (INOHARA, HIDENORI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00273657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌の糖代謝では解糖系が亢進しており、解糖系は癌の治療標的となる可能性がある。我々は解糖系の最終経路で乳酸を細胞外に排出するMCT4に着目し、MCT4を標的とした治療の可能性を検証した。MCT4ノックアウトマウスを作製したところ運動能の低下など重篤な表現型を認めず、MCT4標的治療は許容されることが示された。一方、頭頸部扁平上皮癌培養細胞株を用いMCT4の発現をCRISPR/Cas9遺伝子編集システムを用いてノックアウトした実験系を現在開発中であり、今後この系を用いてMCT4を抑制すると放射線感受性が高まるかなど様々な検証を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Malignant tumors exhibit increased dependence on glycolysis, resulting in abundant production of lactic acid, which is transported to the extracellular by MCT4. We sought to access the possibility of MCT4-targeted therapy. To this end, we developed MCT4 knockout mice, which displayed no severe phenotype, suggesting that the MCT4-targeted therapy would be feasible. We are currently making MCT4 knockout cell lines of head and neck squamous cell carcinoma, which will allow us to do a series of experiment to verify the usefulness of MCT4-targeted therapy, such as increment of radiation sensitivity.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：解糖系 MCT4 ノックアウト 頭頸部扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、治療前 ^{18}F -FDG PET/CT で測定される metabolic tumor volume (MTV, 糖代謝活性が亢進している腫瘍の体積) が化学放射線療法の一次治療効果と相関することを明らかにした (Hanamoto A, et al. *Cancer Med.* 3: 1368-76, 2014.). 更に、化学放射線療法で加療した本来は喉頭全摘を要する局所進行喉頭・下咽頭癌を解析し、原発巣 MTV は粗生存率・喉頭温生存率と相関する独立した予後因子であり、T 分類より遥かに有用であることを明らかにした (Miyabe J, et al. *Cancer Sci.* 108:2030-8, 2017.). これらの結果は、糖代謝活性が高い腫瘍は化学放射線に抵抗性であることを示唆している。

一方我々は、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、上述の如く糖代謝が予後と強く相関することから、その中でグルコース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。そして *in vitro* 実験系を用い、GLUT1 をロックダウンしグルコースの取込みを抑制すると、特に低酸素環境下で放射線への感受性が増大することを明らかにした。これら一連の知見は、糖代謝を標的とした治療を併用することにより放射線抵抗性の癌細胞を制御し得ることを示唆している。

しかし、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を生じる懸念がある。そこで我々は、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 monocarboxylate transporter 4 (MCT4) に着目した (図 1)。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が障害されると考えた。そこで予備実験として *in vitro* 実験系を用い、MCT4 をロックダウンすると乳酸の細胞外への排出が低下し、特に低酸素下での放射線感受性が増大することを確認した。この結果は MCT4 が癌治療において期待のもてる標的分子であることを示唆するものである。しかし、MCT4 を標的とした治療により癌以外の組織が障害され重篤な合併症状が生じる可能性を否定できないため、その検証が必要である。

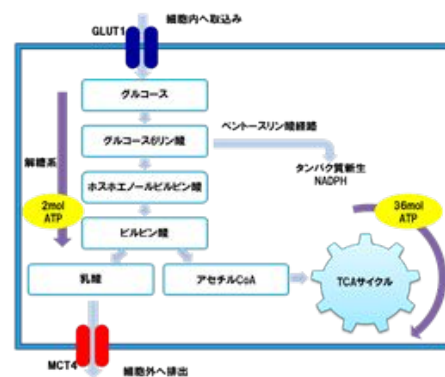


図 1. 糖代謝経路

2. 研究の目的

MCT4 標的治療の併用により放射線の治療効果を劇的に向上し得る可能性があることから、本研究では MCT4 標的治療の実現可能性について検証する。具体的には、MCT4 ノックアウトマウスを作製してその表現型を調べることにより、MCT4 標的治療により各臓器に重篤な障害が生じないことを検証する。特に、虚血下の心筋、運動負荷時の骨格筋では乳酸排出のため MCT4 の発現が増大することから、MCT4 ノックアウトによる心機能、運動能の変化について調べる。こうした表現型は MCT4 標的治療により生じる副作用に近似していると考えられる。

MCT4 ノックアウトマウスを作製すると同時に、胎生致死や運動障害などの重篤な問題が生じた場合に備えて、MCT4 コンディショナ

ルノックアウトマウスも作製することとする。心筋虚血・運動負荷という条件下以外で重篤な表現型が出現しなければ、MCT4 標的治療の実現に向けて更に研究を進展させ得ることとなり、その意義は大きい。万一重篤な表現型が出現した場合も、様々な条件下で各臓器や血液のメタボローム解析を行うことにより MCT4 に代わる解糖系の標的分子を明らかにし得る意義がある。

3 . 研究の方法

大阪大学医学部附属動物実験施設・生殖工学ユニットにおいて loxP-MCT4 ノックインマウス作製を行った。CRISPR - Cas9 システムを用いて C57B6 マウスから作製した。MCT4 のスタートコドンを含む exon は exon3 であるため exon4 を挟む領域を認識するように gRNA を設計した。ターゲット配列と loxP 挿入部位を図 2 に示す。



図 2. gRNA の設計

4 . 研究成果

上記の通り設計した MCT4 exon4 をターゲットとした CRISPR - Cas9 と flox 配列を含んだ 1 本鎖 DNA 断片を 2 分裂期の胚細胞に同時にマイクロインジェクションすることにより、MCT4 exon4 をターゲットとした flox ノックインマウスを作製した。また、同領域が large deletion された MCT4 exon4 ノックアウトマウスも作製した。得られた F0 マウスのジェノタイピングの結果を図 3 に示す。

F0 マウスとして 15 系統作成したが、F1 マウスのジェノタイピングにより flox ノックインマウスは 1 系統、ノックアウトマウスは 1 系統を得ることができた（図 3 でそれぞれ # 13 と # 5 に相当する）。他の 13 系統はすべてモザイクマウスであった。

得られたマウスの loxP-MCT4 ノックインマウスは不妊と死産が続き、F1 マウスは 3 匹得られることができたが、現在までに F2 マウスが得られていない状況である。今後安定してホモノックインマウスが得られるようになれば UBC Cre-ERT2 マウスを Jackson Laboratory から購入し、MCT4 コンディショナルノックアウトマウスを作製する予定である。

一方、MCT4 ノックアウトマウスは現在 F4 まで継代しており、ホモノックアウトマウスを 51 匹得ることができ、胎生致死は認めなかった。ホモノックアウトマウスは、SPF 管理環境下において野性型マウスと比較して明らかな運動能の低下を認めず、特に問題なく成長している。今後ホモノックアウトマウスの各臓器における表現型解析ならびにメタボローム解析を行っていく予定である。

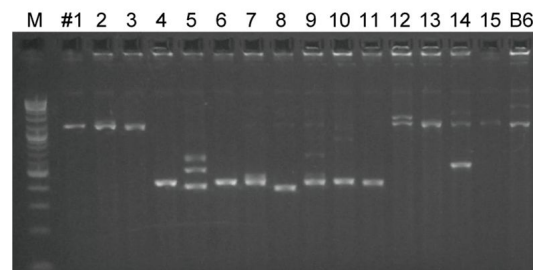


図 3. F1マウスのジェノタイピング

現時点では MCT4 ノックアウトマウスを作製に成功したものの、その詳細な解析は未だこれからの段階である。しかし、MCT4 ノックアウトマウスが野性型マウスと同様に発育していることは、MCT4 をノックアウトしても筋をはじめとする各臓器で代償機構が働き、細胞内に乳酸が蓄積することなく排出されていることを意味している。即ち、MCT4 標的治療を行っても、正常組織に重篤な合併症が発現するリスクが低いことを意味している。今後は MCT4 ノックアウトマウスの詳細な解析を進めるとともに、癌細胞を対象に MCT4 ノックアウトを行い、増殖が抑制されること、

放射線感受性が増感すること、その分子機構を明らかにし、MCT4 標的治療の実現に向けて進む予定である。

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

無し

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

猪原 秀典 (INOHARA, Hidenori)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 00273657

(2) 研究分担者

巽 光朗 (TATSUMI, Mitsuaki)

大阪大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 60397700

谷山 義明 (TANIYAMA, Yoshiaki)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 60372611

中川 崇 (NAKAGAWA, Takashi)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号 : 40610374

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し