

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19942

研究課題名(和文) 消化器癌におけるPPAR アゴニストの代謝関連蛋白質制御機構解明と新規治療の開発

研究課題名(英文) Developments of novel treatments based on inhibiting glycolysis with PPARG agonist

研究代表者

澤山 浩 (SAWAYAMA, Hiroshi)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40594875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌細胞株に対し、糖の取り込みを行うGLUT1の発現を抑制したところ、20-70%の増殖抑制を認めた。その機序は、食道癌の悪性度に関係する遺伝子(CDK6)の発現低下、細胞周期を調節する遺伝子(p21、p27)の発現上昇であった。GLUT1の発現抑制後、PKM2遺伝子の発現低下、抗癌剤耐性に関与するLDHAの発現低下を認め、PPPAGの発現は上昇した。GLUT1発現抑制によりCDDPの感受性が向上した。新規GLUT1阻害剤は低濃度にて強力な抗腫瘍効果を示し、抗癌剤(CDDP)との併用にて相加効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR) is a tumor suppresser gene. Glucose transporter type 1 (Glut1) plays a crucial role in cancer specific metabolism to adapt to the rapid growth and tumor microenvironment. The proliferation of the esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell lines were inhibited (20-70%) using small interfering (si) iRNA for GLUT1. CDK6 mRNA level significantly reduced and p27 kip mRNA level significantly increased after si-RNA for GLUT1. The anti-proliferative effect of low dose cisplatin was not detected in TE11 after control si-RNA, however low dose cisplatin exerted anti-proliferative effect after si-RNA for GLUT1. PKM2 and LDHA mRNA levels which are associated with glycolysis significantly decreased and PPAR mRNA levels increased. The new GLUT1 inhibitor exerted a strong antitumor effect with low concentration and an additive effect with combined with cisplatin.

研究分野：消化器外科

キーワード：PPAR GLUT1 GLUT1阻害剤 CDK6 抗癌剤感受性 細胞周期 Warburg effect 癌代謝

1. 研究開始当初の背景

癌特異的なエネルギー代謝に関連する蛋白の発現が消化器癌における予後因子として同定され、抗癌剤耐性との関係が示され、嫌気性代謝関連蛋白を阻害する低分子化合物が抗腫瘍効果を有することを報告した。乳癌細胞においては、嫌気性代謝に関連する遺伝子として、LDHA の発現が予後と関係しており、抗癌剤耐性に影響を及ぼすことが報告された。また、直腸癌においては、嫌気性代謝関連蛋白である GLUT1、LDHA、PDK1、HIF1A のなかで、GLUT1 の発現と化学放射線治療の治療効果の関係が報告されている。PPAR の転写活性の変化により、代謝関連蛋白の発現が大きく変化すると考えられるため、食道癌、大腸癌、膵癌において、PPAR agonist と新規糖代謝関連蛋白阻害剤の併用療法により PPAR agonist の抗腫瘍効果が相乗的に増強する可能性あると考えられる。

PPAR agonist 投与により、血清の adiponectin 濃度が上昇することが報告された。adiponectin は、グルコース輸送タンパクである GLUT4 を細胞膜に移行させ、インスリン抵抗性を改善させる。食道癌患者において、adiponectin の血清レベルは、健常者に比較して低下しており、さらに腫瘍の進行とともに低下することが示された。ゆえに、adiponectin の発現低下と共に、GLUT 4 を介した糖代謝の変化が起こっている可能性が考えられる。一方、我々は GLUT 1 の高発現が食道扁平上皮癌の腫瘍深達度、静脈浸潤と相関し、予後不良因子であることを示した。GLUT の発現変化、糖代謝関連酵素の発現変化が腫瘍の進展に大きく関与していると考えられる。しかし、PPAR agonist が糖代謝関連遺伝子の発現に与える影響に関しては不明な点が多い。PPAR agonist の転写活性マーカーとして PDK4 (Pyruvate dehydrogenase kinase 4) の転写活性を測定するのが一般的である。PDK1 は胃癌において予後不良因子と報告された。糖代謝関連酵素は、Positive feedback を受けており、相互に作用している。インスリン抵抗性改善薬として臨床応用される PPAR agonist および、GLUT1 阻害剤の相互関係は不明であり、その作用機序を解明することが新規治療法開発に寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

GLUT1 発現抑制により糖の取り込みを抑えることにより、PPAR の発現変化を明らかにする。GLUT1 発現抑制による食道扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果、作用機序を解明する。さらに GLUT1 発現抑制によるシスプラチンとの相加効果、嫌気性代謝蛋白の変化を測定する。解析結果に基づいて、GLUT1 阻害剤の抗腫瘍効果を示す。糖代謝関連蛋白阻害剤を用いた抗癌剤耐性症例に対する新規治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

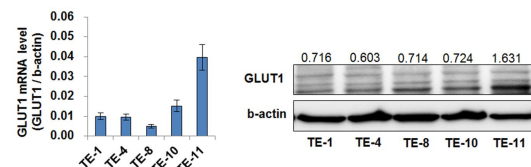
食道癌細胞株に対して siRNA を用いて GLUT1 の発現を抑制後に、増殖抑制効果を測定する、GLUT1 の発現を抑制後に、その機序を解析する。GLUT1 の発現を抑制した後に PPAR の発現の変化を測定する。GLUT1 発現抑制後の糖代謝関連遺伝子の発現変化を解析し、GLUT1 発現抑制後の抗癌剤感受性の変化を測定する。新規 GLUT1 阻害剤を用いて、食道扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果、抗癌剤との併用効果を示す。

4. 研究成果

GLUT1 の発現抑制による抗腫瘍効果

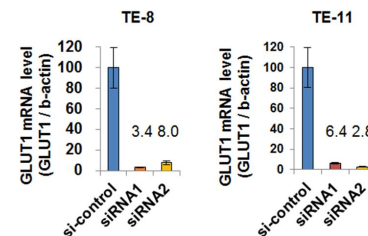
5 種類の食道扁平上皮癌細胞株の GLUT1 の発現を測定したところ、GLUT1 の蛋白発現を認め、mRNA と蛋白発現レベルは関係した。

食道扁平上皮癌の GLUT1 mRNA と蛋白レベル



GLUT1 蛋白発現レベルの高い TE-11、中等度の発現を認めた TE-8 に対して、siRNA を用いて蛋白発現を抑制した。

siRNA を用いた GLUT1 mRNA の変化



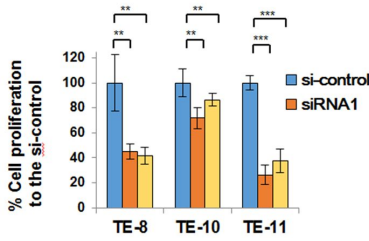
siRNA を用いた GLUT1 蛋白の変化



食道癌細胞株 4 種類 (TE8, TE10, TE11) に si-RNA を用いて GLUT1 の発現を抑制したところ、(43.3%, 79.1%, 31.8%) の増殖抑制効果

を認めた。

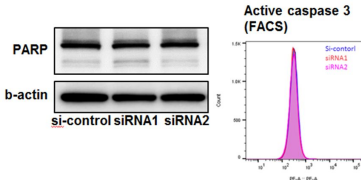
GLUT 発現抑制後の増殖抑制効果 (48h 後)



GLUT1 の発現抑制による抗腫瘍効果の機序

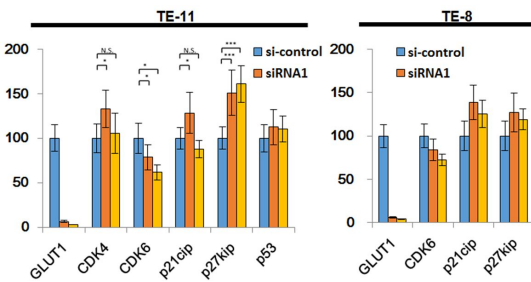
GLUT1 高発現株である TE-11 において、アポトーシス関連蛋白である PPAR の蛋白発現および Active caspase 3 の発現変化を確認したが、アポトーシスは認めなかった。

GLUT1 発現抑制後の PARP、Caspase3 の変化 (TE-11)



増殖抑制を示すメカニズムとして、細胞周期関連遺伝子 (CDK4, CDK6, p15, p16, p21cip, p27kip, p53, RB, DAB2IP) の発現変化を測定したところ、TE-11 において CDK6 の発現が低下し、p27 kip の発現が上昇した。TE-8 においても、CDK6 および p27 kip の発現上昇が確認された。

GLUT1 発現抑制後の細胞周期関連遺伝子の発現の変化

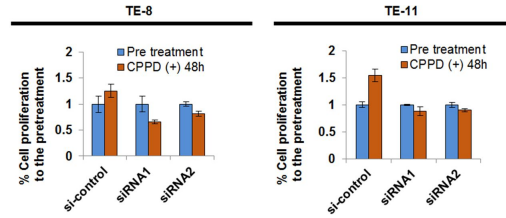


GLUT1 の発現変化は MAPK により抑制されていると報告されたが、GLUT1 発現抑制後の AKT pathway, MAPK pathway のリン酸化を調べたところ、ERK の脱リン酸化を認めた。

GLUT1 の発現抑制による抗癌剤の感受性変化

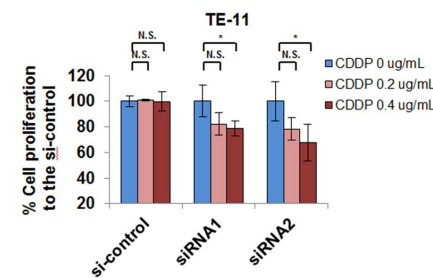
GLUT1 の発現抑制後にシスプラチンを投与したところ、TE-8、TE-11 において抗腫瘍効果は増強した。

GLUT1 発現抑制後のシスプラチン抗腫瘍効果



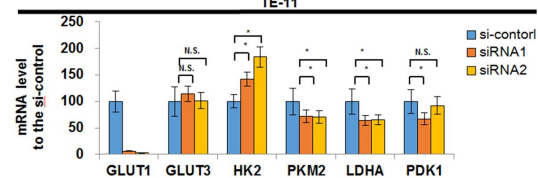
GLUT1 高発現株である TE-11 において、低濃度のシスプラチン (0.2 μg/ml, 0.4 μg/ml) においても抗腫瘍効果を示し、抗癌剤感受性が改善した

GLUT1 発現抑制後のシスプラチン感受性変化



GLUT1 高発現の TE-11 に対し、GLUT1 の発現を抑制後、代謝関連酵素の発現を測定したところ、GLUT3 の変化は認めなかったが、PKM2, LDHA の有意な発現低下を認め、GLUT1 発現抑制による解糖系の制御が示唆された。

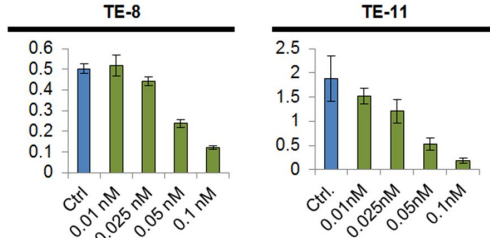
GLUT1 発現抑制後の糖代謝関連遺伝子の変化



新規 GLUT1 阻害剤の抗腫瘍効果

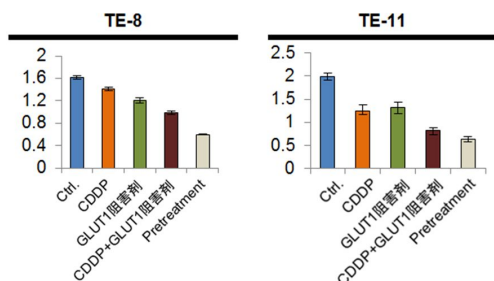
新規 GLUT1 阻害剤を用いて治療効果を測定したところ、0.1nM と低濃度の GLUT1 阻害剤にて強力な増殖抑制効果を認めた。

新規 GLUT1 阻害剤の抗腫瘍効果



新規 GLUT1 阻害剤とシスプラチンを併用投与したところ、相加効果を認めた。

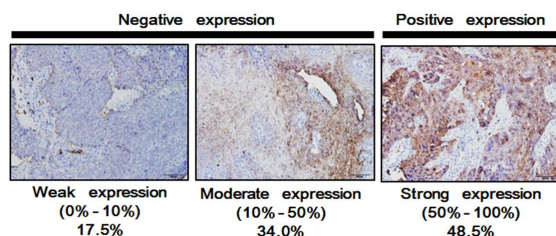
新規 GLUT1 阻害剤とシスプラチンの併用効果



臨床検体を用いた GLUT1 発現と抗癌剤の効果

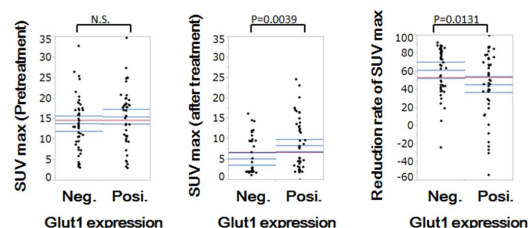
臨床的リンパ節陽性の食道扁平上皮癌患者の原発巣生検サンプルを用いて GLUT1 の免疫染色にて発現を評価したところ、GLUT1 陽性は 48.5% に認められた。

生検サンプルの GLUT1 免疫染色



GLUT1 高発現症例は、化学療法施行前後の SUVmax 減少率が有意に低く抗癌剤治療効果が低いことが示された。さらに手術施行症例においても同様の結果が示された。

GLUT1 発現と化学療法前後の SUVmax 減少率



以上の結果より、食道扁平上皮癌において GLUT1 発現を制御することで、MAPK、p27、CDK6 の発現が変化し増殖抑制効果を示した。PKM2、LDHA の発現が低下し、シスプラチンの感受性が改善した。新規 GLUT1 阻害剤によって、食道扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果、シスプラチンとの相加効果が示された。臨床検体にて GLUT1 高発現症例では抗癌剤抵抗性を示した。抗癌剤抵抗性を示す症例に対する GLUT1 阻害剤を用いた新たな治療法の可能性が示された。

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 15 件)

Yoshida N, Tamaoki Y, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Iwatsuki M, Shono T, Miyamoto H, Imuta M, Kurashige J, Sawayama H, Tokunaga R, Watanabe M, Sasaki Y, Yamashita Y, Baba H: Incidence and risk factors of synchronous colorectal cancer in patients with esophageal cancer: an analysis of 480 consecutive colonoscopies before surgery. *Int J Clin Oncol*. 2016 Dec;21(6):1079-1084. 査読有
doi: 10.1007/s10147-016-1015-8

Yamamura K, Baba Y, Nakagawa S, Mima K, Miyake K, Nakamura K, Sawayama H, Kinoshita K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamoto Y, Yamashita Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H: Human microbiome *Fusobacterium nucleatum* in esophageal cancer tissue is associated with prognosis. *Clin Cancer Res*. 22(22):5574-5581, 2016. 査読有
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1786.

Sawayama H, Miyanari N, Morita K, Matsumoto K, Mizumoto T, Kubota T, Haga Y, Baba H: Surgical management of partial dentures in the cervicothoracic esophagus. *Esophagus* 13(3):270-275, 2016. 査読有
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10388-016-0524-x.pdf>

Izumi D, Ishimoto T, Miyake K, Sugihara H, Eto K, Sawayama H, Yasuda T, Kiyozumi Y, Kaida T, Kurashige J, Imamura Y, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Takamori H, Araki N, Tan P, Baba H: CXCL12/CXCR4 activation by cancer-associated fibroblasts promotes integrin ss1 clustering and invasiveness in gastric cancer. *Int J Cancer* 138(5):1207-19, 2016. 査読有 doi: 10.1002/ijc.29864

Mima K, Ogino S, Nakagawa S, Sawayama H, Kinoshita K, Krashima R, Ishimoto T, Imai K, Iwatsuki M, Hashimoto D, Baba Y, Sakamoto Y, Yamashita YI, Yoshida N, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H: The role of intestinal bacteria in the development and progression of gastrointestinal tract neoplasms. *Surg Oncol*. 2017 Dec;26(4):368-376. 査読有
doi: 10.1016/j.suronc.2017.07.011

Sawayama H, Yoshida N, Miyamoto Y, Uchihara T, Toihata T, Yagi T, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Baba Y, Baba H: Primary colonic

well-differentiated / dedifferentiated liposarcoma of the ascending colon: a case report. *Surg Case Rep.* 2017 Aug 30;3(1):96. 査読有 doi: 10.1186/s40792-017-0373-4

Sawayama H, Miyanari N, Sugihara H, Iwagami S, Mizumoto T, Kubota T, Haga Y, Baba H: A fascia lata free flap in pelvic exenteration for Fournier gangrene due to advanced rectal cancer: a case report. *Surg Case Rep.* 2017 Dec;3(1):74. 査読有 doi: 10.1186/s40792-017-0350-y

Mima K, Nakagawa S, Sawayama H, Ishimoto T, Imai K, Iwatsuki M, Hashimoto D, Baba Y, Yamashita YI, Yoshida N, Chikamoto A, Baba H: The microbiome and hepatobiliary-pancreatic cancers. *Cancer Lett.* 2017 Aug 28;402:9-15. 査読有 doi: 10.1016/j.canlet.2017.05.001

Yoshida N, Harada K, Baba Y, Kosumi K, Iwatsuki M, Kinoshita K, Nakamura K, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Karashima R, Mima K, Sawayama H, Ohuchi M, Chikamoto A, Imamura Y, Watanabe M, Baba H: Preoperative controlling nutritional status (CONUT) is useful to estimate the prognosis after esophagectomy for esophageal cancer. *Langenbeck Archiv Surg* 402(2):333-41, 2017. 査読有 doi: 10.1007/s00423-017-1553-1

Sawayama H, Iwatsuki M, Kuroda D, Toihata T, Uchihara T, Koga Y, Yagi T, Kiyozumi Y, Eto T, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Baba Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H: Total iron-binding capacity is a novel prognostic marker after curative gastrectomy for gastric cancer. *Int J Clin Oncol.* 2018 Apr 9. 査読有 doi: 10.1007/s10147-018-1274-7

Sawayama H, Ishimoto T, Baba H: Microenvironment in the pathogenesis of gastric cancer metastasis. *J Cancer Metastasis Treat* 2018;4:10. 査読有 Doi:10.20517/2394-4722.2017.79

Kiyozumi Y, Yoshida N, Ishimoto T, Yagi T, Koga Y, Uchihara T, Sawayama H, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Baba Y, Miyamoto Y, Watanabe M, Matsuyama T, Oya N, Baba H: Prognostic Factors of Salvage Esophagectomy for Residual or Recurrent Esophageal Squamous Cell Carcinoma After Definitive Chemo-radiotherapy. *World J Surg.* 2018 Feb 8. 査読有 DOI: 10.1007/s00268-018-4536-7

Baba Y, Yagi T, Sawayama H, Hiyoshi Y,

Ishimoto T, Iwatsuki M, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H: Long Interspersed Element-1 Methylation Level as a Prognostic Biomarker in Gastrointestinal Cancers. *Digestion.* 2018;97(1):26-30. 査読有 doi: 10.1159/000484104

Uchihara T, Yoshida N, Baba Y, Yagi T, Toihata T, Oda E, Kuroda D, Eto T, Ohuchi M, Nakamura K, Sawayama H, Kinoshita K, Iwatsuki M, Ishimoto T, Sakamoto Y, Baba H: Risk factors for pulmonary morbidities after minimally invasive esophagectomy for esophageal cancer. *Surg Endosc.* 2018 Jun;32(6):2852-2858. 査読有 doi: 10.1007/s00464-017-5993-z

Kuroda D, Sawayama H, Kurashige J, Iwatsuki M, Eto T, Tokunaga R, Kitano Y, Yamamura K, Ouchi M, Nakamura K, Baba Y, Sakamoto Y, Yamashita Y, Yoshida N, Chikamoto A, Baba H: Controlling Nutritional Status (CONUT) score is a prognostic marker for gastric cancer patients after curative resection. *Gastric Cancer.* 2018 Mar;21(2):204-212. 査読有 doi: 10.1007/s10120-017-0744-3

〔学会発表〕(計 14 件)

澤山 浩、宮成信友、中尾陽佑、杉原栄孝、岩上志朗、水元孝郎、久保田竜生、芳賀克夫、片渕茂、馬場秀夫：腹腔内腫瘍に対する腹腔鏡下腫瘍生検に関する検討。第 71 回日本消化器外科学会総会 2016.7.16 アスティとくしま

Sawayama H, Iwatsuki M, Yoshida N, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Kinoshita K, Tokunaga R, Toihata T, Uchihara T, Baba H: Gastrectomy for gastric cancer with synchronous multiple primary cancers. The 26th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists IASGO2016 2016.9.9 Sheraton Grande Walkerhill Hotel (Seoul, Korea)

Sawayama H, Iwatsuki M, Yoshida N, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Kinoshita K, Tokunaga R, Toihata T, Uchihara T, Baba H: Lymph node metastasis ratio and serum CA19-9 level were associated with early recurrence after gastrectomy for gastric cancer. The Annual Meeting of Federation of Asian Clinical Oncology FACO2016 2016.9.22 Xiamen International Conference Center (Xiamen, China)

澤山 浩、宮成信友、中尾陽佑、山尾宣暢、杉原栄孝、岩上志朗、水元孝郎、久保田竜生、芳賀克夫、片渕茂、馬場秀夫：急性胆嚢炎に対する経皮経肝胆嚢ドレナージ後の待機的手術に関する検討。第24回JDDW 2016.11.4 神戸コンベンションセンター

澤山 浩、岩槻政晃、吉田直矢、坂本快郎、馬場祥史、宮本裕士、木下浩一、美馬浩介、問端 輔、内原智幸、馬場秀夫：胃癌患者治療前のSTNとCEAの測定意義。第89回日本胃癌学会総会 2017.3.10 広島国際会議場

澤山 浩、宮本裕士、日吉幸晴、内原智幸、清住雄希、江藤二男、山下晃平、大徳暢哉、岡留一雄、岩槻政晃、馬場祥史、吉田直矢、馬場秀夫：S状結腸癌、直腸癌に対する腹腔鏡下手術における腹腔内脂肪量と手術時間に関する検討。第30回日本内視鏡外科学会 2017.12.9 国立京都国際会館

澤山 浩、石本崇胤、吉田直矢、黒田大介、江藤二男、清住雄希、八木泰祐、内原智幸、日吉幸晴、岩槻政晃、馬場祥史、宮本裕士、馬場秀夫：Inhibiting GLUT1 expression suppresses proliferation and enhances anticancer agent sensitivity in esophageal cancer. 第28回消化器癌発生学会 2017.11.17 ホテルメルパルク熊本

澤山 浩、岩槻政晃、吉田直矢、馬場祥史、坂本快郎、宮本裕士、木下浩一、問端 輔、内原智幸、八木泰祐、黒田大介、馬場秀夫：胃癌に対する根治切除術症例における術前の血清鉄の測定意義。第25回JDDW 2017.10.14 福岡国際センター

澤山 浩、宮本裕士、日吉幸晴、黒田大介、大徳暢哉、江藤二男、清住雄希、八木泰祐、内原智幸、岩槻政晃、馬場祥史、吉田直矢、馬場秀夫：結腸右半切除術における主リンパ節郭清術式。第42回日本大腸肛門病学会九州地方会 2017.9.16 ホテルメルパルク熊本

澤山 浩、岩槻政晃、吉田直矢、問端 輔、中村健一、大内繭子、木下浩一、馬場祥史、坂本快郎、馬場秀夫：胃上部胃癌におけるリンパ節転移陽性範囲および郭清効果に基づいた至適術式の検討。第72回日本消化器外科学会 2017.7.21 ANA クラウンプラザホテル金沢

澤山 浩、岩槻政晃、吉田直矢、馬場祥史、坂本快郎、宮本裕士、木下浩一、大内繭子、中村健一、問端 輔、内原智幸、八木泰祐、馬場秀夫：胃上部胃癌に対するリンパ節転移範囲・郭清効果に基づいた術式に関する検討。第71回手術手技研究会 2017.5.26 名古屋国際会議場

Sawayama H, Iwatsuki M, Yoshida N, Baba Y, Sakamoto Y, Kinoshita K, Nakamura K, Kuroda D, Eto T, Toihata T, Uchihara T, Oda E, Yagi T, Ohuchi M, Ishimoto T, Baba H : Glucose transporter 1 is associated with proliferation and prognosis on esophageal squamous cell carcinoma. AACR2017 2017.4.4 Walter E. Washington Convention Center (Washington, D.C., USA)

澤山 浩、宮本裕士、日吉幸晴、内原智幸、清住雄希、古閑悠輝、江藤二男、山下晃平、大徳暢哉、岡留一雄、岩槻政晃、馬場祥史、吉田直矢、馬場秀夫：StageIV 大腸癌における原発巣切除症例における原発巣部位に関する検討。第118回日本外科学会総会 2018.4.7 東京国際フォーラム

澤山 浩、石本崇胤、吉田直矢、黒田大介、江藤二男、八木泰祐、内原智幸、日吉幸晴、岩槻政晃、馬場祥史、宮本裕士、馬場秀夫：食道扁平上皮癌におけるGlut1発現抑制による抗腫瘍効果・機序および抗癌剤感受性変化に関する検討。第51回制癌剤適応研究会 2018.3.23 下呂温泉水明館

〔図書〕
(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
澤山 浩(SAWAYAMA, Hiroshi)
熊本大学医学部附属病院・医員
研究者番号：40594875

(2)研究分担者
()
研究者番号：

(3)連携研究者
()
研究者番号：

(4)研究協力者
()