

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11379

研究課題名(和文) 新規レドックス関連蛍光プローブを用いた頭頸部癌における酸化ストレス耐性機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of oxidative stress resistance mechanisms in head and neck cancer using novel redox-related fluorescent probes

研究代表者

吉田 昌史 (Yoshida, Masafumi)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：80396754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌切除検体に対してGGT活性検出プローブであるgGlu-HMRGを適用した結果、約半数の検体において癌から蛍光が検出された。頭頸部癌切除検体に対して網羅的RNAシーケンス解析及びPathway解析を行った結果、イメージングと同様約半数の4例がGGTの主要なsubtypeであるGGT1高発現であった。GGT1高発現群においてFGF21が高発現しているとともにPI3K経路が活性化していることが明らかとなった。培養細胞系においても実験を行ったところPI3K経路が活性化している頭頸部癌由来Detroit562細胞においてGGT1が高発現しており、GGT1活性とPI3K経路との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の目的である頭頸部癌における酸化ストレス耐性機構の解明にまでは至らなかったが、細胞内GSH濃度と関連のあるGGT活性につき、蛍光イメージングの結果からGGT活性とPI3K経路の関連という新たな知見が得られたことは、蛍光イメージングによって同じ頭頸部癌における違う特徴が検出可能であることを示す重要な成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We applied gGlu-HMRG, a probe for detecting GGT activity, to head and neck carcinoma resected specimens, and fluorescence was detected in about half of the specimens. Comprehensive RNA sequencing and pathway analysis of the head and neck cancer resected specimens showed that GGT1, a major subtype of GGT, was highly expressed in about half of the specimens. In the high GGT1 group, FGF21 was highly expressed and PI3K pathway was activated. In addition, GGT1 was highly expressed in Detroit562 cells derived from head and neck cancers, where the PI3K pathway is activated, suggesting a relationship between GGT1 activity and the PI3K pathway.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部外科学 蛍光イメージング 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の治療における放射線化学療法の重要性は機能温存の点からも広く認識されており、近年治療成績の向上が認められているが、その効果は依然として十分ではない。より適切な治療選択のために放射線・化学療法への抵抗性を事前に予測しようとする研究がなされているが特定の遺伝子変異や蛋白の発現だけですべてが説明できるものではなく、実現には至っていない。癌の放射線・化学療法への耐性には GSH を中心とした酸化ストレス耐性機構が関与していると考えられるが、申請者はこれまでに細胞内のレドックス状態の可視化を目的として有機小分子を用いた GSH 感受性蛍光プローブの開発を行っており、今回新たに今まで困難であった細胞内 GSH 濃度のリアルタイムな定量を可能とする新規蛍光プローブ QuicGSH を開発した。本研究はこれらの蛍光プローブにより初めて可能となった「細胞内のレドックスバランスのリアルタイムな検出」を頭頸部癌細胞に対して行うことで、頭頸部癌の酸化ストレス耐性獲得機構におけるこれら抗酸化物質代謝の重要性を明らかにするとともに、イメージング技術を活用することで治療抵抗性の予測及び抗酸化物質代謝の制御による治療感受性の誘導という診断・治療両面に結びつけようとするものである。

## 2. 研究の目的

本研究は癌細胞の酸化ストレス耐性という観点から、主に蛍光イメージングの手法を用いて、頭頸部癌における①治療抵抗性獲得機構の解明、②治療抵抗性の診断法の確立、③治療への応用、について研究を進める。本研究においては癌細胞におけるレドックスバランスの維持機構を明らかにするとともに、*in vivo* がんイメージングや治療抵抗性の予想法の開発、酸化ストレス耐性をターゲットとした治療法の開発に挑戦する。

## 3. 研究の方法

頭頸部癌由来の培養細胞系および頭頸部癌手術検体に対して各種蛍光プローブを適用し、酸化ストレス耐性に関連のある特徴を明らかにする。

## 4. 研究成果

培養細胞系の先行研究において、細胞内 GSH 濃度と Gamma-glutamyltransepeptidase (GGT) 活性との相関が見られた。GGT とは細胞膜上に存在するアミノペプチダーゼであり、細胞外の GSH を分解し細胞内に取り込み GSH を再合成するというサイクルの一端を担っているため、GGT 活性が高い癌細胞は細胞内 GSH 濃度も高く維持されているものと考えられている。よってまず頭頸部癌切除検体に対して GGT 活性検出プローブである gGlu-HMRG を適用したイメージング実験を行った。15 例に対して行った結果 7 例で癌における蛍光が観察された (図 1)。癌の検出という意味では半分程度の検出率は十分ではないが、GGT 活性に差のある 2 群における特徴の違いが酸化ストレス耐性につながるのではないかと考えた。そこで頭頸部癌切除検体 9 例を用いて網羅的 RNA シークエンス解析及び Pathway 解析を行った。GGT の主要な subtype である GGT1 に着目して解析した結果、蛍光イメージングと同様約半数の 4 例が GGT1 高発現であった。GGT1 高発現群において糖脂質代謝調節因子である FGF21 が高発現しているとともに PI3K 経路が活性化していることが明らかとなった (図 2)。頭頸部癌由来の培養細胞系において gGlu-HMRG を適用してイメージング実験を行ったところ、遺伝子変異により PI3K 経路が活性化している頭頸部癌由来 Detroit562 細胞において GGT1 が高発現しており、GGT1 活性と PI3K 経路との関連が示唆された。PI3K 経路は細胞増殖などにおいて非常に重要な pathway であり、頭頸部癌においても治療ターゲットとして注目されているため、治療抵抗性との関連およびその機構が明らかとなれば非常にインパクトの大きい知見となるため、当初の予定からはやや外れたものとなるが FGF21 とともに酸化ストレス耐性との関連について実験を行ったが現時点で有意な結果は得られていない。PI3K 経路の関与は非常に多岐にわたるため実験系および結果の解釈が難しくなっており、今後更なる知見の積み重ねと実験が必要と考えられる。とはいえ蛍光イメージングの結果から GGT1 活性と PI3K 経路の関連という新たな知見が得られたことは、蛍光イメージングによって同じ頭頸部癌における違う特徴が検出可能であることを示す重要な成果と考えられる。

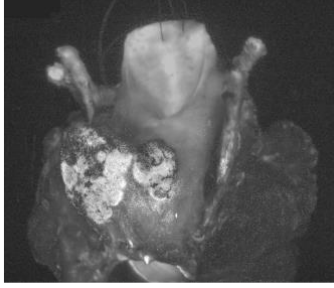


図1. GGT活性検出プローブによる下咽頭がん切除検体の蛍光イメージング (実際は癌は緑の蛍光を発する)

|       | GGT1 up |   |   |   |   |
|-------|---------|---|---|---|---|
| FGF21 | ■       | ■ | ■ | ■ | ■ |
| GGT1  | ■       | ■ | ■ | ■ | ■ |

|   | GGT1 up |   |   |   |   |
|---|---------|---|---|---|---|
| REACTOME_PI3K_EVENTS_IN_ERBB4_SIGNALING | ■       | ■ | ■ | ■ | ■ |
| REACTOME_TKAT6_MEDIATED_IR7_ACTIVATION  | ■       | ■ | ■ | ■ | ■ |
| REACTOME_CAMPXN_GALECTIN_CYCLE          | ■       | ■ | ■ | ■ | ■ |
| REACTOME_G1_PHASE                       | ■       | ■ | ■ | ■ | ■ |
| REACTOME_PI3K_EVENTS_IN_ERBB2_SIGNALING | ■       | ■ | ■ | ■ | ■ |

図2. GGT1高発現群(左4例)と低発現群(右5例)で比較した発現解析(上段)とpathway解析(下段)のヒートマップ

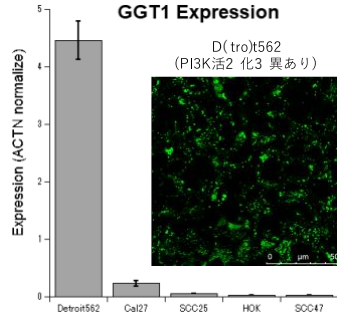


図3. 頭頸部癌由来細胞株におけるGGT1発現比較とGGT活性検出プローブによるイメージング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>吉田 昌史  |
| 2. 発表標題<br>可逆的な蛍光制御機構によるFRET 型新規グルタチオン感受性蛍光プローブの開発と頭頸部癌への応用 |
| 3. 学会等名<br>第41回日本頭頸部癌学会 シンポジウム                              |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>吉田 昌史                            |
| 2. 発表標題<br>血清 -GTP 値をバイオマーカーとした上咽頭癌の治療成績の検討 |
| 3. 学会等名<br>第28回日本頭頸部外科学会                    |
| 4. 発表年<br>2018年                             |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|