

平成 21 年 4 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591541

研究課題名（和文） 癌特異的エネルギー代謝を標的とした新規食道癌治療法の開発

研究課題名（英文）A novel therapeutic strategy based on tumor-specific energy metabolism

研究代表者

宮田 博志（MIYATA HIROSHI）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80362713

研究成果の概要：解糖系酵素である pyruvate kinase M2 (PKM2)の発現を免疫組織学的に検討したところ、PKM2の発現はヒト正常組織では見られず食道癌組織のみで見られ、PKM2発現と予後は逆相関を示した。食道癌細胞株を用いた基礎実験では、PKM2の発現を抑制すると食道癌細胞の増殖が抑制され、さらに化学療法感受性が増強した。以上より PKM2は食道癌治療における新規の分子標的となりうると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道癌,好氣的解糖,ATP産生,アポトーシス,化学療法

1. 研究開始当初の背景

『癌細胞は生存に必要なエネルギーを（好氣的条件下においても）酸化的リン酸化ではなく解糖系を利用して産生している』という癌細胞におけるエネルギー代謝の仮説が Otto Warburg によって提唱されてから約 80 年が経過しようとしているが、Warburg effect と呼ばれるこの aerobic glycolysis（好氣的解糖）の cancer theory は未だ controversial である。しかしながら近年の癌治療における FDG-PET の普及によって癌細胞の好氣的解糖は新たな展開をみせようとしている。ミトコンドリア呼吸鎖における酸化的リン酸化ではグルコース 1 分子につき 36 個の ATP が産生されるのに対して解糖系ではグルコース 1 分子につき 2 個の ATP しか産生されないため、癌細胞が解糖系によって生存に必要なエネルギーを産生するならば正常細胞よりも多量のグルコースを必要とするはずであるが、FDG-PET によって種々の癌組織で正常組織に比して過剰な糖の取り込みが見られることは癌が生存に必要なエネルギーを産生するために解糖系を

胞の好氣的解糖は新たな展開をみせようとしている。ミトコンドリア呼吸鎖における酸化的リン酸化ではグルコース 1 分子につき 36 個の ATP が産生されるのに対して解糖系ではグルコース 1 分子につき 2 個の ATP しか産生されないため、癌細胞が解糖系によって生存に必要なエネルギーを産生するならば正常細胞よりも多量のグルコースを必要とするはずであるが、FDG-PET によって種々の癌組織で正常組織に比して過剰な糖の取り込みが見られることは癌が生存に必要なエネルギーを産生するために解糖系を

利用していることを裏付けている。一方、我々はこれまでに食道癌における分子標的治療のターゲットを模索するなかでセリン・スレオニンキナーゼ Akt が食道癌組織において正常組織と比べて過剰に発現することを見いだした(食道癌患者の約 70%で過剰発現)。Akt はさまざまな growth factor などの刺激によって phosphoinositide 3-kinase(PI3K) の下流で活性化される oncogene であり抗アポトーシス作用を有する一方で、グルコース輸送因子 (glucose transporter) の転写活性化などによって細胞内への糖の取り込みを促進し解糖系を活性化することが報告されている。進行食道癌のほぼ全例において FDG-PET の取り込みが見られることに加えて、食道癌患者の多くの症例で癌部における Akt の過剰発現が見られることから食道癌組織においては恒常的に解糖系が利用されていることが示唆される。正常組織では細胞の生を維持するための ATP の 80~90%をミトコンドリアでの酸化的リン酸化によって生成している。

もし癌組織においては ATP 産生のために主に解糖系が利用されるならば、解糖系を遮断することで正常組織には影響を与えずに癌細胞のみを標的とする治療が可能である。さらに近年の報告では抗がん剤や放射線照射などの DNA damage により癌細胞にもたらされるアポトーシスに解糖系における糖の取り込み低下が関与することがいわれている。つまり解糖系と抗がん剤や放射線治療の耐性との関連が示唆される。我々のこれまでの研究でも化学療法や放射線療法で生き残った食道癌細胞では解糖系を司る Akt の発現がさらに増強していることがわかった。

そこで癌細胞は抗がん剤や放射線などの DNA damage ストレスに対する自己防衛として解糖系をさらに促進させて生き延びるためのエネルギーを産生している。よって解糖系をブロックしてエネルギーを枯渇させることでアポトーシスを誘導し抗がん剤や放射線への感受性を増強することができると考えた。以上のように解糖系を標的とした治療は cancer specific な治療であり、単独治療のみならず、抗がん剤や放射線治療との併用により相乗効果をもたらすことが期待できる有望な治療であると考えている。

2. 研究の目的

(1) 食道癌組織において標的となる解糖系酵素の同定

本研究ではまずヒト食道癌組織において実際に解糖系が亢進していることを証明し、解糖系を司る酵素のなかで治療標的と

なりうる分子を同定したいと考えている。我々は解糖系代謝の各ステップを制御する分子 ~ を候補として考えてい。

hekisokinase glucose-6-phosphate dehydrogenase transketolase-like enzyme 1 lactate dehydrogenase、これらに対してはいずれも inhibitor が存在し治療標的として即、臨床応用が可能である。

(2) 抗がん剤や放射線照射などの DNA damage ストレスに対する癌細胞の自己防衛としての解糖系亢進

我々の仮説では、癌細胞は抗がん剤や放射線照射などの DNA damage から生き延びるためのエネルギーを解糖系亢進による ATP 産生でまかなっていると考えている。よって抗がん剤や放射線に解糖系をブロックする治療を併用することで抗がん剤や放射線への感受性を増強させることができる。この仮説を食道癌培養細胞や動物モデルを用いて証明し、解糖系標的治療と抗がん剤や放射線照射との併用療法の可能性を検討する。

(3) 癌細胞における好氣的解糖の意義の解明

好氣的条件下での解糖系による ATP 産生は、エネルギー効率の点では酸化的リン酸化による ATP 産生に劣っている。にもかかわらず癌細胞で好氣的解糖が行われるのは、Warburg が唱えるように癌ではミトコンドリア呼吸鎖の異常がありそれを用いることができないためなのか、それとも好氣的解糖を行うことで、癌細胞にとって有利に働く機序がほかに存在するのか、未だ明らかにされていない癌の好氣的解糖の本質に迫りたい。我々は、癌細胞が解糖系を利用することはミトコンドリア減少などによるミトコンドリア機能低下をもたらす。そしてミトコンドリアのもう一つの重要な機能であるアポトーシスの開始・実行が阻害され、癌細胞は抗アポトーシス作用を獲得するのではないかと考えている。解糖系と抗アポトーシスをつなぐ key factor としてのミトコンドリア機能についてヒト食道癌組織および食道癌培養細胞株を用いて検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織学的検討：

解糖系関連酵素および TCA サイクルによるエネルギー産生の場であるミトコンドリアについてヒト食道癌組織のパラフィン包埋標本を用いて免疫組織学

的に検討する。用いる食道癌組織は術前未治療症例（100～200例）、術前化学療法例（約80例）、術前放射線治療例（100～120例）を予定。

(2) 食道癌培養細胞を用いての解糖系抑制の検討：

食道癌培養細胞株において解糖系酵素の抑制による腫瘍増殖抑制が可能かどうかを検討する。また、抗がん剤使用時に解糖系酵素を抑制することで、化学療法の感受性を増強することが可能かどうか検討する。

以上の方法にて解糖系酵素が食道癌治療における新規の分子標的となりうるか検証する。

4. 研究成果

(1) 癌細胞におけるエネルギー代謝指標としてのミトコンドリアの検討：

当科での食道癌切除標本において抗ミトコンドリア(mit)抗体を用いた免疫染色を行い食道癌組織におけるmit量を免疫組織学的に評価することを試みた。対象は67例（術前未治療例44例、術前放射線治療例23例）で抗mit抗体(clone SPM198)による免疫染色の評価を各癌細胞において強陽性と弱陽性に分けて強陽性の割合が50%以上をhigh、50%未満をlowとした。67例中43例がhigh、24例がlowであったが、術前未治療群と術前放射線治療群の両群の間にはmit染色に差を認めなかった。mit染色とリンパ節転移、病期進行度などの臨床病理学的因子との関連は明らかでなかったが、生存率ではmit-low群はmit-high群と比べて有意に予後不良であり、食道癌組織における免疫組織学的なmit量は癌の悪性度を反映すると考えられた。

(2) ヒト食道癌組織における解糖系酵素pyruvate kinase M2 (PKM2)発現の検討：

当科での食道癌切除標本において抗PKM2抗体を用いた免疫染色を行い食道癌組織におけるPKM2発現の検討を行った。対象は90例（術前未治療45例、術前化学療法45例）。PKM2の免疫染色の評価は陽性細胞数のfrequencyとintensityの総合評価をスコア化し高発現/低発現の2群に分けて検討を行った。PKM2の発現は正常組織ではみられず癌組織のcytoplasmのみに見られた。術前未治療例の46%、術前化学療法例の65%がPKM2高発現であり術前化療群で発現が強い傾向がみられた。

。術前未治療と術前化療例のいずれにおいてもPKM2高発現群で予後不良であり、食道癌組織におけるPKM2発現は癌の悪性度を反映すると考えられた。

(3) 食道癌細胞株におけるPKM2抑制による腫瘍増殖抑制効果の検討

食道癌細胞株TE3、TE8においてsiRNAによりPKM2をknock downした細胞株TE3kd、TE8kdを作成し、PKM2抑制による細胞増殖などの検討を行なった。正常酸素濃度下での培養ではPKM2knock downによる増殖変化は見られなかったが、低酸素培養下ではPKM2knock down株では有意に増殖が抑制された。また正常酸素下ではATP産生はPKM2knock downの影響を受けなかったが、低酸素下ではPKM2knock down株では有意にATP産生が減少していた。以上より、低酸素下条件においては食道癌細胞の増殖のためのエネルギー産生はPKM2に依存することが考えられた。

(4) 食道癌細胞株におけるPKM2抑制による抗がん剤感受性増強効果の検討

(3)におけるPKM2抑制株とその親株において抗がん剤であるシスプラチン(CDDP)投与下での増殖抑制効果をMTTアッセイで調べるとともに、アポトーシスをFACSにて解析した。PKM2抑制下部では親株に比べて、有意にアポトーシスが増強しており、増殖は抑制されたことからPKM2抑制により食道癌細胞の抗がん剤感受性が増強することが示唆された。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 博志 (MIYATA HIROSHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80362713

(2) 研究分担者

土岐 祐一郎 (DOKI YUICHIRO)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20291445
山崎 誠 (YAMAZAKI MAKOTO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50444518

藤原 義之 (FUJIWARA YOSHIYUKI)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：40314330

瀧口 修司 (TAKIGUCHI SYUJI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00301268