

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24240071

研究課題名(和文) C-13 標識グルコースを用いた多量子コヒレンスMRによる癌代謝評価法の開発

研究課題名(英文) Metabolic Characterization of Cancer by Heteronuclear Multiple Quantum Coherence NMR with <sup>13</sup>C-Labeled Glucose

研究代表者

犬伏 俊郎 (Inubushi, Toshiro)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・名誉教授

研究者番号：20213142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：HMQC法は超偏極による<sup>13</sup>C信号増強法に比べて信号検出感度では劣るが、<sup>13</sup>C信号のT1に左右されることなく、腫瘍代謝の全貌が観察できる。この方法によりがんの代謝過程を解析した結果、代謝経路における酵素反応の阻害は乳酸生成を僅かに抑制させるのみであるが、乳酸排出を制御するとその蓄積が著しく増加した。乳酸を標的にした腫瘍代謝への介入ががん治療の一助になる。

一方、アルツハイマー病脳においても癌と同じ代謝が疑われており、モデルマウスを用いて解析した。認知症の発症と脳エネルギー代謝、並びに、乳酸動態との関連が明らかになり、老化による脳機能の低下を予防する抗老化医学の一助になるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Aerobic glycolysis is the essential metabolic pathway for energy production in tumor cells. Gradient-enhanced heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy (HMQC), a kind of signal enhancement technique to track <sup>13</sup>C-MR tracer in vivo, was used to investigate tumor metabolism starting with <sup>13</sup>C-labeled glucose. The detailed analysis of metabolic profile revealed that PKM2 enzyme plays pivotal role to control glycolytic flux. PKM2 inhibitor and activator suppressed lactate production and perhaps the metabolic flux bypassed to pentose phosphate pathway. Only the inhibition of lactate efflux increased the production of lactate, which indicates to modulate tumor metabolism. We also investigated the glycolytic metabolism in Alzheimer model mouse brain and found that small but definite amount of lactate signal present in any aged model mice. We concluded that lactate may play an essential role in hypometabolic brain in Alzheimer mouse model either as energy source or signaling molecule.

研究分野：生体医工学

キーワード：磁気共鳴 グルコース代謝 乳酸 ワールブルグ効果 アルツハイマー病

## 1. 研究開始当初の背景

磁気共鳴 (MR) 法は体内の病変を高解像度で描出する優れた画像診断法であるが、特定の信号、例えば、代謝産物やタンパク質のそれを検出し識別することは難しい。一方、MR 法は放射線を用いないために生体への被曝が回避でき、繰り返しMR計測することで、物質の生体内での化学動力学が経時的に追跡できる。我々はこれまでにMRでは低感度核でありながら、有機代謝産物の骨格を形成する<sup>13</sup>C核に着目し、この炭素原子に結合した検出感度の高い<sup>1</sup>HのMR信号を利用して間接的に高感度で<sup>13</sup>C核を計測する多量子コヒーレンスMRスペクトロスコピー (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence: HMQC) 法を開発し、生体組織内でのグルコース代謝解析に応用してきた。本課題ではこの手法を癌の代謝計測に応用し、その生体反応を解析した。

多くの癌細胞は好気的な条件下でもミトコンドリアでの呼吸をあまり使わずに、グルコース代謝 (解糖系) を亢進させてエネルギー (ATP) を作り出す。この現象はワールブルグ効果と呼ばれ、グルコース代謝が亢進することで解糖系によるエネルギー産生が飛躍的に高まり、これに対してミトコンドリアでの呼吸が低く抑えられている。この現象は、エネルギー産生では好気的な条件下でのミトコンドリアで酸素を消費する呼吸に比べ極めて非効率なシステムであるものの、癌が酸素の消費を抑えて免疫系システムを回避し、増殖を続けるという利点をもっていると考えられている。一方で、近年の分子生物学的解析から、癌細胞におけるグルコース代謝経路の変化に関する研究が進んできているものの、まだその全体像は明らかになっていない。我々は HMQC 法により実験動物の腫瘍組織におけるグルコースの取り込みや乳酸産生のレベルをリアルタイムでモニターし、その代謝に関わる種々の酵素活性を阻害するとそのレベルの変動が鋭敏に検出されるようになった。このような情報は癌化の分子機構を考える上で重要であり、代謝過程のリアルタイム・モニタリングは薬物による癌抑制の分子機構解明へとつながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

ゲノム情報が明らかになり、その遺伝子産物であるバイオマーカー (代謝産物) の生体内部での時間的、空間的な振舞いを観察することは、様々な疾患あるいは再生医療において重要な病態変動や治療効果を知る上で重要となる。近年、プロテオミクスやメタボロームなどシステムレベルでの解析から、バイオマーカー分子の探索が始まり、同定された分子が生体内のどこで、いつ、どのように働くかを調べて、初めてその重要性が評価できるといえる。ことに最近の癌研究は遺伝子変異の解析から代謝メカニズムの解明へと変

遷しつつある。本課題では核磁気共鳴 (MR) 法を用い、生体システムにおける腫瘍組織の代謝をMRスペクトルにより計測し、MRの形態画像や癌マーカーとしての抗体などの集積部位と比較しながら、癌の病理を総合的に理解するとともに、これらの情報を癌の治療や診断技術に応用することを目指した。

## 3. 研究の方法

1. 腫瘍組織内の<sup>13</sup>C-標識代謝産物による検出に特化した<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H二重共鳴用信号検出器を製作した。これには<sup>13</sup>Cと<sup>1</sup>Hに同調させた独立の表面コイルを同心円状に配置し、それぞれの信号検出の感度化を図るとともに、腫瘍サイズに応じて<sup>1</sup>Hコイルの直径が8、10、15mm検出器を製作し、腫瘍組織の成長に適合させた。

2. 傾斜磁場パルスによるコヒーレンス選択を利用した HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) のパルス系列を作成し、<sup>13</sup>C核MR信号の<sup>1</sup>H核を利用する間接的高感度検出法を確立し、代謝解析を行った。<sup>1</sup>HMRスペクトルによる<sup>13</sup>C標識化合物の追跡はグルコースや乳酸の<sup>1</sup>位-炭素の化学シフトに対応する周波数選択パルスを用いて脂質などによる背景の不要な信号を排除することでスペクトルを簡素化し、解析を容易にする。バックグラウンドのデータとして、<sup>13</sup>C標識化合物を用いないMR代謝計測を<sup>1</sup>H核のSTEAM (STimulated Echo Acquisition Mode) 法、および、PRESS (Point RESolved Spectroscopy) にて行い、LCModelにより信号強度から化学物質の濃度を推定した。

## 4. 研究成果

### (1) HMQC 法によるがんの代謝解析

大部分の細胞はグルコースを栄養源とし、解糖系による一連の反応で代謝されてピルビン酸を生成する。このピルビン酸の多くがミトコンドリアに取り込まれ、クレブス回路によって酸化されてATPを産生し、細胞のエネルギー需要に応えている。しかし、癌細胞では解糖系から供給されるこのピルビン酸の多くはミトコンドリアとは離れて、乳酸脱水素酵素 (LDH) によって乳酸を生成することから、好気的な条件下でもミトコンドリアでの呼吸をあまり使わずに、グルコース代謝 (解糖系) を亢進させてエネルギー (ATP) を作り出す。この現象は“ワールブルグ効果”と呼ばれ<sup>2)</sup>、最近の分子生物学的解析から癌細胞におけるグルコース代謝に関する研究が進んできているものの、まだその全体像は明らかになっていない。この癌の特徴的な代謝活性を<sup>13</sup>C-標識グルコースを投与して HMQC 法にて解析し、腫瘍組織におけるグルコースの取り込みや乳酸産生のレベルから、その代謝に関わる種々の酵素活性との関連を調べた。ピルビン酸を合成するピルビン酸キナーゼのアイソフォーム PKM2 (図1) やその下流にある乳酸生成の乳酸脱水素酵素 (LDH)

(図2)を阻害するとグルコースの取り込みとともに乳酸の生成が抑制されることが分かった。このようなグルコースを出発とする代謝過程の情報は癌化の分子機構を考える上で重要であるとともに、代謝過程の変析は薬物による癌抑制の分子機構解明へとつながる可能性を持っている。

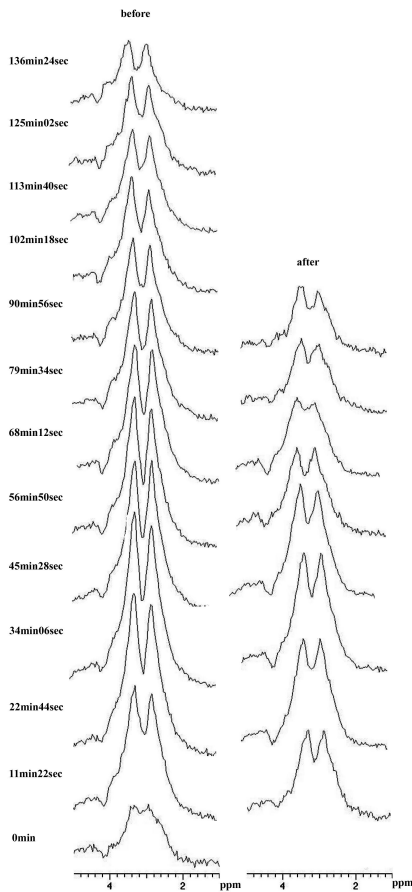


図1 HMQC法で検出したラットのモデル腫瘍組織(C6)における 1-13C-グルコースから産生した 3-13C-乳酸の信号(左)と、ピルビン酸生成阻害による乳酸生成プロファイル(右)

このPKM2の阻害効果を詳しく解析すると、乳酸の生成は著しく阻害されるが、グルコースの腫瘍組織への取り込みはほとんど変化が見られなかった。酵素反応における最終産物である乳酸の生成が抑制されると、その出発物質であるグルコースは酵素反応で消費されずに増加することが予想される(2-コンパートメントモデルによる解析から)。したがって、グルコースの取り込みが抑制されるか、グルコースが乳酸以外への反応に消費されることを示している。図3に示すように、PKM2は代謝反応を水道に例えると、その蛇口のcockのような働きをすることが知られている。したがって、PKM2の活性が抑制されても、側副のアミノ酸や拡散の合成にグルコースが消費され、グルコースの蓄積は観察されない。このことから、現時点ではPKM2の

抑制よりも逆に活性化させる方が癌の縮小に寄与することが示唆されている。これに対し、LDHの阻害効果は乳酸の生成抑制で見限り、きわめて小さいことが推察される(図2)。

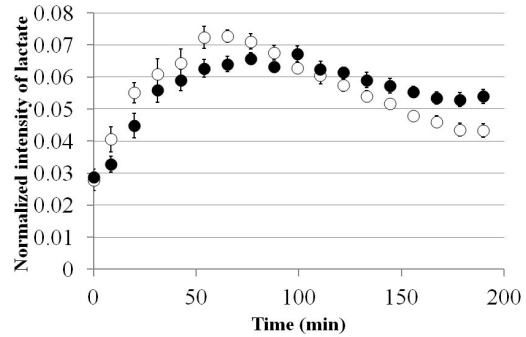


図2 酵素LDHの阻害による乳酸産生の抑制効果

○: 非抑制、●: 抑制

一方、腫瘍組織において乳酸はグルコースから始まる一連の代謝反応の最終生成物であり、その細胞外への排出機能やプロトン(pH)調節機構にも連動するとともに、乳酸産生プロファイルは癌の悪性度にも関連することが示唆されている。そこで、まず細胞内の乳酸排出、ならびに、取り込みに関わるモノカルボン酸輸送体(MCT)やpHを制御するNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE1)、さらには、プロトンポンプ活性との関連に着目した。これらの移送体機能を阻害すると、グルコース取り込みにはおおきな変化は観察されなかったが、乳酸生成、ならびに、その細胞内での蓄積は著しく増加した。このような乳酸信号の増加は、上記の解糖系酵素の阻害による乳酸生成の抑制とは異なり、腫瘍組織でのpHバランスの影響が示唆される。

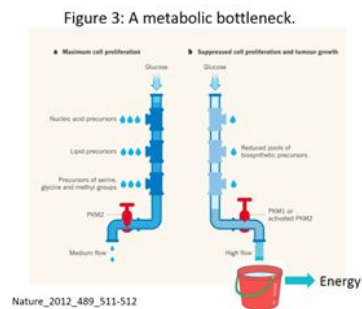


図3 グルコース代謝における酵素PKM2の役割

(Jiang L, Deberardinis RJ. Cancer metabolism: When more is less. Nature. 2012;489(7417):511-2より引用、改変)

このように、癌組織におけるグルコースの乳酸に至る代謝過程とpH制御や酵素反応の阻害剤による影響を解析することから、癌の効果的な治療に関する情報が得られるもの

と期待される。我々のこれまでの実験から、グルコース代謝への介入によるがん治療戦略では、この代謝過程に位置する酵素活性の阻害よりも、最終生成物である乳酸の細胞内外への移送を抑制することで治療効果が発揮されるのではと推察している(図3)。

HMQC法は近年盛んに利用されているDNPによる<sup>13</sup>C信号増強法に比べて信号検出感度では著しく劣るが、信号の増強は<sup>13</sup>C信号のT1に左右されることなく、しかも、グルコースの細胞内取り込みから始まる腫瘍エネルギー代謝の本来の代謝過程が追跡できる点に特色がある。また、腫瘍組織でのグルコース代謝の最終産物は乳酸であり、その蓄積が腫瘍の増殖や浸潤・転移に深く関わると言われていることから、乳酸を標的に腫瘍代謝への抗癌剤の効果が解析できる本手法は、治療介入への新たな機会をもたらす可能性があると考えられる。

## (2) アルツハイマー病脳の代謝解析

アルツハイマーが発症する原因として、脳内の組織にタンパク質のベータアミロイドが蓄積し、脳の神経細胞が死滅すると考えられている。実際、ベータアミロイドの画像化やその除去方法が臨床現場で模索されている。しかし、アルツハイマー病の原因は未だに解明されているわけではなく、遺伝、環境および生活習慣などの複数の因子が絡み合っており、長い期間をかけて脳の中で生じる、複雑な一連の事象によって発症することが次第に明らかになってきている。ことに最近になって脳内のグルコース代謝を再考するような提案が見られるようになってきた。例えば、PETによる好氣的解糖(aerobic glycolysis)(Proc Natl Acad Sci USA (2010) 107:17763-17767)やピルビン酸脱水素酵素キナーゼ(PDK1)と乳酸脱水素酵素(LDHA)の過剰発現(J Biol Chem. 2012;287(44):37245-58)などがアルツハイマー病の脳で報告され、脳内におけるグルコース代謝の変化が病態と関連することが疑われている。

我々はこれまでがんにおける好氣的解糖をMR法で解析してきた。これはがんの糖代謝をFDG-PETなどグルコースの取り込みにより代謝経路の入り口だけで評価するのではなく、解糖系入り口から途中の経路を経て最終出口までグルコースの取り込みとその代謝産物である乳酸の消長を追跡する方法であり、がん代謝の特質を理解する上で適していることが明らかとなってきている。アルツハイマー病にも好氣的解糖が疑われている状況において、MR法を用いて解糖系を精査することは、そのグルコース代謝と病態との関連が調べられる点で重要と考えられる。そこで、アルツハイマー病モデルマウスの脳内糖代謝を解析し、がんにおける糖代謝との関連を調べた。また、アルツハイマー病と糖尿病との関連、ことにインスリン抵抗性との関連

が指摘されており、当該病変におけるグルコース代謝に対するインスリンの影響、ならびに、血中グルコース濃度と脳代謝産物との関連をも本方法にてあわせて調べた。

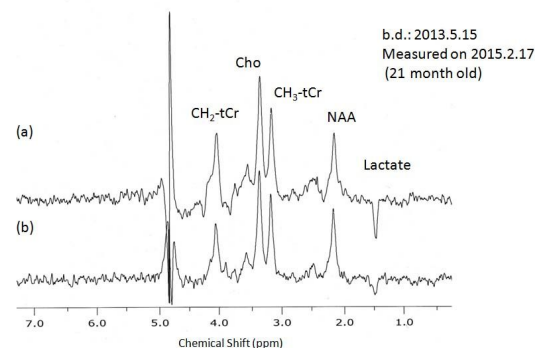


図4 LASER法で測定したアルツハイマー病モデルモデルマウス脳の<sup>1</sup>H NMRスペクトル。

アルツハイマー病のモデルマウス(3xTg-AD)の<sup>1</sup>H NMRスペクトルをLASER法にてTEを144ms(乳酸のメチル基信号がJ-変調により下向きで観察される条件)に設定して測定すると、グルコース代謝の最終産物である乳酸のメチル基信号が1.35ppmに観測された(図4)。この乳酸信号強度は週齢が対応するコントロール動物に比べて優位に高く、3か月から2年にわたるいずれの週齢のマウスにおいてもこの高強度の乳酸レベルが計測され、乳酸はアルツハイマー病脳の特質の一つであると推定される。

しかしながら、これらの乳酸レベルを詳しく観察すると、同一の母体から生まれた3xTg-ADマウスでも、乳酸レベルにはバラツキが見られ、極端に大きな固体から、ほとんど乳酸が観測されない固体までが存在することが分かった。一般に、アルツハイマー病脳ではグルコース代謝が低下することが知られているが、中には代謝が亢進する場合も報告されている。また、アルツハイマー病モデルマウスでは三つの原因遺伝子を併せ持つが、病状の進行、特に脳代謝への影響は固体の個性の影響を受けることが考えられる。モデル動物を使った実験ではこの点を考慮する必要がある。

また、この乳酸の由来を調べるために、<sup>13</sup>C標識のグルコース、および、乳酸を投与した。ところ、図5に示すように、2時間程度経過後に<sup>13</sup>C標識が乳酸のメチル基に検出された。この標識の出現速度は、正常な脳組織におけるグルコース代謝とほとんど変わりがなかった。

ところが、<sup>13</sup>C標識の乳酸を投与したところ、これまでに知られている乳酸の取り込みよりも著しく早い取り込みが明らかとなった。しかも、この乳酸には<sup>13</sup>C標識が含まれておらず、投与された乳酸からではない、別のルートから標識を持たない乳酸が生成していることが分かった。このような乳酸の挙動は癌のそれと類似するとともに、アルツハイマ

一病脳のエネルギー代謝に関わることが示唆されるとともに、ケトン体とともにグルコースに代わるエネルギー源としての役割を解明する必要がある。

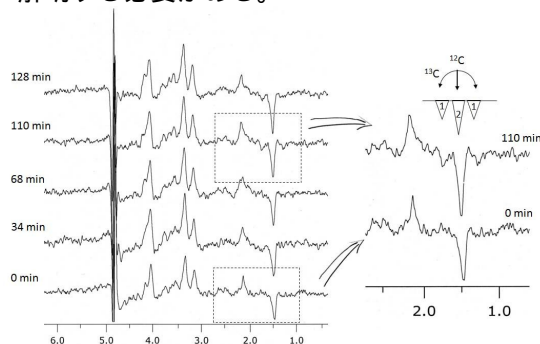


図5 アルツハイマー病モデルマウスの脳における1-<sup>13</sup>C-グルコース投与後の代謝プロファイル。右側には投与前と投与後110分での乳酸領域を拡大している。1-<sup>13</sup>C-グルコースから生成された乳酸の信号が識別できる。

グルコースをエネルギー源にする生体は、それが利用できない事態に陥ると、さまざまな代替物質を動員して生命の維持を図る。その一例として、低血糖症における脳は主としてケトン体を活用すると考えられている。しかし、最近、3-ヒドロキシン酪酸の増加が見られないケースも報告される一方で、乳酸にも注目が集まるようになってきた。例えば新生児の低血糖症や脳損傷では脳で乳酸が利用され、がんのワールブルグ効果による乳酸や疲労時の乳酸代謝も再検討されようとしている。糖代謝が低下すると考えられているアルツハイマー病の脳代謝をでは、グルコースと乳酸に関わる代謝反応を詳しく解析することは、アルツハイマー病の病因を代謝から解明する糸口になるものと期待される。

##### 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 8 件)

Tooyama I, Yanagisawa D, Taguchi H, Kato T, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Ibrahim NF, Inubushi T, Morikawa S. Amyloid imaging using fluorine-19 magnetic resonance imaging ((<sup>19</sup>F-MRI)). Ageing Res Rev. 2016: S1568-1637(15) 30044-1. doi: 10.1016/j.arr.2015.12.008. 査読有

Iwasaki T, Ishibashi F, Miyamoto Y, Doi Y, Kobayashi S, Miyazaki T, Tahara

K, Jahnke KD, Rogers LJ, Naydenov B, Jelezko F, Yamasaki S, Nagamachi S, Inubushi T, Mizuochi N, Hatano M. Germanium-Vacancy Single Color Centers in Diamond. Sci Rep. 2015; 5:12882. doi: 10.1038/srep12882. 査読有

Yoshimura Y, Shiino A, Muraki K, Fukami T, Yamada S, Satow T, Fukuda M, Saiki M, Hojo M, Miyamoto S, Onishi N, Saya H, Inubushi T, Nozaki K, Tanigaki K. Arsenic trioxide sensitizes glioblastoma to a myc inhibitor. PLoS One. 2015; 10(6): e0128288. doi: 10.1371/journal.pone.0128288. 査読有

Suzuki Y, Iida M, Miura I, Inubushi T, Morikawa S. A polymer-based magnetic resonance tracer for visualization of solid tumors by <sup>13</sup>C spectroscopic imaging. PLoS One. 2014 Jul 9;9(7):e102132. doi: 10.1371/journal.pone.0102132. 査読有

Yanagisawa D, Taguchi H, Ibrahim NF, Morikawa S, Shiino A, Inubushi T, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Tooyama I. Preferred features of a fluorine-19 MRI probe for amyloid detection in the brain. J Alzheimers Dis. 2014;39(3): 617-31. doi: 10.3233/JAD-131025. 査読有

Shiino A, Yamauchi H, Morikawa S, Inubushi T. Mapping of cerebral metabolic rate of oxygen using DSC and BOLD MR imaging: a preliminary study. Magn Reson Med Sci. 2012;11(2): 109-15.

査読有

Shiino A, Watanabe T, Shirakashi Y, Kotani E, Yoshimura M, Morikawa S, Inubushi T, Akiguchi I. The profile of hippocampal metabolites differs between Alzheimer's disease and subcortical ischemic vascular dementia, as measured by proton magnetic resonance spectroscopy. J Cereb Blood Flow Metab. 2012 May;32(5):805-15. doi: 10.1038/jcbfm.2012.9. 査読有

Morikawa S, Murayama H, Fujimoto S, Shiino A, Inubushi T. A simple way to acquire T(1)-weighted MR images of rat liver with respiratory triggering. Magn Reson Imaging. 2012 Apr;30(3):453-8. doi: 10.1016/j.mri.2011.10.005. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

犬伏俊郎、乳酸の代謝における役割：癌とアルツハイマー病を例にして、第 19 回 NMR マイクロイメージング研究会、2015 年 8 月 12 日、慶應義塾大学日吉キャンパス 来往舎

Toshiro Inubushi, Metabolic Characterization by <sup>13</sup>C-MR Tracer: HMQC of Warburg Effect in Cancer. The 1st International Congress on Magnetic Resonance Imaging (ICMRI 2013) & the 18th Annual Scientific Meeting of KSMRM (KSMRM 2013). Mar. 30 - Mar. 31, 2013, Grand Hilton Hotel, Seoul, Korea.

〔その他〕

ホームページ等

<http://mr-igaku.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬伏 俊郎 (INUBUSHI, Toshiro)  
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・名誉教授  
研究者番号：20213142

(2) 連携研究者

椎野 顯彦 (SHIINO, Akihiko)  
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・准教授  
研究者番号：50215935

森川茂廣 (MORIKAWA, Shigehiro)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60220042