

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670872

研究課題名(和文) 口腔がん細胞の代謝調節を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) A novel design of metabolic target therapy in oral cancer cells

研究代表者

荻 和弘 (Ogi, Kazuhiro)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：40433114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖代謝阻害薬である2-DG(2-デオキシ-D-グルコース)は、がん細胞に取り込まれるが、がん細胞の性質により取り込み量は異なる。本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株をマウスに移植し xenograft腫瘍モデルを作製し、2-DGと放射線併用による抗腫瘍効果の検証を行った。その結果2-DGと放射線併用群では対照群と比較して有意に腫瘍抑制効果を示した。2-DGは放射線治療と併用した場合に相乗効果を発揮し、これらの治療が有効な代謝を標的とした治療方につながることを示された。

研究成果の概要(英文)：2-DG (2-deoxy-D-glucose), a glucose metabolism inhibitor takes into tumor cells, but the amount of uptakes are depending on the phenotype of tumor cells. In our study, we established mice xenograft models with oral squamous cell carcinoma cell line, and we examined the antitumor effect by the combination of radiotherapy with 2-DG. As a result, in the group of the combination of radiotherapy with 2-DG, there is a significant tumor growth suppression compared with the control group and 2-DG alone. Our study suggested that 2-DG has synergistic effects when combined with radiotherapy, which might lead to the design of an effective metabolic target therapy.

研究分野：口腔腫瘍

キーワード：糖代謝阻害薬 グルコーストランスポーター

1. 研究開始当初の背景

近年口腔癌の治療戦略における化学放射線療法は、セツキシマブなどの分子標的治療薬の併用により、治療成績の向上や生命予後の延長に寄与することが報告されている。これらの抗がん剤は、がん細胞のシグナル伝達系を阻害し、細胞の分化・増殖を制御することで抗腫瘍効果を発揮する。しかしながら、がん微小環境や癌幹細胞の存在により癌細胞が治療抵抗性を示す症例も少なからず存在する。口腔癌などの固形癌の中心部では血流の不足に陥り、低酸素および低栄養状態などのがん微小環境が形成されダイナミックに代謝が変化する。がん細胞が解糖系を主なエネルギー供給源として増殖していることは良く知られており、この代謝の変化ががん細胞の増殖に有利に働いている。この現象は Warrburg 効果と呼ばれ、1920 年代頃からすでに研究されている。

がんでは、PI3K-AKT-mTOR 経路のがん遺伝子の活性化と p53 などの癌抑制遺伝子の阻害が高頻度にみられる。これらの遺伝子発現の有無も代謝に影響を及ぼしている。PI3K-AKT シグナルは GLUT-1、-4 の発現を増加させ、細胞内へのグルコースの取り込みを促進する。グルコースと 2-DG は細胞内に入るとリン酸化され、グルコース-6-リン酸あるいは 2-デオキシ-D-グルコース-6-リン酸 (2-DG-6-リン酸) に変換される。リン酸化されるとグルコース・トランスポーター (GLUT-1) を通過できないため細胞外へ排出されない。このヘキソキナーゼによる 6 位のリン酸化は解糖系によるグルコース代謝の最初のステップで、細胞内に取込んだグルコースを細胞内に留めおく。

今回、がん細胞のグルコースの取り込みの違いに着目し糖代謝薬である 2-DG

を併用した放射線治療との併用効果を検証する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

がん細胞は解糖系を介してグルコースを代謝し、主なエネルギー源として増殖している。また正常細胞に比べて解糖系で産生する ATP の割合が高い。一方で解糖系は酸化的リン酸化と比べて ATP 産生速度は速いが産生効率は悪いため、がん細胞は大量のグルコースを消費して解糖系を回していく必要がある。細胞におけるグルコースの取り込みは、主にグルコース輸送体の GLUT-1 を介して細胞内に取り込まれる。

本研究では、がん細胞における GLUT-1 の発現に着目し、糖代謝阻害薬である 2-デオキシ-D-グルコース (2-DG) を併用した放射線治療との相乗効果を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 口腔癌細胞株における 2-DG と放射線感受性の解析

口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3, HSC-4, SAS について、放射線照射後 (2Gy, 4Gy, 6Gy, 8Gy, 10Gy)、コロニー形成法を用いて放射線感受性を比較した。また、2-DG 投与後 (0.1mM, 0.5mM, 5mM)、MTT assay を用いて 2-DG の感受性の比較を行った。

2) 口腔癌細胞株における GLUT-1 の発現の変化

2-DG 投与後と放射線照射後、各種タイムコース (2-DG: 1hr, 4hr, 8hr, 12hr、放射線: 10min, 30min, 1hr, 3hr, 6hr, 12hr, 24hr) で GLUT-1 の発現の変化を解析した。

3) 放射線照射と 2-DG 併用による細胞

増殖能に対する影響

放射線照射と 2-DG 併用を行い、コロニー形成法を用いて細胞増殖能を検討した。さらに DNA 損傷とアポトーシスの割合をフローサイトメトリー法で解析した。

4) DNA 修復に関わる遺伝子発現の変化

PARP, Rad51, DNA-PKcs, Ku70 の発現を Western blot 法にて解析し、2-DG 処理と放射線照射後の 30min と 24hr 後について比較を行った。

5) eIF4E と p-eIF4E の発現の変化

SAS における eIF4E と p-eIF4E の発現を Western blot 法にて解析し、2-DG 処理と放射線照射後の 30min と 24hr 後について比較を行った。

6) 2-DG 処理と放射線照射後の細胞周期の変化

2-DG 処理と放射線照射後の細胞周期の変化とその割合をフローサイトメトリー法で解析し、比較を行った。

7) マウス移植モデルでの実験系

SAS 細胞株をマウスに移植し、xenograft 腫瘍モデルを作製し、2-DG と放射線併用による抗腫瘍効果の検証を行った。

4. 研究成果

1) 癌細胞株の放射線感受性は、HSC-3 > SAS > HSC-4 の順に感受性を示した。一方 2-DG の感受性は、SAS > HSC-3 > HSC-4 の順に感受性を示した。

2) 2-DG 投与後の GLUT-1 の発現は HSC-3 では著変なかった。一方、HSC-4 と SAS では 0~4hr までは発現上昇を認めるが、4hr 後より徐々に発現低下を認めた。また放射線照射後の GLUT-1 の発

現は、HSC-3 と HSC-4 では時間依存性はなく、SAS では 0~24hr まで経時的に発現増加を認めた。

3) SAS では放射線照射・2-DG の併用により、抗腫瘍効果が認められ DNA 損傷とアポトーシスの割合が増加していた。

4) 2-DG・放射線併用群では放射線単独群と比べ、照射後早期(30min)では塩基除去修復に関わる PARP と NHEJ 修復に関わる DNA-PKcs の発現低下を認めたが、24hr 後ではコントロール群に比べ、発現の減弱はみとめられなかった。

5) 2-DG・放射線併用群では作用後早期(30min)では p-eIF4E の発現の低下を認めた。p-eIF4E のリン酸化が抑制され、タンパクの合成の低下が認められた。

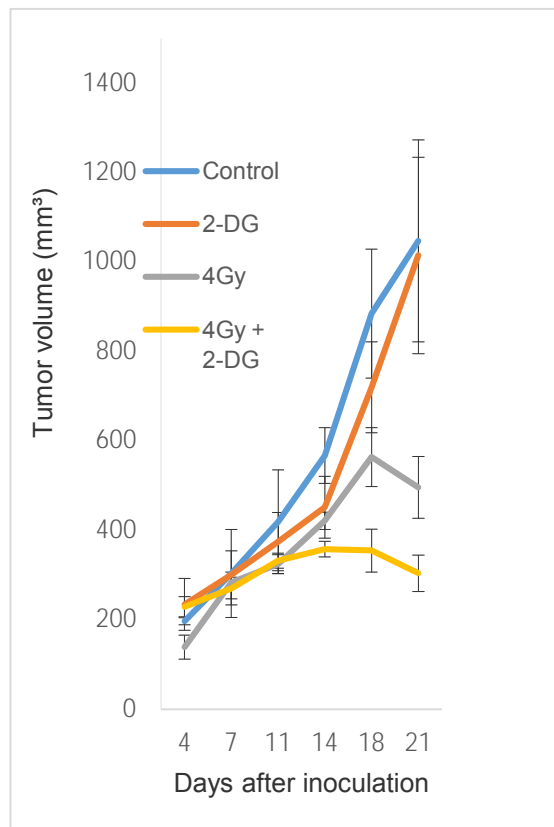
6) 2-DG 投与により G0/G1 期での細胞周期の割合の増加を認めた。HSC-3 と SAS では 2-DG・放射線併用群において G2/M 期の増加を認めた。

7) マウス移植モデルでの実験系 2-DG と放射線併用群では対照群と比較して有意に腫瘍抑制効果を示した。腫瘍径は 2-DG 単独 < 放射線単独 < 2-DG + 放射線の順に増殖抑制がみられ、また Ki-67 の発現とパラレルな結果であった。

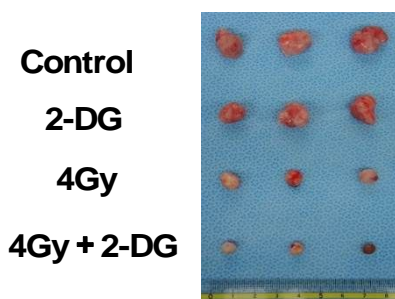
本研究結果から、GLUT-1 の発現亢進を示したがん細胞を治療標的とした治療法について、臨床的に応用することが可能と考えられる。今後は、化学療法薬や分子標的治療薬を併用した放射線治療に抵抗性を示す症例を中心に、糖代謝阻害薬と放射線治療の臨床応用が可能かを検証することが課題である。ただし、ヒトに応用する際

は投与量や副作用の検証が必要であり、今後の検討課題である。また p53 などの癌抑制遺伝子の発現異常が 2-DG と放射線の感受性に影響を及ぼすことが報告されていることから、過剰発現しているがん遺伝子を検索し、その遺伝子に対する阻害薬と代謝阻害薬を組み合わせた治療法も有用であると考えられる。

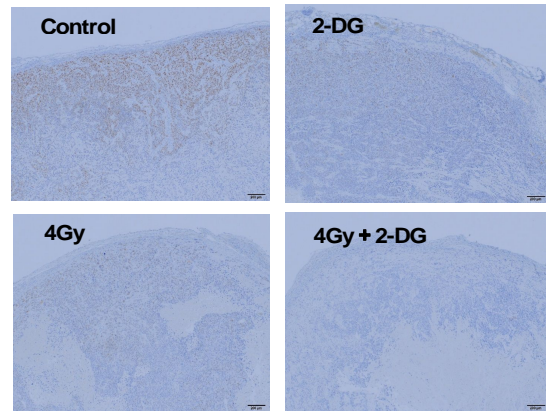
(マウスの腫瘍径の経時的変化)



(摘出した腫瘍のサイズ)



(Ki-67 による染色結果)



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2件)

・ Sasaki Y, Tamura M, Takeda K, Ogi K, Nakagaki T, Koyama R, Idogawa M, Hiratsuka H, Tokino T. Identification and characterization of the intercellular adhesion molecule-2 gene as a novel p53 target. *Oncotarget*.2016;7(38): 61426-61437. (査読有)

・ Kaneko T, Dehari H, Sasaki T, Igarashi T, Ogi K, Okamoto JY, Kawata M, Kobayashi JI, Miyazaki A, Nakamori K, Hiratsuka H. Hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition is regulated by phosphorylation of GSK3-β via PI3 K/Akt signaling in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;122(6):719-730. (査読有)

[学会発表](計2件)

1) Kazuhiro Ogi, Mayumi Kawata, Makoto Shimanishi, Jun-ichi Kobayashi, Takefumi Nakagaki, Kousuke Takeda, Akihiro Miyazaki, Hiroyoshi Hiratsuka: DNA double strand breaks in hypoxic but not in normoxic conditions determine different radiosensitivity of tumors in oral squamous cell carcinoma. 106th AACR, 2015, Philadelphia, U.S.A

荻 和弘、川田真由美ら;がん微小環境において解糖系阻害薬を併用した放射線増感効果に関する研究;日本口腔外科学会総会・学術大会 2016年11月25日 幕張メッセ他 (千葉県千葉市)

〔図書〕(計1件)

・荻 和弘、川田真由美ら：口腔癌細胞に対し糖代謝阻害薬を併用した放射線治療による腫瘍増殖抑制効果 月刊「細胞」6月号 356-358 ニューサイエンス社 2017

〔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

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

荻 和弘(OGI KAZUHIRO)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号:40433114

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし