

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861375

研究課題名(和文) グルコース取り込み阻害と放射線照射の癌への相乗効果

研究課題名(英文) Combination of glucose uptake inhibition and radiation make synergistic inhibitory effect for head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

花本 敦 (Hanamoto, Atsushi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20625917

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)：頭頸部扁平上皮癌の細胞株(FaDu, Detroit562, BICR6, BICR18)において検討を行った。その結果、FaDu, Detroit562, BICR6においてこれらのタンパク質の強い発現を認め、低酸素下では発現は更に増強した。頭頸部癌においてはグルコースの代謝、特に嫌気性代謝が亢進しており、低酸素下では嫌気性代謝が更に亢進していると考えられた。低酸素下においても増殖能はPh.+RT投与群にて著明に低下した。またTUNEL染色ではPh.+RT群は多くの細胞が染色され、アポトーシスを生じている可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We used human HNSCC cell lines. FaDu, Detroit562 and BICR6 had high expression of GLUT1, LDHA and MCT4. It revealed that anaerobic metabolism was high in these cell lines. Cell proliferation assay with or without glucose revealed that all of the cell lines without glucose grew slower than the cells with glucose. Glucose was essential for the growth of HNSCC cell lines. In hypoxia, FaDu, Detroit562 and BICR6 grew faster than those in normoxic condition. Western blot analyses revealed that the expressions of LDHA and MCT4 in hypoxia were higher than those in normoxia. In hypoxia, The knock down of GLUT1 or Ph-treatment inhibited the uptake of glucose. Cell proliferation assay revealed that HNSCC cell lines with Ph-treatment and radiation grew significantly slower than those with only radiation in hypoxia. Additionally, induction of apoptosis was detected in Ph-treated cell lines compared to cell lines treated with only radiation in hypoxia by TUNEL analysis.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 FDG-PET

1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌進行例では治療の方法が、臓器温存の観点から手術から化学放射線療法へ治療のパラダイムシフトが起きた。化学放射線療法は進歩し、完治する症例も増加してきているが、未だ治療の完遂がなされた症例においても腫瘍が残存、再発する症例が散見される。

頭頸部扁平上皮癌では臨床の現場において FDG-PET が頻用されており、ほぼ全症例に原発巣に強い集積を認める。これは頭頸部扁平上皮癌がグルコースを多く使用しているということを示唆する。我々は FDG-PET の解析を過去におこなっており、この結果、原発巣への腫瘍の集積が多いほど治療効果が低く、また予後も悪いことを報告した。

癌において低酸素領域は重要とされており、低酸素領域では放射線や化学療法の効果が薄いとされる。また、低酸素領域においてはエネルギー産生において TCA サイクルを利用できないため、嫌気性解糖系が亢進しており、グルコースの取り込みが亢進すると考えられている。低酸素領域においてはグルコースが特に必要とされ、この取り込みを阻害することにより、これらの癌細胞を死滅できる可能性がある。一方正常酸素圧の部分においてはグルコースの必要量が低いと考えられるが、この部分に関しては放射線の効果が高いため、これらの治療を組み合わせることにより相乗効果を得ることができると考える。

2. 研究の目的

癌の治療において低酸素状態は重要な要素であり、特に低酸素下では放射線治療効果が低くなることが知られている。今回我々は低酸素を伴う頭頸部癌においてグルコースの取り込み阻害と放射線照射が相乗効果を生じるか検討を行った。

3. 研究の方法

FDG-PET による頭頸部扁平上皮癌患者 138 症例での取り込みの確認を行った。

この結果全ての症例において原発巣への強い取り込みを認めた。続いて頭頸部扁平上皮癌の細胞株 (FaDu、Detroit562、BICR6、BICR18) において検討を行った。グルコースの代謝、特に嫌気性代謝に関与するタンパク質として Glucose Transporter (GLUT) 等の発現を確認した。

4. 研究成果

(1) 臨床症例での頭頸部扁平上皮癌におけるグルコースの取り込みの検証

臨床症例の頭頸部扁平上皮癌に FDG が集積するかを、過去の FDG-PET 画像を用いて検証を行った。治療前の頭頸部扁平上皮癌 130 症例の原発巣への FDG の集積の程度を検証したが、全ての症例にて集積を認め、強い集積をするものも多く存在した。

(2) 頭頸部扁平上皮癌の細胞株におけるグルコースの必要性

4 種類の頭頸部扁平上皮癌の細胞株において、グルコースを含む培養液と含まない培養液にて増殖アッセイを行った。この結果、培養後 48-72 時間後にグルコースを含まない培養液にて増殖能は著明に減少した。これらの細胞株においてグルコースが必須のものであると示された。

(3) 頭頸部扁平上皮癌の細胞株における嫌気性代謝に関わるタンパク質の発現

嫌気性代謝に関わるタンパク質で重要とされるものとして GLUT1、LDHA、MCT4 の発現を Western blotting、Immunocytochemistry、Flow cytometry にて確認した。3 種類の細胞株において、これらのタンパク質の強い発現が確認された。

(4) 低酸素状況下における細胞株

低酸素における細胞増殖を検証したが、低酸素状況下で 72 時間後では増殖能が亢進していた。低酸素状況下での嫌気性代謝に関わるタンパク質の発現を確認したが、これらのタンパク質の発現は増強した。すなわち低酸素下では嫌気性代謝は亢進し、細胞増殖も亢進していると考えられる。酸素がない状況では TCA サイクルを利用できないので、この結果は妥当であると解釈できる。

(5) Phloretin (グルコース取り込み阻害薬) の投与

細胞株に Phloretin を投与し、2DG(deoxyglucose) uptake assay (グルコースの取り込みのアッセイ) を行った。この結果 Phloretin500uM、5 分投与でグルコースの取り込みは約半減することが分かった。ついで Phloretin 投与下での増殖アッセイを行った。この結果 Phloretin の IC50 は 200uM-400uM であった。

この結果全ての症例において FDG の原発巣への強い取り込みを認めた。FaDu、Detroit562、BICR6 においてこれらのタンパク質の強い発現を認め、低酸素下では発現は更に増強することを確認した。頭頸部癌においてはグルコースの代謝、特に嫌気性代謝が亢進しており、低酸素下では嫌気性代謝が更に亢進していると考えられた。次に GLUT 阻害薬である Phloretin を用いて細胞株においてグルコースの取り込み抑制を行った。低酸素下において増殖能は放射線照射単独群と比して、Phloretin 投与 + 放射線照射群にて著明に低下した。放射線治療抵抗性とされる低酸素状態において嫌気性代謝は亢進し、グルコース取り込み抑制と放射線照射は頭頸部癌の増殖を著しく抑制した。

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 11 件)

(1) Takenaka Y, Takemoto N, Yasui T, Yamamoto Y, Uno A, Miyabe H, Ashida N, Shimizu K, Nakahara S, Hanamoto A, Fukusumi T, Michiba T, Cho H, Yamamoto M, Inohara H. Transaminase Activity Predicts Survival in Patients with Head and Neck Cancer. PLoS One. 2016 Oct 12;11(10):e0164057. doi: 10.1371/journal.pone.0164057.

(2) 中原晋、花本敦、安井俊道、竹中幸則、山本佳史、福角隆仁、道場隆博、猪原秀典. 甲状腺全摘直後の副甲状腺機能低下症に対するファレカルシトリオールの有効性及び安全性. 頭頸部外科 2016 26(2):197-201

(3) Nakahara S, Hanamoto A, Seo Y, Miyaguchi S, Yamamoto Y, Tomiyama Y, Yoshii T, Takenaka Y, Yoshioka Y, Isohashi F, Ogawa K, Inohara H. Chemoradiotherapy with weekly low-dose docetaxel and cisplatin concurrent with radiation for patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma, followed by adjuvant chemotherapy for selected patients. Jpn J Clin Oncol. 2016 Jul 29. [Epub ahead of print]

(4) 中原晋、足立加那、鈴木修、山本佳史、竹中幸則、安井俊道、花本敦、福角隆仁、道場隆博、瀬尾雄二、磯橋文明、吉岡靖生、小川和彦、猪原秀典. 頭頸部扁平上皮癌ルビエールリンパ節転移症例の臨床検討 特にサイバーナイフの効果について. 頭頸部癌 2015 41(4):452-457

(5) Nakahara S, Kitamura K, Honma K, Yamamoto Y, Takenaka Y, Yasui T, Hanamoto

A, Morii E, Inohara H. [A Case of Nasopharyngeal Cancer with Febrile Neutropenia Followed by Death during Adjuvant Chemotherapy]. Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. 2015 Jun;118(6):763-9.

(6) Sasaki T, Takenaka Y, Hayashi T, Yamamoto M, Cho H, Fukusumi T, Takemoto N, Hanamoto A, Yasui T, Nakahara S, Yamamoto Y, Mitani K, Inohara H. Factors predicting severe infections during chemotherapy in head and neck cancer patients. Acta Otolaryngol. 2015 Oct;135(10):1086-91.

(7) Cho H, Nishiike S, Yamamoto Y, Takenaka Y, Nakahara S, Yasui T, Hanamoto A, Inohara H. Docetaxel, cisplatin, and fluorouracil for patients with inoperable recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. Auris Nasus Larynx. 2015 Oct;42(5):396-400.

(8) Imai R, Takenaka Y, Yasui T, Nakahara S, Yamamoto Y, Hanamoto A, Takemoto N, Fukusumi T, Cho H, Yamamoto M, Inohara H. Prognostic significance of serum squamous cell carcinoma antigen in patients with head and neck cancer. Acta Otolaryngol. 2015 Mar;135(3):295-301.

(9) Takenaka Y, Takemoto N, Nakahara S, Yamamoto Y, Yasui T, Hanamoto A, Fukusumi T, Michiba T, Cho H, Yamamoto M, Inohara H. Prognostic significance of body mass index before treatment for head and neck cancer. Head Neck. 2015 Oct;37(10):1518-23.

(1 0) Takenaka Y, Yamamoto M, Nakahara

S, Yamamoto Y, Yasui T, Hanamoto A, Takemoto N, Fukusumi T, Michiba T, Cho H, Inohara H. Factors associated with malnutrition in patients with head and neck cancer. Acta Otolaryngol. 2014 Oct;134(10):1079-85.

(1 1) Hanamoto A, Tatsumi M, Takenaka Y, Hamasaki T, Yasui T, Nakahara S, Yamamoto Y, Seo Y, Isohashi F, Ogawa K, Hatazawa J, Inohara H. Volumetric PET/CT parameters predict local response of head and neck squamous cell carcinoma to chemoradiotherapy. Cancer Med. 2014 Oct;3(5):1368-76.

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 花本敦、甲状腺乳頭癌における FDG の集積による予後予測、第 49 回甲状腺外科学会、山梨、2016 年 10 月 27 日

(2) 花本敦、SUVmax on FDG-PET Predicts Clinical Outcome in Papillary Thyroid Cancer、AAO-HNSF annual meeting 2016、San Diego、2016 年 9 月 18 日

(3) 花本敦、甲状腺癌における FDG-PET の検討、第 40 回頭頸部癌学会、埼玉、2016 年 6 月 9 日

(4) 花本敦、シンポジウム 2 : 局所進行喉頭癌・下咽頭癌-臓器温存に向けた cutting edge- FDG-PET による喉頭温存の予測、第 28 回喉頭科学会、大阪、2016 年 3 月 4 日

(5) 花本敦、当科における甲状腺癌周囲臓器浸潤症例の検討、第 48 回甲状腺外科学会、東京、2015 年 10 月 29 日

(6) 花本敦、グルコースの取り込み抑制と放射線照射による頭頸部癌への相乗効果、第38回頭頸部癌学会、東京、2014年6月13日

研究者番号:20625917

〔図書〕(計 1件)

(1) 花本敦.【咽頭癌・頸部食道癌の治療戦略 Update】個別化治療の現在 PET からみた咽頭癌の個別化治療.耳鼻咽喉科・頭頸部外科 (0914-3491)86 巻 10 号 Page812-818(2014.09)

(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

()

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

花本 敦 (HANAMOTO Atsushi)

大阪大学医学系研究科、助教