

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893203

研究課題名(和文)食道癌におけるWarburg effect関連遺伝子と抗癌剤耐性に関する検討

研究課題名(英文)The relation between Warburg effect and chemotherapy resistance in esophageal cancer.

研究代表者

澤山 浩(SAWAYAMA, Hiroshi)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：40594875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Warburg effectとは、悪性腫瘍において糖代謝が活性化している状態のことであり、PET検査に臨床応用されている。糖代謝が亢進した状態が抗がん剤耐性を関与していると報告されている。糖の細胞への取り込みに関与するグルコーストランスポーター(Glut1)は、食道扁平上皮癌において正常食道粘膜より発現が亢進しており、PET検査値と正の相関を示した。食道癌生検サンプルのGlut1発現が高い場合、抗癌剤投与の前後のPETの取り込み変化率が減少したことから、Warburg effectと抗癌剤耐性の関係が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells exhibit altered glucose metabolism, termed the Warburg effect, which is described by the increased uptake of glucose and the conversion of glucose to lactate in cancer cells under adequate oxygen tension. Overexpression of transcriptional factors, metabolite transporters and glycolytic enzymes was associated with poor prognosis and may be associated with chemoradiotherapy resistance in multiple gastrointestinal cancer cell types. In esophageal squamous cell carcinoma, the expression of glucose transporter 1 (Glut1) increased. Glut1 positivity of biopsy before chemotherapy was associated with the reduction rate of FDG-PET SUV max after chemotherapy. Glut1 may be significant biomarkers for predicting the resistance of chemotherapy.

研究分野：癌と代謝

キーワード：Warburg effect 食道扁平上皮癌 FDG-PET Glut1 glucose transporter chemotherapy resistance

1. 研究開始当初の背景

Warburg effect と抗癌剤耐性

Warburg effect における乳酸産生と抗癌剤耐性の関係が、近年報告されている (Hirschhaeuser F et al. *Cancer Res.* 2011)。乳癌細胞においては、Warburg effect に関連する遺伝子として、LDHA の発現が予後と関係しており、抗癌剤耐性に影響を及ぼすことが報告された (Zhou M et al. *Mol Cancer.* 2010)。直腸癌において、Warburg effect 関連蛋白である Glucose transporter 1 (Glut1)、LDHA、PDK1、HIF1A のなかで、Glut1 の発現と化学放射線治療の治療効果の関係が報告された (Shim BY et al. *Int J Colorectal Dis.* 2013)。しかし、Warburg effect と抗癌剤耐性の機序には未だ不明な点が多く、臨床検体での検討、および耐性機序の解明が重要である。

Glut1 の発現制御と発現意義

Glut1 は、12 回貫通型の膜内在性タンパクで糖の取り込みを行う。正常上皮においては発現が低く、悪性腫瘍では、多くの癌種にて Glut1 の発現上昇が報告されている (Carvalho KC et al. *Clinics* 2011)。Glut1 は、Warburg effect において HIF1A や MYC によって転写活性が上昇する (Dang CV et al. *Clin Cancer Res.* 2009)。さらに、近年 MAPK の活性化が PKM2 をリン酸化し、Glut1 の発現を制御すると報告され (Yang W et al. *Nat Cell Biol.* 2012)、Warburg effect 関連遺伝子の作用機序が解明されている。In vivo での検討で、Glut1 過剰発現ベクターを導入した乳癌細胞は、増殖速度が速くアポトーシス細胞が少ないと報告された (Young CD et al. *PLoS One.* 2011)。我々は、食道扁平上皮癌において Glut1 の発現増加が、原発巣、リンパ節転移巣において FDG-PET の SUVmax と関係することを示した (Hiyoshi H et al. *Oncology* 2009)

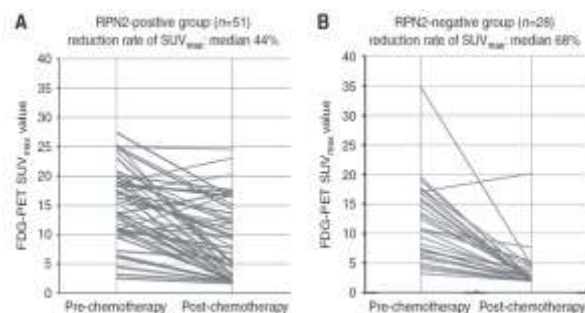
2. 研究の目的

Warburg effect が抗癌剤耐性に関すると報告されたが、その機序に関しては不明な点が多い。我々の研究によって、Warburg effect において抗癌剤耐性に関与する主要な遺伝子を同定し、それらの遺伝子の Warburg effect 関連遺伝子への相互作用、糖代謝経路に与える影響を明らかにすることで、抗癌剤耐性機序の解明することが目的である。食道癌に対して化学療法を施行した症例の生検サンプル、臨床データを集積し、化学療法前後での FDG-PET SUVmax、CT を用いた RECIST 判定、切除後標本の治療効果判定に基づいて、化学療法前の生検サンプル、手術切除標本と化学療法治療効果との関係を解

析する。実臨床における抗癌剤耐性に関する遺伝子を同定が可能である。遺伝子に対する阻害剤を使用し Warburg effect 関連遺伝子への影響や、作用機序を検討することで、抗癌剤耐性の機序が解明し、食道扁平上皮癌における予後の改善のための新しい治療法に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

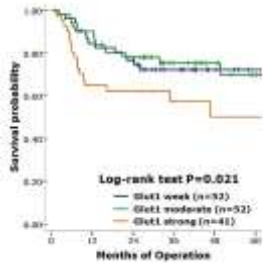
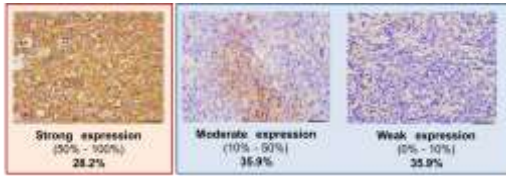
抗癌剤耐性に関し、我々は食道扁平上皮において RPN2 がドセタキセルの耐性に関することを報告してきた (Kurashige J et al. *Br J Cancer* 2011)。同様の手法を用いて、抗癌剤耐性を評価する。化学療法前、化学療法施行後に FDG-PET を施行した症例の治療前サンプルを用いて、化学療法前後での SUVmax の減少率および RECIST 分類において、治療効果が高い群と低い群に分類し、代謝関連遺伝子 (Glut1、HK2、LDHA、PDK1 など) の発現変化を解析する。さらに、代謝産物を網羅的に解析する。また、PKM2 などのリン酸化の状態が重要となる因子に関しては、免疫染色にて評価する。とくに、食道癌の予後と Glut1 の発現と抗癌剤耐性の可能性を臨床検体 122 例で検討したが、同定された遺伝子に関しても、同症例において免疫染色を行うことで、抗癌剤耐性との関係を明らかにする。



抗 Glut1 抗体を 1:200 の濃度となるように 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) で希釈した。薄切標本を 10 mmol/L citrate buffer (pH 6.0) 中で 20 分間、マイクロウェーブ処理し、その後、室温にて 3% hydrogen peroxide で 5 分間、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。それぞれのサンプルを一次抗体として抗 Glut1 抗体を用い 4°C オーバーナイトで反応させた。二次抗体には、horseradish peroxidase-labeled polymer (Envision™ Kit, Dako) を用いて、室温にて 60 分反応させた。

Glut1 の発現は、癌細胞の細胞膜に発現している割合をカウントし、低発現 (0-10%)、中等度発現 (11-50%)、高発現 (51-100%) の 3 段階に分けて評価した。145 例中 52 例 (35.9%) に低発現、52 例 (35.9%) に中等度発現、41 例 (28.2%) に高発現を認めた (図 9)。それぞれの無再発生存率を比較すると、Glut1 の低発現の症例に対し、中等度発現の症例はハ

ザード比 1.100 (95%信頼区間: 0.527-2.341, P=0.804)、高発現の症例はハザード比 1.444 (95%信頼区間: 1.005-2.073, P=0.047)であった。そこで、Glut1 の高発現症例を Glut1 陽性として解析を行った。



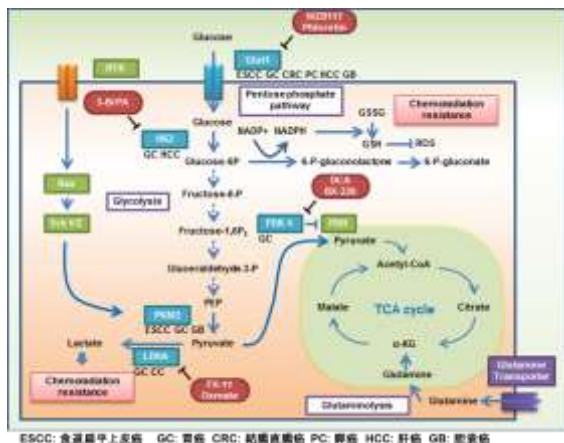
4. 研究成果

On line data base の cDNA array data から、食道扁平上皮癌において Gluts の中で、癌部での Glut1, Glut3 の発現が正常粘膜より上昇していることを確認した。また、HK2, PKM2, PDK1 の発現も上昇を認めた。

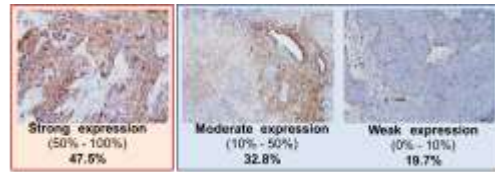
Table II. Overexpression of antiporter transporters and glycolytic enzymes in the Warburg effect.

	Colorectal cancer (N=17) GD54362			ESCC (N=17) GD54363			Pancreatic cancer (N=45) GD54365		
	T/N ratio	95% CI	P-value	T/N ratio	95% CI	P-value	T/N ratio	95% CI	P-value
Glut1	1.88	(1.16-3.06)	0.01	2.44	(1.78-3.34)	<0.001	1.58	(2.74-4.67)	<0.001
Glut2	0.92	(0.87-0.96)	0.01	0.87	(0.83-0.91)	<0.001	0.80	(0.46-0.80)	<0.001
Glut3	1.55	(0.72-3.31)	>0.05	1.86	(1.23-3.14)	0.01	1.54	(1.16-2.01)	<0.001
Glut4	1.18	(0.98-1.40)	>0.05	0.87	(0.83-1.11)	>0.05	0.89	(0.81-0.97)	0.01
Glut5	0.52	(0.31-0.72)	<0.001	1.08	(0.80-1.44)	>0.05	1.10	(0.91-1.31)	>0.05
Glut6	0.64	(0.71-1.00)	0.01	1.21	(1.12-1.34)	<0.001	0.95	(0.88-1.02)	>0.05
Glut9	0.29	(0.18-0.40)	>0.05	1.27	(1.08-1.38)	0.04	0.93	(0.88-0.98)	0.01
Glut9a	1.13	(1.01-1.26)	0.03	1.21	(1.01-1.45)	0.04	1.07	(0.96-1.17)	>0.05
Glut10	0.69	(0.38-1.19)	>0.05	0.89	(0.66-1.18)	>0.05	1.13	(1.02-1.25)	0.02
Glut11	1.23	(0.96-1.65)	>0.05	0.86	(0.88-1.05)	>0.05	0.85	(0.76-0.93)	<0.001
Glut14	1.72	(1.08-2.72)	0.01	1.49	(1.04-2.02)	0.03	1.03	(0.98-1.25)	>0.05
HK2	0.44	(0.28-0.79)	0.003	1.33	(1.16-2.03)	0.001	2.55	(1.97-3.30)	<0.001
HK2a	1.09	(0.92-1.19)	>0.05	0.82	(0.78-1.10)	>0.05	1.49	(1.57-2.29)	<0.001
PKM2	0.60	(0.60-0.80)	0.003	1.41	(1.02-1.95)	0.04	2.03	(1.72-2.40)	<0.001
PDK1	1.18	(0.85-1.65)	>0.05	1.27	(1.08-1.70)	0.012	1.38	(1.18-1.61)	<0.001

また、消化器癌における代謝関連遺伝子と生命予後との関係を調べると、さまざまな遺伝子と生命予後に関係を認めた。

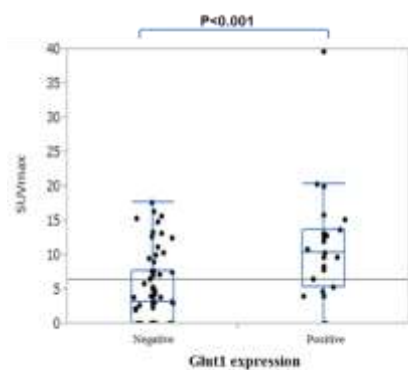


Warburg effect に関連した遺伝子において、Lactate あるいは、Pentose phosphate pathway が化学放射線療法耐性と関係すると報告されている。直腸癌においては、Glut1, LDH-5, PDK-1, HIF1A のうち、Glut1 が化学放射線療法の感受性と関係すると報告された。そこで、我々は、食道癌生検サンプル (N=122) を用いて化学療法の感受性を検討した。食道癌生検サンプルの免疫染色を行ったところ、良好な染色がえられた。



術前加療を行わない切除標本においては、Glut1 陽性は、145 例中 41 例(28.2%)の患者に認められ、単変量解析にて TNM 分類 (P=0.001)、腫瘍深達度 (P<0.001)、リンパ節転移 (P=0.025)および静脈侵襲 (P<0.001)と関係を認めた (表 3)。多変量二項ロジスティック解析では、Glut1 陽性は、腫瘍深達度 T3 以深(オッズ比 2.984; 95% 信頼区間: 1.208-7.371; P=0.018)と静脈侵襲(オッズ比 2.771; 95% 信頼区間: 1.118-6.871; P=0.028)との関係を認めた。また、術前に PET を施行した症例において Glut1 の発現と FDG-PET SUVmax に関係を認めた。

臨床病理学的因子	総数	Glut1の発現		P値
		陽性	陰性	
総数	145	41	104	
年齢				0.512
65以下	68	21 (51 %)	47 (45 %)	
65以上	77	20 (49 %)	57 (55 %)	
性別				0.802
男性	122	34 (83 %)	88 (85 %)	
女性	23	7 (17 %)	16 (15 %)	
腫瘍部位				0.071
頸部、上部、中部	91	21 (51 %)	70 (67 %)	
下部、腹部	54	20 (49 %)	34 (33 %)	
TNM分類				0.001
IA+B	66	9 (22 %)	57 (55 %)	
IIA+B	32	12 (29 %)	20 (19 %)	
IIIA+B+C	47	20 (59 %)	27 (26 %)	
深達度				<0.001
pT1a-pT2	106	20 (49 %)	86 (83 %)	
pT3	39	21 (51 %)	18 (17 %)	
リンパ節転移				0.025
なし	78	16 (39 %)	62 (60 %)	
あり	67	25 (81 %)	42 (40 %)	
リンパ管侵襲				0.074
なし	107	26 (63 %)	81 (78 %)	
あり	38	15 (37 %)	23 (22 %)	
静脈侵襲				<0.001
なし	76	11 (27 %)	65 (63 %)	
あり	69	30 (73 %)	39 (38 %)	
分化度				0.183
Grade 1	48	17 (41 %)	31 (30 %)	
Grade 2	66	20 (49 %)	46 (44 %)	
Grade 3	14	2 (5 %)	12 (12 %)	
不明	17	2 (5 %)	15 (14 %)	
微小血管密度				<0.001
低値	72	10 (24 %)	62 (60 %)	
高値	73	31 (76 %)	42 (40 %)	

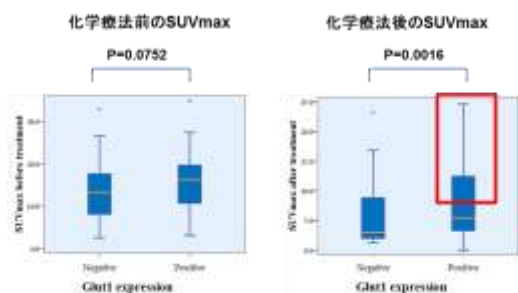


術前化学療法はリンパ節転移陽性症例に対して施行しているため、食道癌生検サンプル (N=122) においては進行症例を多く含んでおり、Glut1 陽性症例を 45.7% であり多く認めた。臨床病理学的検討においては、Glut1 の発現との関係は認められなかった。

Clinical or pathological feature	Total N	Glut1 expression		P value
		Positive	Negative	
All cases	122	58 (48 %)	64 (52 %)	
Age				0.327
<=65	45	24 (41 %)	21 (33 %)	
>65	77	34 (59 %)	43 (67 %)	
Gender				0.534
Male	102	47 (81 %)	55 (86 %)	
Female	20	11 (19 %)	9 (14 %)	
Location of tumor				0.432
Ce U1 M1	87	43 (74 %)	44 (69 %)	
LI A6	35	15 (26 %)	20 (31 %)	
cT stage				0.201
cT1b-T2	34	13 (22 %)	21 (33 %)	
cT3-T4	88	45 (78 %)	43 (67 %)	
Distant metastasis				0.285
Absent	109	50 (86 %)	59 (92 %)	
Present	13	8 (14 %)	5 (8 %)	
Histological grade				0.029 *
SCC	117	58 (100 %)	59 (92 %)	
Others	5	0 (0 %)	5 (8 %)	

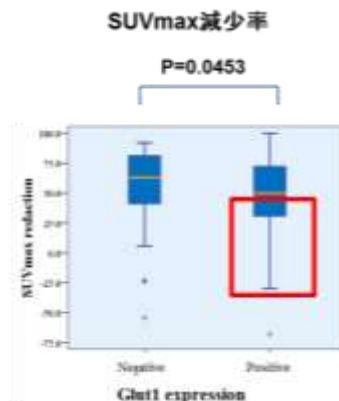
FDG-PET SUV max の変化率は、化学療法の治療効果、および生命予後と関係すると多数の報告があるが、我々は、化学療法前の生検サンプルにおける Glut1 の発現と化学療法前後の SUV max の関係を調べた。

化学療法前の SUV max は Glut1 高発現症例では高値である傾向を認めた (P=0.0752)。治療後に行った PET 検査においては、Glut1 高発現症例において、FDG-PET SUVmax が有意に高値 (P=0.0016) であることが確認された。



さらに、SUVmax の変化率を調べると、Glut1 高発現症例において、優位に SUV max 減少

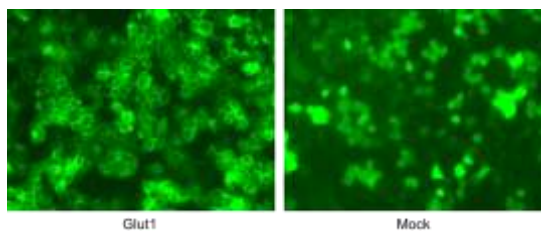
率が低い (P=0.0453) ことが確認された。



以上より、Glut1 高発現が化学療法耐性と関係していることが示唆された。

そこで我々は、On line data base を用いて、食道癌細胞株における Glut1 の発現とシスプラチンの IC50 の関係を調べた。すると、Glut1 高発現細胞株である TE-10、TE-15 は、Glut1 低発現細胞株である TE-8、TE-1 に比較して IC50 が高いことが確認された。

さらなる解析を行うため、Glut1 過剰発現細胞株を作成し、Glut1 蛋白の細胞膜での発現を確認した。



今後、Glut1 の発現の変化により抗癌剤感受性の変化を確認するとともに、その他の Warburg effect 関連遺伝子についても、確認を行っていく予定である。

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 18 件)

※全て査読有

① Sawayama H, Miyanari N, Morita K, Matsumoto K, Mizumoto T, Kubota T, Haga Y, Baba H. Surgical management of partial dentures in the cervicothoracic esophagus. (Esophagus, In press)

② Sawayama H, Miyanari N, Baba H. Cancer metabolism in gastrointestinal cancer. JCMT. 2015; 1(3) 172-182. doi: 10.4103/2394-4722.165533

- ③ Izumi D, Ishimoto T, Miyake K, Sugihara H, Eto K, **Sawayama H**, Yasuda T, Kiyozumi Y, Kaida T, Kurashige J, Imamura Y, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Takamori H, Araki N, Tan P, Baba H. CXCL12/CXCR4 activation by cancer-associated fibroblasts promotes integrin $\beta 1$ clustering and invasiveness in gastric cancer. *Int J Cancer*. 2015; 28. doi: 10.1002/ijc.29864. [Epub ahead of print]
- ④ Sugihara H, Ishimoto T, Yasuda T, Izumi D, Eto K, **Sawayama H**, Miyake K, Kurashige J, Imamura Y, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Takamori H, Baba H. Cancer-associated fibroblast-derived CXCL12 causes tumor progression in adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Med Oncol*. 2015;32(6):618. doi: 10.1007/s12032-015-0618-7. Epub 2015 Apr 24.
- ⑤ Ishimoto T, Izumi D, Watanabe M, Yoshida N, Hidaka K, Miyake K, Sugihara H, **Sawayama H**, Imamura Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Y, Horlad H, Komohara Y, Takeya M, Baba H. Chronic inflammation with *Helicobacter pylori* infection is implicated in CD44 overexpression through miR-328 suppression in the gastric mucosa. *J Gastroenterol*. 2015;50(7):751-7. doi: 10.1007/s00535-014-1019-y. Epub 2014 Dec 6.
- ⑥ Morita K, Haga Y, Miyanari N, **Sawayama H**, Matsumoto K, Mizumoto T, Kubota T, Baba H. A case of an omphalomesenteric duct remnant in an adult treated with laparoscopic surgery. *Int J Surg Case Rep*. 2015;8C:179-81. doi: 10.1016/j.ijscr.2015.01.047. Epub 2015 Jan 30.
- ⑦ Izumi D, Ishimoto T, Yoshida N, Nakamura K, Kosumi K, Tokunaga R, Sugihara H, **Sawayama H**, Karashima R, Imamura Y, Ida S, Hiyoshi Y, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Watanabe M, Baba H. A clinicopathological analysis of primary mucosal malignant melanoma. *Surg Today*. 2014; 9. [Epub ahead of print]
- ⑧ **Sawayama H**, Ishimoto T, Sugihara H, Miyanari N, Miyamoto Y, Baba Y, Yoshida N, Baba H. Clinical impact of the Warburg effect in gastrointestinal cancer (review). *Int J Oncol*. 2014;45(4):1345-54. doi: 10.3892/ijo.2014.2563. Epub 2014 Jul 25.
- ⑨ Ishimoto T, **Sawayama H**, Sugihara H, Baba H. Interaction between gastric cancer stem cells and the tumor microenvironment. *J Gastroenterol*. 2014;49(7):1111-20. doi: 10.1007/s00535-014-0952-0. Epub 2014 Mar 21.
- ⑩ Ishimoto T, Sugihara H, Watanabe M, **Sawayama H**, Iwatsuki M, Baba Y, Okabe H, Hidaka K, Yokoyama N, Miyake K, Yoshikawa M, Nagano O, Komohara Y, Takeya M, Saya H, Baba H. Macrophage-derived reactive oxygen species suppress miR-328 targeting CD44 in cancer cells and promote redox adaptation. *Carcinogenesis*. 2014;35(5):1003-11. doi: 10.1093/carcin/bgt402. Epub 2013 Dec 6.
- ⑪ **Sawayama H**, Ishimoto T, Watanabe M, Yoshida N, Sugihara H, Kurashige J, Hirashima K, Iwatsuki M, Baba Y, Oki E, Morita M, Shiose Y, Baba H. Tumor-suppressive effects and mechanism of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist in esophageal cancer. *Cancer Res*. 2014;15;74(2):575-85. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1836. Epub 2013 Nov 22.
- ⑫ **Sawayama H**, Kanemitsu K, Okuma T, Inoue K, Yamamoto K, Baba H. Safety of polypropylene mesh for incarcerated groin and obturator hernias: a retrospective study of 110 patients. 2014;18(3):399-406. doi: 10.1007/s10029-013-1058-y.
- ⑬ **Sawayama H**, Ishimoto T, Watanabe M, Yoshida N, Baba Y, Sugihara H, Izumi D, Kurashige J, Baba H. High expression of glucose transporter 1 on primary lesions of esophageal squamous cell carcinoma is associated with hematogenous recurrence. *Ann*

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① **澤山 浩** 石本 崇胤 藏重 淳二 辛島 龍一 岩槻 政晃 馬場 祥史 宮本 裕士 坂本 快郎 吉田 直矢 馬場 秀夫、「嫌気性代謝関連蛋白による抗癌剤耐性機序の解明と低分子化合物を用いた新規治療法の開発」、第26回消化器癌発生学会総会 2015年11月20日、米子全日空ホテル（鳥取県・米子市）
- ② **澤山 浩** 石本 崇胤 吉田 直矢 馬場 祥史 岩上 志朗 今村 裕 井田 智 辛島 龍一 杉原 栄孝 泉 大輔 塩瀬 能伸 馬場 秀夫、「食道扁平上皮癌に対するPPAR γ agonistとEGFRシグナルの下流を標的とした分子標的薬の併用効果に関する検討」、第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月16日、ホテルハマツ（福島県・郡山市）
- ③ **澤山 浩** 石本 崇胤 吉田 直矢 宮本 裕士 坂本 快郎 馬場 祥史 岩上 志朗 井田 智 今村 裕 辛島 龍一 杉原 栄孝 泉 大輔 馬場 秀夫、「食道扁平上皮癌におけるGlut1と血管新生に関する検討」、第144回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、国立京都国際会館（京都府・京都市）
- ④ **Hiroshi Sawayama**, Takatsugu Ishimoto, Masayuki Watanabe, Naoya Yoshida, Yoshifumi Baba, Hidetaka Sugihara, Daisuke Izumi, Junji Kurashige, Hideo Baba. “Glucose transporter 1 positivity on primary lesions of esophageal squamous cell carcinoma is associated with hematogenous recurrence.” AACR Annual Meeting 2014, 2014年4月8日, San Diego Convention Center (California, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤山 浩 (SAWAYAMA, Hiroshi)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：40594875