

令和元年6月13日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16916

研究課題名(和文) 頭頸部癌に対する乳酸トランスポーターを標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) A novel strategy, targeting monocarboxylate transporter in head and neck cancer

研究代表者

宮部 淳二 (Miyabe, Junji)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60756831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌培養細胞株を用いて乳酸トランスポーターである monocarboxylate transporter 4(MCT4)の発現を確認し、CRISPR/Cas9(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated Proteins 9)法によりMCT4ノックアウト細胞株を樹立した。MCT4ノックアウト株において、細胞増殖能および放射線感受性の評価を行った。MCT4ノックアウト株において細胞増殖能や放射線感受性に明らかな差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

局所進行頭頸部扁平上皮癌において臓器温存を目指す標準治療は化学放射線療法である。しかし、一部の癌細胞は放射線抵抗性を示し遺残・再発の原因となり、その治療成績は十分に満足のものではない。治療成績の向上のためには、低酸素環境を生き延びる癌細胞を制御する新規治療法の開発が必要であり、今回低酸素環境下で発現が上昇する乳酸トランスポーターに着目し研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) is a transmembrane protein. It is reported that MCT4 is activated by hypoxia and is associated with radioresistance resulting in poor prognosis. I confirmed the expression of MCT4 in head and neck cancer cell lines (Fadu). I established MCT4-knockout Fadu head and neck cancer cell line using CRISPR/Cas9 system-mediated genetic engineering to confirm the malignant potential of head and neck cancer. MCT4 knockout did not affect cell proliferation and radio-sensitivity.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：頭頸部癌 乳酸トランスポーター 放射線抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

局所進行頭頸部扁平上皮癌において臓器温存を目指す標準治療は化学放射線療法である。しかし、低酸素環境下で生存する癌細胞は放射線抵抗性を示し遺残・再発の原因となり、その治療成績は十分に満足のいくものではない。治療成績の向上のためには、低酸素環境を生き延びる癌細胞を制御する新規治療法の開発が望まれる。我々はこれまでに行った治療前 ^{18}F -FDG PET/CT を用いた化学放射線療法の予後予測の研究から、糖代謝活性が高い腫瘍は化学放射線に対し抵抗性であるということを見いだした。放射線治療抵抗性を示す頭頸部癌に対して解糖系をターゲットとした新規治療法の開発を目指すこととした。低酸素環境下の頭頸部扁平上皮癌において発現が増大する分子群をプロテオーム解析により同定し、糖代謝が予後と強く関連することから、その中で glucose を細胞内に取込むトランスポーターである glucose transporter 1 (GLUT1) に着目した。GLUT1 に関して頭頸部扁平上皮癌培養細胞株を用いた実験から、低酸素環境下でグルコースの取り込みを抑制すると放射線の効果が増強する可能性が示唆された。一方、GLUT1 は脳組織などで強く発現しており、その標的治療は重篤な合併症が生じることが懸念された。そこで今回、解糖系におけるグルコースの最終代謝産物である乳酸を細胞外に排出するトランスポーターである monocarboxylate transporter 4 (MCT4) に着目した。通常的好気性条件下の正常組織ではピルビン酸は乳酸ではなくアセチル CoA となり TCA サイクルに入るため、MCT4 の機能を抑制しても重篤な障害は生じないと考えたからである。一方、癌組織では好気性・嫌気性条件下にかかわらず解糖系が亢進している (Warburg 効果) ため、MCT4 の機能を抑制すると解糖系の亢進が障害され致死すると考えられた。

2. 研究の目的

局所進行頭頸部扁平上皮癌において臓器温存を目指す標準治療としてシスプラチンと放射線を併用する化学放射線療法が汎用されている。本研究では、低酸素環境下で亢進する糖代謝、特に解糖系に着目し、グルコースの最終代謝産物である乳酸を細胞外に排出するトランスポーターである monocarboxylate transporter 4 を標的とした新規治療法開発のための基礎研究を行い、放射線抵抗性頭頸部癌の制御を目指す。

また遺伝子改変技術である CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR-associated Proteins 9) システムを導入することでゲノム編集による新たながん治療を頭頸部扁平上皮癌に応用できる可能性についても検討し、MCT4 ノックアウトにより生じる頭頸部扁平上皮癌における増殖能や放射線感受性の変化について検討する。

3. 研究の方法

頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いて、遺伝子改変技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて MCT4 ノックアウト株を作成した。MCT4 ノックアウト株における細胞増殖能や放射線感受性を評価した。細胞増殖能の評価については、MTT アッセイおよび CyQUANT Cell Proliferation Assay によりおこなった。放射線照射による細胞の放射線感受性の評価は細胞生存率および colony formation assay により行った。CRISPR/Cas9 による MCT4 ノックアウト株の樹立は、頭頸部扁平上皮癌培養細胞株 Fadu、Detroit562、BICR6、BICR18 を用いて行い、いずれの細胞株においても少なくとも 3 回樹立を試み、4 種類 (4 組) のガイド RNA を設計しノックアウト手技を行った。MCT4 のノックアウトは DNA シークエンスおよびウェスタンブロットティングにより確認を行った。

4. 研究成果

頭頸部扁平上皮癌培養細胞株 Fadu、Detroit562、BICR6、BICR18 を用いて、MCT4 の発現の有無をウェスタンブロットティングにより確認した。すべての細胞株について CRISPR/Cas9 法により MCT4 ノックアウト株の樹立を試みた。Fadu において MCT4 ノックアウト株の樹立に成功したが、その他の細胞株においては MCT4 ノックアウト株の樹立は困難であった。樹立した MCT4 ノックアウトはガイド RNA で設計した目的のゲノム配列部位でノックアウトされていた。樹立した MCT4 ノックアウト細胞株と control 株を比較した結果、細胞増殖能や放射線感受性に明らかな差は認められなかった。

本研究で、頭頸部扁平上皮癌培養細胞株での MCT4 の発現を確認し、CRISPR/Cas9 による MCT4 遺伝子ノックアウト株の樹立に成功した。MCT4 ノックアウトによる細胞増殖能抑制効果や放射線感受性の増加は検出できなかったが、過去の研究報告から *in vitro* で細胞増殖能や放射線感受性の違いを検出できない場合でも、*xenograft* 等による評価でその違いを検出できることが報告されており、今後検討していく必要があると考えられた。

CRISPR/Cas9によりゲノム編集について複数の guide RNA を設計し、複数回にわたり MCT4 ノックアウト株の樹立を試みたが Fadu のみ、かつ 1 株のみ樹立可能であり、その他の細胞株では樹立することができなかった。MCT4 ノックアウトにより癌細胞が致死に至ったため MCT4 ノックアウト株の樹立が困難であった可能性も示唆されるため、今後は shRNA を用いた MCT4 ノックダウンでの検討が必要となるかもしれない。一方で、shRNA を用いた MCT4 発現抑制の実験系では目的遺伝子の発現を 100% 消失させることはできず、MCT4 タンパクの発現が癌細胞へ与える影響を正確に評価することは困難となる可能性が生じることを考えると、コンディショナルに MCT4 をノックアウトするような実験系を構築する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中川崇

ローマ字氏名：Nakagawa Takashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。