

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08375

研究課題名(和文) 大腸がんにおけるグルコース輸送体の機能解析と治療標的として有用性の検討

研究課題名(英文) Expression of glucose transporter in colorectal cancer and of its usefulness as a therapeutic target

研究代表者

久保田 英嗣 (Kubota, Eiji)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授

研究者番号：30405188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸がんにおけるグルコース輸送体の発現・機能について解析した。大腸がん細胞株HCT116、SW480にはグルコース輸送体、SGLT2が発現し、これらの阻害により細胞増殖が抑制された。細胞実験による検証では、SGLT2は糖取り込み作用だけではなく、細胞エネルギーの恒常性維持の制御因子、AMPKの活性化を介して細胞増殖に関与していることが示された。大腸がん細胞株マウス移植モデルにおいても同様の結果が確認された。さらに、メタボローム解析ではSGLT2阻害によるシスチンの低下、酸化型グルタチオンの増加が確認され、SGLT2による細胞内代謝制御の解明の手がかりとなる結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では大腸がん細胞におけるグルコース輸送体、なかでもSGLT2の機能について細胞内代謝制御機能の観点から検証した。SGLT2阻害は大腸がんの増殖を抑制すること、また、その作用メカニズムとしては、糖の取り込み抑制だけではなく、AMPKの制御が関与していることを明らかとした。これは、細胞内代謝を外的にコントロールすることによる大腸がん治療の有効性を示す結果で、新規薬剤の開発につながるものと考えられる。また、すでに上市されているSGLT2阻害剤の大腸がん予防、治療へのドラッグリポジショニングの可能性を示すものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the expression and function of glucose transporters in colon cancer. The colon cancer cell lines HCT116 and SW480 express the glucose transporter SGLT2, and their inhibition suppresses cell proliferation. Biological experiments using colon cancer cell lines demonstrated that SGLT2 is involved in cell proliferation through the activation of AMPK, a regulator of cellular energy homeostasis, in addition to glucose uptake. Similar results were obtained in the experiments using mouse xenograft models. Metabolomic analysis revealed that SGLT2 inhibition reduced cystine and increased oxidized glutathione, providing clues for the clarification of intracellular metabolic regulation by SGLT2.

研究分野：消化器内科

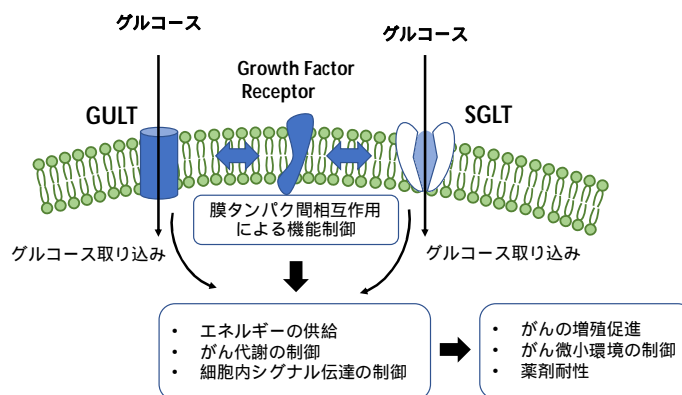
キーワード：大腸癌 グルコース輸送体 SGLT2阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内へのグルコース取り込みやグルコースを起点としたエネルギー代謝が亢進している「ワールブルグ効果」が、がん細胞に特異的な代謝様式として知られており、このワールブルグ効果を応用した画像診断技術として  $^{18}\text{F}$ -FDG PET が臨床実用化されている。最近では、メタボローム解析などの研究手法により、がん細胞は増殖・浸潤能を最大限に発揮できるように自らの代謝機構を巧妙に変化させていることが明らかにされるなど、がん代謝に関連した研究が「ワールブルグ効果」に留まらず発展を見せ、注目されている。

がん代謝において中心的な役割を果たしている蛋白質の一つにグルコース輸送体がある。グルコース輸送体はヒトでは 14 種類確認されており、受動輸送体である glucose transporter (GLUT) と能動輸送体である sodium-dependent glucose transporter (SGLT) とに大別される。GLUT は細胞内外のグルコース濃度差を利用した拡散促進輸送蛋白で、エネルギー消費することなくグルコースを輸送することができる。一方、SGLT は 2 次性能動輸送蛋白であるため、外的な環境には影響されにくいがグルコースの取り込みにはエネルギー (ATP) が必要となる。これらの 2 種のグルコース輸送体は、がん細胞特有の代謝機構や細胞内シグナル活性といった内部要因や、がん細胞へのエネルギー供給の状態、がん微小環境といった外部要因に応じて動的に協調し、がん細胞の生存に寄与していると考えられる (図 1)。その他にグルコース輸送体と EGFR などの膜タンパク質との相互作用による細胞内シグナル活性のメカニズムや、グルコース輸送体が膜タンパク質として安定的に作用するための制御機構などが明らかとなってきているが、各々のグルコース輸送体の機能や役割については不明な点も多く、また治療標的分子としての有用性も十分に検討されていない。

図1 大腸がんにおけるグルコース輸送体の想定される機能



## 2. 研究の目的

本研究は、大腸がんにおけるグルコース輸送体の発現および機能について解析を行い、グルコース輸送体の、がん治療標的としての有用性を検証することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸がん細胞を用いた、グルコース輸送体の発現、機能解析

ヒト大腸がん細胞 (HCT116、SW480) を用い、Western blot により、SGLT1、SGLT2 の発現を検証した。その後、SGLT2 阻害剤による細胞内への糖取り込みおよび、細胞内シグナル伝達系への影響を検証した。糖取り込みについては、グルコース取り込みアッセイを用いて検証した。また、SGLT2 阻害剤による細胞内シグナル伝達系への影響については、AMPK 活性を Western blot を用いて検証した。さらに、siRNA を用いて SGLT2 を knock down して同様の検証を行った。

### (2) メタボロミクスによるグルコース輸送体によるがん代謝制御メカニズムの解析

グルコース輸送体によるエネルギー代謝への影響をメタボローム解析で検証した。SGLT2 阻害剤で処理した大腸がん細胞株、HCT116 から Bligh-Dyer 法により水溶性成分 (アミノ酸、糖類を含む) を分画分取した。得られたサンプルを液体クロマトグラフ分析計にかけ、代謝産物を計測した。処理前後の代謝産物の変化を解析し、グルコース輸送体により活性化されるエネルギー代謝経路を同定した。

### (3) 大腸がん細胞株マウス移植モデルを用いたグルコース輸送体の機能解析

大腸がん細胞株、HCT116 を免疫不全マウス (BALB/cSlc-nu/nu) の皮下に移植し、SGLT2 阻害剤を経口投与し、腫瘍の増殖を経時的に計測した。さらに、腫瘍組織の免疫組織染色により細胞増殖に関連する Ki-67 などの発現を検証した。

## 4. 研究成果

### (1) 大腸がん細胞を用いた、グルコース輸送体の機能解析

Western blot により大腸がん細胞、HCT116、SW480 における SGLT1、SGLT2 の発現が確認された。

HCT116 および、SW480 を SGLT2 阻害剤で処理した後に、細胞増殖アッセイにより、細胞増殖への影響を検証したところ、両細胞ともに SGLT2 阻害剤により増殖が抑制された。次に、グルコース類似体 2-DG を用いたアッセイにより、糖取り込み機能への影響を評価した。SGLT2 阻害剤により SW480 では糖取り込みが抑制されたが、HCT-116 では抑制を認めなかった。siRNA を用いた SGLT2 の knock down による検証でも同様の結果が得られ、細胞株により SGLT2 の機能阻害による影響が異なることが示された。さらに、SGLT2 阻害剤で処理した大腸がん細胞から蛋白質を抽出し、Western blot 法により細胞内シグナルの活性について検証した。HCT116、SW480 とともに SGLT2 阻害剤により、細胞内エネルギー調節に重要な役割を果たしている AMPK シグナル伝達経路の活性が誘導された。以上から、SGLT2 は AMPK 活性を介して大腸がん細胞の増殖に関与していると考えられ、必ずしも SGLT2 の糖取り込み作用が細胞内代謝に関与しているわけではないことが示された。

#### (2) メタボロミクスによるグルコース輸送体のがん代謝制御メカニズムの解析

メタボローム解析では、SGLT2 阻害剤により細胞内 ADP、AMP の上昇および ATP の低下を認め、これらの変化が AMPK の活性に関与していると考えられた。その他にも、SGLT2 阻害剤によるシスチンの低下、酸化型グルタチオンの増加を認め、グルコース輸送体、SGLT2 は糖取り込み以外の細胞内代謝にも関与していることが明らかとなった。

#### (3) 大腸がん細胞株マウス移植モデルを用いたグルコース輸送体の機能解析

マウスの皮下に HCT116 を移植し、腫瘍が形成された後に、SGLT2 阻害剤を経口投与し、腫瘍増殖への影響を評価した。SGLT2 阻害剤投与群では、コントロール群に比較して有意に腫瘍の増殖が抑制された。マウスから摘出した腫瘍組織の免疫組織染色では、SGLT2 阻害剤投与群では、Ki-67 発現の有意な低下を認め、さらに、腫瘍細胞の AMPK の活性化が誘導されており、in vitro の結果と矛盾しないものであった。腫瘍細胞から蛋白質を抽出し、Western blot により細胞内シグナルの活性について検証したところ、免疫組織染色の結果と同様に、SGLT2 阻害剤投与群では、AMPK の活性および、そのシグナル経路の下流にある mTOR 活性の抑制を認め、SGLT2 阻害剤は AMPK 活性を介し、腫瘍増殖を抑制していると考えられた。

これまでの研究結果から、グルコース輸送体、SGLT2 の阻害による大腸がんの増殖抑制のメカニズムは、がん細胞内への糖取り込みの抑制によるものとは異なる細胞内代謝への作用が関与していることが明らかとなった。AMPK が重要な役割を果たしていると考えられたが、メタボローム解析では、SGLT2 阻害剤によるシスチンの低下、酸化型グルタチオンの増加も認めており、今後、これらの細胞内代謝産物の変化がどのように関与しているのか、さらに検証をすすめたい。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	八木 崇志  (Yagi Takashi)  (00781840)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員   (23903)	
研究分担者	片岡 洋望  (Kataoka Hiromi)  (40381785)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関