

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09199

研究課題名(和文) 消化管癌・GISTに対するGLUT1阻害剤を用いた革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the treatment for gastrointestinal cancers and gastrointestinal stromal tumors using the glucose transporter 1 inhibitor.

研究代表者

澤山 浩 (Sawayama, Hiroshi)

熊本大学・病院・助教

研究者番号：40594875

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)：食道癌細胞株に対して、癌細胞に糖の取り込みを行うグルコーストランスポーター1 (GLUT1)の発現を抑制することで癌細胞の増殖抑制効果を示し、その増殖抑制効果の機序を解明した。GLUT1の発現がプラチナ系抗癌剤であるシスプラチンの感受性と関係することを示し、GLUT1の発現を抑制により抗がん剤感受性が向上することを示した。低濃度で特異的にGLUT1を阻害する薬剤(BAY-876)を用い、癌抑制効果およびシスプラチンとの相加効果を示した。食道扁平上皮癌臨床検体において、GLUT1の発現が抗癌剤の治療効果と関係することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗癌剤治療において抗癌剤耐性機序の解明は重要な課題である。また、細胞障害性抗癌剤やがん遺伝子に対する分子標的療法が治療の中心であり新たな治療法の開発が望まれる。我々は、癌の糖代謝経路に関係するGLUT1が抗癌剤感受性の関係することを明らかにした。さらに、低濃度で作用するGLUT1阻害剤を用い、食道扁平上皮癌の増殖抑制効果を示した。本研究によって、抗癌剤感受性に関係する因子が明らかになり、糖代謝経路を標的とした新たな治療法の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Cancer growth is reported to be dependent on glucose metabolism. We demonstrated that suppressing the expression of glucose transporter 1 (GLUT1), which is responsible for glucose uptake into cancer cells, had an inhibitory effect on proliferation in esophageal cancer cell lines. The expression of GLUT1 was associated with the sensitivity to cisplatin, a platinum-based anti-cancer drug, and suppressing GLUT1 expression improved the sensitivity to the anti-cancer drug. BAY-876, a specific inhibitor for GLUT1 at low concentrations, inhibited cell proliferation and had an additive effect with cisplatin. The expression of GLUT1 was associated with the therapeutic effect of anticancer drugs, in clinical specimens of esophageal squamous cell carcinoma.

研究分野：癌特異的な糖代謝に対する低分子化合物を用いた抗がん剤感受性、抗腫瘍効果に関する研究

キーワード：消化管癌 GIST 抗癌剤感受性 GLUT1阻害剤 BAY-876

1. 研究開始当初の背景

(1) 化学療法の進歩と耐性の問題

食道扁平上皮癌において、周術期化学療法による予後の改善が示された (J Clin Oncol. 2003, Ann Surg Oncol. 2012)。胃癌においても、抗癌剤の進歩により術前化学療法、Conversion surgery の有用性が検証されている。消化管 GIST は、イマチニブなどのリン酸化阻害剤により治療成績が向上した。しかしながら、化学療法が奏功しない症例の治療に難渋しており、抗癌剤感受性の評価、抗癌剤耐性の克服、さらに有害事象のより少ない新しい治療法の開発が求められていると考える。

(2) 癌における GLUT1 の発現

腫瘍は急速な増殖に伴い嫌気性代謝経路に依存し糖の取り込みが増加する。その現象は、FDG-PET 診断において応用される。糖の取り込みを行う Glucose transporter (GLUT)には 14 種類あり、その発現頻度には組織特異性があり、Glucose、Galactose、mannose などの各種糖への親和性に差を有している。GLUT1 は様々な悪性腫瘍において発現が亢進し、癌の糖代謝に関係する主要な transporter である。我々は GLUT1 の過剰発現は様々な癌種において予後不良因子であり、化学放射線療法の感受性と関係することを報告した (J Clin Oncol. 2014)。嫌気性代謝による Lactate 産生により、ROS を介し抗癌剤耐性と関係すると報告された (Oncogene. 2012)。

(3) GLUT1 阻害剤の開発

GLUT1 の膜蛋白構造解析が進み (Nature. 2014)、300 万の低分子化合物より Urtra high throughput によって nM 単位で作用する強力な GLUT1 阻害剤 (BAY-876)が同定された (ChemMedChem. 2016)。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的の概要

本研究は、消化管癌、消化管 GIST に対して、我々が継続的に行ってきた GLUT1 に対する si-RNA を用いた増殖抑制効果、およびその機序に関する研究結果に基づいて、近年開発された GLUT1 阻害剤を用いて、In vitro、In vivo での抗腫瘍効果の評価、エネルギー代謝経路の変化、抗癌剤や低分子化合物との併用効果を評価することを目的とする。

(2) GLUT1 阻害剤の増殖抑制効果機序の解明

GLUT1 阻害剤は様々な腫瘍に対して増殖抑制効果を示し、臨床応用が望まれる薬剤であるが、GLUT1 阻害剤による代謝関連酵素の変化、抗腫瘍効果の機序、化学療法との併用効果を明らかにする。

(3) GLUT1 阻害剤の有害事象の克服

In vitro の研究では、GLUT1 の発現を抑制すると、癌の糖代謝に関与する遺伝子である hexokinase2 (HK2)の代償性発現上昇が認められ、HK2 阻害剤(3-Bromohexine)との併用が有効である可能性が考えられる。GLUT1 の発現抑制にて、GLUT3、GLUT4 の代償性発現上昇は認めなかったが、In vivo では GLUT1 阻害剤投与により血糖値上昇、インスリン過剰分泌に伴い、PI-3K-AKT 経路の活性化、GLUT4 の膜移行が促進され、癌の増殖が促進する可能性が考えられる。糖尿病治療薬として SGLT2 阻害剤が近年臨床応用されたが、GLUT1 阻害剤と SGLT2 阻害剤の併用により血糖を適正にコントロールし、有害事象の軽減と腫瘍増殖抑制の相乗効果が期待できると考える。

これらの研究結果により、従来の細胞毒性を有する抗癌剤治療、血管新生、癌増殖シグナルをターゲットとした分子標的療法、および免疫チェックポイント阻害剤に加え、癌特異的な糖代謝経路を標的とする新規治療の臨床応用がより現実的となると考える。

3. 研究の方法

In vitro において、食道癌細胞株、GIST 細胞株に対し BAY-876 (GLUT1 阻害剤)を投与し、0.1nM 以下の濃度で強力に増殖抑制効果を確認した。増殖抑制効果に関する In vitro での機序解明、In vivo での抗腫瘍効果、他剤との併用効果を計画的に評価する。GLUT1 阻害剤を食道癌細胞株 (TE8, TE11)、GIST-T1 に対して投与し、siRNA を用いて GLUT1 を抑制した結果と同様に糖代謝関連酵素 (HK2, PKM2, LDHA)、細胞周期調整遺伝子 (CDK6, p21, p27) の発現の変化を評価する。細胞周期の変化を FACS 解析にて、アポトーシスを Caspase3 assay、PARP の Western blot により解析する。BAY-876 と HK2 阻害剤の併用投与、Imatinib 耐性 GIST 細胞株への BAY-

876 の効果を評価する。

4. 研究成果

(1) GLUT1 発現抑制と作用機序および GLUT1 阻害剤の増殖抑制効果

GLUT1 高発現株 TE-11 に対して、siRNA を用いて GLUT1 の発現を抑制し、FACS 解析にて Caspase 3 assay、Cell cycle assay を行ったところ、GLUT1 の発現抑制にてアポトーシスは認めず、細胞周期の有意な変化も確認されなかった。GLUT1 阻害剤 (BAY-876) を用いた In vitro の検討を行った。GLUT1 高発現株である TE-8 および TE-11 に BAY-876 を投与したところ、TE8 においては 0.025nM、TE11 においては 0.01nM にて増殖抑制効果を示した。抗腫瘍効果は、濃度、時間依存性であった。BAY-876 は臨床応用可能な低濃度で抗腫瘍効果を示すことが確認した。

(2) GLUT1 発現抑制と CDDP 感受性の評価

三種類の細胞株 (TE-8, TE-10, TE-11) の GLUT1 を Si RNA を用いて発現を抑制すると、いずれも増殖抑制効果が確認された。GLUT1 発現抑制後、CDDP (0.2 μM, 0.4 μM) 投与では増殖抑制効果を認めなかった (101%, 99.7%) が、GLUT1 発現抑制後では同濃度で (80.3%, 73.2%) の増殖抑制効果を認め、CDDP の感受性が向上した。

GLUT1 の発現を抑制した際に、GLUT2-4 の発現の変化を確認したが、GLUT1 低下に伴う GLUT2-4 の代償性の変化は認めなかった。On line data base での検討にて 17 種類の食道がん細胞株を GLUT1 の発

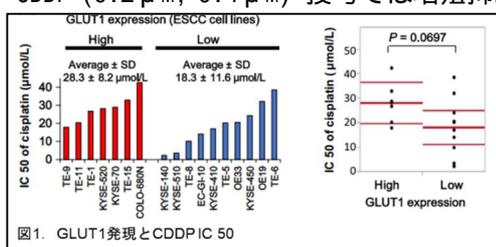


図1. GLUT1発現とCDDP IC50

現が高い細胞株を低い細胞株の 2 群に分けて、CDDP の IC50 を比較したところ、GLUT1 高値群 (n=7) では、平均 ± 標準誤差 28.3 ± 8.2 μM であったのに対して、GLUT1 低値群 (n=10) では、18.3 ± 11.6 μM であり、GLUT1 低値群で感受性が良い傾向にあった (図 1)。

(3) GLUT1 阻害剤と CDDP の併用効果

GLUT1 阻害剤 (BAY-876) と CDDP の併用に関して検討した。TE-8 において、0.5 μmol/L CDDP 単剤 : 0.025nmol/L BAY-876 単剤 : CDDP + BAY-876 併用において、79.9% ± 2.3% : 59.9% ± 4.9% : 38.1% ± 3.1% (average ± SD) の抗腫瘍効果が得られた。TE-11 において、46.0% ± 6.5% : 51.0% ± 8.2% : 15.4% ± 3.7% であり、CDDP と BAY-876 の相加効果が確認された。以上より、BAY-876 は単剤でも低濃度で腫瘍細胞増殖を抑制し、CDDP との併用において相加効果を示すことが明らかになった (図 2)。

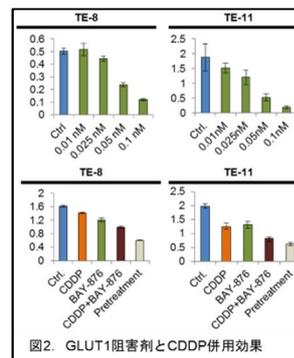


図2. GLUT1阻害剤とCDDP併用効果

(4) 臨床データにおける GLUT1 の発現と抗がん剤感受性の評価

食道扁平上皮癌における術前治療を行った症例を対象とした臨床データにおいても、GLUT1 タンパク発現が高値の症例は SUV max の減少率が 61.2 ± 4.2 に対して、GLUT1 タンパク発現が低い症例では、SUV max の減少率は 46.2 ± 4.4 であり、SUV max 減少率に有意差を認めた (図 3)。

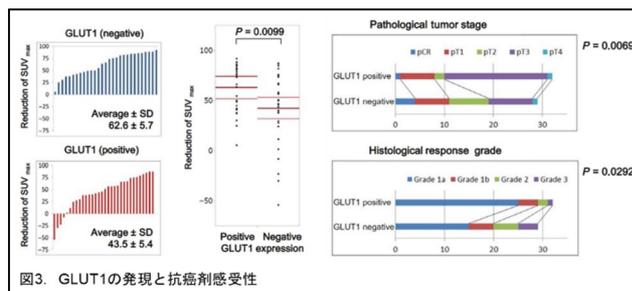


図3. GLUT1の発現と抗がん剤感受性

(5) 胃 GIST における GLUT1 の発現と予後解析

胃 GIST における GLUT1 の発現を検討した。胃 GIST においても、GLUT1 の発現高値症例は、FDG-PET の SUV max が有意に高値であり、再発予後不良であった。

(6) 胃 GIST における増殖抑制機序

GIST の細胞株 (GIST-T1) にて、GLUT1 の発現を siRNA にて抑制すると、増殖抑制効果が確認された。Cell cycle assay にて、GLUT1 の発現を抑制すると S 期細胞が減少し、G1 arrest が誘導されることを確認した。糖代謝関連酵素 (HK2, PKM2)、細胞周期調整遺伝子 (CDK6, p21, p27) の発現の変化を調べたが、有意な変化は確認できなかったが、LDHA の上昇が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sawayama Hiroshi, Ogata Yoko, Ishimoto Takatsugu, Mima Kosuke, Hiyoshi Yukiharu, Iwatsuki Masaaki, Baba Yoshifumi, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Baba Hideo	4. 巻 110
2. 論文標題 Glucose transporter 1 regulates the proliferation and cisplatin sensitivity of esophageal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1705 ~ 1714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sawayama Hiroshi, Miyamoto Yuji, Hiyoshi Yukiharu, Ogawa Katsuhiko, Kato Rikako, Akiyama Takahiko, Kiyozumi Yuki, Yoshida Naoya, Baba Hideo	4. 巻 5
2. 論文標題 Overall survival after recurrence in stage I-III colorectal cancer patients in accordance with the recurrence organ site and pattern	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 813 ~ 822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamane Taishi, Sawayama Hiroshi, Yoshida Naoya, Morinaga Takeshi, Akiyama Takahiko, Eto Kojiro, Harada Kazuto, Ogawa Katsuhiko, Iwatsuki Masaaki, Iwagami Shiro, Baba Yoshifumi, Miyamoto Yuji, Baba Hideo	4. 巻 27
2. 論文標題 Preoperative transferrin level is a novel indicator of short- and long-term outcomes after esophageal cancer surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 131 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-02031-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamane Taishi, Yoshida Naoya, Horinouchi Tomo, Morinaga Takeshi, Eto Kojiro, Harada Kazuto, Ogawa Katsuhiko, Sawayama Hiroshi, Iwatsuki Masaaki, Baba Yoshifumi, Miyamoto Yuji, Baba Hideo	4. 巻 407
2. 論文標題 Minimally invasive esophagectomy may contribute to low incidence of postoperative surgical site infection in patients with poor glycemic control	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langenbeck's Archives of Surgery	6. 最初と最後の頁 579 ~ 585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00423-021-02306-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawayama Hiroshi, Miyamoto Yuji, Mima Kosuke, Kato Rikako, Ogawa Katsuhiro, Hiyoshi Yukiharu, Shimokawa Mototsugu, Akiyama Takahiko, Kiyozumi Yuki, Iwagami Shiro, Iwatsuki Masaaki, Baba Yoshifumi, Yoshida Naoya, Baba Hideo	4. 巻 26
2. 論文標題 Preoperative iron status is a prognosis factor for stage II and III colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 2037 ~ 2045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-01995-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawayama Hiroshi, Miyamoto Yuji, Hiyoshi Yukiharu, Shimokawa Mototsugu, Kato Rikako, Akiyama Takahiko, Sakamoto Yuki, Daitoku Nobuya, Yoshida Naoya, Baba Hideo	4. 巻 5
2. 論文標題 Preoperative transferrin level is a novel prognostic marker for colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 243 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sawayama Hiroshi, Miyamoto Yuji, Ogawa Katsuhiro, Yoshida Naoya, Baba Hideo	4. 巻 4
2. 論文標題 Investigation of colorectal cancer in accordance with consensus molecular subtype classification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 528 ~ 539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 澤山 浩, 石本 崇胤, 吉田 直矢, 日吉 幸晴, 岩槻 政晃, 宮本 裕士, 平尾 洸樹, 坂田 和也, 高田登, 吉仲 一郎, 原田 和則, 馬場 秀夫
2. 発表標題 食道扁平上皮癌におけるGLUT1発現と腫瘍増殖およびCDDP感受性の関係に関する検討
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masaaki Iwatsuki, Hiroshi Sawayama, Daisuke Kuroda, Yuki Koga, Kazuto Harada, Kohei Yamashita, Shiro Iwagami, Kojiro Eto, Takatsugu Ishimoto, Yoshifumi Baba, Naoya Yoshida, Jaffer A. Ajani and Hideo Baba
2. 発表標題 Glucose Transporter 1 regulate cell glycolysis and proliferation in Gastrointestinal stromal tumor and its clinicopathological significance.
3. 学会等名 2019 AACR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤山 浩, 宮本 裕士, 小川 克大, 加藤 梨佳子, 中村 健一, 岩槻 政晃, 岩上 志朗, 馬場 祥史, 吉田 直矢, 馬場 秀夫
2. 発表標題 消化管癌における術前トランスフェリンと術後長期成績の関係に関する検討
3. 学会等名 JDDW
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤山 浩, 宮本 裕士, 小川 克大, 加藤 梨佳子, 森永 剛司, 山根 大侍, 秋山 貴彦, 中村 健一, 原田 和人, 岩槻 政晃, 岩上 志朗, 馬場 祥史, 吉田 直矢, 馬場 秀夫
2. 発表標題 糖尿病を有する大腸癌Stage I-III患者の臨床病理学的背景、術後合併症、長期予後に関する検討
3. 学会等名 消化器病学会九州支部例会
4. 発表年 2021年

〔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	石本 崇胤 (Ishimoto Takatsugu) (00594889)	熊本大学・病院・特任准教授 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	清住 雄希 (Kiyozumi Yuki) (30827324)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員 (17401)	
研究分担者	岩槻 政晃 (Iwatsuki Masaaki) (50452777)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教 (17401)	
研究分担者	宮本 裕士 (Miyamoto Yuji) (80551259)	熊本大学・病院・講師 (17401)	

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