

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

|   |
|---|
| 機関番号：83802  |
| 研究種目：若手（B）  |
| 研究期間：2011～2012  |
| 課題番号：23790928   |
| 研究課題名（和文） GLUT1 を新規治療効果予測マーカーに用いた肺がんの個別化医療の実現にむけた研究   |
| 研究課題名（英文） Investigation of the biological mechanism of GLUT1 to develop it as a novel therapeutic predictive biomarker for realization of the personalized lung cancer medicine |
| 研究代表者<br>芹澤昌邦（SERIZAWA MASAKUNI）<br>静岡県立静岡がんセンター（研究所）<br>研究者番号：00569915   |

### 研究成果の概要（和文）：

mTOR 阻害剤の効果予測マーカーとして、positron emission tomography (PET) を利用することを目的に非小細胞肺癌を対象として基礎的検討を行った。その結果、mTOR 阻害剤と PET において用いられる 2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose の集積との関連性および、mTOR 阻害剤の感受性規定因子としての PTEN の可能性について明らかにすることができた。

### 研究成果の概要（英文）：

We conducted a basic study in non-small cell lung cancer for the purpose of using positron emission tomography (PET) as a predictive marker for the effects of mTOR inhibitors. From the results, we were able to clarify the relationship between mTOR inhibitors and the accumulation of 2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose used in PET as well as the potential of PTEN as a factor determining the sensitivity to mTOR inhibitors.

### 交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：

GLUT1、PET、治療効果予測マーカー、肺癌、mTOR 阻害剤

#### 1. 研究開始当初の背景

本邦を含め世界各国におけるがん関連死における主要な原因であり、難治がんとしてされる肺癌を対象とした分子標的型抗がん剤が多数開発されている。しかしながら、奏功が期待される患者の選択に有用かつ、個別化医療の実現化において必要な「治療効果予測マーカー」が確立されている薬剤は極めて少ない。これまでの研究により、がん組織におけるグルコースの取り込みに働く主要な輸送体である GLUT1 (glucose transporter type

1) の発現レベルが、胸部悪性腫瘍の診断および分子標的型抗がん剤治療時の「治療効果予測マーカー」となり得る可能性があることを見出した。また、GLUT1 は PET (positron-emission tomography) 検査において使用される、[<sup>18</sup>F]FDG (2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose) の集積に関与していることから、GLUT1 がバイオマーカーとなり得た場合、既のがんの診断において広く使われている PET 検査を、治療効果予測マーカーとして利用できる可能性が

あり、早期の臨床への応用も期待できる。そこで、GLUT1 および<sup>18</sup>F]FDG の集積量を、肺癌の分子標的型抗がん剤による治療における「治療効果予測マーカー」として臨床応用するために必要な分子生物学的背景について明確にすることは、分子標的型抗がん剤を用いた肺癌の個別化医療の活性化において意義あるものと考え、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

mTOR は GLUT1 の上流に位置する PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達系の主要分子である。その下流には低酸素条件下におけるがん組織の環境適応を司る HIF-1 $\alpha$  があることから mTOR 阻害剤は、効率的に腫瘍細胞増殖や血管新生の阻害を誘導することが報告されている。本研究では、肺癌治療において開発が進められているものの、明確な「治療効果予測マーカー」が確立されていない、この mTOR 阻害剤に注目し、GLUT1 および<sup>18</sup>F]FDG の集積量を肺癌治療における mTOR 阻害剤の「治療効果予測マーカー」として臨床応用するための理論的根拠の確立および、mTOR 阻害剤の感受性規定因子の探索を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞株および試薬

17 種類の非小細胞肺癌細胞株（腺癌 7 株; HCC827, HCC4006, PC-9, NCI-H1975, NCI-H1650, PC-14, A549, NCI-H441, NCI-H1666, Calu-3, NCI-H1781, NCI-H2228、扁平上皮癌 5 株; NCI-H2170, NCI-H520, NCI-H226, EBC-1, LK-2）を用い検討を行った。GLUT1 阻害剤であるフロレチンおよび mTOR 阻害剤（テムシロリムス、Ku-0063794）を使用した。また、GLUT1 上流分子の HIF-1 $\alpha$  の活性化を誘導するために CoCl<sub>2</sub> を用いた。

### (2)GLUT1 の発現レベルおよび<sup>18</sup>F]FDG の集積レベルの検討

GLUT1 の発現レベルを、ウエスタンブロット法にて検討した。<sup>18</sup>F]FDG の集積量は、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

### (3)非小細胞肺癌細胞株の mTOR 阻害剤に対する感受性の検討

mTOR 阻害剤に対する感受性評価を、MTT アッセイを用いて行い、IC<sub>50</sub> の値により細胞間の感受性について比較を行った。

### (4)mTOR 阻害剤により影響を受ける分子の検出

定常状態および mTOR 阻害剤添加状態において、PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達系、

糖代謝、低酸素条件下での腫瘍環境の制御に関与する遺伝子の発現レベルおよびリン酸化レベルについてウエスタンブロット法を用いて調べ、mTOR 阻害剤添加により変動する遺伝子を検出した。

## 4. 研究成果

### (1) 非小細胞肺癌細胞株における GLUT1 と<sup>18</sup>F]FDG の集積との関連性および<sup>18</sup>F]FDG の集積に影響を与える他の因子の同定

17 種類の非小細胞肺癌細胞株を用いたウエスタンブロット法による GLUT1 の発現レベルの検討結果を基に、高発現群 4 細胞株 (A549, HCC827, NCI-H1650, EBC-1) および低発現群 3 細胞株 (NCI-H441, HCC4006, NCI-H2170) を選び出し以降の解析に用いた。これら細胞株における<sup>18</sup>F]FDG の集積は、GLUT1 阻害剤であるフロレチン処理により完全に抑制された。また、CoCl<sub>2</sub> 刺激による GLUT1 上流分子の HIF-1 $\alpha$  の活性化により GLUT1 の発現が上昇し、連動して<sup>18</sup>F]FDG の集積量も上昇したことから、非小細胞肺癌細胞株における<sup>18</sup>F]FDG の取り込みは GLUT1 に強く依存していることが示された。次に、GLUT1 の発現レベルと<sup>18</sup>F]FDG の集積量との関連性について検討を行った結果、他の癌種同様に相関が認められた。しかし、PTEN を欠損している腺癌細胞株 NCI-H1650 株では、その GLUT1 の発現レベルは中等度であるにもかかわらず、<sup>18</sup>F]FDG の集積量は GLUT1 の発現レベルが最も高い A549 細胞株の 2 倍以上の極めて高い値を示し、他の細胞株とは明らかに異なる傾向が見られた。また、非小細胞肺癌臨床検体を用いた免疫組織染色においても、PTEN の発現強度と PET における<sup>18</sup>F]FDG 集積量は逆相関にあることが明らかになり、PTEN が腫瘍におけるグルコースの取り込みに影響を与える重要な因子であることが示された。

### (2)非小細胞肺癌細胞株における mTOR 阻害剤と<sup>18</sup>F]FDG の集積との関連性について

非小細胞肺癌臨床検体を用いた免疫組織染色において<sup>18</sup>F]FDG の集積量と、mTOR の発現量の間に関係があることが明らかになった。そこで、以前の研究で明らかにした悪性胸膜中皮腫と同様に、mTOR 阻害剤が非小細胞肺癌治療における治療選択肢となり、また GLUT1 および<sup>18</sup>F]FDG の集積量が mTOR 阻害剤の「治療効果予測マーカー」として用いることが可能か検討することを目的に非小細胞肺癌細胞株の mTOR 阻害剤に対する感受性および<sup>18</sup>F]FDG の集積に対する mTOR 阻害剤の阻害作用の機序について解析を行った。

本研究においては、作用機序の異なる 2 種

類の mTOR 阻害剤(mTORC1 阻害剤：テムシロリムス、mTORC1/mTORC2 阻害剤：Ku-0063794)を用い、 $^{18}\text{F}$ FDG の集積に対する両薬剤の阻害効果を比較することで、 $^{18}\text{F}$ FDG の集積に関与するシグナル伝達系の特定を試みた。mTORC1/mTORC2 阻害剤である Ku-0063794 はテムシロリムスに比べ高い増殖抑制効果を示したことから、mTORC1/mTORC2 の両シグナル伝達系の阻害が、非小細胞肺癌における効果的な増殖抑制において必要であることが明らかになった。PTEN 欠損を示す NCI-H1650 株は両 mTOR 阻害剤に対する感受性が最も低かったことから、PTEN はグルコースの取り込みに影響を与えるだけでなく、mTOR 阻害剤において共通の感受性規定因子である可能性が示された。

次に、mTOR 阻害剤の $^{18}\text{F}$ FDG の集積に対する影響について検討を行った。全ての細胞株において、両 mTOR 阻害剤は $^{18}\text{F}$ FDG の集積に対する阻害作用を示したものの、テムシロリムスの示すその阻害効果は Ku-0063794 に比べ顕著に高く、mTOR 及びその下流の S6 のリン酸化に対しても、テムシロリムスは Ku-0063794 より高い阻害効果を示した。上記の結果より、mTORC1 経路は mTOR および下流分子の活性化に関与しているだけでなく、 $^{18}\text{F}$ FDG の集積に強く影響を与えていることが明らかになった。この結果は、テムシロリムスを含む mTORC1 阻害剤の腫瘍における作用を評価するうえで、PET を用いた $^{18}\text{F}$ FDG の集積量の変化の測定が有用である可能性を示唆している。また、Ku-0063794 に対する感受性 (IC<sub>50</sub> 値) と、Ku-0063794 による $^{18}\text{F}$ FDG の集積量の減少率の間には明確な相関関係が認められており、この結果も mTOR 阻害剤の効果予測に、 $^{18}\text{F}$ FDG の集積量を検出する PET を利用できる可能性を示唆しているものと考えられる。

本研究により非小細胞肺癌における $^{18}\text{F}$ FDG の集積に関与する分子機序、mTOR 阻害剤と $^{18}\text{F}$ FDG の集積との関連性そして PTEN がグルコースの取り込みに影響を与える主要な因子であるだけでなく、mTOR 阻害剤の感受性規定因子としての可能性について明らかにすることができた。これらの結果は、mTOR 阻害剤の「治療効果予測マーカー」として GLUT1 および $^{18}\text{F}$ FDG の集積量を臨床にて応用できる可能性を示唆しており、今後のさらなる研究が必要と考える。

#### 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 7 件)

- (1). Serizawa, M., Takahashi, T., Yamamoto, N., Koh, Y. Combined treatment with erlotinib and transforming growth factor- $\beta$  type 1 receptor (TGF- $\beta$ RI) inhibitor is effective to suppress the enhanced cell motility of erlotinib-resistant non-small cell lung cancer cells. *J Thorac Oncol.* 2013. 8:259-269. (査読有り)
- (2). Akamatsu, H., Kaira, K., Murakami, H., Serizawa, M., Koh, Y., Ono, A., Shukuya, T., Tsuya, A., Nakamura, Y., Kenmotsu, H., Naito, T., Takahashi, T., Endo, M., Harada, H., Nakajima, T., Yamamoto, N. The impact of clinical outcomes according to EGFR mutation status in patients with locally advanced lung adenocarcinoma who received concurrent chemoradiotherapy. *Am J Clin Oncol.* 2012. (査読有り)
- (3). Kaira, K., Serizawa, M., Koh, Y., Takahashi, T., Hanaoka, H., Oriuchi, N., Endo, M., Kondo, H., Nakajima, T., Yamamoto, N. Relationship between  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake on positron emission tomography and molecular biology in malignant pleural mesothelioma. *Eur J Cancer.* 2012, 48:1244-1254. (査読有り)
- (4). 芹澤昌邦, 洪 泰浩. 「バイオバンクと個別化医療」 *Progress in Medicine 基礎・治療.* 2011, 31:2575-2580. (総説・査読なし)
- (5). Kaira, K., Serizawa, M., Koh, Y., Miura, S., Kaira, R., Abe, M., Nakagawa, K., Ohde, Y., Okumura, T., Murakami, H., Tsuya, A., Nakamura, Y., Naito, T., Takahashi, T., Kondo, H., Nakajima, T., Endo, M., Yamamoto, N. Expression of thymidylate synthase, orotate phosphoribosyltransferase and dihydropyrimidine dehydrogenase in thymic epithelial tumors. *Lung Cancer.* 2011, 74:419-425. (査読有り)
- (6). Kaira, K., Serizawa M., Koh, Y., Miura, S., Kaira, R., Abe, M., Nakagawa, K., Ohde, Y., Okumura, T., Naito, T., Murakami, H., Takahashi, T., Kondo, H., Nakajima, T., Endo, M., Yamamoto, N. Expression of excision repair cross-complementation group 1, breast cancer susceptibility 1, and  $\beta$  III-tubulin in thymic epithelial tumors.

*J Thorac Oncol.* 2011, 6:606-613. (査読有り)

- (7). Kaira, K., Murakami H., **Serizawa, M.**, Koh, Y., Abe, M., Ohde, Y., Takahashi, T., Kondo, H., Nakajima, T., Yamamoto, N. MUC1 expression in thymic epithelial tumors: MUC1 may be useful marker as differential diagnosis between type B3 thymoma and thymic carcinoma. *Virchows Arch.* 2011, 458:615-620. (査読有り)

〔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

芹澤昌邦 (SERIZAWA MASKUNI)

静岡県立静岡がんセンター (研究所)・研究員

研究者番号：00569915