

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462025

研究課題名(和文) Warburg効果をターゲットとした新規胃癌薬物療法の基礎的研究

研究課題名(英文) Establishment of novel drug therapy targeting Warburg effect in gastric cancer

研究代表者

北島 吉彦 (Kitajima, Yoshihiko)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30234256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：固形癌には低酸素領域が存在する。低酸素環境下癌細胞は浸潤・転移能亢進や抗がん剤耐性を示す。代表研究者はsiRNAによるHIF-1 発現ノックダウン(KD)が、低酸素下胃癌細胞株58As9のWarburg効果を抑制することで過剰活性酸素産生を介し、apoptosisを誘導することを証明した。また、グルコース(G) + インスリン(I)付加がHIF-1 KDによるapoptosis効果を増強させることをin vitroおよびin vivoにて立証し報告した(PLoS ONE 2015)。現在、HIF-1 阻害剤YC-1 + GIが同様の効果を示すことを証明し、臨床応用に向けin vivo解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia is substantial in solid tumors. Cancer cells under hypoxic environment are known to increase malignant characters including metastasis and drug resistance. Present study revealed that HIF-1 knockdown (KD) destroyed Warburg effect in gastric cancer cell line 58As9 under hypoxia, and induced apoptosis owing to excessive ROS production. Glucose (G) plus Insulin (I) treatment enhanced the apoptotic effect in the hypoxic 58As9 KD cells due to further ROS production. In vivo study showed that GI treatment increased apoptotic cells of 58As9 KD tumor, but not 58As9 control in nude mice, supporting in vitro data. These results was successfully published in PLoS One paper in 2015. Thereafter, we isolated HIF-1 inhibitor YC-1 and revealed that YC-1 + GI therapy induced apoptotic effect in wild type 58As9 cells under hypoxia. At present, we are investigating whether or not YC-1 + GI therapy provides apoptotic effect on 58As9 tumor in nude mice.

研究分野：胃癌の分子生物学

キーワード：HIF-1 胃癌 ワールブルグ効果 グルコース インスリン 活性酸素 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は胃癌細胞株 58As9 株に siRNA transfection による HIF-1 発現欠失株 KD 細胞を樹立した。KD 株は低酸素環境(1%O₂)において細胞死増強がみられた。さらに caspase3, チトクローム C 発現上昇がみられ、内在性 apoptosis を確認した。FACS 解析にて低酸素下 KD 株では細胞内 ROS の特異的蓄積がみられた。この apoptosis は、抗酸化剤 NAC 処理によって回避されたため、ROS 蓄積による細胞死であることを明白にした。さらに過剰 ROS 産生を期待して、グルコース + インスリン(GI) 併用効果を解析したところ、予想通り低酸素環境下 KD 細胞の apoptosis は GI 併用によりさらに顕著となった。以上の新知見を踏まえ、今回 Warburg 効果に着眼した新規胃癌治療薬(HIF-1阻害剤+GI 併用療法)の基礎的研究を立案し本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究は、Warburg 効果に着眼し、HIF-1阻害剤さらには GI (グルコース + インスリン) 療法併用による新規固形癌治療開発に向けた基礎的研究を目的とする。

3. 研究の方法

胃癌細胞株 : 58As9

HIF-1 ノックダウン細胞 : 58As9KD およびコントロール 58As9SC

細胞増殖能評価 : MTS およびトリパンブルー染色にて死細胞率を算出する

アポトーシス評価 : cleaved caspase3 および細胞質内チトクローム c をウエスタンブロット法にて検出する。

細胞内活性酸素(ROS)測定 : ROS 測定キットを用いて FACS 解析する

遺伝子発現解析 : 定量的 RT-PCR 法にて

Warburg 効果関連遺伝子群 (GLUT-1, AldolaseC, PDK1, LDHA, MCT4)、ミトファジー関連遺伝子 (BNIP3, BNIP3L)、ROS スカベンジャー (MnSOD)、電子伝達系関連酵素 (LON, COX4-2) の mRNA 発現量を定量的に測定する。

グルコース uptake 解析 : 2DG uptake キットを用いて 58As9KD および 58As9SC 株のグルコース uptake 能を control, G, GI 処理下に測定する (常酸素環境および低酸素環境)。

GLUT1 膜上発現解析 : 58As9KD および 58As9SC 株を control, G, GI 処理後、細胞膜分画を調整し GLUT1 抗体によるウエスタンブロットを行い評価する。

Warburg 効果判定 : アセチル CoA および乳酸量を測定キットにて評価する。

ヌードマウス皮下腫瘍解析 (*in vivo*) : ヌードマウス皮下に 58As9KD および 58As9SC を接種する。10 日後皮下腫瘍形成を確認後、コントロール (PBS)、グルコース (G)、GI の 3 薬剤を毎日 1 回腹腔内投与する。投与 12 日まで腫瘍径を計測後 sacrifice し、腫瘍内アポトーシスを cleaved caspase3 免疫染色にて評価する。

4. 研究成果

(平成 25 年度) 研究背景を元に、低酸素下 58As9HIF-1 KD (KD) における GI 添加のアポトーシス増強効果を詳細に解析した。まず、FACS 解析にて KD はコントロール (SC) に比し経時的な ROS 蓄積を認め、GI 添加により ROS 産生はさらに増加した。抗酸化剤処理により KD 株および KD+GI 処理の低酸素誘導アポトーシスは抑制され、HIF-1 欠失により過剰 ROS 蓄積 アポトーシス機序が立証された。遺伝子発現解析では、Warburg 効果発現に重要な GLUT-1, 解糖系酵素 (Aldolase C), PDK1, LDHA, MCT4 の低酸素誘導発現が SC に比し KD では有

意に抑制されていた。さらに ROS スカベンジャーである MnSOD, 電子伝達系因子 COX4-2, LON、ミトファジー因子 BNIP3, BNIP3L の発現解析においても同様であり、HIF-1 が低酸素環境下において ROS 産生をコントロールする key factor であることが示唆された。Glucose uptake 解析においては、GI 処理が GLUT1 タンパクの膜上移送を促進することで低酸素下 KD 細胞の glucose 取り込みが上昇し、より多量なアセチル CoA が TCA サイクルへ取り込まれ、電子伝達系での ROS 上昇に寄与することを立証した。ヌードマウス皮下腫瘍モデルでは、SC 腫瘍内の HIF-1 発現を認め腫瘍内に低酸素環境が存在する事を証明した。さらに HIF-1 発現が見られない KD 腫瘍は GI 腹腔内投与により著明な腫瘍抑制効果が見られる事を明らかにし、in vitro 結果を指示する結果を得た。

(平成26年度)平成26年度は前年度に得られた結果を複数学会にて発表した。さらに論文にまとめ欧米誌 PLoS One に投稿し受理された。さらに研究を進展すべく、過去の報告をもとに17種類のHIF-1 阻害剤を入手し、低酸素環境のみで殺細胞効果を示す YC-1 を選出した。YC-1(10 μM)は胃癌細胞株 58As9 親株の低酸素下でのHIF-1 発現をKD株と同程度に抑制した。また、YC-1(10 μM)の低酸素特異的な細胞増殖抑制効果がGI添加により増強されることも立証した。またこの細胞増殖抑制効果がアポトーシスによることを証明した。さらに、YC-1(10 μM)およびYC-1(10 μM)+GI 併用によるアポトーシスがKD株での解析と同様に、過剰ROS産生を介して惹起されることを立証した。Glucose uptake 解析においてもKD株を用いた解析と同様、GI処理によるGLUT-1膜上発現誘導を認めた。ヌードマウス皮下腫瘍解析の予備実験として、YC-1 腹腔内投与を1mg/kg, 10mg/kg, 30mg/kg で行うと、10mg/kg,

30mg/kg 投与では経時的体重減少(副作用)がみられたが、1mg/kg 投与ではコントロールと同様に体重が維持され、腫瘍抑制効果も見られた。YC-1 1mg/kg を至適投与量に決定し、H27年度のin vivo 研究へと繋げた。以上の途中経過については、学会にて発表した。

(平成27年度)平成27年度(最終年度)ではYC-1+GI併用のin vitro効果につきさらなる機序解析を行った。まず、低酸素環境下におけるWarburg効果を解析した。細胞内アセチルCoAをコントロール(DMSO)、コントロール+GI、YC-1(10 μM)単独、YC-1+GIと比較した。その結果、低酸素環境下58As9細胞のYC-1+GI処理においてアセチルCoAはKD株と同様に最高値を示し、Warburg効果阻害が示唆された。さらに細胞外乳酸濃度においては、低酸素環境下でのコントロール+GIが最高値となった(Warburg効果)。一方、YC-1, YC-1+GI, KD株では低値を呈し、Warburg効果抑制を示唆する結果であった。

ヌードマウス皮下腫瘍モデルでのin vivo 解析では、H26年度に設定したYC-1濃度(1mg/kg)でcontrol(DMSO)、control+GI、YC-1単独、YC-1+GI投与を行った。その結果、YC-1+GIにのみ強力な抗腫瘍抑制効果が見られた。

以上、H25~H27年度に遂行した研究内容につき報告した。

現在、追加実験を行い「YC-1+GI 併用療法の基礎的研究」として論文発表に向け準備中である。

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1件)

Tanaka T, Kitajima Y, Miyake S, Yanagihara

K, Hara H, Nishijima-Matsunobu A, Baba K, Shida M, Wakiyama K, Nakamura J, Noshiro H. The apoptotic effect of HIF-1 α inhibition combined with glucose and insulin treatment on gastric cancer under hypoxic conditions. PLoS One 2015: 10; e0137257. (査読あり)

〔学会発表〕(計6件)

- 1 脇山幸大、北島吉彦、田中智和、中村 淳、柳原五吉、能城浩和。
固形癌の低酸素環境下エネルギー代謝変容に着眼したHIF-1 阻害剤+GI療法の機序解析と臨床応用への可能性。
第3回がんと代謝研究会 2015 7.16-17 金沢
- 2 脇山幸大、北島吉彦、田中智和、志田雅明、馬場耕一、中村 淳、能城浩和。
HIF-1 と癌エネルギー代謝変容に着眼した新規胃癌治療の可能性。
第115回日本外科学会定期学術集会 2015 4.16-18
- 3 脇山幸大、北島吉彦、田中智和、中村 淳、宮崎耕治、能城浩和。
HIF-1 と癌エネルギー代謝変容に着眼した新規胃癌治療の可能性。
第12回がんとハイポキシア研究会 2014 11.21-22 佐賀
- 4 脇山幸大、北島吉彦、田中智和、宮崎耕治、能城浩和。
HIF-1 の癌エネルギー代謝における役割と新規胃癌薬物治療の可能性。
第25回日本消化器癌発生学会 2014 11.13-14 福岡
- 5 脇山幸大、北島吉彦、田中智和、三宅修輔、西島亜紀、柳原五吉、中村 淳、能城浩和。
HIF-1 発現阻害+GI療法は胃癌に対する理想的薬物療法となりうる。第73回日本癌学会学術総会 2014 9.25-27 横浜
- 6 北島吉彦、田中智和、三宅修輔、中村 淳、

宮崎耕治、能城浩和。
低酸素環境下のエネルギー代謝変容に着眼した新たな胃癌薬物療法の可能性。
第2回がんと代謝研究会 2014 7.10-11 東京

〔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
北島吉彦(KITAJIMA Yoshihiko)
佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30234256

(2)研究分担者
中村 淳(NAKAMURA Jun)
佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：60404175

(3)連携研究者
()

研究者番号：