

【8】

氏 名	しば や のり すけ 渋谷 紀 介
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第652号
学位授与の日付	平成27年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (消化器外科学)
学位論文題目	Augmented pentose phosphate pathway plays critical roles in colorectal carcinomas (大腸癌におけるペントースリン酸回路活性化の意義)
論文審査委員	(主査) 教授 平 石 秀 幸 (副査) 教授 加 藤 広 行 教授 安 西 尚 彦

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

腫瘍細胞では特定の糖代謝経路である、解糖系やペントースリン酸回路(PPP)が活性化している。癌遺伝子や腫瘍抑制因子による糖代謝制御が明らかになりつつあるが、標的治療でそれらの知見を活かすことができるかについては不明な点が多い。

【目 的】

大腸癌で糖代謝が変化している証拠を得るために、大腸癌検体のタンパクを抽出し、PPPの律速酵素および解糖系の酵素タンパクの合成を測定した。PPPの薬理阻害法を確立するために、大腸癌細胞株を使用して、mTOR阻害薬INK128および天然物Avemar, resveratrolの解糖系, PPPに対する薬理作用を評価した。PPPの薬理阻害が実際に制癌作用を示すかどうか、大腸癌検体のヌードマウス継代移植モデルで検証した。

【対象と方法】

本研究は患者からのインフォームドコンセントと獨協医科大学倫理委員会の承認（承認番号：26015）を得て、指針にしたがって行った。

獨協医科大学第二外科で手術した大腸癌の検体を採取しタンパクを抽出、もしくは腫瘍細胞の初代培養を行った。また5つの大腸癌細胞株を使用した。タンパク合成、タンパクのリン酸化はSDS-PAGEとウエスタンブロッティングで測定した。PPPを薬理阻害することが期待される3つの

薬剤 (mTOR阻害剤 (INK128), Avemar, resveratrol) を使用し、解糖系 (ALDOA, PKM2, LDHA)・PPP (G6PD, PGD, TKT)・mTORシグナル系 (pS6^{S235, S236}, pAKT^{S473}, pAKT^{T308}) の酵素タンパクの合成およびリン酸化を観察した。好氣的解糖の変化は細胞株を使用し培地内の糖と乳酸を測定し推測した。細胞内の抗酸化作用を推測するために、薬剤投与前後のNADPH/NADP⁺比、還元型グルタチオン (GSH) /酸化型グルタチオン (GSSG) 比を計算して、薬剤による変化を調べた。初代培養した細胞をヌードマウスに皮下注射し、腫瘍を作成させ、安定して継代可能な検体を選別した。このような腫瘍継代移植モデルにINK128、Avemarを投与し、腫瘍形成・増殖に対する影響を観察した。

【結 果】

大腸癌手術検体でPKM2 (9/16症例), LDHA (5/16), G6PD (11/16), PGD (6/16), TKT (13/16) は上昇していたが、ALDOA (3/16) はあまり変化がなかった。INK128とAvemarは大腸癌細胞株でPPPの酵素合成を低下させた。INK128とresveratrolは糖の消費を抑制し乳酸産生を減少させた。INK128とAvemarはNADPH/NADP⁺比、GSH/GSSG比を低下させた。腫瘍形成させたヌードマウスにINK128およびAvemarを経口摂取させると腫瘍増殖を抑制し、さらに、継代による腫瘍形成を遅らせた。

【考 察】

本研究では、mTORシグナルがエネルギー状態と酸化還元状態などの細胞内の環境情報を統合し、mTORC1は胚線維芽細胞で糖代謝の遺伝子を制御しているという最近の報告に注目して、大腸癌でも同様にmTORが解糖系とPPPを制御しているという作業仮説を立てた。

癌細胞は好氣的解糖を行うことが知られている (Warburg効果)。解糖系は本流とPPPがあり、大腸癌では両方の回路が亢進していた。我々は、大腸癌細胞株でINK128とresveratrolを投与すると培地の色が変わらないことを観察した。すなわち、乳酸が生成されず、培地が酸性にならなかったことを示した (解糖系本流の阻害)。しかしAvemarにはこのような作用はなかった。その一方で、PPPの抑制はINK128とAvemarで顕著であり、resveratrolにそのような作用はなかった。すなわち、好氣的解糖とPPPは互いに協調しているわけではなく、AvemarはPPPを選択的に抑え、resveratrolは本流を選択的に抑制していると考えられた。

GSHは細胞外の酸化還元状態を調節するペプチドである。NADPHはGSSGをGSHに変換する。癌細胞は生存、増殖のシグナル伝達、細胞の運動性の促進、炎症や血管新生による腫瘍微小環境を作るためにROSを産生する。一方、化学放射線治療はROSを生成し癌細胞を死滅させる。よって癌細胞はROSから身を守るために抗酸化作用をもつ。癌細胞はPPPを亢進させ、NADPHを生成、結果GSHを再生し抗酸化作用を示している。今回の結果で、INK128とAvemarは抗酸化作用を抑制していると考えられた。

我々は大腸癌細胞を初代培養しヌードマウスに移植、それを継代するモデルを作成した。腫瘍を繰り返し継代移植できるようになるためには、癌幹細胞が必要不可欠であることが知られている。転移巣は原発巣と違い癌細胞にとっては厳しい環境である。癌幹細胞はその環境に耐え生着する、この現

象をcolonizationと呼び、ヌードマウスへの皮下移植も癌細胞にとっては厳しい環境である。よって、ヌードマウスの皮下に腫瘍を形成することは、転移巣で腫瘍を形成するcolonizationを部分的に模倣すると考えられた。INK128とAvenmarは3症例中2症例で腫瘍増殖を抑えたが1つのケースでは全く抑えなかった。また3症例中別の2症例では腫瘍の形成を遅らせた。これはcolonizationを抑えた結果であり、mTOR-PPP回路は腫瘍細胞の増殖あるいは転移巣のcolonizationに重要な役割を持つと考えられた。

現在再発・転移大腸癌の治療は、分子標的薬の併用が標準的である。しかし、個々に変異プロファイルがあり、分子標的薬が効かない人も存在する。我々の観察によると、大腸癌ではほぼ普遍的に解糖系とPPPが活性化している。つまり、変異プロファイルの個人差に捉われず、mTOR-PPP回路を標的とした治療が有効である可能性がある。

さらに今後臨床応用としては、mTOR阻害剤rapamycinは大腸癌では適応がないことを考えると、INK128とAvenmarは単剤での使用は困難で、既存の抗癌剤との併用が望ましいと考えられた。実際、INK128またはAvenmarがGSH/GSSG比を低下させるという我々のデータは、抗癌剤が引き起こすROSと相乗効果を示す可能性を示唆している。

【結 論】

PPPは大腸癌検体で活性化し、mTORはPPPの上流シグナルである。PPPの薬理的抑制はINK128とAvenmarで成し遂げられた。mTOR-PPP回路の薬理阻害は大腸癌の治療戦略になることが期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

腫瘍細胞では特定の糖代謝経路である、解糖系やペントースリン酸回路(PPP)が活性化している。大腸癌で糖代謝が変化している証拠を得るために、大腸癌検体のタンパクを抽出し、PPPの律速酵素および解糖系の酵素タンパクの合成を測定した。PPPの薬理阻害法を確立するために、大腸癌細胞株を使用して、mTOR阻害薬INK128および天然物Avenmar, resveratrolの解糖系, PPPに対する薬理作用を評価し、実際に制癌作用を示すかどうか、大腸癌検体のヌードマウス継代移植モデルで検証している。その結果、1) 大腸癌手術検体でPyruvate Kinase M2 (9/16症例), LDHA (5/16), G6PD (11/16), Phosphogluconate Dehydrogenase (6/16), Transketolase (13/16) は上昇していることから、大腸癌でPPPは活性化していること、2) INK128とAvenmarは大腸癌細胞株でPPPの酵素合成を低下させたこと、3) INK128とresveratrolは糖の消費を抑制し乳酸産生を減少させたこと、4) INK128とAvenmarはNADPH/NADP⁺比、GSH/GSSG比を低下させたこと、5) 腫瘍形成させたヌードマウスにINK128およびAvenmarを経口摂取させると腫瘍増殖を抑制し、さらに、継代による腫瘍形成を遅らせたことを明らかにしている。これらの結果から、PPPは大腸癌検体で活性化し、mTORはPPPの上流シグナルであること、およびPPPの薬理的抑制はINK128とAvenmarで成し遂げられることが示唆された。mTOR-PPP回路の薬理阻害は大腸癌の治療戦略になることが期待される。

【研究方法の妥当性】

申請論文は、患者からのインフォームドコンセントと獨協医科大学倫理委員会の承認（承認番号：26015）を得て、指針にしたがって行っている。獨協医科大学第二外科で手術した大腸癌症例の検体を採取しタンパクを抽出、もしくは腫瘍細胞の初代培養を行っている。SDS-PAGEとウエスタンブロットリングで酵素タンパクの合成・リン酸化を測定している。また、薬剤の効果を検証するため *in vitro* と *in vivo* の両方の実験を行っており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

癌遺伝子や腫瘍抑制因子による糖代謝制御が明らかになりつつあるが、標的治療で解糖系、PPPが活性化しているという知見を臨床応用できるかについては不明である。申請論文は、大腸癌細胞株を用い、INK128, Avemarの二つの薬剤でPPPの抑制を確認し、GSH/GSSG比を低下させROSの中和を抑制していることを示した。さらに大腸癌検体を使った *in vivo* 実験で腫瘍形成と colonization を抑えたことを明らかにしている。この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文は、多数の大腸癌手術検体を用い、確立された実験手技で初代培養やヌードマウスへの腫瘍の継代を行っている。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、mTOR-PPPの関係からも妥当な結論といえる。

【当該分野における位置付け】

申請論文は、PPPを標的とした治療戦略の先駆けとなる研究である。この研究を通して当該領域の発展につながり、さらに臨床的に応用されることが期待される点で意義が深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、消化器外科学や腫瘍学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Oncology

88 : 309-319, 2015