

【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のか、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。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。私たちはまず、大腸癌細胞株で INK128 と resveratrol を投与すると培地の色に変化しないことに気づいた。つまり、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。つまり好氣的解糖と PPP は互いに協調しているわけではない。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た。

私たち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った。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分かっている。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* を部分的に模擬すると考えられた。INK128 と Avemar 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* を抑えたと考えられた。よって 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治療となっている。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 Avemar は単剤での使用はハードルが高く、既存の抗癌剤と併用していくことが望ましいと考えている。実際、INK128 または Avemar 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 Avemar 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。