

氏 名	島 卓史
(ふりがな)	(しま たかふみ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲博医第18号
学位審査年月日	令和4年1月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Glucose transporter-1 inhibition overcomes imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumor cells (グルコーストランスポーター1の阻害により消化管間質腫瘍細胞のイマチニブ耐性が克服される)
論文審査委員	(主) 教授 樋口 和秀 教授 田中 慶太郎 教授 高井 真司

学位論文内容の要旨

《目的》

消化管間質腫瘍(GIST)は最も一般的な消化管間葉系腫瘍である。メシル酸イマチニブ(IM)はチロシンキナーゼ受容体遺伝子(KIT)の発現阻害によりGIST治療に効果を示す。一方で薬剤耐性が大きな問題となっており、GISTのIM耐性獲得機構を明らかにすることは、新たな治療戦略の構築に不可欠である。がん細胞は好氣的な状況下でも解糖系を用いてATPを産生すること(Warburg effect)が報告されており、解糖系関連蛋白であるグルコーストランスポーター(GLUT)-1は重要な構成要素である。本研究の目的は、GIST細胞における解糖系とIM耐性の関係を調べることで、GISTのIM耐性を克服する可能性を探ることである。

《方 法》

GIST-T1 細胞株（親株）に IM を継続投与し、IM 耐性 GIST 細胞株（耐性株）を樹立した。親株と耐性株において、解糖系関連分子（GLUT-1、hexokinase (HK)2、pyruvate kinase (PK)M2、lactate dehydrogenase (LDHA)）の発現を、Western blotting 法、Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)、グルコースおよびラクテートアッセイを用いて評価した。さらに、IM 投与患者における臨床情報と過去に発表されたトランスクリプトームデータである GEO データベース (GSE15966) を解析した。次に、耐性株に対して siR-*SLC2A1* の細胞導入もしくは GLUT-1 阻害剤 (WZB117) を投与して GLUT-1 阻害による解糖系関連分子 (GLUT-1、HK2、PKM2、LDHA) およびアポトーシス経路関連分子 (Bcl-2、cleaved PARP、cleaved caspase-3、-9) の蛋白発現に対する影響を、Western blotting 法を用いて調べた。アポトーシスアッセイは、Annexin V-FITC/PI 染色後にフローサイトメトリーを用いて施行した。また、耐性株のスフェロイドを作製し、細胞生存率とスフェロイドの直径を測定した。

《結 果》

耐性株は *PDGFRA* の二次変異を認め、親株の約 19 倍の IM 耐性を有していた。親株は KIT のリン酸化に影響を及ぼさない低濃度の IM 投与でも細胞生存率が低下し、解糖系関連遺伝子の mRNA 発現が減少した。対照的に、耐性株ではそれらの mRNA 発現が増加した。同様に IM 投与で GLUT-1 蛋白の発現、解糖系関連蛋白のリン酸化、グルコースの取り込みとラクテートの産生が親株で減少したが耐性株では増加した。GEO データベースを用いた解析では、IM 奏功群で IM 投与後に GLUT-1 発現が有意に低下した。siR-*SLC2A1* を導入した耐性株に IM を投与すると AKT のリン酸化を有意に減少させ、細胞生存率も抑制したが、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 の発現は変化せず、アポトーシス経路の蛋白発現量は IM 投与の有無で有意な変化を認めなかった。アポトーシスアッセイでも併用による有意な変化を認めなかった。一方、WZB117 と IM の併用投与は耐性株における細胞生存率、AKT のリン酸化と Bcl-2 の発現を有意に抑制し、アポトーシス経路の蛋白発現

量を増加させた。さらに、WZB117 と IM の併用投与はアポトーシスを有意に誘導し、スフェロイドの直径と細胞生存率を有意に抑制した。

《考 察》

本研究では、GIST 細胞株の IM 耐性獲得に GLUT-1 が関与していることを明らかにし、耐性株に WZB117 と IM を併用投与することで、アポトーシスの誘導を介して相乗的な細胞増殖抑制作用が生じることが示された。GIST 治療に使用可能な抗がん剤は限られており、IM 耐性の獲得が問題視されている。耐性獲得の詳細な機構の解明は十分とは言えず、本研究はその一端を明らかにした。*SLC2A1* のノックダウンおよび WZB117 による GLUT-1 の抑制は、耐性株の IM 感受性を増加させた。特に WZB117 と IM の併用投与はアポトーシスを顕著に誘導した。*SLC2A1* のノックダウンと異なり、WZB117 は耐性株の Bcl-2 発現を抑制しており、これが IM との併用投与でアポトーシスを誘導する機序であることが推測された。

本研究で樹立された耐性株は *PDGFRA* の変異を有していた。これが IM 投与後に GLUT-1 の合成促進に関与し、細胞生存率の向上に寄与した可能性がある。この変異と解糖系との関係を明らかにするにはさらなる検証が必要である。また、WZB117 の治療効果や副作用および最適なドラッグデリバリーシステムを *in vivo* 実験で検証することも必要である。

《結 論》

GIST 細胞の IM 耐性獲得に GLUT-1 が重要な役割を果たしており、WZB117 と IM の併用投与によりこの耐性を克服できる可能性が示された。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

メシル酸イマチニブ (IM) は、消化管間質腫瘍 (GIST) の薬剤治療に用いられる第一選択薬である。しかし、GIST に使用可能な抗がん剤は限られており、IM に対する薬剤耐性が問題となっている。また、GIST の IM 耐性と解糖系との関係は十分に解明されておらず、解糖系の重要な構成要素であるグルコーストランスポーター (GLUT) -1 と GIST の IM 耐性との関係性を示す報告はない。

今回、申請者らは IM 耐性 GIST 細胞株を樹立し、GLUT-1 が IM 耐性の獲得に関与していることを明らかにした。さらに、耐性株に GLUT-1 阻害剤である WZB117 と IM を併用投与することで、アポトーシスが誘導され相乗的に細胞増殖抑制効果を発揮することを示した。WZB117 は耐性株において、細胞増殖シグナルである AKT のリン酸化とアポトーシス抑制因子である Bcl-2 の発現を抑制しており、これが IM との併用投与時に GIST 細胞でアポトーシスが誘導される重要なメカニズムであることが示唆された。

また、本研究で樹立された耐性株は *PDGFRA* の変異を有していた。この変異が IM 投与後に GLUT-1 の合成促進に関与し、細胞生存率の向上に寄与した可能性がある。この変異と解糖系との関係を明らかにし、WZB117 の治療効果や副作用および最適なドラッグデリバリーシステムを *in vivo* で検証することにより新たな治療戦略の開発に繋がる可能性が期待できる。以上より、本研究で GIST 細胞の IM 耐性獲得に GLUT-1 が重要な役割を果たし、WZB117 と IM の併用投与により IM 耐性の克服に繋がる可能性が示唆された。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Oncology Reports 47(1): 7, 2022 Jan in press

doi: 10.3892/or.2021.8218. Epub 2021 Nov