

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26463040

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌細胞におけるグリコーゲン代謝の解明

研究課題名（英文）Analysis on glycogen metabolism in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

栗田 浩 (KURITA, Hiroshi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：10273103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000 円

研究成果の概要（和文）：口腔癌細胞内のグリコーゲンは癌細胞増殖に必要なエネルギーおよび核酸、脂質などの供給源であると考えられる。本研究の目的は、グリコーゲンの代謝を究明し、さらにその後に控える癌細胞の代謝異常を解明することである。今回の研究結果では、口腔扁平上皮癌細胞は解糖系にてエネルギーを得ていると考えられていたが、グリコーゲン グルコース 解糖系という単純な経路ではなく、アミノ酸代謝等によりエネルギーを得ている可能性が示された。今後、アミノ酸やグルクロン酸、また、核酸等の代謝をさらに検討し癌細胞の代謝を検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：It is thought that the glycogen is one of key sources in supplying energy, nucleic acid, and lipid necessary for cancer cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. The purpose of this study is to analyze metabolism of glycogen and to elucidate metabolism abnormality in oral squamous cell carcinoma. The results of this study suggested that oral squamous cell carcinoma cell got energy not simply in the glycolytic pathway, a simple course called the glycogen glucose glycolytic pathway, and they also suggested the possibility that oral squamous cell carcinoma might get energy by amino acid metabolism. It will be necessary to examine the metabolism of amino acid, glucuronic acid, and nucleic acids etc., and to analyze the specificity in the metabolism of oral squamous cell carcinoma.

研究分野：口腔外科学

キーワード：グリコーゲン 口腔扁平上皮癌 代謝 解糖系

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌（以下OSCC）の増殖にはエネルギー源が必要であり、癌細胞は解糖系を亢進して増殖や転移に必要なエネルギー(ATP)を生産している(Warburg効果)と考えられている。癌細胞における代謝を解明することは、癌の制圧において重要なテーマのひとつである。

われわれはヨード生体染色の機序の解明の研究を行っており、ヨードが細胞内グリコーゲンと反応している事を確認し、OSCC細胞ではグリコーゲンが消失し、染色性が失われる事を明らかにした。また、OSCC細胞におけるグリコーゲンの消失がどのようなメカニズムで生じるか検討するため、細胞内グリコーゲン代謝異常の解明を行った。

その結果、OSCC細胞では正常細胞に比べて

1, 糖の細胞内への取り込み促進: Glucose transporter type 1 の発現増加

2, グリコーゲンの合成促進: Glycogen synthase and Phospho-glycogen synthase の発現増加

3, グリコーゲンの分解促進: Glycogen phosphorylase isoenzyme BB の発現増加

を確認し、癌細胞ではグリコーゲンの代謝が亢進していることを明らかにした。

癌の研究において、がんと代謝は重要なテーマであり、口腔扁平上皮癌においてグリコーゲンは糖代謝の起点／キー物質である。OSCC細胞内のグリコーゲンは癌細胞増殖に必要なエネルギーおよび核酸、脂質などの供給源であると考えられる。グリコーゲンの代謝を究明し、さらにその後に控える癌細胞の代謝異常を解明することにより、OSCC細胞の生物学的特性（主に、分化度、増殖能）を明らかにできると考える。

2. 研究の目的

グリコーゲンの代謝経路を図1に示す。

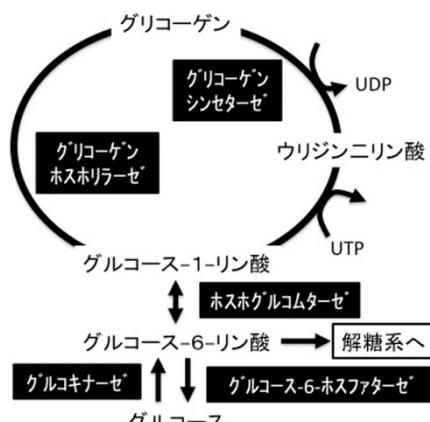


図1：グリコーゲンの代謝経路

これまでの研究から、OSCC細胞においてグリコーゲンの代謝が亢進（グリコーゲンホス

ホリラーゼおよびグリコーゲンシンセターゼの亢進）は明らかとなったが、今回の研究では残された下記の課題を検討する。

(1) グルコース-6-リン酸の代謝の解明（解糖系との関連）

グリコーゲンの分解によりグルコース-6-リン酸が生成される、グルコース-6-リン酸は解糖系に取り込まれるが、その調整はホスホグルコムターゼ、グルコキナーゼおよびグルコース-6-ホスファターゼにより調整されている。そこで、OSCC細胞におけるグルコキナーゼおよびグルコース-6-ホスファターゼの発現を探る。

(2) グリコーゲン代謝バランス および

(3) 口腔扁平上皮癌の代謝経路の解明

OSCC細胞内のグリコーゲンが消失することからグリコーゲンの消費が進んでいることは明らかであるが、同化と異化がどのようなバランスで進んでいるかは確認できていない。また、OSCC細胞内のグリコーゲンは癌細胞増殖に必要なエネルギーおよび核酸、脂質などの供給源であると考えられる。近年メタボロミクスにより細胞内の代謝産物を網羅的に探索することができる。そこで、メタボロミクスを用いて、OSCC細胞内の代謝産物を検討し、癌細胞の代謝経路の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) グルコース-6-リン酸の代謝の解明（解糖系との関連）

対象：口腔粘膜異型性上皮、口腔粘膜癌の切除標本

方法：1, 切除標本（パラフィン固定）から半連続切片を作製。

2, ホスホグルコムターゼ、グルコキナーゼおよびグルコース-6-ホスファターゼの免疫組織染色。

3, H-E 染色、PAS 染色。

4, 光顕下で観察。各種染色部位の分布および強度を検討する。

(2) グリコーゲン代謝バランス および

(3) 口腔扁平上皮癌の代謝経路の解明

対象：信州大学医学部附属病院特殊歯科・口腔外科にて2013年1月～2016年12月までの4年間に外科的切除が行われた口腔扁平上皮がん患者11名（男性7名、女性4名）を対象とした。

方法：インフォームドコンセントのもと切除されたがん組織から「がん細胞部分」とその周辺の「正常細胞部分」を切り出し、液体窒素で急速凍結した。次いで、各組織試料を事前の検討により最適化された抽出法に従って処理し、代謝中間体・代謝産物を抽出の上、濃縮した。得られた試料は、CE-TOFMS (HMT社)

を用いてメタボローム解析を行った。CE-TOFMSにおいては、アニオン・フォーマットにて各種糖代謝中間体及び有機酸を、カチオノン・フォーマットにて各種アミノ酸及びヌクレオチドを対象として、同定及び定量を行った。得られたデータは、バイオインフォマティクス的に解析し、代謝中間体・代謝産物データベースに基づいた既存代謝経路への割り付けや癌細胞に特異的な代謝経路及び新規代謝経路を検討した。

4. 研究成果

(1) グルコースー6-リン酸の代謝の解明

口腔扁平上皮癌組織を用いて、グルコースー6-リン酸の代謝酵素である Glucokinase、Phosphoglucomtase3、Glucose-6-phosphatase の発現を免疫組織学的に検討した結果、OSCC では、グリコーゲンとグルコースー6-リン酸間の代謝に関与する酵素である Glucose-6-phosphatase の発現が更新していることが明らかとなった（図 2）。

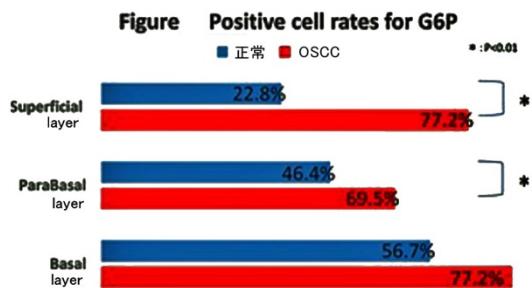


図 2：正常および OSCC 組織における Glucose-6-phosphatase の発現状況

Glucose-6-phosphatase は、グルコースー6-リン酸からグルコースに変換する酵素である。一般的には、本酵素の働きが低下することにより、グルコースー6-リン酸が増加して、解糖系へ流れ込むと考えられている。しかし本研究結果では、OSCCにおいては本酵素の活性が高まっており、OSCC 組織においてグリコーゲンの利用は進んでいるものの、解糖系の亢進とは関連が無い可能性が示唆された。

(2) グリコーゲン代謝バランスの解明

口腔扁平上皮癌組織（11 検体）および性状口腔上皮組織（11 検体）についてメタボローム解析を行った。

中心炭素代謝に関する結果（図 3）では、癌組織ではグルコースー6-リン酸から TCA サイクルに至る代謝物質（3-PG、2-PG、PEP）は見られず、OSCC では解糖系が亢進していない可能性が示された。

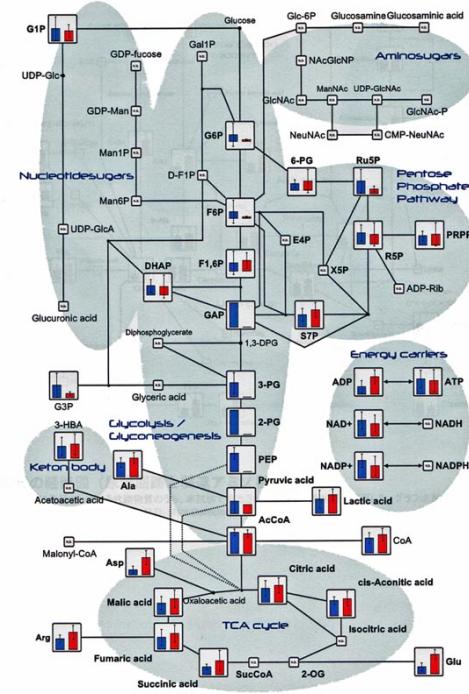


図 3：代謝物質の経路図（中心炭素代謝）

(3) 癌細胞の代謝経路の解明

グリコーゲン→グルコース→解糖系への移行で観察される物質が癌では観察されず、グルコースは解糖系に移行していない可能性が示唆された。その代わりにグルタミン酸やアミノ酸が癌組織で多く検出されており、グルタミン代謝やアミノ酸を利用したエネルギー产生が行われている可能性がある。また、グリコーゲン→グルコース→G 6 P は、ペントースリン酸経路に取り込まれ核酸の合成に関わっている可能性が示唆された（図 4）。

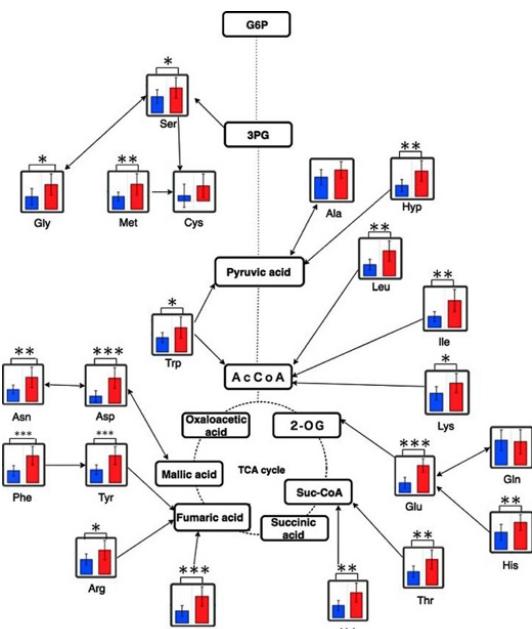


図 4：代謝物質の経路（関連アミノ酸）

本研究成果から、OSCC 等の癌細胞は解糖系にてエネルギーを得ていると考えられていたが、グリコーゲン→グルコース→解糖系という単純な経路ではなく、アミノ酸代謝等によりエネルギーを得ている可能性が示された。今後、アミノ酸やグルクロン酸、また、核酸等の代謝をさらに検討し癌細胞の代謝を検討する必要がある。

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)

①Yamada S, Kurita H, Shimane T, Uehara S, Tanaka H. Estimation of the width of free margin with a significant impact on local recurrence in surgical resection of oral squamous cell carcinoma. Int J Oral Maxillofac Surg 45, 147–152, 2016, 査読あり

〔学会発表〕 (計 4 件)

①相澤仁志、山田慎一、鎌田孝広、近藤英司、田中宏和、嶋根 哲、伊藤隆一、李 穎輝、栗田 浩、口腔扁平上皮癌ヨード不染域におけるグリコーゲン代謝経路内グルコース消費の検討、第 54 回日本癌治療学会学術集会, 2016. 10. 20, 横浜市

②Yoshimura N, Kurita H, Li Y, Aizawa H, Use of glucose in glycogen metabolism in iodine non-stained oral dysplastic/malignant epithelium, 94th IADR General Session, 2016. 6. 22, Seoul, Korea

③相澤仁志、嶋根 哲、上原 忍、鎌田孝広、林 清永、寺本祐二、栗田 浩、第 59 回日本口腔外科学会総会学術大会, 2014. 10. 17, 幕張

④Aizawa H, Shimane T, Qi F, Li Y, Xiao T, Kurita H. Vital staining with iodine solution: Research of glycogen metabolism in oral squamous cell carcinoma. 96th AOMS Annual Meeting, Scientific Sessions & Exhibition. 2014. 9. 8. Honolulu, USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

栗田 浩 (KURITA, Hiroshi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号 : 10273103