



Title	18F-fluorodeoxyglucose/18F-fluoromisonidazole-PETを用いた膠芽腫における低酸素下糖代謝の重要分子を探索する研究
Author(s)	岡本, 迪成
Description	配架番号 : 2683
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14939号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14939
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89017
Type	doctoral thesis
File Information	OKAMOTO_Michinari.pdf



学 位 論 文

^{18}F -fluorodeoxyglucose/ ^{18}F -fluoromisonidazole-PET を用いた膠芽腫
における低酸素下糖代謝の重要分子を探索する研究

(Studies on exploration a potent key molecule of hypoxic glucose
metabolism of glioblastoma derived from the depiction of ^{18}F -
fluoromisonidazole and ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission
tomography)

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

岡本 迪成

学 位 論 文

^{18}F -fluorodeoxyglucose/ ^{18}F -fluoromisonidazole-PET を用いた膠芽腫
における低酸素下糖代謝の重要分子を探索する研究

(Studies on exploration a potent key molecule of hypoxic glucose
metabolism of glioblastoma derived from the depiction of ^{18}F -
fluoromisonidazole and ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission
tomography)

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

岡本 迪成

目 次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・	1 頁
要旨・・・・・・・・・・・・・・・・	2 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・	5 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・	6 頁
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・	9 頁
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・	15 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・	26 頁
総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・	30 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・	31 頁
利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・	32 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・	33 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部をまとめた論文は以下の雑誌に投稿中である。

論文名 Identifying G6PC3 as a potential key molecule in hypoxic glucose metabolism of glioblastoma derived from the depiction of ^{18}F -fluoromisonidazole and ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography

雑誌 Molecular Oncology

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 岡本 迪成, 山口 秀, 澤谷 亮佑, 伊師 雪友, 金子 貞洋, 茂木 洋晃, 豊永 拓哉, 平田 健司, 藤村 幹

演題名 ; FMISO-PET, FDG-PET を併用した膠芽腫の低酸素下糖代謝の key molecule についての検討

学会名 ; 第 39 回日本脳腫瘍病理学会, 2021 年 5 月 22 日, シーガイアコンベンションセンター (オンライン参加)

2. 岡本 迪成, 山口 秀, 澤谷 亮佑, 伊師 雪友, 金子 貞洋, 茂木 洋晃, 豊永 拓哉, 平田 健司, 藤村 幹

演題名 ; FMISO-PET, FDG-PET を併用した膠芽腫の低酸素下糖代謝の key molecule についての検討

学会名 ; 第 80 回日本脳神経外科学会総会, 2021 年 10 月 27 日, パシフィコ横浜 (現地参加)

要旨

【背景】WHO grade IV に分類される膠芽腫は、一般的に手術や放射線化学療法を用いた集学的治療が選択されるものの5年生存率は未だに10%程度と予後不良である。我々は過去に膠芽腫に対して、糖代謝を評価できる ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG)-PET と ^{18}F -fluoromisonidazole (FMISO)-PET を用いて糖代謝と低酸素状態を評価し、低酸素下における糖代謝亢進が予後不良因子であることを示した。しかし、糖代謝や低酸素に関する分子発現については未解明のままであった。今回の研究は、術前 FDG/FMISO PET で評価された膠芽腫の摘出検体を用い、低酸素下糖代謝の key molecule を探索しバイオマーカーたり得るかを検証することを目的とした。

【対象と方法】2008年から2017年の期間に FDG-PET および FMISO-PET で術前に評価した膠芽腫 33 例を対象とした。凍結検体から抽出した messenger RNA (mRNA) を用い reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)によって低酸素と糖代謝に関わる分子として glucose transporter (GLUT)1, GLUT3, glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC)1, G6PC2, G6PC3, hexokinase (HK)1, HK2, Hypoxia inducible factor (HIF)-1 α , HIF-2 α , CA IX, さらに proliferation cell nuclear antigen (PCNA), vascular endothelial growth factor (VEGF)の遺伝子発現を評価し、各 PET 核種の集積の半定量値(病変-正常脳比, LNR: lesion-to-normal ratio) との関連を調べた。また HIF-1 α については免疫組織学的染色を行い、蛋白発現と FMISO 集積の半定量評価も行った。

続いて、膠芽腫の細胞株 (U87MG, U138MG) を用いて低酸素下培養を行い、低酸素下で発現が亢進していた分子に関して、通常環境下培養細胞との比較を行うことで、遺伝子発現の変化を検証した。

さらに上記過程から探索された分子について、予後の判明している患者群で検証した。まず当院で治療された上記 33 例以外の膠芽腫患者で、肉眼的全摘出が達成された後に一般的な標準治療を受けた患者群にもかかわらず、全生存率 (Overall survival; OS) が1年以下の予後不良群と、3年以上の予後良好群の2群間で同分子の遺伝子発現を評価した。術中採取された凍結検体を用いて抽出された mRNA を用いて遺伝子発現を2群間で比較した。続いて米国のデータベースである The Cancer Genome Atlas (TCGA) を利用し、同分子の遺伝子発現が明らかになっている患者間の OS を含む臨床情報を用いて予後を解析した。

【結果】HIF-1 α に関しては、FMISO-PET の集積を反映したのは遺伝子発現より、むしろ免疫染色による蛋白発現だった。免疫組織学的染色による HIF-1 α の核の

染色の割合をスコア化し評価したところ、病変部の FMISO 集積の LNR と有意に相関していた ($P = 0.004$)。続いて病変部の FDG 集積と糖代謝関連分子の遺伝子発現に関して評価したところ、FDG の LNR は糖代謝に関与する HK2, G6PC3 の発現と正に相関していた。(HK2: $P = 0.03$, $R^2 = 0.138$, G6PC3: $P = 0.021$, $R^2 = 0.161$) また、病変部の FMISO 高集積群(≥ 2.0)において、G6PC3 と GLUT1 の mRNA が低集積群 (< 2.0) と比較して多く発現していた (GLUT1: $P = 0.04$, G6PC3: $P = 0.01$)。

これらの結果から、低酸素下で糖代謝が亢進している組織に G6PC3 の mRNA 発現が高いことが示唆された。これは①低酸素下で糖代謝亢進したことから G6PC3 の mRNA 発現が亢進する可能性と②G6PC3 の mRNA 発現により低酸素下の糖代謝が亢進する可能性が考えられた。この検証として、膠芽腫細胞株を用いて通常環境下培養と低酸素下培養のそれぞれの遺伝子発現を比較した。低酸素暴露の妥当性は前述の通り抗 HIF-1 α 抗体を用いた免疫染色により確認した。その結果、低酸素環境下培養の方が、通常環境下培養に比べ G6PC3 が mRNA 高発現した。このことより、膠芽腫細胞においては、低酸素環境下にさらされることが G6PC3 の発現が亢進を惹起することが推測された。

上記検討から膠芽腫組織内での G6PC3 発現亢進が低酸素内糖代謝亢進における重要分子である可能性が示唆された。そこで、この G6PC3 の発現亢進が膠芽腫におけるバイオマーカーとなりうるかに関して検証した。まず、当施設の膠芽腫症例を用い、予後不良群と予後良好群で G6PC3 の mRNA 発現について比較したところ予後不良群で有意に G6PC3 の遺伝子発現が亢進していた (予後良好群: 中間値 0.88, $n = 8$; 予後不良群: 中間値 1.40, $n = 9$; $P < 0.05$)。さらに TCGA のデータ解析を行い、G6PC3 の mRNA 発現について中間値をカットオフに高発現群と低発現群で OS について log-rank 検定を用いて比較したところ、G6PC3 mRNA 高発現群は ($n = 84$, 中間値 385.0 日, 95%信頼区間 0.46–0.91) は低発現群 ($n = 83$, 中間値 455.0 days, 95%信頼区間 1.11–2.18) に比べ有意に OS が短縮していた ($P = 0.008$)。

【考察】

FMISO PET の半定量値と低酸素関連の遺伝子発現の定量評価による相関を解析したところ、蛋白発現がより正確な評価となり得ることが示された。続いて膠芽腫では FDG 集積亢進する組織、FMISO 集積亢進する組織のそれぞれで G6PC3 の発現が亢進していた。また、膠芽腫細胞株においては、低酸素下培養で G6PC3 の遺伝子発現が亢進することが示された。これらから G6PC3 が、膠芽腫において低酸素下で糖代謝が亢進した部分で高く発現していることが示唆された。

G6PC3 は Glucose 6 phosphatase(G6Pase)のサブアイソフォームのひとつであり、糖新生に関与する主要な酵素であるが、低酸素との関連はこれまで報告が少ない。低酸素では解糖系が亢進する一方、糖新生は抑制されるという報告もあるが、本研究では解糖系の亢進とともに糖新生が亢進している可能性を示唆した。

最後に G6PC3 高発現の予後との関連について、自施設例のみならず米国のビッグデータでも有意差を持って OS との関連が確認され、予後不良因子のバイオマーカーとなる可能性がある。

本研究の問題点として、腫瘍の不均一性により組織内の mRNA 発現が一定しない可能性がある。さらに腫瘍検体の採取部位の検証が十分になされておらず核医学評価された部位との不一致の可能性がありえる。サンプル数が少ないことも挙げられる。最後に低酸素による G6PC3 誘導が治療抵抗性に関してどのように関与しているかどうかに関して、さらなる機能解析をもって実証されるべきであり、本研究ではそのメカニズムの解明に至っていない点が考えられた。

【結論】本研究では膠芽腫における FDG/FMISO-PET の集積と G6PC3 の遺伝子発現の関連が示唆され、細胞株培養において低酸素環境下で GLUT1 とともに G6PC3 の遺伝子発現が亢進したことから G6PC3 の遺伝子発現は低酸素下糖代謝の重要分子である可能性が示された。また、膠芽腫において G6PC3 発現が全生存率と有意に関連していたことから、予後予測因子になる可能性も示された。

略語表

CT: computed tomography

FMISO: 18F-fluoromisonidazole

FDG: 18F-fluorodeoxyglucose

GLUT: glucose transporter

G6Pase: glucose-6-phosphatase

G6PC: glucose-6-phosphatase catalytic unit

HIF: hypoxia inducible factor

HK: hexokinase

HRE: hypoxia-responsive elements

IDH: isocitrate dehydrogenase

LNR: lesion-normal tissue-ratio

OS: overall survival

PCNA: proliferation cell nuclear antigen

RT-qPCR: reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction

SUV: standardized uptake value

TCGA: the Cancer Genome Atlas

VEGF: vascular endothelial growth factor

WHO: World Health Organization

緒言

背景

膠芽腫 (glioblastoma: GBM) は WHO 分類ではグレード IV に分類され、神経膠腫の中でも最も予後不良な疾患である (Louis et al., 2016). 昨今、術中蛍光診断等による摘出率の向上や放射線治療、新規薬剤の登場により、予後はやや改善しているものの、依然として 2 年生存率は 43% である (Wachtel and Yang, 2014).

腫瘍組織内ではしばしば低酸素 (低酸素状態では組織の酸素供給量よりも酸素消費量が上回っている状態) となっており、脳腫瘍を含む種々の腫瘍において治療抵抗性に寄与する一因として考えられている (Kayama et al., 1991). 膠芽腫も低酸素が特徴的な腫瘍として知られている (Evans et al., 2004; Hirata et al., 2012; Lally et al., 2006; Oliver et al., 2009; Toyonaga et al., 2016; Toyonaga et al., 2017). ^{18}F -fluoromisonidazole (FMISO)-PET は低酸素トレーサーであり、病変内の低酸素領域を描出することができるため、膠芽腫における組織内低酸素評価に有用である (Hirata et al., 2012; Toyonaga et al., 2016).

一方で ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG)-PET は臨床で広く利用されている画像検査で、細胞内の糖代謝を視覚化している. 特に腫瘍内では解糖系が強く活性化しており、好気環境下でも解糖系が亢進する Warburg effect が知られているが、腫瘍内に糖とともに FDG が集積する特性を活かして、FDG-PET は悪性腫瘍の検索に有効と考えられている (Boellaard et al., 2015). 神経膠腫においても同様に腫瘍の悪性度により FDG は集積するとされる (Borgwardt et al., 2005). FDG の集積は FGD kinetics に基づき、glucose transporter (GLUT), hexokinase (HK), glucose-6-phosphatase (G6Pase) 等の因子によって決定される (Gallagher et al., 1978; Scussolini et al., 2019).

テーマに関連して何がわかっていて、何がわかっていないのか.

まず分子学的機序の確認に際して、FMISO-PET は低酸素トレーサーではあるものの、低酸素に関わる分子である hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) や Carbonic anhydrase 9 (CAIX) の発現のいずれを見ているのか明確なコンセンサスはない.

いずれも FMISO 集積との報告はあるものの、HIF-1 α は特に免疫染色との関連の報告のみで定量評価についての評価が少ない(Bekaert et al., 2017; Sato et al., 2017).

続いて FDG 集積については Figure 1 に示す通り、糖と FDG は GLUT によって細胞内に取り込まれ、HK によりリン酸化される。Glucose-6-phosphate(G6P)は Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) や解糖系、グリコーゲン貯蔵などの代謝経路があるが、 ^{18}F -FDG-6-phosphate(FDG6P)はそれらの代謝はうけず、細胞内にとどまることから PET で描出される(Caracó et al., 2000; Peppicelli et al., 2020; Sambuceti et al., 2021). 一方で G6P や FDG6P は Glucose-6-phosphatase (G6Pase) によりそれぞれ glucose, FDG へと代謝され、糖新生の方向に働く(Caracó et al., 2000; Grasmann et al., 2019).

これまで膠芽腫についてそれぞれの PET 核種の集積との関連は報告されてきたが、その併用による報告は少ない。これにより低酸素下の解糖系亢進を正確に評価することができると考えられる。我々は以前にこれら FDG-PET と FMISO-PET の組み合わせによる半定量値を解析し、それらにより算出される低酸素環境下における糖代謝が活発な部分の体積量が、膠芽腫では予後予測因子になることを示し、全生存期間、無増悪生存期間と関連することを示した(Toyonaga et al., 2017). しかしながら半定量値と予後の間にある分子学的機序については明らかになっていない。

本研究で何を明らかにしようとするのか

本研究では FMISO 集積に関連する低酸素関連で発現する分子を同定することを目的とした。

続いて FDG-PET における病変部位の半定量値が糖代謝関連分子の発現と関連することに加えて、低酸素下により解糖系が亢進するという事実(Kierans and Taylor, 2021)を踏まえると、FMISO-PET における病変部位の半定量値も糖代謝関連分子と関連するという仮説が生じる。両 PET 検査で術前評価された膠芽腫患者において、手術にて摘出された腫瘍組織検体を用いて糖代謝に関わる分子の発現を解析し、低酸素環境下で糖代謝に関連する分子を検証した。さらにその候補分子の発現が予後予測因子たり得るか、予後情報との関連を調べ検証した。

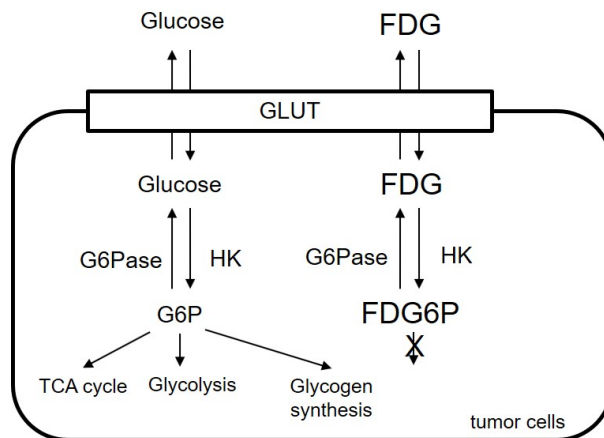


Figure 1 腫瘍細胞内の糖/ ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG) 代謝のシェーマ

FDG は glucose トランスポーター(GLUT) を経て腫瘍内に入り, hexokinase (HK)により水酸化される. Glucose-6-phosphatase (G6Pase) は HK の水酸化と反対に作用し糖新生の方向に働く. 糖は腫瘍内で代謝され, エネルギー産生に寄与する一方, FDG は腫瘍内で代謝されず細胞内に留まる.

G6P: Glucose-6-phosphate, G6Pase: Glucose-6-phosphatase, HK: Hexokinase, TCA: Tricarboxylic acid, FDG: ^{18}F -fluorodeoxyglucose, FDG6P: ^{18}F -fluorodeoxyglucose-6-phosphate

実験方法

1) 実験計画の概要

1. FDG-PET と FMISO-PET で術前評価された患者から採取した腫瘍検体を用いて低酸素・糖代謝に関わる因子の遺伝子発現を評価し、各 PET で得られた病変部位の半定量値と比較し、FDG と FMISO がそれぞれ高集積する組織に多く発現する分子の同定を行った。
2. 続いて上記過程で得た候補分子について低酸素環境下で発現が増加するか膠芽腫細胞株を用いて追加検証した。
3. 最後に臨床的意義を確認しバイオマーカーたり得るかを検証するため、予後情報がある別の患者コホートにおける同因子の発現の比較、および米国の公開データベースを用いて同因子の発現による予後情報の比較を行った。

2) FMISO-PET と FDG-PET で術前評価された患者検体を用いた糖代謝関連遺伝子発現解析

1. 膠芽腫の腫瘍検体採取について：本研究は研究倫理審査委員会により承認されて（No. 018-036）おり、FMISO-PET については同意を取得し施行、FDG-PET は保険診療の一部として施行し追加解析として今回の研究では同意は waive して解析した。北海道大学病院で 2008 年から 2016 年までの期間に術前に FDG/FMISO PET が施行された膠芽腫患者 33 名を対象とした。ガドリニウム造影 T1 強調像と PET 画像を用いた術中ナビゲーション（Stealth Station S7[®], Medtronic, Louisville, CO, USA）を用いて FDG-PET 集積の高い部分を同定した上で生検ないしは摘出を行い、検体を採取した。採取した検体は-80℃で凍結保存した。本研究では放射線治療や化学治療前に検体採取されたこと、組織学的に膠芽腫と診断された症例(Louis et al., 2016)を適格基準とした。

2. PET 検査の Protokol および画像解析：いずれの患者も FDG-PET, FMISO-PET は 1 週間以上の間隔を開けずに施行されており，3 種の PET scan のいずれか (an ECAT EXACT HR+ PET scanner (Siemens, Munich, Germany), a Biograph 64 PET computed tomography (CT) scanner (Siemens, Munich, Germany), and Gemini TF64 PET-CT scanner (Philips, Amsterdam, Netherlands)) により評価した．FDG は静脈投与し，投与後 1.23 ± 0.3 時間時点で 10 分間のスキャンを施行した．実際の投与量は $323.3 \pm 90.6 \text{ MBq}$ だった．FMISO は静脈投与後， 4.06 ± 0.3 時間時点で 10 分間のスキャンを施行し評価した．実際の投与量は $413.9 \pm 28.2 \text{ MBq}$ だった．病変を取り囲むように ROI をおいて範囲内の Standardized uptake value (SUV) の最大値を測定した．Gd 造影 T1 強調像の MRI 画像を参照し，正常と思われる部分からリファレンスとして 10mm の ROI をそれぞれ設定し SUV の最大値を正常とした．FDG-PET については健側前頭葉・頭頂葉から 6 か所を 3 スライス，計 18 か所を ROI として設定し平均を算出した．FMISO-PET については小脳半球の左右それぞれ 5 か所ずつを 3 スライス，計 30 箇所を ROI として設定し平均を算出した．病変の SUV と正常部の SUV の平均の比 (lesion-normal tissue-ratio ; LNR) として算出し，半定量値として利用した．

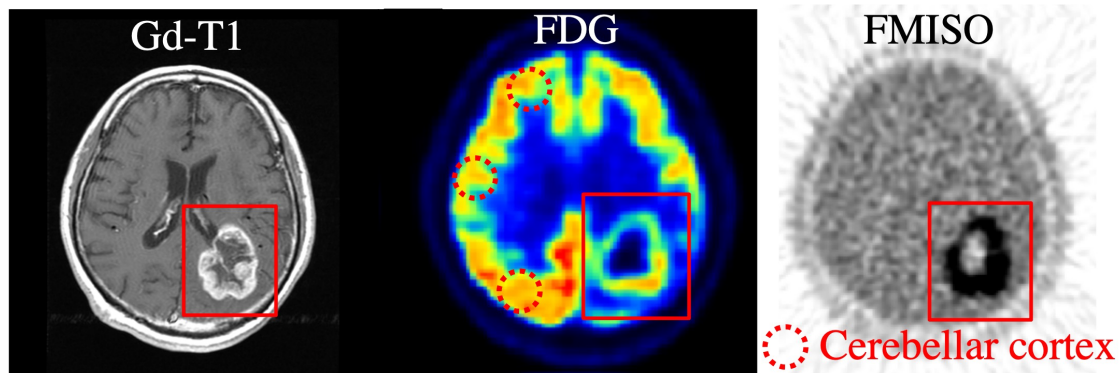


Figure 2 ガドリニウム造影 T1 強調像画像，FDG-PET 検査所見，FMISO-PET 検査所見の一例．

左頭頂葉の造影部位に一致して FDG, FMISO の集積亢進を認めていた

3. 遺伝子解析：FDG-PET および FMISO-PET で術前評価された患者から手術により採取された凍結検体から All Prep DNA/RNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて抽出された DNA を用い，IDH1/2 変異につい

て、変異のホットスポットである IDH1 コドン 132, IDH2 コドン 172 を検索した (Ishi et al., 2020). それぞれの核酸プライマーと Quick Taq HS DyeMix (Toyobo Co., Ltd. Osaka, Japan) を用いサンガー法で PCR を行った (IDH1: フォワードプライマー TGTGGAAATCACCAAATGGGCAC; リバースプライマー TACAAGTTGGAAATTTCTGGGC; IDH2: フォワードプライマー; GGGAGCCCATCATCTGCAAAAA; リバースプライマー; ACAAGAGGATGGCTAGGCGA).

4. 低酸素関連の遺伝子発現とタンパク発現の確認：凍結検体を用いて total RNA を抽出し, PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis kit (Takara Biotechnology Co., Ltd., Kusatsu, Japan)を用いて complementary DNA を合成した. ヒト正常脳から抽出された total RNA (636530; Takara Biotechnology Co., Ltd., Kusatsu, Japan) から合成した complementary DNA を対照として膠芽腫検体の遺伝子発現を比較した. 対象となる遺伝子は HIF-1 α , HIF-2 α 内在性コントロールとして 18S rRNA を使用した. 核酸プライマーは Table 1 の通り使用した. FastStart Essential DNA Green Master with LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)を用いて定量 PCR を施行し, 融解曲線解析を行った. 内在性コントロールにより補正後, 正常脳の遺伝子発現と比較し, 2^{-ddCT} 法 (Livak and Schmittgen, 2001) で得られた値を遺伝子発現として, PET から得られた半定量値と比較した. 各分子の遺伝子発現と FDG PET の LNR の相関を調べた. タンパク発現の評価のためウサギポリクローナル HIF-1 α 抗体 (GTX127309; 1:500; Gene Tex, Hsinchu City, Taiwan) を用い, 一次抗体反応を室温で 1 時間行った. 洗浄後, ヘマトキシリンで対比染色を行った. HIF-1 α は核が染色されることから既報に則り (Allred et al., 1998) その割合を Table 2 の通りスコア化して評価した.

Table 1 HIF-1 α , HIF-2 α , CA IX, 18S rRNA の核酸プライマー

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (3'-5')
HIF-1 α	TTTTGGCAGCAACGACACAG	TTTTCGTTGGGTGAGGGGAG
HIF-2 α	GGTGGCAGAACTTGAAGGGTTA	GGGCAACACACACAGGAAATC
CA IX	TACAGCTGAACTTCCGAGCG	AATTCAGCTGGACTGGCTCA
18S rRNA	CGAACGTCTGCCCTATCAACTT	ACCCGTGGTCACCATGGTA

Table 2 *HIF-1 α* の免疫染色の定量評価：視野あたりの核染色の割合

Positive cells %	Proportion Score
0	0
<1	1
1-10	2
11-33	3
34-66	4
≥ 67	5

5. 糖代謝関連の遺伝子発現の定量評価：上記 2)-4 と同様に凍結検体を用いて total RNA を抽出し， complementary DNA を合成し， ヒト正常脳から抽出された total RNA を用いて合成した complementary DNA を対照として膠芽腫検体の遺伝子発現を比較した．対象となる遺伝子は GLUT1, GLUT3, G6PC1, G6PC2, G6PC3, HK1, HK2 の糖代謝関連の遺伝子に加えて，増殖細胞核抗原（proliferation cell nuclear antigen; PCNA），血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor; VEGF）も評価項目とした．内在性コントロールとして 18S rRNA を使用した．核酸プライマーは Table 3 の通り使用した．
- FastStart Essential DNA Green Master with LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)を用いて定量 PCR を施行し，融解曲線解析を行った．内在性コントロールにより補正後，正常脳の遺伝子発現と比較し， $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001)で得られた値を遺伝子発現として，正常脳での発現を対照として各検体の遺伝子発現を解析した．続いて PET から得られた半定量値と比較した．各分子の遺伝子発現と FDG PET の LNR の相関を調べ，また FMISO LNR 2.0 をカットオフとして各遺伝子発現を比較した．

Table 3 *GLUT1, GLUT3, G6PC1, G6PC2, G6PC3, HK1, HK2, PCNA, VEGF* の核酸プライマー

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (3'-5')
<i>GLUT1</i>	CCTTTTCGTTAACCGCTTTGG	CAGGATCAGCATCTCAAAGGACTT
<i>GLUT3</i>	CGTGGAGAAAACCTTGCTGCTG	ATCAGAGCTGGGGTGACCTTCT
<i>G6PC1</i>	GATAAAGCCGACCTACAGATTTTCG	GCAGCAAGGTAGATTTCGTGACA
<i>G6PC2</i>	TGTGAAACAGGTCCAGGCAT	TGAGCACCTAAGAAGCAGG
<i>G6PC3</i>	TCTTCAAGTGGTTTCTTTTGGAG	GCTAGGCATCACCTTACCC
<i>HK1</i>	GCGATGACAGTATCCTCGTCAA	TCTCGCGGATCTTATCCACAA
<i>HK2</i>	ACCCAGTTCATTACATCATCAGT	CCCTCTACTTTAAGGCCCTATTTCG
<i>PCNA</i>	GAAGGTGTTGGAGGCACTCAA	AGGGTGAGCTGCACCAAAGA
<i>VEGF</i>	CTACCTCCACCATGCCAAGT	GCAGTAGCTGCGCTGATAGA
<i>18S rRNA</i>	CGAACGTCTGCCCTATCAACTT	ACCCGTGGTCACCATGGTA

3) Cell line の低酸素環境下培養

市販されたヒト膠芽腫細胞である U87MG および U138MG(ATCC, Virginia, USA)を用いて培養実験を行った。培地としてダルベッコ変法イーグル培地 (4.5g/l グルコース) (DMEM; NacalaiTesque, Kyoto, Japan) に 10% 胎児ウシ血清 (FBS; Life Technologies, California, USA) および 1%ペニシリン/ストレプトマイシン (NacalaiTesque, Kyoto, Japan) を混合して用いた。低酸素環境下培養として 5% 二酸化炭素, 1% 酸素とし 37°Cのインキュベータ内で 48 時間の培養を行った。培養開始 24 時間前に培地のプレコンディショニングとして予め低酸素環境に暴露したものを低酸素培養用の培地として用いた。48 時間の培養直後に採取された細胞から遺伝子抽出し, 前述の通り定量 PCR を行った。また適切な低酸素暴露が得られたか否かの検証として、HIF-1 α の免疫染色を行い確認した。チャンバースライド(FUKAE-KASEI CO., Ltd., Kobe, Japan)で培養された細胞を抗原賦活化処理, 内在性ペルオキシダーゼ不活性化処理した上で, ウサギポリクローナル HIF-1 α 抗体 (GTX127309; 1:500; Gene Tex, Hsinchu

City, Taiwan)を用い、一次抗体反応を室温で 1 時間行った。洗浄後、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

4) 臨床的意義の確認

1. 検証的コホートにおける遺伝子発現の確認：上記過程で候補分子として同定された分子の臨床的意義として、予後との関連を調べた。前述の 33 例とは別に検証的コホートを設定した。当院で加療された膠芽腫患者の中で病変の全摘出を行い、標準的な術後放射線化学療法(Stupp et al., 2005)を受けたにも関わらず予後が異なる 2 群を選択した。予後良好群は術後 3 年以上の生存が得られた症例、予後不良群は術後 1 年未満の生存期間の症例の群とし、これらの患者から採取された腫瘍の凍結検体から抽出された遺伝子を用いて候補分子の発現を調べた。
2. 米国データベースにおける遺伝子発現の確認：膠芽腫患者の臨床情報、遺伝子情報を the Cancer Genome Atlas (TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov/>)データベースから収集し解析した。診断時 16 歳未満の患者はおよび生存期間の情報が欠落した患者は本研究から除外した。RNA シーケンスデータについて edgeR package (version 3.26.1) in R (version 3.5.3)を用いて標準化し候補分子の遺伝子発現を解析した。

5) 統計学的手法

全データは、平均値±標準誤差で示した。膠芽腫患者の遺伝子発現における 2 群間の比較には Mann Whitney U test を用いた。細胞株の遺伝子発現における 2 群間の比較には unpaired-*t*test を行った。カテゴリ変数については χ^2 検定を行った。2 項目の相関については Spearman's rank correlation test を用いた。候補分子の遺伝子発現について、高発現群と低発現群の比較に際して中間値をカットオフとして用いた。全生存期間については Kaplan-Meier curves を用い、log rank test で検定した。これらは Graphpad Prism version 8 を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に優位とした。

実験結果

1. 対象患者

術前に FMISO/FDG-PET を行い，外科的に組織採取された 33 名の患者の特徴は Table 4 の通りである。16 名（48.4%）が女性，17 名（51.6%）が男性だった。（平均年齢 61.0 ± 15.6 才）32 名は IDH 野生型，1 名は IDH 変異型（1p19q 共欠失なし）だった。

Table 4 FDG/FMISO PET が施行された膠芽腫患者の characteristics

Parameters	No. of patients (%)	
Age (years)	Median(±SD)	61.0 (±15.6)
Gender	Female	16
	Male	17
Gene status	IDH wild type	32
	IDH mutant without 1p/19q codeletion	1
Histology	Glioblastoma (Grade IV)	33

KPS; Karnofsky performance score, IDH; isocitrate dehydrogenase

2. 低酸素関連遺伝子の発現の関連

いずれの低酸素関連遺伝子の mRNA 発現は Figure 3 に示したとおり FMISO-LNR と相関しなかった（HIF-1 α : $P = 0.39$, $R^2 = 0.024$, HIF-2 α : $P = 0.55$, $R^2 = 0.011$, CA IX: $P = 0.99$, $R^2 < 0.001$ ）。一方，免疫染色で評価すると FMISO-PET の定量値との相関を認めた。この際，スコアについて下記の通り HIF-1 α による核濃染像については Figure 4 の通り観察され，スコアにより定量化して比較したところ，本スコアと FMISO 集積の半定量値は有意に相関した。（ $P = 0.004$, $R^2 = 0.240$ ）

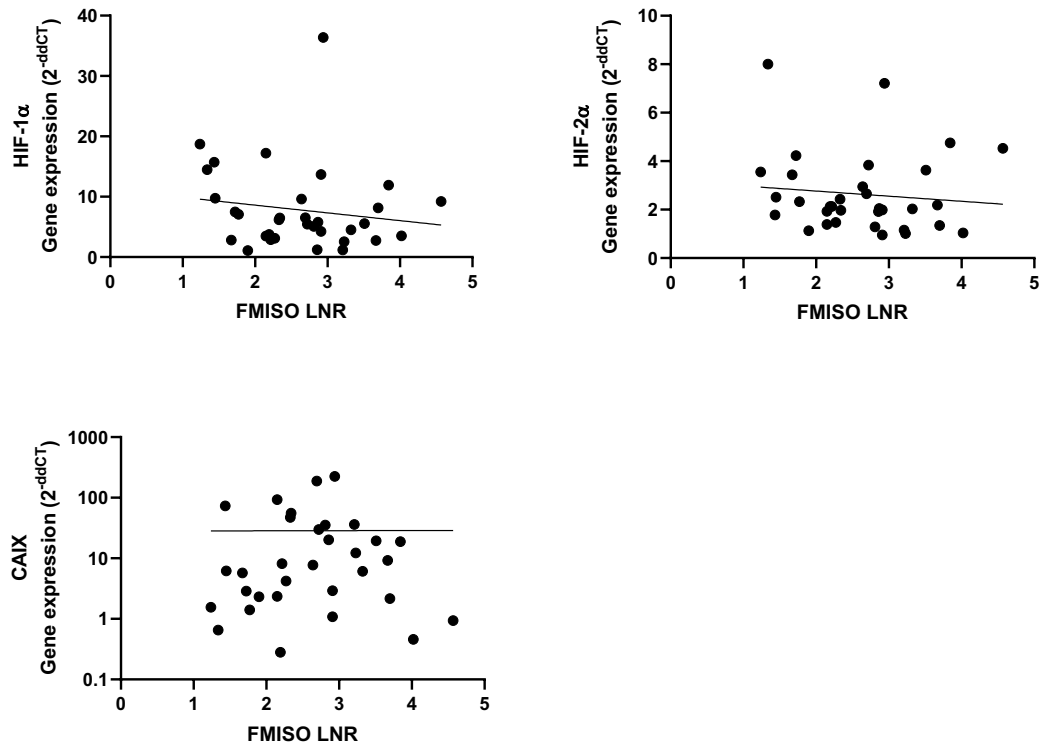
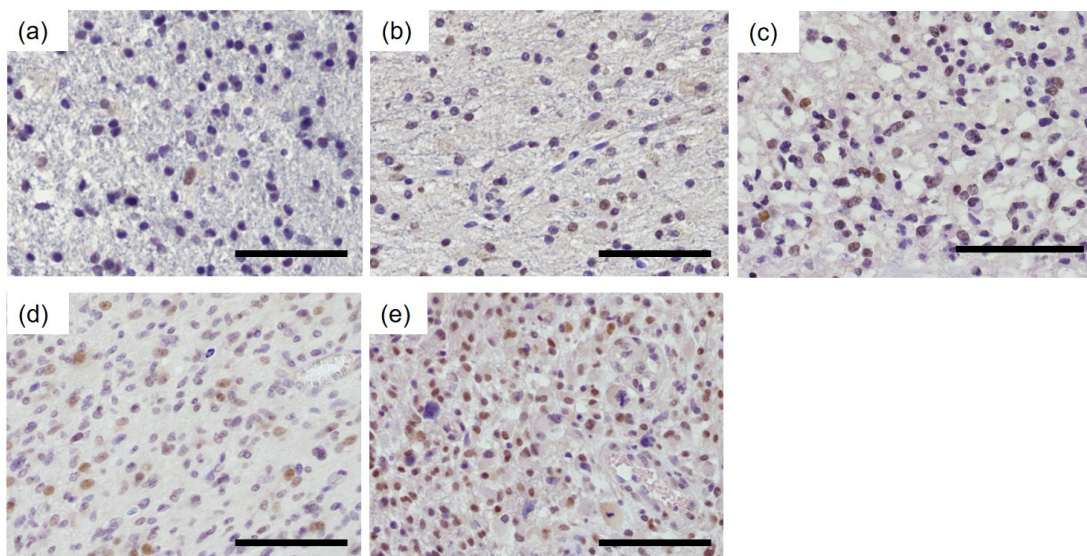


Figure 3 *HIF-1α*, *HIF2-α*, *CA IX*の遺伝子発現と FMISO-PET の相関
HIF-1α, *HIF2-α*, *CA IX* と FMISO LNR について有意な相関を認めなかった.
 (*HIF-1α*: $P = 0.39$, $R^2 = 0.024$, *HIF-2α*: $P = 0.55$, $R^2 = 0.011$, *CA IX*: $P = 0.99$, $R^2 < 0.001$)



(f)

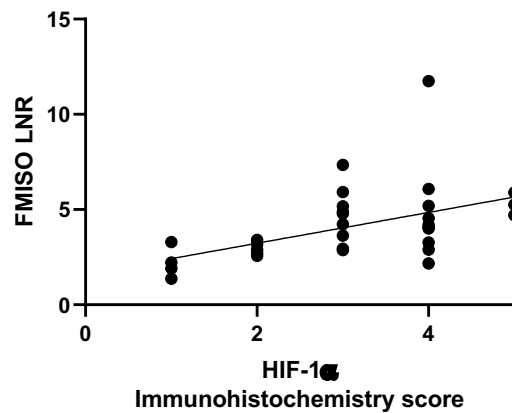


Figure 4 抗 *HIF-1α* 抗体による免疫染色と FMISO との相関

視野あたりの濃染した核の割合が (a)<1%(b)1-10%(c)11-33%(d)34-46%(e)≧67%となった膠芽腫組織の所見を示した. スケールバーは $50\mu\text{m}$. (f)HIF-1a の免疫染色によるスコアと FMISO LNR は Spearman's rank correlation coefficient により有意に相関を認めた ($P = 0.004$, $R^2 = 0.240$).

3. 糖代謝関連遺伝子の発現の正常脳と膠芽腫組織の比較

糖代謝関連遺伝子の発現を評価したところ, Figure 5 に示したとおり, いずれも有意差はなかったが, G6PC2 を除いて膠芽腫組織の方が, 発現が高い傾向があった. また PCNA と VEGF について膠芽腫組織の方が有意に高発現していた. (PCNA; $P = 0.04$, VEGF; $P = 0.01$)

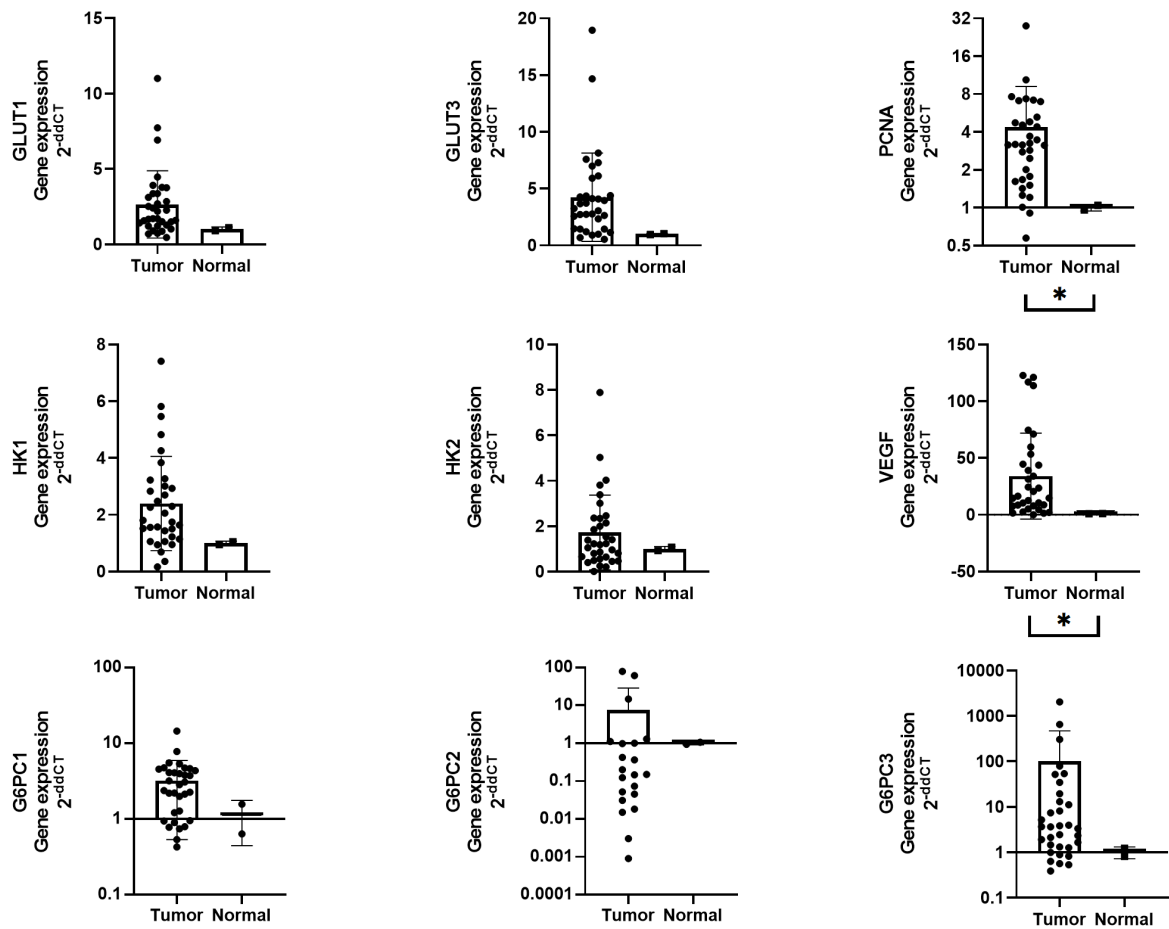


Figure 5 膠芽腫組織と正常脳組織の糖代謝関連遺伝子および増殖細胞核抗原 (*PCNA*) , 血管内皮細胞増殖因子 (*VEGF*) の発現について
糖代謝関連遺伝子について有意差はなかったが (GLUT1; $P = 0.14$, GLUT3; $P = 0.07$, HK1; $P = 0.10$, HK2; $P = 0.76$, G6PC1; $P = 0.17$, G6PC2; $P = 0.39$, G6PC3; $P = 0.14$), G6PC2 の mRNA 発現を除いて腫瘍組織の発現が高い傾向だった. PCNA と VEGF については腫瘍組織の方が mRNA の発現が有意に高かった (PCNA; $P = 0.04$, VEGF; $P = 0.01$).

* $P < 0.05$ の有意差あり. Mann-Whitney U test で検定した.

4. FDG 集積と低酸素, 糖代謝関連遺伝子の発現の関連

FDG 集積の LNR は GLUT1 の mRNA 発現量と相関しなかった. Figure 6(a) ($P = 0.42$). 今回測定した範囲内で FDG 集積と有意に相関があったのは HK2 と

G6PC3 の mRNA 発現だった. (HK2: $P = 0.03$, $R^2 = 0.138$, G6PC3: $P = 0.021$, $R^2 = 0.161$) (Figure 6b, c). G6PC1 を含め, 他に FDG 集積と mRNA 発現が相関した因子はなかった(Figure 7) .

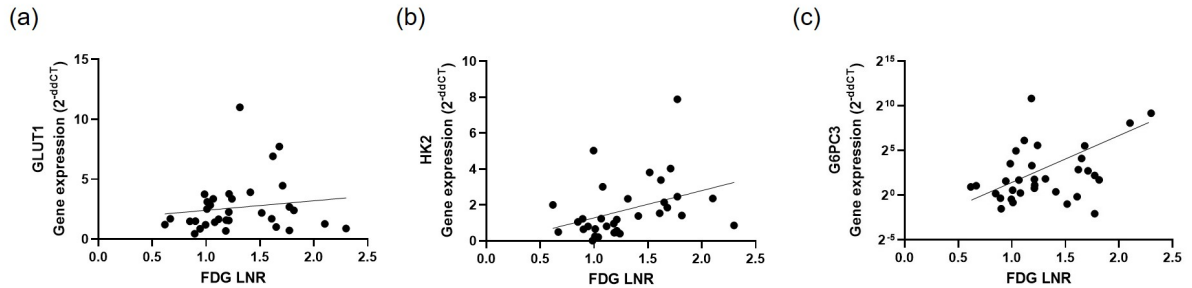


Figure 6 *GLUT1*, *HK2*, *G6PC3* の mRNA 発現と FDG PET の相関
GLUT1 の mRNA 発現は FDG LNR と相関がなかった ($P = 0.42$). FDG LNR と相関したのは HK2 と G6PC3 の mRNA 発現だった (HK2: $P = 0.03$, $R^2 = 0.138$, G6PC3: $P = 0.021$, $R^2 = 0.161$). Spearman's rank correlation coefficient により検定した.

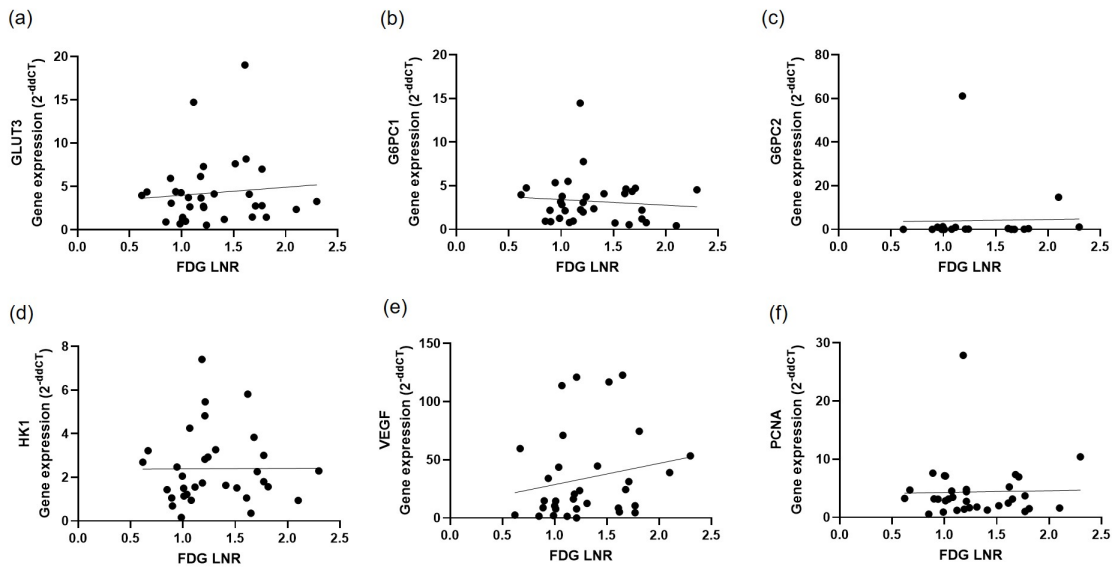


Figure 7 *GLUT1*, *HK2*, *G6PC3* 以外の糖代謝関連遺伝子および VEGF, PCNA の発現と FDG PET の相関
いずれの遺伝子の mRNA 発現も FDG LNR と有意な相関は認めなかった (GLUT3: $P = 0.60$, G6PC1: $P = 0.60$, G6PC2: $P = 0.93$, HK1: $P = 0.97$, VEGF: $P = 0.28$, PCNA: $P = 0.89$). Spearman's rank correlation coefficient により検定した.

5. FMISO 集積に応じた低酸素、糖代謝関連遺伝子の発現の比較

続いて FMISO 集積に応じた各遺伝子発現を調べた。FMISO 集積 LNR 2.0 をカットオフとして、 $\text{LNR} \geq 2.0$ を FMISO 高集積群、 $\text{LNR} < 2.0$ を FMISO 低集積群とした。Figure 8 で GLUT1 と G6PC3 は FMISO 高集積群で有意に mRNA 発現が増加していた (GLUT1: $P = 0.04$, G6PC3: $P = 0.01$)。一方で FDG 取込と相関していた HK2 については FMISO 集積による mRNA 発現の差は認めなかった。その他の遺伝子発現においても Figure 9 に示したとおり有意な mRNA 発現の差は認めなかった。

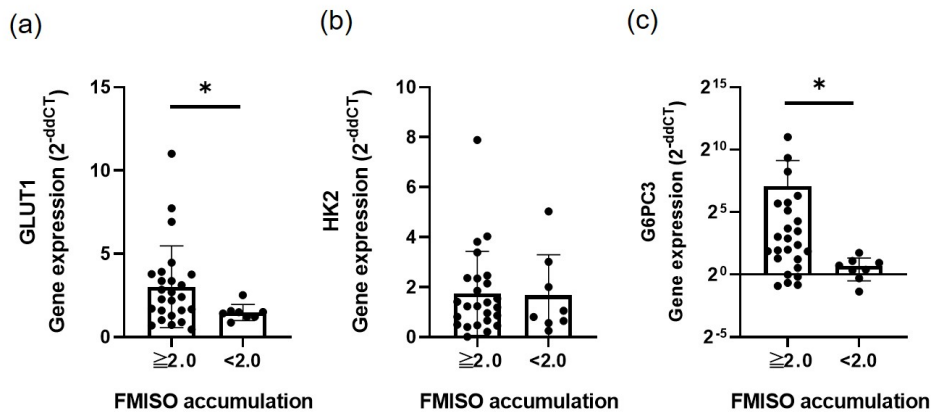


Figure 8 FMISO 集積による *GLUT1*, *HK2*, *G6PC3* の mRNA 発現の比較
FMISO LNR 2.0 をカットオフとして各遺伝子の発現を比較したところ、*GLUT1*(a)と *G6PC3* (c)の mRNA 発現は FMISO 高集積群 ($\text{LNR} \geq 2.0$) で有意に高かった (GLUT1: $P = 0.04$, G6PC3: $P = 0.01$)。HK2 (b) の mRNA 発現は FMISO 集積により有意な違いはなかった ($P = 0.79$)。

* $P < 0.05$ の有意差あり。Mann-Whitney U-test により検定した。

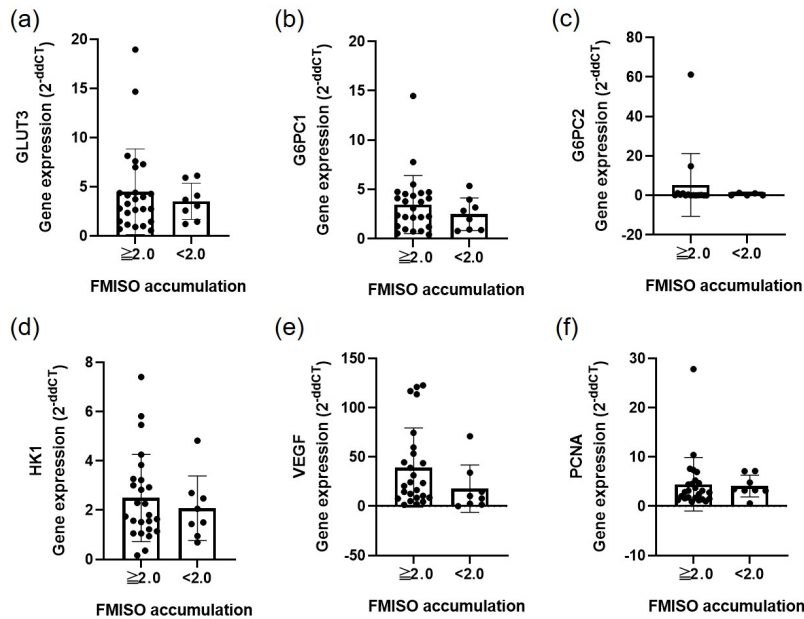


Figure 9 FMISO 集積による *GLUT1*, *HK2*, *G6PC3* 以外の糖代謝関連遺伝子および *VEGF*, *PCNA* の mRNA 発現の比較

FMISO LNR 2.0 をカットオフとして各遺伝子の発現を比較したところ、いずれも (a-f) mRNA 発現は FMISO 集積により有意な違いはなかった (*GLUT3*: $P = 0.31$, *G6PC1*: $P = 0.66$, *G6PC2*: $P = 0.82$, *HK1*: $P = 0.92$, *VEGF*: $P = 0.24$, *PCNA*: $P = 0.56$).

* $P < 0.05$ の有意差あり. Mann-Whitney U-test により検定した.

6. 細胞培養における低酸素による *G6PC3* の発現誘導

これらの結果を踏まえ、FDG 集積と FMISO 集積に関連して有意に高発現していた *G6PC3* は、低酸素領域において *G6PC3* が有意に発現すること、または *G6PC3* が発現することで低酸素が誘導されていることが推察された。我々は低酸素領域において解糖系が亢進するとともに *G6PC3* の発現も亢進することを仮説とし、これを検証するため低酸素下で実際に *G6PC3* の遺伝子発現が亢進するのかを細胞株において確認することとした。細胞株にはヒト膠芽腫細胞である U87MG と U138MG を用いた。低酸素環境暴露の確認として HIF-1 α の免疫染色を行った。(Figure 10). 48 時間の低酸素暴露後、*GLUT1* の mRNA 発現はいずれも通常環境下の細胞株に比して高発現していた。興味深いのは同様に *G6PC3* も低酸素環境下において mRNA 発現が亢進していた。(Figure 11b,d).

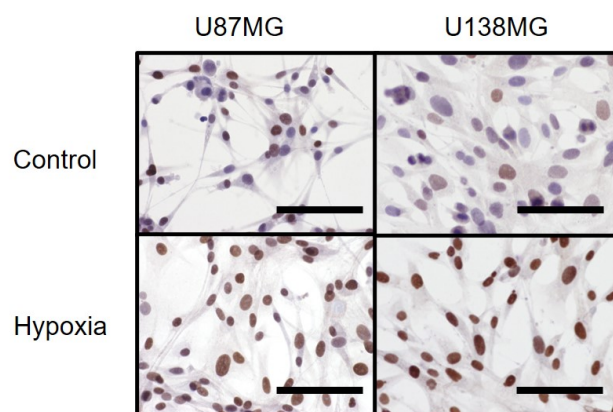


Figure 10 通常環境下，低酸素下それぞれで培養された膠芽腫細胞株の抗 HIF-1 α 抗体による免疫染色
低酸素下で培養された膠芽腫細胞株はいずれも抗 HIF-1 α 抗体による免疫染色で核の濃染像を認めた．スケールバーは 80 μ m.

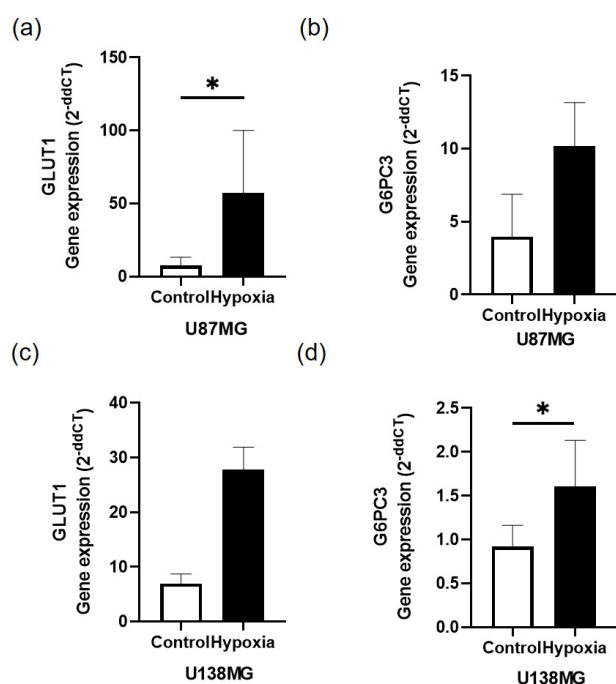


Figure 11 通常環境下，低酸素下それぞれで培養された膠芽腫細胞株の *GLUT1*, *G6PC3* の mRNA 発現の比較

(a) *GLUT1* と (b) *G6PC3* の mRNA 発現を U87MG で評価し，(c) *GLUT1* と (d) *G6PC3* の mRNA 発現を U138MG で評価した．いずれの細胞株も通常環境下培養と比較して低酸素下培養で *GLUT1* mRNA 発現 (U87MG : $P = 0.015$, U138MG : $P = 0.01$)は亢進していた．同様に *G6PC3* の mRNA 発現も低酸素下培養で増加していた (U87MG : $P = 0.04$, U138MG : $P = 0.26$).
* $P < 0.05$ の有意差あり．Paired t test で検定した．

7. G6PC3 と膠芽腫患者の全生存期間の相関

低酸素により G6PC3 が誘導され得ることを踏まえ、G6PC3 の臨床的意義を予後との関連から確認することとした。まず我々の施設において、探索目的で検討した 33 例とは別の膠芽腫症例 (Table 5) を用いて予後と G6PC3 の発現を検証した。このコホートで予後良好群と予後不良群における G6PC3 の mRNA 発現を比較したところ、予後不良群で有意に G6PC3 の発現が高かった ($P=0.027$) (Figure 12a)。さらに一般公開されている TCGA のデータ (Table 6) を用いて検証したところ、G6PC3 高発現群において有意に全生存期間が短かった (Figure 12b)。これらの結果から G6PC3 発現は予後不良に関わる因子であることが示唆された。

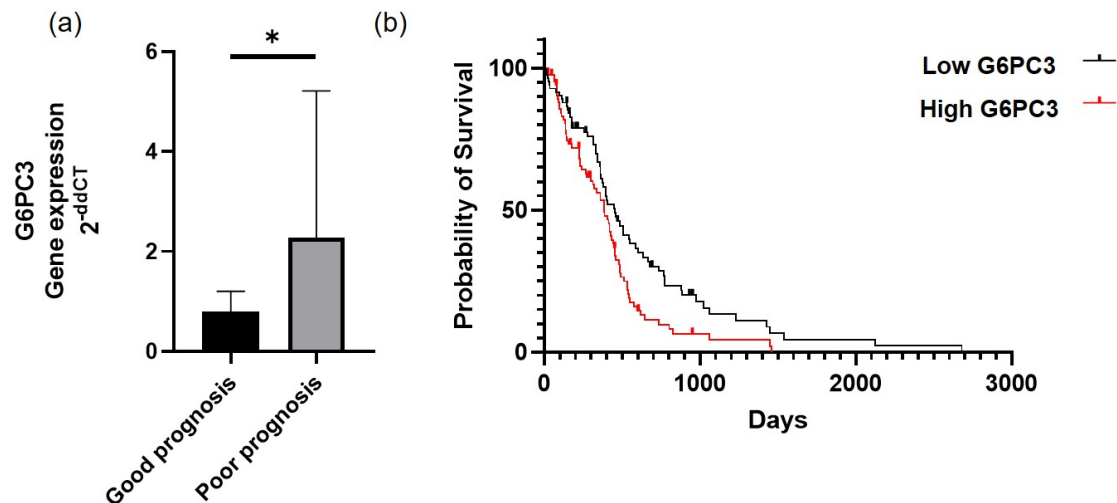


Figure 12 G6PC3 と膠芽腫患者の全生存率の相関

- (a) 探索目的で検討したコホートと別のコホートを用いて予後と G6PC3 の発現を検証したところ、予後良好群に比べ、予後不良群では有意に G6PC3 の mRNA 発現が高かった。(予後良好群: 中間値 0.88, $n = 8$; 予後不良群: 中間値 1.40, $n = 9$; $*P < 0.05$ の有意差あり。Mann-Whitney test を用いて検定した。
- (b) TCGA データベースでは G6PC3 の mRNA 発現量の中間値をカットオフとして G6PC3 高発現群と低発現群の全生存率を Kaplan Meier 曲線で比較したところ、G6PC3 mRNA 高発現群 ($n = 84$, 中間値 385.0 日, 95%信頼区間 0.46–0.91) は低発現群 ($n = 83$, 中間値 455.0 days, 95%信頼区間 1.11–2.18) に比べ有意に全生存率が短かった。($P = 0.008$)。log-rank test で検定した。

Table 5 自施設の別コホートにおける膠芽腫患者のCharacteristics

Parameters	No. of patients (%)	Prognosis		P value
		good (n=8)	poor (n=9)	
Age (years)		66.0 ($\pm$ 11.5)	66.0 ($\pm$ 10.1)	
$\leq$ 60	3	1	2	0.5997
>60	14	7	7	
Gender				
Female	5	3	2	0.4902
Male	12	5	7	
KPS		82.5 ($\pm$ 7.1)	67.8 ($\pm$ 17.9)	
$\geq$ 70	11	7	4	0.0637
<70	6	1	5	
IDH status				
IDH wild type	17	8	9	-
IDH mutant	0	0	0	
Adjuvant radiochemotherapy	17	8	9	-
Yes	0	0	0	
No				
Last status				
Alive	1	1	0	0.4706
Dead	16	7	9	
Overall survival				
Median (days)		1590	278	0.0001
95% C.I		0.065 – 0.470	2.130-15.36	

KPS; Karnofsky performance score, IDH; isocitrate dehydrogenase, 95% C.I; 95% confidence interval

Table 6 TCGAデータベースにおける膠芽腫患者のcharacteristicsと *G6PC3* mRNA 発現の関連

Parameters	No. of patients (%)	G6PC3 expression		P value
		High (n=84)	Low (n=83)	
Age (years)				
≤60	79	33	46	0.1035
>60	88	51	37	
Gender				
Female	59	34	25	0.1616
Male	108	50	58	
KPS				
≥70	91	50	41	0.3497
<70	33	15	18	
Unknown	43	19	24	
IDH status				
IDH wild type	137	75	62	0.2123
IDH mutant	9	3	6	
Unknown	21	6	15	
EOR				
Tumor resection	152	76	75	0.9799
Biopsy	16	8	8	
Adjuvant radiotherapy				
Yes	138	68	70	0.8875
No	21	10	11	
Unknown	8	6	2	
Adjuvant chemotherapy				
Yes	134	68	66	0.5195
No	23	10	13	
Unknown	10	6	4	
Last status				
alive	31	12	19	0.1527
dead	136	72	64	

KPS; Karnofsky performance score, IDH; isocitrate dehydrogenase, EOR; extent of surgical resection

考察

本研究では G6PC3 が膠芽腫において低酸素下で糖代謝が亢進した部分で高く発現していることが示唆された。まず膠芽腫では FDG 集積亢進する組織, FMISO 集積亢進する組織のそれぞれで G6PC3 の発現が亢進していた, 次に膠芽腫細胞株において低酸素下の方が, 通常環境下に比べて G6PC3 の遺伝子発現が亢進していた。これらにより膠芽腫において低酸素環境では G6PC3 の発現が増加することを示唆した。最後に G6PC3 高発現は予後不良因子であることを示した。

1) 膠芽腫における低酸素下糖代謝

悪性腫瘍細胞, 特に低酸素状態では, イノシトール 3 リン酸/AKT/mTOR 経路や細胞外シグナル調整プロテインキナーゼ経路, アデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ経路等を経て HIF-1 α が亢進することが知られている (Imaizumi et al., 1984; Nagao et al., 2019)。腫瘍細胞はミトコンドリアの酸化的リン酸化によるエネルギー産生から解糖系に切り替え, ATP 産生へとスイッチしている (Kierans and Taylor, 2021)。HIF-1 α は hypoxia-responsive elements (HRE; i.e., 5'-ACGTG-3') に結合して複合体を形成し, GLUT や HK, ピルビン酸キナーゼ, 乳酸デヒドロゲナーゼ等の解糖系に関わる下流の経路を刺激する (Gao and Chen, 2015; Nagao et al., 2019)。低酸素に対する一連の反応により, 腫瘍細胞は嫌気性代謝を可能にし, 低酸素下でも生存することができると考えられている。

低酸素の評価について HIF-1 α の遺伝子発現は低酸素を反映しないことが知られていた (Wenger et al., 1997)。これは通常環境下では分解される HIF-1 α 蛋白が酸素濃度依存的にユビキチンの修飾を受ける。低酸素下ではユビキチンがつかず, 分解されないため増加することによる (Chee et al., 2019)。これを考慮しても蛋白発現を用いた評価が妥当と考えられ, 本研究の結果もそれに一致したものだ。

以前の研究で低酸素領域 (FMISO 集積領域) における FDG 取込の程度が腫瘍の低酸素への適応能, つまり FDG/FMISO ともに集積亢進する部分は低酸素下

の解糖系亢進に至る経路が反映された結果ともいえる(Toyonaga et al., 2017). 本研究において膠芽腫全体の糖代謝関連遺伝子の発現は通常細胞と比べて高くはなかった. 一方で細胞増殖能を反映するといわれる PCNA(Kayaselcuk et al., 2002)や血管増生に関連する VEGF(Kawai et al., 2014)は有意に高発現しており, 腫瘍組織の病勢を反映していたと考えられた.

2)FDG 取込と遺伝子発現

本研究は FDG と FMISO の集積に関連する分子の発現が腫瘍の病勢に関与するという仮説に基づいている.

過去の報告では, 腫瘍性病変において FDG 取込は GLUT1(Chung et al., 2004; Meyer et al., 2019)や HK2(Kircher et al., 2019; Paudyal et al., 2008)の発現と関連することが知られていた. そこで, 糖代謝に関連する分子をいくつか選定し, その遺伝子発現の定量的評価と, FDG/FMISO PET で測定された半定量値との関連を調べることにした. FDG 集積を規定する分子の同定には至らないものの, 本研究では FDG 集積と有意に相関していたのは GLUT1 ではなく, HK2 と G6PC3 だった.

3) G6PC3 の mRNA 発現は FDG 取込と相関する

癌腫によっては FDG 集積と G6Pase 発現は逆相関すること(Hutton and O'Brien, 2009; Peppicelli et al., 2020; Sambuceti et al., 2021; Scussolini et al., 2019)が知られており, その点で本研究の結果とは相違があった. 糖代謝は多因子により決定され複雑であることから正確な機序については不明なままだが, 糖代謝の亢進とともに解糖系のみならず糖新生もあわせて亢進した機序が推定された.

また, FDG 動態についての最近の研究では, FDG 集積や ATP 産生に用いられる糖の消費が圧倒的に大きいことから FDG6P の排泄については G6Pase の関与は非常に小さいことが知られている(Noll et al., 2000; Sambuceti et al., 2021)., むしろ FDG の排泄については G6Pase よりも粗面小胞体の glucose-6-phosphate transporter が関与していることが報告されている(Caracó et al., 2000; Scussolini et al., 2019). これらから, G6Pase は必ずしも FDG 取込の逆相関因子とはならない可能性があった. 特に本研究では糖・FDG の取込が増加するとともに, 解糖系による代謝と糖新生がともに活性化することが推察された. 神経膠腫において G6PC3 が FDG 集積と相関するといった報告はないが, 他癌腫である肝内胆管癌において FDG 集積の SUV 最大値と G6PC3 の mRNA 発現と相関したという報告もある(Ahn et al., 2019).

4) G6PC3 の mRNA 発現は FMISO 高集積領域で多く見られた

本研究では GLUT1 と G6PC3 の発現は FMISO 高集積の組織で有意に高かった。 GLUT1 は低酸素で誘導されることが知られているが(Kierans and Taylor, 2021; Labak et al., 2016), G6PC3 と低酸素についての報告はほぼなく特に神経膠腫において酸素が G6PC3 発現に与える影響についての報告はない。 G6PC3 と FDG 集積の関係から、解糖系の亢進とともに低酸素領域に G6PC3 が発現すると推測した。 G6Pase は HIF-1 α の活性化を介して低酸素下で誘導されるという報告がある(Gautier-Stein et al., 2012)一方で、間質系幹細胞においては低酸素下で G6PC3 は誘導されないといった報告もある(Lord-Dufour et al., 2009)。

5) G6PC3: G6Pase のアイソフォーム

G6Pase は粗面小胞体に存在し、G6P や FDG6P を glucose または FDG への加水分解を進める(Hutton and O'Brien, 2009; Lei et al., 1996)。 G6Pase は膠芽腫において腫瘍の病勢に関与し、細胞増殖や遊走に関与していることが示唆されている。 Glucose free の培地で培養された brain tumor-initiating cell が解糖系を抑制された状況で生存することができるのは、糖新生を触媒する G6Pase の働きであることが示され、さらに解糖系が抑制された後に、より病勢を強め、遊走能、浸潤能、増殖能が強まったことは興味深い(Abbadi et al., 2014)。 G6PC3 は G6Pase のアイソフォームであるが、もともと G6Pase- β として知られていた。 G6Pase のアイソフォームとして G6PC, G6PC2, and G6PC3 の 3 つが知られており、G6PC は肝臓、腎臓、腸に多く発現するのに対し、G6PC3 は脳や筋、腎臓に多く発現することが知られている(Guionie et al., 2003; Hutton and O'Brien, 2009)。

6) 低酸素による G6PC3 の mRNA 発現誘導

G6PC3 の遺伝子発現は低酸素により誘導されるのかを確認するため、細胞増殖実験を実施した。 この際、低酸素に適切に暴露されたか HIF-1 α の蛋白発現により確認するため、HIF-1 α の免疫染色を行い確認した。 本研究では膠芽腫細胞株において G6PC3 が低酸素下で発現が増加した。 以前の報告において同様に HIF-1 α を介して G6Pase が誘導されたことも示されていた(Gautier-Stein et al., 2012)。 しかしながらこの結果のみでは低酸素により膠芽腫の G6PC3 の mRNA 発現が増加することを示したことにしならず、さらなる追加検証を要する。

7) G6PC3 mRNA 発現の臨床的意義

最後に予後について解析を行った。この解析は 2 行程施行した。ひとつは自施設の症例で、先に示した FMISO/FDG-PET を用いて探索したコホートとは別のコホートを用い、一方では米国のデータベースである TCGA を用いて予後と G6PC3 の mRNA 発現を検証した。いずれも G6PC3 の mRNA 発現と予後が関連していた。前者では同等の治療が行われたにも関わらず OS が大きく異なる 2 群で比較した結果、予後不良群で有意に G6PC3 の mRNA 発現が有意に亢進していた。後者では TCGA において G6PC3 の高発現、低発現で Kaplan–Meier 曲線を比較したところ高発現群で有意に OS が短かった。昨今では膠芽腫において G6PC3 は予後予測因子として考慮されている(Yin et al., 2019)。しかしながら現時点では G6PC3 が予後に関わるメカニズムは判明していない。低酸素による G6PC3 誘導がそのヒントとなるかもしれない。

本研究の問題点として、腫瘍の不均一性により組織内の mRNA 発現が一定しない可能性がある。さらに腫瘍検体の採取部位の検証が十分になされておらず核医学評価された部位との不一致の可能性がありえた。また本研究の解析においてはサンプル数が少ないことも挙げられる。最後に低酸素による G6PC3 の mRNA 発現の誘導についてはさらなる機能解析をもって実証されるべきであり、本研究ではそのメカニズムの解明に至っていない点が考えられ、結果については慎重な解釈と多角的な解析の追加が求められると考えられた。

一方でまず予後予測因子としての意義は大きい。現状では診断以外の有用な遺伝子変異としては膠芽腫に対する治療薬テモゾロミドの反応性に影響を及ぼす O6-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) は予後に影響することが知られている (Hegi et al., 2005)。ただし治療と関連しない予後予測因子はないため、G6PC3 が予後予測因子となれば治療方針の決定に大きく寄与する。低酸素下の代謝に関わる因子であることから、治療に貢献する可能性としては、血管新生阻害剤であるベバシズマブは現在でも保険適応ではあるが、膠芽腫の中で治療奏効群を検出できる可能性が推測された。さらに G6PC3 を阻害した環境下でベバシズマブの効果を増強することも含め検討を行うことが望まれた。

総括および結論

- 1) 膠芽腫の組織検体において、FMISO を用いて定量的に評価された低酸素について、低酸素関連の遺伝子発現よりも抗 HIF-1 α 抗体を用いた免疫組織学的染色による蛋白発現の方が適切に評価を行うことができると考えられた。
- 2) 膠芽腫において FDG の集積は、GLUT1 ではなく HK2 と G6PC3 の遺伝子発現が関与している可能性が示唆された。
- 3) 膠芽腫について低酸素環境下では GLUT1 のみならず G6PC3 の mRNA 発現が誘導される可能性が示唆されたが、これについてはさらなる検証を要する。
- 4) G6PC3 の mRNA 発現は膠芽腫において全生存期間に関連しており、予後予測因子になる可能性がある。その分子学的機構について機序解明に向けて多方面からの研究継続が期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えてくださいました北海道大学大学院医学研究院脳神経外科学教室 教授 藤村 幹先生に謝意を表します．併せて本研究全般にわたり直接ご指導・ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究院脳神経外科学教室 講師 山口 秀先生・北海道大学大学院医学研究院脳神経外科学教室 助教 茂木 洋晃先生に深く感謝致します．また核医学的評価のご教示を頂いた北海道大学大学院医学研究院放射線科学分野画像診断額教室 准教授 平田 健司先生・豊永 拓哉先生に深謝致します．

最後に本研究に多大なご協力を頂きました実験助手 長島理香様をはじめ研究助手の方々と脳神経外科教室員および秘書の皆様に厚く御礼申し上げます．

利益相反

本研究において開示すべき利益相反はない。

引用文献

- Abbadi, S., Rodarte, J.J., Abutaleb, A., Lavell, E., Smith, C.L., Ruff, W., Schiller, J., Olivi, A., Levchenko, A., Guerrero-Cazares, H., *et al.* (2014). Glucose-6-phosphatase Is a Key Metabolic Regulator of Glioblastoma Invasion. *Molecular Cancer Research* 12, 1547-1559.
- Ahn, K.S., Kang, K.J., Kim, Y.H., Kim, T.-S., Song, B.-I., Kim, H.W., O'Brien, D., Roberts, L.R., Lee, J.W., and Won, K.S. (2019). Genetic features associated with (18)F-FDG uptake in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Treat Res* 96, 153-161.
- Allred, D.C., Harvey, J.M., Berardo, M., and Clark, G.M. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 11, 155-168.
- Bekaert, L., Valable, S., Lechapt-Zalcman, E., Ponte, K., Collet, S., Constans, J.M., Levallet, G., Bordji, K., Petit, E., Branger, P., *et al.* (2017). [18F]-FMISO PET study of hypoxia in gliomas before surgery: correlation with molecular markers of hypoxia and angiogenesis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 44, 1383-1392.
- Boellaard, R., Delgado-Bolton, R., Oyen, W.J.G., Giammarile, F., Tatsch, K., Eschner, W., Verzijlbergen, F.J., Barrington, S.F., Pike, L.C., Weber, W.A., *et al.* (2015). FDG PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour imaging: version 2.0. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 42, 328-354.
- Borgwardt, L., Højgaard, L., Carstensen, H., Laursen, H., Nowak, M., Thomsen, C., and Schmiegelow, K. (2005). Increased Fluorine-18 2-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose (FDG) Uptake in Childhood CNS Tumors Is Correlated With Malignancy Grade: A Study With FDG Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging Coregistration and Image Fusion. *Journal of Clinical Oncology* 23, 3030-3037.
- Caracó, C., Aloj, L., Chen, L.-Y., Chou, J.Y., and Eckelman, W.C. (2000). Cellular Release of [18F]2-Fluoro-2-deoxyglucose as a Function of the Glucose-6-phosphatase Enzyme System. *Journal of Biological Chemistry* 275, 18489-18494.
- Chee, N.T., Lohse, I., and Brothers, S.P. (2019). mRNA-to-protein translation in hypoxia. *Molecular Cancer* 18.

- Chung, J.K., Lee, Y.J., Kim, S.K., Jeong, J.M., Lee, D.S., and Lee, M.C. (2004). Comparison of [18F]fluorodeoxyglucose uptake with glucose transporter-1 expression and proliferation rate in human glioma and non-small-cell lung cancer. *Nuclear Medicine Communications* *25*, 11-17.
- Evans, S.M., Judy, K.D., Dunphy, I., Jenkins, W.T., Hwang, W.-T., Nelson, P.T., Lustig, R.A., Jenkins, K., Magarelli, D.P., Hahn, S.M., *et al.* (2004). Hypoxia Is Important in the Biology and Aggression of Human Glial Brain Tumors. *Clinical Cancer Research* *10*, 8177-8184.
- Gallagher, B.M., Fowler, J.S., Guttererson, N.I., MacGregor, R.R., Wan, C.N., and Wolf, A.P. (1978). Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [18F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J Nucl Med* *19*, 1154-1161.
- Gao, J.-L., and Chen, Y.-G. (2015). Natural Compounds Regulate Glycolysis in Hypoxic Tumor Microenvironment. *BioMed Research International* *2015*, 1-8.
- Gautier-Stein, A., Soty, M., Chilloux, J., Zitoun, C., Rajas, F., and Mithieux, G. (2012). Glucotoxicity Induces Glucose-6-Phosphatase Catalytic Unit Expression by Acting on the Interaction of HIF-1 With CREB-Binding Protein. *Diabetes* *61*, 2451-2460.
- Grasman, G., Smolle, E., Olschewski, H., and Leithner, K. (2019). Gluconeogenesis in cancer cells – Repurposing of a starvation-induced metabolic pathway? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* *1872*, 24-36.
- Guionie, O., Clottes, E., Stafford, K., and Burchell, A. (2003). Identification and characterisation of a new human glucose-6-phosphatase isoform. *FEBS Letters* *551*, 159-164.
- Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., *et al.* (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* *352*, 997-1003.
- Hirata, K., Terasaka, S., Shiga, T., Hattori, N., Magota, K., Kobayashi, H., Yamaguchi, S., Houkin, K., Tanaka, S., Kuge, Y., *et al.* (2012). (1)(8)F-Fluoromisonidazole positron emission tomography may differentiate glioblastoma multiforme from less malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* *39*, 760-770.
- Hutton, J.C., and O'Brien, R.M. (2009). Glucose-6-phosphatase Catalytic Subunit Gene Family. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 29241-29245.

Imaizumi, S., Kayama, T., and Suzuki, J. (1984). Chemiluminescence in hypoxic brain--the first report. Correlation between energy metabolism and free radical reaction. *Stroke* *15*, 1061-1065.

Ishi, Y., Yamaguchi, S., Hatanaka, K.C., Okamoto, M., Motegi, H., Kobayashi, H., Terasaka, S., and Houkin, K. (2020). Association of the FGFR1 mutation with spontaneous hemorrhage in low-grade gliomas in pediatric and young adult patients. *Journal of Neurosurgery* *134*, 1-9.

Kawai, N., Lin, W., Cao, W.-D., Ogawa, D., Miyake, K., Haba, R., Maeda, Y., Yamamoto, Y., Nishiyama, Y., and Tamiya, T. (2014). Correlation between 18F-fluoromisonidazole PET and expression of HIF-1 α and VEGF in newly diagnosed and recurrent malignant gliomas. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* *41*, 1870-1878.

Kayama, T., Yoshimoto, T., Fujimoto, S., and Sakurai, Y. (1991). Intratumoral oxygen pressure in malignant brain tumor. *Journal of Neurosurgery* *74*, 55-59.

Kayaselcuk, F., Zorludemir, S., Gumurduhu, D., Zeren, H., and Erman, T. (2002). PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological type and grade. *J Neurooncol* *57*, 115-121.

Kierans, S.J., and Taylor, C.T. (2021). Regulation of glycolysis by the hypoxia - inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *The Journal of Physiology* *599*, 23-37.

Kircher, S., Stolzenburg, A., Kortum, K.M., Kircher, M., Da Via, M., Samnick, S., Buck, A.K., Einsele, H., Rosenwald, A., and Lapa, C. (2019). Hexokinase-2 Expression in (11)C-Methionine-Positive, (18)F-FDG-Negative Multiple Myeloma. *J Nucl Med* *60*, 348-352.

Labak, C.M., Wang, P.Y., Arora, R., Guda, M.R., Asuthkar, S., Tsung, A.J., and Velpula, K.K. (2016). Glucose transport: meeting the metabolic demands of cancer, and applications in glioblastoma treatment. *Am J Cancer Res* *6*, 1599-1608.

Lally, B.E., Rockwell, S., Fischer, D.B., Collingridge, D.R., Piepmeyer, J.M., and Knisely, J.P. (2006). The interactions of polarographic measurements of oxygen tension and histological grade in human glioma. *Cancer J* *12*, 461-466.

Lei, K.-J., Chen, H., Pan, C.-J., Ward, J.M., Mosinger, B., Lee, E.J., Westphal, H., Mansfield, B.C., and Chou, J.Y. (1996). Glucose-6-phosphatase dependent substrate transport in the glycogen storage disease type-1a mouse. *Nature Genetics* *13*, 203-209.

- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lord-Dufour, S., Copland, I.B., Levros, L.-C., Post, M., Das, A., Khosla, C., Galipeau, J., Rassart, E., and Annabi, B. (2009). Evidence for Transcriptional Regulation of the Glucose-6-Phosphate Transporter by HIF-1 α : Targeting G6PT with Mumbaistatin Analogs in Hypoxic Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells* 27, 489-497.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 131, 803-820.
- Meyer, H.-J., Wienke, A., and Surov, A. (2019). Associations between GLUT expression and SUV values derived from FDG-PET in different tumors—A systematic review and meta analysis. *PLOS ONE* 14, e0217781.
- Nagao, A., Kobayashi, M., Koyasu, S., Chow, C.C.T., and Harada, H. (2019). HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *Int J Mol Sci* 20.
- Noll, T., Mühlensiepen, H., Engels, R., Hamacher, K., Papaspyrou, M., Langen, K.J., and Biselli, M. (2000). A cell-culture reactor for the on-line evaluation of radiopharmaceuticals: evaluation of the lumped constant of FDG in human glioma cells. *J Nucl Med* 41, 556-564.
- Oliver, L., Olivier, C., Marhuenda, F.B., Campone, M., and Vallette, F.M. (2009). Hypoxia and the malignant glioma microenvironment: regulation and implications for therapy. *Curr Mol Pharmacol* 2, 263-284.
- Paudyal, B., Oriuchi, N., Paudyal, P., Higuchi, T., Nakajima, T., and Endo, K. (2008). Expression of glucose transporters and hexokinase II in cholangiocellular carcinoma compared using [18F]-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography. *Cancer Science* 99, 260-266.
- Peppicelli, S., Andreucci, E., Ruzzolini, J., Bianchini, F., and Calorini, L. (2020). FDG uptake in cancer: a continuing debate. *Theranostics* 10, 2944-2948.
- Sambuceti, G., Cossu, V., Bauckneht, M., Morbelli, S., Orengo, A., Carta, S., Ravera, S., Bruno, S., and Marini, C. (2021). 18F-fluoro-2-deoxy-d-glucose (FDG) uptake. What are we looking at? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 48, 1278-1286.

Sato, J., Kitagawa, Y., Watanabe, S., Asaka, T., Ohga, N., Hirata, K., Okamoto, S., Shiga, T., Shindoh, M., Kuge, Y., *et al.* (2017). (18)F-Fluoromisonidazole positron emission tomography (FMISO-PET) may reflect hypoxia and cell proliferation activity in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* *124*, 261-270.

Scussolini, M., Bauckneht, M., Cossu, V., Bruno, S., Orengo, A.M., Piccioli, P., Capitanio, S., Yosifov, N., Ravera, S., Morbelli, S., *et al.* (2019). G6Pase location in the endoplasmic reticulum: Implications on compartmental analysis of FDG uptake in cancer cells. *Scientific Reports* *9*.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., *et al.* (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* *352*, 987-996.

Toyonaga, T., Hirata, K., Yamaguchi, S., Hatanaka, K.C., Yuzawa, S., Manabe, O., Kobayashi, K., Watanabe, S., Shiga, T., Terasaka, S., *et al.* (2016). (18)F-fluoromisonidazole positron emission tomography can predict pathological necrosis of brain tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* *43*, 1469-1476.

Toyonaga, T., Yamaguchi, S., Hirata, K., Kobayashi, K., Manabe, O., Watanabe, S., Terasaka, S., Kobayashi, H., Hattori, N., Shiga, T., *et al.* (2017). Hypoxic glucose metabolism in glioblastoma as a potential prognostic factor. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* *44*, 611-619.

Wachtel, M.S., and Yang, S. (2014). Odds of death after glioblastoma diagnosis in the United States by chemotherapeutic era. *Cancer Medicine* *3*, 660-666.

Wenger, R.H., Kvietikova, I., Rolfs, A., Gassmann, M., and Marti, H.H. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 alpha is regulated at the post-mRNA level. *Kidney Int* *51*, 560-563.

Yin, W., Tang, G., Zhou, Q., Cao, Y., Li, H., Fu, X., Wu, Z., and Jiang, X. (2019). Expression Profile Analysis Identifies a Novel Five-Gene Signature to Improve Prognosis Prediction of Glioblastoma. *Frontiers in Genetics* *10*, 419.