

FDG PET画像

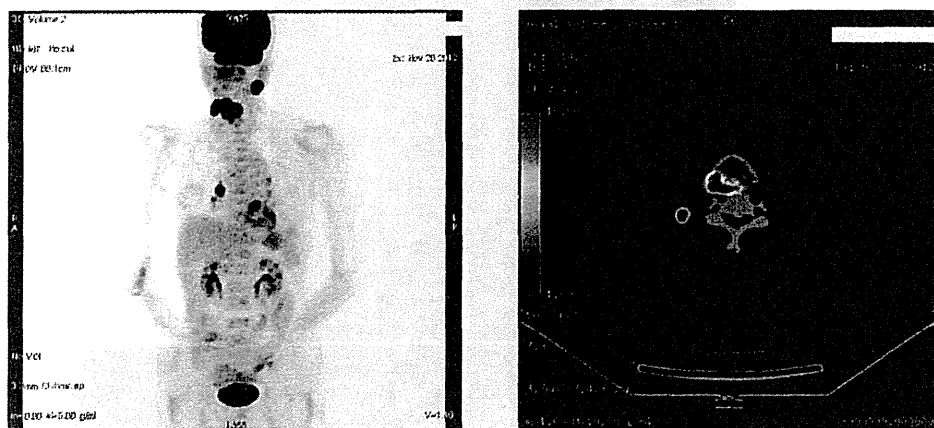


図1 ^{18}F -FDG PET/CT 画像 (下咽頭癌症例) (国立がん研究センター東病院頭頸科 林隆一先生のご厚意による)

ATSM 低酸素PET

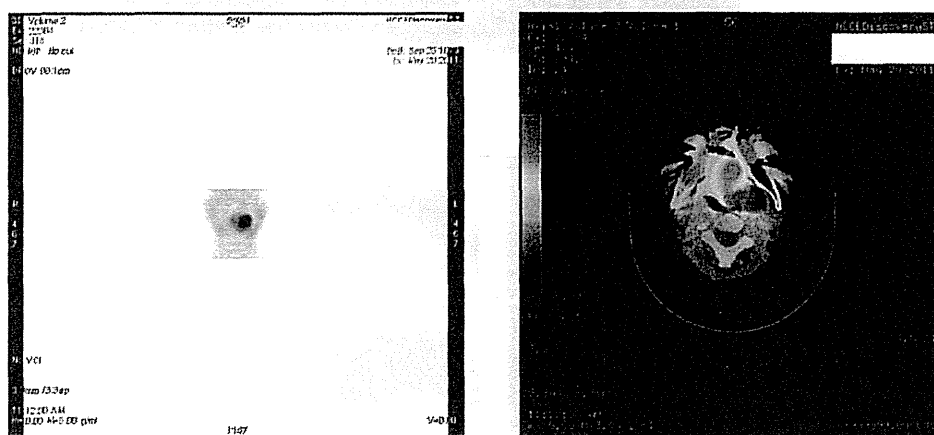


図2 ^{62}Cu -ATSM PET/CT 画像 (舌癌症例) (国立がん研究センター東病院頭頸科 林隆一先生のご厚意による)。強い ATSM 集積から低酸素細胞が多く、放射線感受性が低い可能性が示唆された。年齢なども考慮して、外科手術が選択された。

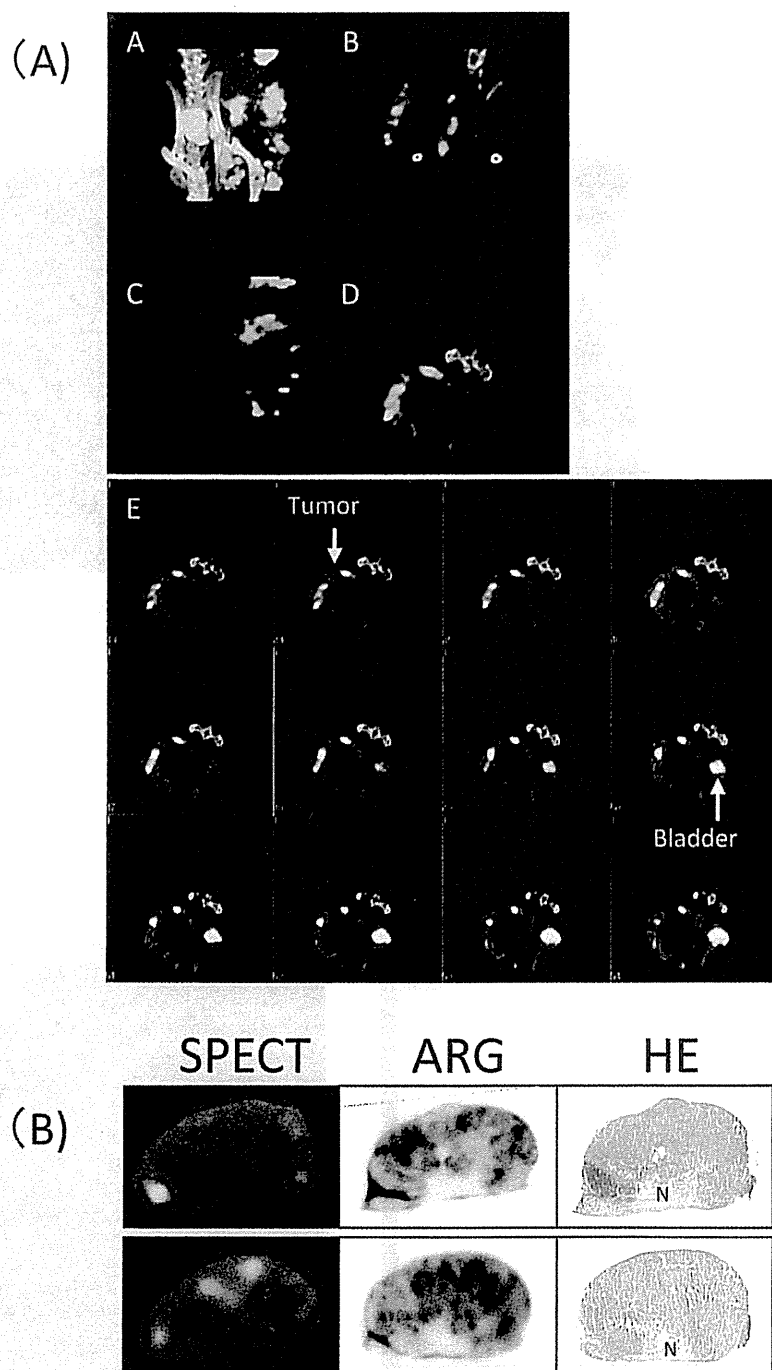


図3 新しい低酸素領域イメージングプローブの開発. ^{125}I -POSによる低酸素誘導因子 HIF1 の可視化.
 (A)インビボ小動物 SPECT/CT 画像 (FM3A 担がんマウス) A: 最大値投影像, B: 冠状断面,
 C: 矢状断面, D: 軸断面, E: 軸断面の連続画像 (0.3mm 間隔). 腫瘍内の不均一な分布が
in vivo で観察できる.
 (B)摘出腫瘍の SPECT/CT 画像および対応する薄切切片オートラジオグラムと HE 染色. N: 壊
 死領域 (文献17より許可を得て転載)

ポーターの機能など、その他、医薬品の体内動態に深く関連する肝臓や腎臓でのトランスポーター群の発現、機能測定や遺伝的要因による変動、動脈硬化病変における不安定プラークの描出等などが挙げられる¹⁴⁾。臨床研究にまで進んでいるものも多い。

がんの低酸素領域イメージングは、頭頸部癌の放射線治療の最適化（照射野および照射線量の決定）に関して、¹⁸F-FDG PET/CT 検査とともに有用な情報を与えるものとして注目されている¹⁵⁾¹⁶⁾。がん低酸素イメージングプローブとしては、¹⁸F-fluoromisonidazole (¹⁸F-FMISO)、¹⁸F-fluoroazomycin arabinoside (¹⁸F-FAZA) 等の nitroimidazole 誘導体や、^{60/61/62/64}Cu-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) (Cu-ATSM) 等がある(図2)。筆者らは、低酸素状態で活性が発現し、がんの悪性度と強い相関を示す低酸素誘導因子(hypoxia inducible factor 1, HIF1)の活性を可視化するプローブも開発している¹⁷⁾¹⁸⁾。このプローブは低酸素領域を描画するとともに、がんの悪性化を導く HIF1 活性そのものの腫瘍内局在を可視化できる可能性をもつ(図3)。

このようなイメージングバイオマーカーに関する研究への取り組みは、疾病治療の最適化を通じて個別化医療への応用に大きく貢献するものと期待されている。

3. 新薬開発ツールとしての分子イメージング

分子イメージングは新薬を開発する際のツールとしても極めて有用である。薬物自体の体内動態の解析、医薬品の作用標的のイメージングや定量解析、受容体占有率試験などが可能である¹⁹⁾。また、新薬開発の前臨床*研究にはマウスやラット等の小動物が多く用いられるが、高感度・高空間分解能を持つ小動物用イメージング装置が開発されており、分子イメージングは前臨床研究にも極めて有用なツールとなりつつある²⁰⁾。また、前臨床研究と臨床研究で同様のプロトコルで検討が可能なることから、前臨床研究の成果を臨床に橋渡しする、いわゆるトランスレーショナル研究の実施も可能である。こういった背景から、近年、核医学分子イメージング技術を新薬開発に応用する動きが高まっている。

(*前臨床：現在は臨床試験の前段階は「非臨床試験」と呼ばれるが、臨床に至る前段階の研究という意味合いで、本稿では「前臨床」と表記する。)

1) 薬物自体の体内動態の解析

医薬品開発のための薬物動態試験は、前臨床研究段階では主に齧歯類を用い、試料投与後に採血を行い、その血漿中薬物濃度を LC/MS などによって測定して、濃度の経時変化や代謝物分析を行うのが一般的である。しかし、脳やがん組織内の薬剤濃度は必ずしも血漿中濃度と

比例せず、血漿中濃度からの予測が困難なことがある。PET 核種や SPECT 核種で候補薬物を標識し、核医学検査を実施すると、薬物自体の体内動態を同一個体で経時的に *in vivo* で可視化し、評価することができる。また、疾病モデルとして高価なトランスジェニック動物などが用いられることもあり、それらの動物における薬物動態学(pharmacokinetics)や薬力学(pharmacodynamics)の情報が *in vivo* で得られる分子イメージング手法は有用性が高い。

薬物動態を調べる場合には、原則として薬物の構造が変わってはならないため、薬物を構成する元素(炭素(C)、窒素(N)、フッ素(F)など)を放射性同位体に置換することが望ましい。¹¹C(半減期20分)や¹⁸F(110分)等の PET 核種を使えばこれが可能である。しかしながら、PET 核種の半減期は一般的に短く、投与後長時間にわたっての薬物動態の検討は難しい。このため、前臨床研究では、候補となる化合物の動態に影響を与えない範囲で半減期の長い^{99m}Tc(6時間)、¹¹¹In(68時間)、¹²³I(13時間)といった SPECT 核種で標識が行われることもある。ペプチド医薬品や抗体などの高分子薬物では一般的に組織移行性や血中クリアランスが遅いため、長時間の薬物動態観察が必要なことが多いが、標識核種の原子量が候補薬物に比して十分に小さいため、半減期の長い SPECT 核種の利用が可能である。

2) 薬効評価、POC 取得など

前述のイメージングバイオマーカーは、新薬開発においても有用な概念である。腫瘍細胞で亢進しているグルコース取込み能を評価する¹⁸F-FDGが、臨床で抗がん剤の治療効果判定に用いられていることは前述した。また分子標的薬の多くがアポトーシスを誘導することから、アポトーシスイメージングも有望視されている²¹⁾。悪性腫瘍では病的な血管新生が起こるため、血管新生阻害薬の開発が進められているが、その評価に新生血管内皮に高発現する α V β 3インテグリンと特異的に結合するペプチド(アルギニン-グリシン-アスパラギン配列をもつ; RGD ペプチド)をプローブとする試みもある。また、アミロイド β タンパク質(A β)の脳内蓄積はアルツハイマー病の病態の最上流に位置し、根本治療薬の標的とされている。これまでに多くの A β イメージング剤が開発されており²²⁾、疾病診断に用いられると同時に、アルツハイマー病治療薬の開発にも活用されている。また向精神薬の作用点である脳内受容体やトランスポーターの占有率評価や有効投与量推定などにも有用である¹⁹⁾。

最近の新薬開発においては、その作用機序の概念が想定通りであることを証明する proof of concept(POC) の

取得が必須となっている。これまで述べてきたように、イメージングバイオマーカーはまさに POC を *in vivo* で表現するツールである。

3) マイクロドーズ臨床試験

医薬品の開発には莫大なコストがかかるため、本格的な臨床試験の開始前に、健常人に薬効や毒性の発現しない薬効用量の 1/100 または 100 μ g 以下という非常に低い投与量の被験化合物を単回投与し、薬物の吸収性、標的臓器への移行性、標的受容体への結合、組織分布、および血液中動態、尿糞中への排泄などを確認するマイクロドーズ臨床試験を実施することが試みられている。この試験では投与量が極微量であることから、高感度な検出法が必要であり、加速器質量分析装置 (accelerator mass spectrometry; AMS) や高感度 LC/MS/MS、および医薬品自身を放射性標識する核医学的手法が用いられる。

核医学的手法での実施には、医薬品自身の放射性標識体が必要であり、PET 核種である ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F で放射性標識体の合成が試みられている。ただし、これらの核種は半減期が短いなどの制約があり、核医学手法によるマイクロドーズ試験の実施には、専門の設備と技術開発が必要である。これまでに海外では抗腫瘍剤、抗生物質、抗不安薬、抗うつ薬、催眠薬、抗精神病薬、カルシウム拮抗薬などを対象とした検討がなされている。わが国では 2008 年に厚生労働省から「マイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンス」が発表され、2012 年 7 月に国内の製薬会社がわが国では初めてのマイクロドーズ臨床試験を実施したことが報告されている。

マイクロドーズ試験の導入により、医薬品開発の初期において薬物動態学的に適正と思われるものを選択しておくことは、その後の臨床開発において、体内動態が原因で失敗する可能性を削減することを期待できる。ただし、一方で、投与量が臨床量とは異なる点には注意しておかなければならない。

4. 新しい分子イメージングの臨床応用

1) 臨床における光イメージング

蛍光イメージングは、透過性・定量性の点で臨床応用に制限がある。しかし一方で、光イメージングは、核医学や MRI のような大型設備を必要としないこと、測定の時間分解能に優れ、リアルタイムの観察が可能なこと、また光プローブは、核医学プローブと異なり、標的分子に結合した時のみに信号 (発光) をオンにする *activatable probe* の開発が可能なことなど、魅力的な特長を有する。内視鏡や体腔鏡との組み合わせで臨床応用が期待されている。

国立がん研究センターと富士フィルム(株)は、レーザー光源搭載の内視鏡システムと画像処理技術を用いて、赤血球中のヘモグロビンの酸素結合度を測定することで、生きた状態で体内組織での酸素飽和度の画像化に世界で初めて成功している。すでに臨床試験に入っており、胃や大腸などの腫瘍と、周辺部との酸素飽和度に違いがあることが明らかになりつつある。

浦野ら (東京大学) は、微量の蛍光プローブの噴霧でがん細胞のみを選択的に光らせる技術を開発した²³⁾。用いた分子プローブは、それ自身は光を發せず、多くのがん細胞で活性亢進がみられる γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -glutamyl transpeptidase: GGT) によって加水分解されることで、初めて蛍光を發するような分子設計が施されている。がん細胞の存在するところのみ発光するために極めて高感度でがん細胞を検出でき、1mm 以下の微小がんも噴霧後数分で検出可能であった。蛍光内視鏡下でのがんモデルマウス体内のがん部位を可視化し、これを鉗子を用いて除去する模擬手術にも成功している。現在は外科手術で摘出直後の検体に対するプローブ機能の検証が進められており、外科手術時や近年実施例が急増している内視鏡・腹腔鏡下手術において、微小がん部位の発見や取り残しを防ぐ画期的な技術として、臨床応用が期待されている。

2) 治療と診断の一体化

Frangioni (Harvard 大学) は、“Seeing is Curing” と唱えているが、分子イメージングの発展は、これまでは推測するしかなかった疾病の本態を目に見えるものにしつつある。疾病や病態と密接にかかわる生体分子、薬物とその標的分子との相互作用などが *in vivo* で描画されるようになった。これをさらに直接治療に結びつけようという動きが加速し、治療 (therapeutics) と診断 (diagnostics) からなる “theranostics” という造語が提案されている^{24)~27)}。診断と治療を一体化することで、患者の状態を観察しながら、安全で有効性の高い治療の実現を目指している。

アイソトープ内用療法: イメージングプローブとして用いられる核種は、原則的に半減期が短い γ 線のみを放出することが、被曝の低減の点で望ましい。一方で、体内での飛程が数 mm 程度の β 線放出核種を用いた疾病の治療 (^{125}I による甲状腺機能亢進症や甲状腺癌転移の治療、 ^{90}Y による悪性リンパ腫治療) も行われている。診断用核種に代わり、治療用核種を標的分子に特異的に送達できれば、内用療法が可能となる。2008 年にわが国でも認可された B 細胞性悪性リンパ腫に対する $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}$ 標識抗 CD20 抗体 (ゼヴァリン®) は、 ^{111}In 標識体でシンチグラム撮像を行い、有害事象につながる異常な体内

分布のないことを確認してから⁹⁰Y標識体による治療を行う。抗体やペプチド製剤を中心に、このように同一骨格のプロープを診断用、治療用の両方の核種で標識して診断と治療を行う試みが進められている²⁸⁾²⁹⁾。

ナノ粒子を用いた多機能プラットフォームによる“theranostics”：薬物の体内動態の制御はドラッグデリバリーシステム(DDS)と呼ばれ、多くの先端科学技術を巻き込んで発展している。リポソーム、ミセル、 dendリマー、ポリマー粒子など、粒子径10～200nm程度のさまざまな材質の微粒子(ナノ粒子)が薬物担体として開発されてきた。こういったナノ粒子は、いずれもその表面や内部にさまざまな加工があり、それによって、薬物を内包し、標的指向性をもち、また標的組織での薬物放出などを制御している。この性質を利用して、さらに分子イメージングプロープとしての機能を持たせ、治療と診断の機能を合わせ持つナノ粒子の開発が進められている²⁷⁾³⁰⁾。薬物の体内動態を、治療前、治療後だけでなく、治療中の全期間にわたってリアルタイムに観察することができるようになると考えられ、より効果的な治療につながるものと期待されている。さらに、薬物が標的に到達するのを確認して、そこで光照射など何らかの引き金を引くことにより集中的に標的にダメージを与えるなどの新たな試みも始まっている²⁴⁾。

近赤外光線免疫療法：小林ら(NIH)は、近赤外光の特定の波長を受けると細胞傷害性を引き起こす光感受性物質を開発し、これを抗体に結合して腫瘍に送達し、体外からのレーザーで近赤外光を照射してがん細胞を破壊することに成功した³¹⁾。近赤外光線免疫療法と名付けられている。近赤外光によって蛍光を発する光イメージングの応用編といえる。抗体にアイソトープを結合させて治療に用いる放射免疫療法 radio-immuno-therapy は古くから研究されているが、抗体の血中滞留時間は長く(～1週間以上)、その間結合したアイソトープが常に放射線を放出するため、正常組織の損傷も避けられない。これに対して近赤外光線免疫療法では、血中にある抗体は無害で、腫瘍に結合してレーザー光を照射されたもののみが細胞傷害性を発揮する。ナノ粒子との組み合わせによりさらに効果が増強されたことも最近報告された³²⁾。正常な細胞は傷つけず、効率的にがん細胞だけを破壊できる治療法として期待される。

ま と め

分子イメージング研究は、まだモダリティ別に進められていく場合が多いが、いずれこの敷居は取り払われ、生理機能や病態を至適な条件で観察するために、必要な情報を的確に得ることができるような複合イメージング

が選択されるようになるだろうと考えている。分子イメージング関連の学会でも、設立当初のモダリティ別のプログラム編成から、「がんを診る」といった目的別の構成で研究発表がされていたりする。「分子イメージング」という学問が成熟しつつあると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Thakur M, Lentle BC: Report of a summit on molecular imaging. *Radiology* 2005; 236: 753-755.
- 2) Mankoff DA: A definition of molecular imaging. *J Nucl Med* 2007; 48: 18N, 21N.
- 3) Hoffman JM, Gambhir SS: Molecular imaging: the vision and opportunity for radiology in the future. *Radiology* 2007; 244: 39-47.
- 4) Werner EJ, Datta A, Jocher CJ, et al: High-relaxivity MRI contrast agents: where coordination chemistry meets medical imaging. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008; 47: 8568-8580.
- 5) Viale A, Reineri F, Santelia D, et al: Hyperpolarized agents for advanced MRI investigations. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2009; 53: 604-617.
- 6) Winter PM: Magnetic resonance chemical exchange saturation transfer imaging and nanotechnology. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2012; 4: 389-398.
- 7) Luker GD, Luker KE: Optical imaging: current applications and future directions. *J Nucl Med* 2008; 49: 1-4.
- 8) Taruttis A, Ntziachristos V: Translational optical imaging. *AJR Am J Roentgenol* 2012; 199: 263-271.
- 9) Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al: New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 205-216.
- 10) Weber WA (Ed): Personalizing Cancer Therapy with FDG PET: From RECIST to PERCIST. *J Nucl Med* 2009; 50 (Suppl 1).
- 11) Tomasi G, Rosso L: PET imaging: implications for the future of therapy monitoring with PET/CT in oncology. *Curr Opin Pharmacol* 2012; 12: 569-575.
- 12) Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, et al: From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J Nucl Med* 2009; 50: 122S-150S.
- 13) 矢野恒夫, 井上登美夫, 伊藤健吾, 他: 放射性イメージング薬ガイダンスに関する草案. *臨床評価* 2010; 37:

- 473-496.
- 14) 佐治英郎 編：創薬研究への分子イメージング応用。メデイカルドゥ；2010.
 - 15) Hendrickson K, Phillips M, Smith W, et al: Hypoxia imaging with [F-18] FMISO-PET in head and neck cancer: potential for guiding intensity modulated radiation therapy in overcoming hypoxia-induced treatment resistance. *Radiother Oncol* 2011; 101: 369-375.
 - 16) Gregoire V, Jeraj R, Lee JA, et al: Radiotherapy for head and neck tumours in 2012 and beyond: conformal, tailored, and adaptive? *Lancet Oncol* 2012; 13: e292-300.
 - 17) Ueda M, Kudo T, Mutou Y, et al: Evaluation of [125I] IPOS as a molecular imaging probe for hypoxia-inducible factor-1-active regions in a tumor: comparison among single-photon emission computed tomography/X-ray computed tomography imaging, autoradiography, and immunohistochemistry. *Cancer Sci* 2011; 102: 2090-2096.
 - 18) Fujii H, Yamaguchi M, Inoue K, et al: In vivo visualization of heterogeneous intratumoral distribution of hypoxia-inducible factor-1 α activity by the fusion of high-resolution SPECT and morphological imaging tests. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 262741.
 - 19) 矢嶋一賀, 西村伸太郎: 分子イメージング技術と創薬製薬企業の立場からの一考察. *薬学雑誌* 2009; 129: 297-304.
 - 20) 梅田 泉, 藤井博史: 小動物の生理機能を in vivo で観る. *IsotopeNews* 2008.
 - 21) De Saint-Hubert M, Bauwens M, Verbruggen A, et al: Apoptosis imaging to monitor cancer therapy: the road to fast treatment evaluation? *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13: 571-583.
 - 22) Nordberg A, Rinne JO, Kadir A, et al: The use of PET in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2010; 6: 78-87.
 - 23) Urano Y, Sakabe M, Kosaka N, et al: Rapid cancer detection by topically spraying a gamma-glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Sci Transl Med* 2011; 3: 110-119.
 - 24) Lee DY, Li KC: Molecular theranostics: a primer for the imaging professional. *AJR Am J Roentgenol* 2011; 197: 318-324.
 - 25) Kelkar SS, Reineke TM: Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjug Chem* 2011; 22: 1879-1903.
 - 26) Alberti C: From molecular imaging in preclinical/clinical oncology to theranostic applications in targeted tumor therapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012; 16: 1925-1933.
 - 27) Svenson S: Theranostics: are we there yet? *Mol Pharm* 2013; 10: 848-856.
 - 28) van Essen M, Krenning EP, Kam BL, et al: Peptide-receptor radionuclide therapy for endocrine tumors. *Nat Rev Endocrinol* 2009; 5: 382-393.
 - 29) Gaertner FC, Kessler H, Wester HJ, et al: Radiolabelled RGD peptides for imaging and therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39: S126-138.
 - 30) Fernandez-Fernandez A, Manchanda R, McGoron AJ: Theranostic applications of nanomaterials in cancer: drug delivery, image-guided therapy, and multifunctional platforms. *Appl Biochem Biotechnol* 2011; 165: 1628-1651.
 - 31) Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, et al: Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med* 2011; 17: 1685-1691.
 - 32) Sano K, Nakajima T, Choyke PL, et al: Markedly enhanced permeability and retention effects induced by photo-immunotherapy of tumors. *ACS Nano* 2013; 7: 717-724.
-
- 連絡先 〒277-8577 柏市柏の葉6-5-1
独立行政法人国立がん研究センター東病院
臨床開発センター機能診断開発分野 梅田 泉

図説

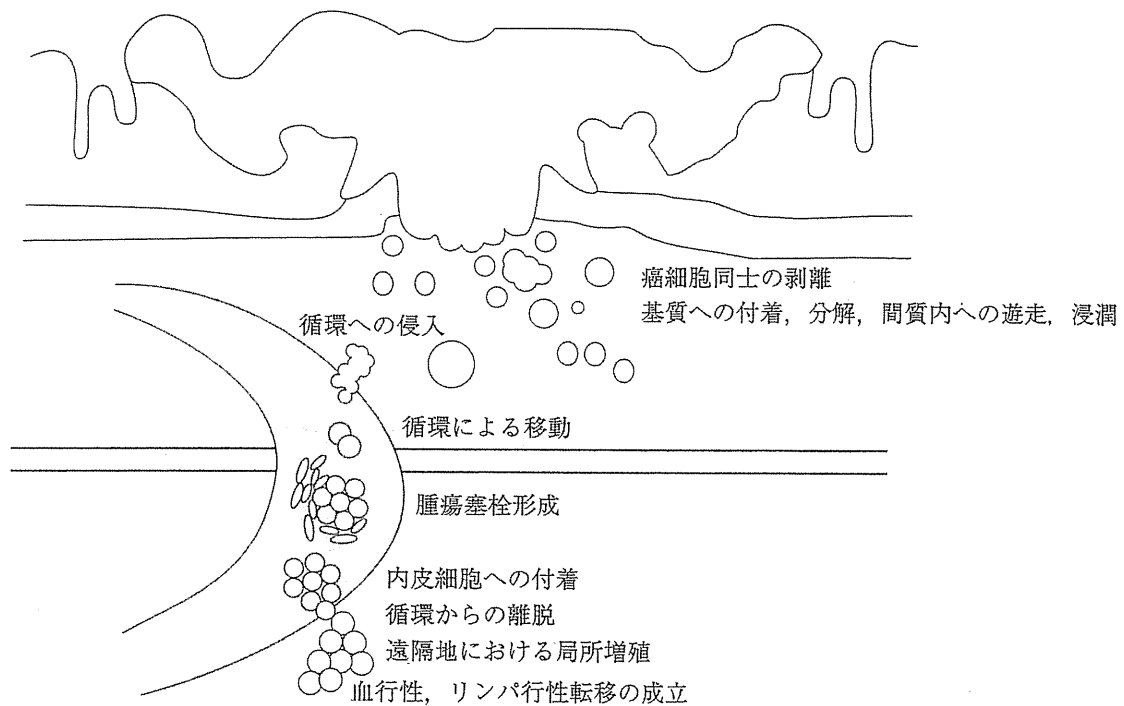
大腸癌の浸潤・転移機構

Mechanism of invasion and metastasis in colorectal cancer

小嶋基寛 落合淳志

はじめに

癌は周囲組織への浸潤に続いて遠隔組織に広がる。この現象を転移と呼ぶ。癌の転移には大きく分けて血行性、リンパ行性および播種性が存在するが、大腸癌においては循環を介した血行性とリンパ行性転移が頻度として高い(図1)¹⁾。転移成立の段階全体像を図1に示した。また、各段階を要約および図説すると以下ようになる。



著者らの施設のStage II-IV大腸癌切除症例における同時性転移頻度

リンパ節転移	血行性転移 (肝転移)	腹膜播種
55.5% (223/402)	19.4% (78/402)	6.0% (24/402)

図1 血行性、リンパ行性転移成立の過程(文献¹⁾より改変)

Motohiro Kojima, Atsushi Ochiai: Pathology Division, Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East 国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 臨床腫瘍病理分野

血行性、リンパ行性転移成立の段階

- (1) 癌細胞同士の解離(図2).
- (2) 基質の分解, 間質内への遊走, 浸潤, 循環経路への侵入(図2).
- (3) 循環による移動, 内皮細胞への付着, 循環経路からの離脱(図3).
- (4) 遠隔臓器における局所増殖(図3).

各段階に多数の分子がかかわり大腸癌を含む腫瘍の複雑な浸潤・転移機構を構成しているため, その研究の多くは上記のいずれかの段階に特化されている. 各段階を総論的にまとめ, 大腸癌における特徴も示した. また, 大腸癌における転移の各段階にかかわる主な因子を表1にまとめた.

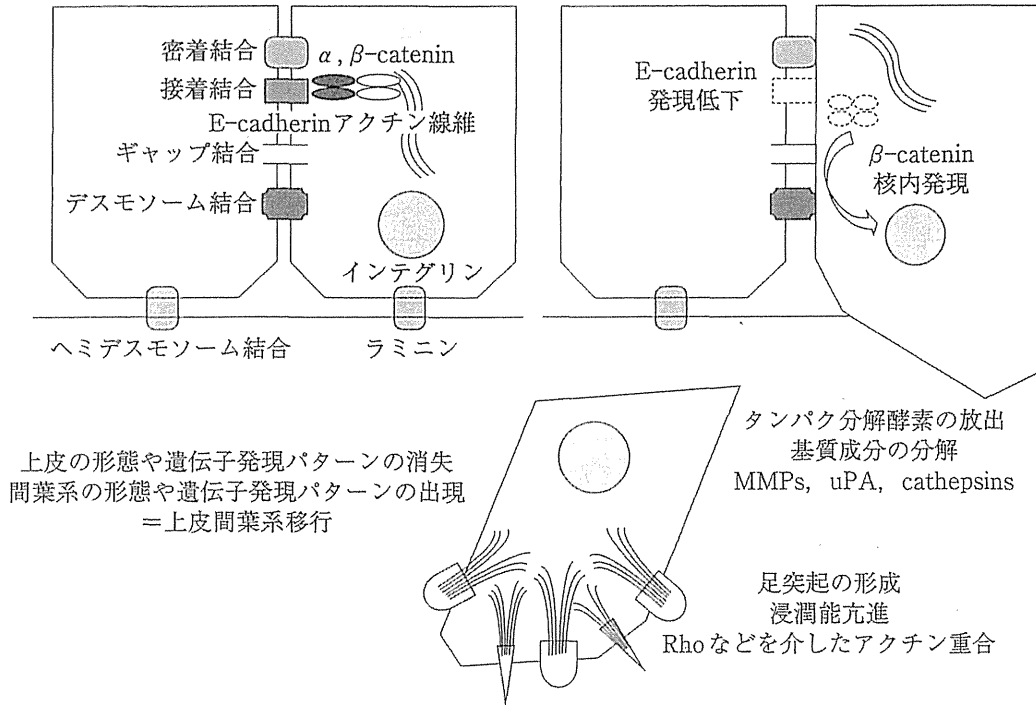


図2 癌細胞同士の剥離および基質の分解, 間質内への遊走, 浸潤, 循環への侵入の過程

循環への侵入

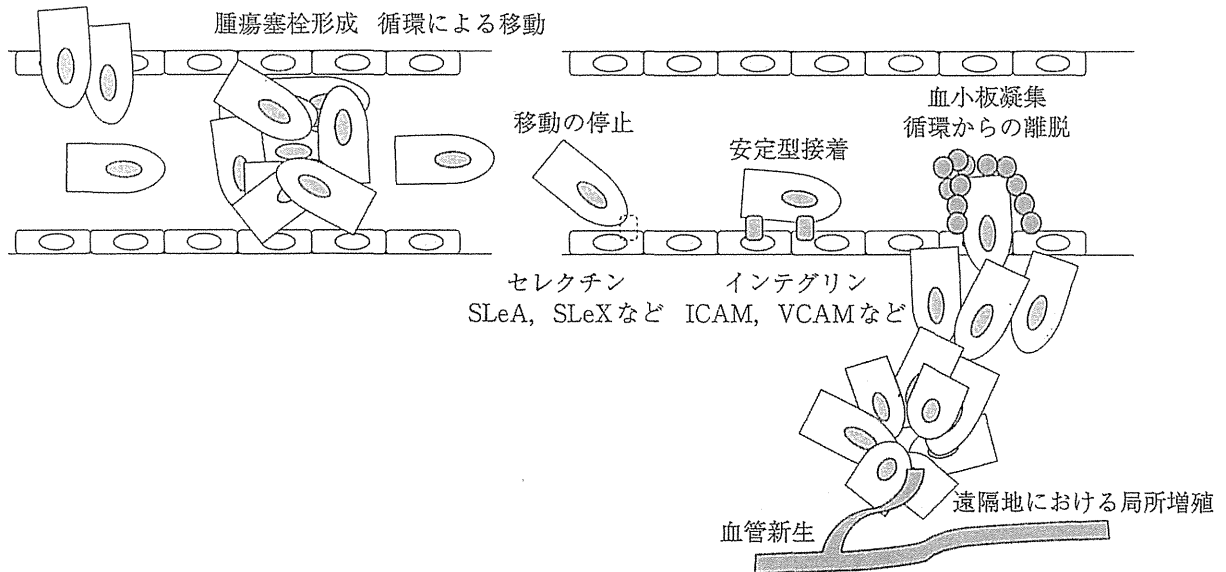


図3 循環による移動, 内皮細胞への付着, 循環からの離脱および遠隔地における局所増殖の過程

表 1 大腸癌転移段階にかかわる分子

	かかわる分子ファミリー	大腸癌における報告
細胞同士の剥離	カテニン	α -, β -, γ -catenin
	カドヘリン	E-, N-, P-cadherin
基質の分解, 間質内への遊走, 浸潤	インテグリン	$\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\beta 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, etc
循環への侵入	MMPs	MMP-2, 7, 9, 13, 14, TIMP-3, 4
循環からの離脱	uPA	
	カテプシン	cathepsin B, D
	Rho ファミリー	RhoA, Rac1, cdc42
	セレクトイン	E-selectin, P-selectin
	免疫グロブリンスーパーファミリー	ICAM-1, VCAM-1
	インテグリン	
	ガレクチン	galectin 3
	TF 抗原	

(文献より改変)

1. 癌細胞同士の解離

生体内における細胞は細胞同士もしくは細胞と基質が接着して存在している。上皮細胞同士の接着は密着接合, 接着結合, ギャップ結合, デスモソーム結合といった特殊で強固な接着構造を形成する。また上皮細胞は基底膜に接着し, ヘミデスモソームを形成する。癌進展過程における細胞同士もしくは基底膜との接着の異常や解離は転移が成立する際の最初の過程と考えられる。

大腸癌細胞における癌細胞同士の解離

大腸癌発癌過程において β -catenin の分解にかかわる APC 変異が非常に高頻度で観察される。これら Wnt pathway の異常は大腸癌発生に重要である。 β -catenin の細胞質内発現も早期病変から認められ, 接着結合において結合する E-cadherin 発現低下も相関してみられる。これらの変化は癌の発生, 進展に寄与していると考えられる。

2. 基質の分解, 間質内への遊走, 浸潤, 循環への侵入

腫瘍の浸潤には基質成分の分解が必要で様々なタンパク分解酵素が知られている。ウロキナーゼ型プラスミンアクチベータ (uPA), マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs), カテプシンなどが代表的である。細胞は遊走の際, 足突起を形成する。足突起においてフォーカルアドヒージョンを形成して基質と接着する。また突起を伸縮させることにより細胞自体が運動する。細胞自体には細胞の接着と運動の両者が不可欠である。基質と接着する際にはインテグリンなどのタンパクが重要である。一方, 運動においてはアクチンとミオシンからなるストレスファイバーの形成が重要で, これはフォーカルアドヒージョンを介してインテグリンと結合している。アクチン重合, ストレスファイバーの形成や収縮には RhoA が重要な役割を果たす。基質の分解と遊走という異なる生物学的事象が複合的に合わさって浸潤という現象は生じ, 結果として癌は循環へ侵入する。

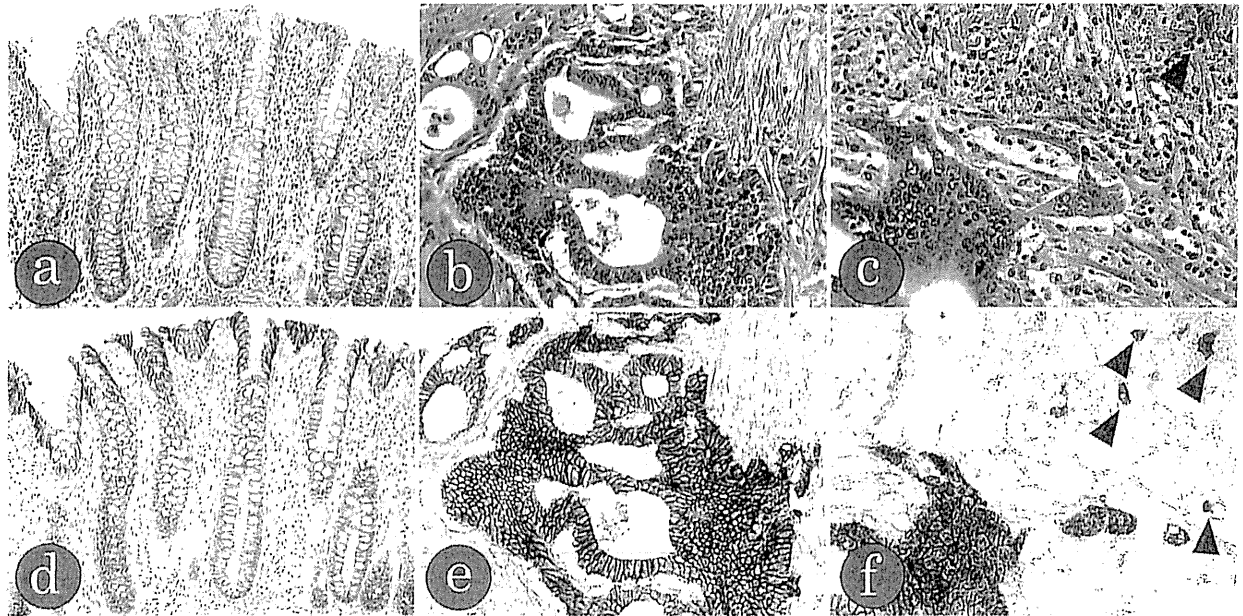


図4 大腸粘膜および大腸癌における β -catenin発現局在と組織像

a, d. 正常粘膜におけるH・E染色(a)および β -catenin免疫染色(d). 正常粘膜における β -catenin発現は細胞膜にはほぼ限局してみられる。

b, e. 大腸癌非浸潤先進部のH・E染色(b)および β -catenin免疫染色(e). 大腸癌の非浸潤先進部における β -cateninの発現は細胞膜および細胞質が中心で、一部核にも発現がみられる。

c, f. 大腸癌浸潤先進部のH・E染色(c)および β -catenin免疫染色(f). 大腸癌の浸潤先進部における β -cateninの発現は細胞質と核が中心である。孤立散在性で上皮の形態が消失した腫瘍細胞胞巣(budding)が右上にみられるが(矢頭), それらにおいては細胞質と核の発現がより強く観察される。

大腸癌細胞における基質の分解, 間質内への遊走, 浸潤, 循環への侵入

Wnt pathwayの異常は引き続いて生じる浸潤の際に病理組織学的に観察される budding および生物学的に観察される上皮-間葉移行(epithelial-mesenchymal transition: EMT)においても重要である。buddingは大腸癌浸潤先進部で観察される5個以下の腫瘍細胞胞巣を指し, buddingにおいては β -cateninの核内発現が非常に強く認められる。またEMTとは生物学的に上皮細胞がその特徴的な形態や遺伝子発現のパターンを捨てて, 間葉細胞に特徴的な形をとることで, E-cadherin発現低下は重要なマーカーである。両者は共通する現象を異なる分野からとらえていると思われ, 特に大腸癌においてはbudding, EMTのいずれにおいてもWnt経路が重要であることは確かである(図4)。Wnt経路の亢進は下流のMMP7を活性化する。生物学的にMMP7発現亢進は基質の分解のみならずIGFやVEGFの活性化を介して, 血管新生を亢進させることが知られている。病理学的にもMMP7発現亢進は大腸癌浸潤先進部に特異的にみられ, 実際のヒト組織でも生物学的現象と類似した作用が生じていると考えられる²⁾。これらの現象には癌の微小環境もかかわっていると考えられる。近年buddingは漿膜近傍で強く生じることが報告されており, EMTもコラーゲンIで誘導されることから, 癌細胞の性質のみならず, 周囲の環境との相互作用によっても, これらの現象は生じていると思われる³⁾。

3. 循環による移動, 内皮細胞への付着, 循環からの離脱

循環の環境は癌細胞の生存に厳しい環境であると思われる。癌細胞は宿主免疫から逃れ、循環の物理的負荷に耐える必要がある。時として癌細胞は塞栓を形成し、その生存率を上昇させている。癌細胞が転移先に到達すると、毛細血管に物理的に引っかかる、もしくは白血球の血管外流出に類似した機序で内皮細胞上で停止する。その機序にかかわる分子としては血管内皮細胞のセレクチンと、その受容体で白血球や癌細胞に発現する sialyl Lewis X, A (SLeX, SLeA) が知られている。その後インテグリンを介した安定型接着が生じるが、その際、血小板凝集も生着を助長していると考えられる。循環からの離脱には浸潤と類似した基質の分解と運動が必要と考えられる⁴⁾。また、癌細胞は特定のケモカインレセプターを発現しており、転移先臓器が分泌するケモカインとの相互作用は臓器特異的転移機構を担っていると思われる。

大腸癌細胞の循環による移動, 内皮細胞への付着, 循環からの離脱

大腸癌組織における SLeA は予後因子として報告されており、同様の現象が生じている可能性がある。大腸癌においては CXCR4 などの高発現が報告されており、肝臓や肺に転移しやすいことの一因と考えられている。

4. 遠隔臓器における局所増殖

遠隔臓器における癌の増殖は循環からの離脱の前から既に再開していると考えられている。EMT を生じて遠隔臓器に到達した細胞はその多くが間葉上皮系移行 (MET) というこれまでと逆の現象を起こして、原発巣と類似した形態を取るようになる。癌細胞の転移した部位は原発腫瘍内と同様に増殖可能な環境であるとは限らない。増殖可能な環境形成には血管新生など生理的な支援体制が必要である。それがいない場合、転移巣は消滅するか微小転移として生存する⁵⁾。

大腸癌の遠隔臓器における局所増殖

肝細胞から分泌される IGF は大腸癌肝転移を促進すると報告されており、増殖可能な環境形成にかかわるとされる。また大腸癌細胞株における SMAD4 欠損による CCL15 発現上昇が、MMP9 を発現する骨髓由来の細胞を集積させ、転移巣の増殖にかかわると報告されている。これらの結果から、転移巣においても腫瘍細胞と環境を形成する細胞が協調してその増殖にかかわっていると考えられる。

おわりに

癌の浸潤、転移は古くから知られる悪性の指標である。その生物像は古くから研究者に興味を抱かせているが、転移が成立する過程は上述のごとく非常に複雑で成立する確率は非常に低い。よって一つ一つの過程を病理学や生物学的な手法を含めて検討する必要がある。その前提として全体を把握することが不可欠であり、その際の一助として本図説が読者に役立つことを願う。

文 献

- 1) 小嶋基寛, 落合淳志: 大腸癌の浸潤・転移に関連する分子(遺伝子異常, 発現異常). 日本臨牀 **69**(増刊 3): 149-152, 2011.
- 2) Ito TK, et al: Degradation of soluble VEGF receptor-1 by MMP allow VEGF access to endothelial cells. Blood **113**: 2123-2124, 2009.
- 3) Kojima M, et al: Elastic laminal invasion in colon cancer: diagnostic utility and histological features. Front Oncol **2**: 179, 2012.
- 4) Miles FL, et al: Stepping out of flow: capillary extravasation in cancer metastasis. Clin Exp Metastasis **25**: 305-324, 2008.
- 5) Weinberg RA: The Biology of Cancer. p 587-654, Garland Science, Taylor & Fransis Group, LLC, Yew York, 2007.



201411040B(4/4)

厚生労働科学研究費補助金

革新的がん医療実用化研究事業

「我が国で新しく発明された概念に基づく抗がん剤
アルクチゲニン臨床第Ⅱ相試験による膵がん克服」
に関する研究

平成 24 年度～平成 26 年度 総合研究報告書

研究代表者 江角 浩安

平成 27 (2015) 年 5 月

平成26年度

研究成果の刊行物・別刷

WJG 20th Anniversary Special Issues (8): Gastric cancer

Mechanisms of regulation of PFKFB expression in pancreatic and gastric cancer cells

Oleksandr H Minchenko, Katsuya Tsuchihara, Dmytro O Minchenko, Andreas Bikfalvi, Hiroyasu Esumi

Oleksandr H Minchenko, Dmytro O Minchenko, Department of Molecular Biology, Palladin Institute of Biochemistry, Kiev 01601, Ukraine

Katsuya Tsuchihara, Hiroyasu Esumi, Department of Innovative Oncology, National Cancer Center, Kashiwa, Chiba 277-8577, Japan

Dmytro O Minchenko, Department of Pediatrics, Bogomolets National Medical University, Kiev 01601, Ukraine

Andreas Bikfalvi, INSERM U1029 Molecular Angiogenesis and Cancer Microenvironment Laboratory, University Bordeaux I, 33405 Talence, France

Author contributions: Minchenko DO and Minchenko OH contributed equally to this work; Minchenko OH and Esumi H contributed to conception and design; Minchenko OH and Minchenko DO wrote the paper; Esumi H, Tsuchihara K, Minchenko OH and Bikfalvi A revised the article critically for important intellectual content and final approval of the version to be published.

Correspondence to: Oleksandr H Minchenko, PhD, Professor, Head, Department of Molecular Biology, Palladin Institute of Biochemistry, 9 Leontovycha St., Kiev 01601, Ukraine. ominchenko@yahoo.com

Telephone: +38-44-2356151 Fax: +38-44-2796365

Received: February 22, 2014 Revised: March 22, 2014

Accepted: May 19, 2014

Published online: October 14, 2014

Abstract

Enzymes 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 and -4 (PFKFB-3 and PFKFB-4) play a significant role in the regulation of glycolysis in cancer cells as well as its proliferation and survival. The expression of these mRNAs is increased in malignant tumors and strongly induced in different cancer cell lines by hypoxia inducible factor (HIF) through active HIF binding sites in promoter region of PFKFB-4 and PFKFB-3 genes. Moreover, the expression and hypoxia responsibility of PFKFB-4 and PFKFB-3 was also shown for pancreatic (Panc1, PSN-1, and MIA PaCa-2) as well as gastric (MKN45 and NUGC3) cancer cells. At the same time, their basal expression level and hypoxia

responsiveness vary in the different cells studied: the highest level of PFKFB-4 protein expression was found in NUGC3 gastric cancer cell line and lowest in Panc1 cells, with a stronger response to hypoxia in the pancreatic cancer cell line. Overexpression of different PFKFB in pancreatic and gastric cancer cells under hypoxic condition is correlated with enhanced expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and Glut1 mRNA as well as with increased level of HIF-1 α protein. Increased expression of different PFKFB genes was also demonstrated in gastric, lung, breast, and colon cancers as compared to corresponding non-malignant tissue counterparts from the same patients, being more robust in the breast and lung tumors. Moreover, induction of PFKFB-4 mRNA expression in the breast and lung cancers is stronger than PFKFB-3 mRNA. The levels of both PFKFB-4 and PFKFB-3 proteins in non-malignant gastric and colon tissues were more pronounced than in the non-malignant breast and lung tissues. It is interesting to note that Panc1 and PSN-1 cells transfected with dominant/negative PFKFB-3 (dnPFKFB-3) showed a lower level of endogenous PFKFB-3, PFKFB-4, and VEGF mRNA expressions as well as a decreased proliferation rate of these cells. Moreover, a similar effect had dnPFKFB-4. In conclusion, there is strong evidence that PFKFB-4 and PFKFB-3 isoenzymes are induced under hypoxia in pancreatic and other cancer cell lines, are overexpressed in gastric, colon, lung, and breast malignant tumors and undergo changes in their metabolism that contribute to the proliferation and survival of cancer cells. Thus, targeting these PFKFB may therefore present new therapeutic opportunities.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key words: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3; 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4; Hypoxia; Hypoxia inducible factor; Panc1; PST-1; MKN45; NUGC3; Gastric cancer;

Lung cancer

Core tip: Enzymes 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 and -4 (PFKFB-3 and PFKFB-4) play a significant role in the regulation of glycolysis and cancer growth by inducing cell proliferation and surviving. The expression of these PFKFB is increased in malignant tumors and strongly induced in various cancer cell lines under hypoxia, including pancreatic and gastric cells. The high expression level of PFKFB-4 protein was found in NUGC3 gastric adenocarcinoma cells and much lower in pancreatic Panc1 cells, with the highest response to hypoxia in the pancreatic cancer cells. Both PFKFB-4 and PFKFB-3 are overexpressed in gastric, colon, lung, and breast cancers being more pronounced for PFKFB-4. Blocking both PFKFB-4 and PFKFB-3 may present new therapeutic opportunities.

Minchenko OH, Tsuchihara K, Minchenko DO, Bikfalvi A, Esumi H. Mechanisms of regulation of PFKFB expression in pancreatic and gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2014; 20(38): 13705-13717 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i38/13705.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.13705>

INTRODUCTION

Pancreatic adenocarcinoma is an aggressive disease with a high mortality rate. Despite intensive efforts, pancreatic cancer remains a formidable challenge for oncologists^[1]. Investigation of the molecular and genetic bases of pancreatic as well as other cancers is very important for understanding tumor formation and growth as well as for development of anticancer strategies. Hypoxia has been recognized as one of the fundamentally important features of solid tumors and plays a critical role in various cellular and physiologic events, including cell proliferation, survival, angiogenesis, metabolism, as well as tumor growth, invasion and metastasis^[2-6]. Moreover, hypoxia has the multifaceted role in the hallmarks of human cancers, including pancreatic cancer. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), represent key features in cell biochemistry, physiology and molecular biology.

Tumors are usually exposed to a hypoxic microenvironment due to their irregular growth and insufficient blood supply while pancreatic tumors have enhanced vascular supply^[3,7,8]. Moreover, there is heterogeneity and genomic complexity between pancreatic tumors as well as hierarchy of cancer cells with different properties, including a subpopulation of cancer stem cells that are inherently resistant to traditional therapies^[8]. Activation of genes that ameliorate or compensate for the oxygen deficit, especially of mRNAs involved in glycolysis and facilitate proliferation is important in adaptations to hypoxia^[9-15]. A high rate of glycolytic flux, even in the presence of oxygen, is a central metabolic hallmark of neoplastic tumors. The high glucose metabolism of cancer cells is

caused by a combination of hypoxia inducible transcription factors, activation of oncogenic proteins and the loss of tumor suppressor function. Over-expression of HIF-1 α or HIF-2 α and MYC, activation of RAS and loss of TP53 and/or other tumor suppressor functions each have been found to stimulate glycolysis in part by activating a family of regulatory bifunctional 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases (PFKFB) and hexokinases^[16-18].

PFKFB AS AN IMPORTANT FACTOR OF TUMOR GROWTH

Enzyme PFKFB controls of glycolysis through maintaining the cellular levels of fructose-2,6-bisphosphate, which is considered to be the major allosteric activator of 6-phosphofructo-1-kinase, a rate-limiting enzyme of glycolysis^[19,20]. Thus, the PFKFB enzymes control glycolysis through fructose-2,6-bisphosphate level^[20-23]. There are 4 different genes encode variable isoforms of this enzyme. Importantly, most cells and tissues express more than one isoform^[23-25]. PFKFB enzyme also plays an important role in the Warburg effect and cancer growth^[16,17,26-28]. Overexpression of PFKFB-3 as well as other variants of PFKFB is observed in various human cancers^[29-33]. Moreover, enhanced expression of PFKFB as well as hexokinase 2 is an obligatory factor of activated tumor cell glycolysis and increased its proliferation^[18,24,32-35].

The expression of different PFKFBs (PFKFB-1, PFKFB-2, PFKFB-3 and PFKFB-4) is induced by hypoxia *in vivo* in organ-specific manner^[21]. At the same time, *in vitro* experiments clearly demonstrated that hypoxia affects the expression only two variants of PFKFB (3 and 4) mRNA in different cell lines^[26,29,31-33]. In promoter region of *PFKFB-4* and *PFKFB-3* genes was identified HIF responsive element which bind transcription factor HIF and mediate hypoxic regulation, because deletion or point mutation of this HIF responsive element eliminates the hypoxic regulation both *PFKFB-4* and *PFKFB-3* genes^[25,31,36,37]. Moreover, the phosphorylation - dephosphorylation of PFKFB isoenzymes is important for enhancing of glycolysis by hypoxia as well as by fructose-2,6-bisphosphate in monocytes upon activation^[17,38,39]. There is also data supporting an important role for PFKFB-3 protein phosphorylation in the increased glycolysis, angiogenesis and tumor progression^[40]. Thus, highly phosphorylated variant of PFKFB-3 was found in cancer cells as well as in other cells, including vascular endothelial cells^[40].

Recently, a novel mechanism by which MK2, MAPK (mitogen-activated protein kinase)-activated protein kinase 2, a key component of the MAPK pathway, up-regulates glycolysis in response to stress in cancer cells was described^[41]. By phosphorylating specific PFKFB3 residues, MK2 promotes both increased its gene transcription and allosteric activation.

It was also shown a significant increase of PFKFB-3 in the nuclei, which associates with enhanced cell prolif-

eration through cyclin-dependent protein kinase^[34]. Moreover, PFKFB-3 isoenzyme is degraded by the E3 ubiquitin ligase APC/C-CDH1, which also degrades cell-cycle proteins^[42]. Thus, this ubiquitin ligase is linking glycolysis to cell proliferation mainly through PFKFB-3 enzyme, which promote glycolysis. It was shown that both aerobic glycolysis and proliferation are prevented by overexpression of this ubiquitin ligase and enhanced by its silencing. Furthermore, activation of glycolysis, as essential factor of cell proliferation, in the presence of active ubiquitin ligase APC/C-CDH1 does not change the rate of cell proliferation^[42]. Recently was also shown that PTEN (phosphatase and tensin homolog) enhances interaction between PFKFB3 and E3 ligase APC/C-CDH1, and overexpression of CDH1 down-regulates the PFKFB3 protein level in wild-type, but not in PTEN-deficient cells^[43]. Moreover, PTEN knockout cells were found to have high protein levels of PFKFB3 that has important consequences for cell proliferation.

There is data that ubiquitin ligase SKP1-CUL1-F(SCF)-beta-TrCP also participate in glycolysis regulation during the cell cycle through PFKFB because this enzyme or activation the glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase is needed for glycolysis up-regulation^[44]. Besides that, the induction of *de novo* lipid synthesis from glucose in prostate adenocarcinoma cells by androgen requires transcriptional up-regulation of PFKFB-2 and phosphorylation of PFKFB-2 generated by the PI3K/AKT signal pathway to supply the source for lipogenesis^[45]. The increased glycolytic flux through the enhanced expression of *PFKFB3* gene was also observed after interaction of adenosine with macrophage TLR4 receptor agonists^[46]. Thus, the enzymes of PFKFB family participate in the regulation of glucose metabolism through glycolysis as well as in the control of the cell cycle, apoptosis, tumor growth, and invasiveness.

It is interesting to note that the transcriptional co-repressor myeloid translocation gene 16 (MTG16) is found in multiple transcription factor-containing complexes as a regulator of gene expression implicated in development and tumorigenesis. MTG16 can serve as a brake on glycolysis, a stimulator of mitochondrial respiration and an inhibitor of cell proliferation through suppression of PFKFB-3, PFKFB-4 and pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 1 (PDK1)^[47]. Furthermore, hypoxia-stimulated production of PFKFB3, PFKFB4 and PDK1 was inhibited by MTG16 expression.

Several alternative splice variants for PFKFB-3 were identified in normal and cancer cells which possibly are important for malignant tumor growth^[35,48-51]. All these splice variants have similar N-terminus and catalytic both 6-phosphofructo-2-kinase and fructose-2,6-bisphosphatase domains, but differ in C-terminal regulatory region. It is possible that a variable C-terminus provide not only for differ regulatory properties and for a variable surviving of PFKFB-3 splice variants. Moreover, the expression of PFKFB-3 alternative splice variants *in vivo* differs in various organs and spectrum of these splice variants changes in rat model of diabetes in organ-specific manner^[51].

Recent data^[52-54] showed that PFKFB-4, which expression at mRNA and protein levels is strongly induced in the lung and breast cancers, has also pleiotropic functions. This variant of PFKFB together with other members of PFKFB family participates in the regulation of glycolysis and also promotes tumor growth and survival of cancer cells^[30,33,52-56]. It was shown that PFKFB4 is required to balance glycolytic activity and antioxidant production to maintain cellular redox balance in prostate cancer cells^[52]. Moreover, depletion of PFKFB4 inhibited tumor growth in a xenograft model, indicating that it is required under physiologic nutrient levels^[52]. PFKFB4 mRNA expression was also found to be greater in metastatic prostate cancer compared with primary tumors^[52]. Moreover, induction of apoptosis by sulforaphane in human hepatic cancer cells mediated by hypoxia inducible factor-1-dependent pathway through inhibition of PFKFB4^[53]. Thus, PFKFB4, a glycolytic enzyme that shunts glucose into the pentose phosphate pathway for NADPH production, as a critical node for the survival of cancer cells^[52-54,56].

Aerobic glycolysis links the high rate of glucose fermentation to cancer^[57]. It was found that the regulatory glycolytic enzyme PFKFB4 is essential for prostate cancer cell survival by maintaining the balance between the use of glucose for energy generation and the synthesis of antioxidants. Cancer cells undergo several changes in their metabolism that contributes to the proliferation and survival of cancer cells. Blocking PFKFB4 induces reactive oxygen species and cancer cell death. Thus, targeting PFKFB4 may therefore present new therapeutic opportunities.

It is interesting to note that non-malignant gastric and colon tissues in contrast to lung and breast tissues have higher level of PFKFB-4 protein; at the same time, no significant differences in mRNA levels^[30,32,33]. It is possible that there is some specific mechanism of PFKFB-4 protein stabilization as well as some additional functions of this enzyme in non-malignant gastric and colon tissues. These aspects of PFKFB biochemistry warrants further investigation.

Several alternative splice variants were identified for human, mouse and rat PFKFB-4^[58-60]. Alternative splice variant with modified N-terminus was identified for PFKFB-4 in melanoma DB-1 cells^[58]. Its expression was very high in these cells and is possibly related to melanoma growth. Other alternative splice variants of PFKFB-4 mRNA with modified C-terminus were founded in rat tissues^[59]. One of them with a modified C-terminal part was observed only in the liver of rats treated by methyl tertial butyl ether, ecologically dangerous chemical compound^[59]. It was not present in normal rat liver and lungs. Second alternative splice variant with deletion in fructose-2,6-bisphosphatase region is expressed in normal liver and lung tissues and its expression is affected by methyl tertial butyl ether^[59]. Results of this investigation demonstrate the sensitivity of PFKFB-4 alternative splicing to the action of toxic chemical compounds, in particular methyl tertbutyl ether. Several unique alterna-

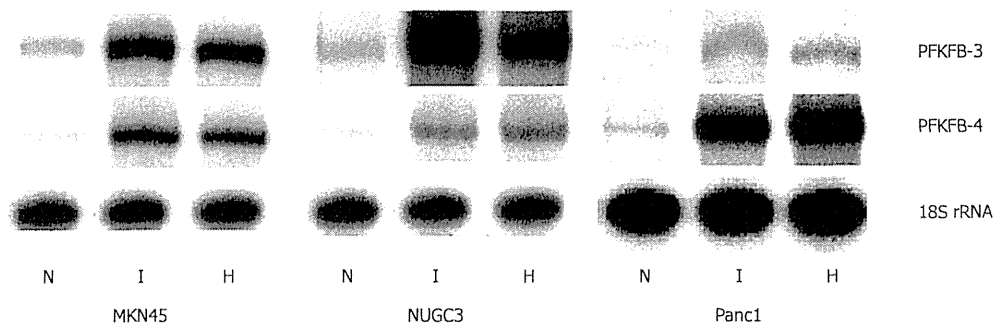


Figure 1 Effect of hypoxia (H) and hypoxia mimic dimethyloxalylglycine (I) on the expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 and -4 mRNA in human gastric cancer cell lines MKN45 and NUGC3 and pancreatic cancer cell line Panc1. Measured by ribonuclease protection assay, N: Control (normoxic) cells^[32]. PFKFB: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase.

tive splice variants were identified in mouse brain and other tissues^[60]. One of them has two ORFs (for 6-phosphofructo-2-kinase and fructose-2,6-bisphosphatase) as a result of insert after the 7th exon. Other alternative splice variants have inserts in kinase domain or a deletion in bisphosphatase domain^[60]. Its functional significance is not elucidated as of yet.

At the same time, the analysis of PFKFB-3 and PFKFB-4 expression as well as its regulation by hypoxia in pancreatic and gastric cancer cells, which significantly differ from many other malignant cells, is needed for further advance our knowledge on the mechanisms of different tumors progression. Recently, it was shown that excess glucose induces hypoxia-inducible factor-1 α in pancreatic cancer cells and stimulates glucose metabolism possibly through PFKFB as well as the migration of these cancer cells and that hypoxia strongly up-regulates the expression of PFKFB-4 and PFKFB-3^[32,61].

PFKFB-4 AND PFKFB-3 GENE EXPRESSIONS IN PANCREATIC AND GASTRIC CANCER CELL LINES AND MOLECULAR MECHANISMS OF ITS REGULATION

It was shown that different *PFKFB* genes are expressed in human pancreatic and gastric cancer cells and are up-regulated in hypoxic condition^[32]. Hypoxia induces the expression of these genes through transcription factor HIF binding sites to hypoxia responsible element (HRE) of *PFKFB-4* and *PFKFB-3* genes, because deletion or point mutation in these HRE eliminates the hypoxic regulation of *PFKFB-4* and *PFKFB-3* genes^[25,31,36,37]. As shown in Figure 1, the expression of PFKFB-4 mRNA is detectable at very low level in both MKN45 and NUGC3 gastric cancer cell lines growing under normal condition. The expression of PFKFB-3 mRNA in these cell lines was significantly higher as compared to the PFKFB-4 mRNA^[32].

Exposure of MKN45 and NUGC3 gastric adenocarcinoma cells to hypoxia or dimethyloxalylglycine,

which suppress prolyl hydroxylase enzymes, significantly enhanced the expression of *PFKFB4* as well as *PFKFB3* genes ($P < 0.001$; Figures 1 and 2). At the same time, the expression of PFKFB-3 mRNA in Panc1 pancreatic cancer cell line ($P < 0.01$) growing under normal condition was lower as compared to gastric cancer cell lines, but for PFKFB-4 slightly higher^[32]. Moreover, the basal level of PFKFB-4 mRNA expression as well as its hypoxia responsiveness was more robust as compared to PFKFB-3 mRNA^[32]. Thus, there is a difference in the basal level of these two variants of PFKFB mRNA between gastric and pancreatic cancer cells as well as in its sensitivity to hypoxia and dimethyloxalylglycine.

At the same time, the protein level of PFKFB-4 isoenzyme in non-treated gastric adenocarcinoma cells was much higher as compared to pancreatic cancer cells (Figure 3). Moreover, the protein level of PFKFB-4 in NUGC3 gastric cancer cells is significantly higher than in MKN45 cells. Hypoxia and dimethyloxalylglycine strongly enhances the expression of PFKFB-4 at protein level in pancreatic and gastric cancer cell lines. This increase of PFKFB-4 protein expression varies in different cancer cell lines possibly because these gastric and pancreatic cells have significantly different constitutive level of PFKFB-4 protein. Moreover, no strong correlation is present between mRNA and protein of PFKFB-4 in the pancreatic and gastric malignant cells in normoxic as well as in hypoxic condition^[32]. This data agrees with results of previous investigations^[31].

It is interesting to note that the level of PFKFB-4 mRNA and protein differs in different mammary gland adenocarcinoma cell lines both in normal condition and after hypoxic exposure^[31]. Thus, the level of PFKFB-4 mRNA is more pronounced in the T47D malignant cell line as compared to MCF7 cells both in normal condition and after hypoxia. At the same time, the protein level of PFKFB-4 is much higher in the MCF7 cells *vs* T47D cell line in normal condition as well as after hypoxic exposure. Other cell lines (SKBR3 and MDA-MB-468) have similar level of PFKFB-4 mRNA expression both in normal condition and upon hypoxia. Unexpectedly, in MDA-MB-468 mammary gland adenocarcinoma cells PFKFB4 protein was detected at negligible level at the same ex-

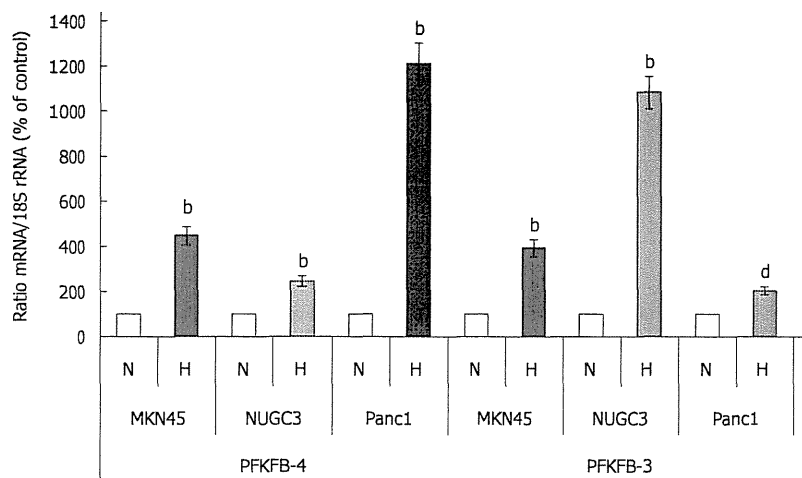


Figure 2 Quantification of ribonuclease protection assay of the effect of hypoxia (H) on the expression level of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 and -3 mRNAs in human gastric (MKN45 and NUGC3) and pancreatic (Panc1) cancer cell lines. ^b $P < 0.01$ vs control cells; ^d $P < 0.01$ vs control cells^[32]. N: Normoxic (control) cells. PFKFB: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase.

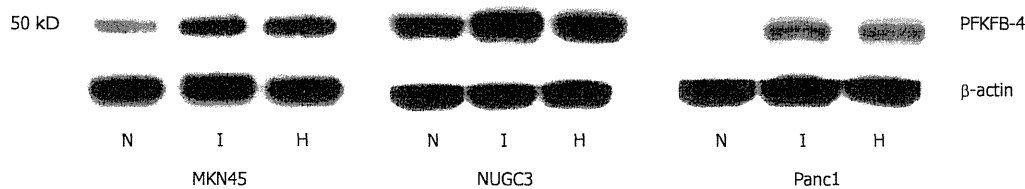


Figure 3 Western blot analysis of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 protein in human gastric (MKN45 and NUGC3) and pancreatic (Panc1) cancer cell lines: Effect of hypoxia (H) and dimethylxalylglycine (I)^[32]. PFKFB: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase.

perimental conditions, which were used for SKBR3 and other mammary gland adenocarcinoma cell lines^[31]. In contrast, the level of PFKFB-4 mRNA is correlated with corresponding protein level both in SKBR3 and BT549 cell lines.

Really, the protein level of PFKFB-4, which in Panc1 pancreatic cancer cells is much lower as compared to gastric cancer cells and correlates with stronger induction of both PFKFB-4 mRNA and protein expressions upon hypoxia. At the same time, the hypoxia-induced PFKFB-4 protein level in Panc1 cells is in fact lower when compared to the level of this protein in NUGC3 cells. Moreover, the high PFKFB-4 protein level in NUGC3 gastric cancer cells is correlated with the lower induction of PFKFB-4 mRNA and protein expressions upon hypoxia; on the other hand, the level of PFKFB-4 protein in hypoxia-treated cells is very high as compared to the levels of PFKFB-4 protein in both Panc1 and MKN45 control or hypoxia-treated cells^[32]. This difference between mRNA and protein levels of PFKFB-4 which in the different pancreatic and gastric cancer cells is possibly related to the mechanisms controlling PFKFB4 protein stability. However, the precise molecular mechanism for these discrepancies is complex and possibly includes PFKFB-4 enzyme posttranslational modification or its stability in a cell-specific manner and warrants further detailed investigation.

The induction of PFKFB-3 mRNA expression in the NUGC3 gastric cancer cell line by hypoxia and dimethylxalylglycine is more pronounced as compared to PFKFB-4 mRNA expression. It is important to note

that the expression PFKFB-3 mRNA in the Panc1 pancreatic cancer cells has the lowest hypoxia responsiveness as compared to both gastric cancer cell lines. We have previously shown that the hypoxic induction of PFKFB-3 mRNA expression in mammary gland cancer cells is more robust in MCF7 and T47D breast cancer cells (estrogen receptor-positive cell lines) as compared to SKBR-3 and MDA-MB-468 cells (estrogen receptor-negative cell lines)^[31]. The dissimilar sensitivity of the *PFKFB-3* gene expression to induction by hypoxia was also shown for other cell lines, like HeLa, Hep3B, RPE, and fibroblasts, while induction of *Glut1* mRNA by hypoxia was similar in all these cell lines^[25].

It is interesting to note that the induction of PFKFB-4 mRNA expression by hypoxia was simulated by dimethylxalylglycine in different pancreatic and gastric as well as in many other cancer cell lines^[25,27,31,32]. Dimethylxalylglycine, a specific inhibitor of prolyl hydroxylases, is an oxoglutarate analog, which protects the HIF-1 α protein from proteasomal degradation and significantly increases its level^[59]. Suppression of prolyl hydroxylase enzymes can induce the level and functional activity of HIF-1 α under normoxia and mimics hypoxic condition^[62]. Induction of PFKFB-4 mRNA synthesis by hypoxia is mediated by the hypoxia responsive element located in the promoter region of this gene which is similar to the same elements, described in different hypoxia responsive genes, including *PFKFB-3* gene^[25,36,63,64].

As shown in Figure 4A, hypoxia increases the expression level of PFKFB-3 and PFKFB-4 as well as VEGF and *Glut1* genes in both gastric and pancreatic cancer

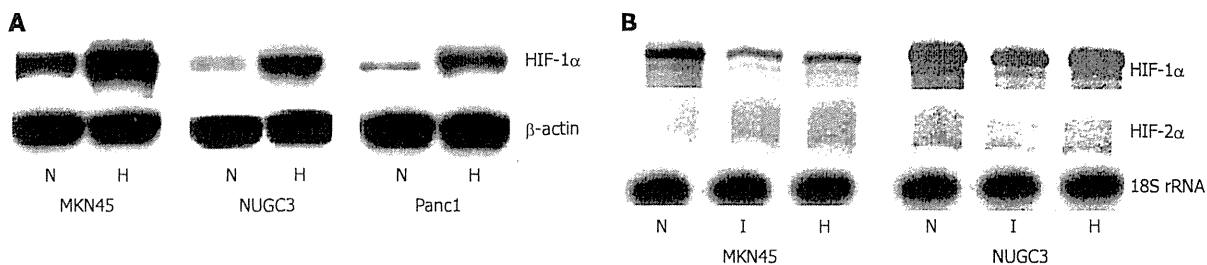


Figure 4 Expression of hypoxia inducible factor-1 α protein (Western blotting; A) and hypoxia inducible factor-1 α and hypoxia inducible factor-2 α mRNA (ribonuclease protection assay; B) in human gastric (MKN45 and NUGC3) and pancreatic (Panc1) cancer cell lines: effect of hypoxia (H) and dimethylxylglycine (I)^[32]. HIF: Hypoxia inducible factor.

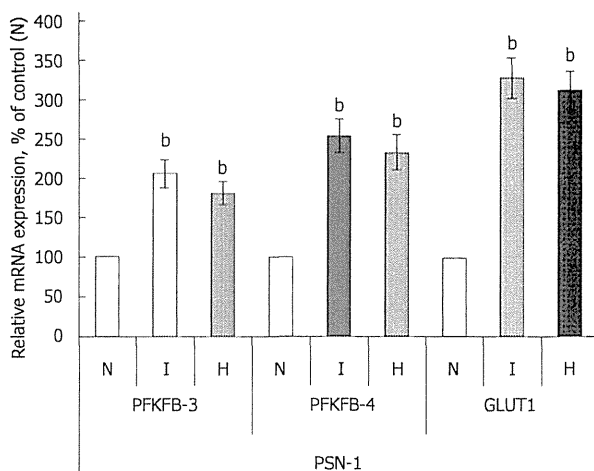


Figure 5 Effect of hypoxia (H) and hypoxia mimic dimethylxylglycine (I) on the expression level of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3, -4, and GLUT1 mRNAs (measured by qPCR) in human pancreatic (PSN-1) cancer cells. $n = 4$; ^b $P < 0.01$ vs control cells. N: Normoxic (control) cells; PFKFB: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase.

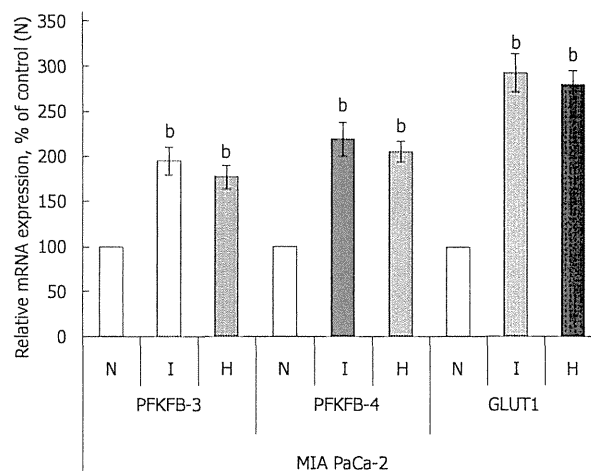


Figure 6 Effect of hypoxia (H) and hypoxia mimic dimethylxylglycine (I) on the expression level of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3, -4, and GLUT1 mRNAs (measured by qPCR) in human pancreatic (MIA PaCa-2) cancer cells. $n = 4$; ^b $P < 0.01$ vs control cells. N: Normoxic (control) cells; PFKFB: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase.

cell lines and these changes are correlated with enhanced level of HIF-1 α protein^[32]. This data argues with HIF-1 α -dependent mechanism of the induction of these genes under hypoxia. At the same time, the constitutive level of HIF-1 α as well as HIF-2 α mRNA expression and their induction by hypoxia (Figure 4B) is dissimilar in the MKN45 and NUGC3 gastric adenocarcinoma cells^[32]. Thus, the level of HIF-1 α mRNA expression is decreased in both gastric cancer cell lines treated by hypoxia or dimethylxylglycine, but no significant changes of HIF-2 α mRNA expression were found in the NUGC3 gastric cancer cell line under hypoxia. However, the expression of HIF-2 α mRNA in the MKN45 gastric cancer cells was slightly induced by dimethylxylglycine as well as hypoxia. A similar pattern of the expression of HIF-1 α and HIF-2 α mRNAs in the A549 lung adenocarcinoma cell line and many other cancer cell lines treated by hypoxia was shown^[25,64-66].

It is important to note that there is an inverse correlation between induction of HIF-1 α mRNA and protein expressions upon hypoxic exposure. These observations suggest that the increase in HIF-1 α protein expression was not reflected at the mRNA level. Moreover, the ex-

pression of HIF-1 α mRNA is significantly decreased both under hypoxia and dimethylxylglycine action. It is possible that this discrepancy between HIF-1 α mRNA and protein levels, which was found in different gastric, pancreatic and many other cancer cell lines, is related to the divergence in mechanisms which control the stability of HIF-1 α mRNA and protein. Thus, the hypoxic induction of HIF-1 α protein expression is a result of its stabilization, possibly mediated by specific prolyl hydroxylase enzymes, oxygen- and iron-dependent, which utilize oxoglutarate as a co-substrate^[62,67,68]. At the same time, the decreased expression of HIF-1 α mRNA both under hypoxia and dimethylxylglycine action is possibly mediated by suppression of transcription or by its increased degradation^[65].

The expression mRNA level of PFKFB variant 3 and 4 was also investigated in two other pancreatic cancer cell lines: PSN-1 and MIA PaCa-2 (Figures 5 and 6). Hypoxia strongly induces ($P < 0.001$) the expression of both *PFKFB4* and *PFKFB3* genes in PSN-1 and MIA PaCa-2 cancer cells being more robust for *PFKFB4* gene. Moreover, hypoxic induction of *PFKFB4* and *PFKFB3* gene expressions in both these pancreatic cancer cell lines cor-