

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14387

研究課題名（和文）小細胞肺がんにおける、好気性代謝亢進とPKM1高発現の意義

研究課題名（英文）Aerobic glucose metabolism and Pkm1 in small cell lung cancer.

研究代表者

伊藤 しげみ（ITO, Shigemi）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん薬物療法研究部・特任研究員

研究者番号：80600006

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：小細胞肺がんの代謝特性を、新規治療標的として開発することを目標に検討をすすめた。細胞株と臨床検体の解析で、肺がんのうち、神経内分泌腫瘍のサブセット（大細胞神経内分泌がん・小細胞肺がんなど）が、非常に高いPkm1/Pkm2レシオをもつことを見出した。細胞株を用いた実験で、小細胞肺がんのPkm1依存性を見出した。小細胞肺がんでは、NAD代謝への依存性も高いことを見出した。マウスxenograft系において、NAD合成の阻害は、シスプラチン化学療法と同等の治療効果をしめした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated whether cellular metabolism can be explored as novel therapeutic target of small cell lung cancer (SCLC). We found that neuroendocrine tumors, a subset of lung cancer, exhibit substantial expression of Pkm1. Functional analyses revealed that Pkm1, but not Pkm2, can fully support proliferation of the SCLC cell-lines, suggesting their dependence on Pkm1. We also found that an inhibitor on NAD salvage suppresses growth of PKM1-expressing cancer cells, suggesting a therapeutic strategy for PKM1-positive tumors such as SCLC

研究分野：腫瘍学

キーワード：肺がん Pkm NAD代謝 グルコース代謝

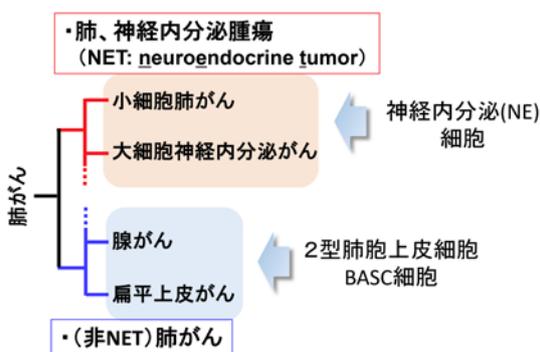
1. 研究開始当初の背景

従来、腫瘍細胞は主に嫌氣的解糖系により ATP を得ていると考えられてきた (Warburg 効果)。しかし、例えば、悪性メラノーマのなかに、好気呼吸 (TCA 回路/酸化的リン酸化) に依存する、より悪性度の高いサブセットが存在することが明らかにされた。さらに最近では、がん遺伝子不活化後の再発腫瘍 (実験的な、がん幹細胞とも言える) が好気呼吸に依存していることが示された。このように、少なくとも、がんのエネルギー代謝は、当初想定よりも、より多様性に富むことが分かってきた。

細胞が、嫌気代謝と好気代謝、どちらを主体としたエネルギー産生戦略をとるのか? その決定因子として極めて重要なのが PKM である。この酵素は、解糖系の最終ステップを触媒し、以って、解糖系から TCA 回路に流入する炭素源の流束を調節する。PKM には、高活性型の PKM1 と、低活性型の PKM2 という、2つの isoform があり、これらは選択的スプライシングによって作り分けられる。多くのがんが PKM2 (低活性型) を特異的に発現している。この事実は、腫瘍細胞では、たとえ O₂ が豊富に存在しても好気代謝が亢進しない (出来ない) ことと、おそらく対応する。一方、神経や筋肉には PKM1 が発現し、好気代謝が活発化する。しかし、そのような代謝現象の意義については、不明の点が多かった。

2. 研究の目的

最近、我々グループは、全肺癌症例の 15~20% を占める小細胞肺癌 (SCLC: small cell lung cancer) では、1) 好気代謝能が比較的高く保たれていること、これに対応して、2) PKM の isoform 発現が、極めて例外的に、PKM1 型となっていることを見出していた。すなわち、肺癌のエネルギー代謝は組織型によって大きく異なり、SCLC という、肺癌サブグループの大半が、PKM1 発現を介した好気代謝に依存している可能性が出てきた。そこで本研究では、SCLC の高い好気代謝能が PKM1 の高発現に起因する可能性と、そのような代謝形質が SCLC の発生や悪性形質において果たす役割を検証することを目標に、研究を行った。



3. 研究の方法

(1) SCLC における RNA レベルでの高 Pkm1 発現が、タンパクレベルにも反映されているか確認するため、質量分析 (LC-MS/MS MRM 法) による Pkm1 および Pkm2 の絶対定量をおこなった。

(2) 細胞株の解析で、小細胞肺癌が非常に高い Pkm1/Pkm2 レシオをもつことを見出していたが、これが臨床手術サンプルでも同様か否か、検討した。凍結腫瘍組織から RNA を精製し、qRT-PCR 法を用いて Pkm1 および Pkm2 の mRNA レベルを定量した。あわせて、神経内分泌腫瘍マーカー (クロモグラニン A、シナプトフィシン、N-CAM、ASCL1) の発現も定量した。

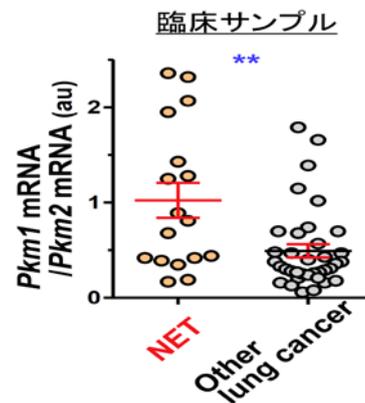
(3) 肺神経内分泌腫瘍の起源細胞と考えられている、気管支上皮神経内分泌細胞における Pkm1 および Pkm2 の発現を免疫組織染色によって解析した。

(4) 約 10 種のヒト SCLC 細胞株を親株として、PKM1 または PKM2 のみを発現する SCLC 細胞の作製に取り組んだ。手法としては、まず、上記の細胞群にマウス型 Pkm1 または Pkm2 cDNA (ヒト Pkm に対する shRNA に耐性) を、ウイルスベクターを用いて導入した。次いで、外来性 Pkm の発現が確認できた細胞について、順次、内在性ヒト Pkm (ヒト Pkm1 および Pkm2 の両方を標的する) に対する shRNA を発現するレトロウイルスを感染させた。

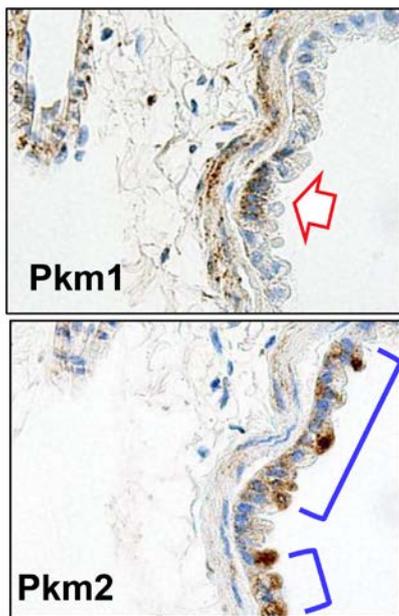
4. 研究成果

(1) 質量分析による絶対定量の結果、非小細胞肺癌に比べ、SCLC 細胞株が著しく高い Pkm1 量を発現していることが明らかになった。従い、mRNA レベルでの高 Pkm1 比が、実際のタンパクレベルにも反映されていることが明らかになった。

(2) 手術検体を用いた解析で、小細胞肺癌を含めた神経内分泌腫瘍では、その他の肺癌 (腺がん・扁平上皮がん) と比べ、Pkm1/Pkm2 レシオが非常に高いことが分かった。



(3) マウス肺の解析で、気管支神経内分泌細胞が、上皮系細胞としては例外的に、Pkm1 発現型であることが分かった。



(4) ヒト小細胞肺癌細胞株を親株にして、Pkm1 あるいは Pkm2 のみ発現する細胞を作製して、その表現型を解析した。

Pkm1 発現 SCLC 細胞と Pkm2 発現 SCLC 細胞との間に、グルコース消費・乳酸産生・酸素消費・ミトコンドリア膜電位などの点にて、はっきりした違いがあることを明らかにできた。さらに、Pkm1 発現が小細胞肺癌の増殖には極めて重要で、その機能は Pkm2 では代替できないことが分かった。すなわち、小細胞肺癌の Pkm1 アディクションが明らかになった。

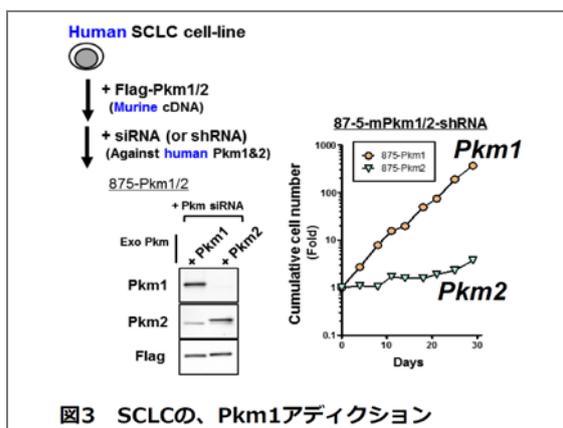


図3 SCLCの、Pkm1アディクション

また、上記細胞を免疫不全マウスに移植し、作製した xenograft 腫瘍に対して化学療法を施して、感受性をしらべた。

Pkm1 による代謝メリットの解明にとりくんだ。まず、Pkm1 が細胞に高 ATP と高 NAD+ レベルをもたらすことを見出だした。NAD 依存的な Parp の活性化もみとめられた。マイクロアレイ解析で、de novo NAD 経路に関わ

る酵素の遺伝子発現に違いがみられなかったことから、もう一つの NAD+ 生成系であるサルベージ経路の関与がうたがわれた。そこで NAD+ サルベージの律速酵素 Nampt に対する阻害剤や RNAi による検討をくわえた。細胞株間で反応に差はみとめられるものの、小細胞肺癌が Nampt 阻害に概ね高感受性であることをみだした。重要なことに、NAD 合成阻害が、従来のシスプラチン化学療法と同様の治療効果をもつこともわかった。

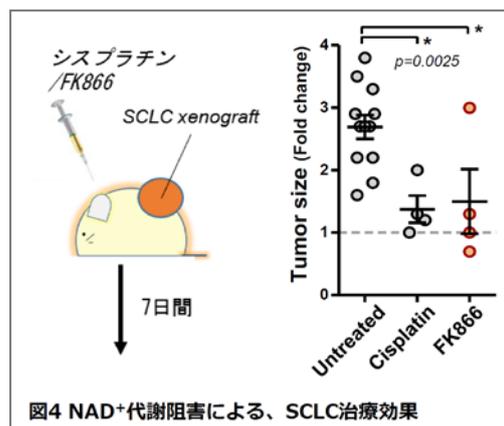
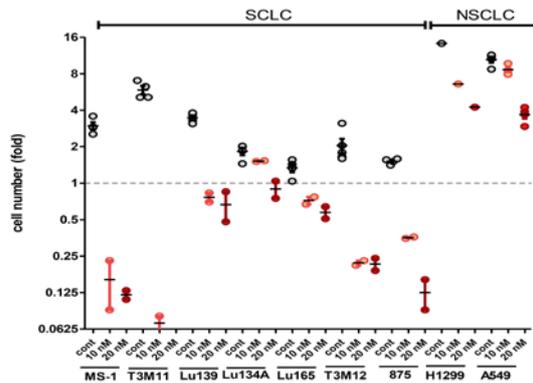


図4 NAD+代謝阻害による、SCLC治療効果

NAD+代謝について、より詳細な知見をえるため、安定同位体ニコチンアミドをトレーサーに用いた評価系を開発した。

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 3 件)

1. Shiroki T, Yokoyama M, Tanuma N, Maejima R, Tamai K, Yamaguchi K, Oikawa T, Noguchi T, Miura K, Fujiya T, Shima H, Sato I, Kamiya N, Hatakeyama M, Iijima K, Shimosegawa T and Satoh K. The enhanced expression of PKM2 is involved in the gastric cancer development via regulating cancer specific metabolism. Cancer Science、査読有、in press

2. Ogoh H, Tanuma N, Matsui Y, Hayakawa N, Inagaki A, Sumiyoshi M, Momoi Y, Kishimoto A, Suzuki M, Sasaki N, Ohuchi T, Nomura M,

Teruya Y, Yasuda K, Watanabe T, Shima H.
The protein phosphatase 6 catalytic subunit (Ppp6c) is indispensable for proper post-implantation embryogenesis. Mech Dev. 査読有、139:1-9, 2016

3. Matsuda S, Adachi J, Ihara M, Tanuma N, Shima H, Kakizuka A, Ikura M, Ikura T, Matsuda T、Nuclear pyruvate kinase M2 complex serves as a transcriptional coactivator of arylhydrocarbon receptor、Nucleic Acids Res、査読有、44(2):636-47, 2016

〔学会発表〕(計 3件)

1. 盛田麻美、野村美有樹、坂本良美、伊藤しげみ、佐藤郁郎、島礼、前門戸任、田沼延公
小細胞肺癌における Pyruvate kinase M の発現と機能解析
第 89 回日本生化学会大会
2016. 9. 25-27 (宮城県・仙台市)

2. 野村美有樹、盛田麻美、坂本良美、伊藤しげみ、佐藤郁郎、島礼、前門戸任、田沼延公
小細胞肺癌の代謝特性と、その標的化戦略
第 39 回日本分子生物学会年会
2016. 11. 30-12. 2 (神奈川県・横浜市)

3. 盛田麻美、野村美有樹、坂本良美、伊藤しげみ、井上維、佐藤郁郎、田中遼太、松本祥子、岸本綾子、渡邊利雄、島礼、田沼延公、
起源細胞での PKM スイッチが、腫瘍細胞のブドウ糖代謝様式を規定する、第 10 回オートファジー研究会、2016. 11. 13-15(新潟県・越後湯沢)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 しげみ (ITO, Shigemi)
地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん薬物療法研究部・特任研究員
研究者番号：80600006

(2) 研究分担者

田沼 延公 (TANUMA, Nobuhiro)
地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん薬物療法研究部・主任研究員
研究者番号：40333645

佐藤 郁郎 (SATO, Ikuro)
地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・ティッシュバンクセンター・センター長
研究者番号：50225918