

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19356

研究課題名(和文)CRISPRシステムを用いた内視鏡的膵癌治療法開発の基礎検討

研究課題名(英文)Endoscopic therapy of pancreatic cancer using CRISPR system.

研究代表者

虻江 誠 (Abue, Makoto)

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)・がん幹細胞研究部・特任研究員

研究者番号：50599967

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)：膵癌をコントロール出来る遺伝子を探索する中で、代謝に重要な遺伝子の一つであるPKM2に焦点を絞り、検討した。PKM2の膵癌細胞での役割を検討するために、siRNAあるいはshRNAを膵癌細胞に導入し、マイクロアレイ・フラックスアナライザー・メタボローム解析を施行した。PKM2をノックダウンすると、細胞増殖能・移動能・造腫瘍能が減少した。また、解糖能の減少がみられた。マイクロアレイの結果、細胞周期関連遺伝子に変動があった。これらの結果、PKM2は膵癌細胞の悪性度および代謝能に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to examine the expression and role of PKM2 in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), we knocked down PKM2 in PDAC cells by introducing small interfering and short hairpin RNAs, and examined the gene expression profiles in the cells by microarray analysis. We analyzed the energy-producing pathways in the cells by XFe Extracellular Flux Analyzers, and detected intracellular metabolites by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. We found that the RNAi-mediated knockdown of PKM2 diminished the proliferative, migratory and tumorigenic ability of the PDAC cell-lines. PKM2 knockdown also resulted in lower glycolytic activities and decreased levels of some intracellular metabolites, such as pyruvate and polyamine. On the whole, the findings of this study demonstrate that PKM2 plays an important role in metabolic activities, as well as in the malignancy of PDAC cells.

研究分野：腫瘍学

キーワード：膵癌

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において2003年～2005年に診断された膵癌患者の5年相対生存率は7%と報告されている。この生存率はあらゆる癌種の中で最も低く、20%を下回るのは膵癌のみである。1993～1996年に診断された膵癌例の5年相対生存率は6.5%であり、様々な診断法や新しい抗がん剤が開発されてきた10年の時を経ても、生存率に大きな改善はみられていない。従って、膵癌患者の予後を改善させるには、今までにない画期的な治療法の開発が必要である。

膵癌の90%以上の症例でK-ras遺伝子の変異があることが知られている。最近、膵臓でのK-rasの活性化をコントロールできる遺伝子改変マウスが樹立された(Cell, 2012)。このマウスによって、腫瘍を形成させた後でもK-rasを不活化すると腫瘍が消退することが明らかとなった。しかし、その後の検討によると、K-rasの不活化によって消退した膵組織の中には残存する膵癌細胞がわずかに存在し、これらの癌細胞は腫瘍形成能が高く癌幹細胞特性を有していた(Nature, 2014)。つまり、K-rasの不活化によって大部分の腫瘍細胞は死滅するが、残存する細胞は高度な悪性化形質を獲得していた。K-rasを標的とした膵癌治療を考える場合、この残存する膵癌細胞に対する治療も加える必要がある。

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) は原核生物で外部から侵入した核酸(ウイルスDNAやRNA)に対する獲得免疫機構として機能しているDNA領域であり、外来DNAがCRISPR座位に挿入されることで免疫記憶として機能する。再感染時には、挿入されたDNA断片を含むCRISPR RNA(crRNA)が配列特異的にCRISPR-associated (Cas)ヌクレアーゼを外来DNAに誘導し切断を引き起こす。そ

のシステムを応用し、ゲノム編集が行われるようになってきた。CRISPRシステムの概要を次ページの図に示す。切断したいDNA配列に対する相補的な配列を含むguideRNA(gRNA)を設計し、それらの断片を発現ベクター(U6プロモーター)にクローニングし、Cas9発現ベクターと共に細胞に導入する。gDNAにはCas9を誘導するようにヘアピン構造を持たせる。標的DNA配列と結合したgRNAに、Cas9が誘導され、ターゲット配列の3'末端側に存在するPAM配列より上流の2本鎖DNAを切断する。切断されたDNAが修復・組換えされることを利用して遺伝子のノックイン、ノックアウトなどの遺伝子編集が容易に可能となった。このシステムを応用して、PTENやp53といった癌抑制遺伝子を標的としたgRNAと次ページの図のようにCas9の双方を発現するように作製したベクターを生体マウスの尾静脈より注入することにより、肝臓に腫瘍が生じることが明らかとなった。アデノウイルスやレトロウイルスなどを使わずに、ベクターを注入するのみで肝細胞にベクターが導入されシステムが稼働することが示された。申請者は、このシステムを膵癌治療にも応用できると考えた。超音波内視鏡(EUS)下吸引細胞診(fine-needle biopsy, FNA)の要領で、EUSで同定した腫瘍部に局注針でCRISPRベクターを注入するのである。

以上から、EUSを用いたCRISPR/Cas9システムを用いて、がん悪性化に関わる遺伝子の不活性化による治療法を着想した。最終的にEUS下での内視鏡治療への臨床応用を目指すべくその可能性の検証を計画した。

## 2. 研究の目的

膵癌細胞の特定の遺伝子を不活化することで、膵癌の悪性度を低下させ、最終的に

は内視鏡を用いた遺伝子不活化を行い、臨床応用を目指す。

まず、遺伝子不活化（ノックダウン）によって膵癌の悪性度が低下するかどうかを検討した。ノックダウンする遺伝子を探索した結果、代謝経路とがん細胞の悪性化に重要なつながりがあることが近年示唆されているため、代謝に重要な遺伝子の一つであるPKMに焦点を絞り、検討した。

### 3. 研究の方法

膵癌および正常部組織は宮城県立がんセンター手術症例から得た。

膵癌細胞株（AsPC-1, BxPC-3, PANC-1, MIAPaCa）はATCCから購入した。それぞれの細胞はDMEM+10% FBS+penicillin, streptomycinで培養した。

PKM2ノックダウンは、siRNA（ニッポンジーン）により行った。

Reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)。total RNAをRNeasy Mini kit (Qiagen)により抽出し、PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis kit (Takara)によって逆転写反応を行った。RT-qPCRはLighCycler480 (Roche)を用いて行った。

細胞増殖試験。細胞増殖試験はMTTを用いて行った。

Cell migration assay。Cell migration assayはwound healing scratch assayを用いて検討した。

### 4. 研究成果

PKM2の膵癌細胞での役割を検討するために、siRNAあるいはshRNAを膵癌細胞に導入し、マイクロアレイ・フラックスアナライザー・メタボローム解析を施行した。PKM2をノックダウンすると、細胞増殖能・移動能・造腫瘍能が減少した。また、解糖能の減少が

みられた。マイクロアレイの結果、細胞周期関連遺伝子に変動があった。

これらの結果、PKM2は膵癌細胞の悪性度および代謝能に重要な役割を果たすことが示唆された。

### 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1件)

M. Yokoyama, N. Tanuma, R. Shibuya, T. Shiroki, M. Abue, K. Yamamoto, K. Miura, K. Yamaguchi, I. Sato, K. Tamai, K. Satoh, Pyruvate kinase type M2 contributes to the development of pancreatic ductal adenocarcinoma by regulating the production of metabolites and reactive oxygen species, Int J Oncol (52) 881-891, 2018

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者

虻江誠 (Abue, Makoto)  
宮城県立がんセンター研究所 特任研究  
員  
研究者番号 : 50599967

(2)研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3)連携研究者  
( )

研究者番号 :

(4)研究協力者  
( )