

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07344

研究課題名(和文) MiR-34aによるがん特異的エネルギー代謝調節機構の解明と臨床応用への試行

研究課題名(英文) Elucidation of cancer specific energy metabolism by MIR34a and clinical application of it.

研究代表者

谷口 高平 (TANIGUCHI, Kohei)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：70779686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：MIR34aを胃癌細胞株に導入すると顕著な増殖抑制効果が得られ、機序としてオートファジーの誘導が示唆された。MIR34aはSLC2A1、LDHAの発現制御を介し、ラクテート産生、グルコース取り込みを抑制することが示唆された。また臨床検体においてもLDHA、SLC2A1の発現亢進を認めMIR34aの脱制御によりこれらの遺伝子の発現亢進が胃癌促進的に機能している可能性が示唆された。また副次的にDDX6がMYC発現を調節し胃癌促進的に機能することを見出した。更に、他のPTBP1標的遺伝子miRNAを同定した。これらの事象はWarburg効果を標的とした創薬開発に重要な所見である。

研究成果の概要(英文)：The ectopic expression of MIR34a significantly inhibited the cancer cell growth through the induction of autophagy in gastric cancer (GC) cells. The production of lactate and the up-take of glucose were decreased in MIR34a-treated GC cells through the down-regulation of the expression levels of SLC2A1 and LDHA. Also, the expression levels of LDHA and SLC2A1 were up-regulated in clinical GC samples. Our findings implied that dysregulation of MIR34a-expression affect the acquisition of the Warburg effect in GC cell. Additionally, we revealed that RNA-helicase DDX6 promote GC development by regulation of MYC. Also, we detected new PTBP1-associated miRNAs. Our findings in this project were very important for innovative drug development which targets the Warburg effect.

研究分野：消化器外科、核酸創薬、分子生物学

キーワード：microRNA Warburg 効果 MIR34a GLUT1 LDHA MYC

### 1. 研究開始当初の背景

近年、メタボローム解析の結果よりがん特異的エネルギー代謝機構 (Warburg 効果) の重要性が再認識されている。しかしながら Warburg 効果の成立機構は十分に解明されていない。我々は先行研究で microRNA (miRNA) が Warburg 効果成立機構に及ぼす影響を検証してきた。その結果より、解糖系の律速酵素である、ピルビン酸キナーゼ (PKM) アイソフォームの発現比が、がんでは PKM2 優位に傾くことが重要であることを見出した(引用文献 1)。更に、PKM アイソフォームを制御するスプライサー遺伝子として HNRNP family に属する PTBP1 が重要であること、PTBP1 は臓器特異的 (脳、筋に分布する) miRNA によって制御されていることを明らかにしてきた(引用文献 1)。このことから、Warburg 効果成立機構には miRNA が深く関与していることが想定される。また、我々は先行研究で、MIR34a が胃癌で脱制御されていることを示した(引用文献 2)。更に、Warburg 効果成立には代表的、がん促進的転写因子である MYC の関与が示唆されており、MIR34a は MYC の発現を制御することが知られていたため、本研究では胃癌における Warburg 効果成立機構を MIR34a の関与から解明することを目標に研究を進めることとした。最終的な大目標は miRNA の創薬化であり、本検討でも予後不良である、スキルス胃癌 (印環細胞癌) を用いる事を計画し研究に臨んだ。

### 2. 研究の目的

MIR34a の胃癌における Warburg 効果成立機構に対する関与を解析することで、Warburg 効果成立における miRNA の役割を詳細に明らかにする。また、これまで研究対象としてきた PTBP1、PKM アイソフォームや、それを調節する miRNA 以外の Warburg 効果関連遺伝子を同定し、機能を解析することを目指した。核酸創薬に繋がる検証を行い次世代医薬として miRNA 創薬の可能性を探ることを最終的な大目標とした。

### 3. 研究の方法

- 細胞株：胃癌細胞株として MKN-45、NUGC-3、印環細胞癌の細胞株として KATOIII、HSC-39 を用いた。
- 細胞導入実験：MIR34a (Ambion®) をリポフェクション (Lipofectamine™ RNAiMAX) を用いて導入した。効果を約 60 時間後に解析した。
- siRNA: BLOCK-iT™ RNAi Designer を用いて設計した。
- 細胞増殖能：トリパンブルー染色による細胞数カウント、及び CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay (Promega) を用いた。
- 蛋白発現解析: 目的の各種 1 次抗体に対し、ウェスタンブロッティング法 (WB 法) 及び、免疫蛍光染色法 (IF、IHC) を用いて解析し

た。

- mRNA/miRNA 発現：リアルタイム PCR (RT-PCR) 法を用いた。
- miRNA の標的遺伝子に対する結合能：Luciferase reporter assay を用いた。
- 阻害剤実験: miRNA の阻害剤を適宜併用した。オートファジー阻害剤として 3-メチルアデニン (3-MA) を MYC 阻害剤として 5-(4-エチルベンジリデン)ロダニンを用いた。
- 形態学的解析: 透過型電子顕微鏡を用いた。
- ラクテート産生量、グルコース取り込み量: Glo™ Assay (Promega) を用いた。
- データベース: Target Scan 7.1 database (<http://www.targetscan.org/>)、Oncomine (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>) を用いた。

### 4. 研究成果

先ず、初めに胃癌細胞株 MKN-45、KATOIII に MIR34a を導入し細胞増殖能に与える影響を解析した。MKN-45 においては顕著な増殖能の抑制を認めた。KATOIII に関しては細胞導入高率が不良で解析が不十分であった。そこで更に細胞株として NUGC-3、HSC-39 を追加し、検証を加えた。両細胞株で、顕著な増殖能の抑制効果を認めた(図 1A)。以降の実験では MKN-45 と印環細胞株として HSC-39 を選択した。何れの細胞も MIR34a 阻害剤併用により細胞増殖能が回復した(図 1B)。

図 1A

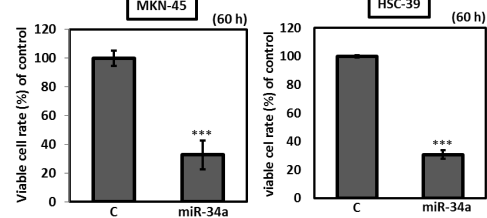
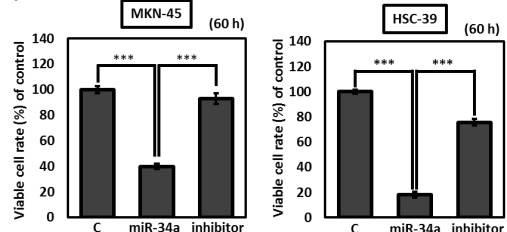


図 1B



次に、PARP1、MAP1LC3B の蛋白レベルでの発現を WB 法で解析した。PARP1 の断片化を認め、アポトーシスを示唆した。また MAP1LC3B は 1 から 2 への顕著な発現移行を認めた(図 2)。また電子顕微鏡で形態を観察したところ、多数のオートファゴソームを認めた。一部にクロマチン凝集、断片化を認め WB 法の解析結果に矛盾しなかった(図 3)。本研究では Warburg 効果との関連性に着目していたため、オートファジーの誘導が特に重要であると考えた。更に 3-MA を併用し細

胞増殖能を解析したが、オートファジーの導入が顕著であり至適濃度で *MAP1LC3B* の移行をキャンセル出来ず、今後の課題とした。

図 2

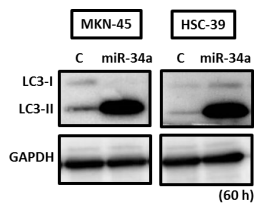
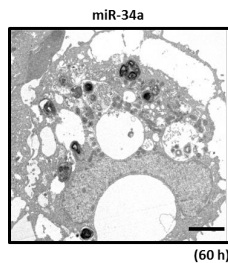
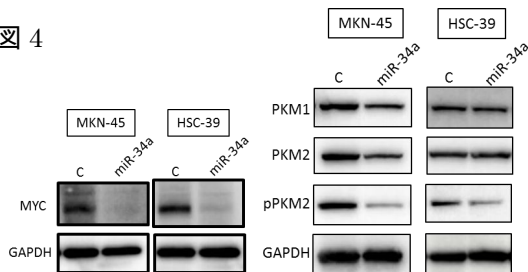


図 3



これまでの研究成果で解糖系反応の律速酵素である *PKM* に関して、*PTBP1* を標的とする miRNA を導入すると、がん優位な *PKM2* の発現が *PKM1* に移行することを見出していた。*MIR34a* は *PTBP1* を直接標的とはしないが、*PTBP1* の転写を促進する *MYC* を制御することが知られているため、*MIR34a* が Warburg 効果に及ぼす影響を *PTBP1*、*PKM* アイソフォームの発現変化から間接的に検証した。*MYC* の発現は *MIR34a* 導入胃癌細胞株で顕著に抑制された。しかし、これまで認めた、*PKM* アイソフォームの発現変化は認められなかった (図 4)。*PKM2* のリン酸化は抑制されたが、この点については検証・考察を追加する必要がある。

図 4



*MIR34a* の Warburg 効果における機能を更に解析するため、データベースを用いて、*MIR34a* が直接標的とする Warburg 効果関連遺伝子について検索した。Target Scan 7.1 database では解糖系の最終産物である、*LDHA* が *MIR34a* により直接制御されていることが示された。よって *MIR34a* 導入胃癌細胞株における *LDHA* の蛋白発現を WB 法で検証したところ、顕著な発現抑制を認め、その効果は *MIR34a* 阻害剤で一部キャンセルされた (図 5)。また Luciferase reporter assay で *MIR34a* が *LDHA* に結合することが示された (図 6)。

図 5

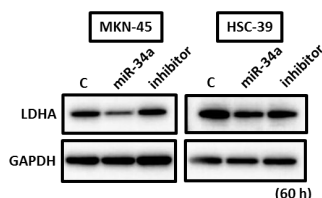
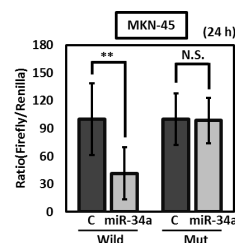
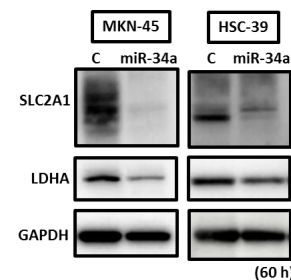


図 6



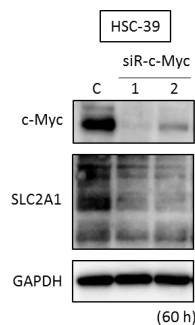
一方、グルコーストランスポーターとして解糖系の入口に存在する膜蛋白、*SLC2A1* の発現を解析したところ、*MIR34a* 導入胃癌細胞株で *SLC2A1* の顕著な発現抑制を認めた (図 7)。WB 法による蛋白発現に関してはバンドが広範囲の分子量に検出されるため正確な同定にやや難渋した。今後、*MIR34a* 阻害剤併用によるキャンセル効果を検証する計画である。

図 7

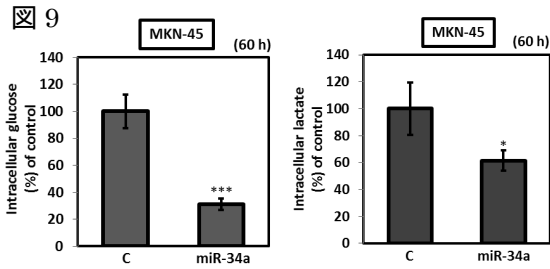


また、*MIR34a* の *SLC2A1* の発現制御メカニズムを追求した。siRNA 及び *MYC* 阻害剤 5-(4-エチルベンジリデン)ロダニンを用いて *MYC* をノックダウンさせ *SLC2A1* 発現を解析した。一部の系では *SLC2A1* の抑制を認めた (図 8)。更なる検証を追加する必要がある。また *MYC* が *SLC2A1* の転写因子となる可能性が示唆されたため、*MYC* ノックダウン時の *SLC2A1* の mRNA 発現レベルを解析したが発現抑制を認めなかった。また、*SLC2A1* を標的とする miRNA の挙動を解析したが *MIR148a* の発現上昇は認めなかった。*MIR34a* の *SLC2A1* 制御システムに関しては今後検証が必要である。

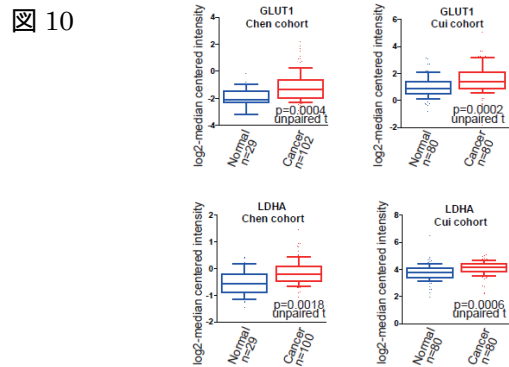
図 8



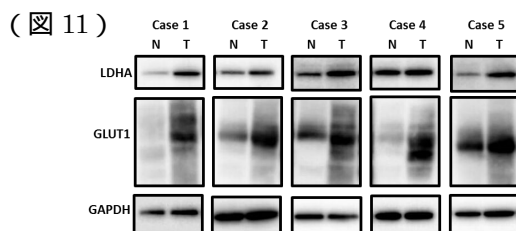
更に、*MIR34a* 導入胃癌細胞株においてラクテート産生量、グルコース取り込み量を解析したところ、*MIR34a* を導入することで、ラクテートの産生量、グルコースも取り込み量が減少した (図 9)。実験結果をより確固たるものにするため、追加実験を考慮しておりメタボローム解析を追加するかを検討中である。



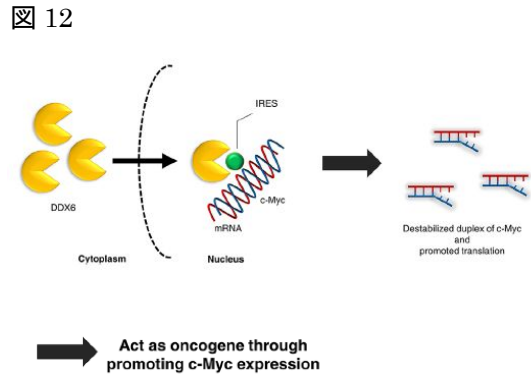
次に臨床検体における *SLC2A1*, *LDHA* の発現を解析した。データセットを用いて mRNA を解析した所、両遺伝子の胃癌組織における発現亢進を認めた (図 10)。



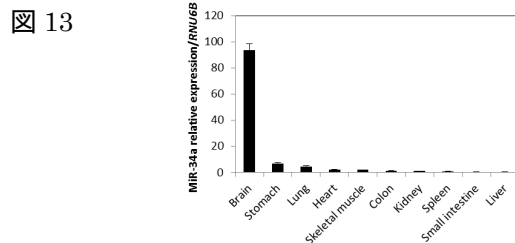
一部、利用可能な手術検体を用いて、両遺伝子の蛋白発現を WB 法で解析したところ、がん組織における両遺伝子の発現亢進を認めた (図 11)。更に現在、IHC を用いての検討を重ねている。我々の先行研究において、胃癌では *MIR34a* の脱制御が示唆されていたため、胃癌においては *MIR34a* の脱制御により Warburg 効果成立に關与する遺伝子発現が亢進し、Warburg 効果を獲得していることが示唆された。更なる実験を追加し、研究成果を論文化する計画である。



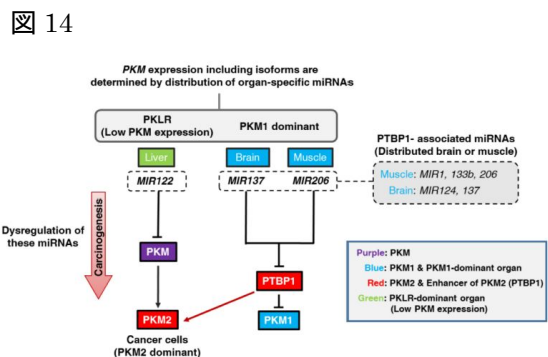
更に、我々は先行研究で RNA ヘリケースである *DDX6* が *MYC* と結合し、がん促進的に機能すること、Warburg 効果調節に深く關与する *MIR124* が *DDX6* を標的とし *MYC* 発現を制御することを大腸癌で明らかとした (引用文献 3)。本研究過程においても、*MYC* が Warburg 胃癌において非常に重要な機能を有していることが想定されたため、*DDX6* と *MYC* の関連性を検討することとした。胃癌臨床検体において、*DDX6* の発現が亢進しており、胃癌細胞株を用いた実験によって、*DDX6* が *MYC* の発現を促進させ、癌促進的に機能することを同定し報告した (図 12)。



更に先行研究では *PTBP1* を標的とする miRNA の内、特に脳に高発現する miRNA が重要であることが明らかになっていた。本研究の先行実験で *MIR34a* は脳に最も発現していることが示されていたが (図 13)、本年度の研究結果では *PKM* アイソフォームの発現変化を認めず、*PKM* アイソフォームの発現に関しては *PTBP1* を直接標的とする miRNA により調節されることがより重要であると考えられた。よって *PTBP1* を標的とする他の miRNA についても検討を加えた。



検証した結果、脳特異的な *MIR9*、筋特異的な *MIR206* が *PTBP1* を標的とし *PKM* アイソフォームを制御することが明らかとなった。更に、直接 *PKM* を標的とする miRNA として肝特異的な *MIR122* を同定した。正常肝組織は *PKM* のアイソザイムである *PKLR* が発現している。これは肝特異的な *MIR122* によって *PKM* の発現が抑制されていることが關与していると考えられ、正常組織における発生的特徴を miRNA が担っている 1 つの典型例であると思われ成果として報告した (図 14)。



これら臓器特異的な miRNA は発癌過程で高率に脱制御を受けることが想定されるため、

miRNA による発がん機構を解析するためにはがん種によって起源となる組織に特異的に発現する miRNA に焦点をおくことが重要であると考えられる。また本プロジェクトにより、新規核酸創薬コンセプトとして Warburg 効果が 1 つの標的となりうることを示唆された。

<引用文献>

Taniguchi K, Ito Y, Sugito N, Kumazaki M, Shinohara H, Yamada N, Nakagawa Y, Sugiyama T, Futamura M, Otsuki Y, Yoshida K, Uchiyama K, Akao Y. Organ-specific PTB1-associated microRNAs determine expression of pyruvate kinase isoforms. *Sci Rep.* 2015 Feb 27;5:8647. doi: 10.1038/srep08647.

Takagi T, Iio A, Nakagawa Y, Naoe T, Tanigawa N, Akao Y. Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers. *Oncology.* 2009;77(1):12-21. doi: 10.1159/000218166.

Taniguchi K, Sugito N, Kumazaki M, Shinohara H, Yamada N, Matsuhashi N, Futamura M, Ito Y, Otsuki Y, Yoshida K, Uchiyama K, Akao Y. Positive feedback of DDX6/c-Myc/PTB1 regulated by miR-124 contributes to maintenance of the Warburg effect in colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Sep;1852(9):1971-80. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.06.022.

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2件)

Taniguchi K, Sugito N, Shinohara H, Kuranaga Y, Inomata Y, Komura K, Uchiyama K, Akao Y. Organ-Specific MicroRNAs (MIR122, 137, and 206) Contribute to Tissue Characteristics and Carcinogenesis by Regulating Pyruvate Kinase M1/2 (PKM) Expression. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 24;19(5). pii: E1276. doi: 10.3390/ijms19051276. 査読有.

Taniguchi K, Iwatsuki A, Sugito N, Shinohara H, Kuranaga Y, Oshikawa Y, Tajirika T, Futamura M, Yoshida K, Uchiyama K, Akao Y. Oncogene RNA helicase DDX6 promotes the process of c-Myc expression in gastric cancer cells. *Mol Carcinog.* 2018 May;57(5):579-589. doi: 10.1002/mc.22781. 査読有.

[学会発表](計7件)

谷口高平、赤尾幸博、内山和久. MicroRNA

の臓器特異性と新規がん遺伝子 PTBP 1 の機能解析. 第 51 回 制癌剤適応研究会. 2018 年

谷口高平、杉戸信彦、田尻下敏弘、二村学、吉田和弘、内山和久、赤尾幸博. Oncogene RNA helicase DDX6 promotes the process of c-Myc expression in gastric cancer cells. 第 76 回 日本癌学会学術総会. 2017 年.

谷口高平. マイクロ RNA の臓器特異性と発癌メカニズム. 第 49 回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 2017 年

谷口高平、杉戸信彦、赤尾幸博、内山和久. がん特異的代謝における miR-34a の機能解析. 第 21 回 日本がん分子標的治療学会学術集会. 2017 年.

谷口高平、高井朋聡、吉川勇希、杉戸信彦、内山和久、東治人、赤尾幸博. がん特異的エネルギー代謝を標的とした RNA 創薬. 日本核酸医薬学会 第 2 回年会. 2016 年.

他 2 件

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.osaka-med.ac.jp/~sur000/html/laboratory.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 高平 (TANIGUCHI Kohei)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70779686