

令和元年6月5日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10615

研究課題名(和文) Warburg効果調節新規がん遺伝子PTBP1の機能解析による胆膵腫瘍病態の解明

研究課題名(英文) The elucidation of biliary and pancreatic tumor's pathobiology through the functional analysis of novel Warburg effect-associated gene PTBP1

研究代表者

朝隈 光弘 (Asakuma, Mitsuhiro)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：40559390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究で大腸腫瘍や胃癌で発現上昇を同定していたPTBP1が膵癌でも高発現していることが明らかとなり、PTBP1が普遍的がん遺伝子であることの一部を見出した。膵癌細胞株に対し、PTBP1のノックダウンを行うことにより細胞増殖抑制効果が認められPTBP1が癌促進的に機能していることが示唆された。PTBP1をノックダウンした際のmRNAシーケンス解析を行い、PTBP1遺伝子と関連性の高い遺伝子群を同定した。更に、バイオインフォマティクス解析を行い、正常組織におけるPTBP1及び標的遺伝子の発現プロファイルや、PTBP1ノックアウトによる致死的作用などが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PTBP1は普遍的がん遺伝子の可能性が示唆され、様々ながん種における病態解析や新規治療標的、バイオマーカーとして新規標的遺伝子となりうることが明らかとなった。また、PTBP1はがんエネルギー代謝に深く関連する遺伝子であり、PTBP1の機能解析を通じて、膵癌の病態が新たな観点で明らかになったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we indicated that the expression of PTBP1 was increased in colorectal tumor and gastric cancer. In this project, the expression of PTBP1 was increased in pancreatic cancer. Our findings suggest that PTBP1 is universal oncogene in various cancer. Knockdown of PTBP1 induced growth suppression in pancreatic cancer cells and this result suggest that PTBP1 has cancer promoted function. We performed mRNA sequence analysis in PTBP1-silencing pancreatic cancer cells and detected the PTBP1 associated genes. Also, the expression profiles of PTBP1 in normal tissues or fatal reaction of PTBP1 were revealed through the bioinformatics analysis.

研究分野：Oncology (pancreas)

キーワード：膵癌 PTBP1 ワールブルク効果 スプライサー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、がん特異的エネルギー代謝機構として、がん細胞は好気下においても解糖系を優位に使用する Warburg 効果が着目されている。解糖系及び TCA 回路の律速酵素である Pyruvate kinase muscle の spliced variants M1、M2 (PKM1、PKM2) は heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family members である Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTBP1) のスプライシングにより発現が調節されており、がん細胞では PTBP1 が高発現することで PKM2 が優位となり Warburg 効果を実現させている。

我々は、これまで PTBP1 の発現を調節する microRNA(miRNA) 群に焦点を当て研究を進め、PTBP1 関連 miRNA が Warburg 効果制御することを明らかにしてきた。その結果、標的遺伝子である PTBP1 が様々ながん種や前がん病態である adenoma でがん遺伝子として機能していることが明らかになった。この結果は Warburg 効果の獲得が発がんにおける根幹の機能獲得であることを示しており、我々はこの新規がん遺伝子 PTBP1 をがんの形質を決める最重要遺伝子と考え研究を進めている。本研究では、我々が明らかにしてきたこの新規がん遺伝子 PTBP1 及び PTBP1 関連 miRNA の機能を膵、胆道腫瘍において解析することで、未だ、早期診断治療が困難な胆膵腫瘍の病態の解明を目的とし研究を開始した。

2. 研究の目的

膵、胆道腫瘍における PTBP1 の発現を解析することで、PTBP1 のがん遺伝子としての普遍性を探索する。PTBP1 の標的とする遺伝子を同定し、スプライサー遺伝子である PTBP1 の発がん、がんの進展における機能を更に詳細に解析する。また、前がん病変にも着目することで Warburg 効果の獲得が発がんのどの段階に寄与するかを解明する。

3. 研究の方法

*臨床試料（病理検体及び蛋白サンプル）を用いた検討

手術検体から、前向きに蛋白検体の収集を進め PTBP1 の発現をウェスタンブロッティング法で解析した。また、過去の病理検体を用いて PTBP1 の発現・局在を免疫組織染色で解析した。

*PTBP1 の機能解析

siRNA-PTBP1 を作製し、膵がん細胞株に導入し細胞増殖能に与える影響を検証した。既知の Warburg 効果関連遺伝子の発現を中心に解析した。

また、PTBP1 をノックダウンした際の mRNA 変化を RNA シーケンスで網羅的に解析し、新規 PTBP1 標的遺伝子の同定を行った。

*バイオインフォマティクスを用いた解析

PTBP1 の様々ながん種における解析を公開されているデータベースから解析した。

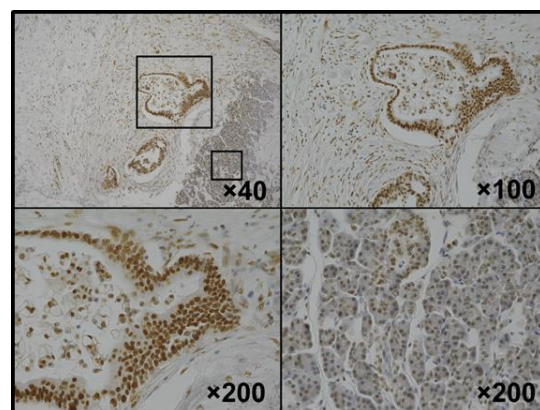
また、正常組織における発現プロファイルも解析した。

RNA シーケンスで同定した、PTBP1 の新規標的遺伝子の正常組織発現プロファイル、様々ながん種における発現プロファイルを解析した。

4. 研究成果

臨床検体における PTBP1 の発現は、同一症例の正常組織と比較し、殆どの症例で上昇していた。病理検体における解析において、PTBP1 は核に存在し正常組織と比較し強発現していることが明らかとなった(図1)。また標的遺伝子として知られる PKM のアイソフォームである PKM2 の発現ががん部で強発現していることが明らかとなった。一方で、臨床検体からのサンプリングを得られる機会は想定より少なく解析が計画通りには進まなかった。理由として、膵がん術前に集学的治療が施行されるケースが多く、未治療の試料の割合が少ないこと、早期膵がんでは試料の採取が困難であることが考えられた。

図1



siRNA を用いた検討では、膵がん細胞株 PANC1、MiaPaCa2、BxPC3 などに siRNA-PTBP1 を導入し、全ての細胞株で細胞増殖抑制効果を認めた。PKM アイソフォームの発現が癌で優位な PKM2 から PKM1 へと移行していることが確認された。一部の細胞株で膵がん発症に寄与する KRAS 発現が抑制されたが細胞株間で異なり、一貫した現象を得ることはできなかった。PTBP1 は選択的スプライシング以外にも RNA の安定化などにも関わるため、PTBP1 ノックダウンによる KRAS の mRNA レベルを RT-PCR 法で解析した。しかし、タンパク発現と同様に細胞株間で一貫した有意な発現低下を得ることが出来なかった。

RNA シークエンス解析は、PANC1、MiaPaCa2 に対し siR-PTBP1 を導入したサンプルで行い、2 種の細胞株で共通の挙動を示す遺伝子をリストアップした。いくつかの候補遺伝子の内、遺伝子 X (未発表のため X とする) に焦点を当て、研究を継続して遂行している。

また、臨床試料の収集が想定通りに進まなかったことを踏まえて、公開されているデータベースから、PTBP1 の発現プロファイル解析を進めることとした。TCGA のデータセットでは、様々ながん種で PTBP1 の発現ががん組織で亢進していることが示された。また、RNA シークエンスで同定された遺伝子 X についても解析を進めた。CRISPR-Cas9 で PTBP1 及び X をノックアウトした際の、致死率などいくつか興味深い解析結果を得た。現在、解析結果を元に、再度、*in vitro* 実験を計画し研究を遂行している。

本研究から、PTBP1 のがん部における発現亢進や、がん促進的機能は普遍的である可能性が示唆された。スプライサー遺伝子として様々な標的遺伝子を調節していることから、更に詳細な解析を進めることで、PTBP1 の発がんにおける機能が明らかになるとともに、発がん過程のどの段階で獲得される形質が明らかになると考えられる。一方で、膵がん研究が進行しづらい理由として、臨床試料の獲得が困難であるということを改めて痛感した。全がん種の中で予後不良な位置づけであるため、研究の遂行は必須のがん種である。腫瘍検体のみならず、他の生体試料を研究に利用する計画を立案することが必要である。また、膵がん発症モデルなどの作製も積極的に進め、病態の解析、新規バイオマーカーの同定、新規抗がん治療の開発が望ましいと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

1: 島卓史、谷口高平、朝隈光弘、内山和久
新規がん遺伝子 PTBP1 普遍性の検討
第 5 2 回 制癌剤適応研究会
2019 年

〔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) 研究分担者

研究分担者氏名：赤尾 幸博

ローマ字氏名：AKAO, yukihito

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：大学院連合創薬医療情報研究科

職名：特任教授

研究者番号 (8 桁)：00222505

研究分担者氏名：廣川 文鋭

ローマ字氏名：HIROKAWA, fumitoshi

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20322373

研究分担者氏名：内山 和久

ローマ字氏名：UCHIYAMA, kazuhisa

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：80232867

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。