

## 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：2016～2016

課題番号：16K14621

研究課題名（和文）Pkm1による好気代謝の亢進が、がんを促進する分子機構

研究課題名（英文）Active glucose metabolism and tumor promotion mediated by Pkm1

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：Pkm1による好気代謝の亢進が、がんを促進する分子機構の解明にとりくんだ。Pkm1が、グルコース代謝全般を活性化することが判明した。重要なことに、グルコースからペントースリン酸経路へのフラックスは、Pkm1細胞でも減弱していなかった。形質転換肺上皮細胞やマウス胎児繊維芽細胞の解析から、Pkm1発現細胞では、ミトコンドリアの品質が高く保たれており、活性酸素の産生が抑制されていることが分かった。ATG7ノックアウト実験により、Pkm1発現細胞の腫瘍促進に、ATG7が非常に重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we explored how Pkm1 promotes tumor growth/survival. We found that the mode of Pkm1's action is tumor cell-intrinsic. Pkm1-expressing cells combine active TCA cycle and lower ROS levels in mitochondria through mitophagy. Importantly, this metabolic rewiring by Pkm1 impedes neither pentose phosphate pathway nor purine synthesis. Our results unveil tumor-promoting function of Pkm1.

研究分野：腫瘍学

キーワード：Pkm グルコース代謝 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

がんではグルコース代謝が大幅に亢進している。大量に取り込まれたグルコースは、ミトコンドリアでの ATP 産生よりも、核酸や NADPH の合成に動員されるとされる(ワールブルグ効果)。しかし、そのような代謝現象の意義については、不明の点も多い。

2. 研究の目的

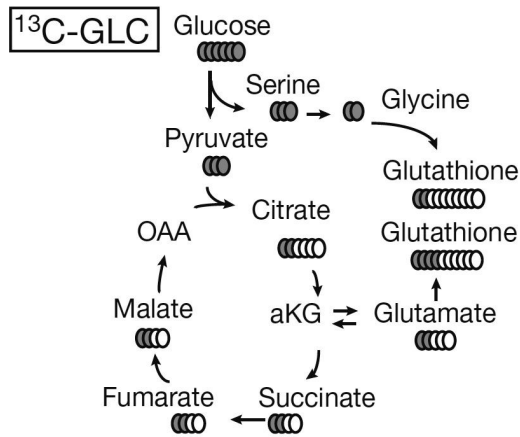
独自の遺伝子改変マウスを用いた解析から、最近、我々は、アンチワールブルグ型の解糖系酵素 Pkm1 が、マウスにおいてがんを促進することを見出だしていた。本研究では、Pkm1 が、がんを促進する分子機構の解明にとりくんだ。

3. 研究の方法

遺伝子ターゲティングにより、Pkm のアイソザイム変換を不能化したマウス(Pkm1/2 ノックイン(KI)マウス)から肺上皮細胞や胎児線維芽細胞を単離し、培養系にて形質転換した。これら細胞を用いて、下記の解析をおこなった。

(1) 形質転換したマウス胎児線維芽細胞および肺上皮細胞をヌードマウスに皮下移植し、造腫瘍能を比較した。

(2) Pkm スイッチによるグルコース代謝への影響をあきらかにするため、細胞をグルコース安定同位体で標識し、質量分析(CE-MS法)によって代謝物の定量などを行った。



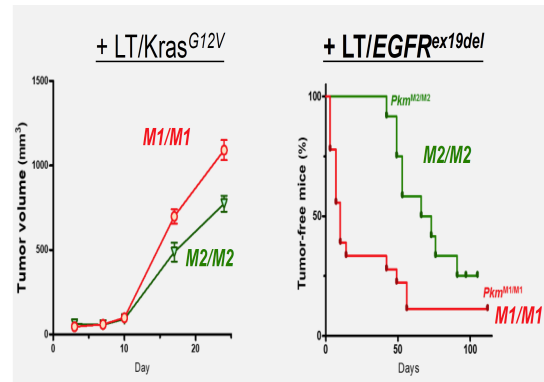
(3) Pkm スイッチによる NAD サルベージ経路への影響をあきらかにするため、15N アミド体ニコチンアミドを合成した。細胞を 15N-ニコチンアミドで標識し、質量分析(CE-MS法)によって代謝物の定量などを行った。

(4) Pkm ノックイン細胞におけるミトコンドリアの性状について、各種蛍光プローブを用いて解析した。オートファジーフラックスについては、LC3-II の定量化や、蛍光タンパクを用いたオートファジープローブによって評価した。細胞株における Atg7 のノックアウトは、Crispr/Cas9 によるゲノム編集に

より、おこなった。Pkm1 がオートファジーを活性化する機序について、各種阻害剤や、経路構成因子に対する RNAi によって解析した。

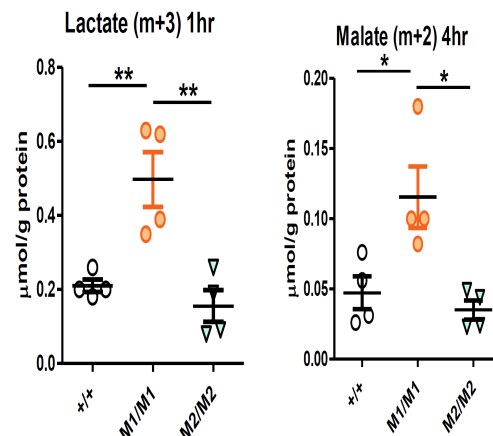
4. 研究成果

(1) マトリゲル三次元培養によってマウス肺上皮細胞を単離し、SV40 T 抗原とともに活性化型 Kras、および活性化型 EGFR を遺伝子導入して形質転換した。これら細胞をヌードマウスに皮下移植し、細胞の造腫瘍能を比較した。Kras および EGFR いずれの場合においても、Pkm1 発現細胞の方が、Pkm2 発現細胞よりも、高い腫瘍原性を示した。マウス胎児線維芽細胞を用いた場合にも、同様の結果が得られた。



これらの結果から、マウス個体レベルの発がん実験でみられた Pkm1 によるがん促進は、基本的に、腫瘍細胞自律的な機序によることが明らかになった。

(2) 安定同位体グルコーストレーサー([13C-U]-glucose)を用いた解析から、Pkm1 が、ミトコンドリアにおけるグルコース好気代謝を促進することが明らかになった。のみならず、Pkm1 によって、グルコース->乳酸のフラックスも上昇することが分かった。このとき、重要なことに、グルコースからペントスリン酸経路へのフラックスは減弱していなかった。すなわち、Pkm1 は、グルコース代謝全般を活性化することが判明した。



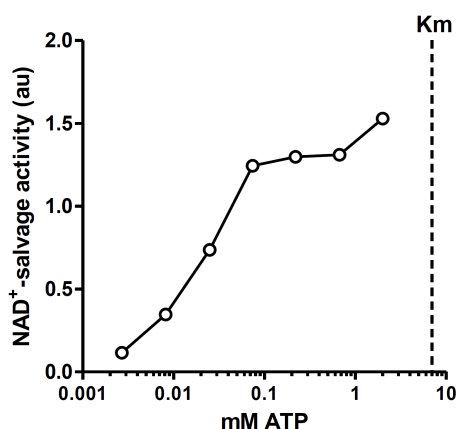
その他メタボローム解析などから、Pkm1 によるグルコース代謝活性化は、細胞内 ATP レベルの上昇、さらに、グルタチオン合成や NAD サルベージ経路の亢進につながることを示唆された。

### PPP/核酸合成

	Pkm <sup>WT/WT</sup>		Pkm <sup>M1/M1</sup>		
<b>0.5 hr</b>	-0.27	-0.27	0.53	-0.15	Ru5P <i>m</i> +5
	-0.15	-0.15	0.42	-0.46	S7P <i>m</i> +7
	-1.25	-1.02	1.14	-0.18	IMP <i>m</i> +5
	-0.97	-0.51	0.71	0.21	AMP <i>m</i> +5
	-1.07	-0.58	0.70	0.31	GMP <i>m</i> +5
	-0.85	-0.67	0.67	0.30	ATP <i>m</i> +5
<b>1 hr</b>	-0.77	0.16	-0.53	0.41	Ru5P <i>m</i> +5
	-0.16	-0.16	-0.16	0.33	S7P <i>m</i> +7
	-1.01	-0.71	0.84	0.14	IMP <i>m</i> +5
	-0.72	-0.12	0.14	0.46	AMP <i>m</i> +5
	-0.86	0.02	-0.02	0.54	GMP <i>m</i> +5
	-0.66	-0.15	0.36	0.25	ATP <i>m</i> +5
<b>3 hr</b>	-0.43	-0.49	0.33	0.37	Ru5P <i>m</i> +5
	-0.30	-0.38	0.28	0.26	S7P <i>m</i> +7
	-0.79	-1.01	0.52	0.57	IMP <i>m</i> +5
	-0.63	-0.63	0.37	0.51	AMP <i>m</i> +5
	-0.86	-0.55	0.48	0.45	GMP <i>m</i> +5
	-0.16	-0.16	0.03	0.19	ATP <i>m</i> +5

(3) 安定同位体ニコチンアミドトレーサーを用いた解析系を開発し、この方法を用いて、Pkm1 が、実際に NAD サルベージのフラックスを上昇させることを実証できた。試験管内での酵素学的な解析から、ATP レベルと NAD サルベージ経路の活性相関を得た。

### In vitro Nampt/Nmnat assay

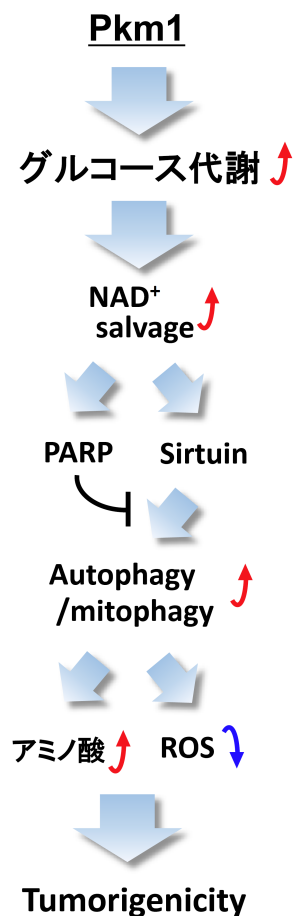


(4) 上記の代謝形質に加え、形質転換肺上皮細胞やマウス胎児繊維芽細胞の解析から、Pkm1 発現細胞では、ミトコンドリアの品質が高く保たれており、活性酸素の産生が抑制されていることが分かった。

さらに、Pkm1 発現細胞では、必須アミノ酸を中心に、細胞内の遊離アミノ酸レベルが高く保たれている傾向がみとめられた。これらの結果から Pkm1 によってオートファジーが促進されていると予測されたため、ゲノム編集によって ATG7 をノックアウトし、検証をすすめた。ノックアウト細胞の移植実験で、Pkm1 発現細胞の腫瘍促進に、ATG7 が非常に重要であることを示唆する結果が得られた。

Pkm1 細胞における高い NAD プールが、オートファジーの活性化を引き起こしている可能性を検討した。各種阻害剤や RNAi を用いた解析から、NAD 依存的なタンパク質脱アセチル化酵素 Sirtuin ファミリーが、Pkm1 誘導性のオートファジー誘導に関わることが死させた。

以上より、Pkm1 によるグルコース代謝の亢進が、NAD サルベージを介して autophagy/mitophagy を活性化し、腫瘍細胞の代謝メリットとなっていることが示唆された。



### 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 2 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. 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 11 件)

1. 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)

2. 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 A PKM switch in precursors dictates mode of tumor cell glucose metabolism、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 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. 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、Targeting metabolism of small cell lung cancer (SCL)、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)

4. 田中遼太、渡邊利雄、山下洋二、三浦康、佐藤郁郎、島礼、田沼延公、PKM ノックアウトマウスは胎生致死となる、第 75 回日本癌学会学術総会、2016.10.6-8 (神奈川県・横浜市)

5. 佐藤卓、坂本良美、野村美有樹、井上維、盛田麻美、田中遼太、渡邊利雄、佐藤郁郎、島礼、岡田克典、田沼延公 Functional analysis of the pyruvate kinase M (Pkm) isoforms by transformation experiments of mouse lungs epithelia cells 第 75 回日本癌学会学術総会 2016.10.6-8 (神奈川県・横浜市)

6. 盛田麻美、野村美有樹、坂本良美、佐藤郁郎、島礼、前門戸任、田沼延公、小細胞肺癌における Pkm1 の役割、第 75 回日本癌学会学術総会、2016.10.6-8 (神奈川県・横浜市)

7. 佐藤卓、坂本良美、野村美有樹、井上維、盛田麻美、田中遼太、渡邊利雄、佐藤郁郎、島礼、岡田克典、田沼延公、遺伝子改変肺上皮細胞を用いた形質転換実験による、代謝酵素 Pkm の機能解析、第 89 回日本生化学会大会、2016.9.25-27 (宮城県・仙台市)

8. 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 (仙台)

9. 田中遼太、小河穂波、井上維、山下洋二、三浦康、河合賢郎、佐藤郁郎、渡邊利雄、島礼、田沼延公、Pyruvate kinase M の両 isoform を欠損するマウスの解析、第 89 回日本生化学会大会、2016.9.25-27 (仙台)

10. 田沼延公、がんの好気代謝依存と、それを標的とする新規治療の模索、第 4 回がん代謝研究会 in 鹿児島、2016.7.7 (鹿児島)

11. 田沼延公、がんのワールブルグ効果とレドックス制御、第 13 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム、2017.3.16(奈良)

〔図書〕(計 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

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

##### (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

( )