

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16216

研究課題名（和文）乏血性環境下にある膵臓がんにおけるHNRNPMの影響

研究課題名（英文）The effects of HNRNPM in pancreatic cancer under the hypovascular environment

研究代表者

瀧野 純一（Takino, Junichi）

広島国際大学・薬学部・講師

研究者番号：00440529

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ヘテロ核リボ核酸タンパク質の1つであるheterogeneous nuclear ribonucleoprotein M（HNRNPM）は、遺伝子発現の調節に重要な役割を果たすスプライシング因子である。これまでにHNRNPMは他の臓器と比較して膵臓組織で高度に発現しているが、膵臓がん組織では発現が減少していることを見出している。さらに本研究において、低濃度グルコース条件下でのHNRNPMタンパク質発現のノックダウンは、グルコース代謝を変化させることにより、グルコース消費を抑制させ、細胞の生存を延長することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国における膵臓がん患者の生存率は、極めて低い。これは、膵臓がんの早期発見が困難であることに加え、他のがんとは異なり一般的に乏血性環境下（血流が乏しく酸素や栄養供給が少ない環境）でも生存可能なメカニズムを持つことに起因している。そのため、この乏血性環境耐性メカニズムに対する特効薬の開発が望まれているが、その獲得機構については未だ解明されていない。今回の研究成果は抗癌剤および早期診断マーカー開発に向けた基礎的研究であり、この研究が更に進展すれば膵臓がん患者のQOL向上に役立つ可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M（HNRNPM）is a splicing factor that plays an important role in the regulation of gene expression by processing heterogeneous nuclear RNAs into mature mRNAs. HNRNPM was highly expressed in pancreatic tissues but expression decreased in pancreatic ductal adenocarcinoma tissues. Furthermore in this study, we found that knockdown of HNRNPM protein expression under low-glucose conditions altered glucose metabolism and prolonged cell survival by suppressing glucose consumption.

研究分野：分子生物学

キーワード：膵臓がん HNRNPM MIA PaCa-2

### 1. 研究開始当初の背景

近年、国立がん研究センターの調査によって数万人規模の10年生存率が初めて示され、がん全体の10年生存率は58.2%であることが分かった。しかしながら部位別にみると、胃がんの5年生存率は70.9%、10年生存率も69.0%であるのに対し、膵臓がんの5年生存率は6.5%、10年生存率も4.9%と極めて低く、腫瘍の部位により大きく異なることが示された。膵臓がんの10年生存率が低い理由は、膵臓が様々な臓器に囲まれていることと、膵臓がん特有の症状が現れにくいことから早期発見が難しいことが第一の理由である。さらに、これらの難題に加え、この腫瘍は他の臓器の腫瘍と異なり一般的に乏血性(血流が乏しく酸素や栄養供給が少ない環境)であるため抗癌剤が届かず効きにくいこと、また、乏血状態でも生存可能なメカニズムを獲得していることも影響していると考えられている。これらの背景から、膵臓がんの生存率向上には、早期発見が可能なバイオマーカー開発だけでなく乏血状態でも生存可能なメカニズムに対する特效薬が必要とされているが、このメカニズムの獲得機構は未だ解明されていない。

### 2. 研究の目的

これまでに申請者は、ヘテロ核リボ核酸タンパク質の1つである heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (HNRNPM) が膵臓で高発現しているが、その癌組織で著しく減少していること、および癌組織の乏血性環境耐性に関与していることを示唆する結果を得ている。そこで、本研究課題は乏血性環境下にある膵臓がんにおける HNRNPM の影響を解明することで抗癌剤および早期診断マーカー開発に向けた基礎研究を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

ヒト膵臓がん細胞株である MIA PaCa-2 細胞は、10%FBS/DMEM (high glucose) で培養した。高濃度グルコース条件を除く実験は、培地を 10%FBS/DMEM (low glucose) に交換し、 $0.8 \times 10^5$  cells/mL の密度で各ディッシュおよびプレートに播種した後にいった。また、HNRNPM のノックダウンは HNRNPM を標的とする 2 種の siRNA を使用した。タンパク質発現はウエスタンブロットを用いて解析し、細胞増殖能は Cell Counting Kit-8 assay (代謝活性) CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (ATP 量) および細胞カウントを用いて評価した。さらに、培地中グルコースは Glucose kit Glucose C II Test Wako、培地中乳酸濃度は Glycolysis Cell-Based Assay Kit、およびグルコース取り込み能は Glucose Uptake-Glo Assay を用いて測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) HNRNPM ノックダウンは、低濃度グルコース条件下で MIA PaCa-2 細胞の細胞生存を延長する。

乏血性環境を模倣する低濃度グルコース条件下での膵臓がんに対する HNRNPM 発現の減少の影響を調べた。HNRNPM タンパク質レベルは、HNRNPM に対する siRNA の 24~60 時間処理によって明らかに減少した (図 1a-c)。

低濃度グルコース条件下において HNRNPM ノックダウン細胞の代謝活性は、対照細胞と比較して 48 時間および 60 時間後に有意に高かった (図 2a)。しかし、代謝活性の顕著な低下は、48 時間後の対照細胞、および 60 時間後の HNRNPM ノックダウン細胞でも観察された。また、HNRNPM ノックダウン細胞の ATP 量は、対照細胞と比較して 60 時間後に有意に増加した (図 2b)。さらに、HNRNPM ノックダウン細胞の細胞数は、対照細胞と比較して 60 時間後で有意に多かった (図 2c)。したがって、これらの結果は HNRNPM ノックダウンが低濃度グルコース条件下での細胞生存を大幅に改善することを示している。

さらに、低濃度グルコース条件下の対照細胞における代謝活性の低下は 36 時間後には観察されなかったが、42 時間後に観察された (図 3a)。一方で、高濃度グルコース条件下では HNRNPM ノックダウン細胞と対照細胞の代謝活性に有意な差はなく代謝活性低下も観察されなかった (図 3b)。

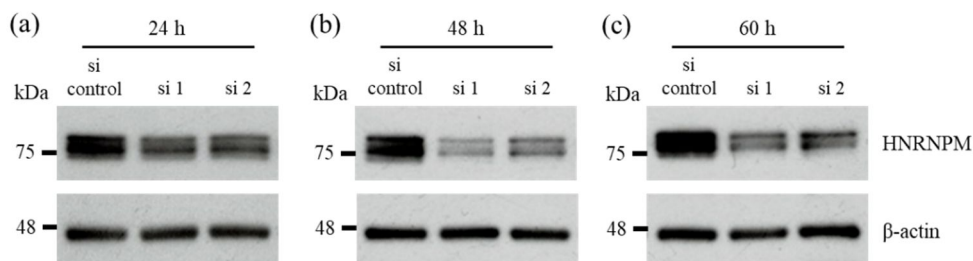


図 1. HNRNPM タンパク質発現のノックダウン  
(a) si 処理 24 h, (b) si 処理 48 h, (c) si 処理 60 h

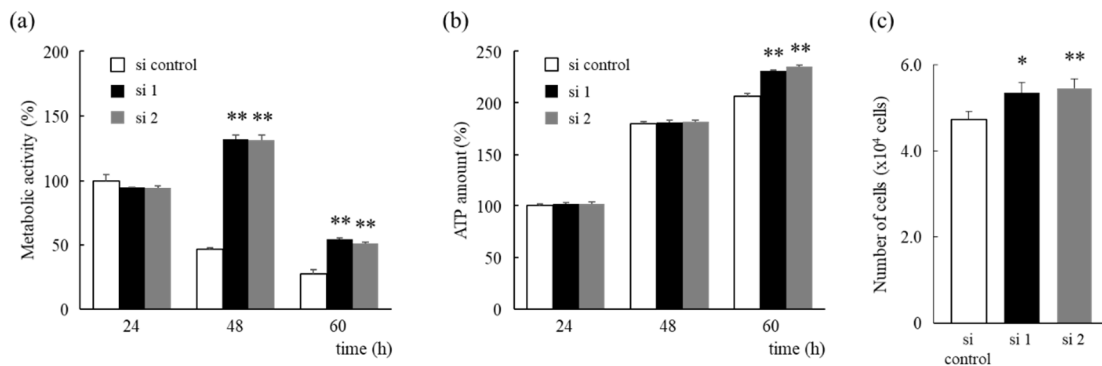


図 2. HNRNPM ノックダウンによる低濃度グルコース条件下での細胞生存延長  
 (a) 代謝活性, (b) ATP 量, (c) 細胞カウント(60 h)  
 Data are shown as mean  $\pm$  SD (n = 3); \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01 compared to each si control.

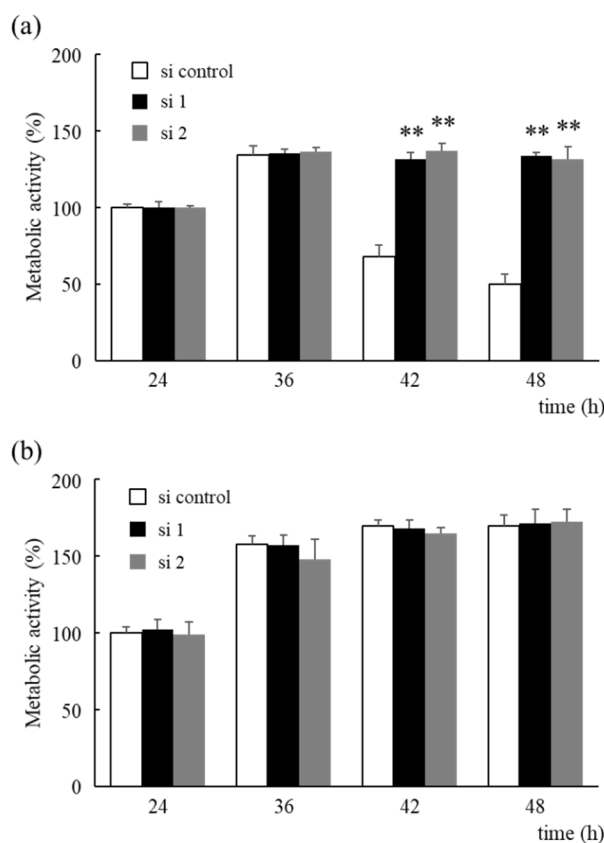


図 3. HNRNPM ノックダウンによる低濃度グルコース条件下での代謝活性変化  
 (a) 低濃度グルコース条件下, (b) 高濃度グルコース条件下  
 Data are shown as mean  $\pm$  SD (n = 3); \*\*, P < 0.01 compared to each si control.

(2) HNRNPM ノックダウンは、グルコース代謝を変化させることにより、MIAPaCa-2 細胞のグルコース消費を低減する。

培地中のグルコース濃度はすべての細胞で時間依存的に減少したが、HNRNPM ノックダウン細胞では対照細胞よりも有意に高く、24 時間後で既に有意な差が観察された(図 4a)。さらに、培地中の乳酸濃度もすべての細胞で増加したが、HNRNPM ノックダウン細胞では対照細胞よりも有意に低かった(図 4b)。グルコース取り込み能解析により、HNRNPM ノックダウン細胞が対照細胞と比較してグルコース取り込みを有意に抑制した(図 4c)。これらの結果は、HNRNPM 発現の低下が、低濃度グルコース条件下でのグルコース代謝を変化させることにより、グルコース消費を低下させ、細胞の生存を延長することを示している。

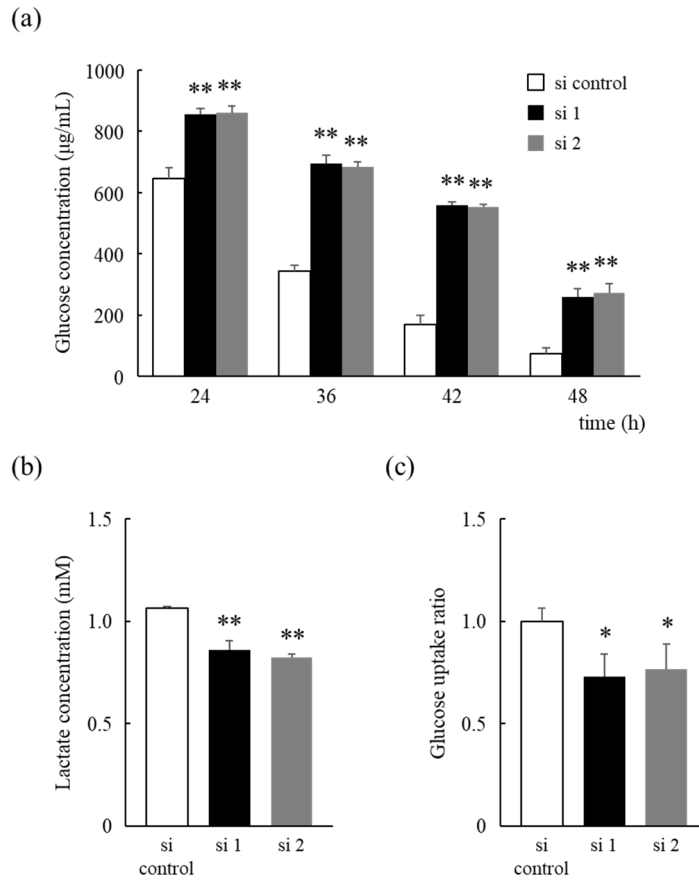


図 4. HNRNPM ノックダウン細胞におけるグルコース消費と乳酸産生の抑制  
 (a) 培地中グルコース濃度測定, (b) 培地中乳酸濃度測定(48 h), (c) グルコース取り込み能測定(48 h)

Data are shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ); \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  compared to each si control.

以上の結果から、膵臓がんにおいて HNRNPM の発現減少がグルコース代謝を変化させて効率的なエネルギー代謝を行うことにより乏血性環境での細胞生存を延長させることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takino Jun-ichi, Sato Takuma, Hiraishi Isamu, Nagamine Kentaro, Hori Takamitsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Alterations in Glucose Metabolism Due to Decreased Expression of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein M in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 57～57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology10010057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤拓真、瀧野純一、長嶺憲太郎、堀隆光
2. 発表標題 低濃度グルコース条件下にある膵臓がんにおけるHNRNPM発現減少の影響
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤拓真、瀧野純一、長嶺憲太郎、堀隆光
2. 発表標題 膵臓がん細胞におけるHNRNPM発現減少による細胞生存の延長
3. 学会等名 第59回 薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧野純一、佐藤拓真、長嶺憲太郎、堀隆光
2. 発表標題 膵臓癌におけるHNRNPM発現低下によるグルコース代謝の変化
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------