

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659621

研究課題名(和文) 大腸発がんにおいて、低酸素・低栄養環境とゲノム不安定性とが作る負のスパイラル

研究課題名(英文) Possible interdependence between Warburg effect and genomic instability during colorectal cancer development

研究代表者

椎葉 健一 (SHIIBA, KENITI)

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・特任研究員

研究者番号：90196345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：PKMスイッチを不能化し、ワールブルグ効果成立を阻害したマウス(ノックインマウス)を樹立した。これらノックインマウス腸において、実際にPKMスイッチを人為的に操作することに成功したことを確認した。上記ノックインマウスを、活性化型Krasを誘導発現できるマウスと交配し、PKM/Krasダブルノックインマウスを樹立した。

Ppp6cコンディショナルノックアウトマウスを樹立した。タモキシフェン投与によってPpp6c欠損を誘導できることを確認したのち、前述のノックインマウスとの交配を開始した。

研究成果の概要(英文)：Novel mouse models to dissect isoform-specific functions of pyruvate kinase M (PKM) were established. Successful manipulations of PKM-switch in vivo were confirmed in colon and other organs/tissues of these mice. The mice were crossed to KrasG12D-LSL strain which conditionally express active mutant of Kras, and Pkm:Kras double knock-in mice were established.

We also developed a novel mice strain on which Ppp6c gene is conditionally inactivated by treatment with 4-hydroxy tamoxifen. We began to cross the Ppp6c-mutant mice with aforementioned knock-in mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：低酸素 ワールブルグ効果 DNA修復 大腸がん

1. 研究開始当初の背景

本来、TCA 回路・電子伝達系優位であるはずの ATP 産生が、がんでは、好氣的条件下においても、解糖系優位へと異常に偏向している。この異常はワールブルグ効果と呼ばれ、FDG-PET 普及に見るように、現象として広く認知されている。数年前、米国グループによる細胞株を用いた実験で、ワールブルグ効果によって腫瘍細胞が低酸素に適応する事が明らかになり、その意義の一端が、初めて実証された。しかし、腫瘍細胞におけるこの代謝異常の本質は、「好氣的条件下でも」解糖系を主とする代謝スタイルを止めない」という点にある。申請者らの実験成績でも、好氣的代謝から嫌氣的代謝へのスイッチは、大腸多段階発がんプロセスの比較的早期に起こる事が示唆されており、細胞がん化への積極的関与を伺わせる。他グループからも、ワールブルグ効果と発がんとの関係を示唆する報告が続いている。いずれにしても、がんにおける解糖系亢進は、「低酸素環境への単なる受動的応答ではない」と広く考えられるようになってきた。一方で、細胞の栄養状態と、ゲノム不安定性との関連性が明らかになってきた。「低栄養環境」から「ゲノム不安定性・発がん性遺伝子変異」へ至る経路や、そのメカニズムが、解明されつつある。しかし、ワールブルグ効果とヌクレオチド代謝・ゲノム不安定性との関係を体系的に解析した研究は無い。

2. 研究の目的

大腸上皮の多段階発がんにおける、「低酸素・低栄養」といった特有の微小環境における代謝特性と、「ゲノム不安定性」との間の相互作用について検討することを目的に、研究をすすめた。

3. 研究の方法

(1) ワールブルグ効果不可能なマウスモデルとしては、解糖系最終反応を触媒し、がんの代謝で鍵を握ると目される酵素、ピルビン

酸キナーゼ M (PKM) の遺伝子改変モデルを採用した。マウス ES 細胞での遺伝子ターゲティングにより、PKM のアイソフォーム変換を不能化するような遺伝子変異を導入した。それら変異 ES 細胞から、定法によりマウスを作製した。

(2) ゲノム不安定性制御の異常マウスとしては、DNA 修復への関与が報告されているタンパク質脱リン酸化酵素、PP6 の欠損マウスを採用した。マウス ES 細胞での遺伝子ターゲティングを行い、それら変異 ES 細胞から、定法によりマウスを作製した。

4. 研究成果

(1) がんに特徴的な代謝異常である「ワールブルグ効果」との関連が深い、解糖系の律速酵素の一つ、ピルビン酸キナーゼ M (PKM) のアイソザイム変換を不可能とした遺伝子改変マウス (PKM1 ノックイン、および、PKM2 ノックインマウス) を樹立した。PKM1 ノックインマウスについては、BL6 系統への戻し交配をスピードコンジェニック法にて行い、5 世代の戻し交配によって、通常の解析にはほぼ問題ない程度までコンジェニック化が進んだ。ヘテロ PKM1-KI、および PKM2-KI マウス同士の交配により、ホモ PKM1-、および PKM2-KI マウスを得た。当初予想に反し、いずれのヘテロおよびホモ KI マウスも、ほぼ正常に出生し、発育し、雌雄ともに繁殖可能であった。変異マウスから組織を採取し、ウエスタンブロット法や免疫組織染色法にて、マウス個体レベルでの PKM スwitch の不能化を確認した。

そこでさらに、Cre リコンビナーゼの作用によって発がん性変異型 Kras (Kras^{G12D}) を誘導発現可能な ノックインマウス (Kras^{G12D} -LSL マウス) との交配を行い、PKM・Kras ダブルノックインマウスを樹立した。

(2) DNA 修復機構に関与する 6 型プロテインホスファターゼ (PPP6C) 遺伝子を誘導欠損する遺伝子改変を導入したマウスを作製した (Ppp6c-cKO マウス)。作製した Ppp6c-cKO マウス

を、タモキシフェン投与によって活性化誘導されるCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと交配し、PP6欠損を細胞特異的に、かつタモキシフェン誘導的にPpp6c欠損を誘導できるマウスを樹立した。

(3) 上記の PKM-KI マウスと、細胞特異的 PP6 誘導欠損マウスを交配し、多重変異マウスの作製を開始した。

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6件)

Sase T, Suzuki T, Miura K, Shiiba K, ほか14名、Runt-related transcription factor 2 in human colon carcinoma: A potent prognostic factor associated with estrogen receptor. *Int J Cancer*. 2012、131巻:2284-93.

Sato R, Suzuki T, Katayose Y, Miura K, Shiiba K, ほか7名: Aromatase in colon carcinoma. *Anticancer Res*. 2012年; 32巻:3069-75.

Nomura M, Shiiba K, ほか13名、Tanuma N, Shima H、Novel function of MKP-5/DUSP10, a phosphatase for stress-activated kinases, on ERK dependent gene expression, and up-regulation of its gene expression in colon carcinomas *Oncol Rep*. 2012、28巻、931-6

菊川利奈、佐藤正幸、山並秀章、藤谷恒明、伊藤しげみ、佐藤郁郎、椎葉健一：退形性膵管癌（紡錘細胞型）の1例。 *日本臨床外科学会誌* 2012年、73巻：442 - 447

Notsuda H, Sakurada A, Endo C, Okada Y, Horii A, Shima H, Kondo T.、p190A RhoGAP is involved in EGFR pathways and promotes proliferation, invasion and migration in lung adenocarcinoma cells.

Int J Oncol. 2013、43巻、1569-77

Shingo Nakahata 他17名、Hiroshi Shima, Masafumi Taniwaki, Ryoji Yamaguchi, and Kazuhiro Morishita, Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers, *Nature Communications*, 査読有、5巻、2014、3393

[学会発表](計11件)

松本祥子、坂本良美、野村美有樹、田中遼大、盛田麻美、伊藤しげみ、椎葉健一、野村栄樹、片倉隆一、山下洋二、佐藤郁郎、渡邊利雄、島礼、田沼延公、Generation of knock-in mice to dissect isoform-specific roles for each splicing isoform of pyruvate_kinase M in vivo、**第36回分子生物学会**、2013年12月05日、神戸

坂本良美、渡邊利雄、野村美有樹、山下洋二、椎葉健一、佐藤郁郎、佐藤雅美、島礼、田沼延公、ノックインモデルを用いた、ピルビン酸キナーゼM(PKM)アイソフォームの機能解析、**第72回日本癌学会学術集会**、2013年10月05日、横浜

坂本良美、松本祥子、渡邊利雄、近藤玄、野村美有樹、野村栄樹、椎葉健一、島礼、田沼延公、PKMアイソフォームに関する生理的、および病態生理的機能解析、**第86回日本生化学会大会**、2013年09月11日、横浜

田沼延公、がんの代謝とピルビン酸キナーゼM-ノックインモデルを用いた解析、**第15回がん・エピゲノム研究会**、2013年04月03日、仙台

田沼延公、がんの代謝とピルビン酸キナーゼMによる制御機構、**第6回Symphony**、2013年09月22日、東京

Tanuma N、Functions of pyruvate kinase M(PKM)isoforms in tumor development、**第72回日本癌学会学術集会 Symposia"Cancer Cell Metabolism"**、2013年10月5日、横浜

Shiroki T, Tanuma N, Sato I, Tanaka N, Sugamura K, Satoh K, Pyruvate kinase type M2 (PKM2) is involved in human gastric cancer development. **第 72 回日本癌学会学術集会**、2013 年 10 月 05 日、横浜

田沼延公、ピルビン酸キナーゼ M と、がんの代謝、**第 1 回 がん代謝研究会**、2013 年 10 月 30 日、鶴岡

Tanuma N, Roles for pyruvate kinase M (PKM) isoforms in tumor metabolism、**第 36 回 日本分子生物学会**、2013 年 12 月 05 日、神戸

横山美沙、渋谷利恵、白木健悠、田沼延公、玉井恵一、山口壹範、田中伸幸、菅村和夫、佐藤賢一、The pyruvate kinase type M2 (PKM2) expression is enhanced and induces cellular proliferation in human pancreatic cancer cells、**第 36 回 日本分子生物学会**、2013 年 12 月 05 日、神戸

坂本良美、野村美有樹、松本祥子、盛田麻美、田中遼太、島礼、渡邊利雄、田沼延公、発がんに伴う、Pyruvate Kinase M のアイソザイム変換-代謝再プログラム化における意義解明のための新規マウスモデル、**第 6 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会**、2014 年 2 月 20 日、津

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

椎葉 健一 (SHIIBA, Keniti)
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・特任研究員
研究者番号：90196345

(2) 研究分担者

島 礼 (SHIMA, Hiroshi)
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・部長
研究者番号：10196462

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：