

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670627

研究課題名(和文) グリオーマ発生における代謝再プログラム化に関わるスプライシング異常

研究課題名(英文) Roles for pyruvate kinase M in metabolic rewiring during gliomagenesis

研究代表者

片倉 隆一 (KATAKURA, RYUICHI)

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：10442675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスでの遺伝子改変を行い、片方のPkmアイソフォームのみを発現するマウスを作製した。グリオーマ、およびその起源細胞と考えられる細胞における、PKM1/2のスプライシング制御を明らかにした。PKMの酵素活性を抑制または上昇させる化合物について、化合物ライブラリーから一次スクリーニングで約20種の化合物を同定した。これらヒット化合物の作用機序を検討したところ、Pkmを直接標的とするのではなく、細胞内シグナル伝達や代謝物レベルの変動を介して、間接的にPKM活性を変動させていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Two isoforms of pyruvate kinase M (Pkm), Pkm1 and Pkm2, differentially control flux of carbon sources from glycolysis to TCA cycle. We developed novel mice in which splicing regulation of Pkm1/2 is disabled. Also, we identified about 20 compounds that inhibit Pkm activity of cells. Further analysis showed that these compounds indirectly regulate pyruvate kinase through modulation of signal transduction and/or cellular metabolism.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：代謝 解糖系 ワールブルグ効果 PKM グリオーマ

1. 研究開始当初の背景

がんでは好气的環境下においても嫌气的解糖系の異常亢進がみられる。「ワールブルグ効果」と呼ばれるこの代謝異常はグリオーマにおいても顕著で、近年、新たな治療標的としても期待されているが、グリオーマや正常脳発生における意義は、よく分かっていない。

2. 研究の目的

グリオーマにおける解糖系異常亢進(ワールブルグ効果)に密接に関与する、解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ M (PKM) の酵素型変換 (PKM スイッチ) と、その原因たるスプライシング異常を採り上げ、グリオーマの新規診断・治療標的として開発することを目的として、研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

マウスでの遺伝子改変によって、片方の Pkm アイソフォームのみを発現するマウスを作製し、解析を行った。

HeLa 細胞を化合物ライブラリーにて処理し、細胞抽出液を得、それらについて、FBP (Pkm2 のアロステリック活性化代謝物) 存在下、および非存在下にて、pyruvate kinase 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 前年度までに樹立した PKM1-、および PKM2- ノックインマウスの解析を行い、成体マウス神経幹細胞における PKM スイッチ不能化を確認した。通常、側脳室脳室下帯領域 (SVZ) における神経幹細胞や神経前駆細胞、および上皮細胞では、PKM2 を発現している。PKM1- ノックインにより、上記の Pkm2 発現を排し、代わりに Pkm1 を発現するよう施したが、顕著な異常は観察されなかった。従って、Pkm2 の発現は、神経幹細胞の維持や上皮細胞の発生には必須ではないことが分かった。一

方、Pkm2 ノックインマウスの脳でも、これまでのところ神経・グリア細胞分化異常等はみとめられていない。今後、さらなる詳細な解析を行い、ノックインの影響を精査する必要があると思われる。

(2) PKM の酵素活性を抑制または上昇させる化合物について、化合物ライブラリーから一次スクリーニングで同定した、約 20 種の化合物について、それらの作用機序を検討した。PKM 精製標品を用いた、試験管内での PK アッセイを行ったところ、上記化合物は全て、PKM の酵素活性には影響を及ぼさなかった。従って、上記化合物は、細胞内シグナル伝達や代謝物レベルの変動を介して、間接的に PKM 活性を変動させ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 4 件)

1. Hayashi K, Momoi Y, Tanuma N, ほか 18 名. Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA. ***Oncogene* 2015 in press** 査読有
2. Hamabe A, Konno M, Tanuma N, ほか 11 名. The role of Pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation and epithelial-mesenchymal transition. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014 (111)15526-31** 査読有
3. Kato H, Kurosawa K, Inoue Y, Tanuma N, ほか 17 名. Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis. ***Cancer Lett.* in press** 査読有
4. Konno M, Ishii H, Koseki J, Tanuma N, ほか 13 名. Pyruvate kinase M2, but not M1, allele maintains immature metabolic states of murine embryonic stem cells. ***Regenerative Therapy* 1, 63-71, 2015** 査読有

[学会発表](計 27 件)

1. 田沼延公: PKM スイッチ不可能なマウスモデル. 日本癌学会 がん代謝シンポジ

- ウム 2013。 2013.1.17-18 (東京)
2. Nobuhiro Tanuma : 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" 2013.10.3-5 (横浜)
 3. Nobuhiro Tanuma : Roles for pyruvate kinase M (PKM) isoforms in tumor metabolism. 第 36 回 日本分子生物学会 2013.12.3-6 (神戸)
 4. 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 2013.10.30-11.1 (鶴岡)
 5. 山下洋二、春日井勲、田沼延公、柴原一陽、園田順彦、金森政之、齋藤竜太、隅部俊宏、富永悌二、島礼、片倉隆二 : 悪性グリオーマ検体およびグリオーマ樹立株における PTPzeta の解析。脳神経外科学会 2012.10.17 19 (大阪)
 6. 松本祥子、岸本綾子、国下侑里、近藤玄、野村美有樹、渡邊利雄、島礼、田沼延公 : ワールブルグ効果に関する in vivo 解析のためのマウスモデル開発。第 35 回日本分子生物学会 2012.12.11 14(福岡)
 7. 松田俊、足立淳、井原賢、田沼延公、島礼、井倉正枝、井倉毅、松田知成 : ピルビン酸キナーゼ M2 はダイオキシン受容体の活性化補助因子である。第 35 回日本分子生物学会 2012.12.11 14(福岡)
 8. 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 2013.9.11-13(横浜)
 9. Takeharu Shiroki, Nobuhiro Tanuma, Ikuro Sato, Nobuyuki Tanaka, Kazuo Sugamura, Kennichi Satoh : Pyruvate kinase type M2(PKM2)is involved in human gastric cancer development. 第 72 回日本癌学会学術集会 2013.10.3-5(横浜)
 10. 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 2013.10.3- 5(横浜)
 11. 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 2014.2.20-21(三重)
 12. 林克剛、田沼延公、加藤浩之、桃井勇貴、渡邊利雄、島礼 : PPP6c 遺伝子欠損による皮膚腫瘍形成の亢進、第 6 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2014.2.20-21(三重)
 13. 小河穂波、岸本綾子、住吉麻美、早川夏姫、鈴木麻衣、田沼延公、島礼、渡邊利雄 : 癌と関連する Ppp6c 遺伝子を欠損するマウスの作製と解析。第 6 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2014.2.20-21(三重)
 14. Yoji Yamashita, Nobuhiro Tanuma, Ichiro Shibahara, Yukihiko Sonoda, Masayuki Kanamori, Ryuta Saito, Toshihiro Kumabe, Teiji Tominaga, Hiroshi Shima, Ryuichi Katakura : Ptpnz gene encoding a transmembrane-type protein phosphatase is up-regulated by Sox-2 in glioma. AACR ANNUAL MEETING 2013, Washington DC., 2013.4.6-10
 15. 林克剛、小河穂波、岸本綾子、加藤浩之、田沼延公、渡邊利雄、島礼 : Ppp6c 遺伝子欠損は、マウス皮膚腫瘍形成を促進する。第 80 回日本化学会東北支部会 2014.5.10 (秋田)
 16. 白木健悠、横山美沙、田沼延公、玉井恵一、山口壹範、佐藤郁郎、田中信幸、菅村和夫、佐藤賢一 : ピルビン酸キナーゼ M2(PKM2)は正常胃粘膜で有意に発現しており、その発現増強が胃癌の進展に関与している。第 73 回 日本癌学会学術総会、2014. 9.25-27(横浜)
 17. 浜部敦史、今野雅允、山本浩文、水島恒和、竹政伊知朗、田沼延公、島礼、西田尚弘、川本弘一、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始 : 上皮間葉移行におけるピルビン酸キナーゼ M2 の遺伝子発現制御機能、第 73 回 日本癌学会学術総会、2014. 9.25-27(横浜)
 18. 野村美有樹、坂本良美、佐藤郁郎、三浦康、椎葉健一、山下洋二、島礼、田沼延公 : 発生や細胞分化・細胞老化に伴う、ピルビン酸キナーゼ M アイソフォームの発現制御、第 73 回 日本癌学会学術総会、2014. 9.25-27(横浜)

19. 今野雅允、田沼延公、西田尚弘、川本弘一、小関準、後藤典子、島礼、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始：マイクロRNA369はピルビン酸キナーゼのスプライシングを制御する。第73回 日本癌学会学術総会、2014.9.25-27(横浜)
20. 加藤浩之、田沼延公、三浦康、角川陽一郎、椎葉健一、山下洋二、林克剛、野村美有樹、佐藤郁郎、伊藤しげみ、渡邊利雄、島礼：皮膚 Ppp6c 欠損マウスは、UVB誘導皮膚扁平上皮発がんを高感受性となる。第73回 日本癌学会学術総会、2014.9.25-27(横浜)
21. 坂本良美、野村美有樹、佐藤郁郎、三浦康、椎葉健一、山下洋二、渡邊利雄、島礼、田沼延公：単一のピルビン酸キナーゼ M アイソフォームを発現するマウスの解析。第73回 日本癌学会学術総会、2014.9.25-27(横浜)
22. Nomura M, Sakamoto Y, Ito S, Katakura R, Shiiba K, Matsumoto S, Watanabe T, Shima H, Tanuma N. Regulation of isoform-expression of pyruvate kinase M (PKM) during cellular differentiation and senescence. 第37回 日本分子生物学会年会、2014.11.26(横浜)
23. 坂本良美、野村美有樹、佐藤郁郎、三浦康、椎葉健一、山下洋二、渡邊利雄、島礼、田沼延公. Characterization of mice expressing a single isoform of pyruvate kinase M. 第73回 日本癌学会学術総会、2014.9.26(横浜)
24. 坂本良美、ほか3名、単一のピルビン酸キナーゼ M アイソフォームを発現するマウスの解析、第2回 がん代謝研究会 2014.07.11、東京
25. Miyuki Nomura, Yoshimi Sakamoto, Ryota Tanaka, Mami Morita, Taku Sato, Tshio Watanabe, Hiroshi Shima, Nobuhiro Tanuma : Roles for pyruvate kinase M in metabolic rewiring during cellular sense. 11th ICPP 2014.11.12-14, Sendai
26. Yoshimi Sakamoto, Miyuki Nomura, Shoko Matsumoto, Yui Inoue, Toshio Watanabe, Hiroshi Shima, Nobuhiro Tanuma: Novel mouse models to dissect isoform-specific functions of pyruvate kinase M. 11th ICPP 2014.11.12-14, Sendai
27. Takeharu Shiroki, Misa Yokoyama, Nobuhiro Tanuma, Keiichi Tamai,

Kazunori Yamaguchi, Ikuro Sato, Hiroshi Shima, Nobuyuki Tanaka, Kazuo Sugamura, Kennichi Satoh: PKM2 is dominantly expressed in normal gastric mucosa and its overexpression is involved in gastric cancer development. 11th ICPP 2014.11.12-14, Sendai

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

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

片倉 隆一 (KATAKURA RYUICHI)

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：10442675

(2)研究分担者

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

(3)研究分担者

伊藤 しげみ (ITO SHIGEMI)

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：80600006