

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 7 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462077

研究課題名(和文)ピルビン酸キナーゼの発現型の変化を利用した膵臓癌治療法の開発

研究課題名(英文)Identification of PKM as a target for pancreatic cancer therapy

研究代表者

山本 久仁治 (Yamamoto, Kuniharu)

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)・がん幹細胞研究部・特任研究員

研究者番号：00375073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、PKM2の膵癌化・進展への関与を検証し、PKMの発現型の変化が膵癌発生を阻止できるか、PKM2あるいはその標的分子が膵癌進展に対する治療標的となるかを確認することである。膵癌手術検体を用いた解析及び膵癌細胞株を用いた解析の結果、PKM2の発現はWarburg効果を促進し膵癌細胞の増殖に關与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to evaluate the role of PKM2 in the development of pancreatic cancer. We will identify PKM2 as a good target for anti-pancreatic cancer therapy. We analyzed the molecular mechanisms of PKM2 using pancreatic cancer tissue and pancreatic cancer cell lines. As a result, we demonstrated that PKM2 promotes pancreatic cancer cell growth through Warburg effect.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌

1. 研究開始当初の背景

本邦での膵癌の死亡者数は 28,000 人を超えており、癌関連死亡の第 5 位を占めている。また、2003 年～2005 年に診断された膵癌患者の 5 年相対生存率は 7% と報告されている。この生存率はあらゆる癌種の中で最も低く、20%を下回るのは膵癌のみである。1993～1996 年に診断された膵癌例の 5 年相対生存率は 6.5%であり、様々な診断法や新しい抗がん剤が開発されてきた 10 年の時を経ても、生存率に大きな改善はみられていない。一方、最新の膵癌全国調査によると Stage I-III の 3 年生存率が 40%以上であるのに対し Stage IVa は 16.5%、Stage IVb は 3.9%と極端な予後の短縮がみられ、早期発見が膵癌患者の生命予後向上のための最良の方策であることがわかる。しかし、Stage III 以前に発見される例が全体のわずか 20%以下であることはいかに膵癌の早期発見が困難で進行が急速なのかを示しており、膵癌患者の予後延長には新しい画期的な治療法の開発が急務である。

癌細胞では嫌気呼吸による解糖系が亢進しミトコンドリアにおける好気性呼吸が抑制されていることが Warburg 効果として知られている。これは、癌細胞を取り巻く微小環境における低酸素状態への適応のためと考えられていたが、活性酸素(ROS)の産生を抑制することにも関与していることが示唆されてきている。例えば、tumor initiating cell や cancer stem cell (CSC) と呼ばれる抗がん剤耐性や再発の起源となる細胞では、正常細胞や前駆細胞に比べ ROS の濃度が低く、ROS による細胞死誘導機構から逃避していることが明らかとなっている。この Warburg 効果に中心的な役割を果たしているのがピルビン酸キナーゼ type M2(PKM2)であることがわかってきた。PKM2 は PKM1 とともに PKM 遺伝子にコードされ、正常細胞では PKM1 が発現

しているが、癌細胞では選択的スプライシングにより PKM2 発現が顕著となっている。例えば、M2 が優位に発現している肺癌細胞で、M1 を強制発現させ、M2 の発現をロックダウンさせると、Warburg 効果維持の喪失と腫瘍形成能の低下が認められる (Nature 2008)。また、PKM2 は触媒酵素としての働き以外に、キナーゼ活性を持ち癌の増殖を促進させる機能があることもわかってきた。しかし、PKM2 の膵癌における代謝および癌化・進展に対する役割については未解明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PKM2 の膵癌化・進展への関与を検証し、PKM の発現型の変化が膵癌発生を阻止できるか、PKM2 あるいはその標的分子が膵癌進展に対する治療標的となるかを確認することである。

3. 研究の方法

PKM のスプライシングを標的にした膵癌の新しい治療法開発を最終目標に以下のことを行う。

膵癌化過程における PKM の発現型の変化を、ヒト手術検体と Pdx1-cre; K-ras^{G12D} マウスの前癌病変を用いて解析する；

PKM2 と膵癌特異的代謝への関連や癌進展への関与を担う標的分子をメタボローム解析および網羅的遺伝子解析にて検討する；

PKM1 および PKM2 ノックインマウスそれぞれと Pdx1-cre; K-ras^{G12D} を交配させ、PKM の発現型の膵癌化への影響を解析する；

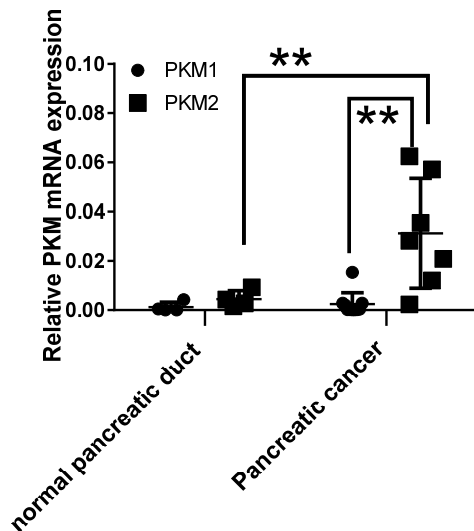
4. 研究成果

1) 膵癌手術検体を用いた PKM1 と PKM2 の発現

膵癌手術摘出検体 10 例の癌部と正常膵管をマイクロダイゼクションを用いて削りだし、RNA を抽出した。Real-time RT-PCR によって PKM1 と PKM2 の発現を比べた。その結果、PKM2 の発現は正常膵管、癌部

ともに PKM1 と比べ有意に高発現していた。また、PKM2 の発現値は癌部で正常膵管に比べ有意に高値を示した。

以上の結果を示した図を下に示す。



2) PKM2 の標的分子の同定
siRNA を導入して PKM2 の発現を抑制した膵癌細胞株とそのコントロールを用いて cDNA array にて網羅的遺伝子解析を行った。その結果、細胞周期関連遺伝子が PKM2 の下流に存在することが示唆された。また、同様にメタボローム解析を行うと、PKM2 の発現抑制によって乳酸の産生が抑制されるとともに、ポリアミンである spermine の産生が低下していた。以上より、PKM2 の発現は Warburg 効果を促進し膵癌細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。

3) PKM の発現型の膵癌化への影響
PKM1 ノックインマウスと Pdx1-cre; K-ras G12D を交配させ、PKM2 の発現がない状態で膵癌化を検討した。その結果、膵癌は形成された。現在、コントロールと詳細に比較して、PKM2 発現の有無が膵癌化に及ぼす影響を解析中である。

4) その他
膵癌において、PKM2 の発現が確認されたことから、他の消化器癌においても検討した

ところ、胃癌においても PKM2 は高発現していた。胃癌では PKM2 高発現例は静脈侵襲例が有意に多かった。PKM2 発現抑制胃癌細胞株は、コントロール細胞株と比べ、*in vitro* で細胞増殖能、遊走能、足場非依存性増殖能、sphere 形成能が低下し、*in vivo* において皮下腫瘍増殖と肝転移が抑制されていた。また、PKM2 ノックダウン胃癌細胞ではセリン依存性の細胞増殖亢進を認めなかった。さらに、CagA は Erk 経路を介して PKM2 の発現を誘導していた。

5. 主な発表文等
(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 1 件)
Shiroki T, Yokoyama M, Tanuma N, Maejima R, Tamai K, Yamaguchi K, Oikawa T, Noguchi T, Fujiya T, Shima H, Sato I, Murata-Kamiya N, Hatakeyama M, Iijima K, Shimosegawa T, Satoh K. The enhanced expression of PKM2 is involved in the gastric cancer development via regulating cancer specific metabolism. Cancer Sci 2017 Feb 24. [Epub ahead of print]

[学会発表](計 2 件)
1) 横山 美沙, 渋谷 莉恵, 坂本 良美, 田沼 延公, 望月 麻衣, 中村 真央, 玉井 恵一, 山口 壹範, 田中 伸幸, 菅村 和夫, 佐藤 賢一
ピルビン酸キナーゼ M2(PKM2)と膵癌細胞増殖第 47 回 日本膵臓学会大会 2016 年 8 月 4-7 日(仙台)
2) 横山 美沙, 渋谷 莉恵, 坂本 良美, 田沼 延公, 玉井 恵一, 田中 伸幸, 山口 壹範, 菅村 和夫, 佐藤 賢一
ピルビン酸キナーゼ M2(PKM2)と膵癌細胞増殖 第39回 日本分子生物学会年会 2016年 11月30日-12月2日 (横浜)

3)
[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：
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

山本 邦仁治 (KUNIHARU, Yamamoto)
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）・がん幹細胞
研究部・特任研究員

研究者番号：00375073

(2) 研究分担者

佐藤 賢一 (KENNICHI, Satoh)
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）・がん幹細胞
研究部・部長

研究者番号：10282055

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