

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670611

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 interplay between metabolism and genomic instability during epithelial oncogenesis

研究代表者

椎葉 健一 (SHIIBA, KENICHI)

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

研究成果の概要(和文)：上皮の発がん過程における、代謝異常とゲノム不安定性との間の相互作用について検証することを目的に研究を行った。ワールブルグ効果との関連が深い解糖系酵素、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から上皮細胞を単離した。3次元培養により継代・純化した上記細胞を、SV40 ラージT抗原・活性化型Kras・活性化型EGFR等にて形質転換した。薬剤選択を行い、それら細胞における上皮マーカー発現を確認したのち、免疫不全マウスに皮下移植をした。Pkmによる糖代謝の制御が、腫瘍原性に大きく影響することが明らかになった。

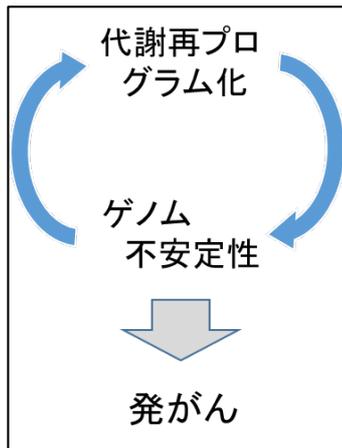
研究成果の概要(英文)：Possible interplay between metabolism and genomic instability during epithelial oncogenesis have been evaluated. We isolated and purified epithelial cells of Pkm gene-targeting mice, then transformed them by active mutants of Kras and EGFR. Transplantation experiments of these cells into nude mice revealed important roles for metabolic remodeling directed by Pkm.

研究分野：大腸外科学

キーワード：がん 代謝 ワールブルグ効果

1. 研究開始当初の背景

がんには、「低酸素・低栄養」といった特有の微小環境があり、それに適応した代謝特性をもっていると考えられている。その代謝特性が、がんの「ゲノム不安定性」を生じさせている可能性があり、検討することにした。

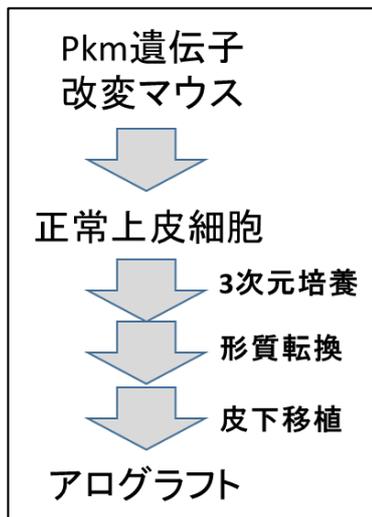


2. 研究の目的

上皮の多段階発がんにおける「代謝制御」と「ゲノム不安定性」との間の相互作用の有無を明らかにする。

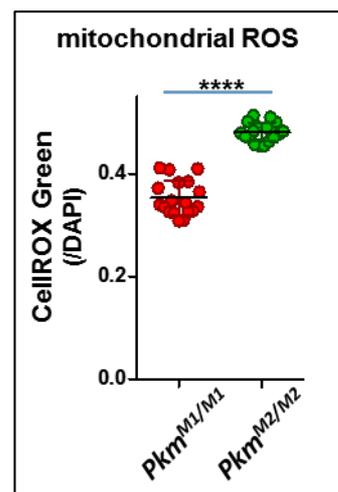
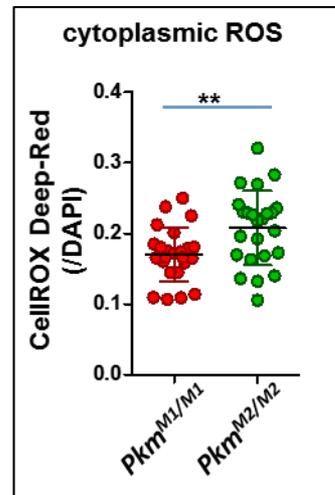
3. 研究の方法

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 ノックインマウス、およびPKM2 ノックインマウス)から上皮細胞を単離し、解析を行った。マトリゲル上での3次元培養により継代・純化した上記細胞に、SV40 ラージT抗原、活性化型 Kras (KrasG12D)、活性化型 EGFR (EGFRex19del) をコードする cDNA を、ウイルスベクターを用いて導入して形質転換した。薬剤選択を行い、それら細胞における上皮マーカー発現を確認したのち、免疫不全マウスに皮下移植をした。



4. 研究成果

Pkm による糖代謝の制御が、腫瘍の生着率や生着後の腫瘍増大速度に差をおよぼすことが明らかになった。興味深いことに、上記の Pkm の腫瘍原生への影響は、KrasG12D 形質転換上皮細胞よりも、EGFRex19del 形質転換上皮細胞において、強く表れた。DNA 損傷への影響を調べるため、形質転換した PKM ノックイン上皮細胞におけるリン酸化 H2AX のレベルを検討したが、これまでのところ、明確な違いはみとめられなかった。しかし、活性酸素レベルには違いがみられることから、今後、実験条件のさらなる最適化が重要と思われる。染色体モード等についても、今後検討する。



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12件)

- Yasufumi Matsuda, Koh Miura, Junko Yamane, Hiroshi Shima, Wataru Fujibuchi, Kazuyuki Ishida, Fumiyoshi Fujishima, Shinobu Ohnuma, Hiroyuki Sasaki, Munenori Nagao, Naoki Tanaka, Kennichi Satoh, Takeshi Naitoh,

- Michiaki Unno
SERPIN11 regulates epithelial - mesenchymal transition in an orthotopic implantation model of colorectal cancer.
Cancer Science, 2016
Doi: 10.1111/cas.12909
2. Honami Ogoh, Nobuhiro Tanuma, Yasuhisa Matsui, Natsuki Hayakawa, Ayaka Inagaki, Mami Sumiyoshi, Yuki Momoi, Ayako Kishimoto, Mai Suzuki, Nozomi Sasaki, Tsukasa Ohuchi, Miyuki Nomura, Yuriko Teruya, Keiko Yasuda, Toshio Watanabe and Hiroshi Shima
The protein phosphatase 6 catalytic subunit (Ppp6c) is indispensable for proper post-implantation embryogenesis.
Mechanisms of Development, 139, 1-9, 2016
Doi: 10.1016/j.mod.2016.02.001
 3. Shun Matsuda, Jun Adachi, Masaru Ihara, Nobuhiro Tanuma, Hiroshi Shima, Akira Kakizuka, Masae Ikura, Tsuyoshi Ikura, Tomonari Matsuda
Nuclear pyruvate kinase M2 complex serves as a transcriptional coactivator of arylhydrocarbon receptor.
Nucleic Acids Res, 44(2), 636-647, 2015
Doi: 10.1093/nar/gkv967
 4. Hiroyuki Kato, Koreyuki Kurosawa, Yui Inoue, Nobuhiro Tanuma, Yuki Momoi, Katsuhisa Hayashi, Honami Ogoh, Miyuki Nomura, Masato Sakayori, Yoichiro Kakugawa, Yoji Yamashita, Koh Miura, Makoto Maemondo, Ryuichi Katakura, Shigemi Ito, Masami Sato, Ikuro Sato, Natsuko Chiba, Toshio Watanabe, and Hiroshi Shima
Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis.
Cancer Letters, 365(2), 223-228, 2015
Doi: 10.1016/j.canlet.2015.05.022
 5. Mami Sumiyoshi, Narumi Masuda, Nobuhiro Tanuma, Honami Ogoh, Eri Imai, Mizuki Otsuka, Natsuki Hayakawa, Kinuyo Ohno, Yasuhisa Matsui, Kanae Hara, Risa Gotoh, Mai Suzuki, Shinya Rai, Hirokazu Tanaka, Itaru Matsumura, Hiroshi Shima, Toshio Watanabe
Mice doubly-deficient in the Arf GAPs SMAP1 and SMAP2 exhibit embryonic lethality.
FEBS Lett., 589(19 Pt B), 2754-62, 2015
Doi:10.1016/j.febslet.2015.07.050
 6. Masamitsu Konno, Jun Koseki, Koichi Kawamoto, Naohiro Nishida, Hidetoshi Matsui, Dyah L Dewi, Miyuki Ozaki, Yuko Noguchi, Koshi Mimori, Noriko Gotoh, Nobuhiro Tanuma, Hiroshi Shima, Yuichiro Doki, Masaki Mori, Hideshi Ishii
Embryonic microRNA-369 controls metabolic splicing factors and urges cellular reprogramming.
PLoS ONE, 10(7), e0132789, 2015
Doi: 10.1371/journal.pone.013278
 7. Katsuhisa Hayashi, Yuki Momoi, Nobuhiro Tanuma, Ayako Kishimoto, (8), Kayoko Fukamachi, Yoichiro Kakugawa, Yoji Yamashita, Shigemi Ito, Ikuro Sato, Akira Suzuki, Miki Nishio, Masami Suganuma, Toshio Watanabe and Hiroshi Shima
Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA.
Oncogene, 34(35), 4647-55
Doi: 10.1038/onc.2014.398.
 8. Koji Yamamoto, Kohta Takahashi, Kazunori Shiozaki, Kazunori Yamaguchi, Setsuko Moriya, Masahiro Hosono, Hiroshi Shima, Taeko Miyagi
Potentiation of Epidermal Growth Factor-Mediated Oncogenic Transformation by Sialidase NEU3 Leading to Src Activation.
PLoS ONE, 10(3), e0120578, 2015
Doi: 10.1371/journal.pone.0120578
 9. Kohta Takahashi, Masahiro Hosono, Ikuro Sato, Keiko Hata, Tadashi Wada, Kazunori Yamaguchi, Kazuo Nitta, Hiroshi Shima, Taeko Miyagi
Sialidase NEU3 contributes neoplastic potential on colon cancer cells as a key modulator of gangliosides by regulating Wnt signaling.
International Journal of Cancer, 137(7), 1560-157
Doi: 10.1002/ijc.29527
 10. Masamitsu Konno, Hideshi Ishii, Jun Koseki, Nobuhiro Tanuma, Naohiro Nishida, Koichi Kawamoto, Tatsunori Nishimura, Asuka Nakata, Hidetoshi

Matsui, Kozou Noguchi, Miyuki Ozaki, Yuko Noguchi, Hiroshi Shima, Noriko Gotoh, Hiroaki Nagano, Yuichiro Doki, Masaki Mori
Pyruvate kinase M2, but not M1, allele maintains immature metabolic states of murine embryonic stem cells.
Regenerative Therapy, 1, 63-71, 2015
Doi: 10.1016/j.reth.2015.01.001

11. 佐藤 正幸, 椎葉 健一, 三浦 康, 木内 誠, 長谷川 康弘, 山本 久仁治, 角川 陽一郎, 藤谷 恒明
成人前仙骨部 epidermoid cyst に発生した扁平上皮癌の 1 例
日本消化器外科学会雑誌, 48(2), 145-151, 2015
Doi: 10.5833/jjgs.2014.0088

12. Atsushi Hamabe, Masamitsu Konno, Nobuhiro Tanuma, Hiroshi Shima, Kenta Tsunekuni, Koichi Kawamoto, Naohiro Nishida, Jun Koseki, Koshi Mimori, Noriko Gotoh, Hirofumi Yamamoto, Yuichiro Doki, Masaki Mori, Hideshi Ishii
Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition
Proc Natl Acad Sci U S A, 111(43), 15526-31, 2014
Doi:10.1073/pnas.1407717111

〔学会発表〕(計 18 件)

Hiroshi Shima, Koreyuki Kurosawa, Honami Ogoh, Yui Inoue, Takahiro Goto, Nobuhiro Tanuma, Toshio Watanabe
Ppp6c deficiency predisposes mouse skin tissue to carcinogenesis initiated by DMBA and UV.
The 13th Korea-Japan Joint Symposium on Cancer and Ageing Research
2016 年 2 月 25-27 日, Jeju (Korea)

井上 維, 黒沢 是之, 小河 穂波, 加藤 浩之, 林 克剛, 野村 美有樹, 田沼 延公, 渡邊 利雄, 島 礼
プロテインホスファターゼ 6 型 (PP6) は、皮膚がん抑制遺伝子として働く
平成 27 年度 個体レベルでのがん研究 支援活動 ワークショップ
2016 年 2 月 3-4 日, 大津

小河穂波, 田沼延公, 早川夏姫, 住吉麻実, 鈴木麻衣, 井上唯, 野村美有樹, 島礼, 渡邊 利雄
脱リン酸化酵素 PP6 の触媒サブユニットの Ppp6c は着床後の胚の正常な発生に不可欠である。
第 7 回プロテインホスファターゼ研究

会学術集会
2016 年 1 月 29-30 日, 岡崎

黒沢是之, 桃井勇貴, 井上唯, 小河穂波, 後藤孝浩, 田沼延公, 渡邊利雄, 島礼
脱リン酸化酵素 PP6 は、皮膚がん抑制遺伝子である
第 7 回プロテインホスファターゼ研究会学術集会
2016 年 1 月 29-30 日, 岡崎

大塚瑞希, 住吉麻実, 増田成美, 早川夏姫, 小河穂波, 田沼延公, 島礼, 渡邊利雄
Arf GTPase 活性化因子 SMAP2 の欠損は EGF の取り込み後の輸送の異常を引き起こすのか
BMB2015 (第 3 8 回日本分子生物学会年会 第 8 8 回日本生化学会大会合同大会)
2015 年 11 月 30-12 月 4 日, 神戸

島礼, 黒沢是之, 井上唯, 小河穂波, 加藤浩之, 田沼延公, 渡邊利雄
皮膚 Ppp6c 欠損マウスは、化学発がんおよび UVB 誘導発がんを高感受性となる
BMB2015 (第 3 8 回日本分子生物学会年会 第 8 8 回日本生化学会大会合同大会)
2015 年 11 月 30-12 月 4 日, 神戸

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 74 回 日本癌学会学術総会
2015 年 10 月 8-10 日, 名古屋

黒沢是之, 後藤孝浩, 田沼延公, 加藤浩之, 佐藤郁郎, 伊藤しげみ, 島礼, 館正弘
紫外線誘導皮膚がんにおいて、PP6 はがん抑制遺伝子として働く
第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会
2015 年 10 月 8-9 日, 盛岡

Yui Inoue, Hiroyuki Kato, Koreyuki Kurosawa, Nobuhiro Tanuma, Honami Ogoh, Toshio Watanabe, and Hiroshi Shima
PP6 deficiency potentiates ultraviolet-B-induced skin carcinogenesis
10th Mechanisms and Models of Cancer 2015
2015 年 8 月 7 日, San Diego (USA)

加藤浩之, 田沼延公, 黒沢是之, 井上維,

林克剛、小河穂波、野村美有樹、渡邊利雄、島礼
UVB 照射により、Ppp6c 欠損では、高頻度に皮膚扁平上皮癌が発生する
第 81 回日本化学会東北支部例会
2015 年 5 月 21-22 日、仙台

Miyuki Nomura, Yoshimi Sakamoto, Shigemi Ito, Ryuichi Katakura, Keniti Shiiba, Shoko Matsumoto, Toshio Watanabe, Hiroshi Shima, Nobuhiro Tanuma
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 年 11 月 25-27 日、横浜

林克剛、田沼延公、渡邊利雄、佐藤郁郎、野村美有樹、山下洋二、角川陽一郎、島礼
PP6 皮膚特異的欠損マウスは、DMBA 誘発皮膚癌に高感受性をしめす
第 73 回 日本癌学会学術総会
2014 年 9 月 25-27 日、横浜

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パライシングを制御する 第 73 回 日本癌学会学術総会
2014 年 9 月 25-27 日、横浜

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 年 9 月 25-27 日、横浜

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 年 9 月 25-27 日、横浜

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 年 9 月 25-27 日、横浜

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 年 9 月 25-27 日、横浜

坂本良美、野村美有樹、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 2 回 がん代謝研究会
2014 年 7 月 10-11 日、東京

〔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

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

(3) 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