

令和元年6月11日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09055

研究課題名(和文)代謝機構および間質との相互関連解明による膵癌幹細胞を標的とした治療法の確立

研究課題名(英文)The establishment of new therapy targeting metabolic characteristics and cancer-stroma interaction for pancreatic cancer

研究代表者

佐藤 賢一 (SATO, Kennichi)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：10282055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：RNAiを用いてPKM2の発現を抑制すると、細胞増殖、細胞移動能、そして造腫瘍能が抑制されることが分かった。さらに解糖系の活性が抑えられ、代謝産物のうち特にピルビン酸とポリアミンの生産が低下した。また、マイクロアレイの結果から、PKM2は細胞周期を進行させる遺伝子の発現と関連のある可能性が示された。さらに、ROS生成はPKM2の発現抑制により上昇することが分かった。Periostinノックアウトマウスと遺伝子改変膵癌マウスを交配させると、Periostinノックアウトマウスでは膵癌の発症がコントロールに比べ遅い傾向がみられるものの、マウスの数を増やし解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、膵臓癌の新たな治療標的としてPKM2に着目した。PKM2は代謝を介し、遺伝子発現や細胞増殖など膵臓癌の進展に大きく関与していることを明らかにした。さらに、PKM2発現抑制によるスベルミン産生低下について明らかにした。これらの結果はPKM2を標的とした新しい膵癌治療法の開発の可能性を示唆するものである。予後の非常に悪い膵癌に対する新し治療法開発の可能性を示したことは、社会的に大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：To examine PKM2's expression and role in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), we knocked PKM2 down in PDAC cells by introducing small interfering and short hairpin RNAs, and examined the cells' gene expression profile by microarray analysis. We analyzed the cells' energy-producing pathways by XFe Extracellular Flux Analyzers, and detected intracellular metabolites by a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometer. We found that RNAi-mediated knockdown of PKM2 diminished proliferation, migration, and tumorigenicity of PDAC cell-lines. PKM2 knockdown also resulted in lower glycolytic activities, and decreased levels of some intracellular metabolites such as pyruvate and polyamine but elevated levels of reactive oxygen species. Microarray analysis revealed functional association between PKM2 and expression of genes that drive the cell cycle. These results demonstrate that PKM2 play important role for metabolic activities as well as malignancy of PDAC cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 癌幹細胞 ピルビン酸キナーゼ ペリオスチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

癌組織は多様な細胞集団によって構成されている。その中で、通常の癌細胞と異なりごく少数の細胞でも癌を生体内で再構築できる細胞群の存在が示され、癌幹細胞と呼ばれている。癌幹細胞の特徴は: 1)自らと全く同じ細胞を作り出す自己複製能; 2)分化度の異なる多種類の細胞に分化する多分化能; 3)不均等分裂; 4) 高い腫瘍形成能; 5)細胞周期 G0 期に存在、などの性質を有することが挙げられる。癌の転移、抗癌剤や放射線療法に対する耐性などの高度の悪性形質は、この癌幹細胞がもたらしめていることが示唆されている。従って、この癌幹細胞に対する治療法の開発が膵癌患者予後改善へ結びつく可能性が高い。癌幹細胞では正常細胞や前駆細胞と比べ活性酸素(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示されている。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、癌細胞を取り巻く低酸素などの微小環境への適応のためと考えられていたが、ROS の産生を抑制することにも関与していると思われる。この Warburg 効果にピルビン酸キナーゼ type M2(PKM2) 中心的な役割を果たしていることがわかってきた。遺伝子改変マウスを用いた検討による興味深い報告がなされた。癌化したマウス膵組織で K-ras を不活性化すると癌は消滅する。しかし、消滅した膵組織の中には残存する膵癌細胞がわずかに残っており、これらの癌細胞は腫瘍形成能が高く、癌幹細胞特性を有していた。さらに、これらの癌細胞ではミトコンドリアによる好気性呼吸が優勢で細胞内 ROS も高く、前述した従来の考えに全く一致しなかった(Nature, 2014)。膵癌幹細胞は通常の癌細胞とは異なった代謝を行っている可能性が示唆されたのである。つまり、PKM2 発現低下による Warburg 効果の抑制は、癌幹細胞以外の通常の膵癌細胞に対しての治療効果が期待できるが、癌幹細胞には効果がないことが考えられる。膵癌は周囲に豊富な間質を伴うことが多く、癌と間質細胞の相互作用によって癌が進展すると考えられている。申請者らも癌間質における MMP2 の発現が膵癌浸潤に関与すること(Gastroenterology, 1994)、膵癌間質で産生される高濃度の Periostin が膵癌の移動能を亢進させること(Int J Cancer, 2008)を明らかにしている。しかし、遺伝子改変マウスにおいて膵癌間質を取り除くと、今までの概念とは逆に、膵癌進展が促進することが示された(Cancer Cell, 2014)。乳癌組織では間質における Periostin の発現が癌幹細胞の転移に不可欠であることが示唆されており、間質からのシグナルに対する癌幹細胞と非癌幹細胞の応答に相違があることも示唆されている。そのために従来との考えと最近の実験結果に矛盾が生まれている可能性がある。以上のことから、膵癌幹細胞と非膵癌幹細胞において、代謝動態の差異ならびに、間質に対する応答性の相違を解明することによって、膵癌幹細胞に対する治療法が開発できるのではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

癌に特徴的な代謝である Warburg 効果に重要な役割を果たしているピルビン酸キナーゼ type2 の発現増減による代謝動態の変化と膵癌幹細胞特性、膵癌間質で発現が亢進し癌進展への関与が知られている Periostin と膵癌幹細胞との関連を明らかにし、膵癌幹細胞を標的とする膵癌治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

膵癌幹細胞と通常癌幹細胞の、「エネルギー獲得機構の相違」及び「癌間質細胞が与える影響の違い」を明らかにするため以下の解析を行う: 1) Patient-derived xenograft(PDX) に PKM2siRNA を導入し、残存した細胞に癌幹細胞が濃縮していると考え、起源細胞との代謝様式、分子発現様式の相違をメタボローム、マイクロアレイを用い網羅的に解析する; 2)遺伝子改変膵癌マウスと PKM 関連遺伝子改変マウスと掛け合わせ、PKM の発現型による代謝の変化が癌化・進展に与える影響を解明する; 3)2)の結果生じる解糖系優位のマウス膵癌細胞と TCA 回路優位の膵癌細胞を分離する; 4)癌間質の性質に重要な役割を演じている Periostin ノックアウトマウスと遺伝子改変膵癌マウスを交配させ、間質の膵癌化・進展に対する影響を明確にする; 5)3)で作製した代謝特性の異なる膵癌細胞を PTON-KO マウスに同所移植し癌の進展への関与を検討する; 6)これらの結果を踏まえ、膵癌幹細胞に対する治療法を確立させる。

## 4. 研究成果

### 1. 膵癌における PKM2 の役割

膵臓癌組織での PKM1 および PKM2 の発現を調べるため、マイクロダイセクションによって切り取った膵臓組織から RNA を抽出し、PKM1 および PKM2 それぞれに特異的なプローブを用いてリアルタイム RT-PCR を行った。PKM2 は正常膵管部に比べ、癌部において有意に高く発現していることが示された ( $P < 0.01$ )。一方で、PKM1 の発現は癌部と非癌部で差は見られなかった。膵臓癌細胞株においても PKM1 に比べ、PKM2 が高発現していた。以上か

ら、膵臓癌においては、PKM2 が高発現していることが明らかとなった。

膵臓癌細胞株に si-RNA または sh-RNA を導入し、PKM2 発現抑制株を作製して実験を行った。PKM2 の発現抑制効果はウエスタンブロットにて確認した。PKM2 をノックダウンすると細胞増殖と細胞遊走能が抑制されることが示された。さらに PKM2 抑制株を NOG マウスに皮下注射すると、明らかに造腫瘍能が低下した。

PKM2 の発現抑制が糖代謝に影響を及ぼしているかどうかを調べるため、まず膵臓癌細胞のグルコース消費量を計測した。その結果 PKM2 抑制細胞にてグルコース消費量が有意に減少していることがわかった。そこで PKM2 の発現と代謝の変化をより詳細に調べるため、細胞外フラックスアナライザーにて酸化的リン酸化の指標となる酸素消費速度 (OCR) と解糖系代謝の指標となる細胞外酸性化速度 (ECAR) を測定した。PKM2 ノックダウンにより ECAR は減少し、OCR に変化は見られなかった。これに伴い OCR/ECAR 比は PKM2 発現抑制株で増加傾向がみられたことから PKM2 抑制株におけるエネルギー生産は酸化的リン酸化が優位になることが示唆された。さらに我々は PKM2 ノックダウンによって細胞増殖能に顕著な差が見られた MIAPaCa-2 を用いて、PKM2 発現抑制株とコントロール細胞株それぞれの細胞内代謝産物についても解析した。PKM2 発現抑制によりいくつかの代謝産物が減少し、とりわけ PKM2 の触媒により生成されるピルビン酸とポリアミンの一種であるスペルミンの減少が顕著であった)。スペルミンの減少と関連するように、スペルミンの前駆体スペルミジンの合成に関わるスペルミジンシンターゼ (SRM) が減少、スペルミンの分解に関わるスペルミジン/スペルミン N1 アセチルトランスフェラーゼ 1 (SAT1) の発現上昇がマイクロアレイの結果から確認された。PKM2 の発現は ATP 生産量には影響を与えなかった。以上の結果から PKM2 は解糖系代謝の維持に重要な役割を担っていることが示された。

## 2. Periostin 発現消失における膵癌間質への影響

Periostin ノックアウトマウスと遺伝子改変膵癌マウスを交配させ、膵癌における Periostin の役割を検討している。現在まで、Periostin ノックアウトマウスでは膵癌の発症がコントロールに比べ遅い傾向がみられるものの、マウスの数を増やし解析中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1 Shiroki T, Yokoyama M, Tanuma N, Maejima R, Tamai K, Yamaguchi K, Oikawa T, Noguchi T, Miura K, 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*. 108; 931-940, 2017. doi: 10.1111/cas.13211. 査読有
- 2 Yokoyama M, Tanuma N, Shibuya R, Shiroki T, Abue M, Yamamoto K, Miura K, Yamaguchi K, Sato I, Tamai K, Satoh K. Pyruvate kinase type M2 contributes to the development of pancreatic ductal adenocarcinoma by regulating the production of metabolites and reactive oxygen species. *Int J Oncol*. 52: 881-891, 2018. doi: 10.3892/ijco.2018.4258. 査読有
- 3 Shimoyama Y, Tamai K, Shibuya R, Nakamura M, MOchizuki M, Yamaguchi K, Kakuta Y, Kinouchi Y, Sato I, Kudo A, Shimosegawa T, Satoh K. Periostin attenuates tumor growth through induction of apoptosis in colitis-related colorectal cancer. *Oncotarget*. 9: 20008-20017, 2018. doi: 10.18632/oncotarget.25026. 査読有

〔学会発表〕(計 3 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 下山 雄丞, 玉井 恵一, 渋谷 莉恵, 中村 真央, 望月 麻衣, 山口 壹範, 佐藤 賢一. 潰瘍性大腸炎関連大腸癌における periostin の役割. 第 76 回 日本癌学会総会 2017 年 9 月 28-30 日 (横浜)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：横山 美沙

ローマ字氏名：(YOKOYAMA, Misa)

研究協力者氏名：渋谷 莉恵

ローマ字氏名：(SHIBUYA, Rie)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。