

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10120

研究課題名(和文) Warburg効果関連microRNAおよび標的遺伝子群の同定と臨床応用の確立

研究課題名(英文) Identification of the Warburg effect-associated microRNAs and those targeting genes and clinical application of those

研究代表者

内山 和久 (UCHIYAMA, Kazuhisa)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：80232867

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)：先行研究を継続した本研究により、がん特異的エネルギー代謝機構を調節するmicroRNA(miRNA)群を更に同定した。それ等の内、本研究においては特に、MIR122、137、206が臓器特異性を有することが明らかとなり先行研究の結果を裏付けた。更にWarburg効果を制御する重要な遺伝子として大腸腫瘍においてPTBP1が高発現していることを見出し、PTBP1はMIR1、133bにより調節されていることが明らかになった。また抗がん剤耐性株におけるWarburg効果関連遺伝子の機能を解析し、がんでは優位なPKM2の発現が耐性株ではPKM1に逆シフトしていることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we found that cancer-specific energy metabolism (Warburg effect) is regulated by several organ-specific microRNAs (miRNAs). Especially, MIR122, 137 and 206 had organ specificity and regulated Warburg effect-associated genes, i.e., PKM or PTBP1. Also, we indicated that PTBP1 is novel oncogene in colorectal tumors and that up-regulation of PTBP1 was induced by dysregulation of the MIR1 and 133b. Moreover, we partially clarified the functions of the Warburg effect-associated genes in chemo-resistant cancer cells. Namely, PKM2 was dominant in cancer cells, but in chemo-resistant cancer cells, PKM1 was re-up-regulated through the reverse shift of PKM isoforms.

研究分野：消化器外科

キーワード：microRNA Warburg 効果 PTBP1 RNA helicase MYC

1. 研究開始当初の背景

がん特異的エネルギー代謝機構 (Warburg 効果) の成立機構を解明するために microRNA(miRNA) の観点から研究を開始した。解糖系の律速酵素である、ピルビン酸キナーゼ(PKM) のアイソフォームが PKM2 優位になることが、Warburg 効果成立機構の 1 つとして知られていた。PKM アイソフォームを調節する遺伝子として先行研究では HNRNP family に属するスプライサー遺伝子 PTBP1 の存在が知られていたが、PTBP1 の発現調節機構は明らかになっていない部分が大半であった。(一部、MYC により発現が亢進することが知られていた。) よって、PTBP1 を標的とする miRNA を中心に、Warburg 効果成立機構の解明することを計画した。

我々の先行研究では脳特異的に分布する MIR124 及び、筋特異的に分布する MIR133b が PTBP1 の発現を制御することにより、PKM アイソフォームの発現を調節することを明らかにしていた。更にこの機構を追求するため本研究では、PTBP1 を標的とする miRNA の内、筋特異的分布を持つ、miRNA が大腸腫瘍において Warburg 効果を通じてどのような影響を与えているかを中心に解析を開始した。

2. 研究の目的

Warburg 効果成立機構を miRNA の観点より詳細に明らかにする。更に標的遺伝子から新規重要遺伝子を抽出し関連性を検討する。最終目標は、Warburg 効果を制御する miRNA を新規創薬に発展させることである。

3. 研究の方法

主に用いた実験系を大別すると、I: *in vitro*、II: *in vivo*、III: ヒト検体における検討の 3 つに大別できる。以下に各実験系における実験方法を記載する。

I : *in vitro*

研究対象のがん細胞株に対して、効果を検証する microRNA、siRNA、過剰発現ベクターをリポフェクションにより導入する。48 時間~72 時間で効果を検証した。効果の検証においては以下の実験を主として用いた。

microRNA: 既存の microRNA を必要に応じ購入した (Ambion®)。

siRNA: BLOCK-iT™ RNAi Designer を用いて設計した。

細胞導入: Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent、Lipofectamine® 2000 を用いた。

細胞増殖能: トリパブルー染色による細胞数カウントを用いた。

蛋白発現: ウェスタンブロットング法(WB 方)、免疫蛍光染色(IF)を用いた。

mRNA/miRNA 発現: リアルタイム PCR(RT-PCR)を用いた。

miRNA 結合能: ルシフェラーゼレポーターアッセイ及び、miRNA 阻害剤の併用を用いた。形態学的観察: 透過型電子顕微鏡 (TEM)、ヘキスト染色、Mito Tracker®を用いた。

細胞周期解析: Tali® Image-Based Cytometer を用いた。

RNA 結合能解析: RIP アッセイを用いた。

データベース: Target Scan 7.1 database (<http://www.targetscan.org/>)、miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>)を用いた。

その他: 実験結果に基づき、ラクテートアッセイや、電子スピン共鳴装置(ESR)、スフェロイド 3 次元培養等を用いた。

II : *in vivo*

ヌードマウス (BALB/cSLC-nu/nu) に大腸癌細胞株を移植し、効果を検証したい miRNA を腫瘍に局所投与し抗腫瘍効果を検証した。また、腫瘍を摘出し蛋白を抽出し WB を用いて標的遺伝子発現の変化を解析した。

また、同マウスの各種臓器を一部摘出し、miRNA を抽出し RT-PCR により各臓器における miRNA の発現分布を解析した。同様に蛋白を抽出し WB により目的遺伝子の臓器分布を解析した。

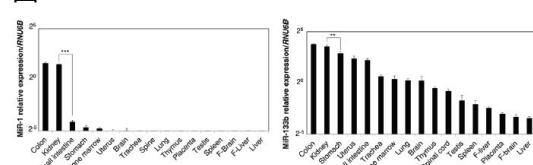
III : ヒト検体

RNA 検体として Clontech (TAKARA BIO INC.)、Biochain (BioChain Institute Inc.)を使用した。また、手術加療で余剰検体を一部採取し miRNA、蛋白を抽出し解析に用いた。

4. 研究成果

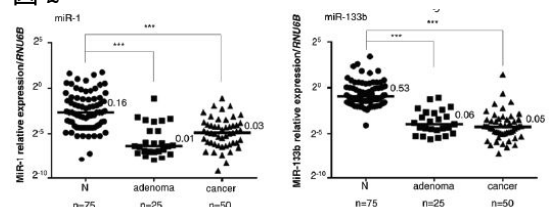
PTBP1 を標的とする miRNA として Target Scan 7.1 database を基に、MIR1、MIR133b を同定した。実際に、筋以外の臓器における発現を検索すると大腸で発現が高いことが明らかになった(図 1)。

図 1



また正常粘膜に比した大腸癌(50 例)及び、大腸腫瘍(25 例)における MIR1、MIR133b の発現は、実に 90% 以上の症例で発現が低下していた(図 2)。

図 2



そこで、大腸癌細胞株 DLD-1 及び WiDr に *MIR1*, *MIR133b* を導入すると顕著な細胞増殖抑制を認めた。また WB を用いてオートファジー関連遺伝子の発現を調べると *LC3I* から *LC3II* への移行を顕著に認めた。更に TEM を用い観察すると autophagosome や mitophagy が観察されオートファジーが誘導されていることが示唆された(図 3)。

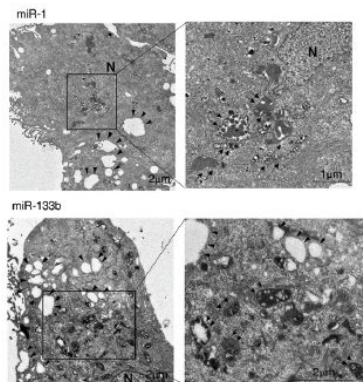
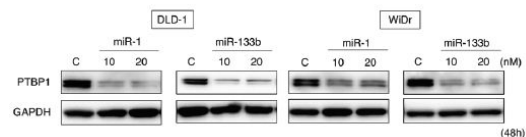


図 3

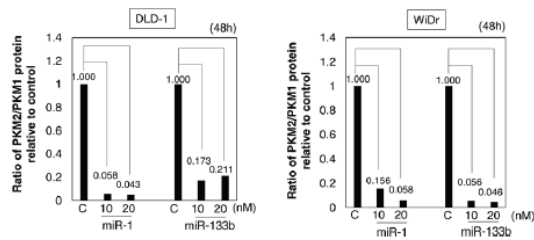
次に、Warburg 効果関連遺伝子の発現について検討すると、*MIR1*, *MIR133b* の導入により *PTBP1* の発現が顕著に抑制され miRNA 阻害剤の併用によりこの効果はキャンセルされた。またルシフェラーゼレポーターアッセイにおいても、*MIR1*, *MIR133b* が *PTBP1* と結合することが示された(図 4)。

図 4



更に下流の PKM アイソフォームの発現を解析するとがんで優位な PKM2 から PKM1 へと移行することが明らかになった(図 5)。

図 5

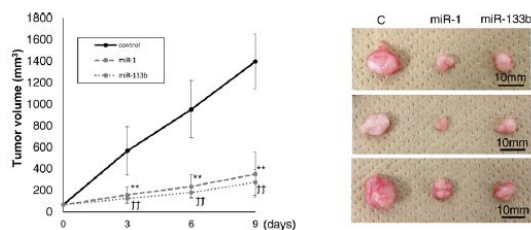


また ESR や N-アセルシステインの併用実験により、両 miRNA の導入により活性酸素が発生していることが示唆され、解糖系最終産物である乳酸産生量は低下し、TCA サイクル産物である ATP の産生量が亢進した。よって両 miRNA の導入が PKM アイソフォームを M2 から M1 へと移行させることによりエネルギー代謝機構に抗がん的な影響を及ぼしていると考えられた。

更に、標的遺伝子である *PTBP1* を siRNA よりノックダウンした際にも同様の結果が

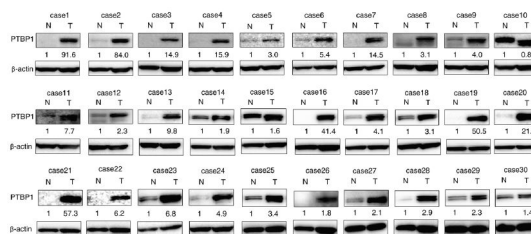
観察され、*MIR1*, *MIR133b* が *PTBP1* を制御することにより PKM アイソフォームを調節し、Warburg 効果に寄与していることが示唆された。次に両 miRNA の抗腫瘍効果を *in vivo* で解析した。DLD-1 細胞株をヌードマウスに皮下移植し両 miRNA を腫瘍局所投与したところ、有意な抗腫瘍効果が確認された(図 6)。また腫瘍片を摘出し *PTBP1* 及び PKM アイソフォームの発現を解析すると *in vitro* と同様の結果が観察された。

図 6



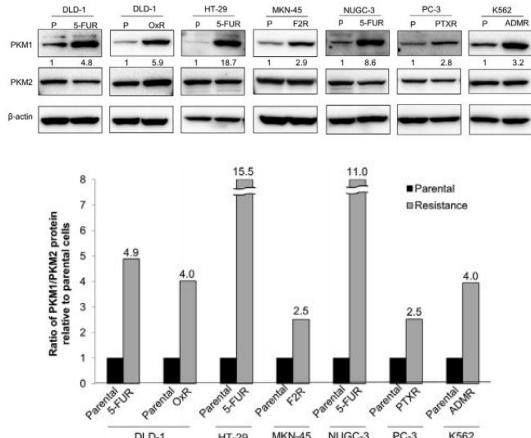
最後に、臨床検体 30 例を用いて *PTBP1* の発現を解析したところ、ほぼ全例で発現が上昇していた(図 7)。また大腸腺腫でも既にこの結果を認めることから、発がんの初期にこれらの現象が生じていると考えられ、Warburg 効果の獲得は発がんの根源的現象であることが示唆された。

図 7

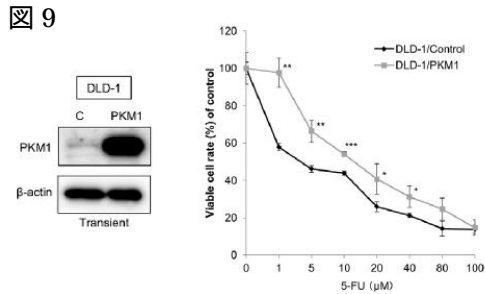


更に、数種の抗がん剤耐性株で PKM アイソフォームの発現を検証すると、興味深いことに、がんで優位であった PKM2 の発現が抗がん剤耐性株では親株と比較し M1 の発現が上昇していることが明らかとなった(図 8)。また、ミトコンドリア能や ATP 産生能が亢進していることが確認された。

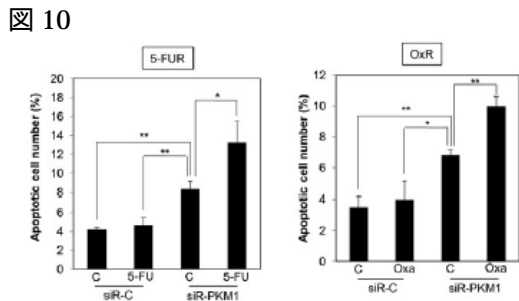
図 8



また抗がん剤耐性株は細胞培養で増殖が親株と比較して遅い傾向にあったが細胞周期を解析すると G0/G1 期に停滞していることが確認された。そこで PKM1 を過剰発現させたところ、抗がん剤に耐性を有することが確認された(図 9)。

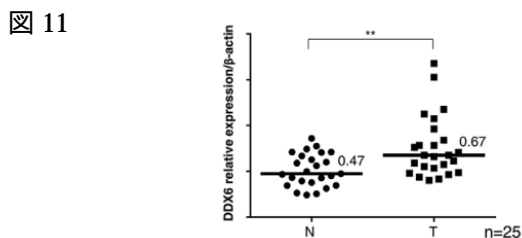


そこで、親株及び抗がん剤耐性株に siRNA を用いて PKM1 ノックダウンさせると内因性アポトーシスを生じることが示唆された。siR-PKM1 と抗がん剤(5-FU、Oxaliplatin)を併用すると、顕著なアポトーシスの増強が示された(図 10)。以上より、抗がん剤耐性には PKM1 が関与していることが示唆された。



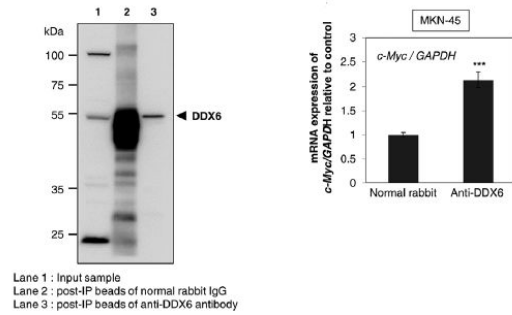
また、PTBP1 は RNA 結合蛋白であり、internal ribosome entry site(IRES)構造をもつ遺伝子との関連性が報告されていた。一方で我々が長年、研究を行っていた RNA 結合蛋白に RNA ヘリケースである DDX6 がある。また PTBP1 は MYC により発現が制御されていることが報告されており、Warburg 効果に深く関与する遺伝子であることが想定される。また MYC は IRES 構造を持つ代表的な遺伝子である。以上のことから、MYC と DDX6 の関連を解析することで更に深くがんの病態を追求することとした。以前の報告で大腸腫瘍に関しては検討が成されていたため、胃癌を用いて検討することとした。

まず、初めに臨床検体(25 例)を用いて、DDX6 の発現を WB 法で解析したところ有意な発現亢進を認めた(図 11)。



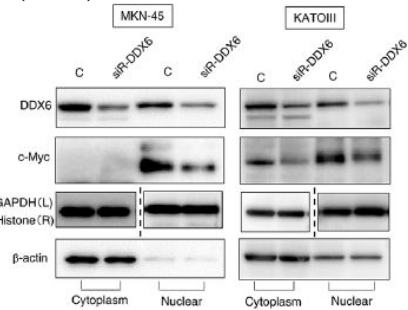
さらに胃癌細胞株 MKN-45 において RIP アッセイを用いて DDX6 と MYC が結合することが示唆された(図 12)。

図 12



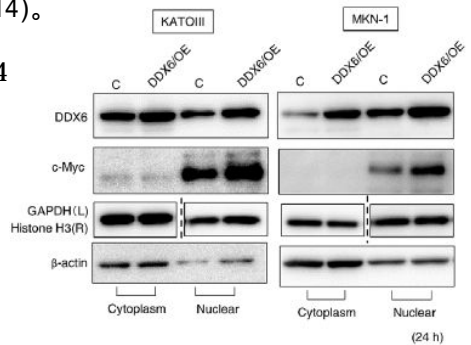
次に siRNA により DDX6 をノックダウンさせた時の影響を検証した。MKN-45 と KATOIII に siR-DDX6 を導入すると、有意な細胞増殖効果が確認され、MYC 発現の減少を認めた(図 13)。

図 13



逆に DDX6 を KATOIII、MKN-1 細胞株に過剰発現させると MYC 発現の亢進を認めた(図 14)。

図 14



また、胃癌細胞株の内、MYC 増幅を有する HSC-39 において DDX6 の効果を検証した。DDX6 の発現は他の胃癌細胞株に比して高かったが、統計学的に有意差は認めなかった。DDX6 のノックダウンにおいては顕著な増殖抑制効果を認めた(図 15)。mRNA レベルでは MYC の発現抑制は認めなかったが蛋白レベルでは有意な発現抑制を認めた(図 16)。

図 15

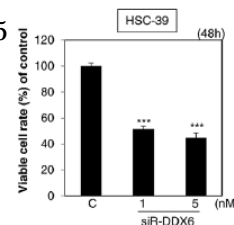
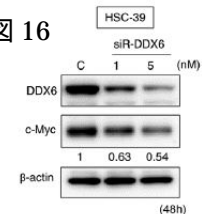
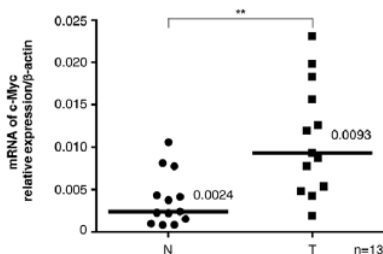


図 16



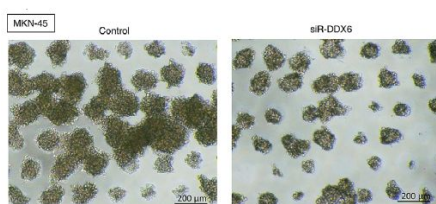
MYC ノックダウンにより *DDX6* の発現抑制は認めず、*DDX6* が *MYC* の上流に位置すると考えた。また、*DDX6* の発現が亢進していた症例 (13 例) においては *MYC* の mRNA 発現が有意に亢進していた (図 17)。

図 17



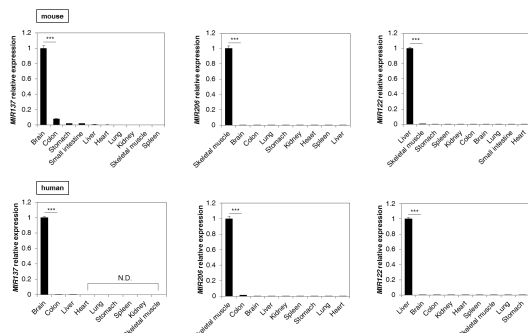
更に MKN-45 を 3 次元培養し *DDX6* をノックダウンすると抗腫瘍効果を認めた。蛋白サンプルでは *MYC* 発現が減少していた (図 18)。

図 18



これまでの検討で *PTBP1* を標的とする miRNA は脳、筋特異的に分布する法則が想定されたが、更に普遍性を明らかにするために *PTBP1* を標的とする他の miRNA について検証を進めることとした。また、がん優位に発現する *PKM2* を直接制御する miRNA にも焦点を当てることとした。Target Scan 7.1 database、miRTarBase を用いて解析し *PTBP1* を標的とする miRNA として *MIR137*、*MIR206* を抽出した。また *PKM2* を標的とする miRNA は *MIR122* のみ存在することが明らかになった。そこで、ヒト、マウスの各臓器でこれ等 miRNA の分布を解析すると、*MIR137* は脳に *MIR206* は筋に *MIR122* は肝臓に特異的に分布していることが明らかになった (図 19)。

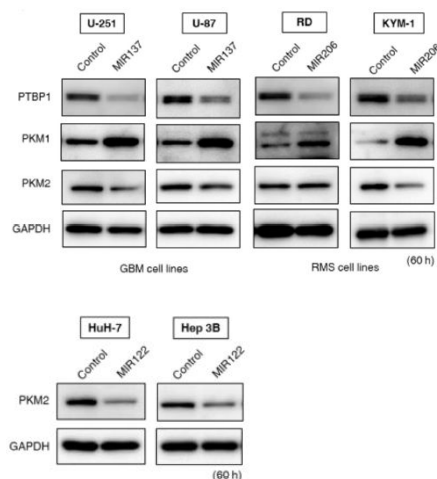
図 19



更に、脳特異的な *MIR137* を多形性膠芽腫細胞株 (U-251、U-87) に筋特異的な *MIR206* を横紋筋肉腫細胞株 (RD、KYM-1) に導入し効果を検証したところ、これまでと同様に *MIR137*、*MIR206* は *PTBP1* を直接標的とし *PKM* アイソフォームの発現を制御してい

ることが明らかになった。更に肝像特異的な *MIR122* を肝細胞癌細胞株 (HUH-7、Hep3B) に導入し効果を検証したところ、*PKM2* を直接標的としていることが WB 法、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、阻害剤併用実験などで示唆された (図 20)。

図 20



また同様の結果は *PTBP1* をこれらの細胞株でノックダウンした時にも観察された。各正常組織と細胞株における、これら臓器特異的な miRNA を比較すると、発現が有意に減少しており、細胞株における mRNA-*PKM2* の発現が亢進していた。以上より、*PKM* を調節する miRNA は臓器特異性を有しており、正常組織における miRNA の分布が組織の発生を方向づけており、発がんにおいては特にこれら臓器特異的な miRNA 脱制御が重要な機構であ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 5 件)

Taniguchi K, Sugito N, Shinohara H, Kuranaga Y, Inomata Y, Komura K, Uchiyama K, Akao Y. Organ-Specific MicroRNAs (*MIR122*, *137*, and *206*) Contribute to Tissue Characteristics and Carcinogenesis by Regulating Pyruvate Kinase M1/2 (*PKM*) Expression. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 24;19(5). pii: E1276. doi: 10.3390/ijms19051276. 査読有。

Taniguchi K, Iwatsuki A, Sugito N, Shinohara H, Kuranaga Y, Oshikawa Y, Tajirika T, Futamura M, Yoshida K, Uchiyama K, Akao Y. Oncogene RNA helicase *DDX6* promotes the process of c-Myc expression in gastric cancer cells. *Mol Carcinog*. 2018 May;57(5):579-589. doi: 10.1002/mc.22781. 査読有。

Taniguchi K, Sakai M, Sugito N,

Kuranaga Y, Kumazaki M, Shinohara H, Ueda H, Futamura M, Yoshida K, Uchiyama K, Akao Y. PKM1 is involved in resistance to anti-cancer drugs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Apr 22;473(1):174-180. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.074. 査読有.

Taniguchi K, Sakai M, Sugito N, Kumazaki M, Shinohara H, Yamada N, Nakayama T, Ueda H, Nakagawa Y, Ito Y, Futamura M, Uno B, Otsuki Y, Yoshida K, Uchiyama K, Akao Y. PTBP1-associated microRNA-1 and -133b suppress the Warburg effect in colorectal tumors. *Oncotarget.* 2016 Apr 5;7(14):18940-52. doi: 10.18632/oncotarget.8005. 査読有.

〔学会発表〕(計 7 件)

谷口高平、赤尾幸博、内山和久. MicroRNA の臓器特異性と新規がん遺伝子 PTBP1 の機能解析. 第 51 回 制癌剤適応研究会. 2018 年

谷口高平、杉戸信彦、田尻下敏弘、二村学、吉田和弘、内山和久、赤尾幸博. Oncogene RNA helicase DDX6 promotes the process of c-Myc expression in gastric cancer cells. 第 76 回 日本癌学会学術総会. 2017 年.

谷口高平、杉戸信彦、赤尾幸博、内山和久. がん特異的代謝における miR-34a の機能解析. 第 21 回 日本がん分子標的治療学会学術集会. 2017 年.

谷口高平、高井朋聡、吉川勇希、杉戸信彦、内山和久、東治人、赤尾幸博. がん特異的エネルギー代謝を標的とした RNA 創薬. 日本核酸医薬学会 第 2 回年会. 2016 年.

谷口高平、杉戸信彦、内山和久、赤尾幸博. Pyruvate kinase isoforms are dysregulated by organ-specific microRNA in cancer development. 第 75 回日本癌学会学術集会. 2016 年.

谷口高平、内山和久、赤尾幸博. 新規重要がん遺伝子 PTBP1 の機能及び発現調節機構の解析. 第 4 回 がん代謝研究会. 2016 年.

谷口高平、杉戸信彦、倉永祐希、熊崎実南、篠原悠、内山和久、赤尾幸博. 新規がん遺伝子 PTBP1 の機能及び発現調節機構の解析. 第 20 回日本がん分子標的治療学会. 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.osaka-med.ac.jp/~sur000/html/laboratory.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 和久 (UCHIYAMA Kazuhisa)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 80232867

(2) 研究分担者

赤尾 幸博 (AKAO Yukihiro)

岐阜大学・大学院連合創薬医療情報研究

科・教授

研究者番号 : 00222505

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

谷口 高平 (TANIGUCHI Kohei)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 70779686