

令和元年6月18日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19620

研究課題名（和文）がんのグルコース代謝に関する新理論の確立 - ワールブルグ効果の“がん抑制”作用

研究課題名（英文）Molecular mechanisms by which PKM1, reversing the Warburg effect, promotes tumor cell growth.

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：がんにはブドウ糖が好氣的に代謝されにくい性質が備わっており、ワールブルグ効果として知られている。これに関連して、がんでは解糖系酵素Pkmの特定isoform（Pkm2）が特異的に発現しており、注目を集めていた。Pkm2発現がワールブルグ効果成立に必須であるが、その生物学的な意義は不明の点多かった。一方、我々は、独自の遺伝子改変マウス群の解析から、Pkmのもう1つのスプライシングアイソフォームPkm1にがん促進的な機能があることを見出だしており、本課題では、その分子機構の解明に取り組んだ。PKM1発現によって、オートファジーやNAD合成が亢進すること等が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんにおけるPkm2/ワールブルグ効果の意義については長く論争が続いていたが、この問題に関し、重要な実験的証拠を示すことができた。これまでいくつかの細胞株を用いた実験にて、Pkm1よりも、Pkm2の方が腫瘍細胞に有利に働くとされていたが、より一般的には、むしろPkm1の方が種々の代謝メリットを腫瘍細胞にもたらすことを明らかにした。また、これまで創薬可能なゲノム変異が見つかっていない難治性肺癌（小細胞肺癌）において、Pkm1やその関連代謝経路が、新たな治療標的となる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Expression of Pkm2, which diverts glucose-derived carbon from catabolic to biosynthetic pathways, is a hallmark of cancer. However, Pkm2 function in tumorigenesis remains controversial. We have long observed that a different Pkm isoform (Pkm1) boosts, rather than inhibits, tumor cell growth in various experimental tumor models. In this study, we found that Pkm1 activates autophagy and NAD bio-synthesis, potentially explaining how Pkm1 confer metabolic advantages to promote tumor growth cell-autonomously. As such, Pkm1 overall promotes, rather than inhibits, tumor cell proliferation. These findings strongly suggest that Pkm1 and factors related its activity are potential targets to treat small-cell lung cancer, a cancer for which few druggable mutations have been identified.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん代謝

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

### 1. 研究開始当初の背景

解糖系酵素の Pkm (pyruvate kinase M) は、ワールブルグ効果の発現・解消の制御における最重要因子の1つで、近年のがん代謝分野では非常にシンボリックな存在である。がんでは Pkm の特定 isoform (Pkm2) が特異的に発現しており、この Pkm2 発現がワールブルグ効果成立に必須であるが、その生物学的な意義は不明の点も多かった。

### 2. 研究の目的

我々は、独自に開発した Pkm 遺伝子改変 (ノックイン) マウス群の解析から、Pkm のもう1つのスプライシングアイソフォーム Pkm1 にかん促進的な機能があることを見出した。本課題では、Pkm1 によるがん促進の分子機構を解明することを通じ、これまで培ってきた“がんとグルコース代謝”にまつわる新知見について、確固たる“がん代謝の新規理論モデル”を確立することを目的として、研究を行った。

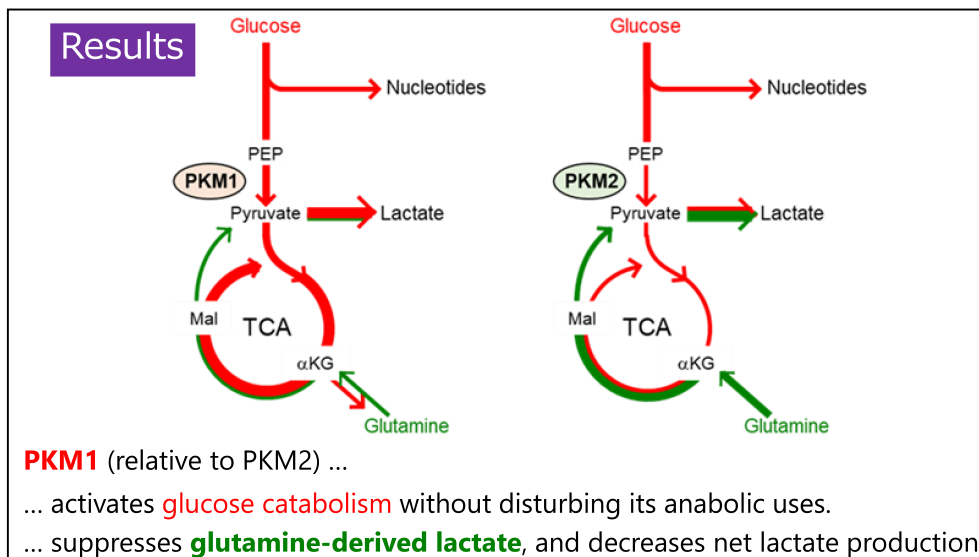
### 3. 研究の方法

安定同位体トレーサー解析: Pkm1 による好気代謝亢進の NAD 合成経路への影響をしらべるため、新たなアッセイ系を確立した。細胞を NAD 経路前駆体等の安定同位体 (15N 標識) トレーサーでラベルし、質量分析で、NAD 関連メタボライトの 15N-ラベル体・非ラベル体のレベルを分別定量した。

### 4. 研究成果

(1) Pkm1 によるオートファジー活性化とそのメカニズム: これまでの生化学的解析・メタボローム解析・ミトコンドリア解析等の結果から、Pkm1 がオートファジーを活性化することが示唆されていた。蛍光タンパク質ベースのオートファジープロブ (GFP-LC3-RFP) を染色体に安定に組み込んだ細胞を作製し、Pkm1 や Pkm2 ノックイン細胞におけるオートファジーフラックスの違いを測定した。このオートファジープロブ解析や、ATG7 ノックアウト細胞の解析などから、Pkm1 がオートファジーを活性化することが示された。各種阻害剤や RNAi を用いた検討から、Pkm1 によるオートファジー活性化に、NAD 合成の亢進が関わることを示唆された。

(2) グルコース代謝とグルタミン代謝の相互作用: Pkm1 によるグルコース代謝の制御が、グルタミン代謝にも影響を及ぼすことを発見した。13C ラベルしたグルタミンをトレーサーに使用した解析から、Pkm1 はグルコース異化を促進する一方、グルタミンの異化を低く保つ作用があることが判明した。



(3) PKM1 によるオートファジー活性化機構の詳細を探る過程にて、PKM1 が NAD 合成経路の1つを特異的に活性化することが分かった。付随的に、PKM1 が、乳がんや婦人科含の治療標的である PARP を活性化することも分かった。上記の NAD 合成系が、一部の難治性肺がんの生存・増殖においてきわめて重要であることが示唆された。そこで、同経路への干渉による新規治療の妥当性を検討した。培養系やマウス移植モデルにおける検討により、NAD 合成阻害が、小細胞肺がんの新規標的治療となる可能性が示された。さらに、これを達成するためのツールとして、NAD 合成酵素に対する新たな低分子阻害化合物を取得し、マウスモデルにて明確な治療効果を確認することができた。また、培養系での関連代謝経路の結果から、ある種の食事制限によって、上記の NAD 合成酵素ターゲット治療の実効性を顕著に高められる可能性が出てきた。この併用療法への感受性予測に活用できるマーカー遺伝子を同定した。PKM1 による NAD 合成亢進の分子メカニズムに関して、トレーサー解析を中心に検討を行った。試験管内での NAD 合成回路再構成実験などと合わせ、現段階にて蓋然性の高いモデルを構築することができた。一方、PKM1

によるサーチュインファミリー活性化の意義についても検討したが、非常に複雑な実験結果となり、現段階で統一的な解釈をするのは困難と結論した。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9件)

田沼延公、ワールブルグ効果について、PKM ノックインモデルを通してもう一度見つめなおす、生化学、査読なし、 91(1):38-43. 2019

Nomura M, Morita M, Tanuma N. A metabolic vulnerability of small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 9(64):32278-32279. 2018、査読有

Kurosawa K, Inoue Y, Kakugawa Y, Yamashita Y, Kanazawa K, Kishimoto K, Nomura M, Momoi Y, Sato I, Chiba N, Suzuki M, Ogoh H, Yamada H, Miura K, Watanabe T, Tanuma N, Tachi M, Shima H. Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes enhances K-rasG12D-driven tumor promotion. *Cancer Sci*. 2018;109(7):2178-2187、査読有

盛田麻美、佐藤卓、田沼延公、ピルビン酸キナーゼ M のアイソフォーム Pkm1 はがんの増殖を細胞自律的に促進する、DOI: 10.7875/first.author.2018.038、2018/4/2 ライフサイエンス新着論文レビュー、査読なし

Sato T, Morita M, Nomura M, Tanuma N: Revisiting glucose metabolism in cancer: lessons from a PKM knock-in model. *Mol Cell Oncol*, 2018;5(4):e1472054、査読有

Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, Ito S, Kurosawa K, Yamaguchi K, Sugiura Y, Takizaki H, Yamashita Y, Katakura R, Sato I, Okada Y, Watanabe H, Kondoh G, Matsumoto S, Kishimoto A, Obata M, Matsumoto M, Fukuhara T, Motohashi H, Suematsu M, Komatsu M, Nakayama K, Watanabe T, Soga T, Shima H, Maemondo M and Tanuma N: Pkm1 confers metabolic advantages and promotes cell-autonomous tumor cell growth. *Cancer Cell*, 33(3):355-367. 2018、査読有

Akaike T, Ida T, Wei FY, Nishida M, Kumagai Y, Alam MM, Ihara H, Sawa T, Matsunaga T, Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Tomizawa K, Nishimura A, Watanabe S, Inaba K, Shima H, Tanuma N, Jung M, Fujii S, Watanabe Y, Ohmuraya M, Nagy P, Feelisch M, Fukuto JM and Motohashi H: Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* 8(1), 1177. 2017、査読有

Sato T, Morita M, Tanaka R, Inoue Y, Nomura M, Sakamoto Y, Miura K, Ito S, Sato I, Tanaka N, Abe J, Takahashi S, Kawai M, Sato M, Hippo Y, Shima H, Okada Y and Tanuma N: *Ex vivo* model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells. *Oncol Lett* 14(6), 6863-6868. 2017、査読有

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 and Satoh K: Enhanced expression of the M2 isoform of pyruvate kinase is involved in gastric cancer development by regulating cancer-specific metabolism. *Cancer Sci* 108(5), 931-940. 2017、査読有

[学会発表](計 5件)

田沼延公、がん代謝のシンボル、ワールブルグ効果の実体とは？、愛媛大学プロテオサイエンスセンター第6回学術シンポジウム、2019.2.16(松山)

田沼延公、Revisiting glucose metabolism in cancer by a Pkm knock-in model、金沢国際がん生物シンポジウム、2018.11.26(金沢)

田沼延公、アンチワールブルグ効果型の解糖系酵素 Pkm1 は、細胞自律的な機序で、がん促進的にはたらく、第77回日本癌学会学術総会 JCA-AACR Joint Symposia、2018.9.27-29(大阪)

田沼 延公、Pkm 遺伝子改変から見えてきた、ワールブルグ効果の“がん抑制的”側面、第5回 がん代謝研究会、2017.7.12-15(札幌)

Tanuma N、Predominance of Pkm2 limits glucose metabolism and tumor development、2017 第76回日本癌学会学術総会(横浜)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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：

ローマ字氏名：

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。