

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16369

研究課題名(和文)膵癌における解糖系酵素PGAMの発現意義解明

研究課題名(英文) To verify the role of phosphoglycerate mutase expression in pancreatic cancer through glucose metabolism and cellular senescence

研究代表者

甲斐田 剛圭 (Kaida, Takayoshi)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：80792580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は未だ有効な抗癌剤治療がなく予後不良疾患である。エネルギー産生経路に関わるPGAM(phosphoglycerate mutase)といったタンパクが遺伝子改変モデルを使用したマウス実験を用いて膵発癌に大きく関わっている可能性が示唆された。またPGAMはセリン生合成系にも関与していることが知られており、セリン飢餓状態の膵癌細胞株においてセリン合成に関与するPHGDHの発現が誘導されていることがわかった。セリン飢餓食が抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は未だ有効な抗癌剤治療がなく予後不良疾患である。エネルギー産生経路に関わるPGAM(phosphoglycerate mutase)といったタンパクが膵発癌に大きく関わっている可能性が示唆された。またPGAMはセリン生合成系にも関与しており、セリン飢餓状態の膵癌細胞においてセリン合成に関与するPHGDHの発現が誘導されていることがわかった。セリン飢餓食が抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Pancreatic cancer is a disease with a poor prognosis because there is still no effective anticancer drug. Phosphoglycerate mutase (PGAM) protein in the energy production pathway might be involved in pancreatic carcinogenesis.

It was also found that PGAM is related with the serine biosynthesis system and that the expression of PHGDH which produced into serine biosynthesis is induced in pancreatic cancer cells starved of serine. We suggest that the serine-starved diet might have an antitumor effect.

研究分野： 消化器癌を中心に癌微小環境における慢性炎症や転移進展機序の分子メカニズムに関する分野

キーワード： 膵癌 PGAM セリン生合成 代謝リモデリング 解糖系

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) がんと解糖系代謝

がん細胞の成長には低酸素環境に適応するために解糖系代謝の亢進が起っていると考えられている。実際、解糖系から枝分かれするペントースリン酸化経路(PPP)やヘキソサミン生合成経路など他の代謝経路が活性化することにより細胞増殖に不可欠な核酸などを大量に産生することがわかっている(Hay et al. Nat Rev Cancer, 2016)。しかし近年の研究により、解糖系代謝と細胞不死化との強い関連が指摘され、解糖系の亢進はがん化の結果生じるのではなく、解糖系の亢進によりがん化を誘導する可能性が示唆されている。

(2) 細胞老化とがん化

がん化を誘導するには、細胞の不死化(細胞老化の抑制)が不可欠である。がん化誘導の初期段階として細胞老化の回避に着目し、回答系代謝酵素の1つであるPGAM(phosphoglycerate mutase)が、共同研究者の近藤らによって同定された(Kondoh et al. Cancer Res 2005)。その後PGAMががん特異的な解糖系酵素であるPKM2(pyruvate kinase 2)を誘導することや(Vandar et al. Science 2010)、PPPを活性化することが報告され(Hitosugi et al. Cancer Cell 2012)、PGAMの解糖系における重要性が報告されている。さらに正常細胞にストレス老化シグナルであるRasを導入すると、PGAMが分解されて早期に細胞老化を生じるが、PGAMを同時に過剰発現させると腫瘍形成能を獲得することが報告された(Mikawa et al. J Cell Biol 2014)。前癌病変からの発癌やがん進展過程におけるPGAMの発現意義に関しては、明らかになっていない。

2. 研究の目的

有効な抗癌剤治療が少なく、効果が乏しい難治性消化器癌の1つである膵癌において、解糖系酵素と細胞不死化として注目を集めるPGAMが発癌、増殖・進展に与える影響について検証し、PGAM発現の臨床的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体を用いた膵癌におけるPGAMの発現評価と予後解析

2004年1月から2018年3月までに熊本大学消化器外科において膵癌による根治切除を行なった201症例を対象に、PGAMを免疫染色しその発現解析を行い、臨床組織学的因子や予後・再発形式などの関連性を検証した。

(2) 膵癌細胞株を用いたPGAM発現と表現系の検討

膵癌細胞株において、PGAMの発現解析を行い、PGAMのsiRNAを用いてノックダウン、または過剰発現株を作成し、解糖系関連酵素の遺伝子発現変化を評価する。またPGAMの発現を変化させた際の細胞増殖能、浸潤能や抗癌剤耐性能を解析した。

(3) 膵腫瘍モデルマウスを用いたin vivoにおける評価

約12週齢で膵に前癌病変であるPanINを形成する膵特異的Kras変異マウスとPGAMノックアウトマウス、またはPGAMトランスジェニックマウスとの高配を行うことでPGAM発現が膵腫瘍形成に与える影響を評価した。

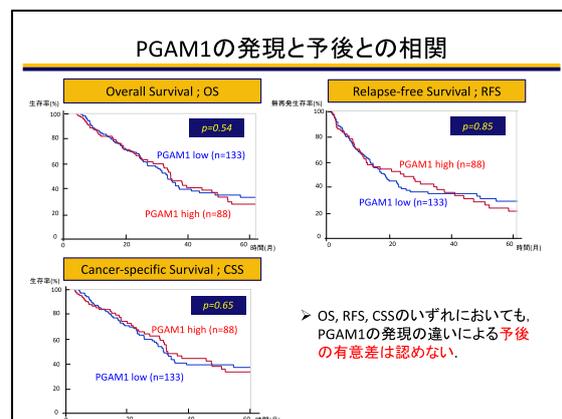
(4) 膵腫瘍モデルマウスにおける膵腫瘍中代謝物の解析

膵癌患者の血中セリン濃度が高値であること、PGAMが関与する解糖系からセリン生合成系が分岐することなどから膵癌細胞とセリンに着目した。様々な膵癌細胞株を用いて、セリンの有無による増殖能や浸潤能、代謝・生成の変化を検証した。

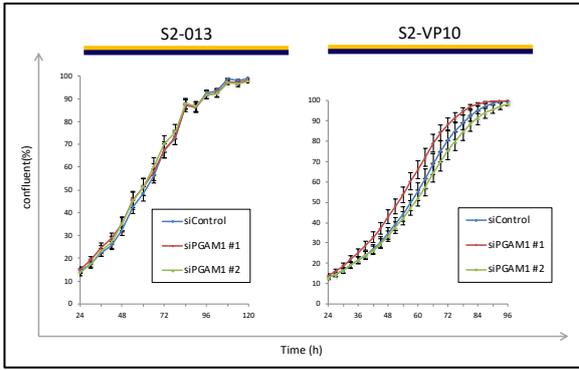
4. 研究成果

(1) 臨床検体を用いた膵癌におけるPGAMの発現評価と予後解析

PGAM1の発現を免疫組織化学染色によって高発現と低発現群に分類し、予後との相関をみたところ、PGAM1の発現による予後には有意差を認めなかった。



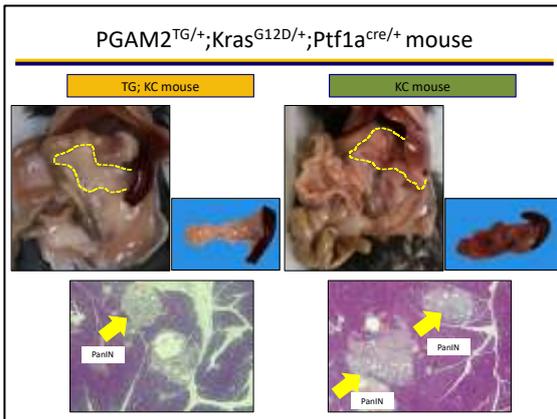
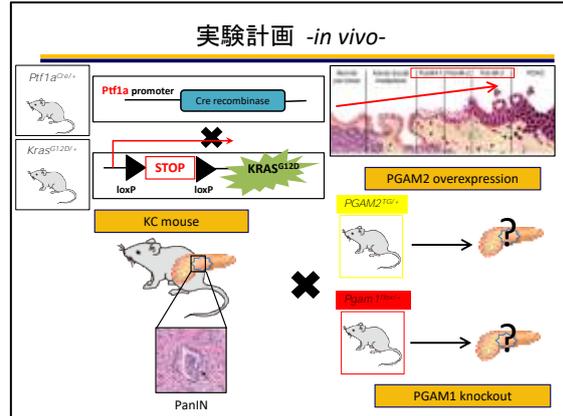
(2) PGAM1のsiRNAを用いたノックダウン実験



膵癌細胞株 5 株を用いて siRNA transfection を行い、PGAM1 をノックダウンした際の細胞の増殖能を検討した。多くの細胞株では PGAM1 をノックダウンしても増殖能はほぼ変わらないことがわかった。(1)-(2)の結果から、PGAM1 は癌の発育・進展にはあまり関与しない可能性が示唆され、仮説のように発癌の段階で重要な遺伝子なのではないかと考え、膵腫瘍モデルマウスを用いた *in vivo* の実験を中心に進めていく方針とした。

(3) 膵腫瘍モデルマウスを用いた *in vivo* における評価

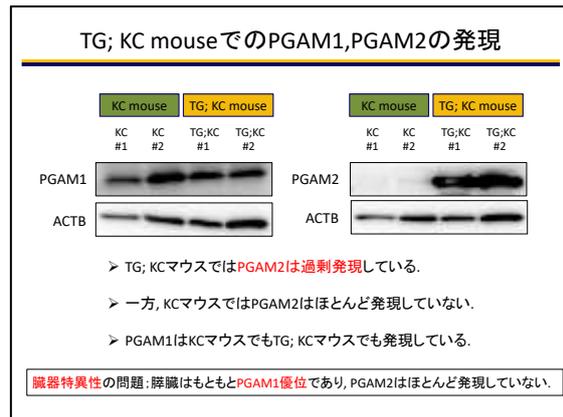
膵上皮特異的に恒常活性変異型 *Kras*G12D 蛋白を発現させると、ヒトの膵発癌過程と同様の PanIN の段階的変化を呈す。*Kras* 遺伝子の片アレルのプロモーター領域に loxP-Stop-loxP 配列が挿入されており、その下流に変異型 *Kras*G12D 蛋白の配列が連なっている *Kras* マウスと、膵上皮でのみ Cre recombinase が発言するマウスを掛け合わせると、生後数週で PanIN が出現し、週齢と共に PanIN の stage が進行する。このマウスを KC マウスと呼んでいる。この KC マウスに PGAM を過剰発現させたマウスを掛け合わせることで、この PanIN がどのように変化するかを検証した。



PGAM2 TG マウスで検証したところ、通常の KC マウスと比較して PanIN の程度に大きな差は認めなかった。まずは、このマウスが本当に PGAM2 を過剰発言しているか確認するために腫瘍のライセートを用いて Western blot を行ったところ、PGAM2 の過剰発現を確認できた。

同時に PGAM1 の発現も併せて確認したところ、そもそも膵臓には PGAM2 はほぼ発現しておらず、膵臓では PGAM1 が特異的に発現していることが確認できた。

この段階で PGAM1 の TG マウスを保有していなかったため、PGAM1 の TG マウスを作成し、現在同様の実験を行いながら仮説を検証している段階である。



(4) 膵腫瘍モデルマウスにおける膵腫瘍中間代謝物の解析

膵癌患者においてはセリンの血中濃度が高値であることが知られており、解糖系から分岐するセリン生合成系が亢進している可能性が示唆された。PGAM が触媒する 3-PG→2-PG の反応の上流である 3-PG からセリン生合成が分岐することもあり、この PGAM とセリン生合成系との関連も検証したいと考えた。モデルマウスは上記のように PGAM1 TG マウスで実験を進めている段階であり、それに先駆けてヒト膵癌細胞株を用いて、現在 *in vitro* の実験を進めている段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita YI, Imai K, Kaida T, Yamao T, Tsukamoto M, Nakagawa S, Okabe H, Chikamoto A, Ishiko T, Yoshizumi T, Ikeda T, Maehara Y, Baba H.	4. 巻 33(1)
2. 論文標題 Multimodal radiofrequency ablation versus laparoscopic hepatic resection for the treatment of primary hepatocellular carcinoma within Milan criteria in severely cirrhotic patients: long-term favorable outcomes over 10 years.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Endosc.	6. 最初と最後の頁 46-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00464-018-6264-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa S, Okabe H, Ouchi M, Tokunaga R, Umezaki N, Higashi T, Kaida T, Arima K, Kitano Y, Kuroki H, Mima K, Nitta H, Imai K, Hashimoto D, Yamashita YI, Chikamoto A, Baba H.	4. 巻 20(10)
2. 論文標題 Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) regulates tumor angiogenesis and predicts recurrence and prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 HPB.	6. 最初と最後の頁 939-948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hpb.2018.03.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitano Y, Okabe H, Yamashita YI, Nakagawa S, Saito Y, Umezaki N, Tsukamoto M, Yamao T, Yamamura K, Arima K, Kaida T, Miyata T, Mima K, Imai K, Hashimoto D, Komohara Y, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H.	4. 巻 118(2)
2. 論文標題 Tumour-infiltrating inflammatory and immune cells in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Br J Cancer.	6. 最初と最後の頁 171-180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/bjc.2017.401.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊東山瑠美、石本崇胤、Luke Bu、米村敦子、三宅慧輔、内原智幸、有馬浩太、山下洋市、近本亮、馬場秀夫
2. 発表標題 膵癌進展におけるPHGDH発現とセリン生合成の意義
3. 学会等名 第74回 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊東山瑠美、石本崇胤、Luke Bu、米村敦子、三宅慧輔、北村文優、内原智幸、山下洋市、近本亮、馬場秀夫
2. 発表標題 膵癌特異的なセリン飢餓への応答メカニズムの解明
3. 学会等名 第7回 がん代謝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rumi Itoyama, Takatsugu Ishimoto, Fumimasa Kitamura, Takahiko Akiyama, Luke Bu, Atsuko Yonemura, Keisuke Miyake, Tomoyuki Uchihara, Yo-ichi Yamashita, Hideo Baba
2. 発表標題 Significance of PHGDH expression and serine biosynthesis in pancreatic cancer progression
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	伊東山 瑠美 (Itoyama Rumi)		