

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09501

研究課題名(和文) 悪性髄膜腫における細胞内エネルギー代謝障害の解析

研究課題名(英文) Glycolytic enzyme, PGK1, plays a crucial role in malignant meningioma.

研究代表者

工藤 琢巳 (Kudo, Takumi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：90632125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究により最も悪性髄膜腫に影響を与える遺伝子として解糖系酵素であるPGK1 (Phosphoglycerate Kinase 1)が同定された。本研究目的では分子細胞生物学的手法を用いて、悪性髄膜腫発生におけるPGK1の関与について調べた。培養細胞を用いた研究からPGK1はより細胞増殖を促すことが分かった。メタボローム解析からPGK1を抑制すると解糖系のPGK1の下流の分子の発現が抑制されたが、TCA cycleの分子の発現量は一定の傾向が得られなかった。以上からPGK1は悪性髄膜腫の発生に寄与していることが示唆されるが、必ずしもエネルギー代謝に依存してはいないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

髄膜腫は原発性頭蓋内腫瘍のうち最も発生頻度の高い腫瘍の一つであり、悪性髄膜腫は再発率が高く、生存予後も満足のものではない。本研究により悪性髄膜腫に解糖系が関与しており、PGK1は悪性髄膜腫の治療標的になりうることが示唆された。今後PGK1や解糖系酵素を標的とした治療方法を確立することで悪性髄膜腫の予後の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：BACKGROUND: Some meningioma is classified as WHO grade II or grade III. Our previous study showed Phosphoglycerate Kinase 1 (PGK1), one of glycolytic enzyme was identified as an oncogene of malignant meningioma. In this study we investigated the role of PGK1 in malignant meningioma. METHOD: PGK1 were transduced or suppressed in malignant meningioma cell line, HKBMM, then the phenotype was analyzed. RESULTS: The proliferation of PGK1-suppressed HKBMM cells was significantly suppressed in hypoxic condition. PGK1-overexpressed HKBMM cells showed an increase of colony formation in hypoxic condition. Metabolome analysis using PGK1-suppressed HKBMM cells which were incubated in hypoxic condition showed that the expression of downstream component of PGK1 in the glycolysis.

CONCLUSION: These results suggested that PGK1 functions as a tumorigenic molecule in malignant meningioma. Translational researches were required to confirm the newly identified therapeutic target.

研究分野：脳神経外科

キーワード：悪性髄膜腫 解糖系酵素 PGK1

1. 研究開始当初の背景

髄膜腫は原発性頭蓋内腫瘍のうち最も発生頻度の高い腫瘍の一つであり、その悪性度により WHO grade 1 ~ 4 に分類されている。Grade 1 では手術摘出により 5 年生存率 95.9% と良好な治療効果が得られているが、grade 2、3、4 では手術摘出に化学療法、放射線照射療法を加えても再発率は高く、5 年生存率は 66.3% と良好な治療成績が得られていない (Fig.1)。悪性神経膠腫の研究は多岐にわたり様々な研究が行われているが、悪性髄膜腫 (Grade 2 及び Grade 3 髄膜腫と定義する) は未だに不明な点が多く、研究課題の多い疾病であり、悪性髄膜腫に対する治療法の開発は喫緊の課題である。

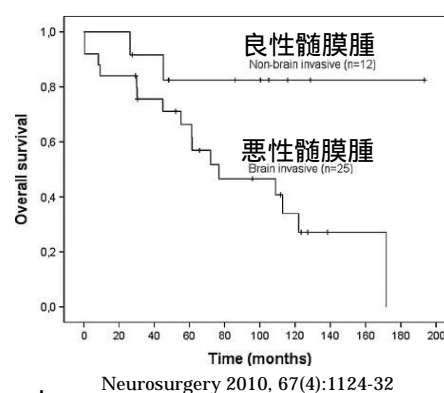


Fig.1

細胞内エネルギー代謝経路はグルコースから ATP を産生してエネルギーを抽出する経路である。解糖系によってグルコースはピルビン酸まで代謝されたのち、ミトコンドリア内での TCA 回路、電子伝達系へと進むが、嫌気的条件下の場合、ピルビン酸は乳酸へと代謝される。通常ピルビン酸は、効率の高いミトコンドリア内の代謝へと進むが、様々な悪性腫瘍において、十分な酸素の存在下でも解糖系が亢進し乳酸が産生されていることが明らかとなっている (Warburg 効果)。これは解糖系への異常な代謝シフトとミトコンドリアの機能障害が主たる原因と考えられており、これによって癌細胞は嫌気条件下でもエネルギーを抽出することが可能となり、また乳酸産生により癌細胞の発育により適した環境を維持することが出来る。悪性度の高い髄膜腫では FDG の取り込みが高く、髄膜腫においても解糖系が亢進していることが示唆される。解糖系への異常な代謝シフトを制御することで悪性腫瘍への新たな治療方法の可能性が期待されている。

申請者の先行研究により **悪性髄膜腫に影響を与える遺伝子として解糖系酵素である PGK1 (Phosphoglycerate Kinase 1) が同定された**。PGK1 は多くの悪性腫瘍においてその発現が亢進し、また **強力な予後不良因子** である。また PGK1 の発現抑制した悪性髄膜腫細胞は細胞増殖が抑制された。さらに遺伝子発現状況をもとにした functional analysis では **ミトコンドリアの機能障害** が示された。

以上の結果から、PGK1 の過活動およびミトコンドリアの機能障害による **解糖系への代謝シフト** が悪性髄膜腫の発生に関与している可能性が示唆される。本研究では分子細胞生物学的手法を用いて、悪性髄膜腫における細胞内代謝解析を Assay kit を用いて行い、更に化合物ライブラリーを用いて細胞内代謝異常に対する薬剤の同定を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性髄膜腫における細胞内代謝異常の解析を行い、この代謝障害に有効な化合物を同定することである。同時に作成した動物モデルを用いて、薬剤投与実験を行い将来患者に投与することを目標とした translational research を行う。

悪性髄膜腫そのものが研究すべき課題の多い分野であり、これ自体が新しい分野であるといえる。特に動物モデル作成は、translational research につながる重要な研究テーマであり、喫緊の課題である。神経膠芽腫をはじめ他の癌の研究領域において発展した種々の研究手法を用いることにより比較的効率的に研究を進めることが出来ると予想している。

現在までに悪性髄膜腫における細胞内代謝に関する研究はほとんどなされていない。この研究が進むことで悪性髄膜腫における細胞内代謝異常の機序が明らかとなり、新たな治療標的の検出が出来る。また悪性髄膜腫の細胞内代謝異常に有効な化合物が同定でき、新たな治療法開発への第一歩となる。更に動物モデルの作成により、治療標的に対する薬剤試験、薬剤耐性研究など translational research を行うことが可能となり、臨床的に極めて重要な情報を得ることが出来る。動物モデルは放射線照射実験などにも応用可能で、汎用性、実用性、重要性が極めて高い。

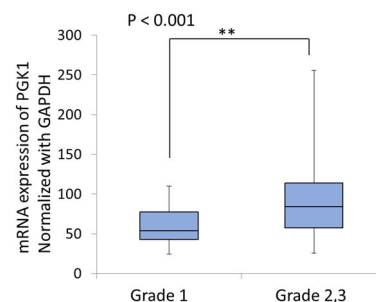


Fig.2

3. 研究の方法

培養細胞は悪性髄膜腫より樹立された HKBMM 細胞を RIKEN より購入した。発現抑制は siRNA 法を用いて行った。

TransfectionはLipofectamine RNAiMAX(Thermo Fischer)を用いた。摘出した腫瘍標本からRNeasy mini kit(QIAGEN)を用いてtRNAを抽出し、cDNAを合成し、qRT-PCRを用いてPGK1の発現量を測定した(Fw:GCCCATGCCTGACAAGTACT、Rv:CCACTTCTGGGCCTACACAG)。低酸素下培養は酸素濃度1%、二酸化炭素濃度5%で培養した。細胞増殖はMTTアッセイを用いて測定した。メタボローム解析はPGK1を発現抑制したHKBM細胞を通常条件および低酸素下でHKBM細胞を3日間培養した。メタボライト抽出法を用いてサンプルを抽出し、解析はHuman Metabolome Technologiesにて行った。

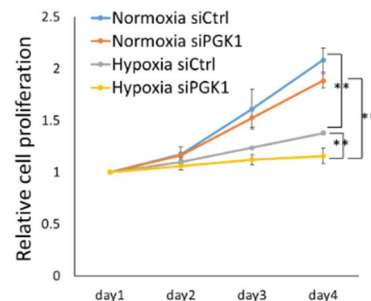


Fig.3

4. 研究成果

(1) PGK1は悪性髄膜腫により多く発現している

治療目的で手術で摘出した髄膜種のサンプル、Grade1 30例、Grade2およびGrade3 28例におけるPGK1の発現量をqRT-PCRを用いて測定した。Grade1と比較しGrade2,3ではPGK1の発現量が明らかに増加していた(Fig.2)

(2) 低酸素下ではPGK1発現抑制により細胞増殖が抑制される

PGK1の発現を抑制したHKBM細胞を通常培養条件下および低酸素下で培養し、MTTアッセイを用いて細胞増殖の評価を行った。低酸素下では通常条件と比較し有意に細胞増殖が抑制された。通常条件ではPGK1発現抑制は細胞増殖に影響を及ぼさなかったが、低酸素下ではPGK1発現抑制により、細胞増殖が抑制された。以上からPGK1は低酸素下において細胞増殖に影響を与えていることが示唆された。

(3) PGK1発現抑制により解糖系酵素発現が低下する

PGK1の発現抑制が解糖系に与える影響を評価すべく、メタボローム解析を行った。CRISPR-d Cas9を用いてPGK1を恒常的に発現抑制したHKBM細胞を生成したが、細胞死が誘導されたため、transient siRNA transfectionを用いて発現抑制したHKBM細胞を用いた。PGK1を発現抑制したHKBM細胞を通常培養条件下および低酸素下で3日間培養し、メタボローム解析を行った。低酸素下ではPGK1より上流の酵素の発現と比較し、PGK1より下流の酵素の発現が減少していた。PGK1を発現抑制すると、PGK1より下流の酵素の発現が減少したが、ピルビン酸およびアセチルCoAはPGK1より下流にも係わらず、PGK1の発現抑制後に増加していた。

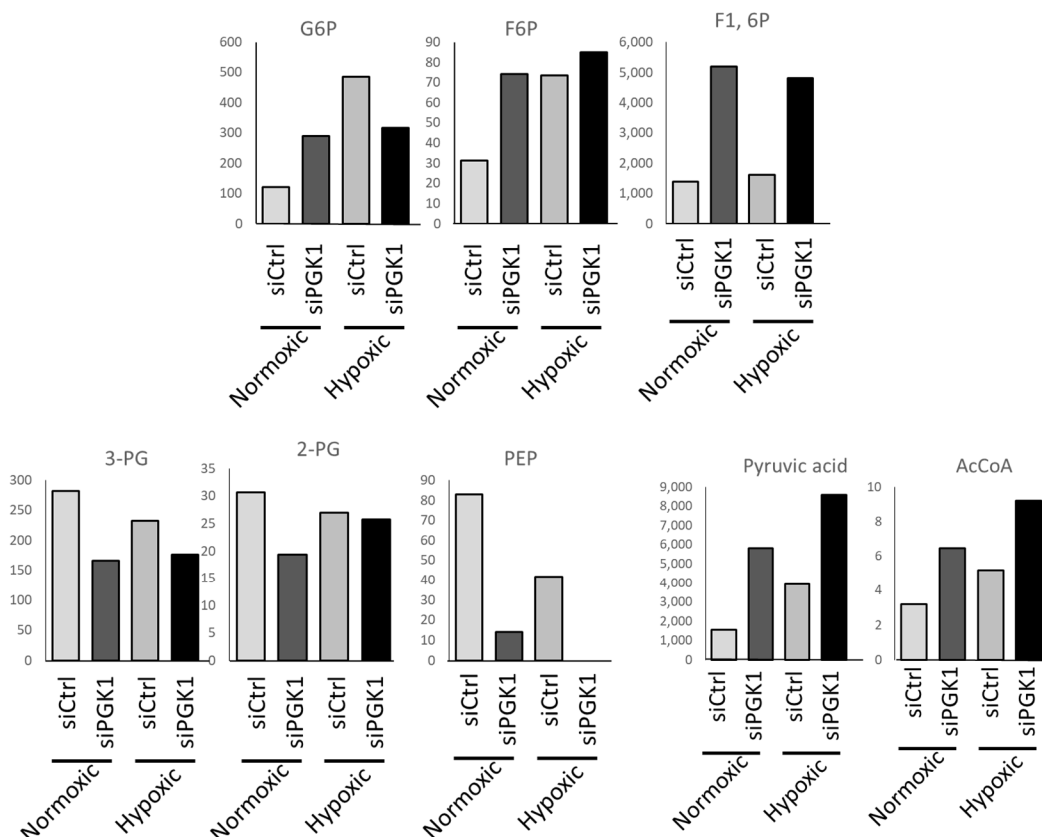


Fig.4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 工藤琢巳、古橋八重子、近藤和樹、田村郁、前原健寿
2. 発表標題 解糖系酵素であるPGK1は悪性髄膜腫において重要な役割を果たしている
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------