

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390272

 研究課題名（和文） 解糖系亢進に関わる肺癌特異的スプライシング異常の臨床的意義と  
診断・治療への展開

 研究課題名（英文） Aberrant pre-mRNA splicing involved in increased flux of glycolysis  
in non-small lung cancer

研究代表者

佐藤 雅美 (SATO MASAMI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30250830

研究成果の概要（和文）：解糖系の亢進は、がんの主要な特性の一つである。本課題では、肺がんにおいて、この解糖系亢進に関わる“解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ M (PKM) の酵素型変換 (PKM スイッチ)”と、その分子機構（スプライシング異常）に関する研究を行った。非小細胞肺癌のスプライシング異常と、FDG-PET シグナル強度の間に、一定の相関があることを見出した。また、PKM の酵素型変換を不可能としたマウスを、ES 細胞を用いた遺伝子改変技術により、開発した。

研究成果の概要（英文）：Increased flux of glycolysis is known as Warburg effect, and now recognized as a core hallmark of cancer. In this study, we explored roles and mechanisms for isozyme-conversion of pyruvate kinase M (PKM), termed PKM-switch, which mediates Warburg effect in lung cancer. PKM-switch was correlated with FDG-PET signal intensity. In addition, a mouse model incapable of switching PKM isoforms was developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学、肺がん

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞における解糖系の異常亢進は古くからワールブルグ効果として広く知られ、その性質を利用した画像診断 (FDG-PET 検査) は、肺がん診療においても一般化しつつある。最近、この代謝異常ががんの低酸素適応をも

たらしている事も明らかにされた。しかし、肺がんにおけるワールブルグ効果の意義や分子機構に関しては、不明の点が非常に多かった。

## 2. 研究の目的

我々のグループは、ワールブルグ効果と密接に関連した、肺がん特異的な、「解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ M (PKM) の遺伝子発現機構における異常 (スプライシング異常)」を見出していた。本課題では、肺がんにおけるスプライシング異常の意義を臨床的にも基礎的にもさらに追求し、さらに、異常を是正するための分子標的の同定に取り組んだ。これらアプローチによって、肺がんのスプライシング異常を標的とし、ワールブルグ効果解消を狙った。新規肺がん治療の基盤となるデータを収集することを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) 臨床サンプルの解析では、手術検体の qRT-PCR 解析、および組織マイクロアレイ等の解析結果と、組織型・TMN 因子/stage・FDG-PET シグナル等の臨床情報との比較照合解析を行った。  
2) 発生工学的手法を用い、ワールブルグ効果を不可能とした ES 細胞・マウスの開発を行った。

## 4. 研究成果

(1) 臨床サンプルを用いた解析から、PKM スプライシング異常が、肺がんにおいて、極めて高率におきていることが明らかになった (図 1)。組織アレイの結果等から、この異常は、非小細胞がんにとりわけ特異的であることが明らかとなった。スプライシング異常と、TNM 因子・stage 等との相関はみとめられなかった。これは、スプライシング異常が、ごく早期の肺がんにおいても既に起きているためと考えられた。Noguchi 分類 A/B に属する症例の IHC 検討でもスプライシング異常がみとめられたことは、前述の結論を強く支持している。

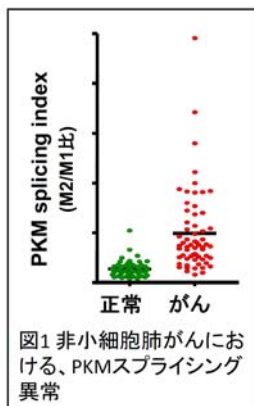


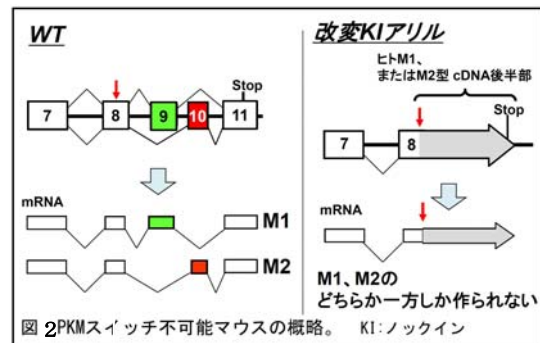
図1 非小細胞肺がんにおける、PKMスプライシング異常

(2) 非小細胞肺がんにおける PKM スプライシング異常の分子機構について、解析を行った。その結果、多くの症例において、hnRNP A1、

hnRNP A2、PTBP1 といったスプライシング制御因子の発現が、がんで上昇していることを見出した。なかでも、PTB の発現上昇は、特に顕著であった。また、これら因子の発現量は、PKM スプライシング異常の程度と関連していた。

(3) 腫瘍径の比較的小さな症例に限って、PKM スプライシング異常と FDG-PET シグナル (PET-SUVmax 値を使用) との間に相関があることが分かった。

(4) PKM の選択的スプライシングを固定化し、ワールブルグ効果を不可能としたマウスモデルの開発に取り組んだ。そのために、まず、ES 細胞における遺伝子ターゲティングを行い、PKM 遺伝子に改変を施したノックイン ES 細胞を樹立した。この変異アリルからは、例えば、PKM のスプライシングが PKM1 (正常型) から PKM2 (がん型) へと切り替わる状況においても、PKM1 型が発現され続ける (図 2)。



(5) PKM1 ノックイン ES 細胞は、通常培養条件では、多分化能を保持したまま増殖可能であったが、低酸素・低グルコース・フィーダーフリー等、ストレス培養条件下では、その自己複製能が減弱していた。また、糖エネルギー代謝にも、広範な異常がみとめられた。

(6) PKM1 ノックイン ES 細胞を用い、ノックインマウスの作製を行った。定法に従い、キメラマウス作製、さらに交配によって、ヘテロノックインマウスを樹立した。ヘテロノックインマウス同士の交配により、ホモ PKM1 ノックインマウスを樹立した (図 3)。

### typing例

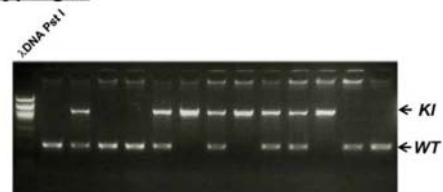


図3 PKM1ノックインマウス樹立

期待通り、ヘテロ PKM1 ノックインマウスでは PKM2 発現が半減し、ホモ PKM1 ノックインマウスでは PKM2 発現が完全に失われていた。代わりに、PKM1 発現が上昇していた。予想に反し、ホモ PKM1 マウスはほぼ正常に出生・生育し、繁殖も可能であった。

(7) 肺がんモデルマウスとの交配に向けて、PKM1 ノックインマウスの戻し交配を行った。マイクロサテライトマーカー解析を併用したスピードコンジェニック法を採用し、コンジェニック率 96% までの戻し交配を達成した。

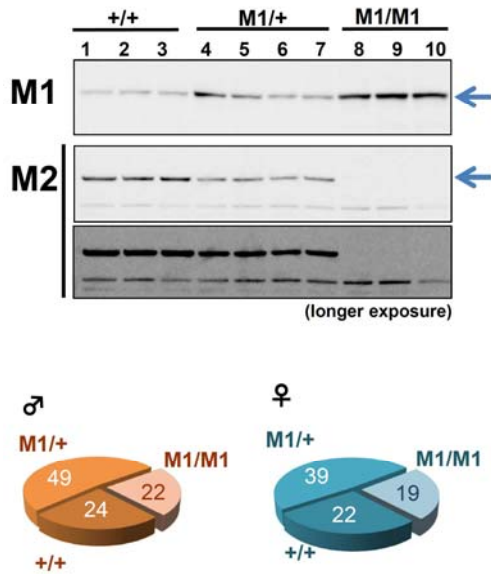


図4 PKM1ノックインマウスは正常に出生・生育し、繁殖も可能である。

## 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 32 件)

- ① Nomura M, Shiiba K, Katagiri C, Kasugai I, Masuda K, Sato I, Sato M, Kakugawa Y, Nomura E, Hayashi K, Nakamura Y, Nagata T, Otsuka T, Katakura R, Yamashita Y, Sato M, Tanuma N, Shima H: Novel function of MKP-5/DUSP10, a phosphatase of stress-activated kinases, on ERK-dependent gene expression, and upregulation of its gene expression in colon carcinomas. **Oncol Rep.** 2012;28(3):931-6. doi: 10.3892/OR.2012.1862. (査読有)
- ② Kato T, Koriyama C, Khan N, Samukawa T, Yanagi M, Hamada T, Yokomakura N, Otsuka T, Inoue H, Sato M, Natsugoe S, Akiba S: EGFR mutations and human papillomavirus in lung cancer. **Lung Cancer.** 2012;78:144-7. doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2012.08.011. (査読有)
- ③ Maeda S, Takahashi S, Sato M: Serum thrombomodulin as a newly identified biomarker for postoperative lung injury: a prospective observational study. **Tohoku J Exp Med.** 2012;228(2):135-41 doi: 10.1620/tjem.228.135. (査読有)
- ④ 田沼延公、発がんにおける PKM スイッチ-意義と分子機構, **実験医学 特集「がんと代謝」** Vol. 30, No. 15, 2012, pp.42-47 (査読無し)
- ⑤ Hiroshima K, Akita H, Usuda K, Ogura S, Kusunoki Y, Kodama T, Saito Y, Sato M, Tagawa Y, Baba M, Hirano T, Horai T, Matsuno Y: Cytological Characteristics of Pulmonary Pleomorphic and Giant Cell Carcinomas. **Acta Cytologica.** 2011;55:173-179doi: 10.1159/000320860. (査読有)
- ⑥ Otsuka T, Nakamura Y, Harada A, Sato M: Extremely rare but a potential complication of diffuse brain edema due to air embolism during lung segmentectomy with selected segmental inflation technique by syringe needle during video-assisted thoracic surgery. **J Thorac Cardiovasc Surgery.** 2011; 142(5):151-2. doi: 10.1016/J.JTCVS.2011.07.061. (査読有)
- ⑦ Katagiri C, Masuda K, Nomura M, Tanoue K, Fujita S, Yamashita Y, Katakura R, Shiiba K, Nomura E, Sato M, Tanuma N, Shima H: DUSP13B/TMDP inhibits stress-activated MAPKs and suppresses AP-1-dependent gene expression. **Mol Cell Biochem.** 2011;352(1-2):155-62. doi: 10.1007/s11010-011-0749-x. (査読有)
- ⑧ Maeda S, Takahashi S, Koike K, Sato M: Primary Ependymoma in the Posterior Mediastinum. **Annal Thoracic Cardiovasc Sur.** 2011;17(5):494-7. doi: 10.5761/atcs.cr.10.01615. (査読有)
- ⑨ Maeda S, Takahashi S, Koike K, Sato M: Preferred Surgical Approach for Dumbbell-shaped Tumors in the Posterior Mediastinum. **Annal Thoracic Cardiovasc Sur.** 2011;17(4):394-6. doi: 10.5761/atcs.cr.10.01537. (査読有)
- ⑩ 佐藤雅美, 斎藤泰紀, 渋谷潔, 中山富雄,

平野隆, 近藤丘, 馬場雅行, 池田徳彦, 佐川元保, 伊豫田明, 宝来威, 中嶋隆太郎, 平田哲士, 三宅真司, 楠洋子, 多田弘人, 古川欣也, 渡辺洋一, 日本肺癌学会・日本呼吸器内視鏡学会・日本臨床細胞学会・3 学会合同委員会報告: 肺門部早期肺癌実態調査アンケート報告, **肺癌**. 2011;51(7):777-85. doi: 10.2482/haigan. 51.777 (査読有)

- ⑪ Masuda K, Katagiri C, Nomura M, Sato M, Kakumoto K, Akagi T, Kikuchi K, Tanuma N, Shima H: MKP-7, a JNK phosphatase, blocks ERK-dependent gene activation by anchoring phosphorylated ERK in the cytoplasm. **Biochem Biophys Res Commun**. 2010;393(2):201-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.097. (査読有)
- ⑫ Yamashita Y, Kasugai I, Sato M, Tanuma N, Sato I, Nomura M, Yamashita K, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T, Katakura R, Shima H: CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples. **J Neurocol**. 2010;100:43-4. doi: 10.1007 / s11060 -010 -0147-3. (査読有)

[学会発表] (計 58 件)

- ① 田沼延公: PKM スイッチ不可能なマウスモデルの開発、日本癌学会 がん代謝シンポジウム、2013 年 1 月 17 日、東京
- ② 佐藤雅美、斎藤泰紀, 佐藤之俊, 柴光年, 渋谷潔, 土田敬明, 中山富雄, 池田徳彦, 三浦弘之, 田中良太, 河原栄, 中嶋隆太郎, 神尾淳子, 島垣二佳子, 田口明美, 長尾緑, 岡上慎一, 三宅真司, 矢羽田一信: 第 2 次肺癌検診喀痰細胞診合同委員会活動状況報告、第 51 回 日本臨床細胞学会秋期大会、2012/11/10、新潟
- ③ 中村好宏、酒瀬川浩一、大塚綱志、永田俊行、渡辺有為、青木雅也、脇田和博、原田亜矢、鈴木聡、佐藤雅美: 上縦隔・肺門リンパ節を一括に摘出する完全鏡視下左上葉切除術、第 53 回日本肺癌学会 2012/11/09、岡山
- ④ 永田俊行、中村好宏、酒瀬川浩一、狩集弘太、青木雅也、渡辺有為、脇田和博、井本浩、山本裕之、佐藤雅美: 大動脈遠位弓部浸潤肺癌に対する開窓型ステントを用いた大動脈合併切除術、第 53 回日本肺癌学会 2012/11/09、岡山
- ⑤ 青木雅也、梅原正、鈴木聡一、原田亜矢、渡辺有為、永田俊行、大塚綱志、狩集弘太、酒瀬川浩一、中村好宏、脇田和博、横枕直哉、柳正和、佐藤雅美: 肺癌進行に対する BMP-7 の臨床病理学的重要性第 53 回日本肺癌学会 2012/11/09、岡山

- ⑥ 原田亜矢、中村好宏、鈴木聡一、梅原正、脇田和博、渡辺有為、青木雅也、永田俊行、大塚綱志、酒瀬川浩一、佐藤雅美: 近赤外光カメラとインドシアニングリーンによる胸膜直下のリンパ流の検討、第 65 回 日本胸部外科学会 2012/10/19、福岡
- ⑦ 田沼延公、渡邊利雄、野村美有樹、佐藤郁郎、椎葉健一、山下洋二、佐藤雅美、島 礼、A mouse model incapable of switching PKM isoforms、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、札幌
- ⑧ 佐藤雅美: 特別講演; 肺動脈血管鞘に注目した 3 つの en-bloc 肺癌肺葉切除リンパ節郭清術、北部九州肺がんセミナー、2011/12/10、福岡、

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 雅美 (SATO MASAMI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・  
教授  
研究者番号: 30250830

### (2) 研究分担者

中村 好宏 (NAKAMURA YOSHIHIRO)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・  
講師  
研究者番号: 60381159

酒瀬川 浩一 (SAKASEGAWA KOICHI)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・  
特任助教  
研究者番号: 80601393

大塚 綱志 (OTSUKA TSUNAYUKI)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・  
助教  
研究者番号: 40464466

永田 俊行 (NAGATA TOSHIYUKI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・  
特任助教  
研究者番号: 70611763

青木雅也 (AOKI MASAYA)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・  
特任助教  
研究者番号: 50624996

島 礼 (SHIMA HIROSHI)  
宮城県立がんセンター (研究所)・がん薬物  
療法研究部・部長  
研究者番号: 10196462

田沼 延公 (TANUMA NOBUHIRO)  
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