

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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659248

研究課題名（和文） 解糖系酵素スプライシング異常の臨床的意義と大腸癌スクリーニングへの応用

研究課題名（英文） Clinical importance of aberrant splicing of pre-mRNA encoding a glycolytic enzyme in colorectal cancer and its potential for diagnostic marker

研究代表者

椎葉 健一 (SHIIBA KENICHI)

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・特任研究員
研究者番号：90196345

研究成果の概要（和文）：臨床サンプルを用いた解析から、解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ M (PKM) のスプライシング異常が、大腸発がんの早い段階で起こることが示唆された。極めて早期の前がん病変と考えられている ACF (aberrant crypt foci) を用いた検討でも、スプライシング異常を示唆する結果が得られた。異常への関与が疑われる、いくつかのスプライシング因子の発現異常を見出した。これらスプライシング因子は、大腸がんでその発現が有意に上昇しており、細胞株においてノックダウンを行うと、スプライシング異常を部分的に是正することが出来た。

研究成果の概要（英文）：Analysis using clinical specimens revealed an aberrant pre-mRNA splicing of pyruvate kinase M (PKM) in early phase during colon carcinogenesis. Such splicing dys-regulation was also observed in aberrant crypt foci of animal models. In addition, we found up-regulation of genes encoding several splicing factors, probably eliciting aberrant PKM splicing in colorectal tumor. Knock-down of these splicing factors partially restored PKM splicing-regulation of cell-lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	360,000	3,260,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小腸大腸肛門外科学

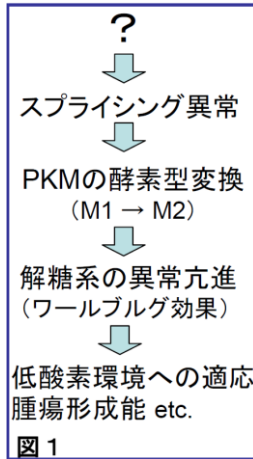
キーワード：大腸癌・遺伝子発現・スプライシング・解糖系酵素・低酸素

1. 研究開始当初の背景

がんにおける解糖系の構成的異常亢進は、古くより「ワールブルグ効果」として広く認識されている。最近普及しつつある FDG-PET 検査は、この代謝異常をがん検出

の理論根拠としており、ほぼ全ての大腸がんがこの異常が起きているという。また最近、ワールブルグ効果が、「低酸素・低グルコース」という特有の微小環境への適応ががん細胞にもたらす事も明らかになってき

た (図 1)。



2. 研究の目的

ワールブルグ効果と密接に関連する解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ M (PKM) の異常な酵素型変換 (M1 型から M2 型へ)、特にその原因 (スプライシング異常) を採り上げて研究を行った。大腸癌のスプライシング異常の臨床的意義についての検討、これを指標とする新規診断法開発の基礎となるデータの収集が本課題の目的である。

3. 研究の方法

がん組織バンクにて収集された検体を中心に、PKM のスプライシング解析を行った。スプライシング解析、および遺伝子発現に関する解析は、mRNA に関しては TaqMan probe を組み合わせた qRT-PCR 法で、タンパクに関しては特異抗体を用いたウエスタンブロット法や免疫組織染色にて行った。

スプライシング可視化に関しては、蛍光タンパク由来のシグナルを指標とするレポーター遺伝子を埋め込んだ BAC コンストラクトを作製し、安定形質発現細胞を樹立した。

4. 研究成果

(1) 臨床サンプルを用いた解析を行い、約 100 症例程度のスプライシング解析 (qRT-PCR 法および免疫組織染色法による; それぞれ図 2 および図 3) を、ほぼ完了した。PKM のスプライシング異常が、大腸がんの極めて多くの症例で見られる異常であることが明らかになった。この異常は、基本的には、初期がんや腺腫においても十分にみとめられた。

臨床サンプルのみならず、ラット化学発がんモデルを用い、ACF (aberrant crypt foci: 大腸がんにおける極めて早期の前がん病変と考えられている) での検討も行った。抗体の交差性の問題から M1 型の発現量は推定できなかったものの、M2 型の著しい上昇がみとめられた。

これらの結果から、PKM のスプライシング異常は、大腸がんの比較的早い段階で起こる、極めて普遍的なイベントであることが示唆された。

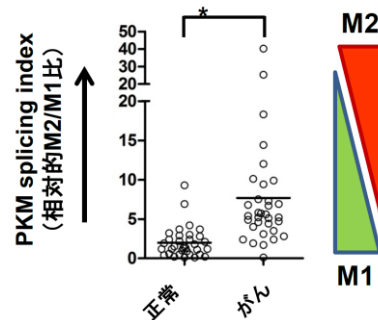


図 2

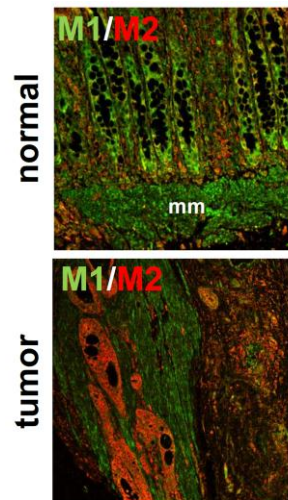


図 3

(2) 独自に開発したモノクローナル抗体を用い、ELISA 法等によって、スプライシング異常の「腫瘍マーカーとしての可能性」評価を行ったが、有用性の立証には至らず、さらなるシステム改良の必要性 (特に、感度の点において) が判明した。一方、特異度に関しては、比較的良好な成績が得られた。

(3) 大腸がんにおけるスプライシング異常

への関与が疑われる、いくつかのスプライシング因子の異常を見出した。これらスプライシング因子は、大腸がんでその発現が有意に上昇していた。また、細胞株においてこれらスプライシング因子のノックダウン実験を行ったところ、スプライシング異常を部分的に是正することが出来た。

独自に開発したレポーターシステムを染色体に安定的に組み込んだ「スプライシング可視化細胞株」を試作した。

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 9 件)

- ① Tomohiko Sase, Kenichi Shiiba
Runt-related transcription factor 2 in human colon carcinoma A potent prognostic factor associated with estrogen receptor.
International Journal of Cancer、査読有、印刷中
- ② Miyuki Nomura, Kenichi Shiiba, Nobuhiro Tanuma
Novel function of MKP-5/DUSP10, a phosphatase for stress-activated kinases, on ERK dependent gene expression, and up-regulation of *its* gene expression in colon carcinomas.
Oncology Reports、査読有、印刷中
- ③ 菊川 利奈、佐藤 郁郎、椎葉 健一
退形性膵管癌（紡錘細胞型）の1例
日本臨床外科学会誌、査読無、73 卷、2012、442 - 447
- ④ Makoto Kinouchi, Kenichi Shiiba
Infiltration of CD14-positive macrophages at the invasive front indicates a favorable prognosis in colorectal cancer patients with lymph node metastasis.
Hepatogastroenterology、査読有、58 卷、2011、352-8
- ⑤ Chiaki Katagiri, Kenichi Shiiba, Nobuhiro Tanuma
DUSP13B/TMDP inhibits stress-activated MAPKs and suppresses AP-1-dependent gene expression.
Molecular and Cellular Biochemistry 査読有、352 卷、2011、155 - 162
- ⑥ 佐藤 正幸、椎葉 健一
低血糖症を呈した骨盤内巨大 solitary fibrous tumor の1例
日本臨床外科学会誌、査読無、71 卷、2010、1649 - 1653
- ⑦ Nele Van Dessel, Nobuhiro Tanuma
The phosphatase interactor NIPPI1 regulates the occupancy of the histone methyltransferase EZH2 at Polycomb targets.
Nucleic Acids Res、査読有、38 卷、2010、7500 - 7512
- ⑧ Yoji Yamashita, Nobuhiro Tanuma
CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples
Journal of Neuro-Oncology、査読有、100 卷、2010、43 - 49
- ⑨ Kouhei Masuda, Nobuhiro Tanuma
MKP-7, a JNK phosphatase, blocks ERK-dependent gene activation by anchoring phosphorylated ERK in the cytoplasm.
Biochem. Biophys. Res. Commun、査読有、393 卷、2010、201 - 206

[学会発表] (計 7 件)

- ① 田沼 延公
リン酸化によるスプライシング装置タンパク Sap155/Sf3b1 制御機構
日本プロテインホスファターゼ研究会
学術集会、2012. 1. 19、大阪

- ② Ayako Kishimoto, Nobuhiro Tanuma
Embryonic Lethality Caused in Mice
Lacking the phosphatase domain of the
PP6c gene
第 34 回日本分子生物学会年会、
2011. 12. 16、横浜
- ③ 大西 伸幸、田沼 延公
Development of mouse brain tumor
models derived from neural stem cells
-神経幹細胞を用いたマウス脳腫瘍モデ
ルの構築
第 70 回日本癌学会学術総会、
2011. 10、名古屋
- ④ 山下 洋二、田沼 延公
グリオーマにおけるピルビン酸キナーゼ M
(PKM) スプライシングのスイッチ機構
日本脳神経外科学会 第 70 回学術総会、
2011. 10. 13、横浜
- ⑤ 野村 美有樹、田沼 延公
Conversion of pyruvate kinase M (PKM)
isozymes in human cancers - an
analysis using isoform-specific
antibodies
BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会
第 83 回日本生化学学会大会 合同大会、
2010. 12. 10、神戸
- ⑥ 野村 美有樹、田沼 延公、椎葉 健一
Generation of isoform-specific
antibodies against pyruvate kinase
(PKM)、第 69 回日本癌学会総会、
2010. 9. 24、横浜
- ⑦ 田沼 延公、椎葉 健一
Aberrant pre-mRNA splicing of
pyruvate kinase M (PKM) in human
cancer
第 69 回日本癌学会総会、2010. 9. 23、
横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎葉 健一 (SHIIBA KENICHI)
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・
特任研究員
研究者番号：90196345

(2) 研究分担者

佐藤 正幸 (SATO MASAYUKI)
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・
特任研究員
研究者番号：00573685

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

佐藤 郁郎 (SATO IKURO)
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)・ティッシュバンクセ
ンター・センター長
研究者番号：50225918

(3) 連携研究者

()
研究者番号