

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592149

研究課題名(和文) ワールブルグ効果解消によるグリオーマ新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy by targeting Warburg effect of gliomas.

研究代表者

山下 洋二 (YAMASHITA, YOUZI)

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：30420045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)： 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、ヒトグリオーマにおいて、極めて高率におきていることを明らかにした。このスプライシング異常により、PKMの発現アイソフォームが、正常型からがん型へと変換していることが判明した。異常の程度は、いくつかのスプライシング制御因子の発現量と良く相関していた。細胞株の実験にて、これらスプライシング制御因子をノックダウンすることで、PKMの発現アイソフォームを、正常型へと部分的に回復させることができた。上記因子に加え、新たなスプライシング因子および低分子化合物を探索するため、スプライシング異常を蛍光可視化できるシステムを開発した。

研究成果の概要(英文)： Pre-mRNA splicing of gene encoding pyruvate kinase M (PKM), a glycolytic enzyme, was dys-regulated, so that expression of PKM isoforms switches from normal- to tumor-type in human glioma. This aberrant splicing was associated with increased levels of a splicing modulator. Experiments using cell-lines showed that suppression of the splicing regulator results in partial restoration of expression of a normal-type PKM isoform. Additionally, we developed mice that transduced with a reporter gene enabling us to live-image PKM splicing regulation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：グリオーマ 解糖系 ワールブルグ効果 PKM スプライシング

1. 研究開始当初の背景

最近の研究から、PKM のスプライシング異常が、腫瘍細胞におけるワールブルグ効果形成に重要であることが、いくつかのがんで報告されていた。

2. 研究の目的

本課題では、がん特有の糖代謝様式（解糖系の異常亢進：ワールブルグ効果）と密接に関連する“解糖系酵素の変換”及びその原因（スプライシング異常）を、グリオーマの新規診断・治療標的として開発する。具体的には、異常の臨床的意義検討、これを指標とする診断法開発、異常の是正・解消に向けた分子標的同定、を行う。～1930年の報告以来、ワールブルグ効果は現象として広く認知されている。この代謝異常をがん検出の理論根拠とする画像診断FDG-PETの結果からも、ほぼ全ての悪性脳腫瘍でこの異常が起きていると見られる。最近、ワールブルグ効果が腫瘍に低酸素適応をもたらす事が明らかになり、その意義も初めて実証された。この古典的知見を再訪し、最新の分子標的医療へと結実させるべく、その基礎となるデータを収集するのが本研究の狙いである。

3. 研究の方法

(1)ピルビン酸キナーゼ M (PKM) のスプライシング異常について

手術検体から total RNA を精製し、逆転写して cDNA を合成した。PKM1 および PKM2 cDNA に特異的な定量 PCR (TaqMan プローブ法) をデザインし、cDNA を鋳型としたリアルタイム PCR 法にて、PKM1 および PKM2 mRNA 発現量を分別定量した。

(2)スプライシング異常に関わるスプライシング制御因子の異常について

スプライシング制御因子の発現を、(1) 同様に qRT-PCR 法にて調べた。

グリオーマにおける PKM 遺伝子座のエピジェネティック制御は、クロマチン免疫沈降-qPCR 法にて調べた。グリオーマ細胞株、および正常培養アストロサイトをホルマリンにて固定した。細胞を破碎後、超音波処理にてクロマチンを断片化し、抗修飾ヒストン抗体による免疫沈降を行った。免疫沈降物から共沈した DNA を精製し、この精製 DNA に、PKM 遺伝子の断片量を、qPCR 法 (サイバークリーン法) にて定量した。同様に、免疫沈降に供する前の細胞抽出物中の遺伝子断片量も定量し、免疫沈降による濃縮率を、各抗体毎に算出した。

(3)いくつかのヒトグリオーマ細胞株において、スプライシング因子およびヒストン修飾因子を siRNA によってノックダウンした。ノックダウンの影響を、PKM のスプライシング解析、あるいはエピジェネティック解析によって検討した。

(4) PKM のスプライシングをライブイメージできるレポーター遺伝子の開発

ヒト PKM 遺伝子の一部をクローニングし、必要な点変異を導入した後、EGFP、DsRed cDNA と融合した。Plasmid 上で構築したこの融合レポーター遺伝子を、BAC ベクターへと組み込み、マウス受精卵へとマイクロインジェクションして、トランスジェニックマウスを作製した。

4. 研究成果

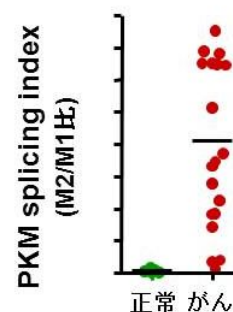


図1 グリオーマにおけるPKMスプライシング異常

(1)

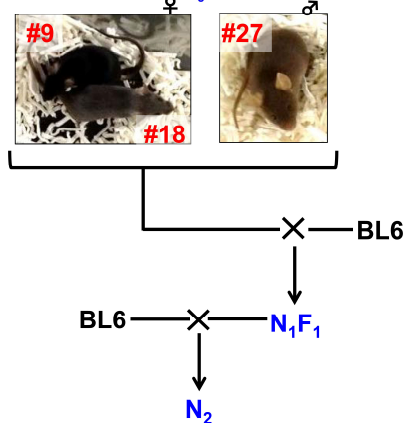
解析したほとんどの症例において、顕著な PKM スプライシング異常がみとめられた。異常の程度は、WHO グレードと相関していた。

(2) 上記スプライシング異常と相関する、PTB、hnRNPA1、hnRNPA2 といった、いくつかのスプライシング制御 RNA 結合タンパクの過剰発現がみとめられた。また、スプライシング異常の程度と相関して、ヒストン H3 のリジン 9 残基、およびリジン 4 残基のメチル化レベル低下をみとめた。

(3) PTB、hnRNP A1、hnRNP A2 をトリプルノックダウンすると、部分的なスプライシング異常の改善がみとめられた。ヒストンメチル化異常の原因として、KDM3A、KDM4C、KDM5B が関与している可能性を検討したが、因果関係はみとめられなかった。

(4) PKM スイッチ可視化のためのレポーター遺伝子を染色体に組込んだマウス (BAC-トランスジェニックマウス・F₀世代) 3 個体について、BL6 系統への戻し交配を行い、ライン化した。

ファウンダーマウス (F₀)



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 6 件)

Takahashi K, Shima Hほか 6 名、Sialidase NEU4 Hydrolyzes Polysialic Acids of Neural Cell Adhesion Molecules and Negatively

Regulates Neurite Formation by Hippocampal Neurons. *J Biol Chem*. 査読有 287 巻、2012、14816-14826

Nomura M, Yamashita Y, Shima H ほか 8 名、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. *Oncol Rep*, 査読有 28 巻、2012、931-936

Sugiyama S, Yamashita Y, ほか 7 名、Safety and feasibility of convection-enhanced delivery of nimustine hydrochloride co-infused with free gadolinium for real-time monitoring in the primate brain., *Neurol Res*, 査読有 34 巻、2012、581-587

Aizawa-Kohama M, Yamashita Y ほか 6 名、Clinicopathological analysis of nine consecutive central nervous system primitive neuroectodermal tumors in a single institute. *Brain Tumor Pathol*, 査読有 30 巻、2012、15-27

Shibahara I, Yamashita Y, ほか 9 名、IDH 1/2 gene status defines the prognosis and molecular profiles in patients with grade III gliomas. *Int J Clin Oncol*, 査読有 17 巻、2012、551-561

Shingo Nakahata, 他 17 名, Hiroshi Shima, Masafumi Taniwaki, Ryoji Yamaguchi, and Kazuhiro Morishita, Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers, *Nature Communications*, 査読有、5 巻、2014、3393

[学会発表](計 4 件)

田沼延公、山下洋二、島礼、渡邊利雄
A mouse model incapable of switching PKM isoforms、第 7 1 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、札幌

松本祥子、坂本良美、野村美有樹、田中
遼大、盛田麻美、伊藤しげみ、椎葉健
一、野村栄樹、片倉隆一、山下洋二、佐藤
郁郎、渡邊利雄、島礼、田沼延公、Generation
of knock-in mice to dissect
isoform-specific roles for each splicing
isoform of pyruvate
kinase M in vivo、第 36 回分子生物学会、2013
年 12 月 05 日、神戸

坂本良美、渡邊利雄、野村美有樹、山下
洋二、椎葉健一、佐藤郁郎、佐藤雅美、島
礼、田沼延公、ノックインモデルを用いた、
ピルビン酸キナーゼ M (PKM) アイソフォー
ムの機能解析、第 72 回日本癌学会学術集会、
2013 年 10 月 05 日、横浜

Yoji Yamashita, Nobuhiro Tanuma,
Ichiro Shibahara, Yukihiro Sonoda,
Masayuki Kanamori, Ryuta Saito, Toshihiro
Kumabe, Teiji Tominaga, Hiroshi Shima,
Ryuichi Katakura, Ptpz gene encoding a
transmembrane-type protein phosphatase
is up-regulated by Sox-2 in glioma., AACR
ANNUAL MEETING 2013、2013 年 04 月 06 日、
Washington, DC

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 洋二 (YAMASHITA, Youzi)
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：30420045

(2) 研究分担者

島 礼 (SHIMA, Hiroshi)
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・部長
研究者番号：10196462

(3) 連携研究者

()

研究者番号：