

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650629

研究課題名（和文） ワールブルグ効果解消による癌治療開発へがん組織バンクを活用して

研究課題名（英文） Development of novel therapy targeting the Warburg effect of cancer

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

腫瘍細胞における糖代謝異常と密接に関連する、解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ M (PKM) に関する解析を行った。臨床検体の解析から、非常に多くのがん種・症例で、PKM アイソフォームの発現が、スプライシング制御の異常によって、PKM1 から PKM2 へと変換していることが明らかになった。また、蛍光によって、PKM のスプライシングパターンを、生細胞観察可能なレポーター遺伝子を開発した。培養細胞を用いた実験により、このレポーター遺伝子が、概ね正しく機能することを確認した。

研究成果の概要（英文）：

A glycolytic enzyme, pyruvate kinase M (PKM), has been suggested to play important roles in altered metabolism in cancer cells. In this study, we analyzed splicing regulation of the PKM gene in tumor. Analysis using clinical specimens revealed that pre-mRNA splicing of PKM gene switches from M1- to M2-type in most case of various human cancers. In addition, we developed a reporter gene enabling us to detect PKM conversion in living cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：代謝、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

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、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、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。ワールブルグ効果形成の機序に関しては、最近、ある解糖系

酵素の特定アイソフォームの発現が、非常に重要な役割を果たすことが報告されていた。

2. 研究の目的

我々グループは、ワールブルグ効果と密接に関連した、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、おけるスプライシング異常の臨床的意義を明らかにし、さ

らに、異常を是正するための分子標的・低分子化合物の同定に向け、独自の機能的スクリーニング系開発に取り組んだ。これらアプローチによって、肺癌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) 当該研究施設がん組織バンク所収検体を対象に、qRT-PCR法・免疫組織染色・組織アレイ等を用いてPKM遺伝子のスプライシング解析を行うとともに、その結果と各種臨床情報との照合・比較・相関解析を行った。また、スプライシング異常が惹起される分子メカニズムについても検討を行った。

(2) 蛍光によってPKMのスプライシングパターンを捕捉可能なレポーター遺伝子を構築した。

4. 研究成果

(1) 臨床検体の解析により、グリオーマ・肺癌・大腸がん・乳がんにおいて、PKMのスプライシング異常が、非常に高率で起きていることが明らかになった(図1)。

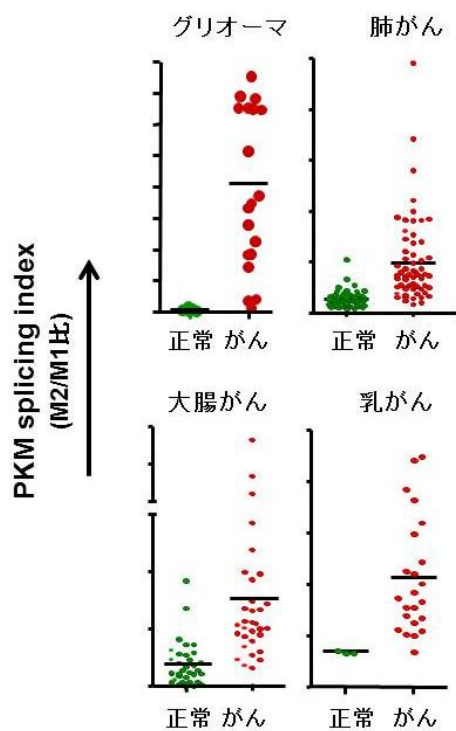


図1 ヒトがんにおける、PKMのスプライシング異常

また、がん種によって、以下の点が明らかになっている；

①非小細胞肺癌において、TNM因子との相関はみとめられないが、stage 1a期の検体ではスプライシング異常の程度が比較的低い

こと。
②非小細胞肺癌において、腫瘍径が比較的小さな症例においては、スプライシング異常の程度とFDG-PETシグナル(SUVmax値を使用)との間に相関がみとめられること。

③小細胞肺癌、および頭頸部がんの多くの症例では、スプライシング異常はみとめられないものの、PKMの発現異常が起きていること。

④グリオーマにおけるスプライシング異常の程度が、WHOグレードと良く相関すること。

⑤乳がんにおいて、スプライシング異常とVEGF(血管新生に関与する増殖因子)発現との間に強い相関があること。Her2異常との相関はみとめられないこと。

⑥グリオーマ・乳がんのPKMスプライシング異常が、いくつかの抑制性スプライシング制御因子の発現異常と強く相関すること。

⑦それらスプライシング因子の発現を抑制することで、PKMスプライシング異常を、部分的ながら、是正することができること(図2)。

qRT-PCR

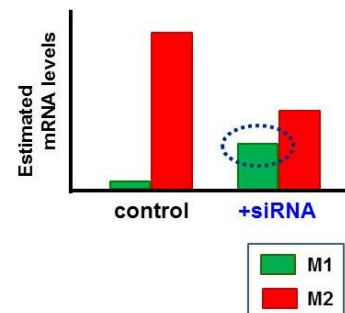


図2 スプライシング因子抑制による、PKMスプライシング異常の抑制効果

(2) GFPやRFPを利用し、PKMのスプライシング変化を、細胞の蛍光変化に基づいてモニターできるレポーター遺伝子を開発した(図3)。

このレポーター系では、PKM1型、またはPKM2型のスプライシングによって、それぞれGFP(A)、またはRFP(B)融合型の蛍光タンパクを生じる設計になっている。レポーターの基本カセット作製を完了させるとともに、BACベクターへの埋め込みも行った。細胞株への一過性導入を行って、レポーターの動作確認を行い、フローサイトメトリーやタイムラプス観察により、概ね、良好な結果を得た。また、上記レポーター遺伝子を染色体に安定的に組み込んだ細胞株を、複数作製した。

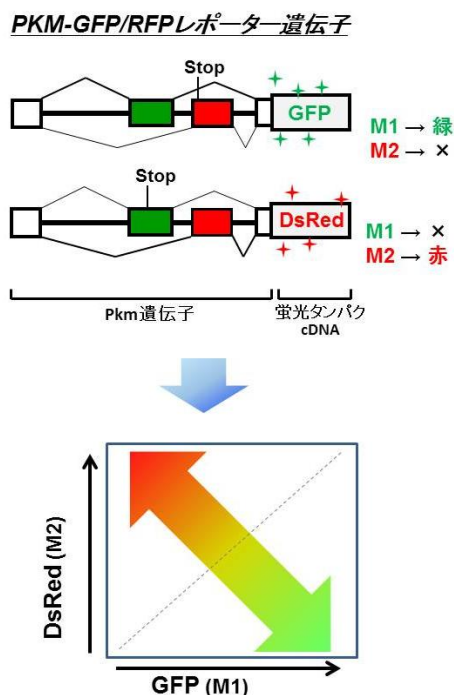


図3 レポーター遺伝子を用いた、蛍光によるPKMスプライシングパターンの検出

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)

- 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/
- ② Ito S, Ishida E, Skalova A, Matsuura K, Kumamoto H, Sato I: Case report of Mammary Analog Secretory Carcinoma of the parotid gland. **Pathol Int.** 2012;62(2):149-52. Doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02759.x.
- ③ Kawamura S, Sato I, Wada T, Yamaguchi K, Li Y, Li D, Zhao X, Ueno S, Aoki H, Tochigi T, Kuwahara M, Kitamura T, Takahashi K, Moriya S, Miyagi T: Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) regulates progression of prostate cancer to androgen-independent growth

through modulation of androgen receptor signaling. **Cell Death Differ.** 2012; 19(1):170-9.

- ④ Yamaguchi K, Shiozaki K, Moriya S, Koseki K, Wada T, Tateno H, Sato I, Asano M, Iwakura Y, Miyagi T: Reduced susceptibility to colitis-associated colon carcinogenesis in mice lacking plasma membrane-associated sialidase. **PLoS One.** 2012;7(7):e41132
- ⑤ 田沼延公, 癆がんにおける PKM スイッチ-意義と分子機構、実験医学 特集「がん代謝」 Vol. 30, No. 15, 2012, pp.42-47
- ⑥ 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.

[学会発表] (計3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 山下洋二、鈴木博義、伊藤しげみ、佐藤郁郎、片倉隆一、炎症性脳アミロイド血管症の一例、第19回東北脳神経病理研究会、2012年11月17日、福島
- ③ 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

伊藤 しげみ (ITO SHIGEMI)

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: 80600006

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

(3)連携研究者
()

研究者番号：