

## 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：23659700

研究課題名（和文）グリオーマに解糖系異常亢進をもたらすスプライシング異常

研究課題名（英文）Aberrant pre-mRNA splicing that contributes to increased glycolysis in glioma

研究代表者

片倉 隆一（KATAKURA RYUICHI）

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：10442675

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、グリオーマにおいて、極めて高率におきていることが明らかになった。この異常により、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。その異常の程度は、ある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、この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。また、PKM のアイソフォーム変換を不可能としたマウスモデルを開発した。

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 model in which the isozyme-conversion of PKM is disabled.

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：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：代謝、解糖系、ワールブルグ効果、PKM、グリオーマ

## 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、がんの低酸素適応や幹細胞性維持に働いている事も明らかになりつつある。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。

## 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、グリオーマ特異的な、「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、グリオーマ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するとともに、異常の分子機構、異常を指標とした新規診断法開発に取り組んだ。これらアプローチによって、グリオーマ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。新規グリオーマ診断法・治療法開発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、手術検体を用いて qRT-PCR 法、ウエスタンブロット法、免疫組織染色等によってスプライシング解析を行い、WHO grade やその他臨床情報との比較照合解析を行った。また、ELISA 法を用いて、血中腫瘍マーカーとしての可能性を評価した。

(2) PKM スプライシング異常の分子機構については、臨床検体、および樹立細胞株での解析によって、解明を試みた。

(3) 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、グリオーマにおいて、極めて高率におきていることが明らかになった (図1)。異常の程度と、WHO grade との間で、相関がみとめられた。

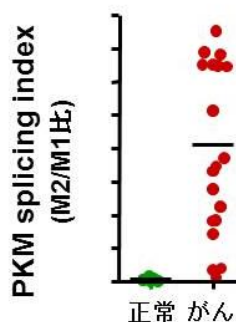


図1 グリオーマにおけるPKMスプライシング異常

(2) 独自に開発した特異抗体を用い、組織染色条件の最適化を行った。その結果、とくに、蛍光標識二重染色法とサブトラクション法を組み合わせた場合に、正常組織に浸潤したグリオーマと思われる細胞を、ほぼ単一細胞の解像度で確認できた (図2)。今後、既存の各種マーカーとの共染色を進め、その細胞のアイデンティティを詳細に検討し、病理

診断への応用を目指す予定である。



図2 subtraction画像

血中腫瘍マーカーへの応用という点では、ELISA を独自に開発し検討を行ったが、十分な感度を得られておらず、今後の改良を要する事が分かった。

(3) グリオーマにおけるスプライシング異常のメカニズムに関しては、一群のスプライシング因子の発現と、PKM スプライシング異常との間に、強い相関があることが分かった。shRNA を用い、いくつかのグリオーマ細胞株においてこれら因子をノックダウンすると、部分的にはあるが、PKM のスプライシング異常を是正することが出来た。これら結果は、スプライシング異常を人為的に是正可能なことを示している。と同時に、ノックダウンの効果が部分的であったことから、さらなる未知の制御機構が存在することが示唆された。

(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よう、改変がなされている。

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)。

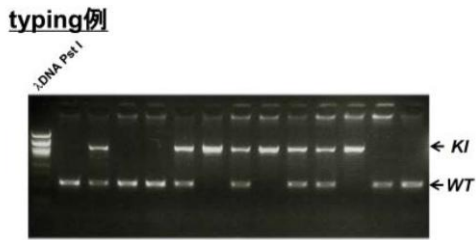


図3 PKM1ノックインマウス樹立

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 (図4)。

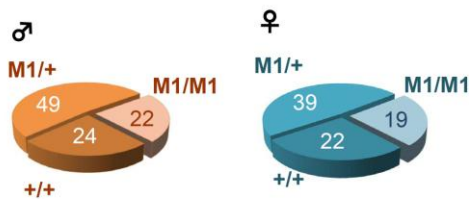
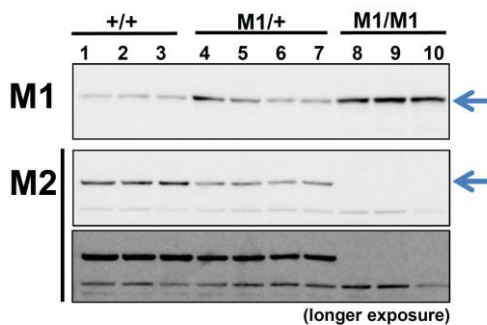


図4 PKM1ノックインマウスは正常に出生・生育し、繁殖も可能である。

(5) グリオーマモデルマウスとの交配や、神経幹細胞の形質転換による *ex vivo* 系での解析に向けて、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98%までの戻し交配を達成した。

## 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4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 田沼延公, 発がんにおける PKM スイッチ-意義と分子機構、査読無、実験医学 特集「がんと代謝」Vol. 30、No. 15、2012、pp. 42-47
- ④ 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4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 山下洋二、春日井勲、田沼延公、柴原一陽、園田順彦、金森政之、齋藤竜太、隈部俊宏、富永悌二、島礼、片倉隆一、悪性グリオーマ検体およびグリオーマ樹立株における PTPzeta の解析、日本脳神経外科学会 第71回総会、2012年10月18日、大阪
- ④ 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

片倉 隆一 (KATAKURA RYUUICHI)  
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：10442675

(2) 研究分担者

伊藤 しげみ (ITO SIGEMI)  
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：