

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501326

研究課題名(和文) がんのワールブルグ効果に関連するスライシング異常の意義と機序

研究課題名(英文) Roles for pyruvate kinase M in tumorigenesis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ピルビン酸キナーゼM(PKM)に関し、そのアイソフォーム変換を不可能とした細胞・マウスモデルの作製と解析を行った。Pkm1-KIおよびPkm2-KIマウスから単離した各種臓器、および胎児線維芽細胞(MEF: mouse embryonic fibroblast)のメタボローム解析や細胞外フラックス解析を行った結果、Pkm1-KIおよびPkm2-KIのいずれもが、細胞内代謝物のレベルに広範な影響を与えることが明らかになった。表現型解析により、Pkmスイッチを介した代謝制御が、細胞老化やがん化など、細胞の運命決定において重要な役割を果たすことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Two isoforms of pyruvate kinase M (Pkm), Pkm1 and Pkm2, differentially control flux of carbon sources from glycolysis to TCA cycle. Thus the abundance of Pkm1 and Pkm2 within cells is important to tune a balance between glycolysis and aerobic metabolism. Using primary cells of the mice which are genetically engineered to express only a single isoform of each Pkm, it was revealed that both Pkm1- and Pkm2-driven metabolism play unique and essential roles in cell-fate decisions during cellular senescence and immortalization/transformation processes.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：PKM 代謝 ワールブルグ効果 スライシング がん

1. 研究開始当初の背景

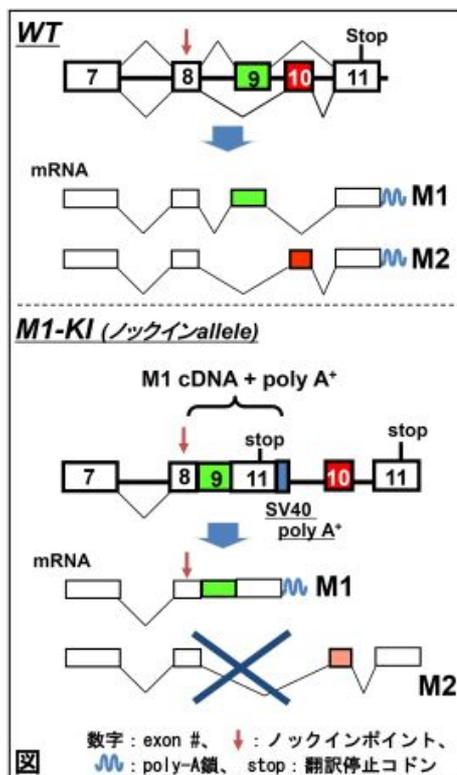
O. Warburg は、1930 年、“がん細胞では好気的環境下においても嫌気的解糖系の異常亢進がみられる”と報告した。「ワールブルグ効果」と呼ばれるこの代謝異常は、現象として広く認知されている。例えば、最新画像診断として近年急速に普及しつつある FDG-PET 検査は、この特有の糖代謝様式をがん検出の理論根拠としており、ほぼ全てのがん種で異常がみとめられるという。

2. 研究の目的

本課題では、がん特有の糖代謝様式(嫌気的解糖系の構成的異常亢進;ワールブルグ効果)と密接に関連する「解糖系酵素遺伝子のスプライシング異常」の意義・分子機構の解明に取り組む。具体的には、遺伝子改変マウスを用いた解析により、スプライシング異常・ワールブルグ効果を是正することで実際にがんを抑制できるか否か? 検討する。スプライシングを標的に、ワールブルグ効果解消を狙った新規がん治療・予防法開発のための基礎となるデータを収集することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

腫瘍細胞における代謝再プログラム化において決定的役割を果たす解糖系酵素、ピルビン酸キナーゼ M (PKM; pyruvate kinase M) に関し、そのアイソフォーム変換を不可能とした細胞・マウスモデルの作製と解析を行った。



4. 研究成果

(1) PKM2(M2)-ノックイン (KI) マウスの炭

し交配 (C57/BL6 に対して) を行い、コンジエニック化を完了した。

(2) Pkm1-KI および Pkm2-KI マウスから単離した各種臓器、および胎児線維芽細胞 (MEF: mouse embryonic fibroblast) のメタボローム解析や細胞外フラックス解析を行った。その結果、Pkm1-KI および Pkm2-KI のいずれもが、細胞内代謝物のレベルに広範な影響を与えること、また、細胞の好気代謝に影響を及ぼすことが明らかになった。これら KI-MEF の表現型解析により、Pkm スイッチを介した代謝制御が、細胞老化やがん化など、細胞の運命決定において重要な役割を果たすことが分かった。

(3) PKM-KI を、活性化変異型 Kras ノックアウトと交配し、得られた二重変異に Cre リコンビナーゼを発現するアデノウイルスを投与して肺がんを誘導する実験を開始した。また、いくつかの化学発がん実験も開始した。

(4) マウス受精卵におけるゲノム編集により、Pkm1 と Pkm2 のいずれも欠損するマウスの作製を試みた。ヘテロ欠損マウス同士の交配結果から、ホモ Pkm1/2 欠損マウスは、着床後極めて早い段階で致死となることが示唆された。

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 6 件)

1. Hayashi K, Momoi Y, Tanuma N,ほか 18 名 . Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA. **Oncogene 2015 in press** 査読有
2. Kato H, Kurosawa K, Inoue Y, Tanuma N, ほか 17 名 , Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis. **Cancer Lett.** 2015 in press 査読有
3. Konno M, Ishii H, Koseki J, Tanuma N, ほか 13 名. Pyruvate kinase M2, but not M1, allele maintains immature metabolic states of murine embryonic stem cells. **Regenerative Therapy** 1, 63-71, 2015 査読有
4. Kanamori M, Higa T, Sonoda Y, Murakami S, Dodo M, Kitamura H, Taguchi K, Shibata T, Watanabe M, Suzuki H, Shibahara I, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, Yamamoto M, Motohashi H, Tominaga T.: Activation of the NRF2 pathway and its impact on the prognosis of anaplastic glioma patients. **Neuro. Oncol.**, 2015: 17(4):555-65 査読有
5. Shibahara I, Sonoda Y, Shoji T, Kanamori M, Saito R, Inoue T,

- Kawaguchi T, Yamashita Y, Watanabe T, Kumabe T, Watanabe M, Suzuki H, Tominaga T: Malignant clinical features of anaplastic gliomas without IDH mutation. **Neuro. Oncol.**, 2015 17(1): 136-44 査読有
6. Hamabe A, Konno M, Tanuma N,ほか 11 名、The role of Pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation and epithelial-mesenchymal transition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2014 (111)15526-31 査読有
- [学会発表](計 27 件)
1. 田沼延公:PKM スイッチ不可能なマウスモデル。日本癌学会 がん代謝シンポジウム 2013。 2013.1.17-18 (東京)
  2. Nobuhiro Tanuma : Functions of pyruvate kinase M(PKM)isoforms in tumor development。第 72 回日本癌学会 学術集会 Symposia"Cancer Cell Metabolism" 2013.10.3-5 (横浜)
  3. Nobuhiro Tanuma : Roles for pyruvate kinase M (PKM) isoforms in tumor metabolism。第 36 回 日本分子生物学会 2013.12.3-6 (神戸)
  4. 田沼延公 :ピルビン酸キナーゼ M と、がんの代謝。第 1 回 がん代謝研究会 2013.10.30-11.1 (鶴岡)
  5. 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、隅部俊宏、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。脳神経外科学会 2012.10.17 19 (大阪)
  6. 松本祥子、岸本綾子、国下侑里、近藤玄、野村美有樹、渡邊利雄、島礼、田沼延公 : ワールブルグ効果に関する in vivo 解析のためのマウスモデル開発。第 35 回日本分子生物学会 2012.12.11 14(福岡)
  7. 松田俊、足立淳、井原賢、田沼延公、島礼、井倉正枝、井倉毅、松田知成 : ピルビン酸キナーゼ M2 はダイオキシン受容体の活性化補助因子である。第 35 回日本分子生物学会 2012.12.11 14(福岡)
  8. 坂本良美、松本祥子、渡邊利雄、近藤玄、野村美有樹、野村栄樹、椎葉健一、島礼、田沼延公:PKM アイソフォームに関する生理的、および病態生理的機能解析。第 86 回日本生化学会大会 2013.9.11-13(横浜)
  9. Takeharu Shiroki, Nobuhiro Tanuma, Ikuro Sato, Nobuyuki Tanaka, Kazuo Sugamura, Kennichi Satoh : Pyruvate kinase type M2(PKM2)is involved in human gastric cancer development. 第 72 回日本癌学会学術集会 2013.10.3-5(横浜)
  10. 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 2013.10.3- 5(横浜)
  11. 坂本良美、野村美有樹、松本祥子、盛田麻美、田中遼太、島礼、渡邊利雄、田沼延公 : 発がんに伴う、Pyruvate Kinase M のアイソザイム変換-代謝再プログラム化における意義解明のための新規マウスモデル。第 6 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 2014.2.20-21(三重)
  12. 林克剛、田沼延公、加藤浩之、桃井勇貴、渡邊利雄、島礼 : PPP6c 遺伝子欠損による皮膚腫瘍形成の亢進、第 6 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2014.2.20-21(三重)
  13. 小河穂波、岸本綾子、住吉麻美、早川夏姫、鈴木麻衣、田沼延公、島礼、渡邊利雄 : 癌と関連する Ppp6c 遺伝子を欠損するマウスの作製と解析。第 6 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2014.2.20-21(三重)
  14. Yoji Yamashita, Nobuhiro Tanuma, Ichiro Shibahara, Yukihiko Sonoda, Masayuki Kanamori, Ryuta Saito, Toshihiro Kumabe, Teiji Tominaga, Hiroshi Shima, Ryuichi Katakura: Ptpnz gene encoding a transmembrane-type protein phosphatase is up-regulated by Sox-2 in glioma. AACR ANNUAL MEETING 2013, Washington DC., 2013.4.6-10
  15. 林克剛、小河穂波、岸本綾子、加藤浩之、田沼延公、渡邊利雄、島礼 : Ppp6c 遺伝子欠損は、マウス皮膚腫瘍形成を促進する。第 80 回日本化学会東北支部会 2014.5.10 (秋田)
  16. 白木健悠、横山美沙、田沼延公、玉井恵一、山口壹範、佐藤郁郎、田中信幸、菅村和夫、佐藤賢一: ピルビン酸キナーゼ M2(PKM2)は正常胃粘膜で有意に発現しており、その発現増強が胃癌の進展に関与している。第 73 回 日本癌学会学術総

- 会、2014. 9.25-27(横浜)
17. 浜部敦史、今野雅允、山本浩文、水島恒和、竹政伊知朗、田沼延公、島礼、西田尚弘、川本弘一、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始：上皮間葉移行におけるピルビン酸キナーゼ M2 の遺伝子発現制御機能、第 73 回 日本癌学会学術総会、2014. 9.25-27(横浜)
  18. 野村美有樹、坂本良美、佐藤郁郎、三浦康、椎葉健一、山下洋二、島礼、田沼延公：発生や細胞分化・細胞老化に伴う、ピルビン酸キナーゼ M アイソフォームの発現制御、第 73 回 日本癌学会学術総会、2014. 9.25-27(横浜)
  19. 今野雅允、田沼延公、西田尚弘、川本弘一、小関準、後藤典子、島礼、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始：マイクロ RNA369 はピルビン酸キナーゼのスプライシングを制御する。第 73 回 日本癌学会学術総会、2014. 9.25-27(横浜)
  20. 加藤浩之、田沼延公、三浦康、角川陽一郎、椎葉健一、山下洋二、林克剛、野村美有樹、佐藤郁郎、伊藤しげみ、渡邊利雄、島礼：皮膚 Ppp6c 欠損マウスは、UVB 誘導皮膚扁平上皮発がんを高感受性となる。第 73 回 日本癌学会学術総会、2014. 9.25-27(横浜)
  21. 坂本良美、野村美有樹、佐藤郁郎、三浦康、椎葉健一、山下洋二、渡邊利雄、島礼、田沼延公：単一のピルビン酸キナーゼ M アイソフォームを発現するマウスの解析。第 73 回 日本癌学会学術総会、2014. 9.25-27(横浜)
  22. Nomura M, Sakamoto Y, Ito S, Katakura R, Shiiba K, Matsumoto S, Watanabe T, Shima H, Tanuma N. Regulation of isoform-expression of pyruvate kinase M (PKM) during cellular differentiation and senescence. 第 37 回 日本分子生物学会年会、2014.11.26(横浜)
  23. 坂本良美、野村美有樹、佐藤郁郎、三浦康、椎葉健一、山下洋二、渡邊利雄、島礼、田沼延公. Characterization of mice expressing a single isoform of pyruvate kinase M. 第 73 回 日本癌学会学術総会、2014.9.26(横浜)
  24. 坂本良美、ほか 3 名、単一のピルビン酸キナーゼ M アイソフォームを発現するマウスの解析、第 2 回 がん代謝研究会 2014.07.11(東京)
  25. Nomura M, Sakamoto Y, Tanaka R,

Morita M, Sato T, Watanabe T, Shima H, Tanuma N : Roles for pyruvate kinase M in metabolic rewiring during cellular sense. 11th ICPP 2014.11.12-14, Sendai

26. Sakamoto Y, Nomura M, Matsumoto S, Inoue Y, Watanabe T, Shima H, Tanuma N: Novel mouse models to dissect isoform-specific functions of pyruvate kinase M. 11th ICPP 2014.11.12-14, Sendai

27. Shiroki T, Yokoyama M, Tanuma N, Tamai K, Yamaguchi K, Sato I, Shima H, Tanaka N, Sugamura K, Satoh K: PKM2 is dominantly expressed in normal gastric mucosa and its overexpression is involved in gastric cancer development. 11th ICPP 2014.11.12-14, Sendai

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 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 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
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

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

### (2) 研究分担者

山下 洋二 (YAMASHITA YOJI)  
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

(3)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