

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640072

研究課題名(和文) 発がん初期における「代謝再プログラム」過程の可視化 実験病理学的解析への応用

研究課題名(英文) Fluorescent live-imaging of the switching of pyruvate kinase isoforms during tumorigenesis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000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)の選択的splicing制御の蛍光可視化に取り組んだ。蛍光タンパクを用いたレポーター遺伝子を染色体に組込んだマウスを作製し、発がん実験を施行した。発がん型Krasを誘導発現させることにより、上述マウスに短期間で効率よくて肺がんを誘導できた。それら肺がんでは、期待通り、M2型PKMの発現が著しく上昇していた。しかし、それに対応するレポーター遺伝子由来の蛍光を検出することができなかった。従って、当初目的のためには、さらなるレポーター遺伝子の改良、あるいはトランスジェニックマウス作製法の変更が必要と思われる。

研究成果の概要(英文)：Pyruvate kinase M (PKM) exists as two isoforms, M1 and M2, generated by alternative splicing. Expression of these isoforms switches from M1- to M2-type during tumorigenesis so that normal differentiated and proliferating/tumor cells express M1 and M2, respectively. In this study, a reporter-gene system, enabling us to visualize PKM-switch by cell-autonomous fluorescence, was developed. Using the reporter-gene, we generated transgenic mice, and examined those for lung tumor model. Unfortunately, any fluorescent signals except for auto-fluorescence were detected in tissues examined including tumor of the Tg-mice. More improvement(s) of the Tg-construct and/or alternative methods for introducing it into the mouse genome might be needed.

研究分野：腫瘍生物学

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

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

ワールブルグ効果の出現に重要と考えられているのが、解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ M (PKM) である。PKM には、選択的 mRNA splicing によって生じる Pkm1・Pkm2 という 2 つの isoform がある。我々は、この切換えの蛍光可視化に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックコンストラクト EF1a プロモーターの制御下に蛍光レポーター cDNA を発現するプラスミドを、制限酵素 Pvu I にて直鎖化後、マウス受精卵のマイクロインジェクションに用いた。

(2) PKM スイッチ可視化カセットトランスジェニックマウスの作製

BDF1 系統マウス受精卵に、直鎖化したレポーター遺伝子プラスミド DNA をマイクロインジェクションし、作製した。得られた産仔を F0 世代とし、これらマウスからゲノム DNA を抽出し、トランスジーンの有無を PCR 法により判別した。

(3) トランスジェニック遺伝子の検出  
トランスジーン有無判定のための PCR 反応は、以下の条件で行った。Taq ポリメラーゼ；Takara EX-taq HS、センスプライマー；5'-caaatggtaacctagcatgctgtg-3'、アンチセンスプライマー；5'-tcggccatgatatagacgttgt-3'。

(4) Kras 依存的発がん実験

6 ~ 8 週齢の KrasG12D-LSL 改変遺伝子をもつマウスを麻酔して皮膚を切開し、露出させた気管内にマイクロシリンジを穿刺し、Ad-Cre ウイルス粒子を  $5 \times 10^7$  tu 含む感染液 (マウス当たり  $5 \mu\text{l}$ ) を投与した。

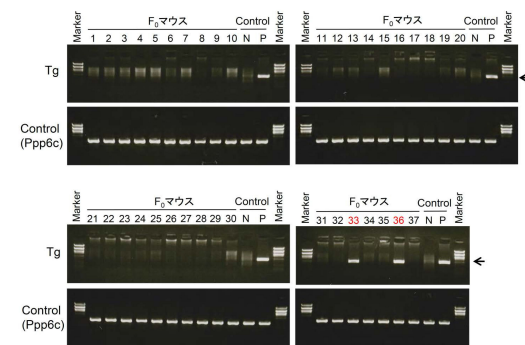
(5) 組織解析

凍結切片あるいはパラフィン包埋切片を作製し、HE 染色、蛍光観察、免疫染色等を行った。緑色蛍光および赤色蛍光観察における励起/観察波長は以下の通りである。緑色：470/525 nm、赤色：530/593 nm。蛍光観察では、DAPI にて対比染色 (青色：360/447 nm) を行った。

4. 研究成果

(1) PKM スイッチ可視化カセットトランスジェニックマウス作製

PKM スイッチ可視化レポーター遺伝子を染色体に組込んだトランスジェニックマウスの作製を行った。まず BAC-Tg 法にて作製を試みたものの、Tg 陽性率が非常に低く、Tg 陽性系統から、Tg 発現陽性個体を得ることはできなかった。そこで、BDF1 系統受精卵へのプラスミドインジェクションを行った。受精卵へのマイクロインジェクション後、仮親への移植を行い、今回得られた 37 匹の産仔をスクリーニングしたところ、トランスジーン陽性個体 (F0 世代：#33 および #36) を 2 個体得ることができた (図 1)。



これら個体を BL6 系統へと戻し交配を行ったところ、#33 の仔のなかには Tg 陽性個体のみとめられず、Tg の生殖系列移行が起こらなかったことが示唆された。#36 の仔からは Tg 陽性個体を得ることができた。そこで、以後の実験には、#36 のマウスを用いることとした。

(2) Kras 依存的発がん実験

上記のトランスジェニック個体 (F0-#36: ) を KrasG12D -LSL マウス ( ) と交配し、得られた F1 マウスを用いた発がん実験を施行した。

KrasG12D -LSL マウスでは、Cre リコンビナーゼ依存的に、発がん型 Kras (KrasG12D) が発現されるよう遺伝子改変がなされており、これまでも、種々の発がん実験に用いられている。例えば、Kras-LSL マウスに Ad-Cre を経鼻投与することで肺がんを作製できることが報告されていたが、投与効率のバラつきが問題とされていた。

そこで我々は、Ad-Cre ウイルスを、皮膚を切開して露出させた気管内に直接投与する方法にて、実験を行った。この投与方法では、非常に高い確率で、非小細胞肺がん、場合によってはリンパ腫も誘導されることが分かった。この場合の肺がんは、基本的には、SPC 陽性の腺がんが主体である。これら人為的に誘導した肺がんでは、期待通り、PKM2 の発現が大きく上昇していることも確認できた。Tg 陽性かつ KrasG12D -LSL 陽性のマウスに Ad-Cre を投与し、約 3 か月後、組織を採取して観察を行った。それら群では、肺腺がん、

あるいはリンパ腫の発生を確認できた。個体によっては、肺がんとリンパ腫を併発する個体もみとめられた。しかし、いずれのマウスにおいても、自家蛍光以外の、レポーターTg遺伝子に由来する蛍光を検出することができなかった(non-TgとTg陽性との比較)。また、肺以外の組織の蛍光観察や、フローサイトメトリー解析においても、いずれの蛍光タンパクも発現を確認できなかった。

### (3) 考察

本研究では、発がんに伴う PKM スイッチの蛍光観察が可能と期待される遺伝子改変マウス(トランスジェニック(Tg)マウス)を作製し、肺がん誘導モデルとの組み合わせによって、上記 Tg マウス上での発がん実験を施行した。そうして人為的に作製した肺がんでは、予想通り、Pkm2 の高い発現がみとめられたものの、それに対応するレポーター遺伝子由来の蛍光変化(DsRed 由来の赤色蛍光)を検出することができなかった。同時に、正常肺で検出されると期待された、EGFP 由来の緑色蛍光も検出できなかった。また、肺以外の組織の蛍光観察や、フローサイトメトリー解析においても、いずれの蛍光タンパクも発現を確認できなかった。トランスジーンがマウスゲノムに保持されている状況と併せ、何らかの理由で、レポーター遺伝子が発現していないと考えるのが合理的である。

受精卵への DNA インジェクションによって Tg マウスを作製する場合、その外来性遺伝子の発現は、挿入されるゲノム内位置の影響を強く受けることが知られる。よって、トランスジーンが組み込まれていても発現しないという現象は、Tg マウス作製においては比較的良くある事で、その克服のためにも、最初に、より多くの F0 仔を得ることが重要とされている。本研究を開始以来、我々もいくつかの方法(BAC-Tg 法やプラスミドの直接インジェクション等)やマウス系統(BDF1 や C57/BL6)を用いてマウス作製を試みてきたが、いずれの方法・マウス系統においても、F0 世代におけるトランスジーン陽性率が高くなかった。現段階において上記低 Tg 陽性率の原因を特定することは困難であるが、可能性として、我々が蛍光モニターとして用いた可視化カセット自体が、Tg 作製が難しい構造・サイズであることはあり得る。

いずれにしても、PKM スイッチの生体内可視化を実現するためには、いくつかの手法変更が必須と思われる。具体的には、1)レポーター遺伝子サイズの小型化、2)相同組み換え技術を用いたノックイン法による Tg マウスの作製、等が考えられる。後者の手法は、特に、通常の Tg 作製が奏功しなかった場合にも有効であることが複数報告されており、検討する価値は十分高いと思われる。

### 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 7 件)

1. Ito S, ほか 5 名 Gastric-type endocervical glandular neoplasms associated with aberrant p16 expression and K-RAS gene mutation in Peutz-Jeghers syndrome. **Pathol Int.** 2014(64)283-8 査読有
2. 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
3. Takahashi K, Hosono M, Sato I, ほか 6 名 , Sialidase NEU3 contributes neoplastic potential on colon cancer cells as a key modulator of gangliosides by regulating Wnt signaling **Int J Cancer** 2015. doi: 10.1002/ijc.29527. 査読有
4. Abue M, ほか 10 名, 7 番目, Circulating miR-483-3p and miR-21 is highly expressed in plasma of pancreatic cancer. **Int. J. Oncol** 2015 (46) 539-47. 査読有
5. 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
6. 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
7. 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 13 件)

1. Yoji Yamashita, Nobuhiro Tanuma, Ichiro Shibahara, Yukihiro Sonoda, Masayuki Kanamori, Ryuta Saito, Toshihiro Kumabe, Teiji Tominaga, Hiroshi Shima, Ryuichi Katakura: Ptporz 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
2. 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)
  3. 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)
  4. 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)
  5. 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)
  6. 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)
  7. 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)
  8. 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)
  9. 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)
  10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 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

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

#### (2) 研究分担者

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

#### (3) 研究分担者

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