

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461967

研究課題名(和文) 選択的pre-mRNAスプライシングを基盤とした消化器癌の新規治療標的の解明

研究課題名(英文) Identification of novel therapeutic targets on alternative pre-mRNA splicing in digestive malignancy

研究代表者

三浦 康 (MIURA, Koh)

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：40282074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：解糖系に必須なピルビン酸リン酸化酵素(pyruvate kinase)の転写産物の4種のisoformのうち、私たちは特にM2 isoformに着目し、このisoformが胃癌患者の癌組織および正常粘膜で高発現し、胃癌発生に重要な意義を持つことを見出した。また、5-FUの異化酵素DPDをコードするDPYD遺伝子のalternative pre-mRNA splicingと5-FU感受性との関連について、東北大学外科と共同研究を進めている。さらに、serpini1遺伝子の5'-UTR領域のsplice variantsの大腸癌における上皮間葉系転換への役割を探索している。

研究成果の概要(英文)：Pyruvate kinase gene, which codes an enzyme essential for glycolytic pathway, has four isoforms of transcripts: L, R, M1 and M2. We especially focused on the M2 isoform and analyzed its expression levels in cancerous and corresponding normal tissues from gastric cancer patients and normal tissues from healthy individuals. The analysis revealed that the M2 isoform is highly expressed in cancer and normal tissues from gastric cancer patients. Along with in vivo experiments, the M2 isoform was shown to be important in development of gastric cancer (Shiroki T, et al. Cancer Sci. 2017; 108:931-940). We are also analyzing alternative pre-mRNA splicing of dihydropyrimidine dehydrogenase gene, which codes a catabolizing enzyme of 5-FU, under collaboration with Department of Surgery, Tohoku University. We found serpini1 gene has an important role in epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer, and we are exploring functions of the splice variants located in the 5'-UTR region.

研究分野：消化器癌

キーワード：消化器癌 選択的pre-mRNAスプライシング 治療標的 新規治療法 浸潤転移 発がん 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

選択的 pre-mRNA スプライシング (alternative pre-mRNA splicing) とは、単一のゲノム DNA 配列に相当する pre-mRNA から、多様な成熟 mRNA (splice variants) が生成される過程である(図1)。

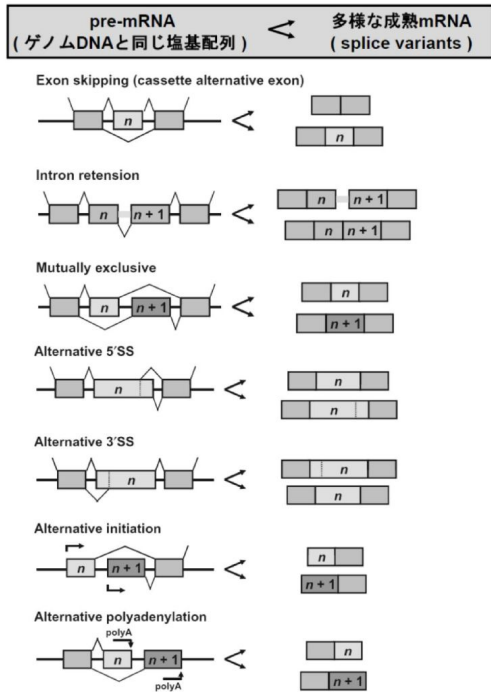


図1 選択的pre-mRNAスプライシングによるsplice variantsの多様性

これは cis-elements (DNA および pre-mRNA の塩基配列) と、それに結合する 200 種以上に及び調節因子 (trans-elements) との複合体 (spliceosome) とによって精密に制御されており(図2)、生命科学的研究の中でも、近年最も飛躍的な進歩を遂げている研究分野の一つである。

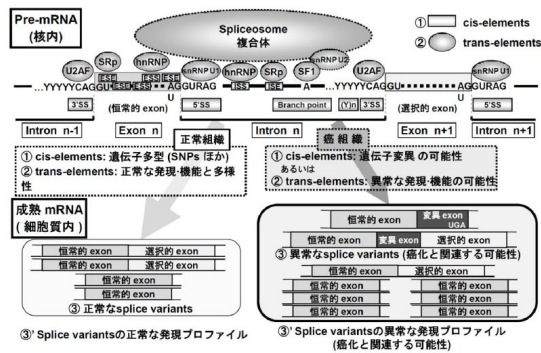


図2 選択的pre-mRNAスプライシングの制御機構、癌組織でのsplice variantsの異常

2004 年のヒトゲノムプロジェクトの完成により、約 23,000 個の遺伝子がヒトゲノム上に存在することが明らかとなったが、それらの95%が splice variants を生成し (引用文献)、選択的スプライシングが生命現象と機能の多様性の根幹を担っていると考えられる。近年 splicing network (引用文献)、splicing code (引用文献) など、選択的スプライシングの制御機構について新たな概念も提唱されている。一方で、選択的スプライ

シングの異常が急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群の発症に関わることが明らかとなり (引用文献)、外科切除標本においても cis-elements と trans-elements の異常、その結果である splice variants およびその発現プロファイルの異常 (図2) の同定が、癌の新規治療標的の解明における極めて重要な課題になっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、消化器癌の外科切除標本と対応する正常組織を用いて、癌に特異的な選択的 pre-mRNA スプライシングの異常、すなわち cis-elements と trans-elements の異常、その結果としての splice variants およびその発現プロファイルの異常を明らかにして、癌の治療標的を解明することである。さらに消化器外科医と当研究所スタッフたちとの連携のもとに、癌の集学的治療に向けた新しい治療法の開発を進めて、癌の治療成績の向上を目指す。これは、私たちがこれまで取り組んで来た選択的スプライシング研究をさらに発展させるもので、今後広く展開されてくるトランスクリプトーム解析の基盤をなす研究である。

3. 研究の方法

NCBI データベース解析、さらに生命情報科学の解析技術の活用から、消化器癌に特異的な選択的スプライシング異常を in silico を中心に解析する。消化器癌の外科切除新鮮凍結標本および対応する正常組織から全 RNA、ゲノム DNA、lysate を抽出し、平成 26 年度から順次、cis-elements と trans-elements の異常、その結果としての splice variants およびその発現プロファイルの異常を解析していく。次に cis-elements、trans-elements と splice variants の機能解析へと進めて、癌の治療標的を絞り込む。

4. 研究成果

ピルビン酸リン酸化酵素 (pyruvate kinase; PK) は解糖系に必須の酵素である。PK 遺伝子の mRNA には L, R, M1, M2 の 4 種の isoform が存在する。私たちは M2 isoform に特に着目し、胃癌患者および健康人の胃組織中での発現を調べた。その結果、M2 isoform は胃癌患者の癌組織のみならず正常粘膜でも高発現しており、in vivo 実験と併せて、PK 遺伝子の M2 isoform が胃癌発生に重要な意義を持つことを見出した (引用文献)。また、5-FU の異化酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase をコードする DPYD 遺伝子の alternative pre-mRNA splicing とフッ化ピリミジン感受性との相関について (引用文献)、東北大学外科との共同研究を進めている。さらに、大腸癌における上皮間葉系転換を規定する遺伝子として serpin1 遺伝子ほかを報告し (引用文献)、serpin1 遺伝子の 5' -UTR 領域その

ほかの splice variants の存在から上皮間葉系転換への影響を、現在探索中である。

<引用文献>

Wang ET, *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008; 456 (7221):470-6.

Moore MJ, *et al.* An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell*. 2010; 142(4):625-36.

Barash Y, *et al.* Deciphering the splicing code. *Nature*. 2010; 465 (7294):53-9.

Yoshida K, *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011; 478 (7367):64-9.

Shiroki T, *et al.* Enhanced expression of the M2 isoform of pyruvate kinase is involved in gastric cancer development by regulating cancer-specific metabolism. *Cancer Sci*. 2017; 108(5): 931-940.

Miura K, *et al.* Drug delivery of oral anti-cancer fluoropyrimidine agents. *Expert Opin Drug Deliv*. 2017 Apr 11:1-12. doi: 10.1080/17425247.2017.1316260.

Matsuda Y, *et al.* SERPIN11 regulates epithelial-mesenchymal transition in an orthotopic implantation model of colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2016; 107(5):619-28.

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 13 件)

Miura K, Shima H, Takebe N, Rhie J, Satoh K, Kakugawa Y, Satoh M, Kinouchi M, Yamamoto K, Hasegawa Y, Kawai M, Kanazawa K, Fujiya T, Unno M, Katakura R. Drug delivery of oral anti-cancer fluoropyrimidine agents. *Expert Opin Drug Deliv*. 査読有, 2017 Apr 11:1-12. DOI: 10.1080/17425247.2017.1316260.

Shiroki T, Yokoyama M, Tanuma N, Maejima R, Tamai K, Yamaguchi K, Oikawa T, Noguchi T, Miura K, Fujiya T, Shima H, Sato I, Murata-Kamiya N, Hatakeyama M, Iijima K, Shimosegawa T, Satoh K. Enhanced expression of the M2 isoform of pyruvate kinase is involved in gastric cancer development by regulating cancer-specific metabolism. *Cancer Sci*. 査読有, 2017; 108(5):

931-940.

DOI: 10.1111/cas.13211.

Yamamura A, Miura K, Karasawa H, Motoi F, Mizuguchi Y, Saiki Y, Fukushige S, Sunamura M, Shibata C, Unno M, Horii A. NDRG2, suppressed expression associates with poor prognosis in pancreatic cancer, is hypermethylated in the second promoter in human gastrointestinal cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 2017; 484(1):138-143.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.055.

Philchenkov AA, Miura K. The IAP protein family, SMAC mimetics and cancer treatment. *Crit Rev Oncog*. 査読有, 2016;21(3-4): 185-202.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27915971>

Maejima R, Tamai K, Shiroki T, Yokoyama M, Shibuya R, Nakamura M, Yamaguchi K, Abue M, Oikawa T, Noguchi T, Miura K, Fujiya T, Sato I, Iijima K, Shimosegawa T, Tanaka N, Satoh K. Enhanced expression of semaphorin 3E is involved in the gastric cancer development. *Int J Oncol*. 査読有, 2016;49(3):887-94.

DOI: 10.3892/ijo.2016.3593.

Matsuda Y, Miura K, Yamane J, Shima H, Fujibuchi W, Ishida K, Fujishima F, Ohnuma S, Sasaki H, Nagao M, Tanaka N, Satoh K, Naitoh T, Unno M. SERPIN11 regulates epithelial-mesenchymal transition in an orthotopic implantation model of colorectal cancer. *Cancer Sci*. 査読有, 2016; 107(5):619-28.

DOI: 10.1111/cas.12909.

Philchenkov AA, Zavelevich MP, Tryndyak VP, Kuiava LM, Blokhin DY, Miura K, Silvestri R, Pogribny IP. Antiproliferative and proapoptotic effects of a pyrrole containing arylthioindole in human Jurkat leukemia cell line and multidrug-resistant Jurkat/A4 cells. *Cancer Biol Ther*. 査読有, 2015; 16 (12):1820-9. DOI: 10.1080/15384047.2015.1078026.

Kato H, Kurosawa K, Inoue Y, Tanuma N, Momoi Y, Hayashi K, Ogoh H, Nomura M, Sakayori M, Kakugawa Y, Yamashita Y, Miura K, Maemondo M, Katakura R, Ito S, Sato M, Sato I, Chiba N, Watanabe T,

Shima H. Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis. *Cancer Lett.* 査読有, 2015; 365(2):223-8.  
DOI: 10.1016/j.canlet.2015.05.022.

Inoue M, Takahashi S, Soeda H, Shimodaira H, Watanabe M, Miura K, Sasaki I, Kato S, Ishioka C. Gene-expression profiles correlate with the efficacy of anti-EGFR therapy and chemotherapy for colorectal cancer. *Int J Clin Oncol.* 査読有, 2015; 20(6):1147-55.  
DOI: 10.1007/s10147-015-0841-4.

Miura K, Satoh M, Kinouchi M, Yamamoto K, Hasegawa Y, Kakugawa Y, Kawai M, Uchimi K, Aizawa H, Ohnuma S, Kajiwara T, Sakurai H, Fujiya T. The use of natural products in colorectal cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 査読有, 2015;10(4): 411-26.  
DOI: 10.1517/17460441.2015.1018174.

Kajiwara T, Miura K, Ohnuma S, Shimada M, Komura T, Toshima M, Kohyama A, Kudoh K, Haneda S, Musha H, Naitoh T, Shirasaka T, Unno M. Gastrointestinal toxicities of 5-fluorouracil increase the proportion of regulatory T cells in intestinal tract: advantages of alternate-day S-1 administration. *Int J Clin Oncol.* 査読有, 2015; 20(5): 913-21.  
DOI: 10.1007/s10147-015-0791-x.

Komura T, Miura K, Shirasaka T, Ohnuma S, Shimada M, Kajiwara T, Fujishima F, Philchenkov A, Nakagawa K, Kudoh K, Haneda S, Toshima M, Kohyama A, Musha H, Naitoh T, Shibata C, Unno M. Usefulness of alternate-day administration of S-1 and leucovorin in a xenograft mouse model of colorectal cancer: a shorter drug-free interval leads to more efficient antitumor effects. *Int J Clin Oncol.* 査読有, 2015; 20(1):117-25.  
DOI: 10.1007/s10147-014-0699-x.

Miura K, Satoh M, Kinouchi M, Yamamoto K, Hasegawa Y, Philchenkov A, Kakugawa Y, Fujiya T. The preclinical development of regorafenib for the treatment of colorectal cancer. *Expert Opin Drug Discov.* 査読有, 2014; 9(9):1087-101.  
DOI: 10.1517/17460441.2014.924923.

〔学会発表〕(計 11 件)

Miura K, Satoh M, Kinouchi M, Yamamoto K, Hasegawa Y, Kakugawa Y, Kawai M, Uchimi K, Aizawa H, Sakurai H, Fujiya T. Natural products as possible anti-cancer agents for digestive malignancies. AACR Annual Meeting 2015, Apr 22, 2015 (Philadelphia, USA).

田中 遼太, 渡邊 利雄, 山下 洋二, 三浦 康, 佐藤 郁郎, 島 礼, 田沼 延公. PKM ノックアウトマウスは胎生致死となる 第 75 回日本癌学会学術総会 2016.10.6-8 (パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜))

田中 遼太, 小河 穂波, 井上 維, 山下 洋二, 三浦 康, 河合 賢郎, 佐藤 郁郎, 渡邊 利雄, 島 礼, 田沼 延公. Pyruvate kinase M の両 isoform を欠損するマウスの解析 第 89 回日本生化学会大会 2016.9.25-27 (仙台国際センター (宮城県・仙台))

三浦 康, 島 礼, 佐藤 賢一, 山口 壹範, 田沼 延公, 角川 陽一郎, 佐藤 正幸, 木内 誠, 山本 久仁治, 長谷川 康弘, 河合 賢朗, 大沼 忍, 藤谷 恒明. 大腸癌における天然物を用いた抗がん剤開発の現況 第 74 回日本癌学会学術総会 2015.10.8-10 (名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋))

加藤 浩之, 田沼 延公, 林 克剛, 野村 美有樹, 角川 陽一郎, 山下 洋二, 三浦 康, 佐藤 郁郎, 佐藤 雅美, 渡邊 利雄, 島 礼. Ppp6c 欠損皮膚では、UVB 誘導発がんへの感受性が高まる 第 74 回日本癌学会学術総会 2015.10.8-10 (名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋))

白木 健悠, 前嶋 隆平, 玉井 恵一, 及川 智之, 野口 哲也, 三浦 康, 飯島 克則, 下瀬川 徹, 佐藤 賢一. 胃癌の癌化・進展、代謝におけるピルビン酸キナーゼタイプ M2(PKM2)の関与 第 101 回日本消化器病学会総会 2015.4.23-25 (仙台国際センター (宮城県・仙台))

戸嶋 政秀, 大沼 忍, 三浦 康, 田中 道廣, 武者 宏昭, 工藤 克昌, 田中 直樹, 森川 孝則, 長尾 宗紀, 内藤 剛, 片寄友, 藤淵 航, 海野 倫明. DPYD、及び MTHFR 遺伝子の 1 塩基多型は消化器癌患者の 5-FU 投与に伴う有害事象の発現を予測する (Single nucleotide polymorphisms of DPYD and MTHFR predict AEs

associated with 5-FU in gastro-intestinal cancer patients) 第73回日本癌学会学術総会 2014.9.25-27 (パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜))

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし

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 (Regulation of isoform-expression of pyruvate kinase M (PKM) during development, cellular differentiation, and senescence) 第73回日本癌学会学術総会 2014.9.25-27 (パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜))

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 (Characterization of mice expressing a single isoform of pyruvate kinase M) 第73回日本癌学会学術総会 2014.9.25-27 (パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜))

松田 泰史, 三浦 康, 藤淵 航, 山根 順子, 石田 和之, 佐々木 宏之, 長尾 宗紀, 大沼 忍, 元井 冬彦, 片寄 友, 内藤 剛, 海野 倫明. マウス同所移植モデルを用いた、上皮間葉転換制御遺伝子 CHST11 及び SERPIN11 遺伝子の解析 (CHST11 and SERPIN11 regulating EMT in colorectal cancer identified with an orthotopic implantation mouse model) 第73回日本癌学会学術総会 2014.9.25-27 (パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜))

三浦 康, 白坂 哲彦, 海野 倫明, 大沼 忍, 小村 俊博, 梶原 大輝. S-1/leucovorin 隔日投与法 切除不能大腸癌化学療法 の次なる治療戦略 (Alternate-day administration of S-1/LV as the next therapeutic strategy for metastatic colorectal cancer patients) 第73回日本癌学会学術総会 2014.9.25-27 (パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜))

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

三浦 康 (MIURA, Koh)

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: 4 0 2 8 2 0 7 4