

氏 名	谷 口 高 平
(ふ り が な)	(たにぐち こうへい)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 27 年 7 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	Organ-specific <i>PTB1</i> -associated microRNAs determine expression of pyruvate kinase isoforms (臓器特異的 <i>PTB1</i> 関連マイクロ RNAs によるピル ビン酸キナーゼアイソフォーム調節機構の解明)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 樋 口 和 秀 教授 矢 野 貴 人 教授 高 井 真 司

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

近年、がん細胞特異的代謝機構として、好気下においても解糖系を優位に使用する Warburg 効果が着目されている。解糖系の律速酵素である Pyruvate kinase muscle の M1、M2 (PKM1、PKM2) は選択的スプライシングによって産生されるアイソフォームである。Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) ファミリーのメンバーである Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTB1) がそのスプライシングを調節しており、がん細胞では PTB1 が高発現することで PKM2 が優位となり Warburg 効果を実現させている。今回、我々は PTB1 を標的とする microRNA (miR) の Warburg 調節機構への関与について検討した。

《方 法》

各種細胞株及び正常マウス各臓器のタンパク質、正常ヒト組織における PKM アイソフォーム mRNA の発現を、各々 Western Blot 法、Real time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法にて比較した。更に、正常マウス各臓器、正常ヒト組織における PTB1 関連 miR の組織分布を RT-PCR 法で調べ、PKM アイソフォームの発現と比較検討した。

PTB1 関連 miR の内、miR-124 と miR-133b を各種がん細胞株に導入し、PTB1 及び PKM アイソフォームへの影響を luciferase reporter assay、Western Blot 法、免疫蛍光染色法を用いて検討した。また両 miR を細胞に導入した際の乳酸産生量を定量した。加えて、PTB1 に対する small interfering RNA (siRNA) を用いてその効果を検証した。

更に大腸腫瘍の臨床検体（腺腫：10 例、癌：10 例）を用いて miR-124 と miR-133b の発現量、PKM アイソフォームのタンパク質発現、及び組織分布を腫瘍と非腫瘍部で比較検討した。

《結 果》

細胞株における PKM アイソフォームの発現は正常、腫瘍の由来に関係なく全ての細胞株で PKM2 優位であった。マウス正常臓器において PKM1 を優位に発現していたのは脳、骨格筋、心臓のみであり、正常ヒト組織由来の RNA 解析でも同様の結果であった。更に、これら PKM1 優位な組織では PTB1 関連 miR (miR-124 は脳、miR-133b は骨格筋及び心臓) が臓器特異的に優位であった。

MiR-124 と miR-133b を細胞株に導入すると、何れの細胞でも PTB1 の発現が顕著に抑制され、anti-miR-124 と anti-miR-133b を併用することでこの効果は阻害された。Luciferase reporter assay においても各々の miR の PTB1 結合部位に変異を加えるとレポーター活性の低下が有意に阻害され、miR-124 と miR-133b が PTB1 を標的としていることが示唆された。

また、両 miR を細胞株に導入すると、何れの細胞でも PKM の発現が PKM2 から PKM1 へ移行することがタンパク質及び細胞レベルで確認できた。PTB1 をノックダウンした際

にも全く同様の結果を認めた。更に、これら PTB1 関連 miR 及び siRNA-PTB1 の導入により解糖系の最終産物である乳酸産生量が有意に減少した。

臨床検体では腺腫において miR-124 は 10 例中 9 例、miR-133b は全例で発現低下を認めた。がん検体では miR-124 は 10 例中 8 例、miR-133b は全例で発現低下を認めた。タンパク質レベルではこれまでと同様に正常組織でも PKM2 の発現が優位であった。興味深いことに、腫瘍由来の検体では更に PKM2 の発現が上昇していた。また免疫組織染色においても腫瘍部において明らかに PKM2 の発現が上昇していた。

《考 察》

これまで定説として、正常組織では PKM1 が優位であり発がん過程において PKM2 に移行し Warburg 効果が成立するとされてきた。しかし今回の検討では正常組織で PKM1 が優位な組織は脳、骨格筋、心臓に限定されており、大腸腫瘍検体による検証からは正常で PKM2 優位な臓器では発がん過程で PKM2 の発現が更に増加することが明らかとなった。即ち、Warburg 効果を成立機構には大きく 2 つのパターンが示された。1 つは PKM1 から PKM2 に典型的に移行するタイプであり、もう 1 つは PKM2 の割合が更に上昇するタイプである。何れのタイプでも発がん過程で PTB1 関連 miR が低下する。

これまで、PTB1 の発現調節分子には c-Myc や STAT3 などが関与していることが報告されてきたが、実態は明らかではなかった。今回の検討で、miR が PTB1 の発現調節を介し PKM アイソフォームの発現を調節していることが示唆された。これは生体内におけるエネルギー代謝を miR が微調節していることを示す典型的な所見である。これらの miR 及び PTB1 は、がんの代謝機構という生存の根幹に関わる分子であり創薬及び診断マーカーに成りうると考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者等は今回の研究で、正常各臓器の PKM プロファイルを網羅的に解析することにより、正常組織における PKM プロファイルの詳細を明らかにした。更に正常で既に PKM2 優位な臓器の発がん過程における PKM プロファイルの変化を大腸腫瘍検体による検証から明らかとした。そして Warburg 効果成立機構に大きく 2 つのパターンが存在することを示した。重要なことは、がん細胞は発がん過程で PKM2 の発現をより優位にすることでがん細胞に適した環境（活性酸素からの回避、核酸の合成、乳酸の産生及び分泌など）を作り出しているということである。

また申請者等は、各種がん細胞株及び大腸臨床検体を用いて、発がん過程で高率に PTB1 関連 miR (miR-124 と miR-133b) が低下することを示した。そして、がん細胞株に PTB1 関連 miR を導入すると PTB1 の抑制を介して、PKM アイソフォーム の発現が PKM2 から PKM1 へと移行することを示した。更に、PTB1 関連 miR の導入により解糖系の最終産物である乳酸の細胞内産生量が有意に減少したことは、これらの miR が Warburg 効果を制御していることを裏付けている。即ち、これらの結果は生体内におけるエネルギー代謝を PTB1 関連 miR が微調節していることを示唆している。

現在、様々な分子標的治療薬が臨床で使用されているが、単一の分子を標的とする治療は必然的に代償性機構を促進させ治療が破綻することが問題となっている。申請者等は、がん細胞に特異的な代謝という、がんの生存機構全体を標的とすることで治療効果の増強と保持を念頭に研究を開始している。その意味で今回、がんの代謝機構の特徴である Warburg 効果のメカニズムに miR が関与することを明らかにしたことは非常に重要であると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Scientific Reports 2015 Feb 27;5:8647. doi:10.1038/srep08647.