

(書式12)

氏名	もりた まみ 盛田 麻美
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成29年3月24日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学専攻
学位論文題目	正常細胞におけるピルビン酸キナーゼMアイソフォームの特異的発現が、腫瘍化後のグルコース代謝様式を規定する
論文審査委員	主査 教授 前門戸 任 教授 島 礼 教授 五十嵐 和彦 教授 井上 彰

論文内容要旨

がん細胞では、酸素が十分高い条件下でもグルコースの酸化が制限されており、この現象は、ワールブルグ効果として知られる。解糖系酵素ピルビン酸キナーゼM (pyruvate kinase M; Pkm) の制御は、細胞のグルコース代謝様式を決定づけると考えられており、ワールブルグ効果成立にも極めて重要とされる。Pkmには、選択的スプライシングで生じる、活性制御を異にする2つのアイソフォーム(Pkm1とPkm2)が存在する。Pkm1が構成的活性化型なのに対し、Pkm2は条件的にのみ活性化する。大半の腫瘍細胞がPkm2を相互排他的に発現しており、このPkm2発現がワールブルグ効果をもたらすことがわかっている。しかしながら、腫瘍におけるPkm2発現・ワールブルグ効果の意義は、未だ定まっていない。本研究では、Pkm1とPkm2の発現制御を解析し、また独自のモデルマウス等を用いて発がんや腫瘍増殖におけるPkmのアイソフォーム特異的機能を、より厳密に評価した。

マウスおよびヒト正常組織の解析から、一部の例外を除き、大半の上皮細胞が腫瘍化する以前よりPkm2発現型であるとわかった。同様に、神経幹細胞や線維芽細胞においても、Pkm2が主に発現していた。一方、Pkm1は、成熟した神経や筋、精子細胞に限局的に発現していた。すなわち、癌腫や肉腫、神経膠腫など、大半の悪性腫瘍の起源細胞が、がん化以前からPkm2発現型であった。

Pkm1およびPkm2、それぞれの特異機能を明らかにするため、遺伝子改変(ノックイン: knock-in (KI))を行い、Pkm遺伝子の選択的スプライシング制御を不能化したマウスモデルを開発した。これらKIマウスは、Pkm1とPkm2のうち、いずれか一方しか発現できない。Pkm-KIマウス由来細胞の解析から、報告通り、Pkm2発現がワールブルグ効果成立に必須であることを確認した。すなわち、Pkm1の異所性発現により、ワールブルグ効果が解消された。しかし、細胞増殖・腫瘍増殖への影響を調べると、驚いたことに、Pkm1は、ストレス条件下の細胞増殖や移植系での腫瘍増殖を、むしろ促進した。ストレス条件下にて、Pkm1発現はATPレベルを高く保って、NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide; ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)・サルベージ経路を活性化し、その結果、オートファジーが亢進して腫瘍細胞の生存促進に繋がることが示唆された。Pkm1の腫瘍促進的な作用は、Kras誘導性肺発がん実験や、DMBA誘導性化学発がん実験により、マウス個体レベルでも証明された。

ほとんどの腫瘍細胞・起源細胞系列がPkm2発現を示す中、例外的に、小細胞肺がん (Small cell lung cancer; SCLC) とその起源細胞である気管支の神経内分泌細胞が、ともにPkm1を高発現することを見いだした。これらの結果は、腫瘍細胞におけるPkmの発現アイソフォームが起源細胞の

(書式12)

種類により規定されることを強く示唆している。細胞株を用いた解析から、Pkm1はSCLCの好気代謝を促進し、NAD⁺レベルを亢進させていた。重要なことに、スフェア培養におけるSCLC増殖にPkm1発現は不可欠であり、その機能はPkm2で代償できないことが示唆された。同様に、NAD⁺-サルベージ経路を阻害すると、SCLCの増殖や生存が、培養系や移植系にて、強く抑制された。従って、Pkm1および関連代謝形質は、SCLCの新規治療標的となる可能性が示された。

以上より、腫瘍におけるグルコース代謝の基本様式は起源細胞の種類によって規定されていることが示唆された。同時に、Pkm1には腫瘍促進能があり、その下流経路は、SCLCを含む一部がん種にて、新規治療標的となるかもしれない。

審査結果の要旨

博士論文題目 正常細胞におけるピルビン酸キナーゼ M アイソフォームの特異的発現が、
腫瘍化後のグルコース代謝様式を規定する

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 呼吸器科腫瘍学分野

学籍番号 B3MD5118 氏名 盛田 麻美

本研究は、解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ M (Pkm) の機能解析を行い、腫瘍のグルコース代謝が腫瘍の悪性度に如何に寄与するかを検証したものである。

がん細胞では、酸素が十分高い条件下でも、グルコースの酸化が制限される（ワールブルグ効果）ことが知られている。一方、解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ M (Pkm) には、選択的スプライシングで生じる 2 つのアイソフォーム (Pkm1 と Pkm2) が存在し、大半の腫瘍細胞においては、Pkm2 を主に発現していることが知られていた。最近 Pkm2 発現がワールブルグ効果成立に重要な機能を持つことが示唆する報告があった。しかし、これまでの実験結果からは、Pkm 発現制御によるワールブルグ効果あるいは腫瘍化への影響について不明の点が多い。

本研究では、まず正常組織および主要組織における Pkm1 と Pkm2 発現の厳密に解析した。次に、Pkm1 または Pkm2 のみを発現するマウスの作製に成功し、それらを用いて発がんや腫瘍増殖における Pkm アイソフォームの特異的機能を解析した。その結果から、腫瘍の起源となり得る多くの細胞が、元来、Pkm2 を発現していることが明らかになった。例外的に、気管支の神経内分泌細胞とそれに由来する小細胞肺癌 (SCLC) 細胞は高レベルの Pkm1 を発現していた。これらの結果から、がん細胞における Pkm アイソフォームの発現は、その起源細胞に依存することが示された。よって大半のがんでみられる Pkm2 発現は、がん化の過程で Pkm アイソフォームの発現が切り替わるわけではなく、その起源細胞の性質を受け継いだ受動的なものということが示唆された。

SCLC 細胞株から得られた結果からは、SCLC 細胞の十分な増殖には、Pkm2 ではなく、Pkm1 が必須であることが示唆され、同時に、Pkm1 ではグルコースの好気代謝が活発であることが判明した。これらのことは、Pkm2、および、好気代謝が抑制されるというワールブルグ効果が、がん促進的であるという定説を覆す結果であった。さらに、Pkm1 発現細胞では、Pkm1-Nampt-NAD⁺経路によるオートファジーの亢進が、がん細胞の増殖に寄与すると考えられ、Nampt 阻害剤である FK866 の抗腫瘍効果が示唆された。

本研究は、正常細胞における Pkm2 発現、およびワールブルグ効果は“がん促進的”ではないことを示唆する実験的証拠を提示し、がんの代謝に係わるこれまでの基本概念について、その再考を強く促すものである。同時に、SCLC のような Pkm1 陽性腫瘍において、Pkm1 の腫瘍促進能は、新規治療標的となりうることを示した。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。