



Title	Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition
Author(s)	浜部, 敦史
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51934
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	浜部 敦史
論文題名 Title	Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition (上皮間葉転換を誘導するPKM2の転写調節機能)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 癌細胞では、好気的環境下においてもグルコースを乳酸へと変換する「好気的解糖」という特異的な代謝システムが存在する。ピルビン酸キナーゼM2 (PKM2) は好気的解糖を維持・促進する代謝酵素で、癌の特異的な代謝機構における重要な分子である。さらにPKM2は核内にも移行し、転写調節機能を介して癌関連遺伝子の発現を制御し、癌の悪性度獲得に寄与している。これまでに、PKM2は代謝調節と遺伝子発現制御を介して、癌細胞増殖を刺激することが示されているが、癌の浸潤転移における意義は現在、未知である。癌細胞には浸潤の初期段階で、上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) が誘導され、細胞は間葉系の形質を獲得する。本研究では、大腸癌のEMTにおけるPKM2の役割を、PKM2の核内機能に着目して解析し、浸潤転移のメカニズムを検討した。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 大腸癌細胞株SW480, HCT116にEGF, TGF β 1を添加してEMTの誘導を行った。SW480にEMTを誘導することで、E-cadherinは減少した。EMT誘導に伴い、PKM2の発現が上昇し、核内分画も増加した。PKM2をsiRNAにより発現抑制するとEMTの誘導が阻害され、E-cadherinの減少は阻害された。ピルビン酸キナーゼをshRNAにより抑制した後に、ピルビン酸キナーゼM1 (PKM1) またはPKM2を過剰発現させた2種類の安定株に、それぞれEMTを誘導すると、PKM2過剰発現株でより高度にE-cadherinが低下した。これらから、EMT誘導によりPKM2の発現が亢進し、さらにEMT誘導にPKM2が必要であることが明らかとなった。 EMT誘導下で、核内PKM2がどのような分子間相互作用を形成するかを確認するため、核内分画でPKM2と共沈する蛋白質をmass spectrometryにて解析すると、TGF-β-induced factor homeobox 2 (TGIF2) が同定された。PKM2-TGIF2の相互作用はwestern blottingでも確認した。TGIF2をsiRNAにより発現抑制すると、E-cadherinの低下はより著明になった。PKM1とPKM2をそれぞれ過剰発現させた安定株にTGIF2発現抑制下でEMTを誘導したところ、PKM1過剰発現群においても、PKM2過剰発現で高度であったE-cadherinの低下と同様の低下を示す変化を認めた。これらからPKM2-TGIF2相互作用の形成はEMT誘導に必要であると示唆された。 PKM2とTGIF2はともにHDACと相互作用することが示されている分子であり、EMT誘導におけるHDACとの関連性を検討した。免疫沈降でPKM2、TGIF2はともにHDAC3と相互作用することが明らかとなった。さらにこれらの複合体によるE-cadherinの発現調節機構を解析するため、E-cadherinのプロモーター領域の配列を使用してChIP-qPCRを行うと、PKM2、TGIF2、HDAC3はE-cadherinプロモーターと結合しEMT誘導下で最も結合量が低下していた。HDAC3の脱アセチル化標的はH3K9であるため、アセチル化H3K9を認識する抗体で共沈した染色体で、同様にChIP-qPCRを行うと、EMT誘導下で最も結合量が低下していた。これらは、PKM2-TGIF2相互作用がE-cadherinプロモーター領域にHDAC3を誘導しヒストンを脱アセチル化することでE-cadherinの転写が抑制され、E-cadherinの発現低下に至るというメカニズムを示す結果であった。 大腸癌の切除標本61例を用いて免疫組織染色を行い、臨床的意義を評価した。大腸癌深部の染色強度でPKM2陽性となった症例は有意にリンパ節転移、遠隔転移が多かった。またE-cadherin、TGIF2との相関を確認すると、PKM2陽性とTGIF2陽性は有意な相関を示し、E-cadherin陰性とも有意ではないが相関する傾向を認めた。 〔総括(Conclusion)〕 EMTにおいて、核内PKM2がTGIF2との相互作用を介してE-cadherinの転写制御を行っていることが明らかとなった。大腸癌の転移抑制のための、核内PKM2標的治療を樹立できる可能性が示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 浜部 敦史			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	森 正 樹
	副 査	大阪大学教授	細 野 敬
	副 査	大阪大学教授	小 川 和 彦

論文審査の結果の要旨

癌は、遺伝子変異が蓄積した結果として発生する疾患と考えられ、癌遺伝子、癌抑制遺伝子の研究が盛んになされてきた。しかし、これらの変異は非常に多様で、癌が進行する過程で更に複雑さを増して同一腫瘍内においても不均一となるため、治療標的としても効果は限定的であった。近年、癌代謝という新たな共通の形質が癌細胞成立に必須であることが示され、中でもピルビン酸キナーゼM2 (PKM2) は、代謝酵素として癌代謝を直接的に維持するだけでなく、遺伝子発現制御を介して癌代謝樹立、悪性度獲得を促進する、中枢的な分子として重要であることが判明した。

本研究ではPKM2が、遺伝子発現制御を介して大腸癌細胞に上皮間葉転換を誘導することで、浸潤能、転移能を付与することが明らかとなった。この過程でPKM2は、TGFβ-Induced Factor Homeobox 2という転写因子と相互作用し、さらにエピジェネティクス制御を行っていることが分子生物学に証明された。

以上の結果は、大腸癌において浸潤、転移が誘導される新規のメカニズムを明らかにしたもので、大腸癌のバイオマーカーや治療法の開発につながると期待され、学位論文に値する成果と認める。