



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Warburg効果とTRAIL誘導がん細胞死

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-08-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 熊崎, 実南 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56206

Warburg 効果と TRAIL 誘導がん細胞死

Perturbation of the Warburg effect increases the sensitivity of cancer cells to TRAIL-induced cell death

2017

熊崎 実南

目次

第1章 緒言	1
第2章 研究の背景と目的	
第1節 TRAIL シグナル	4
第2節 TRAIL シグナルを標的とした治療の変遷と問題点	8
第3節 TRAIL 耐性機構	11
第4節 がん細胞特異的エネルギー代謝制御機構: Warburg 効果	14
第5節 CCN1 の発現と TRAIL 誘導細胞死への関与	17
第3章 Warburg 効果関連 PTBP1 と TRAIL 誘導アポトーシス	
第1節 序	20
第2節 PTBP1 の発現と TRAIL 誘導がん細胞死への関与	21
第3節 TRAIL 耐性機構における PTBP1 の役割	29
第4節 活性酸素 (ROS) の発生と TRAIL 耐性解除機構への関与	31
第5節 CCN1 の発現と TRAIL 誘導細胞死への関与	33
第4章 総括	37
謝辞	41
実験の部	42
参考文献	51
研究業績目録	57

第1章 緒言

腫瘍壊死因子 (TNF: tumor necrosis factor) は、1975年に Sloan-Kettering 癌研究所の Carswell らによってマウスに移植した Meth A 肉腫に出血性の壊死を引き起こす因子として発見されたサイトカインである¹。その後、TNF ファミリーに属すサイトカインとしてアポトーシスに関与する TNF- α 、FasL、TRAIL (Tumor necrosis-factor related apoptosis-inducing ligand) など 20 種類以上が同定されている^{2,3}。TRAIL は、細胞膜に存在する特異的受容体への結合を介してアポトーシス誘導シグナルを細胞内に伝達する抗腫瘍性のサイトカインである。TRAIL は Death receptor (DR) 4/5 に結合してがん細胞に対して特異的にアポトーシスを誘導することから、がん治療及びがん予防において極めて重要な働きを担うことが期待されており世界中で研究が進められている⁴。現在までにヒト組み換え型 TRAIL や DR4/5 を標的とした抗体医薬が開発され様々ながんにおいて臨床試験が行われているが TRAIL 耐性の獲得、副作用の問題から中止となった^{5,6}。このような背景から TRAIL 耐性機構の解明と、耐性解除に関わる分子を同定することが必須課題であると言える。

本研究では、TRAIL 耐性解除に有効な標的分子として、がん細胞特異的なエネルギー代謝制御機構 (Warburg 効果) の成立に必要な遺伝子 PTBP1 (Polypyrimidine tract-binding protein) に着目した。Warburg 効果とは、がん細

胞が酸素の有無に関わらず解糖系に依存したエネルギー代謝を行う現象である⁷。PTBP1はPKM (Pyruvate kinase muscle) 1/2 遺伝子のスプライサーとして機能し、がん細胞においては選択的スプライシングにより PKM2 の発現が優位となっている⁸。我々の研究グループはこれまでに大腸がんの臨床検体の 90% 以上で PTBP1 が高発現していることを報告しており、PTBP1 ががんにおける Warburg 効果の成立に必須な遺伝子であることを示した⁹。

本研究では、Warburg 効果の成立に必須な遺伝子 PTBP1 の発現と TRAIL 誘導がん細胞死への関与 (第 3 章-2 節) と Warburg 効果の脱制御を介した活性酸素の発生が TRAIL 耐性解除機構に関与する機構 (第 3 章-3、4 節) を新たに明らかにした。さらに、CCN1 と TRAIL 誘導細胞死への関与 (第 3 章-5 節) について報告する。

本研究で得られた知見から、Warburg 効果の成立に必須な遺伝子である PTBP1 が TRAIL 耐性解除に有効な標的分子となる可能性が示唆された。今後、PTBP1 を制御する化合物や siRNA ががんのエネルギー代謝の破綻のみならず TRAIL 誘導細胞死を利用したがんの医薬シーズとして期待される。

本学位論文は、下記の原著論文をもとに作成し岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科に提出したものである。

(1) Perturbation of the Warburg effect increases the sensitivity of cancer cells to TRAIL-induced cell death.

Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Kohei Taniguchi, Tomoaki Takai, Yuki Kuranaga, Nobuhiko Sugito, Yukihiro Akao.

Experimental Cell Research; **347**(1): 133-142 (2016)

(2) Understanding of tolerance in TRAIL-induced apoptosis and cancelation of its machinery by α -mangostin, a xanthone derivative.

Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Kohei Taniguchi, Hiroshi Ueda, Mayuko Nishi, Akihiko Ryo, Yukihiro Akao

Oncotarget; **6** (28): 25828-25842 (2015)

第2章 研究の背景と目的

第1節 TRAIL シグナル

TRAIL は、1995 年に Wiley らの研究グループによって単離され¹⁰、活性化 T 細胞のほか、NK 細胞、単球、樹状細胞、好中球などの免疫細胞でその発現が認められており、細胞膜に存在する特異的受容体への結合を介してアポトーシス誘導シグナルを細胞内に伝達する¹¹。TRAIL 受容体には TRAIL-R1 (Death receptor 4: DR4)、TRAIL-R2 (Death receptor 5: DR5)、TRAIL-R3 (Decoy receptor 1: DcR1)、TRAIL-R4 (Decoy receptor 2: DcR2)、Osteoprotegerin (OPG) の 5 種類が存在する (Fig-1)¹²。DR4/5 は、システイン残基に富むドメインの繰り返し構造を特徴とした細胞膜レセプターであり、細胞内領域には DD (Death domain) と呼ばれるアポトーシスの誘導に必須の構造を有している。その他 3 つのレセプターは、TRAIL 誘導アポトーシスを阻害する、'Decoy (おとり)' として機能していると考えられている¹³。DcR1/2 は、DR4/5 と細胞外領域の相同性は高いが、細胞内領域の DD の欠失及び機能不全から TRAIL が結合してもアポトーシスを誘導しない^{4, 13}。OPG は TRAIL との結合親和性が非常に低いため TRAIL レセプターとしての生物学的意義については明らかにされていない。

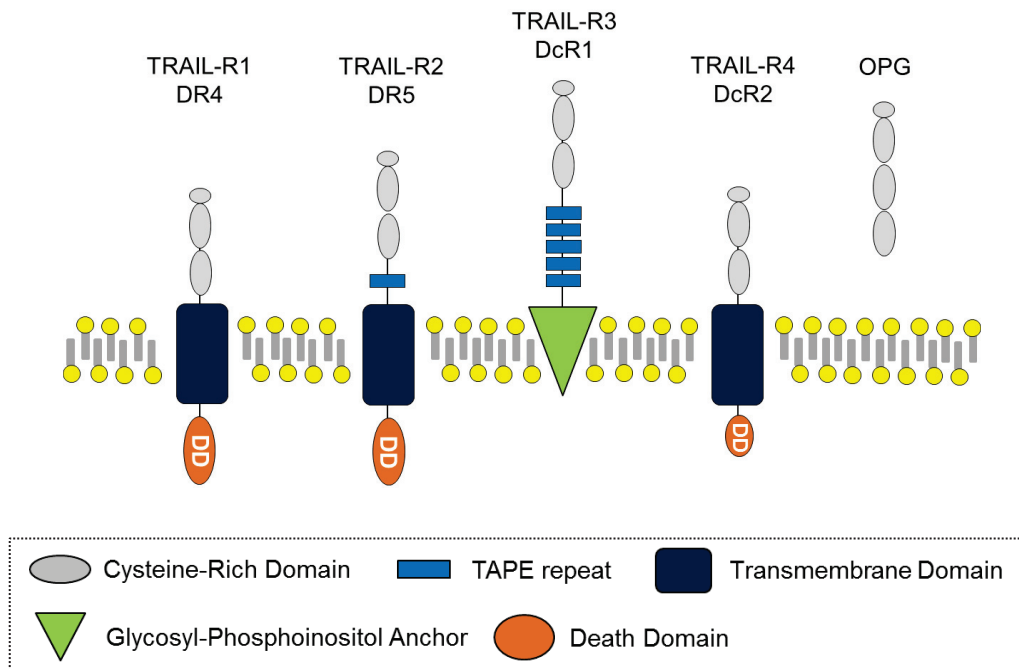


Figure-1 Characteristics of TRAIL-R in humans

TRAIL が DR4/5 に結合すると、腫瘍細胞や形質転換した細胞に対して特異的にアポトーシスを誘導する。X 線結晶構造解析の結果、TRAIL が結合すると DR はホモ三量体化し、細胞内の DD がアダプター分子である FADD (Fas-associated death domain) をリクルートさせ、FADD を介してカスパーゼ 8 が結合することにより DISC (Death-inducing signaling complex) と呼ばれる複合体を形成する^{14, 15}。その後、カスパーゼ 8 は自己分解によって活性化され、2 つの経路を介してアポトーシスを誘導する。1 つは実行カスパーゼであるカスパーゼ 3 の活性化へ進む外因性経路である¹⁵。他には、Bid の切断からミトコンドリア膜電位

の消失、シトクロム **c** の放出、カスパーゼ **9** の活性化、カスパーゼ **3** の活性化へと進む内因性経路である (Fig-2) ^{12, 14, 16}。

TRAIL の生物学的意義については、免疫学的監視機構と腫瘍抑制であることが多数報告されている。TRAIL は免疫細胞のみに発現しており、リポ多糖体 (lipopolysacharides) やインターフェロンなどのサイトカインによって誘導されることから免疫学的監視機構を担っていると考えられている ^{17, 18}。また、Zheng らの研究グループにより TRAIL ノックアウトマウスにおいて、リンパ球数及び骨髄細胞死の減少、リステリア菌の感染に対して低感受性を示すことが報告されている ¹⁹。一方、腫瘍抑制における TRAIL の働きについては、Walczack らの研究グループによりヒトの乳がん細胞を移植したマウスに recombinant TRAIL を投与した結果、腫瘍サイズの縮小効果が認められたことから初めて明らかとなった ²⁰。TRAIL シグナルの腫瘍抑制における生物学的意義とそのがん細胞に対する特異性は非常に興味深い点である。TRAIL シグナルは、がん細胞特異的に誘導されることから、がんに対する最初の防御機構であり、がん細胞と正常細胞における DR4/5 及び DcR1/2 の発現レベルの差がその特異性をもたらしていると考えられているが詳細な機構は未だ明らかにされていない。

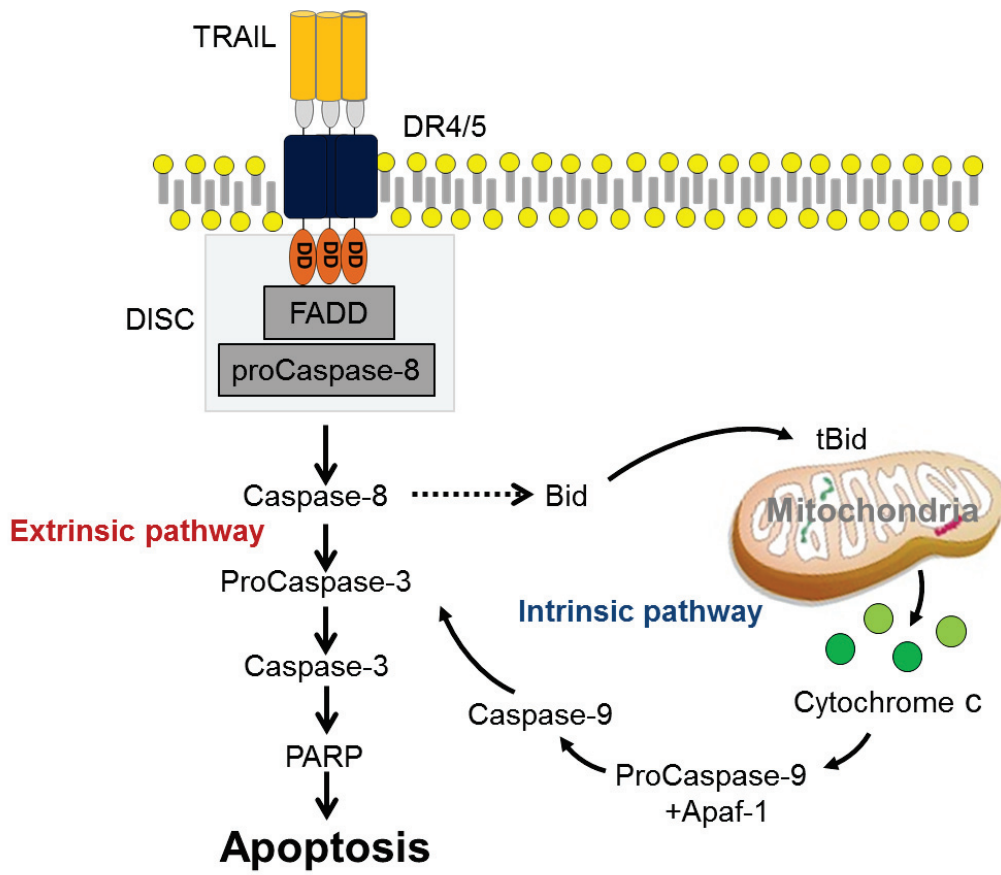


Figure-2 TRAIL-induced apoptosis pathways

第2節 TRAIL シグナルを標的とした治療の変遷とその問題点

TRAIL 誘導細胞死はがん細胞に対して高い特異性を有することから、がん治療及びがん予防において極めて重要な働きを担うことが期待されており世界中で研究が進められている。1999年にはヒト組み換え型 TRAIL を用いた前臨床試験が行われ、強力な腫瘍退縮効果を示したことから、TRAIL 経路を介する細胞死に注目が高まった²¹。Dulanermin は、DR4/5 を発現しているがん細胞に対してカスパーゼの活性化と p53 依存性のアポトーシスの誘導を期待して開発されたヒト組み換え型 TRAIL である。フランスの Soria らは、213名の進行性/再発性非小細胞肺癌患者を対象として、Dulanermin の paclitaxel・carboplatin (PC) / paclitaxel・carboplatin・bevacizumab (PCB) への併用効果及び安全性を評価する第 II 相試験を行った⁵ (Table-1A)。Dulanermin は、患者に対して毒性や副作用はなく良好な有用性を示したが、PC/PCB の追加により相乗的な抗腫瘍効果を示さなかった。その問題点として、ヒト組み換え型 TRAIL は細胞死を誘導しない DcR1/2 へ結合すること、半減期が非常に短いことが挙げられた²²。近年では、TRAIL 受容体を活性化する完全ヒト型モノクローナル抗体が開発され様々ながんに対して臨床試験が行われ、抗体医薬での研究開発例は数多く存在する。大腸がん及び乳がん細胞はアポトーシスの誘導に主に DR5 を使用し、悪性リンパ腫や膵臓がん細胞は DR4 を使用することが報告されており、がん種

により標的となるレセプターが異なることから DR4 (mapatumumab) もしくは DR5 (drozitumumab, conatumumab, lexatumumab, tigatuzumab, LY-135) をそれぞれ標的とした抗体医薬が開発されている^{6, 23-26}。抗体医薬を用いた臨床試験は、いくつかの症例でポジティブな傾向が得られたものの標準的化学療法との併用で顕著な効果は得られなかった (Table-1B)。

(A)

Dulanermin (Recombinant TRAIL)					
Phase	n	Cancer	Combination	Safety	Efficacy
I	27	Colorectal	Chemo+ BV	Safe	6PR
I	24	Lung	Chemo+ BV	Safe	1CR/13PR
II (RCT)	213	Lung	Chemo+ BV	Safe	No
II (RCT)	48	Lymphoma	Rituximab	Safe	No

(B)

Conatumumab (Anti-DR5 antibody)					
Phase	n	Cancer	Combination	Safety	Efficacy
I	12	Lung	Chemo	Safe	1CR/3PR
I	13	Pancreatic	Chemo	Safe	4PR
II (RCT)	83	Pancreatic	Chemo	Safe	No
II (RCT)	190	Colorectal	Chemo+ BV	Safe	No

Table-1 Results of Dulanermin and Conatumumab in clinical trials

(A and B) Abbreviations: BV, bevacizumab; Chemo, chemotherapy; CR, complete response; PR, partial response; n, number of patients; RCT, randomized-controlled trials

Anticancer activity was considered when the addition of the TRAIL-receptor agonist demonstrated statistically significant activity compared with the standard therapy

TRAIL 受容体を標的とした抗体医薬の問題点として、TRAIL 耐性の獲得が挙げられた²⁷。実際に、転移した腫瘍の大部分は TRAIL に耐性を示し、TRAIL 耐性はがん治療の過程で引き起こされている可能性が示唆され TRAIL シグナルを標的とした治療の大きな障壁となっている²⁸。TRAIL 耐性を獲得した細胞では、アポトーシス誘導性の DR4/5 の発現低下や、アポトーシス阻害因子の発現異常の関与が示唆されている^{29, 30}。以上のことから TRAIL 耐性機構の解明と、耐性解除に関わる分子を同定することが必須課題であると言える。

第3節 TRAIL 耐性機構

以前より、TRAIL 耐性メカニズムはアポトーシスを誘導しない DcR1/2 によって調節されていると考えられていた。実際に、DcR1/2 の高発現は初期の胃がんや乳がんを高頻度に認められており予後不良と相関していることが報告されているが、TRAIL に対する感受性との相関関係は未だ解明されていない。近年、TRAIL 耐性を獲得した細胞では、アポトーシス誘導性の DR4/5 の発現低下や FLIP (FLICE-inhibitory protein)、BCL-2 (B-cell lymphoma 2) ファミリー、IAP (Inhibitor of apoptosis protein) ファミリーといったアポトーシス阻害因子の発現異常の関与が示唆されている^{29, 30}。

1. アポトーシス誘導性の DR4/5 の発現低下

がんにおける高メチル化や点突然変異などのエピジェネティックな変化によるアポトーシス誘導性の DR4/5 の発現低下が TRAIL 耐性に関与していることが報告されている³⁰⁻³²。従って、少なくとも機能的な DR4/5 の発現は TRAIL 誘導細胞死の活性に必要であると考えられている。我々はこれまでにヒト大腸癌細胞株 DLD-1 に対する TRAIL 耐性株 (DLD-1/TRAIL) を作製することにより TRAIL 耐性機構として DR5 の発現低下と DR5 の細胞表面上へのリクルートメントの不良を明らかにした (Fig-3A and B)。

2. FLIP の過剰発現

FLIP は、カスパーゼ 8 と構造的に類似しており FLIP_S と FLIP_R、FLIP_L の 3 つのアイソフォームが存在する³³。FLIP_S と FLIP_R はカスパーゼ 8 と競合し DISC 形成を阻害する^{34,35}。一方、FLIP_L のアポトーシスにおける働きは複雑でその発現レベルに依存している。過剰発現した FLIP_L はカスパーゼ 8 とヘテロ二量体を形成することでカスパーゼの活性化を阻害する³⁶。FLIP の過剰発現は多くのがんで認められており、TRAIL シグナルを利用したがん治療の標的として期待されている。

3. BCL-2 ファミリータンパク質の発現異常

BCL-2 ファミリータンパク質は、ミトコンドリアの膜透過性を制御しミトコンドリアを介したアポトーシスの促進や阻害に関与している。これまでの研究からアポトーシス促進性の BAX/BAK の発現低下と同様に、アポトーシス抑制性の BCL-2、BCL-XL、MCL-1 の過剰発現は、がんにおける化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことが明らかとなっている³⁷⁻³⁹。TRAIL シグナルに関しても BCL-2 ファミリータンパク質の発現異常が TRAIL 耐性に関与している可能性が示唆されている。

4. IAP ファミリータンパク質の過剰発現

IAP ファミリータンパク質はカスパーゼを直接的に阻害することによって内因性、外因性いずれものアポトーシスを阻害する。がんにおいて IAP や XIAP の過

剰発現が認められている。Xu らの研究グループは IAP の発現抑制に關与するシスプラチンを投与することにより TRAIL の感受性が回復することを報告しており IAP ファミリータンパク質の過剰発現と TRAIL 耐性の關与が示唆されている。今後 TRAIL レセプターである DR4/DR5 の発現をさらに増強する低分子化合物と TRAIL の併用もしくは、アポトーシス阻害因子の発現抑制と TRAIL との併用により外因性経路のアポトーシスを増強させるなど、TRAIL 耐性機構に合わせた克服法が期待される。

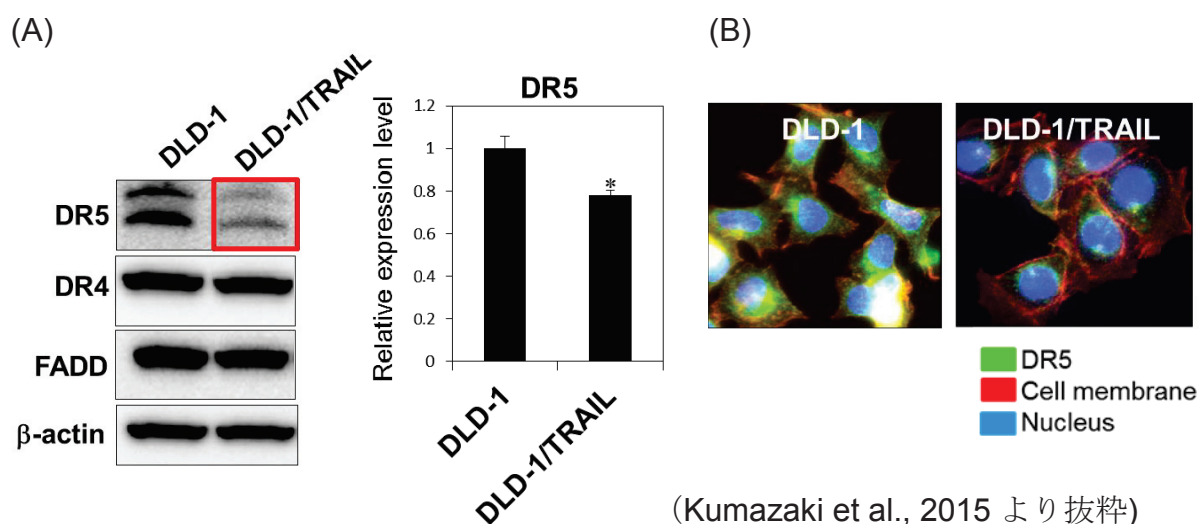


Figure-3

(A) Western blot analysis was performed to determine steady-state expression of DR5, DR4, and adaptor molecule FADD. β -actin was used as an internal control. Also shown are the steady-state expression levels of DR5 mRNA as relative ratios with respect to the GAPDH expression level. The expression level of mRNA was calculated by the $\Delta\Delta Ct$ method. Means +S.D. indicated by error bars are shown. (B) The photomicrograph shows the results of immunofluorescence staining for DR5 (anti-DR5) on the cell surface and in the cytosol of DLD-1 and DLD-1/TRAIL cells. Nuclei were counterstained in blue with Hoechst33342.

第4節 がん細胞特異的エネルギー代謝制御機構：Warburg 効果

近年、がんに対する新たな創薬のターゲットとしてエネルギー代謝が注目されている。がん細胞は低酸素・低栄養状態において限られたエネルギー源を有効利用するために代謝機構のリプログラミングを行っている。その一つが「Warburg 効果」という現象である。Warburg 効果は、「がん細胞は好氣的条件下においても TCA サイクルを活用せず、常に嫌氣的解糖を利用してグルコースを代謝し、大量の乳酸を分泌する」という現象を Otto Warburg が提唱したものである^{7, 40}。がん細胞が Warburg 効果を獲得するのに重要な役割を果たしているのが、PKM である。Warburg 効果の獲得機構を Figure-4 に示した。PKM は解糖系の最終ステップであるホスホエノールピルビン酸 (PEP) からピルビン酸への反応を触媒する酵素であり、解糖系の律速酵素として働く⁴¹。PKM には PKM1 と PKM2 の 2 つのアイソフォームが存在し、スプライシング過程においてエキソン 8、9、11 を取り込むと PKM1、エキソン 8、10、11 を取り込むと PKM2 が作られる⁴²。がん細胞においてはスプライサーである hnRNPA1、hnRNPA2、PTBP1 が高発現することでエキソン 9 の取り込みが阻害され、エキソン 10 を取り込んだ PKM2 が高発現することが知られている⁴³⁻⁴⁵。著者らは、大腸癌の臨床検体の 90%以上で PTBP1 が高発現しており、ほぼすべてのがん種において PKM2 が高発現していることを確認している⁴⁶。

TCA サイクルを介したグルコース代謝ではグルコース 1 モル当たり **36ATP** が産生されるのに対し、解糖系では **2ATP** しか産生することができないため **ATP** の産生効率が低い。しかしながら、解糖系は **TCA** サイクルと比較して反応ステップが単純であるため **ATP** の産生速度が速く、がん細胞はグルコースの取り込みを亢進させることで大量の **ATP** 産生を可能にしている。また、解糖系の使用には **2** つの利点が挙げられ、つまり **TCA** サイクルの過程で発生する活性酸素 (reactive oxygen species; **ROS**) の発生を抑制できることである。細胞内で過剰産生された **ROS** はアポトーシスやオートファジー等のプログラム細胞死の原因となるため、解糖系を使用することで **ROS** の発生を抑制していると考えられている。もう一つの利点は、解糖系の間代謝産物を利用したペントースリン酸回路による核酸合成の促進である。**PKM1** が常に活性型の四量体で存在するのに対して、**PKM2** は比較的活性の低い単量体もしくは二量体で存在する。この多量体化の制御機構には **PKM2** のチロシンリン酸化が関与しており、リン酸化を受けた **PKM2** は四量体の形成が困難になる。**PKM2** のキナーゼ活性が低い状態に保たれることで、細胞内では解糖系の間代謝産物が蓄積しやすくなる。細胞はこの中間代謝産物をペントースリン酸経路 (**PPP**) に動員し、細胞分裂に必要な核酸合成に使用している。

以上の通り、**Warburg** 効果はがん細胞の増殖、生存、エネルギーの獲得に極め

て重要な機構である。

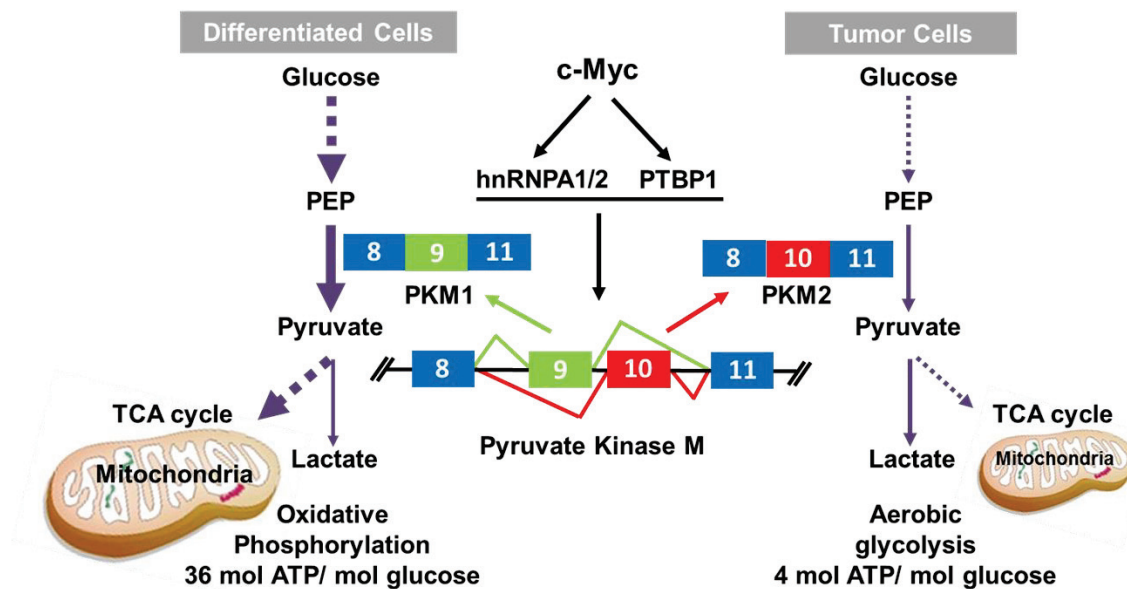


Figure-4 Warburg effect

第5節 CCN1 の発現と TRAIL 誘導細胞死への関与

CCN1 (CYR61) は CCN ファミリーに属し、増殖因子、サイトカイン、低酸素状態による細胞ストレスなど様々な刺激によって誘導される細胞外マトリックスタンパク質である⁴⁷。CCN1 は 4 つのドメインから構成されておりそれぞれが結合するインテグリンレセプターが異なることから細胞の接着、遊走、増殖、生存などの様々な細胞活性の制御に関与している⁴⁸。インテグリンは 2 量体タンパク質であり、 α と β のサブユニットが非共有結合で会合し活性のある 2 量体を形成している^{49, 50}。 α と β のサブユニットは数多く存在し、20 種類以上の α β のインテグリンが同定されており、その組み合わせにより結合する分子が異なる^{50, 51}。CCN1 は細胞の増殖や生存に関与する一方、線維芽細胞において CCN タンパク質は、TNF- α もしくは FasL 存在下でアポトーシスを増強することが *in vitro* 及び *in vivo* の系で明らかになっている⁵²。そのメカニズムを Figure-5 に示す。CCN1 はインテグリン $\alpha_6\beta_1$ とシンデカン 4 (Syndecan-4) への結合を介して 5-リポキシゲナーゼ (5-Lox) の活性化を含む様々なメカニズムにより大量の ROS を発生させる。通常 TNF- α 単独では、NF- κ B がカスパーゼの活性を阻害する c-FLIP の誘導や ROS を抑制することで JNK (c-Jun N-terminal kinase) の活性化を阻害するフォスファターゼを誘導することにより TNF- α 誘導性アポトーシスを阻害している。しかしながら、CCN1 によって産生された

ROS は JNK の活性化を促進維持し、その結果 FLIP の働きを阻害することで TNF- α 誘導性のアポトーシスを促進する。さらに、ROS の発生は p38/MAPK を活性化させ、BAX のミトコンドリアへの局在及びシトクロム c の放出を誘導し、FasL を介したアポトーシスを促進する。がん細胞における CCN1 の働きについても線維芽細胞と類似している。がんの間質では線維芽細胞が活性化されており、がんにおける CCN1 の過剰発現は、AKT や ERK シグナルを活性化させることで腫瘍増殖や血管密度を上昇させることが免疫不全マウスを用いた実験より明らかとなっている⁵¹。近年、前立腺がんにおいても TRAIL 存在下ではインテグリンレセプター $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_6\beta_4$ への結合を介して TRAIL 誘導細胞死を増強することが明らかとなった⁵²。前立腺がん細胞 PC3 における TRAIL との相乗効果には ROS の発生は関与しておらず PKC (Protein kinase C) α の活性化依存的に誘導されることが報告されているが詳細な機構は明らかにされていない⁵²。CCN1 のアポトーシス誘導機構は CCN1 のインテグリンレセプター以外への結合もしくは TRAIL 誘導細胞死に関与するレセプター (DR4/5) の会合に関与することから TRAIL 誘導細胞死が促進されるのではないかと考えられる。

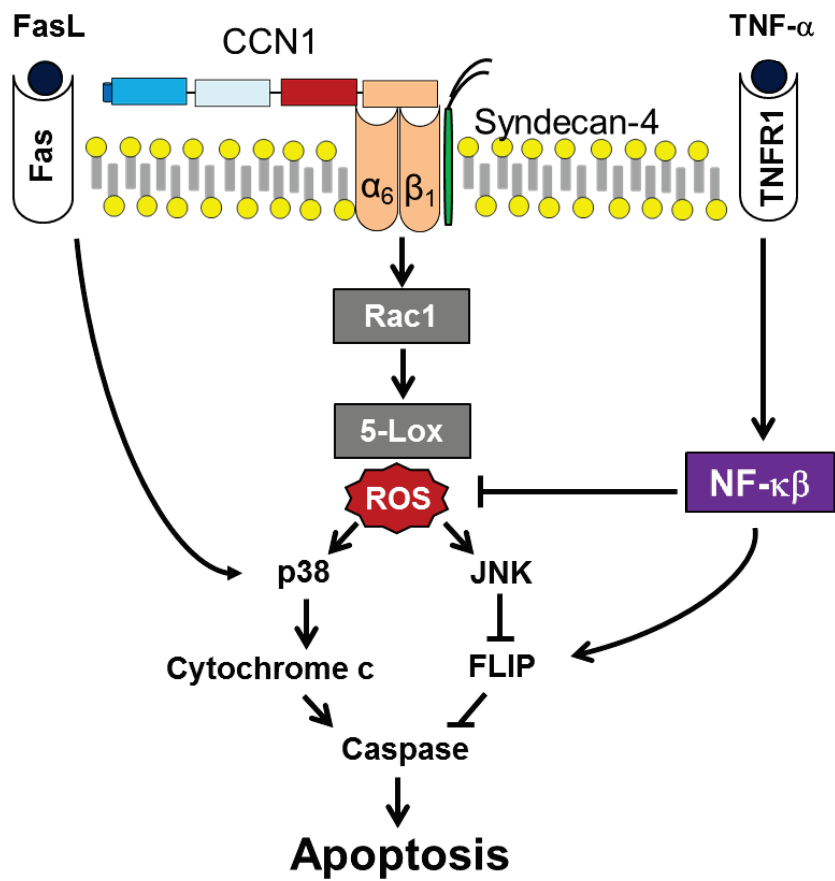


Figure-5 Signaling crosstalk between CCN1 and TNF-α or FasL in fibroblasts

第3章 Warburg 効果関連 PTBP1 と TRAIL 誘導アポトーシス

第1節 序

TRAIL を介したがん細胞特異的な細胞死は抗腫瘍薬の標的として期待されている。ヒト組み換え型 TRAIL はヒトの生体内における半減期が非常に短く、重篤な肝機能障害の懸念があることから、現在は DR4/5 を標的とした抗体医薬の開発が行われている。しかしながら、TRAIL 耐性の獲得が大きな障壁となっており未だ有効な治療法は確立されていない。そこで本章では、TRAIL 誘導細胞死を利用したがんの治療薬の開発に向け TRAIL 耐性解除に関わる分子の同定及びその耐性解除機構の解明を試みた。

第2節 PTBP1の発現と TRAIL 誘導がん細胞死への関与

がん細胞特異的なエネルギー代謝機構である Warburg 効果は PTBP1/PKM カスケードによって成立しており、これまでに大腸がんの臨床検体の 90% 以上で PTBP1 が高発現していることを報告している。2 種細胞株を用いアレイ解析(遺伝子発現プロファイル)を行ったところ、DLD-1 と比較して DLD-1/TRAIL において PTBP1 の高発現が認められた。実際に定常状態における PTBP1 のタンパク質レベルでの発現をウエスタンブロット法により検証したところ、アレイ解析の結果と同様に DLD-1/TRAIL において PTBP1 の高発現が確認された (Fig-6A)。

(A)

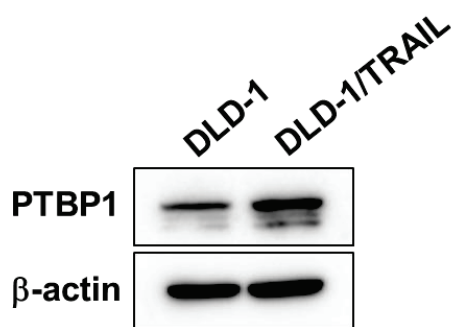


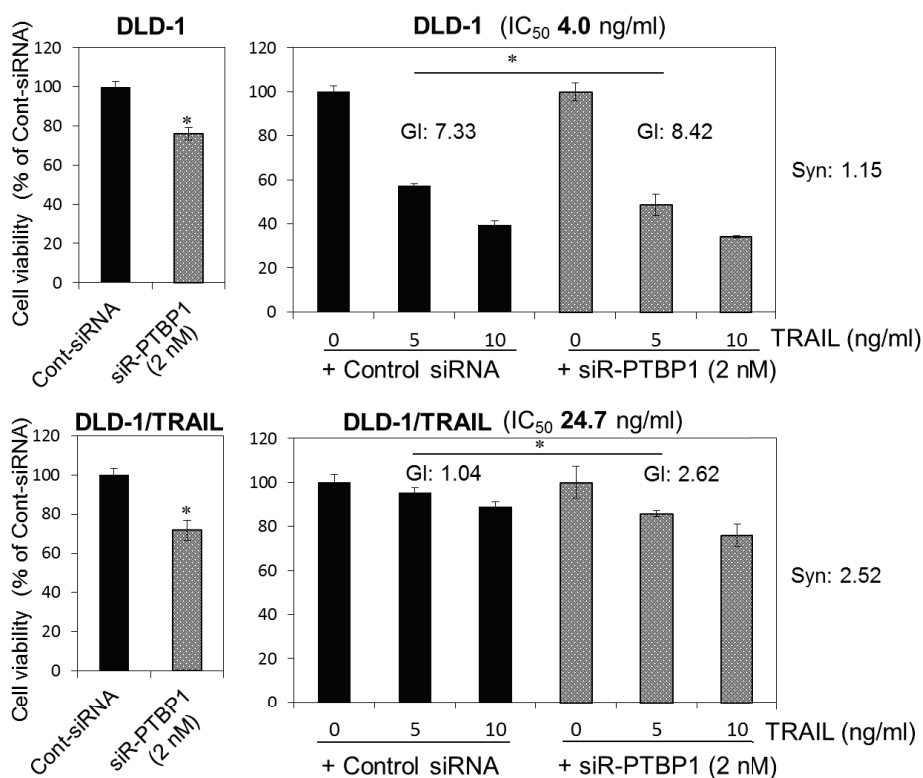
Figure-6

(A) Western blot analysis was performed to determine the steady-state expression of PTBP1 in TRAIL-sensitive DLD-1 and -resistant DLD-1 cells. β -actin was used as an internal control.

そこで、siRNA を用いて PTBP1 の発現をノックダウンした時の TRAIL に対する感受性への影響を評価した。いずれの細胞株においても PTBP1 をノックダウンした細胞では、約 20% の生細胞数の減少が認められた (Fig-6B)。

DLD-1/TRAIL において増殖抑制効果を示さない TRAIL 5 ng/ml においても PTBP1 をノックダウンすることで TRAIL による細胞死が相乗的に誘導されることが分かった (Fig-6B)。Figure-6C で示すように PTBP1 をノックダウンした細胞では TRAIL 誘導アポトーシスの指標であるカスパーゼ 8 の顕著な活性化が認められた。

(B)



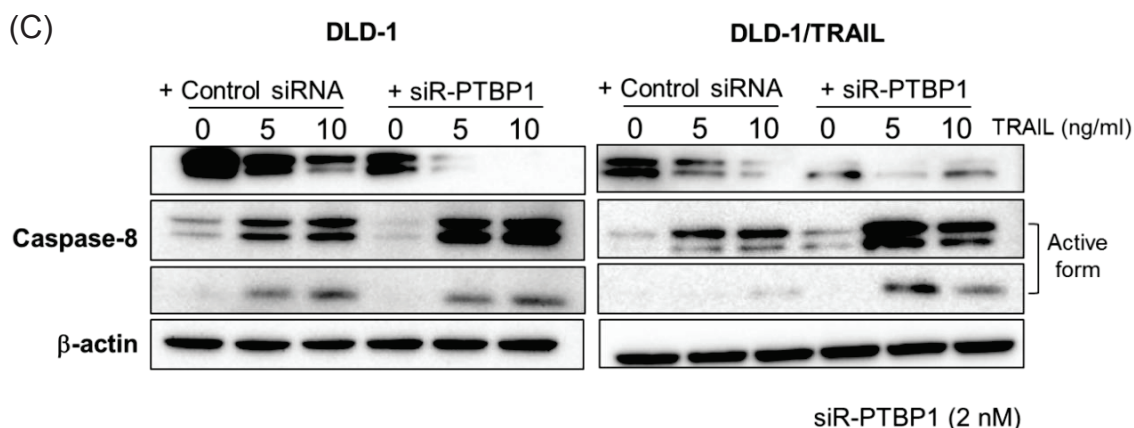
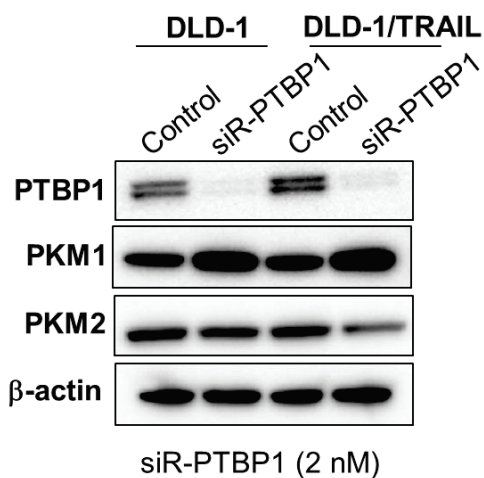


Figure-6

(B) TRAIL-sensitive and -resistant DLD-1 cells were transfected with siR-PTBP1 (2 nM) for 48 h and then treated with rTRAIL (5, 10 ng/ml) for 24 h. The cell viability was estimated at 72 h after the transfection. The cell viability of the control (0; PBS alone) is indicated as 100 %. The growth inhibition effect by TRAIL with and without the transfection with siR-PTBP1 was assessed by the average value of the growth inhibition ratios (GI) at each TRAIL concentrations (5, 10 ng/ml). We defined the synergistic effect (Syn) by introduction of siR-PTBP1 as the ratios of siR-PTBP1 to control siRNA GI value. (C) Western blot analysis was performed to determine the level of the active form of caspase-8. β -actin was used as an internal control.

さらに、PTBP1 をノックダウンした細胞におけるエネルギー代謝への影響を検証すると PKM2 から PKM1 へのスイッチが観察された(Fig-6D)。PKM1 の発現が有意となることで解糖系から酸化的リン酸化へのシフトが予測され、細胞内の ATP レベルと解糖系の最終産物である乳酸レベルの測定を行った。PTBP1 をノックダウンした細胞では、細胞内の ATP レベルの増加と乳酸レベルの減少が認められた (Fig-6E)。この結果から、PTBP1 の発現低下により細胞内のエネルギー代謝が一部解糖系から酸化的リン酸化へシフトしていることが分かった。

(D)



(E)

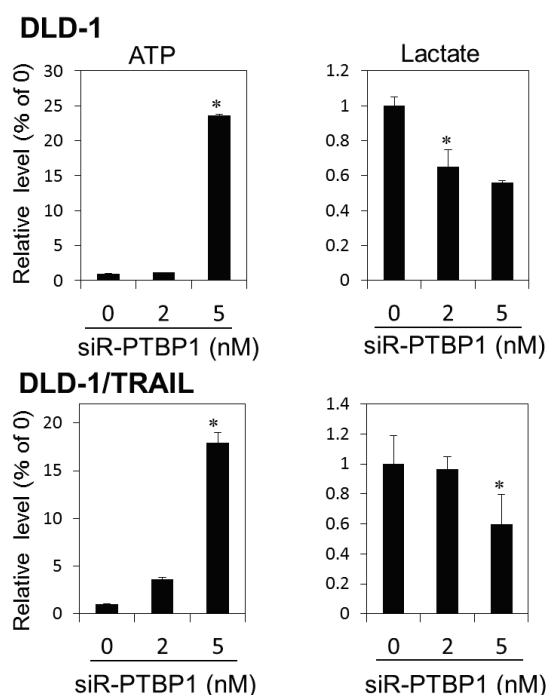


Figure-6

(D) TRAIL-sensitive and -resistant DLD-1 cells were transfected with control or PTBP1 siRNA (siR-PTBP1; 2 nM) for 48 h. Western blot analysis was performed to determine the expression of Warburg effect-related genes. β -actin was used as an internal control. (E) TRAIL-sensitive and -resistant DLD-1 cells was transfected with control or siR-PTBP1 (2, 5 nM) for 72 h. The ATP and lactate production were normalized to cell numbers, and that of the Control (0) is indicated as "1".

実際に PTBP1 のノックダウンによる Warburg 効果の脱制御（解糖系から酸化的リン酸化へのスイッチ）が TRAIL に対する感受性の回復に参与しているのかを解糖系の阻害剤である 2-デオキシグルコース（2-DG）を用いて検証した。

DLD-1/TRAIL に 2-DG を 48 時間作用させた後 TRAIL を投与した細胞では生細胞数の顕著な減少と、カスパーゼ 8 の活性化が認められた (Fig-6F)。これらの

結果から、Warburg 効果の成立に必須な遺伝子 PTBP1 をノックダウンすることによる Warburg 効果の脱制御を介して TRAIL に対する感受性が回復することが明らかとなった。

(F)

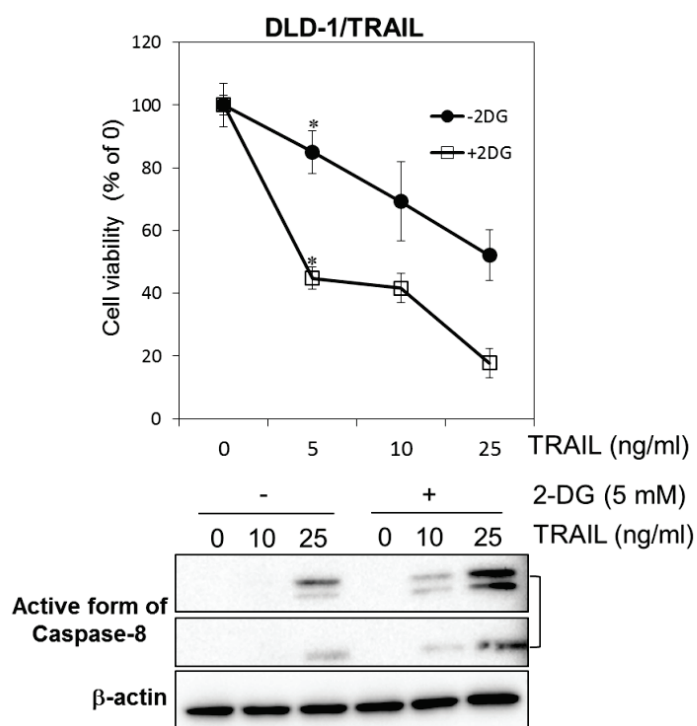
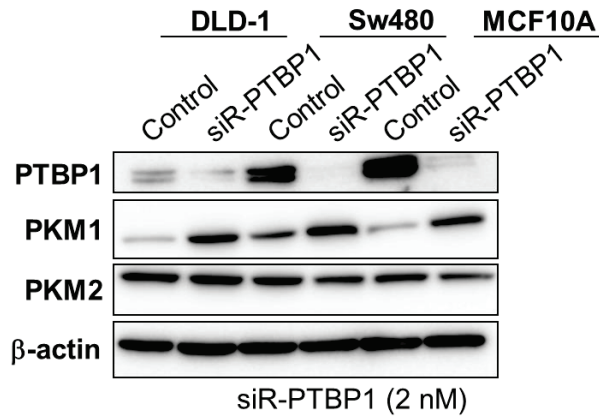


Figure-6

(F) TRAIL-resistant DLD-1 cells were pretreated with 2-DG (5 mM) for 24 h and then treated with rTRAIL (5, 10, 25 ng/ml) for 24 h. The cell viability was estimated at 48 h after the start of treatment. The cell viability of the control (0; DMSO alone) is indicated as 100 %. Western blot analysis was performed to determine the level of the active form of caspase-8. β -actin was used as an internal control.

さらに、PTBP1 の発現と TRAIL 誘導細胞死との関係を明らかにするために、トリパンブルー色素排除試験法により TRAIL の IC₅₀ 値が 20 ng/ml 以上であったヒト大腸癌細胞株 SW480 と、正常ヒト乳腺上皮細胞株 MCF10A を用いて同様の実験を行った。その結果 2 種細胞株の TRAIL の IC₅₀ 値は、それぞれ 20.2 ng/ml、102.1 ng/ml となった。初めに、定常状態における PTBP1 の発現をウエスタンブロット法により検証した。いずれの細胞株においても DLD-1/TRAIL と同様に、PTBP1 の高発現が認められ、MCF10A でその発現レベルが最も高いことが分かった (Fig-6G)。次に、PTBP1 の発現を siRNA を用いてノックダウンした時の TRAIL に対する感受性への影響を検証した。いずれの細胞株においても TRAIL 5 ng/ml において PTBP1 をノックダウンすることで TRAIL による細胞死が相乗的に誘導されることが分かった (Fig-6H)。中でも TRAIL の IC₅₀ 値が最も高い MCF10A で TRAIL の感受性の回復効果が強く認められた (Syn:2.94)。Figure-6G に示すように、DLD-1/TRAIL と同様に PTBP1 の発現をノックダウンすることにより PKM2 から PKM1 へのスイッチが認められた (Fig-6G)。以上の結果から、PTBP1 の高発現は TRAIL 耐性と関連しており、TRAIL 耐性が強い細胞株ほど PTBP1 の発現をノックダウンすることにより TRAIL に対する感受性の回復効果が強いことが分かった。

(G)



(H)

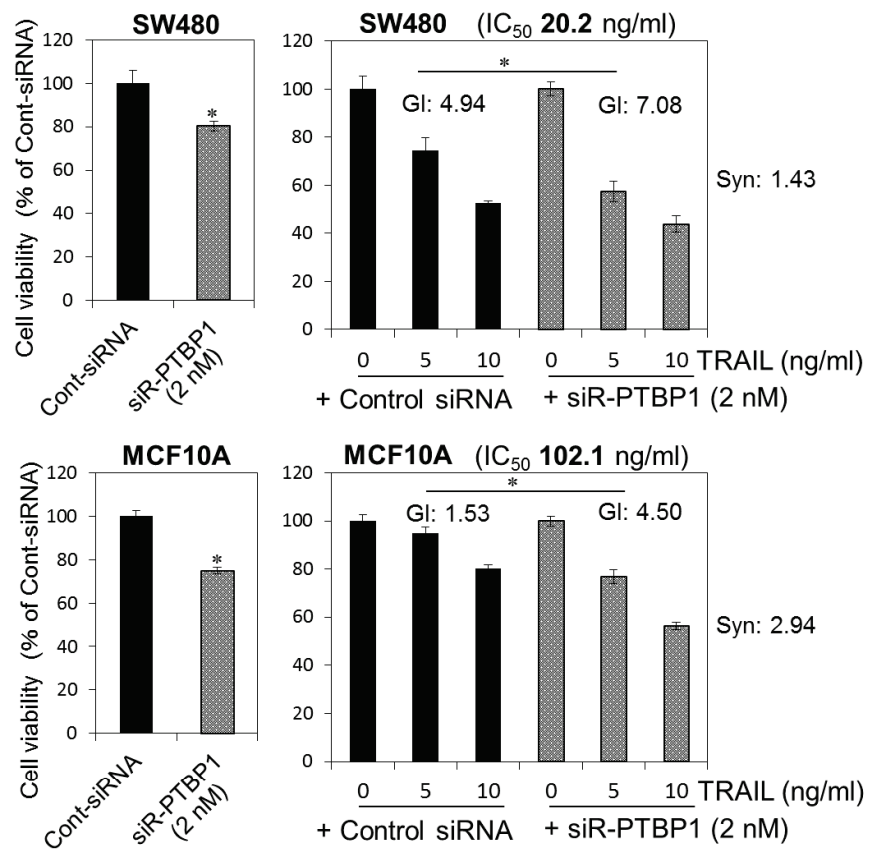


Figure-6

(G) TRAIL-sensitive DLD-1, TRAIL-resistant SW480 and MCF10A cells were transfected with control or siR-PTBP1 (2 nM) for 48 h. Western blot analysis was

performed to determine the expression of Warburg effect-related genes. β -actin was used as an internal control. (H) TRAIL-resistant SW480 and MCF10A cells were transfected with siR-PTBP1 (2 nM) for 48 h and then treated with rTRAIL (5, 10 ng/ml) for 24 h. The cell viability was estimated at 72 h after the transfection. The cell viability of control (0; PBS alone) is indicated as 100 %. The growth inhibition effect by TRAIL with and without the transfection with siR-PTBP1 was assessed by the average value of the growth inhibition ratios (GI) at each TRAIL concentrations (5, 10 ng/ml). We defined the synergistic effect (Syn) by introduction of siR-PTBP1 as the ratios of siR-PTBP1 to control siRNA GI value. Data are expressed as means \pm SD of 3 different experiments. * p <0.05, as indicated by the brackets (Student's t test).

第3節 TRAIL 耐性機構における PTBP1 の役割

これまでの研究から DR5 の発現低下と細胞表面上へのリクルートメントの不良が TRAIL 耐性の要因であることを明らかにした⁵³。本節では、PTBP1 をノックダウンした際に 2 つの TRAIL 耐性機構が解除されるかどうかを検証した。初めに、siR-PTBP1 をトランスフェクション後 48 時間での DR5 の発現レベルをウェスタンブロット法により検証した。その結果、PTBP1 をノックダウンした細胞において DR5 の発現が顕著に増加することが明らかとなった (Fig-7A)。

そこで、PTBP1 の発現ベクターを作製し、PTBP1 が DR5 の転写に与える影響を検証した。DLD-1 に PTBP1 の発現ベクターをトランスフェクションし 24 時間後における DR5 の発現レベルをウェスタンブロット法により評価したところ、DR5 の発現低下が認められたが (Fig-7B)、クロマチン免疫沈降法では PTBP1 と DR5 の直接結合が認められず PTBP1 が DR5 の転写に関与していないことが明らかとなった。次に DR5 の細胞表面上へのリクルートメントの不良への影響を検証した。2 種細胞株に siR-PTBP1 をトランスフェクション後 48 時間での DR5 の細胞内局在を免疫染色法により評価した結果、いずれの細胞株においても PTBP1 の発現をノックダウンすることにより細胞表面上への DR5 の発現増加が観察された (Fig-7C)。以上の結果から PTBP1 の発現をノックダウンすることで DR5 の発現と細胞表面上へのリクルートメントが誘導され TRAIL 耐性が

解除されることが明らかとなった。

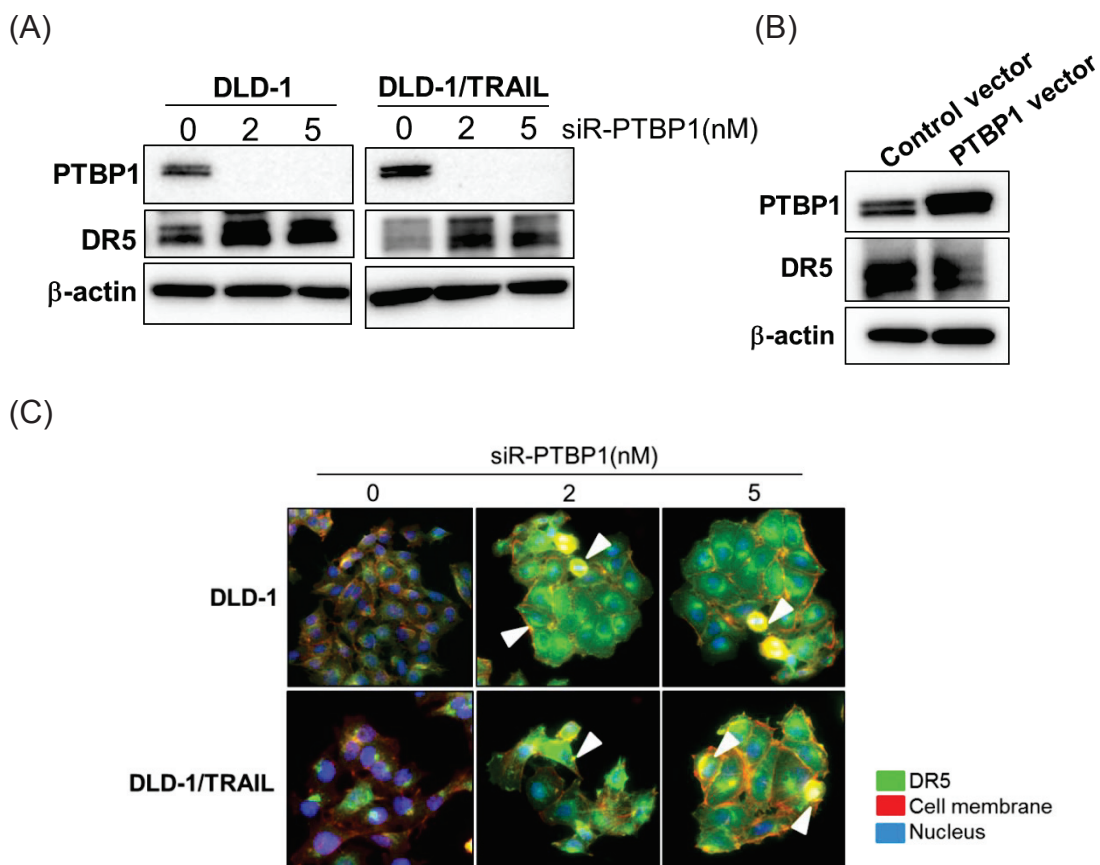


Figure-7

(A) TRAIL-sensitive and -resistant DLD-1 cells were transfected with control or siR-PTBP1 (2, 5 nM) for 48 h. Western blot analysis was performed to determine the expression levels of PTBP1 and DR5. (B) TRAIL-resistant DLD-1 cells were transfected with control and PTBP1 expression plasmid vectors (0.2 μ g/ml) for 24 h. Western blot analysis was performed to determine the levels of PTBP1 and DR5. (C) TRAIL-sensitive and -resistant DLD-1 cells were transfected with siR-PTBP1 (2, 5 nM) for 48 h. The results of immunofluorescence staining for anti-DR5 antibody binding on the cell surface and in the cytosol of untreated (0: Control siRNA) or siR-PTBP1 transfected cells are shown. Nuclei were counterstained in blue with Hoechst33342. Anti-DR5 antibody bound to the cell surface, which is indicated by the white arrows.

第4節 活性酸素 (ROS) の発生と TRAIL 耐性解除機構への関与

前節において、PTBP1 は DR5 の転写に直接関与していないことから、細胞内のエネルギー代謝の変化 (Warburg 効果の脱制御) が DR5 の発現増加に関与しているかを検討した。第2節において PTBP1 の発現をノックダウンすることにより PKM2 から PKM1 へのスイッチが誘導され、細胞内のエネルギー代謝が一部解糖系からミトコンドリアにおける TCA サイクルによる酸化的リン酸化にシフトすることを明らかにし、細胞内では活性酸素 (ROS) が発生している可能性が予測された。我々の研究グループはすでに、PTBP1 の発現をノックダウンすることにより細胞内で ROS の発生が増加することを報告している⁹。そこで、細胞内で発生した ROS と TRAIL 耐性解除機構への関与を検証するために、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) を用いて実験を行った。NAC を 6 時間作用した後 TRAIL に対する感受性への影響をトリパンブルー色素排除試験法により測定した。その結果、NAC を作用させた細胞において、PTBP1 のノックダウンによる TRAIL 誘導細胞死が一部キャンセルされることが分かった (Fig-8A)。非常に興味深いことに、NAC を作用させた細胞では PTBP1 のノックダウンにより解除されていた DR5 の発現とリクルートメントの誘導も一部キャンセルされることが明らかとなった (Fig-8B and C)。これらの結果から、PTBP1 のノックダウンによる DR5 の発現とリクルートメントの誘導は

Warburg 効果の脱制御による ROS の発生が関与していることが明らかとなった。

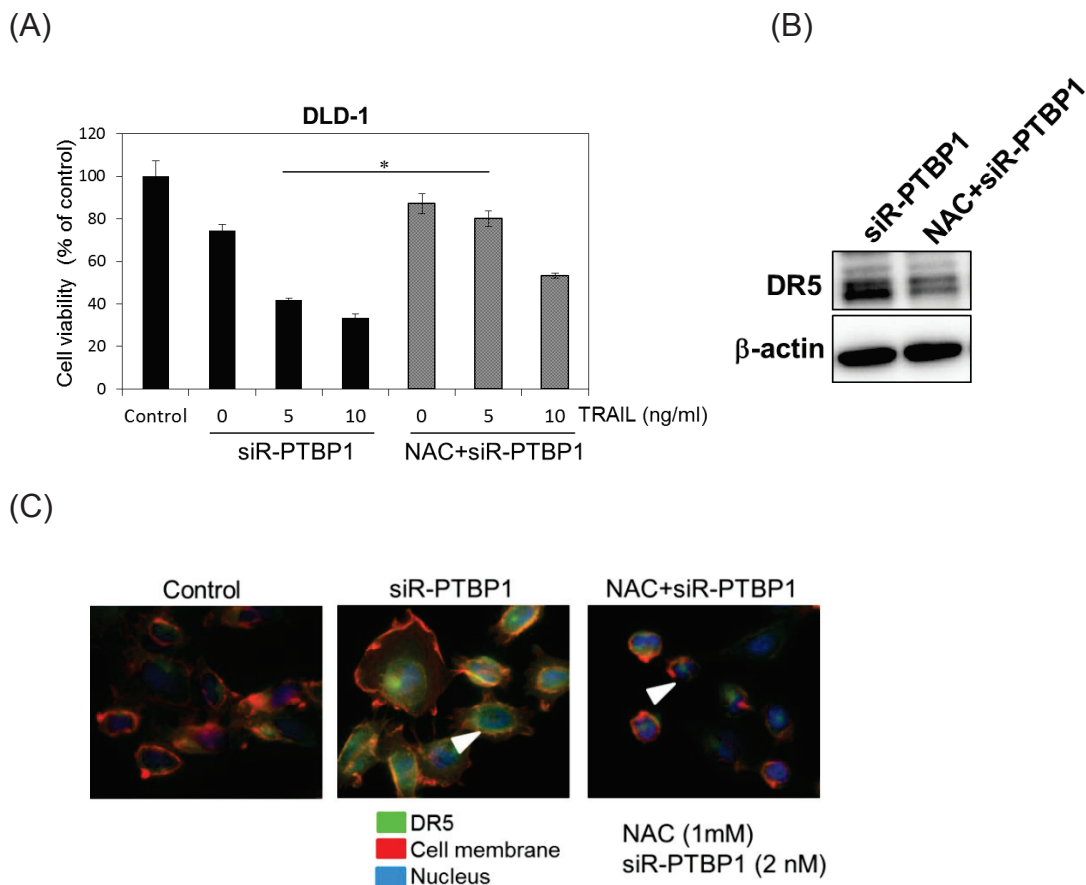


Figure-8

(A) TRAIL-sensitive DLD-1 cells were pretreated with NAC (1 mM) for 6 h and then incubated with siR-PTBP1 (5 nM) and/or rTRAIL (5, 10 ng/ml) for 24 h. The cell viability was estimated at 72 h after the treatment. Data were obtained from 3 independent experiments. The cell viability of the control (Control; Control-siRNA alone) is indicated as 100 %. (B) TRAIL-sensitive DLD-1 cells were pre-treated with NAC (1 mM) before the transfection with siR-PTBP1. Western blot analysis was performed to determine the expression level of DR5 protein. β -actin was used as an internal control. (C) TRAIL-sensitive DLD-1 cells treated with NAC (1 mM) and/or siR-PTBP1 (5 nM). The results of immunofluorescence staining for anti-DR5 binding on the cell surface and in the cytosol of untreated (0: Control-siRNA) or siR-PTBP1 transfected cells are shown. Nuclei were counterstained in blue with Hoechst33342. Anti-DR5 antibody bound to the cell surface, which is indicated by the white arrows. * $p < 0.05$, as indicated by the brackets (Student's t test).

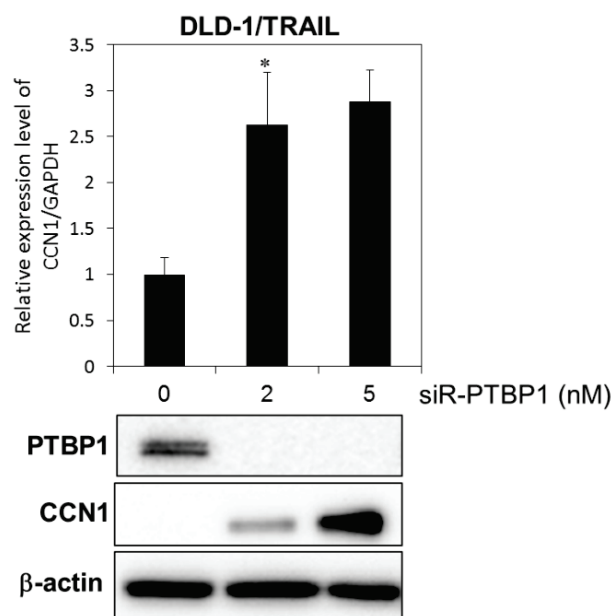
第5節 CCN1 と TRAIL 誘導細胞死への関与

本節では、DLD-1/TRAIL において Control 細胞と PTBP1 をノックダウンした細胞を用いてアレイ解析を行い PTBP1 のノックダウンによるその他の TRAIL 耐性解除メカニズムの解明を行った。その結果、PTBP1 をノックダウンした細胞において CCN1 遺伝子の顕著な発現亢進が認められた。CCN1 は、インテグリン結合タンパク質でありインテグリンレセプターに結合することで細胞接着、遊走、生存など様々な細胞活性制御に関与している⁴⁸。一方、CCN1 は前立腺がん細胞において TRAIL 誘導細胞死を増強することが報告されており、アポトーシスの誘導に関与することが示唆されている⁵²。

DLD-1/TRAIL へ siR-PTBP1 をトランスフェクションした際の CCN1 の mRNA、タンパク質発現レベルを検証した。定常状態においてその発現が認められないのに対して、PTBP1 をノックダウンした細胞では顕著に mRNA、タンパク質レベルで発現が増加していることが分かった (Fig-9A)。そこで PTBP1 のノックダウンにより誘導された CCN1 の発現が TRAIL 細胞死の誘導促進にどのように関与しているのか検証した。初めに、CCN1 の発現ベクターを作製し DLD-1/TRAIL に CCN1 を過剰発現した時の TRAIL に対する感受性を評価した。CCN1 ベクターをトランスフェクション後 24 時間においてその発現亢進が認められたため本実験ではトランスフェクション後 24 時間の細胞を CCN1 過剰発現

細胞として使用した (Fig-9B)。興味深いことに、CCN1 を過剰発現した細胞では、コントロール細胞と比較してカスパーゼ 8 の活性化を伴った TRAIL 誘導細胞死が増強されることが分かった (Fig-9C)。また、PTBP1 の CCN1 に対する転写への影響をクロマチン免疫沈降法により評価した結果、PTBP1 タンパクが CCN1 の mRNA と直接結合している可能性が示された (Fig-9D)。さらに、PTBP1 の発現ベクターを用い PTBP1 を過剰発現した細胞において CCN1 の発現増加が一部キャンセルされた (Fig-9E)。以上の結果から、PTBP1 は TRAIL 誘導細胞死に関与する CCN1 のリプレッサーとして機能しており、PTBP1 をノックダウンすることによる CCN1 の発現増加を介して TRAIL 誘導細胞死が増強される可能性が示唆された。

(A)



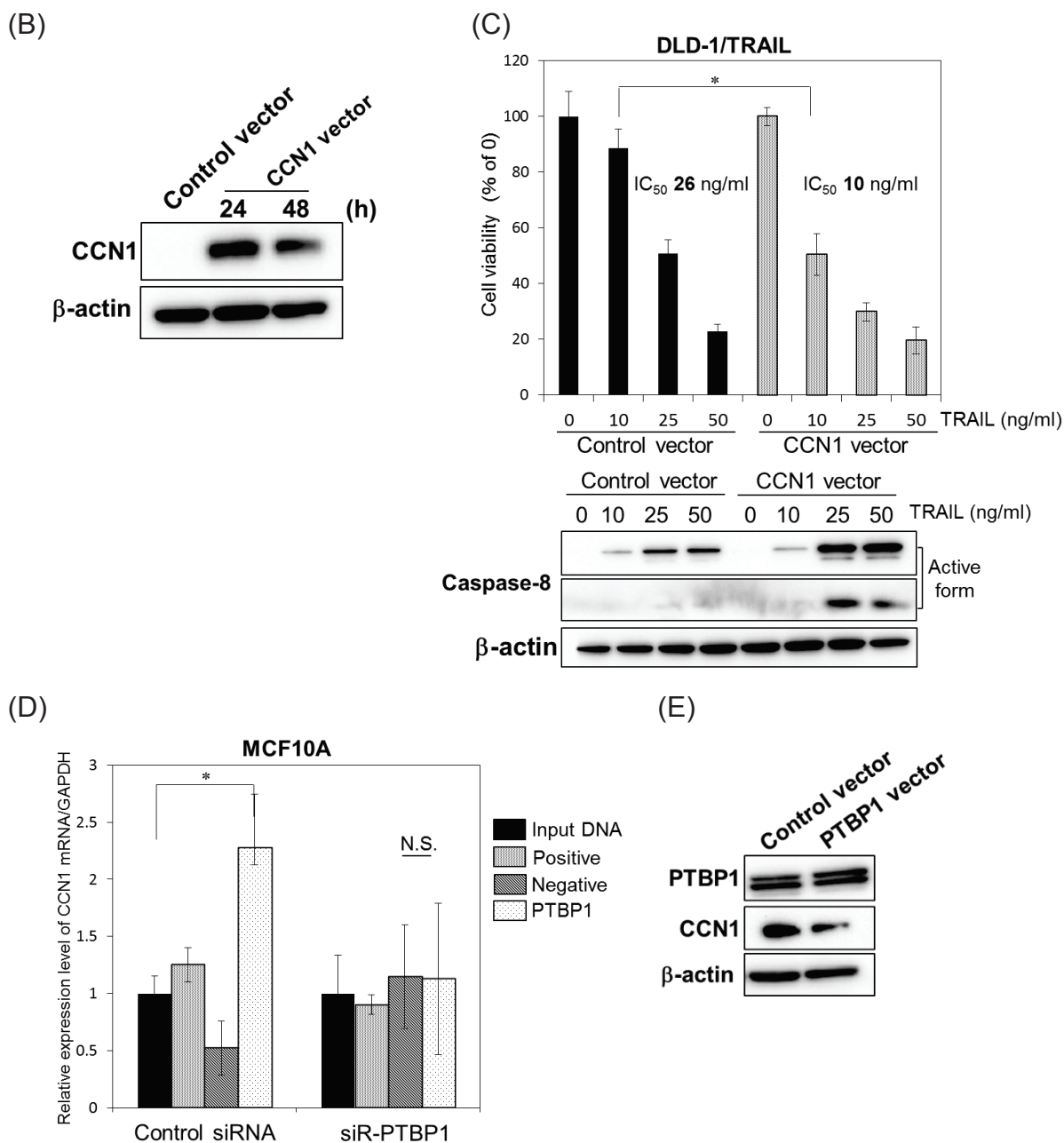


Figure-9

(A) DLD-1/TRAIL cells were transfected with siR-PTBP1 (2, 5 nM) for 48 h. The expression levels of CCN1 mRNA as a relative ratio with respect to the GAPDH expression level was evaluated by RT-qPCR. Also shown is the expression level of CCN1 protein determined by performing Western blot analysis. Means (S.D) indicated by error bars are shown. (B) Control and CCN1-expression plasmid vectors (0.2 μ g/ml) were used to transfect DLD-1/TRAIL cells for 24 or 48 h. Western blot analysis was

performed to determine the expression of CCN1 with β -actin used as the internal control. (C) Control and CCN1-expression plasmid vectors (0.2 μ g/ml) were used to transfect DLD-1/TRAIL cells for 24 h, and the cells were then exposed to rTRAIL (10, 25, 50 ng/ml) for 24 h. The cell viability was estimated at 48 h after the treatment. The cell viability of the control (0; PBS alone) is indicated as 100 %. Western blot analysis was performed to determine the expression of activation of caspase-8 with β -actin used as the internal control. (D) MCF10A cells transfected with control or siR-PTBP1 (2 nM) for 48 h. The expression levels of CCN1 mRNA as relative ratios with respect to the GAPDH expression level was evaluated by RT-qPCR. The expression level of input DNA is indicated as "1". (E) DLD-1/TRAIL cells were transfected with control or PTBP1-expression plasmid vectors (0.2 μ g/ml) for 24 h. Western blot analysis was performed to determine the expression of PTBP1 and CCN1 proteins, with β -actin used as the internal control. * p <0.05, as indicated by the brackets (Student's t test).

第4章 総括

がんに対する TRAIL 誘導アポトーシスを標的とした多くの臨床試験の結果は、TRAIL 耐性の獲得、さらには重篤な肝機能障害等の副作用のため失敗に終わった。このような背景から TRAIL 耐性機構の解明と、耐性解除に有効な標的分子を同定することががん細胞特異的な TRAIL 誘導細胞死を標的にする新規治療薬の開発に求められている。

本研究では、Warburg 効果として知られるがん細胞特異的なエネルギー代謝機構の成立に必須な遺伝子 PTBP1 に着目した。Pyruvate kinase (PK) は、4つのアイソフォームが存在する解糖系の律速酵素である。実際に PKM1/2 の発現レベルは、スプライサータンパク質である PTBP1 によって制御されている。がん細胞においては、PTBP1 が高発現しており選択的スプライシングにより PKM2 の発現が有意となることで Warburg 効果を成立させている。本研究では TRAIL 耐性株において PTBP1 の高発現を認め、PTBP1 をノックダウンすると、TRAIL の感受性が回復することが分かった (第3章-2節)。その効果は TRAIL に対して最も強い耐性を示した正常ヒト乳腺上皮細胞株 MCF10A において顕著に認められた。これらの結果から、PTBP1 の発現と TRAIL 耐性には正の相関があり、PTBP1 をノックダウンすると TRAIL 感受性が回復することが分かった。我々はこれまでに、アポトーシス誘導性の DR5 の発現低下に加えて DR5 の細

胞表面上へのリクルートメントの不良が **TRAIL** 耐性の要因であることを明らかにした⁵³。**PTBP1** をノックダウンすることにより、**DR5** の発現低下とリクルートメントの不良が解除されることが分かった (第 3 章-3 節)。しかしながら、**PTBP1** は **DR5** の転写に直接的に関与していないことから細胞内でのエネルギー代謝の変化に着目し **TRAIL** 耐性解除機構の解明を試みた。**PTBP1** をノックダウンした細胞では、**PKM2/PKM1** の比が定常状態と比較して顕著に減少しており、さらには細胞内の **ATP** レベルの増加と、解糖系の最終産物である乳酸量の減少が認められたことから細胞内のエネルギー代謝が一部解糖系からミトコンドリアにおける酸化的リン酸化へシフトしていることが分かった。2006 年に、ウコンの主要な構成成分であるクルクミンが **ROS** の発生を介して **DR5** の発現が増加することにより **TRAIL** の感受性を回復させることが報告されている⁵⁴。我々は、**PTBP1** の発現をノックダウンすると **PKM2** から **PKM1** へのスイッチにより **ROS** の産生量が上昇することを明らかにしている⁴⁶。実際に、抗酸化剤である **NAC** を作用させることで **PTBP1** のノックダウンによる **TRAIL** 誘導細胞死が一部キャンセルされることが示された。興味深いことに、**DR5** の発現とリクルートメントの誘導もキャンセルされることが分かった。これらの結果から、**Warburg** 効果の脱制御による **ROS** の発生が **DR5** の発現とリクルートメントの誘導に関与している可能性が示唆された (第 3 章-4 節)。しかし、**ROS** の発生

が DR5 の発現を増加させるメカニズムについては明らかにされていない。さらに本研究では、PTBP1 のノックダウンによるその他の TRAIL 耐性解除メカニズムの解明を行った。アレイ解析の結果、PTBP1 をノックダウンした細胞において発現亢進が認められた CCN1 遺伝子と TRAIL 誘導細胞死との関連についても検証を行った。Chen らは、CCN1 がインテグリンレセプター及びシンデカン 4 に結合することで大量の ROS を発生させ JNK の活性化を介して TRAIL 誘導細胞死を促進することを報告している⁵²。実際に、CCN1 を過剰発現させた細胞において TRAIL 誘導による細胞死が増強されることが分かった。PTBP1 は、Pre-miRNA や様々な遺伝子のスプライシングの制御に関与することが報告されている⁵⁵。我々は、クロマチン免疫沈降法により PTBP1 が CCN1 の転写においてリプレッサーとして機能していることを新たに明らかにした (第 3 章-5 節)。これらの結果から、DR5 の発現増加には Warburg 効果の脱制御のみならず、CCN1 の発現増加による ROS の関与が示された。

本研究より、Warburg 効果と TRAIL 誘導細胞死との関連が明らかになり、PTBP1 は TRAIL 耐性解除に有効な標的分子となる可能性が示唆された。今後、PTBP1 を制御する化合物や siRNA ががんのエネルギー代謝の破綻のみならず TRAIL 誘導細胞死を利用したがんの医薬シーズとして期待される。

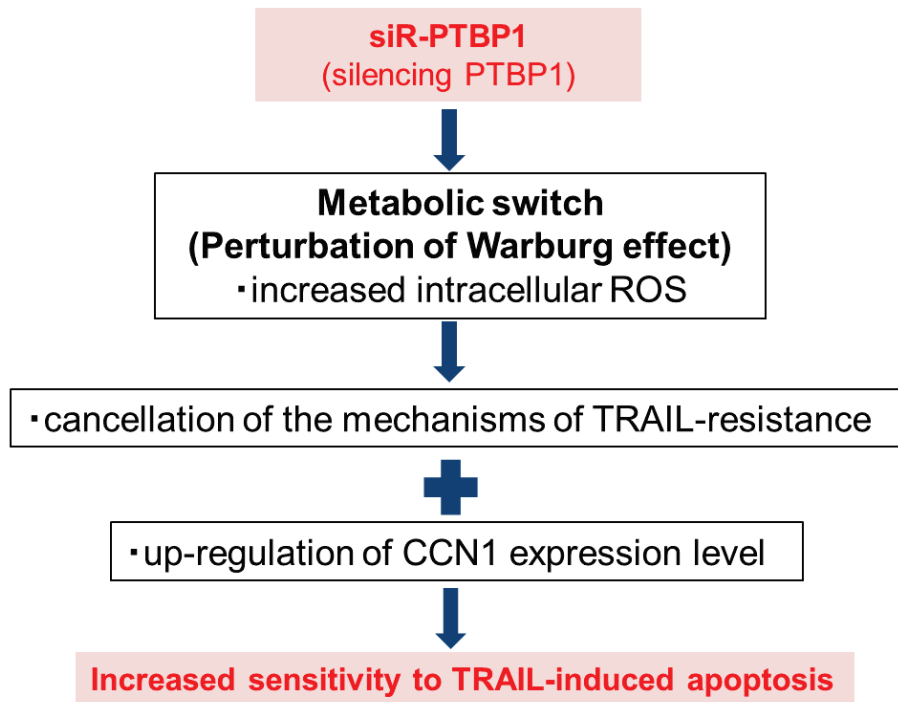


Figure-10 Schematic diagram of the mechanism and machinery involved in the TRAIL-induced apoptosis by silencing PTBP1

謝辞

本研究の遂行および論文の作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 赤尾 幸博 教授に心より感謝の意を表します。

また、本論文の作成に際し、ご助言およびご校閲を賜りました岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 宇野 文二 教授、上田 浩 教授、田中 香お里 教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、研究活動を共にしてきた岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科赤尾研究室の皆様心よりお礼申し上げます。

実験の部

1. 試薬

Recombinant Human TRAIL-Apo2L Ligand (#4354-10; BioVision, CA, USA)、2-デオキシ-D-グルコース(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、N-アセチル-L-システイン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を使用した。

2. 細胞培養

ヒト大腸癌細胞株 DLD-1、SW480 は、Japanese Collection Research Bioresources Cell Bank (Osaka, Japan)より購入した。MCF10A は、American Type Culture Collection (ATCC Manassas, VA, USA)より購入した。細胞は購入後 6 か月以内もしくは MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (LT07-118; Lonza, Rockland, ME, USA)で管理したものを使用した。DLD-1、DLD-1/TRAIL 及び SW480 は 10 % FBS 含有 RPMI-1640(189-02025; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)中で 5 % CO₂、37°Cの条件下で培養した。MCF10A は MEBM(CC3150; Lonza, Tokyo, Japan)中で 5 % CO₂、37°Cの条件下で培養した。

生細胞数は、トリパンブルー色素排除試験法により評価した。培養後の細胞溶液をトリパンブルーと等量混合し、血球計算盤にて生細胞数を計数した。コン

トロール細胞に対する生細胞数(%)を細胞生存率とした。

3. ウェスタンブロット解析

3-1 タンパク質抽出

タンパク質抽出液には、Protein lysis buffer (10 mM Tris-HCL、0.1% SDS、1% NP-40、0.1% デオキシコール酸ナトリウム、150 mM NaCl、1 mM EDTA)に 1% Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail II 及び III を混合して用いた。タンパク質抽出液に回収した細胞を懸濁させ、20 分間水中に静置させた。その後、13,000rpm、4°C、20 分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、タンパク質サンプルとした。タンパク質定量は、DC Protein assay kit (Biorad, Hercules, CA, USA)を用いて行った。定量したタンパク質を SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCL、2% SDS、10% グリセロール、50 mM DTT、0.01%ブロモフェノールブルー)と混和して 50 µg/µL に調整し、98°Cで 5 分間沸騰処理した後、氷上で 5 分間静置した。

3-2 電気泳動および転写

電気泳動には、イージーセパレーター(Wako)及び Super Sep Ace (Wako)を用い

た。泳動後、ゲルを blotting buffer (25 mM Tris、0.2 M グリシン、20%メタノール)に 5 分間浸した。PVDF メンブレン(PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA)はメタノールに 3 分間浸し、超純水に 5 分間浸した。その後、blotting buffer に 5 分間浸した。陽極側から、blotting buffer に浸したろ紙、PVDF メンブレン、ゲル、ろ紙の順に重ね、15 V、370 mA で 40 分間転写した。

3-3 ウェスタンブロッティング

転写後、0.1% Tween 20 含有 50 mM Tris-HCL buffer (TBST)で洗浄し、5%スキムミルク溶液に浸して 1 時間ブロッキングした。TBST で洗浄し、抗体希釈液 (2%BSA、0.01%アジ化ナトリウム、TBST)で希釈した一時抗体に浸して 4°Cで一晩反応させた。TBST で洗浄した後、5%スキムミルク溶液で希釈し、Luminate Forte Western HRP Substrate (WBLUF0500; Millipore)で発光させた後に、Luminescent image analyzer LAS-4000 UV mini (Fujifilm, Tokyo, Japan)を用いて検出した。一次抗体は PTBP1 (#8776)、DR5 (#8074)、Caspase-8 (#9496)、CCN1 (#14479)は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)より、FADD (M035-3)は MBL (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO, LTD, Nagoya, Japan)より、PKM1 (NBP2-14833SS)、PKM2 (NBP1-48308SS)は Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)を使用した。コントロールには anti- β -actin

antibody (A5316; Sigma-Aldrich)を使用した。

4. Real-time PCR

4-1 RNA 抽出

細胞の RNA は NucleaseSpin miRNA kit (TaKaRa, Osaka, Japan) を使用し抽出した。RNA 量は UV spectrophotometry にて定量した。

4-2 mRNA の定量

PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa) を使用し、37°C15 分、85°C5 秒、4°C で RNA サンプルの逆転写反応を行い、鋳型 cDNA を合成した。Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) 反応には Universal SYBR select Master Mix (Applied Biosystems, Forester City, CA) 及び Tabele-2 のプライマーセットを使用した。GAPDH の mRNA 量を内部コントロールとした。95°C30 秒で初期変性を行った後、95°C5 秒の変性反応及び 60°C60 秒のアニーリング・伸長反応を 40 サイクル行い、95°C15 秒、60°C30 秒、95°C15 秒のステップで融解曲線を分析した。各サンプルの反応は 3 回ずつ行い、 $\Delta\Delta Ct$ 法にて mRNA 量を計算した。

Primers	Sequences
<i>DR5</i> forward	5'-GAGAGACTATAAGAGCGT-3'
<i>DR5</i> reverse	5'-CTTCCTGAAGAGAACCACAC-3'
<i>GAPDH</i> forward	5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'
<i>GAPDH</i> reverse	5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3'

Table-2 Sequences of primers using in this study

4-3 miRNA の定量

miRNA の定量には TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems)を使用した。まず TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)、stem-loop RT primer (Applied Biosystems)及び RNA サンプルを混合し、16°Cで30分、42°Cで30分、85°Cで5分、4°Cで10分の順で RT 反応を行った。qRT-PCR には TaqMan MicroRNA Assay 内の PCR primer (Applied Biosystems)及び THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)を使用した。95°Cで30秒で変性させた後、95°C5秒、60°C60秒の反応を40サイクル行い $\Delta\Delta C_t$ 法にて miRNA 量を計算した。*RNU6B* を内部コントロールとし、各サンプルの反応は3回ずつ行った。

5. 遺伝子導入実験

各細胞は 0.5×10^5 cells/mL の細胞密度で 6 ウェルプレートに播種した。トランスフェクションを行う 24 時間前に播種し、プレートに接着させた。本研究に使用した siRNA (Invitrogen) の配列は Tabel-3 に示した。Control となる非特異的 RNA は Hokkaido System Sciences (Sapporo, Japan) より購入した。siRNA は Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を使用してカチオン性リポソームを形成させ、細胞内に導入した。遺伝子導入を行った 48 時間後に回収し、各アッセイに使用した。

Gene	Sequences
<i>PTBP1</i>	5'-AUCUCUGGUCUGCUAAGGUCACUUC-3' (siR-PTBP1)
Control	5'-GGCCUUUCACUACUCCUCA-3'

Table-3 Sequences of siRNAs using in this study

6. CHIP アッセイ

DLD-1/TRAIL に siR-PTBP1 をトランスフェクションし、5%CO₂、37°C で 48 時間培養した。CHIP アッセイには CHIP-IT Express Enzymatic (53009; Active Motif,

Carlsbad, CA, USA)及び DR5 antibody (Cell Signaling Technology)を用いた。また、ポジティブコントロールとして Antibody against Suz12 (39357; Active Motif)、ネガティブコントロールとして rabbit IgG (53025; Active Motif)を使用した。免疫沈降反応で回収した DNA は Real-time PCR にて増幅し、Input DNA の全体量に対する増幅率を求めた。

7. L-lactate アッセイ

DLD-1 及び DLD-1/TRAIL に対し、siR-PTBP1 をトランスフェクションし、5%CO₂、37°Cで 48 時間培養した。細胞を回収し、L-Lactate Assay Kit (700510; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)を用いて細胞内の L-lactate を抽出及び測定を行った。測定値は各サンプルの生細胞数で補正し、細胞内乳酸産生量とした。

8. ATP アッセイ

DLD-1 及び DLD-1/TRAIL に siR-PTBP1 をトランスフェクションし、5%CO₂、37°Cで培養した。48 時間後に細胞を回収し、ATP Determination Kit (A22066;

Invitrogen)にて ATP レベルを測定した。測定値は各サンプルの生細胞数で補正した。

9. 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色は Cell Signaling Technology のプロトコールに従った。DLD-1 及び DLD-1/TRAIL に siR-PRBP1 をトランスフェクションし、48 時間後の細胞を回収した。Smear Gell (SG-01; GenoStaff, Tokyo, Japan)を用いてスライドガラス上に細胞を付着させ、4%ホルムアルデヒドに浸して室温で 15 分間細胞を固定した。PBS にて細胞を洗浄しブロッキングバッファー(1×PBS、5%正常ヤギ血清、0.3% Triton™X100)で 60 分間ブロッキングした。その後、ブロッキングバッファーを吸引除去し、一時抗体をアプライして 4°Cで一晩インキュベートした。PBS で洗浄した後、蛍光標識二次抗体を加えて暗所、室温で 2 時間インキュベートした。二次抗体には、Anti-Rabbit IgG (H+L), F (ab')₂ Fragment Alexa Fluor 488 (#4412; Cell Signaling Technology)を使用した。また、細胞核染色に Hoechst33342、細胞骨格染色に fluorescent F-actin probe Rhodamine Phalloidin (Cytoskeleton, Denver, Co, USA)を使用し、二次抗体と同時にインキュベートした。再度洗浄を行い、封入剤を添加したものを BIOREVO fluorescence

microscope (Keyence, Osaka, Japan)にて観察した。

10. 統計学的解析

各実験は3回ずつ行った。実験成績は平均値±標準偏差で示し、統計学的な比較は Student's *t* test により行った。危険率 5%未満を有意差ありとした。各グラフの有意差は * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ で示している。

参考文献

1. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B: **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975, **72**(9):3666-3670.
2. Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, Dower SK, Cosman D, Goodwin RG: **A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins.** *Science (New York, NY)* 1990, **248**(4958):1019-1023.
3. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B: **Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells.** *The Journal of experimental medicine* 1998, **188**(12):2375-2380.
4. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM: **The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL.** *Science (New York, NY)* 1997, **276**(5309):111-113.
5. Soria JC, Mark Z, Zatloukal P, Szima B, Albert I, Juhasz E, Pujol JL, Kozielski J, Baker N, Smethurst D *et al*: **Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011, **29**(33):4442-4451.
6. Tolcher AW, Mita M, Meropol NJ, von Mehren M, Patnaik A, Padavic K, Hill M, Mays T, McCoy T, Fox NL *et al*: **Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007, **25**(11):1390-1395.
7. Warburg O: **On the origin of cancer cells.** *Science (New York, NY)* 1956, **123**(3191):309-314.
8. Hitosugi T, Kang S, Vander Heiden MG, Chung TW, Elf S, Lythgoe K, Dong S, Lonial S, Wang X, Chen GZ *et al*: **Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth.** *Science signaling* 2009, **2**(97):ra73.
9. Taniguchi K, Sugito N, Kumazaki M, Shinohara H, Yamada N, Nakagawa Y, Ito Y, Otsuki Y, Uno B, Uchiyama K *et al*: **MicroRNA-124 inhibits cancer cell growth through PTB1/PKM1/PKM2 feedback cascade in colorectal cancer.** *Cancer letters* 2015, **363**(1):17-27.
10. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR,

- Smith TD, Rauch C, Smith CA *et al*: **Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis**. *Immunity* 1995, **3**(6):673-682.
11. Musgrave BL, Phu T, Butler JJ, Makrigiannis AP, Hoskin DW: **Murine TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) expression induced by T cell activation is blocked by rapamycin, cyclosporin A, and inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and protein tyrosine kinases: evidence for TRAIL induction via the T cell receptor signaling pathway**. *Experimental cell research* 1999, **252**(1):96-103.
 12. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A: **Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5**. *Immunity* 2000, **12**(6):611-620.
 13. Sheikh MS, Fornace AJ, Jr.: **Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis**. *Leukemia* 2000, **14**(8):1509-1513.
 14. Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H: **Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8**. *The EMBO journal* 2002, **21**(17):4520-4530.
 15. Walczak H, Bouchon A, Stahl H, Krammer PH: **Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells**. *Cancer research* 2000, **60**(11):3051-3057.
 16. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A: **Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8**. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(49):46639-46646.
 17. Ehrlich S, Infante-Duarte C, Seeger B, Zipp F: **Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes**. *Cytokine* 2003, **24**(6):244-253.
 18. Mellier G, Huang S, Shenoy K, Pervaiz S: **TRAILing death in cancer**. *Molecular aspects of medicine* 2010, **31**(1):93-112.
 19. Zheng SJ, Jiang J, Shen H, Chen YH: **Reduced apoptosis and ameliorated listeriosis in TRAIL-null mice**. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2004, **173**(9):5652-5658.
 20. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T *et al*: **Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo**. *Nature medicine* 1999, **5**(2):157-163.

21. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A *et al*: **Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand**. *The Journal of clinical investigation* 1999, **104**(2):155-162.
22. Li R, Yang H, Jia D, Nie Q, Cai H, Fan Q, Wan L, Li L, Lu X: **Fusion to an albumin-binding domain with a high affinity for albumin extends the circulatory half-life and enhances the in vivo antitumor effects of human TRAIL**. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2016, **228**:96-106.
23. Kang Z, Chen JJ, Yu Y, Li B, Sun SY, Zhang B, Cao L: **Droxitumab, a human antibody to death receptor 5, has potent antitumor activity against rhabdomyosarcoma with the expression of caspase-8 predictive of response**. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011, **17**(10):3181-3192.
24. Herbst RS, Kurzrock R, Hong DS, Valdivieso M, Hsu CP, Goyal L, Juan G, Hwang YC, Wong S, Hill JS *et al*: **A first-in-human study of conatumumab in adult patients with advanced solid tumors**. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010, **16**(23):5883-5891.
25. Plummer R, Attard G, Pacey S, Li L, Razak A, Perrett R, Barrett M, Judson I, Kaye S, Fox NL *et al*: **Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers**. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007, **13**(20):6187-6194.
26. Reck M, Krzakowski M, Chmielowska E, Sebastian M, Hadler D, Fox T, Wang Q, Greenberg J, Beckman RA, von Pawel J: **A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 study of tigatuzumab (CS-1008) in combination with carboplatin/paclitaxel in patients with chemotherapy-naive metastatic/unresectable non-small cell lung cancer**. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2013, **82**(3):441-448.
27. Grotzer MA, Eggert A, Zuzak TJ, Janss AJ, Marwaha S, Wiewrodt BR, Ikegaki N, Brodeur GM, Phillips PC: **Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression**. *Oncogene* 2000, **19**(40):4604-4610.
28. Wang S: **The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway**. *Oncogene* 2008, **27**(48):6207-6215.
29. Chawla-Sarkar M, Bae SI, Reu FJ, Jacobs BS, Lindner DJ, Borden EC: **Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis**. *Cell death and*

- differentiation* 2004, **11**(8):915-923.
30. Horak P, Pils D, Haller G, Pribill I, Roessler M, Tomek S, Horvat R, Zeillinger R, Zielinski C, Krainer M: **Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer.** *Molecular cancer research : MCR* 2005, **3**(6):335-343.
 31. Ozoren N, El-Deiry WS: **Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells.** *Seminars in cancer biology* 2003, **13**(2):135-147.
 32. Pennarun B, Meijer A, de Vries EG, Kleibeuker JH, Kruyt F, de Jong S: **Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer.** *Biochimica et biophysica acta* 2010, **1805**(2):123-140.
 33. Fricker N, Beaudouin J, Richter P, Eils R, Krammer PH, Lavrik IN: **Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL.** *The Journal of cell biology* 2010, **190**(3):377-389.
 34. Budd RC, Yeh WC, Tschopp J: **cFLIP regulation of lymphocyte activation and development.** *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(3):196-204.
 35. Golks A, Brenner D, Krammer PH, Lavrik IN: **The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation.** *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(5):1295-1305.
 36. Pop C, Oberst A, Drag M, Van Raam BJ, Riedl SJ, Green DR, Salvesen GS: **FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity.** *The Biochemical journal* 2011, **433**(3):447-457.
 37. Fulda S, Meyer E, Debatin KM: **Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression.** *Oncogene* 2002, **21**(15):2283-2294.
 38. Burns TF, El-Deiry WS: **Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(41):37879-37886.
 39. Taniai M, Grambihler A, Higuchi H, Werneburg N, Bronk SF, Farrugia DJ, Kaufmann SH, Gores GJ: **Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells.** *Cancer research* 2004, **64**(10):3517-3524.
 40. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB: **Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation.** *Science (New York, NY)* 2009, **324**(5930):1029-1033.
 41. Stetak A, Veress R, Ovadi J, Csermely P, Keri G, Ullrich A: **Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death.** *Cancer research* 2007, **67**(4):1602-1608.

42. Noguchi T, Inoue H, Tanaka T: **The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing.** *The Journal of biological chemistry* 1986, **261**(29):13807-13812.
43. Clower CV, Chatterjee D, Wang Z, Cantley LC, Vander Heiden MG, Krainer AR: **The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(5):1894-1899.
44. David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL: **HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer.** *Nature* 2010, **463**(7279):364-368.
45. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC: **The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth.** *Nature* 2008, **452**(7184):230-233.
46. Taniguchi K, Sakai M, Sugito N, Kumazaki M, Shinohara H, Yamada N, Nakayama T, Ueda H, Nakagawa Y, Ito Y *et al.*: **PTBP1-associated microRNA-1 and -133b suppress the Warburg effect in colorectal tumors.** *Oncotarget* 2016, **7**(14):18940-18952.
47. Kurundkar AR, Kurundkar D, Rangarajan S, Locy ML, Zhou Y, Liu RM, Zmijewski J, Thannickal VJ: **The matricellular protein CCN1 enhances TGF-beta1/SMAD3-dependent profibrotic signaling in fibroblasts and contributes to fibrogenic responses to lung injury.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2016, **30**(6):2135-2150.
48. Lau LF, Lam SC: **The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection.** *Experimental cell research* 1999, **248**(1):44-57.
49. Ghatak S, Niland S, Schulz JN, Wang F, Eble JA, Leitges M, Mauch C, Krieg T, Zigrino P, Eckes B: **Role of Integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 in Wound and Tumor Angiogenesis in Mice.** *The American journal of pathology* 2016, **186**(11):3011-3027.
50. Takada Y, Ye X, Simon S: **The integrins.** *Genome biology* 2007, **8**(5):215.
51. Liu Y, Zhou YD, Xiao YL, Li MH, Wang Y, Kan X, Li QY, Lu JG, Jin DJ: **Cyr61/CCN1 overexpression induces epithelial-mesenchymal transition leading to laryngeal tumor invasion and metastasis and poor prognosis.** *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2015, **16**(7):2659-2664.
52. Franzen CA, Chen CC, Todorovic V, Juric V, Monzon RI, Lau LF: **Matrix protein CCN1 is critical for prostate carcinoma cell proliferation and TRAIL-induced apoptosis.** *Molecular cancer research : MCR* 2009, **7**(7):1045-1055.

53. Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Ueda H, Nishi M, Ryo A, Akao Y: **Understanding of tolerance in TRAIL-induced apoptosis and cancelation of its machinery by alpha-mangostin, a xanthone derivative.** *Oncotarget* 2015, **6**(28):25828-25842.
54. Jung EM, Lim JH, Lee TJ, Park JW, Choi KS, Kwon TK: **Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated upregulation of death receptor 5 (DR5).** *Carcinogenesis* 2005, **26**(11):1905-1913.
55. Spellman R, Smith CW: **Novel modes of splicing repression by PTB.** *Trends in biochemical sciences* 2006, **31**(2):73-76.

研究業績目録

第一著者で報告した論文

1. Perturbation of the Warburg effect increases the sensitivity to TRAIL-induced cell death.

Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Takai T, Kuranaga Y, Sugito N, Akao Y
Experimental Cell Research. 2016 Sep 10.

2. Understanding of tolerance in TRAIL-induced apoptosis and cancelation of its machinery by α -mangostin, a xanthone derivative.

Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Ueda H, Nishi M, Ryo A, Akao Y.
Oncotarget. 2015 Sep 22.

3. Propolis cinnamic acid derivatives induce apoptosis through both extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathways and modulate of miRNA expression.

Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Yamada N, Ohta S, Ichihara K, Akao Y.
Phytomedicine. 2014 Jul-Aug.

その他の論文

1. A Novel Role of Dickkopf-Related Protein 3 in Macropinocytosis in Human Bladder Cancer T24 Cells.

Tsujimura N, Yamada N, Kuranaga Y, Kumazaki M, Taniguchi K, Akao Y
International Journal of Molecular Sciences. 2016 Nov 5.

2. Colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles induced phenotypic alteration of T cells into tumor-growth supporting cells with transforming growth factor β -1 mediated suppression

Yamada N, Kuranaga Y, Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Akao Y.
Oncotarget. 2016 Jan 27.

3. PKM1 is involved in resistance to anti-cancer drugs.

Taniguchi K, Sakai M, Sugito N, Kuranaga Y, Kumazaki M, Shinohara H, Ueda H, Futamura M, Yoshida K, Uchiyama K, Akao Y.
Biochemical and Biophysical Research Communications. 2016 Apr 22.

4. PTBP1-associated microRNA-1 and -133b suppress the Warburg effect in colorectal tumors.

Taniguchi K, Sakai M, Sugito N, Kumazaki M, Shinohara H, Yamada N, Nakayama T, Ueda H, Nakagawa Y, Ito Y, Futamura M, Uno B, Otsuki Y, Yoshida K, Uchiyama K, Akao Y.
Oncotarget. 2016 Mar 9.

5. Anti-Oncogenic gem-Dihydroperoxides induce Apoptosis in Cancer Cells by Trapping Reactive Oxygen Species.

Kuranaga Y, Yamada N, Kashiwaya M, Nakamura M, Cui L, Kumazaki M, Shinohara H, Sugito N, Taniguchi K, Ito Y, Nakayama T, Uno B, Itoh A, Akao Y.
International Journal of Molecular Sciences. 2016 Jan 8.

6. Perturbation of energy metabolism by fatty-acid derivative AIC-47 and imatinib in BCR-ABL-harboring leukemic cells.

Shinohara H, Kumazaki M, Minami Y, Ito Y, Sugito N, Kuranaga Y, Taniguchi K, Yamada N, Otsuki Y, Naoe T, Akao Y.
Cancer Letters. 2016 Feb 1.

7. MicroRNA-145 repairs infarcted myocardium by accelerating cardiomyocyte autophagy.

Higashi K, Yamada Y, Minatoguchi S, Baba S, Iwasa M, Kanamori H, Kawasaki M, Nishigaki K, Takemura G, Kumazaki M, Akao Y, Minatoguchi S.
American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology. 2015 Dec 1.

8. Positive feedback of DDX6/c-Myc/PTBP1 regulated by miR-124 contributes to maintenance of the Warburg effect in colon cancer cells.

Taniguchi K, Sugito N, Kumazaki M, Shinohara H, Yamada N, Matsushashi N, Futamura M, Ito Y, Otsuki Y, Yoshida K, Uchiyama K, Akao Y.
Biochimica et Biophysica Acta. 2015 Sep 1.

9. MicroRNA-124 inhibits cancer cell growth through PTBP1/PKM1/PKM2 feedback cascade in colorectal cancer.

Taniguchi K, Sugito N, Kumazaki M, Shinohara H, Yamada N, Nakagawa Y, Ito Y, Otsuki Y, Uno B, Uchiyama K, Akao Y.
Cancer Letters. 2015 Jul 10.

10. Organ-specific PTB1-associated microRNAs determine expression of pyruvate kinase isoforms.

Taniguchi K, Ito Y, Sugito N, Kumazaki M, Shinohara H, Yamada N, Nakagawa Y, Sugiyama T, Futamura M, Otsuki Y, Yoshida K, Uchiyama K, Akao Y. Scientific Report. 2015 Feb 27.

11. Anti-cancer fatty-acid derivative induced autophagic cell death through modulation of PKM isoform expression profile mediated by bcr-abl in chronic myeloid leukemia.

Shinohara H, Taniguchi K, Kumazaki M, Yamada N, Ito Y, Otsuki Y, Uno B, Hayakawa F, Minami Y, Naoe T, Akao Y. Cancer Letters. 2015 Apr 28.

12. Colorectal cancer cell-derived microvesicles containing microRNA-1246 promotes angiogenesis by activating Smad 1/5/8 signaling elicited by PML down-regulation in endothelial cells.

Yamada N, Tsujimura N, Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Nakagawa Y, Naoe T, Akao Y. Biochimica et Biophysica Acta. 2014 Nov.

学会発表

1. 第 18 回 日本がん分子標的治療学会 2014 年 6 月
「TRAIL 耐性メカニズムの解明と Xanthone 誘導体による耐性解除」
2. 第 73 回 日本癌学会 2014 年 9 月
「TRAIL 耐性機構の解明とその解除」
3. 第 135 回 日本薬学会 2015 年 3 月
「TRAIL 耐性メカニズムの解明と新しいサイトカイン療法」
4. 第 19 回 日本がん分子標的治療学会 2015 年 6 月
「TRAIL 耐性メカニズムの解明と新しい TRAIL-アジュバント療法」
5. 第 19 回 日本がん免疫学会 2015 年 7 月
「Understanding of tolerance in TRAIL-induced apoptosis and cancelation of its machinery by Xanthone derivative」
6. 第 74 回 日本癌学会 2015 年 10 月
「ワーバーグ効果関連 PTB1 による TRAIL 耐性の解除」
7. Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics 2016 年 2 月
「The perturbation of Warburg effect increased TRAIL-induced cell death」
8. 第 20 回 日本がん分子標的治療学会 2016 年 5 月
「RAS-ドライブ大腸癌における miR-143 補充による抗 EGFR 抗体の殺細胞効果」
9. 第 4 回 がん代謝研究会 2016 年 7 月
「ワーバーグ効果の破綻と TRAIL-誘導アポトーシス」
10. 第 20 回 日本がん免疫学会 2016 年 7 月
「ワーバーグ効果と細胞死 TRAIL-誘導アポトーシスを中心に」
11. 第 75 回 日本癌学会 2016 年 10 月
「RAS 変異大腸癌における合成 miR-143 による抗 EGFR 抗体の殺細胞効果の回復」