

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07033

研究課題名(和文) 口腔悪性腫瘍におけるPKM2の機能および関連因子間制御機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of the PKM2 function and the regulation mechanism among its related factors in the oral malignant tumor

研究代表者

橋本 修一 (Hashimoto, Shuichi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：00243931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： PKM2は癌にエネルギー産生をもたらす解糖酵素として働く。PKM2はヒト口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞の細胞質およびEMT様癌細胞の核に発現をみた。TGIF2は異形成上皮では核に発現をみたが癌では抑制されていた。ヒトOSCC由来HSC-4のEMT刺激でPKM2発現は細胞質から核内へ移行した。TGIF2核内蛋白発現は抑制されたがmRNA発現は維持され翻訳後に分解されていた。ノックダウン解析よりPKM2はHSC-4の進展を促進した。以上より、核内移行型PKM2がEMTを誘導しTGIF2の翻訳後抑制を介してOSCCの進展を促進することを示し、PKM2の非代謝的機能としての重要性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

解糖酵素の一つであるPKM2はWarburg効果として知られる癌進展におけるエネルギー産生をもたらす代謝機能として働くことが知られている。本研究において、我々は、PKM2がヒト口腔扁平上皮癌(OSCC)において癌浸潤に極めて重要な上皮間葉転換(EMT)およびTGIF2の翻訳後分解を介して癌細胞の進展を増強する非代謝的機能としても働くという極めて重要な役割を持つことを示した。この新たな知見により、口腔癌の進展における新たなメカニズムの一つが明らかとなり、新しい口腔癌の治療法の開発につながる可能性が示されたことに学術的および社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)： PKM2 acts as a glycolytic enzyme on the energy generation in cancers. PKM2 expression was seen in the cytoplasm in human oral squamous cell carcinoma (OSCC) and the nuclei in the EMT-induced cancer cells. TGIF2 was expressed in the nuclei in dysplastic cells but repressed in cancer cells. When EMT was induced in HSC-4, a human derived OSCC, PKM2 expression was translocated from the cytoplasm into the nucleus. Intra-nuclear expression of TGIF2 was inhibited but the mRNA expression was maintained. It was revealed that TGIF2 protein was post-translationally repressed. By the knockdown analysis, PKM2 promoted the progression of HSC-4 migration and invasion. From these findings, we clarified a non-metabolic function of PKM2 that nuclear PKM2 promoted the progression of oral squamous cell carcinoma by inducing EMT and post-translationally repressing TGIF2.

研究分野：病理学

キーワード：PKM2 EMT TGIF2 OSCC Warburg effect

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は世界的には年間約 30 万人が罹患し 6 番目に発生率の高い癌として注目されている。なかでも病理組織学的には扁平上皮癌が口腔癌の 90%以上を占めている(引用文献)。また、口腔領域固有に発生する歯源性腫瘍の悪性例も肺などの他臓器への転移や再発例が問題となっている。これらの癌は、抗癌剤、放射線療法、外科的療法、等の集学的治療にもかかわらず 5 年生存率に目立った改善がみられず依然として予後は不良のままである。さらには、口腔・頭頸部領域の悪性腫瘍は外科的治療の対象となる場合でも、顎・顔面の切除による欠損から美容整形的修復の問題や咀嚼、嚥下など機能的問題が残り大きな問題となっている。このような観点からも口腔・頭頸部領域の悪性腫瘍においては従来の抗癌剤、放射線療法、外科的療法に代わる、より侵襲性の少ない新たな治療法の開発が切望されている。

癌の多くは病理学的に、過形成、異形成、あるいは、腺腫、上皮内癌、浸潤癌、転移性癌のようにいくつかの段階を経て発生・進展すると考えられている(多段階発癌説)。口腔癌の発生病因・誘因としては、喫煙時タバコに含まれるベンツピレン、東南アジアなど習慣的摂取によるヤシ科植物ビンロージ由来アルカロイドなどの発癌因子曝露、ヒトパピロームウイルス(HPV)感染、癌・癌抑制遺伝子変異の蓄積、などの報告がある。また、近年では autophagy の亢進や、癌の浸潤と上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition; EMT)との関連、癌免疫寛容の獲得による増殖能の維持、など癌の新たな性質や分子機序、進展機序が報告されている。

これらの知見に加え、近年、癌の増殖、進展に関して局所での微小環境も注目されている。その一つに、悪性腫瘍は局所環境においては活発な増殖を行う一方で酸素を十分に受給し得ず相対的に低酸素状態にあると考えられるが、悪性腫瘍細胞は嫌気性環境下でも酸素呼吸に依存しない解糖系によるエレルギー産生を行う、いわゆる“Warburg 効果”を獲得し、活発な増殖能を維持できると考えられている(図 1 左)。この効果は悪性腫瘍の代表的 6 つの特性である、

増殖シグナルの持続性、増殖抑制因子からの回避性、浸潤・転移能の活性化、複製的不死性の獲得、血管新生の誘導能、細胞死への抵抗性、に加え、新たな 7 つ目の特性として再注目されている(引用文献)。

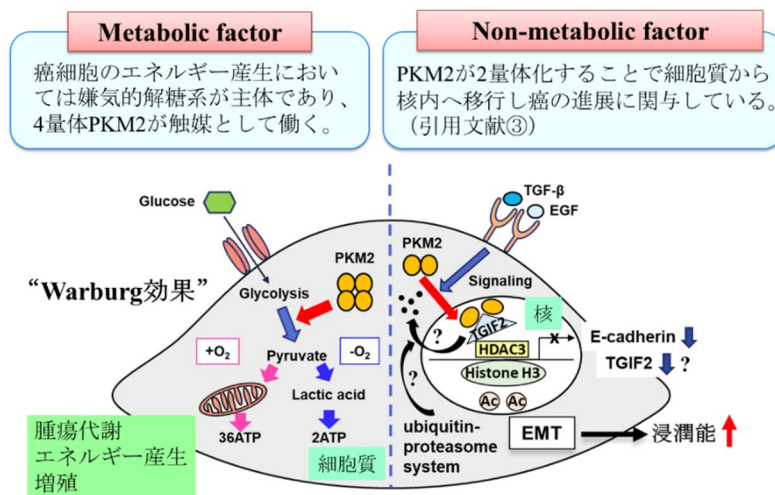


図 1

## 2. 研究の目的

ピルビン酸キナーゼ(PK)は、解糖系の最終ステップにおけるホスホエノールピルビン酸塩からピルビン酸塩への脱リン酸化を促進する触媒作用を有し、ATP 産生に必要な酵素である。PK には遺伝子のスプライシングバリエーションによる発現の違いから PKM1 と PKM2 の二つのアイソフォームが知られている。このうち、PKM2 は悪性腫瘍細胞の細胞質では 4 量体で存在し、解糖系からの ATP 産生を制御している(図 1 左)。近年、この PKM2 の代謝性因子としての機能に加え、悪性腫瘍細胞では PKM2 が 4 量体から 2 量体に移行するとともに細胞質から核内へ移行し、非代謝性因子の機能として悪性腫瘍細胞の浸潤・増殖やアポトーシス抵抗性にも関与することが報告されている(図 1 右)(引用文献)。この浸潤・増殖能の活性化機構の一つとして、PKM2 が核内において転写因子である TGF-β-induced factor homeobox 2 (TGIF2) と結合することで、E-cadherin/CDH1 プロモーター領域への HDAC3 結合および Histone H3 の脱アセチル化を惹起し、CDH1 遺伝子の発現を抑制することで悪性腫瘍細胞の上皮間葉転換(EMT)を誘導する機序が示唆されている。しかしながら、悪性腫瘍での PKM2 や関連因子の機能や制御機構についての詳細は不明のままである。そこで、本研究では口腔領域における悪性腫瘍での PKM2 の機能および関連因子間制御機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象症例と臨床情報

患者情報を用いた当該臨床研究は福岡歯科大学の倫理委員会の承認を得て行った。福岡歯科大学で2010～2017年に手術を受けた、化学療法および放射線療法未治療の口腔癌症例、48症例（男性/女性：29/19、平均年齢：62.1（年齢幅：25～87））を対象とした。病理組織学的内訳は、異形成(DP) 6（中等度異型 3、高度異型/上皮内癌 3）、口腔扁平上皮癌 42（高分化(W) 16、中分化(M)16、中～低分化/低分化(MP&P) 10）であり、pT1：13、pT2：18、pT3：3、pT4：8、リンパ管/血管侵襲：有7、無35、リンパ節転移：有12、無30、遠隔転移：有1、無41であった。

#### (2) 免疫組織化学的検討

10%ホルマリン液固定、パラフィンブロック組織標本を4μmに薄切し、H.E.染色および2ステップHRP標識高分子ポリマー法にて免疫染色を行った。蛍光免疫染色ではAlexa Fluor 594(赤)および488(緑)標識二次抗体を使用した。免疫染色発現判定は病変領域から無作為に3か所を抽出し、1か所最低300個の癌細胞を対象として解析した値の平均値を算定し代表値とする、Allredの変法で行った。即ち、PKM2の細胞質発現に対しては、抽出した3か所で、proportion score (PS) [0: 0%, 1: 10%未満, 2: 30%未満, 3: 30%以上]、intensity score (IS) (0: 陰性, 1: 弱陽性, 2: 中等度陽性, 3: 強陽性)の2因子の評価を行い、抽出3か所のTS(Total Score)=PS+ISの平均を各病変の代表値として判定した。TGIF2の核内発現に対しては3か所のLabeling Index (TGIF2 LI)の平均値を病変の代表値とした。

#### (3) 細胞培養実験

ヒト口腔扁平上皮癌由来 HSC-4 および SAS 細胞株を使用した。MEM 標準培地中、 $5.0 \times 10^4$  cells/mL に癌細胞を調整し、5%CO<sub>2</sub>、37℃環境下で48時間通常培養後に、5.0ng/mL TGF- $\beta$ 1、10ng/mL EGF、100x insulin-transferring selenium (ITS)、および50nmol/L hydrocortisone を添加した FBS-free MEM 培地中で72時間培養し EMT 刺激誘導を行った。プロテアソーム抑制剤解析では、EMT 誘導培地にさらに10μM MG132 を添加後3時間の培養を行い、MG132 無添加 EMT 誘導培地に移行し、EMT 誘導培養開始から72時間後に解析を行った。

#### (4) Western blotting 解析

既報告のプロトコールに準じて Western blotting 解析を行った。即ち、HSC-4 癌細胞をホモジネート後、4℃、50,000xg 遠沈条件下で上清を採取、蛋白量を1サンプル20μgに調整後、4-12% Bis-Tris Plus gel 電気泳動で蛋白分離を行い、polyvinylidene difluoride 膜上に転写を行った後、各抗体を用いてプロット解析を行った。

#### (5) mRNA 発現解析

製品業者プロトコールに従い、癌細胞における mRNA 発現解析については癌細胞から RNA を精製後 cDNA を調整し、real time quantitative PCR (RT-qPCR)法にて行った。また、組織上の mRNA 発現解析については、*in situ* hybridization (ISH) system (RNAscope<sup>®</sup>)を用いて行った(n=5)。ISHの陽性シグナルはImageJソフトを用いてカウントし細胞数で標準化した。

#### (6) RNA interference 解析

製品業者プロトコールに従い、siRNA を用いて癌細胞における PKM2 mRNA 発現を抑制することで、PKM2 の癌細胞における EMT 誘導との関連解析や、wound healing 解析(CR=(w-rw)/wx100(%), CR:傷閉鎖率、w:開始時傷面積、rw:停止時傷面積) boyden chamber assay 遊走・浸潤能解析による癌細胞の動態解析を行い、PKM2 の癌進展に関する役割についての機能解析を行った。

#### (7) 統計解析

すべてのデータは平均値±標準誤差で表現し、各群間の比較は Student's t-test および Mann-Whitney U test を適合して行った。多群間の比較は Kruskal-Wallis test および consecutive Mann-Whitney U test with a Bonferroni correction を適合して行った。RNAscope<sup>®</sup>による ISH 陽性シグナルの群間比較では、one-way analysis of variance (ANOVA) および Tukey's test を用いて解析を行った。統計学的有意性の検定評価は以下のように設定した；\*p<0.05, \*\*p<0.01 および \*\*\*p<0.001。

### 4. 研究成果

#### (1) 上皮異形成および分化度別扁平上皮癌における PKM2, TGIF2 発現解析 (図2)

PKM2 発現は上皮異形成では明らかではなく癌組織で顕著であり、癌細胞の細胞質に発現を認めた。高分化型では癌胞巢の辺縁に発現がみられ、分化度が低くなるほど発現が増加した。また、低分化の特に E-cadherin 陰性、vimentin 陽性の EMT を示唆する紡錘形癌細胞においては PKM2 の核内発現が認められた。一方、TGIF2 は上皮異形成の基底・傍基底細胞の核に発現がみられ、癌組織では分化度が低くなるにつれ発現が低下し、PKM2 と相反する結果であった。さらに、PKM2 発現は脈管侵襲例・リンパ節転移例で、非侵襲例・非転移例より優位に高い発現を認めた。

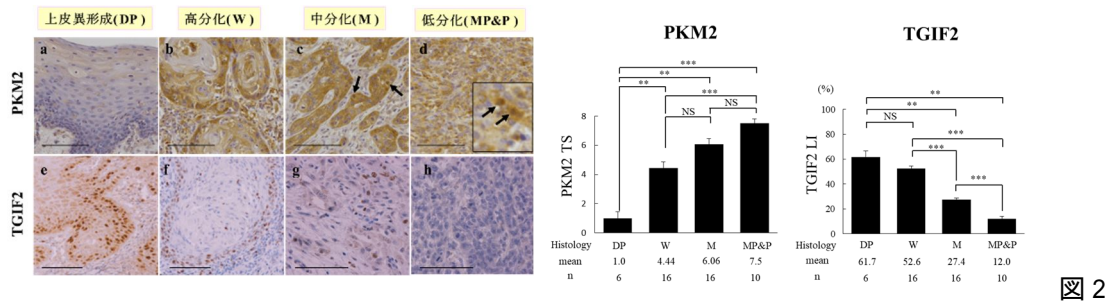


図 2

(2) HSC-4 細胞の EMT 誘導における PKM2 および TGIF2 発現解析 (図 3)

HSC-4 に EMT 誘導を行うと、ウェスタンブロットの Densitometry 解析で PKM2 は発現が増加傾向にあり、TGIF2 発現は有意に減少した (図 3;A)。また、EMT 誘導群では細胞は紡錘形に変化し、蛍光免疫染色では、PKM2 発現は EMT 非誘導時の細胞質から EMT 誘導により核内に発現の局在が移行した。一方、TGIF2 は EMT 非誘導時では核内に発現が見られたが、EMT 誘導により発現の顕著な抑制を認めた (図 3;B)。これらの結果は SAS 細胞でも同様であり、また、組織免疫染色の結果とも一致した。

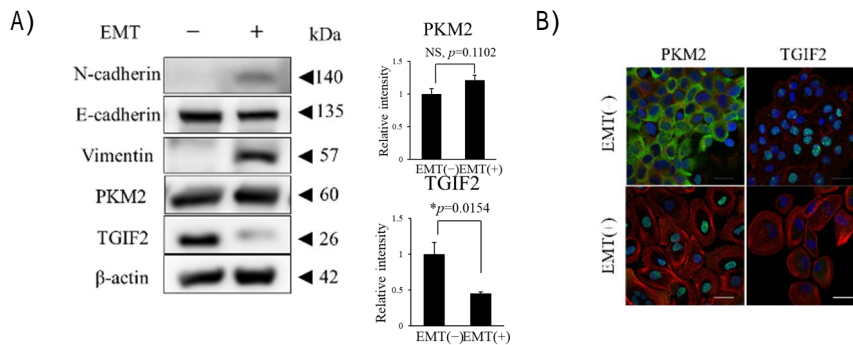


図 3

(3) PKM2 ノックダウンによる HSC-4 の EMT 誘導阻害ならびに TGIF2 発現動態解析 (図 4)

PKM2 を siPKM2 でノックダウンさせると、HSC-4 細胞へ EMT 刺激を与えても、E-cadherin 発現は維持され、Vimentin 発現は認められず、EMT 誘導が抑制された (図 4A;d)。また、TGIF2 の核内発現も維持されており (図 4A;h、B)。HSC-4 の EMT 誘導および TGIF2 発現抑制に PKM2 が関与していることが示された。一方、TGIF2 の mRNA 発現に関しては、siScrbl 導入で EMT が誘導された場合も、siPKM2 導入で EMT が抑制された場合でも、EMT 刺激後に増強する傾向が見られ (図 4;B) TGIF2 蛋白発現との間に解離が見られた。また、扁平上皮癌分化度別解析においても、TGIF2 蛋白発現では低分化になるほど減少したが (図 2)、RNAscope® 解析においては高分化から低分化の分化度間で mRNA 発現に差が見られず (図 4;C)、実際の扁平上皮癌組織上の解析でも同様に蛋白発現と mRNA 発現との間に解離が見られた。

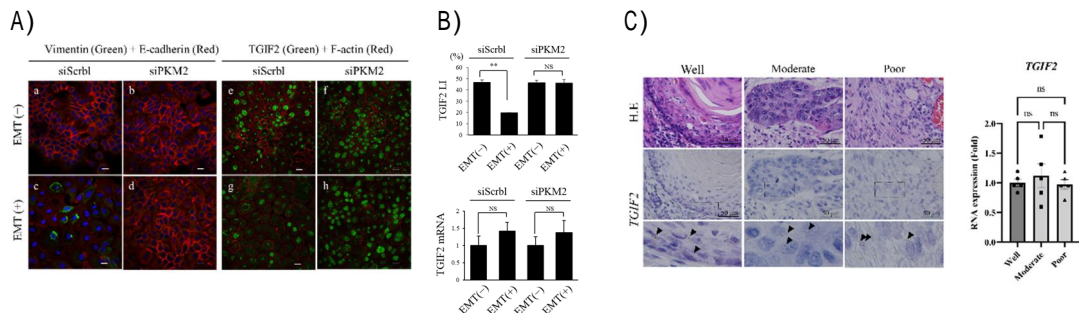
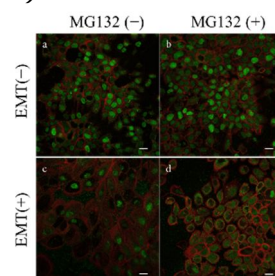


図 4

(4) プロテアソーム阻害による PKM2 の TGIF2 蛋白発現制御解析 (図 5)

HSC-4 の EMT 誘導時、プロテアソーム阻害薬である MG132 添加 (-) 条件下では、TGIF2 の発現はこれまでの結果と同様に核内発現が低下した。一方、MG132 添加 (+) 条件下では、TGIF2 は一部の細胞に核内発現が見られるとともに、広範の細胞の細胞質に発現が顕著にみられた。これらの結果より、核内発現 PKM2 は TGIF2 と相互作用し TGIF2 を細胞質へ移行させることでユビキチン-プロテアソーム系による分解を誘起することが考えられた。

図 5



(5) PKM2 発現阻害による PKM2 の癌細胞における機能（増殖・遊走・浸潤能）解析（図 6）

HSC-4 における wound healing assay による PKM2 の増殖・遊走能解析では、EMT 誘導時、siScrbl 導入細胞の閉鎖率はおおよそ 60%であり、siPKM2 導入細胞における閉鎖率はおおよそ 10%であり有意差を認めた（図 6;A）。また、boyden chamber assay による解析では、siPKM2 導入細胞において遊走能、浸潤能ともに有意に低下した（図 6;B）。以上の結果より、核内発現 PKM2 は癌細胞において、増殖・遊走・浸潤能を促進し、癌の進展に関与することが考えられた。

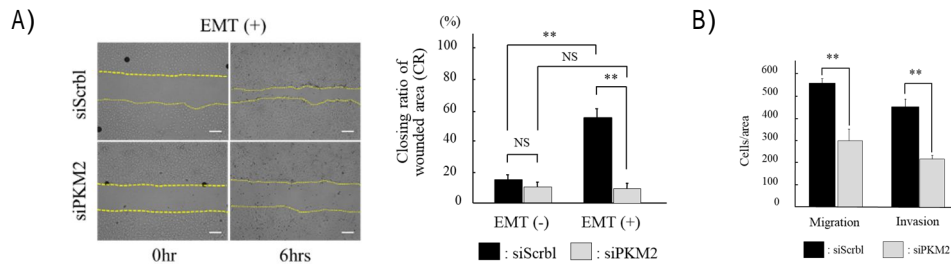


図 6

以上の本研究結果より、口腔癌細胞では、二量体化した核内移行型 PKM2 は TGIF2 と相互作用し、TGIF2 を細胞質へ移行させることでユビキチン-プロテアソーム系による分解を誘起し、この過程を介して EMT を誘導することで癌細胞の増殖・遊走・浸潤能を増強することを示すことができ、PKM2 の口腔癌の進展を促進するという重要な非代謝性の機能を明らかにした（図 7）。

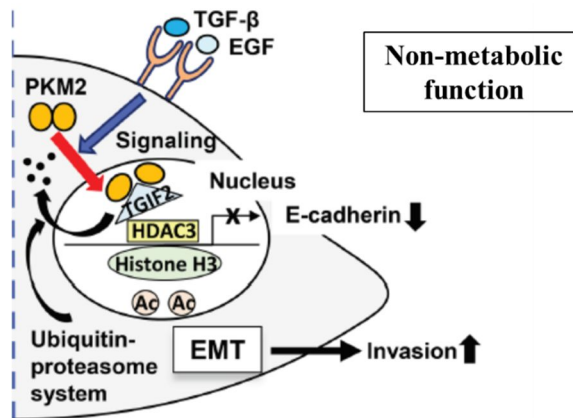


図 7

< 引用文献 >

El-Naggar AK, Chan JK, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, WHO classification of head and neck tumours, International Agency for Research on Cancer, 2017.  
 Hanahan D and Weinberg RA, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, Cell, 144(5), 2011, 646-674.  
 Hamabe A, Konno M, Tanuma N, Shima H, Tsunekuni K, Kawamoto K, Nishida N, Koseki J, Mimori K, Gotoh N, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Ishii H. Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. Proc Natl Acad Sci USA, 111(43). 2014,15526-31.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshimoto Shohei, Morita Hiromitsu, Matsuda Miho, Katakura Yoshinori, Hirata Masato, Hashimoto Shuichi	4. 巻 101
2. 論文標題 NFAT5 promotes oral squamous cell carcinoma progression in a hyperosmotic environment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 38 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-00486-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshimoto Shohei, Yoshizumi Junko, Anzai Hiromasa, Morishita Koichiro, Okamura Kazuhiko, Hiraki Akimitsu, Hashimoto Shuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibition of Alk signaling promotes the induction of human salivary-gland-derived organoids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.045054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shohei Yoshimoto, Fumie Tanaka, Hiromitsu Morita, Akimitsu Hiraki, Shuichi Hashimoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Hypoxia induced HIF 1 and ZEB1 are critical for the malignant transformation of ameloblastoma via TGF dependent EMT	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 7822-7832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2667	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Fumie, Yoshimoto Shohei, Okamura Kazuhiko, Ikebe Tetsuro, Hashimoto Shuichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Nuclear PKM2 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma by inducing EMT and post-translationally repressing TGIF2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 33745-33761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shohei Yoshimoto, Fumie Tanaka, Hiromitsu Morita, Akimitsu Hiraki, Shuichi Hashimoto
2. 発表標題 HIF-1 $\alpha$ and ZEB1 are critical for the malignant transformation of ameloblastoma
3. 学会等名 第109回日本病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shohei Yoshimoto, Shuichi Hashimoto
2. 発表標題 NFAT5 enhances the oral squamous cell carcinoma progression in the hyper-osmotic condition through the EGFR activation
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiromasa Anzai, Shohei Yoshimoto, Kenichiro Hashimoto, Akimitsu Hiraki, Shuichi Hashimoto
2. 発表標題 IFN- $\gamma$ -triggered triptophan-IDO1-kynurenine-AhR signal activation induces immunologic tumor dormancy in OSCC
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiromasa Anzai, Shohei Yoshimoto, Akimitsu Hiraki, Shuichi Hashimoto
2. 発表標題 IFN- $\gamma$ -triggered triptophan-IDO1-kynurenine-AhR signal activation induces immunologic tumor dormancy in human oral squamous cell carcinomas
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumie Tanaka1, Shohei Yoshimoto, Kazuhiko Okamura, Tetsuro Ikebe, Shuichi Hashimoto
2. 発表標題 Nuclear PKM2 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma by inducing EMT
3. 学会等名 第108回日本病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉本尚平, 森田浩光, 橋本修一
2. 発表標題 Hypoxia induced HIF-1 and ZEB1 are critical for the malignant transformation of ameloblastoma
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉本尚平、田中文恵、岡村和彦、池邊哲郎、橋本修一
2. 発表標題 Nuclear PKM2 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma by inducing EMT
3. 学会等名 第108回 日本病理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	吉本 尚平  (Yoshimoto Shohei)  (70780188)	福岡歯科大学・口腔歯学部・講師    (37114)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------