

令和 7 年 4 月 17 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2024

課題番号：22K15100

研究課題名（和文）M型ピルビン酸産生酵素依存的トリセルラータイトジャンクション形態形成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of M-type pyruvate kinase PKM1-dependent tricellular tight junction formation

研究代表者

中津 大貴（Nakatsu, Daiki）

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：30781299

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：癌化上皮細胞の遊走や浸潤は、上皮細胞由来の癌（上皮癌）の予後悪化に寄与する。しかし、遊走や浸潤を抑制する方法は確立されていない。本研究では、上皮細胞間の三細胞接触部の密着結合を担う構造体である、トリセルラータイトジャンクションが、遊走や浸潤を抑制することを示唆した。また、ピルビン酸産生酵素であるPKM1が、細胞膜貫通タンパク質であるLSRやTricellulinの局在化を介した、トリセルラータイトジャンクション形成を促進すること、同促進が、転写調節機能を持つタンパク質であるSMAD4の核内移行抑制による、チロシンキナーゼPYK2の発現量増加により引き起こされることを、明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌は日本人の死因第一位で、高齢化の進展に伴う各個人の発症率の増加から、今後の患者数・死亡数も高い値で推移すると予想されている。そして、上皮細胞由来の癌（上皮癌）は患者数の最も多い癌の1つであるが、上皮癌の予後悪化に繋がる、癌化上皮細胞の遊走および浸潤を促進する機構は、多くが未知である。本研究では、三細胞接着装置であるトリセルラータイトジャンクションが、癌化上皮細胞の遊走および浸潤を抑制することを明らかにした。この発見により、トリセルラータイトジャンクション形成を促進することで、上皮癌の予後悪化を防止できる可能性が示唆された。この点より、研究成果の学術的意義や社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Migration and invasion of epithelial cancer cells contribute to the worsening prognosis of epithelial carcinoma. However, methods to inhibit the migration and invasion have not been established. In this study, we suggested that tricellular tight junctions, which are structures responsible for adhesion of tricellular contacts in epithelial cells, inhibit the migration and invasion. We also found that PKM1, a pyruvate-producing enzyme, enhances the formation of tricellular tight junctions through increased localization of LSR and tricellulin, which are transmembrane proteins, and that this enhancement is caused by increased expression of tyrosine kinase PYK2 through inhibition of nuclear translocation of SMAD4, a transcriptional regulatory protein.

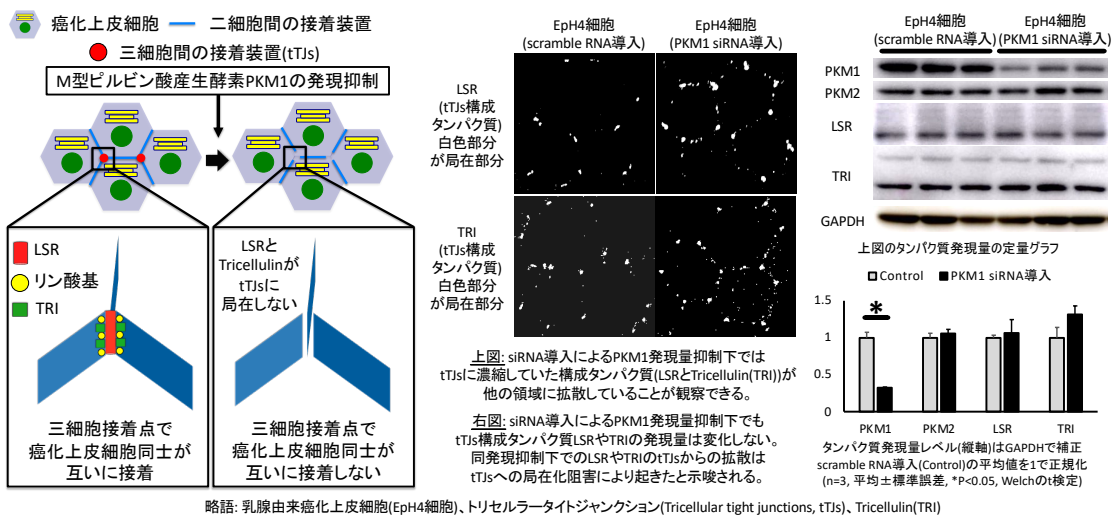
研究分野：細胞生物学、ゲノム生物学、バイオインフォマティクス、画像解析

キーワード：癌化 上皮細胞 タイトジャンクション トリセルラータイトジャンクション 細胞接着 細胞遊走
細胞浸潤 ピルビン酸産生酵素

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

癌による年間死者数は、2020年現在、世界で1000万人、日本だけでも37万人以上とされており、高齢化の進展に伴う各個人の発症率の増加から、今後の急増も予想されている(Sung et al., CA. Cancer J. Clin., 2021; 令和2年(2020)人口動態統計(確定数)の概況, 厚生労働省)。そして、上皮細胞由来の癌(上皮癌)は患者数の最も多い癌の1つであるが、上皮癌の予後不良に繋がると示唆される、癌化上皮細胞の遊走および浸潤を促進する機構は、多くが未知である[Drakes et al., Cancers (Basel), 2020; Wen et al., J. Transl. Med., 2014]。トリセルラータイトジャンクションは、上皮細胞の三細胞接着点に構成される細胞間接着装置であり、癌化した上皮細胞の遊走や浸潤の促進を抑制する機能を持つ可能性が、示唆されている[Kohno et al., Int. J. Mol. Sci., 2019]。また、細胞膜貫通タンパク質である Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) や Tricellulin の局在化が、トリセルラータイトジャンクションの形態形成と正常な機能発現に必須であることも示されている[Furuse et al., Tissue Barriers, 2014; Kohno et al., Int. J. Mol. Sci., 2019]。そして、私達の研究グループは、癌化上皮細胞の遊走や浸潤を抑制する機能を持つM型ピルビン酸産生酵素であるPKM1が[Zhu et al., J. Zhejiang Univ. Sci. B., 2020; Taniguchi et al., Cancer Science, 2021]、構成因子である細胞膜貫通タンパク質(LSRとTricellulin)の、トリセルラータイトジャンクションへの局在化に必須だと最近発見した(図1)。しかし、「PKM1がどのような機構でトリセルラータイトジャンクションへの構成タンパク質の局在化を促進するのか」、「PKM1依存的な構成タンパク質の局在量増加が、トリセルラータイトジャンクションの形態形成促進を介して、癌化上皮細胞の遊走や浸潤促進を抑制するのか」、という点は未解明であり、上記を解明することで、癌化上皮細胞の遊走や浸潤の調節メカニズムの解明に貢献する。また、トリセルラータイトジャンクションの形態形成の促進が、癌化上皮細胞の遊走や浸潤の抑制を介した上皮癌の予後不良の改善に寄与する可能性があるかを明らかにすることで、上皮癌の予防や治療の進展への貢献を行う。



2. 研究の目的

(1) M型ピルビン酸産生酵素(PKM1)が、細胞膜貫通タンパク質(LSRとTricellulin)の局在量を増加させることで、上皮の三細胞接着装置(トリセルラータイトジャンクション)の形態形成を促進する、機構を解明する。

(2) トリセルラータイトジャンクションが、上皮癌の予後不良と関連する、癌化上皮細胞の遊走と浸潤を抑制するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) M型ピルビン酸産生酵素が三細胞接着装置の形成を促進する機構の解明

先行研究と同様の方法で、PKM1の発現を特異的に抑制するsiRNAとコントロールsiRNAを導入した、マウスの乳腺由来癌化上皮細胞(EpH4細胞)を作製した(Nakatsu et al., PLOS ONE, 2019)。

作製後、PKM1の発現を抑制したEpH4細胞(PKM1発現抑制細胞)では、非発現抑制細胞と比較して、先行研究(図1)同様に、上皮の三細胞接着装置(トリセルラータイトジャンクション)の形態形成に必須な、細胞膜貫通タンパク質(LSRとTricellulin)の局在量が低下しているかを、間接蛍光抗体法によるタンパク質の可視化と、可視化タンパク質の顕微鏡画像解析から確認した。

確認後、PKM1発現抑制細胞と非発現抑制細胞に対する、定量的ポリメラーゼ連鎖反応法、免疫沈降法、免疫ブロット法、DNA配列分析を用いた、遺伝子発現量(mRNA量、転写量)、タンパク質局在量、タンパク質量、タンパク質のリン酸化レベル、タンパク質とDNAの結合レベルの解析を

行い、PKM1 が LSR と Tricellulin の局在量増加を介して、トリセルラータイトジャンクションの形態形成を促進する分子メカニズムを解明した。

(2) 三細胞接着装置が癌化上皮細胞の遊走と浸潤を抑制するか否かの検証

CytoSelect™ 細胞遊走アッセイ (Cell Biolabs 社) や QCM ECMatrix 細胞浸潤アッセイ (Sigma-Aldrich 社) を用いた、トリセルラータイトジャンクション形成 EpH4 細胞と非形成 EpH4 細胞の、遊走と浸潤能力の解析から、トリセルラータイトジャンクションの形態形成が、癌化上皮細胞の遊走と浸潤を抑制するかを確認した。

4. 研究成果

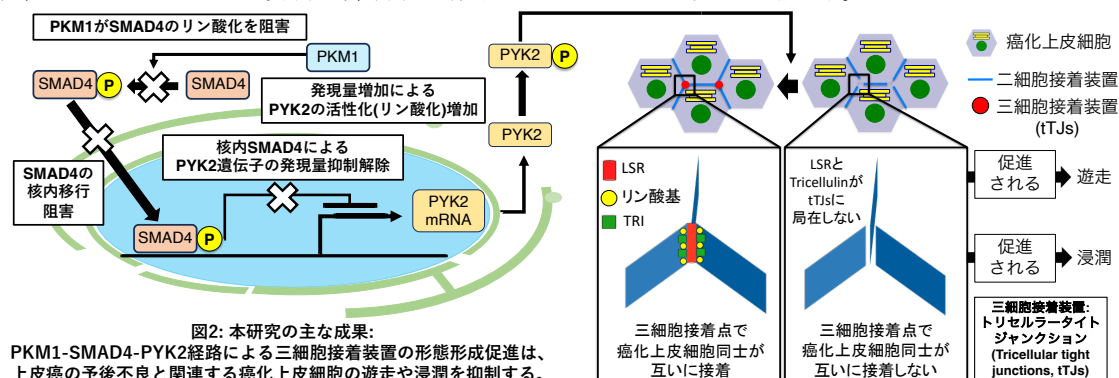
(1) 研究の主な成果

① M 型ピルビン酸産生酵素が三細胞接着装置の形成を促進する機構の解明

PKM1 発現抑制細胞と非発現抑制細胞に対する遺伝子発現量、タンパク質局在量、タンパク質量、タンパク質のリン酸化レベルの解析から、PKM1 は、チロシンキナーゼ PYK2 の遺伝子発現量を増加させる、同増加が PYK2 のタンパク質量と活性の増加を介した LSR の 237 残基目のチロシン (Y237) のリン酸化を促進する、同促進がトリセルラータイトジャンクションへの LSR と Tricellulin の局在量増加と形態形成促進を引き起こすことを示唆した。また、LSR の Y237 をフェニルアラニンに置換してリン酸化を抑制した EpH4 細胞 (LSR-Y237F 細胞) と、非リン酸化抑制細胞の、タンパク質量とタンパク質のリン酸化レベルの比較解析からも、同示唆を支持する結果を得た。さらに、PKM1 と SMAD4 の発現を抑制した EpH4 細胞 (PKM1-SMAD4 発現抑制細胞) と非発現抑制細胞に対する遺伝子発現量、タンパク質局在量、タンパク質量、タンパク質のリン酸化レベルの解析から、PKM1 による PYK2 の遺伝子発現量の増加は、細胞核の内部で遺伝子発現量を調節する機能を持つ SMAD4 の、核内移行を阻害することで行われることを示唆した。また、DNA 配列解析の結果から、SMAD4 による PYK2 の遺伝子発現量調節は、他の遺伝子発現量を調節する機能を持つ核内タンパク質を介して行われることを示唆した。そして、これらの結果から、PKM1 が SMAD4 の核内移行阻害による PYK2 の活性化を介した LSR の Y237 のリン酸化促進を行うこと、同リン酸化促進が、LSR と Tricellulin の局在量増加を介してトリセルラータイトジャンクションの形態形成を促進することを示唆した (図 2)。

② 三細胞接着装置が癌化上皮細胞の遊走と浸潤を抑制するか否かの検証

PKM1 発現抑制細胞と非発現抑制細胞、PKM1-SMAD4 発現抑制細胞と非発現抑制細胞、LSR-Y237F 細胞と非リン酸化抑制細胞の遊走と浸潤能力を比較した。そして、トリセルラータイトジャンクションの形態形成が阻害される癌化上皮細胞 (PKM1 発現抑制細胞と LSR-Y237F 細胞) では、非阻害の癌化上皮細胞 (非発現抑制細胞、PKM1-SMAD4 発現抑制細胞、非リン酸化抑制細胞) と比較して、遊走と浸潤能力の増加を確認した。これらの結果は、トリセルラータイトジャンクションが癌化上皮細胞の遊走と浸潤を抑制する機能を持つことを示唆した (図 2)。



(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまでの研究では、構成タンパク質の量の低下を介したトリセルラータイトジャンクションの形態形成阻害が、癌化上皮細胞の遊走や浸潤に影響するかを解析してきた [Shimada et al., Oncotarget., 2016; Kyuno et al., Histochem. Cell Biol., 2020]。この場合、トリセルラータイトジャンクション構成タンパク質である LSR や Tricellulin の一部が、二細胞接着装置であるバイセルラータイトジャンクションへ局在化して形態形成を制御するという性質上 [Krug et al., Mol. Biol. Cell., 2009]、トリセルラータイトジャンクション形成と、癌化上皮細胞の遊走や浸潤に、関係性があるかの判断は困難だった。一方、構成タンパク質である LSR のアミノ酸変異により、トリセルラータイトジャンクションへの構成タンパク質の局在化と形態形成を阻害するという私達の開発した解析系では [Nakatsu et al., PLOS ONE, 2019]、トリセルラータイトジャンクションの形成を特異的に阻害し、バイセルラータイトジャンクションなど、他の細胞接着装置の形成に影響を与えない [Nakatsu et al., PLOS ONE, 2019]。そのため、同解析系を用いた本研究を行うことで初めて、トリセルラータイトジャンクション形成が、癌化上皮細胞の遊

走や浸潤に、関係性があるという結果を国内外に示すことができた。また、本研究の結果から、トリセルラータイトジャンクション形成促進による、癌化上皮細胞の遊走や浸潤の抑制を介して、上皮癌の予後不良を改善できる可能性があることが示された。この点と、上皮癌は患者数の最も多い癌の 1 つであるという点を併せて考えると、本研究で得られた成果が国内外に与えるインパクトは大きいと考えられる。

(3) 今後の展望

癌化上皮細胞を用いて得られた *in vitro* の結果が、生体内でも成り立つかを、マウスを用いた実験で検証することが考えられる。そして検証は、PKM1 発現抑制細胞と非発現抑制細胞、LSR-Y237F 細胞と非リン酸化抑制細胞を、それぞれマウスに移植した時、両者の遊走や浸潤能力の差が、*in vitro* 同様に確認出来るかで行う。また、トリセルラータイトジャンクションの形態形成促進が、癌化上皮細胞の遊走や浸潤を抑制する機構の解明も今後の課題だと考えられる。そして、機構の解明は、トリセルラータイトジャンクションの形態形成が阻害される癌化上皮細胞と非阻害の癌化上皮細胞の比較実験を行い、遺伝子やタンパク質の違いを抽出する、抽出された違いと各種生物学データベースの情報からバイオインフォマティクスの技術を用いて仮説を構築する、構築した仮説を実験的に検証するという流れで行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mikio Furuse, Daiki Nakatsu, Wendy Hempstock, Shiori Sugioka, Noriko Ishizuka, Kyoko Furuse, Taichi Sugawara, Yugo Fukazawa, Hisayoshi Hayashi	4. 巻 48
2. 論文標題 Reconstitution of functional tight junctions with individual claudin subtypes in epithelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.22068	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角田貴史、中津大貴、村田昌之、加納ふみ
2. 発表標題 PKM1はSMAD4不活性化によるPYK2発現促進を介してトリセルラータイトジャンクションへ構成タンパク質を局在化させる
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中津 大貴、角田貴史、村田 昌之、加納 ふみ
2. 発表標題 PKM1はWIP1依存的なSMAD4不活性化によるPYK2発現促進を介してトリセルラータイトジャンクションへのLSRとtricellulinの局在化と上皮細胞シートのバリア機能を調節する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中津 大貴、角田貴史、村田 昌之、加納 ふみ
2. 発表標題 M型ピルビン酸キナーゼPKM1はトリセルラータイトジャンクション形成を介して癌化上皮細胞の浸潤を抑制する
3. 学会等名 第76回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中津 大貴、角田貴史、村田 昌之、加納 ふみ
2. 発表標題 三細胞接着装置トリセルラータイトジャンクションの形成阻害は癌化上皮細胞の遊走と浸潤を促進する
3. 学会等名 第47回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmapの研究者ページ https://researchmap.jp/7000017724

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

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
---------	---------