2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

学　校　名	**埼　玉　医　科　大　学**	研究所名等		
研 究 課 題	解糖系酵素PKM異常に基づくATL特異的な発症機序解明 −難治性白血病ATL発症機序解明を目指して−	研 究 分 野	医　　学	
キーワード	①ATL、②NDRG2、③解凍系酵素PKM、④脱リン酸化、⑤がん代謝			

〇研究代表者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
市　川　　朝　永	埼 玉 医 科 大 学 医 学 部	講　　師	研究代表者 総括　実験・データ整理・論文作製

〇研究分担者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
村　　上　　孝	埼 玉 医 科 大 学 医 学 部	教　　授	実験・データ整理

解糖系酵素 PKM 異常に基づく ATL 特異的な発症機序解明
－難治性白血病 ATL 発症機序解明を目指して－

1. 研究の目的

成人 T 細胞白血病リンパ腫 ATL(Adult T-cell leukemia/lymphoma)はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 HTLV-1 が $CD4^+$T 細胞に感染したキャリアで発症する極めて予後不良の悪性疾患である。ATL は制御性 T 細胞(Treg)の特徴を有している。近年、いくつかの治療法の導入で平均余命の延長が見られている。しかし、ATL は 50-60 年に及ぶ HTLV-1 持続感染による遺伝子発現、翻訳後修飾や代謝等の異常が多数蓄積し、多くのがん・白血病とは異なる発症機序を呈している。よって治療標的が絞り込めておらず、患者は未だに予後不良であり大きな問題となっている。ATL 発症機構解明および治療法開発は喫緊の課題である。

研究者は ATL 細胞内で新規がん抑制遺伝子 NDRG2(N-myc downstream-regulated gene 2)が有意に発現低下していることを同定した。NDRG2 は脱リン酸化酵素 PP2A と複合体を形成し、NDRG2 結合標的分子である PTEN を含む多種の細胞内情報伝達分子群の Serine/Threonine 脱リン酸化調節に関わっていた。さらに、*Ndrg2* 欠損マウス解析で PI3K/AKT 情報伝達系の異常亢進を介した T 細胞リンパ腫、肝臓がんを含む多様ながんを発症と共に糖および脂質代謝異常が認められた。ATL 細胞に NDRG2 を過剰発現させ、NDRG2 結合タンパク質を網羅的に解析した結果、解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ PKM(Pyruvate Kinase M)を同定した。

がん・白血病では PKM2 のみが発現亢進して、ホモ 2 量体を形成し酵素活性が低下している。グルコース取り込み亢進、解糖系による細胞増殖のためのアミノ酸、脂質、核酸等の合成促進および乳酸産生によって特徴付けられる Warburg effect を惹起してがん発症を促進している。さらに、翻訳後修飾 PKM2 は多機能性タンパク質として転写因子や受容体等の機能を有し腫瘍形成に関与している。一方で、PKM1 は翻訳後修飾されず、ホモ 4 量体形成で酵素活性を亢進させ、ピルビン酸を大量に産生している。PKM 遺伝子は選択的スプライシングによって排他的に PKM1 または PKM2 のどちらかが優位に発現すると報告されている。PKM1 と PKM2 両方が発現しているがん・白血病は少なく、ヘテロ複合体形成の有無および機能は詳しくわかっていない。ATL では NDRG2 発現低下による PKM1 発現、PKM2 の S37 高リン酸化が亢進しており、典型的な Warburg effect とは異なる ATL 特異的ながん代謝や機能が想定される。

本研究は NDRG2 と PKM に着目し、1)NDRG2 発現低下 ATL 特異的な PKM 発現亢進機序、2)PKM2 リン酸化機構解析、3)PKM1/PKM2 ホモおよびヘテロ複合体によるがん代謝の解析を目標とする。PKM 依存的な新規がん代謝を解明し、ATL の発症機構解明と治療標的化につなげたい。

2. 研究の計画

1) PKM1/PKM2 発現調節機構解析

- 正常末梢血単核細胞 PBMCs(Peripheral Blood Mononuclear cells)から、Th1、Th2、Th17 と Treg を分離または分化させ、PKM1/PKM2 発現(ウエスタンブロット-WB、定量 PCR-qPCR)を ATL 患者検体と比較検討する。

2) NDRG2 発現低下による PKM2 リン酸化機構解析

- NDRG2 発現白血病細胞株 T-ALL、PBMCs と $CD4^+$T 細胞で内在性の NDRG2 と PKM2 を免疫沈降し、それらの結合能を明らかにする。
- NDRG2 過剰発現 ATL 関連細胞株および NDRG2 発現低下 T-ALL 細胞株を作製し、PKM2 の S37 リン酸化を検討する。

3) PKM1/PKM2 機能解析

- 白血病細胞株 T-ALL、ATL 細胞株で PKM 酵素活性の違いと PKM1/PKM2 のヘテロ重合度を検討し、主として働く PKM フォームを検討する。

3. 研究の成果

1) PKM1/PKM2 発現調節機構解析

- 健常者 $CD4^+$T 細胞と ATL 患者検体で、PKM1/PKM2 発現を WB や qPCR で比較検討した。多くのがん・白血病と異なり、タンパク質と mRNA レベルで、PKM1 が ATL 患者検体で発現亢進していた。一方で、PKM2 は両群に差はなかった。
- 野生型と *Ndrg2* 欠損マウスサンプルで網羅的遺伝子発現解析を行った。GO(Gene Ontology)解析の結果、*Ndrg2* 欠損で、fatty acid metabolic process(Pck1、Srebf1 等)が有意に増加していた。PKM における転写およびスプライシング因子を解析中。

2) NDRG2 発現低下による PKM2 リン酸化機構解析

- NDRG2 発現 T-ALL、NDRG2 過剰発現 ATL 細胞株で、免疫沈降を行い、NDRG2 と PKM2 が複合体を形成していることを確認した。
- ATL 細胞株では T-ALL 細胞株に比べて PKM2 の S37 リン酸化が顕著に亢進していた。NDRG2 過剰発現 ATL 細胞株では PKM1 および PKM2 発現は変化していなかったが、PKM2 の S37 リン酸化は有意に減少していた。反対に、NDRG2 発現低下 T-ALL 細胞株では PKM2 の S37 リン酸化は顕著に増加していた。NDRG2 が S37 リン酸化を制御していることを明らかにした。NDRG2 発現により細胞増殖は抑制され、細胞死が誘導された。また、さまざまな情報伝達系因子のリン酸化が低下していた。細胞表現型解析はさらに解析中。

3) PKM1/PKM2 機能解析

- PKM1/PKM2 のヘテロ重合度を検討するために、細胞に DSS (Disuccinimidyl suberate)を付加し、クロスリンキングを行った。PKM1/PKM2 ヘテロ・ホモの 2 量体及び 4 量体の確認ができた。さらに、ヘテロ重合度や酵素活性を測定していく。

4. 研究の反省・考察

細胞内のストレス応答として、細胞内リン酸化活性化による情報伝達系の活性化、翻訳後修飾や分子間相互作用によるストレス対応の分子機構が解明されつつある。しかし、ストレス状態から脱却し、恒常状態に戻る機構についての知見は少ない。研究者はストレス対応状態から恒常状態へ戻るための negative feedback 機構の一翼を担う新規がん抑制遺伝子である NDRG2 の働きを同定した。その分子機構として NDRG2 は PP2A リクルーターとして NDRG2 標的分子群を脱リン酸化、続いて情報伝達系を不活化することを突き止めた。

NDRG2 は ATL ではほぼ全症例、他の白血病や固形腫瘍の約 42-85%で高頻度に遺伝子発現低下が認められているので、「NDRG2 発現低下による高リン酸化基質」は幅広く悪性腫瘍に応用できる。NDRG2 標的因子の同定および機能解析はストレス応答、発がん機序の解明、治療標的の同定や開発につながる。

PKM2 過剰発現の依存した Warburg effect と発がんとの関係性はよく研究されているが、PKM1 発現や機能に着目した研究はほとんどない。PKM2 依存的な Warburg effect が腫瘍形成に有利であることは間違いないが、PKM1/PKM2 がよりがん進行に対して効果的な代謝環境を提供するのかもしれない。ATL と同様に難治性の小細胞肺がん(SCLC)で PKM1 が高発現し、他のがん種とは異なるグルコースとグルタミン代謝による特徴的ながん代謝異常によって腫瘍形成が促進される。$CD4^+$T 細胞の Th1、Th17 では PKM2 が優位に発現し嫌気性解糖が誘導されているが、HTLV-1 感染、ATL や Treg に関しては PKM1/PKM2 発現変化や代謝の詳細な検討はされていない。PKM 遺伝子はスプライシングアイソフォームとして存在し、PKM1 は exon9 が、PKM2 は exon10 が選択的にスプライシングされて産生される。この機構に関わる関連因子はいくつか同定されているが、PKM1/PKM2 が両方発現するメカニズムについてはわかっていない。慢性・くすぶり型 ATL が急性転化・悪性化する機序も不明な点が多く、HTLV-1 感染や Treg 分化による PKM1/PKM2 発現調節機能の解明から ATL 発症・悪性化機序の解明に寄与できる。本研究は PKM2 が主体として考えられてきたがん代謝とは異なる代謝異常が惹起される可能性があり、PKM1 発現や PKM1/PKM2 機能解析はがん特異的代謝を見直す重要な鍵であることが考えられる。

ATL を含む難治性のがん・白血病では NDRG2 発現低下による PKM2 の恒常的リン酸化亢進や PKM1 発現、PKM1/PKM2 のホモまたはヘテロ複合体形成によるがん代謝が発症・悪性化に関与していることが考えられる。ATL では、グルコース取り込みが増加しており、それを利用した FDG-PET 検査の実施、糖尿病治療薬 SGLT2 阻害剤や乳酸排泄阻害剤の治療効果検討が行われている。これまで PKM1 発現や翻訳後修飾は PKM2 機能解析の陰に隠れて見逃されてきた。本研究の推進によってがん代謝の詳細と発症機序の解明につなげていく。

5. 研究発表

(1)学会誌等

① **Ichikawa T***#, Nakahata S, Shimoda K, Murakami T, Morishita K. The tumor suppressor NDRG2 recruits protein phosphatase 2A to suppress STAT5 phosphorylation in adult T-cell leukemia/lymphoma. ***J Biol Chem***. 2026 Apr 27:113080. doi: 10.1016/j.jbc.2026.113080.

② **Ichikawa T***#, Shimosaki S, Nakahata S, Suekane A, Kitabayashi I, Iha H, Shimoda K, Murakami T, Morishita K. Clathrin-associated SCYL2 contributes to the activation of PI3K/AKT signaling and tumorigenesis through PTEN phosphorylation in adult T-cell leukemia/lymphoma. ***Cancer Gene Ther***. 2026 Mar;33(3):314-322. doi: 10.1038/s41417-026-01008-9.

③ Kotani N, Iwasa K, Amimoto T, Yamashita Y, Komatsu K, Narimichi Y, Wakabayashi Y, Kurebayashi Y, Horiuchi Y, Kashimata L, Sasaki R, Kumagai M, Yagishita-Kyo N, Awaji T, Murakami T, Mizuno Y, Nakano M, Takahashi T, Takeuchi H, Honke K. Pseudovirus-Mediated Proximity Labeling Identifies Candidate Host Cell Membrane Proteins Involved in Viral Attachment. ***J Virol***. 2026: e0050726. doi: 10.1128/jvi.00507-26.

④ Shinagawa M, Hirabayashi K, Fujioka M, Kamijo K, Uchiyama N, Yokokawa Y, Tanaka Y, Ono M, Chinsuwan T, Asaka R, Hasegawa A, Tanaka M, Murakami T, Yagyu S, Miyamoto T, Shiozawa T, Nakazawa Y. Ligand-based CAR-T cells targeting EGFR exhibit favorable antitumor effects against gynecologic malignancies. ***Cancer Sci***. 2025;116(8):2243-2255. doi: 10.1111/cas.70106.

⑤ Okamoto K, Mihara Y, Ogasawara S, Murakami T, Ohmori S, Mori T, Umata T, Kawasaki Y, Hirano K, Yano H, Tsuneoka M. Interaction between PHF8 and a segment of KDM2A, which is controlled by the phosphorylation status at a specific serine in an intrinsically disordered region of KDM2A, regulates rRNA transcription and cell proliferation in a breast cancer cell line. ***Biomolecules***. 2025;15(5):661. doi: 10.3390/biom15050661.

#Coresponding author, *First author

(2)口頭発表

① **Tomonaga Ichikawa**, Kazuhiro Morishita, Takashi Murakami. Analysis of tumor development through the increase of phosphorylated PKM2 in Adult T-cell leukemia/lymphoma. 第 84 回日本癌学会学術集会. 2025 年 9 月 25 日-27 日.

② 安藤 優希枝、畑澤 さら、又木 萌萌、熊田原 莉子、中嶋 美桜、曽根 陸寿、中村 彰宏、戸叶 美枝子、**市川 朝永**、村上 孝、堀内 大. Immunological characteristics of hyper-differentiated melanoma. 第 84 回日本癌学会学術集会. 2025 年 9 月 25-27 日.

③ 畑澤 さら、熊田原 莉子、安藤 優希枝、又木 萌萌、中嶋 美桜、曽根 陸寿、中村 彰宏、戸叶 美枝子、**市川 朝永**、村上 孝、堀内 大. Bacterial infection induces transient melanoma dedifferentiation with attenuated antigenicity. 第 84 回日本癌学会学術集会. 2025 年 9 月 25-27 日.

(3)出版物

なし