

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14375

研究課題名(和文) p53依存的グルタミン代謝調節分子GLS2 によるNASH-HCC病態制御の役割

研究課題名(英文) Role of p53-inducible glutamine regulator GLS2 in the pathogenesis of NASH-HCC

研究代表者

田中 知明 (TANAKA, Tomoaki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50447299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：NASH・生活習慣病の病態形成にp53がどのようなメカニズムを介して関与するかを明らかにすることが期待されている。我々はグルタミン代謝の鍵となるGLS2が、p53の下流として、エネルギー産生や抗酸化作用を発揮することを明らかとした。これは、癌遺伝子MYCがGLS1を制御することと相反し、グルタミンパラドックスという概念を提唱できた。マウス肥満モデルでは、高脂肪食負荷マウスの脂肪や脂肪肝、NASH肝においてGLS2は有意に増加し、逆にHCCになると発現は低下していた。KOマウスの解析から、GLS2のノックアウトマウスは、NASHが進展し、癌と生活習慣病を結ぶ分子機構に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent epidemiologic evidence suggests that type 2 diabetes and obesity are at significantly higher risk for many types of cancer. In this context, p53 has been shown to control mitochondrial functions through regulation of ROS and cell metabolism, implicating its potential role in biologic links between diabetes and cancer. Here we have explored p53 targets to regulate cell metabolism using ChIP- and RNA-sequencing and identified GLS2, a key enzyme to convert glutamine to glutamate, thereby a regulator of glutathione synthesis and ATP production via TCA cycle. GLS2 overexpression inhibited cancer cell growth as well as invasion in both vitro and vivo, suggesting its potential role for tumor suppression. Thus, p53-GLS2 pathway may contribute to the common pathogenesis between life-style related diseases and cancer.

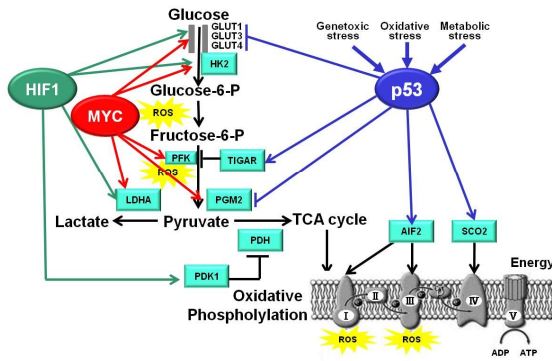
研究分野：医歯薬学

キーワード：NASH 生活習慣病 肝臓がん グルタミン代謝 がん抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

癌細胞における糖やアミノ酸代謝の亢進は癌の進展や治療抵抗性などの悪性化に深く

図1 エネルギー代謝と癌抑制遺伝子p53および癌遺伝子のクロストーク



関わる。一方で、日本人の糖尿病患者の死因の第一位は、長年血管疾患だったが、現在では悪性疾患となり、更に糖尿病患者では特に大腸癌、肝臓癌、膵臓癌のリスクが増加することが明らかとされている (NEJM 2011)。よって癌の細胞内代謝動態解明とその制御機構の探索は、生活習慣病と癌を結びつける共通の分子病態として重要である。このような背景の中、癌における解糖系の亢進はワールブルグ効果として報告されて以来、国際的にも盛んに競争的な研究が進められてきた分野である。これまでの研究から、癌遺伝子 MYC や HIF1 が解糖系を促進する一方で、癌抑制遺伝子 p53 が解糖系を抑制したり SCO2 や AIF2 を介して電子伝達系を促進することが明らかとされつつある (図1)。ところが、実際の癌細胞ではグルコースと共にグルタミンを栄養源として利用しており解糖系の亢進と共にグルタミン代謝も活性化されている。解糖系と比較するとグルタミン代謝の癌における分子制御機構は立ち遅れており、ほとんど未解明であった。そこで、本研究では、GLS2 ノックアウトマウスの解析を通じてグルタミン代謝を介したミトコンドリア制御の個体における役割を明らかにし、細胞エネルギー恒常性の破綻と疾患の関わりを解明することを目指す。具体的には、GLS2 ノックアウトマウスの作成とそのフェノタイプの解析である。体重の変化や脂肪の状態など肥満や糖尿病に関する様々な表現系を解析するとともに、高脂肪食負荷や、発癌物質を皮膚に塗布することで肥満や癌を誘発して検討する。

2. 研究の目的

細胞におけるグルタミン代謝の制御システムの解明は、癌代謝研究の重要研究課題の一つである。癌細胞においては解糖系の亢進とともにグルタミン分解が亢進しており、我々はグルタミン代謝の鍵となる GLS2 を癌抑制遺伝子 p53 が制御しエネルギー産生や抗酸化作用を發揮していることを明らかとした。一方で癌遺伝子 MYC が microRNA を介して GLS1 を制御することが報告され、グルタミン代謝の癌における役割が非常に注目されている。そこで本研究では GLS2 遺伝子のストレートノックアウトマウスおよびコンディショナルノックアウトマウスを作成し生体内での GLS2 の機能を解析する。更にこれら研究結果に基づき、GLS2 の臨床応用特に癌治療標的薬としての可能性を探ることを目的とする。

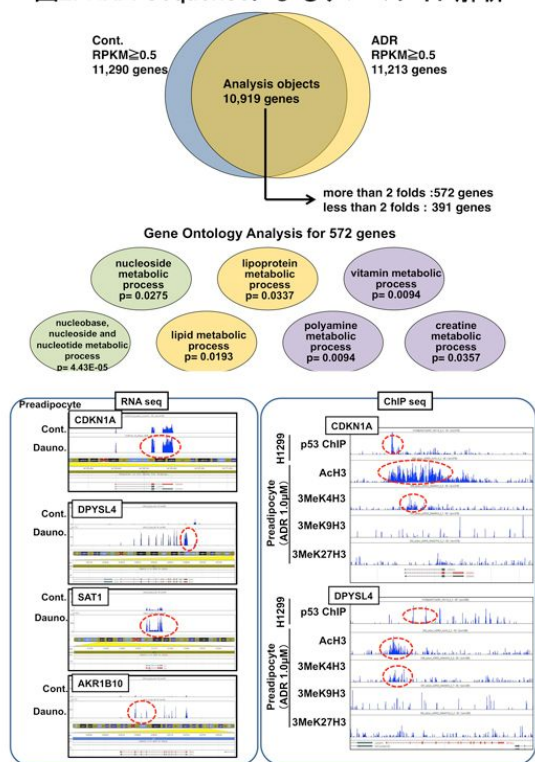
3. 研究の方法

本研究では p53 下流遺伝子 GLS2 のミトコンドリアにおけるエネルギー産生および抗酸化作用が、個体においてどのような生物学的・病態学的意義があるのか明らかとする。多岐にわたり重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、特に肥満・糖尿病といった生活習慣病、更には癌に焦点を当て検討を行う。方法として、まず(A) GLS2 ストレートノックアウトマウスを作成し、そのフェノタイプを解析する。特に体重の変化や脂肪の状態など肥満や糖尿病に関する様々な表現系を解析するとともに、高脂肪食負荷や、発癌物質を皮膚に塗布することで肥満や癌を誘発しそのフェノタイプを詳細に検討する。次に、(B) 肝臓・膵臓・脂肪といった GLS2 が高発現している臓器特異的 GLS2 ノックアウトマウス (コンディショナルノックアウトマウス) を作成し、GLS2 の臓器特異的役割を検討し、GLS2 の臨床応用の可能性を探ることとした。

4. 研究成果

我々は、これまでに癌抑制遺伝子 p53 がグルタミン代謝の鍵分子である Glutaminase2 (GLS2) を活性化することで、好氣的エネルギー産生を正に調整したり、抗酸化作用を發揮しすることを世界に先駆けて明らかにした

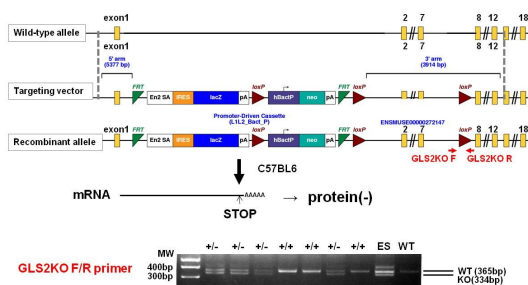
図2. RNA Sequencingによるゲノムワイド解析



(PNAS 2010. 107:7117-8)。次世代型シーケンサーを用いた ChIP-seq とトランスクリプトーム解析による細胞内代謝を制御する新規 p53 下流遺伝子の同定による新たな生理的役割の探索・代謝環境応答時の p53 依存的 epigenetics 解析を行った。その結果、p53 標的遺伝子として、核酸代謝に関わる酵素に高い相同性を持つ DPYSL4、ポリアミン代謝関連の SAT1 など 20 種類以上の遺伝子を同定した(図 2)。その中で、グルタミン代謝に関与する Phosphate Activated Glutaminase (GLS2) に注目した。GLS2 は主にミトコンドリアに局在しグルタミンを加水分解しグルタミン酸を供給する酵素だが、種々の細胞において p53 がその転写誘導を引き起こし、グルタミン代謝を調節していることが確認された。メタボローム解析や生化学的手法による p53-GLS2 経路の機能解析から、還元型グルタチオン産生を介した通じた ROS 調節を通じて p53 依存的抗酸化作用を発揮していた Warburg 効果に関連して、グルタミン酸から ケトグルタル酸を介して TCA 回路に作用し、好氣的回路を経て ATP 産生と酸素消費量を正に司る仕組みが明らかとなった。マウス肥満モデルにおいて、高脂肪食負荷後の各脂肪組織で GLS2 の発現が有意に増加しており、エネルギー代謝との関わりが示唆された。一方、

GLS2 による癌細胞の増殖・浸潤・転移の抑制効果に加えて、SCID マウスでの癌細胞皮下移植後の腫瘍形成を顕著に抑制し、癌抑制作用が示された。これらの結果は、GLS2 は細胞内グルタミン代謝を介して p53 による ROS・エネルギー代謝調節機能を担う重要な役割を果たしていることが明らかとなった。細胞レベルでのミトコンドリア機能制御能と肥満や腫瘍形成の動物モデル解析から、癌と生活習慣病を結ぶ分子機構に参与している可能性が示唆された。これらの知見や遺伝子群は、クロマチン制御とメタボリックストレス応答、細胞内代謝調節の接点で作用する機能的分子であることを示している。従って、糖尿病や肥満モデルにおける解析を更に押し進めることにより、新たな分子病態の解明と新しいタイプの治療薬開発に結びつくことが期待される。

図3. GLS2ノックアウトマウス作成のための遺伝子ターゲティング戦略



また、もう一つの成果として、GLS2 ノックアウトマウスの作成に成功した(図 3)。GLS2 はヒトおよびマウスにおいて代謝で重要な脳、肝臓、膵臓で高発現しており、グルタミン酸は各臓器において非常に多彩な生理作用を発揮している。脳におけるエネルギー代謝情報は、液性因子と神経経路があり、液性因子として、糖質、脂質、アミノ酸が、摂食/絶食によって刻々と変動する栄養状態を脳に伝えエネルギー代謝を短期的および長期的に調整している。中でも分枝鎖アミノ酸であるロイシンは視床下部の mTOR (mammalian target of rapamycin)の活性化を介して摂食を制御するが、グルタミン酸は mTORC1 の活性化にも関与していることが報告されている (Nicklin P et al. Cell, 2009 Feb 6; 136(3):521-534)。このことからグルタミン酸は、エネルギー代謝情報の指標として機能しているのみでなく mTOR を介して摂食を制御している可能性が示唆された。そこで、

ストレートノックアウトマウスのフェノタイプを解析した結果、高脂肪食負荷 Gls2 ノックアウトマウスは肥満、高中性脂肪血症、耐糖能障害といったいわゆるメタボリック症候群を来し、高齢で肝細胞癌を発症することを見出した（現在論文作成中）。これまでグルタミン代謝が肥満に及ぼす影響およびその詳細なメカニズムは全く明らかとされておらず、本研究でその機序を明らかにするとともに肥満の新たな病態解明・予防・治療への可能性を探る。本研究で得られた結果は、高齢者の健康寿命の延長に貢献できると考えられた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Kitajima S, Yoshida A, Kohno S, Li F, Suzuki S, Nagatani N, Nishimoto Y, Nishimoto Y, Sasaki N, Muranaka H, Wan Y, Nishiuchi T, Suzuki Y, Tominaga K, Gotoh N, Suzuki M, Ewen M, Baebie D, Hirose O, Tanaka T, Takahashi C. The RB-IL-6 axis controls self-renewal and endocrine therapy resistance by fine-tuning mitochondrial activity. *Oncogene*. 2017. 査読有.
2. Hashimoto N, Tanaka T. Role of miRNAs in the pathogenesis and susceptibility of diabetes mellitus. *J. Hum. Genet.* 2017, 62, 141-50. 査読有.
3. Yoshida A, Kitajima S, Li F, Cheng C, Takegami Y, Hayashi N, Nishimoto Y, Nagatani N, Kohno S, Muranaka S, Nishiuchi T, Suzuki S, Nakao S, Tanaka T, Hirose O, and Takahashi C. MicroRNA-140 mediates RB tumor suppressor function to control stem cell-like activity through interleukin-6. *Oncotarget*. 2017, 8, 13872-85. 査読有.
4. 橋本直子, 田中知明. P53 によるがん代謝. 月刊糖尿病. 2017, 3, 94-102. 査読有.
5. 樋口誠一郎, 田中知明. ES/iPS 細胞を用いた甲状腺濾胞細胞の再生医療. 医学の

あゆみ. 2017, 9, 17121-126. 査読有.

6. Kobayashi S, Hoshino T, Hiwasa T, Satoh M, Rahmutulla B, Tsuchida S, Komukai Y, Tanaka T, Matsubara H, Shimada H, Nomura F, Matsushita K. Anti-FIRs (PUF60) auto-antibodies are detected in the sera of early-stage colon cancer patients. *Oncotarget*. 2016, 7, 82493-503. 査読有.
7. Sakuma I, Higuchi S, Fujimoto M, Takiguchi T, Nakayama A, Tamura A, Kohno T, Komai E, Shiga A, Nagano H, Hashimoto N, Suzuki S, Mayama T, Koide H, Ono K, Sasano H, Tatsuno I, Yokote K, Tanaka T*. Cushing syndrome due to ACTH-secreting pheochromocytoma aggravated by a glucocorticoid-driven positive-feedback loop. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016, 101, 841-6. 査読有.
8. Hosokawa H, Tanaka T, Endo Y, Kato M, Shinoda K, Suzuki A, Motohashi S, Matsumoto M, Nakayama K, Nakayama T. Akt1-mediated Gata3 phosphorylation controls the repression of IFN γ in memory-type Th2 cells. *Nat Commun*. 2016 :7:11289. 査読有.
9. 佐久間一基, 田中知明. 再生医療 iPS と老化. 日本臨牀. 2016, 74, 1560-64. 査読有.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. RNA シークエンスとメチル化解析から捉えた異所性 ACTH 産生褐色細胞腫の分子機構, ポスター, 佐久間一基, 藤本真徳, 樋口誠一郎, 小野克彦, 笹野公伸, 田中知明, 横手幸太郎, 第 53 回日本臨床分子医学会学術集会, 2016/4/15, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区.
2. 肥満と癌の共通の分子基盤としての Phosphate Activated Glutaminase (GLS2)の役割の解明, 口頭, 鈴木佐和子, 中山哲俊, 藤本真徳, 田村愛, 駒井絵里, 志賀明菜, 佐久間一基, 永野秀和, 小出尚史, 田中知明, 横手幸太郎, 第 37 回日本肥満学会, 2016/10/8, 東京ファッションタウン, 東京

- 都江東区.
3. 続発性無月経を呈した FOXL2 変異陽性 inhibinB 産生顆粒膜細胞腫 2 例.ポスター, 駒井絵里,河野貴史,鈴木佐和子,小出尚史,石川博士,生水真紀夫,田中知明,横手幸太郎, 第 26 回臨床内分泌代謝 Update, 2016/11/18,大宮ソニックシティ,埼玉県さいたま市.
 4. 下垂体腫大を契機に発見された血管内大細胞型 B 細胞性リンパ腫.ポスター, 我妻久美子,鈴木佐和子,藤本真徳,田村愛,駒井絵里,志賀明菜,河野貴史,佐久間一基,永野秀和,小出尚史,田中知明,横手幸太郎, 第 26 回臨床内分泌代謝 Update, 2016/11/18, 大宮ソニックシティ,埼玉県さいたま市.
 5. 副腎偶発腫の 20 年経過後に診断された無症候性褐色細胞腫の一例, ポスター, 田村愛,藤本真徳,駒井絵里,志賀明菜,河野貴史,永野秀和,佐久間一基,中山哲俊,鈴木佐和子,小出尚史,田中知明,横手幸太郎, 第 26 回臨床内分泌代謝 Update, 2016/11/18, 大宮ソニックシティ,埼玉県さいたま市.
 6. 古典型ファブリー病の 17 年間の長期酵素補充療法の経過と慢性管理, ポスター発表, 滝口朋子,佐久間一基,田中知明,横手幸太郎, 第 26 回臨床内分泌代謝 Update, 2016/11/18, 大宮ソニックシティ,埼玉県さいたま市.
 7. 副腎皮質癌 12 例の臨床的特徴と腫瘍組織を用いた予後予測因子解析, 口頭, 志賀明菜,滝口朋子,中山哲俊,樋口誠一郎,佐久間一基,永野秀和,鈴木佐和子,小出尚史,笹野公伸,田中知明,横手幸太郎, 第 26 回臨床内分泌代謝 Update, 2016/11/18, 大宮ソニックシティ,埼玉県さいたま市.
 8. 腫瘍体細胞変異パターンから捉えた先端巨大症 163 例の臨床的特徴, 口頭, 大和梓,河野貴史,永野秀和,石渡規生,堀口健太郎,西岡宏,山田正三,田中知明,横手幸太郎, 第 26 回臨床内分泌代謝 Update, 2016/11/18, 大宮ソニックシティ,埼玉県さいたま市.
 9. SIBO に伴うビタミン D 欠乏性低 P 血症性骨軟化症が疑われた 1 例, ポスター, 河野貴史,吉井聡美,田中知明,横手幸太郎, 第 26 回臨床内分泌代謝 Update,

2016/11/18, 大宮ソニックシティ,埼玉県さいたま市.

10. RNA-seq 解析による褐色細胞腫(Pheo)の悪性/転移性規定因子の探索, ポスター, 藤本真徳,滝口朋子,佐久間一基,中山哲俊,鈴木佐和子,小出尚史,木村伯子,田中知明,横手幸太郎, 第 26 回臨床内分泌代謝 Update, 2016/11/18, 大宮ソニックシティ,埼玉県さいたま市.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

〔その他〕
 ホームページ等

6 . 研究組織
 (1)研究代表者
 田中 知明 (TANAKA TOMOAKI)
 千葉大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号 : 50447299