

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19283

研究課題名(和文) 解糖系代謝リモデリングによる老化から癌化への転換機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of conversion mechanism from ageing to tumorigenesis by the metabolic-remodeling of glycolysis.

研究代表者

三河 拓己 (Mikawa, Takumi)

京都大学・医学研究科・教務補佐員

研究者番号：90608051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では「代謝からの癌予防」を最終目標とし、解糖系酵素の一つPGAMと発癌の関係に着目し研究を行った。その結果、PGAMトランスジェニックマウスでは腫瘍形成が促進されることを突き止めた。反対にPGAMの発現減少による *in vivo*での影響を検討するため、PGAM1ノックアウトマウスを作製し、表現型の解析を行った。その結果、PGAM1のホモノックアウトは胎生致死であった。そこで、ヘテロノックアウトマウスの表現系を解析したところ、体重や耐糖能に異常は見られなかった。さらに我々は培養細胞を用いた *in vitro*でのPGAM結合因子の解析より、その協調的生物学的効果を見出した。

研究成果の概要(英文)：One of glycolytic enzyme, phosphoglycerate mutase (PGAM) is expected to be a strong-target for the preventive therapy of cancer via metabolic regulation. To investigate *in vivo* effect of PGAM, we generate two PGAM model mice; one is PGAM transgenic mouse, another is PGAM conditional knockout mouse. These mice did not show glucose intolerance. However, we found that PGAM transgenic mice are susceptible to chemical-induced carcinogenesis. Moreover, we found novel PGAM binding protein and its cooperative-biological effect.

研究分野：老年医学

キーワード：解糖系代謝 癌 PGAM

## 1. 研究開始当初の背景

本邦を含む多くの先進国で、高齢化とともに、悪性疾患(癌)が死亡原因1位となった(総務省統計局 世界の統計 2014)。疫学的に、高齢ほど発癌しやすい事も知られているが、その理由は不明のまま。また、癌は生活習慣病にも指定されており、一部の食生活はある種の発癌原因となることが知られている(国立がんセンターがん対策情報センター資料)。もう一つの生活習慣病である糖尿病でも、大腸癌、肝癌などの明らかな上昇が指摘されているがその予防法は謎が多い(春日他 糖尿病 2013)。

癌研究で最も古くから知られている代謝特性に、解糖系亢進がある。癌細胞内では、通常酸素状態でも解糖系代謝亢進が維持され、ワールブルグ効果と呼ばれている。癌でのワールブルグ効果は、通常細胞における解糖系制御の破綻・リモデリングとも解釈され、解糖系代謝は癌予防に重要な代謝標的と想定される(Vander Heiden 他 Science 2009)。ワールブルグ効果制御には、HIF-1などの転写因子群、古典的発癌関連遺伝子(癌遺伝子 Ras, Myc や癌抑制遺伝子 p53, Rb など)の関連のみならず、新しい栄養代謝センサー(AMPK やサーチュイン)が注目され始めている。今後は、これら三群の遺伝子や、それ以外の役者たちの相互連関による解糖系リモデリング機構解明が喫緊の課題である。

## 2. 研究の目的

生活習慣病である癌に対し、『代謝からの癌予防』という究極の目的をゴールとしつつ、本計画では解糖系亢進(ワールブルグ効果)に注目し、その中でも解糖系酵素 PGAM に焦点を絞る。PGAM は近藤が細胞長寿遺伝子として世界初報告し、その上流に Mdm2 によるユビキチン分解制御が存在することを申請者が発見・報告した。本課題では PGAM-TG や cKO マウスを樹立し、培養細胞・マウスモデルの両者を用いて、PGAM による老化から癌化への変換分子機構の全貌解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) PGAM 過剰発現モデルマウスとして、CAG プロモーター下で FLAG タグが付加された PGAM2 (PGAM-FLAG) を発現する PGAM トランスジェニックマウスを作製した。さらに PGAM 発現低下モデルマウスとして、PGAM1 コンディショナルノックアウトマウスを作製した。本課題では、PGAM1 コンディショナルノックアウトマウスを CAG-Cre マウスと掛け合わせ、全身 PGAM1 ノックアウトマウスを作製し解析を行った。

(2) 耐糖能試験(IPGTT)。16 時間絶食させた

マウスに 1.5g/kg 体重のグルコースを腹腔内投与し、その後 0、15、30、60、120 分での血中グルコース濃度を測定した。

(3) PGAM 過剰発現モデルにおける発癌性を化学誘導皮膚癌モデルにより検討した。マウス皮膚に発癌性物質である 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を塗布後、20 週間にわたり炎症誘導物質 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を繰り返し塗布し、皮膚の腫瘍形成を促した。出現した腫瘍についてサイズの計測を行い、最終的に 24 週後にマウスをサクリファイし、腫瘍の病理診断を行った。

(4) PGAM 結合因子を免疫沈降法により同定した。PGAM-FLAG を発現させた細胞から調製した蛋白質抽出液中より抗 FLAG 抗体ビーズを用いて PGAM-FLAG を免疫沈降させた。さらに共沈降した PGAM 結合因子をウエスタンブロットにより検出した。

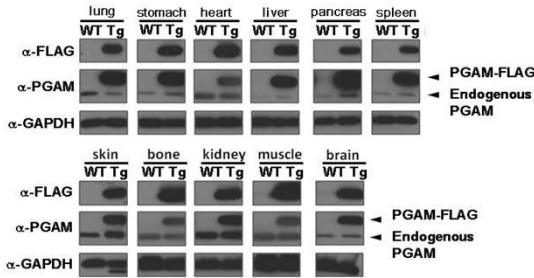
## 4. 研究成果

(1) 正常な細胞には有限の分裂寿命があり、分裂を繰り返した細胞は老化し増殖を停止する(細胞老化)。さらに若い細胞であっても酸化ストレス、DNA 障害、発癌ストレスなど様々なストレスにより早期に細胞老化が引き起こされる(ストレス老化)。現在では「ストレス老化は癌遺伝子変異のある細胞の悪性を防ぐ生体防御バリアーである」と考えられており、(Collado M 他 Nature 2005)。「老化は(完全悪ではなく)必要悪(この場合癌を防ぐ)」となりうる。これまで、我々はストレス老化研究に従事する過程で、細胞老化抑制遺伝子として解糖系酵素ホスホグリセリン酸ムターゼ PGAM を同定した。PGAM 失活により早期老化誘導される一方、PGAM 強制発現によりストレス細胞老化抑制され、さらに解糖系代謝全体が亢進する(近藤他 Can Res 2005)。さらに、ストレス老化時に PGAM がユビキチン・プロテアソーム系による分解を受けること、この時の PGAM ユビキチン分解酵素が細胞周期関連因子である Mdm2 であることを同定し、ストレス老化時の PGAM 分解機構の破綻が癌化に繋がることを見出した(三河他 JCB 2014)。

次のステップとして、これまで培養細胞を用いて解明された PGAM 制御機構の生理病理的意義の理解が重要で、*in vivo*での検証が僅々の課題であった。そこで我々は全身発現型の PGAM トランスジェニックマウスを作製し、PGAM 過剰発現による *in vivo*での影響を検討することにした。

作製した PGAM トランスジェニックマウスは、CAG プロモーター下で FLAG タグが付加された PGAM (PGAM-FLAG) を発現するように設計されており、各臓器における PGAM-FLAG の発現

をウエスタンブロットにより確認することができた (図 1)。



**図 1 PGAM-TG マウス**

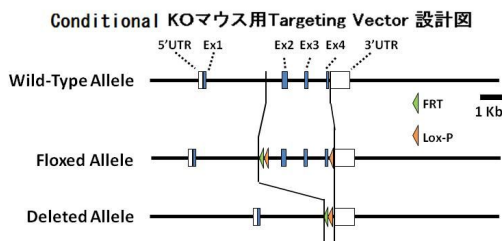
次に PGAM 過剰発現によるマウスの全身糖代謝への影響について検討するため、耐糖能試験を行ったところ、PGAM トランスジェニックマウスでは、野生型との間に耐糖能の有意な差は認められなかった。さらに、PGAM が *in vivo* でも発癌を促進する可能性について検討するため、DMBA/TPA を用いた化学発癌プロトコールにより PGAM トランスジェニックマウスに皮膚腫瘍形成を促したところ、PGAM トランスジェニックマウスでは早期の腫瘍発生やサイズの肥大、出現する腫瘍数の増加が観察された (図 2)。



**図 2 PGAM-TG マウスにおける腫瘍形成の促進**

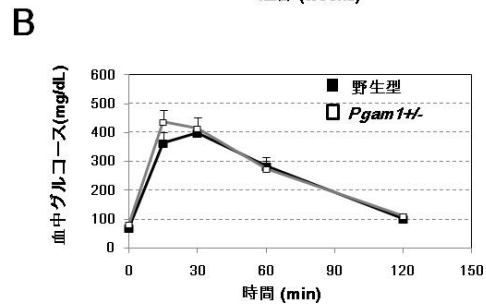
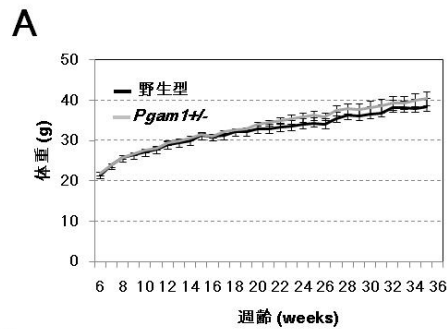
また、出現した腫瘍を病理診断したところ、一部の腫瘍が悪性化していることが明らかになった。これより、PGAM の過剰発現が *in vivo* においても癌化を促進することが明らかになった。

(2)PGAM 発現減少モデルとして PGAM コンディショナルノックアウトマウスを作製し解析を行った (図 3)。



**図 3 PGAM-KO マウス**

本課題では、CAG-Cre マウスとの掛け合わせにより全身 PGAM1 ノックアウトマウスの解析を行った。まず初めに、PGAM *Flox/+* マウスと CAG-Cre マウスの掛け合わせにより、PGAM1 ヘテロノックアウトマウス (PGAM<sup>-/+</sup>) を誕生させた。次に PGAM1 ヘテロノックアウト同士を掛け合わせてホモノックアウトマウスの作成を試みたが、生まれてきたマウスの中に PGAM1 ホモノックアウトマウスは存在せず、胎生致死であると考えられた。そこで、ヘテロノックアウトマウスの表現系を解析したところ、体重や耐糖能に異常は見られなかった (図 4)。



**図 4 PGAM-KO マウスにおける耐糖能**

(3) さらに我々は PGAM 結合因子の解析から、その協調的生物学的效果を見出した。今後さらに解析を進め、PGAM をターゲットとした新規の癌予防および抗癌治療の開発に貢献したい。

## 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 5 件)

三河拓己、稲垣暢也、近藤祥司、ガン代謝制御標的としての PGAM、実験医学、査読有、33 巻、2015、1741-1745

近藤祥司、三河拓己、稲垣暢也、解糖系酵素 PGAM とストレス老化シグナル、生化学、査読有、88-3 巻、2016、296-301

近藤祥司、**三河拓己**、稲垣暢也、細胞老化概論 1～テロメア依存性/非依存性から見た細胞老化、The Lung perspectives, 査読有、24:2 巻、2016、87-90

近藤祥司、**三河拓己**、稲垣暢也、細胞老化概論 2～慢性炎症と SASP を中心に、The Lung perspectives, 査読有、24:3 巻、2016、84-87

近藤祥司、**三河拓己**、稲垣暢也、老化制御・抗加齢医学の現状と展望、査読有、74:9 巻、2016、1429-1434

[学会発表](計7件)

**Takumi Mikawa**, Hiroshi Kondoh, Senescence-inducing stress promotes proteolysis of phosphoglycerate mutase via ubiquitin ligase Mdm2, The Controlling Cancer Summit 2015, London. 12<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> May 2015

**三河拓己**、近藤祥司、ストレス老化シグナルによる解糖系ユビキチン化制御とその病態意義、第 57 回日本老年医学会学術集会、パシフィコ横浜(横浜)、2015 年 6 月 12-14 日

**三河拓己**、伊藤健、堀晃輔、村上逸雄、稲垣暢也、横出正之、近藤祥司、PGAM モデルマウスの解析、第 8 回 Symphony、メトロポリタンエドモンド (東京)、2015 年 9 月 26 日

**三河拓己**、伊藤健、近藤祥司、解糖系酵素 PGAM モデルマウスの解析、第 26 回日本老年医学会近畿地方会、京都府立医大 (京都)、2015 年 11 月 14 日

**三河拓己**、伊藤健、堀晃輔、村上逸雄、稲垣暢也、近藤祥司、細胞老化からガン化への変遷に重要な解糖系酵素 PGAM、第 16 回日本抗加齢学会(招待講演)、パシフィコ横浜(横浜)、2016 年 6 月 10-12 日

**三河拓己**、伊藤健、稲垣暢也、横出正之、近藤祥司、解糖系酵素 PGAM モデルマウスの解析、第 9 回 Symphony、メトロポリタンエドモンド (東京)、2016 年 9 月 18-19 日

**三河拓己**、伊藤健、稲垣暢也、近藤祥司、解糖系酵素 PGAM モデルマウスの解析、第

39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(横浜)、2016 年 11 月 30-12 月 02 日 (優秀ポスター賞受賞)

[図書](計0件)  
なし

[産業財産権]

出願状況(計0件)  
なし

取得状況(計0件)  
なし

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.anti-aging.jpn.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三河 拓己 (MIKAWA, Takumi)  
京都大学大学院医学研究科・教務補佐員  
研究者番号: 90608051

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者

近藤 祥司 (KONDOH, Hiroshi)  
京都大学大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 80402890