

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：16KK0197

研究課題名（和文）グルタミン代謝を介した肥満-NASH/HCC制御機構とその臨床応用（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Regulation of obesity and NASH/HCC via glutamine metabolism and its clinical approach(Fostering Joint International Research)

研究代表者

鈴木 佐和子（Suzuki, Sawako）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60400892

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,600,000円

渡航期間： 9ヶ月

研究成果の概要（和文）：GLS2を介したグルタミン代謝の破綻が、生活習慣病や肝癌発症に関わるといった新知見を更に発展させて、その詳細な分子機序を検証した。共同研究者との共同研究によりメタボローム解析とRNAシークエンス解析を用いた統合融合解析を用い、GLS2を介した生活習慣病発症の分子基盤として糖新生、脂質代謝、更にはインスリン分泌、インスリン抵抗性に関連する鍵分子を同定した。更にグローバルな視点から本研究を見直すことによって、GLS2は新たな細胞死を介して発癌抑制制御に深く関わるといった興味深い新知見が得られ、GLS1とGLS2の発癌におけるパラドックス作用を紐解く鍵となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We have revealed that GLS2 mediated glutamine metabolism and related to lifestyle diseases and hepatocellular tumorigenesis. In this study, we identified key molecules of GLS2 associated with gluconeogenesis, lipid metabolism, insulin secretion and insulin resistance using the combination of metabolome analysis and RNA sequence analysis. Furthermore, we found GLS2, but not GLS1, showed tumor suppressor function through new cell death different from apoptosis and necrosis by reviewing our research from a global point of view. These results might important to explain the paradox action against tumorigenesis of GLS1 and GLS2.

研究分野：糖尿病代謝内分泌内科、エネルギー代謝研究、癌抑制遺伝子

キーワード：グルタミン代謝 生活習慣病 肝癌 統合解析 細胞死

1. 研究開始当初の背景

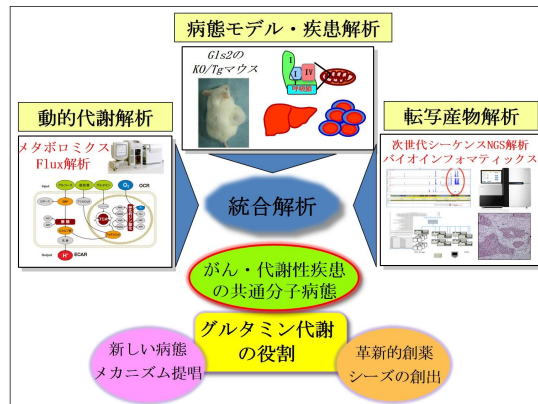
日本人の糖尿病患者の死因の第一位は長年血管疾患だったが現在では悪性疾患となり、更に肥満や糖尿病などの生活習慣病は、肝臓癌や膵臓癌をはじめ様々な癌の発症リスクとなることが明らかとされている。そのような背景の中、癌抑制遺伝子 p53 は様々な段階で解糖系を抑制する一方で、私は解糖系と並ぶ 2 大栄養源で知られるグルタミン代謝のマスター制御分子 Glutaminase2 (GLS2) を p53 が活性化することを見出した。そして p53 はミトコンドリアに存在する GLS2 を介して、好氣的エネルギー産生を正に調整する一方で、抗酸化作用を発揮していることを報告してきた。更に In vitro において GLS2 は癌細胞増殖抑制効果も発揮しており、癌と生活習慣病に共通する分子機構の一つである可能性が示唆された。そこで本研究ではこれまでの In vitro における GLS2 の機能解析を更に推し進め GLS2 ノックアウトマウスを作成し生体内での GLS2 のグルタミン代謝を介した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した。その結果 GLS2 ノックアウトマウスでは肥満や糖尿病といったいわゆる生活習慣病を発症するのに加えて、肝癌を早期に発症するといった新知見を得ることが出来た。

2. 研究の目的

そこで本研究では、これまでの知見を更に発展させ、GLS2 ノックアウトマウスでなぜメタボリック症候群、肝癌を発症するのか、病態モデル・疾患解析、転写産物解析、動的代謝解析を統合・融合解析しグルタミン代謝の癌と生活習慣病における病態生理学的意義、分子病態を解明することを目的とした。一方で、癌細胞における代謝動態の変化として、解糖系の亢進はワールブルグ効果として広く知られている。グルタミン代謝もまた解糖系と並ぶ 2 大栄養素であり、腫瘍形成、病態悪化に関与しているのではないかと考えられてきた。実際に、グルタミン分解のマスターレギュレーターであるグルタミナーゼには 2 つの isoform が存在し、癌遺伝子 MYC によって活性化される GLS1 は癌増殖を促進することが報告されている。ところが今回我々は癌抑制遺伝子 p53 の下流遺伝子である GLS2 が、グルタミン代謝を制御し In vitro および In vivo においても腫瘍発症抑制に作用していることを明らかとした。このようにグルタミナーゼが癌遺伝子と癌抑制遺伝子の両者によってパラドックスに制御されていることに着目し、GLS1 と GLS2 をスイッチング調整することができれば、生活習慣病と発癌の革新的治療法の開発につながり、更には総死亡率の低下に貢献する可能性を秘めているのではないかと考えている。GLS1 と GLS2 の作用メカニズムの違いを明らかとすることで臨床応用への可能性を探った。

3. 研究の方法

ゲノムワイド解析・メタボロミクス解析の統合・融合解析を用いて生体内における GLS2 の細胞内代謝動態の詳細に検討した。具体的な方法として GLS2 ノックアウトマウス肝臓培養細胞を用いて、病期に応じたゲノムワイド解析・メタボロミクス解析を行った。更に安定同位体で標識した基質（グルコースとグルタミン酸）を肝細胞に取り込ませ、代謝産物の流れを動的に評価する代謝 flux 解析を行った。データベース化に関して、TCA 回路を HUB としてそこに連結する解糖系、ペントースリン酸回路、アミノ酸代謝、窒素代謝、脂質合成系等のメタボライトを系統的に記録した。そしてゲノムワイド解析からもたらされる遺伝子情報やエピジェネティクス情報に連結させてグルタミン代謝の生体内におけるメカニズム作用点を明らかにし、病態発症と代謝産物変化と遺伝子発現制御の接点で作用する中心代謝産物を抽出した。



4. 研究成果

2016 年は国際共同研究遂行のために必要な国内での研究（動物実験）の仕上げと、研究代表者が渡米中のマウス飼育を依頼するテクニカルスタッフのトレーニング、細胞管理のため専用液体窒素タンクの購入、千葉大学研究グループ内および事務・会計係をはじめとした各部門と連絡・認識の共有、国際共同研究のコミュニケーションインフラのためのネット環境の整備を行い、適切かつ迅速に研究が遂行できるように環境を整えた。渡米前に使用予定の研究マテリアルに加えて、渡米後すぐに研究に着手できるように、研究に必要な各種遺伝子の primer set・vector・試薬など計画的に購入し送付した。渡米先の apartment は共同研究者の Prives 教授が大学の近くに確保くださり、生活・研究環境調整のための時間を大幅に短縮することが可能であった。渡米後、Prives 教授と直接議論を重ね、より具体的な研究計画の作成に取り組み、実験手法を学び、In vitro のメタボローム解析と RNA シークエンスによるゲノムワイド解析の統合融合解析にとりかかった。そして、GLS2 の生活習慣病発症の分子基盤として糖新生、脂質代謝、更にはインスリン分泌、

インスリン抵抗性に関連する鍵分子を同定することが出来、これらは複雑に相互作用していることが示された。一方で発癌制御に関しては Prives 教授の主催する様々な合同研究会を通じて第一線で活躍する多分野の研究者と研究ネットワークを構築し、まさにグローバルな視野で本研究を見直していった中で、思いがけず新たな細胞死の存在を知り、GLS2 がこの細胞死を介して癌抑制機能を発揮しているといった興味深い知見を得ることが出来た。更に GLS2 とは異なり、GLS1 では認められず、GLS1 と GLS2 の発癌におけるパラドクス作用を紐解く鍵となる可能性が示された。本年5月3日に再度渡米し、国際共同研究者らと直接結果につき話し合いながら共同で論文執筆をすすめていく予定である。

<引用文献>

Sawako Suzuki et al. PNAS 2010; 107 (16): 7117-7118

Gao P et al. Nature 2009 Apr 9;458(7239):762-5.

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Tamura A, Ogasawara T, Fujii Y, Kaneko H, Nakayama A, Higuchi S, Hashimoto N, Miyabayashi Y, Fujimoto M, Komai E, Kono T, Sakuma I, Nagano H, Suzuki S, Koide H, Yokote K, Iseki K, Oguma R, Matsue H, Nojima H, Sugiura K, Yoshitomi H, Ohtsuka M, Rahmutulla B, Kaneda A, Inoshita N, Ogawa S, Tanaka T. Glucagonoma with necrolytic migratory erythema: metabolic profile and detection of biallelic inactivation of DAXX gene. J Clin Endocrinol Metab. 2018 Apr 23. 査読有、doi: 10.1210/jc.2017-02646.

Oka R, Ohira M, Suzuki S, Yoshida T, Koide H, Tanaka T, Tatsuno I. Fracture risk assessment tool (FRAX) and for the diagnosis of osteoporosis in Japanese middle-aged and elderly women: Chiba bone survey. Endocr J. 2018 Feb 26;65(2):193-202. 査読あり doi: 10.1507/endocrj.EJ17-0331.

Koide H, Shiga A, Komai E, Yamato A, Fujimoto M, Tamura A, Kono T, Nakayama A, Takiguchi T, Higuchi S, Sakuma I, Nagano H, Hashimoto N, Suzuki S, Takeda Y, Shibuya M, Nishioka H, Yamada S, Inoshita N, Ishiwatari N, Horiguchi K, Yokote K, Tanaka T. Prednisolone-responsive Postpartum

IgG4-related Hypophysitis. Intern Med. 2018 Feb 1;57(3):367-375. 査読有、doi:10.2169/internalmedicine.

Takiguchi T, Koide H, Nagano H, Nakayama A, Fujimoto M, Tamura A, Komai E, Shiga A, Kono T, Higuchi S, Sakuma I, Hashimoto N, Suzuki S, Miyabayashi Y, Ishiwatari N, Horiguchi K, Nakatani Y, Yokote K, Tanaka T. Multihormonal pituitary adenoma concomitant with Pit-1 and Tpit lineage cells causing acromegaly associated with subclinical Cushing's disease: a case report. BMC Endocr Disord. 2017 Sep 2;17(1):54. 査読有、doi: 10.1186/s12902-017-0203-5.

Nagano H, Nakagawa Y, Ishikawa N, Watanabe H, Miyabayashi Y, Nakayama A, Fujimoto M, Komai E, Shiga A, Tamura A, Kono T, Takiguchi T, Higuchi S, Sakuma I, Hashimoto N, Suzuki S, Koide H, Yokote K, Tanaka T. SEVEN FAMILIAL DYSALBUMINEMIC HYPERTHYROXINEMIA CASES IN THREE UNRELATED JAPANESE FAMILIES AND HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYSIS OF THE THYROXINE BINDING PROFILE. Endocr Pract. 2017 Nov;23(11):1325-1332. 査読有、doi: 10.4158/EP171964.

Ishihara N, Suzuki S, Tanaka S, Watanabe Y, Nagayama D, Saiki A, Tanaka T, Tatsuno I. Atorvastatin increases Fads1, Fads2 and Elovl5 gene expression via the geranylgeranyl pyrophosphate-dependent Rho kinase pathway in 3T3-L1 cells. Mol Med Rep. 2017 Oct;16(4):4756-4762. 査読有、doi: 10.3892/mmr.2017.7141.

Yoshida A, Kitajima S, Li F, Cheng C, Takegami Y, Kohno S, Wan YS, Hayashi N, Muranaka H, Nishimoto Y, Nagatani N, Nishiuchi T, Thai TC, Suzuki S, Nakao S, Tanaka T, Hirose O, Barbie DA, Takahashi C. MicroRNA-140 mediates RB tumor suppressor function to control stem cell-like activity through interleukin-6. Oncotarget. 2017 Feb 21;8(8):13872-13885. 査読有、doi: 10.18632/oncotarget.14681.

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 Glucocorticoid-Driven
Positive-Feedback Loop. J Clin
Endocrinol Metab. 2016
Mar;101(3):841-6. 査読有、doi:
10.1210/jc.2015-2855.

〔その他の海外共同研究者〕
Divya Venkatesh
Columbia University・Biological Science 研
究室・Postdoctoral Research Scientist

〔学会発表〕(計 5 件)

Sawako Suzuki. The roles of GLS2 in
life related disease and liver cancer.
2017年2月 p53 conference in Columbia

鈴木佐和子、中山哲俊、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. 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.
2016年10月18日 第37回日本肥満学会

鈴木佐和子. AIMAH の原因遺伝子 ARMC5
の機能解析による WNT/ β -catenin シグ
ナル制御機構の解明. 2016年4月22日
第89回日本内分泌学会学術総会

鈴木佐和子. 生活習慣病と癌の共通の
分子基盤としての GLS2 の役割の解明.
2016年4月21日 第89回日本内分泌学会
学術総会

Sawako Suzuki. Novel ARMC5
Alterations in Japanese Primary
Macronodular Adrenal Hyperplasia
Patients. 2016年4月2日 米国内分泌
学会 ENDO 2016

〔図書〕(計 2 件)

中山哲俊、**鈴木佐和子**、田中知明. がん
細胞における特異的細胞内代謝と治療
抵抗性、ニューサイエンス社出版、細胞
2017年6月号、2017、総 page 5

鈴木佐和子、横手幸太郎. 診断と治療社、
内分泌性高血圧疾患診療マニュアル改
訂第二版 2017、総 page 2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 佐和子 (SUZUKI, Sawako)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60400892

(2) 研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

Carol Prives
Columbia University・Biological Science 研
究室・教授