

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07887

研究課題名(和文)慢性炎症を転写誘導する代謝基盤の解明

研究課題名(英文)Metabolic mechanism for transcriptional induction of chronic inflammation

研究代表者

三河 拓己(MIKAWA, Takumi)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：90608051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は「加齢および加齢関連疾患に関連する慢性炎症の代謝分子機構の解明」である。特に解糖系代謝酵素PGAMによる解糖制御機構を解析し、加齢関連疾患の一つである炎症や癌細胞の増殖へのPGAMの関与に焦点を当てた。PGAMは癌細胞で解糖系調節に重要な役割を果たすことを同定した。PGAMは発癌性Ras発現条件下でChk1との相互作用を介して、癌細胞における解糖系代謝を上昇させる。PGAMとChk1の相互作用を阻害すると、PGAM活性はそのまま、癌における解糖系代謝亢進が妨げられた。従って、PGAMの非酵素的機能は癌増殖に伴うWarburg効果に必須である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの解糖系阻害を標的とした抗癌剤開発は、酵素活性阻害剤がその主流であったため、正常細胞の解糖系も阻害し、その結果、甚大な副作用により実用化できていなかった。今回の我々の見出した「PGAMの非酵素活性」をターゲットとすることで、正常細胞の解糖系にはより影響の少ない形で、癌細胞のワールブルグ効果に対する阻害剤の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was to "elucidate the metabolic molecular mechanism of chronic inflammation linked to aging and age-related diseases." Especially, we analyzed the glycolytic control mechanism by glycolytic metabolic enzyme PGAM and focused on the involvement of PGAM in inflammation and tumor growth, which is one of the age-related diseases. We identified that PGAM plays a key role in regulating glycolysis in cancer cells, but not in standard cells. Cancer-prone phenotype by PGAM-overexpression in vivo were associated with upregulated glycolytic features. PGAM interacts and cooperates with Chk1 to regulate the enhanced glycolysis in cancer cells, especially under oncogenic Ras expressing conditions. Genetic interference of the PGAM-Chk1 interaction, with intact PGAM activity, abrogated the maintenance of cancerous enhanced glycolysis. Thus, the nonenzymatic function of PGAM is essential for the Warburg effect that accompanies cancerous proliferation.

研究分野：老年医学

キーワード：解糖系酵素 発癌 PGAM

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの加齢性疾患で、慢性炎症が病態進展の一因であることが判明しつつあり、新たな老化概念として「老化・加齢疾患の原因である慢性炎症」が注目されている。癌も加齢と共に発症リスクが上昇する加齢性疾患の一つであるが、古くより知られた癌の代謝異常にワールブルグ効果がある。また、炎症の局所でも解糖系が亢進していることが知られており、これら炎症や癌における代謝変化が病態と密接にリンクすることが予想される。

2. 研究の目的

本研究課題では「老化・加齢性疾患とリンクした慢性炎症の代謝分子機構解明」を目的とし、特に解糖系代謝酵素 PGAM とチェックポイントキナーゼ Chk1 による協調的な解糖系制御機構を解析し、その炎症および加齢性疾患の一つである発癌への関与に注目し研究をおこなった。

3. 研究の方法

PGAM 発現の個体における炎症応答への影響を調べるため、Pgam-Tg マウスおよび野生型マウスに対して耳介への 12-O-テトラデカノイルホルポール-13-アセタート (TPA) 塗布を行い、耳介の炎症による肥厚を測定した。さらに発癌への影響を調べる為に 7, 12-ジメチルベンゾ [a] アントラセン (DMBA) と TPA のマウス皮膚への塗布による化学発癌誘導系を用いた。

解糖系遺伝子群の発現解析にはリアルタイム PCR を用いた。解糖系代謝は、培地中のグルコース消費、培地中の乳酸産生量および解糖系流量で評価した。解糖系流量はトリチウムラベルされたグルコースを用い、細胞内でグルコースから水に分解される量を液体シンチレーションカウンターで測定した。解糖系因子の酵素活性は吸光分光分析的に測定した。

4. 研究成果

(1) PGAM-TG マウスにおける炎症応答の亢進

これまで我々は培養細胞において PGAM がストレス老化シグナルに応答して分解を受けること、さらには、この分解機構が破綻すると細胞が癌化に向かうことを明らかにしていた (Mikawa et al., 2014)。そこで、マウス個体で PGAM を発現させた時の影響について解析を行った。Pgam-Tg マウスの皮膚が、炎症誘発物質である TPA によって引き起こされる炎症に対してより脆弱であることに気が付いた。これより、in vivo での PGAM 過剰発現が炎症ストレス下で解糖に影響を及ぼす可能性が考えられた。以前より我々は、マウス皮膚に対する DMBA 処理とそれに続く TPA の繰り返し処理による化学的誘発発癌プロトコルを用いて、Pgam-Tg マウスにおいて発癌促進されることを突き止めていたが、このプロトコルで形成される腫瘍の解糖系遺伝子群の詳細な発現解析を行うと、野生型マウスと Pgam-Tg マウス由来の腫瘍で明らかな違いが認められた。解糖 mRNA のレベルは、対照マウスと比較して、Pgam-Tg マウス由来のパピローマおよび腫瘍のない皮膚の両方で顕著に増加した (図1)。さらに、これらの mRNA の発現は、同じ遺伝的背景の良性腫瘍よりも Pgam-Tg 由来の悪性腫瘍においてさらに増強された。このように、PGAM 過剰発現は腫瘍形成に伴い解糖遺伝子群の発現を促進した。

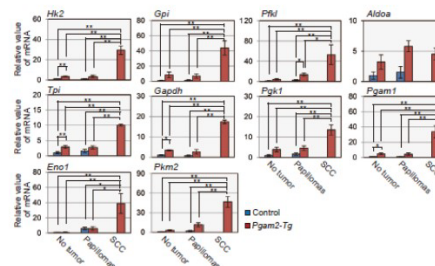


図1. Pgam-Tg マウス腫瘍における解糖系遺伝子発現上昇

(2) PGAM 介した癌細胞における解糖系制御機構

我々のこれまでの解析から非小細胞性肺ガン細胞株である H1299 で PGAM1 発現をノックダウンすると、多くの解糖系遺伝子の発現低下がおこることを観察していた。さらに Pgam1 発現低下による影響を詳細に解析したところ、Pgam1 ノックダウン細胞では細胞増殖が低下していること、この細胞では解糖系因子の酵素活性が低下していること、さらに解糖系代謝（細胞内グルコース流量、乳酸産出、グルコース消費）が低下していることが判明した(図 2)。この細胞増殖や解糖系代謝の低下は皮膚癌細胞株である HSC1 でも観察され、また他の多くの癌細胞種でも Pgam1 ノックダウンによる解糖系遺伝子の発現低下が見られた。興味深いことに Pgam1 発現低下による解糖系遺伝子群の発現低下は正常線維芽細胞である WI38 やマウス胚性線維芽細胞 (MEFs) では起こらなかった。以上の結果は、Pgam1 による解糖系遺伝子群の発現制御が癌細胞に特異的な機構であり、癌代謝の特徴として知られる解糖系亢進すなわちワールブルグ効果の制御に PGAM が関与することを示唆する。

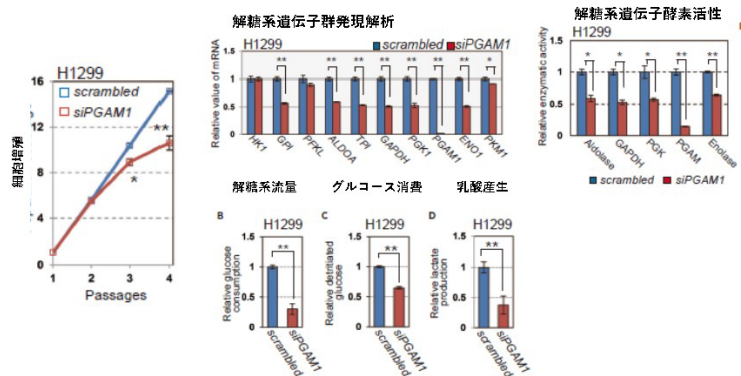


図2. H1299細胞におけるPgam1ノックダウンによる解糖系低下

(3) PGAM と Chk1 による協調的解糖系制御

我々は Pgam2-TgMEF 細胞における p53 応答の減弱から PGAM 新規結合因子としてチェックポイントキナーゼである Chk1 を同定した。当初 Chk1 は PGAM による解糖系上昇を抑制すると予想されたが、意外なことに Chk1 のノックダウンは PGAM ノックダウンと同様に解糖系代謝を低下させた。さらに、PGAM と Chk1 の結合は正常細胞では起こらず、癌細胞でのみ観察されたことから、PGAM と Chk1 が癌細胞において協調的に解糖系を制御することが示唆された(図 3)。

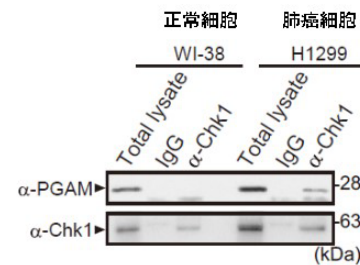


図3. 肺癌細胞株におけるPGAM-Chk1結合

(4) 肺癌患者の予後と PGAM-Chk1 遺伝子発現の関連

PGAM と Chk1 による協調的解糖系制御の臨床的関連性を評価するために、Prognoscan (<http://dna00.bio.kyutech.ac.jp/Prognoscan/>) に登録されたデータセットを用いて癌患者の予後に対する PGAM/Chk1 発現の影響を評価した。非小細胞肺癌 (NSCLC; jacob-00182-MSK) データセットに従い、NSCLC 患者 104 人を PGAM1 および Chk1 の発現量に基づいて低 PGAM1+低 Chk1、低 PGAM1+高 Chk1、高 PGAM1+低 Chk1、および高 PGAM1+高 Chk1 の 4 群に分けた。その結果、我々は他の群と比較して、高 PGAM 1+高 Chk 1 群で予後が最も有意に低下することに気づいた (図 4)。

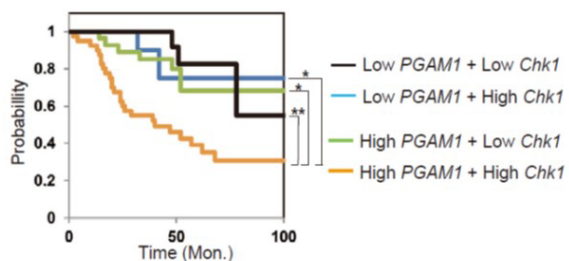


図4. 肺癌患者におけるPGAM/Chk1高発現発現群の予後

(5) PGAM-Chk1 結合の上流制御機構の解明

癌における PGAM-Chk1 結合制御を明らかにするため、肺癌細胞株 H1299 に加えて、皮膚、乳房、結腸、骨、および肝癌細胞株を含む 14 の他の癌細胞における PGAM 発現ノックダウンの影響を評価した。これら全部で 15 種の癌細胞株の中で、H1299、皮膚癌細胞株 HSC-1、大腸癌細胞株 SW480、および DLD-1 は PGAM ノックダウン後に解糖系遺伝子群の著しい発現低下を示した。

次にこれら PGAM ノックダウンに感受性の高い細胞の特徴を調べるため、プレジジョンメディシンの臨床診療で用いられる 50 個の癌関連遺伝子に関し、これら 15 種の癌細胞株が持つ変異を検討した。その結果、PGAM ノックダウンにより有意な解糖系低下を起こす細胞では p53 および Ras 経路の両方に異常を持つことがわかった。

さらに、26 種のヒト肺腺癌細胞株における PGAM/Chk1 経路の関与を分析した。これらの 26 細胞を p53 または Ras 経路のいずれかに遺伝的異常を有する細胞、および両方に異常を有する細胞の二つのサブグループに分類し、ヒト統合オミクスデータベースである DBKERO (DBKERO; <http://kero.hgc.jp/>) に登録されたデータから、Chk1 と解糖酵素群の遺伝子発現の相関を Pearson により解析した。Chk1 とほとんどの解糖系酵素の相関係数は、p53/Ras 経路の両方に異常のあるサブグループで高かった (>0.4)。

これと一致して、PGAM-Chk1 結合が発癌変異 Ras の発現によって増強されることを突き止めた (図 5)。さらに、Ras 経路の下流キナーゼに対するいくつかの阻害剤を用いて検討したところ、MEK/RSK 阻害により PGAM-Chk1 結合が阻害された。以上の結果より、MEK/RSK 経路を介する発癌性 Ras シグナルにより PGAM-Chk1 相互作用が制御されることを明らかにした。

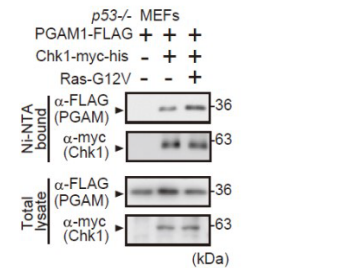


図5. RasによるPGAM-Chk1結合制御

(6) PGAM-Chk1 結合阻害による癌細胞増殖抑制

最近、p53 阻害剤として開発された Nutlin-3a に対するコンセンサス配列 ([L/I/V/M] - [W/Y/F] - x - x - [L/I/V/W]) がプロテオーム解析により決定された (Nicholson et al., 2014)。このコンセンサスモチーフが、ヒトおよびマウスの PGAM の N 末端領域に 2 リピート保存されており、それらが Chk1 相互作用ドメインと重複していることに気づいた。そこで 2 つのコンセンサス配列内にアミノ酸置換を有する PGAM 変異体 (W68A および W78A) を作成したところ、これらの変異体では Chk1 との結合が失われるが、興味深いことにこれらの変異は PGAM 酵素活性には影響を及ぼさなかった。

次に発癌性 Ras 変異の発現下で、これらの変異体の生理学的影響を評価した。発癌性 Ras 変異発現下で、Chk1 を発現させた p53^{-/-}-MEF における野生型 PGAM の異所性発現は、コントロールと比較して解糖代謝を上昇させたのに対し、PGAM-W68A および W78A 突然変異体ではそのような変化は観察されなかった。さらに、野生型 PGAM 過剰発現細胞では *in vitro* 増殖能と *in vivo* 腫瘍増殖に大きな上昇が見られたのに対し、変異型 PGAM では野生型 PGAM にみられる増殖促進効果は観察されなかった (図 6)。このように Chk1 との結合能を欠失させた PGAM 変異体は、発癌性 Ras 変異の存在下

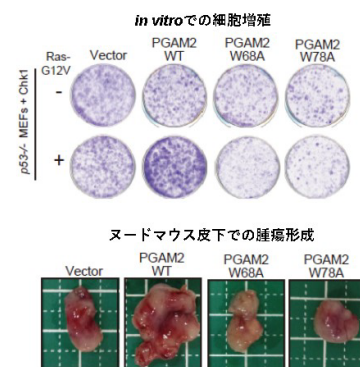


図6. PGAM結合変異体の癌細胞増殖への影響

における癌増殖を消失させた。

以上の結果から、我々は PGAM-Chk1 相互作用を介した癌における解糖系代謝のこれまで知られていなかった調節機構を明らかにした。興味深いことに発癌 Ras 発現下での Chk1 との結合を介した PGAM の機能は「非酵素的」であり、不活性型 PGAM 変異である R90W 変異の過剰発現は上記の細胞において野生型 PGAM と同程度に細胞増殖を促進した。従来、抗癌剤としての解糖系阻害剤の開発は、酵素活性阻害剤がその主流であったため、甚大な副作用により、実用化できていなかった。今回の我々の見出した「PGAM の非酵素活性」により、通常細胞の解糖系には影響の少ない形で、癌でのワールブルグ効果の阻害剤の開発が期待できる。これらの研究成果は、iScience 誌にて発表した(Mikawa et al., 2020)。

さらに本課題の期間中に、PGAM ノックアウトマウス及び PGam-Tg マウスの全身糖代謝への影響を PLOS One 誌にて発表した(Mikawa et al., 2021)。また、愛媛大学の山下政克教授との共同研究により、T 細胞依存性免疫応答における解糖代謝の役割を解析(Toriyama et al., 2020)、熊本大学石本崇胤准教授との共同研究により、膵管腺癌での PGAM の役割を解析した(Itoyama et al., 2021)。今後さらに解析を進め、解糖系代謝と慢性炎症の連関を明らかにし、癌を含む加齢性疾患の治療に繋げたい。

参考文献

Itoyama, R., Yasuda-Yoshihara, N., Kitamura, F., Yasuda, T., Bu, L., Yonemura, A., Uchihara, T., Arima, K., Hu, X., Jun, Z., *et al.* (2021). Metabolic shift to serine biosynthesis through 3-PG accumulation and PHGDH induction promotes tumor growth in pancreatic cancer. *Cancer Lett* 523, 29-42.

Mikawa, T., Maruyama, T., Okamoto, K., Nakagama, H., Leonart, M.E., Tsusaka, T., Hori, K., Murakami, I., Izumi, T., Takaori-Kondo, A., *et al.* (2014). Senescence-inducing stress promotes proteolysis of phosphoglycerate mutase via ubiquitin ligase Mdm2. *J Cell Biol* 204, 729-745.

Mikawa, T., Shibata, E., Shimada, M., Ito, K., Ito, T., Kanda, H., Takubo, K., Leonart, M.E., Inagaki, N., Yokode, M., *et al.* (2020). Phosphoglycerate Mutase Cooperates with Chk1 Kinase to Regulate Glycolysis. *iScience* 23, 101306.

Mikawa, T., Shibata, E., Shimada, M., Ito, K., Ito, T., Kanda, H., Takubo, K., Shimada, A., Leonart, M.E., Inagaki, N., *et al.* (2021). Characterization of genetically modified mice for phosphoglycerate mutase, a vitally-essential enzyme in glycolysis. *PLoS One* 16, e0250856.

Nicholson, J., Scherl, A., Way, L., Blackburn, E.A., Walkinshaw, M.D., Ball, K.L., and Hupp, T.R. (2014). A systems wide mass spectrometric based linear motif screen to identify dominant in-vivo interacting proteins for the ubiquitin ligase MDM2. *Cell Signal* 26, 1243-1257.

Toriyama, K., Kuwahara, M., Kondoh, H., Mikawa, T., Takemori, N., Konishi, A., Yorozuya, T., Yamada, T., Soga, T., Shiraishi, A., *et al.* (2020). T cell-specific deletion of Pgam1 reveals a critical role for glycolysis in T cell responses. *Commun Biol* 3, 394.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 T Mikawa, E Shibata, M Shimada, K Ito, T Ito, H Kanda, K Takubo, ME Lleonart, N Inagaki, M Yokode, H Kondoh.	4. 巻 23
2. 論文標題 Phosphoglycerate mutase cooperates with Chk1 kinase to regulate glycolysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 585-600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101306.	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 該当する
1. 著者名 K Toriyama, M Kuwahara, H Kondoh, T Mikawa, N Takemori, A Konishi, T Yorozuya, T Yamada, T Soga, A Shiraishi, M Yamashita.	4. 巻 3
2. 論文標題 The critical role of glutamine-dependent glycolytic activation in regulating T-cell immune responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01122-w	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 -
1. 著者名 M Kameda, T Mikawa, M Yokode, N Inagaki, H Kondoh.	4. 巻 21
2. 論文標題 Senescence research from historical theory to future clinical application.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Geriatr. Gerontol. Int	6. 最初と最後の頁 125-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ggi.14121.	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 -
1. 著者名 Mikawa T, Shibata E, Shimada M, Ito K, Ito T, Kanda H, Takubo K, Shimada A, Lleonart ME, Inagaki N, Yokode M, Kondoh H	4. 巻 16
2. 論文標題 Characterization of genetically modified mice for phosphoglycerate mutase, a vitally-essential enzyme in glycolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0250856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0250856	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 -

1. 著者名 Itoyama R, Yasuda-Yoshihara N, Kitamura F, Yasuda T, Bu L, Yonemura A, Uchihara T, Arima K, Hu X, Jun Z, Okamoto Y, Akiyama T, Yamashita K, Nakao Y, Yusa T, Kitano Y, Higashi T, Miyata T, Imai K, Hayashi H, Yamashita Y, Mikawa T, Kondoh H, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 523
2. 論文標題 Metabolic shift to serine biosynthesis through 3-PG accumulation and PHGDH induction promotes tumor growth in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 29-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.09.007	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三河拓己、近藤祥司
2. 発表標題 解糖系酵素PGAMとChk1による新規解糖系制御機構の解析
3. 学会等名 MBSJ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三河 拓己
2. 発表標題 解糖系酵素PGAMによる新規解糖系制御機構
3. 学会等名 第30回日本老年医学会近畿地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三河 拓己
2. 発表標題 PGAMモデルマウスの解析
3. 学会等名 第63回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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