

平成 23 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590696

研究課題名（和文） 細胞老化から癌化への転換に重要な解糖系代謝シフトの研究

研究課題名（英文） A study for an essential metabolic shift in glycolytic pathway observed during the transition from cellular senescence to carcinogenesis

研究代表者 近藤 祥司 (KONDOH HIROSHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80402890

研究成果の概要（和文）：

「癌化とはストレス老化という生体バリアーの破壊・回避の結果」という仮説がある。近藤は、長寿遺伝子として解糖系酵素ホスホグリセリン酸ムターゼ PGM 単離を端緒に、「癌でのストレス老化シグナル減弱は、解糖系亢進(ワールブルグ効果)が原因か」という疑問を持った。PGM の上流・下流分子機構検証し、PGM 結合蛋白新規ユビキチンリガーゼ UBLX1 の検証より、PGM ユビキチン化分子機構詳細を解明し、全身発現型 PGM トランスジェニックマウスモデル作成した。

研究成果の概要（英文）：

Stress-induced senescence is recently thought to be a barrier against carcinogenesis. We previously cloned the phosphoglycerate mutase (PGM) cDNA as senescence bypassing clone. We addressed the question why and how enhanced glycolysis could affect cellular senescence. We planned to clarify the molecular mechanism of regulation and physiological impact of PGM. During these attempt, we cloned a PGM binding protein as a novel ubiquitin ligase, called UBLX1. Also we established PGM transgenic mice model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：内科学一般

科研費の分科・細目：老年医学

キーワード：細胞老化、癌化、解糖系代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) ストレス老化研究の重要性について
細胞老化には、テロメア依存性（複製老化）以外に、テロメア非依存性も知られている。後者はテロメア長に関わらず何らかのストレスで誘導される（Sherr & DePinho, Cell 2000）。テロメア非依存性細胞老化は、臓器傷害（Nojiri 他、JBC 2006）・幹細胞多能性維持（Ito 他、Nat Med 2006）・個体老化（Matheu 他、Nature 2007）などにも関するという生物学的意義が判明しつつある。

中でも重要なのは、「初代細胞におけるテロメア非依存性老化は細胞不死化・癌化に対する生理的バリアーである」という仮説（老化バリアー仮説）が、*in vivo*と*in vitro*で証明されつつある点である（Serrano 他、Cell 1997, Braig 他、Nature 2005, Chen 他、Nature 2005）。

(2) 解糖系代謝とストレス老化について

本申請者近藤は、老化抑制 cDNA スクリーニングの結果、解糖系亢進という代謝シフトが 1) テロメア非依存性細胞老化抑制や 2) ES 細胞増殖維持に重要であることを報告した（Kondoh 他、Cancer Res 2005, Kondoh 他、Antioxi Redox Sig 2007）。癌細胞の解糖系亢進は、ワールブルグ効果の名で知られているが、酸素 20% 条件下でも培養癌細胞がワールブルグ効果を示す原因は謎だった（Gatenby & Gillies Nat. Rev. Cancer 2004）。

2. 研究の目的

(1) ストレス老化における解糖系代謝の重要性の確立

我々は、ワールブルグ効果の新たな側面として「解糖系亢進による抗老化・抗酸化ストレス効果」という仮説（抗老化・抗酸化ストレス仮説）を提唱している（Kondoh 他、Drug Disc Today 2005）。上記の二つの仮説（老化バリアー仮説と酸化ストレス軽減仮説）より、老化から癌化（不死化）への転換には解糖系亢進が必須と推測される。その分子機構解明には、*in vivo*と*in vitro*での解糖系亢進の上流（新規制御系）と下流（抗老化効果の分子メカニズム）の研究が重要であると考え、その解明を目的とした本計画を立案した。

(2) 解糖系酵素 PGM を中心とした老化研究

我々は以前、テロメア非依存性老化する代表株マウス初代繊維芽細胞 MEF（Mouse Embryonic Fibroblast）を用いて、レトロウ

イルス cDNA ライブラリーによる老化抑止スクリーニングを行い、解糖系代謝酵素ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGM）による抗老化・抗酸化ストレス効果を見出し報告し、この PGM が老化から癌化への変換のカギとなる解糖系酵素であると推測し、その上流と下流の分子機構解明を目指した。具体的には上流に関しては、PGM のユビキチン依存性分解による蛋白制御の解明、下流に関しては、全身発現型 PGM トランスジェニックマウス（PGM-Tg）作成による、その効果の解明とした。

3. 研究の方法

上述のごとく、我々は長寿遺伝子として解糖系酵素 PGM のクローニングに成功していたので、PGM を突破口として、その上流・下流の分子機構解明を目指した。

(1) 上流に関しては、まず、独自に抗 PGM ポリクローナル抗体を作成し、PGM 蛋白分解を観察できる準備を整えた。一般にユビキチン化蛋白分解の過程には、前段階としての蛋白リン酸化や特異的ユビキチン化リガーゼが重要と知られている（K Nasmyth, Cell 2001）。最近、Pak1 キナーゼが PGM に直接結合しリン酸化することが報告された（Barak 他 JBC 2002）。そこで、Pak1cDNA をクローン化し、PGM 蛋白量への影響を調べることにした。次に PGM 特異的ユビキチンリガーゼの解明が課題となる。そこで、PGM 結合蛋白の探索を通じて、PGM ユビキチン化リガーゼ同定を試みた結果、新規ユビキチンリガーゼ UBLX1 のクローニングに成功した。よって、PGM、Pak1 キナーゼ、UBLX1 の3者の分子関係の詳細な解明を、我々の持つリエージェント（PGM 抗体や PGM 結合蛋白）を駆使して解明することを、第一義とした。

(2) 下流に関しては、CAG プロモーター下の PGM 発現マウスの作成し、その全身・個体寿命への効果や、生活習慣病モデルでの影響の検証を予定した。

(3) さらに同時に、老化制御のさらなる新規遺伝子獲得も同時進行で行った。

4. 研究成果

(1) PGM の上流制御機構に関して。

低酸素で誘導される転写因子 HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) が解糖系酵素の多くを直接制御することより (Iyer 他、Gen & Dev. 98)、ワールブルグ効果は固形腫瘍内低酸素条件に対する環境適応と従来解釈されてきた。しかし酸素 20% 条件下でも培養癌細胞が解糖系亢進を示す点は、HIF-1 では説明できず、謎だった (Gatenby 他 Nat. Rev. Cancer 04)。興味深い事に我々が長寿遺伝子として単離した解糖系酵素 PGM は、HIF-1 で制御されない唯一の例外だ (図 1)。長年の謎である「ワールブルグ効果(癌の解糖系亢進)が、癌化の結果なのか、原因か、」という命題に対し、我々は解糖系酵素 PGM という突破口を得た。そして老化の観点からの PGM 制御機構解明を目指した。

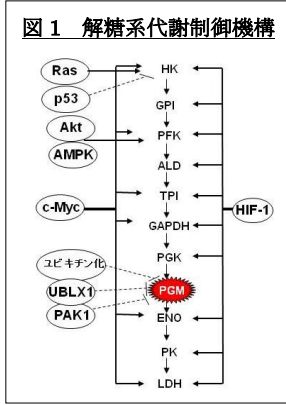
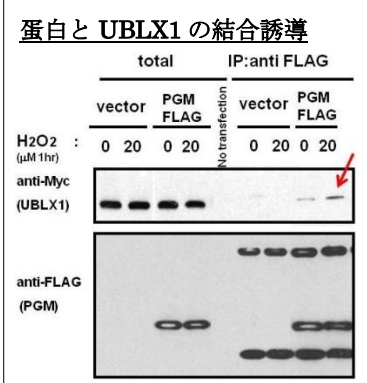


図 1 解糖系代謝制御機構

(2) 新規ユビキチンリガーゼ UBLX1 の解明。

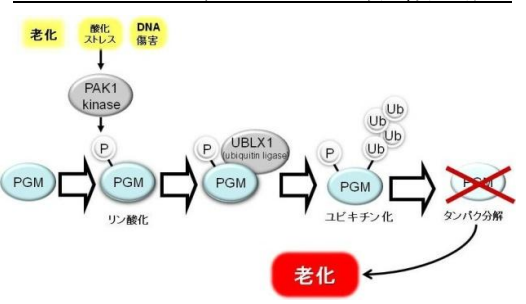
次に我々がクロニングに成功した新規ユビキチンリガーゼを、UBLX1 と名付けた。UBLX1 は、免疫沈降法により PGM 蛋白との共沈を確認した。UBLX1 は PGM の蛋白量減少を促進する。次に抗 PGM 抗体を利用して、老化やストレスの条件により内在性 PGM の不安定化・減少を確認した。我々はストレス刺激により PGM と UBLX1 の結合効率が上昇する事を見出した (図 4)。この結

図 4. 酸化ストレスによる PGM 蛋白と UBLX1 の結合誘導



合は Pak1 依存性であった。さらに Pak1 の細胞導入は、細胞老化を誘導することを見出した。この条件では PGM 活性や解糖系代謝効率も半減する。よって、Pak1 による細胞老化の原因の一つは、PGM 蛋白ユビキチン化と推測した。

図 5. ユビキチン化による PGM 分解分子機構



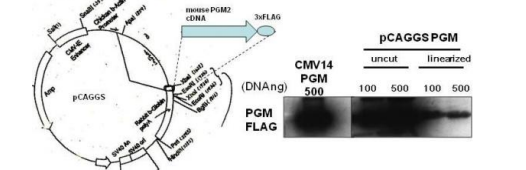
以上より、老化の過程で、PGM ユビキチン化を促進する制御因子の一つは Pak1 キナーゼと推定される。それと同様に、様々なストレス (酸化ストレスや DNA 障害) が PGM のユビキチン化分解を促進することが判明した (図 3)。

以上の結果より、PGM のユビキチン化による細胞老化という全く新しい生命現象と、その意義の分子機構が解明された (図 5)。今年中に、上記内容を論文投稿の予定。

(3) PGM トランスジェニックマウス作成

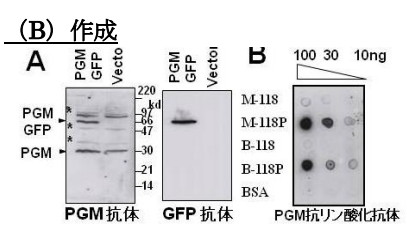
次に、下流に関しては、このような PGM による解糖系代謝シフトが実際に個体レベルで老化から癌化への転換に重要かという点にある。よって我々は、上述の

図 6. pCAAGPGM プラスミド(左)の培養細胞発現(右)



まず、Pak1 キナーゼによるリン酸化の PGM 蛋白への影響を調べ

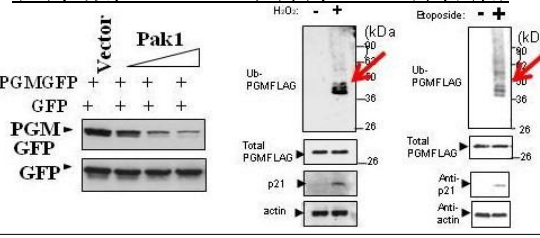
図 2 PGM 抗体(A)とリン酸化抗体



た所、ユビキチン化蛋白分解が促進されることが判った。さらに、Pak1 による PGM リン酸化部位であるセリン 118 残基特異的な抗リン酸化抗体を作成した (図 2)。興味深いことに、老化の過程で PGM セリン 118 リン酸化は激変することが確認された。以上より、老化の過程で、PGM ユビキチン化を促進する制御因子の一つは Pak1 キナーゼと推定される。それと同様に、様々なストレス (酸化ストレスや DNA 障害) が PGM のユビキチン化分解を促進することが判明した (図 3)。

図 3. PGM 蛋白分解 (矢印) ; Pak1 による

(左)、酸化ストレス下(中)、DNA 障害(右)



今年中に、上記内容を論文投稿の予定。

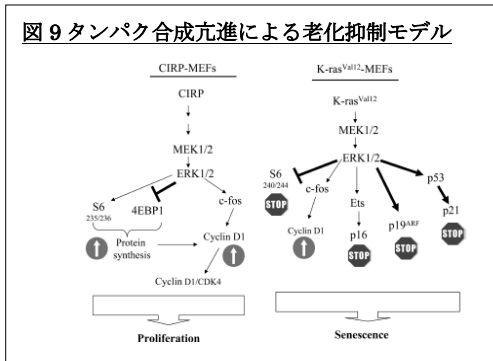
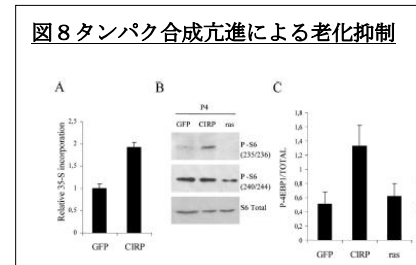
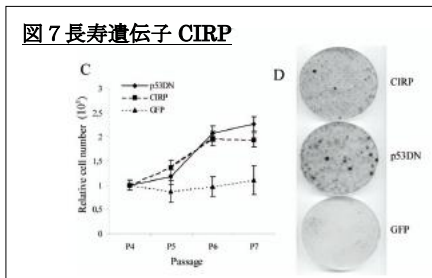
PGM の生物学的効果の検証の有効なツールとして PGM 発現トランスジェニックマウスモデルの作成を計画した。チキンβアクチンプロモーター下全身発現型 PGM のプラスミド完成し(図6)、その培養細胞発現も確認した。この線状化断片を ES 細胞に打ち込み F0 の 3 匹成功例を確認。2010 年 12 月頃に F1 ファウンダー 4 匹の獲得確認した。我々の作成した PGM トランスジェニックマウスは全身発現型なので、その表現形は、多岐にわたる可能性がある。今後、PGM トランスジェニックマウスでの、個体老化や様々な生活習慣病(動脈硬化、肝臓障害、糖尿病、高脂血症、骨粗鬆症、発癌など)への影響を検討する予定である。

(4) 新規長寿遺伝子発見

同時並行で、我々は、スペインのマチルダ・レオナルド博士と共同研究で、新規

の老化抑制スクリーニングを開始した。すなわち、ES 細胞や癌細胞由来の新規の cDNA ライブラリーを作成し、それをもとにスクリーニングを行えば、新規の長寿遺伝子獲得できると推測した。その結果、CIRP (Cold-inducible RNA-binding protein) (図7)とリボソーム蛋白 Rplp1 という二つのタンパク合成にかかわる蛋白のクローニングに成功した。これらは大量発現により、老化抑制効果を発揮し、その際、蛋白合成の促進が見られることが判明し(図8、図9)、それぞれ、発表論文5)、6)の形で報告した。

以上のように、本計画は、基盤 C の研究費により、確実な成果と進展を見せ、下記のごとく、具体的な論文発表、学会発表へと結びついた。



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 20 件)

- 1) T Izumi, K Shirakawa, M Matsui, K Io, M Shinohara, M Kawahara, M Kobayashi, H Kondoh, N Misawa, Y Koyanagi, T Uchiyama, and A Takaori-Kondo. HIV-1 Vif interacts with p53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2011 in press 査読有
- 2) H Kondoh, H Inoue, A Takaori-Kondo, T Mikawa and M Minami. Regulatoral Role of Mitochondria on Ageing and Senescence. *Horizons in DNA Research*, Volume 1 by Nova, New York, 2010 p235-240 査読有
- 3) H Kondoh and T Maruyama. The anti-ageing effect of enhanced glycolysis; another role of the Warburg effect. *Glycolysis: Regulation, Processes and Diseases*. Published by Nova, New York, 2009 p171-178 査読有
- 4) H Kondoh and T Maruyama. Bypassing senescence; a booster for cell proliferation. *Handbook of Cell proliferation*. Published by Nova, New York, 2009 363-70 査読有
- 5) Artero-Castro A, Kondoh H, Fernández-Marcos PJ, Serrano M, Y Cajal SR, Leonart ME. Rplp1 bypasses replicative senescence and contributes to transformation. *Exp Cell Res*. 2009 p1372-83. 査読有
- 6) Artero-Castro A, Callejas FB, Castellvi J, Kondoh H, Carnero A, Fernández-Marcos PJ, Serrano M, Ramón y Cajal S, Leonart ME. Cold-inducible RNA-binding protein bypasses replicative senescence in primary cells through extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation. *Mol Cell Biol*. 2009 (7):1855-68. 査読有
- 7) Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T. MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology*. 2009 Jan 7:6:1. 査読有
- 8) Leonart ME, Artero-Castro A, Kondoh H. Senescence induction; a

- possible cancer therapy. Mol Cancer. 2009;8:3. 査読有
- 9) **H Kondoh**. The role of glycolysis in cellular immortalization. Cellular Respiration and Carcinogenesis. Published by Humana, Texas 2009 p 91-102 査読有
 - 10) **H Kondoh T Maruyama** and M Lleonart. Senescence as a target of cancer therapy. Open Pathology 2008 2,57-62 査読有
 - 11) **H Kondoh**. Cellular life span and the Warburg effect. Exp Cell Res 2008 314, 1923-28 査読有
 - 12) **H Kondoh**, M E. Lleonart, Y Nakashima, **T Maruyama**, **M Yokode**, M Tanaka, D Bernard, and J Gil. A common metabolic profile shared between murine ES cells and primary cells bypassing senescence. Medical Hypotheses and Research 2008.4.29-36 査読有

他日本語論文多数

[学会発表] (計 56 件)

- 1) **近藤祥司** 2011 年 5 月 21・22 日 第 20 回日本創傷・オストミー・失禁管理学会 金沢 老化はなぜ進むのか? 「老化研究とアンチエイジング医療の取り組み」
- 2) **近藤祥司** 2011 年 3 月 9 日 第 18 回 Cardiovascular-Diabetes Meeting in Hiroshima 広島大学病院 特別講演 60 分 「老化はなぜ進むのか? 生体防御システムとしての老化」
- 3) **近藤祥司** 2011 年 3 月 4 日 国立遺伝研 三島 特別講演 60 分「Protective role of enhanced glycolysis in primary cells against the senescence effect of oxidative damage. ~ Beyond the Warburg effect~」
- 4) **近藤祥司** 2011 年 1 月 29 日 第 7 回 老化とアンチエイジング研究会 京都 「~遺伝子から見た老化~ 老化はなぜ進むのか?」
- 5) **近藤祥司** 2011 年 1 月 22 日 加齢医学研究会名古屋 30 分 「ストレス老化シグナルによる解糖系代謝調節の誘導する生体防御バリアー機構 ~Beyond the Warburg effect」
- 6) **近藤祥司** 2010 年 12 月 3 日 第 11 回 FERM 研究会 (Fibrosis & Emphysema Research Meeting) 東京医科大学 60 分 「老化はなぜ進むのか? 遺伝子から見た老化」
- 7) **近藤祥司** 2010 年 11 月 13 日 生化学若手会近畿支部秋セミナー 草津 60 分 「老化はなぜ進むのか? 新たな老化仮説としての解糖系代謝研究」
- 8) **近藤祥司** 2010 年 11 月 5 日 CIA 研究会特別講演 大分 60 分 「老化はなぜ進むのか? 生体防御システムとしての老化」
- 9) **近藤祥司** 2010 年 11 月 4 日 慶応大学山形分校特別講義 鶴岡 60 分 「老化はなぜ進むのか? 生体防御システムとしての老化」
- 10) **近藤祥司** 2010 年 10 月 27 日 国立長寿研 大府 60 分 「細胞老化制御において重要な解糖系代謝・蛋白合成系プロファイルシフト」
- 11) **近藤祥司** 2010 年 6 月 17 日 第 33 回基礎老化学会 名古屋 30 分 「解糖系代謝や細胞成長プロファイルのシフトによる細胞老化抑制機構」
- 12) **近藤祥司** 2010 年 5 月 28 日 第 9 回核ダイナミクス研究会 伊豆 15 分 「細胞老化制御において重要な解糖系代謝・蛋白合成系プロファイルシフト」
- 13) **近藤祥司** 2010 年 5 月 19 日 大分大学医学部大学院特別講演 大分 60 分 「遺伝子から見た老化」
- 14) **近藤祥司** 2010 年 5 月 13 日 京大 iPS センター特別講演 60 分 「新たな老化仮説としての解糖系代謝研究; Beyond the Warburg effect」
- 15) **近藤祥司** 2009 年 12 月 2 日 第 4

- 回「分裂と停止の細胞制御に係る国際ワークショップ」沖縄 20分「A novel shift in metabolic & growth-related profile is essential for bypassing senescence.」
- 16) 近藤祥司 2009年6月19日 第8回核ダイナミクス研究会 伊豆 20分 「新たな老化仮説としての解糖系代謝研究～Beyond the Warburg effect」
- 17) 近藤祥司 2009年6月18日 日本老年医学会招待講演 横浜 20分 「エイジングにおける解糖系代謝」
- 18) 近藤祥司 2009年4月9日 慶応大学医学部眼科教室招待講演 東京 60分 「糖系に関する基礎老化研究の成果」
- 19) 近藤祥司 2009年3月22日 日本循環器病学会総会 大阪 招待講演 18分 「Beyond the Warburg effect; Protective role of enhanced glycolysis via bypassing senescence」
- 20) 近藤祥司 2009年3月5日 日本再生医療学会総会 東京 招待講演 20分 「新たな老化仮説としての解糖系代謝研究～Beyond the Warburg effect」
- 21) 近藤祥司 2008年9月20日 第1回Symphony (東京) 20分 「新しい老化仮説としての解糖系代謝研究; Beyond the classical Warburg effect」
- 22) 近藤祥司 2008年9月13日 第1回心腎代謝と老化研究会 CRMS 30分 東京 「新たな老化仮説としての解糖系代謝研究～アンチエイジング基盤研究の取組みとオルメサルタンのアンチエイジング効果について」
- 23) 近藤祥司 2008年5月15日 久留米大学医学部大学院特別講義 60分 久留米 「老化とアンチエイジング」
- 24) 近藤祥司 2008年4月8日 The 3rd International Workshop on Cell regulation in Division and Arrest under stress 20min

Okinawa 「Why ES cells are immortal as primary cells?」

他多数講演あり

〔図書〕(計1件)

「老化はなぜ進むのか」近藤祥司著
講談社ブルーバックス 2009年12月20日出版 総ページ198ページ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lab-accel.jp/kondoh/index.html>

近藤は、老化研究と同時進行で、その研究を臨床や社会に還元することを目的として、日本の国立大学病院としては最初のアンチエイジング外来を設立した第一人者でもある。その成果は、上述の論文発表、招待講演、図書発刊(「老化はなぜ進むのか」近藤祥司著 講談社ブルーバックス 2009年12月20日出版)などに見られる実績としてあげられる。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 祥司 (Hiroshi Kondoh)
京都大学医学研究科・助教
研究者番号: 80402890

(2) 研究分担者

横出 正之 (Masayuki Yokode)
京都大学医学研究科 教授
研究者番号: 20252447

丸山 雄史 (Takeshi Maruyama)
京都大学医学研究科 研究員
研究者番号: 70467463