

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号： 32666
 研究種目： 基盤研究（B）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22390062
 研究課題名（和文）
 グルコース代謝の制御を介した癌化の誘導と p53 による癌化抑制機構の解析
 研究課題名（英文） Mechanisms underlying oncogenesis by deregulation of glycolysis and p53-mediated tumor suppression.
 研究代表者
 田中 信之（TANAKA NOBUYUKI）
 日本医科大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号： 80222115

研究成果の概要（和文）：我々は、癌抑制因子 p53 がグルコース代謝を制限しており、p53 の機能が失われるとエネルギー産生が亢進し、このことが癌化に重要であることを、培養細胞を用いて明らかにしてきた。そこで、生体での癌化におけるグルコース代謝の役割を、炎症誘発大腸癌発症モデルを用いて解析した結果、炎症組織では IL-6 を介してグルコース代謝が亢進すると共に、p53 の細胞増殖抑制作用が減弱しており、このことが癌化に重要であると推測された。

研究成果の概要（英文）：We found that tumor suppressor p53 hampers aerobic glycolysis, and that enhanced energy provision by loss of p53 is important for oncogenesis *in vitro*. To identify the role of enhanced glycolysis in cancer development *in vivo*, we analyzed these effects in colitis-induced colon cancer. In colitis tissues, glycolysis was enhanced by IL-6, and p53-induced cell growth suppression was attenuated, suggesting that these effects are important for tumorigenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

代表的な癌抑制因子である p53 は、標的遺伝子群の発現誘導を介して細胞周期、アポトーシスの制御を行っており、これらの生理機能

の総和として癌化を抑制していると考えられている。多くのヒト癌細胞で p53 遺伝子の変異が報告されており、実際に p53 が癌化の抑制に重要であることは、p53 遺伝子欠損マ

ウスが高頻度に腫瘍が発生することから証明されている。p53 による癌化の抑制機構として遺伝子の変異を抑制する、染色体の安定性を保つことが考えられている。このような作用に加えて、p53 欠損マウス由来の胎児繊維芽細胞 (MEF) を用いた実験から、癌遺伝子が活性化した細胞を p53 が積極的に排除する機構が存在することが明らかになっている。正常の MEF は、DNA 損傷刺激によって細胞周期が停止するが、c-myc、活性化型 ras、アデノウイルス E1A 等の癌遺伝子を導入した細胞は DNA 損傷刺激が加わると速やかにアポトーシスが誘導されることが報告されている。また、活性化型 ras 遺伝子を導入した MEF は 1 週間ほど継代すると老化様の形態をとって細胞増殖が停止することも報告されている。最近の報告から (Nature, vol. 434, pp864-870, 2005) 早期の腫瘍組織や癌遺伝子を導入した細胞では DNA 損傷応答と同じ ATM/ATR や Chk1/2 の活性化がおきていることが報告された。これはまさに p53 を活性化する経路であり、癌遺伝子が活性化した細胞でのオンコジェニックストレスの実態が明らかになりつつあると考えられる。癌遺伝子を導入した細胞は、それ自体ではトランスフォームして腫瘍形成能を獲得することはないが、将来的に他の遺伝子に変異が蓄積することで癌化しやすくなっていると考えられる。このような癌遺伝子が活性化した細胞に対して、p53 が特異的にアポトーシスや老化を誘導することで積極的に排除するということは、それこそが p53 の重要な癌化の抑制機構であると考えられる。申請者は p53 欠損細胞では活性化型 ras 遺伝子によるアポトーシスの誘導がみられないと共に、活性化型 ras 遺伝子単独でトランスフォームすることを発見し報告した (Cell, vol. 77, pp. 829-839, 1994)。更に、p53 による癌遺伝子活

性化細胞の排除機構を解析する過程で p53 によって発現誘導される新規 Bcl-2 ファミリー分子 Noxa を同定し p53 によるアポトーシス誘導に重要であることを明らかにしてきた (Science, vol. 288, pp1053-1058, 2000; Genes Dev., vol. 17, pp. 2233-2238, 2003)。このような研究を経て、p53 欠損胎児線維芽細胞 (MEF) や変異体 p53 を発現させた正常 MEF では転写因子 NF- κ B の活性が恒常的に高いことを発見した。NF- κ B は多くの癌細胞で恒常的に活性が上昇していることが知られており、癌化に関与することが想像されてきた転写因子である。そこで、申請者が以前に発見した p53 欠損細胞は癌遺伝子を単独で遺伝子導入することでトランスフォームする現象に、NF- κ B の活の活性化が関与するかを解析した結果、この現象が NF- κ B に依存していることを発見した。更に、活性化した NF- κ B がグルコーストランスポーター GLUT3 の発現を誘導し、それによって起こるグルコース代謝の亢進が、この現象に重要であることを見いだした。更に、p53 欠損細胞で起こるグルコース代謝の亢進が、NF- κ B を活性化するキナーゼである IKK の活性化を誘導することを見いだした。これにより、p53 欠損細胞では IKK-NF- κ B-グルコース代謝経路の活性化がポジティブフィードバック経路を解して増幅していき、このことがエネルギー産生を亢進しいて癌化に促進的に働いていることを発見した。このように、p53 による癌化の監視機構が無くなった細胞で、腫瘍形成能を獲得する、即ち、ポジティブな増殖及び進展能を獲得する為には、p53 によって制限されていた NF- κ B-グルコース代謝の亢進が重要であるという癌化の新しいメカニズムを発見して報告した (Nat. Cell Biol., vol. 10, pp. 611-618, 2008)。また、このポジティブフィードバック機構を IKK の O-GlcNAc

修飾が制御していることを報告した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 106, pp. 3431-3436, 2009)。癌細胞が、ミトコンドリアでの呼吸経路を使わずに、解糖系を主なエネルギー源として増殖していることは古くから知られており、Warburg effect と呼ばれている。このような変化は、酸素消費を減らして腫瘍が増大することに有利に働いていると考えられており、p53 が重要な制御因子であるという発見は最先端をいくものと考えている。

2. 研究の目的

上記の解析から、p53 欠損細胞ではグルコース代謝が亢進することが腫瘍形成能力を獲得することに重要であることが明らかとなった。そこで、この現象が生体レベルでもあてはまるかを、マウス発癌モデル実験系を用いて明らかにすることを第一の目的とする。この目的で、腸の炎症誘発癌化の実験系を使用する。この経路では、既に NF- κ B 及び Stat3 の経路が重要であることが報告されている (Cell vol. 118, pp. 258-296, 2004; Cancer Cell, vol. 15, pp. 103-113, 2009)。そこで、炎症性サイトカインによるグルコース代謝の変化を解析した結果、IL-6-Stat3 の経路が顕著に解糖系を亢進させることを見いだした。更に、この系による炎症組織及び腫瘍組織両方で、Stat3 及び NF- κ B 経路の活性化と GLUT3 を始めとするグルコーストランスポーター及び解糖系の酵素群の遺伝子発現が亢進していた。このことから、炎症が起こる微小環境では、グルコース代謝が亢進しており、腫瘍化及び腫瘍細胞の維持・進展に有利に働いていることが想像される。また、NK- κ B 経路の活性化は p53 が正常に機能している時は起こらないことから (前述)、炎症組織では p53 の機能抑制が同時に起こっていることが推測される。そこでその現象について解析すると共に、炎症誘発腫瘍

組織で炎症を収束させると p53 機能が回復して腫瘍組織の退縮が起こるかを解析し、癌の予防・治療法の開発を目指す。また、グルコース代謝以外の代謝経路を解析して、発癌における代謝の異常及びその重要性を明らかにする。更に、グルコース代謝の亢進がどのようにして腫瘍形成能の獲得に至るのかの分子機構を明らかにすることを目的としている。更に、これらの機構がいかんして p53 によって制御されているのかを明らかにすることで、p53 による癌化の抑制の分子機構を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 既に、炎症性サイトカインによるグルコース代謝の変化を解析した結果、IL-6 が顕著に解糖系を亢進させることを始めて見いだしている。この作用は、Stat3 による解糖系酵素の直接の発現誘導によるものであることを見いだしている。そこで、炎症誘発癌の実験系であり、IL-6 シグナル経路が発癌に関わることが証明されている Azoxymethane (AOM)/dextran sulfate sodium salt (DSS) 誘発性大腸炎-発癌モデルを解析した。その結果、これらの酵素を含む様々なグルコース代謝経路の制御因子の発現の亢進が、腫瘍組織及びその周辺の炎症組織で観察された。そこで、この炎症誘発腫瘍の発生における IL-6-Stat3-グルコース代謝の役割を解析する。更に、炎症誘発性腫瘍の発生においては何らかの機構で p53 の機能が抑制されている可能性がある。そこで、炎症性サイトカインによる p53 の機能制御について解析すると共に、この発癌系で腫瘍が発生した後に抗炎症剤を用いることで p53 の機能が回復するか、回復した p53 が腫瘍の排除に働くのかをマウス個体を用いて解析する。更に、発癌におけるグルコース代謝の重要性を明らかにする目的で、解糖系の抑制剤 2DG 等を投与するこ

とでの影響を調べる。

(2) p53 欠損細胞がトランスフォームするのに必要なシグナルは何かを明らかにする。細胞に GLUT3 を強制発現させるだけではグルコース消費の上昇は見られなかった。このことは、グルコースの取り込みのみでは解糖系を亢進させるのに十分ではないことを表している。そこで、p53 欠損細胞にこれらの酵素を発現させて解析すると共に、ras の下流のシグナル分子を発現させ、p53 欠損細胞がトランスフォームするのに最低限必要なシグナルを明らかにする。

(3) 上記の解析で、炎症による組織破壊・修復の過程では、炎症性サイトカインの他に組織修復に必要なシグナルも関わっている。我々は、食道癌、胃癌、肺癌等多くの癌細胞で恒常的に活性が亢進している Hedgehog シグナルが Mdm2 の活性化を介して p53 の分解を促進する現象を初めて発見した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.105, 4838-4843, 2008)。Hedgehog シグナルは組織修復過程で働くものであり、上記の慢性炎症・発癌モデルでの解析系での Hedgehog シグナル分子の解析を行う。同時に、この発癌系で Hedgehog シグナルの抑制が p53 の抑制を介した癌化の誘導を抑制するかを、cyclopamine 等の薬剤を用いて解析する。これらの研究により、初期腫瘍組織で Hedgehog 等の組織修復分子が p53 機能を抑えて腫瘍細胞の維持、癌幹細胞の維持を行っていることを実証する。

4. 研究成果

(1) AOM/DSS 誘発性大腸炎-発癌モデルを解析した。まず炎症反応による代謝の変化を解析した結果、解糖系の酵素 (hexokinase 2 及び 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3) を含む様々なグルコース代謝経路の制御因子の発現の亢進が、腫瘍組

織及びその周辺の炎症組織で観察された。更に、これらの解糖系の酵素の遺伝子発現が IL-6-Stat3 の経路によって誘導されることを見いだした。従って、炎症組織では解糖系の亢進により癌化しやすい環境にあると考えられる。そこで、この炎症誘発腫瘍の発生における IL-6-Stat3-グルコース代謝の役割を解析する目的で、解糖系の阻害剤 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) を投与して癌化への影響を調べた。その結果、驚くべきことに 2-DG により全く腸炎が起こらないことを見いだした。そのメカニズムを解析したところ、解糖系の阻害以外にマンノース代謝の阻害により炎症性サイトカイン受容体の高マンノース型の糖鎖修飾が阻害されて、そのことで IL-6, TNF- α , IL-1 等の炎症性サイトカインシグナルが抑制されることを見いだした。このように糖鎖修飾を阻害することで炎症反応を効果的に抑制することを見いだしたことは初めてであり、医学的にも重要な発見であると考えている。更に、炎症性サイトカインに関わる疾患である炎症性腸疾患の他に、関節リウマチのモデルであるコラーゲン誘発関節炎や敗血症モデルである LPS ショックの発症もこの抑えられることを見いだした。このことは特許出願中 (特願 2010-273704) であり、論文投稿中である。

(2) 炎症がどのようにして癌化を誘発するのかを解析した結果、DSS 腸炎を発症した大腸上皮ではアドリアマイシンを投与すると、p53 の活性化、CDK 抑制因子 p21 の発現誘導は起こるが、細胞周期の停止を引き起こさないことを見いだした。この現象を更に解析した結果、p21 の核への集積が、炎症反応によって抑制されること、この現象は解糖系の阻害によって起こらないことを見いだした。従って、癌遺伝子が活性化した細胞は p53 依存性に細胞分裂老化が誘導されて排除される

が、炎症が起こっているとこの排除機構が働かず、増殖することが可能となり、そのことが癌化につながることを推測された。そこで、p21 欠損マウスでの AOM/DSS 誘発性大腸腫瘍を調べたところ、腫瘍の発生率や大きさは野生型マウスと変わらなかった。そこで、炎症組織では p21 の機能が抑制されるために p21 遺伝子の有無に関係なく腫瘍が発生するのではいかと考え、p21 欠損マウスに変異原である AOM のみを投与して観察したところ、野生型マウスでは全く腫瘍が発生しないが、p21 欠損マウスでは多くの腫瘍が発生することを見いだした。更に、炎症組織では crypt の細胞の増殖が盛んであるが、この増殖は抗生剤を投与して腸内細菌叢を除去することで抑えられることを見いだした。従って、炎症組織ではグルコース代謝が亢進して癌化しやすいことに加えて、細菌感染を引きがねとして細胞増殖の誘導が盛んになり、更に p53-p21 による細胞増殖抑制作用が起こらない、言い換えると p53 による癌化の監視機構が抑制されるために癌が発生するのではいかと考えられた。現在、マウス個体及び腸の幹細胞の培養系を用いて解析している。

(3) hedgehog シグナル伝達系の解析から、その下流で働く転写因子 Gli1 が MEP50/PRMT5 メチロソーム複合体を形成してメチル化されること、メチル化された Gli1 は Itch/Numb ユビキチン化酵素と結合出来なくなり、安定化して活性化状態になることを見いだした。興味あることに、MEP50 の発現は IL-6 等の炎症性サイトカインや癌化に関わるチロシンキナーゼ群によって活性化する転写因子 Stat3 によって誘導され、その結果として Gli1 が活性化することを見いだした。更に、Src による細胞のトランスフォーメーションが Gli1 や MEP50 を抑制すると起こらなくなることから、癌化に重要であること、多くの

ヒト癌症例で MEP50 の発現と共に Gli1 及び Stat3 の標的遺伝子群の発現が亢進していることから、癌化に重要であることが推測され、現在論文を投稿中であり、炎症誘発癌における役割を解析していく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1) Nakajima, W., and Tanaka, N. Noxa induces apoptosis in oncogene-expressing cells through catch-and-release mechanism operating between Puma and Mcl-1. *Biochem Biophys Res Commun* 413, 643-648, 2011 査読有

2) Idrus, E., Nakashima, T., Wang, L., Hayashi, M., Okamoto, K., Kodama, T., Tanaka, N., Taniguchi, T., and Takayanagi, H. The role of the BH3-only protein Noxa in bone homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 410, 620-625, 2011 査読有

3) Ando, M., Uehara, I., Kogure, K., Asano, Y., Nakajima, W., Abe, Y., Kawauchi, K., and Tanaka, N. Interleukin 6 enhances glycolysis through expression of the glycolytic enzymes hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase-3. *J Nippon Med Sch*, 77, 97-105, 2010 査読有

4) Aikawa, T., Shinzawa, K., Tanaka, N., and Tsujimoto, Y. Noxa is necessary for hydrogen peroxide-induced caspase-dependent cell death. *FEBS Lett* 584, 681-688, 2010 査読有

[学会発表] (計 18 件)

1) Tanaka, N.: p53 hampers tumor development by inhibiting NF- κ B-glycolysis pathway. 第 33 回日本分子生物

学会年会、神戸、2010

2) 阿部芳憲：癌化に関わる新しい hedgehog 経路制御機構の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010

3) 上原郁野：糖代謝阻害剤による抗炎症効果の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010

4) 中嶋 亘：癌遺伝子 E1A 発現細胞では Noxa/Mcl-1 経路がアポトーシスの感受性を制御している. 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010

5) 田中信之：p53 による解糖系の制御と癌抑制及び癌化における役割. シンポジウム「がんの代謝調節」第 84 回日本生化学会大会、京都、2011

6) 阿部芳憲：癌化に関わる Hedgehog シグナル伝達経路と STAT3 活性化経路の新しいクロストーク. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011

7) 上原郁野：抗炎症効果を有する糖代謝阻害剤の機能解析. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011

8) 中嶋 亘：紫外線による p53 非依存性な細胞死誘導機構の解析. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011

9) 泉二祐輔：腫瘍の増大における HIF-1 とグルコース代謝の役割の解析. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011

10) 田中信之：Role of enhanced glycolysis in oncogenic transformation in culture cells and tumor development. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012

11) 阿部芳憲：新規 hedgehog シグナル伝達分子 WDR77 は EGFR シグナルの下流での STAT3 活性化による新しい Gli 活性化機構と細胞の癌化にも関与する. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012

12) 中嶋 亘：癌遺伝子 E1A 発現細胞におけ

る BH3-only 因子 Noxa/Puma によるアポトーシス誘導機構の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012

13) 阿部芳憲：新規 hedgehog シグナル伝達分子 WDR77 による癌化に関わる STAT3 を介した新規 Gli1 活性化機構. 第 35 回日本分子生物学会年会、博多、2012

14) 照沼美沙紀：アポトーシス誘導因子 Noxa タンパクの機能制御と癌化の抑制における役割第 35 回日本分子生物学会年会、博多、2012

15) 中嶋 亘：アポトーシス促進因子 Bax の BH2 ドメインによる制御と活性化機構の解析第 35 回日本分子生物学会年会、博多、2012

16) 谷村篤子：DSS 誘発腸炎マウスモデルでの p53-p21 経路の抑制第 35 回日本分子生物学会年会、博多、2012

17) 上原郁野：サイトカインレセプターの糖鎖修飾阻害による抗炎症作用の解析第 35 回日本分子生物学会年会、博多、2012

18) 田中信之：p53 による解糖系の制御とその癌抑制における役割第 35 回日本分子生物学会年会、博多、2012

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：炎症性サイトカインの機能を抑制する炎症性疾患治療剤

発明者：田中信之、上原郁野、他 3 名

権利者：同上

番号：特願 2010-273704

出願年月日：2011 年 12 月 8 日

国内外の別：国際

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nms.ac.jp/ig/moloncol/index.html>

6. 研究組織

研究代表者：田中 信之 (TANAKA NOBUYUKI)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80222115