

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2010～2011
課題番号：22659177
研究課題名（和文）転写因子 p53 による新たな代謝調節機能と代謝環境応答のエピジェネティクス制御機構
研究課題名（英文） Novel role of tumor suppressor p53 for metabolic control and epigenetic regulation upon a metabolic response

研究代表者

田中 知明 (TANAKA TOMOAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：50447299

研究成果の概要（和文）：

糖尿病が発癌リスクを高める一方、p53 遺伝的多型が生活習慣病に関与する事実が報告され、両者を結び共通の分子機構が注目されている。ゲノムワイド解析から p53 下流としてグルタミン代謝に関する Phosphate Activated Glutaminase (GLS2) を同定した。p53-GLS2 経路の解析ではグルタチオンを介した p53 依存的抗酸化作用と α ケトグルタル酸を介した好气的エネルギー産生機構が示された。肥満マウスの脂肪組織における GLS2 の発現増加に加え、*in vitro*・*vivo* における腫瘍抑制作用が確認された。GLS2 はグルタミン代謝を介して p53 による ROS・エネルギー代謝調節機能を担うことで、癌と生活習慣病を結ぶ分子機構に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Recent epidemiologic evidence suggests that type 2 diabetes and obesity are at significantly higher risk for many types of cancer. In this context, p53 has been shown to control mitochondrial functions through regulation of ROS and cell metabolism, implicating its potential role in biologic links between diabetes and cancer. Here we have explored p53 targets to regulate cell metabolism using ChIP- and RNA-sequencing and identified GLS2, a key enzyme to convert glutamine to glutamate, thereby a regulator of glutathione synthesis and ATP production via TCA cycle. GLS2 overexpression inhibited cancer cell growth as well as invasion in both *in vitro* and *vivo*, suggesting its potential role for tumor suppression. Thus, p53-GLS2 pathway may contribute to the common pathogenesis between life-style related diseases and cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	0	2,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	210,000	3,210,000

研究分野：医歯薬学

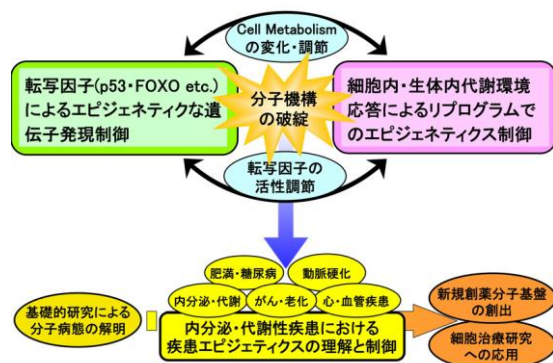
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：p53、転写因子、エネルギー調節、細胞内代謝、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病や肥満などの内分泌代謝性疾患において、細胞や生体レベルでの代謝環境が膵β細胞や脂肪細胞でのエピジェネティック変化を引き起こしゲノムに刷り込まれるという「代謝のリプログラミング仮説」が提唱されている。そして、我々の体の中では、細胞が外界からの刺激や代謝環境に応答して、核内の種々の転写因子がエピジェネティクス変化とそれに連動した遺伝子発現制御を通じて、細胞内代謝動態をコントロールしている。転写因子制御-Cell Metabolism 調節のクロストークにおける分子機構の破綻は、いわゆる疾患エピジェネティクスを引き起こし、がんや細胞老化、糖尿病や肥満、内分泌代謝性疾患の病態と深く関わっている(図1)。

図1. 転写因子・メタボロームのクロストークがもたらす疾患エピジェネティクス



一方で、ゲノムの守護神と呼ばれる転写因子 p53 は、DNA 傷害・酸化ストレスなどの細胞ストレスに応答して活性化し、ゲノムの酸化損傷に対して防御的に機能し癌抑制機能を発揮しているが、他にも血管新生制御・細胞老化・ホルモン調節を介した皮膚色素沈着など多彩な生理作用を有している。 α -MSH/POMC(pro-opiomelanocortin)が p53 の支配を受けることで、紫外線照射後の皮膚の色素沈着を制御している(Rutao et al, *Cell* 2007)ことや、糖代謝・オートファジー・ミトコンドリア呼吸機能にも関与していることなど、p53 の新たな機能や知見がトップジャーナルに報告されている。

実際に、癌や生活習慣病の病態において、

エピジェネティクス制御が重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。そして当然のことながら、転写因子とコファクターは、クロマチン機能調節・核内シグナル制御を介して標的因子を調節するプロセスにおいて、クロマチンの修飾動態が密接に関わっている。PPAR- γ や FOXO、HIF- α 、p53 など数多くの転写因子が、癌化のプロセスだけでなく細胞内代謝制御に関与している。この研究の特色として、癌と生活習慣病の共通分子シグナル経路に対して代謝環境応答・細胞内代謝制御と転写因子/クロマチン機能調節/epigenetics を直接的に結びつけるという新たな切り口からアプローチする。

2. 研究の目的

転写因子 p53 と Cell Metabolism 制御という新たな視点から、脂肪細胞や血管内皮での代謝環境応答によるエピジェネティクス制御における p53 転写因子複合体解析と細胞内代謝調節を司る新たな p53 下流遺伝子の探索を通じて、糖尿病内分泌・代謝性疾患におけるエピジェネティクスの統合的理解を目的に、新たな細胞治療の可能性にアプローチした。

3. 研究の方法

癌や生活習慣病の病態において、エピジェネティクス制御が重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。そこで、癌と生活習慣病の共通分子シグナル経路に対して代謝環境応答という新たな切り口から解析を行った。代謝環境変化時の p53 転写因子複合体ネットワークの生化学的解析とゲノムワイドでの epigenetics 解析を密接に結びつけて解析した。

(1) 次世代型シーケンサーを用いた ChIP-seq とトランスクリプトーム解析による細胞内代謝を制御する新規 p53 下流遺伝子の同定による新たな生理的役割の探索・代謝環境応答時の p53 依存的 epigenetics 解析

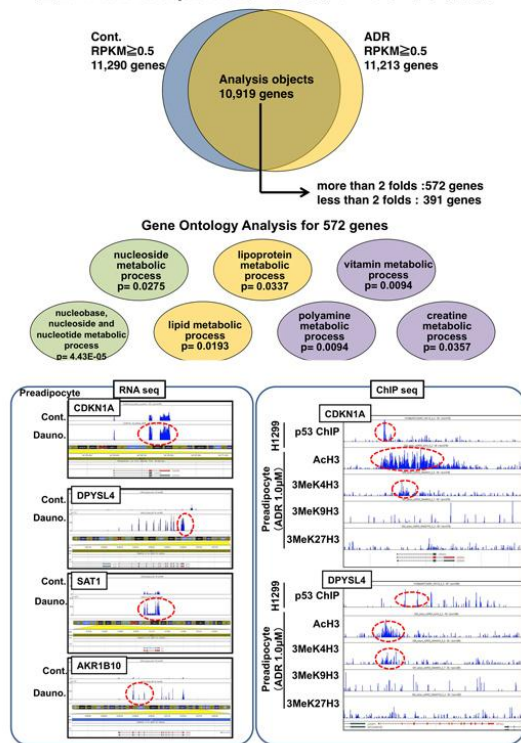
(2) プロテオミクスを用いた代謝環境応答

時の p53 クロマチン会合分子群の網羅的同定とその epigenetics に及ぼす機能の解析

4. 研究成果

次世代型シーケンサーを用いた ChIP-seq

図2. RNA Sequenceによるゲノムワイド解析



とトランスクリプトーム解析による細胞内代謝を制御する新規 p53 下流遺伝子の同定による新たな生理的役割の探索・代謝環境応答時の p53 依存的 epigenetics 解析を行った。p53 標的遺伝子として、核酸代謝に関わる酵素に高い相同性を持つ DPYSL4、ポリアミン代謝関連の SAT1 など 20 種類以上の遺伝子を同定した(図 2)。その中で、グルタミン代謝に関与する Phosphate Activated Glutaminase (GLS2) に注目した。GLS2 は主にミトコンドリアに局在しグルタミンを加水分解しグルタミン酸を供給する酵素だが、種々の細胞において p53 がその転写誘導を引き起こし、グルタミン代謝を調節していることが確認された。メタボローム解析や生化学的手法による p53-GLS2 経路の機能解析から、還元型グルタチオン産生を介した通じた ROS 調節を通じて p53 依存的抗酸化作用を発揮していた。

Warburg 効果に関連して、グルタミン酸から α ケトグルタル酸を介して TCA 回路に作用し、好氣的回路を経て ATP 産生と酸素消費量を正に司る仕組みが明らかとなった。マウス肥満モデルにおいて、高脂肪食負荷後の各脂肪組織で GLS2 の発現が有意に増加しており、エネルギー代謝との関わりが示唆された。一方、GLS2 による癌細胞の増殖・浸潤・転移の抑制効果に加えて、SCID マウスでの癌細胞皮下移植後の腫瘍形成を顕著に抑制し、癌抑制作用が示された。これらの結果は、GLS2 は細胞内グルタミン代謝を介して p53 による ROS・エネルギー代謝調節機能を担う重要な役割を果たしていることが明らかとなった。細胞レベルでのミトコンドリア機能制御能と肥満や腫瘍形成の動物モデル解析から、癌と生活習慣病を結ぶ分子機構に関与している可能性が示唆された。これらの知見や遺伝子群は、クロマチン制御とメタボリックストレス応答、細胞内代謝調節の接点で作用する機能的分子であることを示している。従って、糖尿病や肥満モデルにおける解析を更に押し進めることにより、新たな分子病態の解明と新しいタイプの治療薬開発に結びつくことが期待される。

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 7 件) 全査読有

- ① Sugiyama T, Suzuki S, Yoshida T, Mayama T, Hashimoto N, Suyama K, Tanaka T, Sueishi M, Tatsuno I. (2011) Age, Initial Dose and Dose Increase are Independent Risk Factors for Symptomatic Vertebral Fractures in Glucocorticoid-Treated Male Patients. Intern Med. 50(8):817-24.
- ② Toyoda A, Yokota A, Saito T, Kawana H, Higashi M, Suzuki Y, Tanaka T, Kitagawa M, Harigaya K. (2011) Overexpression of human ortholog of

mammalian enabled (hMena) is associated with the expression of mutant p53 protein in human breast cancers. *Int J Oncol.* 38(1):89-96.

- ③ Horiuchi S, Onodera A, Hosokawa H, Watanabe Y, Tanaka T, Sugano S, Suzuki Y, Nakayama T. (2011) Genome-Wide Analysis Reveals Unique Regulation of Transcription of Th2-Specific Genes by GATA3. *J Immunol.* 2011 Jun 1;186(11):6378-89. Epub 2011 May 2
- ④ Tatsuno I, Suzuki S, Yoshida T, Nagano H, Hashimoto N, Mayama T, Tanaka T, Sugiyama T. (2011) Disease-related risk of vertebral fracture during glucocorticoid treatment in collagen vascular diseases. *J Rheumatology* (in press), 2011.
- ⑤ 吉田知彦、田中知明、龍野一郎(2011) RAGE シグナルにおける骨芽/破骨細胞クロストーク。 *Osteoporosis Japan* Vol. 19, No4, 2011 p120-123.
- ⑥ 田中知明 (2011) 癌抑制遺伝子 p53 による細胞老化のメカニズム。 *日本臨床*, 69(10)。
- ⑦ 田中知明、横手幸太郎 (2011) p53 による細胞内代謝調節機構。 *Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌*、中外医学社、191-198。

[学会発表] (計 27 件)

1. 永野秀和、佐久間一基、中谷行雄、堀口健太郎、村井尚之、佐伯直勝、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明 (2012) GH 産生下垂体腫瘍における Pit-1 及び SSTR サブタイプの発現解析と OCT の臨床的反応性。 第 22 回日本間脳下垂体腫瘍学会、2 月 24 日、東京。

2. Sawako Suzuki, Hidekazu Nagano, Seiichiro Higuchi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Mitsuhiro Kitagawa, Tomoyoshi Soga, Ichiro Tatsuno, Koutarou Yokote, Tomoaki Tanaka (2011) Novel metabolic role of tumor suppressor p53 for ROS and energy regulation through glutamine metabolism by Phosphate Activated Glutaminase (GLS2). 第 34 回日本分子生物学会年会、12 月 14 日、横浜。
3. 永野秀和、鈴木佐和子、佐久間一基、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明 (2011) 癌細胞や正常細胞における p53 下流遺伝子 DPYSL4 の細胞内代謝・エネルギー調整機能。 第 34 回日本分子生物学会年会、12 月 14 日、横浜。
4. 鈴木佐和子、永野秀和、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明 (2011) 転写因子 p53 による Phosphate Activated Glutaminase (GLS2) を介した新たな細胞内代謝調整機構。 第 70 回日本癌学会学術総会、10 月 3 日、名古屋。
5. 橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明 (2011) 新規 p53 クロマチン複合体合分子 Sp110 の同定と p53/p21/Rb 経路を介した p53 依存的な細胞老化制御機構の解析。 第 70 回日本癌学会総会、10 月 3 日、名古屋。
6. 永野秀和、鈴木佐和子、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明 (2011) p53 下流遺伝子 DPYSL4 の同定とエネルギー産生・酸素消費調整機構の解析。 第

- 70 回日本癌学会学術総会、10 月 3 日、名古屋。
7. 田中知明、(2011) 癌抑制遺伝子産物 p53 による代謝調節機構の新展開第 70 回日本癌学会学術総会、10 月 3 日、名古屋。
 8. 田中知明 (2011) 癌抑制遺伝子 p53、その多彩な生理作用と複雑な機能制御メカニズム。第 13 回 Circulation Forum in Hiroshima、7 月 30 日、広島。
 9. 鶴谷悠也、藤本昌紀、竹本稔、田中知明、横手幸太郎 (2011) 低 Na 血症の鑑別に苦慮した症例。第 53 回日本老年医学会学術集会、6 月 16 日、東京。
 10. 田中知明 (2011) ゲノムの守護神 P53 による核初期化・細胞老化制御のメカニズム。第 27 回日本老年学会総会 第 53 回日本老年医学会学術集会、6 月 16 日、東京。
 11. 永野秀和、田中知明、鈴木佐和子、橋本直子、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) p53 下流遺伝子 DPYSL4 の同定とヒト脂肪細胞におけるエネルギー産生・酸素消費調節機構の解析。第 54 回日本糖尿病学会年次総会、5 月 21 日、札幌。
 12. 田中知明、橋本直子、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) ゲノムワイドの解析を用いた p53 による核初期化・細胞老化のメカニズム。第 54 回日本糖尿病学会年次総会、5 月 20 日、札幌。
 13. 鈴木佐和子、田中知明、永野秀和、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (YIA 審査口演) 転写因子 p53 による Phosphate Activated Glutaminase (GLS2) を介した新たな細胞内代謝調節機構。第 54 回日本糖尿病学会年次総会、5 月 19 日、札幌。
 14. 龍野一郎、寺野隆、鈴木佐和子、吉田知彦、田中知明、横手幸太郎、中村貢、鈴木公典、窪田和子、池上宏、山口淳一 (2011) (口演) 日本人女性の骨折リスクと糖尿病 -千葉市骨粗鬆症健診 7 万人のデータ解析-。第 54 回日本糖尿病学会年次総会、5 月 19 日、札幌。
 15. 永野秀和、今田英美、橋本直子、鈴木佐和子、間山貴文、吉田知彦、陶山佳子、田中知明、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (ポスター口演) 成人健診を契機に発見された先天性副腎過形成 (CAH) の二例第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 23 日、神戸。
 16. 鈴木佐和子、田中知明、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) 過去 10 年間に経験した AIMAH 症例の臨床内分泌学的特徴。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 23 日、神戸。
 17. 永野秀和、田中知明、鈴木佐和子、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) 新規 p53 下流遺伝子 DPYSL4 のエネルギー代謝・酸素消費調節に関わる機能調節。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 23 日。
 18. 吉田知彦、樋口誠一郎、佐久間一樹、永野秀和、今田映美、橋本直子、鈴木佐和子、間山貴文、陶山佳子、田中知明、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (ポスター口演) Incidental Pheochromocytoma の臨床的特徴 第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 22 日、神戸。
 19. 田中知明 (2011) (口演) 癌抑制遺伝子 p53、その多彩な生理作用と複雑な機能制御メカニズム～核内構造体を介したエピゲノム制御と、coding・non-coding/多彩な転写産物調節～。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 22 日、神戸。
 20. 間山貴文、鈴木佐和子、小出尚史、陶山佳子、吉田知彦、田中知明、龍野一郎、

- 横手幸太郎 (2011) (ポスター口演) 片側副腎摘除術後 10 年の経過を追った ACTH 非依存性大結節性副腎過形成 (AIMAH) によるサブクリニカルクッシング症候群 (subCS) の 1 例 -subCS を合併する AIMAH 治療の課題-。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 22 日、神戸。
21. 今田映美、陶山佳子、吉田知彦、橋本直子、間山貴文、鈴木佐和子、永野秀和、佐久間一樹、田中知明、龍野一郎、佐伯直勝、横手幸太郎 (2011) (ポスター口演) TSH 産生下垂体腫瘍にたこつぼ型心筋症を合併し、心不全をきたした一例 第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 22 日、神戸。
22. 鈴木佐和子、田中知明、永野秀和、鈴木穰、菅野純夫、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) 転写因子 p53 による新たな細胞内体調節機構 -Phosphate Activated Glutaminase (GLS2) を介したグルタミン代謝とミトコンドリア機能調節-。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日、神戸。
23. 橋本直子、田中知明、三橋暁、古屋充子、中谷行雄、生水真紀夫、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) 第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日、神戸。
24. 陶山佳子、潤間励子、長尾啓一、田中知明、桜井健一、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) 若年随時尿糖陽性者 93 人における耐糖能に関する検討。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日、神戸。
25. 田中知明、渡邊裕哉、石川直文、須山佳子、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (口演) 遺伝子解析にて確定診断に至った家族性異常アルブミン性高サイロキシン血症 (FDH) の 2 家系。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日～23 日、神戸。
26. 間山貴文、田中知明、小出尚史、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (ポスター口演) 脂肪細胞における PPAR γ 標的遺伝子 Tumor Suppressor Candidate 5 (TUSC5) の生理作用。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日、神戸。
27. 橋本直子、田中知明、鈴木穰、菅野純夫、龍野一郎、横手幸太郎 (2011) (ポスター口演) 新規 p53 クロマチン複合体合因子 SP110 による P53/p21 経路を介した細胞老化制御機構の解析。第 84 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日、神戸。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 知明 (TANAKA TOMOAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：50447299