

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390186

研究課題名(和文) ストレス老化シグナルによる解糖系酵素分子制御の誘導する癌化バリアー形成の解明

研究課題名(英文) Senescence-inducing stress modulates glycolysis and the Warburg effect

研究代表者

近藤 祥司 (KONDOH, Hiroshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80402890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：細胞がストレス老化を回避し癌化するのは、解糖系亢進(ワルブルグ効果)が原因、という仮説を我々は提唱し、その検証を解糖系酵素PGAMを中心に進めた。結果、PGAMの癌遺伝子Mdm2によるユビキチン化制御(Mikawa 他JCB 2014)、卵巣がん細胞で転写因子HNF-1の解糖系代謝制御(Okamoto他, Molecu Carci 2013)、マウス個体でPGAMによるミトコンドリア抑制効果(Okuda他, PLOS ONE 2013)、PGAM新規結合分子のPGAMアセチル化制御(Tsusaka他、現在論文投稿中)、PGAM-TGMEFでの癌化効果を国際雑誌報告した。

研究成果の概要(英文)：Our main concern is the senescence-bypassing effect of PGAM, glycolytic enzyme. We reported that PGAM is ubiquitinated by oncogene Mdm2 under senescence-inducing stress(Mikawa et al JCB 2014). We also identified HNF-1 as transcriptional regulator for glycolysis in ovarian cancer(Okamoto et al, Molecu Carci 2013). We reported PGAM impairs mitochondrial respiration in vivo(Okuda et al, PLOS ONE 2013). We also found that PGAM is acetylated in cancer cells. And We finally generated PGAM-TG mice. We also reported transforming ability of MEFs from PGAM-TG (Mikawa et al JCB 2014). Thus we disclosed unknown aspect of the Warburg effect through molecular investigation of PGAM.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般(含心身医学)

キーワード：老化 老年医学 解糖系代謝 癌化

1. 研究開始当初の背景

「加齢(老化)」は生活習慣病を含めた様々な疾病(癌も含む)の疫学的独立危険因子(悪化因子)として知られてきたが、加齢(老化)と癌化の分子生物学的因果関係は必ずしも明らかでは無い。1990年代以降分子生物学的アプローチによる老化研究の進展により、老化と癌化の接点急速に注目されつつある。その代表例として、「ストレス老化」現象の発見がある。従来、培養細胞研究(Hayflickら Exp Cell Res 1961)では、老化時計と呼ばれるテロメア(染色体末端構造)の短縮による細胞老化の分子機構が明らかにされた。一方、1997年頃より、テロメアとは無関係に、細胞は様々なストレスにより老化する事が判明し、「ストレス老化」という概念が普及した(Sherr他, Cell 2000)。若い細胞でも、ストレスにより老化誘導され、テロメア非依存的である。「ストレス老化」は、多彩な生命現象に關与する事が最近続々と報告(臓器傷害(Nojiri他 JBC 06)・幹細胞多能性維持(Ito他 Nat Med 06)・個体老化(Mathieu他 Nature 07)・癌化防御(Serrano他 Cell 97)など)されている。特筆すべきは、「ストレス老化は細胞癌化に対する生体防御システムである」という新概念の誕生である。様々な「ストレス老化シグナル」と総称できる刺激である発癌性化学物質(変異原など)や環境ストレス(紫外線など)により、細胞や遺伝情報に障害が生じた場合、「チェックポイント(がん抑制遺伝子 p53 など)」という防衛システム(生体バリアー)を働かせて、細胞老化を誘導することにより、異常な細胞の蓄積や癌化(悪性化)を防いでいるという概念である(Efeyan他 Cell Cycle 07)。今後の課題は、どのようなストレス老化シグナルが癌化バリアー形成に有効か、それを癌はどのように回避・破壊するのか、詳細説明が重要である。

2. 研究の目的

本計画代表者近藤は、2001年より一貫してストレス老化の研究に従事してきた。近藤は、ストレス老化抑制 cDNA ライブラリースクリーニングの結果、長寿遺伝子として、解糖系代謝酵素の一つであるホスホグリセリン酸ムターゼ PGAM の単離に成功した。近藤は、PGAM 単離を端緒として、解糖系亢進という代謝シフトが 1) ストレス細胞老化抑制や 2) ES 細胞増殖維持に重要という事を見出し、報告した(近藤他, Cancer Res 05, 近藤他, Antioxi Redox Sig 07)。従来の 20 数個の老化仮説の中で、古くからの仮説に、「酸化ストレス仮説」があり、酸化ストレスはストレス細胞老化も誘導できる(Chen他 PNAS.1994)。酸化ストレスの約 9 割は、細胞内ミトコンドリア(解糖系代謝産物と呼吸反応より、生体エネルギー源 ATP の産生器官)より産生されるので、

「酸化ストレス仮説」は最近では「ミトコンドリア老化仮説」の別名でも知られる(Remmen他 Exp.Gerontol.2001)。近藤は、解糖系亢進という代謝シフトがミトコンドリア機能調節を通じて細胞内の酸化ストレス減少(抗酸化ストレス効果)させ、ストレス老化抑制できる事を解明した(近藤他, Drug Disc Tod 05)。一方、解糖系亢進やミトコンドリア酸素消費低下という生命現象は、癌細胞でよく観察され、「ワールブルグ効果」として従来より知られている(Warburg 1930)。よって我々は、「癌がストレス老化シグナルを減弱・回避できるのは、解糖系亢進(ワールブルグ効果)が原因ではないか」という仮説に到達し、その分子生物学的解明を試みた。

3. 研究の方法

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 PGAM という突破口を得た。よって、老化の観点からの PGAM 制御機構とその生物学的効果解明を目指し、培養細胞とマウスの両面で計画を立案した。

1) PGAM や解糖系の上流(制御機構)解明

- A) Pak1 キナーゼや新規ユビキチンリガーゼによる PGAM 蛋白分解機構解明
- B) 解糖系新規転写因子の機能解析

2) PGAM の下流(癌化バリアー機構)解明

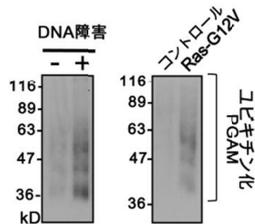
- A) メタボローム代謝変動分析
- B) 新規 PGAM 結合因子の機能解析
- C) PGAM トランスジェニック(全身型)における個体発癌・影響の解析

4. 研究成果

1) PGAM ユビキチン化機構の解明

ストレス老化シグナル(酸化ストレス、DNA 障害、発癌変異 Ras-G12V 発現による発癌ストレスなど)により、PGAM タンパク質のユビキチン-プロテアソーム系依存性減少が観察された。多くのユビキチン化反応は、前段階のタンパク修飾(リン酸化等)の影響を受ける。既に Pak1 キナーゼが PGAM のセリン 118 残基をリン酸化する事が知られていた。そこで我々は、初代 MEF 細胞において、Pak1 キナーゼの PGAM ユビキチン化への影響を検討した。Pak1 を過剰発現した MEF 細胞で、PGAM ユビキチン化によるタンパク分解亢進し、早期老化が引き起こされた。さらにストレス老化シグナルの活性化時、Pak1 による PGAM セリン 118 残基リン酸化が判明した。以上より、Pak1 によるリン酸化修飾が PGAM 分解を促進する事が判明した。次に、PGAM のユビキチン化修飾を行うユビキチンリガーゼの探索を行った。以前、我々は PGAM 酵素活性が p53 依存的である事を報告していた。これを手掛かりに、

p53 の下流因子であり、p53 ユビキチン化も担う RING 型ユビキチンリガーゼ Mdm2 が、PGAM の分解を促進する事を見出した。さらに、Mdm2 がストレス存在下で PGAM と強く結合し、その結合は Pak1 依存性であることを見出した。最終的に、Mdm2 が試験管内で PGAM を基質としてユビキチン化できることを見出した。以上より、PGAM のユビキチン化酵素 E3 が Mdm2 であることが確実になった。これは癌関連遺伝子 Mdm2 による代謝酵素制御の最初の報告となった (Mikawa 他 JCB 2014、下図)。



2) 解糖系新規転写因子 HNF-1 の発見

我々は、京大病院産婦人科大学院生岡本らと共同で、卵巣癌細胞における解糖系代謝解析とその新規制御因子探索を行った。その結果、ovarian clear carcinoma では、転写因子 HNF-1 が解糖系代謝酵素および解糖系代謝効率を制御する重要な因子であることが、siRNA ノックダウンにて判明した。これは、HIF-1 や Myc 以外にも解糖系制御する転写因子が存在するという世界的報告となった (Okamoto 他, Molecu Carci 2013)。

3) PGAM によるミトコンドリア抑制とメタボローム解析

以前、我々は、培養細胞において PGAM 強制発現によりミトコンドリア酸素消費低下と言う代謝シフトを報告した (近藤他, Antioxi Redox Sig 07)。しかし、その in vivo での効果や、メタボローム解析は謎のままだった。我々は、京大病院循環器内科塩井博士らと共同で、心臓特異的 PGAM 発現トランスジェニックマウスを作成し、その代謝変化をマウスで解析した。このマウスでは、ある条件では心不全が起こりやすくなり、ミトコンドリア代謝が低下していることが、mRNA 解析やメタボローム解析にて確認された。よって、in vivo でも PGAM によりミトコンドリア抑制効果があることが判明し報告した (Okuda 他, PLOS ONE 2013)。

4) 新規 PGAM 結合因子の機能解析

PGAM が代謝酵素であり、かつ細胞長寿遺伝子であることより、我々はもう一つの長寿遺伝子であるサーチュインに注目した。カロリー制限すると、様々な生物種で寿命延長効果があることが知られており、その重要なカギはサーチュインだと考えられている。我々は、サーチュインと PGAM が結合し、PGAM の脱アセチル化を触媒することを見出した。

PGAM のアセチル化フォームでは、PGAM 活性が亢進し、脱アセチル化されると活性が低下する。PGAM 内部のアセチル化残基の同定にも成功し、その残基の変異体を作成したところ、ある癌細胞では、増殖抑制効果があることが判明した。以上より、PGAM の新規結合分子が PGAM のアセチル化制御を通じて、PGAM の活性および、癌増殖能力に關与する事が判明した (Tsusaka 他、現在論文投稿中)。

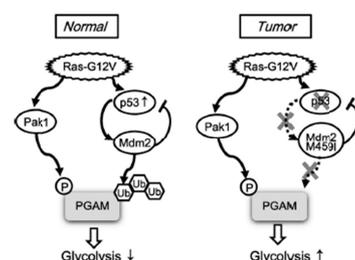
5) PGAM トランスジェニック (全身型) における個体発癌・影響の解析

1) で述べたように、我々は癌遺伝子 Mdm2 が PGAM のユビキチン化分解を担うことを報告した (Mikawa 他 JCB 2014)。従来、Mdm2 は癌遺伝子と考えられてきた一方で、Mdm2 はある環境下では癌抑制遺伝子としても働きうる可能性が知られている。このような一見矛盾する Mdm2 の二面性は、従来謎のままだったが、PGAM 分解により部分的に説明可能ではないかと我々は考えた。

そこで我々は、癌遺伝子変異網羅的データベース上で癌における Mdm2 変異を探索した。興味深いことに、Mdm2 の RING ドメイン内変異 (M459I) は p53 不活性化に関して、野生型とほぼ同様の活性を示す一方で、PGAM ユビキチン化活性は著名な低下を認めた。

そこで我々は、同時並行に PGAM の個体における影響をさらに解析進めるために、全身発現型 PGAM 発現トランスジェニックマウスを作成した。このマウスでは、CAG プロモーター下に PGAM が発現され、ほぼ全身の臓器で PGAM 蛋白が亢進していることを我々は確認した。このマウスの MEF 細胞を用いて、癌化能力の詳細な解析を行った。

その結果、野生型 Mdm2 と異なり、この M459I 変異においてのみ、Ras-G12V と PGAM-TG MEF において、ヌードマウス皮下腫瘍形成能を観察した。以上をまとめると、Mdm2 がその二つの基質 (p53 と PGAM) に対して、ストレス老化シグナル活性化時には、p53 安定化し PGAM 不安定化する一方、ある条件 (Mdm2-M459I 変異) では、Ras-G12V は逆に作用し、p53 を不活性化し PGAM を安定化することにより発癌に寄与する。すなわちワールブルグ効果となる事が判明した (Mikawa 他 JCB 2014、下図)。



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 14 件)

- 1) T Mikawa, T Maruyama, K Okamoto, H Nakagama, ME LLeonart, T Tsusaka, K Hori, I Murakami, T Izumi, A T-Kondo, M Yokode, G Peters, D Beach, & H Kondoh. Senescence-inducing stress promotes proteolysis of glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase via ubiquitin ligase Mdm2. *Journal of Cell Biology* 2014 Mar 3;204(5):729-45. doi:10.1083/jcb.201306149.
- 2) 伊藤健、近藤祥司 古くて新しい酸化ストレス老化仮説 *BioClinica 老化の分子生物学* 2014 Vol29 No1 p38-42
- 3) T Okamoto, M Mandai, N Matsumura, K Yamaguchi, H Kondoh, Y Amano, T Baba, J Hamanishi, K Abiko, K Kosaka, S K, Murphy, S Mori, I Konishi. Hepatocyte nuclear factor-1 β promotes glucose uptake and glycolytic activity in ovarian clear carcinoma. *Molecular carcinogenesis* 2013 Sep 17 DOI: 10.1002/mc.22072
- 4) A Feliciano; J Castellvi; A Artero-Castro; J A Leal; C Romagosa; J Hernández-Losa; V Peg; A Fabra; F Vidal; H Kondoh; S Ramón y Cajal; M E. Lleonart. miR-125b act as a tumor suppressor in breast tumorigenesis via its novel direct targets ENPEP, CK2- α , CCNJ, and MEGF9. *PLoS One*. 2013 Oct 3;8(10):e76247. doi: 10.1371/journal.pone.0076247.
- 5) Okuda J, Niizuma S, Shioi T, Kato T, Inuzuka Y, Kawashima T, Tamaki Y, Kawamoto A, Tanada Y, Iwanaga Y, Narazaki M, Matsuda T, Adachi S, Soga T, Takemura G, Kondoh H, Kita T, Kimura T. Persistent overexpression of phosphoglycerate mutase, a glycolytic enzyme, modifies energy metabolism and reduces stress resistance of heart in mice. *PLoS One*. 2013 Aug 12; 8(8): e72173. doi: 10.1371 / journal. pone.0072173. eCollection 2013.
- 6) V Sosa, BC; T Moliné, BC; R Somoza, BC; R Paciucci; H Kondoh; M E. LLeonart, Oxidative stress and cancer: an overview *Ageing Research Reviews* 2012 12(1) ; p376-390 doi: 10.1016/j.arr.2012.10.004.
- 7) Kitaoka S, Kondoh H, Inoue H. Induced Pluripotent Stem Cell Technology for the Study of Neurodegenerative Diseases. *Induced*

Stem Cells, chapter , Nova Science Publishers Inc, New York, p129-142. 2012

- 8) H Kiyokawa, S Muro, T Oguma, S Sato, N Tanabe, T Takahashi, M Kudo, D Kinose, H Kondoh, T Kubo, Y Hoshino, E Ogawa, T Hirai, and M Mishima. Impact of COPD exacerbations on osteoporosis assessed by chest CT scan. *COPD*, 9:1-8, 2012
- 9) M Ogita, H Takechi, A Kokuryu, H Kondoh, Y Hamakawa, and H Arai. Identifying cognitive dysfunction using the nurses' rapidly clinical judgment in elderly inpatients. *Journal of Clinical Gerontology & Geriatrics* 3 (2012) 21-24
- 10) 石飛博之、三河拓己、近藤祥司 酸化ストレス 老化と疾病 「Hormone Frontier in Gynecology」第 74 号 vol19 No2 2012 年 6 月号「酸化ストレス」特集号 p115-123
- 11) A Feliciano, B S'anchez-Sendra, H Kondoh, and ME. LLeonart MicroRNAs Regulate Key Effector Pathways of Senescence. *Journal of Aging Research* 2011 1-11
- 12) 近藤祥司 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 *日本創傷・オストミー・失禁管理学会誌* 2011 15 巻 4 号 p1-3
- 13) 近藤祥司、横出正之 老化と癌化の接点; 古くて新しい課題、ストレス 老化シグナル *医学の歩み* 2011 239 p337-342
- 14) 近藤祥司 骨粗鬆症に随伴する疼痛にミノドロン酸水和物(ボノテオ)が劇的に奏効した 4 症例 他のビスフォスフォネート製剤からミノドロン酸水和物への切り替え効果 *新薬と臨床* 2011 60 1375 - 1381

〔学会発表〕(計 12 件)

- 2013 年 10 月 30 日 第一回癌と代謝研究会 山形 「ストレス老化シグナルによる解糖系調節の誘導する癌化バリアー形成」
- 2013 年 8 月 22 日 第 23 回内分泌代謝セミナー滋賀医大「ストレス老化シグナルによる解糖系調節の誘導する防御バリアー」
- 2013 年 6 月 27 日 東北大学加齢医学研究所招待講演「ストレス老化シグナルによる解糖系調節の誘導する防御バリアー形成」

2013年6月23日 生化学若手の会
大阪大学「ストレス老化シグナルによる解糖系調節の誘導する生体防御バリアー形成」

2013年1月17日 癌と代謝シンポジウム2013 慶応大「ストレス老化シグナルによる解糖系調節の誘導する癌化バリアー」

2012年12月8日 第29回臨床フリーラジカル会議 亀岡「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防御バリアー形成」

2012年2月24日 京大放生研セミナー「ストレス老化シグナルによる解糖系酵素分子制御の誘導する癌化バリアー形成」

2011年12月17日 第25回日本冠疾患学会 大阪「老化はなぜ進むのか？ 遺伝子から見た老化と老化から診る生活習慣病」

2011年11月11日 第8回アンチエイジング静岡フォーラム「遺伝子から見た老化 老化から診る生活習慣病」

2011年10月25日 5th International workshop on regulations in cell cycle & arrest 沖縄「Cellular lifespan and the Warburg effect」

2011年5月28日 第22回日本老年医学会北海道地方会特別講演 札幌「老化はなぜ進むのか？ 遺伝子から見た老化と老化から診る生活習慣病」

2011年5月22日 第20回日本創傷・オストミー・失禁管理学会教育講演 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」

〔図書〕(計1件)

- 1) **近藤祥司** 老化とはなにか - 生命科学の視点から 健康長寿辞典 2012年 p11-21

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

我々のラボのホームページ
<http://www.anti-aging.jpn.com/>

JCB 2014 の成果は日刊工業新聞に掲載。
<http://www.nikkan.co.jp/news/nkx1020140226eaaj.html>

京大広報ページでも掲載された。
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2013_1/140224_2.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 祥司 (KONDOH, Hiroshi)
京都大学医学研究科・助教、院内講師
研究者番号：80402890

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

岡本 康司 (OKAMOTO, Koji)
国立がん研究センター研究所・室長
研究者番号：80342913

曾我 朋義 (SOGA, Tomoyoshi)
慶応大学環境情報学部・教授
研究者番号：60338217

高折 晃史 (TAKAORI, Akifumi)
京都大学医学研究科・教授
研究者番号：20324626

田中 知明 (TANAKA, Tomoaki)
千葉大学医学部・講師
研究者番号：50447299