

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04150

研究課題名(和文) 老化の多様性を生み出す代謝恒常性の変容破綻の解明とその制御

研究課題名(英文) Investigation for the metabolic basis of ageing diversity

研究代表者

近藤 祥司 (Kondoh, Hiroshi)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80402890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：「ストレス老化」は「発癌抑制の生体防御機構」である一方、SASP(老化関連分泌因子)により慢性炎症や癌化を誘導し、「老化の両面性」に寄与する。ストレス老化に深く関わる解糖系酵素ホスホグリセリン酸ムターゼPGAMの研究に取り組んだ。PGAMの非酵素役割として、Chk1キナーゼと結合し、協調的解糖系代謝制御することが判明した。PGAM-Chk1結合は癌細胞特異的であり、結合阻害すると解糖系代謝も低下することが判明した。以上の結果より、新規の解糖系制御機構におけるPGAMの重要性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、ワールブルグ効果(癌での解糖系亢進)の発見以来、解糖系阻害剤の癌治療への応用は長く期待されてきた。従来の代謝阻害剤は、「活性中心」と呼ばれる代謝酵素活性部位に結合し薬理作用を発揮するようデザインされてきた。しかしながら、解糖系代謝は正常細胞でも生理的必須機能を担っており、全身への重篤な副作用の観点から、単なる代謝阻害は、癌治療として有効性確立や実用化展開が難しい(Granchi et al, Chem Med Chem, 2012)。解糖系代謝調節剤が期待されながらも、長く実現化しない理由である。本研究の成果は、長く実現不可能と言われた解糖系代謝調節による抗癌剤開発に道を開くものである。

研究成果の概要(英文)：Dysregulated glycolysis is also closely related to human pathological features (Mikawa T. et al, CMLS 2014). Impaired glycolysis in vivo is associated with dysfunction in various tissues, degenerative disorders, and diabetes. Conversely, the pathological enhancement of glycolysis is also observed in several diseased states, such as inflammation, ischemia, and the cancerous Warburg effect. We previously reported the proteolytic regulation of glycolytic enzyme PGAM under senescence-inducing stress (Mikawa et al, JCB 2014). Moreover, we identified nonenzymatic role of PGAM in global glycolytic regulation in cancerous condition, but not in standard cells. PGAM interacts with Chk1 kinase, to cooperate for glycolytic regulation.

研究分野：老化生物学

キーワード：老化 解糖系代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

老化 (エイジング) という言葉は普遍的だが、その中身は時代と共に変遷する。グローバル高齢化の中 (WHO 推計) 日本は老化先進国となった。その日本が今直面する本質的重要課題は「老化の多様性」である。多くの疾病で「若年は均一で高齢 (老化) は多様化する」現象が観察される一方、単一細胞解析でも若年は均一だが高齢で発現がバラつく遺伝子群が確認された (Bahar 他 Nature 06)。つまり外的因子により老化にも個人差が予想され、年齢や時間軸を基準とした「老化」定義はもはや現状に合わない点が問題を複雑化している (近藤監訳「老化生物学」2015)。老化先進国日本の臨床や社会の現場で観察される「老化の多様性」とは、寝たきりやフレイル (虚弱) 増加の一方で、健康長寿者や百寿者増加 (2012年 5万人超。厚労省) と言う、「高齢者の 3分極化」である。今、その深い理解と適切な対応 (多様性を生かした医療や社会再構築) が最重要課題となりつつある。

研究代表近藤は老年内科医・基礎老化研究者として、一早く「老化の多様性」に注目した。高齢医療ニーズの質的变化を危惧し、国立病院初の「寝たきり予防」アンチエイジング外来を設立 (06年) する一方、基礎老化研究で注目される「ストレス老化 (若い細胞も様々なストレスにより老化する)」を研究してきた。最近、「ストレス老化」は「発癌抑制の生体防御機構 (癌を防ぐ必要悪) (Collado 他 Nature 05) である一方、SASP (老化関連分泌因子) により慢性炎症や癌化に寄与する事が明らかとなり、「老化の両面性」の発見に繋がった。様々な「老化の両面性」が重なり合い、「老化の多様性」を形成し、その絶妙なバランスが老化恒常性維持し、逆にその破綻は加齢疾患・フレイルへと通じる可能性がある。しかし老化恒常性の本態は不明のまま。老化恒常性維持に重要な候補因子は、長寿遺伝子かもしれない。カロリー制限で活性化させるサーチュイン (Rodgers 他 Nature 05) や、マウス個体長寿やストレス老化に関与する癌抑制遺伝子 p53 (Matheu 他 Nature 07) 等であり、それらは代謝調節因子でもある。近藤は、長寿遺伝子として解糖系酵素を世界初報告し (近藤他 Can Res 05)、「代謝による老化・寿命制御」を提唱している。我々は、老化恒常性維持に必須な代謝特性解明が最重要と考えた。

我々は 2001 年頃より、「解糖系代謝がストレス老化シグナルに拮抗し、生体防御防御バリアーとなる」という仮説提唱し、研究してきた。中でも、解糖系酵素ホスホグリセリン酸ムターゼ PGAM に注目している。PGAM は、近藤が長寿遺伝子として報告した (近藤他 Can Res 05, 近藤他 ARS 07)。PGAM 失活により早期老化誘導される一方、PGAM 強制発現によりストレス細胞老化抑制され、解糖系代謝が亢進し、細胞癌化へ暴走してしまう。癌での解糖系亢進は古くよりワールブルグ効果の名でよく知られる。PGAM は細胞の老化・癌化に密接に関与し、PGAM 活性の厳密制御が「老化恒常性」維持に重要と推測される。しかし、PGAM の上流 (分子制御) や下流 (生物学的効果) 機構は謎のままだった。近年我々は PGAM の上流解明に取り組み、癌遺伝子 Mdm2 による PGAM コピキチン化 (三河他 J Cell Biol. 2014) や、サーチュインによる PGAM 脱アセチル化 (津阪他、GtC 2014) を世界初報告した。今後は PGAM の下流解明が、重要である。

さらに 2008 年頃より我々はヒト血液中メタボライトに注目し新規老化・疾病診断マーカー探索開始し (沖縄科学技術大学柳田充弘教授共同研究)、血液メタボライトの多様性 (個人差) と 14 個の老化メタボライトの同定に成功した (ハレキス他 PNAS 16, 近藤他 PNAS 16)。これら 14 の老化マーカーが、多様な高齢者とうどう相関するか関心が持たれる。上記の代謝の観点からの老化研究の成果を基盤とし、本計画を立案した。

## 2. 研究の目的

「老化の多様性」を規定する代謝特性解明を目的とし、解糖系代謝モデル培養細胞・マウス研究やヒト血液メタボローム解析を行う。

## 3. 研究の方法

老化の多様性を規定する「老化恒常性」維持に必須な代謝特性に注目し、以下の 2 本柱とした。

細胞寿命制御に重要な解糖系酵素 PGAM による代謝維持機構の解明

ヒト血液メタボローム解析での新規老化・代謝マーカー探索

## 4. 研究成果

まず、「解糖系酵素 PGAM による代謝維持機構」に関して、これまで PGAM モデルマウス (TG および cKO) を用いた in vivo 生物学的効果を検証してきたが、糖代謝関連パラメーターはすべて正常であったので、糸口を見い出せずにいた。

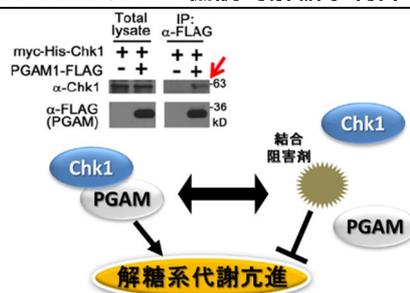
しかし、PGAM - TG マウスが TPA 処理により炎症が惹起されやすいことに気付いた。さらに、DMBA+TPA 処理により、PGAM - TG マウスが易発癌性であることも判明した。その際、PGAM - TG マウスの悪性腫瘍部位では、解糖系 mRNA の亢進があることも見出した。よって、PGAM 大量発現が解糖系代謝亢進とともに、炎症・発癌促進に働くと考えられた (図 1)。

図 1 PGAM による炎症・発癌



よって、PGAM による解糖系代謝制御機構の解明を目指した。我々は、上記 PGAM - TG マウス由来細胞では、がん抑制遺伝子 p53 のリン酸化状態が抑制されており、癌化に寄与する可能性を見出した。p53 のリン酸化状態は幾つかのキナーゼ (ATM, ATR など) や脱リン酸化酵素で制御されていることが知られている。最終的に、我々は PGAM が Chk1 キナーゼと結合することを見出した。

図 2 PGAM-Chk1 による協調的解糖系制御



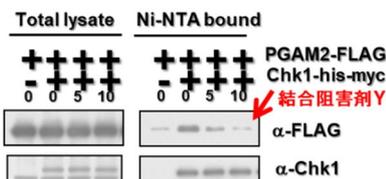
さらに、PGAM や Chk1 の不活性化により、解糖系代謝そのものが低下する一方、PGAM と Chk1 の両者の共発現により解糖系代謝亢進することを見出した。よって、PGAM と Chk1 は協調的に解糖系代謝制御を担うことが判明した (図 2)。

PGAM と Chk1 による協調的解糖系代謝制御機構は、今までに報告のない新規性が高いものであるため、その分子機構解明に注力した。当初、PGAM が脱リン酸化酵素として Chk1 制御に働く可能性を想定し実験を行ったが、PGAM の脱リン酸化酵素活性は見出されなかった。また、PGAM の解糖系代謝酵素活性を欠失した点突然変異 R90W を導入した変異型 PGAM-TG マウスを作成して解析したが、驚いたことに、PGAM-R90W 変異でも Chk1 との結合は保存されており、解糖系代謝亢進が見出された。以上より、PGAM による解糖系代謝制御には、PGAM の酵素活性は不要であると結論づけられた。

一方で、20 数個以上の様々な癌培養細胞株での PGAM 失活実験により、PGAM による解糖系代謝制御に重要な遺伝背景として、発癌性 Ras 変異と p53 失活変異が見出された。実際、培養細胞で発癌性 Ras 変異導入により、PGAM-Chk1 結合が増強されること、発癌 Ras 変異を持たない通常細胞では PGAM-Chk1 結合は観察されないことが確認された。さらにヒト肺癌患者の予後観察疫学データ解析により、PGAM-Chk1 の両者が発現亢進している患者では予後不良となることが見出された。よって、肺癌培養細胞株 26 種の網羅的解析において、発癌性 Ras 変異と p53 失活変異の両者の有無で 2 群分けを行い、解糖系代謝プロファイルと比較検討した。発癌性 Ras 変異と p53 失活変異の両者が見出される細胞群では、解糖系代謝プロファイルの著名な亢進が確認された。以上より、PGAM-Chk1 結合の重要な制御因子の一つは、発癌性 Ras であることが判明した。

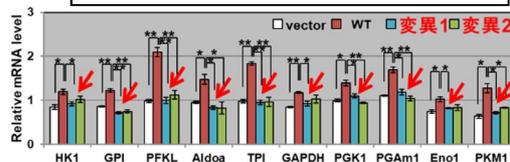
さらに、PGAM による解糖系代謝制御には、PGAM の酵素活性は不要である一方、PGAM-Chk1 の結合の重要性の証明が必要となった。この目的のために、我々は PGAM-Chk1 結合を阻害する化合物の探索を行った。その結果、結合阻害剤 Y を見出した。結合阻害剤 Y は、PGAM 活性には影響しないが、濃度依存性に PGAM-Chk1 結合を阻害する (図 3)。結合阻害剤 Y により、解糖系代謝プロファイルも低下する。これら知見は、国内特許申請した。

図 3 結合阻害剤 Y の同定



さらに化学的手法のみならず、遺伝学的手法でも、PGAM-Chk1 結合阻害に成功した。新規の PGAM 変異 1,2 の導入により、PGAM 活性は正常だが、PGAM-Chk1 結合低下することを見出した。と同時に、PGAM 変異 1,2 の導入により、解糖系代謝プロファイルも低下することを確認した (図 4)。以上より、PGAM の非酵素役割として、Chk1 との結合による解糖系代謝亢進というユニークな分子機構を見出した。

図 4 結合阻害による解糖系低下



本研究結果は、PGAM-Chk1 結合阻害による新規解糖系代謝剤の可能性を示唆する。実際これまで、ワールブルグ効果 (癌での解糖系亢進) の発見以来、解糖系阻害剤の癌治療への応用は長く期待されてきた。従来の代謝阻害剤は、「活性中心」と呼ばれる代謝酵素活性部位に結合し薬理作用を發揮するようデザインされてきた。しかしながら、解糖系代謝は正常細胞でも生理的必須機能を担っており、全身への重篤な副作用の観点から、単なる代謝阻害は、癌治療として有効性確立や実用化展開が難しい (Granchi et al, Chem Med Chem, 2012)。解糖系代謝調節剤が期待されながらも、長く実現しない理由である。本研究の成果は、長く実現不可能と言われた解糖系代謝調節による抗癌剤開発に道を開くものである。

一方、我々は最先端技術メタボロームで、老化メタボライトを報告してきた (ハレキス他 PNAS 16, 近藤他 PNAS 16)。我々は独自のアプローチを追求し、全血 (Blood)、血漿画分 (Plasma)、血球画分 (RBC) の 3 種について分析を行う手法を確立した。この技術を用いて、飢餓応答の血液メタボローム解析を行った。古くからの老化仮説として、「カロリー制限仮説」も代謝に注目した老化仮説の一つである。摂取カロリーを 70~80% に軽減すると、その寿命が約 20% かそれ以上延長するという観察を端緒とする (Mckay, 1934 年)。この寿命延長効果は、マウス、ハエ、線虫、魚、クモなど、多くのモデル生物で再現性よく観察される。カロリー制限により、サーチュイン、AMPK キナーゼ、FOXO 転写因子などのシグナル応答が活性化され、寿命延長効果に結び付くと考えられる。興味深い事に、FOXO 転写因子の重要な標的の一つは、ラジカルスカベンジャー遺伝子群であり、実際カロリー制限により、酸化ストレスの低減が観察される。奇しくも、「カロリー制限仮説」でも酸化ストレスの重要性が再認識されつつある。しかし、「カロリー制限仮説」

説」の健常ヒトでの検証は、非常に困難である。一方で飢餓環境に関して、ヒトは耐性であり、マウスは非常に脆弱であることがよく知られている。従来、ヒト飢餓時には、ケトン体、カルニチン、分子岐アミノ酸などの上昇が、エネルギー補給に重要と考えられていた。我々は、ヒト飢餓応答時の血液メタボローム解析により、その健康効果の何かヒントが得られるのではないかと考えた。よって、健常な若者4名の58時間絶食時の血液メタボローム網羅的解析を実施した。飢餓期間中、参加者の血糖値も低く保たれており、我々の試験プロトコールが従来の飢餓研究と同等に妥当であることが確認できた。

結果、120近いメタボロームの網羅的解析により、実に44のメタボライトが上昇し、我々の予想より遥かに代謝活性化が起こることが判明した。一方、有意に減少するメタボライトは2つであった。これら44の上昇メタボライトの中には、従来よく知られるケトン体、カルニチン、分子岐アミノ酸などの飢餓マーカー14個も含まれていた。それ以外に、TCA回路系、抗酸化系、プリン・ピリミジン系など、新規発見も含まれていた。

まず、TCA回路系メタボライトの上昇は、飢餓時の全身のミトコンドリア機能活性化を反映していると考えられた(赤血球にはミトコンドリアは存在しないため)。ケトン体、カルニチン、分子岐アミノ酸などの既知の飢餓反応とも合致する。一方、幾つかの抗酸化系メタボライトの上昇も見出した。既報のある尿酸以外に、先述のカルノシンやオフタルミン酸、エルゴチオネイン(キノコやカビに豊富に存在。酵母では、低グルコース環境で増加することが知られている)などが新規に見いだされた。さらに、ペントースフォスフェート経路PPP(酸化還元制御に必須なNADPHの主要産生経路)の4つの代謝産物上昇(グルコース-6-リン酸、6-ホスホグルコン酸、セドヘプツロース-7-リン酸、ペントースリン酸)が観察された。よって、飢餓時の重要なメタボライト上昇の意義の一つは、抗酸化力であると思われる。

さらに、プリン・ピリミジン系メタボライトも、既報のあるウリジン以外に、多数上昇(ADP、CTP、GTP、IMP、キサンチン、アデニン、シチジン)が確認された。飢餓時には、転写リプログラミングにより多くの転写因子が活性化することが知られている。さらに、3-ヒドロキシ酪酸や-ケトグルタル酸(2-オキソグルタル酸)は、それぞれHDAC(ヒストンデアセチラーゼ)阻害効果、DNA・ヒストンデメチラーゼ活性化効果を通じて、転写制御するメタボライトとしても知られている。総合的には、飢餓時上昇メタボライトは、シグナル活性化効果も担う可能性がある。興味深いことに、先述の我々の見出した老化で低下する9つの低下メタボライト群の中で、4つのメタボライト上昇(カルノシン、オフタルミン酸、ロイシン、イソロイシン)が確認された。飢餓反応が老化メタボライトを調節する可能性を示唆する。これら知見より、全血メタボローム解析の有用性が改めて確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takayuki Teruya, Romanas Chaleckis, Junko Takada, Mitsuhiro Yanagida and Hiroshi Kondoh.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Diverse metabolic reactions activated during 58-hr fasting are revealed by non-targeted metabolomic analysis of human blood.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-36674-9.	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 近藤祥司、三河拓己、亀田雅博	4. 巻 76
2. 論文標題 老化とは	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床増刊号 老年医学(上)	6. 最初と最後の頁 109-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lorente J, Velandia C, Leal JA, Garcia-Mayea Y, Lyakhovich A, Kondoh H, LLeonart ME.	4. 巻 93, 1
2. 論文標題 The interplay between autophagy and tumorigenesis: exploiting autophagy as a means of anticancer therapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol Rev Camb Philos Soc.	6. 最初と最後の頁 152-165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/brv.12337.	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 近藤祥司	4. 巻 34
2. 論文標題 老化の多様性の進化論的考察	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 New Diet Therapy 日本臨床栄養協会誌	6. 最初と最後の頁 47 - 52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤祥司、照屋貴之、柳田充弘	4. 巻 270
2. 論文標題 老化研究とメタボロミクス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 「医学の歩み」第一土曜特集 メタボローム解析 UPDATE	6. 最初と最後の頁 p380-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤祥司	4. 巻 8
2. 論文標題 新健康概念「細胞老化・慢性炎症」を標的とする研究開発テーマ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊「研究開発リーダー」	6. 最初と最後の頁 4 - 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤祥司、照屋貴之、柳田充弘	4. 巻 15
2. 論文標題 メタボローム解析からの老化研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本抗加齢医学会『アンチ・エイジング医学』	6. 最初と最後の頁 42 - 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤祥司	4. 巻 70
2. 論文標題 解糖系を標的とする創薬シーズ探索	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学工業	6. 最初と最後の頁 p1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 老化・癌化におけるメタボライトと解糖系代謝研究
3. 学会等名 第60回日本老年医学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 老化の多様性の進化論的考察
3. 学会等名 NR・サプリメントアドバイザーレベルアップセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 老化のメカニズムと最新の研究 - 進化論的考察より -
3. 学会等名 第48回栄養学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 ヒト絶食による代謝シフトの網羅的解析
3. 学会等名 日本老年医学会近畿地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 がんと代謝研究の最前線
3. 学会等名 抗加齢医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 血液メタボロームによる老化マーカー解析
3. 学会等名 抗加齢医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 ヒト血液メタボライトの多様性と新規老化マーカー同定
3. 学会等名 日本老年学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 細胞・個体老化における解糖系代謝とメタボライト
3. 学会等名 がんと代謝研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 Novel regulation for glycolysis
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 Identification of the metabolites and glycolytic regulation involved in ageing and its relevant diseases.
3. 学会等名 France-Japan Ageing workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三河拓己、近藤祥司
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 近藤祥司
2. 発表標題 老化と対話する医療から新しい健康概念へ
3. 学会等名 第14回東京フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 ワールブルグ解糖系代謝の新規分子制御メカニズムの解明
3. 学会等名 先端動物モデル成果発表会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 老化の多様性を規定する解糖系代謝恒常性の維持・変容・破綻による病態の解明
3. 学会等名 第61回日本老年医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 ヒト絶食による代謝シフトの網羅的解析
3. 学会等名 日本動脈硬化学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 老化はなぜ進むのか？～テロメア、ストレス老化のメカニズム、アンチエイジング外来の実際～
3. 学会等名 第12回小児がん・脳腫瘍全国大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

老化とアンチエイジング研究室ホームページ  
<http://www.anti-aging.jpn.com/>  
老化の多様性・恒常性を規定する解糖系代謝・メタボライトの探索  
<http://www.anti-aging.jpn.com/>

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
研究分担者	横出 正之  (Yokode Masayuki)  (20252447)	京都大学・医学研究科・教授    (14301)	