

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15894

研究課題名（和文）老化とリンクする解糖系代謝の生物学的効果の解明

研究課題名（英文）The novel regulation pathway of glycolysis via PGAM

研究代表者

三河 拓己（Mikawa, Takumi）

京都大学・医学研究科・教務補佐員

研究者番号：90608051

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：老化や代謝異常による発ガン機構の解明が課題となっている。ガン化に伴う代謝変化として解糖系代謝の亢進が知られている。このような活発な解糖系代謝はガン細胞の高い増殖能維持に必要である。本課題において我々は解糖系酵素の一つであるホスホグリセリン酸ムターゼPGAMと新規結合因子による協調的な解糖系代謝制御機構を見出した。PGAMによる解糖系代謝は特にガン細胞において重要であることから、ガン特異的な標的となりうるが見込まれ、本課題の成果は将来的な臨床応用への基盤となると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢とともに生活習慣病が増加するが、ガンもまた生活習慣病に指定されている。肉食や乳製品の摂取などの食生活や、糖尿病のような代謝異常が発ガン率の上昇に関与すること知られている。また、疫学的に高齢ほど発ガンしやすいことが知られている。よって、新たなガン治療の標的として、老化や代謝異常がガンに結びつくメカニズムの解明は重要課題である。その一方で解糖系代謝を標的とした抗ガン剤はこれまで正常細胞に対する副作用が課題となり実現していない。

本課題で我々が明らかにした解糖系酵素PGAMによる新規解糖系代謝制御機構は、特にガン細胞において重要であることから、新たな抗ガン治療の標的となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Enhanced glycolysis is a characteristic feature of cancer, referred to as the Warburg effect. Glycolysis constitutes an essential metabolism in cancer, serving not only as an energy source but also for the synthesis of macromolecules. Here, we identified that PGAM plays a novel role in regulating glycolysis in cancer cells. PGAM cooperates with novel PGAM-binding protein to regulate the Warburg-like glycolysis in cancer cells. Therefore, targeting the regulatory mechanism for cancerous glycolysis via the PGAM might represent a potential candidate strategy for anti-cancer therapy.

研究分野：老年医学

キーワード：解糖系代謝 ワールブルグ効果 ホスホグリセリン酸ムターゼ ガン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

疫学的知見より、加齢とともに生活習慣病（糖尿病・高血圧・骨粗鬆症など）が増加する。さらに本邦を含む多くの先進国で、悪性疾患(ガン)が死亡原因1位となった⁽¹⁾。実は、ガンは生活習慣病にも指定されており、1)一部の食生活は発ガン原因となること(肉食や乳製品による大腸ガンや乳ガン増加など)、2)糖尿病で大腸癌、肝癌などが上昇すること⁽²⁾、3)疫学的に高齢ほど発ガンしやすいことなどが知られている。現状ではガンに対する予防法はほぼ皆無だが、老化や代謝異常がガンに結びつくメカニズムの解明は今後の重要課題である。ガン研究で最も古くから知られている代謝特性に、ワールブルグ効果と呼ばれる解糖系代謝の亢進がある。ガンの克服には、ガン特異的な解糖系代謝制御の深い理解が必要である。ワールブルグ効果制御には様々な転写因子や古典的発ガンシグナルの関与が報告されている。さらにもう一つの局所的解糖系亢進として、炎症病変もよく知られている。一方、全身糖代謝異常と呼べる糖尿病でも、1)ヒトやマウスで解糖系代謝異常が一因であり、2)糖尿病治療薬によるガン縮小効果が近年報告されつつある⁽³⁾。興味深いことに老化研究で長寿との連関が注目される栄養シグナルもまた、解糖系代謝やワールブルグ効果制御因子である。このように老化と糖代謝の観点からの発ガン研究は大きなブレイクスルーをもたらす可能性がある。

2. 研究の目的

加齢とガンを含めた生活習慣病の深い相関に対し、『解糖系代謝』の観点より、その分子機序解明を目指す。本計画ではその中でも解糖系酵素ホスホグリセリン酸ムターゼ PGAM に焦点を絞る。本計画では、PGAM モデルマウスを中心に解析を進め、その生物学的効果としてガン化過程における PGAM 発現がもたらす影響の全貌を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 本課題では個体レベルでの PGAM 発現変化の影響を解析するため、Cre-LoxP システムを用いた *Pgam1* コンディショナルノックアウトマウス、失活型 *Pgam2* トランスジェニックマウスの解析を行った。各マウスの遺伝子型の識別はマウス尾部あるいは胎児から採取したゲノム DNA を用い genomic PCR によって決定した。PGAM 酵素活性はマウス臓器より抽出したタンパク質抽出液を用い、試験管内反応により 3-ホスホグリセリン酸が乳酸に変換される多段階反応の過程で消費される NADH の減少量として測定した。耐糖能試験 (intraperitoneal glucose tolerance test : IPGTT) は 16 時間絶食後のマウス腹腔に 1.5g/kg bodyweight のグルコース溶液を投与し、投与後 0、10、30、60、120 分後の血糖値をグルテストセンサー (三和化学研究所) により測定した。

(2) 非小細胞性肺癌細胞株 H1299 は American Type Culture Collection (ATCC) より入手した。p53^{-/-}-MEF 細胞は胎生 13.5 日の p53K0 マウスエンブリオより調製した。RNA 干渉法による *Pgam1* 遺伝子のノックダウンはトランスフェクションにより、*Pgam1* 遺伝子内に設計された siRNA を導入して行った。また、対照細胞には scramble RNA を導入した。

(3) mRNA 発現はマウス組織および細胞株より Trizole 試薬 (Invitrogen 社) にて mRNA を抽出後、ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO 社) により逆転写反応を行った。各遺伝子の発現量は内在性コントロールとして置いた *RPL13a* 遺伝子の発現量で補正した。

(4) タンパク質間相互作用の解析は、p53^{-/-}-MEF 細胞に対して、トランスフェクションにより PGAM-FLAG 及び結合因子 X タンパク質を異所的に発現させた。これらの細胞からタンパク質抽出液を調製後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、ウエスタンブロットによって共沈してき

たタンパク質を検出した。

4. 研究成果

(1) PGAM ホモ欠損マウスの表現型

まずは全身でのPGAM欠失の影響を解析するため、*Pgam1+/-flox*マウスを全身発現性の*CAG-Cre*マウスと掛け合わせ、*Pgam1*ヘテロノックアウトマウスを作成した。次に*Pgam1*ヘテロノックアウトマウス同士を掛け合わせて、ホモノックアウトマウスの作成を試みたが、生まれてきた仔マウスの遺伝子型割合は野生型：ヘテロノックアウト：ホモノックアウト=33.5%：66.5%：0%でありホモノックアウトマウスは誕生しなかった。さらに胎生13.5日のエンブリオでの遺伝子型解析を行ったが、同様にホモノックアウトは観察されなかった。これより、*Pgam1*ホモノックアウトは胎生致死であると結論された。既に解糖系を構成するいくつかの遺伝子の欠損で同様の胎生致死となることが知られており、解糖系遺伝子が発生過程で必須の役割を持つと考えられた。

(2) PGAM ヘテロ欠損マウスの全身糖代謝への影響

*Pgam1*遺伝子ホモノックアウトマウスが胎生致死であったことから、ヘテロノックアウトマウスを用いてマウス個体におけるPGAM欠損の影響を検討した。PGAMにはPGAM1とPGAM2のアイソフォームが存在し、臓器ごとに発現のパターンが異なる。まず、*Pgam1+/-*マウスの各臓器におけるPGAM酵素活性を検討したところ、PGAM1がドミナントに発現している脳、肝臓、脂肪組織、腎臓、およびPGAM1とPGAM2が共発現している皮膚、肺においてPGAM酵素活性の低下が認められた。そこで*Pgam1+/-*マウスにおいて耐糖能試験(IPGTT)を行い野生型マウスと比較したところ、ヘテロノックアウトマウスは野生型マウスと同程度の耐糖能を示した(図1)。さらに、血液生化学検査により血中の代謝パラメータについて解析を行ったが、同様にヘテロノックアウトマウスに異常は見られなかった。これらの結果よりPGAM活性の低下による全身の糖代謝への影響は小さいことが示唆された。

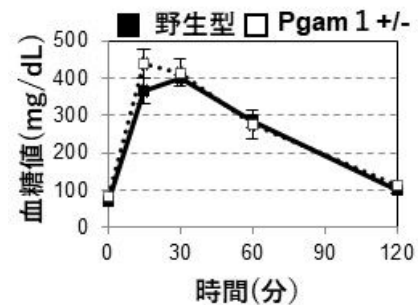


図1 ヘテロKOマウスの耐糖能試験

(3) 失活型PGAM変異Tgマウスの全身糖代謝への影響

これまでにPGAM欠損症で失活型変異として報告されているPGAM-R90Wの糖代謝における影響を検討するため⁽⁴⁾、*Pgam2-R90W*-トランスジェニックマウスを作成し、耐糖能試験を行った。これまでに野生型*Pgam2*トランスジェニックマウスでは、耐糖能は野生型と同様であることを明らかにしていたが、失活型*Pgam*トランスジェニックマウスにおいても、耐糖能に異常は見られなかった。

現在までに*Pgam1*ヘテロノックアウト、*Pgam*トランスジェニック、失活型*Pgam*トランスジェニックの3つのモデルで全身糖代謝を検討したが、いずれも影響は見られなかった。以上の結果より、正常組織では*Pgam*遺伝子の発現変化による糖代謝の恒常性への影響は小さいと考えられた。

(4) PGAM発現低下による癌細胞における解糖系代謝の減少

我々は以前にPGAM分解異常がガン細胞の増殖を促進することを報告した⁽⁵⁾。そこで次にPGAM

発現低下がガン代謝に与える影響について検討を行った。非小細胞性肺ガン細胞株である H1299 は PGAM1 をドミナントに発現している。そこで、RNAi により PGAM1 発現を低下させたところ、H1299 細胞の増殖低下が観察された。我々はこの時の H1299 細胞において、解糖系代謝の低下が認められ、ガン細胞において PGAM が解糖系代謝を制御することを明らかにした。

(5)新規 PGAM 結合因子の解析

さらに免疫沈降実験において PGAM タンパク質と共沈してくる新規 PGAM 結合因子 Chk1 を同定した。この結合因子 Chk1 は PGAM と結合することで、協調的に解糖系代謝を制御することを突き止めた。

以上の結果より、ガン細胞において PGAM を介した解糖系代謝の新規制御機構が存在することが示唆され、この機構がガン細胞特異的な解糖系代謝の亢進の一端を担っていると考えられた。今後、本課題で得られた成果を基盤として、解糖系代謝制御からの抗ガン治療の開発が期待される。

<引用文献>

- (1) 総務省統計局 世界の統計 2016
- (2) 春日 他、糖尿病 56(6) :374-390, 2013
- (3) Eikawa et al. PNAS. 2015;112(6):1809-14
- (4) Tsujino S, et al. Muscle Nerve Suppl. 1995;3:S50-3.
- (5) Mikawa T, et al. J Cell Biol. 2014;204(5):729-45.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1) **三河拓己**、伊藤健、稲垣暢也、横出正之、近藤祥司、解糖系酵素 PGAM による解糖系制御機構の解析、**第 41 回日本分子生物学学会年会**、2018 年 11 月 28 日、(横浜)
- 2) **三河拓己**、伊藤健、横出正之、近藤祥司、PGAM を介した解糖系新規制御機構の解析、**第 60 回日本老年医学会学術集会**、2018 年 6 月 15 日(京都)
- 3) 近藤祥司、**三河拓己** 「解糖系代謝新規制御機構の解明」 **先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会** 2018 年 1 月 25 日(大津)
- 4) **三河拓己**、伊藤健、稲垣暢也、横出正之、近藤祥司「PGAM を介した解糖系新規制御機構の解析」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 7 日(神戸)
- 5) **三河拓己**、近藤祥司「PGAM を介した解糖系新規制御機構の解明」**先端モデル支援プラットフォーム若手支援技術講習会** 2017 年 9 月 8 日(長野)
- 6) 近藤祥司、**三河拓己** ‘Novel regulation for glycolysis’ **日本癌学会** 2017 年 9 月 28 日(横浜)
- 7) 近藤祥司、**三河拓己** ‘Metabolites in organismal ageing & Glycolysis in cellular senescence’ **Asian Society of Aging Research** 2017 年 3 月 3 日(Sapporo)
- 8) 近藤祥司、**三河拓己** ‘Metabolites in organismal ageing & Glycolysis in cellular senescence’ **International symposium in Kumamoto**, 2017 年 2 月 11 日(Kumamoto)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：解糖系代謝制御物質のスクリーニング方法及び解糖系代謝制御剤
発明者：近藤祥司，三河拓己
権利者：近藤祥司(50%)，三河拓己(50%)
種類：特許
番号：特 2017-095320 号
取得年：2017
国内外の別：国内
〔その他〕
ホームページ等
<http://www.anti-aging.jpn.com/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：近藤 祥司

ローマ字氏名：Kondoh Hiroshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。