

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430105

研究課題名(和文) 肥満・糖尿病と発癌を結びつけるグルタミン代謝ネットワークの基盤的研究

研究課題名(英文) Glutamine metabolism network linked to obesity, diabetes mellitus and tumorigenesis

研究代表者

鈴木 佐和子 (SUZUKI, Sawako)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60400892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、肥満や糖尿病は癌の発症、進展、生存に深く関わる多くの研究から明らかとされている。私はグルタミン代謝の鍵分子GLS2が、ミトコンドリアに存在し、ケトグルタル酸を介してTCAサイクルを促進すると共に、グルタチオンを介して抗酸化作用を発揮することを明らかとしてきた。本研究ではGLS2ノックアウトマウスを用いて生体内におけるGLS2の生活習慣病と癌における役割を検討した。その結果、GLS2ノックアウトマウスは高脂肪食を負荷すると肥満・高中性脂肪血症・糖尿病といったメタボリック症候群を呈し生存曲線が有意に低下した。更にGLS2ノックアウトマウスでは肝癌の進行が有意に増悪することが示された。

研究成果の概要(英文)：Recently, several meta analyses revealed obesity and diabetes are oncogenic risk factors and associated with a rise of incidence, prevalence, and the mortality of the cancer. In this context, I focused on the glutamine metabolism which is the main energy source for cancer development. And we reported that GLS2, which is the central in the conversion of glutamine to glutamate, is localized in the mitochondria and promotes the TCA cycle via  $\alpha$ -ketoglutarate. On the other hand, at the same time, GLS2 increases production of glutathione to antagonize the reactive oxygen species levels. In this study, I examined the roles of GLS2 in life-style related diseases and cancer development in vivo using GLS2 knockout mice. We found that high fat diet GLS2 knockout mice showed decreased survival and presented so-called metabolic syndrome such as obesity, diabetes and dyslipidemia. Furthermore, we revealed that GLS2 knockout mice developed early-onset hepatocellular carcinoma.

研究分野：内分泌代謝、癌とエネルギー代謝

キーワード：グルタミン代謝 エネルギー代謝 抗酸化作用 生活習慣病 肝癌

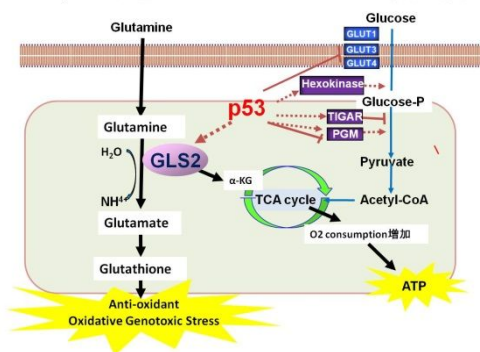
### 1. 研究開始当初の背景

日本人の糖尿病患者の死因の第一位は、長年血管疾患だったが、現在では悪性疾患となり、更に糖尿病患者では特に大腸癌、肝臓癌、膵臓癌のリスクが増加することが明らかとされている。更に近年、分子生物学的手法や次世代型シーケンサーやプロテオミクス解析などの網羅的測定法によって癌細胞が示す特徴的な代謝の制御機序が徐々に解明され、p53, MYC, HIFをはじめとした様々な転写因子ネットワークによって複雑に制御されていることがわかってきた。

そのような背景の中、私は解糖系と共に癌における主要なエネルギー源であるグルタミン代謝の制御機構が依然未解明であることに着目した。そしてマイクロアレイや次世代型シーケンサーを用いた解析から、ゲノムの守護神 p53 がグルタミン代謝のマスターレギュレーターである Glutaminase 2 (GLS2) を活性化することを見出した。GLS2 は、グルタミン分解の中心的役割を担っている細胞内代謝酵素であり、グルタミンをグルタミン酸に変換する。そして、p53 がミトコンドリア遺伝子 GLS2 を介して、好氣的エネルギー産生を正に調整する一方で、抗酸化作用を發揮し、更には *In vitro* において癌抑制的に作用していることを報告してきた (図1)。

しかしながら GLS2 を介したグルタミン代謝の破綻が生体内においてどのような役割を果たしているのか、グルタミン代謝は癌増殖に必応なエネルギー源であるが p53-GLS2 は本当に癌抑制的に作用するのか更なる検討が必要であった。

図1 p53下流遺伝子GLS2によるミトコンドリア機能制御



### 2. 研究の目的

これまでの *In vitro* における GLS2 の機能解析を更に推し進め、本研究では、Gls2 ノックアウトマウスの解析を通じてグルタミン代謝を介したミトコンドリア制御の個体における役割を明らかにし、細胞エネルギー恒常性の破綻と疾患の関わりを解明することを目指した。ミトコンドリア障害は老化、糖尿病、癌、神経変性、心不全など実に様々の一般的な疾患(Common Disease)の発症と進展に深く関わっていることが広く認められつつある。そこで特に生活習慣病と癌に焦点を当て GLS2 の役割につき解析した。

### 3. 研究の方法

Gls2 ノックアウトマウスの作成と肥満と発癌におけるフェノタイプの解析

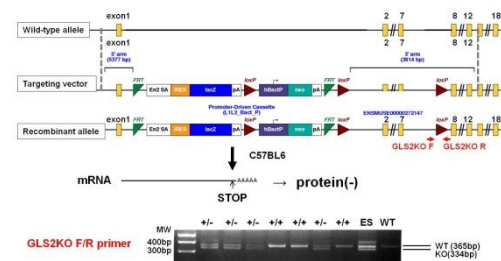
(1) GLS2 の癌と生活習慣病における役割 - 高脂肪食負荷における肥満モデルマウスおよび NASH-HCC モデルマウスにおける Gls2 の発現解析-

高脂肪食負荷によって誘導される肥満モデルマウスや NASH-肝癌誘発モデルである STAM マウスを作成し肝臓や脂肪における Gls2 遺伝子の発現解析を行った。具体的 STAM 作成方法として、株式会社ステリックの方法に準じてマウス生後3日目にストレプトゾドン 200 $\mu$ g を皮下注射し4週齢から高脂肪食負荷した。

(2) Gls2 ノックアウトマウスの作成

ヒトとマウスでは蛋白相同性は 94%と非常に高い。GLS2 のノックアウト作成のための遺伝子ターゲティング戦略は、イントロン1に gene trap vector が挿入されており、exon2 以降が、翻訳されないようになっている(図2)。

図2 GLS2ノックアウトマウス作成のための遺伝子ターゲティング戦略 -GLS2ストレートノックアウト-



(3) Gls2 ノックアウトマウスのフェノタイプ解析

体重の変化や脂肪の状態、外表奇形や癌の発生、行動異常などを観察した。更に糖尿病や脂質異常症の検討のため、血糖・脂質関連の採血に加えて OGTT や ITT などの負荷試験を行いインスリン分泌・インスリン抵抗性の有無を調べた。加えて高脂肪食負荷や STAM を作成し肥満や発癌を誘発し、そのフェノタイプを解析した。

### 4. 研究成果

(1) 高脂肪食負荷によって誘導される肥満モデルマウスにおいて、肝臓および脂肪組織で酸化ストレスが増加すると Gls2 の発現が増加した。更に、肥満や糖尿病などの生活習慣病を契機に発症にその発症に酸化ストレスが関与し肝臓に進行することで知られる NASH においても肝組織で酸化ストレスの増加とともに Gls2 の発現が増加した。ところが NASH 肝組織において肝臓を合併してくると、癌部は非癌部に比較して Gls2 の発現が逆に低下していることが判明し、NASH にお

る肝癌発症過程に GLS2 の発現の低下が関与していることを示唆する結果であった。

(2) 構築したターゲティングベクターをエレクトロポレーション法によって ES 細胞へ導入し相同組み換え ES 細胞を樹立した後に、キメラマウスを作成した。そして最終的にキメラマウスと C57BL6 マウスを交配して、ヘテロマウスを得ることに成功した。更にヘテロマウス同士の交配により GlS2 ノックアウトマウスの取得に成功した。GlS2 ノックアウトマウスは妊孕性に問題なく、メンデルの法則に従って生まれることが確認された。

(3) GlS2 ノックアウトマウスは普通食下では wild type に比較して体重はそれほど大きな差はなかった。ところが6週齢から高脂肪食負荷にすると、ノックアウトマウスの homo 群は WT に比較して10週齢から有意に体重増加を示し、生存曲線が有意に低下した。更に生化学検査および経口ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験、ピルビン酸負荷試験による糖代謝の評価により、高脂肪食負荷 GlS2 ノックアウトマウスは肥満に加えて、糖新生・インスリン抵抗性・高インスリン血症を伴う耐糖能障害、高中性脂肪血症を呈していた(図2)。更に GlS2 ノックアウトマウスでは明らかな脂肪肝を呈し、肝臓では DNA の酸化損傷のマーカーである 8OHdG が増加しており、酸化ストレスの増加が関与していると考えられた。

一方で発癌においては強制的に脂肪肝-NASH-肝癌を誘発する NASH-HCC モデル (STAM) の系を用いて病理学的に詳細に検討した結果、GlS2 ノックアウトマウスでは wild-type に比較して肝癌が有意に悪化することが判明した(図3)。

以上より本研究により生活習慣病、および生活習慣病を背景とする肝癌発症において GLS2 は重要な役割を果たしていることを明らかとすることが出来た。糖尿病治療薬であるメトホルミンはインスリン抵抗性の改善や糖新生を抑制することで抗がん作用も発揮する。今回の検討から、グルタミン代謝のモジュレーターである GLS2 も生活習慣病と癌の新たな創薬標的として期待できると考えられた。現在その詳細な機序につき更に解析をすすめている。



#### < 引用文献 >

Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*, 16, 2008, 569-78.

Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 20, 2010, 7461-6.

#### 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 10 件)

Kitajima S, Yoshida A, Kohno S, Li F, Suzuki S, Nagatani N, Nishimoto Y, Nishimoto Y, Sasaki N, Muranaka H, Wan Y, Nishiuchi T, Suzuki Y, Tominaga K, Gotoh N, Suzuki M, Ewen M, Baebie D, Hirose O, Tanaka T. The RB-IL-6 axis controls self-renewal and endocrine therapy resistance by fine-tuning mitochondrial activity. *Oncogene*, 査読有, 2017 (in press)

Yoshida A, Kitajima S, Li F, Cheng C, Takegami Y, Hayashi N, Nishimoto Y, Nagatani N, Kohno S, Muranaka S, Nishiuchi T, Suzuki S, Nakao S, Tanaka T, Hirose O, and Takahashi C. MicroRNA-140 mediates RB tumor suppressor function to control stem cell-like activity through interleukin-6. *Oncotarget*, 査読有, 8, 2017, 13872-85. DOI: 10.18632/oncotarget.14681.

Namekawa T, Utsumi T, Imamoto T, Kawamura K, Oide T, Tanaka T, Nihei N, Suzuki H, Nakatani Y, Ichikawa T. Composite pheochromocytoma with a malignant peripheral nerve sheath tumor: Case report and review of the literature. *Asian J Surg*, 査読有, 39, 2016, 187-90. DOI: 10.1016/j.asjsur.2012.11.003.

Hosokawa H, Tanaka T, Endo Y, Kato M, Shinoda K, Suzuki A, Motohashi S, Matsumoto M, Nakayama KI, Nakayama T. Akt1-mediated Gata3 phosphorylation controls the repression of IFN in memory-type Th2 cells. *Nat Commun*, 査読有, 7, 2016, 11289. DOI: 10.1038/ncomms11289.

Sakuma I, Higuchi S, Fujimoto M, Takiguchi T, Nakayama A, Tamura A, Kohno

T, Komai E, Shiga A, Nagano H, Hashimoto N, Suzuki S, Mayama T, Koide H, Ono K, Sasano H, Tatsuno I, Yokote K, Tanaka T. Cushing Syndrome Due to ACTH-Secreting Pheochromocytoma, Aggravated by Glucocorticoid-Driven Positive-Feedback Loop, *J Clin Endocrinol Metab*, 査読有、101、2016、841-6.

DOI: 10.1210/jc.2015-2855.

Kaga M, Utsumi T, Tanaka T, Kono T, Nagano H, Kawamura K, Kamiya N, Imamoto T, Nihei N, Naya Y, Suzuki H, Ichikawa T. Risk of New-Onset Dyslipidemia After Laparoscopic Adrenalectomy in Patients with Primary Aldosteronism, *World J Surg*, 査読有、39、2015、2935-40.

DOI: 10.1007/s00268-015-3197-z.

Suzuki S, Tatsuno I, Oohara E, Nakayama A, Komai E, Shiga A, Kono T, Takiguchi T, Higuchi S, Sakuma I, Nagano H, Hashimoto N, Mayama T, Koide H, Sasano H, Nakatani Y, Imamoto T, Ichikawa T, Yokote K, Tanaka T. GERMLINE DELETION OF ARMC5 IN FAMILIAL PRIMARY MACRONODULAR ADRENAL HYPERPLASIA, *Endocr Pract*, 査読有、21、2015、1152-60.

DOI: 10.4158/EP15756.OR.

Sugiyama T, Sugimoto T, Suzuki S, Sato Y, Tanaka T, Tatsuno I. Current smoking is an independent risk factor for new-onset diabetes mellitus during high-dose glucocorticoid treatment, *Int J Clin Pharmacol Ther*, 査読有、53、2015、616-20.

DOI: 10.5414/CP202136.

Hosokawa H, Kato M, Tohyama H, Tamaki Y, Endo Y, Kimura MY, Tumes DJ, Motohashi S, Matsumoto M, Nakayama KI, Tanaka T, Nakayama T. Methylation of Gata3 protein at Arg-261 regulates transactivation of the IL5 gene in Thelper 2 cells, *J Biol Chem*, 査読有、290、2015、13095-103.

DOI: 10.1074/jbc.M114.621524.

Utsumi T, Kawamura K, Imamoto T, Kamiya N, Nagano H, Tanaka T, Nihei N, Naya Y, Suzuki H, Ichikawa T. Assessment of postoperative changes in antihypertensive drug consumption in patients with primary aldosteronism using the defined daily dose, *Asian J Surg*, 査読有、37、2014、190-4.

DOI: 10.1016/j.asjsur.2014.01.011.

[学会発表](計 14 件)

鈴木佐和子、肥満と癌の共通の分子基盤としての Phosphate Activated Glutaminase (GLS2) の役割の解明、第 37 回日本肥満学会、2016 年 10 月 7 日、東京ファッションタウン(東京都江東区)

鈴木佐和子、AIMAH の原因遺伝子 ARMC5 の機能解析による WNT/ -catenin シグナル制御機構の解明、第 89 回日本内分泌学会学術総会、2016 年 04 月 21、国立京都国際会館(京都府京都市)

鈴木佐和子、生活習慣病と癌の共通の分子基盤としての GLS2 の役割の解明、第 89 回日本内分泌学会学術総会、2016 年 04 月 21、国立京都国際会館(京都府京都市)

Sawako Suzuki、Novel ARMC5 Alterations in Japan, ENDO 2016 (国際学会)、2016 年 4 月 2 日、USA ボストン

鈴木佐和子、ACTH 非依存性副腎大結節性過形成 (AIMAH) の新たな分子病態の解明、第 25 回臨床内分泌代謝 Update (招待講演)、2015 年 11 月 28 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

鈴木佐和子、AIMAH の新たな病態 ~ 両側副腎腫大と代謝性疾患発症のメカニズム ~、第 16 回日本内分泌学会関東甲信越地方会 (招待講演)、2015 年 9 月 25 日、幕張メッセ国際会議場 (千葉県千葉市)

鈴木佐和子、癌抑制遺伝子 p53 によるグルタミン代謝調節作用の生活習慣病と癌における役割、第 88 回日本内分泌学会総会、2015 年 4 月 23 日、ホテルニューオータニ東京 (東京都千代田区)

鈴木佐和子、AIMAH における WNT/ -catenin の活性化と特異的なステロイド合成酵素発現パターン、第 88 回日本内分泌学会総会、2015 年 4 月 23 日、ホテルニューオータニ東京 (東京都千代田区)

鈴木佐和子、グルタミン代謝制御因子 GLS2 をターゲットとした癌抑制遺伝子 p53 の新局面、第 51 回日本臨床分子医学会学術集会、2015 年 4 月 11 日、東京国際フォーラム (東京都千代田区)

Sawako Suzuki、GLS2 regulates mitochondrial function, its concern in stemness regulation and cancer, 18th International Vascular Biology Meeting 2014 (IVBM 2014)、2014 年 4 月 15 日、みやこめっせ (京都府京都市)

鈴木佐和子、癌抑制遺伝子 p53 のグルタミン代謝制御因子 GLS2 を介した生活習慣病における癌抑制機構の解明、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年 5 月 23 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

鈴木佐和子、ヒト多能性幹細胞における p53 下流遺伝子 GLS2 のミトコンドリア機能制御を介した幹細胞制御機構の解明、第 32 回内分泌代謝学サマーセミナー、2014 年 7 月 11 日、富士レークホテル (山梨県南都留郡)

鈴木佐和子、Mitochondrial GLS2 regulates pluripotency in human ES/iPS cells through the control of glutamine metabolism, 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

鈴木佐和子、A Novel regulation of pluripotency in human ES/iPS cells by Mitochondrial GLS2 through the control of glutamine metabolism、第 37 回日本分子生物学会年次学術集会(ワークショップ)、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 3 件)

中山哲俊、鈴木佐和子 他、(株)ニューサイエンス社、細胞、2017 年、印刷中

鈴木佐和子 他、診断と治療社、内分泌性高血圧疾患診療マニュアル 改訂第二版、2017 年、印刷中

鈴木佐和子 他、診断と治療社、クッシング症候群診療マニュアル 改訂第 2 版(内分泌シリーズ)、324(202-203)2015 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 佐和子 (SUZUKI, Sawako)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60400892

### (2) 研究分担者

田中 知明 (TANAKA, Tomoaki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50447299

### 【謝辞】

御支援により本研究が大きく発展できましたこと、心より御礼申し上げます。