

対象研究テーマ：がん特異的脂質代謝異常の分子機序に関する基礎研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：がん幹細胞制御を目指した癌抑制遺伝子 p53-Rb ネットワークによる
細胞内代謝・脂質代謝調節における基盤的研究

研究代表者：千葉大学大学院医学研究院 講師 田中知明

研究成果の概要：

高橋らは、これまでに種々の Rb 複合遺伝子欠損マウスの解析結果から、LOH による Rb 不活性化が原因で生じる Rb+/-;p53 K0 マウス由来カルシトニン産生細胞(C細胞)腫は、その他の遺伝子欠損や p53 ヘテロ型背景のマウスから生じた腫瘍と比較して、足場非依存的増殖能が非常に高く、分化マーカーの発現が著しく低い、未分化な腫瘍であることを明らかにした。また、p53K0 マウスに自然発生した軟部組織肉種より樹立した初代培養細胞においても、Rb の不活性化ががん幹細胞様の細胞群を誘導することを明らかにした。

そこで本年度は、p53 欠損背景において Rb 不活性化により、がん幹細胞様細胞が誘導される分子機構を解明するため、高橋らが、Sphere 形成能を指標として、Rb 不活性化により誘導されるがん幹細胞様細胞を選択的に培養し、申請者らが、RNA-sequence により、これらの細胞群の遺伝子発現解析を行った。その結果、野生型背景において Rb の標的としてすでに特定されていたメバロン酸経路および脂肪酸合成経路に加えて、p53 欠損背景における Rb 不活性化により、解糖系およびヘキソースアミン経路、グルタミン代謝に関与する種々の代謝関連遺伝子群が変動することを明らかにした。またこれら遺伝子群の発現変化が実際に代謝経路に及ぼす影響を、高橋らが、放射性標識グルコース誘导体や放射性標識グルタミン誘导体、Extracellular flux analyzer 等を用いて解析した結果、p53 および Rb がともに不活性化したがん細胞群では、脂質合成系の亢進、グルタミン代謝の亢進、ミトコンドリア活性の低下が観察された。Trp53 および pRb 不活性化細胞が示す遺伝子発現の変化、代謝経路の変化については、「4. 研究成果」の項目で具体的に記載する。

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：

1. 研究の背景

がん細胞には解糖系の亢進など「ワールブルク効果」に代表される特有のエネルギー代謝があり、その制御系の解明が創薬のために期待されている。また解糖系に加えて、脂肪酸は脂質合成や蛋白質修飾のみならず α 酸化を介してエネルギー産生の基質となる幅広い用途の細胞内中間生成物であるが、癌細胞では de novo 脂肪酸合成増加やコレステロール合成経路のみならず、phosphatidylinositol や phosphatidylcholine などの脂質代謝調節経路が様々な腫瘍性細胞内シグナルと深く関わっていることが注目を集めている。加えて、脂質代謝を含む細胞内代謝酵素群やミトコンドリアでの抗酸化・エネルギー調節機構が深く関わっている分子病態は、がん幹細胞 (cancer initiating cell)・iPS 細胞・細

胞老化とも密接につながっており、新規サイズ開発や臨床応用にむけて、世界中で激しい研究競争が繰り広げられている。一方、癌抑制遺伝子産物 p53 や Rb の新たな側面として、ROS・エネルギー代謝調節など細胞の恒常性維持に重要な役割を果たすことが明らかにされつつあり、細胞老化や核初期化に関わるエピゲノム制御機能などの多彩な生理作用と密接にクロストークしていることがわかってきた。従って、治療抵抗性やがん幹細胞の分子病態の根底にはがん特異的脂質代謝異常を含む細胞内代謝制御機序が存在し、p53 と Rb 経路のクロストークによるその調節メカニズムの解明が期待されている。

2. 研究の目的

p53 と Rb のクロストークによる代謝制御

の基盤的研究については、転写因子がゲノムワイドでの転写産物調節を引き起こすこと、代謝動態はダイナミックに変化することから、その統合的解析が非常に立ち遅れているのが現状である。そこで共同研究として、細胞内代謝動態を網羅的に捉えることが可能なメタボローム解析を駆使して、高速シーケンサーによるゲノムワイドの探索と各研究者が有しているp53とRbの知見と情報を有機的に結びつけることで、癌抑制遺伝子 p53-Rb ネットワークによる細胞内代謝・脂質代謝調節機構を明らかにする。細胞内(脂質)代謝制御という視点からp53-Rb ネットワークの生化学的・ゲノムワイド解析・動物モデル解析を連結させるという独創的な研究提案であり、この研究を通じて発見される知見や分子群は、がん幹細胞・細胞老化・ES/iPS の接点で機能する共通の代謝制御因子であることが予想され、新規の創薬シーズ開発や解析技術開発につながり、がん分子病態のブレークスルーが期待できる。

3. 研究の方法

申請者らが発見した p53 の抗酸化・エネルギー産生調節作用機構に加え、現在解析を進める脂質代謝制御関連遺伝子 (linc RNA を含む) 群のゲノムワイドの探索と機能解析手法と、高橋らが開発してきた p53/Rb の KO マウスモデルや Rb のコレステロール合成経路とイソプレノイドに関する知見を融合し、新たに効果的に進展・展開する計画である。方法としては、高速シーケンサーによるゲノムワイドの探索と各研究者が有している p53 と Rb の知見を有機的に結びつけることで、癌抑制遺伝子 p53-Rb ネットワークによる細胞内代謝・脂質代謝調節を明らかにする。新たな視点での創薬基盤構築とがん幹細胞制御の共通分子基盤の解明に貢献することが期待できる。

4. 研究成果

p53 欠損背景において Rb 不活性化により、がん幹細胞様細胞が誘導される詳細な分子機構を解明するため、申請者らが、RNA-sequence により遺伝子発現解析を行い、高橋らが、放射性標識グルコース誘導體や放射性標識グルタミン誘導體、Extracellular flux analyzer 等を用いて代謝状態を解析した。その結果、p53 および Rb 不活性化がん細胞群では、脂質合成系の亢進、グルタミン代謝の亢進、ミトコンドリア活性の低下が観察された。以下に、上記の研究より得られた具体的な実験結果を示す。

① メバロン酸経路の種々の遺伝子群が高

発現しており、メバロン酸経路阻害剤であるスタチンで処理すると Sphere 形成能が抑制された。また各種阻害剤を用いた実験から、メバロン酸経路の下流経路として、特にコレステロール合成系亢進ががん幹細胞能の獲得に重要であると考えられ、実際に細胞内コレステロール含有量の増加が観察された。

② 脂肪酸合成経路の種々の遺伝子群が高発現しており、細胞内のトリグリセリド含有量が増加していた。

③ グルコーストランスポーター

(Glut1, Glut4) や解糖系経路の種々の遺伝子群を高発現しているが、放射性標識グルコース誘導體の取り込み実験や

Extracellular flux analyzer を用いた ECAR (細胞外酸性化速度) 測定の結果から、実際のグルコース取り込み量はむしろ減少していることが明らかとなった。

④ 解糖系の分枝経路であるヘキソースアミン経路の種々の遺伝子群が、律速酵素である GFAT を筆頭に高発現しており、現在、ヘキソースアミン経路の代謝産物である N アセチルグルコサミン等の細胞内含有量をメタボローム解析により検討中である。

⑤ グルタミントランスポーター (Slc1a5) の発現が亢進しており、放射性標識グルタミン誘導體を用いた解析により、実際にグルタミン取り込み量の亢進が観察された。コントロール細胞群 (pRb 活性あり) と比較して、グルタミン要求性が高く、グルタミン枯渇に対して素早く細胞死が誘導されることを明らかにした。

⑥ Extracellular flux analyzer により OCR (酸素消費速度) を測定した結果、基本酸素消費量および最大酸素消費量ともに低い値を示した。また陽イオン性色素 JC-1 によりミトコンドリア膜電位を測定した結果、ミトコンドリア膜電位が低いことが明らかになった。

今後は、申請者らによる高速シーケンサーによるトランスクリプトーム解析と、高橋らによるメタボローム解析を駆使することで、これら代謝経路の変化における Trp53 依存性経路と pRb 依存性経路をそれぞれ明確にし、Trp53-pRb クロストークによる代謝経路制御の詳細な分子機構を解明する計画である。

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 4 件)

1. Hosokawa H*, Tanaka T*(Co-first author), Suzuki Y, Iwamura C, Ohkubo S, Endoh K, Kato M, Endo Y,

- Onodera A, Tumes J D, Kanai A, Sugano S, Nakayama T. unfunctionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish Th2 cell identity. Proc Natl Acad Sci USA. (in press) (査読有)
2. Utsumi T, Kawamura K, Imamoto T, Kamiya N, Komiyama A, Suzuki S, Nagano H, Tanaka T, Nihei N, Naya Y, Suzuki H, Tatsuno I, Ichikawa T. High predictive accuracy of Aldosteronoma Resolution Score in Japanese patients with aldosterone-producing adenoma. Surgery (2012) (査読有)
 3. Terano T, Suzuki S, Yoshida T, Nagano H, Hashimoto N, Mayama T, Koide H, Suyama K, Tanaka T, Yamamoto K, Tatsuno I. Glycemic control and bone metabolism in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. Diabetology International, (2012) (査読有)
 4. 田中知明 p53 による細胞内代謝調節機構, Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌, (2012) (査読無)

[学会発表] (計 9 件)

1. 鈴木佐和子、田中知明。p53 は GLS2 によるグルタミン代謝制御を介した抗酸化作用とエネルギー調節により腫瘍抑制作用を発揮する。第 35 回 日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡。
2. 中山哲俊、鈴木佐和子、永野秀和、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明 (ポスター口演) p53 による転写抑制遺伝子群の探索的解析と癌における予後の検討。第 35 回 日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡。
3. 永野秀和、鈴木佐和子、中山哲俊、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 (ポスター口演) p53 下流遺伝子 DPYSL4 の癌抑制機構と細胞内エネルギー調節作用。第 35 回 日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡。
4. 佐久間一基、鈴木佐和子、永野秀和、橋本直子、中山哲俊、樋口誠一郎、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明 (ポスター口演) 第 35 回 日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡。
5. 橋本直子、田中知明。(ポスター口演) p53 クロマチン複合体に含まれる Nuclear body protein SP110 と細胞老

化誘導・癌抑制機能第 35 回 日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡。

6. 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。p53 と GLS2 のミトコンドリア制御を介した生活習慣病および癌における役割。第 71 回 日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、北海道。
7. 橋本直子、滝口朋子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明。癌細胞における COP9 signalosome による p53 および p73 のリン酸化と安定化の制御機構。第 71 回 日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、北海道。
8. 永野秀和、鈴木佐和子、中山哲俊、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。RNA-sequencing 解析を用いた p53 下流遺伝子 DPYSL4 の同定とそのエネルギー代謝調節機構。第 71 回 日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、北海道。
9. 田中知明。癌抑制遺伝子産物 p53 による細胞内代謝制御機構～がん、エネルギー代謝、肝細胞性の接点の新展開～ 第 71 回 日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、北海道。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉大学大学院医学研究院・講師
田中知明

(2) 研究分担者

Columbia University, Biological Sciences
・ Professor Carol Prives

(3) 本研究所担当者

腫瘍分子生物学・教授 高橋智聡