

特集：遺伝子発現制御から迫る生体内環境応答機構

p53 によるグルコース代謝の調節とがん抑制の転写制御

田 中 信 之

がん細胞が解糖系を主なエネルギー供給源として増殖していることは良く知られており、この代謝の変化ががん細胞の増殖に有利に働いていると考えられている。この現象は、ワールブルグ効果と呼ばれ、1920年代頃から研究されているが、その分子機構やがん化における役割については不明であった。p53 は多くのがんで遺伝子変異がみられる代表的ながん抑制遺伝子であり、その遺伝子産物は転写活性化因子として様々な標的遺伝子群の発現を誘導している。我々は、p53 がグルコース代謝を調節していること、p53 の機能が無くなるとグルコース代謝が上昇してエネルギーの産生が増え、このことががん化に重要であることを見だし、最近報告した。本稿では、p53 がどのようにしてがん化を抑制しているのかについての最新の知見を紹介すると共に、グルコース代謝の調節機構とがん抑制における役割について解説する。

はじめに

p53 は多くのヒトがん細胞で遺伝子変異が検出されている代表的ながん抑制遺伝子である^{1,2)}。p53 は若年性に多臓器にがんが発生する遺伝性疾患 Li-Fraumeni 症候群の責任遺伝子としても同定されており³⁾、実際に p53 遺伝子を喪失させた p53 欠損マウスは、生後早い段階で極めて高い頻度で腫瘍の発生がみられることから⁴⁾、がん抑制に重要な因子であることが機能的にも証明されている。この遺伝子産物である p53 は、DNA 損傷や様々なストレスによって誘導され、核内で転写活性化因子として機能する^{1,2)}。これまでに、p53 によって誘導される標的遺伝子群の同定とその機能解析が精力的に行われてきた。その結果、p53 による細胞周期の停止、アポトーシスの誘導、DNA 修復の促進に関わる分子機構が明らかになっている^{1,2)}。これらの解析から、p53 は DNA 損傷刺激を受けた

細胞で活性化して細胞周期を G₁ 及び G₂/M 期で停止させ、その間に DNA 修復を促すことで DNA に変異が入ることを抑制する、更には修復しきれない細胞にアポトーシス（細胞死）を誘導して排除することで、遺伝子の変異を防いでいると考えられてきた。これらのことから p53 はゲノムの守護神 (guardian of the genome) と呼ばれており⁵⁾、実際に p53 の機能が欠失すると染色体が不安定になることが、実験的にも観察されている。一方で、正常細胞にがん遺伝子を発現させると p53 依存性にアポトーシスや細胞老化の誘導が起こることが見いだされたことから、がん遺伝子が活性化した細胞を排除することでがん化を抑制していることが明らかとなりつつある。

多くのがん細胞は、好気的な条件下でもミトコンドリアでの呼吸をあまり使わずに、グルコース代謝（解糖系）を亢進させてエネルギー（ATP）を作り出している。この現象は、ワールブルグ (Otto Warburg, 1883-1970) によって 1920 年代から報告されており、ワールブルグ効果 (Warburg effect) と呼ばれている^{6,7)}。細胞に取り込まれたグルコースは解糖系によりピルビン酸と 2 分子の ATP に代謝され、好気的な条件下ではミトコンドリアで酸素を消費する呼吸によってピルビン酸から 36 分子の ATP が産生される。一方、がん細胞では代謝経路の変化によりグルコース代謝が亢進することで解糖系によるエネルギー産生が飛躍

日本医科大学老人病研究所免疫部門 (〒211-8533 神奈川県川崎市中原区小杉町 1-396)

Transcriptional regulation of glucose metabolism and tumor suppression by p53

Nobuyuki Tanaka (Department of Molecular Oncology, Institute of Gerontology, Nippon Medical School, Kosugi-cho 1-396, Nakahara-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 211-8533, Japan)

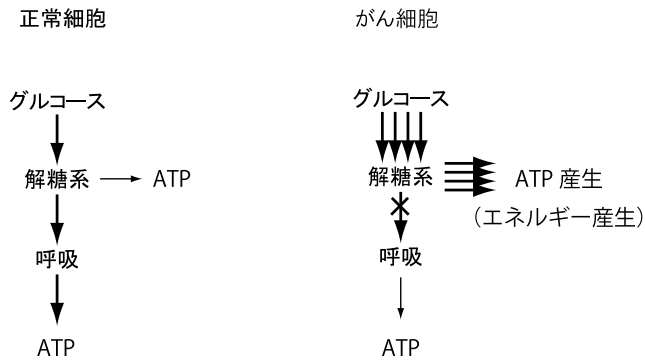


図1 がん細胞での代謝の変化

がん細胞は、ミトコンドリアでの呼吸をあまり使わずに、グルコース代謝(解糖系)を亢進させてエネルギー(ATP)を作り出している。この現象は、ワールブルグ効果と呼ばれている。

的に高まっており、これに対してミトコンドリアでの呼吸が低く抑えられている(図1)。この現象は、エネルギー産生から言えば極めて非効率なシステムであるものの、がんが増殖する、即ち腫瘍が塊として増殖していく上では、酸素の消費を抑えて増殖するという利点をもっていると考えられる。このようながん細胞がグルコースを多く取り込むという性質は、臨床ではPET(ポジトロン・エミッション・トモグラフィ:陽電子放射断層撮影)によるがん組織の画像診断(放射性核種で標識したグルコース類似体を多く取り込んだがん組織を画像として描出する)に応用され、広く用いられている⁸⁾。一方で、近年の分子生物学的解析から、がん細胞におけるグルコース代謝経路の変化の研究が進んできているものの、まだその全体像は明らかになっていない。筆者らは、最近になってp53がグルコース代謝を調節していること、p53の機能が無くなるとグルコース代謝が亢進してエネルギーの産生が増え、このことががん化に重要であることを見いだした。この現象は、がん化の分子機構を考える上で重要であり、この研究を含めて、p53によるがん抑制の分子機構とグルコース代謝に関しての最新の知見を紹介する。

1. p53の制御とその生理機能

前述のように、p53欠損マウスは極めて高い頻度で腫瘍の発生がみられ⁴⁾、我々の解析でも生後200日以内に70%以上のマウスが腫瘍により死亡する⁹⁾。このように、p53の機能を喪失すると、ほとんどのマウスで腫瘍の発生を抑えることができなくなることから、p53は極めて強力ながん抑制遺伝子であることが実験的にも証明されている。その遺伝子産物p53は非常に不安定なタンパク質であり、無刺激状態ではユビキチンリガーゼであるMdm2によってユビキチン化され、プロテアソーム系で速やかに分解されている¹⁰⁾。細胞内で放射線、抗がん剤、紫外線等の刺激によりDNA損傷が起こると、p53タンパク質のリン

酸化が起こり、一過性にタンパク質が安定化されて核内に蓄積する。代表的なリン酸化機構としては、DNA損傷により毛細血管拡張性運動失調症(ataxia telangiectasia)の原因遺伝子産物ATMとその近縁因子であるATRが活性化し、このATMやATRによるChk1やChk2キナーゼの活性化を介してp53がリン酸化される。リン酸化されたp53はMdm2と結合できなくなることで分解を受けなくなり、核内に蓄積して標的遺伝子の発現を誘導すると考えられている。同様に、p53のアセチル化がp53タンパク質の安定化に重要であるということも報告されている¹⁰⁾。最近、p53タンパク質の安定化にはヒストンメチル化酵素であるSet9による372番目のリジン残基のメチル化が重要であること¹¹⁾、ヒストンメチル化酵素Smyd2がSet9によるメチル化部位の近傍の370番目のリジン残基をメチル化しp53の活性を抑制することが報告された¹²⁾。興味深いことに、Set9によるp53のメチル化がSmyd2とp53の結合を抑制することが示され、メチル化を介したp53の正と負の機能制御が注目されている。p53タンパク質の修飾はこの他にも様々なものが解析されている。ヒストンの多様な修飾がそれぞれ異なる情報として書き込まれてそれに応じた応答を行う、いわゆるヒストンコード仮説¹³⁾に基づく制御と同様に、p53自身の多様なタンパク質の修飾によってその生理作用(例えば個々の標的遺伝子群の発現誘導の強度を別々に決定する等)を微妙に調節しているのではないかと推測されている。実際に、p53タンパク質にはヒストンテールにみられるリン酸化、メチル化、アセチル化等の修飾を受けるアミノ酸が密集している部分が存在することから¹⁴⁾、今後の更なる解析が期待されている。

これまでに、p53によるがん抑制機能を明らかにするために、p53標的遺伝子群の同定とその機能解析が精力的に行われてきた。代表的なp53の標的遺伝子産物であるp21は細胞周期のG₁期の進行に必須のサイクリン依存性キナーゼ(cyclin dependent kinase; Cdk)の抑制因子として働き、G₁期の進行を抑制することが知られている¹⁵⁾。その後、同定された14-3-3σは、細胞周期のG₂期から分裂期(M期)への進行の引き金となるサイクリンB/Cdc2複合体の核への移行を阻害する因子である。この14-3-3σとp21を同時に欠損したヒトの細胞(p53を正常にもつ)が作られ、この細胞はDNA損傷時に速やかにアポトーシスを起こすようになることが観察されている¹⁶⁾。このことは、p53が存在することでDNA損傷に対して修復機構が正常に働いて細胞を正常な状態に保っていることを示している。従って、p53による細胞周期の制御は、p53によるがん化の抑制に重要であると考えられる(図2)。即ち、DNA損傷を受けた細胞は、そのままDNA複製や細胞分裂が起こると遺伝子の変異、染色体の異常が起こる危険性が高いため、細胞周期の間期であるG₁及びG₂期で細胞周期を停止

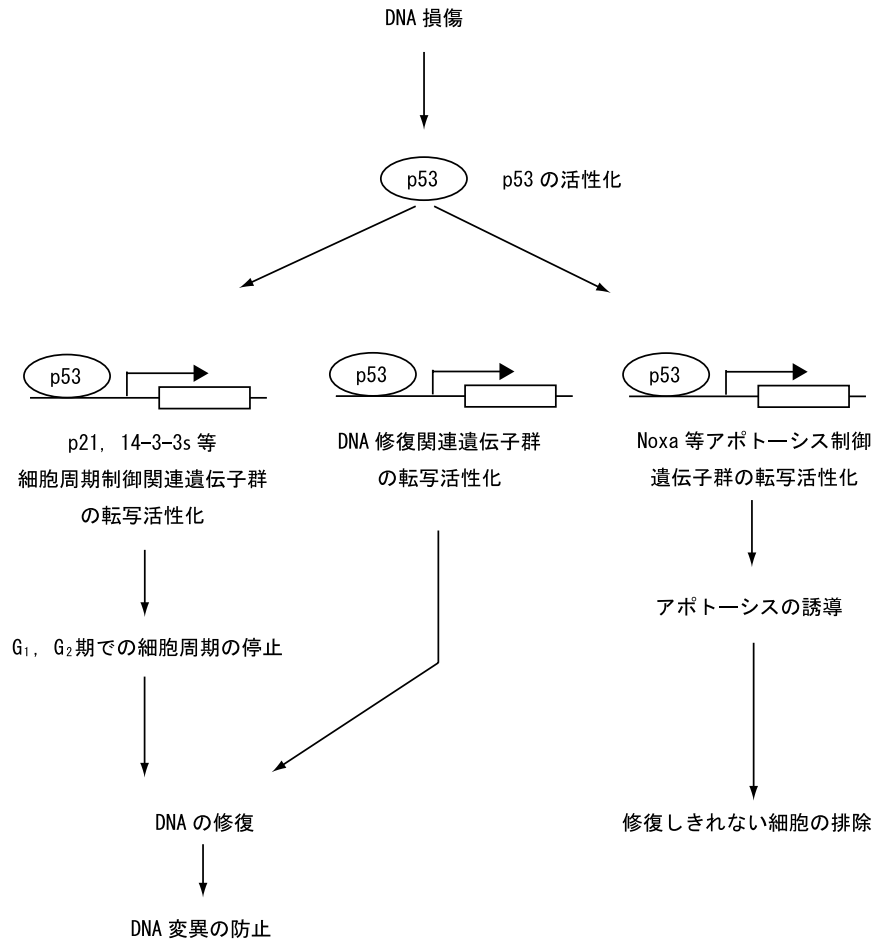


図2 p53 の生理機能
(詳細は本文参照)

させている。細胞周期の進行には、間期において次の周期に進行するための安全性をチェックする機構が存在しており（チェックポイント監視機構と呼ばれる）、異常が認められる時に細胞周期を停止させる。この細胞周期の停止に p53 が働いていると考えられる¹⁵⁾。従って、この機構を働かせることで p53 が遺伝子や染色体の安定性を保っており、p53 が遺伝子の変異や染色体の異常を抑えていると考えられる。この現象の制御には p21 や 14-3-3σ の他にも多くの制御因子が関わっていると考えられている。例えば、*p21* 欠損マウスの細胞は DNA 損傷刺激に対して部分的にしか G₁ 期の静止が阻害されない（これに対して *p53* 欠損細胞はほとんど静止しない¹⁷⁾。また、*p21* 欠損マウスはほとんど腫瘍の発生がみられない（後述）。

このような細胞周期制御と同時に、DNA 損傷の程度が多く修復しきれない細胞は p53 によってアポトーシスが誘導されて排除されることが知られている¹⁸⁾。p53 によるアポトーシスの誘導は、ミトコンドリアでアポトーシス誘導を制御する Bcl-2 ファミリー分子を介して行われていることが知られている。Bcl-2 ファミリー分子によるアポト

シスの誘導は、アポトーシス誘導刺激に応答して BH3 (Bcl-2 homology 3)-only サブファミリー因子と呼ばれる分子群が誘導され、これが同じファミリーに属する Bax と Bak の二つの分子を活性化して起こる¹⁹⁾。同時に、アポトーシスを抑制する Bcl-2 ファミリー分子である Bcl-2 や Bcl-XL は、Bax と Bak の活性化を阻害することでアポトーシスを抑制している。実際に、*Bax* と *Bak* を同時に欠損させたマウスの細胞は、p53 依存性のアポトーシスが起これなくなることが報告されている²⁰⁾。筆者らは、p53 によって誘導される BH3-only 因子 Noxa (ラテン語で damage の意) を同定した²¹⁾。この Noxa の発見の後に、p53 によって発現誘導される Noxa 類似分子 PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) も同定されている^{22,23)}。Noxa 欠損マウスを作製して解析を行った結果、がん遺伝子であるアデノウイルス E1A を遺伝子導入したマウス胎児繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF) にアドリマイシン等の DNA 損傷刺激を加えると p53 依存性のアポトーシスが誘導されるが（がん遺伝子によるアポトーシス誘導は次項参照）、Noxa 欠損 MEF ではこのアポトーシス誘導が減

弱していた²⁴⁾。更に、マウス個体に X 線照射した際の急性に起こる個体死が、p53 欠損マウスと同様に *Noxa* 欠損マウスで起こりにくくなっていること、急性に起こる腸上皮細胞のアポトーシスの誘導が *p53* 欠損、*Noxa* 欠損マウスで共に低下していることを見いだした。これらの結果から、実際に p53 によるアポトーシスの誘導を *Noxa* が（全てでは無いものの、その一部を）媒介していることを明らかにした。一方、我々の発表の直後に *PUMA* 欠損マウスが報告され、*Noxa* と同様に様々な p53 誘導性アポトーシスの制御に部分的に関わることが報告された²⁵⁾。一方で、*Noxa* や *PUMA* 欠損マウスの細胞は、部分的には抑えられるものの、完全には p53 依存性のアポトーシス誘導が抑えられていないことから、これらの他にも重要な分子が存在することが推測されている。いずれにしても、p53 は様々な Bcl-2 ファミリー分子を介してアポトーシスを誘導していると考えられる。p53 自身はがん抑制に必須の因子であり、その機能は他のもので代償することは無いが（即ち、p53 の機能が欠損するとがん化を抑えられなくなる）、p53 のそれぞれの機能（前述の細胞周期停止やアポトーシス）は複数の標的遺伝子群によって制御されており、一つの標的遺伝子を欠損させても、特にがん化が促進される例はみられていない。

2. p53 によるがん化の抑制機構

前項の解析から、p53 は遺伝子の変異、染色体の異常遺伝子を抑えることでがん化を抑制していると当初は考えられていた。その後、これらの機能に加えて、p53 は積極的に異常細胞を排除することで、がん化を抑制していることが理解されてきた。

繊維芽細胞等の正常細胞は、DNA 損傷刺激が加わると p53 依存性に細胞周期の停止が起こるが、*c-myc* 等の細胞増殖の誘導に働くがん遺伝子を発現させた細胞は、p53 によって速やかにアポトーシスが誘導されることが報告された²⁶⁾。更に、がん遺伝子である活性型変異を有する *ras* 遺伝子を発現させた正常細胞は、1 週間以上培養すると、p53 依存的に細胞が老化 (senescence) したような形態を示して増殖を停止することが報告された²⁷⁾。我々の体は、様々な DNA の変異原にさらされており、なかには細胞増殖を誘導するように働く遺伝子(原がん遺伝子)に変異が入ってがん遺伝子に変わることがあると考えられる。このようながん遺伝子を有する細胞は、そのみではがん細胞とはなっていないものの、将来的にがん細胞に変わるリスクが高くなっている。これらの現象から考えて、p53 はがん遺伝子を発現する(異常な)細胞を積極的にアポトーシスや老化を誘導して排除することで、がん化を抑えているのではないかと考えられるようになった²⁸⁾(図 3)。実際に、がん遺伝子を正常細胞に導入すると p53 の活性化が観察され

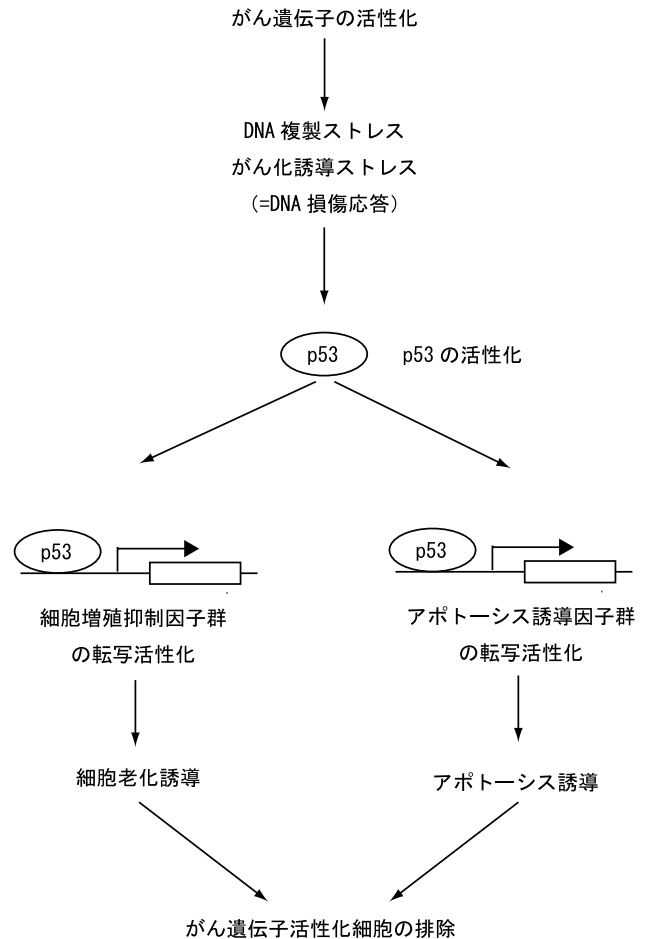


図 3 p53 によるがん遺伝子活性化細胞の排除機構

がん遺伝子の活性化は p53 の活性を誘導して老化ないしアポトーシスを誘導し、細胞は排除される。p53 の機能がなくなると、このような排除機構が働かないためがん化しやすくなると考えられる(詳細は本文参照)。

る。この活性化は、がん遺伝子による細胞増殖誘導によって起こる DNA 複製ストレス (replication stress) あるいはがん化誘導ストレス (オンコジェニックストレス; oncogenic stress と呼ばれる) と考えられるストレスによって誘導されると考えられているが、このストレスは p53 を活性化する DNA 損傷応答と同じシグナルであることが明らかになっている^{29,30)}。更には、がん遺伝子による異常な DNA 複製の誘導が、急激な複製フォークの停止や染色体の断裂を引き起こして DNA 損傷応答が引き起こされることが報告されている^{31,32)}。

最近、誘導的に p53 が機能しなくなる状態で、がん遺伝子の導入によってできた腫瘍が、正常の p53 の機能を回復させるとアポトーシスや老化の誘導を起こして排除されることがマウス個体を用いた腫瘍形成実験で報告されている。このなかで、RNA 干渉法 (RNAi: RNA interference) を用いて、胎児肝細胞に誘導的に p53 の発現を抑制すると共に活性化 *ras* 遺伝子を発現させて腫瘍形成能を獲得した細

胞の解析では、できた肝臓腫瘍が正常の p53 の発現を回復させると退縮すること、p53 の発現が回復したことで、腫瘍組織で細胞老化が誘導され、腫瘍の退縮が起こることが観察された³³⁾。このことから、正常に機能する p53 は極めて強力ながん抑制作用をもつことが証明されている。

3. p53 機能欠損細胞ががん化しやすくなるメカニズム

このように、がん遺伝子が発現した細胞を積極的に排除する機構が無くなれば、がん化は起こしやすいと考えられる。筆者は1990年代の初め頃、別のがん抑制遺伝子候補を解析する過程で、p53 欠損マウスの胎児繊維芽細胞が ras がん遺伝子単独でトランスフォームし、メチルセルロース含有培地内で足場非依存性に増殖してコロニーを作るようになること、ヌードマウスに移植すると腫瘍を作るようになることを発見し報告した³⁴⁾。この当時は、p53 欠損マウスが腫瘍を発生しやすいことはわかっていたものの、p53 の詳細ながん抑制機構は明らかではなく、この現象に対する分子機構は不明であった。しかし、その後の解析から明らかになった p53 によるがん抑制機構（前述）から考え直してみても、p53 欠損細胞、即ち、がん遺伝子発現細胞を排除する機構が無い細胞で、がん遺伝子によって積極的に腫瘍を形成する能力を獲得する過程にどのような機構が働いているかに関しては、これまでの解析のみでは説明できない。

我々は、p53 欠損マウス胎児繊維芽細胞を解析する過程で、p53 欠損細胞では転写因子 NF-κB (nuclear factor-κB) の DNA 結合能及び転写活性化能が恒常的に活性化しており、NF-κB によって誘導される標的遺伝子の発現が高いことを見いだした³⁵⁾。更に、この細胞では、NF-κB の抑制因子 IκB (inhibitor of NF-κB) をリン酸化する酵素 IKK (IκB kinase) α 及び β の活性（リン酸化された IκB は速やかに分解され、NF-κB が活性化する³⁶⁾）が恒常的に高いこと、NF-κB の活性化が IKKα 及び β の活性化によるものであることを見いだした。同じ現象は、正常のマウス胎児繊維芽細胞にがん細胞で高頻度に報告されている p53 の変異体（DNA の変異によるアミノ酸置換で、p53 の転写活性化機能を喪失していると共に、正常の p53 の機能も阻害するように働く）を遺伝子導入した時にも観察されることから、p53 の機能がなくなると IKK-NF-κB 経路が活性化することが明らかとなった³⁵⁾。NF-κB の恒常的な活性化は多くの種類のがんで比較的多く報告されており、がんへの関わりが指摘されていた³⁷⁾。また、NF-κB は多くの炎症性サイトカインによって活性化されることが知られており、慢性炎症から発がんにいたるマウスモデル実験で IKK-NF-κB 経路が重要であることを示す結果が報告されている³⁸⁾。同時に、NF-κB が細胞増殖を誘導するサイクリン D やアポトーシスを抑制する Bcl-XL の発現を誘導することも報

告されていることから³⁹⁾、がん細胞の増殖に有利に働いているのではないかと考えられていた。これらの結果を総合的に考えると、p53 欠損マウス胎児繊維芽細胞が ras がん遺伝子単独でトランスフォームする現象に、NF-κB の恒常的な活性化が関係しているのではないかとということが考えられた。

そこで、p53 欠損マウス胎児繊維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて ras がん遺伝子を発現させ、軟寒天培地でのコロニーの形成（足場非依存性の増殖）により腫瘍形成能の獲得を調べた³⁵⁾。上述のように p53 欠損細胞は、ras がん遺伝子単独でトランスフォームし、腫瘍形成能を獲得する。しかしながら、p53 に加えて NF-κB を形成するサブユニットの一つである p65 を同時に欠損した細胞では、ras を発現させてもほとんどトランスフォームしないという（筆者にとっては極めて驚く）現象を発見した。興味深いことに、通常の培地中での細胞増殖能に関しては p53 欠損マウス胎児繊維芽細胞と p53/NF-κBp65 両欠損細胞では差はみられず、また ras を発現させるとこれらの細胞の増殖能が上昇するが、上昇の程度にはほとんど差はみられなかった。これらの結果から、（少なくともこの実験系では）NF-κB の活性化が腫瘍形成能を獲得することに重要であることが明らかとなった。それでは、どのような機構を介して NF-κB が腫瘍形成能の獲得に働いているのであろうか。

4. p53 欠損細胞でのがん化誘導機構

細胞増殖能にそれほど変化が無いことから、通常のがん遺伝子のように NF-κB が増殖を誘導することでがん化に働いているとは考えにくい。そこで、p53 欠損細胞で起こっている様々な変化を解析する過程で、p53 欠損細胞では正常細胞に比べてグルコース消費量、即ち、グルコース代謝が増大していること、この現象は p53/NF-κBp65 両欠損細胞ではみられなくなることを発見した³⁵⁾。がん細胞での代謝系の変化、特に解糖系を主なエネルギー源とするワールブルグ効果（前述）に関しては古くから知られている。近年、p53 がミトコンドリアでの呼吸に必要なシトクロム c 酸化酵素複合体 (cytochrome c complex) の重要な制御因子である SCO2 (synthesis of cytochrome c oxidase 2) の発現に関わっていること、p53 欠損細胞では SCO2 の発現が低下するためにミトコンドリアでの酸素消費量が低下し、そのために解糖系でのエネルギー産生が多くなっていることが報告された⁴⁰⁾。同時に、p53 の新規標的遺伝子として TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator) が同定されている⁴¹⁾。TIGAR は解糖系の促進に働くフルクトース-2,6-ビスリン酸のレベルの抑制に働いており、発現が高くなると解糖系を阻害する。逆に TIGAR の発現を抑制すると解糖速度の上昇が観察されてい

る。これらのことから、p53が機能しない細胞ではミトコンドリアでの呼吸が低下すると共に、解糖系を促進する機構が働いて解糖系でのエネルギー産生が増加していることが推測されていた。一方、我々の解析でもp53欠損細胞の酸素消費量は正常細胞に比べて減少していたが、p53/NF-κBp65 両欠損細胞での酸素消費量はp53欠損細胞とほとんど変わらなかった。これに対して、p53欠損細胞でみられたグルコース消費の増大はp53/NF-κBp65 両欠損細胞では（酸素消費量が低いにも関わらず）みられなくなった³⁵⁾。従って、p53欠損細胞でのNF-κBによるグルコース代謝の増大は、SCO2やTIGARの発現低下によるミトコンドリアでの呼吸の低下やグルコース代謝の増大では説明できない。一方で、p53欠損細胞ではNF-κB依存的にエネルギー産生経路の変化がみられることから、この現象が、p53欠損細胞ががん遺伝子によって腫瘍形成能力を獲得するのに重要であることが推測された。

5. 代謝経路の変化によるがん細胞の増殖

それでは、代謝経路の変化ががんにとってどのように有利に働くのであろうか。がん細胞が腫瘍塊として増殖していくと、当然のことながら中心部の酸素濃度は低下していく。低酸素状態（hypoxia）に置かれた細胞では、HIF1（hypoxia-inducible factor 1）が活性化する⁴²⁾。HIF1はVEGF（vascular endothelial growth factor）等の血管造成因子の発現を誘導して腫瘍内部に酸素を送るように働きかけると共に、グルコースの取り込みや解糖系に関わる分子を誘導することで解糖系によるエネルギー産生を促し、酸素消費が少なくとも増殖ができる環境を作り出す。これと同時に、解糖系によって産生される水素イオン（H⁺）の増加は周囲にアシドーシスを引き起こす。また、がん細胞自身ではワールブルグ効果によって解糖系の亢進とミトコンドリアでの呼吸の低下が起こっており、それによって乳酸（lactate）の産生とH⁺の増加が起こっている。実際のがん組織を調べてみると、多くのものががん組織とその辺縁のアシドーシスが観察されている。がん細胞自体はこのようなアシドーシスの状態で増殖できるように適応しているが、周囲の正常組織の細胞にはダメージを与えられられる。このことが、がん細胞の増殖、浸潤に有利に働いているのではないかと考えられている^{6,7,42)}。

これらの過程を制御する重要な因子であるHIF1は、様々ながん遺伝子によって活性化されることが知られている。また、がん抑制因子PTEN（phosphatase and tensin homolog）の不活性化はphosphoinositide 3-kinase（PI3K）の活性化を介してHIF1を活性化することや、網膜や神経系に血管腫ができるvon Hippel-Lindau病の責任遺伝子であるVHLの遺伝子産物がHIF1のユビキチン化酵素の一部として働き、VHLの機能が欠損するとHIF1の活性化がみ

られることが知られており、HIF1の活性化ががん化に関わることも考えられている。更に、HIF1が解糖系の酵素の発現を誘導してグルコース代謝を亢進させることも知られていることから、がんにおけるHIF1の重要性が提唱されている⁴²⁾。

6. p53欠損細胞でのNF-κBによるグルコース代謝促進機構

それでは、NF-κBがどのような標的遺伝子を活性化してグルコース代謝を増大させているのであろうか。我々は、p53欠損細胞ではグルコースの取り込み自体が増加しているという結果から解析を進めて、グルコーストランスポーターGLUT3 mRNAの発現が、p53欠損細胞で上昇しており、p53/NF-κBp65 両欠損細胞では正常細胞のレベルまで低下していることを見いだした³⁵⁾。グルコースの細胞内への取り込みは、細胞膜に発現するグルコーストランスポーター（GLUT）ファミリー分子によって行われており、特にGLUT1とGLUT3は生体内に広く発現し、グルコースに対する親和性が高く、グルコース輸送の基礎を担っている^{43,44)}。GLUT3遺伝子を解析したところ、イントロン1にNF-κB結合配列が存在し、実際にp53欠損細胞でNF-κBが結合していることをクロマチン免疫沈降法で検出したことから、GLUT3遺伝子はNF-κBによって直接発現誘導されると考えられた³⁵⁾。

それでは実際に、GLUT3がこの現象にかかわっているのであろうか。RNAiを用いた機能破壊実験（ノックダウン実験）を行うと、部分的にはあるがp53欠損細胞でのグルコース消費量の増大は抑えられると共に、rasがん遺伝子による、軟寒天培地でのコロニーの形成も抑制された。更に、p53欠損細胞でNF-κBp65をノックダウンするとrasがん遺伝子による軟寒天培地でのコロニーの形成が抑えられるが、この細胞にGLUT3を強制発現させると、コロニー形成能が部分的に回復した。従って、GLUT3の誘導がp53の機能が無い細胞でのグルコース代謝の増大とがん化の起こりやすさに関与していると考えられた（図4）。しかし、GLUT3の効果はかなりあるものの、完全にはNF-κBの機能を補完するものではなく、NF-κBには他にもグルコース代謝経路に作用する機構が存在することが推測された³⁵⁾。

7. p53欠損細胞でのIKK-NF-κB-グルコース代謝のポジティブフィードバック制御

このように、p53はNF-κBの機能を制限することで、グルコース代謝を制御しており、p53の機能が失われるとIKK-NF-κB経路の恒常的な活性化によってグルコース代謝の亢進が起こる。面白いことに、p53欠損細胞でのIKKの活性の亢進は、NF-κBの活性を抑制するとみられ

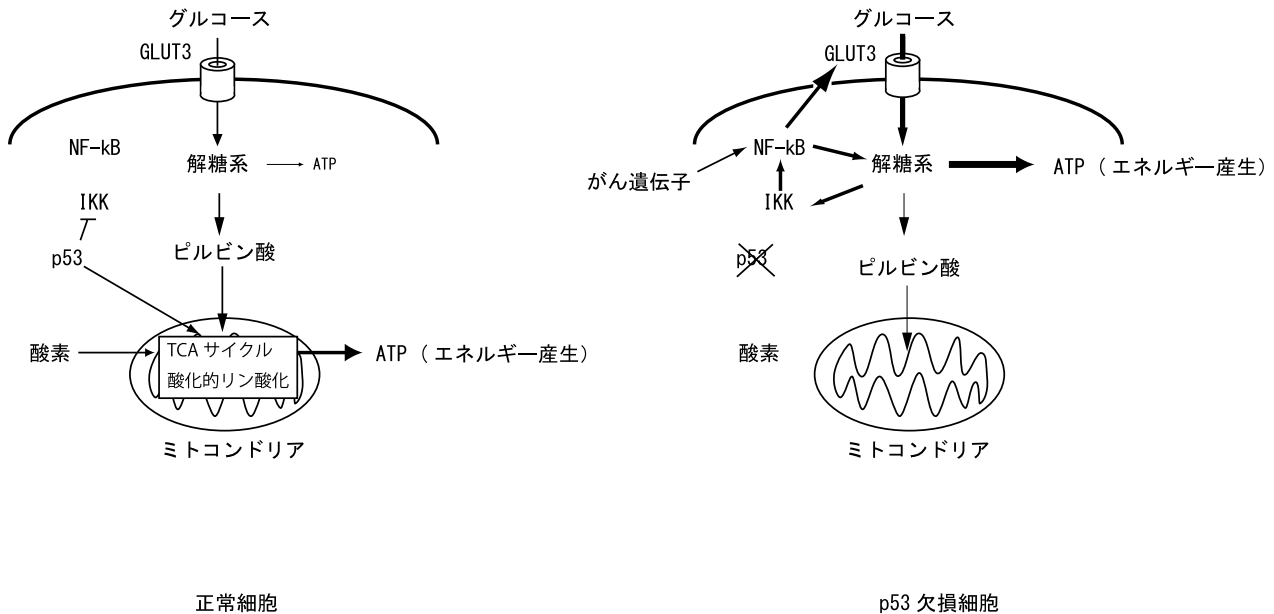


図4 p53によるグルコース代謝制御とがん化

正常細胞では p53 が IKK-NF-κB 経路を制限すると共に、ミトコンドリアでの呼吸 (TCA サイクル, 酸化的リン酸化) を活性化してエネルギーを産生している。p53 が機能欠損すると、ミトコンドリアでの呼吸が減少すると共に、IKK-NF-κB 経路が活性化し、GLUT3 の発現を誘導し、解糖系によるエネルギー産生を増加させる。このエネルギー産生はポジティブフィードバック機構により、自己増幅している。

このような細胞でがん遺伝子が活性化すると、更に IKK-NF-κB 経路の活性化が起き、解糖系によるエネルギー産生が増加する。このことが、がん化に重要である (詳細は本文参照)。

なくなること、解糖系の阻害剤を用いると IKK の活性が抑制されることを見いだした³⁵⁾。このことから、p53 の機能が無い状態では IKK-NF-κB-グルコース代謝のポジティブフィードバックによるグルコース代謝の亢進が起こっていると考えられた。この機構を使って、がん細胞では自己増幅的にグルコース代謝の増大が起こり、エネルギーをどんどん作り出す機構が働いているのではないかと推測される。このポジティブフィードバックの機構として、我々は IKKβ の 733 番目のセリンが *O*-GlcNAc (*O*-linked-*N*-acetylglucosamine) 修飾を受けることを見いだした⁴⁵⁾。この修飾部位はリン酸化を受けることで IKKβ の活性が抑制される部位であり、*O*-GlcNAc 修飾を受けることでこのリン酸化が阻害されて恒常的な活性化を起しているのではないかと考えられる。この *O*-GlcNAc 修飾は、p53 欠損細胞 (グルコース代謝が亢進している; 前述) で恒常的に起こっており、また正常細胞を高グルコース培地で培養すると起こる。これに対して p53 欠損細胞をグルコースを含まない培地で培養するとみられなくなることから、*O*-GlcNAc 修飾自体は解糖系が亢進すると増大するものであり、p53 が機能欠損してグルコース代謝が亢進するとこの機構が働き出すのではないかと考えられる。ヒトの正常繊維芽細胞は、がん遺伝子である活性化 *ras*, *c-myc*, SV40 ウィルス T 抗原 (T 抗原は p53 を不活性化する) を遺伝子導入することでトランスフォームさせることができるが、トランス

フォームさせたヒトの細胞もグルコース代謝が著明に亢進すると共に、IKKβ の恒常的な活性化と *O*-GlcNAc 修飾の亢進が観察された⁴⁵⁾。これらのことから、この機構を介して、がん細胞はエネルギー産生を亢進させているのではないかと考えられる。

おわりに

がん細胞が解糖系を主なエネルギー源として増殖することはワールブルグ効果と呼ばれて古くから知られている現象であるが、最近の分子生物学的解析の進歩によりやっとその機構が明らかになりつつあるところである。我々の解析はそのなかでも p53-NF-κB の役割を明らかにした新しい発見であり、更にこのグルコース代謝の増大ががん遺伝子によって細胞が腫瘍形成能を獲得すること、即ち、がん化に重要であることを見いだしたものである。このことは、がん化の分子機構を解明する上で重要な発見ではないかと考えている。今後は、グルコース代謝の亢進が引き起こす細胞内での変化を解析することで、がん化の分子機構を明らかにしていきたい。一方で、これまでの解析は、培養細胞を使ったものに限定していたので、実際の様々な組織に発生するがんでこの機構が共通してみられるものかは明らかではない。それぞれの組織では特有の制御機構が働いており、全てに IKK-NF-κB-GLUT3 の活性化経路が働いているとは限らない。基本の p53 の機能欠損からグルコー

ス代謝の亢進の経路は必須であるが、この間に関わる制御分子はそれぞれのがんで異なっていることも考えられる。更には、HIF1等のNF- κ Bの他の解糖系の制御因子とp53の制御関係もまだ明らかではない。今後は、これらのことについて更に詳細な分子機構を解析すると共に、p53によるグルコース代謝の制御がマウス個体での発がん過程で果たす役割、各種ヒトがん組織での役割とそれに関わる制御分子の詳細について解析していくと共に、この研究で明らかになった機構を標的としたがんの治療法の開発につなげていきたいと考えている。

文 献

- 1) Oren, M. (2003) *Cell Death Differ.*, **10**, 431-442.
- 2) Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (2004) *Nat. Med.*, **10**, 789-799.
- 3) Tabori, U. & Malkin, D. (2008) *Cancer Res.*, **68**, 2053-2057.
- 4) Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., & Bradley, A. (1992) *Nature*, **356**, 215-221.
- 5) Lane, D.P. (1992) *Nature*, **358**, 15-16.
- 6) Gatenby, R.A. & Gillies, R.J. (2004) *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 891-899.
- 7) Hsu, P.P. & Sabatini, D.M. (2008) *Cell*, **134**, 703-707.
- 8) Meller, J., Sahlmann, C.O., & Scheel, A.K. (2007) *J. Nucl. Med.*, **48**, 35-45.
- 9) Nozawa, H., Oda, E., Nakao, K., Ishihara, M., Ueda, S., Yokochi, T., Ogasawara, K., Nakatsuru, Y., Shimizu, S., Ohira, Y., Hioki, K., Aizawa, S., Ishikawa, T., Katsuki, M., Muto, T., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 1240-1245.
- 10) Bode, A.M. & Dong, Z. (2004) *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 793-805.
- 11) Chuikov, S., Kurash, J.K., Wilson, J.R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G.S., McKinney, K., Tempst, P., Prives, C., Gambelin, S.J., Barlev, N.A., & Reinberg, D. (2004) *Nature*, **432**, 353-360.
- 12) Huang, J., Perez-Burgos, L., Placek, B.J., Sengupta, R., Richter, M., Dorsey, J.A., Kubicek, S., Opravil, S., Jenuwein, T., & Berger, S.L. (2006) *Nature*, **444**, 629-632.
- 13) Strahl, B.D. & Allis, C.D. (2000) *Nature*, **403**, 41-45.
- 14) Sims, R.J., 3rd & Reinberg, D. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 815-820.
- 15) Sherr, C.J. (2004) *Cell*, **116**, 235-246.
- 16) Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., & Vogelstein, B. (1999) *Nature*, **401**, 616-620.
- 17) Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., & Leder, P. (1995) *Cell*, **82**, 675-684.
- 18) Wu, X. & Deng, Y. (2002) *Front. Biosci.*, **7**, d151-156.
- 19) Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J. (2004) *Cell*, **116**, 205-219.
- 20) Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V.M., Adelman, D.M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J.A., Evan, G., Korsmeyer, S.J., MacGregor, G.R., & Thompson, C.B. (2000) *Mol. Cell*, **6**, 1389-1399.
- 21) Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (2000) *Science*, **288**, 1053-1058.
- 22) Nakano, K. & Vousden, K.H. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 683-694.
- 23) Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W., & Vogelstein, B. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 673-682.
- 24) Shibue, T., Takeda, K., Oda, E., Tanaka, H., Murasawa, H., Takaoka, A., Morishita, Y., Akira, S., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 2233-2238.
- 25) Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., & Strasser, A. (2003) *Science*, **302**, 1036-1038.
- 26) Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., & Housman, D.E. (1993) *Cell*, **74**, 957-967.
- 27) Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., & Lowe, S.W. (1997) *Cell*, **88**, 593-602.
- 28) Lowe, S.W., Cepero, E., & Evan, G. (2004) *Nature*, **432**, 307-315.
- 29) Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J., & Bartek, J. (2005) *Nature*, **434**, 864-870.
- 30) Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Dittullo, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., Kletsas, D., Yoneta, A., Herlyn, M., Kittas, C., & Halazonetis, T.D. (2005) *Nature*, **434**, 907-913.
- 31) Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., Takaoka, M., Nakagawa, H., Tort, F., Fugger, K., Johansson, F., Sehested, M., Andersen, C.L., Dyrskjot, L., Orntoft, T., Lukas, J., Kittas, C., Helleday, T., Halazonetis, T.D., Bartek, J., & Gorgoulis, V.G. (2006) *Nature*, **444**, 633-637.
- 32) Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Gare, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., Maestro, R., Pelicci, P.G., & d'Adda di Fagnaga, F. (2006) *Nature*, **444**, 638-642.
- 33) Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., & Jacks, T. (2007) *Nature*, **445**, 661-665.
- 34) Tanaka, N., Ishihara, M., Kitagawa, M., Harada, H., Kimura, T., Matsuyama, T., Lamphier, M.S., Aizawa, S., Mak, T.W., & Taniguchi, T. (1994) *Cell*, **77**, 829-839.
- 35) Kawachi, K., Araki, K., Tobiume, K., & Tanaka, N. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 611-618.
- 36) Karin, M. & Ben-Neriah, Y. (2000) *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 621-663.
- 37) Rayet, B. & Gelinas, C. (1999) *Oncogene*, **18**, 6938-6947.
- 38) Karin, M. (2006) *Nature*, **441**, 431-436.
- 39) Pahl, H.L. (1999) *Oncogene*, **18**, 6853-6866.
- 40) Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., & Hwang, P.M. (2006) *Science*, **312**, 1650-1653.
- 41) Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., & Vousden, K.H. (2006) *Cell*, **126** (1), 107-120.
- 42) Denko, N.C. (2008) *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 705-713.
- 43) Macheda, M.L., Rogers, S., & Best, J.D. (2005) *J. Cell. Physiol.*, **202**, 654-662.
- 44) Medina, R.A. & Owen, G.I. (2002) *Biol. Res.*, **35**, 9-26.
- 45) Kawachi, K., Araki, K., Tobiume, K., & Tanaka, N. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3431-3436.