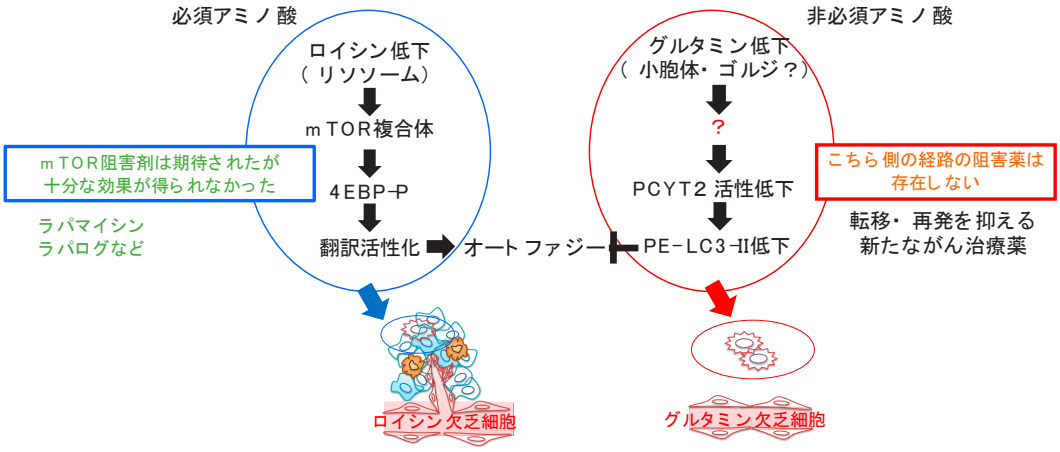
6　がん細胞のアミノ酸欠乏適応機構の解明と治療法の開発	大澤　毅

【目的】がんの転移・浸潤・薬剤耐性などの悪性化には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。必須アミノ酸の欠乏には mTOR 複合体を介した感知メカニズムが広く知られている。一方、我々は非必須アミノ酸欠乏で、がん細胞は mTOR 複合体を介さない感知し適応機構を見出している。本研究では、アミノ酸欠乏の感知・適応機構の探索から新規がんの治療法の開発につながる研究を目的とする。

【方法】本研究は、低栄養のがん細胞の生存の鍵となるアミノ酸欠乏に対する新しい感知・適応メカニズムの解明を目的とし、我々が持つ独自の低栄養培養系（Osawa et al.PNAS 2011、Osawa et al.Cell Reports 201）に、アミノ酸を 1 種類ずつ添加することで、これまで他の栄養素の作用が混在し解析が困難であった 1 アミノ酸に起因する系統的な遺伝子発現解析、エピゲノム解析やメタボローム解析を正常細胞とがん（HeLa、PANC）細胞の比較から実現することを目的とし研究を行った。具体的には、我々独自の実験系を駆使して研究期間内で、1. グルタミンを基軸としたアミノ酸欠乏感知機構の解明、2. グルタミンを基軸としたアミノ酸欠乏に対する細胞適応機構の解明、及び、1、2 で同定した標的について 3. *in vivo* における抗腫瘍効果の検討、の 3 項目を検討した。

【結果】本研究では、グルタミンを基軸としたアミノ酸欠乏感知機構の解明のために、独自の低栄養培地に各アミノ酸のみを添加した培地を作製し 1 種類ずつの各アミノ酸存在下で、繊維芽細胞とがん細胞（HeLa、PANC1 細胞）を 24 時間培養し、グルタミンで誘導され、ロイシンやその他のアミノ酸では変動しない遺伝子群、プロモーター、エンハンサーの同定し、上流転写因子や制御機構因子候補として、NRF や SLC 蛋白質群を同定した（未発表）。次に、アミノ酸欠乏に対する細胞適応機構の解析のため、アミノ酸各種欠乏培地でがん細胞を培養し、LC3Ⅱの蛋白発現を指標として、オートファジーの活性化の検討を行った。ロイシンなどの欠乏は、オートファジーが活性化する。一方、我々は、グルタミン欠乏が PE 合成を抑制しオートファジーを抑制する可能性を発見した。これらの標的候補に関して引き続き抗腫瘍効果を検討している。

アミノ酸の新たな感知・適応機構の解明が画期的ながん治療法につながる



6. がん細胞のアミノ酸欠乏適応機構の解明と治療法の開発

大澤　毅

東京大学 先端科学技術研究センター ニュートリオミクス・腫瘍学分野

Key words：腫瘍微小環境，がん代謝，アミノ酸，オミクス統合解析

緒　言

がんの転移・浸潤・薬剤耐性などの悪性化には、腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。我々は、低酸素・低栄養・低 pH の過酷な腫瘍微小環境ががん悪性化を促進することを報告してきた［1〜3］。また、がん細胞は、低酸素・低栄養・低 pH の過酷な環境において、ミトコンドリア非依存的な解糖系、次いで酢酸代謝、さらにグルタミン代謝という多重の代謝適応システムで生存し悪性化を獲得する知見を得てきた。近年、がんや生活習慣病の研究領域では、アミノ酸の代謝異常が注目されている。ロイシン、バリンなどの必須アミノ酸の欠乏には mTOR 複合体を介したアミノ酸欠乏認識機構が存在することが知られている。一方、我々はグルタミンやセリンなど非必須アミノ酸の欠乏で、がん細胞は mTOR 複合体を介さない新しいアミノ酸欠乏の認識メカニズムを利用する可能性を見出している。

がん細胞が正常細胞とは異なる代謝機構を有することは、1950 年代オット・ワーブルグ博士が提唱した「Origin of Cancer」まで遡る［4］。低酸素環境におけるがん細胞は HIF1α を介し解糖系（ワーブルグ効果）を促進し［5］、乳酸や H^+ 細胞外排出に伴って腫瘍内の一部は低 pH に陥る［6］。我々や Corbet らは、低 pH のがん細胞は SREBP2 や FAO を介し酢酸代謝（ACSS2）を促すことを報告し、低 pH が単なる低酸素やワーブルグ効果の結果ではなく低 pH が原因となってがん進展を促進することを報告してきた［2，7，8］。

近年、がん代謝研究領域では、解糖系、脂質代謝、1 炭素代謝、酢酸代謝に加えて、アミノ酸代謝が注目されている。ロイシン、イソロイシン、バリンなどの必須アミノ酸は、mTOR 複合体を介し転写・翻訳・増殖・転移などがんの進展・悪性化を促すだけでなく、HIF1α、SREBP2、ATF4 のストレス適応機構と協調的に働くことが最近示唆され、mTOR 複合体を介したアミノ酸代謝研究の重要性が報告されている（Manning ら、Sabatini ら、*Cold Spring Harbor* 2018）。

このことからラパマイシン、ラパログなどの mTOR 複合体阻害剤が新しいがん治療薬として登場し一定の治療効果は得られているが、がんの根治には至っていない。一方、我々はグルタミンやセリンなど非必須アミノ酸において mTOR 複合体を介さないアミノ酸欠乏感知・適応機構が存在する可能性を見出している。

本研究は、これまで知られていない新しいアミノ酸センシング機構の解明に挑戦する。具体的には、我々が開発した独自の低栄養培養系［1，2］に、アミノ酸を 1 種類ずつ添加することで、これまで他の栄養素の作用が混在し解析が困難であった 1 アミノ酸に起因する系統的な遺伝子発現解析、ヒストン修飾解析、メタボローム解析などの系統的解析が可能となる。本研究は、1 アミノ酸レベルの解像度でのオミクス情報を取得し、がん細胞の最後の砦である、ノンカノニカルな mTOR アミノ酸センシング機構の探索およびがん悪性化機構の解明を目的とした。

方　法

1. アミノ酸欠乏・添加培地の作製とアミノ酸欠乏・添加培養法

ダルベッコ High グルコース DMDM 培地の栄養素を基準にし、各 1 アミノ酸を欠損させて培地を作製した。また、糖、アミノ酸、ビタミンの全栄養素を抜いた培地（低栄養培地）を作製し［1，2］、低栄養培地に 1 アミノ酸のみを加えた 1 アミノ酸培地を作製した。これら低栄養培地に各アミノ酸のみを添加した培地で、HeLa 細胞を 24 時間培養し、各アミノ酸で特異的に発現誘導される遺伝子群やエピゲノム修飾の解析に用いた。

2. 遺伝子発現、エピゲノム解析

低栄養培養、アミノ酸欠乏培地で培養した細胞試料から総 RNA と抽出し、RNA-Seq 用にライブラリー調製を行い RNA-Seq を行い、さらに各アミノ酸において特異的なパスウェイの解析を行った。また、各種アミノ酸で特異的なヒストン修飾情報（H3K4me3、H3K27ac）を取得し、H3K4me3 陽性で H3K27ac 陽性のプロモーター領域と H3K4me3 陰性で H3K27ac 陽性のエンハンサー領域の同定と解析を行った。

3. mRNA、タンパク質解析

低栄養培養、アミノ酸欠乏培地で培養した細胞試料から総 RNA と抽出し cDNA 合成し、標的遺伝子に関してリアルタイム PCR 法により mRNA 発現やヒストン修飾を確認した。同様に総タンパク質を抽出し、オートファゴソーム膜の合成などを検討するために、LC3Ⅱウエスタンブロット法を用いてタンパク質の発現解析を行った。

結　果

1.　アミノ酸欠乏感知機構の解明

がん細胞はロイシンなどの必須アミノ酸の欠乏を、mTOR 複合体を介したシグナル伝達系で感知することが知られている。一方、非必須アミノ酸欠乏の感知機構は未解明な点が多い。本項目は、独自の低栄養培地に各アミノ酸のみを添加した培地を作製し［1］、各アミノ酸存在下で、がん細胞（HeLa 細胞）を 24 時間培養し、各アミノ酸で特異的に発現誘導される遺伝子群を同定した（図 1）。パスウェイ解析を用いて各アミノ酸における上流制御因子の同定を試みた。我々はグルタミンで誘導され、ロイシンやその他のアミノ酸では変動しない PCYT2 を含む遺伝子群を見出している（図 1）。また、これらの PCYT2 などグルタミン特異的に発現誘導される遺伝子群は、5'UTR のプロモーター領域を導入したルシフェラーゼベクターに導入しても、ルシフェラーゼの発現が誘導されないことから、5'UTR のプロモーター領域のみならず遠隔のエンハンサーの関与が示唆された（未発表データ）。

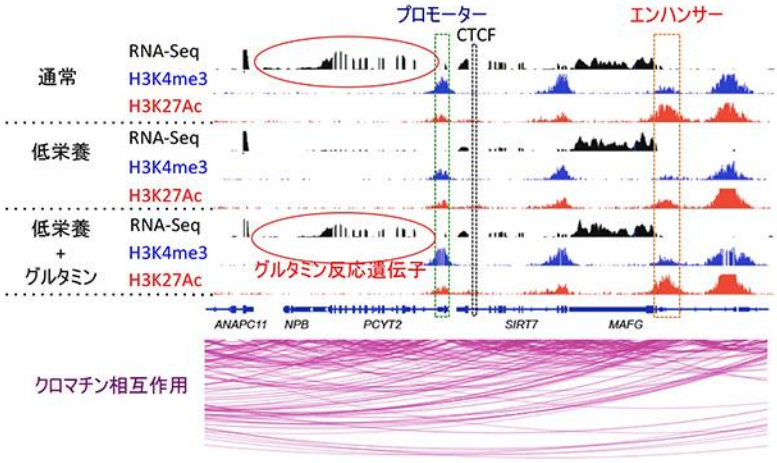


図1. グルタミンに反応する遺伝子の発現はプロモーターのみならずクロマチンの相互作用による遠隔のエンハンサーが関与する

上述のように、グルタミンで誘導され、ロイシンやその他のアミノ酸では変動しない遺伝子群を見出したが（図 1）、グルタミンがどのように遺伝子発現を制御するかは、未だ不明な点が多い。そこで、HeLa 細胞を用いて、通常培養、低栄養培養と比べて低栄養培地にグルタミンを添加した際のヒストン修飾情報（H3K4me3、H3K27ac）を網羅的に取得し、全遺伝子領域においてグルタミン特異的なプロモーター領域（H3K4me3 陽性、H3K27ac 陽性）、エンハンサー領域（H3K4me3 陰性、H3K27ac 陽性）の同定を試みた、グルタミンで誘導されるエンハンサー領域（4%）、グルタミンで誘導されるプロモーター領域（3%）を同定した（図 2a）。また、グルタミン標的遺伝子群、グルタミン標的エンハンサー、グルタミンで変動するクロマチン相互作用の解析から感知・制御因子候補を複数同定した。

また、通常培養と比較較して低栄養で消失し、低栄養培地にグルタミンを添加した際に戻るヒストン修飾領域（H3K4me3-ve H3K27ac+ve）からグルタミン特異的なエンハンサー領域から、グルタミン特異的なエンハンサー領域のモチーフ解析を行い、エンハンサー領域に結合する上流転写制御因子を複数同定した。例として、上流転写制御因子の候補として NRF を同定している（図 2b）。さらに、NRF のクロマチン免疫沈降実験から、グルタミン特異的に NRF が結合する NRF 標的遺伝子群（例 *NQO1* など）を同定した（図 2c）。

このように、グルタミン特異的エンハンサーを介して NRF 転写制御が、代謝リプログラミングを促進する可能性を見出しているため、今後 NRF を重点的にどのような転写複合体を介して、グルタミンを感知するか NRF を免疫沈降したサンプルをプロテオミクス解析から、NRF と転写複合体を形成するタンパク質群の同定を目指す予定である。

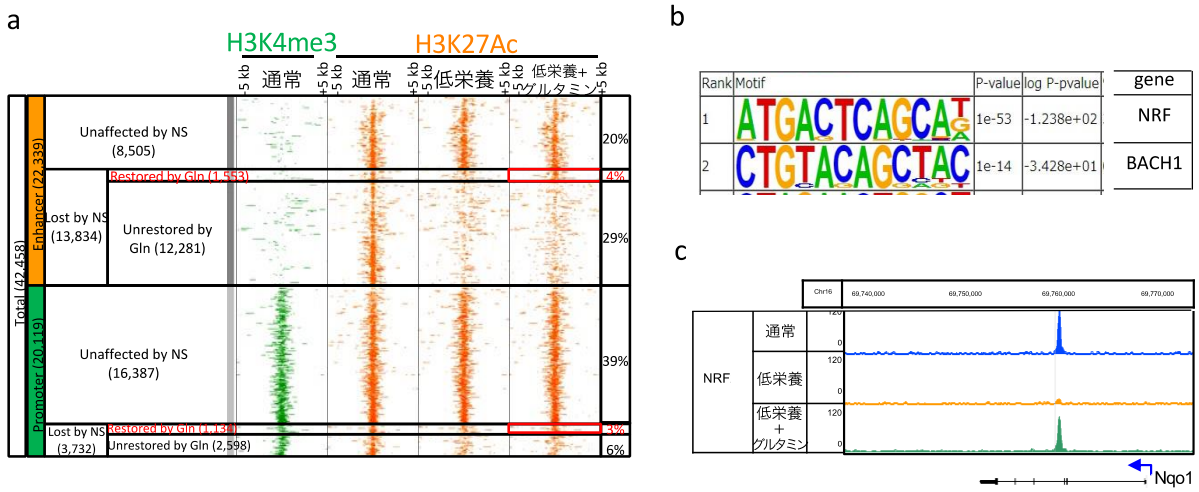


図2. グルタミン特異的なエンハンサー領域のモチーフ解析からNRFを同定した

a) グルタミン特異的なプロモーター領域、エンハンサー領域を同定した。

b) グルタミン特異的なエンハンサー領域のモチーフ解析から NRF を同定した。

c) NRF の ChIP-Seq から標的因子の発現制御領域に結合した。

2. アミノ酸欠乏に対する細胞適応機構の解明

正常細胞はロイシンなどのアミノ酸欠乏に対する適応機構として、オートファジーを介した細胞生存のメカニズムを有する。また、がん細胞は、エネルギー代謝、及び、免疫寛容を促進するため恒常的にオートファジーが活性化されていることが知られている。ロイシンなどの必須アミノ酸の欠乏は、がん細胞において細胞膜リン脂質ホスファチジルエタノールアミン（PE）を膜成分とするオートファゴソーム膜（LC3II/Atg8-PE）の形成を促進し、オートファジーを活性化することが知られている。一方、我々は、グルタミン欠乏が、PCYT2 を発現低下し PE 合成を抑制することを報告した［3］。グルタミンが欠乏したがん細胞は、オートファジーを抑制する可能

性を見出した（図 3）。このように、がん細胞にはロイシンなどの必須アミノ酸に対する適応機構と異なるグルタミン欠乏に対するアミノ酸欠乏適応機構が存在することが示唆された（図 3）。

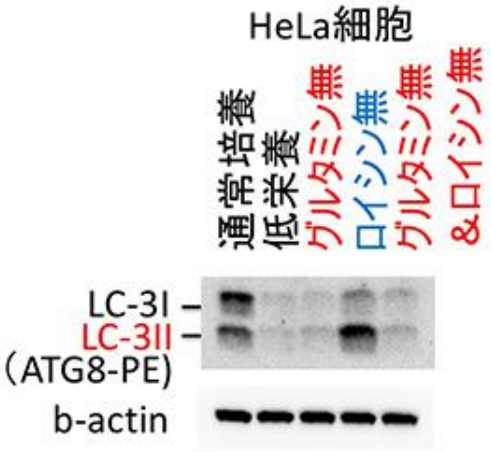


図3. グルタミン欠乏ではオートファジーが活性化しない
HeLa 細胞を通常培養、低栄養、グルタミン欠損培地、ロイシン欠損培地、
グルタミン、ロイシン欠損培地で培養し、ウエスタンブロット法により LC3Ⅱの
蛋白質量を測定した。

考　察

アミノ酸経路は生体内で最も重要な代謝経路の 1 つで、がん細胞においても mTOR 複合体を介した転写・翻訳・増殖・転移ががん悪性化に重要な役割を果たすと考えられてきた。このことからラパマイシン、ラパログなどの mTOR 複合体の阻害剤が新しいがん治療薬として登場し一定の治療効果は得られているが、がんの根治には至っていない。その理由の 1 つとして、mTOR 複合体非依存的なアミノ酸シグナル経路が存在することが考えられるが、mTOR 複合体以外のアミノ酸感知機構や複合体は未だ報告されていない。本研究は、これまで知られていない新しいアミノ酸センシング機構の解明に挑戦した。具体的には、我々が開発した独自の低栄養培養系［1，2］に、アミノ酸を 1 種類ずつ添加する独自の 1 アミノ酸培養法を用いて、これまで他の栄養素の作用が混在し解析が困難であった 1 アミノ酸に起因する系統的な遺伝子発現解析、ヒストン修飾解析、メタボローム解析、プロテオーム解析の系統的解析を行い 1 アミノ酸の有無に起因する遺伝子発現解析、ヒストン修飾解析、メタボローム解析行った。

本研究は、将来的に、ミトコンドリア、リソソームなどの細胞小器官の単離法と［9］、我々が有する 1 アミノ酸培養系を組み合わせた、独自のメタボロ・プロテオーム解析に発展する可能性を有している。すなわち、これまで取得が困難であった 1 アミノ酸に起因する代謝・シグナル伝達の変動を細胞小器官レベルで解析が可能となりミトコンドリア、ER、リソソームシグナルにおける新たな次元のオミクス情報の取得が可能となる。本研究は、これまで我々が行ってきた細胞レベルの単なるオミクス情報取得研究とは全く異なり、細胞小器官ごと、且つ、1 アミノ酸レベルの解像度でのオミクス情報を取得し、がん細胞の最後の砦である、ノンカノニカルな mTOR アミノ酸センシング機構の探索およびがん悪性化機構の解明に繋がる可能性がある課題である。本研究が成功すれば、これまでのがん研究のみならず、アミノ酸代謝疾患研究の治療法への応用や、オートファジー研究などの学術体系の変革や転換にも繋がることが期待され、腫瘍微小環境を標的とした新たながん治療法のみならず、先天性アミノ酸代謝異常疾患の病態生理解明や治療法への応用が期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者について、遺伝子発現解析、エピゲノム解析に用いたシークエンスは、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野の油谷浩幸教授、メタボローム解析は、慶応大学先端生命科学研究所の曽我朋義教授、バイオインフォマティクスの解析は、名古屋大学医学系研究科システム生物学分野の島村徹平教授の協力を得て行った。また、本研究は、東京大学先端科学技術研究センターニュートリオミクス・腫瘍学分野、ゲノムサイエンス分野において、学生諸氏の協力のもと実施された。研究費の支援を受けた上原記念生命科学財団に特に感謝申し上げる。また、本研究は未公表の基礎検討に立脚されており、この間の公的研究費による支援にも深く感謝する。

文　献

1) Osawa T, Muramatsu M, Wang F, Tsuchida R, Kodama T, Minami T, Shibuya M. Increased expression of histone demethylase JHDM1D under nutrient starvation suppresses tumor growth via down-regulating angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Dec 20;108(51):20725-9. doi: 10.1073/pnas.1108462109. Epub 2011 Dec 5.PMID: 22143793

2) Kondo A, Yamamoto S, Nakaki R, Shimamura T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Yoshida T, Aburatani H, Osawa T. Extracellular Acidic pH Activates the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 to Promote Tumor Progression Cell Rep. 2017 Feb 28;18(9):2228-2242. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.006. PMID: 2824916.

3) Osawa T, Shimamura T, Saito K, Hasegawa Y, Ishii N, Nishida M, Ando R, Kondo A, Anwar M, Tsuchida R, Hino S, Sakamoto A, Igarashi K, Saitoh K, Kato K, Endo K, Yamano S, Kanki Y, Matsumura Y, Minami T, Tanaka T, Anai M, Wada Y, Wanibuchi H, Hayashi M, Hamada A, Yoshida M, Yachida S, Nakao M, Sakai J, Aburatani H, Shibuya M, Hanada K, Miyano S, Soga T, Kodama T. Phosphoethanolamine Accumulation Protects Cancer Cells under Glutamine Starvation through Downregulation of PCYT2. Cell Rep. 2019 Oct 1;29(1):89-103.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.087.PMID: 31577958

4) Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. Science. 1956. PMID: 13351639

5) Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. Cell. 2008 Sep 5;134(5):703-7. doi: 10.1016/j.cell.2008.08.021.

6) Corbet C, Feron O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. Nat Rev Cancer. 2017 Oct;17(10):577-593. doi: 10.1038/nrc.2017.77. PMID: 28912578

7) Schug ZT et al. Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. Cancer Cell. 2015, 27(1):57-71. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.12.002 PMID: 25584894

8) Gao X et al. Acetate functions as an epigenetic metabolite to promote lipid synthesis under hypoxia. Nat Commun. 2016, 7:11960. PMID: 27357947, DOI: 10.1038/ncomms11960

9) Chen WW, Freinkman E, Wang T, Birsoy K, Sabatini DM. Absolute Quantification of Matrix Metabolites Reveals the Dynamics of Mitochondrial Metabolism Cell. 2016 Aug 25;166(5):1324-1337.e11. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.040.PMID: 27565352