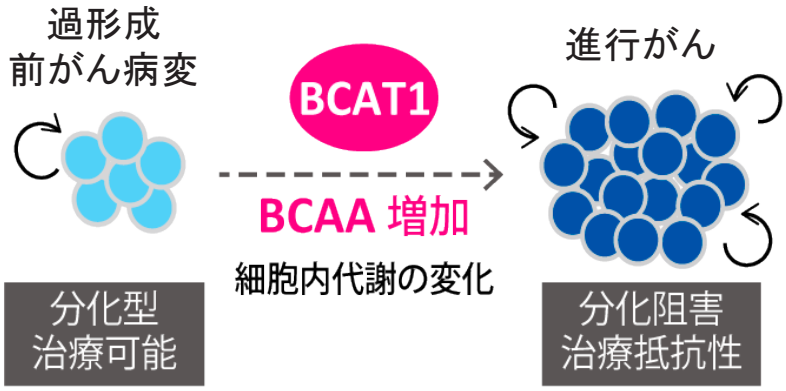
75　固体NMR技術の利用による新しいがん細胞生物学の創出	伊藤　貴浩

【目的】これまでの研究で私たちは、骨髄性白血病の悪性化に伴って細胞内代謝のリプログラミングが生じることを見出している。この代謝変動にはアミノ酸代謝酵素 BCAT1 の発現上昇が必要で、この酵素の発現や機能を阻害するとがん幹細胞が消失して治癒が可能であることをマウスモデル・患者検体を用いた解析で明らかにした。この研究は、特定の代謝経路の阻害が有望ながん治療戦略となる可能性を示しており、がん代謝の精密な観測とそれに基づく代謝制御機構の理解が重要な課題となっている。本研究では、がんの代謝リプログラミング現象の分子機構の解明のための新たな代謝解析法を確立することを目的として、固体核磁気共鳴分光法（NMR）の一技術であるマジック角回転（Magic Angle Spinning : MAS）と高分解能 NMR を組み合わせた High Resolution NMR MAS（HR-MAS）技術を生きた細胞に適用し、細胞内代謝をリアルタイムで検出するシステムを構築することを目指した。

【方法】ヒト白血病細胞株を、バリンを含まない培地に懸濁し、NMR 測定用ロータに移した。ここに安定同位体 ^{13}C で標識されたケトイソ吉草酸を添加し、すぐに NMR スペクトルの測定を開始した。1 次元インバース異種核相関（1D HSQC）実験とそのスペクトルの取得は Avance III HD console を有する 600 MHz 超伝導磁石にて TopSpin（Bruker）を用いて行った。128 走査分を単位時間当たりのスペクトルとした。測定後、スペクトルは MNova（Mestrelab Research）で解析した。

【結果】ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 を用いて ^{13}C 同位体標識したケトイソ吉草酸（^{13}C-KIV）を培地に添加して HR-MAS による計時測定を行ったところ、^{13}C-バリン（Val）に由来するシグナルが検出された。すなわち、HR-MAS 法によって生きた細胞中での分岐鎖アミノ酸の出現をリアルタイムで検出できることがわかった。新しく開発したこの方法を応用した解析を行ったところ、白血病細胞内では BCAA 分解よりも産生が亢進していること、同様の現象がヒト急性骨髄性白血病細胞でも観察されること、またがんで頻回に観察される遺伝子変異によってこの BCAA 産生が変化しうること、が明らかになった。今後、非破壊で連続的に代謝状態を解析できるという本解析系の利点を生かして、患者ごとのがん細胞の代謝様式プロファイリングや患者層別化への利用について検討する技術基盤を構築できたと考えている。

細胞内代謝変動によるがん進行の制御



75. 固体 NMR 技術の利用による新しいがん細胞生物学の創出

伊藤　貴浩

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 がん・幹細胞シグナル分野

Key words：骨髄性白血病，がん代謝，分岐鎖アミノ酸，HR-MAS

緒　言

がん患者の予後に大きな影響を与える要因のひとつが、がんの悪性化・進展の有無である。一般に、病期初期では放射線や化学療法に対する応答は良好であるが、進行期では治療抵抗性や転移が生じるため、予後は不良である。従って、がん進行制御の分子機構を明らかにし、それを標的とする治療法を開発することは、がん制圧に大きく貢献すると考える。この長期目標のもと、私たちは骨髄性白血病をひとつのモデルとして、がん進展の分子機構の理解を目指している。

好気的解糖現象に代表されるように、がん細胞が正常細胞とは異なる代謝様式を示すことや、遺伝子変異によって誘導される積極的な代謝変動ががんの発生に直接寄与すること等が解明されてきた［1］。一方で、分化障害や転移、治療抵抗性の獲得など、がん進展過程における代謝変動の役割や意義については殆ど解析されていない。即ち、予後の改善にはがん進展を制御する細胞代謝特性の理解が必須であり、これら分子機構の理解に基づく新たな分子標的療法の開発と応用がいま必要である。私たちはこれまでの研究で、慢性骨髄性白血病（CML）の病期進展において分岐鎖アミノ酸類（BCAAs）の増加が必須であることを明らかにしている［2］。この代謝リプログラミングには BCAA 代謝酵素 BCAT1 の発現上昇が必須で、実際に BCAT1 の阻害によって急性転化期細胞の分化障害が解除され、治癒が可能であることを発見した。興味深いことに、BCAT1 は正常造血組織では殆ど発現しておらず、BCAT1 機能阻害を行っても顕著な異常が生じなかった。これらの結果は、特定の代謝経路の阻害が有望ながん治療戦略となる可能性を示しており、がん代謝の精密な観測とそれに基づく代謝制御機構の理解が重要な課題となっている。

細胞内代謝解析には、質量分析器を用いる手法が現状では主流だが、これらの技術では細胞の破壊が必須でありがん細胞内の代謝活動を連続的に観察することは不可能である。本研究では、この問題点を克服して新たな代謝解析法を確立するために、固体核磁気共鳴分光法（NMR）の一技術であるマジック角回転（Magic Angle Spinning：MAS）と高分解能 NMR を組み合わせた High Resolution NMR MAS（HR-MAS）技術を生きた細胞に適用し、細胞内代謝をリアルタイムで検出するシステムを構築することを目指した。

方　法

1. 細胞及び培養条件

本研究に使用したヒト白血病細胞株 K562、HL60、U937、MV4;11 株は American Type Culture Collection（ATCC）より入手した。通常培養時は 10%FBS（HL60 は 20%）、100 IU/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン含有 RPMI1640 培地で細胞を増殖維持した。HR-MAS 試験に使用した際には、細胞を生理的食塩水（PBS）にて洗浄して培地成分を除去したのち、添加する化合物を含まない IMDM 培地に懸濁し、アッセイ開始まで氷上で静置した。

2. HR-MAS

上記 1 に記載の方法で調製した細胞を遠心にて回収し、試験 ^{13}C 同位体標識化合物を含まない IMDM 培地に懸濁して HR-MAS 用ジルコニア製ローター（直径 4 mm、Bruker）に移した。^{13}C 同位体標識化合物は重水中に希釈して 100 倍濃度となるようにした溶液を調製した。測定開始直前に終濃度 170 μM になるように細胞位懸濁液に添加してピペッティングでよく混合し、Kel-F ロータキャップで封入後にすぐにスペクトル測定を開始した。NMR スペクトルの測

定は、Avance III HD console を有する 600 MHz 超伝導磁石（Bruker、UGA NMR Facility）を用いて行った。測定中ロータは 3.1 kHz、298 K に維持した。1 次元インバース異種核相関（1D HSQC）実験とそのスペクトルの取得は TopSpin（v4.0、Bruker）を用いて行った。128 走査分を単位時間当たりのスペクトルとした。測定後、スペクトルは MNova（v14.1.0、Mestrelab Research）で解析した。

結　果

1. 細胞内 BCAA 合成のリアルタイム検出系の構築

これまでに細胞内代謝様式の変化とくに分岐鎖アミノ酸（BCAA）代謝が白血病幹細胞の機能維持に必須であること、また慢性骨髄性白血病の病期進展に寄与することを私たちは見出している［2］。この BCAA 代謝変動は主に BCAA アミノ基転移酵素 BCAT1 の発現上昇によることがわかっている。そこでまずは分岐鎖アミノ酸に着目して HR-MAS による細胞内代謝のリアルタイム分析について開発を試みた。

BCAT1 は、グルタミン酸と分岐鎖ケト酸から、ケトグルタル酸と分岐鎖アミノ酸を合成する反応を触媒するアミノ基転移活性をもつ酵素である（図 1a）［3］。ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 を用いて、^{13}C 同位体標識したケトイソ吉草酸（^{13}C-KIV）を培地に添加して HR-MAS による計時測定を行った結果を図 1b に示す。測定開始直後には ^{13}C-KIV の側鎖メチル基に由来するダブレットピークが 1.1 ppm に検出された。このピークは時間経過に伴って減弱していったが、^{13}C-KIV 添加後 4 サイクル（約 16 分後）からバリン（Val）側鎖のメチル基に由来する 2 つのダブレットが 0.98、1.03 ppm 近辺に検出された。Val ピークの出現は、KIV ピークの消失と逆相関するような時間経過で観察された。以上の結果から、HR-MAS 法によって生きた細胞中での分岐鎖アミノ酸の出現をリアルタイムで検出できると考えた。

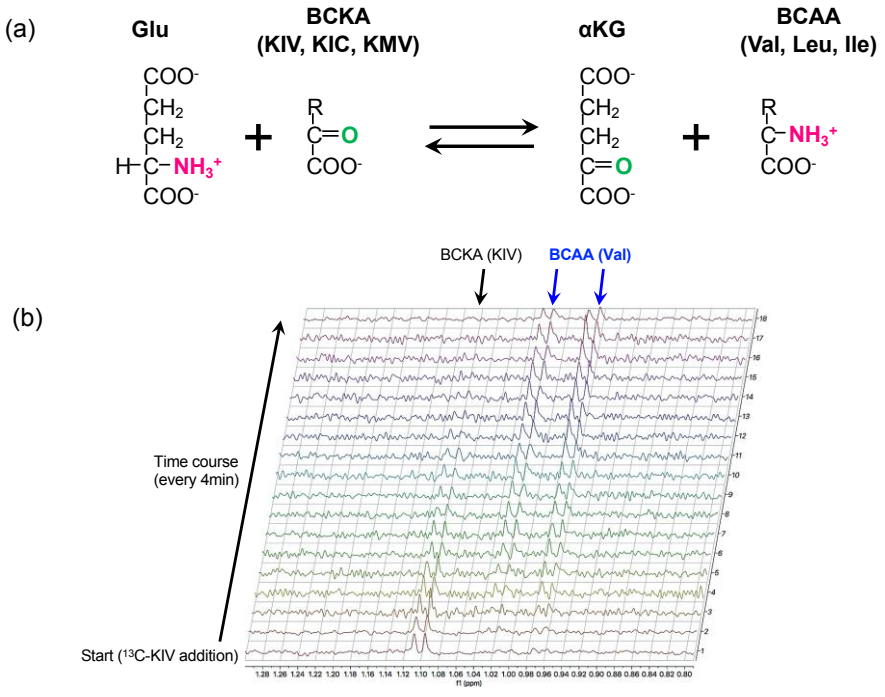


図 1. HR-MAS による細胞内バリン合成の検出

a）BCAT1 によって触媒されるアミノ基転移反応。KIV：alpha-ketoisovaleric acid、KIC：alpha-ketoisocaproic acid、KMV：alpha-keto-beta-methylvaleric acid、aKG：alpha-ketoglutaric acid、BCKA：branched-chain ketoacid、BCAA：branched-chain amino acid。

b）慢性骨髄性白血病由来細胞株 K562 に^{13}C-KIV を添加して経時的に計測した 1 次元インバース異種核相関スペクトル。KIV および Val 側鎖のメチル基に由来するシグナルを矢印で示した。

試験管内ではBCAT1は図1aに示したアミノ基転移反応をどちらの方向に触媒可能であることが報告されているが、骨格筋などの正常組織では、BCAA を分解して分岐鎖ケト酸とグルタミン酸を産生する異化反応が主要であると考えられている。一方、前段に述べた結果からは、白血病細胞内ではBCAA産生が亢進していることが示唆された（図2b）。そこで次に、BCAA分解が白血病細胞内でも起きているのか、解析した。^{13}C-Valを培地に添加してHR-MASによる計時測定を行った結果、Val側鎖のメチル基に由来する２つのダブレットは添加直後から検出され、スペクトルを取得した18サイクル中（約70分間）常に観察可能であったが、1.1 ppmの^{13}C-KIVの側鎖メチル基ピークはこの観察時間内にはほぼ検出できなかった（図2a）。以上の結果から、白血病細胞内ではBCAAを分解するのではなく、むしろ産生が促進されるような代謝フローの逆転が生じていることが明らかになった。

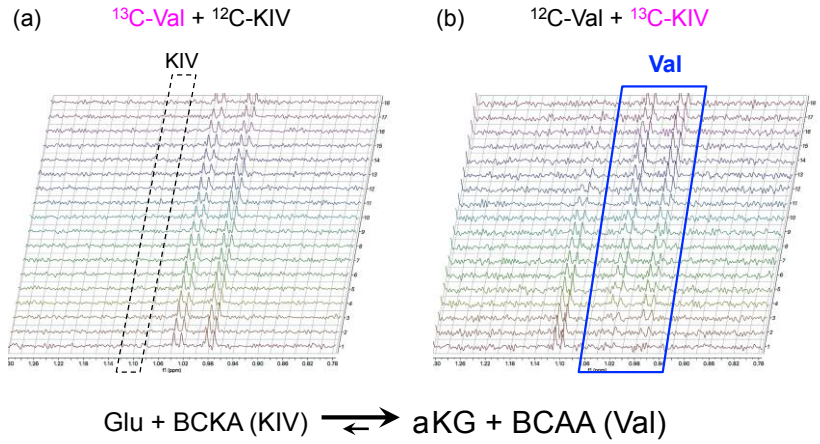


図2. 慢性骨髄性白血病細胞における分岐鎖アミノ酸産生

a）^{13}C-Valを添加した場合のスペクトル。KIVのシグナルは検出されなかった。

b）^{13}C-KIVを添加した場合のスペクトル。Valのシグナルが４サイクル目以降検出され、KIVのシグナルは時間を追うごとに減弱した。

2. 急性骨髄性白血病における分岐鎖アミノ酸合成の発見

ここまでに慢性骨髄性白血病細胞に於いてアミノ酸代謝リプログラミングが起きていることを、HR-MAS NMRを利用した新しい代謝解析法で見出した。この現象がK562細胞に特異な現象であるか否かを知るため、急性骨髄性白血病（AML）細胞を用いて同様の解析を行った。前骨髄球性白血病由来HL60（図3a）、組織球単球性白血病由来U937（図 3b）、急性骨髄性白血病由来 MV4;11（data not shown）について解析したところ、いずれの細胞株においても^{13}C-KIV添加によってはVal産生が検出されたが、^{13}C-Val添加ではKIV産生は観察されなかった。即ちこれら３種の骨髄性白血病細胞では分岐鎖アミノ酸産生が促進される代謝変動が共通して生じていることがわかった。

3. BCAT1と遺伝的相互作用する遺伝子変異の発見

次にこの新しい代謝解析法の応用展開の一例として、変異遺伝子の導入によるBCAA代謝への影響の有無について検討を行った。ヒトの腫瘍で繰り返し観察される遺伝子変異 （recurrent mutations）は細胞がん化や腫瘍形成に寄与している可能性がある。膵癌における*K-RAS*遺伝子変異はその一例である。このような遺伝子変異の中には細胞の代謝状態を変化させるものが多く存在し、またこのような代謝変動はがん化の結果ではなくむしろ直接の原因になっていることがこれまでの研究で明らかにされてきた。HR-MAS 法を用いて変異遺伝子による代謝変動が解析できるか検証するため、ある遺伝子変異がBCAA代謝を変化させうるか、予備的検討を行った。対照群では８サイクル目（^{13}C-KIV添加後約30分）から^{13}C-Valが検出された（図4a）。一方、変異遺伝子を発現させた細胞においては20サイクル目（同添加後約80分）まで^{13}C-Valは検出されず、またその産生量も非常に少なくなることがわかった（図4b）。この結果は当該遺伝子変異によってBCAA産生が阻害されることを示しており、本研究で構築した代謝解析法が遺伝的相互作用による代謝変動の検出にも利用可能であることがわかった。

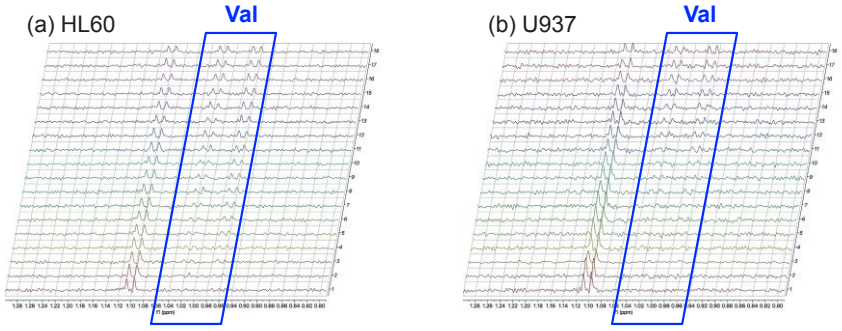


図 3. 急性骨髄性白血病（AML）細胞における分岐鎖アミノ酸産生

a）^{13}C-KIV を添加した場合の HL60 細胞のスペクトル。

b）^{13}C-KIV を添加した場合の U937 細胞のスペクトル。いずれの AML 細胞においても Val のシグナルが検出された。

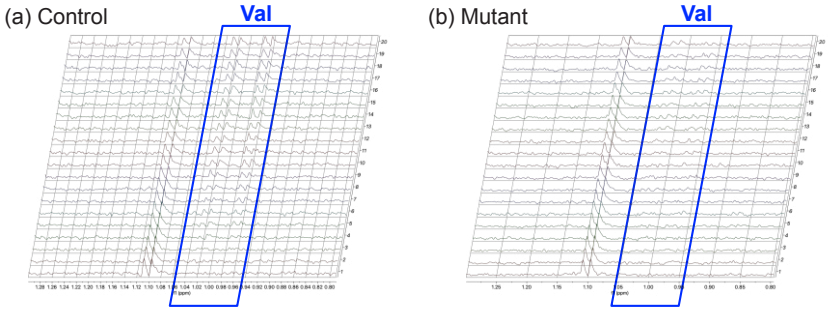


図 4. 遺伝子変異による分岐鎖アミノ酸産生の抑制

a）^{13}C-KIV を添加した場合の野生型遺伝子を発現する細胞のスペクトル。

b）^{13}C-KIV を添加した場合の変異型遺伝子を発現する細胞のスペクトル。Val 産生が抑圧されることがわかった。

考　察

本研究により、マジック角回転高分解能核磁気共鳴分光法によって生きたがん細胞の代謝をリアルタイムで検出する方法を世界で初めて構築した。またこの方法を用い、ヒト白血病細胞において、分岐鎖アミノ酸は分解されるよりもむしろ産生が促進されるような代謝変動が起きていることがわかった。更に遺伝子導入細胞を利用することで、細胞代謝に影響を与える遺伝子変異を同定できることを明らかにした。本研究では主に BCAA 代謝に注目して解析を行ったが、^{13}C 同位体標識した他の化合物、例えばグルコース、ピルビン酸、グルタミンなどは試薬として容易に入手可能であるので、これらを利用することで、多様な代謝物の細胞内運命を追跡することが可能と考えられる。また、変異遺伝子の導入によって代謝変動を検出できたことから、アミノ酸以外の代謝物についても、同様の作用を示す遺伝子や薬物を同定することが可能である。非破壊で連続的に代謝状態を解析できるという本解析系の利点を生かして、患者検体に対して様々な^{13}C 同位体標識物質に対する代謝プロファイルを取得し、これを有効な治療法や薬剤を選択する層別化に利用することも可能になったと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究は、ジョージア大学複合糖質研究センターNMR 施設の Art Edison 教授、John Glushka 博士、京都大学大学院理学研究科の竹腰清乃理先生、武田和行先生を始め、多くの共同研究者にご協力頂きました。この場を借りてお礼申し上げます。また本研究を実施するにあたり、公益財団法人上原記念生命科学財団からご支援頂きましたことを改めて御礼申し上げます。

文　献

1） Luengo A, Gui DY, vander Heiden MG. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. Cell Chem Biol. 2017 Sep 21;24(9):1161-1180. PMID: 28938091 DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.08.028

2） Hattori A, Tsunoda M, Konuma T, Kobayashi M, Nagy T, Glushka J, Tayyari F, McSkimming D, Kannan N, Tojo A, Edison A, Ito T. Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia. Nature 2017 May 25;545(7655):500-504. PMID: 28514443 DOI: 10.1038/nature2231

3） Conway ME, Hutson SM. BCAA Metabolism and NH3 Homeostasis. Adv Neurobiol 2016;13:99-132. PMID: 27885628 DOI: 10.1007/978-3-319-45096-4_5