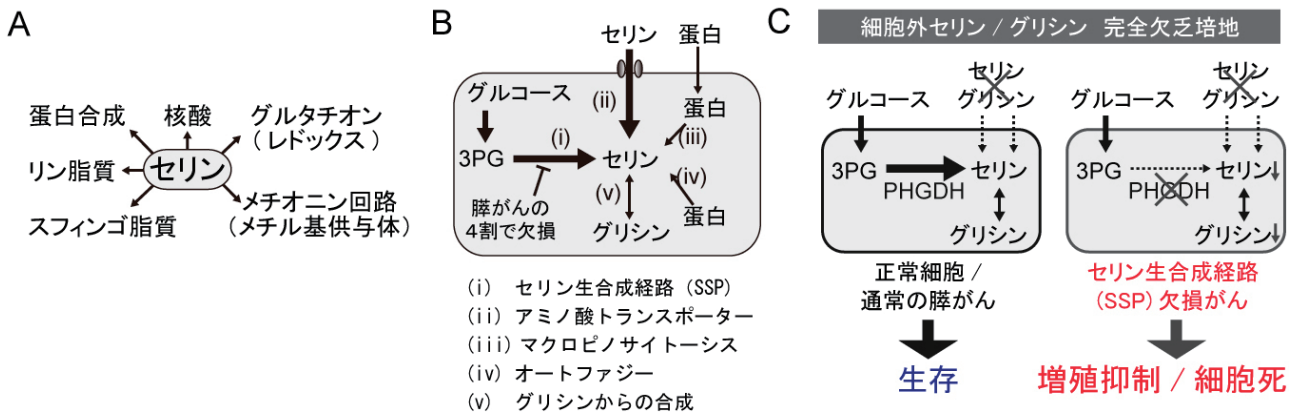
63　セリン代謝に着目した膵癌の新規合成致死治療法の開発	山本　恵介

【目的】細胞外セリン濃度が低下すると、正常細胞はグルコースを基質としてセリンを新規に合成する（セリン生合成経路 serine synthesis pathway：SSP）。我々は、膵癌の約 4 割が、SSP の律速酵素である PHGDH を欠損しており、セリン不含培地では生存できないことを発見、世界に先駆けて報告した。こうした膵癌症例では、セリン制限食によって膵癌細胞の増殖を特異的に抑制できる可能性がある。しかしながら、マウスモデルでの検討では、セリン欠乏食によって *SSP* 欠損膵癌の増殖は抑制されたものの、腫瘍の完全消失にはいたらなかった。さらなる検討の結果、これは生体内では腫瘍の間質細胞から癌細胞へのセリン供給経路が存在しているためと判明した。このため、こうした腫瘍微小環境からのセリン供給経路を同定し遮断すること、またセリンが不足した環境で *SSP* 欠損膵癌に特異的に生じる脆弱性を同定することが必要と考えた。

【方法】SSP の欠損によって膵癌細胞に生じる代謝特性の変化・差異を検出するためには、SSP の有無以外の条件の揃ったコントロール細胞との比較することが望ましい。また、生体内における膵癌細胞と腫瘍微小環境中の細胞との相互作用、特に免疫細胞も含めた解析を行うためには、免疫系が正常なマウスモデルを用いた検討が不可欠である。こうした背景から、C57BL/6 背景の KPC マウスより樹立したマウス膵癌細胞株（KPC 細胞）を用いて、SSP 経路の律速酵素である *PHGDH* の安定ノックアウト（KO）細胞を作製した。単一細胞に由来するクローンを複数樹立し、様々な濃度のセリン・グリシン存在下での増殖速度を比較検討した。樹立した細胞にドキシサイクリン誘導性に PHGDH を発現可能なコンストラクトを作製・導入することで、ドキシサイクリン濃度依存性に PHGDH すなわち SSP 活性を制御可能なマウス膵癌細胞を樹立した。これらの細胞を用いて、SSP の有無が、様々なセリン・グリシン濃度下において、細胞増殖や（想定される）種々のセリン獲得経路に与える影響を評価した。

【結果】*PHGDH*-KO マウス膵癌細胞では、培地中のセリン・グリシンの多寡によらず PHGDH の発現が喪失していること、セリン・グリシン不含培地で増殖が顕著に抑制されることを確認した。得られた *PHGDH*-KO 細胞を用いて、ドキシサイクリン誘導性に PHGDH 発現を回復できる細胞を複数樹立した。これらの細胞では、ドキシサイクリンの存在下でのみ PHGDH 発現／SSP 活性が回復し、セリン・グリシン欠乏状態での生存が可能になることを確認した。現在、これら細胞を用いて、膵癌細胞における SSP の有無が、膵癌細胞の代謝にどのような影響を及ぼすか、また、マウス生体内で、腫瘍微小環境中の間質細胞における代謝経路にどの様な影響を及ぼすか、検討を進めているところである。なお、これらの細胞を用いた検討から、*SSP* 欠損膵癌では、低セリン・グリシン条件下ではオートファジー活性が増強することを見出した（下図 B（iv））。このことから、オートファジー阻害によってセリン制限食による抗腫瘍効果を増強できる可能性があり、現在、*in vitro*、*in vivo* で検証を進めているところである。

膵癌におけるセリン代謝経路とその異常



63. セリン代謝に着目した膵癌の新規合成致死治療法の開発

山本　恵介

東京大学 医学部附属病院 消化器内科

Key words：膵癌，腫瘍微小環境，低栄養，セリン生合成経路，オートファジー

緒　言

膵癌は 5 年生存率が約 10%と予後不良の難治癌である。治療選択肢も少なく、現時点では膵癌に対して有効な分子標的薬も免疫療法も存在しないため、患者ごとの膵癌の特性に基づいた新規治療法の開発が喫緊の課題である［1〜3］。

膵癌は線維性間質を伴った乏血性の腫瘍を特徴とし、腫瘍内部に高度な低酸素・低栄養環境を生じる。このような微小環境で生存するため、膵癌細胞は膵星細胞や神経細胞から栄養素の供給を受け［4，5］、自身の代謝を改変して適応するなど［1，6〜8］、特徴的な代謝特性を有しており、その理解は新たな治療法の開発に有用と考えられる。

セリンは、ヒト膵癌の原発巣腫瘍内部でグルタミンに次いで 2 番目に不足しているアミノ酸である［9］。セリンは様々な生合成経路の基質であり（図 1A）、その確保は細胞の生存・増殖に必須である。通常、細胞は細胞外のセリンを取り込むが、これが不足した場合にはグルコースを基質としてセリンを生合成する（セリン生合成経路 SSP；図 1B）。これまで、マウスモデルを用いた検討から、膵癌では SSP が亢進していると考えられてきたが［10］、我々は予想に反して、ヒト膵癌では約 4 割の症例が SSP の律速酵素である *PHGDH* を欠損していることを発見した［5］。重要なことに、これら *SSP* 欠損膵癌細胞は、セリンを生合成することができないため、セリン完全欠乏培地で死滅する（図 1C）。しかしながら、膵癌マウスモデルを用いた検討では、セリン欠乏食餌での *SSP* 欠損膵癌の増殖は通常食餌の 50%程度までの減少にとどまり、腫瘍の完全消失には至らなかった。これは、宿主側の代償機構により血漿中セリン濃度が一定値以下には減少しないため、また腫瘍内へ浸潤した神経細胞から膵癌細胞へセリンが供給されるためであり［5］、セリン欠乏食単独で腫瘍へのセリン供給を完全に遮断し、腫瘍を根治することは困難であると判明した。このため、セリン制限との併用治療の開発が必要と考え、*SSP* 欠損膵癌に対するセリン制限による抗腫瘍効果を増強するため、*SSP* 欠損膵癌の代謝特性の解明を目指して研究を行った。

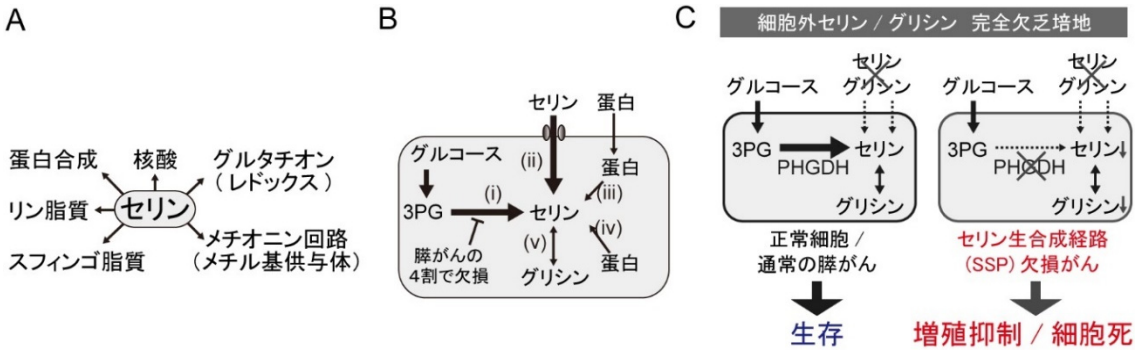


図 1. 膵癌におけるセリン代謝経路とその異常

A)　セリンを起点とした生合成経路。

B)　主なセリン獲得経路。（ⅰ）セリン生合成経路（serine synthesis pathway：SSP）、（ⅱ）アミノ酸トランスポーターを介した細胞外からの取り込み、（iii）マクロピノサイトーシス、（iv）オートファジー、（v）グリシンからの合成。

C)　セリン生合成経路欠損膵癌は、セリン欠乏培地で死滅する。

方　法

1. 細胞培養、培養試薬

マウス膵癌細胞株（KPC）およびヒト膵癌細胞株（AsPC1、PaTu8902、MiaPaCa2、PaTu8988T、PL45）は、グルコース／グルタミン／セリン／グリシン／ピルビン酸ナトリウム不含の DMEM（D9082-01、US Biological 社）に、4 mM L-glutamine、2.78 mM glucose、1 mM Sodium pyruvate、10%透析済み胎児ウシ血清を終濃度で添加した培地を用いた。マクロピノサイトーシスの評価のためには、脂肪酸不含のアルブミン（126609、Sigma）を使用した。

2. *PHGDH* 遺伝子のノックアウト細胞、および薬剤誘導性 PHGDH 発現細胞の樹立

CRISPR-Cas9 システムを用いた遺伝子ノックアウト（KO）には、guide RNA（gRNA）と Cas9 を同時に発現できるコントラクト lentiCRISPRv2-hygro（Addgene plasmid #98291）を用いた。本プラスミドは、Brett Stringe 博士の好意により提供いただいた。制限酵素処理・ライゲーションによるクローニングにより、マウス Phgdh に対する複数の gRNA ないし、non targeting control（sgNTC）を発現するコンストラクトを作製した。

ドキシサイクリン（Dox）誘導性 PHGDH 発現細胞の作製には、pINDUCER20 blast（Addgene plasmid #109334）を用いた。本プラスミドは、Jean Cook 博士の好意により、提供いただいた。ヒト PHGDH の完全長 cDNA は、GATEWAY クローニング（Invitrogen）により、pINDUCER20-blast へ組み込んだ。

結　果

1. *SSP* 欠損マウス膵癌細胞株の作製

前述の通り、ヒト膵癌臨床検体・ヒト膵癌細胞株の約 4 割が SSP の律速酵素である PHGDH の発現を欠損している［5］。これとは対照的に、膵癌研究に広く用いられている遺伝子改変膵癌マウスモデル（p48-Cre;LSL-Kras^{G12D};p53$^{wt/flox}$;KPC マウス）では、PHGDH は過剰発現している［5, 10］。そこで、膵癌細胞における *SSP* の欠損によって、癌細胞ならびに腫瘍微小環境の間質細胞において、どのような代償経路が活性化するのかを比較・検討するためには、遺伝的背景が同一な細胞を用いて、SSP を ON／OFF に制御できる系が有用である。また、生体内での癌細胞の挙動を、免疫細胞との相互作用も含めて精緻に検討・評価するためには、同系統マウスへの移植が可能なマウス膵癌細胞が有用である。

こうした背景から、まずは C57BL/6 背景の KPC マウスより樹立した細胞株（KPC 細胞）を用いて、SSP 経路の律速酵素である *PHGDH* の安定 KO 細胞を作製した。単一細胞に由来するクローンを複数樹立し、それぞれセリン／グリシン含有培地（各々400 μM Ser／Gly）と不含培地（−Ser／Gly）で培養の後、ウエスタンブロットによるタンパク発現評価、クリスタルバイオレット染色による細胞増殖の評価を行った。

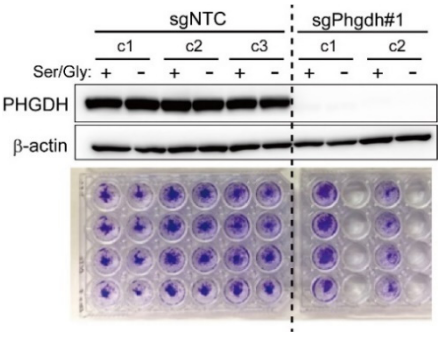


図 2. PHGDH-KO マウス膵癌細胞株の樹立

コントロール細胞（sgNTC）では、培地中のセリン／グリシン（Ser／Gly）の有無によらず PHGDH は高発現しており（上段）、また細胞増殖も影響を受けない。一方、*PHGDH* ノックアウト細胞（sgPhgdh）では、セリン／グリシン完全欠乏培地では増殖できない。

図2に示す通り、コントロール細胞（sgNTC）においては、培地中のセリン／グリシンの有無によらず、PHGDHは恒常的に高発現していた。一方、*PHGDH*-KO細胞では、培地中のセリン／グリシンの有無によらず、PHGDHの発現が喪失していることを確認した。さらに、クリスタルバイオレット染色を用いた増殖アッセイでは、コントロール細胞（sgNTC）ではセリン／グリシン不含培地でも増殖速度は変化せず、SSPを介したグルコースからのセリン生合成により代償されていることが示唆された。一方で、*PHGDH*-KO細胞の増殖速度は、セリン／グリシン含有培地ではコントロール細胞と変わらなかったのに対し、セリン／グリシン不含培地では顕著に抑制された。このことから、SSPの律速酵素である*PHGDH*のノックアウトにより、セリンの生合成が適切に抑制されていることが示唆された。

2. ドキシサイクリン誘導性にSSPを制御可能なマウス膵癌細胞株の樹立

次に、結果1で樹立した*PHGDH*-KO膵癌細胞を用いて、ドキシサイクリン誘導性にPHGDHを発現可能な細胞株を樹立した。図3に示すとおり、培地中のセリン／グリシンの有無によらず、これらの細胞ではPHGDH発現が消失しており、一方でドキシサイクリン投与により、PHGDHの発現が回復することを確認した。さらに、これらの細胞におけるSSP経路の有無と増殖速度をクリスタルバイオレット染色で検討したところ、セリン／グリシン含有培地では、ドキシサイクリン投与によるSSP経路の活性化は細胞増殖に影響を与えなかった。一方で、セリン／グリシン欠乏条件下では、SSP経路の活性化により細胞増殖・生存は回復することが確認された。このことから、これらの細胞では、ドキシサイクリン誘導性に、PHGDHの発現を調節することで、SSPを制御できることが確認された。

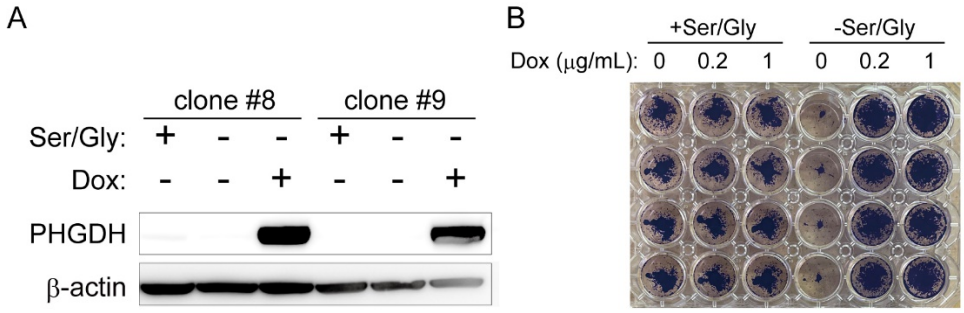


図3. ドキシサイクリン誘導性にSSPを制御可能なマウス膵癌細胞株の樹立

A) clone #8、9とも、Dox存在下でのみPHGDHが発現する。

B) Dox投与により、セリン／グリシン欠乏培地での増殖が回復する。一方で、セリン／グリシン存在下では、PHGDH発現回復により細胞増殖は影響を受けない。

3. *SSP*欠損膵癌におけるセリン獲得経路の評価

*SSP*欠損膵癌は、グルコースからセリンを合成することができない。このため、セリン獲得経路としては、（ii）細胞外からの取り込みに加え、（iii）マクロピノサイトーシス、（iv）オートファジー、（v）グリシンからの生合成によりセリンを獲得している可能性が考えられる（図1B）。（v）については、自験ではグリシンからのセリン生合成はほとんど行われなかったため［5］、主に（iii）マクロピノサイトーシス（iv）オートファジーの関与を評価した。

マクロピノサイトーシスとは、細胞外に突出した細胞膜が、細胞外液をつつみこみ、細胞内に取り込む作用を指す。膵癌では、マクロピノサイトーシスを介した細胞外のアミノ酸／タンパク質の取り込みにより、低栄養環境での栄養素の補充を行っている［9］。特に、必須アミノ酸であるグルタミンの欠乏条件下では、膵癌細胞はマクロピノサイトーシスによる細胞外のアルブミンの取り込みとその分解により、グルタミンを補充する［9］。そこで、*SSP*欠損膵癌における細胞外セリン欠乏に対し、マクロピノサイトーシスがセリン補充経路となるかどうかを検討した。

図4に示すように、様々な濃度の低セリン／グリシン培地において、アルブミン添加は*PHGDH*-KO細胞の増殖を回復できなかった。また、グルタミン欠乏培地と異なり、セリン／グリシン欠乏培地ではマクロピノサイトーシスに関

連した遺伝子の発現上昇も認めなかった。このことから、マクロピノサイトーシスは、*SSP*欠損膵癌におけるセリン獲得経路としては重要ではないものと考えられた。

次に、*SSP*欠損膵癌におけるオートファジーの寄与を、LC3 のウエスタンブロッティングにより評価した。図 4 に示すとおり、コントロール細胞ではセリン除去によってLC3 Ⅱ／Ⅰ比に変化を認めなかったが、*PHGDH*-KO 細胞ではLC3 Ⅱ／Ⅰ比の上昇を認め、オートファジー活性の増強が示唆された。このことから、*SSP*欠損膵癌は、細胞外セリン濃度の低下に対して、オートファジーを介した基質分解によりセリンを獲得し、生存に寄与している可能性が示唆された。

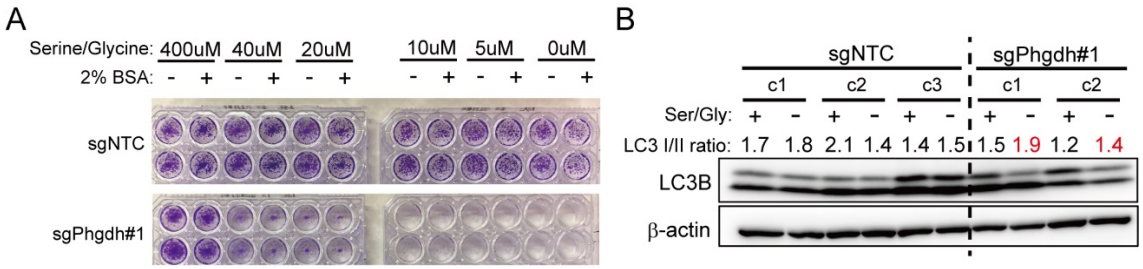


図 4. セリン欠乏に対する*SSP*欠損膵癌の応答

A）マクロピノサイトーシスはセリン欠乏培地での増殖を回復させることができなかった。

B）SSP 野生型膵癌では、セリン欠乏によりオートファジー活性は変化しないが、*SSP* 欠損膵癌ではセリン欠乏によりオートファジー活性の増強を認めた。

考　察

膵癌の約 4 割の症例が SSP を欠損しており、こうした症例に対する特異的な治療の開発には、*SSP*欠損膵癌の代謝特性の理解が不可欠である。本研究では薬剤誘導性に SSP を制御可能な膵癌細胞を作製した。現在、これらの細胞を用いて、SSP 経路の多寡・有無によってどのような代償経路が活性化するのかを探索中である。そのような試みの一つとして、細胞外セリンの取り込みにかかわるアミノ酸トランスポーターの同定を目指している。具体的には、(a) SSP の on-off に伴う発現変動遺伝子の網羅的比較（RNA-seq）、(b) CRISPR-KO library による機能的スクリーニング、(c) 阻害剤ライブラリーを用いたスクリーニングから、候補分子の探索を行っている。

生体内では、癌細胞は宿主細胞から様々な代謝産物の供給を受けている［4］。我々は、*SSP*欠損膵癌が、原発巣では神経細胞からセリンの供給を受けることを報告したが［5］、他臓器への転移巣において、どのような代謝産物のクロストークが存在するかは明らかではない。今回樹立した細胞を用いて、生体内で SSP 経路を ON／OFF することで、周囲間質細胞の代謝特性がどのように変化し、その結果どのような代謝産物が癌細胞に供給されるのかを検討中である。

In vitro での細胞培養環境と異なり、生体内では、セリン／グリシン欠乏食餌下でも、腫瘍内のセリン濃度を完全に遮断することは不可能である。このため、セリン制限食単独では*SSP*欠損膵癌の根治は難しく、(セリン欠乏環境での)*SSP*欠損膵癌の生存に必須な経路を同時に阻害することで、根治を目指すのが現実的な治療戦略と考えられる。本研究では、*SSP*欠損膵癌が、細胞外からのセリン／グリシン供給の低下時にオートファジーへの依存度が増加することを見出した。すなわち、オートファジー阻害により、セリン制限食による抗腫瘍効果を増強できる可能性を示唆しており、現在、*in vitro*、*in vivo* で検証を進めているところである。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科消化器内科学研究室の岩立堂佑である。

文 献

1) **Yamamoto K**, Venida A, Yano J, Biancur DE, Kakiuchi M, Gupta S, Sohn ASW, Mukhopadhyay S, Lin EY, Parker SJ, Banh RS, Paulo JA, Wen KW, Debnath J, Kim GE, Mancias JD, Fearon DT, Perera RM, Kimmelman AC. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. **Nature**. 2020 May;581(7806):100-5. PMID: 32376951 DOI: 10.1038/s41586-020-2229-5

2) **Yamamoto K*** (*corresponding author), Iwadate D, Kato H, Nakai Y, Tateishi K, Fujishiro M. Targeting autophagy as a therapeutic strategy against pancreatic cancer. J Gastroenterol. 2022 Sep;57(9):603-618. PMID: 35727403 DOI: 10.1007/s00535-022-01889-1

3) **Yamamoto K*** (*corresponding author), Iwadate D, Kato H, Nakai Y, Tateishi K, Fujishiro M. Targeting the Metabolic Rewiring in Pancreatic Cancer and Its Tumor Microenvironment. Cancers (Basel). 2022 7;14(18):4351. PMID: 36139512

4) Parker SJ, Amendola CR, Hollinshead KER, Yu Q, **Yamamoto K**, Encarnación-Rosado J, Rose RE, LaRue MM, Sohn ASW, Biancur DE, Paulo JA, Gygi SP, Jones DR, Wang H, Philips MR, Bar-Sagi D, Mancias JD, Kimmelman AC. Selective Alanine Transporter Utilization Creates a Targetable Metabolic Niche in Pancreatic Cancer. Cancer Discov. 2020 Jul;10(7):1018-1037. PMID: 32341021 DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-0959

5) Banh RS, Biancur DE, **Yamamoto K**, Sohn ASW, Walters B, Kuljanin M, Gikandi A, Wang H, Mancias JD, Schneider RJ, Pacold ME, Kimmelman AC. Neurons Release Serine to Support mRNA Translation in Pancreatic Cancer. Cell. 2020 Nov 25;183(5):1202-1218.e25. PMID: 33142117 DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.016

6) **Yamamoto K**, Venida A, Perera RM, Kimmelman AC. Selective autophagy of MHC-I promotes immune evasion of pancreatic cancer. Autophagy. 2020;16(8):1524-1525. PMID: 32459143 DOI: 10.1080/15548627.2020.1769973

7) Biancur DE, Kapner KS, **Yamamoto K**, Banh RS, Neggers JE, Sohn ASW, Wu W, Manguso RT, Brown A, Root DE, Aguirre AJ, Kimmelman AC. Functional Genomics Identifies Metabolic Vulnerabilities in Pancreatic Cancer. Cell Metab. 2021 Jan 5;33(1):199-210.e8. PMID: 33152323 DOI: 10.1016/j.cmet.2020.10.018

8) Banh RS, Kim ES, Spillier Q, Biancur DE, **Yamamoto K**, Sohn ASW, Shi G, Jones DR, Kimmelman AC, Pacold ME. The Oxy-metabolome Reveals the 4-Hydroxymandelate Pathway in CoQ10 Synthesis. Nature. 2021 Sep; 597(7876):420-425. PMID: 34471290 doi.org/10.1038/s41586-021-03865-w

9) Kamphorst JJ, Nofal M, Commisso C, Hackett SR, Lu W, Grabocka E, Vander Heiden MG, Miller G, Drebin JA, Bar-Sagi D, Thompson CB, Rabinowitz JD. Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. Cancer Res. 2015 Feb 1;75(3):544-53. PMID: 25644265 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2211.

10) Maddocks ODK, Athineos D, Cheung EC, Lee P, Zhang T, van den Broek NJF, Mackay GM, Labuschagne CF, Gay D, Kruiswijk F, Blagih J, Vincent DF, Campbell KJ, Ceteci F, Sansom OJ, Blyth K, Vousden KH. Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation. Nature. 2017 Apr 19;544(7650):372-376. PMID: 28425994 doi: 10.1038/nature22056.