

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07115

研究課題名(和文) グルタミン代謝経路の解明による新規がん治療法の開発

研究課題名(英文) Understanding of glutamine metabolism in cancer cells

研究代表者

入野 康宏 (Irinno, Yaushiro)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：10415565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、がん細胞が成長期に急速にグルタミンを消費してアンモニアを分泌すること、そしてグルタミン制限ががん細胞の増殖を抑制することを明らかにしました。この増殖の障害は、アンモニアと α -ケトグルタル酸からグルタミン酸を合成する酵素であるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ2 (GDH2) の細胞レベルでの発現量に応じて、細胞にアンモニアを補給することによって克服することができました。さらに、GDH2は、グルタミン枯渇条件下での増殖や生存をサポートするのに十分でありました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンモニアは、生体内での代謝の結果生じる毒性を持つ老廃物とされてきました。今回の研究の結果、がん細胞はこの老廃物であるアンモニアを窒素源として利用してアミノ酸、特にグルタミン酸を合成していることが分かりました。この反応にはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ2と呼ばれる酵素が必要であることも分かりました。この研究結果をまとめると、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ2は、がんの利用標的分子となり得ることを示唆することができます。

研究成果の概要(英文)：In this study, we show that cancer cells rapidly consume glutamine and secrete ammonia during the growth phase and that glutamine limitation suppresses cancer cell proliferation. Strikingly, this proliferation impairment can be overcome by supplementing cells with ammonia, depending on the cellular level of the enzyme glutamate dehydrogenase 2 (GDH2), which synthesizes glutamate from ammonia and α -ketoglutarate. Moreover, we demonstrate that GDH2 is sufficient for glutamate production to support proliferation or survival under glutamine-depleted conditions. Our findings provide insight into how cancer cells survive under glutamine deprivation conditions and contribute to the elucidation of cancer cell proliferation mechanisms.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：グルタミン代謝 アンモニア グルタミン酸デヒドロゲナーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

古くからがん細胞によるグルタミンの選択的な消費が知られている (Nat. Rev. Cancer, 11: 325-337, 2011)。グルタミンがグルタミン酸、アスパラギン酸などへと分解される一連の化学反応をグルタミノリシスと呼び、代謝されたグルタミンは、ATP 産出や脂質や他のアミノ酸生合成のための炭素源と核酸などの生合成に必要な窒素源を細胞に供給する (Trends Biochem. Sci., 35: 427-433, 2010, Oncogene, 29: 313-324, 2009)。

グルタミノリシスの研究は国内外で精力的に取り組まれている。現在までに、グルタミンの利用の様式は、酸素分圧などの細胞周辺環境に依存しており、がん細胞の多様性の一因であると考えられている (Nature, 481: 385-388, 2012, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108: 19611-19616, 2011)。さらに、がん遺伝子である c-myc とがん抑制遺伝子である p53 がそれぞれグルタミノリシスを制御していることが報告された (Cell Metab., 15: 131-133, 2012, Cell Metab., 15: 110-121, 2012)。このようなグルタミノリシスの代謝リプログラミングはがん細胞の特徴であり、グルタミノリシスはがん治療の標的となるはずである。

グルタミノリシスはエネルギー供給だけでなく、細胞内のレドックス環境の維持に大きく貢献していることが分かった。グルタミノリシスによって生じるグルタミン酸と NADPH がそれぞれレドックス環境の調整因子であるグルタチオンの生合成材料であることと酸化型グルタチオンの還元を利用して、レドックス環境が維持されている。さらに、近年では、グルタミノリシスを行うがん細胞はアンモニアを産出し、腫瘍周辺の正常組織を破壊して栄養を得るとともに、がん自身が増殖させるための空間を得ていることが明らかになった (Cell Death Differ., 16: 21-30, 2009)。

2. 研究の目的

がんにおけるグルタミノリシスの特徴が明らかにされつつあるが、未だ不明な点が多い。本研究はグルタミノリシスに着目して、がん細胞の代謝機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

グルタミノリシスを抑制させたときのがん細胞および培養液中のグルコース代謝、グルタミン代謝、および TCA 回路に関与する代謝産物の変化について網羅的に評価した。増殖時の細胞から分泌される成分を調べ、グルタミン非含有培地にその成分を添加し増殖能が変化するかを検討した。

4. 研究成果

(1) アンモニアを利用してグルタミン酸を合成することで、がん細胞はグルタミン飢餓状態でも増殖することができる。

MCF7 細胞をグルタミン含有培地で培養すると 72 時間後には培地中のグルタミンが枯渇しているにもかかわらず、MCF7 細胞は増殖することがわかった。一方、グルタミン非含有培地で MCF7 細胞を培養すると、MCF7 細胞は増殖できなかった (Figure 1A)。グルタミン含有培地で培養したときには、培養後 24 時間では培地中のアンモニアが増加し、その後速やかに減少していくことと、グルタミン非含有培地で培養するとアンモニアは発生しないことを分かった (Figure 1B)。この結果から、MCF7 細胞はグルタミンが枯渇している状況下でアンモニアを窒素源として利用しているのではないかと考えた。この仮説を検証するためにグルタミン飢餓状態でアンモニアを添加したときの細胞増殖能を調べると、MCF7 細胞は部分的ではあるがアンモニアを添加すると増殖能が増加することが分かった (Figure 1C)。

次に、アンモニアを添加したときの細胞内の代謝を調べると、アンモニアの添加によって細胞内のグルタミン酸が上昇していた

(Figure 1D)。このグルタミン酸がどのような経路で合成されているかを調べるため

に、グルコースの炭素原子を安定同位体で標識したグルコースを添加してみると、アンモニア

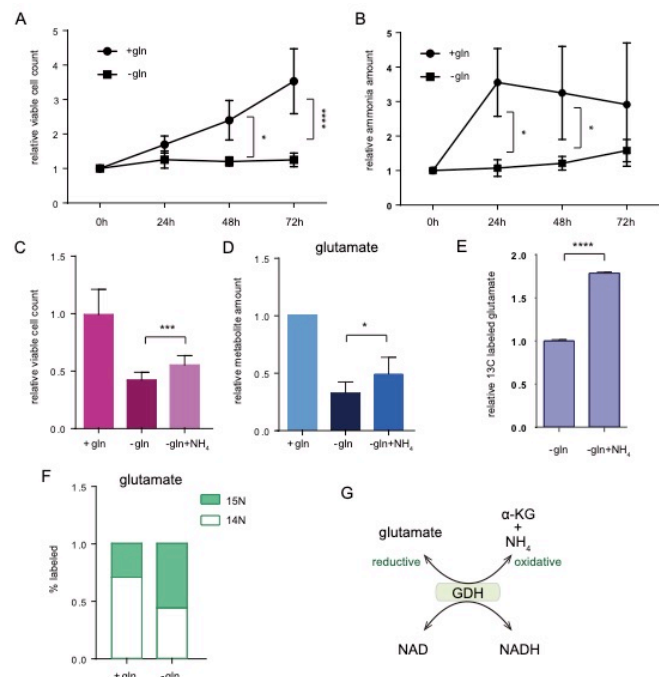


Figure 1

を添加したときに、安定同位体で標識されたグルタミン酸が増加したことから、 α -ケトグルタル酸(α -KG)からグルタミン酸が合成されていた(Figure 1E)。次に、窒素原子を安定同位体で標識したアンモニアを添加すると、標識されたグルタミン酸が増加したことから、 α -KG とアンモニアからグルタミン酸が合成されていることが示唆された。この合成経路は

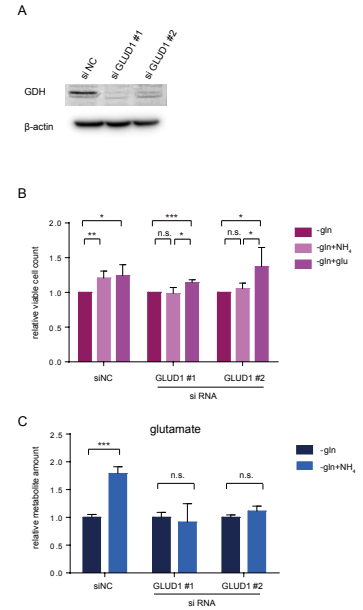


Figure 2

(2) GDHはアンモニアを利用した細胞増殖に重要である。

上記の結果からアンモニアを利用した細胞増殖に GDH が必要かどうかを調べるために、MCF7 細胞の GDH をノックダウンした(Figure 2A)。グルタミン飢餓状態では、GDH をノックダウンした MCF7 細胞は、アンモニアによる細胞増殖能の回復は認められなかった(Figure 2B)。一方、グルタミン飢餓時においても、グルタミン酸を添加することで増殖能の回復は認められた。GDH をノックダウンした MCF7 細胞は、グルタミン酸をアンモニアから合成することもできなかった(Figure 2C)。これらの結果から、グルタミン飢餓状態における細胞増殖には、アンモニアからグルタミン酸を合成する GDH が重要な働きを担っていることが分かった。

(3) アンモニアを利用した細胞増殖は、一部のがん細胞が可能である。

がん細胞は、グルタミン飢餓状態でのアンモニアの利用ができるか調べると、MCF7 と T47D 細胞が効率よくアンモニアを利用できることが分かった(Figure 3A)。MCF7, T47D, PC3, MDA-MB-231 細胞において、グルタミン酸添加は細胞増殖能を部分的に回復したが、MDA-MB-151, Hs578T 細胞において、グルタミン飢餓による細胞死を抑える程度であった。恐らくグルタミン依存性の程度を反映した結果だと考えられる。この時の細胞内のグルタミン酸を測定すると、すべての細胞において、グルタミン酸添加は細胞内グルタミン酸を増加させたのに対して、MCF7 と T47D 細胞のみがアンモニアからグルタミン酸を合成できた(Figure 3B)。さらに、PC3 と Hs578T 細胞では、アンモニアの有無にかかわらず安定同位体標識されたグルタミン酸に変化が認められなかったことから、PC3 と Hs578T 細胞はアンモニアからグルタミン酸を合成できないことが示唆された(Figure 3C)。

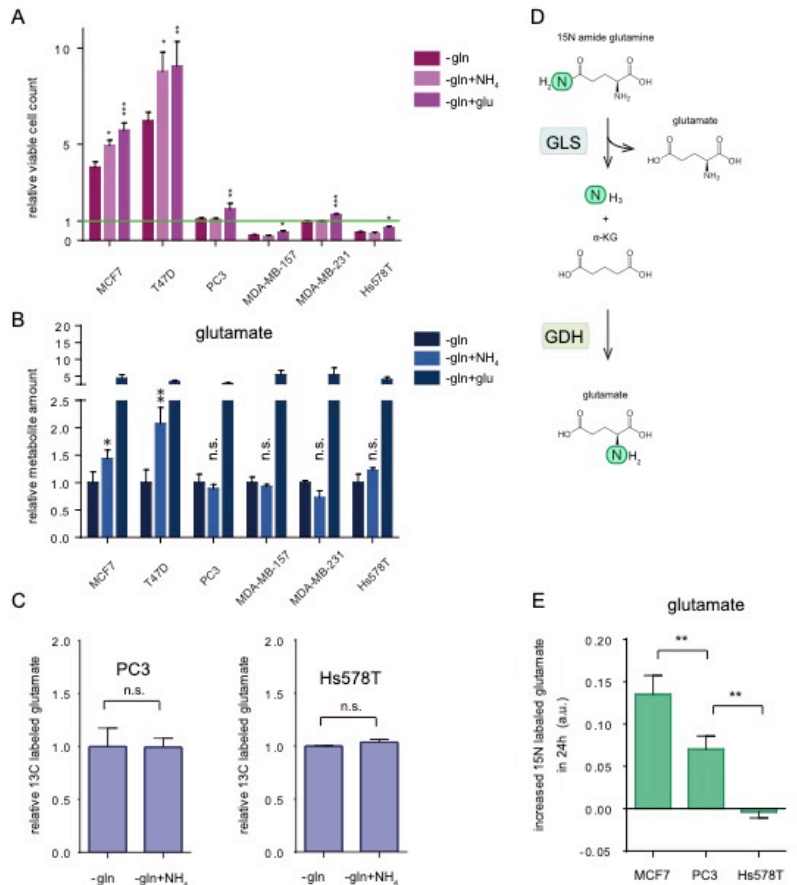


Figure 3

次に、グルタミン代謝で発生したアンモニアを利用してグルタミン酸を合成しているかを調べるために、安定同位体で標識したグルタミンを細胞に添加した実験を実施した。仮説通りであると、安定同位体標識されたグルタミン酸が検出されるはずである(Figure 3D)。実際に実験を行うと、予想通り MCF7 細胞では標識されたグルタミン酸量が多く、アンモニアを利用したグルタミン酸合成ができない PC3 と Hs578T 細胞の標識グルタミン酸量は少なかった(Figure 3E)。

(4) アンモニアを利用した細胞増殖は、GDH2 が重要である。

グルタミン飢餓状態での細胞増殖には GDH によるグルタミン酸の合成が必要であることから、アンモニアを利用できる細胞とできない細胞間で、GDH の発現や活性が異なっているかどうかを調べた。GDH の発現量をウエスタンブロット法で調べた結果、がん細胞間で GDH の発現量に大きな変化は認められなかった(Figure 4A)。次に、GDH の酵素活性を調べてみてもがん細胞間で GDH の酵素活性とアンモニアの利用能力に関連性を見つけないことができなかった(Figure 4B)。

ヒトでは GDH1 と GDH2 の 2 つのアイソフォームが存在している。GDH1 と GDH2 は非常に高い相同性を持っており、市販の抗体では GDH1 と GDH2 を区別することができない。アンモニアを利用できる細胞と利用できない細胞では、GDH1 と GDH2 の発現量が異なるのではと考えた。そこで、デジタル PCR 法を用いて GDH1 の mRNA (GLUD1) 発現量と GDH2 の mRNA (GLUD2) 発現量を定量した。その結果、アンモニアを利用できない PC3、Hs578T 細胞では、GDH1 の発現量が高く、アンモニアを利用できる MCF7 と T47D 細胞での GDH2 の発現量が高いことが分かった (Figure 4C and D)。

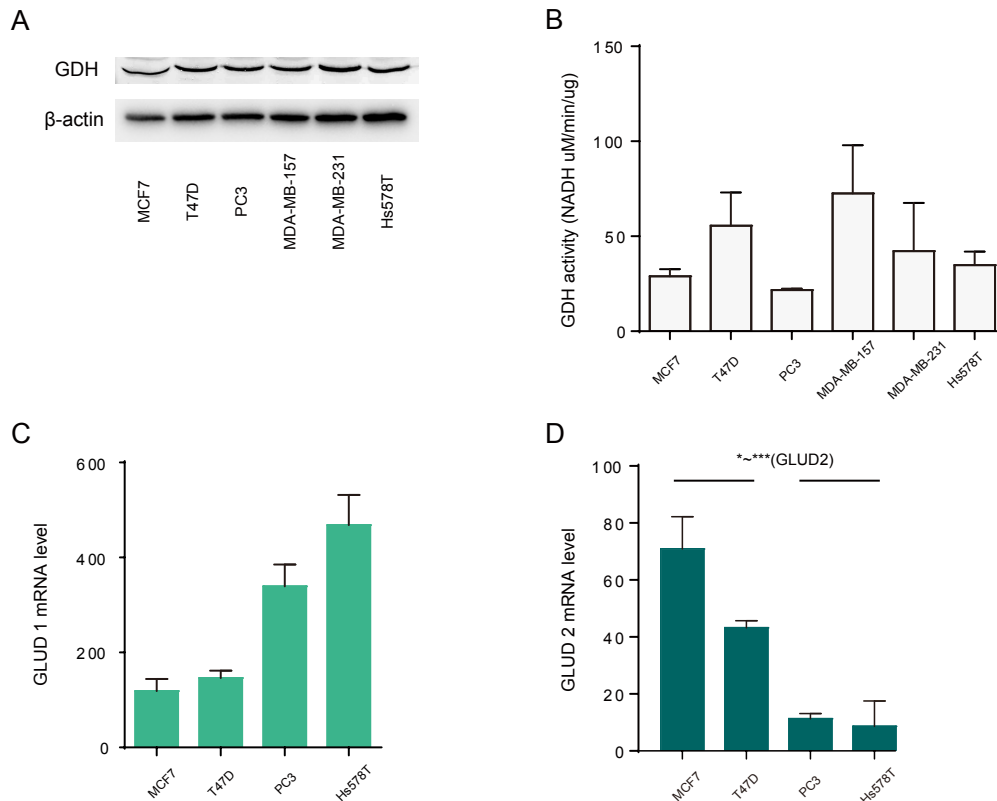


Figure 4

(5) グルタミン飢餓状態において GDH2 を発現させるとアンモニアからグルタミン酸の合成と増殖が可能になる。

最後に GDH2 の発現量が低い細胞に GDH2 を過剰発現させるとアンモニアの利用が可能になるかどうかを調べた。GDH2 を過剰発現させた 2 つの PC3 細胞株をクローニングした。GDH2 発現量をウエスタンブロット法で確認して、GDH2 の局在はミトコンドリアであることを免疫染色法で確認した(Figure 5A and B)。この GDH2 発現細胞株(G16 and G18)をグルタミン飢餓状態にすると、アンモニアを利用して細胞増殖能が回復することが分かった(Figure 5C)。GDH2 発現細胞株に安定同位体で標識したグルタミンを添加すると、グルタミン代謝で発生したアンモニアを利用してグルタミン酸を合成していることが明らかになった(Figure 5D)。

(6) 結論

がん細胞は周辺環境に応答して代謝老廃物とされてきたアンモニアまでも有効利用して増殖している。このアンモニアの利用には GDH2 が深く関与していた(Figure 6)。本研究結果は、今後 GDH2 が新たながん治療の標的分子となり得ることを示唆している。

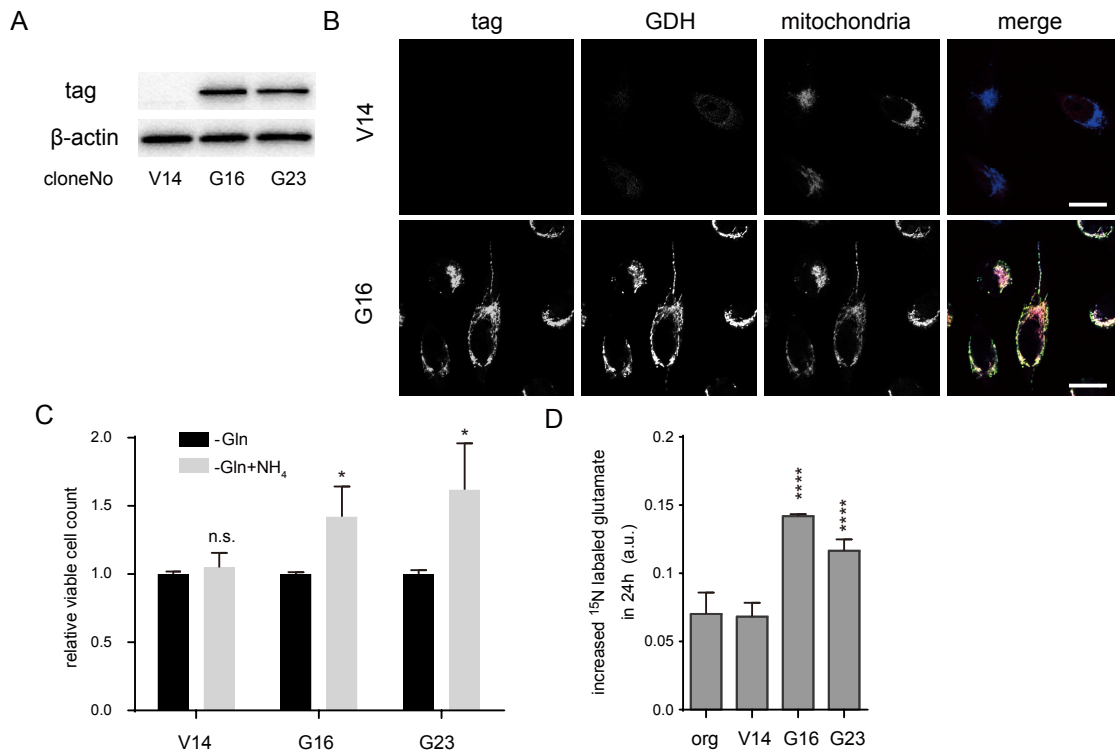


Figure 5

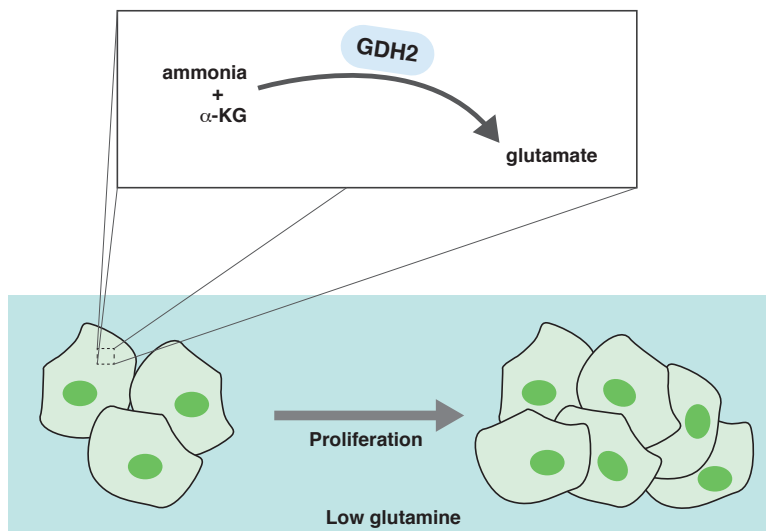


Figure 6

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件) 査読有 *は corresponding author

Takeuchi, Y., Nakayama, E., Fukusaki, and Y. Irino*. 2018. Glutamate production from ammonia via glutamate dehydrogenase 2 activity supports cancer cell proliferation under glutamine depletion. *Biochem Biophys Res Commun* 495: 761-767. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.088.

[学会発表] (計 5 件)

①入野 康宏、竹内由紀子、中山泰宗、福崎英一郎 「グルタミン酸デヒドロゲナーゼ 2 はアンモニアからグルタミン酸を産出し、グルタミン飢餓状態の細胞増殖を助ける」 第 43 回日本医用マンスペクトル学会 2018 年

②入野 康宏 「グルタミン酸デヒドロゲナーゼ 2 はアンモニアからグルタミン酸を産出し、グルタミン飢餓状態の細胞増殖を助ける」 がん代謝研究会・若手の会 2018 年

③入野 康宏、竹内由紀子、中山泰宗、福崎英一郎 「アンモニアを利用するがん細胞は栄養飢餓状態でも生存できる」 第42回日本医用マンスペクトル学会 2017年

④入野 康宏、竹内由紀子、中山泰宗、福崎英一郎 「アンモニアを利用するがん細胞は栄養飢餓状態でも生存できる」 第5回がんと代謝研究会 2017年

⑤竹内 由紀子、中山泰宗、福崎英一郎、入野康宏 「Utilization of ammonia supports cell survival under glutamine depletion」 生命科学系学会合同年次大会 2017年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。