

令和元年6月8日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16648

研究課題名(和文)アミノ酸代謝リモデリング分子をターゲットとした新たな膠芽腫治療の開発

研究課題名(英文)Analysis of metabolic remodeling in amino acids in glioblastoma cells

研究代表者

中溝 聡 (Nakamizo, Satoshi)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：00569238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫では腫瘍中心部で栄養飢餓状態となっており、グルタミンが不足し、セリン代謝酵素の亢進およびセリン代謝物の上昇が生じている。セリン代謝物の上昇は、アミノ酸代謝リモデリングからもたらされている可能性が高い。膠芽腫組織において、セリン代謝酵素であるPSAT1, SHMT2, MTHFD2は全体的に発現が亢進していたが、特に壊死周囲の腫瘍細胞で発現が高く、壊死部で特にセリンを代謝していると考えられた。また、膠芽腫細胞でPSAT1をノックダウンすると、細胞の増殖や細胞周期が抑制され、アポトーシス細胞が増加した。セリン代謝酵素は、膠芽腫の治療ターゲットとして有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、質量分析器などの機器の向上で、がん細胞での代謝リモデリングが細かなことまで明らかとなってきている。しかし、セリンに注目した研究はまだ端緒についたばかりである。膠芽腫におけるセリン代謝が明らかになれば、新たな治療法の開発につながる可能性もあり、臨床的にも意義ある研究と思われる。

研究成果の概要(英文)：Core of the glioblastoma (GBM) tissue had nutrient starvation. As compared with edge of the GBM, core of the GBM had low concentration of glutamine and high concentration of serine, which was brought by a metabolic remodeling of amino acid. Serine metabolic enzyme, PSAT1, SHMT2, and MTHFD2 were increased in GBM tissues, especially, in the area nearby necrotic regions. Cell proliferation and cell cycle was inhibited by knockdown of PSAT1. In addition, knockdown of PSAT1 induced apoptosis in glioma cells. Our study suggested that the amino acid metabolic remodeling pathway and remodeling enzymes may be useful therapeutic targets in GBM therapy.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 グルタミン セリン 代謝リモデリング

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫(グリオブラストーマ)は、最も悪性の脳腫瘍の1つであり、集学的治療を施行しても生存期間中央値は2年に満たず、新たな治療法が切望されている。近年、グリオーマにおいて、isocitrate dehydrogenase(IDH)の変異が発見され、グリオーマ細胞内での代謝物について盛んに研究が行われるようになった。申請者が所属する研究室では、IDH変異のあるグリオーマでは2-ヒドロキシグルタレート(2HG)の産生が上昇するのみでなく、 α -ケトグルタル酸(α -KG)補充のためにグルタミン代謝が亢進することを見出し、IDH変異のあるグリオーマの診断バイオマーカーとして有用であることを報告した。(Nagashima, et al., Neuro Oncol. 2016)

がん細胞は正常細胞とは異なり、低酸素状態をはじめとする特殊環境で活動をするため、さまざまな代謝のリプログラミングが生じている。最近、糖代謝と関連の深いアミノ酸代謝でも劇的なリプログラミングが起こることが明らかとなった。アミノ酸の中で、グルタミン、セリン、グリシン、トリプトファン消費ががん細胞で共通して高く、これらのアミノ酸代謝のリプログラミングにより、がん細胞は過酷な環境での生存、増殖が可能となっている。また、アミノ酸はタンパク質の構成成分として働くことは当然であるが、糖新生をはじめとした糖質合成の基質、脂質合成の基質として働いている。

栄養学的非必須アミノ酸の中でセリンは特殊な代謝様式を示し、3ステップの酵素反応[ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ(PHGDH)、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ1(PSAT1)、ホスホセリンホスファターゼ(PSPH)]で3ホスホグリセリン酸(3PG)から合成される。ヒト結腸がん細胞株はセリンの消費が早く、培地からセリンを除くと細胞増殖が強く抑制されることが報告された。また、セリン欠乏時には、癌抑制蛋白であるp53を介してセリン合成系の促進とグルタチオン合成といった代謝リプログラミングが引き起こされており、セリン自身が代謝リプログラミングを引き起こすフィードバック要素となっている。

メラノーマ細胞でもセリン合成が亢進しているが、悪性度が増すに従いセリン合成酵素の遺伝子コピー数が増加している。

また、セリン合成の亢進は、がん細胞の転移活性においても重要な役割をしている(Breast Cancer Res. Treat.,125, 2011)。何故セリンがそれほどがん細胞に重要なかが問題となるが、セリンはグリシンの前駆体であり、グリシンはグルタチオンやクレアチンの前駆体であり、酸化還元電位の維持やエネルギー代謝に関与しているためと考えられる。また、グリシンは一炭素代謝の炭素の供与体であり、葉酸サイクルとメチオニンサイクルを通して核酸合成とエピジェネティクスの中心的反応であるメチル化反応のメチル基を供与している。

このようにセリンはほかのアミノ酸よりもそこから派生する化合物が多く、糖代謝、アミノ酸代謝、脂質代謝、核酸代謝、一炭素代謝などの代謝を結びつける「ハブ」のような役割をしているとみることもできる。

2. 研究の目的

がん細胞は正常細胞とは異なり、特殊環境下で増殖や転移などの活発な活動を行うために、さまざまな代謝リプログラミングが起こっている。申請者はグルタミン、セリンに着目し、膠芽腫内でのグルタミンの状態、グルタミン飢餓状態でのアミノ酸代謝リモデリングについて明らかにすることを目的とした。また、膠芽腫におけるセリン代謝酵素の発現を調べ、セリン代謝酵素阻害による抗腫瘍効果などを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) GS/MSによるメタボローム解析

膠芽腫細胞(U87)をグルタミンフリー培地で培養し、GS/MSによるメタボローム解析を行う。通常培地でのメタボローム解析と比較し、アミノ酸代謝リモデリングについて検討する。また、グルコースの炭素に放射線同位元素を付け、代謝のフラックス解析を行い、グルタミンフリーでの炭素の流れを解析する。

2) 膠芽腫におけるセリン代謝酵素の発現

神戸大学医学部脳神経外科研究室に保存されている膠芽腫およびグリオーマの摘出標本を用いて、セリン代謝酵素(PSAT1など)の発現をmRNA、蛋白レベルで解析する。

3) 膠芽腫組織内のアミノ酸代謝物の測定

膠芽腫患者のMRスペクトロスコピーを解析し、腫瘍内部と辺縁での代謝物の変化を調べる。

4) 膠芽腫細胞におけるPSAT1ノックダウンでの抗腫瘍効果の解析

U87細胞に対して、PSAT1のsiRNAによるノックダウンを行い、細胞の増殖、細胞周期、アポトーシスなどの反応を解析する。

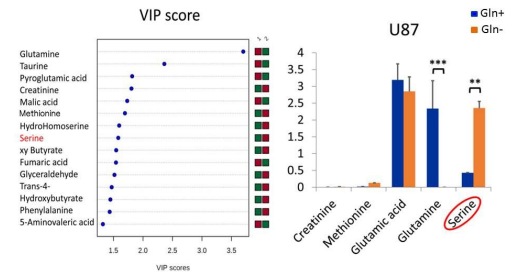
4. 研究成果

(1) グルタミンフリー培地でのアミノ酸リモデリング

グルタミンフリー培地で膠芽腫細胞を培養すると、細胞内セリンの著名な上昇が生じることを見出した。(右上図)セリンは3つの代謝酵素により3PGから生成されるが、グルタミンフリーの状態ではPSAT1が著明に発現亢進していた。

グルタミンフリーの培地ではセリンへの炭素供給はグルコースからくるものと、それ以外からくるものとに二分され、グルコースからの供給はそれほど上昇してはいなかった。これはグルタミンからの炭素供給が遮断されることで他のアミノ酸から供給されることを意味した。グルタミンフリーによるセリンの上昇はグルコースからの炭素供給でない可能性が高い。

グルタミンフリー培地で培養したときのメタボローム解析および代謝酵素の変化

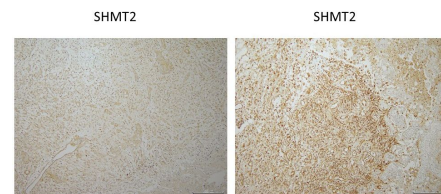


(2) グルタミンフリー培地でのアミノ酸代謝酵素の変化

グルタミンフリー培地で膠芽腫細胞を培養し、アミノ酸代謝酵素の mRNA 発現を調べると、セリン代謝酵素である PSAT1、MTHFD2、SHMT2 がコントロールに比較して有意に上昇していた。

(3) PSAT1, MTHFD2, SHMT2 の膠芽腫内での発現

膠芽腫の組織を用いて、PSAT1, MTHFD2, SHMT2 の免疫染色を行うと、ほとんどの膠芽腫腫瘍組織での発現亢進が認められ、特に壊死周囲の細胞で発現が特に亢進していた。これは、壊死部ではグルタミン飢餓状態となり、アミノ酸リモデリングが生じて、これらの酵素の発現が亢進していると考えられた。



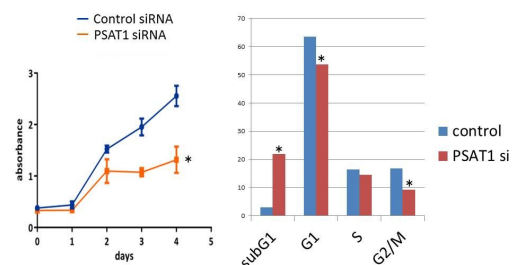
(4) 膠芽腫内でのグルタミン、セリン量の解析

膠芽腫の腫瘍中心と腫瘍辺縁でグルタミン量を MR スペクトロスコピーで計測すると、辺縁に比べ腫瘍中心ではグルタミンが有意に低下して、代わりにセリン、メチオニンなどのアミノ酸は有意に上昇していた。腫瘍中心ではグルタミン飢餓状態となり、アミノ酸リモデリングによりセリンが上昇していることが確認できた。

(5) セリン代謝酵素 PSAT1 のノックダウンによる抗腫瘍効果

PSAT1 は P-Pyr を P-Ser に変換するアミノトランスフェラーゼであるが、この酵素をノックダウンすると膠芽腫細胞の増殖は著明に抑制され、cell cycle arrest が起こり、アポトーシスが誘導されることが判明した。(右下図)以上より、PSAT1 はグルタミン不足環境下で非常に重要な酵素であることが明らかとなった。

PSAT1のノックダウンによる細胞増殖抑制および細胞周期への影響



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

Sakata J, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Nakada M, Tanaka H, Hashimoto N, Kagawa N, Kinoshita M, Nakamizo S, Maeyama M, Nishihara M, Hosoda K, Kohmura E. MicroRNA regulating stanniocalcin-1 is a metastasis and dissemination promoting factor in

〔学会発表〕(計 3件)

中溝 聡、中村直人、岡田真幸、阪上義雄

破裂脳動脈瘤に対するコイル塞栓術後に親水コーティングに関連する脳実質変化を認めた1例
第42回日本脳卒中学会学術集会 2017年

Masahiro Maeyama, Takashi Sasayama, Kazuhiro Tanaka, Yasuhiro Irino, Masamitsu Nishihara, Hiroto Tanaka, Satoshi Nakamizo, Eiji Kohmura, Anti-tumor effect of VEGF inhibitor plus ketogenic diet therapy for glioblastoma, the 2018 Annual Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, 2018

Takashi Sasayama, Kazuhiro Tanaka, Tatsuo Hori, Masamitsu Nishihara, Hiroto Tanaka, Satoshi Nakamizo, Hiroaki Nagashima, Masahiro Maeyama, Eiji Kohmura, Interleukin-6 in Cerebrospinal Fluid as a Prognostic Marker for Glioblastoma Patients, the 2018 Annual Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, 2018

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等: 該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

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。