

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401  
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）  
研究期間：2018～2022  
課題番号：17KK0199  
研究課題名（和文）上皮間葉転換におけるGTP代謝シグナルの解明と新たながん治療戦略

研究課題名（英文）GTP Metabolism in Epithelial-Mesenchymal Transition

研究代表者

田畑 祥（Tabata, Sho）

大阪大学・蛋白質研究所・特任講師（常勤）

研究者番号：30708342

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 18ヶ月

研究成果の概要（和文）：上皮間葉転換（EMT）は、がんの遠隔転移や薬剤耐性に関与する。近年、TGF- $\beta$  依存的なEMTのシグナル伝達や転写因子が明らかにされているが、細胞内代謝がEMTにどのように関与しているかは、十分に理解されていない。本研究では、トランスクリプトームとメタボロームを組み合わせた解析によって、特異的なアミノ酸および核酸代謝がEMTの促進に寄与することを見出した。また、アミノ酸代謝酵素・P4HA3および、ピリミジン核酸代謝酵素・CPTSの発現上昇がEMTの誘導に重要なことがわかった。これらの結果から、両酵素の阻害剤は、がんEMTの有望な治療薬になる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんにおけるEMTは10年以上前から精力的に研究されており、EMTに関連する遺伝子の転写因子制御、翻訳機構、非コードRNAの制御、選択的スプライシングやタンパク質安定性など、様々な分子機構が明らかになっている。しかしながら、EMT特異的な代謝変化およびその機構については不明な点が多い。本研究で、EMTにおける特異的なアミノ酸および核酸の代謝変化が示され、EMTの新しい分子基盤が明らかになった。また、がんEMTにおいてアミノ酸代謝酵素のP4HA3および、ピリミジン代謝酵素のCPTSの発現上昇が、重要であることが判明し、その両酵素の阻害剤は新規がん治療薬になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is involved in distant metastasis and drug resistance of cancer. Although TGF- $\beta$ -dependent signal transduction and transcription factors for EMT have been identified, how intracellular metabolism is involved in EMT remains to be fully elucidated. In this study, combined metabolome and transcriptome analysis revealed that unique amino acid and nucleic acid metabolisms contribute to the promotion of EMT. We also found that elevated expression of prolyl 4-hydroxylase 3 (P4HA3), an amino acid metabolic enzyme, and CTP synthase (CPTS), a pyrimidine nucleic acid metabolic enzyme, are important for the induction of EMT. These results suggest that inhibitors of both enzymes may be therapeutic agents for cancer.

研究分野：がん代謝

キーワード：上皮間葉転換

## 様式 F - 19 - 2

### 1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) は、がん転移において重要なプロセスの一つで、上皮細胞 (細胞接着能の高い) が間葉系細胞 (細胞接着能が低く、運動能が高い) に変化する現象である。EMT を獲得したがん細胞は極性の喪失、移動・浸潤能が亢進し、がんの転移に大きく貢献する。また、EMT は様々な抗がん剤に対して耐性を付与することから、がん治療の側面からも問題となっている。最近、EMT による代謝変化が、間葉系形質の維持に重要であることが報告されており、ピリミジン代謝に関与するジヒドロピリミジン脱水素酵素、中心代謝を制御するグルタミンナーゼやピルビン酸脱水素酵素キナーゼ 4 などの酵素が、EMT の代謝変化を制御することが明らかになっている (Shaul YD. et al., Cell, 2014; Sun Y. et al., Cancer Metab., 2014; Ulanet DB. et al., PLoS One, 2014)。しかしながら、EMT の代謝機構は部分的な経路しか解析されておらず、十分に理解されていなかった。

我々は、(慶應義塾大学の曾我朋義教授が開発した)キャピラリー電気泳動-質量分析 (CE-MS) 法による網羅的な代謝解析 (メタボローム解析) 技術を有しており、数千種類のイオン性代謝物質の測定が可能である (Soga T. et al., J. Proteome Res., 2003)。そこで基課題では、このメタボローム解析にマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現 (トランスクリプトーム) 解析を組み合わせ、EMT 特異的なアミノ酸代謝を見出した。本課題では、EMT の代謝研究を進展させ、EMT と核酸代謝の関係性について検討を行った。

### 2. 研究の目的

肺がん・上皮間葉転換に特異的なアミノ酸代謝および核酸代謝の分子基盤を解明する。

### 3. 研究の方法

#### I. EMT における核酸代謝変化の解析

トランスフォーミング増殖因子 (TGF) - $\beta$  で EMT を誘導した非小細胞肺がん細胞で、核酸代謝の変化をマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析 (トランスクリプトーム解析) およびキャピラリー電気泳動-質量分析 (CE-MS) 法による網羅的な代謝解析 (メタボローム解析) で調べた。

#### II. CTP シンターゼ (CTPS) の遺伝子発現解析

TGF- $\beta$  で EMT を誘導した非小細胞肺がん細胞で、CTPS mRNA レベルおよびタンパク質レベルを、Real-time PCR 法およびウェスタンブロット法でそれぞれ調べた。また、EMT 誘導転写因子 (SNAI1, TWIST1, および ZEB1) を抑制した条件での CTPS 発現変化についても調べた。

#### III. CTPS の機能解析

siRNA で CTPS をノックダウンし、EMT マーカーおよび EMT 機能 (移動能、薬剤耐性) について調べた。EMT マーカーは、CDH1, CDH2, および FN1 発現を Real-time PCR 法およびウェスタンブロット法で調べた。移動能はトランスウェルアッセイで、薬剤耐性は抗癌剤エルロチニブに対する生存抵抗性を MTT アッセイで評価した。

#### IV. CTPS ノックダウン細胞の代謝解析

siRNA で CTPS をノックダウンした細胞の (CE-MS による) メタボローム解析を行った。

#### V. 担癌マウスモデルにおける P4HA3 ノックダウン細胞の解析

shRNA で P4HA3 ノックダウン細胞を作製し、その細胞を用いた担癌マウスモデルにおける腫瘍サイズ、がん転移およびアミノ酸代謝プロファイルを調べた。

### 4. 研究成果

#### I. EMT における核酸代謝変化の解析

メタボローム解析において GTP 代謝および CTP 代謝が変化していることが示唆された。また、マイクロアレイ解析で上記代謝に関与する酵素の発現を調べた結果、(CTP 代謝経路上の) CTP 合成の律速酵素である CTP シンターゼ (CTPS) の発現増加が認められた。一方、GTP 代謝の変化に関与する酵素は同定できず、以後 CTPS に着目して研究を進めた。

#### II. CTPS の遺伝子発現解析

上記オミクス解析によって、TGF- $\beta$  誘導性の EMT で CTPS の発現亢進が見出されたことから、詳細な解析を行ったところ、TGF- $\beta$  刺激の濃度および、時間依存的な CTPS 発現上昇が確認された。また、EMT 誘導転写因子である SNAI1, TWIST1, および ZEB1 の関与を調べるために、それらの転写因子をノックダウンした条件で CTPS の発現解析を行った。その結果、SNAI1 ノックダウンは TGF- $\beta$  誘導性の CTPS の発現亢進を一部抑制することがわかった。

#### III. CTPS の機能解析

TGF- $\beta$  刺激下で CTPS をノックダウンすると、上皮細胞マーカー・CDH1 の発現が上昇する一

方、間葉系マーカー・CDH2 および FN1 の発現が減少した。また、CTPS ノックダウンは、TGF- $\beta$  による移動能の亢進、およびエルロチニブ耐性を抑制した。

#### IV. CTPS ノックダウン細胞の代謝解析

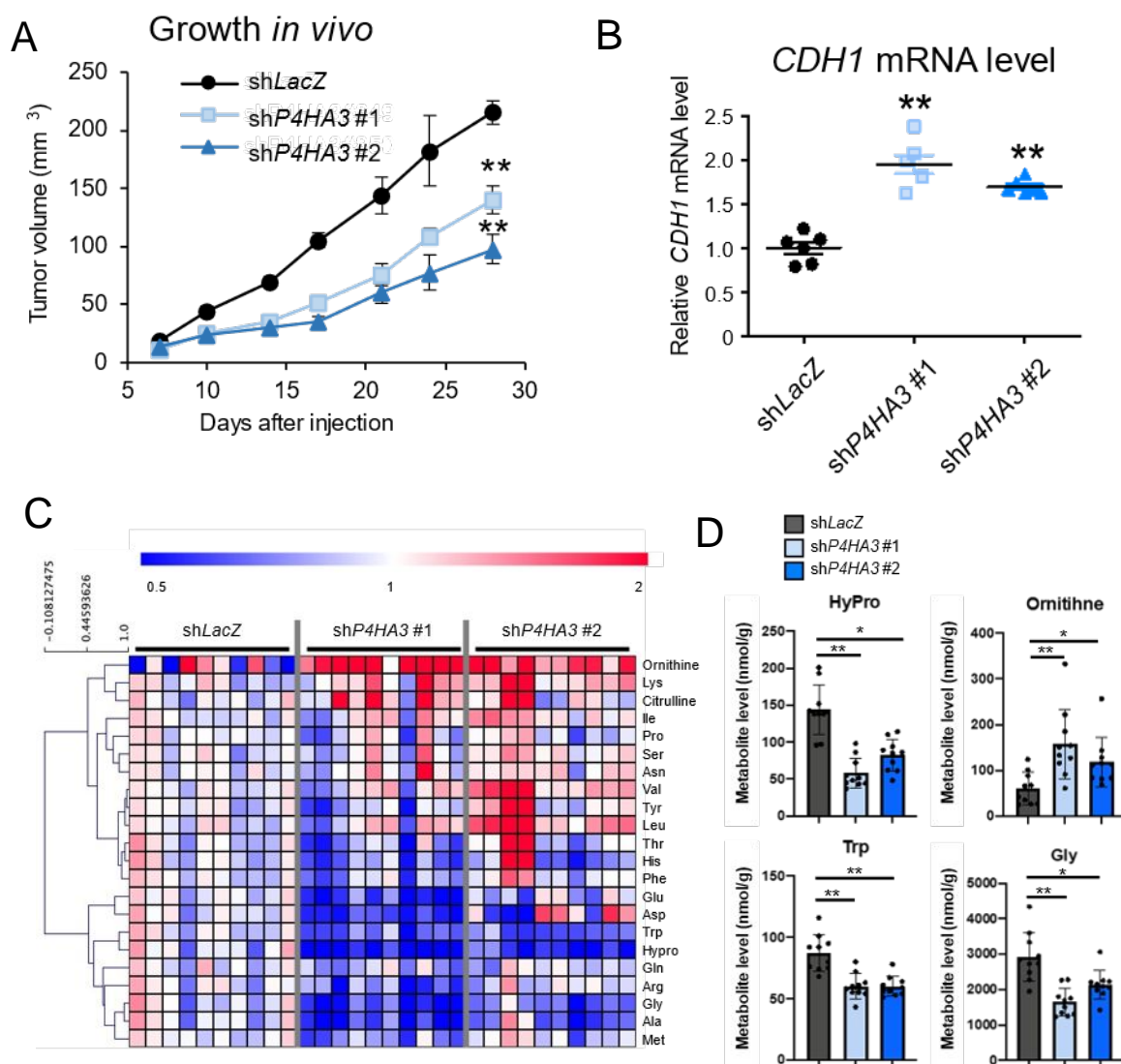
予想と反して、UTP および CTP 関連代謝物質の変化は少なかった。一方、TGF- $\beta$  で誘導されるタウリンの減少が、CTPS ノックダウンで完全に抑制された。

#### V. 担癌マウスモデルにおける P4HA3 ノックダウン細胞の解析

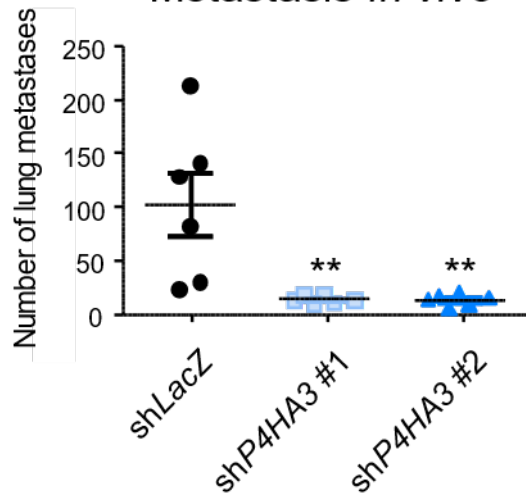
先行していたアミノ酸代謝の研究で、P4HA3 のノックダウンが *in vivo* の腫瘍増大、がん転移および腫瘍組織内のアミノ酸レベルに影響を及ぼすか、検討を行った。その結果、P4HA3 ノックダウンは、腫瘍サイズおよび、がん転移を抑制し、特定のアミノ酸レベルを変化させることが明らかになった (図 1)。

P4HA3 の解析では、2021 年度に論文化した (Nakasuka F., Tabata S. et al., *Commun Biol.*, 2021)。CTPS の解析は、今後、論文化を行う予定である。

図 1: P4HA3 ノックダウンによる腫瘍増大、がん転移およびアミノ酸代謝変化 (Nakasuka F., Tabata S. et al., *Commun Biol.*, 2021)



## E Metastasis *in vivo*



- A. コントロール (shLacZ) および P4HA3 ノックダウン (shP4HA3) A549 細胞の皮下移植後の成長率。n = 6/グループ。データは平均値 ± SEM を示す。\*\*\* $P < 0.01$ 。
- B. shLacZ、shP4HA3 #1、shP4HA3 #2 A549 細胞由来の腫瘍における CDH1 mRNA レベル。
- C. P4HA3 ノックダウン A549 細胞由来の腫瘍組織におけるアミノ酸レベルの変化。n = 10/グループ。各サンプルの代謝物レベルは、shLacZ の平均代謝物レベルに対する変化量に変換した。赤と青は、shLacZ (白) と比較して、P4HA3 ノックダウン腫瘍組織 (shP4HA3 #1 および shP4HA3 #2) の代謝物のレベルがそれぞれ高いこと、低いことを示す。
- D. P4HA3 ノックダウン腫瘍組織のヒドロキシプロリン (HyPro)、グリシン (Gly)、トリプトファン (Trp)、オルニチンのレベル。データは平均値 ± SEM で示す。
- E. 尾静脈内投与したコントロール、および P4HA3 ノックダウン A549 細胞の肺転移。n = 6/グループ。データは平均値 ± SEM で示す。\*\*\* $P < 0.01$ 。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Guo Jing, Satoh Kiyotoshi, Tabata Sho, Mori Masaru, Tomita Masaru, Soga Tomoyoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Reprogramming of glutamine metabolism via glutamine synthetase silencing induces cisplatin resistance in A2780 ovarian cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-021-07879-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kanazawa Tomomi, Michida Hiroki, Uchino Yuki, Ishihara Akari, Zhang Suxiang, Tabata Sho, Suzuki Yutaka, Imamoto Akira, Okada Mariko	4. 巻 288
2. 論文標題 Cell shape based chemical screening reveals an epigenetic network mediated by focal adhesions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 5613 ~ 5628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.15840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishida Hiroshi, Okada Morihiro, Yang Lynna, Takano Tomomi, Tabata Sho, Soga Tomoyoshi, Ho Diana M, Chung Jongkyeong, Minami Yasuhiro, Yoo Sa Kan	4. 巻 10
2. 論文標題 Methionine restriction breaks obligatory coupling of cell proliferation and death by an oncogene Src in Drosophila	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e59809
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.59809	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hayasaka Ryosuke, Tabata Sho, Hasebe Masako, Ikeda Satsuki, Ohnuma Sumiko, Mori Masaru, Soga Tomoyoshi, Tomita Masaru, Hirayama Akiyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Metabolomic Analysis of Small Extracellular Vesicles Derived from Pancreatic Cancer Cells Cultured under Normoxia and Hypoxia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 215 ~ 215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo11040215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakasuka Fumie, Tabata Sho, Sakamoto Takeharu, Hirayama Akiyoshi, Ebi Hiromichi, Yamada Tadaaki, Umetsu Ko, Ohishi Maki, Ueno Ayano, Goto Hisatsugu, Sugimoto Masahiro, Nishioka Yasuhiko, Yamada Yasuhiro, Tomita Masaru, Sasaki Atsuo T., Yano Seiji, Soga Tomoyoshi	4. 巻 4
2. 論文標題 TGF- $\beta$ -dependent reprogramming of amino acid metabolism induces epithelial to mesenchymal transition in non-small cell lung cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02323-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirayama A, Tabata S, Kudo R, Hasebe M, Suzuki K, Tomita M, Soga T.	4. 巻 1619
2. 論文標題 The use of a double coaxial electrospray ionization sprayer improves the peak resolutions of anionic metabolites in capillary ion chromatography-mass spectrometry.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Chromatogr A	6. 最初と最後の頁 460914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2020.460914.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tabata Sho, Kojima Yasushi, Sakamoto Takeharu, Igarashi Kaori, Umetsu Ko, Ishikawa Takamasa, Hirayama Akiyoshi, Kajino-Sakamoto Rie, Sakamoto Naoya, Yasumoto Ken-ichi, Okano Keiichi, Suzuki Yasuyuki, Yachida Shinichi, Aoki Masahiro, Soga Tomoyoshi	4. 巻 42
2. 論文標題 L-2-hydroxyglutaric acid rewires amino acid metabolism in colorectal cancer via the mTOR-ATF4 axis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1294 ~ 1307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-023-02632-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayasaka Ryosuke, Tabata Sho, Hasebe Masako, Ikeda Satsuki, Hikita Tomoya, Oneyama Chitose, Yoshitake Jun, Onoshima Daisuke, Takahashi Kumiko, Shibata Takahiro, Uchida Koji, Baba Yoshinobu, Soga Tomoyoshi, Tomita Masaru, Hirayama Akiyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Metabolomics of small extracellular vesicles derived from isocitrate dehydrogenase 1-mutant HCT116 cells collected by semi-automated size exclusion chromatography	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1294 ~ 1307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2022.1049402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Whitburn Jessica, Rao Srinivasa R., Morris Emma V., Tabata Sho, Hirayama Akiyoshi, Soga Tomoyoshi, Edwards James R., Kaya Zeynep, Palmer Charlotte, Hamdy Freddie C., Edwards Claire M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Metabolic profiling of prostate cancer in skeletal microenvironments identifies G6PD as a key mediator of growth and survival	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabf9096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abf9096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田畑 祥、曾我 朋義
2. 発表標題 大腸がんにおけるオンコメタボライト・2-ヒドロキシグルタル酸の役割
3. 学会等名 第16回メタボロームシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 早坂 亮祐、平山 明由、田畑 祥、曾我 朋義、富田 勝
2. 発表標題 がん細胞が放出した細胞外小胞のメタボローム解析
3. 学会等名 日本生化学会 東北支部 第88回例会・シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 早坂 亮祐、平山 明由、田畑 祥、曾我 朋義、富田 勝
2. 発表標題 がん細胞が放出した細胞外小胞のメタボローム解析
3. 学会等名 第70回質量分析討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 早坂 亮祐、田畑 祥、長谷部 雅子、池田五月、曾我 朋義、富田 勝、平山明由
2. 発表標題 低酸素膵臓がん細胞が分泌した細胞外小胞のメタボローム解析
3. 学会等名 第15回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中宿 文絵、田畑 祥、坂本 毅治、平山 明由、山田 忠明、衣斐 寛倫、矢野 聖二、富田 勝、曾我 朋義
2. 発表標題 TGF- $\alpha$ 誘導性のアミノ酸欠失は EMT を誘導する
3. 学会等名 第7回がん代謝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早坂 亮祐、平山 明由、田畑 祥、長谷部 雅子、石川 貴正、曾我 朋義、富田 勝
2. 発表標題 低酸素ストレス下でがん細胞が放出した細胞外小胞中の代謝物質量変化
3. 学会等名 第7回がん代謝研究会、宮城、2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早坂 亮祐、平山 明由、田畑 祥、長谷部 雅子、森 大、大沼 澄子、曾我 朋義、富田 勝
2. 発表標題 がん細胞が放出する細胞外小胞のメタボローム解析
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
アメリカ	シンシナティ大学	Dep. of Internal Medicine	