

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06072

研究課題名(和文) セリン合成経路による悪性形質獲得のためのがん細胞代謝リプログラミング機構の解明

研究課題名(英文) Serine synthesis pathway activates de novo fatty acid synthesis to drive chemoresistance in malignant breast cancer.

研究代表者

山本 雄広 (Takehiro, Yamamoto)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：50383774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の大きな特性である旺盛な増殖能に対し、その標的として核酸合成や細胞分裂阻害などに対する数々の抗がん剤の適用がこれまでにトライされているが、継続的な化学治療により耐性を獲得してしまうのが現代のがん治療における大きな障壁である。本研究では耐性獲得機序として代謝酵素のアルギニンメチル化を介した解糖系からセリン生合成経路への代謝経路の切り替え(リモデリング)という新しいメカニズムを明らかにした。そのなか、セリン生合成経路の律速酵素であるPHGDHがメチル化を受け、セリン合成系から派生する脂肪酸の新規合成能を亢進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、代謝酵素の高メチル化とその核局在は化学治療の奏功の指標となるばかりでなく、化学治療抵抗性乳がん細胞の脂肪酸代謝特性や翻訳後修飾に介入することで耐性を喪失させうる可能性を示唆しており、現時点で有望なマーカー分子が知られていない、トリプルネガティブ型の乳がんの代謝特性を明らかにした点で、本研究の社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Although a number of anti-cancer drugs have been tried to target the vigorous proliferative capacity such as nucleic acid synthesis, rapid cell division, and accumulation of anti-oxidants. Unfortunately, the acquisition of resistance due to continuous chemotherapy is a major barrier in modern cancer treatment. In this study, we have elucidated a novel mechanism of resistance acquisition, namely, a metabolic pathway switch (remodeling) from the glycolytic pathway to the serine biosynthetic pathway mediated by arginine methylation of three metabolic enzymes (PFKFB3, PKM2, and PHGDH). We found that PHGDH, the rate-limiting enzyme of the serine synthesis pathway, undergoes methylation at R20 and R54 and enhances the ability to synthesize new fatty acids derived from the serine biosynthetic pathway.

研究分野：代謝生化学、病態医化学

キーワード：乳がん 治療抵抗性 アルギニンメチル化 解糖系 脂肪酸代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エネルギー産生の恒常性(需要と供給のバランス)は糖、アミノ酸、核酸、脂質など各代謝系との連携の上に成立している。これらはすべて中心炭素代謝から分岐し、この連携バランスの崩壊が代謝性疾患やがん、老化の一因とされている。申請者はこれまでに代謝酵素群の翻訳後修飾レベルの変化が経路切り替えに作用し増殖・分化制御に寄与する、『代謝-修飾コード』という新概念を提唱し、特定の代謝酵素の翻訳後修飾が代謝経路の切り替えに寄与し、がん細胞の benefit に作用することを報告してきた。

がん細胞の大きな特性である旺盛な増殖能に対し、既存の抗がん剤は核酸合成や細胞分裂阻害などが主たる標的であるが、継続的的化学治療により耐性を獲得してしまうのががん治療における目下の大きな障壁である。耐性獲得メカニズムとして、薬剤の排出、突然変異によるシグナル伝達系の異常活性化に加え、代謝経路の切り替え(リモデリング)による耐性獲得が近年注目されている。予備実験において、我々は有糸分裂阻害剤であるパクリタキセルを乳がん細胞株に添加すると解糖系酵素 PFKFB3 および PKM2 のメチル化が亢進することを偶然見出した。当初は解糖系酵素群と細胞骨格分子の相互作用に着目していたが、培養皿上で段階的にパクリタキセル濃度を上げて樹立した *in vitro* における耐性乳がん株では元の親株に比べ、高度にこれら酵素のメチル化が認められた。

本提案研究では申請者が発見した、パクリタキセル耐性株における代謝酵素のメチル化動態の差異に着目し、代謝変動が耐性獲得にどのように作用するかその機構を明らかにし、治療抵抗性に対する新しい克服戦略を提示できないかを検討することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が見出したパクリタキセル耐性乳がん株特有の代謝特性、つまり解糖系からセリン生合成系を経た含硫化合物代謝経路への経路切り替えがどのようにして制御されているか、そのメカニズムを明らかにすることでその化学治療抵抗性の喪失を狙った実効性のある方策を生み出すことである。

3. 研究の方法

(1)耐性株の樹立

ヌードマウス (BALB/cA Jcl-nu/nu 系統、日本クレア) 1 匹に対し、等量のマトリゲルと混合した 1×10^6 個の MDA-MB-231 細胞を接種した。一定の大きさに腫瘍が成長した後、パクリタキセルを 1 週間に 2 回、4 週間の間腹腔投与した。パクリタキセルの投与期間終了後、腫瘍を摘出し、Tumor Dissection Kit, human (ミルテニー社)を用いて細胞を回収した。回収後の細胞は上記と同様のサイクルを合計 3 度繰り返した。投与したパクリタキセル(プリストル・マイヤーズ社のタキソール注射液 30mg を使用)の用量は、20mg/kg (1 ターン目)、30mg/kg (2 ターン目)、60mg/kg (3 ターン目)とした。

(2)PRMT1 ノックアウト株の樹立

plentiCRISPRv2 ベクター (Addgene) にヒト PRMT1 を標的とするガイド RNA 配列 (5'-GTGGATGCCAAAGTGTGCGT(AGG)-3' および 5'-TTTGACTCCTACGCACACTT(TGG)-3') を挿入した。レンチウイルス用いて MDA-MB-231 および MDA-MB-468 細胞に感染させ、導入細胞をピューロマイシンで選択した。KO 効率はウェスタンブロットで確認した。

(3) メタボローム解析

対照群、耐性細胞それぞれを 100mm ディッシュに 1×10^7 個ずつ回収前日に撒いた。グルコースの代謝の流れを調べるために安定同位体ラベルされた $^{13}\text{C}_6$ -グルコースをグルコース非含有 DMEM 培地に 1g/L となるように添加し、15 分間細胞に取り込ませた。その後、5% (v/v) マンニトールで 2 回洗浄し、メタノール・クロロホルム処理により、細胞を変性させ、ライセートを回収した。遠心処理にて細胞残渣を分離し、上清（代謝物などの低分子化合物を含む）を 5kDa カットオフフィルターで精製し中心代謝経路測定用のサンプルとした。また脂肪酸の測定は 60mm ディッシュに 3×10^6 個ずつ細胞を用意し、 $^{13}\text{C}_6$ -グルコース（1g/L）を 24 時間添加し、メタノール・クロロホルム処理後の有機層を回収しこれを測定した。

(4) 細胞死アッセイ

細胞死アッセイは Promega 社の CellTOX Green Cytotoxicity assay キットを用いて測定した。対照群および耐性細胞を 96well プレートにまき、様々な濃度のパクリタキセル（LKT Laboratories, Inc.）で約 16 時間処理した。細胞には予め Hoechst Dye を添加しておき、蛍光プレートリーダーにて CellTOX 励起 488nm/蛍光 520nm、Hoechst 励起 355nm/蛍光 415nm にて測定した CellTOX 由来の蛍光測定値は Hoechst で得られる生細胞由来の蛍光測定値で割り、補正した。

(5) 修飾部位の同定

FLAG タグ標識したヒト PHGDH を HEK293T に強制発現させ、M2 アガロース（WAKO）でプルダウンした。溶出画分を SDS-PAGE で分離後、該当バンドをトリプシン処理し、LC-MS 解析を行った。修飾部位の解析には Thermo 社のソフト Proteome Discoverer2.5 を用いた。

(6) メチル化特異的抗体の作成

上記実験で同定したメチル化部位近傍で抗原を設計し（48-CEGLIV(R)mmaSATKVIT-60）、ウサギを用いてメチル化部位特異的（R54mma）PHGDH 抗体の作成を行った。得られた抗体の特異性はドットプロット法によって確認した。

(7) PHGDH 活性測定

1×10^6 個の細胞を 0.2ml の Lysis buffer（50mM、Tris-HCl (pH9.0)、1mM EDTA、0.01% Tween-20）中で懸濁し、20000xg、30 分遠心し上清を得た。上清は 2 倍量の硫酸を加え、氷中 30 分間静置することで塩析した。20000xg、15 分遠心後、ペレットを 100ul の抽出バッファーで懸濁し、サンプルとした。各測定には 10ul の測定サンプルを用いて、アッセイバッファー（1.25mM グルタミン、0.3mM の NAD⁺、80ng/ul のヒト組み換え PSAT1、0.2mM resazurn-Na、0.2mg/ml diaphorase）と混合した。最後に 0.1M 3-PG を混合して反応を開始した。活性は励起波長 550nm、蛍光波長 600nm での蛍光値の経時変化を基に算出した。

(8) ゼノグラフト実験

免疫不全 NOG マウスの脇腹に 3×10^6 個の細胞（MDA-MB-231 親株、パクリタキセル耐性株、耐性株+PRMT1-KO）を接種し、10 日後から 3 日おきに 20mg/kg パクリタキセルを尾静脈注射した。腫瘍径（mm³）は（長径 × 短径 × 短径）/2 で算出した。

4. 研究成果

まず、複数種の乳がん細胞株についてエネルギー代謝酵素の発現量を比較したところ、パクリタキセルに抵抗性を示す MDA-MB-468 細胞において解糖系の律速酵素である PFKFB3 および PKM2 の発現およびアルギニンメチル化修飾レベルが高く、同時にセリン生合成系酵素の発現量が高いことがわかった。次に我々はパクリタキセル感受性である MDA-MB-231 細胞をヌードマウスに移植、腫瘍定着後にパクリタキセルを段階的濃度で暴露することで、in vivo におけるパク

リタキセル耐性株を樹立した。樹立した耐性株と親株とを比較したところ、耐性株では MDA-MB-468 細胞同様にセリン合成系酵素の発現亢進と解糖系律速酵素の高メチル化が認められた。そこで、¹³C 標識されたグルコースを用いてメタボローム解析したところ、やはり耐性株では取り込んだグルコースを解糖系中間代謝物 3-phosphoglycerate からセリン合成経路へ分岐する代謝特性であった。しかしながらグルタチオン産生やその酸化還元比に影響を与えなかった。

セリン合成は葉酸代謝を経た核酸の供給やシステイン代謝の活性化だけでなく、脂肪酸の合成に関与することが示唆されているが、我々は LC-MS を用いて脂肪酸合成能の測定を試みた結果、耐性株では親株に比べ有意に脂肪酸合成能が亢進していることを発見した。PRMT1 のノックアウト株では脂肪酸合成は抑えられることから、脂肪酸合成能の制御は PRMT1 による未知分子のメチル化による作用であると推測された。そこで、該当する代謝経路中の酵素について精査したところ、セリン合成系の律速段階を制御する酵素である PHGDH (D-3-phosphoglycerate dehydrogenase) の 20 番目および 54 番目のアルギニン残基がメチル化を受けることが分かった。これらのアルギニン残基は PHGDH の活性中心の近傍に存在し、R20 はユビキチン化が報告されている K21 に拮抗して働くことで酵素の安定化に寄与し、R54 は基質とのアフィニティに正に作用することがわかった。さらに PHGDH は複数のシステイン残基に対し脂肪酸付加型の翻訳後修飾である S-パルミトイル化を受けることが判明し、上記メチル化修飾と協調的に修飾を受け、酵素活性の活性維持に作用することが明らかになった。また、新たに作成したメチル化部位特異的 PHGDH 抗体、およびすでにわれわれが樹立している抗メチル化 PFKFB3 および抗メチル化 PKM2 抗体を用いて検討したところ、パクリタキセル耐性株では 3 つの代謝酵素 PFKFB3, PKM2, PHGDH のメチル化レベルがすべて高く、同一のメチル化酵素 PRMT1 (protein arginine methyltransferase 1) によってメチル化レベルが制御されていることが分かった。

次に我々は耐性株の代謝特性、つまり脂肪酸合成を抑制することでパクリタキセルに対する抵抗性を解除できうるかについて検討を行った。脂肪酸合成酵素阻害剤オルリスタット、PRMT1 阻害剤 MSO23、および S-パルミトイル化の阻害剤 2-bromopalmitate、いずれの阻害剤で処理した場合も耐性株ではパクリタキセルに対する抵抗性が解除された。一方、脂肪酸合成を促すために ketoglutarate の膜透過性アナログである dmKG を添加したところ、逆に感受性株を抵抗性へと誘導することができた。

さらに我々は vivo マウスモデルや実際の乳がん患者検体においてもこのような代謝特性が当てはまるかを検証した。パクリタキセル耐性株および PRMT1-KO 耐性株を移植したヌードマウスモデルでは、耐性株に対し、PRMT1-KO 株ではパクリタキセルに対する腫瘍の縮退効果が部分的に回復した。また、患者の術前組織診断サンプルを用いて、上記の代謝酵素のメチル化の度合いを判定したところ、術前化学療法による病理学的完全奏効 (pathological complete response: pCR) が得られた患者に対し、得られなかった患者 (non-pCR) 検体では有意にメチル化型酵素の核局在の割合が高かった。

本研究から、化学治療抵抗性を有する難治性乳がん細胞では PRMT1 による 3 酵素のメチル化を通じ、以下のような代謝経路のリモデリングが起こることが分かった。解糖系からセリン合成経路へ代謝の分岐経路が活性化する。セリン合成系経路の活性化による aKG 産生増加から脂肪酸の合成能が亢進する。PHGDH、FASN に対して脂肪酸由来の翻訳後修飾 S-パルミトイル化が起こり、それぞれの酵素活性を増強することでポジティブフィードバック的に高い脂肪酸合成能を支持している。また、メチル化酵素の核局在は化学治療奏功の指標となるだけでなく、メチル化化学治療抵抗性乳がん細胞の脂肪酸代謝特性や翻訳後修飾に介入することで耐性を喪失させる可能性を示唆しており、当初計画していた、難治性乳がんへの新しい治療標的を提示するという研究目的は一定程度達成できたのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamura T, Honda S, Ito S, Mizoguchi T, Yamamoto T, Kasahara M, Kabe Y, Matsuo K, and Suematsu M	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of bicistronic Dmp1-Cre knock-in mice using a self-cleaving 2A peptide.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-023-01425-y	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 Takei N, Sato K, Takada Y, Iyyappan R, Susor A, Yamamoto T, and Kotani T.	4. 巻 2
2. 論文標題 Tdrd3 regulates the progression of meiosis II through translational control of Emi2 mRNA in mouse oocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Research in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 100009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crcbio.2021.100009	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 Honda K, Hishiki T, Yamamoto S, Yamamoto T, (他36名)	4. 巻 41
2. 論文標題 On-tissue polysulfide visualization by surface-enhanced Raman spectroscopy benefits patients with ovarian cancer to predict post-operative chemosensitivity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 101926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.redox.2021.101926	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 山本雄広 吉岡佑士郎、山本有紗、末松誠	4. 巻 54
2. 論文標題 CO がもたらす代謝変動と翻訳後修飾～アルギニンメチル化によるがん細胞の代謝制御	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 134-137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Yamamoto Takehiro, Hayashida Tetsu, Masugi Yohei, Oshikawa Kiyotaka, Hayakawa Noriyo, Itoh Mai, et al.,	4. 巻 84
2. 論文標題 PRMT1 Sustains <i>De Novo</i> Fatty Acid Synthesis by Methylating PHGDH to Drive Chemoresistance in Triple-Negative Breast Cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1065 ~ 1083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-23-2266	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 Watanuki Shintaro, Kobayashi Hiroshi, Sugiura Yuki, Yamamoto Masamichi, Karigane Daiki, Shiroshita Kohei, Sorimachi Yuri, Fujita, Oshima Motohiko, Nishiyama Akira, MurakShinya, Morikawa Takayuki, Koide Shuhei, Koichi, Haraguchi Miho, Tamaki Shinpei, Yamamoto Takehiro, et al.,	4. 巻 12
2. 論文標題 Context-dependent modification of PFKFB3 in hematopoietic stem cells promotes anaerobic glycolysis and ensures stress hematopoiesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 87674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.87674	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 Sato Josei, Satoh Yui, Yamamoto Takehiro, Watanabe Takehiro, Matsubara Shin, Satake Honoo, Kimura Atsushi P.	4. 巻 893
2. 論文標題 PTBP2 binds to a testis-specific long noncoding RNA, Tesra, and activates transcription of the Prss42/Tessp-2 gene	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 147907 ~ 147907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2023.147907	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 Takada Yuki, Fierro Ludivine, Sato Keisuke, Sanada Takahiro, Ishii Anna, Yamamoto Takehiro, Kotani Tomoya	4. 巻 9
2. 論文標題 Mature mRNA processing that deletes 3' end sequences directs translational activation and embryonic development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadg6532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.adg6532	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本雄広
2. 発表標題 含硫化合物が支持するがん細胞の代謝特性獲得機構
3. 学会等名 第94 回日本生化学会年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本雄広、押川清孝、伊藤真衣、菱木貴子、高野直治、松本雅記、末松 誠
2. 発表標題 セリン合成経路酵素PHGDHのアルギニンメチル化は乳がん化学治療抵抗性獲得に寄与する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------