

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14971

研究課題名（和文）放射線による中性アミノ酸代謝動態の解析とこれを標的とした新規がん治療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of neutral amino acid metabolism after X-irradiation and Radio-sensitization by targeting amino acid metabolism

研究代表者

房 知輝（BO, TOMOKI）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90878141

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では中性アミノ酸の動態をエネルギー代謝の面から解析し、中性アミノ酸代謝の放射線応答についても調べる。これらの検討から、がん細胞の中性アミノ酸代謝を標的とした新たながん治療法の開発を目指した。申請者は研究期間を通じて、(1)中性アミノ酸のうち分岐鎖アミノ酸代謝過程を標的とした放射線増感を試み、(2)分岐鎖アミノ酸代謝阻害時の放射線照射時のエネルギー応答を評価し、(3)また、(1)で得られた放射線増感作用のメカニズムに関する証左を示した。以上の検討から、分岐鎖アミノ酸代謝を標的とした放射線増感を実現し、新規放射線療法の開発につながる基礎的データを得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により中性アミノ酸代謝のうち分岐鎖アミノ酸を標的とした放射線増感効果が実証することができたことから、新規がん放射線療法の開発につながる基礎データを得られた。また、がん細胞におけるアミノ酸代謝過程の理解が進めることができ、新規のがん治療標的を確立する上で意義ある研究結果となった。本知見は、放射線照射を受けたがん細胞の生存戦略におけるアミノ酸代謝の担う役割の理解に繋がり、放射線生物学の知見をより一層深化させただけでなく、アミノ酸代謝を標的とした新規がん放射線療法の開発につながる知見となった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyze cancer neutral amino acids metabolism in terms of energy metabolism after X-irradiation. We investigated the radiation response of neutral amino acid metabolism to develop a new cancer therapy targeting neutral amino acid metabolism in cancer cells.

(1) We attempted radiosensitization targeting the branched-chain amino acid metabolic process among neutral amino acids. (2) We evaluated the energy response to X-irradiation when branched-chain amino acid metabolism was inhibited. (3) We also provided the mechanism of radiosensitization by inhibiting the branched-chain amino acid metabolic process. Based on the above studies, we succeeded in obtaining basic data for the development of novel radiotherapy by realizing radiosensitization targeting branched-chain amino acid metabolism.

研究分野：放射線生物学

キーワード：がん 分岐鎖アミノ酸 代謝 放射線療法

## 1. 研究開始当初の背景

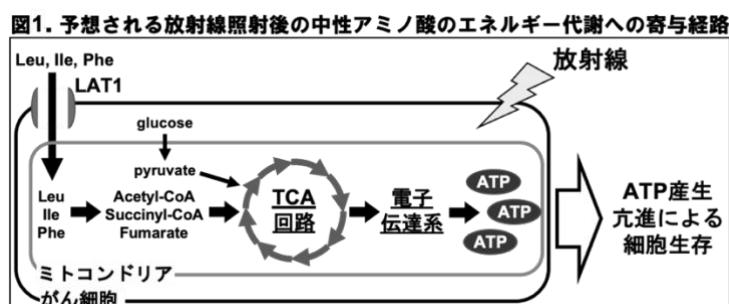
放射線によるがん治療の基盤は細胞死の誘導であり、その中心は核 DNA の損傷と考えられてきた。一方で、放射線はがん細胞を死滅させるだけでなく、その代謝を大きく変化させることが明らかとなってきた。申請者は、放射線照射を受けたがん細胞ではミトコンドリア量、電子伝達系に由来する酸素消費量ならびに細胞内 ATP 量が増加することを明らかにしており、放射線照射されたがん細胞ではミトコンドリア機能の変化が生じ、これが放射線の傷害作用に対する生存のための適応応答に働く可能性を示唆している。実際に、ミトコンドリア電子伝達系を阻害または修飾する薬剤を放射線と併用することで、放射線増感効果が得られるという結果が複数報告されている。このことから、**放射線照射の際に、ミトコンドリア機能とそれに関わる代謝経路を標的とする治療を併用することで、放射線による殺がん細胞効果を高めることが期待できる**。

近年、がん細胞に特有のアミノ酸代謝が注目されており、様々ながん種において糖代謝だけでなくアミノ酸代謝にもリプログラミングが生じていることが知られる。これまで、それぞれのがん細胞種が特定のアミノ酸に依存した代謝を行っているとの報告が複数あり、アミノ酸代謝を標的としたがん治療法の研究が進められている。その中で、がんと中性アミノ酸に関わる研究は、中性アミノ酸輸送体 L-type amino acid transporter 1 (LAT1) についての報告が挙げられる。LAT1 は Na<sup>+</sup>非依存性にフェニルアラニンや、分岐鎖アミノ酸であるバリンおよびロイシンなどの中性アミノ酸の細胞内への取込みに働く。LAT1 の発現量は様々ながん種で非がん部に比べて増加しており、その発現量と悪性度との間に相関が認められ、実際に、LAT1 の抑制または阻害が抗腫瘍効果をもたらす知見がある。このことから、LAT1 を介して取込まれる中性アミノ酸はがん細胞の生存において重要な役割を担う可能性が示唆される。細胞内に取り込まれた中性アミノ酸はタンパク質の生合成以外にも様々な役割を担う。例えば、ロイシンはインスリンおよび mTOR シグナルの増強ならびに エネルギー代謝に利用される。バリン、ロイシンなどの分岐鎖アミノ酸らも同様にエネルギー代謝に利用され、ミトコンドリア内でアセチル CoA やスクシニル CoA、フマル酸等の TCA 回路の基質や中間代謝産物に変換される。これまでに、ロイシンが mTOR シグナル活性化を通じて腫瘍の成長を促進する知見が報告されているものの、**分岐鎖アミノ酸エネルギー代謝ががん細胞の生存にどの程度寄与するかは現在まで検討されていない**。

## 2. 研究の目的

申請者は、放射線ががん細胞内中性アミノ酸量を増加させる結果ならびに LAT1 阻害剤ががん細胞の放射線感受性を増大させる結果を得ている。そこで、放射線照射を受けたがん細胞ではミトコンドリア代謝が大きく亢進しているという知見を踏まえて、**放射線照射により中性アミノ酸代謝が亢進し、これが放射線照射後の細胞生存に働くのではないかと考えた**。

(図 1)



本研究の目的は、**放射線照射後のがん細胞内の中性アミノ酸量が増加し、がん細胞のエネルギー代謝を亢進させて細胞保護に働き、放射線感受性を低下させる要因となることを証明する**。目的のために、中性アミノ酸の中の分岐鎖アミノ酸代謝酵素である BCKDHA を siRNA により抑制した時の放射線感受性ならびにミトコンドリアにおける TCA 回路、ATP 産生などのエネルギー代謝経路を解析し、分岐鎖アミノ酸代謝の放射線応答についても調べた。また、放射線増感を引き起こすメカニズムについて検討するため、細胞死様式様式の変化を中心に解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1)細胞株および培養方法

ヒト肺腺がん由来 A549 細胞を使用し、10% FBS を含む RPMI1640 培地を用いて培養した。細胞はウォータージャケット式インキュベーターにて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で維持した。

#### (2)siRNA の導入

細胞を 35 mm Dish に播種し、一晩培養した。その後、OPTI-MEM に Lipofectamine™ RNAiMAX ならびに Control siRNA または siBCKDH $\alpha$  を混合し、細胞にトランスフェクションした。37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 8 時間培養した後に、新鮮 10% FBS を含む RPMI1640 培地に交換して 16 時間以上培養して実験に使用した。

#### (3) コロニー形成法による細胞の放射線感受性の評価

トランスフェクションを行った細胞をトリプシン処理により剥離し、シャーレに一定数の細胞を播種した。6 時間培養後に shimadzu X-TITAN 225S を用いて X 線照射を行い、その後約 2 週間培養した。細胞はメタノールで固定し、3% ギムザ染色液により染色してコロニー数をカウントして生存率を算出した

#### (4) LC-MS を用いた細胞内アミノ酸量の測定

X 線照射および siRNA 導入によるアミノ酸量・TCA サイクル代謝産物に対する影響を LC/MS を用いて評価した。使用機器は Ultimate300liquid chromatography system および Q Exactive Hybrid Quadruple-Orbitrap mass spectrometer を用いた。カラムには SeQuant® ZIC®-pHILIC column を、バッファーには 100% acetonitrile および 20 mM ammonium bicarbonate, pH9.8 を使用した。

#### (5)細胞内 ATP 量の定量評価ならびにミトコンドリア膜電位・ROS の測定

X 線照射および siRNA を導入した細胞は Cell ATP Assay reagent を用いた ATP-Luciferase 法により測定した。プレートリーダーは ARVO X3 を使用した。ミトコンドリア膜電位・ROS の測定には tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) および MitoSOX red による染色を行い、BD FACSMelody Cell Sorter を用いて蛍光強度を測定した。

#### (6) senescence associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ gal)染色による細胞老化の評価

X 線照射および siRNA を導入した細胞は 5%パラホルムアルデヒドによって固定した。固定した細胞は SA- $\beta$ gal staining kit を用いて染色した。染色した細胞の顕微鏡画像を取得し、SA- $\beta$ gal 陽性細胞の割合を算出した。

#### (7)Annexin PI 二重染色法によるアポトーシスの評価

X 線照射および siRNA を導入した細胞はトリプシン処理により剥離、回収した。その後、 $5.0 \times 10^5$  個/mL の細胞を Annexin V Ready Flow Conjugates for Apoptosis Detection およ

びPIにより染色した。染色した細胞はBD FACSMelody Cell Sorter を用いて蛍光強度を測定した。Annexin V 陽性、PI 陰性をアポトーシス陽性細胞とし、その割合を算出した。

(8)ウエスタンブロット法による LC3-I, II および p62 発現量の評価

回収した細胞は RIPA buffer に溶解し、18,000 g, 15 min, 4°Cの条件で遠心して上清を回収した。その後、上清に 3 x Laemmli sample buffer を加え、SDS-PAGE に用いた。メンブレンは 5%スキムミルク TBST で 1 時間ブロッキングしてから一次抗体と一晩 4°Cで反応させた。翌日、二次交代と反応させた後、Western Lightning Plus-ECL を使用してバンドを撮像した。

4. 研究成果

我々は、放射線照射後に LAT1 を通じた中性アミノ酸の取込みが亢進していることをこれまでに明らかにしてきた。このことから、中性アミノ酸代謝が亢進することが予想される。そこで、中性アミノ酸のうち分岐鎖アミノ酸代謝を担っている代謝酵素 branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase (BCKDH) 複合体の構成因子である BCKDHA E1 $\alpha$  の活性を評価した。BCKDHA E1 $\alpha$  は branched-chain keto acid dehydrogenase kinase (BCKDK) によるリン酸化を受けることで BCKDH 複合体が不活性化することが知られている。そこで、X 線照射後の BCKDHA E1 $\alpha$  リン酸化量を経時的に評価したところ、X 線照射後のリン酸化レベルが低下していることが明らかとなった (図 2)。この結果から、BCKDH 複合体を介した分岐鎖アミノ酸代謝が放射線照射により亢進していることが示唆された。そこで、BCKDHA E1 $\alpha$  を siRNA により発現抑制した際の放射線感受性に与える影響を評価した。まず、ウエスタンブロットにより siBCKDHA がタンパク質発現量に与える影響を評価したところ、タンパク質発現が低下することを確認した。次に、コロニー形成法により BCKDHA 発現抑制が放射線感受性に与える影響を評価した。その結果、siBCKDHA 処理は放射線照射後の細胞生存率を有意に低下したことから、分岐鎖アミノ酸代謝の抑制が放射線感受性を増強することが示唆された (図 3)。

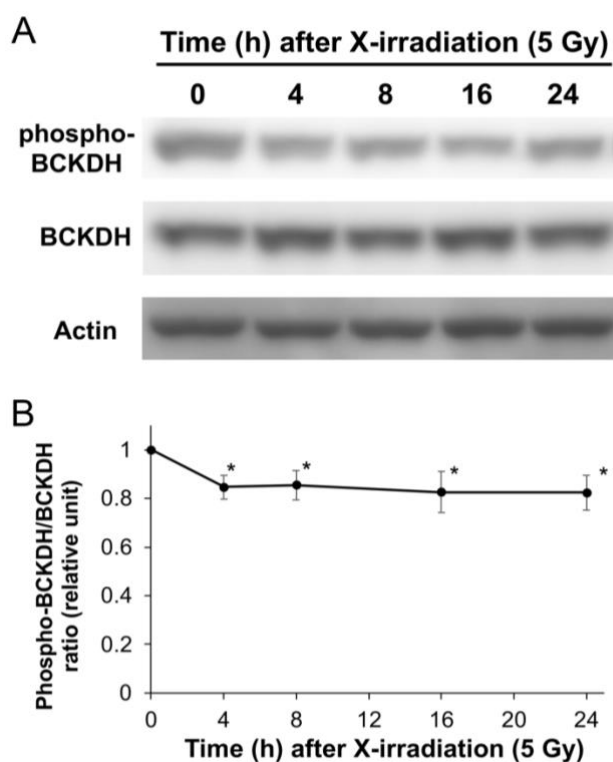


図 2

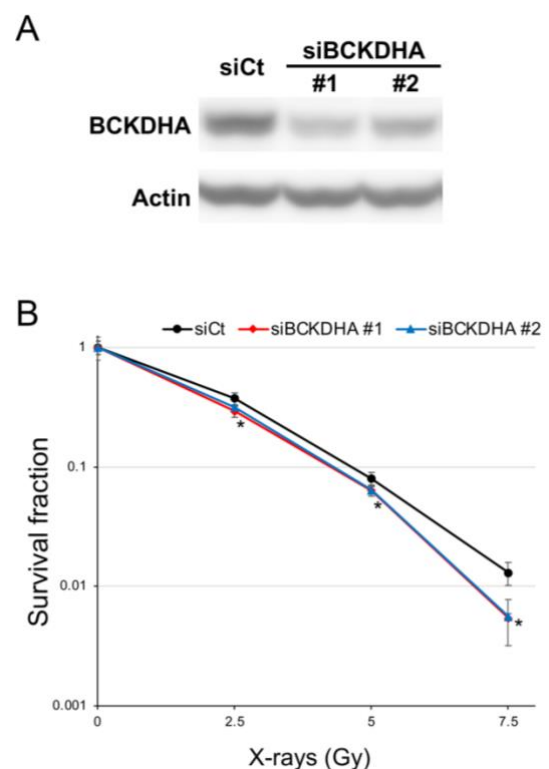


図 3

次に、細胞内 ATP 産生量を測定したところ、siBCKDHA 処理が放射線照射後の増加する ATP 産生量を低減することが明らかとなった(図 4)。一方で、ミトコンドリア膜電位および ROS 産生といった機能パラメータを測定したところ、これらには大きな変化は認められなかった。また、LC/MS によって放射線照射前後ならびに siBCKDHA 処理時の代謝産物を評価した。残念ながら、分岐鎖アミノ酸代謝産物である分岐鎖ケト酸などは検出することができなかったものの、siBCKDHA 処理が TCA サイクル代謝産物量を変化させることが明らかとなった。これらの結果から、放射線照射後に BCKDH 複合体を介して分岐鎖アミノ酸から TCA サイクル代謝産物への供給が亢進することで ATP 産生が増大していることが示唆された。

最後に、BCKDHA 発現抑制により放射線感受性が増大したメカニズムを検討するため、分裂期崩壊、細胞老化、アポトーシスならびにオートファジーなどの細胞死様式を評価した(図 5)。分裂期崩壊は放射線による増殖死の主要因とされており、分裂期崩壊が生じた細胞は最終的に細胞老化により増殖能を失う、またはアポトーシスなどにより死に陥る。放射線照射後の分裂機崩壊を評価したところ、siBCKDHA 処理は分裂期崩壊を有意に増加させた。一方で、細胞老化を評価したところ、siBCKDHA 処理は放射線照射後の細胞老化を低減した。アポトーシスを評価したところ、siBCKDHA 処理は放射線照射後のアポトーシスを有意に一部増加させた。また、LC3-I,II ならびに p62 といったオートファジー関連タンパク質も一部変化していた。これらの結果から、BCKDHA 発現抑制は放射線による分裂期崩壊を増加させることで放射線感受性を増大させることが示唆された。分裂期崩壊に陥った細胞に誘導される細胞死様式については議論の余地があるものの、アポトーシスやオートファジーが寄与することが予想される。

以上の結果から、中性アミノ酸代謝のうち分岐鎖アミノ酸代謝が放射線照射後のエネルギー代謝亢進に寄与して細胞保護的に作用しており、この代謝経路を阻害することで放射線感受性が増強できることが示唆された。

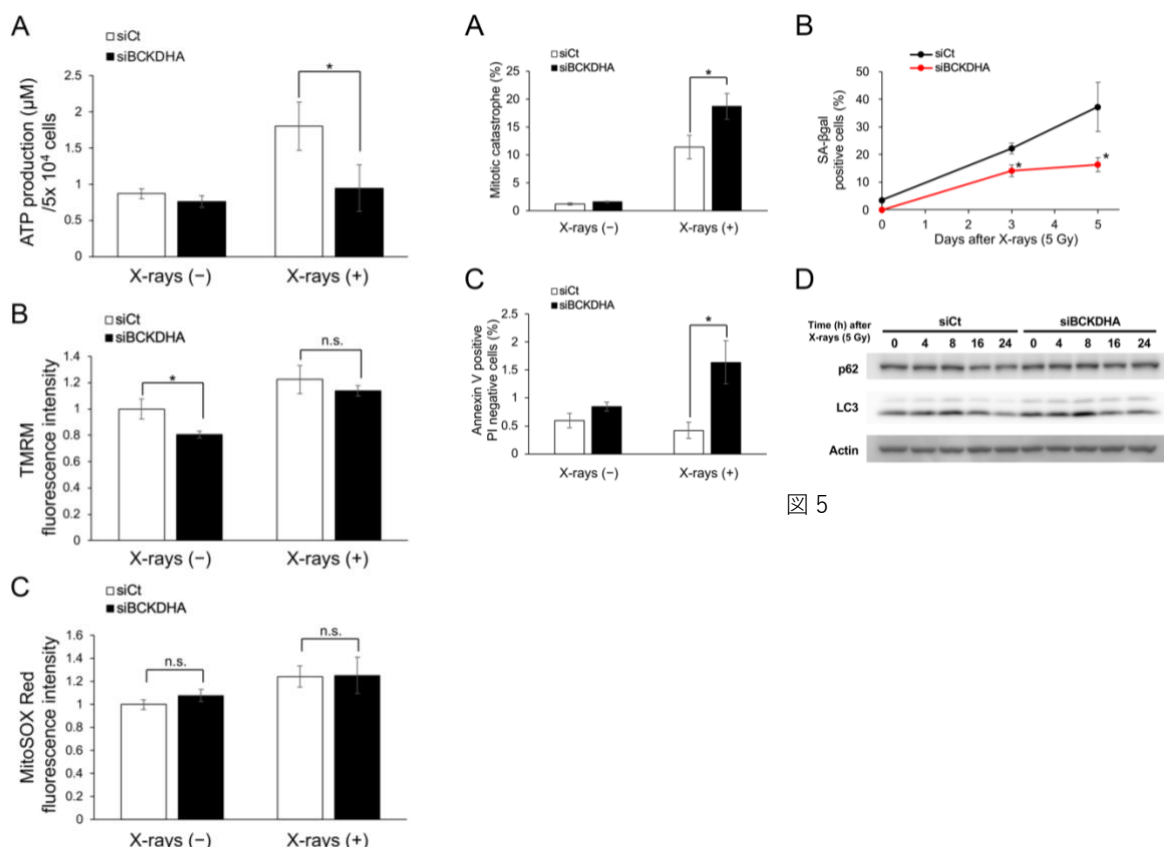


図 4

図 5

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bo Tomoki, Nohara Hidekazu, Yamada Ken-ichi, Miyata Satoshi, Fujii Junichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Ascorbic Acid Protects Bone Marrow from Oxidative Stress and Transient Elevation of Corticosterone Caused by X-ray Exposure in Akr1a-Knockout Mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 152 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox13020152	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 Bo Tomoki, Van Wijk Koen, Nakajima Osamu	4. 巻 201
2. 論文標題 Heme Biosynthesis is Crucial for Cell Survival and Mitochondrial OXPHOS after X Irradiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 48-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RADE-23-00035.1	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 Fujii Junichi, Osaki Tsukasa, Bo Tomoki	4. 巻 27
2. 論文標題 Ascorbate Is a Primary Antioxidant in Mammals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 6187 ~ 6187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27196187	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 Bo Tomoki, Kobayashi Sho, Inanami Osamu, Fujii Junichi, Nakajima Osamu, Ito Tsunekata, Yasui Hironobu	4. 巻 14
2. 論文標題 LAT1 inhibitor JPH203 sensitizes cancer cells to radiation by enhancing radiation-induced cellular senescence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2021.101212	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoki BO
2. 発表標題 Heme biosynthesis is upregulated to enhance oxidative phosphorylation for cell survival after X-irradiation
3. 学会等名 17th International Congress of Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomoki BO
2. 発表標題 Inhibition of BCAT1 and BCKDH enhances cancer radiosensitivity.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomoki BO, Koen Van Wijk, Tsunekata Ito, Osamu Nakajima
2. 発表標題 The effect of inhibition of heme synthesis on cellular survival and mitochondrial function after X-irradiation
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 房 知輝, Koen Van Wijk, 伊藤 恒賢, 中島 修
2. 発表標題 Succinyl acetoneによるヘム生合成阻害はX線照射後のミトコンドリア機能亢進を抑制し放射線誘発細胞死を増強する
3. 学会等名 第30回山形分子生物学セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 房知輝、小林翔、伊藤恒賢、中島修、藤井順逸
2. 発表標題 中性アミノ酸輸送体 LAT1阻害剤 JPH203によるがん放射線増感効果の評価とメカニズムの解明
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会/第21回日本NO学会合同学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoki Bo, Sho Kobayashi, Osamu Inanami, Junichi Fujii, Osamu Nakajima, Tsunekata Ito, Hironobu Yasui
2. 発表標題 LAT1 inhibitor JPH203 enhances radiation-induced cellular senescence by downregulation of mTOR activity
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2021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
---------	---------