

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25513008

研究課題名(和文)メチオニン代謝の可視化によるがん進展におけるエピゲノム制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of epigenetic regulation by visualizing S-adenosylmethionine metabolism in cancer cells using imaging mass spectrometry.

研究代表者

久保 亜紀子 (Kubo, Akiko)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50455573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、がんの進展に伴うメチル化反応の動態を基質供給、すなわちメチル化反応の唯一の基質であるS-アデノシルメチオニン(SAM)の代謝に注目して解析した。固形腫瘍を形成している生きた動物モデルを用いて含硫代謝物の半定量的質量イメージングによるin vivoメタボロミクス解析を行うことで、エピジェネティック変異の形成にかかわるがんの代謝を時空間的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on S-adenosylmethionine (SAM) metabolism. SAM is the only substrate in which is used in all the methylation reaction in vivo. In an experimental model of xenograft transplantation of human colon cancer HCT116 cells in superimmunodeficient NOG mice, snap-frozen liver tissues containing metastatic tumors were examined by quantitative-imaging mass spectrometry. As reported previously, short hairpin CD44 RNA interference (shCD44) in cancer cells caused significant regression of tumor growth in the host liver. Under these circumstances, the CD44 knockdown suppressed polyamines (polyamines are biosynthesized from SAM), GSH and energy charges.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：メタボロミクス 質量分析イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

最近5年の研究で、DNAのメチル化によるエピジェネティック変異が、腫瘍抑制遺伝子の動作停止に大きくかかわり、がんの発症に決定的な役割を果たしていることが明らかになってきた。がん細胞に特有のDNAのメチル化を制御することが出来れば、がんの進展を押える新たな治療のターゲットとなる。生体内にはメチル化反応にかかわるメチル基転移酵素が多種類存在するが、DNAだけでなく、たんぱく質やリン脂質合成の際のメチル化反応も含め、生体内のすべてのメチル化酵素の唯一の基質となる物質はS-アデノシルメチオニン(SAM)である。SAMは、必須アミノ酸のメチオニンとATPから作られ、その生合成酵素は核内では、がん関連蛋白Mafによる転写抑制の共役因子として働いていることが明らかにされた。細胞内のSAMやメチオニンの合成は、中間代謝産物によるアロステリックな制御が知られているが、それに加え、酵素自身のタンパク質メチル化を介した制御も存在することを申請者らの研究グループが報告している。現在、脱メチル化酵素の探索や、メチル化酵素の制御因子などの研究が盛んに行われ、解明が進んでいるが、反応基質の供給系をターゲットとした、がん細胞のメチオニン代謝の研究はほとんど進んでいない。

## 2. 研究の目的

がんの進展にはDNAのメチル化を含むエピジェネティックな変化が大きくかかわっていることが近年明らかになってきた。がんの進展に伴うメチル化反応の動態を基質供給、すなわちメチル化反応の唯一の基質であるS-アデノシルメチオニンの代謝に注目して解析する。固形腫瘍を形成している生きた動物モデルを用いて半定量的質量イメージングによる*in vivo*メタボロミクス解析を行うことで、エピジェネティック変異の形成にかかわるがんの代謝を時空間的に明らかにする。今までのように、栄養と酸素が豊富な培養環境で行われてきた*in vitro*でのがんの代謝研究と異なり、実際の生体環境内に存在する固形腫瘍で何が起きているかを明らかにすることで進行がんの難治性の克服につながる基礎知見を生み出すことが大いに期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では、最初にごん細胞株を用いて<sup>13</sup>Cや<sup>34</sup>S、<sup>15</sup>N、重水素などの安定同位体でラベルした必須アミノ酸であるメチオニンをがん細胞に投与し、がん細胞の中で、メチオニン由来の代謝物がどのように利用されているのかを明らかにする。次に免疫不全マウスを用いたヒト固形腫瘍モデルに同位体

ラベルしたメチオニンを投与し、一定時間後に組織を回収して同位体ラベルされた代謝物を質量分析イメージングとメタボローム分析で解析する。この2種類の解析を統合し、2次元的な代謝物の分布変化と経時的な代謝変化を合わせた*in vivo*代謝解析をおこなう。従来のメタボローム解析に加え、同位体ラベル化合物を投与して、その代謝の経時変化を追い、かつ、組織切片上で周辺組織やがんの細胞塊の周辺と内部など、位置情報を保ったまま解析を行うことで、生体内に存在するがんが、周囲の組織から栄養を取り込み、がん細胞の分裂や進展、転移に有利な代謝をどのように行っているのかを解析する。それらを統合することで、メチル化基質の供給系まで含めたエピジェネティック変異の制御メカニズムを明らかにする。

## 4. 研究成果

がんの進展に伴うメチル化反応の動態を基質供給、すなわちメチル化反応の唯一の基質であるS-アデノシルメチオニン(SAM)の代謝に注目して解析した。固形腫瘍を形成している生きた動物モデルを用いて含硫代謝物の半定量的質量イメージングによる*in vivo*メタボロミクス解析を行うことで、エピジェネティック変異の形成にかかわるがんの代謝を時空間的に明らかにした。具体的にはヒト大腸がん細胞株HCT116を用い、細胞内への硫黄源の取り込みに寄与するCD44の発現量を抑制した細胞株と正常株の比較を行なう事で、細胞内の含硫代謝物の変化を明らかにした。さらに、これらの細胞株を免疫不全動物に移植し、腫瘍塊を作らせた状態でのがん病巣での代謝を比較した。硫黄源の取り込みを抑制した株は、通常の培地中での増殖は正常株と同様であったが、動物に移植して腫瘍塊を作らせた場合には病巣の大きさが明らかに小さかった。次に、がんを栄養する環境の違いによる細胞増殖の変化の原因を特定するため、定量的質量分析イメージングによって、病巣部分の代謝物の推定含有量を比較した。硫黄源の取り込みを抑制した腫瘍では正常の腫瘍に比較してSAM由来の代謝物であるポリアミン類(Spermidine, Spermine)と還元型グルタチオンの含有量が有意に減少していた。ポリアミンは細胞増殖に必須の代謝物である事が良く知られており、生体内の環境下での増殖が抑制されている事と関連付ける事が出来る。還元型グルタチオンは酸化ストレスとの関連が知られており、硫黄源のがん病巣への取り込みを抑制する事で病巣の増殖を抑制する可能性が考えられた。これらの結果はNitric Oxide (2015) 46:102-113に発表した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

(1) Suhara T, Hishiki T, Kasahara M, Hayakawa N, Oyaizu T, Nakanishi T, Kubo A, Morisaki H, Kaelin WG Jr, Suematsu M, Minamishima YA. Inhibition of the oxygen sensor PHD2 in the liver improves survival in lactic acidosis by activating the Cori cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有, 112(37):11642-7. (2015)  
DOI: 10.1073/pnas.1515872112

(2) Takenouchi T, Sugiura Y, Morikawa T, Nakanishi T, Nagahata Y, Sugioka T, Honda K, Kubo A, Hishiki T, Matsuura T, Hoshino T, Takahashi T, Suematsu M, Kajimura M. Therapeutic hypothermia achieves neuroprotection via a decrease in acetylcholine with a concurrent increase in carnitine in the neonatal hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 査読有, 35(5):794-805. (2015)  
DOI: 10.1038/jcbfm.2014.253

(3) Ohmura M, Hishiki T, Yamamoto T, Nakanishi T, Kubo A, Tsuchihashi K, Tamada M, Toue S, Kabe Y, Saya H, Suematsu M. Impacts of CD44 knockdown in cancer cells on tumor and host metabolic systems revealed by quantitative imaging mass spectrometry. *Nitric Oxide*. 査読有 46: 102-113. (2015)  
DOI: 10.1016/j.niox.2014.11.005

(4) Yamazoe S, Naya M, Shiota M, Morikawa T, Kubo A, Tani T, Hishiki T, Horiuchi T, Suematsu M, Kajimura M. Large-area surface-enhanced Raman spectroscopy imaging of brain ischemia by gold nanoparticles grown on random nanoarrays of transparent boehmite. *ACS Nano*. 査読有 8(6):5622-32. (2014)  
DOI: 10.1021/nn4065692

(5) Yamamoto T, Takano N, Ishiwata K, Ohmura M, Nagahata Y, Matsuura T, Kamata A, Sakamoto K, Nakanishi T, Kubo A, Hishiki T, Suematsu M. Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway. *Nature Communications*. 査読有 5:3480. (2014)  
DOI: 10.1038/ncomms4480

(6) Toue S, Sugiura Y, Kubo A, Ohmura M, Karakawa S, Mizukoshi T, Yoneda J, Miyano H, Noguchi Y, Kobayashi T, Kabe Y, Suematsu M. Microscopic imaging mass spectrometry assisted by on-tissue chemical derivatization for visualizing multiple amino acids in human colon cancer

xenografts. *Proteomics*. 査読有 14(7-8):810-819. (2014)  
DOI: 10.1002/pmic.201300041

(7) Bao Y, Mukai K, Hishiki T, Kubo A, Ohmura M, Sugiura Y, Matsuura T, Nagahata Y, Hayakawa N, Yamamoto T, Fukuda R, Saya H, Suematsu M, Minamishima YA. Energy management by enhanced glycolysis in G1-phase in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Res*. 査読有 11(9):973-85. (2013)  
DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0669-T

(8) Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y & Amagai M. The stratum corneum comprises three layers with distinct metal-ion barrier properties *Scientific reports* 査読有 3, Article number: 1731 (2013)  
DOI: 10.1038/srep01731

[学会発表] (計 5 件)

(1) 久保亜紀子・鮑彦・向井邦晃・菱木貴子・大村光代・南嶋洋司・末松誠 「ヒト大腸がん肝転移病巣の *in vivo* 細胞周期依存的エネルギー代謝を質量分析イメージングで可視化する BMB2015 ワークショップ指定演者 2015年12月1日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

(2) 久保亜紀子・大村光代・中西 豪・菱木貴子・山本雄広・末松 誠 「担がん組織切片における過酸化グルタチオン蓄積の質量イメージングによる評価」 第63回質量分析総合討論会 口頭発表 2015年6月17日 つくば国際会議場エポカル(茨城県つくば市)

(3) 久保亜紀子・大村光代・中西 豪・末松誠 "Detection of ammonia on human colon cancer-bearing livers of superimmunodeficient NOG mice by MALDI imaging mass spectrometry" 第62回アメリカ質量分析学会年会 ポスター発表 2014年6月16日-19日, ボルチモア(アメリカ合衆国)

(4) 久保亜紀子・大村光代・中西 豪・末松誠 「生体組織切片に含まれるアンモニアの質量イメージング」 第62回質量分析総合討論会 2014年5月14日-16日 ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)

(5) 久保亜紀子・鮑彦・向井邦晃・菱木貴子・大村光代・南嶋洋司・末松誠 「ヒト大腸がん細胞の *in vitro* 同調培養および *in vivo* における細胞周期依存的エネルギー代謝」 第61回質量分析総合討論会 2013年9月11日 つくば国際会議場エポカル(茨城県つくば市)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 3 件）

(1) 名称：分析データ表示処理装置及び表示処理プログラム

発明者：後藤信一 梶村真弓 久保亜紀子  
末松誠 池上将弘 緒方是嗣

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-161543

出願年月日：2015. 8. 19

国内外の別：国内

(2) 名称：MALDI 用試料調製方法及び試料調製装置

発明者：緒方是嗣 高橋和輝 久保亜紀子  
末松誠 山本卓志

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT\_JP2014/059946、各国移行出願番号 特願 2015-510153

出願年月日：2014. 4. 4（国内），2015, 8. 19（国外）

国内外の別：国内、国外

(3) 名称：質量分析を用いたアンモニア測定方法

発明者：緒方是嗣 久保亜紀子 末松誠

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2013-209000

出願年月日：2013. 10. 4

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 亜紀子 (KUBO Akiko)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：50455573

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山本 雄広 (YAMAMOTO Takehiro)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50383774