

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15122

研究課題名（和文）アミノ酸光学異性体による新規癌代謝機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of cancer metabolism by D-amino acids or the enzymes which metabolize D-amino acids

研究代表者

大島 健司 (Ohshima, Kenji)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40817152

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）：がん細胞は、自身の生存に有利になるように、正常組織とは全く異なる代謝動態を獲得していることが知られており、がん特異的な代謝経路の同定とそれを標的とした治療法の開発が近年試みられている。我々は中枢神経系でのみ機能が明らかにされていたセリンラセマーゼという代謝酵素が、大腸がんにおいてL-セリンからピルビン酸を産生する新たながん代謝経路を担い、がん細胞の増殖を促進することを明らかにした。そして、セリンラセマーゼ阻害剤が大腸がん細胞の増殖を抑制し、さらには従来抗がん剤である5-フルオロウラシルとの併用で大腸がん細胞の増殖を顕著に抑制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

本研究は、これまでがん細胞の代謝の分野では探索されていなかったセリンラセマーゼという代謝酵素がL-セリンからピルビン酸に至る代謝経路を担い、大腸がんの増殖を促進していることを明らかにした。さらに、セリンラセマーゼ阻害剤が大腸がん細胞の増殖抑制効果を示すことを明らかにし、セリンラセマーゼが大腸がんの治療標的になる可能性を示した。大腸がんは日本人において罹患率、死亡率とも上位に入るがんであるが、手術不能進行・再発例の根治は難しい。本研究結果から、セリンラセマーゼが、大腸がんの代謝経路を標的とする新たなコンセプトの創薬ターゲットになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Colorectal cancer, one of the most common cancers in the developed world, is intrinsically resistant to many drug therapies. Serine racemase (SRR) catalyzes not only the racemization but also the dehydration of L-serine and D-serine, resulting in the formation of pyruvate and ammonia. In an attempt to identify novel treatment strategies, we examined the contribution of SRR to colorectal cancer metabolism. In a world first, we showed that SRR is required for cancer cell proliferation, and that inhibition of SRR in mice halted tumor progression, paving the way for future drug development.

研究分野：実験病理 人体病理 腫瘍学

キーワード：がん代謝 ピルビン酸 セリンラセマーゼ ミトコンドリア ヒストンアセチル化 活性酸素 アポトーシス 大腸がん

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。

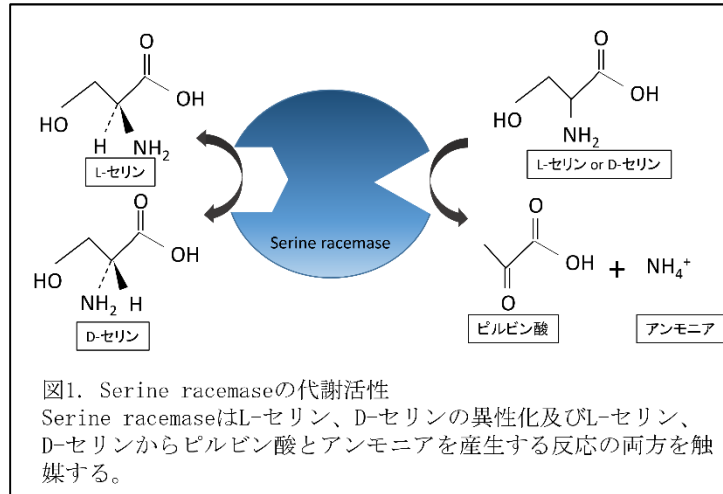
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸にはL型、D型の2種類の光学異性体が存在する。ヒトの体内で利用、合成されるアミノ酸はそのほとんどがL-アミノ酸であり、D-アミノ酸はヒトの生体構成要素ではないとされてきたが、脳において高濃度のD-セリンが存在することが見出され、D-セリンをL-セリンから合成する Serine racemase (SRR)が発見されている (Wolosker H, et al. *PNAS*. 1999)。SRRはピリドキサル-5'-リン酸依存性の代謝酵素であり、L-セリン、D-セリンの異性化及びL-セリン、D-セリンからピルビン酸とアンモニアを産生する反応の両方を触媒する(図1)。ヒトの脳においては、D-セリン濃度は、合成酵素であるSRRとD-アミノ酸分解酵素であるD-amino acid oxidase (DAO)により調節されており、D-セリンの代謝動態が記憶や統合失調症、アルツハイマー病と関係するという報告もなされている。SRRタンパクは、脳以外にも腸や精巣、心臓、肝臓などでも発現しているが (Wilhelm M, et al. *Nature*. 2014)、現在脳以外の臓器での機能は明らかにされていない。

一方、D-アミノ酸は細菌ペプチドグリカンの構成要素であり、腸管内にはD-アミノ酸が比較的豊富に存在することが知られている。近年、腸管に発現するDAOによるD-アミノ酸の分解が腸管免疫や腸内細菌叢のホメオスタシスに寄与していることが報告されている (Sasabe J, et al. *Nature microbiology*. 2016)。また、腸内細菌とがんとの関連に関しては、大腸がん部分にはfusobacterium属が多く、がん部と非がん部では腸内細菌の構成が異なることが知られている (Castellarin M, et al. *Genome Res*. 2012)。しかしながら、腸内細菌の産生するD-アミノ酸などの代謝産物が大腸がんの増殖、代謝動態にどのような影響を及ぼすかは十分には明らかにされていない。

がんの代謝動態に関しては、がん細胞では活発な増殖能、あるいは低酸素、低栄養など過酷な微小環境下での生存を支えるために代謝のリプログラミングが起きていることが知られている。好気条件下でも解糖系が活性化している「Warburg効果」は古くから知られているが、アミノ酸の代謝動態、アミノ酸代謝酵素の発現動態が、がん細胞において変化していることも近年明らかになりつつある。しかしながら、これらがん特異的なアミノ酸代謝については未知の部分が多く、特にアミノ酸異性体のバランスとの関係性やD-アミノ酸代謝酵素のがん細胞における機能はほとんど知見が得られていない。



### 2. 研究の目的

本研究は、「アミノ酸の異性体は腫瘍代謝にどのような制御をかけているか」という問いに答えることを目的に、D-アミノ酸代謝に関わるSRRが、大腸がんの増殖、代謝動態にどのような影響を及ぼすかを明らかにし、新規の大腸がん代謝経路を同定することで、それらを標的とした新たな治療・診断戦略を見出すことを目指す。

### 3. 研究の方法

本研究計画では、SRRが大腸がんの増殖に関与するメカニズムとして、新たながん代謝経路を見出すことを目標とする。

まず、(1)ヒト大腸がん切除検体を用いてがん部分におけるSRRの発現と腫瘍の進行度などとの関連を調べる。予備的にTCGAなどのデータベースにおいて、大腸がん、大腸腺腫部分では正常大腸粘膜と比較してSRRのmRNAの発現が高いことを見出している。そこで、実際にタンパクレベルで発現が亢進しているかどうかを明らかにするために、ヒト大腸がん、大腸腺腫、大腸腺腫内腺がん切除標本を用いて、SRRの免疫組織化学染色を行う。この際、組織ブロック間の染色性のばらつきを除外するために、同一パラフィン切片上の腫瘍部分と非腫瘍部分のSRRの染色性をスコア化し評価を行う。

次に、(2)大腸がん細胞にけるSRRの詳細な機能を調べるためにヒト大腸がん細胞株を用いてSRRノックアウト細胞やSRR安定発現株を作成し、増殖能や代謝物の変化などを調べる。ヒト大腸がん細胞株の中で、HCT116、DLD-1がSRRを高発現し、WiDrではSRRの発現が低いことを見出している。そこで、HCT116、DLD-1を用いてSRRノックアウト細胞を作成し、WiDrを用いてSRR安定発現株を作成する。これらの細胞を用いて増殖能、細胞内D-セリンやピルビン酸などの代謝物測定、ミトコンドリア機能の解析、アポトーシスアッセイなどを行う。

最後に、(3)免疫不全マウスを用いたxenograft実験を行い、SRRがin vivoにおける大腸が

ん細胞の増殖能に影響を及ぼすかを調べる。さらに、SRR 阻害剤が *in vivo* における大腸がん細胞の増殖を抑制するかを調べる。これまで SRR の阻害薬として L-Aspartic acid -hydroxamate や Phenazine Methosulfate (PMS) などいくつか報告されている。PMS は脳虚血モデルマウスへの投与がなされた報告があり、マウスへの投与が可能と考えられる。大腸がん細胞株を免疫不全マウスへ移植し、Phenazine Methosulfate の *in vivo* での抗腫瘍効果を検証する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト大腸癌における SRR の発現と増殖能への寄与

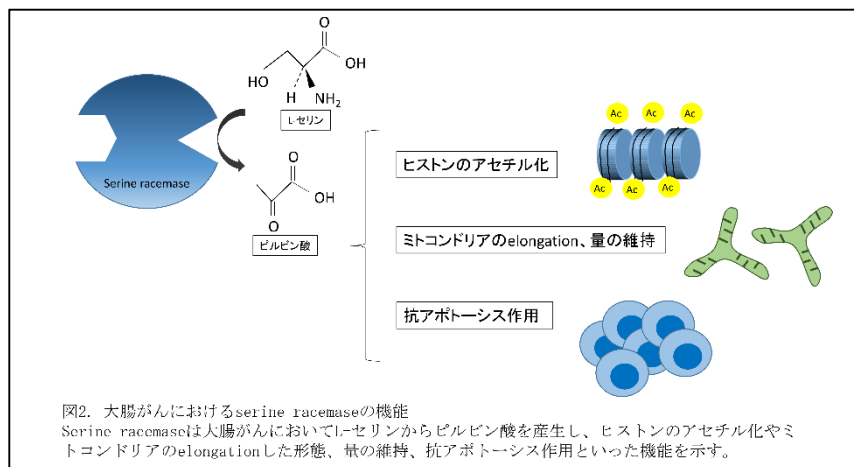
SRR はがん細胞において重要である L-セリンとピルビン酸の代謝に関与する酵素であるが、これまでがん細胞における発現、機能に関する報告はなかった。そこで、まず public database である Oncomine を用いて、各種がんにおける SRR の発現を調べた。すると、TCGA を含む複数のデータセットで、大腸がん、大腸腺腫では非腫瘍部位と比較して SRR の mRNA の発現が上昇していることが明らかになった。次に、大腸がん 83 例、大腸腺腫 38 例と同一検体内に腺腫と腺がんが併存する腺腫内腺がん 36 例の手術切除検体を用いて SRR の免疫組織化学染色を行った。すると、隣接正常部位と比較して、大腸腺腫、大腸がんでは SRR の発現が増加しており、さらに腺腫内腺がんでは同一検体内で腺腫から腺がんへ腫瘍が進行するに従い SRR の発現が増加していることが明らかになった。実際に SRR が大腸がん細胞の増殖に寄与しているかを調べるために、ヒト大腸がん細胞株を用いて、SRR knockout (KO) 細胞と定常発現細胞を樹立し増殖能を調べた。すると、*in vitro* での増殖能、ヌードマウスに移植した xenograft の増殖能はいずれも、SRR KO 細胞で低下し、定常発現株で上昇した。以上のことから、SRR は大腸がんにおいて発現が増加し、実際に大腸がん細胞の増殖に寄与していることが示された。

##### (2) 大腸がん細胞の代謝における SRR の機能

本研究は当初は SRR の産生する D-セリンが大腸がん細胞において機能しているかに着目して開始したが、大腸がん細胞株に D-セリンを添加し増殖能やミトコンドリア機能、抗アポトーシス作用の解析を行ったところ、D-セリン添加でそれらの機能に差が認められなかった。そこで、L-セリン、ピルビン酸はともにごん細胞の増殖を促進することが知られているが、両者を結びつける代謝経路ががん細胞の増殖に寄与するかは明らかにされていないことを踏まえ、SRR が代謝する L-セリンからピルビン酸を産生する経路が大腸がんの増殖に寄与するかを調べた。

まず、SRR の代謝活性が大腸がん細胞株において機能しているかどうかを、安定同位体標識 L-セリン (L-serine-13C3) を用いてトレース実験を行った。すると、13C3 標識の D-セリン、ピルビン酸ともに検出され、大腸がん細胞株で発現している SRR が酵素活性を有していることが示された。そして、SRR KO 細胞では有意に細胞内のピルビン酸量が低下していた。重要なことに、ピルビン酸を添加すると SRR KO 細胞の増殖能が回復し、SRR の産生するピルビン酸が細胞増殖に寄与していることが示唆された。

また、ミトコンドリア内でピルビン酸から産生されるアセチル CoA とそれが基質となり生じるヒストンアセチル化が、SRR KO 細胞で有意に低下していた。このことから、SRR KO 細胞ではミトコンドリアの量や質に変化があるのではないかと考え、共焦点顕微鏡、フローサイトメトリー、電子顕微鏡を使用してミトコンドリアの解析を行った。すると、SRR KO 細胞のミトコンドリアは量が減少し、より小型で円形の形態を示し、クリステの密度も低下していた。次に、RNA-sequencing を行い Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて解析を行ったところ、SRR KO 細胞では細胞生存に関わる遺伝子の発現の低下が認められた。そこで、アポトーシス assay を行ったところ、SRR KO 細胞ではアポトーシス抵抗性の低下が認められた。重要なことに、ピルビン酸を添加すると、SRRKO 細胞のヒストンアセチル化、ミトコンドリアの量、形態変化やアポトーシス抵抗性は回復した。以上のことから、SRR は L-セリンからピルビン酸を産生することによって、ヒストンアセチル化、ミトコンドリアの量・質の維持、アポトーシス抵抗性に寄与していることが示唆された (図 2)。



##### (3) SRR の治療標的としての可能性

これまで SRR は D-セリンを産生する酵素として中枢神経系において研究されており、SRR 阻

害剤として PMS が使用されてきた。PMS により薬物的に SRR を阻害すると大腸がん細胞の増殖が抑制されるかを調べるために PMS の投与実験を行った。すると、in vitro と in vivo における xenograft 移植実験において PMS は大腸がん細胞の増殖を抑制した。次に、SRR はアポトーシス抵抗性に寄与していることから PMS で SRR を阻害すると既存の抗がん剤のアポトーシス誘導作用が増強すると考え、シスプラチンあるいは 5-fluorouracil と併用投与する実験を行った。すると、これらの抗がん剤と併用すると in vitro, in vivo において大腸がん細胞の増殖が顕著に抑制された。これらの結果は、SRR が大腸がんの治療標的になり得ることを示すものである。

本研究は、これまでがん細胞の代謝の分野では探索されていなかった SRR という代謝酵素が L-セリンからピルビン酸に至る代謝経路を担い、細胞内ピルビン酸とその下流の代謝産物であるアセチル CoA の量を維持することで、ヒストンのアセチル化、ミトコンドリアの量・質の維持、さらにアポトーシス抵抗性、化学療法抵抗性に寄与し大腸がんの増殖を促進していることを明らかにした。さらに、SRR 阻害剤が大腸がん細胞の増殖抑制効果を示すことを明らかにし、SRR が大腸がんの治療標的になる可能性を示した。大腸がんは日本人において罹患率、死亡率ともに上位に入るがんであるが、手術不能進行・再発例の根治は難しい。本研究結果から、SRR が、大腸がんの代謝経路を標的とする新たなコンセプトの創薬ターゲットになることが期待される。

5. 主な発表論文等

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

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Kenji Ohshima, Satoshi Nojima, Shinichiro Tahara, Masako Kurashige, Keisuke Kawasaki, Yumiko Hori, Moyu Taniguchi, Yutaka Umakoshi, Daisuke Okuzaki, Naoki Wada, Jun-ichiro Ikeda, Eiichiro Fukusaki & Eiichi Morii | 4. 巻<br>2           |
| 2. 論文標題<br>Serine racemase enhances growth of colorectal cancer by producing pyruvate from serine   | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Nature Metabolism   | 6. 最初と最後の頁<br>81-96 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br><a href="https://doi.org/10.1038/s42255-019-0156-2">https://doi.org/10.1038/s42255-019-0156-2</a>  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔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<br>大島健司   |
| 2. 発表標題<br>Serine racemase is a new therapeutic target for colon cancer       |
| 3. 学会等名<br>American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018（国際学会） |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大島健司                                     |
| 2. 発表標題<br>D-セリン合成酵素 Serine racemase は大腸癌細胞の増殖を促進する |
| 3. 学会等名<br>第15回日本病理学会カンファレンス                        |
| 4. 発表年<br>2018年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大島健司   |
| 2. 発表標題<br>Serine racemase is a potential new therapeutic target for colon cancer |
| 3. 学会等名<br>第77回日本癌学会学術総会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大島健司   |
| 2. 発表標題<br>Serine racemase enhances colon cancer cell proliferation by maintaining mitochondrial mass |
| 3. 学会等名<br>第108回日本病理学会総会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大島健司                                     |
| 2. 発表標題<br>Serine racemaseは細胞内ピルビン酸量を維持し大腸癌の増殖を促進する |
| 3. 学会等名<br>第7回がん代謝研究会                               |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大島健司                                      |
| 2. 発表標題<br>Serine racemaseはセリンからピルビン酸を産生し大腸癌の増殖を促進する |
| 3. 学会等名<br>第2回 医学系研究科・産業科学研究所 懇話会                    |
| 4. 発表年<br>2019年                                      |

〔図書〕 計1件

|                     |                 |
|---------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>大島健司、森井英一 | 4. 発行年<br>2020年 |
| 2. 出版社<br>羊土社       | 5. 総ページ数<br>4   |
| 3. 書名<br>実験医学       |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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