

令和元年5月14日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19012

研究課題名(和文)がん細胞代謝シミュレーションシステムの開発

研究課題名(英文)Development of Simulation System of Cancer Metabolism

研究代表者

清水 浩 (SHIMIZU, Hiroshi)

大阪大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：00226250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞は大量の栄養を消費し、Warburg効果と呼ばれる特異的な代謝状態をとることが古くから知られている。炭素中枢代謝に関連する遺伝子の変異が特異的な代謝物質の蓄積を引き起こし、がん化が促進されるという現象が発見されている。本研究においては、¹³C標識された化合物を細胞培養系に添加し¹³C標識を細胞内代謝中間体中から解析することにより炭素中枢代謝におけるがん細胞の特徴を明らかにすることを目的とした。また、このような中枢代謝の情報をもとに、がん細胞の代謝変化を予測可能でゲノムワイドな代謝モデルを構築することを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん研究は特定の遺伝子の変異が引き金になって起こるため、従来、遺伝子変異とシグナル伝達のかく乱によって多くの研究が行われてきた。近年、遺伝子の変異に伴う代謝の変化とがんの悪性化などの研究がすすめられ注目を集めている。本研究では、代謝状態をとらえるためフラックス解析手法の開発と環境が変化した際にどのような代謝状態を取るのかといった議論を可能とするための予測システムの開発を試みた。実験的な代謝フラックス解析においてはヒト乳がん細胞の代謝状態をとらえるのに成功し、他のがん種の細胞にも適用された。またシミュレーションと実験を突き合わせることでがん細胞のシミュレーションを行う足掛かりを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：It is well known that cancer cells uptake a lot of carbon source and show the particular metabolic state called as Warburg effect metabolism. Genetic mutations related to central carbon metabolism trigger accumulation of specific metabolites and it might be related to the cancer malignant. In this study, to elucidate the state of metabolism in cancer cells ¹³C-metabolic flux analysis (¹³C-MFA) was performed with ¹³C-labelled compounds ([1-¹³C]glucose and [U-¹³C]glutamine). Metabolic flux distribution in the central metabolism of breast cancer (MCF-7) cells was determined by ¹³C-MFA with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of mass isotopomer distributions (MIDs). Genome wide simulation system was also performed to predict the metabolic fluxes in the cancer cells. Flux balance analysis (FBA) method was successfully applied to genome scale metabolic model.

研究分野：化学工学およびその関連分野

キーワード：がん細胞 シミュレーション 代謝フラックス解析 生物情報工学 代謝解析 代謝フラックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は大量の栄養を消費し、Warburg 効果と呼ばれる特異的な代謝状態をとること古くから知られている。最近では、グルタミン代謝など糖やアミノ酸代謝を変化させることで増殖が促進されていることが明らかになっている。がん細胞の悪性進展と代謝の「リワイヤリング」には密接な関係が存在することが明らかとなっており (Mitsuhashi et al., *Cancer Cell* 2012; Hayes and Ashford, *Cell Metabolism* 2012)。これらの研究では、がん関連遺伝子の変異や発現変化と細胞の増殖や代謝物質濃度の変化が議論されている。また、炭素中枢代謝に関連する遺伝子の変異が特異的な代謝物質の蓄積を引き起こし、がん化がより促進されるという現象が発見されている (Bardella et al., *Cancer Cell* 2016)。遺伝子と代謝とがんの進展という階層を跨いだ細胞内ネットワークの摂動ががんに及ぼす影響の解明が注目されている。

再生医療においては、iPS 細胞由来の分化細胞集団から腫瘍化する細胞が生まれることが大きな課題となっているが、グルコースやグルタミンの必須因子を除去することで目的の心筋細胞のみが得られることが報告されている (Tohyama et al., *Cell Metabolism* 2016)。今後、細胞の代謝状態を迅速かつ正確にとらえ、制御することは、がんの治療や再生医療といった最先端医療分野の必須アイテムになることは間違いがない。

現在、細胞の代謝物質の蓄積量を測るメタボローム解析は代謝研究の主流であるものの、本来、代謝は細胞内の化学反応であり、直接的な解析方法としてその反応物、生成物の蓄積量を議論するだけでは十分とは言えない。代謝の反応の大きさ、代謝フラックス (細胞当たりの反応流量) を解析する方法の開発が喫緊の課題であると考えた。

2. 研究の目的

我々は、微生物代謝工学において環境調和型化学物質、燃料を微生物に生産させることを目的とし、研究を行ってきた。微生物の代謝をゲノムワイドにモデリングをすることで、すべての遺伝子を対象として代謝最適化のための遺伝子改変のためのコンピュータシミュレーション技術の開発 (Ohno et al., *Bioinformatics* 2014) とその化学物質へ生産株の合理的構築 (Tokuyama et al., *Microb Cell Fact* 2014)、安定同位体 ^{13}C 化合物を炭素源として取り込ませ、代謝物質を質量分析することで微生物の代謝を実験的に決定すること (Maeda et al., *Metab Eng Commun* 2016) により、微生物の代謝改変を効果的に行う方法の確立において顕著な成果を上げてきた。また、*p53* ノックアウトマウス由来軟部腫瘍細胞の炭素中心代謝解析において ^{13}C 標識グルコースおよびグルタミンの取り込み実験と中心炭素代謝シミュレーションを組み合わせた代謝解析を行い、特異的な代謝を見出すに至っている (Okahashi et al., *J Biosci Bioeng* 2015)。

そこで、本研究においては、まず、ヒト細胞の代謝を表現するシステムの開発を行うことを目的とした。細胞内の代謝反応を化学量論式の形式で蓄積することで細胞全体にわたる代謝反応の大きさを統一的に表現することを目的とした。細胞のゲノム情報から代謝情報をすべて化学量論の形式で蓄積し、統一的に扱えるプラットフォームを整備する。そして、がん細胞において亢進することがわかっているグルコースおよび、グルタミンを取り込ませた際に、どのように細胞全体の代謝が影響を受けるかをシミュレーションする方法を確立しようと考えた。

得られたシミュレーション結果は、実験で検証しながら代謝状態を正確に予測するシステムとして開発改良を進めることが将来的にも重要である。そのために、 ^{13}C 安定同位体で標識された化合物を細胞培養系に添加し、 ^{13}C 標識を細胞内代謝中間体中から解析することにより炭素中心代謝における、がん細胞の特徴を明らかにすることを第二の目的とした。

さらに、がん細胞と通常細胞の代謝状態の違いが生じる原因をシミュレーションに基づいて明らかにすることができれば創薬などにも研究が展開できるため、細胞腫の違いや環境条件の違いにより異なる代謝フラックスを予測可能なシステムとして開発することとした。またこれらの研究を統合することで、がん細胞の代謝状態を予測することのできるシステムを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、がん細胞の代謝状態をシミュレーションすることができる代謝予測システム開発を行うことを目的としている (図 1 左)。本モデルは、細胞の遺伝的背景、置かれた環境 (栄養状態、酸素状態など) を入力として与えると化学量論に基づいて細胞の代謝状態を予測するシミュレーションシステムとして構築した。このモデルにおいては、アウトプットとして細胞全体の代謝反応の活性化状態を代謝フラックス (細胞当たり時間当たりの代謝反応のモル速度) として可視化して、理解することを可能とする。これにより、異なる細胞の代謝フラックスや置かれた環境の違いを入力することにより異なる代謝の表現型を取る細胞に対して代謝の活性として細胞状態を予測できるモデルとして発展させていくことができると考えている。

代謝解析において代謝フラックスを基盤とする解析法は、中心炭素代謝の流れを明らかにする方法であり、がん細胞の代謝経路の流れが様々な遺伝子背景、置かれた環境、器官などのコンテキストにおいて、どのように変化するかを観察することができる。

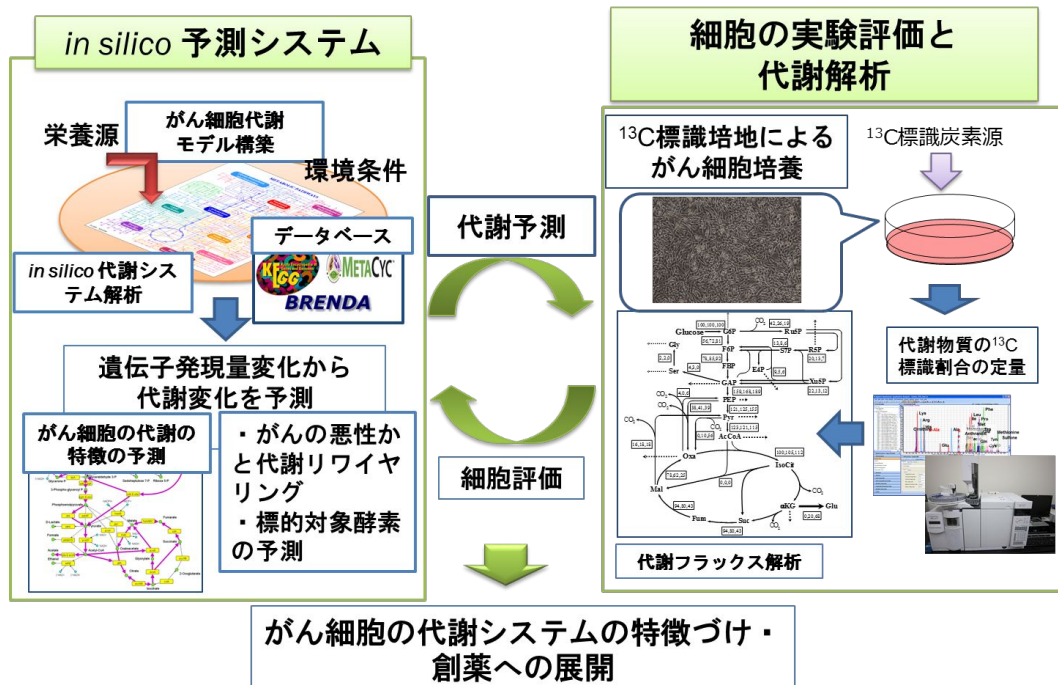


図1 がん細胞の代謝研究におけるシミュレーションと実験的代謝フラックス決定法

次に ^{13}C 代謝フラックス解析 (^{13}C -MFA) を行う方法を確立する (図1右)。この方法はシャーレで培養した細胞に ^{13}C 安定同位体で標識されたグルコース、グルタミンを添加し、 ^{13}C 安定同位体が細胞内のどの代謝物質に取り込まれていくかを液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS)、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で分析する。同時に細胞が取り込むグルコース、グルタミン、アミノ酸などの取り込み速度、細胞増殖速度、乳酸などの細胞から排出される代謝物質分泌速度を分析し、これらの値をもっともよく説明する中枢代謝フラックスを中枢代謝モデルを用いて決定する。

さらに、これらのゲノムワイドなシミュレーションと実験的 ^{13}C -MFA 結果を照らし合わせることで細胞のシミュレーションの精度を検討するとともにシミュレーションに重要な因子を絞り込む。これにより、信頼性の高いがん細胞代謝予測シミュレーションシステムの開発ができると考えた。

4. 研究成果

1) がん細胞のゲノムワイドな代謝モデルの開発

本研究では、がん細胞のゲノムスケール代謝モデルとして先行研究で報告された代謝モデルを基盤にモデルを構築した (Zielinski *et al.*, 2017)。このモデルは中央代謝経路 (解糖系、PPP、TCA サイクル) と 2 次代謝反応 (脂質・核酸代謝経路) を含む 350 を超える反応からなるモデルである。モデルでは、各代謝反応を化学両論式で記述することにより統一した代謝反応フラックスを扱うことができる。また、代謝の定常状態を仮定することで各代謝反応フラックスの関係は一次代数方程式で記述できる。

このモデルに対して代謝フラックスを決定するにはこれらの代謝フラックスを自己調節するための評価関数を設定し、その評価関数が最大、または最小になる代謝状態を線形計画法により決定する。すべての計算には MATLAB (Mathworks Inc., Natic, MA, USA) を用いた。また、線形計画法ソルバーとして GLPK (GNU Linear Programming Kit) を用いた。これにより研究者が設定する評価関数に対してがん細胞の定常状態における代謝フラックスをゲノムワイドに評価できる方法が整い、環境条件やゲノム情報に基づいて代謝をシミュレーションすることが可能となった。

2) ^{13}C 代謝フラックス解析 (^{13}C -MFA) に基づく実験的代謝フラックス解析法の開発とがん細胞の代謝決定

さまざまながん種やがん細胞を取り巻く環境条件に対して細胞の炭素中心代謝がどのような代謝フラックスを取るかを決定するための実験的手法を開発した。本手法もグルコースやグルタミンを炭素源とする中枢炭素代謝の代謝分子および炭素原子の反応間の移動を基盤とするがん細胞中心代謝モデルが必要となるため、解糖系、酸化的ペントースリン酸経路、TCA サイクルを含む代謝モデルを構築した。

^{13}C 代謝フラックス解析の例として、ヒト乳がん細胞株 MCF-7 の細胞培養時に ^{13}C -MFA を実施した。また、この細胞に、呼吸差阻害剤パクリタキセルで処理を行い、その細胞の代謝解析を行った。過去の知見によれば、パクリタキセル処理された細胞ではミトコンドリアの脱分

極が起こり、呼吸速度が増大すること、SDH や MDH などのクエン酸回路の酵素タンパク量や呼吸鎖タンパク量が増加することが報告されている。パクリタキセルへの適応には中心炭素代謝におけるエネルギー獲得が関与している可能性が考えられたため、¹³C 代謝フラックス解析の性能評価も兼ねて実施した。

MCF-7 を [^{1-¹³C}]glucose を含む培地で培養し、培地成分および細胞内代謝物の ¹³C 標識割合の分析を行った。培地成分の計測から、細胞あたり時間当たりのグルコースの取り込み量や乳酸の排出量を調べたところ、グルコース取り込みフラックスや乳酸生産フラックスが低下した。一般に解糖系では 1 分子のグルコースから最大 2 分子の乳酸を産生できるが、パクリタキセル処理ではグルコースに対する乳酸産生収率が 1.72 から 1.21 に低下した。我々の研究グループで開発した OpenMebius (Kajihata, 2017) で統合的に解析し、中心炭素代謝経路のフラックス分布を決定した。

¹³C 代謝フラックス解析から中心炭素代謝経路で再生される補酵素 ATP、NADH などの再生にいずれの反応が寄与しているのかを量的に知ることが可能となった。この結果から、薬剤処理前後の代謝状態を正確に決定する分析方法が確立することができた(Araki, 2018)。

3) ゲノムワイドな代謝モデルシミュレーションと ¹³C 代謝フラックス解析 (¹³C-MFA) による統合解析

上記の 2 つの方法を併用することにより、現実の細胞の代謝フラックスを説明するためにどのような細胞状態を取るのが好ましいのかを議論することができると考えた。ここでは、MCF7 (ヒト乳がん由来細胞株)、HeLa (ヒト子宮頸がん細胞株)、HepG2 (ヒト肝がん由来細胞株) を [^{1-¹³C}]グルコースを含む培地で培養し、培地中代謝物濃度と細胞内代謝物の ¹³C 標識割合を測定した。いずれの株でも ¹³C 代謝フラックス解析の適用に必要な代謝定常と同位体定常状態を取ることを確認した。実測した比速度と細胞内代謝物の ¹³C 標識割合から、細胞内代謝フラックス分布を推定することに成功した。

また、¹³C 代謝フラックス解析が適用可能であることを確認するとともに、それぞれの株間の共通な代謝状態と異なる点について量的に議論することができると分かった。さらにこれらの株間の共通点や相違点を説明する代謝状態のシミュレーションを試みた。

本研究では、がん種の違いによって代謝フラックスの相違点、共通点を議論することが可能な実験的手法を開発し、シミュレーションでそのデータを説明する方法の開発を目指した。また、このシステムは特定の代謝反応のフラックスに制限を与えてシミュレーションすることが容易にできることから、特徴的な反応量を示す代謝反応の情報や環境条件 (炭素源、窒素源、酸素供給状態など) を設定し、環境条件によって細胞がどのように代謝状態を変化させるかをシステムとして明らかにすることが今後期待される。これらのシステムを発展させることで、どのような反応の阻害が細胞の増殖を抑えるのに有効かを議論することができるようになり、将来、抗がん剤の開発にとって有効なツールとして利用可能となると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Chie Araki, Nobuyuki Okahashi, Kousuke Maeda, Hiroshi Shimizu, Fumio Matsuda, Mass spectrometry-based method to study inhibitor-induced metabolic redirection in the central metabolism of cancer cells, *Mass Spectrometry*, 査読有, Vol.7, 2018, A0067, DOI:10.5702/massspectrometry.A0067

Fumio Matsuda, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu, Learning from quantitative data to understand central carbon metabolism, *Biotechnology Advances*, 査読有, Vol.35, 2017, 971-980, DOI:10.1016/j.biotechadv.2017.09.006

[学会発表] (計 4 件)

Hikaru Uehara, Chie Araki, Kousuke Maeda, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, ¹³C-Metabolic flux analysis of the central carbon metabolism in three cancer cell lines, *YABEC2018*, 2018

上原ひかる、荒木千絵、前田昂亮、岡橋伸幸、松田史生、高橋智聡、清水浩、がん種の異なる細胞間での中心代謝における ¹³C 代謝フラックス解析、第 70 回日本生物工学会大会、2018

上原ひかる、岡橋伸幸、荒木千絵、前田昂亮、河野 晋、松田史生、高橋智聡、清水 浩、

がん幹細胞特異的代謝フラックスの解明、金沢大学がん進展制御研究所拠点シンポジウム、
2017

上原ひかる、荒木千絵、前田昂亮、岡橋伸幸、松田史生、高橋智聡、清水浩、¹³C 代謝フラックス
解析によるがん細胞中心代謝株間比較、第 65 回質量分析総合討論会 2017 つくば、2017

〔図書〕(計 1 件)

岡橋伸幸、松田史生、清水浩、シーエムシー出版、第 25 章培養動物細胞の ¹³C 代謝フラックス
解析、2018、pp.218-228(11P)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 松田 史生

ローマ字氏名: Matsuda Fumio

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 情報科学研究科

職名: 教授

研究者番号(8 桁): 50462734

研究分担者氏名: 戸谷 吉博

ローマ字氏名: Toya Yoshihiro

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 情報科学研究科

職名: 准教授

研究者番号(8 桁): 70582162

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 高橋智聡

ローマ字氏名: Takahashi Chihiro

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。