

令和元年8月28日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19606

研究課題名(和文)次世代定量プロテオミクスによるがん悪性進展機構の解明

研究課題名(英文)Next-generation proteomics to reveal the mechanism for malignant transformation

研究代表者

松本 雅記(Masaki, Matsumoto)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：60380531

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)：本研究では正常細胞から人工的に構築した前がん状態の細胞を試験管内悪性させるモデルを構築した。これらのモデル細胞株に対して、われわれが独自に構築した次世代型定量プロテオミクスの手法であるiMPAQT法を適用することで、がん悪性進展過程における代謝再編成の実体をプロテオームレベルで解明することを試みた。その結果、がん悪性進展に伴いグルタミン代謝経路に関わる酵素の発現が顕著に変化していることを明らかにした。特に、グルタミンの窒素をPRPPに転移することで核酸合成を促す酵素であるPPATが足場非依存増殖において重要な役割を担っており、その阻害が造腫瘍能を低下させ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

本研究によってがんの悪性進展過程においてグルタミン代謝経路が核酸合成に偏重してシフトしていることを見出した。このがん特有の代謝シフトの原因であるPPATの発現抑制によって腫瘍形成を減弱させることができたことから、この酵素が抗がん剤の有効なターゲットとなり得ることが示唆された。また、代謝酵素の一斉定量法を確立したことで、広範な疾患の分子機構を代謝経路の変化として捉えることが可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established an in vitro model for malignant transformation from oncogene-induced pre-cancerous state cell line. In order to reveal the molecular basis of malignant transformation, the expression level of metabolic enzymes in these cell lines was quantified by our originally developed next-generation proteomics, iMPAQT. We found that glutamine metabolism is significantly altered during malignant transformation and PPAT which transfers nitrogen to 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP), a precursor in nucleotide biosynthesis, from glutamine, acts as a key enzyme in cancer specific glutamine metabolism. We also demonstrated that attenuation of PPAT induces the reduction in the tumor size.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオミクス 代謝 がん

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノム損傷によって偶発的に前がん状態となった細胞は、さらなる変遷を経て、浸潤・転移能を有する悪性度の高いがん細胞へと進展する。これまで、大腸がんの多段階発がんに代表されるゲノム変異の蓄積が悪性進展において重要な役割を担っていると考えられている。その一方で遺伝子変異を伴わない変化が悪性進展に関与する可能性も十分に考えられる。栄養や酸素濃度などの環境要因は細胞の代謝ネットワーク構造変化（＝代謝モデリング）を引き起こすが、古くから知られているがんにおける解糖亢進等の代謝的特徴を考慮すると、悪性進展と代謝モデリングの関連は容易に推察される。事実、細胞内の代謝中間体がエピジェネティックな機構を介して転写環境に影響を与えることが示され、環境要因が代謝を介して半永続的に細胞の性質を変えてしまう可能性も示唆されており、様々な要因で引き起こされる代謝モデリングが悪性進展の駆動力になっている可能性も高い。しかしながら、これまでの複雑な代謝ネットワークの全体構造を迅速かつ定量的に解析する技術がなかったことや、がん組織に由来する細胞を用いたレトロスペクティブな研究が主流であったことから、悪性進展への代謝モデリングの関与や意義に関する直接的な研究はほとんどなされていない。申請者はこれまで不可能とされてきた全タンパク質の絶対定量を可能とする画期的なプロテオーム解析法（iMPAQT法：in vitro proteome assisted protein absolute quantification）を開発しており、代謝モデリングの全体像を正確に捉えることが可能となっている【Matsumoto et al. Nature Methods, 2017】。本研究では、ヒト正常細胞にがん原遺伝子を導入することで得た前がん状態細胞をコロニー培養やヌードマウスにおける腫瘍形成を経ることで段階的に悪性進展させた細胞株に対し、iMPAQT法を実施し、悪性進展に特徴的な代謝ネットワーク構造変化をあぶり出す。見出されたネットワークに対する介入実験により、悪性進展における代謝モデリングの意義や脆弱性ポイントの解明を試みる。本研究の実行・達成は、細胞がん化過程の分子論的理解を促進するだけでなく、代謝ネットワーク構造解析に基づいた細胞システム研究を先導するものであり、生命科学全般に大きなインパクトを与えることが期待される。

### 2. 研究の目的

生体内で生じたがん細胞は様々な生体内環境に対して適応することで生き残り、より悪性度の高いがん細胞へと進化する。がん細胞において解糖系の亢進など代謝ネットワーク構造変化（＝代謝モデリング）が生じていることは古くから知られており、環境適応によるがんの生存戦略に一役かっている可能性が高い。しかしながら、がん悪性進展と代謝モデリングの関係性に関する研究は、1) 代謝モデリングを総体的・定量的に捉える手法の不足、2) がん悪性進展の途中過程を捉えることができないこと、によって大きく遅れている。本研究は独自のプロテオーム解析技術と悪性進展モデルを利用することでこれらの問題点を解消し、がん悪性進展における代謝モデリングの意義を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) 試験管内悪性化モデルの構築

ヒトの胎児肺に由来する線維芽細胞である TIG-3 は hTERT/SV40/cMyc でトランスフォームさせると（TSM 細胞）、通常の 2 次元培養での増殖能は著しく増加するが、足場非依存増殖能（コロニー形成能）は決して高くないことが知られている（Akagi T. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:13567-13572, 2003）。また、ヌードマウスでの造腫瘍能もほとんど有さないことがわかっている。この TSM 細胞を前がん状態細胞と仮定し、この細胞を試験管内で悪性進展させる方法を模索する。

#### 2) iMPAQT 法による悪性進展関連代謝モデリングのプロテオーム解析

iMPAQT はゲノムワイドな組み替えタンパク質を用いて LC-MS 解析における高感度ペプチドの選定とその座標情報（LC 上の保持時間、質量、および部分質量）の事前取得を行うことで、大規模なターゲットプロテオミクス（MRM：multiple reaction monitoring など）を実施する定量プロテオミクス・プラットフォームである。既に 1,8000 種類の遺伝子（全タンパク質コード遺伝子の約 9 割をカバー）に関して、事前情報取得を終えデータベース化している。本研究では環境要因で生じる悪性化プロセスに関与すると思われるカテゴリー（代謝酵素、シグナル伝達因子、クロマチン制御因子等）を中心に、測定対象タンパク質の選定とメソッド最適化を実施する。

### 3) がん悪性進展モデルのトランスオミクス解析

作製した悪性進展モデルを対象にメタボロームなどの情報を階層横断的に取得する。また、プロテオーム階層に関しては発現量解析に加えて、各種翻訳後修飾の定量解析も実施する。例えば、シグナル伝達において重要なリン酸化やヒストンコードに重要なアセチル化やメチル化を定量するためのメソッド構築とそれを利用したターゲットプロテオミクスによる定量を実施する。

### 4) がん悪性進展と代謝リモデリングの関係性検証

これまでに得られた各種オミクスデータから、KEGG 等の経路情報に基づいて悪性進展過程において変化するネットワークを抽出・可視化し、悪性度と関連する重要ネットワーク構造や、複数の局所ネットワーク間の関連性を推定する。

## 4. 研究成果

### 1) 試験管内悪性化モデルの構築

hTERT/SV40/cMyc でトランスフォームした細胞を一旦、足場非依存培養を行い、生き残った（コロニー形成した）細胞をさらにコロニー培養したところ、得られたクローンは親クローンに比べて高いコロニー形成能を有していることを見出した。この効果は足場非依存培養を繰り返すことでさらに増加し、造腫瘍能の高い細胞（Anchorage-independent growth: AIG 細胞）へと変化した。また、形成された腫瘍や転移巣からも細胞株を取得し、正常から段階的に悪性進展した一連の細胞株を樹立した(図 1)。

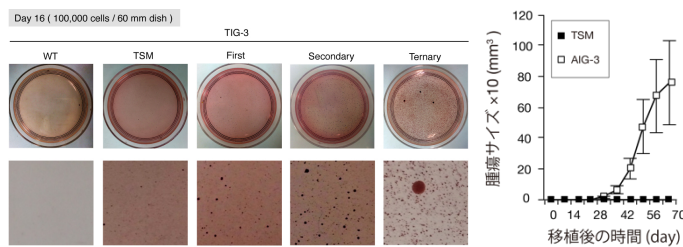


図 1 | コロニー形成による悪性進展モデルの構築  
TIG-3 細胞を hTERT, SV40 および c-Myc にて前がん状態の細胞(TSM)を樹立した。TSM 細胞をメチルセルロース中で足場非依存状態で繰り返し培養した細胞 (AIG 細胞) ではコロニー形成能の増大および造腫瘍能を獲得が観測された

### 2) iMPAQT 法による悪性進展関連代謝リモデリングのプロテオーム解析

次に、AIG 細胞において代謝酵素発現量変化を iMPAQT 法で解析したところ、多数の代謝酵素の変化が認められた (図 3)。特に、AIG 細胞において、de novo 核酸合成経路の酵素の発現が増加、一方、グルタミンノリシスの酵素群の発現は低下していた。これらの二つはグルタミン代謝における重要な経路であり、グルタミン代謝運命が AIG 細胞において核酸合成の方に偏っていることが示唆された。

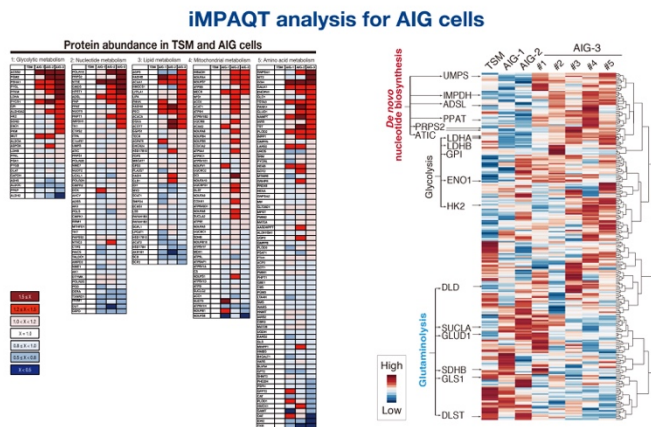


図 2 | iMPAQT 法による悪性進展関連代謝リモデリングの解明

TSM 細胞と AIG 細胞における代謝酵素発現量を iMPAQT 法で解析した。赤が発現量増加、青が発現量低下したタンパク質。

### 3) がん悪性進展モデルのトランスオミクス解析

上記の仮説を検証するために、悪性進展モデルを対象に同位体標識グルタミンを取り込ませて、メタボローム解析を行なった。その結果、AIG細胞ではグルタミンの窒素の核酸前駆体への取り込みが加速していることが明らかとなった(図3)。

#### Metabolomic analysis of TSM/AIG-3 by glutamine labeling

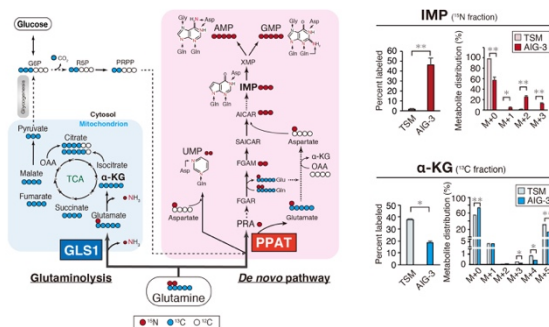


図3 | 悪性進展における代謝活性変化の追跡  
窒素および炭素を安定同位体標識したグルタミンを取り込ませたのち、メタボローム解析を実施した。

### 4) がん悪性進展と代謝リモデリングの関係性検証

このようにがん悪性進展においてグルタミン代謝経路を中心とした代謝リモデリングが起きていることが示唆されたため、これらの代謝リモデリングにおける重要酵素と考えられる、アミドホスホリボシルトランスフェラーゼ (PPAT) およびグルタミナーゼ 1 (GLS1) の発現を過剰発現およびノックダウンによって攪乱した。その結果、PPAT の発現抑制および GLS1 の過剰発現によって有意なコロニー形成能の低下および造腫瘍能の低下が認められた (図4)

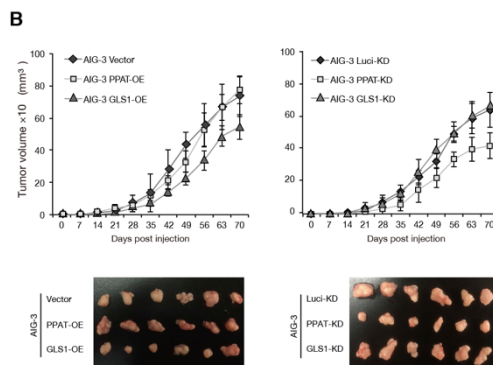


図4 | グルタミン代謝経路の攪乱による腫瘍形成能の低下  
PPAT および GLS1 のノックダウンおよび過剰発現した TSM 細胞において、ヌードマウスにおける造腫瘍能を検証した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- 1) Hada K, Hirota K, Inanobe A, Kako K, Miyata M, Araoi S, Matsumoto M, Ohta R, Arisawa M, Daitoku H, Hanada T, Fukamizu A. Tricarboxylic acid cycle activity suppresses acetylation of mitochondrial proteins during early embryonic development in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 294:3091-3099, 2019.
- 2) Kawata K, Yugi K, Hatano A, Kokaji T, Tomizawa Y, Fujii M, Uda S, Kubota H, Matsumoto M, Nakayama KI, Kuroda S. Reconstruction of global regulatory network from signaling to cellular functions using phosphoproteomic data. *Genes Cells* 24: 82-93, 2019.
- 3) Hosokawa H, Romero-Wolf M, Yui MA, Ungerback J, Quiloan MLG, Matsumoto M, Nakayama KI, Tanaka T, Rothenberg EV. Bcl11b sets pro-T cell fate by site-specific cofactor recruitment and by repressing Id2 and Zbtb16. *Nat. Immunol.* 19: 1427-1440, 2018.
- 4) Hosokawa H, Ungerback J, Wang X, Matsumoto M, Nakayama KI, Cohen SM, Tanaka T, Rothenberg EV. Transcription factor PU.1 represses and activates gene expression in early T cells

- by redirecting partner transcription factor binding. *Immunity* 49: 782, 2018.
- 5) Matsumoto M, Nakayama KI. The promise of targeted proteomics for quantitative network biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 54:88-97, 2018.
  - 6) Fujimoto T, Nakamura O, Saito M, Tsuru A, Matsumoto M, Kohno K, Inaba K, Kadokura H. Identification of the physiological substrates of PDIp, a pancreas-specific protein disulfide isomerase family member. *J. Biol. Chem.* 293: 18421-18433, 2018.
  - 7) Moriya Y, Kawano S, Okuda S, Watanabe Y, Matsumoto M, Takami T, Kobayashi D, Yamanouchi Y, Araki N, Yoshizawa AC, Tabata T, Iwasaki M, Sugiyama N, Tanaka S, Goto S, Ishihama Y. The jPOST environment: an integrated proteomics data repository and database. *Nucleic Acids Res.* 47(D1): D1218-D1224, 2018.
  - 8) Kawata K, Hatano A, Yugi K, Kubota H, Sano T, Fujii M, Tomizawa Y, Kokaji T, Tanaka KY, Uda S, Suzuki Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Saitoh K, Kato K, Ueno A, Ohishi M, Hirayama A, Soga T, Kuroda S. Trans-omic analysis reveals selective responses to induced and basal insulin across signaling, transcriptional, and metabolic networks. *iScience* 7: 212-229, 2018.
  - 9) Watanabe S, Fujiyama H, Takafuji T, Kayama K, Matsumoto M, Nakayama KI, Yoshida K, Sugimoto N, Fujita M. GRWD1 regulates ribosomal protein L23 levels via the ubiquitin-proteasome system. *J. Cell Sci.* 131. pii: jcs213009, 2018.
  - 10) Tognon CE, Rafn B, Cetinbas NM, Kamura T, Trigo G, Rotblat B, Okumura F, Matsumoto M, Chow C, Davare M, Pollak M, Mayor T, Sorensen PH. Insulin-like growth factor 1 receptor stabilizes the ETV6-NTRK3 chimeric oncoprotein by blocking its KPC1/Rnf123-mediated proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 293: 12502-12515, 2018.
  - 11) Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, Ito S, Kurosawa K, Yamaguchi K, Sugiura Y, Takizaki H, Yamashita Y, Katakura R, Sato I, Kawai M, Okada Y, Watanabe H, Kondoh G, Matsumoto S, Kishimoto A, Obata M, Matsumoto M, Fukuhara T, Motohashi H, Suematsu M, Komatsu M, Nakayama KI, Watanabe T, Soga T, Shima H, Maemondo M, Tanuma N. PKM1 confers metabolic advantages and promotes cell-autonomous tumor cell growth. *Cancer Cell* 33: 355-367.e7, 2018.
  - 12) Nakatsumi H, Matsumoto M, Nakayama KI. Noncanonical pathway for regulation of CCL2 expression by an mTORC1-FOXK1 axis promotes recruitment of tumor-associated macrophages. *Cell Rep.* 21: 2471-2486, 2017.
  - 13) Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Watanabe M, Nomura T, Kano T, Matsumoto M, Nakayama KI, Watanabe M, Hatakeyama S. Sez6l2 regulates phosphorylation of ADD and neuritogenesis. *Biochem Biophys Res. Commun.* 494: 234-241, 2017.
  - 14) Kita K, Shiota M, Tanaka M, Otsuka A, Matsumoto M, Kato M, Tamada S, Iwao H, Miura K, Nakatani T, Tomita S. Heat shock protein 70 inhibitors suppress androgen receptor expression in LNCaP95 prostate cancer cells. *Cancer Sci.* 108: 1820-1827, 2017.
  - 15) Yachie N; Robotic Biology Consortium (Inc. Matsumoto M), Natsume T. Robotic crowd biology with Maholo LabDroids. *Nat. Biotechnol.* 35: 310-312, 2017.
  - 16) Cui L, Nakano K, Obchoei S, Setoguchi K, Matsumoto M, Yamamoto T, Obika S, Shimada K, Hiraoka N. Small nucleolar noncoding RNA SNORA23, up-regulated in human pancreatic ductal adenocarcinoma, regulates expression of spectrin repeat-containing nuclear envelope 2 to promote growth and metastasis of xenograft tumors in mice. *Gastroenterology* 153: 292-306.e2, 2017.

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 松本 雅記、中山 敬一、iMPAQT: a scalable and flexible platform for the quantification of proteins of interest、第91回日本生化学会 2018年10月(京都)
- 2) 松本 雅記、中山 敬一、iMPAQT ver.2.0: 拡張性と柔軟性を備えたタンパク質絶対定量

プラットフォーム、MSP2018、2018年5月（大阪）

- 3) Masaki Matsumoto, Robotics promotes accurate and reproducible data acquisition in proteomics, Robotics and Semantic Systems for Biology2 Symposium、2018年1月（Tokyo）
- 4) 松本 雅記、中山 敬一、次世代定量プロテオミクスによる生命システム理解への挑戦, Conbio2017、2017年12月（神戸）
- 5) 松本 雅記、iMPAQT：組み換えタンパク質を用いたタンパク質絶対定量プラットフォーム、第7回新アミノ酸分析研究会学術講演会、2017年12月（東京）
- 6) 松本 雅記、定量プロテオミクス技術の開発と応用に関する研究、日本プロテオーム学会大会（学会賞受賞講演）、2017年7月（大阪）
- 7) 松本 雅記、中山 敬一、iMPAQT:ヒト in vitro プロテオームに基づく大規模ターゲットプロテオミクス解析基盤、日本プロテオーム学会大会、2017年7月（大阪）
- 8) 松本 雅記、iMPAQT: A Platform for Large-Scale Targeted Proteomics Based on an in Vitro Human Proteome, 第65質量分析総合討論会（基調講演）2017年5月（筑波）

〔図書〕（計3件）

- 1) 松本 雅記、中山 敬一、精密定量プロテオミクスに基づく生命科学研究、ライフサイエンス領域融合レビュー、2017年, DOI: 10.7875/leading.author.6.e002
- 2) 松本 雅記、中山 敬一、ラボドロイドの活用：プロテオミクス実験(Application of LabDroid: Proteomics), 実験医別冊「あなたのラボに AI（人工知能）×ロボットがやってくる」、2017年12月発行
- 3) 松本 雅記、中山 敬一、次世代プロテオミクスによるがんの代謝解析、実験医学増刊「がん代謝 ワールブルグを超えて全容解明に挑む」Vol.35 No.10、2017年06月

〔その他〕

公開データベース

<https://impaqt.jpost.org/IMPAQT/>

## 6. 研究組織

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：中山 敬一

ローマ字氏名：Nakayama Keiichi

※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。