

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22553

研究課題名(和文)がん細胞におけるアミノ酸アダプティブセンサーの探索

研究課題名(英文)Elucidation of amino acid adaptive sensor in cancer cells

研究代表者

大澤 毅(Osawa, Tsuyoshi)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：50567592

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): 本研究は、グルタミン欠乏を基軸としたがん細胞のアミノ酸欠乏のアダプティブセンサーの探索から新規がんの治療法の開発につながる研究を目的とし、(1)グルタミンを基軸としたアミノ酸欠乏センサーの探索、及び、(2)グルタミンを基軸としたアミノ酸欠乏に対するアダプティブ機構の解明の2項目について研究を行い、グルタミン特異的に誘導される遺伝子群、ヒストン修飾(H3K4me3, H3K27ac)、プロモーター、エンハンサー、上流転写因子やアミノ酸トランスポーターなどアミノ酸欠乏のセンサー・制御因子候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がん細胞はロイシンなどの必須アミノ酸をmTOR複合体を介したシグナル伝達系で感知することが知られている。一方、グルタミンなどのアミノ酸欠乏感知機構は未だ不明な点が多い。本研究は、独自の低栄養培養やアミノ酸培養系を作成し、各アミノ酸で特異的に発現誘導される遺伝子群やエピゲノム制御機構を同定、各アミノ酸における上流転写因子を同定など、がん細胞の新規アミノ酸欠乏アダプティブ機構が存在する可能性を見出した。本研究により、がん悪性化を促進する新しいアミノ酸欠乏の感知・適応システムやアミノ酸代謝異常に関する代謝経路や遺伝子変動の解明が可能となり、今後、新規がん治療法への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文): The tumor microenvironment plays an important role in malignant transformation such as growth, metastasis and drug resistance of cancer cells. The purpose of this study was to identify adaptive sensors to amino acid deficiency in cancer cells, inhibition of which can be utilized for the development of novel cancer treatments. We conducted researches on (1) exploration of adaptive sensors for amino acid deficiency and (2) elucidation of the adaptive mechanism of cancer to amino acid deficiency. We identified glutamine and other amino acid-specifically induced genes, histone modifications (H3K4me3, H3K27ac), promoters, enhancers, and possible upstream regulators. We identified candidate of sensors and regulators that are essential for amino acid deficiency, such as transcription factors and amino acid transporters.

研究分野: がん代謝

キーワード: 腫瘍微小環境 がん代謝 アミノ酸 アミノ酸欠乏 オミクス統合解析

1. 研究開始当初の背景

がんの転移・浸潤・薬剤耐性などの悪性化には、腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者は、低酸素・低栄養・低 pH の過酷な腫瘍微小環境ががん悪性化を促進することを報告してきた[1, 2, 3]。また、がん細胞は、低酸素・低栄養・低 pH の過酷な環境において、ミトコンドリア非依存的な解糖系、次いで酢酸代謝、さらにグルタミン代謝という多重の代謝適応システムで生存し悪性化を獲得する知見を得てきた。近年、がんや生活習慣病の研究領域では、アミノ酸の代謝異常が注目されている。ロイシン、バリンなどの必須アミノ酸の欠乏には mTOR 複合体を介したアミノ酸欠乏認識機構が存在することが知られている。一方、申請者はグルタミンやセリンなど非必須アミノ酸の欠乏で、がん細胞は mTOR 複合体を介さない新しいアミノ酸欠乏の認識メカニズムを利用する可能性を見出している。

がん細胞が正常細胞とは異なる代謝機構を有することは、1950 年代オット・ワーブルグ博士が提唱した「Origin of Cancer」まで遡る[4]。低酸素環境におけるがん細胞は HIF1 α を介し解糖系(ワーブルグ効果)を促進し[5]、乳酸や H⁺細胞外排出に伴って腫瘍内の一部は低 pH に陥る[6]。申請者や Corbet らは、低 pH のがん細胞は SREBP2 や FAO を介し酢酸代謝 (ACSS2) を促すことを報告し、低 pH が単なる低酸素やワーブルグ効果の結果ではなく低 pH が原因となってがん進展を促進することを報告してきた[2, 7, 8]。

近年、がん代謝研究領域では、解糖系、脂質代謝、1 炭素代謝、酢酸代謝に加えて、アミノ酸代謝が注目されている。ロイシン、イソロイシン、バリンなどの必須アミノ酸は、mTOR 複合体を介し転写・翻訳・増殖・転移などがんの進展・悪性化を促すだけでなく、HIF1 α 、SREBP2、ATF4 のストレス適応機構と協調的に働くことが最近示唆され、mTOR 複合体を介したアミノ酸代謝研究の重要性が報告されている(Manning ら, Sabatini ら, *Cold Spring Harbor* 2018)。

このことからラパマイシン、ラパログなどの mTOR 複合体阻害剤が新しいがん治療薬として登場し一定の治療効果は得られているが、がんの根治には至っていない。一方、申請者はグルタミンやセリンなど非必須アミノ酸において mTOR 複合体を介さないアミノ酸欠乏感知・適応機構が存在する可能性を見出している。

2. 研究の目的

本研究は、これまで知られていない新しいアミノ酸センシング機構の解明に挑戦する。具体的には、申請者が開発した独自の低栄養培養系[1, 2]に、アミノ酸を 1 種類ずつ添加することで、これまで他の栄養素の作用が混在し解析が困難であった 1 アミノ酸に起因する系統的な遺伝子発現解析、ヒストン修飾解析、メタボローム解析などの系統的解析が可能となる。本研究は、1 アミノ酸レベルの解像度でのオミクス情報の取得し、がん細胞の最後の砦である、ノンカノニカルな mTOR アミノ酸センシング機構の探索およびがん悪性化機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

1. アミノ酸欠乏・添加培地の作成とアミノ酸欠乏・添加培養法

ダルベッコ High グルコース DMDM 培地の栄養素を基準にし、各 1 アミノ酸を欠損させて培地を作成した。また、糖、アミノ酸、ビタミンの全栄養素を抜いた培地(低栄養培地)を作成し[1, 2]、低栄養培地に 1 アミノ酸のみを加えた 1 アミノ酸培地を作成した。これら低栄養培地に各アミ

ノ酸のみを添加した培地で、HeLa 細胞を 24 時間培養し、各アミノ酸で特異的に発現誘導される遺伝子群やエピゲノム修飾の解析に用いた。

2. 遺伝子発現、エピゲノム解析

低栄養培養、アミノ酸欠乏培地で培養した細胞試料から総 RNA と抽出し、RNA-Seq 用にライブラリー調整を行い RNA-Seq を行い、さらに各アミノ酸において特異的なパスウェイの解析を行った。また、各種アミノ酸で特異的なヒストン修飾情報 (H3K4me3, H3K27ac) を取得し、H3K4me3 陽性で H3K27ac 陽性のプロモーター領域と H3K4me3 陰性で H3K27ac 陽性のエンハンサー領域の同定と解析を行った。

2. mRNA、タンパク質解析

低栄養培養、アミノ酸欠乏培地で培養した細胞試料から総 RNA と抽出し cDNA 合成し、標的遺伝子に関してリアルタイム PCR 法により mRNA 発現やヒストン修飾を確認した。同様に総タンパク質と抽出し、オートファゴソーム膜の合成などを検討するために、LC3II ウェスタンブロット法を用いてタンパク質の発現解析を行った。

4. 研究成果

1. アミノ酸欠乏感知機構の解明

がん細胞はロイシンなどの必須アミノ酸の欠乏を、mTOR 複合体を介したシグナル伝達系で感知することが知られている。一方、非必須アミノ酸欠乏の感知機構は未解明な点が多い。本項目は、独自の低栄養培地に各アミノ酸のみを添加した培地を作成し[1]、各アミノ酸存在下で、がん細胞 (HeLa 細胞) を 24 時間培養し、各アミノ酸で特異的に発現誘導される遺伝子群を同定した (図 1)。パスウェイ解析を用いて各アミノ酸における上流制御因子を同定を試みた。申請者はグルタミンで誘導され、ロイシンやその他のアミノ酸では変動しない PCYT2 を含む遺伝子群を見出している (図 1)。また、これらの PCYT2 などグルタミン特異的に発現誘導される遺伝子群は、5' UTR のプロモーター領域を導入したルシフェラーゼベクターに導入しても、ルシフェラーゼの発現誘導されないことから、5' UTR のプロモーター領域のみならず遠隔のエンハンサーの関与が示唆された (未発表データ)。

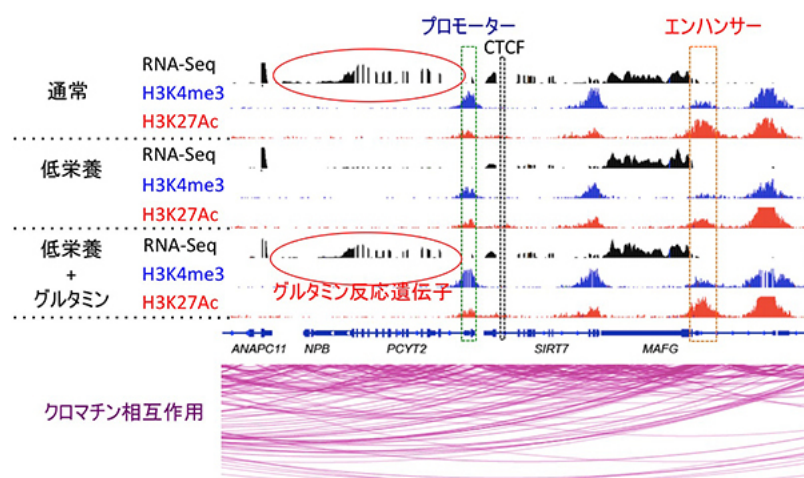


図1. グルタミンに反応する遺伝子の発現はプロモーターのみならずクロマチンの相互作用による遠隔のエンハンサーが関与する

上述のように、グルタミンで誘導され、ロイシンやその他のアミノ酸では変動しない遺伝子群を見出したが（図 1）、グルタミンがどのように遺伝子発現を制御するかは、未だ不明な点が多い。そこで、HeLa 細胞を用いて、通常培養、低栄養培養と比べて低栄養培地にグルタミンを添加した際のヒストン修飾情報（H3K4me3, H3K27ac）を網羅的に取得し、

全遺伝子領域においてグルタミン特異的なプロモーター領域（H3K4me3 陽性, H3K27ac 陽性）、エンハンサー領域（H3K4me3 陰性, H3K27ac 陽性）の同定を試みた、グルタミンで誘導されるエンハンサー領域（4%）、グルタミンで誘導されるプロモーター領域（3%）を同定した（図 2 a）。また、グルタミン標的遺伝子群、グルタミン標的エンハンサー、グルタミンで変動するクロマチン相互作用の解析から感知・制御因子候補を複数同定した。

また、通常培養と比較して低栄養で消失し、低栄養培地にグルタミンを添加した際に戻るヒストン修飾領域（H3K4me3-ve H3K27ac+ve）からグルタミン特異的なエンハンサー領域から、グルタミン特異的なエンハンサー領域のモチーフ解析を行い、エンハンサー領域に結合する上流転写制御因子を複数同定した。例として、上流転写制御因子の候補として NRF を同定している（図 2b）。さらに、NRF のクロマチン免疫沈降実験から、グルタミン特異的に NRF が結合する NRF 標的遺伝子群（例 *NQO1* など）を同定した（図 2c）。

このように、グルタミン特異的エンハンサーを介して NRF 転写制御が、代謝リプログラミングを促進する可能性を見出しているため、今後 NRF を重点的にどのような転写複合体を介して、グルタミンを感知するか NRF を免疫沈降したサンプルをプロテオミクス解析から、NRF と転写複合体を形成するタンパク質群の同定を目指す予定である。

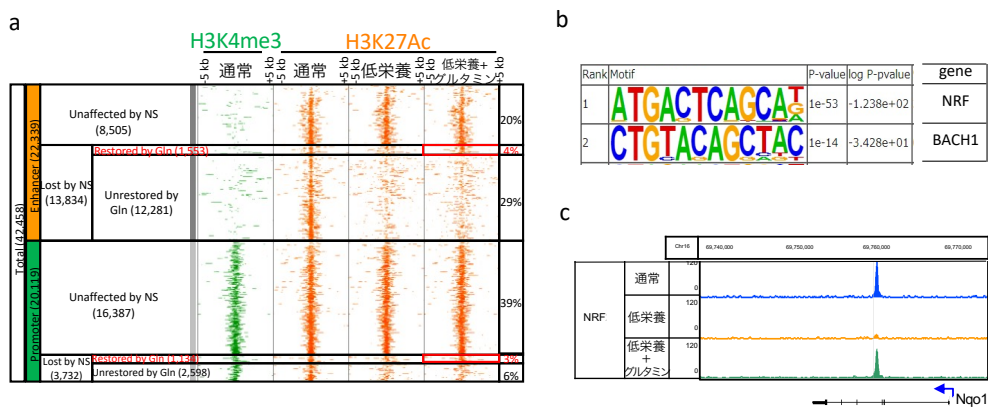


図2. グルタミン特異的なエンハンサー領域のモチーフ解析からNRFを同定した

- グルタミン特異的なプロモーター領域、エンハンサー領域の同定した
- グルタミン特異的なエンハンサー領域のモチーフ解析から NRF を同定した
- NRF の ChIP-Seq は、標的因子の発現制御領域の結合が認められた

2. アミノ酸欠乏に対する細胞適応機構の解明

正常細胞はロイシンなどのアミノ酸欠乏に対する適応機構として、オートファジーを介した

細胞生存のメカニズムを有する。また、がん細胞は、エネルギー代謝、及び、免疫寛容を促進するため恒常的にオートファジーが活性化されていることが知られている。ロイシンなどの必須アミノ酸の欠乏は、がん細胞において細胞膜リン脂質ホスファチジルエタノールアミン (PE) を膜成分とするオートファゴソーム膜 (LC3II/Atg8-PE) の形成を促進し、オートファジーを活性化することが知られている。一方、提案者は、グルタミン欠乏が、PCYT2 を発現低下し PE 合成を抑制することを報告した[3]。グルタミンが欠乏したがん細胞は、オートファジーを抑制する可能性を見出した (図 3)。このように、がん細胞にはロイシンなどの必須アミノ酸に対する適応機構と異なるグルタミン欠乏に対するアミノ酸欠乏適応機構が存在することが示唆された(図 3)。

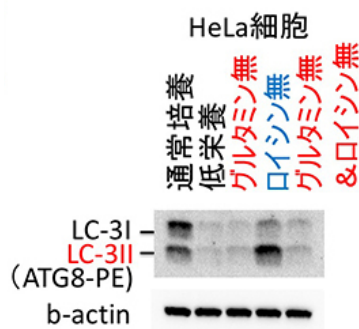


図3. グルタミン欠乏ではオートファジーが活性化しない

HeLa 細胞を通常培養、低栄養、グルタミン欠損培地、ロイシン欠損培地、グルタミン、ロイシン欠損培地で培養し、ウエスタンブロット法により LC3II の蛋白質量を測定した。

本研究は、これまで知られていない新しいアミノ酸センシング機構の解明に挑戦した。具体的には、申請者が開発した独自の低栄養培養系 [1, 2] に、アミノ酸を 1 種類ずつ添加する独自の 1 アミノ酸培養法を用いて、これまで他の栄養素の作用が混在し解析が困難であった 1 アミノ酸に起因する系統的な遺伝子発現解析、ヒストン修飾解析、メタボローム解析、プロテオーム解析の系統的解析を行い 1 アミノ酸の有無に起因する遺伝子発現解析、ヒストン修飾解析、メタボローム解析を行った。本研究が成功すれば、これまでのがん研究のみならず、アミノ酸代謝疾患研究の治療法への応用や、オートファジー研究などの学術体系の変革や転換にも繋がるのが期待され、腫瘍微小環境を標的とした新たながん治療法のみならず、先天性アミノ酸代謝異常疾患の病態生理解明や治療法への応用が期待できる。

<引用文献>

- 1) Osawa T et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Dec 20;108(51):20725-9.
- 2) Kondo A et al. Cell Rep. 2017 Feb 28;18(9):2228-2242.
- 3) Osawa T et al. Cell Rep. 2019 Oct 1;29(1):89-103.e7.
- 4) Warburg O. Science. 1956.
- 5) Corbet C, Feron O. Nat Rev Cancer. 2017 Oct;17(10):577-593.
- 6) Schug ZT et al.. Cancer Cell. 2015, 27(1):57-71.
- 7) Gao X et al. Nat Commun. 2016, 7:11960.
- 8) Chen WW, Cell. 2016 Aug 25;166(5):1324-1337.e11.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 大澤ら
2. 発表標題 Metabolic dynamics within tumor microenvironments towards cancer plasticity
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Osawa T
2. 発表標題 Tumor Microenvironmental Metabolic Adaptation induces Tumor Progression
3. 学会等名 Establishing International Research Network of Mathematical Oncology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大澤 毅
2. 発表標題 Integrative Nutriomics Approach for understanding Cancer and Metabolism
3. 学会等名 International Conference on Cancer Systems Biology Beyond (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大澤 毅
2. 発表標題 Information and life science fusion brings innovation-To break through the limits of omics analysis
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤 毅
2. 発表標題 Tumor progression though amino acids metabolic shift
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤 毅
2. 発表標題 Integrative understanding and control of biological phenomena through specio-temporal omics
3. 学会等名 The 92nd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤 毅
2. 発表標題 がん細胞におけるグルタミン欠乏適応機構の解明
3. 学会等名 第7回がん代謝研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤 毅
2. 発表標題 Adaptation of Cancer cells against amino acid deprivation to promote tumor progression
3. 学会等名 2019 Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 哺乳類胚の休眠ダイナミクス	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 84
3. 書名 Precision Medicine	

1. 著者名 多階層オミクス統合解析-オミクス解析	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 120
3. 書名 医学のあゆみ	

〔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
---------	---------