

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15100

研究課題名（和文）13C代謝フラックス解析を用いた分化細胞の代謝計測と運命制御

研究課題名（英文）13C-metabolic flux analysis and fate control for differentiable cells

研究代表者

岡橋 伸幸（Okahashi, Nobuyuki）

大阪大学・大学院情報科学研究科・准教授

研究者番号：30802748

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：特定の機能を持つ細胞への分化誘導技術の開発は、再生医療の重要な課題である。本研究では、細胞種ごとに代謝状態が異なる可能性に注目し、代謝反応速度を計測できる13C代謝フラックス解析法を用いて、分化前後の細胞の代謝状態の定量的な比較に取り組んだ。解析対象とした好中球モデル細胞のHL-60とマクロファージモデル細胞THP-1の代謝モデルを検討し、分化前後のフラックス分布の変化をとらえることに成功した。さらに、分化に伴って活性化した反応を阻害することで、細胞分化を外的に制御できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で最適化した13C代謝フラックス解析法は、これまで不明であった終末分化した細胞の代謝状態を定量的に明らかできる点で新規性があり、分化前後での細胞の代謝の変化をフラックスレベルで明らかにした先駆的な事例である。今後、分化する他の種類の細胞の代謝の変化を計測するための基盤技術としての活用が見込まれ、細胞分化のメカニズム解明や、再生医療などにおける細胞の分化制御に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The development of technology to induce differentiation into cells with specific functions is an important issue in regenerative medicine. In this study, we developed 13C metabolic flux analysis, which can measure metabolic reaction rate, to quantitatively compare the metabolic state of cells before and after differentiation. The metabolic models of HL-60, a neutrophil-like cell line, and THP-1, a macrophage-like cell lines were examined. Then flux distribution before and after differentiation was successfully calculated using the developed model. Furthermore, we showed that cell differentiation can be externally controlled by inhibiting reactions activated during differentiation.

研究分野：代謝工学

キーワード：13C代謝フラックス解析 細胞分化 分化制御 中心炭素代謝 補酵素バランス

### 1. 研究開始当初の背景

特定の機能を持つ細胞への分化誘導技術の開発は、再生医療の重要な課題である。細胞は種類ごとに異なる代謝状態をとることによって細胞の形態や分化、機能発揮を実現していることが示唆されており、細胞種ごとの代謝状態を明らかにすることが、細胞の分化方向性を制御する重要な手掛かりとなることが期待される。これまでに分化前後の細胞内に蓄積した代謝物量などの情報をもとに細胞ごとの代謝状態を推し量る試みがなされているが、代謝の実体であり、最終表現型である代謝反応速度（フラックス）レベルでの解析は十分なされていない。それゆえに、分化前後の細胞における代謝状態の定量的な比較や、活性化/抑制された代謝経路の重要性を読み解くことができていないのが現状である。この課題を解決するためには、細胞内の代謝反応速度を計測できる  $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析法が有効である。本法は、細胞に炭素の安定同位体である  $^{13}\text{C}$  で標識した炭素源を取り込ませ、代謝物中に蓄積した  $^{13}\text{C}$  の標識割合を質量分析装置で計測し、計算機上に構築した代謝モデル上で解析することで細胞内の代謝フラックスを推定する手法である。これまでに微生物細胞を中心に技術開発がなされ、我々のグループでは活発に増殖する *in vitro* がん細胞も解析できるよう技術の汎用化を進めてきた。しかし、終末分化した細胞は一般に増殖しないことが知られており、増殖細胞とは異なる代謝状態を示すことが示唆される。このような細胞を解析するためには、これまでの増殖細胞の解析に最適化された代謝モデルを非増殖細胞に拡張する必要がある。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、代謝反応速度を計測できる  $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析法を分化前後の細胞に適用できるよう汎用化し、分化前後の代謝状態を定量的に比較することを目的とした。さらに、変化した代謝反応への介入を通して細胞の形態や分化、機能を外的に制御することが可能か検討することとした。

### 3. 研究の方法

まず、解析対象とする分化可能細胞モデルを選定した。細胞の形態によらず解析できるように、浮遊細胞である好中球モデル HL-60 と接着細胞であるマクロファージモデル細胞 THP-1 を選んだ。培養条件、分化条件を検討し、それらの分化度合いを表す細胞表面マーカーを用いてフローサイトメーターで分化した細胞だけを分取する方法を検討した。

続いて、細胞外から中心炭素代謝経路に流入する炭素源を明らかにするために、培地中に含まれる炭素源を一つずつ  $^{13}\text{C}$  フルラベル体に交換し、細胞内代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合を質量分析装置で計測した。得た結果をもとに、解析に用いる代謝モデルを最適化し、これを用いて HL-60 と THP-1 の代謝フラックス解析を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 好中球モデル HL-60 細胞の解析

HL-60 細胞を 1  $\mu\text{M}$  レチノイン酸を添加して 6 日間培養し、分化前は発現していない CD11c をマーカーとして分化した細胞を分取する系を構築した。続いて、培地中の炭素源をひとつずつ  $^{13}\text{C}$  フルラベル体に交換した培地を作成し、分化前後の細胞について中心炭素代謝経路の中間体に  $^{13}\text{C}$  が取り込まれるかどうかを GC-MS で計測した。細胞にとって重要な炭素源であるグルコースやグルタミンに由来する  $^{13}\text{C}$  は中心炭素代謝経路への流入が確認された（図 1）。他にも、従来のがん細胞の培地には含まれないグルタミン酸やアスパラギン酸といった非必須アミノ酸の流入も確認された（図 1）。これらのアミノ酸は細胞外へ吐き出される傾向があるにも関わらず、細胞内外で常に交換されていることが示唆された。一方、アルギニンは培地中から減少するにもかかわらず、中心炭素代謝経路への流入は確認されなかったため、代謝モデルから除外した。ここまでの結果を用いて、各代謝物の総  $^{13}\text{C}$  標識割合を計算したところ、培地中に添加した  $^{13}\text{C}$  標識炭素源だけでは細胞内代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合は 100%にはならず、その傾向は特に分化後の HL-60 細胞で顕著であった。

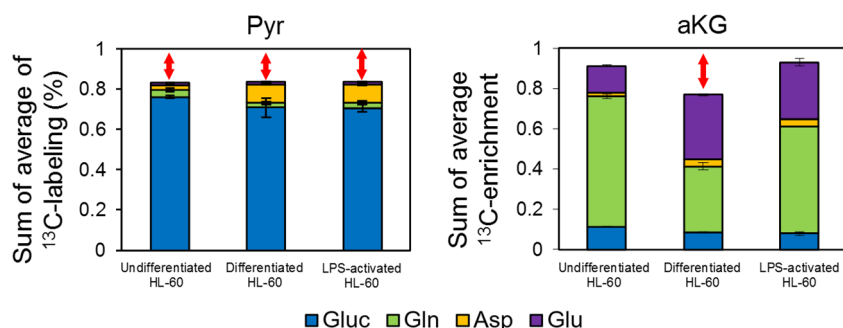


図 1 培地中の炭素源に由来する  $^{13}\text{C}$  が細胞内代謝物を標識した割合

これは、細胞内に蓄積した細胞構成成分から非標識の炭素源が中心炭素代謝経路に逆流している可能性を示唆している。

そこで、細胞自体を  $^{13}\text{C}$  標識グルコースでしばらく培養することで、細胞構成成分を  $^{13}\text{C}$  標識した細胞を調製し、非標識炭素源のみからなる培地中で培養して、中心代謝中間体に  $^{13}\text{C}$  標識が含まれるか調べた。その結果、リボース5リン酸やクエン酸に  $^{13}\text{C}$  標識が含まれていることが明らかとなり、核酸や脂肪酸の分解反応が起きていることが示唆された(図2)。

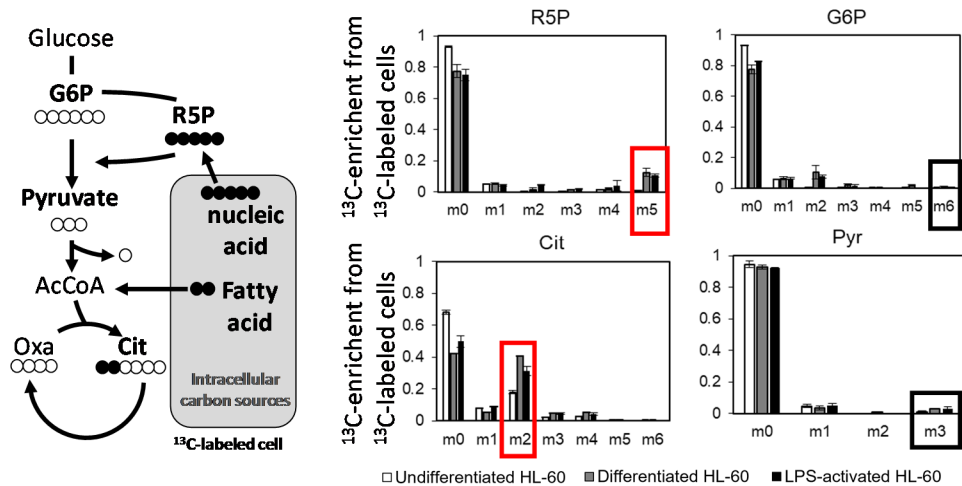


図2 細胞構成成分に由来する  $^{13}\text{C}$  が細胞内代謝物を標識した割合

そこで、これらの反応を新たに代謝モデルに追加し、以降の代謝フラックス解析に利用した。分化前後の細胞を  $[1,2-^{13}\text{C}]$  glucose で培養し、細胞内代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識割合と代謝物の取り込み、吐き出し速度情報を用いて代謝フラックス解析を行った。その結果、分化前の細胞は取り込んだグルコースの90%を解糖系、10%をペントースリン酸経路で代謝していた(図3A)。取り込んだグルコースの95%は乳酸として排出され、残りはTCAサイクルに流入し、取り込まれたグルタミンとともにTCAサイクルで酸化的に代謝されていた(図3A)。一方、分化したHL-60細胞では、グルコースの取り込みが70%に減少しており、ペントースリン酸経路は不活化していた(図3B)。一方、TCAサイクルに流入するフラックスには変化は見られなかった(図3B)。従来、分化前後で細胞の代謝は解糖系優位からTCAサイクルを介した酸化的リン酸化優位に切り替わることが示唆されてきたが、今回の結果は、分化に伴って解糖系の減少に対し、TCAサイクルのフラックスが維持されることで相対的に酸化的リン酸化でのATP再生の割合が高まることが分化による代謝変化の実態であることが明らかとなった。

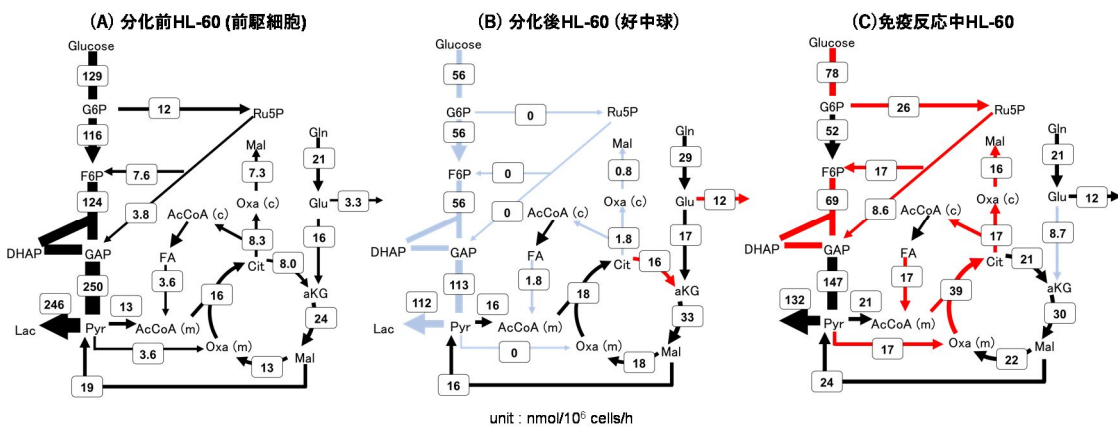


図3 HL-60の代謝フラックス分布

好中球は免疫応答によって中心炭素代謝経路で再生されるNADPHを利用して活性酸素種を産生し、外敵を排除する。そこで、分化後細胞に1 mg/mLのLPSを添加して免疫応答を誘導し、同様に  $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析を行った。その結果、分化に伴って減少していたグルコース取り込みが再び活性化し、ペントースリン酸経路のフラックスは分化前の2倍まで活性化した(図3C)。これは、活性酸素種の産生するために、ペントースリン酸経路でNADPHを再生したと考えられる。そこで中心代謝経路のNADPH再生経路に注目して、NADPHの再生と消費のバランスを比較した。その結果、イソクエン酸デヒドロゲナーゼやリンゴ酸酵素のフラックスもLPS刺激によって増加していたことから、これらの反応も活性酸素種の産生に関わっていることが示唆された。そこでこれらの代謝反応をそれぞれの小分子阻害剤で阻害したところ、活性酸素種の産生量の減少が確認された(図4)。このことから、これらの代謝反応で再生されるNADPHが免疫応答に重要であり、その反応の活性を調節することで免疫応答の強さを制御できる可能性が示唆され

た。本成果は論文誌に投稿中である。

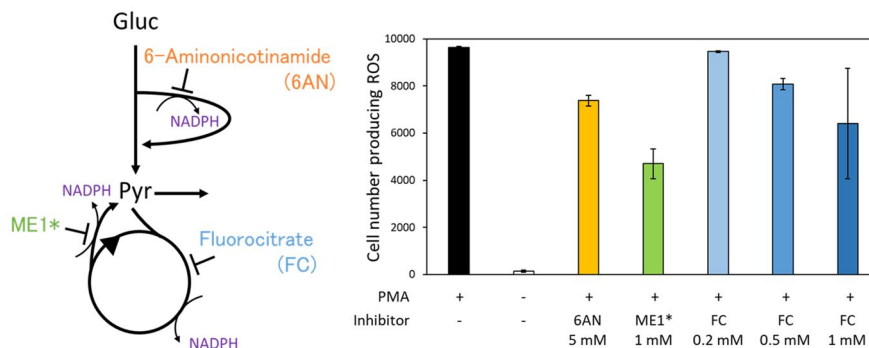


図4 代謝阻害剤が活性酸素種 (ROS) の産生に与える影響

(2) マクロファージモデル THP-1 細胞の解析

マクロファージモデル細胞 THP-1 の解析を行った。PMA を添加して 3 日間培養することでマクロファージ様に分化させ、ディッシュ底面に接着することを確認した。続いて、HL-60 の場合と同様に培地中の炭素源を一つずつフルラベル  $^{13}\text{C}$  標識体に置き換えることで中心炭素代謝に流入する代謝物を調べ、HL-60 と同様の代謝モデルを使用できることを確かめた。そこで、 $[1,2-^{13}\text{C}]$ glucose を用いて代謝フラックス解析を行った結果、未分化細胞は HL-60 と似通ったフラックス分布を示したのに対し、分化後細胞は、解糖系のフラックスが 5 倍近く活性化していることが明らかとなった (図 5)。中心炭素代謝経路での ATP の再生と消費のバランスを計算したところ、再生が消費を大きく上回っており、増殖や代謝以外の用途に ATP が使用されている可能性が示唆された。分化によって浮遊細胞から接着細胞に変容したことに注目し、接着を維持するためのアクチン重合に ATP が使用されている可能性が考えられた。そこで、アクチン重合を阻害するラトランクリンを追加して同様に THP-1 細胞を分化させたところ、グルコース取り込みの減少や接着強度の減弱が見られた。このことから THP-1 がマクロファージ様に分化して接着状態を維持するために、解糖系が重要な役割を果たすことが明らかとなった。本成果も論文にまとめている段階である。

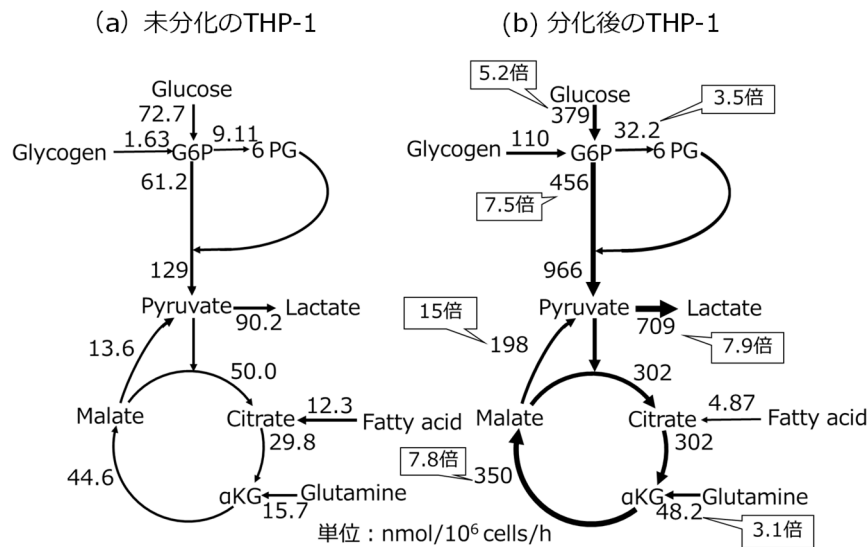


図5 THP-1 の代謝フラックス分布

以上のように、 $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析を分化細胞に適用できる代謝モデルを決定し、分化前後の細胞の代謝状態を定量的に比較することができた。また、分化に伴って活性化した代謝反応を阻害することで、その反応の役割と表現型との関連を明らかにすることができた。

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 1件）

1. 著者名 Okahashi Nobuyuki, Yamada Yuki, Iida Junko, Matsuda Fumio	4. 巻 12
2. 論文標題 Isotope Calculation Gadgets: A Series of Software for Isotope-Tracing Experiments in Garuda Platform	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 646 ~ 646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo12070646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 本谷真奈, 谷口起夫, 岡橋伸幸, 松田史生
2. 発表標題 質量分析法を用いた分化前後のヒト単球細胞株THP1の13C代謝フラックス解析
3. 学会等名 第69回質量分析総合討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeo Taniguchi, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda
2. 発表標題 Quantifying central carbon metabolism in neutrophils by using 13C-metabolic flux analysis
3. 学会等名 Metabolic engineering 14 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mana Hontani, Nobuyuki Okahashi, Takeo Taniguchi, Fumio Matsuda
2. 発表標題 13C-Metabolic Flux Analysis of Human Monocytic Leukemia Cell Line THP-1 before and after Differentiation
3. 学会等名 Metabolic engineering 14 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本谷真奈, 谷口赳夫, 岡橋伸幸, 松田史生
2. 発表標題 13C代謝フラックス解析を用いたマクロファージの分化による代謝変化の計測
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 夏のオンラインセミナー-2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡橋伸幸, 谷口赳夫, 松田史生
2. 発表標題 13C代謝フラックス解析法を用いた好中球の中心炭素代謝の解析
3. 学会等名 第15回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本谷真奈, 谷口赳夫, 岡橋伸幸, 松田史生
2. 発表標題 13C代謝フラックス解析を用いたマクロファージの分化に伴う代謝変化の解析
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口赳夫, 岡橋伸幸, 松田史生
2. 発表標題 13C代謝フラックス解析法を用いた好中球の中心炭素代謝の解析と機能制御への応用
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口赳夫, 岡橋伸幸, 松田史生
2. 発表標題 好中球の中心炭素代謝経路は活性酸素種産生能を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本谷真奈, 谷口赳夫, 岡橋伸幸, 松田史生
2. 発表標題 13C代謝フラックス解析を用いたマクロファージへの分化に関与する中心炭素代謝経路の探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡橋伸幸, 松田史生
2. 発表標題 同位体標識を用いた代謝トレーシング解析のためのソフトウェア開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口赳夫 岡橋伸幸 松田史生
2. 発表標題 質量分析法を用いた骨髄性前駆細胞株HL-60の13C代謝フラックス解析
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口赳夫 岡橋伸幸 松田史生
2. 発表標題 13C代謝フラックス解析を用いた好中球における中心炭素代謝の測定
3. 学会等名 第2回生物工学若手会2020オンライン
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeo Taniguchi Nobuyuki Okahashi Fumio Matsuda
2. 発表標題 Measurement of neutrophils metabolism using 13C-metabolic flux analysis
3. 学会等名 Metabolomics2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nobuyuki Okahashi Fumio Matsuda
2. 発表標題 Development of a data processing platform for isotope tracing experiments in Garuda
3. 学会等名 Metabolomics2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口赳夫 岡橋伸幸 松田史生
2. 発表標題 Clarification of relationship between neutrophils metabolism and differentiation/immune function
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡橋伸幸、松田 史生	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 334
3. 書名 メタボロミクス実践ガイド 13C標識トレーサー解析	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 同位体分布データ作成方法	発明者 岡橋伸幸、松田史生、岡本真美、山田洋平	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-027052	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------