

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16220

研究課題名（和文）D-グルタミン酸代謝酵素D-グルタミン酸シクラーゼのがん代謝における機能の解明

研究課題名（英文）Function of D-glutamate cyclase in colorectal cancer metabolism

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） 3,000,000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おり、アミノ酸代謝もその一つである。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-アミノ酸であるが、ヒトはいくつかのD-アミノ酸代謝酵素を有している。本研究では、D-グルタミン酸の代謝に関わるC14orf159がヒト大腸がんの増殖能、浸潤能、転移能を抑制することを見出した。そのメカニズムとして、C14orf159が大腸がんの転移に関与するMMP、Wntファミリーの遺伝子発現を抑制していることを示し、その遺伝子発現制御にはC14orf159が維持するミトコンドリア膜電位が関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞がL-アミノ酸代謝を改変していることは広く知られており多くの研究がなされている。しかし、がん細胞におけるD-アミノ酸代謝酵素の機能は、申請者らがこれまでの研究で示した大腸がんにおけるSerine racemaseの機能以外は明らかになっていなかった。本研究は、もう一つのD-アミノ酸代謝酵素であるC14orf159の大腸がんにおける機能を明らかにした。これらは、これまで未知であった「D-アミノ酸代謝酵素群」のがんにおける機能を明らかにするものであり学術的意義を有している。

研究成果の概要（英文）：Reprogramming of metabolism, including amino acid metabolism, is a hallmark of cancer, and it supports their growth and metastasis. Most of the amino acids which consist of the human body are L-amino acids. However, human beings possess several D-amino acid metabolising enzymes, whose functions have not been well elucidated in cancer. In this study, we found that C14orf159, which is involved in D-glutamic acid metabolism, suppressed the proliferative, invasive and metastatic potential of human colorectal cancer. As a mechanism, we showed that C14orf159 suppresses the gene expression of MMP and Wnt family involved in the metastasis of colorectal cancer, and found that the mitochondrial membrane potential maintained by C14orf159 might be involved in the regulation of these gene expression.

研究分野：実験病理 人体病理 腫瘍代謝

キーワード：腫瘍代謝 大腸がん ミトコンドリア C14orf159

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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おり、アミノ酸代謝もその一つである。アミノ酸にはL型、D型の2種類の光学異性体が存在し、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-アミノ酸である。しかし、ヒトはいくつかのD-アミノ酸代謝酵素を有している。例えば、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を産生する Serine racemase や、D-グルタミン酸を 5-oxo-D-プロリンへ代謝する D-glutamate cyclase (C14orf159) が近年同定されている (Wolosker H, et al. *PNAS*. 1999), (Ariyoshi M, et al. *Sci Rep*. 2017)。しかし、これらのD-アミノ酸代謝酵素ががんの悪性度に寄与するかどうかは明らかにされていなかった。申請者はこれまで大腸がんにおいてD-アミノ酸代謝酵素群が特徴的な発現パターンを示すことを見出し、その中でも Serine racemase が大腸がんでは発現が上昇しており、L-セリンからピルビン酸を産生することで大腸がんの増殖を促進することを示していた (Ohshima K, et al. *Nat Metab*. 2020)。一方で、D-グルタミン酸の代謝に関わる C14orf159 は大腸がんでは発現が低下することを見出していたが、大腸がんの悪性度に寄与するかは明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、C14orf159 が大腸がんの代謝においてどのような役割を担い、大腸がん細胞の悪性度にどのように寄与するかを明らかにする。そして、Serine racemase とともに大腸がんにおける「D-アミノ酸代謝酵素群」の機能を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

まず、(1)ヒト大腸がん切除検体およびリンパ節転移巣、遠隔転移巣の切除検体を用いて C14orf159 の免疫組織化学染色を行い、原発巣のがん部分および転移巣における C14orf159 の発現分布を調べる。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、原発巣の検体においては同一パラフィン切片上の腫瘍部分と非腫瘍部分の C14orf159 の染色性をスコア化し評価を行う。また、免疫組織化学染色で得られた結果が TCGA などの他のデータベースにおいても見出されるか検討する。

次に、(2)大腸がん細胞にける C14orf159 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 C14orf159 ノックアウト細胞を作成し、増殖能、移動能、浸潤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, Lovo が C14orf159 を高発現していることを見出し、HCT116, Lovo を用いて C14orf159 ノックアウト細胞を作成する。これらの細胞を用いて増殖能、移動能、浸潤能の解析や gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) によるメタボローム解析、RNA-sequencing 解析を行う。また、C14orf159 はマウスの心筋細胞においてミトコンドリアに局在することが報告されており (Ariyoshi M, et al. *Sci Rep*. 2017)、ヒト大腸がん細胞においてもミトコンドリアに局在するかを共焦点顕微鏡および単離したミトコンドリアを用いたウェスタンブロットで調べる。そして、ミトコンドリアの量、膜電位を Mitotracker, TMRE を用いてフローサイトメトリーにより解析する。また、ミトコンドリアの形態を電子顕微鏡を用いて解析する。

最後に、(3)ヌードマウスを用いて上記大腸がん細胞を皮下移植および脾内移植し、C14orf159 が *in vivo* において大腸がん細胞の増殖能、転移能に寄与するかを調べる。また、採取した腫瘍および肝転移巣の組織切片を作成し、免疫組織化学染色などの併用により組織学的な変化を詳細に観察する。

4. 研究成果

(1) C14orf159 はヒト大腸がんの増殖能、浸潤能、転移能を抑制する

まず、ヒト大腸がん切除検体 92 例とリンパ節転移巣 37 例、遠隔転移巣 8 例を用いて C14orf159 の免疫組織化学染色を行った。すると、原発巣の大腸がん検体のがん部分では C14orf159 の発現分布に heterogeneity が認められ、腫瘍の表層と比較し浸潤先進部で発現が低い傾向が認められた (図 1)。さらに、リンパ節転移巣、遠隔転移巣においては対応する原発巣と比較し、C14orf159 の発現が低い傾向が認められた。これらの結果から、C14orf159 が大腸がんの浸潤能、転移能に寄与する可能性が示唆された。そこで、C14orf159 高発現株である HCT116, Lovo を用いて C14orf159 ノックアウト細胞を作成し、*in vitro* で増殖能、浸潤能を解析した。すると、C14orf159 ノックアウト細胞では移動能、浸潤能の亢進が認められ、マトリゲルを用いた 3 次元培養下で spheroid の増殖能の亢進が認められた。次に、ヌードマウスを用いて大腸がん細胞株を皮下移植および脾内移植し、C14orf159 が *in vivo* においても大腸がん細胞の増殖能、転移能に寄与するかを調べた。すると、C14orf159 ノックアウト細胞で皮下移植腫瘍の増大傾向と脾内移植後の肝転移巣の増加傾向が認められた。これらの結果から、C14orf159 はヒト大腸がんの増殖能、浸潤能、転移能を抑制することが示唆された。

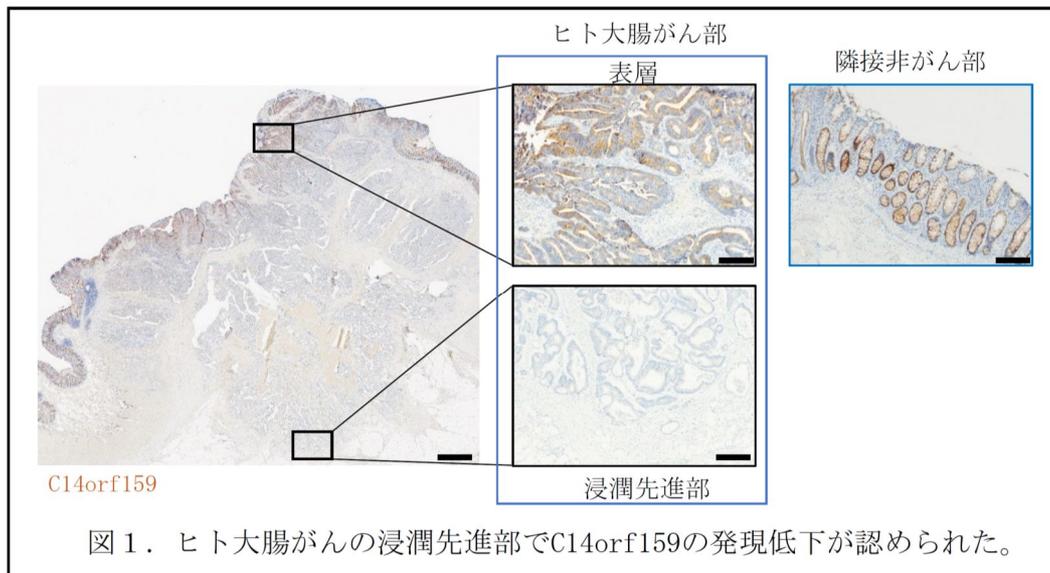


図1. ヒト大腸がんの浸潤先進部でC14orf159の発現低下が認められた。

(2) C14orf159 はヒト大腸がん細胞においてミトコンドリアマトリックスに局在しミトコンドリア膜電位を維持する

次に C14orf159 がヒト大腸がん細胞の代謝に及ぼす影響を調べた。まず、C14orf159 はマウスの心筋細胞においてミトコンドリアに局在することが報告されていることから、ヒト大腸がん細胞においてもミトコンドリアに局在するかを共焦点顕微鏡とウェスタンブロットにより解析した。すると Mitotracker を用いた共焦点顕微鏡による観察下において C14orf159 はミトコンドリアと共局在しており、単離したミトコンドリア画分を用いたウェスタンブロットでも C14orf159 とミトコンドリアの共局在が確認された。さらに Proteinase K protection assay によりミトコンドリアにおける局在を調べたところ、C14orf159 はミトコンドリアのマトリックスに局在することが確認された。そして、フローサイトメトリー、電子顕微鏡を用いた解析により C14orf159 のノックアウトはミトコンドリアの量、形態には影響を及ぼさないが、膜電位を低下させることが確認された。次に、GC-MS によるメタボローム解析を行ったところ、C14orf159 ノックアウト細胞では、アスパラギン、アスパラギン酸の低下とグルタチオンの増加が認められた。

(3) C14orf159 は MMP ファミリー、Wnt ファミリーの発現を抑制する

C14orf159 が遺伝子発現に及ぼす影響を RNA-sequencing 解析により調べた。すると、C14orf159 ノックアウト細胞では、大腸がんの浸潤、転移に重要な MMP ファミリー、Wnt ファミリーの発現増加が認められた。ミトコンドリアの膜電位が遺伝子発現を制御するという知見がマクロファージで報告されていたため (Sanin D, et al. *Immunity*. 2018)、C14orf159 が維持するミトコンドリア膜電位が上記の遺伝子発現に影響を及ぼす可能性を検討した。C14orf159 ノックアウト細胞に C14orf159 を定常発現させミトコンドリアの膜電位を上昇させた細胞を低用量 valinomycin で処理し膜電位を低下させると、C14orf159 の定常発現により低下した Wnt6 の遺伝子発現が増加した。このことから、C14orf159 はミトコンドリアの膜電位を維持することで上記の遺伝子の発現を抑制している可能性が示唆された。また、Wnt ファミリーの遺伝子発現の抑制が C14orf159 の大腸がん転移抑制能に寄与しているかを、ヌードマウスの肝転移巣を用いて活性型 カテニンの免疫組織化学染色を行い検討したところ、C14orf159 ノックアウト細胞から得られた転移巣において活性型 カテニンの発現増加が認められた。これらのことから、C14orf159 は MMP ファミリー、Wnt ファミリーの発現の抑制を介して大腸がんの浸潤能、転移能を抑制していることが示唆された。

(4) ミトコンドリアは大腸がんにおいてヒストンのアセチル化を維持する

大腸がんにおける C14orf159 の機能を解析する過程において、ミトコンドリアが大腸がん細胞のヒストンのアセチル化、特にスーパーエンハンサーのマーカであるヒストン H3 の 27 番目のリジンのアセチル化 (H3K27ac) を維持することを副次的に見出した。まず、ヒト大腸がん組織検体においてミトコンドリア外膜タンパク質である TOMM20、そしてミトコンドリア DNA の転写に寄与する TFAM と H3K27ac の免疫組織化学染色を行ったところ、がん部では TOMM20、TFAM の発現が上昇し H3K27ac が増加していることを見出した。そして、ミトコンドリア阻害剤で処理、あるいはミトコンドリア DNA を除去したヒト大腸がん細胞では H3K27ac が低下していることを見出した。さらに、がん細胞の増殖特性である非足場依存性培養下において、ミトコンドリアの量の増加とともに H3K27ac の増加が認められた。これらの結果により、大腸がん細胞におい

てミトコンドリアが H3K27ac の維持に寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Ohshima Kenji, Oi Ryo, Nojima Satoshi, Morii Eiichi	4. 巻 256
2. 論文標題 Mitochondria govern histone acetylation in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5818	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Ohshima Kenji, Oi Ryo, Okuzaki Daisuke, Motooka Daisuke, Shinohara Masakazu, Nojima Satoshi, Morii Eiichi	4. 巻 125
2. 論文標題 Mitochondrial matrix protein C14orf159 attenuates colorectal cancer metastasis by suppressing Wnt/ -catenin signalling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1699 ~ 1711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-021-01582-9	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Ohshima Kenji, Morii Eiichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Metabolic Reprogramming of Cancer Cells during Tumor Progression and Metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 28 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo11010028	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 -
1. 著者名 大島健司、森井英一	4. 巻 4
2. 論文標題 がん細胞特異的代謝を標的とした治療戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 1202 ~ 1205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大島健司
2. 発表標題 c14orf159 loss facilitates colorectal cancer cell invasion through upregulates Wnt signaling
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大島健司
2. 発表標題 大腸がんの増殖と転移を司る新たな代謝酵素群
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大島健司
2. 発表標題 Serine racemase promotes colorectal cancer growth and is a new therapeutic target for colorectal cancer
3. 学会等名 Manchester Pathology 2021（英国病理学会）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大島健司
2. 発表標題 ミトコンドリア局在タンパク質C14orf159の大腸がん細胞の浸潤・転移における機能
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大島健司
2. 発表標題 大腸がんの増殖を促進する新たな代謝経路の解明
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------