

ニュートリオミクスから迫るがんアミノ酸代謝適応システムの解明

Mechanism of cancer metabolism adaptation to amino acids deficiency through nutriomics approach

代表研究者	東京大学	大澤 毅	The University of Tokyo	Tsuyoshi OSAWA
協同研究者	東京大学	児玉 龍彦	The University of Tokyo	Tatsuhiko KODAMA
	東京大学	油谷 浩幸	The University of Tokyo	Hiroyuki ABURATANI
	慶応大学	曾我 朋義	Keio University	Tomoyoshi SOGA
	名古屋大学	島村 徹平	Nagoya University	Teppei SHIMAMURA

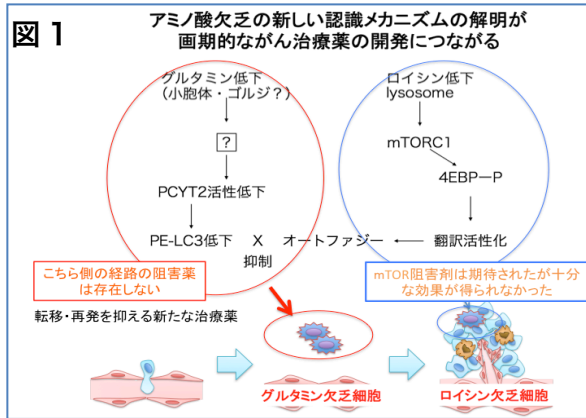
Extreme tumor microenvironments such as hypoxia, nutrient starvation and acidic pH induce tumor aggressiveness including metastasis, invasion and drug resistance. We reported metabolic adaptations through glycolysis, lipid/acetate acid metabolism and glutamine metabolism may contribute to promote the malignant transformation of cancer (*Cell Reports* 2017, *Cell Reports* 2019, *Nat Commun.* 2022). In recent years, adaptive mechanism of cancer cells in amino acid metabolism has attracted attention in cancer research. Deficiency of essential amino acids such as leucine isoleucine and valine regulates an amino acid recognition mechanism mediated by mTOR complex. On the other hand, the we found that cancer cells may utilize unknown amino acid recognition mechanism through the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum transport independent of mTOR complex, when deficient in non-essential amino acids “glutamine”. In the future, using comprehensive nutriomics approach which enables integration of multilayered data analysis of this research, we will elucidate a novel sensing mechanism for amino acid deficiency within the tumor microenvironments. Using our nutriomics approach, we will develop cancer treatment against tumor aggressiveness.

研究目的

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(*Science* 1956)。低酸素環境におけるがん細胞は低酸素誘導因子(HIF1 α)を介し解糖系(ワーブルグ効果)を促進し(*Cell* 2008)、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(*Nature Review Cancer* 2017)。申請者やCorbetらは、低pHのがん細胞はステロール調節配列結合蛋白(SREBP2)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(*Cell Metabolism* 2016, *Cell Reports* 2017, *Nature Commun.* 2017)。

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、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・転移などががんの進展・悪性を促すだけでなく、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*)。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(図1)。



本研究第1の目的は、がん微小環境でがん細胞の生存の鍵となる mTOR 複合体非依存的なアミノ酸感知・適応機構の解明である。また、アミノ酸を始めとする代謝物のシグナル伝達機構は、核、ミトコンドリア、小胞体、リソソームなどの細胞小器官ごとに異なることが考えられるが、細胞小器官ごとの詳細な代謝物の解析はこれまで困難であった。

そこで本研究第2の目的は、1アミノ酸に起因する代謝機構は細胞小器官でどのように変動するかである。本研究の成果から将来的には、がん細胞で鍵となるアミノ酸感知適応機構を標的とした画期的ながん治療法の開発に繋がることを期待できる。

具体的には、本研究は、「がん微小環境におけるアミノ酸欠乏の感知・適応システムの理解」を目的とし、(1)アミノ酸欠乏感知機構の解明、(2)低酸素・低栄養・低 pH ストレス応答と糖・脂質・アミノ酸代謝クロストークの検討、(3)がん微小環境における細胞相互作用の解析、の3項目について検討した。

本研究は、これまで申請者が行ってきた細胞レベルの単なるオミクス情報取得研究とは全く異なり、細胞小器官ごと、且つ、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、mTOR 非依存的なアミノ酸感知・適応システムの解明を目指す独創的且つ挑戦的な課題である。本研究は、小児科領域の難治性疾患である先天性アミノ酸代謝異常疾患の病態生理解明や治療法にも将来的には応用可能であり、さらに「mTOR 研究」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可能性があり学術的、医療経済的な波及効果を有する課題である。

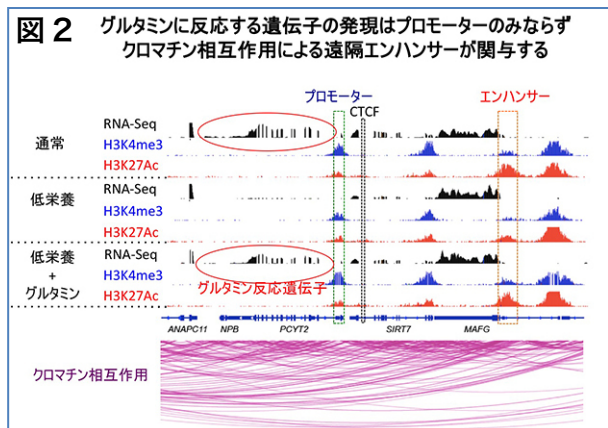
研究経過

腫瘍微小環境におけるがん細胞は mTOR 非依存的なアミノ酸感知・適応機構を介しがん悪性を促進するという研究仮説をもとに、申請者が持つ独自の低栄養培養系(PNAS 2011, Cell Reports 2017)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、エピゲノム解析やメタボローム解析を正常細胞とがん(HeLa, PANC1)細胞を比較した。具体的には、申請者独自の実験系を駆使して本研究期間内で、以下の3項目を検討した。

(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、その他アミノ酸欠乏の感知機構は未だ不明な点が多い。本研究は、独自の低栄養培地に各アミノ酸のみを添加した培地を作成し20種類の各アミノ酸存在下で、繊維芽細胞とがん細胞(HeLa, PANC1 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、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する。既に、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遺伝子群を見出した(図2)。



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、プロモーター、エンハンサーの同定、クロマチン相互作用のデータとの統合解析から、パスウェイ解析で得られなかった上流制御因子やアミノ酸トランスポーターなど各アミノ酸欠乏で必須となる感知機構を解明を目的とし研究を行った。申請者は、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・制御因子候補として NRF2 を同定した。近年、薬剤耐性や転移浸潤能を持つパーシスターがん細胞に NRF2 が関与することが報告されているが(Cell 2021)、申請者らは、この NRF2 依存的なパーシスターがん細胞のメカニズムに新たにグルタミン依存的なエピゲノム制御が関与する可能性を見出した(未発表データ)。

(2)低酸素・低栄養・低 pH ストレス応答と糖・脂質・アミノ酸代謝クロストークの検討

がんの増殖・転移・浸潤・薬剤耐性などの悪性化には、がん微小環境が重要な役割を果たす。申請者は、がん細胞が低酸素・低栄養・低 pH の過酷ながん微小環境で、解糖系・脂質代謝・アミノ酸代謝の多重の代謝適応システムを介して悪性化することを報告してきた (*PNAS* 2011, *Cell Reports* 2017 図 4)。また、ロイシン、イソロイシン、バリンなどの分岐鎖必須アミノ酸は、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 、ATF4、SREBP2 のストレス適応機構と協調的に働くことが近年示唆され、mTOR 複合体を介したストレス応答とアミノ酸代謝研究が注目されている (Manning ら, *Cold Spring Harbor*)。

一方、申請者は、がん微小環境において、低酸素・低栄養・低 pH の組み合わせが、低酸素誘導転写因子 HIF1 α の下流として知られる血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現や低栄養 (小胞体ストレス) 応答転写因子である ATF3 の発現を相乗的に誘導することを見出している (図 3)。これら転写応答機構を、申請者独自の 1 アミノ酸培養系で行い、低酸素・低栄養・低 pH、および、HIF1 α ・ATF4・SREBP2 のストレス適応とアミノ酸シグナルがどのように協調的に働くか、エンハンサー領域のモチーフ解析、発現遺伝子のシークエンス解析やメタボローム解析を行った。本研究では、これまで申請者が報告してきた糖、脂質、アミノ酸にわたる多重の適応機構を、低酸素・低栄養・低 pH の「組み合わせ」で、HIF1 α ・ATF4・SREBP2 のストレス適応機構が相補的に制御している可能性を見出した。この様に、がん細胞の多重の代謝適応機構に寄与する転写因群の組み合わせの統合的な理解は、がん微小環境におけるがん細胞の悪性化にはにおけるその多重の転写適応機構の解明に必須であると考えられる。この詳細なメカニズムは、現在も引き続き検討を続けており将来必ず明らかにしたいと考えている。

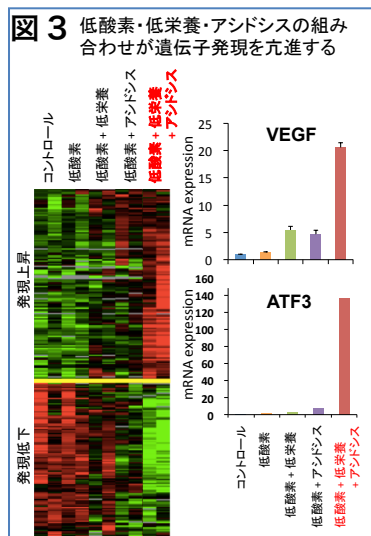
(3) がん微小環境における細胞間相互作用の解析

申請者はこれまで、がん細胞における低酸素・低栄養・低 pH に対する適応機構を解明してきた。しかし、がん微小環境には、がん細胞の他に、線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞など多様な細胞が存在し、これらの細胞間の代謝物を介した相互作用ががんの進展に寄与することが知られている。そこで

本研究項目では、がん細胞と線維芽細胞や免疫細胞との細胞間代謝物の相互作用が、如何にがんの進展に寄与するか解明を試みた。申請者らは、必須アミノ酸や細胞間相互作用におけるアミノ酸の役割を、膀胱癌細胞と PSC の共培養マウスモデルと子宮頸がん (HeLa, A431 細胞) +vCAF 共移植モデルを比較対象に用いて、1 細胞解析、スライドシーク、メタボローム解析で検討した結果、線維芽細胞由来の必須アミノ酸により、がん細胞と協調して腫瘍微小環境内の免疫細胞の免疫寛容に寄与する可能性を見出し、現在論文の投稿に向けて準備中である。本研究よりがん悪性化を促進する新しいアミノ酸欠乏の感知・適応システムを細胞連関の視点から解明し、新たな治療法の開発に繋がりたいと考えている。

考察

がん代謝研究は 1950 年代のワーバーグ効果提唱に端を発し、近年のメタボローム解析技術の革新により大きく発展し競争を増している。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 (*Cell* 2008)、乳酸や H⁺ の細胞外排出により微小環境の一部は低 pH に陥る (*Nature Review Cancer* 2017)。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た (*Cell Metabolism* 2016, *Cell Reports* 2017, *Nature Commun.* 2017)。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, *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 複合体を介さない細胞小器官の変動を伴ったアミノ酸欠乏感知・適応機構が存在する可能性を見出している



(図2、図3)。

本研究は、腫瘍微小環境で鍵となる mTOR 複合体非依存的なアミノ酸感知・適応機構の解明に挑戦した。また、代謝シグナル伝達機構は、核、ER、リソソームなどの細胞小器官ごとに異なることが知られているが、細胞小器官ごとの詳細なメタボローム解析はこれまで困難であった。本研究から将来的には、1アミノ酸に起因する細胞小器官ごとの代謝機構の解明に挑み、低栄養で悪性化するがん細胞を攻略する画期的ながん治療法の開発に繋がることを期待できる。

また、本研究は、小児科領域の難治性疾患である先天性アミノ酸代謝異常疾患の病態生理解明や治療法にも応用可能であり、さらに「mTOR 研究」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可能性がある学術的、医療経済的な波及効果を有する課題である。本研究を発端として今後さらに本研究を発展させて、アミノ酸代謝異常疾患の新たな概念提唱に挑戦したい。

研究の発表

口頭発表 (主な招待講演)

1. 大澤毅、ニュートリオミクスから迫るオルガネラダイナミクス” iSeminar (異分野融合セミナー), (ZOOM) , May. 12, 2022
2. 大澤毅、 “ニュートリオミクスから迫るがんの治療戦略” 第4回 JST 産学共創プラットフォーム共同研究推進プログラム TUT-OPERA Webinar, (ZOOM) , Dec. 9, 2021
3. 大澤毅、 “造血細胞、エクソソーム、多階層オミクス解析からみる全身性疾患生物学” 第94回日本生化学会, 横浜 (ZOOM) , Nov. 3-5, 2021
4. 大澤毅、 “がん微小環境におけるがん細胞と線維芽細胞の代謝相互作用” 第80回日本癌学会学術総会, 横浜 , Sep. 30-Oct. 2, 2021
5. 大澤毅、 “ニュートリオミクス、がんと代謝” 2021年度若手支援技術講習会, WEB 開催, Sep. 6, 2021
6. 大澤毅、 “ニュートリオミクスから迫るがん悪性化機構の解明” 第121回北海道癌談話会春

季シンポジウム, 札幌 (ZOOM) , Jun. 26, 2021

7. 大澤毅、 “ニュートリオミクス、がんと代謝” 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会, 東京, May. 28, 2021
8. 大澤毅、 “がん微小環境におけるエピジェネティック制御” 第14回日本エピジェネティクス研究会, 名古屋, 31 March, 2021
9. 大澤毅、 “Integrative Nutriomics Approach for understanding Cancer and Metabolism” International Conference on Cancer Systems Biology Beyond, 東京 Jan. 29, 2020

誌上発表

1. Aki S, Nakahara R, Maeda K, Osawa T[§]. Cancer metabolism within tumor microenvironments. *Biochemica et Biophysica Acta*, 2023. In press ([§] Correspondence)
2. Nakahara R, Maeda K, Aki S, Osawa T[§]. Metabolic adaptations of cancer in extreme tumor microenvironments. *Cancer Science*, 2023. In press ([§] Correspondence)
3. Hirose S, Waku T, Tani M, Masuda H, Endo K, Ashitani S, Aketa I, Ktano H, Nakada S, Wada A, Hatanaka A, Osawa T, Soga T, Kobayashi A. NRF3 activates mTORC1 arginine-dependently for cancer cell viability. *iScience*. 2023 In press.
4. Kaneko Y, Yamatsugu K, Yamashita T, Takahashi K, Tanaka T, Aki S, Tatsumi T, Kawamura T, Miura M, Ishii M, Ohkubo K, Osawa T, Kodama K, Ishikawa S, Tsukagoshi M, Chansler M, Sugiyama A, Kanai M, Katoh H, Pathological complete remission of relapsed tumor by photo-activating antibody-mimetic drug conjugate treatment, *Cancer Science*, Sep 19, 2022.
5. Pan M, Zorbas C, Sugaya M, Ishiguro K, Kato M, Nishida M, Zhang H, Candeias MM, Okamoto A, Soga T, Aburatani H, Sakai J, Matsumura Y, Suzuki T, Proud CG, Lafontaine DLJ, Osawa T[§], Glutamine deficiency in solid tumors confers resistance to

- ribosomal RNA synthesis inhibitors. *Nat Commun.* 13, 3706, 2022.
6. Nagata N, Nishijima S, Kojima Y, Hisada Y, Imbe K, Miyoshi-Akiyama T, Suda W, Kimura M, Aoki R, Sekine K, Ohsugi M, Miki K, **Osawa T**, Ueki T, Oka S, Mizokami M, Kartal E, Schmidt TSB, Molina-Montes E, Estudillo L, Malats N, Trebicka J, Kersting S, Langheinrich M, Bork P, Uemura N, Itoi T, and Kawai T, Metagenomic identification of microbial signatures predicting pancreatic cancer from a multinational study. *Gastroenterology.* 163, 222-238, 2022
 7. Murakami K, Sasaki Y, Asahiyama M, Yano W, Takizawa T, Kamiya W, Matsumura Y, Anai M, **Osawa T**, Fruchart JC, Fruchart-Najib J, Aburatani H, Sakai J, Kodama T and Tanaka T, Selective PPAR α Modulator Pemafibrate and Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Tofogliflozin Combination Treatment Improved Histopathology in Experimental Mice Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis, *Cells.* 11(4), 720, 2021.
 8. Yamatsugu K, Katoh H, Yamashita T, Takahashi K, Aki S, Tatsumi T, Kaneko Y, Kawamura T, Miura M, Ishii M, Ohkubo K, **Osawa T**, Kodama T, Ishikawa S, Kanai M, Sugiyama A. Antibody mimetic drug conjugate manufactured by high-yield Escherichia coli expression and non-covalent binding system. *Protein Expr Purif.* doi: 10.1016/j.pep.2021.
 9. Yoneshiro T, Kataoka N, Walejko JM, Ikeda K, Brown Z, Yoneshiro M, Crown SB, **Osawa T**, Sakai J, McGarrah RW, White PJ, Nakamura K, and Kajimura S, Metabolic flexibility via mitochondrial BCAA carrier SLC25A44 is required for optimal fever. *eLife*, 10, e66865, 2021.
 10. Muramatsu M[#], **Osawa T**[#], Miyamura Y, Nakagawa S, Tanaka T, Kodama T, Aburatani H, Sakai J, Ryeom S, Minami T. Loss of Down syndrome critical region-1 leads to cholesterol metabolic dysfunction that exaggerates hypercholesterolemia in ApoE-null background. *Journal of Biological Chemistry*, 296 : 100697, 2021.
 11. Shirai K, Nagae G, Seki M, Kudo Y, Kamio A, Hayashi A, Okabe A, Ota S, Tsutsumi S, Fujita T, Yamamoto S, Nakaki R, Kanki Y, **Osawa T**, Midorikawa Y, Tateishi K, Ichinose M, Aburatani H. TET1 upregulation drives cancer cell growth by aberrant enhancer hydroxymethylation of HMG2A in hepatocellular carcinoma. *Cancer Science*, 112(7), 2855-2869, 2021.
 12. Morihiro K, Ishinabe T, Takatsu M, Osumi H, **Osawa T**, Okamoto A. Fluoxuridine Oligomers Activated under Hypoxic Environment. *J. Am. Chem. Soc.* 143, 9, 3340–3347, 2021.
 13. Muramatsu M[#], Nakagawa S[#], **Osawa T**[#], Toyono T, Uemura A, Kidoya H, Takakura N, Usui T, Ryeom S, Minami T. Loss of Down Syndrome Critical Region-1 Mediated-Hypercholesterolemia Accelerates Corneal Opacity Via Pathological Neovessel Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 40, 2425-2439, 2020.
 14. Sasaki Y, Asahiyama M, Tanaka T, Yamamoto S, Murakami K, Kamiya W, Matsumura Y, **Osawa T**, Anai M, Fruchart JC, Aburatani H, Sakai J, Kodama T. Pemafibrate, a selective PPAR α modulator, prevents non-alcoholic steatohepatitis development without reducing the hepatic triglyceride content. *Scientific Reports*, 10, 7818, 2020.