

博士論文

低 pH 腫瘍微小環境における代謝適応機構の解明

東京大学大学院・工学系研究科・先端学際工学専攻

加藤 美樹

## 目次

略語一覧	6
第1章 序章	8
1-1 研究の背景	8
1-2 研究の目的	24
第2章 低 pH 環境におけるがん細胞の代謝変動の検証	25
2-1 緒言	25
2-2 実験方法	26
2-2-1 細胞培養	26
2-2-2 通常(pH7.4)・低 pH(pH6.8)培養培地調製	26
2-2-3 低酸素・低栄養培養培地調製	27
2-2-4 メタボローム解析	27
2-2-5 CE-TOF-MS によるポリアミン代謝、メチオニン代謝及び尿素回路 関連の代謝物定量	28
2-2-6 培養細胞からの RNA 抽出	31
2-2-7 RNA-seq (RNA sequencing)	31
2-2-8 逆転写反応による cDNA 合成	32
2-2-9 RT-qPCR (Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction)	32
2-3 結果	33
2-3-1 低酸素・低栄養・低 pH(pH6.8)培養における代謝物変動の検討	33
2-3-2 低酸素・低栄養・低 pH(pH6.8)培養下における変動代謝経路の検討	35
2-3-3 低 pH(pH6.8)培養下のポリアミン経路代謝物 N1-アセチルスペルミ ジンの変動	41

2-3-4	低 pH(pH6.8)培養下における SAT1 発現変動 .....	41
2-3-5	低 pH(pH6.8)培養下におけるポリアミン代謝経路関連代謝物の変動 .....	45
2-3-6	低 pH(pH6.8)培養下におけるポリアミン代謝関連酵素の遺伝子発現変動の検証 .....	45
2-3-7	低 pH(pH6.8) 培養下における尿素回路酵素の遺伝子発現及び代謝物の変動 .....	45
2-3-8	低 pH(pH6.8) 培養下におけるメチオニンサルベージ回路及びメチオニン回路酵素の遺伝子発現及び代謝物の変動 .....	49
2-4	考察 .....	57
第3章 ポリアミンが低 pH 培養下でがん細胞の生存維持に及ぼす影響 .....		59
3-1	緒言 .....	59
3-2	実験方法 .....	60
3-2-1	細胞増殖 (SRB) アッセイ .....	60
3-2-2	ミトコンドリア膜電位測定 .....	60
3-2-3	OCR の測定 .....	61
3-2-4	培養細胞からの全細胞タンパク質抽出液の調整 .....	61
3-2-5	イムノブロット法(MAPK、p-MAPK、Akt、p-Akt) .....	62
3-3	結果 .....	64
3-3-1	PANC-1、HeLa 細胞における低 pH (pH6.8) 培養 72 時間後の、細胞増殖に対するポリアミンの影響 .....	64
3-3-2	PANC-1 細胞における、通常 (pH7.4) 培養、低 pH (pH6.8) 培養下でのミトコンドリア膜電位に対するポリアミンの影響 .....	68
3-3-3	N1-アセチルスペルミジン添加による N1-アセチルスペルミジン取り込み量の測定 .....	68

3-3-4	酸素消費量に対するポリアミンの影響の検証 .....	71
3-3-5	Akt、Erk1/2 発現に及ぼすポリアミンの影響 .....	71
3-4	考察 .....	76
第4章	SAT1 が低 pH (pH6.8) 環境培養下で腫瘍微小環境に及ぼす影響 ..	78
4-1	緒言 .....	78
4-2	実験方法 .....	79
4-2-1	Small interference (siRNA)導入法 .....	79
4-2-2	Vector ウイルス導入による SAT1 の過剰発現細胞作成方法 .....	79
4-2-3	イムノブロット法(SAT1) .....	80
4-2-4	RT-qPCR .....	80
4-2-5	代謝物測定法 .....	81
4-2-6	クロマチン免疫沈降法(Chromatin immunoprecipitation, ChIP) ...	81
4-2-7	細胞増殖 (SRB) アッセイ .....	83
4-2-8	腫瘍移植による腫瘍増殖試験 .....	83
4-2-9	腫瘍中 RNA の抽出方法及び RT-qPCR 方法 .....	83
4-2-10	腫瘍代謝物 .....	84
4-2-11	免疫染色法 .....	84
4-2-12	生存率分析 .....	85
4-3	結果 .....	86
4-3-1	RNAi 干渉法を用いた SAT1 の発現抑制、及びウイルスベクターを用いた SAT1 の過剰発現による影響の検討 .....	86
4-3-2	低 pH (pH6.8) 培養下における SAT1 転写因子の発現変動 .....	86
4-3-3	低 pH (pH6.8) 環境で SAT1 が発現制御する代謝酵素の探索 .....	86
4-3-4	低 pH (pH6.8) 環境における SAT1 発現と連動する代謝物の探索 ..	92

4-3-5	低 pH (pH6.8) 培養下における細胞増殖に対する SAT1 の影響の検討 .....	92
4-3-6	低 pH (pH6.8) 培養下における ODC1 阻害剤が細胞増殖に及ぼす影響の検討 .....	92
4-3-7	SAT1 発現抑制細胞の腫瘍形成能評価 .....	97
4-3-8	移植腫瘍に対する免疫細胞の浸潤及び血管新生の定量 .....	97
4-3-9	低 pH(pH6.8)培養下におけるケモカイン遺伝子発現の上昇検証...104	
4-3-10	低 pH(pH6.8)培養下における N1-アセチルスペルミジン放出量の検証 .....	104
4-3-11	臨床がんにおける SAT1 発現と予後の関係の検討 .....	109
4-4	考察 .....	111
第5章	低 pH (pH6.8) 培養下におけるオンコメタボライトの解析 .....	113
5-1	緒言 .....	113
5-2	実験方法 .....	114
5-2-1	標準品 .....	114
5-2-2	測定条件及び試薬、試液 .....	114
5-2-3	ノンターゲット解析方法 .....	114
5-3	結果 .....	115
5-3-1	PANC-1 細胞の低 pH(pH6.8)培養下で変動する代謝物に対するノンターゲット解析 .....	115
5-4	考察 .....	119
第6章	結語 .....	120
	参考文献 .....	123
	謝辞 .....	132

## 略語一覽

AP1: activator protein 1

BSA: bovine serum albumin

CA IX : Carbonate dehydratase IX

CBP : CREB-binding F protein

cDNA: complementary DNA

CE : capillary electrophoresis

ChIP-seq: chromatin immunoprecipitation with deep sequencing

ChIP: chromatin immunoprecipitation

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNMT : DNA methyltransferase

DW: distilled water

ER : Endoplasmic Reticulum

EZH2: enhancer of zeste homolog 2

Glut1 : Glucose Transporter, type 1

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HDAC : Histone Deacetylase

HIF :hypoxia-inducible factor

IL8 : Interleukin-8

MPP : Mass Profile Professional

MS : mass spectrometry

mTORC1 : mTOR complex1

NF-kB : nuclear factor-kappa B

p-Akt : phospho-Akt

PBS: phosphate buffered saline

p-Erk: phospho-Erk

PI3K : phosphatidylinositol 3' -kinase

PCR: polymerase chain reaction

PHD2: prolyl hydroxylase domain-containing protein 2

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SAT1 : spermidine/spermine N 1 -acetyltransferase 1

siRNA: small interfering RNA

SP1: specificity protein 1

SRB : Sulforhodamine B sodium salt

TCA : trichloroacetic acid

TEMED: tetra methylethylene diamine

TOF : Time of flight

Tris: Tris (hydroxymethyl) aminomethane 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

VEGF : vascular endothelial growth factor

VHL: von Hippel-Lindau

# 第1章 序章

## 1-1 研究の背景

悪性新生物（がん）は世界中で死亡原因の上位を占める疾患であり、我が国でも死因の第一位である。その治療法開発のために多くの研究が進められており、現在の手術や化学療法、放射線療法をもってしても完治に至るのは困難である。一方で、膵臓がんや胆管がん、膠芽細胞腫などは、5年生存率が非常に悪い多くの場合、治療に抵抗性を示す細胞集団の出現や、再発・転移が見られるため、根治することが極めて難しいのが現状である。2018年のデータ(全国がん登録、国立がん研究センター)においては日本人の2人に1人はがんと診断され、2019年のデータ(2019年人口動態統計、厚生労働省)では、全死亡者数のうち男性で26.7%、女性で17.8%ががんで命を落としている(1)。部位別にみると、がん罹患患者数の上位3位は男女総計で大腸、胃、肺で、4位は女性特有の乳房、5位は男性特有の前立腺である(表1-1)(1,2)。

医療や保健衛生の進歩から日本は世界第一位の長寿国となった一方、高齢化の進展に伴ってがんによる死亡者は増加の一途をたどっており、がん克服を目指した研究及び新薬の開発は我が国の大きな課題である。これまでのがん研究の成果による診断・治療法の進歩と普及により、がん罹患患者の5年生存率に改善が見られ、現在ではがん全体で6割もの患者が完治するようになってきた(図1-1)(3,4)。

一方で、膵臓がんや胆管がん、膠芽細胞腫などは、5年生存率が非常に悪い難治性がんである(図1-1)。難治性の理由として、早期発見の難しさ、周囲部位や他臓器への転移、高い再発率に加えて、薬剤や放射線治療などへの抵抗性が高いことが挙げられる。

がんの発生や悪性化の原因の一つとして、がん抑制因子 tumor protein p53 (TP53)へのミュータントが発見されて以来、様々ながん関連遺伝子が研究されてきた。



**表 1-1 2018 年データによるがん罹患数の順位（上）及び 2019 年データによるがん死亡数の順位（下）**

日本におけるがん罹患数とがん死亡数の上位 5 位を総計及び男女別で示す。罹患数では男女ともに大腸、胃、肺がんが上位を占める。一方で死亡数では大腸を抜いて肺が 1 位である。

男女別になると、男性は前立腺、女性は乳房、子宮が上位となる。

がん理患者数の順位 (2018 年データ)

	1位	2位	3位	4位	5位
総数	大腸	胃	肺	乳房	前立腺
男性	前立腺	胃	大腸	肺	肝臓
女性	乳房	大腸	肺	胃	子宮

がん死亡者数の順位 (2019 年)

	1位	2位	3位	4位	5位
総数	肺	大腸	胃	膵臓	肝臓
男性	肺	胃	大腸	膵臓	肝臓
女性	大腸	肺	膵臓	胃	乳房

国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」（全国がん登録）より改変

[https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/summary.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html)

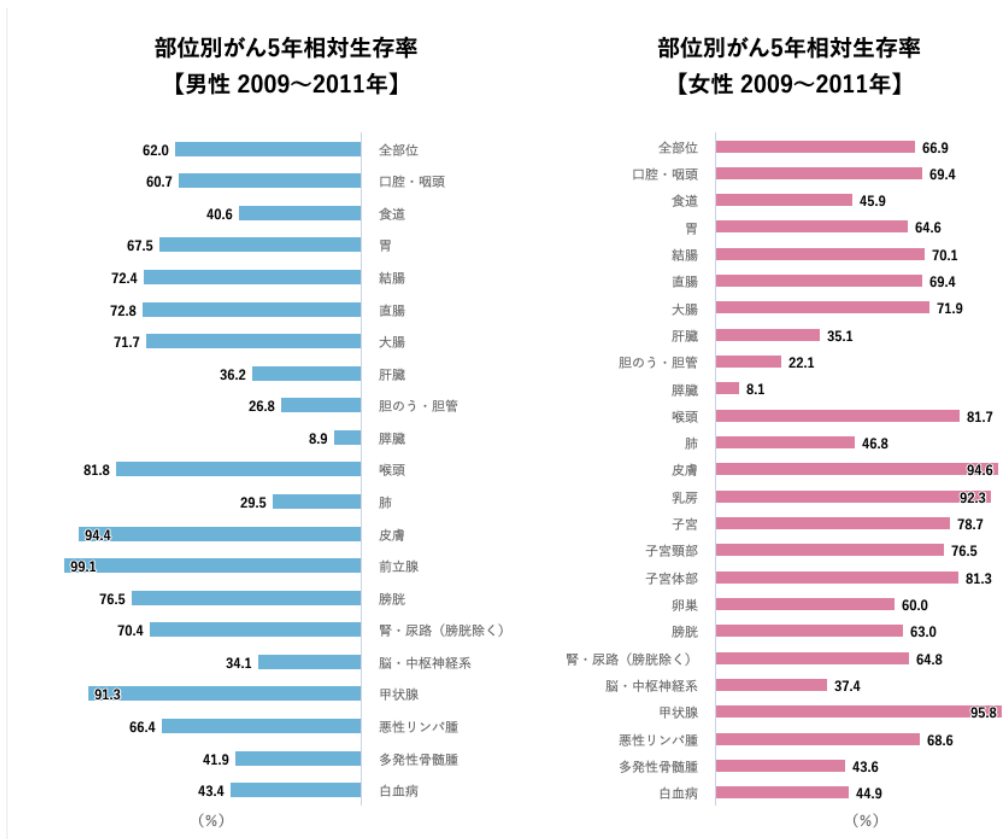


図 1-1 日本における部位別がん 5 年相対生存率

日本における各がん種におけるがん種別 5 年相対生存率を示す。全体としては 6 割ほどの生存率であるが、膵臓がんは依然として 5 年後相対生存率が極めて悪い (8.1%)。

国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」(全国がん登録)より抜粋

[https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/summary.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html)

一方、繰り返す細胞分裂、増殖にあたり、遺伝子複製のミスリードや紫外線、化学物質などのがん変現性な刺激により常に癌細胞は生命体で生み出されているが、これら癌細胞が増殖し悪性化する前に免疫細胞が駆除することで、がんを抑制していることが知られている。この免疫細胞の能力に着目し、チェックポイント療法(5,6)といった新しいがん治療法が開発されている。しかしながら効果は一定の範囲にとどまり、未だ5年生存率が5%の癌腫があることから、今までにない新たな治療戦略が必要である。

がん研究はこれまで遺伝子中心の研究が進められてきたが、近年では遺伝子の発現を制御するエピジェネティックや、転写制御、タンパク合成やタンパク修飾、更にはがん細胞が生存していく過程で生成される腫瘍微小環境が、がん化に影響を及ぼすことがわかっており、多岐にわたる範囲の研究が進められている。

腫瘍微小環境とは、腫瘍組織やその周囲に混在する正常組織や免疫細胞等、様々な細胞・非細胞成分から構成された環境で、腫瘍の進行に大きな役割を果たすことが知られている(図 1-2) (7,8)。

また、腫瘍微小環境内では、低酸素、低栄養、低 pH といった、正常細胞が生存するのに、非常に困難な環境になっていることが知られている(9,10)。これらの環境を生成するメカニズムの少なくとも一部は、がん細胞特有の代謝に由来する。がん細胞は迅速な増殖のための必要なエネルギー獲得源として酸素、栄養を大量に消費する。このため、腫瘍内が低酸素状態となると、がん細胞では酸素供給のために低酸素応答として、血管新生を促進する。酸素が正常に存在する時のがん細胞では、低酸素応答因子-1 (HIF-1 $\alpha$ ; hypoxia-inducible factor1 $\alpha$ ) サブユニット及び $\beta$ のサブユニットうち、HIF-1 $\alpha$  サブユニットはプロリン水酸化酵素( PHD2; prolyl hydroxylase domain-containing protein 2)により水酸化され、フォン・ヒッペル・リンドウがん抑制タンパク質(VHL; von Hippel-Lindau)が HIF-1 $\alpha$  を認識して結合し、ユビチキン化されるとプロテアソ

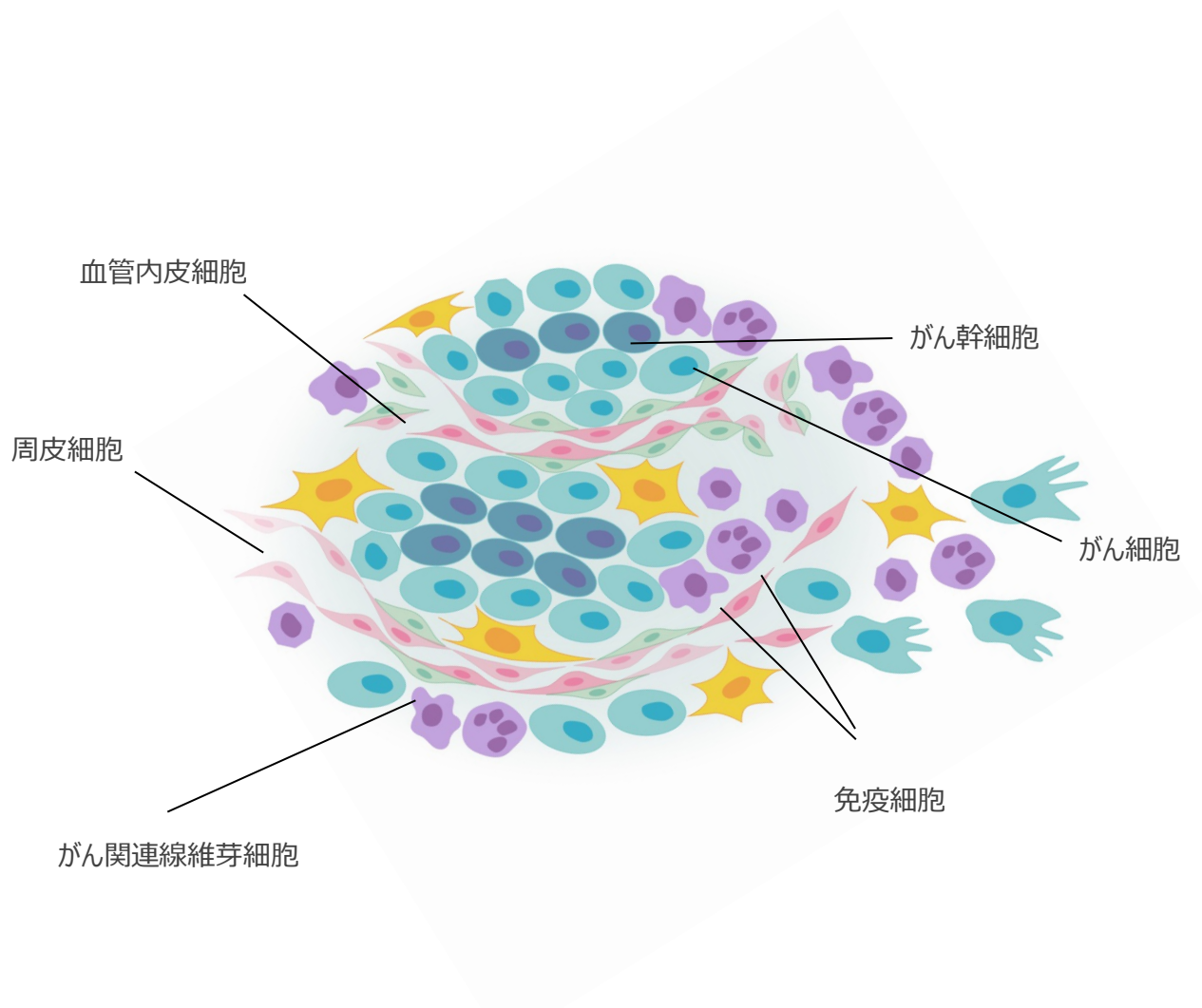


図 1-2 がんを取り巻く周辺細胞からなる腫瘍微小環境

腫瘍組織はがん細胞だけでなく、がん幹細胞、免疫細胞、がん関連線維芽細胞、周皮細胞など多種の細胞によって構成されている。また、がん関連線維芽細胞、がん関連マクロファージががんの進展に寄与する子ことが明らかにされている。

ームによって分解される。低酸素の環境下では、HIF-1 $\alpha$  が分解せず核内に移行し HIF-1 $\beta$  と結合することでシスタチオニン合成酵素(CBP; Cystathionine- $\beta$ -synthase)とともに、低酸素に応答する遺伝子の転写調節領域にある特定の DNA 領域と結合し、pH 調節のための炭酸脱水素酵素 9 (CA IX; carbonic anhydrase)、血管形成のための血管内皮細胞増殖因子(VEGF; vascular endothelial growth factor)、グルコース代謝のためのグルコーストランスポーター1(GLUT1; Glucose transporter 1)発現が誘導し(図 1-3)、低酸素環境に適応する (11-14)。しかし、血管新生で構築された血管は、正常血管と比較し、血管内皮細胞間の接着、及び内皮細胞と壁細胞の接着が疎になるため血管透過性が高く、基底膜構造も異常であることが知られている (15-17)。そのため、がん組織では血管が豊富であるにも拘らず血流が少なく、低酸素、低栄養環境と陥る。

低栄養環境に対するがん細胞適応機構としては、小胞体 (ER; endoplasmic reticulum) ストレス反応によるアポトーシスの誘導やホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ/プロテインキナーゼ B (PI3K-Akt; phosphatidylinositol 3' kinase-protein kinase B)経路の不活性化によるラパマイシン標的タンパク質複合体 1 (mTORC1; mechanistic target of rapamycin complex1) の不活性化を誘発し、オートファジーの抑制を解除することで、分解産物を生合成経路や ATP 産生に利用し、栄養飢餓に適応すると考えられ、広く研究がなされてきた(18-20)。

一方、低 pH 環境は、低酸素応答で誘発される HIF 誘導が発端となる (図 1-4)。

HIF は血管新生関連因子のみならず、LDHA (Lactate dehydrogenase A) 等の解糖系代謝酵素の発現を誘導することで、低酸素においても非効率な好氣的解糖系によって ATP を産生し、生存することが知られている(21-24)。好氣的解糖系の過程で生じた乳酸やプロトンは細胞内環境を酸性化する。細胞内 pH を一定に維持するため、NHE1 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1) や ATPase、MCT1, 4

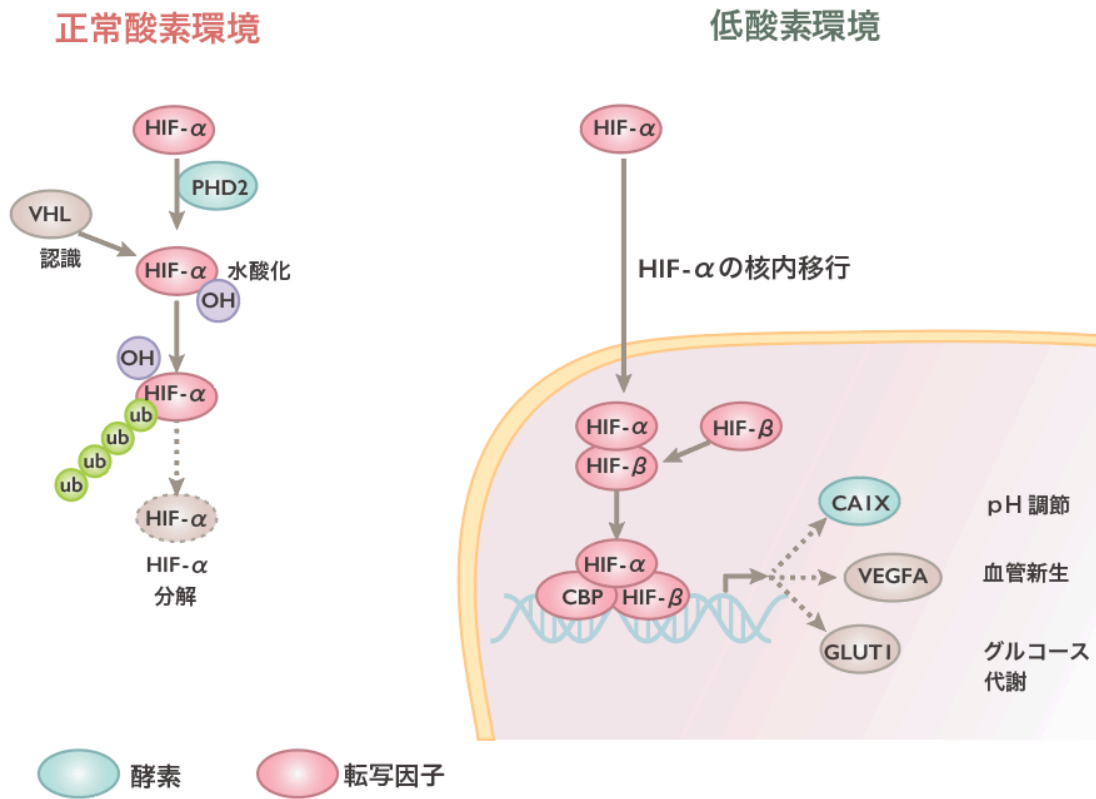


図 1-3 低酸素における HIF の制御機構

通常酸素状態にあるときは、HIF-1 $\alpha$  が PHD2 により水酸化されることで、VHL タンパク質が HIF-1 $\alpha$  を認識し、HIF-1 $\alpha$  はユビチキン化されプロテアソームによって分解される。低酸素の環境下では、HIF-1 $\alpha$  が分解せず核内に移行し HIF-1 $\beta$  と結合することで CBP とともに、低酸素に応答する遺伝子の転写調節領域にある特定の DNA 領域と結合し、pH 調節のための CAIX、血管形成のための VEGF、グルコース代謝のための GLUT1 の発現が促進される。

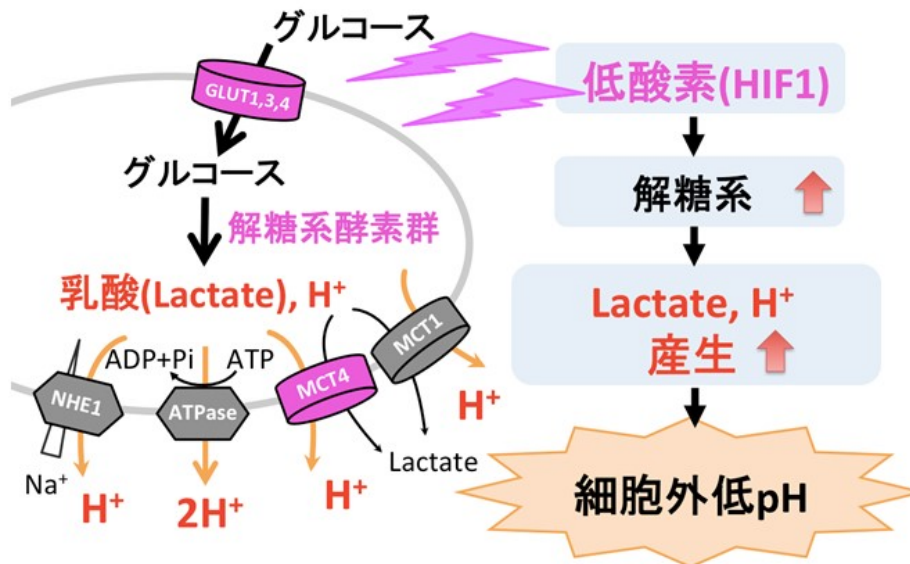


図 1-4 低酸素環境による低 pH 環境誘発メカニズム

低 pH 環境は、低酸素状態、および増殖の盛んながん細胞における解糖系の亢進の結果引き起こされる。HIF1 の標的因子 GLUT1 の発現亢進により細胞内へのグルコースの取り込みが促進され、同様に HIF1 によって発現誘導された一連の解糖系酵素群によってグルコースが代謝されてエネルギー生成する過程で乳酸 (Lactate) とプロトンを生産する。この Lactate やプロトンが NHE1 や ATPase, MCT1, 4 によって細胞外に排出され、細胞外 pH が低下する。

(monocarboxylate transporter 1, 4) 等の膜タンパク質によって乳酸やプロトンを細胞外に排出し(25,26)、通常組織で pH 7.4 に保たれている細胞外 pH が pH 6.8 程度まで低下することが報告されている(27)。

低 pH 環境に対する適応機構としては Melanoma 由来細胞株の遊走能が増加したという報告や、血管新生関連因子の発現を誘導するという報告、Xenograft モデルにおいて in vivo 転移能が亢進したという報告等、低 pH 環境ががんの悪性化に貢献するという報告がある(28-32)。

低 pH 環境において遺伝子発現の調整機構の一つとして研究されているのがヒストンの翻訳後修飾である。ヒストンとは、真核生物のクロマチン（染色体）を構成する主要なタンパク質であり、球体を形成する C 末端と、特定の構造をとらない N 末端のヒストンテールから構成されている。このヒストンテールには、特定の位置、特定のアミノ酸にアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化といった様々な修飾が入る事で、遺伝子発現制御等種々のクロマチン機能制御にかかわることがわかっている。このヒストンの修飾は DNA メチル化とともに、エピジェネティクスと呼ばれ、何らかの原因で変化すると、さまざまな疾病につながる（図 1-5）。

遺伝子のプロモーター領域やエンハンサー領域に複数のヒストン修飾の組み合わせが起こることにより、DNA がヌクレオソームから乖離し、転写因子が結合することで転写が開始されるため、この遺伝子のオン・オフに関与するエピジェネティクス関連酵素が、新たな抗がん剤の標的として上市されている。癌で異常活性化が見られる DNA メチル基転移酵素である DNMT（DNA methyltransferase）を阻害する azacytidine や decitabine などの DNMT 阻害剤や、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC（Histone Deacetylase）阻害剤として vorinostat や romidepsin がある(33-37)。また、発現抑制的ヒストン修飾の一つであるヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化(H3K27me3)を担う酵素 enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)等を標的とした研究も盛んで、2021



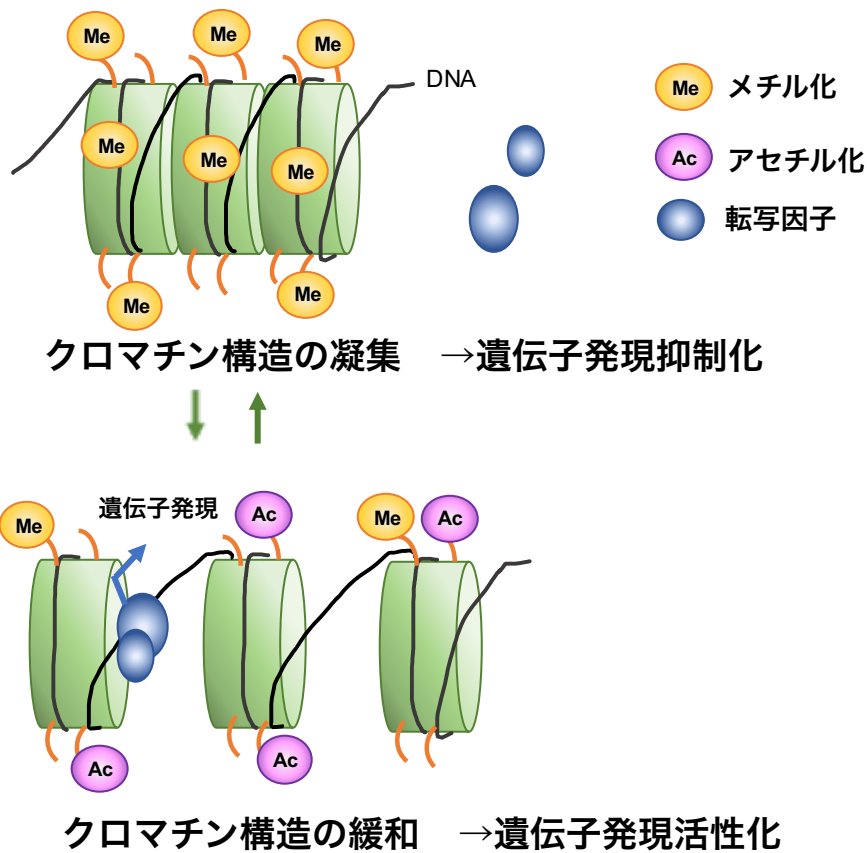


図 1-5 エピジェネティクスの構成要素とヒストン修飾

DNA の塩基配列の変異を伴わず、修飾が遺伝子機能を調節する制御機構をエピジェネティクスと呼ぶ。DNA の高メチル化や抑制型ヒストン修飾の増加によりクロマチン構造が凝集すると、遺伝子発現の活性が抑制されている。一方、DNA の低メチル化やアセチル化などの活性化型ヒストン修飾の増加により、正の電荷が中和され、DNA の負の電荷との結合が弱くなることで、クロマチン構造が緩むと遺伝子発現が活性化される。

年には EZH2 遺伝子変異陽性の濾胞性リンパ腫に適応の Tazverik が上市されている(38-41)。

エピジェネティクス制御に加えて、がん特異的代謝経路や代謝物も新たながん戦略への期待が大きい。Otto Heinrich Warburg が提唱した、がん細胞は低酸素下では解糖系を利用しエネルギー産生を行い、低酸素下を脱しても好氣的解糖系を亢進しているという「Warburg 効果」(図 1-6)をはじめとし、その後分析機器技術の発達により代謝産物の網羅的な解析(メタボローム解析)が可能となり、グルタミンを栄養素として利用するグルタミン代謝、低栄養時の炭素源としての酢酸代謝など、がんの生存や悪性化に貢献する代謝経路が明らかとなっている(42-45) (図 1-7)。また、オンコメタボライトと呼ばれる、がん細胞特異的に蓄積する代謝物として D-2-Hydroxyglurate が発見され、大腸がんの転移やグリオーマの悪性化に関与することが明らかにされた(46,47)。

このようにがん細胞が、低酸素、低栄養の劣悪な環境下で巧みに代謝経路をシフトさせて増殖を維持していること事から、がん代謝に関連する因子は新たな創薬標的として注目されている。

以上のように、低酸素、低栄養環境によって転写、ヒストン修飾、代謝物を制御し、腫瘍微小環境が構築され、結果、劣悪な外部環境への適応応答を誘起し、増殖、浸潤、転移等悪性化を引き起こすことが報告されてきたが、低酸素応答として HIF1 $\alpha$  を介した解糖系の亢進により生成される乳酸が引き起こす低 pH 環境における代謝変動が、転写やヒストン修飾に関与し、がんの悪性化に及ぼす影響については未だ明らかにされていない。また、メタボローム解析は古くから汎用されている液体クロマトグラフィーと質量分析器計を組み合わせた LC-MS (液体クロマトグラフ質量分析計(Liquid Chromatograph - Mass Spectrometry)、ガスクロマトグラフィーと質量分析器計を組み合わせた GC-MS (ガスクロマトグラフ質量分析計(Gas Chromatograph - Mass Spectrometry) がその汎用性、簡便性、網羅性から多く使われているが、各物質の [電荷] / [イオン半径] の比に基づいて移動する電気的性質を利用して分画するキャピラリー電気泳動法に

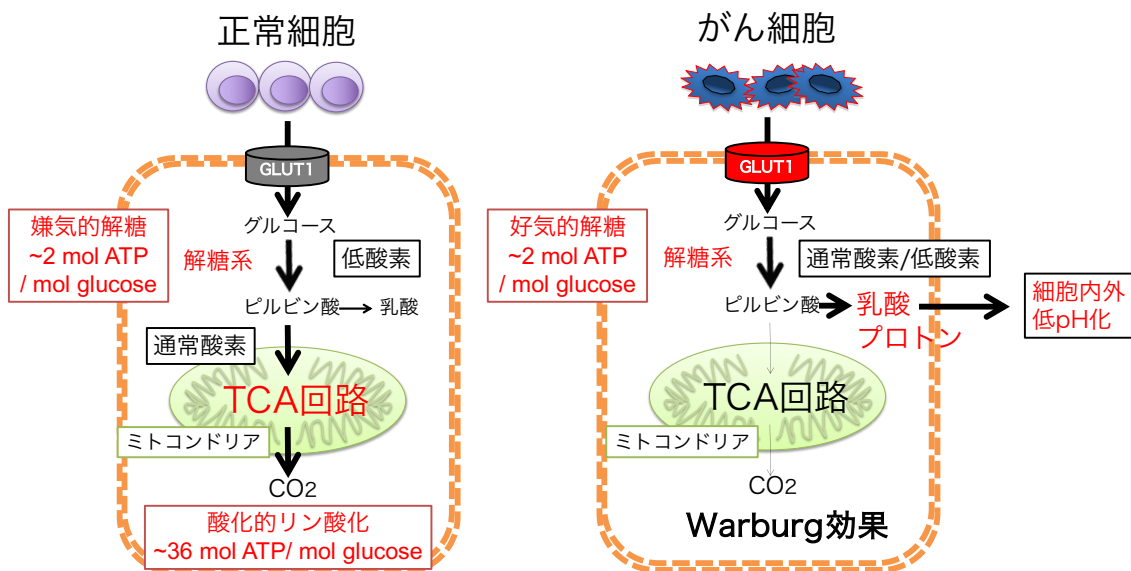
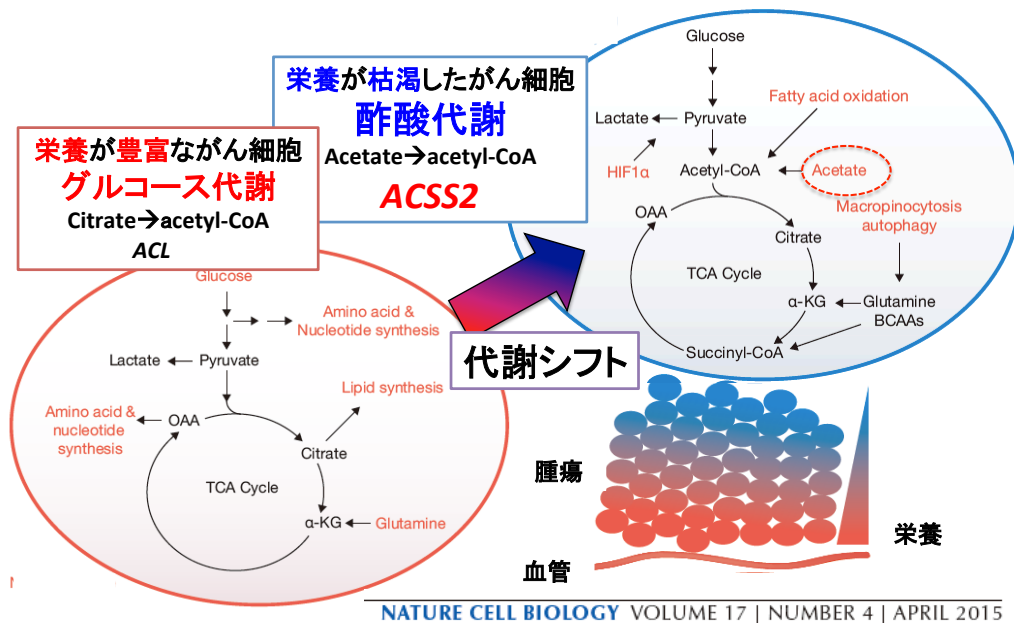


図 1-6 がんにおける解糖系への代謝リプログラミング

酸化的リン酸化では1分子のグルコースから36分子のATPが産生されるが、解糖系では2分子のATPしか産生されない。正常細胞が通常酸素環境下では酸化的リン酸化によって効率的にエネルギー産生を行う一方、がん細胞は、通常酸素環境下においても好んで非効率な好氣的解糖系を利用しエネルギー産生を行う (Warburg 効果)。好氣的解糖系の過程で生じた乳酸やプロトンは細胞内外環境を酸性化する。



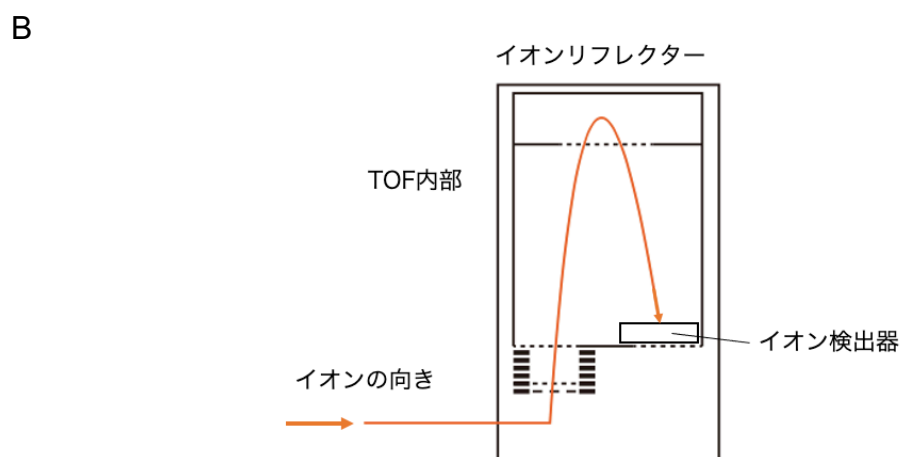
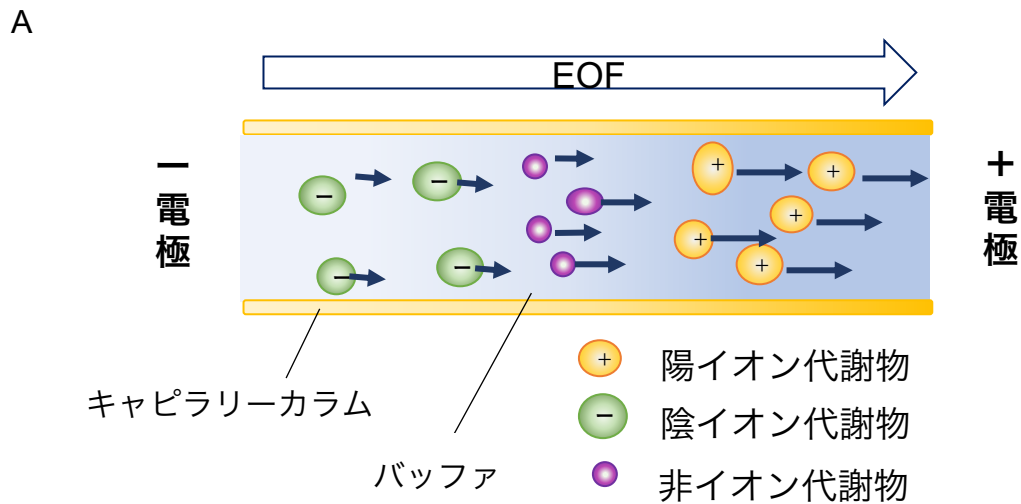
NATURE CELL BIOLOGY VOLUME 17 | NUMBER 4 | APRIL 2015

図 1-7 低栄養状態のがんにおける酢酸代謝への代謝シフト

通常栄養環境下では、TCA 回路で生成されたクエン酸がミトコンドリアから細胞質に移行しアセチル-CoA を生成する。一方、低栄養環境下のがん細胞においては、酢酸がアセチル-CoA 産生酵素である ACSS2 (acyl-CoA synthetase short-chain family, member 2) によってアセチル-CoA を生成することで、アセチル-CoA 供給源がクエン酸から酢酸にシフトし (酢酸代謝シフト)、エネルギー源を確保する。

質量分析装置を組み合わせた CE-MS(capillary electrophoresis mass spectrometry)(図 1-8)も近年盛んに利用されるようになってきており、LC-MS、GC-MS では見えてこなかった高極性代謝物の変動の解明を可能となってきた(図 1-9)。質量分析計は高分解能のフーリエ変換-リニアイオントラップハイブリッド質量分析 (Orbitrap) やフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析 (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry; FT-ICR-MS)、飛行時間型質量分析 (Time-of-flight Mass Spectrometry; TOF-MS) といった、精密質量を各クロマトグラフィーによって分画された化合物を瞬時に測定し、化学式を計算で求めることで、ノンターゲットメタボローム解析を可能としている。

極性化合物の増減を検出、意義を解明することは、一般的に実施される血液検査とともに、尿、唾液のような非侵襲性検査の精度向上の可能性を高め、簡便検査からの早期発見へと繋がると考えられる。そのため、CE-MSは、血漿や尿、唾液のような水溶性が高い検体からのバイオマーカー探索などに用いられ、LC-MS では見られなかった新たな知見が見いだされている(48-51)ことから、がん悪性化機構の解明に向けて CE-MS を用いたメタボローム解析が重要である。



### 図 1-8 CE-TOF-MS システムの概要

A; CE による電気泳動により、陽イオン、陰イオン性化合物の物性（電荷、径、粘度など）によって分画される。溶離液が移動することで生じる電気浸透流（Electroosmotic flow; EOF）によって電荷をもたない代謝物もキャピラリー内を移動することができる。

B; CE から分画された代謝物は TOF-MS のイオン化室に入ると溶媒が急速に蒸発することによってイオン性物質が濃縮されると同時にイオン化され、検出器側へ飛行する。質量によって飛行時間が異なるため、これを利用して精密質量を計算する。

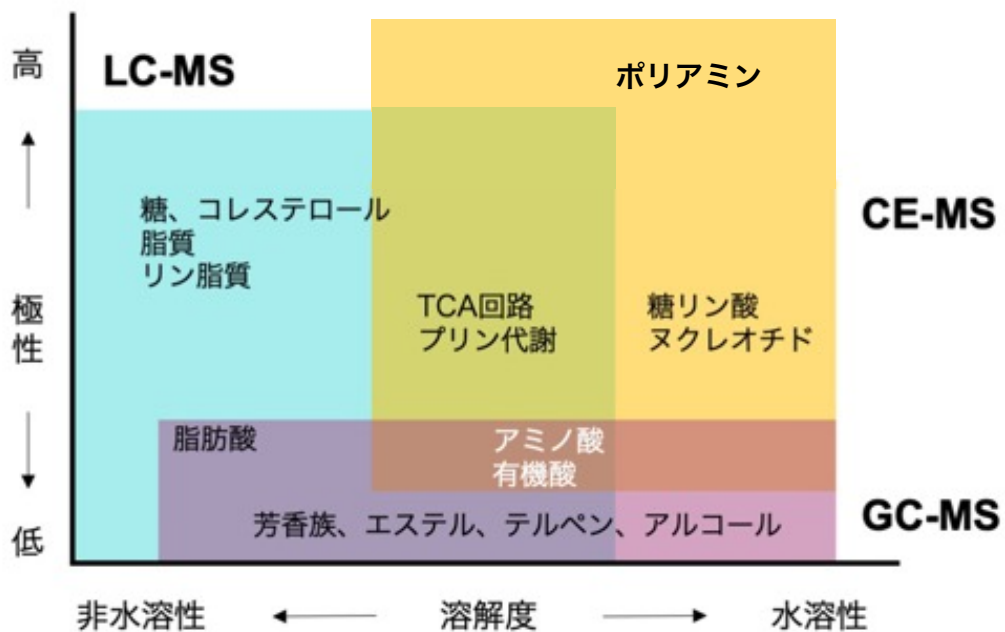


図 1-9 LC-MS, GC-MS, CE-MS による代謝物の測定可能範囲

質量分析計を用いたメタボローム解析では LC-MS, GC-MS, 及び CE-MS が使われている。それぞれ測定を得意とする化合物が異なり、1つの機器で全ての代謝物を測定するのは不可能である。一般的に、代謝物の極性によってどの機器を使用するかを目安とする。CE-MS では LC-MS では分画できないような高極性代謝物を得意とし、揮発性代謝物は GC-MS が優れている。

## 1-2 研究の目的

本研究は、低 pH 環境において、がん細胞が劣悪な腫瘍微小環境で生存能を獲得するための代謝適応機構を解明することを目的とする。代謝物変動は CE-TOF-MS を用いた。がんで特に 5 年相対生存率が悪く、悪性度が高いと知られる膵臓がん由来の細胞株である PANC-1、AsPC-1 細胞及び上皮がんモデルとして広く研究されている子宮頸がん細胞株である HeLa 細胞をモデル細胞として、第 2 章では低 pH 環境が細胞の代謝と遺伝子発現に与える影響を、第 3 章では、低 pH 培養時に変動が認められた SAT1 の発現変動が、がん細胞の遺伝子発現、代謝物、細胞の生存及び腫瘍形成に及ぼす影響を、第 4 章では、低 pH 培養時に細胞内に蓄積されるポリアミンが、がん細胞の生存維持に及ぼす影響を、第 5 章では、PANC-1 細胞の代謝物をノンターゲット解析し、新たな変動代謝物の探索を検討した。

以上の検討により、低 pH 環境においてがん細胞は SAT1 の発現を上昇させることで、細胞毒性があるスペルミジンを、細胞増殖を亢進させる N1-アセチルスペルミジンに変換させ生存能を獲得し、且つ腫瘍微小環境内で免疫細胞の浸潤を促し血管新生を亢進させることで腫瘍形成を促進する可能性を示唆する研究である。



## 第2章 低 pH 環境におけるがん細胞の代謝変動の検証

### 2-1 緒言

腫瘍組織はがん細胞のみならず、その周囲に存在する免疫系細胞、線維芽細胞、血管細胞、リンパ管等の多様な細胞や結合組織が存在し、低酸素、低栄養、低 pH などの腫瘍微小環境で形成されている。低酸素、低栄養、低 pH などの劣悪な腫瘍微小環境で細胞生存していく上で、がん細胞は生存していくために代謝変動を引き起こすことが知られている (42-45)。例えば、低酸素応答として、低酸素誘導因子 (HIF-1 $\alpha$ ) は、pH 調節のために CA IX、血管新生のために VEGF、グルコースの取り込みのために GLUT1 などの遺伝子発現が誘導される (11-13)。また、低栄養応答として、がん細胞は小胞体 (ER) ストレス反応やアポトーシスの誘導、mTORC1 の不活性化、オートファジーの活性化により、低栄養に適応することが知られている (17-19)。

一方、低酸素の結果として、がん細胞は解糖系を亢進させ、乳酸やプロトンが、細胞膜トランスポーター (NHE1, ATPase, MCT1, 4) によって排出され、細胞外の pH が低下することが知られている。正常組織での細胞外 pH が pH7.4 程度に保たれているのに対し、腫瘍内部においては細胞外 pH が pH6.8~pH6.4 程度まで低下することが、pH プローブや MRI を用いた検討により報告されている (26,52)。

細胞外 pH の低下は、がんの増殖・浸潤・転移などの、がんの悪性化に関与する事が示唆されている (53-57)。一方、近年、転写応答機構や網羅的遺伝子発現などが行われているが低 pH 環境における代謝変動については、いまだ解明されていないことが多い。低 pH 環境における代謝変動を理解することは、腫瘍微小環境におけるがんの特性を理解する上で重要であると考えられる。

本章では、低 pH(pH6.8) 環境で特異的に変動する代謝物を特定する為、膵臓がん細胞株 (PANC-1、AsPC-1) で変動した代謝物を CE-TOF-MS により測定した。次に、低 pH(pH 6.8)環境で増加する代謝物に関連する酵素群の遺伝子発現

変動を特定する為、RNA-seq による網羅解析と RT-qPCR による定量を行なった。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 細胞培養

ヒト膵臓腺がん由来細胞株 PANC-1 細胞(ATCC)は RPMI (Roswell Park Memorial Institute)培地(GIBCO, #11875)に、ヒト転移性膵臓腺がん由来細胞株 AsPC-1 細胞(ATCC)及びヒト子宮頸部がん細胞 HeLa 細胞(ATCC)は DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)培地(GIBCO, # 11965)に 10%FBS (Fetal Bovine Serum, Invitrogen, # 26140)で 37 °C 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターに静置し培養した。継代は、dish 表面が 80%程度覆われた時点で行った。dish から培地を除いた後 PBS (phosphate buffered saline)で洗浄し、Trypsin-EDTA (Invitrogen, # 25200)を 1 ml 加え、37 °Cで 1 分間静置して剥がした。各細胞に適した培地で懸濁させ、新しい dish に撒き直すことを行った。

### 2-2-2 通常(pH7.4)・低 pH(pH6.8)培養培地調製

ダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」② (Nissui) 9.5g (Nissui, #05919)を蒸留水に溶解し、全量を 1L とし、高圧蒸気滅菌した後、10%FBS、滅菌ろ過済み 200µM L-glutamine (GIBCO, #25030-81) を 10ml 加えた。高圧蒸気滅菌しておいた 10%NaHCO<sub>3</sub> を、pH メーターを用いて培地 pH7.4 となるように加えた。最終的に加えた 10%NaHCO<sub>3</sub> の量は 24mL であった。この組成の培地を通常(pH7.4)培養培地とした。また、同様に培地 pH6.8 となるように高圧蒸気滅菌しておいた 10%NaHCO<sub>3</sub> を加えた。最終的に加えた 10%NaHCO<sub>3</sub> の量は 6 mL であった。この組成の培地を低 pH(pH6.8)培養培地とした。

### 2-2-3 低酸素・低栄養培養培地調製

低酸素培養は、培地は細胞に適切な培地を選択し、インキュベーターは INVIVO 400 (BAKER RUSKINN)を用いて、酸素濃度 1%で実施した。低栄養培地培地の調整は、0.2g CaCl<sub>2</sub>, 0.4g KCl, 0.2g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, Phenol Red 0.05g を 1L の MilliQ 水に溶かし、オートクレーブした後に、10% NaHCO<sub>3</sub> を 48mL 加え、更に 10ml の通常培地を加えることで調整した。

### 2-2-4 メタボローム解析

メタボローム解析は、Human Metabolome Technologies 株式会社 (HMT)に Dual-Scan 解析を委託した。

#### 2-2-4-1 LC 分析用の接着細胞のメタボライト抽出

Internal Standard Solution 1 (10mM, HMT 製)をエタノールで 1000 倍希釈し、メタボライト抽出用エタノール溶液を調整した。マンニトールと MilliQ 水を用いて、5% (w/w)マンニトール水溶液を細胞洗浄液として調整した。細胞培養液を吸引除去後、常温にした細胞洗浄液を 10cm dish の場合 10ml を用いて培養皿表面を洗浄した。洗浄液を除去後、再度細胞洗浄液 2ml で再び洗浄作業を行った。洗浄液を吸引除去後、常温に戻したメタボライト抽出用エタノール 1.3ml を培養皿に添加し、軽く振倒した。セルスクレイパーにて細胞を剥離し、遊離した細胞を一か所にかき集めた。この細胞塊を 15ml tube に移し、-80°Cで HMT に郵送した。

#### 2-2-4-2 CE-TOF-MS 解析用のメタボライト抽出

Internal Standard Solution 1 (10mM, HMT)を超純水で 1000 倍に希釈し、内部標準溶液を作成した。また、2-2-4-1と同様に細胞洗浄液を調整した。限外濾過ユニットの準備として、限外濾過ユニットのフィルターカップに超純水を 250  $\mu$ l 添加し、蓋を閉めた後、4°C、9100g、35 分で遠心した。遠心後、ろ液を除去した。2-2-4-1と同様に細胞の洗浄を行った後、抽出作業を行った。細胞洗浄液を除去後、メタノール 800  $\mu$ l を培養皿に添加し、軽く振倒した。その後培養皿を 30 秒静置した後、内部標準溶液を 550  $\mu$ l 添加した。ゆっくり数回ピペティングした後に、軽く振倒した。その後培養皿を 30 秒静置した後、混合液を 1ml マイクロチューブに回収し、氷冷した。回収した抽出液を 4°C、2300g、5 分で遠心分離した。上澄みを約 350  $\mu$ l ずつ限外濾過ユニットのフィルターカップに移し、フィルターカップの液がなくなるまで、40°C、9100g、2~5 時間程度遠心した。フィルターカップをはずし、蓋をきつく締めた後、-80°Cで HMT へ郵送した。

#### 2-2-5 CE-TOF-MS によるポリアミン代謝、メチオニン代謝及び尿素回路関連の代謝物定量

2-2-5-1 及び 2-2-5-2 に示す標準物質、内部標準物質、試薬、及び機器・器具を用いて CE-TOF-MS システムを準備し、分析前に 30 分間泳動バッファーでフラッシングをしてフューズドシリカキャピラリーカラム内壁の平衡化を行った後、電圧を徐々に印加して電流が流れることを確認してから分析を進めた。分析条件を表 2-1 に示す。

表 2 - 1 CE-TOF-MS における測定条件

CE-TOF-MS における陽イオン性代謝物測定条件を示した。

Device	
Agilent CE-TOFMS system	
CE	7100
Capillary	Fused-silica, i. d. 50 $\mu$ m $\times$ 100 cm
Buffer	1 M Formate
Voltage	Positive, 30 kV
Temperature	20°C
Injection	Pressure injection 50 mbar, 5 sec (approximately 5 nL)
Preconditioning	90s at water wash, 5 min at run buffer
TOFMS	
6546 LC/Q-TOF	
Ion Source	ESI
Polarity	Positive
Capillary voltage	4,000 V
Fragmentor	75 V
Skimmer	50 V
OCT RFV	500 V
Drying gas	N <sub>2</sub> , 10 L / min
Drying gas temp.	300°C
Nebulizer gas press.	7 psig
Sheath liquid	50% MeOH / Water containing with 0.1 $\mu$ M prine m/z 121.05, Hexakis m/z 966.0071
Flow rate	10 $\mu$ L / min
Lock mass	prine m/z 121.0509, Hexakis m/z 922.0098

### 2-2-5-1 標準物質、内部標準物質

標準物質及び内部標準物質は、全て特級か、純度の高いものを使用した。ポリアミン代謝、メチオニン代謝、尿素回路関連の陽イオン性化合物と内部標準物質を 200 $\mu$ M になるように合わせて適宜溶解させた後、1.5ml チューブに小分けして、-80 $^{\circ}$ C 保管した。凍結融解の繰り返しによる化合物の安定性を危惧し、測定の際に小分け分を融解して使い切りとした。

### 2-2-5-2 使用機器、器具

CE-TOF-MS システムは、Agilent 社製のキャピラリー電気泳動を前段に設置した飛行時間型質量分析装置 6546 Q-TOF と 7100 Capillary Electrophoresis と 1260 Infinity II (いづれもアジレントテクノロジー社) を使用した。フェーズドシリカキャピラリーカラム(スパイラルラップ、molex、# 106815-0017)、は、専用のダイヤモンドカッターで 100 cm にカットし、外側を覆うポリビニルフィルムを 5mm ほどライターで焼いた後、焦げカスを MeOH で拭き取り、内側のガラス部分が両端ともに見えるようにした。片方を CE 専用カセットに納め、もう片方をネブライザーに差し込んだ。キャピラリーカラムの先端は、MS 側へ入る切り口がネブライザーから出ているインナーニードルの長さの約 1/3 程度とし、専用の拡大鏡を用いてシース液が霧状に放出されているかを確認して、イオン化室に設置されるスプレイヤーにセットした。

### 2-2-5-3 使用試薬

分析に使用した試薬類は、すべて MS grade を用いた。LC-MS grade Methanol (FUJIFILM wako、# 138-14521) は、試薬調整および分析時のシース液に用い、positive mode 分析用泳動バッファーは LC-MS grade 1mol/L ギ酸

(FUJIFILM wako、#067-04531)を用いてそれぞれ調整した。陽イオン性化合物用内部標準物質として Methionine Sulfone を用いた。

#### 2-2-6 培養細胞からの RNA 抽出

6 cm dish からの抽出法を以下に示す。培地を除いた後、500  $\mu$ l の Sepasol<sup>®</sup>-RNA I Super G (Nakarai, #09379-84) を加え、5 分間室温でインキュベートした。その後、200  $\mu$ l のクロロホルムを加え 30 秒間激しく振とうし、5 分間室温でインキュベートした。その後、12000  $\times g$  で 4  $^{\circ}$ C 15 分間遠心し、二層に分かれた上清のうち 400  $\mu$ l を新しいチューブに移した。回収した上清に 500  $\mu$ l のイソプロパノールを加えた後に、ボルテックスしてから室温で 10 分間インキュベートした。その後、12000  $\times g$  で 4  $^{\circ}$ C 10 分間遠心し、上清を除去してからペレットを 70%エタノール 50  $\mu$ l で洗浄した。このサンプルを 12000  $\times g$  で 4  $^{\circ}$ C 5 分間遠心し、上清を除去してからペレットを乾燥させて適当量 (30  $\mu$ l ~) の RNase free water で溶解させた。RNA 濃度測定は 260 nm の吸光度から算出した。

#### 2-2-7 RNA-seq (RNA sequencing)

本研究では Illumina 社の次世代シーケンサー HiSeq 2000 を用いて転写産物の網羅的解析を行った。TruSeq RNA sample Preparation Kits v2 (Illumina, #RS-122)を用いて、ライブラリー作成を行い、100bp、ペアエンドのリードを取得し、BWA aliner を用いてリファレンスゲノム (Human, GRC37, hg19)へのマッピングを行い、Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments (FPKM) 値を算出した。

### 2-2-8 逆転写反応による cDNA 合成

逆転写反応は逆転写酵素 Rever Tra Ace RT-qPCR RT Master Mix (TOYOBO、#FSQ-201)を用いて、RNA 1 $\mu$ g から cDNA (complementary DNA) を合成した。4 $\mu$ L、1000ng になるように調整した精製済み RNA、Nuclease-Free Water (Ambion、#1705023)をトータル 20 $\mu$ L になるよう加え、42 $^{\circ}$ C15分、95 $^{\circ}$ C5分、4 $^{\circ}$ C $\infty$ でインキュベートさせることで cDNA を合成した。

### 2-2-9 RT-qPCR (Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction)

定量的 RT-PCR (以下、RT-qPCR) は bio-rad 社の CFX96 を用いて行った。反応液量 20  $\mu$ l の系での SYBR $^{\circ}$  Premix Ex Taq $^{\text{TM}}$  II (Tli RNaseH Plus) (Takara、#RR820)を用いた系を示す。SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$ ) を 10  $\mu$ l、PCR Forward Primer (100  $\mu$ M) 0.04  $\mu$ l、PCR Reverse Primer (100  $\mu$ M) 0.04  $\mu$ l、template cDNA (< 100 ng) 1  $\mu$ l、dH<sub>2</sub>O (滅菌蒸留水) 8.84  $\mu$ l で合計 20  $\mu$ l にした。反応は、95  $^{\circ}$ C3分, [95  $^{\circ}$ C 15秒、64  $^{\circ}$ C 60秒] を 40 サイクル、95  $^{\circ}$ C 15秒、60  $^{\circ}$ C 15秒、95  $^{\circ}$ C 15秒で行い、SYBR の蛍光量を測定し、ACTB を内部標準として相対定量することで cDNA 濃度を算出した。RT-qPCR に用いた各遺伝子の Primer 配列を以下に示す。



primer	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
ACTB	5'-AGAAGGAGATCACTGCCCTGGCACC-3'	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTG-3'
B2M	5'-GTGCTCGCGCTACTCTCTCT-3'	5'-TCTCTGCTGGATGACGTGAG3'
SAT1	5'-ATCACTCATCACGAAGAAGTCC-3'	5'-CAGCATTGTTGGTTTTGCC-3'
SRM	5'-GTGGTGGCCTATGCCTACTG-3'	5'-CTCCTGGAAGTTCGTGCTCG-3'
AGR2	5'-GAGAA GCTGGCTTGATGAAA-3'	5'-CAGCTCTGCTAACCACCTCA-3'
ODC1	5'-GCATTGGGACGTTTTTATGG3'	5'-GGTGGACCCACTCATTGTTC-3'
PAOX	5'-CCACTGGAACGGGTCCTTC-3'	5'-GGCACGGTGACGATGACAT-3'
SMOX	5'-CAGGTGCTGTTTTCCGGTGA-3'	5'-TCGGTACATCTCAATGAGGCG-3'
SMS	5'-TACATGCGAAAAACGTGTGGC-3'	5'-CTTCAGTACCGGGATACAGTCT-3'
CPS1	5'-ATTCCCTGGTGTGGCTGAAC-3'	5'-ATGGAAGAGAGGCTGGGATT-3'
CTH	5'-CTCCCTTCTACAGCCTCAGAAA-3'	5'-CAGACACCAGGCCATTACAA-3'
MAT1A	5'-CAGACACCAGGCCATTACAA-3'	5'-GCGTTGAGCTTGTGAGCAA-3'
MAT2A	5'-ATCATGAGTTTCAGGCTCCATT-3'	5'-TCCCATCAGAGTCCACACAA-3'
DNMT1	5'-CCTAGCCCCAGGATTACAAGG-3'	5'-ACTCATCCGATTTGGCTCTTTC -3'
AHCYL1	5'-GTCCATCACAGCCACAACAC-3'	5'-AGCTGGCAACGTATTCATCC-3'
AHCYL2	5'-CAGTTTGCTGACCAGAAGCA-3'	5'-ATATGAAGCCGCTGAGCTGT-3'
MTAP	5'-CCACAGTTCAGAGGTGGTT-3'	5'-GAAACTGCTTCTCGTGCTC-3'
MRI	5'-CAGGAGCTGACCGATGTTAATG-3'	5'-CCACCAGTGATGAGGTCGT-3'

## 2-3 結果

### 2-3-1 低酸素・低栄養・低 pH(pH6.8)培養における代謝物変動の検討

RNA-seq を用いた低 pH(pH6.8)培養 24 時間後の遺伝子発現変化の検討により、低 pH(pH6.8)培養下において、SREBP2 がコレステロール生合成経路や酢酸代謝系で重要な遺伝子群の発現を変化させることを我々のグループが報告してきたが (58)、代謝物変動に着目した、pH 変化に対するがん細胞の応答については、未だ詳細には解明されていない。そこで、低 pH(pH6.8)培養下における特異的代謝変動を解析するために、膵がん細胞株 (PANC-1) において、低酸素 (1% pO<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>)、低栄養 (全栄養の 1/100)、低 pH(pH6.8)培養 24 時間後に細胞を回収し、メタボローム解析を行った。定量及び計算された質量数からの候補化合物の変動について、クラスタリングした結果をヒートマップで示す (図 2-1)。

低 pH 培養下で特異的に、N1-アセチルスペルミジン、N アセチルプロレシンなどのポリアミンの他、ジエタノールアミン、グリシン-グリシン、プロリンやアデノシン 5 ホスホ硫酸などがコントロール群と比較して増加していた (図 2-1)。

一方、中心代謝経路 (解糖系、ペントースリン酸経路、TCA サイクル) や脂質

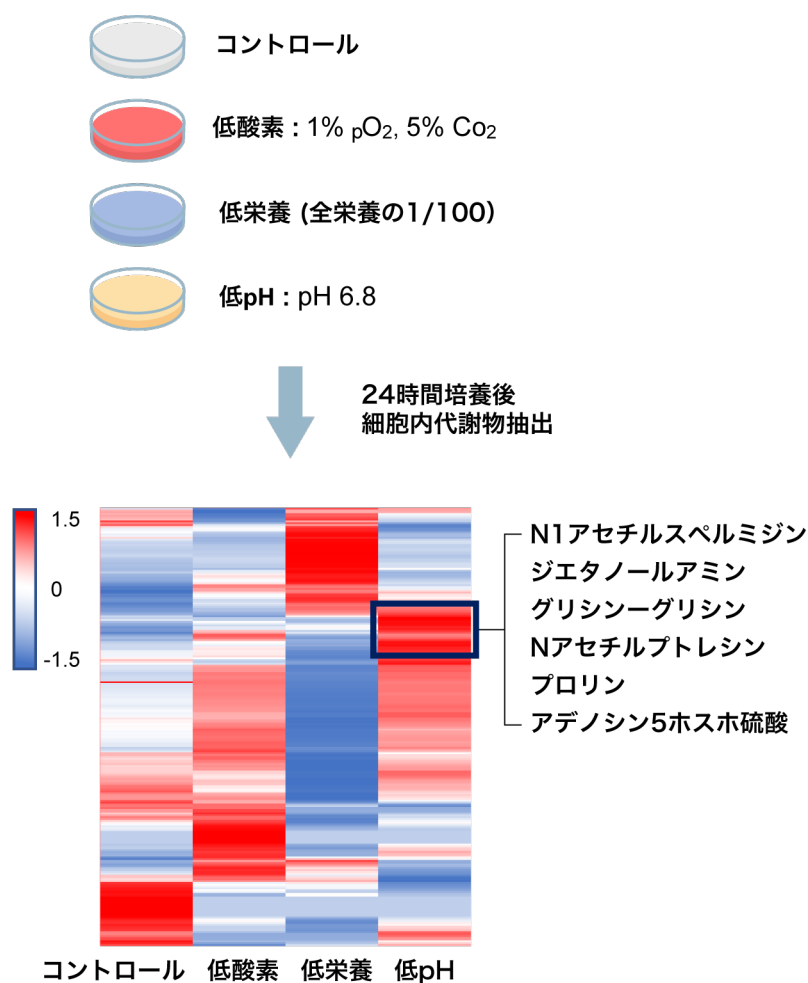


図 2-1 低酸素・低栄養・低 pH(pH6.8)培養 24 時間後の代謝物変動

PANC-1 細胞において、低酸素・低栄養・低 pH(pH6.8)培養 24 時間後のメタボロームデータを取得し、クラスタリングした結果をヒートマップで示した。赤が上昇、青が低下した化合物を示す。低 pH 特異的に蓄積される代謝物を四角の枠で囲み、代謝物を明記した。

分解経路に関する代謝物は、コントロール群と比較して低 pH (pH6.8)培養下では増加していなかった。

### 2-3-2 低酸素・低栄養・低 pH(pH6.8)培養下における変動代謝経路の検討

膵がん細胞株 (PANC-1) 細胞において低酸素、低栄養、及び、低 pH (pH6.8) 培養 24 時間後のメタボローム解析結果から、通常培養下と比較して各培養下で 1.5 倍以上の上昇が見られた代謝物を表 2-2、2-3、2-4 に示す。低 pH (pH6.8) 培養下において、中心代謝経路の代謝産物である、グルコース 6 リン酸、フルクトース 6 リン酸、ピルビン酸、アセチル CoA、セドヘプツロース 7 リン酸は上昇し、フルクトース 1,6 ビスリン酸、グリセルアルデヒド 3 リン酸、ジヒドロキシアセトンリン酸、ホスホリボシルニリン酸は減少していた (図 2-2)。

各培養下において 1.5 倍以上変動した代謝物は低酸素培養下では 82 種類、低 pH (pH6.8) 培養下では 78 種類、低栄養培養下は 45 種類であった(図 2-3 A)。低酸素培養下と低 pH (pH6.8) 培養下で共通して上昇した代謝物が 49 種類、低栄養培養下と低 pH (pH6.8) 培養下で共通して上昇した代謝物が 18 種類、低酸素培養下と低栄養培養下では共通して上昇した代謝物が 19 種類であった。各培養下で共通して上昇した代謝物数は 9 種類であった (図 2-3 A)。

各培養下で変動する代謝経路を明らかにするために、上昇した代謝物のリストを用いてパスウェイ解析 (IMPALA<http://impala.molgen.mpg.de>) を行なった。-log<sub>10</sub>(p-value)が 4 より大きい値の代謝経路を変動代謝経路とし、そのうち上昇した 6 つの代謝経路を図 2-3 B に示した。低酸素下では尿素回路が最も変動し、糖新生、フルクトースビスリン酸欠損、warburg 効果、解糖系、コリ回路など糖に関する代謝経路が有意に亢進していた。また、低栄養培養下では、ヌクレオチドの転換が最も変動し、他、ヌクレオチド、脂質、グルタミン酸に関連した代謝経路が変動していた。一方、低 pH(pH6.8)培養下では、尿素回路やポリアミン経

表2-2 メタボローム解析による PANC-1 細胞株において低酸素培養下で変動した代謝物のリスト

PANC-1 細胞を低酸素培養 24 時間後と通常培養と比較して代謝物の変動比(相対比)が 1.5 倍以上上昇した代謝物を示す。分析機器とモードは、CE-C は CE のカチオンモード、CE-A は CE のアニオンモード、LC-P は LC-MS のポジティブモード、LC-N は LC-MS のネガティブモードを示す。>1 は通常培養の結果が検出限界以下の代謝物を示す。

分析機器とモード	代謝物名	相対比 <sup>1</sup>	分析機器とモード	代謝物名	相対比 <sup>1</sup>
CE_C	1-Methyl-2-pyrrolidone	1<	LC_P	1-Hexadecyl-2-acetyl-glycero-3-phosphocholine	1.79
CE_C	5-Hydroxylysine	1<	CE_C	Thiamine	1.77
LC_P	AC(14:0)	1<	CE_C	Pyridoxal	1.77
LC_P	AC(20:0)	1<	CE_C	N6-Methyllysine	1.76
CE_A	Allantoic acid	1<	CE_A	Mevalonic acid	1.75
CE_A	Azelaic acid	1<	CE_A	ADP	1.75
CE_C	Cystine	1<	LC_P	1-Oleoyl-glycero-3-phosphocholine	1.74
LC_P	p-Anisic acid	1<	CE_C	Lys	1.73
CE_C	Pyridoxine	1<	CE_A	Sulfotyrosine	1.72
CE_C	Stachydrine	1<	CE_A	ADP-ribose	1.69
LC_N	Taurochenodeoxycholic acid	1<	CE_C	Putrescine	1.69
CE_A	XA0017	1<	CE_A	Glucose 1-phosphate	1.68
CE_A	XA0027	1<	LC_P	Cholesterol	1.68
CE_A	Sedoheptulose 7-phosphate	9.76	LC_P	1-Myristoyl-glycero-3-phosphocholine	1.68
CE_C	Cysteine glutathione disulfide	9.73	CE_C	Trp	1.67
CE_A	Fructose 6-phosphate	8.27	LC_P	Palmitoylcarnitine	1.67
LC_P	AC(18:0)	7.79	CE_C	5-Amino-4-oxovaleric acid	1.66
CE_C	N1-Acetylspermidine	5.36	CE_A	4-Acetamidobutanoic acid	1.66
CE_A	Glucose 6-phosphate	4.95	CE_C	Ala	1.64
LC_P	AC(18:1)	2.86	CE_C	Pyridoxamine	1.63
CE_C	Cadaverine	2.82	CE_C	Hydroxyproline	1.62
CE_C	Streptomycin sulfate +H2O_divalent	2.79	CE_A	Succinic acid	1.61
CE_A	GDP-glucose	2.33	CE_C	Hypotaurine	1.59
LC_P	1,2-Distearoyl-glycero-3-phosphocholine	2.29	CE_C	Leu	1.58
CE_C	SDMA	2.28	LC_P	1-Palmitoyl-glycero-3-phosphocholine	1.58
CE_A	myo-Inositol 1-phosphatemyo-Inositol 3-phosphate	2.28	CE_C	β-Ala	1.58
CE_A	Lactic acid	2.12	CE_C	Methionine sulfoxide	1.57
CE_C	Kynurenine	2.10	CE_C	Ile	1.57
CE_C	Asn	2.10	CE_A	UMP	1.57
CE_A	Pyruvic acid	2.04	CE_A	Phenaceturic acid	1.57
CE_C	Ornithine	2.01	CE_A	myo-Inositol 2-phosphate	1.55
CE_C	Glutathione (GSSG)_divalent	1.98	CE_A	Xanthine	1.54
CE_C	4-Methyl-5-thiazoleethanol	1.97	CE_C	Phe	1.54
CE_C	Gln	1.96	CE_C	Ser	1.54
LC_P	1-Stearoyl-glycero-3-phosphocholine	1.92	CE_C	Nicotinic acid	1.54
CE_C	Arg	1.90	CE_C	1-Methylnicotinamide	1.53
LC_P	Sphingomyelin(d18:1/18:0)	1.90	CE_C	Glycerol	1.53
CE_A	CDP-choline	1.88	CE_C	Tyr	1.53
CE_A	GDP	1.88	CE_A	4-Methyl-2-oxovaleric acid3-Methyl-2-oxovaleric acid	1.52
CE_A	N-Glycolylneuraminic acid	1.86	CE_A	Isethionic acid	1.52
CE_A	Hippuric acid	1.81	CE_A	O-Succinylhomoserine	1.51

表 2-3 メタボローム解析による PANC-1 細胞株において低栄養培養下で変動した代謝物のリスト

PANC-1 細胞を低栄養培養 24 時間後と通常培養と比較して代謝物の変動比(相対比)が 1.5 倍以上上昇した代謝物を示す。分析機器とモードは、CE-C は CE のカチオンモード、CE-A は CE のアニオンモード、LC-P は LC-MS のポジティブモード、LC-N は LC-MS のネガティブモードを示す。>1 は通常培養の結果が検出限界以下の代謝物を示す。

分析機器とモード	代謝物	相対比	分析機器とモード	代謝物	相対比
CE_A	Myristoleic acid	>1	CE_A	ADP	2.37
CE_A	XA0027	>1	CE_A	Maleic acid	2.18
LC_P	AC(14:0)	>1	LC_P	Sphingomyelin(d18:1/18:0)	2.12
CE_A	XA0017	>1	CE_A	dUMP	2.06
CE_C	β-Ala-Lys	>1	CE_C	Glycerophosphocholine	2.01
CE_A	Ethanolamine phosphate	19.5	LC_P	Sphingomyelin(d18:1/16:0)	1.99
CE_A	CDP-choline	17.5	CE_A	Decanoic acid	1.96
CE_C	Asn	13.6	CE_A	Lauric acid	1.94
LC_P	Palmitoylcarnitine	12.8	LC_P	Cholesterol	1.93
CE_A	Deamido-NAD+	12.0	CE_A	p-Toluic acid	1.88
LC_P	AC(18:1)	9.44	CE_C	Streptomycin sulfate_+H2O_divalent	1.79
CE_C	Hydroxyproline	8.08	LC_P	7-Dehydrocholesterol	1.74
CE_C	Cystathionine	5.49	CE_A	CDP	1.73
LC_P	AC(18:0)	5.27	CE_C	Glycerol	1.72
CE_A	XA0065	4.85	CE_A	AMP	1.71
CE_C	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	4.11	CE_A	N-Acetylneuraminic acid	1.67
CE_A	N-Formylmethionine	4.11	CE_C	Ala	1.66
CE_A	GDP	3.30	CE_C	Hypotaurine	1.64
CE_A	GMP	2.98	CE_C	Creatine	1.63
CE_A	Phenaceturic acid	2.84	CE_A	Acetyl CoA_divalent	1.59
CE_A	NADP+	2.66	CE_A	Terephthalic acid	1.52
CE_A	CMP-N-acetylneuraminic acid	2.46	LC_P	Sphingosine	1.51
CE_A	Isethionic acid	2.43			

表2-4 メタボローム解析による PANC-1 細胞株において低 pH(pH6.8)培養  
下で変動した代謝物のリスト

PANC-1 細胞を低 pH(pH6.8)培養 24 時間後と通常培養と比較して代謝物の変動比  
(相対比) が 1.5 倍以上上昇した代謝物を示す。分析機器とモードは、CE-C は CE の  
カチオンモード、CE-A は CE のアニオンモード、LC-P は LC-MS のポジティブモード、  
LC-N は LC-MS のネガティブモードを示す。>1 は通常培養の結果が検出限界以下の代  
謝物を示す。

分析機器と モード	代謝物	相対比	分析機器と モード	代謝物	相対比
CE_C	1-Methyl-2-pyrrolidone	1<	CE_C	Lys	1.79
CE_C	5-Hydroxylysine	1<	CE_C	Pyridoxal	1.77
CE_C	Cystine	1<	CE_C	Methionine sulfoxide	1.77
CE_C	Gly-Gly	1<	CE_A	Pyruvic acid	1.76
CE_A	Myristoleic acid	1<	CE_C	Asn	1.76
CE_A	XA0027	1<	CE_C	Trp	1.73
CE_C	N8-Acetylspermidine	15.02	CE_C	Ser	1.72
CE_C	Cysteine glutathione disulfide	8.94	CE_C	Pyridoxamine	1.72
CE_A	Sedoheptulose 7-phosphate	5.42	CE_A	Succinic acid	1.70
CE_C	N-Acetylputrescine	4.51	CE_A	myo-Inositol 2-phosphate	1.70
LC_P	1-Stearoyl-glycero-3-phosphocholine	4.40	CE_A	Xanthine	1.70
LC_P	1-Hexadecyl-2-acetyl-glycero-3-phosphocholine	3.61	CE_A	N-Acetylneuraminic acid	1.67
CE_A	CDP-choline	3.32	CE_C	Glycerophosphocholine	1.67
CE_A	Fructose 6-phosphate	3.24	CE_C	Nicotinamide	1.64
CE_C	Putrescine	3.09	CE_A	Gluconic acid	1.63
CE_A	Glucose 6-phosphate	2.38	CE_C	His	1.63
CE_A	N-Glycolylneuraminic acid	2.33	LC_P	1-Palmitoyl-glycero-3-phosphocholine	1.62
CE_A	Hippuric acid	2.32	CE_C	Ile	1.62
CE_C	SDMA	2.31	CE_A	XA0065	1.62
CE_A	Acetyl CoA_divalent	2.21	CE_A	GDP-glucose	1.62
CE_C	Cadaverine	2.21	CE_C	Leu	1.62
CE_C	1H-Imidazole-4-propionic acid	2.20	CE_C	Arg	1.60
CE_A	Pantothenic acid	2.11	CE_C	Glycerol	1.59
CE_A	Pelargonic acid	2.10	CE_C	N6-Methyllysine	1.58
CE_A	Phenaceturic acid	2.09	LC_P	Sphingomyelin(d18:1/18:0)	1.58
CE_C	Kynurenine	2.07	CE_C	Val	1.57
CE_C	Ornithine	2.06	CE_C	Phe	1.57
CE_A	Lauric acid	2.00	CE_C	Met	1.56
CE_C	4-Methyl-5-thiazoleethanol	1.99	CE_C	Thr	1.56
CE_C	Gln	1.99	CE_C	Thiaproline	1.55
CE_A	XA0055	1.98	CE_C	Creatine	1.55
CE_C	Pro	1.96	CE_A	Adenosine 5'-phosphosulfate	1.54
CE_C	GABA	1.95	CE_C	Tyr	1.53
CE_C	Thiamine	1.95	CE_A	p-Toluic acid	1.52
CE_A	Ethanolamine phosphate	1.94	CE_C	3-Methylhistidine	1.52
CE_C	Streptomycin sulfate_+H2O_divalent	1.92	CE_A	GDP	1.51
CE_A	Glutaric acid	1.84	CE_C	Nicotinic acid	1.51
CE_C	1-Methyl-4-imidazoleacetic acid	1.81	CE_C	Hydroxyproline	1.51
CE_C	XC0065	1.80	CE_A	Sulfotyrosine	1.50

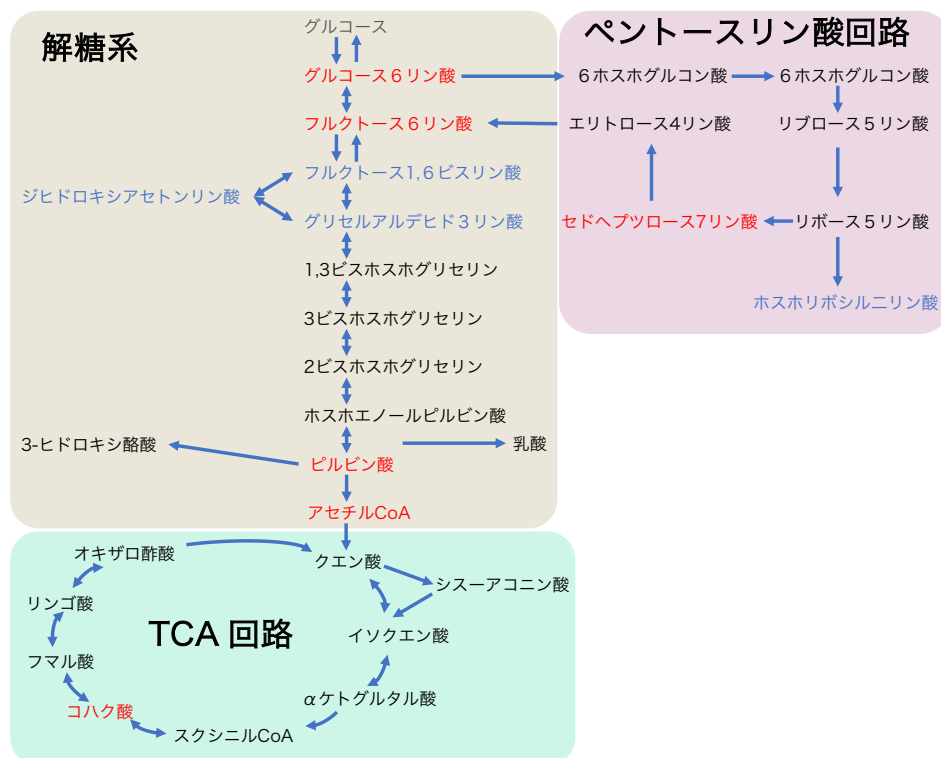
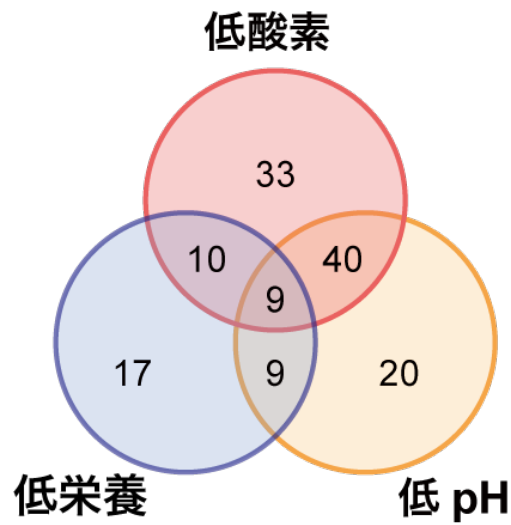


図2-2 低 pH 培養下における中心代謝物変動

中心代謝経路である解糖系、ペントースリン酸経路及び TCA 回路を示す。赤字は通常培養 (pH7.4) に対して低 pH(pH6.8)培養の変動比が 1.5 倍以上変動した代謝物、青字は通常培養に対して低 pH 培養下での変動比が 0.75 倍以下となった代謝物を示した。

A



B

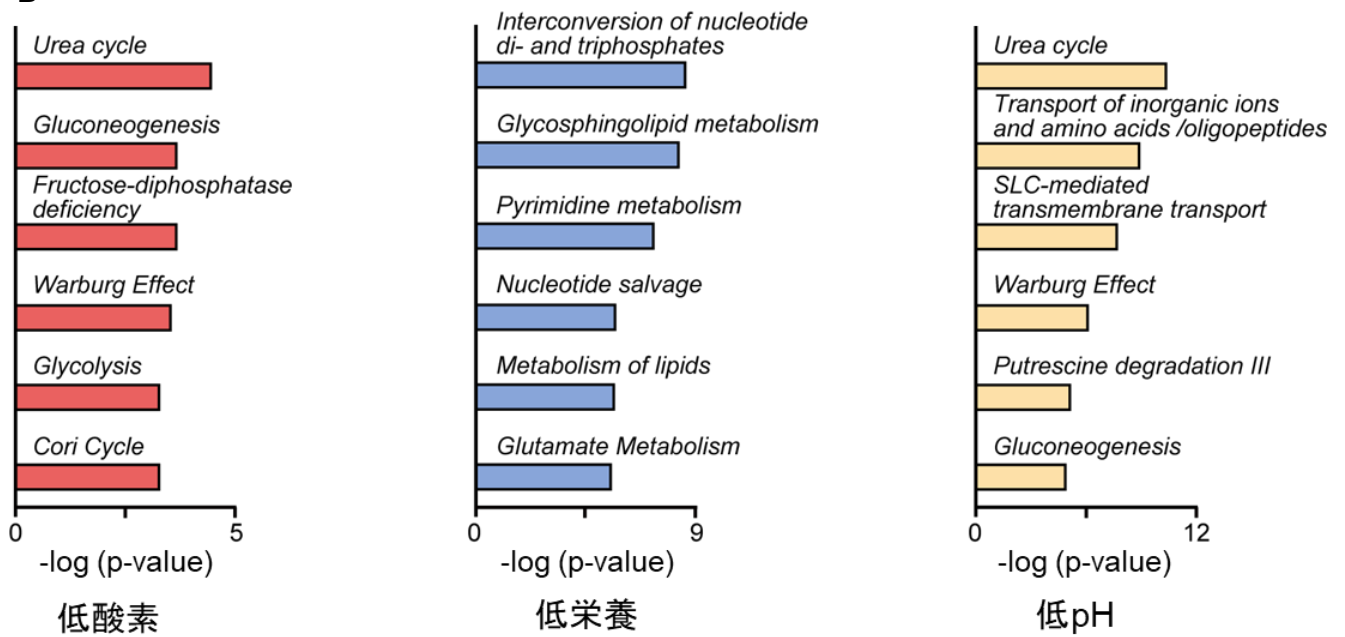


図 2-3 低酸素・低栄養・低 pH(pH6.8)培養下における増加代謝物の比較

図 2-1 で抽出した、PANC-1 細胞における各培養下で変動した代謝物の比較を行った。ベン図の中の数字はそれぞれの領域に該当する代謝物数を示す。下段はパスウェイ解析から予想された各培養下における変動代謝経路を示す。横軸は p-value のログの負の値 ( $-\log(p\text{-value})$ ) を示す。



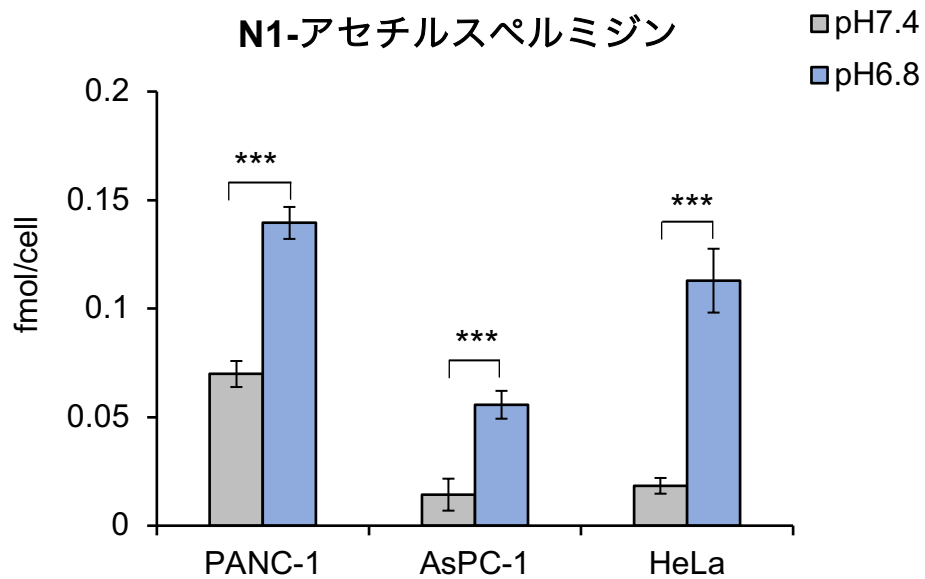
路が最も変動し、アミノ酸やイオンのような低分子代謝物の輸送、糖代謝関連の代謝経路が変動していた。低酸素培養下と低 pH(pH6.8)培養下では共通して尿素回路が最も亢進していた (図 2-3. B)。低 pH(pH6.8)培養下での上昇変動代謝物のパスウェイ解析では、中心代謝経路のうち、解糖系、糖新生は上昇していたが、TCA サイクル(-log<sub>10</sub>(p-value)=3.7)、ペントースリン酸経路(-log<sub>10</sub>(p-value)=3.4)と変動が緩やかであった。

### 2-3-3 低 pH(pH6.8)培養下のポリアミン経路代謝物 N1-アセチルスペルミジンの変動

2-3-1 の結果で、PANC-1 細胞において、低 pH (pH6.8) 培養 24 時間後に、ポリアミン経路の代謝物である N1-アセチルスペルミジンが最も増加していた。N1-アセチルスペルミジンが PANC-1 細胞以外にも増加しているか検討するために、他のすい臓がん細胞株である AsPC-1 細胞や、子宮頸がん細胞である HeLa 細胞株を用いた。低 pH (pH6.8) 培養 24 時間後、AsPC-1 及び HeLa 細胞でも、N1-アセチルスペルミジンが顕著に増加した (図 2-4)。

### 2-3-4 低 pH(pH6.8)培養下における SAT1 発現変動

N1-アセチルスペルミジンが細胞内で増加する要因として、その生成に関わる代謝酵素である SAT1 の発現増加を仮定した。N1-アセチルスペルミジンはスペルミジンが Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1 (SAT1) によって 1 位のアミン基がアセチル基に変換された代謝物である (図 2-5)。3 細胞株 (PANC-1, AsPC-1, HeLa 細胞) における SAT1 の遺伝子発現を検討する為、これらの細胞を低 pH (pH6.8) 培養 24 時間後に RNA を抽出し、RT-qPCR を用いて SAT1 の mRNA を測定したところ、PANC-1, AsPC-1, HeLa 細胞株において、低 pH (pH6.8) 培養 24 時間後で SAT1 の遺伝子発現が有意に上昇していた(図 2-6)。



**図 2-4 3細胞株を用いた低 pH(pH6.8)培養下における N1-アセチルスペルミジン変動**

PANC-1, AsPC-1, HeLa 細胞において、通常 (pH7.4)、及び低 pH (pH6.8) 培養 24 時間後の N1-アセチルスペルミジン (fmol/cell) を示す。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。検定は Student t-test 法を用いた。\*\*\*P < 0.001 とする。

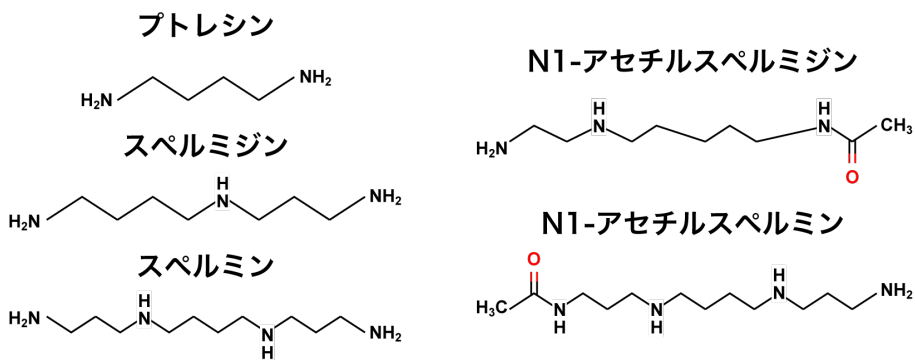


図 2-5 ポリアミン代謝経路及び構造式

アミノ酸であるアルギニンを発端に、オルニチン、プトレシン、スペルミジンを経て N1-アセチルスペルミジンが生成されるポリアミン合成経路を示す。

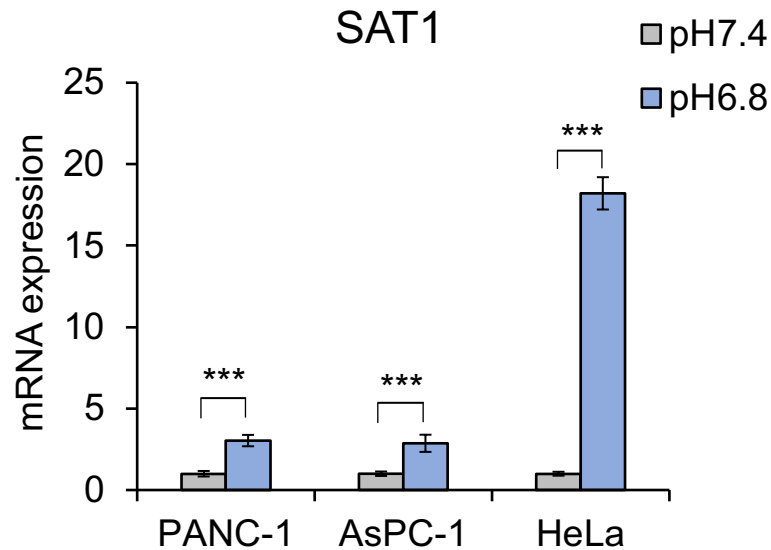


図 2-6 低 pH(pH6.8)培養下におけるスペルミジンアセチルトランスフェラーゼ SAT1 の遺伝子発現変動

通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養 24 時間後 PANC-1、AsPC-1、HeLa 細胞における SAT1 の遺伝子発現変動を RT-qPCR で評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\*P < 0.05; \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 とする。

### 2-3-5 低 pH(pH6.8)培養下におけるポリアミン代謝経路関連代謝物の変動

低 pH (pH6.8) 培養 24 時間後のポリアミン代謝物を測定するために、CE-TOF-MS を用いて検討した。

低 pH (pH6.8) 培養 24 時間後の PANC-1 細胞、AsPC-1 細胞、及び HeLa 細胞では、N1-アセチルスペルミジンの基質となるスペルミジンは有意に減少した。

また、スペルミジンの基質であるプトレシンは全ての細胞株で減少した。一方、ポリアミン合成経路の上流にあるアルギニン、オルニチンは AsPC-1 細胞でのみ減少し、ポリアミン代謝経路の末端であるスペルミンや N1-アセチルスペルミンは変動しなかった。(図 2-7)。

### 2-3-6 低 pH(pH6.8)培養下におけるポリアミン代謝関連酵素の遺伝子発現変動の検証

ポリアミン代謝酵素の遺伝子発現変動を検討する為、低 pH (pH6.8) 培養 24 時間後に PANC-1、AsPC-1、及び HeLa の RNA を抽出し、RT-qPCR を用いて各酵素の mRNA を測定した。全ての細胞株において PAOX (Polyamine oxidase) が有意に減少し、SRM (spermidine synthase) は減少傾向であった。その他の SMS (spermine synthase)、ODC1 (ornithine decarboxylase 1)、SMOX (spermine oxidase)、及び ARG2 (Arginase 2) などは共通して変動していなかった(図 2-8)。

### 2-3-7 低 pH(pH6.8) 培養下における尿素回路酵素の遺伝子発現及び代謝物の変動

尿素回路はポリアミン生合成経路と接続する代謝経路であるため (図 2-9)、尿素回路の酵素遺伝子発現を検討した。尿素回路の代謝酵素のうち、低 pH(pH6.8)

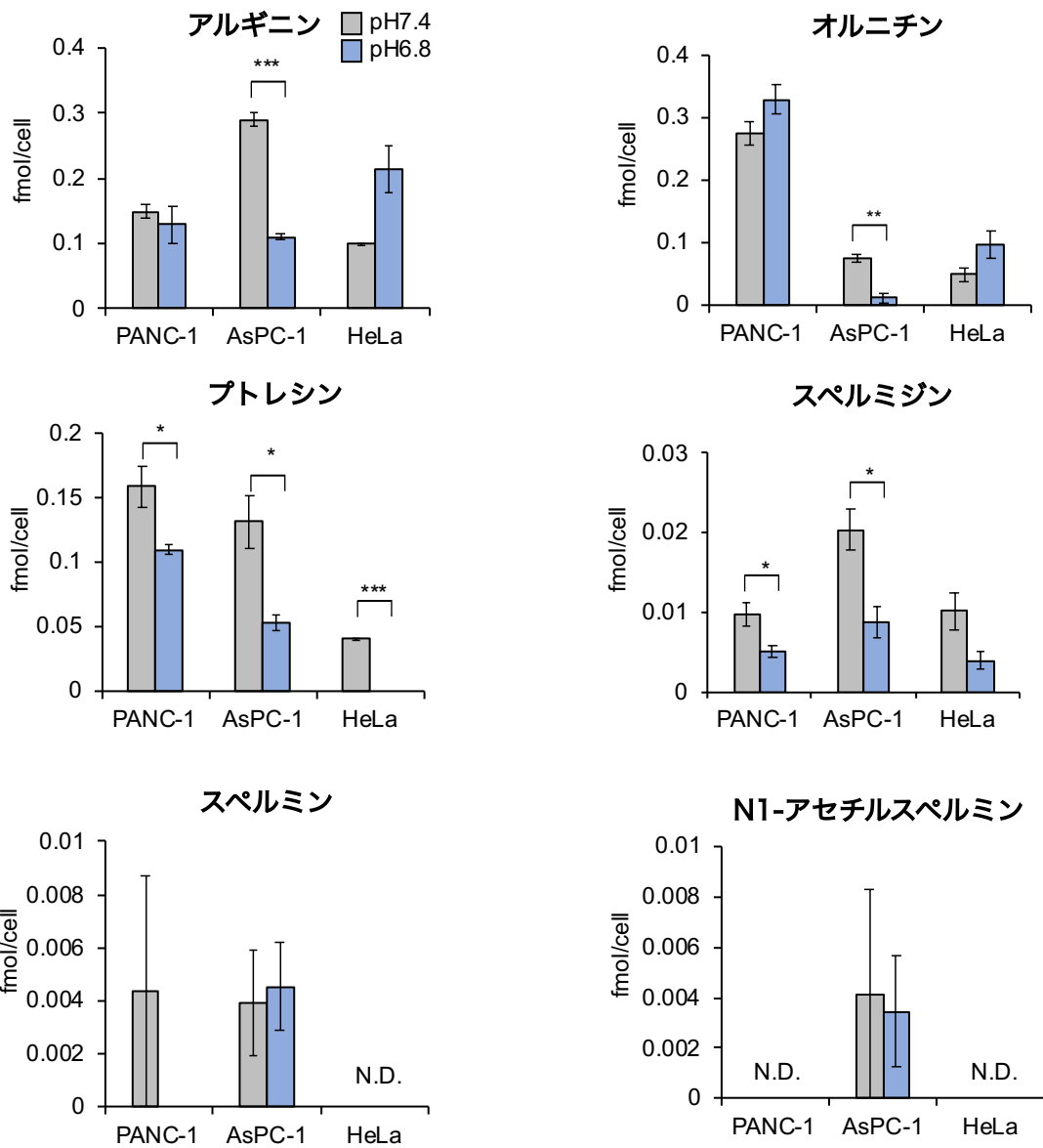
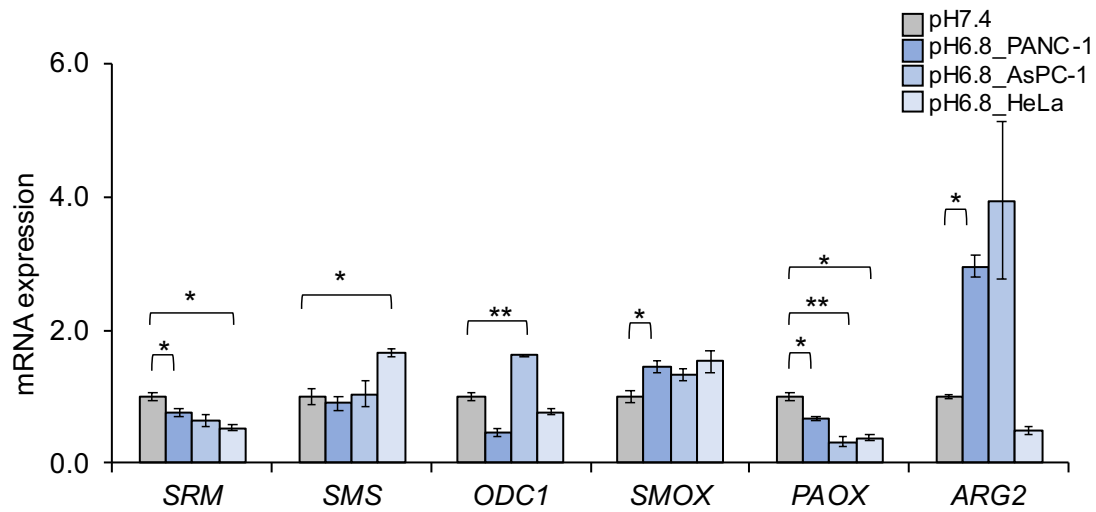


図 2-7 低 pH(pH6.8)培養下におけるポリアミン代謝物変動

通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養 24 時間後 PANC-1、AsPC-1、HeLa 細胞におけるポリアミン代謝物、アルギニン、オルニチン、プトレシン、スペルミジン、スペルミン、N1-アセチルスペルミン (fmol/cell) を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。検出限界以下であったものは N.D.(Not detected) で示した。Student t-test を実施。\*P < 0.05; \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 とする。



**図 2-8 低 pH(pH6.8)培養下におけるポリアミン代謝酵素の遺伝子発現変動**

通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養 24 時間後 PANC-1、AsPC-1、HeLa 細胞におけるポリアミン代謝酵素の遺伝子発現変動を RT-qPCR で評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\* $p < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  とする。

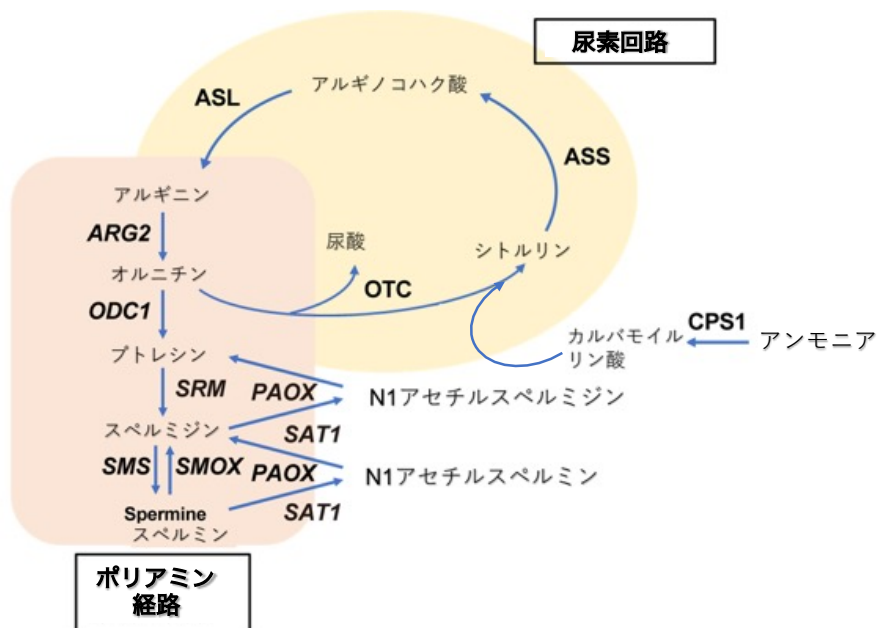


図 2-9 ポリアミン合成経及び尿素回路における、代謝物及び酵素  
 ポリアミン合成経及び尿素回路における、代謝物及び酵素を示す。



培養下において PANC-1 細胞と AsPC-1 細胞が共通して変動する遺伝子発現を、PANC-1 細胞、As PC-1 細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析で絞り込みをしたところ、*CPS1*(carbamoyl phosphate synthase 1)遺伝子発現が共通して低下していた(表 2-5)。そこで PANC-1、AsPC-1 及び HeLa 細胞を用いて低 pH(pH6.8)培養 24 時間後、*CPS1* の mRNA を RT-qPCR で測定したところ、3 細胞株に共通して *CPS1* の遺伝子発現が減少していた。

更に、CE-TOF-MS を用いて、PANC-1、AsPC-1 及び HeLa 細胞の尿素回路代謝物定量を行ったが、共通して変動する代謝物はなかった(図 2-10)。

### 2-3-8 低 pH(pH6.8) 培養下におけるメチオニンサルベージ回路及びメチオニン回路酵素の遺伝子発現及び代謝物の変動

メチオニンサルベージ回路はポリアミン代謝経路にアミノプロピル基の供給源として、結合している。メチオニン回路はメチオニンサルベージ回路と接続している(図2-11)。

このため、メチオニンサルベージ回路及びメチオニン回路の酵素遺伝子発現を検討した。メチオニンサルベージ回路及びメチオニン回路の代謝酵素のうち、低pH(pH6.8)培養下においてPANC-1細胞とAsPC-1細胞が共通して変動する遺伝子群を、PANC-1細胞、As PC-1細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析で絞り込みをしたところ、*CTH*(cystathionine gamma-lyase)、*MAT1A* (methionine adenosyltransferase 1A)、*MAT2A* (methionine adenosyltransferase 2A)、*DNMT1*(DNA methyltransferase 1)、*AHCYL2*,( adenosylhomocysteinase 2)、*MTAP*(methylthioadenosine phosphorylase)、*MRI1*(methylthioribose1-phosphate isomerase 1)の遺伝子発現が2細胞株で共通に変動していた (表2-5)。

そこでPANC-1細胞を用いて、低pH(pH6.8)培養24時間後、*CTH*、*MAT1A*、*MAT2A*、*DNMT1*、*AHCYL2*、*MTAP*、*MRI1*の遺伝子発現をRT-qPCRで測定し

**表 2-5 低 pH(pH6.8)培養下における PANC-1、AsPC-1 において、共通して変動する遺伝子発現群**

PANC-1、及び AsPC-1 細胞における、通常(pH7.4)培養と低 pH(pH6.8)培養下の遺伝子発現変動比 (PANC-1 pH6.8/pH7.4、AsPC-1 pH6.8/pH7.4) を示した。

**メチオニンサルベージ回路及びメチオニン回路**

	PANC-1 pH6.8/pH7.4	AsPC-1 pH6.8/pH7.4
CTH	2.27	1.34
MAT1A	0.62	0.00
MAT2A	0.33	0.76
DNMT1	0.71	0.67
AHCYL2	0.92	0.83
MTAP	0.58	0.37
MRI1	0.52	0.79

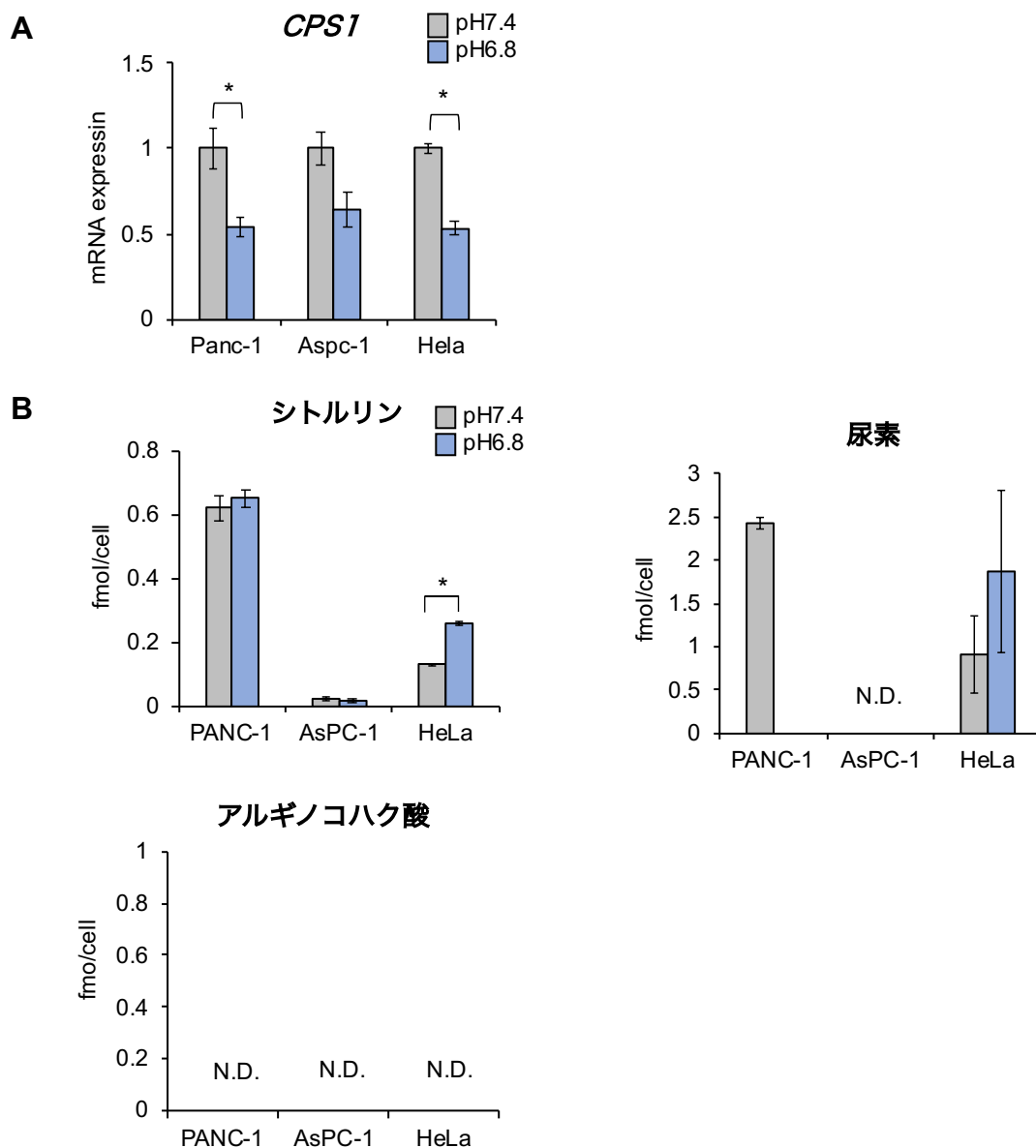


図2-10 低 pH(pH6.8)培養下における尿素回路酵素の遺伝子発現及び代謝物変動

通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養 24 時間後 PANC-1、AsPC-1、HeLa 細胞におけるカルベシルリン酸合成酵素 (CPS1) 遺伝子発現変動を RT-qPCR で評価した。また、尿素回路代謝物シトルリン、尿素、アルギノコハク酸(fmol/cell)を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\*P < 0.05 とする。A; 縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。B; 検出限界以下であったものは N.D.(Not detected)で示した。

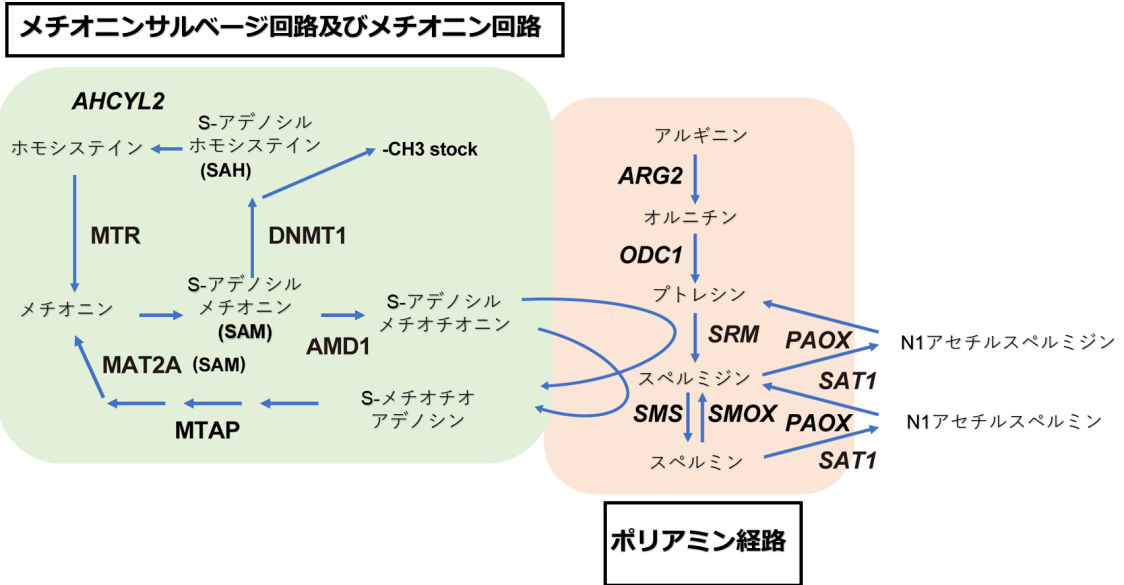


図 2-11 メチオニンサルベージ回路及びメチオニン回路における代謝物、及び酵素

メチオニンサルベージ回路及びメチオニン回路における代謝物、及び酵素を示す。赤字は低 pH 培養下で発現が増加した代謝酵素、青字は減少した代謝酵素を示す。

たところ、*MAT2A*、*DNMT1*が有意に低下していた (図2-12)。次にAsPC-1、及びHeLa細胞を用いて低pH(pH6.8)培養24時間後、*MAT2A*、*DNMT1*のmRNAをRT-qPCRで測定したところ、3細胞株に共通して*MAT2A*の遺伝子発現が減少していた (図2-13)。

更に、CE-TOF-MSを用いて、PANC-1、AsPC-1及びHeLa細胞の尿素回路代謝物定量を行ったが、共通して変動する代謝物はなかった (図 2-14)。

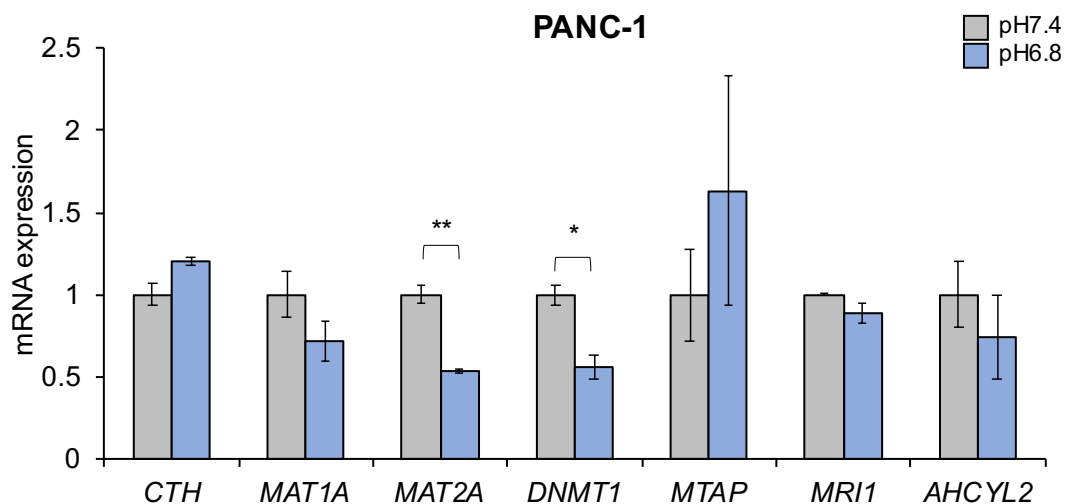
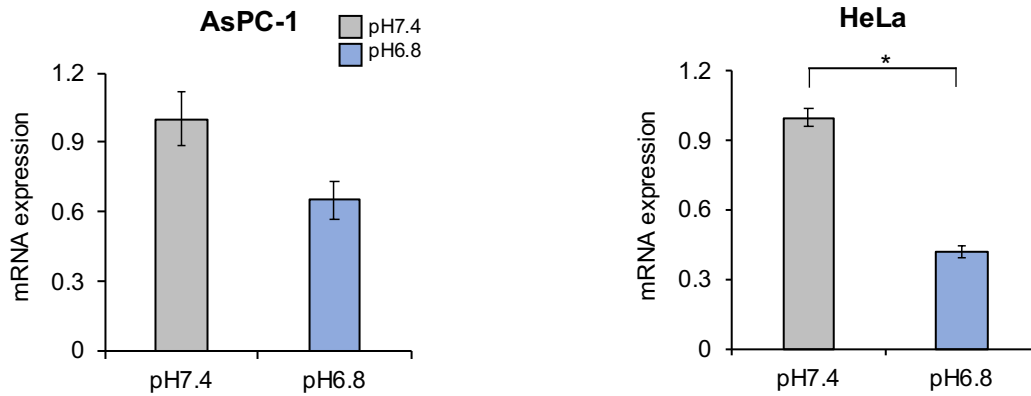


図 2-1 2 低 pH(pH6.8)培養下におけるメチオニンサルベージ回路及びメチオニン回路酵素の遺伝子発現変動

通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養 24 時間後 PANC-1 細胞におけるメチオニンサルベージ回路及びメチオニン回路代謝酵素群の遺伝子発現変動を定量 PCR(リアルタイム PCR)で評価した。縦軸は通常 pH7.4 培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\*P < 0.05; \*\*P < 0.01 とする。

## MAT2A



## DNMT1

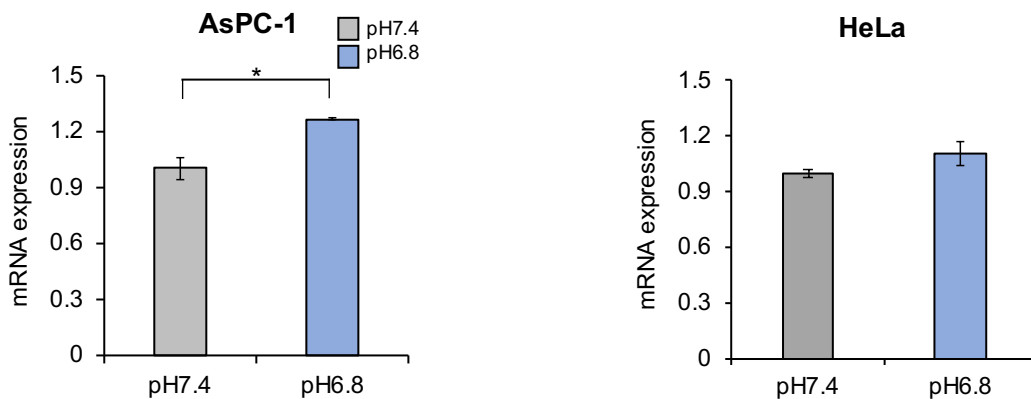


図 2-13 低 pH 培養下におけるメチオニンサルベージ回路及びメチオニン回路代謝酵素 MAT2A、DNMT1 遺伝子の発現変動

通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養 24 時間後 AsPC-1、HeLa 細胞における MAT2A と DNMT1 の遺伝子発現変動を RT-qPCR で評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\*P < 0.05; \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 とする。

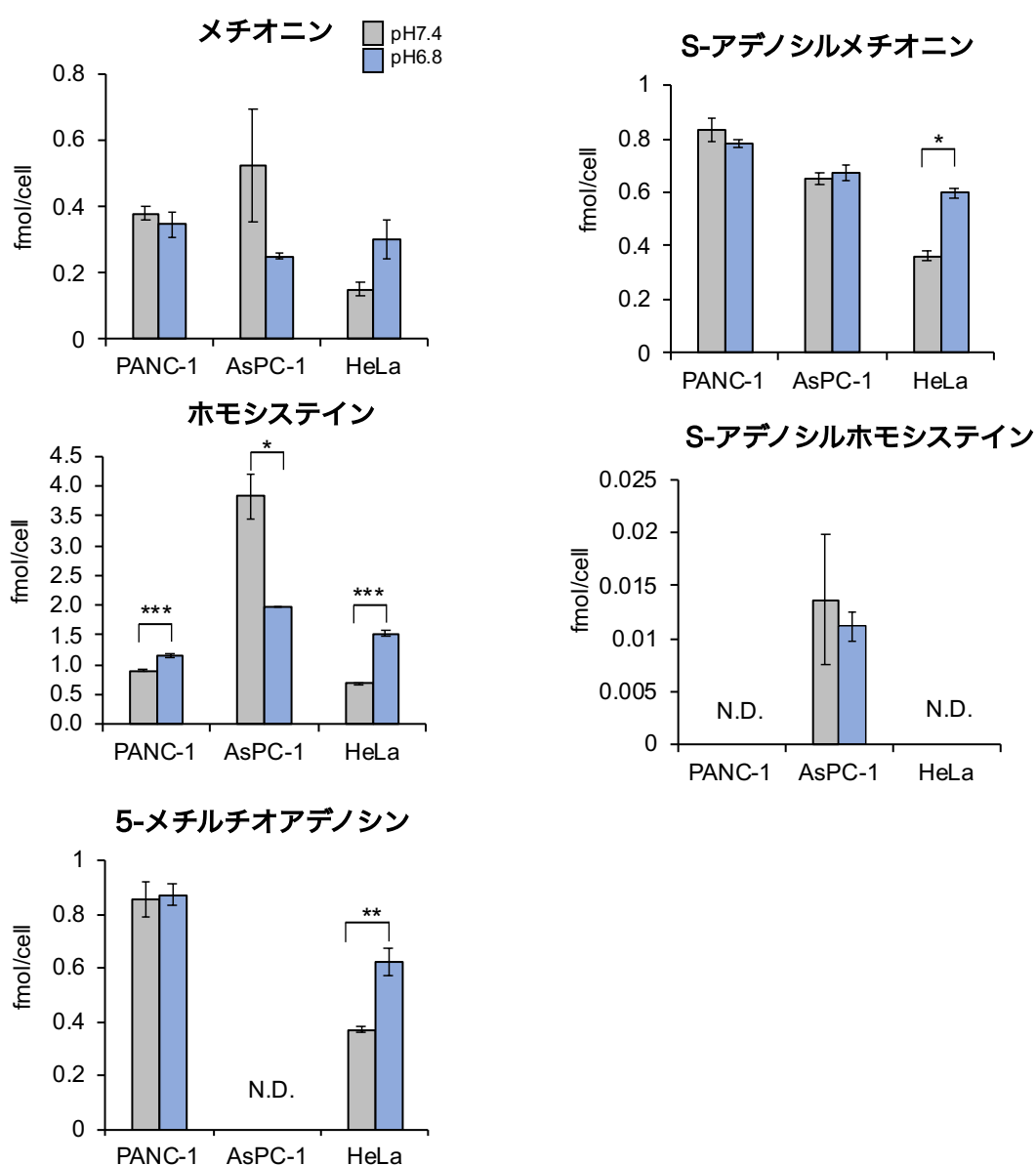


図2-14 低pH培養下におけるメチオニンサルベージ回路及びメチオニン回路代謝物の変動

通常 (pH7.4)、及び低pH(pH6.8)培養24時間後PANC-1、AsPC-1、HeLa細胞におけるメチオニンサルベージ回路及びメチオニン回路代謝物、メチオニン S-アデノシルメチオニン、ホモシステイン、S-アデノシルホモシステイン、5-メチルチオアデノシン (fmol/cell)を示した。独立した3回の実験の平均 ±S.E.M 値を示した。検出限界以下であったものはN.D.(Not detected)で示した。Student t-test を実施。\*P < 0.05; \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 とする。



## 2-4 考察

本章では、腫瘍微小環境の一要因である低 pH (pH6.8) 培養下で変動する代謝物と遺伝子発現について、①PANC-1、AsPC-1、HeLa 細胞で共通して、N1-アセチルスペルミジンが増加し、スペルミジンと、プトレシンは低下した。②PANC-1、AsPC-1、HeLa 細胞で共通して、SAT1 の遺伝子発現が増加し、SRM、PAOX、CPS1、MAT2A の遺伝子発現が低下していた。

がん細胞は低 pH 環境応答として、IL-8 や VEGF といった血管新生関連因子の発現誘導 (12, 59) や、コレステロール生合成関連酵素である HMGCS1、酢酸代謝関連酵素である ACSS2 の発現誘導が報告されている (57)。いずれも遺伝子発現変動であるが、今回、低 pH(pH6.8)環境下における代謝物の変動に着目し、がん細胞の環境適応機構について検討した。低 pH(pH6.8)培養 24 時間後に N1-アセチルスペルミジンが増加し、その生合成酵素である SAT1 の遺伝子発現が上昇していることを明らかにした。虚血性前立腺癌でポリアミン代謝経路が亢進していること (60)や、皮膚がん、乳がん、結腸がん細胞内のポリアミン濃度の上昇は、がん細胞の増殖や正常組織の腫瘍化と関連することが明らかになっている(61-63)ことから、低 pH 環境でポリアミン代謝経路が何らかの作用を及ぼし、がん悪性化に寄与する可能性が示唆された。

低 pH 環境下でポリアミン代謝経路の変動に伴い尿素回路が変動すると予測したが、代謝物量においては影響がなかった。PANC-1、AsPC-1、HeLa 細胞株において CPS1 は減少傾向が見られた。これは細胞外低 pH に対する一時的な適応反応である可能性と、下流の SAT1 が関与するポリアミン経路の亢進による二次的な反応である可能性が考えられた。

一方、メチオニン回路は DNA メチル化などに必要なメチル基を生成する。DNA のメチル化により遺伝子発現が抑制され、個体の発生・成長やがん細胞の増殖能維持に重要な役割を果たしている(64)。メチオニン回路は、ポリアミン経路を S アデノシルメチルチオニンを介して制御することが報告されており(65)、低 pH(pH6.8)環境においてポリアミン経路とメチオニン回路が連動している可

能性が示唆された。しかし、PANC-1、AsPC-1、HeLa 細胞共に共通して変動するメチオニン回路代謝物は確認されず、関連遺伝子の発現は MAT2A のみ変動した。メチオニン回路はポリアミン代謝経路と連動しないことが示唆された。

また、N1-アセチルスペルミジンは SLC3A2 から細胞外に排泄されることが報告されており(66)、低 pH(pH6.8)環境の生存応答として、こうした代謝物トランスポーターの発現や活性が変動している可能性もある。また、ポリアミンは必要に応じて N1-アセチルスペルミジンは PAOX を経てプトレシンに戻す経路があり、(図 2-4) 生命維持に必要な代謝物であることから、プトレシン、スペルミジン、N1-アセチルスペルミジンが環境に応じて増減され、環境に適応していると思われる。低 pH(pH6.8)環境ではプトレシン、スペルミジン、N1-アセチルスペルミジンががん細胞の生命維持に直接関与していると考えられた。

以上の結果から、低 pH 環境におけるがん細胞の代謝変動として、ポリアミン代謝物 N1-アセチルスペルミジンと SAT1 の上昇が認められた。

## 第3章 ポリアミンが低 pH 培養下でがん細胞の生存維持に及ぼす影響

### 3-1 緒言

第2章の検討で、細胞外 pH が pH 7.4 から pH 6.8 に低下すると、スペルミジン / スペルミン N1-アセチルトランスフェラーゼ (SAT1) を介して N1 アセチルスペルミジンが増加し、スペルミジンの低下に寄与していた。このことから、本章では、ポリアミン代謝物が低 pH 環境下のがん細胞にどのような影響を及ぼすか検討した。

ポリアミンは、すべての生体細胞に共通して存在するポリカチオン性のアルキルアミンであり、代表的なものは、プトレスシン、スペルミン、スペルミンが知られてる。ポリアミンは、アミン基由来の電荷分布の柔軟性により、DNA、RNA、タンパク質、酸性リン脂質など、さまざまな負電荷を帯びた高分子と結合する(66)。そのため、ポリアミンは、クロマチン構造の維持、イオンチャネルの制御、膜の安定性の維持、フリーラジカルの消去などに加え、細胞の成長、増殖、分化、移動、遺伝子の制御、タンパク質や核酸の合成などに重要な役割を果たす(67)。ポリアミンとがんの関係について多くの報告がされている。例えば、皮膚がん、乳がん、結腸がん細胞内のポリアミン濃度の上昇は、がん細胞の増殖や腫瘍化と関連することが明らかになっている(61-63)。またポリアミンは尿中や唾液中に排泄され、大腸がん患者やすい臓がん患者では高値を示すことが知られている(68,69)。しかし、ポリアミンが、がん細胞の生存維持にどのように関与するかについては、未だ解明されていない。

本章では、ポリアミンががん細胞の生存に与える影響を明らかにする為、以下の検討を実施した。まず、ポリアミンが細胞増殖能に及ぼす影響を検討するため、細胞増殖(SRB)アッセイを用いて測定した。次に好気呼吸によるエネルギー獲得の場として重要なミトコンドリアの活性を測定する為、ミトコンドリア膜電位、及びフラックスアナライザーによる酸素消費速度 (OCR) を測定した。最

後に、細胞増殖に重要な Erk、及び Akt の発現変動をイムノブロット法によって検証した。

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 細胞増殖 (SRB) アッセイ

細胞数を定量する細胞増殖 (SRB) アッセイは以下のように行った。96well に 3000cells / well で PANC-1、HeLa 細胞を播種し、24 時間後に培地を除去し、通常培地、低 pH 培地にそれぞれプトレシン、スペルミジン、N1-アセチルスペルミジン及びスペルミジンを 3  $\mu$ M、10  $\mu$ M、30  $\mu$ M、100  $\mu$ M、300  $\mu$ M、1000 $\mu$ M になるように添加して、72 時間培養した。培地を除去し、100  $\mu$ l の氷冷した 10% (wt/vol) trichloroacetic acid (TCA) (SIGMA、#6399)を加え、細胞を固定した。4°C で 20 分間静置した後、水道水で 3 回洗浄した後、100  $\mu$ l の 1%酢酸に溶解させた 0.4% (wt/vol) Sulforhodamine B sodium salt (SRB) (SIGMA、#S1402)を加え、室温で 20 分間静置した。未結合の色素は 1%酢酸で 3 回洗浄した後、室温にて乾固させた。次に 100  $\mu$ l の 10 mM Tris 溶液を加え、室温で 20 分静置した。570 nm の吸光度 OD を測定した。

### 3-2-2 ミトコンドリア膜電位測定

3.5cm ガラスボトムディッシュに PANC-1、HeLa 細胞をそれぞれ 2 x 10<sup>5</sup> cells で播種し 24 時間培養後、培地を除去し、PBS で 1 回洗浄した後、プトレシン、スペルミジン、N1-アセチルスペルミジンを 0mM、0.1mM、1mM になるように添加した通常培地と低 pH 培地を加え、更に 24 時間培養した。MT-1 Dye を培養培地で 10 倍希釈した Working solution を作成後、100 倍希釈になるようにガラスディッシュに添加した。インキュベーター (37°C,5%CO<sub>2</sub>) で 30 分間培養後、共焦点顕微鏡(STERALLIS5, Leica)にて蛍光を観察した。

### 3-2-3 OCR の測定

PANC-1、HeLa 細胞を  $5 \times 10^5$  cells/ml で 100 $\mu$ l ずつ(= $5 \times 10^4$  cells/well)専用の 24well プレートに播き、37°C で 3 時間インキュベートした。さらに適度な培養培地を 150 $\mu$ l/well 加えて 37°C で一晩インキュベートした。キャリブレーション用プレート(Seahorse Bioscience XF24 Extra cellular flux assay kit、Agilent technology)の一番下の透明プレートにキャリブレーション試薬(Seahorse Bioscience XF24 Calibrant、Agilent technology、#100840-000)を 1ml/well 加え、これをプレートが入っていた容器に入れ、CO<sub>2</sub>がない大腸菌用インキュベータにて 37°C で一晩インキュベートした。DMEM 30ml+ピルビン酸 100mM 300 $\mu$ l+グルタミン 200mM 300 $\mu$ l をませたものを用意し、ウォーターバスで 37°C に加熱した。これを pH7.4 または pH6.8 になるように、NaOH または HCl で調製し、試験培地とした。試験培地を 5ml 取り、プトレシンを 1mM になるように加え、Cell culture plate を洗浄後、675 $\mu$ l/well 培地を加え、大腸菌用インキュベータにて 37°C で 1 時間インキュベートした。1mg/ml Oligomycin (ATP 共役剤)、1mM FCCP (ETC 促進剤)、10mM Antimycin A (ミトコンドリア阻害剤 A)、1mM Rotenone (ミトコンドリア阻害剤 B) を適量の使用試薬と混合し、XF24 (Agilent technology) にプレートと共にセットし、OCR を測定した。

### 3-2-4 培養細胞からの全細胞タンパク質抽出液の調整

イムノブロット法に使用する全細胞抽出液調整は以下のように行った。まず、細胞培養から培地を除去し、氷上で冷やした D-PBS(-)を 5mL で 2 回洗浄後、PBS を除去し、RIPA Buffer+P.I.+PhosSTOP (RIPA バッファー (和光純薬株式会社、#182-02451)、cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche、#11697498001)、PhosSTOP (Roche、#4906845001 を mix したもの) を 100 $\mu$ l 加え、dish 全体に行き渡らせた。Cell Lifters (zorning®、#3008) で細胞を剥が

したのち、エッペンチューブに回収した。氷上で 10 分おきにタッピングしながら合計 30 分静置した。その後、15,000rpm で 10 分遠心して、上清を細胞抽出液とした。回収後、Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad、#5000006) を用いてタンパク質濃度を測定した。

### 3-2-5 イムノブロット法(MAPK、p-MAPK、Akt、p-Akt)

サンプルに対して 1/4 量の 5 × sample buffer (250 mM Tris-HCl (pH8.0)、10% (w/v) SDS (Sodium Dodecylsulphate)、50% (w/v) Glycerol、0.5% (w/v) bromophenol blue、500 mM DTT (dithiothreitol)) を加え、95 °C で 5 分間加熱して変性させたものを電気泳動用のサンプルとした。

電気泳動には 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた。Running gel solution は、2ml 蒸留水、30% (w/v) アクリルアミド溶液 1.7ml、1.5 M Tris-HCl (pH8.8) 1.3ml、10% (w/v) SDS 溶液 50 µl、10% (w/v) APS (ammonium peroxodisulfate) 溶液 50 µl、TEMED (tetra methylethylene diamine) 2 µl を混合させ、1.0mm 厚ガラスプレート(BioRad、#1653311)と、ショートプレート (BioRad、#1653308) キャスティングスタンドで重ねた隙間に流し込み、さらに Milli Q 水を 1ml を上から静かに添加し、室温で 30 分間重合させた。Milli Q 水を捨て、stacking gel solution として蒸留水 1.4 ml、30% (w/v) アクリルアミド溶液 330 µl、1 M Tris-HCl (pH6.8) 250 µl、10% (w/v) SDS 溶液 20 µl、10% (w/v) APS 溶液 20 µl、TEMED 2 µl を混合したものを添加し、室温で 30 分で重合させた。電気泳動用緩衝液は 10 × SDS PAGE (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis) 用 buffer (30 g Trizma、10 g SDS、144 g Glycin、蒸留水 1 L) を希釈して使用した。泳動時の電流は 0.02A で 20 分、その後 0.04A で 30 分間電気泳動した。

ニトロセルロース膜(Bio-Rad、# 1620113) にかけて転写を行った。転写したのち、膜をブロッキングのため、TBS-T(0.05% (v/v) Tween-20) で希釈した

5%(w/v)スキムミルクまたは 5%(w/v) BSA (Wako、#012-15113) に浸し、室温で 30 分間反応させた後、1 次抗体による抗原抗体反応を行った。1 次抗体は MAPK(Erk1/2) (Cell Signaling Technology、#9107)、p-MAPK(Erk1/2) (Cell Signaling Technology、#9106)、Akt(Cell Signaling Technology、#4691)、p-Akt(Cell Signaling Technology、#4060) 及び  $\beta$ -actin (SIGMA、#A5441)を用いた。1 次抗体は 5%(w/v)スキムミルクまたは 5% BSA で希釈して 4℃にて一晩で反応させた。

各 1 次抗体におけるブロッキング溶液、抗原抗体反応時の希釈率・希釈溶液及び 2 次抗体を以下に示す。

一次抗体	ブロック溶液	1次抗体希釈溶液	1 次抗体希釈率	二次抗体
MAPK(ERK1/2)	5% milk	5% milk	1:500	mouse
p-MAPK(ERK1/2)	5% milk	5% milk	1:1000	mouse
Akt	5% milk	5% BSA	1:1000	rabbit
p-Akt	5% milk	5% BSA	1:2000	rabbit
Actin	5% BSA	5% BSA	1:5000	mouse

TBS-T で室温 10 分間 3 回洗浄を行い、その後 HRP (horseradish peroxidase) を標識した 2 次抗体を上記表にしたがって反応させた。2 次抗体は、mouse は Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (GE ヘルスケア、# NA931)、rabbit は Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey (GE ヘルスケア、# NA934) を TBS-T で 10,000 倍に希釈して室温で 60 分間反応させた。その後、TBS-T で室温 10 分間 3 回洗浄して、検出反応を行った。検出試薬には Chemi-Lumi One Ultra (Nakarai、#11644)を用い、Fusion FX (VILBER)でバンドを検出した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 PANC-1、HeLa 細胞における低 pH (pH6.8) 培養 72 時間後の、細胞増殖に対するポリアミンの影響

第 2 章で、N1-アセチルスペルミジン、プトレシン、スペルミジン が低 pH(pH6.8)培養 24 時間後の PANC-1 細胞で増加していたことから、N1-アセチルスペルミジン、プトレシン、スペルミジン、が細胞増殖能に及ぼす影響を検討する為、PANC-1、HeLa 細胞を用いて、細胞増殖 (SRB) アッセイを実施した。

それぞれ N1-アセチルスペルミジン、プトレシン、及びスペルミジンを添加した通常 (pH7.4) 培養液と低 pH(pH6.8)培養液で PANC-1 細胞を 72 時間培養した後、細胞増殖能を測定した。増殖能は 0 時間の値を 100%とした。

PANC-1、HeLa 細胞において、ポリアミン無添加 (0 $\mu$ M) の通常 (pH7.4) 培養下と比較して、低 pH(pH6.8)培養下の増殖能が顕著に抑制された (図 3-1、3-2)。

PANC-1、HeLa 細胞において、通常 (pH7.4) 培養下では、N1-アセチルスペルミジンを添加すると、いずれの濃度においても増殖能は変わらず亢進していた。プトレシンを添加すると、濃度依存的に細胞増殖能が亢進した。スペルミジンを添加すると 300 $\mu$ M 以上で細胞増殖が抑制された (図 3-1、3-2)。スペルミンを添加すると、全ての濃度条件で細胞増殖能が抑制された (図 3-3)。

PANC-1、HeLa 細胞において、低 pH(pH6.8)培養下では N1-アセチルスペルミジンを添加すると、細胞増殖能は変わらないか、濃度によっては亢進した (図 3-1、3-2)。プトレシンを添加すると、濃度依存的に細胞増殖が亢進した。スペルミジンを添加すると細胞増殖率は 300 $\mu$ M 以上で増殖能が抑制された。スペルミンを添加すると、全ての濃度条件で細胞増殖能が抑制された (図 3-3)



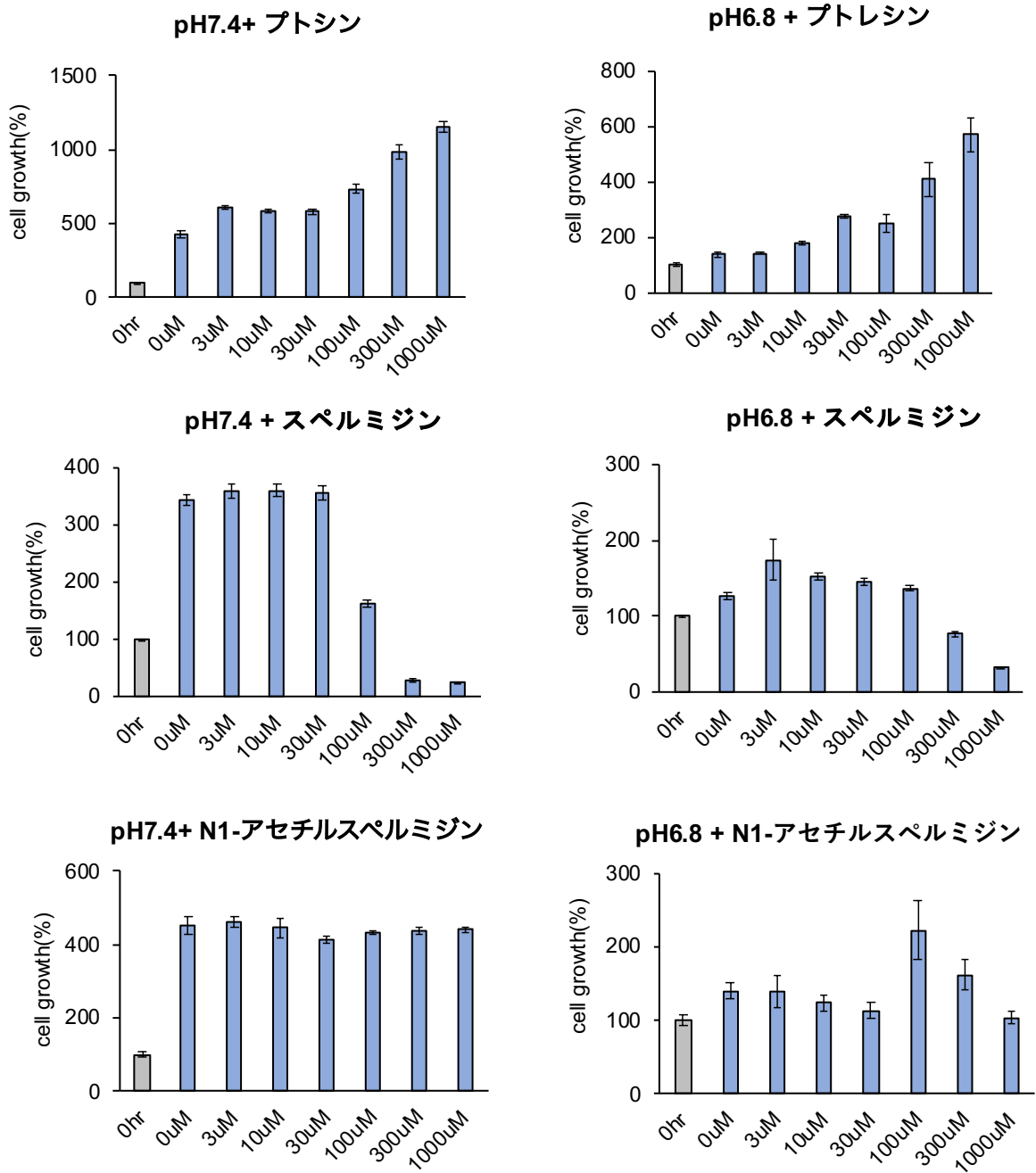


図 3-1 通常 (pH7.4) 培養、低 pH(pH6.8)培養 72 時間後におけるポリアミンの細胞増殖への影響

PANC-1 細胞において、通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養下で、各ポリアミン濃度における細胞増殖能を示す。縦軸は実験開始時の細胞数を%で示す(対 コントロール (%))。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M を示した。

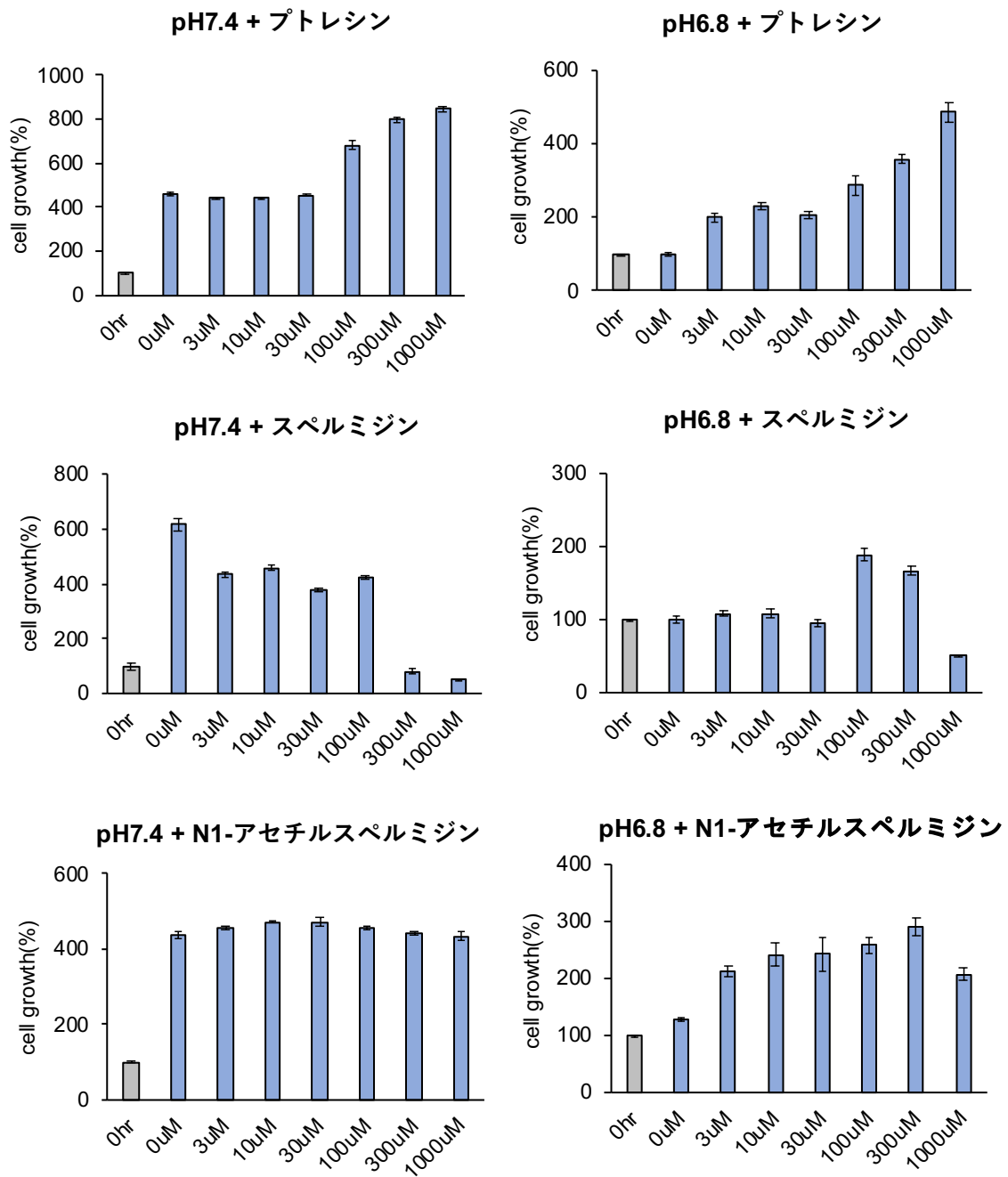


図 3-2 通常 (pH7.4) 培養、低 pH(pH6.8)培養 72 時間後におけるポリアミンの細胞増殖への影響

HeLa 細胞において、通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養下で、各ポリアミン濃度における細胞増殖能を示す。縦軸は実験開始時の細胞数を%で示す(対 コントロール (%))。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M を示した。

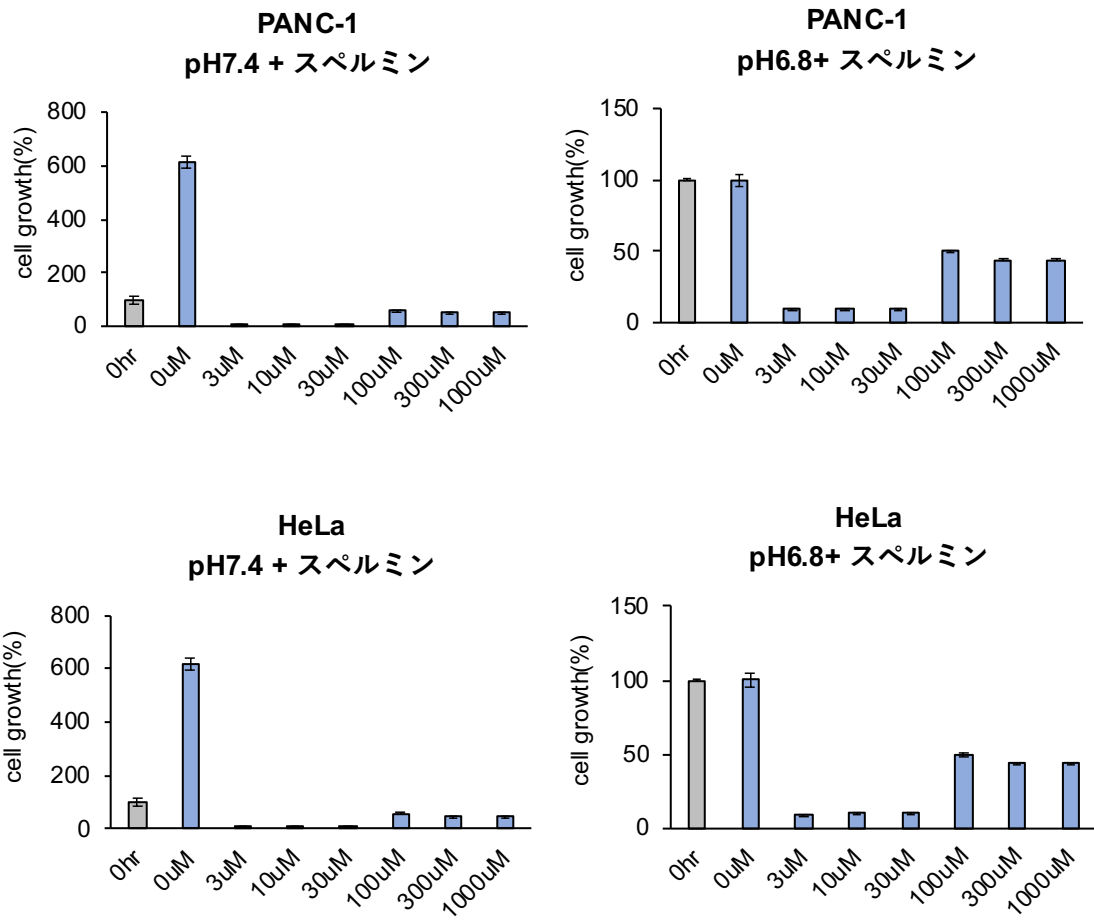


図 3-3 通常培養、低 pH 培養下におけるスペルミンの細胞増殖への影響

PANC-1、HeLa 細胞細胞において、通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養下で、スペルミン濃度における細胞増殖能を示す。縦軸は実験開始時の細胞数を%で示す(対 コントロール(%))。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M を示した。

### 3-3-2 PANC-1 細胞における、通常 (pH7.4) 培養、低 pH (pH6.8) 培養下でのミトコンドリア膜電位に対するポリアミンの影響

ミトコンドリア膜電位はミトコンドリア内膜で ATP 産生などを司る呼吸鎖複合体が、その代謝活性により内膜を境に H<sup>+</sup> イオン濃度勾配による電位差であり、ミトコンドリア活性の維持を示す指標となる。ポリアミン添加 (100 $\mu$ M、1mM) によるミトコンドリア膜電位の変動を検討する為、ミトコンドリア膜電位に依存して集積する色素である MT-1 MitoMP を用いて、ミトコンドリア膜電位を蛍光顕微鏡で測定した (図 3-4、3-5)。

PANC-1、HeLa 細胞において、低 pH (pH6.8) 培養下では通常 (pH7.4) 培養下と比較してミトコンドリア膜電位が有意に低下していた。

PANC-1、HeLa 細胞において、通常 (pH 7.4) 培養下で N1-アセチルスペルミジン、プトレシンを添加することでミトコンドリア膜電位が有意に増加した。スペルミジンを添加すると、1mM でミトコンドリア膜電位が有意に低下した。

低 pH (pH6.8) 培養により低下したミトコンドリア膜電位は、N1 アセチルスペルミジン、プトレシン添加により回復が見られた。一方、1mM のスペルミジン添加では回復が見られなかった (図 3-4、3-5)。

### 3-3-3 N1-アセチルスペルミジン添加による N1-アセチルスペルミジン取り込み量の測定

3-3-2 の検討で、100 $\mu$ M の N1-アセチルスペルミジン、プトレシンを細胞外から添加した低 pH (pH6.8) 培養下で、ミトコンドリア膜電位を回復させた時の、細胞内 N1-アセチルスペルミジン量を CE-TOF-MS を用いて測定した。N1-アセチルスペルミジンを 0 $\mu$ M、1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、100 $\mu$ M になるように調製した低 pH(pH6.8)培養液で、PANC-1 細胞を 24 時間培養した後、2-2-5 の試験方法にしたがって代謝物を抽出し、N1-アセチルスペルミジンを定量した。

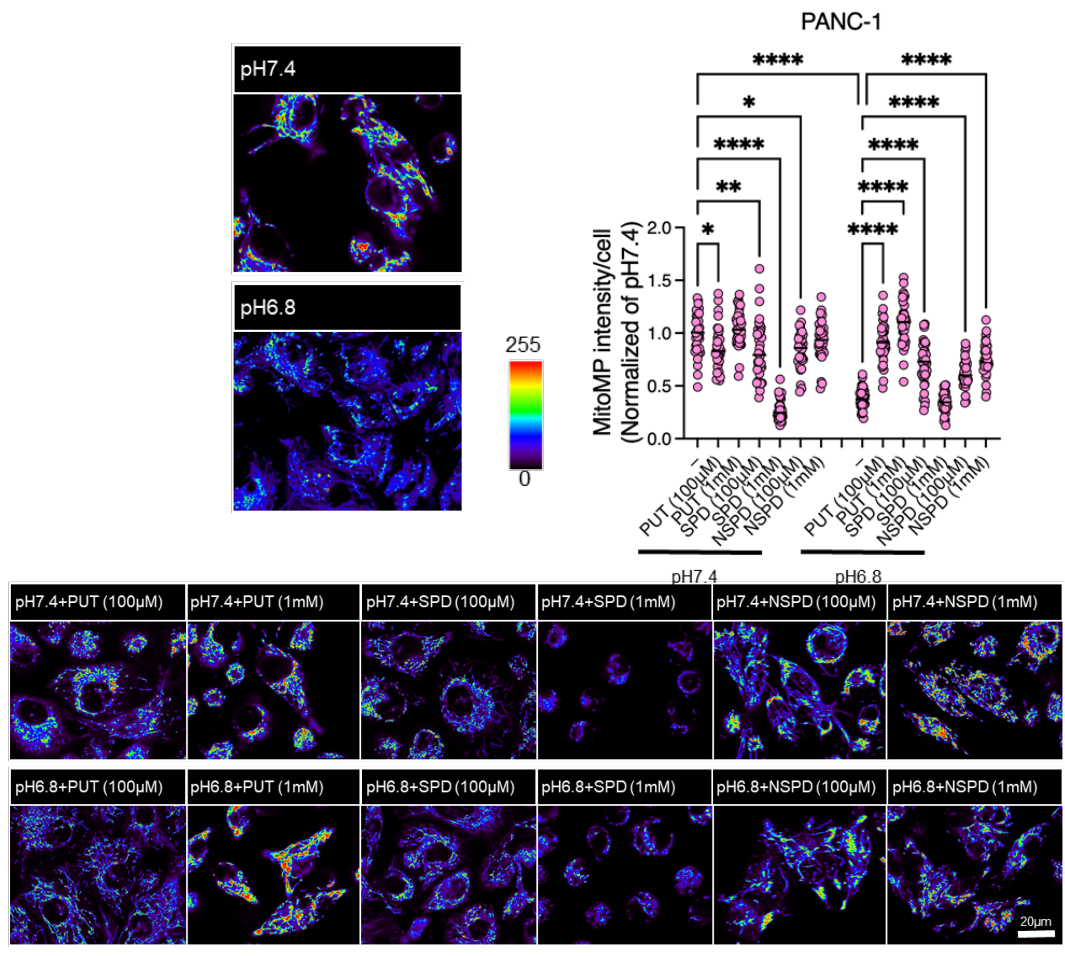


図 3-4 PANC-1 細胞におけるポリアミンのミトコンドリア膜電位機能への影響

PANC-1 細胞において、通常 (pH7.4)、及び低 pH (pH6.8) 培養下にプトレシン (PUT)、スペルミジン (SPD)、N1-アセチルスペルミジン (NSPD) を添加し、各ポリアミンのミトコンドリア機能に及ぼす影響を検討した。各サンプルをミトコンドリア膜電位検出試薬、MT-1 MitoMP Detection Kit を用いて染色し、共焦点顕微鏡で撮影した蛍光イメージングを図に示す。Two-way ANOVA を実施。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  とする。

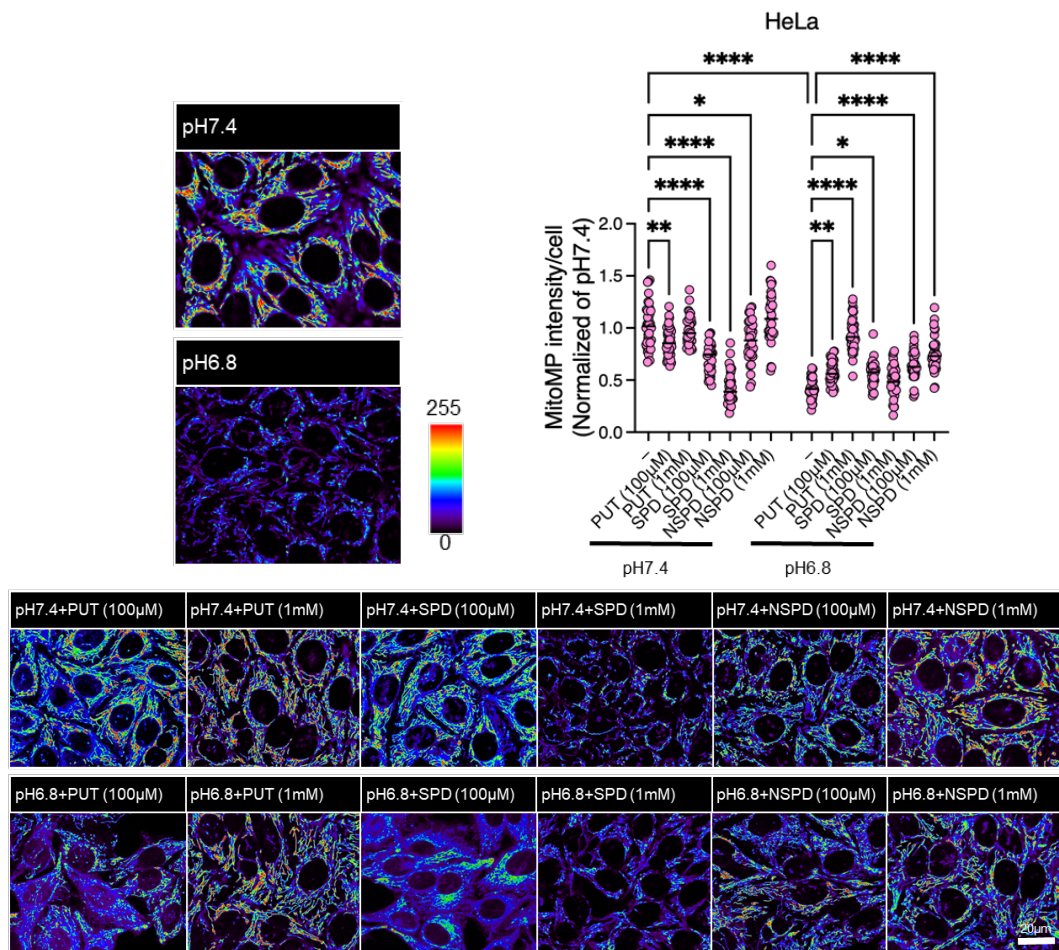


図 3-5 HeLa 細胞におけるポリアミンのミトコンドリア膜電位への影響

HeLa 細胞において、通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養下にプロレシン (PUT)、スペルミジン (SPD)、N1-アセチルスペルミジン (NSPD) を添加し、各ポリアミンのミトコンドリア機能に及ぼす影響を検討した。各サンプルをミトコンドリア膜電位検出試薬、MT-1 MitoMP Detection Kit を用いて染色し、共焦点顕微鏡で撮影した蛍光イメージングを図に示す。Two-way ANOVA を実施。\*P < 0.05; \*\*, P < 0.01, \*\*\*\*P < 0.0001 とする。

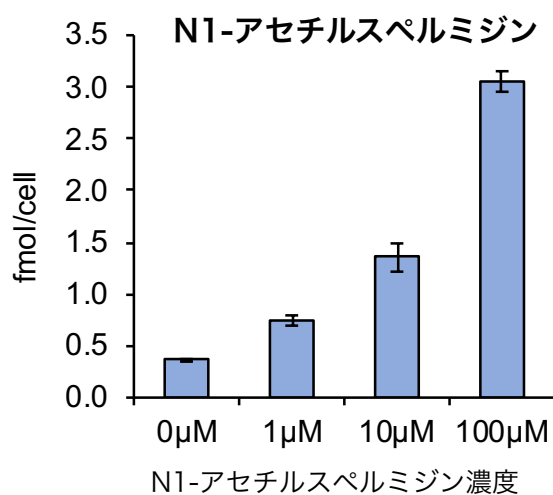
N1-アセチルスペルミジン無添加培地での培養下では、N1-アセチルスペルミジンは 0.35 fmol/cell であり、また N1-アセチルスペルミジン 100 $\mu$ M 培地での培養下では 3.07 fmol/cell であった(図 3-6)。N1-アセチルスペルミジン 100 $\mu$ M 培地培養下と、N1-アセチルスペルミジン無添加培地培養下での N1-アセチルスペルミジン濃度差は 10 倍程度であった。

#### 3-3-4 酸素消費量に対するポリアミンの影響の検証

3-3-2 の検討で、スペルミジンは通常 (pH7.4)、及び低 pH (pH6.8) 培養下で、ミトコンドリア膜電位を低下させたことから、スペルミジンのミトコンドリア活性に及ぼす影響を検証するため、フラックスアナライザーを用いて、スペルミジンを添加した時の酸素消費速度 (Oxygen Consumption Rate:OCR) を測定した。スペルミジンを添加することで、通常 (pH 7.4) 培養、及び低 pH (pH6.8) 培養共に OCR が低下した。(図 3-7)。

#### 3-3-5 Akt、Erk1/2 発現に及ぼすポリアミンの影響

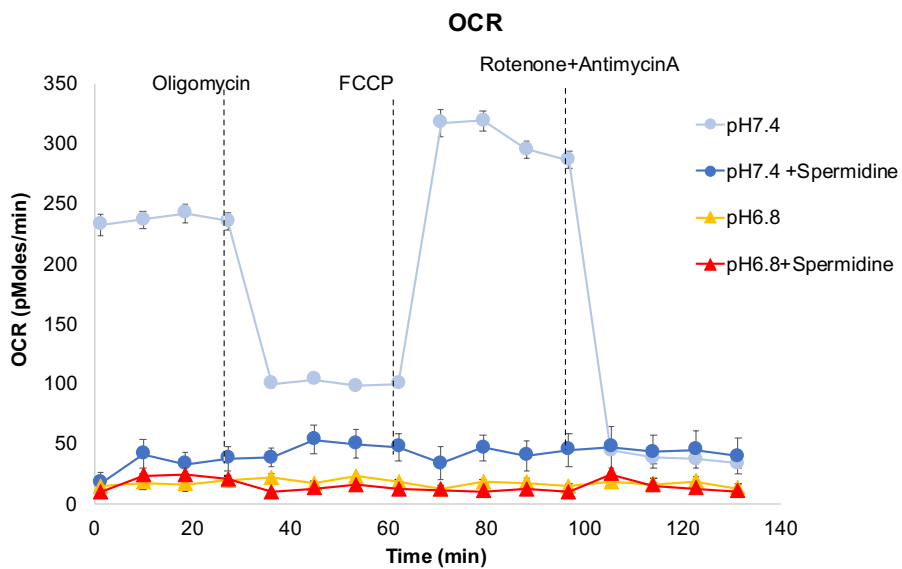
3-3-2 で検討結果から、N1-アセチルスペルミジン、及びプトレシンは低 pH(pH6.8)培養下でミトコンドリア膜電位を回復させ、スペルミジンは回復させなかったことから、N1-アセチルスペルミジン、プトレシン、及びスペルミジンの Akt、及び Erk のリン酸化状態、タンパク発現変動に対する影響を検討するため、イムノブロット法によって解析した。通常 (pH7.4) 培養、低 pH(pH6.8)培養 24 時間後の PANC-1、HeLa 細胞において、ポリアミン添加による Akt、及び Erk の活性化型であるリン酸化状態タンパク発現量は、3-3-2 で検討したミトコンドリア膜電位の活性化と一致しなかった (図 3-8、3-9)。



**図 3-6 N1-アセチルスペルミジンを添加した低 pH(pH6.8)培地における N1-アセチルスペルミジン変動**

PANC-1 細胞において、0 μM、1 μM、10 μM、100 μM N1-アセチルスペルミジンに調製した低 pH (pH6.8) 培地で培養 24 時間後の N1-アセチルスペルミジン量 (fmol/cell) を示す。独立した 3 回の実験の平均 ±S.E.M 値を示した。





**図 3-7 PANC-1 細胞における pH7.4 培養、pH6.8 培養におけるスベルミジンのミトコンドリア酸素消費速度 (OCR)の評価**

PANC-1 細胞において、通常 (pH7.4) 培地、及び低 pH(pH6.8)培地に、測定 1 時間前にスベルミジンが 1mM になるように添加し、ミトコンドリア OCR に及ぼす影響を評価した。フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア OCR の経時変化を図に示す。縦軸は OCR(pMoles/minute)、横軸は時間 (minute) を示す。

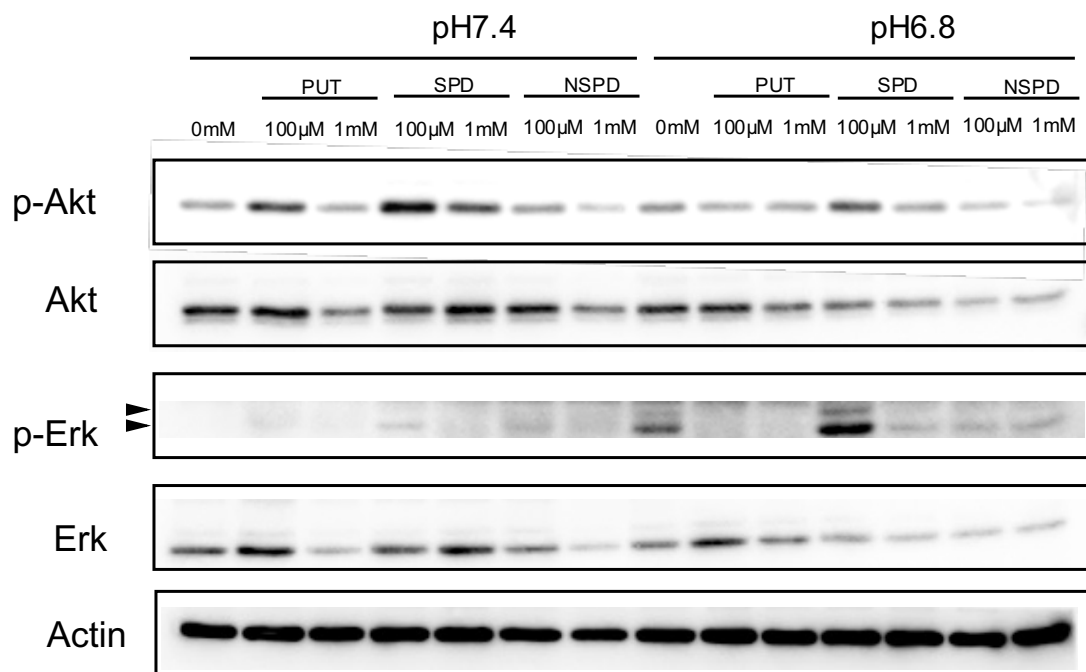


図 3-8 PANC-1 細胞における細胞増殖シグナル分子 Akt 及び Erk にポリアミンが及ぼす影響の検討

PANC-1 細胞において、通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養下にポリアミンを添加し、細胞増殖シグナル分子 Akt、Erk 活性を免疫ブロット法により評価した。

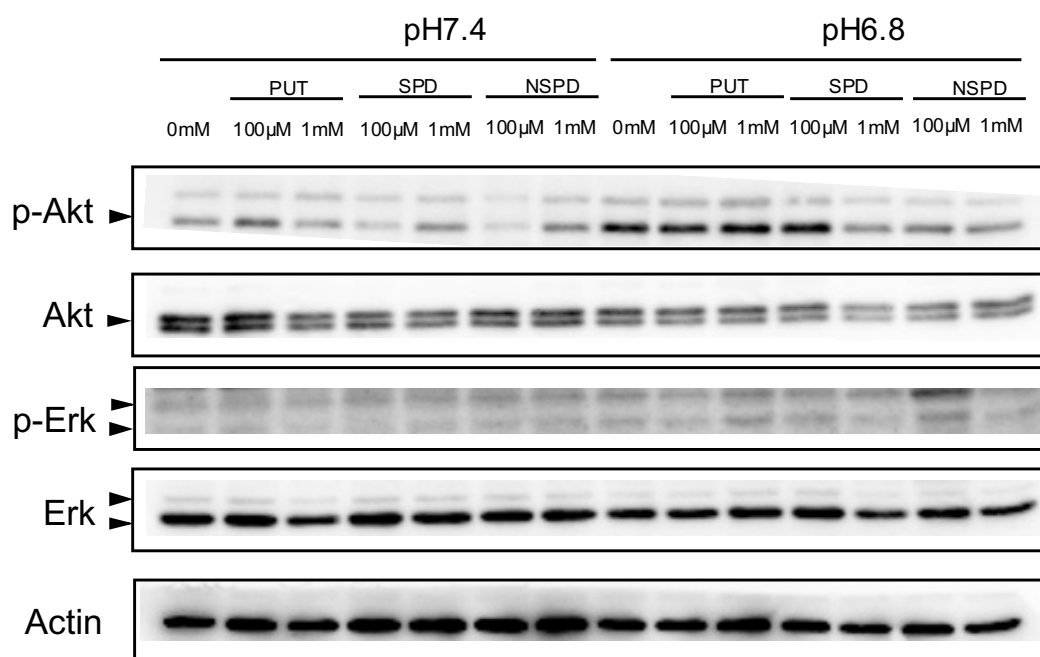


図 3-9 HeLa 細胞における細胞増殖シグナル分子 Akt 及び Erk にポリアミンが及ぼす影響の検討

HeLa 細胞において、通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養下にポリアミンを添加し、細胞増殖シグナル分子 Akt、Erk 活性をイムノブロット法により評価した。

### 3-4 考察

本章での検討により、①N1-アセチルスペルミジン、及びプトレシンは通常 (pH7.4) 培養下、及び低 pH (pH6.8) 培養下において、がん細胞増殖率を亢進したが、スペルミジンは細胞増殖能を抑制すること② N1-アセチルスペルミジン、及びプトレシン添加は、低 pH(pH6.8)培養下によるミトコンドリア膜電位低下を回復させるが、スペルミジンは回復させないこと、が明らかとなった。

2章の検討から、PANC-1、HeLa 細胞内では、通常 (pH7.4) 培養下と比較して低 pH (pH6.8) 培養下で、N1-アセチルスペルミジンが上昇し、プトレシン、スペルミジンが減少傾向になることが明らかとなっている。プトレシン、スペルミジン、N1-アセチルスペルミジンががん細胞生存に与える影響を検討する為、各ポリアミンを添加した培地で培養した PANC-1、HeLa 細胞について細胞増殖 (SRB) 試験を実施した。低 pH(pH6.8)培養下で細胞増殖能が抑制されるが、N1-アセチルスペルミジン、及びプトレシン添加は細胞増殖能を亢進し回復させるが、一方スペルミジンは抑制し、細胞毒性を示した。スペルミンはいずれの濃度でも細胞毒性を示した。スペルミン、及びスペルミジンは異化作用の際に活性酸素を放出することで細胞毒性があるが、プトレシンは毒性が弱いと報告がある (70,71)。またプトレシンは低 pH 環境下でバッファーとして働き、がん関連骨髄細胞の生存させることが報告されている(72)。プトレシンが癌細胞の増殖能を亢進し、スペルミジン、及びスペルミンは毒性があった結果を支持している。低 pH(pH6.8)培養下において、濃度が高くなるにつれて細胞毒性が現れるスペルミジンや毒性が高いスペルミンを素早く代謝し、細胞増殖を亢進する N1-アセチルスペルミジン、及びプトレシンを維持することで、低 pH 環境での生存能を獲得する代謝適応機構が機能していることが考えられた。

また、N1-アセチルスペルミジン、及びプトレシンががん細胞の生存能を亢進する一因としてミトコンドリア膜電位上昇によるミトコンドリアの機能維持によるものである可能性が見いだされた。がん細胞では、ミトコンドリアによる酸化的リン酸化からの ATP 産生より、効率の悪い解糖系が亢進している (warbrug

効果)。しかし、本章の検討により N1-アセチルスペルミジン、及びプトレシンは低 pH(pH6.8)培養下においてミトコンドリア膜電位や ORC などのミトコンドリア機能を回復させた。ポリアミンによる低 pH(pH6.8)培養下における生存能獲得機構に新たな知見を得た。

一方、Akt や Erk はがん細胞が増殖する際に活性化する重要なシグナル伝達因子であるが、N1-アセチルスペルミジン、及びプトレシンは Akt、及び Erk の持続的発現には寄与しなかった。

以上の結果から、低 pH 培養下における N1-アセチルスペルミジン生成の亢進は、低 pH 環境で細胞毒性があるスペルミジンを除去することに加え、N1-アセチルスペルミジンによるミトコンドリア機能回復を図るためと考えられた。また、プトレシンも細胞増殖及びミトコンドリア膜電位を回復させた。低 pH(pH6.8)培養下ではプトレシンは減少傾向であったが、本検討は 24~72 時間という短時間暴露の結果であるため、腫瘍において低 pH に長時間暴露された際に、プトレシンからスペルミジンに変換する酵素である SRM の低下が継続すれば、プトレシンが蓄積することも考えられる。N1-アセチルスペルミジンとプトレシンがスペルミジン濃度を制御している可能性が考えられた。

第 4 章では SAT1 のノックダウン細胞を作成し、SAT1 変動が、遺伝子発現、代謝物、細胞増殖、及び腫瘍形成や生存率について与える影響について検討を行う。

## 第4章 SAT1 が低 pH (pH6.8) 環境培養下で腫瘍微小環境に及ぼす影響

### 4-1 緒言

第2章において、低 pH(pH6.8)培養下で、ポリアミン代謝物 N1 アセチルスペルミジンが増加し、プトレシン、スペルミジンが減少した。さらに、これらの代謝酵素である SAT1, PAOX の発現が変動したことから、がん細胞は低 pH 環境下において代謝酵素の発現制御によりポリアミン代謝を変動させることが示唆された。

SAT1 は、スペルミジンとスペルミンを基質とするアセチル化酵素であり、ポリアミン代謝の律速酵素である。基質の N 末端にアセチル CoA 由来のアセチル基を付加し、N1-アセチルスペルミジン、N1-アセチルスペルミンを生成する。アセチル化ポリアミンは SLC3A2 を介して細胞外に排出される経路と、PAOX により酸化され、脱アセチル化経路が存在し、SAT1 はポリアミンの量を厳密に調節する上で重要な役割を果たしている。SAT1 の増加は、ポリアミンフラックスの上昇、アポトーシス誘導、フェロトーシス誘導など、ポリアミン代謝の亢進のみならず、細胞死を引き起こすことが報告されている (73-75)。なお、SAT1 と近縁の酵素であり、SAT2 は、スペルミジン、スペルミンとの親和性は低く、チアリシン-Ne-アセチル基転移酵素であることが知られている (76)。

本章では SAT1 の発現変動による、遺伝子発現変動、代謝物変動、in vivo 腫瘍移植試験、及び予後解析を行う。

## 4-2 実験方法

### 4-2-1 Small interference (siRNA)導入法

siRNA の濃度が 50  $\mu$  M となるように siRNA を溶解した。抗生物質を抜いた培地で懸濁した PANC-1、AsPC-1、HeLa 細胞を用い、Lipofection 法にて導入した。以下、60 mm dish 培養時の導入法を示す。まず、siRNA と Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, #13778) の混合液を作製した。Lipofectamine RNAiMAX を使用前によく混合してから、490  $\mu$ l の Opti-MEM I (Invitrogen, #31985) 内に 10  $\mu$ l を混合し、室温で 5 分間インキュベートした。次に、DEPC 水で溶解させた siRNA 0.5  $\mu$ l を 499  $\mu$ l の Opti-MEM I に溶かし、室温で 5 分間インキュベートしてから上記 RNAiMAX と Opti-MEM I の混合溶液と混ぜた。ゆっくりピペティングしてから室温で 20 分間インキュベートした。その後、細胞培養 dish に  $2.0 \times 10^5$  cells / ml の懸濁溶液を 1ml 加え、インキュベートした混合液 1ml 加え、更に適度な培養培地を 3mL 加えることで siRNA を導入した。37 °C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、48 時間後に RNA を回収、及び pH6.8 培養下へ変更した。用いた siRNA 配列を以下に記載する。

siRNA		Sence	Antisence
SAT1	siRNA #1	5'-CCUUGAAUAUCUUUCGAUAaa-3'	5'-UAUCGAAAGAUUUCAGGag-3'
	siRNA #2	5'-CGACAAGGAGUACUUGCUAaa-3'	5'-UAGCAAGUACUCCUUGUCGat-3'

### 4-2-2 Vector ウイルス導入による SAT1 の過剰発現細胞作成方法

HaloTag (promega、#)SAT1 HaloTag vector 及び HaloTag vector コントロールが 1 $\mu$ g/ $\mu$ l になるように調製した。抗生物質を抜いた培地で懸濁した PANC-1 細胞を用い、Lipofection 法にて導入した。以下、60 mm dish 培養時の導入法を示す。まず、プラスミドベクター 8 $\mu$ l に対し、492  $\mu$ l の Opti-MEM I (Invitrogen, #31985) で混合液を作成し室温で 5 分間インキュベートした。Lipofectamine 2000 (invitrogen#13778-150) 20 $\mu$ l に対し、480  $\mu$ l の Opti-MEM I

(Invitrogen, #31985) を混合し、室温で 5 分間インキュベートした後、上記 Lipofectamine 2000 と Opti-MEM I の混合溶液と混ぜた。ゆっくりピペティングしてから室温で 20 分間インキュベートした。その後、前日に 6cm dish に  $2.0 \times 10^5$  cells / dish を播種し 24 時間培養し接着させた dish に上記の Lipofectamine 2000 と Opti-MEM I とベクター懸濁液を 1ml 加え、37 °C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、24 時間後に RNA を回収、及び pH6.8 培養下へ変更した。

細胞増殖 (SRB) 試験用に 96well で使用する場合は Lipofectamine 2000 と Opti-MEM I と Opti-MEM I とベクターの容量比を変えずスケールを変更して懸濁液を作成し、前日に細胞が播種され接着している 96well-plate 中の培地を除去し、新たな培地を 100 $\mu$ l 足し、更に懸濁液を 100 $\mu$ L 滴下した。

#### 4-2-3 イムノブロット法(SAT1)

3-2-5 の方法で実施した。1 次抗体は SAT1 抗体(proteintech、# 10708-1-AP)、及び  $\beta$ -actin (SIGMA, #A1978)を用いた。ブロッキングは 5%(w/v)スキムミルクを使用し、SAT1 抗体を 5%(w/v)スキムミルクで 1:400 に希釈して 4°C にて一晩で反応させた。

2 次抗体は SAT1 抗体には Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Antibody(Cell Signaling、# 7074S)を、 $\beta$ -actin 抗体には Anti-mouse IgG, HRP (Sigma、#4416)用いた。

#### 4-2-4 RT-qPCR

2-2-8、2-2-9 の方法で実施した。RT-qPCR に用いた各遺伝子の Primer 配列を以下に示す。



primer	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
CXCL14	5'TCCCAACCTGAGGATTTCTG-3'	5'-TGACAGTGTTGGGAACCTCA-3'
CCL3	5'-GCAGGGAATTCACCTCAAGA-3'	5'-TTTTCGATGATTTTCTGAACCA-3'
CCL5	5'-GGTCTGAGCTCTGGCTTTG-3'	5'-GCGGAAGCTTAAGAGTGCAAG-3'
IL8	5'-GTTAAATCTGGCAACCCTAGTC-3'	5'-TGAGGTAAGATGGTGGCTAATAC-3'
SCL6A6	5'-TCTGCTTGGGATGGGTCAGA-3'	5'-ACAACCCCCTCGCTTCCTTT-3'
ARHGAP19	5'TCCTCCGCAAAGGAAAGCTC-3'	5'AGCCCATTTCCCAAGGGTGT-3'

#### 4-2-6 クロマチン免疫沈降法(Chromatin immunoprecipitation, ChIP)

##### 4-2-6-1 ホルムアルデヒドによる固定

150mm dish で培養した約 107 個の PANC-1 細胞に、最終濃度 1%となるようにホルムアルデヒドを添加し、室温で 10 分間反応させて架橋を行った。その後、グリシン溶液を最終濃度 125 mM になるように加え、室温で 5 分間反応させて架橋反応を停止させた。

##### 4-2-6-2 ChIP サンプルの調整

セルスクレイパーで細胞を回収し、遠心後上清を捨て、ペレットに SDS Lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1% SDS, 1 mM EDTA, Protease Inhibitor Cocktail (Roche, # 04693159001))を加え、ピペッティングを行った。その後、サンプルを氷冷した状態で超音波細胞破碎装置 (BRANSON SONIFER 250, Output 2, Duty 50%) を用いて 2 分間 DNA の断片化を行った。この 2 分間の sonication によって DNA は約 300 bp~400 bp の断片になることを Agilent 社の BioAnalyzer によって確かめた。

このサンプルを 13000 ×g で 10 分間 4 °Cで遠心し、核タンパク質を含む溶液を回収した。このサンプルを ChIP Dilution buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, Protease Inhibitor Cocktail (Roche, # 04693159001)) で 5 倍に希釈し、このうち 0.3%を INPUT とし、4 °Cで保存した。

#### 4-2-6-3 Magnetic Beads の調整

ChIP には 1 サンプルあたり DynaBeads M-280 sheep anti-Rabbit IgG (LifeTechnologies, #11203D)を 50  $\mu$ l 使用した。まず、ChIP Dilution buffer でビーズを洗浄し、次に ChIP Dilution buffer 中で anti-H3K27ac antibody (Millipore, #07-360)を 5 $\mu$ g 加え、4  $^{\circ}$ Cで 6 時間以上反応させた。磁気ラックを用いてビーズを沈殿後、上清を捨てて ChIP dilution buffer で 3 回 Wash Buffer 洗浄した後に免疫沈降反応に使用した。

#### 4-2-6-4 免疫沈降反応、脱架橋、DNA の回収

調整した抗体とビーズの複合体と、断片化したタンパク質-DNA 複合体を 4  $^{\circ}$ Cで一晩抗原抗体反応を行った。

反応させたサンプルを、磁気ラックを用いて沈殿させたのち、上清を捨て、ChIP Dilution buffer で常温 3 分間、2 回洗浄し、次に Wash buffer 1 (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM PMSF) 、Wash buffer 2 (10 mM Tris-Hcl (pH8.0), 1 mM EDTA, 0.25 M LiCl, 0.5% Na-Deoxycholate, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF) 、TE buffer を用い 3 回それぞれ常温で 3 分間洗浄した。このサンプルに 100 $\mu$ l の Elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM EDTA, 1% SDS) を加えたのち、Protenase K (Invitrogen, #25530-049) 10  $\mu$ l を加えて、42 $^{\circ}$ Cで 2 時間インキュベートした。

この ChIP サンプルと 4  $^{\circ}$ Cで保存しておいた INPUT に Elution buffer を加え 100 $\mu$ l にメスアップしたサンプルに、RNase A (QIAGEN, #19101)を 1  $\mu$ l 添加したのち、37 $^{\circ}$ Cで 1 時間インキュベート後、65  $^{\circ}$ Cで一晩加熱し、脱架橋を行った。

磁気ラックでビーズを沈殿させたのち、上清を回収し、PCR Purification Kit (QIAGEN, #28104)を用いて ChIP サンプルは 20 $\mu$ l、INPUT は 50 $\mu$ l の MilliQ で溶出した。

#### 4-2-7 細胞増殖 (SRB) アッセイ

細胞数を定量する細胞増殖 (SRB) アッセイは以下のように行った。96well に 3000cells / well で播種した細胞の培地を除去し、100  $\mu$ l の氷冷した 10% (wt/vol) trichloroacetic acid (TCA) (SIGMA, #6399)を加え、細胞を固定した。4°C で 20 分間静置した後、水道水で 3 回洗浄した後、100  $\mu$ l の 1%酢酸に溶解させた 0.4%(wt/vol) Sulforhodamine B sodium salt (SRB) (SIGMA, #S1402) を加え、室温で 20 分間静置した。未結合の色素は 1%酢酸で 3 回洗浄した後、室温にて乾固させた。次に 100 $\mu$ l の 10 mM Tris 溶液を加え、室温で 20 分静置した。570 nm の吸光度 OD を測定した。

#### 4-2-8 腫瘍移植による腫瘍増殖試験

shRNA が導入により SAT1 がノックダウンされた PANC-1、HeLa 細胞を  $1 \times 10^7$  cells / mouse に皮下投与し、腫瘍形成を経時的に大きさをノギスにて測定した。コントロールと SAT1 ノックダウン細胞の腫瘍形成で差が見られ、腫瘍の大きさが 2500mm<sup>3</sup> になる前に腫瘍を摘出した。

#### 4-2-9 腫瘍中 RNA の抽出方法及び RT-qPCR 方法

ガラスチューブに摘出した腫瘍が 3-30mg になるように秤取し、500  $\mu$ l の Sepasol<sup>®</sup>-RNA I Super G (Nakarai, # 09379-84) を加え、氷が入ったビーカーにつけながら、超音波 (28000rpm、10~30 秒) にて腫瘍を破碎した。腫瘍が破碎された液を 1.5ml チューブに回収し、5 分間室温でインキュベートした。その後、200  $\mu$ l のクロロホルムを加え 30 秒間激しく振とうし、5 分間室温でインキュベートした。その後、12000  $\times g$  で 4 °C 15 分間遠心し、二層に分かれた上清のうち 400  $\mu$ l を新しいチューブに移した。回収した上清に 500  $\mu$ l のイソプロパノールを加えた後に、ボルテックスしてから室温で 10 分間インキュベートした。

その後、12000 ×g で 4 °C 10 分間遠心し、上清を除去してからペレットを 70% エタノール 50 μl で洗浄した。このサンプルを 12000 ×g で 4 °C 5 分間遠心し、上清を除去してからペレットを乾燥させて適当量 (30 μl ~ ) の RNase free water で溶解させた。RNA 濃度測定は 260 nm の吸光度から算出した。以下 2 – 2 – 9 の方法で RT-qPCR を実施した

#### 4-2-10 腫瘍代謝物

2.0ml ストロングチューブ (#MT020-01A、BMS) に摘出した腫瘍が 3-30mg になるように秤取し、内部標準物質の Methionine sulfone, CSA(D-Camphol-10-sulfonic acid)および MES 各 20μM を含む MeOH 溶液 500 μL, ジルコニアビーズ (5 mm×2, 3 mm×4) を加え bio medical science Shake Master NEO を用いて 3 分間 (1,500 rpm×3min) ホモジナイズした。さらにクロロホルム 500μL, Milli-Q 水 200μL を加えて攪拌し、4°C, 4,600g で 15 分間遠心分離。上層の水-メタノール層より 300 μL を限外濾過フィルター (分画分子量 5,000 Da) にとり 20°C, 9,100g で遠心分離し、その濾液を遠心濃縮したものをサンプルとした。測定前に、Milli-Q 水 50 μL で溶解し、2-2-4 の CE-TOFMS 測定条件で測定した。

#### 4-2-11 免疫染色法

摘出した腫瘍を OCT コンパウンドで固定し、-80°C で凍結させた後、Cryostat (Leica 社) で 15 μm の厚さに切り出し、スライドガラスに貼り付け 30 分乾燥させた。PBS で 5 分洗浄を 2 回実施した後、150 μl の 4% PFA を滴下し室温にて 10 分インキュベートし、PBS で 5 分洗浄を 2 回実施した。ブロッキングは Dako タンパク質ブロック、血清フリー (X0909、アジレント テクノロジー社) を用いた。これを滴下後、室温 30 分でインキュベートし、PBS で 5 分洗浄を 2

回実施した。ハムスター抗 CD31 (MAB1398Z, Sigma-Aldrich 社), ラット抗 CD11b (550282, BD Biosciences 社), ラット抗 F4/80 (MCA 497GA, Bio-Rad Laboratories 社), ラット抗 Ly6G (127602, BioLegend 社) をそれぞれ Dako タンパク質ブロック、血清フリーで 1:100 に希釈させた 1 次抗体を滴下してモイストチャンバーに入れ 4°C で一晩染色した。PBS-T 0.03% (PBS に Triton200 を 0.03% になるように添加したもの) で 10 分洗浄を 3 回実施した。この切片を、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ラット (#A11006, Molecular Probes 社) と Alexa Fluor 568 標識ヤギ抗ハムスター (#A21112 Molecular Probes) の二次抗体を PBS で 1:1000 に希釈した液に浸し室温で 60 分間インキュベートした。PBS-T 0.03% で 10 分洗浄を 3 回実施した後、カバーガラスを用いて Dapi-Fluoromount-G (0100-20, Southern Biotech) をマウントし、これを共焦点顕微鏡 (STELLARIS 5, Leica) を用いて分析した。

#### 4-2-12 生存率分析

Gene Expression Omnibus database(GEO : GSE21501)の脳腫瘍、肺がん、大腸がんのサンプルの発現情報を元に、Cox の比例ハザードモデルを用い、全患者を SAT1 の発現が高い pH signature High グループと、発現の低い pH signature Low のグループに分け、 Kaplan-Meier 法 (Kaplan-Meier method) にて生存率を算出した。有意差検定はログランク検定で行った。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 RNAi 干渉法を用いた SAT1 の発現抑制、及びウイルスベクターを用いた SAT1 の過剰発現による影響の検討

SAT1 ノックダウン細胞、及び SAT1 過剰発現細胞を用いて細胞内 N1-アセチルスペルミジン量を測定した。

低 pH(pH6.8)培養 24 時間後、PANC-1 細胞において、SAT1 の mRNA 発現、及びタンパク質の発現上昇が見られた (図 4-1 A、B)。また、RNAi 干渉法により SAT1 の mRNA 発現、及びタンパク質の発現は抑制され (図 4-1 C、D)、低 pH(pH6.8)培養下で増加した N1-アセチルスペルミジンは、SAT1 ノックダウン細胞では顕著に減少した (図 4-1 E)。更に、SAT1 過剰発現細胞において、SAT1 の mRNA 発現、及びタンパク質の発現上昇が見られ (図 4-2 A、B)、細胞内 N1-アセチルスペルミジンが著しく増加した (図 4-2 C)。HeLa 細胞も同じ結果を得た (図 4-3、4-4)。

#### 4-3-2 低 pH (pH6.8) 培養下における SAT1 転写因子の発現変動

SAT1 の転写開始地点より上流の DNA 配列から、転写因子の結合領域と転写因子は NFkB、AP-1、Sp-1、CREB、CEBP が報告されている(77)ことから、低 pH(pH6.8)培養が転写因子の遺伝子発現に影響を与えるかを検証した。転写因子の遺伝子発現量を膵がん細胞株である PANC-1、AsPC-1 細胞について RT-qPCR で評価したところ、AP-1、Sp-1 の遺伝子発現量は、低 pH(pH6.8)培養 24 時間後に上昇していた (図 4-5)。

#### 4-3-3 低 pH (pH6.8) 環境で SAT1 が発現制御する代謝酵素の探索

第 2 章において、低 pH(pH6.8)培養下で SRM、PAOX、CPS1、MAT 2 A の遺伝子発現が抑制されたことから、SAT1 がこれらの発現制御に関与するかを検証

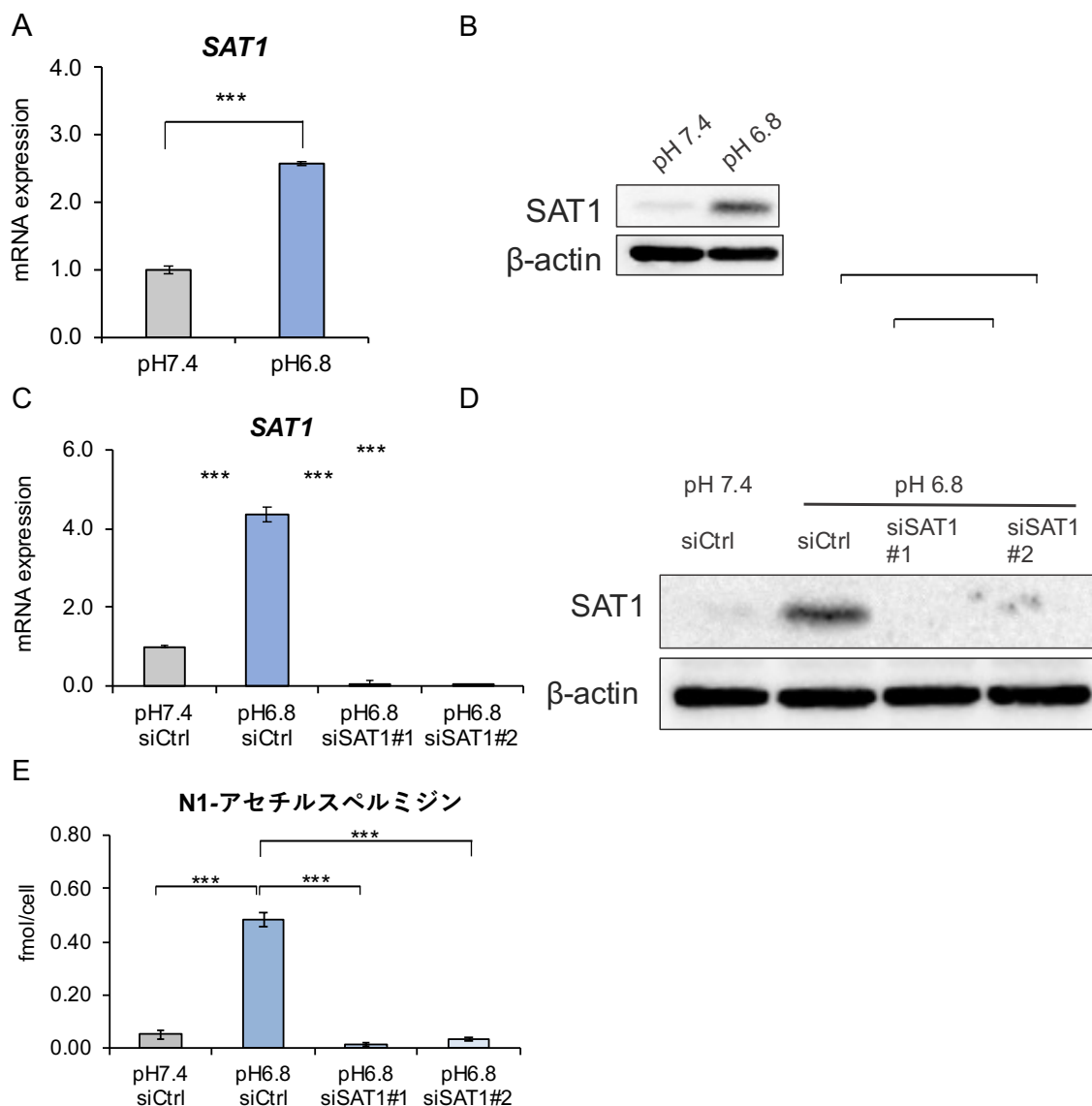
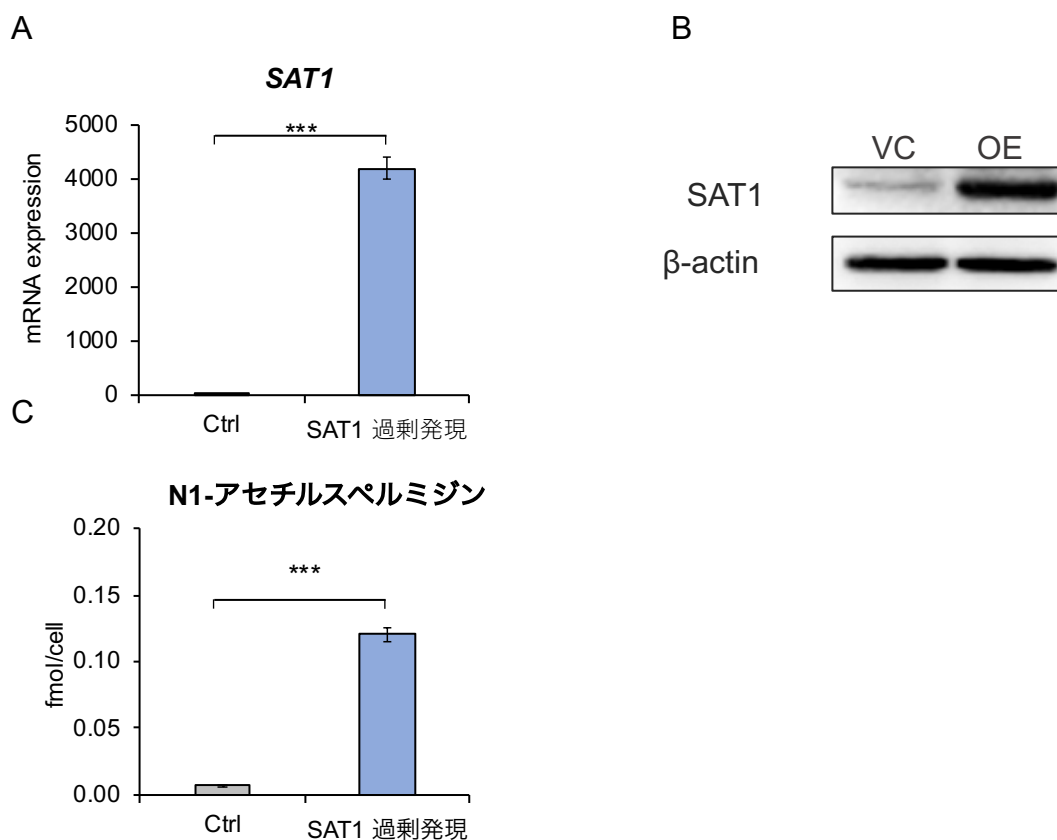


図4-1 RNAi 干渉法を用いた SAT1 の発現抑制による影響の検討

低 pH(pH6.8)培養 24 時間後の、A、B; PANC-1 細胞における SAT1 の遺伝子発現量を RT-qPCR により、SAT1 タンパク質の発現量をイムノブロット法により評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。C、D; SAT1 発現抑制 (SAT1 ノックダウン) PANC-1 細胞における SAT1 の遺伝子発現量を RT-qPCR により、SAT1 タンパク質の発現量をイムノブロット法により評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。E; N1-アセチルスペルミジン(fmol/cell)を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\*\*\*P < 0.001 とする。



**図 4-2 SAT1 の過剰発現による N1 アセチルスぺルミジンの変動の検討**

通常 (pH7.4) 培養 24 時間後の SAT1 過剰 PANC-1 細胞における、A; SAT1 の遺伝子発現量を RT-qPCR で評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。B; イムノブロット法により SAT1 タンパク質を評価した。C; N1-アセチルスぺルミジン(fmol/cell)を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\*\*\*P < 0.001 とする。

VC; ベクターコントロール、 OE ; SAT1 過剰発現



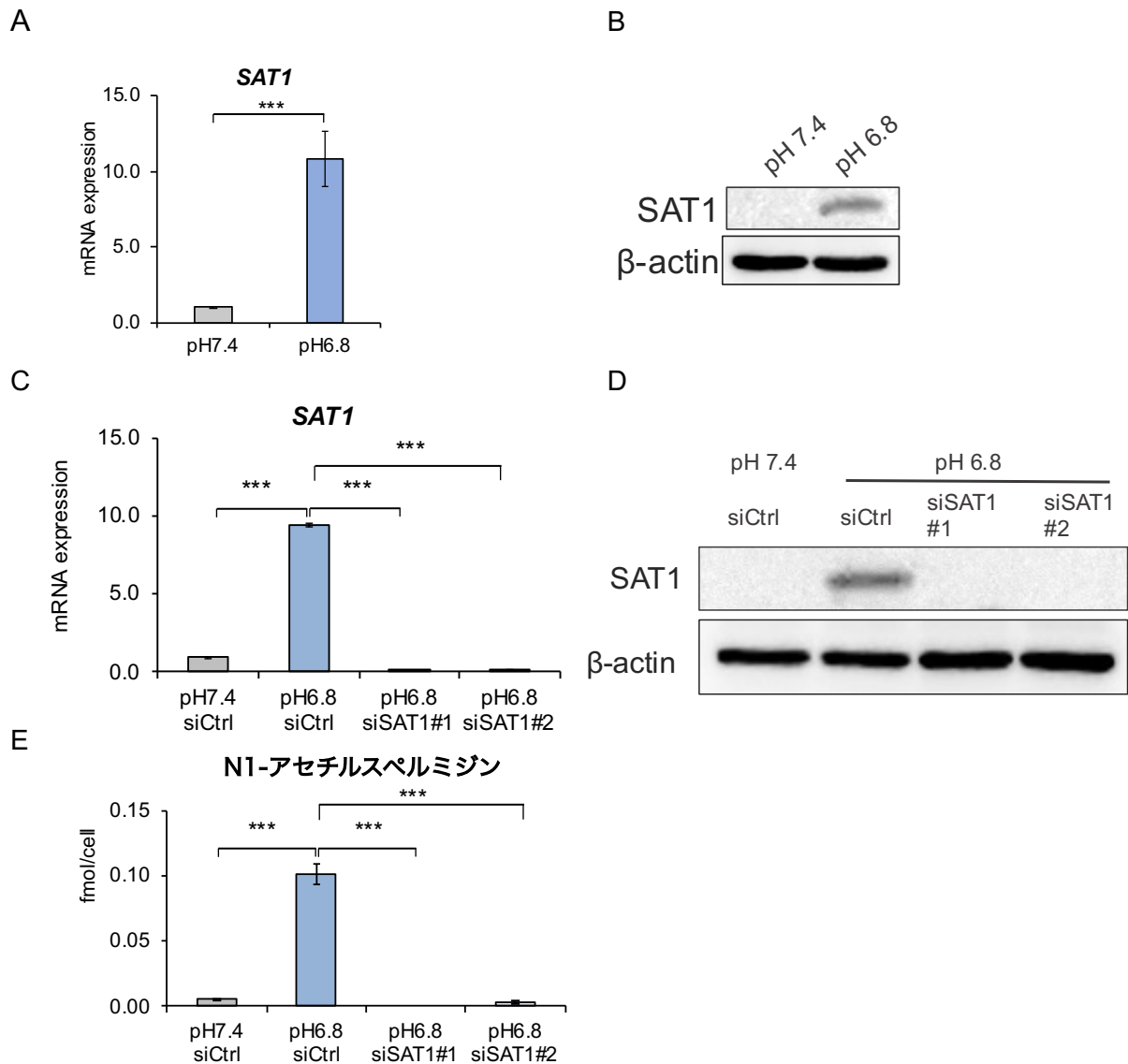


図4-3 RNAi 干渉法を用いた SAT1 の発現抑制による影響の検討

低 pH(pH6.8)培養 24 時間後の、A、B; HeLa 細胞における SAT1 の遺伝子発現量を RT-qPCR により、SAT1 タンパク質の発現量をイムノブロット法により評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。C、D; SAT1 発現抑制 (SAT1 ノックダウン) PANC-1 細胞における SAT1 の遺伝子発現量を RT-qPCR により、SAT1 タンパク質をイムノブロット法により評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。E; N1-アセチルスペルミジン(fmol/cell)を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\*\*\*P < 0.001 とする。

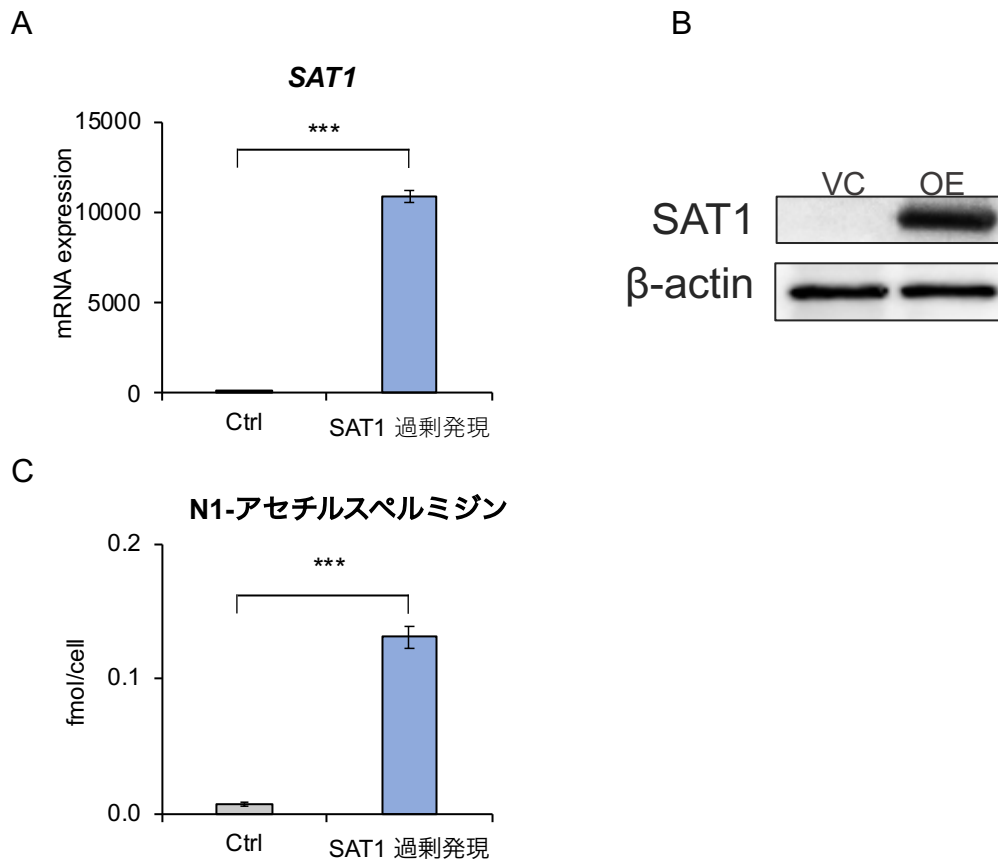


図4-4 SAT1の過剰発現によるSAT1タンパク質発現とN1アセチルスペルミジンの変動の検討

通常 (pH7.4) 培養 24 時間後の、A; SAT1 過剰 HeLa 細胞における SAT1 の遺伝子発現量を RT-qPCR で評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。B; イムノブロット法により SAT1 タンパク質を評価した。C; N1-アセチルスペルミジン(fmol/cell)を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\*\*\*P < 0.001 とする。

VC; ベクターコントロール、 OE ; SAT1 過剰発現

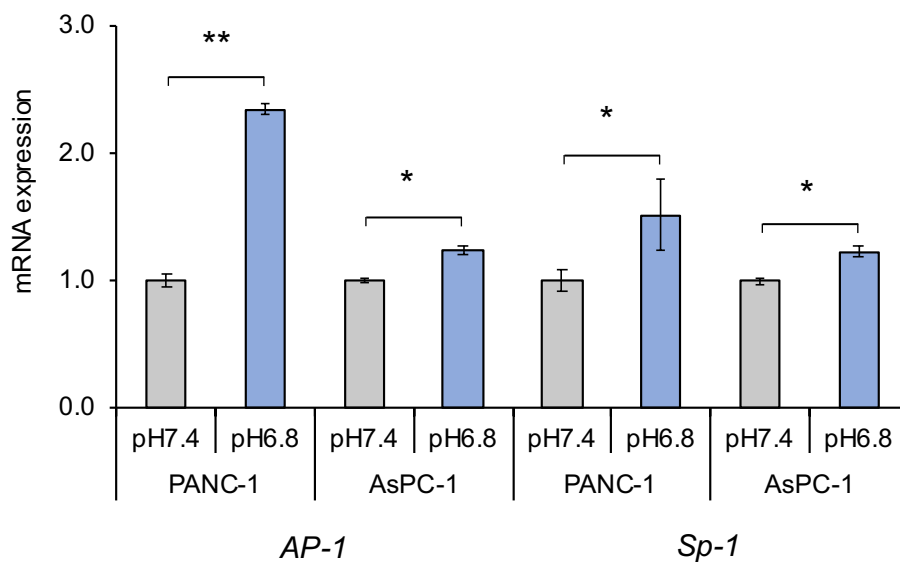


図4-5 通常 (pH7.4)、低 pH(pH6.8)培養 24 時間後における転写因子の遺伝子発現変動

低 pH(pH6.8)培養 24 時間後の、PANC-1、HeLa 細胞における転写因子の遺伝子発現量を RT-qPCR で評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。

した。SAT1 ノックダウン細胞を用いて、上記遺伝子の RT-qPCR を行ったところ、SRM、PAOX、CPS1、MAT2A の遺伝子発現は、SAT1 ノックダウンの影響を受けなかった (図 4-6)。

#### 4-3-4 低 pH (pH6.8) 環境における SAT1 発現と連動する代謝物の探索

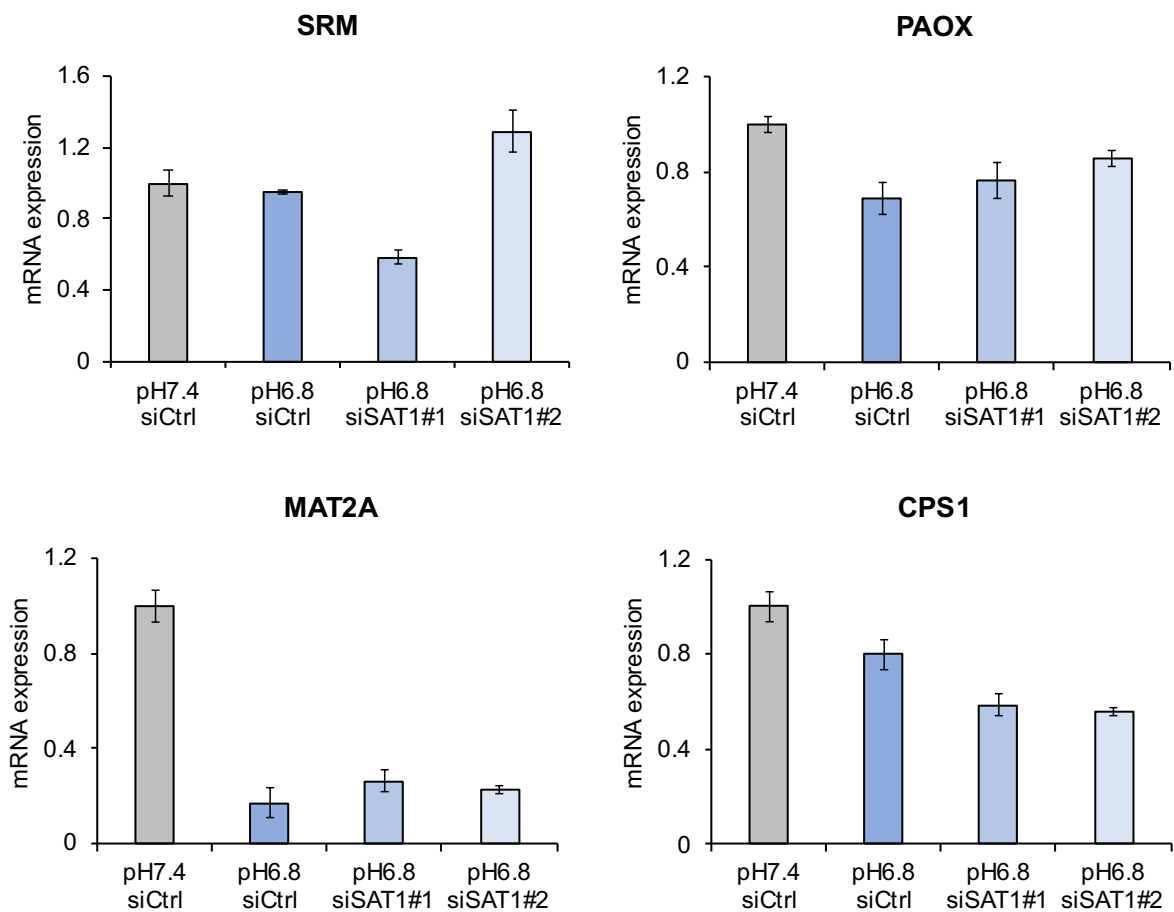
第 2 章において、低 pH(pH6.8)培養下でスペルミジン、プトレシン、ホモシステイン量が低下したことから、SAT1 がこれらの代謝物の変動に関与するかを検証した。SAT1 ノックダウン細胞における代謝物を CE-TOF-MS を用いて測定したところ、いずれも SAT1 発現レベルの影響を受けなかった (図 4-7)。

#### 4-3-5 低 pH (pH6.8) 培養下における細胞増殖に対する SAT1 の影響の検討

SAT1 が、がん細胞の増殖に関与するか検討した。RNAi 干渉法による SAT1 ノックダウン PANC-1、及び HeLa 細胞の増殖能を SRB 法により評価した。72 時間後の細胞増殖は、低 pH(pH6.8)培養で低下したが、SAT1 発現レベルには依存しなかった (図 4-8)。

#### 4-3-6 低 pH (pH6.8) 培養下における ODC1 阻害剤が細胞増殖に及ぼす影響の検討

ポリアミン合成経路の律速酵素 ODC1 の活性を阻害することにより、細胞増殖に与える影響を SRB 細胞増殖試験により評価した。ODC1 の阻害剤として、ジフルオロメチルオルニチン(DFMO; difluoromethylornithine)を用いた。PANC-1、及び HeLa 細胞において、DFMO(0.3mM、1mM)処理 72 時間後で細胞増殖抑制が見られた(図 4-9)。



**図4-6 RNAi 干渉法を用いた SAT1 発現抑制による低 pH 応答遺伝子発現の変動**

低 pH(pH6.8)培養 24 時間後の、SAT1 発現抑制 (SAT1 ノックダウン) PANC-1 細胞における SAT1 の遺伝子発現量を RT-qPCR で評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。

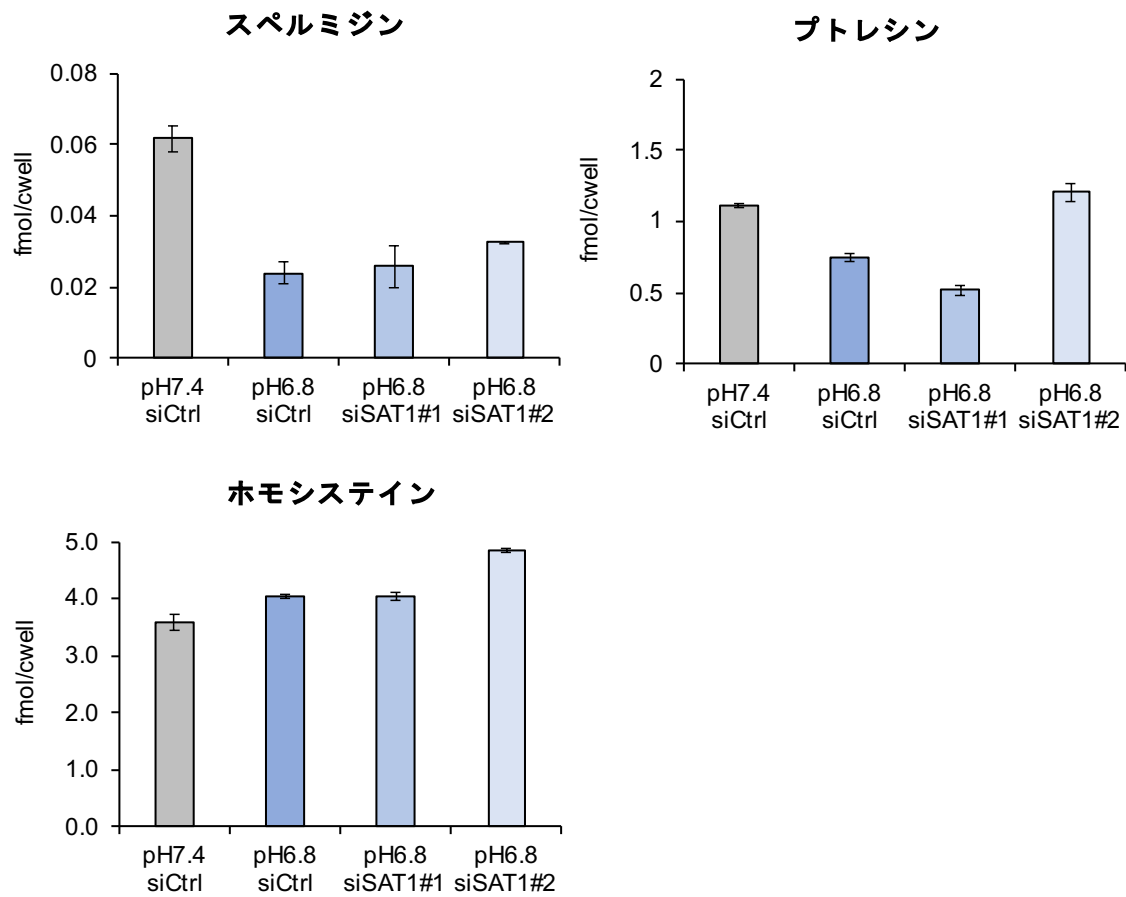


図4-7 SAT1 ノックダウン介入による、低 pH 応答代謝物の変動

低 pH(pH6.8)培養 24 時間後の、SAT1 発現抑制 (SAT1 ノックダウン) PANC-1 細胞におけるスぺルミジン、プトレシン、及びホモシステイン (fmol/cell)を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\*P < 0.05、\*\*\*P < 0.001 とする。

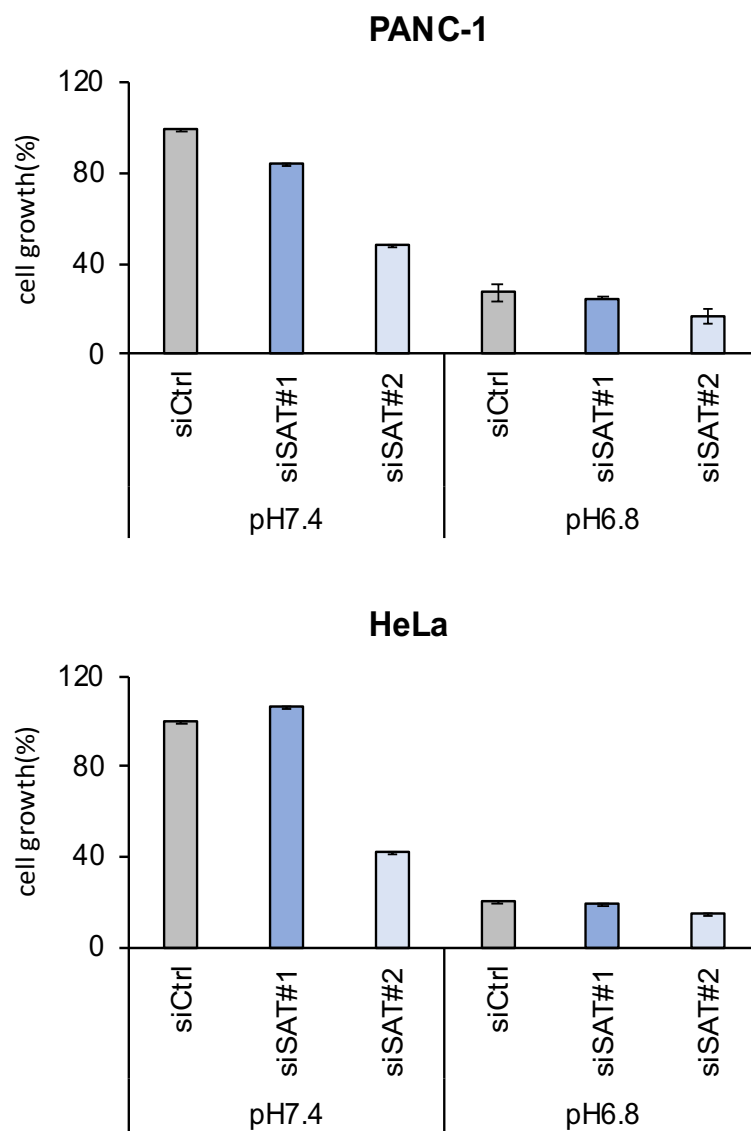
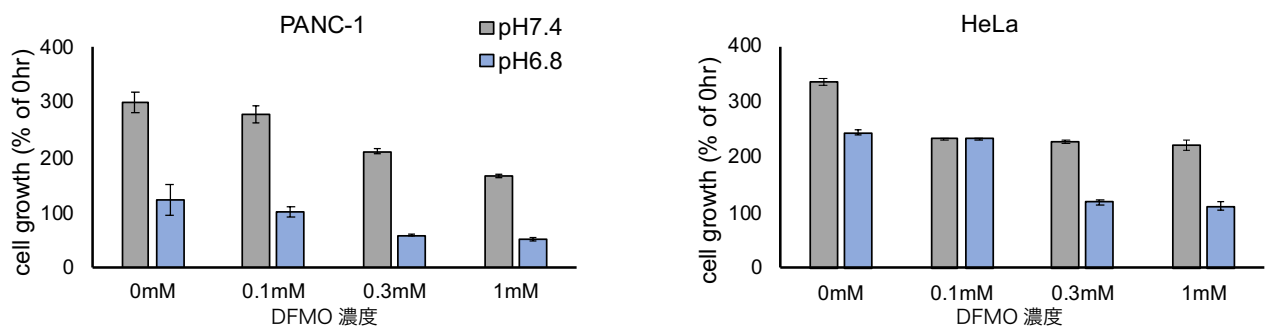


図4-8 SAT1 発現抑制に及び亢進における細胞増殖 (SRB) 試験

低 pH(pH6.8)培養 72 時間後の、siRNA による SAT1 ノックダウン PANC-1 細胞における細胞増殖能を示す。縦軸は通常 (pH7.4) 培養下における si コントロール (siCtrl) を 100%としたときに対する細胞数を%で示す(対 コントロール(%))。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M を示した。



#### 図 4-9 DFMO 添加による ODC1 阻害活性下での細胞増殖 (SRB) 試験

DFMO 濃度が 0mM、0.1m、0.3mM、1mM の通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培地で 72 時間培養した PANC-1、HeLa 細胞における細胞増殖能を示す。縦軸は通常 (pH7.4) 培養下における si コントロール (siCtrl)を 100%としたときに対する細胞数を%で示す(対 コントロール(%))。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M を示した。



また、72時間後のポリアミン量を CE-TOF-MS を用いて測定したところ、通常 (pH7.4) 培養、低 pH(pH6.8)培養下においては N1-アセチルスペルミジン、及びプトレシンは 1mM DFMO 添加で減少した(図 4-10、4-11)。

#### 4-3-7 SAT1 発現抑制細胞の腫瘍形成能評価

shRNA を用いた SAT1 発現抑制 PANC-1、HeLa 細胞を SCID/SCID (免疫不全) マウス皮下に移植し、腫瘍増殖を経時観察した。SAT1 発現抑制がん細胞は、腫瘍増殖が有意に低下し (図 4-12、4-13)、また、腫瘍内 N1-アセチルスペルミジンは減少傾向であった (図 4-14)。

#### 4-3-8 移植腫瘍に対する免疫細胞の浸潤及び血管新生の定量

4-3-7 で摘出した腫瘍の凍結切片を作成し、腫瘍組織に対する免疫細胞及び血管の浸潤を定量する為、CD11b (ミエロイド系細胞)、及び CD31 (血管内皮) 抗体を用いた免疫染色細胞の浸潤と腫瘍血管新生を評価した。細胞核は DAPI による染色を実施した。コントロールでは腫瘍内へのミエロイド系細胞浸潤、及び腫瘍血管新生が観察されたのに対し、shRNA による SAT1 発現抑制腫瘍ではいずれも著しく減少した (図 4-15A)。単位あたりのミエロイド系細胞の細胞数を、コントロールと SAT1 発現抑制腫瘍で比較すると、有意に減少していた (図 4-15C)。また、血管内皮の面積をコントロールと SAT1 発現抑制腫瘍で比較すると、有意に減少していた (図 4-15D)。そこで、新たに F4/80 (マクロファージ)、Ly6G (好中球)、及び CD31 (血管) 抗体を用いた免疫染色細胞の浸潤と腫瘍血管新生を評価した。コントロールでは腫瘍内へのマクロファージ、好中球の免疫細胞浸潤、及び腫瘍血管新生が観察されたのに対し、SAT1 発現抑制腫瘍ではいずれも著しく減少した (図 4-15B)。単位あたりのマクロファージ、好中球の細胞数を、コントロールと SAT1 発現抑制腫瘍で比較

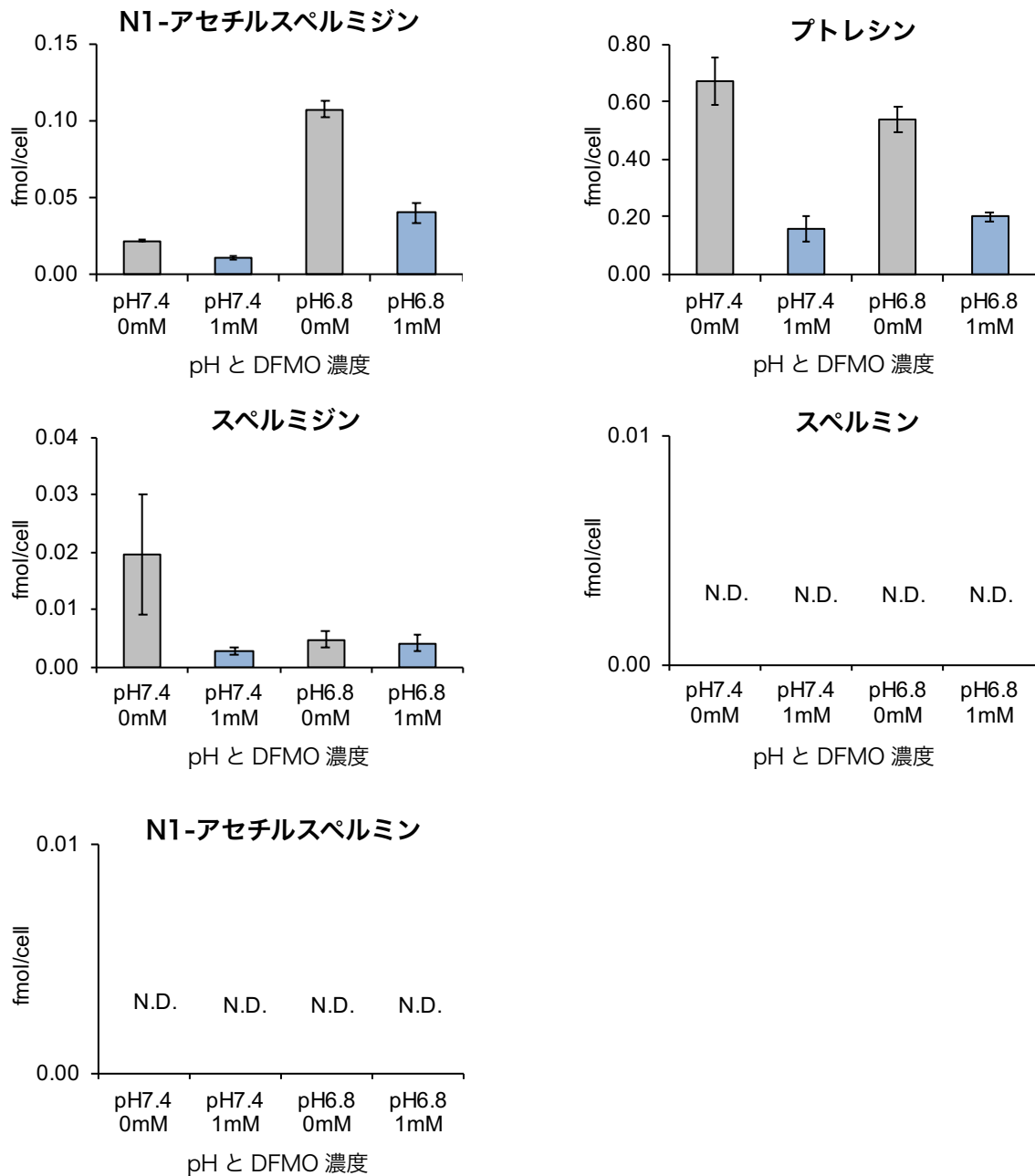


図4-10 DFMO 添加によるポリアミン変動

DFMO 濃度が 0mM、1mM の通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培地で 72 時間培養後の、PANC-1 細胞におけるプトレシン、スペルミジン、N1-アセチルスペルミジン、スペルミン、N1-アセチルスペルミン (fmol/cell)を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\*P < 0.05、\*\*\*P < 0.001 とする。

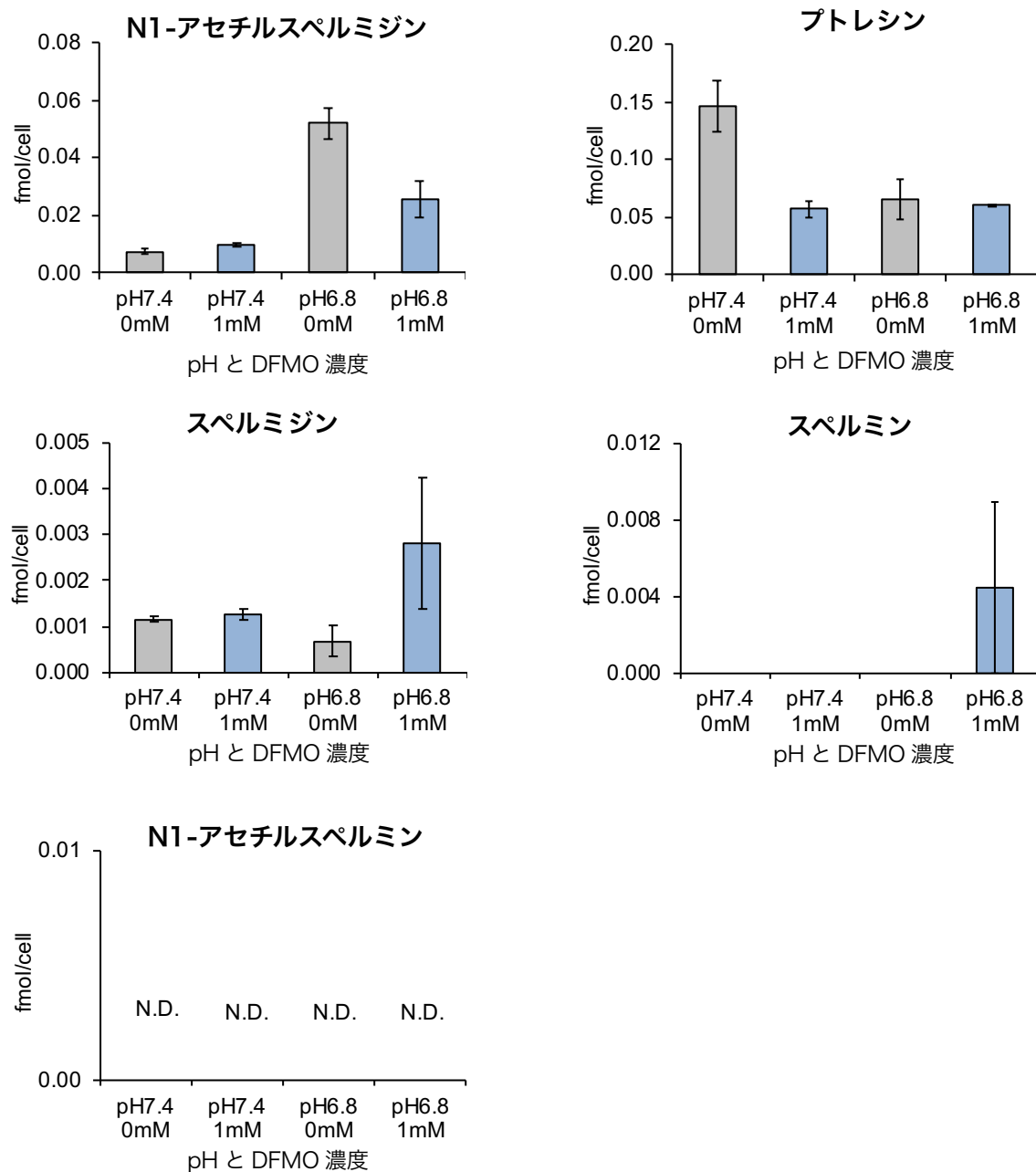
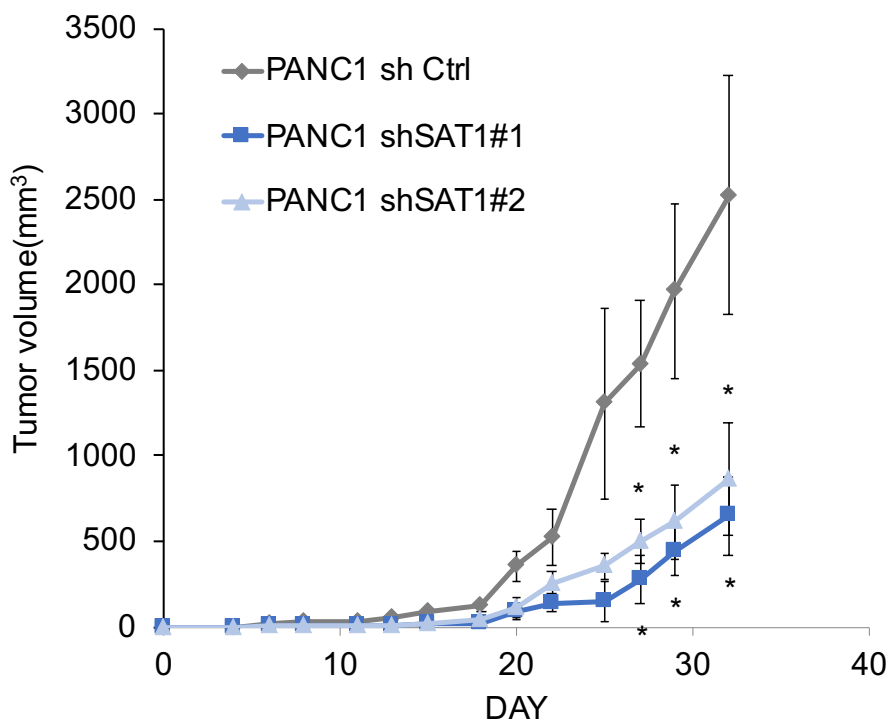


図4-11 DFMO 添加によるポリアミン変動

DFMO 濃度が 0mM、1mM の通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培地で 72 時間培養後の、HeLa 細胞におけるプトレシン、スペルミジン、N1-アセチルスペルミジン、スペルミン、N1-アセチルスペルミン (fmol/cell)を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\*P < 0.05、\*\*\*P < 0.001 とする。



**図4-12 shRNAを用いたSAT1発現抑制PANC-1細胞のin vivo腫瘍増殖試験**

shRNAを用いたSAT1発現抑制PANC-1細胞を、SCID/SCIDマウス（免疫不全マウス）に移植し、腫瘍増殖を経時観察した。n=5の平均±S.E.Mを示した。Student t-testを実施した。\*P<0.05とする。

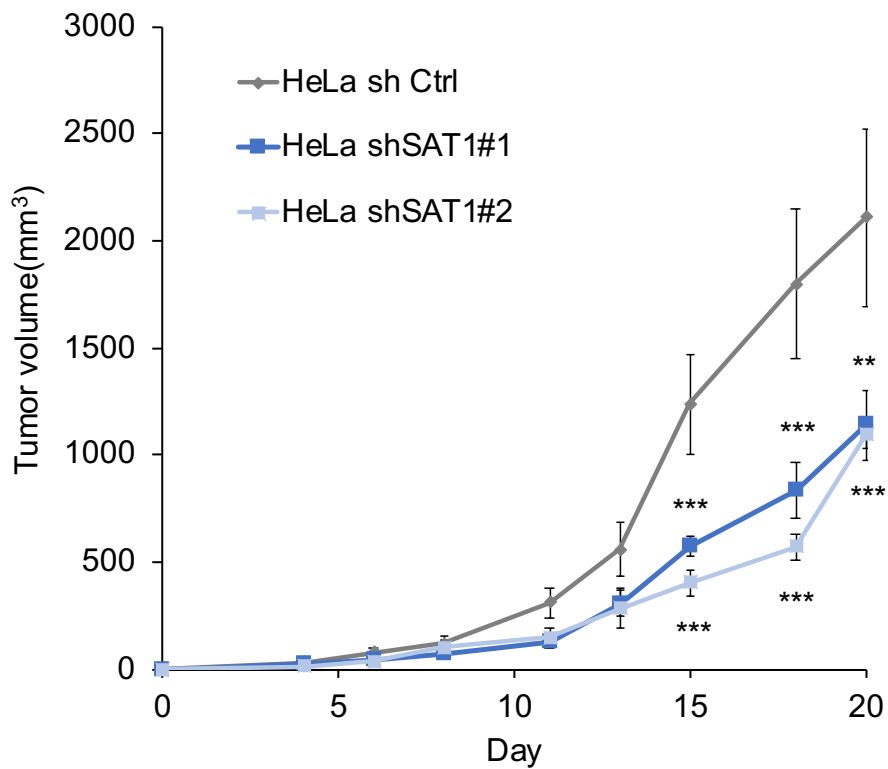
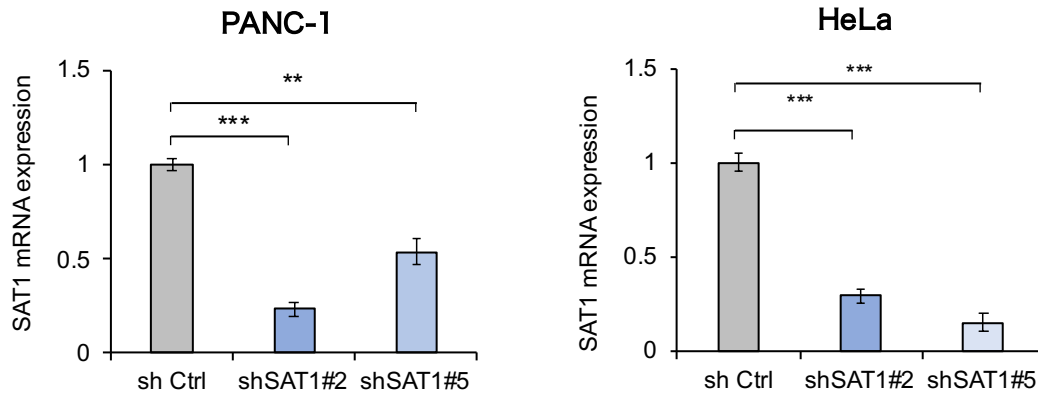


図4-13 shRNAを用いたSAT1発現抑制HeLa細胞のin vivo腫瘍増殖試験

shRNAを用いたSAT1発現抑制HeLa細胞を、SCID/SCIDマウス（免疫不全マウス）に移植し、腫瘍増殖を経時観察した。n=5の平均±S.E.Mを示した。Student t-testを実施した。\*P<0.05とする。

A



B

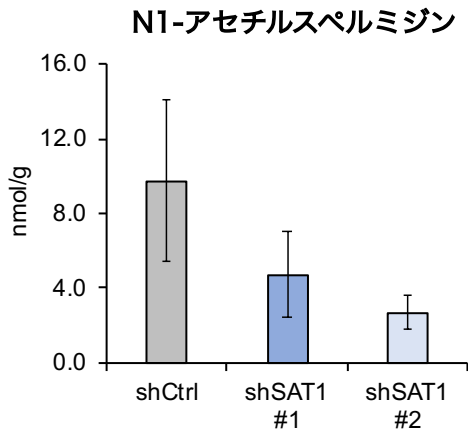


図4-14 SAT1 発現抑制腫瘍における SAT1 の遺伝子発現量、及び N1-アセチルスペルミジンの定量

腫瘍移植試験 (4-6、4-7)終了後、A;腫瘍から RNA を抽出、RT-qPCR で SAT1 発現量を評価した。B; HeLa 細胞の腫瘍内の N1-アセチルスペルミジン量を CE-TOF-MS を用いて定量した。n=3 の平均  $\pm$ S.E.M を示した。Student t-test を実施した。\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 とする。

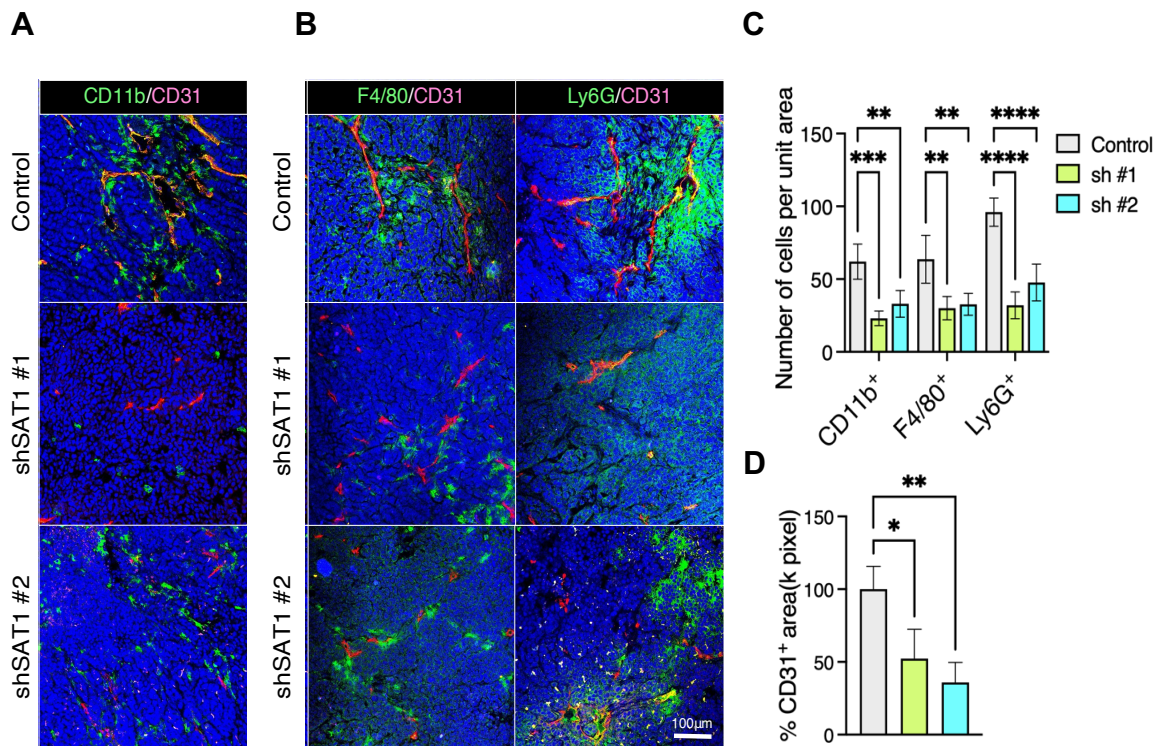


図 4-15 SAT1 発現抑制腫瘍における免疫細胞、及び腫瘍血管の免疫染色像

4-3-7より採取した HeLa 細胞の腫瘍の切片を作成し、A; CD11b (ミエロイド系細胞)、B; F4/80 (マクロファージ)、Ly6G (好中球)、及び CD31 (血管) 抗体を用いて免疫染色を実施した。A, B; 共焦点顕微鏡で観察した免疫染色像を示す。C, D; 定量結果を示す。n=3 の平均  $\pm$ S.E.M を示した。Student t-test を実施した。\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001 とする。

すると、有意に減少していた (図 4-15B)。また、血管内皮の面積をコントロールと SAT1 発現抑制腫瘍で比較すると、有意に減少していた (図 4-15C)。

#### 4-3-9 低 pH(pH6.8)培養下におけるケモカイン遺伝子発現の上昇検証

4-3-6の結果から、細胞は SAT1 のノックダウンにより腫瘍内の免疫細胞の浸潤、及び血管新生が減少していたことから、免疫細胞の遊走に関連するケモカインの遺伝子発現を検証した。2-2-7の RNA-seq データ (表 4-1) から、低 pH (pH6.8)培養下において遺伝子発現が上昇するサイトカイン (CXCL14)や自然免疫における初動細胞であるミエロイド細胞の遊走性サイトカイン(CCL3、CCL5)、免疫抑制的な骨髄由来抑制細胞を腫瘍微小環境へ動員し、血管新生およびがんの転移を促進する IL8 を検証した。PANC-1 細胞において、CCL 5、IL8 の遺伝子発現が上昇した(図 4-16)。さらに、低 pH (pH 6.8)で発現誘導され、SAT1 に対する siRNA によって発現抑制される標的遺伝子として、ARHGAP19、SLC6A6 を同定した(図 4-17)。

#### 4-3-10 低 pH(pH6.8)培養下における N1-アセチルスペルミジン放出量の検証

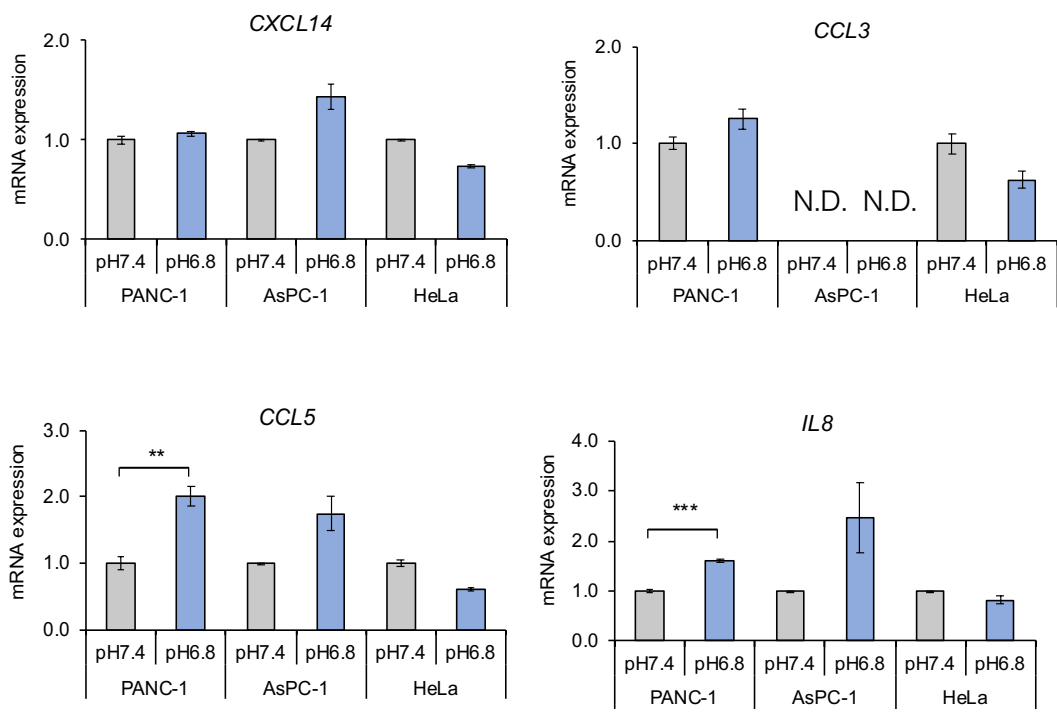
SAT1 発現抑制により、腫瘍形成能が低下したため、細胞外に放出される N1-アセチルスペルミジンが腫瘍形成に影響を与えていると考えた。そこで、N1-アセチルスペルミジンが経時的にがん細胞から放出されるか検証するため、PANC-1、HeLa 細胞を低 pH(pH6.8)培養した培養液中の N1-アセチルスペルミジンを CE-TOF-MS にて測定した結果、N1-アセチルスペルミジンが経時的に培養液中で増加していた (図 4-18)。この増加は siRNA による SAT1



表 4-1 低 pH(pH6.8)培養下、及び SAT1 発現抑制 PANC-1 細胞株の変動遺伝子リスト

PANC-1 細胞を低 pH(pH6.8)培養 24 時間後と通常培養と比較して遺伝子発現の変動比 (相対比) が 2 倍以上上昇し、且つ SAT1 発現抑制細胞の低 pH(pH6.8)培養 24 時間後と低 pH(pH6.8)培養と比較して遺伝子発現の変動比 (相対比) が 2 倍以上低下した遺伝子群を示す。

Gene	Gene	Gene	Gene	Gene	Gene
SCARNA9	XLOC_006379	AK125237	C4B-AS1	AK025288	STX18-IT1
ERI3-IT1	XLOC_012143	BC071803	XLOC_011294	BC044655	C20orf202
BC033996	BC042385	BC144419	NOX1	WNT9B	AADAC
XLOC_009401	LOC390748	AK303607	KCNT1	GAGE1	BC062350
XLOC_010626	CELA3A	TTC36	SNORD25	XLOC_006624	XLOC_001894
SNHG3	ENPP7	XLOC_012506	OR7E156P	LAX1	HYMAI
FAM25B	XLOC_013787	SPINK4	KIAA0987	NEUROD2	GJC3
SULT1A2	OATPRP4	SEBOX	KCND2	RORC	C1orf177
HIST1H4B	OR1F2	GAGE2A	EMCN	AK055853	AK293540
XLOC_000820	AK096159	XLOC_001525	LOC641367	MSLNL	AK092589
XLOC_006327	AK126253	XLOC_011408	ACSBG2	BC016484	LOC643955
IL28A	SPATA8	IL1F7	GLP1R	LHFPL3	C14orf178
XLOC_011094	C16orf65	ICHTHYIN	AK094916	RASGRP4	XLOC_000283
CPSF4L	AK302734	XLOC_001313	USP44	XLOC_009185	MMP12
XLOC_005279	XLOC_006177	MAL	AY927512	IMPG1	XLOC_013547
XLOC_012131	FAM99B	SPDYE1	XLOC_006236	MBNL3	C1QTNF9
HRCT1	TMEM61	RHOXF2	XLOC_007835	BC042052	DYDC2
XLOC_006176	XLOC_002897	ELA3A	AK091028	TNRC4	LOC389705
VTN	XLOC_011696	XLOC_002128	RERG	MYO7B	ANKRD36BL1
XLOC_001980	XLOC_010931	BC041443	AK123722	TCTE1	GRM2
XLOC_006325	PABPNL1	SSTR5	XLOC_011680	XLOC_013491	BC020884
XLOC_000061	BC037891	XLOC_002573	TGM7	TRPC3	CXCL14
XLOC_010079	IL6	XLOC_002236	VWA3B	MYO1A	XLOC_014118
PAGE5	XLOC_004890	AK094480	ZC3H12D	C6	BC038530
XLOC_006450	XLOC_005128	SLC25A2	DKFZp451I0318	AK124897	TLT4
IL29	XAGE1D	ZAR1	PNPLA1	PKNOX2	TREML4
BC061919	XLOC_002602	CARD14	OLIG2	SCUBE1	AK026805
XLOC_006865	SSX5	BC007399	TFL	MLC1	AK127609
BC144418	SLCO5A1	CTAG1A	SLC22A2	SGOL1-AS1	LINC00336
OSM	HS3ST3A1	CDKL4	BMX	XLOC_009100	AK096219
STEAP2-AS1	LINC00273	GOLGA6B	DLEU2	AX748166	
XLOC_001081	MGC26733	AX746699	AX748239	BC051808	



#### 図 4-16 PANC-1、HeLa 細胞におけるケモカインの遺伝子発現変動

通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養 24 時間後、PANC-1、AsPC-1、HeLa 細胞におけるケモカイン遺伝子発現変動を RT-qPCR で評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 とする。

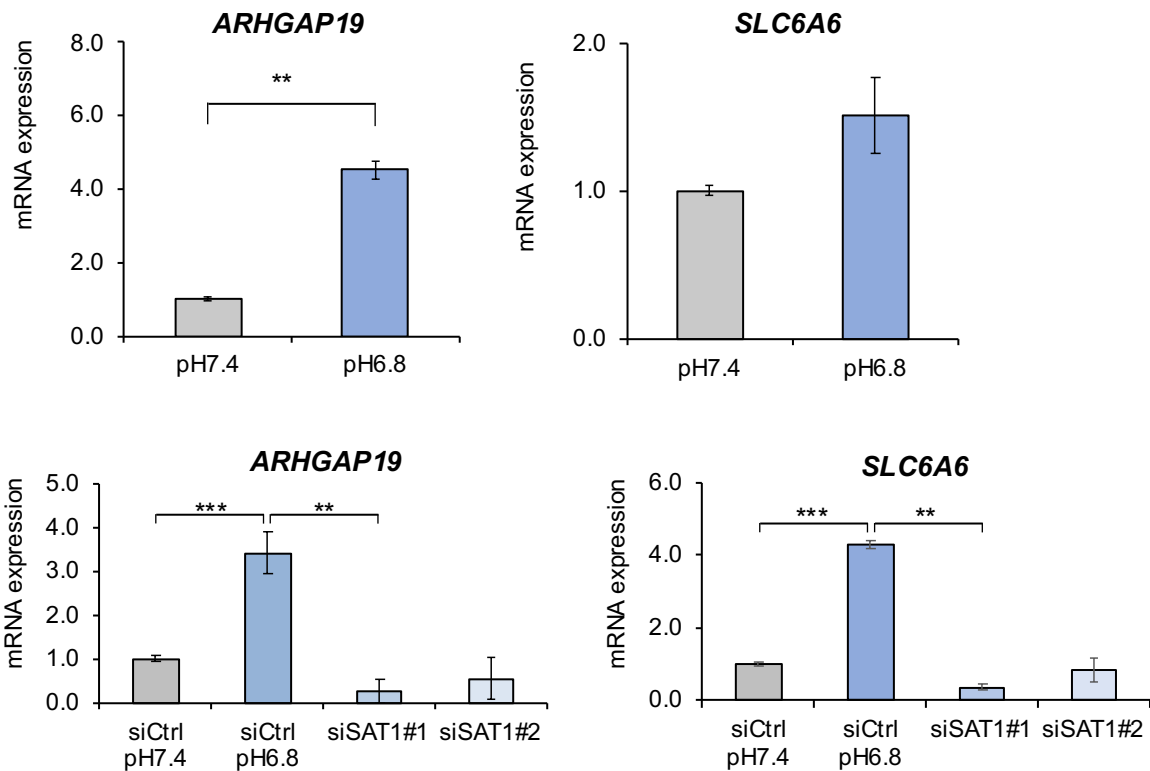


図 4-17 PANC-1、HeLa 細胞におけるケモカインの遺伝子発現変動

通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養 24 時間後、PANC-1 細胞、及び siRNA による SAT1 発現抑制 PANC-1 細胞における *ARHGAP19*、*SLC6A6* の遺伝子発現変動を RT-qPCR で評価した。縦軸は通常(pH7.4)培養下の mRNA 発現量を 1 としたときの倍率(対コントロール(倍))を示した。独立した 3 回の実験の平均  $\pm$ S.E.M 値を示した。Student t-test を実施。\* $p < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  とする。

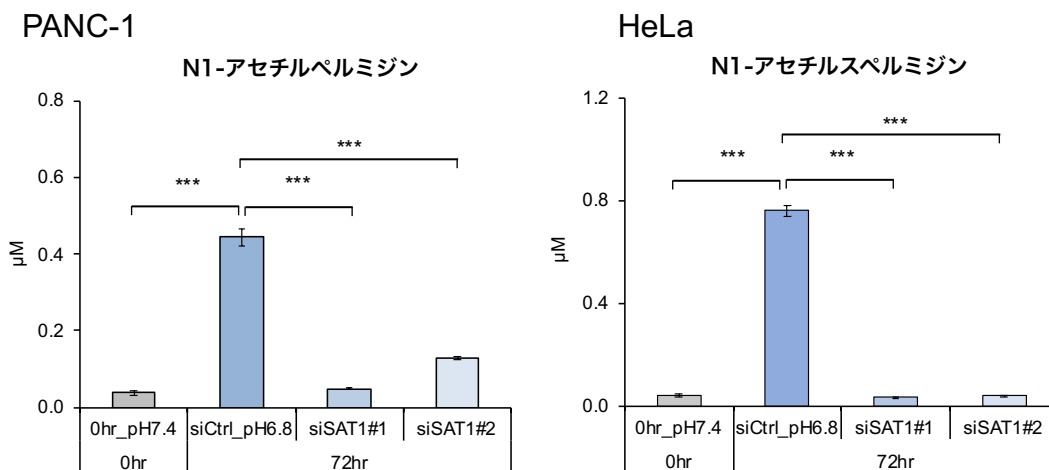
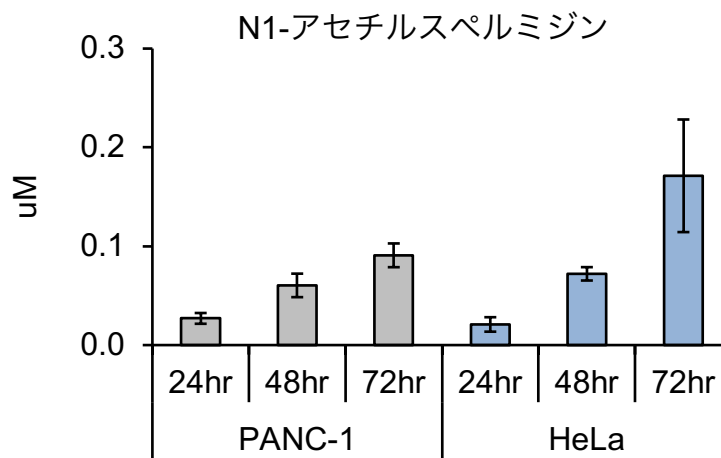


図4-18 低 pH(pH6.8)培養下における N1-アセチルスペルミジン放出量の検証

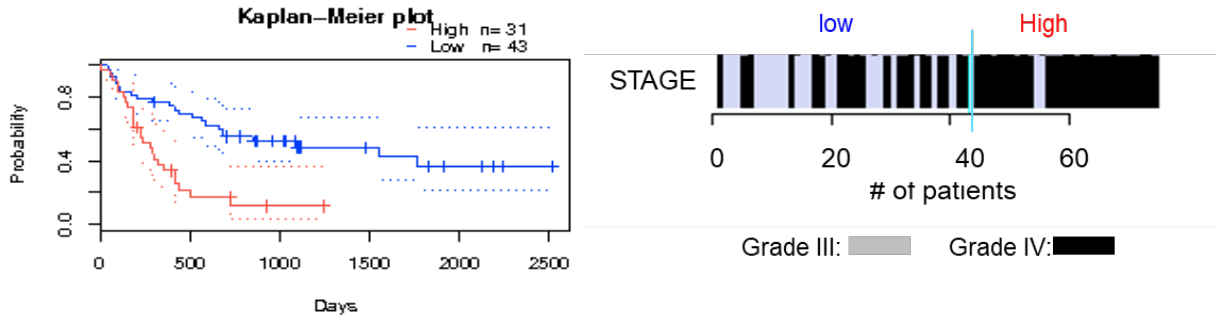
PANC-1、HeLa 細胞、siRNA による SAT1 発現抑制 PANC-1、HeLa 細胞を通常 (pH7.4)、及び低 pH(pH6.8)培養 72 時間後の N1-アセチルスペルミジンを CE-TOF-MS を用いて定量した。n=3 の平均 ±S.E.M を示した。Student t-test を実施した。\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 とする。

発現抑制 PANC-1、及び HeLa 細胞では減少していた(図 4-18)。

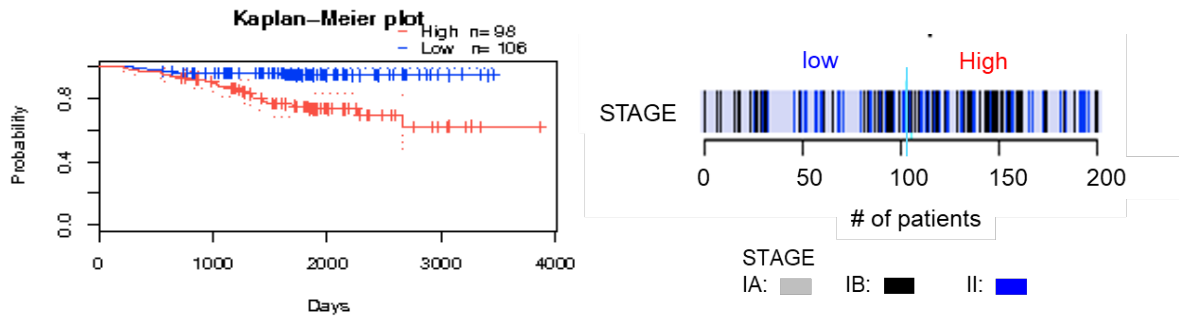
#### 4-3-1 1 臨床がんにおける SAT1 発現と予後の関係の検討

公共データベースである Gene Expression Omnibus database を用いて、様々ながん種で、SAT1 発現ががん悪性化に及ぼす影響を検討した。脳腫瘍、肺がん、大腸がんにおける SAT1 高発現患者において予後不良、及びがんステージの進行が認められたことから、SAT1 はがん悪性化に寄与することが示唆された (図 4-18)。

脳腫瘍 (p-value; 0.0044)



肝がん (p-value; 0.055)



肺がん (p-value; 0.014)

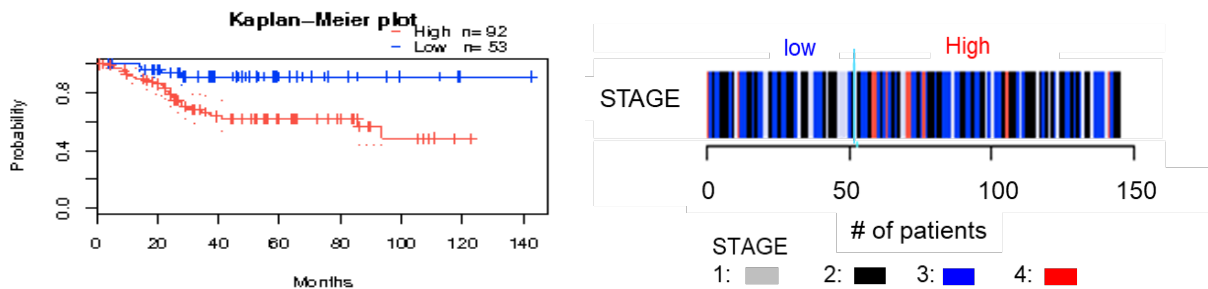


図 4-18 Gene Expression Omnibus database を用いた SAT1 発現量による生存率分析

脳腫瘍、肺がん、大腸がんにおいて、SAT1 発現量とがんステージ、及び予後不良との関連性を示す。SAT1 発現量とがんステージ、及び予後不良は相関する。

#### 4-4 考察

本章での検討により、SAT1 の発現抑制は、①尿素回路、メチオニン回路、及び *in vivo* 細胞増殖能には影響しないこと、②免疫不全マウスにおける *in vivo* 腫瘍増殖を抑制すること、③腫瘍内免疫細胞浸潤の抑制、血管新生の抑制をすることを、を明らかにした。

第2章で pH 低下に伴い変動した遺伝子、代謝物は、SAT1 に依存しているか検討したところ、低 pH 培養下で遺伝子発現が減少した SRM、PAOX、CPS1、MAT2A は、SAT1 発現レベルに依存していなかった。また同様に、低 pH 培養下で減少したポリアミン、プトレシン、及びスペルミジンは、SAT1 ノックダウン細胞でも減少しており、SAT1 の発現レベルに依存しなかった。以上より低 pH 環境下で変動する酵素群、及び代謝物プトレシン、及びスペルミジンは、SAT1 非依存的な pH 環境独自の細胞応答であると考えられる。

SAT1 の発現抑制により細胞内の N1-アセチルスペルミジンが減少するが、細胞増殖能には影響せず、低 pH(pH6.8)培養下でも生存を維持した。これは、N1-アセチルスペルミジンの上流代謝物であるプトレシンが、代替物質として作用し、ミトコンドリア膜電位を回復し、細胞増殖能を向上させ、細胞生存の維持に寄与しているためと考えられた。また、N1 アセチルスペルミジン、プトレシン、及びスペルミジンによるポリアミンの強いホメオスタシス(78)が、細胞の生存に寄与していると考えられる。

shRNA を用いた SAT1 発現抑制 PANC-1、HeLa 細胞を免疫不全マウスに皮下移植すると、SAT1 発現抑制群において腫瘍増殖が有意に抑制された。また、SAT1 発現抑制腫瘍では、腫瘍促進性免疫細胞浸潤、及び腫瘍血管新生が強く抑制された。SAT1 は、免疫細胞の腫瘍内への浸潤、及び腫瘍血管新生への関与が示唆された。ケモカインの遺伝子発現は低 pH(pH6.8)培養下において上昇は見られなかった。SAT1 発現抑制腫瘍内において、SAT1 は免疫細胞に対し直接的または間接的に関与している可能性が考えられた。

RNA-seq データで低 pH(pH6.8)培養下で遺伝子発現が上昇していた遺伝子のうち、ARHGAP19、及び SLC6A6 は SAT1 発現に制御されている可能性が示唆された。ARHGAP19 はトリプルネガティブ抵抗性乳がん細胞の細胞移動に関与している(79)。また SLC6A6 は胃がん、大腸がんを高発現しており、大腸がん細胞においては SLC6A6 のノックダウンによりアポトーシスが促進され、細胞増殖が抑制される(80,81)ことから、低 pH 環境下における生存能に関与している可能性が考えられた。SAT1 発現抑制腫瘍では、N1-アセチルスペルミジンが減少傾向であり、PANC-1、HeLa 細胞は経時的に N1-アセチルスペルミジンが細胞外に放出されていくことから、N1-アセチルスペルミジンも免疫細胞の腫瘍内への浸潤、及び腫瘍血管新生への関与が示唆された。

生存率分析では、脳腫瘍、肺がん、大腸がん患者において、SAT1 高発現群では、低発現群と比較して予後が悪く、進行ステージが高いほど SAT1 の発現が高くなっていた。このことから、SAT1 の発現は腫瘍増殖を促進し、がん悪性化に寄与していることが示唆された。

第 4 章では、これまでは低 pH 培養下で変動した SAT1 及び N1 アセチルスペルミジンを中心にターゲット分析により低 pH 環境下におけるがん細胞生存機構について検討したが、第 5 章では低 pH 培養下で変動する代謝物をノンターゲット分析法を用いて抽出し検討する。



## 第5章 低 pH (pH6.8) 培養下におけるオンコメタボライトの解析

### 5-1 緒言

近年、メタボローム解析技術の進歩からがん代謝研究が加速化し、がん細胞が好氣的解糖系を積極的に利用する「Warbrug 効果」やグルタミン代謝、酢酸代謝など、がんの生存や悪性化に貢献する代謝経路が次々と報告され(42-45)、がん代謝に着目した創薬研究が盛んに進められている。現在、代謝物の網羅解析 (メタボローム解析) は、高速液体クロマトグラフィーに質量分析計をつなげた LC-MS が主流となっている。しかし、LC-MS では高極性代謝物やリン酸代謝物の分離の限界があり、CE-TOF-MS が注目されている。CE とはフェーズドシリカキャピラリー管内に泳動液を満たし、試料溶液を注入した後、両端に電圧(-30~+30kV)を掛けて電気泳動を行うことにより、成分を荷電・大きさ・形などに基づく移動度の差異で分離する手法である。LC とは分離方式が異なり、高極性化合物、リン酸化された化合物の分離に優れており、逆に脂質のような低極性化合物や水に溶解しない気体などは不得意とする。そのため、CE-TOF-MS は尿、唾液のような、高極性代謝物が含まれる検体の測定と得意とする。尿、唾液は非侵襲性の高い検体であることから、これらの検体からバイオマーカーを見出すことは、低侵襲で、且つ郵送などで簡便に検査が行える利点があり、早期発見早期治療の一助として期待される。CE-TOF-MS システムを利用した高極性代謝物測定技術により、尿、唾液から検出されたバイオマーカーが多数報告されている(48-51,68,82)。

本章では PNAC-1 細胞の代謝物をターゲット解析、及びノンターゲット解析を行い、ノンターゲット解析の有用性を検討した。ターゲット解析とは、予め測定対象を決定し、決定した化合物の標品と比較して検出、解析を行う解析方法で、一方、ノンターゲット解析とは、定量分析する対象化合物を特定せず、分析機器で検出される全ピークを解析対象とし、CE-TOF-MS の場合は質量電荷比

(m/z) から得られる組成式などの精密質量データを用いた定量・定性分析を指す。ノンターゲット解析の有効性を確認するため、測定試料中にコントロールと比較して、増加が確認されている試料を2群用意し、ノンターゲット解析により、増加代謝物の抽出が可能かを検討した。まず、ノンターゲット解析の有効性について検討する為、PANC-1 細胞において、通常 (pH7.4) 培養と低 pH(pH6.8) 培養 24 時間後の代謝物を、CE-TOF-MS を用いて測定したデータについてノンターゲット解析を実施し、N1-アセチルスペルミジンの増加が確認されるかを検証した。

## 5-2 実験方法

### 5-2-1 標準品

カチオン性代謝物測定用の標準品を表 5-1 に示す。各標準品を 10~100mM になるように適度な溶媒で溶解させ、それぞれを 5ml メスフラスコに適量加え、最後に超純水で 5mL にメスアップした。これを 1.5ml チューブに小分けし、-80°C 冷凍庫で保管し、試験のたびに小分けを解凍し、再凍結品は使わないようにした。

### 5-2-2 測定条件及び試薬、試液

カチオン測定条件は表 2-1 と同じものを使った。

### 5-2-3 ノンターゲット解析方法

CE-TOF-MS で得られたマイグレーションタイム、強度、m/z データを Profinder (アジレントテクノロジー, ver.10.0.2) を用いて、マイグレーションタイムをスタンダードのピークを参照に補正した。補正されたピークを統計解析ソフトである Mass Profile Professional (MPP; アジレントテクノロジー, ver.15.1)

を用いて Filter on Volcano plot (moderated T TEST と Fold change を同時に行う検定方法)で検定を行なった。データベースは METLIN(ver. 8.00)を用いた。

## 5-3 結果

### 5-3-1 PANC-1 細胞の低 pH(pH6.8)培養下で変動する代謝物に対するノンターゲット解析

PANC-1 細胞の通常 (pH7.4) 培養及び低 pH(pH6.8)培養 24 時間後、代謝物を CE-TOF-MS を用いてカチオンモードで測定した。測定データを統計解析ソフトである Mass Profile Professional (MPP) を用いてノンターゲット解析を行なった。有意差の条件として、出現率 66%以上、増加比 1.5 以上、p 値 0.05 未満の条件で検定すると、N1-アセチルスペルミジンが変動の大きい代謝物として上位に抽出された。このことから、細胞内から抽出された代謝物についてノンターゲット解析の有用性が検証された (表 5-2、図 5-1)。また、N1,N8-ジアセチルスペルミジン、N1,N12-アセチルスペルミンも上位に示された。

表5-1 カチオン性代謝物測定標準品

カチオン性代謝物測定で用いる標準品を示す。

Formula	Mass	Cpd	Formula	Mass	Cpd
CH4N2O	60.0324	urea	C7H7NO2	137.0477	Anthranilic acid
C2H5NO2	75.0320	Glycine	C7H19N3	145.1579	Spermidine
C4H12N2	88.1000	Putrescine	C5H10N2O3	146.0691	L(+)-Glutamine
C3H7NO2	89.0477	beta-Alanine	C6H14N2O2	146.1055	L(+)-Lysine
C3H7NO2	89.0477	L-Alanine	C5H9NO4	147.0532	L-Glutamic acid
C3H7NO2	89.0477	Sarcosine	C5H11NO2S	149.0510	L-Methionine
C4H9NO2	103.0633	4-Aminobutyric acid (GABA)	C5H5N5O	151.0494	Guanine
C4H9NO2	103.0633	NN-Dimethylglycine	C5H4N4O2	152.0334	xanthine
C4H9NO2	103.0633	2-Aminobutyrate	C6H9N3O2	155.0695	L-Histidine
C3H7NO3	105.0426	L-Serine	C7H15NO3	161.1052	Carnitine
C2H7NO2S	109.0197	Hypotaurine	C9H11NO2	165.0790	L(-)-Phenylalanine
C4H5N3O	111.0433	Cytosine	C6H14N4O2	174.1117	L(+)-Arginine
C4H7N3O	113.0589	Creatinine hydrochloride	C6H13N3O3	175.0957	L-Citrulline
C5H9NO2	115.0633	L(-)-Proline	C5H11NO4S	181.0409	[ISC2]L-Methionine sulfone
C5H11NO2	117.0790	L-Valine	C9H11NO3	181.0739	L(-)-Tyrosine
C5H11NO2	117.0790	Betaine	C9H21N3O	187.1685	N1-acetylspermidine
C4H9NO3	119.0582	L-Homoserine	C9H11NO4	197.0688	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-L-alanine
C4H9NO3	119.0582	L(-)-Threonine	C10H26N4	202.2157	Spermine
C5H13NO2	119.0946	Betaine aldehyde+H2O	C11H12N2O2	204.0899	L-Tryptophan
C3H7NO2S	121.0197	L-Cysteine	C9H14N4O3	226.1066	L-Carnosine
C5H14N4	130.1218	agmatine	C9H13N3O5	243.0855	Cytidine
C5H9NO3	131.0582	L-Hydroxyproline	C12H28N4O	244.2263	N1-acetylspermine
C4H9N3O2	131.0695	Creatine monohydrate	C10H13N5O4	267.0968	Adenosine
C6H13NO2	131.0946	L(+)-Isoleucine	C10H12N4O5	268.0808	Inosine
C6H13NO2	131.0946	L-Leucine	C10H13N5O5	283.0917	Guanosine
C4H8N2O3	132.0535	L-Asparagine monohydrate	C10H18N4O6	290.1226	L-Argininosuccinate
C5H12N2O2	132.0899	L(+)-Ornithine monohydrochloride	C11H15N5O3S	297.0896	5-Methylthioadenosine
C4H7NO4	133.0375	L-Aspartic acid	C10H17N3O6S	307.0838	Glutathione (GSH)
C4H9NO2S	135.0354	Homocysteine	C14H20N6O5S	384.1216	S-Adenosylhomocysteine
C5H5N5	135.0545	Adenine	C15H22N6O5S	398.1372	S-(5-Adenosyl)-L-methionine chloride
C5H4N4O	136.0385	Hypoxanthine	C20H32N6O12S2	612.1520	Glutathione (GSSG)

**表5-2 ノンターゲット解析で抽出された、低 pH(pH6.8)培養下で増加する代謝物**

ノンターゲット解析で抽出された代謝物を、METLIN データベースを用いて推定した。データベースにない組成式の代謝物は組成式で示した。

Compound
16beta-16-Hydroxy-3-oxo-1,12-oleanadien-28-oic acid
N1,N12-Diacetylspermine
Flumipropyn
Lysyl-Leucine
Ethyl (7)-3-hydroxyoctanoate
Cyhalofop-butyl
Thr Gly Thr Asp
Aristolochic acid
C19 H42 N8 O3
Fluenetil Esi+28.535997
N1,N8-Diacetylspermidine
(3beta,22R,23R,24S)-3,22,23-Trihydroxystigmastan-6-one Esi+12.236
Trp Val Val Gly
C12 H33 N14 O3 P3
Emedastine
(-)-11-Hydroxy-9,15,16-trioxooctadecanoic acid
9-Methylthiononanaldoxime
(3beta,22R,23R,24S)-3,22,23-Trihydroxystigmastan-6-one
C17 H31 N O6
5-Aminoimidazole ribonucleotide
N1-Acetylspermidine
9-Hydroxy-7-megastigmen-3-one glucoside
3'-Hydroxy-T2-triol
Lycodine Esi+12.285
Osmaronin
Methyl nigakinone
Lycodine Esi+12.957
C18 H33 N O7
3-[[5-Methyl-2-(1-methylethyl)cyclohexyl]oxy]-1,2-propanediol
C15 H27 N O5
Fluenetil Esi+28.554998
Fluenetil
C16 H32 N9 O3 P
Lycodine
Adenine
Butoctamide hydrogen succinate Esi+14.2109995
Butoctamide hydrogen succinate
Glycerophosphocholine Esi+28.544
Glycerophosphocholine

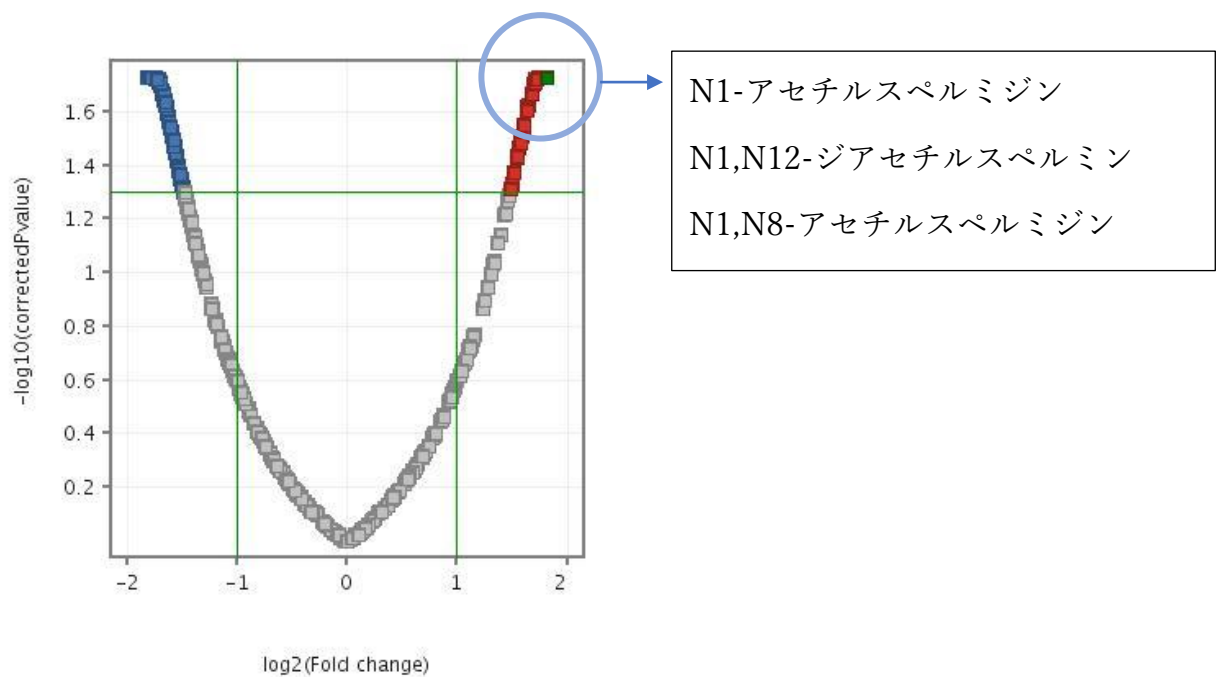


図 5-1 低 pH(pH6.8)培養下で変動する代謝物に対するノンターゲット解析

PANC-1 細胞を低 pH(pH6.8)培養 24 時間後、代謝物を CE-TOF-MS を用いて測定し、ノンターゲット解析を行なった。ピーク出現率 66%以上、増加比 1.5 以上、p 値 0.05 未満の条件で Filter on Volcano plot を実施。

## 5-4 考察

本章では、CE-TOF-MS 測定データからノンターゲット解析の実行性と有用性の検証とバイオマーカー探索について、①PANC-1 細胞の代謝物測定データから N1-アセチルスベルミジンを、ノンターゲット解析の有用性を検証した。

CE-TOF-MS 測定データをアンバイアスでノンターゲット解析を行い、通常 (pH7.4) 培養と比較して低 pH(pH6.8)培養 24 時間後の PANC-1 細胞代謝物では N1-アセチルスベルミジンが有意に増加していることを検証した。これにより細胞代謝物のノンターゲット解析の有用性を検証することができた。また、N1,N8-ジアセチルスベルミジン、N1,N12-アセチルスベルミンも増加化合物として検出され、新たな低 pH 環境応答の可能性が示唆された。

以上の結果により、PANC-1 細胞における低 pH(pH6.8)培養下のオンコメタボライトの探索を、ノンターゲット解析を用いて検討したところ、N1-アセチルスベルミジン、N1N12-アセチルスベルミン、及び N1N8-アセチルスベルミジンが抽出された。N1N12-アセチルスベルミン、及び N1N8-アセチルスベルミジンは膵臓がんのマーカー候補として報告(77)があることから、本検討の有効性が確認された。CE-TOF-MS によるノンターゲット分析は新たな標的代謝物を見出す強力な分析方法であると示唆された。

## 第6章 結語

がんの悪性化や治療抵抗性には、低酸素、低栄養、低 pH などの腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。これまで、がん細胞が低酸素や低栄養などの過酷な環境に適応するために、エピゲノム、転写、代謝制御が関わるということが報告されているが、低 pH 環境への適応機構は未だ不明な点が多い。我々のグループは、低 pH 環境における細胞応答を担うエピゲノム制御、転写制御因子を報告してきたが、本研究では、近年がん研究において注目されている代謝変動に着目して、①低 pH 環境が、がん細胞の代謝変動に与える影響、②低 pH 環境で変動する代謝物 (N1-アセチルスペルミジン) が、がん細胞の生存に及ぼす影響、③低 pH 環境で亢進する代謝酵素 (スペルミジン /スペルミン N アセチルトランスフェラーゼ ; SAT1) が腫瘍増殖に及ぼす影響、④神経芽腫患者の尿検体中代謝物について検討した。

第2章では低 pH 培養下において、がん細胞でポリアミン代謝物の N1-アセチルスペルミジンが増加し、N1-アセチルスペルミジンの基質であるスペルミジンやスペルミジンの基質であるプトレシンが低下することを明らかにした。また、低 pH 環境下ではポリアミン代謝酵素群の中で、スペルミジンを基質として N1-アセチルスペルミジンを産生する代謝酵素、SAT1 の遺伝子発現が亢進し、その一方で、ポリアミン代謝酵素のポリアミンオキシターゼ (PAOX)、尿素回路酵素のカルバミリルリン酸シンターゼ (CPS1)、メチオニンサルベージ回路酵素のメチルチオアデノシンホスホリラーゼ 2A (MA2A) の遺伝子発現が抑制されていることを明らかにした。

第3章では、低 pH 環境下において、N1-アセチルスペルミジン、及びプトレシンが、がん細胞のミトコンドリア機能を回復させ、細胞増殖を亢進することで、過酷な環境下での生存を可能にしていることが示唆された。一方で、低 pH 環境下において、スペルミジンは、ミトコンドリア膜電位の低下や、酸素消費速度 (OCR) の低下など、ミトコンドリア機能を低下させ、がん細胞の増



殖を抑制した。このことから、低 pH 環境下における N1-アセチルスペルミジンの増加は、スペルミジンの細胞毒性回避機構であることが示唆された。

第 4 章では、SAT1 は尿素回路、メチオニン回路、及びメチオニンサルベージ回路の代謝変動に関与しないこと、また、低 pH 環境下における SAT1 の遺伝子発現抑制は、細胞増殖には影響を及ぼさないが、*in vivo* マウス腫瘍移植実験において、SAT1 のノックダウン細胞はコントロール群と比較して、顕著に腫瘍増殖を抑制していた。その一因として、腫瘍内への腫瘍促進性免疫細胞 (ミエロイド細胞、マクロファージ、好中球) の浸潤抑制や腫瘍血管新生が抑制された。このことから、SAT1 は腫瘍微小環境を構成するがん細胞以外の細胞 (免疫細胞、線維芽細胞など) との相互作用を介して腫瘍形成を促進することが示唆された。SAT1 の発現増加は、脳腫瘍、大腸がん、肺がんで見られ、予後不良に寄与していることが報告されており、SAT1 はがん悪性化に重要な役割を果たすことが考えられた。

第 5 章では、既知の代謝物を capillary electrophoresis -time-of flight mass spectrometry (CE-TOF-MS) を用いたノンターゲット解析で特定することで、ノンターゲット解析の有効性を検討した。

本研究は、低 pH 環境を低酸素環境の単なる「結果」として捉えるのではなく、低 pH 環で変動する代謝の適応機構の解明である。例えば、N1-アセチルスペルミジン代謝酵素 SAT1 が、低 pH 環境下におけるがん細胞生存機構に非常に重要な代謝適応経路である事を明らかとした点に独創性がある。また、低 pH 環境下で増加する代謝酵素 SAT1 の発現抑制は、腫瘍増殖を抑制させ、免疫細胞浸潤、及び腫瘍血管新生が抑制されていることを新たに見出した。本研究で明らかにした N1-アセチルスペルミジン、及び SAT1 を中心とした低 pH 特異的な代謝変動は、がん細胞の低 pH 環境への適応機構の解明に新たな知見を与える。

最後に、低 pH 環境における N1-アセチルスペルミジンと SAT1 の増加は、ステージが進行した脳腫瘍、大腸がん、及び肺がんの予後不良と相関があり、他のがん種においても同様の低 pH 環境下への細胞適応に寄与する可能性があ

る。以上から、本研究結果は N1-アセチルスベルミジンと SAT1 を標的とした新規がん治療薬の開発に繋がることを期待できる。

## 参考文献

1. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」(全国がん登録)  
[https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/data/dl/index.html#a14](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/data/dl/index.html#a14)
2. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」(厚生労働省人口動態統計)  
[https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/data/dl/index.html#a7](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/data/dl/index.html#a7)
3. 全国がん罹患モニタリング集計 2009-2011 年生存率報告 (国立研究開発法人国立がん研究センターがん対策情報センター, 2020)  
[https://ganjoho.jp/public/qa\\_links/report/ncr/pdf/mcij2009-2011\\_report.pdf](https://ganjoho.jp/public/qa_links/report/ncr/pdf/mcij2009-2011_report.pdf)
4. 独立行政法人国立がん研究センターがん研究開発費「地域がん登録精度向上と活用に関する研究」平成 22 年度報告書  
[https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/data/dl/index.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/data/dl/index.html)
5. Rosenberg, S. A., Yang, J. C. & Restifo, N. P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 10, 909–915 (2004)
6. Ledford, H., Else, H. & Warren, M. Cancer immunologists scoop medicine Nobel prize. *Nature* 562, 20–21 (2018)
7. Tredan, O., Galmarini, C. M., Patel, K. & Tannock, I. F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 1441-1454 (2007).
8. Vaupel, P., Kallinowski, F. & Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 49, 6449-6465 (1989).
9. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 21:309–22( 2012)
10. Frisch J, Angenendt A, Hoth M, Prates Roma L, Lis AJC: STIM-Orai Channels and Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel).* 211, 4, (2019)

11. Silagi ES, Schoepflin ZR, Seifert EL, Merceron C, Schipani E, Shapiro IM, Risbud MV. Bicarbonate Recycling by HIF-1-Dependent Carbonic Anhydrase Isoforms 9 and 12 Is Critical in Maintaining Intracellular pH and Viability of Nucleus Pulposus Cells. *J Bone Miner Res.*,33, 338-355 (2018).
13. Xu, L., Fukumura, D. & Jain, R. K. Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. *J. Biol. Chem.* 277, 11368-11374 (2002).
14. Li liLu. et al. Effects of pH on the activity of the human red cell glucose transporter Glut 1: transport retention chromatography of D-glucose and L-glucose on immobilized Glut 1 liposomes. *Biochim Biophys Acta.*, 1150, 2, 135-146 (1993).
15. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653-660 (2003).
16. Jain, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 9, 685-693 (2003).
17. Jain, R. K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat. Med.* 7, 987-989 (2001).
18. Codogno, P. & Meijer, A. J. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 2, 1509-1518 (2005).
19. Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R. & Kondo, S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 5, 726-734 (2005).
20. Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 21-35 (2011).

21. Denko, N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat. Rev. Cancer.* 8, 705-713 (2008).
22. Lu, H., Forbes, R. A. & Verma, A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* 277, 23111-23115 (2002).
23. Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M. & Wang, G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269, 23757-23763 (1994).
24. Xu, R. H. et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* 65, 613-621 (2005).
25. Izumi, H. et al. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* 29, 541-549 (2003).
26. Pouyssegur, J., Dayan, F. & Mazure, N. M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437-443 (2006).
27. Gerweck, L. E. & Seetharaman, K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res.* 56, 1194-1198 (1996).
28. Kato, Y. et al. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 10938-10944 (2005).
29. Martinez-Zaguilan, R. et al. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 14, 176-186 (1996).
30. Robey, I. F. et al. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Res.* 69, 2260-2268 (2009).

31. Rofstad, E. K., Mathiesen, B., Kindem, K. & Galappathi, K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res.* 66, 6699-6707 (2006).
32. Silva, A. S., Yunes, J. A., Gillies, R. J. & Gatenby, R. A. The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion. *Cancer Res.* 69, 2677-2684 (2009).
33. Marks, P. et al. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer.* 1, 194-202 (2001).
34. Minucci, S. & Pelicci, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 6, 38-51 (2006).
35. Robert, M. F. et al. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat. Genet.* 33, 61-65 (2003).
36. Yoo, C. B. & Jones, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 37-50 (2006).
37. Lyko, F. & Brown, R. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 1498-1506 (2005).
38. Fiskus, W. et al. Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 114, 2733-2743 (2009).
39. Qi, W. et al. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 21360-21365 (2012).
40. Varambally, S. et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624-629 (2002).

41. Sarah K. et al. Selective Inhibition of EZH2 by EPZ-6438 Leads to Potent Antitumor Activity in EZH2-Mutant Non-Hodgkin Lymphoma. *Molecular Cancer Therapeutics*. 13, 4, 842–854(2014)
42. DeBerardinis, R. J. & Cheng, T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 29, 313-324 (2010)
43. Metallo, C. M. et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481, 380-384 (2011).
44. Chen, R. et al. The acetate/ACSS2 switch regulates HIF-2 stress signaling in the tumor cell microenvironment. *PLoS One* 10, e0116515 (2015).
45. Comerford, S. A. et al. Acetate dependence of tumors. *Cell* 159, 1591-1602 (2014).
46. Hugh Colvin. et al. Oncometabolite D-2-Hydroxyglurate Directly Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and is Associated with Distant Metastasis in Colorectal Cancer. *Scientific Reports*. 6, 36289 (2016)
47. Ovidiu C Andronesi . et al. Pharmacodynamics of mutant-IDH1 inhibitors in glioma patients probed by in vivo 3D MRS imaging of 2-hydroxyglutarate. *Nat Commun*. 9, 1,1474(2018)
48. Wei Zhang. et al. Assessing the suitability of capillary electrophoresis-mass spectrometry for biomarker discovery in plasma-based metabolomics. *Electrophoresis*, 40, 18-19, 2309-2320 (2019)
49. Züribig P. · Mischak H. Capillary Electrophoresis Coupled to Mass Spectrometry for Biomarker Discovery and Diagnosis of Kidney Diseases. Thongboonkerd V (ed): *Proteomics in Nephrology - Towards Clinical Applications*. *Contrib Nephrol*. Basel, Karger, 160, 107-126(2008)
50. Masahiro Sugimoto et al. Quantification of Salivary Charged Metabolites using Capillary Electrophoresis Time-of-flight-mass Spectrometry. *Bio Protoc*. 10, 20, e3797 (2020)

51. Akiyoshi Hirayama, Masataka Wakayama, Tomoyoshi Soga. Metabolome analysis based on capillary electrophoresis-mass spectrometry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 61, 215-222(2014)
52. Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. & Jain, R. K. Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat. Med.* 3, 177-182 (1997).
53. Tredan, O., Galmarini, C. M., Patel, K. & Tannock, I. F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 1441-1454 (2007).
54. Webb, B. A., Chimenti, M., Jacobson, M. P. & Barber, D. L. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat. Rev. Cancer.* 11, 671-677 (2011).
55. Funato Y. et al. The oncogenic PRL protein causes acid addiction of cells by stimulating lysosomal exocytosis. *Dev Cell.* 55, 4, 387-397(2020)
56. Sutoo S, Kato Y. et al., Adaptation to chronic acidic extracellular pH elicits a sustained increase in lung cancer cell invasion and metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 37, 133–144 (2020)
57. Kato Y. et al. Cancer metabolism: New insights into classic characteristics. *Jpn Dent Sci Rev.* , 54, 1, 8-21(2018)
58. Kondo A. et al. Extracellular Acidic pH Activates the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 to Promote Tumor Progression. *Cell Rep.* 18, 2228-2242 (2017)
59. Lei Xu. Et al. Acidic pH-induced Elevation in Interleukin 8 Expression by Human Ovarian Carcinoma Cells. *CANCER RESEARCH* 60, 4610–4616,(2000)
60. Amaia Zabala-Ietona et al. mTORC1-dependent AMD1 regulation sustains polyamine metabolism in prostate cancer. *Nature*, 547, 109(2017)
61. Elmets CA, Athar M. Targeting ornithine decarboxylase for the prevention of nonmelanoma skin cancer in humans. *Cancer Prev Res (Phila).* 3,1,8–11(2010)



62. Manni A, Grove R, Kunselman S, Aldaz CM. Involvement of the polyamine pathway in breast cancer progression. *Cancer Lett.* 92 1,49–57(1995)
63. Upp JR Jr, Saydjari R, Townsend CM Jr, Singh P, Barranco SC, Thompson JC. Polyamine levels and gastrin receptors in colon cancers. *Ann Surg.* 207,6,662–9(1988)
64. Tawnya L. Bowles. et al. Pancreatic cancer cell lines deficient in arginosuccinate synthetase are sensitive to arginine deprivation by arginine deiminase. *Int J Cancer.* 123, 8, 1950–1955(2008).
65. Kuniyasu Soda. Polyamine Metabolism and Gene Methylation in Conjunction with One-Carbon Metabolism. *Int J Mol Sci.*, 19, 10,3106 (2018)
66. Casero RA, Pegg AE. Polyamine catabolism and disease. *Biochem J.* 421, 3,323–38(2009).
67. Dong-HunBae. et al. The old and new biochemistry of polyamines. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.*,1862, 9, 2053-2068(2018).
68. Kaori Igarashi et al. High-throughput screening of salivary polyamine markers for discrimination of colorectal cancer by multisegment injection capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* Aug 30;1652:462355(2021)
69. Naoto Egawa et al. Sensitivity of urinary N1,N12-diacetylspermine for pancreatic cancer. *Japan Journal of Molecular Tumor Marker Research.* 24, 33-34(2009)
70. Keiko MURAKAMI et al. Cytotoxic Effects of Polyamines. *Nutrients Research* 27 : 43-46(2010)
- 71 Igarashi K, Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol.* 42, 1, 39–51(2010)
- 72.Jason Miska etal. Polyamines drive myeloid cell survival by buffering intracellular pH to promote immunosuppression in glioblastoma. *Sci. Adv.*,

73. Marc Cerrada-Gimenez et al. Polyamine flux analysis by determination of heavy isotope incorporation from <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-enriched amino acids into polyamines by LC-MS/MS. *Amino Acids*. Feb;42, 2-3,451-60(2012).
74. Swati Mandal, Ajeet Mandal, Myung Hee Park. Depletion of the polyamines spermidine and spermine by overexpression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SAT1) leads to mitochondria-mediated apoptosis in mammalian cells. *Biochem J*. Jun 15;468,3,435-47(2015)
75. Yang Ou, Shang-Jui Wang, Dawei Li, Bo Chu, and Wei Gu. Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses. *PNAS* November 1, 113 (44) E6806-E6812 (2016)
76. Coleman CS, Stanley BA, Jones AD, Pegg AE. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase-2 (SSAT2) acetylates thialysine and is not involved in polyamine metabolism. *Biochem J.*, 384, 139–148(2004).
77. Anthony E. Pegg Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E995–E1010(2008).
78. Miller-Fleming, L. et al.; Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J. Mol. Biol.*, 427, 3389–3406 (2015).
- 79.
- 80.
- 81.
82. Kazuki Yokota et al. Identification of novel neuroblastoma biomarkers in urine samples. *Scientific report*. 11:4055(2021)



## 謝辞

本研究の実施にあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました東京大学先端科学技術研究センター ニュートリオミクス・腫瘍学分野 大澤毅特任准教授に心からの感謝の意を表します。

親身となって基本的な実験手技から研究推進、論文・図版作成に至るまで、懇切丁寧な御指導を賜りました東京大学先端科学技術研究センター ニュートリオミクス・腫瘍学分野 安藝翔特任助教に深謝致します。

研究全体を通して基本的な実験手技から研究推進、御指導、激励を賜りました東京大学先端科学技術研究センター ニュートリオミクス・腫瘍学分野 土田里香特別研究員に感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、有意義な御討論を頂きました東京大学先端科学技術研究センター システム生物医学分野 児玉龍彦名誉教授、東京大学先端科学技術研究センター 代謝医学分野 酒井寿郎教授に深く感謝いたします。

本研究の解析にあたり、名古屋大学医学系研究科 システム生物学島村徹平教授に多大なる御指導、御協力を頂きました。

本研究の試料作成は、東京大学先端科学技術研究センター ニュートリオミクス・腫瘍学分野 石井直子技術員、西田美由紀技術員、菅谷麻希研究員の御協力により実現致しました。

ChIP-seq に関してご指導いただきました東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス部門 野中綾特任研究員に御礼申し上げます。

本研究で行いました OCR 測定に関して、東京大学先端科学技術研究センター代謝医学分野 酒井寿郎教授に懇切丁寧に御指導頂きました。

本研究における患者尿検体の解析につきまして、名古屋大学大学院医学系研究科 希少性・難治性がん解析研究講座 檜頭成教授に多くのご指導ご尽力をいただきましたこと、御礼申し上げます。

本研究全般及び研究室生活におきまして、東京大学先端科学技術研究センターニュートリオミクス・腫瘍学の皆様に広範な御支援を賜りました。研究室での

3年間、研究に打ち込む事が出来たのは、皆さんの支えがあったからです。厚く御礼申し上げます。