

学位論文抄録

Metabolic shift to serine biosynthesis through 3-PG accumulation and PHGDH induction
promotes tumor growth in pancreatic cancer

(PHGDH の発現誘導と 3-PG の蓄積を介したセリン生合成系への代謝シフトが
膵癌の腫瘍増殖を促進する)

伊東山 瑠美

指導教員

馬場 秀夫 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻消化器外科学

Abstract of the Thesis

Background and Purpose: Cancer cells craftily adapt their energy metabolism to their microenvironment. Nutrient deprivation due to hypo vascularity and fibrosis is a major characteristic of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC); thus, PDAC cells must produce energy intrinsically. The aim of this study is to clarify the molecular mechanism underlying the metabolic shift of pancreatic cancer cells under the serine deprivation, focusing on the serine biosynthesis, which is a kind of non-essential amino acid.

Methods: Immunohistochemical staining of PHGDH, which is one of the serine biosynthesis enzymes, and amino acid analysis were performed using pancreatic cancer patients' samples. And proliferation assay was performed using pancreatic cancer cell lines under serine deprivation. At that time, changes in intracellular serine concentration and expression of PHGDH were examined. Furthermore, the methylation level of the CpG sites in the PHGDH promoter region was verified using pyrosequence. In addition, in order to verify the relationship between the serine biosynthesis and the glycolysis, comprehensive analysis of metabolites was conducted when the glycolytic enzyme PGAM1 was knocked down under serine deprivation.

Results: Amino acid analysis revealed that the concentrations of all essential amino acids and most nonessential amino acids were decreased in the blood of PDAC patients. In addition, the plasma serine concentration was significantly higher in PDAC patients with PHGDH-high tumors than in those with PHGDH-low tumors. Although the growth and tumorigenesis of PK- 59 cells with PHGDH promoter hypermethylation were significantly decreased by serine starvation, these activities were maintained in PDAC cell lines with PHGDH promoter hypomethylation by serine biosynthesis through PHGDH induction. PHGDH knockdown efficiently suppressed PDAC cell growth and tumor growth under serine starvation. In addition to PHGDH induction by serine starvation, PDAC cells showed enhanced serine biosynthesis under serine starvation through 3-PG accumulation via PGAM1 knockdown, resulting in enhanced PDAC cell growth and tumor growth.

Discussion: It has been reported that activation by Kras mutation, which is often seen in pancreatic cancer, imparts the resistance to serine starvation. However, PK-59 with Kras mutation does not have resistance to serine starvation, and it was newly revealed that the methylation level of PHGDH promoter region is involved in serine starvation.

Conclusions: PDAC cells maintain their proliferation by enhancing serine biosynthesis, in nutrient-deprived microenvironments. The expression level of PHGDH is useful as a marker for predicting its proliferative potential, and at the same time, it can be a therapeutic target.

学位論文抄録

【背景と目的】 がん細胞はそれらを取り巻く微小環境に適応するよう、その代謝系を変化させていることが知られる。乏血性で線維組織に富む膵癌は通常、外からの栄養を取り込むには過酷な状況であり、自らエネルギーを産生する必要がある。本研究では非必須アミノ酸の一種であるセリンの生合成系に着目し、外的セリン飢餓状態での膵癌細胞の代謝シフトの根底にある分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方 法】 膵癌患者の血液サンプルを用いてアミノ酸分析を行うとともに、切除検体の免疫組織化学染色を行い、セリン生合成酵素の一つである PHGDH の癌部での発現レベルとの比較を行った。また膵癌細胞株を用いて、外的セリン飢餓状態での増殖能の変化を検証した。その際の細胞内セリン濃度の変化やセリン生合成酵素の一つである PHGDH の発現変化を検証した。さらに PHGDH プロモーター領域に存在する、PHGDH 発現の key regulator とされる転写因子 ATF4 の結合部位周囲の CpG site のメチル化の程度を、pyrosequence を用いて検証した。加えて、セリン生合成系の分岐する解糖系との関連を検証すべく、セリン飢餓状態で解糖系酵素 PGAM1 をノックダウンした際の代謝物の網羅的解析を行った。

【結 果】 血液サンプルからアミノ酸分析を行った結果、一部の非必須アミノ酸を除いて、膵癌患者は低アミノ酸血症であることがわかった。セリンに着目すると健康者との間に有意差はなかったが、同一患者の切除検体を用いて癌部での PHGDH 発現レベルと血中セリン濃度を比較すると、高発現群で血中セリン濃度が高値であった。また高発現群が有意に予後不良であることもわかった。次に 5 つの膵癌細胞株をセリン欠乏 medium で培養し増殖能を検証したところ、PHGDH プロモーター領域が高メチル化である PK-59 では、外的セリン飢餓により有意に増殖能が減少した。一方で低メチル化であったその他 4 つの膵癌細胞株は外的セリン飢餓状態で PHGDH の発現が誘導され、セリン生合成が亢進することで増殖能が維持されていた。低メチル化細胞のセリン飢餓状態での PHGDH ノックダウンは増殖能低下に寄与した。また、セリン飢餓状態による PHGDH の発現誘導に加えて、解糖系酵素の PGAM1 をノックダウンし、その上流で 3-PG を蓄積させることでセリン飢餓状態でのセリン生合成をさらに亢進させ、膵癌細胞を増殖させた。

【考 察】 膵癌で多く見られる Kras 変異による活性化がセリン飢餓耐性を付与するといった報告があるが、Kras 変異を有する PK-59 ではセリン飢餓耐性は見られず、PHGDH プロモーター領域のメチル化レベルがセリン飢餓への耐性に関与することを今回新たに明らかにした。

【結 語】 栄養不足の微小環境に置かれた膵癌細胞はセリン生合成を亢進することで増殖能を維持しており、PHGDH の発現レベルはその増殖能を予測するマーカーとして有用であると同時に、治療ターゲットにもなり得る。