



Title	In vitroモデル細胞を用いた代謝フラックス変化とがん細胞の増殖や生存との関係に関する研究
Author(s)	野口, 真悟
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82298
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

In vitro モデル細胞を用いた
代謝フラックス変化とがん細胞の
増殖や生存との関係に関する研究

提出先 大阪大学大学院情報科学研究科

提出年月 2021年1月

野口真悟

学位取得に関わる発表論文

国際学術論文（採択済み）

[1] Shingo Noguchi, Hirokazu Ishikawa, Kenichi Wakita, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, “Direct and quantitative analysis of altered metabolic flux distributions and cellular ATP production pathway in fumarate hydratase-diminished cells”, *Scientific Reports*, **10**, 1-12, 2020. (博士論文第2章)

国際会議

[1] Shingo Noguchi, Kenichi Wakita, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, “¹³C metabolic flux analysis revealed metabolic flux alterations induced by three-dimensional culture in human cancer cell line”, 16th Annual Conference of the Metabolomics Society, Online, October 27-29 2020. (博士論文第3章)

内容梗概

近年, がんにおけるアンメットメディカルニーズは高まってきており, より有効な治療薬の開発が望まれている. 一般的に, がん細胞では遺伝子変異によって異常な細胞増殖や細胞生存が可能となり, 腫瘍微小環境の形成とともに腫瘍が進展することで病態が進行していくと考えられている. 多くの薬物療法で用いられているように, がん細胞の増殖や生存を抑制することは有効な治療戦略であると考えられる. 代謝は細胞増殖や細胞生存にとって必須の細胞内プロセスであるため, がん細胞における特徴的な代謝状態を治療標的にすることで, 有効ながん治療薬の開発が可能になると期待される. 代謝を標的とした治療薬の研究開発を進めるためには, 定量的な代謝比較解析により, がん細胞において亢進あるいは抑制される代謝経路を明らかにすることが必要であると考えられる. そして, こうした代謝変化と細胞の増殖や生存との関係を検証することで, 薬剤標的代謝反応の選定が可能になると期待される. ^{13}C 代謝フラックス解析は代謝の本質である代謝反応における単位細胞あたりの反応速度, つまり代謝フラックスを算出することができる. *In silico* 代謝モデルと ^{13}C 標識実験から得られた ^{13}C 標識データを用いた計算機によるフィッティングから代謝フラックス分布を推定し, その 95% 信頼区間を算出することにより, 代謝フラックス変化を定量的に解析することが可能となる. さらに, 代謝フラックス分布からは nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) や nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) のような酸化還元反応を触媒する補因子や, adenosine triphosphate (ATP) のようなエネルギー産生に関わる分子の消費あるいは産生を見積もることができるため, 細胞内でのエネルギー産生状態に関する情報も得ることができる. したがって, ^{13}C 代謝フラックス解析技術は遺伝子変異や腫瘍微小環境形成が及ぼす細胞内代謝への影響を評価するのに適していると考えられる. しかしながら, これまで ^{13}C 代謝フラックス解析のがん創薬研究への適用事例は少ない. そのため, トリカルボン酸サイクル (TCA サイクル) 代謝酵素遺伝子変異のようにエネルギー代謝系に直接影響を及ぼす因子によるエネルギー産生機構の適応について詳細が明らかとなっていない. また, 腫瘍微小環境下でがん細胞は低酸素状態となるが, 低酸素による代謝応答については一般的な 2 次元培養下での解析がほとんどであり, 生体内での立体的な腫瘍微小環境下での代謝状態について明らかとなっていない. そこで本研究では, がん創薬研究における ^{13}C 代謝フラックス解析法の適用可能性を検討することを目的とした. 方策として *in vitro* モデル細胞を用いて遺伝子変異や腫瘍微小環境形成による代謝フラックス変化を明らかにし, 細胞の増殖や生存との関係の推察および検証を実施した.

本学位論文は以下の 4 章で構成される. 第 1 章では研究の背景および目的を述べた. 第 2 章では, がんの発症と関連が報告されている fumarase (FH) 遺伝子変異に着目し, FH 酵素活性を低下させた細胞株 (FH^{dim}) を構築し, その親株細胞である HEK293 細胞と代謝フラックスを比較した. FH^{dim} 細胞では pyruvate のミトコンドリアへの流入フラックスが減少し, それに起因して TCA サイクル全体のフラックスが減少した. さらに, 代謝フラックス分布から算出された酸化還元収支ならびにエネルギー収支より, FH 活性低下により細胞内

ATP 産生における解糖系依存性が高まる細胞内代謝変化を起こしていることを示した。さらに、FH 活性低下によって TCA サイクルでの酸化的代謝に依存した細胞内 ATP 産生が低下し、oligomycin の感受性が低下することを確認した。これらの結果から、FH 活性低下がん細胞に対して酸化的リン酸化阻害が有望な治療戦略とはならず、解糖系の抑制が有効な治療戦略となる可能性が示唆された。また、酸化還元状態の変化に起因すると考えられる glutamate 由来の proline 合成フラックスの低下という、FH 活性低下による新規の代謝フラックス変化を明らかにした。さらに FH 活性低下により arginine 由来の proline 合成フラックスが増加していたことから、arginine からの proline 合成代謝の抑制が新たな治療薬の標的となる可能性が示唆された。以上の結果より、FH 活性低下により亢進あるいは抑制される代謝経路を同定し、細胞内エネルギー産生における代謝経路への依存性の変化を示すことができたため、遺伝子変異による代謝変化の解析における ^{13}C 代謝フラックス解析法の適用可能性を示した。第 3 章では、がんの進展に寄与する低酸素腫瘍微小環境形成に着目し、*in vitro* にて腫瘍微小環境を構築可能な 3 次元培養と一般的な 2 次元培養での代謝フラックスを、大腸がん由来細胞株 HCT116 細胞を用いて比較した。細胞内代謝物の ^{13}C 標識割合を説明変数とした主成分分析により、3 次元培養細胞 spheroid は通常酸素ならびに低酸素条件下での 2 次元培養細胞とは異なる代謝状態を有することが示された。代謝フラックス分布を決定したところ、3 次元培養において特異的に glutamine から TCA サイクルへの流入フラックスの減少と pyruvate carboxylase (PC) フラックスの増加が確認された。PC フラックスは glucose 由来の炭素を TCA サイクルへ供給する補充経路であり、glutamine 代謝フラックスの減少を補填するように亢進しているため、腫瘍微小環境中のがん細胞に対する PC フラックスの抑制が有効な治療戦略となる可能性が示唆された。また、glutamine 代謝の低下や PC フラックスの亢進は先行研究で報告された *in vivo* 腫瘍と同様の代謝変化であるため、3 次元培養細胞 spheroid がより *in vivo* 腫瘍に近い性質を有することが代謝的な観点より示唆された。また、glutaminase 阻害剤である CB-839 の感受性が 3 次元培養において低下することを確認し、3 次元培養下での腫瘍微小環境の形成による、PC フラックスの増加と glutamine 代謝フラックスの減少が CB-839 感受性低下の一因である可能性が示唆された。以上の結果より、3 次元培養下で亢進あるいは抑制される代謝経路を同定し、細胞の増殖や生存における glutaminase への依存性の変化を示すことができたため、腫瘍微小環境下での代謝解析における、 ^{13}C 代謝フラックス解析法の適用可能性が示された。

第 4 章では、本研究で得られたがん創薬研究の進展に寄与する知見をまとめ、今後のがん創薬研究における ^{13}C 代謝フラックス解析の適用に関する展望について述べた。

目次

第1章	緒論	8
1.1.	がん治療の現状	8
1.2.	がん発症と進展のメカニズム	10
1.3.	がん細胞の増殖や生存を標的としたがん治療	10
1.4.	がん細胞における代謝変化	11
1.5.	がん治療薬開発を目指したがん代謝解析における課題	13
1.6.	^{13}C 代謝フラックス解析手法を用いたがん代謝変化解析	13
1.6.1.	遺伝子変異によるがん代謝変化解析	14
1.6.2.	腫瘍微小環境形成によるがん代謝変化解析	16
1.7.	本論文の目的と構成	17
第2章	FH 酵素活性低下による代謝フラックス変化解析	20
2.1.	緒言	20
2.2.	実験材料と実験方法	21
2.2.1.	使用細胞株	21
2.2.2.	使用培地	21
2.2.3.	FH 活性低下細胞株の構築	21
2.2.4.	細胞培養ならびに ^{13}C 標識実験	22
2.2.5.	ウェスタンプロッティング	22
2.2.6.	FH 酵素活性測定	23
2.2.7.	細胞外フラックス算出	23
2.2.8.	細胞内代謝物分析	24
2.2.8.1.	抽出操作	24
2.2.8.2.	測定	24
2.2.9.	^{13}C 代謝フラックス解析	26
2.2.10.	Glucose または glutamine 不含条件下での ATP アッセイ	28
2.2.11.	Oligomycin 感受性評価	28
2.3.	結果	29
2.3.1.	FH 活性低下細胞の構築	29
2.3.2.	細胞外フラックスプロファイリング	33
2.3.3.	^{13}C 標識パターン解析	35
2.3.3.1.	[1,2- ^{13}C]glucose 標識による ^{13}C 標識パターン	35
2.3.3.2.	[U- ^{13}C]glutamine 標識による ^{13}C 標識パターン	35
2.3.4.	^{13}C 代謝フラックス解析	37
2.3.4.1.	FH 活性低下による代謝フラックス変化	37
2.3.4.2.	酸化還元収支ならびにエネルギー収支	39

2.3.5.	ATP アッセイならびに oligomycin 感受性評価	42
2.4.	考察	45
2.5.	小括	48
第3章	3次元培養細胞を用いた腫瘍微小環境形成による代謝フラックス変化解析	49
3.1.	緒言	49
3.2.	実験材料と実験方法	51
3.2.1.	使用細胞株	51
3.2.2.	使用培地	51
3.2.3.	細胞培養	51
3.2.3.1.	2次元培養	51
3.2.3.2.	3次元培養による細胞 spheroid 形成	51
3.2.4.	細胞 spheroid の断面積測定	51
3.2.5.	LOX-1 プローブを用いた低酸素状態の検出	52
3.2.6.	HIF-1 レポーター系統を用いた低酸素状態の検出	52
3.2.6.1.	レンチウイルス粒子の調製と遺伝子導入	52
3.2.6.2.	HIF-1 レポーター-GFP 発現検出	52
3.2.7.	細胞外フラックス算出	52
3.2.8.	¹³ C 標識実験	52
3.2.9.	細胞内代謝物分析	53
3.2.9.1.	抽出操作	53
3.2.9.2.	測定	53
3.2.10.	主成分分析	54
3.2.11.	¹³ C 代謝フラックス解析	54
3.2.12.	ウェスタンブロッティング	55
3.2.13.	CB-839 感受性評価	56
3.2.14.	統計解析	56
3.3.	結果	57
3.3.1.	播種細胞数と細胞 spheroid 増殖の関係	57
3.3.2.	3次元培養による低酸素環境形成の確認	57
3.3.3.	¹³ C 標識パターン解析	59
3.3.3.1.	主成分分析	59
3.3.3.2.	[U- ¹³ C]glutamine 標識による ¹³ C 標識パターン	62
3.3.3.3.	[1,2- ¹³ C]glucose 標識による ¹³ C 標識パターン	65
3.3.3.4.	[3- ¹³ C]glucose 標識による ¹³ C 標識パターン	67
3.3.4.	¹³ C 代謝フラックス解析	69
3.3.4.1.	比増殖速度ならびに細胞外フラックス算出	69

3.3.4.2. 代謝フラックス分布の算出.....	71
3.3.5. PC タンパク質発現解析.....	78
3.3.6. CB-839 に対する感受性変化.....	78
3.4. 考察.....	81
3.5. 小括.....	84
第 4 章	
総括.....	85
4.1. 結果のまとめ	85
4.2. がん創薬研究における本研究の寄与.....	86
4.3. がん創薬研究における ^{13}C 代謝フラックス解析法の適用可能性	87
参考文献	90
謝辞	98
付録	99

第1章 緒論

1.1. がん治療の現状

近年、がんにおけるアンメットメディカルニーズは非常に高くなってきており、日本人の累積がん罹患率は男性で62%，女性で46%と報告されており（Takahashi M. 2016），日本人の約半数はがんに罹患する試算となりまさにがんは国民病といつても過言ではない疾患である。2014年には文部科学省、厚生労働省、経済産業省が一体となって「がん研究10か年戦略」を策定し、がんの病態解明や総合的ながん治療に向けた研究を推進してきた。しかしながら依然として、がんによる死亡率が高いのが現状である。日本国内での主な死因別死亡率を見ると、1980年代後半からがん（悪性新生物）が最も高く、2019年までその死亡率は増加し続けてきている（図1-1）。また、全世界的にもがんの死亡率は高く、循環器疾患に次いで2番目に高い（Dagenais GR *et al.* 2020）。こうした状況から、より有効ながん治療法の必要性が叫ばれている。

がん治療においては主に、外科的手術療法、放射線療法、薬物療法が用いられ、三大療法と呼ばれている。薬物療法は薬の投与によってがん細胞を攻撃する治療である。薬物療法で使用される薬には様々な種類がある（表1-1）。化学療法は薬物療法の中心であり、細胞障害性を有する抗がん剤によってがん細胞の増殖や生存を阻害する。分子標的療法は、がん細胞で特徴的に機能する分子を標的とした治療薬によってがん細胞の増殖や生存を阻害する。また、近年注目を集める免疫療法では、生体内の免疫系を利用してがん細胞を攻撃する。本研究では、一般的な化学療法や分子標的療法で用いられているがん細胞の増殖や生存を標的とした薬剤治療について焦点を当てる。

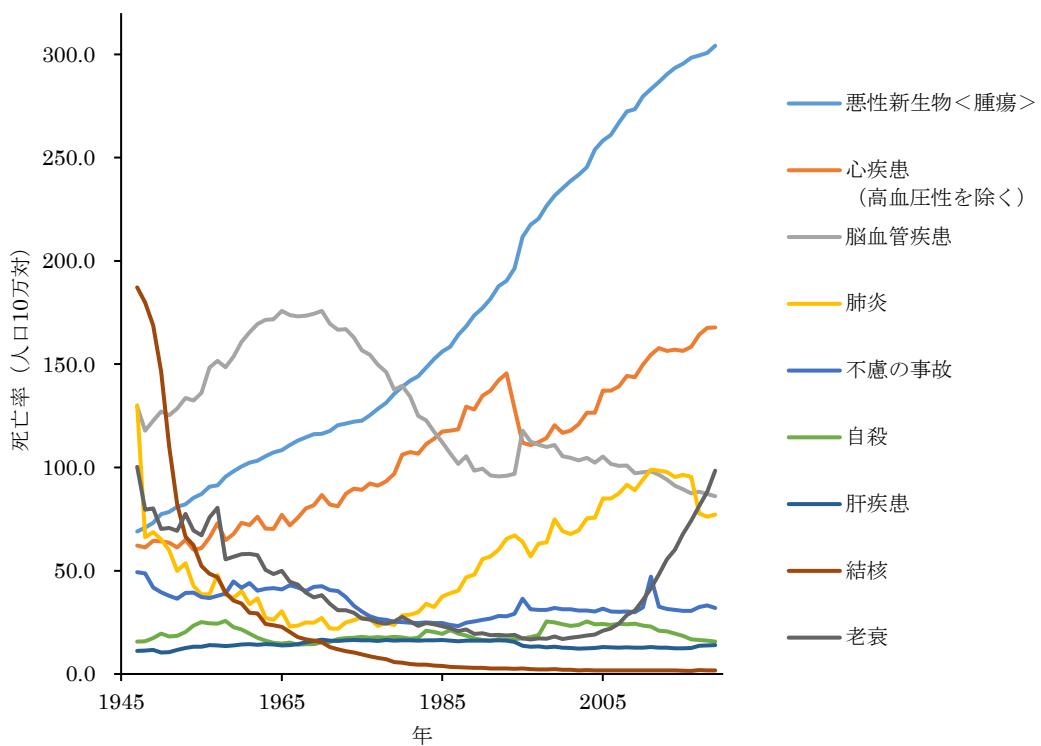


図 1-1 日本国内における主な死因別死亡率の年次推移.

厚生労働省ホームページ内の R1zu.xlsx ファイル中のデータから作成した
[\(<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai19/index.html>\)](https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai19/index.html).

表 1-1 がん薬物療法の種類

種類	主な作用	例
化学療法	細胞の増殖や分裂を阻害し、がん細胞の増殖や生存を抑制する	トポイソメラーゼ阻害薬 代謝拮抗薬
分子標的療法	がん細胞特異的に機能する分子を標的として、がん細胞の増殖や生存を抑制する	チロシンキナーゼ阻害薬
免疫療法	がん細胞に対する免疫作用を利用してがん細胞を攻撃する	免疫チェックポイント阻害薬

1.2. がん発症と進展のメカニズム

一般的に、がんは様々な遺伝子変異や遺伝子異常を原因とする疾患であると考えられている。正常細胞において遺伝子変異が生じることにより、細胞の増殖や生存を制御するシグナルの亢進などが生じることでがん細胞となり、悪性腫瘍（以下、腫瘍）を形成すると考えられている（図 1-2）。腫瘍内部では腫瘍微小環境という特殊な環境が形成される。例えば、腫瘍内部におけるマクロファージなどの免疫細胞や纖維芽細胞等といった正常細胞の存在や、腫瘍の増大に伴い近接血管から離れるために酸素や栄養の供給が滞るといったことが知られている。腫瘍微小環境内での低酸素状態は血管新生の亢進などを介して腫瘍の進展に寄与すると考えられている（Semenza GL, 2010）。そして他の組織への浸潤や転移が起こり、各種臓器の正常な機能を阻害することにより患者を死に至らしめることが病態の特徴である（図 1-2）。つまり、原発巣や転移巣でのがん細胞の増殖や生存を阻害することにができるれば、がん病態の進行を抑えることができ、さらにはがん細胞を完全に死滅させることができれば根治が可能になると期待される。そのため本研究ではがんの発症の原因と考えられる遺伝子変異や、がんの進展に寄与すると考えられる腫瘍微小環境に焦点を当てる。

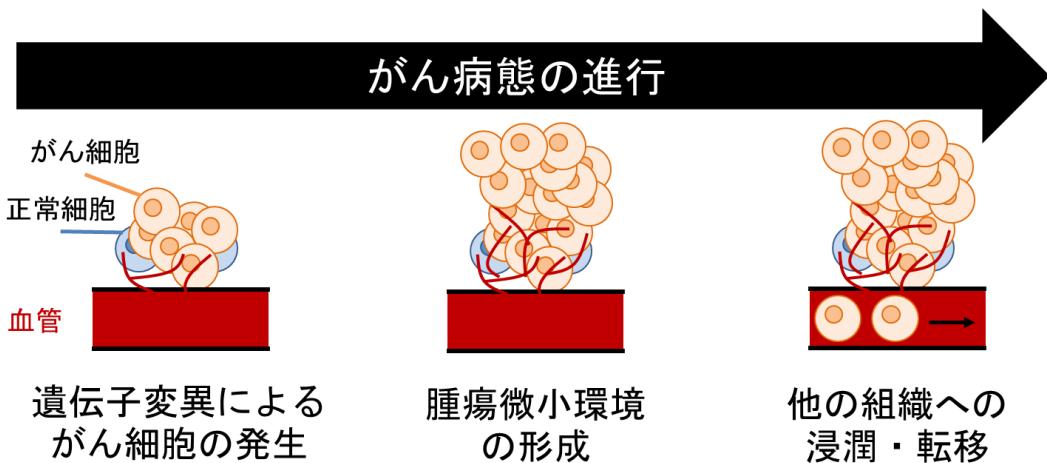


図 1-2 がんの発症と進展プロセスを表した模式図。

1.3. がん細胞の増殖や生存を標的としたがん治療

細胞増殖や細胞死に関わる遺伝子に変異や異常が生じることにより、正常細胞は細胞内増殖シグナルや細胞周期、アポトーシスにおける適切な制御を失って異常な増殖や生存が可能となる。がん治療薬の開発を目指して、がん細胞の異常な増殖や生存を引き起こす分子メカニズムを解明すべくこれまで多くの研究が実施されてきた。例えば HER2 や EGFR といった受容体型チロシンキナーゼは遺伝子増幅や遺伝子変異を受けることにより、タンパク質発現の増加や、リガンドである増殖因子非依存的な活性化を介して細胞増殖を活性化する（Hsu JL *et al.* 2016）。また、受容体型チロシンキナーゼの下流に存在する Ras は多くのがんで遺伝子変異が報告されており、変異した Ras は恒常に細胞増殖シグナルを送り続ける（Takashima A *et al.* 2013）。細胞周期の制御に関わる転写因子である Myc では遺伝子増

幅によりその活性が増加し、細胞周期の制御が解除されることで細胞分裂が促進される (Kalkat M et al. 2017). アポトーシス誘導や細胞周期制御を担う p53 では機能喪失型の遺伝子変異が生じ、適切な細胞死や細胞周期の停止を誘導することができなくなる。このように種々の遺伝子の変異や異常によって細胞内では増殖や生存を亢進させるシグナル経路が機能することになるため、こうしたシグナルを遮断する低分子阻害剤やモノクローナル抗体が治療薬として臨床現場で使用されている。しかしながら細胞の増殖や生存の制御に関わるシグナル経路は多数の分子によって構成されており、フィードバック制御に代表されるクロストークが生じるため、あるシグナル経路を遮断しても別の経路が活性化することで増殖や生存が亢進してしまう（図 1-3）。こうしたクロストークは実際に受容体型チロシンキナーゼ阻害薬の薬剤耐性に関与している（Yamaguchi H et al. 2014）。したがって、より効果的にがん細胞の増殖や生存を阻害するためには、より増殖や生存に密接した細胞内プロセスに着目する必要があると考えられる。

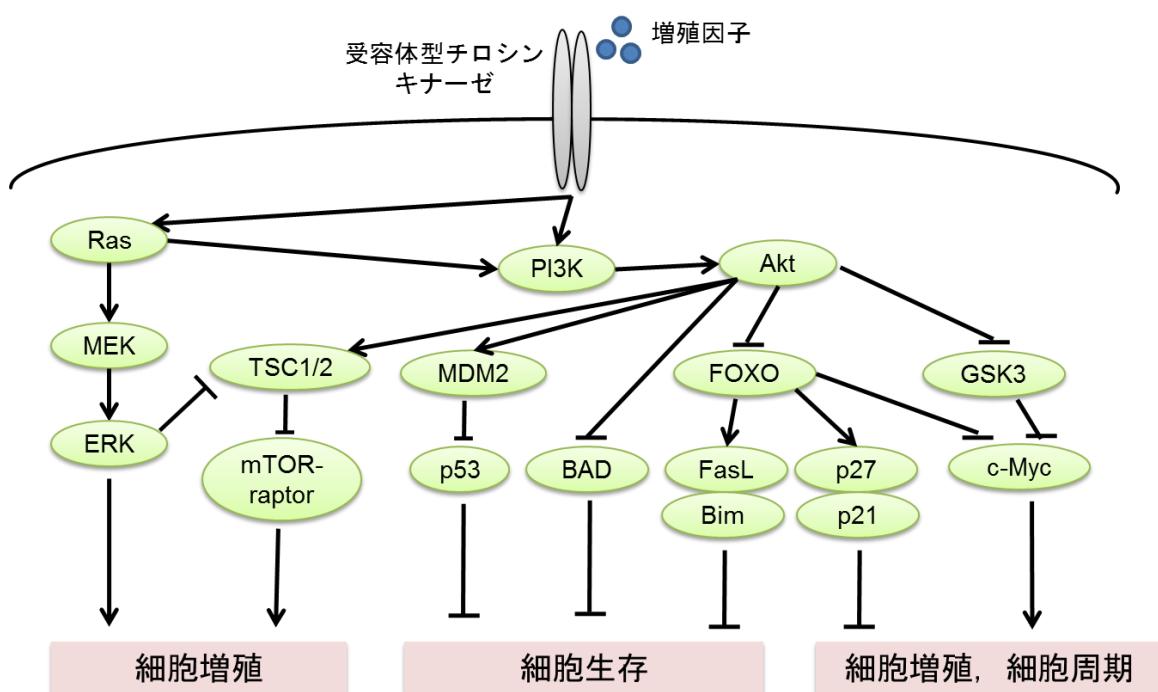


図 1-3 細胞の増殖や生存の制御に関わる細胞内シグナル経路の例.

Markman B et al. Ann Oncol. 2010;21(4):683-691.より一部改変して引用.

1.4. がん細胞における代謝変化

代謝は、細胞外の栄養源（糖やアミノ酸、有機酸など）を取り込み、細胞内での化学反応によってバイオマス構成成分の合成やエネルギー产生を行う細胞の生命活動である。つまり、細胞増殖や細胞生存にとって代謝は必須の細胞内プロセスである。細胞の増殖や生存に関わるシグナル経路が亢進したがん細胞では、活発な増殖やストレス環境に適応したバイ

オマスの合成やエネルギー產生が必要となるために細胞内代謝リプログラミングが起こり、正常細胞とは異なる代謝状態を示すことが知られている（図 1-4）。こうしたがん細胞に特徴的な代謝を制御することで、がん細胞の増殖や生存を阻害しながら比較的正常細胞への影響が少ないがん治療薬の開発につながると期待できる。こうしたがん細胞特有の代謝状態は「がん代謝」と呼ばれ、がん病態の発症や進展に関与していると考えられており、最近多くの研究が進展している。例えば、がん細胞では好気的な環境下にも関わらず、エネルギー代謝の大部分をミトコンドリアでの酸化的代謝ではなく解糖系に制限する「Warburg 効果」が起こり、正常細胞と比較して glucose 取り込みが増加するという性質を有している（Warburg O. 1956）。Warburg 効果により、核酸やアミノ酸、脂質の *de novo* 合成が亢進することで細胞増殖に必要なバイオマスを產生することが可能となり、ミトコンドリアでの酸化的代謝による活性酸素種（reactive oxygen species, ROS）の過剰生成が回避され、がん細胞の転移を促進することにつながる（Lu J et al. 2015）。そのため、解糖系代謝を標的とした glucose transport proteins 阻害剤や hexokinase 阻害剤などの探索が行われ、臨床試験に進んでいる化合物も存在する（Akins NS et al., 2018；Sborov DW et al. 2015）。また、核酸合成を阻害する 5-fluorouracil は、がん細胞の増殖を抑制する代謝拮抗剤としてがん治療に使用されている（Kaye SB, 1998）。がん細胞における脂質の *de novo* 合成を抑制するために、fatty acid synthase 阻害剤の研究や臨床試験も実施されている（Zaytseva YY et al. 2018）。Glutamine は多くのがん細胞において必須の栄養源であると考えられており、がん細胞における glutamine 代謝の亢進はトリカルボン酸サイクル（TCA サイクル）への炭素供給や、核酸合成ならびに非必須アミノ酸の合成に寄与していると考えられている（Yoo HC et al. 2020）。Glutamine 代謝を抑制するために、glutaminase 阻害剤の研究や臨床試験が実施されている（Yoo HC et al. 2020）。このように、がん細胞における特徴的な代謝変化の理解は、がん治療薬の開発に有用であると期待される。

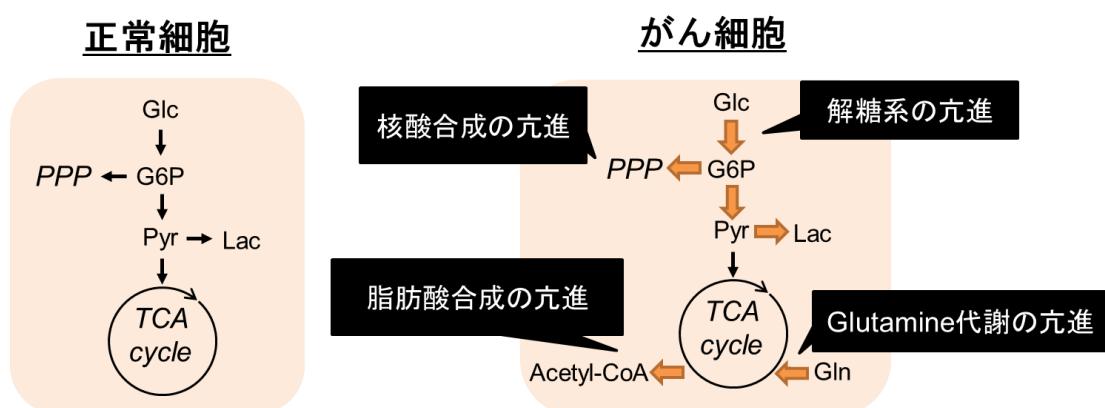


図 1-4 正常細胞とがん細胞の代謝状態の違い。

Józwiak P et al. Front Endocrinol (Lausanne). 2014;5:145. より一部改変して引用。

1.5. がん治療薬開発を目指したがん代謝解析における課題

代謝を標的とした治療薬の開発を進める上で、がんの発症や進展に関わる因子によるがん細胞での代謝変化に関して必要な情報について論じる。がん細胞は、その増殖や生存を維持するために特定の代謝経路を亢進あるいは抑制すると考えられる。そして、亢進あるいは抑制された代謝経路については、がん細胞における増殖や生存への依存性が変化していると考えられる。したがって、代謝経路活性の変化を知ることによりその代謝経路におけるがん治療薬の標的としての妥当性を評価することが可能となる。また、解糖系やTCAサイクルのようなadenosine triphosphate (ATP) 産生に関与する代謝経路の変化からは、細胞の増殖や生存に必要なエネルギー産生機構の変化についても知ることができるため、治療標的を考慮する際に必要な情報となる。加えて、代謝変化を解析するためには異なる条件下での細胞内代謝を比較する必要があるため、代謝反応や代謝経路の活性を比較可能な定量的指標が必要となる。つまり、代謝を標的とした治療薬の開発を進めるためには、遺伝子変異や腫瘍微小環境形成による代謝への影響を定量的な指標を用いて評価し、亢進あるいは抑制される代謝経路や、エネルギー産生機構の変化を明らかにすることが必要であると考えられる。こうしたがん細胞における代謝変化を明らかにすることで、治療標的代謝反応の選定が可能になると考えられるため、代謝を標的とした治療薬の開発が進展することが期待される。

1.6. ^{13}C 代謝フラックス解析手法を用いたがん代謝変化解析

代謝の本質は代謝経路内の各化学反応における単位細胞あたりの反応速度、つまり代謝フラックスであると考えられる。細胞内代謝フラックスを実測することは不可能なため、 ^{13}C 代謝フラックス解析によって細胞内代謝フラックス分布を算出する必要がある。 ^{13}C 代謝フラックス解析では、 ^{13}C 標識基質を細胞へ取り込ませることによって生じた細胞内代謝物の ^{13}C 標識割合 (mass distribution vector, MDV) を基に、*in silico* で構築された代謝モデルを用いた計算処理によって細胞内代謝フラックス分布を推定する技術である (図 1-5)。細胞外フラックスデータを束縛条件として算出された細胞内代謝フラックス分布と、実験に使用した ^{13}C 標識基質情報を引数として、作成した *in silico* 代謝モデルに基づき MDV の推定値が算出される。この推定値と、実験により取得された MDV 実測値がよくフィットする代謝フラックス分布を非線形最適化によって決定することで代謝フラックス分布最適値が得られる。得られた最適値については、フィッティングの適合性をカイ二乗検定によって評価し、95%信頼区間を算出することでその精度を評価することができる (Antoniewicz *et al.* 2006)。細胞内代謝フラックス分布とその信頼区間が決定されると、異なる条件下で亢進あるいは抑制された代謝反応や代謝経路を網羅的に同定することが可能となり、代謝ネットワークレベルでの代謝変化が解析可能となる。また、代謝反応では nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) や nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) のような酸化還元反応を触媒する補因子や、ATP のようなエネルギー産生に関わる分子の消費あるいは

産生が行われるため、細胞内での酸化還元状態やエネルギー状態に関する情報も代謝フラックス分布から得ることができる。したがって、¹³C代謝フラックス解析は、がんの発症や進展に関わる因子が及ぼす細胞内代謝への影響を評価するのに適した解析ツールであると考えられる。しかしながら、がん創薬研究における¹³C代謝フラックス解析技術の適用についての報告はまだ少ない。そのため、がん創薬研究における¹³C代謝フラックス解析の適用可能性について検討する必要があると考えられる。

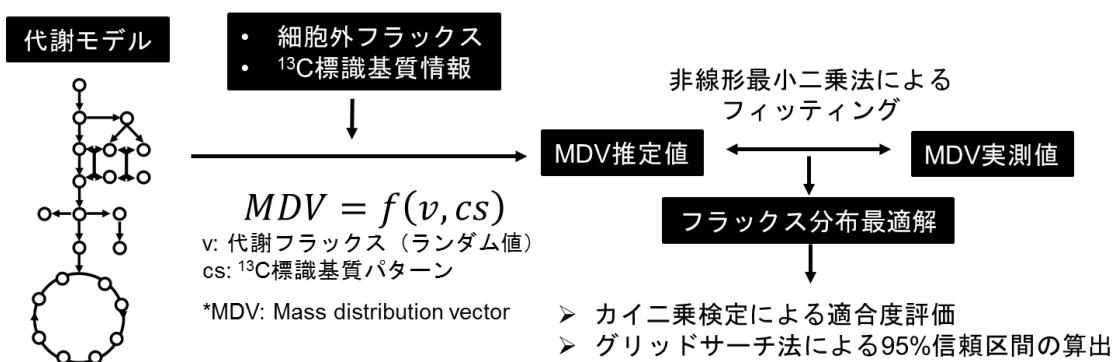


図 1-5 ¹³C代謝フラックス解析のワークフロー

1.6.1. 遺伝子変異によるがん代謝変化解析

がん細胞が有する遺伝子変異には多様性があり、がん種やひいては患者ごとに異なってくる。そのため、解糖系の亢進のように幅広いがん種で共通して見られるがん細胞特徴的な代謝変化もあるが、特定の遺伝子変異によって引き起こされる代謝変化も存在する。特に代謝酵素における遺伝子変異はその酵素活性に変化が起きるため、細胞内代謝は直接的に影響を受けることが想定される。エネルギー代謝にて重要な役割を担うTCAサイクルを構成する代謝酵素（図1-6）には、遺伝子変異とがん発症の関連が報告されているものが複数あり、表1-1にそうした代謝酵素遺伝子を挙げた。例えばIsocitrate dehydrogenase (IDH) 1/2遺伝子については酵素活性部位に変異が入ることにより、isocitrateを α -ketoglutarateに変換する正常な酵素活性を失い、 α -ketoglutarateを2-hydroxyglutarate (2-HG)に変換する酵素活性を新たに獲得する（Dang L *et al.*, 2009）。細胞内で蓄積された2-HGは、tet methylcytosine dioxygenaseやhistone demethylasesを阻害することで細胞内DNAやヒストンのメチル化状態を変化させることで、がんの発生や進展に関わっていると考えられている（Xu W *et al.*, 2011）。そのため変異型IDH1あるいはIDH2に対する阻害剤の研究開発が進められ、IDH2阻害剤についてはenasidenibが急性骨髓性白血病を適応疾患として米国で承認されており、代謝酵素活性変化が引き起こす代謝変化解析の重要性を物語っている。また、IDH1変異細胞を用いた¹³C代謝フラックス解析により、IDH1変異による酵素活性変化は低酸素条件下での酸化的TCAサイクルの亢進と還元的glutamine代謝の抑制を引き起こすことが報告されており（Grassian AR *et al.* 2014），TCAサイクル代謝酵素活性の変化は中心代謝フラック

スに直接的な影響を与えると考えられる。しかしながら、TCA サイクルはエネルギー代謝にて重要な役割を担うにも関わらず、TCA サイクル代謝酵素活性変化によるエネルギー代謝の適応メカニズムについては未知の部分が多いため、その定量的な解析が必要となる。

表 1-1 がんとの関連が報告されている遺伝子変異を有する代謝酵素

遺伝子名	代謝酵素名	がん種	参考文献
<i>IDH1</i>	Isocitrate dehydrogenase 1	神経膠腫、急性骨髓性白血病	Dang L <i>et al.</i> , 2010
<i>IDH2</i>	Isocitrate dehydrogenase 2		
<i>FH</i>	Fumarase	遺伝性平滑筋腫および腎細胞がん	Toro JR <i>et al.</i> , 2003
<i>SDHA</i>			Burnichon N <i>et al.</i> , 2010
<i>SDHB</i>	Succinate dehydrogenase	傍神経節腫、褐色細胞腫	Astuti D <i>et al.</i> , 2001
<i>SDHC</i>			Niemann S <i>et al.</i> , 2000
<i>SDHD</i>			Baysal BE <i>et al.</i> , 2000
<i>MDH2</i>	Malate dehydrogenase 2	傍神経節腫、褐色細胞腫	Cascón A <i>et al.</i> , 2015

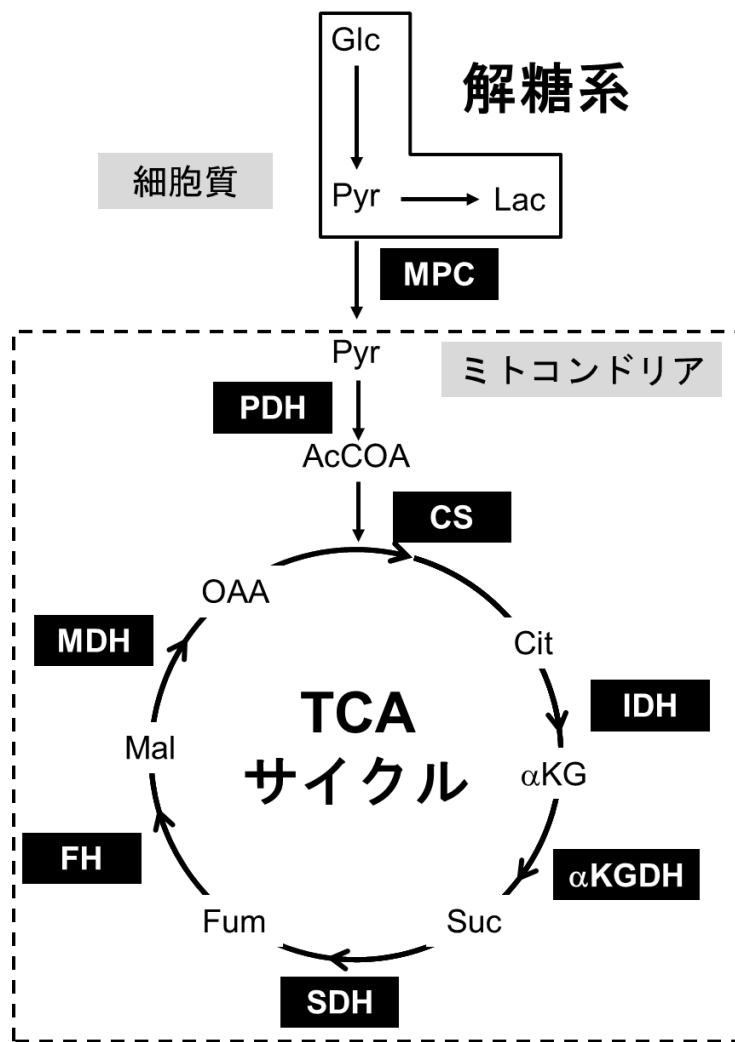


図 1-6 解糖系および TCA サイクルの概略図

略称 : Glc, glucose; Pyr, pyruvate; Lac, lactate; AcCoA, acetyl-CoA; Cit, citrate; α -KG, α -ketoglutarate; Suc, succinate; Fum, fumarate; Mal, malate; OAA, oxaloacetate; MPC, mitochondrial pyruvate carrier; PDH, pyruvate dehydrogenase; CS, citrate synthase; α KGDH, alpha-ketoglutarate dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; IDH, isocitrate dehydrogenase; FH, fumarase; SDH, succinate dehydrogenase.

1.6.2. 腫瘍微小環境形成によるがん代謝変化解析

生体内でがん細胞は腫瘍を形成する。1.2 節でも述べたように、腫瘍内では腫瘍微小環境と呼ばれる特徴的な環境を形成することが知られている。例えば、腫瘍内部にはがん細胞以外にもマクロファージなどの免疫細胞や纖維芽細胞等が存在している。こうした細胞集団の一部は腫瘍内の免疫状態の抑制や、増殖因子の放出によって腫瘍の進展に関わっていると考えられている (Galli F *et al.* 2020 ; Sahai E *et al.* 2020)。また、腫瘍内部では血管新生が誘導されるが、がん細胞の増殖に追いつかず、がん細胞が近接血管から離れることで酸素供

給が滞る状態となる。したがって、腫瘍内の微小環境下では、がん細胞は血管からの距離に応じて酸素状態が変化し、腫瘍内部のがん細胞ほど低酸素状態となる（図 1-7）。腫瘍内部での低酸素状態は固形腫瘍で共通して見られる現象であり、腫瘍内低酸素は予後不良因子であることが知られている（Hockel M *et al.* 1996；Nordström M *et al.* 1996；Fyles A *et al.* 2002；Brizel DM *et al.* 1996）。さらに、酸素は好気的エネルギー代謝において必要不可欠な分子であり、低酸素状態では細胞内代謝が制御されることが想定されるため、がん治療戦略を考える上でがん細胞における低酸素状態での代謝変化の理解は重要であると考えられる。そのため、本研究では腫瘍微小環境を構成する低酸素状態での代謝に焦点を当てた。これまで、hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) の活性化による解糖系の亢進や（Semenza GL. 2010），還元的 IDH 反応の亢進（Metallo CM *et al.* 2011）といったがん細胞における低酸素下での代謝変化が明らかとなっている。しかしながら、こうした知見は 2 次元的な平面培養法（2 次元培養）を用いた実験系を基にしており、生体内での立体的な腫瘍微小環境が失われてしまっている。そのため、腫瘍微小環境形成によって生じるがん細胞での代謝変化については未知な部分が多く、亢進もしくは抑制される代謝経路に関する知見はほとんど無い。

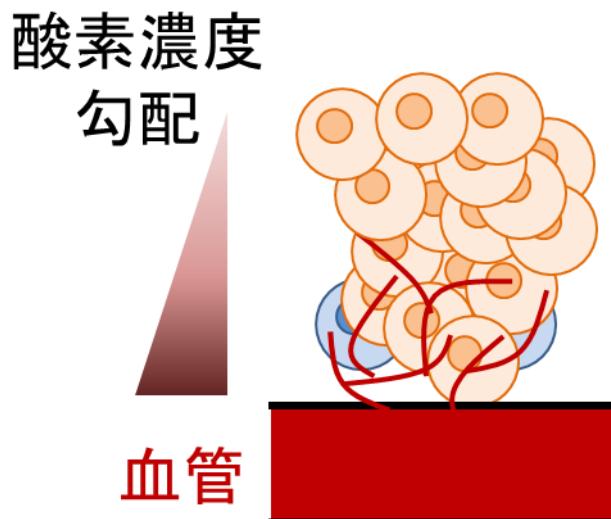


図 1-7 腫瘍微小環境の模式図

腫瘍内では血管からの距離に応じて酸素濃度が変わる。腫瘍内部のがん細胞ほど低酸素状態に晒されている。

1.7. 本論文の目的と構成

これまで述べてきたように、代謝を標的としたがん治療薬の開発を進展させるためには、がんの発症や進展と関連のある遺伝子変異や腫瘍微小環境形成といった因子により生じる代謝フラックス変化を明らかにすることが必要であると考えられる。しかしながらがん創薬研究において ^{13}C 代謝フラックス解析の適用例はほとんどなく、本解析法の適用可能性について検証する必要があると考えられる。そこで本研究では、fumarase (FH) 酵素活性低下

細胞ならびに 3 次元培養といった、遺伝子変異による代謝酵素活性変化および腫瘍微小環境形成の *in vitro* モデル実験系を構築し、¹³C 代謝フラックス解析により代謝フラックス変化を明らかにし、がん細胞の増殖や生存との関係の検証を試みた。

本学位論文は第 1 章から第 4 章で構成される。第 1 章では研究の背景および目的を述べた。第 2 章では、がんの発症と関連が報告されている FH 遺伝子変異に着目し、FH 酵素活性低下による代謝フラックス変化を明らかにするため、遺伝子改変部位以外は遺伝的バックグラウンドが同一な（アイソジエニック）細胞株ペアを作製し、FH 活性低下細胞とその親株細胞に対して ¹³C 代謝フラックス解析を適用した。得られた代謝フラックス変化から、FH 活性低下によって亢進あるいは抑制される代謝反応の同定や、細胞内エネルギー代謝の適応メカニズムの推定を試みた。さらに、代謝フラックス変化と細胞の増殖や生存との関係について推察および検証を実施した。第 3 章では、腫瘍微小環境形成による代謝フラックス変化を明らかにするため、3 次元培養法によって低酸素腫瘍微小環境を形成する細胞 sphroid を作製し、¹³C 代謝フラックス解析を適応した。さらに、2 次元培養下での低酸素環境下と 3 次元培養下での低酸素環境下での代謝フラックス変化についても比較した。そして、得られた代謝フラックス変化と細胞の増殖や生存との関係について推察および検証を実施した。第 4 章では、本研究で得られたがん創薬研究の進展に寄与する知見をまとめ、今後のがん創薬研究における ¹³C 代謝フラックス解析法の適用に関する展望について述べた。

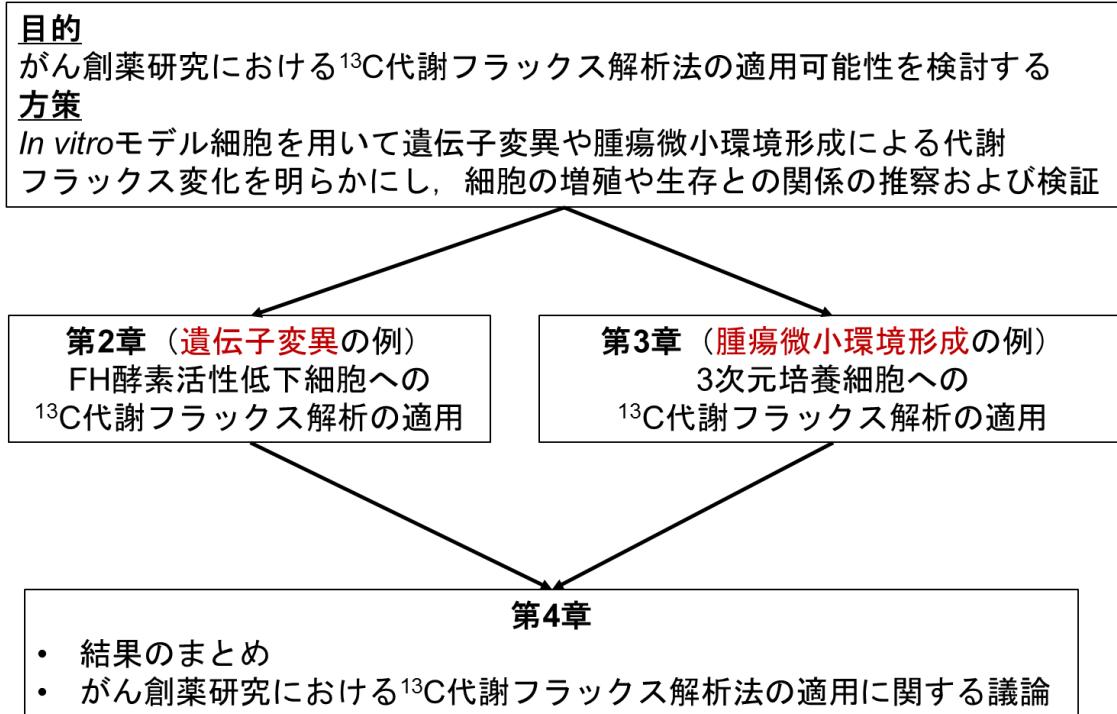


図 1-8 本論文の構成

第2章 FH 酵素活性低下による代謝フラックス変化解析

2.1. 緒言

FH は TCA サイクルを構成する代謝酵素の一つであり, fumarate から malate への変換反応を触媒する. 機能喪失型の FH 遺伝子変異は, 遺伝性平滑筋腫症および腎細胞癌症候群 (HLRCC) の要因であると考えられている (Tomlinson IP *et al.*, 2002; Sudarshan S *et al.*, 2007). HLRCC は皮膚や子宮での平滑筋腫, ならびに進行性の乳頭状腎細胞癌 type 2 によって特徴づけられる (Linehan WM *et al.*, 2004). HLRCC 関連腎細胞がんの 5 年生存率は 30% 程度であり標準治療も未だ存在しないため, その治療法の開発が求められている (Toro JR *et al.* 2003). TCA サイクルは細胞内エネルギー代謝において重要な役割を有するため, FH 活性の低下は細胞の代謝系に大きな影響を与えると考えられる. FH 活性低下による細胞内代謝への影響については, Fh1 (マウスの FH) ノックアウトマウス細胞や HLRCC 関連腎腫瘍由来の FH 欠損細胞株 UOK262 (Yang Y *et al.*, 2010) を用いた研究がこれまで報告されている. 例えば, 解糖系で産生される lactate による培地中水素イオン濃度変化に基づく細胞外酸性化速度 (extracellular acidification rate, ECAR) や, ミトコンドリアでの酸素消費速度 (oxygen consumption rate, OCR) を測定することにより, FH 欠損細胞では解糖系が亢進し, ミトコンドリア代謝が抑制されることが知られている (Yang Y *et al.*, 2013; Frezza C *et al.*, 2011; O'Flaherty L *et al.*, 2010). ECAR や OCR はがん代謝研究において広く汎用されており, それ解糖系, あるいは TCA サイクルと共に役するミトコンドリア呼吸の指標であるが, 両パラメータは次元が異なるため直接的な比較ができない. また, ECAR は細胞が排出した lactate 以外に, 酸化的代謝により産生される二酸化炭素による影響を受けるため (Mookerjee SA *et al.* 2015), 解糖系以外の代謝も加味されてしまっている. そのため, ECAR や OCR を測定するだけでは主要な代謝経路である解糖系と TCA サイクルの細胞内エネルギー代謝におけるバランスが不明であり, FH 活性低下による細胞内エネルギー代謝の適応メカニズムについて不明瞭な部分が残る. また, メタボローム解析によって, FH 機能欠損細胞では尿素回路での代謝変化が起り, arginine 栄養要求性が増加することも知られている (Adam J *et al.*, 2013; Zheng L *et al.*, 2013). さらに, リン酸化プロテオーム解析ならびに ¹³C トレーサー解析により, FH 欠損細胞では pyruvate dehydrogenase タンパク質のリン酸化が亢進し, TCA サイクルへの glucose 由来炭素の流入が減少していることも報告されている (Gonçalves E *et al.* 2018). 上述のように, FH 活性低下による細胞内代謝系への影響については様々なアプローチで調べられてきたが, FH 活性低下により亢進または抑制される代謝反応については未知な部分が残る.

第 1 章でも述べたように, ¹³C 代謝フラックス解析により算出される代謝フラックスは細胞内エネルギー産生や代謝反応活性に関する情報を含む. したがって, ¹³C 代謝フラックス解析により, FH 酵素活性低下による細胞内エネルギー代謝適応メカニズムや, FH 酵素活性低下により亢進または抑制される代謝反応を明らかにすると期待される. そこで本章では, アイソジェニック細胞株ペアを作製し, FH 活性低下細胞とその親株細胞

に対して ^{13}C 代謝フラックス解析を適用した。得られた代謝フラックス変化より、FH 酵素活性低下により亢進または抑制された代謝反応を同定し、細胞内エネルギー代謝適応メカニズムを明らかにした。さらに、得られた代謝フラックス変化と細胞増殖との関係の推察および検証を実施した。

2.2. 実験材料と実験方法

2.2.1. 使用細胞株

American Type Culture Collection より入手した、ヒト胎児腎細胞 293 (Human Embryonic Kidney cells 293, HEK293)を使用した。

2.2.2. 使用培地

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Without glucose, L-glutamine, phenol red, sodium pyruvate and sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich) を使用した。以降、特に断りがない限り、前述 DMEM 培地に 20 mM glucose, 2 mM glutamine, 44 mM sodium bicarbonate, 10%透析 fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific)を添加した培地を使用した。

2.2.3. FH 活性低下細胞株の構築

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-Cas9 システムを用いた FH 活性低下細胞株の構築は第一三共 RD ノバーレ株式会社に委託した。図 2-1 に FH の exon1 周辺の塩基配列ならびに用いた guide RNA (gRNA) 配列を示した。Lipofectamine2000 を用いて、Edit-R Cas9 expression plasmid (GE Healthcare, Inc.)ならびに gRNA expression plasmid を HEK293 細胞にトランスフェクションし、限界希釈法により単一細胞クローンを取得した。得られたモノクローナル細胞の染色体 DNA を調製し、図 2-1 に示す selection primer で exon1 を含む領域を増幅した。増幅した断片のダイレクトシーケンシングにより FH 遺伝子に塩基欠損が導入された細胞の選別を実施した。

tcccttcttctagttccatgaatccgaaggccttacacccacactactactagaaagttaacccgcccc
 ctcattcttactggtcattcacgattggcctgccccacctgtcggtgtgaggctgttgattggataagagc
ggaggccggtggcggaacggttctgacaaccggcgtggaggcgtggccACAGCCGCCAGAAATTCTACCC
AAGCTCCCTCAGCACCATGTACCGAGCACTTCGGCTCCTCGCGCCTCGCGTCCCTCGTGC
GGGCTCCAGCC
GCAGCCTTAGCTTCGGCTCCGGTTGGGTGGCGCGCCGTGCCCTCGTTGGCCTCCGAACGCGGCTCGAA
TGgtgagcgcaggccatccccggctcccgcagtgacccttcagccctctgcctgcggcctggcgc
ccgcgacttggcgggagagattccccggcgtcggccgcccagactctggcttagcgcccgtgcggcgc
tggcgccctccggcctcggacgcctttccggcgcaggatggagccgcagcccggagagcgcttgggg
agggacggggctgtcagagagggctactggccgcctccggcctccctcgagccgtccgtggcgggc
caggccggggcgtttgaggttaacttcgctgctggcgccaggccccagccccggggcgctgcccctca
aggacag

図 2-1 FH exon1 周辺の DNA 塩基配列

大文字部分が FH exon1, 太文字がコーディング領域を表す. 単一下線部分は selection primer 配列を表す. 二重下線部分は PAM 配列を含む gRNA 標的配列を表す.

2.2.4. 細胞培養ならびに ^{13}C 標識実験

親株細胞 (HEK293 細胞) ならびに FH^{dim} 細胞を, 細胞培養表面処理済みの 60 mm ディッシュにそれぞれ 5.0×10^5 cells/ディッシュ, 8.0×10^5 cells/ディッシュで播種し, 5% CO₂ 存在下, 37°C で培養した. 細胞播種後 16 時間で培地を新鮮な培地に交換し, この時点を基準点とした (0 h). 細胞数計測は TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories) を用いて実施した. 細胞の比増殖速度は, 細胞数と時間の片対数プロットにおける傾きから算出した. ^{13}C 標識実験における培地交換では, [1,2- ^{13}C]glucose (99% purity, Cambridge Isotope Laboratories) もしくは [U- ^{13}C]glutamine (98% purity, Sigma-Aldrich) 入りの培地を使用した.

2.2.5. ウェスタンプローティング

細胞を Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) にて洗浄後, プロテアーゼ阻害剤入りの lysis buffer (150 mM NaCl, 1% Triton-X, 50 mM Tris-HCl) を用いて細胞を溶解し, 4°C で 30 分間インキュベーションして遠心分離により上清を回収した. 回収した細胞溶解液を NuPage LDS sample buffer (Thermo Fisher Scientific) と NuPage Sample Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific) と混合し, 100°C で 10 分間インキュベーションした. その後, アクリルアミドゲル (DRC) にサンプルをアプライし, 150 V 定電圧で 90 分間電気泳動した. 泳動後, ゲル内のタンパク質を PVDF メンブレン (Millipore) に転写し, 5%スキムミルクでブロッキングを実施した. 1 次抗体としてウサギ抗 FH 抗体 (Cell Signaling Technology, #4567), ウサギ抗 β -actin 抗体 (Cell Signaling Technology, #4970), ウサギ抗 GAPDH 抗体 (Cell Signaling Technology, #2118) ならびにウサギ抗 COX IV 抗体 (Cell Signaling Technology, #4850) を

使用した。1次抗体反応を4°Cで一晩実施し、TBS tween-20でメンブレンを洗浄し、2次抗体反応を4°Cで1時間実施した。2次抗体として、Horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, #7074) もしくは Horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare, #NA934V) を使用した。TBS tween-20でメンブレンを洗浄した後、Peroxidase 基質 (Millipore) と反応させ、化学発光を LAS4000 (富士フィルム) によって検出した。

2.2.6. FH 酵素活性測定

細胞は DMEM 培地に 20 mM glucose, 2 mM glutamine, 44 mM sodium bicarbonate, 10% FBS (HyClone) を添加した培地を使用した。ミトコンドリアならびに細胞質画分の分画には市販の Cell Fractionation Kit-Standard (アブカム) を使用した。 3.0×10^6 cells の細胞をキット付属の Buffer A で懸濁し、Detergent I を添加した後に 7 分間室温でインキュベーションし、 $5,000 \times g$, 4°C で 1 分間遠心分離して上清を回収し、細胞質画分とした。先の遠心分離により生じた細胞ペレットをキット付属の Buffer A で懸濁し、Detergent II を添加した後に 10 分間室温でインキュベーションし、 $5,000 \times g$, 4°C で 1 分間遠心分離して上清を回収し、ミトコンドリア画分とした。細胞質画分ならびにミトコンドリア画分のサンプルはウェスタンブロッティング用ならびに FH 酵素活性測定用に分割した。FH 酵素活性測定は、Colorimetric Fumarase Activity Assay Kit (アブカム) を用いて実施した。本キットの反応によって、サンプル中の FH が fumarate を malate に変換し、產生された malate がキット付属の enzyme mix と反応して NADH を產生する。產生された NADH とキット付属の developer との反応生成物を 450 nm 吸光度でモニターすることにより計算される NADH の產生量から FH の酵素活性を算出した。吸光度測定には Versamax (Molecular deices) を用い、37°C で 2 時間インキュベーションしながら kinetic mode で測定した。タンパク質濃度の測定は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

2.2.7. 細胞外フラックス算出

培養上清中成分濃度を測定するため、1 mL の培養上清を回収し、 $10,000 \times g$, 4°C の条件下で 5 分間遠心分離を実施し、その上清を回収した。回収されたサンプルを 50 mM pimelate ならびに 5 mM norvaline 入りの内部標準溶液と 9:1 の割合で混合した。Glucose, lactate ならびに pyruvate は Aminex HPX-87H カラム (Bio-Rad Laboratories) を用いて液体クロマトグラフィー (LC) により分離した。移動相には 1.5 mM H₂SO₄ 溶液を使用し、流速は 0.5 mL/min, カラムオーブン温度は 65°C とした。アミノ酸は AccQ. Tag 法 (Armenta JM *et al.*, 2010) を用いた UPLC システム (Waters) によって測定した。細胞外フラックスは R ver 3.4.1 を用いて式(1)に基づく非線形回帰により算出した (Glacken MW *et al.*, 1988)。

$$A = A_0 e^{-kt} + \frac{q(e^{-kt} + e^{\mu t})X_0}{\mu + k} \quad (1)$$

A は対象物の培地中存在量で、 A_0 はその初期値を表す。 μ は細胞の比増殖速度を表す。 X_0 は初期細胞数を表し、 q は対象物の取り込み速度を表す（正の値の場合は取り込み、負の値の場合は排出を表す）。Glutamine は培地中で自発的に pyroglutamate やアンモニアへ分解することが知られているため、細胞による取り込みに加えて培地中での分解速度 k を考慮する必要がある (Ozturk SS *et al.*, 1990; Ahn WS *et al.*, 2013)。ブランク培地中の経時的な glutamine 存在量の変化を測定し、glutamine の分解速度は 0.00345 h^{-1} と決定した。

2.2.8. 細胞内代謝物分析

2.2.8.1. 抽出操作

培養細胞を DPBS を用いて洗浄し、 0.4 mL の $10 \mu\text{M}$ ribitol 入り冷却メタノール溶液を加えてクエンチングを実施した。セルスクレーパーを用いて細胞をマイクロチューブに回収し、さらに追加で 0.4 mL の冷却メタノールをウェルに添加して残存細胞を回収した。メタノール溶液を回収したマイクロチューブをボルテックスした後、 $10,000 \times g$, 4°C の条件下で 5 分間遠心分離を実施して上清を回収し、 0.3 mL の chloroform と 0.3 mL の H_2O を加えてボルテックスにより十分混合した。 $12,000 \times g$, 4°C の条件下で 5 分間遠心分離を実施し、二層分離した上層を回収し、遠心濃縮により乾固した。

2.2.8.2. 測定

抽出・乾固したサンプルを誘導体化し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS, 島津製作所) に供することで、細胞内代謝物量を測定した。細胞内 fumarate 測定では、乾固したサンプルに pyridine で溶解した 20 mg/mL methoxyamine hydrochloride (Sigma-Aldrich) を加え、 30°C で 90 分間インキュベーションした後、*N*-methyl-*N*-trimethylsilyl trifluoroacetamide (MSTFA, GL Sciences)を加え、 37°C で 30 分間インキュベーションした。 ^{13}C 標識代謝物測定では、pyridine で溶解した 20 mg/mL methoxyamine hydrochloride を加え、 30°C で 60 分間インキュベーションした後、*N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl) trifluoroacetamide (MTBSTFA) + 1% *tert*-butyldimethylchlorosilane (Thermo Fisher Scientific)を加えて 60°C で 30 分間インキュベーションした。誘導体化されたサンプルを GC-MS を用いて測定した。カラムは DB-5MS + DG capillary column ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.} \times 0.25 \mu\text{m}$, Agilent Technologies)を使用し、注入量は $1 \mu\text{L}$ とした。キャリアガスには He を使用し、流速は 1.14 mL/min に設定し、スプリット比は 50:1 とした。インレットの温度は 250°C とした。カラムオーブン温度は 60°C で 3.5 分間ホールドした後、 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ の割合で 325°C まで増加させた後、10 分間ホールドした。MS 部でのイオン化は電子イオン化モードで実施し、ion source の温度は 200°C とした。測定対象物代謝物とその質量電荷比 (m/z) ならびに化学式を表 2-1 に示した。各代謝物存在量もしくは存在比率はクロマトグラムのピーク高さ強度を基に算出した。 ^{13}C 標識実験での測定結果については、C, H, O, N, Si, P 各原子の天然同位体存在比の影響を考慮して補正することで (van Winden *et al.* 2002), ^{13}C 標識炭素数に応じた代謝物の質量ごとの存在比率を算

出し, ^{13}C 代謝フラックス解析に用いた.

表 2-1 GC-MS 解析での測定対象代謝物

代謝物名	<i>m/z</i>	化学式
MTBSTFA 誘導体化		
Pyruvate	174	C ₆ H ₁₂ O ₃ NSi
Lactate	261	C ₁₁ H ₂₅ O ₃ Si ₂
Alanine	260	C ₁₁ H ₂₆ O ₂ NSi ₂
Glycine	246	C ₁₀ H ₂₄ O ₂ Si ₂
Glycine	218	C ₉ H ₂₄ OSi ₂
Lactate	261	C ₁₁ H ₂₅ O ₃ Si ₂
Fumarate	287	C ₁₂ H ₂₃ O ₄ Si ₂
α -Ketoglutarate	346	C ₁₄ H ₂₈ O ₅ NSi ₂
Malate	419	C ₁₈ H ₃₉ O ₅ Si ₃
Phosphoenolpyruvate	453	C ₁₇ H ₃₈ O ₆ Si ₃ P
Citrate	459	C ₂₀ H ₃₉ O ₆ Si ₃
3-Phosphoglycerate	585	C ₂₃ H ₅₄ O ₇ Si ₄ P
Proline	286	C ₁₃ H ₂₈ O ₂ NSi ₂
Proline	184	C ₁₀ H ₂₂ NSi
Aspartate	418	C ₁₈ H ₄₀ O ₄ NSi ₃
Aspartate	390	C ₁₇ H ₄₀ O ₃ NSi ₃
Glutamate	432	C ₁₉ H ₄₂ O ₄ NSi ₃
Glutamate	330	C ₁₆ H ₃₆ O ₂ NSi ₂
MSTFA 誘導体化		
Fumarate	245	C ₉ H ₁₇ O ₄ Si ₂

2.2.9. ¹³C 代謝フラックス解析

親株細胞ならびに FH^{dim} 細胞の代謝モデルを KEGG データベース (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg/>) や、文献情報 (Okahashi N *et al.* 2015; Araki C *et al.* 2018; Ahn WS *et al.* 2013) を基に構築した。本モデルは解糖系、TCA サイクル、酸化的ペントースリン酸経路 (oxidative pentose phosphate pathway, oxPPP)、補充経路、リンゴ酸酵素経路、アミノ酸代謝反応ならびにバイオマス合成反応を含んでいる。乾燥細胞重量は、文献情報を基に 514 pg/cell と設定した (Dietmair S *et al.* 2012)。表 2-2 に先行研究から得られたタンパク質や脂質、核酸といったバイオマス構成成分の合成に必要な前駆体量を示す (Quek LE *et al.* 2010; Keibler MA *et al.* 2016)。乾燥細胞重量ならびにバイオマス合成に必要な前駆体量から、バイオマス合成反応式における係数を決定した。バイオマス合成に必要な acetyl-CoA は細胞質画分由来とした。

表 2-2 バイオマス構成成分の合成に必要な前駆体量

代謝物名	バイオマス構成成分 (mmol/g-乾燥重量)
Ala	0.600
Arg	0.377
Asp	0.359
Asn	0.288
Cys	0.145
Gln	0.322
Glu	0.386
Gly	0.538
Pro	0.313
Ser	0.43
AcCoA	2.46
G6P	0.278
R5P	0.232
DHAP	0.119

Pyruvate, citrate, oxaloacetate, acetyl-CoA については、モデル上で細胞質画分とミトコンドリア画分に区分した。ミトコンドリア画分内の pyruvate についてはさらに、TCA サイクルで使用される pyruvate と補充経路で使用される pyruvate を分画した (Ahn WA *et al.* 2013, Lu D *et al.* 2002)。¹³C 代謝フラックス解析では、[1,2-¹³C]glucose 標識実験と[U-¹³C]glutamine 標識実験を独立して実施するパラレルラベリング実験にて得られたデータを使用した。代謝フラックス算出時のフィッティング計算は、Python ver 2.7.8 を用いた OpenMebius (Kajihata S *et al.* 2014) ソフトウェアによって実施した。上記 Python プラットフォームでは NumPy 1.9.1, SciPy 0.15.1, PyOpt 1.2, parallel Python 1.6.4 のモジュールを使用した。代謝フラックス分布の初期値をランダムに発生させ、使用した ¹³C 標識炭素源情報を基に各代謝物の MDV を算出し、実験で求められた MDV と比較して以下の式 (2) で表される残差二乗和 (RSS) を最小化することでフラックス分布の最適解を得た。

$$RSS = \sum_{i=1}^n \left(\frac{MDV_{obs,i} - MDV_{sim,i}}{\sigma_{MDV}} \right)^2 + \sum_{k=1}^m \left(\frac{X_{obs,k} - X_{sim,k}}{\sigma_X} \right)^2 \quad (2)$$

ここで、n はフィッティング計算に使用した MDV の総数であり、MDV_{obs} と MDV_{sim} はそれぞれ実験データならびにモデル上で算出された MDV を表す。σ_{MDV} は MDV 測定値の標準偏差を表し、ここでは 0.01 と設定した。m はフィッティング計算に使用した細胞外フラックスの総数であり、X_{obs} と X_{sim} はそれぞれ実験データならびにモデル上で算出された細胞外フラックスを表す。ここでは glucose 取り込みフラックスと lactate 排出フラックスをフィッティング計算に使用し、σ_X は実測値の 5% と設定した。モデルの適合度を評価するため、

フィッティング計算結果で得られた RSS に対して有意水準 α を 0.05 としてカイ二乗検定を実施した (Antoniewicz *et al.* 2006). 算出された代謝フラックス値の 95%信頼区間はグリッドサーチ法を用いて決定した (Antoniewicz *et al.* 2006 ; Maeda *et al.* 2016). ミトコンドリアでの酸化的リン酸化 (oxidative phosphorylation, OxPHOS) における P/O 比は文献情報より 2.3 と設定した (Hinkle PC 2005).

2.2.10. Glucose または glutamine 不含条件下での ATP アッセイ

親株細胞と FH^{dim}細胞をそれぞれ、細胞培養表面処理済み 96 ウエルプレートに 3.5×10^3 cells/ウェルあるいは 5.0×10^3 cells/ウェルで播種した翌日に培地交換を実施した (培地交換実施時点を day 0 とした). 培地は、通常培地、glucose 不含培地あるいは glutamine 不含培地を使用した. CellTiter-Glo 2.0 Assay (PROMEGA) をウェルに添加し、ATP 量に応じて発生する発光シグナルをプレートリーダーEnVision (PerkinElmer) によって測定した. 各時点における発光シグナル強度は day 0 におけるシグナル強度の相対値として算出した.

2.2.11. Oligomycin 感受性評価

親株細胞と FH^{dim}細胞をそれぞれ、細胞培養表面処理済み 96 ウエルプレートに 2.0×10^3 cells/ウェルあるいは 3.0×10^3 cells/ウェルで播種した翌日に、10, 5, 2.5, 1.3, 0.63, 0.31, 0.16, 0.078, 0.039 nM 濃度となるように oligomycin (Sigma-Aldrich) を添加した (oligomycin 添加時点を day 0 とした). コントロール用ウェルには 0.1%濃度の dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加した. Day 3 時点で、CellTiter-Glo 2.0 Assay (PROMEGA) をウェルに添加し、ATP 量に応じて発生する発光シグナルをプレートリーダーEnVision によって測定した. oligomycin 各濃度における発光シグナル強度を DMSO コントロールでの発光シグナル強度で除することで、細胞生存率を算出した. 50%細胞増殖阻害濃度値 (IC₅₀ 値) は Microsoft Excel 2013 (マイクロソフト)に搭載されている GROWTH 関数を用いて算出した.

2.3. 結果

2.3.1. FH 活性低下細胞の構築

FH 活性低下による中心代謝系への影響を調べるために、CRISPR-Cas9 システムを用いて HEK293 細胞株の FH exon1 部分に 8 bp の塩基欠損が導入された細胞株 (FH^{dim} 細胞) を構築した (図 2-2)。

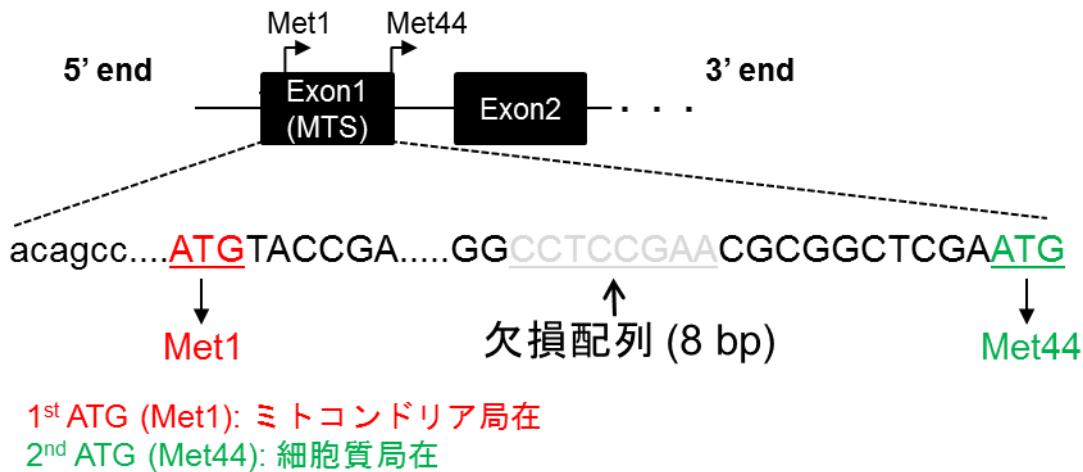


図 2-2 FH 遺伝子 exon1 部分の模式図。

アルファベット大文字は FH コーディング領域を表し、灰色文字は FH^{dim} 細胞において導入された 8 bp の塩基欠損を表す。

親株細胞ならびに FH^{dim} 細胞の比増殖速度を比較したところ、両細胞株の比増殖速度はそれぞれ 0.0343 h^{-1} , 0.0208 h^{-1} であり、FH^{dim} 細胞は親株細胞と比べて比増殖速度が低下していた (図 2-3)。また、両細胞株ともに培地交換後 48 時間までは対数増殖期であった (図 2-3)。

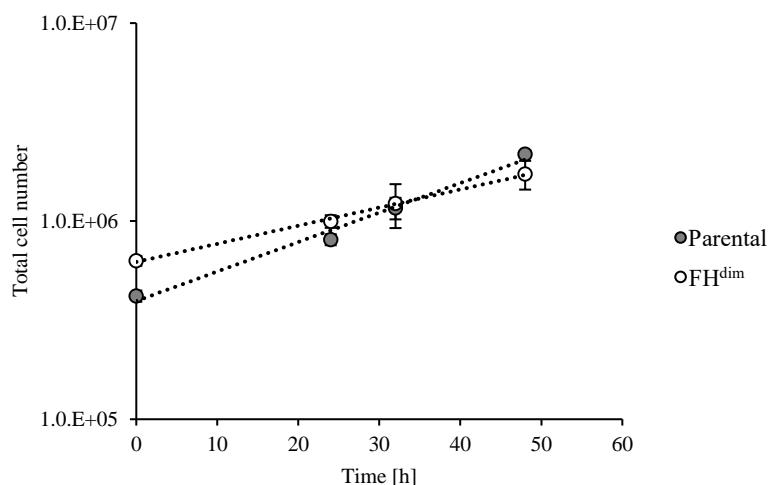


図 2-3 親株細胞と FH^{dim} 細胞の増殖曲線。

データポイントとエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す (n=3)。

ウェスタンブロッティングにより、両細胞株の全細胞溶解液中 FH タンパク質発現を解析した結果、 FH^{dim} 細胞では FH タンパク質発現が劇的に減少していた (図 2-4)。FH タンパク質はミトコンドリア画分ならびに細胞質画分の両方に存在する echoform であるため (Yogev O *et al.* 2011)，両細胞株のミトコンドリアならびに細胞質を分画し、それぞれの画分での FH タンパク質発現ならびに酵素活性を評価した結果。ミトコンドリア画分では FH タンパク質発現ならびに酵素活性はどちらも検出されなかった。 (図 2-4, 表 2-3)。一方、細胞質画分では FH タンパク質発現が検出され、親株細胞と比べて 44% の酵素活性が維持されていた (図 2-4, 表 2-3)。FH exon1 はミトコンドリア標的配列 (mitochondrial targeting sequence, MTS) および Met1 あるいは Met44 をコードする 2 つの開始コドン (ATG) を有し、2 番目の開始コドン Met44 からは細胞質 echoform がコードされる (Dik E *et al.* 2016) (図 2-1)。CRISPR-Cas9 法により導入された 8 bp の塩基欠損は 2 つの開始コドンの間に位置するため、 FH^{dim} 細胞は 2 番目の開始コドンを有し、細胞質 echoform を産生することが可能である (図 2-1)。

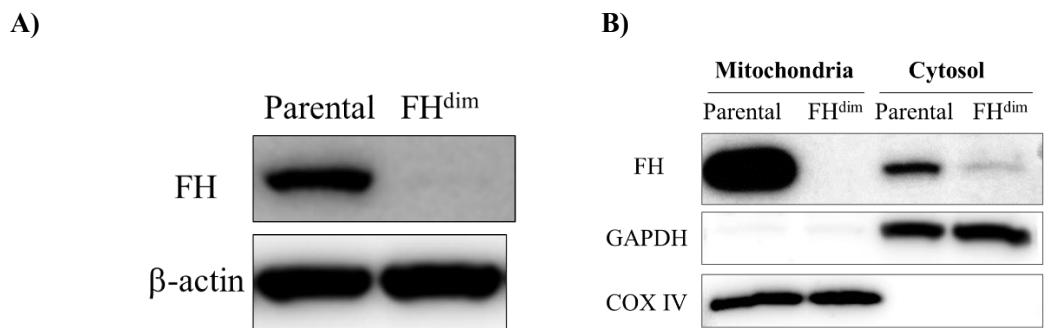


図 2-4 ウェスタンブロッティングによる FH タンパク質発現解析.

(A) 全細胞溶解液中での FH タンパク質発現. β-actin をローディングコントロールとして使用した. (B) ミトコンドリアおよび細胞質画分での FH タンパク質発現. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)および cytochrome C oxidase subunit 4 (COX IV)をそれぞれ細胞質マーカー, ミトコンドリアマーカーとして使用した.

表 2-3 ミトコンドリア画分および細胞質画分での FH 酵素活性

Compartment	Cell line	FH activity (nmol/min/mg-protein)
Mitochondria	Parental	14.1 ± 0.6
	FH ^{dim}	ND
Cytosol	Parental	2.7 ± 0.1
	FH ^{dim}	1.2 ± 0.5

FH 酵素活性は平均値±標準偏差として表される (n=3). ND は not detected を意味する.

細胞質 echodorm の発現残存が確認された FH^{dim} 細胞における細胞内 FH 活性の減少を確認するため, GC-MS を用いて酵素基質である細胞内 fumarate 量を測定した結果, FH^{dim} 細胞では親株細胞と比較して細胞内 fumarate 量が 13 倍増加していた (図 2-5). したがって, FH^{dim} 細胞では細胞内 FH 活性が低下していることが示唆された.

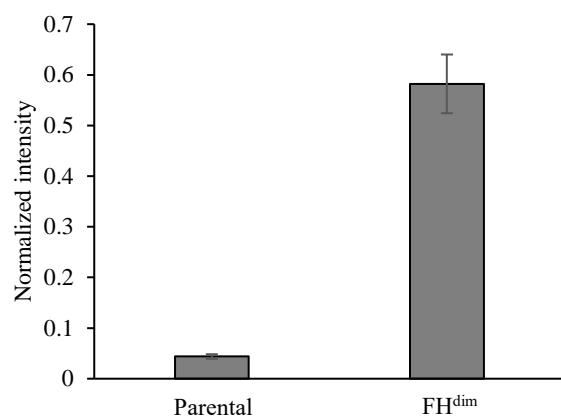


図 2-5 細胞内 fumarate 量.

棒グラフとエラーバーはそれぞれ平均と標準偏差を表す (n=3).

2.3.2. 細胞外フラックスプロファイリング

Glucose, 有機酸, アミノ酸について, 親株細胞ならびに FH^{dim} 細胞の培養上清中濃度の経時変化と細胞比増殖速度から, 各成分の取り込みあるいは排出フラックスを産出した. FH^{dim} 細胞での glucose 取り込みフラックスの減少率は 8%であり, lactate ならびに pyruvate 排出フラックスの減少率はそれぞれ 7%ならびに 6%であった (表 2-4). これらは解糖系に関連する細胞外フラックスであるが, FH 活性低下による変化率は小さかった. また, lactate 排出フラックスと glucose 取り込みフラックスの比は両細胞間で同等の値であった (表 2-4). これらの結果より, FH 活性低下による解糖系への影響は非常に小さいことが示唆された. 大部分の哺乳細胞株と同様に, HEK293 細胞株はその細胞増殖に glutamine を必要とする (Henry O *et al*, 2011). Glutamine はアミノ酸生合成や TCA サイクルにおいて重要な炭素源もしくは窒素源となる. FH^{dim} 細胞での glutamine 取り込みフラックスの減少率は 36%と顕著な現象を示し (表 2-4), FH^{dim} 活性低下によるアミノ酸代謝もしくは TCA サイクル代謝の変化を示唆している. さらに, FH^{dim} 細胞では proline 排出フラックスも 89%と高い減少率を示しており (表 2-4), FH 活性低下による proline 生合成フラックスの低下も示唆された.

表 2-4 細胞外フラックス算出値

Components	Parental		FH ^{dim}		Percent change
	Flux (nmol/h/10 ⁶ cells)	95% CI (LB, UB)	Flux (nmol/h/10 ⁶ cells)	95% CI (LB, UB)	
Uptake					
Glucose	578.8	(541.5, 616.1)	533.5	(499.3, 567.8)	-8%
Glutamine	82.7	(77.3, 88.1)	52.7	(49.3, 56.1)	-36%
Cysteine	4.1	(3.8, 4.5)	3.3	(3.1, 3.6)	-19%
Serine	22.0	(20, 24.1)	16.2	(15.2, 17.3)	-26%
Arginine	8.7	(8.1, 9.3)	9.6	(8.9, 10.4)	10%
Secretion					
Lactate	1087.7	(1036.9, 1138.5)	1009.8	(975.1, 1044.6)	-7%
Pyruvate	61.7	(55.5, 67.8)	57.8	(52, 63.6)	-6%
Alanine	17.1	(16.2, 18.1)	19.4	(18.4, 20.3)	13%
Proline	13.9	(13.4, 14.3)	1.5	(1.4, 1.5)	-89%
Ratio of lactate					
secretion flux to glucose uptake		1.88		1.89	
flux					

Percent change は親株細胞と FH^{dim} 細胞でのフラックス値の差分を親株細胞のフラックス値を除した値を示す。正値および負値は FH^{dim} 細胞において増加もしくは減少したフラックス値を意味する。略称 : CI, confidence interval; LB, lower bound; UB, upper bound.

2.3.3. ^{13}C 標識パターン解析

$[1,2-^{13}\text{C}]$ glucose ならびに $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glutamine を用いて、親株細胞ならびに FH^{dim} 細胞における細胞内代謝物の ^{13}C 標識パターンを調べた。両細胞ともに ^{13}C 標識基質添加後添加後 24, 29, 32 時間後に細胞を回収し、各時点での細胞内代謝物の MDV を算出した。24 時間後から 32 時間後まで各代謝物の MDV 時系列変化は小さく、一定であると見なせるため同位体定常状態に達していることが示された（図 S-1, 図 S-2）。

2.3.3.1. $[1,2-^{13}\text{C}]$ glucose 標識による ^{13}C 標識パターン

oxPPP では、 $[1,2-^{13}\text{C}]$ glucose 由来の ^{13}C によって $\text{M}+1$ の解糖系中間体代謝物が產生される。両細胞株ともに phosphoenolpyruvate (PEP) や 3-phosphoglycerate (3PG) の $\text{M}+1$ アイソトポマーが検出されており、両細胞で oxPPP が動いていることを示している（図 2-6）。また、PEP や 3PG の $\text{M}+1$ 存在比は両細胞で同等であり（図 2-6）、FH 活性低下による解糖系から oxPPP の分岐フラックスへの影響は非常に小さいことを示唆している。さらに、PEP や 3PG, pyruvate といった解糖系中間体代謝物の MDV は両細胞間で非常に類似しており（図 2-6），これは FH 活性低下により、glucose 以外の炭素源が解糖系に有意に流入していないことを示唆している。

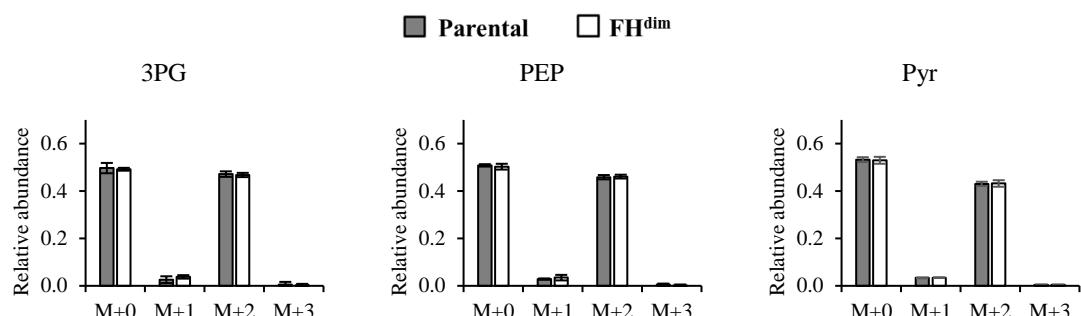


図 2-6 $[1,2-^{13}\text{C}]$ glucose 標識による細胞内代謝物 ^{13}C 標識パターン

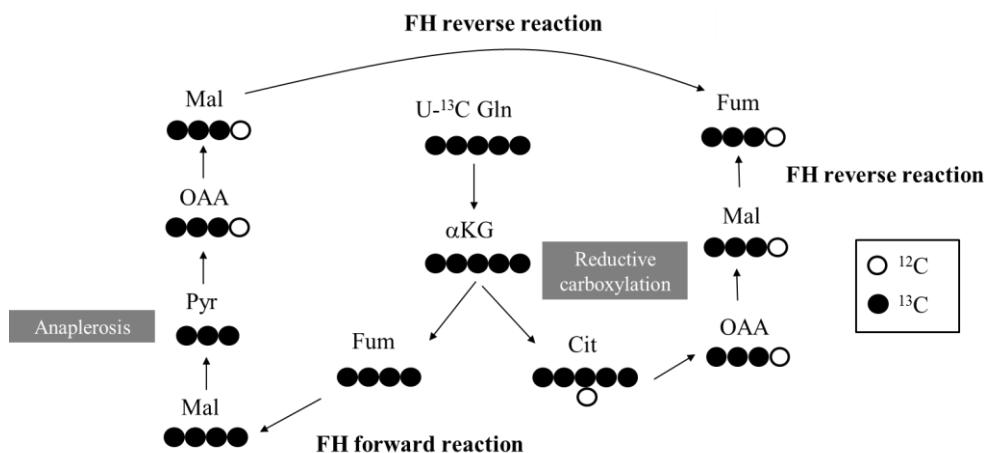
棒グラフとエラーバーはそれぞれ平均と標準偏差を表す（ $n=3$ ）。略称: 3PG, 3-phosphoglyceric acid; PEP, phosphoenolpyruvate; Pyr, pyruvate。

2.3.3.2. $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glutamine 標識による ^{13}C 標識パターン

FH の順反応が起こると、 $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glutamine 由来の ^{13}C から $\text{M}+4$ malate が主に產生される（図 2-7）。親株細胞と FH^{dim} 細胞において、malate では $\text{M}+4$ 存在比が最も高く、 FH^{dim} 細胞は細胞内 FH 酵素活性を有することが確認された（図 2-7）。 FH^{dim} 細胞において、fumarate の $\text{M}+3$ 存在比が親株細胞と比較して低下していた（図 2-7）。 $\text{M}+3$ fumarate は、malic enzyme と pyruvate carboxylase 反応を介するか、もしくは glutamine の還元的カルボキシル化を介して產生される $\text{M}+3$ malate を前駆体として FH 逆反応によって產生されるため（図 2-7）， FH^{dim} 細胞では FH の逆反応が抑制されていることが示唆される。これは FH^{dim} 細胞内で FH 順反

応の基質である fumarate 濃度が増加したことにより (図 2-5), FH 順反応の駆動力が増加したことによる起因と考えられる。また, FH^{dim} 細胞では proline の M+0 存在比が増加した一方, M+5 存在比が減少した (図 2-7)。Glutamate が proline 生合成の前駆体のひとつであるため, proline の M+5 存在比の減少は glutamate からの proline 生合成反応の低下を示唆している。

A)



B)

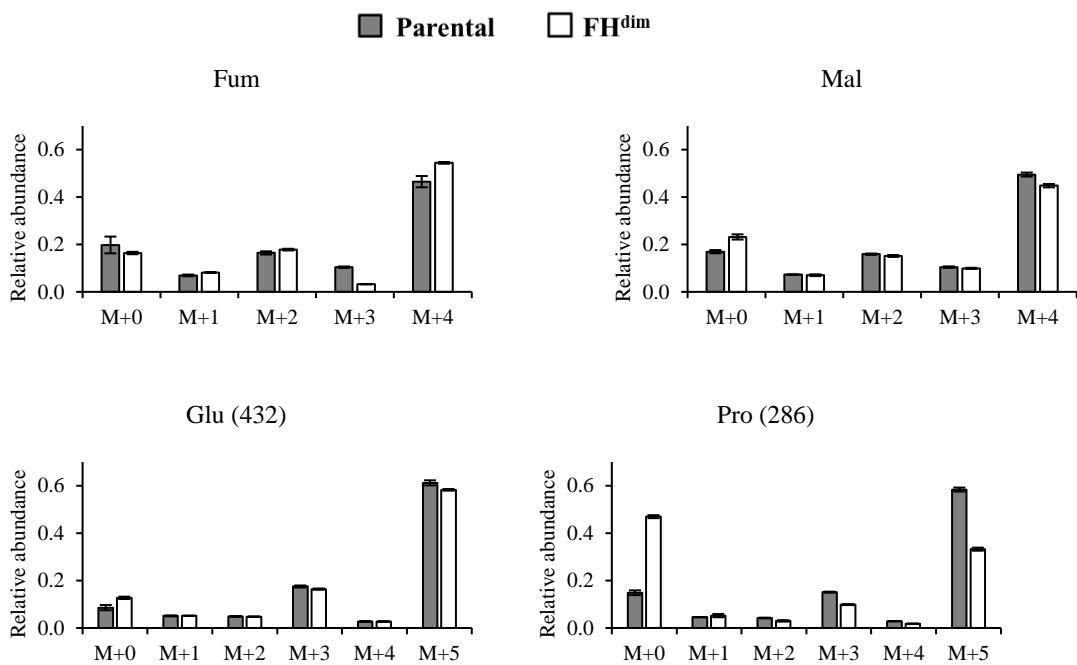


図 2-7 [^{13}C]glutamine 標識による細胞内代謝物 ^{13}C 標識パターン

(A) [^{13}C]glutamine 標識時の炭素の動きを示した模式図. (B) 棒グラフとエラーバーはそれぞれ平均と標準偏差を表す ($n=3$). 略称 : Fum, fumarate; αKG , alpha-ketoglutarate; Mal, malate; Pro, proline; Glu, glutamate; Gln, glutamine; Cit, citrate; OAA, oxaloacetate.

2.3.4. ^{13}C 代謝フラックス解析

2.3.4.1. FH 活性低下による代謝フラックス変化

^{13}C 代謝フラックス解析には ^{13}C 標識基質添加後 32 時間での MDV を使用し、単一 ^{13}C 炭素源として $[1,2-^{13}\text{C}]\text{glucose}$ あるいは $[\text{U}-^{13}\text{C}]\text{glutamine}$ を使用した標識実験を独立して実施するパラレルラベリング実験にて得られたデータを使用した。実験によって得られた MDV データと代謝モデルのシミュレーションによって算出された MDV をフィッティングすることにより、親株細胞ならびに FH^{dim} 細胞における細胞内代謝フラックス分布を決定した。代謝フラックス値の 95% 信頼区間が重なり合わない代謝反応を有意差ありと定義した。実測 MDV データとシミュレーションによる MDV データを図 2-8 に示したが、親株細胞ならびに FH^{dim} 細胞ともに良好なフィッティング結果が得られた。

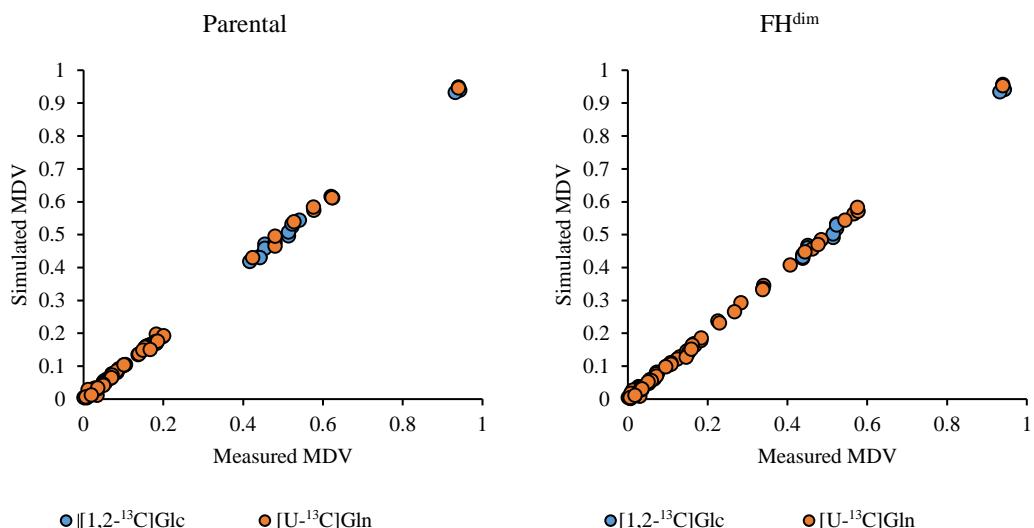


図 2-8 親株細胞および FH^{dim} 細胞における実測 MDV データとシミュレーションによる MDV データのフィッティング結果

FH^{dim} 細胞では、pyruvate の細胞質からミトコンドリアへの流入 (mitochondrial pyruvate carrier, MPC), pyruvate dehydrogenase (PDH), citrate synthase (CS), isocitrate dehydrogenase (IDH), α -ketoglutarate dehydrogenase (α KGDH), succinate dehydrogenase (SDH), FH ならびに malate dehydrogenase (MDH) といった TCA サイクルにおける代謝フラックスが有意に減少していた (図 2-9)。TCA サイクルへの炭素の流入は glutamine 由来と補充経路である pyruvate carboxylase が存在する。Glutamine 取り込みフラックスならびに glutamate 合成フラックスは、 FH^{dim} 細胞で 36% 減少していたが (表 2-4, 図 2-10), glutamate から α -ketoglutarate への変換反応フラックスは両細胞間で同程度であった (親株細胞 : 52.9 nmol/h/ 10^6 cells, FH^{dim} 細胞 : 45.9 nmol/h/ 10^6 cells, 図 2-10)。さらに、補充経路である pyruvate carboxylase フラックスは両細胞間で変化はなかった (図 2-10)。以上の結果より、FH 活性低下によって、pyruvate のミトコンドリアへの流入フラックス抑制に起因する TCA サイク

ル全体の代謝フラックス減少が示された。興味深いことに、glutamate からの proline 合成フラックスは FH^{dim} 細胞で劇的に減少していた（親株細胞：17.9 nmol/h/10⁶ cells, FH^{dim} 細胞：2.8 nmol/h/10⁶ cells, 図 2-10）。さらに、arginine から proline の合成フラックスは FH^{dim} 細胞において増加していた（親株細胞：1.5 nmol/h/10⁶ cells, FH^{dim} 細胞：2.0 nmol/h/10⁶ cells, 図 2-10）。また、親株細胞と FH^{dim} 細胞での FH 逆反応フラックスと順反応フラックスの比は、それぞれ 1.00 と 0.18 であり、 FH^{dim} 細胞で減少していた（表 S-1）。これは、 FH^{dim} 細胞では FH 順反応のほうが逆反応よりも優位であることを意味しており、2.3.3.2 での結果と一致する。

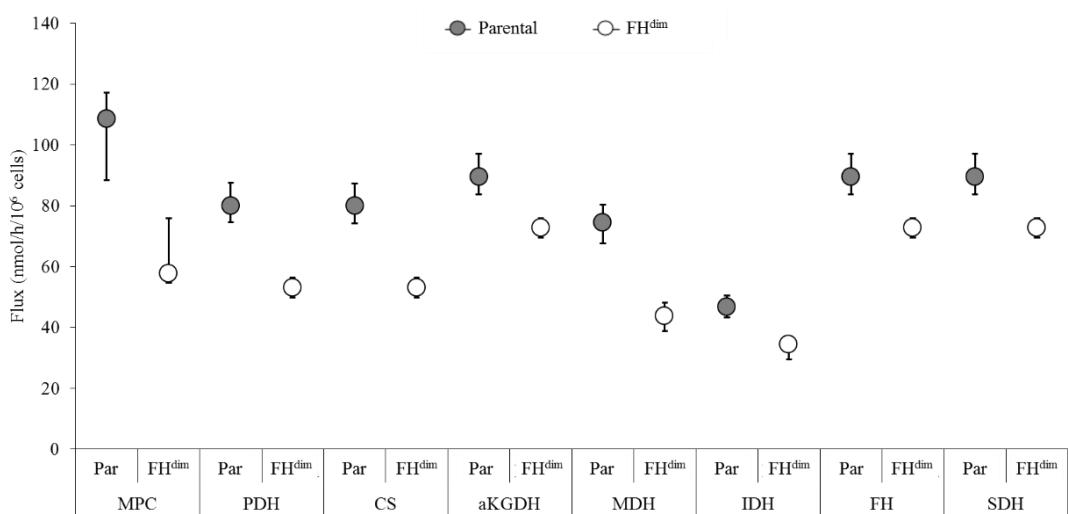


図 2-9 TCA サイクル内反応における代謝フラックス算出値

データポイントは代謝フラックス算出時の最適値を表し、エラーバーは 95% 信頼区間を表す。略称：MPC, mitochondrial pyruvate carrier; PDH, pyruvate dehydrogenase; CS, citrate synthase; aKGDH, alpha-ketoglutarate dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; IDH, isocitrate dehydrogenase; FH, fumarase; SDH, succinate dehydrogenase.

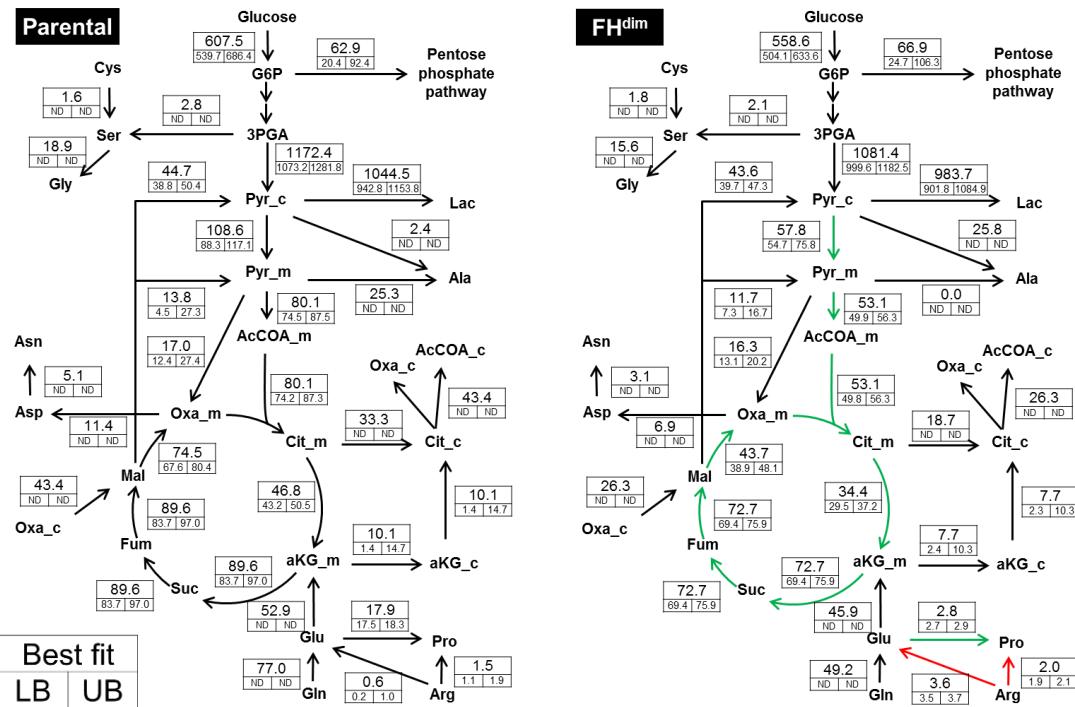


図 2-10 親株細胞と FH^{dim} 細胞における細胞内代謝フラックス分布

代謝フラックス値は最適値と 95%信頼区間の上限値と下限値で表されている。単位は nmo/h/10⁶ cells。親株細胞と FH^{dim} 細胞で 95%信頼区間が重ならない代謝フラックスを有意差ありと定義した。緑色と赤色の矢印は、FH^{dim} 細胞において有意に減少または増加した代謝フラックスを意味する。略称：LB, lower boundary; UB, upper boundary; ND, not determined

2.3.4.2. 酸化還元収支ならびにエネルギー収支

FH 活性低下により有意に変化した代謝フラックスとして, TCA サイクルならびに proline 合成が検出された. これらの反応は細胞内の酸化還元状態に関わる補因子である NADH や NADPH を使用するため, 求められた代謝フラックス分布からそれら補因子の收支を算出した. 賞味の NADH 産生フラックスを算出したところ, 親株細胞では $426.6 \text{ nmol/h}/10^6 \text{ cells}$, FH^{dim} 細胞では $327.9 \text{ nmol/h}/10^6 \text{ cells}$ であり, 主に FH^{dim} 細胞での TCA サイクルフラックスの減少によって NADH 産生フラックスが低下していた (表 2-5).

表 2-5 NADH フラックス収支

Type	Reaction name	Pathway	Stoichiometry	Parental (nmol/h/10 ⁶ cells)	FH ^{dim} (nmol/h/10 ⁶ cells)	
		PDH	TCA cycle	Pyrmit + NAD --> AcCOAmit + CO2in + NADH	80.1	53.1
		aKGDH	TCA cycle	aKGmit + NAD --> Suc + CO2in + NADH	89.6	72.7
NADH	production	MEmit	Others	Mal + NAD --> Pyrmit2 + CO2in + NADH	13.8	11.7
flux		MDHmit	TCA cycle	Mal + NAD --> Oxamit + NADH	74.5	43.7
		GAPDH	Glycolysis	GAP + NAD --> PGA + NADH	1175.3	1083.5
		IDHmit	TCA cycle	Citmit + NAD --> aKGmit + CO2in + NADH	46.8	34.4
		SDH	TCA cycle	Suc + 0.6 NAD --> Fum + 0.6 NADH	53.8	43.6
		Sum		1533.9	1342.7	
		LDH	Glycolysis	Pyrcyt + NADH --> Lac + NAD	1044.5	983.7
NADH	consumption	MDHcyt	Others	Oxacyt + NADH --> Mal + NAD	43.4	26.3
flux		Pro_synthesis_1	Others	Glu + NADH --> Pro + NAD	17.9	2.8
		Pro_synthesis_2	Others	Arg + NADH --> Glu + NAD	1.5	2.0
		Sum		1107.3	1014.8	
Net NADH						
	production			426.6	327.9	
	flux					

正味の NADPH 産生フラックスを算出したところ、親株細胞では 36.5 nmol/h/10⁶ cells, FH^{dim} 細胞では 97.3 nmol/h/10⁶ cells であり、主に FH^{dim} 細胞での glutamine を前駆体とする proline 合成フラックスや脂肪酸バイオマス合成フラックスの減少による NADPH 消費反応フラックス減少により、NADPH 産生フラックスが増加していた（表 2-6）。

表 2-6 NADPH フラックス収支

Type	Reaction name	Stoichiometry	Parental (nmol/h/10 ⁶ cells)	FH ^{dim} (nmol/h/10 ⁶ cells)
OxPPP		G6P + NADP --> Ru5P + CO2in + NADPH	62.9	66.9
MEcyt		Mal + NADP --> Pyrcyt + CO2in + NADPH	44.7	43.6
NADPH production flux	One_carbon_1	Ser + 2 NADP --> Gly + 2 NADPH	37.8	31.1
	One_carbon_2	Gly + 2 NADP --> GlyDeg + 2 NADPH	18.8	19.6
	Sum		164.2	161.3
Lipid synthesis		AcCOAcyt + 1.85 NADPH --> Lipid_BIOMASS + 1.85 NADP	80.3	48.7
NADPH consumption flux	IDHcyt	aKGcyt+CO2in + NADPH --> Citcyt + NADP	10.1	7.7
	Pro_synthesis_1	Glu + 2 NADPH --> Pro + 2 NADP	35.8	5.6
	Pro_synthesis_2	Arg + NADPH --> Pro + NADP	1.5	2.0
	Sum		127.7	64.0
Net NADPH production flux			36.5	97.3

細胞内 NAD⁺は TCA サイクルの各種反応で NADH に還元され、OxPHOS により ATP が產生される。そこで、OxPHOS フラックス値と ATP 消費ならびに產生に関わる代謝反応のフラックス値を用いて、親株細胞ならびに FH^{dim} 細胞における正味の ATP 產生フラックスを計算した（表 2-7）。正味の総 ATP 產生フラックスは、親株細胞と比較して FH^{dim} 細胞では 330.2 nmol/h/10⁶ cells だけ減少していた（表 2-8）。そのうち、解糖系ならびに TCA サイクル由来の ATP 產生フラックスの減少分はそれぞれ、86.7 nmol/h/10⁶ cells と 244.1 nmol/h/10⁶ cells であった（表 2-8）。したがって、FH^{dim} 細胞における正味の ATP 產生フラックスの減少は、主に TCA サイクル由来の ATP 產生フラックスの減少に起因していた。本結果より、FH^{dim} 細胞では細胞内 ATP 產生を TCA サイクルよりも解糖系に依存していることが考えられた。

表 2-7 ATP フラックス収支

Type	Reaction name	Pathway	Stoichiometry	Parental (nmol/h/10 ⁶ cells)	FH ^{dim} (nmol/h/10 ⁶ cells)
ATP production	GAPDH	Glycolysis	GAP + ADP --> PGA + ATP	1175.3	1083.5
	aKGDH	TCA cycle	aKGmit + ADP --> Suc + CO2in + ATP	89.6	72.7
	flux	PK	Glycolysis PEP + ADP --> Pyrcyt + ATP	1172.4	1081.4
	OXPHOS	TCA cycle	NADH --> 2.3 ATP	981.3	754.1
Sum				3418.6	2991.7
ATP consumption	HK	Glycolysis	SubsGlc + ATP --> G6P + ADP	607.5	558.6
	PFK	Glycolysis	F6P + ATP --> FBP + ADP	578.9	531.6
	flux	PC	Others Pyrmit2 + CO2in - + ATP --> Oxamit + ADP	17.0	16.3
	Sum				1203.3
Net ATP production flux				2215.3	1885.1

表 2-8 代謝経路ごとの ATP フラックス収支

Pathway	ATP production flux (nmol/h/10 ⁶ cells)			Fold change FH ^{dim} /Parental
	Parental	FH ^{dim}	Difference	
Glycolysis	1161.3	1074.6	86.7	0.93
TCA cycle	1070.9	826.8	244.1	0.77
Total net	2215.3	1885.1	330.2	0.85

2.3.5. ATP アッセイならびに oligomycin 感受性評価

2.3.4.2 で提示された仮説を検証するため、親株細胞と FH^{dim} 細胞を glucose または glutamine 不含培地で培養し、細胞内 ATP 产生への影響を調べた。Glucose 不含培地中では解糖系が抑制されるため、細胞は解糖系以外の代謝経路で ATP を产生する必要がある。Glutamine 不含培地中では glutamine から TCA サイクルへの流入フラックスが無くなるため TCA サイクル由来の ATP 产生が抑制される。通常培地での培養では、両細胞ともに培養時間の増加と共に細胞内 ATP 量が増加した（図 2-11）。Glucose 不含培地での培養では、親株細胞は day 1 時点で細胞内 ATP 量が増加した後に day 3 時点まで減少したのに対し、FH^{dim} 細胞は day 3 時点まで連続的に細胞内 ATP 量が減少していった（図 2-11）。この各細胞における ATP 产生経時変化プロファイルの違いは、FH^{dim} 細胞において解糖系への ATP 产生依存度が増加して

いることを示唆している。対照的に、glutamine 不含培地での培養では、親株細胞は day 3 時点まで連続的に細胞内 ATP 量が減少したのに対し、 FH^{dim} 細胞は day 3 時点まで細胞内 ATP 量を維持した（図 2-11）。この各細胞における ATP 産生経時変化プロファイルの違いは、 FH^{dim} 細胞において TCA サイクルへの ATP 産生依存度が低下していることを示唆している。

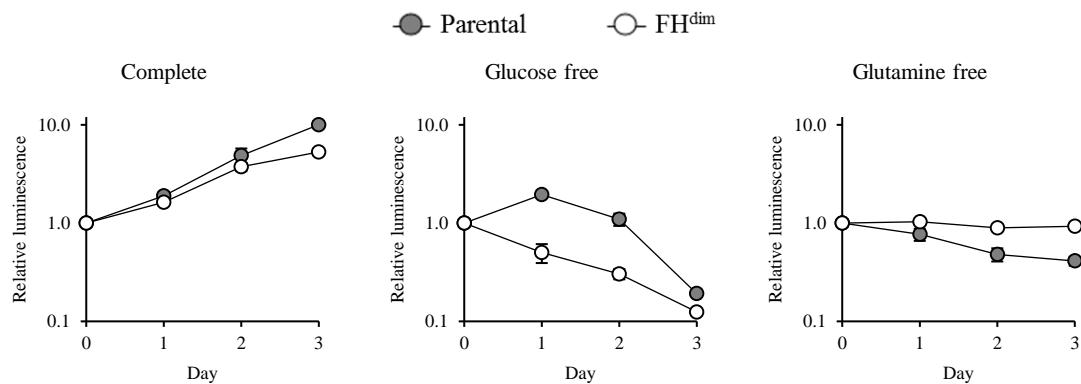


図 2-11 Glucose または glutamine 不含培地中の細胞内 ATP 量変化

データポイントは平均値、エラーバーは標準偏差を表す (n=4)。

さらに、ミトコンドリア内 ATP 合成酵素阻害剤である oligomycin に対する感受性を両細胞株で調べたところ、 FH^{dim} 細胞において oligomycin の感受性が低下していた（図 2-12、表 2-9）。以上の結果から、 FH^{dim} 細胞では FH 活性低下により細胞内 ATP 産生をより解糖系に依存する状態となり、TCA サイクルへの依存度が低下することによって oligomycin 感受性が低下したと示唆される。

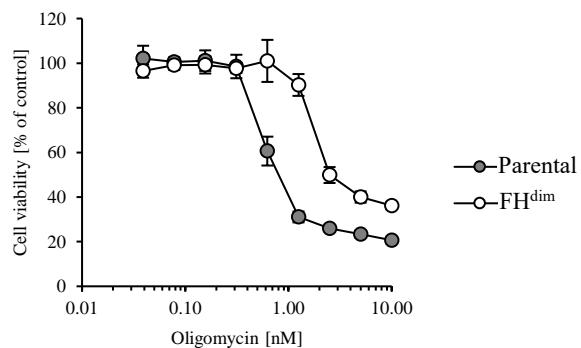


図 2-12 Oligomycin による細胞増殖阻害効果

データポイントは平均値、エラーバーは標準偏差を表す (n=3)。

表 2-9 Oligomycin における IC_{50} 値

Cell	IC_{50} [nM]
Parental	0.7
FH^{dim}	2.5

図 2-12 に示された結果より算出した.

2.4. 考察

本研究で構築された FH^{dim} 細胞は FH exon1 部分に 8 bp の塩基欠損を有しているにも関わらず、細胞質画分に FH タンパク質発現ならびに酵素活性が残存していた（図 2-4, 表 2-3）。留意すべきことは、 FH のミトコンドリアならびに細胞質に存在する echoform が単一の FH 遺伝子からコードされることだ（Yogev O *et al.* 2011）。 FH 遺伝子のプロモーター領域には多くの転写開始点が存在し、2種類の FH mRNA が転写されることが知られている。一つは MTS を含む FH タンパク質、もう一つは MTS を欠いた FH タンパク質にそれぞれ翻訳される（Dik E *et al.* 2016）。 FH^{dim} 細胞では MTS コード領域に 8 bp 欠損を有しており、フレームシフトが生じているため FH ミトコンドリア局在 echoform を発現することはできないが、 FH 細胞質局在 echoform を発現する開始コドンがフレームシフト以降に残っているため、 FH 細胞質局在 echoform を発現することができる。先行研究では MTS コード領域にフレームシフトを有する FH cDNA を細胞にトランスフェクションすることで、外来性 FH タンパク質発現が細胞質に限定されることを示しており（Dik E *et al.* 2016），先に述べた FH^{dim} 細胞で FH タンパク質発現が細胞質に残存していた原因を支持するものである。これまで HLRCC 患者で細胞質 FH 活性の残存についての報告は無いが、本研究と同様に FH exon1 の Met1 あるいは Met44 をコードするそれぞれの開始コドンの間にフレームシフトを有する変異は報告されている（Muller M *et al.* 2017, Tomlinson IP *et al.* 2002）。

先行研究では、 FH 機能欠損により解糖系が亢進することが報告されている（Yang Y *et al.* 2010, Yang Y *et al.* 2013, Frezza C *et al.* 2011, O’Flaherty *et al.* 2010）。しかしながら、本章で作成された FH^{dim} 細胞はそうした表現型を示さなかった（表 2-4）。 FH 機能欠損により解糖系が亢進するメカニズムのひとつとして、HIF の安定化がある。細胞内に蓄積された fumarate が、HIF prolyl hydroxylase を阻害することによって HIF を安定化する（Isaacs JS *et al.*, 2005 ; Koivunen P *et al.*, 2007）。 $Fh1$ ノックアウトマウス細胞を用いた先行研究では、細胞内 fumarate 量がおよそ 100 倍増加していたのに対し、 FH^{dim} 細胞での細胞内 fumarate 量は親株細胞と比較して 13 倍の増加であり、先行研究と比較すると細胞内 fumarate 量の増加分はかなり小さい。そのため、 FH^{dim} 細胞では細胞内 fumarate 量が HIF を安定化するにはまだ不十分であったと考えられる。また、細胞質での $Fh1$ タンパク質発現が細胞内 fumarate 量を減少させ、亢進した HIF 経路を元に戻すことができると先行研究で報告されている（O’Flaherty *et al.* 2010）。したがって、 FH^{dim} 細胞で残存している細胞質 FH タンパク質が HIF 依存的な解糖系の亢進を抑制している可能性が考えられる。興味深いことに、 FH^{dim} 細胞では FH 酵素活性としては劇的に低下しているにも関わらず（図 2-4, 表 2-3），残存している細胞質 FH 酵素活性は TCA サイクルを分断することなく回転させるのに十分であった（図 2-10）。この結果は、本章で用いた細胞株（HEK293）において、 FH タンパク質発現レベルが十分に高いという重要な知見を導いている。なぜならば、 FH 遺伝子はがん抑制遺伝子として知られており、fumarate はオンコメタボライトとして報告されているからである（Schmidt C *et al.*, 2020 ; Yang M *et al.*, 2012）。酸化的な TCA サイクルを維持するのに必要な FH タンパク質発現レベ

ルは実際の発現量よりもはるかに低いという性質は、FH 活性が完全に消失するまでは FH の有するがん抑制効果を保つためであると考えられる。本知見は FH 活性欠損による腫瘍形成を完全に説明するものではないが、FH の機能を理解するための非常に重要なものであると考えられる。

FH 活性低下による代謝フラックスの変化について、本章ではミトコンドリアへの pyruvate 流入が減少していることに起因する TCA サイクルフラックスの減少を示した（図 2-9）。FH 機能喪失型変異を有する UOK262 細胞では PDH 活性がリン酸化によって抑制されていることが先行研究で示されており（Gonçalves E *et al.*, 2018），本章で示された PDH 反応を介した pyruvate から TCA サイクルへの流入フラックス減少と一致する結果である。TCA サイクルフラックスの他にも FH^{dim} 細胞では proline 合成フラックスが減少しており（図 2-10），Fh1 ノックアウトマウス細胞で培地中への proline 排出フラックスが減少している先行研究の報告と一致する（Zheng L *et al.*, 2015）。これまで FH 活性低下による glutamine 由来の proline 合成フラックスの減少について報告されていない。細胞内 proline は glutamate から 1-pyrroline-5-carboxylate（P5C）を中間体として合成される（Phang, J. M. *et al.* 2015）。ミトコンドリア内の P5C reductase 1（PYCR1）では proline 合成代謝反応において、NADPH よりも親和性の高い NADH を補因子として用いる（De Ingeniis, J. *et al.* 2012）。TCA サイクルフラックスの減少に伴う、FH^{dim} 細胞での NADH 産生フラックスの減少を考慮すると（表 2-5），proline 合成フラックスの減少は NADH 還元力の低下に起因している可能性が考えられる。実際に、proline 合成がミトコンドリア内での酸化還元バランスの維持に関与していることはすでに先行研究で報告されている（Hollinshead, K. E. R. *et al.* 2018）。また、proline は尿素回路を介して arginine からも合成されるが（Albaugh VL *et al.* 2017），本研究では FH 活性低下により arginine からの proline 合成フラックスが亢進しており、glutamate 由来の proline 合成フラックスと同程度なっていた（図 2-10）。先行研究では FH 機能欠損細胞における arginine 栄養要求性の増加が報告されているが（Adam J *et al.*, 2013；Zheng L *et al.*, 2013），その原因のひとつとして、細胞増殖に必要な proline 合成を維持するためであることが本研究の結果から示唆された。つまり、arginine から proline への合成フラックスを抑制することにより FH 活性低下細胞の増殖を阻害できる可能性が提示された。このように、本研究での proline 合成フラックスに関する発見は、HLRCC 関連腎細胞がんに対する新規治療戦略構築に有用な知見であると考えられる。FH^{dim} 細胞での NADPH 産生フラックス増加は、脂肪酸バイオマス合成や proline 合成フラックスの減少による NADPH 消費反応フラックスの減少に起因していた（表 2-6）。FH 機能欠損により NADPH oxidase を介した ROS が増加することが知られており（Sudarshan S *et al.*, 2009），FH^{dim} 細胞では NADPH oxidase の亢進を補填するために NADPH 産生フラックスが増加している可能性が考えられる。

本研究では、¹³C 代謝フラックス解析によるエネルギー収支の計算から、FH^{dim} 細胞では TCA サイクル由来の ATP 産生が減少していることを示した（表 2-8）。さらに、FH^{dim} 細胞は glucose 不含培地条件下にて親株と異なり経時的に ATP 産生量が減少し、oligomycin に対

する感受性が低下していることを示した（図 2-11, 図 2-12, 表 2-9）。つまり, FH 活性低下により, 細胞内 ATP 産生における解糖系への依存度が増加し, TCA サイクルへの依存度が低下すると, 呼吸鎖阻害剤に対する抵抗性が増加した。この結果は, FH 活性低下細胞に対して OxPHOS の阻害は有効な治療戦略とはならず, 解糖系の阻害が有効な治療戦略となり得ることを示唆している。また, FH 欠損細胞では細胞内で蓄積した fumarate が呼吸鎖複合体 I ならびに II を阻害することで, oligomycin のような呼吸鎖阻害剤に対して抵抗性を示すことが知られているが (Tyrakis PA *et al.* 2017), 本研究結果は呼吸鎖阻害剤に対する抵抗性メカニズムとして, 細胞内エネルギー代謝の観点から新たな知見を提供するものである。また, 先行研究では FH 機能欠損細胞での ECAR や OCR を測定することにより間接的に解糖系の亢進や OxPHOS の低下を示すのみであったが (Yang Y *et al.*, 2013; Frezza C *et al.*, 2011; O'Flaherty L *et al.*, 2010), 本研究では ^{13}C 代謝フラックス解析により直接的かつ定量的に解糖系と TCA サイクルのエネルギー代謝におけるバランスを考察できるようになり, エネルギー代謝の適応メカニズムを明らかにすることができた。

以上のように, ^{13}C 代謝フラックス解析を適用することで, FH 活性低下により亢進あるいは抑制される代謝経路を同定し, 細胞内エネルギー産生における代謝経路への依存性の変化を示した。これらの知見は HLRCC 病態の理解や新たな治療戦略構築に向けた将来的な研究に有用であると期待される。

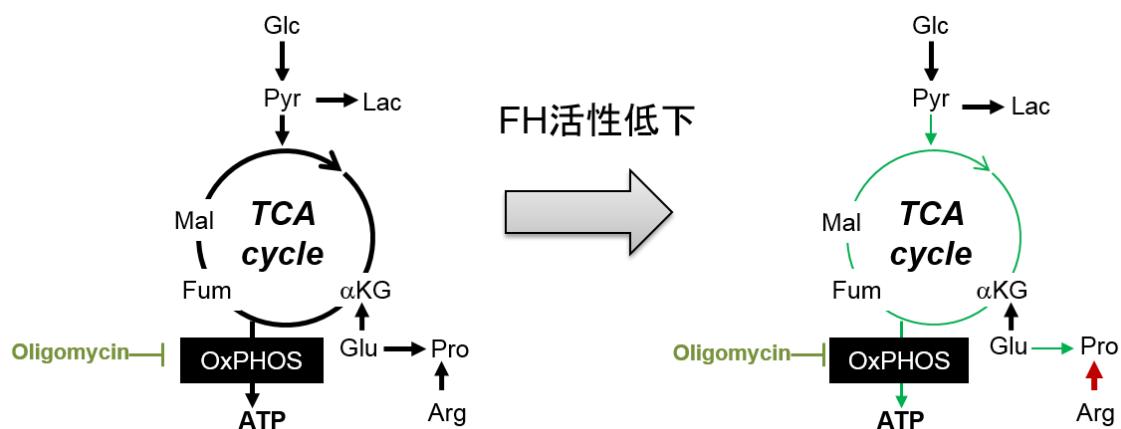


図 2-13 FH 活性低下による代謝フラックス変化の模式図

略称 : Glc, glucose; Pyr, pyruvate; Lac, lactate; Fum, fumarate; αKG , alpha-ketoglutarate; Mal, malate; Glu, glutamate; Pro, proline; Arg, arginine.

2.5. 小括

本研究では HLRCC の原因と考えられている FH 遺伝子変異に着目し, FH 酵素活性低下による細胞内代謝フラックス変化を明らかにした. これまで, 種々の方法で FH 活性低下による代謝変化に対してアプローチされてきたが, 直接的かつ定量的に細胞内代謝フラックス変化を示したのは本研究が初めての報告である. CRISPR-Cas9 システムによって HEK293 細胞株の FH 遺伝子にフレームシフト変異を導入することで, FH 活性が低下したアイソジエニックな FH^{dim} 細胞株を構築した. FH^{dim} 細胞株は FH 細胞質 echoform が翻訳可能な開始コドンを有するため, 細胞質画分での FH 活性は残存していたが, ミトコンドリア画分での FH 活性は欠失して細胞内 fumarate レベルの増加も確認されたため, 細胞内 FH 活性が低下していることが確認された. ^{13}C 代謝フラックス解析を適用して親株細胞との代謝フラックス分布を比較したところ, FH 活性低下による解糖系フラックスの変化は無かったが, pyruvate のミトコンドリアへの流入フラックスが減少し, それに起因して TCA サイクル全体のフラックスが減少した. さらに, 代謝フラックス分布から算出された酸化還元収支ならびにエネルギー収支より, FH 活性低下により TCA サイクル由来の ATP 産生フラックスが解糖系と比較して優位に減少していることが明らかとなった. そして, 細胞内 ATP 産生における解糖系依存性が高まる細胞内代謝変化を起こしていることを示した. さらに, FH 活性低下による oligomycin の感受性低下を示した. これらの結果から, FH 活性低下がん細胞に対して OxPHOS 阻害が有望な治療戦略とはならず, 解糖系の抑制が有効な治療戦略となる可能性が示唆された. また, 酸化還元状態の変化に起因すると考えられる glutamate 由来の proline 合成フラックスの低下という, FH 活性低下による新規の代謝フラックス変化を明らかにした. さらに FH 活性低下により arginine 由来の proline 合成フラックスが増加していくことから, arginine からの proline 合成代謝の抑制が新たな治療薬の標的となる可能性が示唆された.

本検討では, ^{13}C 代謝フラックス解析を適用することで, FH 活性低下により亢進あるいは抑制される代謝経路を同定し, 細胞内エネルギー産生における代謝経路への依存性の変化を示した. したがって, 遺伝子変異による代謝変化の解析における, ^{13}C 代謝フラックス解析法の適用可能性が示された.

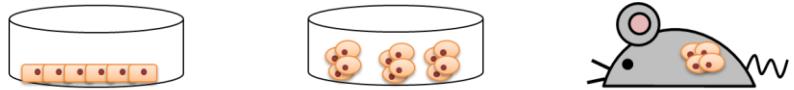
第3章 3次元培養細胞を用いた腫瘍微小環境形成による代謝フラックス変化解析

3.1. 緒言

がん細胞が生体内で腫瘍を形成することにより、腫瘍内部では低酸素状態となる。浸潤や転移、薬剤抵抗性、ゲノム不安定性や免疫系の抑制など、低酸素腫瘍微小環境の形成は腫瘍の進行に関わる様々な生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしている (Bristow RG *et al.* 2008 ; Noman MZ *et al.* 2015 ; Teicher BA. 1994 ; Rankin EB *et al.* 2016)。がん細胞は腫瘍の進行において低酸素環境下にその代謝状態を適応させることができ、培養プラスコやディッシュの底面での細胞の接着を可能とした2次元単層培養を用いることで、がん細胞における低酸素環境下での代謝変化が調べられてきた (Lee P *et al.* 2020 ; Semenza GL. 2010 ; Schulze A *et al.* 2012 ; Metallo CM *et al.* 2011)。しかしながら、2次元培養ではディッシュ底面で単層に細胞が配置されてしまっているために *in vivo* 腫瘍で見られるような立体構造が失われてしまっている。したがって、腫瘍微小環境を反映した状態での代謝状態を解析する必要がある。担癌動物モデルを用いて腫瘍微小環境を形成することが最も生体内の腫瘍を模倣したモデルであると考えられるが、こうした動物モデルではがん細胞における細胞外フラックスを測定することが難しく、また ^{13}C 標識基質も経口投与や静脈投与によって投与しなければならないため、血中や組織中に存在する非標識基質 (glucose や glutamine など) による影響を回避できず、正確な MDV 測定が困難であると考えられる。したがって、担癌動物モデルでは現状 ^{13}C 代謝フラックス解析を適応することができない (図 3-1)。

最近では、*in vitro* で3次元的に腫瘍微小環境を形成可能な培養法 (3次元培養) が用いられるようになり、より生体内の腫瘍を模倣した実験モデルとして薬剤スクリーニングや腫瘍生物学の基礎研究で活用されている (Sant S *et al.* 2017)。3次元培養ではがん細胞を凝集させることで立体構造を有した細胞 spheroid を形成し、酸素濃度勾配のような *in vivo* 腫瘍で観察されるような腫瘍微小環境を形成することができる (Riffle S *et al.* 2017 ; Nunes AS *et al.* 2019 ; Muir A *et al.* 2018)。また、細胞を凝集させるため細胞間相互作用も生じる。したがって 3次元培養は腫瘍微小環境下での細胞内代謝に関する研究に非常に有用であると考えられるが、こうした *in vitro* での腫瘍微小環境形成によってどのような代謝経路が亢進または抑制されるのか、詳細な知見は少ない。また、2次元培養における低酸素下での代謝変化と、腫瘍微小環境を形成する3次元培養下での代謝変化の相違点についても不明である。

本章では腫瘍微小環境形成によって特異的に亢進または抑制される代謝反応を同定するため、通常酸素および低酸素下での2次元培養、ならびに3次元培養での大腸がん由来細胞株 HCT116 細胞に対して ^{13}C 代謝フラックス解析を適用した。さらに、得られた代謝フラックス変化と細胞の増殖や生存との関係の推察および検証を実施した。



項目	2次元単層培養 (<i>in vitro</i>)	3次元スフェロイド培養 (<i>in vitro</i>)	担癌動物モデル (<i>in vivo</i>)
モデル作製に 要する時間	<24時間	3-4日間	>1週間
酸素濃度勾配	✗	✓	✓
細胞間相互作用	✗	✓	✓
栄養供給	人工的 (培地)	人工的 (培地)	生理的 (給餌)
細胞外フラックス 測定	✓	✓	✗
¹³ C標識	✓	✓	✓ (生体内の非標識 基質の影響あり)
¹³ C代謝フラックス 解析	✓	✓	✗

図 3-1 *In vitro* および *in vivo* での各種がんモデルの特徴

3.2. 実験材料と実験方法

3.2.1. 使用細胞株

American Type Culture Collection より入手した、ヒト大腸がん細胞株 HCT116、ヒト肺がん細胞株 A549 ならびにヒト継維肉腫細胞株 HT-1080 を使用した。これら細胞株は、特に細胞外マトリックスタンパク質などの添加物を使用せずとも細胞 spheroid を形成できるために、モデル細胞として選択した。

3.2.2. 使用培地

培地には DMEM Without glucose, L-glutamine, phenol red, sodium pyruvate and sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich) を使用した。以降、特に断りがない限り、前述 DMEM 培地に 20 mM glucose, 2 mM glutamine, 44 mM sodium bicarbonate, 10% FBS (HyClone) を添加した培地を使用した。

3.2.3. 細胞培養

3.2.3.1. 2 次元培養

細胞培養表面処理済みのプレート、ディッシュもしくはフラスコを用いて、5% CO₂ 存在下、37°C で細胞を培養した。本章では、細胞培養表面処理済みの培養容器を使用した細胞培養を便宜的に 2 次元培養とした。細胞数計測は TC20 Automated Cell Counter を用いて実施した。細胞の比増殖速度は、細胞数と時間の片対数プロットにおける傾きから算出した。

3.2.3.2. 3 次元培養による細胞 spheroid 形成

3 次元培養による細胞 spheroid 作成法については種々の手法が報告されているが、本研究では均一なサイズの単一 spheroid を形成できる点から、丸底タイプの超低吸着 96 ウェルプレートを用いて細胞 spheroid を作成した (Sant S *et al.*, 2017)。細胞をウェルに播種後、140 × g で 10 分間遠心分離して細胞を底面に凝集させ、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。播種細胞数は 4.0 × 10² cells/ウェル、2.0 × 10³ cells/ウェル、1.0 × 10⁴ cells/ウェルあるいは 5.0 × 10⁴ cells/ウェルとした。播種時の細胞培養液量は 100 μL とした。便宜上、2.0 × 10³ cells/ウェルあるいは 5.0 × 10⁴ cells/ウェルで播種した細胞 spheroid をそれぞれ small spheroid, large spheroid とした。細胞数計測は TC20 Automated Cell Counter を用いて実施した。細胞の比増殖速度は、細胞数と時間の片対数プロットにおける傾きから算出した。

3.2.4. 細胞 spheroid の断面積測定

細胞 spheroid は 3.2.3.2 に記載された方法で作成した。超低吸着 96 ウェルプレートに細胞を播種した時点を day 0 とし、day 3 時点で 100 μL/ウェルで培地を追加した後、day 5, day 7, day 10, day 12 時点で培地交換を実施した。培地交換では 100 μL の培養上清を除き、100 μL の培地を追加した。4 倍の対物レンズを装着した Incucyte ZOOM (Essen BioScience) を

用いて細胞 spheroid の画像を撮影し, ImageJ (Schneider CA *et al.*, 2012) ソフトウェアを用いて, day 3 から day 14 時点での細胞 spheroid の断面積を算出した.

3.2.5. LOX-1 プローブを用いた低酸素状態の検出

細胞 spheroid は 3.2.3.2 に記載された方法で作成した. 超低吸着 96 ウェルプレートに細胞を播種した時点を day 0 とし, day 3 時点で $2 \mu\text{M}$ の LOX-1 probe solution (Medical & Biological Laboratories) を添加した. Day 4 時点にて, 低酸素環境下で LOX-1 プローブが発する赤色リン光を, Texas Red フィルターを装着した Evos FL Auto2 Imaging System (Thermo Fisher Scientific) を用いて検出した.

3.2.6. HIF-1 レポーターシステムを用いた低酸素状態の検出

3.2.6.1. レンチウイルス粒子の調製と遺伝子導入

プラスミドは市販の pGreenFire 2.0 HIF-1 reporter plasmid (System Biosciences) を使用した. 本プラスミドでは, HIF-1 の転写応答領域 (transcriptional response elements, TREs) が CMV プロモーターの上流に位置しており, レポータータンパク質である緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, GFP) の発現を検出することで HIF-1 活性を評価することができる. HIF-1 レポータープラスミドと pPACKH1 packaging plasmid (System Biosciences) を Lenti-X 293T 細胞 (タカラバイオ) へトランسفエクションし, 3 日後に上清を回収して $0.45 \mu\text{m}$ PVDF フィルターでろ過した後 Lenti-X Concentrator (タカラバイオ) を用いてレンチウイルス粒子を調製した. HCT116 細胞に上述レンチウイルス粒子と $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ のポリブレンを添加して 1,000 rpm で 1 時間半遠心分離することで, レンチウイルスを細胞へ感染させた. 感染後, 細胞を $5\% \text{CO}_2$ 存在下, 37°C で培養し, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシンを用いて遺伝子導入細胞の選択を実施した.

3.2.6.2. HIF-1 レポーターGFP 発現検出

HIF-1 レポーターコンストラクトが導入された HCT116 細胞から 3.2.3.2 に記載された方法により細胞 spheroid を作成し, 4 日後に GFP フィルターを装着した Evos FL Auto2 Imaging System を用いて GFP 蛍光シグナルを検出した.

3.2.7. 細胞外フラックス算出

細胞外フラックスの算出は 2.2.7 に記載した方法で実施した.

3.2.8. ^{13}C 標識実験

2 次元培養では, HCT116 細胞を細胞培養表面処理済みの 6 ウェルプレートに 3.0×10^5 cells/ウェルで播種し, $5\% \text{CO}_2$ 存在下, 37°C で培養した. 酸素濃度は 1%, 2%, 5% に設定, もしくは通常酸素条件下 (大気中酸素濃度) とした. 細胞播種後 24 時間で, 10%透析 FBS

を含む新鮮な培地に交換し、この時点を基準点とした (0 h). 3 次元培養では、HCT116 細胞から 3.2.3.2 に記載された方法により small spheroid と large spheroid を作成し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。細胞播種後 96 時間で、small spheroid については 10 ウエル分、large spheroid については 5 ウエル分の細胞 spheroid をプールして、超低吸着 6 ウエル プレートに移した。その後 10%透析 FBS を含む新鮮な培地に交換し、この時点を基準点とした (0 h). ¹³C 標識炭素源として、[1,2-¹³C]glucose (99% purity, Cambridge Isotope Laboratories), [U-¹³C]glutamine (98% purity, Sigma-Aldrich) もしくは[3-¹³C]glucose (99% purity, Cambridge Isotope Laboratories) を使用した。

3.2.9. 細胞内代謝物分析

3.2.9.1. 抽出操作

2 次元もしくは 3 次元培養細胞を DPBS で洗浄し、0.5 mL の冷却メタノール溶液を加えてクエンチングを実施した。その後、2.2.8.1 に記載された方法で細胞内代謝物を抽出した。

3.2.9.2. 測定

抽出・乾固したサンプルを 2.2.8.2 で記載されたように MTBSTFA を用いて誘導体化し、GC-MS で測定を実施後、測定結果を C, H, O, N, Si, P 各原子の天然同位体存在比で補正することで MDV を算出した。測定対象物代謝物とその質量電荷比 (*m/z*) ならびに化学式を表 3-1 に示した。

表 3-1 GC-MS 解析での測定対象代謝物

代謝物名	<i>m/z</i>	化学式
Pyruvate	174	C ₆ H ₁₂ O ₃ NSi
Lactate	233	C ₁₀ H ₂₅ O ₂ Si ₂
Lactate	261	C ₁₁ H ₂₅ O ₃ Si ₂
Fumarate	287	C ₁₂ H ₂₃ O ₄ Si ₂
α -Ketoglutarate	346	C ₁₄ H ₂₈ O ₅ NSi ₂
Malate	419	C ₁₈ H ₃₉ O ₅ Si ₃
Malate	391	C ₁₇ H ₃₉ O ₄ Si ₃
Phosphoenolpyruvate	453	C ₁₇ H ₃₈ O ₆ Si ₃ P
Dihydroxyacetone phosphate	484	C ₁₈ H ₄₃ O ₆ NSi ₃ P
Citrate	459	C ₂₀ H ₃₉ O ₆ Si ₃
Citrate	431	C ₁₉ H ₃₉ O ₅ Si ₃
3-Phosphoglycerate	585	C ₂₃ H ₅₄ O ₇ Si ₄ P
Alanine	232	C ₁₀ H ₂₆ ONSi ₂
Alanine	260	C ₁₁ H ₂₆ O ₂ NSi ₂
Glycine	246	C ₁₀ H ₂₄ O ₂ Si ₂
Glycine	218	C ₉ H ₂₄ OSi ₂
Proline	286	C ₁₃ H ₂₈ O ₂ NSi ₂
Proline	184	C ₁₀ H ₂₂ NSi
Serine	390	C ₁₇ H ₄₀ O ₃ NSi ₃
Serine	288	C ₁₄ H ₃₄ ONSi ₂
Aspartate	390	C ₁₇ H ₄₀ O ₃ NSi ₃
Aspartate	418	C ₁₈ H ₄₀ O ₄ NSi ₃
Glutamate	432	C ₁₉ H ₄₂ O ₄ NSi ₃
Glutamate	330	C ₁₆ H ₃₆ O ₂ NSi ₂
Glutamine	431	C ₁₉ H ₄₃ O ₃ N ₂ Si ₃

3.2.10. 主成分分析

天然同位体比で補正した MDV を説明変数として主成分分析 (principle component analysis, PCA) を実施した。R ver 3.4.1 内の prcomp 関数を使用し、説明変数を正規化して PCA を実施した。

3.2.11. ¹³C 代謝フラックス解析

HCT116 細胞の代謝モデルを KEGG データベース (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg/>) や、文献情報 (Okahashi N *et al.* 2015 ; Araki C *et al.*

2018 ; Ahn WS *et al.*, 2013) を基に構築した。本モデルは解糖系, TCA サイクル, oxPPP, 補充経路, リンゴ酸酵素経路, アミノ酸代謝反応ならびにバイオマス合成反応を含んでいる。乾燥細胞重量は, 文献情報を基に 400 pg/cell と設定した (Grassian AR *et al.*, 2014)。表 3-2 に先行研究から得られたタンパク質や脂質, 核酸といったバイオマス構成成分の合成に必要な前駆体量を示す (Quek LE *et al.*, 2012 ; Keibler MA *et al.*, 2016)。乾燥細胞重量ならびにバイオマス合成に必要な前駆体量から, バイオマス合成反応式における係数を決定した。バイオマス合成に必要な acetyl-CoA ならびに aspartate は細胞質画分由来とした。

表 3-2 バイオマス構成成分の合成に必要な前駆体量

代謝物名	バイオマス構成成分 (mmol/g-乾燥重量)
Ala	0.600
Asp	0.359
Asn	0.288
Gln	0.322
Glu	0.386
AcCoA	2.46
G6P	0.278
R5P	0.232
DHAP	0.119

Pyruvate, citrate, fumarate, malate, α -ketoglutarate, aspartate, oxaloacetate, acetyl-CoA については, モデル上で細胞質画分とミトコンドリア画分に区分した。本モデルでは, 細胞回収時や細胞内代謝物抽出操作の際に生じる非標識代謝物プールの混入 (異なる細胞内画分やタンパク質, 培地成分に由来する) を想定した dilution flux を組み込んだ (Grassian AR *et al.*, 2014 ; Noguchi Y *et al.*, 2009)。さらに, 非増殖細胞での脂肪酸合成を表現するため, バイオマス合成反応以外の脂肪酸合成反応を追加した (Ahn WS *et al.*, 2013)。 ^{13}C 代謝フラックス解析では, [1,2- ^{13}C]glucose 標識実験, [U- ^{13}C]glutamine 標識実験, [3- ^{13}C]glucose 標識実験を独立して実施するパラレルラベリング実験にて得られたデータを使用した。代謝フラックス算出時のフィッティング計算, カイ二乗検定ならびに 95% 信頼区間の計算は, 2.2.9 に記載の方法で実施した。本章では, glucose 取り込みフラックスならびに glutamine 取り込みフラックスと, lactate 排出フラックスをフィッティング計算に使用し, σ_x は実測値の 0.5-8% と設定した。

3.2.12. ウェスタンプロットティング

2 次元培養では, HCT116 細胞を細胞培養表面処理済みの 6 ウェルプレートに 2.0×10^5 cells/ウェルで播種し, 5% CO_2 存在下, 37°C で培養した。酸素濃度は 1% に設定, もしくは

正常酸素条件下（大気中酸素濃度）とした。3次元培養では、HCT116 細胞、A549 細胞、HT-1080 細胞から 3.2.3.2 に記載された方法により small spheroid と large spheroid を作成し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。2次元培養については細胞播種後 48 時間、3次元培養については細胞播種後 96 時間で、細胞を回収し RIPA buffer（ナカライトスク）で溶解した。4°C で 30 分間インキュベーションした後に遠心分離により上清を回収し、細胞溶解液を NuPage LDS sample buffer（Thermo Fisher Scientific）と NuPage Sample Reducing Agent（Thermo Fisher Scientific）と混合し、100°C で 10 分間インキュベーションした。その後、アクリルアミドゲル（DRC）にサンプルをアプライし、200 V 定電圧で 60 分間電気泳動した。泳動後、ゲル内のタンパク質を PVDF メンブレン（Millipore）に転写し、5%スキムミルクでブロッキングを実施した。1次抗体としてウサギ抗β-actin 抗体（Cell Signaling Technology, #4970）ならびにマウス抗 pyruvate carboxylase 抗体（Santa Cruz Biotechnology, #sc-365673）を使用した。1次抗体反応を 4°C で一晩実施し、TBS tween-20 でメンブレンを洗浄し、2次抗体反応を 4°C で 1 時間実施した。2次抗体として、Horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体（GE Healthcare, #NA934V）もしくは Horseradish peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体（GE Healthcare, #NA931V）を使用した。TBS tween-20 でメンブレンを洗浄した後、Peroxidase 基質（Millipore）と反応させ、化学発光を LAS4000（富士フィルム）によって検出した。

3.2.13. CB-839 感受性評価

2次元培養では、細胞を細胞培養表面処理済みの 96 ウェルプレートに 2.0×10^3 cells/ウェルで播種し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。酸素濃度は 1% もしくは正常酸素条件下（大気中酸素濃度）とした。3次元培養では、3.2.3.2 に記載された方法により small spheroid と large spheroid を作成し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。2次元培養については細胞播種後 24 時間、3次元培養については播種後 96 時間で、1000, 333, 111, 37, 12, 4.1, 1.4, 0.45, 0.15 nM 濃度となるように CB-839（MedChemExpress）を添加した（添加時点を day 0 とした）。コントロール用ウェルには 0.5%濃度の DMSO を添加した。2次元培養細胞に対しては CellTiter-Glo 2.0 Assay（PROMEGA），3次元培養細胞 spheroid に対しては CellTiter-Glo 3D Assay（PROMEGA）をウェルに添加し、ATP 量に応じて発生する発光シグナルをプレートリーダーEnVision によって測定した。CB-839 各濃度における発光シグナル強度を DMSO コントロールでの発光シグナル強度で除することで、細胞生存率を算出した。20%細胞増殖阻害濃度値（IC₂₀ 値）および IC₅₀ 値は Microsoft Excel 2013 に搭載されている GROWTH 関数を用いて算出した。

3.2.14. 統計解析

統計解析には SAS System Release 9.2（SAS Institute）を用い、ダネットの検定を実施して P 値を算出した。

3.3. 結果

3.3.1. 播種細胞数と細胞 spheroid 増殖の関係

HCT116, A549, HT-1080 細胞を用いて、播種時の細胞数と細胞 spheroid の増殖の関係を調べた。増殖の指標として、細胞 spheroid 断面積の時間変化を用いた。全細胞株において、細胞播種数 4.0×10^2 cells/ウェル, 2.0×10^3 cells/ウェルならびに 1.0×10^4 cells/ウェルでは断面積の増加が確認された（図 3-2）。一方、 5.0×10^4 cells/ウェルの条件では断面積は増加しなかった（図 3-2）。また、より細胞播種数が多いほど細胞 spheroid 断面積の増加速度が減少し、増殖が低下する傾向が見られた。

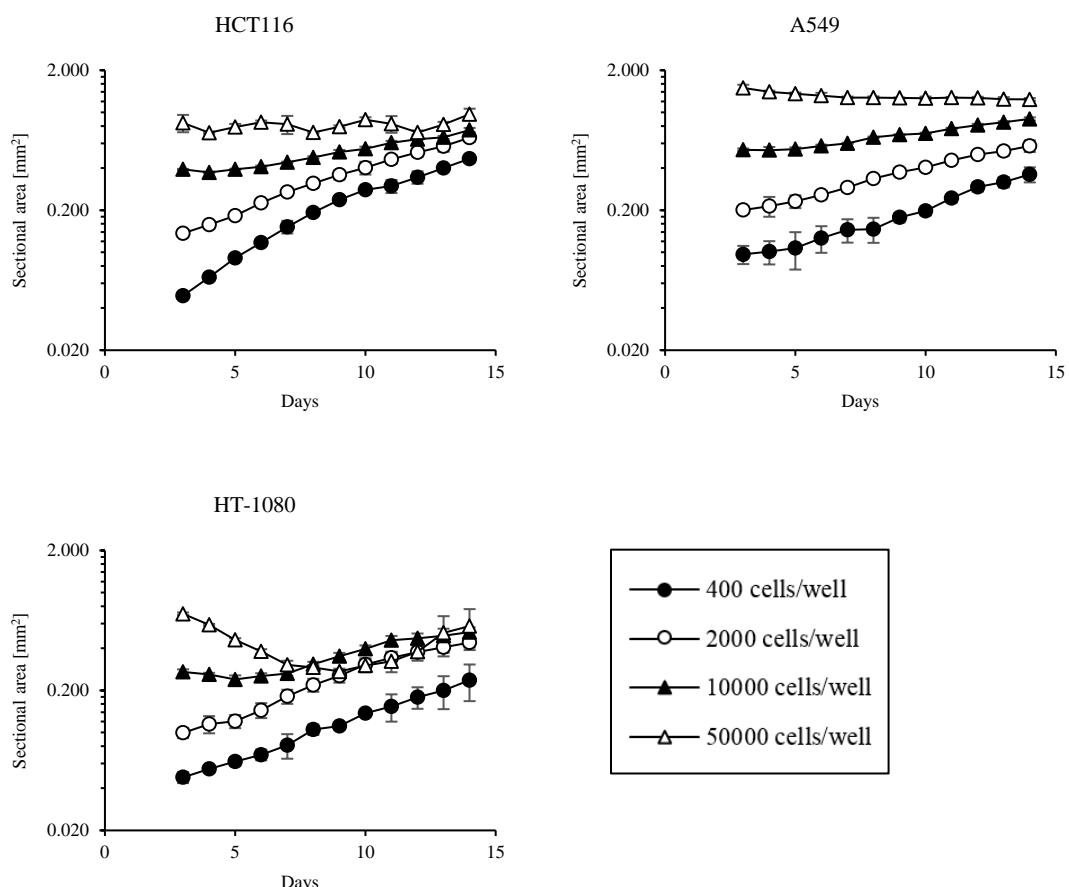


図 3-2 3 次元培養細胞 spheroid における増殖曲線

データポイントは平均値、エラーバーは標準偏差を表す（n=3）。

3.3.2. 3 次元培養による低酸素環境形成の確認

3 次元培養下での HCT116 細胞 spheroid に LOX-1 低酸素プローブを処理し、低酸素により生じる赤リン光を蛍光顕微鏡によって検出した。蛍光は、主に細胞 spheroid 内部で検出され（図 3-3），細胞 spheroid 内部における低酸素環境の形成が示された。次に、HIF-1 レポーター-GFP コンストラクトを導入した HCT116 細胞を作成し、細胞 spheroid の低酸素状態を

評価した。LOX-1 プローブ由来の蛍光と同様、GFP 由来の蛍光は主に細胞 spheroid 内部で検出され（図 3-4），本結果も細胞 spheroid 内部における低酸素環境の形成が示された。

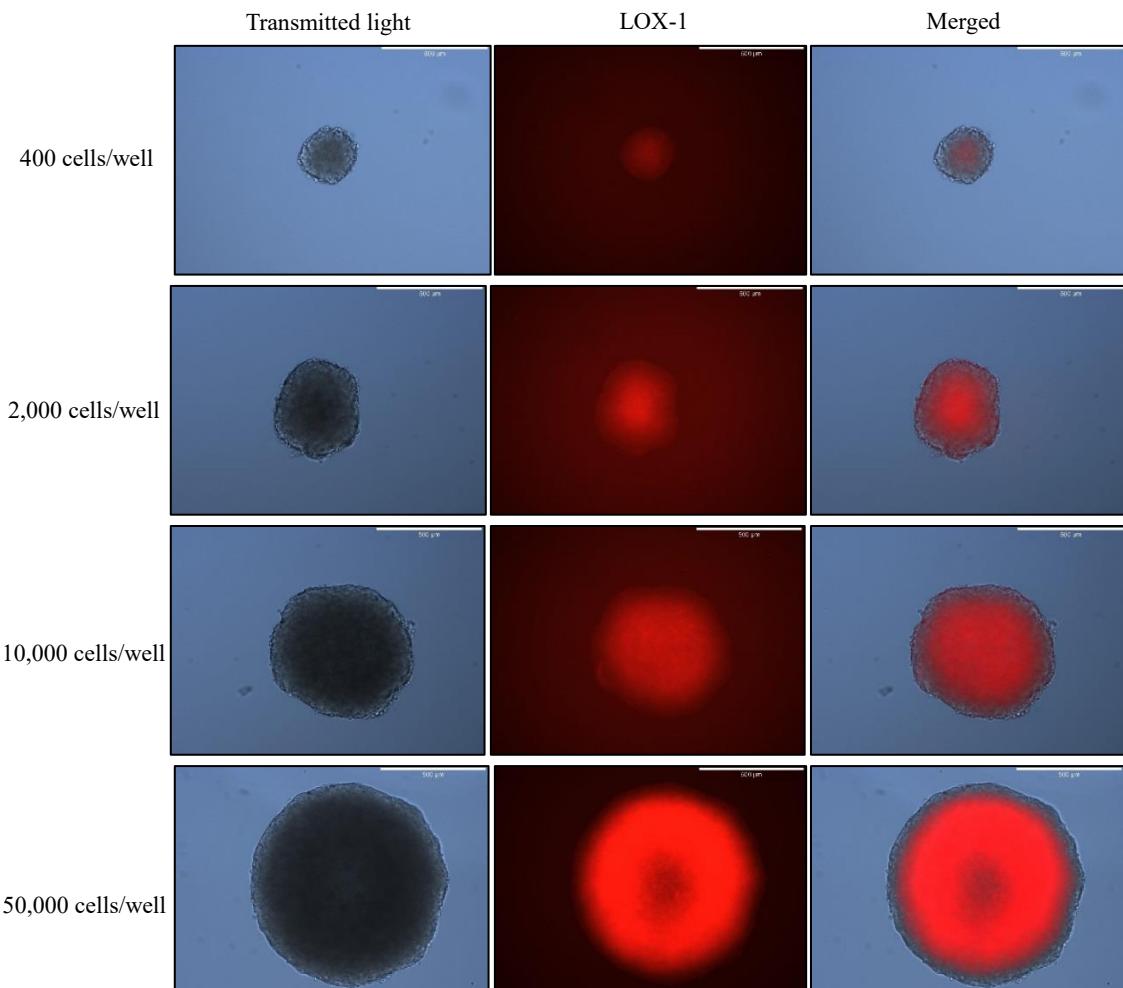


図 3-3 LOX-1 低酸素プローブを用いた 3 次元培養 HCT116 細胞 spheroid での低酸素状態の検出

スケールバーは 500 μ m.

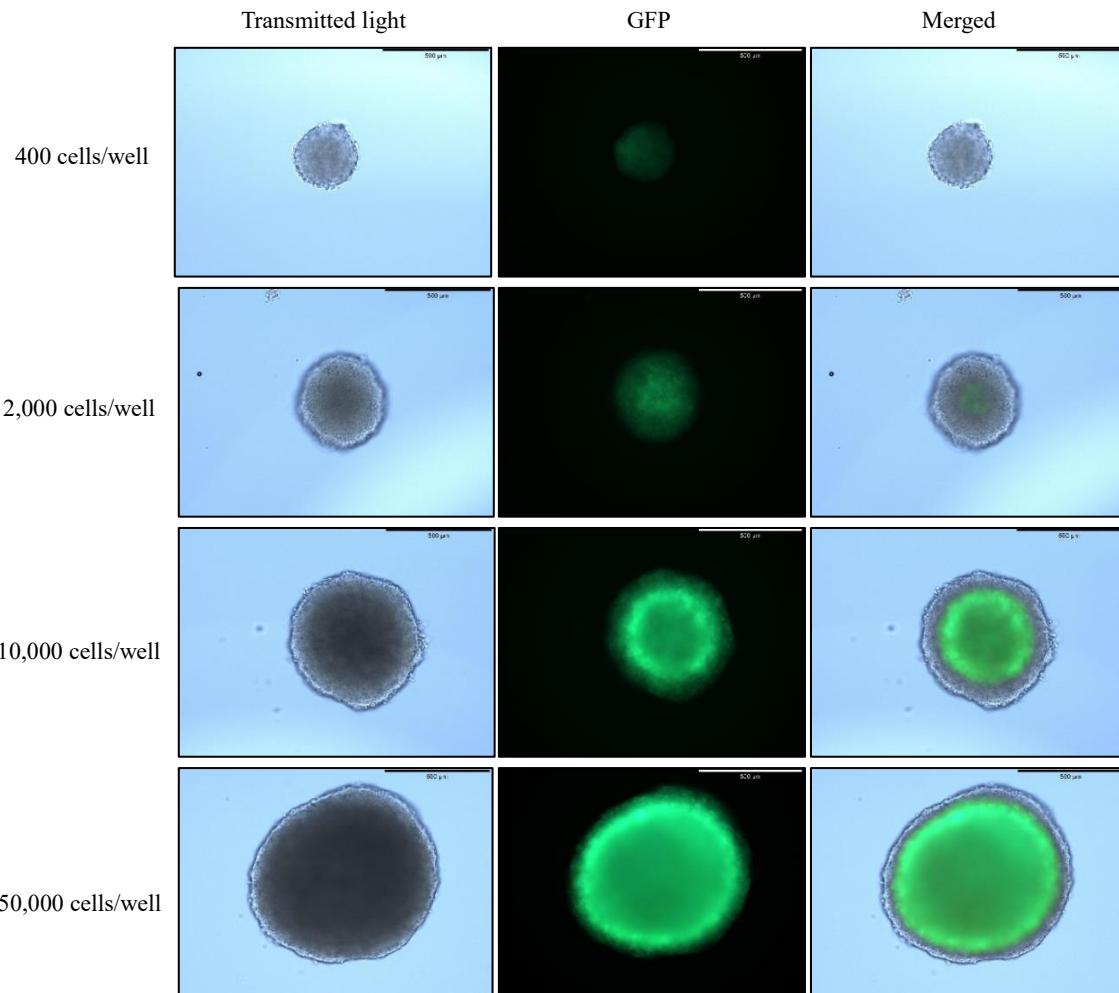


図 3-4 HIF-1 レポーター-GFP 発現を基にした 3 次元培養 HCT116 細胞 spheroid での低酸素状態の検出

スケールバーは 500 μ m.

3.3.3. ^{13}C 標識パターン解析

3.3.3.1. 主成分分析

HCT116 細胞を 2 次元ならびに 3 次元培養し, $[1,2-^{13}\text{C}]$ glucose ならびに $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glutamine を用いて ^{13}C 標識実験を実施した. 2 次元培養では, 通常酸素条件での培養もしくは酸素濃度を 1%, 2% もしくは 5% に設定して培養した. 3 次元培養では, 細胞播種数が 2.0×10^3 cells/ウェルあるいは 5.0×10^4 cells/ウェルの細胞 spheroid を用いており, 便宜上それぞれの条件で作成された細胞 spheroid を small spheroid あるいは large spheroid と呼ぶ. ^{13}C 標識基質添加後 24 時間で細胞内代謝のクエンチングを実施し, 細胞内代謝物を GC-MS で測定して MDV を算出した. 酸素濃度の異なる 2 次元培養または 3 次元培養での細胞内代謝物の ^{13}C 標識パターンを比較解析するため, 算出した MDV を説明変数として主成分分析を実施し

た. 酸素濃度を調整可能なマルチガスインキュベーターが 1 台のみであったため, 異なる酸素濃度での培養は違う実験日で実施しなければならず, バッチ間変動の影響を考慮する必要があった. そのため, 各条件 $n=3$ で実施しているが, 通常酸素条件下の 2 次元培養のみ $n=6$ とすることで, バッチ間変動の影響を確認した. $[1,2-^{13}\text{C}]$ glucose ならびに $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glutamine 標識実験でのスコアプロット上において, 通常酸素条件下の 2 次元培養は全て近接した位置にプロットされており, バッチ間変動の影響は無視できると考えられる (図 3-5, 図 3-6). $[1,2-^{13}\text{C}]$ glucose 標識では, 酸素濃度 5%を除いた 1%ならびに 2%酸素濃度下での 2 次元培養において, 通常酸素下 2 次元培養よりも小さい第 1 主成分ならびに第 2 主成分スコアの位置にプロットされた (図 3-5). $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glutamine 標識では, 1%, 2%ならびに 5%酸素濃度下での 2 次元培養において, 通常酸素下 2 次元培養よりも第 1 主成分スコアが大きく, 第 2 主成分スコアの小さい位置にプロットされた (図 3-6). また, 2 次元培養ではスコアプロット上で酸素濃度に応じて線形的にプロットされていたが, 3 次元培養はその直線上に位置せず, 異なる位置にプロットされた (図 3-5, 図 3-6). この結果は, 3 次元培養での代謝状態が通常酸素ならびに低酸素状態での 2 次元培養とは明確に異なることを示している. 次に, 主成分分析のローディングから, スコアプロット上での各培養条件の分離に寄与している代謝物フラグメントを選抜した. $[1,2-^{13}\text{C}]$ glucose 標識については, 1%酸素条件下の 2 次元培養においては $M+0$ citrate, 3 次元培養においては $M+2$ malate と $M+2$ aspartate が特徴的な代謝物フラグメントとして選択された (図 3-5). また, $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glutamine 標識で特徴的な代謝物フラグメントとして選択されたのは, 通常酸素条件下の 2 次元培養においては $M+4$ citrate と $M+4$ malate, 1%酸素条件下の 2 次元培養においては $M+5$ citrate と $M+3$ malate, 3 次元培養においては $M+0$ citrate と $M+0$ glutamate であった (図 3-6).

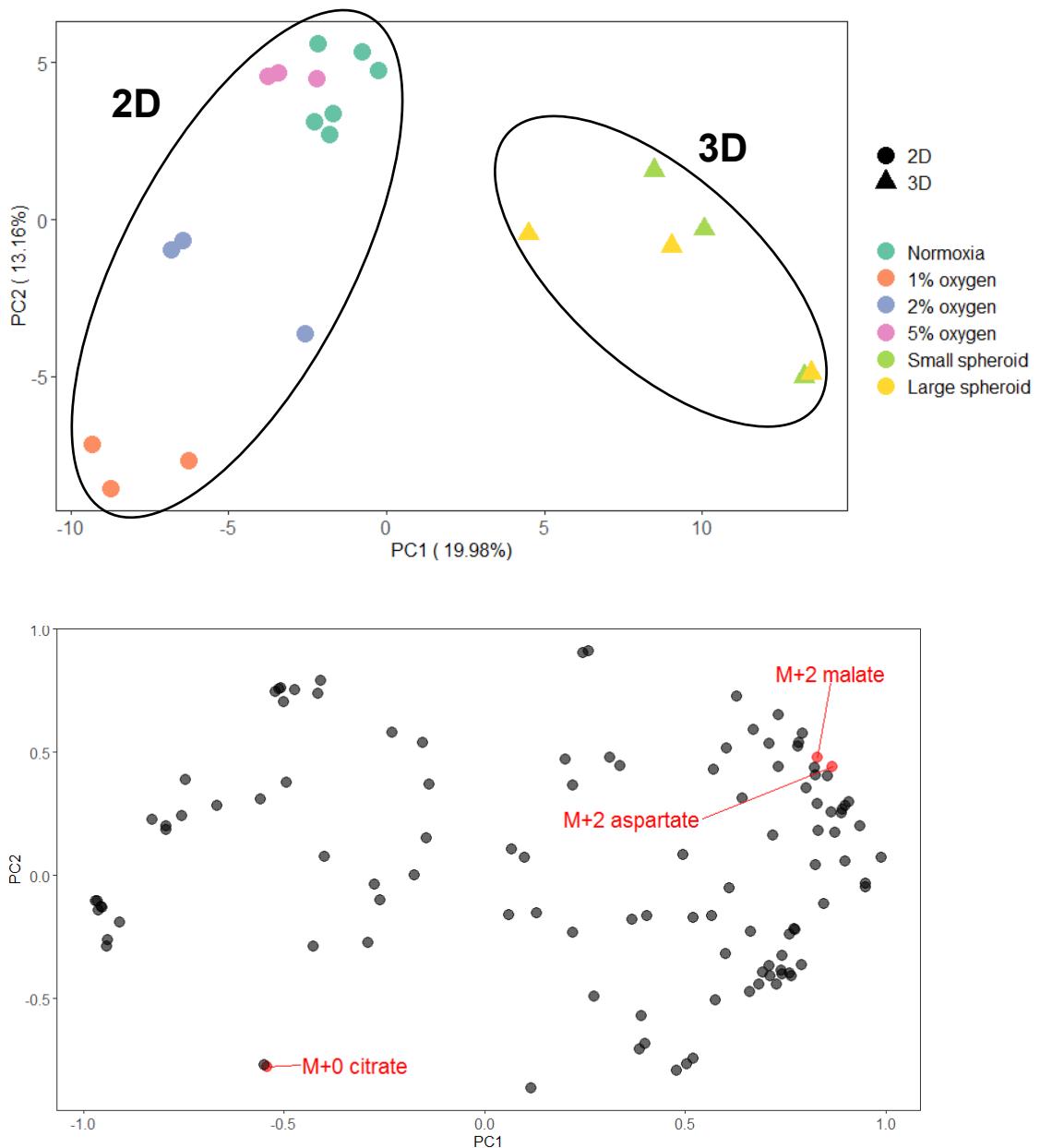


図 3-5 [1,2-¹³C]glucose 標識条件下での 2 次元培養または 3 次元培養 HCT116 細胞における MDV を説明変数とした主成分分析スコアプロットならびにローディングプロット

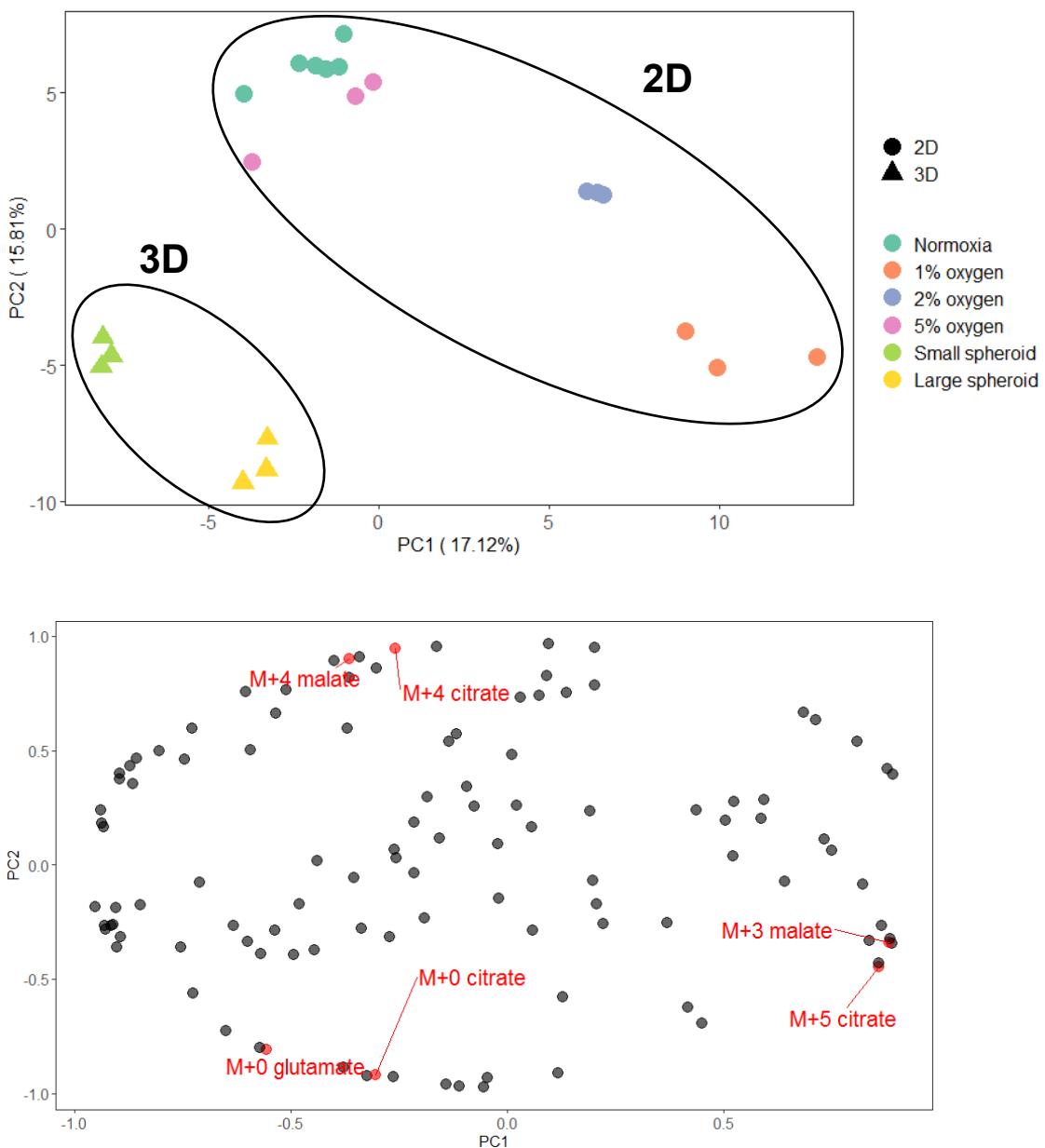


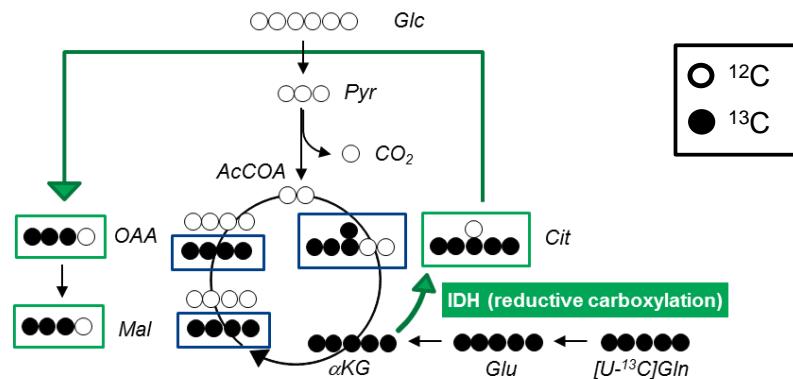
図 3-6 $[U-^{13}\text{C}]$ glutamine 標識条件下での標識条件下での 2 次元培養または 3 次元培養 HCT116 細胞における MDV を説明変数とした主成分分析スコアプロットならびにローディングプロット

3.3.3.2. $[U-^{13}\text{C}]$ glutamine 標識による ^{13}C 標識パターン

3.3.3.1 にて主成分分析の結果から特徴的なフラグメントとして選択された代謝物について、 $[U-^{13}\text{C}]$ glutamine 標識時の ^{13}C 標識パターンを調べた。M+4 citrate ならびに M+4 malate の存在比は、1%，2%ならびに 5%酸素条件下の低酸素 2 次元培養と比較して、通常酸素条件下の 2 次元培養で高い値を示した（図 3-7）。一方、M+5 citrate と M+3 malate は 1%ならび

に 2%酸素条件下の低酸素 2 次元培養で高い値を示した (図 3-7). [^{13}C]glutamine 由来 ^{13}C は glutamate を介して α -ketoglutarate に変換されて TCA サイクルに入った後, 酸化的な TCA サイクル順反応が起こることにより M+4 citrate や M+4 malate が產生される一方, 還元的な IDH 反応が起こることで M+5 citrate や M+3 malate が產生される (図 3-7). したがって, 本結果は低酸素 2 次元培養では IDH の還元反応が亢進していることを示唆しており, 先行研究の知見ともよく一致する (Metallo CM, *et al.*, 2011). また, M+0 citrate ならびに M+0 glutamate の存在比は, 2 次元培養よりも 3 次元培養で大きくなっていること, glutamate 生合成や TCA サイクルへの glutamine 由来炭素の寄与が小さくなっていることを示している (図 3-7).

A)



B)

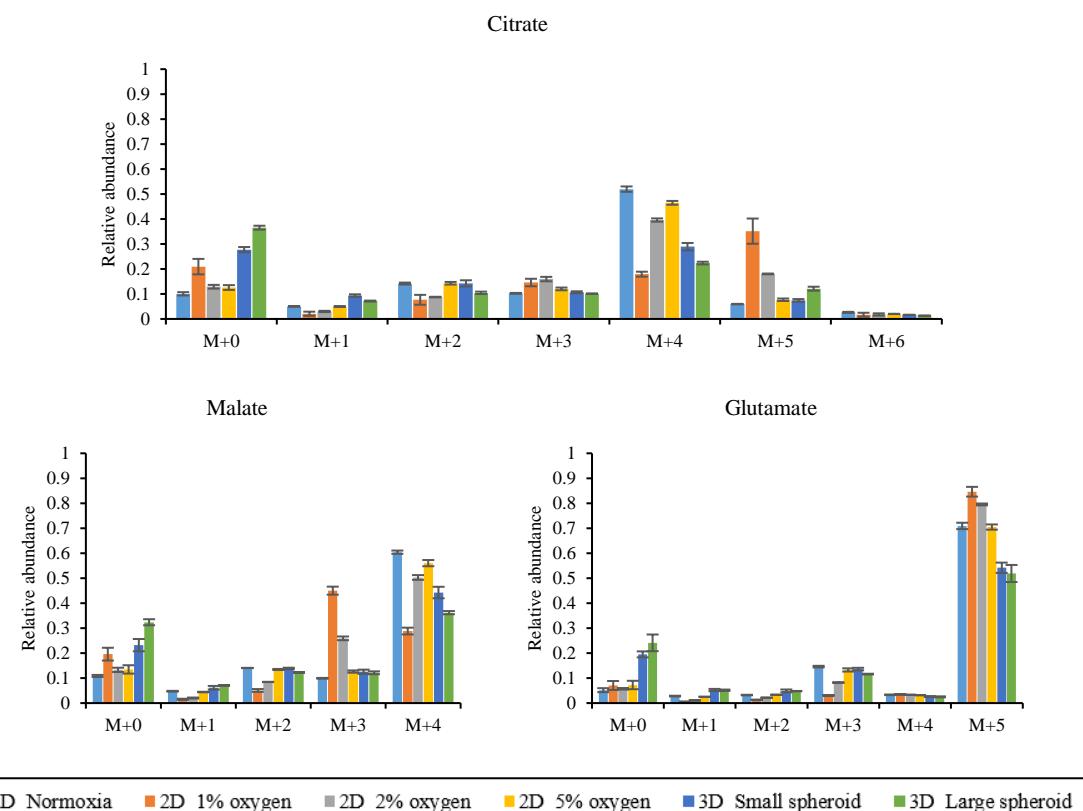


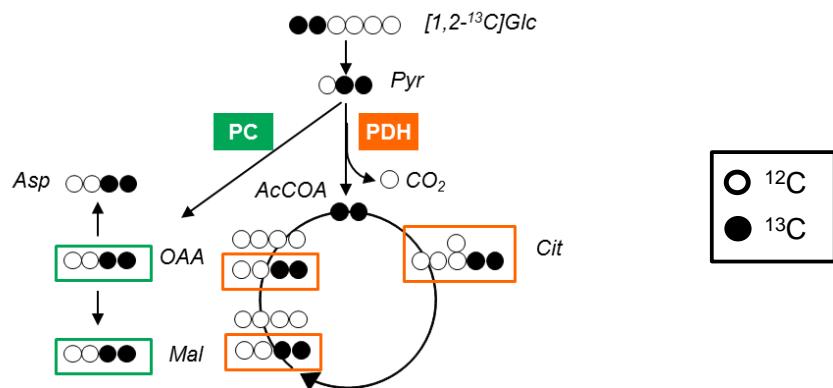
図 3-7 $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glutamine 標識条件下での標識条件下での 2 次元培養または 3 次元培養 HCT116 細胞における ^{13}C 標識パターン

(A) $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glutamine 標識時の炭素の動きを示した模式図. (B) 棒グラフとエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す (n=3).

3.3.3.3. [1,2-¹³C]glucose 標識による ¹³C 標識パターン

3.3.3.1 にて主成分分析の結果から選択された代謝物について、[1,2-¹³C]glucose 標識時の¹³C 標識パターンを調べた。通常酸素条件下での 2 次元培養と比較して、1%ならびに 2%酸素条件下の 2 次元培養で M+0 citrate の存在比が大きく、M+2 citrate の存在比は小さくなっていた（図 3-8）。[1,2-¹³C]glucose 由来 ¹³C は PDH 反応を介して TCA サイクルに流入することで M+2 citrate が産生されるため（図 3-8），M+0 citrate 存在比の増加と M+2 citrate 存在比の減少は glucose 由来炭素の TCA サイクル流入減少を示唆するものである。同様に、3 次元培養での large spheroid でも通常酸素条件下での 2 次元培養と比較して、M+0 citrate の存在比が大きく、M+2 citrate の存在比は小さくなっていた（図 3-8）。3 次元培養での small spheroid では M+2 citrate の存在比は小さくなっていた（図 3-8）。これらの結果は 3 次元培養細胞 spheroid においても glucose 由来炭素の TCA サイクルへの流入減少が生じていることを示唆している。しかしながら、1%ならびに 2%酸素条件下の 2 次元培養における M+2 malate ならびに M+2 aspartate の存在比率は通常酸素条件下での 2 次元培養と比較して減少しているにも関わらず、3 次元培養細胞 spheroid では増加していた（図 3-8）。Glucose 由来炭素の TCA サイクル流入が減少した場合、酸化的な TCA サイクル順反応によって生じる M+2 malate や M+2 aspartate の存在比は減少するはずであるため、3 次元培養細胞 spheroid では補充経路である pyruvate carboxylase (PC) 反応が亢進している可能性が考えられた（図 3-8）。[1,2-¹³C]glucose 標識では PDH および PC 反応のどちらを介しても M+2 malate および M+2 aspartate が生じるため、[1,2-¹³C]glucose 標識による MDV データだけでは PC 反応の TCA サイクルに対する寄与について明確に評価することができない。そこで、[3-¹³C]glucose 標識により、PC 反応の TCA サイクルに対する寄与について検討を行った。

A)



B)

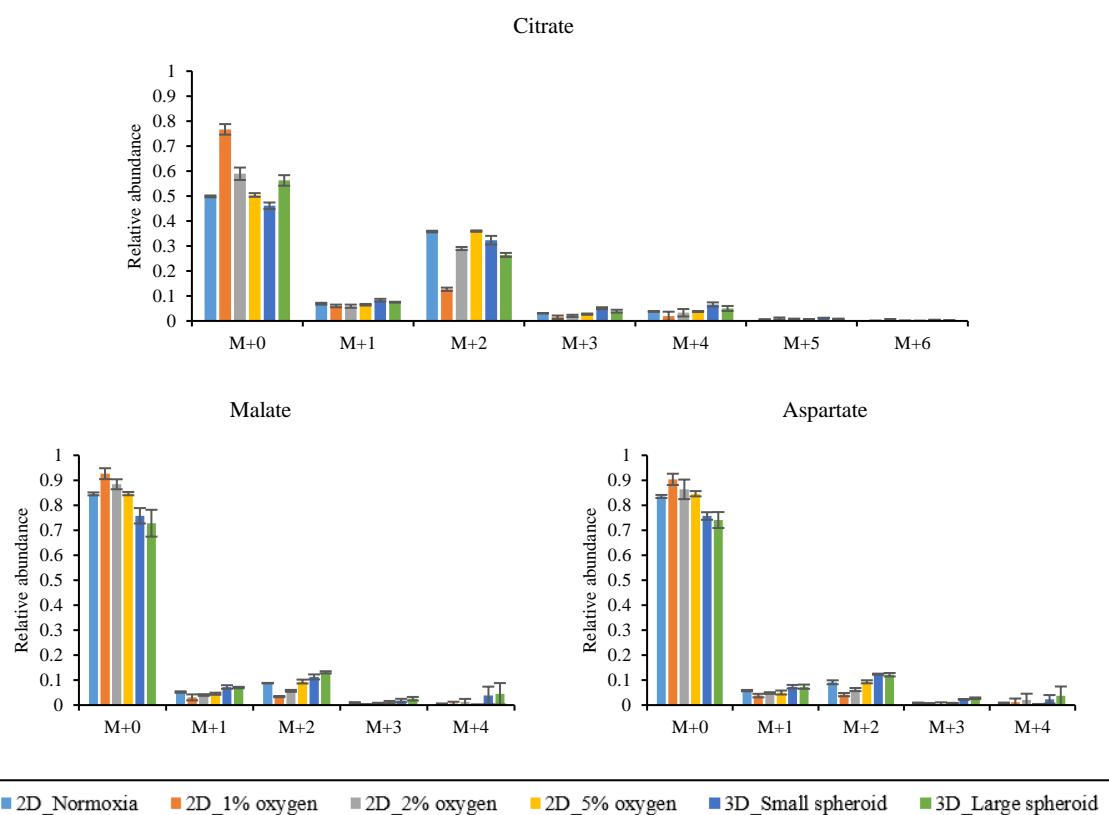


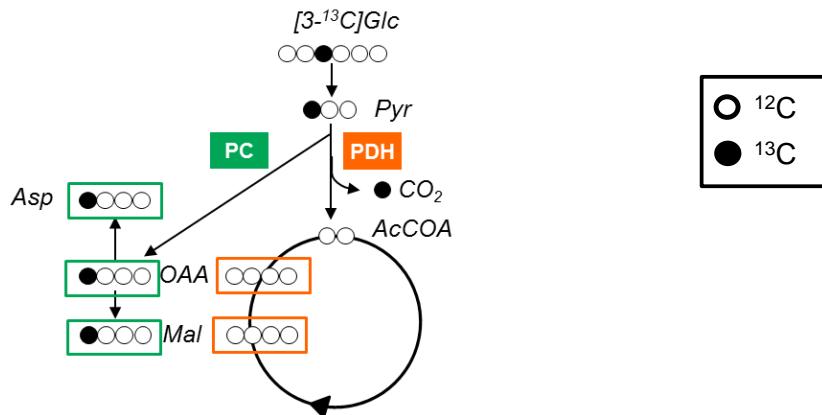
図 3-8 [1,2- ^{13}C]glucose 標識条件下での 2 次元培養または 3 次元培養 HCT116 細胞における ^{13}C 標識パターン

(A) [1,2- ^{13}C]glucose 標識時の炭素の動きを示した模式図. (B) 棒グラフとエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表す (n=3)

3.3.3.4. [3-¹³C]glucose 標識による ¹³C 標識パターン

3 次元培養における PC 反応の TCA サイクルへの寄与における変化を推定するため, HCT116 細胞を[3-¹³C]glucose を用いて標識した. [3-¹³C]glucose 由来の ¹³C は, PDH 反応を介して M+0 oxaloacetate を產生し, PC 反応を介して M+1 oxaloacetate を產生するため, oxaloacetate から合成される malate や aspartate の M+1 アイソトポマーの存在比を調べることで, PC 反応の TCA サイクルへの寄与を見積もることができる (Jang C *et al.*, 2018). 3 次元培養 small spheroid ならびに large spheroid における M+1 malate ならびに M+1 aspartate の存在比率は, 通常酸素条件下での 2 次元培養と比較して有意に増加していた (図 3-9). 一方で, 通常酸素条件下と 1%酸素条件下での 2 次元培養の間には有意差が検出されなかった (図 3-9). これらの結果は, 3 次元細胞 spheroid では 2 次元培養と比較して PC 反応の TCA サイクルへの寄与が大きくなっていることを示唆している.

A)



B)

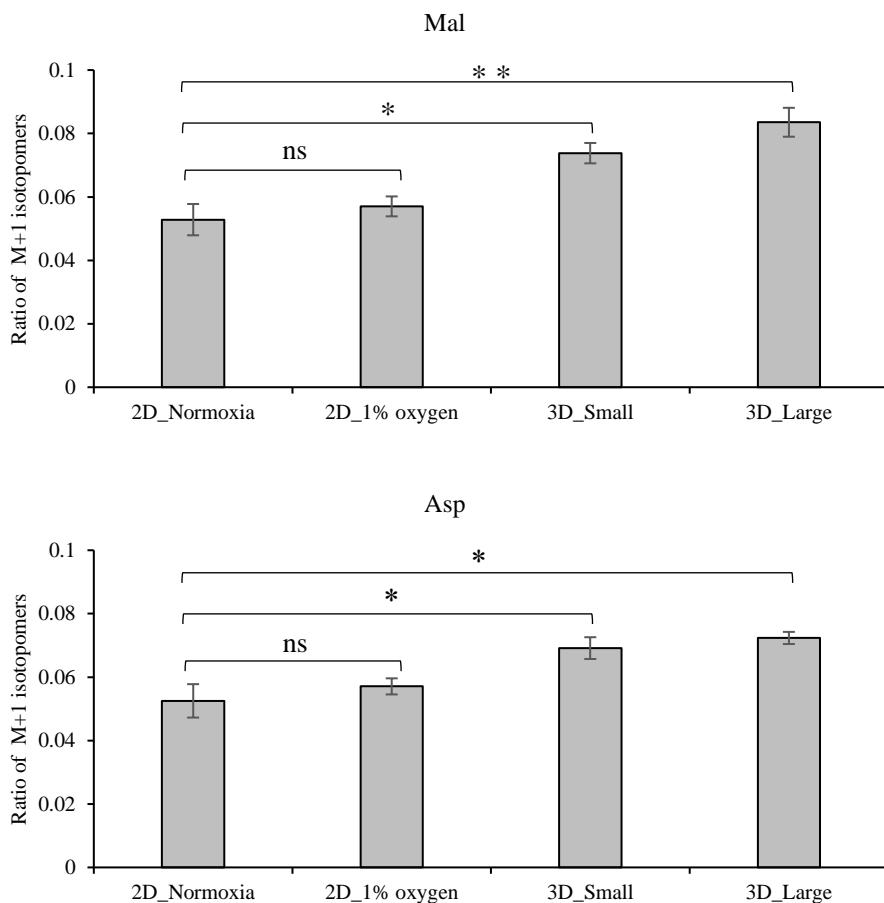


図 3-9 $[3-^{13}\text{C}]$ glucose 標識条件下での 2 次元培養または 3 次元培養 HCT116 細胞における $\text{M}+1$ アイソトポマー存在比

(A) $[3-^{13}\text{C}]$ glucose 標識時の炭素の動きを示した模式図. (B) 棒グラフとエラーバーはそれぞれ平均値と標準誤差を表す ($n=3$). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ns: not significant.

3.3.4. ^{13}C 代謝フラックス解析

3.3.4.1. 比増殖速度ならびに細胞外フラックス算出

2次元ならびに3次元培養したHCT116細胞を用いて ^{13}C 代謝フラックス解析を実施するため、各条件で比増殖速度ならびに、glucose, 有機酸, アミノ酸の取り込みもしくは排出フラックスを決定した。各値は、2回実施した実験（1st batchならびに2nd batch）で算出された値の平均値とした。通常酸素条件下および1%酸素条件下での2次元培養、ならびに3次元培養 small spheroid では、培地交換後48時間まで対数増殖期であり、比増殖度速度はそれぞれ0.034, 0.029, 0.014 h^{-1} であった（図3-10、表3-3）。3次元培養 large spheroid は増殖していないと見なすことができるため、その比増殖速度はsmall spheroidのおよそ1/1000である $1 \times 10^{-5} \text{ h}^{-1}$ と設定した（図3-9、表3-3）。細胞外からの取り込みフラックスはglucose, glutamineならびにaspartateについて算出し、細胞外への排出フラックスはlactate, glutamate, pyruvate, alanineならびにasparagineについて算出した（表3-3）。

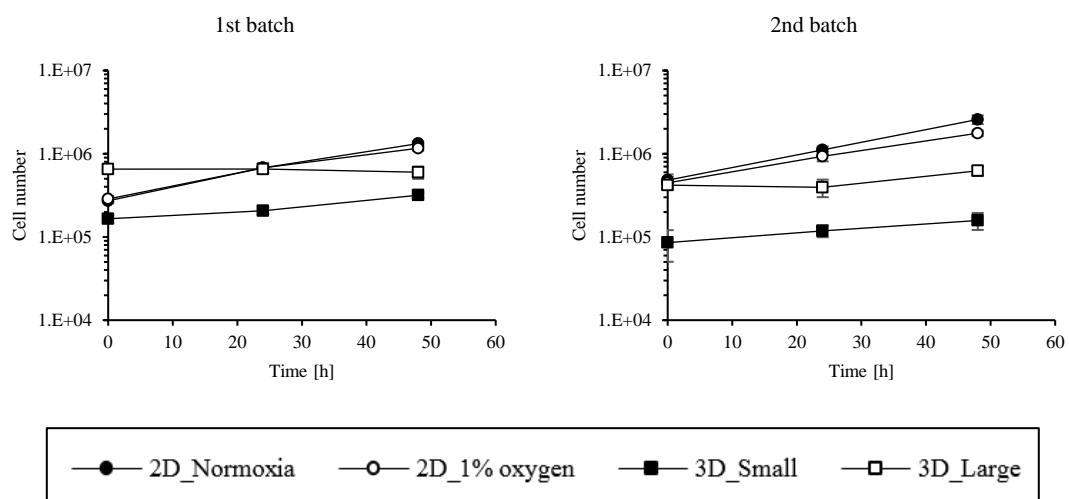


図3-10 2次元培養または3次元培養 HCT116細胞における細胞増殖曲線

データポイントは平均値、エラーバーは標準偏差を表す（n=3）。

表 3-3 2 次元培養または 3 次元培養 HCT116 細胞における比増殖速度および細胞外フラックス算出値

	2D culture		3D culture	
	Normoxia	1% oxygen	Small spheroid	Large spheroid
Specific growth rate [h^{-1}]	0.034	0.029	0.014	0.003*
Consumption rate [$\text{nmol/h/10}^6 \text{ cells}$]				
Glucose	282.1	482.5	628.2	258.7
Glutamine	57.0	38.4	43.5	15.8
Aspartate	-0.1	0.0	0.0	0.0
Secretion rate [$\text{nmol/h/10}^6 \text{ cells}$]				
Lactate	495.0	854.8	444.9	330.8
Glutamate	24.4	20.4	10.0	3.4
Pyruvate	14.4	7.7	19.0	7.6
Alanine	5.4	4.7	5.1	3.6
Asparagine	2.4	1.5	1.1	0.2

比増殖速度および細胞外フラックス値は 2 回繰り返した実験によって算出された平均値を使用した. *Large spheroid は増殖していないと見なし (図 3-9), ^{13}C 代謝フラックス解析時には比増殖速度を $1 \times 10^{-5} \text{ h}^{-1}$ と設定した.

3 次元培養 small spheroid の glucose 取り込みフラックスならびに lactate 排出フラックスは 1st batch と 2nd batch で非常にばらつきが大きかった (図 3-11). さらに, 2nd batch における glucose ならびに glutamine 取り込みフラックスの 95%信頼区間は他の条件と比較して大きかった (図 3-11). 上述のような再現性の低さから, 3 次元培養 small spheroid では信頼性のある細胞外フラックス算出値を得ることが難しいため, 通常酸素条件下および 1%酸素条件下での 2 次元培養, ならびに 3 次元培養 large spheroid の 3 条件に対して ^{13}C 代謝フラックス解析を実施した.

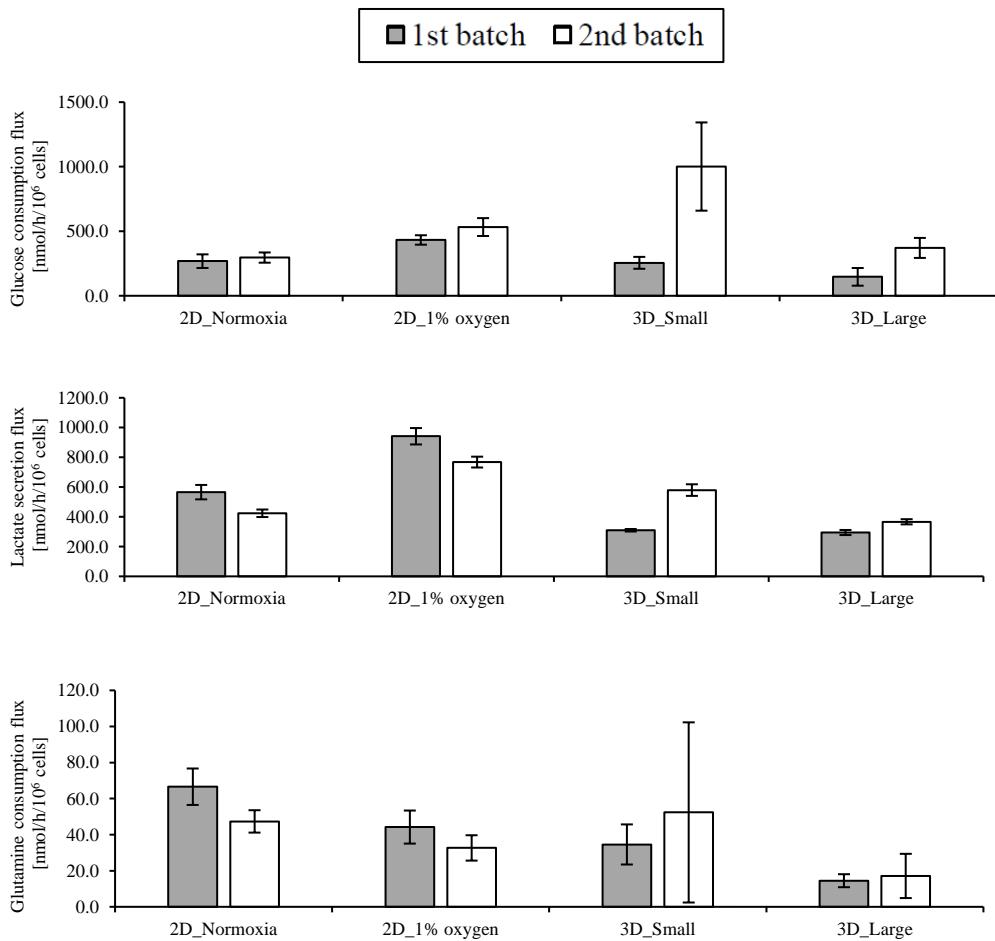


図 3-11 2 次元培養または 3 次元培養 HCT116 細胞における glucose もしくは glutamine 取り込みフラックスおよび lactate 排出フラックス算出値のバッチ間比較
棒グラフは最適値を表し、エラーバーは 95%信頼区間を表す。

3.3.4.2. 代謝フラックス分布の算出

2 次元ならびに 3 次元培養 HCT116 細胞が同位体定常状態であることを確認するため、 $[1,2\text{-}^{13}\text{C}]$ glucose ならびに $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glutamine を添加後 12, 18, 24 時間後に細胞を回収し、各時点での細胞内代謝物の MDV を算出した。 ^{13}C 標識基質添加後 12 時間から 24 時間では、通常酸素条件下および 1% 酸素条件下での 2 次元培養、ならびに 3 次元培養 large spheroid の 3 条件で同位体定常状態にあることが確認された（図 S-3, 図 S-4）。 ^{13}C 代謝フラックス解析には ^{13}C 標識基質添加後 24 時間での MDV を使用し、単一 ^{13}C 炭素源として $[1,2\text{-}^{13}\text{C}]$ glucose, $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glutamine あるいは $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ glucose を使用した標識実験を独立して実施するパラレルラベリング実験にて得られたデータを使用した。実験によって得られた MDV データと代謝モデルのシミュレーションによって算出された MDV をフィッティングすることにより、通常酸素条件下および 1% 酸素条件下での 2 次元培養、ならびに 3 次元培養 large spheroid の各条

件における細胞内代謝フラックス分布を決定した。代謝フラックス値の 95%信頼区間が重なり合わない代謝反応を有意差ありと定義した。実測 MDV データとシミュレーションによる MDV データを図 3-12 に示したが、全ての条件において良好なフィッティング結果が得られた。

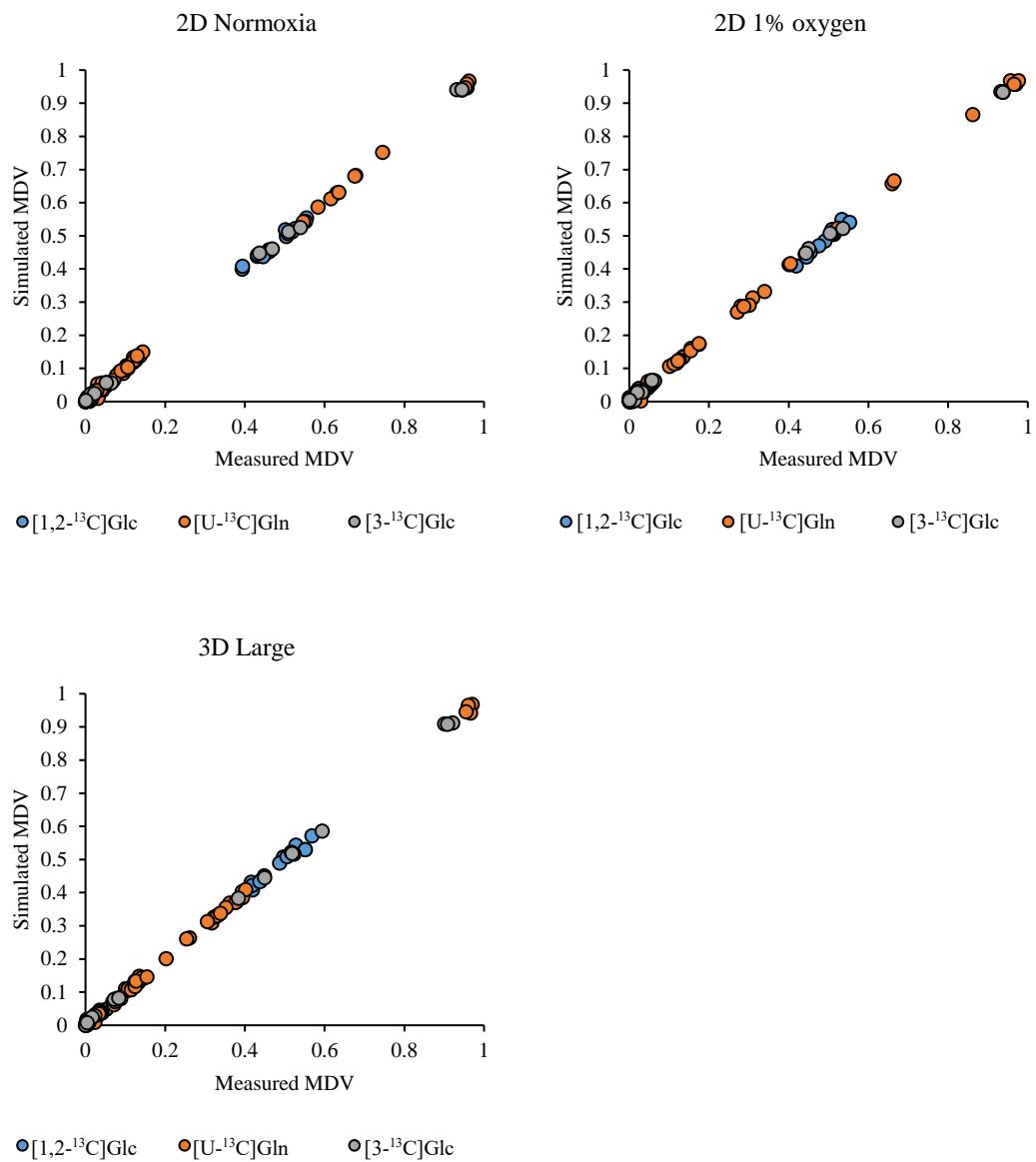


図 3-12 通常酸素および 1% 酸素条件下での 2 次元培養細胞と、3 次元培養 large spheroid における実測 MDV データとシミュレーションによる MDV データのフィッティング結果

1%酸素条件下での 2 次元培養では、通常酸素条件下と比較して glucose 取り込みから lactate 產生までの解糖系フラックスが有意に増加しており、pyruvate のミトコンドリアへの流入を含む TCA サイクルを構成する各代謝反応のフラックスが有意に減少していた（図 3-13）。

還元的な IDH 反応のフラックス値は、通常酸素条件下では $5.6 \text{ nmol/h}/10^6 \text{ cells}$ (95%信頼区間 : $4.4 - 8.9 \text{ nmol/h}/10^6 \text{ cells}$)、1%酸素条件下では $10.2 \text{ nmol/h}/10^6 \text{ cells}$ (95%信頼区間 : $8.4 - 13.3 \text{ nmol/h}/10^6 \text{ cells}$) であり、有意差は検出されなかったが 1%酸素条件下では増加しており、3.3.3.2 で得られた結果と一致する。3 次元培養では、通常酸素条件下と比較して lactate 產生フラックスを除く解糖系フラックス、ならびに IDH 順反応を除く TCA サイクル各代謝反応のフラックスが有意に減少していた（図 3-13）。各条件での嫌気性代謝と好気性代謝の比率として、lactate 產生フラックスを PDH 反応フラックスで除した値を算出したところ、通常酸素条件下の 2 次元培養では 10.6、1%酸素条件下での 2 次元培養では 35.1、3 次元培養では 17.6 であった。

A)

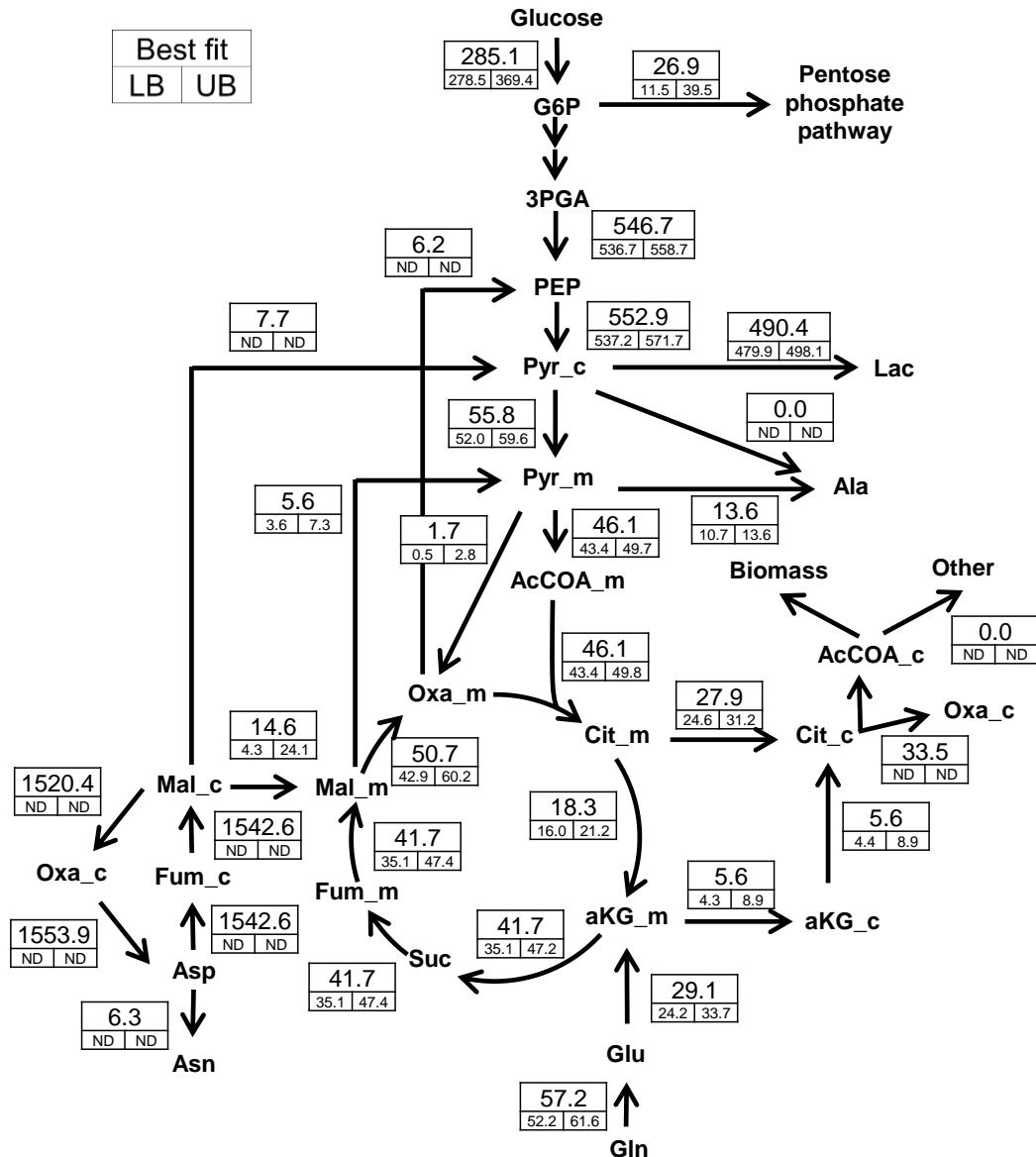


図 3-13 2 次元培養または 3 次元培養 HCT116 細胞における細胞内代謝フラックス分布 (1/3)

(A) 通常酸素条件下での 2 次元培養での代謝フラックス分布. 代謝フラックス値は最適値と 95% 信頼区間の上限値と下限値で表されている. 単位は nmo/h/10⁶ cells. 略称: LB, lower boundary; UB, upper boundary; ND, not determined.

B)

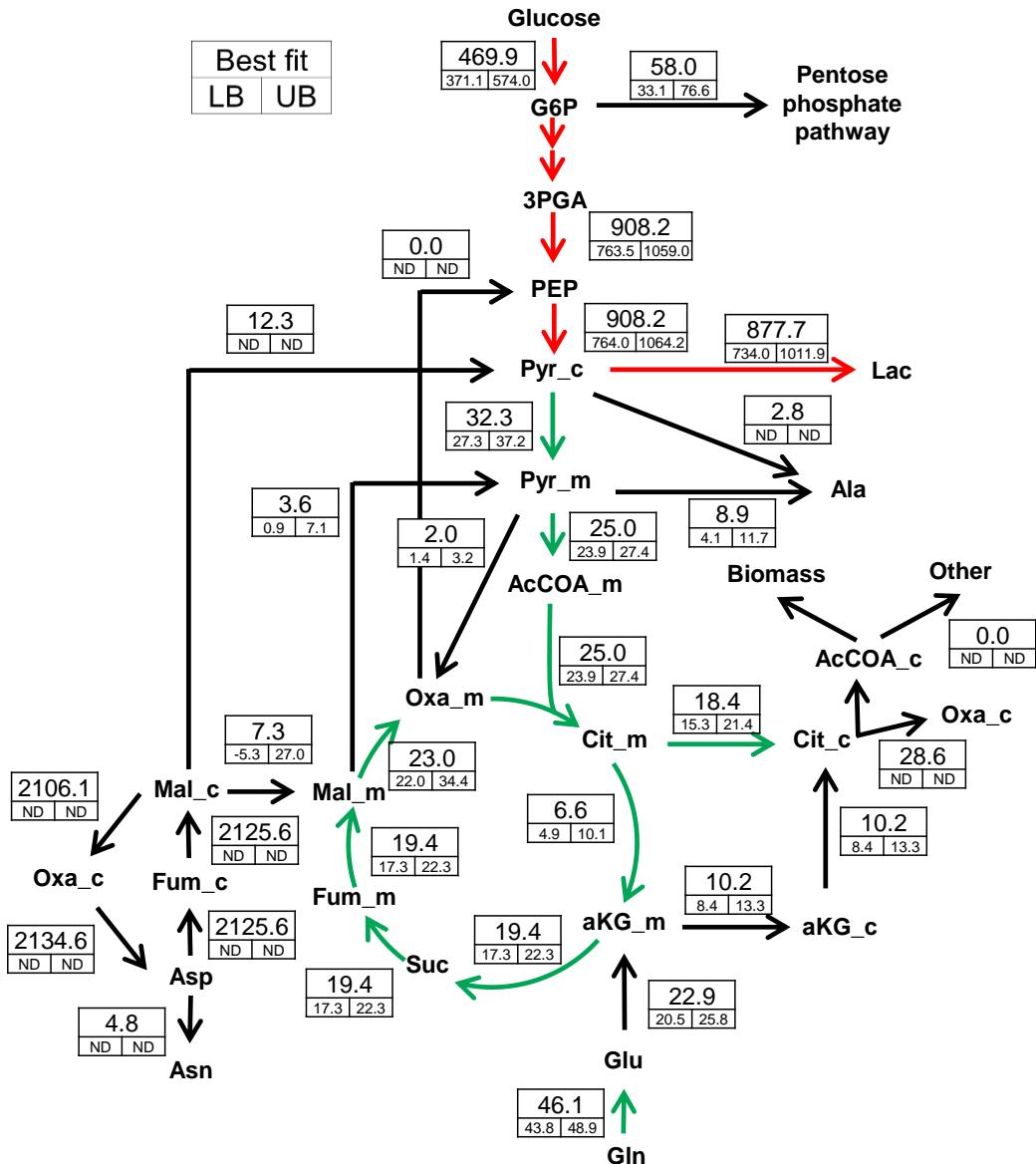


図 3-13 2 次元培養または 3 次元培養 HCT116 細胞における細胞内代謝フラックス分布 (2/3)

(B) 1%酸素条件下での 2 次元培養. 代謝フラックス値は最適値と 95%信頼区間の上限値と下限値で表されている. 単位は $\text{nmo}/\text{h}/10^6 \text{ cells}$. 通常酸素条件下での 2 次元培養細胞と比較して 95%信頼区間が重ならない代謝フラックスを有意差ありと定義した. 緑色と赤色の矢印は, 通常酸素条件下での 2 次元培養細胞と比較して有意に減少または増加した代謝フラックスを意味する. 略称 : LB, lower boundary; UB, upper boundary; ND, not determined.

C)

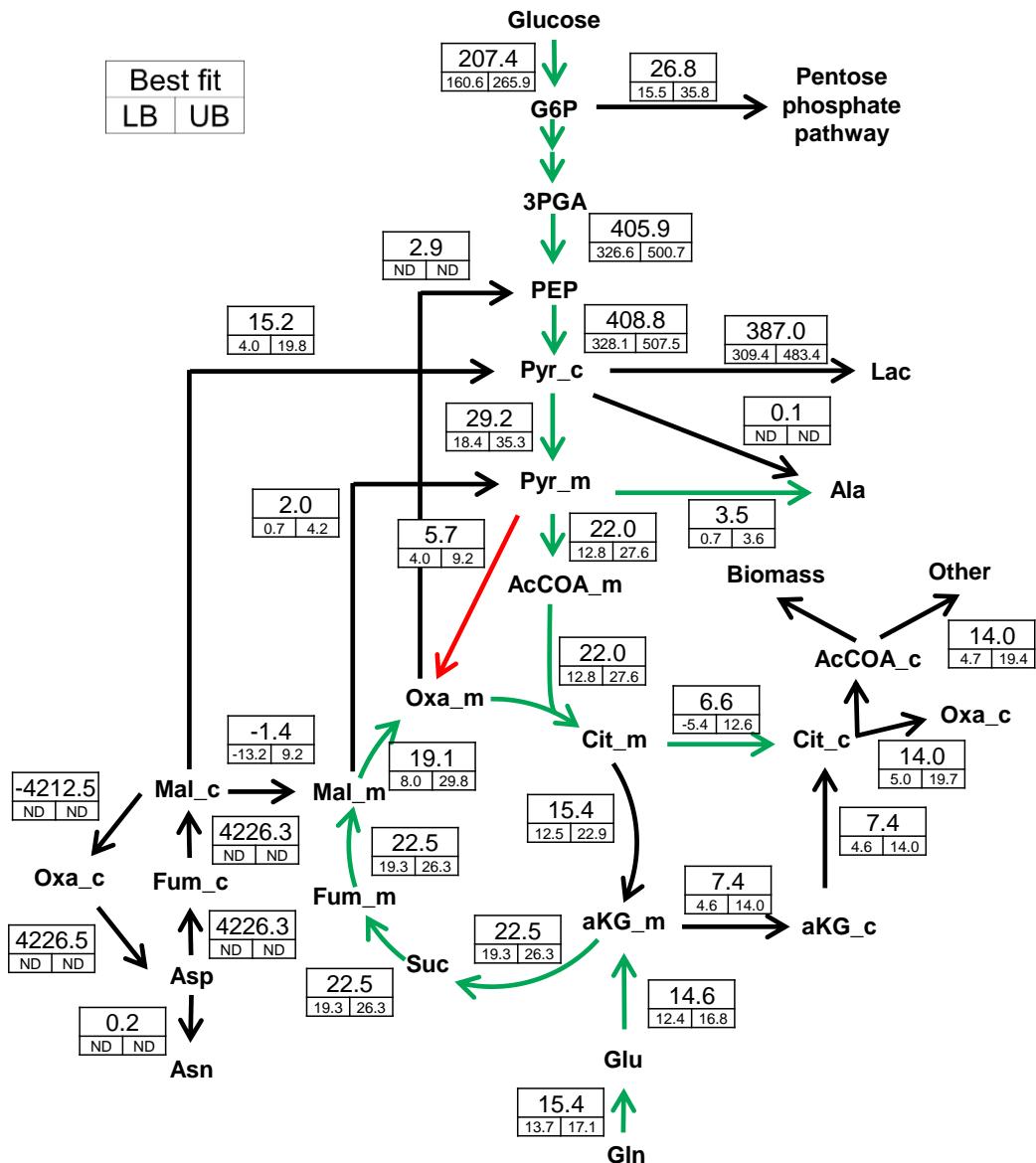


図 3-13 2 次元培養または 3 次元培養 HCT116 細胞における細胞内代謝フラックス分布
(3/3)

(C) 3 次元培養での代謝フラックス分布。代謝フラックス値は最適値と 95% 信頼区間の上限値と下限値で表されている。単位は nmol/h/10⁶ cells。通常酸素条件下での 2 次元培養細胞と比較して 95% 信頼区間が重ならない代謝フラックスを有意差ありと定義した。緑色と赤色の矢印は、通常酸素条件下での 2 次元培養細胞と比較して有意に減少または増加した代謝フラックスを意味する。略称 : LB, lower boundary; UB, upper boundary; ND, not determined.

また、3次元培養では glutamine 代謝フラックスにも変化が見られた。通常酸素条件下の2次元培養と比較して、1%酸素条件下での2次元培養ならびに3次元培養では glutamine から glutamate への変換反応フラックスが有意に減少しており、その減少分はそれぞれ 19%ならびに 73%であり、3次元培養での減少分のほうがより大きかった(図 3-14)。また、glutamate から α -ketoglutarate への変換反応のフラックス値が、通常酸素条件下ならびに 1%酸素条件下での2次元培養と比較して3次元培養でのみ有意に減少した(図 3-14)。つまり、3次元培養では2次元培養と比較して glutamine 代謝が抑制され、glutamate 生合成や TCA サイクルへの glutamine 由来炭素の寄与が小さくなっている、これも 3.3.3.2 で得られた結果と一致する。さらに、PC 反応のフラックス値について、通常酸素条件下ならびに 1%酸素条件下での2次元培養と比較して3次元培養において有意に増加していた(図 3-14)。3.3.3.4 において、3次元培養では PC 反応の TCA サイクルへの寄与の増加が示されたが、PC 反応フラックス値自体が増加していることがここでは示された。

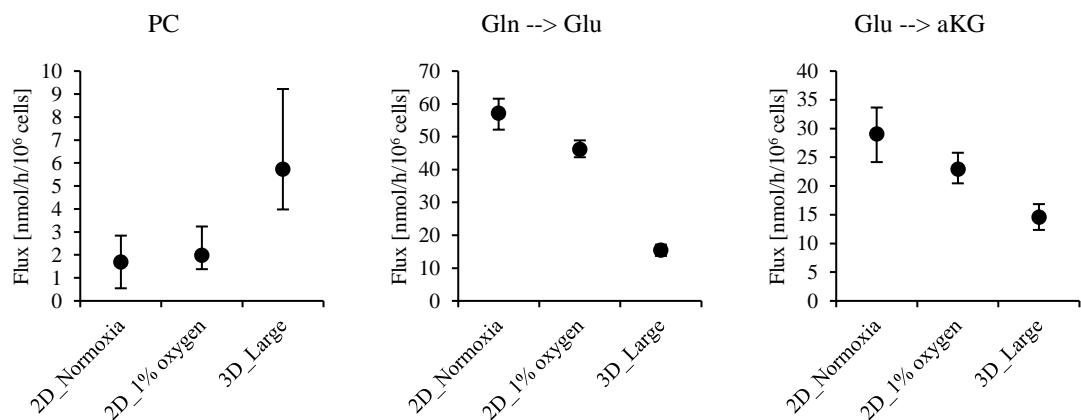


図 3-14 2次元培養または3次元培養 HCT116 細胞における各種代謝フラックス値の比較
データポイントは最適値を表し、エラーバーは 95% 信頼区間を表す。

3.3.5. PC タンパク質発現解析

3.3.4.2 で述べられたように、¹³C 代謝フラックス解析の結果、2 次元培養と比較して 3 次元培養では PC フラックスが有意に増加していた。HCT116 細胞を用いて PC タンパク質をウェスタンブロッティングによって検出したところ、通常酸素条件下ならびに 1%酸素条件下での 2 次元培養と比較して、3 次元培養 small spheroid ならびに large spheroid の PC タンパク質発現レベルは高かった（図 3-15）。さらに、HCT116 細胞以外の A549 や HT-1080 細胞についても同様に、3 次元培養 small spheroid ならびに large spheroid の PC タンパク質発現レベルは高くなっていた（図 3-15）。したがって、3 次元培養細胞における PC 反応フラックスの増加は、PC タンパク質発現レベルの増加に起因していることが示唆され、¹³C 代謝フラックス解析を実施した HCT116 細胞以外でも起こる現象であることが分かった。

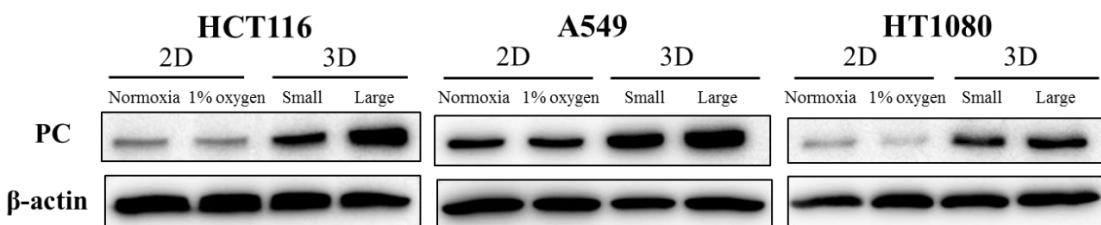


図 3-15 2 次元培養または 3 次元培養下での細胞内 PC タンパク質発現

3.3.6. CB-839 に対する感受性変化

PC は解糖系から TCA サイクルへの重要な補充反応であり、細胞内での glutamine 代謝を抑制することでがん細胞の増殖を阻害する glutaminase 阻害剤 CB-839 への抵抗性に関与していると報告されている（Andrew LM *et al.*, 2015 ; Singleton DC *et al.*, 2020）。3 次元培養により PC フラックスが増加し、glutamine 代謝フラックスが低下していることから、3 次元培養細胞 spheroid は 2 次元培養細胞と比較して CB-839 への感受性が低下しているのではないかと考えられた。通常酸素ならびに 1%酸素条件下での 2 次元培養細胞と、3 次元培養 small spheroid ならびに large spheroid における CB-839 への感受性を評価したところ、3 次元培養での両 spheroid のほうが、通常酸素ならびに 1%酸素条件下での 2 次元培養細胞よりも CB-839 に対して低い感受性を示した（図 3-16、表 3-4）。

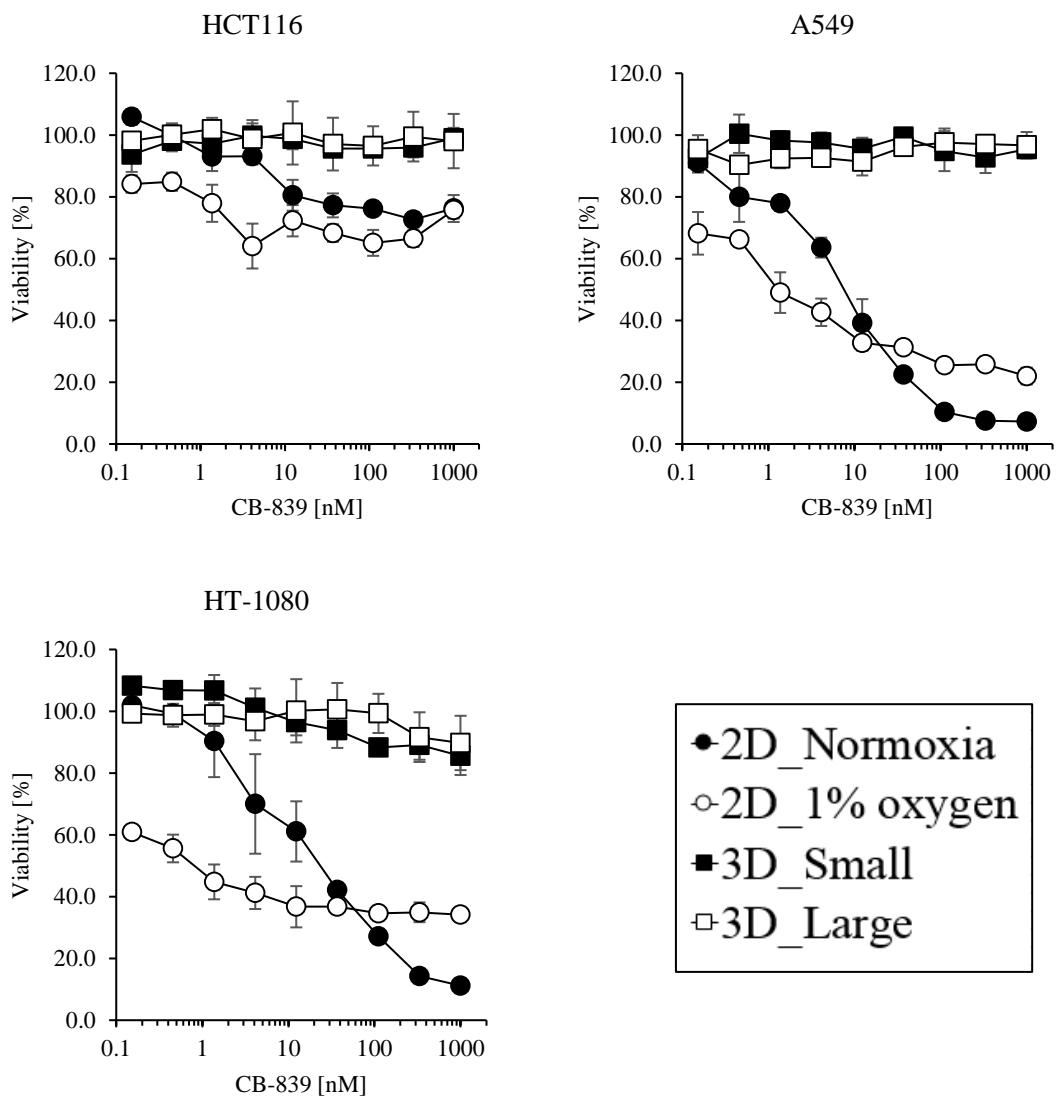


図 3-16 CB-839 による細胞増殖阻害効果.

データポイントは平均値, エラーバーは標準偏差を表す (n=3).

表 3-4 CB-839 における IC_{50} 値および IC_{20} 値

Cell	Conditions	IC_{50} [nM]	IC_{20} [nM]
HCT116	2D_Normoxia	>1000	14.7
	2D_1% oxygen	>1000	1
	3D_Small	>1000	>1000
	3D_Large	>1000	>1000
A549	2D_Normoxia	7.6	0.5
	2D_1% oxygen	1.3	<0.2
	3D_Small	>1000	>1000
	3D_Large	>1000	>1000
HT-1080	2D_Normoxia	23.5	2.4
	2D_1% oxygen	0.8	<0.2
	3D_Small	>1000	>1000
	3D_Large	>1000	>1000

図 3-16 で示された結果より算出した.

3.4. 考察

3次元培養による細胞 spheroid は生体内での腫瘍を模倣する微小環境を形成することができるため、一般的に用いられている 2 次元培養細胞よりも *in vivo* 腫瘍に近い細胞モデルであると考えられている。3次元培養 spheroid では周縁部からの距離が増加することで酸素や栄養の供給量が減少するため、spheroid 作成時の播種細胞数を増やして spheroid の内径を大きくすることにより、増殖能の高い細胞の割合が減少すると考えられる（図 3-2）また、spheroid 作成時の播種細胞数が増えることで細胞密度が高まることに起因する接触阻害も細胞 spheroid の増殖に影響すると考えられる（Jagiella N *et al.*, 2016）。

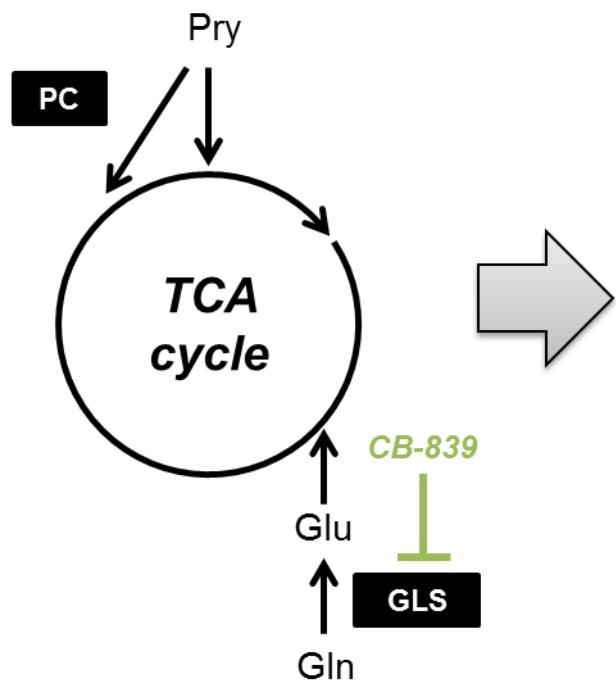
本研究では細胞内 ^{13}C 標識パターン解析ならびに ^{13}C 代謝フラックス解析により、3次元培養細胞 spheroid では、一般的に用いられている 2 次元培養での低酸素環境下とは異なる代謝状態を有することが本研究によって示された（図 3-5, 図 3-6, 図 3-14）。腫瘍での酸素濃度はおよそ 2%以下であり、正常な組織においても 5%程度の酸素濃度が維持されることから（McKeown SR, 2014），5%酸素濃度条件は正常な生理的低酸素状態であるために通常酸素濃度（およそ 20-21%）と類似した代謝状態を有すると考えられる（図 3-5, 図 3-6）。3次元培養細胞 spheroid は微小環境形成により周縁部からの距離によって酸素濃度が異なるため、通常酸素状態もしくは低酸素状態のがん細胞が混ざり合った状態と考えることができる（図 3-3, 図 3-4）。MDV を説明変数とした主成分分析によるスコアプロット上で、2次元培養では酸素濃度に応じて線形的にプロットされていたのに対して、3次元培養では異なる位置にプロットされていたことから（図 3-5, 図 3-6），3次元培養細胞 spheroid で検出された代謝フラックス変化は酸素濃度が異なる細胞の代謝状態の単純な重ね合わせではなく、腫瘍微小環境形成に起因するものであると考えられる。

2次元培養での低酸素状態による代謝フラックス変化はこれまで報告されているが（Metallo CM *et al.* 2011），3次元培養細胞 spheroid との比較結果は本研究で初めて報告される。2次元培養では、低酸素環境下で解糖系が亢進し、TCA サイクルでの酸化的代謝が抑制されることはよく知られており（Metallo CM *et al.* 2011 ; Wise DR *et al.* 2011），本研究においても確認された（図 3-13）。一方、低酸素条件下での 2 次元培養とは異なり、3 次元培養では解糖系は亢進していなかった（図 3-12）。3 次元培養細胞 spheroid では細胞増殖の低下によってバイオマス合成に必要な炭素量が減少していたと考えられるため（図 3-10, 表 3-3），主要炭素源である glucose 由来の解糖系を亢進させる必要は無いと考えられる。3 次元培養細胞 spheroid では解糖系フラックスの亢進は見られなかったが、好気性代謝と比較して嫌気性代謝の比率が増加しており、低酸素環境の影響を受けていると考えられる。3 次元培養細胞 spheroid に関するこれらの結果については、先行研究でも同様の結果が報告がされている（Jiang L *et al.*, 2016 ; Kim BJ *et al.*, 2007）。通常酸素ならびに低酸素条件下における 2 次元培養細胞と比較して、3 次元培養細胞 spheroid で特徴的に変化していたのは、PC フラックスの増加と glutamine 代謝フラックスの減少であった。（図 3-14）。PC フラックスは glucose 由来の炭素を TCA サイクルへ供給する補充経路であるため、3 次元培養細胞 spheroid では

glutamine 代謝が抑制されて TCA サイクルへの炭素供給が減少するが、その減少を補填する形で、PC 酵素発現量の増加により glucose 由来の炭素を TCA サイクルへと供給するメカニズムが存在すると考えられる。これは腫瘍微小環下でのがん細胞における PC フラックスへの依存性が増加している可能性を示唆するものである。つまり、腫瘍微小環境中のがん細胞に対する PC フラックスの抑制が有効な治療戦略となり得ることが示唆された。肺がんモデルマウス中の腫瘍でも、2 次元培養時と比較して glutamine 代謝が低下し、PC や PDH を介した glucose の TCA サイクルへの寄与が増加することが報告されている (Davidson SM *et al.*, 2016)。さらに、肺がん患者の腫瘍検体では正常組織と比較して PC 活性が増加することが報告されている (Sellers K *et al.*, 2015)。つまり、3 次元培養細胞 spheroid で確認された代謝フラックス変化は、生体内での腫瘍での代謝状態により類似した性質であることを示しており、3 次元培養は 2 次元培養と比較してより *in vivo* 腫瘍を模倣したモデルであるということが代謝的な観点からも示唆される。一般的に薬剤候補化合物による細胞増殖阻害試験は 2 次元培養を用いて実施されることが多いが、本研究での知見は 3 次元培養での化合物評価の重要性を支持している。また、本研究で明らかとなった 3 次元培養での代謝フラックス変化は、低酸素状態だけでなく微小環境形成に起因するものであると考えられたが、その詳細な要因については今後さらなる検討が必要である。接触阻害を受ける増殖静止状態の線維芽細胞では増殖状態と比較して、PC 反応による補充経路フラックスが亢進することが報告されているため (Lemons JM *et al.*, 2010)、3 次元培養細胞 spheroid における細胞間相互作用が代謝フラックス変化を引き起こしている可能性も考えられる。

3 次元培養細胞 spheroid における CB-839 の感受性低下については乳がん細胞株でも確認されているが (Singleton DC *et al.*, 2020)、glutamine 代謝フラックスや PC フラックスの変化が感受性低下メカニズムの要因のひとつである可能性を示したのは本研究が初めてである。本研究では、細胞 spheroid 周縁部からの距離によって酸素濃度が異なる細胞集団全体から抽出した ¹³C 標識データを使用しているため、得られた代謝フラックス分布はそうした細胞集団全体 (バルク) の代謝フラックスの平均であると考えられる。3 次元培養による CB-839 に対する感受性低下がバルク細胞 spheroid で検出されていることを考慮すると、PC フラックスの増加や glutamine 代謝フラックスの減少といった 3 次元培養における特異的な代謝フラックス変化は、細胞 spheroid 内の少数の細胞集団ではなく、大部分の細胞集団で生じていると推定される。また、イメージング技術を用いて細胞 spheroid 切片の酸素濃度情報や ¹³C 標識パターン、酵素発現量の分布情報を得ることができれば、代謝フラックス変化が生じている細胞集団を正確に同定することができ、CB-839 感受性変化に関してさらに詳細な知見を得ることが可能になると期待できる。

2次元培養



3次元培養

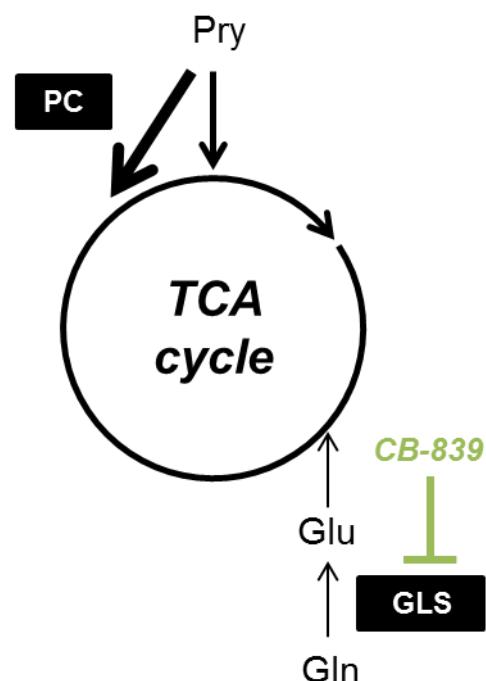


図 3-17 3 次元培養下でのがん細胞における代謝フラックス変化の模式図

略称 : Pyr, pyruvate; Glu, glutamate; Gln, glutamine; PC, pyruvate carboxylase; GLS, glutaminase.

3.5. 小括

がん細胞の低酸素下での代謝状態を理解することはがん病態の理解や治療戦略の構築に重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、3次元培養細胞 spheroid モデルに ^{13}C 代謝フラックス解析を適用することにより、腫瘍微小環境形成による代謝フラックス変化を明らかにした。これまで2次元培養下での低酸素応答による代謝フラックス変化についての報告はあったが、3次元培養での腫瘍微小環境下での代謝フラックス変化との違いを示したのは本研究が初めてである。がん細胞株を丸底タイプの超低吸着 96 ウェルプレートに播種することにより細胞 spheroid を形成し、内部が低酸素となる腫瘍様の微小環境の形成を確認した。 ^{13}C 標識実験から得られた MDV を説明変数とした主成分分析の結果、3次元培養下での腫瘍微小環境形成による代謝変化は、2次元培養における低酸素による代謝変化とは異なることが示された。 ^{13}C 代謝フラックス解析の結果、PC フラックスの増加と glutamine 代謝フラックスの減少が 3次元培養による特異的な代謝フラックス変化であることが判明した。PC は glucose 由来の炭素を TCA サイクルへ供給する補充経路であり、glutamine 代謝フラックスの減少を補填するように亢進しているため、腫瘍微小環境中のがん細胞に対する PC フラックスの抑制が有効な治療戦略となる可能性が示唆された。先行研究において動物モデルを用いた腫瘍でも同等の代謝変化を起こすことが報告されており、一般的な2次元培養と比較して3次元培養による細胞 spheroid モデルがより生体内の腫瘍と近い代謝状態を示すことが本研究により明らかとなった。また、3次元培養下での PC フラックスの増加と glutamine 代謝フラックスの減少は glutaminase 阻害剤 CB-839 に対して感受性が低下することを示唆しており、3次元培養下では2次元培養下と比較して CB-839 に対するがん細胞株への感受性が低下することを確認した。

本検討では、 ^{13}C 代謝フラックス解析を適用することで、3次元培養により亢進あるいは抑制される代謝経路を同定し、細胞の増殖や生存における glutaminase への依存性の変化を示した。したがって、腫瘍微小環境下での代謝解析における、 ^{13}C 代謝フラックス解析法の適用可能性が示された。

第4章 総括

4.1. 結果のまとめ

本論文では、がんの発症や病態の進行に関わる因子として遺伝子変異ならびに腫瘍微小環境の形成に焦点を当てて研究を進めてきた。がん細胞は遺伝子変異のような内的要因や微小環境形成のような外的要因に適応するべく代謝変化を起こすため、そうした因子の影響を受けて亢進あるいは抑制される代謝反応を同定し、細胞の増殖や生存との関係を明らかにすることで、がん代謝を標的とした治療薬の開発に貢献することが可能であることが期待される。本研究では代謝の本質である単位細胞あたりの細胞内代謝反応速度である代謝フラックスに着目し、*in vitro* 細胞モデルに ^{13}C 代謝フラックス解析を適用することで、FH 酵素活性低下や、3 次元培養下での腫瘍微小環境形成による代謝フラックス変化を明らかにした。さらに、得られた代謝フラックス変化と細胞の増殖や生存との関係について検証した。

第2章では、がんの発症と関連が報告されている FH 遺伝子変異に着目し、FH 酵素活性低下による代謝フラックス変化を明らかにするため、CRISPR-Cas9 システムを用いて FH 酵素活性が低下した FH^{dim} 細胞とその親株細胞とのアイソジエニックな細胞株ペアを作製し、当該細胞株に ^{13}C 代謝フラックス解析を適用した。FH 活性低下により、pyruvate のミトコンドリア流入フラックスの減少に起因して、FH を含む TCA サイクルを構成する各代謝反応のフラックスが有意に減少した。 FH^{dim} 細胞では TCA サイクルの抑制に起因して、NADH ならびに ATP 産生フラックスが減少した。これらの結果は FH^{dim} 細胞において ATP 産生がより解糖系依存的になっていることを示唆しており、実験的に証明した。また、 FH^{dim} 細胞において ATP 合成阻害剤である oligomycin に対する感受性の低下を確認した。さらに、酸化還元状態の変化に起因すると考えられる glutamine 由来の proline 合成フラックスの減少も示されており、FH 活性低下による代謝変化としては新規の知見が得られた。さらに、FH 活性低下により arginine 由来の proline 合成フラックスが増加していたことから、arginine からの proline 合成代謝の抑制が新たな治療薬の標的となる可能性が示唆された。以上の結果より、FH 活性低下により亢進あるいは抑制される代謝経路を同定し、細胞内エネルギー産生における代謝経路への依存性の変化を示すことができたため、遺伝子変異による代謝変化の解析における ^{13}C 代謝フラックス解析の適用可能性が示された。

第3章では、大腸がん由来細胞株 HCT116 細胞を用いて、一般的な2次元平面培養における通常酸素および低酸素条件下と、3次元 spheroid 培養条件下で代謝フラックスを比較した。細胞内代謝物の ^{13}C 標識割合を説明変数とした主成分分析により、3次元培養細胞 spheroid は通常酸素ならびに低酸素条件下での2次元培養細胞とは異なる代謝状態を有することが示された。代謝フラックス分布を決定したところ、3次元培養において glutamine 代謝フラックスの減少と、酵素発現増加による PC フラックスの増加が示され、glutamine 代謝の低下を補填するために glucose 由来の補充経路が亢進するメカニズムの存在が推察された。また、先行研究の知見と併せた考察より、2次元培養と比較して 3次元培養による細胞

spheroid モデルがより生体内の腫瘍と近い代謝状態であることが示唆された。さらに、得られた代謝フラックス変化の結果から、glutaminase 阻害剤である CB-839 の感受性が 3 次元培養において低下することを確認した。つまり、3 次元培養下での腫瘍微小環境の形成による PC フラックスの増加と glutamine 代謝フラックスの減少が、CB-839 感受性低下の一因である可能性を示唆した。以上の結果より、3 次元培養下で亢進あるいは抑制される代謝経路を同定し、細胞の増殖や生存における glutaminase への依存性の変化を示すことができたため、腫瘍微小環境下での代謝解析における、¹³C 代謝フラックス解析法の適用可能性が示された。

4.2. がん創薬研究における本研究の寄与

ミトコンドリア内における OxPHOS によるエネルギー産生はがん治療薬における有望なターゲットのひとつであると考えられており、OxPHOS 阻害剤である低分子化合物 IACS-010759 が臨床試験の段階に入っている (Molina JR *et al.* 2018)。本研究では代謝フラックス解析により、FH^{dim} 細胞では細胞内 ATP 産生における TCA サイクルへの依存度が低下し、oligomycin による OxPHOS 阻害に対する感受性が低下することが示されたため、FH 活性低下がん細胞に対して OxPHOS 阻害が有望な治療戦略とはならないことが示唆された。さらに、FH^{dim} 細胞では細胞内 ATP 産生における解糖系への依存度が増加していることが示されたため、FH 活性低下がん細胞に対して解糖系を抑制することが有効な治療戦略のひとつであることが示唆された。FH 活性低下によって glutamine 由来の proline 合成フラックスが減少し、arginine 由来の合成フラックスが増加していることから、arginine から proline への合成フラックスを抑制することも新たな治療戦略となる可能性が示唆された。このように、本研究によって明らかとなった FH 活性低下による代謝フラックス変化によって、FH 活性低下がん細胞の治療戦略構築に資する知見が得られた。

低酸素下でのがん細胞における代謝変化の解析は 2 次元平面培養での実験により解析されることが多く、生体内での腫瘍が有する腫瘍微小環境が無視されているため、実際の生体内での腫瘍の代謝状態を反映できているのか不明であった。本研究では代謝フラックス解析により、低酸素腫瘍微小環境を形成する 3 次元培養 spheroid 細胞モデルにおいて glutamine 代謝フラックスの減少と PC フラックスの増加を示し、動物モデルでの *in vivo* 腫瘍を用いた先行研究結果を合わせて考察することで、*in vitro* での 3 次元培養細胞 spheroid が *in vivo* 腫瘍と類似した代謝変化が起きていることを示唆した。がん代謝研究で代謝解析を実施する場合や、製薬企業などでがん治療薬候補化合物の探索を *in vitro* で実施する場合には 2 次元平面培養を用いて実施されることが多い。本研究では *in vivo* 腫瘍との代謝的類似点が検出され、より生体内の腫瘍の状態を模倣することのできる 3 次元培養を用いることの重要性が示された。さらに、得られた代謝フラックス変化から、glutaminase 阻害剤である CB-839 の感受性が 3 次元培養下で低下することを明らかにした。PC フラックスは glucose 由来の炭素を TCA サイクルへ供給する補充経路の役割を果たすため、glutamine 代謝フラックスの減少を補填する形で PC フラックスが亢進していると考えられる。つまり、腫瘍微小環境の

形成により増殖や生存に対する PC フラックスへの依存性が増加している可能性が示唆され、腫瘍微小環境中のがん細胞に対する PC フラックスの抑制が有効な治療戦略となる可能性が示唆された。このように、本研究によって明らかとなった腫瘍微小環境形成による代謝フラックス変化によって、生体内の腫瘍微小環境中のがん代謝研究における 3 次元培養の重要性に関する知見と共に、腫瘍微小環境中のがん細胞に対する治療戦略構築に資する知見が得られた。

本研究での知見を受けた今後の展開としては、解糖系や arginine からの proline 代謝、PC を標的とした創薬研究が考えられる。例えば、解糖系は正常細胞でも機能する代謝経路であるため、がん細胞で選択的に薬効を発揮できる標的因子を同定する必要がある。さらに、解糖系は代謝経路を構成する酵素以外にも種々の転写因子やトランスポーター、microRNA などによって制御されているため (Yu L *et al.* 2016 ; Singh PK *et al.* 2011)， 薬剤の標的となる因子を同定するためには、網羅的な遺伝子発現やタンパク質発現データを統合して解析し、生体内分子間の相互作用を明確にすることが有用であると考えられる (Yugi K *et al.* 2016 ; de Anda-Jáuregui G *et al.* 2020)。また、arginine から proline の合成反応についても、arginase, ornithine aminotransferase, pyrroline-5-carboxylate reductase といった 3 種類の酵素反応を介するため (Albaugh VL *et al.* 2017)，どの代謝反応が最も効果的に薬効を発揮できる標的であるかを同定する必要がある。そうした場合には、RNA 干渉による酵素発現抑制や CRISPR-Cas9 法による酵素発現欠損により酵素発現を減少させ、細胞の増殖や生存への影響を評価することが効果的であると考えられる。PC についても同様に、その酵素発現を低下させることによる腫瘍微小環境下での細胞の増殖や生存への影響を評価することで、PC フラックスへの増殖や生存に対する依存性を調べることができる。PC 酵素発現低下による細胞の増殖や生存の低下を確認することができれば、PC が腫瘍微小環境中のがん細胞に対する有望な標的となることが期待される。

4.3. がん創薬研究における ^{13}C 代謝フラックス解析法の適用可能性

本研究では *in vitro* 実験系を構築し、 ^{13}C 代謝フラックス解析を適応することでがん細胞での特徴的な代謝状態を解析した。そして、遺伝子変異に起因する代謝酵素活性変化や、微小環境形成といった因子による代謝フラックス変化と細胞の増殖や生存との関係を検証することができた。本研究で用いた方法論は、がん創薬研究における他の解析対象に拡大することが可能であると考えられる。

薬物治療後のがん細胞の中には、薬剤耐性によって生き残るがん細胞が存在し、その中には遺伝子変異が生じることで薬剤耐性を獲得する細胞が存在する。例えば、大腸がんにおける抗 EGFR 抗体薬を用いた治療においては、KRAS 遺伝子変異が薬剤耐性獲得と関係していることが報告されている (Misale S *et al.* 2012)。このような薬剤耐性に関わる遺伝子変異をがん細胞株に導入して *in vitro* 実験系を構築し、 ^{13}C 代謝フラックス変化を適用することで、薬剤耐性に関わる代謝適応メカニズムの解明が可能になると考えられる。そして、薬剤

耐性がん細胞を対象とした治療薬開発に資する知見を獲得できると期待される。

本研究では、一般的な *in vitro* 実験で用いられているように不死化した細胞株を使用して、3次元培養下での ¹³C 代謝フラックス解析の有効性を示した。がん患者由来の腫瘍組織から採材された初代培養がん細胞は、腫瘍内微小環境を含む生体内の状態を維持するために3次元培養を用いられることが多い (Mitra A *et al.* 2013 ; Lee JM *et al.* 2013)，こうした初代培養がん細胞への ¹³C 代謝フラックス解析の適応拡大が期待される。腫瘍の取得や、腫瘍分散法および細胞培養の条件検討といった課題はあるが、*in vitro* 実験系を構築し、¹³C 代謝フラックス解析を適用することができれば、臨床での薬剤応答結果と代謝フラックス分布を患者ごとに比較することで、薬剤の感受性や抵抗性に関わる代謝経路を発見し、より有効な治療薬の開発に資する知見を獲得できると期待される。

本研究では、がん細胞の増殖や生存を抑制するための治療薬開発という観点で、がん細胞における代謝フラックス変化を解析したが、これらは同一組織中に存在した場合のがん細胞における代謝変化を想定している。がんは原発巣で発生した後に周囲の組織へ浸潤し、他の組織へ転移することで病態の悪性度が高まるが、原発巣と転移巣の組織は栄養状態や酸素濃度といった環境が異なるために転移先ではさらに代謝変化が生じると考えられる。実際に、マウス乳がんモデル細胞にて、原発腫瘍とは異なり肺転移腫瘍では PC 酵素発現が腫瘍増殖に必要となることが報告されており (Shinde A *et al.* 2018)，同じがん細胞でも異なる臓器中では増殖や生存における代謝経路への依存性が変化すると考えられる。また、転移巣のがん細胞は、原発巣では検出されない遺伝子変異を獲得することも報告されており、原発巣と転移巣でのがん細胞の性質の違いに寄与していると考えられる (Aljohani HM *et al.* 2018)。こうした原発巣と転移巣での代謝フラックスの違いを明らかにするためには、ヒト由来がん細胞株を免疫不全マウスへ移植し、目的の臓器へ転移した細胞を回収することで高転移性がん細胞株を作成することが必要だと考えられる (Minn AJ *et al.* 2005 ; Munoz R *et al.* 2006)。取得できた高転移性がん細胞株と元のがん細胞株に対して、*in vitro* 実験系にて ¹³C 代謝フラックス解析を適用することにより、転移巣で亢進または抑制される代謝経路を同定することができ、さらに転移巣での細胞の増殖や生存における代謝経路の依存性が明らかとなれば、転移により病態が進行したがんに対しても有効な治療薬の開発に貢献できると期待される。

上述の解析対象とは異なり、本研究で用いた方法論では適用できない対象も存在する。近年注目を集めるがん免疫療法は、1.1 節でも述べたように薬剤によって生体内の免疫細胞が、がん細胞を攻撃できるようにする治療法である。そのため、がん細胞と免疫細胞といった複数細胞種の代謝状態を考慮する必要がある。がん免疫における代謝解析の重要性は先行研究で明らかとなっている。例えば、がん細胞を攻撃する免疫細胞は主に T 細胞であるが、活性化されると増殖能が高まり、バイオマス構成成分やエネルギー産生を満たすために解糖系を亢進させる (Zhang L *et al.* 2018)。また、腫瘍微小環境下ではがん細胞の産生する lactate により T 細胞の活性が抑制されると考えられており (Schwörer S *et al.* 2018)，がん細胞と免

疫細胞間での代謝物交換が示唆される。したがって、がん細胞と免疫細胞の共培養条件下で、それぞれの代謝フラックス分布を明らかにすれば、がん免疫の活性化状態を制御する因子の発見につながる可能性がある。そのためには、本研究で用いた単一細胞種に対しての¹³C代謝フラックス解析を、複数細胞種へと拡張する必要がある。先行研究では大腸菌を用いた共培養下で、異なる株の代謝フラックス分布を決定する手法が報告されている (Gebreselassie NA *et al.* 2015)。この手法を基に、がん細胞と免疫細胞の共培養系において各細胞種の細胞数比を新たな変数として追加し、代謝物交換が行われる代謝物について細胞間での交換反応フラックスを追加して¹³C代謝フラックス解析を実施することで、それぞれの細胞種ごとのフラックス分布を取得することが可能になると期待される。

第1章で述べたように、がんの発症や進展に伴って亢進あるいは抑制を受ける代謝経路を明らかにし、細胞の増殖や生存との関係を検証することができれば、代謝を標的としたがん治療薬の開発に貢献できると考えられる。本研究においては、特に遺伝子変異に起因する代謝酵素活性の変化ならびに腫瘍微小環境の形成に伴う代謝変化に焦点を当て、*in vitro* モデル実験系を構築し、¹³C代謝フラックス解析を適用した。がん細胞の解析の方法には、図3-1に示したように *in vitro* および *in vivo* での各種モデルが用いられているが、*in vivo* 担癌動物を用いて¹³C代謝フラックス解析を行うには、図3-1に示した技術的なハードルをクリアする必要がある。しかし、本研究で示されたように2次元培養における代謝変化や、より動物モデルに近い3次元培養に¹³C代謝フラックス解析が適用され、治療薬開発につながると期待される知見が得られたことは意義が大きいと考える。本研究で示した代謝解析手法が本節で述べられたような対象へと適用拡大され、がん免疫療法のような近年急速な発展を見せる領域についても適用可能な技術の開発が進むことによって、がん創薬研究が進展し、がんのアンメットメディカルニーズが充足されることを期待する。

参考文献

- 厚生労働省.”令和元年(2019)人口動態統計月報年計（概数）の概況 結果の概要”. 厚生労働省. <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai19/dl/kekka.pdf>
- Adam J, Yang M, Bauerschmidt C, et al. A role for cytosolic fumarate hydratase in urea cycle metabolism and renal neoplasia. *Cell Rep.* 2013;3(5):1440-1448.
- Ahn WS, Antoniewicz MR. Parallel labeling experiments with [1,2-(13)C]glucose and [U-(13)C]glutamine provide new insights into CHO cell metabolism. *Metab Eng.* 2013;15:34-47.
- Akins NS, Nielson TC, Le HV. Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer. *Curr Top Med Chem.* 2018;18(6):494-504.
- Albaugh VL, Mukherjee K, Barbul A. Proline Precursors and Collagen Synthesis: Biochemical Challenges of Nutrient Supplementation and Wound Healing. *J Nutr.* 2017;147(11):2011-2017.
- Aljohani HM, Aittaleb M, Furgason JM, et al. Genetic mutations associated with lung cancer metastasis to the brain. *Mutagenesis.* 2018;33(2):137-145.
- Andrew L MacKinnon, Mark Bennett, Matt Gross, Julie Janes, Weiqin Li, Mirna Rodriquez, Tracy Wang, Winter Zhang, Francesco Parlati; Metabolomic, Proteomic and Genomic Profiling Identifies Biomarkers of Sensitivity to Glutaminase Inhibitor CB-839 in Multiple Myeloma. *Blood* 2015; 126 (23): 1802.
- Antoniewicz MR, Kelleher JK, Stephanopoulos G. Determination of confidence intervals of metabolic fluxes estimated from stable isotope measurements. *Metab Eng.* 2006;8(4):324-337.
- Araki, C., Okahashi, N., Maeda, K., Shimizu, H. & Matsuda, F. Mass spectrometry-based method to study inhibitor-induced metabolic redirection in the central metabolism of cancer cells. *Mass Spectrom. (Tokyo)* 7(1), A0067 (2018).
- Armenta JM, Cortes DF, Pisciotta JM, et al. Sensitive and rapid method for amino acid quantitation in malaria biological samples using AccQ.Tag ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-MS/MS with multiple reaction monitoring. *Anal Chem.* 2010;82(2):548-558.
- Astuti D, Latif F, Dallol A, et al. Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma . *Am J Hum Genet.* 2001;69(1):49-54.
- Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science.* 2000;287(5454):848-851.
- Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(3):180-192.
- Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 1996;56(5):941-943.

- Burnichon N, Brière JJ, Libé R, et al. SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet*. 2010;19(15):3011-3020.
- Cascón A, Comino-Méndez I, Currás-Freixes M, et al. Whole-exome sequencing identifies MDH2 as a new familial paraganglioma gene. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(5):djv053.
- Dagenais GR, Leong DP, Rangarajan S, et al. Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10226):785-794.
- Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med*. 2010;16(9):387-397.
- Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274):739-744.
- Davidson SM, Papagiannakopoulos T, Olenchock BA, et al. Environment Impacts the Metabolic Dependencies of Ras-Driven Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Metab*. 2016;23(3):517-528.
- de Anda-Jáuregui G, Hernández-Lemus E. Computational Oncology in the Multi-Omics Era: State of the Art. *Front Oncol*. 2020;10:423.
- De Ingeniis J, Ratnikov B, Richardson AD, et al. Functional specialization in proline biosynthesis of melanoma. *PLoS One*. 2012;7(9):e45190.
- Dietmair S, Hodson MP, Quek LE, Timmins NE, Gray P, Nielsen LK. A multi-omics analysis of recombinant protein production in Hek293 cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e43394.
- Dik E, Naamati A, Asraf H, Lehming N, Pines O. Human Fumarate Hydratase Is Dual Localized by an Alternative Transcription Initiation Mechanism. *Traffic*. 2016;17(7):720-732.
- Frezza C, Zheng L, Folger O, et al. Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase. *Nature*. 2011;477(7363):225-228.
- Fyles A, Milosevic M, Hedley D, et al. Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(3):680-687.
- Galli F, Aguilera JV, Palermo B, Markovic SN, Nisticò P, Signore A. Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era of immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):89.
- Gebreselassie NA, Antoniewicz MR. (13)C-metabolic flux analysis of co-cultures: A novel approach. *Metab Eng*. 2015;31:132-139.
- Glacken MW, Adema E, Sinskey AJ. Mathematical descriptions of hybridoma culture kinetics: I. Initial metabolic rates. *Biotechnol Bioeng*. 1988;32(4):491-506.
- Gonçalves E, Sciacovelli M, Costa ASH, et al. Post-translational regulation of metabolism in fumarate hydratase deficient cancer cells. *Metab Eng*. 2018;45:149-157.

- Grassian AR, Parker SJ, Davidson SM, et al. IDH1 mutations alter citric acid cycle metabolism and increase dependence on oxidative mitochondrial metabolism. *Cancer Res.* 2014;74(12):3317-3331.
- Henry O, Jolicœur M, Kamen A. Unraveling the metabolism of HEK-293 cells using lactate isotopomer analysis. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2011;34(3):263-273.
- Hinkle PC. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1706(1-2):1-11.
- Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, et al. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996;56(19):4509-4515.
- Hollinshead KER, Munford H, Eales KL, et al. Oncogenic IDH1 Mutations Promote Enhanced Proline Synthesis through PYCR1 to Support the Maintenance of Mitochondrial Redox Homeostasis. *Cell Rep.* 2018;22(12):3107-3114.
- Hsu JL, Hung MC. The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;35(4):575-588.
- Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, et al. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell.* 2005;8(2):143-153.
- Jagiella N, Müller B, Müller M, Vignon-Clementel IE, Drasdo D. Inferring Growth Control Mechanisms in Growing Multi-cellular Spheroids of NSCLC Cells from Spatial-Temporal Image Data. *PLoS Comput Biol.* 2016;12(2):e1004412.
- Jang C, Chen L, Rabinowitz JD. Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell.* 2018;173(4):822-837.
- Jiang L, Shestov AA, Swain P, et al. Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature.* 2016;532(7598):255-258.
- Jóźwiak P, Forma E, Bryś M, Krześlak A. O-GlcNAcylation and Metabolic Reprograming in Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:145.
- Kajihata S, Furusawa C, Matsuda F, Shimizu H. OpenMebius: an open source software for isotopically nonstationary ¹³C-based metabolic flux analysis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:627014.
- Kalkat M, De Melo J, Hickman KA, et al. MYC Deregulation in Primary Human Cancers. *Genes (Basel).* 2017;8(6):151.
- Kaye SB. New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *Br J Cancer.* 1998;78 Suppl 3(Suppl 3):1-7.
- Keibler MA, Wasylewko TM, Kelleher JK, Iliopoulos O, Vander Heiden MG, Stephanopoulos G. Metabolic requirements for cancer cell proliferation. *Cancer Metab.* 2016;4:16.

- Kim BJ, Forbes NS. Flux analysis shows that hypoxia-inducible-factor-1-alpha minimally affects intracellular metabolism in tumor spheroids. *Biotechnol Bioeng*. 2007;96(6):1167-1182.
- Koivunen P, Hirsilä M, Remes AM, Hassinen IE, Kivirikko KI, Myllyharju J. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem*. 2007;282(7):4524-4532.
- Lee JM, Mhawech-Fauceglia P, Lee N, et al. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Lab Invest*. 2013;93(5):528-542.
- Lee P, Chandel NS, Simon MC. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(5):268-283.
- Lemons JM, Feng XJ, Bennett BD, et al. Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity. *PLoS Biol*. 2010;8(10):e1000514.
- Linehan WM, Vasselli J, Srinivasan R, et al. Genetic basis of cancer of the kidney: disease-specific approaches to therapy. *Clin Cancer Res*. 2004;10(18 Pt 2):6282S-9S.
- Lu D, Mulder H, Zhao P, et al. ¹³C NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):2708-2713.
- Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett*. 2015;356(2 Pt A):156-164.
- Maeda K, Okahashi N, Toya Y, Matsuda F, Shimizu H. Investigation of useful carbon tracers for ¹³C-metabolic flux analysis of *Escherichia coli* by considering five experimentally determined flux distributions. *Metab Eng Commun*. 2016;3:187-195.
- Markman B, Atzori F, Pérez-García J, Tabernero J, Baselga J. Status of PI3K inhibition and biomarker development in cancer therapeutics. *Ann Oncol*. 2010;21(4):683-691.
- McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol*. 2014;87(1035):20130676.
- Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*. 2011;481(7381):380-384.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005;436(7050):518-524.
- Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012;486(7404):532-536.
- Mitra A, Mishra L, Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol*. 2013;31(6):347-354.
- Molina JR, Sun Y, Protopopova M, et al. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med*. 2018;24(7):1036-1046.

- Mookerjee SA, Goncalves RLS, Gerencser AA, Nicholls DG, Brand MD. The contributions of respiration and glycolysis to extracellular acid production. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1847(2):171-181.
- Muir A, Danai LV, Vander Heiden MG. Microenvironmental regulation of cancer cell metabolism: implications for experimental design and translational studies. *Dis Model Mech*. 2018;11(8):dmm035758.
- Muller M, Ferlicot S, Guillaud-Bataille M, et al. Reassessing the clinical spectrum associated with hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma syndrome in French FH mutation carriers. *Clin Genet*. 2017;92(6):606-615.
- Munoz R, Man S, Shaked Y, et al. Highly efficacious nontoxic preclinical treatment for advanced metastatic breast cancer using combination oral UFT-cyclophosphamide metronomic chemotherapy. *Cancer Res*. 2006;66(7):3386-3391.
- Niemann S, Müller U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet*. 2000;26(3):268-270.
- Noguchi Y, Young JD, Aleman JO, Hansen ME, Kelleher JK, Stephanopoulos G. Effect of anaplerotic fluxes and amino acid availability on hepatic lipoapoptosis. *J Biol Chem*. 2009;284(48):33425-33436.
- Noman MZ, Hasmim M, Messai Y, et al. Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;309(9):C569-C579.
- Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol*. 1996;41(1):31-39.
- Nunes AS, Barros AS, Costa EC, et al. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnol Bioeng*. 2019;116(1):206-226.
- O'Flaherty L, Adam J, Heather LC, et al. Dysregulation of hypoxia pathways in fumarate hydratase-deficient cells is independent of defective mitochondrial metabolism. *Hum Mol Genet*. 2010;19(19):3844-3851.
- Okahashi N, Kohno S, Kitajima S, Matsuda F, Takahashi C, Shimizu H. Metabolic characterization of cultured mammalian cells by mass balance analysis, tracer labeling experiments and computer-aided simulations. *J Biosci Bioeng*. 2015;120(6):725-731.
- Ozturk SS, Palsson BO. Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, pH, and serum concentration. *Biotechnol Prog*. 1990;6(2):121-128.
- Phang JM, Liu W, Hancock CN, Fischer JW. Proline metabolism and cancer: emerging links to glutamine and collagen. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015;18(1):71-77.
- Quek LE, Dietmair S, Krömer JO, Nielsen LK. Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metab Eng*. 2010;12(2):161-171.

- Rankin EB, Nam JM, Giaccia AJ. Hypoxia: Signaling the Metastatic Cascade. *Trends Cancer*. 2016;2(6):295-304.
- Riffle S, Pandey RN, Albert M, et al. Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer*. 2017;17(1):338.
- Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(3):174-186.
- Sant S, Johnston PA. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discov Today Technol*. 2017;23:27-36.
- Sborov DW, Haverkos BM, Harris PJ. Investigational cancer drugs targeting cell metabolism in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24(1):79-94.
- Schmidt C, Sciacovelli M, Frezza C. Fumarate hydratase in cancer: A multifaceted tumour suppressor. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;98:15-25.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-675.
- Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature*. 2012;491(7424):364-373.
- Schwörer S, Vardhana SA, Thompson CB. Cancer Metabolism Drives a Stromal Regenerative Response. *Cell Metab*. 2019;29(3):576-591.
- Sellers K, Fox MP, Bousamra M 2nd, et al. Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation. *J Clin Invest*. 2015;125(2):687-698.
- Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20(1):51-56.
- Shinde A, Wilmanski T, Chen H, Teegarden D, Wendt MK. Pyruvate carboxylase supports the pulmonary tropism of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2018;20(1):76.
- Singh PK, Mehla K, Hollingsworth MA, Johnson KR. Regulation of Aerobic Glycolysis by microRNAs in Cancer. *Mol Cell Pharmacol*. 2011;3(3):125-134.
- Singleton DC, Dechaume AL, Murray PM, Katt WP, Baguley BC, Leung EY. Pyruvate anaplerosis is a mechanism of resistance to pharmacological glutaminase inhibition in triple-receptor negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2020;20(1):470.
- Sudarshan S, Pinto PA, Neckers L, Linehan WM. Mechanisms of disease: hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer--a distinct form of hereditary kidney cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 2007;4(2):104-110.
- Sudarshan S, Sourbier C, Kong HS, et al. Fumarate hydratase deficiency in renal cancer induces glycolytic addiction and hypoxia-inducible transcription factor 1alpha stabilization by glucose-dependent generation of reactive oxygen species. *Mol Cell Biol*. 2009;29(15):4080-4090.

- Takahashi M. Cancer survivorship: current status of research, care, and policy in Japan. *Jpn J Clin Oncol.* 2016;46(7):599-604.
- Takashima A, Faller DV. Targeting the RAS oncogene. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17(5):507-531.
- Teicher BA. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 1994;13(2):139-168.
- Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet.* 2002;30(4):406-410.
- Toro JR, Nickerson ML, Wei MH, et al. Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. *Am J Hum Genet.* 2003;73(1):95-106.
- Tyrakis PA, Yurkovich ME, Sciacovelli M, et al. Fumarate Hydratase Loss Causes Combined Respiratory Chain Defects. *Cell Rep.* 2017;21(4):1036-1047.
- van Winden WA, Wittmann C, Heinze E, Heijnen JJ. Correcting mass isotopomer distributions for naturally occurring isotopes. *Biotechnol Bioeng.* 2002;80(4):477-479.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-314.
- Wise DR, Ward PS, Shay JE, et al. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(49):19611-19616.
- Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell.* 2011;19(1):17-30.
- Yamaguchi H, Chang SS, Hsu JL, Hung MC. Signaling cross-talk in the resistance to HER family receptor targeted therapy. *Oncogene.* 2014;33(9):1073-1081.
- Yang M, Soga T, Pollard PJ, Adam J. The emerging role of fumarate as an oncometabolite. *Front Oncol.* 2012;2:85.
- Yang Y, Lane AN, Ricketts CJ, et al. Metabolic reprogramming for producing energy and reducing power in fumarate hydratase null cells from hereditary leiomyomatosis renal cell carcinoma. *PLoS One.* 2013;8(8):e72179.
- Yang Y, Valera VA, Padilla-Nash HM, et al. UOK 262 cell line, fumarate hydratase deficient (FH-/FH-) hereditary leiomyomatosis renal cell carcinoma: in vitro and in vivo model of an aberrant energy metabolic pathway in human cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;196(1):45-55.
- Yoge O, Naamati A, Pines O. Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions. *FEBS J.* 2011;278(22):4230-4242.
- Yoo HC, Yu YC, Sung Y, Han JM. Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp Mol Med.* 2020;52(9):1496-1516.

- Yu L, Chen X, Wang L, Chen S. The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget*. 2016;7(25):38908-38926.
- Yugi K, Kubota H, Hatano A, Kuroda S. Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple 'Omic' Layers. *Trends Biotechnol*. 2016;34(4):276-290.
- Zaytseva YY, Rychahou PG, Le AT, et al. Preclinical evaluation of novel fatty acid synthase inhibitors in primary colorectal cancer cells and a patient-derived xenograft model of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018;9(37):24787-24800.
- Zhang L, Romero P. Metabolic Control of CD8+ T Cell Fate Decisions and Antitumor Immunity. *Trends Mol Med*. 2018;24(1):30-48.
- Zheng L, Cardaci S, Jerby L, et al. Fumarate induces redox-dependent senescence by modifying glutathione metabolism. *Nat Commun*. 2015;6:6001.
- Zheng L, MacKenzie ED, Karim SA, et al. Reversed argininosuccinate lyase activity in fumarate hydratase-deficient cancer cells. *Cancer Metab*. 2013;1(1):12.

謝辞

本研究を遂行し、学位論文を作成するにあたり、格別なるご指導とご高配を賜りました大阪大学大学院情報科学研究科 清水浩教授に謹んで深謝の意を表します。

本論文の審査において、貴重なご指導とご助言を賜りました大阪大学大学院情報科学研究科 松田史生教授、松田秀雄教授、岡橋伸幸准教授に謹んで深謝の意を表します。

本研究の進捗などについて、ご指導およびご助言を賜りました大阪大学大学院情報科学研究科 前田太郎教授、若宮直紀教授に謹んで深謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、代謝フラックス解析についてご助言いただきながら、学位論文の方向性についても貴重なご意見をいただいた大阪大学大学院情報科学研究科 戸谷吉博准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、研究室内や研究科内での報告会にて貴重なご意見をいただきました大阪大学大学院情報科学研究科 二井手哲平助教ならびに豊島正和特任助教に心より感謝申し上げます。

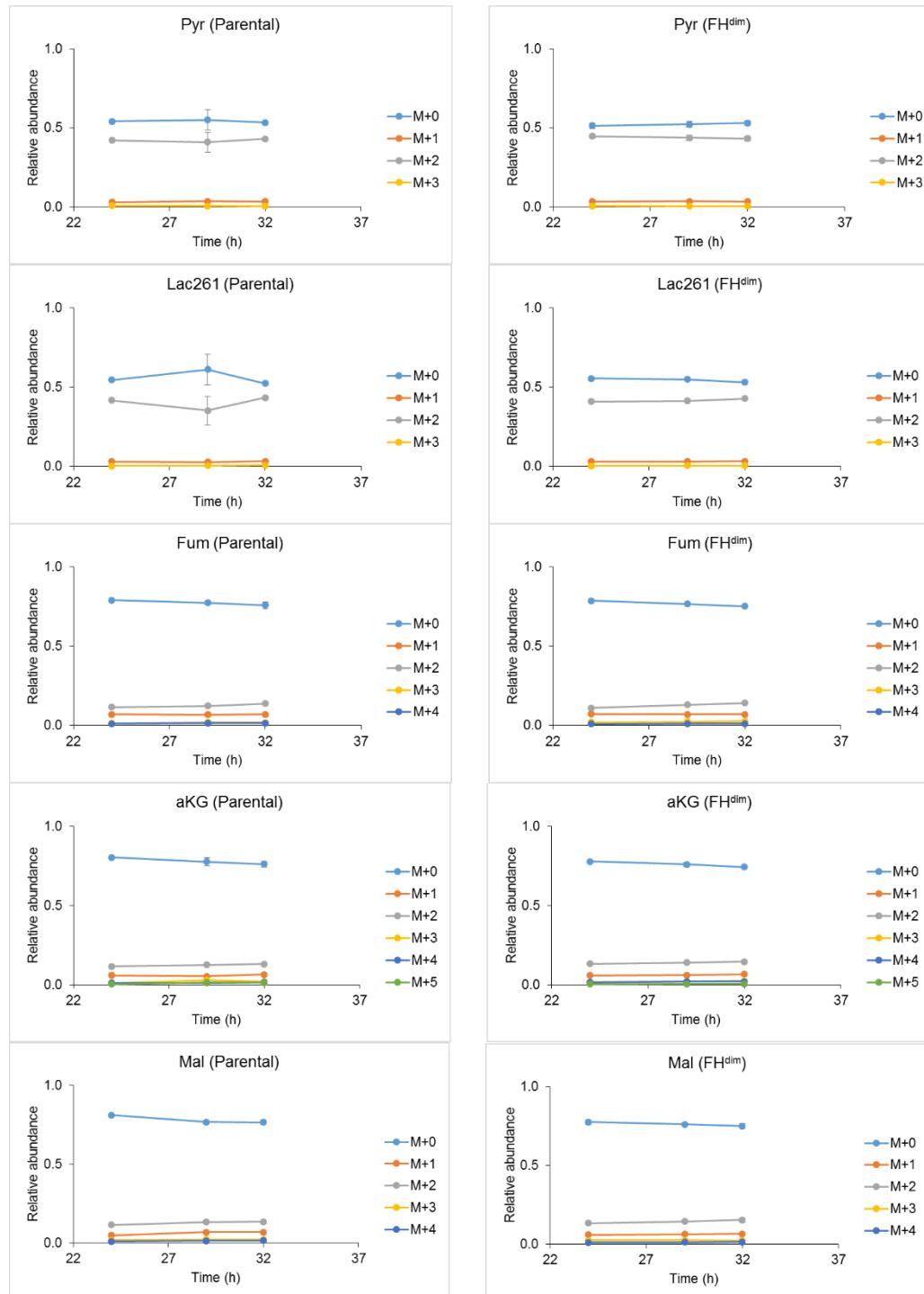
博士課程への進学にあたり、あたたかいご支援を頂きました第一三共株式会社 安東治博士（現第一三共 RD ノバーレ株式会社）、村上雅人博士、中丸健治博士に深く感謝申し上げます。また、研究の全体的な方向性や詳細な実験デザインから論文作成に関して丁寧なご指導をいただきながら、博士としてあるべき姿を説いていただいた第一三共株式会社 脇田賢一博士に心より感謝申し上げます。また、大阪大学との共同研究を開始し、本研究の着手にご尽力いただいた第一三共株式会社 渡邊伸明博士、幸長秀雄博士、三日市剛博士に心より感謝申し上げます。また、細胞株の作成にご協力いただきました第一三共 RD ノバーレ株式会社 石川裕一氏に厚く感謝申し上げます。論文執筆や学会発表資料作成時に適切なご助言をいただいた第一三共株式会社 橋本和之博士に心より感謝申し上げます。

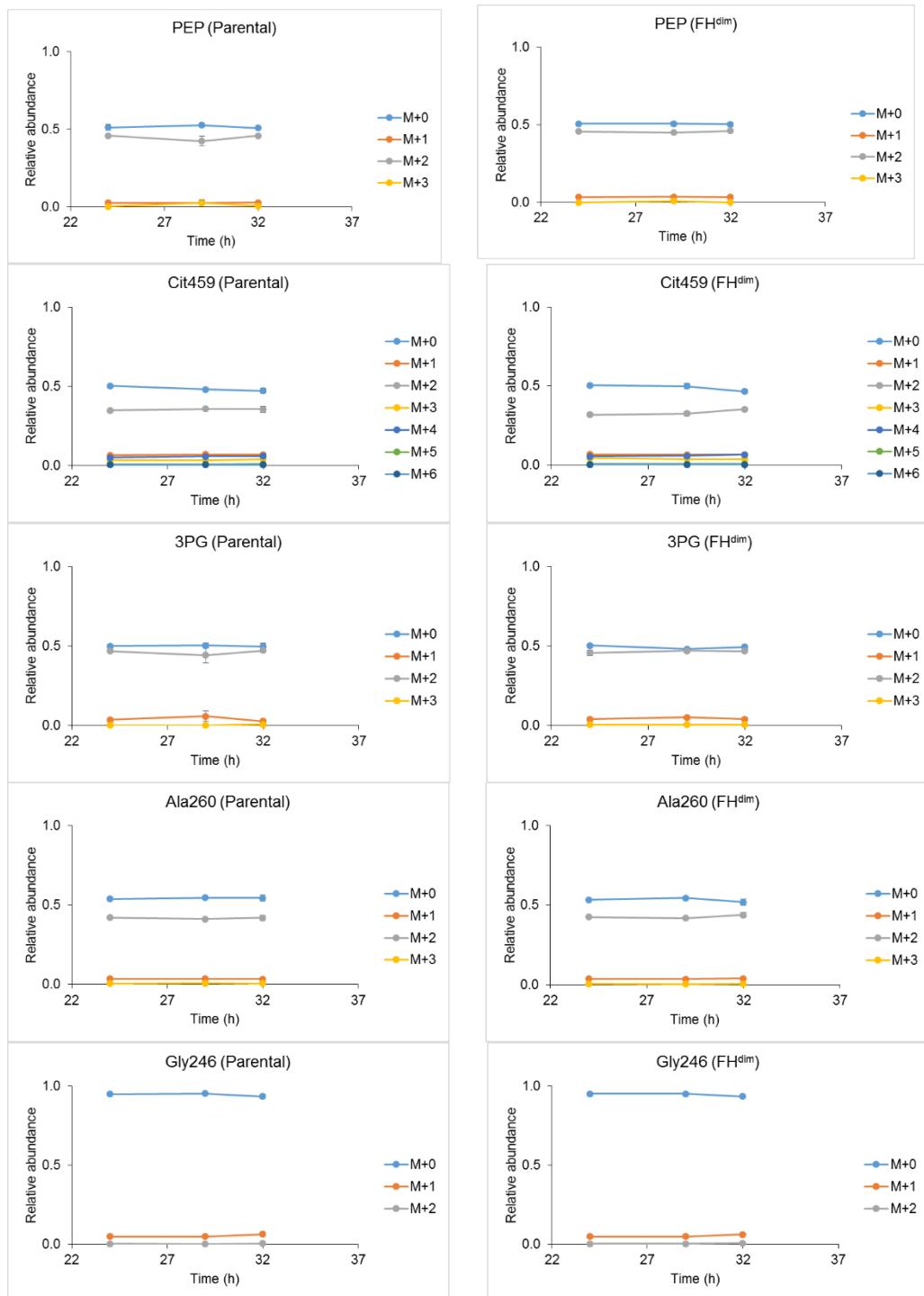
代謝フラックス解析プログラムについて基礎から教えていただきました、前田昂亮氏、荒木千絵氏、上原ひかる氏に感謝申し上げます。

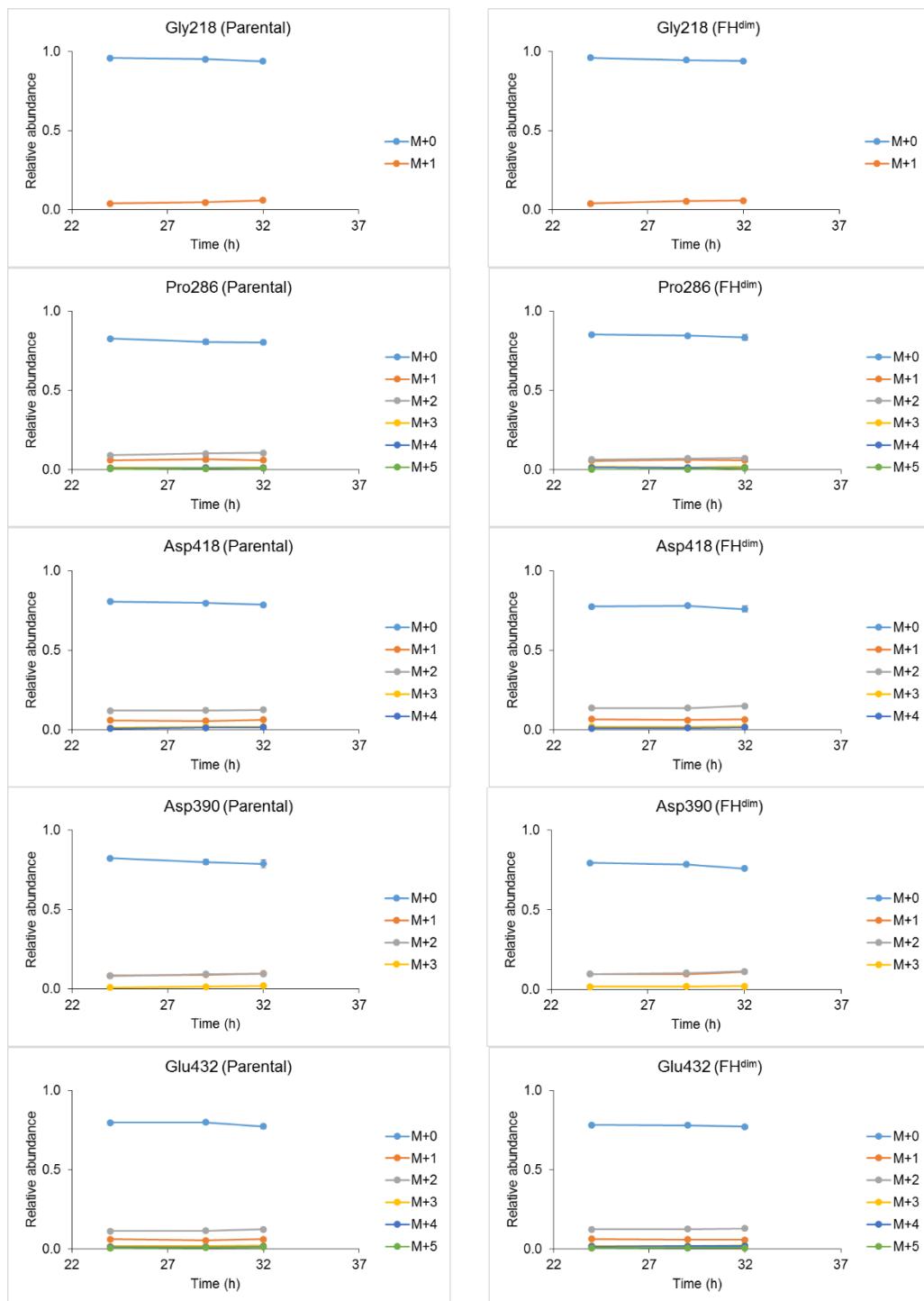
本研究を行うにお世話になりました、大阪大学大学院情報科学研究科 清水研究室の諸先輩方、学生諸氏、事務の方々、第一三共株式会社の研究員の皆様に心から感謝の意を表します。

最後に、社会人博士取得に向けて励ましの言葉とともに深い愛情を持って全面的にサポートをしてくれた家族に対して深い感謝の意を表して謝辞と致します。

付録







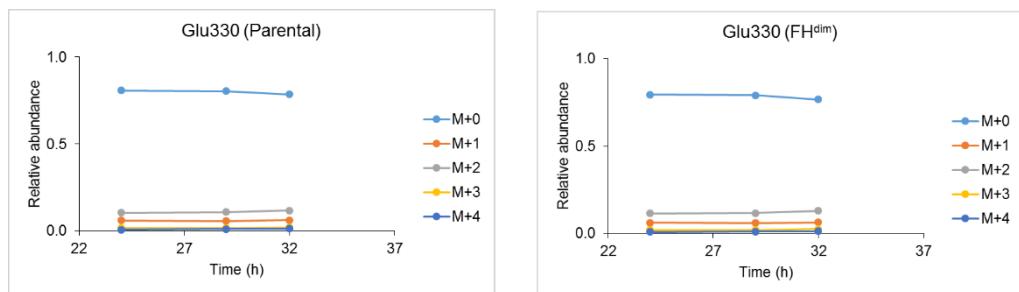
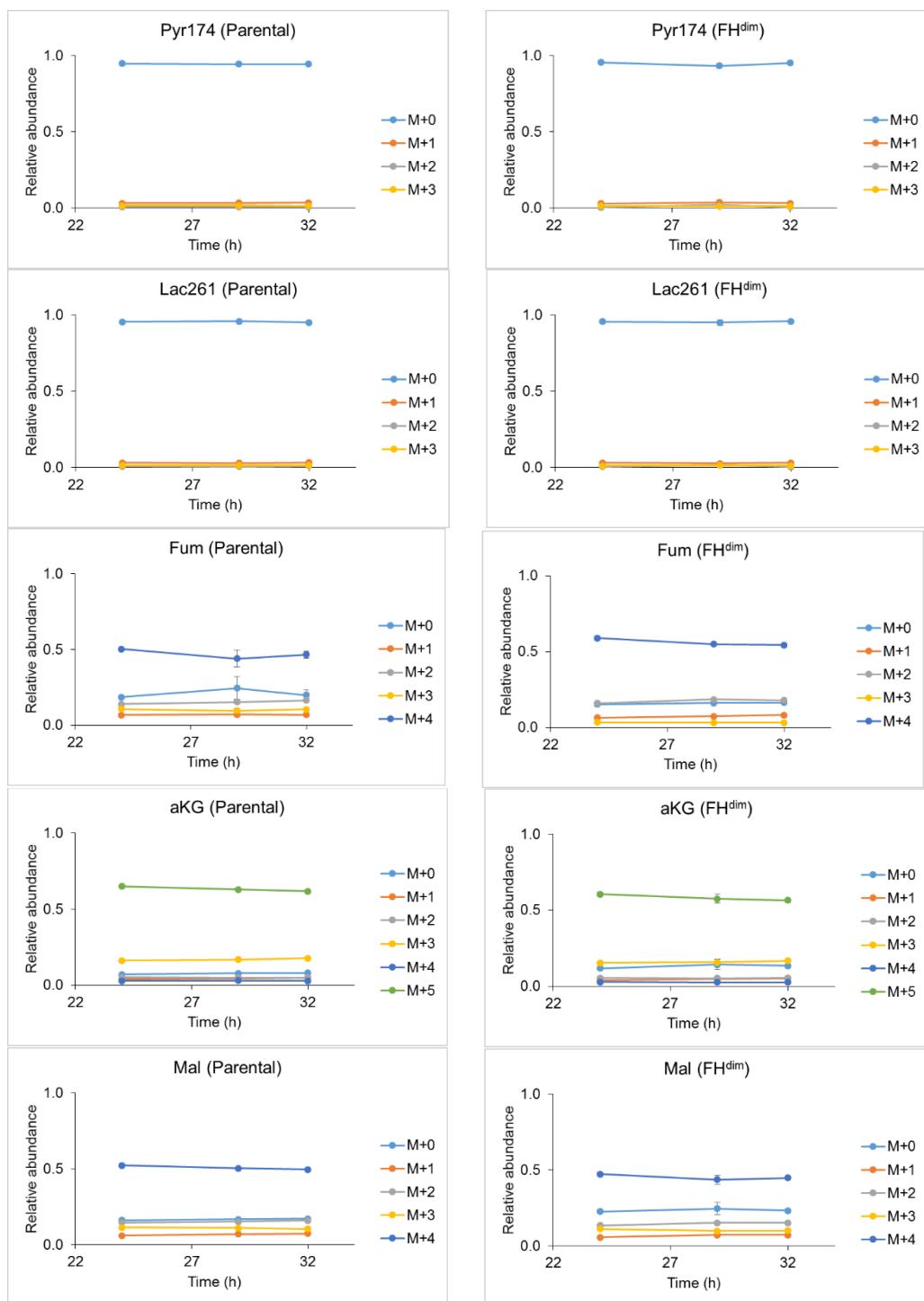
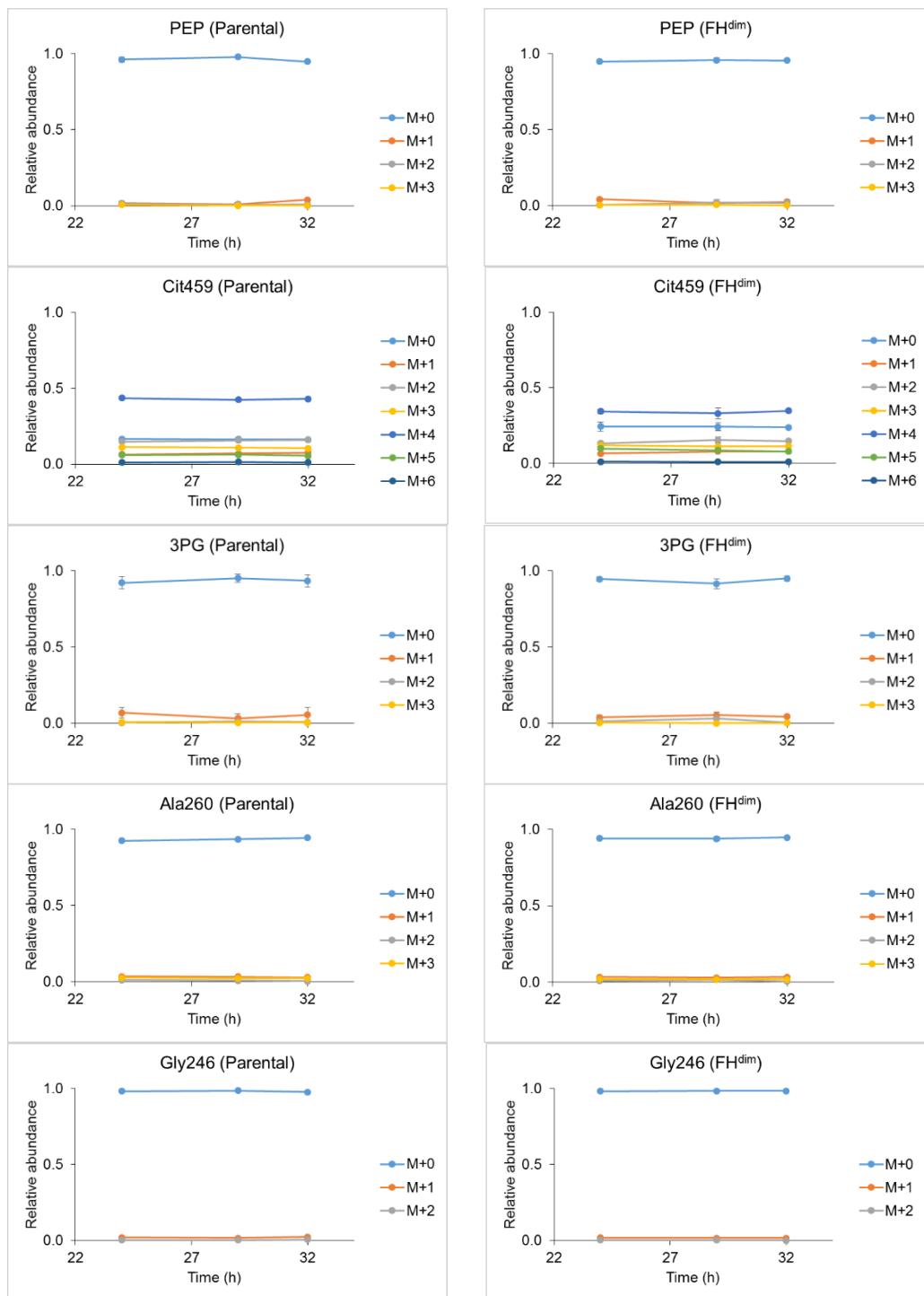
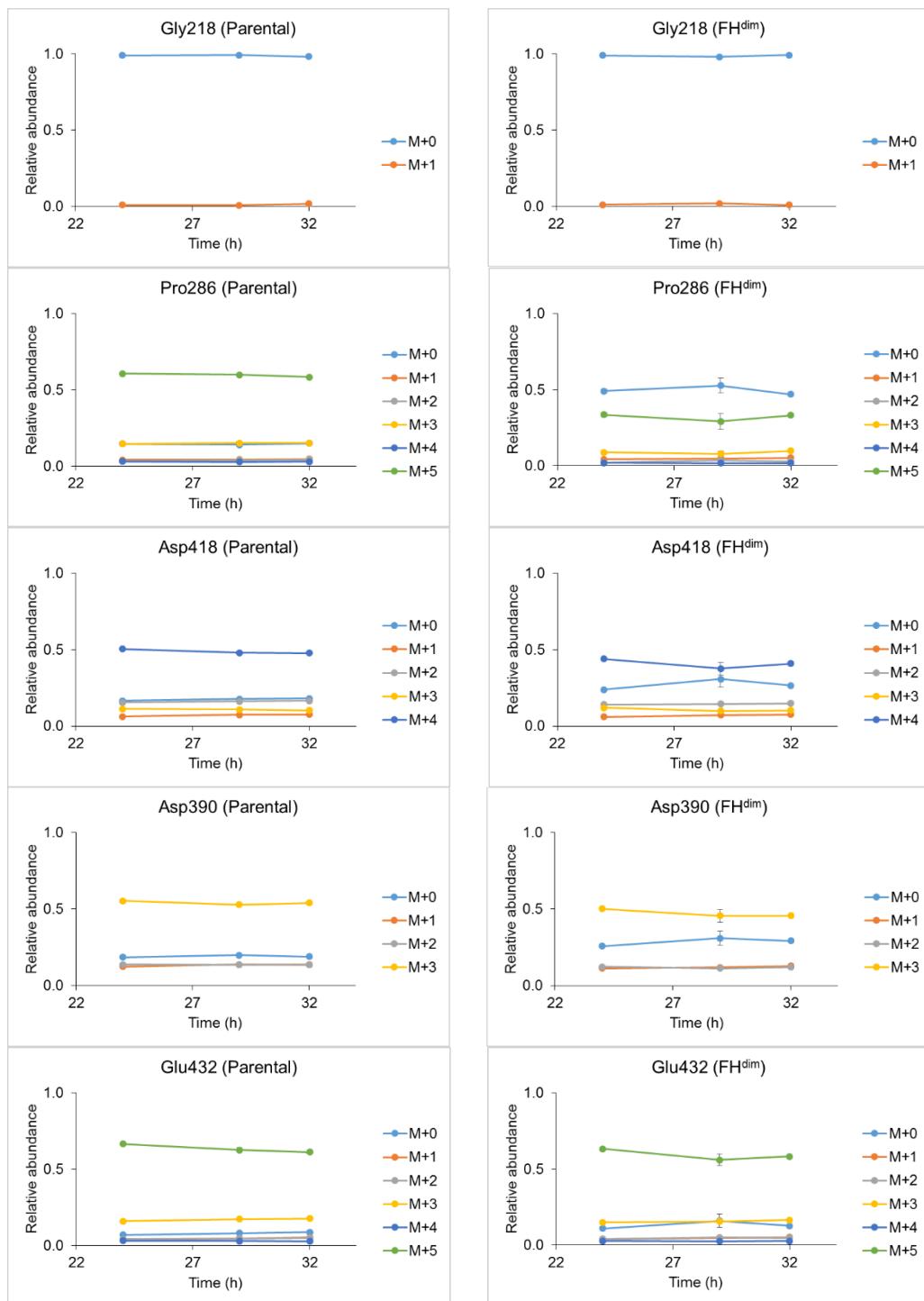
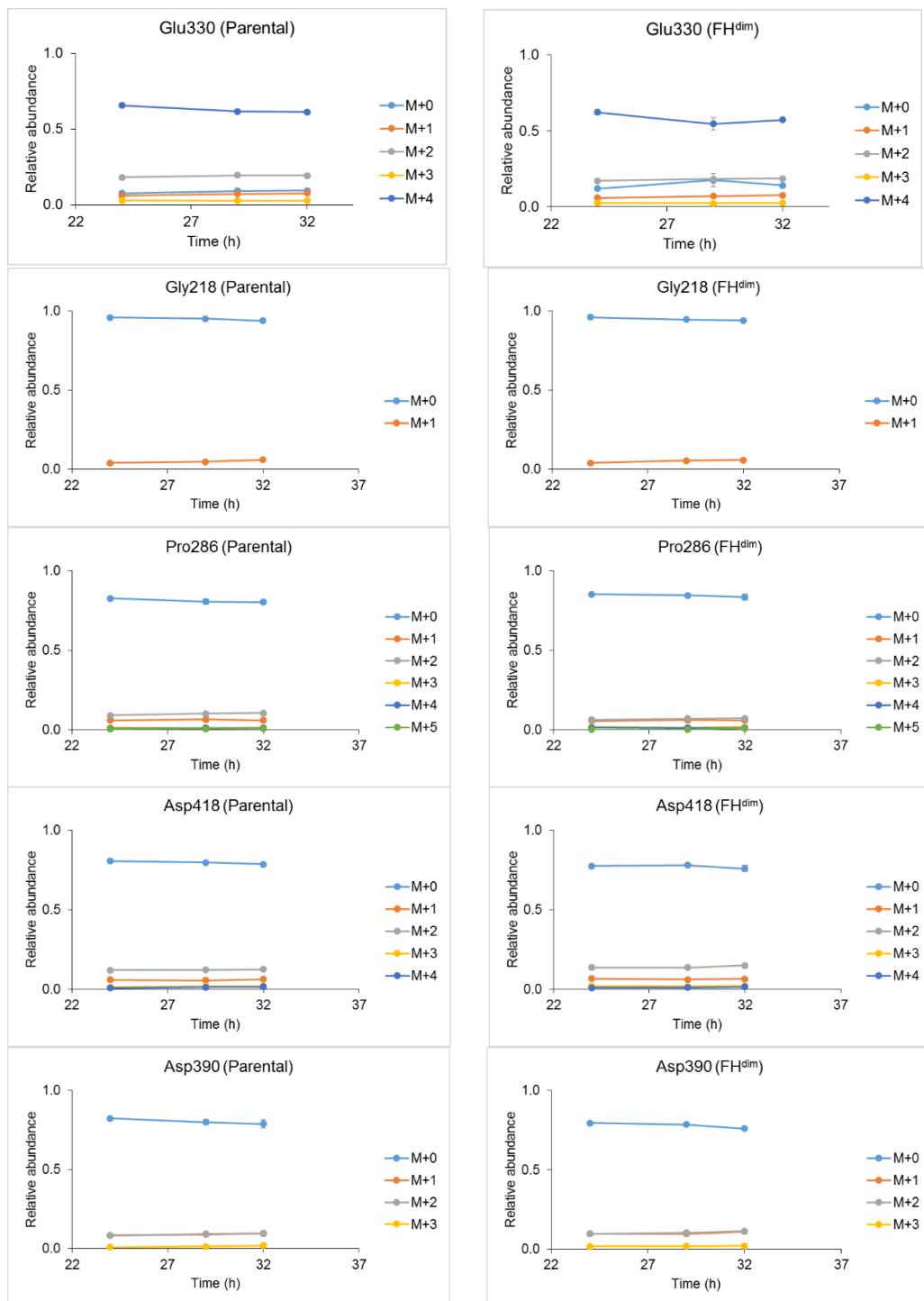


図 S-1 親株細胞ならびに FH^{dim} 細胞における $[1,2-^{13}C]glucose$ 標識時の細胞内代謝物 ^{13}C 標識パターンの経時変化
データポイントは平均値、エラーバーは標準偏差を表す ($n=3$)。









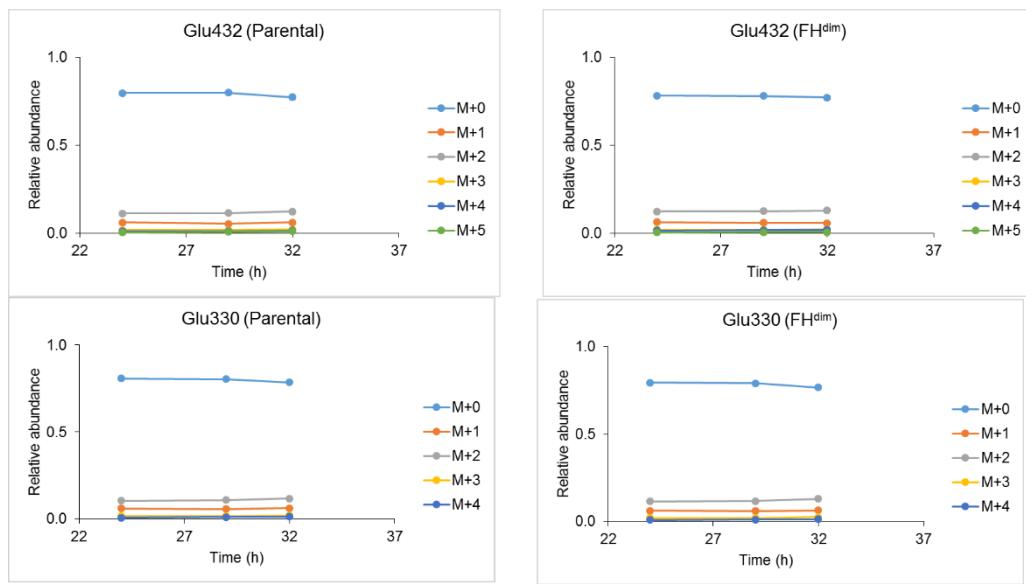
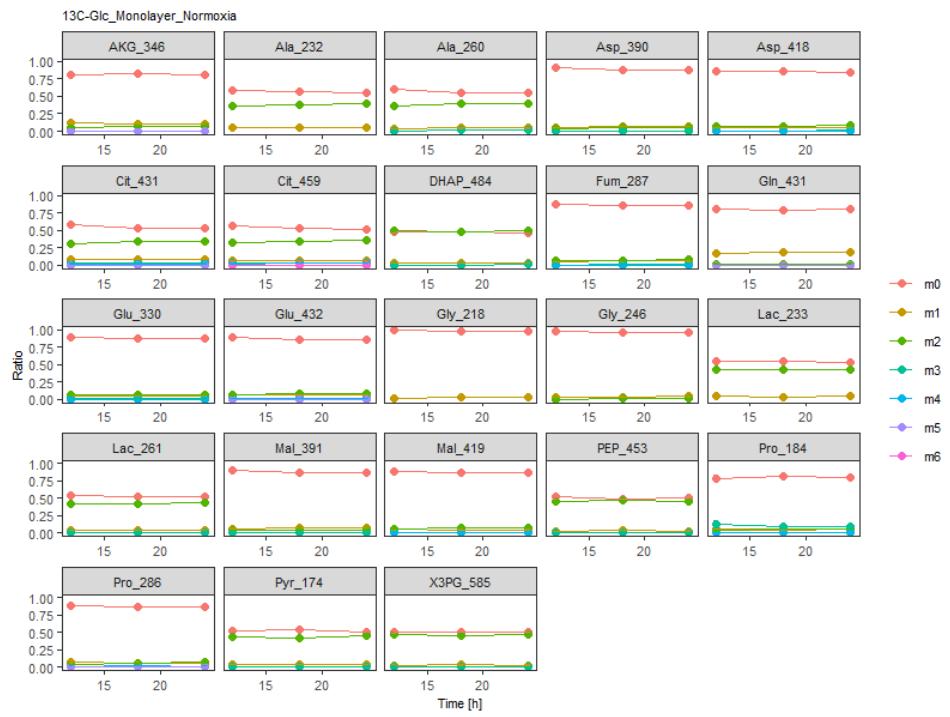


図 S-2 親株細胞ならびに FH^{dim} 細胞における $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glutamine 標識時の細胞内代謝物 ^{13}C 標識パターンの経時変化

データポイントは平均値、エラーバーは標準偏差を表す (n=3) .

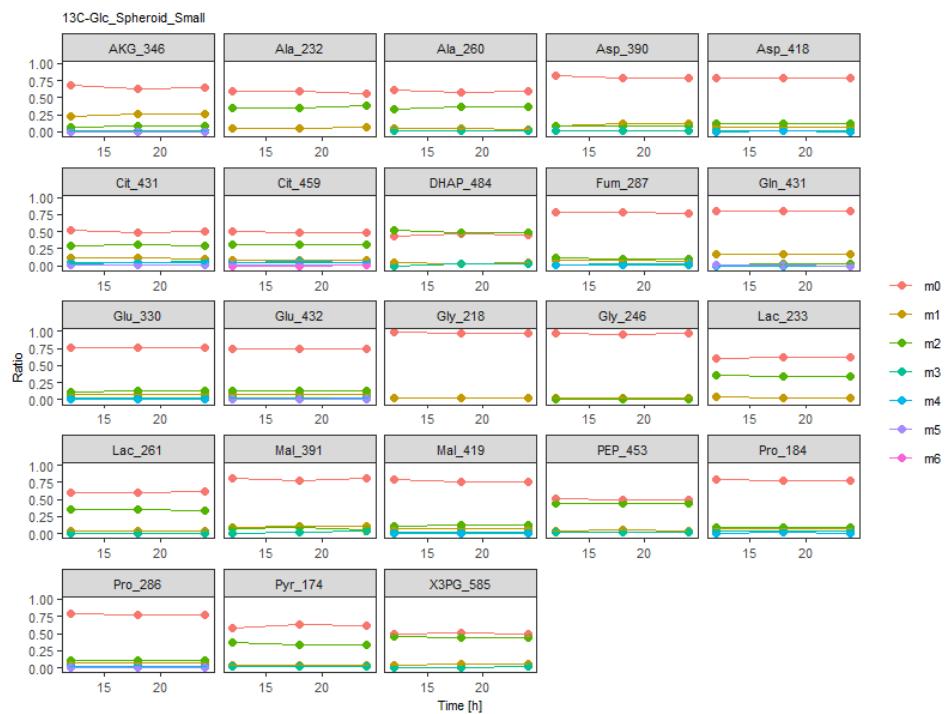
A)



B)



C)



D)

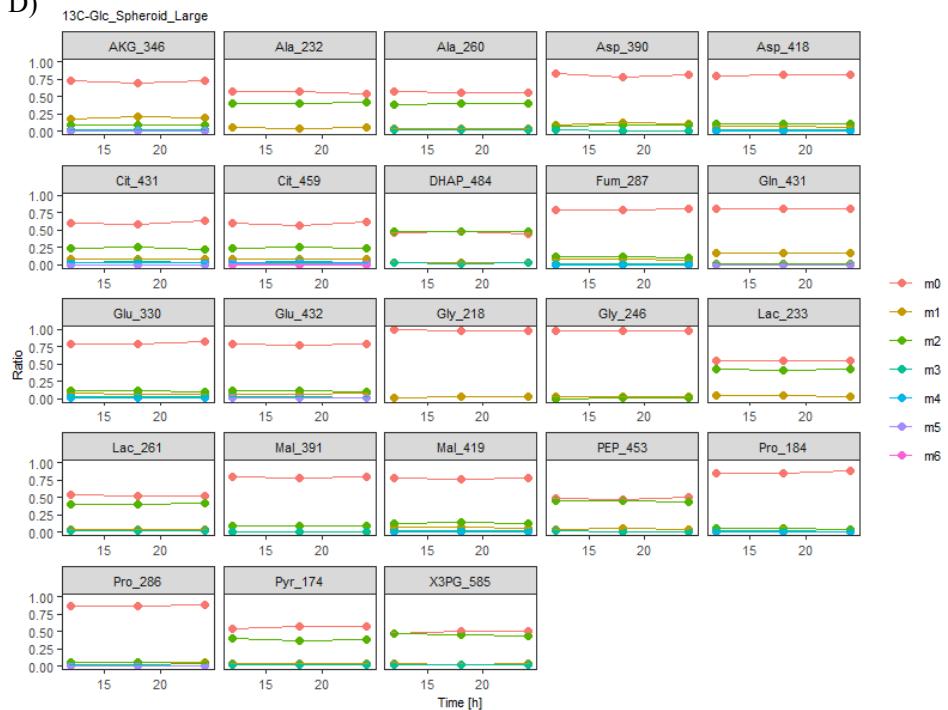
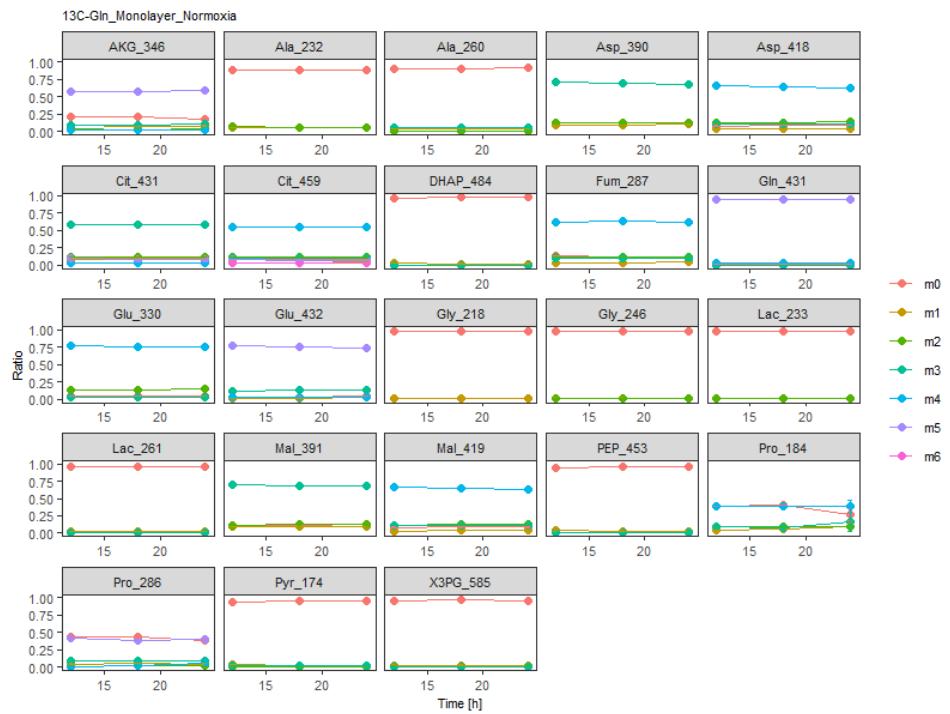


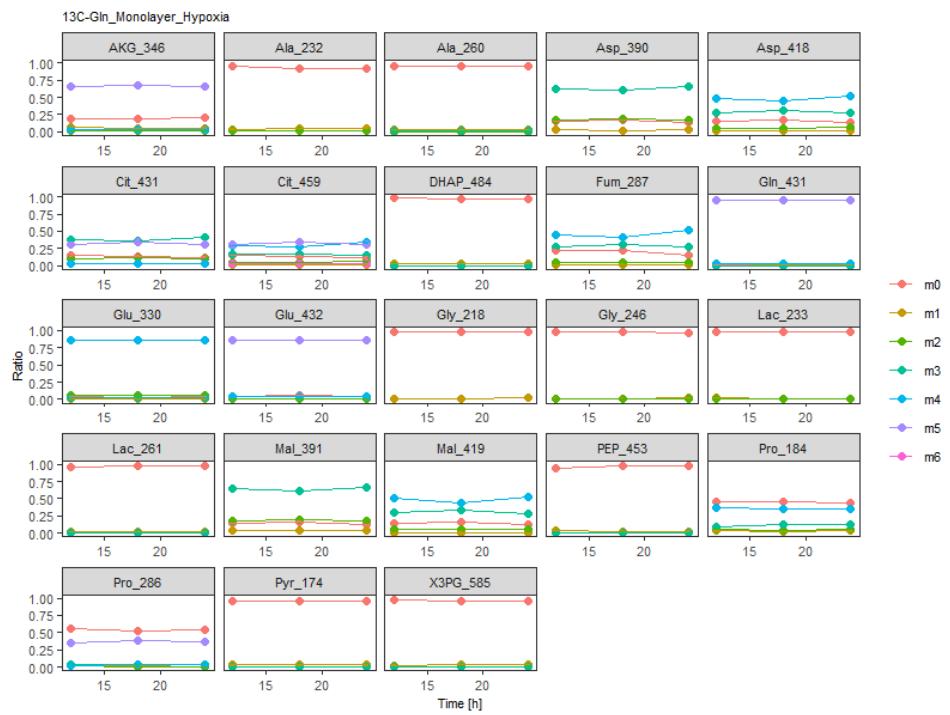
図 S-3 2次元および3次元培養下でのHCT116細胞における[1.2-¹³C]glucose標識時の細胞内代謝物¹³C標識パターンの経時変化

(A) 通常酸素条件下での2次元培養, (B) 1%酸素条件下での2次元培養, (C) 3次元培養 small spheroid, (D) 3次元培養 large spheroid.

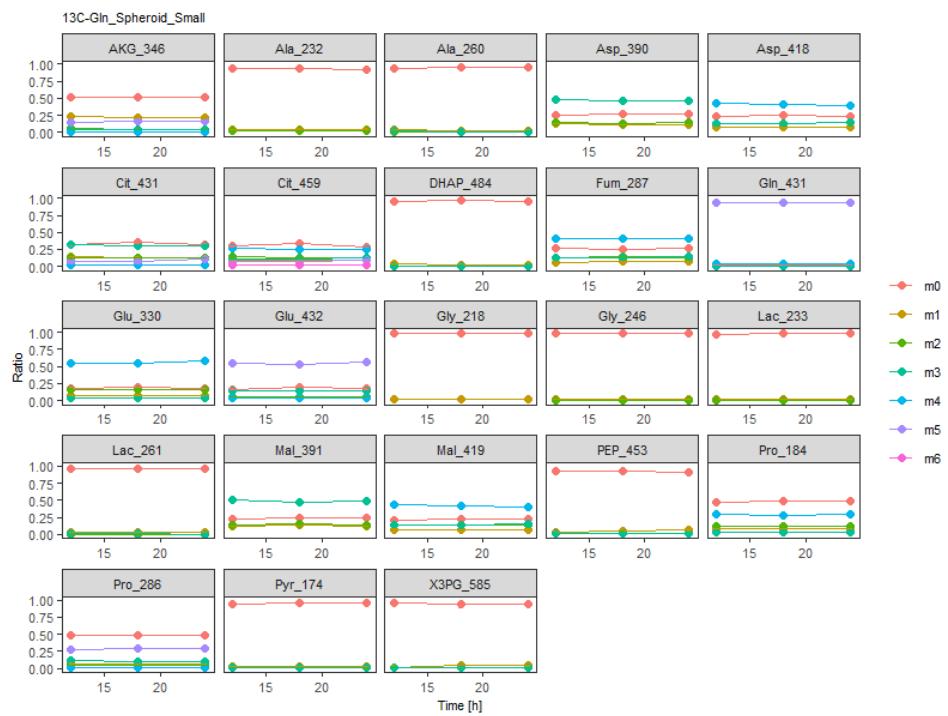
A)



B)



C)



D)

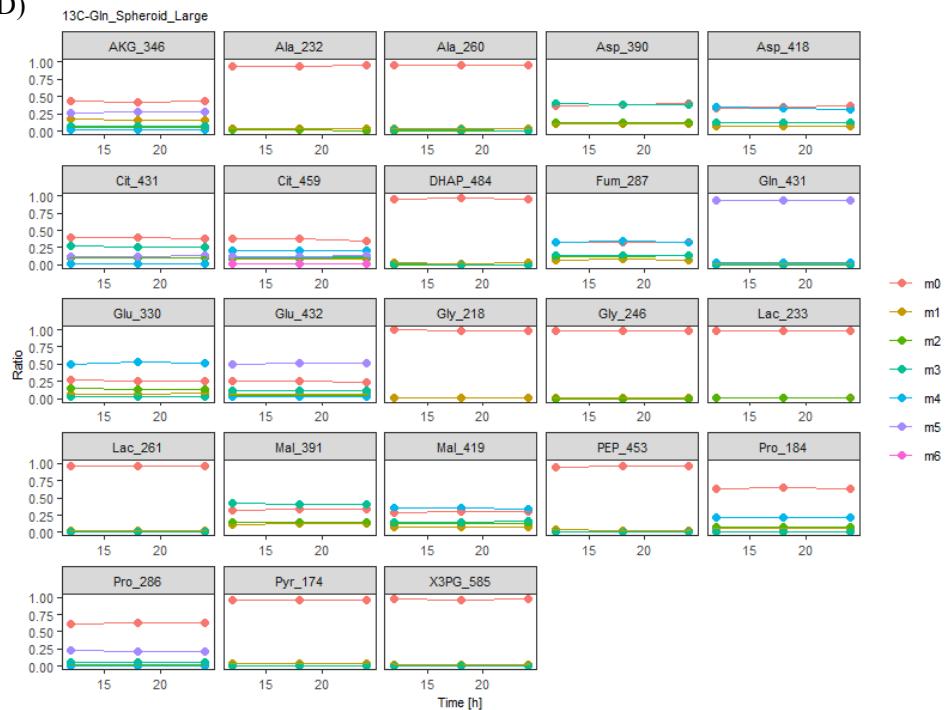


図 S-4 2次元および3次元培養下でのHCT116細胞における[U-¹³C]glutamine標識時の細胞内代謝物¹³C標識パターンの経時変化

(A) 通常酸素条件下での2次元培養, (B) 1%酸素条件下での2次元培養, (C) 3次元培養 small spheroid, (D) 3次元培養 large spheroid.

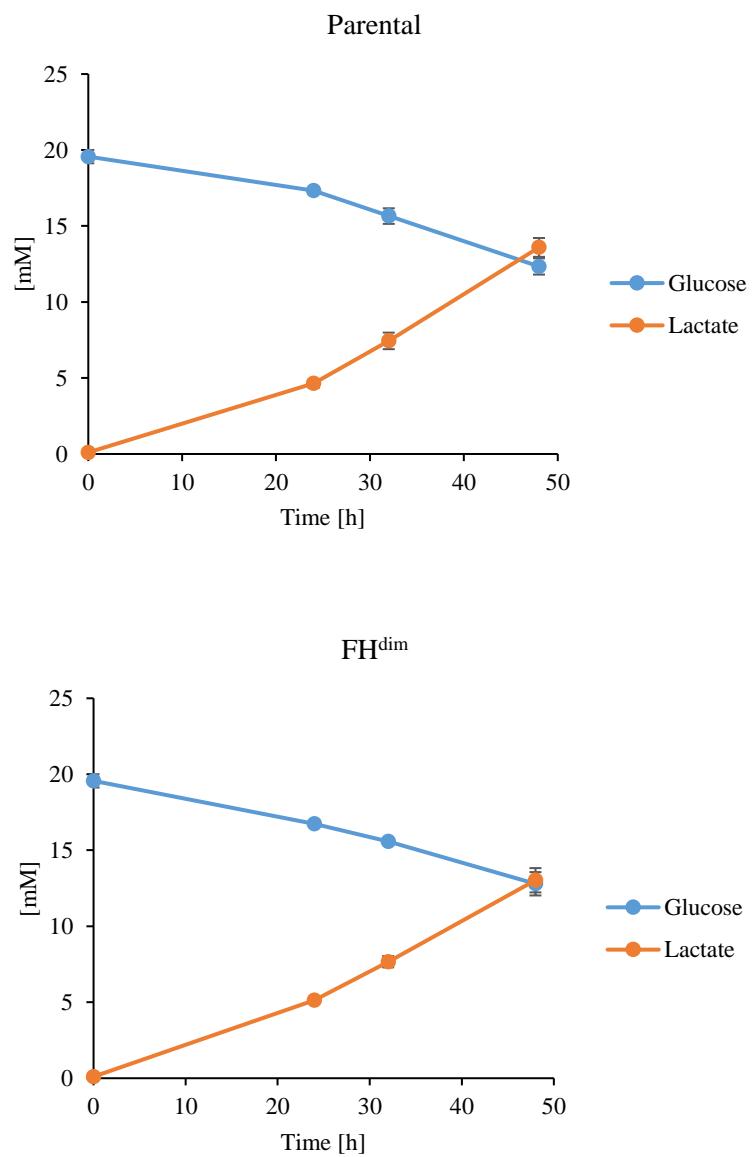
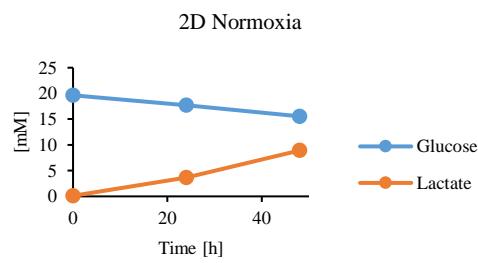
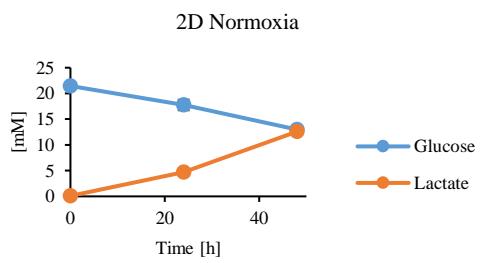
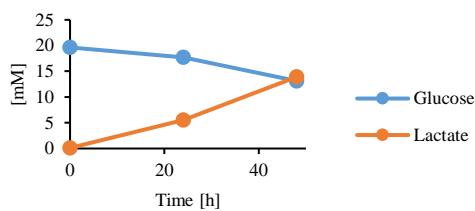
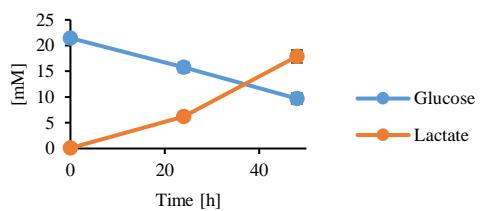


図 S-5 親株細胞および FH^{dim} 細胞での培地中 glucose および lactate の経時的濃度変化

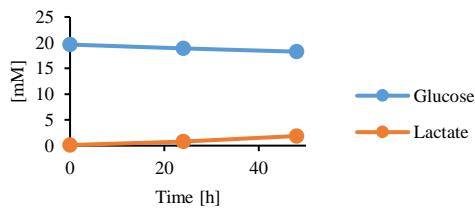
A)



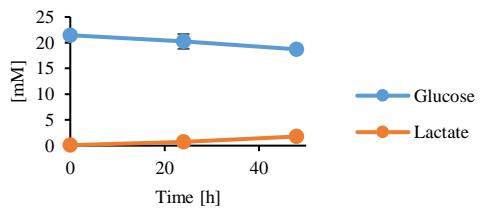
B)

2D 1% O₂2D 1% O₂

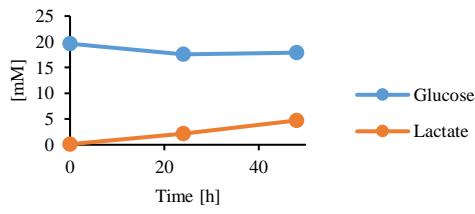
3D Small



3D Small



3D Large



3D Large

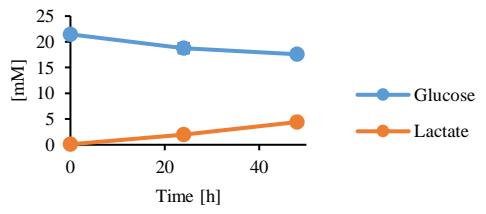


図 S-6 2 次元および 3 次元培養下での HCT116 細胞での培地中 glucose および lactate の経時的濃度変化

A) 1st batch, B) 2nd batch の結果をそれぞれ示す。

表 S-1 親株細胞および FH^{dim} 細胞での細胞内代謝フラックス分布算出値

Reaction ID	Reaction	Parental [nmol/h10 ⁶ cells]			FH ^{dim} [nmol/h10 ⁶ cells]		
		Flux	LB	UB	Flux	LB	UB
SubsGlc	SubsGlc-->G6P	607.5	539.7	686.4	558.6	504.1	633.6
SubsArg	SubsArg-->Arg	8.7	-	-	9.6	-	-
SubsCys	SubsCys-->Cys	4.1	-	-	3.3	-	-
SubsGln	SubsGln-->Gln	82.7	-	-	52.7	-	-
SubsSer	SubsSer-->Ser	22.0	-	-	16.2	-	-
SubsCO2	SubsCO2-->CO2in	8869.3	-	-	369186.6	-	-
Lac_ex	Lac-->LacEx	1044.5	866.4	1206.7	983.7	863.4	1133.2
Pyr_ex	Pyrcyt-->PyrEx	61.7	-	-	57.8	-	-
Ala_ex	Ala-->AlaEx	17.1	-	-	19.4	-	-
Pro_ex	Pro-->ProEx	13.9	-	-	1.5	-	-
Cit_Dummy	Cit-->Citdummy	100.0	-	-	100.0	-	-
Pyr_Dummy	Pyr-->Pyrdummy	100.0	-	-	100.0	-	-
aKG_Dummy	aKG-->aKGdummy	100.0	-	-	100.0	-	-
Glycolysis_r1	G6P-->F6P	539.6	-	-	488.7	-	-
Glycolysis_r1r	F6P-->G6P	0.0	-	-	0.0	-	-
Glycolysis_r2	F6P-->FBP	578.9	527.6	633.6	531.6	490.5	581.9
Glycolysis_r3	FBP-->DHAP+GAP	685.3	-	-	8053.1	-	-
Glycolysis_r3r	DHAP+GAP-->FBP	106.4	-	-	7521.5	-	-
Glycolysis_r4	DHAP-->GAP	49402.3	-	-	207737.2	-	-
Glycolysis_r4r	GAP-->DHAP	48825.6	-	-	207206.8	-	-
Glycolysis_r5	GAP-->PGA	1175.3	-	-	2953.6	-	-
Glycolysis_r5r	PGA-->GAP	0.0	-	-	1870.1	-	-
Glycolysis_r6	PGA-->PEP	1205.5	-	-	2969.4	-	-
Glycolysis_r6r	PEP-->PGA	33.0	-	-	1888.1	-	-
Glycolysis_r7	PEP-->Pyrcyt	1172.4	1071.5	1281.9	1081.4	999.6	1182.5
Glycolysis_r8	Pyrcyt-->Lac	1044.5	942.8	1153.8	983.7	901.8	1084.9
TCA_r1	Pyrcyt-->Pyrmit	108.6	88.3	117.1	57.8	54.7	75.8
TCA_r2	Pyrmit-->AcCOAmit+CO2in	80.1	74.5	87.5	53.1	49.9	56.3
TCA_r3	AcCOAmit+Oxamit-->Citmit	80.1	74.2	87.3	53.1	49.8	56.3
TCA_r4	Citmit-->aKGmit+CO2in	46.8	-	-	34.4	-	-
TCA_r4r	aKGmit+CO2in-->Citmit	0.0	-	-	0.0	-	-

TCA_r5	aKGmit-->Suc+CO2in	89.6	83.7	97.0	72.7	69.4	75.9
TCA_r6	Suc-->Fum	23194.0	-	-	412.9	-	-
TCA_r6r	Fum-->Suc	23104.4	-	-	340.2	-	-
TCA_r7	Fum-->Mal	194650.0	-	-	89.6	-	-
TCA_r7r	Mal-->Fum	194560.3	-	-	16.9	-	-
TCA_r8	Mal-->Oxamit	446715.0	-	-	180.7	-	-
TCA_r8r	Oxamit-->Mal	446640.5	-	-	137.1	-	-
Anaplerosis_r1	Pyrmit2+CO2in-->Oxamit	17.0	12.4	27.4	16.3	13.1	20.2
Anaplerosis_r2	Mal-->Pyrmit2+CO2in	13.8	4.5	27.3	11.7	7.3	16.7
Anaplerosis_r3	Mal-->Pycyt+CO2in	44.7	38.8	50.4	43.6	39.7	47.3
Anaplerosis_r4	Pyrmit-->Pyrmit2	59.0	-	-	33.2	-	-
Anaplerosis_r4r	Pyrmit2-->Pyrmit	55.8	-	-	28.6	-	-
PPP_r1	G6P-->Ru5P+CO2in	62.9	20.4	92.4	66.9	24.7	106.3
PPP_r2	Ru5P-->R5P	24.6	-	-	5431.5	-	-
PPP_r2r	R5P-->Ru5P	0.8	-	-	5407.5	-	-
PPP_r3	Ru5P-->Xu5P	9207.6	-	-	26407.5	-	-
PPP_r3r	Xu5P-->Ru5P	9168.4	-	-	26364.5	-	-
PPP_r4	R5P+Xu5P-->S7P+GAP	19.6	-	-	21.5	-	-
PPP_r4r	GAP+S7P-->Xu5P+R5P	0.0	-	-	0.0	-	-
PPP_r5	GAP+S7P-->F6P+E4P	273.3	-	-	14761.8	-	-
PPP_r5r	E4P+F6P-->S7P+GAP	253.6	-	-	14740.3	-	-
PPP_r6	E4P+Xu5P-->F6P+GAP	53.6	-	-	49.1	-	-
PPP_r6r	GAP+F6P-->Xu5P+E4P	34.0	-	-	27.7	-	-
AA_r1	Gln-->Glu	77.0	-	-	49.2	-	-
AA_r2	Glu-->aKGmit	9035.8	-	-	1998.0	-	-
AA_r2r	aKGmit-->Glu	8982.9	-	-	1952.1	-	-
AA_r3	Glu-->Pro	17.9	17.5	18.3	2.8	2.7	2.9
AA_r4	Oxamit-->Asp	11.4	-	-	6.9	-	-
AA_r5	Asp-->Asn	5.1	-	-	3.1	-	-
AA_r6	Ser-->Gly	18.9	-	-	15.6	-	-
AA_r7	Gly-->GlyDeg	9.4	-	-	9.8	-	-
AA_r8	PGA-->Ser	2.8	-	-	2.1	-	-
AA_r8r	Ser-->PGA	0.0	-	-	0.0	-	-
AA_r9	Arg-->Glu	0.6	0.2	1.0	3.6	3.5	3.7
AA_r10	Cys-->Ser	1.6	-	-	1.8	-	-
AA_r11	Arg-->Pro	1.5	1.1	1.9	2.0	1.9	2.1

AA_r12	Pyrmit-->Ala	25.3	-	-	0.0	-	-
AA_r13	Pyrcyt-->Ala	2.4	-	-	25.8	-	-
Cyt_r1	Citcyt-->AcCOAcyt+Oxacyt	43.4	-	-	26.3	-	-
Cyt_r2	Mal-->Oxacyt	18112.5	-	-	499.1	-	-
Cyt_r2r	Oxacyt-->Mal	18155.9	-	-	525.4	-	-
Cyt_r3	Citmit-->Citcyt	33.3	-	-	18.7	-	-
Cyt_r4	aKGmit-->aKGcyt	10.1	1.4	14.7	7.7	2.4	10.3
Cyt_r5	aKGcyt+CO2in-->Citcyt	10.1	1.4	14.7	7.7	2.3	10.3
BIOMASS	{308.4}Ala+{193.8}Arg+{184.5}Asp+{148}Asn+{74.5}Cys+{165.5}Gln+{198.4}Glu+{276.5}Gly+{160.9}Pro+{221.0}Ser+{1265.6}AcCOAcyt+{143.1}G6P+{119.4}R5P+{61.2}DHAP-->Biomass	0.034	-	-	0.021	-	-
CO2	CO2in-->CO2Ex	9180.1	-	-	369445.1	-	-
Mix_r1	{0}Citmit-->Cit	83.0	-	-	69.9	-	-
Mix_r2	{0}Citcyt-->Cit	17.0	-	-	30.1	-	-
Mix_r3	{0}Pyrmit-->Pyr	0.0	-	-	0.0	-	-
Mix_r4	{0}Pyrmit2-->Pyr	0.0	-	-	0.0	-	-
Mix_r5	{0}Pyrcyt-->Pyr	100.0	-	-	100.0	-	-
Mix_r6	{0}aKGmit-->aKG	41.4	-	-	49.4	-	-
Mix_r7	{0}aKGcyt-->aKG	58.6	-	-	50.6	-	-
PEPH	Glycolysis_r6<=>Glycolysis_r6r	1172.4	1073.2	1281.8	1081.4	999.6	1182.5
MDH	TCA_r8<=>TCA_r8r	74.5	67.6	80.4	43.7	38.9	48.1
TKT2	PPP_r6<=>PPP_r6r	19.6	5.4	29.4	21.5	7.4	34.6
TKT1	PPP_r4<=>PPP_r4r	19.6	5.5	29.4	21.5	7.4	34.6
PyrmitExchange	Anaplerosis_r4<=>Anaplerosis_r4r	3.2	-2.8	8.9	4.6	0.7	8.2
GAPDH	Glycolysis_r5<=>Glycolysis_r5r	1175.3	1075.4	1281.4	1083.5	1001.9	1184.6
TPI	Glycolysis_r4<=>Glycolysis_r4r	576.8	526.3	631.8	530.4	489.2	580.6

PGI	Glycolysis_r1<=>Glycolysis_r1r	539.6	474.1	613.7	488.7	437.0	551.7
TAL	PPP_r5<=>PPP_r5r	19.6	5.4	29.4	21.5	7.4	34.6
FBA	Glycolysis_r3<=>Glycolysis_r3r	578.9	527.5	632.5	531.6	490.5	581.9
IDH	TCA_r4<=>TCA_r4r	46.8	43.2	50.5	34.4	29.5	37.2
GLUDH	AA_r2<=>AA_r2r	52.9	-	-	45.9	-	-
RPI	PPP_r2<=>PPP_r2r	23.7	9.5	33.5	24.0	9.9	37.1
MDHcyt	Cyt_r2<=>Cyt_r2r	-43.4	-	-	-26.3	-	-
RBE	PPP_r3<=>PPP_r3r	39.2	10.9	58.9	42.9	14.8	69.2
SDH	TCA_r6<=>TCA_r6r	89.6	83.7	97.0	72.7	69.4	75.9
FH	TCA_r7<=>TCA_r7r	89.6	83.7	97.0	72.7	69.4	75.9
PGAtoSer	AA_r8<=>AA_r8r	2.8	-	-	2.1	-	-

表 S-2 主成分分析ローディング

Metabolite	[1,2- ¹³ C]Glucose		[U- ¹³ C]Glutamine		Metabolite	[1,2- ¹³ C]Glucose		[U- ¹³ C]Glutamine	
	PC1	PC2	PC1	PC2		PC1	PC2	PC1	PC2
Pyr_174_m0	0.693814037	-0.395054763	0.641237256	-0.071048959	Ala_232_m0	0.708153948	-0.36790952	0.417904536	-0.623992081
Pyr_174_m1	0.218629037	0.364559757	-0.446078898	-0.374657421	Ala_232_m1	-0.229710734	0.580218416	-0.094000294	0.341914875
Pyr_174_m2	-0.746026451	0.3896652	-0.336914656	-0.27747954	Ala_232_m2	-0.753330558	0.241673797	-0.535206318	0.66053084
Pyr_174_m3	0.520080928	-0.17376249	-0.51173694	0.766128225	Ala_260_m0	0.66203696	-0.230340498	0.450497503	-0.693737943
Lac_233_m0	0.774301445	-0.220184021	0.732886487	0.111652282	Ala_260_m1	0.337690337	0.444264533	-0.075382657	0.25599867
Lac_233_m1	0.2017257513	0.471845243	-0.481807964	-0.171061394	Ala_260_m2	-0.792652756	0.199639041	-0.439760817	0.015607039
Lac_233_m2	-0.794727151	0.186406046	-0.710611211	-0.077844109	Ala_260_m3	0.741849922	-0.32464704	-0.302135276	0.857899492
Lac_261_m0	0.76048416	-0.241548742	0.750967286	0.060610893	Gly_246_m0	0.38525565	-0.705515253	0.127224392	-0.57743008
Lac_261_m1	0.312353579	0.477430771	-0.271757282	-0.314929025	Gly_246_m1	-0.415546769	0.737049368	-0.116631536	0.573606828
Lac_261_m2	-0.828126347	0.228029895	-0.632812172	-0.266021931	Gly_246_m2	-0.136957917	0.368616497	-0.134781539	0.538659601
Lac_261_m3	0.564955192	-0.16402389	-0.605983227	0.755575099	Gly_218_m0	0.520596685	-0.745494439	-0.191983438	-0.234636818
Fum_287_m0	-0.965267928	-0.103526213	-0.142292534	-0.961947535	Gly_218_m1	-0.520596685	0.745494439	0.191983438	0.234636818
Fum_287_m1	0.641827599	0.312373078	-0.911881572	-0.260308093	Pro_286_m0	-0.175899436	0.001997963	0.117211095	-0.912079123
Fum_287_m2	0.3564443491	0.403823134	-0.86689816	0.352497167	Pro_286_m1	-0.28971851	-0.274693166	0.056651342	0.165625464
Fum_287_m3	0.949603249	-0.033951523	0.889294716	-0.343165672	Pro_286_m2	0.73231995	0.441294668	-0.493581832	-0.392148468
Fum_287_m4	0.727759536	-0.44438066	-0.400365061	0.891446519	Pro_286_m3	0.405258052	-0.166146254	-0.745986395	0.460197855
AKG_346_m0	-0.952513648	-0.129374557	-0.650849199	-0.724401371	Pro_286_m4	-0.275276066	-0.035616295	0.503766734	0.192921379
AKG_346_m1	0.845731415	-0.11382485	-0.726292017	-0.560305843	Pro_286_m5	-0.260968463	-0.10103381	0.073457492	0.740129266
AKG_346_m2	0.628708305	0.72609354	-0.893523968	-0.313903259	Pro_184_m0	0.067930308	0.106745217	-0.045013768	-0.930251525
AKG_346_m3	0.801361353	0.353614274	-0.366224429	0.817495589	Pro_184_m1	0.719123692	0.162983421	-0.847631377	-0.174385665
AKG_346_m4	0.602227064	0.517854248	0.684720708	0.665881937	Pro_184_m2	0.710178947	0.534113828	-0.72965635	0.594820306
AKG_346_m5	0.682832985	-0.442562187	0.809142687	0.540285681	Pro_184_m3	-0.426755688	-0.288601738	0.437503516	0.237603039
Mal_419_m0	-0.96131374	-0.141529413	-0.264100815	-0.929533852	Pro_184_m4	0.220840372	-0.230971688	0.090668426	0.825394027
Mal_419_m1	0.892634108	0.269281345	-0.904401966	-0.189063661	Ser_390_m0	0.47811857	-0.791331943	0.19730052	-0.067313062
Mal_419_m2	0.828938706	0.478084842	-0.897403491	0.401063853	Ser_390_m1	-0.407272342	0.792216041	-0.256302401	0.028156521
Mal_419_m3	0.898520106	0.055696269	0.883931903	-0.340743692	Ser_390_m2	-0.506974852	0.760592706	-0.021168224	0.092814189
Mal_419_m4	0.765506363	-0.408307893	-0.365343849	0.898942361	Ser_390_m3	-0.153871016	0.537615014	-0.215454295	0.187090185
Mal_391_m0	-0.956045563	-0.126092756	-0.324110029	-0.922093493	Ser_288_m0	0.504639868	-0.767153705	0.221004157	-0.25797559
Mal_391_m1	0.781998813	0.540476872	-0.933488948	0.163915083	Ser_288_m1	-0.472947198	0.755029378	-0.186044288	0.296809872
Mal_391_m2	0.864661193	0.255214762	0.836948856	-0.333708449	Ser_288_m2	-0.512909881	0.755988862	-0.261318801	0.068018128
Mal_391_m3	0.741932449	-0.400782758	0.202766593	0.951381876	Asp_390_m0	-0.909344783	-0.189684332	-0.110662964	-0.968969006
PEP_453_m0	0.061538775	-0.160181873	-0.157337994	0.117151613	Asp_390_m1	0.670577211	0.589820041	-0.937438839	0.183358646
PEP_453_m1	0.60991358	-0.050880314	-0.01998996	-0.148230726	Asp_390_m2	0.907130908	0.296593277	0.866080969	-0.267550987
PEP_453_m2	-0.667624967	0.283434563	0.370261947	-0.254202284	Asp_390_m3	0.661562255	-0.472240056	0.095089318	0.967561832
PEP_453_m3	0.368477008	-0.178391075	-0.370418372	0.59520883	Asp_418_m0	-0.968121354	-0.106052203	-0.054505967	0.974096751
DHAP_484_m0	0.11691456	-0.865573882	0.588111511	0.20092405	Asp_418_m1	0.829118322	0.291327404	-0.916823317	-0.267601782
DHAP_484_m1	0.494590562	0.082866115	0.13693277	0.75188152	Asp_418_m2	0.866299821	0.441173497	-0.873257834	0.432388061
DHAP_484_m2	-0.500492062	0.705373597	-0.570186573	-0.389718788	Asp_418_m3	0.949025701	-0.046165619	0.884797367	-0.323453555
DHAP_484_m3	0.770422313	-0.219006755	-0.355066426	-0.054580725	Asp_418_m4	0.575920316	-0.506571871	-0.341370506	0.909778848
Cit_459_m0	-0.542681002	-0.779482254	-0.30429703	-0.918536217	Glu_432_m0	-0.941907235	-0.289466865	-0.556375721	-0.809239242
Cit_459_m1	0.83060306	0.180665836	-0.929078401	-0.281136233	Glu_432_m1	0.571072412	0.430482988	-0.902779429	-0.362575906
Cit_459_m2	0.259034307	0.912463866	-0.806135251	0.499099279	Glu_432_m2	0.731801719	0.653211813	-0.931311688	-0.267221276
Cit_459_m3	0.889651982	0.253500837	0.822339445	-0.085549612	Glu_432_m3	0.98802698	0.071078656	-0.857151468	0.463805501
Cit_459_m4	0.872124769	0.175347788	-0.259502635	0.94458107	Glu_432_m4	0.934318512	0.199069652	0.713368836	0.633370703
Cit_459_m5	0.391299234	-0.570083663	0.858358317	-0.444927469	Glu_432_m5	0.760241755	-0.39895488	0.878570819	0.42211375
Cit_459_m6	0.272706247	-0.492288604	0.029651505	0.733863093	Glu_330_m0	-0.939015592	-0.260805278	-0.571331709	-0.799865308
Cit_431_m0	-0.549318261	-0.7709338	-0.379137406	-0.888381695	Glu_330_m1	0.825196316	0.406916514	-0.952206916	-0.185347405
Cit_431_m1	0.780415463	0.5227788	-0.940769189	0.239584872	Glu_330_m2	0.792875748	0.578363519	-0.896464052	0.374700543
Cit_431_m2	0.245129749	0.903296627	0.011665664	0.480057236	Glu_330_m3	0.8991841	0.284610799	0.202340225	0.786738779
Cit_431_m3	0.824892338	0.041249568	-0.162607442	0.952729383	Glu_330_m4	0.788914065	-0.365670738	0.891626004	0.395501838
Cit_431_m4	0.821397337	0.438951643	0.52393038	0.275376559	Gln_431_m0	-0.494182545	0.37683799	-0.53720071	-0.285142078
Cit_431_m5	0.39911061	-0.684655102	0.859991782	-0.429299058	Gln_431_m1	-0.399685274	0.076011092	-0.599610017	-0.336517557
3PG_585_m0	0.129949254	-0.152465925	0.021879004	0.258723752	Gln_431_m2	-0.144032922	0.150014221	-0.754852424	-0.359516162
3PG_585_m1	0.100383542	0.073936717	0.059738338	-0.287143569	Gln_431_m3	NA	NA	-0.593868487	0.503232815
3PG_585_m2	-0.558066197	0.309158958	-0.214963644	-0.037240041	Gln_431_m4	0.738181628	-0.385079489	0.522318775	0.038908064
3PG_585_m3	0.601483789	-0.318900575	0.206249355	-0.169867774	Gln_431_m5	0.711748273	-0.409057205	0.59425259	0.283591924

表 S-3 2次元培養および3次元培養下でのHCT116細胞における細胞内代謝フラックス分布算出値

Reaction ID	Reaction	2D Normoxia			2D Hypoxia			3D Large		
		[nmol/h/10 ⁶ cells]			[nmol/h/10 ⁶ cells]			[nmol/h/10 ⁶ cells]		
		Flux	LB	UB	Flux	LB	UB	Flux	LB	UB
SubsGlc	SubsGlc-->G6P	285.1	278.5	369.4	469.9	371.1	574.0	207.4	160.6	265.9
SubsGln	SubsGln-->Gln	61.6	50.7	74.3	49.9	47.9	70.5	15.4	3.2	19.0
SubsCO2	SubsCO2-->CO2in	1770.0	-	-	5036.1	-	-	541.4	-	-
Lac_ex	Lac-->LacEx	490.4	319.1	504.4	877.7	706.5	1090.9	387.0	270.6	669.3
Pyr_ex	Pyrcyt-->PyrEx	14.4	-	-	7.7	-	-	7.6	-	-
Ala_ex	Ala-->AlaEx	5.4	-	-	4.7	-	-	3.6	-	-
Asn_ex	Asn-->AsnEx	2.4	-	-	1.5	-	-	0.2	-	-
Asp_ex	Aspcyt-->AspEx	0.1	-	-	0.0	-	-	0.0	-	-
Glu_ex	Glu-->GluEx	24.4	-	-	20.4	-	-	3.4	-	-
Cit_Dummy	Cit-->Citdummy	100.0	-	-	100.0	-	-	100.0	-	-
Pyr_Dummy	Pyr-->Pyrdummy	100.0	-	-	100.0	-	-	100.0	-	-
Mal_Dummy	Mal-->Maldummy	100.0	-	-	100.0	-	-	100.0	-	-
Asp_Dummy	Asp-->Aspdummy	100.0	-	-	100.0	-	-	100.0	-	-
Fum_Dummy	Fum-->Fumdummy	100.0	-	-	100.0	-	-	100.0	-	-
FA_ex	AcCOAcyt-->FAsnk	0.0	-	-	0.0	-	-	14.0	4.7	19.4
Glycolysis_r1	G6P-->F6P	1435.9	-	-	3105.5	-	-	6745.2	-	-
Glycolysis_r1r	F6P-->G6P	1181.5	-	-	2696.7	-	-	6564.6	-	-
Glycolysis_r2	F6P-->FBP	270.2	262.4	278.6	445.6	374.9	519.8	198.5	159.8	244.7
Glycolysis_r3	FBP-->DHAP+GAP	281.9	-	-	448.5	-	-	199.7	-	-
Glycolysis_r3r	DHAP+GAP-->FBP	11.7	-	-	2.9	-	-	1.2	-	-
Glycolysis_r4	DHAP-->GAP	2855.3	-	-	10740. 6	-	-	1669.4	-	-
Glycolysis_r4r	GAP-->DHAP	2586.7	-	-	10296. 4	-	-	1470.9	-	#REF!
Glycolysis_r5	GAP-->PGA	772.1	-	-	943.1	-	-	407.7	-	-
Glycolysis_r5r	PGA-->GAP	225.3	-	-	34.9	-	-	1.8	-	-
Glycolysis_r6	PGA-->PEP	620.0	-	-	928.0	-	-	405.9	-	-
Glycolysis_r6r	PEP-->PGA	73.3	-	-	19.8	-	-	0.0	-	-
Glycolysis_r7	PEP-->Pyrcyt	552.9	537.2	571.7	908.2	764.0	1064.2	408.8	328.1	507.5
Glycolysis_r8	Pyrcyt-->Lac	490.4	479.9	498.1	877.7	734.0	1011.9	387.0	309.4	483.4
TCA_r1	Pyrcyt-->Pymit	55.8	52.0	59.6	32.3	27.3	37.2	29.2	18.4	35.3

TCA_r2	Pyrmit-->AcCOAmit+CO2in	46.1	43.4	49.7	25.0	23.9	27.4	22.0	12.8	27.6
TCA_r3	AcCOAmit+Oxamit-->Citmit	46.1	43.4	49.8	25.0	23.9	27.4	22.0	12.8	27.6
TCA_r4	Citmit-->aKGmit+CO2in	18.3	16.0	21.2	6.6	4.9	10.1	15.4	12.5	22.9
TCA_r5	aKGmit-->Suc+CO2in	41.7	35.1	47.2	19.4	17.3	22.3	22.5	19.3	26.3
TCA_r6	Suc-->Fummit	43.9	-	-	25.0	-	-	22.6	-	-
TCA_r6r	Fummit-->Suc	2.2	-	-	5.7	-	-	0.0	-	-
TCA_r7	Fummit-->Malmit	561.9	-	-	1301.9	-	-	483.1	-	-
TCA_r7r	Malmit-->Fummit	520.2	-	-	1282.5	-	-	460.5	-	-
TCA_r8	Malmit-->Oxamit	68.8	-	-	23.0	-	-	19.1	-	-
TCA_r8r	Oxamit-->Malmit	18.2	-	-	0.0	-	-	0.0	-	-
Anaplerosis_r1	Pyrmit+CO2in-->Oxamit	1.7	0.5	2.8	2.0	1.4	3.2	5.7	4.0	9.2
Anaplerosis_r2	Malmit-->Pyrmit+CO2in	5.6	3.6	7.3	3.6	0.9	7.1	2.0	0.7	4.2
Anaplerosis_r3	Malcyt-->Pyrcyt+CO2in	7.7	-	-	12.3	-	-	15.2	4.0	19.8
Anaplerosis_r4	Oxamit-->PEP+CO2in	6.2	-	-	0.0	-	-	2.9	-	-
PPP_r1	G6P-->Ru5P+CO2in	26.9	11.5	39.5	58.0	33.1	76.6	26.8	15.5	35.8
PPP_r2	Ru5P-->R5P	567.3	-	-	859.0	-	-	4712.6	-	-
PPP_r2r	R5P-->Ru5P	556.2	-	-	837.9	-	-	4703.7	-	-
PPP_r3	Ru5P-->Xu5P	3166.2	-	-	36.8	-	-	17.9	-	-
PPP_r3r	Xu5P-->Ru5P	3150.4	-	-	0.0	-	-	0.0	-	-
PPP_r4	R5P+Xu5P-->S7P+GAP	22.7	-	-	31.1	-	-	30.6	-	-
PPP_r4r	GAP+S7P-->Xu5P+R5P	14.8	-	-	12.7	-	-	21.6	-	-
PPP_r5	GAP+S7P-->F6P+E4P	1543.4	-	-	36639.2	-	-	821.8	-	-
PPP_r5r	E4P+F6P-->S7P+GAP	1535.5	-	-	36620.7	-	-	812.8	-	-
PPP_r6	E4P+Xu5P-->F6P+GAP	7.9	-	-	20.4	-	-	8.9	-	-
PPP_r6r	GAP+F6P--	0.0	-	-	2.0	-	-	0.0	-	-

>Xu5P+E4P											
AA_r1	Gln->Glu	57.2	52.2	61.6	46.1	43.8	48.9	15.4	13.7	17.1	
AA_r2	Glu->aKGmit	1050.4	-	-	186.0	-	-	125.2	-	-	
AA_r2r	aKGmit-->Glu	1021.3	-	-	163.1	-	-	110.6	-	-	
AA_r3	Oxacyt-->Aspcyt	1553.9	-	-	2134.6	-	-	4226.5	-	-	
AA_r4	Aspcyt-->Asn	6.3	-	-	4.8	-	-	0.2	-	-	
AA_r5	Pyrmit-->Ala	13.6	10.7	13.6	8.9	4.1	11.7	3.5	0.7	3.6	
AA_r6	Pyreyt-->Ala	0.0	-	-	2.8	-	-	0.1	-	-	
Cyt_r1	Citeyt-->AcCOAcyt+Oxacyt	33.5	-	-	28.6	-	-	14.0	5.0	19.7	
	Oxacyt-->Malcyt	58.3	-	-	458.3	-	-	8493.5	-	-	
Cyt_r2r	Malcyt-->Oxacyt	1578.7	-	-	2564.4	-	-	12706.0	-	-	
Cyt_r3	Citmit-->Citeyt	30.7	-	-	38.7	-	-	10.1	-	-	
Cyt_r3r	Citeyt-->Citmit	2.8	-	-	20.3	-	-	3.5	-	-	
Cyt_r4	aKGcyt+CO2in-->Citeyt	5.6	4.4	8.9	10.2	8.4	13.3	7.4	4.6	14.0	
	Malcyt-->Malmit	1050.7	-	-	87.2	-	-	77.1	-	-	
Cyt_r5r	Malmit-->Malcyt	1036.1	-	-	79.9	-	-	78.5	-	-	
Cyt_r6	Aspcyt-->Fumcyt	1542.6	-	-	2125.6	-	-	4226.3	-	-	
Cyt_r7	Fumcyt-->Malcyt	1542.6	-	-	2234.6	-	-	4227.7	-	-	
Cyt_r7r	Malcyt-->Fumcyt	0.0	-	-	109.0	-	-	1.4	-	-	
Cyt_r8	aKGmit-->aKGcyt	5.6	4.3	8.9	10.2	8.4	13.3	7.4	4.6	14.0	
{240.0}Ala+{143.6}Aspcyt+{115.2}Asn+{12.8.8}Gln+{154.4}Glu+{984.9}AcCOAcyt+{11.4}G6P+{92.9}R5P+{47.6}DHAP-->Biomass											
CO2	CO2in-->CO2Ex	1915.1	-	-	5148.9	-	-	635.0	-	-	
Mix_r1	{0}Citmit-->Cit	74.2	-	-	0.0	-	-	48.9	-	-	
Mix_r2	{0}Citeyt-->Cit	25.8	-	-	100.0	-	-	51.1	-	-	
Mix_r3	{0}Pyrmit-->Pyr	0.0	-	-	0.0	-	-	0.0	-	-	
Mix_r4	{0}Pyreyt-->Pyr	98.6	-	-	98.0	-	-	88.0	-	-	
Mix_r5	{0}Pyrdil-->Pyr	1.4	-	-	2.0	-	-	12.0	-	-	

Mix_r6	{0}Malmit->Mal	49.1	-	-	4.6	-	-	0.0	-	-
Mix_r7	{0}Malcyt->Mal	48.8	-	-	93.4	-	-	100.0	-	-
Mix_r8	{0}Gludil->Glu	1.5	-	-	1.7	-	-	2.5	-	-
Mix_r9	{0}Fummit->Fum	26.7	-	-	15.8	-	-	0.0	-	-
Mix_r10	{0}Fumcyt->Fum	68.2	-	-	78.5	-	-	96.6	-	-
Mix_r11	{0}Fumdil->Fum	5.1	-	-	5.7	-	-	3.4	-	-
Mix_r12	{0}Aspcyt->Asp	98.2	-	-	96.8	-	-	91.3	-	-
Mix_r13	{0}Aspdil->Asp	1.8	-	-	3.2	-	-	8.7	-	-
Mix_r14	{0}Maldil->Mal	2.1	-	-	2.0	-	-	0.0	-	-
PEPH	Glycolysis_r6<=>Glycolysis_r6r	546.7	536.7	558.7	908.2	763.5	1059.0	405.9	326.6	500.7
MDH	TCA_r8<=>TCA_r8r	50.7	42.9	60.2	23.0	22.0	34.4	19.1	8.0	29.8
TKT2	PPP_r6<=>PPP_r6r	7.9	1.9	12.0	18.4	-0.1	29.9	8.9	5.2	11.9
TKT1	PPP_r4<=>PPP_r4r	7.9	2.6	11.9	18.4	-0.1	29.9	8.9	5.1	11.9
Cit_Transport	Cyt_r3<=>Cyt_r3r	27.9	24.6	31.2	18.4	15.3	21.4	6.6	-5.4	12.6
FHeyt	Cyt_r7<=>Cyt_r7r	1542.6	-	-	2125.6	-	-	4226.3	-	-
GAPDH	Glycolysis_r5<=>Glycolysis_r5r	546.7	536.8	559.0	908.2	763.5	1059.0	405.9	326.7	500.7
TPI	Glycolysis_r4<=>Glycolysis_r4r	268.6	260.8	277.0	444.2	373.5	518.4	198.5	159.8	244.7
PGI	Glycolysis_r1<=>Glycolysis_r1r	254.4	231.0	275.0	408.7	340.4	492.5	180.6	144.9	227.1
MDHcyt	Cyt_r2<=>Cyt_r2r	1520.4	-	-	-	-	-	4212.5	-	-
RPI	PPP_r2<=>PPP_r2r	11.1	6.4	15.2	21.1	12.8	27.3	8.9	5.2	11.9
FBA	Glycolysis_r3<=>Glycolysis_r3r	270.2	266.3	275.3	445.6	374.9	519.9	198.5	159.8	244.7
GLUDH	AA_r2<=>AA_r2r	29.1	24.2	33.7	22.9	20.5	25.8	14.6	12.4	16.8
TAL	PPP_r5<=>PPP_r5r	7.9	1.9	12.1	18.4	-0.1	29.9	8.9	5.1	11.9
Mal_Transport	Cyt_r5<=>Cyt_r5r	14.6	4.3	24.1	7.3	-5.3	27.0	-1.4	-13.2	9.2
RBE	PPP_r3<=>PPP_r3r	15.8	6.4	24.0	36.8	20.3	49.3	17.9	10.3	23.9
SDH	TCA_r6<=>TCA_r6r	41.7	35.1	47.4	19.4	17.3	22.3	22.5	19.3	26.3
FH	TCA_r7<=>TCA_r7r	41.7	35.1	47.4	19.4	17.3	22.3	22.5	19.3	26.3