

Agilent Seahorse XF テクノロジーを用いた がん治療開発のためのエネルギー代謝の ターゲティング

Authors

George W. Rogers
Heather Throckmorton
Sarah E. Burroughs

Abstract

エネルギー代謝の変化は、今、多くの疾患の駆動装置と認識されています。がん研究において、代謝中間体が有望な治療標的として浮上するという、薬剤標的の定義の中で大きな進歩が見られています。Agilent Seahorse XF テクノロジーは、潜在的な薬剤候補遺伝子とタンパク質ターゲットを同定し、がん細胞の増殖・適応・生存におけるそれらの役割を検証するために、生きた細胞で重要な機能的な計測を提供します。がんの治療法を前進させるため、生体エネルギー表現型、細胞 ATP 産生速度とミトコンドリアおよび解糖の機能を計測することによって、がん細胞の代謝の脆弱性を明らかにすることができます。

Introduction

背景：がんの薬剤治療を前進させる機会

がん細胞の増殖は、生体材料とエネルギーを著しく要求するダイナミックなプロセスです。従来の見解は一般的に、がん細胞が自身の増殖要求のために、しばしばワールブルグ効果として特徴づけられた上方制御された解糖に依存すると推測されてきました^{1,2}。しかしながら、代謝解析技術の前進に伴い、一部のがん細胞が無秩序な増殖と生存のために、しばしば下方制御された解糖と同時に、優先してミトコンドリア呼吸を利用することが最近明らかになっています^{3,4,5}。それゆえ、がん代謝の依存性がんサブセットにわたって多様であるだけでなく、がん細胞の傾向性を明らかにするためにがん代謝を計測するという理解に向けたパラダイムシフトがありました^{6,7}。ひとたび同定と検証された代謝経路の傾向性は、治療学的なターゲティングのために活用される可能性があります⁸。がん代謝の治療のための有望な薬剤ターゲットは、エネルギー代謝を配線し直すがん遺伝子、がん遺伝子経路の中間体、基質・栄養源輸送と利用 / 酸化に関連する遺伝子・タンパク質・経路を含みます。

パラダイム・シフト：発がんを駆動する代謝表現型の不均一性

がん細胞は、様々な基質利用可能性と酸素濃度の環境で適応し、生き残り、転移するために、変化させた形質を獲得するように、様々な代謝的变化を受けます⁹。結果としてそれらの細胞は、それらの形質が変化していない親細胞との明確な遺伝子的、生体エネルギー的および機能的な差異を示します。最近の10年には、生体エネルギーの研究は、この生命エネルギーを誘導するために優先して用いられるメカニズムと基質における、がんタイプの間の、そしてがんタイプの範囲内の多様性さえもハイライトしてきました。解糖（またはワールブルグ代謝）はがん細胞のエネルギー産生と同化作用の発達のための主要な代謝プロセスと長く考えられてきましたが、ミトコンドリアが発がんにおいて重要な役割を果たすことは、いまや明確です¹⁰。中心的な代謝および生体エネルギーの機能に加え、ミトコンドリアはまた、酸化還元とカルシウムホメオスタシスの制御だけでなく、腫瘍同化作用のための素材も提供します⁶。がんの主な教義が異常細胞増殖に寄与する正常細胞代謝の調節異常であるにもかかわらず、がんは1つの疾患ではありません。したがって、治療的な介入のための機会を同定し開発するために、与えられたがんタイプの代謝経路がどのように配線し直されるかを理解することが重要です。

代謝/生体エネルギー表現型の定義

がんのあらゆるタイプを理解することにおける最初のステップは、細胞の代謝および生体エネルギーの特性を特徴づけることです。酸素消費速度 (OCR) / 細胞外酸化速度 (ECAR) 比と Agilent SeahorseXF Cell Energy Phenotype Test (Rogers et al., 2019 で詳細に解説¹¹) は、生体エネルギー平衡の高水準の評価を提供します。Lanning et al. は、トリプル・ネガティブ乳がん (TNBC) 由来の細胞株が、基底の代謝表現型に関して著しい不均一性を示したことを明らかにするためにこのアッセイを用いました (Fig.1)¹²。類似した研究において、Guha et al. はいくつかの乳がん細胞株の基底の代謝特性のプロファイルを描きました (Fig.2)。ここでは、著者は悪性の TNBC 細胞がミトコンドリアの遺伝子的および機能的な欠陥と関連する特有の代謝表現型を持つことを示しました¹³。これらの腫瘍形成の欠陥はミトコンドリアの呼吸を減じて、腫瘍原性に関連する解糖への代謝スイッチを誘導しました。これらの結果は、代謝表現型が転移の危険にさらされている TNBC 患者を同定するために用いることができ、そして、変更された代謝が化学療法の応答の改善のための標的になる可能性があることを示唆します。

OCR と ECAR の XF 計測に基づき、生体エネルギー表現型のより機能的および定量的な計測は、ATP 産生の速度とソース (ミトコンドリア vs 解糖) を定量することです。Agilent Seahorse XF Real-Time ATP Rate アッセイは、細胞で合計 ATP 産生速度を計測し、ミトコンドリアの酸化的リン酸化 (OXPHOS) と解糖 (Fig.3 および¹⁴) から産生される ATP を区別します。このアッセイは、がん細胞株のパネルに適用されるとき、がん細胞株がそれらのエネルギー需要を満たすためにミトコンドリアの OXPHOS と解糖の活性を異なる比率で利用することを示します (Fig.4 および¹⁵)。これらの発見は、異なるがん細胞は特有の代謝特性を持つこと、その特性が疾患サブタイプのターゲティングおよび使用する細胞株がその疾患の良いモデルであるかを判断するための戦略立てに重要であることを強調します。

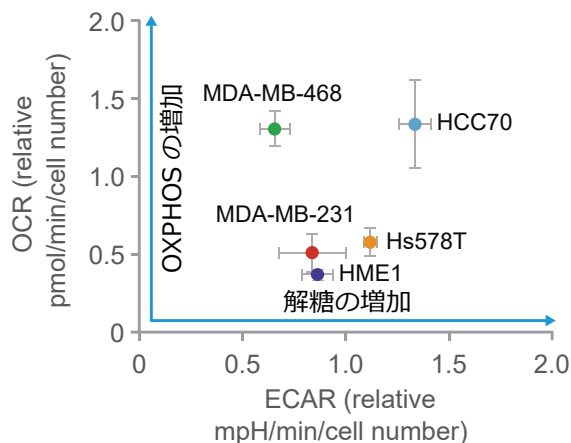


Figure 1 : 乳がん細胞株のAgilent Seahorse XFエネルギーマップは、異なる代謝表現型を明らかにする。 ノーマライズされたECAR・OCRデータは、各細胞モデルの全体的な相対的基底代謝プロファイルを明らかにするためにプロットされた¹²。

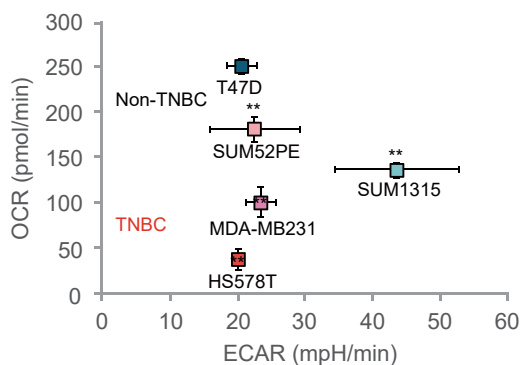
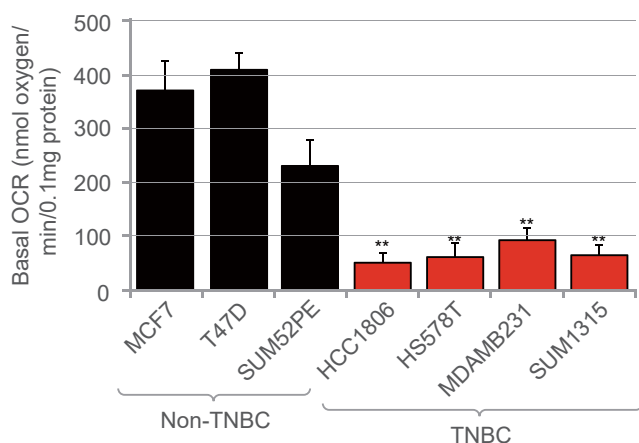


Figure 2 : TNBCと非TNBC細胞株は、異なる代謝表現型を示す。
上 : TNBCと非TNBC細胞株の基底の酸素消費速度(OCR)。
下 : TNBCと非TNBC細胞株のXFエネルギーマップ¹³。

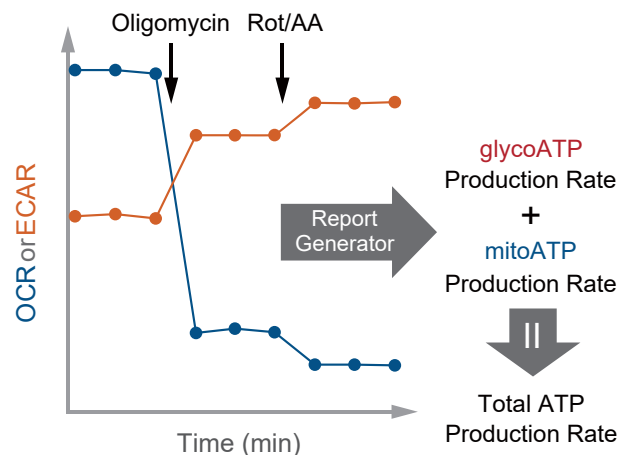


Figure 3 : Agilent Seahorse XF Real-Time ATP Rateアッセイの代表的な図式。 このアッセイは、ミトコンドリアおよび解糖の経路から、ATP産生速度の定量的な計測を提供する。生細胞のOCRとECARは、Agilent Seahorse XF Analyzerを用いて同時に計測される。標準化されたコントロール化合物の注入とデータ解析を用いて、細胞のATP産生速度がレポートされる¹⁴。

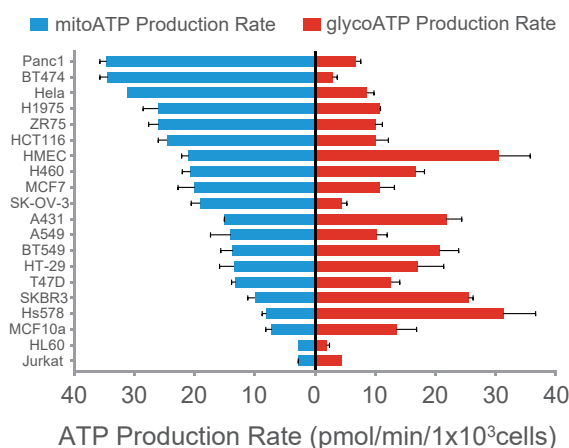


Figure 4 : 治療的な戦略のための重要な意味を持ちながら、がん細胞は細胞エネルギー産生のための異なる戦略を発展させてきた。 主に酸化的なもの(上)から主に解糖的なもの(下)まで、20のがん細胞株のパネルにわたってATP産生速度を計測することにより、広範囲のエネルギー表現型を明らかにする¹⁵。

がん細胞のエネルギー代謝を調節する

潜在的な治療的化合物に反応するがん細胞の代謝の変化を計測することは、薬剤作用機序・有効性・毒性・オフターゲット作用を理解するために最も重要です。ヒト胃腺がん細胞で γ -Tocotrienol (γ -T3) の作用を調査するとき、Wang et al. はミトコンドリア ATP 産生から離れて解糖 ATP 産生に向かう著しいシフトを観察しました。更に γ -T3 は、これらの細胞でトータル ATP 産生速度を減少させました (Fig.5)¹⁶。

一旦生体エネルギー表現型の変化が検出されたならば、代謝の平衡のシフトに関して責任を持つメカニズムを発見するために、しばしば更なる調査が必要になります。したがって、Fig.5 に示される観察に対する洞察を得るため、 γ -T3 の存在下におけるミトコンドリアと解糖の機能を直接評価するために更なるアッセイが実行されまし

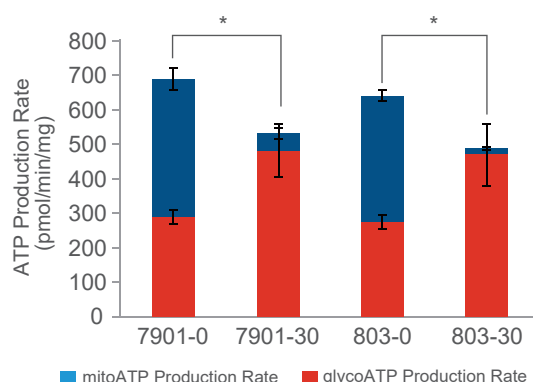


Figure 5 : ATP産生速度の定量は、2つの腺がん細胞株における薬物誘発性の解糖のスイッチを明らかにする。胃癌細胞は0または4時間、30 μ M γ -T3で処理され、ATP生産速度がAgilent Seahorse XF Real Time ATP Rate Assayを用いて計測された。¹⁶から適応。

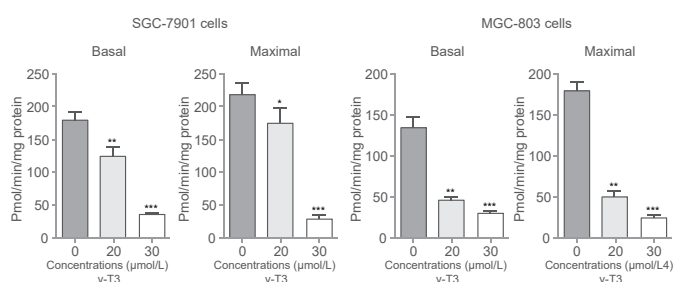


Figure 6 : ミトコンドリア機能への γ -T3の作用の用量依存性は、Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Testで計測される。SGC-7901とMGC-803細胞は示された γ -T3濃度で4時間処理され、基底および最大のOCRがXF Cell Mito Stress Test を用いて計測された¹⁶。

た。Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test を用いて、Wang et al. は SGC-7901 細胞と MGC-803 細胞の基底および最大の呼吸の用量依存的な減少と、いずれもミトコンドリア機能障害を示していることを証明しました (Fig.6)。解糖の定量化が可能な計測を提供するために Agilent Seahorse XF Glycolytic Rate Assay を用いて (Fig.7¹⁷)、著者らは双方の細胞種における基底の解糖の用量依存的増加も示しました (Fig.8)。このデータは、より下方のトータル産生速度以外での、細胞 ATP 産生の主に解糖へのスイッチングについての観察をサポートします。これらの結果は、直交性データとともに、ミトコンドリア機能が抗癌剤開発のための有効なターゲットである可能性があることを示唆します¹⁶。

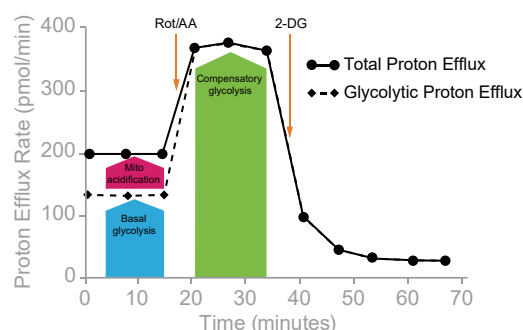


Figure 7 : Agilent Seahorse XF Glycolytic Rate Assayの典型的な図式。このアッセイは、ミトコンドリアによる酸化を減算するため、OCRとECAR(同時に、Agilent Seahorse XF Analyzerで測定される)を用いた解糖の定量的な計測を提供する。結果として生じる基底および補償的な条件における解糖のProton Efflux Rate (glycoPER)がレポートされる¹⁷。

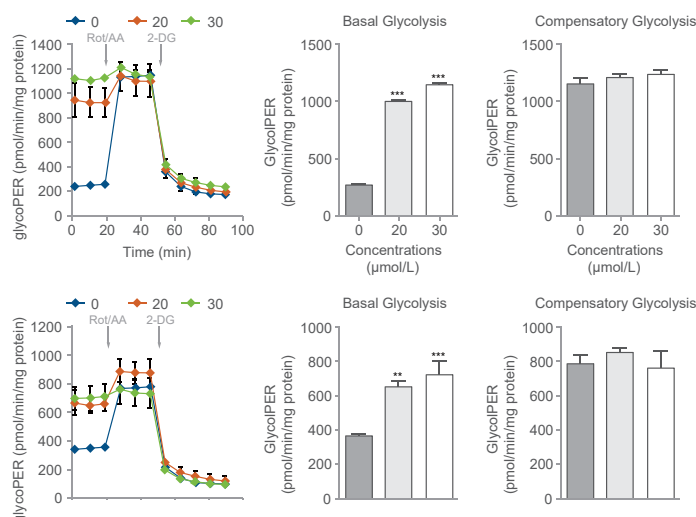


Figure 8 : 解糖の速度に対する γ -T3の作用の用量依存性は、Agilent Seahorse XF Glycolytic Rate Assayで計測される。SGC-7901細胞(上)とMGC-803細胞(下)は示された γ -T3濃度で4時間処理され、XF Glycolytic Rate Assayを用いて細胞外酸化速度が計測された。棒グラフは、基底および補償的な解糖速度の定量的なデータを示す¹⁶。

治療学的なターゲットとしてのミトコンドリアおよび解糖の機能： 遺伝子型と代謝表現型の関係

がん細胞のエネルギー表現型の最初の分類を越えて、ATP 産生速度と OXPHOS vs 解糖から供給される ATP の比は、がんに関連した突然変異の機能的な影響を調査するために更に用いることができます。例えば、KRAS と EGFR が突然変異した NSCLC 細胞の評価は、ATP 産生のソースに関して異なる代謝表現型を持つことを明らかにしました (Fig.9¹⁸)。EGFR 突然変異を持つ細胞株は、一般的に KRAS 突然変異を持つ細胞株よりも酸化的で、がんサブセットの代謝の脆弱性と、潜在的な治療ターゲットとしての EGFR に関する洞察を提供します。

Deribe の研究は、XF Cell Mito Stress Test を使用した計測により、代謝調節のターゲットとして機能する可能性のある既知の癌原遺伝子の変異を明らかにしたもう一つの例を示しています¹⁹。この研究において著者らは、SWI/SNF クロマチン・リモデリング複合体における変異が、肺がん細胞株においてターゲットとなり得る OXPHOS への依存を誘発することを明らかにしました。最も頻繁に不活性化される複合体サブユニットである SMARCA4 に欠陥のある細胞 (KPS 細胞、Fig.10A、B) は、ミトコンドリア呼吸を増加させました。SMARCA4 に欠

陥のある H1299 肺細胞株が SMARCA4 で再構成された時 (H1299 SMARCA4)、基底の呼吸と予備呼吸能は減少し (Fig.10C、D)、更に、これらの変異した肺がん細胞が OXPHOS の阻害に感受性を示すことが明らかになりました¹⁹。

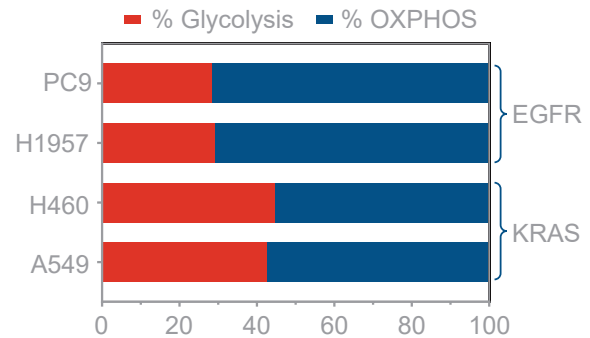


Figure 9 : KRASとEGFRに突然変異のあるNSCLC細胞は、異なるATP産生パターンを示す。標準的なアッセイ培地 (10mM グルコース、1mMピルビン酸塩、2mMグルタミンを含むpH 7.4の XF RPMI)で培養したNSCLCの4種類の細胞モデルの代謝プロファイル。これらの2種類のKRAS突然変異細胞株は、EGFR突然変異細胞株よりわずかに解糖的である¹⁸。

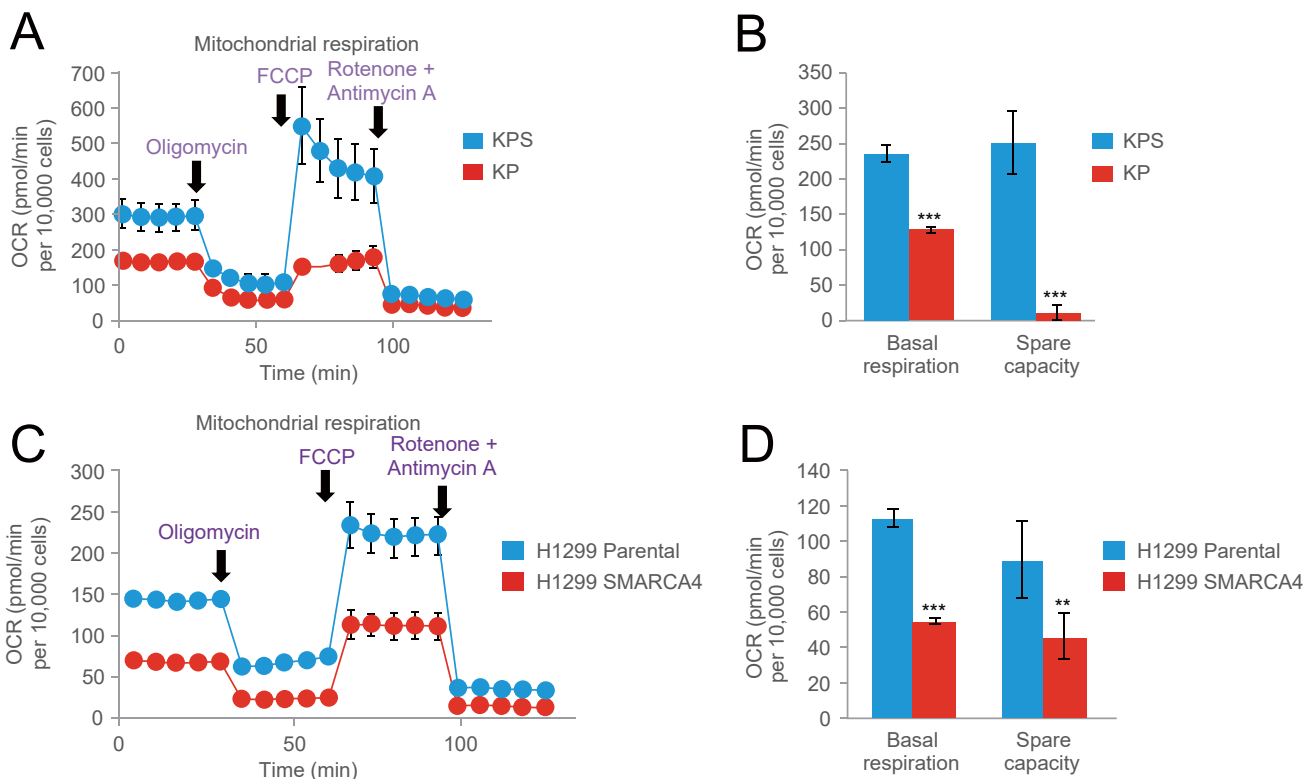


Figure 10 : 基底の呼吸と予備呼吸能を用いた、ミトコンドリアの遺伝子突然変異の機能的な影響の計測。A) Kras-p53(KP)由来の細胞株 (赤)とKras-p53-SMARCA4由来の細胞株(KPS、すなわち欠陥のあるSMARCA4、青)からのOCR値のトレース。B) 基底の呼吸と予備呼吸能。C) H1299の親細胞(すなわち欠陥のあるSMARCA4、青)とSMARCA4で再構成されたH1299細胞株(赤)を示したmitochondrial stress testのカイネティック・トレース。D) 基底の呼吸と予備呼吸能¹⁹。

先の例では、XF アッセイが上方制御された OXPHOS を伴う代謝の脆弱性をどのように明らかにするかについて議論しました。同様に、上方制御された解糖と関連する代謝の脆弱性を同定することができます。代謝表現型の変化を駆動するもう一つのがん遺伝子の例として、Barnoud et al. は最近、47 番目のアミノ酸にセリンを持つ p53 アレルを発現する腫瘍細胞 (S47 腫瘍細胞) が、野生型 p53 を持つ細胞と比較して OXPHOS への依存性の減少を伴う上方制御された解糖を示すことを証明しました²⁰。これは、解糖およびミトコンドリアの機能を調査するために、それぞれ XF Glycolytic Rate assay と XF Mito Stress Test を実行することによって達成されました。ミトコンドリア機能の計測により、野生型細胞と比較して S47 細胞の基底および最大 (ストレスがか

かっている) のミトコンドリア呼吸が減少することが明らかになり (Fig.11A)、このことは OXPHOS を行う能力の減少を示唆しました。逆に、基底および補償的な解糖の計測 (Fig.11B-D) は、S47 腫瘍細胞が基底およびストレスがかかった条件において解糖を上方制御していることを明らかにしました。このことは、代謝の再配線が野生型細胞と比較して解糖へのより大きな依存性をもたらしたことを示します。まとめると、この結果はこれらの腫瘍細胞において、解糖系が S47 バリエーションがんにとっての潜在的な代謝のターゲットであることを示唆します。このことは、解糖阻害剤である 2-デオキシグルコースに対する S47 細胞の感受性の増加を示した実験によって更にサポートされます²⁰。

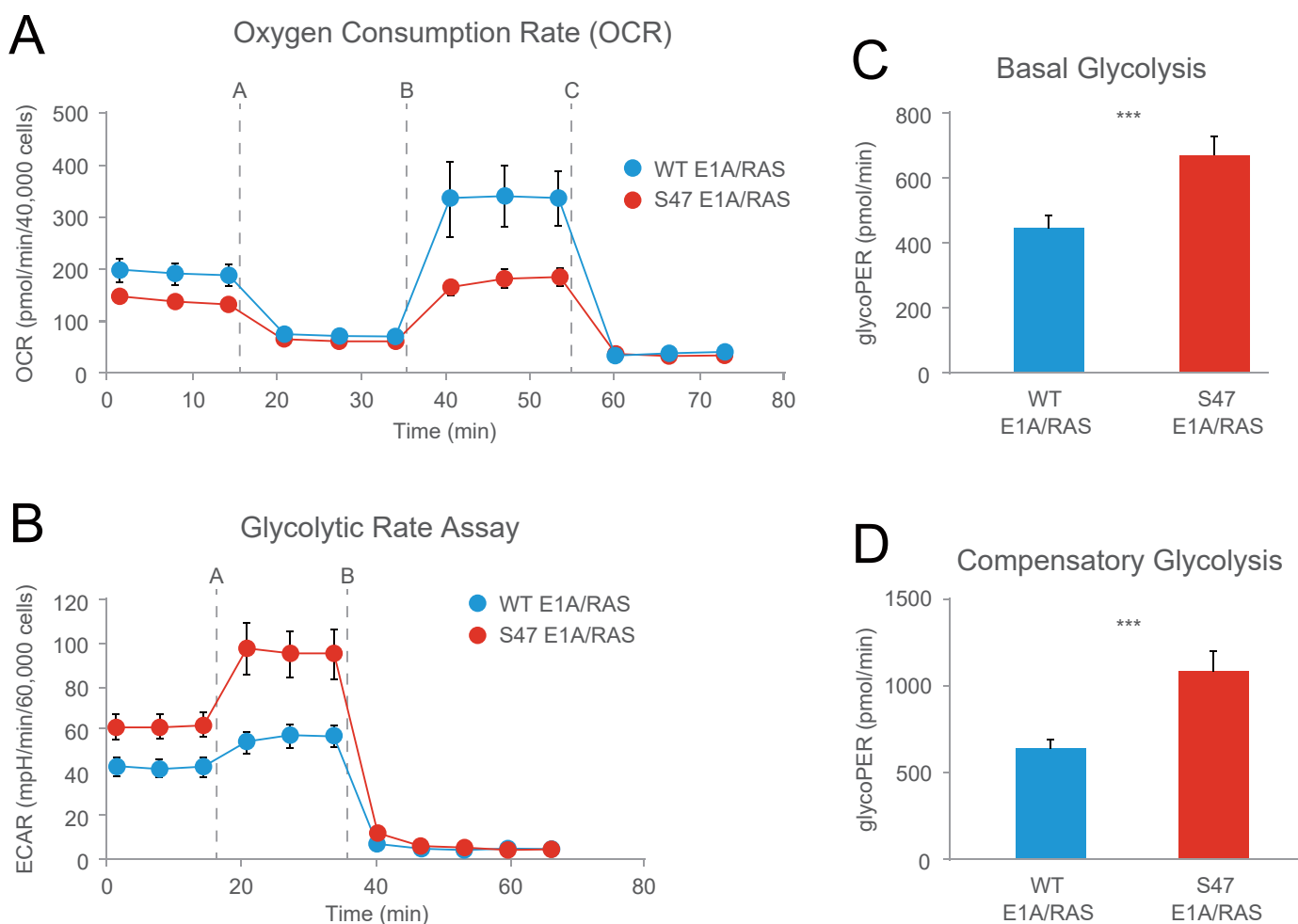


Figure 11. A) Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress TestはS47腫瘍細胞において、野生型細胞と比較して基底のミトコンドリア呼吸と予備呼吸能の減少を明らかにする。B、C、D) Agilent Seahorse XF Glycolytic Rate Assayは、WT細胞と比較したS47腫瘍細胞の基底および補償的な解糖の統計的に有意な差分を明らかにする (Figは²⁰から適応)。

Summary

- がん細胞における酸化的リン酸化と解糖の間の生体エネルギー平衡の変化を最初に理解するために、OCR / ECAR 比を計測することが奨励されます。この計測基準は、細胞表現型または代謝活性の変化に関する使いやすい指標です。この比を決定するために用いることができるアッセイには、XF Cell Energy Phenotype Test、XF Cell Mito Stress Test、XF Glycolytic Rate Assay が含まれます。
- がん細胞の代謝表現型のより機能的および定量的な計測は、ATP 産生の速度とソース (ミトコンドリア vs 解糖) を定量化することです。XF Real-Time ATP Rate Assay は、細胞のトータル ATP 産生速度を計測し、ミトコンドリア OXPHOS vs 解糖から産生される ATP を区別します。このアッセイはそれゆえ、がん細胞の表現型と代謝の詳細な機能的な概要を提供します。
- XF Real-Time ATP Rate アッセイ (total、glyco- および mitoATP 産生速度)、XF Cell Mito Stress Test (基底および最大 OCR)、XF Glycolytic Rate Assay (基底および補償的な解糖) によって提供される定量的および機能的な指標の組み合わせにより、代謝の傾向性、有効性、毒性、ターゲット同定、作用機序などの点から抗がん剤の作用を明らかにすることができます。
- がん遺伝子 (すなわち発現したタンパク質) と、ミトコンドリアおよび解糖の機能と ATP 産生速度 / ソースの変化に関するがん細胞代謝への影響の間の相関パターンについての証拠は増加しています。これらの代謝の変化またはシフトは、抗癌の治療法のための潜在的なターゲットである可能性があります。

References

- Counihan, J. L.; Grossman, E. A.; Nomura, D. K., Cancer Metabolism: Current Understanding and Therapies. *Chemical Reviews* 2018, 118 (14), 6893-6923.
- Zheng, J., Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncology letters* 2012, 4 (6), 1151-1157.
- Wallace, D. C., Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 2012, 12 (10), 685-98.
- Vyas, S.; Zaganjor, E.; Haigis, M. C., Mitochondria and Cancer. *Cell* 2016, 166 (3), 555-566.
- Danhier, P.; Bański, P.; Payen, V. L.; Grasso, D.; Ippolito, L.; Sonveaux, P.; Porporato, P. E., Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2017, 1858 (8), 556-572.
- Ashton, T. M.; McKenna, W. G.; Kunz-Schughart, L. A.; Higgins, G. S., Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2018, 24 (11), 2482-2490.
- Porporato, P. E.; Filigheddu, N.; Pedro, J. M. B.-S.; Kroemer, G.; Galluzzi, L., Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Research* 2017, 28, 265.
- Kalyanaraman, B.; Cheng, G.; Hardy, M.; Ouari, O.; Lopez, M.; Joseph, J.; Zielonka, J.; Dwinell, M. B., A review of the basics of mitochondrial bioenergetics, metabolism, and related signaling pathways in cancer cells: Therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds. *Redox biology* 2017, 14, 316-327.
- Jose, C.; Bellance, N.; Rossignol, R., Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochimica et biophysica acta* 2011, 1807 (6), 552-61.
- Teoh, S. T.; Lunt, S. Y., Metabolism in cancer metastasis: bioenergetics, biosynthesis, and beyond. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 2018, 10
- Rogers, G. W.; Throckmorton, H.; Burroughs, S. E., Gaining Insights into Disease Biology for Target Identification and Validation using Seahorse XF Technology. *Agilent Technologies Application Note* 2019, publication number 5991-7894EN.
- Lanning, N. J.; Castle, J. P.; Singh, S. J.; Leon, A. N.; Tovar, E. A.; Sanghera, A.; MacKeigan, J. P.; Filipp, F. V.; Graveel, C. R., Metabolic profiling of triple-negative breast cancer cells reveals metabolic vulnerabilities. *Cancer Metab* 2017, 5, 6.
- Guha, M.; Srinivasan, S.; Raman, P.; Jiang, Y.; Kaufman, B. A.; Taylor, D.; Dong, D.; Chakrabarti, R.; Picard, M.; Carstens, R. P.; Kijima, Y.; Feldman, M.; Avadhani, N. G., Aggressive triple negative breast cancers have unique molecular signature on the basis of mitochondrial genetic and functional defects. *Biochimica et biophysica acta* 2018, 1864 (4 Pt A), 1060-1071.
- Romero, N.; Rogers, G. W.; Neilson, A.; Dranka, B. P., Quantifying Cellular ATP Production Rate Using Agilent Seahorse XF Technology. *Agilent Technologies Application Note* 2018, publication number 5991-9303EN.
- Romero, N.; Swain, P.; Kam, Y.; Rogers, G. W.; Dranka, B. P., Bioenergetic profiling and fuel dependencies of cancer cell lines: quantifying the impact of glycolytic and mitochondrial ATP production on cell proliferation. *Agilent Technologies poster EACR*, 2018 2018.
- Wang, H.; Luo, J.; Tian, W.; Yan, W.; Ge, S.; Zhang, Y.; Sun, W., gamma-Tocotrienol inhibits oxidative phosphorylation and triggers apoptosis by inhibiting mitochondrial complex I subunit NDUF8 and complex II subunit SDHB. *Toxicology* 2019, 417, 42-53.
- Romero, N.; Swain, P.; Dranka, B. P., Quantifying cellular glycolytic rate using CO₂-corrected extracellular acidification. *Agilent Technologies Application Note* 2017, publication number 5991-7894EN.
- Swain, P.; Romero, N.; Kam, Y.; Van de Bittner, G.; El Azzouny, M.; Dranka, B. P., Differential use of lactate for mitochondria by NSCLC cells. *Agilent Technologies Poster, AACR* 2019 2018.
- Lissanu Deribe, Y.; Sun, Y.; Terranova, C.; Khan, F.; Martinez-Ledesma, J.; Gay, J.; Gao, G.; Mullinax, R. A.; Khor, T.; Feng, N.; Lin, Y.-H.; Wu, C.-C.; Reyes, C.; Peng, Q.; Robinson, F.; Inoue, A.; Kochat, V.; Liu, C.-G.; Asara, J. M.; Moran, C.; Muller, F.; Wang, J.; Fang, B.; Papadimitrakopoulou, V.; Wistuba, I. I.; Rai, K.; Marszalek, J.; Futreal, P. A., Mutations in the SWI/SNF complex induce a targetable dependence on oxidative phosphorylation in lung cancer. *Nature Medicine* 2018, 24 (7), 1047-1057.
- Barnoud, T.; Parris, J. L. D.; Murphy, M. E., Tumor cells containing the African-Centric S47 variant of TP53 show increased Warburg metabolism. *Oncotarget* 2019, 10 (11), 1217-1223.

www.agilent.com/chem/drugdiscovery-cellmetabolism

●お問合せ先 (XFシリーズ日本総代理店):



プライムテック株式会社

東京都文京区小石川 1-3-25 小石川大田ビル2F
Phone: [東京] 03-3816-0851 [大阪] 06-6310-8077
<http://www.primetech.co.jp/> sales@primetech.co.jp

●製造元:



Agilent Technologies

rev00 (201908E)