

令和元年6月5日現在

機関番号：34428  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2016～2018  
課題番号：16K08503  
研究課題名(和文)「癌細胞のクロライドシフト」による細胞接着能変化を介した癌転移メカニズムの解明  
  
研究課題名(英文)Molecular mechanisms of cancer metastasis via "chloride shift" of cancer cells  
  
研究代表者  
宮崎 裕明(Miyazaki, Hiroaki)  
  
摂南大学・理工学部・教授  
  
研究者番号：30360027  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、原発巣と転移巣における癌細胞の細胞外環境変化により細胞内Cl<sup>-</sup>濃度が変化する「癌細胞のクロライドシフト」により細胞接着能や運動能が変化し、癌転移を引き起こすという仮説の検証を行った。細胞内Cl<sup>-</sup>濃度の低下は細胞接着分子の発現パターンを変化させ、細胞接着能へ影響を与えることが明らかになった。また、細胞内Cl<sup>-</sup>濃度の低下は、細胞接着や細胞遊走能の制御に関わっているSrcキナーゼに対して影響を与え、下流分子へのシグナル伝達が減少していた。従って、細胞内Cl<sup>-</sup>はSrcキナーゼの活性を制御し細胞接着や細胞運動に影響を与え、癌転移のきっかけとなり得ることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
癌転移については長年にわたって様々なアプローチからの研究が行われているが、癌転移は多段階の複雑なプロセスを経ているため、全体のメカニズム解明にはほど遠い状態が続いている。例えば、原発巣の細胞が上皮間葉転換を起こす際に、様々な細胞接着に関与するタンパク遺伝子の発現が変化することが知られているが、なぜこれらの遺伝子発現が変化するのか、またそのきっかけは何なのか、といった癌転移発症メカニズムとの因果関係については全く明らかにされていない。本研究は、これまでの癌研究とは全く異なるアプローチから癌転移メカニズムの解明を目指すことにより、癌研究において新たな概念を構築する斬新な研究になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we confirmed the hypothesis that changes of the extracellular environment in cancer cells at primary and metastatic sites would affect intracellular Cl<sup>-</sup> concentration (chloride shift of cancer cells), which changed cell adhesion and migration, and would cause of cancer metastasis. The reduction of intracellular Cl<sup>-</sup> concentration affected the expression pattern of cell adhesion molecules and the cell adhesion ability. In addition, the decrease of intracellular Cl<sup>-</sup> concentration altered activities of Src signaling pathways, which were involved in the control of cell adhesion and cell migration. Therefore, these results strongly suggest that changes of intracellular Cl<sup>-</sup> concentration via chloride shift of cancer cells play important roles in cancer migrations and invasion.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞内Cl<sup>-</sup>濃度 癌転移 細胞接着因子

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌細胞が原発巣にのみとどまっている早期癌においては、手術による切除および適切な抗癌剤の使用により徐々に治癒率は改善されつつある。しかしながら癌細胞が原発巣から移動し、転移巣を形成したのちの治療は現在においても非常に困難を極める。従って、原発巣からの癌細胞の転移を抑制できれば癌の治癒率を劇的に回復させることが可能となる。我々の科学研究費補助金採択研究から、細胞内 Cl 濃度変化が細胞運動を制御していることが明らかになった。しかし、なぜ原発巣から細胞が離脱し、転移先の組織において再接着するのか、細胞の接着能・浸潤能変化メカニズムに関しては未だ未解明な点が多く残っている。

ヒトの赤血球細胞では、クロライドシフトと呼ばれる現象の存在が知られている。末梢組織の毛細血管では、高い CO<sub>2</sub> 分圧 (pCO<sub>2</sub>) により赤血球内では炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase: CA) の作用により HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> が合成される。HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> は、細胞膜上に存在する Anion Exchanger (AE) の働きにより細胞外に輸送される。AE は、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> と Cl<sup>-</sup> を交換輸送するため、Cl<sup>-</sup> が細胞内へ輸送される。一方、肺泡に存在する毛細血管では pCO<sub>2</sub> が低く、O<sub>2</sub> 分圧が高い環境となっていることから、赤血球内では HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> から CO<sub>2</sub> が合成される。そのため、細胞外から HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> が AE を介して細胞内に輸送される。その際に、Cl<sup>-</sup> が細胞内から細胞外へと交換輸送される。このように、赤血球では細胞内 Cl 濃度が末梢組織中の毛細血管と肺泡の毛細血管中において細胞内の Cl 濃度が逆方向に変化していると考えられる。

一般に癌細胞では、原発巣周辺では癌細胞の高い代謝活性により pCO<sub>2</sub> が高い状態となっていることが想定される、一方、癌の転移先として多くの報告がある肺では、肺泡上皮を介したガス交換により pCO<sub>2</sub> が低下している。従って、癌細胞においても原発巣と転移巣ではそれぞれに存在する癌細胞内の Cl 濃度が逆に変化する「癌細胞のクロライドシフト」がおきていると考えることが出来る。我々は、以前の研究から細胞内 Cl 濃度が継上皮イオン輸送、神経突起伸長や癌細胞の細胞増殖制御に重要な役割を果たしている事を明らかにしている。また、以前の科学研究費採択研究から細胞内 Cl 濃度変化が細胞の運動能に対しても影響を与えることが明らかになっており、細胞内 Cl は様々な細胞の生理機能を制御する調節因子として働いていると考えられる。従って、原発巣と転移巣における細胞内 Cl 濃度の変化が細胞の接着・脱接着を制御し癌転移を引き起こされている可能性が強く示唆される。そこで本研究では、細胞外 pCO<sub>2</sub> の違いによる細胞内 Cl 濃度変化が癌転移の原因となり得るかについて検討する。

## 2. 研究の目的

癌が発生した部位 (原発巣) から異なる場所へ移動し、再び腫瘍を形成することを転移という。一般に、癌細胞が転移巣を形成したのちの治療は非常に困難を極める。これまでの科学研究費補助金採択研究により、細胞内 Cl 濃度変化が細胞運動を制御していることが明らかになったが、なぜ原発巣から細胞が離脱し、転移先の組織において再接着するのか、細胞の接着能変化メカニズムに関しては明らかにされていない。本研究では、原発巣と転移巣における癌細胞の細胞外環境変化、特に二酸化炭素分圧 (pCO<sub>2</sub>) 変化が細胞内 Cl 濃度変化 (癌細胞のクロライドシフト) させることで細胞の接着能や運動能が変化し、一連の癌転移が起こるといふ仮説の検証を行う。これらの結果から、「癌細胞のクロライドシフト」が癌転移の分子メカニズムである可能性を検討するため、以下の内容について検討する。

- (1) 細胞内 Cl 濃度による癌細胞の細胞接着因子発現変化に与える影響
- (2) 細胞内 Cl 濃度による癌細胞の細胞接着能に与える影響
- (3) 細胞内 Cl 濃度による癌細胞の細胞運動能に与える影響
- (4) 細胞内 Cl 濃度が Src キナーゼシグナル伝達経路に与える影響
- (5) AE (anion exchanger) -CA (carbonic anhydrase) 変異 HT-29 細胞の作製
- (6) pCO<sub>2</sub> を変化させた条件下での癌細胞内 Cl 濃度変化

これら結果を基に、細胞レベルにおいて pCO<sub>2</sub> 変化が細胞内 Cl 濃度に変換され、その結果細胞の接着能が変化することが癌転移のメカニズムの一つになっている事の証明を目指す。また、pCO<sub>2</sub> を変化させた条件下での癌細胞内 Cl 濃度変化に関与する carbonic anhydrase や anion exchanger が、将来の癌転移治療や予防のターゲットとなる可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) 細胞内 Cl 濃度による癌細胞の細胞接着因子発現変化に与える影響

Cl<sup>-</sup> を NO<sub>3</sub><sup>-</sup> に置換することで Cl 濃度を変えた (5 - 120 mM) RPMI1640 培養液を用いて MKN28 細胞を培養し、24 時間後に RNA およびタンパクサンプルを抽出した。それらのサンプルを用いて、癌細胞が転移する際に発現が変化すると報告されている細胞間や細胞-細胞外マトリクス間の接着に関わる各細胞接着因子 (E-cadherin、N-cadherin、EpCAM、Integrins 等) の発現変化を、qPCR (mRNA レベル) や Western blotting 法を用いて検討した。

(2) 細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度による癌細胞の細胞接着能に与える影響

Cl<sup>-</sup>を NO<sub>3</sub><sup>-</sup>に置換することで Cl<sup>-</sup>濃度を変えた (5 - 120 mM) RPMI1640 培養液を用いて、MKN28 細胞の細胞懸濁液を作製した。この細胞懸濁液を、コラーゲン type I をコーティングした 96 well plate に播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で 30 分間インキュベートした後、PBS で各 well を洗浄した。洗浄後、plate の底面に残った細胞数を MTT assay により定量化し、その値を細胞と細胞外マトリクス間との接着能として評価した。

(3) 細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度による癌細胞の細胞運動に与える影響 (wound healing assay)

大腸癌由来 HT-29 細胞を通常の RPMI1640 培養液中で 6 well plate に confluent になるまで培養し、細胞層をマイクロチップの先端で傷を付けた後、Cl<sup>-</sup>濃度を変化させた培養液に交換した。その後、培養を続け、1 日おきに同じ部位の傷の写真撮影し、細胞が移動する距離を測定し Cl<sup>-</sup>濃度の違いが細胞の移動距離に影響を与えるかを評価した。

(4) 細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度が Src キナーゼシグナル伝達経路に与える影響

細胞接着や運動、および細胞浸潤に影響を与えるシグナル伝達経路として知られている Src キナーゼシグナル伝達経路が、「癌細胞のクロライドシフト」に関与しているかについて検討を行った。Cl<sup>-</sup>濃度の異なる各 RPMI1640 培養液を用いて HT-29 細胞を培養し、6 時間おきに 48 時間後までタンパクサンプルを抽出した。それらのサンプルを用いて、Src キナーゼの活性化に関わる Y416 残基のリン酸化レベルやその下流に存在し細胞接着や細胞運動に関わっていると考えられている FAK や paxillin などの活性化 (リン酸化) レベルを Western blotting 法により確認した。

(5) AE (anion exchanger) - CA (carbonic anhydrase) 変異 HT-29 細胞の作製

「癌細胞のクロライドシフト」の形成に必要な anion exchanger (AE) や carbonic anhydrase (CA) をコードする遺伝子配列に変異を加え、それらが機能しない AE-CA 変異 HT-29 細胞の作製を目指した。Human anion exchanger 1 (AE1) および human carbonic anhydrase (I ~ III) の gRNA を作製し、CRISPR-CAS9 法によりそれぞれの遺伝子の knockout 細胞株の確立をめざした。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度による癌細胞の細胞接着因子発現変化に与える影響

胃癌由来細胞株 MKN28 細胞において、癌細胞が転移する際に発現が変化すると報告されている細胞間や細胞-細胞外マトリクス間の接着に関わる各細胞接着因子 (E-cadherin、N-cadherin、EpCAM、Integrins 等) の発現が細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度によって影響を受けるか、qPCR (mRNA レベル) や Western blotting 法を用いて検討した。

まず上皮細胞間の接着に関わる E-cadherin の発現について検討した。E-cadherin は癌細胞が転移する際に減少することが知られているが、MKN28 細胞を低 Cl<sup>-</sup>培地中で培養したところ、E-cadherin の発現が有意に減少した。次に、細胞内 Cl<sup>-</sup>が細胞と細胞外マトリクスとの接着に関与するインテグリンの発現に対する影響について検討した。α2 インテグリンの mRNA 発現は、低 Cl<sup>-</sup>環境下で有意に減少していたが、β1 インテグリンについては変化が認められなかった。また、上皮細胞に特異的に発現し、癌細胞が浸潤する際に起こる上皮間葉転換に関与している事が知られている EpCAM の発現についても検討した。通常および低 Cl<sup>-</sup>環境下において total EpCAM の発現について変化は認められなかった。しかし、癌増殖の増殖促進因子として機能する細胞内ドメインの遊離が低 Cl<sup>-</sup>環境下では有意に減少した。これらの結果から、細胞内 Cl<sup>-</sup>は、癌転移に関与する細胞接着因子の発現に影響を与えることが明らかになった。

(2) 細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度による癌細胞の細胞接着能に与える影響

コラーゲン type I をコーティングした 96 well plate への MKN28 細胞の接着能について評価したところ、低 Cl<sup>-</sup>環境中ではコラーゲンへの細胞接着能が有意に低下していた。従って、細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度は癌細胞の細胞外基質との間の接着能についても大きな影響を与えることが明らかになった。

(3) 細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度による癌細胞の細胞運動に与える影響 (Wound healing assay)

次に、細胞内 Cl<sup>-</sup>が細胞運動に与える影響について、wound healing assay によって検証した。大腸癌由来 HT-29 細胞を通常の RPMI1640 培養液中で 6 well plate に confluent になるまで培養し、細胞層をマイクロチップの先端で傷を付けた後、Cl<sup>-</sup>濃度を変化させた培養液に交換した。その後、培養を続け、1 日おきに同じ部位の傷の写真撮影し、細胞が移動する距離を測定し Cl<sup>-</sup>濃度の違いが細胞の移動距離に影響を与えるかを評価した。通常の Cl<sup>-</sup>を含む培地中では、3 日後には傷の半分が細胞遊走によって修復されたが、低 Cl<sup>-</sup>環境下では約 1/4 程度しか修復されなかった。従って、細胞内 Cl<sup>-</sup>が低下した状態では、細胞の遊走能が抑制されることが明らかになった。

(4) 細胞内 Cl 濃度が Src キナーゼシグナル伝達経路に与える影響

細胞接着や運動、および細胞浸潤に影響を与えるシグナル伝達経路として知られている Src キナーゼシグナル伝達経路が、細胞内 Cl により影響を受けるかについて検討を行った。cSrc は自己リン酸化部位である pY416 のリン酸化によって活性化されることが知られており、細胞内 Cl が pY416 のリン酸化レベルに与える影響について検討を行った。細胞内 Cl が低下すると、pY416 のリン酸化レベルは有意に減少していた (Fig. 1)。また、cSrc の細胞接着に対するシグナルカスケードの下流分子である FAK や paxillin のリン酸化レベルも減少していた。一方、cSrc の細胞増殖に対するシグナルカスケードの下流分子である ERK と STAT-3 についても検討を行った。ERK のリン酸化は細胞内 Cl 濃度が減少しても変化しなかった。しかし、cSrc の下流分子で細胞増殖に関与する STAT-3 のリン酸化は有意に減少していた。従って、細胞内 Cl は Src キナーゼの活性を制御し、Src シグナルカスケードを介して細胞増殖や細胞接着に影響を与えている可能性が強く示唆された (Fig. 2)。

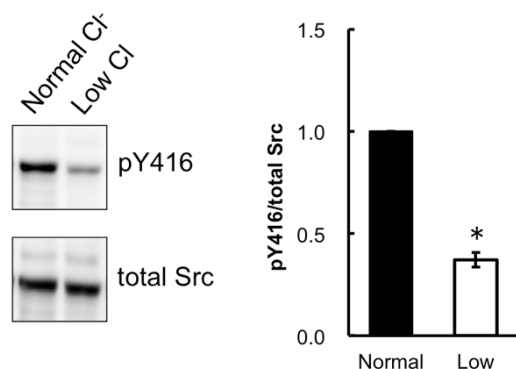


Fig. 1 細胞内 Cl 濃度変化が cSrc 自己リン酸化部位(pY416)のリン酸化に与える影響

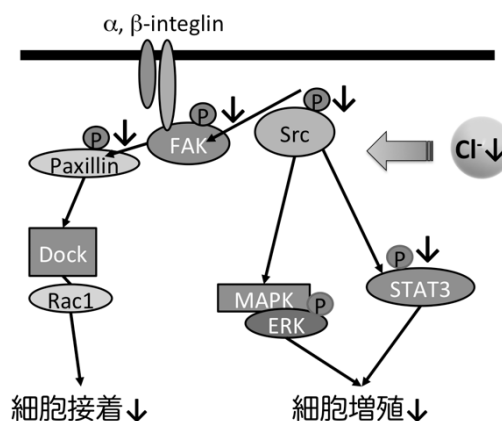


Fig. 2 細胞内 Cl 濃度変化が cSrc カスケードに与える影響

(5) AE (anion exchanger) - CA (carbonic anhydrase) 変異 HT-29 細胞の作製

「癌細胞のクロライドシフト」形成に必須と考えられるイオン輸送体である anion exchanger (AE) と細胞内の重炭酸イオン ( $\text{HCO}_3^-$ ) 濃度の維持に必要な酵素である炭酸脱水酵素 (CA) の役割について明らかにすることを目標とした。そこで、AE(I) と CA(I~III) をコードする遺伝子配列に CRISPR-CAS9 法を用いて変異を加え、それらが機能しない変異 HT-29 細胞を作製するため、Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit を用いてそれぞれの遺伝子に対する sgRNA の作製を行った。さらに、Cas9 タンパク質と sgRNA の HT-29 細胞への導入効率についての検証を行った。また、今後の検証に備え、細胞の代謝活性を亢進させることで、細胞内の  $\text{CO}_2$  発生量を上昇させた際に細胞内 Cl 濃度が変化するか確認するという新たな評価方法についての検討も行った。

<引用文献>

- ① Niisato N, Eaton DC, Marunaka Y: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 287, F932-F939 (2004)
- ② Nakajima K, Niisato N, Marunaka Y: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 425, 225-229 (2012)
- ③ Miyazaki H, Shiozaki A, Niisato N, Marunaka Y: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 292, F1411-F1417 (2007)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Tanaka S, Miyazaki H, Shiozaki A, Ichikawa D, Otsuji E, Marunaka Y. Cytosolic Cl<sup>-</sup> affects the anticancer activity of paclitaxel in the gastric cancer cell line, MKN28 cell., *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42, 2017, 68-80. (査読有)  
DOI: 10.1155/99/0/000474717161

[学会発表] (計 6 件)

- ① Hiroaki Miyazaki Malignancy of cancer cell lines correlates with NKCC1 expression and intracellular Cl<sup>-</sup> concentration. 9th Federation of the Asian and Oceanian

Physiological Societies Congress. (2019)

② 宮崎裕明、丸中良典 ネプリライシンの pH 依存的な酵素活性は buffer 組成により変化する 第 95 回日本生理学会大会 (2018)

③ 宮崎裕明、田中幸恵、丸中良典 細胞内クロライドイオンが paclitaxel の増殖抑制効果に及ぼす影響 生理研研究会「体内環境の維持機構における上皮膜輸送の多角的・統合的理解」(2017)

④ 宮崎裕明、丸中良典 細胞内 Cl<sup>-</sup>による DNA polymerase 活性制御を介した S 期細胞周期進行制御 第 94 回日本生理学会大会 (2017)

⑤ 田中幸恵、宮崎裕明、塩崎敦、大辻英吾、丸中良典 細胞内クロライドイオンが paclitaxel による癌細胞増殖抑制効果に及ぼす影響 第 94 回日本生理学会大会 (2017)

⑥ 宮崎裕明、田中幸恵、丸中良典 膜輸送体の発現変化に伴った細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度変化が胃癌細胞増殖を制御する 日本膜学会第 38 年会 (2016)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。