

令和元年6月20日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11517

研究課題名(和文) 酸性細胞外pHによる糖代謝リプログラミングについて - 特に癌幹細胞維持に関連して -

研究課題名(英文) Effect of acidic extracellular pH on reprogramming of glycolysis -special reference to maintenance of cancer stem cell-

研究代表者

加藤 靖正 (Kato, Yasumasa)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：50214408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：がん組織内の細胞外pHは、しばしば酸性を示す。本研究では、この酸性細胞外pHの受容機構にTRPM5の関与を明らかにした。メラノーマや胃癌でのTRPM5高発現症例の5年生存率が低いことも示された。また、TRPM5の阻害剤であるTriphenylphosphine Oxideをマウス腹腔投与すると、B16-BL6細胞の肺転移を阻害した。一方、酸性pH馴化細胞を作成してみるとNR-S1細胞では造腫瘍性が亢進し、Lewis肺癌細胞では転移が促進した。また、酸性pH馴化細胞NR-S1細胞はグルコースの消費と乳酸の分泌が中性pHで親株より亢進していたが、酸性pHで培養することで親株レベルに戻った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、がん細胞の性質として、グルコース代謝においては解糖系に依存したエネルギー産生が旺盛であるため、乳酸を最終代謝産物として分泌し、結果としてがん組織内の細胞外pHは低下するという結果論的な認識であったが、私たちの結果は、酸性細胞外pHが糖代謝を制御し、さらにがんの再発に関与する造腫瘍性や遠隔転移能を亢進させることが明かとなり、さらに、酸性pHの受容機構を阻害することで、抗転移療法の臨床応用の可能性を示したことは、新たな治療概念を構築する基礎データとして意義深い。

研究成果の概要(英文)：Extracellular pH (pHe) of tumor tissue is often acidic. In this study, we identified TRPM5 as a molecule contributing acidic pHe sensing. We also found that 5-year survival rate of patients with melanoma and gastric cancer were short. When acidic pHe-adapted cells were established from NR-S1 and Lewis lung cell carcinoma, tumorigenesis in NR-S1 model and lung metastasis in Lewis lung carcinoma model were significantly elevated. These phenotypes were maintained even though they were passaged around 10 times at neutral pHe.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：酸性細胞外pH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は、解糖系の亢進により癌組織内の細胞外 pH は酸性を示す。これは、好氣的な条件下で乳酸を最終代謝産物とする“好氣的解糖”あるいは“Warburg effect”として知られている癌細胞の特徴の一つである。一方、癌組織を構成している癌細胞は不均一であり、中には殆ど増殖せずに化学療法や放射線療法に非感受性な細胞が存在して再発や転移の原因として考えられている。このような細胞として癌幹細胞の存在が報告されている。癌幹細胞は、特定のマーカー遺伝子の発現と共に、自己複製能を有し高い造腫瘍能を示す。本研究では、癌細胞を取り巻く微小環境として、癌細胞自らが構築する酸性細胞外 pH に注目した。好氣的解糖のみでは説明できない酸性環境の形成として、細胞内のグルコースやグルタミン代謝などが癌化に伴い変化していることが明かにされてきている。

2. 研究の目的

造腫瘍性や遠隔転移能は、がんの予後を規定する重要な性質であるが、この事象に酸性細胞外 pH が促進的に関与する環境因子としての作用メカニズムを明らかにするとともに、酸性 pH 馴化をした場合の性質の変化についても検討した。

3. 研究の方法

一過性の酸性細胞外 pH 刺激としてマウス B16 メラノーマでは matrix metalloproteinase-9 誘導が最も顕著だった pH 5.9 を用い、Lewis 肺癌細胞では pH 6.8 を用いた。また、酸性細胞外 pH 馴化細胞の樹立に関しては、10% FBS 存在下で pH 6.2 まで段階的に低下させつつ継代培養を行い、安定して pH 6.2 で増殖するようになるまで培養を続けた。結果として2ヶ月間を要したが、pH 6.2 で安定的に増殖できる細胞株を得た。遺伝子発現は RT-qPCR、タンパク質発現はウエスタンブロッティングにより解析した。グルコース濃度や乳酸濃度については、比色定量法により測定した。

4. 研究成果

(1) 一過性酸性 pH 刺激の受容機構

私達はマウス B16-BL6 メラノーマ細胞において、酸性刺激に応じた細胞外からの Ca^{2+} 流入がトリガーとした細胞内シグナルを介して matrix metalloproteinase-9 (MMP9) が発現誘導されることを明らかにしている。そこで、本研究では Ca^{2+} により活性化される分子として TRPM5 に注目した。B16-BL6 メラノーマ細胞に TRPM5 を強制発現させると、酸性刺激で誘導される MMP9 の合成が増加するとともに、肺への転移も増加した。TRPM5 に対する siRNA を細胞に導入すると酸性 pH により誘導される MMP9 合成は抑制された。そこで、TRPM5 の阻害物質である Triphenylphosphine Oxide で細胞を処理することで酸性 pH により誘導される MMP9 合成についての影響を調べたところ、Triphenylphosphine Oxide 濃度依存的に MMP9 合成の誘導が阻害された。さらに、Triphenylphosphine Oxide を腹腔内投与することにより、マウス皮下に移植した B16-BL6 の肺への転移が有意に阻害された。公的データベースを用いた解析によって、メラノーマや胃癌では、TRPM5 が高発現の症例ほど5年生存率が低いことが示された。これらの結果は、ある種のがんでは、酸性 pH の受容に関与する TRPM5 を標的とした抗転移療法の可能性を示唆している。さらに、p21-activated kinases (PAKs) ファミリー分子のうち、PAK6/7 が、酸性細胞外 pH の細胞内シグナリングに関与することを見出したが、この詳細については、さらなる検討が必要である。

(2) 酸性 pH 耐性株の作成とその性質の検討

原発巣でのがん細胞は、長期にわたり酸性細胞外 pH にさらされていると考えられる。従って長期に酸性細胞外 pH にさらされた結果生存した細胞が、再発や転移に関与するとの仮説をたてた。そこで、酸性細胞外 pH に馴化させた細胞株を作成し、性質の変化を調べることにした。NR-S1 口腔扁平上皮癌細胞を酸性 pH で2ヶ月間かけて pH6.2 でも増殖する population を作成すると、フローサイトメトリーにより CD44v+/CD326+ の癌幹細胞リッチな side population の割合が増加した。実際、酸性細胞外 pH 馴化細胞は、高いスフェア形成能とヌードマウスへの高い造腫瘍性が確認された。スフェア形成能は、酸性 pH で培養することで維持され、中性 pH で継代培養を続けても10代程度までは維持されたが、20代を超えると低下した。このことは、中性 pH で維持できる side population は少なく、酸性 pH でのの方が side population の割合を高い状態で維持できることを示している。また、酸性 pH 馴化細胞 NR-S1 細胞はグルコースの消費と乳酸の分泌が中性 pH で親株より亢進していたが、酸性 pH で培養することで親株レベルに戻ったことは、酸性細胞外 pH がグルコース代謝の調節をしていることが示唆された。一方、NR-S1 細胞は、マウス皮下移植の系では転移が確認されなかったため、低いながらも転移性を示す Lewis 肺癌(LLC)細胞から分離した低転移性バリエーションである LLCm1 細胞を用いて酸性 pH 馴化を行ったところ、肺への転移性を促進することを見出した。マトリゲルを用いた浸潤活性は、中性 pH で継代すると最大活性より低下するものの、親株よりも高い浸潤活性は維持された。これらの結果は、酸性細胞外 pH は、転移性やがん幹細胞形質を誘導・維持する微小環境因子であることを示唆している。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

1. Aguirre-Ghiso J, Zijlstra A, Von Lersner A, Yu D, Borrello, B, Oudin M, Kang Y, Sahai E, Fingleton B, Stein U, Cox T, Price J, **Kato Y**, Welm A. The importance of developing therapies targeting the biological spectrum of metastatic disease. *Clin Exp Metastasis*, 2019 in press. DOI: 10.1007/s10585-019-09972-3
2. Sumida R, **Maeda T**, Kawahara I, Yusa J, **Kato Y**. Platelet-rich fibrin increases the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand ratio in osteoblasts. *Exp Ther Med* 18(1); 358-365, 2019. DOI: 10.3892/etm.2019.7560
3. Yang XY, Ozawa S, **Kato Y**, Maehata Y, Izukuri K, Ikoma T, Kanamori K, Akasaka T, Suzuki K, Iwabuchi H, Kurata SI, Katoh I, Sakurai T, Kiyono T, Hata RI. C-X-C motif chemokine ligand 14 is a unique multifunctional regulator of tumor progression. *Int J Mol Sci* 20(8); E1872, 2019. DOI: 10.3390/ijms20081872
4. **Kato Y**, **Maeda T**, **Suzuki A**, Baba Y. Cancer metabolism: new insights into classic characteristics. *Jpn Dent Sci Rev* 54; 8-21, 2018. DOI: 10.1016/j.jdsr.2017.08.003.
5. **加藤靖正**, **前田豊信**, **鈴木厚子**. 酸性細胞外 pH : がん転移に関連する微小環境. *細胞*. 50(5); 258-262, 2018.
6. Baba Y, **Kato Y**. Neutrophil to lymphocyte ratio as biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomarkers J* 4(2); 14, 2018. DOI: 10.21767/2472-1646.100052
7. Fingleton B, Lange K, Caldwell B, Bankaitis KV, Kang Y, Yu D, Aguirre-Ghiso J, Cox TR, Erler JT, Gelman IH, Hurst DR, **Kato Y**, Lynch CC, Price JT, Samant RS, Sleeman J, Stein U, Zijlstra A. Perspective on the interpretation of research and translation to clinical care with therapy-associated metastatic breast cancer progression as an example. *Clin Exp Metastasis* 34; 443-447, 2017. DOI: 10.1007/s10585-017-9872-8
8. **Maeda T**, **Suzuki A**, Koga K, Miyamoto C, Maehata Y, Ozawa S, Hata RI, Nagashima Y, Nabeshima K, Miyazaki K, **Kato Y**. TRPM5 mediates acidic extracellular pH signaling and TRPM5 inhibition reduces spontaneous metastasis in mouse B16-BL6 melanoma cells. *Oncotarget* 8(45); 78312-78326, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.20826
9. Baba Y, **Kato Y**. Promising biomarkers to predict the efficacy of inhibitors of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomarkers J* 3(1); 6, 2017. DOI: 10.21767/2472-1646.100028
10. Baba Y, **Kato Y**. Deguelin, a novel anti-tumorigenic agent in human esophageal squamous cell carcinoma. *EBioMedicine* 26; 10, 2017. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.11.010
11. Baba Y, **Maeda T**, **Suzuki A**, Takada S, Fujii M, **Kato Y**. Deguelin potentiates apoptotic activity of an EGFR tyrosine kinase inhibitor (AG1478) in PIK3CA-mutated head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 18(2); E262, 2017. DOI: 10.3390/ijms18020262
12. **Maeda T**, Yuzawa S, **Suzuki A**, Baba Y, Nishimura Y, **Kato Y**. RhoA mediates the expression of acidic extracellular pH-induced matrix metalloproteinase-9 mRNA through phospholipase D1 in mouse metastatic B16-BL6 melanoma cells. *Int J Oncol* 48(3); 1251-1257, 2016. DOI: 10.3892/ijo.2016.3322
13. **加藤靖正**. がんのグルタミン代謝. *奥羽大学歯学誌* 43(4); 102, 2016.

[学会発表](計 25 件)

1. 川嶋雅之, **前田豊信**, **鈴木厚子**, **加藤靖正**. Pak6/7 はマウス B16 メラノーマにおいて酸性細胞外 pH によって誘導される MMP-9 レベルを調節する第 60 回歯科基礎医学学会学術大会(福岡), 2018 年 9 月.
2. 河村徳之, 川鍋 仁, **前田豊信**, **加藤靖正**, 福井和徳. Bis-GMA が NIH3T3 細胞に及ぼす影響. 第 77 回日本矯正歯科学会学術大会(横浜), 2018 年 10 月.
3. **加藤靖正**, **鈴木厚子**, **前田豊信**. Metastatic phenotype and acidic microenvironment. 第 76 回日本癌学会学術総会(大阪), 2018 年 9 月.
4. 川嶋雅之, **前田豊信**, **鈴木厚子**, **加藤靖正**. マウス B16 メラノーマにおける酸性細胞外 pH による MMP-9 発現誘導への Pak6/7 の関与. 第 91 回日本生化学会大会(京都), 2018 年 9 月.
5. **Kato Y**, Sudo S, **Suzuki A**, and **Maeda T**. Adaptation to extracellular acidification induces metastatic phenotype which sustains within several passage generation at physiological pH in Lewis lung carcinoma. 17th International Biennial Congress the Metastasis Research Society. Princeton, NJ, USA. August, 2018.
6. **加藤靖正**, **鈴木厚子**, **前田豊信**. 酸性 pH_e による転移性細胞の選択と維持. 第 27 回日本がん転移学会学術集会・総会(横浜), 2018 年 7 月.
7. 小島剛志, 金子良平, **前田豊信**, **加藤靖正**, 山森徹雄. 亜鉛が TAS2R8 遺伝子の発現に及ぼす影響. 第 65 回奥羽大学歯学会(郡山), 2018 年 6 月.
8. **加藤靖正**, **前田豊信**, **鈴木厚子**. 卵巣癌における酸性細胞外 pH の影響の検討. 第 50 回日

- 本結合組織学会学術大会 (福岡), 2018 年 6 月 .
9. 河村徳之, 川鍋 仁, 前田豊信, 加藤靖正, 福井和徳 . Bis-GMA が培養線維芽細胞に及ぼす影響 . 第 34 回東北矯正歯科学会大会 (仙台), 2018 年 5 月 .
 10. 前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正 . 酸性細胞外 pH シグナルを標的とした癌転移抑制の試み . 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 第 90 回日本生化学会大会 (神戸), 2017 年 12 月 .
 11. 前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正 . SPARC contributes osteoblastic bone metastasis as an osteoblast differentiation associating factor . 第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2017 年 9 月 .
 12. 前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正 . マウス B16 メラノーマ細胞では, 酸性細胞外 pH によって誘導される MMP-9 mRNA の発現は, PLD1 を介す . 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (塩尻), 2017 年 9 月 .
 13. 陽暁艶, 小澤重幸, 生駒丈晴, 前畑洋次郎, 加藤靖正, 畑隆一郎 . 多段階癌抑制分子 CXCL14 の発現上昇は p38 δ マップキナーゼ特異的シグナル経路による . 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (塩尻), 2017 年 9 月 .
 14. 角田隆太, 前田豊信, 鈴木厚子, 櫻井裕子, 遊佐淳子, 加藤靖正 . Concentrated Growth Factors による骨代謝能への影響 . 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (塩尻), 2017 年 9 月 .
 15. 前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正 . SPARC は AP-1 活性を抑制して、骨形成を誘導する。 - 造骨性骨転移への関与の検討 - . 第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会 (大阪), 2017 年 7 月 .
 16. 陽 暁艶, 小澤重幸, 加藤靖正, 畑隆一郎 . ヒト細胞の UV 照射による癌抑制分子 CXCL14 の発現上昇は p38 δ 特異的シグナル経路による . 第 49 回日本結合組織学会学術大会 (津), 2017 年 6 月 .
 17. 前田豊信, 鈴木厚子, 須藤周作, 加藤靖正 . オステオネクチンが細胞分化に及ぼす影響 . 第 63 回奥羽大学歯学会 (郡山), 2017 年 6 月 .
 18. 河村徳之, 川鍋 仁, 前田豊信, 加藤靖正, 福井和徳 . 低濃度ボンディング材が培養線維芽細胞に及ぼす影響 . 第 33 回東北矯正歯科学会 (秋田), 2017 年 5 月 .
 19. 加藤靖正, 西村行生 . Simvastatin inhibits acidic extracellular pH signaling through RhoA-PLD1 axis in mouse B16-BL6 melanoma cells . 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2016 年 10 月 .
 20. 前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正 . SPARC は in vitro で AP-1 活性を抑制して脂肪細胞分化を抑制する . 第 89 回日本生化学会大会 (仙台), 2016 年 9 月 .
 21. Maeda T, Suzuki A, Baba Y, Nishimura Y, Kato Y. Coordination of RhoA and Cdc42 activation by extracellular pH contributes matrix metalloproteinase-9 production in mouse B16-BL6 melanoma. 16th International Biennial Congress the Metastasis Research Society. Chengdu, China. September 2016.
 22. 前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正 . オステオネクチンは AP-1 活性を抑制して脂肪細胞分化を抑制する . 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 (札幌), 2016 年 8 月 .
 23. 前田豊信, 長岡正博, 鈴木厚子, 加藤靖正, 鈴木恵子 . フィトケミカルの生体調節機能に関する研究—ペチュニジンの骨形成促進作用— . 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 (札幌), 2016 年 8 月 .
 24. 加藤靖正, 前田豊信, 湯澤 仁, 鈴木厚子, 西村行生 . Simvastatin は、酸性細胞外 pH により誘導される MMP9 発現を阻害する . 第 25 回日本がん転移学会学術集会/総会 (米子) 2016 年 7 月 .
 25. 前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正 . Pak6/7 の酸性細胞外 pH により誘導される MMP-9 合成における役割 . 第 48 回日本結合組織学会学術大会 (長崎), 2016 年 6 月 .

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/read0031525>

6 . 研究組織

(1)研究協力者

前田 豊信 (MAEDA, Toyonobu)

奥羽大学・歯学部・准教授

研究者番号 : 10382756

鈴木 厚子 (SUZUKI, Atsuko)

奥羽大学・歯学部・講師

研究者番号 : 90405986