

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07173

研究課題名(和文) Metabolic gradients下のがん細胞の方向性遊走誘導因子

研究課題名(英文) Directional migration of cancer cells under metabolic gradients

研究代表者

高橋 英嗣 (Takahashi, Eiji)

佐賀大学・理工学部・教授

研究者番号：30206792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞(MDA-MB-231)の遊走に方向性を付与する代謝性因子(cue)の存在をin vitroで検討した。まず、培養ディッシュ内に腫瘍組織で報告されている程度のpHおよびO₂勾配を形成できる微小流体デバイス(GCG)を新規考案した。次に、GCG直下の細胞の遊走を24時間にわたって観察し、これらが高pH/O₂方向に遊走すること(方向性遊走)を示した。細胞外pH勾配を消失させると方向性遊走は消失した。方向性遊走の強さは培地の平均pHに依存した。一方で、細胞外O₂勾配は方向性遊走のcueとはならなかった。最後に、細胞外のマクロな空間的pH勾配が方向性遊走をもたらすモデルを提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは日本人の死因の第1位を占めるが、その90%は原発がんではなく、転移したがんによるものであることから、がん転移のコントロールは極めて重要である。われわれは、がん生物学の観点から、血行性遠隔転移の最初のステップ、すなわちがん細胞が局所組織内を浸潤し腫瘍内微小血管に到達するプロセスで、固形がん組織に特有な極めて急峻な組織内代謝物質濃度勾配、とりわけpH勾配が、がん細胞遊走の方向を決め、がん細胞を血管に誘導する因子である可能性をin vitroで示した。この結果は、薬物等により組織内pHを制御することで血行性遠隔転移の確率を低下させ得る可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：We defined an extracellular metabolic cue that directs cancer cell migration. First, we devised a novel microfluidic device (GCG) that establishes gradients of pH and O₂ concentration in the extracellular medium in standard culture dish. We demonstrated that MDA-MB-231 cells under GCG migrate toward higher pH/O₂ regions, whereas directional migration was abolished when extracellular pH gradients were eliminated by hepes buffer. Extracellular pH in the bulk medium significantly affected directional migration. In contrast, extracellular O₂ concentration gradients did not appear to guide the cells. Finally, we have proposed a model for directional cell migration under macroscopic spatial gradients in extracellular pH.

研究分野：生理学

キーワード：がん 血行性遠隔転移 酸素濃度勾配 pH勾配 細胞遊走 方向性遊走 イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第1位は悪性新生物(腫瘍)であり、日本人の2人に1人が生涯でがん罹患すると言われている。特に、がんによる死亡の90%は原発がんではなく、転移したがんによるものであることから、がん転移のコントロールの意義は極めて大きい。われわれはがんの生物学および医工学の観点から、がんの血行性遠隔転移のメカニズムに迫ろうと考えた。

がんの血行性遠隔転移は多段階であるが、われわれは、その最初のステップ、すなわちがん細胞が局所組織内を浸潤し腫瘍内微小血管に到達するプロセスに注目した。具体的には、原発がん細胞は、空間的にランダムな方向に組織内を浸潤し、“偶然”、腫瘍内微小血管にたどりつくのではなく、組織に内在するなんらかの情報をもとに腫瘍内微小血管を“目指して”遊走すると考えた。これを方向性遊走とよぶ。いうまでもなく、方向性遊走は、原発がん細胞の血管内侵入および血行性遠隔転移の確率を大幅に増加させることが予想される。がん細胞の方向性遊走の存在を示唆する報告 [1] も存在するが、がん細胞遊走の方向性を決める情報(これを cue とよぶ)がなんであるかについては、多くの議論があるものの依然として不明である。[2]

多くの固形腫瘍組織では、腫瘍内血管と腫瘍細胞の間に pH や酸素濃度のような代謝物質濃度の空間的勾配が形成されることが知られており、しかもそれらの勾配は極めて急峻であることが特徴となっている。[3] 従って、腫瘍細胞がその濃度勾配を逆行すれば、細胞は容易に血管に到達することが可能であろう。

本研究では、腫瘍細胞周辺の pH および酸素濃度勾配が、細胞遊走に方向性を付与するかどうかを培養細胞(転移性乳がん細胞株である MDA-MB-231) を用い *in vitro* で検討した。

2. 研究の目的

- (1) 通常の細胞培養ディッシュに培養した細胞の近傍に pH および酸素濃度の勾配を形成するための方法を確立する。
- (2) 上記の pH および酸素濃度勾配をイメージング・定量する方法を確立する。
- (3) 上記の pH および酸素濃度勾配下での MDA-MB-231 細胞の遊走を観察し、方向性遊走が誘導されるかどうか、またその場合、方向性遊走の cue を決定する。
- (4) MDA-MB-231 細胞における方向性遊走を説明するモデルを提案する。

3. 研究の方法

- (1) 細胞外 pH および酸素濃度勾配の形成法: MDA-MB-231 細胞は 35 mm ディッシュに定法に従って培養した。培地は Leibovitz の L-15 培地を用いた。細胞は、そのエネルギー代謝のため酸素を消費し、炭酸ガスを排出する。これらのガスは物理的拡散により細胞に供給(酸素の場合)され、また細胞から除去(CO₂/pH の場合)される。従って、拡散による細胞と培地間のガス交換を制限することにより、酸素濃度および pH の勾配を形成することが可能である(Fick の法則)。このようなロジックに基づき、われわれは、ガラス製微小流体素子である gap cover glass (GCG) を新規に開発した。その構造および製法は[4]に詳述した。
- (2) GCG 直下の細胞外 pH および酸素濃度勾配のイメージング: pH については pH 感受性蛍光色素の BCECF (Dojindo) を培地に加え蛍光顕微鏡下でイメージングした。[5] 酸素濃度については酸素感受性蛍光色素を塗布したフィルム (PreSens、SF-RPSu4) の微小片を GCG に貼付し、蛍光顕微鏡を用いイメージングした。[2]
- (3) GCG 直下の細胞遊走: 80% confluent となった MDA-MB-231 細胞組織に GCG を静置し、10 分毎、24 時間にわたって GCG 直下の細胞遊走を位相差顕微鏡でタイムラプスイメージングした。具体的な実験プロトコルは [2] と [6] に詳述した。細胞の遊走およびその方向性の有無は、accumulated distance、forward migration index (FMI)、L/R ratio 等で評価した。
- (4) MDA-MB-231 細胞の方向性遊走メカニズム: 1 個の細胞のサイズに相当する細胞外 pH/酸素濃度勾配は極めて小さく、個々の細胞がこれらを検出し、その遊走方向が決まるとは考えづらい。細胞の大きさの数倍~数十倍にわたる空間に形成されるマクロな勾配が細胞集団としての方向性を決めるモデルを模索した。

4. 研究成果

GCG により細胞外に 0.2~0.3 units/cm の pH 勾配と最大 6%/cm の酸素濃度勾配が形成された(図1)。この値は、*in vivo* での報告 [7] に匹敵する。酸素濃度勾配は細胞密度に比例し、ま

たミトコンドリア呼吸を antimycin A で阻害すると消失したことから、その起源は細胞のエネルギー代謝（呼吸）と考えられる。pH 勾配は培地 (L-15) に hepes (15 mM) を添加することで消失した (図 2)。Hepes は酸素濃度勾配には影響しなかった。以上より通常の培養ディッシュに培養した細胞組織中に pH および酸素濃度勾配を形成する簡便な方法を確立した。

上記の pH および酸素濃度勾配下で MDA-MB-231 細胞は、高 pH・高酸素濃度方向へ遊走した。[2] 図 3 に forward migration index を用いた方向性遊走の評価を示す。一方、hepes で細胞外 pH 勾配を消失させると方向性遊走は見られなかった。また、酸素濃度が非生理的レベル (15%) でも pH 勾配が存在する限り方向性遊走は見られた。一方、酸素濃度を生理的レベル (<5%) とした場合、hepes で pH 勾配を消滅させると方向性遊走も消失したことから、今回見られた MDA-MB-231 細胞の方向性遊走の cue は細胞外 pH 勾配であったと結論した。[2]

細胞遊走速度が細胞外 pH により変化することが報告されている。われわれは至適 pH (~7.1) において遊走速度が最大となり、これより高 pH および低 pH では遊走速度が低下する、すなわち遊走速度が pH に対してベル型を示すという報告 [8] に注目した。われわれのモデルでは、個々の細胞の遊走方向はランダムであるが、至適 pH から外れた pH 領域に“偶然”入り込んだ細胞は次第に遊走速度が低下し、その領域にトラップされてしまうと考えた。GCG 直下では、低 pH 領域に偶然入り込んだ細胞がその領域にトラップされることで、巨視的に見た方向性が現出したものとする。実験では細胞外 pH に依存したベル型の遊走速度変化が示された。今後コンピュータシミュレーションを用いこの仮説を検討する必要がある。以上、1 個の細胞レベルでの pH センシングを仮定しない方向性細胞遊走モデルを提案することができた。

以上をまとめると、われわれは、がん生物学の観点から、血行性遠隔転移の最初のステップ、すなわちがん細胞が局所組織内を浸潤し腫瘍内微小血管に到達するプロセスで、がん組織に特有な極めて急峻な組織内代謝物質の濃度勾配、とりわけ pH 勾配が、がん細胞遊走の方向を決め、がん細胞を血管に誘導する因子である可能性を *in vitro* で示した。この結果は、薬物等により組織内 pH を制御することで血行性遠隔転移の確率を低下させ得る可能性を示すもので、今後 *in vivo* での検討が必要である。

<引用文献>

- ① Kedrin D, Gligorijevic B, Wyckoff J, Verkhusha VV, Condeelis J, Segall JE, Rheenen J. Intravital imaging of metastatic behavior through a mammary imaging window. *Nat Methods* 5: 1019-1021, 2008. doi: 10.1038/nmeth.1269.
- ② Takahashi E, Yamaguchi D, Yamaoka Y. A relatively small gradient of extracellular pH directs migration of MDA-MB-231 cells *in vitro*. *Int J Mol Sci* 21(7):2565, 2020. doi: 10.3390/ijms21072565.
- ③ Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol* 14: 198-206, 2004.
- ④ Yahara D, Yoshida T, Enokida Y, Takahashi E. Directional migration of MDA-MB-231 cells under oxygen concentration gradients. *Adv Exp Med Biol* 923: 129-134, 2016. doi: 10.1007/978-3-319-38810-6_17.
- ⑤ Enokida Y, Tsuruno Y, Okubo K, Yamaoka Y, Takahashi E. Directional migration of MDA-MB-231 cells under O₂/pH gradients. *Adv Exp Med Biol* 977: 169-174, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-55231-6_23.
- ⑥ Tsuruno Y, Okubo K, Fujiwara T, Yamaoka Y, Takahashi E. An *in vitro* model for determining tumor cell migration under metabolic gradients. *Adv Exp Med Biol* 1072: 201-205, 2018. doi: 10.1007/978-3-319-91287-5_32.
- ⑦ Helminger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors *in vivo*: High-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3: 177-182, 1997.
- ⑧ Stock C, Gassner B, Hauck CR, Arnold H, Mally S, Eble JA, Dieterich P, Schwab A. Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na⁺/H⁺ exchange. *J Physiol* 567: 225-238, 2005.

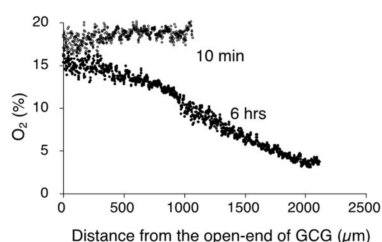


図 1. GCG 直下に形成された酸素濃度勾配

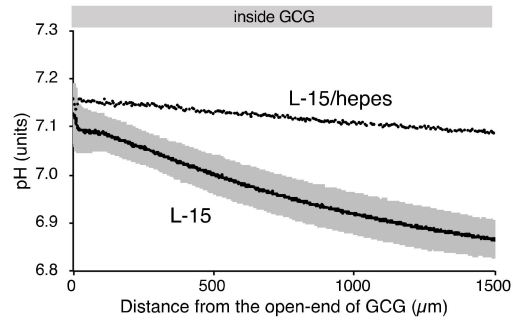


図2. GCG直下に形成されたpH勾配。培地にhepesを添加するとpH勾配は消失した。

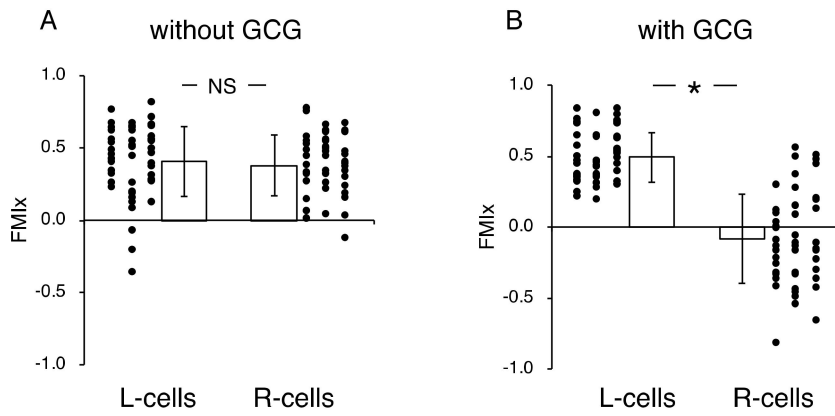


図3. Forward migration index (FMix)で評価したMDA-MB-231細胞の方向性遊走。GCGを用いpH勾配を形成するとL-cellsとR-cellsの遊走方向が逆転した(B)。[2]

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi E, Yamaguchi D, Yamaoka Y	4. 巻 21
2. 論文標題 A Relatively Small Gradient of Extracellular pH Directs Migration of MDA-MB-231 Cells In Vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2565-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamaoka Y, Funatsu K, Yoshidumi Y, Kubo A, Notsuka Y, Takahashi E	4. 巻 59
2. 論文標題 A compact scanning probe for photoacoustic microscopy using ultrasonic actuator stage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 030906-030906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ab7061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Notsuka Y, Kurihara M, Hashimoto N, Takahashi E, Yamaoka Y	4. 巻 -
2. 論文標題 In vivo visualization of blood vessels in mouse ear by photoacoustic microscopy with transmissive liquid-crystal adaptive optics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc. SPIE 11240, Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2020	6. 最初と最後の頁 1124039-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/12.2545777	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuruno Y, Okubo K, Fujiwara T, Yamaoka Y, Takahashi E	4. 巻 1072
2. 論文標題 An in vitro model for determining tumor cell migration under metabolic gradients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 201-205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-319-91287-5_32	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi E, Yamaoka Y	4. 巻 67
2. 論文標題 Simple and inexpensive technique for measuring oxygen consumption rate in adherent cultured cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Physiol Sci	6. 最初と最後の頁 731-737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-017-0563-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Enokida Y, Tsuruno Y, Okubo K, Yamaoka Y, Takahashi E	4. 巻 977
2. 論文標題 Directional migration of MDA-MB-231 cells under O ₂ /pH gradients	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 169-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-319-55231-6_23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大久保魁馬、霧野雄介、藤原隆祐、井上海大、山岡禎久、高橋英嗣	4. 巻 MBE2017-75
2. 論文標題 Ru錯体による培養細胞組織中の酸素濃度勾配イメージング法の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 信学技法	6. 最初と最後の頁 47-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Yamaguchi D, Kojima K, Yamaoka Y, Takahashi E
2. 発表標題 Extracellular gradients of pH direct migration of MDA-MB-231 cells
3. 学会等名 ISOTT2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi E, Yamaoka Y
2. 発表標題 Mitochondrial membrane potential can be sustained without functioning complex IV
3. 学会等名 ISOTT2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口大輔, 小島健太郎, 波田悠暉, 井上海大, 大場未那, 山岡禎久, 高橋英嗣
2. 発表標題 細胞外pH勾配による細胞遊走方向の制御
3. 学会等名 生体医工学シンポジウム 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原隆祐, 高橋英嗣
2. 発表標題 pH勾配下にある腫瘍細胞の方向性遊走
3. 学会等名 2019年 日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上海大, 小島健太郎, 山口大輔, 波田悠暉, 大庭未那, 山岡禎久, 高橋英嗣
2. 発表標題 pH勾配下のがん細胞の方向性遊走: コンピュータシミュレーション
3. 学会等名 2020年 日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口大輔, 井上海大, 小島健太郎, 波田悠暉, 大庭未那, 山岡禎久, 高橋英嗣
2. 発表標題 pH勾配下のがん細胞の方向性遊走
3. 学会等名 2020年 日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島健太郎, 山口大輔, 波田悠暉, 大庭未那, 井上海大, 山岡禎久, 高橋英嗣
2. 発表標題 pH勾配下のがん細胞の方向性遊走: 細胞内pH勾配の関与について
3. 学会等名 2020年 日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahashi E
2. 発表標題 How we survive in oxygen deprivations; cellular and molecular strategies
3. 学会等名 The 10th Joint Seminar between Saga University and Liaoning University -New Trends in Chemistry and Materials Science- (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Notsuka Y, Kurihara M, Hashimoto N, Takahashi E, Yamaoka Y
2. 発表標題 In vivo visualization of blood vessels in mouse ear by photoacoustic microscopy with transmissive liquid-crystal adaptive optics
3. 学会等名 SPIE PHOTONICS BIOS 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamaoka Y, Matsumoto K, Notsuka Y, Takahashi E
2. 発表標題 Photoacoustic microscopy by spatial overlap modulation using femtosecond optical pulse train
3. 学会等名 SPIE PHOTONICS BIOS 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東 祐希、能塚雄介、高橋英嗣、山岡禎久
2. 発表標題 光音響イメージングのためのパルス駆動 LED 励起光源の試作
3. 学会等名 2019年度応用物理学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岡禎久, 船津海斗, 能塚雄介, 高橋英嗣
2. 発表標題 超音波アクチュエータステージを用いた光音響顕微鏡の小型化
3. 学会等名 第58回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原隆祐, 高橋英嗣
2. 発表標題 pH勾配下にある腫瘍細胞の方向性遊走
3. 学会等名 日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋英嗣
2. 発表標題 教育講演：細胞・臓器・生体における酸素の測定
3. 学会等名 第22回酸素ダイナミクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋英嗣
2. 発表標題 代謝リプログラミングにおけるミトコンドリア膜電位の維持
3. 学会等名 第69回西日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大久保魁馬、霧野雄介、藤原隆祐、井上海大、山岡禎久、高橋英嗣
2. 発表標題 Ru錯体による培養細胞組織中の酸素濃度勾配イメージング法の検討
3. 学会等名 MEとバイオサイバネティックス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuruno Y, Okubo K, Fujiwara T, Yamaoka Y, Takahashi E
2. 発表標題 An in vitro model for determining tumor cell migration under metabolic gradients
3. 学会等名 ISOTT2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大久保魁馬、霧野雄介、藤原隆祐、榎田祐也、山岡禎久、高橋英嗣
2. 発表標題 培養細胞培地に形成されるO2勾配のイメージング
3. 学会等名 日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋英嗣
2. 発表標題 生体組織における酸素測定とその課題
3. 学会等名 日本大学工学部酒谷研究室セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahashi E
2. 発表標題 Anoxic core in single cardiac myocyte: how the cell survives in hypoxia
3. 学会等名 群馬大学理工学府分子科学部門大学院セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤原隆祐、大久保魁馬、霧野雄介、井上海大、山岡禎久、高橋英嗣
2. 発表標題 MDA-MB-231細胞の遊走方向を決める細胞外因子
3. 学会等名 第21回酸素ダイナミクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahashi E
2. 発表標題 Life with less oxygen: how mitochondria sustain membrane potential in metabolic reprogramming
3. 学会等名 UCC, School of Biochemistry and Cell Biology Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ATF: BIOMED ENG TAKAHASHI LAB http://www.ee.saga-u.ac.jp/sensor/ATF_Biomed/Research.html RESEARCH http://www.ee.saga-u.ac.jp/sensor/ATF_Biomed/Research.html RESEARCH http://www.ee.saga-u.ac.jp/sensor/ATF_Biomed_J/Research.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------