

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23042

研究課題名(和文) ダイナミックな酸素濃度の変化が口腔がん細胞の代謝に及ぼす悪影響

研究課題名(英文) Effect of oxygen concentration on glucose metabolism of cancer cells

研究代表者

篠原 優太 (Shinohara, Yuta)

東北大学・大学病院・医師

研究者番号：00876477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞、正常細胞共に、酸素濃度に関わらずほぼ同様の増殖は可能だが、糖代謝の様相は大きく異なった。がん細胞の糖代謝は急激な低酸素化の影響を受け難いと考えられた。また、1%酸素下培養細胞では、がん細胞においてのみ、大気下代謝時に乳酸以外の酸産生が大きく増加する特徴が見られた。低酸素下の培養がん細胞で観察された酸素濃度上昇による糖代謝の活性化とそれに伴う乳酸以外の酸産生亢進は、TCAサイクルを経て電子伝達系に至る酸化リン酸化の活性化によるエネルギー供給の急増を示唆し、合わせて観察されたROS産生増加は、細胞傷害やシグナル伝達を介する表現型の変化を起こす可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、細胞の代謝活性を低酸素環境においてリアルタイムにモニタリングすることで、がん周囲環境中の酸素濃度の変動が、がん細胞の代謝に影響を及ぼすこと、さらには単純な酸素濃度の違いだけではなく、高酸素から低酸素、低酸素から高酸素濃度条件といった濃度変動により、より多彩な代謝反応の変化が起きることが明らかとなった。本研究結果は、がん細胞の代謝は、複雑にその様相が変化していくがん周囲の微小環境を再現しながら探っていく必要性が高いこと、その際、単に環境を変えるだけではなく、その変動という視点を加味することが必要であることを示唆し、これからの細胞代謝研究に新たな視点を与えるものとなった。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells cultured in hypoxia showed a higher metabolic activity in normoxic than hypoxic conditions ($p < 0.05$). There were no significant differences between normoxic and hypoxic metabolic activity of normoxia-cultured cancer cells or hypoxia-cultured normal cells. The cancer cells cultured in hypoxia produced lactic acid in hypoxic conditions; however, they did not increase the lactic acid production in normoxic conditions, irrespective of their high metabolic activity. ROS production was higher in normoxic conditions in all cells, especially the hypoxically cultured HSC-3 cells. Rapid increases in oxygen levels might enhance the glucose metabolism of hypoxically cultured cancer cells by mainly activating the TCA cycle and electron transport system. The activation of the TCA cycle and the electron transport system might increase the ATP and ROS supply in cancer cells through the oxidative phosphorylation.

研究分野：歯科補綴学分野

キーワード：低酸素 糖代謝 pHスタッドシステム リアルタイムモニタリング 口腔扁平上皮癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん組織の内部は、低酸素環境に陥りやすいが、その酸素濃度は一定ではなく、転移や播種の過程で変化する。そのため、がん細胞の真の代謝を解明するためには、酸素濃度という環境因子の変動が、代謝活性および代謝機構に及ぼす影響を調べるのが重要である。そこで、口腔扁平上皮癌細胞由来株を用いて、酸素濃度変動条件下における糖代謝活性を、代謝活性リアルタイムモニタリングシステムと低酸素環境実験システムを組み合わせた新たなシステムを用いて評価したいと考えた。また、活性酸素種や代謝中間体についても、メタボロームを活用し解析することで、どのようにがん細胞の代謝動態へ影響を及ぼすのかを明らかにすることが望まれている。

2. 研究の目的

そこで本研究では口腔扁平上皮癌細胞由来株を用いて、様々な酸素濃度変動条件下における糖代謝活性を、代謝活性リアルタイムモニタリングシステムと低酸素環境実験システムを組み合わせた新たなシステムを用いて評価することを目指した。

また、同時に産生される活性酸素種 (ROS) や他の代謝産物の変動についても、メタボローム的視点も視野に入れながら解析し、周囲の微小環境の変化が、どのようにがん細胞の代謝動態へ影響を及ぼすのかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究には、ヒト扁平上皮癌細胞由来株 (HSC-2 および HSC-3)、正常ヒト角化上皮細胞株 (HaCaT) を使用した。大気下 (酸素濃度 21%) および低酸素下 (1%) で培養した各細胞に glucose を加えた際の糖代謝活性を、pH stat システムを用いた代謝活性リアルタイムモニタリングシステムと低酸素環境実験システムを組み合わせた新たな代謝測定システムを用いて、大気下および 1%酸素下で測定した。その際の各有機酸と活性酸素種 (ROS) の産生量を、それぞれ HPLC および ROS 活性アッセイキットを用いて測定した。

1. pH stat システムを用いた代謝活性リアルタイムモニタリング

各細胞の代謝活性に関する酸素濃度による影響を評価するため、低酸素環境実験システムを構築し使用した。本システムは、酸素濃度計を設置した嫌気グローブチャンパー内の気体を、実験に必要な酸素濃度 (1%) に達するまで窒素ガスにて順次希釈・置換し、当該酸素濃度環境を維持できる実験空間を確保するものである。さらに本チャンパー内に、後述の pH stat システムを設置し、各種酸素濃度環境下での代謝活性の評価を行った。

代謝活性の評価は、大気下および前述の低酸素環境実験システム内で 1%酸素下にて、自動滴定装置 pH stat システムを用いて行った。試験管内に前述の細胞懸濁液、生理食塩水を加え、上記の pH stat システムにセットし、代謝基質として glucose 溶液を添加した。glucose 代謝によって酸が産生され、pH が低下すると、あらかじめ pH stat システムに設定しておいた規定 pH (本実験では pH 7.5) を維持しようと、反応系チューブ内にアルカリが滴下される。そのアルカリ滴下量をモニタリングすることにより、代謝活性すなわち酸産生活性を評価できる。本実験では 20 分間にわたりモニタリングを行い、各条件下の各細胞の酸産生活性を評価した。pH stat システムによる代謝活性モニタリングを終えた試料は、代謝産物評価のためすみやかに遠心後、細胞と上清に分離し、凍結保存した。

2. 反応液中における有機酸濃度の測定

前述の pH stat システムによる代謝活性モニタリングの後に回収保存した試料を、再度遠心分離し、その上清をポリプロピレン膜を通して濾過した後、HPLC にて分析した。酢酸、乳酸、ギ酸、リンゴ酸、フマル酸、コハク酸、クエン酸、 α -ケトグルタル酸、オキサロ酢酸およびピルビン酸を分析対象とした。

3. 糖代謝に伴う活性酸素種 (Reactive oxygen species : ROS) の産生

代謝に伴う ROS 産生量を、ROS 活性アッセイキットを用いて測定した。本試薬は、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、tert-ブチルヒドロペルオキシドに反応すると蛍光を発生し、また細胞内に浸入可能であることから、細胞内 ROS を測定可能である。

pH stat に用いる細胞懸濁液に、予め Amplite™ ROS deep red を加え、予備温浴し、細胞に試薬を取り込ませた後、上述の通り、pH-stat にセットしてグルコースを加え 20 分間の代謝活性のモニタリングを行った。グルコース添加の前後に試料を採取し、速やかに 96 well プレートに滴下し、励起波長 658 nm および測定波長 675 nm における蛍光強度を、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、大気下で測定した。

4 . 研究成果

1 . pH stat システムを用いた代謝活性リアルタイムモニタリング

全細胞種において、酸素濃度変化による増殖への影響はほぼなかった。一方、糖代謝活性に対しては、その影響が確認された。大気下で培養し、代謝環境の酸素濃度を变化させた実験では、正常細胞のみ 1%酸素下で 0.54 ~ 0.63 倍と有意な代謝活性低下が認められた。また、1%酸素下で培養した細胞を用いた同様の実験では、がん細胞のみ大気下で 2.02 ~ 4.79 倍と顕著な代謝活性増加が認められた。

2 . 反応液中における有機酸濃度の測定

糖代謝に伴い産生された総酸産生量に占める乳酸の割合は、大気下培養した場合、がん細胞では 23.6 ~ 36.6% と高く、正常細胞では 11% 以下と低かった。ともに代謝時酸素濃度の影響はほとんどなかった。一方、1%酸素下培養細胞では、がん細胞において、大気下代謝時に乳酸以外の酸産生が 2.13 ~ 6.92 倍と大きく増加する特徴が見られた。一方、正常細胞では、代謝環境に関わらず乳酸産生の割合が高くなった。

3 . 糖代謝に伴う活性酸素種 (Reactive oxygen species : ROS) の産生

ROS 産生量は、総じて大気下代謝時により高く、特に低酸素下培養した HSC-3 で 2.92 倍と有意な増加を示した。

がん細胞、正常細胞共に、酸素濃度に関わらずほぼ同様の増殖は可能だが、糖代謝の様相は大きく異なった。がん細胞の糖代謝は急激な低酸素化の影響を受け難いと考えられた。また、低酸素下の培養がん細胞で観察された酸素濃度上昇による糖代謝の活性化とそれに伴う乳酸以外の酸産生亢進は、TCA サイクルを経て電子伝達系に至る酸化的リン酸化の活性化によるエネルギー供給の急増を示唆し、合わせて観察された ROS 産生増加は、細胞傷害やシグナル伝達を介する表現型の変化を起こす可能性が考えられた。本研究結果から、がん細胞の代謝研究には、複雑にその様相が変化していくがん細胞周囲の微小環境の変化を考慮する必要性があることが示され、今後の研究に新たな視点を与えるものとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shinohara Yuta, Washio Jumpei, Kobayashi Yuri, Abiko Yuki, Sasaki Keiichi, Takahashi Nobuhiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Hypoxically cultured cells of oral squamous cell carcinoma increased their glucose metabolic activity under normoxic conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0254966
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0254966	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 Liu Shan, Washio Jumpei, Sato Satoko, Abiko Yuki, Shinohara Yuta, Kobayashi Yuri, Otani Haruki, Sasaki Shiori, Wang Xiaoyi, Takahashi Nobuhiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Rewired Cellular Metabolic Profiles in Response to Metformin under Different Oxygen and Nutrient Conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 989 ~ 989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23020989	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuta Shinohara, Jumpei Washio, Yuri Kobayashi, Yuki Abiko, Hiromitsu Morishima, Keiichi, Sasaki Nobuhiro, Takahashi
2. 発表標題 Effect of rapid increases in oxygen levels on glucose metabolism of cancer cells
3. 学会等名 International Symposium for Interface Oral Health Science 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------