

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430117

研究課題名(和文)がん細胞の酸素走性に関する研究

研究課題名(英文)Aerotaxis in cancer cells

研究代表者

高橋 英嗣(Takahashi, Eiji)

佐賀大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30206792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がんの血行性遠隔転移メカニズムの解明を目指し、腫瘍細胞(MDA-MB-231細胞)が細胞外の誘導因子(cue)に従い方向性に遊走するかどうかを検討し以下の成果を得た。
in vitroで培養細胞組織内に安定した代謝物質/代謝産物濃度勾配を簡便かつ安価に形成可能な方法を新規に開発した、濃度勾配下の細胞は、高酸素濃度方向もしくは低H⁺濃度方向へ遊走した、ここで観察された方向性細胞遊走は、非生理的な高酸素濃度(21%)下でも見られた、細胞外H⁺濃度勾配を人為的に変化させると方向性遊走が消失する場合があった、以上より今回証明した方向性遊走のcueは細胞外H⁺濃度勾配の可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the initial step of hematogenous metastasis of tumors, we hypothesized that migration of tumor cells might be directed by extracellular gradients of metabolic substrates/metabolites particularly by oxygen and/or H⁺. We first developed a novel technique to produce metabolic gradients in monolayers of cultured cell (MDA-MB-231 cells) in which cell migrations can be tracked for up to 24 hrs. We found significant directional migrations of the cell toward higher oxygen concentration or lower H⁺ concentration. These directional migrations were demonstrated in unphysiologically high oxygen concentrations (eg. 21%) while changes in extracellular H⁺ gradients in physiological ranges appeared to affect the directionality. From these results, we conclude that migrations of MDA-MB-231 cells in vitro seem to be directed by extracellular pH gradients.

研究分野：酸素の生理学

キーワード：がん細胞 血行性遠隔転移 酸素 pH 細胞遊走 低酸素微小環境

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、日本人の死亡原因の第1位は、男女ともに悪性新生物（がん）であり、国民の3人に1人はがんで亡くなる。[1] このうち原発がんが直接の原因で亡くなる人は、全体の約10%に過ぎず、残りの約90%の人は転移したがんで命を落とすと言われており、がん転移のメカニズム解明とその制御は極めて重要である。

がんの血行性遠隔転移は、腫瘍細胞の限局性浸潤とそれに続く血管内侵入から始まるが、本研究では、腫瘍細胞が何らかの手がかり (cue) をもとに、腫瘍内血管を目指して遊走し、効率よく血管内に侵入する可能性を想定した。このような方向性遊走が存在する場合、そのメカニズム解明を通して腫瘍細胞の血管内侵入を阻害することができれば、血行性遠隔転移の確率を低下させることが期待できる。

これまで細胞遊走の cue となる情報として各種のケモカインの他に代謝物質や代謝産物（例えば、酸素[2-5]やH⁺[6, 7]）の関与が報告されて来たが、腫瘍細胞における方向性遊走や血行性遠隔転移との関連については不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、固形腫瘍組織中で腫瘍内血管と腫瘍細胞の間に形成される代謝物質や代謝産物の急峻な濃度勾配、特に酸素濃度勾配を上記の cue と仮定し、in vitro 実験系で腫瘍細胞の方向性遊走の可能性を検討することである。

3. 研究の方法

(1) GCG (gap cover glass) による培養細胞組織内の metabolic gradients 形成

最初に、培養細胞組織内に安定した酸素濃度勾配を形成するために、GCG (gap cover glass) を新規に開発した (図1)。GCG を単層培養した細胞組織上に静置すると、GCG 中央部の gap 直下の細胞への酸素供給は図中に矢印で示した2箇所の開口部からのみに制限される。この時、gap 直下の細胞の酸素消費の結果、開口部から gap 中央部に向かう酸素濃度勾配が形成される。

Gap 直下の酸素濃度勾配は、細胞の形態変化および Live-Dead assay, コンピュータシミュレーション, ルテニウム錯体を酸素プローブとした gap 内メediumの酸素分布イメージングにより確認した。

Gap 直下には酸素濃度勾配のみではなく細胞の代謝による pH 勾配の形成が予測される。gap 直下のメedium pH は pH 感受性蛍光色素である BCECF を用い2波長法でイメージングした。

(2) Wound healing assay と GCG を組み合わせた新しい細胞遊走評価法

上記(1)の方法で形成される酸素濃度勾配の大きさは gap 直下の細胞の数に比例す

るため、酸素濃度勾配を cue とした方向性遊走を検討する際には細胞密度をある程度増加させることが重要である。一方で、細胞密度を増加させると、遊走する細胞どうしが衝突し、それぞれの遊走方向が変わってしまうという現象が確認された。そこで、細胞密度を高くしつつ細胞衝突の影響を回避可能な細胞遊走評価モデルを確立する必要が生じた。

このために、一般に細胞遊走実験に使われる wound healing assay と GCG を組み合わせた新しい方法を考案した。Wound healing assay とは、confluent となった細胞組織上にピペットチップの先端等を用い線状の細い (300 μm 程度) 細胞が存在しない空間 (以下スクラッチ空間とよぶ) を作成し、その後スクラッチ空間に浸潤する細胞の様子を観察するもので、細胞どうしの衝突を大幅に回避できる。スクラッチ空間に酸素濃度勾配を形成するために、GCG をスクラッチ空間上に静置した。

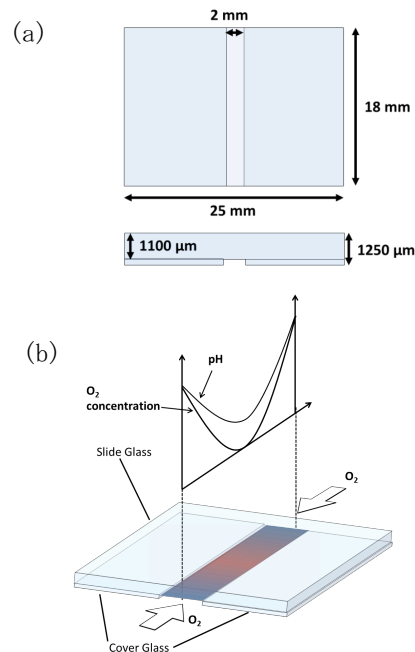


図1. GCG (gap cover glass). (a) GCGの外形図. Gapの深さは150 μmである. (b) Gap下に形成される酸素濃度およびpH勾配を表す概念図.

(3) 細胞の方向性遊走の定量化

上記(1)または(2)の方法で形成した酸素濃度勾配下で、乳がん由来の培養細胞株であるMDA-MB-231細胞の遊走を最長24時間にわたって観察した。方向性遊走の有無の判定およびその定量化には、それぞれ、Rayleighの角度検定およびforward migration index (FMI)を用いた。実験は大気中で行ったため、培地には重炭酸塩を含まないL-15培地を用いた。また、GCGを格納したマイクロインキュベータ内の酸素濃度は21% (空気) または3%とした。

4. 研究成果

(1) 単層培養した MDA-MB-231 細胞上に GCG を静置することで、細胞組織内に酸素濃度勾配を形成することができた。また酸素濃度勾配の空間的パターンはコンピュータシミュレーションの結果とよく合致した。以上より、GCG を用いることで、高価な微小流体デバイス等を用いることなく、培養細胞組織内に metabolic gradients を形成することが可能となった。

(2) GCG 下の細胞組織には、酸素濃度勾配だけではなく、pH 勾配も形成された(図 2)。pH 勾配の大きさは、時間、場所 (GCG 開口部からの距離) および細胞密度により変化した。また、培地を工夫することで、pH 勾配を消失させることが可能であった(図 3)。

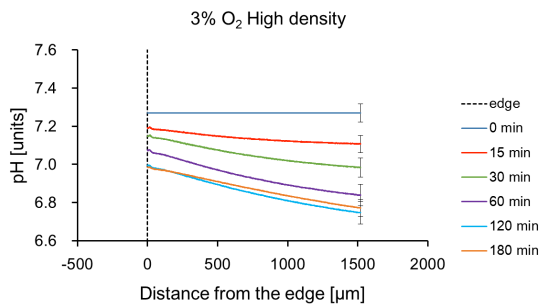


図 2. 酸素条件 3%O₂, 細胞密度 High density における pH 勾配。

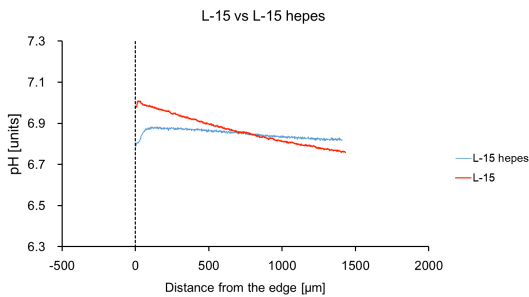
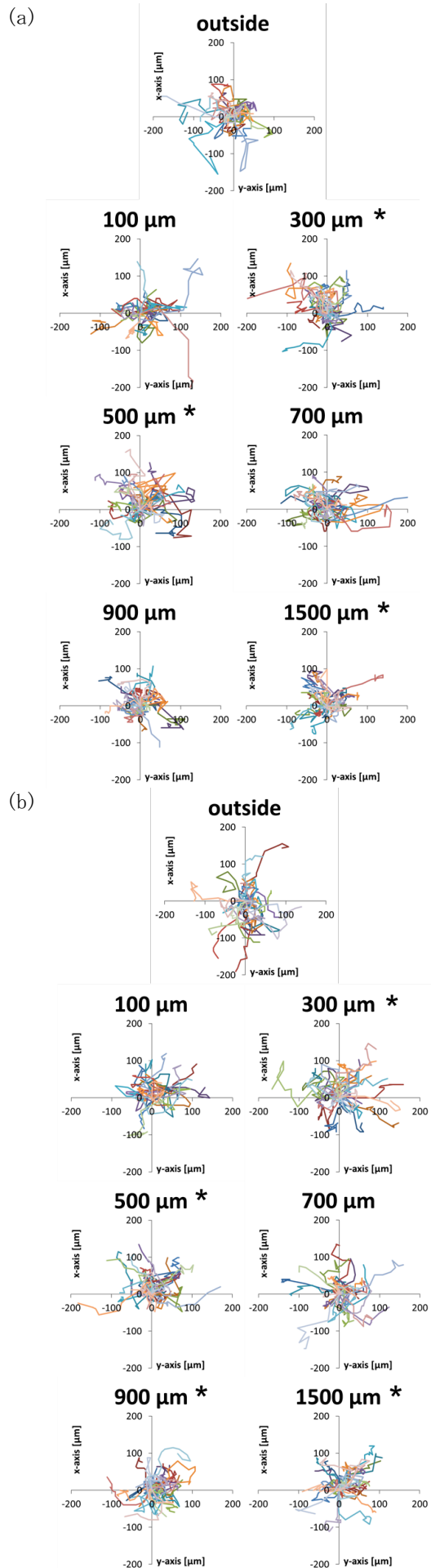


図 3. L-15 と L-15/hepes 培地の Gap 内 pH 勾配の比較。

(3) GCG を細胞組織上に静置すると、細胞の遊走に GCG 開口部に向かう方向性が観察された(図 4)。細胞遊走は“研究の方法”(1)で述べた方法で評価した。

図 4 (右コラム)。MDA-MB-231 細胞の 12 時間における遊走軌跡。GCG 外 (マイクロインキュベータ内) の酸素濃度は(a)が 3%, (b)が 21% (空気) である。*は、有意 ($p < 0.05$) な方向性遊走を示す (Rayleigh 検定)。



(4) GCG 外の酸素濃度を 21%とした時も 3%とした時も、同様の方向性遊走が観察された。(図 4)

(5) GCG に wound healing assay を併用したより精度の高い遊走評価方法 (“研究の方法” (2)) においても、GCG 外酸素濃度 21%で方向性遊走が示された。(図 5)以上より、GCG 直下の MDA-MB-231 細胞は GCG 開口部へ向かい方向性遊走することが証明できた。

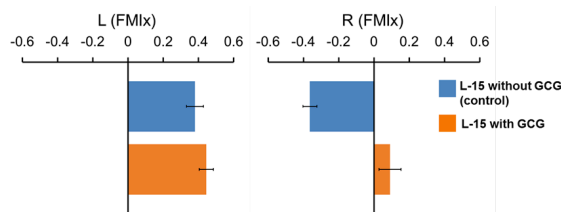


図 5. Wound healing assay と GCG を併用した細胞遊走方向性の評価. Forward migration index (FMI) を用いて細胞遊走を定量化した結果、GCG を用いない場合 (酸素濃度勾配が形成されない場合、青色) はスクラッチ空間右縁の細胞 (R) もスクラッチ空間左縁の細胞 (L) も同等にスクラッチ空間内部に向かって遊走した. 一方、GCG を用いスクラッチ空間内に metabolic gradients を形成すると (オレンジ色)、スクラッチ空間右縁 (R) の細胞では遊走方向が逆転し、GCG 開口部に向かう方向性遊走が証明された. マイクロインキュベータ内の酸素濃度は 21%である.

(6) 当初、酸素濃度勾配に応答する分子として、低酸素誘導性転写因子である HIF-1 α を想定した. しかしながら、HIF-1 α は酸素濃度 5%以下で誘導されることが知られているため [9]、(3)~(5) で述べた結果を HIF-1 α 誘導から説明することは難しいと思われた.

(7) GCG の gap 直下には、酸素濃度勾配だけでなく pH 勾配も形成されることから、pH 勾配を cue とした MDA-MB-231 細胞の方向性遊走を検討した. 細胞密度を変化させることで、pH 勾配を変化させたところ、pH 勾配の減少にともない方向性遊走が消失することが示された.

(8) 以上より、現時点では、細胞外 pH 勾配が MDA-MB-231 細胞の方向性遊走に関与している可能性がある と結論した.

(9) 本研究では、培養細胞を用い in vitro で metabolic gradients を形成する簡便かつ安価な方法を開発した. すでに他の研究者から、本法を利用した研究成果が発表されており、本法の有用性が確認されたと考えている.

(10) これまで酸素濃度勾配を cue とする方向性細胞遊走に関する報告がなされてきたが [2-5]、方法論的問題からそれらのデー

タは必ずしも堅固なものとは言えず、より説得力のある方法を用いた実験が望まれた. 本研究では新しい細胞遊走評価方法を導入することで、この問題を解決できたと考えている.

(11) 科研費の援助により本研究をさらに発展させる機会をいただいた (課題番号 17K07173). 今後は、①MDA-MB-231 細胞の方向性遊走に HIF-1 α が関与しているかどうかの検討、と②方向性遊走の細胞内メカニズムの解明およびその制御に関する研究を進めていく予定である.

<引用文献>

- 厚生労働省 平成 27 年 (2015) 人口動態統計 (確定数)
http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei15/dl/10_h6.pdf
- Derda R *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 106:18457-184, 2009.
- Mosadegh B *et al.*, Biomaterials 52: 262-271, 2015.
- Chang CW *et al.*, Lab Chip 14: 3762-3772, 2014.
- Lewis DM *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 113:9292-9297, 2016.
- Gilkes DM *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 111: E384-E393, 2014.
- Paradise RK *et al.*, Exp Cell Res 319: 487-497, 2013.
- Jagielska A *et al.*, PLoS One 8(9):e76048, 2013.
- Jiang BH *et al.*, Am J Physiol 271: C1172-C1180, 1996.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 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 (in press) 査読あり
- ② 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 査読あり

[参考 (投稿中)]

Takahashi E, Yamaoka Y: Simple and inexpensive technique for measuring oxygen consumption rate in adherent cultured cells. J Physiol Sci

[学会発表] (計 23 件)

- ① 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: 培養細胞培地に形成される O_2 勾配のイメージング. 日本生体医工学学会九州支部学術講演会, 2017. 3. 4, 九州大学 (福岡県福岡市)
- ② 霧野雄介, 大久保魁馬, 藤原隆祐, 榎田祐也, 山岡禎久, 高橋英嗣: Metabolic gradients 下の細胞遊走. 第 20 回酸素ダイナミクス研究会, 2016. 11. 19, 島津製作所東京支社 (東京都)
- ③ 霧野雄介, 大久保魁馬, 藤原隆祐, 榎田祐也, 高橋英嗣: MDA-MB-231 細胞は metabolic gradient 下で方向性に遊走する. 第 14 回がんとハイポキシア研究会, 2016. 11. 4, 岐阜グランドホテル (岐阜県岐阜市)
- ④ 高橋英嗣: がんの遠隔転移: がん細胞は酸素をもとめて遊走するか? 酸素ダイナミクスに関するセミナー, 2016. 10. 14, 日本大学工学部 (福島県郡山市) 【招待講演】
- ⑤ Takahashi E: Imaging of oxygen in single cardiac myocyte reveals intracellular trafficking of energy. Ireland-Japan Joint Seminar: Membrane trafficking, cilia and oxygen sensing, Tokyo, 2016. 10. 12, アイルランド大使館 (東京都) 【招待講演】
- ⑥ 高橋英嗣: 酸素を必要としないミトコンドリア呼吸の可能性. 第 67 回西日本生理学会, 2016. 10. 7, レインボー桜島 (鹿児島県鹿児島市)
- ⑦ Takahashi E: Mitochondrial membrane potential in DMOG model of metabolic reprogramming. ISOTT2016, 2016. 7. 12, Chicago (USA)
- ⑧ Enokida Y, Tsuruno Y, Okubo K, Yamaoka Y, Takahashi E: Directional migration of MDA-MB-231 cells under O_2 /pH gradients. ISOTT2016, 2016. 7. 11, Chicago (USA)
- ⑨ 榎田祐也, 矢原大裕, 吉田拓磨, 霧野雄介, 大久保魁馬, 馬場 嵐, 山岡禎久, 高橋英嗣: MDA-MB-231 細胞遊走の pH 依存性. 第 55 回日本生体医工学学会大会, 2016. 4. 27, 富山国際会議場 (富山県富山市)
- ⑩ 高橋英嗣: 酸素の生理学と臓器再生工学への応用. 2016 年日本生体医工学学会九州支部学術講演会, 2016. 3. 5, 佐賀大学 (佐賀県佐賀市) 【招待講演】
- ⑪ 高橋英嗣: メタボリックリプログラミングによる低酸素細胞のサバイバル. 第 49 回日本生体医工学学会東北支部大会 特別講演 1, 2015. 11. 21, 日本大学工学部 (福島県郡山市) 【招待講演】
- ⑫ 矢原大裕, 吉田拓磨, 榎田祐也, 大久保魁馬, 霧野雄介, 馬場 嵐, 高橋英嗣: 腫瘍細胞遊走の酸素濃度勾配依存性. 第 66 回西日本生理学会, 2015. 10. 9, 久留米大学 (福岡県久留米市)
- ⑬ 榎田祐也, 吉田拓磨, 矢原大裕, 高橋英嗣: Gap cover glass (GCG) を用いて形成した低酸素微小環境中の pH イメージング. 生体医工学シンポジウム 2015, 2015. 9. 26, 岡山理科大学 (岡山県岡山市)
- ⑭ 矢原大裕, 吉田拓磨, 榎田祐也, 大久保魁馬, 霧野雄介, 馬場 嵐, 高橋英嗣: 酸素濃度勾配に沿った MDA-MB-231 細胞の遊走. 第 19 回酸素ダイナミクス研究会, 2015. 9. 12, 島津製作所東京支社 (東京都)
- ⑮ Yahara D, Yoshida T, Enokida Y, Takahashi E: Directional migration of MDA-MB-231 cell under oxygen concentration gradients. ISOTT2015, Wuhan, 2015. 7. 13, Wuhan (China)
- ⑯ Takahashi E, Enokida Y: Life with less oxygen: role of prolyl hydroxylase pathway activation in pH_i stabilization in a cancer cell line. ISOTT2015, 2015. 7. 13, Wuhan (China) 【招待講演】
- ⑰ 矢原大裕, 吉田拓磨, 榎田祐也, 高橋英嗣: 酸素濃度勾配下での腫瘍細胞の方向性遊走. 第 54 回日本生体医工学学会大会, 2015. 5. 8, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- ⑱ 吉田拓磨, 矢原大裕, 榎田祐也, 高橋英嗣: Gap cover glass (GCG) を用いた 2 次元低酸素微小環境モデル. 第 54 回日本生体医工学学会大会, 2015. 5. 8, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- ⑲ 高橋英嗣: OS 4 生体, 組織, 細胞の酸素を測る技術. 第 54 回日本生体医工学学会大会, 2015. 5. 7, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) 【招待講演】
- ⑳ 矢原大裕, 吉田拓磨, 榎田祐也, 高橋英嗣: 酸素濃度勾配下での MDA-MB-231 細胞の不均一分布. 第 12 回がんとハイポキシア研究会, 2014. 11. 21, ホテルマリタール創生佐賀 (佐賀県佐賀市)
- 21 吉田拓磨, 矢原大裕, 榎田祐也, 高橋英嗣: Gap cover glass (GCG) を用いた 2 次元低酸素微小環境モデル. 第 12 回がんとハイポキシア研究会, 2014. 11. 21, ホテルマリタール創生佐賀 (佐賀県佐賀市)
- 22 高橋英嗣: 低酸素に対する細胞レベル・遺伝子レベルの適応. 第 49 回日本高気圧環境・潜水医学会学術総会 教育講演 3, 2014. 11. 8, 鹿児島県医師会館 (鹿児島県鹿児島市) 【招待講演】
- 23 高橋英嗣: 生体の低酸素適応メカニズム. 日大工学部次世代工学技術センターセミナー, 2014. 10. 31, 日本大学工学部 (福島県郡山市) 【招待講演】

[その他]

ホームページ等

英文：

http://www.ee.saga-u.ac.jp/sensor/ATF_Biomed/Research.html

和文：

http://www.ee.saga-u.ac.jp/sensor/ATF_Biomed_J/Research.html

<http://www.fusion.saga-u.ac.jp/research/takahashi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 英嗣 (TAKAHASHI, Eiji)

佐賀大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：30206792

(4) 研究協力者

佐賀大学大学院工学系研究科大学院生

矢原 大裕 (YAHARA, Disuke)

吉田 拓磨 (YOSHIDA, Takuma)

榎田 祐也 (ENOKIDA, Yuya)

学会発表⑧により The 44th ISOTT
International Society on Oxygen
Transport to Tissue The Duane F.
Bruley 賞受賞

大久保 魁馬 (OKUBO, Kaima)

齋野 雄介 (TSURUNO, Yusuke)

藤原 隆祐 (FUJIWARA, Takahiro)