

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460301

研究課題名(和文) 癌幹細胞特異的プロトン制御機構を分子標的とした新たな癌治療戦略の展開

研究課題名(英文) the pH regulation system is new target of cancer stem cells

## 研究代表者

細木 誠之 (Hosogi, Shigekuni)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30433254

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)：癌細胞において低酸素・低pH環境においても癌の細胞内pHがより高く維持されていることを確認している。また癌の分化度の違いと酸排泄イオン輸送体の発現に明らかな差があることを認め、またその阻害剤が酸排出イオン輸送体発現に依存して、効果を発揮する事を報告している。本研究において細胞内pHの維持機構について癌細胞と癌幹細胞との差異の有無を明らかとし、細胞内pH制御因子としての炭酸脱水酵素9が癌幹細胞特異的な標的分子となることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Tumor cells predominantly produce energy with high-rate glycolysis followed by lactate formation in their cytoplasm due to their fast proliferation under hypoxic conditions differently from most normal cells producing energy with relatively low-rate glycolysis followed by oxidation of pyruvate in mitochondria. This high-rate glycolysis with lactate formation of tumor cells provides a large amount of H<sup>+</sup> leading to acidic microenvironments. Even in environments that tumor cells produce a large amount of H<sup>+</sup> due to high-rate glycolysis, the cytosolic pH (pH<sub>c</sub>) of tumor cells is maintained at a level identical to or even slightly higher than that of normal cells. To maintain pH at a normal level, tumor cells should have higher expression and/or activity of H<sup>+</sup> transporting systems than normal cells. The aim of this project is to clarify the differences of pH regulation system in cancer cells and cancer stem cells reading to discovery of new target molecules to treat cancer.

研究分野：細胞生理学

キーワード：癌幹細胞 proton dynamics

### 1. 研究開始当初の背景

在日本の死亡率の約30%が悪性新生物による死亡である。本研究代表者も癌治療に取り組み、従来の抗がん剤の放射線治療とのコンビネーションや、造血幹細胞移植を併用した癌幹細胞を標的としたHigh doseの抗がん剤治療を臨床において行い、成果を報告してきている。しかし実際、如何に抗がん剤を駆使しても、一部のpopulationが残存し、再発するケースがほとんどである。その原因に癌幹細胞(CSC)の薬剤抵抗性があげられる。癌幹細胞は細胞分裂がdormantであり、また薬剤排出輸送体であるMDRの発現が多い事その原因となること、また癌細胞集団のより血流の悪い低酸素、低栄養環境に順応し抗がん剤の物理的に届きにくい部位に存在することが明らかとなっている。低酸素・低栄養環境において、癌細胞では酸化的リン酸化よりも解糖系が亢進していることが明らかとなっている(Warburg 効果)。そのような代謝の変化により癌の周囲において乳酸増加が原因となり、細胞外環境が酸性である事が明らかとなっている。酸性環境においても癌の細胞内pHは正常細胞と同様に維持されていることが明らかとなっており、癌における酸排出機構の亢進が示唆される。近年、本研究者は、癌細胞において低酸素・低pH環境においても癌の細胞内pHがより高く維持されていることを確認している。また癌の分化度の違いと酸排泄イオン輸送体の発現に明らかなる差があることを認め、またその阻害剤が酸排出イオン輸送体発現に依存して、効果を発揮する事を報告している。本研究において癌細胞の細胞内pHの維持機構について癌細胞と癌幹細胞との差異の有無を明らかとし、新たな分子標的分子の開発を目的とする。

### 2. 研究の目的

本研究において癌細胞の細胞内pHの維持機構について癌細胞と癌幹細胞との差異の有無を明らかとし、新たな分子標的分子の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

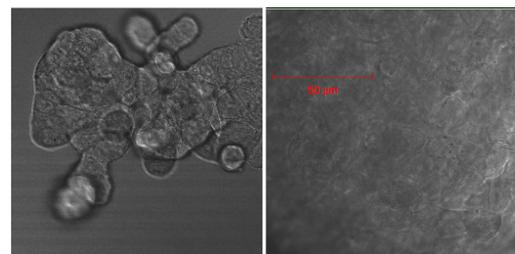
(1) 肺癌細胞株である A549細胞と胃癌細胞株 MKN28を用いて実験を行う。A549細胞と MKN28細胞より低接着培養フラスコを用いて癌幹細胞の作成し、癌幹細胞マーカーである nanog, oct3/4 の発現を確認する。

(2) 癌幹細胞(CSC)と親株(parental)である細胞とにおいて、細胞内pHをpH感受性蛍光色素(carboxy SNARF-1)を用いて測定する。その後pH制御イオン輸送体の発現をリアルタイムPCRにて確認する。

(3) 差異を認めたイオン輸送体の阻害剤を用いて、細胞内pH、細胞増殖、ミトコンドリア活性に及ぼす影響を検討する。

### 4. 研究成果

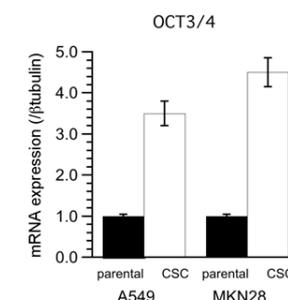
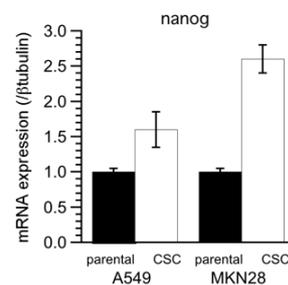
(1) 癌細胞株の作成  
癌幹細胞作成に低接着フラスコと、各種増殖因子(progesterone, putrescine, apo-transferrin, insulin)を加えたDMEM-F12培地を用いて培養を行い、spheroidの形成を確認した。(図1)



A549

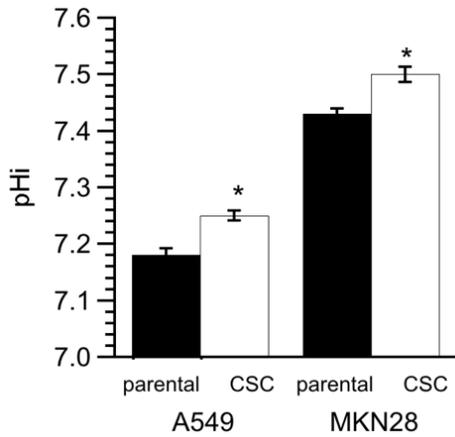
MKN28

作成した spheroid を用いて real time PCR を行い、癌幹細胞マーカーである nanog oct3/4 の発現を確認した。(図2)



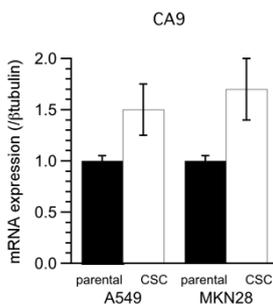
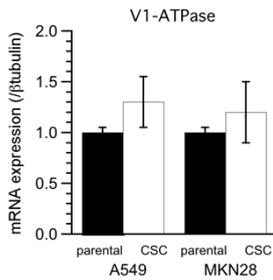
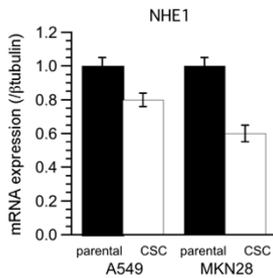
(2) 細胞内 pH の測定

親株である A549 と MKN28 細胞において細胞内 pH を測定した。また上記にて作成した癌幹細胞においても細胞内 pH を測定した。またいずれの細胞においても低酸素環境 (1%O<sub>2</sub>) にて pH の増加を認めた。

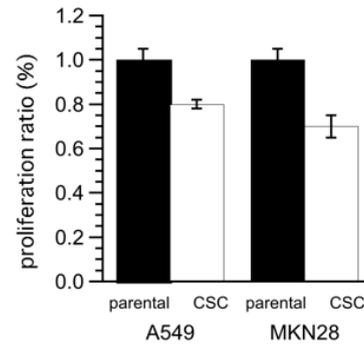
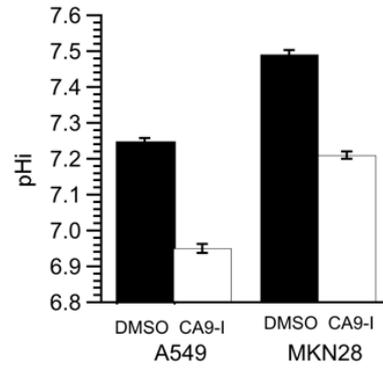


(3) pH 制御イオン輸送体の発現評価

親株においていずれも pH の上昇を認めたため、pH 制御輸送体である NHE1、V-ATPase、CA9 の発現を real time PCR にて評価した。いずれの癌幹細胞において CA9 のみ発現の有意な増加を認めた。



(4) 上記にて確認した CA9 の阻害剤 (CA9I: U104) を用いて癌細胞の pH 及び増殖に及ぼす影響を確認したところ、いずれの癌幹細胞に



おいて有意に pH の低下を認め増殖抑制効果を認めた。また、その増殖抑制のメカニズムとしてミトコンドリア活性の低下によるエネルギー枯渇が考えられた。これらの結果より、幹細胞特異的な分子標的として CA9 の存在が明らかとなった。

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 11 件) (全て査読あり)

- ① Raman micro-spectroscopy as a viable tool to monitor and estimate the ionic transport in epithelial cells. Puppulin L, Pezzotti G, Sun H, Hosogi S, Nakahari T, Inui T, Kumamoto Y, Tanaka H, Marunaka Y. Sci Rep. 2017 Jun 13;7(1):3395.
- ② A low [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-induced enhancement of cAMP-activated ciliary beating by PDE1A inhibition in mouse airway cilia. Kogiso H, Hosogi S, Ikeuchi Y, Tanaka S, Shimamoto C, Matsumura H, Nakano T, Sano KI, Inui T, Marunaka Y, Nakahari T. Pflugers Arch. 2017 May 5. (in press)

- ③ Quercetin is a useful medicinal compound showing various actions including control of blood pressure, neurite elongation and epithelial ion transport. Marunaka Y, Niisato N, Miyazaki H, Nakajima K, Taruno A, Sun H, Marunaka R, Okui M, Yamamoto T, Kanamura N, Kogiso H, Ikeuchi Y, Kashio M, **Hosogi S**, Nakahari T. *Curr Med Chem*. 2016 Sep 18.
- ④ Inhibition of Regulatory Volume Decrease Enhances the Cytocidal Hepatocellular Carcinoma. Kudou M, Shiozaki A, Kosuga T, Ichikawa D, Konishi H, Morimura R, Komatsu S, Ikoma H, Fujiwara H, Okamoto K, **Hosogi S**, Nakahari T, Marunaka Y, Otsuji E. *J Cancer*. 2016 Jul 8;7(11):1524-33.
- ⑤ PPAR $\alpha$  activation of NOS1 via PI3K/Akt in guinea pig antral mucous cells: NO-enhancement in enhancement of Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis. Tanaka S, **Hosogi S**, Sawabe Y, Shimamoto C, Matsumura H, Inui T, Marunaka Y, Nakahari T *Biomed Res* 37:167-178, 2016
- ⑥ Carbonic anhydrase IX inhibition is an effective strategy for osteosarcoma treatment. Perut F, Carta F, Bonuccelli G, Grisendi G, Di Pompo G, Avnet S, Sbrana FV, **Hosogi S**, Dominici M, Kusuzaki K, Supuran CT, Baldini N. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(12):1593-605.
- ⑦ Ambroxol による線毛運動活性化機構～細胞内 pH・クロライドイオンを介して. **細木誠之**、池内優紀子、小木曾遥香、中張隆司、丸中良典. *分子呼吸器病* 20: 115-119, 2016
- ⑧ Knockdown of ezrin causes intrahepatic cholestasis by the dysregulation of bile fluidity in the bile duct epithelium. Hatano R, Akiyama K, Tamura A, **Hosogi S**, Marunaka Y, Caplan MJ, Ueno Y, Tsukita S, Asano S. *Hepatology* 61:1660-71, 2015
- ⑨ Effect of pH and monovalent cations on the Raman spectrum of water: Basics revisited and application to measure concentration gradients at water/solid interface in Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> biomaterial. Pezzotti G, Puppulin L, La Rosa A, Boffelli M, Zhu W, McEntire BJ, **Hosogi S**, Nakahari T, Marunaka Y. *Chemical Physics* 463:120-136, 2015
- ⑩ Low pH of interstitial fluid around hippocampus of the brain in diabetic OLETF rats. Marunaka Y, Yoshimoto K, Aoi W. **Hosogi S**, Ikegaya H. *Mol. Cellular Therapies* 2:6, 2014
- ⑪ V-ATPase as an effective therapeutic target for sarcomas. Perut F, Avnet S, Fotia C, Baglio SR, Salerno M, **Hosogi S**, Kusuzaki K, Baldini N. *Exp Cell Res* 320(1);21-32, 2014
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Epithelial ion secretion of human nasal ciliary epithelium **Hosogi S**, Murakami K, Kuremoto T, Yasuda M, Nakahari T, Hirano S, Marunaka Y The 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2017.3.28-30; ACT city Hamamatsu. Shizuoka Hamamatsu.
- ② Raman spectroscopy as a viable tool to monitor the effect of aldosterone on A6 renal epithelial cell Puppulin L, Pezzotti G, Sun H, **Hosogi S**, Nakahari

- T, Kumamoto Y, Tanaka H, Marunaka Y The 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2017.3.28-30; ACT city Hamamatsu. Shizuoka Hamamatsu
- ③ Ca<sup>2+</sup>-regulation of cAMP-activated ciliary beating mediated via PDE1 in mouse bronchiolar cilia  
Kogiso H, Ikeuchi Y, **Hosogi S**, Tanaka S, Shimamoto C, Nakahari T, Marunaka Y The 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2017.3.28-30; ACT city Hamamatsu. Shizuoka Hamamatsu
- ④ Carbocistein-activated bronchiolar ciliary beating via Cl<sup>-</sup> and pHi-pathway in mice Ikeuchi Y, Kogiso H, Tanaka S, **Hosogi S**, Nakahari T, Marunaka Y The 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2017.3.28-30; ACT city Hamamatsu. Shizuoka Hamamatsu
- ⑤ Production of arachidonic acid, a ligand for PPAR $\alpha$ , activated by ACh in antral mucous cells Tanaka S, **Hosogi S**, Shimamoto C, Matsumura H, Nakahari T, Marunaka Y The 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2017.3.28-30; ACT city Hamamatsu. Shizuoka Hamamatsu
- ⑥ Activation of ciliary beating by carbocistein via modulation of [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> and pHi in bronchiolar ciliary cells in mice. Ikeuch Y, Kogiso H, Tanaka S, **Hosogi S**, Nakahari T, Marunaka Y. International Symposium on Ion Channels, Transporters and Signal Transduction. 2016.5.21;Kyoto hotel. Kyoto
- ⑦ Ciliary beat frequency modulated by PDE1A activity in Procaterol stimulated mouse bronchiole. Kogiso H, **Hosogi S**, Ikeuchi Y, Tanaka S, Shimamoto C, Nakahari T, Marunaka Y. International Symposium on Ion Channels, Transporters and Signal Transduction. 2016.5.21; Kyoto hotel Kyoto
- ⑧ Ambroxol-stimulated increase in CBA and CBF via pHi increase and [Cl<sup>-</sup>] decrease in airway ciliary cells of mice.  
**Hosogi S**, Kogiso H, Ikeuchi Y, Nakahari T, Marunaka Y. International Symposium on Ion Channels, Transporters and Signal Transduction. 2016.5.21; Kyoto hotel Kyoto
- ⑨ PPAR $\alpha$ -stimulated NOS1 phosphorylation mediated via PI3K/Akt in antral mucous cells: enhancement of Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis  
Tanaka S, **Hosogi S**, Shimamoto C, Matsumura H, Nakahari T, Marunaka Y. International Symposium on Ion Channels, Transporters and Signal Transduction. 2016.5.21; Kyoto hotel Kyoto
- ⑩ New method based on Raman spectroscopy to detect in-situ concentration of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> from physiologically relevant solutions.  
Puppulin L , Pezzotti G, **Hosogi S**, Nakahari T, Marunaka Y. International Symposium on Ion Channels, Transporters and Signal

Transduction. 2016.5.21; Kyoto hotel  
Kyoto

- ⑪ Effect of IL-13 on the ciliary beating  
of nasal epithelium of mice.

Kuremoto T, Murakami K, **Hosogi S**,  
Yasuda M, Nakahari T, Marunaka Y.  
International Symposium on Ion  
Channels, Transporters and Signal  
Transduction. 2016.5.21; Kyoto hotel  
Kyoto

- ⑫ Activation of ciliary beating by Seihai-  
to in distal airway epithelial cells of  
mice. Sumiya S, **Hosogi S**, Ikeuchi

Y, Kogiso H, Nakahari T, Marunaka  
Y. International Symposium on Ion  
Channels, Transporters and Signal  
Transduction. 2016.5.21; Kyoto hotel  
Kyoto

---

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

---

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細木誠之 (HOSOGI SHIGEKUNI)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究  
院） 講師

研究者番号：30433254

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし