

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07199

研究課題名(和文)細胞外酸性pHによる癌細胞の微小環境ストレス適応機構の解析

研究課題名(英文) Roles of extracellular acidic pH on cancer cell survival against microenvironment stress in cancer cells

研究代表者

松尾 泰佑 (Matsuo, Taisuke)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：70533222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞では、酸化リン酸化から解糖系への代謝変化が生じているため、固形癌の微小環境は乳酸により細胞外pHが酸性に傾いている。本研究では、B16F10メラノーマ細胞において、酸性pHが細胞の生存に与えるAktを活性化し、mTORとともに作用することでグルコース飢餓ストレス誘導性細胞死を抑制していることを明らかにした。一方、細胞外pHの酸性化は、MKN45およびMKN74胃癌細胞においてもグルコース飢餓ストレスによる細胞死を抑制したものの、これらの細胞ではAktのリン酸化は認められなかったことから、酸性pHによるグルコース飢餓環境下での生存促進機構は癌細胞によって異なることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化リン酸化から解糖系への代謝変化は癌細胞特異的な変化である。また、固形癌では癌細胞は低栄養および低酸素からなる微小環境ストレス下で生存している。本研究では、細胞外酸性pHによる癌細胞の微小環境ストレスへの適応機構の一部を明らかにすることができた。その機構は固形癌において共通ではなかったが、癌細胞の微小環境ストレスへの適応は、in vivoでの癌の生存に必須であるため、新規治療薬の開発に向けた標的分子の同定も視野に入れた今後の研究につながる成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glucose is catabolized into lactic acid to enhance aerobic glycolysis, and causes the tumor microenvironment to be acidic. We demonstrated that acidic pH activated Akt, which related with cell survival. Inhibition of Akt and mTOR increased glucose deprivation induced cell death of B16F10 melanoma cells under acidic conditions. Glucose deprivation also induced cell death of MKN45 and MKN74 gastric cancer cells. Although acidic pH reduced the cell death, did not activate Akt. The results showed that cell survival mechanisms by acidic pH under glucose deprivation were different among cancer cells.

研究分野：医療系薬学

キーワード：癌微小環境 細胞外酸性pH

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は、ワールブルグ効果と呼ばれる代謝変化によって、解糖系が活性化され、乳酸合成量が増加している。腫瘍組織は、癌の成長とともに形成される新生血管が未熟なため、低栄養および低酸素状態からなる微小環境が形成される。癌細胞が微小環境下で生存するためには、癌細胞自身が耐性を獲得する必要があるが、癌細胞の中には *in vitro* で微小環境ストレスを受けた際に細胞死が生じるものもある。我々はこれまでに、乳酸による細胞外 pH の酸性化が B16F10 メラノーマ細胞のグルコース飢餓環境下での生存に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞外酸性 pH による B16F10 細胞におけるグルコース飢餓ストレス耐性機構の解明を試みた。さらに、その機構が MKN45 および MKN74 胃癌細胞に対しても認められるか検証した。

さらに、P388 白血病細胞がイダルビシン耐性を獲得する際にも酸化的リン酸化から解糖系への代謝変化が生じることを明らかにしたため、イダルビシン耐性 P388 細胞に対する解糖系阻害の効果を調べた。

3. 研究の方法

(1) 細胞外酸性 pH により変化している分子の同定

B16F10 細胞において、乳酸により細胞外 pH を酸性化した際に変化が生じる分子を明らかにするために、10–25 mM 乳酸を含むグルコース不含培地で 24 時間培養した B16F10 細胞を Western blot 解析に供した。

(2) 同定した分子の細胞外酸性 pH によるグルコース飢餓ストレス耐性への関与の検証

B16F10 細胞において、細胞外 pH の酸性化によって変化が生じた分子の活性を阻害した際に、乳酸によるグルコース飢餓ストレス下での生存促進が阻害されるか検証した。

(3) MKN45 および MKN74 胃癌細胞における検証

B16F10 メラノーマ細胞において細胞外酸性 pH によるグルコース飢餓ストレス下での生存促進に重要であることが示された因子が、MKN45 および MKN74 胃癌細胞における生存促進にも関与しているか同様の実験により検証した。

(4) P388 細胞とイダルビシン耐性 P388 細胞に対する解糖系および小胞体ストレス阻害効果の検証

P388 細胞およびイダルビシン耐性 P388 細胞に対して解糖系を阻害する 2-デオキシグルコース (2DG) を処置した際の細胞増殖に対する影響を調べた。また、2-DG は解糖系の阻害だけでなく小胞体ストレスも誘導するため、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンに対する影響も比較した。

4. 研究成果

(1) 細胞外酸性 pH によって活性化している分子の同定

これまでに、B16F10 細胞にグルコース飢餓ストレスを与えた際に、オートファジーによる細胞死が生じ、乳酸による細胞外 pH の酸性化はそれを抑制することを報告している。まず、オートファジーを抑制する mTOR が乳酸によって活性化されているか調べたところ、mTOR のリン酸化は 25 mM 乳酸存在下でもほとんど変化しなかった。一方、細胞の生存に重要な Akt についても同様の解析を行ったところ、Akt は乳酸濃度依存的にリン酸化されていることが確認された (図 1A)。

(2) 同定した分子の細胞外酸性 pH によるグルコース飢餓ストレス耐性への関与の検証

B16F10 細胞の酸性 pH によるグルコース飢餓ストレス下での生存促進が Akt の阻害により抑制されるか調べたところ、Akt の単独阻害では強い抑制効果は認められなかった。しかし、mTOR 阻害剤と併用した際には著しい細胞死の増加が認められた (図 1B)。従って、B16F10 細胞では、酸性 pH によって活性化された Akt が mTOR と作用することでグルコース飢餓ストレス誘導性細胞死を抑制している可能性が示唆された。

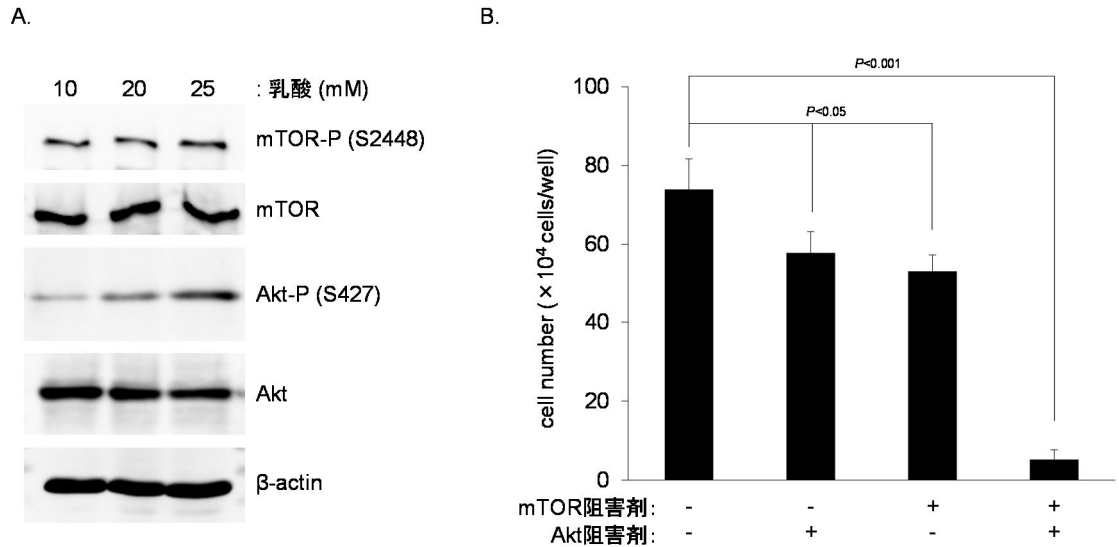


図 1 乳酸によって活性化される因子の同定とその因子の細胞生存への関与

- A. 10–25 mM 乳酸を含むグルコース不含培地で 24 時間培養した B16F10 細胞の Western blot 解析
 B. 25 mM 乳酸を含むグルコース不含培地に Akt 阻害剤 (Akt inhibitor VIII) および mTOR 阻害剤 (ラパマイシン) を処理した 24 時間後の生存細胞数

(3) MKN45 および MKN74 胃癌細胞における検証

MKN45 および MKN74 胃癌細胞に対して、グルコース飢餓ストレスを与えた際に、細胞死が引き起こされることが確認された。この際、PARP の切断が認められたことから、アポトーシスによる細胞死が生じている可能性が示唆された (結果は示さない)。また、乳酸によって細胞外 pH を酸性にした際には、グルコース飢餓ストレスによる細胞死が抑制され、cleaved PARP が減少した (図 2)。しかし、乳酸による Akt のリン酸化は認められなかった (結果は示さない)。従って、これらの癌細胞において、細胞外酸性 pH は B16F10 細胞とは異なる機構でグルコース飢餓環境下での生存を促進している可能性が示唆された。

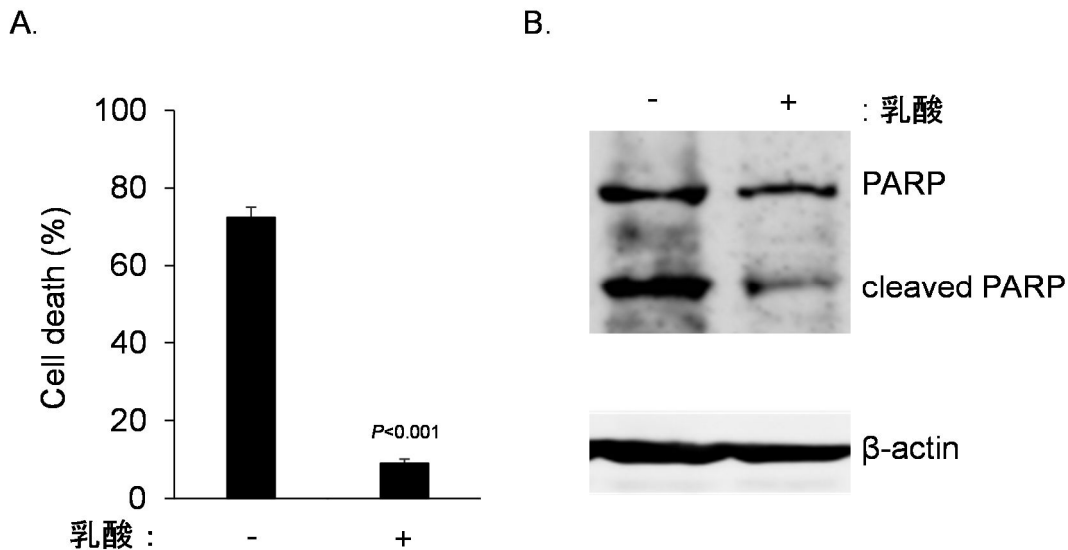


図 2 MKN45 細胞における乳酸による細胞死の抑制

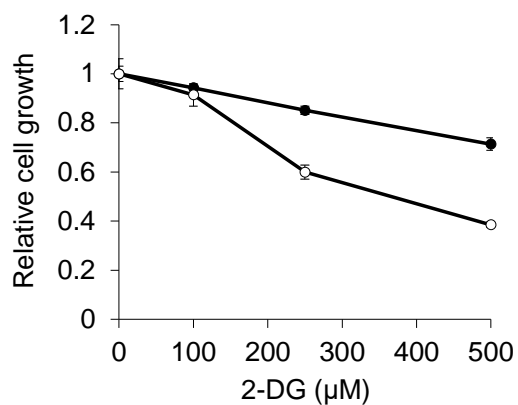
- A. 乳酸を含むグルコース不含培地で培養した MKN45 細胞の死細胞率の測定
 B. 乳酸を含むグルコース不含培地で培養した MKN45 細胞の Western blot 解析

(4) P388 細胞とイダルビシン耐性 P388 細胞に対する解糖系および小胞体ストレス阻害効果の検証

イダルビシン耐性 P388 白血病細胞は、解糖系を阻害する 2-デオキシグルコース (2-DG) を処置した際に P388 細胞よりも低濃度で細胞死が認められた (図 3A)。また、2-DG は解糖系の阻害だけではなく小胞体ストレスも誘導するが、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンに対し

では P388 細胞の方が低濃度で細胞死が誘導された (図 3B)。従って、解糖系の阻害は、解糖系優位の代謝変化が生じているイダルビシン耐性白血病細胞に対する有効な治療標的となることが示された。

A.



B.

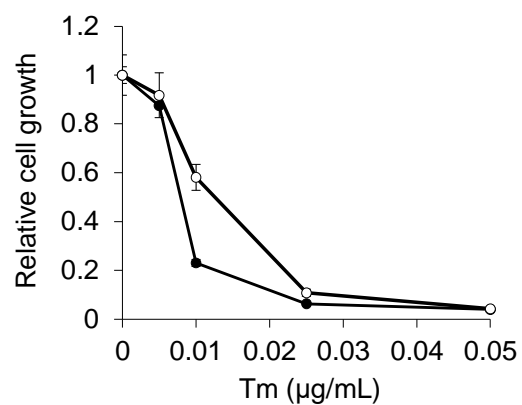


図 3 P388 細胞およびイダルビシン耐性 P388 細胞に対する 2-DG、Tm の影響

A. P388 細胞およびイダルビシン耐性 P388 細胞に対する 2-DG の効果

B. P388 細胞およびイダルビシン耐性 P388 細胞に対する Tm の効果

: P388 細胞、○:イダルビシン耐性 P388 細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Matsuo Taisuke, Asano Takashi, Mizuno Yuki, Sato Shuri, Fujino Ibuki, Sadzuka Yasuyuki	4. 巻 58
2. 論文標題 Water spinach and okra sprouts inhibit cancer cell proliferation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	6. 最初と最後の頁 79 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11626-022-00650-5	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 Matsuo Taisuke, Konya Yumiko, Hirayama Eri, Sadzuka Yasuyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 2-Deoxy-D-glucose enhances the anti-cancer effects of idarubicin on idarubicin-resistant P388 leukemia cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 962 ~ 966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.11616	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 Kimura Ryuichiro, Yoshimaru Tetsuro, Matsushita Yosuke, Matsuo Taisuke, Ono Masaya, Park Jae?Hyun, Sasa Mitsunori, Miyoshi Yasuo, Nakamura Yusuke, Katagiri Toyomasa	4. 巻 56
2. 論文標題 The GALNT6-LGALS3BP axis promotes breast cancer cell growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 581 ~ 595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2019.4941	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 Matsuo Taisuke, Daishaku Shun, Sadzuka Yasuyuki	4. 巻 42
2. 論文標題 Lactic Acid Promotes Cell Survival by Blocking Autophagy of B16F10 Mouse Melanoma Cells under Glucose Deprivation and Hypoxic Conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 837 ~ 839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00919	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松尾 泰佑、佐塚 泰之
2. 発表標題 B16F10メラノーマ細胞のグルコース飢餓ストレス耐性および転移に対する乳酸によるAkt活性化の関与
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松尾 泰佑、近谷 悠美子、平山 瑛里、佐塚 泰之
2. 発表標題 2-デオキシグルコースのイダルビシン耐性P388白血病細胞に対する治療効果の検討
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019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
---------	---------