

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18957

研究課題名（和文）口腔癌細胞の代謝活性と環境因子の関連をリアルタイムモニタリング法で探る

研究課題名（英文）Exploring the relationship between metabolic activity and environmental factors in oral cancer cells using real-time monitoring system.

研究代表者

森島 浩允 (Morishima, Hiromitsu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30825740

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では細胞代謝のリアルタイムモニタリングシステムを用いて他の様々な環境因子や抗がん剤などの薬剤による代謝活性への影響を検討することを目的としていたが、今年度はヒト口腔扁平上皮癌細胞(HSC-2)の増殖や糖代謝、及び2-deoxy glucose（以下2DG）感受性に対する培養時の栄養基質濃度の影響について検討した結果、本細胞は高グルコース濃度下で増殖能、糖代謝能が共に高くなり、2DGへの薬剤感受性が低下することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト口腔扁平上皮癌細胞(HSC-2)の増殖や糖代謝、及び2-deoxy glucose（以下2DG）感受性に対する培養時の栄養基質濃度の影響について検討した結果、本細胞は高グルコース濃度下で増殖能、糖代謝能が共に高くなり、2DGへの薬剤感受性が低下することが判明した。したがって抗がん剤使用時に糖尿病などの基礎疾患の存在下では薬剤の効果が薄れる可能性が示唆された。本研究からがんの臨床治療における血中糖濃度の管理の重要性が示唆され、今後は効果的な抗がん剤の使用法の確立の一助となる可能性を秘めているものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：The objective of this project was to investigate the effects of various environmental factors and drugs such as anticancer agents on the metabolic activity of human oral squamous cell carcinoma cells (HSC-2) by using a real-time monitoring system for cell metabolism. As a result, it was found that both proliferation and glucose metabolism of HSC-2 cells increased under high glucose concentration, and their sensitivity to 2DG was decreased.

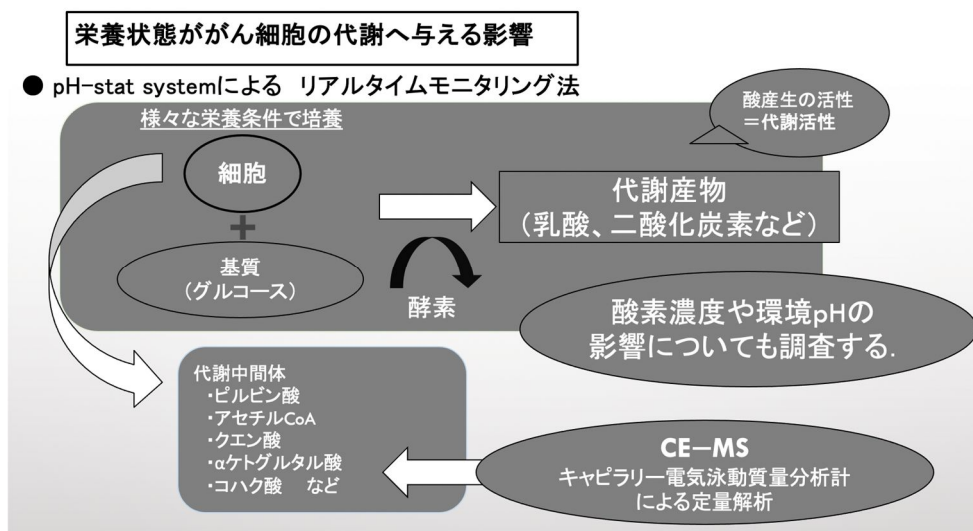
研究分野：口腔がん

キーワード：口腔がん メタボローム がんの代謝活動 環境pH 栄養条件

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞の研究において、その代謝に注目が集まるようになってきている。がん細胞の特徴である無限の増殖能を支えるエネルギーはその代謝活動に由来しており、がん細胞の代謝を解明することは、がんを理解する重要な方法と考えられている。また、すでにがん細胞の周囲の環境の特異性(pH、酸素濃度等)は様々な報告がなされており、それらの環境因子ががん細胞の遺伝子発現と関連することも明らかになってきている。しかし、がん組織周囲の独特の環境因子が遺伝子発現に影響を与えた結果、実際に細胞自身がどのようにその代謝活動を変化させているかについての知見は明らかになっていない。私たちはすでに細胞の代謝をリアルタイムでモニタリングするシステムを確立し、pH環境ががん細胞の代謝活性に及ぼす影響の一端を明らかにしており、これを応用することでさらに詳細ながん細胞周囲環境と代謝の関係性を明らかにできるのではないかと着想した。



2. 研究の目的

本研究ではこれまでに確立した手法を活かしつつ、pH以外の様々な環境因子や抗癌剤などの薬剤による代謝活性への影響を、栄養条件によってがん細胞の代謝に変化が起こる可能性があることを視野に入れ、単一・複合因子で多角的に比較・検討し、口腔がん特有の代謝動態を明らかにすることを目指す。また、所属する研究環境においては世界有数の嫌気環境実験システムが揃っており、今まで確立してきた独自のリアルタイム代謝活性測定システムを組み合わせることで、実際のがん細胞周囲の環境により近い状態を再現しつつ、環境因子と代謝活性のダイナミックな関係性を調べることが可能である点は非常に独自性が高いと考えた。

本研究においてはがん細胞の周囲の栄養状態が代謝活性に及ぼす影響を明らかにすること。同時に酸素分圧とpHなどの環境因子が相乗的に影響している可能性も含めて検討を行う。また、抗がん剤ががん細胞の発育および代謝に対して与える影響を明らかにすること。口腔扁平上皮癌とその他のがん細胞種における代謝活性を比較することで口腔がん特有の代謝動態を明らかにしていくこと。以上を目的とし、将来的にはがん細胞の診断、治療における新たな知見に役立てられないか模索する。

3. 研究の方法

がん細胞に対して、今まで確立してきた細胞代謝モニタリングシステム(pH stat)を応用することで、諸環境因子ががん細胞の代謝活性に及ぼす影響について分析測定を行う。そこに複合因子、具体例としては、酸素分圧とpHの相乗的な影響などについても調べる。さらには抗がん剤ががん細胞の代謝活性に対して与える影響を検討する。また、口腔扁平上皮癌とその他のがん細胞種における代謝活性を比較する。

使用するがん細胞株は、口腔扁平上皮癌細胞株としてHSC-2 (RCB1945) およびHSC-3 (RCB1975)の2種と、対照となる正常細胞株としてヒト表皮角化細胞株であるHaCaTを使用する。HSC-2 (RCB1945) およびHSC-3 (RCB1975)はこれまで多くの研究において使用されている代表的な細胞株である。HSC-2は口腔扁平上皮由来であり転移能が少ないという特徴を持つのに対して、HSC-3は舌扁平上皮由来であり転移能が高いという特徴を持つ。

・代謝活性のリアルタイムモニタリング法及び各pHでの測定

細胞懸濁液 (1.0×10^6 cells / ml) 1.6 ml に、生理食塩水 6.0 ml を加え、穏やかに撹拌しながら10分間予備温浴を行い、各代謝基質 (glucose, glutamine, glutamate) を最終濃度 5 mM となるよう添加した後、pH stat システムを用いて各条件下での酸産生活性をモニターした。pH

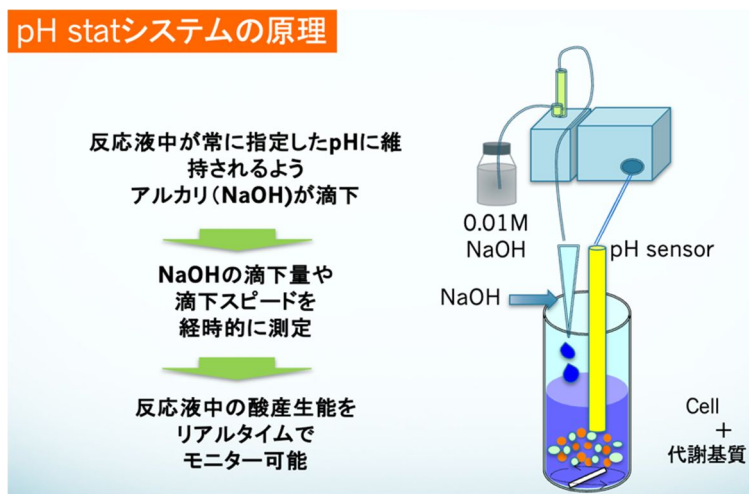
stat システムは、細胞による酸産生に伴い pH が低下しようとする反応液中に、自動的にアルカリを注入して設定した pH に維持するもので、アルカリ注入量をモニターすることで細胞の酸産生量の継時的測定、すなわち酸産生活性のモニターが可能となる。本研究では酸産生活性を代謝活性と定義した。注入アルカリ液として 0.01M NaOH を用い、代謝活性測定は 20 分間とした。いずれの測定においても、代謝基質添加前及び代謝反応後に、後述の乳酸測定に用いる試料として反応液を 1.0 ml 回収し速やかに -80 にて保管した。

・反応液中の乳酸濃度及びアンモニア濃度の測定

代謝基質の反応前後での反応液を用いて上清中の乳酸量を測定した。回収した反応液の遠心分離を行った後、上清成分を回収し、内部標準物質と混合し、測定サンプルとした。サンプルはキャピラリー電気泳動 (CE) と飛行時間型質量分析法 (TOFMS) を組み合わせた CE-TOFMS を用いて測定した。測定によって得られたデータは分析ソフトを用いて分析した。

また、glutamine および glutamate を代謝基質とした測定についてはアミチェックメータを用いた。同様に反応開始時および反応終了後にそれぞれ反応液の上清を 20 μ l 回収し、液中のアンモニア量の測定を行った。

pH statシステムの原理



4. 研究成果

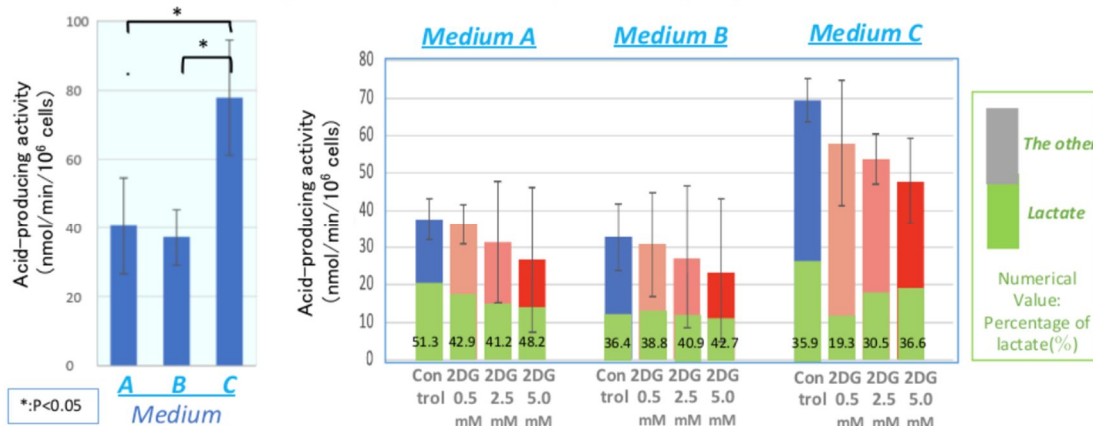
本研究においては細胞代謝のリアルタイムモニタリングシステムを用いて他の様々な環境因子や抗がん剤などの薬剤による代謝活性への影響を検討することを目的としていたが、その一環として、ヒト口腔扁平上皮癌細胞(HSC-2)の増殖や糖代謝、及び 2-deoxy glucose(以下 2DG)感受性に対する培養時の栄養基質濃度の影響について検討した結果、本細胞は高グルコース濃度下で増殖能、糖代謝能が共に高くなり、2DG への薬剤感受性が低下することが判明した。

したがって抗がん剤使用時に糖尿病などの基礎疾患の存在下では薬剤の効果が薄れる可能性が示唆された。本研究からがんの臨床治療における血中糖濃度の管理の重要性が示唆され、今後は効果的な抗がん剤の使用方法の確立の一助となる可能性を秘めているものと考えられた。

細胞の培養条件一覧

Culture medium	GC	GT	
medium A	100mg/dL	4mM	standard medium
medium B	100mg/dL	0.5mM	referred to the serum concentration in healthy subjects
medium C	450mg/dL	0.5mM	referred to the serum concentration in diabetic patients

培養条件ごとの酸産生活性(左)と 2 DG 添加後の酸産生活性(右)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ayano Igarashi, Jumpei Washio, Satoko Sato, Hiromitsu Morishima, Kensuke Yamauchi, Nobuhiro Takahashi
2. 発表標題 Nutritional conditions for cell growth affect anticancer drug sensitivity
3. 学会等名 102nd General Session & Exhibition of International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yuta Shinohara, Jumpei Washio, Yuri Kobayashi, Yuki Abiko, Hiromitsu Morishima, Keiichi Sasaki and 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
---------	---------