

腫瘍細胞におけるミトコンドリアによる 細胞遊走・走化制御に関する研究

研究代表者： 松岡 達（医学系部門・教授）、藤田 聡（工学系部門・准教授）
共同研究者： 竹内 綾子（医学系部門・特命助教）

概要	
細胞遊走には ATP がエネルギーとして用いられるが、ATP 産生場であるミトコンドリアが腫瘍細胞遊走に果たす役割については明らかではない。本研究においては、腫瘍細胞におけるミトコンドリアの細胞内局在および膜電位と、細胞の遊走性を 1 細胞レベルで解析することで、両者の関係を解明することを目指す。実験では、神経膠芽腫細胞をミトコンドリア膜電位感受性色素で染色し、平面ディッシュ上または 1 本の微細ファイバーに細胞を接着させて細胞遊走をタイムラプス観察した。その結果、ミトコンドリアが細胞核周囲から仮足の方向へ流動的に移動していき、細胞進行方向に向かってミトコンドリアが局在することが明らかになった。今後はさらに解析を推し進め、腫瘍細胞におけるミトコンドリアによる細胞遊走・走化制御の意義を解明し、腫瘍細胞の転移を制御する新しい手法の開発につなげる。	
関連キーワード	細胞遊走, ミトコンドリア, 細胞内局在, 1 細胞観察, 神経膠芽腫

研究の背景および目的

悪性腫瘍の治療では、浸潤と転移を抑制することが重要であり、腫瘍細胞の遊走挙動を理解することが欠かせない。細胞遊走の詳しい分子メカニズムについては ATP 駆動による運動であることが明らかにされている。ATP 加水分解によって生じる化学的エネルギーを、ミオシンやキネシン等のモータータンパク質が運動エネルギーに変換し、細胞骨格のダイナミックな変化を引き起こされる。しかしながら、ATP がミトコンドリアで産生されるにもかかわらず、ミトコンドリア活性と腫瘍細胞の遊走性については重要視されてこなかった。

その理由として、腫瘍細胞の代謝にはミトコンドリアがほとんど関与していないと考えられてきたためである。正常細胞はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化により ATP を産生するのにに対し、腫瘍細胞の代謝経路は、嫌氣的解糖系により ATP 産生されており、これは Warburg 効果として古くから知られている。以来、腫瘍細胞の遊走性とミトコンドリア活性について関連性は示されてはこなかった。解糖系に依存した腫瘍細胞は、グルコースを取り込む必要に迫られ、ATP 産生の効率は悪い。高い遊走性を有する腫瘍細胞がどのように

ATP が供給されるかはいまだわかっていない。

さらに、必ずしもすべての腫瘍細胞が Warburg 効果を示すわけではないこともわかってきた。Warburg 効果によるグルコース取込亢進や代謝経路の変化は、腫瘍細胞のイメージングに利用されているが、こうした解析により、腫瘍細胞のなかにはグルコース取込が低いものもあることが示された。従来、腫瘍はクローナルな細胞集団と考えられていたが、近年のゲノム解析から腫瘍内の細胞は不均一性をもったヘテロな集団であることも解明されつつある。Warburg 効果を利用し、腫瘍細胞に蓄積したポルフィリン化合物を腫瘍マーカーとして術中診断に利用する等の診断・治療法も期待されているが、腫瘍細胞の不均一性はこうした診断や治療の有効性や限界にも大きく影響する。

以上を踏まえ、腫瘍細胞の遊走性について理解するためには、ミトコンドリア活性と腫瘍細胞の遊走の関係を 1 細胞レベルで解析する必要があると考えた。そこで、転移能および浸潤能が高い悪性脳腫瘍を形成する神経膠芽腫細胞に着目し、細胞遊走の方向性や移動速度が、ミトコンドリア活性に関係しているかどうかを調べた。

研究の内容および成果

【方法】ミトコンドリア活性の評価には、膜電位活性を評価した。ミトコンドリアの融合や分裂は細胞の機能に影響を与えるとの報告もある。そこで、膜電位に応じて蛍光を発するインジケータを用いてミトコンドリアを可視化し、細胞内での局

在の時間変化をタイムラプス蛍光顕微鏡を用いて観察をおこなった。神経膠芽腫 U87 細胞を、Mitotracker Green またはミトコンドリア膜感受性蛍光色素 TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester, perchlorate) と GFP 標識アクチン(Bacman)

で共染色し 30 秒間隔で数時間観察した。

細胞の遊走性について、これまで代表研究者は、1 細胞の遊走性を定量的に評価する手法として、細胞外マトリックスの繊維状の構造を模倣した微細ファイバーを細胞足場に用いて、移動方向を 1 次元方向に単純化した実験系を構築してきた。この手法によると、生体中の細胞周辺環境を模倣した環境中で細胞の運動を定量的に測定することができる。本研究では、この手法を用いて細胞遊走とミトコンドリア動態を 1 細胞レベルで解析した。

【結果】平面ディッシュでの細胞を観察した結果、細胞核の周りに集積していたミトコンドリアが仮足先端部に流動していく様子が観察された。細胞の伸展とミトコンドリアの動きが連動していることから、次に、細胞の伸展や遊走に関する細胞骨格分子アクチンに GFP を導入し観察した。その結果、細胞末端でアクチンの重合が活発に起こり、そこへ連動してミトコンドリアが繊維状となり流

れこんでいくことがわかった。仮足が複数あった場合にも、それぞれの細胞突起に向かってミトコンドリアが流動していった。1 本の微細繊維上に接着させた細胞で、同様に観察した結果、細胞の進行方向に向かってミトコンドリアが流動し、集結する様子が観察された (Fig. 1)。

ディッシュ上での観察では仮足を伸ばす方向へミトコンドリアが流入している様子が観察されたが、ファイバー上での解析では、ミトコンドリアは仮足末端の方へ流動的に流れていく動きが観察されるとともに、遊走方向前方に優位に局在が存在することがわかった。

この知見は、腫瘍細胞の遊走プロセスに高いミトコンドリア活性が必要である可能性を示しており、従来考えられてきた腫瘍細胞の代謝パターンでは説明できない。この現象が生体内の腫瘍細胞でも起こりうるのかなどさらに詳細かつ慎重に解析する必要がある。

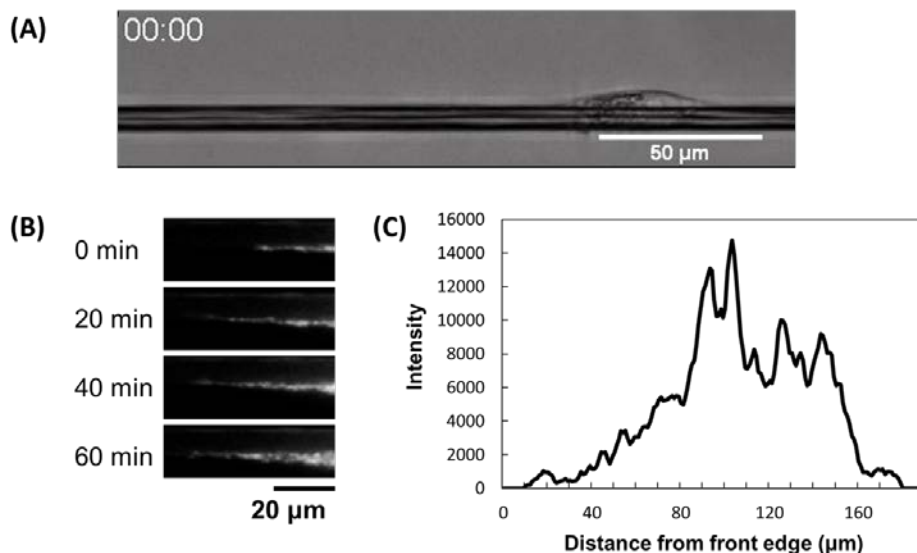


Fig. 1 (A) Phase contrast image of U87 cell migrating on a fiber. (B) 6 Timelapse observation of mitochondrial localization of a U87 cell migrating along with a single fiber. (C) Mitochondrial localization to distance from front edge of GBM cell migrating on a single fiber.

本助成による主な発表論文等、特記事項および 競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Analysis of cell migration on a single fiber immobilized with Fc-cadherin, R. Hayamizu, S. Suye, T. Akaike, S. Fujita, 9th International Conference on Fiber and Polymer Biotechnology, Osaka (2016)

神経膠芽腫細胞遊走におけるミトコンドリア動態のシングルファイバーを用いた解析, 河合 佑介, 竹内 綾子, 藤田 聡, 松岡 達, 第 63 回中部日本生理学会, 岡崎 (2016)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

藤田 聡, 科研費・基盤研究(C), 2016 年度, 凍結保存材料への応用を目指した生体吸収性ナノファイバーの物性解析と生体適合性評価 (代表), 採択, 200 万円