

## 神経膠芽腫細胞におけるミトコンドリアー細胞遊走・走化連関に関する研究

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

概要	
	正常な細胞の遊走時にはミトコンドリアが局在し、局所への ATP 供給を担う。一方、腫瘍細胞の代謝経路は解糖系に依存するため、エネルギー的にはミトコンドリアの寄与はほとんどない。しかし、神経膠芽腫細胞 U-87 の遊走時にはミトコンドリアは細胞前方に局在しており、ミトコンドリアが腫瘍細胞の遊走に関わることが示唆される。本研究では、ナノファイバー細胞遊走評価デバイスを用いて一細胞イメージングを行い、U-87 の遊走とミトコンドリアの連関を調べた。U-87 の遊走時には仮足の活発な動きに伴いミトコンドリアは細胞前方に流れこんだ。一方、解糖系を阻害すると、仮足の動きや遊走は著しく抑制された。また、ミトコンドリアは常に細胞前方に局在するものの、動きが消失した。したがって、腫瘍細胞では、解糖系がミトコンドリアの局在や細胞遊走の制御に関わると考えられる。
関連キーワード	神経膠芽腫、細胞遊走、ミトコンドリア、ナノファイバー、一細胞観察

### 研究の背景および目的

竹内・松岡は、ミトコンドリアの局在が細胞の遊走・走化と深く関わることを明らかにした (Kim et al., 2016)。局在化したミトコンドリアは局所の細胞骨格に ATP を効率的に供給し、ダイナミックな細胞の動きを惹き起こすと考えられる。すなわち、ミトコンドリアは正常細胞の遊走・走化に重要な役割を果たす。一方、正常細胞と異なり腫瘍細胞の代謝経路は解糖系に依存するため、エネルギー的にはミトコンドリアの寄与はほとんどないと考えられてきた (Warburg 効果)。しかし、神経膠芽腫細胞 U-87 では、遊走時にミトコンドリアが細胞前方に流れ込んだ (第 63 回中部日本生理学会で発表)。これは、ミトコンドリアが腫瘍細胞においても遊走・走化に関わることを強く示唆する。

近年のゲノム解析から、腫瘍内の細胞が不均一性をもったヘテロな集団であることが明らかになりつつある。したがって、腫瘍の転移・浸潤を理解するためには、集団としての解析のみならず、一細胞での遊走・走化解析が必須となる。

これまでの学内共同研究により、藤田の開発したナノファイバー細胞遊走評価デバイスを用いて、一細胞イメージング法を確立した。これによって、一次元方向に単純化した前後方向の細胞遊走挙動を定量化することが可能となった。本研究では、この独自の評価系を発展させ、利用することで、神経膠芽腫細胞 U-87 におけるミトコンドリア機能と細胞遊走・走化連関を明らかにすることを目的とする。

### 研究の内容および成果

#### 【方法】

エレクトロスピンニング法によりアクリル製の基板上に3-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシヘキサノエート重合体を用いてナノファイバーを製作し、神経膠芽腫細胞 U-87 の遊走・走化の定量評価に供した。走査型電子顕微鏡 (HITACHI S-2600HS; ライフサイエンス支援センターに設置) を用いてファイバー径を計測したところ、 $4.5 \pm 1.5 \mu\text{m}$  ( $n=40$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) であった。ファイバーへの細胞の吸着を向上させるために、酸素プラズマ処理を施した。

細胞内のミトコンドリア局在については、細胞にミトコンドリア感受性蛍光色素 MitoTracker

Green またはミトコンドリア膜電位感受性蛍光色素 TMRE を負荷し、蛍光顕微鏡 (ニコン Eclipse Ti) または共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV1000-D; ライフサイエンス支援センターに設置) を用いて時間経過を観察した。腫瘍細胞では、主に解糖系によって ATP が産生されるが、細胞運動に必要な局所の ATP 供給にミトコンドリアが寄与する可能性が考えられる。そこで、種々のエネルギー代謝修飾試薬、1. FCCP ( $1 \mu\text{M}$ ); 電子伝達系と ATP 合成の脱共役剤、2. oligomycin ( $1 \mu\text{M}$ ); ATP 合成酵素阻害剤、3. 2-deoxy-D-glucose (2-DG;  $10 \text{ mM}$ ); 解糖系阻害剤、を用いて、ミトコンドリア機能 (TMRE によるミトコンドリア膜電位を評価) ならびに細

胞遊走に対する影響を調べた。

細胞遊走ならびにミトコンドリア局在の解析には、画像解析ソフト Fiji (<https://fiji.sc/>)を用いた。

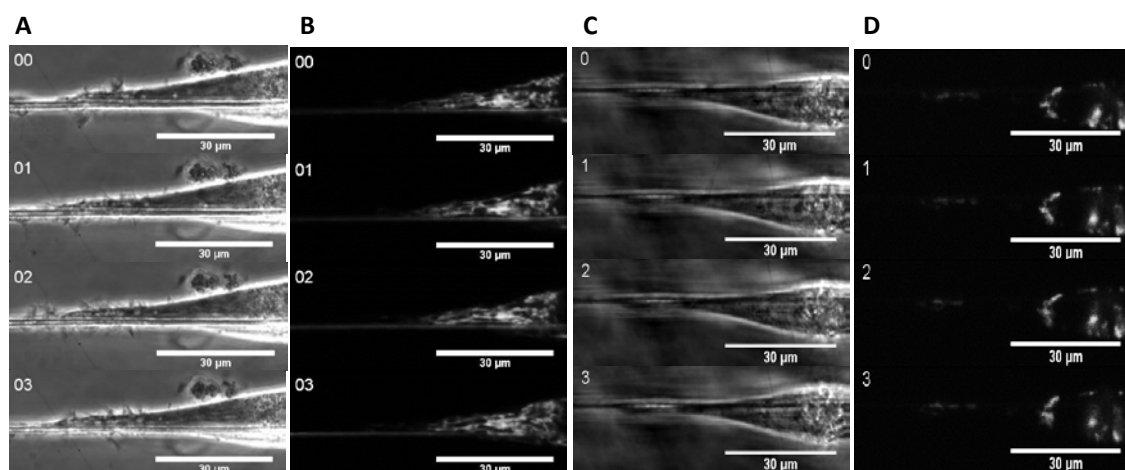
#### 【結果・考察】

まず、ミトコンドリア膜電位に対する種々のエネルギー代謝修飾試薬の影響について、平面ディッシュを用いて確認した。その結果、FCCP ならびに oligomycin 添加により著しいミトコンドリア膜電位の脱分極が認められたが、2-DG ではほとんど変化がなかった。また、平面上での細胞遊走に対するこれらの試薬の影響を調べたところ、control と比較して FCCP ならびに oligomycin 添加群では遊走速度の減少傾向が、2-DG 添加群では著しい遊走速度の減少が観察された。したがって、解糖系による ATP 産生が、腫瘍細胞の遊走に重要であることが示唆された。

次に、細胞遊走時におけるミトコンドリア動態について、ナノファイバー細胞遊走評価デバイスを用いて一細胞イメージングを行い、一次元方向に単純化した前後方向の挙動を解析した。その結果、細胞末端部において細胞が伸展する際、細胞の進行方向に向かって仮足が活発に動いていた (Fig. 1A)。また、仮足の動きに伴いミトコンドリア

が細胞末端部に流入していくことを捉えることができた (Fig. 1B)。一方、2-DG を添加した細胞では仮足の動きが認められなかった (Fig. 1C)。さらに、control と比較してミトコンドリアはより細胞末端に近い部分に局在するものの、動きに変化は認められなかった (Fig. 1D)。

以上の結果から、解糖系による ATP 産生が腫瘍細胞の遊走性のみならず、細胞遊走時におけるミトコンドリアの流動性の制御にも関わることが強く示唆された。一方、解糖系の阻害による ATP の枯渇がミトコンドリアをより細胞末端部に局在化させるメカニズム、ならびにその意義の解明については、さらなる検討が必要である。特に、細胞全体のグローバルな ATP 枯渇時においても、エネルギー需要の高い細胞内領域にミトコンドリアが積極的に動員されれば、ATP 供給を代償でき、腫瘍細胞の高い生存率の維持につながるものが考えられる。今後、複数のエネルギー代謝修飾試薬を組み合わせ、細胞遊走ならびにミトコンドリア機能・動態の連関解析を行い、そのメカニズムを明らかにできれば、腫瘍の新たな転移制御法の開発にもつながると期待される。



**Fig. 1.** Timelapse imaging of migration and mitochondrial dynamics of glioblastoma cell line U-87 on a single fiber, in the absence (A, B) or presence (C, D) of 10 mM 2-DG. Cells were preloaded with fluorescent dye, TMRE. Transmitted (A, C) and fluorescent (B, D) images were acquired every 1 min. Scale bar; 30  $\mu\text{m}$

### 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」

「シングルファイバーを用いた神経膠芽腫細胞遊走におけるミトコンドリア動態の解析」  
河合佑介、末信一郎、藤田聡、竹内綾子、松岡達、  
第 39 回日本バイオマテリアル学会大会、東京  
(2017)

#### 「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)、2017-2019 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、494 万円