

論文題目：環境応答がもたらす細胞内酸性オルガネラの pH 変化とその生物学的意味

2008 年 3 月修了

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

学生証番号：47-66527 氏名：梶田千尋

指導教員：江角浩安 教授

キーワード：栄養環境、栄養飢餓耐性、酸性オルガネラ pH、オートファジー、飢餓耐性解除薬

[背景]

がん組織は、正常組織とは異なる環境におかれている。がん細胞が増殖するためには、血液から供給される栄養素が必要不可欠であるため、がん組織にとって血管新生は重要である。しかし、実際にはがん組織を見てみると、無秩序な細胞増殖によって不完全な脈管構造が出来上がり、十分に機能している血管は少数である。そのため多くの固形がんでは、平均すると組織が常に低酸素、低栄養環境におかれている。また、血管が不十分であるために、代謝によって産生された酸をうまく排出できずに、がん細胞は細胞外、細胞内ともに正常細胞と比較して若干酸性に偏っているという報告がある。

現在一般的に行われている、21%酸素、DMEM 等の富栄養培地は、出来るだけ増殖を良くする目的のもので、この条件を用いた培養では、実際のがん組織を模倣しているとは言えない。本研究ではアミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地といった栄養欠乏培地を作製し、また、通常酸素濃度、低酸素濃度の 2 種類の条件で培養を行うことにより、がん組織の環境を模倣した。また、よりがん組織に近い性質を持つ細胞として、栄養欠乏培地でも、48 時間の生存が可能である、ヒトすい臓がん細胞株 PANC-1 を用いた。前述した、がん細胞は細胞内外ともに pH が酸性へ偏っているという点に着目し、細胞内酸性オルガネラ pH が、培養環境ごとにどう変化するか、栄養欠乏環境におけるシグナル伝達系の変化と関連はあるか、グルコース欠乏培地選択的に細胞毒性を示す化合物である kigamicin D を処理した場合にどう変化するかについて検討した。

[結果と考察]

PANC-1 細胞を、DMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地で 24 時間培養した後、pH 指示試薬 LysoSensor Yellow/Blue DND-160 で染色した。pH3 ~ 5 を示す黄色の蛍光と、pH6 ~ 8 を示す青色の蛍光の比から、細胞内酸性オルガネラの pH 環境を定量的に評価した。

DMEM で培養した細胞と比較して、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地、グルコースの代謝を阻害する 2-Deoxy-D-Glucose を DMEM に添加した培地では、細胞内リソソームの pH の著明な低下が認められた (Fig.1A,B)。しかし通常酸素条件 (normoxia:21%酸素) と低酸素条件 (hypoxia:1%酸素) で培養した細胞を比較すると、低酸素条件で培養した細胞では、通常培地条件での各種栄養欠乏培地で見られたリソソームの pH の低下が抑制されていた (Fig.1C)。

栄養欠乏環境では、ER ストレスが生じることや、オートファジーが働くことが知られている。また、ER ストレスによってオートファジーが働くという報告もある。オートファジーによって、種々のタンパクがリソソーム内で分解される。リソソーム内の酵素の至適 pH が酸性であることから、栄養欠乏に対するリソソーム pH の低下は、オートファジーの誘導に関係している可能性が示唆された。また、低酸素かつ、栄養欠乏環境は、がんの組織をよく模倣しているといえる。

本来高等動物細胞では、低栄養だけが生じる可能性は低い。よって、今回得られた低酸素、低栄養環境での pH 制御は非常に興味深い。低酸素環境によって発現が変化する遺伝子の関与等、生物学的意義も含め、今後の検討課題としたい。

シグナル伝達系と、栄養欠乏認識のメカニズムの関与を解明するため、Akt、mTOR、AMPK について各種活性化剤もしくは阻害剤を処理し、酸性オルガネラ pH を観察した。mTOR 阻害が生じる系においては、DMEM 中でもリソソームの pH の低下が観察された。代表として mTOR 阻害剤である rapamycin 処理時のデータを示す(Fig.1D)。また、mTOR シグナル変化への経路として、グルコース欠乏時には、AMPK の関与が、またアミノ酸欠乏時には、より mTOR に近い部分にある因子への未知の経路の関与が示唆された。

グルコース欠乏環境特異的な細胞毒性を持つ kigamicin D を処理し、酸性オルガネラ pH を観察した。KigamicinD 処理時には、mTOR の基質の一つである、p70S6K リン酸化の抑制が見られたが(Fig2)、これらのシグナル伝達系の動きとは関係なく、各種栄養欠乏培地でのリソソームの pH の低下が解除された(Fig.1E)。シグナルよりも下流の、リソソームの pH を調節している v-ATPase に直接関与しているかと考えたが、v-ATPase に対する直接の活性阻害は認められなかった(Fig3)。オルガネラ pH 制御に関わる別の因子と、kigamicin D の持つ選択的な殺細胞効果に関連があるかどうかについては、今後の検討課題としたい。

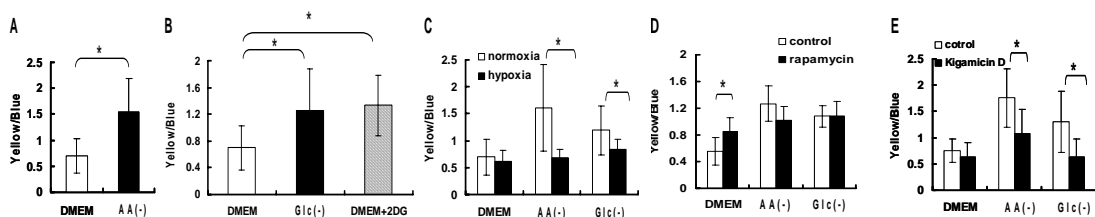


Fig.1 各条件での細胞あたりの酸性オルガネラ pH 環境の定量化(酸性領域/中性領域)

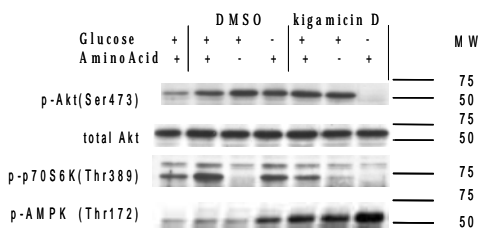


Fig.2 Akt、mTOR、AMPK に対する kigamicin D の効果

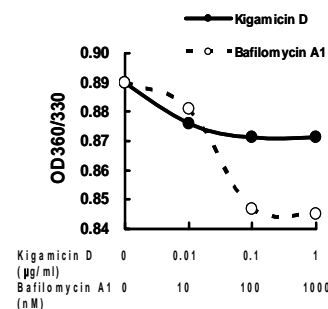


Fig.3 v-ATPase に対する kigamicin D の効果

[今後の展望]

各種栄養欠乏培地での pH 変化が、低酸素環境で抑制されていたことから、今後はがん組織の環境を模倣した低酸素、低栄養環境での細胞の適応応答のメカニズム解析を進める。また細胞内酸性オルガネラ pH 制御に関わる因子と、kigamicin D の作用の関連についての解析を進め、がん細胞が生存するために必要な応答の解明を目指す。