

低酸素状態におけるミトコンドリオン数の変化

千葉 真弓*¹, 岡田 真衣*², 横山 智哉子*³, 久富 寿*⁴

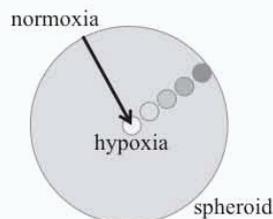
Mitochondrial genes expression are reduced in hypoxia cancerous cell lines

Mayumi Chiba*¹, Mai OKADA*², Chikako YOKOYAMA*³, Hisashi HISATOMI*⁴

(Received Aug 28, 2013)

1. 背景

通常の酸素分圧では、ヒト細胞はミトコンドリアにおいてTCA回路、電子伝達系、 β -酸化によりエネルギーを得ている。初期段階の体内のがん細胞では、周囲の血管構築が充分ではなく、酸素供給量不足が想定される。そのため、体内のがん細胞内では電子伝達系、 β -酸化などの膨大な酸素供給を必要とする反応系ではエネルギー獲得が不十分となる。そこで、体内のがん細胞では酸素を必要としない解糖系によってエネルギーを獲得する傾向が強い。がん患者に疲労感が強いのも、酸素に頼らない、非効率なエネルギー産生により体内に乳酸が溜まりやすいからと考えられている。体内のがん細胞は、血管新生される前や塊の内部など酸素が行き届きにくい状態、すなわち低酸素状態ではエネルギー獲得にミトコンドリアを使用していないのは明らかであるが、その使われないミトコンドリアは消滅するのだろうか。酵母におけるパストール効果の実験では、好氣的条件で数多く確認されたミトコンドリアが、嫌氣的条件では数も大きさも減少する。我々は、がん細胞のミトコンドリオン数を、まずはがん細胞株において調査した。調査には通常の酸素分圧で培養したがん細胞株と低酸素で培養したがん細胞株を比較した。また、培養条件が体内のがん細胞の生育条件と類似した三次元培養法によって培養したがん細胞株でも同様に調査した。



Schema 三次元培養におけるspheroidの酸素分圧
数万個の細胞で立体構造を形成するspheroidでは内部は低酸素状態になる。

2. 材料と方法

2.1 細胞培養

ヒトヒト結腸がん細胞株DLD1細胞を10% Fetal Bovine Serum (FBS), D-MEM培地 (GIBCO) を用い、37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。通常酸素分圧条件では上記培養条件で48時間培養した。低酸素状態は、vacuum oven mini VM-3030(日伸理化)にて通常空気を窒素で置換し、48時間培養した。三次元培養はがん細胞株をNanoCulture® Plate(SCIVAX)にて6日間培養し、細胞塊(spheroid)を得た。

2.2 PCRによるミトコンドリアDNAの定量

各細胞からWizard SV Minicolumns (Promega) を用いてDNAを抽出した。抽出したDNA 20 ngを、real-time PCR mixture (1×Kapa Sybr® Fast qPCR Master Mix (Kapa Biosystems), 0.4 pM Forward primer, 0.4 pM Reverse primer) に添加し、95°C/ 5min, その後95°C/ 20sec, 60°C/ 25sec, 72°C/ 20secを1サイクルとし、40サイクルPCR反応を行った(LightCycler® Nano System, Roche Diagnostics)。反応終了後、PCR増幅産物を2% アガロースゲルに供し、電気泳動を行った。エチジウムブロマイド染色したPCR増幅産物をUVトランスイルミネーターにより確認した。再現性を確保するため、培養から測定まで、3回実施した。測定対象はミトコンドリアDNAのNADH dehydrogenase 6領域およびゲノムDNAの β -Actin領域とした。

*1: 理工学研究科理工学専攻博士前期課程修了生

*2: 物質生命理工学科学部生

*3: 物質生命理工学助教

*4: 物質生命理工学教授(hisatomi@st.seikei.ac.jp)

3. 結果

ミトコンドリアの数は正確には解析できないため、ここでは1細胞あたりのミトコンドリアDNA数²⁾を調査した(Figure)。細胞培養による各細胞群において、DLD-1細胞で通常酸素分圧で培養した細胞群(normoxia)と比較して、低酸素状態で培養した細胞群(hypoxia)および三次元培養で培養した細胞群(spheroid)では、1細胞あたりのミトコンドリアDNA数が大幅に減少した。

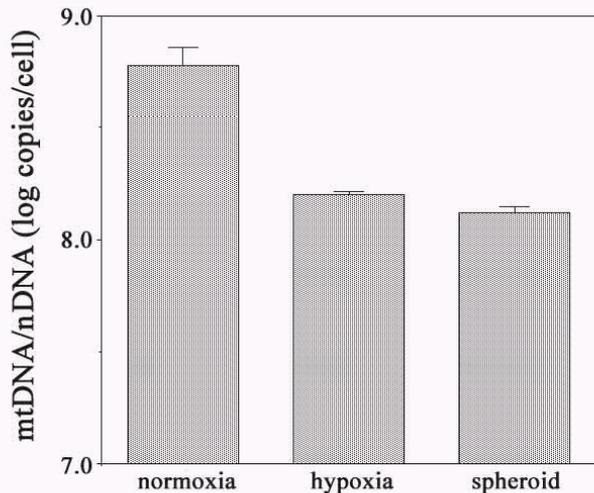


Figure 酸素分圧の違いによるミトコンドリアDNA数

normoxia, 正常酸素分圧での細胞; hypoxia, 低酸素での細胞; spheroid, 三次元培養細胞

縦軸, 1細胞あたりのミトコンドリアDNA数

4. 考察

本研究によって、低酸素で培養したがん細胞株と三次元培養法によって培養したがん細胞株では、ミトコンドリアDNA数の減少が確認された。DLD-1細胞の減少率は、低酸素で培養したがん細胞株では25.9%までに、三次元培養法によって培養したがん細胞株では21.8%までに減少していた。低酸素状態によってミトコンドリアの活動が弱まるとは予想していたが、ミトコンドリアDNAは予想を上回る減少率となった。これによって、三次元培養で形成されるspheroidの内部が低酸素状態と示唆された。同様な傾向は、DLD-1細胞以外でも確認されている(未発表データ)。

本研究のみで、低酸素状態におけるミトコンドリア数の減少を証明できたとは考えておらず、培養細胞におけるミトコンドリアの染色によっても証明する予定である。spheroidの内部は生きてそのまま染色できないので、切片作製により内部とspheroid表面細胞とのミトコンドリア数を

確認する予定である。

低酸素状態におけるミトコンドリア数の減少の証明は、同時にがん細胞塊内部の細胞状態の予測に役立つと期待される。ミトコンドリア数が周囲の細胞より大幅に減少している場合、その細胞群がグルコースによる有酸素系でエネルギーを獲得している可能性が低い。それらの細胞群では細胞質の乳酸発酵を抑制すれば、細胞群として獲得するエネルギーが格段に減少すると予想される。体内のがん細胞が、低酸素で生活している以上、低酸素における細胞の挙動の確認は、がん細胞の理解に重要である。

参考文献

- 1) Krebs HA. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem.* 1972;8:1-34.
- 2) Côté HC, Gerschenson M, Walker UA, *et al.* Quality Assessment of Human Mitochondrial DNA Quantification: MITONAUTS, an International Multicentre Survey. *Mitochondrion.* 2011;11: 520-527.