

Title	顕微質量イメージングによる細胞周期依存蛍光標識ヒトがん細胞の生体内代謝動態の解明
Sub Title	Metabolomic profile of cell cycle dependent human derived colon cancer cells using Microscopic imaging mass spectrometry
Author	大村, 光代(Omura, Mitsuyo)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012. )
JaLC DOI	
Abstract	細胞周期依存的蛍光プローブ(Fucci)導入大腸がん細胞HCT116をNOGマウスに移植し得られた凍結担がん肝組織を用いて、組織切片腫瘍部位における細胞周期別の代謝物質局在について検討を行った。Fucci-green蛍光陽性腫瘍部位をS/G2/M期、Fucci-red蛍光陽性腫瘍部位をG1期として質量イメージング画像と重ね合わせて解析を行った結果、G1期でATP, NADH, UDP-GlcNAc等が顕著に高く解糖系の亢進が示唆された。また、細胞周期同調培養で得られた細胞周期毎の細胞メタボローム解析等により、1)細胞外流出の乳酸がG1期で高く、2)G2/M期のATP生成はミトコンドリア呼吸依存的であることが認められた。以上から、がん細胞は細胞分裂するたびに内因性機構により酸化ストレスに曝露されること、グルタチオン等の内因正酸化機構を阻害することによって増殖を制御出来る可能性が示唆された。
Notes	研究種目：研究活動スタート支援 研究期間：2011～2012 課題番号：23800054 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：腫瘍生物学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23800054seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23800054seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23800054

研究課題名（和文） 顕微質量イメージングによる細胞周期依存蛍光標識ヒトがん細胞の生体内代謝動態の解明

研究課題名（英文） Metabolomic profile of cell cycle dependent human derived colon cancer cells using Microscopic imaging mass spectrometry

研究代表者

大村 光代 (OHMURA MITSUYO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40468509

研究成果の概要（和文）：細胞周期依存的蛍光プローブ（Fucci）導入大腸がん細胞 HCT116 を NOG マウスに移植し得られた凍結担がん肝組織を用いて、組織切片腫瘍部位における細胞周期別の代謝物質局在について検討を行った。Fucci-green 蛍光陽性腫瘍部位を S/G2/M 期、Fucci-red 蛍光陽性腫瘍部位を G1 期として質量イメージング画像と重ね合わせて解析を行った結果、G1 期で ATP, NADH, UDP-GlcNAc 等が顕著に高く解糖系の亢進が示唆された。また、細胞周期同調培養で得られた細胞周期毎の細胞メタボローム解析等により、1) 細胞外流出の乳酸が G1 期で高く、2) G2/M 期の ATP 生成はミトコンドリア呼吸依存的であることが認められた。以上から、がん細胞は細胞分裂するたびに内因性機構により酸化ストレスに曝露されること、グルタチオン等の内因正抗酸化機構を阻害することによって増殖を制御出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Using tumor-bearing liver of which Fucci-introduced human derived colon cancer cell line, HCT116, in superimmunodeficient NOG mice, we studied the localization of major metabolites of metastasized tumor in both G1 and S/G2/M phase by microscopic imaging mass spectrometry. We revealed that higher concentration of ATP, UTP, NADH and UDP-GlcNAc in G1 phase cells than that that in S/G2/M phase, suggesting acceleration of glycolysis in G1 phase in vivo. By synchronization of Fucci-HCT116 cells in G1, S and G2-M phases, the metabolome and flux analysis in each phase were performed. The data exhibit 1) concentration of extracellular efflux of lactate was higher in G1 phase, and 2) more activation of mitochondrial oxidative phosphorylation in G2-M phase. From the above results, as the cell cycle progressed from G2-M to G1 phases, the dependency of energy production on glycolysis in the cancer cells was increased while the mitochondrial energy production was reciprocally decreased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：細胞周期（Fucci）、質量分析イメージング技術、質量顕微鏡、がん肝転移

## 1. 研究開始当初の背景

微小環境下にあるがん細胞と宿主側の臓器・組織の代謝変動の検証はこれまで組織学的区別が困難であったが、我々は超免疫不全

マウス（NOG マウス）にヒト由来大腸がん細胞を移植し、再現性の高いヒトがん細胞肝転移モデルを確立し、肝臓内微小がん転移層の可視化や「がん部・非がん部代謝弁別解析」

を可能にした。また、生体内組織・細胞の代謝プロファイル解明に有用な CE-MS によるメタボローム解析に加え、空間分解能の高い質量顕微鏡を用いることにより凍結組織切片上の生体代謝物質・生体分子の分布・局在情報の集積が可能となり、生存時の環境を反映した組織上の定量的代謝解析を行うことが出来るようになった。そこで、細胞周期依存的蛍光プローブ (Fucci) 導入ヒトがん細胞を作製し、まず高濃度チミジンによる細胞同調培養を行って回収した細胞周期ごとの細胞の代謝をメタボローム解析で予備検討したところ、G1 期で解糖系への依存が高まり乳酸産生が亢進する、等の知見が得られた。本研究では、その Fucci 導入がん細胞 (Fucci-HCT116) を NOG マウスに移植した肝転移モデルを用いて、がん転移肝組織内の腫瘍部の細胞周期特異的局在と細胞周期ごとの代謝変動を検証するという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞周期依存的蛍光プローブ (Fucci) 導入ヒト由来大腸がん細胞株 (HCT116) を超免疫不全マウス (NOG マウス) に移植した肝転移モデルと、高空間分解能を有する質量分析イメージング技術を用いて、*in vivo* でがん細胞の細胞周期ごとの代謝変動を明らかにすることである。特に DNA 合成前 (G1 期) とがん細胞増殖時の DNA 複製期・細胞分裂期各々の細胞の生体内がん病巣での分布と局在、またそれらの糖代謝動態や ATP 等のエネルギー変動に焦点をあてて、組織構造を崩さずに新手法で生体内代謝動態を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) Fucci 導入 HCT116 細胞を 11-15 週令の NOG マウス (♂) に移植 (脾注脾摘) してがん肝転移モデルを作成し、移植 10 日後 17~18 時間の絶食後に、麻酔下で速やかに肝臓を摘出し凍結がん肝を作成する。

(2) 質量イメージング (MALDI-IMS) の予備検討・最適条件の検討結果に基づき、厚さ 5 $\mu$ m の凍結肝臓組織切片から 15 から 20 か所の腫瘍部の任意測定位置 (ROI: Region of interest) を選定し、予め蛍光顕微鏡で切片画像を取得した後、マトリクス (イオン化補助物質) として 9-Aminoacridine を切片表面に噴霧し、20 $\mu$ m 間隔でレーザーを照射してイメージング画像を取得した。

(3) チミジンブロック法による細胞同調培養を行い、G1, S, G2-M 期それぞれの細胞周期ごとの細胞を回収し、メタボローム解析を行った。また、培養液のメタボローム測定により、細胞外流出した乳酸濃度を検討した。

## 4. 研究成果

(1) Fucci-HCT116 細胞移植 10 日後の担がん肝腫瘍部位における細胞周期別の局在とイメージング画像

質量顕微鏡 (MALDI-IMS) を用いた担がん肝のイメージングでは、ATP, UTP, NADH, UDP-GlcNAc の濃度は、肝実質部に比べて腫瘍部位で高い (図 1 左パネル)。また、蛍光顕微鏡による画像 (図 1 左パネル上) から、担がん肝の腫瘍部位に、Fucci-red 蛍光陽性細胞 (G1) と Fucci-green 蛍光陽性細胞 (S/G2/M 期) が混在していることが認められた。蛍光顕微鏡で得られた画像の Fucci-red (G1 期) 及び Fucci-green (S/G2/M 期) の Intensity と肝実質部の Intensity をプロットしてそれぞれの部位の相対的濃度を解析すると、G1 期で ATP, UTP, NADH, UDP-GlcNAc が有意差を持って高いことが明らかであった。

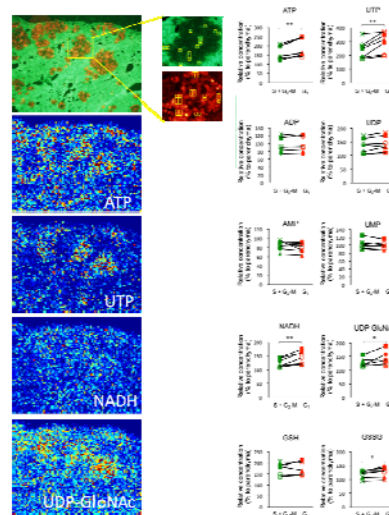


図1: 担がん肝の蛍光イメージング画像と腫瘍部位の拡大図及び両視野のATP, UTP, NADH, UDP-GlcNAcのイメージング画像(左パネル) 腫瘍内のFucci-green及びFucci-redの相対的濃度(右パネル)

(2) チミジンブロック法により細胞同調培養し回収した細胞周期ごとの細胞のメタボローム解析では、図 2 に示すように G1 期で ATP 濃度の上昇を認めた。

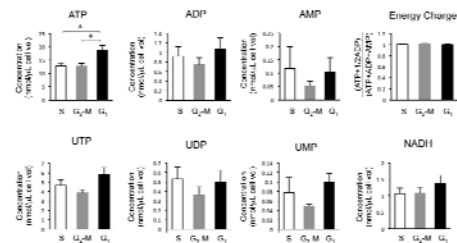


図2: 細胞周期ごとのメタボローム解析データ

また、培養液のメタボローム解析では、細胞外流出した乳酸濃度を測定すると、G1 期で乳酸濃度の上昇がみられた。

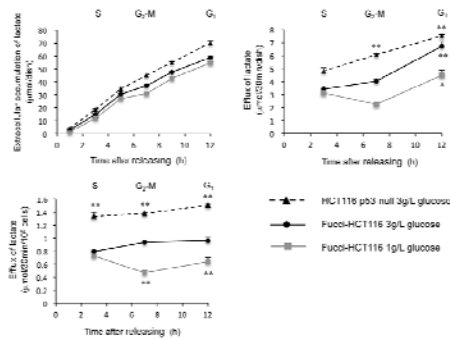


図3:培養液のメカニズム解析により、細胞外産出乳酸濃度を測定

以上の結果に加え、解糖系の主要酵素活性の検討等を行った結果、G2-M期からG1期に周期が進むにつれ、ミトコンドリアエネルギー産生から解糖系依存エネルギー産生に移行することが明らかとなった。

本研究結果より、細胞周期特異的な代謝動態を更に検証することにより、細胞周期に着目した新規がん治療の可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

- ① Bao Y., Mukai K., Hishiki T., Kubo A., Ohmura M., Sugiura Y., Matsuura T., Nagahata Y., Yamamoto T., Fukuda R., Saya H., Suematsu M., and Minamishima Y., “Energy management by enhanced glycolysis in G1 phase in human colon cancer cells in vivo and in vitro”, *Molecular Cancer Research* (in press) 査読有
- ② Toue S., Sugiura Y., Kubo A., Ohmura M., Karakawa S., Mizukoshi T., Yoneda J., Miyano H., Noguchi Y., Kobayashi T., Kabe Y., Suematsu M.; “Microscopic imaging mass spectrometry assisted by on tissue chemical derivatization for visualizing multiple amino acids in human colon cancer xenografts”, *Proteomics* (in press) 査読有
- ③ Yae T., Tsuchihashi K., Ishimoto T., Motohara T., Yoshikawa M., Yoshida G., Wada T., Masuko T., Moguchi K., Tanaka H., Osawa T., Kanki Y., Minami T., Aburatani H., Ohmura M., Kubo A., Suematsu M., Takahashi K., Saya H., and Nagano O.; “Alternative splicing of CD44mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell” *Nature Comm.* 3:883 (ncomms1892), 2012 査読有
- ④ Tamada M., Nagano O., Tateyama S., Ohmura M., Yae T., Ishimoto T., Sugihara E., Onishi N., Yamamoto T., Yanagawa H.,

Suematsu M., and Saya H.; “Modulation of Glucose Metabolism by CD44 Contributes to Antioxidant Status and Drug Resistance in Cancer Cells” *Cancer Res.* 72(6), 1438-48, 2012 査読有

- ⑤ Kubo A., Ohmura M., Wakui M., Harada T., Kajihara S., Ogawa K., Suemizu H., Nakamura M., Setou M., and Suematsu M.; “Semi-quantitative analyses of metabolic systems of human colon cancer metastatic xenografts in livers of superimmunodeficient NOG mice” *Anal Bioanal Chem* 400:1895-1904, 2011 査読有
- ⑥ Ishimoto T., Nagano O., Yae T., Tamada M., Motohara T., Oshima H., Oshima M., Ikeda T., Asaba R., Yagi H., Ishikawa T., Kai K., Takahashi E., Imamura Y., Baba Y., Ohmura M., Suematsu M., Baba H. and Saya H.; “CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth”, *Cancer Cell* 19:387-400, 2011 査読有
- ⑦ 涌井昌俊、久保亜紀子、大村光代、末松誠、「質量分析によるがんの分子イメージング」最新医学 Vol. 66, No. 10, pp. 2321-2329, 2011 査読有

〔学会発表〕(計6件)

- ① 大村光代、久保亜紀子、東江咲乃、杉浦悠毅、中西豪、加部泰明、末松誠; 「高分解能質量顕微鏡を用いた肝転移がんの代謝プロファイルの解明」第85回日本生化学学会 2012年12月15日 福岡
- ② 東江咲乃、杉浦悠毅、久保亜紀子、大村光代、加部泰明、末松誠、他。「誘導体化イメージング質量分析による、複数種アミノ酸の局在イメージング法の開発」第85回日本生化学学会 2012年12月15日 福岡
- ③ Kubo A., Ohmura M., Hishiki T., Wakui M., Suematsu M.; “*in situ* metabolic flow analyses of  $^{13}\text{C}_3$  alanine in tumor bearing-liver using CE-MS and MALDI mass spectrometric imaging” 第60回 ASMS. USA, 2012年5月20-24日
- ④ 大村光代、久保亜紀子、涌井昌俊、末水洋志、中村雅登、小河潔、瀬籐光利、末松誠; 「高分解能質量顕微鏡によるがん転移肝の代謝変動の解明」第84回日本生化学学会 2011年9月22日 京都
- ⑤ 久保亜紀子、大村光代、涌井昌俊、小河潔、瀬籐光利、末松誠; 「質量顕微鏡とCE-MSを用いたヒト大腸がん肝転移モデルの半定量的局所代謝解析」第84回日本生化学学会 2011年9月22日 京都
- ⑥ Kubo A., Ohmura M., Hishiki T., Wakui M.,

Murata M., Setoh M., Suematsu M.,;  
“Microscopic MALDI imaging revealed  
heterogenous distribution of metastasis in  
and around hepatic metastasis of human  
colon cancer xenograft in mice” 第 59 回  
ASMS, USA 2011 年 6 月 5 - 9 日

〔図書〕（計 3 件）

- ① 末松誠、**大村光代**、森川隆之、笠原正貴、  
久保亜紀子、南嶋洋司、梶村真弓、羊土  
社、「代謝システム生物学の新たな理解に  
向けて」、実験医学別冊「質量分析実験ガ  
イド」 pp212-223, 2013
- ② 末松誠、久保亜紀子、**大村光代**、菱木貴  
子、梶村真弓、加部泰明、杉浦悠毅、「が  
ん代謝システムの顕微質量イメージング  
による解析」実験医学 Vol. 30, No. 15,  
2012
- ③ 末松誠、菱木貴子、久保亜紀子、**大村光  
代**、梶村真弓、加部泰明、高野直治、山  
本雄広、「ガス分子を介した代謝システム  
制御機構：酸素とグルコースが紡ぐ複雑  
系」、細胞工学 Vol. 20, No. 01, 2011

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大村 光代 (OHMURA MITSUYO)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号：40468509