

腹水癌細胞のエネルギー代謝に関する研究*

第 1 編

腹水癌細胞よりのミトコンドリアの分離及びその性状

岡山大学医学部病理学教室 (指導: 妹尾左知丸教授)

西 風 桂 子

(昭和41年5月23日受稿)

癌細胞エネルギー代謝の研究は Crabtree (1929)¹⁾ による“糖添加にともなう呼吸活性の減少”即ち Crabtree effect に端を発しているが永く人々の目に止まらないまま放置されて来た。しかし Kunら (1951)²⁾ によつて再びその問題が取り上げられて以来注目されることとなり、Warburg ら (1957)³⁾ は癌組織のみが glucose 添加で WQ (Q_L/Q_{O_2}) が高値を示すことを観察した。このことは癌細胞の特性として強調されるようになった。Crabtree effect に対する生化学的解釈は ADP の平衡状態から説明しようとする McKee らの考え方⁴⁾、ATP の平衡状態から説明しようとする Chance ら⁵⁾ の考え方、更にミトコンドリアと解糖系酵素の“Reconstructed system”で Crabtree effect を再現しそれが解糖系とミトコンドリアでの ADP の競争的要求性にあるとする Racker ら⁶⁾ の考え方を総合して考えてみれば、ミトコンドリアがもつ性格がこの Crabtree effect に重要な作用を及ぼすことは云うまでもない。然も最近 Sauer (1964)⁷⁾ はエールリッヒ腹水癌細胞に hexokinase が多く、分離したミトコンドリアにおいても Crabtree like effect が glucose 添加で示されることが明らかにされている。一方、Crabtree effect が癌細胞の特性であるか否かは最近の Morris の“minimum deviation tumor”においては Crabtree effect が見られず、これが癌細胞の特性でないとする考え方が強い⁸⁾。しかし発癌機転の研究上から考えれば minimum deviation tumor の Crabtree effect がないことは重要な発見であるとしても、maximum deviation tumor においては Crabtree effect はほとんど例外なく示され⁸⁾ 矢張り癌細胞の生化学的研究にとつて重要であることは云うまでもない。このような見地に立てば癌細胞のミトコンドリアの性格を研究することは癌の究明にとつて有意義なことである。

る。

最近の癌細胞の生化学的研究の多くの結果を総合すれば色々の酵素活性の変動は極めて著しいが、何れも癌細胞の特異性としての決定的要因となり得ないものがほとんどで、むしろ、細胞自体の代謝調節機構の攪乱と解釈すべき点が多く、今後の問題を提示するものと考えられる。この考え方に立脚して細胞のエネルギー代謝調節を観察すれば、それがミトコンドリアの性格に依つて調節される可能性が大きいことは云うまでもなからう。

著者は先づその分離が困難とされている腹水癌細胞より intact なミトコンドリアを分離することを試みた。本編ではその分離法及び得られたミトコンドリアの性状について報告する。

実験方法

材料: エールリッヒ腹水癌細胞はマウス (DDL 系) に腹腔内移植後、6~9日目のものを10~20匹より採取、又 AH-130 腹水肝癌細胞は雑系ラットに腹腔内移植後 9~12日目のものを2~3匹より採取し、一実験当りに使用した。腹水共々分離された癌細胞は採取後直ちに 0~4°C に保ち、その後の癌細胞の分離及びミトコンドリアの分画操作は全てこの温度下で行なつた。腹腔より採取された腹水及び癌細胞は 0.25 M Sucrose 又は 0.9 % NaCl (いずれも 10 m M Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) 液に浮游、遠沈法⁹⁾ を数回繰返し、腹水及び血球を除いた。しかし、余り赤化している腹水癌細胞液は実験に用いなかつた。

ラット肝ミトコンドリアの分離: ラット肝細胞よりのミトコンドリアの分離は Utsumi らの報告¹⁰⁾ による Hogeboom の変法を用いた。

ミトコンドリアの活性測定方法: 種々の方法で分

* 文部省科学研究費による。

離された癌細胞ミトコンドリアは先に報告した装置¹¹⁾を用いてその性格を検出し、分離法の検定に供した。即ち、白金回転酸素電極法による酸素消費、90° 光散乱によるミトコンドリアの容積変化、蛍光法によるピリジヌクレオチドの酸化還元、この三者を同時に測定記録出来る装置を用いて種々の試薬による変化度を求め、ミトコンドリアの intact さを示すと云われる酸化的リン酸化（呼吸調節比、ADP/O 比¹²⁾）を求めた。反応液としては Sucrose 反応液 (0.05~0.1 M Sucrose, 20 mM KCl, 10 mM Tris-HCl buffer, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) を用い、これに適時 3 mM K-phosphate (pH 7.4), 1 mM Mg Cl₂ を加え、25°C 下、全量 2 ml で測定した。ADP はシグマ製を Tris buffer で pH 7.4 にし使用した。

実験結果

腹水癌細胞よりミトコンドリアの分離：腹水癌細胞よりのミトコンドリアの分離は通常のラット肝よりの分離法では分離が困難である。これは先づ第一に癌細胞膜が破壊されないためと考えられるので、細胞膜破壊のためにプロテアーゼ（長瀬産業製）を

用いた¹³⁾。即ち腹水癌細胞を packed ml 当り mg のプロテアーゼを含む分離液 (0.25M Sucrose, 10mM Tris-HCl buffer, 0.1mM EDTA, 0.05% BSA, pH 7.4) に 0°C 15分間浮游放置後、遠沈、分離液で洗滌した。プロテアーゼ処理された癌細胞は 5 倍量の分離液中で Teflon ホモジナイザーによりホモゲナイズされ、これを更に 6 倍に分離液で希釈、以後 Hogeboom の方法¹⁴⁾に準じてミトコンドリアを分離した。この分離過程は図 1 に示す如くである。

プロテアーゼの処理はその量及び作用時間によってミトコンドリアの収量、活性に影響するが、0°C 15~30分（遠沈操作を含めて）の場合、収量はエールリッヒ腹水癌細胞においてはかなりよく、これに比べて AH-130 では悪い。これはもともと細胞のミトコンドリア含量が異なるのかも知れないが、測定された活性からみれば上記程度の処理で最もよく定常的な活性をもつミトコンドリアが得られた。又、BSA を分離液より除くと活性の良いものが得られず、BSA による保護作用¹⁵⁾が観察された。

プロテアーゼを用いて分離したラット肝ミトコンドリアの活性変化：癌細胞膜破壊の目的で使用せるプロテアーゼをラット肝よりのミトコンドリアの分離

Fig. 1 Diagram of isolation process of ascites tumor mitochondria. The preparation solution contained 0.25M sucrose, 0.1mM EDTA, 10mM tris-HCl buffer (pH 7.4) and 0.05% BSA. All processes were carried out at 0°C.

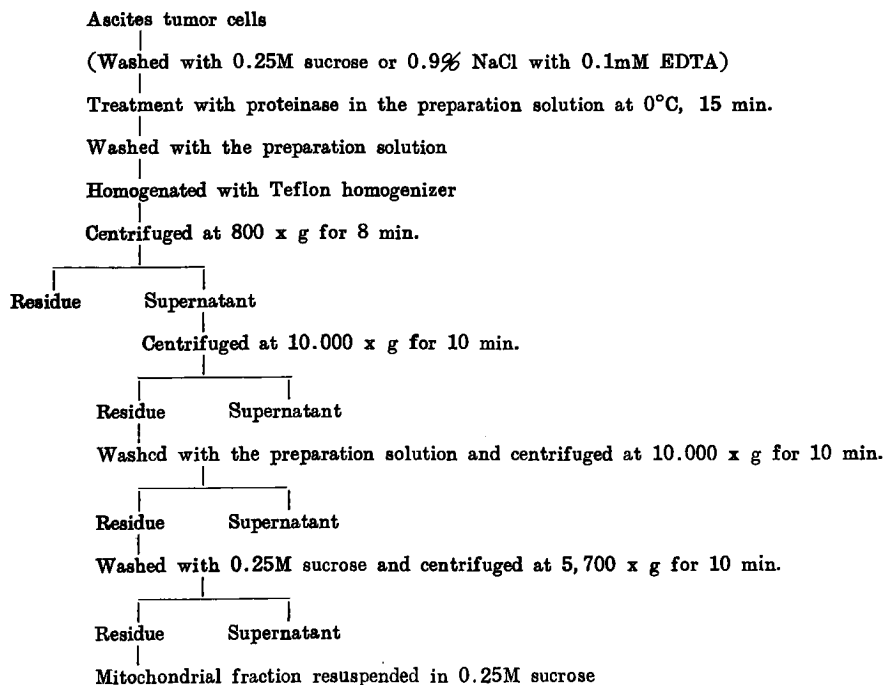


Table 1. Activities of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria and in ascites tumor mitochondria linked succinate. The ADP/O ratio was calculated from the amount of oxygen consumption by the added ADP and respiratory control index was indicated by the ratio between the rates of respiration in the presence of ADP and in its absence.

Mitochondria	ADP/O ratio	Respiratory control index
Rat liver	2.1	3.8
Rat liver (20 hours aged at 0°C)	2.0	2.5
Rat liver (isolated using proteinase)	2.1	3.5
Rat liver (id. 20 hours aged at 0°C)	—	1.2
AH-130	1.8	3.0
Ehrlich ascites tumor	2.0	3.0

過程に用いてその影響を観察した。即ち、ラット肝細胞を軽くあら目にホモジナイズしたのち、これにプロテアーゼを細胞 1g 当り 1mg の量で加え、0°C 15分作用放置後、対照にプロテアーゼを加えないものを取り、両者より同時に別個の遠沈管でミトコンドリアを分離した。正常のラット肝ミトコンドリアのコハク酸基質下の酸素消費、90° 光散乱変化、即ち膨潤収縮及びピリジンスクレオチドの酸化還元の trace は図2に示す如くである。この場合、ADP 添加により測定せられる ADP/O 比及び呼吸調節比はそれぞれ 2.1, 3.8 である。一方プロテナーゼ処理画分のミトコンドリアのそれは ADP/O 比 2.1, 呼

吸調節比 3.5 であつて、著しい変化はみられない (図2)。又種々の試薬による膨潤収縮及びピリジンスクレオチドの酸化還元度合変化も両者間で著しい差はみられなかつた。しかし24時間 0°C 0.25M Sucrose 中での aging 効果は対照ミトコンドリアでは ADP/O 比 2.0 と分離時と同様の活性がみられ、構造的観察の指針ともなり得る呼吸調節比は 2.5 と約半分に減少したに過ぎなかつたが、実験群ミトコンドリアでは uncoupling がみられ呼吸調節比は 1.2 となり僅かの調節比しかみられず ADP/O 比は oxymetric には測定出来なくなつた。この aging にもなつて膨潤収縮変化及びピリジンスクレオチドの酸化還元変化もその差が対照と実験群に観察された (図2)。この結果から、分離過程におけるプロテナーゼの処理は分離されたミトコンドリアが単時間内に使用されれば、正常分離のミトコンドリアと同様の酸化的リン酸化能が認められ、又同時に膨潤収縮、ピリジンスクレオチドの酸化還元変化も正常分離ミトコンドリアと同傾向同程度認められ、その活性面において intact と云えることが明らかとなつた。

腹水癌細胞より分離せるミトコンドリアの性状：プロテナーゼ処理によつてエールリッヒ腹水癌細胞より分画されたミトコンドリアのコハク酸、 α -ケトグルタル酸、アスコルビン酸基質下の酸素消費、膨潤収縮変化、ピリジンスクレオチドの三者の同時測定記録を図3に示す。コハク酸、 α -ケトグルタル酸アスコルビン酸基質下の ADP/O 比は理論値 2 : 3 : 1 であるがエールリッヒミトコンドリアの ADP/O 比、呼吸調節比はコハク酸基質下 2.0, 3.2, α -ケトグルタル酸基質下 2.8, 3.5, アスコルビン酸下 1.5, 1.5 を示し、ADP によるこれら傾向は膨潤収縮変化と又、ピリジンスクレオチドの酸化

Fig. 2 The aging effect on rat liver mitochondria. Swelling-shrinkage change (trace A), oxygen consumption (B) and oxidation-reduction of pyridine nucleotides in relative fluorescence intensity (C) were measured simultaneously in the medium contained 0.1 M sucrose, 0.02 M KCl, 1mM MgCl₂, 0.1mM EDTA and 10mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 at 25°. Uper traces refer to control mitochondria and under traces to mitochondria isolated from proteinase treated liver. Left traces were recorded at the time of one hour aging and right traces at 20 hours aging on 0° in 0.25M sucrose.

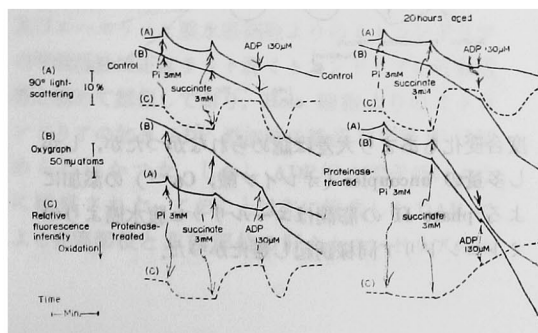
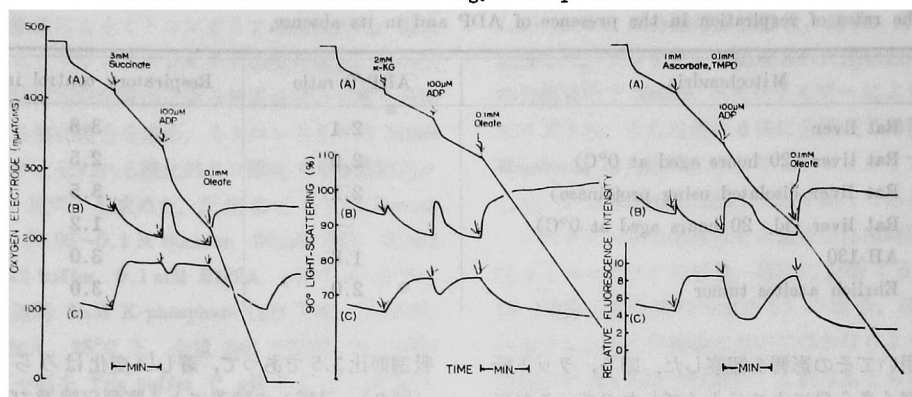


Fig. 3 The records of oxygen consumption (trace A), swelling-shrinkage change (B) and relative fluorescence intensity change (C) in mitochondria isolated from Ehrlich ascites tumor. Incubation medium are as shown in Fig. 2 except 0.05M sucrose.



還元状態と共軛して観察され、ラット肝ミトコンドリアと同一傾向が示された。しかし phase I における膨潤収縮¹⁶⁾は正常ラット肝ミトコンドリアよりもかえって ADP による感受性が大きいように観察された。又、phase II の膨潤¹⁶⁾は正常ラット肝ミトコンドリアと異なり、例えば図 4 に示す如く多量のオレイン酸による膨潤は誘起し難い。又ピリジヌクレオチドの Pi による酸化度合がやや低く、基質による還元度合が大きくみられた。オレイン酸による酸化度合も多量に添加しても起き難い。

Fig. 4 Effect of large amount of oleate on Ehrlich ascites tumor mitochondria. Conditions of measurement are as shown in Fig. 3 except that incubation medium does not contain $MgCl_2$.

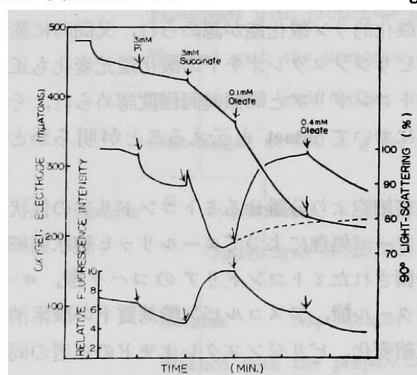
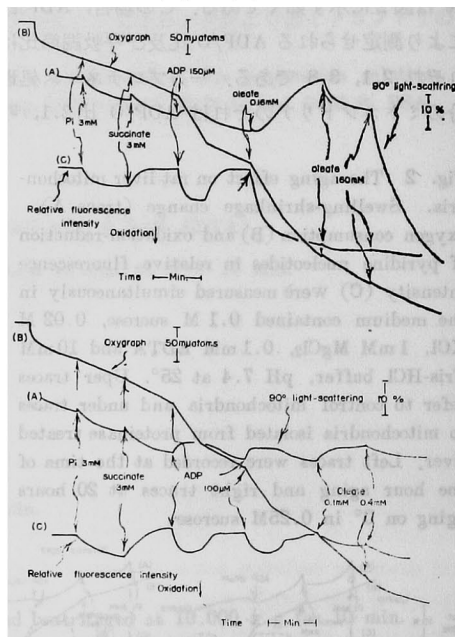


図 5 は AH-130 腹水癌細胞より分画せるミトコンドリアの記録を示す。AH-130 はその起源がラット肝の故に、正常ラット肝ミトコンドリアとの比較が可能とされるが、その呼吸活性は若干 ADP/O 比 1.8, 呼吸調節比 3.0 と低く観察された。又、phase I の膨潤収縮及びピリジヌクレオチドの酸化還元

Figs. 5 and 6 Simultaneous traces of swelling-shrinkage (A), oxygen consumption (B) and relative fluorescence intensity (C) of rat liver mitochondria (Fig. 5) and of AH-130 mitochondria (Fig. 6). These traces were recorded at 25° in the medium contained 0.05M sucrose, 0.02M KCl, 1mM $MgCl_2$, 0.1mM EDTA and 10mM Tris-HCl buffer, pH 7.4.



度合変化もあまり大差は認められなかつたが、しかし多量の uncoupler (オレイン酸, Ca^{++}) の添加による phase II の膨潤はエールリッヒ腹水癌よりのミトコンドリア同様誘起し難かつた。

考 按

癌細胞より分離されたミトコンドリアについての研究はその組成に関する研究と解糖と呼吸の関係、即ち Crabtree effect から種々の見地で観察され、その含有物質及び活性には若干の量的変化はあるがほとんど正常のものとの差が認められていない。最近、癌ミトコンドリアが種々の膨潤試薬に対して極めて反応し難いことが報告されているが¹⁷⁾¹⁸⁾、ミトコンドリアの intact さを示す酸化的リン酸化能についての関係は明らかでない。一般に癌細胞よりのミトコンドリアを intact な呼吸調節能を有する状態で分離することは困難とされており、はたして得られたミトコンドリアがそのもの固有の性状を有しているものか、分離過程における変化を受けているものか充分検討する必要がある。しかもミトコンドリアの示す形態変化は酸化的リン酸化の中間体と密接な関係が認められる¹⁹⁾²⁰⁾ことから充分考えねばならぬ点と云える。又癌ミトコンドリアと正常のそれとを比較するにしても、対照と起源を一とするものでなければあまり意味をもたぬかも知れない。この点ミトコンドリアとしてよく研究されているラット肝ミトコンドリアと AH-130 ミトコンドリアを比較することは意義がある。著者はこの目的で著者ら考案の酸素消費、90° 光散乱によるミトコンドリアの容積変化、還元型ピリジンヌクレオチドの変化を三者同時に測定し得る装置¹¹⁾を用いて腹水癌細胞よりのミトコンドリアの分離方法の検討を行なつて来たが一応定常的な状態のミトコンドリアの分離に成功した。しかし、これでもまだ収量等の点で不充分であり、更に研究を進める必要がある。

プロテアーゼを用いて定常的に分離され得る癌ミトコンドリアの呼吸活性は分離後単時間内に使用すれば、分離過程中的 aging を全く考慮外におくことは出来ないが、充分 intact なミトコンドリアとして実験材料となり得るものと考えられる。AH-130 及びエールリッヒ腹水癌細胞よりのミトコンドリアの呼吸活性は正常ラット肝ミトコンドリアの呼吸活性と極めて類似しており、Hela 細胞よりのミトコンドリアの如き ADP 添加時の緩慢な呼吸¹³⁾は認められなかつた。しかし ADP/O が若干低いように観察された。このことは先に報告した DAB による発癌部位と非癌部位の肝ミトコンドリアの比

較においても認められている²¹⁾。しかし、代謝調節と密接に関係があるとされるミトコンドリアの容積変化において¹⁶⁾¹⁹⁾²⁰⁾、酸化的リン酸化能と couple して phase I の膨潤収縮は正常ラット肝ミトコンドリアのそれと余り差がないにもかかわらず、uncoupler であるオレイン酸²²⁾、 Ca^{2+} ²³⁾らの薬剤による phase II の膨潤が著しく起り難いことは、上記 AH-130、エールリッヒ腹水癌及び DAB 発癌部肝より分離されたミトコンドリアに観察され、共通な性状と考えられる。この phase II の膨潤度合についての観察は後述の論文が追求する。又癌より分離のミトコンドリアは概して分離直後の還元型ピリジンヌクレオチドの状態が正常ラット肝ミトコンドリアのそれよりも低く、基質による還元能が大きく異なるように見受けられるが、これは今後の詳細な測定を試みなければなんとも云えない。

総 括

1) エールリッヒ腹水癌細胞及び AH-130 腹水肝癌細胞よりのミトコンドリアの分離を種々の方法で行ない、それらの分離法をミトコンドリアの酸素消費、90° 光散乱による容積変化、ピリジンヌクレオチドの酸化還元変化を同時測定出来得る装置を用いて検討した。

2) 癌細胞をプロテアーゼ処理により破壊し、ミトコンドリアを分画する方法で定常的に intact と云える酸化的リン酸化能、呼吸調節能を有するミトコンドリアが得られた。

3) 腹水癌細胞のミトコンドリアを正常ラット肝ミトコンドリアと比較した時、呼吸調節能は同程度であるが若干 ADP/O 比が低い。

4) 腹水癌ミトコンドリアの phase I の膨潤収縮変化及びピリジンヌクレオチドの酸化還元変化度合は呼吸変化と平行して、正常ラット肝ミトコンドリアと同傾向にみられ大差は認められなかつた。

5) Uncoupler による phase II の膨潤は癌ミトコンドリアにおいてはその変化度合が低く、誘起し難い。

文 献

- 1) Crabtree, H. G. : Observation on the carbohydrate metabolism of tumors. *Biochem. J.*, **23**, 536, 1929.
- 2) Kun, E., Talalay, P. and Williams-Ashmann, H. G. : Ehrlich ascites tumors, I. The enzymic and metabolic activities of the ascitic cells and the ascitic plasma. *Cancer Research*, **11**, 858, 1951.
- 3) Warburg, O. : On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, **124**, 209, 1956.
- 4) Ibsen, K. H., Coe, E. L. and McKee, R. W. : Interrelationships of metabolic pathways in the Ehrlich ascites carcinoma cells. I. Glycolysis and respiration (Crabtree effect). *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 384, 1958.
- 5) Chance, B. and Hess, B. : Metabolic control mechanisms. IV. Effect of glucose on the steady state of respiratory enzymes in the ascites cell. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2421, 1959.
- 6) Ray, Wu. and Racker, E. : Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. III. Limiting factors in glycolysis of ascites tumor cells. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1029, 1959.
- 7) Sauer, L. A. : A Crabtree-like effect with isolated ascites tumor mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **17**, 294, 1964.
- 8) 杉村隆 : 最小変異肝ガン 蛋白質・核酸・酵素 **9**, 1110, 1964.
- 9) Scholefield, P. G. : Studies on fatty acid oxidation. VI. The effect of fatty acids metabolism of Ehrlich ascites carcinoma cells. *Cancer Research*, **18**, 1026, 1958.
- 10) Utsumi, K. : Relation between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of P^{32} in mitochondrial Pi fraction. *Acta Med. Okayama*, **17**, 259, 1963.
- 11) 内海, 山本, 浦上, 西風 : Mitochondria の 90° 光散乱, Pyridine nucleotides の螢光及酸素消費量変化の同時測定装置の試作. *岡山医学会雑誌* **76**, 193, 1964.
- 12) Chance, B. and Williams, C. R. : The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in Enzymol.*, **17**, 65, 1956.
- 13) 小林, 萩原, 増住, 奥貴 : HeLa 細胞からのミトコンドリアの調製と性質. *酵素化学シンポジウム*, **17**, 67, 1962.
- 14) Hogeboom, G. H. : *Methods in Enzymology* vol. I, 16, 1955, Acad. Press. New York
- 15) Borst, P. : Mitochondria from Ehrlich ascites tumor cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**, 381, 1960.
- 16) Packer, L. : Size and shape transformations correlate with oxidative phosphorylation in mitochondria. I. Swelling-shrinkage mechanisms in intact mitochondria. *J. Cell Biol.*, **18**, 487, 1963.
- 17) Arcos, J. C., Griffith, G. W. and Cunningham, R. W. : Fine structural alteration in cell particles during chemical carcinogenesis. II. Further evidence for their involvement in the mechanism of carcinogenesis. The swelling of rat liver mitochondria during feeding of aminoazodyes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**, 49, 1960.
- 18) Utsumi, K., Ohara, S., Yamamoto, G., Inaba, K., Urakami, H. and Yamamoto, G. : Mitochondrial swelling and uncoupling activity of long-chain fatty acids. *Acta Med. Okayama*, **16**, 317, 1962.
- 19) 内海, 山本, 稲葉, 大原, 山本 : ミトコンドリアの膨潤収縮と酸化的磷酸化. *細胞化学シンポジウム*, **13**, 113, 1963.
- 20) Packer, L. : Metabolic and structural state of mitochondria. I. Regulation by adenosine diphosphate. *J. Biol. Chem.*, **235**, 242, 1960.
- 21) Yamamoto, G., Utsumi, K. and Nishikaze, K. : Studies on swelling-shrinkage and oxidative phosphorylation of liver mitochondria of rat fed 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene. *Acta Med. Okayama*, in press.
- 22) Yamamoto, G. : Effect of sodium oleate on the metabolism and size of rat liver mitochondria. *Acta Med. Okayama*, **18**, 247, 1964.
- 23) Utsumi, K. : Mitochondrial swelling induced by Ca^{2+} and inorganic phosphate and its related phenomena. *Acta Med. Okayama*, **18**, 189, 1964.

Studies on the energy metabolism of ascites tumor cells

I. A method to isolate the mitochondria from tumor cells and their biological activities

By

Keiko NISHIKAZE

Department of pathology, Okayama University Medical School

SUMMARY

The method of separation of tumor cell mitochondria (Ehrlich ascites cell and rat hepatoma cell, AH 130) by treating tumor cells with proteinase, by which the mitochondria are retained in a biologically active state, has been reported. The mitochondria thus obtained proved to have the normal activities of oxidative phosphorylation and respiratory control. The respiratory control of these mitochondria was nearly the same as those of liver mitochondria from normal rat but rather low in ADP/O ratio than the later. The tumor cell mitochondria also showed nearly a normal potency in the swelling at phase I and the oxidation-reduction of pyridine nucleotide, but the swelling at phase II which is induced by adding uncouplers such as oleate and Ca^{++} , was markedly low as compared with that of rat liver mitochondria.
