

論文題目 : Kigamicin D と Diphenyleiodonium Chloride は活性酸素種産生により  
栄養飢餓選択的な細胞死を誘導する

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 : 47-66516 氏名 : 金原 左京

指導教員 : 江角 浩安 教授

キーワード : Kigamicin D、Diphenyleiodonium Chloride (DPI)、活性酸素種、  
膵臓がん、栄養飢餓耐性

【序論および研究目的】

膵臓がんは他臓器がんと比較し、5年相対生存率が最も悪いことが知られている。一方、膵臓がん組織は強く乏血管性であり、低酸素・低栄養状態にあることが知られている。ゆえに、膵臓がん組織は過酷な微小環境に対する適応反応を示し、悪性化していると考えられる。当研究室の過去の知見より、*in vitro* 実験において膵臓がん細胞株は、栄養飢餓培地中であっても正常細胞と比較して長時間生き延びることを見出してきた。これらの現象は既知の低酸素反応では説明が困難である為、『栄養飢餓耐性』と定義した。栄養飢餓耐性のメカニズムは十分に解明されていないが、極めて特殊な代謝が起こっている可能性が高いこと、および正常組織では栄養欠乏状態にはないことの2点より、栄養飢餓耐性を遮断することが新たながん治療の標的になると仮説を立てた。この仮説に基づき、通常の栄養培地中では細胞毒性を示さず、グルコース・アミノ酸・血清などを欠乏させた栄養飢餓培地 (NDM; nutrient deprived medium) 中において選択的な細胞毒性を示す化合物を探索してきた。得られてきた化合物 (栄養飢餓耐性解除薬) としては kigamicin D、arctigenin、pyrvinium pamoate などが挙げられる。いずれの化合物も、明確な抗腫瘍効果を示し、栄養飢餓耐性を標的とした抗がん治療の有用性が示されてきた。

既に示されている kigamicin D の作用機序としては、ヒト膵臓がん細胞において、グルコース欠乏に曝すことで誘導される Akt のリン酸化を抑制し細胞死を誘導することが挙げられる。しかしながら、その他の詳細な作用機序は明らかとなっていない。そこで、新たな作用機序を解明することを目的として、酸化ストレスメカニズムに着目し修士論文研究を行った。また、新たな栄養飢餓耐性解除薬として diphenyleiodonium chloride (DPI) の抗がん効果を検討した。

【結果および考察】

： Kigamicin D は活性酸素種産生により栄養飢餓選択的な細胞死を誘導する

本研究において、なぜ新たな kigamicin D の作用機序として酸化ストレスメカニズムの関与を検討したかを示す。乳がん細胞やグリオーマ細胞株では、グルコース欠乏状態に曝すだけで酸化ストレスが増大し、細胞死が誘導されることが報告されている。前述してきた様に、乏血管性のヒト膵臓がん細胞株では、グルコースを欠乏させただけでは顕著な細胞死は誘導されない。そこで『グルコース欠乏状態に対しては耐性を示す膵臓がん細胞は、通常の細胞よりも活性酸素種を出しにくいのか、活性酸素に耐性があり、kigamicin D はこのメカニズムを崩しているのではないか』という仮説を立てた。最も汎用されている膜透過性の蛍光プローブ DCFH-DA を用いてフローサイトメーター解析を行い、細胞内の酸化ストレス量を測定した。予想した通り、kigamicin D は膵臓がん細胞株に対してグルコース欠乏選択的な酸化ストレスの増大を示した。次に、kigamicin

D処理することで主に産生される活性酸素種は何であるかを、特異的な活性酸素種のみを検出する様々な蛍光プローブを用いて同定することにした。結果、過酸化水素を特異的に検出するBES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>プローブを処理した際に顕著なシグナルの増大が観察された。ゆえにグルコース欠乏培地中でkigamicin D処理することにより産生された活性酸素種は主に過酸化水素であることが示唆された。対照実験として、フリーラジカルスカベンジャーであるN-Acetyl-L-Cysteine (NAC)と過酸化水素の分解酵素であるCatalase (CAT)を用いることにより、細胞生存に対する影響を調べた。NACやCATを共処理することにより、kigamicin Dのグルコース飢餓選択的な細胞死を部分的に抑制した。また、NACはkigamicin Dのグルコース飢餓選択的な細胞内過酸化水素の増大を濃度依存的に抑制した。Kigamicin Dによりグルコース飢餓選択的に抑制されるAktのリン酸化を、CATを共処理することで回復した。

### **：新たな栄養飢餓耐性解除薬として Diphenyleneiodonium Chloride (DPI)が栄養飢餓選択的な細胞死を誘導する**

新たな知見として、diphenyleneiodonium chloride (DPI)は膵臓がん細胞株に対し、栄養飢餓選択的な細胞毒性を示すことを見出した。ヒト膵臓がん由来PANC-1、PSN1、KP3細胞、およびヒト結腸がん由来WiDr細胞に対して、DPIは通常の栄養培地と比較し、グルコース欠乏培地中で数十～数百倍の選択的な細胞死を誘導した。また、DPIによる栄養飢餓選択的な細胞死は、アミノ酸や血清の有無に関係なくグルコースが欠乏することに起因することを明らかにした。次に、より実際の生体内でのがん組織に近い三次元培養モデルを用いたDPIの抗がん活性を検討することにした。まず、ヒト結腸がん由来WiDr細胞を三次元培養することにより、スフェロイドを作成した。栄養培地中で培養するとスフェロイドの内外で栄養の濃度勾配が生じることが知られており、内部は栄養供給が乏しい。したがって、栄養培地中であってもDPIを処理することで顕著にスフェロイドの増殖が抑制された。また、DPIを処理してもスフェロイド表面上で顕著な細胞死は観察されなかった。更に、細胞への栄養供給が豊富である通常の単層培養において、栄養培地中でDPI処理することにより増殖が完全に抑制されることはなかった。以上の結果より、三次元培養モデルにおいてもDPIの抗がん活性が示された。グルコース欠乏培地中でDPI処理することにより、Aktのリン酸化の抑制と、AMPK- $\alpha$ リン酸化の亢進が観察された。AMPK- $\alpha$ リン酸化の顕著な亢進はATPの枯渇と酸化ストレスの増大に起因していると考えられる。そこで、BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いて細胞内の過酸化水素量を測定することとした。グルコース欠乏培地中、DPI処理することで酸化ストレスの増大が観察された。また、DPIのグルコース飢餓選択的なAktのリン酸化の抑制およびAMPK- $\alpha$ リン酸化の亢進を、CATを共処理することで抑制した。また、CATを共処理することにより、DPIのグルコース飢餓選択的な細胞死を部分的に抑制した。

### **【結論】**

本研究では、ヒト膵臓がん細胞株に対する栄養飢餓耐性解除薬の新たな作用機序として、kigamicin Dが栄養飢餓選択的に誘導する細胞死には活性酸素種産生が関与していることを明らかにした。また、新たな栄養飢餓耐性解除薬として diphenyleneiodonium chloride (DPI)のグルコース欠乏選択的な抗がん効果を証明した。また、DPIが栄養飢餓選択的に誘導する細胞死にも活性酸素種産生が関与していることを明らかにした。