

修士論文

**Kigamicin D と
Diphenyleneiodonium 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**

平成 18 年度（2006 年） 入学

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

がん先端生命科学分野

江角 浩安 教授

47-66516

金原 左京

目次	1
要旨	2
第1章 序論	
1-1 Summary (英語)	5
1-2 膵臓がん	6
1-3 膵がんは慢性的乏血に曝されている	11
1-4 栄養飢餓耐性	12
1-5 栄養飢餓耐性解除薬	13
第2章 遺伝子発現解析による栄養飢餓への適応反応と栄養飢餓耐性解除薬の作用機序解析	
2-1 研究目的	14
2-2 実験手法	15
2-3 実験結果	19
2-4 考察	34
第3章 Kigamicin D の栄養飢餓選択的な細胞死誘導に対する酸化ストレスメカニズムの関与	
3-1 研究目的	37
3-2 実験手法	39
3-3 実験結果	42
3-4 考察	56
第4章 栄養飢餓耐性解除薬としての Diphenyleneiodonium Chloride(DPI)の効果	
4-1 研究目的	58
4-2 実験手法	59
4-3 実験結果	61
4-4 考察	72
第5章 参考文献	74
謝辞	80

要旨

「Kigamicin D と Diphenyleneiodonium 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」

学生証番号：47-66516

所属研究分野名：がん先端生命科学分野

指導教官名：江角 浩安 教授

氏名：金原 左京

【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 **diphenyleneiodonium chloride (DPI)** の抗がん効果を検討した。

【結果および考察】

I : 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、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-H₂O₂** 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。

II：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- α** リン酸化の亢進が観察された。**AMPK- α** 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-H₂O₂** 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- α 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。

第1章 序論

1-1 Summary (英語)

Human pancreatic cancer are considered to be expressed ischemia, i.e., under hypoxia and nutrient deprivation because they show severe hypovascularity on clinical angiography. Therefore, the release of tumor tolerance (referred to as “anti-austerity”) could be a new key to cancer therapy strategy.

Thus, the hypothesis of our team is that the chemical compounds that reveal cytotoxicity under the nutrient deprivation can function as anti-pancreatic cancer agents. We developed a screening method to discover anticancer agents that do not reveal any toxicity in ordinary medium but inhibit the survival of cancer cells in the nutrient-deprived medium. As a result, we have discovered many of such compounds; kigamicin D, arctigenin, pyrvinium pamoate, and so on.

However, the mechanism of the anti-austerity drug has not been identified yet. Moreover, the mechanism of the phenomenon of anti-austerity itself has not been identified, either. Therefore, we have attempted to illuminate the mechanism of anti-austerity of pancreatic cancer cells both by pharmacological and biochemical method using nutrient anti-austerity drugs and by transcriptome analysis. To be concrete, in our team, I have done three researches as follows:

- 1) Transcriptome analysis with anti-austerity drugs in nutrient deprived condition (Chapter 2);
- 2) The cell death is introduced by Kigamicin D in nutrient deprived condition via oxidative stress mechanism (Chapter 3); and
- 3) The effect of Diphenyleneidonium Chloride (DPI) as nutrient anti-austerity drug (Chapter 4).

As a result, it has been identified that kigamicine D and diphenyleneidonium chloride can lead death of cancer cells by production of reactive oxygen species. However, the identification of the genes that are related to the anti-austerity mechanism needs further research.

1-2 膵臓がん

膵臓の主な働きと膵がんの定義

膵臓は、胃と脊柱の間に存在し、長さが約 15cm、厚さが約 2cm のバナナ状の臓器である¹⁾。膵臓は、解剖学的には 3 つの部位（頭部、体部、尾部）に分けられる²⁾。膵臓の働きとしては、消化液を作ること（外分泌）と、血糖を調節するホルモンを作ること（内分泌）が挙げられる³⁾。外分泌として、消化液である膵液は膵臓の腺細胞より分泌され、主膵管を通過して十二指腸へと向かう¹⁾。一方、内分泌腺であるランゲルハンス島（ α 細胞と β 細胞が存在）より血液の糖濃度を調節しているホルモンが分泌される。 β 細胞からは血糖を下げるインスリン、 α 細胞からは逆に血糖を上げるグルカゴンが分泌されている¹⁾。

膵がんは、膵管上皮あるいは膵実質細胞から発生するがんとして定義される。特に、膵管上皮から発生するがんを膵管がんといい、膵管がんが膵がんの大部分（80%以上）を占めている¹⁾。

膵がんによる死亡率（統計）

Fig.1-1.は年齢階級別に見た膵がんの死亡率のグラフであり、**Fig.1-2.**は年齢階級別に見た膵がんの罹患率のグラフである⁴⁾。青線が男性、赤線が女性を示している。両グラフを比較すると、膵臓がんの罹患数と死亡数のグラフは、ほぼ重なる。膵がん罹患患者の生存率が低いことを意味している。**Fig.1-2.**に示される様に、年齢階級別に見た膵がんの罹患率は 50 代前半より急激に増加していることが分かる。**Fig.1-3.**では 1960 年から 2000 年における膵臓がんの年齢調整死亡率（昭和 60 年モデル人口で補正）を男女別に示してある⁵⁾。日本において、膵臓がんによる死亡率は、男女ともに 1960 年代より 1980 年代後半まで増加し、1990 年代以降は横ばいとなっている。**Fig.1-4.**および **Fig.1-5.**より、膵臓がんによる死亡率を国際比較することが出来る⁵⁾。日本とは異なり、アメリカ、イギリス、フランスにおける膵臓がん死亡率は 1960 年代より 2000 年に至るまで横ばい傾向にある。イタリアは日本にはやや劣るが、1960 年代より 1980 年代後半にかけて膵臓がん死亡率の増加を示している。

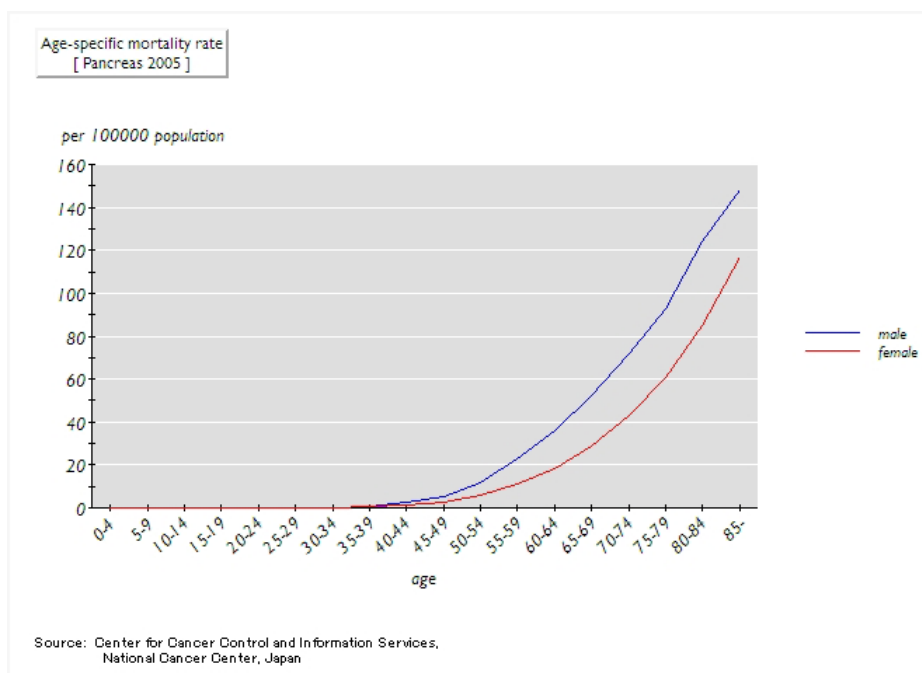


Fig.1-1. 年齢階級別がん死亡率（膵臓がん 2005 年）⁴⁾

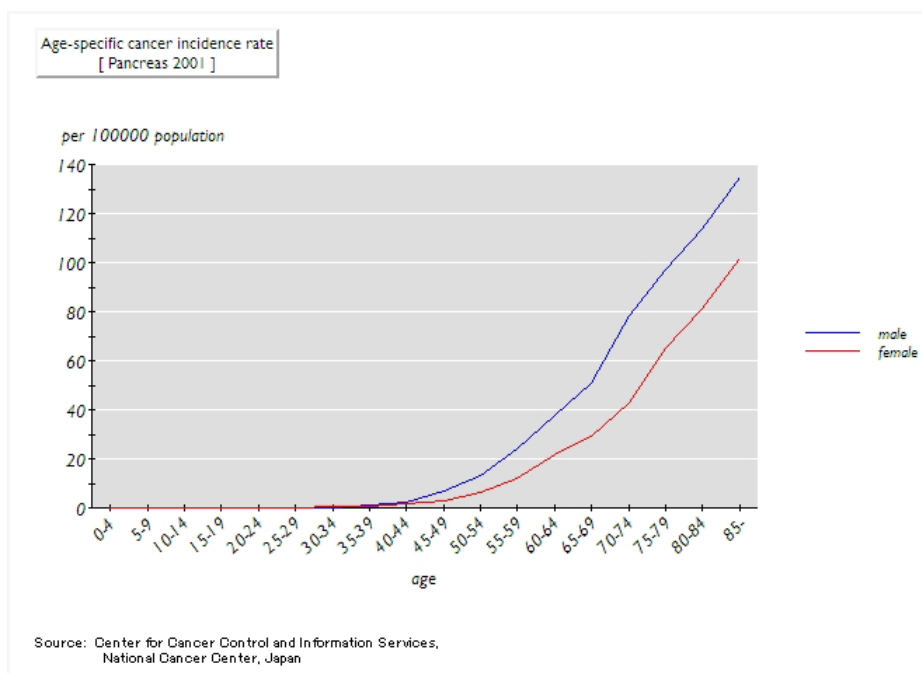


Fig.1-2. 年齢階級別がん罹患率（膵臓がん 2001 年）⁴⁾

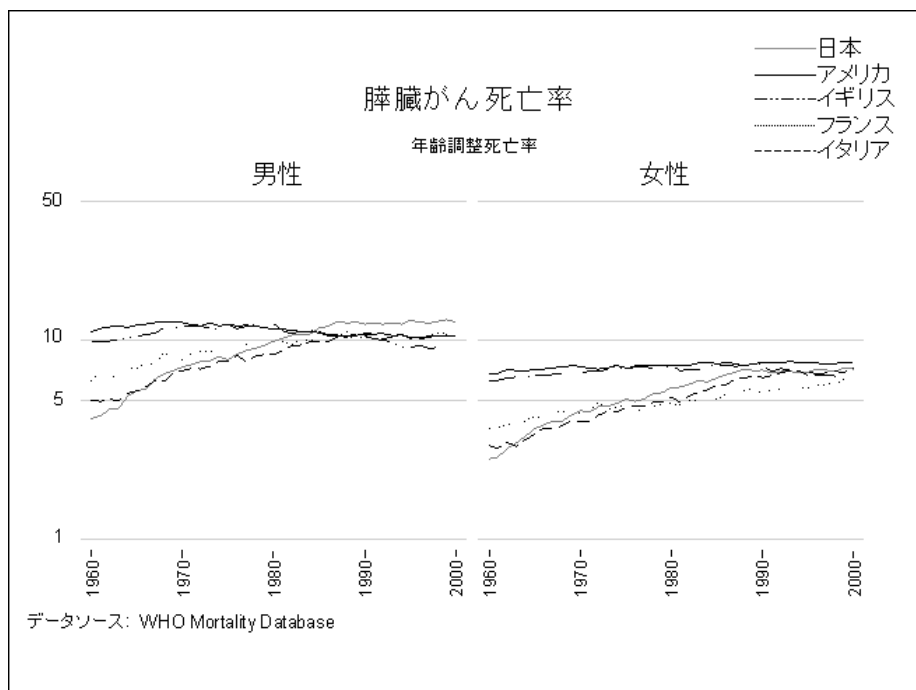


Fig.1-3. 男女別膵臓がん年齢調整死亡率（昭和 60 年モデル人口で補正、人口 10 万対）⁵⁾

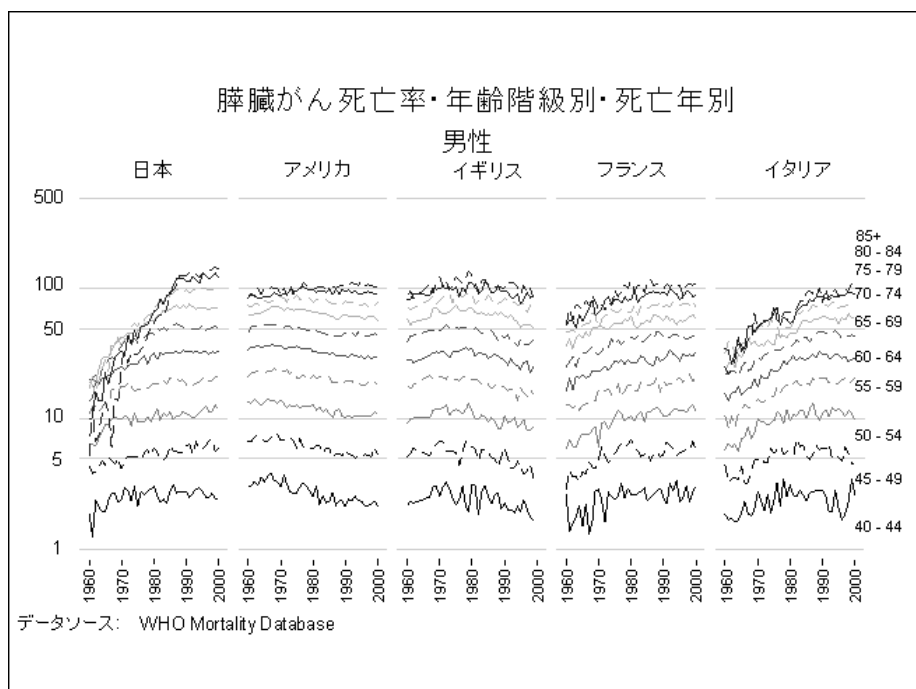


Fig.1-4. 5 カ国における 40 歳以上男性年齢階級別膵臓がん死亡率(人口 10 万対)

⁵⁾

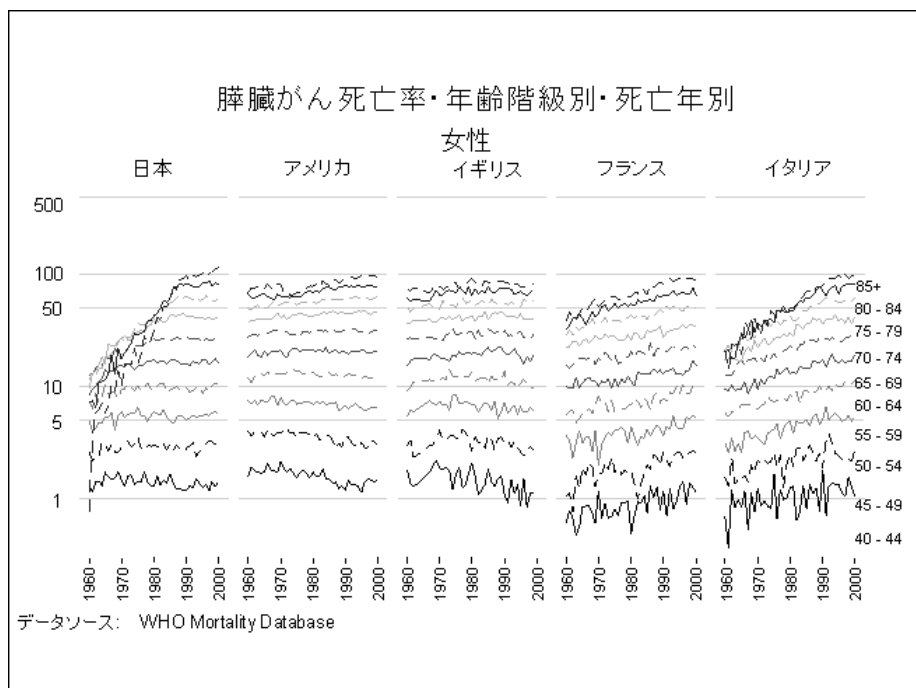


Fig.1-5. 5 カ国における 40 歳以上女性年齢階級別膵臓がん死亡率(人口 10 万対)
5)

膵がんの危険因子

膵がんの危険因子について以下にまとめる。喫煙は膵がん発症の危険率を明らかに増加させる⁶⁻⁸⁾。コーヒーと膵がんの関係は、不明との報告がある⁹⁾。肥満⁶⁾、ヘリコバクターピロリ感染¹⁰⁾でも、膵がんリスクの増加が報告されている。糖尿病の罹患^{7, 11, 12)}や慢性膵炎^{7, 13)}によって膵がんリスクが上がるという報告もある。膵がん患者の 4~8%は家族歴に膵がんがあり、対照群と比較して 13 倍との報告がある¹⁴⁾。膵がんの早期発見のためには無症状の危険因子群を検診することが望ましいが、上記の危険因子を一つでも有する症例数は膨大であり、現状ではどのような人が膵がんになり易いか確定的な結論は出ていない。現状、複数の危険因子を有する症例では、膵がん発症も念頭においた慎重な経過観察と定期的検査が望ましいとされている¹⁵⁾。

膵がんの早期発見

日本において、膵がんによる年間死亡数は約 2 万人弱(2004 年)である¹⁾。しかし、その診断と治療は未だに難しい。理由として、生体内における膵臓の位置的問題がある。**Fig.1-6.**に示す通り、膵臓の周辺には多くの臓器が存在するため診断が難しい。膵臓がんは早い段階において特徴的な症状も無い³⁾。前述した様に、膵がん危険因子も明確ではない。ゆえに、膵臓がんの早期発見は未だ

に難しい。**Fig.1-7.**では部位別のがん患者 5 年生存率が示されているが、早期発見の困難さも反映し、膵臓がん患者 5 年生存率は最も予後が悪いことが分かる。

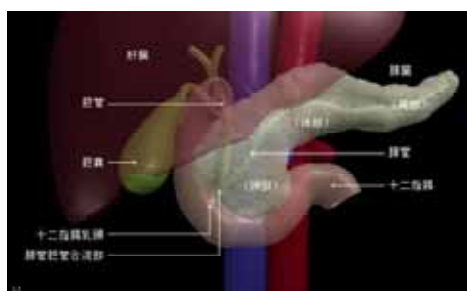


Fig.1-6. 膵臓と周辺臓器 ³⁾

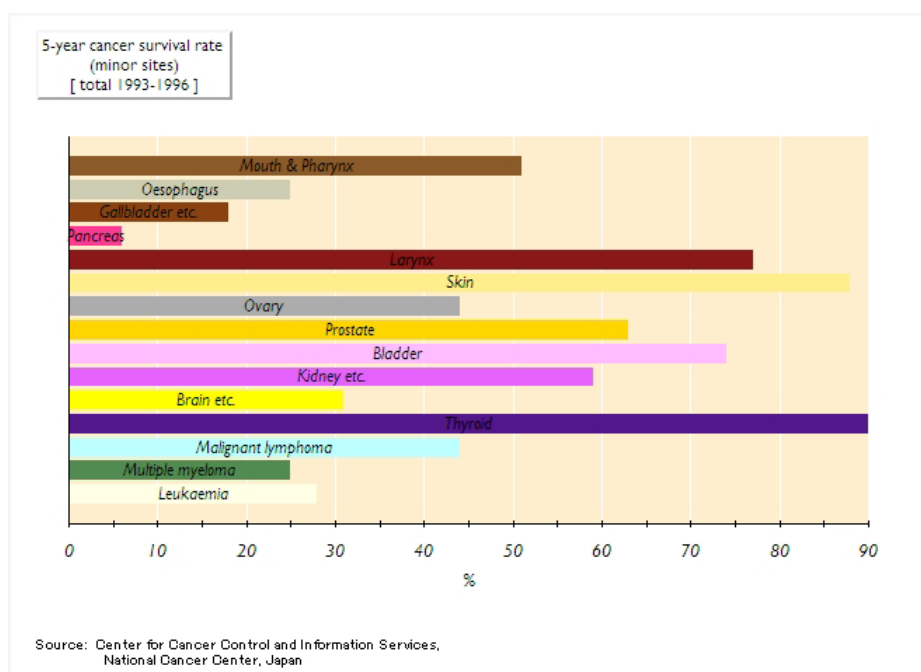


Fig.1-7. 部位別がん患者 5 年相対生存率(部位詳細) (総数 1993～1996 年) ⁴⁾

膵がんの治療

膵がんの治療は、大きく外科的治療法・放射線療法・化学療法の 3 つに分けられる ¹⁵⁾。診断時には既に進行がんである場合が多く、集学的治療が試みられる。膵臓がんでは、切除可能率は **35～40%**であり、残りは根治手術不能な例である。切除可能例では、拡大手術＋術中放射線照射＋術後化学療法が主に行われる。また、切除不能例では、**5-FU** を主体とした化学療法と放射線治療の併用が行われる ¹⁾。

1-3 膵がんは慢性的乏血に曝されている

膵がんは非常に予後が悪く、悪性度が高いことが知られている。一方、臨床知見より膵がんは強く乏血管性であり、低酸素、低栄養状態に曝されている¹⁶⁻¹⁸⁾。**Fig.1-8** (写真、左) より、**angiography** 画像を見てみると、赤矢印で囲まれたヒトの膵がん組織部位は、他に比べて造影剤の到達が悪く血流が極度に少ないことが分かる。ヒトの膵がん組織は、乏血管性のがんであると言える。**Fig.1-8** (写真、右) において、**Dynamic CT** 画像でもこの事が確認できる。米国の研究者により、手術中に酸素電極で測定された酸素濃度が報告されている。正常組織では **24.3 から 92.7mmHg** であるのに対し、膵がん組織では **0 から 5.3mmHg** となっている。腫瘍組織は極めて強い低酸素状態である事が確認されている。腫瘍の低酸素の強さと悪性度に関しては、膵がんに限らず多くのがんでは報告されている^{17, 18)}。

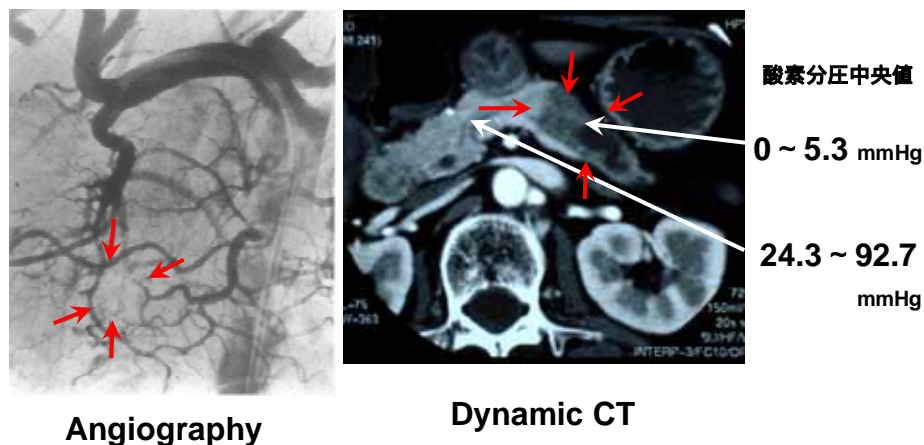


Fig. 1-8. 膵臓がん組織は強く乏血管性(低酸素、低栄養)である

1-4 栄養飢餓耐性

当研究室では、血流が少ない状態でがんが生き延びることと、がんの悪性化に結びつきがあると考え、これを細胞や遺伝子レベルで研究している。一般に血流が少ない場合は低酸素状態として把握され、低酸素に対する適応反応が広く研究されている。血流が少ない時の低酸素状態は、同時に栄養供給も低いという事に注目した所に当研究室の独自性がある。一般には、低酸素下で動物細胞は酸素を必要としないエネルギー産生機構として、嫌氣的解糖を使うとされている¹⁹⁾。しかし、血流不足により引き起こされた低酸素の場合、当然の如く嫌氣的解糖の基質であるグルコースの供給も極めて限られている。低酸素への適応を考える上で、グルコース欠乏も同時に起こる事を考える必要がある。

Fig.1-9.に示す通り、*in vitro*において、乏血管性由来である膵臓がん細胞株は、グルコースなどを枯渇させた栄養飢餓培地であっても正常細胞と比較して生き延びることを見出してきた²⁰⁾。したがって、強い血流不足に曝されながら発生しかつ悪性化してきたがん、典型例としての膵がんは、嫌氣的解糖の活性化により低酸素下を生き延びるという考え方では説明がつかない生物学的特性があると考え、この現象を『**栄養飢餓耐性**』と定義した²⁰⁻²²⁾。

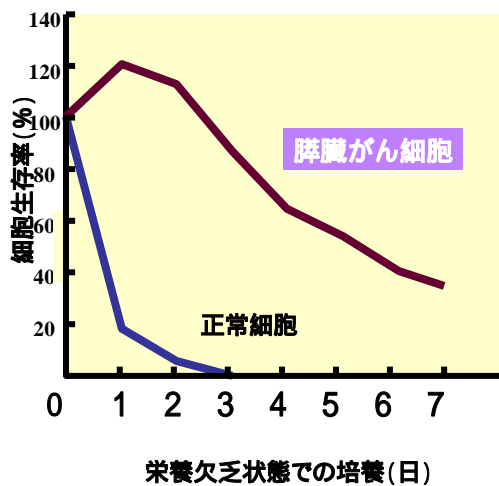


Fig. 1-9. 膵臓がん細胞は、正常細胞と比較して栄養飢餓状態でも生きながらえる

1-5 栄養飢餓耐性解除薬

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、及び正常組織では栄養欠乏状態にないことの二点より、栄養飢餓耐性を遮断する事が新たながん治療標的となると考え研究を行ってきた。この仮説に基づき、栄養培地下では細胞毒性を示さず、アミノ酸・グルコース・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スクリーニングしてきた (Fig.1-10)。得られてきた代表的な化合物として、kigamicin D²³⁾、arctigenin²⁴⁾、pyrvinium pamoate²⁵⁾などが挙げられる。いずれの化合物も、ヌードマウス皮下腫瘍モデルに対する顕著な抗腫瘍効果を示した。ゆえに、栄養飢餓耐性を標的とした抗がん治療は有用と考えられる。

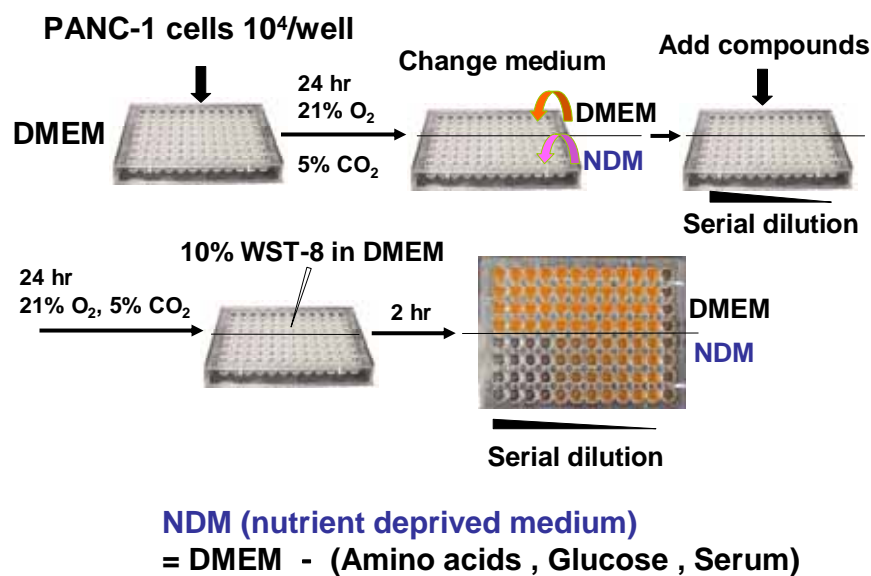


Fig. 1-10. 栄養飢餓耐性解除薬のスクリーニング法、概略図

第2章 遺伝子発現解析による栄養飢餓への適応反応と栄養飢餓耐性解除薬の作用機序解析

2-1 研究目的

前述の様に、栄養飢餓耐性を新たな抗がん標的とするため、当研究室では独自のスクリーニング法を確立した。現在、栄養飢餓状態で選択的な細胞毒性を示す化合物は多数得られ、我々の戦略の有用性も確立されつつある。しかし、栄養飢餓耐性という現象そのものは十分に解明されていない。そこで、『栄養欠乏下、膵臓がん細胞株に対していくつかの栄養飢餓耐性解除薬を処理した際に共通して発現変化が生じる遺伝子は、栄養飢餓耐性の調節機構における重要な遺伝子であろう』と仮説を立てた (Fig.2-1. の概念図を参照)。栄養飢餓耐性ヒト膵臓がん由来 PANC-1 細胞をグルコース欠乏培地中、3 種類の栄養飢餓耐性解除薬 (kigamicin D、arctigenin、pyrvinium pamoate) で処理、または未処理した場合に抽出された各々の RNA を用いトランスクリプトーム解析を検討することとした。コントロールと比較して少なくとも 2 つ以上の飢餓耐性解除薬により、共通して遺伝子発現変化が見られたものを候補遺伝子とした。栄養飢餓耐性解除薬を起爆剤としてゲノム情報を解析 (ケミカルゲノミクス) し、栄養飢餓耐性に関与する遺伝子候補を探索することが目的である。

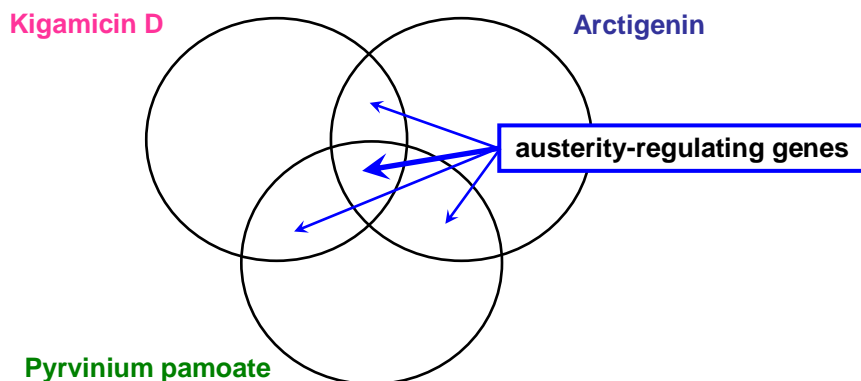


Fig.2-1. 栄養飢餓耐性関連遺伝子の探索戦略

2-2 実験手法

2-2-1 研究試薬

kigamicin D²³⁾は財団法人微生物化学研究会の國元節子博士との共同研究により精製したものであり、arctigenin²⁴⁾は、富山大学医学部和漢薬研究所の門田重利教授のグループと共に精製したものである。pyrvinium pamoate²⁵⁾は、Sigma より購入した。LY294002 は Calbiochem より購入した。他の化学薬品は研究用製品として手に入れることが可能である。kigamicin D、arctigenin、pyrvinium pamoate、LY294002 はそれぞれ最終濃度 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.5 µg/ml, and 20 µM で用いた。試薬を溶解した DMSO 溶媒は、細胞生存に影響の無い、培地中の最終濃度 0.5 %で用いた。

2-2-2 細胞培養

細胞は全て、American Type Culture Collection (ATCC)より購入した。ヒト膵臓がん由来 PANC-1 細胞と MIA PaCa2 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO)に 10% fetal calf serum (FCS, Sigma)を加えて培養した。ヒト膵臓がん由来 PSN1、BxPC3、KP2、KP3 細胞は RPMI1640 培地 (Nissui, Tokyo)に 10% FCS を加えて培養した。細胞をグルコース欠乏状態にする際、以前に報告されている手法を用いた²⁰⁾。グルコースを加える場合には最終濃度が 1 g/l となるようにした。FCS はアミノ酸やグルコースを除去するために PBS で透析してから用いた。また、細胞数は WST-8 cell counting kit (Dojindo)により測定した。

2-2-3 RNA抽出

Fig.2-2.に示す処理の後に RNA 抽出を行った。PANC-1 細胞を 100 mm ペトリ皿に 1×10^6 cells /dish でまいた。そして、DMEM 中、37 °C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した。細胞を PBS で洗い、DMEM またはグルコース欠乏培地中で各栄養飢餓耐性解除薬を処理した。未処理の対照群には DMSO 溶媒 0.5% 処理した。PANC-1 細胞を各条件に曝して 1 時間後に回収し、RNA 抽出は RNeasy kit (QIAGEN) を用いた。各条件のトータル RNA サンプルは異なる日に回収した (duplicate の実験)。RNA の純度は Agilent 2100 Bioanalyzer により確認した。

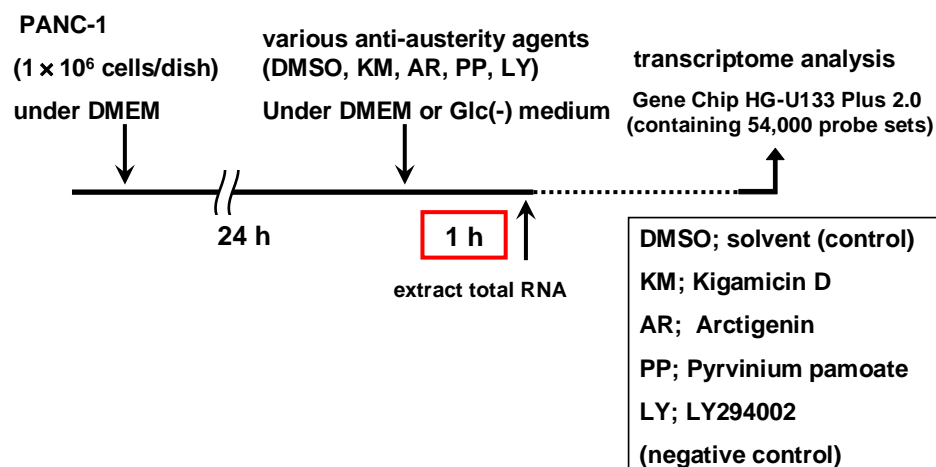


Fig.2-2. トランスクリプトーム解析手法

2-2-4 DNA マイクロアレイ

トランスクリプトーム解析は、54,000 プローブセット以上、約 38,500 遺伝子を含む HG-U133 Plus 2.0 Affymetrix GeneChip を用いた。トータル RNA (3 µg) に対し、T7-Oligo(dT)プライマーと SuperScript II (Life Technologies) を用い first-strand cDNA を合成した。その後、second-strand cDNA 合成を製品プロトコールに従い行った。鋳型 cDNA よりビオチン化された cRNA を合成した。ビオチン標識 cRNA (20 µg) を断片化し、HG-U133 Plus 2.0 Affymetrix GeneChip 上加え、専用ハイブリダイゼーションオーブン中、45 °C で 16 時間反応させた。一晩反応させた GeneChip を、Fluidics Station を用い洗浄・蛍光標識した。蛍光標識はストレプトアビジン - フィコエリスリンによる。

2-2-5 データ解析

蛍光標識された GeneChip の画像データは、ChipScanner 3000 (Affymetrix) を用い取り込んだ。取り込まれた画像に、アレイの欠損・不純物の混入が無いことを視覚的に確認した。Affymetrix GeneChip Microarray Analysis GCOS ソフトウェアを用いシグナルを数値化した。標準化されたデータの解析には、Microsoft Excel を用いた。少なくとも 2 倍以上の遺伝子発現変化を閾値とした (2 倍以上の発現増加または 1/2 以上の発現の減少)。

2-2-6 確認 RT-PCR

DNA マイクロアレイの結果を確認するため RT-PCR を行った。製品プロトコールに従って、total RNA 0.5 µg、oligo dT-Adaptor プライマーまたは random 9 mers プライマー、AMV Reverse Transcriptase XL、RNase Inhibitor

(TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0)より cDNA を合成した。各遺伝子の特異的に検出する PCR プライマー対は、PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/links.html>)からの情報または Primer3 ソフトウェアによりデザインした。プライマーは、融解温度 58 °C から 60 °C、PCR 産生物が 200~300 bp となるよう設計した。PCR 反応は 50 µl 系で行い、4.5 µl の cDNA、TaKaRa Ex Taq HS、プライマー対、超純水を混合した。PCR 条件は、94 °C・2 分で変性、94 °C・30 秒、60 °C・30 秒、72 °C・30 秒のセットを 25 周。2 %アガロースゲルを用い、PCR 産生物を電気泳動した。泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射により PCR 産生物を検出した。

2-2-7 *Real-time RT-PCR*

Total RNA 0.1 µg、LightCycler (Roche Diagnostics)、AMV Reverse Transcriptase XL (Life Sciences)、LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)を用いた real-time RT-PCR 法により、各遺伝子の発現量を検出した。各遺伝子の特異的に検出するプライマー対は以下の通り。

MAFF は、

Fw:5'-AAACCTGGGTGTCCTCACTG-3'

Rv:5'-CTATTTGCCACAGCAGTCCA-3'。

EFNA1 は、

Fw:5'-CCCCAGTCCAAGGACCAAG-3'

Rv:5'-CTGTGAGTGATTTTGCCACTGA-3'。

DLX2 は、

Fw:5'-TTAGCCTGGACTTGGACACA-3'

Rv:5'-TAAAAAGGAGGGGTTGCTGA-3'。

GAPDH は、

Fw: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'

Rv: 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'

各遺伝子の発現量は、GAPDH 遺伝子を内部標準として補正をかけた。実験は triplicate で行い、結果は means±SD で示した。

2-2-8 *siRNA* を用いたノックダウン実験

遺伝子抑制実験は、QIAGEN の siRNA システムを用いて行った。各遺伝子に対応する siRNA・試薬は全て QIAGEN より購入した。EFNA1 遺伝子には Hs_EFNA1_2_HP siRNA と Hs_EFNA1_6_HP siRNA。DLX2 遺伝子には Hs_DLX2_2_HP siRNA と Hs_DLX2_3_HP siRNA。MAFF 遺伝子には

Hs_MAFF_1_HP siRNA と Hs_MAFF_6_HP siRNA を用いた。ネガティブコントロールは、AllStars Neg. Control siRNA を用いた。siRNA トランスフェクション試薬は、HiPerFect Transfection Reagent を用いた。遺伝子抑制実験は、製品プロトコールに従って行った。

2-2-9 統計処理

全ての結果は、**means**±**SD** 値で表した。統計比較は、分散解析を行った後にスチューデント T 検定を用いて行った。結果が、*P* 値が **0.05** 未満の場合を有意さ有りと考えた。

2-3 実験結果

2-3-1 PANC-1 細胞に対する各栄養飢餓耐性解除薬のグルコース欠乏選択的な細胞毒性

Fig.1-10.に示したスクリーニング法により、kigamicin D、arctigenin、pyrvinium pamoate、LY294002 はグルコース・アミノ酸・血清などを除いた NDM(nutrient deprived medium)中で選択的な細胞毒性を示す化合物として得られた。今回、実験条件を複雑にしないため『栄養欠乏状態＝グルコース欠乏状態』と定義した。Fig.2-3.に示すよう、kigamicin D、arctigenin、pyrvinium pamoate は NDM 中と同様にグルコース欠乏培地中において選択的な細胞毒性を示した。しかし、NDM 中では選択的な細胞毒性を示す LY294002 が、グルコース欠乏培地中では選択的な細胞毒性を示さなかった。これは LY294002 がアミノ酸欠乏特異的な細胞毒性を示すという過去の知見とよく一致する²⁰⁾。ゆえに、今回のグルコース欠乏下でのトランスクリプトーム解析では kigamicin D、arctigenin、pyrvinium pamoate を栄養飢餓耐性解除薬として用い、LY294002 はネガティブコントロールとして用いることとした。

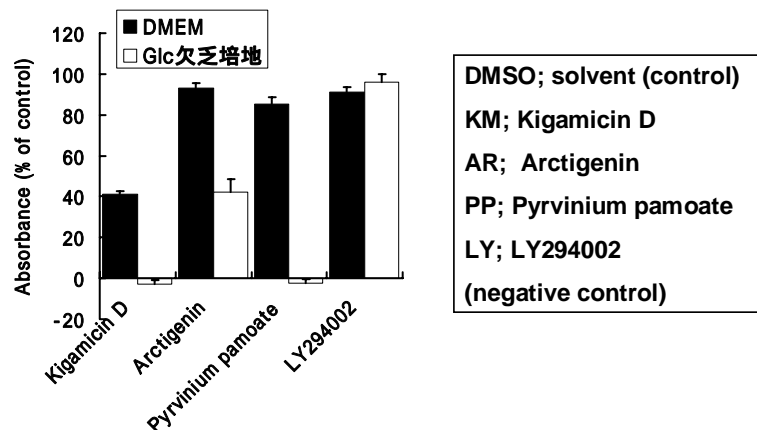


Fig.2-3. PANC-1 細胞に対する各栄養飢餓耐性解除薬のグルコース欠乏特異的な細胞毒性。ヒト膵臓がん細胞株 PANC-1 を DMEM (■)または、グルコース欠乏培地(□)中で、0.1 $\mu\text{g/ml}$ の kigamicin D、0.5 $\mu\text{g/ml}$ の arctigenin、0.5 $\mu\text{g/ml}$ の pyrvinium pamoate、20 μM の LY294002 を加え培養した。DMSO 処理した場合の細胞数を 100%とした。縦軸は、薬剤処理 24 時間後に WST-8 cell counting kit により測定した生存細胞数。全ての実験は triplicate で行い、結果は means \pm SD で示した。

2-3-2 PANC-1 細胞でグルコース欠乏下、栄養飢餓耐性解除薬処理により共通して発現変化する遺伝子の探索

『栄養欠乏下、膵臓がん細胞株に対していくつかの栄養飢餓耐性解除薬を処理した際に共通して発現変化が生じる遺伝子は、栄養飢餓耐性の調節機構における重要な遺伝子であろう』という仮説のもと、トランスクリプトーム解析を行った。54,000 プローブセットを含む Gene Chip Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 を用いた。それぞれの栄養飢餓耐性解除薬 (kigamicin D, arctigenin, pyrvinium pamoate) を処理したサンプルと、DMSO 溶媒を処理したコントロールサンプルとを比較した。実験は各条件、duplicate で行った。候補遺伝子のプローブセットは、二つ以上の薬剤処理群が DMSO コントロール群と比較して、共通して 2 倍以上あるいは 1/2 以上の遺伝子発現変化を示すものとした。Fig.2-4. に示す通り、合計 8 のプローブセットが共通して 2 倍以上の発現増加を示し、合計 11 のプローブセットが共通して 1/2 以上の発現減少を示した。GeneChip 上には、各々の遺伝子や EST に対して 11 から 20 種類のオリゴヌクレオチドプローブが搭載されている。ゆえに、絞ったプローブセットに対応した遺伝子として、発現増加した遺伝子が合計 2 つ、発現減少した遺伝子が 8 つ得られた。これら 10 遺伝子全てに関して、DNA マイクロアレイの結果を確認するために RT-PCR を行った。Fig.2-5. に示すように、グルコース欠乏培地中で DMSO 処理したコントロールと比較して三種類の栄養飢餓耐性解除薬で共通して遺伝子発現の減少が見られた EFNA1、DLX2、MAFF という 3 種類の遺伝子を同定した。これらの 3 つの遺伝子はいずれも、DMEM 栄養培地中と比較して、グルコース欠乏に 1 時間曝すことで遺伝子発現が増加していることが分かった。つまり、通常の栄養培地中よりグルコース欠乏状態に曝すことで顕著に遺伝子発現が増加するが、栄養飢餓耐性解除薬を処理により発現の増加が抑制される遺伝子を得ることが出来た。また、ネガティブコントロールとして用いた LY294002 処理したサンプルでは、いずれの遺伝子に対しても、グルコース欠乏状態に曝して 1 時間後では、DMSO 処理したコントロールサンプルと同様の発現増加が観察された。

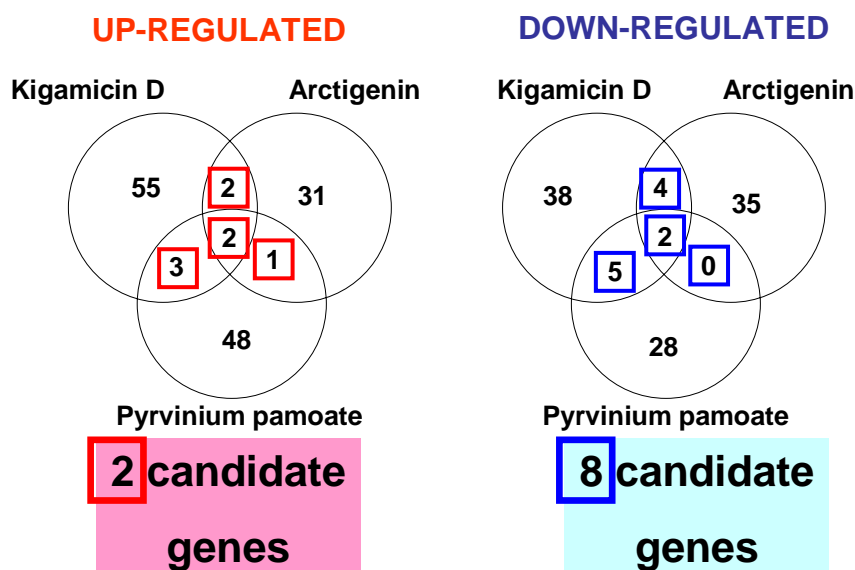


Fig.2-4. 栄養飢餓耐性解除薬処理により共通して発現変化するプローブセット (Venn Diagram)。トランスクリプトーム解析は、54,000 プローブセットを含む、Gene Chip Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 を用いた。それぞれ、三種類の栄養飢餓耐性解除薬(kigamicin D, arctigenin, pyrvinium pamoate)を処理したサンプルと、DMSO 溶媒を処理したコントロールサンプルとを比較した。候補遺伝子のプローブセットは、二つ以上の薬剤処理群が DMSO コントロール群と比較して、共通した遺伝子発現変化を示すものとした。合計 8 のプローブセットが共通して 2 倍以上の発現増加を示し、合計 11 のプローブセットが共通して 2 倍以下の発現減少が見られた。これらのプローブセットに対応した遺伝子として、発現増加した遺伝子が合計 2 つ、発現減少した遺伝子が 8 つ得られた。

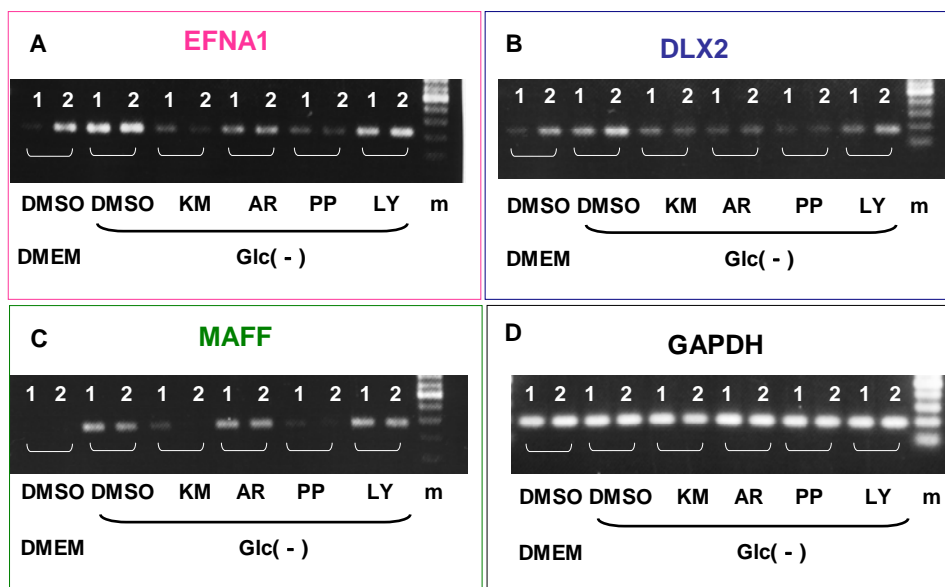


Fig.2-5. PT-PCR による候補遺伝子発現変化に対する確認実験。DNA マイクロアレイの結果を RT-PCR により確認した。グルコース欠乏培地中で DMSO 処理したサンプルと比較して、三種類の栄養飢餓耐性解除薬(KM;kigamicin D, AR;arctigenin, PP;pyrvinium pamoate)を処理した場合に共通して発現減少が見られた EFNA1、DLX2、MAFF 遺伝子、内部標準として GAPDH 遺伝子について検討した。いずれの条件も duplicate で実験を行った。LY;LY294002 はネガティブコントロールとして用いた。m は DNA 分子量マーカーである。

2-3-3 グルコース欠乏下、各栄養飢餓耐性解除薬処理による *EFNA1*、*DLX2*、*MAFF* 遺伝子発現の経時変化

Real-time RT-PCR により、グルコース欠乏下で各栄養飢餓耐性解除薬を処理した際の *EFNA1*、*DLX2*、*MAFF* 遺伝子発現変化を経時的に追跡した。**Fig.2-6.** に示すように、いずれの遺伝子においても DMSO 処理したコントロールサンプルでは、グルコース欠乏に曝してから経時的に発現増加が見られた。*EFNA1* ではグルコース欠乏 2 時間後まで経時的に発現増加を認めた。*DLX2*、*MAFF* 遺伝子はグルコース欠乏に曝して 90 分後に最大の発現増加を認めた。また、いずれの遺伝子も *kigamicin D*、*arctigenin*、*pyrvinium pamoate* を処理することで、グルコース欠乏により誘導される遺伝子発現の増加を顕著に抑制した。注目すべき結果として、グルコース欠乏による各遺伝子の誘導が、ネガティブコントロールとして用いた *LY294002* 処理することで部分的に抑制され遅延していた。

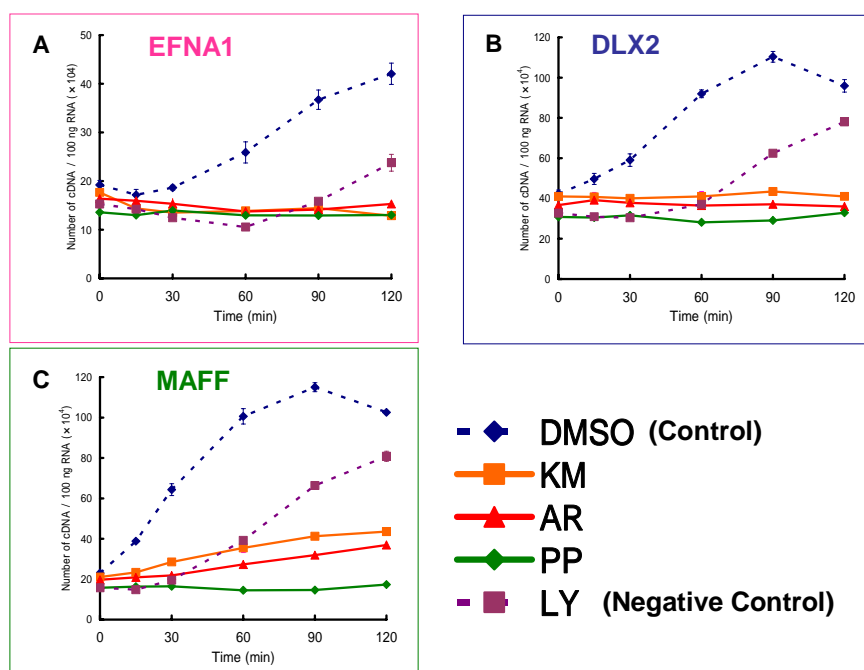


Fig.2-6. Real-time RT-PCR による候補遺伝子の経時的発現変化。*EFNA1*、*DLX2*、*MAFF* について real-time RT-PCR により発現を調べた。PANC-1 細胞をグルコース欠乏培地(Glc⁻)で、DMSO、0.1 μ g/ml の KM; *kigamicin D*、0.5 μ g/ml の AR; *arctigenin*、0.5 μ g/ml の PP; *pyrvinium pamoate*、20 μ M の LY; *LY294002* を加え培養した。細胞は 0、15、30、60、90、120 分薬剤処理した。*EFNA1* (A.)、*DLX2* (B.)、*MAFF* (C.) の遺伝子発現変化は、それぞれに特異的なプライマーセットにより検出した。

2-3-4 siRNA を用いた EFNA1、DLX2、MAFF 遺伝子のノックダウン実験

グルコース欠乏に曝すことで EFNA1、DLX2、MAFF 遺伝子は顕著に発現誘導され、同時に各栄養飢餓耐性解除薬を処理すると抑制されることが示された。グルコース欠乏下において各栄養飢餓耐性解除薬が顕著な細胞毒性を示すことは前述してきた通りである。ゆえに、EFNA1、DLX2、MAFF 遺伝子が栄養飢餓耐性に対して直接的に関与する重要な遺伝子であれば、これらの遺伝子発現を抑制してグルコース欠乏状態に曝せば、顕著な細胞死が誘導されるであろうと考えた。そこで、siRNA をトランスフェクションし EFNA1、DLX2、MAFF 遺伝子をノックダウンすることとした。まず、siRNA 導入の最適条件を検討した。Fig.2-7.に示すように、PANC-1 細胞に対し、Alexa Fluor 488 ラベルされた Nonsilencing Control siRNA を 1、5、10、25 nM の濃度で HiPerFect Transfection Reagent を用いてトランスフェクションした。結果、24 well plate において、10 nM 以上の濃度で効率良く siRNA の導入が認められた。また、25 nM の siRNA をトランスフェクションしても、顕著な細胞毒性は認められなかった。Fig.2-8.においては、siRNA の濃度を 25 nM に固定し、実験系を大きく (6 well) または小さく (96 well) して条件検討を行った。結果、いずれの系においても効率良く siRNA の導入が認められた。また、グルコース欠乏に曝した場合でも問題なく siRNA がトランスフェクションされていることを確認した。実際に、各遺伝子の siRNA を用いてノックダウン効率を real-time RT-PCR により確認した。各遺伝子に対応する siRNA は QIAGEN より購入した既製品を用いた。Fig.2-9.より、ネガティブコントロールを処理したサンプルと比較して、EFNA1 においては、Hs_EFNA1_2_HP siRNA (EFNA1②) で 61%、Hs_EFNA1_6_HP siRNA (EFNA1⑥) で 73%のノックダウン効率を示した。また、DLX2 においては、Hs_DLX2_2_HP siRNA (DLX2②) で 62%、Hs_DLX2_3_HP siRNA (DLX2③) で 55%のノックダウン効率を示した。MAFF においては、Hs_MAFF_1_HP siRNA (MAFF①) で 48%、Hs_MAFF_6_HP siRNA (MAFF⑥) で 61%のノックダウン効率を示した。Fig.2-10.により、siRNA 処理することで、各遺伝子に対応する遺伝子の特異的にノックダウンしていた。例えば、Fig.2-10.A.において、DLX2 や MAFF に対する siRNA を処理しても EFNA1 遺伝子の発現には影響を及ぼさなかった。すなわち、EFNA1、DLX2、MAFF 遺伝子はシグナル伝達における上下関係はなく、『並列』関係にあることが示唆される。

また Fig.2-10.は、DMEM 中で 24 時間各遺伝子に対する siRNA を処理した後、グルコース欠乏に 90 分曝した場合の各遺伝子発現量を調べた結果である。DMEM 中で 24 時間各遺伝子に対する siRNA を処理したサンプルであっても、

グルコース欠乏に 90 分間曝すと遺伝子発現の増加が確認された。この際、増加した各遺伝子発現量は、DMEM 培地中で通常に発現している量 (ベースライン) を大きく超えることはなかった。

Fig.2-11.において、実際に各遺伝子に対する siRNA を用いてノックダウンを行い、DMEM またはグルコース欠乏培地に曝した後の細胞生存に対する影響を、WST8 cell counting kit を用いて調べた。**Fig.2-11.A** より、各遺伝子に対する siRNA 一種類で処理した場合には DMEM 培地中、グルコース欠乏培地中で顕著な細胞生存に対する変化は見られなかった。また、**Fig.2-11.B.**より、EFNA1、DLX2、MAFF 遺伝子に対する siRNA のコンビネーションで同時に複数の遺伝子をノックダウンした場合でも、細胞生存に対する顕著な差異は認められなかった。

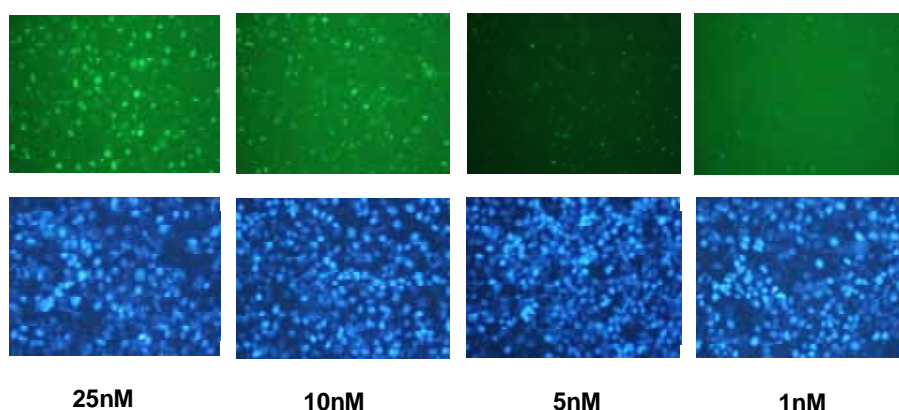


Fig.2-7. PANC-1 細胞に対する siRNA のトランスフェクション効率の検討(24 well-plate)。PANC-1 細胞を 24 well plate に 1×10^5 cells/well で DMEM を用いてまいた。その後、トランスフェクション試薬に HiPerFect Transfection Reagent 3 μ l/well を用いて Alexa Fluor 488 でラベルされた Nonsilencing Control siRNA を 1,5,10,25 nM で処理し、24 時間培養した。Hoechst33342 を用いて細胞核を染めた。そして、蛍光顕微鏡を用いて、Nonsilencing Control siRNA のシグナル (写真、上) と Hoechst33342 のシグナル (写真、下) を撮影した。

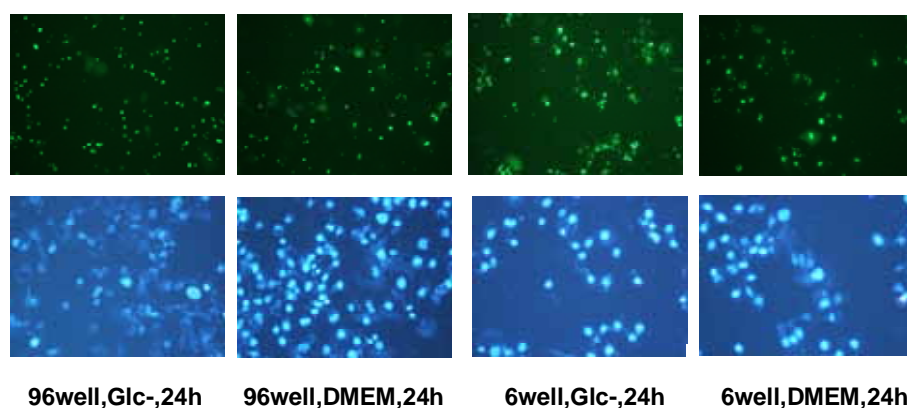


Fig.2-8. PANC-1 細胞に対する siRNA のトランスフェクション効率の検討(96 well、6 well-plate)。PANC-1 細胞を 96 または 6 well plate に 1×10^4 または 1.5×10^5 cells/well で、DMEM またはグルコース欠乏培地を用いてまいた。その後、トランスフェクション試薬に HiPerFect Transfection Reagent を用いて Alexa Fluor 488 でラベルされた Nonsilencing Control siRNA を 25 nM で処理し、24 時間培養した。Hoechst33342 を用いて細胞核を染めた。そして、蛍光顕微鏡を用いて、Nonsilencing Control siRNA のシグナル (写真、上) と Hoechst33342 のシグナル (写真、下) を撮影した。

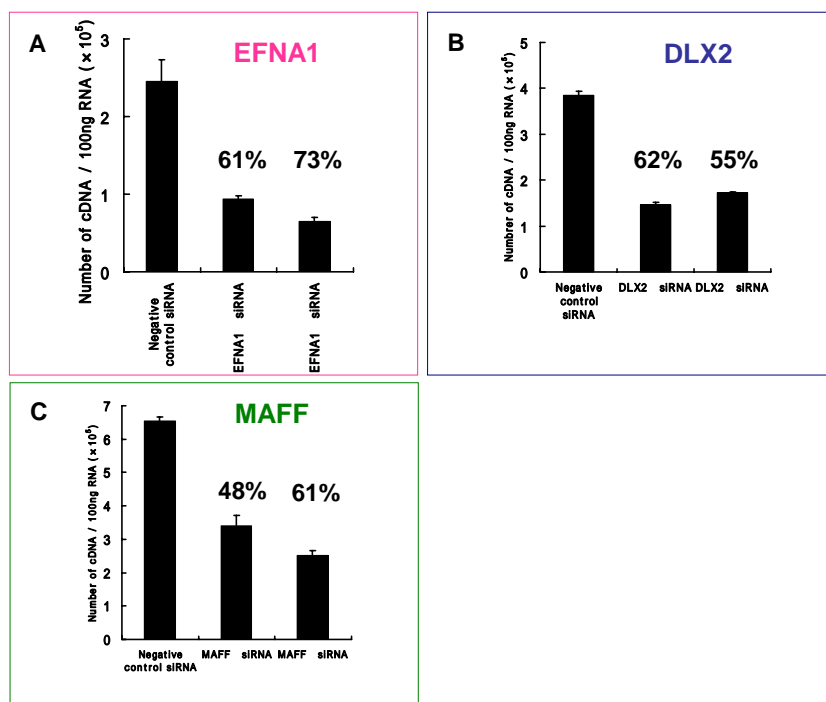


Fig.2-9. real-time RT-PCR による候補遺伝子のノックダウン効率の検討。EFNA1 に対する siRNA は Hs_EFNA1_2_HP siRNA (EFNA1②) と Hs_EFNA1_6_HP siRNA (EFNA1⑥) を用いた。DLX2 に対する siRNA は Hs_DLX2_2_HP siRNA (DLX2②) と Hs_DLX2_3_HP siRNA (DLX2③) を用いた。MAFF に対する siRNA は Hs_MAFF_1_HP siRNA (MAFF①) と Hs_MAFF_6_HP siRNA (MAFF⑥) を用いた。ネガティブコントロール siRNA として、AllStars Neg. Control siRNA を用いた。

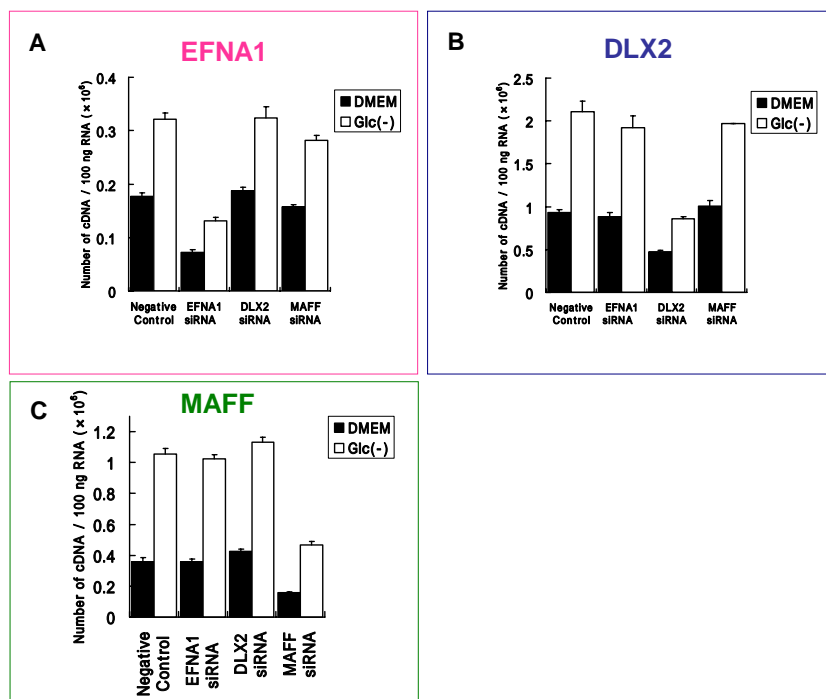


Fig.2-10. real-time RT-PCR による候補遺伝子のノックダウン効率の検討。EFNA1 に対する siRNA は Hs_EFNA1_6_HP siRNA (EFNA1⑥) を用いた。DLX2 に対する siRNA は Hs_DLX2_2_HP siRNA (DLX2②) を用いた。MAFF に対する siRNA は Hs_MAFF_6_HP siRNA (MAFF⑥) を用いた。ネガティブコントロール siRNA として、AllStars Neg. Control siRNA を用いた。DMEM 中で 24 時間、10 nM の siRNA でノックダウンした。その後、グルコース欠乏培地または DMEM に 90 分間曝した。

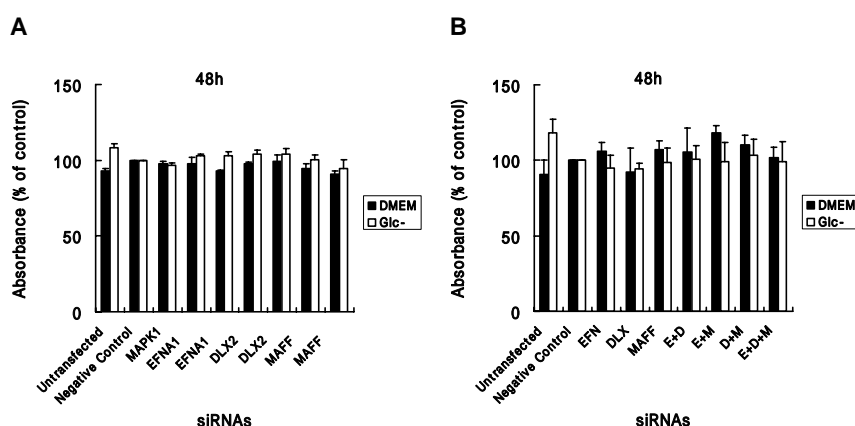


Fig.2-11. 候補遺伝子をノックダウンすることによる細胞生存への影響。PANC-1 細胞を 96 well plate に 1×10^4 cells/well で、DMEM またはグルコース欠乏培地を用いてまいた。その後、トランスフェクション試薬に HiPerFect Transfection Reagent を用いて各 siRNA を 25 nM で処理し、48 時間培養した。EFNA1 に対する siRNA は Hs_EFNA1_2_HP siRNA (EFNA1②) と Hs_EFNA1_6_HP siRNA (EFNA1⑥) を用いた。DLX2 に対する siRNA は Hs_DLX2_2_HP siRNA (DLX2②) と Hs_DLX2_3_HP siRNA (DLX2③) を用いた。MAFF に対する siRNA は Hs_MAFF_1_HP siRNA (MAFF①) と Hs_MAFF_6_HP siRNA (MAFF⑥) を用いた。ネガティブコントロール siRNA として、AllStars Neg. Control siRNA を用いた。ネガティブコントロール siRNA 処理した場合の細胞数を 100%とした。縦軸は、薬剤処理 48 時間後に WST-8 cell counting kit により測定した生存細胞数。全ての実験は triplicate で行い、結果は means \pm SD で示した。**A.**各遺伝子に対する siRNA 一種類で処理した場合の細胞生存への影響。**B.**各遺伝子に対する siRNA をコンビネーションで処理した場合の細胞生存への影響。

2-3-5 MAFF 遺伝子下流の HO-1 遺伝子の発現変化

Fig.2-12.に示すように、MAFF を含む小 MAF 群は p45 関連因子の Nrf2 などとヘテロ二量体を形成することにより、酸化ストレス応答や解毒第二相酵素の活性化を制御していることが知られている。そこで、MAFF 下流に位置し、酸化ストレス応答に関与するヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 遺伝子について調べることとした。HO-1 はヘム分解酵素であり、HO-1 遺伝子発現が活性化されると、ヘム分解を促進する。ヘムは HO-1 によりビリベルジン²⁶⁾と、2 価鉄イオンと、一酸化炭素に分解される。ビリベルジンから派生されるビリルビンは強力な抗酸化作用を持つことが知られている²⁷⁾。ゆえに、HO-1 遺伝子発現変化は、酸化ストレス応答において重要な働きをしている。

Fig.2-13.B.に示すように、DMEM 中、グルコース欠乏培地中において MAFF siRNA は顕著に MAFF 遺伝子をノックダウンした。このサンプルにおいて HO-1 遺伝子発現を調べてみると、**Fig.2-13.A.**に示すように、顕著に HO-1 遺伝子の発現が抑制されていた。ゆえに、**Fig.2-12.**に示すように、PANC-1 細胞においても MAFF の下流で HO-1 が発現制御されていることが示唆された。引き続き、6 種類のヒト膵臓がん由来 PANC-1、MIA PaCa2、PSN1、BxPC3、KP2、KP3 細胞に対して、グルコース欠乏に 2 時間曝した場合、グルコース欠乏培地中で kigamicin D 処理した場合の MAFF、HO-1、Nrf2 遺伝子発現変化を調べた。**Fig.2-14.A.**に示すように、全ての膵臓がん細胞株においてグルコース欠乏に曝すことで顕著に MAFF 遺伝子発現が増加し、これを kigamicin D 処理することで抑制した。同様に、**Fig.2-14.B.**に示すように、全ての膵臓がん細胞株においてグルコース欠乏に曝すことで顕著に HO-1 遺伝子発現が増加し、これを kigamicin D 処理することで抑制した。また、MAFF とヘテロ二量体を形成する Nrf2 遺伝子に関しては、**Fig.2-14.C.**に示すように、いずれの細胞においてもグルコース欠乏、kigamicin D 処理することによる顕著な遺伝子発現変化は認められなかった。

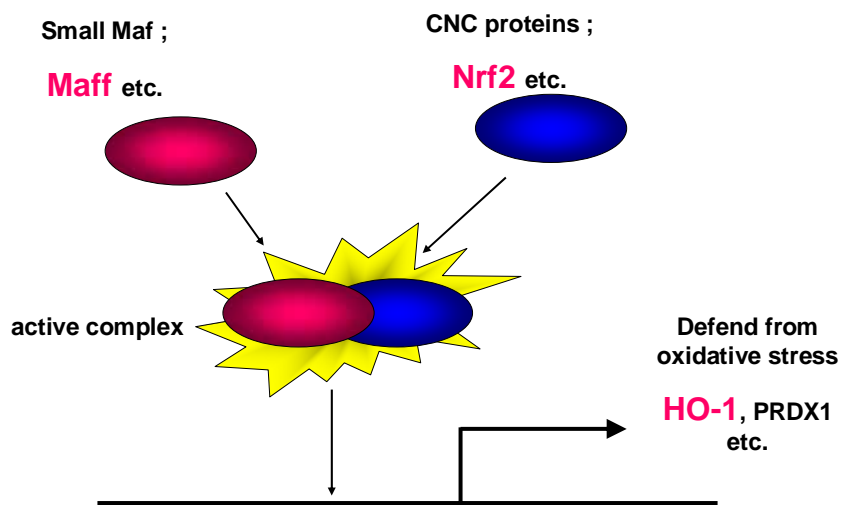


Fig.2-12. MAFF 下流に位置している HO-1 は、酸化ストレス防御に関与する遺伝子。小 MAF は p45 関連因子の Nrf1 や Nrf2 などとヘテロ二量体を形成することにより、酸化ストレス応答や解毒第二酵素の活性化を制御する。

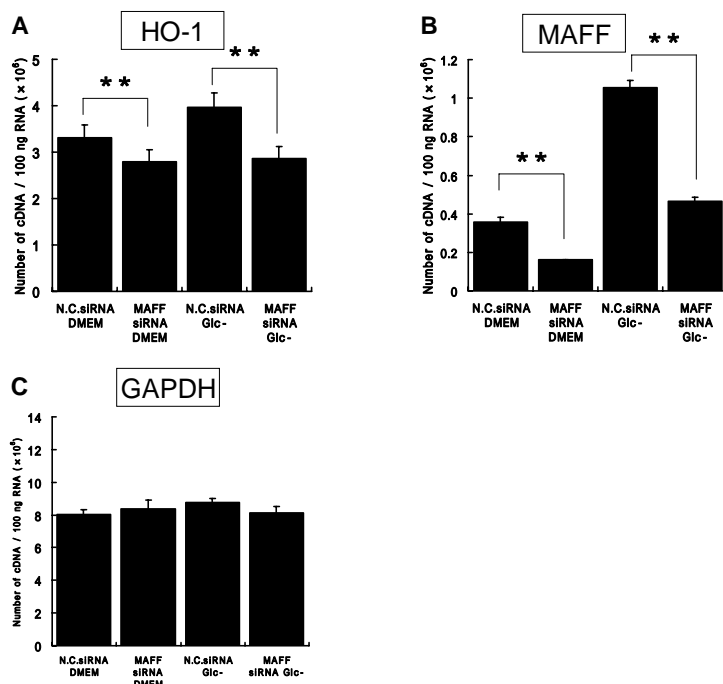


Fig.2-13. MAFF をノックダウンすることによる HO-1 遺伝子発現への影響。候補遺伝子をノックダウンすることによる細胞生存への影響。PANC-1 細胞を 6 well plate に 1.5×10^5 cells/well で、DMEM を用いてまいた。その後、トランスフェクション試薬に HiPerFect Transfection Reagent を用いて各 siRNA を 10 nM で処理し、24 時間培養した。MAFF に対する siRNA は Hs_MAFF_6_HP siRNA を用いた。ネガティブコントロール siRNA として、AllStars Neg. Control siRNA を用いた。siRNA 24 時間処理後に、DMEM またはグルコース欠乏培地 (Glc-) で 90 分処理し、RNA を回収した。real-time RT-PCR により、HO-1 (A.)、MAFF (B.)、GAPDH (C.) の遺伝子発現量を測定した。全ての実験は triplicate で行い、結果は means \pm SD で示した。**, 有意差 $P < 0.01$ 。

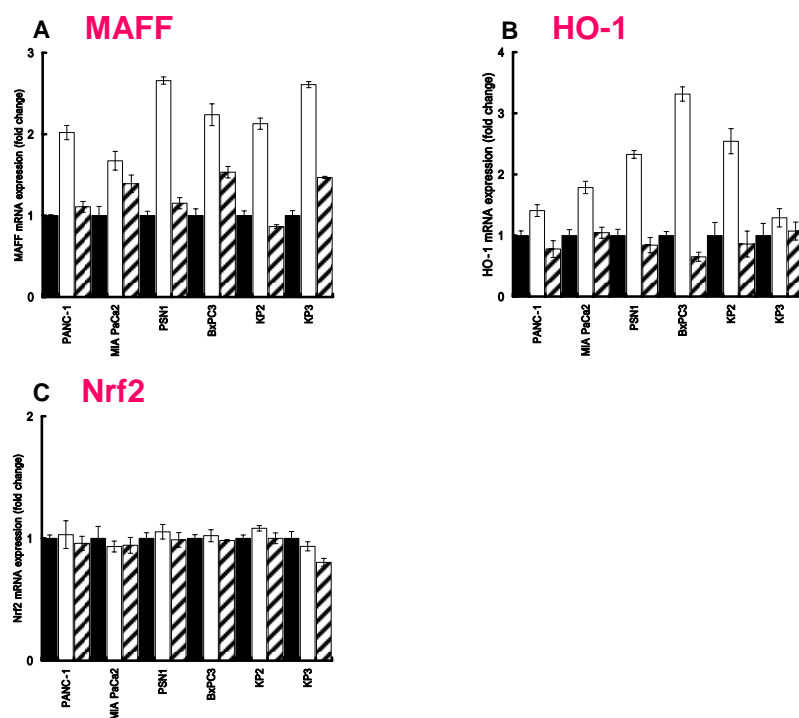


Fig.2-14. 様々な膵臓がん細胞株に対する、グルコース欠乏および Kigamicin D 処理することによる、MAFF、HO-1、Nrf2 遺伝子の発現変化。6 種類のヒト膵臓がん由来 PANC-1、MIA PaCa2、PSN1、BxPC3、KP2、KP3 細胞を 6 well plate に 1.5×10^5 cells/well で、DMEM を用いてまき、24 時間培養した。その後、DMEM (■)、グルコース欠乏培地(□)、またはグルコース欠乏培地中で 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の Kigamicin D(▨)で 2 時間処理し、RNA を回収した。real-time RT-PCR により、MAFF (A.)、HO-1 (B.)、Nrf2 (C.) の遺伝子発現量を測定した。全ての実験は triplicate で行い、結果は means \pm SD で示した。各々の細胞において、DMEM 処理した場合を値 1 と設定した。

2-4 考察

I : EFNA1、DLX2、MAFF いずれの遺伝子も、ヒト膵臓がん **PANC-1** 細胞をグルコース欠乏に曝したことにより発現が誘導され、各栄養飢餓耐性解除薬により顕著に抑制されることが明らかとなった

『栄養欠乏下、膵臓がん細胞株に対していくつかの栄養飢餓耐性解除薬を処理した際に共通して発現変化が生じる遺伝子は、栄養飢餓耐性の調節機構における重要な遺伝子であろう』という仮説のもと、トランスクリプトーム解析を行った。トランスクリプトーム解析の結果、グルコース欠乏状態に曝することで遺伝子発現が増加し、各栄養飢餓耐性解除薬によりその誘導が抑制される様な **EFNA1、DLX2、MAFF** という 3 つの遺伝子を得ることが出来た。各々の遺伝子に関する知見を以下にまとめた。

まず、得られた一つ目の **EFNA1** 遺伝子は **Eph** ファミリーに属する。**Eph** ファミリーは、少なくとも 14 のレセプターと 8 つのリガンドを含むレセプターチロシンキナーゼファミリーである。**Eph** リガンドのレセプターに対する結合は、細胞間接触により制御されている。なぜならば、エフィリンとして知られている **Eph** リガンドは細胞表面に固定されているからである。エフィリンのふたつのサブクラス (**A、B**) は、それぞれ細胞膜にどのように結合されているかに基づいて定義されている²⁸⁻³⁰⁾。エフィリン **A** リガンドは、グリコシルフォスファチジルイノシトール (**GPI**) で細胞膜に結合されており、エフィリン **B** リガンドは膜貫通型である。**EFNA1** の代表的な知見としては、内皮細胞において **TNF- α** により誘導されることが知られており、**TNF- α** が誘導する血管新生に関与している³¹⁾。

得られた二つ目の遺伝子であるディスタルレスホメオボックス 2 (**DLX2**) 遺伝子は、推定上の転写因子である。**Dlx2、3、4** が高発現しているがん細胞株では、**fenretinide (4HPR)**が誘導するアポトーシスへの感受性が高まったという知見がある³²⁾。また、**Dlx** 遺伝子は急性リンパ性白血病 (**ALL-1**) の下流標的であるとの報告もある³³⁾。

得られた三つ目の遺伝子 **MafF** は、小 **Maf** 群因子のひとつである。小 **Maf** 群因子は、トリ筋腱繊維肉腫ウイルス (**AS42**) の原因遺伝子である **v-Maf** の細胞性関連因子として単離された。脊椎動物以上において、**MafG、MafK、MafF** の 3 種類の小 **Maf** 群因子がよく保存されている。魚類では、**MafF** の代わりに **MafT** が存在する。ショウジョウバエでは、**MafS** として報告されているホモログが存在する。小 **Maf** 群因子の分子構造は、**Maf** 群因子全体でよく保存された塩基性ロイシンジッパー (**B-ZIP**) 構造と、その **N** 末端側に存在する”Extended

Homology Region (EHR)”と呼ばれる 25 アミノ酸からなる領域を有する。これ以外には特徴的な機能ドメインを持たず、転写活性化ドメインもない。小 Maf 群因子は、それ自身でホモ二量体を形成し転写を抑制する³⁴⁻³⁶⁾。他に、B-ZIP 構造を有する CNC 群因子 (NF-E2p45³⁷⁾、Nrf1、Nrf2^{38, 39)}、Nrf3)、Bach 群因子 (Bach1、Bach2) のヘテロ二量体形成相手分子として機能する。MafG、MafK、MafF いずれも、様々な細胞系列に広く発現している。小 Maf は過酸化水素⁴⁰⁾、重金属⁴¹⁾、求電子剤⁴²⁾に対する細胞内応答に働く。小 Maf は p45 関連因子の Nrf1 や Nrf2 などとヘテロ二量体を形成することにより、酸化ストレス応答^{34, 36, 39)}や解毒第二相酵素⁴³⁾の活性化を制御する。また、ATDC5 マウス軟骨形成前駆細胞を 1%低酸素状態に曝すと MafF 遺伝子の発現が増加することが報告されている⁴⁴⁾。

EFNA1、DLX2、MAFF いずれの遺伝子も、ヒト膵臓がん PANC-1 細胞をグルコース欠乏に曝したことにより発現が誘導されるという知見は、今回の実験で初めて明らかとなった。EFNA1、DLX2、MAFF いずれの遺伝子もグルコース欠乏に曝してから 2 時間後まで経時的に発現誘導されていた。このことは、グルコース欠乏状態に対して膵臓がん細胞株が適応反応を示した結果ではないかと考えた。膵臓がん細胞株はグルコース欠乏培地中であっても長時間生存すること（栄養飢餓耐性）と、これらの遺伝子の発現が増加することに関連があるのではないかと考えた。

Ⅱ：グルコース欠乏により誘導される EFNA1、DLX2、MAFF 遺伝子発現は、PI3K/Akt 経路と間接的に繋がっていることが示唆された

当研究室の過去の知見として、グルコース欠乏下において誘導される Akt のリン酸化を、栄養飢餓耐性解除薬を処理することで顕著に抑制することが知られている²³⁻²⁵⁾。PI3K/Akt 経路と栄養飢餓耐性との関与が示唆されている。グルコース欠乏培地中で LY294002 処理することにより、EFNA1、DLX2、MAFF いずれの遺伝子の発現誘導も遅延されていた。このことから、EFNA1、DLX2、MAFF 遺伝子発現は、PI3K/Akt 経路と間接的に繋がっていることが示唆された。

Ⅲ：EFNA1、DLX2、MAFF 遺伝子をノックダウンした後、グルコース欠乏に曝したが細胞生存に大きな変化は見られなかった理由について

グルコース欠乏培地中で各々の栄養飢餓耐性解除薬を作用させると、EFNA1、DLX2、MAFF 遺伝子発現は顕著に抑制された。したがって、EFNA1、DLX2、MAFF 遺伝子をノックダウンした細胞をグルコース欠乏状態に曝すと、膵臓がん細胞は栄養飢餓に対して耐性を示すことが出来ず、細胞死を誘導するのではないかと仮説を立てた。EFNA1、DLX2、MAFF を約 60～70%の効率で一過的

にノックダウンすることによる、細胞生存への影響を調べることにした。**EFNA1**、**DLX2**、**MAFF** 遺伝子を単独、あるいはコンビネーションで同時にノックダウンした後にグルコース欠乏に曝したが、細胞生存に大きな変化は見られなかった。

ここで考えられる一つ目の可能性として、**EFNA1**、**DLX2**、**MAFF** 遺伝子は膵臓がん細胞における栄養飢餓耐性のメカニズムに直接的に関与している遺伝子ではないということである。つまり、グルコース欠乏状態に対する耐性を解除して、栄養飢餓耐性解除薬が膵臓がん細胞を死へと導く直接的な遺伝子変化はもっと早い時間帯に生じており、**EFNA1**、**DLX2**、**MAFF** 遺伝子の発現変化は、その変化から生じる『結果（間接的変化）』であるという解釈である。この考察が正しい場合、薬剤処理 1 時間よりも早い段階で発現変化を示す遺伝子を探索していかなければならない。

また、二つ目の解釈としては、実験系の不適當さである。**EFNA1**、**DLX2**、**MAFF** 遺伝子をノックダウンした後にグルコース欠乏に曝すと、**DMEM** 中での通常発現量とまではいかないが、いずれの遺伝子も発現誘導が確認された。したがって、**EFNA1**、**DLX2**、**MAFF** 遺伝子の発現量自体ではなく、これらの遺伝子の『発現量が増加する』という反応が重要であるとすれば、今回の実験系は不適當であると考えられる。**RNAi** ベクターにより、持続的に遺伝子発現を抑制する必要があるのかもしれない。また、ノックダウン系が不適當であるとするならば、遺伝子の過剰発現系による裏の実験を検討すべきである。グルコース欠乏培地中で細胞死が誘導されるような細胞（ヒト肝臓がん由来 **HepG2** 細胞⁴⁵⁾など）に、**EFNA1**、**DLX2**、**MAFF** 遺伝子を過剰発現させることで、グルコース欠乏培地中での生存が延びるかどうかの検討が有用ではないかと考えている。

三つ目の可能性として、グルコース欠乏に対する適応生存反応は、遺伝子発現レベルの変化を伴わない反応であるという事である。今回用いた **PANC-1** 細胞は、元々、グルコース欠乏に対して耐性の強い細胞であり、生存反応にとって重要な遺伝子は既に発現しており、強い発現変化を示す遺伝子を拾いあげた時点で、真の意味合いで大切な遺伝子を逃してしまった可能性もある。今後は、グルコース欠乏耐性の無い細胞との比較についても検討する必要がある。

第3章 *Kigamicin D* の栄養飢餓選択的な細胞死誘導に対する酸化ストレスメカニズムの関与

3-1 研究目的

まず我々の過去の知見より、栄養飢餓状態において種々の栄養飢餓耐性解除薬を作用させると、グルコース欠乏にした場合に増加する Akt のリン酸化が抑制されることが知られている²³⁻²⁵⁾。また、*kigamicin D* は ATP が枯渇することにより導かれるネクロシスにより細胞死を誘導することが明らかとなってきた²³⁾。しかし、*kigamicin D* の作用機序にはまだまだ不明な点が多く残されている。

我々の研究材料である「がん細胞」において、細胞死と酸化ストレスとの間に様々な報告がなされている。乳がん細胞⁴⁶⁾、グリオーマ細胞株⁴⁷⁾では栄養飢餓状態に曝すだけで、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。私が用いている栄養飢餓状態に耐性を持つ膵臓がん細胞株においては、グルコース欠乏にするだけでは生存し続けるので、既に酸化ストレスを予防する機構を備えているか、生じた酸化ストレスに対して充分に対応する能力を備えていると考えられる。さらに、グルコース欠乏下で *kigamicin D* 処理することにより、このメカニズムを崩して細胞死を誘導するのだと予測した。この仮説を証明するため、栄養飢餓状態で *kigamicin D* を作用させた際の酸化ストレスの動きを検討することとした。*Kigamicin D* の栄養飢餓状態で誘導される細胞死誘導メカニズムの一部として、「酸化ストレス」が関与しているということを明らかにすることが今回の研究目的である。

まず、上記の様な仮説に着想した経緯を示すために、「酸化ストレス」について概説する。『酸化ストレス』の定義として広く受け入れられているのは「**a disturbance in the pro-oxidant / anti-oxidant system in favour of the former**」すなわち「酸化力が抗酸化力を上回った状況」というものである⁴⁸⁾。確かに狭義はその通りであるが、**Selye**(カナダ、1907-1982)が1930年代半ばに定義したように、ストレスというものを外からの刺激(ストレッサー)またはシグナルと考えると、抗酸化力を上回るものでなくても「ストレス」といえる。実際に、障害を及ぼさない程度の低レベルのストレスに対しても、生体は生理的に重要な様々な応答をする。例えば、放射線は代表的な酸化ストレスであり、それが様々な酸化障害を引き起こすことは良く知られている。逆に、低線量の放射線に対しては、生体は防御力を亢進させる応答を示し、生体にとってはむしろ「好ましいストレス (eustress)」となる。このような効果を「ホルミシス効果」といい⁴⁹⁾、培養細胞実験、動物実験でも確認されている。また、過酸化水素につ

いても低濃度ではホルミシス効果を生じ、また、その濃度の増大に伴い「悪いストレス(distress)」となり細胞死を引き起こすことが知られている。すなわち、酸化ストレス全てが生体にとって悪いものではなく、好ましいストレスもある(**Fig.3-1.**)。さらに、酸化ストレスを引き起こす活性酸素種は、生体分子、組織と直接反応して酸化するばかりでなく、細胞内情報伝達などのシグナルメッセンジャーとしても作用することが明らかとなってきた⁵⁰⁾。

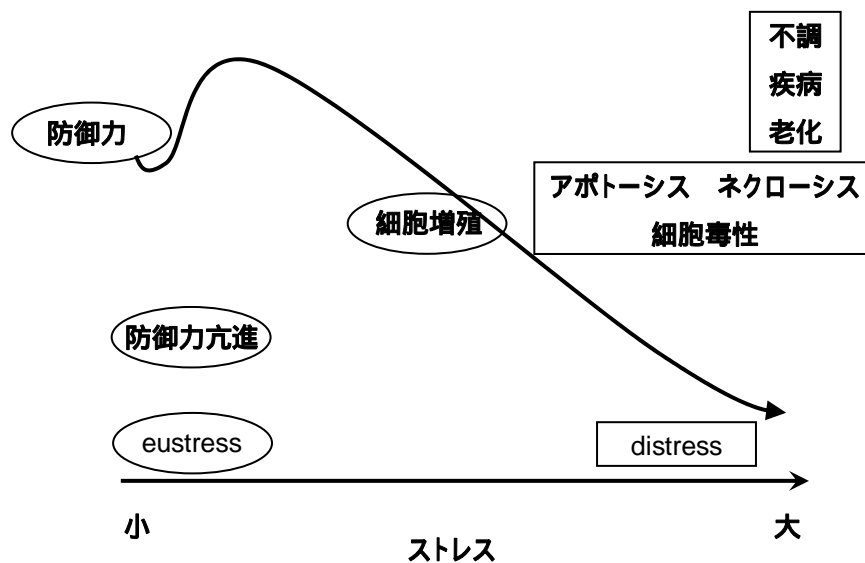


Fig.3-1. 酸化ストレスのレベルと生体反応⁵¹⁾

3-2 実験手法

3-2-1 研究試薬

Kigamicin D²³⁾は財団法人微生物化学研究会の國元節子博士との共同研究により精製したものであり、Arctigenin²⁴⁾は、富山大学医学部和漢薬研究所の門田重利教授のグループと共に精製したものである。Pyrvinium Pamoate²⁵⁾、Catalase、N-Acetyl-L-Cysteine は、Sigma より購入した。HPF⁵²⁾、APF⁵²⁾、DAR-4M AM^{53, 54)}、DAF-2 DA^{55, 56)}、DAF-FM DA⁵⁷⁾は第一化学薬品より購入した。BES-H₂O₂-Ac は Wako より購入した。DCFH-DA は CAYMAN より購入した。L-NAME、L-NMMA、L-NIL は Dojindo より購入した。他の化学薬品は研究用製品として手に入れることが可能である。HPF、APF、DAR-4M AM、DAF-2 DA、DAF-FM DA、BES-H₂O₂-Ac、DCFH-DA は DMSO 溶媒に 5mM となるように溶解し、stock solution として冷凍保存した。

3-2-2 細胞培養

細胞は全て、American Type Culture Collection(ATCC)より購入した。ヒト膵臓がん由来 PANC-1 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO)に 10% fetal calf serum(FCS, Sigma)を加えて培養した。ヒト膵臓がん由来 PSN1 と KP3 細胞は RPMI1640 培地 (ニッスイ) に 10% FCS を加えて培養した。細胞をグルコース欠乏状態にする際、以前に報告されている手法を用いた²⁰⁾。グルコースを加える場合には最終濃度が 1 g/l となるようにした。FCS はアミノ酸やグルコースを除去するために PBS で透析してから用いた。細胞生存は propidium iodide と Hoechst33342 による二重染色法⁴⁵⁾を用いて調べた。また、細胞数は WST-8 cell counting kit (Dojindo)により測定した。

3-2-3 Western blot

Akt(#9272)、リン酸化 Akt(#9271)抗体は、それぞれ Cell Signaling より購入した。全細胞抽出液を得るために、細胞は SDS lysis buffer (10% SDS, 100mM Tris/HCl, 10mM Na₃VO₄)を用いて回収し、100℃で 3 分間変性させ、10 秒間ソニケーションした。遠心器を用いて 15,000 rpm で 10 分間遠心沈降し、細胞上清を回収した。タンパク質濃度は BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology)により測定した。検量線は bovine serum albumin (BSA)を基準に求めた。各レーン 10 µg のタンパク質を SDS-PAGE により分離した。このタンパク質をセミドライ方式でゲルからニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンは 5%(w/v)スキムミルクを含む TBS で 1 時間、室温でブロッキングした。メンブレンを 0.1% Tween-20 を含む TBS(Tween-TBS)で洗い、5%(w/v)BSA を含む

TBS に一次抗体を希釈し、一晚 4℃で反応させた。翌日、メンブレンを Tween-TBS で洗い、5%(w/v) スキムミルクを含む TBS に二次抗体 (HRP-conjugated anti-rabbit IgG 抗体) を 2000 倍希釈し、1 時間、室温で反応させた。メンブレンを Tween-TBS で洗い、ECL system (Amersham Biosciences)を用いてフィルムに反応産物を検出した。

3-2-4 フローサイトメーター

細胞を本文に示すような様々な条件で 6 時間培養した。これらの培地を除去し、DMEM またはグルコース欠乏培地に最終濃度 5 μ M となるようにそれぞれの蛍光プローブを加え、37℃で 30 分間培養した。培地を除去し、PBS で洗い、トリプシン/EDTA を用いて細胞をペトリ皿より化学的に剥がした。浮遊状態の細胞を数回 PBS であらった後、500 μ l の PBS に細胞を懸濁した。以上の操作は、遮光条件で行った。励起波長 488 nm のアルゴンイオンレーザーを搭載した、FACSCalibur (Becton Dickinson)を用いて、直ちに細胞懸濁液中の蛍光プローブの蛍光強度を測定した。発光波長は 530 nm にセットした。1 サンプルあたり 20000 個の細胞を測定した。蛍光強度の Mean 値は、Cell Quwst プログラム(Becton Dickinson)により計算した。

3-2-5 Real-time RT-PCR

PANC-1 細胞を 100 mm dishes に 1×10^6 cells /dish でまいた。DMEM 中、37 °C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した。細胞をまず、PBS で洗い、DMEM またはグルコース欠乏培地中 0.1 μ g/ml の Kigamicin D 処理、または未処理した。PANC-1 細胞を各条件に曝してから 0,15,30 分、1,2,4,6,8 時間後に回収し、RNA 抽出は RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いた。Total RNA 0.1 μ g、LightCycler (Roche Diagnostics)、AMV Reverse Transcriptase XL (Life Sciences)、LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)を用いた real-time RT-PCR 法により、各遺伝子の発現を検出した。各遺伝子の特異的に検出するプライマー対は以下の通り。

c-fos は

Fw: 5'-GGGCAAGGTGGAACAGTTATC-3'

Rv: 5'-CCGCTTGGAGTGTATCAGTCA-3'。

fosb は

Fw: 5'- GTGCGCCGGAACGAAATA-3'

Rv: 5'-TCTTCCTCCAAGTATCTGTCTC -3'。

c-jun は

Fw: 5'-TGCCTCCAAGTGCCGAAAAA -3'

Rv: 5'-TGACTTTCTGTTTAAGCTGTGCC -3'。

egr-1 は

Fw: 5'-GGTCAGTGGCCTAGTGAGC -3'

Rv: 5'-TGCTGTCGTTGGATGGCAC -3'。

GAPDH は

Fw: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'

Rv: 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'

各遺伝子の発現量は、GAPDH 遺伝子を内部標準として補正をかけた。実験は triplicate で行い、結果は means±SD で示した。

3-2-6 統計処理

全ての結果は、means±SD 値で表した。統計比較は、分散解析を行った後にスチューデント T 検定を用いて行った。結果が、*P* 値が 0.05 未満の場合を有意さ有りと考えた。

3-3 実験結果

3-3-1 *Kigamicin D* はグルコース欠乏下、膵臓がん細胞株に対して特異的な細胞毒性を示した

典型的な乏血管性腫瘍であるヒト膵臓がん由来の PANC-1、PSN1、KP3 細胞はグルコース欠乏状態に対して耐性を示す。**Fig.3-2,A** は、PANC-1、PSN1、KP3 細胞をグルコース欠乏培地で培養し、24、48、72 時間後に細胞生存を測定した結果である。細胞生存は、**Propidium iodide** と **Hoechst 33342** による二重染色法を用いて接着細胞の生存率（**Propidium iodide** 陽性細胞=死細胞。**Hoechst 33342** 陽性細胞=生細胞+死細胞とした。）を求め、接着細胞全体をコールターカウンターで測定した細胞数に掛け合わせて求めた。グルコース欠乏にして 24 時間後では、細胞の増殖は止まるものの、顕著な細胞毒性は見られなかった。グルコース欠乏状態にして 72 時間後であったとしても、約半数の細胞が生存していた。ヒト膵臓がん由来の PANC-1、PSN1、KP3 細胞はグルコース欠乏に対して強い耐性を示している。*Kigamicin D* は、**Fig.3-2,B** に示す化学構造式をしており M.W.=953 の化合物である。水には難溶解性であり、CHCl₃、EtOAc、MeOH、DMSO などの有機溶媒に溶解する。0.05 µg/ml の *kigamicin D* を処理して 24 時間後、**Fig.3-2,C** に示す様に PANC-1、PSN1、KP3 細胞の全てにおいて DMEM 中では細胞毒性が無く、グルコース欠乏培地でのみ選択的な細胞毒性が観察された。今回の研究目的である *kigamicin D* を栄養飢餓培地で処理した際の酸化ストレスの関与を調べることにした。蛍光プローブとして 2',7'-ジクロロフルオレセイン-ジアセテート (DCFH-DA) を用いた。DCFH を用いて細胞中の酸化ストレスを測定する試みは盛んに行われている⁵⁸⁾。その酢酸ジエステル体である DCFH-DA を細胞培養液中に添加すると、細胞膜を透過し細胞内に存在するエステラーゼによって DCFH へと加水分解される。DCFH-DA 自体が酸化ストレスによって蛍光を発することはほとんどないと考えられているが、加水分解された DCFH はフリーラジカルと速やかに反応して蛍光物質である 2',7'-ジクロロフルオレセイン (DCF) となる (励起波長 502 nm、蛍光波長 520 nm)。DCFH とラジカルとの反応は水素引き抜き反応に起因すると考えられる。ゆえに、ヒドロキシラジカル、アルコキシラジカル、ペルオキシラジカル、ペルオキシナイトライト⁵⁹⁾などと容易に反応する。しかし、DCFH の欠点も指摘されている。DCFH および DCF とともに、光⁶⁰⁾や西洋ワサビペルオキシダーゼ^{61, 62)}と反応し得る。**Fig.3-2,D** に示す様に、PANC-1 細胞において薬剤処理 6 時間後に、DCFH-DA を処理し酸化ストレスを測定した。結果、DMEM 中で 0.05 µg/ml の *kigamicin D* を処理した場合、またはグルコース欠乏培地に曝した場合にわずかな蛍光強度、つまり酸化ストレスの増大が観察さ

れた。グルコース欠乏培地中で**0.05 µg/ml**の**kigamicin D**を処理した場合には、顕著な酸化ストレスの増大が観察された。以上のことから、『細胞内の酸化ストレスの増大が細胞死に関与しているのではないか』という仮説によく一致した結果が得られた。

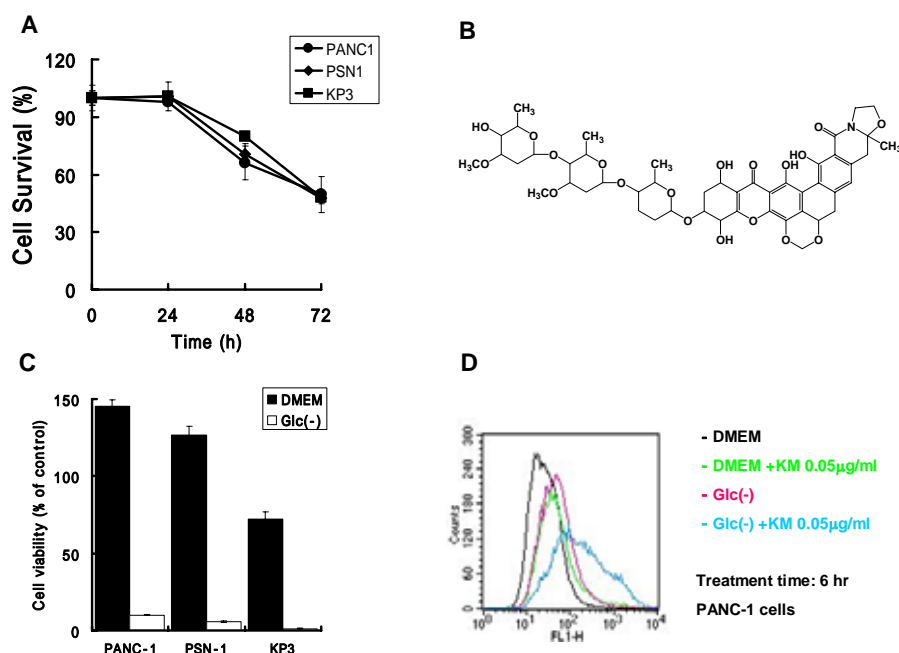


Fig.3-2. グルコース欠乏下での膵臓がん細胞に対する **kigamicin D** の細胞毒性。**A.** ヒト膵臓がん細胞株 PANC-1, PSN-1, KP3 をグルコース欠乏培地中で 3 日間培養した。グルコース欠乏にする直前の細胞数を 100%とした。薬剤処理 24, 48, 72 時間後の細胞数をコールターカウンター、Propidium iodide と Hoechst 33342 による二重染色法を用いて測定した。縦軸は細胞生存 (% of control) を表している。全ての実験は triplicate で行い、結果は means±SD で示した。**B.** Kigamicin D (KM)の化学構造式。**C.** ヒト膵臓がん細胞株 PANC-1 を DMEM (■)またはグルコース欠乏培地(□)中で、0.05 µg/ml の kigamicin D を加え培養した。Kigamicin D 処理していない場合の細胞数を 100%とした。縦軸は、薬剤処理 24 時間後に WST-8 cell counting kit により測定した生存細胞数。全ての実験は triplicate で行い、結果は means±SD で示した。**D.** PANC-1 細胞を DMEM またはグルコース欠乏培地中で、0.05 µg/ml の kigamicin D で処理または未処理した。薬剤処理 6 時間後、細胞膜透過性の蛍光プローブ DCFH-DA で染色し、フローサイトメーターを用いて細胞内の酸化ストレスを検出した。

3-3-2 様々な蛍光プローブを用いた、グルコース欠乏下で *Kigamicin D* 処理することにより発生される活性酸素種の同定

Fig.3-2,D において、グルコース欠乏で *kigamicin D* 処理した際に顕著に発生した酸化ストレスが、いったいどの活性酸素種に由来するものなのかを同定することとした。なぜなら、DCFH-DA は様々な活性酸素種と反応してしまうことが知られているためである。**Fig.3-3** において、ある種の活性酸素種だけを特異的に検出する様々な蛍光プローブを用いて **Fig.3-2,D** と同じ条件で実験を行った。**Fig.3-3** で用いたそれぞれの蛍光プローブが検出する活性酸素種は以下に示す通り。HPF(A)は、ONOO-と $\cdot\text{OH}$ を特異的に検出する。APF(B)は、ONOO-と $\cdot\text{OH}$ と-OCIを特異的に検出する。BES-H₂O₂-Ac(C)は、過酸化水素を特異的に検出する。**Fig.3-3.**に示した様に、HPF(A)と APF(B)は、*kigamicin D* を処理した条件においてわずかな蛍光シグナルの増加が観察されたが、顕著な動きではなかった。過酸化水素を特異的に検出する BES-H₂O₂-Ac(C)では、グルコース欠乏状態で *kigamicin D* 処理することにより、顕著な蛍光シグナルの増大が観察された。グルコース欠乏下、*kigamicin D* 処理することにより生じる活性酸素種に過酸化水素が含まれていることが示唆された。

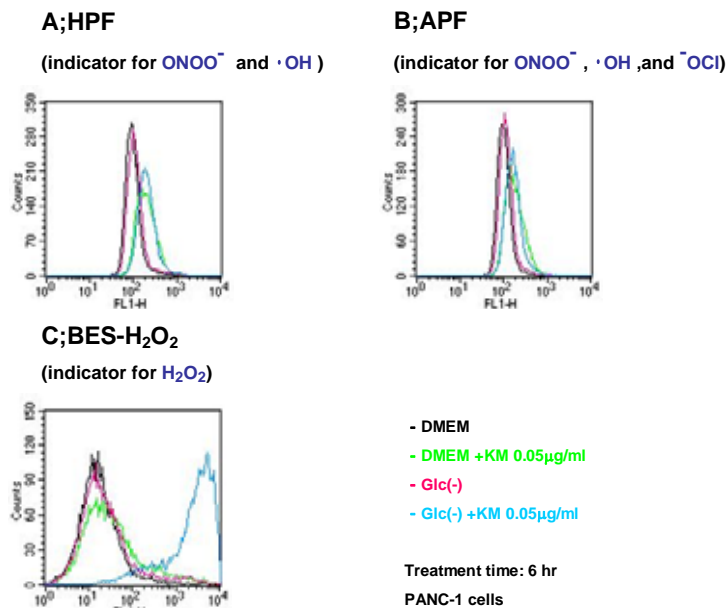


Fig.3-3. 特異的な活性酸素種を検出する様々な蛍光プローブを用いた、グルコース欠乏状態下で **kigamicin D** 処理することにより発生される活性酸素種の同定。PANC-1 細胞を DMEM またはグルコース欠乏培地下で、**0.05 μg/ml** の **kigamicin D** で処理または未処理した。薬剤処理 **6** 時間後、細胞膜透過性の蛍光プローブ **HPF(A)**, **APF(B)**, **BES-H₂O₂-Ac(C)**で染色し、フローサイトメーターを用いて細胞内の酸化ストレスを検出した。**HPF(A)**は、 ONOO^- と $\cdot\text{OH}$ を特異的に検出する。**APF(B)**は、 ONOO^- と $\cdot\text{OH}$ と ^-OCl を特異的に検出する。**BES-H₂O₂-Ac(C)**は、過酸化水素を特異的に検出する。

3-3-3 一酸化窒素特異的な蛍光プローブ；DAF 類が検出した蛍光シグナルについて

活性酸素種である一酸化窒素を検出することが出来る蛍光プローブは DAF・DAR 類が挙げられる。そこで、DAF-2 DA、DAF-FM DA、DAR-4M AM を用いて、**Fig.3-2,D** と同様の条件で実験を行った。**Fig.3-4.**に示す通り、DAF-2 DA(**A**)と DAF-FM DA(**B**)の両方の蛍光プローブによる結果は非常に類似していた。まず、DMEM 中で **kigamicin D** を加えた場合、グルコース欠乏に曝した場合には、わずかな蛍光シグナルの増大が観察された。グルコース欠乏培地中で **kigamicin D** を処理した際には、顕著な蛍光シグナルの増強を観察した。DAF 類を用いた結果からは、グルコース欠乏下で **kigamicin D** 処理することによって一酸化窒素が大量に細胞内に発生したことが示唆される。しかしながら、**Fig.3-4,C** に示す様に、一酸化窒素を検出する蛍光プローブ DAR-4M AM を用いた場合、いずれの条件においても蛍光シグナルの動きが観察されなかったことからデータに矛盾が生じた。この矛盾を解決すべく、一酸化窒素合成酵素 (NOS) の阻害剤を用い対照実験を行うこととした。L-NMMA は三種類の NOS アイソフォームすべてに対する阻害剤であり、L-アルギニンのグアニジノ基を修飾した化合物である。L-NMMA は基質に対する拮抗阻害剤として作用する。L-NAME も三種類の NOS アイソフォームすべてに対する阻害剤であり、L-アルギニンの類似体である。L-NAME も基質に対する拮抗阻害剤として作用する。L-NIL は iNOS に対する選択的阻害剤であり、L-アルギニンの類似体である。L-NIL も基質に対する拮抗阻害剤として作用する。**Fig.3-4,D** において、DAF-2DA が検出した、グルコース欠乏培地中で **kigamicin D** 処理した際の顕著な蛍光シグナルの増大が各 NOS 阻害剤を用いることで抑制されるかどうかを検討した。結果、L-NAME、L-NMMA、L-NIL のいずれの阻害剤を用いても、グルコース欠乏下で **kigamicin D** 処理したことによるシグナルの増大を抑制出来なかった。ゆえに、DAF 類が検出するシグナルは一酸化窒素に対して反応したものではないと示唆される。正体は分からないが、DAF 類が検出した恐らく何らかのラジカルは、細胞死を誘導した条件であるグルコース飢餓状態で **kigamicin D** 処理した際にのみ特異的に増強されたシグナルであるため、重要な指標にはなる。今後、その正体を明らかにする必要がある。

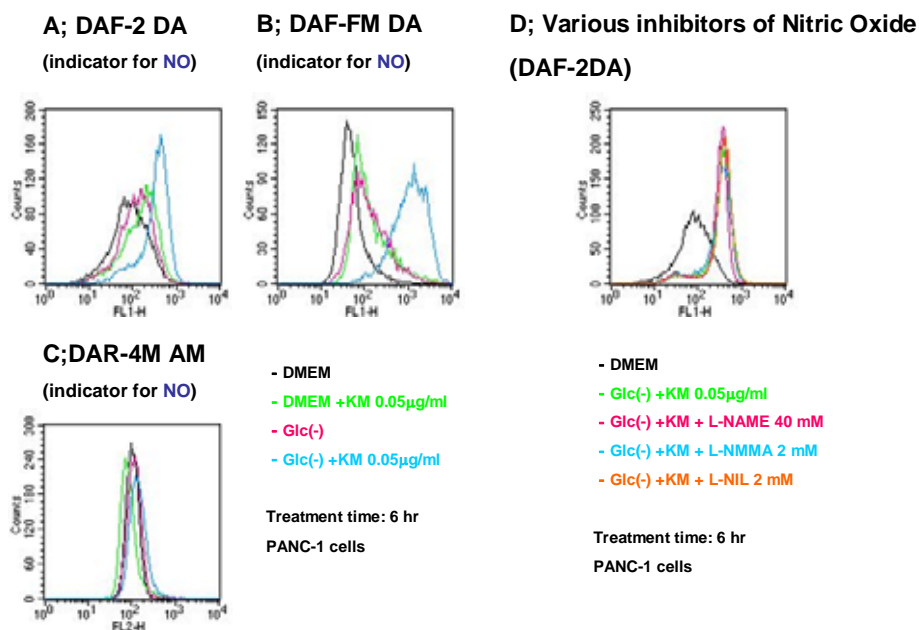


Fig.3-4. DAF-2DA が検出したシグナルが NO によるものではないことの証明。PANC-1 細胞を DMEM またはグルコース欠乏下で、0.05 μ g/ml の kigamicin D を加え培養した。薬剤処理 6 時間後、細胞膜透過性の蛍光プローブ DAF-2DA(A.), DAF-FM DA(B.) DAR-4M AM(C.)で染色し、フローサイトメーターを用いて細胞内の酸化ストレスを検出した。DAF・DAR 類はいずれも NO を特異的に検出することになっている。**D.** PANC-1 細胞を DMEM またはグルコース欠乏培地下で 0.05 μ g/ml の kigamicin D を加え培養した。また、グルコース欠乏培地中で 0.05 μ g/ml の kigamicin D を加えた場合に、40mM L-NAME、2mM L-NMMA、2mM L-NIL をそれぞれ加えた。薬剤処理 6 時間後、細胞膜透過性の蛍光プローブ DAF-2DA で染色し、フローサイトメーターを用いて細胞内の酸化ストレスを検出した。

3-3-4 抗酸化剤 *N*-Acetyl-L-Cysteine(NAC)と過酸化水素特異的な分解酵素 *catalase*(CAT)を用いた、活性酸素種の抑制実験

グルコース欠乏状態で *kigamicin D* を処理した際に、顕著に増強された BES-H₂O₂ と DAF-2DA のシグナルを抗酸化剤や酵素を用いることで抑制出来るかどうか実験を行った。まず、**Fig.3-5,A** に示す通り、抗酸化剤 *N*-Acetyl-L-Cysteine(NAC)によって濃度依存的に、グルコース欠乏下で *kigamicin D* 処理した際に誘導される細胞死を阻害することが出来た。*Kigamicin D* 未処理でグルコース欠乏にした場合の細胞生存を 100%とした場合に、グルコース欠乏下で 0.05 µg/ml の *kigamicin D* を処理すると 10%以下となっていた生存率が、NAC 40mM を共処理することで約 80%まで回復された。**Fig.3-5,B** に示す通り、NAC は DAF-2DA のシグナルには影響を与えなかった。しかしながら、**Fig.3-5,C** に示す通り NAC は、グルコース欠乏下で *kigamicin D* 処理した際に増大される BES-H₂O₂ のシグナルを濃度依存的に抑制した。しかし、NAC 40mM を処理した場合においても、DMEM のコントロールシグナルほどまでには抑えなかった。次に、過酸化水素の特異的な分解酵素である *catalase*(CAT)を用いて実験を行った。**Fig.3-5,D** に示す通り、グルコース欠乏下で *kigamicin D* 処理した際に誘導される細胞死を、1 mg/ml の CAT を加えた場合のみ顕著に阻害した。*Kigamicin D* 未処理でグルコース欠乏にした場合の細胞生存を 100%とした時に、グルコース欠乏下で 0.05 µg/ml の *kigamicin D* と CAT 1 mg/ml を処理することで細胞生存は約 60%まで回復された。また、面白いことに、**Fig.3-5,E** に示す通り、1 mg/ml の CAT は、グルコース欠乏下で *kigamicin D* 処理することにより増強される DAF-2DA のシグナルを抑制した。また、**Fig.3-5,F** に示す通り、グルコース欠乏下で *kigamicin D* 処理した際に増大される BES-H₂O₂ のシグナルを、CAT 1mg/ml を共処理した場合、わずかしこ抑えなかった。以上の結果より、グルコース欠乏状態で *kigamicin D* 処理することにより誘導された細胞死を、抗酸化剤 NAC と過酸化水素特異的な分解酵素である CAT を加えることで部分的に抑制することが出来た。したがって、グルコース欠乏状態で *kigamicin D* 処理することにより誘導された細胞死には酸化ストレスが関与していることが強く示唆される。

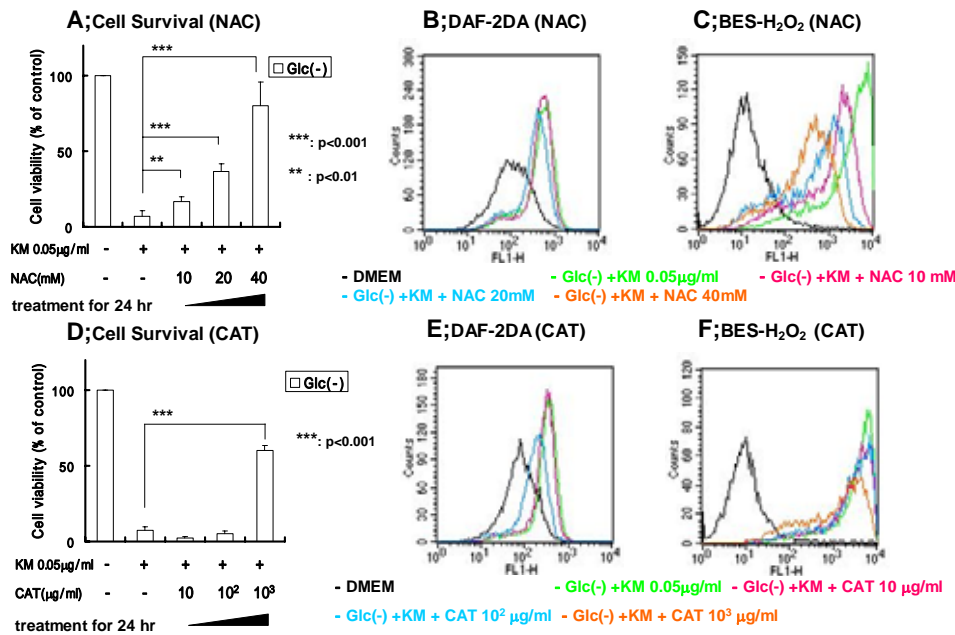


Fig.3-5. PANC-1 細胞に対するグルコース欠乏状態での細胞毒性を、抗酸化剤 N-Acetyl-L-Cysteine(NAC)と過酸化水素の特異的な分解酵素 catalase(CAT)は抑制した。ヒト膵臓がん細胞株 PANC-1 をグルコース欠乏培地(□)中で、0.05 μg/ml の kigamicin D、様々な濃度の NAC(A.)または CAT(D.)で処理し培養した。Kigamicin D 処理していない場合の細胞数を 100%とした。縦軸は、薬剤処理 24 時間後に WST-8 cell counting kit により測定した生存細胞数。全ての実験は n=6 で行い、結果は means±SD で示した。PANC-1 細胞を DMEM またはグルコース欠乏培地中で、0.05 μg/ml の kigamicin D、様々な濃度の NAC(B.と C.)または CAT(E.と F.)で処理し培養した。薬剤処理 6 時間後、細胞膜透過性の蛍光プローブ DAF-2DA(B.と E.), BES-H₂O₂-Ac(C.と F.)で染色し、フローサイトメーターを用いて細胞内の酸化ストレスを検出した。DAF-2DA は、NO を特異的に検出する。BES-H₂O₂-Ac は、過酸化水素を特異的に検出する。

3-3-5 その他の栄養飢餓耐性解除薬である *Arctigenin*(AR)、*Pyrrvinium Pamoate*(PP)を用いた酸化ストレスの測定

栄養飢餓耐性解除薬として *kigamicin D* 以外にも *arctigenin*(AR)や *pyrvinium pamoate*(PP)が得られている。これらの化合物に関しても、栄養飢餓状態選択的な細胞死が酸化ストレスメカニズムと関与しているかどうかを検討することとした。**Fig.3-6,A** に示す様に、5 $\mu\text{g/ml}$ の AR は PANC-1、PSN1、KP3 細胞の全てに対して DMEM 中では細胞毒性が無く、グルコース欠乏培地でのみ特異的な細胞毒性を示した。また AR は **Fig.3-6,B** に示すようにグルコース欠乏下で DAF-2DA のシグナルを顕著に増強した。また **Fig.3-6,C** に示すように、AR はグルコース欠乏下で BES-H₂O₂ のシグナルも顕著に増強した。一方、**Fig.3-6,D** に示す様に、0.1 $\mu\text{g/ml}$ の PP は PANC-1、PSN1、KP3 細胞の全てに対して DMEM 中では細胞毒性が無く、グルコース欠乏培地でのみ特異的な細胞毒性を示した。また PP は **Fig.3-6,E** に示すようにグルコース欠乏下で DAF-2DA のシグナルを顕著に増強した。PP の場合には、DMEM 中で処理した際にもわずかに DAF-2DA のシグナルの増大が観察された。また **Fig.3-6,F** に示すように、PP はグルコース欠乏下でのみ BES-H₂O₂ のシグナルも顕著に増強した。

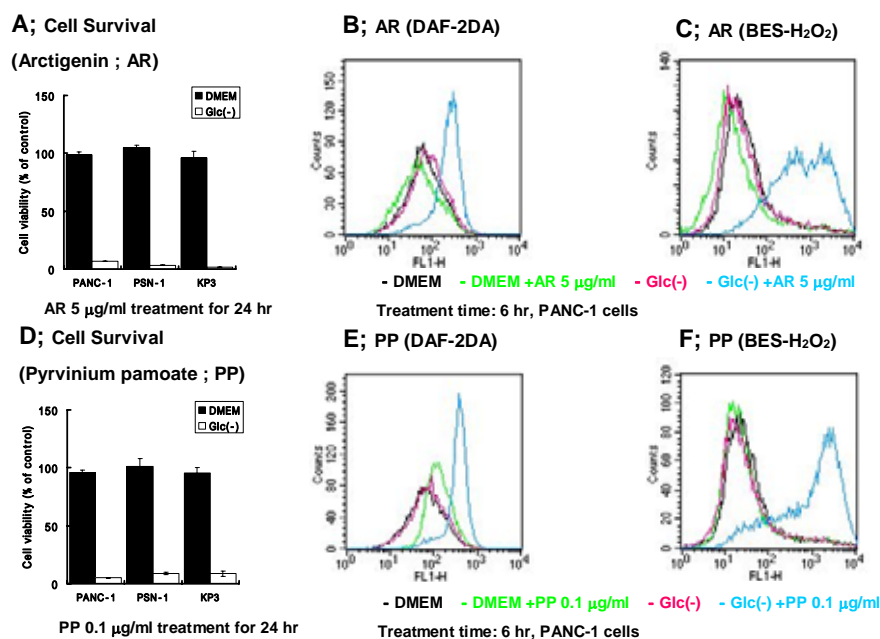


Fig.3-6. その他の栄養飢餓耐性解除薬である Arctigenin(AR)、Pyrvinium Pamoate(PP)を用いて酸化ストレスを測定した。ヒト膵臓がん細胞株 PANC-1,PSN-1,KP3 を DMEM (■)または、グルコース欠乏培地(□)中で、5 $\mu\text{g/ml}$ の arctigenin(A.)または 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の pyrvinium pamoate(D.)を加え培養した。薬剤処理していない場合の細胞数を 100%とした。縦軸は、薬剤処理 24 時間後に WST-8 cell counting kit により測定した生存細胞数。全ての実験は triplicate で行い、結果は means \pm SD で示した。PANC-1 細胞を DMEM またはグルコース欠乏培地中で、5 $\mu\text{g/ml}$ の arctigenin(B.と C.)または 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の pyrvinium pamoate(E.と F.)を加え培養した。薬剤処理 6 時間後、細胞膜透過性の蛍光プローブ DAF-2DA(B.と E.), BES-H₂O₂-Ac(C.と F.)で染色し、フローサイトメーターを用いて細胞内の酸化ストレスを検出した。DAF-2DA は、NO を特異的に検出する。BES-H₂O₂-Ac は、過酸化水素を特異的に検出する。

3-3-6 グルコース欠乏下で *Kigamicin D* 処理することによる、*Akt* のリン酸化の抑制および、この現象に対する *NAC* と *CAT* の影響

当研究室の過去の研究より、正常酸素、低酸素状態の両条件において、グルコース欠乏状態における *Akt* 経路の活性化が細胞の生存に重要であることを示してきた^{20, 21)}。Fig.3-7,A に示す通り、PANC-1, PSN1, KP3 細胞全てにおいて、*Akt* セリン 473 のリン酸化はグルコース欠乏にすることで亢進し、これを *kigamicin D* 処理することで顕著に抑制した。前述の様に、*NAC*、*CAT* で *kigamicin D* による細胞毒性が強く抑制された。そこで、これらの処理が *Akt* の活性化にどのような影響を与えるか調べた。Fig.3-7,B に示す通り、PANC-1 細胞において、グルコース欠乏下 *kigamicin D* 処理することで観察される *Akt* セリン 473 のリン酸化の抑制は、*catalase* 処理することで顕著に阻害された。しかし、グルコース欠乏下 *kigamicin D* 処理することで観察される *Akt* セリン 473 のリン酸化の抑制に対して、40 mM の *NAC* は影響を与えなかった。

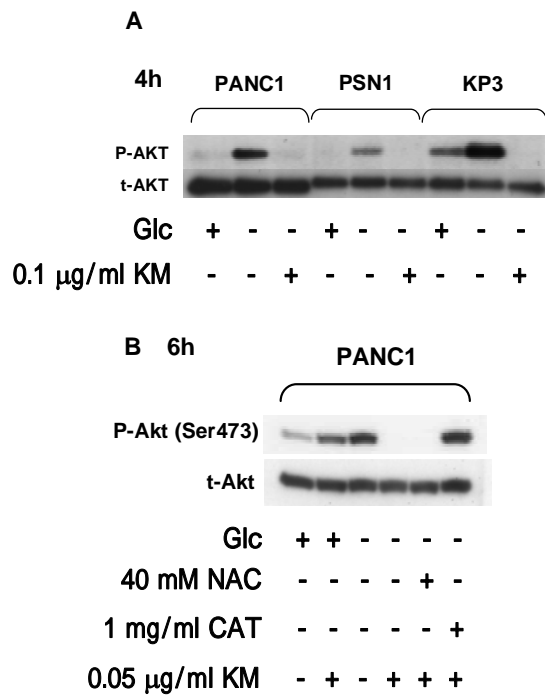


Fig.3-7. Akt と AMPK の活性化について Western blot により調べた。
A.PANC-1, PSN1, KP3 細胞を DMEM (Glc +)またはグルコース欠乏培地(Glc -)下で、0.1 µg/ml の kigamicin D で処理または未処理した。細胞は 4 時間薬剤処理した。Akt のリン酸化(P-Akt), total Akt (t-Akt)タンパク質は、特異的な抗体によって検出した。
B.PANC-1 細胞を DMEM (Glc +)またはグルコース欠乏培地(Glc -)下で、0.05 µg/ml の kigamicin D、40 mM NAC や 1 mg/ml CAT で処理または未処理した。細胞は 6 時間薬剤処理した。Akt のリン酸化(P-Akt), total Akt (t-Akt)タンパク質は、特異的な抗体によって検出した。

3-3-7 活性酸素による遺伝子発現変化の測定

活性酸素は細胞内の様々な遺伝子発現変化を起こし、その変化は細胞の活性酸素応答に関与すると考えられる。少なくとも、細胞内で発現が変化する遺伝子の一部は、酸化ストレス応答に関与していると考えられる。マウスの骨芽細胞 MC3T3 E1 において、過酸化水素が **c-Fos**、**c-Jun**、**Egr-1**、**JE** などのアーリーレスポンス遺伝子の発現を誘導することが報告されている⁶³⁾。また、ヒト子宮頸がん由来 **HeLa** 細胞において、酸化ストレスの誘導剤であるジエチルマレイン酸を処理すると **c-fos** の発現が亢進することが報告されている⁶⁴⁾。以上の知見より、グルコース欠乏培地中で **kigamicin D** 処理した際、アーリーレスポンス遺伝子の発現変化が見られるか検討することにした。**Fig.3-8.A.**に示すように、グルコース欠乏下で **kigamicin D** 処理した際に、**c-Fos** 遺伝子発現が顕著に亢進した。**c-Fos** 遺伝子は、グルコース欠乏培地中で **kigamicin D** 処理してから 1 時間後にコントロールと比較して約 6 倍に増大した。また、この顕著な **c-Fos** 遺伝子発現の増大は、薬剤処理 6 時間後まで維持された。**Fig.3-8.**において、その他のアーリーレスポンス遺伝子 **FosB (B.)**、**c-Jun(C.)**、**Egr-1(D.)**についても検討したが、**c-Fos** 遺伝子の様なグルコース欠乏下で **kigamicin D** 処理した際に見られた特異的かつ顕著な変化は見られなかった。

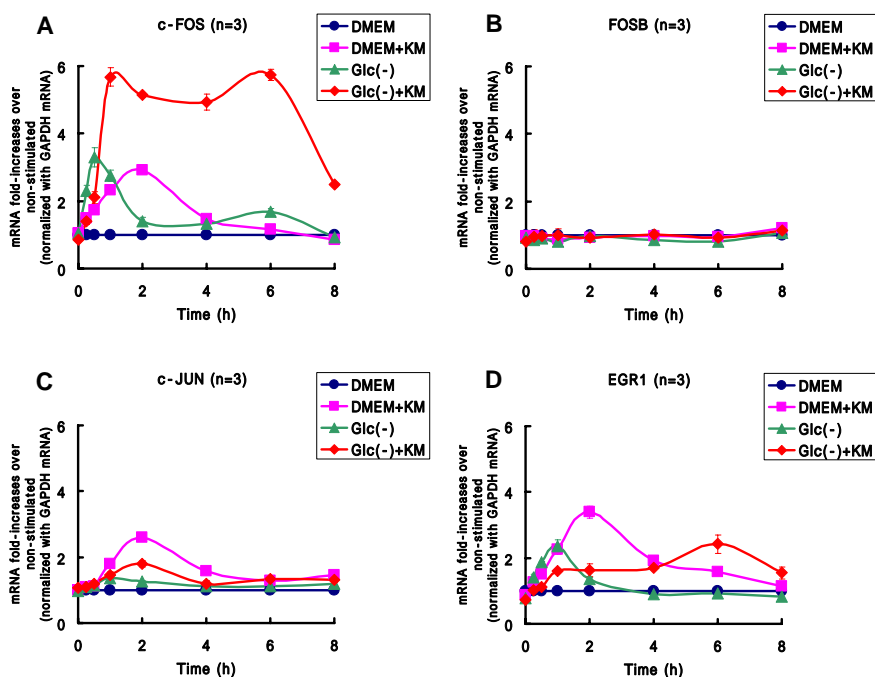


Fig.3-8. c-Fos、Fosb、c-Jun、Egr-1 について real-time RT-PCR により調べた。PANC-1 細胞を DMEM (Glc +)またはグルコース欠乏培地(Glc -)中で、0.1 $\mu\text{g/ml}$ の kigamicin D で処理または未処理した。細胞は 0、15、30 分、1、2、4、6、8 時間薬剤処理した。c-Fos (A.)、FosB (B.)、c-Jun (C.)、Egr-1 (D.) の遺伝子発現変化は、それぞれに特異的なプライマーセットによって検出した。DMEM 中でのシグナル値を 1 とした。縦軸は、各遺伝子発現量を示している。

3-4 考察

I : Kigamicin D の栄養飢餓選択的な細胞死の誘導は活性酸素種の産生に起因している

Kigamicin D の栄養飢餓選択的な細胞死誘導の詳細な作用機序は不明である。しかしながら、今回の研究により、**kigamicin D** の細胞死誘導メカニズムに活性酸素種産生が関与していることが明らかとなった。まず、グルコース欠乏培地中で **kigamicin D** を処理した場合のみ顕著な酸化ストレスの増加を検出した (DCFH-DA 試薬により)。グルコース欠乏に曝しただけ、または DMEM 中で **kigamicin D** 処理した際にも、わずかな酸化ストレスの増大は観察された。しかし、この程度の活性酸素種産生では細胞死は誘導されないで、むしろホルミシス効果を引き起こしているのではないかと考えられる。また、グルコース欠乏培地中で **kigamicin D** を処理した際に産生される活性酸素種は、主に過酸化水素であると同定した。また、抗酸化剤 NAC により濃度依存的に細胞内の過酸化水素量を抑制することで、グルコース欠乏培地中で **kigamicin D** を処理した際に誘導される細胞死を濃度依存的に抑制したと考えられる。また、グルコース欠乏培地中で **kigamicin D** を処理した際に誘導される Akt のリン酸化の抑制を、CAT 共処理することで顕著に抑制した。また、グルコース欠乏培地中で **kigamicin D** を処理した際に誘導される細胞死を CAT 処理することにより顕著に抑制したが、細胞内の過酸化水素量は減少していなかった。CAT は細胞膜非透過性である。したがって、CAT は細胞外の過酸化水素は分解するが、細胞内の過酸化水素量には影響を与えなかったのではないかと考えられる。CAT の処理濃度は 1 mg/ml と非常に高濃度ではじめて有効であった。0.1 および 0.01mg/ml の CAT 処理では、**kigamicin D** による細胞死に影響を与えていなかった。CAT を 1mg/ml という高濃度で処理した時だけ **kigamicin D** による細胞死を顕著に抑制したので、極少量の過酸化水素が細胞外に発生した場合、細胞死に決定的な役割をもったと考えられる。基質と酵素の衝突頻度を考えると、比較的大量の酵素が必要であったのかもしれない。しかし、この事を直接には証明していない。今後の課題である。

kigamicin D のグルコース欠乏特異的な酸化ストレスの増大を示す別の証拠を以下に挙げる。活性酸素は細胞内の様々な遺伝子発現変化を起こし、その変化は細胞の活性酸素応答に関与すると考えられている。少なくとも、細胞内で発現が変化する遺伝子の一部は、酸化ストレス応答に関与していると考えられている。おそらく過酸化水素の増大に起因して、グルコース欠乏培地中で **Kigamicin D** を処理した場合にだけアーリーレスポンス遺伝子である **c-Fos** 遺

伝子発現が顕著に誘導されていた。以上の知見より、**kigamicin D** の栄養飢餓選択的な細胞死には、過酸化水素産生が関与していることが明らかとなった。

更に、グルコース飢餓選択的な **kigamicin D** による酸化ストレスの増大は、**kigamicin D** にだけ見られるのか、または栄養飢餓耐性解除薬において一般的に見られる現象なのかを調べた。**Kigamicin D** だけではなく、**arctigenin** や **pyrvinium pamoate** など他の栄養飢餓耐性解除薬が栄養飢餓選択的に誘導する細胞死に関しても、過酸化水素の増大が関与していることが分かった。したがって、栄養飢餓耐性解除薬による栄養飢餓選択的な細胞死において、活性酸素種産生という現象は一般的であることが示唆された。

II : DAF 類が検出したシグナルは一酸化窒素によるものではないと考えられるが、**kigamicin D** が栄養飢餓特異的に増強した重要な指標である可能性

一酸化窒素を特異的に検出するとされる蛍光プローブ **DAF** 類のシグナルが、グルコース欠乏培地中で **kigamicin D** 処理することにより顕著に増大していた。この変化は、様々な **NOS** 阻害剤の影響を受けなかったことから、一酸化窒素の産生を検出したものではないと示唆される。また、**DAR-4MAM** (**DAR** 類) という別の一酸化窒素特異的な蛍光プローブを作用させた場合には、グルコース欠乏培地中で **kigamicin D** を処理させた場合に顕著なシグナルの変化は観察されなかった。以上のことから、一酸化窒素産生に由来しない、**DAF** 類が検出するシグナルの存在が示唆された。また、このシグナルは **kigamicin D** だけではなく **arctigenin** や **pyrvinium pamoate** など他の栄養飢餓耐性解除薬によっても、栄養飢餓選択的に誘導された。さらに、**kigamicin D** によって栄養飢餓選択的に誘導される **DAF-2DA** のシグナルは、抗酸化剤 **NAC** による影響を受けないが、**CAT** によって抑制されることが分かった。**DAF** 類に対して、一酸化窒素以外で蛍光の増大が観察されたという報告は、デヒドロアスコルビン酸、アスコルビン酸⁶⁵⁾がある。また、**Ca²⁺**や**Mg²⁺**などの2価イオンや光によって、一酸化窒素により得られる **DAF** 類の蛍光強度が通常より大きくなるとの報告がある^{66, 67)}。今後検討していく必要がある。

第4章 栄養飢餓耐性解除薬としての *Diphenyleneiodonium Chloride(DPI)* の効果

4-1 研究目的

栄養飢餓耐性研究の過程で、**Fig.4-1** に化学構造式を示した *Diphenyleneiodonium Chloride(DPI)* にも栄養飢餓条件で選択的な細胞毒性を示すことを見出した。DPI は M.W.314.6 という比較的、分子量の小さい化合物である。DPI は難水溶性であるが、有機溶媒 DMSO には 5 mg/ml まで溶解することが出来る。DPI はその作用機序の一端が明らかとなっている。内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の不可逆的阻害剤で、無拘束ラット大動脈輪のアセチルコリン誘発弛緩を阻害することが示されている⁶⁸⁾。また、マクロファージの iNOS に対しても阻害作用を示す⁶⁹⁾。大動脈平滑筋細胞において、カリウムイオン電流およびカルシウムイオン電流を遮断する⁷⁰⁾。また、ミトコンドリアの NADH-ユビキノンオキシドリダクターゼ(Complex I)の阻害剤でもある⁷¹⁾。つまり、DPI はフラボプロテインに対して強い結合能を示していることが推測される。これらの働きを参考に、栄養飢餓耐性を解除する薬剤の作用機序を予想出来るのではないかと考えた。面白いことに栄養飢餓耐性解除薬のスクリーニング実験においては、度々、ミトコンドリア呼吸鎖を阻害する化合物が得られている。DPI も complex I を阻害することが知られている。ミトコンドリアは生体内において、酸化的リン酸化をはじめとする主要なエネルギー産生のあると同時に、活性酸素種の主要な生成器官として知られている。DPI にも *kigamicin D* と類似した、酸化ストレスメカニズムに関わる作用機序の下で栄養飢餓状態特異的な細胞毒性を誘導しているのではないかと考えた。膵臓がん細胞株に対する DPI の効果について検討することとした。

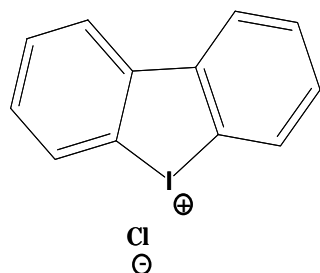


Fig.4-1. *Diphenyleneiodonium Chloride (DPI)* の化学構造式

4-2 実験手法

4-2-1 研究試薬

Diphenyleneiodonium Chloride (DPI)は、CALBIOCHEM より購入した。Catalase は、Sigma より購入した。過酸化水素を特異的に検出する蛍光プローブ、細胞膜透過性の BES-H₂O₂-Ac⁷²⁾は Wako より購入した。他の化学薬品は研究用製品として手に入れることが可能である。また、BES-H₂O₂-Ac は DMSO 溶媒に 5mM となるように溶解し、stock solution として冷凍保存した。

4-2-2 細胞培養

細胞は全て、American Type Culture Collection(ATCC)より購入した。ヒト膵臓がん由来 PANC-1 細胞とヒト結腸がん由来 WiDr 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO)に 10% fetal calf serum(FCS, Sigma)を加えて培養した。ヒト膵臓がん由来 PSN1 と KP3 細胞は RPMI1640 培地 (ニッスイ)に 10% FCS を加えて培養した。細胞をグルコース、アミノ酸、血清欠乏状態にする際、以前に報告されている手法を用いた²⁰⁾。グルコースを加える場合には最終濃度が 1 g/l となるようにした。アミノ酸を加える際には、MEM アミノ酸 mixture (必須アミノ酸、非必須アミノ酸、そして L-グルタミンが含まれている)を DMEM の組成中に含まれているアミノ酸と等しい量だけ加えた。FCS はアミノ酸やグルコースを除去するために PBS で透析してから用いた。細胞生存は propidium iodide と Hoechst33342 による二重染色法⁴⁵⁾を用いて調べた。また、細胞数は WST-8 cell counting kit (Dojindo)により測定した。

4-2-3 スフェロイド形成とその増殖阻害実験

WiDr は PANC-1 細胞と比較して、よりきれいな真円のスフェロイドを形成することが分かっている²⁵⁾。WiDr 細胞を用いてスフェロイドを形成させることとした。WiDr 細胞を 1000cells/well でスミロンセルタイトスフェロイドプレート(住友ベークライト)に DMEM でまいた。2日後、それぞれの well には直径約 300μm のスフェロイドが形成された。この日より、DMEM または 0.1μg/ml の DPI を加えた DMEM でスフェロイドを培養し始めた。12 日間の実験を通じて、一日おきに培地を新しく交換した。4 日ごとに、位相差顕微鏡 (KEYENCE)を用いてスフェロイドの写真を撮り、写真上でスフェロイドの直径を測定した。

4-2-4 Western blot

Akt(#9272)、リン酸化 Akt(#9271)、AMPK- α (#2603)、リン酸化 AMPK- α (#2535)抗体は、それぞれ Cell Signaling より購入した。全細胞抽出液を得るために、細胞は SDS lysis buffer (10% SDS, 100mM Tris/HCl, 10mM Na_3VO_4)を用いて回収し、100°Cで 3 分間変性させ、10 秒間ソニケーションした。遠心器を用いて 15,000 rpm で 10 分間遠心沈降し、細胞上清を回収した。タンパク質濃度は BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology)により測定した。検量線は bovine serum albumin (BSA)を基準に求めた。各レーン 10 μg のタンパク質を SDS-PAGE により分離した。このタンパク質をセミドライ方式でゲルからニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンは 5%(w/v)スキムミルクを含む TBS で 1 時間、室温でブロッキングした。メンブレンを 0.1% Tween-20 を含む TBS(Tween-TBS)で洗い、5%(w/v)BSA を含む TBS に一次抗体を希釈し、一晩 4°Cで反応させた。翌日、メンブレンを Tween-TBS で洗い、5%(w/v)スキムミルクを含む TBS に二次抗体(HRP-conjugated anti-rabbit IgG 抗体)を 2000 倍希釈し、1 時間、室温で反応させた。メンブレンを Tween-TBS で洗い、ECL system (Amersham Biosciences)を用いてフィルムに反応産物を検出した。

4-2-5 フローサイトメーター

細胞を本文に示すような様々な条件で 6 時間培養した。これらの培地を除去し、DMEM またはグルコース欠乏培地に最終濃度 5 μM となるように BES- H_2O_2 -Ac を加え、37°Cで 30 分間培養した。培地を除去し、PBS で洗い、トリプシン/EDTA を用いて細胞をペトリ皿より化学的に剥がした。浮遊状態の細胞を数回 PBS であらった後、500 μl の PBS に細胞を懸濁した。以上の操作は、遮光条件で行った。励起波長 488 nm のアルゴンイオンレーザーを搭載した、FACSCalibur (Becton Dickinson)を用いて、直ちに細胞懸濁液中の BES- H_2O_2 -Ac の蛍光強度を測定した。発光波長は 530 nm にセットした。それぞれの条件は triplicate で行い、1 サンプルあたり 20000 個の細胞を測定した。蛍光強度の Mean 値は、Cell Quwst プログラム(Becton Dickinson)により計算した。

4-2-6 統計処理

全ての結果は、means \pm SD 値で表した。統計比較は、分散解析を行った後にスチューデント T 検定を用いて行った。結果が、*P*値が 0.05 未満の場合を有意とありと考えた。

4-3 実験結果

4-3-1 DPIはグルコース欠乏下、様々ながん細胞株に対して特異的な細胞毒性を示した

前述の通り、典型的な乏血管性腫瘍であるヒト膵臓がん由来の PANC-1 細胞は、グルコース欠乏状態に対して耐性を示す。**Fig.4-2** に示す通り、DPI はヒト膵臓がん由来 PANC-1(A)、PSN1(B)、KP3(C)細胞やヒト結腸がん由来 WiDr(D)細胞に対して通常の DMEM と比較して、グルコース欠乏培地中では数十倍から数百倍の選択的な細胞毒性を示した。グルコース欠乏培地中で、DPI による細胞死の IC_{50} 値はそれぞれ、PANC-1 で $6.3 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ 、PSN1 で $1.4 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ 、KP3 で $8.0 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ 、WiDr で $7.4 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ であった。一方、通常の DMEM 中で、DPI による細胞死の IC_{50} 値は、それぞれ、PANC-1 で $1.9 \mu\text{g/ml}$ 、PSN1 で $4.7 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ 、KP3 で $3.7 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ 、WiDr で $5.8 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ であった。細胞種間での選択性の違いは、主にグルコース欠乏培地中よりも DMEM 中における DPI の感受性が細胞種間で異なっていることに起因している。

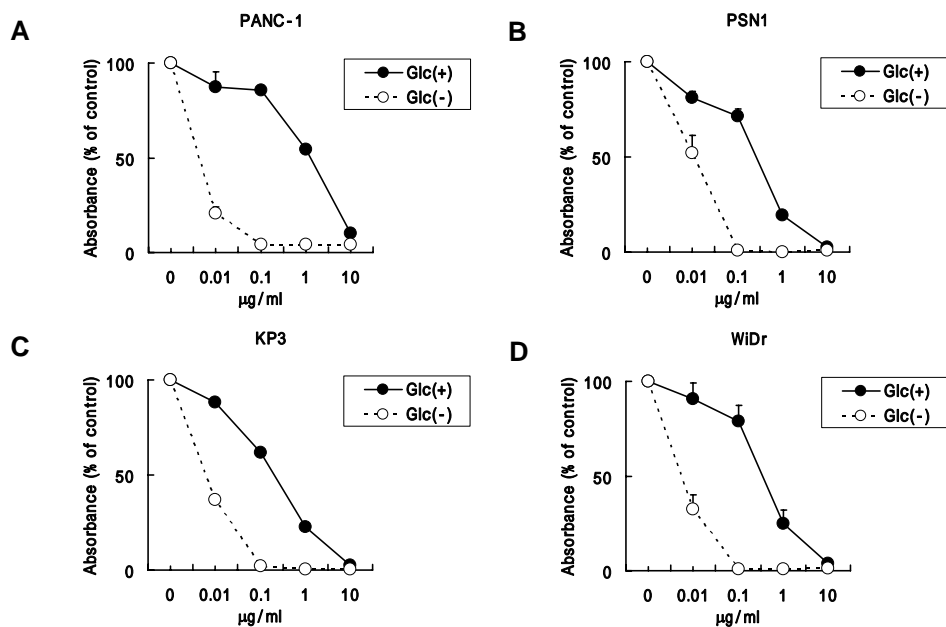


Fig.4-2. グルコース欠乏状態での様々ながん細胞に対する DPI の細胞毒性。ヒト膵臓がん細胞株 PANC-1 (A), PSN-1 (B), KP3 (C)とヒト結腸がん細胞株 WiDr (D)を DMEM (●)または グルコース欠乏培地(○)中で、様々な濃度の DPI を加え培養した。DPI 処理していない場合の細胞数を 100%とした。縦軸は、薬剤処理 24 時間後の WST-8 cell counting kit により測定した生存細胞数。全ての実験は triplicate で行い、結果は means±SD で示した。

4-3-2 栄養飢餓状態での PANC-1 細胞に対する DPI の細胞毒性は、グルコースが欠乏していることが重要な要因である

DPI の栄養飢餓選択的な細胞毒性はグルコースが欠乏していることにのみ寄与しているのか、他の栄養素を欠乏させた際も栄養欠乏培地特異的な細胞毒性を示すのか調べた。通常の DMEM より、グルコース・アミノ酸・血清を欠乏させた培地を用いて検討した。**Fig.4-3.A** に示す通り、DPI 0.1 $\mu\text{g/ml}$ を加えて 24 時間後、アミノ酸や血清の有り無しに関わらず、グルコースを欠乏させた培地でのみ選択的な細胞毒性が観察された。**Fig.4-3.B** に示す通り、グルコース濃度が低ければ低い培地ほど、より顕著な DPI による細胞毒性が観察された。DPI の栄養飢餓選択的な細胞毒性は、グルコースが欠乏していることが重要な因子であることが分かった。また、Propidium iodide と Hoechst 33342 による二重染色法を用いて、PANC-1 細胞の形態学的な変化を観察した。**Fig.4-3.C** に示す通り、グルコース欠乏培地中で 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の DPI を加えて 24 時間後、ほとんどの細胞が Propidium iodide 陽性となった。加えて、核の凝集やクロマチンのフラグメンテーションなどが観察されなかったため、典型的なアポトーシスではない細胞死であると示唆された。また、DMEM 中で 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の DPI を加えた場合やグルコースを欠乏させただけでは、24 時間後に顕著な細胞死は観察されなかった。

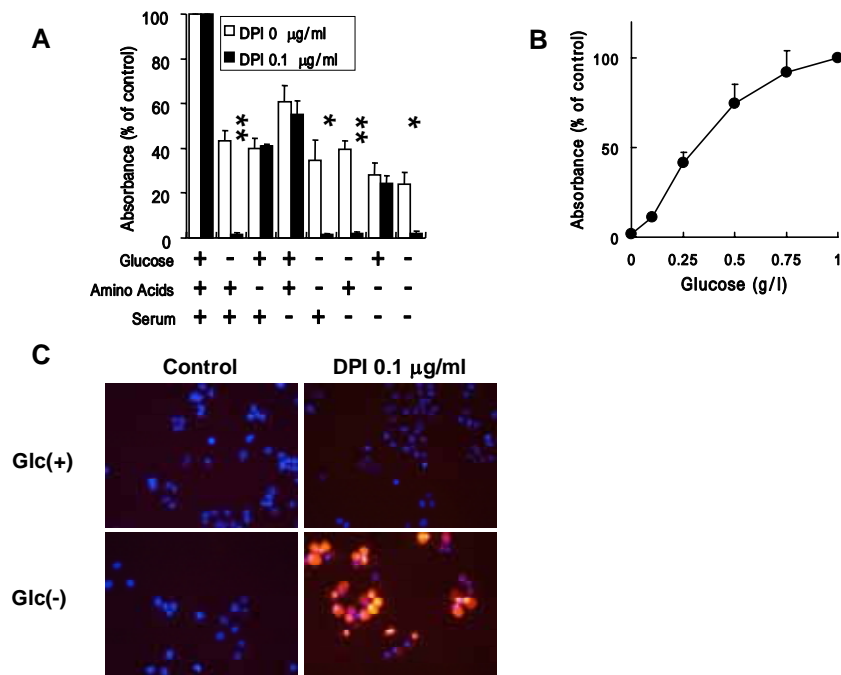


Fig.4-3. PANC-1 細胞に対する DPI のグルコース欠乏選択的な細胞毒性。 **A.** PANC-1 細胞をグルコース、アミノ酸、血清の有無で培養し、DPI 未処理(□)、または 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の DPI 処理(■)した。 DMEM 中で培養した場合の細胞数を 100%とした。縦軸は、薬剤処理 24 時間後の生存細胞数 (% of control) を表している。全ての実験は triplicate で行い、結果は means \pm SD で示した。*, 有意差 $P < 0.05$ 。**, 有意差 $P < 0.01$ とした。 **B.** PANC-1 細胞を 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の DPI を加え、様々なグルコース濃度下で培養した。DMEM(1g/l グルコース)で培養した場合の細胞数を 100%とした。縦軸は、薬剤処理 24 時間後の生存細胞数を表している。実験は n=6 で行い、結果は means \pm SD で示した。 **C.** DMEM またはグルコース欠乏培地で、0.1 $\mu\text{g/ml}$ の DPI を処理または未処理してから 24 時間後の Propidium iodide と Hoechst 33342 による二重染色のパターン。写真は蛍光顕微鏡により撮影した。

4-3-3 ヒト結腸がん由来 WiDr 細胞で形成させたスフェロイドに対する DPI の効果

従来の *in vitro* 実験では、がん細胞をペトリ皿で単層培養し研究が進められてきた。しかしながら、単層培養実験では酸素や栄養素が欠乏しているような実際のがん組織に対する、真の薬剤効果をシミュレーションするのは困難である。三次元培養により形成されるスフェロイドは、中心部位における酸素や栄養素の供給が限られているため、実際のがん組織によく似た *in vitro* モデルである^{73, 74})。PANC-1 細胞では綺麗な真円のスフェロイドを形成出来なかったのも、今回の実験ではスフェロイドを形成することが既に知られているヒト結腸がん由来 WiDr 細胞を用いた。96well スミロンセルタイトスフェロイドプレートに WiDr 細胞を 1000cells/well でまくと、2 日後に直径約 300 μ m の真円のスフェロイドが形成された。培地中の栄養素が消費されることを考え、特にグルコース消費は致命的であるので、DMEM は一日おきに新鮮な培地へと交換した。Fig.4-4.A, B に示す通り、DPI を加えないコントロール群では、実験開始後 12 日目でスフェロイドは直径約 700 μ m の大きさにまで成長した。一方、DMEM に 0.1 μ g/ml の DPI を加えた場合、12 日間の実験を通して、スフェロイドは直径約 300 μ m の大きさのままであった。この際、スフェロイド表面上に顕著な細胞死は観察されなかった。通常の培養条件である DMEM 中で単層培養をした場合に、DPI が WiDr 細胞の細胞増殖に与える影響について調べた。Fig.4-4.C に示す通り、薬剤処理後 48 時間後においてわずかに細胞増殖が抑制された。しかし、細胞増殖が完全に止まることはなかった。ゆえに、WiDr 細胞は DMEM 中、0.1 μ g/ml の DPI を加えたとしても単層培養条件では増殖し続けることが示された。これらの結果より、DMEM 中で DPI 処理することにより、スフェロイドの増殖が強力に阻害された。この結果はおそらく、スフェロイドの内部における栄養の濃度勾配に起因すると考えられた。

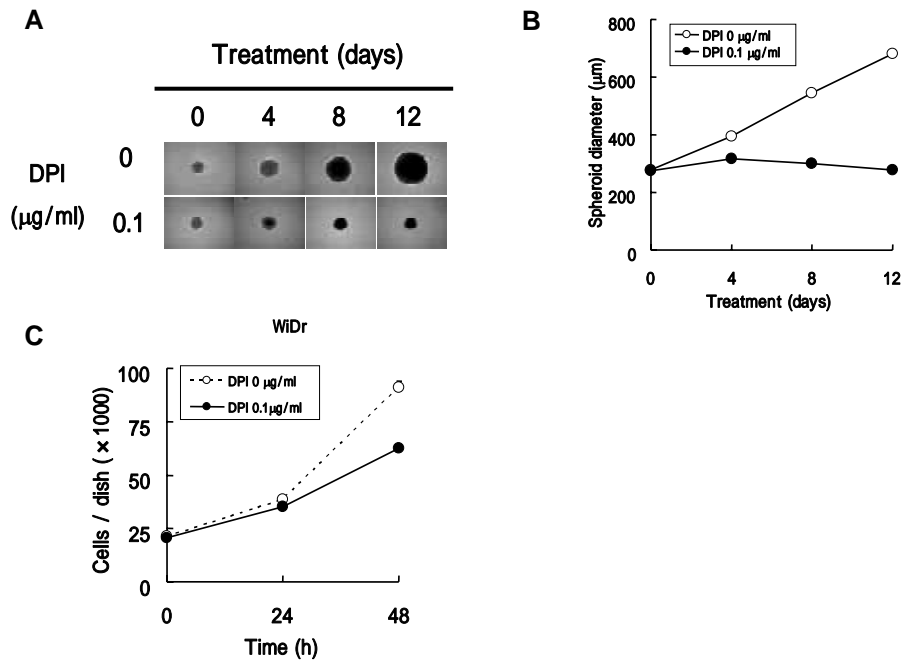


Fig.4-4. ヒト結腸がん細胞株 WiDr で形成したスフェロイドに対する DPI の効果。**A.** グルコースを含む培地(DMEM)中で、0.1 µg/ml の DPI を加えた場合と、加えなかった場合の代表的なスフェロイドの顕微鏡写真。写真は、位相差顕微鏡により撮影した。**B.** 縦軸は、実験期間中におけるスフェロイドの直径を示している。スフェロイドの直径は顕微鏡写真より測定した。実験は $n=12$ で行い、結果は $\text{means} \pm \text{SD}$ で示した。●, DPI 未処理の DMEM で培養 ; ○, 0.1 µg/ml の DPI を処理した DMEM で培養。**C.** DMEM 中で培養した際の DPI による WiDr の細胞増殖への影響を一般的な単層培養ペトリ皿を用いて測定した。全ての実験は **triplicate** で行い、結果は $\text{means} \pm \text{SD}$ で示した。●, DPI 未処理の DMEM で培養 ; ○, 0.1 µg/ml の DPI を処理した DMEM で培養。縦軸は、細胞数を表している。

4-3-4 グルコース欠乏下で DPI 処理による、Akt のリン酸化の抑制と AMPK のリン酸化の亢進

当研究室の過去の研究より、正常酸素、低酸素状態の両条件において、グルコース欠乏における Akt 経路の活性化が細胞の生存に重要であることを示してきた^{20, 21)}。Fig.4-5 に示す通り、PANC-1, PSN1, KP3 細胞全てにおいて、Akt セリン 473 のリン酸化はグルコース欠乏にすることで亢進し、これを DPI 処理することで顕著に抑制した。一方、AMP-activated protein kinase (AMPK)は、栄養飢餓、ヒートショック、低酸素、乏血などのストレスに伴う AMP/ATP 比の増加によって活性化されることが知られている⁷⁵⁾。当研究室の過去の知見より、AMPK の活性化が細胞の生存にも重要であることが示されている²²⁾。Fig.4-5 に示す通り、PANC-1, PSN1, KP3 細胞全てにおいて、AMPK- α の活性化を表す AMPK- α スレオニン 172 のリン酸化はグルコース欠乏下、DPI 処理することで顕著に亢進された。この結果は、ATP の顕著な枯渇を示唆しているとともに、がん細胞が何らかの適応反応を起こしていることを示している。

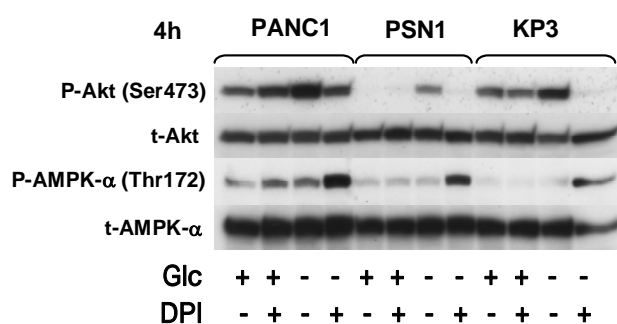


Fig.4-5. Akt と AMPK の活性化について Western blot により調べた。PANC-1, PSN1, KP3 細胞を DMEM (Glc +)またはグルコース欠乏培地(Glc -)下で、DPI 未処理(-)または DPI 処理(+)した。細胞は 4 時間薬剤処理した。Akt のリン酸化 (P-Akt), total Akt (t-Akt), AMPK- α のリン酸化(P-AMPK- α), total AMPK- α (t-AMPK- α)タンパク質は、特異的な抗体によって検出した。

4-3-5 グルコース欠乏下で DPI 処理することによる細胞死は酸化ストレスに関連し、過酸化水素を分解する *catalase* (CAT) によりキャンセルされた

過去の知見より、グリア芽細胞種⁴⁷⁾や乳がん腫⁴⁶⁾など様々ながん細胞において、グルコース欠乏状態にすること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。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であったとしても、グルコース欠乏下で DPI 処理することによる細胞死には酸化ストレスが関与しているのではないかと仮説を立てた。**Fig.4-6,A** に示す通り、PANC-1 細胞における細胞内の過酸化水素量を測定した。グルコース欠乏状態下で 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の DPI を処理すると、薬剤処理 6 時間後に顕著な細胞内の過酸化水素の増大が観察された。しかし、過酸化水素を分解する CAT を処理しても、細胞内の過酸化水素の量は減少しなかった。このことはおそらく、CAT が細胞膜非透過性であることに起因していると考えられる。予想とは逆に、CAT を処理することにより細胞内の過酸化水素の量はむしろ増大していた。現状、この現象に対する明確な説明は見出せていない。

Akt、AMPK 経路に対する CAT の影響を調べることにした。**Fig.4-6,B** に示す通り、PANC-1, PSN1, KP3 細胞全てにおいて、グルコース欠乏下 DPI 処理することで観察されていた Akt セリン 473 のリン酸化の抑制は、CAT 処理することで回復していた。一方、**Fig.4-6,B** に示す通り、PANC-1, PSN1, KP3 細胞全てにおいて、グルコース欠乏下、DPI 処理することで顕著に亢進されていた AMPK- α スレオニン 172 のリン酸化も、CAT 処理することにより抑制されていた。また、細胞生存に対する CAT の影響を調べた。**Fig.4-6,C** に示す通り、PANC-1 細胞においてグルコース欠乏下、DPI 処理することにより誘導される細胞死を、CAT 処理することで顕著に回復していた。

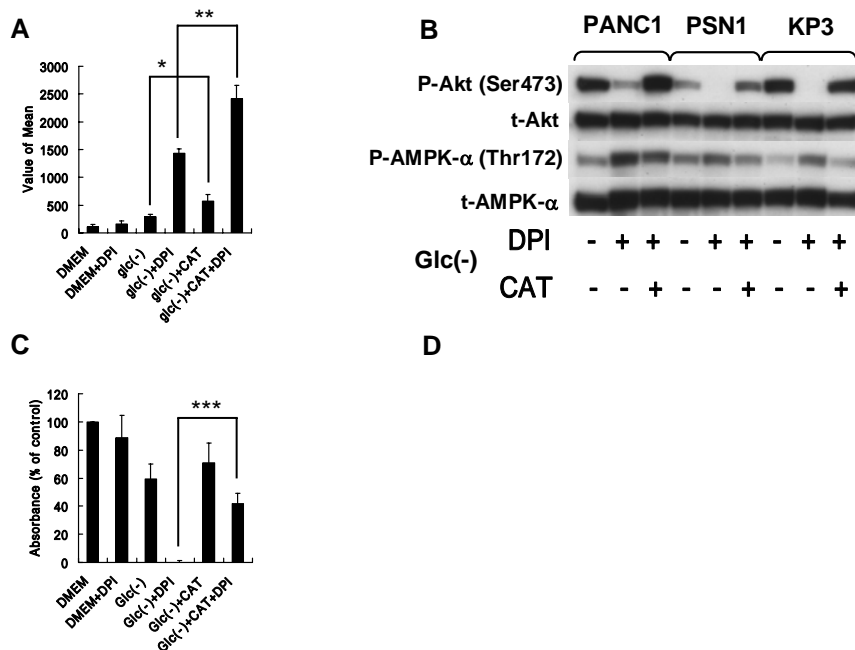


Fig.4-6. PANC-1 細胞におけるグルコース欠乏状態で DPI 処理した場合の細胞死には酸化ストレスが関与しており、過酸化水素の分解酵素である catalase(CAT)によって抑制された。 **A.** PANC-1 細胞を DMEM またはグルコース欠乏培地中で、0.1 $\mu\text{g/ml}$ の DPI (DPI) や 1 mg/ml の catalase(CAT)で処理または未処理した。薬剤処理 6 時間後、細胞膜透過性の蛍光プローブ BES- H_2O_2 -Ac で染色し、フローサイトメーターを用いて細胞内過酸化水素量を検出した。縦軸は BES- H_2O_2 -Ac の蛍光強度の Mean 値を示している。実験は triplicate で行い、結果は means \pm SD で示した。*,有意差 $P < 0.05$ 。**, 有意差 $P < 0.01$ 。 **B.** Akt と AMPK の活性化について Western blot により調べた。PANC-1, PSN1, KP3 細胞を DMEM (Glc +)またはグルコース欠乏培地(Glc -)中で、0.1 $\mu\text{g/ml}$ の DPI (DPI) や 1 mg/ml の catalase(CAT)で処理または未処理した。細胞は 6 時間薬剤処理した。Akt のリン酸化(P-Akt), total Akt (t-Akt), AMPK- α のリン酸化(P-AMPK- α), total AMPK- α (t-AMPK- α)タンパク質は、特異的な抗体によって検出した。 **C.** PANC-1 細胞を、DMEM またはグルコース欠乏培地(Glc (-))中で、0.1 $\mu\text{g/ml}$ の DPI (DPI) や 1 mg/ml の catalase (CAT)で処理または未処理した。DMEM で培養した場合の細胞数を 100%とした。縦軸は、薬剤処理 24 時間後の生存細胞数 (% of control) を表している。実験は n=10 で行い、結果は means \pm SD で示した。***,有意差 $P < 0.001$ 。

4-3-6 様々なミトコンドリア呼吸鎖阻害剤が示す、グルコース欠乏培地中での選択的な細胞毒性

DPI はミトコンドリア呼吸鎖における **Complex I** の阻害能を持つことが知られている。そこで、**Table 4-1.**に示す様な、様々なミトコンドリア呼吸鎖阻害剤を用いて、DMEM 中とグルコース欠乏培地中での細胞生存について調べることとした。DPI や Rotenone は **Complex I** の阻害剤であり、**Complex I** の Fe-S 中心からユビキノンの電子の流れを阻害し、酸化リン酸化の全過程を遮断する。Antimycin A は **Complex III** における電子伝達の阻害剤である。Oligomycin は **F₀** に結合して H⁺ 輸送チャネルを閉じる。Nonactin や Valinomycin などのイオノホアは、無機イオンを容易に膜透過させる。イオノホアは、ミトコンドリアの膜を挟む電気化学的勾配を形成させる電気的な力を消失させることによって、電子伝達と酸化リン酸化を脱共役させる。**Fig.4-7.**に示す様に、**Rotenone(A)**, **Antimycin A(B)**, **Oligomycin (C)**, **Nonactin(D)** , **Valinomycin(E)** の全ての薬剤において、DMEM 中よりも、グルコース欠乏培地中で選択的な細胞毒性を示した。

Type of interference	Compound	Target/mode of action
Inhibition of electron transfer	①DPI	Prevent electron transfer from Fe-S center to ubiquinone
	②Rotenone	
	③Antimycin A	Blocks electron transfer from cytochrome <i>b</i> to cytochrome <i>c</i> ₁
Inhibition of ATP synthase	④Oligomycin	Inhibit Fo and CFo
Uncoupling of phosphorylation from electron transfer	⑤Nonactin	K ⁺ ionophore
	⑥Valinomycin	

Table 4-1. 様々なミトコンドリア呼吸鎖阻害剤

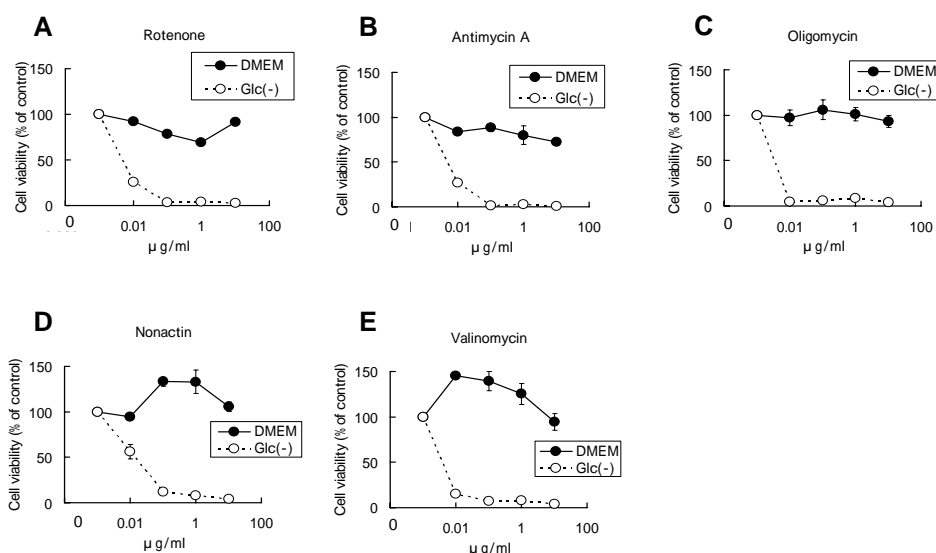


Fig.4-7. グルコース欠乏培地選択的な、PANC-1 細胞に対する様々なミトコンドリア呼吸鎖阻害剤の細胞毒性。様々な濃度の Rotenone(A), Antimycin A(B), Oligomycin (C), Nonactin(D) , Valinomycin(E)を加え、DMEM (●)または グルコース欠乏培地(○)中で PANC-1 細胞を培養した。薬剤処理していない場合の細胞数を 100%とした。縦軸は、薬剤処理 24 時間後に WST-8 cell counting kit により測定した生存細胞数 (% of control)。全ての実験は triplicate で行い、結果は means±SD で示した。

4-4 考察

I : DPI のグルコース飢餓選択的な抗がん効果の証明

本研究より、diphenyleneiodonium chloride (DPI)が新たな栄養飢餓耐性解除薬となる可能性を示した。DPI はヒト膵臓がん由来 PANC-1、PSN1、KP3 細胞、ヒト結腸がん由来 WiDr 細胞に対して、通常の DMEM と比較して、グルコース欠乏培地中では数十倍から数百倍の選択的な細胞毒性を示した。DPI の栄養飢餓選択的な細胞毒性は血清やアミノ酸の有無には関係なく、グルコースが欠乏することに依存したものであることが分かった。より実際のがん組織に近い三次元培養モデルであるスフェロイドを作成し、DMEM 中で DPI を処理した場合、DPI はスフェロイドの増殖を顕著に阻害した。12 日間の実験を通じて、DPI を処理したスフェロイド群は一貫して約 300 μ m の直径を維持した。細胞に対する栄養供給が充分である通常の単層培養においては、DMEM 中で DPI を処理した場合に細胞は増殖し続けることから、三次元培養の場合には、DMEM 中で DPI を処理した際に栄養供給の乏しいスフェロイドの内部に作用することでスフェロイドの増殖を抑制したと考えられる。より生体内のがん組織に近い *in vitro* 実験系においても DPI の抗がん効果を示すことが出来た。

II : グルコース欠乏下で DPI は、単純に解糖系と呼吸鎖を阻害したことにより細胞死を誘導した訳ではない

グルコースは細胞内に取り込まれ、ヘキソキナーゼによりグルコース 6 リン酸となる。グルコース 6 リン酸は解糖系を介し 2 分子のピルビン酸へと酸化され、アセチル CoA へと変換され TCA 回路により酸化される。その過程で放出された電子は NADH や FADH₂ により運ばれ、ミトコンドリアでの酸化リン酸化を経て水となり、そのエネルギーを利用して ATP が産生される。Otto Warburg は、がん組織は他の組織に比べて速い速度でグルコース代謝を示していることを報告している¹⁹⁾。ゆえに、がん細胞は産生する ATP を嫌氣的解糖に依存しながら調達していると考えられる¹⁹⁾。乳がん細胞⁴⁶⁾やグリオーマ⁴⁷⁾などのがん細胞ではグルコースを欠乏させ、解糖系を止めただけでも細胞死が誘導される。前述の様に、膵臓がん細胞ではグルコースを欠乏させても短期的には細胞死は誘導されないため、解糖系が十分に働いていなくてもアミノ酸や脂肪酸を使って TCA 回路を介し、細々と生存していると考えられる。DPI はミトコンドリア呼吸鎖の阻害剤として働くことが知られている。ゆえに、グルコース欠乏により解糖系が十分に働いていない状況下で、DPI により呼吸鎖までもを止めてしまえば、ATP が極度に枯渇し、がん細胞が死んでいくのは当たり前の

ことの様に思う。しかしながら、細胞膜非透過性の過酸化水素分解酵素である **CAT** を処理することで、**DPI** が栄養飢餓選択的に誘導した細胞死を顕著に抑制した。つまり、グルコース欠乏で **DPI** を処理することで、細胞外に過酸化水素が発生したと考えられる。ゆえに、グルコース欠乏培地中、膵臓がん細胞に **DPI** を処理した際、単に解糖系と呼吸鎖を遮断したことにより **ATP** が枯渇して細胞死が誘導されたのではなく、細胞外の過酸化水素の発生が細胞死に決定的な役割を果たしていたと考えられる。

Ⅲ：グルコース欠乏下において **DPI** 処理することで発生する、細胞外の過酸化水素が細胞死を誘導している

CAT は細胞膜非透過性の過酸化水素分解酵素であるので、グルコース欠乏下で **DPI** を処理することにより細胞外に発生した過酸化水素が、細胞死に決定的な役割を果たしているか検討出来る。おそらく **DPI** のグルコース飢餓選択的な細胞死の一因として、グルコース欠乏下で誘導される **Akt(Ser473)** のリン酸化を **DPI** は顕著に抑制した。**CAT** を共処理することで、グルコース欠乏培地で **DPI** を処理しても **Akt** のリン酸化は抑制されなかった。ゆえに、グルコース欠乏において **DPI** 処理により細胞外に発生した過酸化水素が、**Akt** 経路を介して細胞死を誘導していると示唆される。

また、細胞外から過酸化水素を処理することによって **AMPK-α** のリン酸化が引き起こるという知見が報告されている⁷⁶⁾。グルコース欠乏培地中で **DPI** 処理することにより、顕著な **AMPK-α** のリン酸化の亢進が観察された。**CAT** を共処理することで、グルコース欠乏培地で **DPI** を処理しても **AMPK-α** のリン酸化は亢進されなかった。ゆえに、グルコース欠乏において **DPI** 処理することで細胞外に発生した過酸化水素が、**AMPK** 経路を介して細胞死に対する何らかの適応反応を抑制したと考えられる。

グルコース欠乏で **DPI** を処理した際、**BES-H₂O₂** という過酸化水素を特異的に検出する蛍光プローブにより、顕著な細胞内過酸化水素量の増大を検出した。しかし、**CAT** は細胞膜非透過性であるために、細胞内の過酸化水素量を減らしではなかった。グルコース欠乏で **DPI** 処理した際、**CAT** を共処理すると細胞内過酸化水素量は増大されたままであるが、顕著に細胞死を抑制したことから、細胞内の過酸化水素量は細胞生存には重要ではなく、むしろ細胞外で発生した過酸化水素こそが細胞死に決定的な役割を示しているのではないかと考えられる。今後は、**CAT** が膜非透過性であることを実際に自分でも確認したい。また、グルコース欠乏に曝した場合や、**DPI** で処理した際の、細胞外の過酸化水素量を実測する必要がある。

第5章 参考文献

1. 医療情報科学研究所. イヤーノート 内科・外科等編 (2008 年) 第 17 版 メディックメディア.
2. 日本膵臓学会. 膵癌取り扱い規約. 金原出版株式会社. 2002 年 4 月 (第 5 版) .
3. 国立がんセンター, がん対策情報センター, がん情報サービス, 膵がん.
<http://ganjoho.ncc.go.jp/public/cancer/data/pancreas.html>.
4. 国立がんセンター, がん対策情報センター, がん情報サービス, 統計.
<http://ganjoho.ncc.go.jp/professional/statistics/index.html>.
5. Imamura Y, Mizuno S. Comparison of pancreatic cancer mortality in five countries: France, Italy, Japan, UK and USA from WHO mortality database (1960-2000). Jpn J Clin Oncol. 2005; 35: 283-6.
6. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiologic and etiologic factors of pancreatic cancer. Hematol Oncol Clin North Am. 2002; 16: 1-16.
7. DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA. AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association. Gastroenterology. 1999; 117: 1464-84.
8. Whitcomb DC, Applebaum S, Martin SP. Hereditary pancreatitis and pancreatic carcinoma. Ann N Y Acad Sci. 1999; 880: 201-9.
9. 林櫻松, 玉腰暁子. 生活習慣と膵癌. 肝胆膵. 2004; 48: 561-6.
10. Stolzenberg-Solomon RZ, Blaser MJ, Limburg PJ, et al. Helicobacter pylori seropositivity as a risk factor for pancreatic cancer. J Natl Cancer Inst. 2001; 93: 937-41.
11. 日本膵臓学会膵癌登録委員会. 膵癌全国登録調査報告. 膵臓. 2001; 16: 115-47.
12. 江川新一、武田和憲、福山尚治、阿部永、横山忠明、砂村真琴、松野正紀. 膵癌登録からみた膵癌のリスクファクター. 肝胆膵. 2004; 48: 547-54.
13. 北川元二. 膵癌のリスクファクター慢性膵炎. 肝胆膵. 2004; 48: 591-7.
14. Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM. Coffee and cancer of the pancreas: an Italian multicenter study. The Italian Pancreatic Cancer Study Group. Pancreas. 1995; 11: 223-9.
15. 膵癌診療ガイドライン作成小委員会 日. 科学的根拠に基づく 膵癌 診療ガイドライン 2006 年度版. 金原出版株式会社.
16. Vaupel P, Hockel M. Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance. Int J Oncol. 2000; 17: 869-79.
17. Hockel M, Vaupel P. Biological consequences of tumor hypoxia. Semin Oncol. 2001; 28: 36-41.

18. Sutherland RM. Tumor hypoxia and gene expression--implications for malignant progression and therapy. *Acta Oncol.* 1998; 37: 567-74.
19. 川寄敏祐、中山和久. レーニンジャーの新生化学[上][下] 第4版. 廣川書店. 平成 18 年.
20. Izuishi K, Kato K, Ogura T, Kinoshita T, Esumi H. Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy. *Cancer Res.* 2000; 60: 6201-7.
21. Esumi H, Izuishi K, Kato K, et al. Hypoxia and nitric oxide treatment confer tolerance to glucose starvation in a 5'-AMP-activated protein kinase-dependent manner. *J Biol Chem.* 2002; 277: 32791-8.
22. Kato K, Ogura T, Kishimoto A, et al. Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation. *Oncogene.* 2002; 21: 6082-90.
23. Lu J, Kunimoto S, Yamazaki Y, Kaminishi M, Esumi H. Kigamicin D, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity strategy targeting cancer cells' tolerance to nutrient starvation. *Cancer Sci.* 2004; 95: 547-52.
24. Awale S, Lu J, Kalauni SK, et al. Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Res.* 2006; 66: 1751-7.
25. Esumi H, Lu J, Kurashima Y, Hanaoka T. Antitumor activity of pyrvinium pamoate, 6-(dimethylamino)-2-[2-(2,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrrol-3-yl)ethenyl]-1-methyl-quinolinium pamoate salt, showing preferential cytotoxicity during glucose starvation. *Cancer Sci.* 2004; 95: 685-90.
26. Stocker R, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 5918-22.
27. Bhaskaran M, Radhakrishnan N, Patni H, Singh P, Chaudhary AN, Singhal PC. Dialysis membrane-induced oxidative stress: role of heme oxygenase-1. *Nephron Exp Nephrol.* 2007; 105: e24-32.
28. Davy A, Gale NW, Murray EW, et al. Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev.* 1999; 13: 3125-35.
29. Bruckner K, Pasquale EB, Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science.* 1997; 275: 1640-3.
30. Holland SJ, Gale NW, Mbamalu G, Yancopoulos GD, Henkemeyer M, Pawson T. Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature.* 1996; 383: 722-5.

31. Cheng N, Chen J. Tumor necrosis factor- α induction of endothelial ephrin A1 expression is mediated by a p38 MAPK- and SAPK/JNK-dependent but nuclear factor- κ B-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2001; 276: 13771-7.
32. Ferrari N, Paleari L, Palmisano GL, et al. Induction of apoptosis by fenretinide in tumor cell lines correlates with DLX2, DLX3 and DLX4 gene expression. *Oncol Rep.* 2003; 10: 973-7.
33. Ferrari N, Palmisano GL, Paleari L, et al. DLX genes as targets of ALL-1: DLX 2,3,4 down-regulation in t(4;11) acute lymphoblastic leukemias. *J Leukoc Biol.* 2003; 74: 302-5.
34. Nguyen T, Huang HC, Pickett CB. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J Biol Chem.* 2000; 275: 15466-73.
35. Igarashi K, Kataoka K, Itoh K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature.* 1994; 367: 568-72.
36. Dhakshinamoorthy S, Jaiswal AK. Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 gene. *J Biol Chem.* 2000; 275: 40134-41.
37. Kotkow KJ, Orkin SH. Dependence of globin gene expression in mouse erythroleukemia cells on the NF-E2 heterodimer. *Mol Cell Biol.* 1995; 15: 4640-7.
38. Wild AC, Moinova HR, Mulcahy RT. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem.* 1999; 274: 33627-36.
39. Gong P, Hu B, Stewart D, et al. Cobalt induces heme oxygenase-1 expression by a hypoxia-inducible factor-independent mechanism in Chinese hamster ovary cells: regulation by Nrf2 and MafG transcription factors. *J Biol Chem.* 2001; 276: 27018-25.
40. Crawford DR, Leahy KP, Wang Y, Schools GP, Kochheiser JC, Davies KJ. Oxidative stress induces the levels of a MafG homolog in hamster HA-1 cells. *Free Radic Biol Med.* 1996; 21: 521-5.
41. Suzuki T, Blank V, Sesay JS, Crawford DR. Maf genes are involved in multiple stress response in human. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280: 4-8.
42. Moran JA, Dahl EL, Mulcahy RT. Differential induction of mafF, mafG and mafK expression by electrophile-response-element activators. *Biochem J.* 2002; 361: 371-7.
43. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 236: 313-22.

44. Chen L, Fink T, Ebbesen P, Zachar V. Temporal transcriptome of mouse ATDC5 chondroprogenitors differentiating under hypoxic conditions. *Exp Cell Res.* 2006; 312: 1727-44.
45. Suzuki A, Kusakai G, Kishimoto A, et al. Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein. *J Biol Chem.* 2003; 278: 48-53.
46. Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, et al. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J Biol Chem.* 1998; 273: 5294-9.
47. Jelluma N, Yang X, Stokoe D, Evan GI, Dansen TB, Haas-Kogan DA. Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes. *Mol Cancer Res.* 2006; 4: 319-30.
48. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991; 91: 31S-8S.
49. Luckey TD. Hormesis with Ionizing Radiation. CRC Press, Boca Raton. 1980.
50. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15: 247-54.
51. 二木鋭雄、野口範子、内田浩二. 酸化ストレスマーカー. 学会出版センター. 2005.
52. Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem.* 2003; 278: 3170-5.
53. Kojima H, Hirotsu M, Nakatsubo N, et al. Bioimaging of nitric oxide with fluorescent indicators based on the rhodamine chromophore. *Anal Chem.* 2001; 73: 1967-73.
54. Vatsa A, Mizuno D, Smit TH, Schmidt CF, MacKintosh FC, Klein-Nulend J. Bio imaging of intracellular NO production in single bone cells after mechanical stimulation. *J Bone Miner Res.* 2006; 21: 1722-8.
55. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem.* 1998; 70: 2446-53.
56. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, et al. Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. *Neuroreport.* 1998; 9: 3345-8.
57. Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1999; 38: 3209-12.
58. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5: 227-31.

59. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H. Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite. *Free Radic Res.* 1997; 27: 245-54.
60. Marchesi E, Rota C, Fann YC, Chignell CF, Mason RP. Photoreduction of the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein: a spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 148-61.
61. Rota C, Fann YC, Mason RP. Phenoxyl free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase. Possible consequences for oxidative stress measurements. *J Biol Chem.* 1999; 274: 28161-8.
62. Rota C, Chignell CF, Mason RP. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 873-81.
63. Nose K, Shibamura M, Kikuchi K, Kageyama H, Sakiyama S, Kuroki T. Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line. *Eur J Biochem.* 1991; 201: 99-106.
64. Ammendola R, Fiore F, Esposito F, et al. Differentially expressed mRNAs as a consequence of oxidative stress in intact cells. *FEBS Lett.* 1995; 371: 209-13.
65. Zhang X, Kim WS, Hatcher N, et al. Interfering with nitric oxide measurements. 4,5-diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid. *J Biol Chem.* 2002; 277: 48472-8.
66. Broillet M, Randin O, Chatton J. Photoactivation and calcium sensitivity of the fluorescent NO indicator 4,5-diaminofluorescein (DAF-2): implications for cellular NO imaging. *FEBS Lett.* 2001; 491: 227-32.
67. Chatton JY, Broillet MC. Detection of nitric oxide production by fluorescent indicators. *Methods Enzymol.* 2002; 359: 134-48.
68. Wang YX, Cheng X, Pang CC. Vascular pharmacology of methylene blue in vitro and in vivo: a comparison with NG-nitro-L-arginine and diphenyleneiodonium. *Br J Pharmacol.* 1995; 114: 194-202.
69. Stuehr DJ, Faselun OA, Kwon NS, et al. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J.* 1991; 5: 98-103.
70. Weir EK, Wyatt CN, Reeve HL, Huang J, Archer SL, Peers C. Diphenyleneiodonium inhibits both potassium and calcium currents in isolated pulmonary artery smooth muscle cells. *J Appl Physiol.* 1994; 76: 2611-5.
71. Majander A, Finel M, Wikstrom M. Diphenyleneiodonium inhibits reduction of

iron-sulfur clusters in the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J Biol Chem*. 1994; 269: 21037-42.

72. Maeda H, Fukuyasu Y, Yoshida S, et al. Fluorescent probes for hydrogen peroxide based on a non-oxidative mechanism. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2004; 43: 2389-91.

73. Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, Folkman J. Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *Br J Cancer*. 1977; 35: 347-56.

74. Franko AJ, Chapman JD. Binding of ¹⁴C-misonidazole to hypoxic cells in V79 spheroids. *Br J Cancer*. 1982; 45: 694-9.

75. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci*. 2004; 117: 5479-87.

76. Choi SL, Kim SJ, Lee KT, et al. The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 287: 92-7.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、恵まれた環境で研究する機会を与えてくださった東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野 江角 浩安 教授に深く感謝致します。研究機器・研究試薬などの研究環境において、不自由することなく研究を遂行することが出来ました。また、多くの学会・シンポジウムでの発表・聴講の機会を与えて下さいました。何より一番嬉しく思い感謝していることとして、先生は非常にお忙しいにもかかわらず、常日頃から直に多くのディスカッションの時間を割いて下さいました。優しく、厳しく、ご指導して頂きまして非常に感謝しております。

日常、最も近くで指導して頂きました国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部 がん組織生理機能解析プロジェクト 微小環境標的療法室長 土原 一哉 先生に深く感謝の意を表します。毎週木曜日のミーティングでは厳しく指導して頂きました。また、主観的で曖昧な表現を用いていた私に、データの客観的な捉え方、また実験を行っていく上での論理的な構成についてご指導して頂きました。先生の厳しいご指導の下、少しずつではありますが研究者としての考え方が身についているのではないかと思います。

DNA マイクロアレイ解析でお世話になりました国立がんセンター中央病院 研究所 腫瘍ゲノム解析・情報研究部長 吉田 輝彦 先生ならびに三牧 幸代 先生に深く感謝致します。**DNA** マイクロアレイ解析における実験手法、機器操作を一から丁寧にご指導頂きまして、有難うございました。

株式会社アーティセルシステムズ 岸本 充弘 先生に深く感謝の意を表します。数多くのご助言を頂き、また数多くのディスカッションの機会を設けて頂きまして大変感謝しております。

がん先端生命科学分野の先輩・同期・後輩、がん治療開発部の皆様には、日頃から大変ご迷惑をお掛けしました。

最後になりましたが、いつも支えて下さった両親、先生方、友人に感謝しております。

2008 年 1 月下旬
Sakyo Kanehara