

# 環境応答がもたらす細胞内酸性オルガネラの pH 変化とその生物学的意味

東京大学大学院 新領域創成科学研究科  
先端生命科学専攻修士課程

がん先端生命科学分野  
学生証番号 47-66527 氏名：梶田 千尋

指導教員：江角 浩安教授

## [目次]

Summary	1
---------	---

### 第一章

1-1 序論	3
1-1-1 がん微小環境について	
1-1-2 すい臓がんと、栄養飢餓耐性について	
1-1-3 がん組織の pH 環境について	
1-1-4 栄養欠乏と、シグナル伝達経路との関係について	
1-1-5 Kigamicin D の作用について	
1-2 本研究の目的	8
1-3 略語	9

### 第二章

実験方法	10
2-1 試薬	
2-2 細胞培養と各種培地	
2-3 蛍光染色法による細胞内オルガネラの観察	
2-4 細胞内酸性オルガネラ pH の観察	
2-5 細胞抽出液の作成	
2-6 SDS-PAGE 法	
2-7 Western blotting	
2-8 WST-8 法による細胞生存率の測定	
2-9 マウス肝臓/PANC-1 細胞からの細胞内オルガネラ膜画分の抽出	
2-10 v-ATPase 活性の測定	

### 第三章

結果	15
3-1 培養環境の違いによる、細胞内酸性オルガネラ pH の変化	
3-1-1 アミノ酸欠乏培地	

- 3-1-2    グルコース欠乏培地
- 3-1-3    低酸素条件
  
- 3-2      シグナル伝達経路と細胞内酸性オルガネラ pH 変化との関係
  - 3-2-1    各種培地におけるシグナルの変化
  - 3-2-2    Akt シグナル系
  - 3-2-3    AMPK シグナル系
  - 3-2-4    mTOR シグナル系
  
- 3-3      Kigamicin D 処理による、細胞内酸性オルガネラ pH への影響
  - 3-3-1    各栄養培地での kigamicin D 処理による細胞生存率
  - 3-3-2    各栄養培地での細胞内酸性オルガネラ pH への影響
  - 3-3-3    グルコース濃度に依存した kigamicin D の効果
  - 3-3-4    v-ATPase への作用

## 第四章

考察	22
----	----

## 第五章

図表	25
----	----

## 第六 6 章

参考文献	50
------	----

謝辞	53
----	----

# **The Biological Role for Change of Intracellular Organella's pH Regulation under the Different Microenvironment.**

## **Background and aim**

Cancer tissues are frequently exposed to hypoxia and nutrient deprived condition. Angiogenesis is one way to provide oxygen and nutrients, but morphologically and functionally immature tumor vessels can support insufficient blood flow to provide necessary oxygen and nutrients. In addition to the shortage of supply, less blood flow causes disturbance of drainage of acids produced by cellular metabolism. Accumulated acids induce lower extra and intracellular pH of cancer tissues comparing to that of normal tissues. Adaptation to such environment and regulation of extra and intracellular pH might be very important for the survival and growth of cancer cells.

In this study, we aim to clarify how cancer cells behave under the hypoxic and nutrient deprived condition. To mimic the tumor microenvironment, a pancreatic cancer-derived cell line, PANC-1, which has austerity, tolerance to nutrient-deprivation, was cultured under the 1% O<sub>2</sub> (hypoxia) or 21% O<sub>2</sub> (normoxia) condition with amino acid- or glucose-deprived media or a nutrient rich medium. We examined the change of pH in acidic organella of PANC-1 cells under each condition and investigated the involvement of signaling pathways which mediate nutrient deprivation-induced signals. Furthermore, we applied kigamicin D, which cancels the austerity of PANC-1 cells, to examine the effect on the organella pH regulation under nutrient-deprived condition.

## **Material and Methods**

The pH of intracellular organella was examined with a pH indicator, LysoSensor Yellow/Blue DND-160. LysoSensor is specifically incorporated into lysosomes and Golgi apparatus and shows yellow fluorescent at pH3-5 and blue fluorescent at pH6-8. Organella pH was quantitatively assessed using Yellow/Blue ratio.

## **Results and Discussion**

Amino acid deprivation induced lower organella pH (pH3-5) under 21% O<sub>2</sub>. Similar results were observed in a glucose-deprived medium and a medium containing 2-deoxy-glucose which inhibits glucose metabolism. Since optimum pH of lysosomal enzymes is <pH5, lower pH leads to the activation of lysosomal enzymes. Autophagy is a catabolic process that degrades long-lived proteins and organella to supply free amino acids as an alternative energy source under nutrient-deprived condition. Since autophagy depends on the lysosomal proteases to degrade proteins, lower pH may be implicated in the activation of autophagy. Interestingly, lower organella pH was not observed in the nutrient-deprived media under 1% O<sub>2</sub>. Nutrient-deprivation and hypoxia supposedly occur simultaneously *in vivo*. Biological significance of the pH regulation under hypoxia might be further studied.

## [目次]

Summary	1
---------	---

### 第一章

1-1 序論	3
1-1-1 がん微小環境について	
1-1-2 すい臓がんと、栄養飢餓耐性について	
1-1-3 がん組織の pH 環境について	
1-1-4 栄養欠乏と、シグナル伝達経路との関係について	
1-1-5 Kigamicin D の作用について	
1-2 本研究の目的	8
1-3 略語	9

### 第二章

実験方法	10
2-1 試薬	
2-2 細胞培養と各種培地	
2-3 蛍光染色法による細胞内オルガネラの観察	
2-4 細胞内酸性オルガネラ pH の観察	
2-5 細胞抽出液の作成	
2-6 SDS-PAGE 法	
2-7 Western blotting	
2-8 WST-8 法による細胞生存率の測定	
2-9 マウス肝臓/PANC-1 細胞からの細胞内オルガネラ膜画分の抽出	
2-10 v-ATPase 活性の測定	

### 第三章

結果	15
3-1 培養環境の違いによる、細胞内酸性オルガネラ pH の変化	
3-1-1 アミノ酸欠乏培地	

- 3-1-2    グルコース欠乏培地
- 3-1-3    低酸素条件
  
- 3-2      シグナル伝達経路と細胞内酸性オルガネラ pH 変化との関係
  - 3-2-1    各種培地におけるシグナルの変化
  - 3-2-2    Akt シグナル系
  - 3-2-3    AMPK シグナル系
  - 3-2-4    mTOR シグナル系
  
- 3-3      Kigamicin D 処理による、細胞内酸性オルガネラ pH への影響
  - 3-3-1    各栄養培地での kigamicin D 処理による細胞生存率
  - 3-3-2    各栄養培地での細胞内酸性オルガネラ pH への影響
  - 3-3-3    グルコース濃度に依存した kigamicin D の効果
  - 3-3-4    v-ATPase への作用

## 第四章

考察	22
----	----

## 第五章

図表	25
----	----

## 第六 6 章

参考文献	50
------	----

謝辞	53
----	----

Signaling molecules Akt, mTOR and AMPK, which reportedly mediate nutrient deprivation-induced signals, were inhibited or activated and involvement of these signaling molecules to the organella pH regulation was examined. A series of experiments suggested that mTOR has a key role in pH regulation; suppression of mTOR induced lower organella pH. It is also reported that mTOR suppression induced autophagy. Our hypothesis that lower lysosomal pH is implicated in the activation of autophagy is consistent with above findings.

Kigamicin D cancelled the change of organella pH during nutrient starvation. The effect of kigamicin D was observed specifically under the nutrient-deprived condition, suggesting potential relevance of pH regulation to the specific cytotoxicity of this compound. Since kigamicin D did not affect the mTOR signaling, we assumed that kigamicin D targets downstream of mTOR. We examined the effect of kigamicin D to the activity of v-ATPase, which is a major proton pump regulating lysosomal pH. However, we did not observed significant effect of kigamicin D to the *in vitro* v-ATPase activity in this study. The mechanism how kigamicin D affect the pH regulation still remains to be elucidated.

In this study, we clearly showed that the different culture conditions affect the intracellular pH regulation of cancer cells. Further investigation, which clarifies the mechanism of this phenomenon more specifically, will provide the biological insight of cancer microenvironment.

## 第一章

### 1-1 序論

#### 1-1-1 がん微小環境について

我々の体を構成する細胞は、常に様々な因子の作用を受けながら生命活動を行っている。同じ遺伝子変化を持っている均一な培養がん細胞でも、ペトリ皿の種類を変えるだけで、各種の抗がん剤への感受性が変わる。特に、三次元的に細胞が増殖する環境を作れば、正常細胞の如くなる場合すらある。現在の多くの研究では、ペトリ皿の中での単層二次元細胞培養により、種々の実験を行っている。しかしながら、単層二次元培養によって育てられた細胞が、実験の内容によっては生体組織内と同様の挙動を示しているとは限らない。

がん組織は、正常組織と同様、様々な素材から形成されている。細胞や、繊維芽細胞、基質、血管が三次元的に配置されて組織を構築し、そこに、ホルモンやサイトカインなどの伝達物質が働くことによって生理的活動を行っている。また、酸素濃度、グルコース濃度、pH 環境が正常組織と異なることも、がん組織の特徴である(詳細については後述)。がんの組織周辺を取り巻く環境を、がん微小環境と名づけているが、当研究室では特に、がん組織における血管構築の特異性と、組織内の酸素や栄養素の供給に関する特異性に着目している。

実際の組織の環境を模倣しつつ、細胞の応答について検証した研究は、例が少ない。*in vitro* から *in vivo* へと実験を移行させる過程で、あるいは *in vivo* の状態を *in vitro* でモデル化する上でも、また、がん細胞の特質を見抜き、がんの発生、進展や、がん生物学的特性の理解をし、新しい抗がん剤を探索するためにも、がん微小環境の理解と模倣は必須であると言える。



## すい臓がんと栄養飢餓耐性について

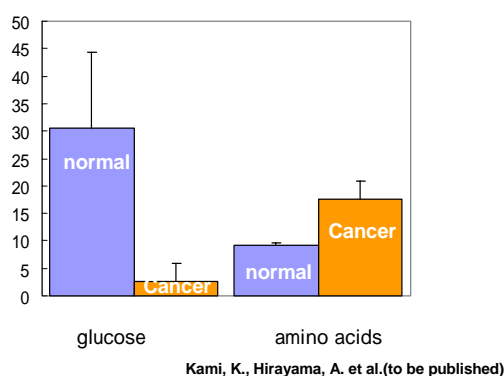
すべてのがんで血管新生は大きな働きをしている。たとえ、栄養欠乏環境に対する耐性を獲得したとしても、外部からの栄養、酸素の供給のまったくない環境では、縮小再生産しかあり得ないのは自明である。1970年代の初頭、ハーバード大学のFolkman教授は、腫瘍の増殖にとって血管新生はもっとも重要で、かつ成人の正常組織では一部の例外を除けば血管新生は起こらない為、血管新生は絶好のがん治療の標的であると提案した[1]。この考えに基づき、現在多くの血管新生阻害薬が開発され、その一部は肝がん、腎がんで画期的効果を見せつつある。

しかし、多くの固形がんでは、無秩序な腫瘍細胞の増殖と、不完全な脈管構築により、組織の形が崩れ、不完全な血管やリンパ管が形成されている。正常に機能しない血管では、組織を構成する細胞ひとつひとつに十分な血流が行き渡らず、結果として、細胞は酸素や栄養が欠乏した環境に曝されることになる[2]。血流が乏しい固形がんでは、組織中の特に血管から離れた場所に位置する部位には薬が行き渡りにくい。既存の抗がん剤は、副作用が大きいものが多く、大量投与が困難である。より効果のある治療を得るためには、大量投与以外の道を探らねばならない。これらの問題を解決するために、既存の戦略とは異なる抗がん剤の開発を目指さねばならない。

血流が乏しく、酸素、栄養ともに不足する環境に曝されたときに、すい臓がん、大腸がん扁平上皮がん等のがん組織において、がん細胞は代謝系を変化させて、乏しい栄養で生き残るための適応応答を取る[3]。後者のすい臓がん細胞株、大腸がん細胞株では、栄養（グルコース・アミノ酸）と血清が欠乏した培地においても、48時間～72時間ほどの生存が可能である[4]。下記の図に実際のヒトの大腸粘膜と大腸がん組織中のグルコースとアミノ酸濃度の実測値を示す。ヒトのがん組織で、グルコースが如実に不足していることが明らかであり、その代謝は正常組織と大きく異なっていると考えられる。

当研究室では、以前より、こうした栄養欠乏環境に対する適応応答を「栄養飢餓耐性」と名づけ、特に悪性度が高く、治療が困難であるすい臓がんに対して、環境に対する適応応答を標的とした新規抗がん剤の開発を目指している[5-8]。

### Metabolomic Analysis of Clinical Colon Cancers



大腸がん組織におけるグルコースとアミノ酸の濃度  
(平山らの未発表データを許可を得て借用)

### 1-1-3 がん組織の pH 環境について

がんの組織は、正常組織とは異なる pH 環境に曝されていることも特徴のひとつである。無秩序な細胞増殖と、血管新生を繰り返すがん組織は、平均すると常に低酸素、低栄養状態であるといえる。また、血管が少ないために、代謝によって生み出される酸の排出が困難になり、組織中に酸性物質が蓄積される。こうした 2 重 3 重の悪環境に曝されたがんほど、悪性度が高くなっているという報告が多くある[9, 10]。

正常細胞、がん細胞問わず、各種酵素が適切に働くために、pH 環境の維持は重要である。しかし、栄養、酸素ともに豊富な環境にある正常細胞では、細胞質の pH はおよそ 7.4 に、保たれているのに対し、ある種のがん細胞では、細胞質の pH が、正常細胞よりも若干低くなっていることが報告されている[11, 12]。また、正常細胞では、リソソームの pH は約 5 付近に保たれているが、抗がん剤に対して抵抗性を獲得しているがん細胞では、正常細胞、もしくは抗がん剤に対して抵抗性を獲得していない細胞に比べてリソソームの pH が低くなっている[11, 13]。抗がん剤に対する抵抗性は、主に抗がん剤ががん細胞の酸性オルガネラにトラップされ、本来の毒性を失うことによってもたらされるものあり、リソソームなどの酸性オルガネラの pH 制御を阻害し、pH を中性方向へ変化させることにより、抗がん剤の本来の毒性が回復することがあることも知られている[11, 14]。さらに、腫瘍組織において、細胞外 pH が、7.4 よりも低くなっており、こうした細胞外 pH の低下が、がんの転移能と関係しているという報告もある[15, 16]。そのほかにも、乳酸のトランスポーターである、monocarboxylate transporter(MCT1)の発現が、がんのリスクに関係しているという報告もある[17]。がん細胞が、周囲の環境に適応し、異常増殖や浸潤を行うメカニズムのひとつとして、がん細胞がどのように pH を制御しているのかを解明することは、がん治療の点からみても、非常に意義深いことであるといえる。[15, 18-20]。

#### 1-1-4 栄養欠乏に対する適応応答と、シグナル伝達経路との関係について

細胞の、栄養環境への応答には、タンパク質のリン酸化や脱リン酸化を通じたシグナル伝達経路が関与することが知られている。まず、アミノ酸の欠乏に応答するシグナル系として、**mTOR(mammalian target of rapamycin)**を中心としたシグナル経路は、最もよく研究されている[21, 22]。アミノ酸が欠乏すると、**mTOR** と、その下流にある因子のリン酸化が抑制され、更に下流にある **p70S6K** のリン酸化が抑制されてタンパク質の翻訳が阻害される機構が働く。また、がん細胞のアミノ酸欠乏やグルコースの欠乏に応答するシグナル伝達系の変化として、当研究室は以前から、**Akt** のリン酸化を報告してきた[5, 7]。がん細胞では栄養状態が悪化すると、**Akt** のリン酸化が亢進し、下流の因子の活性を変化させることで、環境への適応応答を誘導すると考えられている[23]。グルコースの不足によって、**ATP** の量が減少し、**AMP** の量が増加することにより活性化が誘導される因子としては、**AMPK(AMP-activated protein kinase)**が上げられる。**AMPK** が活性化すると、**ATP** の消費が抑えられ、エネルギーを貯蓄する方向へと代謝が動く。また、**mTOR** は **Akt** の下流に位置し、**Akt** からのシグナルを受け取っていること、**AMPK** によって働きを抑制されること[24, 25]など、これまであげてきた因子間では、複雑な相互作用が働いていると考えられる。

アミノ酸欠乏によるタンパク質合成の停止や、グルコース欠乏による、正常な糖鎖付加ができなくなると、異常たんぱく質が蓄積することになる。この状態に対する細胞の反応を **Unfolded Protein Response(UPR)**あるいは **endoplasmic reticulum (ER)**ストレスと呼び、広く研究されている。細胞に備わっているオートファジーの機能は、主にタンパク質の素となるアミノ酸を得るために、細胞内外のタンパク質や組織をリソソームで分解することであると考えられてきたが、近年、**ER** ストレスに対する適応応答の一つとして、細胞がオートファジーを亢進させることも報告された。[26, 27]。また、前述の **mTOR** をはじめとする、種々のシグナルがオートファジーの働きに関係していることも報告されている[28, 29]。オートファジーが起こるには、リソソームの酵素が働くためにリソソーム内が酸性環境にならねばならない。これらをまとめると、栄養環境に対する適応応答とシグナル伝達経路、そしてリソソームの **pH** 制御には、密接なつながりがあることが考えられる。

#### 1-1-5 Kigamicin D の作用について

当研究室では、先に述べた栄養飢餓耐性を解除することにより、がん細胞の置かれた微小環境特異的に細胞毒性を示す化合物を、新規抗がん剤の候補として探索、同定してきた。**Kigamicin D** も、こうしたコンセプトの元に、放線菌の代謝産物から発見された栄養飢餓耐性解除作用を持つ化合物である[30, 31]。精製物は、黄色い結晶状で、水に難溶、**DMSO** に可溶である。これまでに、ヒトすい臓がん由来細胞株 **PANC-1** に対して、栄養欠乏培地(**NDM**)、グルコース欠乏培地特異的に殺細胞効果を示すこと、**Akt** リン酸化の抑制作用があること、ヌードマウスを用いた、*in vivo* のすい臓がん由来細胞による担がんモデル実験にて、抗腫瘍効果を示すことが報告されている[5]。しかし、その選択的な毒性をもたらすメカニズムについては、現在も研究中であり、さまざまな角度から解析が行われている。この **kigamicin D** の持つ選択毒性は、低酸素、低栄養環境に曝され、高い悪性度を示すがんに対する治療にとって、新しい可能性を秘めているといえる。**Kigamicin D** が、がん細胞の栄養欠乏環境に対するどの適応応答に対して働いているのかを探るため、栄養欠乏環境における細胞の応答と、**kigamicin D** 処理による変化を解析することは、極めて重要であるといえるだろう。

## 1-2 本研究の目的

先に述べたように、がん組織では、組織内、また細胞内の **pH** 環境が、正常組織、正常細胞のものと比べて低く保たれているという報告がある。また、がんの転移やリスクにも、酸の排出機構や、**pH** 調節機構が関わっているということがわかってきた。こうした中で、がん組織の環境を模倣し、環境に対するがん細胞の **pH** 応答を調べることは、がんの本質を探る手がかりになると考えられる。本研究では、特に、がん細胞内の酸性オルガネラの **pH** 環境を調べることによって、がん細胞の環境への適応応答を分析し、種々の栄養環境に対して生存するためのメカニズムを探ることを目的としている。

### 1-3 略語

2DG・・・2-Deoxy-D-Glucose

AICAR・・・5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- $\beta$ -D-ribofuranoside

AMPK・・・AMP-activated protein kinase

DMEM・・・Dulbecco's Modified Eagle's Medium

mTOR・・・mammalian Target Of Rapamycin

NDM・・・Nutrient Deprived Medium

TBST・・・0.01% Tween in TBS

v-ATPase・・・vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase

## 第二章

### 実験方法

#### 2-1 試薬

各試薬は以下の容量で調製、保存した。(購入時にすでに調製済みのものも含まれる)

LysoTracker® Red DND-99(invitrogen):1mM solution in DMSO、-20℃保存

BODIPY®FL C<sub>5</sub>-ceramide(invitrogen):1mM solution in water、15μl ずつ分注、-20℃保存

Hoechst33342(invitrogen):1mg/ml solution in water、遮光、4℃保存

LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160(invitrogen):1mM solution in DMSO、-20℃保存

Acridine Orange(SIGMA):10 μ g/ml solution in water、遮光、4℃保存

LY294002(Calbiochem):50mM solution in DMSO、-20℃保存

wortmannin(SIGMA):100 μ M solution in DMSO、遮光、-20℃保存

AICAR(BIOMOL):250mM solution in water、-20℃保存

rapamycin(SIGMA):50 μ M solution in DMSO、-20℃保存

Bafilomycin A1:100 μ M solution in DMSO、-20℃保存

Kigamicin D:100 μ g/ml solution in DMSO、遮光、-20℃保存

#### 2-2 細胞培養と各種培地

ヒトすい臓がん由来 PANC-1 細胞は American Type Culuture Collection より購入した。細胞は、25mM HEPES、10% fetal bovine serum(FBS、Tissue Culture Biologicals)、2% L-glutamine(SIGMA)、1% penicillin、1% streptomycin(SIGMA) を含み、pH7.4 に調整した Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM、ニッスイ) 中で、37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件で培養した。培地は 3 日ごとに交換し、コンフルエントになる前に細胞を継代した。インキュベーターは、通常培養には 5%CO<sub>2</sub>、95% 空気(O<sub>2</sub>:約 21%)に設定されているものを用いたが、低酸素環境での実験には、N<sub>2</sub> ガス置換により、1% O<sub>2</sub>に設定されているものを使用した。

また、栄養欠乏培地として、グルコース欠乏培地、アミノ酸欠乏培地を用意した。

グルコース欠乏培地は、pH7.4 に調整した DMEM-base(SIGMA) に透析済み FBS(Tissue Culture Biologicals)10%、L-glutamine を 2%、pyruvic acid・Na(SIGMA)を 1mM、penicillin・streptomycin 溶液を 1%、100×Non-essential amino acid(SIGMA)を 1×濃度となるように加えた。

アミノ酸欠乏培地は、CaCl<sub>2</sub>(2H<sub>2</sub>O):265mg/l、Fe(NO<sub>3</sub>)(9H<sub>2</sub>O):0.1mg/l、KCl:400mg/l、MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O):200mg/l、NaCl:6400mg/l、NaHCO<sub>3</sub>:700mg/l、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:125mg/l、phenol red:15mg/l、25mM HEPES buffer(pH7.4)、MEM vitamin solution(GIBCO) を加え、1L にし、pH を 7.4 に調整したものに、透析済み FBS を 10%、pyruvic acid・Na を 1mM、penicillin・streptomycin 溶液を 1%、D-Glucose を 1g/L となるように加えた。

シグナル伝達経路の解析、kigamicin D の作用解析には、上記の各種培地に、LY294002(Calbiochem) は終濃度 50 μ M、wortmannin(SIGMA) は終濃度 10 μ M、rapamycin(SIGMA)は終濃度 50nM、Kigamicin D は終濃度 0.1 μ g/ml となるように添加し、37℃で3時間培養した。また、AICAR(BIOMOL)は終濃度 250 μ M となるように培地に添加、

37℃で6時間培養した。

## 2-3 蛍光染色法による細胞内オルガネラの観察

細胞内オルガネラの局在分布を観察は、蛍光染色試薬を用いてリソソーム、ゴルジ体、核を染色し、蛍光顕微鏡で取得した画像を重ね合わせて行った。オルガネラ染色に用いた試薬は、リソソーム: LysoTracker® Red DND-99、ゴルジ体: BODIPY®FL C<sub>5</sub>-ceramide、核: Hoechst33342 である。

PANC-1 細胞  $1 \times 10^5$  個を  $\mu$ -Dish ibiTreat(日本ジェネティクス、径 35mm)に撒き、各種培地で 24 時間培養した。その後、まず LysoTracker を終濃度 50nM となるように培地に添加し、37℃で 1 時間処理した。次に、BODIPY を終濃度  $5 \mu\text{M}$  となるように 25mM HEPES(pH7.4)に添加したものを培地と交換し、4℃で 30 分処理した。その後、処理液を、各種培養用培地と交換し、37℃で 30 分培養した。その後、Hoechst33342 を終濃度  $5 \mu\text{M}$  となるように培地に添加し、37℃で 20 分処理した。最後に、培地を PBS(-)と交換し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。観察と解析にキーエンス BZ9000 蛍光顕微鏡システムを用いた。フィルターセットは、LysoTracker 用に TRITC 標準フィルター(Exciter:540nm、Emitter:605、Dichroicmirror:565nm)を、BODIPY 用に GFP-BP 標準フィルター(Exciter:470nm、Emitter:525nm、Dichroicmirror:495nm)を、Hoechst33342 用に DAPI-BP 標準フィルター(Exciter:360nm、Emitter:460nm、Dichroicmirror:400nm)を用い、100 倍の対物油浸レンズで観察した。

## 2-4 細胞内酸性オルガネラ pH の観察

細胞内オルガネラの pH を観察するため、pH 指示試薬を用いて酸性オルガネラを染色した。染色に用いた薬剤は、LysoSensor™Yellow/Blue DND-160 と、Acridine orange である。観察と解析には、キーエンス BZ9000 蛍光顕微鏡システムを用いた。

PANC-1 細胞  $1 \times 10^5$  個をプラスチックボトムディッシュ(日本ジェネティクス、径 35mm)に撒き、各種培地で 24 時間培養した。その後、LysoSensor は、終濃度  $1 \mu\text{M}$  となるように培地に添加し、37℃で 1 分間培養した後、培地を PBS(-)と交換し、pH6~8 を示す青色の蛍光を観察するために、DAPI-BP 標準フィルター、pH3~5 を示す黄色の蛍光を観察するためにフィルターセット (Exciter:XF1301.415.WB100、Emitter:XF3105.545.AF75、Dichroicmirror:XF2007.475.DCLP,Optoscience)を用いて 60 倍の対物油浸レンズで観察した。また、acridine orange は、終濃度  $6 \mu\text{M}$  となるように培地に添加し、37℃で 45 分間培養した後、細胞内で相対的に中性環境を示す緑色の蛍光を観察するために GFP-BP 標準フィルター、酸性環境を示す赤色の蛍光を観察するために TRITC 標準フィルターを使用し、40 倍の対物レンズで観察した。得られた画像について、BZ9000 システム解析アプリケーションを用いて、細胞 1 個ずつの青色(440nm)蛍光強度分布と黄色(540nm)蛍光強度分布を測定し、細胞あたりの黄色/青色比を求めて、細胞内 pH の相対値とした。それぞれの処理について、150 個以上の細胞について測定し、統計解析を行った。それぞれの処理間で得られた値について、



F 検定を行い集団の正規分布を調べた後、ステューデント t 検定、もしくはウェルチ t 検定を行い、有意差を求めた。P<0.001 を有意差ありとし、P<0.001 を\*で表した。

## 2-5 細胞抽出液の作成

PANC-1 細胞  $3.5 \times 10^5$  個を、6well ディッシュ(Corning)に撒き、24 時間培養後に、それぞれの実験に沿った処理を行った。その後培地を吸引除去した後 PBS(-)で細胞を一度洗い、100mM Tris-HCl(pH7.2)、100mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、10%SDS からなる Lysis buffer を 100℃にて 5 分間加熱したものをウェルに添加して、セルスクレイパーで回収した。回収した細胞抽出液を、100℃で 3 分間ボイルし、酵素反応を失活させた後、超音波破碎によってゲノム DNA を細断し、15,000rpm、10 分間遠心した上清を実験に用いた。回収した細胞抽出液は、BCA Protein Assay Kit For Protein Assays Using Bicinchoninic Acid(PIERCE)を用いてタンパク定量し、濃度を求めた。

## 2-6 SDS-PAGE 法

各サンプル 10  $\mu\text{g}$  の総タンパク質を 10% SDS ポリアクリルアミドゲル(濃縮ゲル:4%アクリルアミド、62.5mM Tris-HCl pH6.8、0.1% SDS、0.1% APS、0.1%TEMED、分離ゲル:10%アクリルアミド、1.5M Tris-HCl pH8.8、0.1% SDS、0.1% APS、0.075% TEMED)で電気泳動し、分離した。泳動は、泳動バッファー(25mM Tris-base、192mM Glycine、0.1%(w/v) SDS)を用い、濃縮用ゲルを 80V、分離用ゲルを 140V の定電圧で行った。その後、タンパク質を、セミドライトランスファー装置(ATTO)を用いて、転写バッファー(25mM Tris-base、190mM Glycine、20%(w/v) MeOH)で、PVDF メンブレン(MILLPORE)に転写した。トランスファー後、5%スキムミルク・2%BSA を含む TBST(0.01% Tween20 を含む TBS:20mM Tris-base、137mM NaCl を pH7.6 に調製し、オートクレーブ後室温で保存)で 2 時間室温にて振盪させながら、ブロッキングを行った。

## 2-7 Western blotting

各一次抗体は、5%BSA を含む TBST に 1000 倍希釈して調製し、振盪させながら 4℃で一晩反応させた。一次抗体処理後、メンブレンを TBST で 15 分、3 回洗った。二次抗体は、5%BSA を含む TBST に 2000 倍希釈して調製し、振盪させながら、室温で 1 時間反応させた。二次抗体処理後、再びメンブレンを TBST で 15 分×3 回洗い、ECL Western blotting Detection Reagents(GE Healthcare)を用いて発光後、X 線フィルムに感光させ、検出した。

なお、細胞抽出液中の Akt、リン酸化 Akt、リン酸化 p70S6K、リン酸化 AMPK を検出するために、一次抗体はそれぞれ、抗 Akt 抗体、抗 phospho-Akt(Ser473)抗体、抗 phospho-p70S6K(Thr389)抗体、抗 phospho-AMPK  $\alpha$  (Thr172)抗体、(以上 CellSignaling Technology)を、二次抗体は、ヤギ抗ウサギ IgG-HRP 抗体(Santa Cruz Biotechnology)を使用した。また、v-ATPase を検出するために、一次抗体は、抗 v-ATPase C1(N20)抗体(Santa Cruz

Biotechnology)を、二次抗体はロバ抗ヤギ IgG-HRP 抗体(Santa Cruz Biotechnology)を使用した。

## 2-8 WST-8 法による細胞生存率の測定

96well プレートに、PANC-1 細胞を  $1 \times 10^4$  cells/well ずつ撒き、24 時間後に、各種培地に交換し、Kigamicin D をそれぞれの濃度で 24 時間処理した。処理後、各ウェルを PBS(-)で洗い、DMEM 中に 10 倍希釈した WST-8 試薬(DOJINDO)100  $\mu$ l を各ウェル加え、37°C で 1 時間半インキュベートした後、マイクロプレートリーダー(SPECTRA MAX 190、日本モレキュラーデバイス)で吸光度 450nm を、650nm の吸光度を対照として測定した。Kigamicin D 処理していない細胞の吸光度を基準として各サンプルの吸光度の比を求め、生存率を求めた。

## 2-9 マウス肝臓／PANC-1 細胞からの細胞内オルガネラ膜画分の抽出

### 1) マウス肝臓からの細胞内オルガネラ膜画分の抽出

28 週齢の BALB C nu/nu マウス(SLC)の肝臓を摘出し、重さを測った。肝臓湿重量の 3 倍量の 250mM Sucrose、1mM EDTA を加え、氷上にて、ダウンス型のガラスホモジナイザーを使ってホモジナイズし、細胞を緩やかに破砕した。細胞破砕液を 400  $\mu$  m のナイロンメッシュにてフィルトレーションした後、8000g、4°C で 10 分間遠心した。上清を超遠心用チューブに移し、あらかじめ 4°C に冷却したローター(TLC100.3、BECKMAN)にセットし、超遠心機(Optima™TLX Ultracentrifuge、BECKMAN)で 200,000g、4°C で 30 分間超遠心した。上清を捨て、250mM Sucrose 6mM histidine(pH7.0)を加え、再度 200,000g、4°C で 30 分間超遠心した。沈殿物を 100 $\mu$ l の 10mM Tris-HCl、1mM EDTA(pH8.0)で懸濁して分注し、使用する時まで-80 度にて保存した。

### 2) PANC-1 細胞からの細胞内オルガネラ膜画分の抽出

PANC-1 細胞を 15cm ディッシュに撒き、グルコース欠乏培地で 24 時間培養した。Wash buffer(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、150mM NaCl(pH7.4))にて 3 回洗浄し、セルスクレイパーで細胞を回収した後、3 容積倍の 250mM Sucrose、1mM EDTA を加え、ホモジナイズした。以降はマウス肝臓抽出液と同様に処理した。

## 2-10 v-ATAPase 活性の測定

v-ATAPase の活性測定には、EnzCheck®Phosphate Assay Kit(invitrogen)を使用した。このキットでは、組織、細胞サンプルに含まれる ATPase の活性によって、反応液中の ATP から乖離した遊離リン酸により、PNP(purine nucleoside phosphorylase)を触媒として MESG(2-amino-6-mercapto-7-methylpurine riboside:最大吸光波長 330nm)を加リン酸分解し、これにより生成した 360nm に最大吸光波長持つ反応産物を測定する。各吸光度は、SPECTROPHOTOMETER(BECKMAN)にて測定した。

実験では、400 $\mu$ M ATP 入りの酵素反応液(200  $\mu$  M MESG、50mM Tris-HCl 1mM MgCl<sub>2</sub>、

pH7.5、100  $\mu$  M sodium azide、1U PNP)にあらかじめ kigamicin D もしくは Bafilomycin A1 を各濃度で加えて 980  $\mu$  l に調製したものに、v-ATAPase を含むマウス肝臓抽出液もしくは PANC-1 細胞抽出液 20  $\mu$  l を加えて、37°C で 30 分間インキュベートし、反応させた。その後基質を Abs 330nm にて、反応産物を Abs 360nm にて測定した。酵素活性は、OD360/330 を各サンプルの相対的な ATPase 活性として、片対数グラフ上にプロットした。

### 第三章

#### 結果

#### 3-1 培養環境の違いによる、細胞内酸性オルガネラ pH の変化

##### 3-1-1 アミノ酸欠乏培地

栄養飢餓耐性を持つヒトすい臓がん由来細胞株 PANC-1 を用い、通常培養に用いられる培地 (DMEM) および、DMEM の組成から栄養源となるグルコースまたはアミノ酸を除いた培地での細胞内酸性オルガネラの pH 変化を観察した。

細胞内酸性オルガネラの代表的なものとして、リソソームとゴルジ体があげられる。まず PANC-1 細胞におけるリソソーム、ゴルジ体の形態を確認するために、オルガネラ特異的に集積する蛍光試薬を添加し、蛍光顕微鏡で観察した。

ゴルジ体は細胞質の核周辺部に強く局在していた。一方リソソームは細胞質全体に広く顆粒状に分布しており、局在の違いから、これら二つのオルガネラを識別することは容易だった (Fig.1)。

次に生細胞のリソソーム、ゴルジ体にとりこまれ、オルガネラ内の pH によって蛍光波長が変化する指示試薬、LysoSensor Yellow/Blue DND-160 (以下 LysoSensor) を用い、オルガネラ pH の評価を行った。LysoSensor は周囲の pH が 3~5 の酸性の時には 540nm にピークを持ち黄色の蛍光を発し、一方 pH6~8 の弱酸性から中性環境では、450nm にピークを持つ青色の蛍光を発する。およそ pH5~6 のオルガネラは、重ね合わせ像で黄色と青色の重なった白色像として観察される。また、細胞内の黄色/青色蛍光強度の比を求めることにより、各々の細胞におけるオルガネラ pH 環境を定量的に評価することができる。

DMEM 中で培養した細胞では、ゴルジ体に相当する核周辺部に強い黄色の蛍光の集積が見られたが、リソソームの黄色傾向は軽微だった (Fig.2A)。青色の蛍光は、細胞質全般に広く分布していた (Fig.2B)。両者の重ねあわせ像では、ゴルジ体が白色となり、リソソームは青色に描出された (Fig.2C)。

一方、アミノ酸欠乏培地で 24 時間培養した細胞では、ゴルジ体の黄色 (Fig.2D)、青色の蛍光像 (Fig.2 E)、重ね合わせ像 (Fig.2F) は、DMEM 中と大きな違いはなかったが、細胞質の顆粒状の黄色の蛍光染色像が著明に認められ (Fig.2D)、重ね合わせ像でも明らかな黄色の領域として観察され (Fig.2 F)、リソソーム内の pH がより酸性に変化していると考えられた。

以上の結果を細胞 1 個ずつの黄色/青色比により定量化した。各々の培養条件で 150 個以上の細胞を用いたところ、黄色/青色比は DMEM で  $0.65 \pm 0.22$ 、アミノ酸欠乏培地で  $1.55 \pm 0.63$  と、有意差 ( $P < 0.001$ ) をもって、アミノ酸欠乏培地で高くなっており、細胞内オルガネラの pH が酸性に変化していることが明らかとなった (Fig.3)。

##### 3-1-2 グルコース欠乏培地

グルコース欠乏がオルガネラ pH に及ぼす影響を確認するために、PANC-1 細胞を、グルコース欠乏培地、またはグルコースの代謝を阻害する 2-Deoxy-D-Glucose (2DG) を DMEM に加えた培地で 24 時間培養し、酸性オルガネラの pH 変化を観察した。3-1-1 で述べた方法と同様に、LysoSensor による染色と、蛍光像を元にした定量化を行った。

3-1-1 で示したとおり、DMEM 中ではゴルジ体は白色の酸性領域、リソソームは青色の中性領域として描出された(Fig.4A-C)。

グルコース欠乏培地で 24 時間培養した細胞では、ゴルジ体の黄色(Fig.4D)、青色の蛍光像(Fig.4E)、両者の重ね合わせ像(Fig.4F)は、DMEM 中と大きな違いはなかったが、細胞質の顆粒状の黄色の蛍光染色像が著明に認められ(Fig.4D)、重ねあわせ像でも明らかな黄色領域として観察され(Fig.4F)、リソソーム内の pH が強い酸性に変化していると考えられた。

DMEM に 2DG を添加した培地で 24 時間培養した細胞でも、ゴルジ体の黄色(Fig.4G)、青色の蛍光像(Fig.4H)、両者の重ね合わせ像(Fig.4I)は、DMEM 中と大きな差は無かったが、細胞質の顆粒状の黄色の蛍光染色像が著明に認められ(Fig.4G)、重ねあわせ像でも明らかな黄色領域として観察され(Fig.4I)、グルコース欠乏培地中と同様リソソーム内の pH が強い酸性に変化していると考えられた。

以上の結果を細胞 1 個ずつの黄色/青色比により定量化した。各々の培養条件で 150 個以上の細胞を用いたところ、黄色/青色比は DMEM で  $0.65 \pm 0.22$ 、グルコース欠乏培地で  $1.19 \pm 0.45$ 、DMEM に 2DG を添加した培地で  $1.33 \pm 0.28$  と、有意差( $P < 0.01$ )をもって、グルコース欠乏培地、DMEM に 2DG を添加した培地で高く、細胞内オルガネラの pH が酸性に変化していることが明らかとなった(Fig.5)。

### 3-1-3 低酸素条件

低酸素環境がオルガネラ pH に及ぼす影響を確認するために、PANC-1 細胞を、DMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地の 3 種類の培地に撒き、それぞれ通常酸素濃度(21%酸素)もしくは低酸素濃度(1%酸素)に設定されたインキュベータ内で 24 時間培養し、酸性オルガネラの pH 変化を観察した。3-1-1 で述べた方法と同様に、LysoSensor による染色と、蛍光像を元にした定量化を行った。

通常酸素環境では、DMEM でゴルジ体部分に白色の蛍光が、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地では、細胞質に顆粒状の黄色の蛍光が著明に認められるのに対し(Fig.6A-C)、低酸素環境では、DMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地いずれにおいても、ゴルジ体には黄色と青色の蛍光の重なりである、白色像として描出されたが、細胞質の顆粒状の黄色い蛍光はほとんど増加しなかった(Fig.6 D,E,F)。

以上の結果を、細胞 1 個ずつの黄色/青色比により定量化した。通常酸素環境においた細胞と、低酸素環境においた細胞の黄色/青色比は、DMEM で、通常酸素環境が  $0.65 \pm 0.22$ 、低酸素環境が  $0.61 \pm 0.19$ 、アミノ酸欠乏培地で、通常酸素環境が  $1.55 \pm 0.63$ 、低酸素環境が  $0.67 \pm 0.16$ 、グルコース欠乏培地で、通常酸素環境が  $1.19 \pm 0.45$ 、低酸素環境が  $0.83 \pm 0.20$  となり、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地で誘導される細胞内オルガネラの酸性への変化が、低酸素環境では減弱していることが示された(Fig.7)。

## 3-2 シグナル伝達経路と細胞内酸性オルガネラ pH 変化との関係

### 3-2-1 各種培地におけるシグナルの変化

栄養欠乏により引き起こされるシグナル伝達系の変化と、細胞内酸性オルガネラ pH 変化の関連を検討した。まず、DMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地、DMEM に 2DG を添加した培地で 24 時間培養した PANC-1 細胞における Akt、p70S6K、AMPK のリン酸化を western blotting によって調べた。

Akt が活性化したときに亢進する 473 番目のセリン残基のリン酸化は、DMEM(Fig.8 Lane2)と比較して、アミノ酸欠乏培地(Fig.8 Lane3)、グルコース欠乏培地(Fig.8 Lane4)、DMEM に 2DG を添加した培地(Fig.8 Lane5)で培養した細胞で亢進していた。一方、活性型 p70S6K を示す 389 番目のスレオニン残基のリン酸化は、アミノ酸欠乏培地(Fig.8 Lane3)ではほぼ完全に抑制されており、グルコース欠乏培地(Fig.8 Lane4)、DMEM に 2DG を添加した培地(Fig.8 Lane5)でも、DMEM(Fig.8 Lane2)と比較して抑制されていた。活性型 AMPK を示す 172 番目のスレオニン残基のリン酸化は、グルコース欠乏培地(Fig.8 Lane4)、DMEM に 2DG を添加した培地(Fig.8 Lane5)で亢進されていた。

### 3-2-2 Akt シグナル系

Akt の活性化が、オルガネラ pH の制御に関与しているかを確認するために、Akt の上流で活性化を制御している PI3K を阻害したときの pH 変化を観察した。まず PI3K の阻害剤、LY294002 と wortmannin を処理した細胞の抽出液を用いて、リン酸化 Akt の western blotting を行った。LY294002、wortmannin により、DMEM で見られる基礎量の Akt、p70S6K のリン酸化は抑制された(Fig.9 Lane2,5,8)。アミノ酸欠乏により誘導された Akt のリン酸化も、LY294002、wortmannin 処理により抑制されたが、アミノ酸欠乏によって抑制されていた p70S6K のリン酸化状態にも変化はなかった(Fig.9 Lane3,6,9)。また、グルコース欠乏培地で亢進していた Akt のリン酸化も、LY294002、wortmannin 処理で抑制され、p70S6K のリン酸化も減弱していた(Fig.9 Lane4,7,10)。また、DMEM 中で見られる基礎量の AMPK のリン酸化と比べて、LY294002、wortmannin 処理では亢進が見られた(Fig.9 Lane2,5,8)。AMPK のリン酸化のアミノ酸欠乏培地での比較(Fig.9 Lane3,6,9)、グルコース欠乏培地での比較(Fig.9 Lane4,7,10)では、コントロールと LY294002、wortmannin 処理の間に明確な差は認められなかった。

次に、LysoSensor を用いて各条件でのオルガネラ pH の観察を行い、蛍光像を元にした定量化を行った。

DMSO を加えたコントロールでは、DMEM ではゴルジ体部分に白い蛍光が見られた(Fig.10A)。また、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地では細胞質に顆粒状の黄色の蛍光が見られた(Fig.10B,C)。一方、LY294002 を処理した細胞では、DMEM においても、顆粒状の黄色の蛍光が増加していた(Fig.10D)。また、アミノ酸欠乏培地(Fig.10E)、グルコース欠乏培地(Fig.10F)でも、コントロールと同様の顆粒状の黄色の蛍光が著明に観察された。wortmannin を処理した細胞の染色像でも、DMEM において、顆粒状の黄色の蛍光の増加が観察された(Fig.10G)がアミノ酸欠乏培地(Fig.10H)、グルコース欠乏培地(Fig.10I)では、顆粒状の黄色の蛍光の粒が大きくなっていた。

以上の結果を、細胞 1 個ずつの黄色/青色比により定量化した。DMEM で、コントロールが

0.56±0.21、LY294002 処理が 1.06±0.30、wortmannin 処理が 1.16±0.31 となり、LY294002、wortmannin 処理によって、細胞内オルガネラの pH が有意差をもって低下していた。また、アミノ酸欠乏培地では、コントロールと薬剤処理群との間に差は認められなかった。また、グルコース欠乏培地では、コントロールと比較して、wortmannin 処理では、有意差をもって pH の低下が認められた。LY294002 処理では、コントロールと比較して平均値は増加しているものの、統計学的な有意差は認められなかった。(Fig.11)

### 3-2-3 AMPK シグナル系

AMPK の活性が細胞内酸性オルガネラの pH 制御に関与しているかどうかを確認するために、AMPK の活性化剤である、AICAR(5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-β-D-ribofuranoside) を処理したときの pH 変化を観察した。まず、薬剤の効果を確認するために、AICAR を処理した細胞の抽出液を用いて western blotting を行った。DMEM の基礎量のリン酸化 AMPK(Fig.12 Lane2)と比較して、AICAR を処理した細胞では、DMEM 中で、AMPK のリン酸化がわずかに亢進していた(Fig.12 Lane5)。また、アミノ酸欠乏培地でも、コントロールのリン酸化 AMPK 量(Fig.12 Lane3)と比較して、AICAR 処理によって AMPK のリン酸化が亢進していた(Fig.12 Lane6)。グルコース欠乏培地での比較(Fig.12 Lane4,7)では、AICAR 処理による変化は見られなかった。

Akt のリン酸化については、アミノ酸欠乏培地中でコントロール(Fig.12 Lane3)と比較すると、AICAR 処理では僅かにリン酸化の亢進が見られた(Fig.12 Lane8)。DMEM での比較(Fig.12 Lane2,5)、グルコース欠乏培地での比較(Fig.12 Lane4,7)では、明確な差は見られなかった(Fig.12)。また、p70S6K のリン酸化は、それぞれの培地でのコントロールと比較して(Fig.12 Lane2,3,4)、AICAR 処理による変化は見られなかった(Fig.12 Lane5,6,7)。

次に、LysoSensor を用いて各条件でのオルガネラ pH の観察を行い、蛍光像を元にした定量化を行った。

コントロールの細胞の染色像では、DMEM でゴルジ体に白色蛍光が観察され、リソソームには青色蛍光が見られた(Fig.13A)。また、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地では、顆粒状の黄色の蛍光が細胞質に広く分布していた(Fig.13B,C)。一方 AICAR を処理した細胞は、DMEM 中で顆粒状の黄色の蛍光が増加していた(Fig.13D)。また、アミノ酸欠乏培地はコントロールと同程度の(Fig.13E)、グルコース欠乏培地では、コントロールよりも多くの顆粒状の黄色の蛍光が観察された(Fig.13F)。

以上の結果を、細胞 1 個ずつの黄色/青色比により定量化した。DMEM では、コントロールが 0.59±0.17、AICAR を処理した細胞では 1.50±0.17 となり、有意差を持って細胞内オルガネラの pH の低下が認められた。アミノ酸欠乏培地では、コントロールが 1.30±0.28、AICAR を処理した細胞が 1.34±0.30 となり、差は見られなかった。また、グルコース欠乏培地では、コントロールが 1.20±0.24、AICAR を処理した細胞が 1.63±0.23 となり、有意差をもってオルガネラ pH の低下が認められた(Fig.14)。

### 3-2-4 mTOR シグナル系

AMPK や Akt 下流で制御をうける mTOR の活性が、細胞内酸性オルガネラの pH 制御に関与しているか確認するために、mTOR の阻害剤である rapamycin を処理し、酸性オルガネラ pH を観察した。まず、阻害剤の効果を確かめるために、rapamycin 処理を行った細胞抽出液を用いて western blotting を行った。Akt のリン酸化については、DMEM での比較(Fig.15 Lane2,5)、アミノ酸欠乏培地での比較(Fig.15 Lane3,6)、グルコース欠乏培地での比較(Fig.15 Lane4,7)で、コントロールと rapamycin 処理の間に明確な差は見られなかった。P70S6K のリン酸化については、DMEM で確認された p70S6K のリン酸化を rapamycin が抑制していた(Fig.15 Lane2,5)。また、グルコース欠乏培地で存在していたリン酸化 p70S6K も、rapamycin 処理によって抑制された(Fig.15 Lane4,7)。AMPK のリン酸化は、DMEM での基礎量と rapamycin 処理細胞とを比較すると(Fig.15 Lane2,5)、rapamycin 処理により亢進が見られた。

次に、LysoSensor を用いて、rapamycin 処理時のオルガネラ pH の観察を行い、蛍光像を元にした定量化を行った。

DMSO を加えたコントロールでは、DMEM ではゴルジ体に白い蛍光が見られ、リソソームは青色蛍光像であった(Fig.16A)。また、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地では細胞質に顆粒状の黄色の蛍光が見られた(Fig.16B,C)。一方、rapamycin を処理した細胞では、DMEM において、顆粒状の黄色い蛍光が増加していた(Fig.16D)。アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地では、コントロールと同様に、細胞質に顆粒状の黄色の蛍光が見られた(Fig.16E,F)。

以上の結果を、細胞 1 個ずつの黄色/青色比により定量化した。DMEM で、コントロールが  $0.56 \pm 0.21$ 、rapamycin を処理した細胞は  $0.85 \pm 0.22$  となり、統計学的に有意に細胞内オルガネラが酸性に変化した。アミノ酸欠乏培地では、rapamycin を処理した細胞で、黄色/青色比が低下していたが、統計学的な有意差は認められなかった。また、グルコース欠乏培地では、両者の間に差は認められなかった(Fig.17)。

## 3-3 Kigamicin D 処理による、細胞内酸性オルガネラ pH への影響

### 3-3-1 各栄養培地での kigamicin D 処理による細胞生存率

Kigamicin D は栄養飢餓に対する耐性を解除する化合物として同定された。各種栄養条件の異なる培地で 24 時間処理したときの細胞生存率を、WST-8 法によって測定した。DMEM、アミノ酸欠乏培地では  $IC_{50}$  がおよそ  $0.1 \mu g/ml$  なのに対し、グルコース欠乏培地、アミノ酸とグルコースが共に欠乏している栄養欠乏培地(NDM)では  $IC_{50}$  がおよそ  $0.01 \mu g/ml$  となった(Fig.18)。

Kigamicin D 処理による Akt、p70S6K、AMPK のリン酸化の変化について western blotting により確認した。DMEM 中で見られる基礎量の Akt のリン酸化は Kigamicin D 処理により、僅かに亢進していた(Fig.19 Lane2,5)。アミノ酸で見られる Akt のリン酸化は、kigamicin D 処理をしても変化がなかった(Fig.19 Lane3,6)。グルコースで見られる Akt のリン酸化は kigamicin D 処理により、完全に抑制されていた(Fig.19 Lane4,7)。P70S6K のリン酸化については、DMEM で見られた基礎量に対し、kigamicin D 処理では、僅かに減弱していた(Fig.19 Lane2,5)。また、グルコース欠乏培地で見られた p70S6K のリン酸化は、kigamicin D 処理によって抑制されていた(Fig.19 Lane4,7)。AMPK のリン酸化は、コントロールの各培地(Fig.19



Lane2-4)に対して、kigamicin D 処理では、どの培地においても著明に亢進されており (Fig.19 Lane5-7)、特にグルコース欠乏培地での亢進が顕著だった (Fig.19 Lane7)。

### 3-3-2 各栄養培地での細胞内酸性オルガネラ pH への影響

LysoSensor を用いて、各培地中で kigamicin D を処理したときの、細胞内オルガネラの pH 変化を観察した。DMSO を加えたコントロール (Fig.20A,B,C) に対し、kigamicin D 処理を行った細胞では、DMEM ではコントロールと同様に、ゴルジ体に白色の蛍光が、リソソームに青色の蛍光が描出され (Fig.20D) た。一方アミノ酸欠乏培地では、コントロールで見られた顆粒状の黄色の蛍光が減少した (Fig.20E)。また、グルコース欠乏培地においてもコントロールで見られた顆粒状の黄色い蛍光が、著明に減少した (Fig.20F)。

以上の結果を、細胞 1 個ずつの黄色/青色比により定量化した。DMEM では、コントロールとの間に差は見られなかったが、アミノ酸欠乏培地では、コントロールが  $1.76 \pm 0.55$ 、kigamicin D 処理を行った細胞が  $1.07 \pm 0.47$ 、グルコース欠乏培地では、コントロールが  $1.30 \pm 0.59$ 、kigamicin D 処理細胞が、 $0.64 \pm 0.34$  と、有意差をもって pH が中性方向へと変化していた (Fig.21)。

### 3-3-3 グルコース濃度に依存した kigamicin D の効果

3-2-2 で観察された、kigamicin D が持つ、栄養環境に対する細胞内酸性オルガネラ pH の適応応答を解除する働きが、グルコースの濃度に依存しているか確認した。グルコース濃度を通常培地と同等の 1g/L から段階的に希釈し、0.1g/L、0.01g/L および、グルコースを含まない培地での kigamicin D の効果を検討した。

DMSO を加えたコントロールでは、培地内のグルコース濃度が減少するにつれて細胞内の顆粒状の黄色の蛍光が増加していた (Fig.22 上段)。しかし、kigamicin D を処理した細胞では、顆粒状の黄色の蛍光の増加は見られなかった (Fig.22 中段)。また acridine orange の染色像では、pH6.4 以下で酸性度が高いオルガネラに局在し、pH が周囲と相対的に下がっていることを示す赤い蛍光が、グルコース濃度が下がるにつれて減少していった (Fig.22 下段)。

LysoSensor 染色による結果を元に、細胞 1 個ずつの黄色/青色比の定量化を行った。コントロールでは、グルコース濃度が低下するにしたがって増加していた Y/B 比が、kigamicin D 処理細胞では、増加しなかった (Fig.23)。

### 3-3-4 v-ATPase への作用

細胞内酸性オルガネラ pH を制御している、v-ATPase に対する kigamicin D の効果を、調べた。マウス肝臓、もしくはグルコース欠乏培地にて 24 時間培養した PANC-1 細胞から抽出した細胞内オルガネラ膜画分内に v-ATPase が含まれていることを、western blotting によって確認した (Fig.24)。

この抽出液を用い、kigamicin D が v-ATPase 活性に及ぼす影響を、v-ATPase の阻害剤とし

て知られる Bafilomycin A1 と比較して検討した。

Bafilomycin A1 の v-ATPase 阻害と、オルガネラ pH 制御への影響を確認するために、グルコース欠乏培地に Bafilomycin A1 100nM を加え、3 時間後に LysoSensor および acridine orange で染色した。コントロールでは LysoSensor 染色による酸性環境を示す黄色の蛍光 (Fig.25A) と、acridine orange 染色による、酸性環境を示す赤の蛍光 (Fig.25B) が観察されたのに対し、Bafilomycin A1 処理細胞の染色像では、LysoSensor、acridine orange どちらの染色像でも、酸性環境を示す蛍光が減少し、オルガネラが中性方向へと変化していることを示した (Fig.25C,D)。

マウス肝臓からの細胞内オルガネラ膜分画を用いた系では、Bafilomycin A1 は、100nM まで濃度依存的に ATPase 活性を阻害した。一方、kigamicin D の効果は、細胞内酸性オルガネラ pH 観察に使用した 0.1g/ml の濃度でも、Bafilomycin A1 の阻害効果の約 40% の効果しか示さなかった (Fig.26A)。次に、グルコース欠乏培地にて 24 時間培養した PANC-1 細胞からの細胞内オルガネラ膜分画を用いた系では、Bafilomycin A1 が 10nM から顕著な阻害効果を示すのに対し、kigamicin D は、細胞内酸性オルガネラ pH 変化が確認された 0.1  $\mu$ g/ml の処理でも v-ATPase に対する阻害効果は認められなかった (Fig.26B)。

## 第四章

### 考察

本研究では、栄養飢餓耐性を持つがん細胞が、培地の栄養環境によってどのような応答を示すのか、また、そうした応答が持つ生物学的な意味を明らかにするために、細胞内酸性オルガネラ pH 制御という観点から研究を行った。

実験の結果、アミノ酸、グルコースなどの栄養源が枯渇、もしくは利用不可になるとき、細胞内酸性オルガネラ、特にリソソームの pH がより低下しているということが示された。

がん細胞だけでなく、正常細胞でも、アミノ酸が不足したときの反応として、オートファジーが働くことが知られている[32]。これは、細胞内外の古くなった組織やタンパク質、ミトコンドリアを分解することによって、タンパク質の素となるアミノ酸を得るという応答である。分解する組織を包んだオートファゴソームがリソソームと融合してオートソームを形成し、リソソーム内の酵素の働きによって細胞内小器官やタンパク質などの構成成分が分解される[33-36]。

また、細胞がアミノ酸欠乏環境やグルコース欠乏環境に曝されると、正常なタンパク構成や糖鎖付加が阻害され、異常タンパクが蓄積することにより、ER ストレスが増加する[37]。ER ストレスに対する応答はいくつかの系が知られているが、その中のひとつに、オートファジーを誘導するという系が報告されている[27]。リソソーム内の加水分解酵素は酸性環境で活性を示し、中性では不活化することから、オートファジーが盛んなときには、オートソームの pH も低下していることが予想される。アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地で見られた細胞内酸性オルガネラ pH の低下は、栄養飢餓耐性を持つがん細胞が、オートファジーを利用して、長時間の栄養欠乏に耐えていることを示唆している可能性がある[38]。

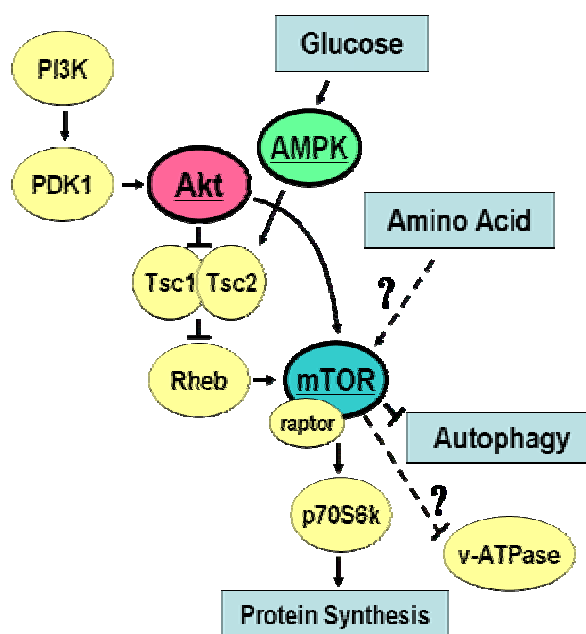
低酸素環境では、培地の栄養欠乏による細胞内酸性オルガネラの pH 低下が観察されなかった。これは、もともと、栄養飢餓耐性を持つがん細胞は、血流が乏しい環境で生存するという性質を獲得していることと関係しているのかもしれない。すなわち、血流不足により、細胞内で発生する酸を効率良く逃がすことができなくなることに対する適応応答を獲得していると考えられる。低酸素環境では、遺伝子発現や、代謝経路が異なってくるため[39, 40]、不必要な酸を細胞質に留めない働きや、酸の生成そのものに関する働きが変化している可能性が考えられる。今回得られた通常酸素濃度での、栄養欠乏培地におけるオルガネラ pH の低下は、本来低酸素、低栄養環境にあるがん細胞が獲得している pH 調節機構が働かず、細胞質が過剰に酸性になることを避けるために、酸性オルガネラ内に不要なプロトンを隔離した結果であるとも考えられる。低酸素かつ、各種栄養欠乏環境こそ、実際のがん組織をよく模倣した形であると言えため、こうした環境下でのオルガネラ pH 制御が持つ生理的な意義の検討は、未知のエネルギー代謝など、未知の適応応答の存在を示唆していると考えられるが、今後の課題としたい。

次に、シグナル伝達経路と、細胞内酸性オルガネラ pH 変化との関係を探るために、各種阻害剤や活性化剤を用いた際のオルガネラ pH の観察と解析を行った。各培地と薬剤処理時の主だった変化を表にまとめると、以下のようになる。

Table1 リン酸化により示唆されるシグナル伝達分子の活性と pH 変化

AA(-)	Glc(-)	DMEM+PI3K inhibior	DMEM+ AICAR	DMEM+ rapamycin
Akt	Akt	Akt	Akt	Akt
AMPK	AMPK	AMPK	AMPK	AMPK
mTOR	mTOR	mTOR	mTOR	mTOR
pH	pH	pH	pH	pH

アミノ酸欠乏、グルコース欠乏状態では Akt のリン酸化が亢進する。このリン酸化の亢進が、栄養欠乏の認識に関与しているのではないかと考え PI3K 阻害剤を処理した。当初の予想では、PI3K 阻害剤処理によって、細胞内酸性オルガネラ pH の低下が抑制されると考えていたが、結果は Akt リン酸化が顕著に抑制されていたにもかかわらず、DMEM 中でのオルガネラ pH が低下した。インスリンや、成長因子の刺激による PI3K から Akt を通るシグナル伝達系では、Akt の下流にある mTOR、p70S6K のリン酸化も亢進され、タンパク合成が行われる。アミノ酸欠乏、グルコース欠乏環境での Akt リン酸化亢進が、この PI3K 経路と同様の反応を示すものかどうかを確認するために、mTOR の活性をはかる指標として p70S6K のリン酸化を確認したところ、抑制が見られた。また、PI3K 阻害剤処理によっても、p70S6K リン酸化抑制が得られたことから、アミノ酸欠乏、グルコース欠乏に関する認識は、Akt より下流で行われているのではないかと考えた。そこで、次に mTOR の選択的阻害剤である rapamycin を処理し、オルガネラ pH の観察を行ったところ、rapamycin 処理によって、DMEM 中でも顕著なオルガネラ pH の低下が観察された。このことから、Akt より下流で、mTOR に作用する何らかの因子によって、栄養欠乏が認識されているのではないかと考えられた。次に、グルコース欠乏環境では、AMPK のリン酸化が亢進していたので、AMPK のリン酸化亢進とオルガネラ pH 変化との関係を調べた。AMPK 活性化剤である AICAR を処理した際に、DMEM 中でのオルガネラ pH の低下が観察されたことから、AMPK のリン酸化亢進はグルコース栄養欠乏の認識に関与していると考えられた。



アミノ酸欠乏環境では、p70S6K のリン酸化抑制は見られたものの、AMPK のリン酸化の亢進は見られていない。よって、アミノ酸欠乏の認識は、AMPK とは異なる因子によって行われていると考えられる。p70S6K のリン酸化が抑制されていたことから、グルコース欠乏時と同様に、mTOR の活性化に関与する何らかの因子によって認識が行われている可能性が高い。一つの例としては、Akt の下流で、mTOR の活性を制御している因子に Rheb が知られている。アミノ酸欠乏によって、Rheb と mTOR の結合が抑制され、mTOR が不活化した結果、オルガネラ内の pH が低下したという可能性も示唆された。また、前述した

ように、mTOR の不活化は、オートファジーを誘導することが知られている。栄養欠乏を認識する因子によって、mTOR が不活化し、酸性オルガネラ(主にリソソーム)の pH を低下させることにより、オートファジーを誘導しているという可能性が示唆された。(概略を右図に示す。)

Kigamicin D は、PANC-1 細胞に対し、グルコース欠乏時に選択的な細胞毒性を示すと共に、栄養欠乏時のオルガネラ pH の低下を解除した。しかし、このときのシグナル伝達分子の活性を見ると、オルガネラ pH の低下によく関連していた上述の AMPK の活性化、mTOR の抑制は阻害されていなかった。このことから、kigamicin D は、AMPK や mTOR より下流で、より直接的にリソソームの pH 環境を制御する機構に作用しているのではないかと考えた。v-ATPase は、リソソーム膜上にあり、リソソームの pH を制御する主要なプロトンポンプである。v-ATPase の阻害剤である Bafilomycin A1 は、グルコース欠乏により誘導されるリソソームの pH 低下を顕著に抑制すると共に、マウス肝臓および PANC-1 細胞のミクロソーム画分の ATPase 活性を *in vitro* で阻害することができた。同様の実験を、kigamicin D について行ったが、明らかな ATPase の抑制効果は見られなかった。Kigamicin D の標的が v-ATPase 以外にあるのか、あるいは *in vitro* のアッセイ系では再現できない別の因子の助けを借りて pH 制御を行っているのか、今後の検討で明らかにする必要がある。

今回示してはいないが、Bafilomycin A1 による、細胞内オルガネラ pH 制御の阻害のみではグルコース欠乏培地において、選択的な毒性は得られていない。しかし、Bafilomycin A1 の過剰投与により、グルコース欠乏培地で選択的な毒性が現れるという予備的なデータを得ることができた。また、Bafilomycin A1 は高濃度でカリウムの流入を阻害する作用が報告されていることから [41]、kigamicin D にも同様の作用があるかどうかについて、検討していく予定である。

序論にも述べたように、低酸素、低栄養環境という、正常組織とは異なる環境に曝されたがん細胞に特異的な殺細胞効果を示す薬剤の開発は、今後のがん治療にとって大変重要である。がん細胞が獲得している、正常細胞には無い環境適応能力を逆手に取り、薬剤の届きにくい部位にあるがん細胞を淘汰するためにも、より正確に、実際の組織を模倣した環境でがん細胞がどのような応答を示しているかについて探る必要がある。またそのメカニズムを解明し、がん細胞の生存に関わる決定的な応答を特定するために、kigamicin D をはじめとする各種栄養飢餓耐性解除薬はとてもよい材料になる。今後とも、環境に対する細胞の適応応答と、栄養飢餓耐性解除薬の作用解析の双方から研究を進めていく必要がある。

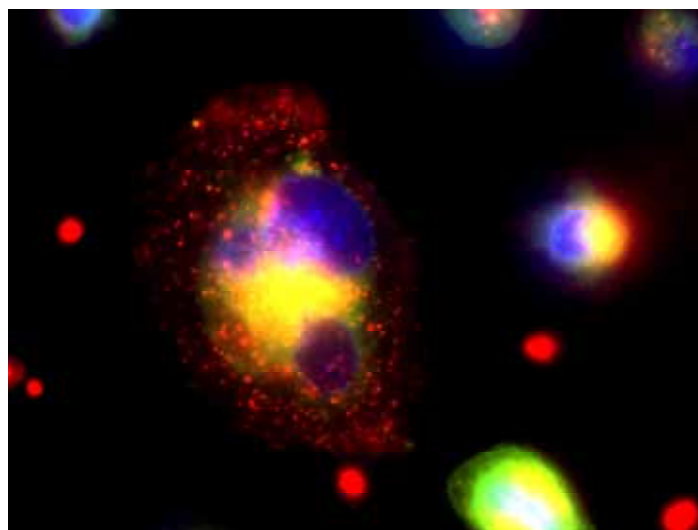


Fig.1 細胞内酸性オルガネラの分布

細胞内酸性オルガネラの分布を、オルガネラ特異的な蛍光染色によって調べた。赤い蛍光は、LysoTracker Red DND-99によるリソソーム染色像を、緑はBODIPY FL C<sub>5</sub>-ceramideによるゴルジ体染色を、青はhoechst33342による核の染色を示している。細胞質中で、ゴルジ体は核の周囲に局在し、リソソームは細胞全体に広く顆粒状に分布していた。

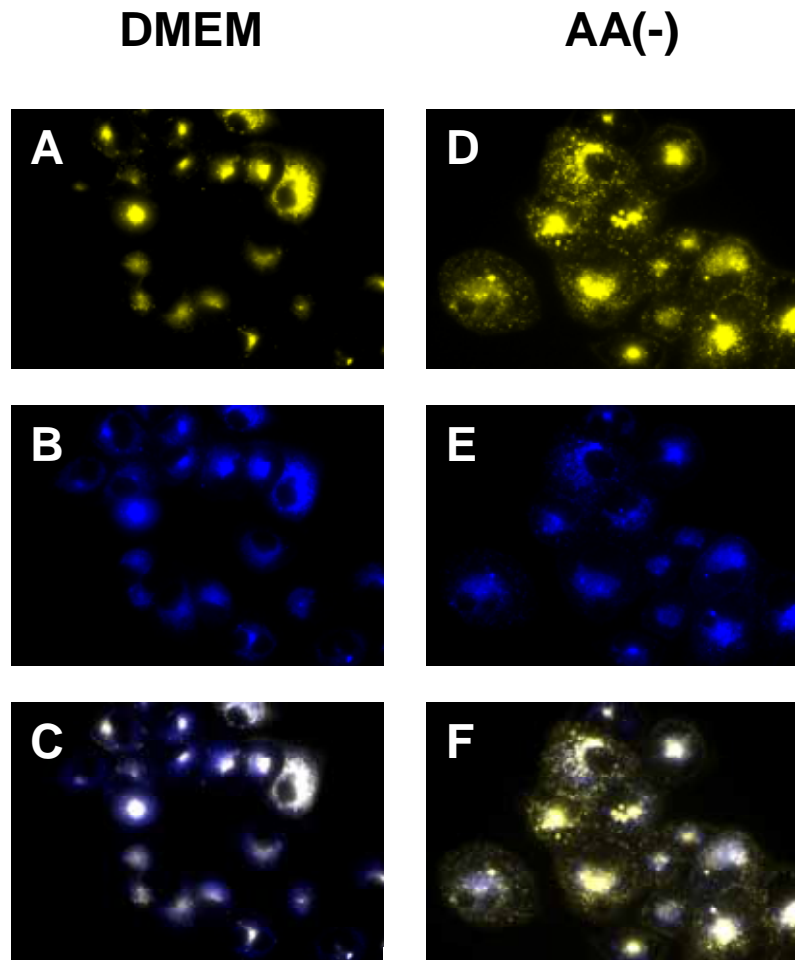


Fig.2 DMEMとアミノ酸欠乏培地中での細胞内オルガネラpHの変化

PANC-1細胞をDMEMまたはアミノ酸欠乏培地中で24時間培養した後、LysoSensor Yellow/Blue DND-160を用いて酸性オルガネラを染色した。pH3で540nm(黄色)、pH9で440nm(青色)の蛍光を示し、pH5付近では、両者のレシオを取ることで、白色で観察される試薬である。A、B、CはDMEMで培養した細胞の染色像、D、E、Fはアミノ酸欠乏培地で培養した細胞の染色像を示す。また、A、DはpH3-5を示す黄色の蛍光像、B、EはpH6-8の弱酸性～中性を示す青色の蛍光像、C、Fは2つの重ね合わせた像である。アミノ酸欠乏培地で培養した細胞では、細胞質中に広く顆粒状の黄色の蛍光が分布していた。

AA(-):アミノ酸欠乏培地

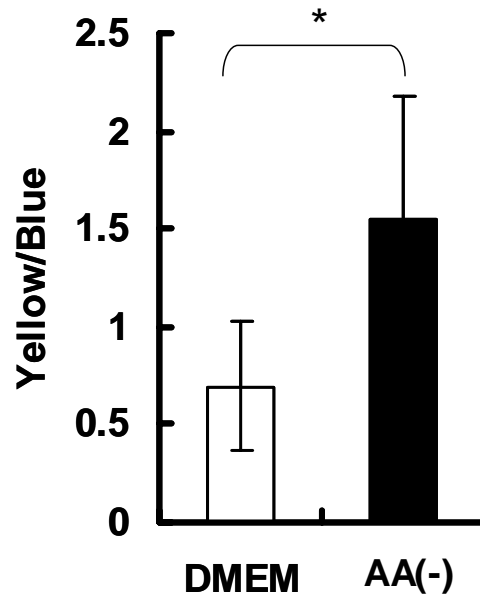


Fig.3 DMEM、アミノ酸欠乏培地でそれぞれ培養した細胞の細胞内酸性領域の定量化

各培地での、細胞内酸性度をLysoSensorの黄色/青色比で評価した。DMEMで培養した細胞に対し、アミノ酸欠乏培地で培養した細胞では黄色/青色比が上昇し、より酸性に変化していた。

グラフの値は平均値 ± 標準偏差  
AA(-): アミノ酸欠乏培地



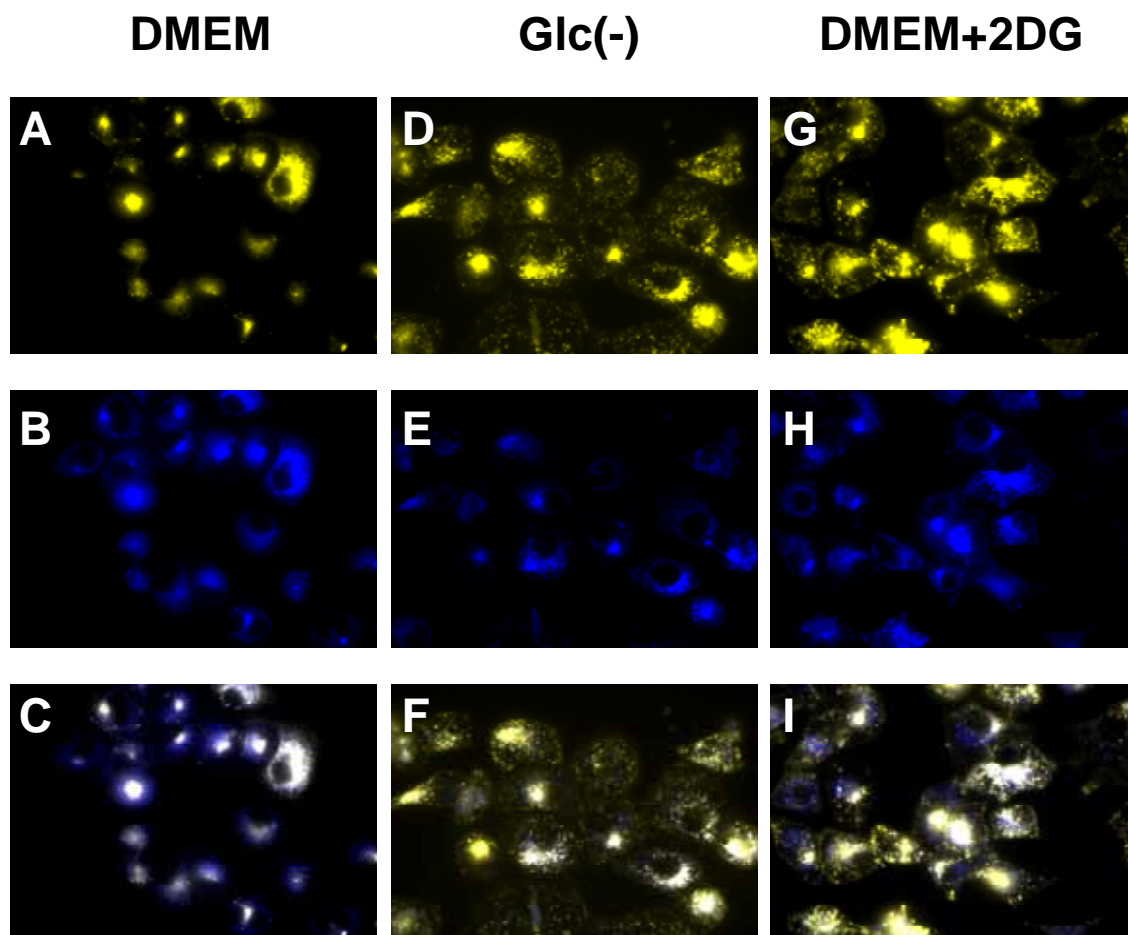


Fig.4 DMEMとグルコース欠乏培地、またDMEMに2-deoxy-D-glucoseを添加した培地中での細胞内オルガネラpHの変化

PANC-1細胞を、DMEM、グルコース欠乏培地、DMEMに含まれているグルコースと等量の2-deoxy-D-glucoseを添加した培地(DEMEM + 2DG)中で24時間培養した後、LysoSensor Yellow/Blue DND-160を用いて酸性オルガネラを染色した。A、B、CはDMEMで培養した細胞の染色像、D、E、Fはグルコース欠乏培地で培養した細胞の染色像、G、H、IはDMEM+2DG中で培養した細胞の染色像を示す。また、A、D、GはpH3-5を示す黄色の蛍光像、B、E、HはpH6-8の弱酸性～中性を示す青色の蛍光像、C、F、Iは2つの重ね合わせた像となる。グルコース欠乏培地、DMEM + 2DGで培養した細胞では、細胞内に広く黄色の蛍光が分布していた。

Glc(-):グルコース欠乏培地

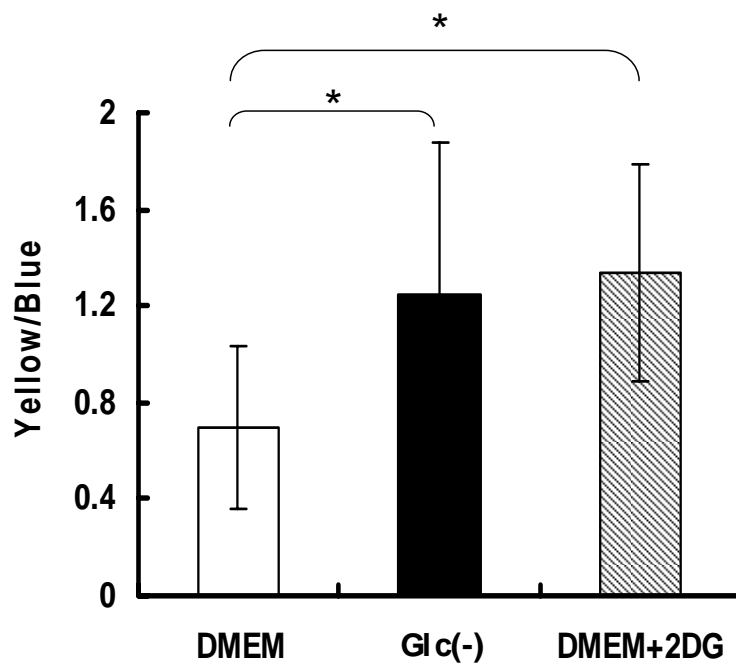


Fig.5 DMEM、グルコース欠乏培地、DMEM+2DG中でそれぞれ培養した細胞の細胞内酸性領域の定量化

各培地での、細胞内酸性度をLysoSensorの黄色/青色比で評価した。DMEMで培養した細胞に対し、グルコース欠乏培地、DMEM+2DGで培養した細胞では黄色/青色比が上昇し、より酸性に変化していた。

グラフの値は平均値 ± 標準偏差

Glc(-): グルコース欠乏培地

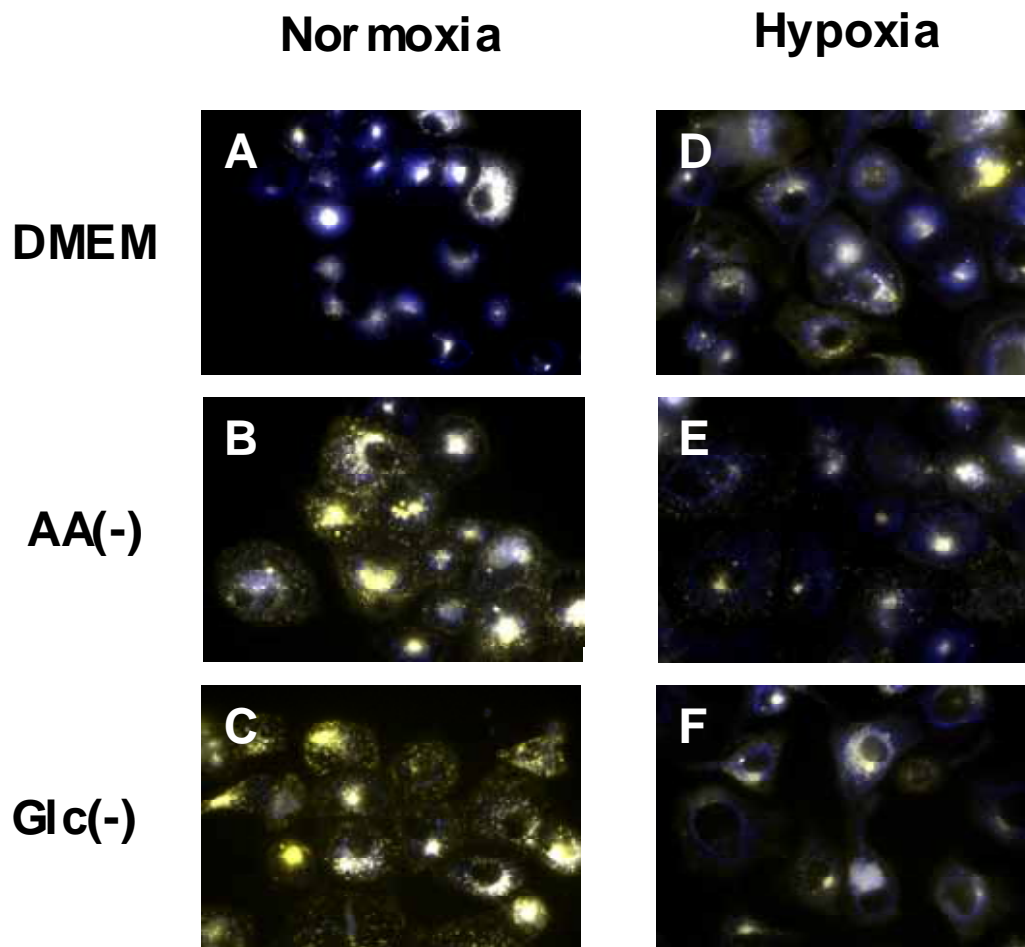


Fig.6 低酸素環境下で栄養欠乏条件に置いたときの細胞内酸性オルガネラのpH変化

PANC-1細胞を、それぞれDMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地中で、通常酸素濃度(normoxia)もしくは低酸素濃度(hypoxia)の二種類の酸素濃度で24時間培養した。A、B、Cは通常酸素環境、D、E、Fは低酸素環境で培養した細胞の染色像(重ね合わせ像)である。また、A、DはDMEM中、B、Eはアミノ酸欠乏培地中、C、Fはグルコース欠乏培地で培養した。通常酸素環境で培養した細胞は、各種栄養欠乏培地にて顆粒状の黄色の蛍光が増加しているのに対し、低酸素環境で培養した細胞では、各種栄養欠乏培地中でも顆粒状の黄色の蛍光が増加していなかった。

AA(-): アミノ酸欠乏培地

Glc(-): グルコース欠乏培地

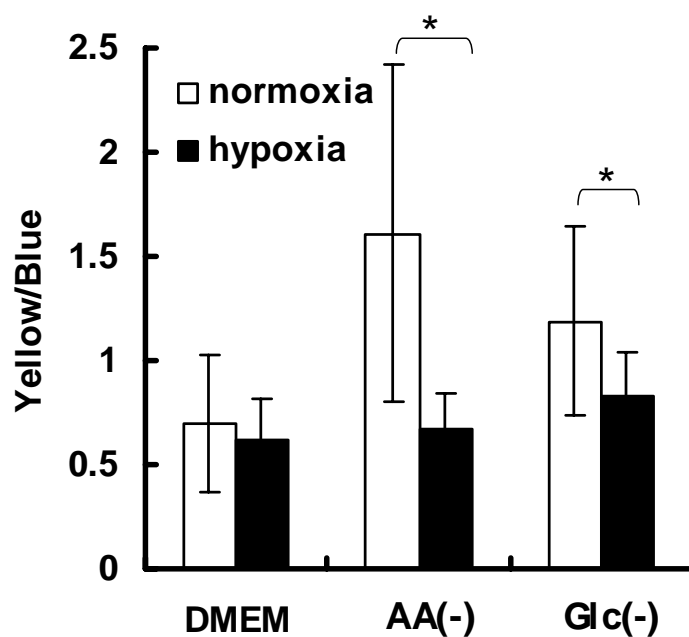


Fig.7 通常酸素環境、低酸素環境環境で培養した細胞の細胞内酸性領域の定量化

各条件での、細胞内酸性度をLysoSensorの黄色/青色比で評価した。通常酸素で培養した細胞に対し、低酸素環境で培養した細胞では各種栄養欠乏培地中でも、黄色/青色比の上昇が抑えられ、オルガネラpHの酸性方向への変化が抑制されていた。

グラフの値は平均値 ± 標準偏差

AA(-): アミノ酸欠乏培地、Glc(-): グルコース欠乏培地

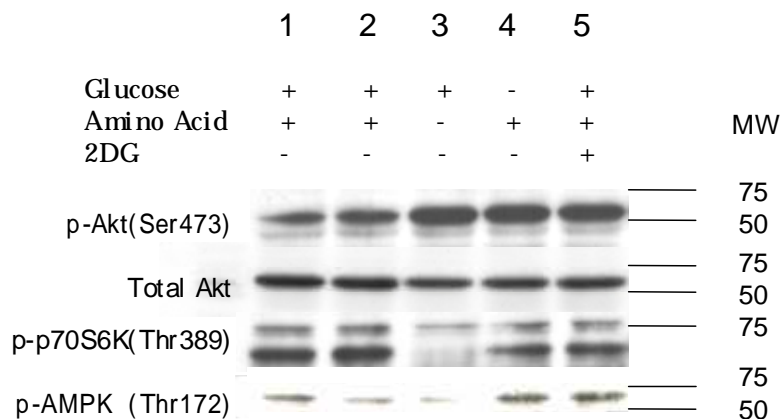


Fig.8 DMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地、DMEMに2DGを添加した培地で培養した細胞のAkt、p70S6K、AMPKリン酸化の確認

DMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地、DMEMに2DGを添加した培地にて24時間培養した細胞の抽出液を用いてAkt、p70S6K、AMPKのリン酸化の程度をwestern blottingで確認した。レーン1は培地交換前のコントロールである。DMEM(レーン2)と比較して、Aktのリン酸化は、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地、DMEMに2DGを添加した培地で増加していた(レーン3~5)。また、p70S6Kのリン酸化は、アミノ酸欠乏培地(レーン3)でほぼ完全に、グルコース欠乏培地、DMEMに2DGを添加した培地(レーン4,5)でも、DMEMと比較するとやや抑制されていた。AMPKのリン酸化は、グルコース欠乏培地、DMEMに2DGを添加した培地(レーン4,5)で亢進されていた。

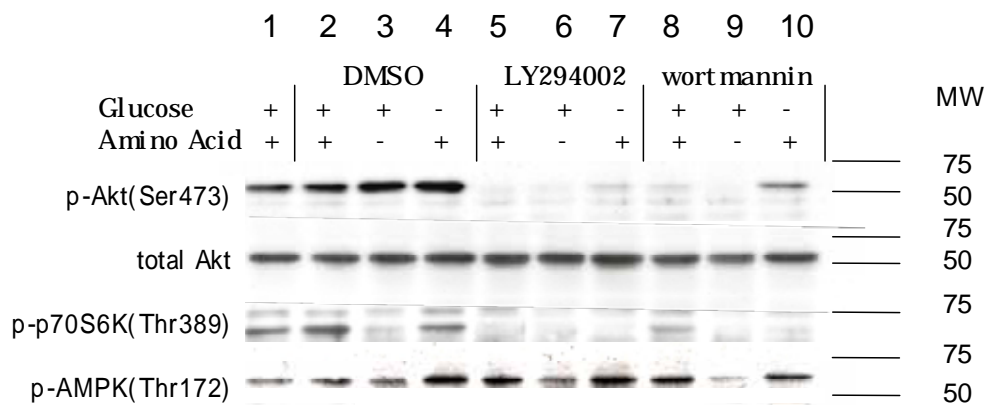


Fig.9 LY294002、wortmanninを処理した細胞の、Akt、p70S6K、AMPKリン酸化の確認

DMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地にて24時間培養した後、LY294002、wortmanninをそれぞれ3時間処理した細胞の抽出液を用いてAkt、p70S6K、AMPKのリン酸化の有無をwestern blottingで確認した。レーン1は培地交換前のコントロールである。レーン2-4のコントロールと比較して、レーン5-7のLY294002処理、レーン8-10のwortmannin処理では、Aktのリン酸化が抑制されていた。また、p70S6Kのリン酸化に関しては、レーン2,4で見られたバンドが、レーン5,7、レーン8,10でのLY294002、wortmannin処理により、顕著に抑制されていた。また、レーン2のDMEMでのコントロールとレーン5のDMEMでのLY294002処理、レーン8のDMEMでのwortmannin処理を比べると、薬剤処理によってAMPKのリン酸化が亢進されていた。

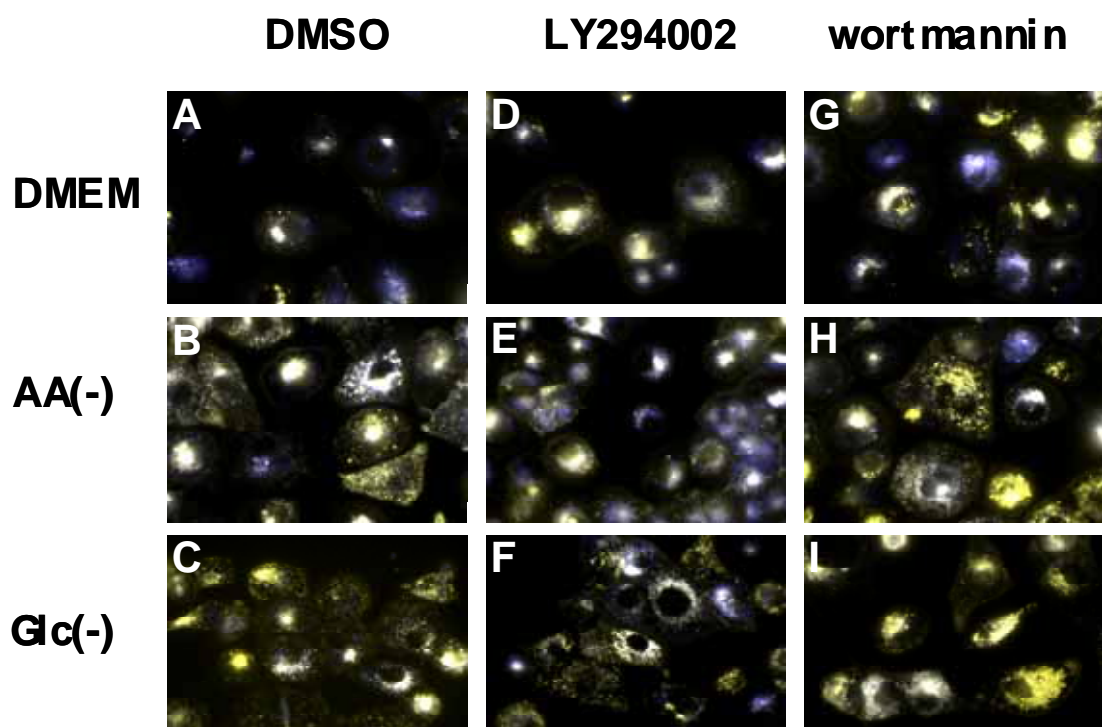


Fig.10 LY294002と、wortmanninを添加した培地中での細胞内オルガネラpHの変化

PANC-1細胞を、DMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地中で24時間培養した後、それぞれLY294002とwortmanninを3時間処理し、LysoSensor Yellow/Blue DND-160を用いて酸性オルガネラを染色した。A、B、CはコントロールとしてDMSOを添加した細胞の染色像、D、E、FはLY294002を添加した細胞の染色像、G、H、Iはwortmanninを添加した細胞の染色像を示す。また、A、D、GはDMEM、B、E、Hはアミノ酸欠乏培地、C、F、Iはグルコース欠乏培地での染色像である。(写真はすべて黄色・青色蛍光の重ね合わせ像である)コントロールと比較して、LY294002、wortmanninを処理した細胞では、DMEM中でも黄色の蛍光が増加していた。

AA(-): アミノ酸欠乏培地

Glc(-): グルコース欠乏培地

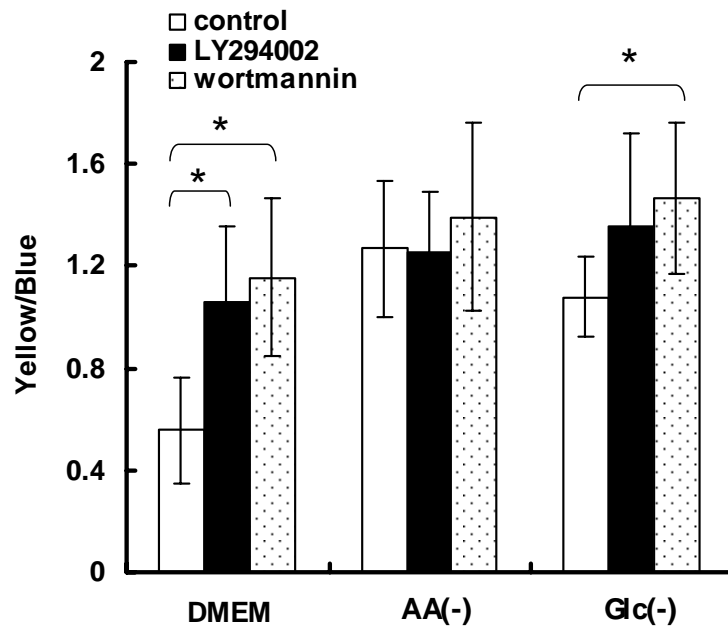


Fig.11 LY294002、wortmanninをそれぞれ処理した細胞の細胞内酸性領域の定量化

各条件での、細胞内酸性度をLysoSensorの黄色/青色比で評価した。コントロールの細胞に対し、LY294002、wortmanninを処理した細胞ではDMEM中で、黄色/青色比が上昇し、より酸性に傾いていた。アミノ酸欠乏培地では、コントロールと薬剤処理群の間で有意差をもった変化はなかった。グルコース欠乏培地では、コントロールと比較して、LY294002、wortmannin共に黄色/青比の平均値の上昇が確認され、wortmannin処理群に関しては、統計学的な有意差が認められた。

グラフの値は平均値 ± 標準偏差

AA(-): アミノ酸欠乏培地

Glc(-): グルコース欠乏培地



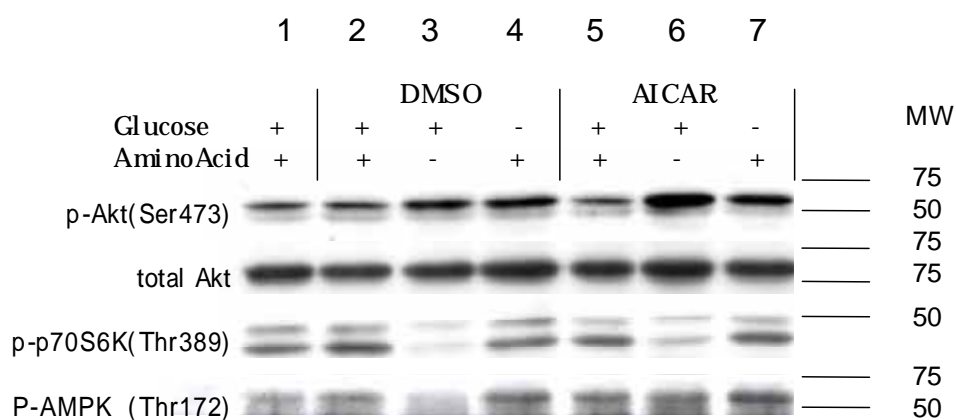


Fig.12 AICARを処理した細胞の、Akt、p70S6K、AMPKリン酸化の確認

DMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地にて24時間培養した後、AICARを6時間処理した細胞の抽出液を用いてAkt、p70S6K、AMPKのリン酸化の有無をwestern blot法で確認した。レーン1は培地交換前のコントロールである。レーン2-4のコントロールと比較して、レーン5-7のAICAR処理細胞では、Aktのリン酸化、p70S6Kのリン酸化に大きな変化はなかった。AMPKのリン酸化は、特にレーン2,3のコントロールと比較して、レーン5,6のAICAR処理群では亢進されていた。

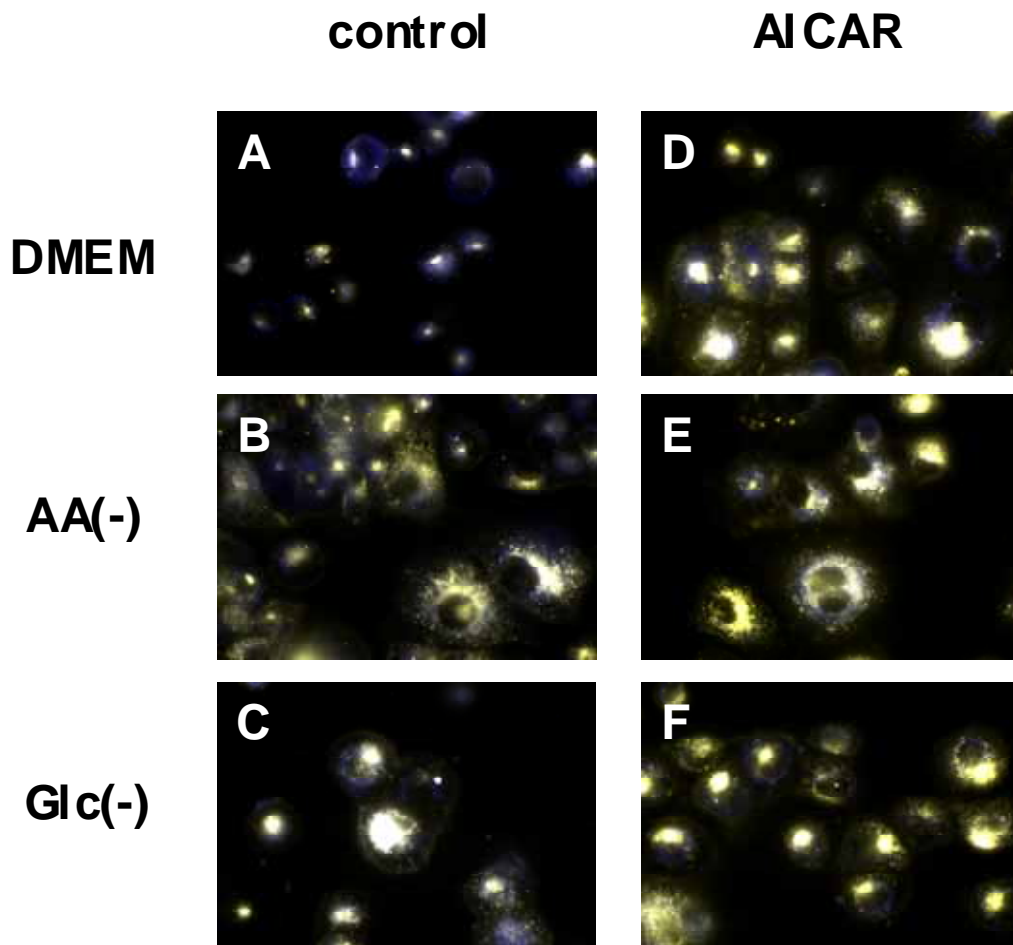


Fig.13 AlCARを処理したときの細胞内酸性オルガネラのpH変化

PANC-1細胞を、それぞれDMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地中で、24時間培養した後、AlCARを6時間処理し、LysoSensor Yellow/Blue DND-160を用いて酸性オルガネラを染色した。A、B、Cはコントロールの染色像、D、E、FはAlCARを処理した培地での染色像である。また、A、DはDMEM中、B、Eはアミノ酸欠乏培地中、C、Fはグルコース欠乏培地での染色像である。(写真はすべて黄色と青色の重ね合わせ像である。)AlCARを処理した細胞は、DMEM中でも顆粒状の黄色の蛍光の増加が見られた。

AA(-): アミノ酸欠乏培地  
Glc(-): グルコース欠乏培地

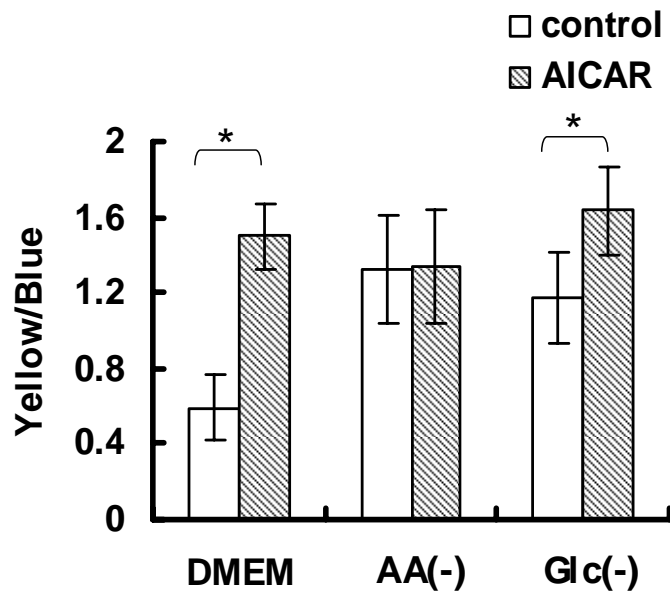


Fig.14 AICARを処理した細胞の細胞内酸性領域の定量化

各条件での細胞内酸性度をLysoSensorの黄色/青色比で評価した。DMEMでは、コントロールの細胞の値と比較して、AICARを処理した細胞では黄色/青色比が上昇し、より酸性に変化していた。アミノ酸欠乏培地では、コントロールとAICAR処理群との間に差は見られなかった。グルコース欠乏培地では、コントロールと比較して、AICAR処理により、黄色/青色比の上昇が見られ、より酸性に変化していた。

グラフの値は平均値 ± 標準偏差

AA(-): アミノ酸欠乏培地

Glc(-): グルコース欠乏培地

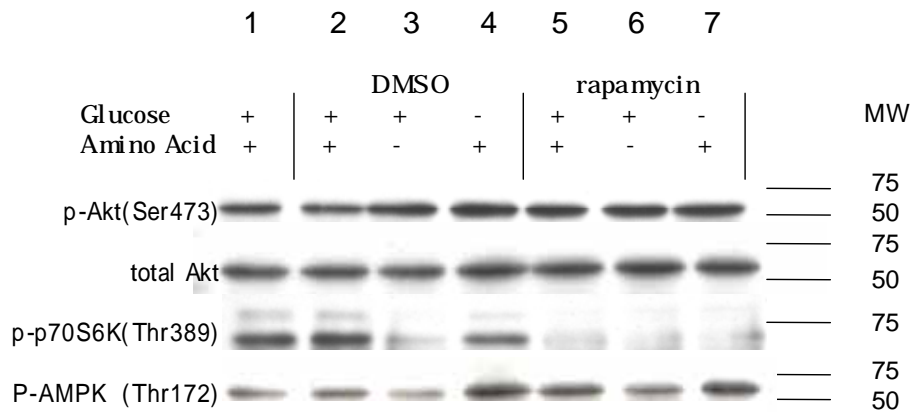


Fig.15 Rapamycin処理した細胞の、Akt、p70S6K、AMPKリン酸化の確認

DMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地にて24時間培養した後、rapamycinを3時間処理した細胞の抽出液を用いてAkt、p70S6K、AMPKのリン酸化をwestern blottingで確認した。レーン1は培地交換前のコントロールである。Aktのリン酸化の亢進については、レーン2-4のコントロールとレーン5-7のrapamycin処理間で顕著な差は見られなかった。p70S6Kのリン酸化については、DMEMで培養したレーン2のコントロールとレーン5のrapamycin処理、グルコース欠乏培地で培養したレーン4のコントロールとレーン7のrapamycin処理との間で比較すると、rapamycin処理群では、p70S6Kのリン酸化が顕著に抑制されていた。アミノ酸欠乏培地では、コントロールとrapamycin処理群との間に明確な差は見られなかった。AMPKのリン酸化に関しては、コントロールの各レーンと比べて、rapamycin処理による、明確な変化はなかった。

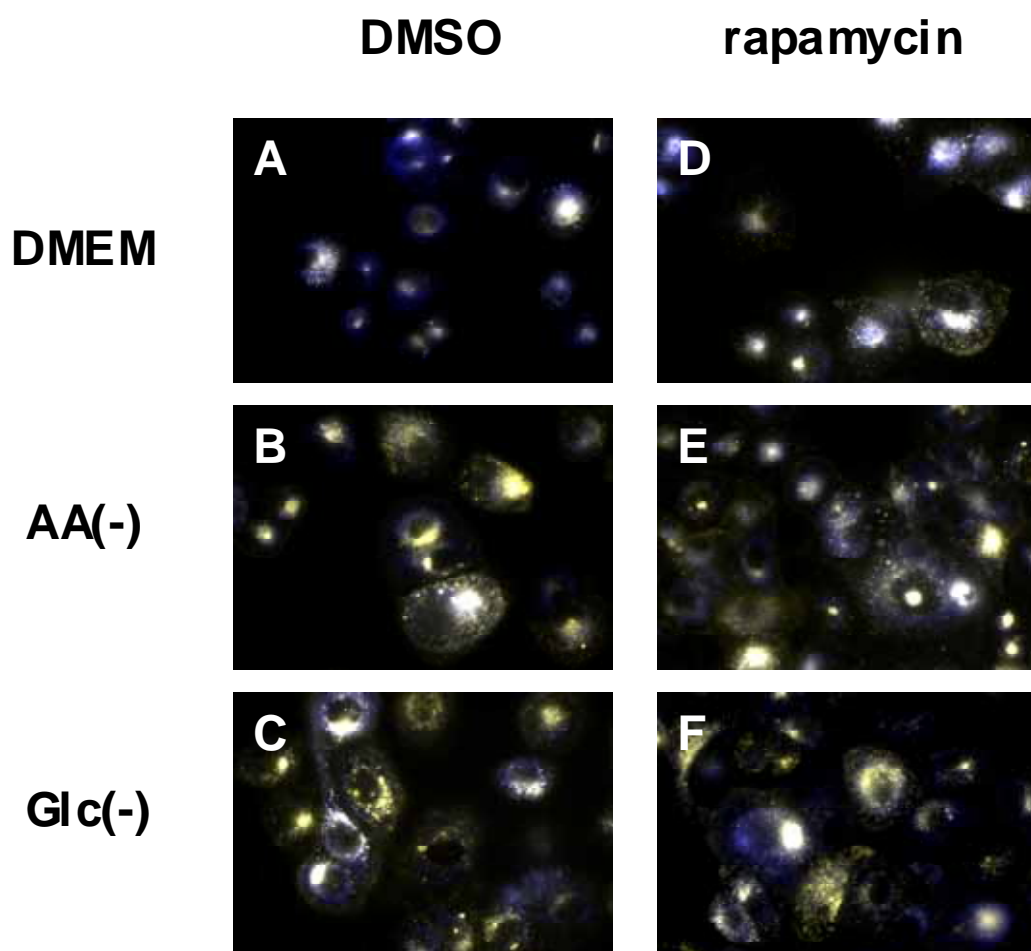


Fig.16 rapamycinを処理したときの細胞内酸性オルガネラのpH変化

PANC-1細胞を、それぞれDMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地中で、24時間培養した後、rapamycinを3時間処理し、LysoSensor Yellow/Blue DND-160を用いて酸性オルガネラを染色した。A、B、CはコントロールとしてDMSOを添加した培地での染色像、D、E、Fはrapamycinを処理した培地での染色像である。また、A、DはDMEM中、B、Eはアミノ酸欠乏培地中、C、Fはグルコース欠乏培地での染色像である。(写真はすべて黄色と青色の重ね合わせ像である。) rapamycinを処理した細胞では、DMEM中でも若干の黄色の蛍光の増加が見られた。

AA(-): アミノ酸欠乏培地

Glc(-): グルコース欠乏培地

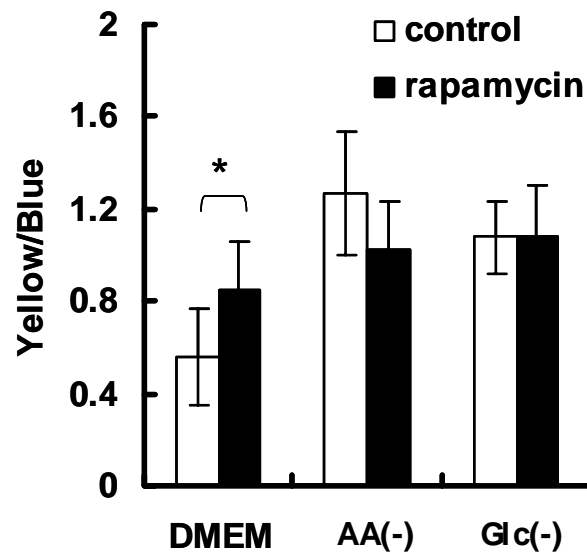


Fig.17 rapamycinを処理した細胞の細胞内酸性領域の定量化

各条件での細胞内酸性度をLysoSensorの黄色/青色比で評価した。DMEMで、コントロールの細胞と比較して、rapamycinを処理した細胞では黄色/青色比が上昇し、より酸性に変化していた。また、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地では、コントロールとrapamycin処理群との間に、統計学的な有意差は認められなかった。

グラフの値は平均値 ± 標準偏差

AA(-): アミノ酸欠乏培地

Glc(-): グルコース欠乏培地

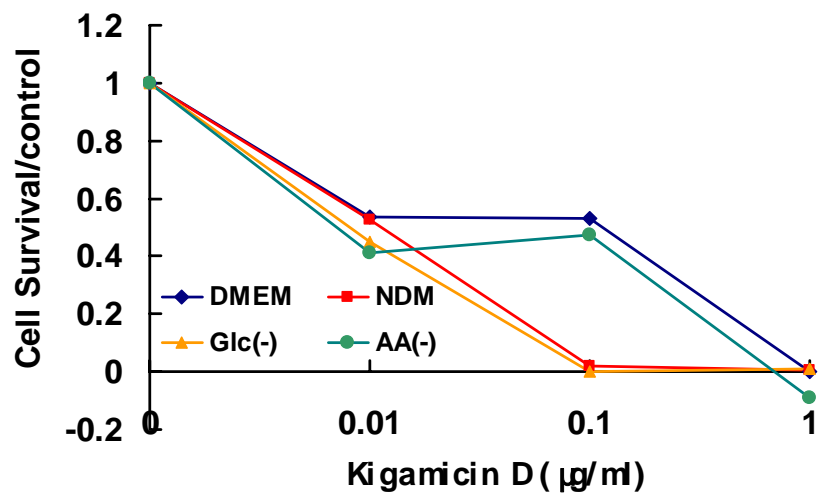


Fig.18 栄養環境によるkigamicin Dの殺細胞効果の検討

PANC-1細胞を、各濃度のkigamicin Dを添加したDMEM、NDM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地中で24時間培養し、WST-8法によって生存率を測定した。グルコースが欠乏している、NDMとグルコース欠乏培地での処理では、DMEM、アミノ酸欠乏培地での処理にくらべて約10倍程度の効果の差があった。

NDM: 栄養欠乏培地(アミノ酸、グルコース欠乏培地)

AA(-): アミノ酸欠乏培地

Glc(-): グルコース欠乏培地

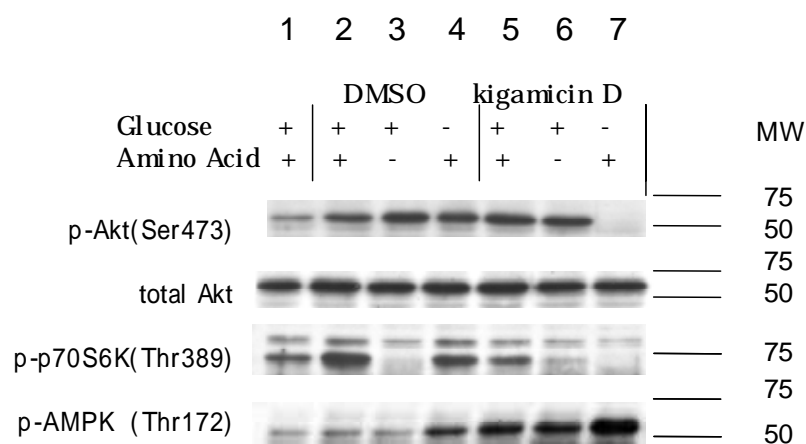


Fig.19 Kigamicin D処理した細胞の抽出液を用いた、Akt、p70S6K、AMPKリン酸化の確認

DMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地にて24時間培養した後、kigamicin Dを3時間処理した細胞の抽出液を用いてAkt、p70S6K、AMPKのリン酸化をwestern blottigで確認した。レーン1は培地交換前のコントロールである。Aktのリン酸化については、グルコース欠乏培地で、レーン4のコントロールに対してレーン7のkigamicin D処理細胞では、Aktのリン酸化が抑制されていた。また、レーン4とレーン7を比較すると、レーン7ではp70S6Kのリン酸化も抑制されていた。また、レーン2-4のコントロールと比較して、レーン5-7のkigamicin D処理群では、AMPKのリン酸化がDMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地いずれにおいても亢進されていた。



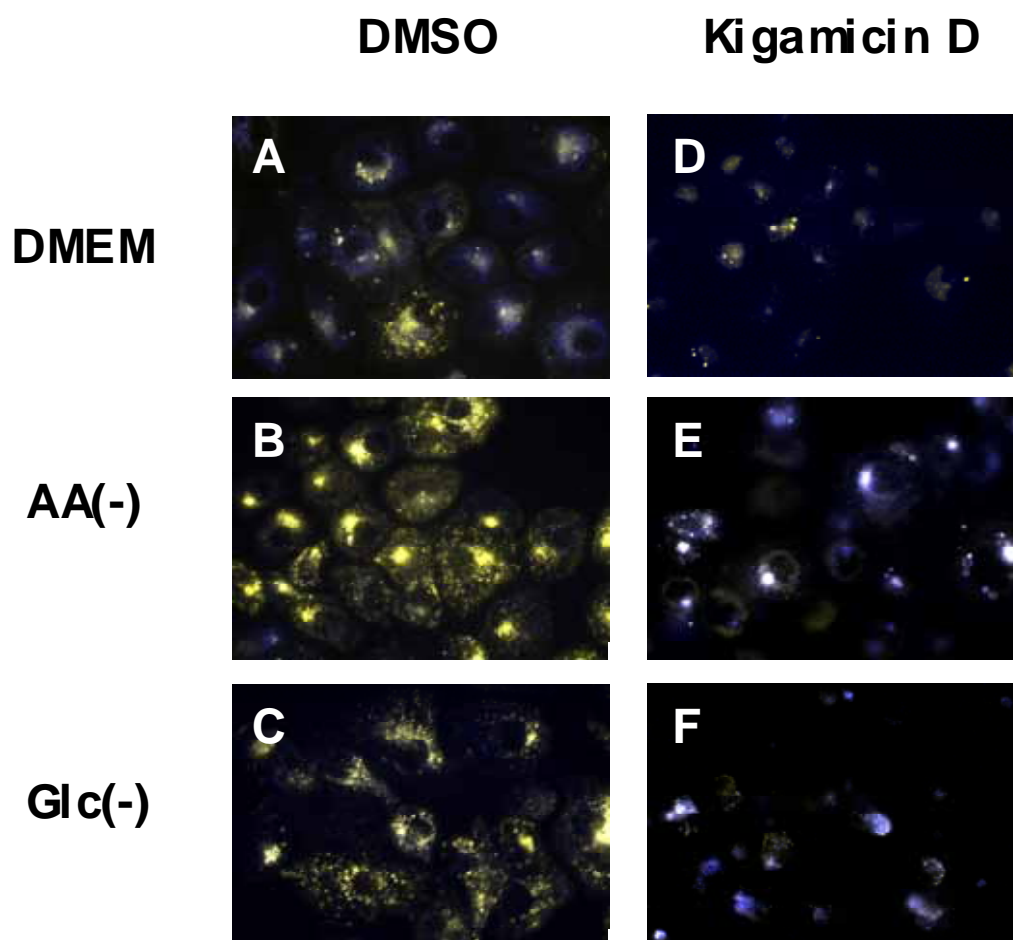


Fig.20 Kigamicin Dを処理したときの細胞内酸性オルガネラpHの変化

PANC-1細胞を、それぞれDMEM、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地中で、24時間培養した後、kigamicin Dを3時間処理し、LysoSensor Yellow/Blue DND-160を用いて酸性オルガネラを染色した。A、B、CはコントロールとしてDMSOを添加した培地での染色像、D、E、Fはkigamicin Dを処理した培地での染色像である。また、A、DはDMEM中、B、Eはアミノ酸欠乏培地中、C、Fはグルコース欠乏培地での染色像である。(写真はすべて重ね合わせ後である) Kigamicin Dを処理した細胞は、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地でもコントロールに見られるような粒子状の黄色い蛍光の増加は見られなかった。

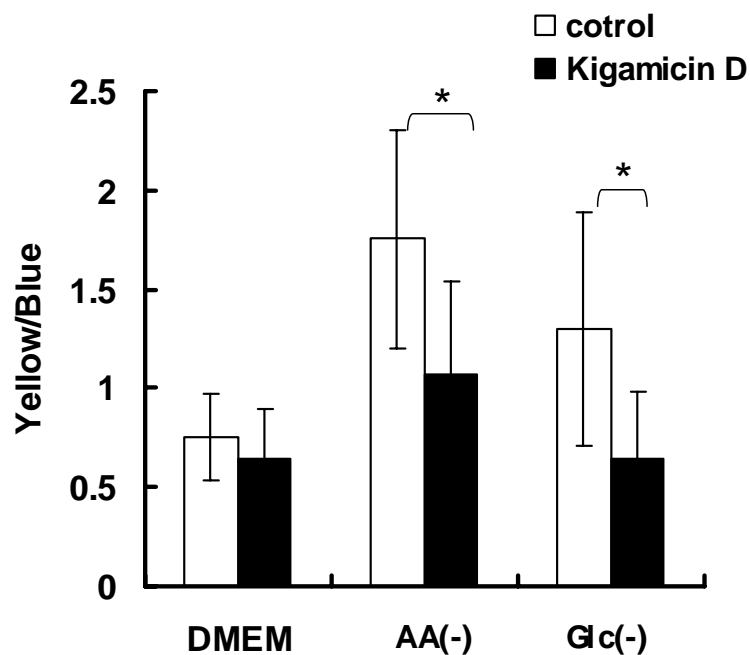


Fig.21 Kigamicin Dを処理した細胞の細胞内酸性領域の定量化

各条件での細胞内酸性度をLysoSensorの黄色/青色比で評価した。DMEMでは、コントロールの細胞とkigamicin D処理細胞との間に差は見られなかったが、アミノ酸欠乏培地、グルコース欠乏培地では、コントロールの細胞と比較して、kigamicin D処理細胞では黄色/青色比が減少しており、酸性オルガネラのpHの低下が抑制されていた。

グラフの値は平均値 ± 標準偏差

AA(-): アミノ酸欠乏培地

Glc(-): グルコース欠乏培地

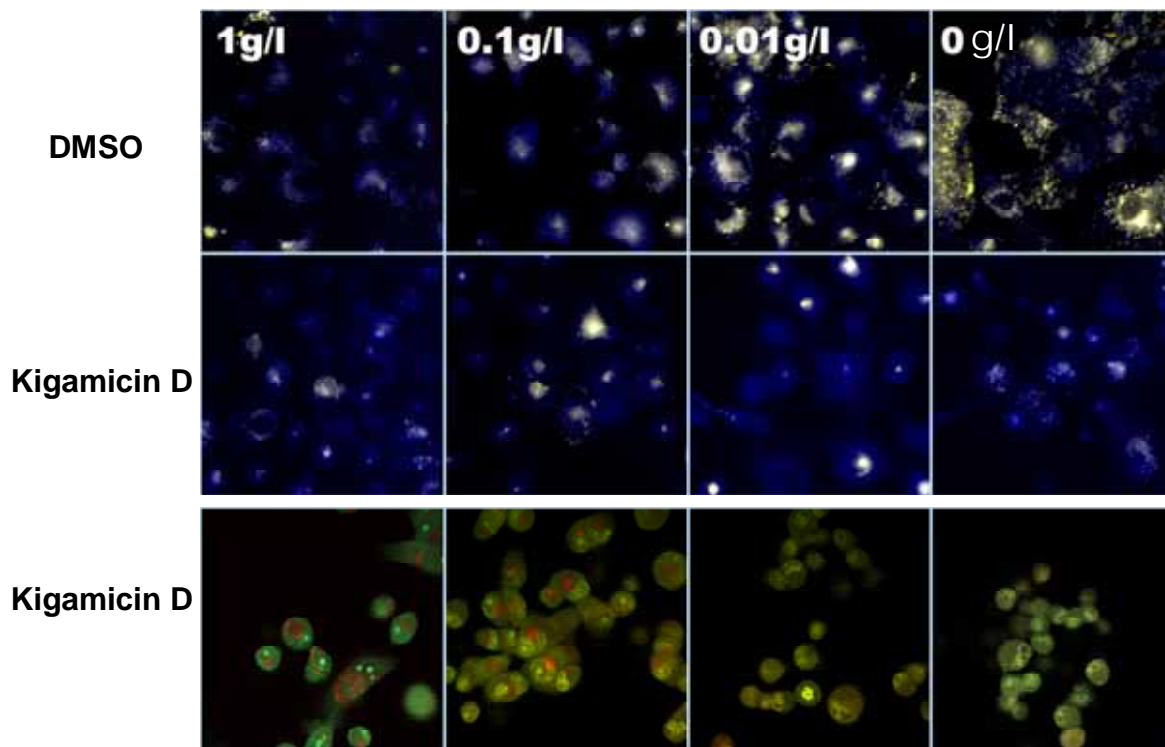


Fig.22 グルコース濃度を変化させたときのkigamicin Dの効果

グルコース濃度を1g/L、0.1g/L、0.01g/L、および0g/Lに調製した培地中で24時間培養した後、kigamicin Dを3時間処理し、細胞内の酸性オルガネラpHを観察した。上段と中段はLysosensor Yellow/Blue DND-160染色で、上段がDMSOを添加したコントロール、中段がkigamicin D処理の染色像である。下段は、kigamicin D処理群を、acridine orange染色したものである。上段のコントロールでは、グルコースの濃度が下がるにつれて、細胞内の黄色い蛍光の割合が増加しているが、中段のkigamicin D処理群ではグルコース濃度が下がっても、黄色い蛍光の増加は見られなかった。また、下段のacridine orangeでの染色像では、グルコースの濃度が下がるにつれて、細胞内における酸性部位を示す、acridine orange赤い蛍光が減少していた。

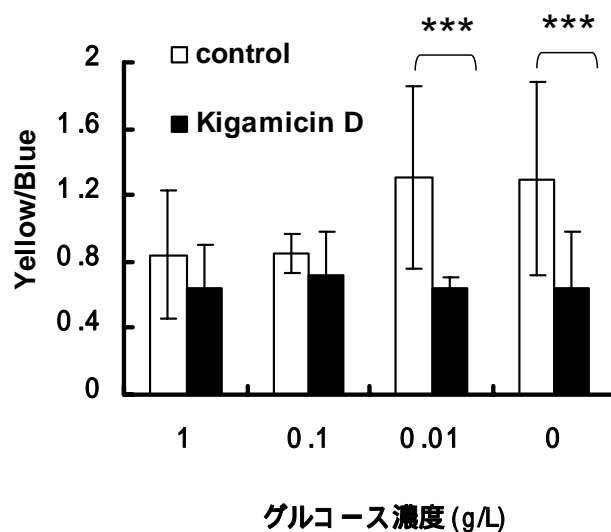


Fig.23 グルコースの濃度を变化させたときのkigamicin D処理による、細胞内酸性領域の定量化

各グルコース濃度での細胞内酸性度を、LysoSensorの黄色/青色比で評価した。コントロールでは、グルコースの濃度が減少するにつれて細胞内の酸性領域の割合も増加しているが、kigamicin Dを処理した細胞では、グルコースの濃度が下がっても、細胞内の酸性領域の割合は増加しなかった。また、コントロールでは、グルコース濃度が通常の1/100である、0.01g/lの培地から、顕著に細胞内の酸性オルガネラのpHが減少していた。

グラフの値は平均 ± 標準偏差  
 AA(-): アミノ酸欠乏培地  
 Glc(-): グルコース欠乏培地

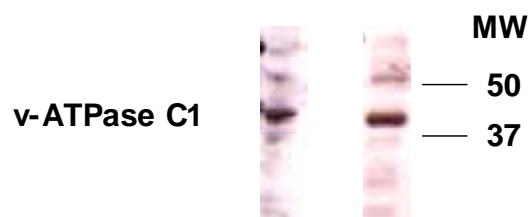


Fig.24 抽出液中のV-ATPaseの確認  
 左: マウス肝臓からの抽出液、右: グルコース欠乏培地にて24時間培養したPANC-1細胞からの抽出液内に、V-ATPaseが含まれていることを、western blottingにて確認した。

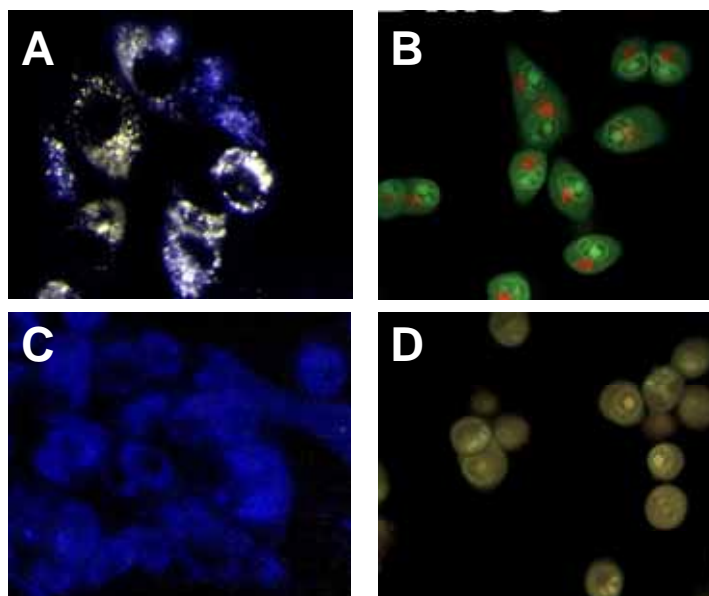


Fig.25 Bafilomycin A1 による、細胞内酸性オルガネラpHの変化

v-ATPaseの特異的阻害剤であるBafilomycin A1の効果を確認するため、グルコース欠乏培地で24時間培養した細胞に、Bafilomycin A1を100nM、3時間処理し、それぞれLysoSensor、acridine orangeで染色した。左がLysoSensor染色像、右がacridine orange染色像である。LysoSensorで、酸性環境を示す黄色の蛍光や、acridine orangeで酸性環境を示す赤の蛍光が減衰していた。

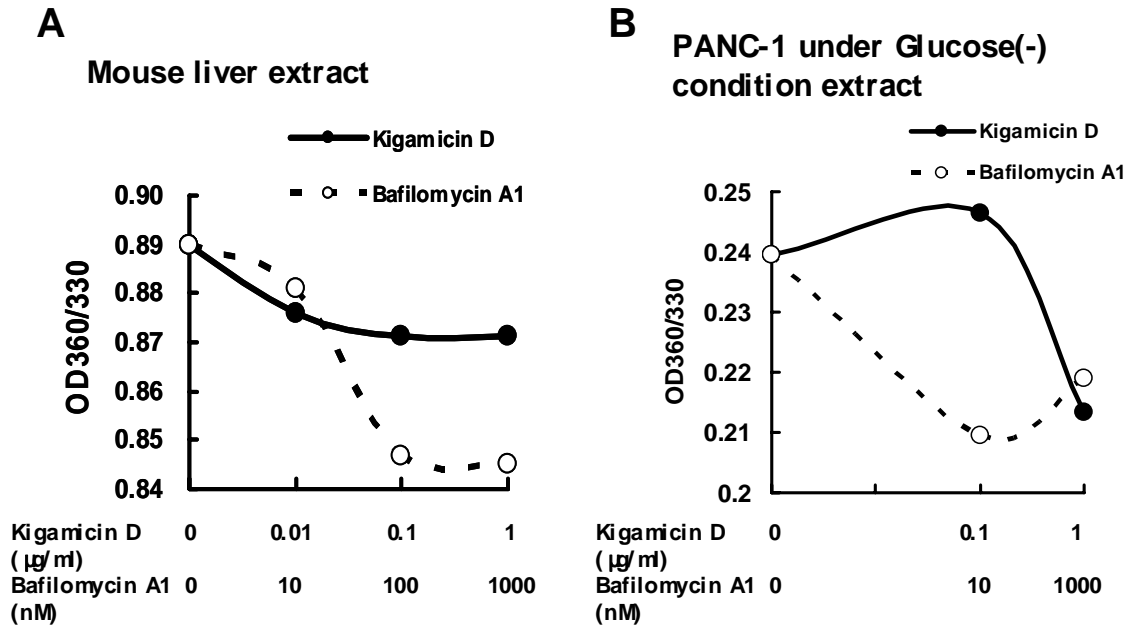


Fig.26 V-ATPaseに対するkigamicin Dの効果

V-ATPaseに対するkigamicin Dの効果調べた。

A: マウス肝臓から抽出した細胞内オルガネラ膜分画に、kigamicin Dと、ポジティブコントロールとしてbafilomycin A1をそれぞれ濃度を変化させて処理し、活性に変化があるかどうか調べた。B: グルコース欠乏培地にて24時間培養したPANC-1細胞から抽出した細胞内オルガネラ膜分画に、kigamicin Dとbafilomycin A1をそれぞれ処理し、活性に変化があるかどうか調べた。

A、B共に、コントロールのbafilomycin A1と比較して、kigamicin Dは、栄養環境選択的な殺細胞効果を持ち、酸性オルガネラpH制御を乱す働きを示す濃度で効果は得られなかった。

## 第五章

### 参考文献

1. Folkman, J., *Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors*. Ann Surg, 1972. **175**(3): p. 409-16.
2. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
3. Esumi, H., 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**(36): p. 32791-8.
4. Izuishi, K., et al., *Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy*. Cancer Res, 2000. **60**(21): p. 6201-7.
5. Lu, J., et al., *Kigamicin D, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity strategy targeting cancer cells' tolerance to nutrient starvation*. Cancer Sci, 2004. **95**(6): p. 547-52.
6. Esumi, H., et al., *Antitumor activity of pyrrvinium 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**(8): p. 685-90.
7. Awale, S., 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**(3): p. 1751-7.
8. Awale, S., et al., *Angelmarin, a novel anti-cancer agent able to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation*. Bioorg Med Chem Lett, 2006. **16**(3): p. 581-3.
9. Sutherland, R.M., *Tumor hypoxia and gene expression--implications for malignant progression and therapy*. Acta Oncol, 1998. **37**(6): p. 567-74.
10. Hockel, M. and P. Vaupel, *Biological consequences of tumor hypoxia*. Semin Oncol, 2001. **28**(2 Suppl 8): p. 36-41.
11. Gong, Y., M. Duvvuri, and J.P. Krise, *Separate roles for the Golgi apparatus and lysosomes in the sequestration of drugs in the multidrug-resistant human leukemic cell line HL-60*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50234-9.
12. Lin, H.J., P. Herman, and J.R. Lakowicz, *Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells*. Cytometry A, 2003. **52**(2): p. 77-89.
13. Altan, N., et al., *Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy*. J Exp Med, 1998. **187**(10): p. 1583-98.
14. Ouar, Z., et al., *Inhibitors of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase impair the preferential accumulation of daunomycin in lysosomes and reverse the resistance to anthracyclines in drug-resistant renal epithelial cells*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 1): p. 185-93.
15. Wahl, M.L., et al., *Regulation of intracellular pH in human melanoma: potential therapeutic implications*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(8): p. 617-28.
16. Rofstad, E.K., et al., *Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice*. Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6699-707.

17. Fang, J., et al., *The H<sup>+</sup>-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(6): p. 2108-15.
18. Otero-Rey, E.M., et al., *Intracellular pH regulation in oral squamous cell carcinoma is mediated by increased V-ATPase activity via over-expression of the ATP6V1C1 gene*. Oral Oncol, 2007.
19. Izumi, H., et al., *Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy*. Cancer Treat Rev, 2003. **29**(6): p. 541-9.
20. Petrangolini, G., et al., *Effect of a novel vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor on cell and tumor response to camptothecins*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(3): p. 939-46.
21. Cardenas, M.E., et al., *The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3271-9.
22. Hara, K., et al., *Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14484-94.
23. Suzuki, A., et al., *ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation*. Oncogene, 2003. **22**(40): p. 6177-82.
24. Shaw, R.J., et al., *The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling*. Cancer Cell, 2004. **6**(1): p. 91-9.
25. Kimura, N., et al., *A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway*. Genes Cells, 2003. **8**(1): p. 65-79.
26. Munafo, D.B. and M.I. Colombo, *A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 20): p. 3619-29.
27. Ogata, M., et al., *Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(24): p. 9220-31.
28. Yang, Y.P., et al., *Molecular mechanism and regulation of autophagy*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(12): p. 1421-34.
29. Meley, D., et al., *AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis*. J Biol Chem, 2006. **281**(46): p. 34870-9.
30. Kunimoto, S., et al., *Kigamicins, novel antitumor antibiotics. I. Taxonomy, isolation, physico-chemical properties and biological activities*. J Antibiot (Tokyo), 2003. **56**(12): p. 1004-11.
31. Kunimoto, S., et al., *Kigamicins, novel antitumor antibiotics. II. Structure determination*. J Antibiot (Tokyo), 2003. **56**(12): p. 1012-7.
32. Mortimore, G.E. and A.R. Poso, *The lysosomal pathway of intracellular proteolysis in liver: regulation by amino acids*. Adv Enzyme Regul, 1986. **25**: p. 257-76.
33. Seglen, P.O. and P. Bohley, *Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms*. Experientia, 1992. **48**(2): p. 158-72.



34. Dunn, W.A., Jr., *Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation*. Trends Cell Biol, 1994. **4**(4): p. 139-43.
35. Klionsky, D.J. and S.D. Emr, *Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1717-21.
36. Massey, A., R. Kiffin, and A.M. Cuervo, *Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(12): p. 2420-34.
37. Zhang, K. and R.J. Kaufman, *Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response*. Handb Exp Pharmacol, 2006(172): p. 69-91.
38. Sato, K., et al., *Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9677-84.
39. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21513-8.
40. Harvey, A.J., et al., *Differential expression of oxygen-regulated genes in bovine blastocysts*. Mol Reprod Dev, 2007. **74**(3): p. 290-9.
41. Teplova, V.V., et al., *Bafilomycin A1 is a potassium ionophore that impairs mitochondrial functions*. J Bioenerg Biomembr, 2007. **39**(4): p. 321-9.

## 謝辞

本研究に取り組むに当たり、恵まれた環境を与えてくださり、ご指導していただきました、国立がんセンター東病院院長兼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教授江角浩安博士に深く御礼申し上げます。ご多忙の中、ミーティングを始め、至らない私に度々時間を割いていただき、感謝しております。先生の、広範な知識に触れ、自分の考えの幅も広がったのではないかと思います。先生の下で研究させていただいた2年間は、大変充実したものとなりました。

研究の方針、手法、データ解析についてご指導していただきました、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微小環境標的療法室長土原一哉博士に深く御礼申し上げます。経験の浅い私に、何度も丁寧にご指導くださり、感謝しております。発表や論文に関しまして、度々お時間、お手間を取らせてしまいましたが、先生からいただいた適切なアドバイスは、今後とも大切にしていきたいと思います。

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部長松村保広博士、臨床腫瘍病理部部長落合淳志博士を始め、同センター実験動物管理室長の杉山賢司博士、細胞動態室長藤井誠志先生、微小環境標的療法室の三好千香先生、ならびに臨床開発センターの皆様には多くのご助言をいただきましたことを、深く御礼申し上げます。実験手法から、研究者の心構えにいたるまで、様々なことを学ばせていただき、感謝しております。

最後に、研究生生活を応援し、支えてくださった両親、姉、友人に、深く御礼申し上げます。