

Kigamicin D により glucose 欠乏選択的に増大する活性酸素種の細胞死における役割と発生機構の解明

2011 年 3 月修了

がん先端生命科学分野 47-096323 須藤夏希

指導教官名 江角浩安 教授

キーワード Kigamicin D, 栄養飢餓, 活性酸素種, catalase 過剰発現, p0 細胞

序論・背景

膵臓がんは極度の血流不足が故に低酸素・低栄養環境であると知られている。このようながん組織微小環境では多くの既存の抗がん剤の効果が極端に減弱される。ここに、がん組織を標的とした物質の探索の必要性がある。膵臓がん由来細胞は、栄養飢餓培地でも容易には細胞死に至らないことが分かり、がん細胞のもつ栄養飢餓環境に適応し生存する能力を栄養飢餓耐性と名付けた。栄養飢餓耐性のメカニズムは十分に解明されてはいない。けれども、正常組織との差別化につながる特殊な代謝が起こっている可能性が高く、新規抗がん剤の標的として理にかなっていると考えた。膵臓がん由来細胞株 PANC-1 の栄養飢餓耐性を解除する化合物を探索したところ、kigamicin D 等の化合物が得られ、ゼノグラフトで抗腫瘍性が証明されたが、そのメカニズムは解明されていない。PANC-1 は glucose 欠乏状態に細胞内の活性酸素種 (ROS) 量が増加しないが、glucose 欠乏状態の PANC-1 に kigamicin D を処置すると細胞内 ROS、特に過酸化水素 (H_2O_2) が増加することが先行研究より分かっている。様々ながん細胞で glucose 欠乏により ROS が増加し、細胞死を誘導すると報告されていることから、kigamicin D は ROS 特に H_2O_2 増大を介して細胞死を誘導するのではないかと、という仮説を立てた。その検討のために、本研究は kigamicin D による細胞内 H_2O_2 量の増大が細胞死誘導に直接関わっているか否か、kigamicin D による細胞内 H_2O_2 量増大の発生源およびメカニズムの解明を目的とした。

結果・考察

Kigamicin D による glucose 欠乏選択的な H_2O_2 増大が細胞死を誘導しているか否かの検討

膵臓がん細胞株 PANC-1 に対する kigamicin D の glucose 欠乏選択的毒性 (図 1)、および glucose 欠乏選択的 H_2O_2 量増大誘導 (図 2) が観察された。ここで、kigamicin D の誘導する H_2O_2 増大が細胞死を誘導しているのか否かを検討するために、抗酸化剤を添加して H_2O_2 を消去した場合の kigamicin D の細胞毒性を検討した。抗酸化剤 N-acetylcystein, catalase, catalase-polyethylene glycol の添加による kigamicin D の細胞毒性の減弱はわずかなものであった。先行研究の結果もあわせると、 H_2O_2 増大は細胞死には大きな関与はない可能性を示唆しているが、完全には否定できていない。

AKT リン酸化抑制は H_2O_2 増大に結びつくか否かの検討

Glucose 欠乏培地にて細胞を培養すると速やかに AKT がリン酸化

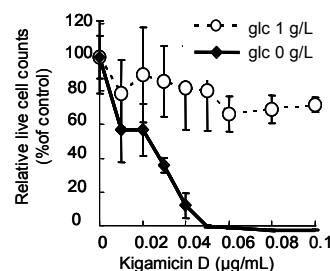


図1. Kigamicin D の膵臓がん細胞株 PANC-1 に対する glucose 欠乏選択的な細胞毒性

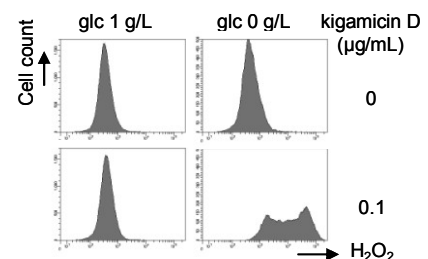


図2. Kigamicin D による glucose 欠乏選択的な細胞内 H_2O_2 量増大

され、一方栄養飢餓耐性解除化合物は AKT がリン酸化を抑制する。PI3K の阻害剤 LY294002 の添加により、AKT リン酸化の抑制により H₂O₂ 増大や細胞死が誘導されるか否かを検討した。結果は、LY294002 添加では glucose 欠乏条件下での H₂O₂ 増大や細胞死は誘導されなかった。このことをより、kigamicin D の主たる作用点が 1 つであるとすれば、PI3K のさらに上流であり、その作用点から PI3K-AKT 経路以外の cell survival に関与する経路を同時に阻害したと考えざるをえない。もうひとつの可能性としては、kigamicin D による AKT リン酸化の抑制は副次的なものであるという可能性もある。

Kigamicin D による glucose 欠乏選択的な H₂O₂ 増大のメカニズムの検討

細胞内の ROS の産生機序の 1 つにミトコンドリアの電子伝達系が挙げられる。また glucose 欠乏時に誘導される ROS は電子伝達系由来であると考えられている。これらのことから、kigamicin D が glucose 欠乏時に誘導する H₂O₂ が電子伝達系由来か否かを検討した。Kigamicin D が直接電子伝達系阻害により H₂O₂ を増大させているか否かを、PANC-1 の酸素消費に対する影響で調べた結果、kigamicin D には呼吸鎖阻害作用は観察されなかった。呼吸鎖欠失をもつ p0PANC-1 (mtDNA の欠失 図 3) を作製し、kigamicin D 誘導 H₂O₂ の電子伝達系への関与を直接検討した結果、kigamicin D

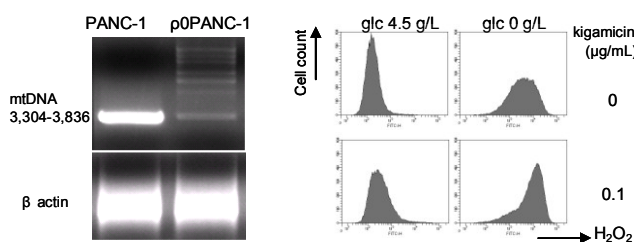


図 3 . p0PANC-1 の mtDNA 特異的配列の欠失

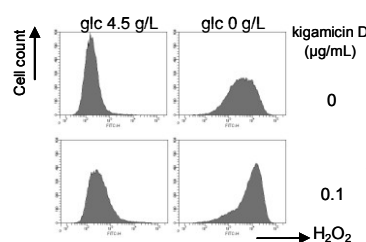


図 4. Kigamicin D の p0PANC-1 に対する H₂O₂ 増大誘導

は p0PANC-1 に対しても H₂O₂ 増大を誘導した (図 4)。この結果から、kigamicin D 誘導 H₂O₂ は電子伝達系由来でないことが示唆された。Kigamicin D 誘導 H₂O₂ の細胞内局在を調べた結果、H₂O₂ は細胞全体に広がっており、ミトコンドリアへの局在は観察されず、p0PANC-1 の結果を支持するものとなった。

Kigamicin D 呼吸鎖欠失細胞への細胞毒性

呼吸鎖欠失をもつ p0PANC-1 に対する kigamicin D は細胞毒性を調べた。その結果、kigamicin D の p0PANC-1 に対する細胞毒性は、親細胞 PANC-1 に対する細胞毒性よりも軽減していた。この結果から、kigamicin D の細胞死誘導には正常なミトコンドリア機能が必要であることが示唆された。

結論・展望

本研究を通して、kigamicin D により glucose 欠乏選択的に増大する H₂O₂ は細胞死に直接関わっている可能性は低いことが分かった。しかし完全に否定することはできなかった。H₂O₂ 産生機序に関しては、ミトコンドリア以外の細胞質から発生していることが分かった。Kigamicin D の標的に関しては、最終的な決定はできなかったが PI3K-AKT 経路が関与している可能性は高いが、この経路単独ではなくさらに上流に働いている可能性が高いことが分かった。今後は細胞質に広く分布する ROS 産生系の検討を進める一方で、本研究では検討していない、kigamicin D の H₂O₂ 消去系への影響も検討する必要がある。本研究の範囲では、H₂O₂ の増大機序を同定することはできなかったが、多量の H₂O₂ がミトコンドリア電子伝達系以外から増大し、p0 細胞がこれに絶えているメカニズムは極めて興味深い。