

修士論文

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

平成 21 年度 (2009 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

47-096323 須藤 夏希

# 目次

## 要旨

### *Summary*

#### 第1章 序論

1 - 4

1-1 背景および研究目的

1-2 略語表

#### 第2章 実験手法

5 - 12

#### 第3章 実験結果

13 - 26

3-1. 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

3-2. Kigamicin D による glucose 欠乏選択的な細胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量増大

3-3. 抗酸化剤による kigamicin D 誘導 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生量及び細胞生存への効果

3-4. Human catalase 発現ベクター-pQCXIN-CAT の作製

3-5. Catalase 一過性過剰発現による kigamicin D 誘導 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の消去

3-6. Catalase 安定過剰発現細胞の調製

3-7. Catalase 安定過剰発現による kigamicin D 誘導 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の消去

3-8. Glucose 欠乏による PANC-1 細胞の AKT リン酸化

3-9. Kigamicin D の酸素消費への影響

3-10. ρ0 細胞の作製

3-11. ρ0PANC-1 に対する kigamicin D の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生誘導

3-12. Kigamicin D に誘導される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の細胞内局在の検討

3-13. ρ0PANC-1 に対する kigamicin D の細胞毒性

3-14. ρ0PANC-1 の glucose 欠乏時、kigamicin D 処置時の細胞死の形態

3-15. PANC-1, ρ0PANC-1 に対する kigamicin D の他 ROS 種 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO) 誘導の検討

第4章 考察 27 - 32

第5章 図表 33 - 59

第6章 参考文献 60 - 62

謝辞

## Summary

Pancreatic cancer tissue is known to be under severe hypoxic condition caused by its hypovascular nature. We have been interested in the nutrient-deprived condition that is also induced by insufficient blood supply, and reported that pancreas cancer-derived cell lines exhibit tolerance to nutrient deprivation. We named this tolerance, “austerity”. Austerity seems a specific character of cancer cells, it could be a new target for cancer therapy. The agents showing cell toxicity selectively under nutrient deprived condition have been screened. Kigamicin D is a polycyclic xanthone having sugar moieties and selectively kills pancreatic cancer cells under nutrient-deprived condition.

Increase in intracellular reactive oxygen species (ROS) and following cytotoxicity were reported in some cancer cells. Our previous studies revealed that intracellular ROS level was not increased by glucose-deprivation in a pancreatic cancer-derived cell line, PANC-1. However, treatment of kigamicin D drastically increased the intracellular level of ROS, especially  $H_2O_2$ , specifically under glucose-deprived condition. Therefore, we have attempted to clarify

- The relationship between increase of ROS and cell toxicity by kigamicin D.
- Molecular and biochemical mechanisms of increase of  $H_2O_2$  by kigamicin D.

To be concrete, I will show as follows in this thesis:

$H_2O_2$  scavengers N-acetyl cystein (NAC) and catalase only partly reduced cytotoxicity induced by kigamicin D, indicating that kigamicin D induced  $H_2O_2$  may not be the main cause of cell death. Inhibition of PI3K, resulting in inhibition of AKT phosphorylation under glucose deprivation did not induce  $H_2O_2$  increase nor cytotoxicity. This suggests that key molecule in austerity mechanisms above the PI3K- AKT pathway might be that

the target of kigamicin D. Kigamicin D increased intracellular  $H_2O_2$  of respiratory chain deficient p0PANC-1 cells, indicating that increase of  $H_2O_2$  by kigamicin D is related to ROS production in the cytoplasm.

## 第 1 章 序論

### 1-1 背景及び研究目的

悪性新生物、がんは 1981 年以後日本人の死因で一位であり続け、現在はその三分の一を占めている。そのため、がんの発生原因を解明しがんの予防を可能にすることが最も重要なことである。、これまでにヘリコバクター・ピロリと胃がん、パピローマウイルスと子宮頸部がんの因果関係などが明らかにされ、発生の予防も進んできている。がんと診断された後、がんが転移する以前の段階であれば手術、放射線による治療が効果的で、治癒する例が多い。一方がんが転移し全身化した段階から、薬物療法が採用される。薬物療法も一部の白血病のように極めて有効性が高く治癒に至ることはあるが、残念ながら大部分の固形腫瘍、がんでは治癒に至るのはまれである。

従来多くのがん薬物治療は、がん細胞の高い増殖性を標的としてきた。しかしながら、このアプローチはがんに対する選択性の低さから、副作用を回避できないことが多かった。近年、がん細胞のがん化に関わる増殖シグナルを初めとする分子メカニズムが解明され、これに関与する特定の分子に作用する分子標的薬（抗体医薬、小分子化合物等）の研究が進んでいる。Gleevec、Herceptin 等画期的な成果を挙げた例はあるが、がん細胞の極めて複雑な増殖・生存シグナル系のために、がんに対して高い有効性と選択性を示す抗がん剤は未だに充分には見つかっていない。

進行固形がん組織には血管新生の亢進が見られるが、これらの血管は機能的に未熟で、解剖学的にも不十分な血管網となる。そのため、大部分のがん組織は血液の灌流不足があるといわれている。これを固形がんの薬物治療の観点から考えれば、がん組織には元々薬物が到達しにくいこと、たとえ到達したとしてもその組織の特徴であるがん組織微小環境では多くの抗がん剤が分子標的薬剤を含めて効果が極端に減弱するという影響をもたらす [1][2]。一方血液灌流不足のがん細胞の生物学的挙動という観点から見れば、血液灌流不足の結果起こる低酸素が挙げられる。実際にかん組織における酸素分圧を測定し、多種のが

ん組織が極度の低酸素にあることが示されている[3]。がん細胞は低酸素環境で嫌氣的解糖が盛んになることが知られている。低酸素環境下では、多くの細胞は嫌氣的解糖を促進しエネルギーを得ると考えられている。更に、がん細胞は元々好氣的条件であっても解糖系が盛んで（Warburg効果 [4]） グルコースの消費量は多いため、血液灌流不足ながん組織では、酸素ばかりでなく、嫌氣的解糖の基質であるglucoseの供給も不十分であると予想される。実際、ヒトの大腸がんと胃がん組織のglucose濃度は、周囲の非腫瘍部の数分の一から十分の一程度と報告されている[5]。これらのことより、がん微小環境におけるがん細胞のエネルギー産生は「解糖系の亢進」だけでは説明しきれないと考えられる。我々は、がん細胞は低栄養環境で、嫌氣的解糖の促進だけではない、正常細胞とは異なる特殊な代謝系を用いてエネルギー生産し、生存増殖していると考えた。このエネルギー代謝を誘導するメカニズム、またこのエネルギー代謝を司るメカニズムはがん組織特異的治療薬開発の標的とすることができると考えた。また、既存の抗がん剤の限界を補完する治療薬開発につながると考えた。

膵臓がんは極度の血流不足であると知られている。膵臓がん由来細胞は、glucose やアミノ酸を培地から無くした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[6][7][8]と名付けた。栄養飢餓耐性という概念はがん組織と正常組織の差別化にもつながり、これをターゲットとした物質の探索の可能性があると考え、がん細胞の栄養飢餓耐性を解除する化合物を探索した。この結果、kigamicin D [2], arctigenin [9], pyruvinium pamoate [10]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。

Kigamicin Dは放線菌培養液から単離された、多環性キサントン骨格に配糖体をもつ分子式 $C_{48}H_{59}NO_{19}$ の化合物である[2]。これまでにkigamicin Dは栄養飢餓培地選択的にPANC-1に対し細胞毒性を示すこと、単独で数種類のゼノグラフトに抗腫瘍効果があることが報告されている。けれどもkigamicin Dがどのようにして栄養飢餓選択的に細胞を細胞死

に導くのかの分子機構は未だ明らかになっていない。先行の金原の研究より、kigamicin Dにより glucose 欠乏選択的にPANC-1細胞内の活性酸素種（ROS）が増大することが報告されている。そのため、本研究ではkigamicin Dの薬効発揮におけるROSの意味に注目した。様々ながん細胞において、栄養飢餓状態に曝すことで酸化ストレスが増加し細胞死が誘導されるという報告[11][12][13]がある。一方先行の研究より、本実験で用いる膵臓がん細胞株PANC-1は栄養飢餓状態に曝しても数日間生き延び、細胞内のROS量も増加しなかった。栄養飢餓状態のPANC-1に栄養飢餓耐性解除化合物を処置すると、細胞内ROS、特に過酸化水素（ $H_2O_2$ ）が増加することが分かっている。このことから、①PANC-1は栄養不足が誘発する細胞内ROS増加を防ぐ能力を獲得し、そのため栄養飢餓下でも生き延びられるのではないか、②栄養飢餓耐性解除化合物はROS増大を介して細胞死を誘導するのではないか、という仮説が立てられているが、その妥当性は証明されていない。

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。これらを通して、栄養飢餓におかれたがん細胞の飢餓耐性、ストレス応答のメカニズムの解明を目指した。



## 1-2 略語表

KD = kigamicin D

ROS = reactive oxygen species

DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium

glc = glucose

NAC = N-acetylsystein

PEG-catalase = catalase polyethylene glycol

DMSO = dimethyl sulfoxide

## 第2章 実験方法

### 研究試薬

Kigamicin D 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る。N-acetyl-L-cysteine、catalase、catalase-polyethylene glycol は、Sigma より購入した。BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac, BES-So-AM は Wako より購入した。DAF-2 DA は第一化学薬品より購入した。LY294002 は Calbiochem より、Rotenone は Sigma より、camptothecin はヤクルトより購入した。Kigamicin D は最終濃度 0.05 µg/mL 又は 0.1 µg/mL 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 0.1%以下で用いた。BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac, BES-So-AM は DMSO 溶媒に 5 mM 又は 0.5 mM となるように溶解し、stock solution として冷凍保存した。

### 細胞培養

ヒト膵臓がん由来 PANC-1 細胞は American Type Culture Collection(ATCC)より購入した。ヒト大腸がん由来 HT-29 細胞、その ρ0 細胞 (ρ0HT-29 細胞) は財団法人癌研究会の芳賀直実博士より供与頂いた。PANC-1 細胞、HT-29 細胞は pH 7.4 に調節した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO)に 10% fetal calf serum(FCS, Sigma)、1×MEM non-essential amino acid solution (Sigma)、1×Antibiotic Antimycotic solution (Sigma) を加えて培養した。

mtDNA 欠失 PANC-1 細胞 (ρ0PANC-1) は以下のように作製した。PANC-1 細胞を ethidium bromide (Wako) を 500 ng/mL 又は 1µg/mL 添加した pyruvic acid, uridine 添加 high glucose DMEM で3ヶ月間培養し、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を欠失した ρ0 細胞を得た。High glucose DMEM とは、pH 7.4 に調節した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO)に glucose が終濃度 4.5 g/L となるよう添加し、10% fetal calf serum(FCS, Sigma)、1×MEM non-essential amino acid solution (Sigma)、1×Antibiotic

antimycotic solution (Sigma)を加えた培地である。mtDNA の欠失は Table に示したプライマーを用い、KOD plus NEO (TOYOBO) で mtDNA 特異的配列を増幅し mDNA が存在しないことで確認した。また、mtDNA にコードされる cytochrome c oxidase subunit 1 (MTCO1) の欠損をウェスタンブロットで確認した。さらに、ミトコンドリアの酸素消費量測定により機能欠損を確認した。

mtDNA 欠失確認後の ρ0PANC-1、ρ0HT-29、さらに ρ0PANC-1 に対するコントロール PANC-1(親細胞 PANC-1)は pyruvic acid, uridine 添加 high glucose DMEM で培養した。

細胞を glucose 欠乏状態にする際、pH 7.4 に調節した glucose 不含の DMEM-base (Sigma)に、透析済み 10% FCS (Sigma)、1×MEM non-essential amino acid solution (Sigma)、1×Antibiotic Antimycotic solution (Sigma)、4 mM L-glutamine (Sigma) を加えて培養した。グルコースを加える場合には最終濃度が 1 g/L 又は 4.5 g/L となるように、pyruvic acid は終濃度が 2 mM、uridine は終濃度が 50 mg/L となるように添加した。FCS はアミノ酸や glucose を除去するために PBS で透析してから用いた。

#### 相対的生存細胞数、生存細胞数の測定

相対的生存細胞数は WST-8 cell counting kit (Dojindo)を用いて、生存細胞数は trypan Blue Stain 0.4% (Invitrogen) で染色し Countess (Invitrogen) を用いて測定した。

#### フローサイトメトリー

PANC-1 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 glucose 欠乏 DMEM 培地に最終濃度 5 μM となるように BES·H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac を加え、37°C で 30 分間培養した。ρ0PANC-1 と親細胞 PANC-1 の実験の際は、本文に示す条件で 4 時間培養後、BES·H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac, BES·So-AM, DAF·2DA を最終濃度 0.5 μM となるよう培地に加え、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

を用いて細胞をシャーレより剥がした。浮遊状態の細胞を 4°C 800 rpm で 5 分間遠心後、数回 PBS であらった後、500  $\mu$ L の PBS に細胞を懸濁しセルストレイナーキャップ付き 5 mL チューブ (BD Falcon) に移した。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) または FACSCanto (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 サンプルあたり最低で 10,000 個の細胞を測定した。蛍光強度の mean 値は、Cell Quest プログラム (Becton Dickinson) により計算した。

## プラスミド構築

Human Catalase 発現ベクターである pQCXIN-CAT は以下のように作製した。

pQCXIN を *Not* I、*Bsi*WI で制限酵素処理した後に脱リン酸化処理をし、線形ベクターを得た。PC-9 細胞から得た 1 本鎖 cDNA 断片を、Table に示すプライマーを用い KOD-Plus-Neo (TOYOBO) で catalase 配列を増幅した。PCR は 94°C 2 分、98°C 10 秒 / 60°C 30 秒 / 68°C 2 分を 10 サイクル の条件で行った。得られた PCR 産物を In-Fusion™ Advantage PCR cloning Kit (Clontech) と Table に示すプライマーを用いて、線形 pQCXIN ベクターに組み込んだ。In-Fusion cloning は 94°C 2 分、98°C 10 秒 / 60°C 30 秒 / 68°C 2 分を 25 サイクル の条件で行った。得られた産物を *Eco*R1 で制限酵素処理し、9 kbp の線形バンドの有無をアガロースゲル泳動で確認した。また、Table に示すプライマー、反応試薬に BigDye Terminator Cycle Sequencing, FS (Applied Biosystems)、解析に 3500 Sequencing Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を確認した。

## トランスフェクション

本研究では、6 ウェルプレート (Corning) に細胞を 1 ウェルあたり  $1 \times 10^5$  個まき 24 時

間培養した後に、空ベクターpQCXIN (Clonetech) 又は human catalase cDNA 含有 pQCXIN (pQCXIN-CAT) ベクターの一過性発現系と安定発現細胞株樹立の両方を行った。

一過性発現系では、OPTI-MEM 1mL を 1.5 mL チューブに入れ、ここに 1  $\mu$ gDNA/ $\mu$ L に調製した上記発現ベクター合計 4  $\mu$ L (pQCXIN + pQCXIN-CAT = 4+0, 2+2, 0+4 )、RFP 発現ベクター (pDSRed1-C1, Clonetech) 1  $\mu$ L、さらに TransFast transfection reagent (Promega) 15  $\mu$ L を入れて混合し、15 分間室温静置後、培地を除去した各ウェルに注入した。4 時間 37°C で培養した後、各ウェルに DMEM を 2 mL 添加しさらに 20 時間培養した。

安定発現細胞株樹立では、OPTI-MEM 100  $\mu$ L を 96 ウェルプレートに入れ、1  $\mu$ g DNA/ $\mu$ L の上記発現ベクターを 2  $\mu$ L、FuGENE-HD (Roche Molecular Biochemicals) 6  $\mu$ L を添加しウェル内で混合し、培養細胞の培養液に全量滴後、37°C で 48 時間培養した。pQCXIN を導入した 3 サンプル (P-p1、P-p2、P-p3) と pQCXIN-CAT を導入した 3 サンプル (P-c1、P-c2、P-c3) を 100mm シャーレ (Corning) にまきなおした。同時に無処置 Panc-1 も 100 mm シャーレにまき、先述の 100 mm シャーレとともに 700  $\mu$ g/mL の geneticin を含む 10% FBS 入り DMEM 培地で 14 日間培養した。無処置 Panc-1 が死に絶えたことを確認し、各トランスフェクタントをウェスタンブロッティングによる catalase 発現の確認、catalase 活性測定、kigamicin D 誘導 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去能の実験系に用いた。

#### ウェスタンブロッティング

抗 Catalase rabbit polyclonal 抗体 (219010) は Calbiochem より、抗 Actin(c-11)抗体 (sc-1615)は Santa Cruz Biotechnology より、抗 AKT 抗体 (#9272)、抗リン酸化 AKT(#9271) 抗体、抗 GAPDH 抗体 (#14c10) はそれぞれ Cell Signaling Technology より、抗 MTCO1 mouse monoclonal 抗体 (ab14705)は abcam より購入した。二次抗体 HRP- conjugated anti-rabbit IgG 抗体、HRP- conjugated anti-goat IgG 抗体、HRP-conjugated anti-mouse IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology 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, 100 mM Tris/HCl pH7.4, 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)を用いて回収し、100°Cで5分間変性させ、10秒間ソニケーションした。粗抽出物を15,000 rpmで15分間遠心分離し、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10% SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (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Polyvinylidene Difluoride (PVDF) 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0.1% Tween-20 Tris-buffered Salines (Tween-TBS)で1時間、室温でブロッキングした。メンブレンをTween-TBSで洗い、5%(w/v)BSAを含むTween-TBSに一次抗体を希釈し、一晩4°Cで反応させた。希釈倍率は抗Catalase抗体(8000:1)、抗Actin抗体(200:1)、抗AKT抗体(1:1000)、抗リン酸化AKT抗体(1:1000)、抗MTCO1抗体(1:5000)、抗GAPDH抗体(1:1000)とした。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Tween-TBSに抗Catalase、抗AKT、抗リン酸化AKT、抗GAPDHに対しては二次抗体HRP-conjugated anti-rabbit IgG抗体を5000倍希釈、抗Actinに対してはHRP-conjugated anti-goat IgG抗体を400倍希釈、抗MTCO1に対してはHRP-conjugated anti-mouse 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、HRP化学発光液(ECL Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare Bioscience)を用いてX線フィルムを感光させ反応産物を検出した。

### **Catalase Activity Assay**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液を50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>で希釈すると、90 mMまでは分光光度計による250 nmでの吸収は線形性がみられた。

細胞抽出液は以下の如く調製した。5~10×10<sup>5</sup>個のcatalase過剰発現PANC-1細胞、空

ベクター導入 PANC-1 細胞、無処置 PANC-1 細胞を 15 mL 遠沈管に収集し、4°C 1,000 rpm で 5 分遠心して PBS で 2 回洗浄した。得られた細胞ペレットを phosphate buffer 1.5 mL に懸濁し、ホモジナイザーを用いて細胞膜を破壊した。細胞抽出液を 1.5 mL チューブに採集し、4°C 10,000×g で 15 分間遠心し、得られた上清を細胞抽出酵素液とした。抽出液の総タンパク質濃度は BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology)により測定し、phosphate buffer で 2 μg/μL に調製した。検量線は bovine serum albumin (BSA)を基準に求めた。標準 catalase 溶液は、catalase を phosphate buffer に溶解させて作製した。

予備実験の結果、54 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液を基質とし 500 μL を用い、37°C で 5 分間の反応では、catalase 1.5 units/mL までは線形性が確認された。インキュベーション前の基質・酵素液の 250 nm における吸光度 (A<sub>0</sub>)、インキュベーション後の基質・酵素液の 250 nm における吸光度 (A<sub>5</sub>) を分光吸光高度計で測定し、吸光度減少量 (− (A<sub>5</sub> − A<sub>0</sub>)) を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の減少量として計算し、酵素活性を求めた。

細胞抽出液の酵素活性は、反応液に総タンパク量で 10 μg 添加し、37°C で 5 分間インキュベーションして求めた。

## 酸素消費測定

細胞の酸素消費は、酸素濃度を YSI 5300A 生物用酸素モニターシステム (INSTECH)、5300A ミクロチャンバーシステム (INSTECH) を用いて測定し、その減少量を薬剤添加群と非添加群とを比較した。2×10<sup>6</sup> 個/mL の細胞懸濁液を 1.5 mL ずつ 2 mL チューブに分注した。これを 4°C 1,000 rpm で 3 分間遠心して上清を除き、対応する培地を 1.5 mL 添加した。室温にて、空気を飽和した水の酸素濃度を 100%とした後に細胞懸濁液を 2.5 mL テルモシリンジ (TERUMO) に 18 G×1 1/2 テルモ注射針 (TERUMO) を装着したものを、用いてチャンバー内に注入した。10 分後に薬剤、25 分後にシアン化カリウム (KCN) を、マイクロシリンジを用いて注入した。

## Total DNA 抽出、PCR

1~5×10<sup>5</sup> 個の細胞を 15 mL チューブ (Corning) に回収し、4℃ 1000 rpm で 5 分間遠心し PBS で 2 回洗った。得られた細胞ペレットを 1.5 mL の mitochondria extracting buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA pH 7.5, 1 mM DTT) に懸濁し、ホモジナイザーを用いて細胞膜を破壊した。細胞抽出液を 1.5 mL チューブに採集し、4℃ 12,000 rpm で 15 分間遠心し、上清を捨てた。得られた沈沙に DNA 抽出 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% SDS) 487.5 μL と 20 mg/mL proteinase K 12.5 μL を添加し、55℃で 2 時間インキュベーションした。その後、Ultra Pure Buffer-Saturated phenol (invitrogen) を 500 μL 添加し、室温で 30 分間ローテーターを用いて転倒混和後 12,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を新たな 1.5 mL チューブに回収した。これに buffer saturated phenol/クロロホルム (Wako) /イソアミルアルコール (1:1:1/24) を 500 μL 加え、室温で 15 分間ローテーターを用いて転倒混和後 12,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を新たな 1.5 mL チューブに回収した。これにクロロホルムを 500 μL 加え、室温で 15 分間ローテーターを用いて転倒混和後 12,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を新たな 1.5 mL チューブに回収した。これに 100% エタノール (Wako) 1 mL 加え、-80℃で 15 分間置いた後、4℃ 12,000 rpm で 15 分間遠心した。得られたペレットを 70%エタノールで洗った後、エバポレーターを用いて十分に乾燥させ、TE に溶解させた。細胞から得た DNA100 ng を、Table に示すプライマーを用い KOD-Plus-Neo (TOYOBO) で mtDNA 特異的配列、control に β actin を増幅した。PCR は mtDNA 特異的配列を 94℃ 2 分、98℃ 10 秒/65.1℃ 30 秒/68℃ 30 秒を 30 サイクル の条件で、β actin を 94℃ 2 分、98℃ 10 秒/60℃ 30 秒/68℃ 30 秒を 30 サイクル行った。得られた PCR 産物をアガロースゲル泳動し、530 bp, 580 bp のバンドの有無を確認した。



## 細胞形態撮影

細胞をガラスボトムディッシュ ( $\mu$ -Dish 35 mm, ibidi) にて 24 時間培養後、500 nM MitoTracker Red CMXRos1 (Molecular Probes) 含有 DMEM で更に 37°C で 30 分間培養し、メディアウム除去後、5  $\mu$ g/mL Hoechst33342 (invitrogen) PBS 溶液を用いて染色し、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 LSM710 (Carl Zeiss) を用いて撮影した。

## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の細胞内局在

細胞をガラスボトムディッシュ ( $\mu$ -Dish 35 mm, ibidi) にて 24 時間培養後、BES- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac を終濃度 0.5  $\mu$ M で加えた glucose 含有培地で 30 分培養して蛍光プローブを細胞内に取り込ませた後、kigamicin D を終濃度 0.05  $\mu$ g/mL で加えた glucose 欠乏培地で PANC-1 を 45 分間培養し、kigamicin D を終濃度 0.05  $\mu$ g/mL、MitoTracker Red CMXRos1 (Molecular Probes) を 100 nM で加えた glucose 欠乏培地でさらに 15 分間培養した。メディアウム除去後、5  $\mu$ g/mL Hoechst33342 (invitrogen) PBS 溶液で染色し、蛍光顕微鏡 (Keyence) を用いて撮影した。

## 細胞死の形態観察による検出

細胞死の形態観察は Hoechst33342 と propidium iodide (PI) の二重染色で検討した。細胞を 6 ウェルプレート (Corning) に  $1 \times 10^5$  個撻いて 24 時間培養後、培地を除き、kigamicin D を 0, 0.1  $\mu$ g/mL 添加 high glucose DMEM (glucose 4.5 g/L) および glucose 欠乏培地に変えた。12 時間後にメディアウムを除去し、5  $\mu$ g/mL Hoechst33342 (invitrogen) および 1  $\mu$ g/mL PI (invitrogen) PBS 溶液で染色し、蛍光顕微鏡 (Keyence) を用いて撮影した。Necrosis のコントロールには 10% DMSO を添加した glucose 欠乏培地で 24 時間培養した PANC-1 を、apoptosis のコントロールには 100 nM camptothecin を添加した glucose 欠乏培地で 24 時間培養した PANC-1 を用いた。

## 第3章 実験結果

### 3-1.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

膵臓がん細胞の中でも強く栄養飢餓耐性を示す PANC-1 を用い、kigamicin D の細胞毒性を検討した。Kigamicin D を終濃度 0~0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で加えた glucose 含有培地 (glucose 1 g/L) および glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L) で細胞を培養し、24 時間後の相対的生存細胞数を WST-8 法により測定した。Glucose 含有培地に kigamicin D を添加しても明らかな細胞毒性は見られなかった。Glucose 欠乏培地では kigamicin D 濃度依存的に顕著な細胞毒性が確認され、相対的生存細胞数は、glucose 含有 kigamicin D 非添加コントロールを 100% として表示した。Kigamicin D 0.05, 0.06, 0.08, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加では全ての細胞が死滅した (図 1)。すでに報告されている kigamicin D の選択毒性をよく再現できた。なお、50%の細胞が死滅する薬剤濃度(IC50)は 0.023  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と計算された。

### 3-2.Kigamicin D による glucose 欠乏選択的な細胞内 $\text{H}_2\text{O}_2$ 量増大

金原らの先行研究では、kigamicin D は培養条件船滴的に活性酸素種を誘導することが報告されている。

Kigamicin D を終濃度 0~0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で加えた glucose 含有培地および glucose 欠乏培地で PANC-1 細胞を 6 時間培養後、BES- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ac を 5  $\mu\text{M}$  で加えた glucose 含有培地および glucose 欠乏培地に培地交換した。30 分間培養後、トリプシン処理により細胞を回収し、蛍光量をフローサイトメーターを用いて測定した。その結果を図 2 に示す。Glucose 含有培地では kigamicin D を添加しても、軽度ながらも明らかに細胞毒性を示すほどの  $\text{H}_2\text{O}_2$  増大は見られなかった。これらの所見は先行の研究とよく一致していた。一方 glucose 欠乏培地に kigamicin D を添加したものでは、0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では顕著な  $\text{H}_2\text{O}_2$  量増大は見られなかったが、0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では顕著に増大し、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ではわずかではあるがさらに増大していた。

Kigamicin D 終濃度 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を加えた glucose 欠乏培地で PANC-1 細胞を 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 時間培養後、フローサイトメーターを用いて細胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  量を調べた。その結果と mean BES- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ac 値 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  量) を図 3(a)(b) に示す。Glucose 欠乏培地に 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の kigamicin D を添加後、0.5 時間では値は変化していなかった。1 時間では mean BES- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ac 値が増大し、その後 4 時間まで増大し続けた。4 時間から 6 時間にかけては mean BES- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ac 値の減少が観察された。

### 3-3. 抗酸化剤による kigamicin D 誘導 $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生量及び細胞生存への効果

Kigamicin D に glucose 欠乏選択的に誘導される  $\text{H}_2\text{O}_2$  が細胞死を誘導しているのかを確認するために、抗酸化剤を添加して  $\text{H}_2\text{O}_2$  を消去した場合の kigamicin D の細胞毒性を検討した。抗酸化剤は N-acetylcystein (NAC) , catalase, catalase-polyethylene glycol (PEG-catalase) を用いた。

まず、それぞれの抗酸化剤で kigamicin D に誘導された  $\text{H}_2\text{O}_2$  が消去できているか否かをフローサイトメーターを用いて検討した。NAC を終濃度 0, 10, 20, 40 mM、又は catalase を終濃度 0, 100, 1000, 10000 units/mL、又は PEG-catalase を終濃度 0, 1500, 3000, 6000 units/mL で加えた glucose 含有培地で PANC-1 を 2 時間前処理した。対応する抗酸化剤を含み kigamicin D を終濃度 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  加えた glucose 含有又は欠乏培地で 6 時間培養後、フローサイトメーターにて細胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  量を調べた。NAC 10 mM~40 mM 添加で  $\text{H}_2\text{O}_2$  量減少が確認できた (図 4)。その効果は NAC の濃度に依存していたが、40 mM でも完全には消去できなかった。Catalase 0 units/mL~1000 units/mL 添加では  $\text{H}_2\text{O}_2$  量減少は見られなかった。PEG-catalase 0 units/mL~6000 units/mL 添加では  $\text{H}_2\text{O}_2$  量減少は確認できなかった。

抗酸化剤添加による kigamicin D の誘導する細胞毒性への影響を WST-8 法により確認した。NAC を終濃度 0~40 mM、又は catalase を終濃度 0~10000 units/mL、又は

PEG-catalase を終濃度 0~6000 units/mL で加えた glucose 含有培地で PANC-1 を 2 時間前処理した後、対応する抗酸化剤を含み kigamicinD を終濃度 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  加えた glucose 欠乏培地で培養し、24 時間後の生存細胞数を WST-8 法により測定した。NAC を添加した培地での相対的生存細胞数は、kigamicin D 非添加コントロールを 100% とすると NAC 0 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM 添加の順に  $9.7 \pm 8.4\%$ ,  $2.5 \pm 1.3\%$ ,  $7.6 \pm 0.76\%$ ,  $19 \pm 2.9\%$  となり、NAC 40 mM 添加でわずかに相対的生存細胞数が増加した (図 5)。Catalase を添加した培地での相対的生存細胞数は、kigamicin D 非添加コントロールを 100% とすると catalase 0, 100, 1000, 10000 units/mL 添加の順に  $-0.7 \pm 0.2\%$ ,  $-0.9 \pm 0.2\%$ ,  $-0.6 \pm 0.2\%$ ,  $33 \pm 7.5\%$  となった。 $\text{H}_2\text{O}_2$  消去効果は見られなかったにも関わらず、catalase 1000 units/mL 添加で相対的生存細胞数が若干増加した。PEG-catalase を添加した培地での相対的生存細胞数は、kigamicin D 非添加コントロールを 100% とすると、PEG-catalase 0, 1500, 3000, 6000 units/mL 添加の順に  $4.7 \pm 0.0\%$ ,  $9.5 \pm 0.0\%$ ,  $7.2 \pm 0.0\%$ ,  $22 \pm 0.1\%$  となった。 $\text{H}_2\text{O}_2$  消去効果は見られなかったにも関わらず PEG-catalase 6000 units/mL 添加でもわずかに相対的生存細胞数が増加した (図 5)。

#### 3-4. Human catalase 発現ベクター pQCXIN-CAT の作製

Catalase による kigamicin D の細胞毒性の抑制が細胞内で働く catalase 活性に依存するか否かを検討し、kigamicin D により glucose 欠乏選択的に誘導される  $\text{H}_2\text{O}_2$  が、細胞死を誘導しているのか否かをより慎重に確認するために、catalase を過剰発現させ  $\text{H}_2\text{O}_2$  消去系を亢進させた場合の kigamicin D の細胞毒性を検討することを考えた。得られた human catalase 発現ベクター pQCXIN-CAT の塩基配列をザンガー法に基づき決定した。遺伝子の accession number が P04040、1584 塩基対の配列が得られた。配列は期待されるものであった。

### 3-5.Catalase 一過性過剰発現による kigamicin D 誘導 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の消去

Human catalase 発現ベクターpQCXIN-CAT プラスミドを PANC-1 細胞に transient transfection し一過性過剰発現させ、まず kigamicin D により誘導される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を消去できるか否か調べた。RFP 発現ベクターpDSRed1-C1 を pQCXIN-CAT 0, 2, 4 μg と co-transfection し、RFP 陽性細胞で、pQCXIN-CAT の transfection により BES- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Ac 値 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量) が減少するか否かを確認した。

図 6(a)(b)(c)に transfection した細胞を glucose 欠乏培地に 4 時間培養した細胞、(d)(e)(f) に 0.1 μg/mL kigamicin D 含有 glucose 欠乏培地に 4 時間培養した細胞の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量をフローサイトメーターにて検討した結果を示す。RFP 強度 (RFP の発現量) と BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac 強度 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量) を表した。RFP 陽性細胞は全体の約 10%であった。Glucose 欠乏培地中で kigamicin D 処置により BES- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac 強度が増大している細胞が増えた(a)(d)。ここに pQCXIN-CAT を 2 μg, 4 μg を導入しても、RFP 陽性細胞における BES- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac mean 値に pQCXIN-CAT 導入量に相関した顕著な変化が認められず(d)(e)(f)、catalase 遺伝子導入細胞でも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量に大きな変化が見られなかった。

### 3-6.Catalase 安定過剰発現細胞の調製

一過性過剰発現では期待した抗酸化能が得られなかった。また、transfection 効率を RFP 発現でみると 10%程度で、充分とは言えなかった。遺伝子強制発現の効果が期待したものではなかったのは発現量に問題があると考えて、geneticin を用いた selection で選別し安定発現細胞を得ることにした。10 日間の選別の後、この細胞の catalase 発現をウェスタンブロットにより検討した。その結果、図 7 に示すように pQCXIN-CAT 導入 PANC-1 (P-c1, P-c2, P-c3) は、空ベクターpQCXIN 導入 PANC-1 (P-p1, P-p2, P-p3) や親株の PANC-1 よりも catalase の発現量が約 1.5 ~ 1.9 倍多いことが確認できた。

活性測定に用いる細胞抽出液量の検討を行った。図 8a のように、細胞抽出液のタンパク

量依存的に吸光度減少がみられた。またこの吸光度減少は、図 8b に示す catalase 標準液を用いた吸光度減少において線型性が確認できる範囲内であった。

pQCXIN 導入 PANC-1 (P-p1, P-p2, P-p3)、pQCXIN-CAT 導入 PANC-1 (P-c1, P-c2, P-c3)、親株の PANC-1 の細胞抽出液の catalase 活性測定を行い、元の PANC-1 の単位タンパク質あたりの活性を 1 として、相対的 catalase 活性を算出した結果を図 9 に示す。この結果より、catalase 活性が単位タンパク質あたり 1.5 倍程度の catalase 安定過剰発現 PANC-1 を得たことが分かった。ウェスタンブロットの結果とよく合致していた。

### 3-7.Catalase 安定過剰発現による kigamicin D 誘導 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の消去

親株の PANC-1 や空ベクター-pQCXIN 導入細胞 (P-p1, P-p2, P-p3) に比べ、Catalase 安定過剰発現細胞 (P-c1, P-c2, P-c3) の方が catalase の発現量が多く、またその活性も強いことが分かった。この catalase 安定過剰発現細胞では、kigamicin D による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の増加が減少するかどうかをフローサイトメーターで検討した。その結果、P-c1, P-c2, P-c3 でも kigamicin D により誘導される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は減少していなかった (図 10)。この catalase 安定過剰発現細胞では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が kigamicin D 誘導細胞死に関与しているのか否かを検討することはできないと判断した。今回得られた catalase 遺伝子強制発現細胞では、発現量が親株の約 1.5 倍程度と高くはなかった。その理由に関する考察は後に述べるが、まず、より高い発現量を示す細胞を得るためクローニングを行い同様の実験を行う準備をしている。

### 3-8.Glucose 欠乏による PANC-1 細胞の AKT リン酸化

多くの生物で PI3K-AKT 経路は栄養ストレス下での生存に関与することが知られている [14][15]。C. elegans では、insuline like receptor を介して PI3K-AKT 経路が活性化されると、dauer larva formation が阻害されることが報告されている [16][17]。一方がん細胞では、我々の研究室の過去の研究から、栄養飢餓環境における生存に PI3K-AKT 経路の活

性化が必要で、glucose 欠乏に曝すことで AKT のリン酸化が亢進すること、また栄養飢餓耐性解除薬が glucose 欠乏下で AKT リン酸化亢進を抑制することが分かっている [2][9][10]。そのため、これらの確認をした。

PANC-1 細胞を glucose 含有培地および glucose 欠乏培地で 2 時間培養後、細胞を回収し AKT のリン酸化をウェスタンブロットにて検出した。その結果を図 11(a)に示す。Glucose 欠乏培地で培養した PANC-1 では、glucose 含有培地で培養した PANC-1 に比べてリン酸化 AKT の量が観察された。Kigamicin D を終濃度 0 ~0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で加えた glucose 欠乏培地で PANC-1 細胞を 2 時間培養後ウェスタンブロットにて AKT のリン酸化を検出した。その結果を図 11(b)に示す。リン酸化部位は 473 番目のセリンである。0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では AKT リン酸化に変化は見られなかったが、0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では顕著に減少し、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では消失していた。

AKT は、細胞外のシグナルが受容体に到達し、PI3kinase (PI3K) が活性化され、PIP3 の増加と PDK1 の活性化、AKT の膜へのリクルート等を通じてリン酸化されて活性化される [14][15]。kigamicin D により AKT のリン酸化が抑制されたという事は、kigamicin D がこれらの活性化メカニズムを抑制したか、AKT の脱リン酸化を促進したかのいずれかである。そもそも、glucose 欠乏培地にて細胞を培養すると速やかに AKT がリン酸化されるメカニズムは明らかになっていない。そこで、PI3K 阻害剤である LY294002 を培地中に入れ、AKT の glucose 欠乏によるリン酸化が阻害されるか否かを検討した。図 11(b)に示すように、2  $\mu\text{M}$  で顕著に減少、10  $\mu\text{M}$  では完全に AKT のリン酸化は消失した。この事は glucose 欠乏のシグナルに AKT のリン酸化は PI3K の活性化に依存している事を意味する。また、その事は kigamicin D による AKT のリン酸化抑制も、PI3K-PDK1-AKT のシグナル伝達のどこかに対して抑制的に働いたことを示唆する。論理的には、このほかに kigamicin D が PTEN を活性化して AKT のリン酸化を抑制した可能性もある。この点に関しては金原の先行研究で、PTEN を knock down する事によるその可能性が否定されている。

PI3K 阻害剤 LY294002 を最終濃度 0~20  $\mu\text{M}$  で加えた glucose 欠乏培地で PANC-1 細胞を 2 時間培養後、AKT のリン酸化をウェスタンブロットにて検出した。2.0  $\mu\text{M}$  の LY294002 に、0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の kigamicin D と同程度の AKT リン酸化抑制が観察された (図 11(b))。

LY294002 が kigamicin D と同程度の  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘導をするか否かをフローサイトメーターを用いて検討した。その結果を図 11(c)に示す。0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kigamicin D は細胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  量を増大させるが、これと同程度 AKT リン酸化を抑制する 2.0  $\mu\text{M}$  LY294002 による  $\text{H}_2\text{O}_2$  増大誘導は観察されなかった (図 11(c))。LY294002 を終濃度 0~20  $\mu\text{M}$  で加えた glucose 含有培地および glucose 欠乏培地で細胞を培養し、24 時間後の相対的生存細胞数を WST-8 法により測定した。その結果を図 11(d)に示す。0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の kigamicin D 存在下では 24 時間以内に glucose 欠乏下では全ての細胞が死滅するが、PI3K 阻害剤 LY294002 は AKT リン酸化を抑制する濃度、およびそれ以上でも 24 時間後に kigamicin D のような細胞死を誘導しないことがわかった。

### 3-9. Kigamicin D の酸素消費への影響

呼吸鎖阻害剤は、電子伝達・酸化的リン酸化を阻害し、細胞の酸素消費を抑制し、電子伝達系からの ROS 産生を誘導すると言われている[18][19]。Kigamicin D も呼吸鎖阻害剤のように細胞の呼吸鎖を阻害する作用があるか、それが glucose 欠乏環境下特異的に起こるのかを確認するために、クラーク型酸素電極を用いて kigamicin D の酸素消費速度への影響を測定した。その結果 (図 12(a)(b))、呼吸鎖阻害剤 rotenone を PANC-1 に添加すると glucose の有無に関係なく直ちに酸素消費が抑制されるのに対し、kigamicin D は glucose 欠乏でも含有であっても PANC-1 の酸素消費速度に変化を与えなかった。この結果から、kigamicin D はミトコンドリア呼吸に対し呼吸鎖阻害剤のような作用は持たず、呼吸鎖を阻害して  $\text{H}_2\text{O}_2$  増大を誘導している可能性は低いことが示唆された。



### 3-10. $\rho 0$ 細胞の作製

ミトコンドリアの kigamicin D 誘導  $H_2O_2$  産生への関与をより直接検討するために、 $\rho 0$  細胞を用いることにした。

$\rho 0$  細胞は、呼吸鎖欠失細胞のことをいう。mtDNA にはミトコンドリア電子伝達系を担う複合体のサブユニットが多くコードされていて、低濃度の ethidium bromide に細胞を長期間曝露させることで mtDNA を欠失させることが可能である[20][21]。この方法で  $\rho 0$  細胞を作製した。Kigamicin D が glucose 欠乏選択的に増大させる  $H_2O_2$  が電子伝達系由来であれば、 $\rho 0$  細胞では  $H_2O_2$  産生が減弱することが期待される。

PANC-1 細胞を 500 ng/mL 又は 1  $\mu$ g/mL ethidium bromide が添加された培地で 3 ヶ月培養した。財団法人癌研究会の芳賀直実博士に譲渡して頂いた  $\rho 0$ HT-29 とその親株 HT-29 をコントロールとして、ウェスタンブロッティングにて mtDNA にコードされる cytochrome c oxidase の subunit 1 (MTCO1) の発現を確認した。その結果、図 13(a)に示すように、ethidium bromide 1 $\mu$ g/mL を含む培地で培養していた細胞は  $\rho 0$ HT-29 と同様に、親株には見られる 40 kDa のバンドが無く、cytochrome c oxidase の subunit 1 を発現していないと考えられた。また、細胞から total DNA を抽出し、mtDNA 特異的配列を PCR で増幅したところ、親株で見られる 530 bp のバンドが  $\rho 0$ HT-29 と同様に検出されなかった(図 13(b))。この細胞を  $\rho 0$ PANC-1 とした。図 13(c)に細胞形態を示す。この  $\rho 0$ PANC-1 のミトコンドリアでの呼吸、酸素消費の欠損を確認するために、酸素消費速度 (oxygen consumption rate, OCR) をクラーク型酸素電極を用いて測定したところ、親株では酸素消費 7.5 nmol/10<sup>6</sup>cells/min であったのに対し、 $\rho 0$ PANC-1 は 3.3 nmol/10<sup>6</sup>cells/min であった(図 13(d))。

### 3-11. $\rho 0$ PANC-1 に対する kigamicin D の $H_2O_2$ 産生誘導

Kigamicin D 誘導  $H_2O_2$  のミトコンドリアへの関与を検討するために、 $\rho 0$ PANC-1 を用い、

kigamicin D 添加による  $H_2O_2$  量の変化を調べた。p0PANC-1 継代培地 (pyruvic acid, uridine 添加 high glucose DMEM) とその glucose 欠乏培地 (pyruvic acid, uridine 添加 glucose 欠乏 DMEM) に kigamicin D を終濃度 0, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で加え、その培地で p0PANC-1 細胞を 4 時間培養後、フローサイトメーターにて検討した。その結果と mean BES- $H_2O_2$ -Ac 値 ( $H_2O_2$  量) を図 14 に示す。p0PANC-1 は、対照群に kigamicin D 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加したものである、 $H_2O_2$  の若干の増加が観察された。対象群に比較して glucose 欠乏条件では、 $H_2O_2$  量の明らかな増加が観察された。Glucose 欠乏培地に kigamicin D を添加すると、非添加コントロールに比べわずかであるが  $H_2O_2$  量の増加が観察された (図 14(a))。一方、親細胞株 PANC-1 に関して同様の検討を行うと、対照群に kigamicin D 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加したものである、 $H_2O_2$  の若干の増加が観察された。対象群に比較して glucose 欠乏条件では、 $H_2O_2$  量の若干の増加が観察された。Glucose 欠乏培地に kigamicin D を添加すると、非添加コントロールに比べわずかであるが  $H_2O_2$  量の増加が観察された (図 14(b))。親細胞 PANC-1 のこの結果は、これまで観察された PANC-1 に glucose 欠乏時に kigamicin D を添加した結果と大きく異なった。そこで、pyruvic acid と uridine の影響を無くすために、両者を添加しない条件で同様の実験を行った。その結果を図 14(c)に示す。

p0PANC-1 は、対照群に kigamicin D 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加したものである、 $H_2O_2$  の若干の増加が観察された。対象群に比較して glucose 欠乏条件では、 $H_2O_2$  量の顕著な増加が観察された。Glucose 欠乏培地に kigamicin D 添加すると、さらなる  $H_2O_2$  量の増加が観察された (図 14(c))。一方、親細胞株 PANC-1 に関して同様の検討を行うと、対照群に kigamicin D 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加したものである、 $H_2O_2$  の若干の増加が観察された。対象群に比較して glucose 欠乏条件では、 $H_2O_2$  量の増加が観察された。Glucose 欠乏条件培地に kigamicin D を添加すると、 $H_2O_2$  量の顕著な増加が観察された (図 14(d))。親細胞 PANC-1 の結果は、これまで観察された PANC-1 に glucose 欠乏時に kigamicin D を添加した結果と近いものであった。これらの結果から、glucose 欠乏コントロールと比較して、p0PANC-1 は

kigamicin D 添加で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 増大したことが観察された。

Pyruvic acid と uridine の ρ0PANC-1 の細胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量への影響を検討するために、培地に pyruvic acid のみ又は uridine のみを添加した条件で、フローサイトメーターにて細胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量を調べた。その結果を図 14(e)(f)に示す。Pyruvic acid を培地に添加した条件では、対照群に kigamicin D 0.1 μg/mL を添加したものでは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の若干の増加が観察された。対象群に比較して glucose 欠乏条件では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量の顕著な増加が観察された。Glucose 欠乏培地に kigamicin D を添加すると、さらなる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量の増加が観察された (図 14(e))。Uridine を添加した条件では、対照群に kigamicin D 0.1 μg/mL を添加したものでは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の若干の増加が観察された。対象群に比較して glucose 欠乏条件では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量の明らかな増加が観察された。Glucose 欠乏培地に kigamicin D を添加すると、わずかであるが H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量の増加が観察された (図 14(f))。

### 3-12.Kigamicin D に誘導される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の細胞内局在の検討

Kigamicin D に glucose 欠乏選択的に誘導される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> はどこで発生しているのか。これを解明するために、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を特異的な蛍光プローブを用いて蛍光標識し細胞内局在を顕微鏡で調べた。その結果を図 15 に示す。Kigamicin D を終濃度 0.05 μg/mL で加えた glucose 欠乏培地で PANC-1 を 1 時間培養し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を蛍光プローブ BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac (緑) で標識し、核を Hoechst33342 (青) で、ミトコンドリアを MitoTracker Red CMXRos1 (赤) で染色した。図 15 に示すように、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は細胞質全体に広がっていた。

### 3-13.ρ0PANC-1 に対する kigamicin D の細胞毒性

ρ0PANC-1 に対する kigamicin D の細胞毒性を調べた。ρ0PANC-1 継代培地 (pyruvic acid, uridine 添加 high glucose DMEM) とその glucose 欠乏培地 (pyruvic acid, uridine 添加 glucose 欠乏 DMEM) に kigamicin D を終濃度 0, 0.1 μg/mL で加え、その培地で 4×10<sup>5</sup>

個の  $\rho$ 0PANC-1 細胞及び PANC-1 細胞を 24 時間培養後、細胞を回収し trypan blue 染色法にて相対的生存細胞数を測定した。24 時間後の生細胞数を図 16(a)に示す。 $\rho$ 0PANC-1 は、対照群では細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 2.8 倍に増加していた。対照群に kigamicin D 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加したものでは、細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 1.3 倍に増加しており、細胞数の増加がほとんど観察されなかった。Glucose 欠乏条件, kigamicin D 非処置コントロールを 100%とすると、kigamicin D 添加で生細胞数が 87%となった (図 16(a))。一方、親細胞株 PANC-1 に関して同様の検討を行うと、対照群では細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 3.8 倍に増加していた。対照群に kigamicin D 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加したものでは、細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 1.6 倍に増加しており、細胞数の増加の減少が観察された。Glucose 欠乏条件, kigamicin D 非処置コントロールを 100%とすると、kigamicin D 添加で生細胞数が 31%と期待値より多かった (図 16(b))。この結果は、図 1 に示す親細胞株 PANC-1 に対する kigamicin D の効果と大きく異なった。そこで、pyruvic acid と uridine の影響を無くすために、両者を添加しない条件で同様の実験を行った。その結果を図 16(c)(d)に示す。

Pyruvic acid, uridine を添加しない条件で  $\rho$ 0PANC-1 は、対照群では細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 1.8 倍に増加していた。対照群に kigamicin D 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加したものでは、細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 1.3 倍に増加しており、細胞数の増加がほとんど観察されなかった。Glucose 欠乏条件培地で  $\rho$ 0PANC-1 を培養すると、24 時間後には細胞は全て死滅していた。ここに kigamicin D を添加しても 24 時間後に全て死滅していた (図 16(c))。一方、親細胞株 PANC-1 に関して同様の検討を行うと、対照群では細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 2.3 倍に増加していた。対照群に kigamicin D 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加したものでは、細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 1.5 倍に増加しており、細胞数の増加の減少が観察された。Glucose 欠乏条件, kigamicin D 非処置コントロールを 100%とすると、kigamicin D 添加で生細胞数が 3.5%となった (図 16(d))。この結果は、図 1 に示す親細胞株 PANC-1 に対する kigamicin D の効果とほぼ一致した。24 時間培養後の生存細胞測定では、glucose 欠乏下における  $\rho$ 0PANC-1 に対する

kigamicin D の効果が検討できないため、12 時間の時点で細胞数を測定した。その結果を図 16(e)に示す。Glucose 欠乏条件,kigamicin D 非処置コントロールを 100%とすると、 $\rho$ 0PANC-1 は kigamicin D 添加で生細胞が 84.2%となった一方、親細胞 PANC-1 は kigamicin D 添加で生細胞が 39.7%となった。この結果より、 $\rho$ 0PANC-1 に対する kigamicin D の glucose 欠乏下での毒性は、親細胞 PANC-1 に対する毒性と大きく異なることが観察された。

Pyruvic acid と uridine の  $\rho$ 0PANC-1 の細胞生存への影響を検討するために、培地に pyruvic acid のみ又は uridine のみを添加した条件で、24 時間後の生細胞数を調べた。その結果を図 16(f)(g)に示す。Pyruvic acid を添加した条件で  $\rho$ 0PANC-1 は、対照群では細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 1.9 倍に増加していた。対照群に kigamicin D 0.1  $\mu$ g/mL を添加したもものでは、細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 1.3 倍に増加しており、細胞数の増加がほとんど観察されなかった。Glucose 欠乏培地で  $\rho$ 0PANC-1 を培養すると、24 時間後には細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約半分になっていた。Glucose 欠乏条件, kigamicin D 非処置コントロールを 100%とすると、kigamicin D 添加で生細胞数が 51%となっていた (図 16(f))。 Uridine を添加した条件で  $\rho$ 0PANC-1 は、対照群では細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 1.4 倍に増加していた。対照群に kigamicin D 0.1  $\mu$ g/mL を添加したもものでは、細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 1.6 倍に増加していた。Glucose 欠乏培地で  $\rho$ 0PANC-1 を培養すると、細胞数は  $4 \times 10^5$  個の約 1.3 倍になっていた。Glucose 欠乏条件, kigamicin D 非処置コントロールを 100%とすると、kigamicin D 添加で生細胞数が 75%となった (図 16(g))。

### 3-14. $\rho$ 0PANC-1 の glucose 欠乏時、kigamicin D 処置時の細胞死の形態

$\rho$ 0PANC-1 は glucose 欠乏に曝されると 24 時間後に全て死滅するが、この時の細胞死の形態は何なのか。また glucose 欠乏下の  $\rho$ 0PANC-1 に kigamicin D を処置することで、細胞死の形態に変化が現れないか。これらを検討するために、Hoechst33342 と PI の二重染

色で細胞死の形態を調べた。その結果を図 17 に示す。Necrosis のコントロールである 10% DMSO 添加では、Hoechst33342 とともに PI で染まる典型的な necrosis を確認できた。Apoptosis のコントロールである 100 nM camptothecin 添加では、PI 陰性で、Hoechst 染色された核にバブリング・分断が見られ、apoptosis が観察できた。

$\rho$ 0PANC-1 は、glucose 4.5 g/L 対照群に kigamicin D 0.1  $\mu$ g/mL を添加したのでは、死細胞数に変化がほとんど観察されなかった。Glucose 欠乏条件、kigamicin D 非処置コントロールに比較して、kigamicin D 添加で細胞死の形態に変化は観察されず、necrotic な細胞死が観察された。

### 3-15.PANC-1, $\rho$ 0PANC-1 に対する kigamicin D の他 ROS 種 ( $O_2^-$ , NO) 誘導の検討

PANC-1,  $\rho$ 0PANC-1 において、glucose 欠乏や kigamicin D 添加で  $H_2O_2$  以外の ROS 種、 $O_2^-$ , NO が増加するか否かを検討した。High glucose DMEM とその glucose 欠乏培地に kigamicin D を終濃度 0, 0.1  $\mu$ g/mL で加え、その培地で  $\rho$ 0PANC-1 細胞を 4 時間培養後、フローサイトメーターにて検討した結果と mean BES-So-AM 値 ( $O_2^-$ 量)、mean DAF-2DA 値 (NO 量) を図 18 に示す。 $\rho$ 0PANC-1 は、対照群に kigamicin D 0.1  $\mu$ g/mL を添加したものでは、 $O_2^-$ の若干の増加が観察された。対象群に比較して glucose 欠乏条件では、 $O_2^-$ 量の増加が観察された。Glucose 欠乏培地に kigamicin D 添加すると、わずかな  $O_2^-$ 量の減少が観察された (図 18(a))。一方、親細胞株 PANC-1 に関して同様の検討を行うと、対照群に kigamicin D 0.1  $\mu$ g/mL を添加したものでは、 $H_2O_2$ の若干の増加が観察された。対象群に比較して glucose 欠乏条件では、 $H_2O_2$ 量の若干の増加が観察された。Glucose 欠乏培地に kigamicin D を添加すると、わずかであるが  $H_2O_2$ 量の減少が観察された (図 18(b))。 $\rho$ 0PANC-1 は、対照群に kigamicin D 0.1  $\mu$ g/mL を添加したものでは、NO の若干の増加が観察された。対象群に比較して glucose 欠乏条件では、NO 量の増加が観察された。Glucose 欠乏培地に kigamicin D を添加すると、わずかな NO 量の減少が観察された (図 18(c))。

一方、親細胞株 PANC-1 に関して同様の検討を行うと、対照群に kigamicin D 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加したものでは、NO の若干の増加が観察された。対象群に比較して glucose 欠乏条件では、NO の若干の増加が観察された。Glucose 欠乏培地に kigamicin D を添加すると、わずかであるが NO 量の減少が観察された (図 18(d))。これらの結果から、 $\rho\text{0PANC-1}$ , 親細胞 PANC-1 を glucose 欠乏培地で培養しても  $\text{O}_2^-$ , NO の顕著な増大は観察されず、また培地に kigamicin D を添加しても顕著な増大は観察されなかった。

## 第4章 考察

本研究は、kigamicin Dにより glucose 欠乏選択的に増大する  $\text{H}_2\text{O}_2$  の細胞死における役割と、 $\text{H}_2\text{O}_2$  発生機構の解明に取り組んできた。栄養飢餓耐性を示す膵臓がん細胞株 PANC-1 に対し、先行研究とほぼ同様に glucose 欠乏培地で kigamicin D を  $0.05 \mu\text{g/mL}$  以上の濃度で添加すると 24 時間後の細胞死は 100% になり、kigamicin D の glucose 欠乏選択的な細胞毒性が確認された。また、先行研究と同様に、PANC-1 細胞において、kigamicin D が glucose 欠乏選択的に顕著な  $\text{H}_2\text{O}_2$  増大を誘発することも確認した。

様々ながん細胞で、glucose 欠乏状態に曝すことで酸化ストレスが増加し細胞死が誘導されるという報告[11][12][13]がある。Glucose 欠乏による細胞内 ROS が増加するメカニズムの1つとして、ミトコンドリア電子伝達系での一電子還元による  $\text{O}_2^-$  等の ROS 物産生が挙げられる。電子伝達系では、複合体 I  $\rightarrow$  III  $\rightarrow$  IV 又は複合体 II  $\rightarrow$  III  $\rightarrow$  IV と電子が渡され、複合体 IV により分子状酸素が四電子還元され水になる。一電子還元とは、電子伝達系から電子がリークして酸素に渡され、 $\text{O}_2^-$  が産生するというメカニズムである[19]。細胞内の ROS の 15% はこのミトコンドリア電子伝達系における機序で産生されると言われている[22]。さらに、がん細胞はミトコンドリア電子伝達系に欠陥があり、そもそも酸素の一電子還元による細胞内過酸化物質増加を引き起こしやすいとも考えられている[23]。細胞を glucose 欠乏に曝すと、解糖系からの ATP 供給不足及びアセチル CoA を補うために、アミノ酸や脂質を基質とした TCA cycle と酸化的リン酸化で ATP 合成をする。この経路の亢進により、結果としてミトコンドリア電子伝達系からの  $\text{O}_2^-$  産生が亢進し、その結果  $\text{H}_2\text{O}_2$  も増大すると考えられている。本来電子伝達系は正確に四電子還元が起これば  $\text{O}_2^-$  の発生は無いはずである。しかし、実際には消費される酸素の 10% 位が一電子還元を受けるという報告もある[22]。

Kigamicin D による細胞死の誘導に関し、今回の研究で示した如く、glucose 欠乏選択的に  $\text{H}_2\text{O}_2$  増大が誘導されることを考えると、 $\text{H}_2\text{O}_2$  増大は細胞死誘導に関与している可能性



が高いと考えた。抗酸化剤を用いた検討では、40 mM の NAC で kigamicin D 誘導  $H_2O_2$  を減弱させると、kigamicin D による細胞毒性はわずかながら軽減した。一方、catalase、PEG-catalase の添加では、kigamicin D 誘導  $H_2O_2$  は減少しなかったが、kigamicin D による細胞毒性は軽減した。Catalase は分子量約 24 万の高分子であるため、膜透過性は低いと考えられる。そのため、catalase 添加により見られた細胞毒性軽減は、PANC-1 細胞外の  $H_2O_2$  消去による可能性もある。NAC 添加による細胞内の  $H_2O_2$  消去系を亢進させるよりも、catalase による細胞外の  $H_2O_2$  の消去を亢進させたほうが、より kigamicin D による細胞死が軽減されるのならば、kigamicin D の細胞死誘導は細胞外の  $H_2O_2$  に誘導されているということになる。この点に関する検討には、細胞外だけで働く  $H_2O_2$  消去剤による検討が必要である。一方、catalase の膜透過性を向上させるために PEG 化された catalase も用いたが、catalase と同様に  $H_2O_2$  の減少は見られなかったが、細胞死は少ないながら抑制された。実際に PEG-catalase が細胞膜を透過して効果を示しているのか、細胞外での効果なのかは区別がつかなかった。先行の研究で、様々な種から得られた catalase で kigamicin D の細胞毒性への影響を調べたところ、本研究でも用いたウシ肝由来 catalase のみが kigamicin D の細胞毒性を軽減した。本実験で kigamicin D の細胞毒性軽減効果が見られるには非常に高濃度の catalase 添加が必要であったこと、PEG-catalase もウシ肝由来であったことを考えると、ウシ肝由来 catalase 抽出物に含まれる不純物に、PANC-1 に対して survival factor として働く物質が混入している可能性は残っている。

Catalase による kigamicin D の細胞毒性の抑制が、細胞内で働く catalase 活性に依存するか否かを検討するため、catalase 安定過剰発現細胞を調整した[25] [26]。しかし、その catalase 発現量はタンパク質量で親細胞の 1.5~1.9 倍、catalase 活性で 1.5 倍程度の細胞しか得られなかった。Catalase をさらに高発現した安定細胞が得られなかった理由として、catalase 過剰発現が PANC-1 細胞にとって有害である可能性がある。Catalase の  $H_2O_2$  消去能は、抗酸化酵素の中でも非常に強いと言われている一方で、細胞内の  $H_2O_2$  消去系は主

に glutathione redox cycle が担っていると報告されている[18]。また、catalase は生理的条件下では細胞内の peroxisome に存在する。これらのことより、細胞はそもそも catalase に依存しない  $H_2O_2$  消去を行うなか、catalase を 3 倍 4 倍に発現した場合、 $H_2O_2$  の過剰消去が起こりうる。 $H_2O_2$  は細胞毒性だけでなく細胞の生存・増殖に関わるシグナル伝達も行う[24]ため、 $H_2O_2$  の過剰消去はむしろ細胞に有害で、細胞死に至る可能性もある。いずれにせよ、今回の実験で得られた範囲では、catalase の強制発現により  $H_2O_2$  が減少したという証拠は得られなかった。

過去の多くの論文では、 $H_2O_2$  と細胞死の関連を検討する場合は、NAC や catalase の添加をして  $H_2O_2$  を消去した場合の細胞毒性を調べている[11][12][13]。 $H_2O_2$  と細胞死に関連がある場合は、これらの添加で顕著な細胞死の抑制が観察されている。本実験でも同様に NAC, catalase, さらに PEG-catalase の添加で検討したが、そのような顕著な細胞死の抑制は観察されなかった。このことから、kigamicin D が  $H_2O_2$  増大させることで細胞死を誘導している、という可能性は低いと考える。けれども、NAC 40mM 添加で細胞死の減弱は観察され、また catalase、PEG-catalase を添加しても減弱したため、 $H_2O_2$  増大が細胞死を誘導しているという仮説を完全には否定できない。記述した検討、catalase 高発現細胞を用いてさらなる検討は必要である。一方、本研究では  $H_2O_2$  の増大の理由として考えられる  $O_2^-$  や NO の増大は観察されなかったことから、 $O_2^-$  や NO により細胞毒性が誘導されている可能性は低いのではないかと考えている。

過去の研究から、PI3K-AKT 経路と栄養飢餓耐性に関与があることが示唆されている[2][9][10]。LY294002 添加では細胞死が誘導されなかったことから、kigamicin D の主たる作用点が 1 つであるとすれば、その作用点は PI3K のさらに上流であり、そこから 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仮定せざるをえない。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。PI3K-AKT 経路が kigamicin D の細胞死とは直接関係しな

い可能性は、結果で述べたように、LY294002 添加で  $H_2O_2$  が増大しなかったことから支持される。

Kigamicin D は呼吸鎖阻害剤と同様にミトコンドリア呼吸鎖を阻害することで、電子伝達系での  $O_2^-$  産生を増大させる[19]のではないかと考えた。しかし、細胞を用いた実験で kigamicin D は PANC-1 の酸素消費の阻害は観察されず、kigamicin D が電子伝達系を直接阻害して  $H_2O_2$  を増大しているという可能性は除外された。けれども、この結果はあくまでも kigamicin D が直接電子伝達系・呼吸を阻害していないことを示し、ミトコンドリア電子伝達系からの  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  産生が増大したという可能性は完全には否定できていない。この点を明らかにするため、呼吸鎖を欠失している  $\rho 0$ PANC-1 を用い、kigamicin D の誘導する  $H_2O_2$  は電子伝達系由来か否かを直接検討した。

$\rho 0$  細胞とは、呼吸能を欠失した細胞のことを言う。mtDNA には、電子伝達系を構成する複合体 I の 7 個のサブユニット、複合体 III の 1 個のサブユニット、複合体 IV の 3 個のサブユニット、ATP synthase の  $F_0$  unit における 2 個のサブユニットがコードされている。 $\rho 0$  細胞は環状 DNA である mtDNA を ethidium bromide 等インターカレートする試薬で細胞を培養することにより mtDNA を欠失させ、創り出すことができる[20][21]。本実験で  $\rho 0$ PANC-1 の mtDNA 由来タンパクや mtDNA 特異的配列、酸素消費速度の検討から、mtDNA の欠失および呼吸鎖機能の欠失を観察できた。もし kigamicin D が誘発する  $H_2O_2$  が電子伝達系由来であるのならば、 $\rho 0$ PANC-1 に glucose 欠乏下で kigamicin D を添加しても  $H_2O_2$  増大が観察されないのではないかと考えた。しかし、実験結果は予想とは異なった。 $\rho 0$ PANC-1 は、kigamicin D 添加した glucose 欠乏培地で培養すると、glucose 欠乏コントロールに比べさらなる  $H_2O_2$  量の増加が観察された。この結果から、kigamicin D は電子伝達系以外の ROS 産生機序由来の  $H_2O_2$  を増大させている可能性が示唆された。

Kigamicin D が誘導する  $H_2O_2$  がミトコンドリア電子伝達系由来であるならば、蛍光色素を用いて  $H_2O_2$  の細胞内局在を調べるのではないかと考えた。その結果は、ミ

トコンドリアに局在することなく細胞全体に広がっていた。 $\text{H}_2\text{O}_2$ は拡散しやすい分子であるため局在決定は難しいという可能性もあるが、 $\rho 0\text{PANC-1}$ の結果を考えると、kigamicin D誘導 $\text{H}_2\text{O}_2$ の産生メカニズムとして、細胞質全体で産生されている機序を考えるべきであろう。細胞質に広がるROS産生系としてはNADPH oxidase, キサンチンオキシダーゼやペルオキシソームが挙げられる。ペルオキシソームは長鎖脂肪酸の $\beta$ 酸化等のエネルギー代謝の過程で、オキシダーゼの働きで有機物から水素原子を引き抜く際に酸素を用い、その結果 $\text{H}_2\text{O}_2$ を産生する。今後kigamicin Dによりオキシダーゼの活性が増大するか否かを検討していく必要がある。

一方、 $\rho 0\text{PANC-1}$ に対するkigamicin Dの細胞毒性も検討した。その結果、 $\rho 0\text{PANC-1}$ に対するkigamicin Dの毒性は親株PANC-1に対するものよりも軽減していた。しかし、kigamicin Dには呼吸鎖阻害作用はない。Apoptosisは呼吸鎖不全である $\rho 0$ 細胞で起こりにくいという報告はある[27]。そのため、もしkigamicin Dがapoptosisを誘導するのならば、 $\rho 0\text{PANC-1}$ に対する細胞毒性が軽減している理由に、 $\rho 0$ 細胞がapoptosisを起こしにくいからと言える。しかし、本研究でも確認した通り、kigamicin Dはapoptoticな細胞死を誘導しないためこの理由は除外できる。よってkigamicin Dの毒性発揮には何らかの理由で呼吸鎖が必要であることを示唆している可能性がある。

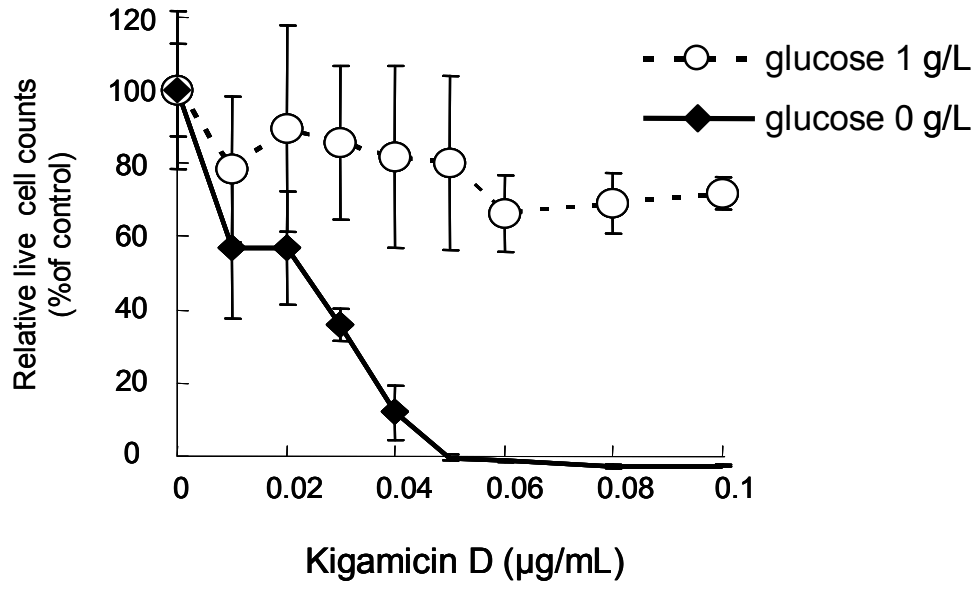
また、 $\rho 0\text{PANC-1}$ をglucose欠乏培地で培養すると顕著な $\text{H}_2\text{O}_2$ 増大が観察された。そしてこの増大は、uridine添加で顕著に減弱した。またuridineの添加は、 $\rho 0\text{PANC-1}$ のglucose 0 g/L条件における細胞死を顕著に抑制した。Pyruvic acid添加でも、uridineほど顕著ではないがglucose 0 g/Lの誘導する $\text{H}_2\text{O}_2$ 増大、細胞死の両方の抑制が観察されたが、これらの作用機序は明らかではない。

本研究を通して、kigamicin Dによりglucose欠乏選択的に増大する $\text{H}_2\text{O}_2$ 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。

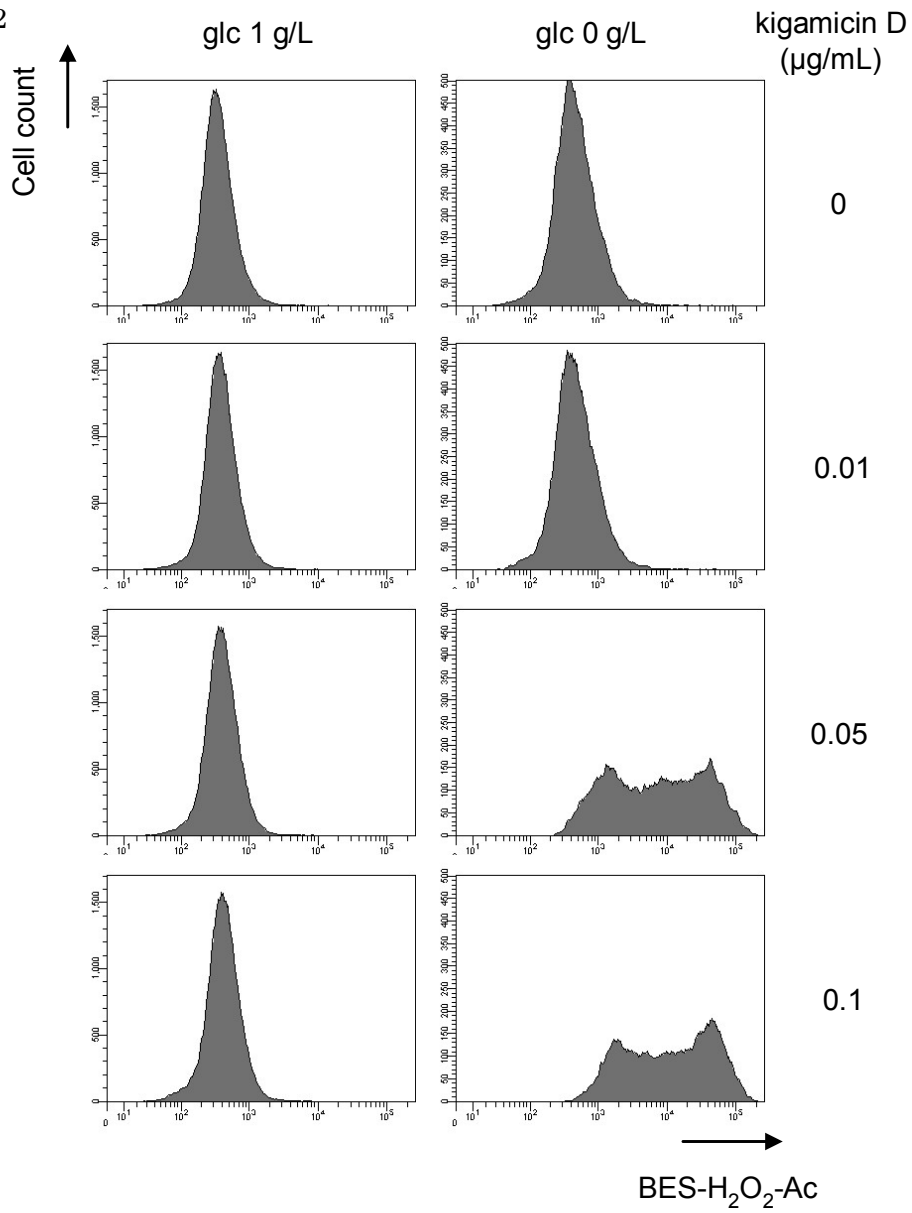
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生機序に関しては、ミトコンドリア以外の細胞質から発生していることが分かった。Kigamicin D の標的に関しては、最終的な決定はできなかったが PI3K-AKT 経路が関与している可能性は高いが、この経路単独ではなくさらに上流に働いている可能性が高いことが分かった。今後は細胞質に広く分布する ROS 産生系の検討を進める一方で、本研究では検討していない、kigamicin D の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去系への影響も検討する必要がある。本研究の範囲では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の増大機序を同定することはできなかったが、多量の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> がミトコンドリア電子伝達系以外から増大し、 $\rho 0$  細胞がこれに絶えているメカニズムは極めて興味深い。

第 5 章 图表

图 1

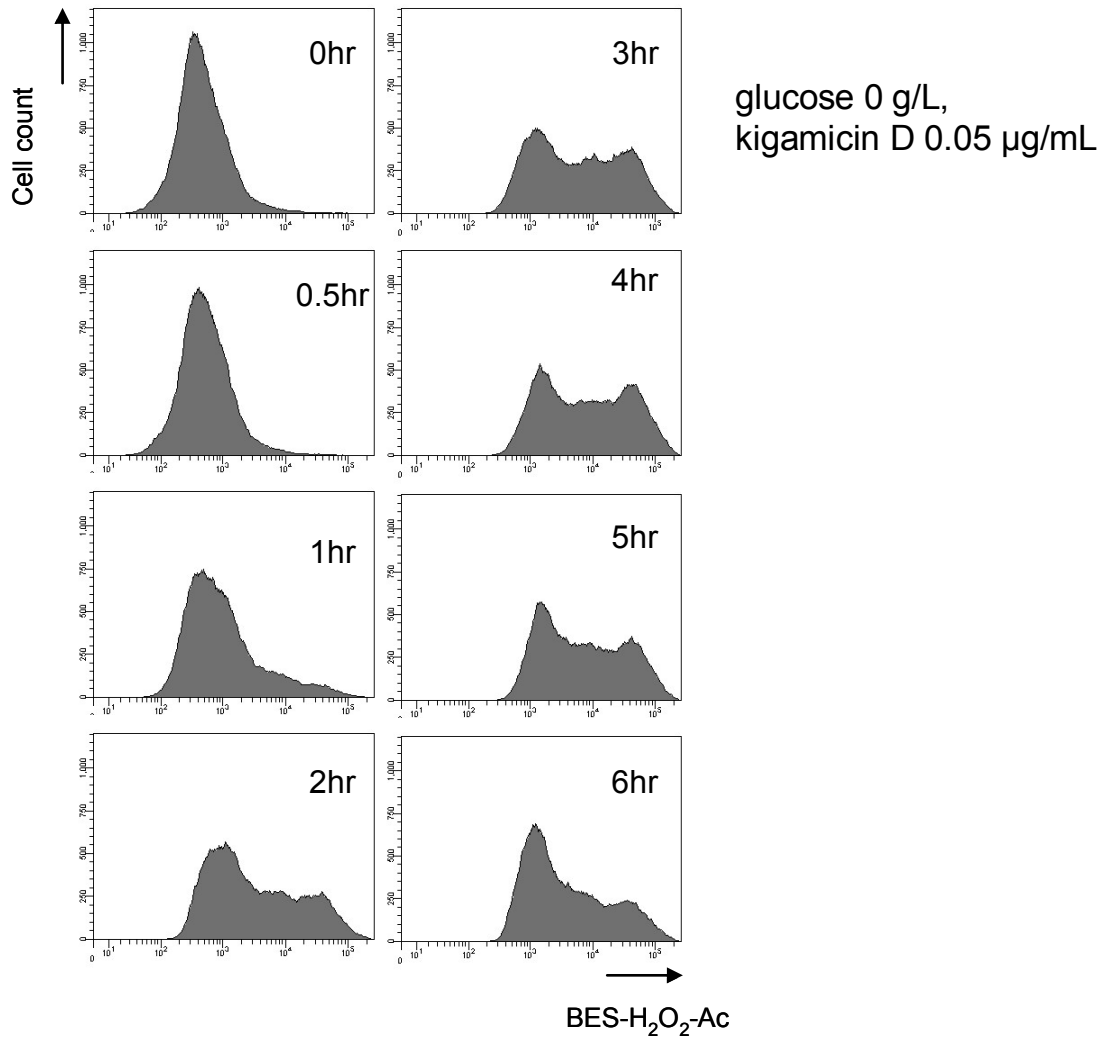


☒ 2

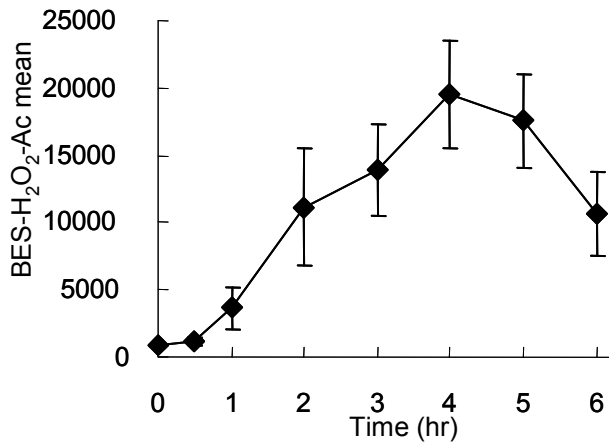


3

(a)

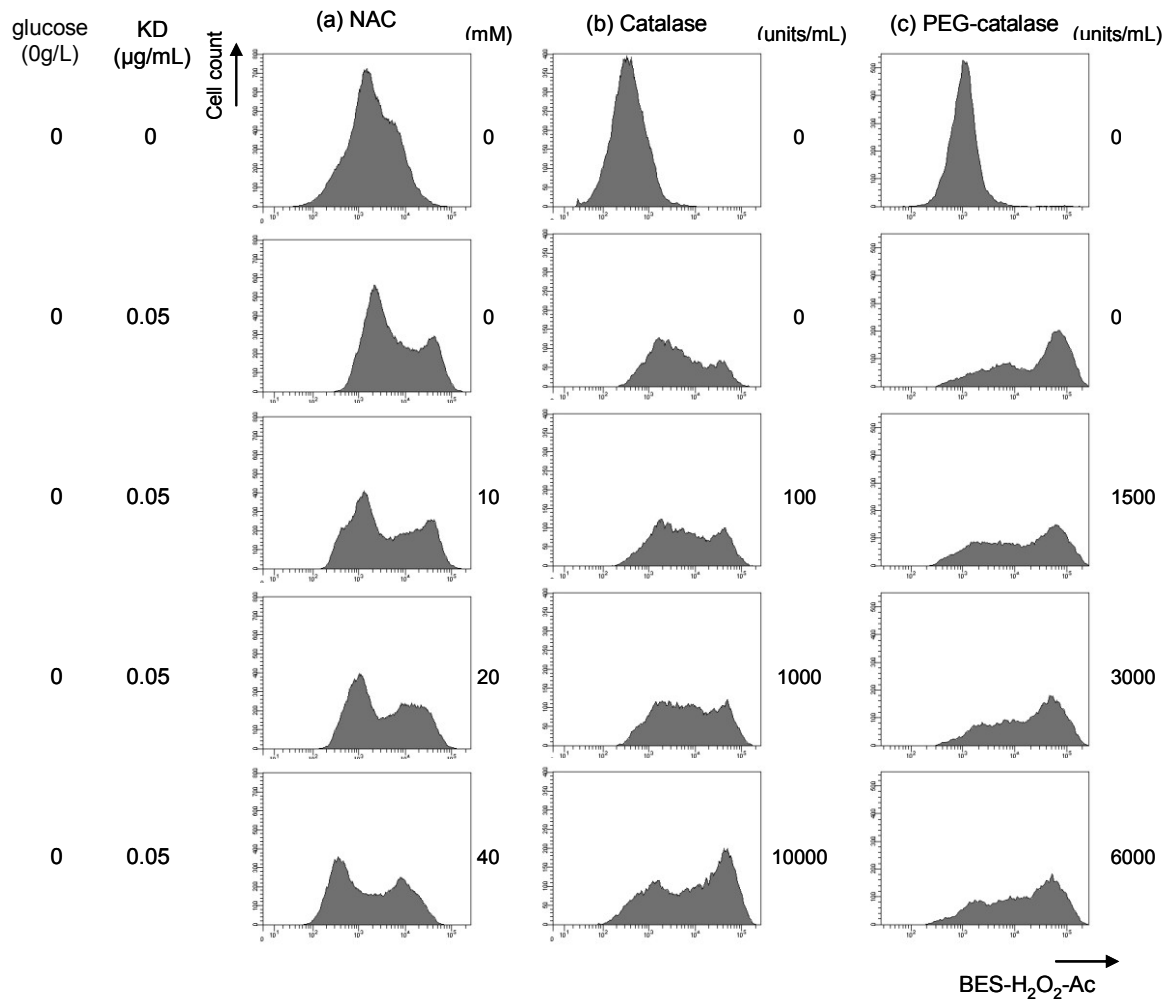


(b)



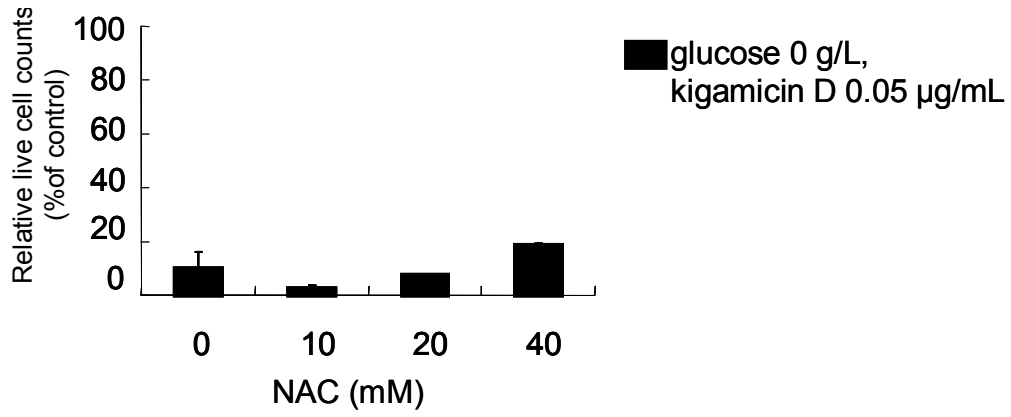


☒ 4

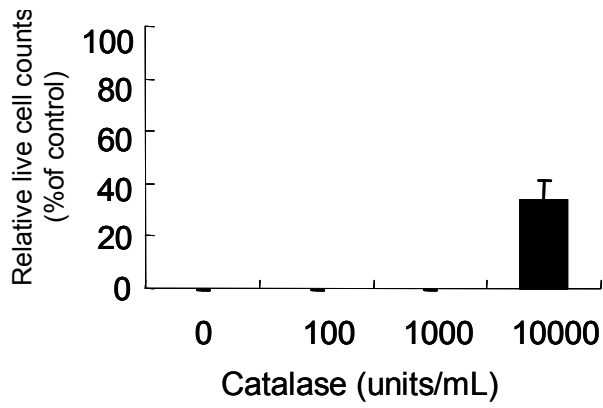


5

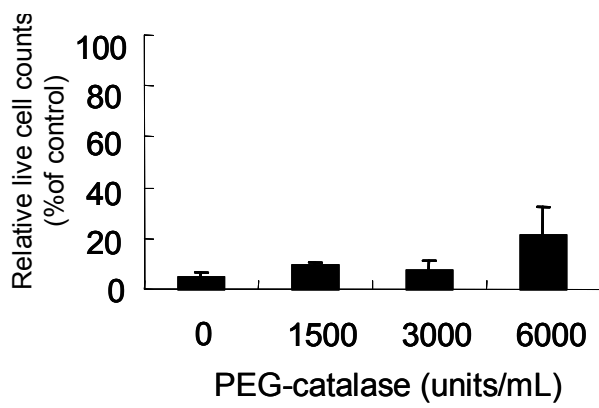
(a)



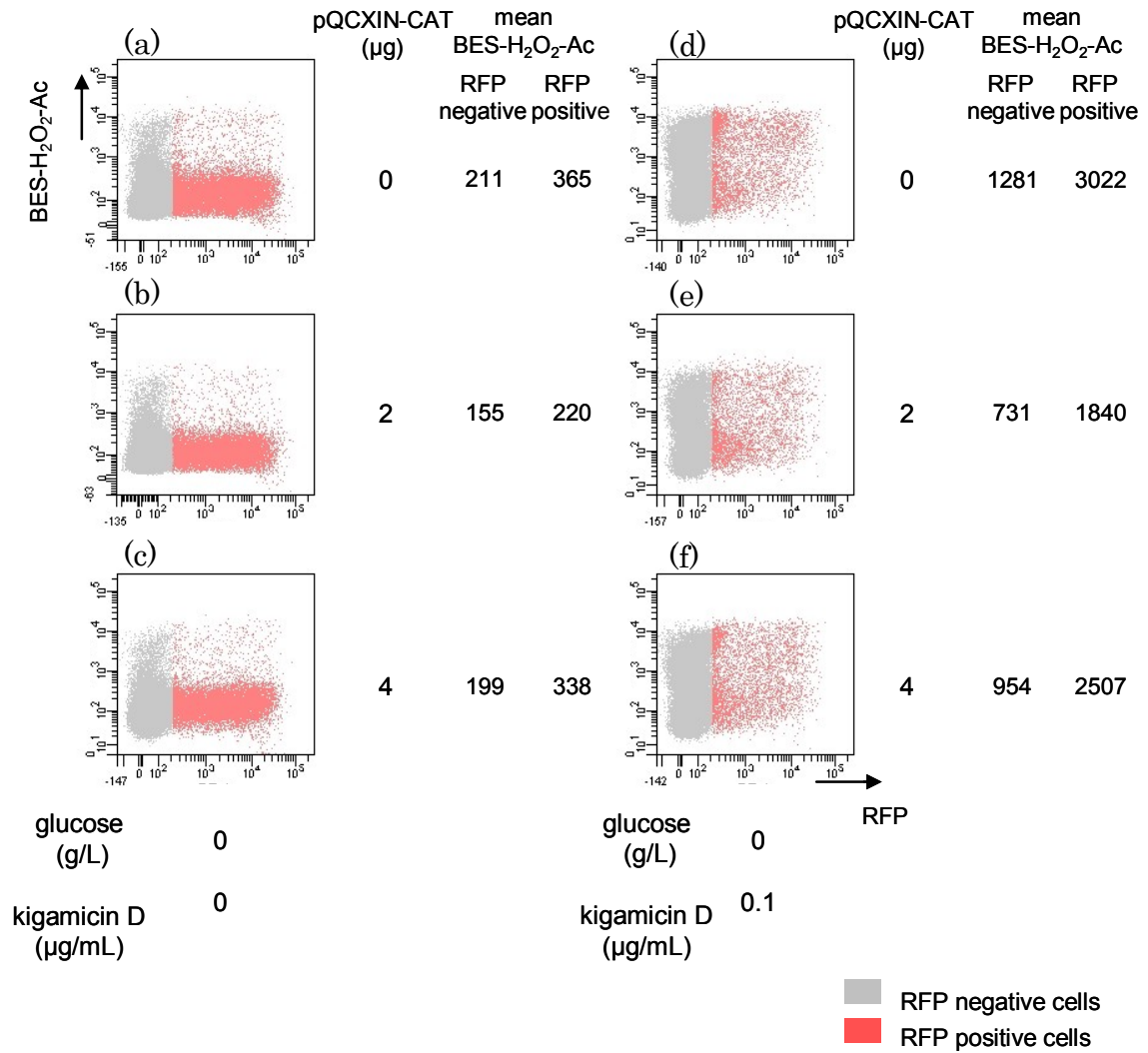
(b)



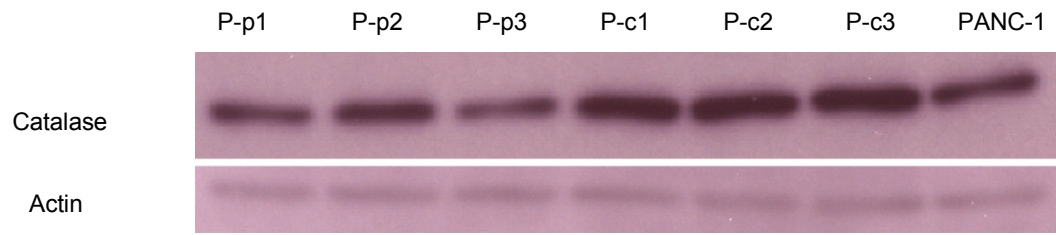
(c)



6

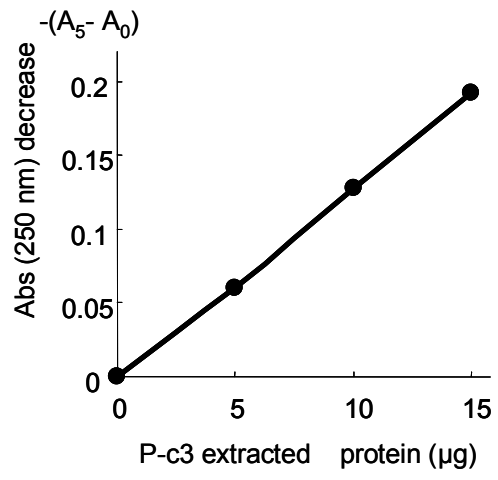


☒ 7

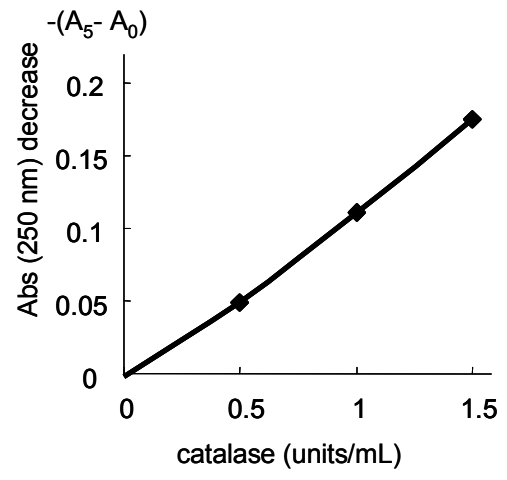


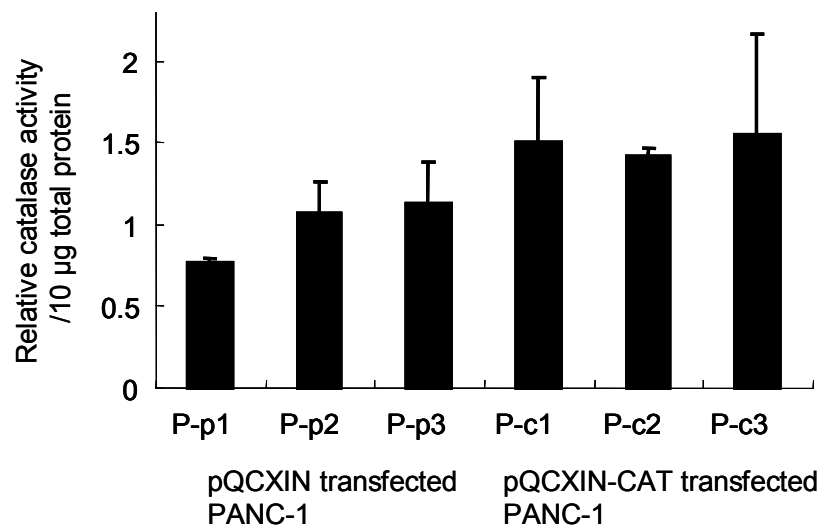
8

(a)

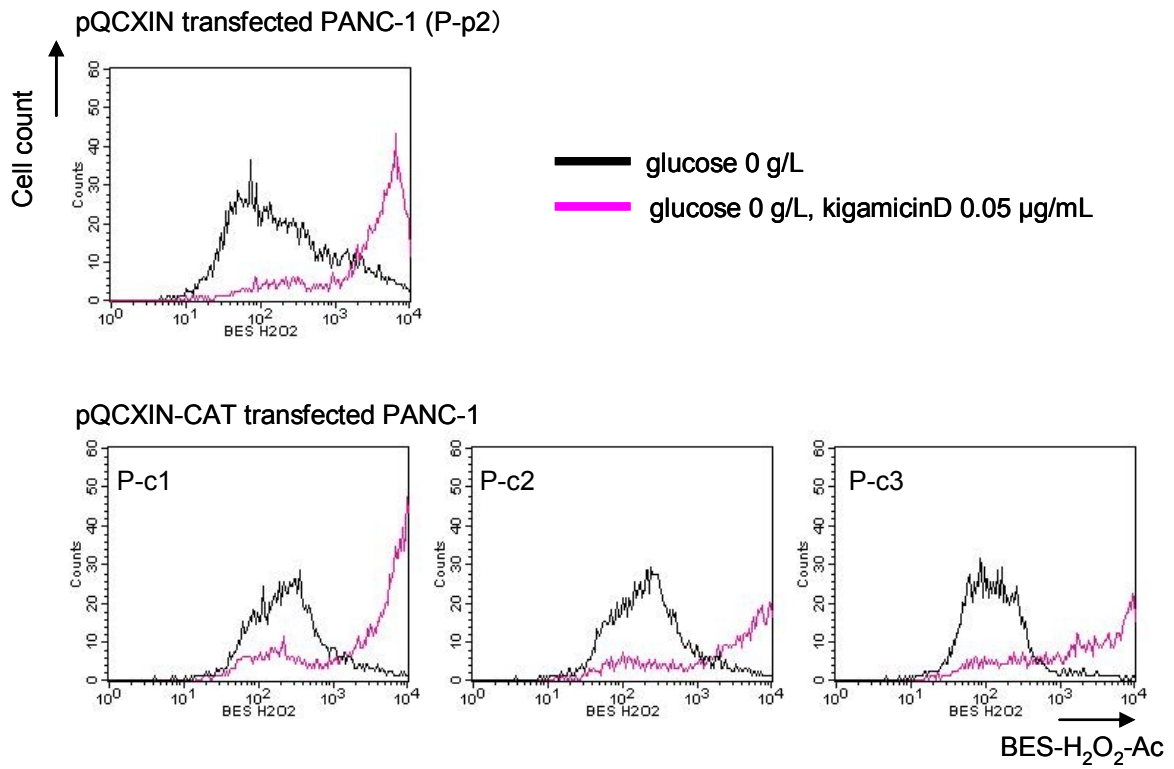


(b)

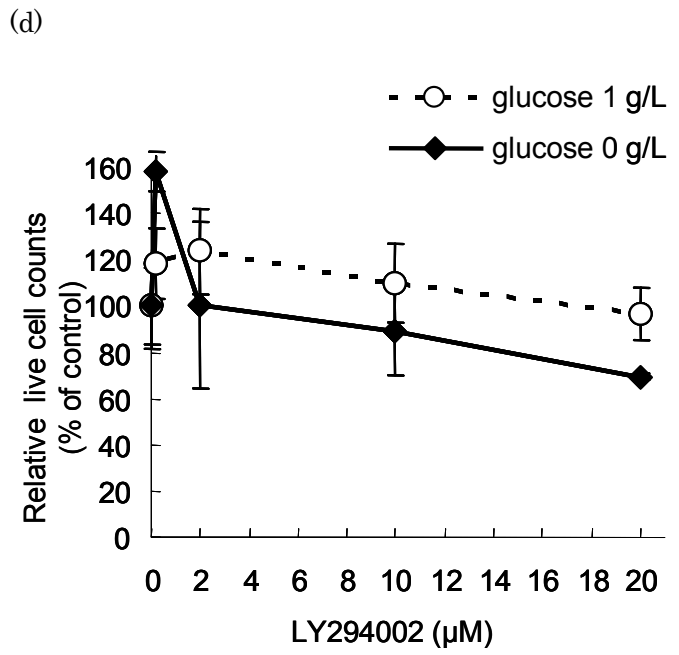
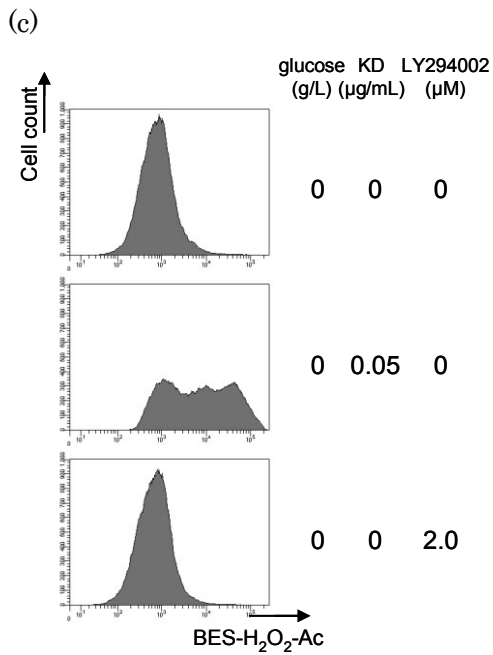
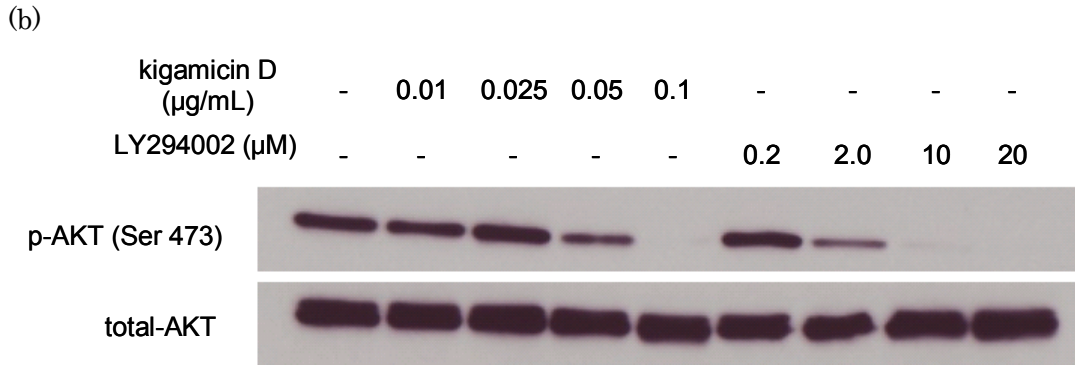
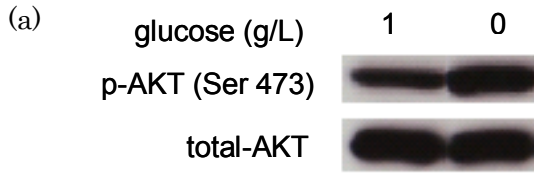




☒ 10



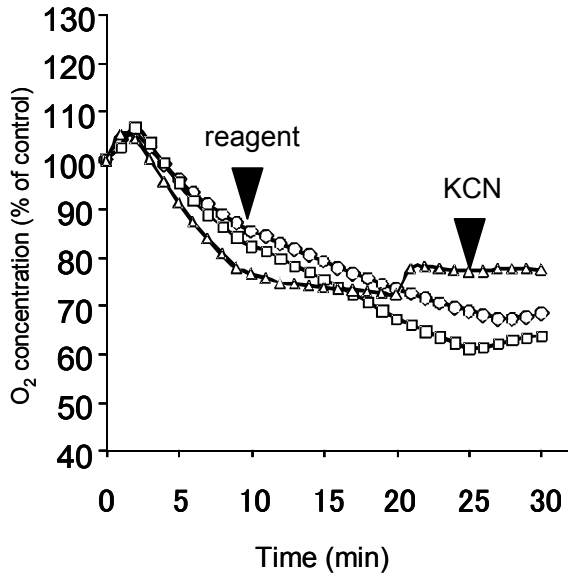
11



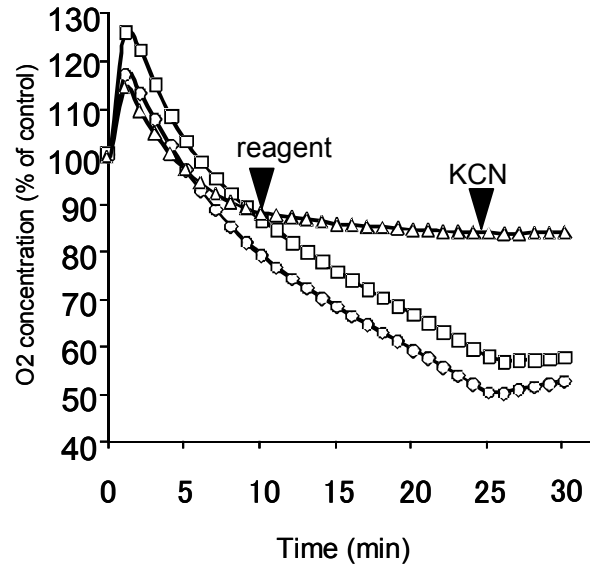


☒ 12

(a) glucose 1 g/L



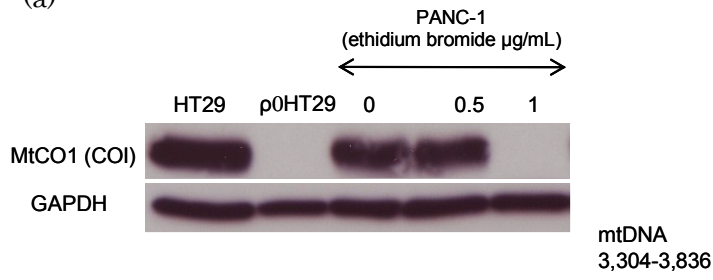
(b) glucose 0 g/L



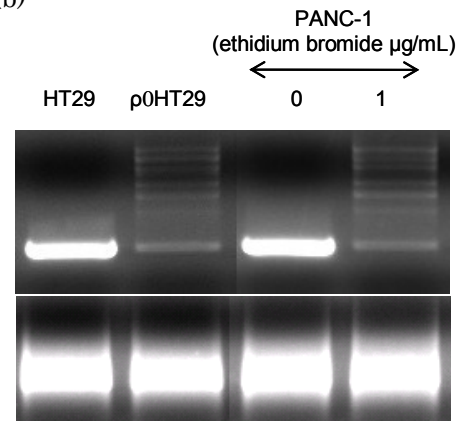
- DMSO
- Kigamicin D 0.1 µg/mL
- △ Rotenone 0.5 µM

13

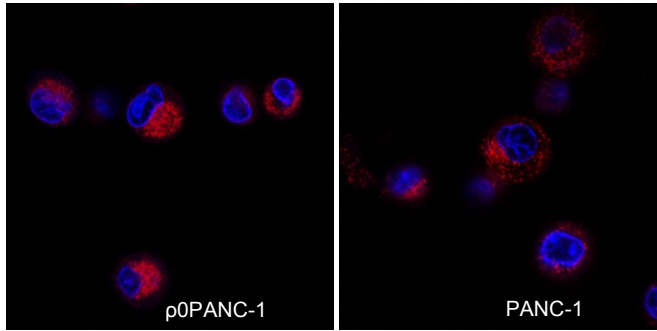
(a)



(b)

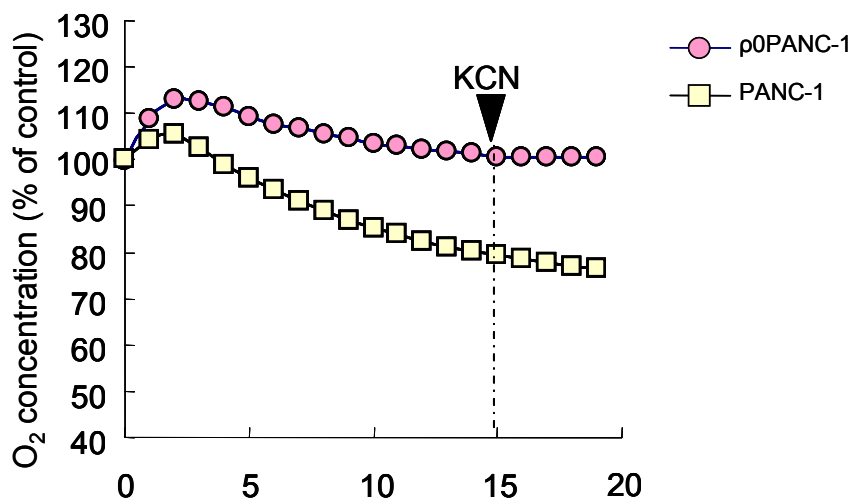


(c)

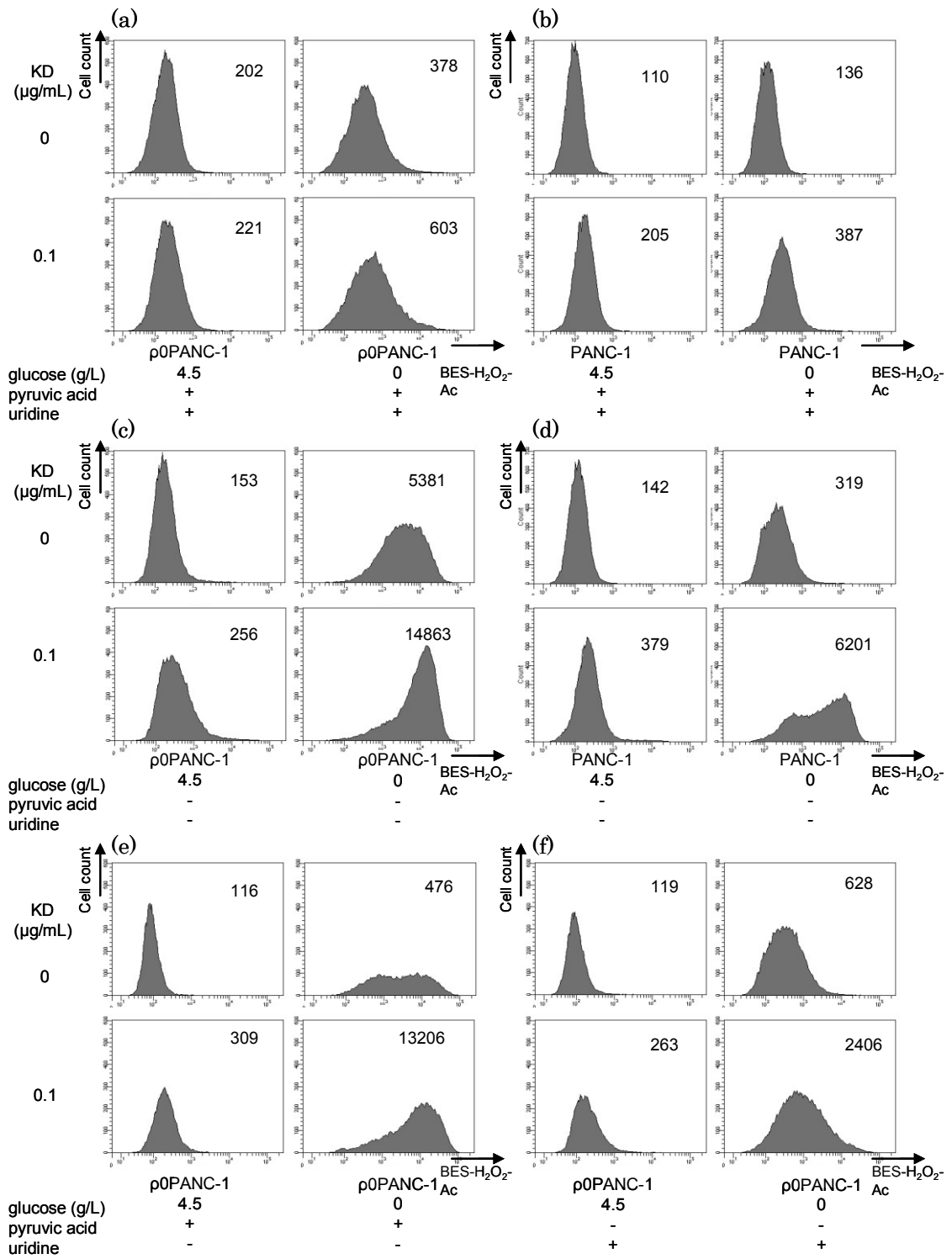


Red: Mitotracker  
Blue: Hoechst33342  
Original magnification: 60x

(d)

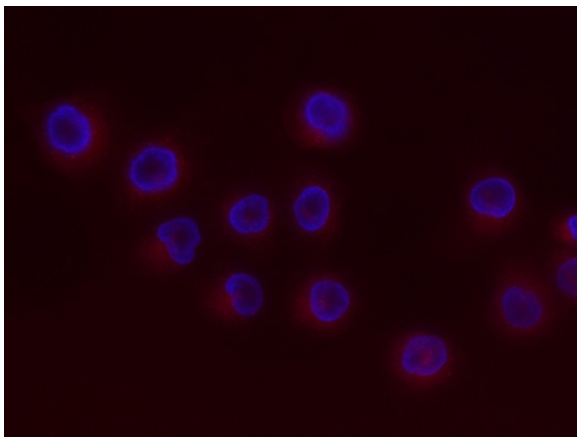


☒ 14



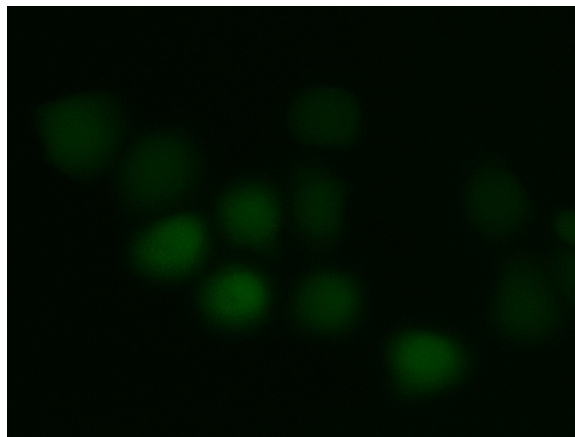
☒ 15

(a)



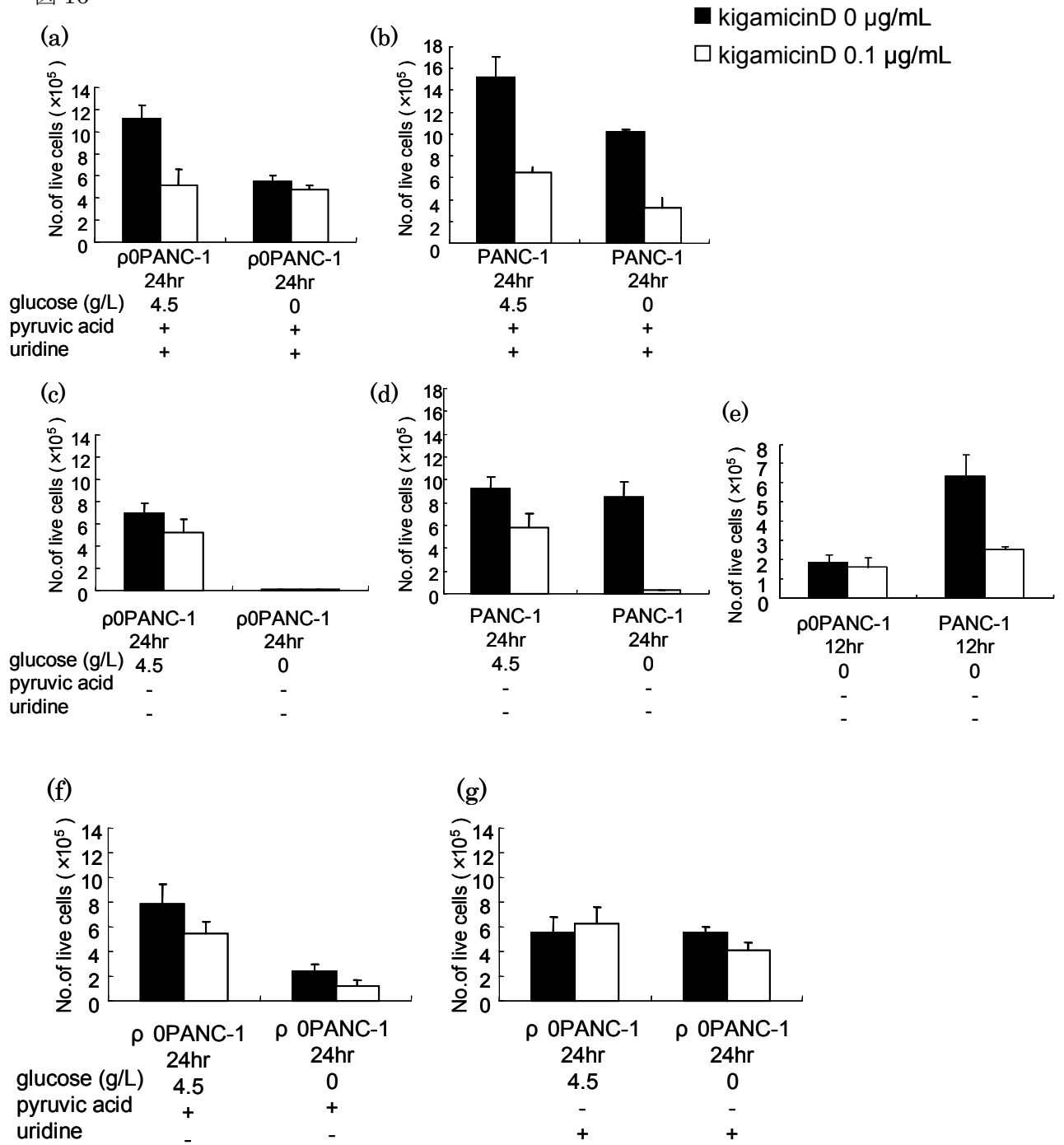
**Red: Mitotracker**  
**Blue: Hoechst33342**  
**Original magnification:60x**

(b)

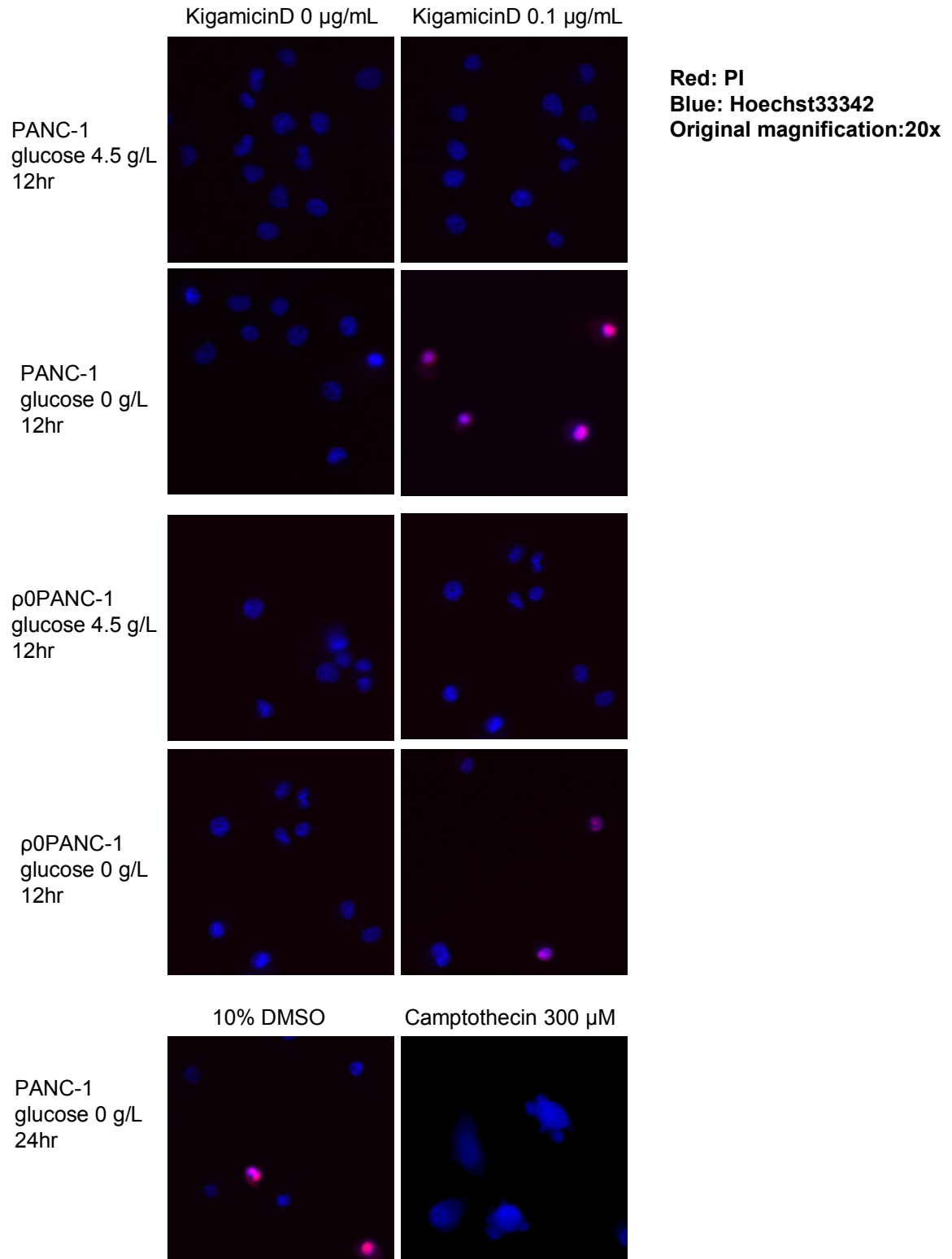


**Green: BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac**  
**Original magnification:60x**

16

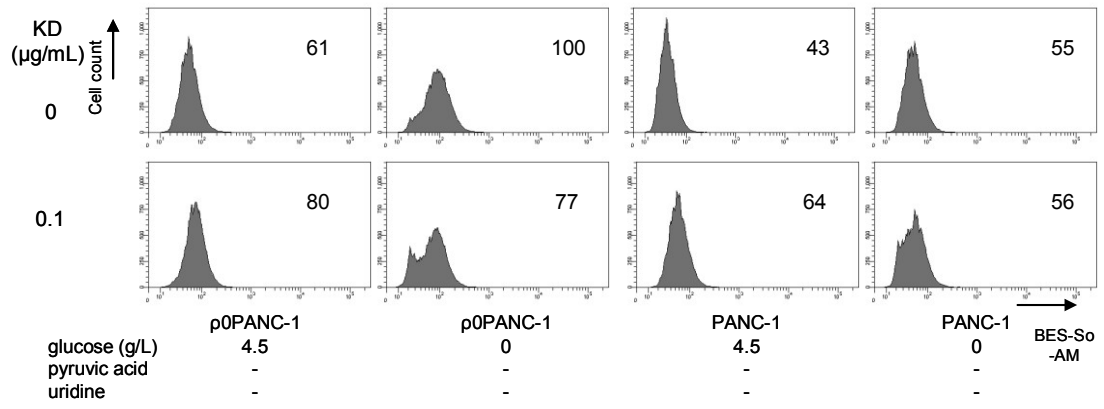


☒ 17

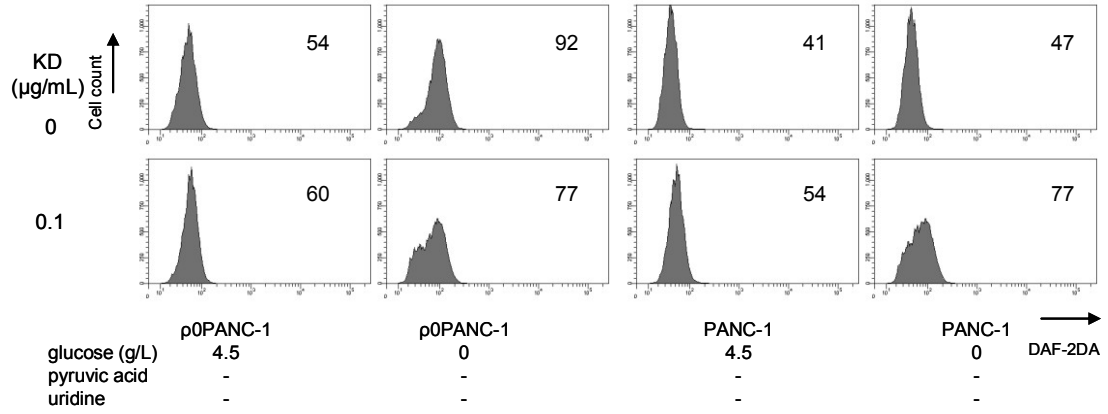


☒ 18

(a) BES-So-AM



(b) DAF-2DA



**Table プライマー配列**

用途		配列
pQCXIN-CAT 作製	1 st PCR (catalase配列の増幅)	forward 5' -AGGCCTCCTGCAGTGTCT reverse 5' -ATCCAGTGATGAGCGGGTTA
	In-Fusion cloning (catalase配列の線形ベクターへの組み込み)	forward 5' -AGACACATCTGAAGGATCCGGACAT reverse 5' -GTTAATTAAGCGTACGGCCACGGCCTCACAGATT
	塩基配列確認	forward 5' -ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCT reverse 5' -AAGCGGCTTCGGCCAGTAACGTTA forward(2) 5' -AGACACATCTGAAGGATCCGGACAT
p0PANC-1 作製 (mtDNA欠失確認)	mtDNA(3,304-3,836)の欠失確認	forward 5' -AACATACCCATGGCCAACCT reverse 5' -GGCAGGAGTAATCAGAGGTG
	β-actin の確認	forward 5' -AGAGCTACGAGCTGCCTGAC reverse 5' -CACCTTCACCGTTCCAGTTT



## 図の解説

### 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**

Kigamicin D を終濃度 0~0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で加えた glucose 含有培地 (○glucose 1 g/L) および glucose 欠乏培地 (◆glucose 0 g/L) で PANC-1 細胞を培養し、24 時間後の相対的生存細胞数を WST-8 法により測定した。Kigamicin D 非添加コントロールを 100 % として表示した。縦軸は、薬剤処理 24 時間後に WST-8 cell counting kit により測定した相対的生存細胞数。全ての実験は N=3 で行い、結果は means $\pm$ SD で示した。

### 図 2.

#### **Kigamicin D による glucose 欠乏選択的な細胞内 $\text{H}_2\text{O}_2$ 量増大**

Kigamicin D を終濃度 0~0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で加えた glucose 含有培地 (glucose 1 g/L) および glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L) で PANC-1 細胞を培養し、6 時間後、細胞膜透過性の蛍光プローブ BES- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ac で染色し、フローサイトメーターを用いて細胞内の  $\text{H}_2\text{O}_2$  を検出した。

### 図 3.

#### **Kigamicin D による glucose 欠乏選択的な細胞内 $\text{H}_2\text{O}_2$ 量増大の時間推移**

(a) (b) Kigamicin D を終濃度 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で加えた glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L) で PANC-1 細胞を 0~6 時間培養し、細胞膜透過性の蛍光プローブ BES- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ac で染色し、フローサイトメーターを用いて細胞内の  $\text{H}_2\text{O}_2$  を検出した。(c)に mean BES- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ac の平均値の時間推移を示す。N=3

### 図 4.

#### 抗酸化剤による kigamicin D 誘導 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生量への効果

(a)NAC を終濃度 0～40 mM、又は(b)catalase を終濃度 0～10000 units/mL、又は(c)PEG-catalase を終濃度 0～6000 units/mL で加えた glucose 含有培地で PANC-1 を 2 時間前処理した。対応する抗酸化剤を含み kigamicin D を終濃度 0.05 µg/mL 加えた glucose 含有又は欠乏培地で 6 時間培養後、フローサイトメーターにて細胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量を調べた。

KD = kigamicin D

#### 図 5.

#### 抗酸化剤による kigamicin D 誘導細胞死への効果

(a)NAC を終濃度 0～40 mM、又は(b)catalase を終濃度 0～10000 units/mL、又は(c)PEG-catalase を終濃度 0～6000 units/mL で加えた glucose 含有培地で PANC-1 を 2 時間前処理した。対応する抗酸化剤を含み kigamicin D を終濃度 0.05 µg/mL 加えた glucose 欠乏培地で培養し、24 時間後の相対的生存細胞数を WST-8 法により測定した。Kigamicin D 非添加コントロールを 100 % として表示した。縦軸は、薬剤処理 24 時間後に WST-8 cell counting kit により測定した相対的生存細胞数。全ての実験は N=3 で行い、結果は means ±SD で示した。

#### 図 6.

#### Catalase 一過性過剰発現による kigamicin D 誘導 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の消去

RFP 発現ベクター pDSRed1-C1 を pQCXIN-CAT 0, 2, 4µg と co-transfection し、RFP 陽性細胞で、pQCXIN-CAT の transfection により mean BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac 値 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量) が減少するか否かをフローサイトメーターにて調べた。(a)(b)(c)に transfection した細胞を glucose 欠乏培地に 4 時間培養した細胞、(d)(e)(f)に 0.1µg/mL kigamicin D 含有 glucose 欠乏培地に 4 時間培養した細胞のフローサイトメーターの結果を示す。RFP の発現量と

BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量) を表した。Mean BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac を示す。

図 7.

#### Catalase 安定過剰発現細胞の catalase 発現

空ベクターpQCXIN 導入 PANC-1 (P-p1, P-p2, P-p3)、catalase 安定過剰発現 PANC-1 (P-c1, P-c2, P-c3)、親細胞 PANC-1 (PANC-1) の catalase 発現をウェスタンブロットにより検出した。Catalase, actin 特異的な抗体によって検出した。

図 8.

#### Catalase 活性測定に用いる細胞抽出液量の検討

(a) 54mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液に、P-c3 細胞抽出液を総タンパク量で 0~15 μg 添加しインキュベーション前 (A<sub>0</sub>) 及び 37°C で 5 分間インキュベートした後 (A<sub>5</sub>) の 250 nm における吸光度の減少量  $-(A_5 - A_0)$  を測定した。P-c3 細胞抽出液総タンパク量に対する吸光度減少のグラフを示す。N=1

(b) 54 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液に、0~1.5 units/mL の catalase 標準液を添加した場合の 250 nm における吸光度の減少を(a)と同様に測定した。Catalase 濃度に対する吸光度減少のグラフを示す。N=1

図 9.

#### Catalase 安定過剰発現細胞の catalase 発現

空ベクターpQCXIN 導入 PANC-1 (P-p1, P-p2, P-p3)、catalase 安定過剰発現 PANC-1 (P-c1, P-c2, P-c3)、親細胞 PANC-1 (PANC-1) の catalase 活性を測定した。54 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液に、細胞抽出液を総タンパク量で 10 μg 添加した場合の 250 nm における吸光度の減少を測定した。元の親細胞 PANC-1 (PANC-1) の単位タンパク質あたりの活性を 1 として算出し

た、相対的 catalase 活性を示す。

**図 10.**

**Catalase 安定過剰発現による kigamicin D 誘導 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の消去**

空ベクターpQCXIN 導入 PANC-1 ((a)P-p2) 及び catalase 安定過剰発現 PANC-1 ((b)P-c1, (c) P-c2, (d) P-c3) を kigamicin D を終濃度 0, 0.05 µg/mL 加えた glucose 欠乏培地で 6 時間培養後、フローサイトメーターにて細胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量を調べた。各細胞の Kigamicin D 非添加コントロール (黒) および kigamicin D 添加サンプル (赤) の結果を示す。

**図 11.**

**Glucose 欠乏による PANC-1 細胞の AKT リン酸化**

(a)PANC-1 細胞における AKT リン酸化をウェスタンブロットで検出した。PANC-1 を glucose 含有培地 (glucose 1 g/L) または glucose 乏培地 (glucose 0 g/L) 下で、2 時間薬剤処理した。リン酸化 AKT (p-AKT), total AKT タンパク質は、特異的な抗体によって検出した。

(b)PANC-1 細胞における AKT リン酸化をウェスタンブロットで検出した。PANC-1 を 0~0.1 µg/ml の kigamicin D 又は 0~20 µM の LY294002 40 mM を添加した glucose 乏培地 (glucose 0 g/L) 下で、2 時間培養した。リン酸化 AKT (p-AKT), total AKT タンパク質は、特異的な抗体によって検出した。

(c) PANC-1 を DMSO, 0.05 µg/ml の kigamicin D 又は 2 µM の LY294002 40 mM を添加した glucose 乏培地 (glucose 0 g/L) 下で、6 時間培養した。フローサイトメーターにて細胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量を調べた。KD = kigamicin D

(d) LY294002 を終濃度 0~20 µM で加えた glucose 含有培地 (○glc 1 g/L) および glucose 欠乏培地 (◆glc 0 g/L) で PANC-1 細胞を培養し、24 時間後の相対的生存細胞数を WST-8 法により測定した。LY294002 非添加コントロールを 100% として表示した。縦軸は、薬剤

処理 24 時間後に WST-8 cell counting kit により測定した相対的生存細胞数。全ての実験は N=3 で行い、結果は means±SD で示した。

## 図 12.

### Kigamicin D の酸素消費への影響

PANC-1 を glucose 含有培地 (glucose 1 g/L, (a)) 及び glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L, (b)) に懸濁し、クラーク型酸素電極を用いて酸素消費速度を測定した。測定開始 10 分後に DMSO (○)、kigamicin D を終濃度 0.1 µg/mL (□)、rotenone を終濃度 0.5 µM (△) 添加し、測定開始 25 分後に KCN を添加した。

## 図 13.

### ρ0PANC-1 の(a)MTCO1 発現, (b)mtDNA 欠失の確認、(c)細胞形態および(d)酸素消費欠失

(a)HT-29 細胞、ρ0HT-29 細胞、PANC-1、0.5 µg/mL ethidium bromide 含有培地で培養した PANC-1、1 µg/mL ethidium bromide 含有培地で培養した PANC-1 の MTCO1 発現をウェスタンブロットにより調べた。MTCO1、GAPDH 特異的な抗体によって検出した。

(b)HT-29 細胞、ρ0HT-29 細胞、PANC-1、1 µg/mL ethidium bromide 培養 PANC-1 の totalDNA を抽出し、mtDNA 特異的配列及び β actin を PCR にて増幅した。

(c)親細胞 PANC-1 および(a)(b)で確認された ρ0PANC-1 の細胞形態を撮影した。核を Hoechst33342 (青) で、ミトコンドリアを MitoTracker Red CMXRos1 (赤) で染色した。

(d) 親細胞 PANC-1 (□) および(a)(b)で確認された ρ0PANC-1 (○) を pyruvic acid, uridine 添加 high glucose 培地 (glucose 4.5 g/L) に懸濁し、クラーク型酸素電極を用いて酸素消費を測定した。室温、大気圧下における MilliQ 水に含まれる酸素量を 100%とした。

図 14.

**ρ0PANC-1 に対する kigamicin D の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生誘導**

(a)-(f)下記の培地に kigamicin D を終濃度 0, 0.1 μg/mL で加え、その培地で ρ0PANC-1 又は親細胞 PANC-1 細胞を 4 時間培養後、フローサイトメーターにて細胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量を調べた。ヒストグラム及び mean BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac 値を示す。

(a)(b)Pyruvic acid, uridine 添加 high glucose 培地 (glucose 4.5 g/L)、及び pyruvic acid, uridine 添加 glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L)

(c)(d)High glucose 培地 (glucose 4.5 g/L)、及び glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L)

(e)Pyruvic acid 添加 high glucose 培地 (glucose 4.5 g/L)、及び pyruvic acid 添加 glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L)

(f)Uridine 添加 high glucose 培地 (glucose 4.5 g/L)、及び uridine 添加 glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L)

図 15.

**Kigamicin D に誘導される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の細胞内局在**

Kigamicin D を終濃度 0.05 μg/mL で加えた glucose 欠乏培地で PANC-1 を 1 時間培養した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を蛍光プローブ BESH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac (緑) で、核を Hoechst33342 (青) で、ミトコンドリアを MitoTracker Red CMXRos1 (赤) で染色した。(a)に核とミトコンドリア、(b)に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を示す。Original magnification ×60

図 16.

**ρ0PANC-1 に対する kigamicin D の細胞毒性**

(a)-(d),(f)(g)下記の培地に kigamicin D を終濃度 0, 0.1 μg/mL で加え、その培地で 4×10<sup>5</sup> 個の ρ0PANC-1 又は親細胞 PANC-1 細胞を 24 時間培養後、細胞を回収し trypan blue 染

色法にて生細胞数を測定した。24 時間後の生細胞数を示す。(e) 下記の培地に kigamicin D を終濃度 0, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で加え、その培地で  $4 \times 10^5$  個  $\rho 0\text{PANC-1}$  及び親細胞 PANC-1 細胞を 12 時間培養後、細胞を回収し trypan blue 染色法にて生細胞数を測定した。12 時間後の生細胞数を示す。

(a)(b)Pyruvic acid, uridine 添加 high glucose 培地 (glucose 4.5 g/L)、及び pyruvic acid, uridine 添加 glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L)

(c)(d)(e)High glucose 培地 (glucose 4.5 g/L)、及び glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L)

(f)Pyruvic acid 添加 high glucose 培地 (glucose 4.5 g/L)、及び pyruvic acid 添加 glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L)

(g)Uridine 添加 high glucose 培地 (glucose 4.5 g/L)、及び uridine 添加 glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L)

## 図 17.

### $\rho 0\text{PANC-1}$ の kigamicin D 添加時の細胞死形態

High glucose 培地 (glucose 4.5 g/L)、及び glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L) に kigamicin D を終濃度 0, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で加え、その培地で  $\rho 0\text{PANC-1}$  及び親細胞 PANC-1 細胞を 12 時間培養後、Hoechst33342 と PI の二重染色を行った。Necrosis コントロール, apoptosis コントロールを得るために、glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L) に 10% DMSO, 又は Canptothecin を 100 nM 加え、その培地で親細胞 PANC-1 細胞を 24 時間培養後、PI と Hoechst33342 の二重染色を行った。PI : 赤、Hoechst33342 : 青、original magnification 20 $\times$

図 18.

**ρ0PANC-1 に対する kigamicin D の他 ROS 種 ( $O_2^-$ , NO) 誘導の検討**

High glucose 培地 (glucose 4.5 g/L)、及び glucose 欠乏培地 (glucose 0 g/L) に kigamicin D を終濃度 0, 0.1  $\mu\text{g/mL}$  で加え、その培地で ρ0PANC-1 又は親細胞 PANC-1 細胞を 4 時間培養後、フローサイトメーターにて細胞内  $O_2^-$  量 (BES-So-AM (a)) 及び NO 量 (DAF-2DA(b)) を調べた。ヒストグラム及び mean BES-So-AM 値, mean DAF-2DA 値を示す。



## 第 6 章 参考文献

- [1] Teicher, B. A. (1981). "Classification of Antineoplastic Agents by their Selective Toxicities toward Oxygenated and Hypoxic Tumor Cells." Cancer Research **41**:73-81
- [2] Lu, J., S. Kunimoto, et al. (2004). "Kigamicin D, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity strategy targeting cancer cells' tolerance to nutrient starvation." Cancer Science: 547-552.
- [3] Brown, J. M. and W. R. Wilson (2004). "Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment." Nature Reviews Cancer **4**(6): 437-447.
- [4] Heiden, M. G. V., L. C. Cantley, et al. (2009). "Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation." Science **324**(5930): 1029-1033.
- [5] Hirayama, A., K. Kami, et al. (2009). "Quantitative Metabolome Profiling of Colon and Stomach Cancer Microenvironment by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry." Cancer Research **69**(11): 4918-4925.
- [6] Izuishi, K., K. Kato, et al. (2000). "Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: Possible new biochemical target for cancer therapy." Cancer Research **60**(21): 6201-6207.
- [7] Esumi, H., K. Izuishi, et al. (2002). "Hypoxia and nitric oxide treatment confer tolerance to glucose starvation in a 5'-AMP-activated protein kinase-dependent manner." Journal of Biological Chemistry **277**(36): 32791-32798.
- [8] Kato, K., T. Ogura, et al. (2002). "Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation." Oncogene **21**(39): 6082-6090.
- [9] Awale, S., J. Lu, et al. (2006). "Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation." Cancer Res **66**(3): 1751-1757.
- [10] Esumi H, Lu J, Kurashima Y, Hanaoka T. (2004) "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. **95**: 685-90.

[11] Lee, Y. J., S. S. Galoforo, et al. (1998). "Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells." Journal of Biological Chemistry **273**(9): 5294-5299.

[12] Blackburn, R. V., D. R. Spitz, et al. (1999). "Metabolic oxidative stress activates signal transduction and gene expression during glucose deprivation in human tumor cells." Free Radical Biology and Medicine **26**(3-4): 419-430.

[13] Jelluma, N., X. Yang, et al. (2006). "Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes." Mol Cancer Res **4**(5): 319-330.

[14] Engelman, J. A. (2009). "Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations." Nature Reviews Cancer **9**(8): 550-562.

[15] Liu, P., H. Cheng, et al. (2009). "Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer." Nature Reviews Drug Discovery **8**(8): 627-644.

[16] Morris, J. Z. (1996). "A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*." Nature **382**: 536-539.

[17] Minaxi S. Gami, Catherine A. Wolkow (2006). "Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan" Aging cell **5**:31-37

[18] Ahmad, I. M., N. Aykin-Burns, et al. (2005). "Mitochondrial O<sub>2</sub>(-center dot) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate glucose deprivation-induced cytotoxicity and oxidative stress in human cancer cells." Journal of Biological Chemistry **280**(6): 4254-4263.

[19] Murphy, Michael P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." Biochemical Journal **417**: 1-13.

- [20] Nass, M. M. K. (1970). "Abnormal DNA Patterns in Animal Mitochondria: Ethidium Bromide-Induced Breakdown of Closed Circular DNA and Conditions Leading to Oligomer Accumulation." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **67**: 1926-1933.
- [21] Michael P. King, G. A. (1989). "Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation." Science **246**: 500-503.
- [22] 内海耕慥、井上正康 新ミトコンドリア学 初版. 共立出版. 2001年
- [23] Spitz, D. R. (2000). "Glucose Deprivation-induced Oxidative Stress in Human Tumor cells." Ann. N. Y. Acad. Sci. **899**: 349-362.
- [24] 谷口直之 (監修)、赤池孝章、鈴木敬一郎、内田浩二 (編集) 実験医学 羊土社 Vol.27 No.15 2009年
- [25] Bai, J. (1999). "Overexpression of Catalase in Cytosolic or Mitochondrial Compartment Protects HepG2 Cells against Oxidative Injury." Journal of Biological Chemistry **274**. 26217-26224.
- [26] Bai, J. (2000). "Overexpression of Catalase in the Mitochondrial or Cytosolic Compartment Increases Sensitivity of HepG2 Cells to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Apoptosis." Journal of Biological Chemistry **275**(25): 19241-19249.
- [27] Chandel, N. S. (1999 ). "Cells depleted of mitochondrial DNA (p0) yield insight into physiological mechanisms." FEBS Letters **454**: 173-176.

## 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 教授に深く御礼申し上げます。まだ修士学生 1 年の私にも、学会での発表というの機会を与えて下さり、これは私にとって貴重な経験となりました。また先生は非常にお忙しいにもかかわらず、ミーティングを始めとして常日頃から直にディスカッションの時間を割いて下さりました。先生とのディスカッションを通して、学びその知識を使って考えることの楽しさを実感できたと思っています。とても充実した 2 年間になりました。深く感謝しております。

最も近くで指導して頂きました国立がん研究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。経験の浅い私にこの 2 年間、実験手法からデータ解析、発表方法、文章の書き方まで丁寧に分かりやすく、先生の体調が悪いときもご指導下さりました。先生の教えは今後とも忘れません。

本研究の基盤を築いて下さった金原左京先輩に深くお礼を申しあげます。お忙しい中、本研究に必要な研究背景の知識や実験手法を丁寧にご指導下さりました。そのため、テーマに対する理解を深めることができました。ありがとうございました。

財団法人癌研究会の芳賀直実先生に深く感謝の意を表します。細胞を供与頂くだけでなく、数多くのご助言を頂き、大変感謝しております。

国立がん研究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の富塚江利子先生、三好千香先生にはご多忙の中、研究の相談にのって頂き、多くのご指摘・ご助言を頂いたことに深く感謝しております。また本研究室に属する皆様には、研究面・生活面において毎日支えて頂きましたことを深く感謝しております。

同研究室の稲塚歩佳先輩、小野塚博子先輩、大和田賢先輩には 2 年間に渡り大変お世話になりました。入学当初から本日まで、皆様には常に質問に伺っていました。皆様のご指導のもと、少しは成長できたのではないかと思います。大変感謝しております。

同研究室の後輩の鈴木牧人君、松島洸達君、がん先端生命科学分野の先輩・同期・後輩には、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、私を支えてくれた両親、弟、友人に感謝しております。