

# 学位論文内容の要旨

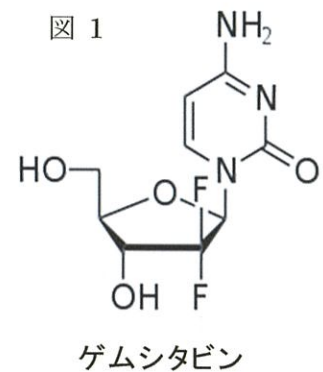
学位論文題目 抗がん剤ゲムシタビンによるミトコンドリア DNA 枯渇作用と細胞死に関する研究

論文指導教授 桜井 光 一

学位申請者 稲村 明 洋



抗がん剤ゲムシタビン(2,2-difluorodeoxycytidine nucleic acid) (図1)は、膵臓癌、乳癌、非小細胞肺癌などの多くのがんに対して有効である。ゲムシタビンの活性代謝物ゲムシタビン三リン酸化物はリボヌクレアーゼレダクターゼを阻害して細胞内 deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) プールを枯渇させ、さらに DNA 鎖伸長反応を阻害する。これらの DNA 鎖複製阻害作用は細胞増殖や分裂を阻害し、アポトーシス性細胞死を誘導する。低用量で有益な効果を有するゲムシタビンは、膵管腺癌の第一選択薬として汎用されているが、重大な副作用を有する。さらに、ゲムシタビンは細胞増殖シグナル系であるホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K)/Akt シグナル伝達経路を活性化し、細胞の薬物耐性作用を容易に誘導する。



副作用の一つとして尿糖の増加作用を有することから、ゲムシタビンによるヒト膵臓  $\beta$  細胞障害が生じることが推定される。近年、ゲムシタビンが培養膵  $\beta$  細胞株 INS-1 に対してインスリン分泌に関与する細胞増殖経路 PI3K/Akt 系を活性化し、アポトーシス性細胞死を誘導することが明らかとなった。しかしながら、ミトコンドリア機能障害を含む細胞死誘導機構の詳細は明らかではない。

細胞内のエネルギー産生を担うミトコンドリアは、細胞内環境に応じて迅速に融合と分裂を繰り返すが、これらの調節がアポトーシスを含む様々なシグナルの発生源として認識されている。ミトコンドリアに存在する DNA (mtDNA) は、16,569 塩基対からなる環状の DNA であり、電子伝達系を構成するタンパク質の 13 遺伝子が含まれている。mtDNA 合成には、核 DNA と同様に、細胞質に存在する dNTP が利用される。これらの知見から、ゲムシタビンは、mtDNA 合成を阻害する可能性があること、この傷害が細胞死誘導機構に関与することが推定されるが、その詳細は検討されていない。

本研究において、ミトコンドリア活性の高いインスリン分泌能を持つラット由来膵  $\beta$  細

胞株 INS-1 を用いて、ゲムシタビンによる mtDNA 傷害、PI3K/Akt 経路、ミトコンドリア機能障害およびオートファジーが、細胞死を誘導する機構について検討した。

### 1. ゲムシタビン誘導細胞周期停止と細胞死

培養膵β細胞株 INS-1 をゲムシタビンで処理すると、18 時間で細胞周期の S 期の細胞比が増加して G<sub>2</sub>/M 期の細胞比が低下し、24 時間以降 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期の細胞が増加して S 期と G<sub>2</sub>/M 期の細胞比は減少した。微小管重合阻害剤ノコダゾール共存下におけるゲムシタビン処理は、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期の細胞比を増加させたが、G<sub>2</sub>/M 期の細胞比を減少させた。同条件下において、24 時間以降に細胞数の低下が観察された(図 2)。微小管重合阻害剤ノコダゾールは細胞周期を G<sub>2</sub>/M 期に停止させるが、単独処理で細胞数の変化は観察されなかった。これらの結果は、ゲムシタビンが S 期及び G<sub>2</sub>/M 期の細胞に死を誘導する可能性を示唆し、細胞死を誘導した濃度が著しく低濃度で

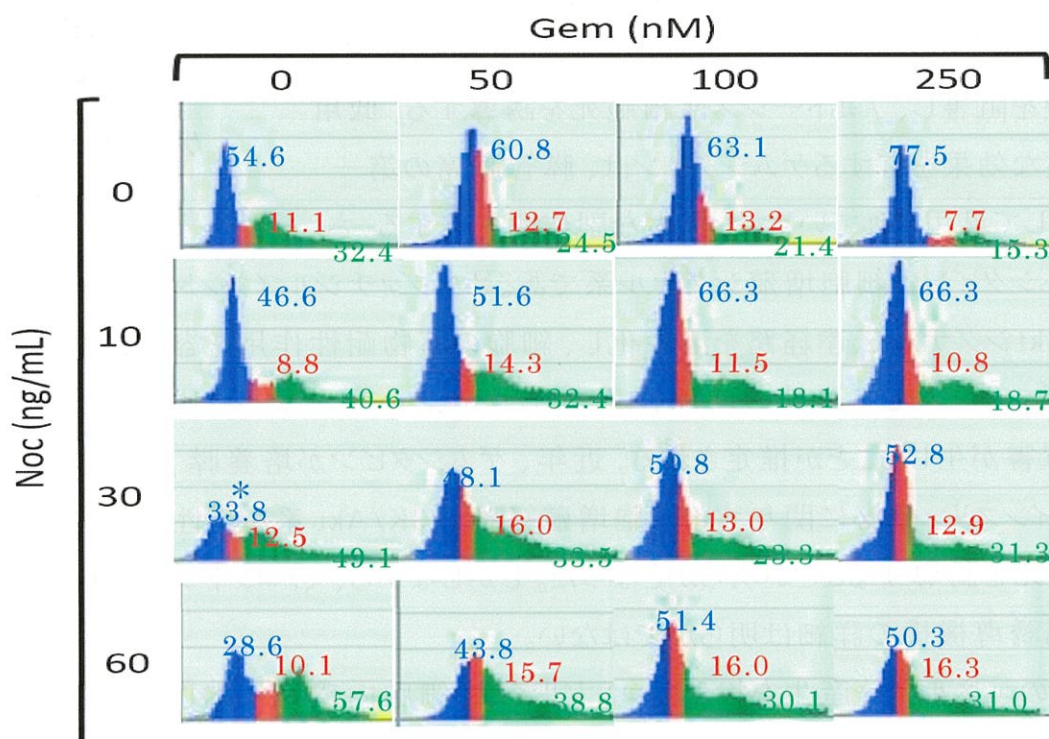


図2 INS-1 細胞における細胞周期に対するゲムシタビンの影響

ノコダゾール存在下、INS-1 細胞を種々濃度ゲムシタビンと 18 時間インキュベーションした。DNA は DAPI で染色した後、細胞イメージングシステムで検出し解析した。3 回の実験を行い、代表的な結果を示した。ヒストグラム中、青が G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期、赤が S 期、緑が G<sub>2</sub>/M 期、黄色が 2 倍体となった DNA を示している。

あったことから、細胞死誘導機構が他の抗がん剤とは異なっている可能性を示唆され

た。

## 2. ミトコンドリア DNA 枯渇と機能障害

ゲムシタビンによる mtDNA 量の変化について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した(図 3)。INS-1 細胞の DNA を SYBR<sup>®</sup> Green I で染色すると、核および核外で明らかな緑色蛍光が観察された。核外の緑色蛍光は、ミトコンドリア染色試薬の赤色蛍光の位置とほぼ一致し、核外の DNA が mtDNA であることが確認された。ゲムシタビンで細胞を処理すると、mtDNA を示す蛍光強度の低下が観察された。

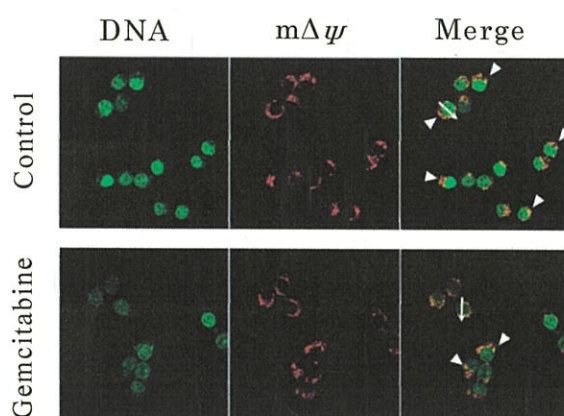


図3 ゲムシタビン処理細胞における DNA 像

INS-1 細胞をゲムシタビンと 24 時間インキュベーションした。ミトコンドリアは MitoTracker<sup>®</sup>Red で、DNA は SYBR<sup>®</sup> Green I で染色した。

ゲムシタビンで処理した細胞からミトコンドリアを抽出して、DNA を定量すると、コントロール細胞に比べて mtDNA 含量は有意に低下した(図 4)。また、リアルタイム PCR を用いて、核 DNA 数と mtDNA のコピー数の変化を測定解析すると、ゲムシタビンは有意に INS-1 細胞の mtDNA コピー数の減少を誘導した。核 DNA 含量の低下はこの条件下では認められなかった。これらの結果は、ゲムシタビンが mtDNA 含量を低下させることを示した。

ミトコンドリアが細胞内環境に応じて頻繁にそして迅速に分裂と融合を繰り返すことから、活発に行われる mtDNA 合成がゲムシタビンにより迅速にかつ特異的に阻害されたものと推定できる。

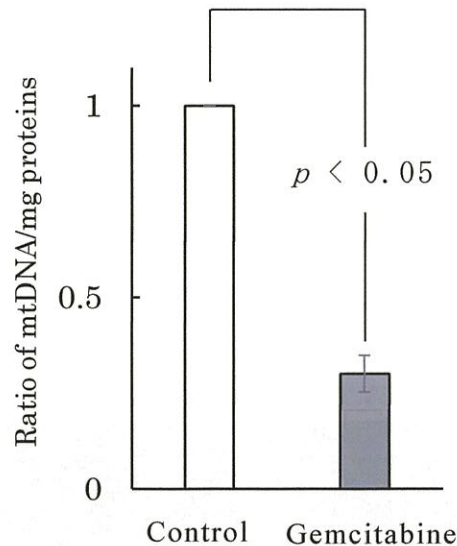


図4 ゲムシタビンの mtDNA 含量の低下作用

INS-1 細胞をゲムシタビンと 24 時間インキュベーションした後、ミトコンドリアを抽出し、DNA を SYBR<sup>®</sup> Green I で染色して定量した。

ゲムシタビンがミトコンドリア機能障害を誘導することを明らかにするため、細胞内のミトコンドリア量、ミトコンドリア膜電位 ( $m \Delta \psi$ )、ATP 含量および活性酸素種 (ROS) 濃度について検討した。ゲムシタビン添加後 INS-1 細胞を 24-48 時間インキュベーションすると、コントロール細胞に比べてミトコンドリア量、 $m \Delta \psi$ 、ATP 含量の時間に依存する減少が確認された。また、添加したゲムシタビン濃度に依存して ROS 生成量の増加が観察された。これらの結果は、ゲムシタビン処理は INS-1 細胞のミトコンドリア機能障害を誘導し、ROS 生成を増加させることを示唆した(図 5)。

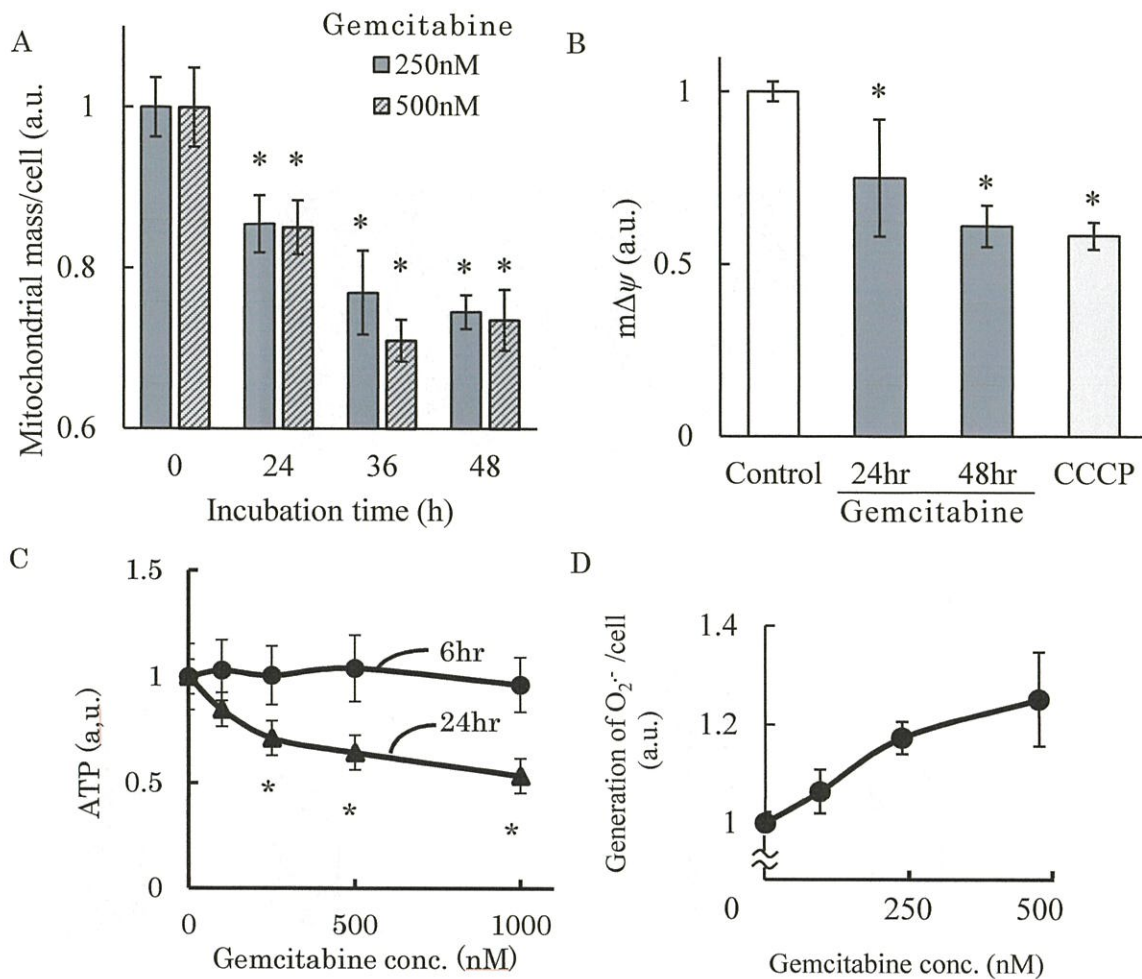


図4 ゲムシタビンによるミトコンドリア機能障害

INS-1 細胞をゲムシタビンと 24 時間インキュベーションした後、ミトコンドリア量(A)、内膜電位(B)、ATP 含量(C) ROS 生成(D)を測定した。

### 3. オートファジー発現と細胞死への関与

オートファジーは、飢餓状態やストレス条件下、細胞内成分を自己消化することで必要な栄養素を確保しまたは不要な成分を除去するリソソーム系代謝経路である。近年、細胞オルガネラの量的な調節に、オートファジーが関与することが示された。オートファジーが、ゲムシタビン処理細胞において、ミトコンドリア傷害に引き続いて誘導されるか、またこのオートファジーが細胞死に関与する可能性について検討した。

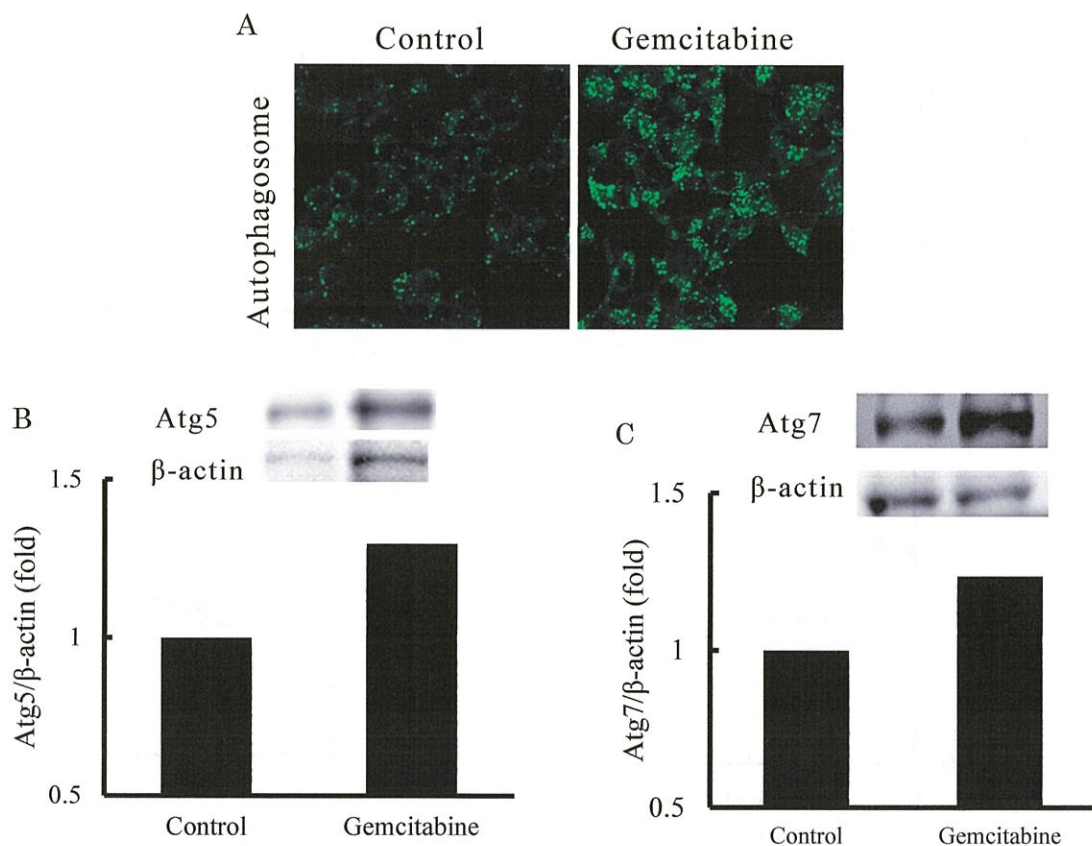


図6 ゲムシタビンによるオートファジーの誘導

INS-1 細胞をゲムシタビンで処理し、24 時間インキュベーションした後、オートファジーの誘導を共焦点レーザー顕微鏡で観察した(A)。INS-1 細胞をゲムシタビンで 30 時間インキュベーションした後、オートファジー関連タンパク質 Atg5(B)および Atg7(C)の発現をウェスタンブロット法で検出した。

INS-1細胞をゲムシタビンで処理すると、オートファジーの過程で出現するオートファゴソームが観察された(図 6A)。さらに、ゲムシタビンはオートファジー関連タンパク質である Atg5 及び Atg7の細胞内濃度を増加させた(図 6 B,C)。これらの結果から、ゲムシタビンが INS-1 細胞にオートファジーを誘導することが明らかとなった。

オートファゴソーム形成阻害剤であるクロロキン、オートファジー発生阻害剤である 3-メチルアデニンまたはスパウチン-1 存在下、ゲムシタビンによる細胞死は有意に減少した(図 7)。これらの結果は、ゲムシタビン処理により誘導される細胞死にオートファジーが関与することを示唆した。

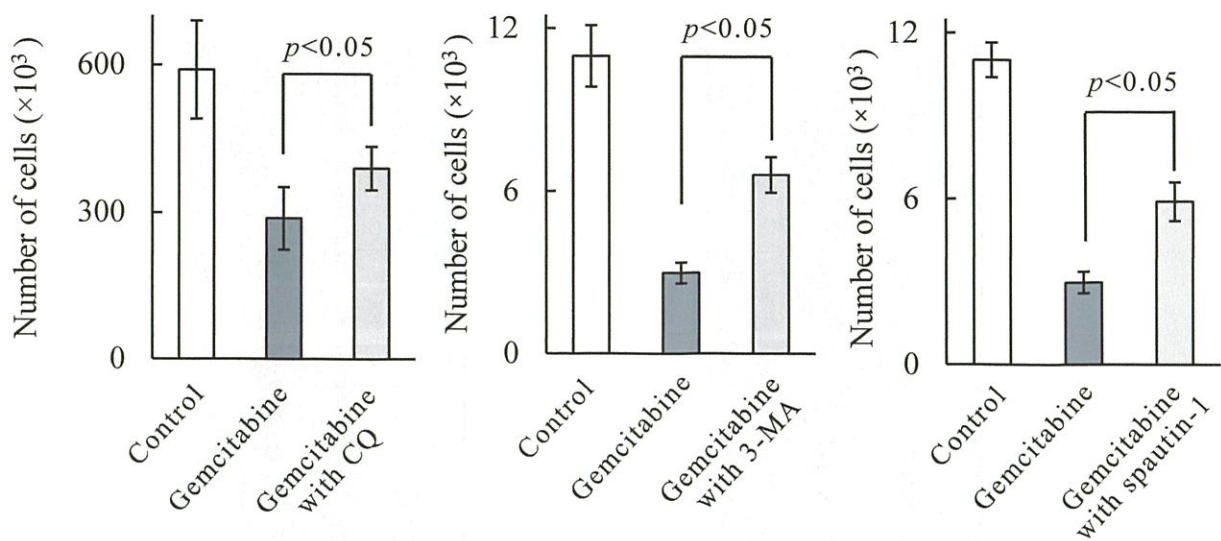


図7 ゲムシタビンによる細胞死に対するオートファジー阻害剤の影響

オートファジー阻害剤であるクロロキン(CQ)、3-メチルアデニン(3-MA)またはスパウチン-1 存在下また非存在下、INS-1 細胞をゲムシタビンと 24 時間インキュベーションした。細胞数は、hoechst33342 で染色後、Cytell Cell Imaging System を用いて核数を測定した。

ミトコンドリア機能障害とオートファジー発生が細胞死に関与する可能性を明らかにするため、ゲムシタビン処理細胞におけるオートファジー発生と  $m\Delta\phi$  の関係について検討した。図 8 に示すように、コントロール細胞において、オートファジーの発現を示す Atg5 の蛍光強度の増加はインキュベーション 24 時間では観察されなかったが、 $m\Delta\phi$  を示す明らかな蛍光は観察された(領域 2、94.8%)。オートファジー誘導剤であるラパマイシンで細胞を処理すると、オートファジータンパク質 Atg5 の増加に基づく蛍光強度の増加が観察されたが、 $m\Delta\phi$  に基づく蛍光強度は減少した(領域 1、43.5%)。この結果は、ラパマイシン誘導オートファジーの発現において  $m\Delta\phi$  が崩壊することが明らかとなった。ゲムシタビン処理 INS-1 細胞において、オートファジー発生を示す Atg5 発現の強い蛍光強度と高い  $m\Delta\phi$  を示す強い蛍光強度が認められた(領域 3、37.6%)。この結果は、オートファジー発生部位とミトコンドリアが共局在すること、またこのオートファジー誘導においてミトコンドリア活性が維持されていることが示唆された。これらの結果から、ゲムシタビンが部位特異的なオートファジーの一つであるマイトファジーを誘導する可能性が示唆された。

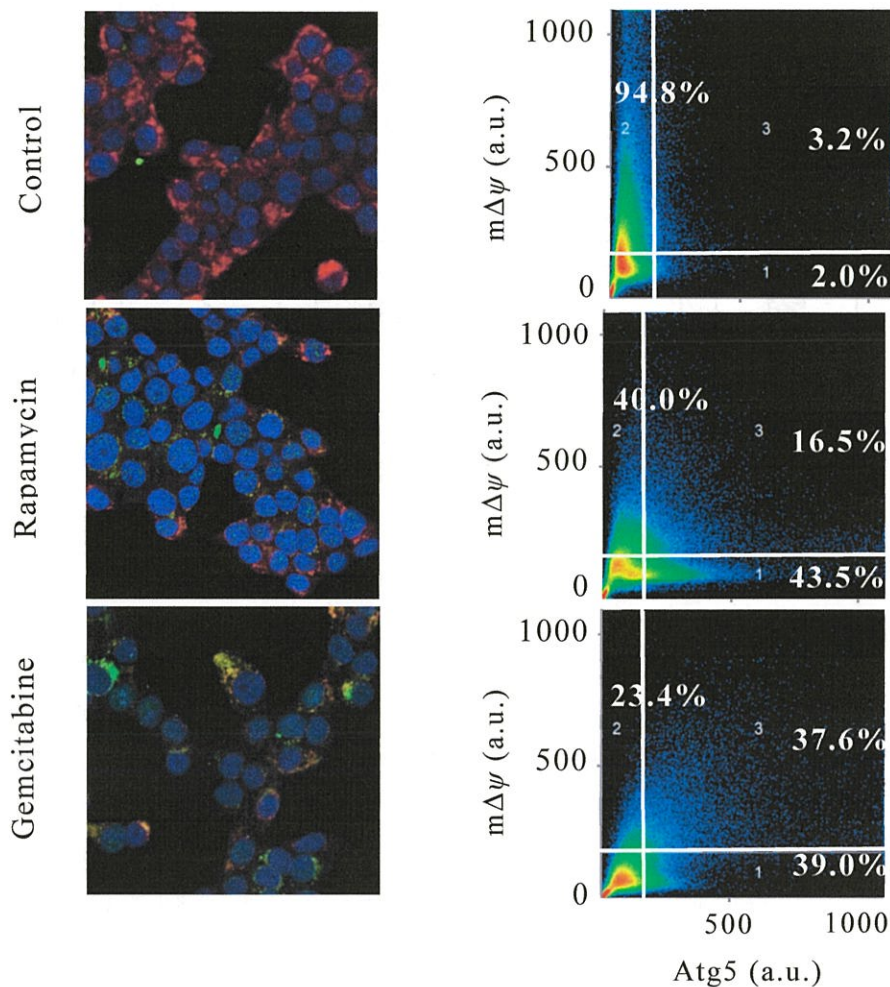


図8 ゲムシタビン誘導オートファジー発生と  $m\Delta\psi$  の関係

INS-1 細胞をゲムシタビンで 24 時間処理し、オートファジーの発現を Atg5 蛍光免疫法、 $m\Delta\psi$  を MitoTracker®Red 蛍光検出試薬による染色法で確認した。蛍光強度の検出及び局在性は共焦点レーザー顕微鏡システムで行った。

#### 4. マイトファジー発現への PI3K/Akt 経路の関与

ミトコンドリア特異的なオートファジーであるマイトファジーは、細胞内環境においてミトコンドリア過剰になった場合や損傷を受けたミトコンドリアの除去に関与することが示唆されている。それゆえ、ゲムシタビン処理により mtDNA 量が減少する条件におけるマイトファジーの発生について検討した。図 9 に示すように、コントロール細胞においてマイトファジーを示す蛍光は観察されなかったが、ゲムシタビン処理 INS-1 細胞においてマイトファジーを示す強い蛍光が観察された。



PI3K 阻害剤 LY294002 と wortmannin は、ゲムシタビン誘導マイトファジーの発生を明らかに阻害した。この結果は、ゲムシタビンによるマイトファジー発生に PI3K/Akt 経路の活性化が関与をすることを示唆するものであった。

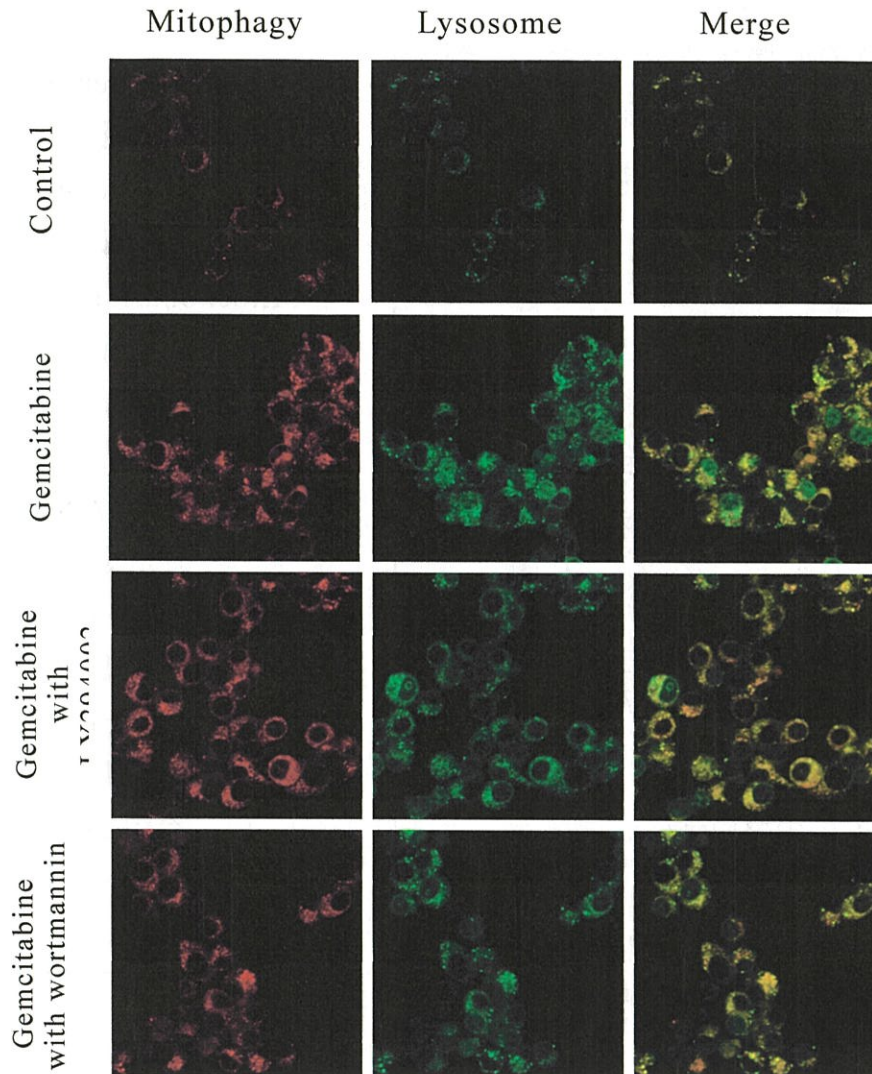


図9 ゲムシタビンによるマイトファジーの発生と PI3K/Akt 経路の関与

INS-1 細胞をゲムシタビンで 24 時間処理した。マイトファジー発現は、マイトファジー検出キットを用いて蛍光染色した後、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。PI3K 阻害剤である LY294002 と wortmannin はゲムシタビン添加 18 時間前に培養液に添加した。

## 結 語

本研究において、抗がん剤ゲムシタビンが、培養膵β細胞株 INS-1 に対して細胞死を誘導すること、この機構に mtDNA 含量の減少作用、ミトコンドリア機能障害が関与

することを明らかにした。

図 10 には推定されるゲムシタビン処理による細胞死誘導機構を示す。リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤であるゲムシタビンは、迅速に mtDNA コピー数の低下を惹起した。mtDNA はミトコンドリア電子伝達系を構成するいくつかの遺伝子をコードしていることから、 $m \Delta \phi$  の崩壊が誘導された。引き続いて漏出した電子が分子状酸素と反応して ROS を生成させ、この ROS は mtDNA の枯渇とミトコンドリア量の減少を引き起こした。

ゲムシタビンは高い  $m \Delta \phi$  を維持したオートファジーの発生を誘導し、このオートファジーの発生部位がミトコンドリアと共局在していた。また、ゲムシタビン処理細胞において、オルガネラ特異的オートファジーの一つであるマイトファジーが検出された。PI3K/Akt 阻害剤がゲムシタビン誘導のマイトファジーを阻害したことから、PI3K/Akt 経路の活性化がマイトファジー誘導を介して細胞死に関与することが示唆された。

本研究で、抗がん剤ゲムシタビンが mtDNA 含量低下を誘導すること、この作用に起因するミトコンドリア機能障害及びマイトファジーの発生が細胞死を惹起することを示した。この研究は、mtDNA 傷害をターゲットとする細胞死誘導機構が、がん治療に有効である可能性を示唆し、抗がん剤の開発や新たな化学療法の実現に寄与するものと考えられる。

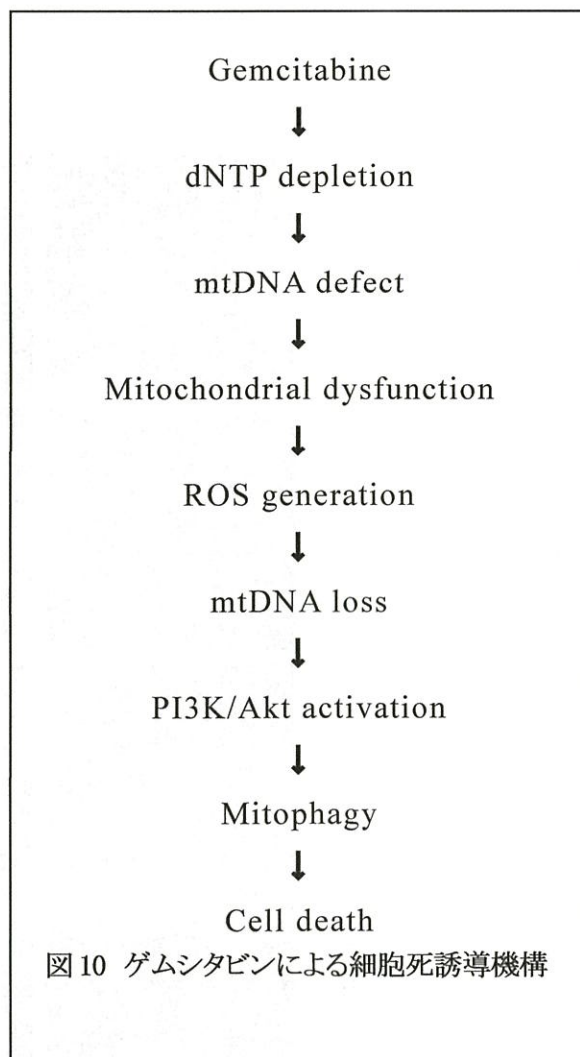


図 10 ゲムシタビンによる細胞死誘導機構