

Title	がん細胞の酸化ストレス耐性を支える代謝経路および代謝物質の探索
Sub Title	
Author	飯野, 慧子(lino, Keiko)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2012
Jtitle	生命と情報 No.19 (2012. ) ,p.8- 16
JaLC DOI	
Abstract	<p>細胞は、酸化ストレスを防ぐ複数の機構を備えており、特にがん細胞は効率的な抗酸化機構を持つと考えられている。近年、この抗酸化機構への代謝物の関与が見出され、グルタチオン代謝による酸化還元状態の調節機構などが注目を浴びている。一方で研究対象となる代謝物はごく一部に限られており、細胞の酸化ストレス抵抗性に寄与する代謝機構がまだ埋もれている可能性がある。そこで本研究では、メタボローム解析により細胞の酸化ストレス耐性に寄与する代謝機構の網羅的な探索を行った。はじめに、酸化ストレス刺激に応答して変化する代謝物を調べるため、臓がん細胞(Panc-1)に過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)で酸化ストレスを負荷した時の代謝変動を調べた。その結果、中心炭素代謝経路上の物質と、還元性物質である還元型グルタチオン(GSH)と spermidine が、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 負荷から短時間のうちに大きく変化することが観測できた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 負荷に対して還元性物質の変化が顕著だったことから、酸化ストレス抵抗性に寄与する還元性物質を探索すべく18種のがん細胞株を用いてスクリーニングを行った。そして、定常時の細胞内代謝物のうち、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に抵抗性のある細胞株で顕著に濃度が高い25物質を同定することができ、そのうち中心炭素代謝系路上の物質10種がH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を還元して除去することを <i>in vitro</i> で確かめた。さらに高濃度グルコース条件下で、細胞内の解糖系とペントースリン酸経路の代謝物を増加させた細胞は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 負荷に対する細胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 上昇の抑制と生存率の回復が確認することができた。以上の結果をまとめると、がん細胞の抗酸化作用にはGSHだけでなく還元能を持つ中心炭素代謝経路の物質も寄与しており、酸化ストレス刺激があった場合にも代謝物が瞬時に反応して酸化物を除去し、細胞内の酸化還元状態の維持に寄与している可能性があると考えられる。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2012年度学生論文集 修士論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000019-0008">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000019-0008</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# がん細胞の酸化ストレス耐性を支える代謝経路および代謝物質の探索

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科

飯野 慧子

## 要旨

細胞は、酸化ストレスを防ぐ複数の機構を備えており、特にがん細胞は効率的な抗酸化機構を持つと考えられている。近年、この抗酸化機構への代謝物の関与が見出され、グルタチオン代謝による酸化還元状態の調節機構などが注目を浴びている。一方で研究対象となる代謝物のごく一部に限られており、細胞の酸化ストレス抵抗性に寄与する代謝機構がまだ埋もれている可能性がある。そこで本研究では、メタボローム解析により細胞の酸化ストレス耐性に寄与する代謝機構の網羅的な探索を行った。はじめに、酸化ストレス刺激に応答して変化する代謝物を調べるため、膵臓がん細胞 (Panc-1) に過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) で酸化ストレスを負荷した時の代謝変動を調べた。その結果、中心炭素代謝経路上の物質と、還元性物質である還元型グルタチオン (GSH) と spermidine が、 $H_2O_2$  負荷から短時間のうちに大きく変化する事が観測できた。 $H_2O_2$  負荷に対して還元性物質の変化が顕著だった事から、酸化ストレス抵抗性に寄与する還元性物質を探索すべく18種のがん細胞株を用いてスクリーニングを行った。そして、定常時の細胞内代謝物のうち、 $H_2O_2$  に抵抗性のある細胞株で顕著に濃度が高い25物質を同定することができ、そのうち中心炭素代謝系路上の物質10種が $H_2O_2$  を還元して除去することを *in vitro* で確かめた。さらに高濃度グルコース条件下で、細胞内の解糖系とペントースリン酸経路の代謝物を増加させた細胞は、 $H_2O_2$  負荷に対する細胞内 $H_2O_2$  上昇の抑制と生存率の回復が確認することができた。以上の結果をまとめると、がん細胞の抗酸化作用にはGSHだけでなく還元能を持つ中心炭素代謝経路の物質も寄与しており、酸化ストレス刺激があった場合にも代謝物が瞬時に反応して酸化物を除去し、細胞内の酸化還元状態の維持に寄与している可能性があると考えられる。

キーワード：メタボロミクス, 還元性代謝物, がん, 過酸化水素, 中心炭素代謝経路

## 1. 序論

我々の体を構成するひとつひとつの細胞内では、数千にのぼる物質が一連の化学反応を起こし別の新しい分子へと変化している。この物質の流れを代謝といい、エネルギー分子や体の構成分子など、生体の維持に必要な物質を供給し、細胞の成長・増殖を支えている。物質の生合成を通して細胞の成長・分裂を支える代謝は、無限の増殖を繰り返すがん細胞の生理学を理解する上でも重要な要素である。1970年代初頭には、がん組織に特異的にみられる代謝機構がワーバーグらによって発見され（ワーバーグ効果）（Warburg, *et al.*, 1927），正常細胞と比べた時のがん代謝の特殊性が示された。最近では、がんに見られる遺伝子変異やシグナルが、代謝調節に関わっていることも示され、がん特異的な代謝の調節機構の発見・解明も進んでいる（Dang and Semenza, 1999）。がん細胞の普遍的特徴である無限増殖は、代謝による分子供給に支えられており、もし代謝調節が機能せず、がん細胞が必要になる分子をとれない状況になれば、その生存・増殖は不可能である。従ってがん代謝の役割を知ることは、がんの生理学を理解する上で重要な手がかりになると期待される。

近年、細胞の酸化ストレス抵抗性に対する代謝調節の働きが注目されている（Kondoh, *et al.*, 2005, Tian, *et al.*, 1998）。酸化ストレスとは、スーパーオキシドラジカル ( $O_2^-$ ) やヒドロキシラジカル ( $OH^\cdot$ ) などを含む活性酸素種 (ROS) や酸化物が、細胞内に過剰量に蓄積された状態をいう。これらの分子は反応性が高く、細胞内のタンパク質や核酸、脂質などと容易に反応して細胞疾患や細胞死を引き起こしてしまう（Camhi, *et al.*, 1995, Pelicano, *et al.*, 2003）。がん細胞は、正常細胞に比べ酸化ストレスに強いことが認められており、これまで、抗酸化酵素として知られるスーパーオキシドデスムターゼ (SOD) やカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) などの研究を通じ、がん細胞の酸化ストレス耐性機構の理解が試みられている。しかし、これらの抗酸化酵素のみでは、実際に細胞が示す酸化ストレス耐性の強度や細胞間の差について説明できないことが現状であり（Marklund, *et al.*, 1982），別の抗酸化機構の存在が指摘されている。その中でも代謝物の抗酸化機構としての働きが再認識されており、特に還元型グルタチオン (GSH) と、細胞の酸化ストレス抵抗性との関与については重点的に研究されている。また、その他にもポリアミン類 (Rider, *et al.*, 2007) やタウリン (Messina and Dawson, 2000) などの還元性代謝物による酸化ストレス抑制が示されている。一方で、これまで報告されている抗酸化代謝物はごく少数であり、抗酸化作用に寄与する分子がまだまだ埋もれている可能性がある。そこで本研究では、メタボローム解析を利用して酸化ストレス耐性に寄与している代謝調節機構および代謝物の探索を行うことを目的とした。

本研究では、大きく2つのアプローチをしている。はじめに、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) で酸化ストレス刺激を与えた細胞の代謝応答をメタボローム解析によって調べた。結果、GSHやspermidine、中心代謝経路上の多数の物質が酸化ストレスに応答して短時間内に変動することがわかった。次に、複数のがん細胞株の細胞内代謝物を比較し、 $H_2O_2$ 感受性と相関のある物質を探索した。そして中心炭素代謝経路上の多くの物質が、 $H_2O_2$ に対し還元作用を持つことを見出した。本研究は、酸化ストレスに寄与する物質を網羅的にスクリーニングするという点で新規性があり、これまで認識されてこなかった抗酸化機能を見出せる可能性を示唆した。

## 2. 結果と考察

### 2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷に対する短期応答

#### 2.1.1 既知の抗酸化物質

Panc-1細胞に非致死濃度のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を負荷し、細胞内代謝物の変動を調べた。還元能の指標となるGSH/酸化型グルタチオン (GSSG) 比は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷群において3時間の時点で減少した (図2.1A)。この結果より、たとえ細胞の生存が保たれていても、細胞内の酸化還元状態は変動して代謝に反映されていることを示した。また、既知の抗酸化物質であるspermidineについてその挙動を見てみると、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷後に急激に上昇し、その6時間後には最初のレベルに戻り (図2.1B)、GSH/GSSGの結果と同様、酸化還元状態の変化が短い間に生じ、その間に細胞内濃度が変化する事を示唆した。

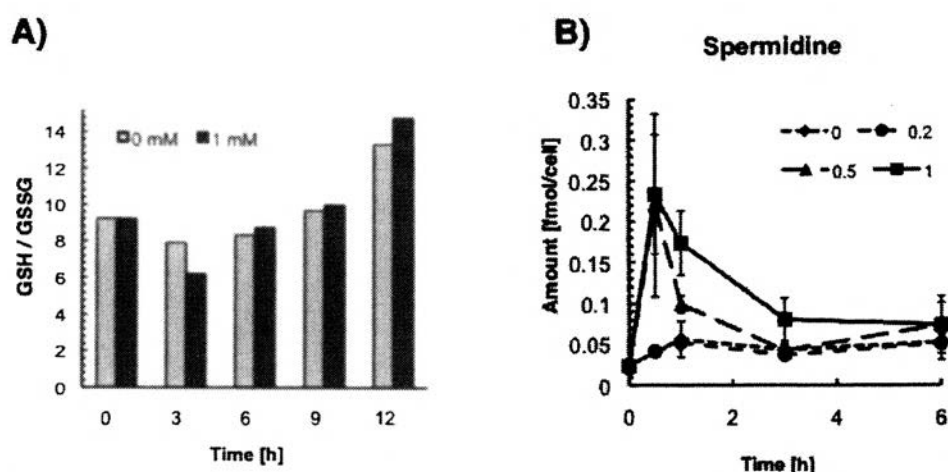


図2.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷に対するGSH/GSSGとspermidineの変化。(A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷後のGSH/GSSG比。(B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷後のspermidineの変動。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は最終濃度が0, 0.2, 0.5, 1 mMになるようH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を培地に添加した。エラーバーは試行数3回の標準偏差を示す。

#### 2.1.2 中心炭素代謝経路物質の変動

TCA回路とペントースリン酸経路 (PPP) の物質は、GSHやspermidineと同様、短時間内で変動した後に最初の濃度に回復する様相を示した。各代謝物の変動を詳しく見るため、それぞれの経路ごとに6時間までの変動を対照群との比でプロットした (図2.2)。PPPの物質は、総じて細胞内物質が一時的に増加したのに対し (図2.2A)、TCA回路の物質については、回路前半のcitrateとcis-aconitateのみ物質量が上昇し、それ以外の物質は、量が変わらないか減少していた (図2.2B)。PPPは、酸化されたGSHを元に戻す時に必要なNADPHの生産経路であり、GSH量の維持に必要な経路とされている。また、TCA回路は、主要なROSの発生源として知られており、いずれの経路も細胞内酸化還元状態と密接な関係にあると考えられる。一方でTCA回路やPPPの経路の代謝阻害はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性能には影響しないことが分かった (修士論文にデータ掲載)。

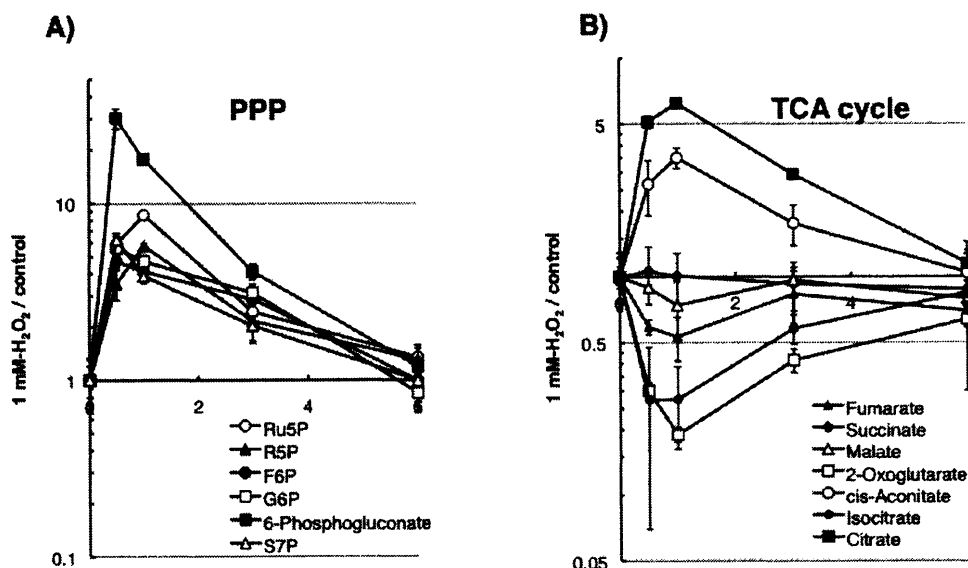


図2.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷による細胞内代謝物量の変化。(A) PPP関連物質の時系変化。(B) TCA回路関連物質の時系変化。それぞれのタイムポイントにおけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>暴露群と対照群の比を示した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は最終濃度1 mMになるよう培地に添加した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を負荷する直前を0時間とし、その後H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加してから各タイムポイントで代謝物を抽出した。エラーバーは試行数3回の標準偏差を示す。

## 2.2. 中心炭素代謝経路物質の還元作用

### 2.2.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に強い細胞に多い物質のスクリーニング

我々は、PPPやTCA回路を含む多くの物質の時系変化が、GSHやspermidineなど既知の抗酸化物質と同じタイミングであることに着目した。細胞内に、ROSと酸化還元反応を起こす還元性代謝物が多種類含まれている可能性は十分に考えられ、この短時間内に動く物質の中には、細胞の酸化ストレス耐性に寄与している還元性代謝物が存在する可能性がある。意外にも、これまで知られているごく一部の還元性代謝物をのぞくと、その他数千ある代謝物について還元能と酸化ストレス耐性への関係は調べられていない。我々は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性に寄与する還元性代謝物が存在すると仮説を立て、細胞のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性を支える還元性代謝物のスクリーニングを行った。スクリーニングでは、複数の細胞株における定常状態のメタボロームデータを取得し、各細胞株のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性と相関のある物質を選出することにした。

始めに、異なる細胞株18種についてのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性と、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の主要な還元酵素であるGPxの活性を調べた(表2.1)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性はEC<sub>50</sub>の値で比較し、結果、KP3細胞とMKN7細胞が他の細胞に比べ顕著にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性が低かった。また、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性試験に用いたいくつかの細胞についてGPxの活性を調べたが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性との間に関連性は見られず、抗酸化酵素の活性が直接H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性に関与しないことを示した。この結果は、酸化ストレス感受性の異なる細胞間で抗酸化酵素の活性測定を行い、酸化ストレス感受性差と酵素活性の間に関連がないことを示した先行研究の結果と一致している (Marklund, *et al.*, 1982)。

表2.1. 様々ながん細胞株におけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性およびGPxの活性.

Cancer Cell	Tissue	EC <sub>50</sub> [mM]	GPx [mU/mg protein]
MKN7	stomach	1.38	28.7 (± 2.8)
KP3	pancreas	1.21	28.2 (± 2.8)
A431	unknown	0.60	35.2 (± 1.3)
BxPC-3	pancreas	0.54	
MKN74	stomach	0.54	25.5 (± 1.6)
DLD-1	colon	0.53	
A549	lung	0.51	17.8 (± 1.2)
HT29	colon	0.50	56.7 (± 0.4)
MKN28	stomach	0.48	20.4 (± 2.6)
HepG2	liver	0.47	50.9 (± 0.2)
Panc-1	pancreas	0.44	
KMRC-1	kidney	0.43	
MCF-7	breast	0.42	11.0 (± 0.6)
ACHN	kidney	0.41	58.2 (± 4.2)
PSN-1	pancreas	0.38	22.9 (± 1.0)
PC14	lung	0.34	
HeLa	cervix	0.33	33.3 (± 2.0)
AsPC-1	pancreas	0.32	12.0 (± 0.5)

EC<sub>50</sub>はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷から24時間後に細胞生存率が50%になる濃度を示す.

GPx活性の【】内の値は、4回の独立な試行間の標準誤差を示す.

### 2.2.2. 中心炭素代謝経路上の物質が持つ還元作用

次にそれぞれの細胞の通常培養下でのメタボロームデータを取得した。18種の細胞株のうち、9株以上で同定できた物質は94種あった。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性と相関する物質を抽出するため、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-EC<sub>50</sub>の値と各代謝物質との間の相関係数を計算し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性と高い相関を示す代謝物質を抽出した。そうしたところ、25の物質がH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-EC<sub>50</sub>に正に相関 ( $r > 0.5$ ,  $p < 0.05$ ) する物質として抽出され、それらの物質がH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性の高いKP3とMKN7に顕著に多いことが分かった (図2.3A)。次に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-EC<sub>50</sub>とメタボロームデータとの比較で選択した25の物質が、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を還元する作用を持つか*in vitro*で調べた。チューブ内でH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と各物質の純粋水溶液を混和し、一定時間後のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>除去率を調べることでその還元能を確かめた。前項で選出した25物質それぞれについて還元性を調べた結果、解糖系およびPPP上のglucose 6-phosphate (G6P), fructose 6-phosphate (F6P), fructose 1,6-diphosphate (F1,6P), dihydroxyacetone phosphate (DHAP), 3-phosphoglycerate (3PG), pyruvate, ribulose 5-phosphate (Ru5P), phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP), そしてTCA回路上の2-oxoglutarate, *cis*-aconitate, その他FAD, thiamine, cAMP, NADの計13種の物質について還元性が示された (図2.3B)。これらの物質のうち、解糖系, PPP, TCA回路の物質にRu5Pを加えた10種の中心代謝経路上の物質の還元能についてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度が50%になる値をEC<sub>50</sub>として求めたところ、pyruvateを始め複数の物質が高い還元力を示し、特にpyruvate, PRPP, Ru5P, 2-oxoglutarateについては、既知の還元性物質であるGSHとspermidineよりもH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>除去作用が高かった (表2.2)。還元性を調べた物質の一細胞あたりの細胞内濃度はおおよそ0.1~1 mM程度であり、本研究でEC<sub>50</sub>として求めた濃度よりかなり低い濃度で細胞内では保持されている。そのため、細胞内で実際に酸化還元反応が起きているかは断言が難しい。一方で、細胞内に存在するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>も数nMから数μMであることと、同程度の細胞内濃度で抗酸化物質として働くことが知られているspermidineと比較し、調べた物質の多くが同等以上の還元能を示していることから、細胞内で実際に酸化

還元反応が起きている可能性はある。

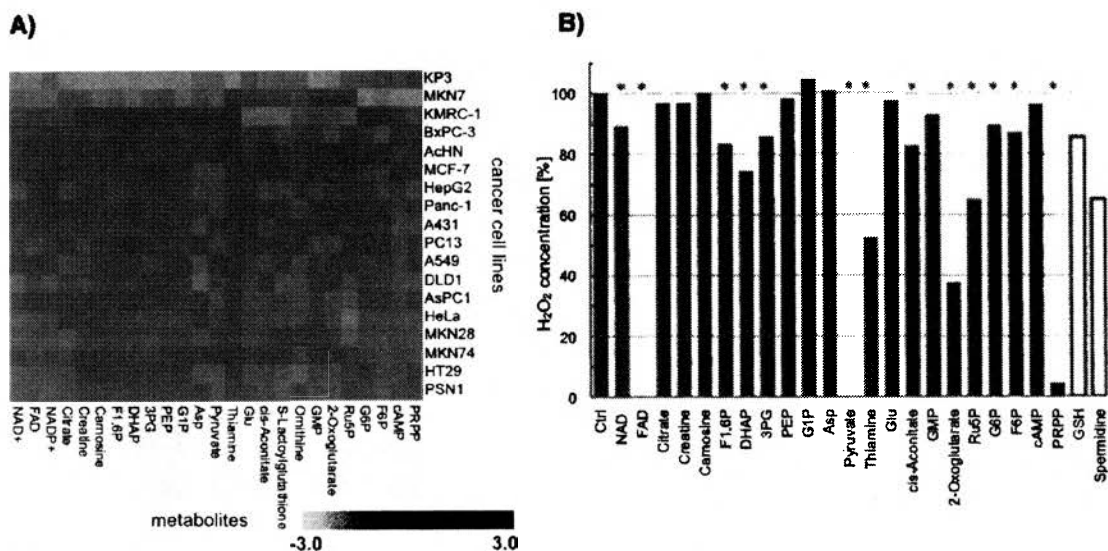


図2.3. 細胞のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性能に相関する代謝物のスクリーニング。(A) 各細胞株のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-EC<sub>50</sub>と、細胞内代謝物量の間で相関係数を計算し、その値が0.5 ( $p < 0.05$ ) 以上であった物質。値は物質ごとにz値に変換してあり、数値が高い程、単位細胞内あたりの物質が多い。(B) *In vitro*にて各物質のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>除去作用を確認した。\*印のついた物質はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>除去作用が認められた物質。縦軸は代謝物を添加していない対照サンプル (Ctrl) を100としたときの比を示しており、GSHとspermidineをポジティブコントロールとしておいた (白抜き)。各物質とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はそれぞれ最終濃度が9.5 mMと70 $\mu$ Mになるように混合した。

表2.2. 中心代謝経路上の物質のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>還元能

Metabolite	EC <sub>50</sub> [mM]
Spermidine	51.7
GSH	29.3
Pyruvate	0.9
PRPP	1.0
Ru5P	2.3
2-Oxoglutarate	4.0
R5P	20.1
G6P	21.5
DHAP	25.1
F6P	30.9
F1,6P	42.6
3PG	51.5

EC<sub>50</sub>は混和したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を50%除去する物質の濃度を示している。

### 2.2.3. 解糖系の物質の上昇によるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性の変化

これまでの結果より、中心炭素代謝経路上の物質がH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性の低い細胞に多く、その多くが還元性を持つことが示された。そこで次に、細胞内の中心炭素代謝上の物質の量を変えた時にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性が変化するか調べた。まず中心炭素代謝関連物質の量を変化させるため、濃度を変えたグルコース条件下でKP3細胞とHeLa細胞を培養し、一定時間後の代謝物量を調べ

た。結果、培地中グルコース濃度を変えた細胞株間では、実験開始から3時間経過したところで細胞内の代謝物量に違いが生じることが確かめられ、実験開始から12時間経過した地点では、低濃度グルコースで培養した細胞に比べ、高濃度グルコース条件下で培養した細胞で解糖系上流の代謝物量が総じて多くなることが確かめられた（修士論文にデータ掲載）。そこで次に、高濃度グルコースと低濃度グルコースで培養した細胞それぞれにH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を負荷し、負荷直後の細胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度の上昇と48時間後の生存率を調べた。結果、高濃度グルコース条件下で培養した細胞内ではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の上昇を抑制し（図2.4A）、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷に対する48時間後の細胞生存率が高くなった（図2.4B）。以上の結果より、解糖系上の物質の上昇がH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性の向上に寄与することを示した。

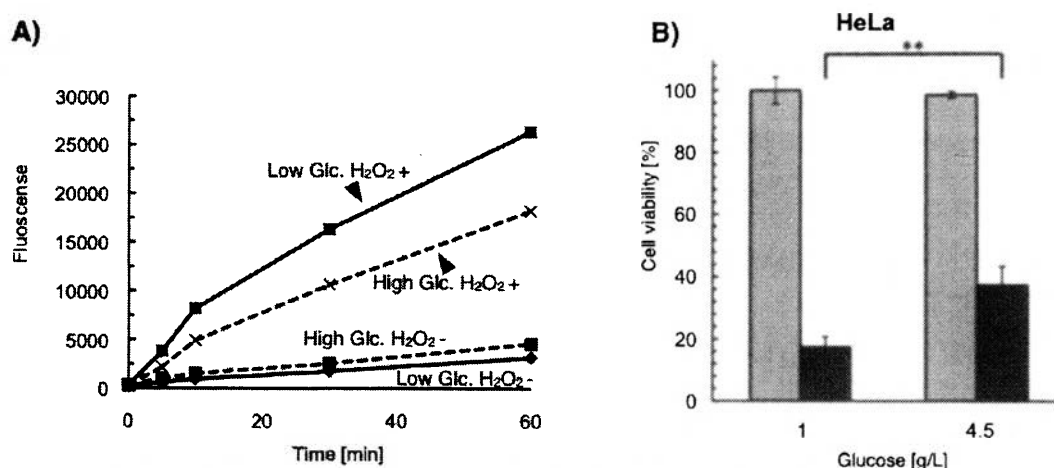


図2.4. 培地中グルコース濃度の違いによるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>対性能の変化。(A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷後の細胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度の変化。細胞はあらかじめ1 g/L (Low. Glc.) か4.5 g/L (High Glc.) のグルコース培地で培養し、6時間後に7 μMのCM-H<sub>2</sub>DCFDA入りHanks液に培地交換した上で1 mMになるようH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を培地に添加した。(B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷後の細胞生存率。細胞はあらかじめ1 g/Lか4.5 g/Lのグルコース培地で培養し、6時間後に0.1 mMになるようH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を培地に添加し、48時間後の細胞生存率をMTTによって求めた。エラーバーは異なる3回の試験間の標準偏差を示す。\*\*:  $p < 0.01$

### 3. 総括

本研究では、酸化ストレス耐性に寄与する代謝経路、代謝物質の探索を目的とした。酸化ストレスは、細胞の生死や増殖に関与するため、がんの治療を考える上で欠かせない要素であり、長年にわたりその生理学的また病理学的変化が研究されている。しかし、酸化ストレスと代謝の関係については、ごく一部の代謝物をのぞいてほとんど分かっていない (Kong, *et al.*, 2000, Trachootham, *et al.*, 2009)。そこで我々はまず、酸化ストレスを与えた時の短期的なメタボロームプロファイル調べ、細胞内では酸化還元状態の変化に対して多数の代謝物がダイナミックに変動することを示した。このH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>応答性の代謝プロファイルから還元性物質の挙動に着目した我々は、複数の細胞株のメタボロームデータを用いてスクリーニングをし、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷に対しダイナミックな変動を見せた中心炭素代謝経路上の物質が、実は高い還元力を示すことを見出した。これらの物質が抗酸化機能を果たし、細胞の酸化ストレス耐性に寄与するとしたら、細胞にとって複数の利点がある。第一に、がん細胞など増殖の早い細胞では、細胞構成分子の生産のために解糖系が亢進されていることが知られており (Harris, *et*



al., 2012, Vander Heiden, et al., 2010) , この解糖系の亢進がROSの除去にも寄与することになる。第2に中心炭素代謝に備わる柔軟な調節機構がある。近年がん細胞のエネルギー代謝については、細胞内外の環境に応じて柔軟に対応できる代謝調節機構が次々と示されており、そうした、柔軟な機構をうまく利用すれば細胞内酸化還元状態の変化に素早く対応できる。例えば、がん細胞において、解糖系と電子伝達系の切り替え酵素として知られるピルビンサンキナーゼアイソフォーム2 (PKM2) は、細胞内のセリン (Chaneton, et al., 2012) やSAICAR (Keller, et al., 2012) の修飾を受けて、グルコース代謝のフラックスを変えることができる。また、glyceraldehyde-3 phosphate 脱水素酵素 (GAPDH) (Grant, 2008) やアコニターゼ (Bulteau, et al., 2003, Nulton-Persson and Szweda, 2001) は酸化ストレスにより活性調節されるため、細胞内酸化還元状態の変化に応じて代謝調節できると考えられる。そして第3に非酵素的な反応なので速やかに反応がおり、酸化ストレス分子の素早い除去が期待できる。我々の時系列メタボロームデータでも、中心炭素代謝経路上の物質が大きな変動を見せたが、この短時間内の変動の間にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>除去に働いたのかもしれない。以上の理由より、中心炭素代謝関連物質が還元性物質として機能すれば、がん細胞の酸化ストレス耐性を支える上で非常に有利であるといえる。これまでに知られているGSH, spermidineなどの還元性物質に加え、細胞内は本研究で示したようなたくさんの還元性物質に溢れており、それらの代謝物が相加的に酸化還元状態維持機構として働き、細胞構成分子が酸化されることを防いでいるのかもしれない。

本研究では中心炭素代謝経路上の物質が還元性物質として酸化ストレス分子の除去に寄与する可能性を提唱した。この仮説をより強く支持するため、今後は、細胞内の酸化物候補となる物質の同定が必要である。また今回、「H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性に相関する物質」というスクリーニング条件で還元性代謝物の発見に至ったことから、この方法を拡張し、より大規模な解析によって代謝物と酸化ストレス耐性に関する知見を広げられることが期待される。例えば60近くの細胞のメタボロームデータと薬剤感受性データが蓄積されているNCI60の公開データを用いた解析で、細胞の薬剤感受性と相関のある物質を見出すことができるかもしれない。

近年は、がん代謝を狙った治療薬の開発がますます着目を浴びている。がん代謝は、様々ながん種に共通する一方で、正常細胞にはないという特徴がある。細胞の酸化ストレス耐性を支える代謝機構の解明は、がん治療の発展において、抗酸化作用を担うがん細胞特異的な経路の代謝経路を狙った治療薬の探索や、人為的代謝調節による抗がん剤治療の効能向上、酸化ストレスマーカーの発見へと繋がると期待できる (Kong, et al., 2000, Pelicano, et al., 2003, Trachootham, et al., 2009, Wittgen and van Kempen, 2007) .

## 謝辞

本研究を行うにあたり、曾我朋義教授、杉本昌弘博士には有益なディスカッションとアドバイスを頂きました。北川光洋博士と紙健次郎博士にはテーマ・実験の相談で大変お世話になりました。野崎慎氏にはコンピュータプログラムの作成でお世話になりました。富田勝教授には研究活動を通し数々の素晴らしい機会と環境を与えて頂きました。

## 参考文献

BULTEAU, A. L., IKEDA-SAITO, M. and SZWEDA, L. I. (2003). Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* **42**, 14846-14855.

CAMHI, S. L., LEE, P. and CHOI, A. M. (1995). The oxidative stress response. *New Horiz* **3**, 170-182.

- CHANETON, B., HILLMANN, P., ZHENG, L., MARTIN, A. C., MADDOCKS, O. D., CHOKKATHUKALAM, A., COYLE, J. E., JANKEVICS, A., HOLDING, F. P., VOUSDEN, K. H., FREZZA, C., O'REILLY, M. and GOTTLIEB, E. (2012). Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature* **491**, 458-462.
- DANG, C. V. and SEMENZA, G. L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* **24**, 68-72.
- GRANT, C. M. (2008). Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *J Biol* **7**, 1.
- HARRIS, I., MCCRACKEN, S. and MAK, T. W. (2012). PKM2: a gatekeeper between growth and survival. *Cell Res* **22**, 447-449.
- KELLER, K. E., TAN, I. S. and LEE, Y. S. (2012). SAICAR stimulates pyruvate kinase isoform M2 and promotes cancer cell survival in glucose-limited conditions. *Science* **338**, 1069-1072.
- KONDOH, H., LEONART, M. E., GIL, J., WANG, J., DEGAN, P., PETERS, G., MARTINEZ, D., CARNERO, A. and BEACH, D. (2005). Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res* **65**, 177-185.
- KONG, Q., BEEL, J. A. and LILLEHEI, K. O. (2000). A threshold concept for cancer therapy. *Med Hypotheses* **55**, 29-35.
- MARKLUND, S. L., WESTMAN, N. G., LUNDGREN, E. and ROOS, G. (1982). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* **42**, 1955-1961.
- MESSINA, S. A. and DAWSON, R., JR. (2000). Attenuation of oxidative damage to DNA by taurine and taurine analogs. *Adv Exp Med Biol* **483**, 355-367.
- NULTON-PERSSON, A. C. and SZWEDA, L. I. (2001). Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **276**, 23357-23361.
- PELICANO, H., FENG, L., ZHOU, Y., CAREW, J. S., HILEMAN, E. O., PLUNKETT, W., KEATING, M. J. and HUANG, P. (2003). Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem* **278**, 37832-37839.
- RIDER, J. E., HACKER, A., MACKINTOSH, C. A., PEGG, A. E., WOSTER, P. M. and CASERO, R. A., JR. (2007). Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids* **33**, 231-240.
- TIAN, W. N., BRAUNSTEIN, L. D., PANG, J., STUHLMEIER, K. M., XI, Q. C., TIAN, X. and STANTON, R. C. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J Biol Chem* **273**, 10609-10617.
- TRACHOOTHAM, D., ALEXANDRE, J. and HUANG, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* **8**, 579-591.
- VANDER HEIDEN, M. G., LOCASALE, J. W., SWANSON, K. D., SHARFI, H., HEFFRON, G. J., AMADOR-NOGUEZ, D., CHRISTOFK, H. R., WAGNER, G., RABINOWITZ, J. D., ASARA, J. M. and CANTLEY, L. C. (2010). Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* **329**, 1492-1499.
- WARBURG, O., WIND, F. and NEGELEIN, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* **8**, 519-530.
- WITTGEN, H. G. and VAN KEMPEN, L. C. (2007). Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. *Melanoma Res* **17**, 400-409.