

博士論文

**3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene** のフェロトキシ  
様細胞死誘導による抗がん作用メカニズムの解析

2023.09

岩手大学大学院

連合農学研究科生物資源科学専攻

(岩手大学)

USUKHBAYAR Narandulam

# 目次

序論 .....	1
序-1. がん治療薬の研究の現状 .....	2
序-2. 天然資源から始まるケミカルバイオロジー .....	7
序-3. がん治療をターゲットにした細胞死の研究に関する現状 .....	10
序-4. フェロトーシス.....	15
<b>第1章 3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene の HL60 細胞に対するフェロトーシス様細胞死誘導作用機序 .....</b>	<b>19</b>
1-1. 緒言 .....	20
1-1-1. 3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene (EDBD) .....	20
1-2. 実験方法 .....	25
1-2-1. 細胞培養.....	25
1-2-2. プロテオーム解析.....	25
1-2-3. 細胞生存率.....	26
1-2-4. 細胞死の形態観察.....	27
1-2-5. 脂質過酸化の検出.....	27
1-2-6. タンパク質の発現解析 .....	27
1-2-7. GSH 定量.....	31
1-2-8. 統計処理.....	32
1-3. 結果 .....	33

1-3-1. 2D-DIGE による EDBD 処理細胞のプロテオーム解析 .....	33
1-3-2. 既存の細胞死と EDBD による細胞死の比較 .....	36
1-3-3. 脂質過酸化阻害剤の EDBD による細胞死に対する影響 .....	39
1-3-4. C11-BODIPY 蛍光プローブを用いた EDBD による脂質過酸化の検出 .	41
1-3-5. EDBD による脂質過酸化に対する鉄イオンの影響 .....	43
1-3-6. EDBD の脂質過酸化に関連するシグナル伝達への影響 .....	46
1-3-7. 細胞内 GSH に対する EDBD の影響 .....	48
1-4. 考察 .....	50
<b>第 2 章 3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene とスルファサラジンの乳がん細胞に対する</b>	
<b>相乗効果とその作用機序 .....</b>	<b>54</b>
2-1. 緒言 .....	55
2-1-1. 乳がんの現状 .....	55
2-1-2. スルファサラジン (SSZ) について .....	58
2-1-3. EDBD と乳がん .....	61
2-2. 実験方法 .....	63
2-2-1. 細胞培養 .....	63
2-2-2. 細胞生存率 .....	63
2-2-3. DCFH-DA を用いた ROS 産生の検出 .....	64
2-2-4. 脂質過酸化の検出 .....	64
2-2-5. 薬物相乗効果の解析 .....	64
2-2-6. 統計処理 .....	64

2-3. 結果 .....	65
2-3-1. EDBD の乳がん細胞に対する影響 .....	65
2-3-2. 乳がん細胞における EDBD による増殖抑制作用への DFOM の影響 ...	67
2-3-3. EDBD 処理乳がん細胞における ROS 検出.....	69
2-3-4. EDBD 処理乳がん細胞における脂質過酸化の検出.....	73
2-3-5. 脂質過酸化阻害剤の EDBD 処理乳がん細胞に対する影響 .....	76
2-3-6. EDBD と SSZ の併用処理が乳がん細胞に及ぼす影響 .....	78
2-3-7. EDBD と SSZ の相乗効果に対する DFOM と Fer-1 の影響 .....	81
2-3-8. EDBD と SSZ の相乗効果に対する IM-54 の影響 .....	83
2-3-9. Dihydroartemisinin (DHA) と SSZ の併用処理の乳がん細胞に対する影 響.....	85
2-3-10. EDBD の正常細胞に対する影響 .....	88
2-4. 考察 .....	90
総合考察 .....	94
参考文献 .....	102
謝辞 .....	111

# 序論

## 序-1. がん治療薬の研究の現状

がんは、世界各国の医療業界において重大な問題として挙げられ続けている病気である。過去60年間にかけて、衛生の改善及び抗生物質とワクチンの開発により、感染症による死亡率は劇的に減少した。また、心疾患の一次予防と二次予防の改善に伴い、人口動態と危険因子が変化し、現在ではがんが早期死亡の上位に入っている。2016年のWorld Health Organization (WHO)による統計報告をみると、1520万人が非伝染性病で亡くなっている内、450万人(29.8%)のがんによって死亡している。世界では早期死亡(30-69歳の死亡)の死因を主になんが占めており、世界の183ヶ国の中で134ヶ国では死因の1位と2位、45ヶ国では死因の3位と4位に入っている [1]。日本では、がんは昭和56(1981)年以降日本の死因順位1位になった後、一貫して上昇しており、令和4(2022)年の全死亡者に占める割合は24.6%となっている(図序-1) [2]。

また、がんは難病として世界各国で重大な問題であるため、発がん、がんの悪性化、がん治療薬の開発などの研究が活発に進んでいる。その成果として、先進国では一般的な種類のがんの予防、早期発見、治療などを通して、発症率に対して死亡率が低下している。一方で、開発途上国においては、乳がん、前立腺がん、結腸直腸がんなど多くの種類のがん死亡率が依然として増加している [1]。このように、がん治療研究において進展がある一方、進行・再発がんや難治がんにおいて抗がん薬は延命効果をもたらすが、根治はいまだ難しい状況である。このように、がんが医療業界の難題である理由の一つはがんの発症にある。感染症は、真菌や細菌やウイルスなど人間とは全く異なる構造や機能を持つものより由来しているため、人間には存在しないが真菌や細菌やウイルスにとって重要な分子の機能を妨害する薬剤を開発すれば、副作用の少ない治療ができる。しかしながら、がん細胞は我々の細胞がいくつかの遺伝子変異を経て、異常な細胞増殖や遠隔転移など悪性形質を持つ細胞であるため、基本

構造や性質は人間の正常細胞と類似していることから、殆どの抗がん薬は副作用を伴う。

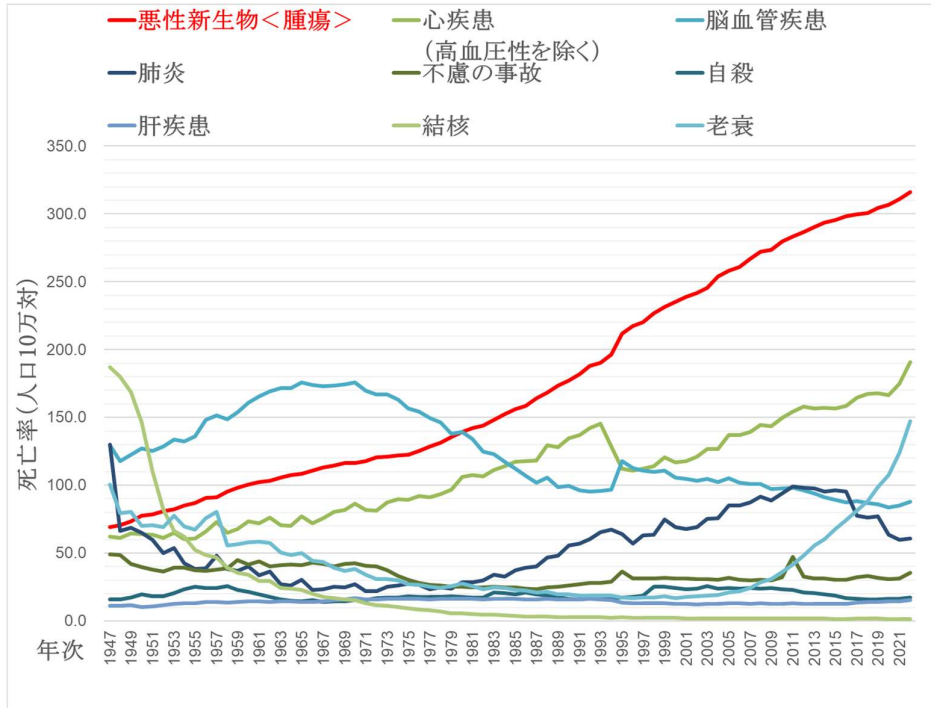


図 序-1. 年次別にみた主な死因別死亡率の年次推移

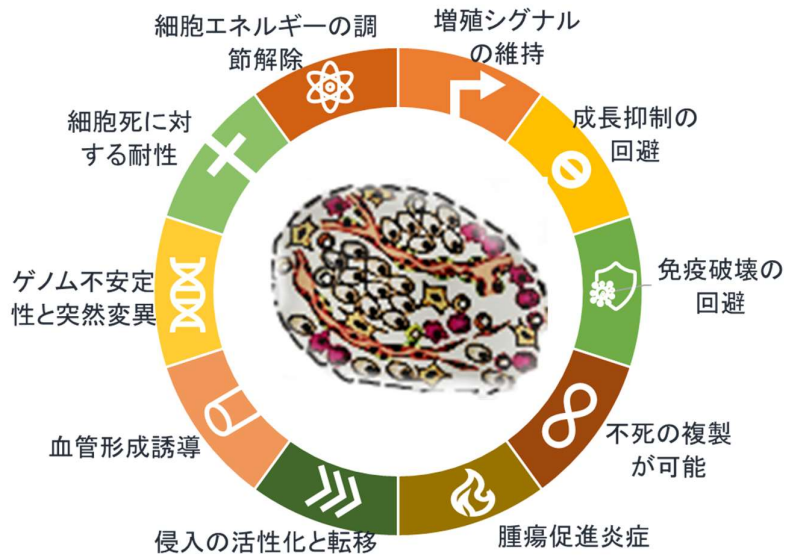


図 序-2. がんのホールマーク

それでも遺伝子変異は起きているため、正常細胞と異なる点がある。がん細胞と正常細胞を見分けるホールマークは、増殖シグナルの維持、成長抑制の回避、免疫破壊の回避、不死の複製が可能、腫瘍促進炎症、侵入の活性化と転移、血管形成誘導、ゲノム不安定性と突然変異、細胞死に対する耐性、細胞エネルギーの調節解除などが挙げられる(図序-2) [3]。がんの薬剤治療は、この遺伝子変異で生じる違いをターゲットにしている。

抗がん薬は、がん細胞の旺盛な分裂増殖性に対抗する「細胞障害性抗がん薬」と、がん細胞における質的・量的な分子変化を選択的に認識、阻害、又は矯正する「分子標的治療薬」に大きく分けられる。細胞障害性抗がん薬の歴史は、1940年代のnitrogen mustardから始まり、1950年代の代謝拮抗剤である5-FUや微小管阻害剤のビンカアルカロイド、1960年代のプラチナ製剤、1970年代のトポイソメラーゼ阻害剤、及び1990年代のタキサン系薬剤の開発が続いた [4]。DNAをアルキル化するアルキル化薬、代謝拮抗薬、微小管阻害薬など、細胞の分裂増殖に必須の生体分子に作用する。代謝拮抗薬(S期)やトポイソメラーゼ阻害薬(S~G2期)、微小管阻害薬(M期)などは作用点が細胞周期依存的であり、作用する時間が長いほど効果を期待できる。一方で、アルキル化薬などは細胞周期非依存的にDNAなどに直接障害を与える。細胞の盛んな分裂増殖を抑えるため、骨髄・腸管・皮膚・毛根などの増殖性の高い組織での障害に加え、悪心・嘔吐や手足のしびれなど副作用も大きい [5]。薬物療法は化学物質を用いるため化学療法とも呼ばれるが、近年紹介された分子標的治療薬や免疫療法などの新たな薬物療法が普及してきたため、細胞障害性抗がん薬を用いた薬物療法のみが化学療法と区別して呼ばれる。

長年の間積み重ねられてきたがんの研究と分子生物学の発展により、発がんの仕組みが分子レベルで解明されてきた。すなわち、本来は細胞の生存増殖を正に制御する遺伝子が、機能獲得型変異もしくは遺伝子増幅などを起こしてがん遺伝子



(oncogene)として活性化したり、細胞の生存増殖を負に制御するがん制御遺伝子 (tumor suppressor gene)が、機能喪失型または欠損したりすることでがんが生じるという概念が確立した。こうして発がん及びがんの悪性化に関わる遺伝子をドライバー遺伝子と呼んでおり、がん細胞はこのドライバー遺伝子に対する依存性を示していることが分かってきた。このドライバー遺伝子産物は、がん細胞を正常細胞と見分ける鍵となるため、これを標的として、その働きを抑制する小分子化合物及び免疫グロブリン製剤が分子標的治療薬として広く使われるようになった。小分子化合物としてはキナーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、ポリ(ADP-リボシル)化酵素(PARP)阻害薬、並びにヒストン脱アセチル化酵素阻害薬やメチル化酵素阻害薬などのエピゲノム標的薬などがある(図序-3)。

このように分子標的治療が開発されてきた中で、いくつかの課題が挙げられた。これには、標的としづらいドライバー遺伝子を持つがん、珍しい遺伝子変異によって生じたがんへの対応、並びにドライバー遺伝子が不明ながんなどがある。これらに加えて薬剤耐性の出現も挙げられる。薬剤耐性には、最初から効かない自然耐性、治療に伴って効かなくなる獲得耐性がある。さらに、作用点が異なる複数の薬剤が効かなくなる多剤耐性もある。こういった変化は、ゲノム変化によるクローン進化やゲノム変化を伴わないエピゲノム変化や適応応答、あるいは休眠状態にあつてストレスにも抵抗性を示すがん幹細胞などに起因する。耐性の具体的なメカニズムとしては、ABCトランスポーターの発現による薬剤の細胞外への排出、薬剤不活性化の亢進、薬剤活性化の低下、アポトーシス機構の欠損、並びに標的タンパク質の質的・量的な変化などが挙げられる。また、がん治療におけるもう一つの問題はがんの不均一性にある。がんは悪性化を重ねると一つの腫瘍の中に異なる遺伝子変異をもついくつかの種類細胞が存在するようになる。さらに、休眠状態にあるがん幹細胞の存在もがん治療の大きな問題である [5]。

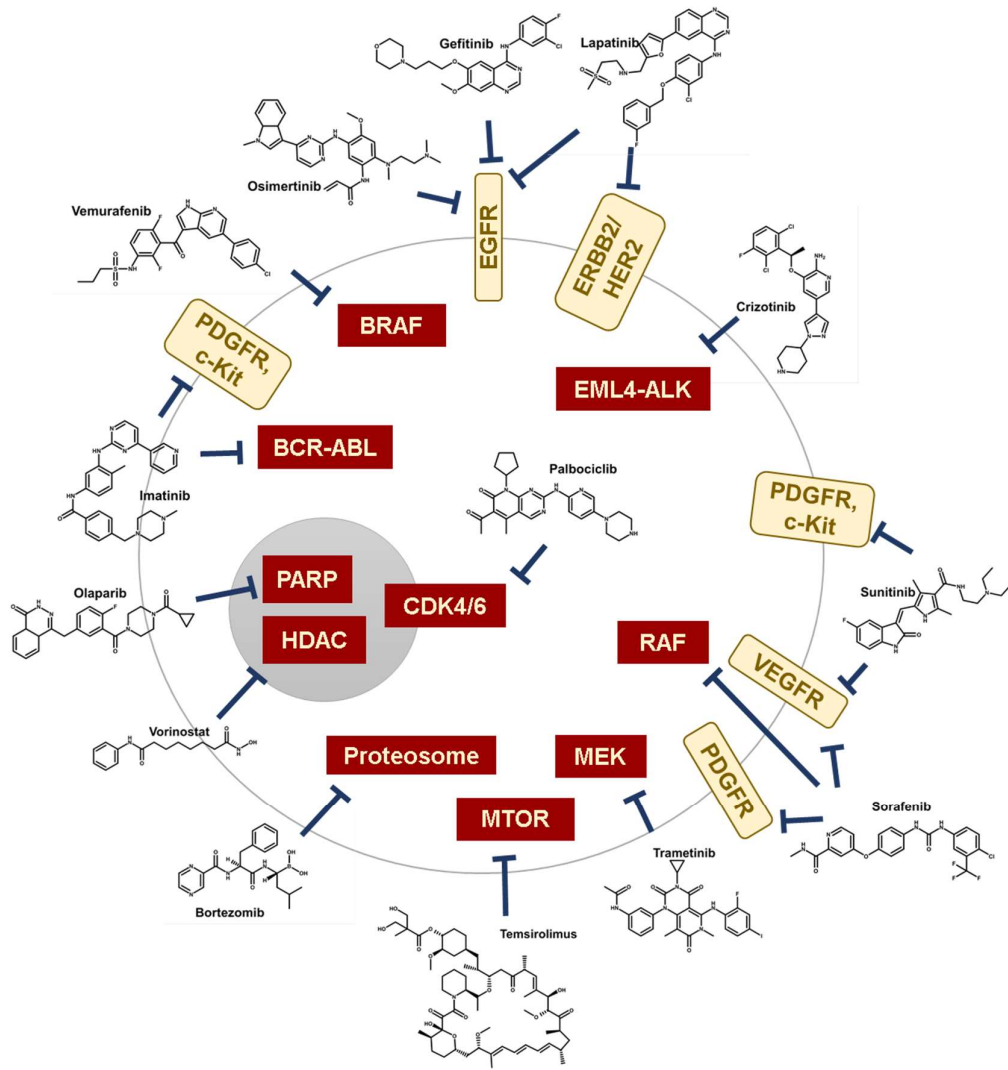


図 序-3. 様々ながん分子標的治療薬

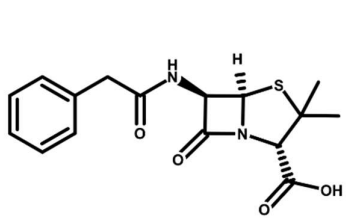
## 序-2. 天然資源から始まるケミカルバイオロジー

ケミカルバイオロジーとは、化学的観点あるいは化学的手法で生命現象を解明する学問分野である [6]。ケミカルバイオロジーは比較的新しい学問で、創始者であるハーバード大学の S. Schreiber 博士は、生体に影響を及ぼす化合物や化合物ライブラリーを用いて遺伝学や生物学の研究をできるという信念に基づき、この分野を切り開いた [7]。酵素、受容体、DNA、RNA、糖あるいはNOやCa<sup>2+</sup>のような、生理活性小分子などの生体分子などの機能を制御すると生体にどのような変化が起こるか、それに基づいてその生体分子の生理作用を解明すること主題としている [8]。ケミカルバイオロジーが発展することは、新しい医薬品の開発、薬の効果や副作用の理解が深まることが期待できる。さらに、複雑な生命現象を解き明かすことにも貢献できると考えられる。

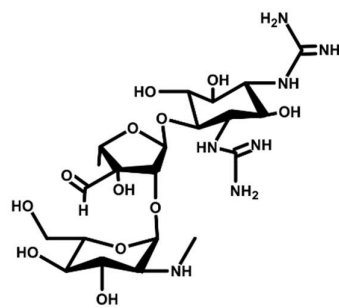
ケミカルバイオロジーは、研究領域は広いが、その一つとして、ケミカルライブラリーあるいは天然資源抽出ライブラリーの構築、活性物質を探索するためのスクリーニング系の確立と、見出した活性物質の作用解明という流れで行われる。ケミカルライブラリーは、様々な構造を持つ単一化合物を集めたものであり、一般に製薬企業は 100 万種類以上の化合物を保有していると言われている [8, 9]。このケミカルライブラリーから、特定のスクリーニング系を用いることで目的とする生物活性を持つものを見出す。標的分子により特異的に作用する分子を探すために、化合物の数が多く多様なケミカルライブラリーほど有用である。一方で天然資源抽出物ライブラリーは、様々な天然資源の抽出物を集めたものを指しており、その一つ一つは、さらに多くの化合物を含む混合物である。従って、スクリーニング系を用いて活性の探索、さらには、そこから単離精製することで単一の活性物質を見出すことができる。動植物や微生物などの天然資源は、化合物の宝庫ともいえる。天然物から見出される化合物は、人間の想像を上回る構造やその多様性が注目されている。1928 年に英国の細菌学者である A.

Fleming によって *Penicillium* 属から見出された抗生物質のペニシリン(1945 年ノーベル生理学・医学賞)、1943 年ラトガース大学(米)の S. Waksman によって *Streptomyces griseus* から見出された抗生物質ストレプトマイシン(1952 年ノーベル生理学・医学賞)、1958 年にニチニチソウ(*Catharanthus roseus*=*Vinca rosea*)から見出された抗がん剤のビンブラスチン、1967 年に *Streptomyces peucetius* var *caesius* から見出された抗がん剤のドキソルビシン、1972 年に Tu 等のグループによってクソニンジン(*Artemisia annua*)から見出された抗マラリア薬のアルテミシニン(2015 年ノーベル生理学・医学賞)、1979 年に北里研究所と Merck 社との共同研究によって、放線菌 *Streptomyces avermectinius* から見出された寄生虫感染症治療薬エバーメクチンを改変したイベルメクチン(2015 年ノーベル生理学・医学賞)など、天然資源からはユニークな活性を化合物が発見されている(図序-4) [10]。

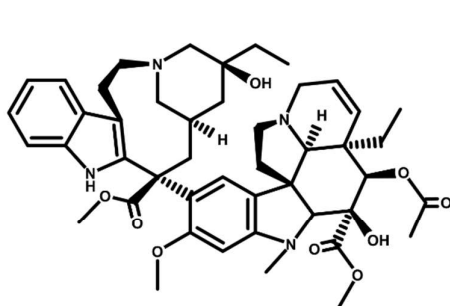
一方で、スクリーニングとは、「何らかの基準によって選別すること」であり、ケミカルバイオロジーでは活性物質を探索のために様々なスクリーニング系が用いられている [8]。その中には、酵素のような標的タンパク質そのものを使うこともあれば、細胞や微生物や原生生物等の生物全体を使うこともある。スクリーニング系は、目的の活性を発見するという有用性があり、簡単な手法により短期間で行うという簡易性と同時に、低コストという基準を果たす必要がある。多数のケミカルライブラリーから効率的にスクリーニングする技術には、一日に 1 万の化合物からスクリーニングするハイスループットスクリーニング、一日に 10 万の化合物からスクリーニングする超ハイスループットスクリーニングなど、様々な技術が使用されている [11]。スクリーニング系を用いて新しい生物活性物質を見出す他、既存の薬の有効性を判定したり、新しい用途を見つけ出ししたりすることもできる。



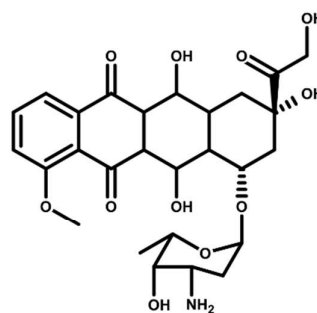
**Penicillin G**



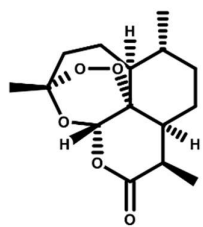
**Streptomycin**



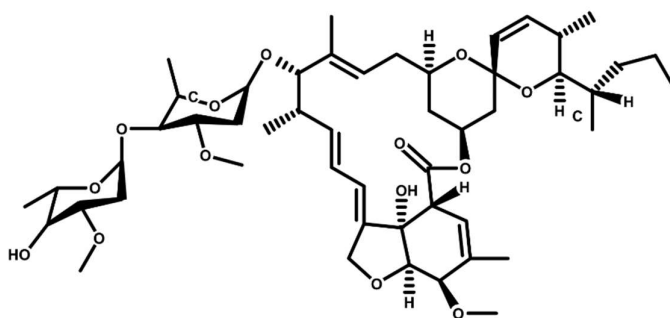
**Vinblastine**



**Doxorubicin**



**Artemisinin**



**Avermectin A1a**

図 序-4. 天然由来の生物活性物質

### 序-3. がん治療をターゲットにした細胞死の研究に関する現状

細胞死の研究は、生物の発生過程の分化、病気の進行、がん治療薬の研究などで広く行われている。最初は、炎症部位の組織に見られる細胞死のネクローシス(壊死)と、分子的に調節されているアポトーシスの2種類だったが、現在では細胞死の研究がさらに進み、他の種類の細胞死も提唱されている [12, 13]。これには、オートファジーが起因として引き起こされるオートファジー性細胞死 [14]、受容体相互作用タンパク質キナーゼ(RIPK)を介するネクロトーシス [15]、鉄イオン依存的な細胞死のフェロトーシス [16]、ミトコンドリア膜透過性遷移(MPT)を介するネクローシス(MPT-driven necrosis) [17]、炎症カスパーゼを介するパイロトーシス(pyroptosis) [18]、poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) の過剰活性化によって引き起こされるパータナトス(parthanatos) [19]、細胞の共食い現象のエントーシス(entosis) [20]、並びにリソソームの膜透過性の亢進によって引き起こされるリソソーム依存性細胞死 [21]などがある [22]。このように、様々な細胞死が提唱され制御された細胞死(Regulated cell death: RCD)として、その分類と誘導メカニズム、人体における役割、病気の進行との関わり、及びがん治療への有効性などが研究され、いくつかのレビューによって整理され報告されている [23, 24, 25, 26]。

アポトーシスは、細胞の縮小、染色体の凝縮、DNA の断片化、細胞膜のブレブ形成、カスパーゼの活性化などで特徴づけられる細胞死で、プログラムされた細胞死として初めて提唱された細胞死である。発見されてから発生過程での重要性が注目され、盛んに研究されてきた。アポトーシスで死んだ細胞の破片は食細胞によって食べられるため、ネクローシスと異なり炎症を引き起こさない細胞死としてがん治療薬の開発研究においても注目されてきた。アポトーシスには、death receptor を介する外因性アポトーシス経路とミトコンドリア外膜透過性(MOMP)によって誘導される内因性アポトーシス経路の2種類がある。外因性アポトーシスは、細胞膜に存在する death receptor に細

胞外からリガンドが結合することで誘導型カスパーゼ 8 が活性化する。一方で、内因性アポトーシスの際は、酸化ストレスなどの刺激により Bax/Bak がミトコンドリア外膜に穴を開けると、ミトコンドリア内膜と外膜の間に存在していたシトクロム c が細胞質に放出される(図序-5) [27]。シトクロム c は、誘導型カスパーゼ 9 を活性化する。誘導型カスパーゼは実行型カスパーゼの 3 と 7 を活性化し、カスパーゼ 3 と 7 は DNA 断片化、DNA を修復する PARP1 の切断などを引き起こすことでアポトーシスが誘導される。アポトーシスは、分子レベルで調節されたプログラム細胞死であることと炎症を引き起こさないことから、アポトーシス誘導剤は有力な抗がん剤候補である [28]。しかしながら、腫瘍の薬物耐性獲得などでアポトーシス耐性のがん細胞も出現するようになったことから、同じくプログラム細胞死であるネクローシスやフェロトーシスなどの細胞死もがん治療の研究対象となってきた。

ネクローシスは、2005 年に提唱された細胞死で、「プログラムされたネクローシス」として注目を集めた [15, 29]。それまで、ネクローシスはすべて事故的に起こる細胞死で制御できないものとされていたが、ネクローシスの発見はこの概念を覆した。ネクローシスは、細胞の膨張、細胞膜の損傷、細胞内 ROS 増加などの特徴を示しており、その発見はアポトーシスの研究に起因している。外因性アポトーシスをカスパーゼ阻害剤の z-VAD-fmk で阻害すると、細胞株によっては細胞死が回復せず、ネクローシス様の形態を示す細胞死を誘導するケースがみられた(図序-5) [30]。後に、この細胞死をRIPK阻害剤の necrostatin-1 (nec-1) で抑制されることが発見され、プログラムされたネクローシスとして紹介された。ネクローシスは、アポトーシスが止められたときに引き起こされる細胞死であるため、生物において除去しなければならない細胞がアポトーシスを誘導されたときに死ななかった場合、残された二つ目の選択肢としてプログラムされているのではないかと考えられた。

オートファジー性細胞死 (Autophagic cell death) は、細胞の自食作用であるオートフ

アジーの発見とともに注目された細胞死である(図序-5) [13, 31]。オートファジー性細胞死の提唱により細胞死が 3 つに分類されるようになり、アポトーシスは I 型細胞死、オートファジー性細胞死は II 型細胞死、ネクローシスは III 型細胞死とされていた。オートファジー性細胞死は、オートファゴソーム形成によって細胞内に液胞が見えることで形態的に特徴付けられている。オートファジー自体は、細胞が栄養不足になった時に不要な高分子や細胞小器官を分解する現象であり、アポトーシスなどの他の細胞死が誘導されているときに観測されることもあるため、他の細胞死であるにもかかわらずオートファジー性細胞死として間違われることもあった。そのため、オートファジー性細胞死はオートファジーが伴われる細胞死ではなく、オートファジーを起因とする細胞死であると定義された。従って、オートファジー性細胞死を見分けるためにオートファジーが起きていることを確認するとともに、オートファジー阻害剤で細胞死が抑制されるかどうかを確認する必要もある [32]。

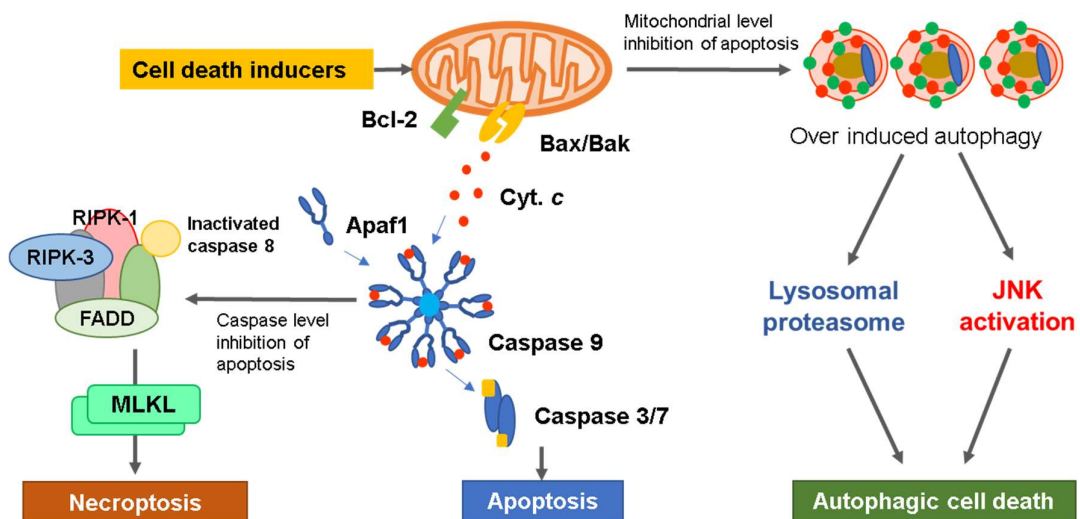


図 序-5. アポトーシス、ネクローシス、オートファジー性細胞死のメカニズム(ミトコンドリアの関与)



パータナトスは、PARP1 の過剰活性化により誘導される細胞死で、PARP1 を介するネクロシスとして紹介されていた [33]。後に、その誘導メカニズムが解明され、パータナトスとして、他のネクロシスと区別された。形態的に細胞膜の損傷、MOMP の誘導、染色体の凝縮、並びに DNA が大きく断片化されるなどで特徴付けられている [34]。PARP1 は、DNA の修復に働く酵素で、DNA 断片化をするアポトーシスでは切断されることで不活性化されている。一方で、DNA の激しい損傷などで PARP1 が過剰に活性化すると、細胞内 ATP が低下するなどエネルギーロスが生じ、ATP を使って働くカスパーゼも活性化できないためアポトーシス誘導経路に入れないと考えられている。一方で、ATP 低下は MOMP の誘導につながり、ミトコンドリアからアポトーシス誘導因子(AIF)が細胞質に放出され、カスパーゼやエンドヌクレアーゼ G(EndoG)非依存的に DNA 断片化などを誘導することで、パータナトスが誘発される。パータナトスは、DNA のアルキル化の他、酸化ストレス、無酸素状態、低血糖症、炎症などで誘導されることが報告されている。

細胞死は、このように誘導メカニズムやそこに関わる生体分子も様々であることが近年の研究で明らかになって来た。以上述べてきた様々な細胞死に関わる多様な細胞死誘導剤も開発され、その有用性を明らかにする研究が続けられている [23]。しかしながら、同じ化合物でも、作用濃度や作用時間によって異なる細胞死を誘導することも報告されている。例えば、過酸化水素は低濃度ではアポトーシスを誘導するが、高濃度ではネクロシスを誘導する [35]。ジヒドロアルテミシニン<sup>1</sup>は、ヒト白血病細胞 HL60 において低濃度ではアポトーシス(72 時間処理の IC<sub>50</sub> 値:0.11 μM)、高濃度ではフェロトーシス(12 時間処理の IC<sub>50</sub> 値:6.82 μM)を誘導する [36, 37]。さらに、アルテミシニン誘導体のアルテスネート<sup>2</sup>は、白血病細胞の HL60 と KG1 においてはアポトーシスを誘導するが、膵臓がん細胞 Panc-1 においてはフェロトーシスを誘導するなど、同じ化合物でも細胞種によって異なる細胞死を誘導することも報告されている [38,

39]. このように、抗がん作用を示している化合物は複数の細胞死を誘導するケースもみられるため、細胞死の誘導メカニズムの解明はがん治療薬の開発研究においても重要である。

#### 序-4. フェロトーシス

フェロトーシスは、2012年に鉄イオン依存的に誘導される非アポトーシスのプログラム細胞死として提唱された [16]。フェロトーシスは、鉄イオン依存的な脂質過酸化誘導による細胞死で、細胞膜の損傷やミトコンドリアの縮小、ミトコンドリアのクリステの減少などで形態的に特徴付けられている [40-44]。フェロトーシスは、システム  $x_c^-$  阻害剤 (エラスチン、ソラフェニブ、スルファサラジンなど)、グルタチオン枯渇剤 (ブチオニンスルホキシミン)、および GPX4 阻害剤 [(1S,3R)-RSL3:RSL3、FIN56 など]により誘導される [45]。脂質過酸化阻害剤[ferrostatin-1 (Fer-1)、リプロスタチン-1]、脂溶性抗酸化剤[ $\alpha$ -tocopherol (VE)、コエンザイム Q<sub>10</sub>(CoQ<sub>10</sub>)]、および鉄キレート剤(DFOM)は、フェロトーシスを軽減することで知られている [45]。

細胞には脂質過酸化から保護するシステムがある。グルタチオンペルオキシダーゼ 4(GPX4)は、還元型グルタチオン(GSH)を使用して酸化ストレスから細胞を守る GPXファミリーの一つで、過酸化脂質を無毒化する酵素として知られている。GPX4は、GSHを酸化型グルタチオン(GSSG)に変換し、脂質過酸化物(L-OOH)を対応するアルコール(L-OH)に還元する [46]。したがって、GPX4の活性化に必要なGSHが減少するとGPX4の働きも抑制される。そのため、細胞内GSH量の増加に関わるシスチン/グルタミン酸対向輸送システム  $x_c^-$ の阻害は、GSHの枯渇をもたらし、GPX4の阻害につながる。このようにGPX4活性の阻害は、鉄イオンを介したフェントン反応による脂質過酸化を促進し、フェロトーシスの誘導につながる(図序-6)。

GPX4以外に、フェロトーシス抑制タンパク質 1 (FSP1)、GTP シクロヒドロラーゼ 1 (GCH1)、及びジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ (DHODH) も、細胞内脂質過酸化ラジカルを除去することで、GPX4非依存的にフェロトーシスを抑制することが報告されている(図序-6) [47]。FSP1は、ユビキノン(コエンザイム Q<sub>10</sub>:CoQ<sub>10</sub>)を介してフェロトーシスを抑制する。還元型 CoQ<sub>10</sub>は、脂質過酸化を誘発する脂質過酸化ラジカルをト

ラップする。一方で、FSP1 は NADPH を使用して酸化型 CoQ<sub>10</sub> を還元型 CoQ<sub>10</sub> に還元する反応を触媒することで、脂質過酸化の誘導を防いでいる [48]。DHODH はミトコンドリアに局在する FSP1 と類似作用をもつ酵素で、ミトコンドリアにおける脂質過酸化を抑制する。そのため、DHODH 阻害剤は GPX4 高発現細胞において GPX4 阻害によるフェロトーシス誘導作用を高めることが報告されている。また、GPX4 の低発現細胞では、DHODH 阻害剤は単独でもフェロトーシスを誘発することが報告されている [49]。GCH1 は、脂溶性抗酸化剤の tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) の合成と、多価不飽和脂肪酸リン脂質 (PUFA-PL) の減少、及び CoQ<sub>10</sub> の上昇を促すことでフェロトーシスを抑制する [50]。

一方、アシルコエンザイム A 合成酵素長鎖ファミリー4 (ACSL4) とリゾフォスファチジルコリンのアシルトランスフェラーゼ3 (LPCAT3) は、フェロトーシスプロモーターとして報告されており、これらの不活性化は GPX4 阻害によるフェロトーシスを抑制することが報告されている [51]。ACSL4 は、リン酸化によって活性化し、遊離多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を PUFA-PL に組み込み、細胞膜の PUFA-PL を増やす。この時、GPX4 などの過酸化脂質を無害化する働きをするメカニズムが抑制されると、脂質過酸化が促進されてフェロトーシスにつながる (図序-6)。

フェロトーシスの誘導 (ACSL4) や抑制 (GPX4、FSP1、DHODH、GCH1) に関わるタンパク質は、細胞株によって異なる発現量を示しており、発現量の違いはフェロトーシスに対する感受性とも関連している。例えば、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 とヒト肝がん由来細胞 HepG2 は、ヒト前立腺がん細胞株 LNCaP やヒト慢性骨髄性白血病細胞 K562 と比較して ACSL4 の発現が高い。そして、ACSL4 が比較的高発現している HL60 と HepG2 は、フェロトーシス誘導剤であるエラスチンに対し、K562 と LNCaP より高い感受性を示している。また、FSP1 は T 及び B 急性リンパ性白血病細胞においてエピジェネティックレベルで発現が抑制されているため、FSP1 の発現がみられて

いる K562 より、GPX4 阻害剤 RSL3 に対する感受性が高かった。一方で、HL60 では FSP1 は通常発現しておらず、NRF2 誘導因子に応答する場合のみ発現がみられる [52]。

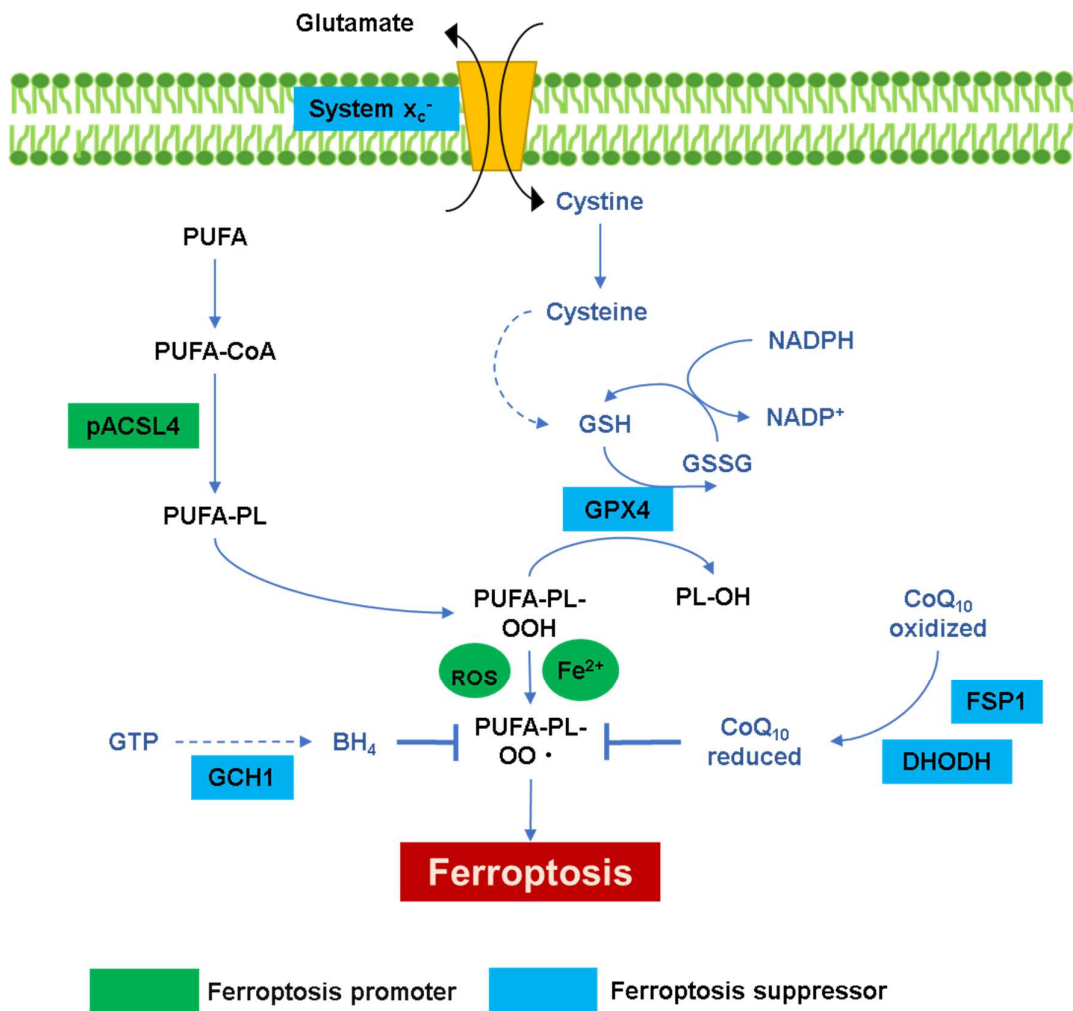


図 序-6. フェロトーシスの誘導メカニズム

# 第1章

**3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene** の HL60 細胞に対する  
フェロトキシ様細胞死誘導作用機序

## 第 1 章

### 1-1. 緒言

#### 1-1-1. 3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene (EDBD)

3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene (EDBD)は、1978 年に初めてキオン属の *Senecio paludaffinis* から単離されたビスボラン型セスキテルペンのエンドパーオキサイド化合物である(図 1-1) [53]。後に、我々の研究グループは、抗がん剤の探索を目的とした遺伝子変異酵母 WCTR312A (*cdc2-1 rad9Δ*) 株 [54]における生育回復活性を指標に、山菜のモミジガサ (*Cacalia delphiniifolia*) とボウナ (*Cacalia hastata*) の葉と花から本物質を単離し、初めてその抗がん作用を解析した [55, 56, 57]。

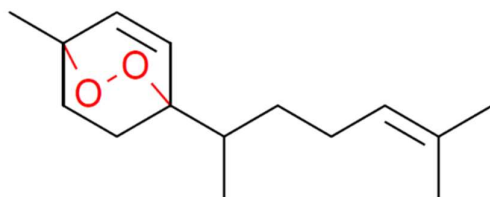


図 1-1. 3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene (EDBD)の構造

モミジガサは、北海道、本州、四国、九州の全国いたるところに広く分布しているキク科の多年草である。尚、その葉や茎は天ぷらやおひたしなどに調理され、特に東北地方で古くから親しまれてきた [58]。モミジガサの抽出物は、ラット神経膠細胞腫細胞株 C6 glioma に対して、50%細胞生存率濃度 (CC<sub>50</sub>) 0.52 mg/ml で生存を抑制することが報告されている。この時の作用は、アポトーシス誘導でも細胞周期異常による増殖阻害でもなかったため、その他の作用によって細胞の生存を抑制していると考えられた [59]。モミジガサからの活性物質としては、抗酸化作用や抗がん作用で知られているカカロール (cacalol) が報告されている。カカロールは、抗がん剤の探索に用いている WCTR312A 株でも活性を示していた。我々はカカロールに加え、モミジガサの葉と花から EDBD を、根からはカカロン型の化合物のヒドロキシペルオキシカカロン



( hydroperoxycacalone: HPC ) とヒドロキシペルオキシエピカカロン (hydroperoxyepicacalone: HPEC)を見出し、その抗がん作用を解析した(図 1-2) [55, 56, 60]。

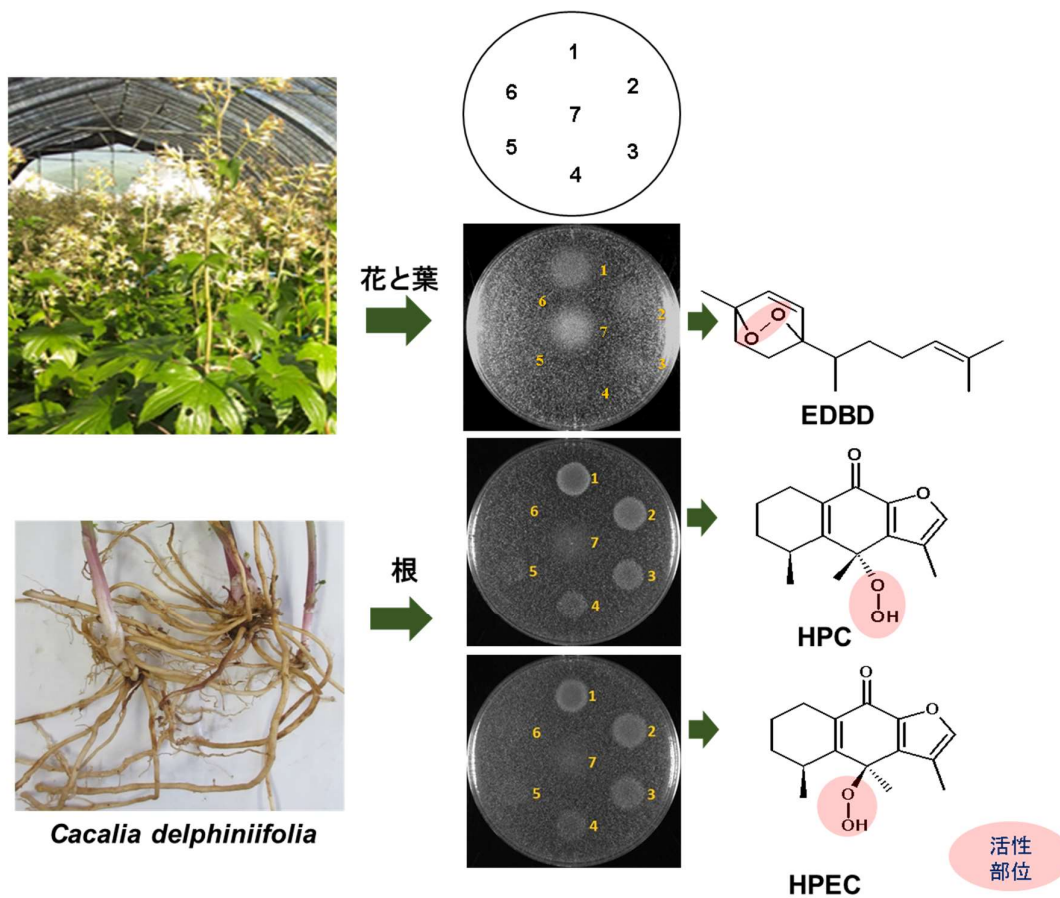


図 1-2. WCTR312A 株を利用してモミジガサから単離された活性物質

YPD 培地と混合した WCTR312A 株をシャーレに播き、サンプルを 5  $\mu$ l スポットし、37°C で 6 時間、28°C で 48 時間培養した。1: Sample (62.5 ng/spot EDBD、5  $\mu$ g/spot HPC と HPEC)、2~6:1 の 1/2 希釈、7: hydroxyurea 1.25 mg/spot。

## 第 1 章

一方で、モミジガサの葉と花から単離された EDBD は、39 種がん細胞パネルスクリーニング (JFCR39) の中で、HBC-5 (乳がん)、HT-29 (大腸がん)、HCl-H522 (肺がん)、Lox-IMVI (メラノーマ) の 4 種の細胞に対して、特に強い活性を示した。さらに、Lox-IMVI を移植したゼノグラフトマウスモデルにおいて腫瘍体積の増加を抑制した。この際に、ポジティブコントロールのシスプラチンとは異なり、マウスの体重を減少させなかったことから、副作用が少ないことが示唆された [57]。

EDBD のようなエンドパーオキシド化合物は、構造中のエンドパーオキシド結合が鉄イオンにより開裂することが有機化学的に広く知られている。実際に、EDBD は鉄イオンによってエンドパーオキシドが開裂し安定なエポキシド変換体を生成する (図 1-4)。この変換体の HL60 に対する活性が EDBD より 80 倍弱いことと、EDBD の活性が鉄イオンの添加で上昇し、鉄イオンキレート剤の DFOM の存在下で活性が減少することから、EDBD の活性の本体は鉄イオンの開裂で生成された不安定なラジカル中間体であることが考えられた [57]。

EDBD の細胞レベルでの作用を HL60 細胞で調べた結果、EDBD は p38 MAPK の活性化を介した内因性アポトーシス経路の活性化と DR4 を介した外因性アポトーシス経路の活性化を誘導した。その結果、カスパーゼの活性化、染色体の凝縮、DNA の断片化などのアポトーシスのホールマーク現象を引き起こした (図 1-5) [57, 61]。

また、EDBD のターゲットを探ったアフィニティークロマトグラフィーでは、特異的に結合するタンパク質は見出されなかった [61]。このことから EDBD のターゲットは、細胞膜タンパク質などの機能構造を保ったまま抽出できないタンパク質、あるいはタンパク質ではない分子であると考えられた。

# 第 1 章

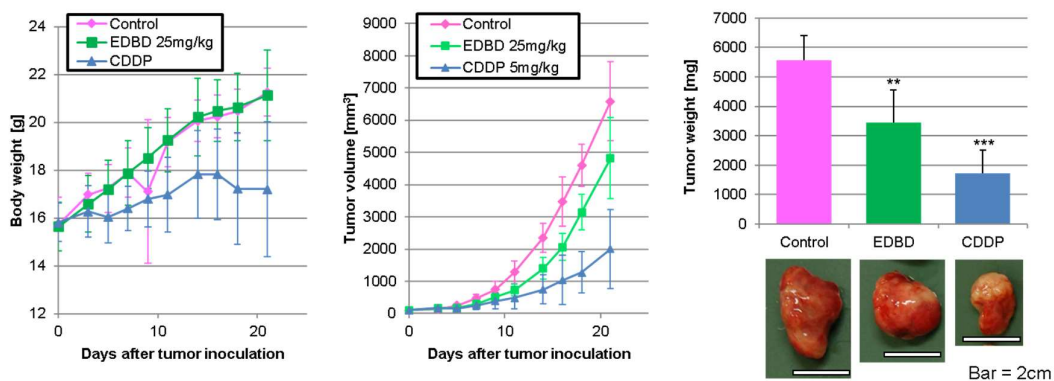


図 1-3. マウスゼノグラフトモデルに対する EDBD の抗がん作用

マウス (BALB/c nu/nu、メス、6 週齢) の左鼠径部に、ヒトメラノーマ細胞 Lox-IMVI ( $1 \times 10^6$  cells/mouse) を皮下注射し、腫瘍が  $100 \text{ mm}^3$  となった時点で各サンプルを静脈注射し、薬剤投与後 21 日目で屠殺および解剖し、腫瘍重量を測定した。25 mg/kg EDBD は、1、6、11、16 日目に、5 mg/kg cisplatin (CDDP) は、1、8、15 日目にそれぞれ静脈注射した。また、腫瘍体積は次式により求めた: 腫瘍体積 [ $\text{mm}^3$ ] = (長さ  $\times$  幅<sup>2</sup>) / 2。 (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control, control:  $n=8$ , EDBD:  $n=5$ , CDDP:  $n=5$ )

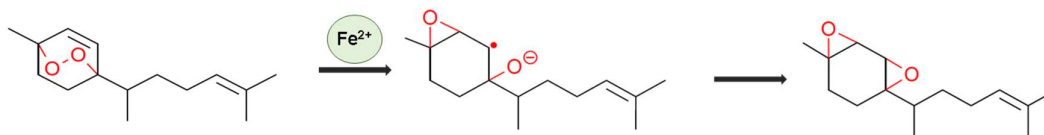


図 1-4. EDBD の鉄イオンによって開裂する反応

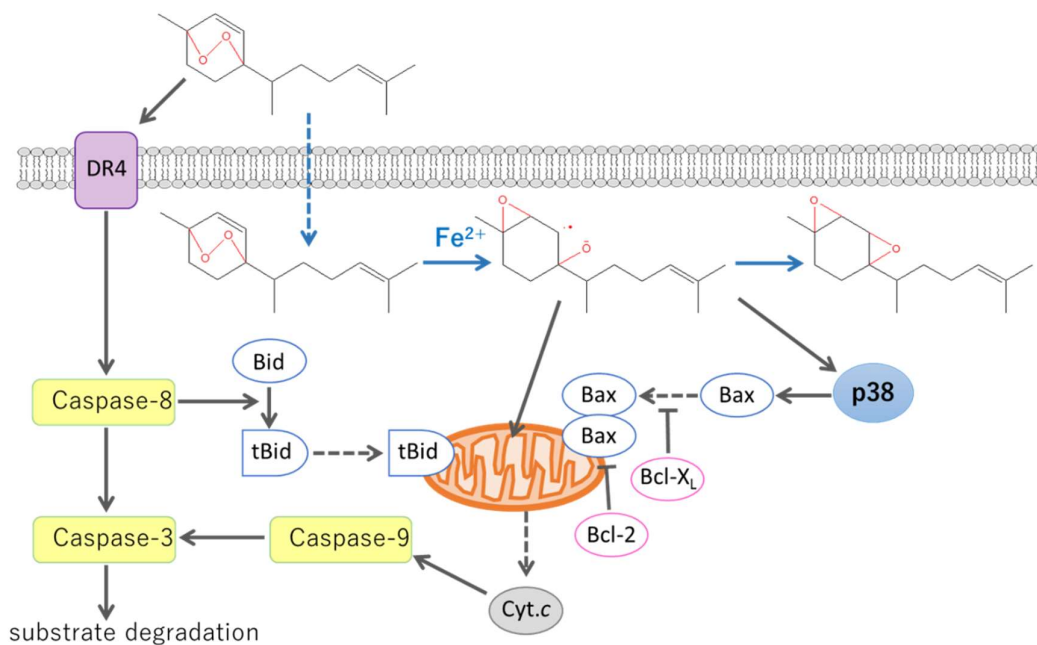


図 1-5. EDBD のアポトーシス様現象誘導の分子メカニズム

以上述べた様に、EDBD の作用機序を解明する研究が進む中で、EDBD による細胞死の多くの形態は、アポトーシスを誘導するカンプトテシン (Cpt) と異なる細胞死の形態を示していた [56]。その作用を調べた結果、EDBD は脂質過酸化を介してネクローシス様の細胞死を誘導していると考えられた [56, 62]。近年では、脂質過酸化を介する細胞死としてフェロトーシスが報告され、その詳細な分子メカニズムも解明されてきた [16, 63]。従って、今回の研究では EDBD のフェロトーシス様細胞死誘導作用を調べることにした。

## 第 1 章

### 1-2. 実験方法

#### 1-2-1. 細胞培養

ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 (RCB0041、理研バイオリソースセンター)は、10%の非働化済 FBS (BioWest Co. Ltd.、Vancouver、Canada)、1% Penicillin (50 units/ml)-Streptomycin (50 µg/ml) (Gibco; Thermo Fisher Scientific Inc.、Waltham、MA、USA)を添加した RPMI-1640 (L-グルタミン、フェノールレッド含有)培地[富士フィルム和光純薬(株)]を用いて、75 cm<sup>2</sup> フラスコにおいて、3 日間に一度  $7.2 \times 10^4$  cells/ml なるように植え継ぎながら、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

#### 1-2-2. プロテオーム解析

HeLa 細胞 ( $3 \times 10^5$  cells)を、3 ml 培地とともに 35 mm dish に播き、一晩培養後、25 µM EDBD で 18 時間処理した。細胞を氷冷した PBS で洗浄し、ラバーポリスマンを用いて剥し、4°C、4,000 rpm、3 分間遠心して細胞を集めた。PBS で再洗浄後、細胞を sample buffer (7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS、30 mM Tris、buffered to pH8.5) に懸濁させて sonication により破碎した。得られた cell lysate は、氷中で 1.25 U/µl benzonase により 60 分間処理し、4°C、12,000 rpm、3 分間遠心して上清を回収し、cell lysate とした。Cell lysate のプロテオーム分析は、2D DIGE システム (GE Healthcare UK Ltd.、Buckinghamshire、UK) を使用し、ゲルの画像は Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics、Newcastle upon Tyne、UK) を使用した。各 2D DIGE ゲルで検出可能な 1,000 個を超えるスポットのうち、参照化合物で処理した時の結果で共通して見出された 296 個のスポットを選択した [64, 65]。次に、DMSO 処理した HeLa 細胞のスポット体積で各スポットを比例し結果を出した。スポット内のタンパク質を決定するために、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量分析装置を使用してペプチド質量フィンガープリンティング (PMF) を実施した [66]。

## 第 1 章

### 1-2-3. 細胞生存率

HL60 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/ml に希釈し、96 well plate に  $98 \mu\text{l}$  ずつ播いた。メタノール (MeOH) で希釈した  $50 \mu\text{M}$  z-VAD-fmk と nec-1、及び  $5 \mu\text{M}$  IM-54 で処理 (各  $1 \mu\text{l}$ ) し、1 時間後に同じく MeOH で希釈した  $5 \mu\text{M}$  EDBD を  $1 \mu\text{l}$  添加し、48 時間培養後 MTT アッセイで生存率を算出した。DPBS[富士フィルム和光純薬(株)]に溶解した  $5 \text{ mg/ml}$  MTT 溶液を  $10 \mu\text{l}$  ずつ添加し、4 時間培養して生細胞で生成されるフォルマザンを、 $100 \mu\text{l}$  のイソプロパノール ( $0.04 \text{ N HCl}$  含有) を添加しピペティングで溶解した。その後、プレートリーダー (Tecan, Männedorf, Switzerland) で  $560 \text{ nm}$  の吸光度を測定した。尚、細胞生存率は、溶媒のみ入れた吸光度をコントロールとし、(1) の式で算出した。

$$\text{細胞生存率 [\%]} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (1)$$

MTT アッセイは、細胞の還元力を指標に細胞生存率を求める方法であるため、水溶性の抗酸化剤を含む培地に MTT を添加すれば、MTT が直ぐに還元され細胞生存率を求めることができない。接着細胞の場合は、MTT を添加する前に培地を交換することで細胞生存率を求められる。しかしながら、HL60 細胞のような浮遊細胞ではこの方法は困難である。従って、抗酸化剤と EDBD の併用の生存率をトリパンブルー色素排除法で求めた。HL60 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/ml で 24 well plate に  $980 \mu\text{l}$  で播いた。その後、 $1 \text{ mM}$  *N*-acetyl-L-cysteine (NAC)、 $0.2 \text{ mM}$  ascorbic acid (VC)、 $10 \mu\text{M}$  VE[富士フィルム和光純薬(株)]と Fer-1 (Sigma-Aldrich Inc.) で 1 時間処理 (各  $10 \mu\text{l}$ ) した後、 $10 \mu\text{M}$  EDBD 又は  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  で 48 時間処理 (各  $10 \mu\text{l}$ ) した。処理した細胞をトリパンブルーで染色し、血球計算盤で生細胞を数えた。生存率は、コントロールの細胞数を対照に比率で算出した。

## 第 1 章

### 1-2-4. 細胞死の形態観察

24 well plate に、 $5 \times 10^5$  cells/ml の HL60 細胞の培養液を 980  $\mu$ l ずつ播いた。MeOH で希釈したカンプトテシン (Cpt)、dihydroartemisinin (DHA)、 $H_2O_2$ 、cumene hydroperoxide (CuOOH)、EDBD をそれぞれ 20  $\mu$ l 添加し、細胞の形態に変化がみられた 5 h と 15 h に光学顕微鏡で細胞の形態を観察した。

### 1-2-5. 脂質過酸化の検出

HL60 細胞を  $5 \times 10^5$  cells/ml となるように希釈し、 $\phi 10$  cm dish (Thermo Fisher Scientific Inc.) に播き、1 mM C11-BODIPY (C11-BODIPY<sup>®</sup> 581/591, Sigma-Aldrich Inc.) を終濃度 1  $\mu$ M になるように加えた。37°C、暗所で 30 分間培養した後、15 ml の遠心チューブ (Thermo Fisher Scientific Inc.) に移し、1000 rpm で 3 分間遠心した。上清をアスピレーターで除き、等量の新しい培地に懸濁した後、24 well plate に 980  $\mu$ l ずつ入れた。MeOH で希釈した EDBD (終濃度: 5、10、20  $\mu$ M) を 20  $\mu$ l ずつ添加し、3 時間培養した。その後、1.5 ml の遠心チューブを用いて、冷却遠心機 (5415R、Eppendorf) で遠心 (3000 rpm、4°C、3 分間) して上清を取り除き、同条件による遠心操作で DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (Gibco Corp.) による洗浄を 1 回行った後、30  $\mu$ l DPBS に細胞を懸濁させた。作成したサンプルの蛍光を、共焦点レーザー顕微鏡 (Laser=488、561 nm) 及び cellometer (K2、トミーデジタルバイオロジー (株)) (Ex: 470 nm、Em: 535 nm) で観測した。尚、併用実験では 10  $\mu$ M DFOM で 1 時間、あるいは 20  $\mu$ M  $FeSO_4$  [富士フィルム和光純薬 (株)] で 3 時間処理した後、EDBD を添加した。

### 1-2-6. タンパク質の発現解析

#### 1-2-6-1. HL60 細胞からのタンパク質抽出

## 第 1 章

培養した細胞を、培地ごと氷上で 15 ml あるいは 50 ml 遠心チューブ (Thermo Fisher Scientific Inc.) に全量を回収し、冷却遠心機で遠心 (1000 rpm、4°C、3 min) して培地を取り除いた。DPBS 1.2 ml で細胞を懸濁して 1.5 ml の遠心チューブに移し、遠心 (3000 rpm、4°C、5 min) して上清を取り除いた。その後、DPBS 0.5 ml を加え上記と同じ操作 2 回行うことにより、細胞を洗浄した。細胞ペレットに 1×RIPA buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、1% NP-40、0.1% Sodium deoxycholate、0.1% SDS、1 mM EDTA、1×Phosphatase Inhibitor Cocktail Solution I [富士フィルム和光純薬 (株)]、1×Complete Mini (protease inhibitor cocktail、Roche Diagnostics Corp.) を 105  $\mu$ l を加えて懸濁後、4°C で 30 分静置した。静置後、遠心 (15000×g、4°C、30 min) し、上清 103  $\mu$ l を新しいチューブに移した。回収した上清のうち 3  $\mu$ l を 27  $\mu$ l の滅菌水で希釈し、1-2-6-2 の方法に従って BCA 法によるタンパク質定量を行った。残りの 100  $\mu$ l は、5×SDS サンプルバッファー [312.5 mM Tris-HCl (pH6.8)、25% 2-ME、25% Glycerol、25% SDS、0.005% BPB] を 25  $\mu$ l ずつ加えて攪拌後、5 分間煮沸し、氷中に入れ急冷した。熱処理によりチューブ内に生じた水滴もボルテックスで攪拌し、フラッシュ遠心を行い Western blotting 用 SDS 化サンプルとした。

### 1-2-6-2. タンパク質濃度の測定

タンパク質抽出液の濃度は、BCA kit (Pierce® BCA Protein Assay Kit、Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて測定した。96 well plate に、希釈した BSA 及び測定サンプルを 10  $\mu$ l ずつ入れた。BCA kit の Reagent A 及び B を、A:B=50:1 の割合で混合し、各ウェルに 200  $\mu$ l ずつ添加し、室温で 30 分間反応させた。反応後、プレートリーダー (Infinite F200 PRO、テカンジャパン(株)) を用いて 560 nm の吸光度を測定した。その後、BSA の検量線を作成し、サンプルのタンパク質濃度を求めた。



## 第 1 章

### 1-2-6-3. SDS-ポリアクリルアミドゲルの作製

まず、2.72 ml の MQ 水、2 ml の 4×Lower buffer (1.5 M Tris-HCl (pH8.8)、0.4% SDS)、3.2 ml の 30% Acrylamide/Bis (Bio-Rad Laboratories, Inc.)、80 µl の 10% APS (Ammonium Persulfate, GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) を 15 ml の遠心チューブにいれ、転倒混和した。さらに、8 µl の TEMED (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) を加え転倒混和し、素早く 75 mm ゲル板 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) に 3.2 ml ずつ流し込み、イソプロパノール [富士フィルム和光純薬 (株)] を重層した。45 分間静置した後、イソプロパノールを取り除き、MQ 水でよく洗浄した。次に、3.6 ml の MQ 水、1.5 ml の 4×Upper buffer (1.5 M Tris-HCl (pH6.8)、0.4% SDS)、0.9 ml の 30% Acrylamide/Bis、60 µl の 10% APS を 15 ml の遠心チューブにいれ、転倒混和した。さらに、6 µl の TEMED を加え転倒混和し、素早く各ゲル板に満ちるまで流し込んだ。すぐにコームを差し込み、30 分間静置させた。

### 1-2-6-4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

1-2-6-3 で作製したゲルのコームを外して泳動槽にセットし、1×SDS 泳動バッファー (25 mM、192 mM glycine、0.1% SDS) を注いだ。マーカー (Precision Plus Protein™ Standard, Bio-Rad Laboratories, Inc.) は 1 µl/lane、SDS 化したサンプルは 6.74 µg/lane となるように SDS 化した 1×RIPA buffer で量を合わせ、各サンプルをアプライした。アプライ後、泳動槽 (Mini PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc.) にふたをして電極をつなぎ、200 V で 45 分間泳動を行った。

### 1-2-6-5. Western blotting

電気泳動後ゲル板を外し、分離ゲルのみを回収した。トランスファーバッファー (48 mM Tris、39 mM glycine、20% MeOH) で浸したろ紙 (東洋濾紙 (株)) 3 枚、トランスフ

## 第 1 章

ァーバッファーで平衡化した PVDF 膜 (Immobilon-P、Millipore Corp.)、回収した分離ゲル、およびトランスファーバッファーで浸したろ紙 3 枚を下から順に重ね、空気を抜いた後、ブロットイング用装置 (Trans-Blot<sup>®</sup> TurboTM、Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いて 30 分間ブロットイングした。マーカーおよびタンパク質のバンドが転写されていることを確認後、ブロッキングバッファー [1×TBS (10×TBS (200 mM Tris、1.25 M NaCl、pH7.6) を希釈して使用)、0.1% Tween 20、1% Polyvinyl pyrrolidone] を入れたプラスチックケースに PVDF 膜を移し、シェーカー [(株)エル・エム・エス] でゆっくり攪拌しながら室温で 1 時間ブロッキングした。1 時間後、PVDF 膜を TBS-T buffer (1×TBS、0.1% Tween 20) で軽く 3 回すすぎ、上部を開けた状態でパッキングした。これに Can Get Signal Solution 1 [東洋紡 (株)] で希釈した一次抗体 (抗ラビット  $\beta$ -actin 抗体、抗ラビット GPX4: Cell Signaling Technology Inc.; 抗ラビット ACSL4/FACL4 抗体、抗ラビット GCH-1 抗体: Proteintech Group Inc.) を入れ、上部をパッキングした後、シェーカーを用いて室温で 3 時間ゆっくり攪拌させた。3 時間後、PVDF 膜を TBS-T buffer を用いて室温で 5 分間洗浄する操作を 3 回繰り返した。洗浄した PVDF 膜を、Can Get Signal Solution 2 [東洋紡 (株)] で希釈した二次抗体 (ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラビット IgG: Cell Signaling Technology Inc.) が入ったプラスチックケースに移し、シェーカーを用いて室温で 1 時間ゆっくり攪拌させ、二次抗体処理を行った。二次抗体処理後、再び PVDF 膜を TBS-T buffer を用いて室温で 5 分間洗浄する操作を 3 回繰り返した。洗浄した PVDF 膜に、ImmunoStar<sup>®</sup> Zeta [富士フィルム和光純薬 (株)] の A と B 液を直前に等量混ぜた溶液を、PVDF 膜 1 枚当たり 800  $\mu$ l ずつ直接滴下し、1 分間室温で反応後、PVDF 膜をパッキングシートに挟んだ。バンドの検出および撮影は、ImageQuant Las 4000 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) を用いて行った。

## 第 1 章

### 1-2-7. GSH 定量

GSH (還元型グルタチオン) 量を、GSH/GSSG Quantification Kit [(株) 同仁化学研究所] を用い製造元のマニュアルに従い定量した。HL60 細胞を  $5 \times 10^5$  cells/ml になるように培地で希釈し、6 well plate に 2.97 ml ずつ播いた。濃度依存性の結果は、播いた細胞に EDBD (終濃度: 5、10  $\mu$ M) 又は MeOH を 0.03 ml ずつ添加し、6 時間培養した。時間依存性は、10  $\mu$ M EDBD で処理した細胞を 0、3、6、9 時間培養した。サンプルで処理した細胞を 10 ml チューブに回収し、1 ml cold PBS で残りの細胞を回収し、遠心 (1000 rpm、4°C、3 min) した。上清を捨てて、500  $\mu$ l cold PBS で細胞を懸濁し、1.5 ml のマイクロチューブに移した。さらに、500  $\mu$ l cold PBS で残りの細胞を回収し、遠心 (3000 rpm、4°C、3 min) した。上清を捨て、500  $\mu$ l cold PBS で細胞を洗い、遠心 (3000 rpm、4°C、3 min) 後、上清を除去した。洗浄した細胞に 10 mM HCl を各 80  $\mu$ l を添加し、凍結 (-80°C) と溶解 (室温) を 2 回繰り返す、細胞膜を破壊した。その後、5% SSA [5-スルホサリチル酸: 富士フィルム和光純薬 (株)] を各 20  $\mu$ l 添加し、遠心 (8,000 g、4°C、10 min) して上清を新しいマイクロチューブに移した。100  $\mu$ l 滅菌水で SSA を 0.5% になるように希釈し、二つに分けて、総グルタチオン定量用と GSSG (酸化型グルタチオン) 定量用のサンプルとした。GSSG 定量用サンプル 100  $\mu$ l にキットのマスキング試薬を 2  $\mu$ l を添加し、サンプル中の GSH のチオール基 (SH 基) をマスクした。GSH の GSSG スタンダード溶液と各サンプルを酵素反応用の 96 well plate に入れ、バッファー溶液 60  $\mu$ l をマルチピペットで添加し、37°C で 1 時間保温した。基質溶液と酵素溶液を各 60  $\mu$ l ずつマルチピペットで添加し、37°C で 10 分間保温した。その後、プレートリーダーを用いて 405 nm の吸光度を検出した。総グルタチオン濃度と GSSG 濃度をスタンダードの検量線から求めて、GSH 濃度を (2) の式で算出した。

$$\text{GSH 濃度} = \text{総グルタチオン濃度} - [\text{GSSG 濃度}] \times 2 \quad (2)$$

## 第 1 章

総グルタチオン定量用サンプルを 40  $\mu$ l を使用し、BCA kit を用いて 1-2-5-2 と同じ方法でサンプル中のタンパク質を定量した。サンプル中のタンパク濃度で GSH 濃度を除することによって、単位タンパク質量あたりの GSH 量を算出した。

### 1-2-8. 統計処理

統計テストは、統計ソフトウェア R バージョン 4.3.0 を使用して実行した。統計的に有意な差は、ANOVA および Tukey 法により決定した。データは平均 $\pm$ SD として表され、P値が 0.05 以下、すなわち危険率 5%以下を有意とした。

## 第 1 章

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. 2D-DIGE による EDBD 処理細胞のプロテオーム解析

EDBD の作用点を網羅的に探るために 2D DIGE を使用して HeLa 細胞でプロテオーム解析を実施し、タンパク質発現に対する EDBD の影響を調べた結果、28 種類のタンパク質が 1.5 倍以上に有意に増加した(図1-6、表 2-1)。検出されたほぼすべてのタンパク質は、ミトコンドリアまたは小胞体に関連するタンパク質だった。

また、ChemProteoBase を使用して、他の化合物とのコサイン類似度も算出した結果(コサイン類似度の数値が 0.7 を超える場合、同様の作用メカニズムを持つ可能性が示唆される)、EDBD (25  $\mu\text{M}$ )と、アルテミシニン(100  $\mu\text{M}$ )やアルテスネート(100  $\mu\text{M}$ )などのアルテミシニン類のコサイン類似度は、それぞれ 0.12 と 0.10 と、類似性を示さなかった。一方で、DHODH 阻害剤 A771726 (500  $\mu\text{M}$ 、コサイン類似度=0.71) および brequinar (10  $\mu\text{M}$ 、コサイン類似度=0.64)、FSP1 阻害剤 iFSP1 (10  $\mu\text{M}$ 、コサイン類似度=0.65)は EDBD と類似性を示した [67, 68, 69]。

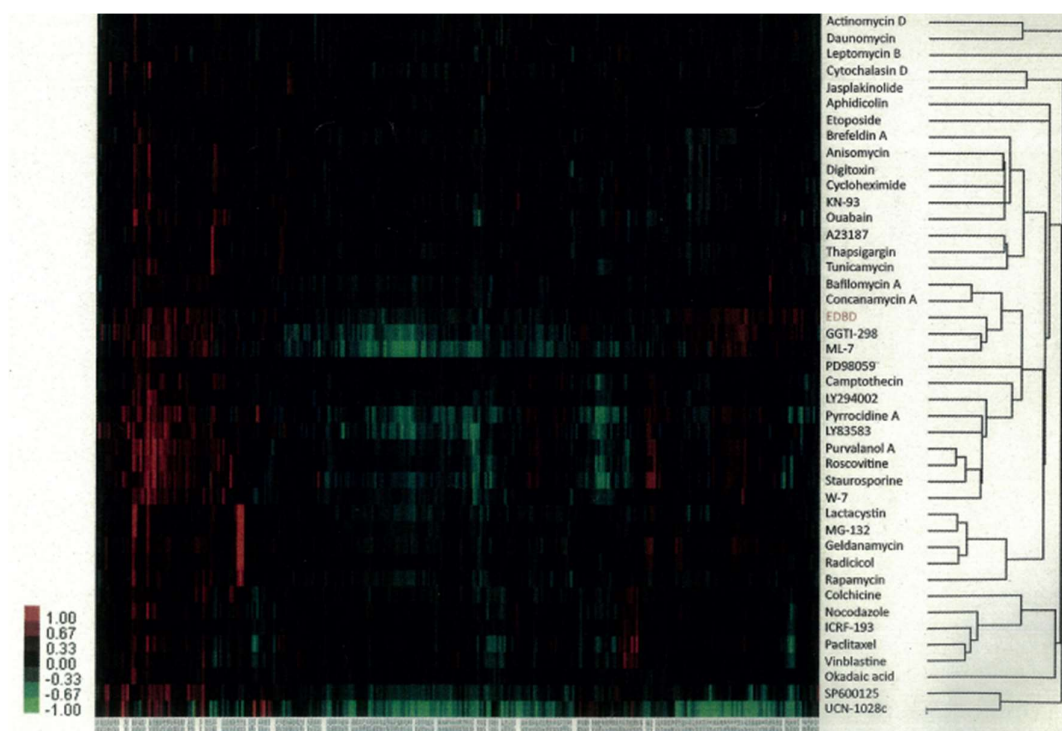


図 1-6. ChemProteoBase を用いたプロテオーム解析による各種阻害剤との比較

HeLa 細胞を用いた 2D-DIGE により、各種化合物で誘導されるタンパク質発現の増減を定量した。階層的クラスター解析を行い、対照化合物と比較した結果をヒートマップで示した。薬剤処理によって増加したタンパク質は赤色、減少したタンパク質は緑色で表示した。

表 1-1. EDBD 処理による HeLa 細胞において発現が優位に増加したタンパク質

Spot no	Fold ratio	UniProt Ac.	Protein Name
1737	2.14 *	P30040	Endoplasmic reticulum protein ERp29
963	2.06 **	P31040	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
1218	1.95 **	P06576	ATP synthase subunit beta
1734	1.93 *	P18669	Phosphoglycerate mutase
851	1.84 **	P02545	Prelamin-A/C
845	1.76 **	P02545	Prelamin-A/C
1116	1.72 *	O94925	Glutaminase kidney isoform
857	1.71 **	P38646	Stress-70 protein
1049	1.70 *	P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1
1055	1.69 **	P10809	60kDa heat shock protein
861	1.68 **	P38646	Stress-70 protein
2148	1.67 **	P00367	Glutamate dehydrogenase 1
2007	1.65 *	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6
1668	1.64 *	P35232	Prohibitin
2107	1.62 *	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
1057	1.59 **	P10809	60 kDa heat shock protein
1207	1.59 **	P06576	ATP synthase subunit beta
594	1.59 **	P14625	Endoplasmic reticulum chaperone
2177	1.59 **	P31040	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
902	1.58 **	P20700	Lamin-B1
1097	1.56 **	P30101	Protein disulfide isomerase A3
1054	1.55 *	P10809	60kDa heat shock protein
1382	1.55 **	Q9UBS4	DnaJ homolog subfamily B member 11
2083	1.55 *	P25705	ATP synthase subunit alpha
1660	1.53 **	Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase
1752	1.53 *	P30084	Enoyl-CoA hydratase
847	1.52 *	P11021	78 kDa glucose-regulated protein
2061	1.50 *	Q16891	Mitochondrial inner membrane protein

HeLa 細胞を 25  $\mu$ M EDBD で 18 時間処理し、全細胞溶解物を 2D DIGE に供た。Fold ratio はコントロールに対して増加した倍数を示す (\*  $p < 0.03$ , \*\*  $p < 0.01$ )。

## 第 1 章

### 1-3-2. 既存の細胞死と EDBD による細胞死の比較

HL60 細胞における EDBD の細胞死誘導メカニズムを解明するために、まずは、EDBD による細胞死を抑制する酸化ストレス誘導性ネクローシス阻害剤の IM-54 を含め、各種細胞死阻害剤の EDBD による細胞死に対する影響を調べた [56]。カスパーゼ阻害剤の z-VAD-fmk、ネクロトーシス阻害剤の necrostatin-1 (nec-1)、IM-54 と EDBD を併用した結果、IM-54 のみが EDBD による細胞死を抑制した (図 1-7)。

さらに、EDBD による細胞死の形態をアポトーシス誘導剤 (カンプトテシン: Cpt)、ネクローシス誘導剤 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ 、cumene hydroperoxide: CuOOH)、並びにエンドパーオキシサイド化合物 (dihydroartemisinin: DHA) と比較し観察した。HL60 細胞を EDBD で 5 時間処理した結果、Cpt によるアポトーシスの形態とは異なり、 $\text{H}_2\text{O}_2$  や CuOOH と類似した形態の細胞死が観察された (図 1-8A)。尚、5 時間処理では、DHA で処理した細胞には細胞死は観察されなかった。EDBD で処理した細胞は 5 時間後の段階で一部のみ細胞死が認められたが、15 時間処理には全ての細胞でネクローシス様形態が観察された (図 1-8B)。一方で、15 時間の DHA 処理は Cpt と類似したアポトーシス様の細胞死を誘導した。

この結果から EDBD はアポトーシスやネクロトーシスではなく、酸化ストレス誘導性ネクローシスに類似した細胞死を誘導することが示唆された。



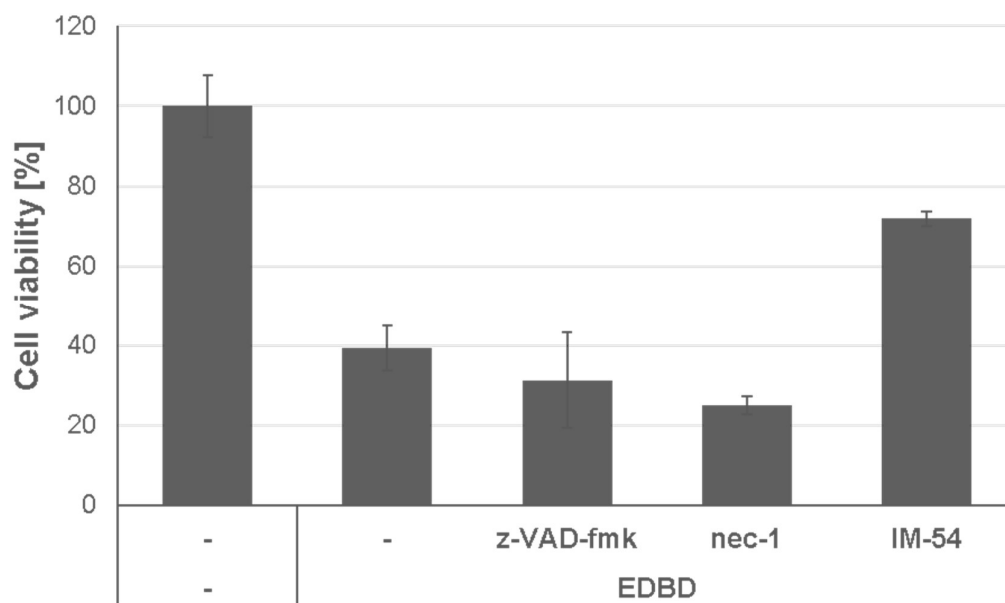


図 1-7. 各種細胞死阻害剤の EDBD による細胞死誘導作用への影響

HL60 細胞を 50  $\mu$ M z-VAD-fmk、50  $\mu$ M nec-1、5  $\mu$ M IM-54 で 1 h 前処理し、5  $\mu$ M EDBD で 48 h 処理し、MTT assay により細胞生存率を測定した (n=3)。

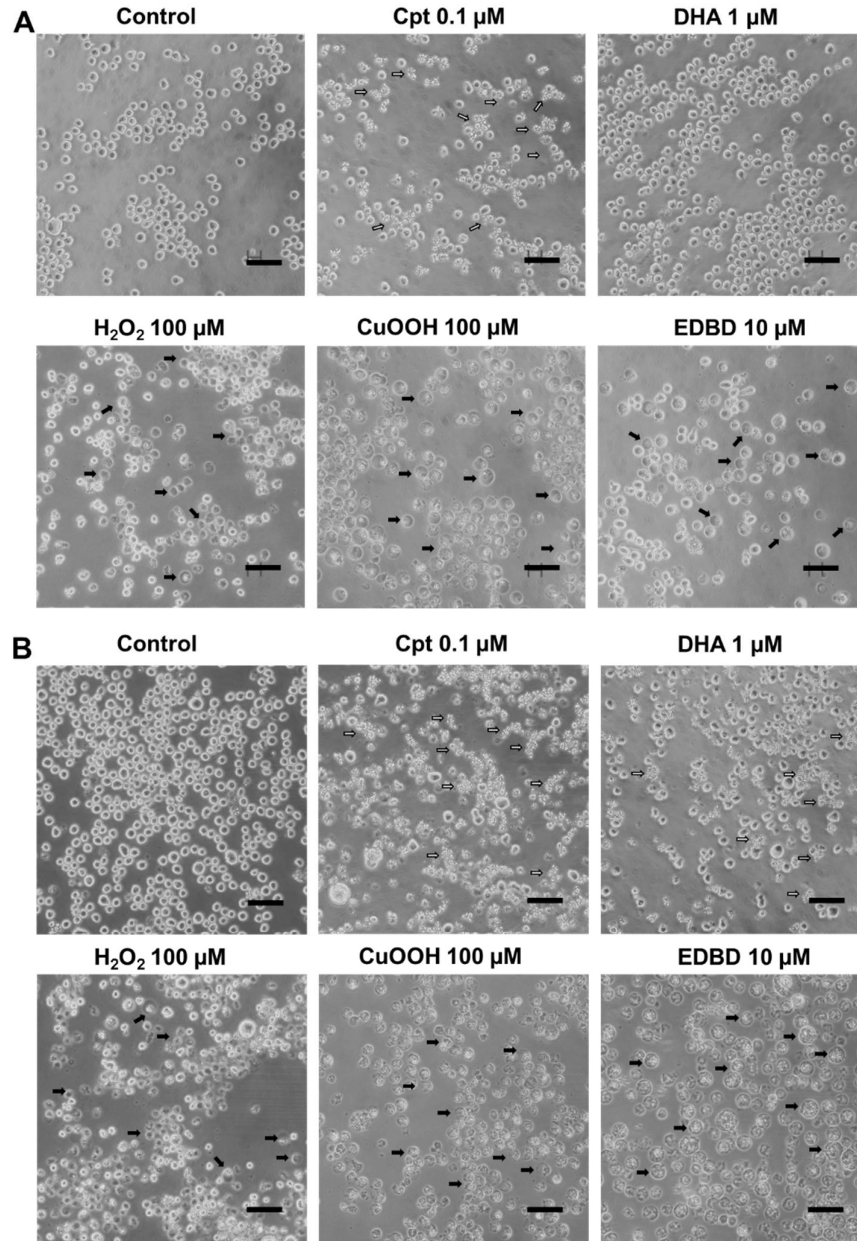


図 1-8. HL60 細胞における EDBD による細胞死の形態観察

HL60 細胞を Cpt、DHA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、CuOOH、EDBD(それぞれ図中に記載の濃度)で処理し、経過時間 5 h(A)と 15 h(B)で観察した。(⇨ : アポトーシス形態; ➡ : ネクローシス様形態)

## 第 1 章

### 1-3-3. 脂質過酸化阻害剤の EDBD による細胞死に対する影響

EDBD は、酸化ストレスで応答する p38 MAPK を活性化することや、その細胞死は酸化ストレス誘導性ネクロシス阻害剤 IM-54 によって阻害されることから、EDBD による生物活性には酸化ストレスが深く関わっていると見える。そのため、水溶性抗酸化剤の NAC と VC、脂溶性抗酸化剤の VE、脂質過酸化阻害剤の Fer-1 との併用による影響を解析した。さらに、EDBD と同様に IM-54 によって細胞死が阻害される  $\text{H}_2\text{O}_2$  と比較した [70]。その結果、EDBD による細胞死は VE と Fer-1 によって完全に抑制され、VC によっても一部抑制された (図 1-9)。一方で、 $\text{H}_2\text{O}_2$  による細胞死は NAC によってのみ一部抑制される程度であった (図 1-9)。

$\text{H}_2\text{O}_2$  は、初代心筋細胞や C6 ラットグリオーマ細胞においてフェロトーシスを誘導することが報告されているが、HL60 細胞では Fer-1 によって細胞死は抑制されなかった [71, 72]。EDBD と  $\text{H}_2\text{O}_2$  による細胞死は、どちらも IM-54 で抑制されるが、その他の阻害剤には異なる反応を示した。

このことから、EDBD と  $\text{H}_2\text{O}_2$  の細胞死誘導活性にはともに酸化ストレスが関わっているが、そのメカニズムは異なるものであると考えられた。

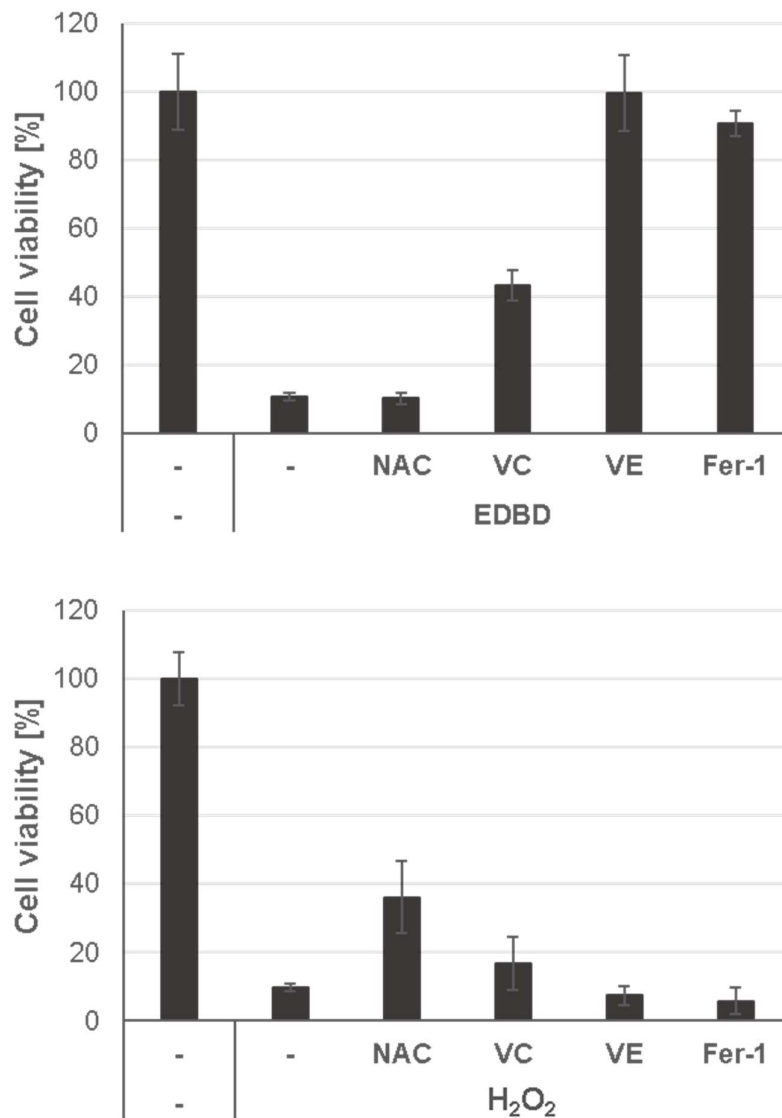


図 1-9. EDBD(上)と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(下)の各種抗酸化剤との併用

HL60 細胞を 1 mM NAC、0.2 mM VC、10 μM VE、10 μM Fer-1 で 1 h 前処理した後、10 μM EDBD、100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 48 h 処理し、トリパンプルー染色により細胞生存率を算出した (n=3)。

## 第 1 章

### 1-3-4. C11-BODIPY 蛍光プローブを用いた EDBD による脂質過酸化の検出

EDBD は、HL60 細胞に対して 3 時間処理から脂質過酸化を誘導する [56, 62]。さらに、EDBD の細胞死を阻害する Fer-1 と IM-54 は、EDBD 処理による脂質過酸化も抑制する [62]。そこで、EDBD による脂質過酸化の濃度依存性を、脂質過酸化センサー C11-BODIPY 蛍光染色で検出することとした [73]。

C11-BODIPY は脂溶性の蛍光プローブで、染色すると細胞の脂質構造に入り込み赤色の蛍光 (Ex/Em=561/575-615 nm) で検出される (図 1-10: C11-BODIPY reduced)。細胞で脂質過酸化が誘導されると、C11-BODIPY も過酸化され緑色の蛍光 (Ex/Em=488/500-550 nm) として検出される (図 1-10A: C11-BODIPY oxidized)。共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、2.5  $\mu\text{M}$  以上の EDBD 処理により酸化型 C11-BODIPY の蛍光が観察され、濃度依存的に増加した。一方で、イメージサイトメトリーで酸化型 C11-BODIPY で蛍光している細胞を計算した結果、5  $\mu\text{M}$  以上の EDBD 処理で有意に脂質過酸化が誘導されていることが確認できた (図 1-10B)。

このことから、EDBD は時間依存的 [62]かつ濃度依存的に脂質過酸化を誘導することが明らかになった。

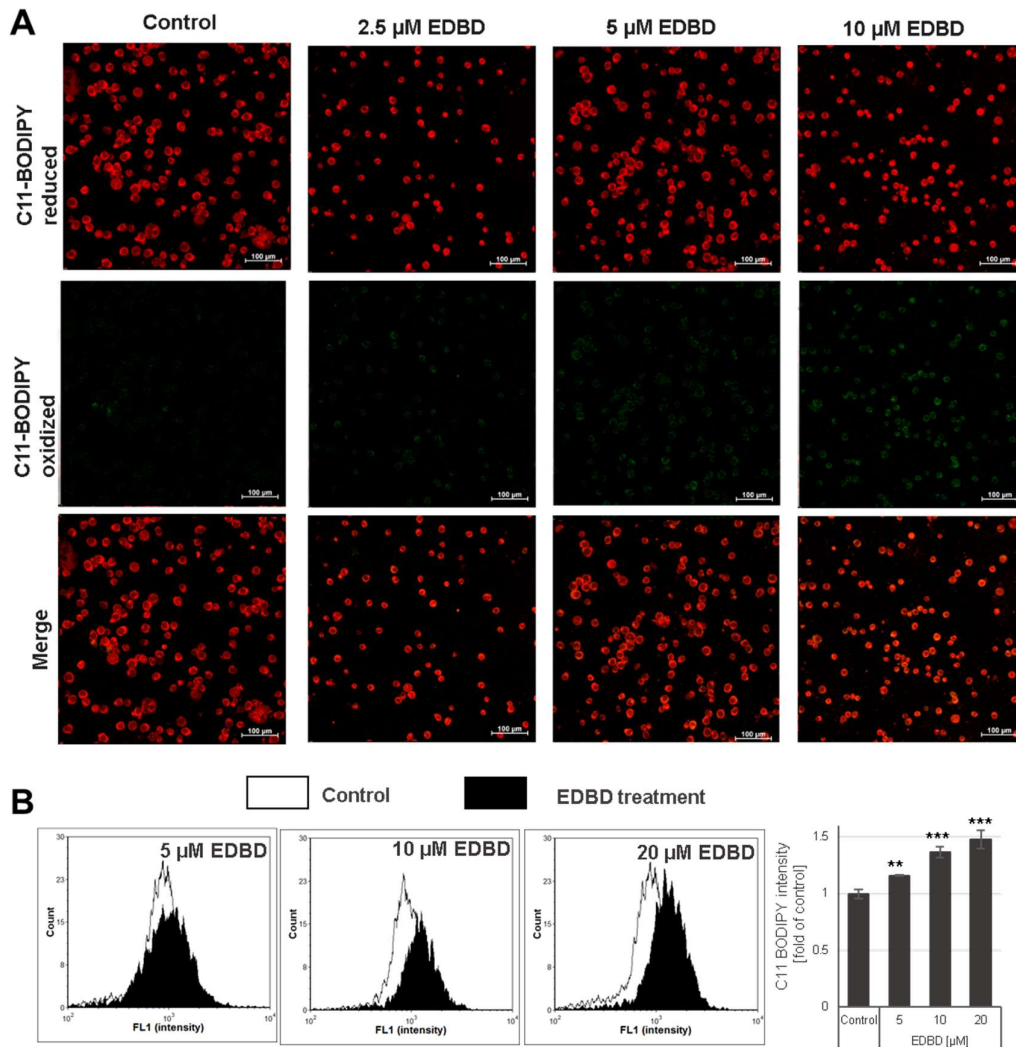


図 1-10. EDBD の濃度依存的な脂質過酸化の観察

C11-BODIPY で染色された HL60 細胞を示した濃度の EDBD で 3 h 処理し、共焦点レーザー顕微鏡 (C11-BODIPY reduced: Ex/Em=561/575-615 nm; C11-BODIPY oxidized: Ex/Em=488/500-550 nm; Merge: 重ね合わせ) (A) とイメージサイトメトリー (Ex/Em=470/535 nm) (B) で観察及び数値化した。 (\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 、vs コントロール、 $n=3$ )

## 第 1 章

### 1-3-5. EDBD による脂質過酸化に対する鉄イオンの影響

ここまでの結果から、EDBD による細胞死は脂質過酸化に依存していると考えられた。一方、EDBD の活性には鉄イオンを介した開裂反応が深く関わっているが、実際に、脂質過酸化誘導作用への関与は明らかになっていない。そこで、鉄イオンキレート剤 DFOM 及び鉄イオン( $\text{FeSO}_4$  直接添加)を EDBD と併用し、C11-BODIPY 蛍光プローブによる脂質過酸化の検出を行った [73]。

その結果、EDBD によって誘導される脂質過酸化は DFOM によって有意に抑制され、鉄イオンによって有意に促進された(図 1-11)。このことから、EDBD は鉄イオン依存的に脂質過酸化を誘導することが明らかになり、EDBD による細胞死の主な原因が脂質過酸化であることが裏付けられた。さらに、EDBD の細胞死を抑制する Fer-1、VE、並びに IM-54 も、EDBD による脂質過酸化を有意に抑制した(図 1-12)。

# 第1章

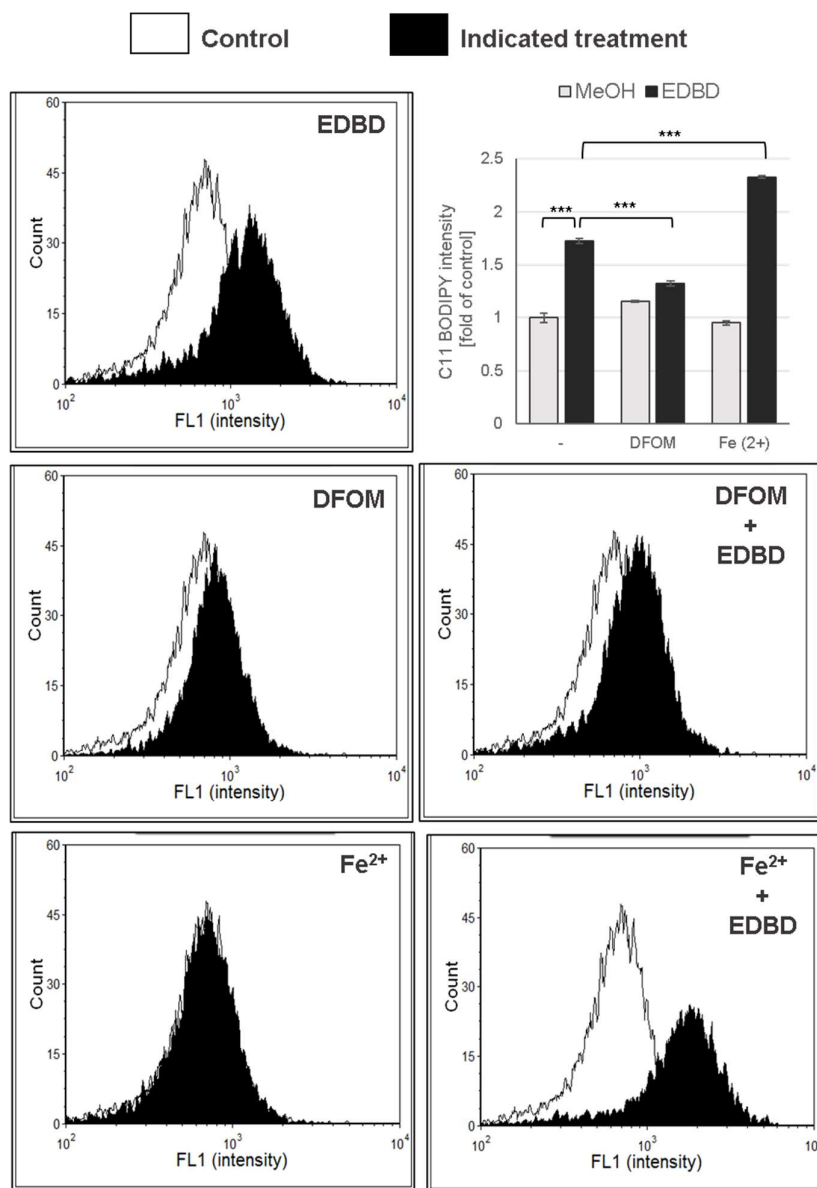


図 1-11. 鉄イオンのEDBDによる脂質過酸化への影響

C11-BODIPY で染色された HL60 細胞を 10  $\mu$ M DFOM で 1 h、20  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> で 3 h 前処理し、10  $\mu$ M EDBD で 3 h 処理し、酸化された C11-BODIPY の蛍光 (Ex/Em=470/535 nm) をイメージサイトメトリーで検出した (\*\*\*)  $P < 0.001$ 、vs 10  $\mu$ M EDBD 処理細胞、n=3)



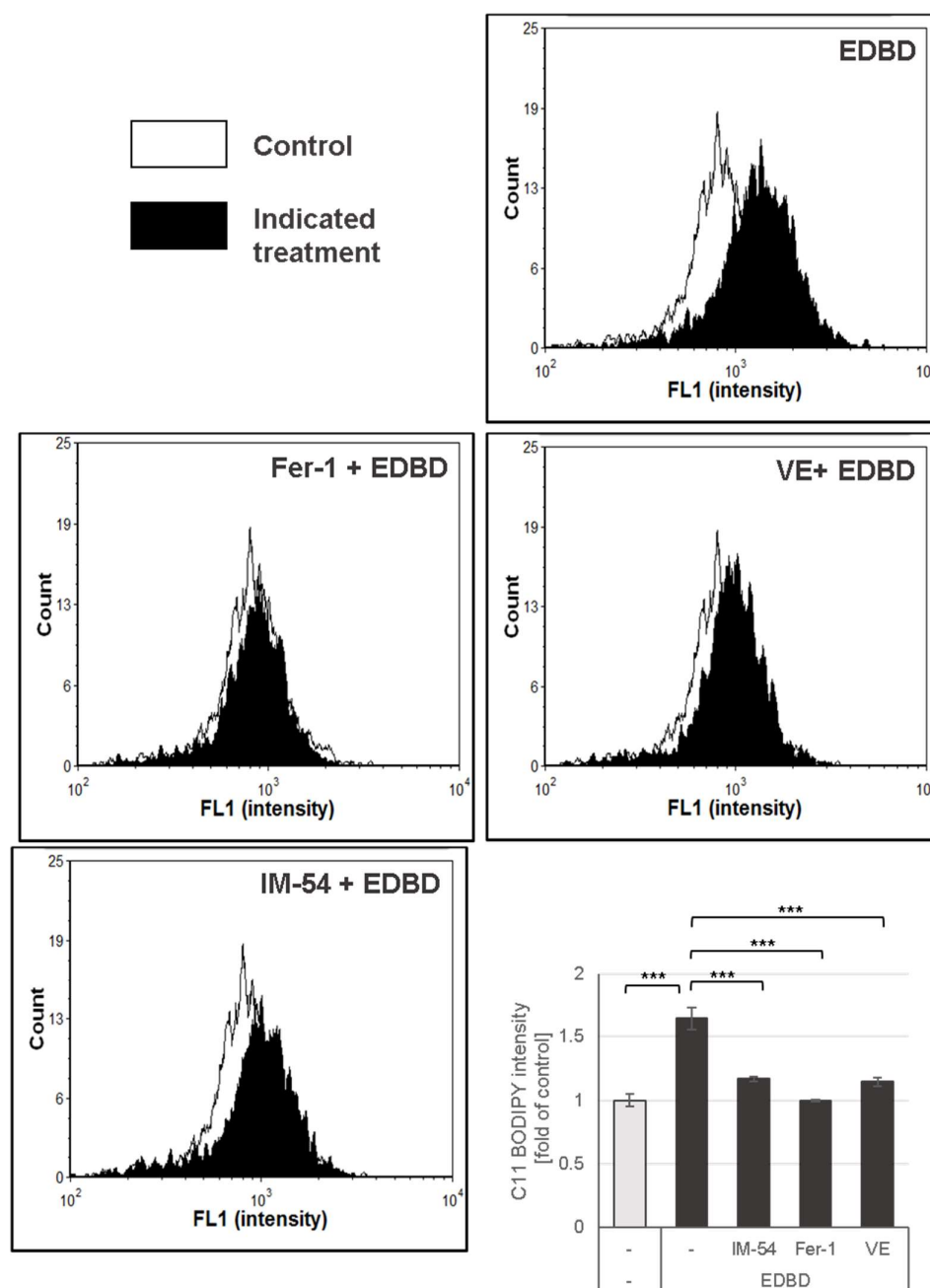


図 1-12. 細胞死阻害剤のEDBDによる脂質過酸化への影響

C11-BODIPY で染色された HL60 細胞を 10  $\mu$ M Fer-1、VE、又は IM-54 で 1 h 前処理し、10  $\mu$ M EDBD で 3 h 処理し、酸化された C11-BODIPY の蛍光 (Ex/Em=470/535 nm) をイメージサイトメトリーで検出した (\*\*\*) $P$ <0.001、vs 10  $\mu$ M EDBD 処理細胞、 $n$ =3)

## 第 1 章

### 1-3-6. EDBD の脂質過酸化に関連するシグナル伝達への影響

脂質過酸化が EDBD による細胞死の原因であることが明らかになったため、次に、細胞の脂質過酸化に関わるシグナル伝達系に対する EDBD の影響を調べることにした。具体的には、脂質過酸化から細胞を守る GPX4 と GCH1、及び脂質過酸化を促進する ACSL4 のタンパク質発現が、EDBD 処理によってどのように変動するかを時間依存的(図 1-13A)及び濃度依存的(図 1-13B)に検出した。

その結果、EDBD は GPX4 の発現を有意に低下させることが明らかとなった。一方、GCH1 と ACSL4 の発現の変動には有意差はみられなかった。このことから、EDBD は直接的に脂質過酸化を誘導するだけでなく、GPX4 の発現を低下させていることが明らかになった。

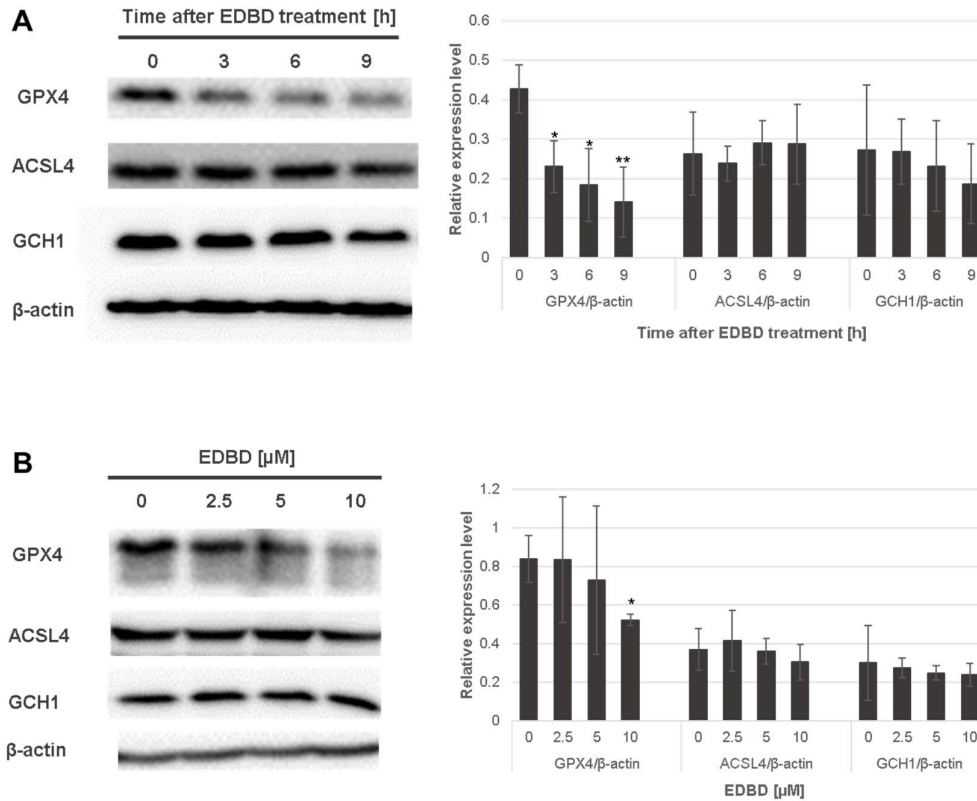


図 1-13. 細胞の脂質過酸化に関連するシグナルに対するEDBDの影響

(A) 時間依存性:HL60 細胞を 10 μM EDBD で示した時間で処理した。

(B) 濃度依存性:HL60 細胞を示した濃度の EDBD で 6 時間処理した。

処理した細胞から全タンパク質を抽出し、western blotting で各タンパク質の発現をみた。(\* $P < 0.05$ 、

\*\* $P < 0.01$ 、vs 0 h 処理又はコントロール、n=3)

## 第 1 章

### 1-3-7. 細胞内 GSH に対する EDBD の影響

GPX4 の活性は、GSH に依存している。そのため、細胞内の GSH 量が減少すると、GPX4 の活性が低下する。従って、細胞内の GSH 量が EDBD の処理でどのように変動するのか、濃度依存的及び時間依存的に定量した(図 1-14)。

その結果、EDBD は濃度依存的かつ時間依存的に GSH を低下させていることが明らかになった。10  $\mu\text{M}$  の EDBD 処理は 6 h 処理から有意に細胞内 GSH 量を低下させた。しかしながら、10  $\mu\text{M}$  の EDBD の 5 h 処理は細胞死が観察され始める時間でもあるため、GSH の低下は細胞死に伴って起こっていると考えられる。

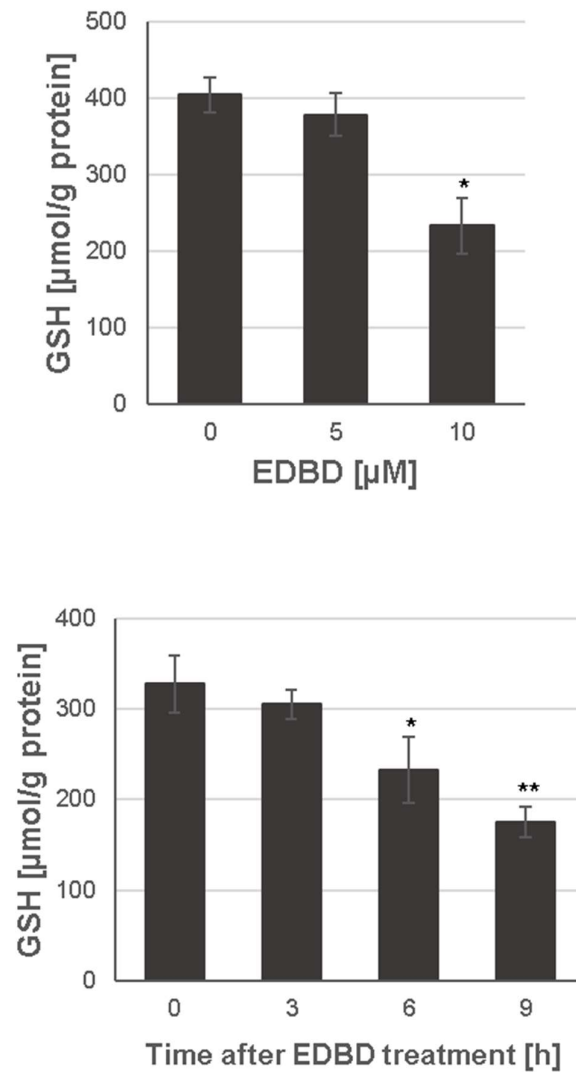


図 1-14. EDBD の処理の細胞内 GSH 量への影響

(上)濃度依存性:HL60 細胞を示した濃度のEDBDで 6 時間処理した。

(下)時間依存性:HL60 細胞を 10 μM EDBDで示した時間で処理した。

処理した細胞の GSH 量を定量し、全タンパク質量で補正した。(\* $P<0.05$ 、\*\* $P<0.01$ 、vs コントロール又は 0 h 処理、n=3)

### 1-4. 考察

EDBD による細胞死の光学顕微鏡で観察される形態は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  と  $\text{CuOOH}$  によって誘導されるネクローシスと類似し、Cpt や DHA によって誘導されるアポトーシスとは異なっていた(図 1-8) [36, 70]。見た目が類似するネクローシスでも、誘導メカニズムが異なる様々な細胞死の種類が存在することから、EDBD による細胞死を同定するために各種の細胞死阻害剤と併用し検証した。カスパーゼ阻害剤の z-VAD-fmk、ネクロトーシス阻害剤の Nec-1、酸化ストレス誘導性ネクローシス阻害剤の IM-54、フェロトーシス阻害剤の Fer-1、脂溶性抗酸化剤の VE、水溶性抗酸化剤の VC、並びに ROS 阻害剤の NAC を EDBD と併用した結果、これらのうち IM-54、Fer-1、VE が EDBD による細胞死を抑制した(図 1-7 と 1-9)。

Fer-1 は脂質の過酸化を阻害するが、ROS 産生やリソソーム膜透過性によって誘導される細胞死は阻害しない [74]。また、脂溶性抗酸化剤の VE は脂質過酸化を阻害し、フェロトーシスを抑制することが知られている [75]。一方で、IM-54 は  $\text{H}_2\text{O}_2$  によって誘導されるネクローシスを阻害することが知られている [70]。EDBD は、IM-54 で細胞死が抑制される点で  $\text{H}_2\text{O}_2$  に類似するが、脂質過酸化阻害剤で  $\text{H}_2\text{O}_2$  による細胞死が抑制されないことと、EDBD による細胞死は NAC で抑制されないことで、 $\text{H}_2\text{O}_2$  による細胞死とは異なっていた(図 1-7 と 1-9)。IM-54 のフェロトーシスとの関わりについては報告がないが、IM-54 は EDBD による細胞死を脂質過酸化の抑制を介して阻害した。

EDBD による細胞死は脂質過酸化阻害剤により抑制されること(図 1-9)、それら阻害剤は EDBD による脂質過酸化を抑制すること(図 1-11 と 1-12)、さらに 5 時間処理から観察される EDBD の細胞死(図 1-8)より脂質過酸化が 3 時間処理という早い時間で有意に観察される(図 1-10)ことなどの結果から、EDBD による細胞死は脂質過酸化によって誘導されていると結論付けた。

## 第 1 章

抗マalaria薬であり、抗がん剤候補の DHA も EDBD と同様にエンドパーオキシド部分が活性部位として知られている。また、DHA は HL60 細胞において、低濃度(72 時間処理の IC<sub>50</sub> 値は 0.11  $\mu$ M)ではアポトーシスを誘導するが、高濃度(12 時間処理の IC<sub>50</sub> 値は 6.82  $\mu$ M)ではオートファジーを介してフェリチンを分解することでフェロトーシスを誘導することが報告されている [36, 37]。フェリチンは、鉄イオンを貯蔵するタンパク質で、鉄イオンはフェリチンに含まれているときはフェントン反応を誘導しないことが知られている。従って、フェリチンがオートファジーによって分解されると、フェントン反応に入る鉄イオンが増えるためフェロトーシスが誘導される。このように、DHA も EDBD もエンドパーオキシド結合が活性部位であり、フェロトーシスを誘導するという共通点がある。しかしながら、2D-DIGE プロテオミクス解析で、EDBD とアルテミシニン類は類似性が非常に低いこと、JFCR39 パネルスクリーニングで EDBD と DHA に対し異なるがん細胞株が感受性を示すことから、EDBD と DHA は異なる作用メカニズムによって細胞死を誘導することが強く示唆された。

一方で、2D-DIGE プロテオーム解析で、EDBD は DHODH 阻害剤 A771726 および FSP1 阻害剤 iFSP1 など、フェロトーシス誘導剤と作用が類似していることが示された。また、EDBD は小胞体やミトコンドリアなど脂質膜構造の豊富な細胞小器官に関わるタンパク質の発現量を増加させたことから、小胞体やミトコンドリアにおいても脂質過酸化を誘導している可能性が示唆された。

細胞を脂質過酸化から保護するタンパク質 GPX4 と GCH1、またフェロトーシスプロモーターである ACSL4 のタンパク質発現に、EDBD がどのような影響を及ぼすかを検証した。尚、FSP1 は HL60 で通常発現していないため、DHODH の阻害は GPX4 低発現細胞株にのみフェロトーシスを誘導することから、EDBD による細胞死と関連性が低いと考えられた。その結果、EDBD は GPX4 のタンパク質発現を減少させた(図 1-13)。一方で、GCH1 と ACSL4 のタンパク質発現レベルには影響を及ぼさなかった。

## 第1章

また、GPX4の活性化に必要な細胞内GSHのレベルも低下させた(図1-14)。GPX4のタンパク質発現の減少や細胞内GSHの低下は、脂質過酸化の誘導と比較して遅い時間から観測されていることから、脂質過酸化の原因ではなく、細胞がダメージを受けることにより後発的に起こった現象である可能性もある。

EDBDによる細胞死を抑制しなかったNACは、細胞内GSHを増加させることで脂質過酸化を軽減することで知られている(図1-9)。本来なら、EDBDによる脂質過酸化を抑制し細胞死を阻害すると予測されたNACがそのような作用を示さなかったのは、NACで上昇するGSHを使って脂質過酸化を抑えるはずだったGPX4のタンパク質発現が、減少しているためであると考えられる。

今回の研究では、EDBDは二価の鉄イオンによってエンドパーオキシド結合が開裂し、そこで生じるラジカル体が細胞のリン脂質膜構造において脂質過酸化を誘発する。その上、脂質過酸化を抑制するGPX4のタンパク質発現を減少、細胞内GSHを低下させるなどにより、細胞における脂質過酸化の耐性を弱めることが明らかとなった。そして、EDBDの作用において、脂質過酸化が細胞死誘導の主たる原因であることが明らかになった。まとめると、山菜由来の天然有機化合物であるEDBDはユニークな作用をもつフェロトーシス様細胞死誘導剤である(図1-15)。



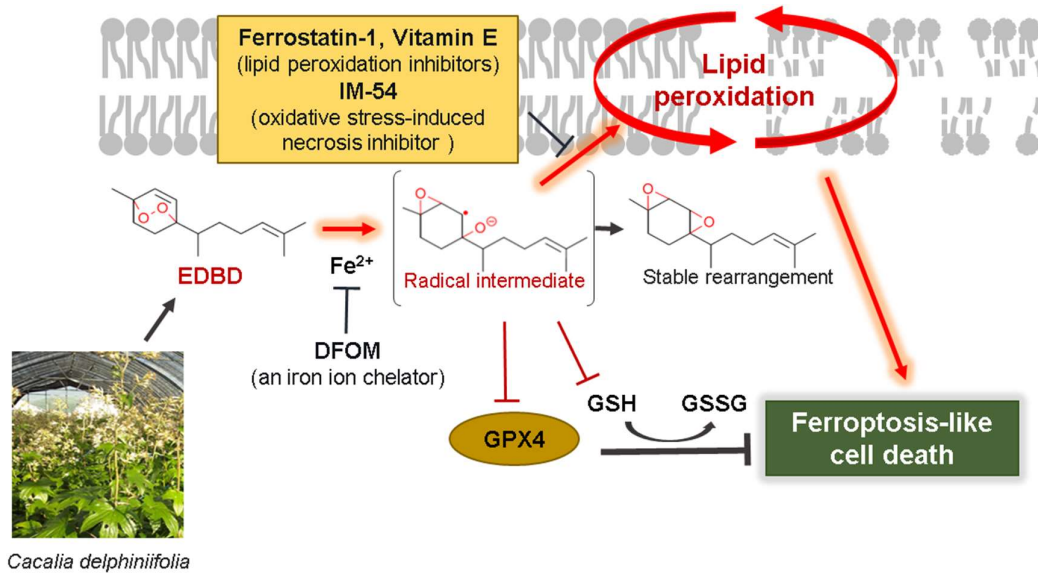


図 1-15. 山菜のモミジガサ由来の天然化合物である EDBD の HL60 細胞に対する  
フェロトーシス様細胞死を誘導する作用機序

## 第2章

### 3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene とスルファサラジンの 乳がん細胞に対する相乗効果とその作用機序

### 2-1. 緒言

#### 2-1-1. 乳がんの現状

乳がんは、女性で最も多く診断されるがんであり(2018年の新規症例数は210万人)、世界中の女性のがんによる死亡の主な原因である(2018年の死亡者数は62万7,000人) [1]。多くの国で発生率の上昇が観察されている。ヒトの乳がんは最も一般的な浸潤がんであり、日本では女性の死亡原因として4番目(2022年の死亡率25.4%)に多い(図2-1) [2]。年齢、太りすぎ、初潮の早さ、閉経の遅さ、高齢での初妊娠、エストロゲンやプロゲステロンなどの閉経後ホルモンの使用、並びにBRCA1またはBRCA2乳房遺伝子の遺伝的変異の存在は、乳がんの主な危険因子とされている。乳がん細胞の増殖は、細胞増殖を誘導およびアポトーシス抑制を促すエストロゲン受容体(ER)への結合を介して、エストロゲンによって調節されることが知られている [76]。

乳がんの分類は、その形態学的基準(例:乳管、小葉、浸潤性および原発性)、エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)、およびヒト上皮増殖因子受容体2(Her2)の発現、または、包括的なmRNA類似性(例:管腔および基底)に基づく分子表現型の特徴で分けられる。乳がんの約4分の1は「トリプルネガティブ(TNBC)」[ER/PR/Her2の欠如]であり、20%はHer2+乳がんが占めている [77]。乳がんの治療法としては、ホルモン療法、化学療法、並びに分子標的療法が推奨される。しかしながら、乳がんの化学療法への耐性とTNBCを標的とした治療法の欠如により、患者の予後は厳しい。そのため、現在でも効果的な治療薬が求められている。

シスチン枯渇はTNBCに対して細胞死を誘導することから、シスチンはTNBCにおいて最も重要なアミノ酸の1つといえる [78]。シスチンの取り込みに関わるシステム $x_c^-$ は、TNBCの治療ターゲットの一つでもある [79]。一方で、MUC1-C膜貫通タンパク質はTNBCで高度に発現されており、システム $x_c^-$ のxCT軽鎖に似ている。MUC1-Cは、xCTおよびxCTとCD44バリエント(CD44v)の複合体と相互作用し、システム $x_c^-$ の機能を安定化させる。MUC1-C/xCTシグナル伝達経路の活性化を阻害すると、

## 第 2 章

TNBC 細胞のフェロトーシスが誘導され、それによってがん細胞が死滅するか、がん細胞の自己複製能力が低下する [80]。このことから、フェロトーシスは乳がん細胞の治療ターゲットとして有望であると考えられる。

がんに対するフェロトーシス誘導療法は画期的な発見であった。Her2 過剰発現乳がんの治療に使われる分子標的治療薬ラパチニブ (lapatinib) に対する耐性を有するがん細胞は、フェロトーシスに対して感受性を示すことが報告されている [81, 82]。さらに、ラパチニブ及び同じく Her2 過剰発現乳がんの分子標的治療薬のネラチニブ (neratinib) は、ROS レベルを上昇させることによって乳がん細胞のフェロトーシスを誘導する。TNBC がフェロトーシスに対して感受性を示すという発見により、TNBC 治療においてフェロトーシスが有用である可能性が拓かれた [83, 84]。スルファサラジン (SSZ)、シラメシン (siramesine)、エラスチン (erastin)、クルクミン (curcumin) などのフェロトーシス誘導剤は、乳がんに対し効果を示す [82]。たとえば、SSZ は システム  $x_c^-$  を阻害してフェロトーシスを強化することができる。

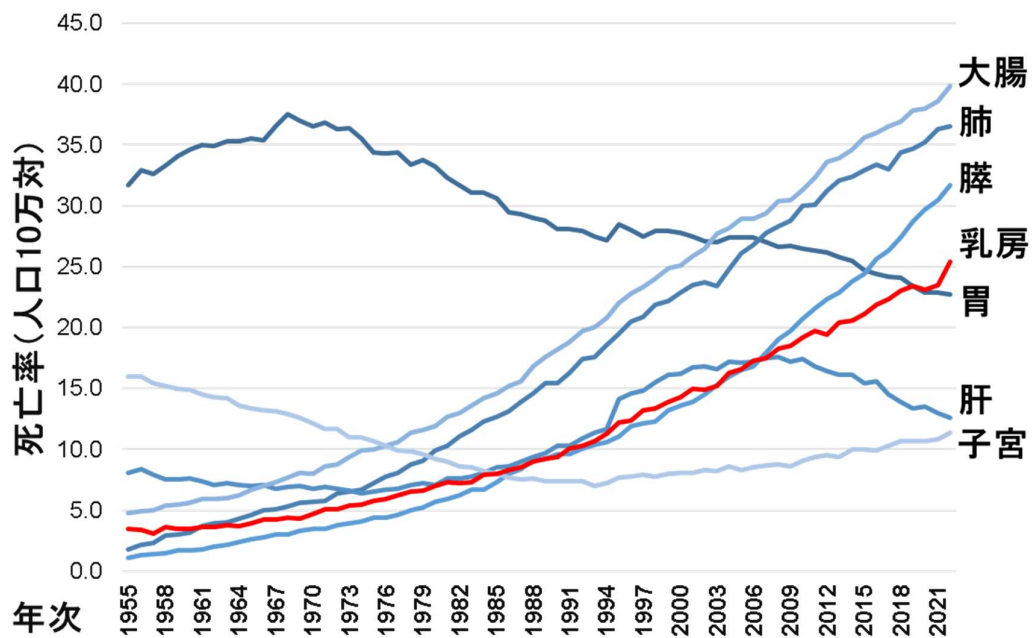


図 2-1. 悪性新生物<腫瘍>の主な部位別にみた死亡率(人口 10 万対)の年次推移

## 2-1-2. スルファサラジン(SSZ)について

スルファサラジン (SSZ) (図 2-2)は、転写因子 NF- $\kappa$ B の阻害を介して関節リウマチなどの慢性炎症性疾患を治療するために広く使用されている抗炎症剤である [85]。後に、SSZ はシステム  $x_c$ も阻害することが明らかになった。その後、2012 年にフェロトーシスがシステム  $x_c$ を介する細胞死として報告された際、SSZ もフェロトーシス誘導剤として挙げられた [16]。さらに、SSZ はフェロトーシス誘導剤として乳がんや膵臓がんなどに対して抗がん作用を示すことが報告されている [77, 86]。

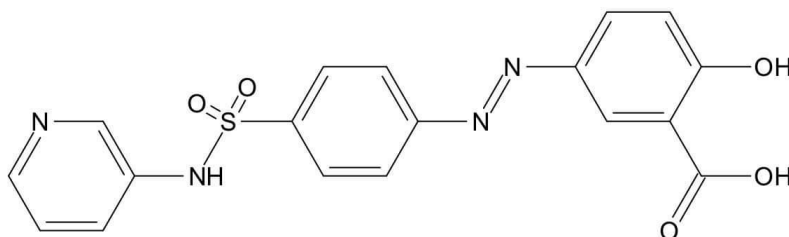


図 2-2. スルファサラジン(SSZ)の構造

フェロトーシスの分子メカニズムが解明されてきた現在では、異なる分子をターゲットにするフェロトーシス誘導剤は相乗効果を示すことが分かってきた。SSZ は、HT-1080 異種移植片において DHODH 阻害剤 brequinar [49]、膵臓がん細胞において抗酸化酵素グルタチオン S-トランスフェラーゼ Pi 阻害剤 piperlongumine [86]、卵巣がん細胞において PARP 阻害剤オラパリブ [87]など、SSZ とは異なる標的を有する他の細胞死誘導剤との相乗効果が報告されている。

SSZ は、乳がん細胞においてシステム  $x_c$ の阻害に加えて、鉄代謝の活性化を通してフェロトーシスを誘導することが報告されている。また、Her2(+)乳がん、ER(-)乳がん、および TNBC に対して、他の乳がんと比較的して SSZ に対し高い感受性を有する可能性が示されている。さらに、ER の発現は鉄イオンの細胞内流入に関わるトランスフェ

## 第2章

リン受容体(TFRC)の発現を抑制することが報告されており、その阻害効果は分子型が異なる乳がん細胞がSSZによるフェロトーシスに対して、異なる感受性を有する原因である可能性が提示された [77]。

今回の研究では、乳がん細胞の HBC-5、MCF-7、及び MDA-MB-231 を使用するが、それぞれ表 2-1 に示した特徴を持つ [88]。SSZ の乳がんに対する効果の研究から、[Her2(+), ER(-)]である HBC-5 は SSZ に対し最も高い感受性を示し、反対のパターンである[Her2(-), ER(+)]の MCF-7 は感受性が弱いことが示唆される。

表 2-1. 各種乳がん細胞の特徴

	MCF-7	HBC-9	HBC-5	BT-474	MDA-MB-231
Her2	-	-	+++	+++	-
ER	+	-	-	+	-
PgR	+	-	-	+	-
EGFR	-	+++	+++	-	+++
Doubling time [h]	42	60	60	51	28

Her2: human epidermal growth factor receptor 2、ER: estrogen receptor、PgR: progesterone receptor、EGFR: epidermal growth factor receptor.



## 第 2 章

### 2-1-3. EDBD と乳がん

EDBD の作用機序について情報を得ることを目的として実施した JFCR39 パネルスクリーニングの結果、5 種の乳がん細胞のうち HBC-5 が、EDBD に対して最も高い感受性を示した(図 2-3) [57]。しかしながら、乳がん細胞に対する EDBD による作用メカニズムの研究はされていない。

EDBD は、HL60 細胞において主にフェロトーシス様細胞死を誘導することを第 1 章で述べた。一方で、SSZ は乳がん細胞においてフェロトーシス誘導剤の効果を増強することが知られている。乳がんは現在でも治療が難しい疾患であることから、本章では乳がん治療の新しい選択肢を広げるために、乳がん細胞における EDBD と SSZ の併用効果に焦点をあてた。乳がん細胞における SSZ の効果はすでに Yu 等のグループによって明らかにされているため [77]、本研究では乳がん細胞株における EDBD の作用機序と、SSZ と EDBD を併用した際の作用を解析した。

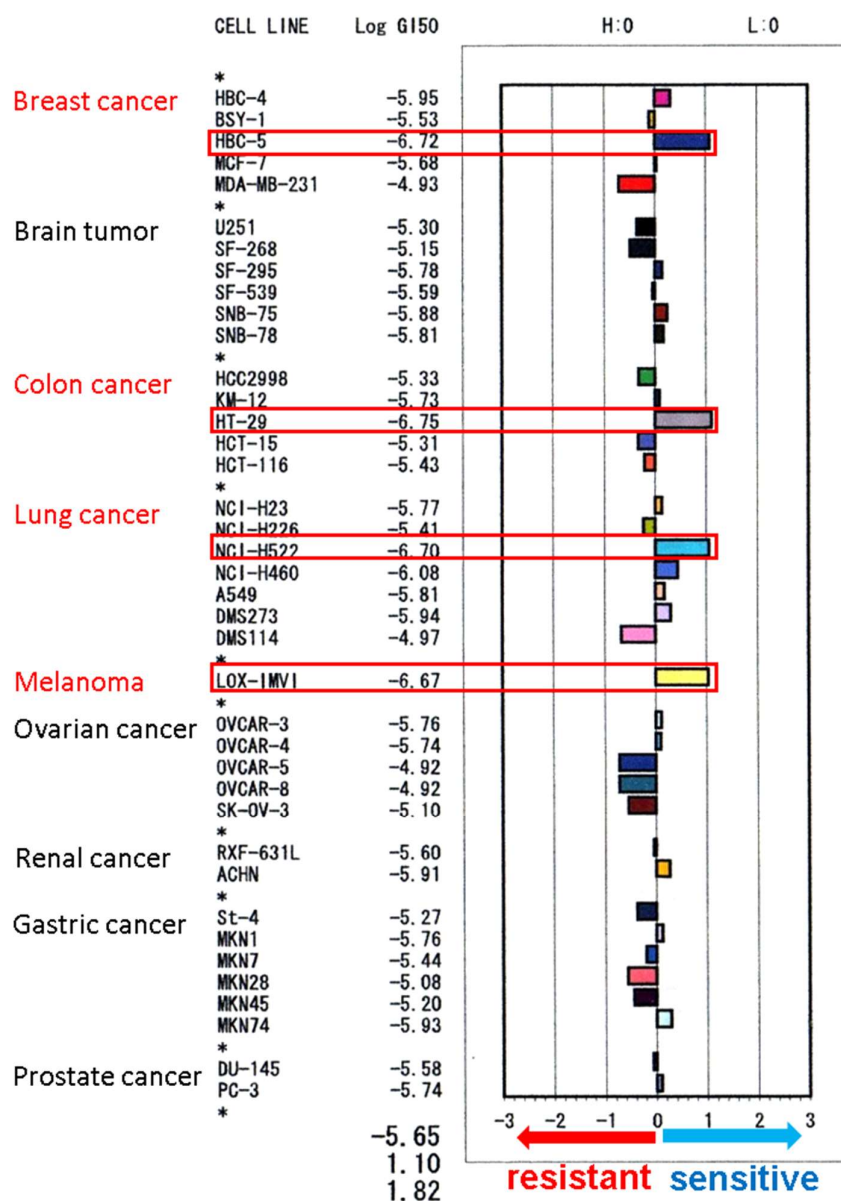


図 2-3. 39 種のがん細胞を用いた JFCR39 パネルスクリーニングにおける EDBD の効果

## 第 2 章

### 2-2. 実験方法

#### 2-2-1. 細胞培養

ヒト乳がん細胞:HBC-5 細胞は国立がん研究センター研究所(東京)から、MCF-7(RCB1904) 細胞は理化学研究所バイオリソースセンター(筑波)から、MDA-MB-231 細胞(ATCC® HTB-26TM)は ATCC(米国バージニア州マナッサス)から購入した。細胞は、10%の非働化済 FBS (BioWest Co. Ltd., Vancouver, Canada)、1% Penicillin (50 units/ml)-Streptomycin (50 µg/ml) (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)を添加した RPMI-1640(L-グルタミン、フェノールレッド含有)培地[富士フィルム和光純薬(株)]を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> の加湿インキュベーターで培養した。ヒト線維芽細胞株 WI-38(RCB0702)を理化学研究所バイオリソースセンター(筑波)から入手し、10%の非働化済 FBS (BioWest Co. Ltd., Vancouver, Canada)、1% Penicillin (50 units/ml)-Streptomycin (50 µg/ml) (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)を含む DMEM 培地[富士フィルム和光純薬(株)]を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の加湿インキュベーター内で培養した。

#### 2-2-2. 細胞生存率

細胞生存率は、MTT アッセイによって評価した(1-2-3 参考)。HBC-5、MCF-7、MDA-MB-231、WI-38 細胞を、それぞれ  $1 \times 10^5$  cells/ml、 $5 \times 10^4$  cells/ml、 $2 \times 10^5$  cells/ml、 $5 \times 10^4$  cells/ml を 96 well plate に 98 µl ずつ播き、一晚培養した。MeOH に溶解した指定濃度の EDBD 又は MeOH:DMSO(1:1v/v)に溶解した SSZ で処理し、48 時間培養した。その後、1-2-3 と同じ方法で細胞生存率を算出した。前処理の時は規定濃度の DFOM(滅菌水で希釈)、Fer-1、VE、IM-54(MeOH で希釈)で 1 時間処理し、培地を交換せずに EDBD または SSZ で処理した

## 第 2 章

### 2-2-3. DCFH-DA を用いた ROS 産生の検出

HBC-5、MCF-7、MDA-MB-231 を、それぞれ  $2 \times 10^5$  cells/ml、 $1 \times 10^5$  cells/ml、 $4 \times 10^5$  cells/ml として 96 well white plate に 98  $\mu$ l ずつ播き、一晚培養した。MeOH に溶解した 25、50、100  $\mu$ M EDBD を添加し、すぐに 5  $\mu$ M DCFH-DA を 5  $\mu$ l 入れ、30 分間培養した。その後、cellometer (Ex: 488 nm、Em: 535 nm) で蛍光を観測した。尚、時間依存的な観察は 100  $\mu$ M EDBD で処理し、0、1、3、6 h 培養した後、DCFH-DA で染色した。

### 2-2-4. 脂質過酸化の検出

HBC-5、MCF-7、MDA-MB-231 細胞を、それぞれ  $1 \times 10^5$  cells/ml、 $5 \times 10^4$  cells/ml、 $2 \times 10^5$  cells/ml として multiwell 35mm dish に播いた。一晚培養した後、細胞を 2  $\mu$ M C11-BODIPY581/591 で 30 分間染色し、その後 EDBD で 3 時間処理した。染色された細胞は、共焦点レーザー顕微鏡 (C2、ニコン、東京、日本) を使用して観察した。

### 2-2-5. 薬物相乗効果の解析

SSZ と EDBD の間の相乗効果を評価するために、ソフトウェア CompuSyn (ComboSyn, Inc., New York, NY, USA) を使用した。すべてのシミュレーションは、2 つの薬剤が 3 つの濃度の SSZ および 3 つの濃度の EDBD を、非固定の用量比で組み合わされると仮定して実行した。CompuSyn は、薬理的相互作用の定量的表現である Combination Index (CI) を算出するために使用した。この方法は、Chou-Talalay によって提案された統一理論に基づいている [89]。CI < 1 は相乗効果、CI = 1 は相加効果、並びに CI > 1 は拮抗効果を示す。

### 2-2-6. 統計処理

統計処理は、1-2-8 と同じ方法で行った。

## 第2章

### 2-3. 結果

#### 2-3-1. EDBD の乳がん細胞に対する影響

先行研究で行われた乳がん細胞(HBC-4、BSY-1、HBC-5、MCF-7、MDA-MB-231)を含む JFCR39 パネルスクリーニングでは、HBC-5 細胞は EDBD に対し感受性を示し、MDA-MB-231 は耐性を示した [57]。

実際に HBC-5、MCF-7、及び MDA-MB-231 細胞に対する EDBD による増殖抑制効果の  $IC_{50}$  値は、それぞれ  $8.5 \pm 0.7$ 、 $27.0 \pm 0.9$ 、及び  $76.5 \pm 4.8 \mu\text{M}$  であり(図 2-4)、JFCR39 パネルスクリーニングの結果と一致の感受性パターンであった。

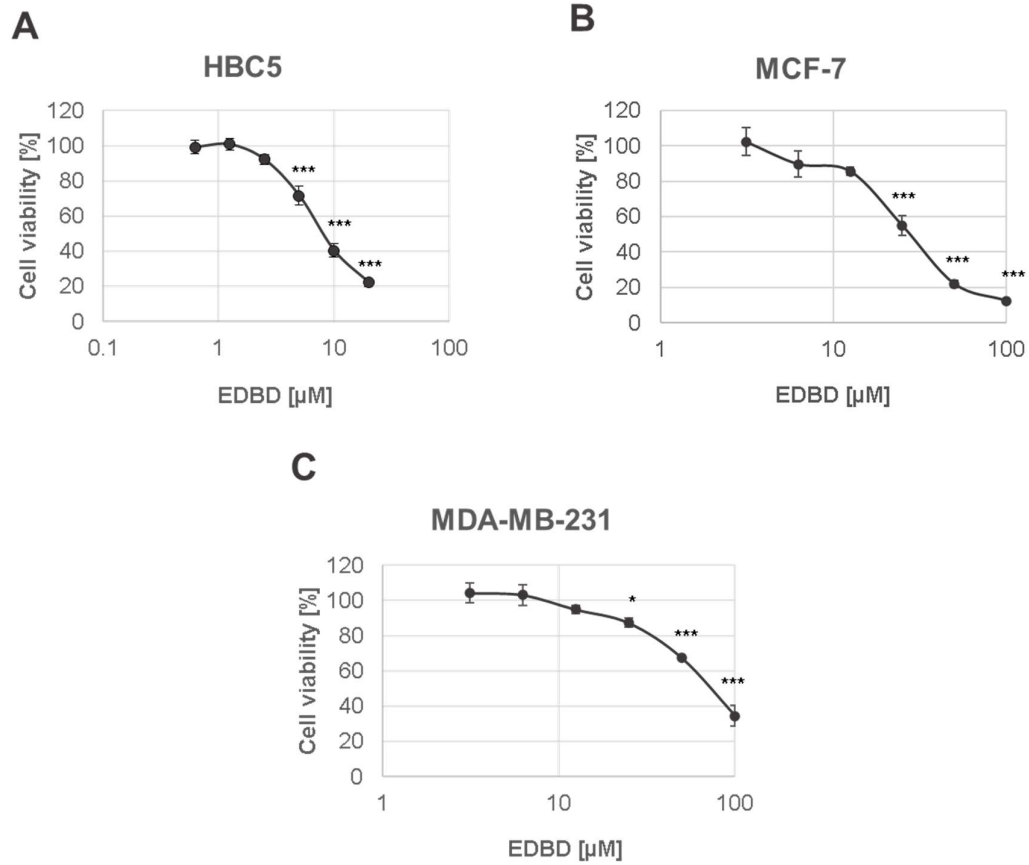


図 2-4. EDBD に乳がん細胞に対する細胞増殖抑制作用

(A)HBC-5 細胞、(B)MCF-7 細胞、(C)MDA-MB-231 細胞を、表示された濃度の EDBD で 48 h 処理し、MTT assay により細胞生存率を測定した (n=3)。\*P<0.05、\*\*\*P<0.001 vs コントロール。

### 2-3-2. 乳がん細胞における EDBD による増殖抑制作用への DFOM の影響

フェロトーシスの鍵因子の一つは鉄イオンである [16]。鉄イオンは、フェントン反応の繰り返し作用を通じて脂質過酸化を直接引き起こす [63]。一方、広く知られているフェロトーシス誘導剤(エラスチンや SSZ など)は、脂質過酸化に対する細胞防御因子の 1 つである GPX4 の機能を間接的にブロックすることにより、鉄イオンの存在下でフェロトーシスを誘導する。

一方で、鉄イオンはエンドパーオキシド結合を切断することが広く知られている。実際に、当研究室の以前の研究により、鉄イオンが EDBD のエンドパーオキシド結合を切断し、不安定なラジカル中間体を生成する可能性が示された。そして、この不安定なラジカル中間体が EDBD の細胞死誘導活性に重要であると報告した [57]。

そこで、EDBD が乳がん細胞でも同様の活性を示すかを明らかにするために、鉄イオンキレート剤である DFOM の時の細胞生存率への影響を調べた。その結果、DFOM は 3 つの乳がん細胞株すべてにおいて EDBD による増殖抑制作用を阻害し、細胞の増殖を回復させた(図 2-5)。このことから、EDBD は乳がん細胞でも鉄イオン依存的な活性を示すことが判明した。

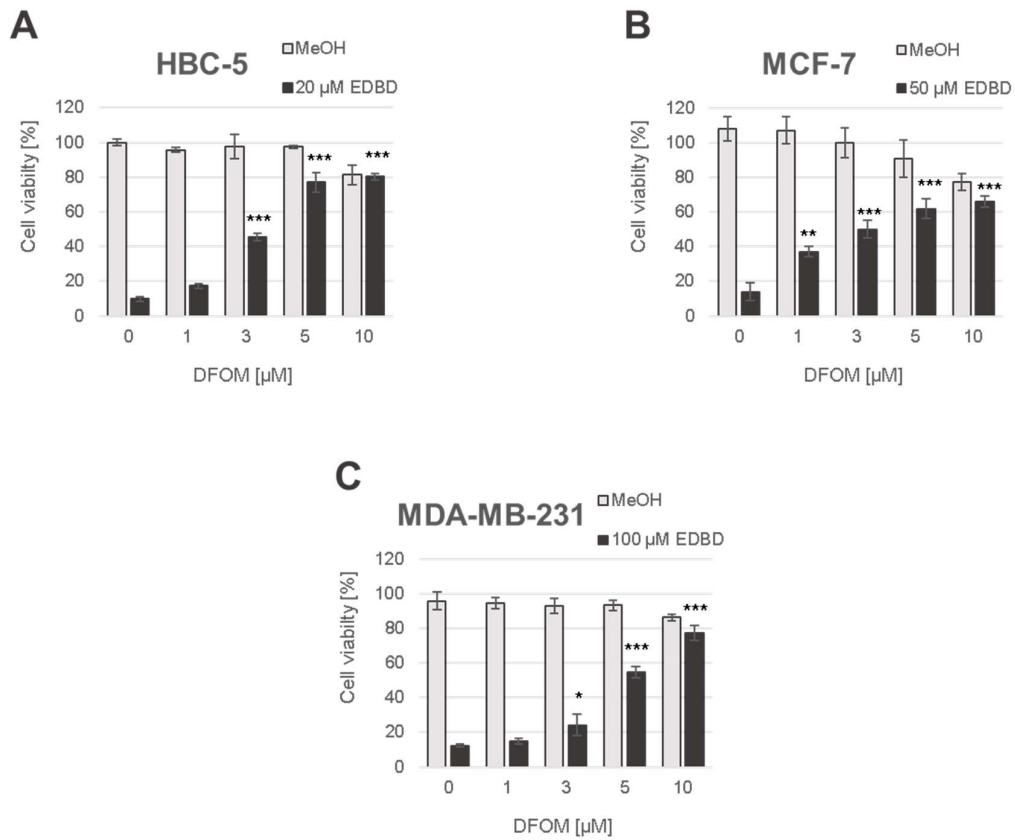


図 2-5. 乳がん細胞における EDBD の細胞死に対する DFOM の影響

(A) HBC-5 細胞、(B) MCF-7 細胞、(C) MDA-MB-231 細胞を表示された濃度の DFOM で 1 h 前処理し、表示された濃度の EDBD で 48 h 処理し、MTT assay により細胞生存率を測定した (n=3)。

\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$  vs EDBD 処理細胞。



### 2-3-3. EDBD 処理乳がん細胞における ROS 検出

EDBD は、鉄イオンによって不安定なラジカル中間体に変化すると考えられる。HL60 細胞において EDBD は、処理後直ぐに微量ながらも ROS 産生することが分かっている。EDBD は鉄イオンに曝されると直ぐに開裂しラジカル体に変換することから、ここで観測される ROS は、EDBD の不安定なラジカル中間体自身であると考えられている。EDBD 処理で見られる ROS は、観測後、時間依存的に低下していくことから、この仮説が裏付けられている。

乳がん細胞でも、EDBD は HL60 の時と同様に処理後直ぐに濃度依存的 (図 2-6) に ROS を産生し、その後、時間依存的 (図 2-7) に低下することが分かった。EDBD による ROS 産生 (100  $\mu$ M 処理において、HBC-5 で 1.7 倍、MCF-7 で 1.3 倍、MDA-MB-231 で 1.8 倍 ROS が増加) は、対象である  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M 処理において、HBC-5 で 2.8 倍、MCF-7 で 13.3 倍、MDA-MB-231 で 14.0 倍 ROS が増加) と比較する変化が小さかった (図 2-8)。

この結果は、EDBD は他の ROS 誘導剤とは異なるメカニズムで ROS 産生していることを示しており、不安定なラジカル中間体の仮説をさらに裏付ける結果となった。

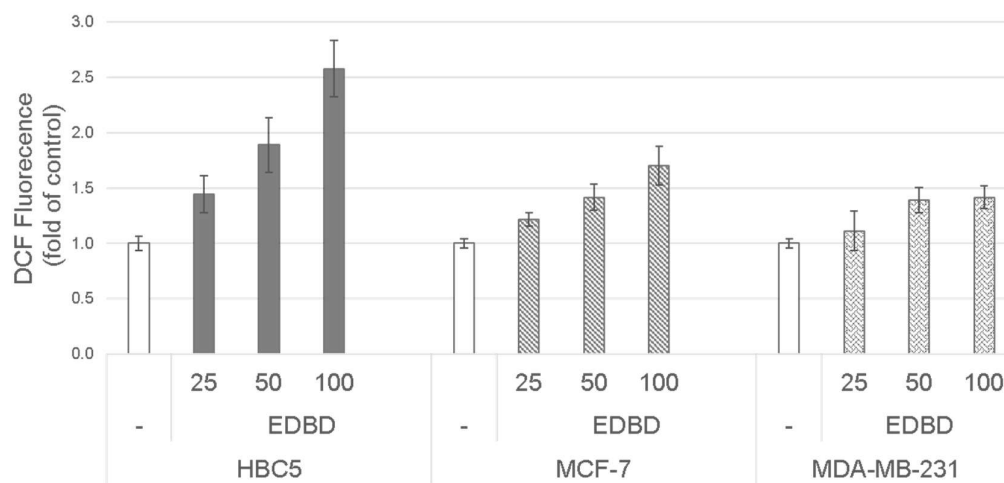


図 2-6. 乳がん細胞における EDBD による濃度依存的な ROS 検出

HBC-5 細胞、MCF-7 細胞、MDA-MB-231 細胞を示した濃度の EDBD 処理し、直ぐに (0 h 処理) DCFH-DA を加えて 30 分間処理し、プレートリーダーで測定した (Ex/Em=488/535 nm)

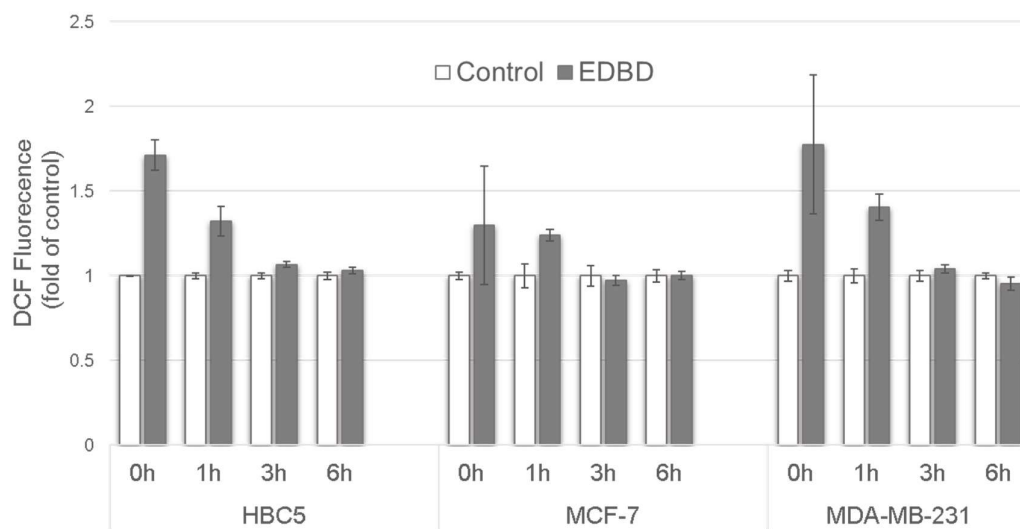


図 2-7. 乳がん細胞における EDBD による時間依存的な ROS 検出

HBC-5 細胞、MCF-7 細胞、MDA-MB-231 細胞を 100  $\mu$ M EDBD で示した時間処理し、DCFH-DA0 を加えて 30 分間処理し、プレートリーダーで測定した Ex/Em=488/535 nm)

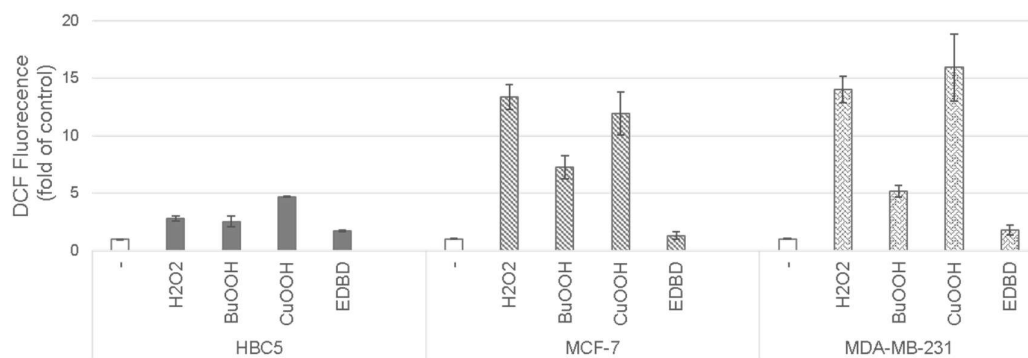


図 2-8. 乳がん細胞における EDBD による ROS 検出の対象との比較

HBC-5 細胞、MCF-7 細胞、MDA-MB-231 細胞を 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、BuOOH (butyl hydroperoxide)、CuOOH (cumene hydroperoxide)、EDBD で処理し、直ぐに DCFH-DA で 30 を加えて 30 分間処理し、プレートリーダーで測定した (Ex/Em=488/535 nm)

## 第 2 章

### 2-3-4. EDBD 処理乳がん細胞における脂質過酸化の検出

EDBD は、HL60 では脂質過酸化による細胞死を誘導する。乳がん細胞でも、脂質過酸化を誘導することが予測される。そこで、3 種の乳がん細胞における脂質過酸化を C11-BODIPY 染色を用いて検出した [73]。

EDBD 処理して 3 時間後に検出した結果では、EDBD は 3 種のがん細胞において濃度依存的に脂質過酸化を誘導した(図 2-9)。その蛍光強度を数値化した結果、統計的にも有意に酸化型 C11-BODIPY の平均蛍光強度を増加させていた(図 2-10)。

しかしながら、図 2-7 に示したように、EDBD の 3 時間処理では DCF の蛍光が検出されないことから、DCF で検出される ROS と C11-BODIPY で検出される脂質過酸化は、同じ酸化ストレスでも異なる分子種であることが明らかである。また、脂質過酸化はフェロトーシスのホールマークであるため、EDBD は乳がん細胞に対してもフェロトーシスを誘導することが、この結果から示唆された。

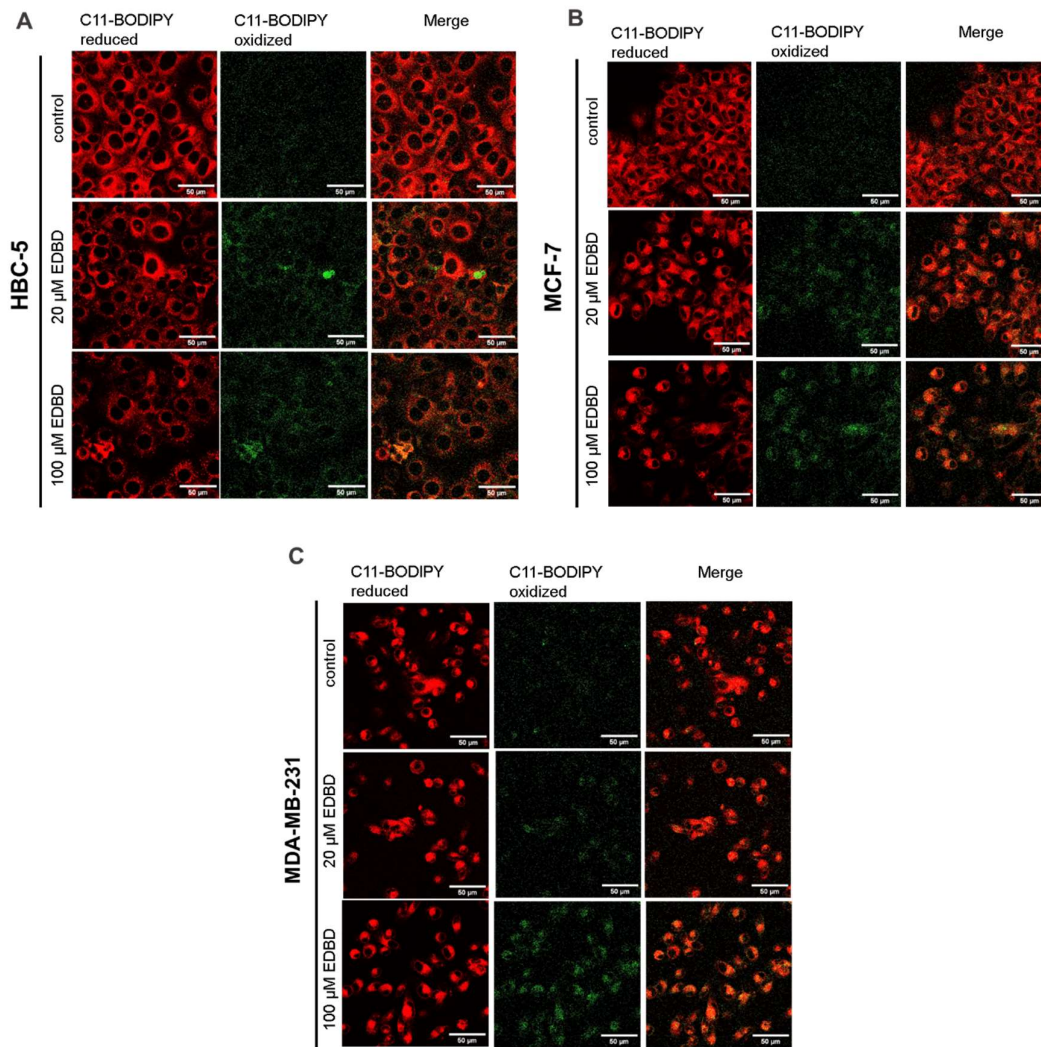


図 2-9. 乳がん細胞における EDBD による脂質過酸化の検出

(A)HBC-5 細胞、(B)MCF-7 細胞、(C)MDA-MB-231 細胞を C11-BODIPY で 30 分染色し、示した濃度の EDBD で 3 h 処理し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した(C11-BODIPY reduced: Ex/Em=561/575-615 nm; C11-BODIPY oxidized: Ex/Em=488/500-550 nm; Merge: 重ね合わせ)

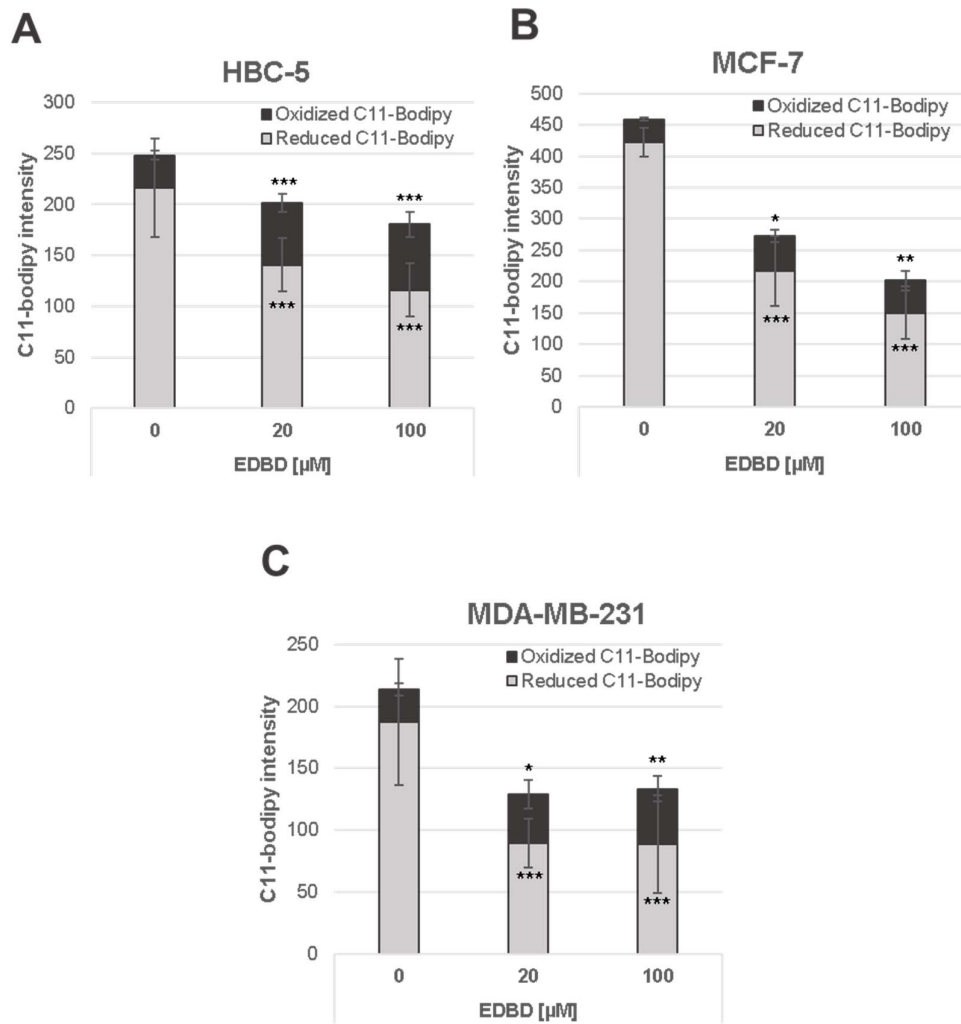


図 2-10. 乳がん細胞における EDBD による脂質過酸化の数値化

図 2-9 で観察した(A)HBC-5 細胞、(B)MCF-7 細胞、(C)MDA-MB-231 細胞の C11-BODIPY の平均蛍光強度を算出し、グラフ化した。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$  vs コントロール。

## 第 2 章

### 2-3-5. 脂質過酸化阻害剤の EDBD 処理乳がん細胞に対する影響

EDBD は、乳がん細胞でも脂質過酸化を誘導すること(図 2-9、図 2-10)、その細胞増殖抑制作用は DFOM によって抑えられること(図 2-5)から、乳がん細胞においてもフェロトーシス様細胞死を誘導することが示唆された。そこで、脂質過酸化は EDBD による細胞死の主たる原因であるかを調べるために、脂質過酸化を阻害する Fer-1 と VE が EDBD による細胞増殖抑制作用を打ち消すのか否かを調べた。

その結果、Fer-1 と VE は、3 種の乳がん細胞株において、EDBD による細胞増殖抑制作用を濃度依存的に打ち消した(図 2-11)。

EDBD は、処理後直ぐに ROS 産生を誘導する、脂質過酸化を誘導する、DFOM、Fer-1、VE で細胞死が抑制されるなど、HL60 細胞と同様の作用を乳がん細胞で示している。このことから、EDBD は乳がん細胞でもフェロトーシス様細胞死を誘導することが明らかとなった。



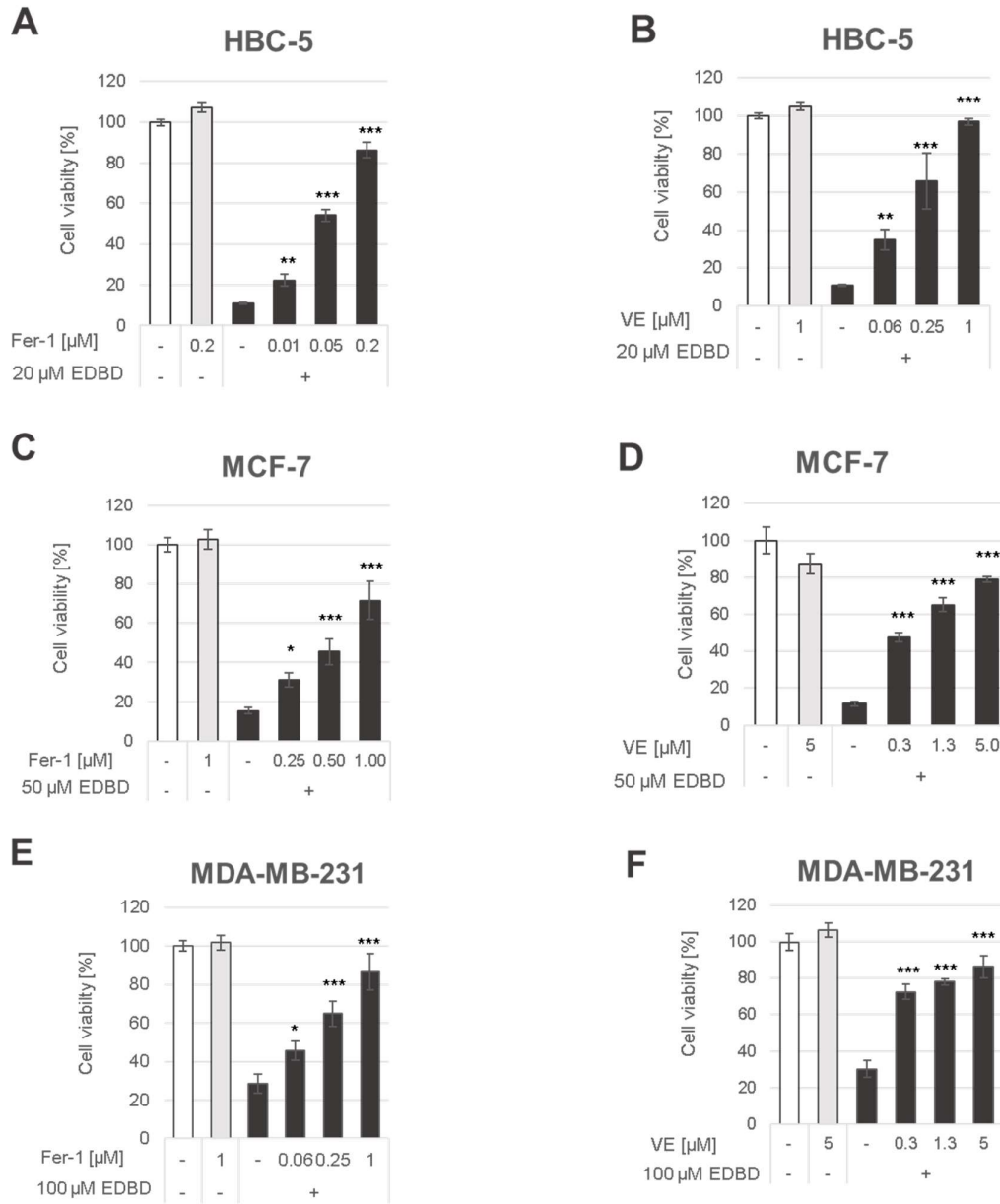


図 2-11. 乳がん細胞における EDBD の細胞死に対する脂質過酸化阻害剤の影響

(A, B)HBC-5 細胞、(C, D)MCF-7 細胞、(E, F)MDA-MB-231 細胞を表示された濃度の Fer-1 と VE で 1 h 前処理し、表示された濃度の EDBD で 48 h 処理し、MTT assay により細胞生存率を測定した (n=3)。\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001 vs EDBD 処理細胞。

### 2-3-6. EDBD と SSZ の併用処理が乳がん細胞に及ぼす影響

SSZ は、がん幹細胞に対しても有効な抗がん剤候補として高く評価されている [90]。前述したように、SSZ は乳がん細胞において、フェロトーシス誘導剤の効果を増加することが報告されている。EDBD はフェロトーシス様細胞死を誘導することから、SSZ との相乗効果が期待されるため、3 種の乳がん細胞すべてに対して SSZ と EDBD の併用を実施した。

その結果、EDBD は 3 種の乳がん細胞に対する SSZ の細胞増殖抑制作用を有意に増強した (図 2-12)。特に、HBC-5 と MDA-MB-231 細胞において高い増強がみられた。実際に、この増強効果は相乗効果であるかを検証するために、Chou-Talalay 法に基づく CompuSyn ソフトウェアを用いた。CompuSyn は、薬物相互作用の定量化に広く使用されていることから、相乗効果の評価に適していると考えられたため、SSZ と EDBD の併用処理の評価に使用した [91, 92]。このソフトウェアは、combination index (CI) を計算し、相乗効果(CI<1)、相加効果(CI=1)、または拮抗効果(CI>1)を示すものである [89]。

その結果、HBC-5 と MDA-MB-231 細胞に対する SSZ と EDBD 併用の CI 値は、9 対の濃度の組み合わせの内 1 対を除いて 1 未満であり、相乗効果であることが明確に示された。一方で、MCF-7 細胞に対しては 5 対の濃度組み合わせが相乗効果を示し、4 対は拮抗効果を示した (表 2-2)。

この結果から、EDBD と SSZ は予想通りに相乗効果を示すことと、MCF-7 細胞に対する相乗効果は、HBC-5 と MDA-MB-231 細胞と比較して弱いことが明らかになった。

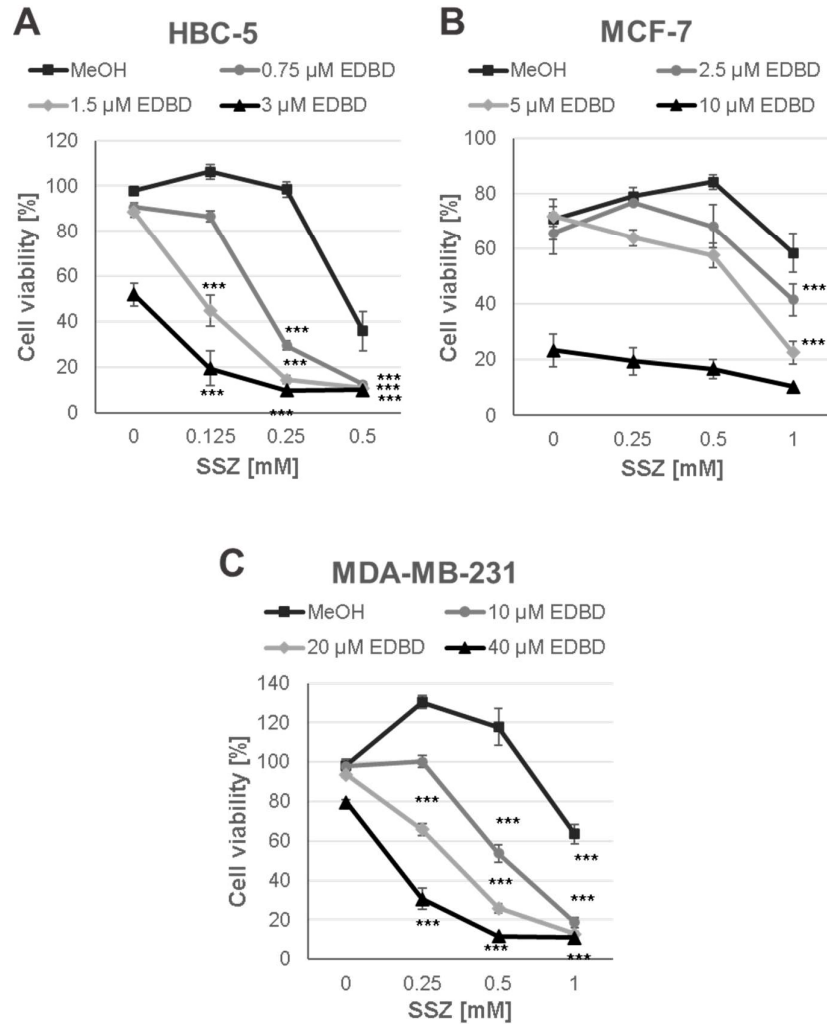


図 2-12. 乳がん細胞における EDBD と SSZ の併用

(A) HBC-5 細胞、(B) MCF-7 細胞、(C) MDA-MB-231 細胞を表示された濃度の SSZ と EDBD で共処理し 48 h 培養後、MTT assay により細胞生存率を測定した (n=3)。\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001 vs 各 EDBD 処理細胞。

表 2-2. 乳がん細胞における EDBD と SSZ の共処理の効果

Cell line	SSZ [mM]	EDBD [ $\mu$ M]	Effect [Fa]	CI Value	Interaction
HBC-5	0.5	3	0.10	0.72	Synergism
	0.25	3	0.10	0.55	Synergism
	0.125	3	0.20	0.49	Synergism
	0.5	1.5	0.11	0.64	Synergism
	0.25	1.5	0.15	0.43	Synergism
	0.125	1.5	0.45	0.57	Synergism
	0.5	0.25	0.12	0.30	Synergism
	0.25	0.25	0.29	0.48	Synergism
	0.125	0.25	0.87	1.029	Antagonism
MCF-7	1	10	0.10	0.49	Synergism
	0.5	10	0.17	0.70	Synergism
	0.25	10	0.20	0.77	Synergism
	1	5	0.23	0.50	Synergism
	0.5	5	0.58	1.34	Antagonism
	0.25	5	0.64	1.40	Antagonism
	1	2.5	0.42	0.63	Synergism
	0.5	2.5	0.68	1.26	Antagonism
	0.25	2.5	0.77	1.41	Antagonism
MDA-MB-231	1	40	0.11	0.46	Synergism
	0.5	40	0.12	0.32	Synergism
	0.25	40	0.31	0.42	Synergism
	1	20	0.13	0.42	Synergism
	0.5	20	0.26	0.35	Synergism
	0.25	20	0.66	0.53	Synergism
	1	10	0.19	0.45	Synergism
	0.5	10	0.54	0.47	Synergism
	0.25	10	0.99	2.24	Antagonism

Fractional effect (Fa)は、細胞生存していないことを 0、全て生存していることを 1 とした時の各処理における細胞生存状態を意味する。

### 2-3-7. EDBD と SSZ の相乗効果に対する DFOM と Fer-1 の影響

SSZ は、乳がん細胞に対してシステム  $x_c$  を阻害及び鉄イオン代謝に干渉することで、細胞を脂質過酸化に対して感受性にする。一方で、EDBD は直接脂質過酸化を誘導すると考えられる。そのため、SSZ と EDBD の相乗効果はフェロトーシスが增強された結果と考えられる。従って、EDBD と SSZ の相乗効果がフェロトーシスか否かを検証するために、DFOM 又は Fer-1 との併用実験を行った。

HBC-5 細胞および MDA-MB-231 細胞において、Fer-1 と DFOM は SSZ と EDBD による相乗効果を抑制した (図 2-13A、B、E、F)。一方で、MCF-7 細胞では Fer-1 のみが相乗効果を完全に阻害したが (図 2-13D)、DFOM はわずかに抑制するのみであった (図 2-13C)。

SSZ は、ER (-) の細胞に強い作用を示すこと [77] から、HBC-5、MDA-MB-231、MCF-7 の順に高感受性から低感受性を示すことが示唆されていた。そのため、DFOM の併用で見られたこの違いは、SSZ の作用に関連するものだと考えられる。

SSZ は、システム  $x_c$  を阻害する他、TFRC の発現 (鉄イオン流入) を上昇させる。EDBD の活性は、鉄イオンで増強されることから、SSZ と相乗効果を示すことは合理的である。一方で、ER (+) 乳がん (MCF-7) は、TFRC の発現が比較的少ない。そのため、MCF-7 では相乗効果が明確に表れない可能性がある。また、Fer-1 は SSZ と EDBD の相乗効果を顕著に抑制した一方で、DFOM の抑制効果はわずかであったことから、MCF-7 細胞に対する SSZ と EDBD の相乗効果は鉄イオンに依存しないことが示唆された。

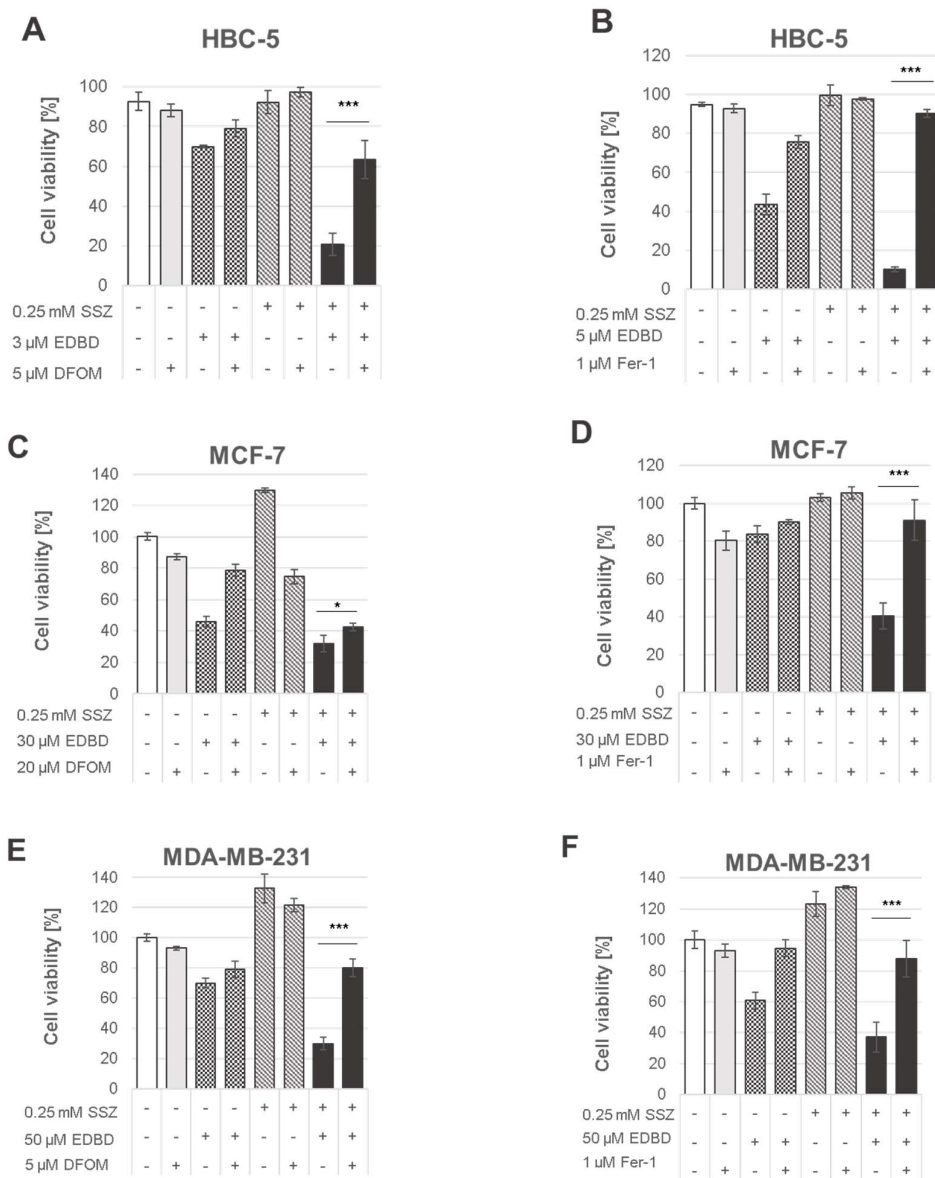


図 2-13. 乳がん細胞における EDBD と SSZ の共処理による細胞死に対する DFOM と Fer-1 の影響

(A, B) HBC-5 細胞、(C, D) MCF-7 細胞、(E, F) MDA-MB-231 細胞を表示された濃度の DFOM と Fer-1 で 1 h 前処理し、表示された濃度の SSZ と EDBD で 48 h 処理した後、MTT assay により細胞生存率を測定した (n=3)。\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001 (指定データ間)。

## 第 2 章

### 2-3-8. EDBD と SSZ の相乗効果に対する IM-54 の影響

第 1 章では、酸化ストレス誘導性ネクロシス阻害剤 IM-54 は EDBD による脂質過酸化を抑制することで、EDBD の細胞増殖抑制作用を阻害することが明らかになった。そのため、IM-54 は SSZ と EDBD の相乗効果にどのように影響するかを検証した。

興味深いことに、IM-54 は DFOM と同様に、HBC-5 と MDA-MB-231 細胞における SSZ と EDBD の相乗効果を抑制したが、MCF-7 では影響を及ぼさなかった(図 2-14)。

IM-54 は、 $H_2O_2$  や EDBD の細胞死を抑制するが、これらは酸化ストレスの他、鉄イオン依存的に細胞死を誘導する。EDBD は鉄イオンによって開裂することで活性を持つようになる一方、 $H_2O_2$  は鉄イオン依存的なフェントン反応により細胞死を誘導する。今回の結果で、IM-54 は DFOM と同じ傾向をみせたことから、IM-54 は DFOM と類似する鉄イオンに関連する作用を持つことが示唆された。

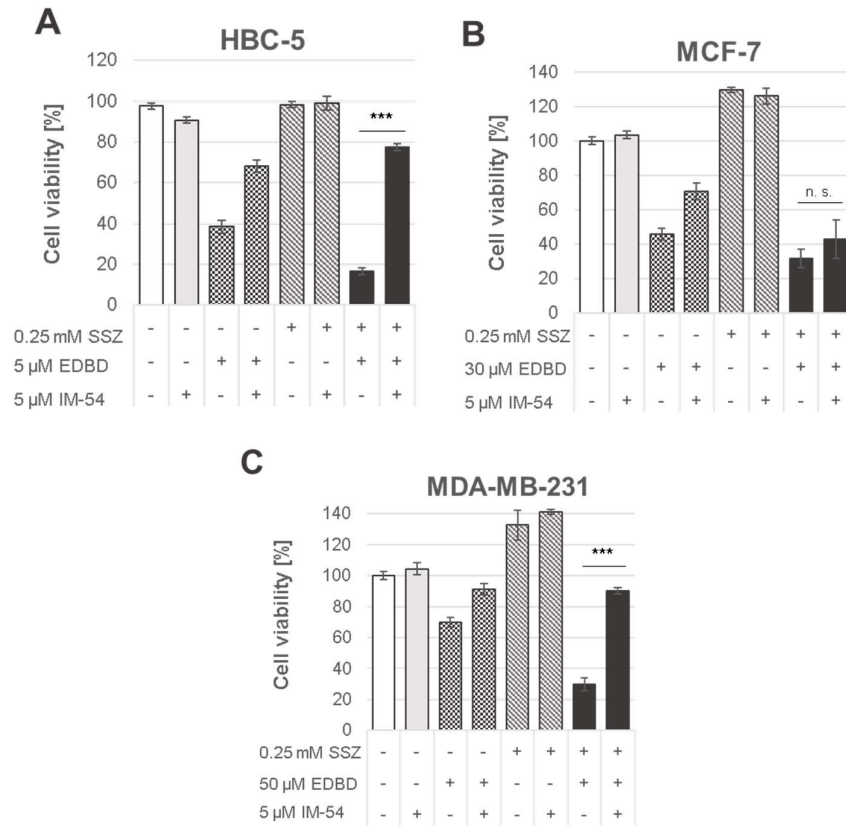


図 2-14. 乳がん細胞における EDBD と SSZ の共処理による細胞死に対する IM-54 の影響

(A, B)HBC-5 細胞、(C, D)MCF-7 細胞、(E, F)MDA-MB-231 細胞を、表示された濃度の IM-54 で 1 h 前処理し、表示された濃度の SSZ と EDBD で 48 h 処理した後、MTT assay により細胞生存率を測定した (n=3)。\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001 (指定データ間)。



## 第 2 章

### 2-3-9. Dihydroartemisinin (DHA) と SSZ の併用処理の乳がん細胞に対する影響

DHA は、EDBD と同じくエンドパーオキサイド結合を持つことから、第 1 章ではその作用を比較して、明確に異なる作用であることが明らかとなった。しかしながら、DHA は乳がん細胞に対して EDBD と類似した形態の細胞死を誘導していることが観察されたため、EDBD と同じように SSZ と相乗効果を示すか検証した。

DHA は、乳がん細胞に比較的弱い活性を示し、HBC-5、MCF-7、MDA-MB-231 細胞に対する細胞増殖抑制作用の IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 43.4、69.4、157.5  $\mu$ M であった。感受性の傾向が EDBD と同様であるものの、SSZ との併用では顕著な相乗効果を示さなかった(図 2-15)。

併用効果を CompuSyn で評価した結果、9 対の濃度組み合わせで MCF-7 では 4 対、MDA-MB-231 では 1 対は相乗効果で、HBC-5 ではすべて拮抗効果であった(表 2-3)。

この結果から、DHA と SSZ は相乗効果を示さないことが明らかになり、乳がん細胞でも DHA と EDBD は異なるメカニズムで細胞死を誘導することが示唆された。

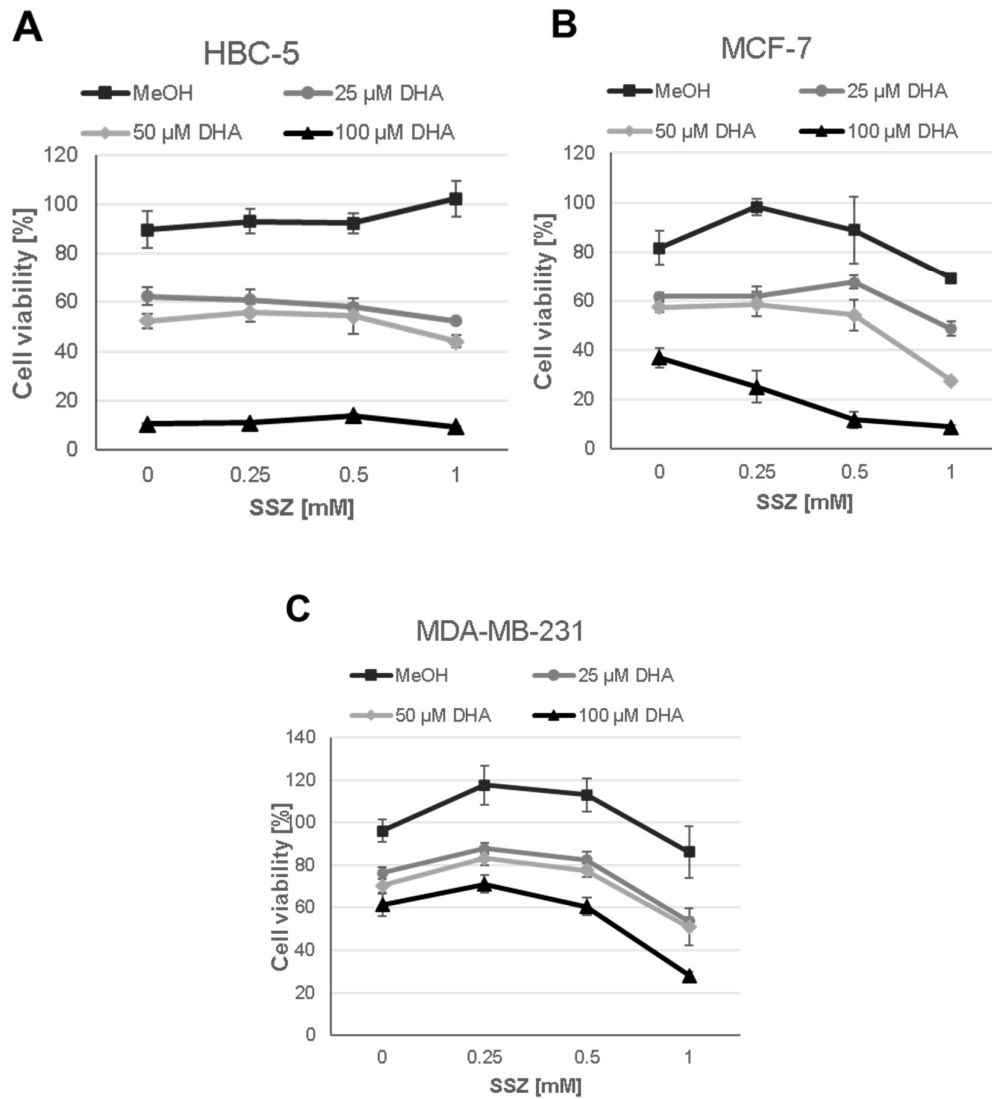


図 2-15. 乳がん細胞における DHA と SSZ の併用

(A)HBC-5 細胞、(B)MCF-7 細胞、(C)MDA-MB-231 細胞を表示された濃度の SSZ と DHA で共処理し 48 h 培養後、MTT assay により細胞生存率を測定した (n=3)。

表 2-3. 乳がん細胞における DHA と SSZ の共処理の効果

Cell line	SSZ [mM]	DHA [ $\mu$ M]	Effect [Fa]	CI Value	Interaction
HBC-5	0.5	100	0.09	46.0	Antaginism
	0.25	100	0.14	18.0	Antaginism
	0.125	100	0.11	10.8	Antaginism
	0.5	50	0.44	14.8	Antaginism
	0.25	50	0.54	6.8	Antaginism
	0.125	50	0.56	4.1	Antaginism
	0.5	25	0.52	12.0	Antaginism
	0.25	25	0.58	5.7	Antaginism
	0.125	25	0.61	3.1	Antaginism
MCF-7	1	100	0.09	0.33	Synergism
	0.5	100	0.12	0.27	Synergism
	0.25	100	0.25	0.52	Synergism
	1	50	0.28	0.72	Synergism
	0.5	50	0.54	1.51	Antaginism
	0.25	50	0.59	1.68	Antaginism
	1	25	0.49	1.14	Antaginism
	0.5	25	0.68	1.76	Antaginism
	0.25	25	0.62	1.10	Antaginism
MDA-MB-231	1	100	0.28	0.26	Synergism
	0.5	100	0.61	1.17	Antaginism
	0.25	100	0.71	2.46	Antaginism
	1	50	0.51	16.38	Antaginism
	0.5	50	0.78	30.20	Antaginism
	0.25	50	0.83	35.41	Antaginism
	1	25	0.54	8.70	Antaginism
	0.5	25	0.83	17.74	Antaginism
	0.25	25	0.88	21.73	Antaginism

Fractional effect (Fa)は細胞生存していないことを 0、全て生存していることを 1 とした時の各処理における細胞生存状態を意味する。

## 第 2 章

### 2-3-10. EDBD の正常細胞に対する影響

EDBD の正常細胞への影響を調べるために、ヒト線維芽細胞 WI-38 を用いた。EDBD は WI-38 に対しても細胞増殖抑制作用を持ち、その  $IC_{50}$  値は  $2.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$  であった。また、EDBD と SSZ の併用効果を WI-38 で検証した結果、EDBD は WI-38 細胞株に対する SSZ の効果を増強しなかった(図 2-16)。

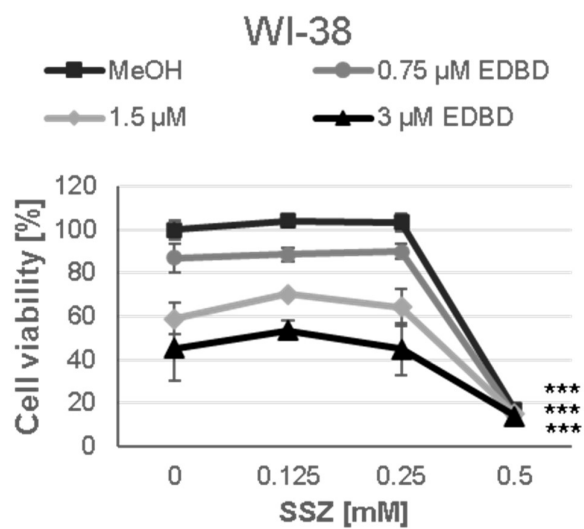


図 2-16. 正常細胞における EDBD と SSZ の併用

WI-38 細胞を表示された濃度の SSZ と EDBD で共処理し 48 h 培養後、MTT assay により細胞生存率を測定した (n=3)。\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001 vs 各 EDBD 処理細胞。

### 2-4. 考察

SSZ は、乳がん細胞においてシステム  $x_c^-$  の阻害と TNFR の発現増強を促すことで、フェロトシス誘導剤の効果を増強することが知られている [77]。EDBD は鉄イオン依存的に脂質過酸化を誘導することから、二つの化合物は相乗効果を示すことが予想された。本研究では、EDBD と SSZ の相乗効果を検証することを目的とした。

まずは、EDBD の乳がん細胞に対する効果が不明であるため、HL60 細胞に対する作用を基準に、EDBD の乳がん細胞への影響を HBC-5、MCF-7、並びに MDA-MB-231 細胞を用いて検証した。EDBD は、MDA-MB-231 細胞 ( $IC_{50}$  値:  $76.5 \pm 4.8 \mu\text{M}$ )、MCF-7 細胞 ( $IC_{50}$  値:  $27.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$ )、HBC-5 細胞 ( $IC_{50}$  値:  $8.5 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ) に対して増殖抑制作用を示し、感受性の高さ、以前に EDBD の抗がん作用の特徴を調べた JFCR39 パネルスクリーニングの結果と一致していた。一方で、HL60 細胞において EDBD よりも強い細胞毒性を示す DHA (72 h の  $IC_{50}$  値:  $0.11 \mu\text{M}$ ) は、乳がん細胞に対する活性は弱いものの、感受性の高さは MDA-MB-231 細胞 ( $IC_{50}$  値:  $157.5 \mu\text{M}$ )、MCF-7 細胞 ( $IC_{50}$  値:  $69.4 \mu\text{M}$ )、HBC-5 細胞 ( $IC_{50}$  値:  $43.4 \mu\text{M}$ ) であり、EDBD と同様の傾向を示した。

EDBD は、乳がん細胞において処理して直ぐに ROS を産生する、DCF による ROS が検出される時間よりも早く脂質過酸化を誘導する、並びに DFOM、Fer-1、VE で細胞死が抑制されるなど、HL60 細胞に対する作用と同様のメカニズムで乳がん細胞においても細胞死を誘導した。このことから、EDBD は乳がん細胞でもフェロトシス様細胞死を誘導することが示された。さらに、EDBD と SSZ を併用することにより、予想された相乗効果も認められた。また、EDBD と SSZ の併用による相乗効果は DFOM や Fer-1 により抑制されることから、相乗効果も鉄イオン依存的な脂質過酸化によるフェロトシスであると考えられた。一方で、EDBD は正常細胞株に対しても細胞増殖抑制作用を示したが、SSZ の WI-38 に対する効果は EDBD によって増強されなかった。

## 第 2 章

SSZ は、システム  $x_c$  を阻害することで、GPX4 が持つ脂質過酸化からの細胞保護機能を妨害し、さらに、TFRC の発現を増加させることで鉄イオン流入を促進する。一方で、EDBD は鉄イオン依存的に脂質過酸化を誘導するとともに、GPX4 のタンパク質発現も低下させる。そのため、SSZ と EDBD は、メカニズムは異なるもののいずれもフェロトーシスが起りやすい状態を作り、そして、EDBD が直接的に脂質過酸化を引き起こすことで、相乗効果を発揮するものと考えられた。

HBC-5 と MDA-MB-231 に対する EDBD と SSZ の相乗効果は、DFOM、Fer-1、および IM-54 で抑制されることから、両方の細胞に対する EDBD と SSZ の相乗効果は同じフェロトーシス様作用だと考えられた。一方で、Fer-1 は MCF-7 細胞に対する EDBD と SSZ の相乗効果を抑制したが、DFOM と IM-54 は顕著な抑制効果を示さなかった。従って、EDBD と SSZ の併用は、MCF-7 に対しては、他の 2 種の細胞とは異なる作用によって細胞死を誘導するものと考えられる。尚、EDBD は 3 種の乳がん細胞において同じような作用を示したことから、MCF-7 に対して EDBD と SSZ の併用が異なる作用であるのは、SSZ の作用に原因がある可能性が示唆された。

SSZ は、乳がん細胞、特に ER の発現が低い細胞においてフェロトーシスを誘導することが Yu 等によって提示された [77]。Yu 等のグループは、ER の発現が TFRC の発現を阻害することと、ER(-) 乳がんでは TFRC の発現が比較的高いことを明らかにした。さらに、Her2(+) 乳がんでも TFRC が比較的高く発現していることを報告している。TFRC は、細胞の鉄取り込みに関与する鉄代謝における重要な役割を果たしており、その発現の違いは、さまざまな乳がん細胞における SSZ に対する感受性と相関している [77]。Yu 等の研究成果から、Her2(+) と ER(-) に TFRC が高発現する傾向にあることと、SSZ は ER(-) 乳がん細胞に強い活性を示すことから、SSZ は HBC-5 [Her2(+) と ER(-)]、MDA-MB-231 [Her2(-) と ER(-)]、MCF-7 [Her2(-) と ER(+)] の順に高感受性から低感受性を示すことが示唆されていた。そのため、DFOM が MCF-7 細胞に対

## 第 2 章

して EDBD と SSZ の相乗効果を抑制しないのは、MCF-7 細胞に TFRC の発現型に関わっている可能性がある。

IM-54 は、HL60 細胞において過酸化水素によって引き起こされる細胞死を阻害する酸化ストレス誘導性ネクロシス阻害剤である [70]。また、IM-54 はアポトーシスとネクロトーシスの両方を阻害しないことが報告されているが [93]、IM-54 がフェロトーシスに関与するかは不明である。本研究では、IM-54 は DFOM と同様に、MCF-7 で EDBD と SSZ の相乗効果に影響を与えなかった。このことから IM-54 は、DFOM と類似する鉄イオンに関連する作用を持つことが示唆された。さらに、IM-54 で細胞死が抑制される EDBD と  $\text{H}_2\text{O}_2$  は、酸化ストレスが関与するという以外に、鉄イオン依存的に活性を示すという共通点もあることから、この仮説は裏付けられる。

結論として、EDBD は 3 種の乳がん細胞において鉄イオン依存的な脂質過酸化誘導を介して細胞増殖抑制効果を示した。一方で、SSZ はシステム  $x_c^-$  の阻害を通して脂質過酸化耐性を低下させ、TFRC の発現上昇を通して細胞における鉄イオン流入を促進するため、乳がん細胞において EDBD の作用を増強することが示唆された(図 2-18)。EDBD と SSZ の相乗効果は HBC-5 と MDA-MB-231 細胞に強く認められており、その作用はフェロトーシスであると考えられた。



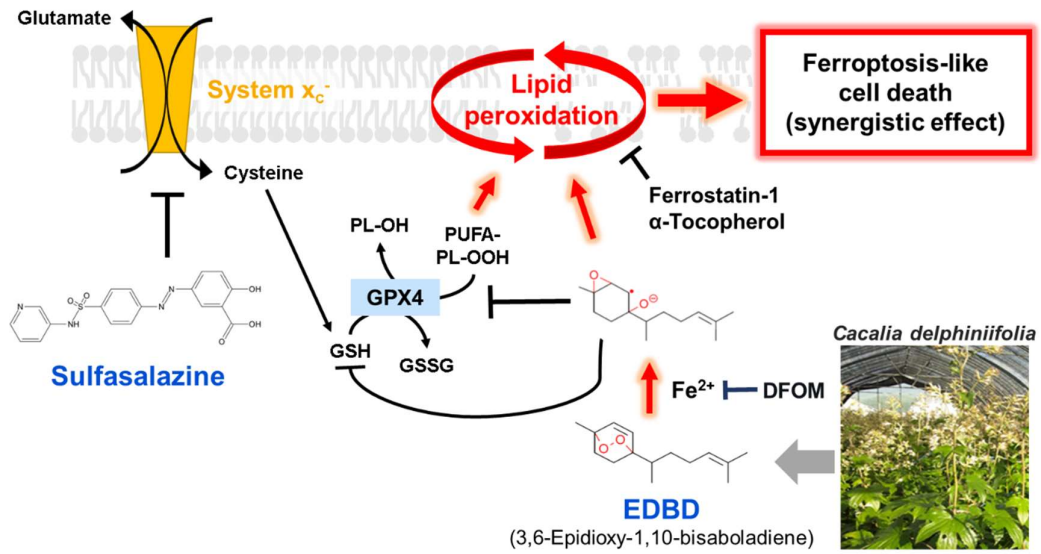


図 2-17. EDBD と SSZ の乳がん細胞に対する相乗効果の作用機序

# 総合考察

## 総合考察

EDBD は、細胞周期停止作用を有する生物活性物質の探索を目的としたスクリーニング系である、遺伝子変異酵母株 WCTR312A を用いた生育回復活性スクリーニングにより、山菜として食されているモミジガサとボウナから、抗がん作用を有する生物活性物質の候補として単離された [55]。WCTR312A 株では、DNA 損傷チェックポイント経路で重要なアダプタータンパク質として機能する Rad9 が欠損、DNA ポリメラーゼ  $\delta$  の触媒サブユニットとして機能する Cdc2 が変異している [54]。その結果、WCTR312A 株は、37°C で 6 時間培養により高温ストレスに晒した後、28°C に戻しても生育が回復しなくなる。しかしながら、ヒドロキシウレア、チアベンダゾール、マイコフェノール酸などの細胞周期を調節する活性物質を添加すれば、高温ストレスの後の許容温度 (28°C) に戻すと、細胞は正常に増殖できる。そのため、WCTR312A 株を用いたスクリーニング系は、簡易かつ酵母という人間と同じ真核生物に対する生育回復活性を指標にしているため、がん細胞に対して選択毒性をもつ生物活性物質が見つかることが期待できる。

細胞における増殖抑制作用は、細胞死を誘導するものと、細胞周期を停止させるものがある。これらの作用は、無限に増殖するという性質をもつがん細胞に対して有望である。WCTR312A 株を用いたスクリーニングで単離された EDBD は、細胞周期を停止する作用が期待された。実際に、EDBD は *S. cerevisiae* において Hog1 の活性化を介して G1 期と G2 期で細胞周期を停止することを証明した [94]。一方、EDBD のヒトがん細胞における細胞増殖抑制作用は細胞周期停止ではなく、細胞死誘導作用であった。

EDBD の細胞死誘導作用メカニズムを解明するために、当時最も研究が進み、同じエンドパーオキサイド構造を有する DHA で行われていたアポトーシスの検証をした。その結果、EDBD は HL60 細胞において DNA の断片化、染色体の凝縮、カスパーゼ活性化などアポトーシスのホールマーク現象を引き起こしていた。さらに、この現象は

酸化ストレスなどストレスに応答する p38 MAPK の活性化を介して誘導されていることが分かった [57, 61]。このように、生化学的な指標に基づくと EDBD はアポトーシス様の現象を誘導しており、カスパーゼの活性化を伴う細胞死はアポトーシス以外に報告されていなかったため、EDBD はアポトーシスを誘導すると考えられた。しかしながら、細胞形態観察により、多くの細胞ではアポトーシス特有のブレブ形成などの形態的特徴がみられないことから、主たる細胞死はアポトーシスとは異なることが示唆された [56]。

ここで、I 型細胞死であるアポトーシスではなければ、II 型細胞死のオートファジー性細胞死と III 型細胞死のいずれかであると考えられた。そこで、ネクローシスを誘導する  $H_2O_2$  と比較したところ、細胞死の形態が類似していた。さらに、 $H_2O_2$  による細胞死を阻害する酸化ストレス誘導性ネクローシス阻害剤の IM-54 は、EDBD による細胞死も抑制することから、EDBD はネクローシスを誘導すると示唆された。さらに、PI 染色によってネクローシスの特徴である細胞膜にダメージも与えることが明らかになった。そこで、細胞膜の損傷がどのように誘導されているかを解明するため、細胞膜を構成するリン脂質に着目した。具体的には、細胞膜における脂質過酸化が細胞膜損傷の原因である可能性が考えられたため、脂質過酸化阻害剤との併用による影響を調べた。その結果、脂質過酸化を抑制すると報告されている Fer-1 [74]、VE [75]、さらにモミジガサのもう一つの生物活性成分であり、強力な脂質過酸化阻害作用が知られているカカロール [95] は、いずれも EDBD の作用を抑制した [56, 62]。そのため、EDBD は脂質過酸化を通してネクローシス様細胞死を誘導すると考えられた。

近年は、がん治療に向けて細胞死の研究が盛んに進められている。その成果として、かつては 3 種類だとされていた細胞死の種類も現在では 10 種類以上に分類されている。それらの誘導メカニズム、誘導剤の開発、病気との関連性、がん治療のターゲットとしての可能性が研究され、いくつかの総説によってまとめられている [34, 23, 96]。報

告当時、まだ誘導メカニズムが不明瞭だったフェロトーシスも、分子メカニズムが明らかになり、特有の分子メカニズムをもつ細胞死であることが分かってきた [63]。このようにフェロトーシスの研究が進んできた中、フェロトーシスのホールマークとして脂質過酸化と鉄イオン依存性が提示された。まさに、EDBD は鉄イオン依存的に活性を示し、脂質過酸化を介して細胞死を誘導するため、フェロトーシスの特徴と類似していた。従って、本研究では EDBD のフェロトーシス様作用メカニズムを解明することを目的とし、第 1 章では HL60 細胞においてフェロトーシス様作用のメカニズムを解析し、第 2 章では、乳がん細胞においてフェロトーシス誘導剤である SSZ との相乗効果の検証を行った。

第 1 章では、EDBD の細胞死誘導メカニズムに着目して行った。その結果、EDBD は鉄イオン依存的に脂質過酸化を誘導すること、EDBD による細胞死を抑制する阻害剤 (DFOM、Fer-1、VE、IM-54) は、EDBD による脂質過酸化を抑制すること、さらに EDBD は過酸化脂質を還元する酵素 GPX4 のタンパク質発現を抑制すること、GPX4 の活性に必要な細胞内 GSH を低下させることなどを新たに発見した。これらの結果から、EDBD は鉄イオン依存的な脂質過酸化を誘導するとともに、GPX4 の活性を抑制することでフェロトーシス様の細胞死を誘導することを明らかにした。

第 2 章では、EDBD の応用性に着目し、難治性の乳がんにおいて、有望な抗がん剤候補である SSZ のフェロトーシス誘導作用を増強するかを検証した。その結果、EDBD は乳がん細胞でもフェロトーシス様の細胞死を誘導し、さらに予想したように、SSZ のフェロトーシス誘導作用を増強し相乗効果を示すこと、この相乗効果は HBC-5 と MDA-MB-231 細胞ではフェロトーシス様作用であるが、MCF-7 細胞では鉄イオン非依存的な脂質過酸化を介する細胞死であること、EDBD は正常細胞においても細胞毒性を示したものの SSZ の作用を増強しないことなどを明らかにした。多くの抗がん剤は激しい副作用を伴うこと、またがんは不均一性であること、並びに薬剤耐性を獲得すること

などから、二つ以上の抗がん剤によるコンビネーション治療が注目されている。その中で、食用植物である山菜のモミジガサに含まれる EDBD が、抗がん剤候補である SSZ と相乗効果を示すことは、抗がん剤としての可能性と有用性を高める知見になると考えられる。コンビネーション治療は、薬剤の副作用を和らげるために、二つ以上の薬剤を低濃度で用いる治療法である。従って、EDBD は正常細胞で毒性を示すとしても、使用する濃度設定によっては応用できる可能性がある。実際に、0.75  $\mu\text{M}$  EDBD と 0.25 mM SSZ の併用では、WI-38 ではわずかな細胞生存率の抑制(細胞生存率 80%以上)にとどまっているが、HBC-5 細胞においては細胞生存率を 29%まで抑制していた(図 2-12 と 2-16)。このことから、EDBD はフェロトーシスをターゲットにするがん治療薬候補としても期待できることが確かめられた。

このように、第 1 章と第 2 章における EDBD のフェロトーシスに着目した研究で、EDBD による細胞死はフェロトーシス様細胞死でありながら、従来のフェロトーシスと異なる特徴的な細胞死であることが示唆された。ここでまとめると、EDBD による細胞死は以下の特徴を有する。

EDBD のターゲットは脂質である。高い脂溶性を有する EDBD は細胞質に存在しにくくと考えられ、脂質膜構造の中で、鉄イオンによって開裂し、生成された不安定なラジカル中間体は細胞膜構造における PUFA-PL に対して連鎖反応を誘導することで、脂質過酸化を引き起こしていると考えられる。細胞内 ROS を検出する DCF の検出で、0 時間で見られたわずかな ROS は次第に減少し(図 2-6~2-8) [57]、C11-BODIPY で検出される脂質過酸化は時間依存的に増加する結果 [62]は、この仮説を裏付けている。また、EDBD は脂質膜が豊富な構造を持つ小胞体とミトコンドリアにおいて脂質過酸化を誘導している可能性が高い。これは、2D-DIGE プロテオーム解析で、EDBD は小胞体及びミトコンドリアに関連するタンパク質を増加させたことと(表 1-1)、細胞核がはっきり見える接着細胞(乳がん細胞)において、C11-BODIPY の蛍光は細胞核の

周りに一番強い(図 2-9)ことから推定されている。これを検証するためには、小胞体又はミトコンドリア特有の蛍光染色と、脂質過酸化を検出する蛍光染色によりダブル染色を用いて検出する必要がある。

EDBD は、脂質過酸化の誘導とともにカスパーゼを活性化している [57, 61]。現在までの細胞死の盛んな研究の中で、アポトーシス以外にカスパーゼの活性化を伴う細胞死は報告されていない。フェロトーシスも、カスパーゼの活性化がみられないことで特徴付けられている [16]。カスパーゼの活性化は ATP のエネルギーを利用する現象である。一方で、EDBD はエネルギーを使わない化学反応を誘導しているため、二つの現象は同時に誘導し得ると考えられる。ここで、EDBD のエンドパーオキサイド結合を有さない類縁体の  $\alpha$ -クルクメンは、細胞毒性は弱いものの DNA 断片化などアポトーシスに特有の現象を誘導する [97]。従って、EDBD のエンドパーオキサイド結合以外の骨格でアポトーシス様現象を引き起こしていると推定している。

EDBD の細胞死誘導メカニズムは、これらの特徴を持つため、従来のフェロトーシスとは異なる作用である。そのため、EDBD はフェロトーシスではなく、フェロトーシス様細胞死を誘導する。さらに、カスパーゼの活性化が維持されていることや EDBD の化学的性質(高い脂溶性のため細胞質に存在しにくい)から、脂質過酸化を誘導すると報告されている CuOOH とは異なり、DNA など脂質以外の生体分子へ影響しない可能性が示唆される [98]。このような特徴から EDBD は、独特な細胞死誘導剤でもあると考えられるため、細胞死の研究にも役立つことが期待される。

今回の研究で EDBD の細胞死誘導作用が明らかになってきたが、以下のような不明な点が残っている。EDBD は脂質膜において脂質過酸化を直接誘導すると考えられるが、その他のシグナルをどのように活性化しているかは不明である。例えば、EDBD は p38 MAPK を通じてアポトーシス様の現象を引き起こす。酸化ストレスによって p38 MAPK を活性化している可能性が高いが、そのメカニズムは不明である。また、今回

## 総合考察

の研究で EDBD は、GPX4 のタンパク質発現減少や細胞内 GSH レベルの低下などフェロトーシスに特徴的な現象も誘導しているが、その分子メカニズムは明らかではない。さらに、今回初めて EDBD の作用を正常細胞で検証したが、EDBD は正常細胞で SSZ のフェロトーシス誘導を増強しないという、がん細胞の時と明らかに異なる結果が得られた。しかしながら、なぜそのような違いがみられているのかは明確ではない。EDBD の応用に向けてこれらのことを明らかにする必要があると考えられる。

一方で、本研究は EDBD に着目して進めたものであるが、EDBD 以外でも新たな発見があった。IM-54 は酸化ストレス誘導性ネクロトーシス阻害剤として使用されており、 $H_2O_2$  による細胞死を誘導することが知られている。また、アポトーシスとネクロトーシスを阻害しないことや、ミトコンドリアに局在することが報告されているが、それ以外の作用については不明な点が多い細胞死阻害剤である。今回の研究では、IM-54 は EDBD による細胞死及び EDBD による脂質過酸化を抑制した。また、EDBD の作用は基本的に IM-54 によって抑えられるが、MCF-7 細胞における SSZ との相乗効果に対してのみ抑制しなかった。SSZ と EDBD の MCF-7 に対する相乗効果は DFOM では十分に抑制されず鉄イオン非依存的であったことから、IM-54 は何らかの形で鉄イオンに関わる作用を持つ可能性が高い。また、 $H_2O_2$  も鉄イオンによってフェントン反応を誘導することで活性を示すことから、この仮説は矛盾しない。

本研究では、HL60 細胞において EDBD の細胞死誘導作用のメカニズムを解明し、乳がん細胞でも HL60 と同様のメカニズムで抗がん作用を示すことを明らかにした。EDBD は SSZ の作用を顕著に増強し相乗効果を見せることと、フェロトーシスはがん治療の有望なターゲットであることから、EDBD が抗がん物質として優れた作用メカニズムを持つと言える。一方で、EDBD は独特な作用によりフェロトーシス様作用を誘導することから、細胞死誘導剤として細胞死のメカニズム解明に応用できる可能性が示唆された。この成果は、治療が困難な場合が多い乳がんに対する抗がん剤の開発研



## 総合考察

究、及び抗がん剤の開発を目的とした細胞死の研究に貢献できることを期待している。

## 参考文献

### 参考文献

- [1] C. P. Wild, E. Weiderpass and B. W. Stewart, "World cancer report," World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2020.
- [2] 厚生労働省, "結果の概要," 令和 4 年人口動態統計月報年計(概数)の概況, 2022.
- [3] D. Hanahan, "Hallmarks of cancer: new dimensions," *Cancer Discov.*, vol. 12, pp. 31-46, 2022.
- [4] 曾根三郎、鶴尾隆, がん分子標的治療研究実践マニュアル, 株式会社 金芳堂, 2009.
- [5] 清宮啓之, 進化するがん創薬, (株)化学同人, 2019.
- [6] 入門ケミカルバイオロジー編集委員会, 入門ケミカルバイオロジー, 株式会社オーム社, 2008.
- [7] 半田宏, ケミカルバイオロジー・ケミカルゲノミクス, シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社, 2005.
- [8] 長野哲雄、長田裕之、菊池和也、上杉志成, "ケミカルバイオロジー," *蛋白質核酸酵素*, 第 52, 第 13, 2007.
- [9] 日本学術振興会ケミカルバイオロジー第 189 委員会, ケミカルバイオロジー化合物集ー研究展開のヒントー, 株式会社オーム社, 2018.
- [10] 秋久俊博、小池一男, 資源天然物化学, 共立出版株式会社, 2017.
- [11] S. A. Sundberg, "High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 11, no. 1, pp. 47-53, 2000.
- [12] J. F. R. Kerr., A. H. Wyllie and A. R. Currie, "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics," *Br. J. Cancer*, Vols. 239-257, p. 26, 1972.
- [13] W. Chaabane, S. D. User, M. El-Gazzah, R. Jaksik, E. Sajjadi, J. Rzeszowska-Wolny and M. J. Los, "Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: independence between those pathways and effect on cancer," *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, vol. 61, pp. 43-58, 2013.
- [14] S. Shimizu, T. Yoshida, M. Tsujioka and S. Arakawa , "Autophagic cell death and cancer," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, pp. 3145-3153, 2014.
- [15] L. Galluzi and G. Kroemer, "Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis," *Cell*, vol. 135, pp. 1161-1163, 2008.

## 参考文献

- [16] S. J. Dixon, K. M. Lemberg, M. R. Lamprecht, R. Skouta, E. M. Zaitsev, C. E. Gleason, D. N. Patel, A. J. Bauer, A. M. Cantley, W. S. Yang, B. Morrison III and B. R. Stockwell, "Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death," *Cell*, vol. 149, pp. 1060-1072, 2012.
- [17] K. Oh, T. Qian, D. A. Brenner and J. J. Lemasters, "Salicylate enhances necrosis and apoptosis mediated by the mitochondrial permeability transition," *Toxicol. Sci.*, vol. 73, no. 1, pp. 44-52, 2003.
- [18] S. L. Fink and B. T. Cookson, "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells," *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 4, pp. 1907-1916, 2005.
- [19] S. A. Andrabi, T. M. Dawson and V. L. Dawson, "Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1147, pp. 233-241, 2008.
- [20] E. White, "Entosis: it's a cell-eat-cell world," *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 840-842, 2007.
- [21] F. Wang, R. Gómez-Sintes and P. Boya, "Lysosomal membrane permeabilization and cell death," *Traffic.*, vol. 19, no. 12, pp. 918-931, 2018.
- [22] L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson and e. al., "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018," *Cell Death Differ.*, vol. 25, no. 3, pp. 486-541, 2018.
- [23] F. Peng, M. Liao, R. Qin, S. Zhu, C. Peng, L. Fu, Y. Chen and B. Han, "Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies," *Sig. Transduct. Target. Ther.*, vol. 7, p. 286, 2022.
- [24] D. Tang, R. Kang, T. V. Berghe, P. Vandenabeele and G. Kroemer, "The molecular machinery of regulated cell death," *Cell Res.*, vol. 29, pp. 347-364, 2019.
- [25] J. Cui, S. Zhao, Y. Li, D. Zhang, B. Wang, J. Xie and J. Wang, "Regulated cell death: discovery, features, and implications for neurodegenerative diseases," *Cell Commun.Signal.*, vol. 19, p. 120, 2021.
- [26] D. P. Del Re, D. Amgalan, A. Linkermann, Q. Liu and R. N. Kitsis, "Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease," *Physiol. Rev.*, vol. 99, pp. 1765-1817, 2019.
- [27] N. Yan and Y. Shi, "Mechanisms of apoptosis through structural biology," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 21, pp. 35-56, 2005.
- [28] M. S. Ricci and W. Zong, "Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways," *Oncologist*, vol. 11, pp. 342-357, 2006.

## 参考文献

- [29] M. Pasparakis and P. Vandenabeele, "Necroptosis and its role in inflammation," *Nature*, vol. 517, pp. 311-320, 2015.
- [30] L. Galluzzi, O. Kepp, F. K. Chan and G. Kroemer, "Necroptosis: mechanisms and relevance to disease," *Annu. Rev. Pathol.*, vol. 12, pp. 103-130, 2017.
- [31] G. Kroemer and B. Levine, "Autophagic cell death: story of a misnomer," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 12, pp. 1004-1010, 2008.
- [32] D. Denton and S. Kumar, "Autophagy-dependent cell death," *Cell Death. Differ.*, vol. 26, pp. 605-616, 2019.
- [33] J. Sosna, S. Voigt, S. Mathieu, A. Lange, L. Thon, P. Davarnia, T. Herdegen, A. Linkermann, A. Rittger, F. K.-M. Chan, D. Kabelitz, S. Schütze and D. Adam, "TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 71, pp. 331-348, 2014.
- [34] G. Yan, M. Elbadawi and T. Efferth, "Multiple cell death modalities and their key features (Review)," *World Acad. Sci. J.*, vol. 2, pp. 39-48, 2020.
- [35] S. Teramoto, T. Tomita, H. Matsui, E. Ohga, T. Matsuse and Y. Ouchi, "Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblast: protective roles of glutathione," *Jpn. J. Pharmacol.*, vol. 79, pp. 33-40, 1999.
- [36] J. J. Lu, L. H. Meng, Y. J. Cai, Q. Chen, L. J. Tong, L. P. Lin and J. Ding, "Dihydroartemisinin induces apoptosis in HL-60 leukemia cells dependent of iron and p38 mitogen-activated protein kinase activation but independent of reactive oxygen species," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 7, no. 7, pp. 1017-1023, 2008.
- [37] J. u, T. Wang, Y. Li, Y. Zhou, X. Wang, X. Yu, X. Ren, Y. An, Y. Wu, W. Sun, W. Fan, Q. Zhu, Y. Wang and S. Tong, "DHA inhibits proliferation and induces ferroptosis of leukemia cells through autophagy dependent degradation of ferritin," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 131, pp. 356-369, 2019.
- [38] J. L. Liu, R. X. Yu and J. F. Chen, "[Apoptosis of HL-60 cells induced by artesunate in vitro]," *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, vol. 15, no. 3, pp. 506-509, 2007.
- [39] N. Eiling, L. Reuter, J. Hazin, A. Hamacher-Brady and N. R. Brady, "Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells," *Oncoscience*, vol. 2, no. 5, pp. 517-532, 2015.
- [40] W. S. Yang and B. R. Stockwell, "Ferroptosis: death by lipid peroxidation," *Trends Cell Biol.*, vol. 26, no. 3, pp. 165-176, 2016.
- [41] L. Magtanong, P. J. Ko and S. J. Dixon, "Emerging roles for lipids in non-apoptotic cell death," *Cell Death. Differ.*, pp. 1-11, 2016.

## 参考文献

- [42] Y. J. Cao and S. J. Dixon, "Mechanisms of ferroptosis," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 73, pp. 2195-2209, 2016.
- [43] W. S. Yang, K. J. Kim, M. M. Gaschler, M. Patel, M. S. Shchepinov and B. R. Stockwell, "Peroxydation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis," *PNAS*, pp. E4966-E4975, 2016.
- [44] S. J. Dixon and B. R. Stockwell, "The role of iron and reactive oxygen species in cell death," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 9-17, 2014.
- [45] W. S. Yang, R. SriRamaratnam, M. E. Wlsch, K. Shimada, R. Skouta, V. S. Viswanathan, J. H. Cheah, P. A. Clemons, A. F. Shamji, C. B. Clish, L. M. Brown, A. W. Girotti, V. W. Cornish, S. L. Schreiber and B. R. Stockwell, "Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4," *Cell*, vol. 156, no. 1-2, pp. 317-331, 2014.
- [46] J. Li, F. Cao, H. L. Yin, Z. J. Huang, Z. T. Lin, N. Mao, B. Sun and G. Wang, "Ferroptosis: past, present, and future," *Cell Death Dis.*, vol. 11, no. 2, p. 88, 2020.
- [47] B. R. Stockwell, "Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications," *Cell*, vol. 185, pp. 2401-2421, 2022.
- [48] S. Doll, F. P. Freitas, R. Shah, M. Aldrovandi, M. C. Silva, I. Ingold, A. G. Grocin, T. N. X. Silva, E. Panzilius, C. H. Scheel, A. Mourão, K. Buday, M. Sato, J. Wanninger, T. Vignane, V. Mohana, M. Rehberg, A. Flatley, A. Schepers, A. Kurz, D. White, M. Sauer, M. Sattler, E. W. Tate, W. Schmitz, A. Schulze, V. O'Donnell, B. Proneth, G. M. Popowicz, D. A. Pratt, J. P. F. Angeli and M. Conrad, "FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor," *Nature*, vol. 575, no. 7784, pp. 693-698, 2019.
- [49] C. Mao, X. Liu, Y. Zhang, G. Lei, Y. Yan, H. Lee, P. Koppula, S. Wu, L. Zhuang, B. Fang, M. V. Poyurovsky, K. Olszewski and B. Gan, "DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer," *Nature*, vol. 593, pp. 586-590, 2021.
- [50] V. A. N. Kraft, C. T. Bezjian, S. Pfeiffer, L. Ringelstetter, C. Müller, F. Zandkarimi, J. Merl-Pham, X. Bao, N. Anastasov, J. Kössl, S. Brandner, J. D. Daniels, P. Schmitt-Kopplin, S. B. Hauck, B. R. Stockwell, K. Hadian and J. A. Schick, "GTP Cyclohydrolase 1/Tetrahydrobiopterin Counteract Ferroptosis through Lipid Remodeling," *ACS Cent. Sci.*, vol. 6, pp. 41-53, 2020.
- [51] S. J. Dixon, G. E. Winter, L. S. Musavi, E. D. Lee, B. Snijder, M. Rebsamen, G. Superti-Furga and B. R. Stockwell, "Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death," *ACS Chem. Biol.*, vol. 10, pp. 1604-1609, 2015.

## 参考文献

- [52] L. B. Pontel, A. Bueno-Costa, A. E. Morellato, J. C. Santos, G. Roué and M. Esteller, "Acute lymphoblastic leukemia necessitates GSH-dependent ferroptosis defenses to overcome FSP1-epigenetic silencing," *Redox Biol.*, vol. 55, p. 102408, 2022.
- [53] F. Bohlmann, J. Jakupovic and C. Zdero, "Neue norsesquiterpene aus *Rudbeckia laciniata* und *Senecio paludaffinis*," *Phytochemistry*, vol. 17, pp. 2034-2036, 1978.
- [54] E. Tsuchiya, M. Yukawa, M. Ueno, K. Kimura and H. Takahashi, "A novel method of screening cell-cycle blockers as candidates for anti-tumour reagents using yeast as a screening tool," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 74, no. 2, pp. 411-414, 2010.
- [55] K. Nishikawa, N. Aburai, K. Yamada, H. Koshino, E. Tsuchiya and K. Kimura, "The bisabolane sesquiterpenoid endoperoxide, isolated from *Cacalia delphiniifolia* inhibits the growth of human cancer cells and induces apoptosis," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 72, pp. 2463-2466, 2008.
- [56] 高野侑恵, "シドケ花からの 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene (EDBD) の単離精製とがん細胞に対するネクローシス作用," 修士論文, 岩手大学大学院農学研究科, 2015.
- [57] K. Kimura, Y. Sakamoto, N. Fujisawa, S. Uesugi, N. Aburai, M. Kawada, S. Ohba, T. Yamori, E. Tsuchiya and H. Koshino, "Cleavage mechanism and anti-tumour activity of 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene isolated from edible wild plants," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 20, no. 12, pp. 3887-3897, 2012.
- [58] 吉岡康隆, しどけーこれで高収益が期待できる, 1993.
- [59] 名取貴光、中川裕子、桜林ひかる、福井智、野田聖子、窪島愛華、戸澤一宏、仲尾玲子, "ラット神経膠腫細胞に対する山菜抽出物のアポトーシス誘導効果," *日本食品保蔵科学会誌*, 第 41 巻, 第 3 号, pp. 91-102, 2015.
- [60] 高橋優太, "山菜のシドケ(モミジガサ)の根に由来する *cacalone* 類の単離精製と細胞死誘導メカニズムの解析," 修士論文, 岩手大学大学院農学研究科, 2016.
- [61] 坂本良美, "山菜由来の 3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene の HL60 細胞へのアポトーシス誘導メカニズム," 修士論文, 岩手大学大学院農学研究科, 2012.
- [62] ウスフバヤル ナランドラム, "エンドパーオキシサイド化合物のネクローシスによる抗がん作用メカニズム," 修士論文, 岩手大学大学院農学研究科, 2017.
- [63] X. Jiang, B. R. Stockwel and M. Conrad, "Ferroptosis: mechanisms, biology, and role in disease," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 22, no. 4, pp. 266-282, 2021.
- [64] M. Muroi, S. Kazami, K. Noda, H. Kondo, H. Takayama, M. Kawatani and H.

## 参考文献

- Osada, "Application of proteomic profiling based on 2D-DIGE for classification of compounds according to the mechanism of action," *Chem. Biol.*, vol. 17, no. 5, pp. 460-470, 2010.
- [65] M. Muroi and H. Osada, "Proteomic profiling for target identification of biologically active small molecules using 2D DIGE," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1888, pp. 127-139, 2019.
- [66] K. Suvarna, K. Honda, M. Muroi, Y. Kondoh, N. Watanabe and H. Osada, "Identification of target protein for bio-active small molecule using photo-cross linked beads and MALDI-TOF mass spectrometry," *Bio. Protoc.*, vol. 10, no. 3, p. e3517, 2020.
- [67] S. Greene, K. Watanabe, J. Braatz-Trulson and L. Lou, "Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase by the immunosuppressive agent leflunomide," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 50, no. 6, pp. 861-867, 1995.
- [68] S. F. Chen, R. L. Ruben and D. L. Dexter, "Mechanism of action of the novel anticancer agent 6-fluoro-2-(2'-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)-3-methyl-4-quinolinecarboxylic acid sodium salt (NSC 368390): inhibition of de novo pyrimidine nucleotide biosynthesis," *Cancer Res.*, vol. 46, no. 10, pp. 5014-5019, 1986.
- [69] A. Jo, J. H. Yoon, T. H. Chung, E. Lee, Y. Kim, H. M. Joh and J. W. Chung, "Plasma-activated medium induces ferroptosis by depleting FSP1 in human lung cancer cells," *Cell Death. Dis.*, vol. 13, p. 212, 2022.
- [70] K. Dodo, M. Katoh, T. Shimizu, M. Takahashi and M. Sodeoka, "Inhibition of hydrogen peroxide-induced necrotic cell death with 3-amino-2-indolylmaleimide derivatives," *2005*, vol. 15, no. 12, pp. 3114-3118, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*
- [71] C. Sun, F. Peng, J. Li, X. Cui, X. Qiao and W. Zhu, "Ferroptosis-specific inhibitor ferrostatin-1 relieves H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced redox imbalance in primary cardiomyocytes through Nrf2/," *Dis. Markers*, vol. 2022, p. 4539932, 2022.
- [72] T. Jiang, J. Chu, H. Chen, H. Cheng, J. Su, X. Wang, Y. Cao, S. Tian and Q. Li, "Gastrodin inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ferroptosis through its antioxidative effect in rat glioma cell line C6," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 43, no. 3, pp. 480-487, 2020.
- [73] E. H. Pap, G. P. Drummen, V. J. Winter, T. W. Kooij, P. Rijken, K. W. Wirtz, J. A. Op den Kamp, W. J. Hage and J. A. Post, "Ratio-fluorescence microscopy of lipid peroxidation in living cells using C11-BODIPY (581/591)," *FEBS Lett.*, vol. 453, no. 3, pp. 278-282, 1999.

## 参考文献

- [74] R. Skouta, S. J. Dixon, J. Wang, D. E. Dunn, M. Orman, K. Shimada, P. A. Rosenberg, D. C. Lo, J. M. Weinberg, A. Linkermann and B. R. Stockwell, "Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 12, pp. 4551-4556, 2014.
- [75] B. van Dam, V. W. van Hinsbergh, C. D. Stehouwer, A. Versteilen, H. Dekker, R. Buytenhek, H. M. Princen and C. G. Schalkwijk, "Vitamin E inhibits lipid peroxidation-induced adhesion molecule expression in endothelial cells and decreases soluble cell adhesion molecules in subjects," *Cardiovasc. Res.*, vol. 57, no. 2, pp. 563-571, 2003.
- [76] F. Rusolo, F. Capone, R. Pasquale, A. Angiolillo, G. Colonna, G. Castello, M. Costantini and S. Costantini, "Comparison of the seleno-transcriptome expression between human non-cancerous mammary epithelial cells and two human breast cancer cell lines," *Oncol. Lett.*, vol. 13, pp. 2411-2417, 2017.
- [77] H. Yu, C. Yang, L. Jian, S. Guo, R. Chen, K. Li, F. Qu, K. Tao, Y. Fu, F. Luo and S. Liu, "Sulfasalazine-induced ferroptosis in breast cancer cells is reduced by inhibitory effect of estrogen receptor on the transferrin receptor," *Oncol. Rep.*, vol. 42, no. 2, pp. 826-838, 2019.
- [78] M. S. Chen, S. F. Wang, C. Y. Hsu, P. H. Yin, T. S. Yeh, H. C. Lee and L. M. Tseng, "CHAC1 degradation of glutathione enhances cystine-starvation-induced necroptosis and ferroptosis in human triple negative breast cancer cells via the GCN2-eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway," *Oncotarget*, vol. 8, no. 70, pp. 114588-114602, 2017.
- [79] L. A. Timmerman, T. Holton, M. Yuneva, R. J. Louie, M. Padro, A. Daemen, M. Hu, D. A. Chan, S. P. Ethier, L. J. van't Veer, K. Polyak, F. McCormick and J. W. Gray, "Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target," *Cancer Cell*, vol. 24, pp. 450-465, 2013.
- [80] M. Hasegawa, H. Takahashi, H. Rajabi, M. Alam, Y. Suzuki, L. Yin, A. Tadge, T. Maeda, M. Hiraki, V. P. Sukhatme and D. Kufe, "Functional interactions of the cystine/glutamate antiporter, CD44v and MUC1-C oncoprotein in triple-negative breast cancer cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 11, pp. 11756-11769, 2016.
- [81] M. Voigtlaender, T. Schneider-Merck and M. Trepel, "Lapatinib," *Recent Results Cancer Res.*, vol. 211, pp. 19-44, 2018.
- [82] H. Wang, D. Lin, Q. Yu, Z. Li, C. Lenahan, Y. Dong, Q. Wei and A. Shao, "A promising future of ferroptosis in tumor therapy," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, p. 629150, 2021.



## 参考文献

- [83] J. Zhu, Y. Xiong, Y. Zhang, J. Wen, N. Cai, K. Cheng, H. Liang and W. Zhang, "The molecular mechanisms of regulating oxidative stress-induced ferroptosis and therapeutic strategy in tumors," *Oxid. Med. Cell Longev.*, vol. 2020, p. 8810785, 2020.
- [84] E. D. Deeks, "Neratinib: first global approval," *Drugs*, vol. 77, no. 15, pp. 1695-1704, 2017.
- [85] C. Wahl, S. Liptay, G. Adler and R. M. Schmid, "Sulfasalazine : a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B," *J. Clin. Invest.*, vol. 101, pp. 1163-1174, 1998.
- [86] Y. Yamaguchi, T. Kasukabe and S. Kumakura , "Piperlongumine rapidly induces the death of human pancreatic cancer cells mainly through the induction of ferroptosis," *Int. J. Oncol.*, vol. 52, no. 3, pp. 1011-1022, 2018.
- [87] T. Hong, G. Lei, X. Chen, H. Li, X. Zhang, N. Wu, Y. Zhao, Y. Zhang and J. Wang , "PARP inhibition promotes ferroptosis via repressing SLC7A11 and synergizes with ferroptosis inducers in BRCA-proficient ovarian cancer," *Redox Biol.*, vol. 42, p. 101928, 2021.
- [88] F. Kimura, K. Iwaya, T. Kawaguchi, H. Kaise, K. Yamada, K. Mukai, O. Matsubara, N. Ikeda and N. Kohno, "Epidermal growth factor-dependent enhancement of invasiveness of squamous cell carcinoma of the breast," *Cancer Sci.*, vol. 101, no. 5, pp. 1133-1140, 2010.
- [89] T. C. Chou, "Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 2, pp. 440-446, 2010.
- [90] K. Shitara, T. Doi, O. Nagano, C. K. Imamura, T. Ozeki, Y. Ishii, K. Tsuchihashi, S. Takahashi, T. E. Nakajima, S. Hironaka, M. Fukutani, H. Hasegawa, S. Nomura, A. Sato, Y. Einaga, T. Kuwata , H. Saya and A. Ohtsu, "Dose-escalation study for the targeting of CD44v+ cancer stem cells by sulfasalazine in patients with advanced gastric cancer (EPOC1205)," *Gastric. Cancer*, vol. 20, no. 2, pp. 341-349, 2017.
- [91] M. Pariera and N. Vale, "Repurposing alone and combination of the antiviral saquinavir with 5-fluorouracil in prostate and lung cancer cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 20, p. 12240, 2022.
- [92] P. Q. Luo, L. X. Zhang, Z. M. Chen, G. Wang, H. Zhu, S. Ying, Z. J. Wei, W. X. Han and A. M. X, "Effects and mechanisms of trifluridine alone or in combination with cryptotanshinone in inhibiting malignant biological behavior of gastric cancer [published online ahead of print, 2023 Jun 4]," *Cell Cycle*, pp. 1-15, 2023.

## 参考文献

- [93] K. Dodo, T. Shimizu, J. Sasamori, K. Aihara, N. Terayama, S. Nakao, K. Iuchi, M. Takahashi and M. Sodeoka, "Indolylmaleimide derivative IM-17 shows cardioprotective effects in ischemia-reperfusion injury," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 9, no. 3, pp. 182-187, 2018.
- [94] Y. Imamura, M. Yukawa, M. Ueno, K. Kimura and E. Tsuchiya, "3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene inhibits G1-specific transcription through Swi4/Swi6 and Mbp1/Swi6 via the Hog1 stress pathway in yeast," *FEBS J.*, vol. 281, no. 20, pp. 4612-4621, 2014.
- [95] K. Shindo, M. Kimura and M. Iga, "Shindo, K; Kimura, M; Iga, M;," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 68, no. 6, pp. 1393-1394, 2004.
- [96] A. Strasser and D. L. Vaux, "Cell death in the origin and treatment of cancer," *Mol. Cell*, vol. 78, no. 6, pp. 1045-1054, 2020.
- [97] 木村賢一, "山菜のシドケ(モミジガサ)に含まれる機能性物質の癌細胞に対する作用," *NewFoodIndustry*, 第 卷 52, 第 5, pp. 33-42, 2010.
- [98] M. A. Baker and S. Q. He, "Elaboration of cellular DNA breaks by hydroperoxides," *Free. Radic. Biol. Med.*, vol. 11, no. 6, pp. 563-572, 1991.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧なご指導をいただきました、岩手大学大学院連合農学研究科生物資源科学専攻、天然物生化学研究室、木村賢一教授に心から感謝いたします。副指導と副査を務めていただきました、岩手大学農学部、斎藤靖史准教授、弘前大学農学部、坂元君年准教授には、各年度における研究進捗状況報告会や中間審査において有益な御助言を賜りました。心より御礼申し上げます。また、本研究の副査を務めていただきました、山形大学農学部、小林翔准教授、並びに本研究にあたって御助言も賜りました、岩手生物工学研究センター、生物資源研究部、上杉祥太主任研究員に深く感謝致します。

また、プロテオーム解析を実施して頂き、作用機序解析において多大なる御協力を賜りました、理化学研究所環境資源科学研究センター、ケミカルバイオロジー研究グループ、長田裕之グループディレクター(現静岡県立大学特任教授)、室井誠専任研究員に心より感謝申し上げます。

そして、本研究で使用した EDBD の単離精製の元であるシドケを恵与して下さった濱田農園の濱田潔さん、単離精製して下さり、作用機序の研究の一部を行って頂いた高野侑恵先輩に感謝申し上げます。

さらに、共焦点レーザー顕微鏡の使用にあたって御指導いただきました、岩手大学農学部、河村幸男准教授、英語論文投稿の際に英語を御指導いただきました、La Trobe University 生化学部、Don R. Phillips 名誉教授に感謝申し上げます。

最後に、様々な面で研究室生活を支えていただきました研究室の皆様方、そして、大学院生活で私を支え励まして下さった家族に心より感謝申し上げます。

2023 年 9 月