



Title	がん細胞のミトコンドリア機能を中心としたエネルギー代謝の放射線応答に関する研究
Author(s)	山本, 久美子
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 甲第14117号
Issue Date	2020-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k14117
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/78523
Type	theses (doctoral)
File Information	Kumiko_YAMAMOTO.pdf



[Instructions for use](#)

がん細胞のミトコンドリア機能を中心とした
エネルギー代謝の放射線応答に関する研究

山本 久美子

<目次>

目次	1
略語一覧	3
緒言	5
第一章 放射線がミトコンドリアエネルギー代謝に与える影響の評価	
1. 序論	11
2. 材料および方法	15
3. 結果	
3-1. LiNc-BuO を用いた ESR オキシメトリー法によるミトコンドリア呼吸機能の評価法の確立	23
3-2. X 線照射および M10 のがんの酸素消費率およびミトコンドリア呼吸パラメーターへの影響の評価	24
3-3. HeLa 細胞の低温条件下における ESR 測定	26
3-4. X 線照射のミトコンドリア由来 ROS 産生への影響の評価	29
3-5. X 線照射が細胞内 F2-イソプロスタニンに与える影響の評価	29
3-6. X 線照射の細胞内 AMP、ADP、ATP、NAD ⁺ ならびに NADH に対する影響の評価	30
4. 考察	46
5. 小括	52
第二章 ESR 法を用いた細胞外酸性化速度の新規評価法の確立および解糖系の放射線応答の評価	
1. 序論	53
2. 材料および方法	55
3. 結果	
3-1. R-SG を用いた ESR 法による細胞外酸性化速度の評価法の確立	58
3-2. X線照射のがん細胞における解糖系に対する影響の評価	59
4. 考察	65

5. 小括	68
総括	69
謝辞	72
引用文献	73
英語抄録	84

<略語一覧>

2-DG: 2-deoxy-D-glucose

5-iPF_{2α}-VI: 5,9α,11α-trihydroxy-(8β)-prosta-6E,14Z-dien-1-oic acid

8-iso PGF_{2α}: 5,9α,11α-trihydroxy-(8β)-prosta-6E,14Z-dien-1-oic acid

ADP: adenosine diphosphate

AEBS: 4-(2-aminoethyl)benzene sulfonamide

AEC: adenylate energy charge

AMP: adenosine monophosphate

ATP: adenosine triphosphate

BHT: 2,6-di-tert-butyl-*p*-cresol

CA IX: carbonic anhydrase IX

CCCP: carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazine

DMEM: dulbecco's modified eagle's medium

ESI: electron spray ionization

ESR: electron spin resonance

ETC: electron transport chain

FBS: fetal bovine serum

Fe-S cluster: iron-sulfur cluster

GFP: green fluorescent protein

GLUT1: glucose transporter 1

HPLC: high performance liquid chromatography

LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LDHA: lactate dehydrogenase A

LOD: limit of detection

LOQ: limit of quantitation

LiNc-BuO: lithium 9,14,18,23,27,32,36-octa-*n*-butoxy-2,3-naphthalocyanine

M10: 1-decyl-triphenylphosphonium bromide

MCT4: monocarboxylate transporter 4

MRM: multiple reaction monitoring

NAD⁺, NADH: nicotinamide adenine dinucleotide

OCR: oxygen consumption rate

PDH: pyruvate dehydrogenase

R-SG: 2-(4-((2-(4-amino-4-carboxybutanamido)-3-(carboxymethylamino)-3-oxopropyl
thio)methyl)phenyl)-4-pyrrolidino-2,5,5-triethyl-2,5-dihydro-1H-imidazol-1-
oxyl

ROS: reactive oxygen species

SQ: semiquinone

TCA: tricarboxylic acid

＜緒言＞

がんの治療には主に外科療法、化学療法ならびに放射線療法が用いられている。この中でも放射線治療は非侵襲的であり、局所制御ができる方法として多くの固形腫瘍に対して用いられている。近年では、陽子線や重粒子線などの深部の幹部へ集約的に線量を集中して与えることが出来る放射線発生装置の普及によって劇的にがんの治療効率が上がり、放射線治療は急速に広まっている。また、放射線と制がん剤の併用が広く用いられており、それぞれ単独では十分な効果が得られない腫瘍に対して殺細胞効果を高め、両者の用量を減らすことで正常細胞への副作用を最小限に抑えることが出来る。しかし、さらに正常組織に対する影響を低減しつつ、がん治療の効率を高めるためには、がん細胞に特異的な標的を見つける必要がある。一般的に、放射線による細胞致死の主要な原因は核の DNA の損傷によるものであると考えられている。DNA が受ける放射線の作用としては、放射線が標的である DNA に直接作用し、DNA 自身が電離もしくは励起することで傷害を生じる直接作用、周囲の水分子の放射線分解産物である活性酸素種 (ROS) を介して傷害を起こす間接作用の 2 つがあると言われている。このようにして発生した DNA 損傷は、様々な修復機構により修復されるが、修復できなかった DNA を持つ細胞は細胞死や発がんに至ると一般的に考えられている。

近年では、上述の放射線照射直後の DNA の損傷による細胞死だけではなく、放射線照射後の様々な細胞応答が放射線による細胞死に関連していることが明らかになってきた。例えば、間接作用によって生じる ROS ではなく、放射線照射後数時間から十数時間後に細胞内に生じる ROS が上昇することや、抗酸化物質である Trolox を照射後に細胞に処理することによって細胞死が抑制されることが報告されている^{38, 62)}。このことから、X 線照射直後に起きる直接作用もしくは間接作用によって生じる DNA 損傷以外に、X 線照射から十数時間後に細胞内に生じる ROS が細胞死に関与していることが示唆されている。この細胞内に生じる ROS の産生源として、ミトコンドリア電子伝達系 (ETC) が考えられてい

る^{46, 64, 102})。ミトコンドリアはエネルギーを産生する際に、ETCで酸素を消費しているが、その際に通常1~2%の酸素が1電子還元されることで $O_2^{\cdot-}$ が生成され、ミトコンドリアから漏出していると考えられている^{42, 91})。実際に、抗がん剤や放射線による酸化ストレスによって、ミトコンドリア由来のROS産生が上昇することが報告されており^{15, 45, 99})、さらにミトコンドリア由来のROSがmtDNAの変異やミトコンドリア膜電位の低下を始めとしたミトコンドリアの機能低下に関与しているとの報告もある^{58, 63, 69, 96})。このことから、放射線を照射した細胞ではミトコンドリアに由来するROSが上昇し、ミトコンドリアの機能低下が細胞死の一部に関与したり、細胞死を修飾したりしていることが示唆されている。

ミトコンドリアは細胞内において主なエネルギーの産生源である。細胞内では、生命の維持のためにエネルギー源であるATPを産生しており、この産生源は大きく2つに分けることが出来る。1つ目の経路は解糖系であり、細胞内に取り込まれたグルコースからピルビン酸が生じ、その際にATPが産生され、ピルビン酸は最終的に乳酸へと変換されて細胞外へと排出される。この解糖系では1分子のグルコースから2分子のATPが産生される。2つ目はミトコンドリアであり、グルコースから変換されたピルビン酸からアセチルCoAが生じ、ミトコンドリア内のTCA回路へと入り、さらにその先のミトコンドリアETCにおいてATPが産生される。ミトコンドリアでは解糖系と比較するとより大きなエネルギーを生じ、1分子のグルコースから36分子のATPが産生される。一般的に、正常な細胞では有酸素下においてミトコンドリアETCにATP産生を依存している。一方で、がん細胞では酸素が十分にある状態にあってもミトコンドリアETC機能は抑制されており、解糖系にエネルギー産生を依存していることが知られており、この現象はワールブルグ効果と呼ばれている⁹⁵)。この効果はin vivoのみならず、培養細胞系でも働いていると言われている。がん細胞においてワールブルグ効果によって解糖系が亢進している生理的意義についてはこれまでに様々な議論がなされてきている。例えば、解糖系では1分子のグルコースから

産生される ATP 量はミトコンドリアよりも少ないが、解糖系はミトコンドリアよりもはるかに速く ATP を合成できるため、増殖能が高く、大量にエネルギーが必要ながん細胞では解糖系が亢進していると考えられている⁵⁵⁾。また、ワールブルグ効果によって解糖系の中間体を動員するペントースリン酸経路も活性化するため、増殖のために必要な核酸、アミノ酸ならびに脂質といったバイオマスの産生も促進されるため、がん細胞はワールブルグ効果に依存していると考えられている⁹²⁾。近年、放射線照射後の細胞死に影響を与える細胞応答には上述の細胞内 ROS 上昇以外に、エネルギー代謝機構の関与が報告されてきている。上述のように、がん細胞ではワールブルグ効果が生じているため、解糖系に着目した研究がこれまで多く行われている。例えば、解糖系を阻害する 2-deoxy-D-glucose (2-DG) の処理によって、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、ヒト膵臓がん由来 MIA PaCa-2 細胞、ヒト乳がん由来 SkBi3 細胞、MDA-MB-468 細胞ならびに MCF-7 細胞で細胞毒性効果が見られることが報告されている^{1, 16, 53)}。また、ヒト膵臓がん由来 P198 細胞を移植したマウスにおいて、グルコース由来のピルビン酸から乳酸へと変換する酵素である lactate dehydrogenase A (LDHA) の阻害剤 F11 をマウスに投与すると、移植腫瘍の成長が抑制されることが報告されている⁵¹⁾。さらに、HeLa 細胞、ヒト神経膠芽腫由来 U373MG 細胞ならびにヒト肺腺がん由来 A549 細胞への 2-DG 処理によって放射線の致死効果が上昇することも報告されている^{5, 43, 53)}。

一方で、ワールブルグ効果のためにこれまでがん研究においてミトコンドリアはあまり重要視されてこなかったが、最近の研究では、メトホルミンを始めとする様々なミトコンドリア ETC に対する阻害剤処理によって、がん細胞の細胞死が増加することが明らかになっている^{2, 14, 107)}。さらに、当研究室の研究では、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞およびヒト肺腺がん由来 A549 細胞において、X 線照射後に細胞当たりの酸素消費率、ATP 産生、ミトコンドリア由来の ROS 産生ならびにミトコンドリア膜電位が上昇することを明らかにしており、X 線照射によってミトコンドリア ETC が活性化することが示唆されている¹⁰²⁾。さら

にミトコンドリア阻害剤の処理によってミトコンドリア ETC の放射線応答による活性化が見られなくなると共に放射線感受性が上昇することも明らかになっている¹⁰⁴⁾。以上の報告から、がん細胞においてもミトコンドリアは何らかの役割を担っており、放射線に対する生存に寄与している可能性があるが、放射線に対するミトコンドリア ETC の役割については不明な点も多い。より効果的ながん治療の開発を行うためにもミトコンドリア ETC の放射線応答の詳細を明らかにする必要がある。

これまでにエネルギー代謝に関連した研究においては共通の手法が多くの研究で行われている。例えば、ミトコンドリア代謝の指標である酸素消費率の測定には細胞外フラックスアナライザーを用いた研究報告が多い。この手法は閉鎖系での蛍光強度の変化率を数分間毎に測定し、酸素による蛍光に対するクエンチング作用を利用して酸素分圧の変化をリアルタイムに評価する方法であるため、GFP のような蛍光タンパク質を発現した細胞は扱いにくいことやクエンチャーとして働く試薬の処理ができないといった欠点がある。さらに、この手法は接着細胞の測定に適しているため、得られた結果を細胞数で基準化することが困難であるといったデメリットもある。そこで本研究では、電子スピン共鳴 (ESR)法や高速液体クロマトグラフィー (HPLC)法を始めとした定量性の高い手法を用い、従来から用いられている研究手法の欠点を補う評価法の開発を行い、その方法を用いて X 線に対する細胞の代謝応答の評価を行った。

第一章では、X 線に対するがん細胞のミトコンドリア ETC のエネルギー代謝およびミトコンドリア由来 ROS 産生の役割に着目した。まず、ESR オキシメトリ法による様々なミトコンドリア標的薬剤を用いたミトコンドリア呼吸機能の評価法を確立した。この方法を用いてミトコンドリア呼吸機能の放射線応答を評価したところ、X 線照射後にミトコンドリア呼吸パラメーターは上昇したが、この値を細胞当たりのミトコンドリア量で補正すると、非照射の細胞の値と同程度であった。このことから、これまでの報告で見られた X 線照射後のミトコンドリア ETC の活性化はミトコンドリア量が増加したことが寄与している事

が示された。また、ミトコンドリア ETC における電子の授受に重要な役割を担っているセミキノン (SQ)ラジカルおよび鉄-硫黄 (Fe-S)クラスターの測定を 110K の低温下における ESR 測定によって行った。その結果、X 線照射後の細胞において SQ ラジカルが上昇していたことから、X 線照射後にミトコンドリア ETC の電子の流れが活性化していたことが示唆された。しかしながら、Fe-S クラスターについては X 線照射後も変化はなかったことから、X 線照射後に上昇したミトコンドリア由来の ROS 産生はこの SQ ラジカルおよび Fe-S クラスターの放射線照射後の応答の違いによるレドックス不均衡による現象である事が示唆された。また、X 線照射後にミトコンドリア由来の ROS 産生が上昇することも示されたが、その ROS の細胞損傷への影響を評価するために、細胞膜を構成するリン脂質のアラキドン酸と ROS との反応で生じる F2-イソプロスタンの測定をトリプル四重極質量分析計を用いた液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC-MS/MS)法により行った。その結果、ROS 産生が有意に上昇する X 線照射から 24 時間後も F2-イソプロスタン量に変化はなかった。また、細胞内エネルギー代謝関連物質の測定を高速液体クロマトグラフィー (HPLC)法により行ったところ、X 線照射から 12 時間後に ATP および NAD⁺が、24 時間後には AMP および ADP も上昇した。さらに、細胞内のエネルギー状態の指標であるアデニル酸エネルギー充足率 (adenylate energy charge; AEC)は X 線照射から 24 時間後まで変化はなく、値は生理的条件下の範囲を示した。これらの結果から、X 線照射後の ATP 産生の上昇は、放射線による細胞損傷の修復や適応機構に重要な役割を果たしており、このミトコンドリアの代謝応答を阻害する事で放射線による致死効果を増強させる事が出来る可能性を示していることから、ミトコンドリア ETC はがんの放射線治療の標的となる事が示唆された。また、本研究で確立した ESR 法によるミトコンドリア代謝の評価法は、再現性が高く、少ない細胞数で測定が可能であり、さらに蛍光について気にすることなく評価が行えるため、使える試薬の幅が広がるなど、がん治療の標的の探索に応用が利く有用な手法であることが示唆された。

ワールブルグ現象が起こっていると言われているがん細胞の放射線治療を考える上では、ミトコンドリア ETC のみならず、解糖系の放射線応答についても明らかにする必要がある。そのため第二章では、グルコース代謝の指標として細胞外酸性化速度、グルコース類似体である 2-DG の細胞内への取り込みならびに乳酸産生の放射線応答について評価を行った。その結果、細胞外酸性化速度については変化は見られなかったものの、2-DG の取り込みや乳酸産生については X 線照射後に上昇したことから、グルコース代謝が放射線照射によって活性化した事が示唆された。以上の結果から、ミトコンドリア ETC のみならず、グルコース代謝についてもがんの放射線治療の標的となり得る事が示された。

本学位論文における第一章・図 1~6, 10~11 の結果は Yamamoto K, Yasui H, Bo T, Yamamori T, Hiraoka W, Yamasaki T, Yamada K I, Inanami O, Genotoxic Responses of Mitochondrial Oxygen Consumption Rate and Mitochondrial Semiquinone Radicals in Tumor Cells, *Applied Magnetic Resonance*, **49**: 837-851, 2018 ならびに図 8~9, 12~14 の結果については Yamamoto K, Ikenaka Y, Ichise T, Bo T, Ishizuka M, Yasui H, Hiraoka W, Yamamori T, Inanami O, Evaluation of mitochondrial redox status and energy metabolism of X-irradiated HeLa cells by LC/UV, LC/MS/MS and ESR, *Free Radic Res*, **52**: 648-660, 2018 において既に誌上発表済みである。

＜第一章＞

放射線がミトコンドリアエネルギー代謝に与える影響の評価

1. 序論

がん細胞は一般的に、好氣的な条件下においてもエネルギー産生をミトコンドリア電子伝達系 (ETC) に依存せず、主に解糖系で行っており、この現象はワールブルグ効果として古くから知られている⁹⁵⁾。しかし近年では、がん細胞においてもミトコンドリアは機能していることを示す報告がなされてきており¹⁰⁹⁾、ミトコンドリア ETC の阻害によってアポトーシス経路が活性化することも報告されている¹²⁾。Lu らは、乳がん由来 MCF-7 細胞、大腸がん由来 HCT116 細胞ならびに神経膠芽腫 U87 細胞において、細胞質の栄養状態や増殖因子、ストレスなどのシグナルを統合し、細胞の成長と代謝を制御する役割を持つ mTOR が放射線照射によってミトコンドリアに移動し、解糖系制御タンパク質である hexokinase II を阻害することを示した⁵⁶⁾。その結果としてミトコンドリア膜電位の上昇、酸素消費率の増加ならびに ATP 産生の上昇などのミトコンドリア ETC の活性化を示唆する現象が起きることによって放射線照射はワールブルグ効果の解除を誘導することが示唆されている。当研究室の以前の研究では、X 線照射後のマウス線維芽由来 NIH3T3 細胞およびマウス不死化胚線維芽細胞において、ミトコンドリアの分裂を制御するタンパク質である dynamin-related protein 1 (Drp1) の阻害によって分裂期崩壊が減少することを明らかにしている^{100,101)}。また、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を始めとした固形腫瘍に X 線を照射することによってミトコンドリア由来の ATP 産生や活性酸素種 (ROS) 産生の増加がみられることから、X 線照射はがん細胞のミトコンドリア ETC を活性化させることが示唆されている¹⁰²⁾。さらに、ミトコンドリア ETC 阻害の効果を示す lipophilic triphenyl phosphonium cation (TPP⁺) をがん細胞に処理し X 線を照射すると、X 線照射により上昇した ATP 産生が抑制されると共に放射線による細胞死が増加することを報告している¹⁰⁴⁾。また、化学療法抵抗性 A2780/CP70 細胞に

において cisplatin 単独による細胞毒性と比較すると、ナノ粒子 (NP)によってミトコンドリアに特異的に cisplatin が輸送された際に細胞毒性効果の上昇が観察され、mtDNA レベルやミトコンドリア機能の低下も起こっていることが報告されている⁵⁹⁾。対照的に、ミトコンドリア ETC を活性化剤する作用を有する 3-methyl pyruvate は、ヒト肺腺がん由来 A549 細胞およびマウス扁平上皮がん由来 SCCVII 細胞においてミトコンドリア由来の ROS レベルの上昇によって放射線感受性を上昇させる事も報告されている⁶⁸⁾。これらの研究から、ミトコンドリアはがんの放射線および化学療法の新たな標的となり得ることが示唆されている。

ヒト肝臓がん由来 HLE 細胞、HeLa 細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs)、ヒト白血病細胞由来 K562 細胞、HL60 細胞、正常ヒト包皮線維芽由来 BJ-hTERT 細胞ならびにチャイニーズハムスター卵巣細胞において、電離放射線の照射後にミトコンドリア由来の遅延性の ROS が産生することが報告されている^{13,27,36,37,39,44,45,64,79)}。さらに、DNA 傷害作用を持つ抗がん剤である cisplatin および doxorubicin がミトコンドリア由来の ROS 産生を誘導し、これが腫瘍のアポトーシスに関連していることも報告されている^{15,83)}。これらの報告は、ミトコンドリア由来の遅延性の ROS は遺伝毒性刺激による細胞毒性に対して重要な役割を担っている可能性がある。ミトコンドリア由来の ROS 産生およびミトコンドリア量の増加は、DNA 損傷チェックポイントによる G2/M 期停止と密接に関連している¹⁰²⁾。細胞内ミトコンドリア含量は G1、S、ならびに G2/M 期の順に増加し⁴⁰⁾、細胞内の ROS の主な産生源はミトコンドリア ETC の complex I および III であると考えられているため^{50,80)}、細胞内の ROS レベルは細胞周期によって制御されるミトコンドリア量に強く依存していることが示唆されている。さらに、Yoshida らは、γ線照射によって mtDNA 損傷の誘導やミトコンドリア ETC からの ROS 産生を制御するのに重要な酵素である NADH 脱水素酵素活性の低下がみられることを示している¹⁰⁵⁾。しかしながら、X線照射後のミトコンドリアからの遅延性の ROS 産生の上昇の役割については明らかになっていない。そこで本研究では、放射線照射によるミトコンドリア ETC の活性化のメカニズムや役

割について明らかにすることを目的とした。

ミトコンドリアの代謝を評価する上で重要なパラメーターであるのが細胞の酸素消費率 (OCR)である。細胞の OCR は、特にミトコンドリア呼吸機能を反映しているとされる。最近では、蛍光測定技術を用いた細胞外フラックスアナライザー (Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer, Agilent, Santa Clara, CA, USA)を用いた、様々なミトコンドリア標的試薬 [ATP 合成酵素阻害剤 (oligomycin)、脱共役剤 (FCCP もしくは CCCP) ならびにミトコンドリア ETC complex I および III 阻害剤 (rotenone および antimycin A)]の存在下でのミトコンドリアのストレステストは、図 1 に示すように、ミトコンドリア呼吸パラメーター (基礎呼吸、ATP 依存呼吸、プロトンリーク、最大呼吸、予備呼吸能ならびにミトコンドリア非依存呼吸) を評価するための標準的な方法として報告されている^{67, 76)}。その一方で、酸素感受性の安定プローブである lithium 5,9,14,18,23,27,32,36-octa-n-butoxy-2,3-naphthalocyanine (LiNc-BuO)を用いた電子スピン共鳴 (ESR)法による腫瘍細胞における酸素濃度の測定やがん組織の酸素依存画像化が行われている^{65, 102-104)}。そこで本研究では、この ESR オキシメトリーと様々なミトコンドリア標的試薬の組み合わせにより、ミトコンドリア呼吸機能パラメーターの評価法を確立することをもう 1 つの目的とした。

また、ESR 法はセミキノンラジカル (SQ)および鉄-硫黄 (Fe-S)クラスターといたったミトコンドリアのレドックス状態を評価する上でも広く使われており、例として、心筋の虚血再灌流、心筋症、敗血症ならびにがんの指標として評価が試みられている^{10, 25, 78, 85)}。Ruuge らは虚血再灌流によって心臓組織において SQ ($g=2.004$)およびコハク酸脱水素酵素由来の Fe-S クラスタ ($g=2.02$)の ESR シグナルが上昇し、虚血再灌流を行った心臓から単離したミトコンドリアではスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)が有意に増加していたことを示した^{52, 78)}。Burlaka らの報告によると、胃がんのステージに依存して SQ の ESR シグナル強度は上昇する一方で、NADH 脱水素酵素由来の Fe-S クラスタ ($g=1.94$)に関しては減少することが明らかにされている¹⁰⁾。さらに、1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-

piperidine (TEMPONE-H)および Fe/DETC を用いたスピントラップ法による実験では、疾患のステージに伴って腫瘍組織の $O_2^{\cdot-}$ およびニトロオキシド (NO) の産生が上昇することが明らかになっている¹¹⁾。これらの報告から、ESR 分光法は細胞や組織試料において、酸化ストレスに対するエネルギー産生および ROS の漏出に関連するミトコンドリアのレドックス状態の不均衡を評価するための強力な手法として使用できることが示唆されている。放射線照射後のがん細胞におけるミトコンドリアのレドックス状態の評価を行うために、110K および 20K の低温下における ESR 測定によりミトコンドリア由来 SQ および Fe-S クラスターの測定も行った。

また、X 線照射後のがん細胞のミトコンドリア由来 ROS の上昇の役割を明らかにするために、ROS と細胞膜との反応によって生じる過酸化脂質 (F2-イソプロスタン) の測定をトリプル四重極質量分析計による液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)法を用いて行った。さらに、エネルギー状態の指標としてアデノシンヌクレオチドの測定を UV 検出器による液体クロマトグラフィー(LC/UV)法を用いて行った。

2. 材料および方法

2-1. 試薬

Rotenone、ATP、ADP ならびに AMP は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。NAD⁺ および NADH は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した。MitoSOX Red および MitoTracker Green は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から入手した。Oligomycin および antimycin A は Wako Pure Chemical Co. (大阪) から入手した。8-Iso PGF_{2α}、8-iso PGF_{2α}-d4、5-iPF_{2α}-VI ならびに 5-iPF_{2α}-VI-d11 は Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。(1-decyl) triphenyl phosphonium bromide (M10) は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) から購入した。

2-2. 細胞株および培養方法

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、ヒト大腸がん由来 SW480 細胞、ヒト肺腺がん由来 A549 細胞ならびにヒト膵臓がん由来 MIA PaCa-2 細胞の培養には、10% fetal bovine serum (FBS: Biowest, Nuaille, France) および 3.7 g/L NaHCO₃ を含む DMEM 培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。細胞はウォータージャケット式インキュベーターにて 37°C、5% CO₂ 条件下で維持した。

2-3. X 線照射および薬剤処理

X 線照射は、X-Rad iR-225 (Precision X-Ray, North Branford, CT, USA) を使用し、管電圧 200 kVp、管電流 15 mA、線源距離 650 mm、1.0 mm Al フィルターを用いて 1.37 Gy/min の線量率で照射した。X 線照射はターンテーブル上に細胞を置き、回転させながら室温で行った。M10 処理については、最終濃度が 0.5 μM になるように培地中に添加し、12 時間、37°C、5% CO₂ 条件下でインキュベートを行った。

2-4. ESR オキシメトリーによる細胞の酸素消費率の測定

酸素分圧は、細胞浮遊液に安定ラジカルを酸素プローブとして添加し、その安定ラジカルとバイラジカルである試料中の酸素分子とのスピン-スピン相互作用によるプローブのラジカルの緩和時間の変化を ESR スペクトルの変化として評価した。安定ラジカルより得られる ESR スペクトルの線幅が酸素分圧に依存することを利用し、細胞浮遊液の酸素分圧を測定した。酸素感受性安定ラジカルとして用いた LiNc-BuO は Pandian らの方法に従って以下の通り合成した^{29,71)}。アルゴン置換下のナスフラスコ内で 3.5 mg のリチウム顆粒に pentanol 7.5 mL を添加し、攪拌しながら 60°C のオイルバス中にて溶解した。この 7.5 mL の Li-pentanol 溶液と 50 mg の octa-n-butoxynaphthalocyanine (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) をアルゴン置換ナスフラスコ内で 140°C、2.5 時間スターラーによって攪拌した。三角フラスコにて上記の反応液と 150 mL の tert-butyl-methyl-ether (Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) を混合し、綿とシリカを用いてろ過した。ろ液から 40°C のエバポレーターで溶媒を除き、15 mL の hexane に溶解し、氷冷エバポレーターで濃縮した。濃縮液に 10 mL の methanol を加え、ガラスフィルターで回収したものを乾燥させ、LiNc-BuO の精製物を得た。

10 Gy の X 線を照射してから 24 時間後、細胞を回収し、PBS で 3 回洗浄した。細胞は 2 mg/mL LiNc-BuO および 2% dextran を含む無血清培地に懸濁させた。ミトコンドリア呼吸パラメーターを得るために、ミトコンドリアを標的とした種々の薬剤を処理した 4 種類の試料を測定した。1 つ目は薬剤を処理していないコントロール細胞、2 つ目はミトコンドリア ETC の ATP synthase におけるプロトンの流入を阻害する薬剤である oligomycin (Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) (1 μ M) を処理した細胞、3 つ目は 1 μ M oligomycin と脱共役剤である 1 μ M carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) を処理した細胞、4 つ目は 1 μ M oligomycin、1 μ M CCCP ならびにミトコンドリア ETC complex I の阻害剤である rotenone (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1 μ M) および complex III の阻害剤である antimycin A (1 μ M) を処理した細胞であ

る。各薬剤を処理した 7.5×10^4 個の細胞を含む $30 \mu\text{L}$ の細胞懸濁液をガラスキャピラリーに封入し、両端を塞いだ。ESR 測定については JEOL-RE X-band ESR 装置 (JEOL, Tokyo, Japan) を使用し、温度コントローラー (ES-DVT3, JEOL) を用いて 37°C に維持して測定を行った。ESR パラメーターは、マイクロ波強度 1 mW 、磁場変調周波数 100 kHz 、磁場変調振幅 $6.3 \mu\text{T}$ 、磁場掃引幅 $\pm 0.5 \text{ mT}$ とした。ESR スペクトルの線幅の解析は Win-Rad radical analyzer system (Radical Research, Tokyo, Japan) を用いて行った。酸素分圧に対する検量線の作成のために、 0 mmHg はアルゴンガス中、 38 、 76 ならびに 152 mmHg は混合比を換えた酸素とアルゴンの混合ガス中、 159.6 mmHg は大気圧条件にて ESR スペクトルを取得し、その線幅から検量線を作成した。各ミトコンドリア標的薬剤を処理することで、基礎呼吸、ATP 依存呼吸、プロトンリーク、最大呼吸、予備呼吸能ならびにミトコンドリア非依存呼吸の 6 つのパラメーターが得られた。

2-5. フローサイトメトリーによるミトコンドリア量の解析

ミトコンドリア量の評価は、ミトコンドリア膜電位非依存性の蛍光色素である MitoTracker Green FM を使用して細胞のミトコンドリアを染色することによって行った。細胞を 10% FBS および 50 nM MitoTracker Green FM を含んだ DMEM で 30 分間、 37°C でインキュベートした。その後、トリプシン処理によって細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄した。PBS に細胞を再懸濁させ、BD FACS VersTM flow cytometer (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて解析した。

2-6. ESR 法によるミトコンドリア由来の SQ ラジカルおよび Fe-S クラスターの測定

X 線照射してから 24 時間後の 3×10^7 個の細胞をトリプシン処理によって回収し、PBS で 2 回洗浄した。細胞を $300 \mu\text{L}$ の PBS に懸濁させ、natural quartz ESR tube ($\phi 5 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, Tokyo Chemical Industry Co., Tokyo, Japan) に移した。 103 K および 110 K の温度下での測定のために、スペクトルは JEOL-RE X-band ESR 装置

(JEOL)を用いて温度コントローラー (ES-DV3, JEOL)を使用して測定を行った。20K における ESR 測定は、ELEXSYS E580 (Bruker GmbH, Mannheim, Germany)を用いて行い、ER 4112HV (Bruker GmbH)によって温度を維持した。ESR パラメーターは、マイクロ波強度 2 mW、磁場変調周波数 100 kHz、磁場変調振幅 1 mT、磁場掃引幅 ± 50 mT もしくは磁場変調周波数 100 kHz、磁場変調振幅 0.63 mT、磁場掃引幅 ± 5 mT とした。

2-7. フローサイトメトリーによるミトコンドリア由来 ROS 量の測定

ミトコンドリア由来 ROS 量を測定するために、特異的プローブである MitoSOX Red を使用した。X 線を照射してから 24 時間後の HeLa 細胞をトリプシン処理によって回収し、PBS で洗浄した。その後、2 μ M MitoSOX Red を含む無血清培地で細胞を再懸濁し、37°C で 30 分間インキュベートした。その後、PBS で 1 回洗浄したものを試料とし、10,000 個の細胞について BD FACSVerser flow cytometer により解析を行った。

2-8. LC-MS/MS による細胞内アラキドン酸過酸化生成物 F2-イソプロスタンの測定

イソプロスタンは化学的に安定な脂質過酸化生成物であり、酸化ストレスによって多価不飽和脂肪酸から生成される。そのため、イソプロスタンは酸化ストレスマーカーとして広く用いられている^{49, 54}。そこで細胞の X 線による酸化ストレス応答を調べるために、LC-MS/MS を用いてアラキドン酸の酸化生成物である F2-イソプロスタン(8-iso PGF_{2 α} および 5-iPF_{2 α} -VI)を Labuschagne らの報告に基づき、いくつかの改変を加えた方法にて測定した⁴⁹。具体的には、X 線照射した HeLa 細胞をトリプシン処理によって回収し、1,000 rpm、4°C にて 5 分間遠心した。上清を除去し、PBS で細胞を洗浄した後に、1,000 rpm、4°C にて 5 分間遠心した。上清を除去後、PBS 100 μ L で細胞を懸濁させ、内部標準 (8-iso PGF_{2 α} -d4 および 5-iPF_{2 α} -VI-d11)を各 27 ng ずつ添加した。細胞を超音波処理 (5 秒 \times 3 回)し、溶解した。試料に 100 μ M 2,6-di-tert-butyl-*p*-cresol (BHT)を含んだ 3 M KOH

(3:1 v/v H₂O:MeOH)を加え、ヒートブロックにて 45°Cで 45 分間、加水分解した。試料を室温に戻し、6 N HCl で pH を 3 以下にした。試料をガラスの試験管に移し、4 ml の酢酸エチルにて 3 分間 vortex し、イソプロスタンを抽出した。20 分間氷上にて平衡化し、1.5 mL チューブに移して 3,500 g、4°Cにて 5 分間遠心分離した。上層の有機層を回収し、固相抽出を行った。固相抽出の方法は以下に示す。NH₂ Sep-Pak カートリッジ(Waters, Carlsbad, MA, USA)を 5 ml の hexane にてコンディショニングした。試料を流した後に、3 mL の溶出溶媒 (ethyl acetate : methanol : acetate, 10:85:5, v:v:v)での溶出を 2 回行った。試料を遠心濃縮後、0.15% NH₄OH: acetonitrile (90:10, v:v)にて再懸濁し、これを LC-MS/MS 試料とした。

分析には HPLC-ESI-MS/MS を用いた。移動相 A 液 (0.15% NH₄OH)および B 液(95% acetonitrile、5% methanol ならびに 0.0125% NH₄OH)を使用し、流量 0.35 mL/min およびカラムオープン温度 45°Cとし、グラジエントプログラムとして次の条件を用いた。始めに 3%の B 液を 2 分間流し、次の 8 分で B 液の濃度を 30%になるように buffer 間の濃度比を直線的に変化させ、さらに 5 分間で B 液の濃度を 95%に変化させ、3 分間濃度を維持した。カラムは逆相カラムである Wakopak Ultra C18-3 (2.0×100 mm, 3 μm, Wako Pure Chemical Co.)を用いた。質量分析計の分析条件として、エレクトロスプレーイオン化法 (electron spray ionization; ESI)ネガティブモードによるイオン化を行い、多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring; MRM)によってターゲットイオンの選択を行った。選択したプリカーサーイオン、プロダクトイオンならびにイオンの衝突解離の際の電圧は表 1 に示した。検量線は 50 nM の 8-isoPGF_{2α}-d4 および 5-iPF_{2α}-VI-d11 を含む、10、25、50、100、200 nM の 8-isoPGF_{2α}および 5-iPF_{2α}-VI の標準物質の混合物を調製し、それぞれ 5 回分析した際の平均値にて、縦軸をピーク面積、横軸を標準物質の濃度として作成した。また、この結果から検出限界 (limit of detection; LOD)および定量限界 (limit of quantitation; LOQ)を算出した。算出方法は次式に示す。

$$\text{LOD (nM)} = \frac{\text{検量線の切片の標準偏差}}{\text{検量線の傾きの平均値}} \times 3.3 \quad (1)$$

$$\text{LOQ (nM)} = \frac{\text{検量線の切片の標準偏差}}{\text{検量線の傾きの平均値}} \times 10 \quad (2)$$

データ解析および収集には、島津製作所 (Kyoto, Japan) 製トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8040、システムコントローラ CBM-20A、送液ポンプ LC-20AD、オートサンプラーSIL-20A、カラムオーブン CTO-20A を用いた。

2-9. LC/UV による細胞内 AMP、ADP、ATP、NAD⁺ならびに NADH 量の測定

細胞内の AMP、ADP、ATP、NAD⁺ならびに NADH の測定は Bornhorst らの測定法にいくつかの改変を加えた方法を用いて行った⁷⁾。HeLa 細胞に 10 Gy の X 線を照射し、X 線照射から 12 時間および 24 時間後の細胞をトリプシン処理によって回収した。PBS で洗浄した後、1.5 mL チューブに細胞を移し、314 g、4°C で 4 分間遠心した。上清を除去後、300 μL の 0.5 M KOH をペレットに加え、23 gauge 針に 10 回通した。細胞溶解液を 10% H₃PO₄ にて pH 7.0 とし、14,100 g、4°C で 30 分間遠心した。上清は逆相カラムである TSKgel ODS-80Ts (4.6×150 mm, 5 μm 東ソー, Tokyo, Japan)を用いて分離した。移動相として A 液[10 mM リン酸カリウム (pH 5.0)、3% acetonitrile、2 mM tetrabutylammonium hydroxide]および B 液[10 mM リン酸カリウム (pH 7.5)、50% acetonitrile]を用いた。UV 検出器は 260 nm、カラムオーブンは 40°C に設定した。解析には以下のグラジエントプログラムを用いた。始めに A 液を 100% で 0.8 mL/min にて 0.6 分間流し、1.5 分で B 液の濃度を 25% まで増加させ、11.4 分で 30% まで増加させた。さらに 3 分で B 液の濃度を 70% まで上げ、1.5 分で 95% にした。データ収集および解析は、東ソー・テクノシステム (Tokyo, Japan) 製 LC-8020 Model II シリーズ、データ処理装置 SC-8020、UV 検出器 UV-8020、送液ポンプ CCPM-II、オートサンプラー AS-8020、カラムオーブン CO-8020、デガッサー SD-8022 を用いた。細胞内 AMP、ADP、ATP、NAD⁺ならびに NADH の濃度はそれぞれの化合物ごとに検量線を作

成し、 1×10^6 個当たりの細胞数で定量した。エネルギー代謝の指標である Adenylate energy charge (AEC)は次式にて求めた。

$$\text{AEC} = \frac{[\text{ATP}] + 0.5[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]} \quad (3)$$

また、ミトコンドリア電子伝達系の F_0/F_1 -ATPase 阻害剤である oligomycin (2 ng/mL)は X 線照射直後に培地へ添加し、12 時間処理した後に細胞を回収した。

2-10. 統計解析

全ての結果は、少なくとも 3 回の独立した実験から平均 \pm 標準誤差 (SE)で示した。統計解析は、Student's *t* test、Dunnett ならびに Tukey の検定を用いて行った。解析ソフトについては Student's *t* test は Microsoft excel、Dunnett および Tukey の検定は JMP Pro 14 (SAS Institute Inc., Tokyo, Japan)を使用した。 $P < 0.05$ で統計的に有意であるとみなした。

表 1 各化合物の MRM パラメーター

Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Q1 Pre Bias (V)	Collision Energy (V)	Q3 Pre Bias (V)
8-iso PGF _{2α}	353.40	193.10	10	26	19
8-iso PGF _{2α} -d4	357.40	313.20	18	20	22
5-iPF _{2α} -VI	353.40	115.10	17	23	24
5-iPF _{2α} -VI-d11	364.30	115.15	30	25	19

3. 結果

3-1. LiNc-BuO を用いた ESR オキシメトリー法によるミトコンドリア呼吸機能の評価法の確立

ミトコンドリアはエネルギーを産生する際に酸素を消費するため、細胞内の酸素消費率はミトコンドリアエネルギー代謝の指標となる。酸素プローブとして用いた LiNc-BuO は安定なフリーラジカル化合物であり、培地中に溶け込んでいるバイラジカルである酸素と相互作用することによって緩和時間が変化するため、酸素濃度に比例して ESR スペクトルの線幅が広がる特徴を持つ⁷¹⁾。当研究室のこれまでの研究において既に、この LiNc-BuO (図 2A)を用いた ESR 測定により、細胞の単純な酸素消費率の評価を行ってきた^{102, 104)}。37°Cの条件下で LiNc-BuO を含む培地に HeLa 細胞を懸濁した試料の ESR 測定を行うと、ESR スペクトルの線幅は時間経過ごとに小さくなっていくことが観察された (図 2B)。これは細胞内で酸素が消費されることにより、密封されたキャピラリー中の酸素濃度が徐々に低下していったことを示している。本研究ではさらにミトコンドリアの詳細な呼吸パラメーターを得るために、oligomycin、oligomycin+CCCP ならびに oligomycin+CCCP+rotenone/antimycin A を加えた細胞の酸素消費率を評価した。経過時間毎の培地中の pO₂ (mmHg)は、図 2C に示した検量線に従って ESR スペクトルの線幅から算出した。コントロール細胞 (5.35±1.03 mmHg/min) に対して、oligomycin を加えると、ATP 産生に依存した呼吸が阻害されるため酸素消費率は減少し (1.45±0.20 mmHg/min)、そこに CCCP を加えるとミトコンドリア ETC のプロトン勾配の脱共役によって酸素消費率が上昇した (10.1±1.56 mmHg/min) (図 3A)。さらに rotenone および antimycin A を加えると、ミトコンドリア ETC の complex I および II が阻害されるため、酸素の消費はほとんど見られなくなった (0.42±0.06 mmHg/min)。すでに細胞外フラックスアナライザーで確立されている方法に従って、基礎呼吸、ATP 依存呼吸、プロトンリーク、最大呼吸、予備呼吸能ならびにミトコンドリア非依存呼吸のパラメーターを算出した (図 3B)。

3-2. X線照射およびM10処理ががん細胞の酸素消費率およびミトコンドリア呼吸パラメーターへ与える影響の評価

当研究室の以前の研究では、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、ヒト肺腺がん由来 A549 細胞、ヒト胃癌由来 MKN45 細胞、ヒトメラノーマ由来 MeWo 細胞ならびにマウス線維芽細胞由来 NIH3T3 細胞への X 線照射後 12 時間から 24 時間後に酸素消費率が上昇した¹⁰²⁾。一方で、lipophilic TPP⁺誘導体の M10 はミトコンドリア ETC の阻害剤として働き、HeLa 細胞および A549 細胞の酸素消費を抑制した^{90,104)}。Trendeleva らは別の lipophilic TPP⁺誘導体 (M12)がミトコンドリア ETC の脱共役剤として作用することを示している⁸⁹⁾。これらの化合物のミトコンドリア機能への影響をさらに明らかにするために、M10 を処理した際のミトコンドリア呼吸パラメーターの評価を行った。図 4A に非照射 (白カラム)、10 Gy の X 線照射から 24 時間後 (黒カラム) ならびに 0.5 μM M10 処理から 12 時間後 (ドットカラム) の細胞の OCR の結果を示した。OCR の値から、ミトコンドリア呼吸パラメーターを算出した (図 4B)。X 線照射後の HeLa 細胞では、基礎呼吸、ATP 依存呼吸、プロトンリーク、最大呼吸ならびに予備呼吸能が有意に上昇した。このことから、X 線照射は細胞当たりのミトコンドリア ETC 機能を上昇させることが示唆された。また、HeLa 細胞と同様の放射線応答が他のがん細胞においても起こるのかを確かめるために、ヒト大腸がん由来 SW480 細胞、ヒト肺腺がん由来 A549 細胞ならびにヒト膵臓がん由来 MIA PaCa-2 細胞を用いて同様に X 線照射後のミトコンドリア呼吸パラメーターの評価を行った (図 4C)。細胞の種類によって程度の差はあったものの、SW480 細胞、A549 細胞ならびに MIA PaCa-2 細胞においても HeLa 細胞と同様に X 線照射から 24 時間後にミトコンドリア呼吸パラメーターは上昇傾向にあることが示された。このことから、今回評価を行った 4 種のがん細胞では X 線照射後にミトコンドリア ETC が活性化することが示唆された。以前の研究では、ミトコンドリア膜電位、ATP 産生ならびにミトコンドリア由来スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)産生が X 線照射後に上昇することも示していることから¹⁰²⁾、酸素消費率の上昇は X 線照射後のミトコンド

リア機能の活性化と関連していることが示唆された。一方で、M10 を処理した細胞では、基礎呼吸および予備呼吸能が減少傾向にあったことから、M10 はミトコンドリア ETC を阻害することが示唆された。

いくつかの研究グループが細胞周期の G2/M 期の中に細胞内のミトコンドリア量が最大になること実証していることから^{34, 40, 60}、本研究において細胞内のミトコンドリア量が X 線照射および M10 処理後に変化している可能性がある。そこで次に、X 線照射もしくは M10 処理後の細胞内のミトコンドリア量が変化しているかどうかを明らかにするために、HeLa 細胞を用いて MitoTracker Green FM を用いてフローサイトメトリーによる膜電位に依存しないミトコンドリア膜量すなわちミトコンドリア量の評価を行った。図 5A にフローサイトメトリーの代表的なヒストグラムを示した。その結果、コントロール細胞と比較して X 線照射後の細胞ではミトコンドリア量が有意に上昇することが明らかになった。一方で、M10 を処理した細胞ではミトコンドリア量に変化は見られなかった。コントロールの細胞のフローサイトメトリー測定から得られたミトコンドリア量の平均値と比較して、X 線照射および M10 処理した細胞のミトコンドリア量はそれぞれ 1.85 倍および 0.94 倍であった (図 5B)。この結果から、以前の当研究室の報告と同様に¹⁰²、X 線照射による G2/M 期チェックポイントの活性化によって、細胞当たりのミトコンドリア量が増加したことが示唆された。

次に、放射線照射後に上昇した OCR がミトコンドリア量の増加によるものであるのかもしくはミトコンドリア呼吸鎖の酵素の活性化によるものかを確認するために、図 4A および B の OCR の値を図 5B のミトコンドリア量で補正した (X 線照射および M10 処理の値にそれぞれ 1.85 および 0.94 を掛けた)。図 5C および D に示したように、細胞当たりのミトコンドリア量で補正を行うと、X 線照射による OCR およびミトコンドリア呼吸パラメーターの上昇が見られなくなった。一方で、OCR の M10 に対する応答については変化はなかった。以上の結果から、HeLa 細胞の放射線照射後のミトコンドリア ETC の活性化は、細胞当たりのミトコンドリア量の増加に起因していることが示された。当研究室の以前

の研究では、A549 細胞においても X 線照射後にミトコンドリア量が増加することを報告しており¹⁰²⁾、HeLa 細胞のみならず、他のいくつかのがん細胞種における X 線照射後のミトコンドリア ETC の活性化についてもミトコンドリア量の増加による現象であることが示され、X 線によるこの応答はがんの種類に依存せず、固形腫瘍に普遍的なものであることが示唆された。

3-3. HeLa 細胞の低温条件下における ESR 測定

1960 年代に、多くの研究者が 100K 程度の低温下における ESR 測定による正常組織および腫瘍細胞のミトコンドリア SQ の検出を報告している^{17, 66, 88, 93)}。その後の様々な報告により、細胞の SQ に由来する ESR シグナルが、腫瘍増殖、ウイルス形質転換、敗血症、虚血、拡張型心筋症および電磁放射のような病理的条件下のミトコンドリア ETC 活性のバイオマーカーとして使用できる可能性が示されてきた^{9, 18, 25, 26, 85, 110)}。本研究では、HeLa 細胞の SQ ラジカルの解析についてミトコンドリアを標的とした種々の薬剤を用いて行い、さらに、SQ ラジカルに対する X 線照射の影響を評価した。

過去の ESR 研究において、正常組織およびそれらから分離された細胞において $g=1.94$ および $g=2.004$ のシグナルを含む同様の ESR スペクトルが報告されており⁸⁷⁾、本研究においても、マウスの心臓、肝臓組織およびウシの心臓から単離したミトコンドリアにおいて $g=2.004$ および $g=1.941$ の信号が確認できた (図 6)。103K の温度下において 3×10^7 個の細胞の ESR 測定を行ったところ、組織や単離したミトコンドリアと同様に $g=1.941$ および $g=2.004$ の位置にシグナルが見られた (図 7A, 上)。同様の ESR 信号が HeLa 細胞、A549 細胞ならびに胃がん (T2-4、N0-2、M0-1 ならびに G1-G4 細胞) を始めとしたがん細胞において報告されている^{10, 41, 81)}。Emanuel は、種々のがん細胞において $g=2.004$ 付近の ESR シグナルは主にミトコンドリアに局在する SQ によるものであり、 $g=1.94$ のシグナルは硫黄化合物を含むミトコンドリアの非ヘム鉄に由来するシグナルであると報告している²⁶⁾。

過去の研究では、大腸菌のミトコンドリア SQ 由来および 77K でのウシの心臓のミトコンドリア SQ 由来の $g=2.004$ の信号は $10 \mu\text{W}$ 以下の低いマイクロ波強度で飽和が見られ、half saturation ($P_{1/2}$)は $10\sim 100 \mu\text{W}$ であることが示されている^{20, 86)}。植物、細菌ならびに副腎のミトコンドリアにおける $12.5\sim 20.7 \text{ K}$ の温度下の Ferredoxin-type Fe-S クラスタ (2Fe-2S)は $P_{1/2}$ の値は $0.1\sim 0.4 \text{ mW}$ 以下の範囲であることが報告されている⁷⁷⁾。以上の報告から、Fe-S クラスタの緩和時間は、SQ ラジカルと比較して短いことが示されている。実際に、 $g=2.004$ の信号の $P_{1/2}$ は 103K で 0.04 mW であり、 $g=1.941$ の信号の $P_{1/2}$ は 103K では 0.35 mW 、 20K では 0.22 mW であった (図 8A および B)。以上のことから、HeLa 細胞で見られた $g=2.004$ および $g=1.941$ のシグナルはそれぞれ、ミトコンドリアの SQ ラジカルおよびミトコンドリアの ferredoxin-type Fe-S クラスタ由来であることが同定された。

次に、 10 Gy の X 線を照射してから 24 時間後の 3×10^7 個の HeLa 細胞の ESR 測定を 103K の温度下で行った (図 7A, 下)。各 ESR 信号のピークの高さを測定したところ、 $g=2.004$ の信号強度は X 線照射後に有意に上昇した (図 7C)。Jong および Albracht²⁰⁾ および Vinogradov^{8, 48)} らは、NADH もしくは succinate によるウシ心臓のサブミトコンドリア粒子の呼吸鎖の活性化によって、 $g=2.004$ の ESR シグナル強度が上昇し、rotenone によってこの応答が抑制されることを示していることから、SQ ラジカルはミトコンドリア ETC における中間体として機能していることが示唆されている。 $g=2.004$ の信号の放射線照射による上昇とミトコンドリア機能との関係性を明らかにするために、X 線照射後の HeLa 細胞にミトコンドリア ETC complex I の阻害剤である rotenone を処理し、インキュベートした。その結果、X 線照射による $g=2.004$ のシグナルの上昇は、rotenone 処理によって完全に見られなくなった (図 7B および C)。非照射の HeLa 細胞では、rotenone 処理によって $g=2.004$ の信号強度が約半分になったことから、 $g=2.004$ のシグナルは部分的に complex I に由来していることが示された。さらに、X 線照射と rotenone 処理を併用した細胞のシグナル強度は、rotenone を処理した非照射細胞

のシグナル強度と同様の値を示したことから、X線照射によって増加するSQはミトコンドリアETC機能と深く関連していることが示された。

一方で、 $g=1.941$ のESRシグナルの強度はX線照射後に変化は見られなかった(図7A)。しかし、 $g=1.941$ のシグナル強度を103Kの温度下では緩和時間が短く、線幅が7.5 mTと広すぎるため、定量において正確ではない可能性がある。より正確なデータを得るために、次にHeLa細胞を20Kの温度下において緩和時間を長くした条件で測定を行った(図9A)。20Kにおける $g=1.941$ のシグナルの線幅は4.1 mTであり、さらにS/N比も向上していた。20Kの温度下でHeLa細胞を測定した際も、X線照射後に $g=1.941$ のシグナル強度に変化は見られなかったことから(図9B)、X線照射後にSQラジカルは増加するが、Fe-Sクラスターは変化しないことが示された。

さらに、本研究で観測されたSQラジカルの信号がミトコンドリア由来であることを確証づけるために、ヒト網膜色素上皮由来RPE-1細胞のミトコンドリアDNAが欠損したRPE-1 ρ^0 細胞の $g=2.004$ のシグナルの放射線応答について評価を行った。図10AにRPE-1細胞の非照射(上)およびX線照射後(下)のESRスペクトルを示した。その結果、HeLa細胞と同様にRPE-1細胞においてもX線照射後に $g=2.004$ のシグナル強度が上昇した。図10Bには、RPE-1 ρ^0 細胞の非照射(上)およびX線照射後(下)のESRスペクトルを示した。RPE-1細胞とは対照的に、RPE-1 ρ^0 細胞ではX線照射後も $g=2.004$ のシグナル強度に変化は見られなかった。また、非照射のRPE-1細胞(図10A上)およびRPE-1 ρ^0 細胞(図10B上)の $g=2.004$ のシグナルを比較すると、RPE-1 ρ^0 細胞のシグナルは半分以下になっていることが明らかになった。これらの結果から、 $g=2.004$ のSQラジカルの信号はミトコンドリアに関連したシグナルであり、さらにミトコンドリアETCにおける電子の流れはX線照射後に活発になっている事が示唆された。最後に、X線照射後に上昇した $g=2.004$ のシグナル強度に対するM10の影響の評価を行った。図11に示した様に、M10はHeLa細胞の非照射の信号強度を減少させ、X線照射後の増加についても大幅に減衰させた。

3-4. X線照射のミトコンドリア由来 ROS 産生への影響の評価

ミトコンドリア由来の ROS は、ミトコンドリア ETC complex I および III から漏れ出した電子と酸素が反応することによって産生されることが過去に報告されているため^{50,80)}、X線照射による ETC からの過剰な電子の漏れ出しが $O_2^{\cdot-}$ を含む細胞内 ROS レベルの増加を引き起こす可能性がある。そのため、ミトコンドリア $O_2^{\cdot-}$ 感受性プローブである MitoSOX Red を用いてフローサイトメトリーにより X線照射後の細胞のミトコンドリア由来 ROS の評価を行った。X線照射から 24 時間後の細胞では、非照射の細胞と比較すると、MitoSOX Red の蛍光強度は有意に上昇した (図 12A, B)。さらに、rotenone を処理した細胞では、コントロールの細胞よりも MitoSOX Red の蛍光強度が上昇し、X線照射による MitoSOX Red の蛍光強度の増加をさらに増幅させた (図 12B)。これらの結果から、X線照射によってミトコンドリア ETC の活性化に伴ってミトコンドリア由来の ROS 産生が上昇することが示唆された。

3-5. X線照射が細胞内 F2-イソプロスタニンに与える影響の評価

アラキドン酸は哺乳類細胞において主な多価不飽和脂肪酸であり、細胞膜の維持に重要な役割を担っている。イソプロスタンはプロスタグランジンに構造的に類似した化合物であり、ROS とアラキドン酸が反応することによってアラキドン酸の過酸化物として生体内で非酵素的に形成される⁴⁹⁾。本研究では、X線照射によって増加した ROS の細胞内の脂質過酸化への影響について調べるために、アラキドン酸の過酸化生成物である F2-イソプロスタニン量の評価を LC-MS/MS によって行った。イオンの選択は MRM によって行い、8-iso PGF_{2α} および 5-iPF_{2α}-VI のそれぞれの標準物質のプリカーサーイオンおよび優位なフラグメントイオンを図 13A および B (共に上段) に示した。また、8-iso PGF_{2α} および 5-iPF_{2α}-VI のクロマトグラムも図 13A および B (共に下段) に示した。それぞれの標準物質の溶出時間は、8-iso PGF_{2α} は 7.8 分、5-iPF_{2α}-VI は 8.2 分であり、細胞試料においてはこれらの溶出時間から 8-iso PGF_{2α} および 5-iPF_{2α}-VI のピーク

を決定した。図 13C は非照射の細胞から得られた細胞内の 8-iso PGF_{2α} (上段) および内部標準物質である 8-iso PGF_{2α}-d4 (下段) のクロマトグラムを示しており、図 13D は非照射の細胞から得られた細胞内の 5-iPF_{2α}-VI (上段) および内部標準物質である 5-iPF_{2α}-VI-d11 (下段) のクロマトグラムを示している。図 13E は X 線照射から 12 時間もしくは 24 時間後の細胞内 8-iso PGF_{2α} 量を示しており、8-iso PGF_{2α} 量は X 線照射から 24 時間後まで変化は見られなかった。図 13F は X 線照射から 12 時間もしくは 24 時間後の細胞内 5-iPF_{2α}-VI 量を示しており、8-iso PGF_{2α} 量と同様に 5-iPF_{2α}-VI 量も X 線照射から 24 時間後まで変化は見られなかった。図 13G はピーク面積から 8-iso PGF_{2α} 量を定量したグラフであり、細胞内 8-iso PGF_{2α} 量は X 線照射から 24 時間後も非照射細胞と比較して有意な変化はなかった。しかし、rotenone を処理した細胞ではコントロール細胞と比較して 8-iso PGF_{2α} 量は有意に上昇した。同様の傾向が 5-iPF_{2α}-VI でも観察された (図 13H)。これらの結果から、X 線照射によって誘導された細胞内 ROS 量の増加は細胞膜の酸化的損傷にはそれ程影響していないことが示唆された。

3-6. X 線照射の細胞内 AMP、ADP、ATP、NAD⁺ならびに NADH に対する影響の評価

X 線照射が細胞内のエネルギー代謝に与える影響を評価するために、細胞内 AMP、ADP、ATP、NAD⁺ならびに NADH の定量を HPLC 法にて行った。X 線非照射の HeLa 細胞の代表的な HPLC クロマトグラムを図 14A(上段)に示す。NAD⁺、AMP、NADH、ADP ならびに ATP の溶出時間は各標準サンプルの測定により決定し、それぞれ 6.1 分、11.4 分、16.9 分、21.0 分ならびに 23.3 分であった。10 Gy の X 線を照射してから 24 時間後の細胞のクロマトグラム (図 14A, 下段)では、非照射の細胞と比較して、AMP、ADP ならびに ATP のピークの高さが明らかに上昇していた。X 線照射から 12 時間および 24 時間後の HeLa 細胞における細胞内 AMP、ADP、ATP、NAD⁺ならびに NADH 量を図 14B および D に示した。細胞内 ATP 量は照射から 12 時間後に上昇し始め、ATP、ADP ならびに AMP 量

は照射から 24 時間後に非照射細胞と比較して有意に増加した (図 14B)。一方で、AEC は照射から 12 時間および 24 時間後も非照射の細胞と比べて変化は見られなかった(図 14B)。また、ミトコンドリアの ATP 合成酵素の H⁺輸送チャンネルを阻害する oligomycin を細胞に処理すると、非照射細胞の ATP 量に変化は見られなかったものの、X 線照射による ATP の増加が抑制されることが示された (図 14C)。また、細胞内 NAD⁺は X 線照射から 24 時間後に有意に増加したが、NADH は有意な変化は見られなかった (図 14D)。しかし、NAD⁺/NADH は X 線照射から 24 時間後まで増加傾向にはあったものの有意な変化は見られなかった(図 14D)。以上の結果から、ミトコンドリア ETC の F₀F₁-ATPase/ATP synthase に依存した ATP 産生は NAD⁺量の増加に伴って X 線照射後に上昇することが示された。

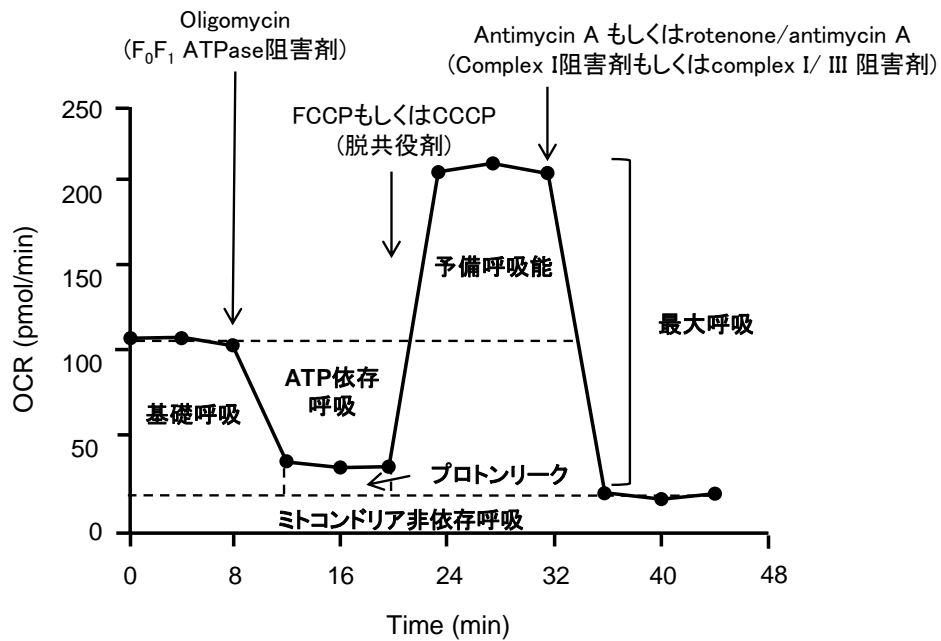


図1. 細胞外フラックスアナライザーを用いた蛍光測定による酸素消費率 (OCR)評価におけるミトコンドリア呼吸パラメーターの定義。ミトコンドリアストレス評価は、oligomycin (F₀F₁ ATPase阻害剤)、FCCPもしくはCCCP (脱共役剤)ならびにrotenone/antimycin A (complex Iおよびcomplex III阻害剤)といったミトコンドリア電子伝達系を標的とする試薬の連続的かつ累積的な添加によって行われる。

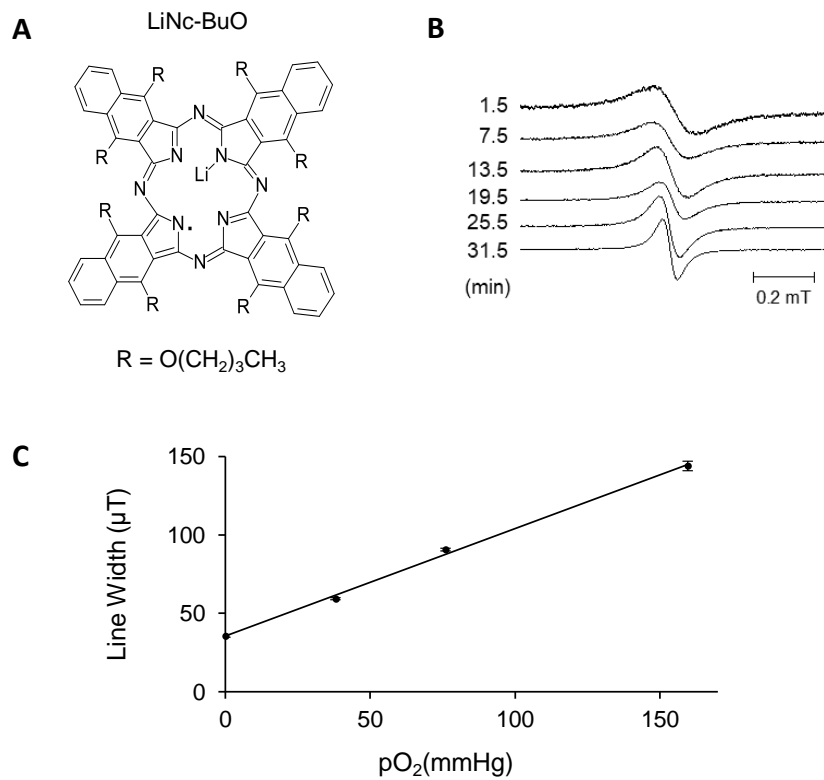


図2. 細胞レベルにおけるESRオキシメトリー法

(A) Lithium 5,9,14,18,23,27,32,36-octa-n-butoxy-2,3-naphthalocyanine (LiNc-BuO)の構造。
 (B) LiNc-BuO (2 mg/mL)、HeLa細胞 (7.5×10^4 cells/tube)ならびに5% デキストランを含む培地から得られた代表的なESRスペクトル。測定は3分間隔で1.5~31.5分まで行った。(C) LiNc-BuOを含む培地から得られたESRスペクトルの線幅 (μT)に対する培地中の pO_2 をプロットした検量線。データは平均 \pm SEで示した。近似曲線の式: 線幅 (μT)= $0.685 \times \text{pO}_2$ (mmHg)+35.5は最小二乗法によって得られ、相関係数 (R^2)は0.998であった。

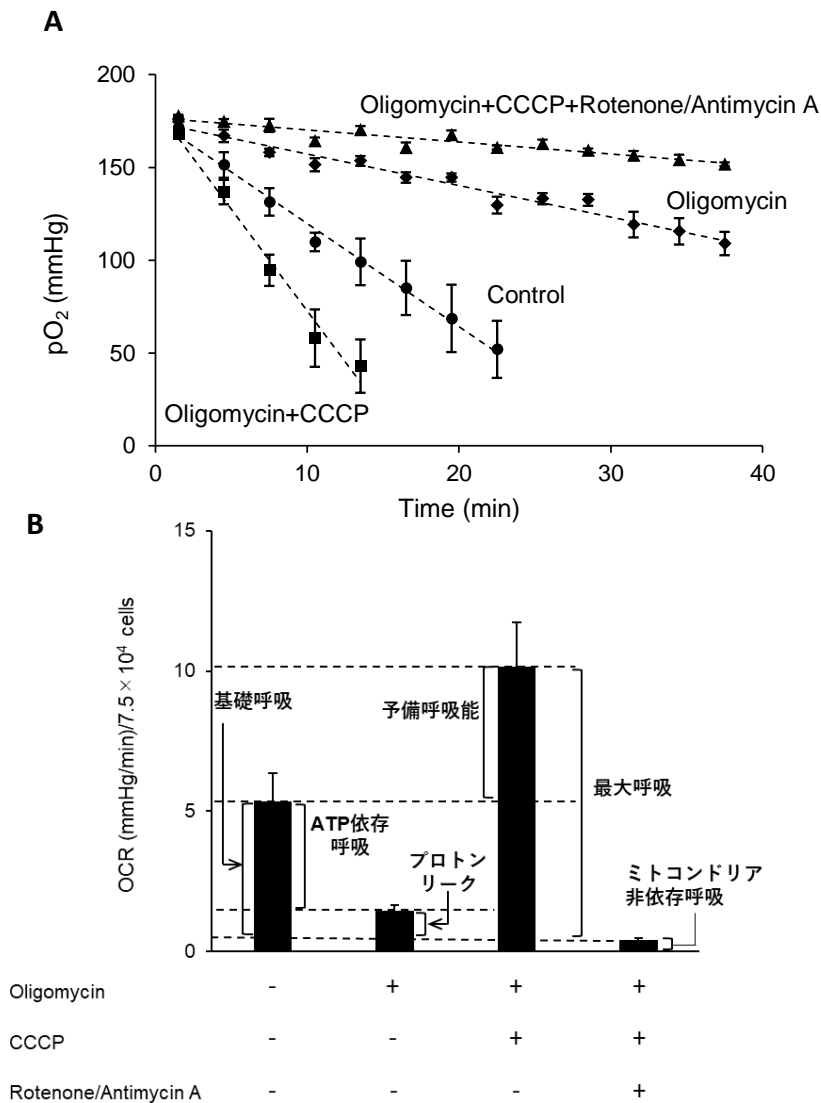
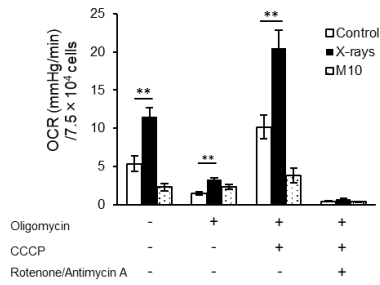
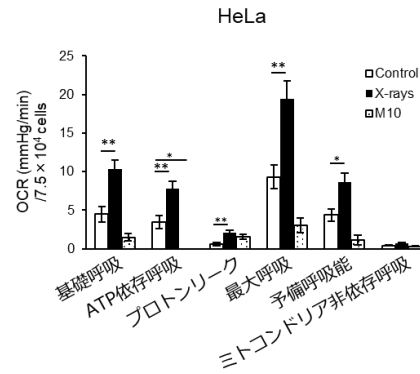
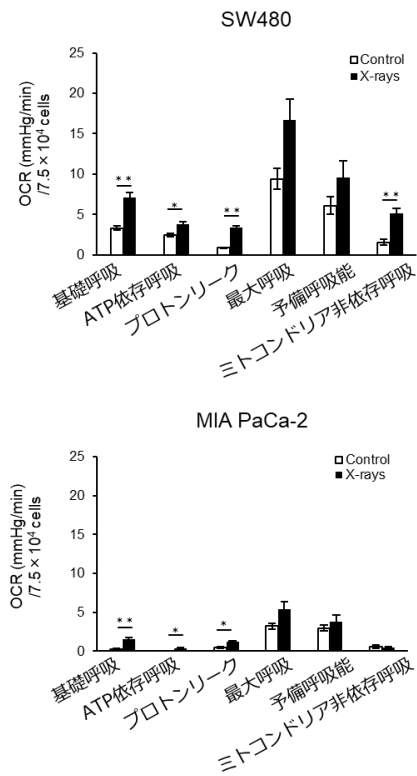


図3. ESRオキシメトリー法によるミトコンドリア呼吸パラメーターの決定

(A) HeLa細胞における pO_2 の時間経過ごとの変化。薬剤未処理の細胞 (●: Control)、 $1 \mu M$ oligomycinを添加した細胞 (◆: Oligomycin)、 $1 \mu M$ oligomycin+ $1 \mu M$ CCCPを処理した細胞 (■: Oligomycin+CCCP)ならびに $1 \mu M$ oligomycin+ $1 \mu M$ CCCP+ $1 \mu M$ rotenone/ $1 \mu M$ antimycin Aを処理した細胞 (▲: Oligomycin+CCCP+Rotenone/Antimycin A)の4試料の測定を行った。(B) (A)の直線の傾きから算出したOCR (mmHg/min)。データは3回の独立した実験の平均±SEで示した。各ミトコンドリア呼吸パラメーターは細胞外フラックスアナライザーの方法に従って算出した。

A**B****C****図4. ミトコンドリア呼吸パラメーターへのX線およびM10の影響**

(A) ミトコンドリアを標的とした薬剤を添加した際のHeLa細胞のOCR。白: X線および薬剤未処理コントロール細胞、黒: 10 GyのX線を照射してから24時間後の細胞、ドット: 0.5 μ M M10を処理してから12時間後の細胞。データは独立した3回の実験の平均 \pm SEで示した。Dunnettの検定を行い、統計的有意差は* p < 0.05, ** p < 0.01で示した。(B) (A)から得られたミトコンドリア呼吸パラメーター。(C) SW480細胞、A549細胞ならびにMIA PaCa-2細胞のミトコンドリア呼吸パラメーター。白: X線非照射細胞、黒: 10 GyのX線を照射してから24時間後の細胞。データは独立した3回の実験の平均 \pm SEで示した。Student's t testを行い、統計的有意差は* p < 0.05, ** p < 0.01で示した。

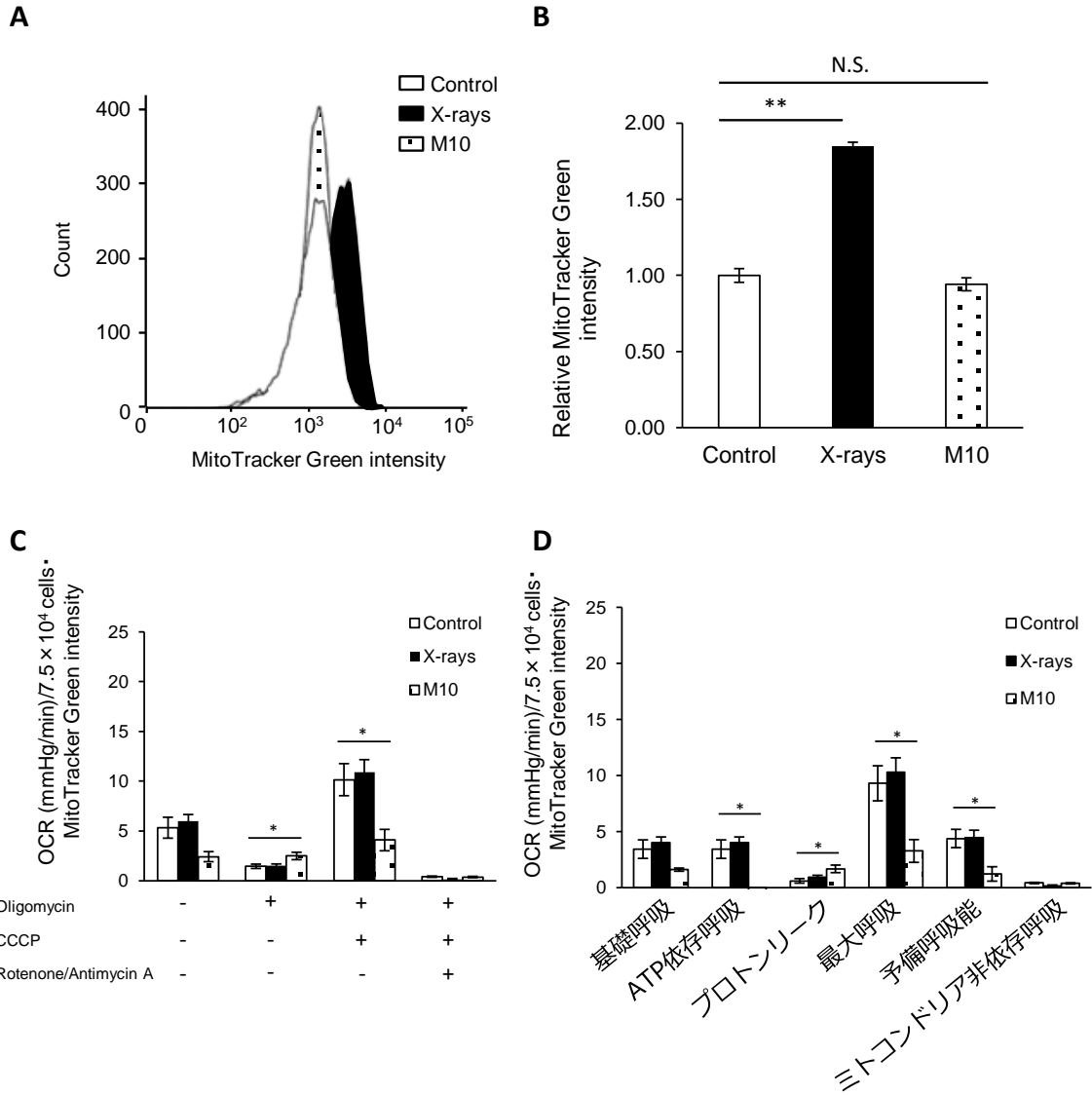


図5. X線照射もしくはM10処理後のHeLa細胞のミトコンドリア呼吸パラメーターとミトコンドリア量の関係

(A)フローサイトメトリーの代表的なヒストグラム。ミトコンドリア量はHeLa細胞をMitoTracker Greenで染色し、フローサイトメーターによって測定した。X線照射から24時間後もしくは0.5 μ M M10処理から12時間後の細胞の評価を行った。(B)各細胞のミトコンドリア量の相対値。データは3回の独立した実験の平均 \pm SEで示した。統計はDunnnettの検定を行った。N.S.: not significant, ** $P < 0.01$ (B) (A)から得られたミトコンドリア呼吸パラメーター。(CおよびD)図4Aおよび4Bの値を(B)に示したMito Tracker Greenの相対量でそれぞれ補正した際のOCRおよびミトコンドリア呼吸パラメーター。

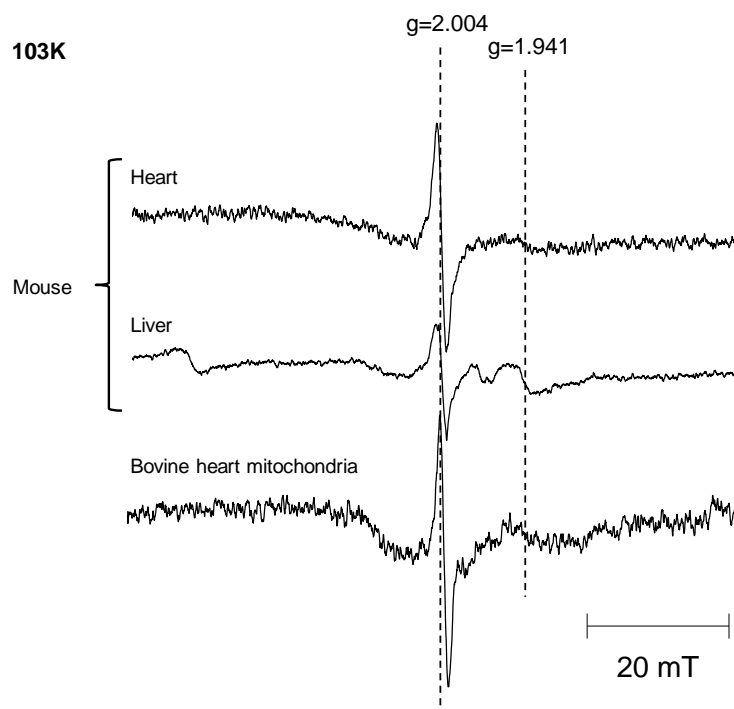


図6. 103Kにおけるマウスの心臓、肝臓組織ならびにウシの心臓から単離したミトコンドリアから得られたESRスペクトル。

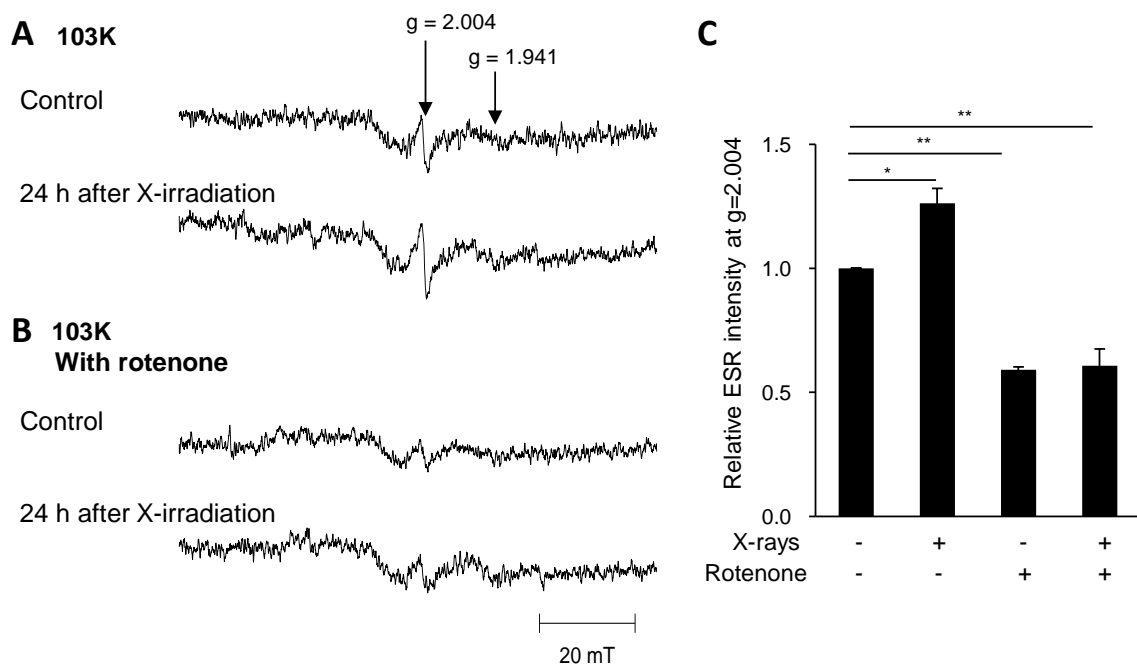


図7. ESR法によるHeLa細胞におけるX線のミトコンドリア電子伝達系関連物質に対する影響の評価

(A) 非照射(上)および10 GyのX線を照射してから24時間後(下)のHeLa細胞(3×10^7 個)から得られた代表的なESRスペクトル。ESR測定は103Kの温度下で行った。矢印は $g=2.004$ および $g=1.941$ のシグナルの位置を示している。(B) $g=2.004$ (SQ)および $g=1.941$ (Fe-Sクラスター)のシグナルに対するrotenoneの影響。非照射(上)および10 GyのX線を照射してから24時間後(下)の細胞にrotenoneを処理した際の代表的なESRスペクトル。Rothenone処理については、最終濃度が $1 \mu\text{M}$ になるようにrotenoneをX線照射直後の細胞の培地に添加し、24時間インキュベートした。ESR測定は103Kの温度下で行った。(C) 10 GyのX線照射をしてから24時間後のHeLa細胞から得られた $g=2.004$ のESRシグナルの信号強度の相対値。Rothenone処理については(B)と同様に行った。実験は独立した3回の結果の平均 \pm S.E.を表しており、Dunnettの検定を行い、統計的有意差は $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ で示した。

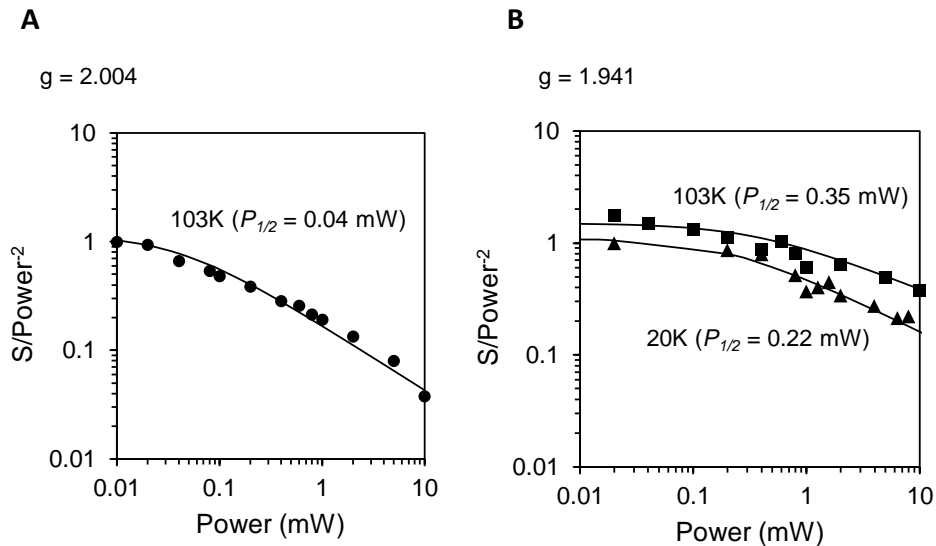


図8. HeLa細胞における $g=2.006$ (A) および $g=1.941$ (B) のESRシグナルの緩和挙動。ESR測定は0.01～10 mWのマイクロ波強度で行った。グラフは \log (マイクロ波強度)に対する \log (シグナル強度/マイクロ波強度^{0.5})でプロットした。PadmakumarおよびBamerjee [J. Biol. Chem., 270:9295-9300, 1995]が示したESRシグナル強度(S)はマイクロ波強度 (P)に関連しているという $\log S/(P)^{0.5} = \log A/(1+P/P_{1/2})^{0.5b}$ の式で表され、ここで $P_{1/2}$ およびAはそれぞれ半飽和マイクロ波強度および基準化因子を示す。bは不均一性パラメーターを示し、不均一な広がり1.0から均一な広がり2.0まで変化する。 $P_{1/2}$ の値は実験による飽和データ(入射マイクロ波強度の関数としてのESR信号強度)をこの式に当てはめることにより決定した。最小二乗法によるデータのフィッティングは、Microsoft Excelによって行った。

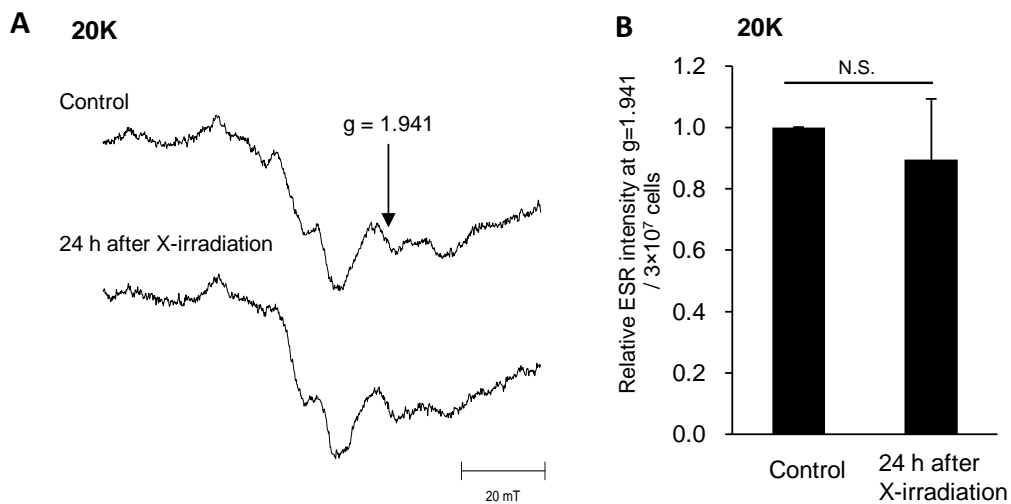


図9. 20Kにおけるミトコンドリア電子伝達系関連物質のESR法による測定

(A) 非照射(上)および10 GyのX線を照射してから24時間後(下)のHeLa細胞から得られた代表的なESRスペクトル。ESR測定は20Kの温度下で行った。矢印は $g=1.941$ のシグナルの位置を示している。(B) 10 GyのX線照射をしてから24時間後のHeLa細胞から得られた $g=1.941$ のESRシグナルの信号強度の相対値。実験は独立した3回の結果の平均 \pm S.E.を表している。統計処理はStudent's *t* testを行った。N.S.: not significant

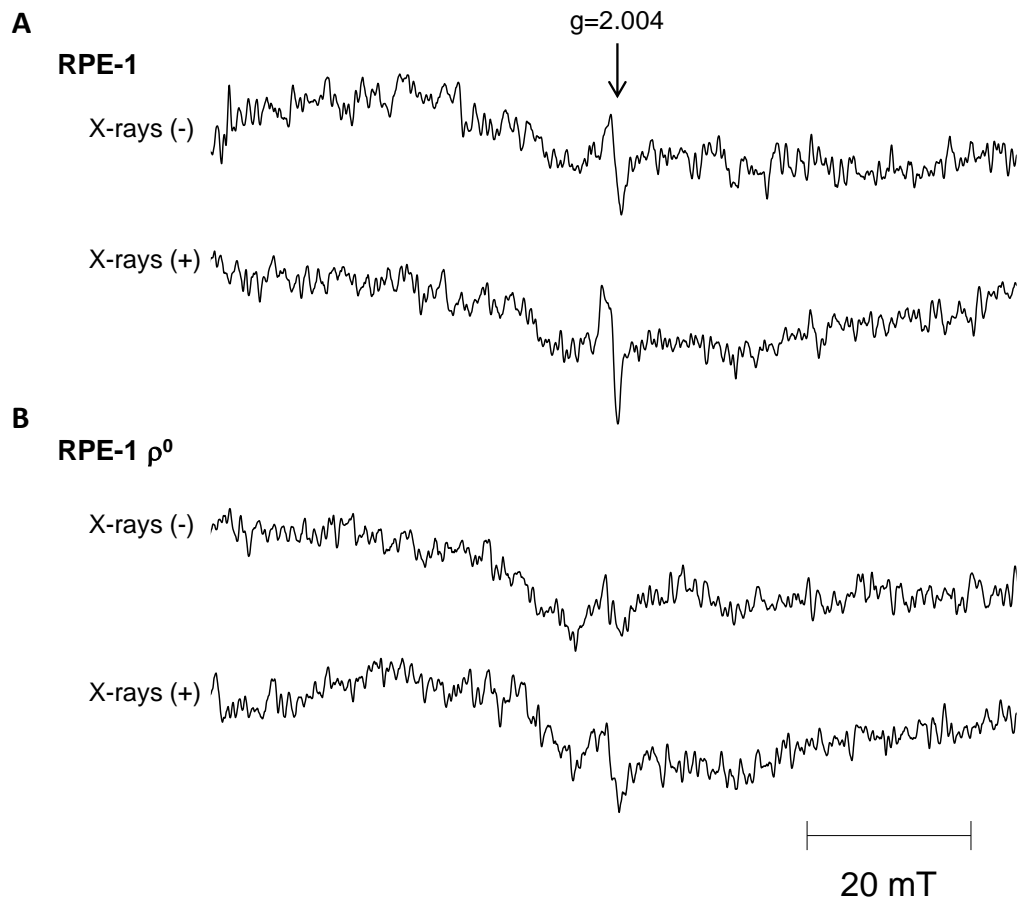


図10. (A) RPE-1細胞および(B) RPE-1 ρ^0 細胞から得られた非照射(上)およびX線照射後(下)のESRスペクトル。細胞に10 GyのX線を照射してから24時間後に110Kの温度でESR測定を行った。

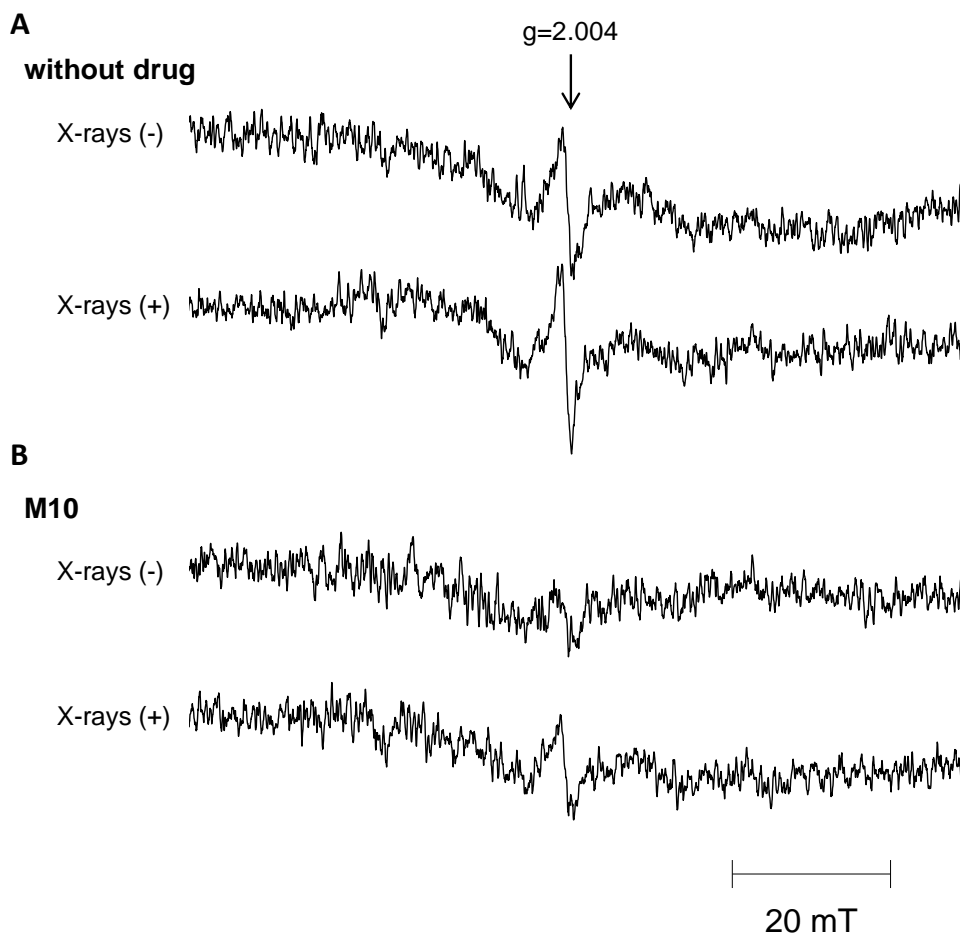


図11. HeLa細胞へM10を処理した際のESRスペクトル

非照射(上)および10 GyのX線を照射してから24時間後(下)のESRスペクトル。(A)薬剤無処理および(B)0.5 μ M M10を12時間処理した細胞を110Kの温度下でESR測定した。

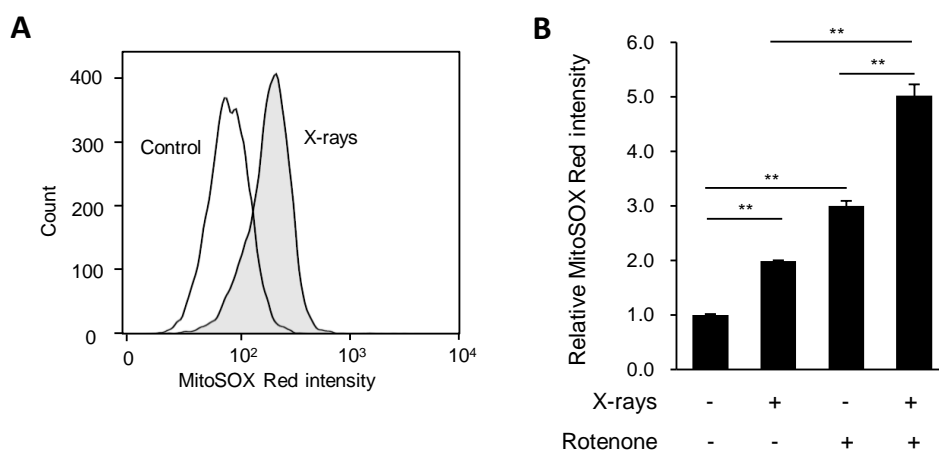


図12. X線がHeLa細胞のミトコンドリア由来ROSレベルに与える影響の評価

(A)ミトコンドリア由来のROSレベルはMitoSOX Redを用いたフローサイトメトリーによって評価した。X線非照射 (Control)および10 GyのX線を照射してから24時間後の細胞 (X-rays)の代表的なフローサイトメトリーの図を示した。(E)X線非照射もしくは照射後のHeLa細胞のミトコンドリア由来ROSレベルの相対値を示したグラフ。Rotenone処理については最終濃度が1 μ Mになるようにrotenoneを培地に添加し、X線を照射後に細胞に処理し、12時間インキュベートした。データは平均 \pm S.E.を表しており、Tukeyの検定を行い、統計的有意差は** $p < 0.01$ で示した。

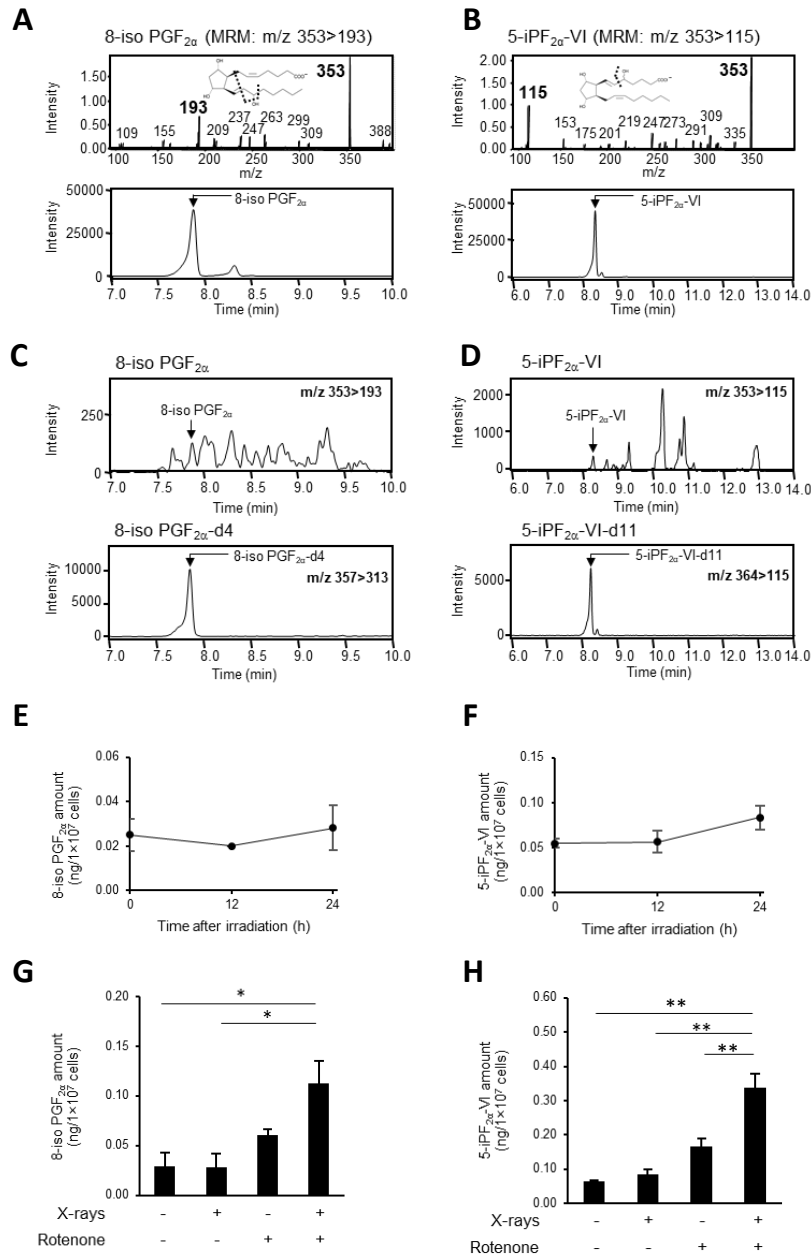


図13. LC-MS/MSを用いたHeLa細胞の細胞内F₂-イソプロスタンへのX線の影響の評価

(A) 8-iso PGF_{2α} の標準試料のプロダクトイオンスペクトル(上)とMRMクロマトグラム(*m/z* 193)(下)。(B) 5-iPF_{2α}-VI の標準試料のプロダクトイオンスペクトル(上)とMRMクロマトグラム(*m/z* 115)(下)。(C) HeLa細胞のLC-MS/MS分析を行い、得られた細胞内8-iso PGF_{2α} (上)およびHeLa細胞試料に添加した内部標準 (8-iso PGF_{2α}-d4)(下)のMRMクロマトグラム。(D) HeLa細胞のLC-MS/MS分析を行い、得られた細胞内5-iPF_{2α}-VI (上)およびHeLa細胞試料に添加した内部標準 (5-iPF_{2α}-VI-d11)(下)のMRMクロマトグラム。(EおよびF) X線照射後のHeLa細胞における時間経過による8-iso PGF_{2α} (E)および5-iPF_{2α}-VI(F)の量をESIによるLC/MS/MSを用いて評価した。統計処理はDunnettの検定を行った。(GおよびH) X線非照射およびX線照射後の細胞におけるroenoneの細胞内8-iso PGF_{2α} (G)および5-iPF_{2α}-VI(H)に対する影響の評価は、X線照射から24時間後にLC/MS/MS解析によって行った。Rotenone処理については最終濃度が1 μMになるようにrotenoneを培地に添加し、X線を照射後に細胞に処理し、12時間インキュベートした。データは平均±S.E.を表しており、Tukeyの検定を行い、統計的有意差は*p < 0.05, **p < 0.01で示した。

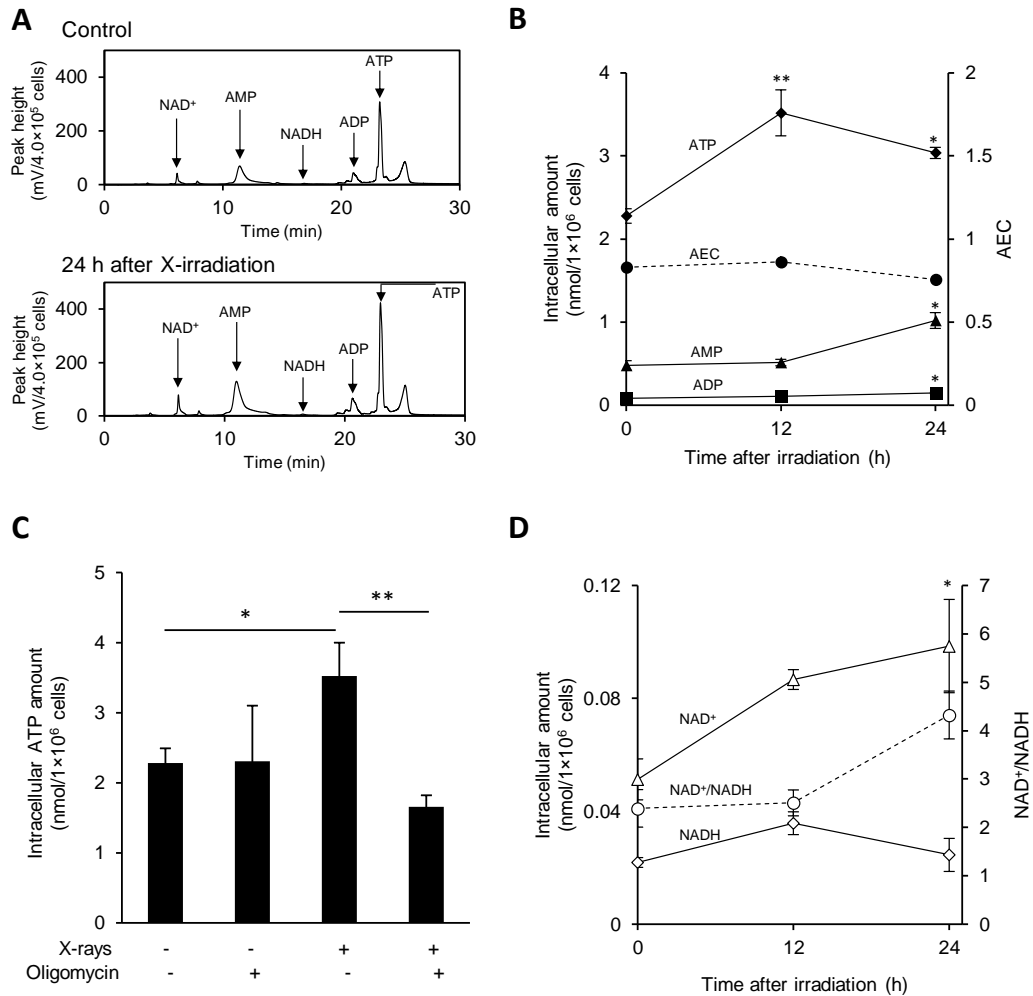


図14. HPLC法を用いたX線照射のHeLa細胞における細胞内AMP、ADP、ATP、NAD⁺ならびにNADH量に対する影響の評価

(A) 非照射(上)および10 GyのX線を照射してから24時間後(下)のHeLa細胞から得られた代表的なHPLCクロマトグラム。(B) 細胞内AMP(▲)、ADP(■)ならびにATP(◆)量とAEC値(●)。AMP、ADPならびにATP量は標準試料の測定によって作成した検量線から算出した。AECは以下の計算式によって算出した: $AEC = ([ATP] + 0.5[ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$ 。平均±S.E.を表しており、Dunnettの検定を行い、統計的有意差は* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で示した。(C) X線照射したHeLa細胞の細胞内ATP量に対するoligomycinの効果。HeLa細胞に対して非照射ならびに10 GyのX線照射を行った直後に培地にoligomycinを2 ng/mLとなるように添加し、12時間インキュベートした後にHPLC法にて細胞内ATP量の測定を行った。平均±S.E.を表しており、Tukeyの検定を行い、統計的有意差は* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で示した。(D) 10 GyのX線照射から12時間後および24時間後のHeLa細胞の細胞内NAD⁺(△)、NADH(◇)量ならびにNAD⁺/NADH比(○)の変化。NAD⁺およびNADH量は標準試料の測定によって作成した検量線から算出した。データは平均±S.E.を表しており、Dunnettの検定を行い、統計的有意差は* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で示した。

4. 考察

近年の研究では、ヒト大腸がん由来 HCT116 細胞、骨肉腫由来 HPS11 細胞ならびにヒト肺腺がん由来 A549 細胞において、X 線照射後にミトコンドリアのエネルギー代謝が活性化することが示されている^{6, 102)}。また、親脂質性 triphenylphosphonium 誘導体がミトコンドリアのエネルギー代謝の阻害を介して放射線による細胞死を促進するため、ミトコンドリア呼吸におけるエネルギー代謝の細胞スイッチング機構が細胞生存のために重要である事が示唆されている¹⁰⁴⁾。

ミトコンドリア代謝の評価を行う上で、細胞の酸素消費率は重要なパラメーターである。酸素消費率の測定には、細胞外フラックスアナライザーが広く用いられているが、この方法は蛍光強度の測定により培地中の酸素分圧を評価するため、GFP を始めとした蛍光色素を発現する細胞は扱いにくいことやクエンチャーとして働く薬剤が使用できないといった欠点がある。さらに、測定直前の細胞数を算出することができないため、定量性についても問題がある。そこで本研究では、細胞外フラックスアナライザーの代替法として、LiNc-BuO を用いた ESR オキシメトリーによって、細胞レベルにおけるミトコンドリア呼吸パラメーター評価法を確立した。この手法を用いることで、細胞外フラックスアナライザーと同様のミトコンドリア呼吸パラメーターを得られた上に、再現性が高く、少ない細胞数 (7.5×10^4 個)でも評価が可能であった。さらにこの方法には、GFP のような蛍光を発現した細胞においても蛍光物質の影響を受けることなく pO_2 の絶対値が比較的簡便に測定できるという利点がある。また本手法は浮遊系での測定のため、細胞外フラックスアナライザーでは扱いにくい浮遊細胞の測定が容易であるため、血液由来の細胞やスフェロイド形成がん幹細胞の酸素消費率についても評価が可能である。

この手法を用いた HeLa 細胞、SW480 細胞、A549 細胞ならびに MIA PaCa-2 細胞のミトコンドリア機能の評価から、X 線照射後にミトコンドリア呼吸パラメーターが上昇することが明らかになった。一般的に、細胞内のミトコンドリア含

量は細胞周期と同期しており、G1 期、S 期、G2/M 期の順に上昇することが報告されている⁴⁰⁾。過去の当研究室の研究では、放射線を照射したがん細胞において数時間から十数時間後に G2 チェックポイントが起こり、G2 期の細胞の集積が起きると共に、ミトコンドリア量の増加、ミトコンドリア膜電位の上昇、ATP 量の増加ならびに細胞内 ROS の上昇が数時間続くことを報告している¹⁰²⁾。本研究では、ミトコンドリア量の増加に伴ってミトコンドリア ETC の活性化が起きたと仮定し、ミトコンドリア呼吸パラメーターの値を細胞当たりのミトコンドリア量で補正した。その結果、X 線照射後の細胞の値は非照射の細胞の値と同程度であったことから、実際に、X 線照射後のミトコンドリア呼吸の活性化はミトコンドリア呼吸関連酵素の活性化ではなく、ミトコンドリア量の増加によるものであることが明らかになった。

また、本研究では SQ および Fe-S クラスターへの X 線照射の影響を低温条件における ESR 法によって評価した。HeLa 細胞の低温 ESR 測定により、 $g=2.004$ および $g=1.941$ のシグナルが得られた。X 線照射によって $g=2.004$ のシグナル強度は上昇したが、 $g=1.941$ クラスターについては変化は見られなかった。HeLa 細胞におけるマイクロ波強度に依存する飽和実験 (図 8) や rotenone 処理 (図 7) の結果から、 $g=2.004$ および $g=1.941$ のシグナルはそれぞれミトコンドリアの SQ およびフェレドキシンタイプの Fe-S クラスター由来であると同定した。また、rotenone 処理によって SQ のシグナル強度が減少し、X 線照射による増加も見られなくなった (図 7)。さらに、ミトコンドリア DNA の欠損によるミトコンドリア機能不全の ρ^0 細胞を用いて、SQ ラジカルがミトコンドリア由来であることも確認した (図 10)。De Jong および Albracht や Burbaev らはウシの心臓から単離したミトコンドリアにおいて NADH の短期間の反応 (10 ms~15 s) が $g=2.004$ の SQ のシグナル強度は上昇させるが $g=1.94$ の Fe-S クラスターには影響がないこと、さらにこの NADH による SQ シグナルの上昇が rotenone 処理によって見られなくなることを報告しており^{8, 20)}、SQ の形態は complex I とユビキノンとが反応した際の間接体であることが示されている。これらの報告や本研究で観察

された結果から、X線照射から24時間後にミトコンドリアETCにおいて電子の流れが活発になったことが示唆された。しかし、マウスの心臓における虚血や心筋症といった他の酸化ストレス状態ではFe-Sクラスターの鉄イオンが酸化することによってFe-Sクラスターの信号強度が変化することや^{3, 25)}、Burlakaらは、ラットへの超高周波の電磁放射線の照射により、肝臓、心臓ならびに大動脈組織の $g=2.00$ および $g=1.94$ のシグナルにおいてESR信号強度が低下することを示しているにも関わらず⁹⁾本研究ではFe-Sクラスターのシグナル強度はX線の影響を受けなかった。がん治療において、近年ではlipophilic TPP⁺誘導体以外にもmetformin、MKT-077ならびにナノ粒子など、ミトコンドリアを標的とした薬剤が着目されている^{14, 84, 97)}。本研究では、HeLa細胞へのM10処理によってSQ由来のシグナル強度が減少し、さらにX線照射によるシグナル強度の上昇も抑制したことから、M10はミトコンドリアETCの電子の流れを抑制することが示された。

近年では、X線照射や抗がん剤のようなDNA損傷を引き起こす薬剤を細胞に処理すると、遅延性のミトコンドリアROSが上昇し^{13, 15, 27, 36, 37, 39, 44, 45, 64, 79, 83)}、このROS産生はアポトーシスや細胞老化と関連している事が様々な細胞株で報告されている^{70, 73)}。図12で示したように、放射線照射後のミトコンドリアからのROS産生の上昇がHeLa細胞で見られたが、脂質過酸化物である8-isoPGF_{2 α} および5-iPF_{2 α} -VIはX線照射から24時間後まで変化は見られなかった(図13EおよびF)。図12Bに示したように、ミトコンドリアETC complex Iの阻害剤であるrotenoneを細胞に処理すると、ミトコンドリアROS産生が増加し、X線とrotenoneの併用ではさらにROS産生が増加したことから、ROSはミトコンドリアETC complex Iから漏れ出た電子が酸素分子と反応して産生されており、X線照射によって増加するROSがcomplex Iから産生していることが示唆された。図13GおよびHより、8-isoPGF_{2 α} および5-iPF_{2 α} -VI量はrotenoneを処理すると有意に増加したにもかかわらず、X線照射後の細胞では変化は見られなかった。この現象は、細胞のROSの濃度がX線照射された細胞で比較的低レベルである

場合に、細胞内の抗酸化物質が細胞の酸化的損傷を防ぐために十分に存在していることを示唆している。一方で、rotenone と X 線の併用処理において細胞内の ROS が上昇していたことに関しては、抗酸化剤によって ROS を消去しきれずに、酸化的損傷が起こり、過酸化脂質の蓄積が生じた可能性がある。

本研究では、過去の報告と同様に酸素消費率 (図 4)や ATP 産生 (図 14B)が X 線照射から 24 時間後に上昇することを明らかにしたが、その際に AEC 値は X 線照射後も 0.76 から 0.86 の間で一定であった。生理的な条件下の細胞では AEC 値は 0.7-0.95 の範囲内であり^{21, 75)}、この値は rotenone 処理、低酸素症ならびに虚血状態等のエネルギーの減少にかかわる病理学的条件において減少する事が報告されている^{4, 19, 61, 82)}。さらに、X 線照射後に NADH 量に変化は見られなかったが、NAD⁺および ATP 量は増加していたことから (図 14B および D)、TCA 回路もしくは他の経路からの NADH の供給が X 線照射後も十分であることが示唆された。これらの結果から、細胞内 NAD⁺および ATP プールの放射線照射による増加は、生理的なホメオスタシスの元で起こっていることが示された。さらに、ヒト前立腺がん由来 NQO1 細胞 (PC-3、DU145 ならびに LNCaP 細胞)において poly(ADP-ribose)polymerase one (PARP1)によって誘導される代謝異常による NAD⁺および ATP 量の低下が放射線照射によるネクロシスを上昇させる事が報告されているため²³⁾、この放射線照射後の NAD⁺および ATP プールの上昇は放射線照射後の DNA 損傷に対する適応応答である可能性が示された。このことから、NAD⁺および ATP プールの放射線照射による増加に関連するミトコンドリア ETC 機能が、がんの放射線治療の標的になり得ることが示唆された。

がん細胞における解糖系の放射線応答については、Fujibayashi らがヒト大腸がん由来 LS180 細胞において 30 Gy の X 線照射から 3-5 時間後に解糖系関連遺伝子 [glucose transporter protein type 1 (SLC2A1)およびヘキソキナーゼ]および [³H]-2-deoxy-D-glucose の取り込みが上昇していることを示している。この放射線による [³H]-2-deoxy-D-glucose の取り込みの上昇は、mRNA (actinomycin D)およびタンパク質合成 (cycloheximide)の両方の阻害によって減少したことから、グ

ルコース代謝の上昇は遺伝子の発現を介して引き起こされていることが示されている²⁸⁾。近年では、Wang らはヒト肝臓がん由来 HepG2 細胞および横紋筋由来 HMCL-7304 細胞において、2 Gy の γ 線照射から 4 時間後にグルコース 6 リン酸、乳酸ならびにアラニンが上昇することを報告しており、放射線照射によって細胞質の好氣的解糖の上昇が引き起こされていることが示唆されている⁹⁴⁾。しかし、図 14C で示したように、oligomycin 処理によって X 線照射後に上昇した ATP 産生が完全に抑制されたことから、X 線照射後に上昇した ATP は主にミトコンドリア ETC の complex IV における F₀F₁-ATPase/ATP synthase 由来であることが示唆されている。これらの結果から、HeLa 細胞においては X 線照射による解糖系の活性化は、解糖系における ATP 産生の効率 (2ATP/グルコース 1 分子)は酸化的リン酸化 (36ATP/グルコース 1 分子)と比較してとても小さいため、全体の ATP 産生にそれほど寄与していないことが推測された。

まとめると、本研究では HeLa 細胞への 10 Gy の X 線照射から 24 時間後に OCR、ATP 量ならびに ROS 産生の増加が見られたことから、ミトコンドリア機能が活性化したことが示唆された。このミトコンドリアの活性化の際は、AEC 値や NADH は生理的条件の範囲で一定であった。さらに、ROS 産生の増加が見られた X 線照射から 24 時間後でもアラキドン酸の過酸化物である F₂-イソプロスタノール量に変化は見られなかったことから、照射後に上昇したミトコンドリア由来の ROS は生体損傷にそれ程影響を与えないことが示唆された。以上のことから、X 線照射後のミトコンドリア ETC の活性化は放射線に対する適応応答であり、この適応応答はがんの放射線治療の標的となり得ることが示唆された。また、本研究で確立した ESR オキシメトリー法によるミトコンドリア呼吸パラメータの新規評価法や細胞レベルの低温下の ESR による SQ および Fe-S クラスターの評価法は、がんの化学療法および放射線療法におけるミトコンドリアを標的とした新規の治療法を見つけるための有用な手法であることが示唆された。

遅延性の ROS 産生と腫瘍細胞への X 線照射後の ATP 産生の増加の正確なメカニズムを明らかにするためには、ミトコンドリア ETC だけではなく、解糖系、

グルタミノリシスならびに TCA 回路のエネルギー代謝の放射線応答の評価が必要であり、解糖系の放射線応答については第二章で検討を行った。

5. 小括

本章では、ESR オキシメトリー法を用いた新規のミトコンドリア呼吸機能評価法を開発し、がん細胞のミトコンドリア ETC のエネルギー代謝を中心とした放射線応答の評価を行った。様々なミトコンドリアを標的とした薬剤の処理によって基礎呼吸、ATP 依存呼吸、プロトンリーク、最大呼吸、予備呼吸能ならびにミトコンドリア非依存呼吸の 6 つのミトコンドリア呼吸パラメーターを得ることが出来た。この方法を用いて HeLa 細胞のミトコンドリア呼吸の放射線応答を評価したところ、X 線照射から 24 時間後にミトコンドリア呼吸パラメーターは上昇していた。さらに、この上昇は細胞当たりのミトコンドリア量の増加によるものであることが明らかになった。また、低温条件下での HeLa 細胞の ESR 測定より、ミトコンドリア ETC において電子の受け渡しを行っている SQ ラジカルおよび Fe-S クラスターのシグナルを確認することが出来た。X 線照射後の HeLa 細胞では SQ ラジカルは上昇していたものの、Fe-S クラスターに変化は見られなかったことから、X 線照射後にミトコンドリアにおけるレドックスの不均衡が起きていることが示唆された。また、細胞内 ROS と脂質との反応によって生じる脂質過酸化物の評価を行うために、LC-MS/MS による細胞内アラキドン酸の過酸化物の 8-iso PGF_{2α} および 5-iPF_{2α}-VI の放射線応答を評価した。その結果、どちらの化合物も X 線照射後も非照射細胞との差は見られなかった。HPLC 法を用いた細胞内 AMP、ADP、ATP、NAD⁺ならびに NADH 量の測定では、これまでの報告では放射線によって ATP のみの上昇が明らかになっていたが、本研究において X 線照射によって ATP のみならず、AMP、ADP ならびに NAD⁺が上昇し、NADH は一定であることが明らかになった。さらに、エネルギー充足率 (AEC)を算出すると、照射後も変化は見られず、生理的な条件下の細胞と同レベルである 0.76~0.86 の値を示した。以上の結果から、放射線照射後のミトコンドリア ETC の活性化は放射線に対する適応応答であることが示唆された。

<第二章>

ESR 法を用いた細胞外酸性化速度の新規評価法の確立および 解糖系の放射線応答の評価

1. 序論

第一章でも述べたように、がん細胞はエネルギーを産生するために、有酸素下にあってもミトコンドリア電子伝達系 (ETC) を使うよりもグルコースから乳酸へと変換する経路に依存している⁹⁵⁾。

このがん細胞における解糖系の亢進のメカニズムについてはこれまでに多くの研究がなされてきている。具体的には、肝臓がん、膵臓がん、乳がんならびに肺がんを始めとした多くのがんでは、細胞膜を介してグルコースの輸送を行う膜タンパク質である glucose transporter 1 (GLUT1) の発現が上昇している⁵⁷⁾。さらに、ヒト乳腺上皮細胞 HMEC と比較すると、ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞ならびに MCF-7 細胞ではピルビン酸を乳酸へと変換する酵素の lactate dehydrogenase A (LDHA) や乳酸を細胞外に排出する膜輸送タンパク質の monocarboxylate transporter 4 (MCT4) の発現が上昇していることが報告されている³⁰⁾。また、このがん特異的な代謝である解糖系の亢進を放射線治療の標的とする試みも多くされており、例えば、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、ヒト神経膠芽腫由来 U37MG 細胞ならびにヒト非小細胞肺癌由来 NCI-H460 細胞において、グルコースをグルコース 6 リン酸に変換する酵素であるヘキソキナーゼの阻害剤の 2-deoxy-D-glucose を処理すると、放射線の致死効果の増強が見られることが報告されている^{5,43,53)}。しかし、この放射線増感メカニズムの詳細については明らかにはなっていない。前章や当研究室のこれまでの結果から、X 線照射後にミトコンドリア ETC が活性化していることが示唆されている^{102, 104)}。しかしながら、がん細胞ではワールブルグ現象が起こっているため、がんの状態について明らかにするためにはミトコンドリア ETC のみならず解糖系の放射線応答についての情報も必要である。

グルコース由来のピルビン酸が乳酸へと変換され、この乳酸が細胞外へと排出されると、乳酸由来の H^+ によって細胞外の pH は低下する、そのため、細胞外酸性化速度はグルコース代謝において重要なパラメーターである。細胞外 pH の測定については酸素消費率の測定と同様に細胞外フラックスアナライザーが広く用いられている。しかし第一章でも述べたように、細胞外フラックスアナライザーは蛍光タンパク質を発現した細胞を扱いにくいことや、結果を細胞数で基準化することが困難であるといった欠点がある。そのため、本研究では細胞外フラックスアナライザーの持つ欠点を補う代替法として pH 感受性プローブである 2-(4-((2-(4-amino-4-carboxybutanamido)-3-(carboxymethylamino)-3-oxopropylthio)methyl)phenyl)-4-pyrrolidino-2,5,5-triethyl-2,5-dihydro-1H-imidazol-1-oxyl (R-SG) を用いた ESR 法による細胞外酸性化速度の評価法の確立を目的とした。これまでに、R-SG を pH 感受性プローブとして用いた腫瘍モデルマウスの *in vivo* 三次元 pH マッピングについては報告がなされているが^{33, 47)}、細胞レベルにおいては未だ評価法が確立できていないため、本研究では、細胞レベルにおける細胞外 pH の評価法を確立し、グルコース代謝に対する放射線応答の影響の評価を行った。さらに、グルコース代謝の指標として、グルコースの類似体である 2-deoxy-D-glucose (2-DG) の取り込み評価や、グルコース代謝の最終産物として排出される乳酸の産生量についての放射線応答の評価を行った。

2. 材料および方法

2-1. 試薬

2-Deoxy-D-glucose は Wako Pure Chemical Co.から入手した。MitoTracker Green は Thermo Fisher Scientific から入手した。4-(2-aminoethyl)benzene sulfonamide (AEBS)は Sigma Aldrich から購入した。2-(4-((2-(4-amino-4-carboxybutanamido)-3-(carboxymethylamino)-3-oxopropylthio)methyl)phenyl)-4-pyrrolidino-2,5,5-triethyl-2,5-dihydro-1H-imidazol-1-oxyl (R-SG)は West Virginia University の Valery V. Khrantsov 教授ならびに北海道大学大学院情報科学研究所の平田拓教授からご提供いただいた。

2-2. 細胞株および培養方法

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、ヒト大腸がん由来 SW480 細胞、ヒト肺腺がん由来 A549 細胞ならびにヒト膵臓がん由来 MIA PaCa-2 細胞の培養には、10% fetal bovine serum および 3.7 g/L NaHCO₃ を含む DMEM 培地を用いた。細胞はウォータージャケット式インキュベーターにて 37°C、5% CO₂ 条件下で維持した。

2-3. X 線照射

X 線照射は、X-Rad iR-225 を使用し、管電圧 200 kVp、管電流 15 mA、線源距離 650 mm、1.0 mm Al フィルターを用いて 1.37 Gy/min の線量率で行った。X 線照射はターンテーブル上に細胞を置き、回転させながら室温で行った。

2-4. ESR 分光法による細胞外酸性化速度の測定

細胞外の pH は、細胞浮遊液にニトロキシラジカルの pH 感受性スピンプローブである R-SG (図 15A)を添加し、評価を行った。この R-SG は (図 15B)に示すように、プロトン化型と非プロトン化型の異なる超微細分裂定数を持つ pH 依存の ESR スペクトルを示す。

10 Gy の X 線を照射してから 24 時間後の細胞を回収し、PBS で 3 回洗浄し

た。細胞は 2 μ M R-SG および 2% dextran を含む 0.1 mM tricine に懸濁させた。グルコース代謝に関連した細胞外酸性化速度を測定していることを確かめるために、グルコース代謝に関連した試薬を添加した 4 種類の試料を測定した。具体的には、1 つ目は、薬剤を処理していないコントロール細胞、2 つ目は解糖系の基質であるグルコース (25 mM) を添加した細胞、3 つ目は 25 mM グルコースとミトコンドリア ETC の ATP synthase におけるプロトンの流入を阻害する薬剤である oligomycin (1 μ M)、4 つ目は 25 mM グルコース、1 μ M oligomycin ならびにグルコースからグルコース-6-リン酸へと変換する酵素であるヘキソキナーゼの阻害剤の 2-DG (100 mM) を処理した細胞である。各試薬を含む 0.1 mM tricine に 7.5×10^4 個の細胞を懸濁させ、測定中に細胞が低酸素状態になることを防ぐためにガス透過性であるポリメチルペンテン製のキャピラリー (内径 $\phi 0.76$ mm) に細胞を封入した。ESR 測定については JEOL-RE X-band ESR 装置を使用し、温度コントローラー (ES-DVT3) を用いて 37°C に維持して測定を行った。ESR パラメーターは、マイクロ波強度 1 mW、磁場変調周波数 100 kHz、磁場変調振幅 0.1 mT、磁場掃引幅 ± 2.5 mT とした。ESR スペクトルの解析は Win-Rad radical analyzer system (Radical Research, 東京) を用いて行った。pH に対する検量線の作成のために、10 mM リン酸バッファーを 0.1 N HCl もしくは 0.1 N NaOH を用いて各 pH に合わせ、ESR スペクトルを取得し、1 本目の信号から 3 本目の信号間の距離から検量線を作成した (図 15C)。

2-5. 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) の取り込み

細胞を 35 mm dish に播種し、X 線照射から 24 時間後に 40 nM (2.4 μ Ci) [1,2-³H(N)]-(2-DG) を培地に添加し、細胞を 20 分間、37°C、5% CO₂ 条件下でインキュベーションした。その後、細胞を冷 PBS 1 mL で 3 回洗浄し、1 mL の 0.1 N NaOH で溶解した。10 分間静置した後、溶解した細胞をバイアル瓶に回収し、そこに乳化シンチレーター AQUASOL-2 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を 5 mL 加えて、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, 日立アロカ, 東京) で ³H

からの β 線をカウントし、外部標準線源法により放射活性 (DPM)を求めた。

2-6. 細胞外乳酸の測定

細胞外に排出された乳酸の測定は、Lactate Assay Kit II (BioVision Inc., CA, USA) を用いて、製造者の説明書に従って行った。細胞を 60 mm dish に播種し、一晚インキュベートした後、X線を照射した直後に培地を交換 (5 mL)し、24 時間後に培養上清を回収した。96 穴プレートに 50 倍に希釈した培養上清を 50 μ L 移し、乳酸測定試薬を 50 μ L 加え、30 分間室温でインキュベートした。乳酸レベルは Victor NivoTM マルチモードプレートプレートリーダー (PerkinElmer)を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

2-7. 統計解析

全ての結果は、少なくとも 3 回の独立した実験から平均 \pm 標準誤差 (SE)で示した。統計解析は、Student's *t* test を用いて行った。 $P < 0.05$ で統計的に有意であるとみなした。

3. 結果

3-1. R-SG を用いた ESR 法による細胞外酸性化速度の評価法の確立

解糖系では、最終産物として乳酸が産生され、この乳酸が細胞外に排出されると細胞外の pH の低下が引き起こされるため、細胞外 pH の酸性化速度はグルコース代謝において重要なパラメーターである。本研究では、pH 感受性プローブの R-SG³³⁾を用いて HeLa 細胞の細胞外酸性化の測定を行った。バッファーには、微小な pH 変化を捉えるために緩衝能を抑えた 0.1 mM tricine を使用した。また、測定中に細胞が低酸素状態になることを防ぐために、細胞を封入するキャピラリーにはガス透過性のポリメチルペンテン (TPX) 製のものを使用した。37°C の条件下で経時時間毎に ESR 測定を行い、得られた ESR スペクトルと図 15C の検量線から時間経過ごとの pH をプロットした (図 16A)。コントロール細胞には pH の変化はほとんどなかったが、グルコース添加によって酸性化が見られ、oligomycin 処理によって pH の酸性化が大きくなった。そこに 2-DG を添加することでこの酸性化が見られなくなることが示され、コントロール細胞と同程度まで酸性化速度が抑制された (図 16B)。これらの結果から、本評価法はグルコース代謝による細胞外酸性化を反映していることが示された。

また、細胞外の酸性化は解糖系由来の乳酸の排出のみならず、ペントースリン酸経路や TCA 回路から産生される CO₂ の産生によっても引き起こされる。Carbonic anhydrase IX (CA IX) は細胞外に排出された CO₂ が水和されて HCO₃⁻ と H⁺ に変換される際に触媒として働く酵素である⁹⁸⁾。したがって、CA IX は細胞外の酸性化に関与している重要な因子の一つである。本研究では、CA IX の細胞外酸性化への寄与について明らかにするために、MIA PaCa-2 細胞に対して CA IX の阻害剤である、4-(2-aminoethyl)benzene sulfonamide (AEBS) を処理した際の細胞外酸性化速度の評価を行った (図 17)。その結果、グルコースの存在下で細胞外酸性化速度は有意に減少することが示された。このことから、MIA PaCa-2 細胞では CA IX が細胞外の pH 変化に寄与していることが示唆された。

3-2. X線照射のがん細胞における解糖系に対する影響の評価

第一章やこれまでの研究^{102,104)}から、X線照射後のがん細胞のミトコンドリアETCが活性化することが明らかになったが、グルコース代謝の放射線応答については十分に明らかになっていないため、図16で確立した評価法を用いてHeLa細胞、SW480細胞、A549細胞ならびにMIA PaCa-2細胞の細胞外酸性化に対するX線照射の影響を評価した。図18に示したように、HeLa細胞、SW480細胞ならびにMIA PaCa-2細胞においては10 GyのX線照射後も細胞外酸性化速度は非照射の細胞と同程度であり、X線の影響は見られないことが観察された。A549細胞では、oligomycin処理によってX線照射後に有意に上昇はしたものの、グルコース添加時の細胞外酸性化速度については他の2つの細胞株と同様に変化は見られなかった。

さらにグルコース代謝の放射線応答について明らかにするために、グルコース類似体の2-DGの細胞内への取り込みや乳酸の細胞外への排出量の評価を行った(図19)。2-DGの取り込み量については、HeLa細胞、SW480細胞ならびにA549細胞の全ての細胞株においてX線照射から24時間後に有意に上昇した(図19A)。乳酸排出量についてもHeLa細胞およびSW480細胞共にX線照射後に有意に増加した(図19B)。これらの結果から、グルコースから乳酸へと変換される経路については放射線照射によって活性化するが、細胞外酸性化速度にはそれほど影響を与えないことが示唆された。

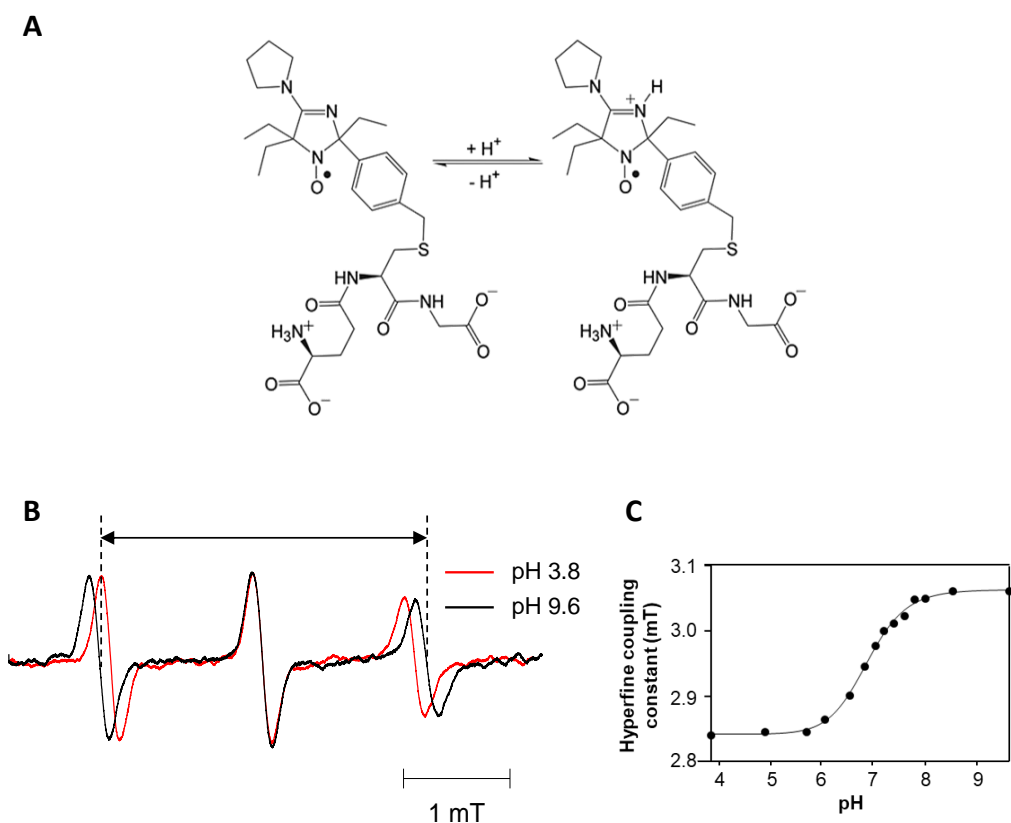


図15. R-SGを用いたESRによるpHの測定

(A) pH感受性プローブである2-(4-((2-(4-amino-4-carboxybutanamido)-3-(carboxymethylamino)-3-oxopropylthio)methyl)phenyl)-4-pyrrolidino-2,5,5-triethyl-2,5-dihydro-1H-imidazol-1-oxyl (R-SG)の構造 (Goodwin *et al.*, NMR Biomed., 27, 453, 2014)。(B) pH依存的なR-SGのESRスペクトル。HFCは1本目の信号から3本目の信号間の距離 (hyperfine coupling constant)を評価した。(C) R-SGの検量線。バッファーには10 mMのリン酸バッファーを使用した。各pHのバッファーに対するESRスペクトルのhyperfine coupling constant (mT)をプロットした。フィッティングはimage Jにて行った。

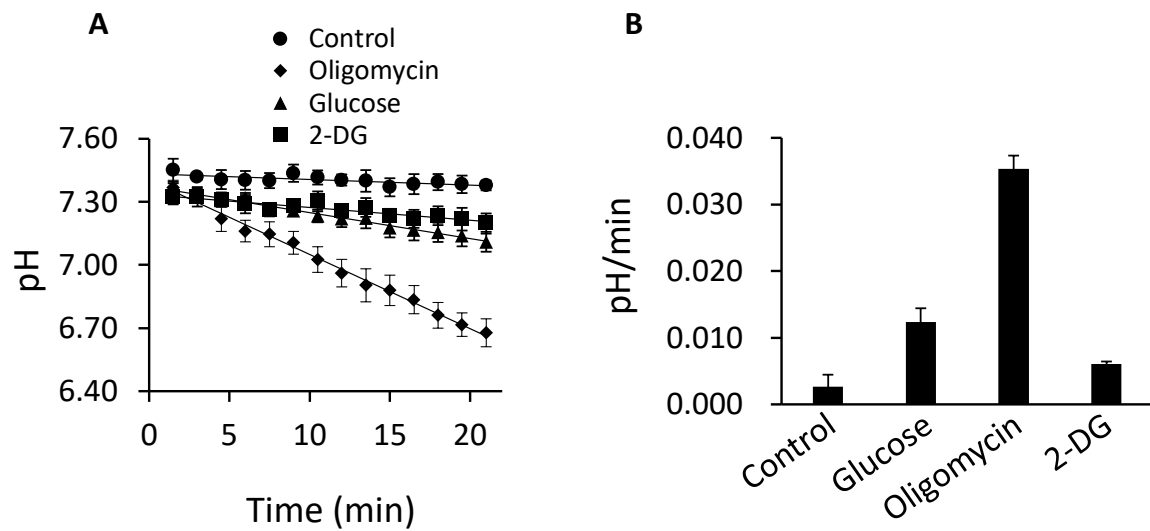


図16. R-SGを用いたESRによるHeLa細胞の細胞外酸性化速度の測定

(A) HeLa細胞存在下における37°Cで経時的にESR測定した際のpHの時間経過ごとの変化。バッファーとして0.1 mM tricineを使用した。細胞とバッファーのみの細胞 (Control)、25 mM グルコースを添加した細胞 (Glucose)、Glucose試料に1 μ M oligomycinを添加した細胞 (Oligomycin)ならびにOligomycin試料に100 mM 2-deoxy-D-glucose (2-DG)を添加した細胞 (2-DG)の4試料の測定を行った。(B) (A)の直線の傾きから算出した細胞外酸性化速度 (pH/min)。データは3回の独立した実験の平均 \pm SEで示した。

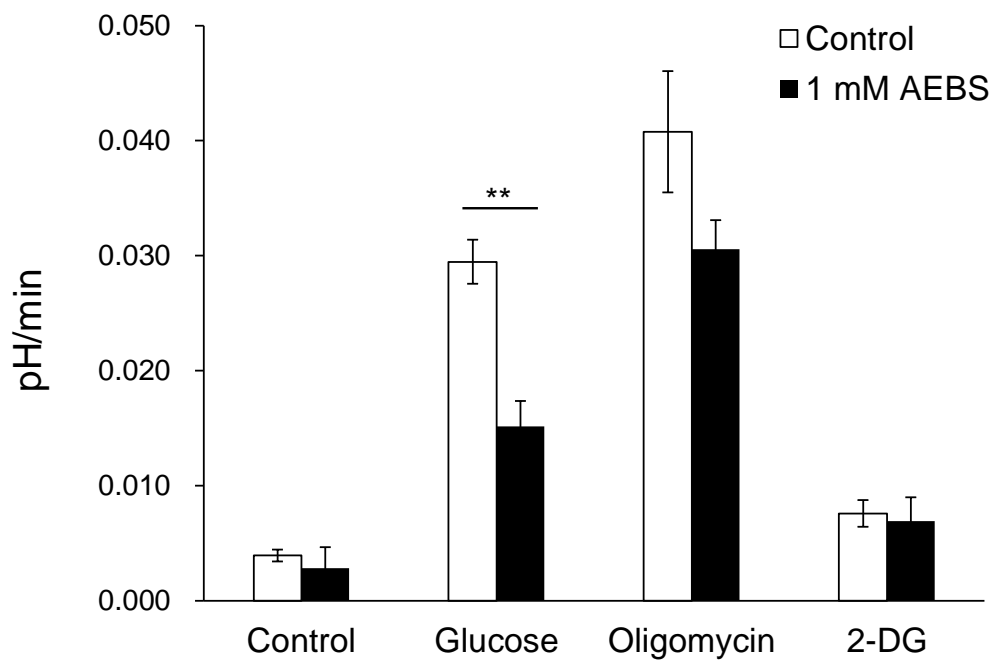


図17. MIA PaCa-2細胞における細胞外酸性化へのAEBSの影響の評価

Carbonic anhydrase IX (CA IX)の阻害剤であるAEBS [4-(2-aminoethyl)benzene sulfonamide]を処理した際のMia PaCa-2細胞の細胞外酸性化速度。白:薬剤未処理コントロール細胞、黒:1 mM AEBSを処理してから24時間後の細胞。データは独立した3回の実験の平均±SEで示した。統計的有意差は** $p < 0.01$ で示した。

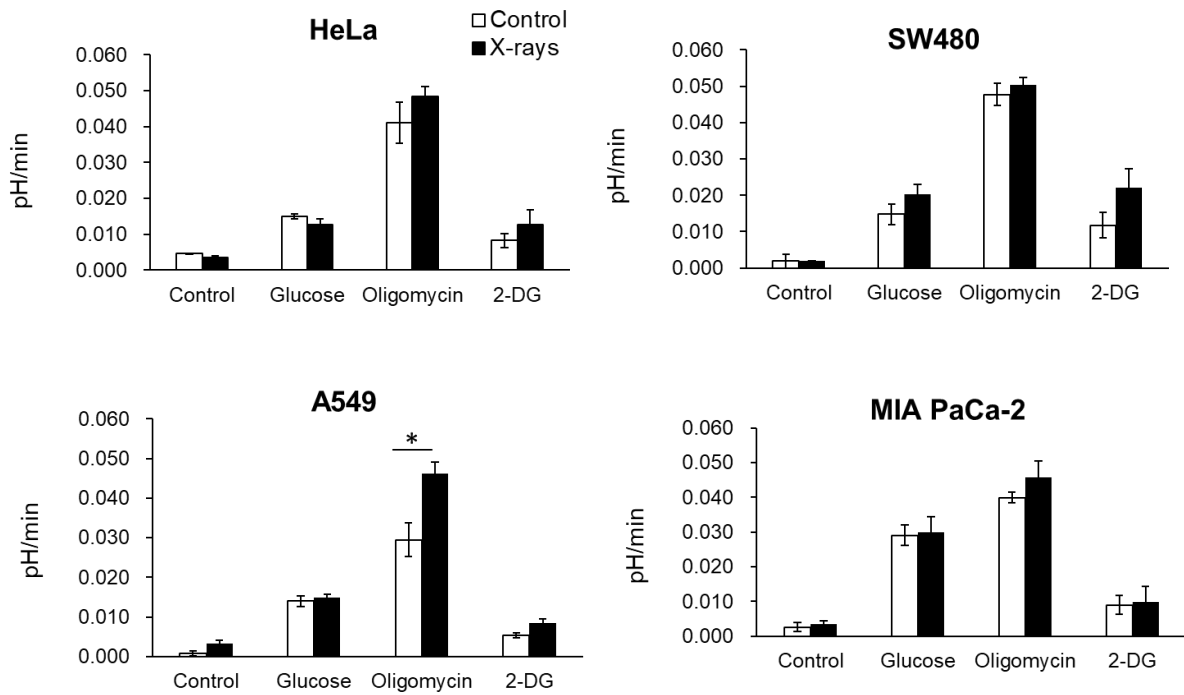


図18. 種々の細胞における細胞外酸性化速度へのX線照射の影響

グルコース代謝およびミトコンドリア関連試薬を添加した際のX線照射後のHeLa細胞、SW480細胞、A549細胞ならびにMIA PaCa-2細胞における細胞外酸性化速度。白：X線非照射細胞、黒：10 GyのX線を照射してから24時間後の細胞。データは独立した3回の実験の平均±SEで示した。統計的有意差は* $p < 0.05$ で示した。

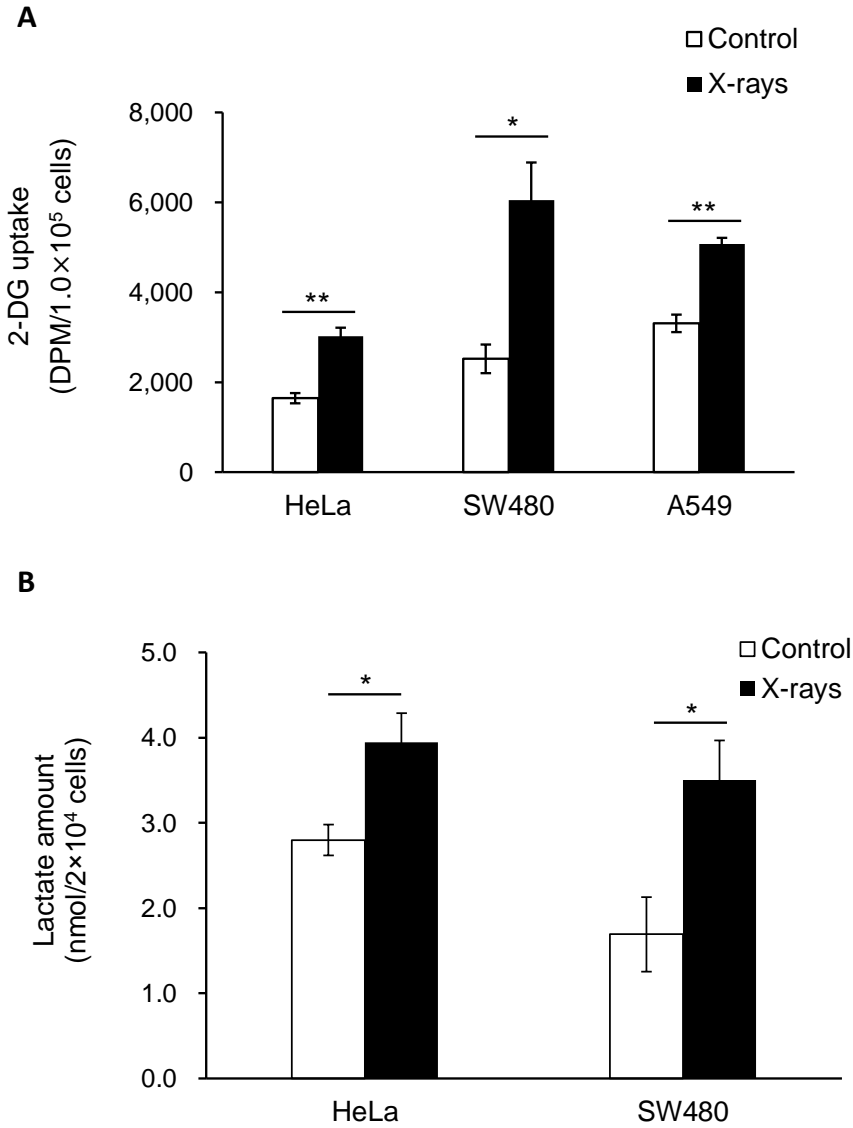


図19. 種々の細胞における解糖系へのX線照射の影響

(A) 2-Deoxy-D-glucose, [1,2-³H(N)]-(2-DG)のHeLa細胞、SW480細胞ならびにA549細胞内への取り込み量の評価。10 GyのX線を照射してから24時間後の細胞の培地に2-DGを添加し、20分間インキュベートした際の細胞内2-DG量を液体シンチレーションカウンターを用いて評価した。(B) HeLa細胞およびSW480細胞における細胞外への乳酸の排出量の評価。10 GyのX線を照射した直後に培地を交換し、24時間後の培地中の乳酸量の測定を行った。データは独立した3回の実験の平均±SEで示した。統計的有意差は* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で示した。

4. 考察

がん細胞のエネルギー産生は解糖系が優位である事がよく知られている⁹⁵⁾。そのため、本研究ではミトコンドリア ETC のみならず、グルコース代謝に対する放射線応答の評価も行った。グルコース代謝の代表的なパラメーターとして挙げられるのが細胞外酸性化速度であるが、この細胞外酸性化速度については酸素消費率の測定と同様に細胞外フラックスアナライザーが広く用いられている⁷⁴⁾。本研究では細胞外フラックスアナライザーの代替法として、pH 感受性プローブ R-SG を用いた ESR 法による細胞外酸性化速度の評価法を確立した (図 16)。グルコースを添加することによって酸性化が見られ、oligomycin 処理によって酸性化速度が上昇し、2-DG 添加によってこの酸性化が抑制されたことから、本評価法はグルコース代謝を反映していることが示された。この評価法を用いて X 線照射後の HeLa 細胞、SW480 細胞、A549 細胞ならびに MIA PaCa-2 細胞の細胞外酸性化速度を測定したところ、非照射と比較しても変化は見られなかった (図 18)。

細胞外の pH は正常な組織では 7.4 付近であるのに対して、がん組織では 6.8-7.2 と正常組織よりも酸性の値を取ることが報告されている³¹⁾。これは、多くのがん細胞が正常細胞と比較して GLUT1、LDHA ならびに MCT4 を始めとした解糖系に関与するタンパク質の発現の上昇によってグルコース代謝が促進しているため、グルコース由来の乳酸によってがん細胞の細胞外酸性化が引き起こされているからであると考えられている^{30, 57)}。グルコース代謝の放射線照射後の活性化のメカニズムについては明らかになっていないが、ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞において、放射線照射後にグルコースの取り込みや乳酸産生が上昇し、それと共にグルコースの取り込みに関与する膜タンパク質である GLUT1 の発現が上昇することが報告されている¹⁰⁸⁾。このことから、本研究でも観察された放射線照射後のグルコース代謝の活性化は GLUT1 発現上昇によるものである可能性がある。また本研究では、X 線照射によって乳酸産生が上昇したにもかかわらず細胞外酸性化には変化が見られなかった。要因の一つとして、本研究に

において開発した ESR による評価法の感度が低く、X 線照射後の差が見られなかった可能性が考えられる。本評価法については、従来から付着細胞における細胞外酸性化速度の測定に広く用いられている細胞外フラックスアナライザーとの比較を行う等、さらなる検討が必要であると考え。さらに、乳酸の他に細胞外 pH に関わる因子として膜結合型タンパク質である CA IX が挙げられる。CA IX は CO_2 と水分子を HCO_3^- と H^+ へと変換する酵素であり、細胞外 pH の制御に関与していることが明らかになっている。CA IX は固形腫瘍で顕著に発現しており、予後不良の診断マーカーになり得ることが示されている⁷²⁾。ヒト腎臓がん由来 786-O 細胞では、CA IX のノックアウトもしくは阻害剤の両方で放射線感受性が上昇することが示され、その際に細胞外の酸性化が抑制されることも報告されている²⁴⁾。本研究では MIA PaCa-2 細胞における CA IX 阻害剤の AEBS 処理によって細胞外酸性化が有意に抑制されることが示されたことから、MIA PaCa-2 細胞では CA IX は細胞外の pH の制御に大きく関与していることが示唆された。今後は、放射線照射後における CA IX の細胞外 pH への寄与についても検討する必要があると考える。

本研究では、HeLa 細胞、SW480 細胞、A549 細胞ならびに MIA PaCa-2 細胞の 4 種類のがん細胞において第一章ではミトコンドリア呼吸機能、本章ではグルコース代謝の放射線応答について評価を行ったが、A549 細胞や MIA PaCa-2 細胞はミトコンドリア呼吸パラメーターが全体的に低い値を示したことや、SW480 細胞はグルコース添加時の細胞外酸性化速度、2-DG の取り込み量ならびに乳酸排出量の X 線照射後の増加幅が他の 2 種類のがん細胞と比較して大きいことが示された。グルコース代謝において乳酸産生を制御する因子として pyruvate dehydrogenase (PDH)³⁵⁾ や LDHA²²⁾ が重要であることが示されている。PDH はピルビン酸をアセチル CoA に変換する酵素であり、PDH が活性化するとミトコンドリアの TCA 回路に動員されるピルビン酸の量が上昇し、PDH の活性が低いとピルビン酸から乳酸への変換が増加する。また、LDHA は前述の通り、ピルビン酸を乳酸へと変換する酵素である。これらの酵素は組織によって発現量が異なる

っていることから^{32,106)}、今回の細胞間の代謝の程度の違いは、PDH や LDHA が関与している可能性がある。

まとめると、本研究において ESR 法を用いた細胞レベルにおける細胞外 pH の新規の測定法が確立できた。本手法は第一章で確立した ESR オキシメトリー法による呼吸パラメーターの評価法と同様に少ない細胞数で測定が可能であり、細胞外フラックスアナライザーと比較して蛍光色素を発現した細胞についても問題なく評価ができる利点がある。この手法を用いて X 線照射後の細胞の細胞外酸性化速度を測定したところ、非照射の細胞と比べて変化はなかった。その一方で、2-DG の取り込みや乳酸産生は X 線照射後に上昇していたことから、X 線照射によって解糖系が活性化することは示唆されたが、細胞外酸性化の結果と差異が見られた。そのため、本研究で確立した細胞外 pH の評価法についてはさらなる検討が必要であると考ええる。

5. 小括

本章では解糖系の放射線応答についての検討を行った。グルコース代謝の指標として、pH 感受性プローブ R-SG を用いた ESR 法による新規の細胞外酸性化速度の評価法を新規に確立した。基質であるグルコースの添加によって酸性化が見られ、解糖系の阻害剤である 2-deoxy-D-glucose の処理によってこの酸性化が抑制されたことから、本手法はグルコース代謝を反映できていることが示された。確立した手法を用いて HeLa 細胞、SW480 細胞、A549 細胞ならびに MIA PaCa-2 細胞の細胞外酸性化速度の放射線応答を評価したところ、X 線照射後も細胞外の pH に変化は見られなかった。一方でグルコースの類似体である 2-DG の取り込みや乳酸産生については、X 線照射後に上昇していることが示された。以上の結果から、X 線照射によって解糖系が活性化していることが示唆された。

<総括>

通常、正常な細胞は好氣的な状態ではエネルギー産生の大部分をミトコンドリア電子伝達系 (ETC) に依存している。一方がん細胞では、酸素が十分にあってもエネルギー産生をミトコンドリア ETC よりも解糖系に依存していることが広く知られている (ワールブルグ効果)。しかし、近年の研究ではがん細胞への X 線照射によってミトコンドリアが活性化することやミトコンドリア阻害剤の処理によってがん細胞の放射線感受性が上昇することが明らかになっており、ミトコンドリアは放射線照射後の細胞の生存において重要な役割を担っている可能性が示されている。そのため、がん細胞においてもミトコンドリアは放射線治療の標的となり得るが、放射線に対するミトコンドリア ETC の役割については不明な点も多い。そこで本研究では、ミトコンドリア ETC を中心とした放射線応答の詳細を明らかにするために、ミトコンドリアエネルギー代謝の新規評価法を確立し、この方法を用いて X 線照射後の代謝応答の評価を行った。

第一章では、がん細胞におけるミトコンドリア ETC のエネルギー代謝の放射線応答について評価を行った。電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いた酸素消費率の測定と様々なミトコンドリア標的試薬を組み合わせた新規のミトコンドリア呼吸機能評価法を確立し、ミトコンドリア呼吸機能の放射線応答の評価を行った。HeLa 細胞、SW480 細胞、A549 細胞ならびに MIA PaCa-2 細胞への X 線照射後にミトコンドリア呼吸パラメーターが上昇したことから、放射線照射後にミトコンドリア ETC が活性化することが示唆された。また、この活性化のメカニズムを明らかにするために、細胞当たりのミトコンドリア量でミトコンドリア呼吸パラメーターの値を補正したところ、X 線照射後の細胞の値は非照射の細胞の値とほぼ同じであった。さらに、ミトコンドリア ETC において電子の受け渡しを担っているセミキノン (SQ) ラジカルおよび鉄-硫黄 (Fe-S) クラスタを低温条件の ESR 測定により評価した。X 線照射後に SQ ラジカルは上昇したものの、Fe-S クラスタに変化は見られなかった。このことから、X 線照射によってミトコンドリア ETC の電子の流れは活発になり、さらにレドックス状態の不

均衡が誘導されていることが示唆され、これが X 線照射後のミトコンドリアからの ROS 産生増加の原因の一つであることが類推された。また、この ROS の増加が細胞損傷に寄与するのかを確かめるために、細胞内アラキドン酸の過酸化物である 8-isoPGF_{2α} および 5-iPF_{2α}-VI の測定を行った。その結果、どちらの化合物も ROS 産生が増加する X 線照射から 24 時間後まで非照射細胞との差はほとんど見られなかった。さらに、細胞内 AMP、ADP、ATP、NAD⁺ならびに NADH 量の測定を行ったところ、これまでの研究では X 線照射後に ATP のみの上昇が報告されていたが、本研究では X 線照射によって ATP のみならず AMP、ADP ならびに NAD⁺が上昇し、NADH は一定であることが明らかになった。さらに細胞内のエネルギー状態の指標であるエネルギー充足率 (AEC) を算出したところ、X 線照射後にもかかわらず生理的な条件下の細胞と同レベル 0.76~0.86 の間の値を示した。以上の結果から、放射線照射後にミトコンドリア ETC が活性化することが示唆され、その際に AEC や NADH が生理的条件の範囲内で維持されていたことから、このミトコンドリア ETC の活性化は放射線に対する ATP を必要とする DNA 修復等のための適応応答の一つであることが示された。

がんはワールブルグ効果により解糖系が優位であるといわれているため、第二章ではミトコンドリア ETC のみならず解糖系の放射線応答の評価も HeLa 細胞、SW480 細胞、A549 細胞ならびに MIA PaCa-2 細胞を用いて行った。グルコース代謝の指標の一つである細胞外酸性化速度の ESR 法を用いた新たな評価法を確立し、放射線応答の評価を行った。細胞外酸性化速度については X 線照射の影響は見られなかった。また、グルコース類似体である 2-deoxy-D-glucose (2-DG) の細胞内への取り込みやグルコース代謝の最終産物である乳酸の細胞外への排出に対する X 線照射の影響を評価したところ、2-DG の取り込みおよび乳酸産生の両方で X 線照射後に値が上昇することが示された。以上の結果から、グルコース代謝についても放射線照射後に活性化することが示唆された。

以上の結果をまとめると、放射線照射後のがん細胞のミトコンドリア ETC の活性化は放射線に対する適応応答の一つであり、このミトコンドリアの適応応

答は放射線療法における標的となり得ることが示唆された。さらに、本研究ではミトコンドリア電子伝達系のみならず、グルコース代謝についても放射線による活性化が見られた。がん治療の観点から考えると、ミトコンドリア ETC は好氣的な状態であると正常細胞にとっても重要なエネルギー代謝経路であることから、がんの特異的な代謝経路である解糖系とミトコンドリア ETC の両方の阻害を行うことで、よりがん特異的な治療を行えるのではないかと考える。

さらに今回確立した ESR を用いたミトコンドリア呼吸機能の評価法では、少ない細胞数でも再現性の高い評価が可能であり、蛍光による影響も受けなため、GFP を始めとした蛍光物質を発現した細胞の測定やクエンチャーとして作用する試薬の処理も可能である。また、本手法は細胞を浮遊させた状態で測定を行うため、細胞外フラックスアナライザーでは扱いにくい骨髄腫細胞やリンパ球などの浮遊細胞の測定にも適していると考えられる。さらに、少ない細胞数での測定が可能であるため、増殖が極めて遅い細胞であっても測定に必要な細胞数の確保ができるといった利点がある。そのため、本手法はあらゆる細胞種におけるミトコンドリアを標的としたがん治療の発展のために有用な評価法であると考えられる。

<謝辞>

本稿を終えるにあたり、ご指導賜りました北海道大学大学院獣医学研究院応用獣医科学分野放射線学教室の稲波修教授、安井博宣准教授に深く感謝いたします。また、本論文をご校閲いただきました本研究院環境獣医科学分野毒性学教室の石塚真由美教授ならびに池中良徳准教授に厚くお礼申し上げます。本研究において、SQ および Fe-S クラスターの極低温 ESR 測定にご協力頂きました明治大学大学院理工学研究科の平岡和佳子教授に深く感謝いたします。本研究に用いた pH 感受性プローブ R-SG を供与していただきました West Virginia University の Valery V. Khramtsov 教授ならびに本学情報科学研究院の平田拓教授に深く感謝いたします。最後に、本研究の遂行にあたり終始多大なご助言、ご協力をいただきました教室の皆様に謹んでお礼申し上げます。

<引用文献>

1. Aft R L, Zhang F W, Gius D, Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death, *Br J Cancer*, **87**: 805-812, 2002.
2. Ara G, Kusumoto T, Korbut T T, Cullere-Luengo F, Teicher B A, cis-Diamminedichloroplatinum(II) resistant human tumor cell lines are collaterally sensitive to PtCl₄(Rh-123)₂: evidence for mitochondrial involvement, *Cancer Res*, **54**: 1497-1502, 1994.
3. Baker J E, Kalyanaraman B, Ischemia-induced changes in myocardial paramagnetic metabolites: implications for intracellular oxy-radical generation, *FEBS Lett*, **244**: 311-314, 1989.
4. Balestri F, Giannecchini M, Sgarrella F, Carta M C, Tozzi M G, Camici M, Purine and pyrimidine nucleosides preserve human astrocytoma cell adenylate energy charge under ischemic conditions, *Neurochem Int*, **50**: 517-523, 2007.
5. Bandugula V R, N R P, 2-Deoxy-D-glucose and ferulic acid modulates radiation response signaling in non-small cell lung cancer cells, *Tumour Biol*, **34**: 251-259, 2013.
6. Bartoletti-Stella A, Mariani E, Kurelac I, Maresca A, Caratozzolo M F, Iommarini L, Carelli V, Eusebi L H, Guido A, Cenacchi G, Fuccio L, Rugolo M, Tullo A, Porcelli A M, Gasparre G, Gamma rays induce a p53-independent mitochondrial biogenesis that is counter-regulated by HIF1 α , *Cell Death Dis*, **4**: e663, 2013.
7. Bornhorst J, Ebert F, Lohren H, Humpf H U, Karst U, Schwerdtle T, Effects of manganese and arsenic species on the level of energy related nucleotides in human cells, *Metallomics*, **4**: 297-306, 2012.
8. Burbaev D S, Moroz I A, Kotlyar A B, Sled V D, Vinogradov A D, Ubisemiquinone in the NADH-ubiquinone reductase region of the mitochondrial respiratory chain, *FEBS Lett*, **254**: 47-51, 1989.
9. Burlaka A, Selyuk M, Gafurov M, Lukin S, Potaskalova V, Sidorik E, Changes in mitochondrial functioning with electromagnetic radiation of ultra high frequency as revealed by electron paramagnetic resonance methods, *Int J Radiat Biol*, **90**: 357-362, 2014.
10. Burlaka A P, Ganusevich, II, Gafurov M R, Lukin S M, Sidorik E P, Stomach Cancer: Interconnection between the Redox State, Activity of MMP-2, MMP-9 and Stage of Tumor Growth,

- Cancer Microenviron*, **9**: 27-32, 2016.
11. Burlaka A P, Ganusevich I I, Lukin S N, Gafurov M R, Sidorik E P, Superoxide- and NO-Dependent Mechanisms of the Reprogramming of Bone Marrow Cells by Tumor Cells, *Applied Magnetic Resonance*, **45**: 1261-1273, 2014.
 12. Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels S J, Gibson S B, Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species, *J Cell Sci*, **120**: 4155-4166, 2007.
 13. Chen Z, Wang B, Yu F, Chen Q, Tian Y, Ma S, Liu X, The roles of mitochondria in radiation-induced autophagic cell death in cervical cancer cells, *Tumour Biol*, **37**: 4083-4091, 2016.
 14. Cheng G, Zielonka J, Ouari O, Lopez M, McAllister D, Boyle K, Barrios C S, Weber J J, Johnson B D, Hardy M, Dwinell M B, Kalyanaraman B, Mitochondria-Targeted Analogues of Metformin Exhibit Enhanced Antiproliferative and Radiosensitizing Effects in Pancreatic Cancer Cells, *Cancer Res*, **76**: 3904-3915, 2016.
 15. Choi Y M, Kim H K, Shim W, Anwar M A, Kwon J W, Kwon H K, Kim H J, Jeong H, Kim H M, Hwang D, Kim H S, Choi S, Mechanism of Cisplatin-Induced Cytotoxicity Is Correlated to Impaired Metabolism Due to Mitochondrial ROS Generation, *PLoS One*, **10**: e0135083, 2015.
 16. Coleman M C, Asbury C R, Daniels D, Du J, Aykin-Burns N, Smith B J, Li L, Spitz D R, Cullen J J, 2-deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer, *Free Radic Biol Med*, **44**: 322-331, 2008.
 17. Commoner B, Ternberg J L, Free radicals in surviving tissues, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **47**: 1374-1384, 1961.
 18. Conti F, Segre A L, Eremenko T, Zaniratti S, Elia G, Benedetto A, Volpe P, Electron spin resonance of growing normal and virus-transformed cells, *Cancer Biochem Biophys*, **5**: 195-199, 1981.
 19. Danielsen T, Skoyum R, Rofstad E K, Hypoxia-induced changes in radiation sensitivity in human melanoma cells: importance of oxygen-regulated proteins, adenylate energy charge and cell cycle distribution, *Radiother Oncol*, **44**: 177-182, 1997.
 20. De Jong A M, Albracht S P, Ubisemiquinones as obligatory intermediates in the electron transfer

- from NADH to ubiquinone, *Eur J Biochem*, **222**: 975-982, 1994.
21. Derr R F, Zieve L, Adenylate energy charge: relation to guanylate energy charge and the adenylate kinase equilibrium constant, *Biochem Biophys Res Commun*, **49**: 1385-1390, 1972.
22. Doherty J R, Cleveland J L, Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics, *J Clin Invest*, **123**: 3685-3692, 2013.
23. Dong Y, Bey E A, Li L S, Kabbani W, Yan J, Xie X J, Hsieh J T, Gao J, Boothman D A, Prostate cancer radiosensitization through poly(ADP-Ribose) polymerase-1 hyperactivation, *Cancer Res*, **70**: 8088-8096, 2010.
24. Duivenvoorden W C, Hopmans S N, Gallino D, Farrell T, Gerdes C, Glennie D, Lukka H, Pinthus J H, Inhibition of carbonic anhydrase IX (CA9) sensitizes renal cell carcinoma to ionizing radiation, *Oncol Rep*, **34**: 1968-1976, 2015.
25. Elas M, Bielanska J, Pustelny K, Plonka P M, Drelicharz L, Skorka T, Tyrankiewicz U, Wozniak M, Heinze-Paluchowska S, Walski M, Wojnar L, Fortin D, Ventura-Clapier R, Chlopicki S, Detection of mitochondrial dysfunction by EPR technique in mouse model of dilated cardiomyopathy, *Free Radic Biol Med*, **45**: 321-328, 2008.
26. Emanuel N M, Kinetics and the free-radical mechanisms of tumor growth, *Ann N Y Acad Sci*, **222**: 1010-1030, 1973.
27. Fetisova E K, Antoschina M M, Cherepanynets V D, Izumov D S, Kireev, II, Kireev R I, Lyamzaev K G, Riabchenko N I, Chernyak B V, Skulachev V P, Radioprotective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQR1, *Radiat Res*, **183**: 64-71, 2015.
28. Fujibayashi Y, Waki A, Sakahara H, Konishi J, Yonekura Y, Ishii Y, Yokoyama A, Transient increase in glycolytic metabolism in cultured tumor cells immediately after exposure to ionizing radiation: from gene expression to deoxyglucose uptake, *Radiat Res*, **147**: 729-734, 1997.
29. Fujii H, Sakata K, Katsumata Y, Sato R, Kinouchi M, Someya M, Masunaga S, Hareyama M, Swartz H M, Hirata H, Tissue oxygenation in a murine SCC VII tumor after X-ray irradiation as determined by EPR spectroscopy, *Radiother Oncol*, **86**: 354-360, 2008.
30. Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind J F, Tumor glycolysis as a target for cancer therapy:

- progress and prospects, *Mol Cancer*, **12**: 152, 2013.
31. Gerweck L E, Seetharaman K, Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer, *Cancer Res*, **56**: 1194-1198, 1996.
 32. Goldman R D, Kaplan N O, Hall T C, Lactic Dehydrogenase in Human Neoplastic Tissues, *Cancer Res*, **24**: 389-399, 1964.
 33. Goodwin J, Yachi K, Nagane M, Yasui H, Miyake Y, Inanami O, Bobko A A, Khramtsov V V, Hirata H, In vivo tumour extracellular pH monitoring using electron paramagnetic resonance: the effect of X-ray irradiation, *NMR Biomed*, **27**: 453-458, 2014.
 34. Havens C G, Ho A, Yoshioka N, Dowdy S F, Regulation of late G1/S phase transition and APC Cdh1 by reactive oxygen species, *Mol Cell Biol*, **26**: 4701-4711, 2006.
 35. Heigenhauser G J, Parolin M L, Role of pyruvate dehydrogenase in lactate production in exercising human skeletal muscle, *Adv Exp Med Biol*, **474**: 205-218, 1999.
 36. Hosoki A, Yonekura S, Zhao Q L, Wei Z L, Takasaki I, Tabuchi Y, Wang L L, Hasuike S, Nomura T, Tachibana A, Hashiguchi K, Yonei S, Kondo T, Zhang-Akiyama Q M, Mitochondria-targeted superoxide dismutase (SOD2) regulates radiation resistance and radiation stress response in HeLa cells, *J Radiat Res*, **53**: 58-71, 2012.
 37. Hu S, Gao Y, Zhou H, Kong F, Xiao F, Zhou P, Chen Y, New insight into mitochondrial changes in vascular endothelial cells irradiated by gamma ray, *Int J Radiat Biol*, **93**: 470-476, 2017.
 38. Inanami O, Takahashi K, Kuwabara M, Attenuation of caspase-3-dependent apoptosis by Trolox post-treatment of X-irradiated MOLT-4 cells, *Int J Radiat Biol*, **75**: 155-163, 1999.
 39. Indo H P, Inanami O, Koumura T, Suenaga S, Yen H C, Kakinuma S, Matsumoto K, Nakanishi I, St Clair W, St Clair D K, Matsui H, Cornette R, Gusev O, Okuda T, Nakagawa Y, Ozawa T, Majima H J, Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE, *Free Radic Res*, **46**: 1029-1043, 2012.
 40. Jahnke V E, Sabido O, Freyssenet D, Control of mitochondrial biogenesis, ROS level, and cytosolic Ca²⁺ concentration during the cell cycle and the onset of differentiation in L6E9 myoblasts, *Am J Physiol Cell Physiol*, **296**: C1185-1194, 2009.

41. Jakubowska M, Sniegocka M, Podgorska E, Michalczyk-Wetula D, Urbanska K, Susz A, Fiedor L, Pyka J, Plonka P M, Pulmonary metastases of the A549-derived lung adenocarcinoma tumors growing in nude mice. A multiple case study, *Acta Biochim Pol*, **60**: 323-330, 2013.
42. Jastroch M, Divakaruni A S, Mookerjee S, Treberg J R, Brand M D, Mitochondrial proton and electron leaks, *Essays Biochem*, **47**: 53-67, 2010.
43. Kalia V K, Prabhakara S, Narayanan V, Modulation of cellular radiation responses by 2-deoxy-D-glucose and other glycolytic inhibitors: implications for cancer therapy, *J Cancer Res Ther*, **5 Suppl 1**: S57-60, 2009.
44. Kashino G, Tamari Y, Kumagai J, Tano K, Watanabe M, Suppressive effect of ascorbic acid on the mutagenesis induced by the bystander effect through mitochondrial function, *Free Radic Res*, **47**: 474-479, 2013.
45. Kobashigawa S, Kashino G, Suzuki K, Yamashita S, Mori H, Ionizing radiation-induced cell death is partly caused by increase of mitochondrial reactive oxygen species in normal human fibroblast cells, *Radiat Res*, **183**: 455-464, 2015.
46. Kobashigawa S, Suzuki K, Yamashita S, Ionizing radiation accelerates Drp1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **414**: 795-800, 2011.
47. Komarov D A, Ichikawa Y, Yamamoto K, Stewart N J, Matsumoto S, Yasui H, Kirilyuk I A, Khramtsov V V, Inanami O, Hirata H, In Vivo Extracellular pH Mapping of Tumors Using Electron Paramagnetic Resonance, *Anal Chem*, **90**: 13938-13945, 2018.
48. Kotlyar A B, Sled V D, Burbaev D S, Moroz I A, Vinogradov A D, Coupling site I and the rotenone-sensitive ubiquinone in tightly coupled submitochondrial particles, *FEBS Lett*, **264**: 17-20, 1990.
49. Labuschagne C F, van den Broek N J, Postma P, Berger R, Brenkman A B, A protocol for quantifying lipid peroxidation in cellular systems by F2-isoprostane analysis, *PLoS One*, **8**: e80935, 2013.
50. Lanciano P, Khalifaoui-Hassani B, Selamoglu N, Ghelli A, Rugolo M, Daldal F, Molecular

- mechanisms of superoxide production by complex III: a bacterial versus human mitochondrial comparative case study, *Biochim Biophys Acta*, **1827**: 1332-1339, 2013.
51. Le A, Cooper C R, Gouw A M, Dinavahi R, Maitra A, Deck L M, Royer R E, Vander Jagt D L, Semenza G L, Dang C V, Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**: 2037-2042, 2010.
52. Ledenev A N, Ruuge E K, Generation of superoxide radicals by mitochondria of the ischemic heart, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **100**: 1204-1206, 1985.
53. Lin X, Zhang F, Bradbury C M, Kaushal A, Li L, Spitz D R, Aft R L, Gius D, 2-Deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism, *Cancer Res*, **63**: 3413-3417, 2003.
54. Liu W, Morrow J D, Yin H, Quantification of F2-isoprostanes as a reliable index of oxidative stress in vivo using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method, *Free Radic Biol Med*, **47**: 1101-1107, 2009.
55. Lopez-Lazaro M, The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen?, *Anticancer Agents Med Chem*, **8**: 305-312, 2008.
56. Lu C L, Qin L, Liu H C, Candas D, Fan M, Li J J, Tumor cells switch to mitochondrial oxidative phosphorylation under radiation via mTOR-mediated hexokinase II inhibition-a Warburg-reversing effect, *PLoS One*, **10**: e0121046, 2015.
57. Macheda M L, Rogers S, Best J D, Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer, *J Cell Physiol*, **202**: 654-662, 2005.
58. Maharjan S, Oku M, Tsuda M, Hoseki J, Sakai Y, Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition, *Sci Rep*, **4**: 5896, 2014.
59. Marrache S, Pathak R K, Dhar S, Detouring of cisplatin to access mitochondrial genome for overcoming resistance, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**: 10444-10449, 2014.
60. Martinez-Diez M, Santamaria G, Ortega A D, Cuezva J M, Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'UTRs, *PLoS One*, **1**: e107, 2006.
61. Matsumoto S S, Raivio K O, Seegmiller J E, Adenine nucleotide degradation during energy

- depletion in human lymphoblasts. Adenosine accumulation and adenylate energy charge correlation, *J Biol Chem*, **254**: 8956-8962, 1979.
62. McClain D E, Kalinich J F, Ramakrishnan N, Trolox inhibits apoptosis in irradiated MOLT-4 lymphocytes, *Faseb j*, **9**: 1345-1354, 1995.
63. Moran M, Moreno-Lastres D, Marin-Buera L, Arenas J, Martin M A, Ugalde C, Mitochondrial respiratory chain dysfunction: implications in neurodegeneration, *Free Radic Biol Med*, **53**: 595-609, 2012.
64. Motoori S, Majima H J, Ebara M, Kato H, Hirai F, Kakinuma S, Yamaguchi C, Ozawa T, Nagano T, Tsujii H, Saisho H, Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase protects against radiation-induced cell death in the human hepatocellular carcinoma cell line HLE, *Cancer Res*, **61**: 5382-5388, 2001.
65. Nagane M, Yasui H, Yamamori T, Zhao S, Kuge Y, Tamaki N, Kameya H, Nakamura H, Fujii H, Inanami O, Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model, *Biochem Biophys Res Commun*, **437**: 420-425, 2013.
66. Nebert D W, Mason H S, AN ELECTRON SPIN RESONANCE STUDY OF NEOPLASMS, *Cancer Res*, **23**: 833-840, 1963.
67. Nicholas D, Proctor E A, Raval F M, Ip B C, Habib C, Ritou E, Grammatopoulos T N, Steenkamp D, Doms H, Apovian C M, Lauffenburger D A, Nikolajczyk B S, Advances in the quantification of mitochondrial function in primary human immune cells through extracellular flux analysis, *PLoS One*, **12**: e0170975, 2017.
68. Nishida N, Yasui H, Nagane M, Yamamori T, Inanami O, 3-Methyl pyruvate enhances radiosensitivity through increasing mitochondria-derived reactive oxygen species in tumor cell lines, *J Radiat Res*, **55**: 455-463, 2014.
69. Nissanka N, Moraes C T, Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease, *FEBS Lett*, **592**: 728-742, 2018.
70. Ogura A, Oowada S, Kon Y, Hirayama A, Yasui H, Meike S, Kobayashi S, Kuwabara M, Inanami O, Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung

- carcinoma A549 cells, *Cancer Lett*, **277**: 64-71, 2009.
71. Pandian R P, Parinandi N L, Ilangoan G, Zweier J L, Kuppusamy P, Novel particulate spin probe for targeted determination of oxygen in cells and tissues, *Free Radic Biol Med*, **35**: 1138-1148, 2003.
72. Parks S K, Chiche J, Pouyssegur J, pH control mechanisms of tumor survival and growth, *J Cell Physiol*, **226**: 299-308, 2011.
73. Passos J F, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor C J, Miwa S, Olijslagers S, Hallinan J, Wipat A, Saretzki G, Rudolph K L, Kirkwood T B, von Zglinicki T, Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence, *Mol Syst Biol*, **6**: 347, 2010.
74. Pike Winer L S, Wu M, Rapid analysis of glycolytic and oxidative substrate flux of cancer cells in a microplate, *PLoS One*, **9**: e109916, 2014.
75. Privalle L S, Burris R H, Adenine nucleotide levels in and nitrogen fixation by the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 7120, *J Bacteriol*, **154**: 351-355, 1983.
76. Reily C, Mitchell T, Chacko B K, Benavides G, Murphy M P, Darley-Usmar V, Mitochondrially targeted compounds and their impact on cellular bioenergetics, *Redox Biol*, **1**: 86-93, 2013.
77. Rupp H, Rao K K, Hall D O, Cammack R, Electron spin relaxation of iron-sulphur proteins studied by microwave power saturation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, **537**: 255-269, 1978.
78. Ruuge E K, Ledenev A N, Lakomkin V L, Konstantinov A A, Ksenzenko M, Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion, *Am J Physiol*, **261**: 81-86, 1991.
79. Saenko Y, Cieslar-Pobuda A, Skonieczna M, Rzeszowska-Wolny J, Changes of reactive oxygen and nitrogen species and mitochondrial functioning in human K562 and HL60 cells exposed to ionizing radiation, *Radiat Res*, **180**: 360-366, 2013.
80. Schonfeld P, Wojtczak L, Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport, *Biochim Biophys Acta*, **1767**: 1032-1040, 2007.
81. Segre A L, Benedetto A, Eremenko T, Volpe P, Di Nola A, Conti F, An electron paramagnetic

- resonance study of free radicals in cells, *Biochim Biophys Acta*, **497**: 615-621, 1977.
82. Skoyum R, Eide K, Berg K, Rofstad E K, Energy metabolism in human melanoma cells under hypoxic and acidic conditions in vitro, *Br J Cancer*, **76**: 421-428, 1997.
83. Sorokina I V, Denisenko T V, Imreh G, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Reactive oxygen species regulate a balance between mitotic catastrophe and apoptosis, *Int J Biochem Cell Biol*, **81**: 133-136, 2016.
84. Starenki D, Park J I, Selective Mitochondrial Uptake of MKT-077 Can Suppress Medullary Thyroid Carcinoma Cell Survival In Vitro and In Vivo, *Endocrinol Metab (Seoul)*, **30**: 593-603, 2015.
85. Svistunenko D A, Davies N, Brealey D, Singer M, Cooper C E, Mitochondrial dysfunction in patients with severe sepsis: an EPR interrogation of individual respiratory chain components, *Biochim Biophys Acta*, **1757**: 262-272, 2006.
86. Swartz H M, Effect of oxygen on freezing damage: II. Physicalchemical effects, *Cryobiology*, **8**: 255-264, 1971.
87. Swartz H M, Chapter 4, Cells and Tissues, in: H.M. Swartz, J.R. Bolton, D.C. Borg (Eds.) Biological Applications of Electron Spin Resonance, John Wiley & Sons Inc, Place Published, 1972, pp. 155-196.
88. Swartz H M, Molenda R P, ELECTRON SPIN RESONANCE CHARACTERISTICS OF SOME NORMAL TISSUES: EFFECT OF MICROWAVE POWER, *Science*, **148**: 94-95, 1965.
89. Trendeleva T A, Rogov A G, Cherepanov D A, Sukhanova E I, Il'yasova T M, Severina, II, Zvyagil'skaya R A, Interaction of tetraphenylphosphonium and dodecyltriphenylphosphonium with lipid membranes and mitochondria, *Biochemistry (Mosc)*, **77**: 1021-1028, 2012.
90. Trnka J, Elkalaf M, Andel M, Lipophilic triphenylphosphonium cations inhibit mitochondrial electron transport chain and induce mitochondrial proton leak, *PLoS One*, **10**: e0121837, 2015.
91. Turrens J F, Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain, *Biosci Rep*, **17**: 3-8, 1997.
92. Vander Heiden M G, Cantley L C, Thompson C B, Understanding the Warburg Effect: The

- Metabolic Requirements of Cell Proliferation, *Science*, **324**: 1029-1033, 2009.
93. Vithayathil A J, Ternberg J L, Commoner B, Changes in electron spin resonance signals of rat liver during chemical carcinogenesis, *Nature*, **207**: 1246-1249, 1965.
94. Wang M, Keogh A, Treves S, Idle J R, Beyoglu D, The metabolomic profile of gamma-irradiated human hepatoma and muscle cells reveals metabolic changes consistent with the Warburg effect, *PeerJ*, **4**: e1624, 2016.
95. Warburg O, On the origin of cancer cells, *Science*, **123**: 309-314, 1956.
96. Wiegman C H, Michaeloudes C, Haji G, Narang P, Clarke C J, Russell K E, Bao W, Pavlidis S, Barnes P J, Kanerva J, Bittner A, Rao N, Murphy M P, Kirkham P A, Chung K F, Adcock I M, Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *J Allergy Clin Immunol*, **136**: 769-780, 2015.
97. Wongrakpanich A, Geary S M, Joiner M L, Anderson M E, Salem A K, Mitochondria-targeting particles, *Nanomedicine (Lond)*, **9**: 2531-2543, 2014.
98. Wykoff C C, Beasley N J, Watson P H, Turner K J, Pastorek J, Sibtain A, Wilson G D, Turley H, Talks K L, Maxwell P H, Pugh C W, Ratcliffe P J, Harris A L, Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases, *Cancer Res*, **60**: 7075-7083, 2000.
99. Yamaguchi M, Kashiwakura I, Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells, *PLoS One*, **8**: e70503, 2013.
100. Yamamori T, Ike S, Bo T, Sasagawa T, Sakai Y, Suzuki M, Yamamoto K, Nagane M, Yasui H, Inanami O, Inhibition of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein 1 (Drp1) impairs mitochondrial fission and mitotic catastrophe after x-irradiation, *Mol Biol Cell*, **26**: 4607-4617, 2015.
101. Yamamori T, Sasagawa T, Ichii O, Hiyoshi M, Bo T, Yasui H, Kon Y, Inanami O, Analysis of the mechanism of radiation-induced upregulation of mitochondrial abundance in mouse fibroblasts, *J Radiat Res*, **58**: 292-301, 2017.
102. Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, Inanami O, Ionizing

- radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint, *Free Radic Biol Med*, **53**: 260-270, 2012.
103. Yasui H, Matsumoto S, Devasahayam N, Munasinghe J P, Choudhuri R, Saito K, Subramanian S, Mitchell J B, Krishna M C, Low-field magnetic resonance imaging to visualize chronic and cycling hypoxia in tumor-bearing mice, *Cancer Res*, **70**: 6427-6436, 2010.
104. Yasui H, Yamamoto K, Suzuki M, Sakai Y, Bo T, Nagane M, Nishimura E, Yamamori T, Yamasaki T, Yamada K I, Inanami O, Lipophilic triphenylphosphonium derivatives enhance radiation-induced cell killing via inhibition of mitochondrial energy metabolism in tumor cells, *Cancer Lett*, **390**: 160-167, 2017.
105. Yoshida T, Goto S, Kawakatsu M, Urata Y, Li T S, Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation, *Free Radic Res*, **46**: 147-153, 2012.
106. Zhang W, Zhang S-L, Hu X, Tam K Y, Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target?, *International Journal of Biological Sciences*, **11**: 1390-1400, 2015.
107. Zhang X, Zhou X, Chen R, Zhang H, Radiosensitization by inhibiting complex I activity in human hepatoma HepG2 cells to X-ray radiation, *J Radiat Res*, **53**: 257-263, 2012.
108. Zhao F, Ming J, Zhou Y, Fan L, Inhibition of Glut1 by WZB117 sensitizes radioresistant breast cancer cells to irradiation, *Cancer Chemother Pharmacol*, **77**: 963-972, 2016.
109. Zong W X, Rabinowitz J D, White E, Mitochondria and Cancer, *Mol Cell*, **61**: 667-676, 2016.
110. Zweier J L, Flaherty J T, Weisfeldt M L, Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**: 1404-1407, 1987.

**The effect of X-irradiation on energy metabolism of mitochondria and glycolysis
in several cancer cells**

Kumiko Yamamoto

Laboratory of Radiation Biology,

Graduate School of Veterinary Medicine,

Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

It is well known that cancer cells depend on glycolysis for energy production rather than utilizing the mitochondrial electron transport chain (ETC) even under oxygenated conditions and this phenomenon is called “Warburg effect”. However, recent studies showed that mitochondrial ETC inhibitors induce the increase of cell death in several cancer cells. Recently, the studies of our laboratory showed that ATP production, reactive oxygen species (ROS) from mitochondria and mitochondrial membrane potential increased after X-irradiation, suggesting that mitochondrial ETC in cancer cells was activated by X-irradiation. Furthermore, it has been reported that the inhibitors of mitochondrial ETC induced sensitization to X-irradiation. These reports indicate that mitochondria have important roles in cell survival of cancer cells. However, details of radiation responses of mitochondrial ETC in cancer cells are not fully elucidated.

In this study, to clarify the role of mitochondrial function in tumor cells exposed to X-rays, I established methods to evaluate mitochondrial respiration parameters, mitochondrial semiquinone (SQ) radical, Fe-S cluster and extracellular acidification by

electron spin resonance (ESR). ESR oximetry demonstrated that mitochondrial respiratory parameters increased in HeLa cells, SW480 cells, A549 cells and MIA PaCa-2 cells at 24 h after X-irradiation. However, the mitochondrial mass also increased following X-irradiation. When the OCR was standardized to the mitochondria membrane mass, the X-irradiation-induced increase in respiratory parameters disappeared. These results indicate that X-irradiation induced the increase in cellular OCR by an increase in mitochondrial mass but not by the activation of mitochondrial respiratory-related enzymes. In addition, mitochondrial SQ at $g=2.004$ and Fe-S cluster at $g=1.941$ were detected in HeLa cells by low-temperature ESR spectroscopy. The ESR signal intensity of SQ was enhanced by X-irradiation although the signal intensity of Fe-S cluster was not altered after X-irradiation in HeLa cells, indicating that the increase in the electron flow in the mitochondrial ETC and redox imbalance in the mitochondria of X-irradiated cells. Moreover, to evaluate the effect of X-irradiation-induced ROS production on intracellular lipid peroxidation levels, I analysed F2-isoprostane levels, a lipid peroxidation product of arachidonic acid, by LC-MS/MS. F2-isoprostanes contents remained unaltered until 24 h after X-irradiation even though mitochondrial ROS production was increased at 24 h after X-irradiation. Furthermore, to evaluate whether X-irradiation-induced activation of mitochondrial ETC impacts cellular energy metabolism, intracellular AMP, ADP, ATP, NAD^+ and NADH levels were measured by LC/UV. ATP and NAD^+ were increased at 12 h after X-irradiation, and AMP, ADP, ATP were also increased at 24 h after X-irradiation in HeLa cells. The values of adenylate energy charge (AEC), an indicator of energy balance, and NADH were maintained within the range of physiological condition. These results suggesting that X-irradiation-induced mitochondrial ETC activation is the

adaptive response against genotoxic stimuli such as X-rays.

Next, to clarify the radiation responses of glucose metabolism as well as mitochondrial metabolism, I evaluated the radiation responses of extracellular acidification rate, uptake of [³H]-deoxy-2-glucose and lactate production in HeLa cells, SW480 and A549 cells. The measurements of extracellular acidification rate was evaluated by ESR spectrometry with a pH-sensitive probe, 2-(4-((2-(4-amino-4-carboxybutanamido)-3-(carboxymethylamino)-3-oxopropylthio)methyl) phenyl)-4-pyrrolidino-2,5,5-triethyl-2,5-dihydro-1H-imidazol-1-oxyl (R-SG). The result showed that extracellular acidification rate was not changed although [³H]-deoxy-2-glucose and lactate production were significantly increased at 24 h after X-irradiation in HeLa cells, SW480 cells, A549 cells and MIA PaCa-2 cells. These results suggested that not only mitochondrial respiration linked with ETC but also glycolysis upregulated after X-irradiation.

In conclusion, X-irradiation induced mitochondrial ETC activation and this activation is the adaptive responses for cell survival against X-rays. In addition, the application of ESR oximetry, low-temperature ESR spectroscopy and the evaluation of extracellular acidification by ESR to analyse whole cells are powerful tool for analyzing the energy metabolism.