HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	がん細胞におけるミトコンドリア由来活性酸素を介した3-Methyl pyruvateによる放射線感受性の増強
Author(s)	西田, 直哉
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11283号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11283
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56134
Type	doctoral thesis
File Information	Naoya_Nishida.pdf



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

がん細胞におけるミトコンドリア由来活性酸素を介した 3-Methyl pyruvate による放射線感受性の増強

西田　直哉

目次 1

略語一覧 2

1) 序論 3

2) 材料と方法 8

2-1 試薬 8

2-2 細胞株及び培養方法 8

2-3 薬剤処置後の各細胞におけるコロニー形成法による増殖死の評価 8

2-4 X 線照射 9

2-5 ミトコンドリア膜電位(Δψ*m*)とミトコンドリア由来 ROS 産生の測定 10

2-6 細胞内 ATP 量の解析 10

2-7 統計解析 11

3) 結果 12

3-1 腫瘍細胞におけるコロニー形成法による MP の細胞毒性と
放射線増感効果 12

3-2 正常細胞におけるコロニー形成法による MP の細胞毒性と
放射線増感効果 13

3-3 MP による X 線照射細胞のミトコンドリア膜電位に及ぼす影響 13

3-4 MP による X 線照射細胞の細胞内 ATP 産生に与える効果 14

3-5 MP による X 線照射細胞のミトコンドリア由来 ROS 産生に
及ぼす影響 15

3-6 A549 細胞並びに SCCVII 細胞における、MP 誘発放射線増感効果
に対する抗酸化物質 vitamin C の効果 16

4) 考察 24

5) 総括 30

謝辞 31

参考文献 32

英文抄録 40

略語一覧

αMEM：alpha minimum essential medium

BSA：bovine serum albumin

DCA：dichloroacetate

DMSO：dimethyl sulfoxide

EDTA：ethylenediamine tetraacetic acid

FBS：fetal bovine serum

MSR：Mito SOX^{TM} Red

PBS：phosphate-buffered saline

PDK：pyruvate dehydrogenase kinase

PDH：pyruvate dehydrogenase

PE：plating efficiency

ROS：reactive oxygen species

SAPK：stress-activated protein kinases

TMRM：tetramethylrhodamine methyl ester

1)　序論

がん細胞では正常細胞と比較して異なる様式のエネルギー代謝を示すということがよく知られている[1-4]。一般的に、がん細胞では解糖系の亢進やペントースリン酸回路の亢進、さらに酸化的リン酸化の低下を示す[1-4]。これら正常細胞とがん細胞の代謝の違いは、がん細胞において酸化的リン酸化が機能不全に陥り、代償的に解糖系を亢進することでこの機能不全を補っているものと考えられている[1]。近年この様ながん細胞に特徴的なエネルギー代謝を標的として放射線感受性を高める事で、効果的ながんの放射線増感効果を促す方法がいくつか報告されている。しかし、正常細胞とがん細胞におけるエネルギー代謝の違いが何故、放射線感受性に影響を与えるのか、その具体的なメカニズムは十分に解明されていない。

まず、解糖系に関していえば、多くのがん細胞における特徴として解糖の亢進が存在し、酸化的リン酸化よりも解糖系に依存したエネルギー産生システムを持つ事が知られている。ワールブルグ効果として知られるこの現象は、単位時間当たりのグルコース取り込み量の増加や、酸素が存在するにも関わらず解糖系により ATP 産生を行うという特徴を示す[5]。がん治療における放射線照射は、フリーラジカルの産生による細胞障害をその機序としており、グルタチオン(GSH)などのチオール化合物が、フリーラジカルによる生体損傷の修復に関与する事が知られている[6]。したがって、チオール代謝を介して

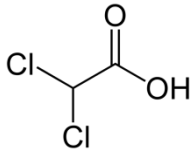
酸化ストレス誘発性細胞障害を増強する薬剤は放射線による抗腫瘍効果を増強すると考えられる[7,8]。解糖系はグルタチオンジスルフィドレダクターゼの介する GSH 産生に必要な NADPH の産生に深く関わっている事が知られている。解糖系を阻害する薬剤の候補として 2-deoxy-D-glucose (2DG)が挙げられる。2DG はグルコース 6 リン酸以降の反応を阻害し、グルコース欠乏と似た効果を示す

事から[9,10]、2DG を用いることでがん細胞に特徴的な好気的解糖系を標的とし、解糖系が阻害されると、NADPH の枯渇が起き、細胞内の GSH が低下し、放射線増感効果を引き起こす事が期待される。実際、Lin らはヒトの子宮頸がん HeLa 細胞を用いた培養系において、2DG を処理後、放射線を照射することで、細胞内総グルタチオン量の減少、細胞毒性ならびに放射線増感効果を報告している[11]。また、著者の卒業論文でも報告したが、マウス口腔扁平上皮癌 SCCVII 細胞を用い 2DG と X 線照射を併用する事で *in vivo* ならびに *in vivo* において 2DG による放射線増感効果と腫瘍成長抑制が見られた[12]。これらの結果はエネルギー代謝を修飾する事で、細胞内の抗酸化能の変化を通じて、細胞の放射線感受性を変えることができることを示している。

次に、通常のエネルギー代謝において主要な役割を果たすミトコンドリアに着目すると、ミトコンドリアについては解糖系以上に細胞死との関連があることが知られている。例えば、放射線照射によりBcl-2ファミリータンパク質の誘導を通じて、ミトコンドリアからチトクローム*c*やSmac/DIABLOなどを遊離し、ATP存在下でアポトーシスが起こること[13]、また、Oguraらの研究において放射線照射によりミトコンドリアから活性酸素が生じ、ミトコンドリアからのチトクローム *c* の遊離が引き金となり、下流のカスパーゼの活性化によりアポトーシスが起こることなどが報告されている[13]。このように放射線照射を介してミトコンドリアと細胞死は深く関わっている事[14]から、ミトコンドリア機能をエネルギー代謝の点から修飾する事で、細胞死を制御できる事が考えられる。また、ヒト多発性骨髄腫IM-9細胞や不死化マウス胚m5s細胞にX線照射数時間後に、細胞内の活性酸素種(ROS)が増加し[15,16]、この増加した細胞内ROS量はミトコンドリアからの漏出に寄与している[17]という報告がいくつかなされている。この様なX線照射後の細胞内ROS量の増加は、最近、Yamamoriらによって株化線維芽細

胞系(NIH3T3細胞)だけでなく多種多様ながん細胞系(ヒト肺腺がんA549細胞、ヒト子宮頸がんHeLa細胞、ヒト胃がんMKN45細胞、ヒトメラノーマMeWo細胞)でも報告されており、放射線により誘導されるミトコンドリア電子伝達系機能の亢進やミトコンドリア量の増加がミトコンドリア由来ROS量の増加に寄与しうるという事が示唆されている[18)]。近年の研究から、放射線照射後における細胞内ROS量の増加が、バイスタンダー効果[19,20)]、遺伝子不安定性[15,21-23)]、そしてアポトーシス[17,24,25)]などのいくつかの生物学的な作用を持つという事も報告されている。

これらの知見から、著者はミトコンドリア由来ROSの過剰な蓄積をがん細胞に起こさせる事によって放射線に対する感受性を増強し得るのではないかと仮説を立てた。しかしながら、多くのがん細胞におけるエネルギー代謝は、前述の様に酸素存在下にも関わらず、ミトコンドリアが休止状態にある為ミトコンドリア電子伝達系による酸化反応より好気的解糖に依存しており[1-4)]、ROSの生成が抑制されていると考えられる。がん細胞におけるこの様な制限を克服するために、pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)を抑制する事でピルビン酸デヒドロゲナーゼを活性化するジクロロ酢酸(DCA)がミトコンドリア機能を正常化するために用いられた一連の研究が報告されている[26-32)]。下記の様にDCAは150 ダルトン程の小さな分子であり、濃度依存的にPDKを阻害する薬剤である[26)]。

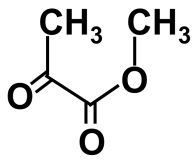


ジクロロ酢酸 (DCA)

このDCAはPDKを阻害することで、がん細胞ではPDKの作用により強く阻害されているpyruvate dehydrogenase (PDH)を活性化する事が知られている。活性化し

たPDHによって、ピルビン酸からAcetyl-CoAへの代謝を亢進させ、それ以降のミトコンドリアにおけるTCA回路や酸化的リン酸化が亢進することでミトコンドリア機能が活性化すると考えられている。DCAはこのような薬理作用から、ヒトの臨床では古くから、後天的あるいは先天的な乳酸性アシドーシス、心筋虚血や心不全、さらに先天的なミトコンドリア疾患の治療薬として使用されている[35,36]。Bonnetらによってがん細胞ではDCA処理した非小細胞肺がんA549細胞の細胞内のATP量、酸素消費、ミトコンドリアROS量の増加により腫瘍成長の抑制とアポトーシスの誘導を起こす事が報告されている[27]。同様の腫瘍成長抑制に関連する報告が、乳がん[28]、すい臓がん[29]、転移性乳がん[27,30]、結腸がん[31]、前立腺がん[32]、子宮内膜がん[33]、あるいは神経膠腫[34]を含む多くの異なるがん細胞系でもなされている。さらに、CaoらはPC3細胞を用いてDCA処理とX線照射の併用処理により、アポトーシスやG1細胞周期停止の増強を介した相乗的な細胞死の誘導が起きる事を明らかにしている[32]。これらの結果から、ミトコンドリア代謝を標的とした薬剤ががん細胞における放射線増感効果を誘導しうるという事が示唆される。実際に著者の卒業論文でも、DCAを用いてミトコンドリア膜電位の増加とミトコンドリア由来ROS産生の上昇などのミトコンドリア機能を亢進する事で放射線増感効果が明らかとなっている[12]がその詳細なメカニズムは依然として明らかとなっていない。また、このDCAを用いた放射線増感効果は、卒業論文での研究を通じていくつかの問題点が存在している事に著者は気付いた。一点目はDCAにおける放射線増感効果を示すのには、正常細胞の約40%を細胞死に導くという高い細胞毒性を持つ高いDCA濃度が必要である事であり、二点目はその作用機序からPDKとPDHという少なくとも二つの酵素活性に依存してしまう事で、がん細胞の種類によってはこれらの酵素の活性化の程度に依存して放射線の増感効果が小さい可能性が存在する事である。

そこで、DCAと同様にミトコンドリア機能をより直接的に活性化する方法はないかと考え、新規ミトコンドリア代謝の活性化薬剤3-メチルピルビン酸(MP)に着目した。下に示す様な構造で、MPはその脂質性から高い膜透過性を持ち、ピルビン酸よりTCA回路の基質となりやすい事が報告されている[37,38]。



3-メチルピルビン酸 (MP)

本研究では、ヒト非小細胞肺がんA549細胞、マウス口腔扁平上皮癌SCCVII細胞、さらにチャイニーズハムスター肺線維芽由来V79細胞を用いて、MPがミトコンドリア機能を亢進し得るのか、また、放射線増感効果を誘導しうるのかどうかの評価を行った。まず、MPが細胞の放射線感受性に与える影響についてコロニー形成法により評価した。次に、MPが腫瘍細胞でも実際にミトコンドリアを活性化できるか否かについて、ミトコンドリア膜電位ならびにATP産生量を指標に評価した。さらに、MPがミトコンドリア由来の活性酸素種 (ROS)の生成に対してどのように影響するのかをその特異的蛍光プローブを用いてフローサイトメーターにて測定した。また、過剰なミトコンドリア内ROS量と細胞死の関連性を調べる為に、放射線照射後の細胞に対して抗酸化物質であるビタミンC (vitamin C)処理の効果を増殖死の観点からも調べた。

2) 材料と方法

2-1 試薬

Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM)とMitoSOX™ Red (MSR)はInvitrogen (Carlsbad, CA, USA)より購入した。MSRはDMSOで溶解し5 mMのstock solutionとして調製した。MSRの終濃度が5 μMとなるように培地にこのstock solutionを添加した。TMRMは培地に直接溶解し20 mMに調製した。終濃度を20 nMとなるように培地に添加した。ATP assay kitsはTOYO B-Net Co. (Tokyo, Japan)より購入した。MP、vitamin C (L-ascorbic acid sodium salt)、その他一般試薬は和光純薬工業ならびに同仁化学研究所(熊本)より購入した。MPならびにvitamin Cは超純水で1 Mに調整し、培地に直接溶解し希釈して使用した。

2-2 細胞株及び培養方法

ヒト肺腺がん由来A549細胞の培養は、RPMI 1640培地(Invitrogen) (10%牛胎仔血清[FBS]、0.66 g/l $NaHCO_3$、10^5 U/l ペニシリンGカリウム[萬有製薬、東京]、0.1 g/l ストレプトマイシン[明治製菓，東京])、マウス口腔底扁平上皮がん由来SCCⅦ細胞とチャイニーズハムスター肺線維芽由来V79細胞の培養はαMEM培地(Invitrogen) (10%牛胎仔血清[FBS]、0.66 g/l $NaHCO_3$、10^5 U/l ペニシリンGカリウム[萬有製薬、東京]、0.1 g/l ストレプトマイシン[明治製菓，東京])にてそれぞれ行い、ウォータージャケット式インキュベーター(BNA-111; タバイエスペック、東京)にて37°C、5% CO_2の条件下で維持した。

2-3 薬剤処置後の各細胞におけるコロニー形成法による増殖死の評価

対数増殖期にあるA549細胞を10%FBS含有RPMI 1640に、またSCCVII細胞ならびにV79細胞をαMEMに再浮遊し、6 cmプラスチックシャーレ上に接着させた。

この際、最終的に一つのシャーレに10から100個のコロニーができるように線量に応じて細胞を播種した。培養液は総量が3 mlとなるように加えた。6時間インキュベーションして接着させた細胞は、MP処置では24時間、それぞれ培地1.5 ml中で薬剤処理した。シャーレを各線量のX線照射後直ちにPBS(-)で2回洗浄し、新鮮培地を5 ml加えて4から10日間培養した。vitamin Cの生存曲線に対する効果を調べる実験では、X線照射直後にvitamin Cを培地に加えた(終濃度;A549では1 mM、SCCVIIでは500 μM)。細胞をvitamin C存在下で培養した。培養終了後、培養液を捨ててメタノールでシャーレを洗浄し、再びメタノールを入れて10分間細胞を固定した。固定後、メタノールを捨てて1時間乾燥させた。次に2%ギムザ染色液(0.01 M NaH_2PO_4、0.01 M Na_2HPO_4)を3 ml入れ，1時間以上染色した後、乾燥させた。染色された細胞のコロニー数を計測し、生存率を求めた。横軸を線量（Gy)、縦軸に生存率（生存率＝コロニー形成数/播種細胞数×［1/PE］、PEはplating efficiencyの事であり、非照射の対照群のコロニー形成効率を示す。）をプロットした。なお、コロニー数の計測の際には、50個以上の細胞群からなるものをコロニーと定義した。生存曲線はOrigin Pro 7 data analysis software (OriginLab Co., Northampton, MA, USA)を用いて線形二次モデルに適合した。

2-4 X 線照射

X線照射には、X線発生装置PANTAK HF-320（島津製作所、京都）を使用した。培養細胞での実験においては、出力200 kV、20 mA、線源距離590 mmで、1.0 mm Alフィルターを使用し、ターンテーブルを用いて回転させながら線量率2.55 Gy/minで照射した。

2-5 ミトコンドリア膜電位(Δψ*m*)とミトコンドリア由来 ROS 産生の測定

ミトコンドリア膜電位の測定の為に、特異的蛍光プローブである TMRM[39)]をまた、ミトコンドリア由来 ROS 産生の為に MSR [39,40)]をそれぞれ用いた。6 cm に播種した対数増殖期の細胞を用いた。細胞を MP で 24 時間前処理して、それから PBS で 2 回洗い新鮮培地を加えた。X 線照射を行った細胞は 6、12、24 時間それぞれ培養した。培養後、細胞をトリプシン処理後回収して、20 nM の TMRM あるいは 2 μM の MSR を含む培地で 30 分間 37℃で染色を行った。染色後細胞を PBS(-)で 2 回洗浄し、細胞を回収して 1,500 rpm、4°C にて 5 分間遠心した。1 ml の血清を加えていない培地に再浮遊させてフローサイトメーターにより解析した。それぞれのサンプルの平均蛍光強度はコントロールの平均蛍光強度で標準化した。

2-6 細胞内ATP量の解析

細胞内ATP量の測定は、ホタルルシフェラーゼ発光法を利用したATP発光測定キット(TOYO B-Net Co.)を用いた。細胞を50 mMのMP処理単独、10 GyのX線あるいは50 mM MPとX線を照射して、24時間インキュベートした。各処理後細胞をトリプシン処理により回収し、10%FBSを含む培地を添加し、細胞を5×10^4個/mlになるように調整した。10 mM HEPES (pH 7.75)に溶解した1 mM ATP溶液をFBSを含まない培地で希釈し、10^{-4}~10^{-10} Mの希釈系列を作成し、これを検量線用標準サンプルとした。96穴プレートの各ウェルに、細胞液およびATP溶液を100 μl分注し、ATP測定試薬を各100 μl添加した。その後96穴プレートを1分間撹拌し、暗所にて25℃、30分間静置した後、25℃に設定したLuminometer (Luminescencer-JNR; ATTO, 東京)で単位時間当たりの発光量を測定した。

2-7 統計解析

データは平均値±標準誤差で表示し、少なくとも3回の独立した実験を行った。Student's *t*-検定により検定を行った。$p < 0.05$または$p < 0.01$の場合その差が有意であると判断した。

3) 結果

3-1 がん細胞におけるコロニー形成法によるMPの細胞毒性と放射線増感効果の評価

まず、MP の A549 細胞と SCCVII 細胞に対する細胞毒性を調べる為にコロニー形成法を用いて評価を行った。各細胞の薬剤未処理時に得られるコロニー形成率である plating efficiency (PE)を検討したところ、A549 細胞では 85%また SCCVI 細胞では 95%であった。そして、各濃度の MP 処置 24 時間後のコロニー形成率を検討し、この PE 値で補正し、片対数グラフに表す事で、MP による細胞毒性を調べた。図 1A と図 1B に示す様に 15 mM の MP は両細胞に対して全く細胞毒性を示さなかった。30 mM の MP の生残率は A549 細胞で 16±7%、SCCVII 細胞で 21±2%であった。さらに MP の濃度を上げた 50 mM の MP の生残率は、A549 細胞で 12±1%、SCCVII 細胞で 27±4%であった。データには示していないが 15 mM の MP は有意な放射線増感効果を示さなかった。しかしながら、図 1C と図 1D に示す様に X 線誘導細胞増殖死に対する MP の効果について評価したところ、X 線単独で得られた生存曲線に対し、MP の処理により明らかな生残率の減少を示した事から、濃度依存的な MP による放射線による増殖死の増強が見られた。また、X 線照射単独処置と 50 mM の MP と X 線照射の併用処置の際にコロニー形成率が 10%となる 10%生存率線量(D_{10})の比から増感比(Enhancement ratio)を計算したところ、A549 細胞では 1.30、SCCVII 細胞では 1.28 という値が得られた。これらの結果から MP は腫瘍細胞の放射線感受性を増強する事が示された。

3-2 非腫瘍細胞におけるコロニー形成法によるMPの細胞毒性と放射線増感効果の評価

次に、非腫瘍細胞であるチャイニーズハムスターV79 肺繊維芽細胞を用いて腫瘍細胞との MP に対する効果を A549 細胞や SCCVII 細胞と同様に検討した。まず、薬剤未処理時に得られるコロニー形成率である PE を検討したところ、92%であった。そして、各濃度の MP 処置 24 時間後のコロニー形成率を検討し、この PE 値で補正し片対数グラフに表す事で、MP による細胞毒性を調べた。その結果、図 2A から明らかな様に 15 mM ないし 30 mM の MP は全く細胞毒性を示さなかった。さらに MP の濃度を上げた 50 mM 処理では、8±1%のわずかな細胞毒性しか示さなかった。また、図 2 B から明らかな様に 50 mM の MP を用いても前述の腫瘍細胞と異なり、V79 細胞では全く放射線増感効果を示さなかった。

3-3 MPによるX線照射細胞のミトコンドリア膜電位に及ぼす影響

図 1C と図 1D から明らかになったように MP で処理をした各腫瘍細胞では有意な放射線増感効果を示すことが明らかとなった。しかしながら、この正常細胞よりミトコンドリア機能が低下していると言われる腫瘍細胞で MP がミトコンドリア機能を亢進させうるのかどうかについては不明である。そこで、腫瘍細胞でも MP によりミトコンドリア機能が亢進しているのかどうかについて、ミトコンドリア膜電位を指標として検討を行った[39]。ミトコンドリア膜電位は、その特異的蛍光プローブである TMRM (20 nM)を用いて、X 線と MP の併用処理細胞に対してフローサイトメトリーにより評価した。図 3A は、50 mM の MP、10 Gy の X 線照射、そして併用処理 24 時間後の A549 細胞から得られたフローサイトメトリーのプロファイルを示している。図 3A に示すように未処理の細胞と比較して、MP 単独処理した細胞では TMRM の蛍光強度に影響を与えなかっ

たが、X 線単独処理によりわずかに蛍光強度の増加が明らかとなった。X 線と MP の併用処理をした細胞では、X 線単独処理と比較して有意な TMRM の蛍光強度の増加を誘導した。また、A549 細胞と SCCVII 細胞において無処置の細胞における平均蛍光強度を 1 とした際の MP 単独、X 線単独、および X 線と MP 併用処理による TMRM の蛍光強度の経時的変化を評価した。図 3B に示すように、A549 細胞において MP 単独処理はいずれの経過時間でも TMRM の蛍光強度にあまり影響を与えなかったが、X 線処理単独では処理 12 時間および 24 時間後に有意な TMRM の蛍光強度の増加が観察された。さらに、A549 細胞においてX線と MP の併用処理 6 時間後において有意な TMRM の蛍光強度の増加が観察され、24 時間後ではX線処理単独と比較して約 1.4 倍程度の有意な TMRM の蛍光強度の増加が観察された。SCCVII 細胞では図 3C の示すように、MP 単独処理あるいはX線単独処理はいずれの経過時間でもTMRMの蛍光強度に影響をあまり与えなかったが、X 線処理 24 時間後ではわずかに増加傾向が見られた。SCCVII においてX線と MP の併用処理は、12 時間以降有意な TMRM の蛍光強度の増加がみられ、24 時間後ではX線処理単独と比較して約 1.4 倍増加した(図 3C)。これらの結果から、MP と X 線の併用処理は A549 細胞および SCCVII 細胞のミトコンドリア機能を亢進する事でミトコンドリア膜電位が増加したことを示している。

3-4 MPによるX線照射細胞の細胞内ATP産生に与える効果

図3Bと図3Cから明らかになったように、MPとX線照射の併用処理によりミトコンドリア膜電位の増加が見られた。この併用処理によるミトコンドリア膜電位の増加が、さらにミトコンドリアのエネルギー産生を活性化しているかどうかを検討するために、50 mMのMP単独処理、10 GyのX線単独処理、そして両

者の併用処理24時間後の細胞における細胞内ATP量を測定した。図4Aと図4Bに示す様に、未処理の細胞と比較して、MP単独処理では細胞内ATP産生に対して影響を与えないが、X線照射単独処理ではA549細胞ならびにSCCVII細胞において細胞内ATP量の有意な増加が生じた。さらに、両細胞においてMPとX線の併用処理ではX線単独処理と比較して、有意なATP量の増加が観察された。これらの結果から、MPはX線照射細胞におけるミトコンドリアATP産生を促進する事が示された。

3-5 MPによるX線照射細胞のミトコンドリア由来ROS産生に及ぼす影響

ミトコンドリアによるエネルギー代謝の過剰な活性化が、ミトコンドリアの電子伝達系から電子の漏出を引き起こし、酸素の一電子還元を介して活性酸素種のスーパーオキシドアニオンラジカル(O_2^{-}・)の生成を誘導する事が知られている[40]為、A549細胞並びにSCCVII細胞のミトコンドリア由来O_2^{-}・量をミトコンドリア由来の活性酸素種に特異的な蛍光プローブであるMito SOX^{TM} Red (MSR)を用いて、フローサイトメトリーにより測定した。図5Aは、50 mMのMP、10 GyのX線照射、そして併用処理24時間後のA549細胞から得られたフローサイトメトリーのプロファイルを示している。図5Aに示すように未処理の細胞と比較して、MP単独処理した細胞ではMSRの蛍光強度が増加し、X線単独処理でも同様に蛍光強度の増加が明らかとなった。X線とMPの併用処理をした細胞では、MP単独処理ならびにX線単独処理と比較して有意なMSRの蛍光強度が増加した。また、A549細胞とSCCVII細胞において無処置の細胞における平均蛍光強度を1とした際のMP単独、X線単独、およびMPとX線併用処理によるMSRの蛍光強度の経時的変化を評価した。MPとX線の併用処理を24時間した細胞では、X線単独処理と比較してミトコンドリア由来ROS産生量がA549細胞では約1.5倍、SCCVII

細胞では約1.6倍にまで有意に増加した(図5Bと図5C)。これらの結果から、MPとX線の併用処理はミトコンドリアのエネルギー代謝を過剰に活性化し、がん細胞におけるミトコンドリア由来のROS産生を亢進する事が示された。

3-6 A549細胞並びにSCCVII細胞における、MP誘発放射線増感効果に対する抗酸化物質vitamin Cの効果

MP誘発放射線増感効果におけるMPのROS産生の役割を明らかにするために、抗酸化物質であるvitamin Cを用いてMP誘発放射線増感効果に対する影響を調べた。細胞をX線照射後にvitamin C処理を行い、それからコロニー形成法を用いて増殖死を評価した。図6Aに示すように、X線単独処理をしたA549細胞に対してvitamin C処理は生存率に対して全く影響を与えなかったが、MP誘発放射線増感効果を完全に抑制した。一方、図6Bに示すようにSCCVII細胞ではvitamin C処理はMP誘発放射線増感効果の一部分を抑制した。次に、MP存在下におけるX線照射を行ったがん細胞のミトコンドリア由来ROS産生がvitamin C処理により減弱させるのかを確認するために、A549細胞とSCCVII細胞におけるミトコンドリア由来O_2^{-}・量を特異的蛍光プローブであるMSRを用いて測定した。図6Cと図6Dに示されるように、vitamin C処理は両細胞においてMP単独処理ならびにX線とMP併用処理によるミトコンドリア由来ROS産生を有意に抑制した。しかしながら、X線処理によるミトコンドリア由来のROS産生の増加には影響を与えなかった。これらの結果から、MP誘発放射線増感効果は少なくとも部分的に、ミトコンドリア由来のROS産生の増加に起因するという事が示唆された。

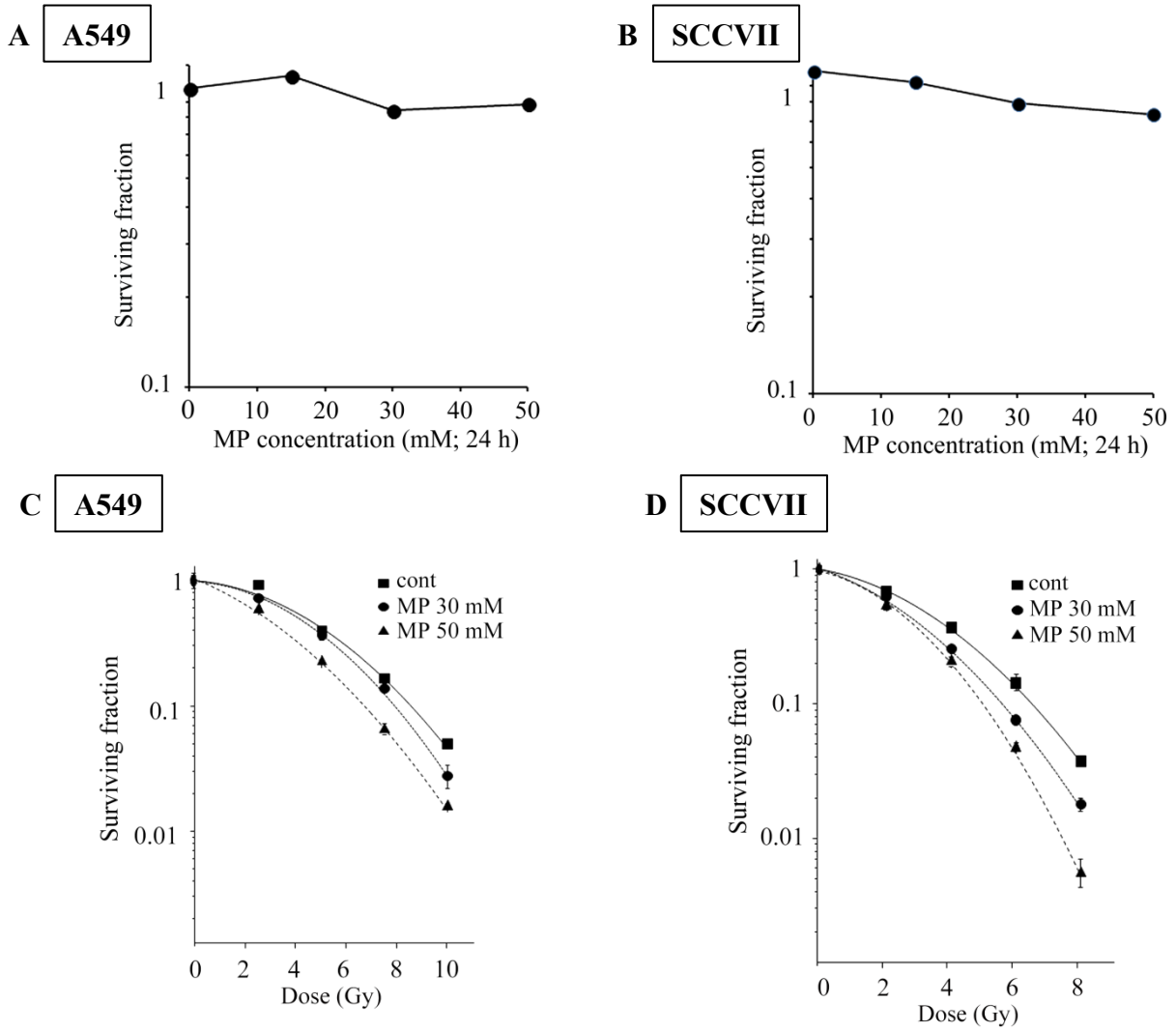


図1: A549細胞、SCCVII細胞におけるMPの放射線誘導増殖死の増強効果。
(A) A549細胞と(B) SCCVII細胞のMPによる細胞毒性。縦軸に細胞生存率、横軸にMP濃度とした。
(C) A549細胞と(D) SCCVII細胞のMPとX線照射の併用効果。縦軸に生存率、横軸にX線線量とした。
■: X線照射単独, ●: X線照射単独+ 30 mM MP、▲: X線照射単独+50 mM MPを表す。結果は平均±標準誤差(S.E.)で表示した。MPで処理直後新しい培地に交換し、MP存在下でX照射を行った。A549は10日間、SCCVII細胞は4日間培養した。

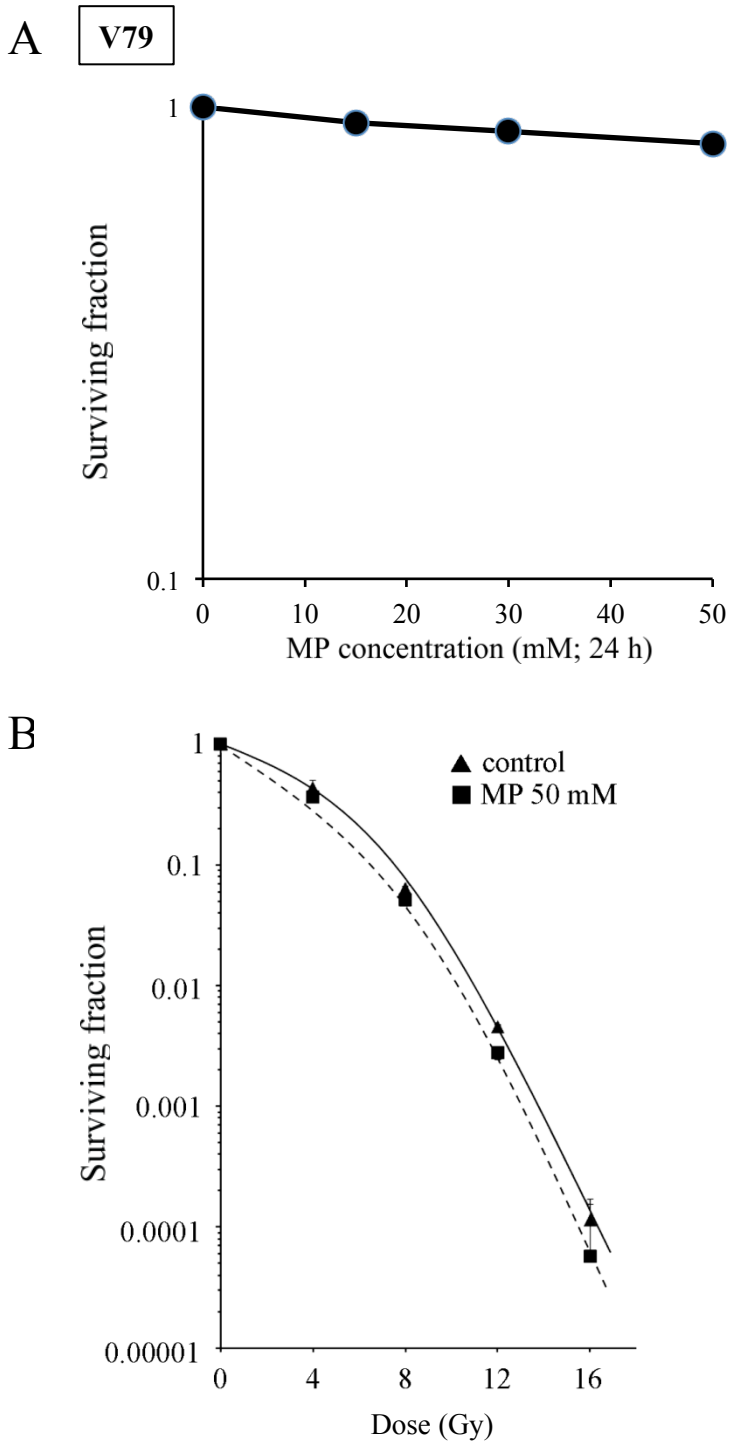


図2: V79細胞におけるMPの放射線誘導増殖死の増強効果。
(A) MPによる細胞毒性。縦軸に細胞生存率、横軸にMP濃度とした。
(B) MPとX線照射の併用効果。縦軸に生存率、横軸にX線線量とした。
▲ : X線照射単独, ■ : X線照射単独+ 50 mM MPを表す。結果は平均±標準誤差(S.E.)で表示した。MPで処理直後新しい培地に交換し、MP存在下でX照射を行い7日間培養した。

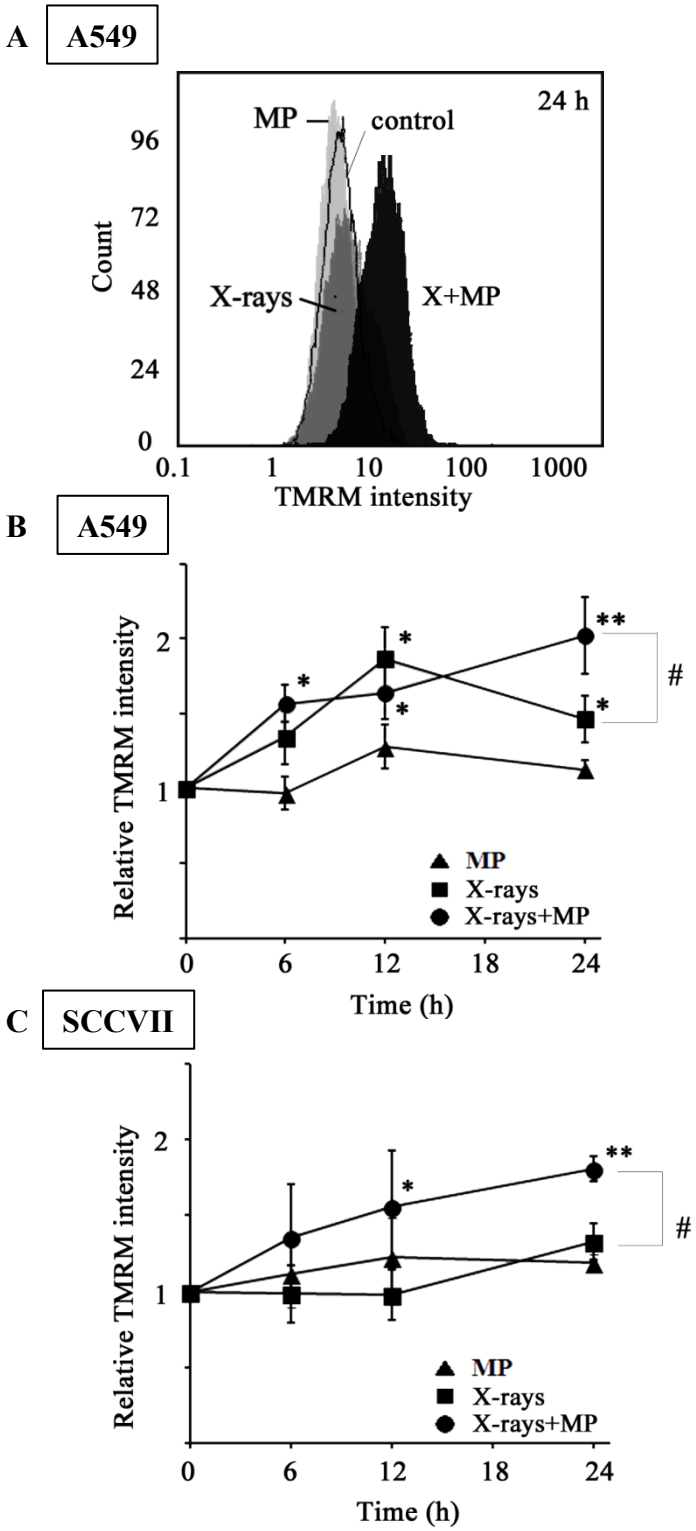


図3: A549細胞とSCCVII細胞におけるMP単独処理、X線照射単独処理ならびにMPとX線照射の併用処理のミトコンドリア膜電位に対する効果。

(A) A549細胞を無処理群、MP存在下あるいは非存在下でX線照射処理24時間インキュベーションし、20 nMのTMRMで37℃、30分処理した際に得られたフローサイトのプロファイル。白: 無処理; ライトグレー:50mM MP単独処理; ダークグレイ: 10 Gy X線照射単独処理; 黒: 10 Gy X線照射処理+ 50 mM MP処理。

(B) A549細胞と(C) SCCVII細胞は無処理、MP単独処理、X線照射単独処理およびMPとX線照射の併用処理し、それぞれ6、12、24時間のインキュベーションを行った。その後、細胞はTMRMで処理した後にフローサイトメトリーで分析した。結果は無処理細胞におけるプロファイルの平均蛍光強度を1とした際の相対的平均蛍光強度として示した。各データとバーは平均±標準誤差(S.E.)を示す。無処理群に対する有意差は、*:$p<0.05$、**:$p<0.01$、またX線照射単独処理群に対する有意差は#:$p<0.05$で示した。

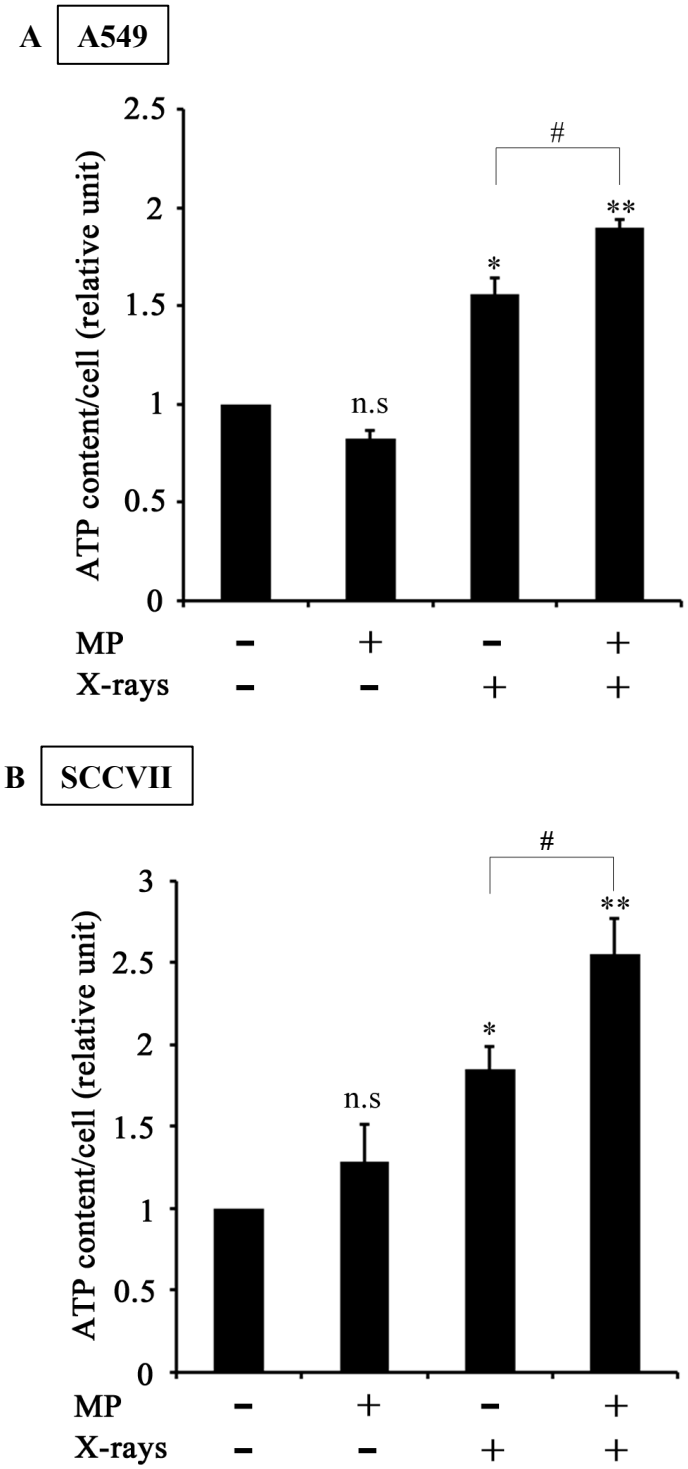


図4: A549細胞とSCCVII細胞におけるMP単独処理、X線照射単独処理ならびにMPとX線照射の併用処理の細胞内ATP量に対する効果。

(A)A549細胞と(B) SCCVII細胞は無処理、MP単独処理、X線照射単独処理ならびにMPとX線照射の併用処理をそれぞれ24時間インキュベーションを行った。処理後細胞はATP測定を行い、得られたルシフェラーゼ発光量の相対的変化として示した。各カラムとバーは平均±標準誤差(S.E.)で表示した。無処理群に対する有意差は、*:$p<0.05$、**:$p<0.01$、またX線照射単独処理群に対する有意差は#:$p<0.05$で示した。

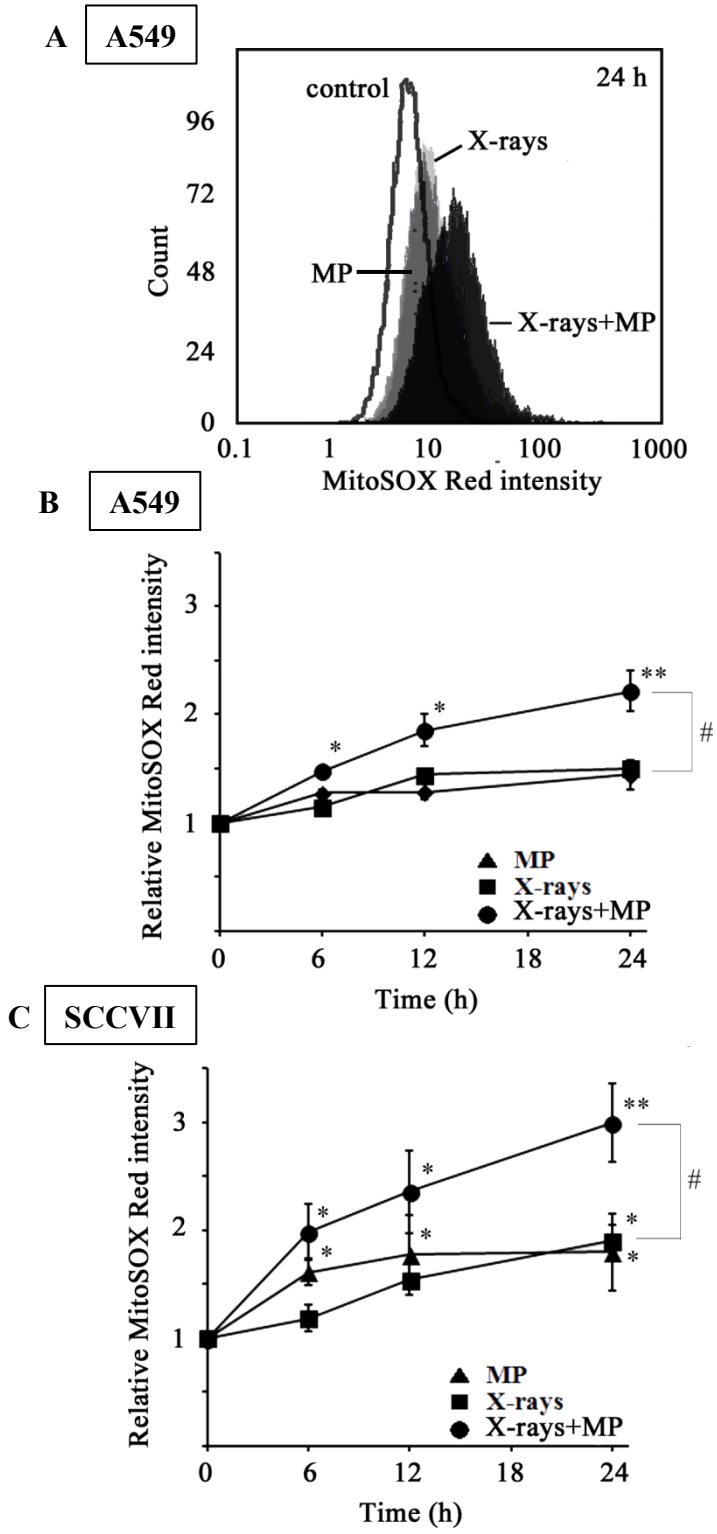


図5: A549細胞とSCCVII細胞におけるMP単独処理、X線照射単独処理ならびにMPとX線照射の併用処理のミトコンドリア由来ROSに対する効果。

(A) A549細胞を無処理群、MP存在下ならびに非存在下でX線照射を行った。照射後、24時間インキュベーションし、5 mMのMSRで37℃、30分処理した際に得られたフローサイトのプロファイル。白: 無処理; ライトグレー:50mM MP単独処理; ダークグレイ: 10 Gy X線照射単独処理; 黒: 10 Gy X線照射処理+ 50 mM MP処理。

(B) A549細胞と(C) SCCVII細胞は無処理、MP単独処理、X線照射単独処理およびMPとX線照射の併用処理をそれぞれ6, 12, 24時間インキュベーションを行った。細胞はMSRで処理した後にフローサイトメトリーで分析した。結果は無処理細胞におけるプロファイルの平均蛍光強度を1とした際の相対的平均蛍光強度を示した。各データとバーは平均±標準誤差(S.E.)を示す。無処理群に対する有意差は、*:$p<0.05$、**:$p<0.01$、またX線照射単独処理群に対する有意差は#:$p<0.05$を示す。

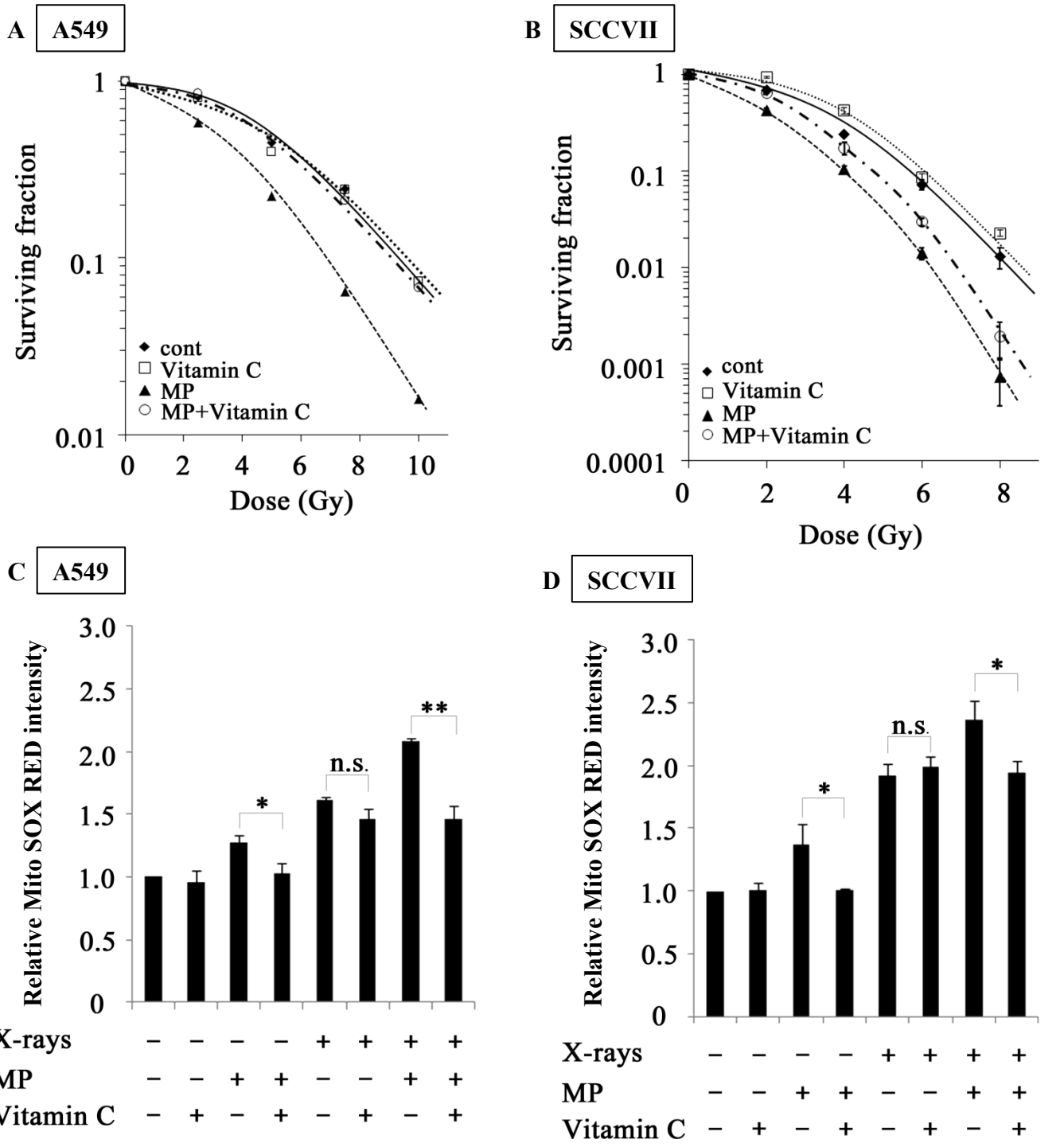


図6: A549細胞とSCCVII細胞におけるvitamin CのMP誘発放射線増感効果とROS産生に与える効果。

(A) A549細胞と(B) SCCVII細胞のMPとX線照射の放射線増感効果に対するvitamin Cの効果。縦軸に生存率、横軸にX線線量で示した。◆: X線照射単独,□: vitamin C + X線照射, ▲: X線照射+ MP, ○: X線照射+MP + vitamin Cを表す。結果は平均±標準偏差(S.E.)で表示した。それぞれの細胞は、MP存在下でX照射を行い照射直後にA549は1 mMのvitamin Cを処理し10日間、またSCCVII細胞は500 mMのvitamin Cを処理し4日間培養し、コロニーを形成させた。

(C) A549細胞と(D) SCCVII細胞のMPとX線照射のミトコンドリア由来ROS産生に対するvitamin C(A549細胞は1 mM、SCCVII細胞は500 μM)の効果。各細胞は24時間vitamin C処理した後にMSRを用いたフローサイトメトリーで分析 した。結果は無処理細胞のプロファイルの平均蛍光強度を1とした際の相対的平均蛍光強度として示した。各カラムとバーは平均±標準誤差(S.E.)で表示した。

統計的有意差はvitamin C未処理群に対して、*:$p<0.05$、**:$p<0.01$で示した。

4) 考察

本研究では、ヒト小細胞肺腺がんA549細胞ならびにマウス口腔扁平上皮がんSCCⅦ細胞を用いて、ミトコンドリアの活性化によるエネルギー代謝の修飾が放射線感受性に及ぼす影響についての検討を行った。がん細胞では正常細胞と異なり、好気的解糖の亢進とミトコンドリア機能の低下というワールブルグ効果として知られる特徴的なエネルギー代謝を行っている[1~4]。また、ミトコンドリアと細胞死は深く関わっている事が知られている[11-13]。放射線感受性とミトコンドリアとの関連性を示すいくつかの報告がすでになされている。ミトコンドリアの存在が放射線感受性に影響を与える直接的な証明として、ρ^0細胞と呼ばれるミトコンドリアDNAの欠如した細胞株を用いた研究がいくつか報告されている[41-43]。それらの研究はρ^0細胞は正常細胞と比較し放射線抵抗性を示し、増殖死が抑制される事を報告しており、ミトコンドリアの存在が放射線感受性を高めている事を示唆しており、この事は休止状態にあるがん細胞のミトコンドリア機能を活性化することにより、がん特異的細胞死を増強できる可能性を示している。近年、がん細胞のこの様なエネルギー代謝を標的とした、がんの治療戦略が注目を集めている。

MPが膵臓ランゲルハンスβ細胞のミトコンドリアにおけるTCA回路のよい基質となり得る事が示されている事やその脂溶性の高さからミトコンドリアに直接取り込まれ、より直接的にミトコンドリア機能を活性化する[38,39]との報告がある事から、本研究ではMPをがん細胞のミトコンドリアのエネルギー代謝を修飾する薬剤として用いた。図3、図4ならびに図5で示されたように、X線照射したA549細胞ならびにSCCVII細胞においてMPの前処理によりミトコンドリア膜電位、細胞内ATP量、そしてミトコンドリア由来ROS量の増加を引き起こす事が明

らかとなった。興味深い事に、両細胞においてMP単独では常にこれらミトコンドリア代謝に関わるパラメーターの増加を引き起こす事はなかった。この現象の理由としては、現段階では正確な説明をする事は不可能であるが、考え得る可能性としては、がん細胞においてMP以外にX線照射によって活性化あるいは誘導される未知の因子がエネルギー代謝系に存在し、それが好気的解糖からミトコンドリアの酸化的リン酸化への代謝の転換に必要とされるからではないかと考えられる。また、図2から非腫瘍細胞であるチャイニーズハムスターV79肺繊維芽細胞系のコロニー形成法から得られた生存曲線の10%致死線量のSERが約1.05であるが、A549細胞ならびにSCCVII細胞の2つのがん細胞では、SERがA549細胞では1.30、SCCVII細胞では1.28という値が得られた。即ち非腫瘍細胞ではがん細胞と比較してMP誘発放射線増感効果がはるかに小さい結果が観察された。この結果は、MPががん細胞特異的にX線照射によって増感効果を誘導できる可能性を示している。

すでに、放射線照射後のROS量の増加がミトコンドリアからのROSの漏出により引き起こされる事がIndoらによって報告されている[17)]。また、Yamamoriらにより線維芽細胞系や多くのがん細胞系において放射線照射後の細胞内のROS量の増加がミトコンドリアの電子伝達系の機能の亢進とミトコンドリア量の増加の結果により生じる事[18)]が報告されている。また、superoxide dismutase 2 (SOD2)をマウス造血前駆細胞である32D cl 3細胞やヒト肝癌HLE細胞に過剰発現させると放射線によるアポトーシスならびに増殖死が対照細胞と比較して、減少するということも示されている[43,44)]。最近、Chenらはヒトとハムスターのハイブリッド細胞を用いて、放射線の照射により誘導されるミトコンドリア由来の活性酸素種が近傍の細胞のDNA二本鎖切断の原因の一つであり、いわゆるバイスタンダー効果の一つの因子であることを報告している[45)]。これらの事実は、ミトコン

ドリアから生じる活性酸素種が放射線による細胞死の誘導を修飾していることを示している。WangならびにYi [46]また、Laurentらは[47] がん細胞における細胞内ROSについて、「ROS閾値説」として知られる新たな仮説を提唱している。この仮説に従えば、ある程度のROS量は細胞の生存に必須であるが、高濃度のROS量に達すると細胞死の引き金となると考えられている。一方、がん細胞におけるROS量は正常細胞と比較して相対的に高い水準にあると考えられている。従って、この仮説ではさらなるROS量の増加をきたす外的刺激が加わると、正常細胞と比較してより早くがん細胞の細胞死を起こすROS量の閾値を越え、細胞死ががん細胞に特異的に誘導されるという考え方である。本研究ではこの仮説から予想される通り、図1と図2に示されるようにMPの前処理によりA549細胞ならびにSCCVII細胞の2つのがん細胞系において放射線感受性の増強が起こり、非がん細胞であるV79細胞では放射線増感がほとんど誘導されないという結果であった。さらに、図6に示されるようにこのMP誘発放射線増感効果が抗酸化物質であるvitamin Cの照射後長期間の処理により有意に抑制され、がん細胞ではX線とMPの曝露による細胞死にはROS量に起因する細胞死が一部含まれる事も明らかとなった。しかし、SCCVII細胞ではMP誘発放射線増感効果が高濃度のvitamin C(1 mM)処理でも抑制効果が小さいが、A549細胞ではより低濃度のvitamin C(500 μM)でも完全に抑制された事からMP誘発放射線増感効果に寄与するROSの程度はがんの細胞の種類に強く依存していると考えられる。したがってこれらの結果から、SCCVII細胞におけるMP誘発放射線増感効果は上述の「ROS閾値説」に加えて、別の明らかになっていない未知のメカニズムによって生じている可能性が示唆される。

その未知のメカニズムの一つとしてMPによるミトコンドリアの活性化がアポトーシスを誘導しているのではないかと考えられる。すでに、ミトコンドリ

ア機能を活性化する薬剤として用いられているDCAは単独処置で子宮内膜がんRL952細胞や肺線がんA549細胞において、アポトーシスを引き起こすことが報告されている[48,49]。したがって、ミトコンドリア機能の活性化という観点からDCAと同様な作用を示すと考え、MPによるアポトーシスの誘導についても検討した。しかしながら、本研究で用いたA549細胞ならびにSCCⅦ細胞ではDCA処置後48時間まで観察したが、単独処置だけでなくX線併用処置でもアポトーシスは全く観察されず (データ未掲載) 、コロニー形成法により評価した増殖死のみが観察された。別の可能性としてストレス活性化タンパク質キナーゼ(SAPKs)やオートファジーの関与が考えられる。Benharら[50,51]は近年、SAPKsならびにROSがシスプラチン(CDDP)、アニソマイシン、そして紫外線(UV)に曝露されたがん細胞のアポトーシスによる細胞死に重要な役割を果たしている事を報告している。これらの研究では、一過性かつ低レベルのSAPK活性やROS量がAP-1のような有糸分裂に関わるシグナルを活性化する事によって細胞の増殖を促進するが、持続的かつ高レベルのSAPK活性やROS量ががん細胞におけるアポトーシスの増強を引き起こす事が報告されている。実際に、Inanamiらはヒト白血病MOLT-4細胞においてX線照射後に持続的高レベルのSAPK活性が増加し、水溶性vitamin E類似物質であるTroloxを放射線照射後処理する事で、有意に放射線誘発アポトーシスを抑制する事を報告している[24]。また、ミトコンドリアから生じる過剰なROS産生がリソソームの膜透過性を亢進させ、リソソームのプロテアーゼを放出させ、オートファジーを引き起こすとの報告も存在する[52-54]。ChuiらはX照射とミトコンドリア膜に存在するアデニンヌクレオチド輸送体を標的とする急性白血病治療薬として用いられる亜ヒ酸の併用が、ヒト前立腺がんPC-3細胞の単独処理と比較して治療効果を高める事を報告している[52]。さらに、この併用処理はそれぞれの単独処理と比較して同じ細胞系においてオートファ

ジーの誘導を多く伴い、またROS産生も増強する[52]。これらの報告から、ROSの関与に加えてSAPKあるいはオートファジーががん細胞におけるMP誘発放射線増感効果に関連しているかもしれないと推察される。がん細胞のMP誘発放射線増感効果におけるSAPKやオートファジーの正確な関わりを決定し、この効果を完全に理解する為にさらなる実験が今後必要となると考えられる。

本研究では、*in vitro*の培養細胞でMPによってミトコンドリア機能を亢進させることによって、放射線増感を起こす事が出来る事を示した。次の段階として、この様なミトコンドリアを標的とした方法によって*in vivo*でも放射線増感を誘導できるかが、臨床応用に向けた研究として重要である。しかし、Saitoら[55]によりSCCVII移植モデルで、ピルビン酸の投与によりミトコンドリアの好気的代謝を亢進させると、がん組織が低酸素化し、かえって放射線に対して抵抗性を示す事が近年報告されている。一般に酸素分子は放射線照射によって生じたフリーラジカルと反応し、修復不可能なペルオキシルラジカルを形成することによって組織の初期損傷を固定化する。そのため、組織における酸素濃度は放射線感受性に大きな影響を与える。一般的に、放射線感受性はがん細胞の酸素濃度が高いと大きく、酸素濃度が低いと小さい。これを酸素効果といい、通常がん細胞の酸素分圧が約3 mmHg以下の組織に対して放射線抵抗性が強く生じる事が知られている。したがって、*in vivo*で放射線増感を起こさせるためには腫瘍のミトコンドリア代謝が亢進している状態ではあるが、低酸素状態ではない状態のタイミングで照射する事が必要である。著者は放射線照射のタイミングの最適化についてMPと類似の作用を持つDCAを用いて、様々なDCA投与後の照射のタイミングをかえて、SCCVII移植モデルで腫瘍成長に及ぼす効果を検討してきている(結果は示していない)。その結果、DCA処置1時間後のX線照射では、X線照射単独よりかえって成長速度が早くなる傾向を示したが、DCA投与10時間

後のX線照射ではX線単独照射と比較して、腫瘍成長速度の有意な遅延が観察された。この事は、ミトコンドリアを亢進させる薬剤の投与と照射のタイミングを最適化する事で、増感効果を誘導できる事を意味している。現在までのところ、MPでの同様の検討はまだ行っていないが、臨床応用の為には投与経路、投与量、適用できる腫瘍の種類、さらには照射のタイミングなどさらなる今後の検討が必要である。

本研究を要約すると、図7に示すようにX線照射とMPの併用処理によって膜電位の上昇やATPの増加から明らかな様にミトコンドリア機能が亢進する。さらにこの活性化によって、ミトコンドリア由来のROSの増加が起こり、それが一部関与して細胞死を起こすというメカニズムを本研究で初めて明らかにする事ができた。また、こうしたMPによる増感作用は腫瘍に特異的に起きる事も示唆された。本研究によって、これらの結果はMPはがん細胞における有望な増感剤として使用できる可能性を持つ事を示している。

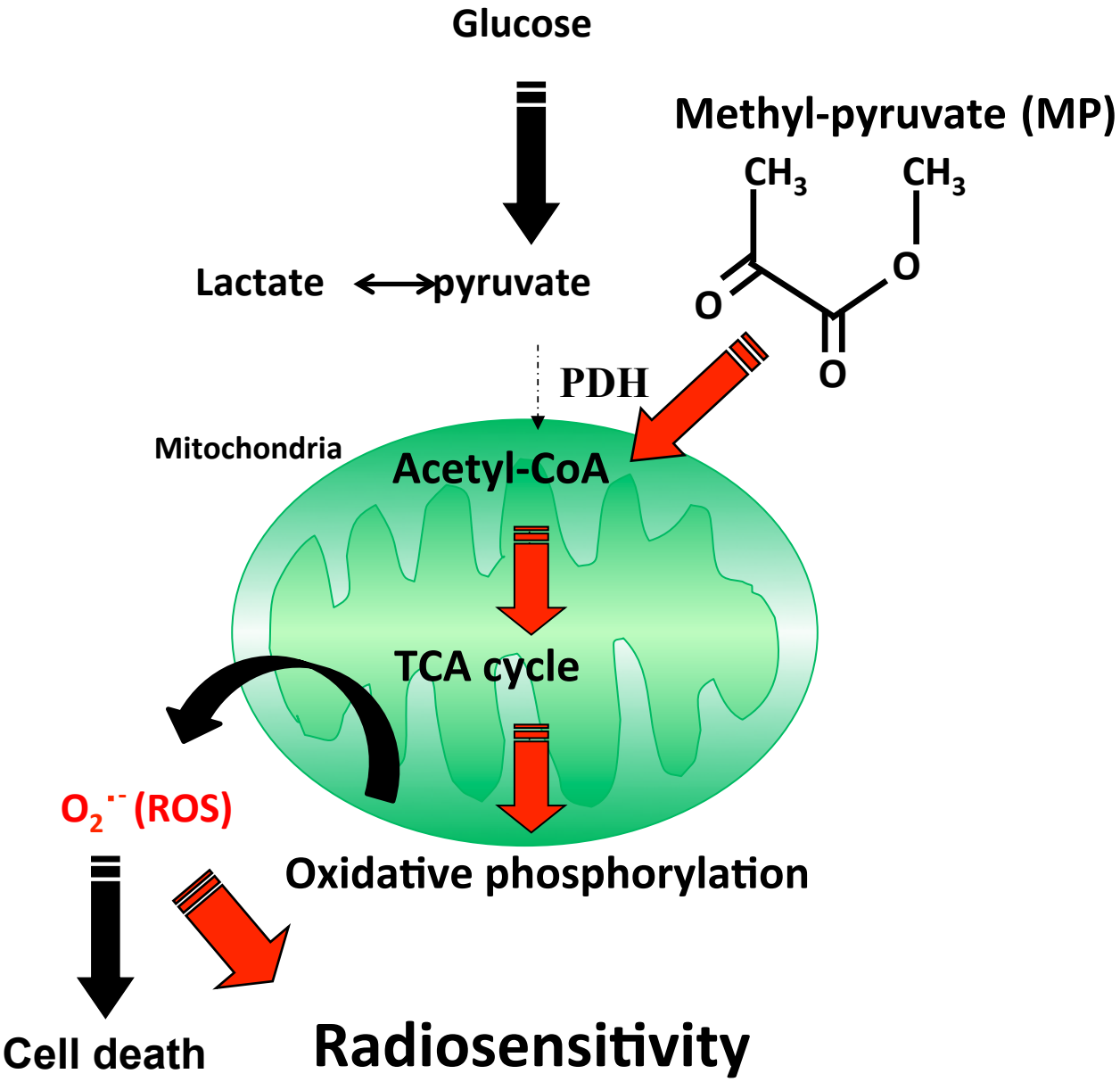


図7: MPの構造式および作用機序
PDHによって、メチルピルビン酸からAcetyl-CoAへの代謝が亢進し、それ以降のミトコンドリアにおけるTCA回路や酸化的リン酸化が亢進することでミトコンドリアの機能が活性化する。

5) 総括

がん細胞の特徴的なエネルギー代謝を標的としたがんの治療戦略が、近年多くの注目を集めており、がんの代謝を修飾する為に構築された複数の薬剤が潜在的な抗がん剤として検証されている。しかしながら、現在まで抗がん剤と放射線療法の併用効果を検討する為に行われている研究はほとんど存在しない。本研究では、がん細胞の放射線誘発細胞死におけるミトコンドリア由来活性酸素種(ROS)の役割を評価する為に、3 メチルピルビン酸(MP)の効果を調べた。MP はミトコンドリアのエネルギー代謝を活性化することが出来る膜透過性のピルビン酸誘導体であり、ヒト小細胞肺腺がん A549 細胞とマウス口腔扁平上皮癌細胞 SCCVII 細胞に与える効果について検討を行った。細胞を MP で前処理した後 X 線照射を行う事で、両細胞において放射線誘発細胞死が有意に増強され、またミトコンドリア膜電位、細胞内 ATP 量、そしてミトコンドリア由来 ROS 量の増加が誘導された。A549 細胞では、MP 誘発放射線増感効果が vitamin C で完全に抑制された。一方 SCCVII 細胞ではその抑制効果は有意ではあったが部分的であった。したがってこれらの結果から、MP はがん細胞において過剰なミトコンドリア由来 ROS 産生を介して放射線増感効果を誘導する事が示唆された。

6)　謝辞

本稿を終えるに当たり、研究遂行の為に終始御懇切な指導を賜りました北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座放射線学教室、稲波修教授に深く感謝いたします。また、本論文をご校閲下さいました本研究科環境獣医科学講座毒性学教室、石塚真由美教授、本研究科診断治療学講座臨床分子生物学教室、佐藤耕太准教授ならびに本研究科環境獣医科学講座放射線学教室、山盛徹准教授に深く感謝いたします。最後に、本研究の遂行に際し終始多大な御助言ならびに御協力いただきました本研究科環境獣医科学講座放射線学教室安井博宣助教ならびに教室各位に謹んでお礼申し上げます。

参考文献

1) Warburg, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science,* **132:** 309-314.

2) Weber, G. 1977. Enzymology of cancer cells (first of two parts). *N. Engl. J. Med*., **296:** 486-492.

3) Weber, G. 1977. Enzymology of cancer cells (second of two parts). *N. Engl. J. Med*., **296:** 541-551.

4) Lehninger, A. L. 1976. *Biochemistry*, **467:** 245-441.

5) Chen, Z., Lu, W., Garcia-Prieto, C., and Huang, P. 2007. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J. Bioenerg. Biomembr*., **39:** 267–274.

6) Holmgren, A. 2000. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid. Redox. Signal.,* **2:** 811–820.

7) Biaglow, J. E., Clark, E. P., Epp, E. R., Morse-Guadio, M., Varnes, M. E., and Mitchell, J. B. 1983. Nonprotein thiols and the radiation response of A549 human lung carcinoma cells. *Int. J. Radiat. Biol.,* **44:** 489-495.

8) Mitchell, J. B., and Russo, A. 1987. The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity. *Br. J. Cancer,* **55:** 96-104.

9) Laszlo, J., Humphreys, S. R., and Goldin, A. 1960. Effects of glucose analogues (2-deoxy-D-glucose, 2-deoxy-D-galactose) on experimental tumors. *J. Natl. Cancer Inst.,* **24:** 267-280.

10) Shenoy, M. A., and Singh, B. B. 1985. Non-nitro radiation sensitizers. *Int. J. Radiat. Biol.,* **48:** 315-326,

11) Lin, X., Zhang, F., Bradbury, C. M., Kaushal, A., Li, L., Spitz, R. D., Aft, L. R., and Gius, D. 2003. 2-Deoxy-d-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism. *Cancer Res.,* **63:**

3413–3417.

12) 西田　直哉. 2010. マウス口腔底扁平上皮癌 SCCⅦ細胞におけるエネルギー代謝調節による放射線増感作用の検討、北海道大学、札幌

13) Ogura, A., Oowada, S., Kon, Y., Hirayama, A., Yasui, H., Meike, S., Kobayashi, S., Kuwabara, M., and Inanami, O. 2009. Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells. *Cancer Lett.,* **277:** 64–71

14) Green, D. R., and Reed, J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science,* **281:** 1309-1312.

15) Chen, Q., Chai, Y. C., Mazumder, S., Jiang, C., Macklis, R. M., Chisolm, G. M., and Almasan, A. 2003. The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ*., **10:** 323-334.

16) Tominaga, H., Kodama, S., Matsuda, N., Suzuki, K., and Watanabe, M. 2004. Involvement of reactive oxygen species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation. *J. Radiat. Res*., **45:** 181-188.

17) Indo, HP., 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., and Majima, H. J. 2012. 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.

18) Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H., and Inanami, O. 2012. 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.

19) Iyer, R., Lehnert, B-E., and Svensson, R. 2000. Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles. *Cancer Res*., **60**: 1290-8.

20) Chen, S., Zhao, Y., Zhao, G., Han, W., Bao, L., Yu, K. N., and Wu, L. 2009. Up-regulation of ROS by mitochondria-dependent bystander signaling contributes to genotoxicity of bystander effects. *Mutat. Res*., **666:** 68-73.

21) Little, J. B. 2003. Genomic instability and bystander effects: a historical perspective. *Oncogene*., **22:** 6978-6987.

22) Seymour, C. B., and Mothersill, C. 1997. Delayed expression of lethal mutations and genomic instability in the progeny of human epithelial cells that survived in a bystander-killing environment. *Radiat. Oncol. Investig*., **5**: 106-110.

23) Lorimore, S. A., Kadhim, M. A., Pocock, D. A., Papworth, D., Stevens, D. L., Goodhead, D. T., and Wright, E. G. 1998. Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*., **95:** 5730-5733.

24) Inanami, O., Takahashi, K., and Kuwabara, M. 1999. Attenuation of caspase-3-dependent apoptosis by Trolox post-treatment of X-irradiated MOLT-4 cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, **75:** 155-163.

25) Ogura, A., Oowada, S., Kon, Y., Hirayama, A., Yasui, H., Meike, S., Kobayashi, S., Kuwabara, M., and Inanami, O. 2009. Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells. *Cancer Lett.*, **277:** 64-71.

26) Stacpoole, P. W. 1989. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism,* **38**: 1124–1144.

27) Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R, Lee, C. T., Lopaschuk, G. D., Puttagunta, L., Bonnet, S., Harry, G., Hashimoto, K., Porter, C. J., Andrade, M. A., Thebaud, B., and Michelakis, E. D. 2007. A mitochondria-K^+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*, **11:** 37-51.

28) Sutendra, G., Dromparis, P., Kinnaird, A., Stenson, T. H., Haromy, A., Parker, J. M., McMurtry, M. S., and Michelakis, E. D. 2013. Mitochondrial activation by inhibition of PDKII suppresses HIF1α signaling and angiogenesis in cancer. *Oncogene*, **32:** 1638-1650.

29) Chen, Y., Cairns, R., Papandreou, I., Koong, A., and Denko, N. C. 2009. Oxygen consumption can regulate the growth of tumors, a new perspective on the Warburg effect. *PLoS One*, **4:** e7033.

30) Sun, R. C., Fadia, M., Dahlstrom, J. E., Parish, C. R., Board, P. G., and Blackburn, A. C. 2010. Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res. Treat.*, **120:** 253-260.

31) Sánchez-Aragó, M., Chamorro, M., and Cuezva, J-M. 2010. Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis*, **31:** 567-576.

32) Cao, W., Yacoub, S., Shiverick, K. T., Namiki, K., Sakai, Y., Porvasnik, S., Urbanek, C., and Rosser, C. J. 2008. Dichloroacetate (DCA) sensitizes both

wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate*, **68:** 1223-31.

33) Wong, J. Y., Huggins, G. S., Debidda, M., Munshi, N. C., and De, Vivo, I. 2008. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol. Oncol.*, **109**: 394-402.

34) Vella, S., Conti, M., Tasso, R., Cancedda, R., and Pagano, A. 2012. Dichloroacetate inhibits neuroblastoma growth by specifically acting against malignant undifferentiated cells. *Int. J. Cancer*, **130:**1484-1493.

35) Stacpoole, P. W., Nagaraja, N. V., and Hutson, A. D. 2003. Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug. *J. Clin. Pharmacol.,* **43:** 683–691.

36) Stacpoole, P. W. 1969. Review of the pharmacologic and therapeutic effects of diisopropylammonium dichloroacetate (DIPA). *J. Clin. Pharmacol.,* **9:** 282–291.

37) Lembert, N., Joos, H. C., Idahl, L. A., Ammon, H. P., and Wahl, M. A. 2001. Methyl pyruvate initiates membrane depolarization and insulin release by metabolic factors other than ATP. *Biochem. J.*, **354:** 345-350.

38) Düfer, M., Krippeit-Drews, P., Buntinas, L., Siemen, and D., Drews, G. 2002. Methyl pyruvate stimulates pancreatic beta-cells by a direct effect on KATP channels, and not as a mitochondrial substrate. *Biochem. J.*, **368:** 817-825.

39) Cottet-Rousselle, C., Ronot, X., Leverve, X., and Mayol, J. F. 2011. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A*, **79:** 405-425.

40) Kalyanaraman, B. 2011. Oxidative chemistry of fluorescent dyes: implications in the detection of reactive oxygen and nitrogen species. *Biochem. Soc. Trans.*, **39:** 1221–1225.

41) Tang, J, T., Yamazaki, H., Inoue, T., Koizumi, M., Yoshida, K., Ozeki, S., and

Inoue, T. 1999. Mitochondrial DNA influences radiation sensitivity and induction of apoptosis in human fibroblasts. *Anticancer Res.*, **19:** 4959-4964.

42) Herst, P. M., Tan, A. S., Scarlett, D-JG., and Berridge, M. V. 2004. Cell surface oxygen consumption by mitochondrial gene knockout cells. *Biochim. Biophys. Acta*., **1656:** 79–87.

43) Shigeatsu, M., Hideyuki, J., Majima, Masaaki E., Hirotoshi, K., Futoshi, H., Shizuko, K., Chizuru, Y., Toshihiko, O., Tetsuo, No., Hirohiko, T., and Hiromitsu, S. 2001. 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.

44) Epperly, M. W., Sikora, C. A., DeFilippi, S. J., Gretton, J. A., Zhan, Q., Kufe, D. W., and Greenberger, J. S. 2002. Manganese superoxide dismutase (SOD2) inhibits radiation-induced apoptosis by stabilization of the mitochondrial membrane. *Radiat. Res.,* **157:** 568-577.

45) Chen, S., Zhao, Y., Zhao, G., Han, W., Bao, L., Yu, KN., and Wu, L. 2009. Up-regulation of ROS by mitochondria-dependent bystander signaling contributes to genotoxicity of bystander effects. *Mutat. Res.,* **666:** 68-73.

46) Wang, J., and Yi, J. 2008. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol. Ther.,* **7:** 1875-1884.

47) Laurent, A., Nicco, C., Chéreau, C., Goulvestre, C., Alexandre, J., Alves, A., Lévy, E., Goldwasser, F., Panis, Y., Soubrane, O., Weill, B., and Batteux, F. 2005. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res*., **65:** 948-956.

48) Wong, J. Y., Huggins, G. S., Debidda, M., Munshi, N. C., and De, Vivo I. 2008.

Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol. Oncol.,* **109:** 394-402.

49) Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C. T., Lopaschuk, G. D., Puttagunta, L., Bonnet, S., Harry, G., Hashimoto, K., Porter, C. J., Andrade, M. A., Thebaud, B., and Michelakis, E. D. 2007. A mitochondria-K^+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell.,* **11:** 37-51.

50) Benhar, M., Engelberg, D., and Levitzki, A. 2002. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep*., **3:** 420-425.

51) Benhar, M., Dalyot, I., Engelberg, D., and Levitzki, A. 2001. Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol. Cell. Biol.*, **21:** 6913-6926.

52) Chiu, H. W., Chen, Y. A., Ho, S. Y., and Wang, Y. J. 2012. Arsenic trioxide enhances the radiation sensitivity of androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells. *PLoS One*, **7**: e31579.

53) Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Murakami, S., Uchida, Y., and Arihiro, K. 2006. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J. Pathol.,* **208:** 319-326.

54) Belzacq, A. S., El, Hamel, C., Vieira, H. L., Cohen, I., Haouzi, D., Métivier, D., Marchetti, P., Brenner, C., and Kroemer, G. 2001. Adenine nucleotide translocator mediates the mitochondrial membrane permeabilization induced by lonidamine, arsenite and CD437. *Oncogene,* **20**: 7579-7587.

55) Saito, K., Matsumoto, S., Devasahayam, N., Subramanian, S., Munasinghe, P. J.,

Morris, H. D., Lizak, J. M., Ardenkjaer-Larsen, H. J., Mitchell, B. J., and Krishna, C. M. Transient decrease in tumor oxygenation after intravenous administration of pyruvate, *Magn. Reson. Med.,* **67**: 801–807

3-Methyl pyruvate enhances the radiosensitivity through increase of mitochondria derivedreactive oxygen species in tumor cell lines

Naoya NISHIDA

Laboratory of Radiation Biology,

Department of Environmental Veterinary Sciences,

Graduate School of Veterinary Medicine,

Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

Considerable interest has recently been focused on the special characteristics of cancer metabolism, and several drugs designed to modulate cancer metabolism have been tested as potential anticancer agents. To date, however, very few studies have been conducted to investigate the combined effects of anticancer drugs and radiotherapy. In this study, to evaluate the role of mitochondria-derived reactive oxygen species (ROS) in the radiation-induced cell death of tumor cells, we have examined the effect of 3-methyl pyruvate (MP). MP is a membrane-permeable pyruvate derivative that is capable of activating mitochondrial energy metabolism, on human lung carcinoma A549 cells and murine squamous carcinoma SCCVII cells. Pretreatment with MP significantly enhanced radiation-induced cell death in both cell lines, and also led to increases in the mitochondrial membrane potential, intracellular adenosine triphosphate content, and mitochondria-derived ROS production following the exposure of the cells to X-rays. In A549 cells, MP-induced radiosensitization was completely abolished by vitamin C. In contrast, it was partially abolished in SCCVII cells. These results therefore suggest that the treatment of the cells with MP induced radiosensitization via

the production of excess mitochondria-derived ROS in tumor cells.