

ミトコンドリア分裂阻害剤 Mdivi-1 による  
ミトコンドリアの過剰融合を介したヒトがん細胞の  
TRAIL 誘導性アポトーシスに対する増強機構の研究

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科学系整形外科学専攻

秋田 護

2015 年

指導教員 長岡 正宏

ミトコンドリア分裂阻害剤 Mdivi-1 による  
ミトコンドリアの過剰融合を介したヒトがん細胞の  
TRAIL 誘導性アポトーシスに対する増強機構の研究

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科学系整形外科学専攻

秋田 護

2015 年

指導教員 長岡 正宏

# 目次

概要	1
緒言	4
対象と方法	9
結果	17
考察	25
まとめ	31
謝辞	32
図表	33
図説	44
参考文献	49
研究業績目録	56

# 概要

**背景：**メラノーマ、肺癌、骨肉腫は悪性度の高い悪性腫瘍であり、化学療法、放射線療法、免疫療法に抵抗性を示す。様々な集学的治療により予後は改善してきているが、劇的な予後の改善には至っておらず、新たな治療が必要とされている。

近年、新たな抗腫瘍薬として Tumor necrosis factor (TNF) -related apoptosis inducing ligand (TRAIL) の研究が進められている。TRAIL は、TNF スーパーファミリーに属し、TRAIL 受容体に結合してアポトーシスシグナルを伝達するサイトカインで、正常な細胞には影響を与えず、がん細胞のみに選択的にアポトーシスを誘導することから、腫瘍選択的抗腫瘍薬としての応用が期待されている。しかし、メラノーマ細胞、非小細胞性肺癌細胞、骨肉腫細胞は TRAIL 抵抗性であり、TRAIL 単独では十分なアポトーシスを誘導できない。

ミトコンドリアの形態は分裂と融合のバランスにより維持されており、細胞の機能と生存に重要な役割を持っている。しかし、TRAIL により誘導されるアポトーシスにおけるミトコンドリア形態の動態の役割については知られていない。

**目的：**ヒトメラノーマ細胞、ヒト肺癌細胞、ヒト骨肉腫細胞の TRAIL 感受性を Mitochondrial division inhibitor-1 (Mdivi-1) が増強するかどうか、増強するなら

ばその分子機序を明らかにすることを目的として研究を行った。

**対象と方法：**ヒトメラノーマ細胞、ヒト肺癌細胞、ヒト骨肉腫細胞を用いてミトコンドリア分裂調整タンパク質 dynamin-related protein (Drp-1) の抑制物質である Mdivi-1 が TRAIL による細胞死を増強するかについて調べた。さらに、その増強の分子機序について、ミトコンドリアの形態の関与を中心に検討した。

**結果：**Mdivi-1 ( $\geq 12.5 \mu\text{M}$ ) は用量ならびに時間依存的にヒトメラノーマ細胞、ヒト肺癌細胞、ヒト骨肉腫細胞において細胞死を誘導したが、正常細胞の生存にはほとんど影響を与えなかった。また Mdivi-1 はがん細胞に対する TRAIL によるアポトーシスを増強した。この増強効果は、ミトコンドリアや小胞体のストレス経路を含む、カスパーゼ依存性の機序によると考えられた。ミトコンドリア内の活性酸素レベル、ミトコンドリア質量、ミトコンドリア内リン脂質カルジオリピンの酸化が増加することから、Mdivi-1 はミトコンドリアおよび小胞体ストレスの主要な原因の一つである、ミトコンドリア内酸化ストレスを増強することが示された。

**結語：**本研究でわれわれは、Mdivi-1 がヒトがん細胞ミトコンドリアの形態ならびに、TRAIL 誘導性アポトーシスを制御することを初めて明らかにした。これらの知見は、がん細胞が正常細胞と比べて、ミトコンドリア形態動態に対する

攪乱の影響を受けやすいこと、およびこの性質が腫瘍選択的な細胞死や TRAIL による細胞死に対する感作へ応用できることを示唆する。

# 緒言

## 1. 骨肉腫

骨肉腫は原発性悪性骨腫瘍の中では最も頻度の高い疾患である。発生源は不明である。以前は四肢の切断を余技なくされ、切断しても肺転移等により死亡する可能性の高い、高悪性度の腫瘍である。現在では様々な外科的手技、医療機器、集学的治療の進歩により、健常部を含めた広範切除と、欠損部に対する腫瘍型人工関節置換術、皮弁移植術、自家骨移植術等を併用し、四肢を温存することも可能になってきている。

近年、集学的治療として neoadjuvant 療法や、adjuvant 療法が行われ、多剤併用化学療法の進歩により、5 年生存率は約 70%にまで向上している。しかし、予後は決して良好とはいえず、多くの患者は肺転移等により死亡する。様々な治療上の進歩はあるが、化学療法で使用する薬剤はここ 20 年間でほとんど進歩しておらず、新たな治療薬の開発が必要とされている。

## 2. メラノーマ（悪性黒色腫）

メラノーマはメラノサイトを発生起源とする悪性腫瘍であり、メラノサイトの存在する皮膚、粘膜などから発生する。ほとんどが皮膚から発生し、日本人では特に足底に発生するものが多い。メラノーマは非常に転移しやすい悪性腫瘍であり、早期ならば切除のみでの完治が望めるが、進行期では骨肉腫同様、

化学療法、放射線療法に抵抗性であり予後は不良である。メラノーマでも様々な治療が試みられ予後は改善してきているが、劇的な改善には至っておらず、新たな治療が必要とされている。

骨肉腫、メラノーマ細胞を中心に本研究は行っているが、悪性腫瘍全般において、がん細胞のアポトーシスとミトコンドリアの形態変化の関連については不明な点が多く、TRAIL 抵抗性の機序についても解明されていない。これらの解明は予後の劇的な改善につながることを期待される。

### 3. TRAIL ( Tumor necrosis factor ( TNF ) -related apoptosis inducing ligand )

Tumor necrosis factor ( TNF ) -related apoptosis inducing ligand ( TRAIL ; 腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘発リガンド) は TNF スーパーファミリーに属するサイトカインであり、正常細胞対しては、細胞毒性を示さずに、がん細胞にアポトーシスを誘導することができるため、抗腫瘍薬として期待されている。

TRAIL は 2 種類の細胞死受容体 ( death receptor, DR ) DR4 および DR5 に結合することにより、外因性経路および内因性経路の 2 つの細胞死経路を活性化しアポトーシスを誘導する ( 5, 6 )。しかし、メラノーマ、非小細胞性肺癌、骨肉腫等は DRs を細胞膜上に発現しているにも関わらず TRAIL に対して抵抗性を示す ( 7, 8 )。また TRAIL 感受性がん細胞が TRAIL 治療中に TRAIL 抵抗性を獲得することも報告されている。したがって、有効な TRAIL による治療には、



TRAIL 抵抗性を克服できる薬剤との併用が必要であり、そのような薬剤が早急に求められている。

#### 4. TRAIL によるアポトーシスシグナル伝達

TRAIL が DR4/DR5 に結合することにより、カスパーゼ-8、-10 が活性化される。これによりさらに下流のカスパーゼ-3、-7 が活性化されアポトーシスが生じる（外因性経路）。

またミトコンドリアを介した経路もあり、活性型カスパーゼ-8 がミトコンドリアに作用することで引き起こされる。活性型カスパーゼ-8 の作用で、ミトコンドリア膜電位が低下し透過性が亢進する。さらにチトクローム *c* が放出され、カスパーゼ-9 が活性化され、下流のカスパーゼ-3、-7 が活性化されアポトーシスが増幅される。

#### 5. Thapsigargin

Thapsigargin は、小胞体へのカルシウム輸送を阻害し、細胞質基質のカルシウム濃度を上昇させる。また、小胞体ストレスを引き起こし、最終的にはアポトーシスを誘導することが知られている。本研究では、ミトコンドリアのアポトーシス誘導経路を活性化させることなく、小胞体ストレスのみを引き起こす試薬として使用した。

## 6. ミトコンドリアの形態変化

ミトコンドリアは、様々な形態変化を示す細胞小器官であり、分裂と融合のバランスによって制御される網状構造をもつ。ミトコンドリアの形態は細胞の機能と生存において重要である (9, 10)。ミトコンドリア間のネットワークはミトコンドリア膜の融合と分裂という相反する機構に依存している。ミトコンドリアの分裂が障害されると、ミトコンドリア間のネットワークの破綻が生じ、一方、ミトコンドリアの融合が障害されるとミトコンドリアの断片化とミトコンドリア DNA の欠失が起こる (11)。ミトコンドリアの分裂はオートファジー (ミトファジー) を介して障害されたミトコンドリアを除去するのを助ける (12)。一方、ミトコンドリアの融合はミトコンドリアの機能維持に必要な、ミトコンドリア DNA と代謝産物の交換を促進する (13)。ミトコンドリアの融合が欠如すると、細胞増殖障害やミトコンドリアの膜電位の低下が生じるため、効率的なミトコンドリアの融合が細胞の生存能に重要である (14)。哺乳類細胞におけるミトコンドリアの融合と分裂は、GTP 加水分解酵素活性をもつダイナミン関連タンパク質すなわち、mitofusin1/2 (Mfn1/2)、optic atrophy 1 および、dynammin-related protein 1 ダイナミン関連タンパク質 (Drp1) 等により制御されている。Mfn1/2 と optic atrophy 1 は協調してミトコンドリアの融合と内膜クリステの組織化を調節する一方、Drp1 はミトコンドリアの分裂を調節している (14, 15)。

## 7.研究の背景・目的

がん細胞のアポトーシスにおけるミトコンドリアの分裂の役割については相反する結果が報告されている。ミトコンドリアの分裂は細胞の種類やアポトーシス刺激次第で、アポトーシスを促進または抑制する（16-22）。現在のところがん細胞のアポトーシスにおける、ミトコンドリアの分裂のこの二重作用を説明できるモデルはない。

Mdivi-1 は、最近酵母や哺乳類の細胞における強力な Drp1 阻害剤として同定された合成化合物である（23）。本研究では、がん細胞のアポトーシスにおけるミトコンドリア形態の動態の役割について洞察を得る目的で、Mdivi-1 がミトコンドリアの形態、TRAIL 誘導性アポトーシスに影響を及ぼすかどうかを調べた。

# 対象と方法

## 1. 使用試薬

遺伝子組み換えヒト可溶性 TRAIL と Mdivi-1 はエンゾライフサイエンス社（サンディエゴ、USA）から購入した。Thapsigargin、ロテノン、アンチマイシン A、オリゴマイシン、ならびに FCCP はシグマアルドリッチ社（セントルイス、USA）から購入した。z-VAD-FMK、z-DEVD-FMK、z-LEHD-FMK および z-IETD-FMK はメルクジャパンから購入した。これらの試薬はすべてジメチルスルホキシドに溶解し、ハンクス緩衝塩溶液（Hank's balanced salt solution; HBSS, pH 7.4）で希釈し最終濃度 0.1 %未満で使用した。

## 2. 細胞培養

ヒトメラノーマ細胞（A375、GAK）、ヒト A549 肺癌細胞、骨肉腫細胞株（MG63、HOS、G292）ならびにヒト繊維芽細胞様肺細胞（WI-38-40）はヘルスサイエンスリサーチソリューションバンク（大阪）から購入した。これらの細胞は、10%ウシ胎児血清（fetal bovine serum; FBS シグマアルドリッチ社）を含むダルベッコ改変イーグル培地 [Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM（シグマアルドリッチ社）] 中で、37°C で、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。正常ヒト上皮メラノサイト（Normal human epidermal melanocytes）はカスケードバイオロジクス社（ポートランド、USA）から購入した。細胞は、DermaLife

M LifeFactors（クラボウ社、大阪）を含む DermaLife Basal Medium（クラボウ社、大阪）中で、37℃で、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

### 3. 細胞生存率、アポトーシスの測定

細胞生存率はセルカウンティングキット（Dojindo、熊本）を用いた WST-8 法により測定した。細胞を 10 %FBS/DMEM にサスペンドし、96 穴マイクロプレートに  $1 \times 10^3$  個/穴で播種し 37℃で、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 72 時間培養した。その後 WST-8 試薬を 1/10 量加え、さらに 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間培養し、マイクロプレートリーダー（ARVO MX、パーキンエルマージャパン）で吸光度を測定して細胞生存率を算出した。

アポトーシス細胞死はフルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate, FITC）標識アネキシン V とプロピジウムヨウ化物（propidium iodide, PI）による二重染色とフローサイトメトリーを用いて既報（24）のように測定した。すなわち、細胞を 24 穴プレートに  $2 \times 10^5$ /穴で播種し、試験試薬で処理した後、37℃で、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。その後市販のキット（Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit I: BD バイオサイエンスジャパン）を用いてアネキシン V-PI で染色し、FACSCalibur（BD バイオサイエンスジャパン）で測定し、CellQuest ソフトウェア（BD バイオサイエンスジャパン）で解析した。4 つの細胞集団を評価した。すなわち、アネキシン V 陰性で PI 陰性細胞を生細胞とし、アネキシン V 陽性で PI 陰性細胞を前期アポ

トーシス細胞とし、アネキシン V 陽性で PI 陽性細胞を後期アポトーシス細胞とし、アネキシン V 陰性で PI 陽性細胞をネクロシス細胞とした。このうちアネキシン V 陽性細胞をアポトーシス細胞とした。

#### 4. DR4 / DR5 発現の測定

細胞膜表面の DR4 / DR5 発現はフローサイトメトリーで既報 (25) のように測定した。すなわち細胞 ( $5 \times 10^5/100 \mu\text{l}$ ) をヒトモノクローナル抗 DR4 / DR5 抗体もしくは、アイソタイプが同じなマウスコントロール抗体 ( R&D System, Minneapolis, MN, USA ) と 4 °C で、30 分間インキュベートした。その後細胞を遠心、PBS で洗浄し、さらに phycoerythrin 標識マウス IgG 抗体と 4 °C で、30 分間インキュベートして、蛍光を FACSCalibur の FL-2 チャネルで測定し、CellQuest ソフトウェアで解析した。

#### 5. カスパーゼ-3/7 活性化とミトコンドリア膜電位の測定

カスパーゼ-3/7 活性化、ミトコンドリア膜電位の変化はフローサイトメトリーを用いて同時に評価した。細胞を 24 穴プレートに  $2 \times 10^5/$ 穴で播種し、試験試薬で処理した後、37 °C で、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。その後、細胞を dual-sensor MitoCasp kit ( Cell Technology, Mountain View, CA, USA ) を用いて染色した。染色した細胞は FACSCalibur で測定し、CellQuest ソフトウェアで解析した。

## 6. カスパーゼ-12 活性化の測定

生細胞におけるカスパーゼ-12 の活性化の評価は、FITC 標識されたカスパーゼ-12 の阻害剤である、ATAD-FMK ( FITC-ATAD-FMK ) を用いて評価した。FITC-ATAD-FMK は細胞透過性を示し、細胞毒性はなく、アポトーシス細胞で活性カスパーゼ-12 に非可逆的に結合するが、不活性カスパーゼ-12 には結合しない。細胞を 24 穴プレートに  $2 \times 10^5$ /穴で播種し、試験試薬で処理した後、37 °C で、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。その後、CaspGLOW Fluorescein Caspase-12 Staining Kit ( バイオビジョン社、Mountain View, CA, USA ) を用いて染色し、蛍光を FACSCalibur の FL-1 チャネルで測定し、CellQuest ソフトウェアで解析した。

## 7. ミトコンドリア酸化ストレスの測定

ミトコンドリアの酸化ストレスは、MitoSOX<sup>TM</sup> Red ( MitoSOX,Life Technologies Japan ) を用いてフローサイトメトリーによりミトコンドリア内活性酸素産生を測定することで既報 ( 26 ) のように評価した。細胞 (  $5 \times 10^5$ /500  $\mu$ l ) を試験試薬で処理した後、37 °C で、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 4 時間培養した。その後、5  $\mu$ l の MitoSOX を添加し 37 °C で、15 分間反応させ細胞に負荷した。その後、細胞を HBSS で洗浄し、氷上で HBSS にサスペンドして、4 °C で遠心分離した後、蛍光をフローサイトメトリーで測定した。

ミトコンドリアの酸化ストレスは、酸化されていないカルジオリピンとのみ

結合する 10-*N*-nonyl acridine orange ( NAO, Life Technologies Japan ) で染色し、カルジオリピンの酸化をフローサイトメトリーで測定することでも評価した。細胞 (  $5 \times 10^5/500 \mu\text{l}$  ) を試験試薬で処理した後、37 °C で、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。その後、100 nM の NAO を添加し 37 °C で、15 分間反応させ細胞に負荷し、HBSS で洗浄後、フローサイトメトリーにて評価した。MitoSOX の赤の蛍光と NAO の緑の蛍光はそれぞれ FACSCalibur の FL-2, FL-1 のチャンネルでそれぞれ測定し、CellQuest ソフトウェアで解析した。結果は  $F/F_0$  の形式で表記した。  $F_0$  は無刺激細胞の蛍光強度、  $F$  は刺激した細胞の蛍光強度をそれぞれ示す。

#### 8. Small-interfering ( si ) RNA による Drp1 遺伝子の発現抑制

ミトコンドリアの分裂は、siRNA を用いた Drp1 遺伝子の発現で阻害した。細胞を 6 穴プレート  $2.5 \times 10^5/穴$  で播種し、20 nM の Drp1 標的 siRNA またはスクランブルコントロール siRNA を Lipofectamine RNA/MAX Kit ( Life Technologies Japan ) を用いて、トランスフェクションし、37 °C で、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 72 時間培養した。Drp1 タンパクの発現低下はウエスタンブロッティング法で評価した。



## 9. ウェスタンブロッティング

Drp1、プロカスパーゼ-3 および、カスパーゼ-3 タンパク質の発現レベルはウェスタンブロッティング法で測定した。Drp1 については細胞 ( $1 \times 10^6$ /ml) を PBS で洗浄しプロテアーゼ阻害剤を含む RIPA バッファーで溶解した。細胞溶解物 (30  $\mu$ g タンパク質) を還元条件下で 10 % の分離ジェル (ATTO, 東京) を用いた、SDS ポリアルリルアミドゲル電気泳動で分離して、polyvinylidene difluoride 膜 (PVDF 膜、Nippon Millipore、東京) に転写した。PVDF 膜を、室温で、1 時間、3 % の BlockAce<sup>TM</sup> (Dainippon Sumitomo Pharma、大阪) を含む PBS でインキュベーションしてブロッキングを行った。0.1 % Tween-20 を含む PBS で洗浄後、1000 倍希釈した各抗体で PVDF 膜を 4 °C、一晩インキュベーションし、その後、HRP 標識抗ウサギ二次抗体 (GE ヘルスケアジャパン、東京) で、室温で、1 時間インキュベーションした。洗浄後、免疫活性タンパク質を、ECL Prime kit (GE ヘルスケア社) を用いて検出した。

カスパーゼ-3 については、細胞 ( $1 \times 10^6$ /ml) を 10 % FBS/DMEM 中で試験薬と反応させた後、PBS で洗浄し RIPA バッファーで溶解した。細胞溶解物 (15  $\mu$ g タンパク質) を 4-12 % のグラディエントジェル (Life Technologies Japan) を用いた、SDS ポリアルリルアミドゲル電気泳動で分離して、Immobilon 膜 (Nippon Millipore) に転写した。Immobilon 膜を 4 °C、一晩 Blocking One (Nakalai Tesque、東京) でインキュベーションしてブロッキングを行った。各抗体 (Cell Signaling Technology Japan) で 4 °C、一晩インキュベーションし、さらに HRP

標識抗ウサギ二次抗体（GEヘルスケアジャパン、東京）で、室温で、1時間インキュベーションした。0.1% Tween-20を含むPBSで洗浄後、Chemi-Lumi One Super（Nakalai Tesque）で免疫活性タンパク質を可視化した。電気泳動の各サンプルのタンパク量が均一であることを確認するために、PVDF膜をモノクローナル抗 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）抗体、または抗  $\beta$ -actin 抗体を用いてリプローブした。

#### 10. ミトコンドリア形態イメージング

ミトコンドリアの形態は、ミトコンドリアに選択的に局在する色素 MitoTracker Red CMXRos（ライフテクノロジージャパン）で染色して、蛍光顕微鏡で観察した。8穴カバースリップ（アサヒガラス、東京）に  $1 \times 10^4$ /穴で細胞を播種し、37°Cで、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で24時間培養した。その後20 nM MitoTracker Red CMXRosならびに Hoechst 33342（Dojindo）で染色し37°Cで、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内、暗所で1時間反応させた。

低倍率画像は蛍光顕微鏡（IX71 inverted microscope、Olympus、東京）で取得し、Lumina Vision software（Mitani Corporation、福井）を用いて解析した。高倍率画像は観察、解析ともに EVOS FL Cell Imaging System（ライフテクノロジージャパン）を用いておこなった。

## 11. 統計処理

実験群間の統計的有意性は分散分析および Tukey test で解析し、値は平均±標準誤差で表記し、 $p<0.05$  を有意とした。

# 結果

## 1. WST-8 法による Mdivi-1 で刺激したがん細胞の生存率の評価、および TRAIL 細胞毒性への感作作用の評価

Mdivi-1 がヒトがん細胞の生存率に影響を与えるかどうかを調べるために、TRAIL 感受性の異なる種々の細胞、すなわちメラノーマ細胞株の A375、GAK、肺癌細胞株 A549 で実験をおこなった。

細胞を Mdivi-1 単独、TRAIL 単独、または Mdivi-1 と TRAIL 併用で 24～72 時間刺激し、細胞生存率を WST-8 法で測定した。実験した全ての細胞において、Mdivi-1 単独群では 50  $\mu$ M までは最初の 24 時間では細胞生存率に有意な影響はなかった。しかし 72 時間では 12.5  $\mu$ M 以上で濃度依存的に細胞生存率を減少させた (Fig.1 A-C)。

TRAIL 感受性が比較的高い GAK は Mdivi-1 に対しても感受性で、Mdivi-1 (50  $\mu$ M) は最大で 40 %細胞生存率を減少させた。さらに Mdivi-1 これらの細胞を TRAIL 毒性に感作し、その作用は最初の 24 時間でみられ、その後 48 時間にさらに増強した (Fig.1 A-C)。

骨肉腫細胞株、MG63、HOS、G292 は比較的 TRAIL 抵抗性であり、TRAIL100 ng/ml で 72 時間処理しても、細胞生存率は最大で 30 %しか減少しなかった。これに対して、Mdivi-1 単独ですべての細胞株で濃度依存的に細胞生存率を減少させた。さらに、Mdivi-1 は TRAIL 細胞毒性を増強した (Fig. D-F)。

## 2. フローサイトメトリーによる Mdivi-1、抗 DR4 抗体、抗 DR5 抗体で刺激したがん細胞のアポトーシスの評価

Mdivi-1 によって増強される細胞死の様式を明らかにするために、A375 細胞をアネキシン V ならびに PI で二重染色してフローサイトメトリーで解析した結果を Fig. 2A に示した。

Mdivi-1 ( 25  $\mu$ M ) 単独ではアネキシン V 陽性細胞は有意な増加を認めなかったが、TRAIL によるアネキシン V 陽性細胞の増加を増強した。これは最少有効濃度 12.5  $\mu$ M から濃度依存的に認められた ( Fig. 2A and B )。これに反して thapsigargin 1  $\mu$ M はアポトーシスを誘導せず、Mdivi-1 を併用してもアポトーシスは増強されなかった ( Fig. 2A and C )。Mdivi-1 は A375 細胞を抗 DR5 抗体、抗 DR4 抗体によるアポトーシスに対しても増強した ( Fig. 2D )。同様に Mdivi-1 は A549 細胞も TRAIL によるアポトーシスに対して増強した ( Fig. 2E )。

A375、A549 いずれの細胞でも TRAIL は 100 ng/ml まではネクローシス ( アネキシン V 陰性/PI 陽性 ) 細胞数をほとんど増加させなかった ( 2.5 %未満 )。これに対して、MG63 細胞は、未刺激の状態でかなりのレベルのネクローシス ( 11.1  $\pm$  2.4 %, n = 3 ) が見られ、TRAIL の投与で 16 %まで増加したが、Mdivi-1 投与により減少した。

## 3. フローサイトメトリーによる Mdivi-1 刺激でのアポトーシスに対するカスパーゼ阻害剤の影響の評価

取り扱いやすさ、Mdivi-1 に対する高反応性、および正常対応細胞の入手が可能であることから、A375、A549 細胞をモデルに用いて、Mdivi-1 によるアポトーシスの増強作用の機序を調べた。

カスパーゼカスケードの役割を明らかにするために、一連のカスパーゼ阻害薬のアポトーシスの増強作用に対する作用を試験した。全てのカスパーゼを阻害する z-VAD-FMK により A375 細胞におけるアポトーシス増強作用は完全に抑制された (Fig. 3A)。

カスパーゼ-8 阻害剤 z-IETD-FMK、カスパーゼ-9 阻害剤 z-LEHD-FMK、カスパーゼ-3/7 阻害剤 z-DEVD-FMK いずれもが有意にアポトーシスを抑制した。カスパーゼ-8 および-9 の阻害剤の効果がカスパーゼ-3 の阻害剤と比較して弱かったこと以外は、A549 細胞でもほぼ同様の結果が得られた (Fig. 3B)。

ミトコンドリア膜電位の消失は、ミトコンドリアの統合性の崩壊を誘導し、カスパーゼ-3 が活性化され、アポトーシスが生じるため、TRAIL と Mdivi-1 のミトコンドリア膜電位、カスパーゼ-3 活性化に与える影響について試験した。

ミトコンドリア膜電位特異的色素とカスパーゼ-3 特異的基質を用いた同時測定の結果、TRAIL は A375 細胞において 24 時間以内に、濃度依存的にミトコンドリア膜電位低下ならびに、カスパーゼ-3 活性化を誘導することがわかった (Fig. 3C)。Mdivi-1 単独では 50  $\mu$ M までミトコンドリア膜電位低下と、カスパーゼ-3 活性化に有意な影響を与えなかったが、TRAIL の作用を増強した (Fig. 3C-E)。対照的に、Mdivi-1 は thapsigargin によるミトコンドリア膜電位低下、

カスパーゼ-3 活性化には影響を与えなかった ( Fig. 3C ) 。

イムノブロットィング法による解析で、Mdivi-1 による TRAIL 誘導性カスパーゼ-3 活性化のさらなる証拠が得られた。Mdivi-1 または TRAIL 単独ではカスパーゼ-3 前駆体 ( p32 ) の活性型カスパーゼ-3 ( p17/p12 ) への切断は認められなかったが、Mdivi-1 と TRAIL を併用すると活性型カスパーゼ-3 が顕著に増加した。活性型カスパーゼ-3 は刺激後 8 時間から観察され、さらに 4 時間増加したが、その後減少した ( Fig. 3F ) 。

#### 4. フローサイトメトリーによる Mdivi-1 刺激でのアポトーシスに対するカスパーゼ-12 阻害剤の影響の評価

Mdivi-1 のアポトーシス増強作用における小胞体経路の役割を調べるため、カスパーゼ-12 の活性化に対する Mdivi-1 の影響を調べた。カスパーゼ-12 は、外因性経路ならびに内因性経路とは独立した経路で活性化される、小胞体に付随するカスパーゼである。

カスパーゼ-12 が活性化された細胞の割合は無刺激では低く (  $1.46 \pm 0.19$  % ,  $n = 3$  )、TRAIL ( 100 ng/ml ) 刺激で 10.4 %、Mdivi-1 ( 50  $\mu$ M ) 刺激で 15.4 % とほぼ同程度の増加がみられた。しかし、両者を併用すると相乗的に 59.9 % まで増加し相乗効果が確認された ( Fig. 4A ) 。

次に、カスパーゼ-12 の特異的阻害剤である z-ATAD-FMK のアポトーシスに対する作用を調べた。z-ATAD-FMK は、TRAIL によるアポトーシスを強く抑制

した（最大 60 %阻害）が、別の小胞体付随酵素である、カスパーゼ-4 の阻害剤である z-LEVD-FMK は抑制しなかった（Fig. 4B）。さらに、TRAIL によるアポトーシスに対する Mdivi-1 の増強作用も z-ATAD-FMK は完全に抑制したが、z-LEVD-FMK はほとんど抑制しなかった（10 %未満）(Fig. 4C)。

## 5. フローサイトメトリーによる細胞膜脱分極、ミトコンドリア酸化ストレス、ミトコンドリア質量の増加の評価

細胞膜の持続的な脱分極は、TRAIL を含む様々なアポトーシス誘導刺激によるヒトがん細胞でのアポトーシスの初期にみられ、カスパーゼ-3 の活性化のために必要な事象である（24,28-31）。

Mdivi-1 による TRAIL 誘導アポトーシスに対する感作における、細胞膜脱分極の役割を解明するために、Mdivi-1 の脱分極誘導能をもつ陰イオン色素である bis-oxonol を用いたフローサイトメトリーにより試験した。Mdivi-1 単独では 50  $\mu$ M までわずかな脱分極しか誘導しなかった。しかし、Mdivi-1（25  $\mu$ M 以上）は、TRAIL による脱分極を増強し、その結果 antimycinA（5  $\mu$ g/ml）と同程度の脱分極がみられた（Fig. 5A）。

ミトコンドリア内の活性酸素（mROS）レベルの増加がミトコンドリア統合性の崩壊と内因性経路の主要な原因の一つであると考えられているため、MitoSOX を用いたフローサイトメトリー解析により Mdivi-1 の mROS レベルへの影響を調べた。MitoSOX はミトコンドリアに局在し、superoxide に選択的な



蛍光プローブである (32,33)。図 5B に示したように、TRAIL 25 ng/ml、100 ng/ml の投与 4 時間後で、MitoSOX の蛍光はそれぞれ 1.5 倍、3 倍に増加した。Mdivi-1 単独でも MitoSOX の蛍光は増加した (3 倍)。TRAIL と Mdivi-1 を併用すると相加的な効果がみられた (Fig. 5B)。

ミトコンドリア内膜の外側表面でチトクローム *c* と会合しているリン脂質である、カルジオリピンの酸化についても評価した。蛍光色素 NAO は、酸化されていないカルジオリピンと結合するが、酸化されたカルジオリピンとは結合しないので、NAO の蛍光を測定することにより、ミトコンドリア内のカルジオリピンの酸化状態を知ることができる (34)。図 5C に代表的なヒストグラムを示した。NAO の蛍光の減少 (M1 の増加) から、TRAIL が濃度依存的にカルジオリピンの酸化を増加させることがわかった。Mdivi-1 単独ではカルジオリピンの酸化に影響を与えなかったが、TRAIL によるカルジオリピン酸化を著しく増強した (Fig. 5C)。これに対して、thapsigargin は単独でカルジオリピンの酸化をほとんど起こさず、Mdivi-1 を併用してもわずかな増加しかみられなかった。TRAIL 単独および TRAIL と Mdivi-1 併用で NAO の蛍光の増加 (M2 の増加) があり、ミトコンドリア質量の増加が示唆される。しかし、MitoSOX の蛍光や、カルジオリピンの酸化とは異なり、ミトコンドリアの質量の増加は TRAIL 濃度に依存しなかった。対照的に thapsigargin はミトコンドリア質量についてもほとんど影響を与えなかった。

## 6. Mdivi-1 の正常細胞に対する影響の評価

正常細胞への Mdivi-1 の影響を調べるために、初代培養メラノサイトを TRAIL および Mdivi-1 単独、または併用で刺激し、アネキシン V と PI で染色してフローサイトメトリーで解析した。

メラノサイトは DR4、DR5 とともに細胞表面に強く発現している (Murai et al., 2012) にも関わらず、図 6A に示したように、いずれの刺激もほとんどアポトーシスを誘導しなかった。

繊維芽細胞様肺細胞、WI-38 でも同様の実験を行ったが、WI-38 でも細胞表面の DR5 は強く発現しているにも関わらず (Fig. 6C)、TRAIL および Mdivi-1 単独、または併用のいずれもほとんどアポトーシスを誘導しなかった (Fig. 6B)。

## 7. Mdivi-1 によるミトコンドリアの形態変化の評価

Mdivi-1 による TRAIL 感作効果における、ミトコンドリアの形態変化の役割を評価するため、Mdivi-1 のミトコンドリア形態への影響を調べた。細胞をミトコンドリア選択的色素、MitoTracker Red で染色して蛍光顕微鏡で観察した。

未処理の A375 細胞では、核から放射線状に広がる、網状のミトコンドリアが明確に観察された (Fig. 7A)。予想されたとおり、Mdivi-1 投与後 24 時間でミトコンドリアの形態が著しく変化した。多くの細胞でミトコンドリアの核の片側への偏りと過剰融合が観察された (Fig. 7A)。Mdivi-1 は、同様なミトコンドリア形態変化を A549、MG63 細胞でも惹起した (Fig. 7C)。

A549 細胞では未刺激の状態ではミトコンドリアが核の片側へ偏っているものが多くみられた。Mdivi-1 による刺激でミトコンドリアの過剰融合は他の細胞と同様に観察された ( Fig. 7B )。

Drp1 の GTPase の活性がミトコンドリアの分裂には不可欠であるので、Mdivi-1 のこの効果はそのミトコンドリアの分裂調節能により媒介されているかを調べるために、Drp1 遺伝子の発現抑制(ノックダウン)のミトコンドリア形態への影響を試験した。Drp1 を標的とする siRNA で 72 時間処理すると、無関係な siRNA で処理したコントロールと比較して Drp1 タンパク質の発現が顕著に減少した ( Fig. 7D )。

Drp1 ノックダウン細胞では、Mdivi-1 処理細胞と同様に、ミトコンドリアの過剰融合が観察された ( Fig. 7E )。さらに、Drp1 ノックダウン細胞では未処理ではアポトーシスの増加は見られなかったが、TRAIL によるアポトーシスに対してコントロール細胞よりも感受性で、この感作は TRAIL の濃度が高いほど顕著であった ( Fig. 7F and G )。Drp1 ノックダウンは thapsigargin への感受性にはほとんど影響を与えなかった ( Fig. 7F and G )。

## 考察

本研究で、Mdivi-1 のがん細胞殺細胞作用が確認され、TRAIL によるアポトーシスに対する感作作用が初めて実証された。

また各結果より以下の結論が得られると考えた。1. Mdivi-1 はがん細胞の生存率を減少させ、TRAIL 毒性への感作作用をもつ。2. Mdivi-1 は複数の細胞で、DR4/5 による細胞死を増強する効果をもつ。3. Mdivi-1 によるアポトーシスの増強作用は内因性経路を含むカスパーゼ依存性経路を介して生じる。4. Mdivi-1 のアポトーシス増強作用はカスパーゼ-12 の活性化によって媒介される。5. 脱分極およびミトコンドリア酸化ストレスとミトコンドリア質量の増加が、アポトーシスの増強に先行し、Mdivi-1 はこれらすべてを増強する。6. Mdivi-1 の効果は腫瘍選択的である。7. Mdivi-1 はミトコンドリアの形態を変調させることにより、がん細胞を TRAIL に対して感作する。

さらに、[ 1 ]Mdivi-1 処理後、ミトコンドリアの過剰な融合や核の片側への偏在を含む、ミトコンドリアの形態変化が観察された。[ 2 ]Drp1 ノックダウン細胞でも同様のミトコンドリアの形態変化が観察された。[ 3 ]Drp1 ノックダウンも、種々のがん細胞を TRAIL によるアポトーシスに対して感作した。

これらの証拠は、Mdivi-1 の作用がミトコンドリア形態の調節により媒介されることを示している。これらの知見を総合すると、ミトコンドリアの分裂を抑制するとアポトーシスが増強されることを示しており、ミトコンドリアの分裂

ががん細胞のアポトーシスを抑制していることを示唆する。また、これらの知見は、エトポシドや亜ヒ酸による、グリオブラストーマ細胞のアポトーシスでの観察における、チトクローム *c* 放出の上流で起こる、ミトコンドリアの凝集と類似しており、ミトコンドリアの形態ネットワーク変化のがん細胞のアポトーシスにおける普遍的役割を示唆する。

正常なミトコンドリアが細胞の生存に必須であり、悪性腫瘍を含む多くの疾患にミトコンドリアネットワーク動態の異常が関与しているとされている(37)。したがって、ミトコンドリアの凝集と分裂のバランスを調節する薬剤は、適切な動態を回復して、治療に利用できる可能性がある。しかし、がん細胞のアポトーシスにおけるミトコンドリアの分裂の役割については相反する報告があり、はっきりしない。

多くのアポトーシス誘導物質が、ミトコンドリア外膜の透過性の亢進や、チトクローム *c* の放出を伴うがん細胞のミトコンドリアの断片化を惹起する(19,21)。さらに、Drp1 やその会合の相手である Fis-1 の発現低下によるミトコンドリアの分裂抑制が、チトクローム *c* 放出を遅延させることから、ミトコンドリアの分裂はアポトーシスに重要であると考えられる(16,17,20)。

対照的に、ミトコンドリアの分裂はチトクローム *c* 放出にも、アポトーシスにも必須ではなく、Drp1 依存性のミトコンドリアの分裂はアポトーシスには必要のない別々の現象であることを示している研究もある(19,22)。

さらに、ミトコンドリアの分裂はカルシウム誘導性のアポトーシスに対して

は抑制的に働くことを示唆する、いくつかの証拠もある (14)。

ヒト肺癌細胞株は、Drp1 と Mfn-2 の発現比が正常肺胞上皮細胞、血管内皮細胞と比べて不均衡で、ミトコンドリアが分裂状態を示す。同様にミトコンドリアの分裂が、肺癌患者から採取した肺癌組織では正常肺組織に比べて増加している。

ミトコンドリアの分裂の保護的役割に一致して、Drp1 ノックダウン Mdivi-1 処理、または Mfn-2 の発現増加によるミトコンドリアの融合促進によって、ミトコンドリアの分裂を抑制すると、肺癌細胞の自発的アポトーシスが増加し、in vivo における腫瘍増大が抑制される (38)。

本研究のデータはこれらの観察を拡張して、ミトコンドリアの分裂はメラノーマ、肺癌、骨肉腫を含むヒトがん細胞をアポトーシスから保護していると考えられる。重要な点は、Mdivi-1 は正常メラノサイトや線維芽細胞にはほとんど殺細胞作用ならびに TRAIL に対する感作作用を示さないことである。このことは Mdivi-1 はがん細胞に選択的に細胞毒性を発揮することを示している。この腫瘍選択性の機序は今後解明が必要であるが、ミトコンドリアの形態動態の変化は、がん細胞において優先的にミトコンドリアの機能不全の原因になることが考えられる。

Mdivi-1 は、細胞膜脱分極、ミトコンドリア膜電位の喪失、カスパーゼ-3、-12 の活性化、mROS の発生、カルジオリピンの酸化など、いろいろなアポトーシス関連事象を増強することを見出した。

これらの観察は、高濃度カリウム、ATP 作動性カリウムチャンネル阻害剤グリベンクラミド、U37883A ( 24,28 )、ニンニク含有有機硫黄化合物ジアリルトリスルフィド ( 25 )、細胞透過性酸化剤、過酸化水素、ならびにミトコンドリア阻害剤アンチマイシン A、FCCP などの様々な化合物が、これらのアポトーシス関連事象と TRAIL 誘導性アポトーシスを増強するというわれわれのこれまでの知見と一致している。

ミトコンドリア膜電位の喪失は、ミトコンドリア外膜の透過性亢進、ミトコンドリア統合性の崩壊、アポトーシス誘導性タンパク質放出の主要な原因である。ミトコンドリア外膜の透過性亢進により、チトクローム *c*、apoptosis-inducing factor-1 などいくつかのアポトーシス誘導性タンパク質が放出され、それによりカスパーゼ-9、および-3 の経路の活性化と主要な調節ならびに構造蛋白質の分解が促進される。

ミトコンドリア外膜透過性亢進の正確な機序は不明であるが、ミトコンドリア内膜の透過性の増加が関与し、ミトコンドリア透過性遷移孔 ( mPTPs ) が中心的な役割を果たすことが広く受け入れられている ( 40,41 )。mPTPs はミトコンドリア内膜にある、ミトコンドリア内膜ならびに外膜と結合したタンパクから構成される、仮想的な高透過性非特異的チャンネルである。ミトコンドリア膜にある電位差依存性陰イオンチャンネルやアデニンヌクレオチド交換輸送体などが mPTPs を構成すると考えられている。

複数の mPTPs が同時に開放することにより、ミトコンドリアの過剰な膨張、

ミトコンドリア外膜の生理的な組織崩壊、アポトーシス誘導タンパク放出および、アポトーシスが起これると考えられている (42)。

この点に関して、Mdivi-1 によるアポトーシスの増強作用に、ミトコンドリアの膨張の特徴である、ミトコンドリア質量の増大が付随することは注目すべき点である。

アデニンヌクレオチド交換輸送体は 3 つのシステイン残基を持ち、その酸化が mPTPs の開閉を規定するので、mPTPs は特に活性酸素の影響を受けやすい (40,41,43)。したがって、ミトコンドリア透過性遷移は、mROS の過剰な産生や、ミトコンドリア酸化還元恒常性の破綻によって生じうる。さらに、mROS はミトコンドリア内脂質カルジオリピンの酸化を介して cytochrome *c* の放出を制御できる (46)。

持続的な細胞膜脱分極が、TRAIL 誘導性のアポトーシス早期に誘導され、必要とされる事象の一つであることから (24,28) 細胞膜脱分極の Mdivi-1 による増強が、アポトーシスの増強で重要な働きを担っているかもしれない。

重要なことに、脱分極と、mROS は相互に制御しあっている。脱分極は、TRAIL 誘導性の mROS の産生を増強し、一方、酸化剤による mROS の消去は脱分極を低下させ、ミトコンドリアの代謝不全による mROS の産生は、脱分極を亢進させる (28)。加えて mROS を消去すると、膜電位の喪失やカスパーゼ-3、および-12 活性化などの内因性経路ならびに小胞体経路におけるアポトーシス誘導性事象が阻害されることから、mROS がこれらの経路で中心的な役割を果たす



ことが推察される (48)。

本研究の結果を考え合わせると、Mdivi-1 による TRAIL に対する感作作用において、ミトコンドリアの酸化ストレスが重要な働きをしていることが示唆された。

今後の展望としては、臨床応用に結びつくようさらなる研究が必要である。現在の治療では十分な治療効果を得られない悪性腫瘍は多く存在する。TRAIL は正常細胞に影響を与えないという優れた性質を持っているが、TRAIL に抵抗性を示す腫瘍が多く存在するという問題点もある。そのため、この抵抗性に対抗できる薬剤が必要となるが、今回初めて、Mdivi-1 により TRAIL 抵抗性に対抗できることを示した。これは今後、抗腫瘍薬として応用できる可能性を秘めており、新たな治療法の確立が期待される。

また、今回ミトコンドリアの形態とアポトーシスの関連についても、いくつかのデータが得られた。この点については様々な相反する報告があり、未だ詳細な機序についての解明はなされていないが、ミトコンドリアの形態とアポトーシスの間に関連があることは明らかである。ミトコンドリアの形態異常は、悪性腫瘍だけでなく様々な疾患に関連しているとする報告もある。今回の結果は、今後の発展によっては、悪性腫瘍だけではなく、様々な疾患の診断・予防・治療に応用できる可能性を秘めており、さらなる研究が望まれる。

## まとめ

本研究は、がん細胞は正常細胞と比較して、ミトコンドリアネットワーク動態の混乱による影響を受けやすいことを明らかにした。この高度な感受性は悪性腫瘍の治療、特に TRAIL 併用による治療へ利用することが可能である。この機序のさらなる解明により、悪性腫瘍の新たな治療薬の開発に道を拓くことが期待される。

## 謝辞

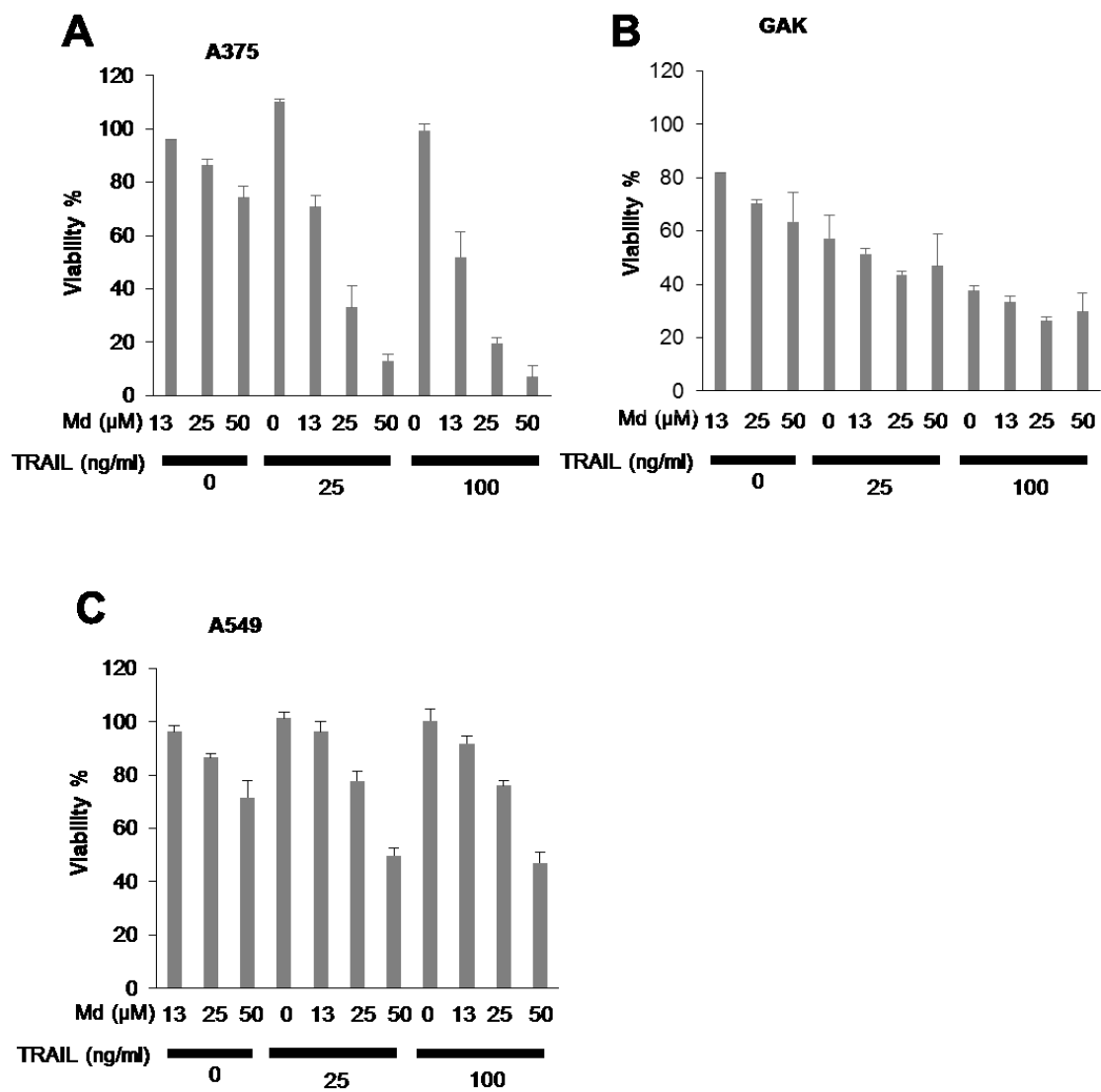
本研究に関し、利益相反はありません。

本研究は日本大学医学部大学院医学研究科難治疾患治療開発グループ（相馬正義教授）において実施したものです。

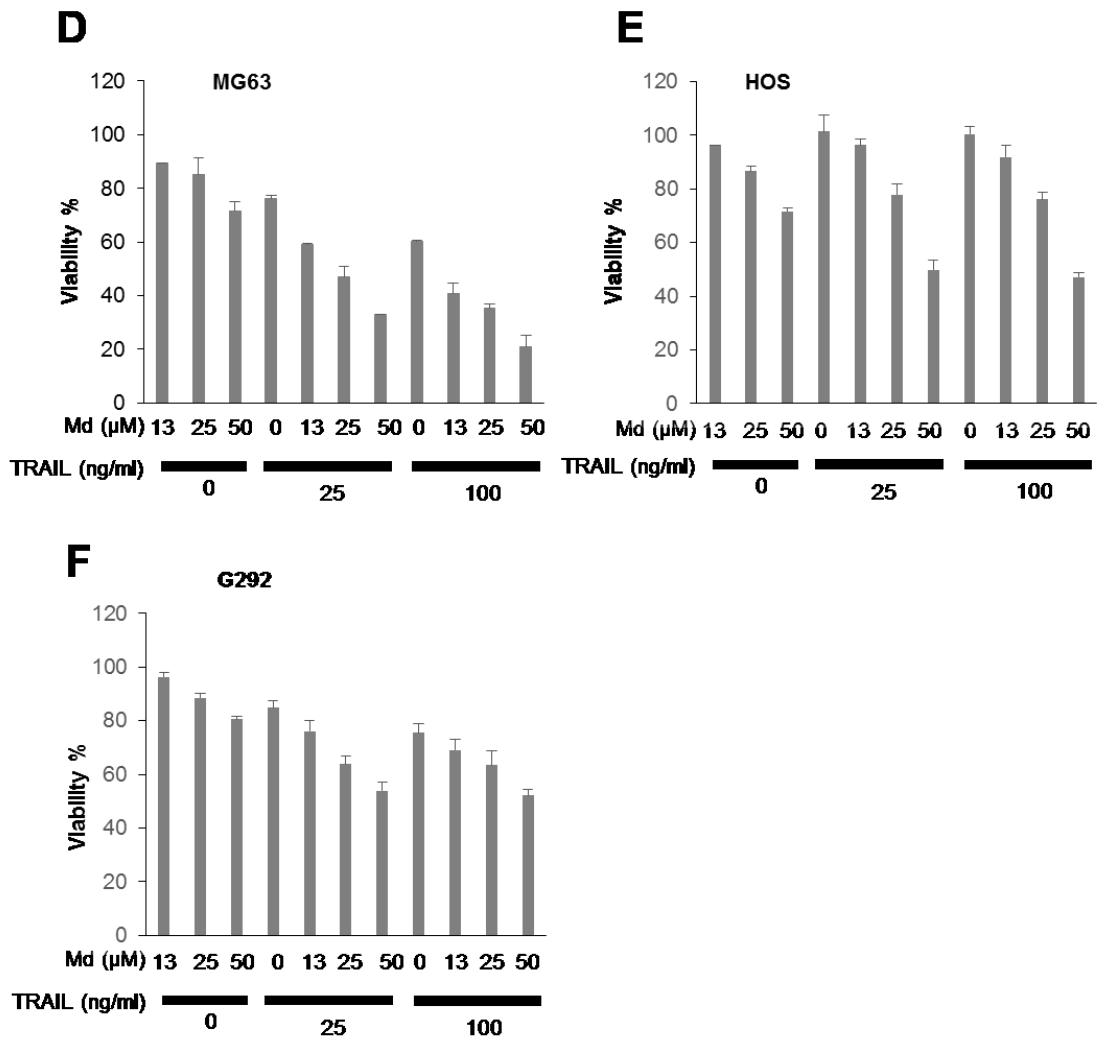
本研究に関して、研究、国際学会発表、国際雑誌への掲載ならびに学位論文の御指導、御校閲を直接賜りました鈴木良弘博士（生理学分野ならびに難治疾患治療開発グループ）に深謝いたします。また、研究の御指導を賜りました鈴木美喜研究員、藤原恭子博士に深謝いたします。

本研究の御指導を賜りました日本大学医学部外科学系整形外科学分野、長岡正宏教授、吉田行弘准教授、徳橋泰明教授ならびに日本大学医学部皮膚科学系皮膚科学分野、落合豊子教授、中川千夏先生に深謝いたします。

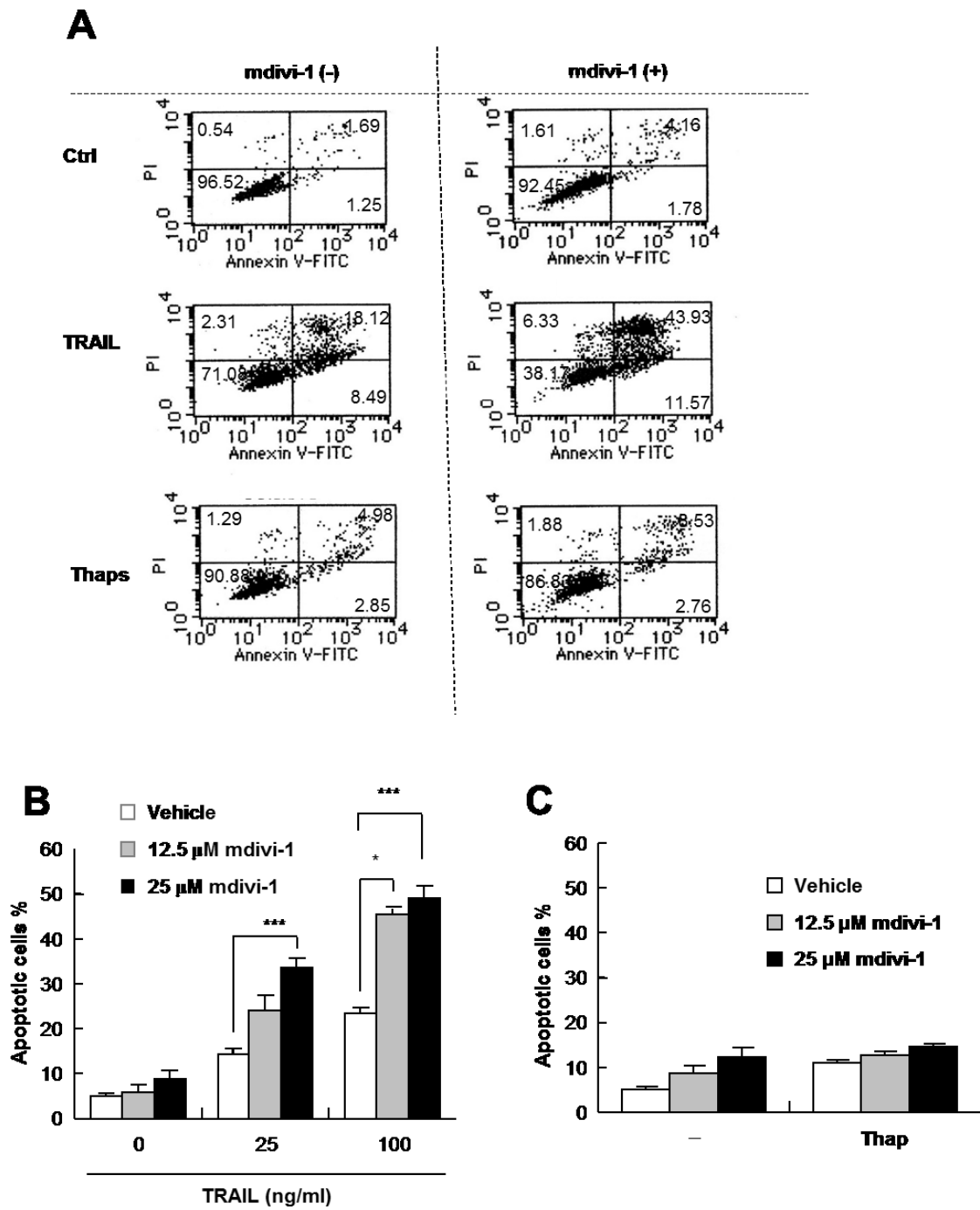
**Figure 1**



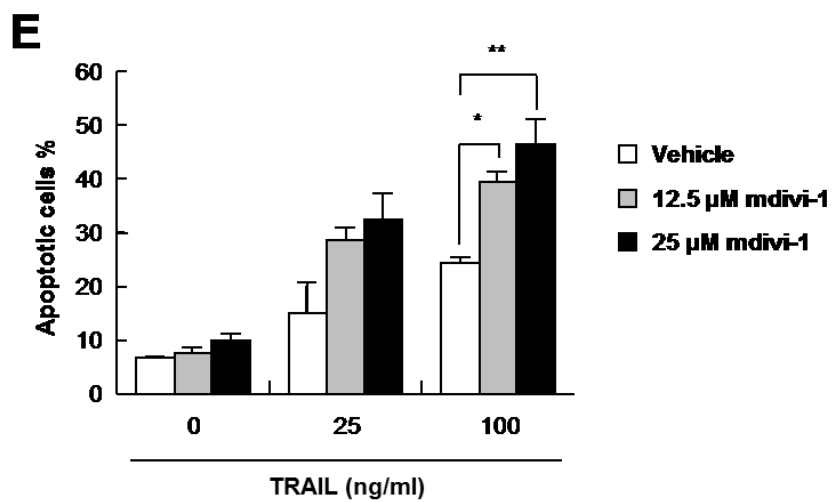
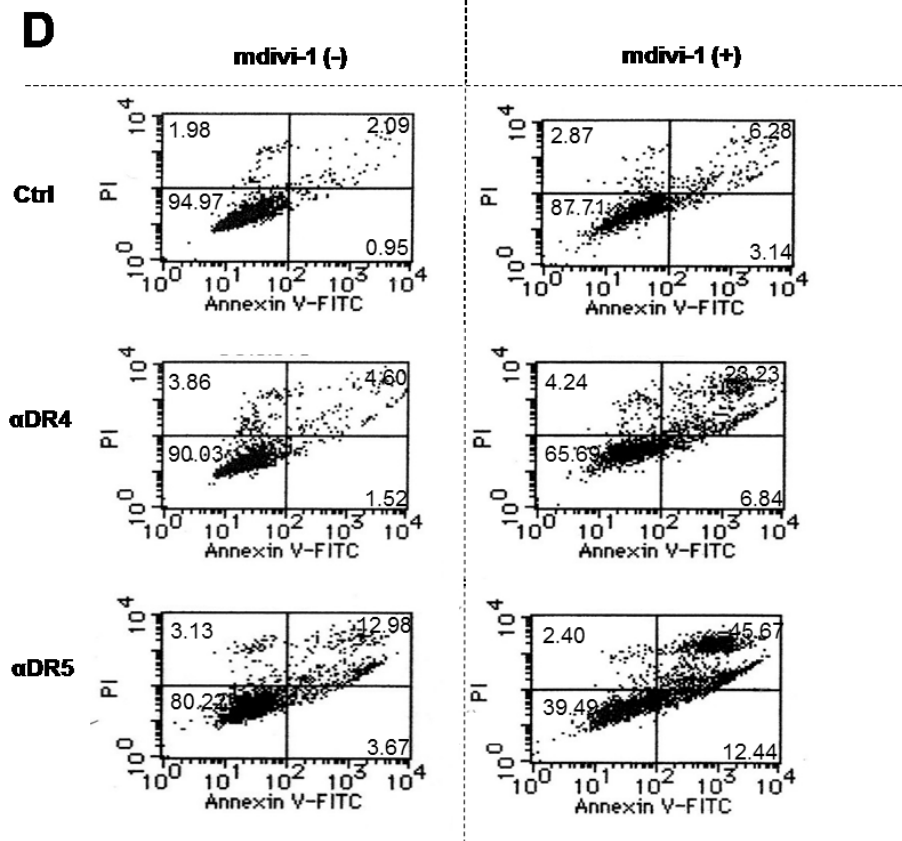
**Figure 1  
(Continued)**



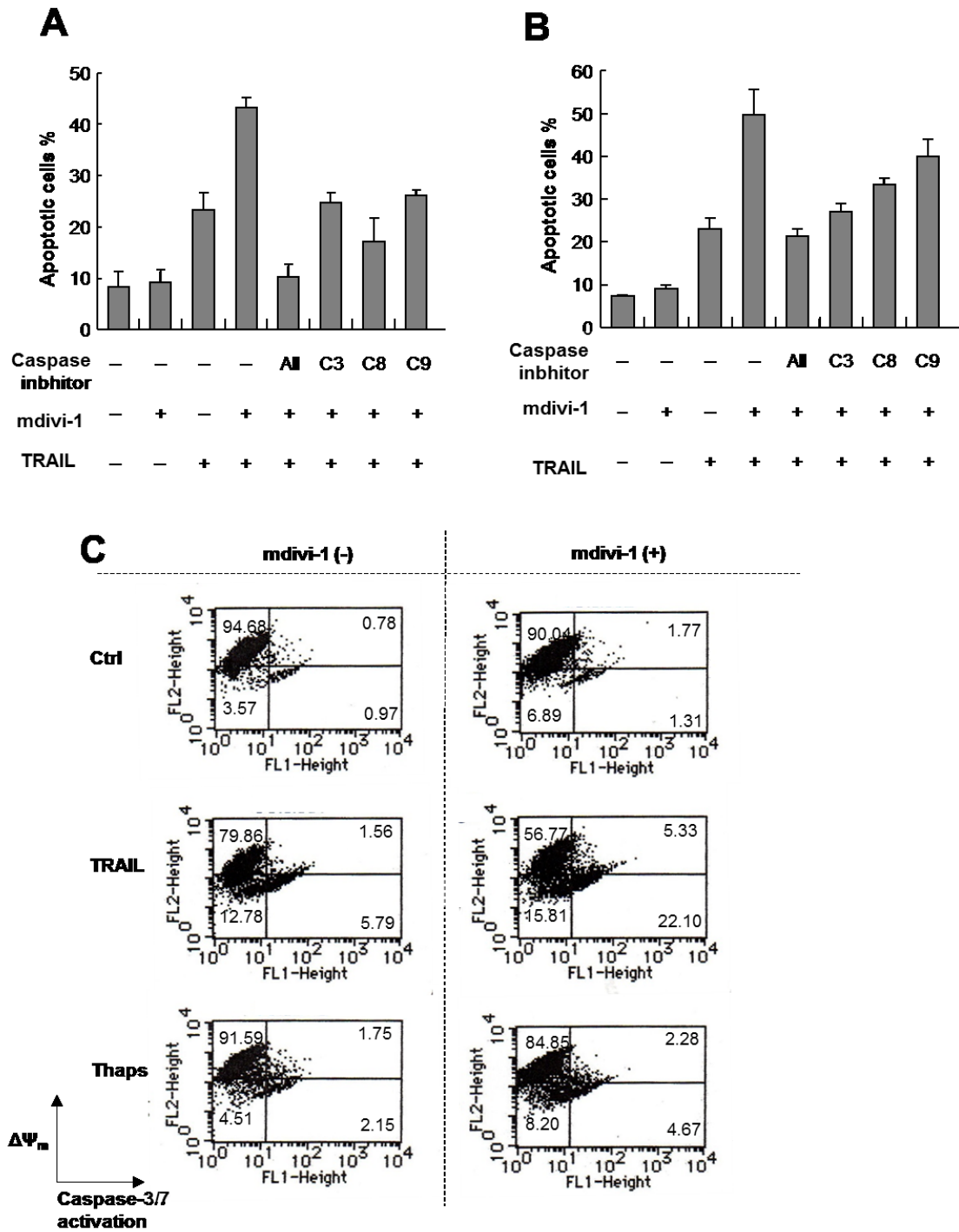
**Figure 2**



**Figure 2  
(Continued)**



**Figure 3**





**Figure 3  
(Continued)**

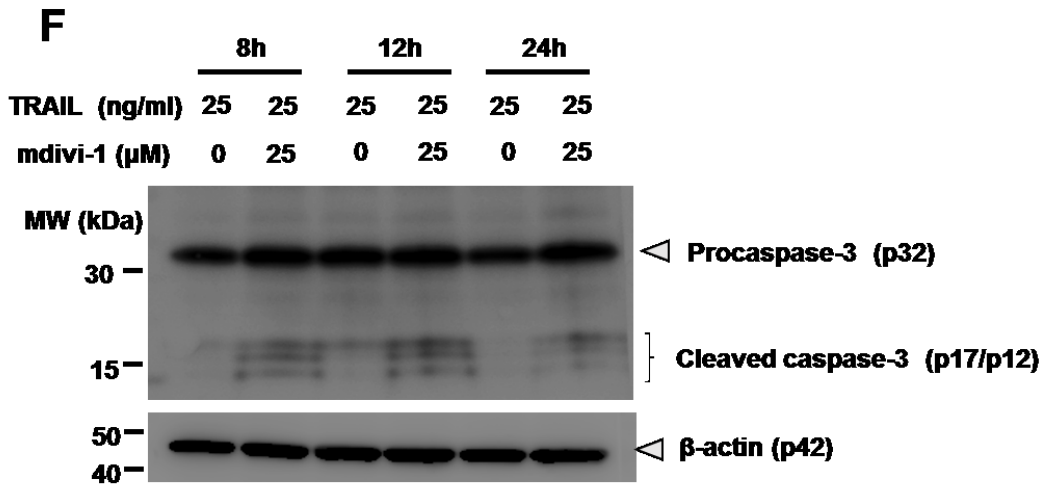
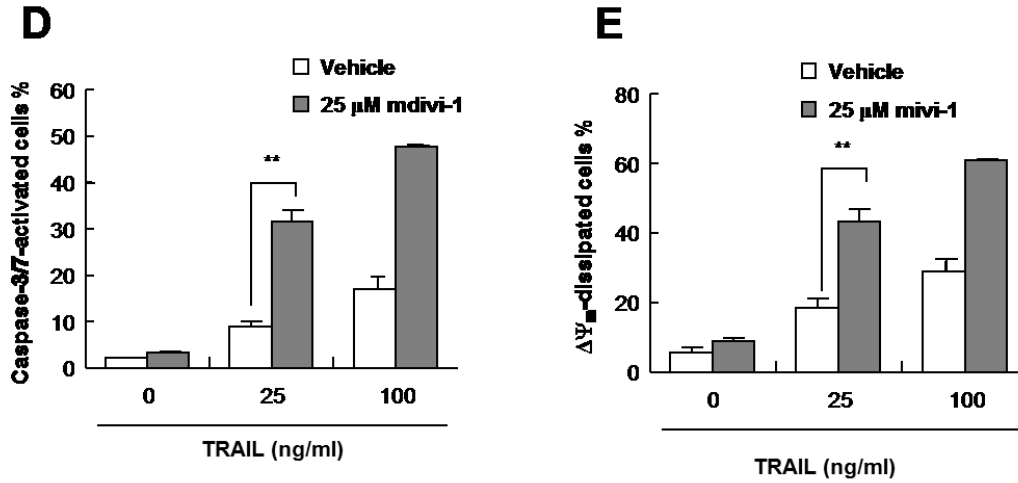
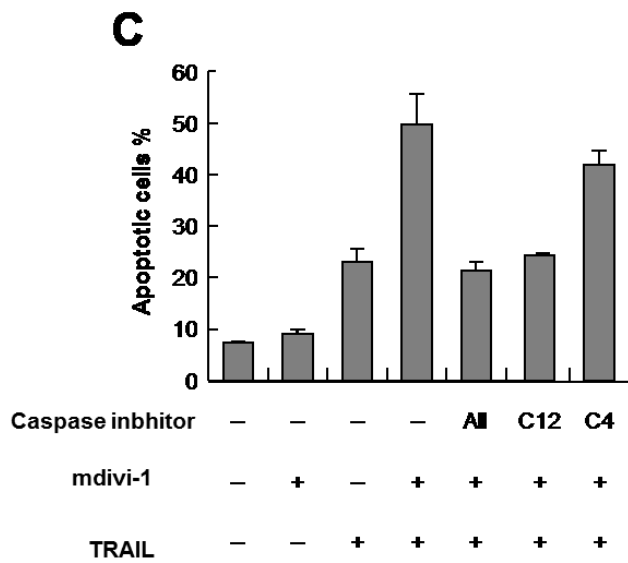
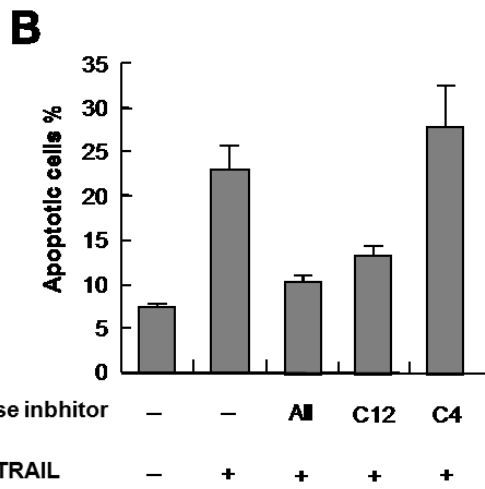
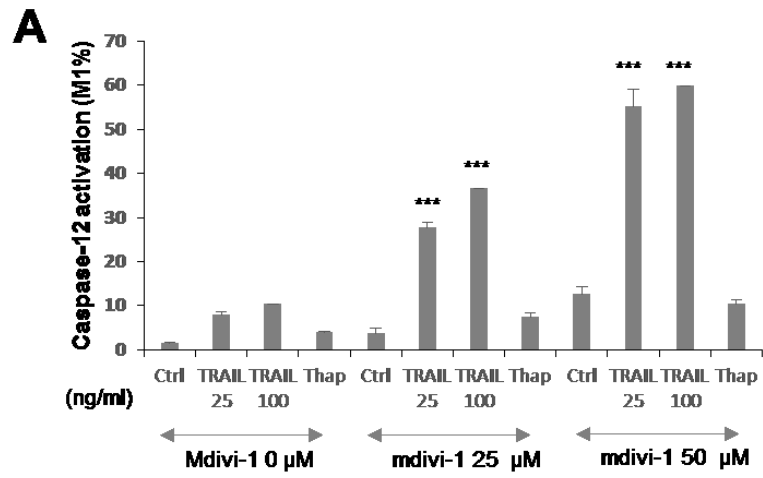
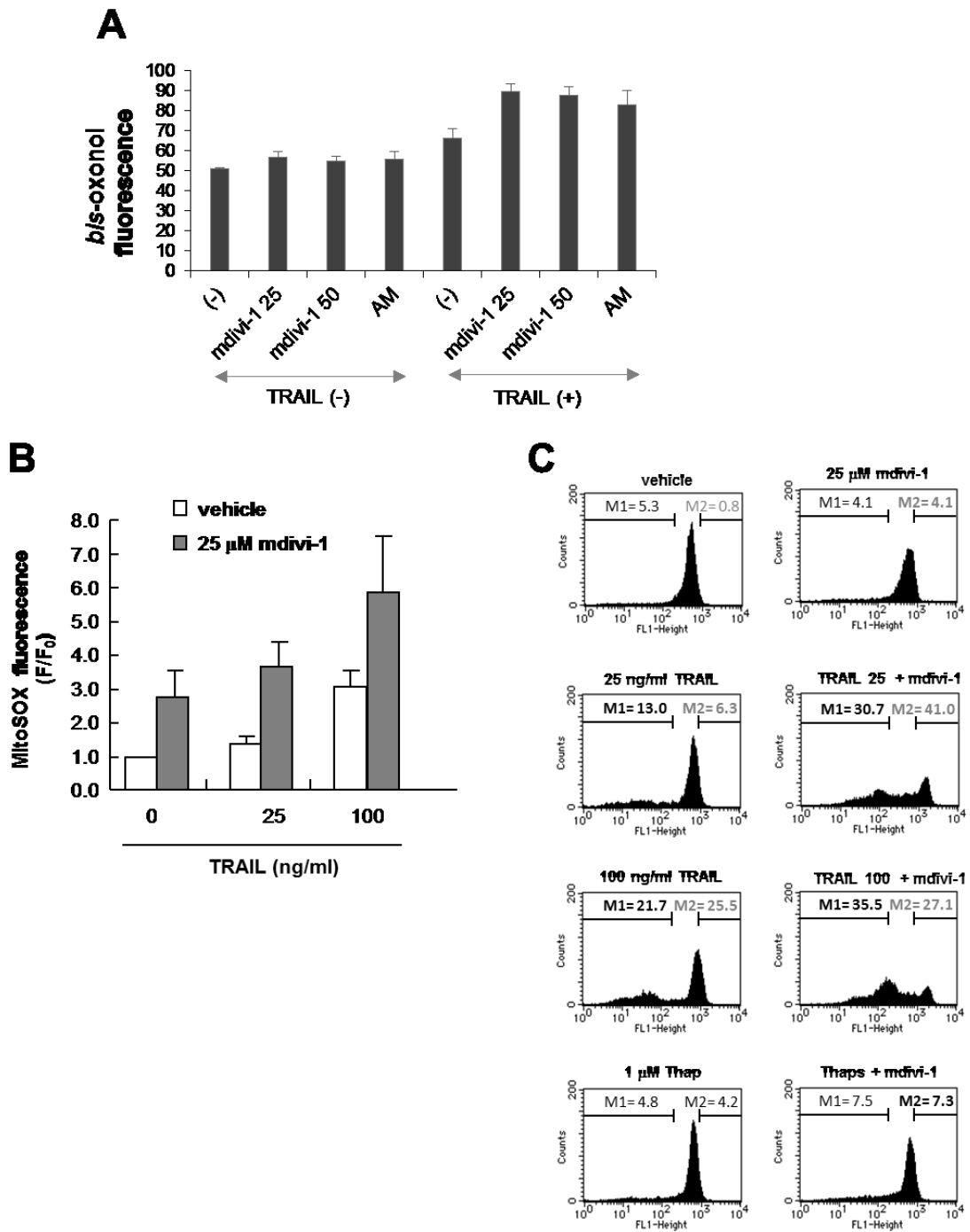


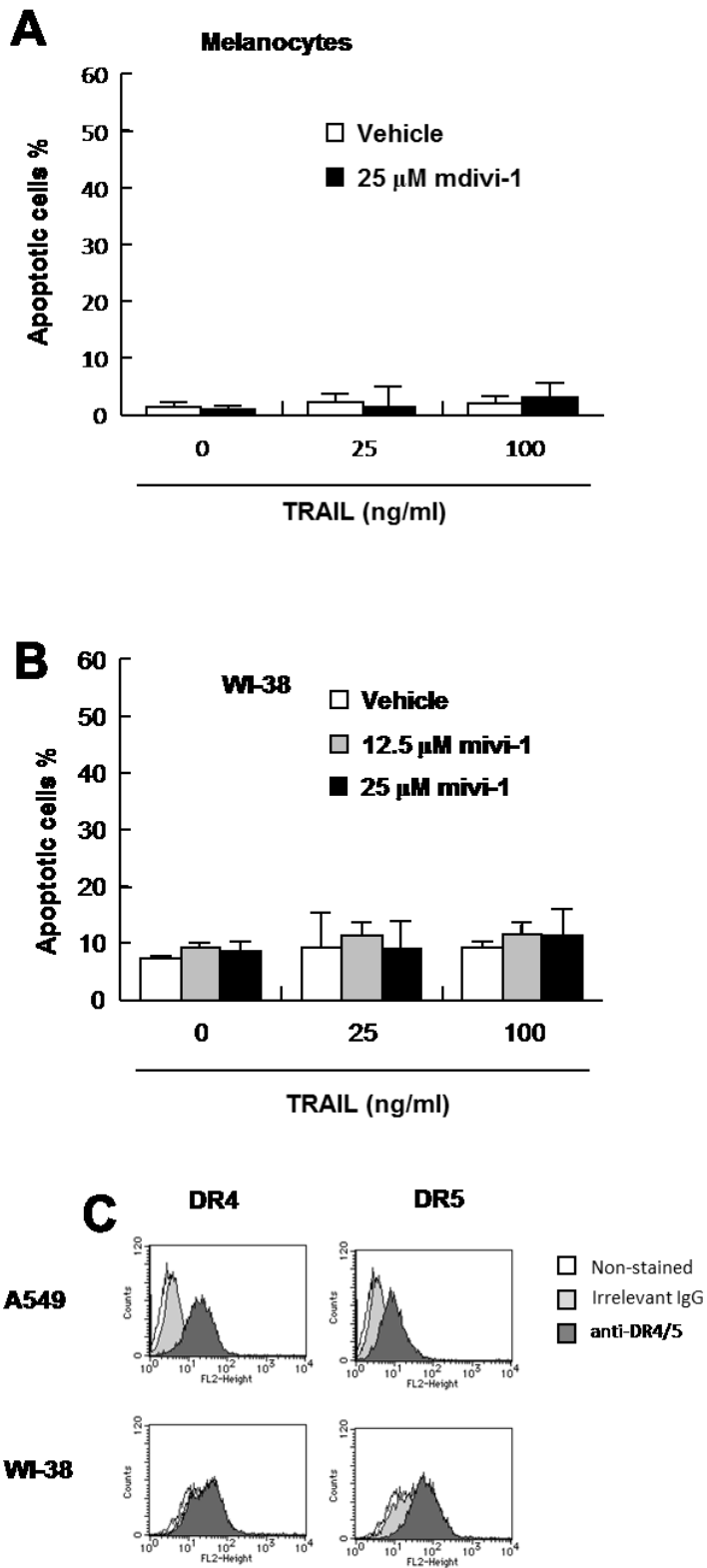
Figure 4



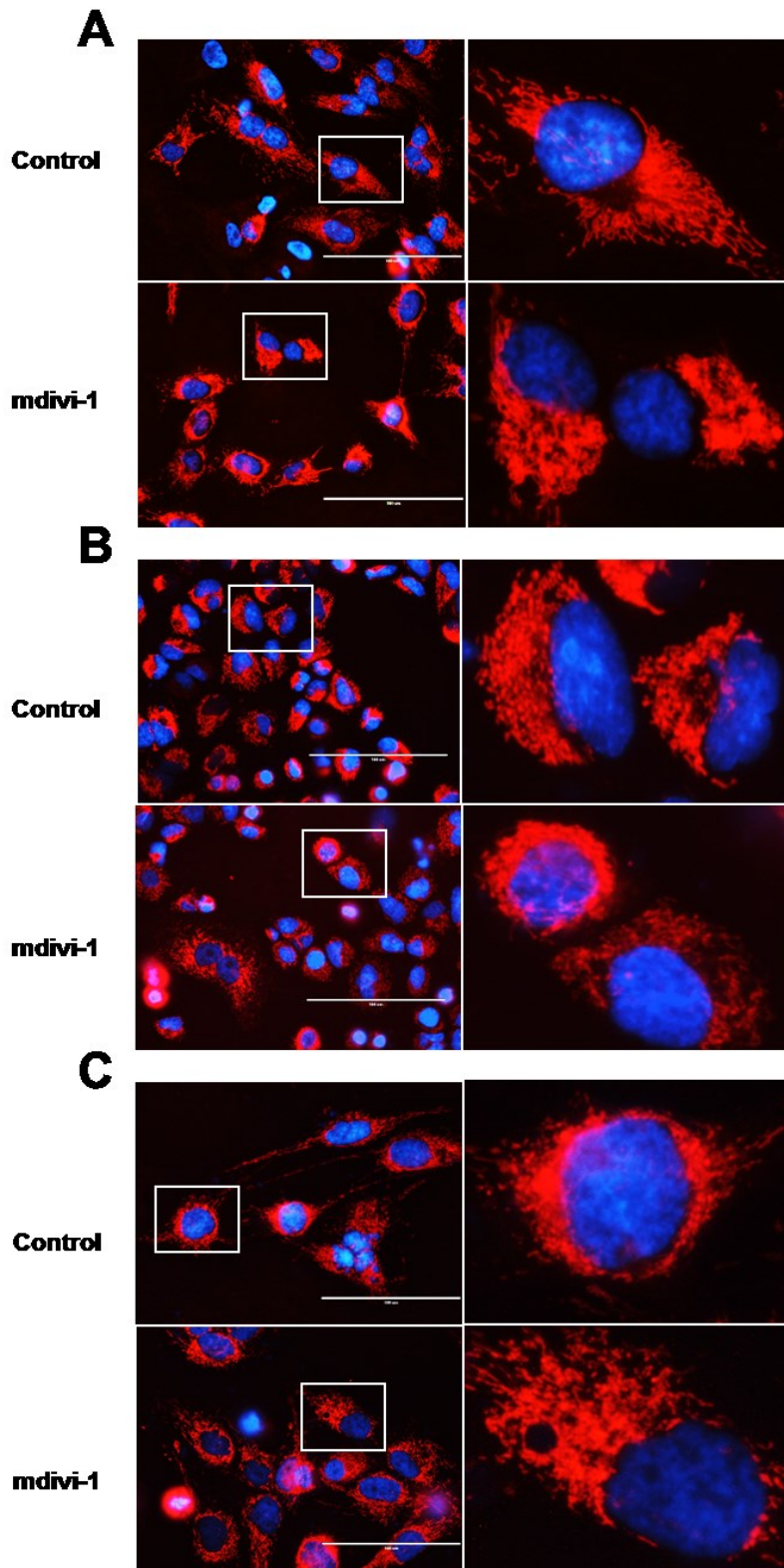
**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**



**Figure 7  
(Continued)**

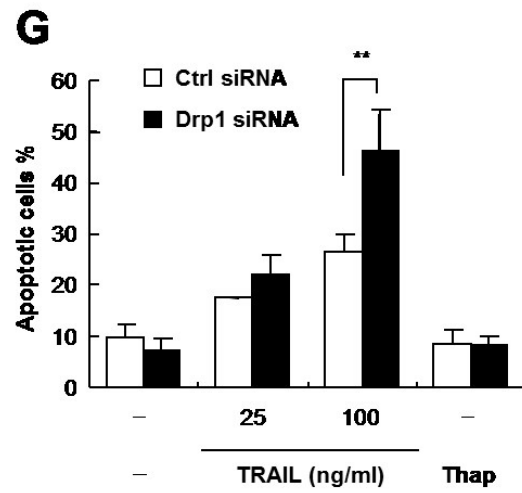
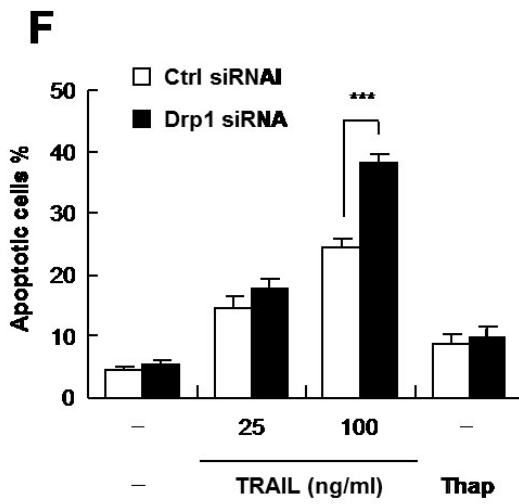
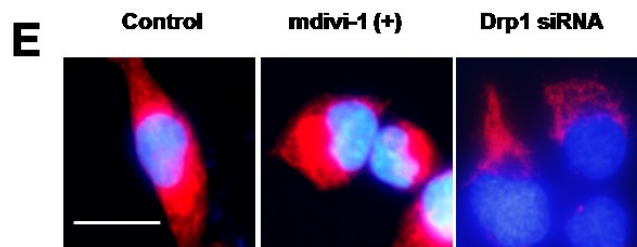
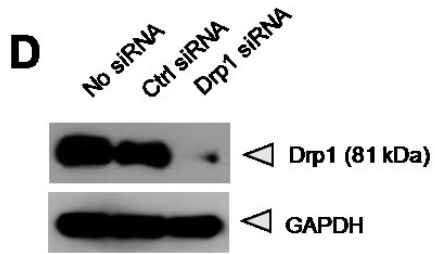


図 1 WST-8 法による Mdivi-1 で刺激したがん細胞の生存率の評価、および TRAIL 細胞毒性への感作作用の評価

Mdivi-1 は、ヒトがん細胞の細胞生存率を抑制し、TRAIL による細胞毒性に対して感作する。(A-F): (A) A375、(B) GAK、(C) A549、(D) MG63、(E) HOS、(F) G292 細胞それぞれを 96 穴プレートで TRAIL ( 25,100 ng/ml )、Mdivi-1 ( 13 ,25 ,50  $\mu$ M ) 単独または併用で 72 時間刺激した。細胞生存率を WST-8 法で測定し、結果は平均  $\pm$ 標準誤差で表記した。n=3-5.

図 2 フローサイトメトリーによる Mdivi-1、抗 DR4 抗体、抗 DR5 抗体で刺激したがん細胞のアポトーシスの評価

Mdivi-1 はがん細胞において、DR4 / 5 を介したアポトーシスを増強する。(A) A375 を 24 穴プレート中で TRAIL ( 25 ng/ml )、thapsigargin ( Thap, 1  $\mu$ M )、Mdivi-1 ( 25  $\mu$ M ) で刺激し、24 時間処理した。処理後、アネキシン V と PI にて染色しフローサイトメトリーにて評価した。結果はヒストグラムにて示す。(B) TRAIL ( 25 ,100 ng/ml )、Mdivi-1 ( 12.5 ,25  $\mu$ M ) で刺激。(C) Thap ( 1  $\mu$ M )、Mdivi-1 ( 12.5 ,25  $\mu$ M ) で刺激。(D) Mdivi-1 ( 25  $\mu$ M )、抗 DR4 抗体 ( 1  $\mu$ g/ml )、抗 DR5 抗体 ( 1  $\mu$ g/ml ) で刺激。(B-D) それぞれ 24 時間処理後、アネキシン V と PI にて染色しフローサイトメトリーにて評価した。(B,C) 標準誤差にて表記。n=3-5,\*P<0.05,\*\*\*P<0.001。(E) A549 を TRAIL、Mdivi-1 にて 24 時間処理。アネキシン V と PI にて染色しフローサイトメトリーにて評価

した。標準誤差にて表記。n=3,\*P<0.05,\*\*P<0.01.

図 3 フローサイトメトリーによる Mdivi-1 刺激でのアポトーシスに対する  
カスパーゼ阻害剤の影響の評価

Mdivi-1 のアポトーシスの増強作用はカスパーゼ依存性である。(A) A375、(B) A549 細胞をそれぞれ TRAIL (100 ng/ml)、Mdivi-1 (25  $\mu$ M) で刺激し、カスパーゼ全体の阻害剤 z-VAD-FMK (All)、カスパーゼ-3 阻害剤 z-DEVD-FMK (C3)、カスパーゼ-8 阻害剤 z-IETD-FMK (C8)、カスパーゼ-9 阻害剤 z-LEHD-FMK (C9) を添加し 24 時間処理した。アネキシン V と PI で染色しフローサイトメトリーにより評価した。結果は平均  $\pm$  標準誤差で表記した。n = 3。(C-E) A375 細胞を TRAIL (12.5, 25 ng/ml)、Mdivi-1 (25  $\mu$ M) で刺激。(C) カスパーゼ-3/-7 の活性化、ミトコンドリア膜電位を評価 (D) カスパーゼ-3/-7 の活性化を評価 (E) ミトコンドリアの膜電位を評価 (F) A375 細胞を TRAIL (25 ng/ml)、Mdivi-1 (25  $\mu$ M) で刺激。ウエスタンブロッティング法で評価した。

図 4 フローサイトメトリーによる Mdivi-1 刺激でのアポトーシスに対する  
カスパーゼ-12 阻害剤の影響の評価

Mdivi-1 によるアポトーシス増強作用はカスパーゼ-12 によって媒介される。(A) A375 細胞を TRAIL (25, 100 ng/ml)、Mdivi-1 (25, 50  $\mu$ M) で 24 時間刺激し、カスパーゼ-12 の活性化を FITC-ATAD-FMK を用いてフローサイトメトリーによ



り評価した。ヒストグラムでカスパーゼ-12の活性化を認めた細胞 ( M1 ) の割合を示す。結果は平均 ± 標準誤差で表記した。n=3.\*\*\*P<0.001. ( B ) TRAIL ( 25 ng/ml ) と、カスパーゼ全体の阻害剤 z-VAD-FMK ( All ) 、カスパーゼ-12 阻害剤 z-ATAD-FMK ( C12 ) 、カスパーゼ-4 阻害剤 z-LEVD-FMK ( C4 ) で 24 時間処理し、アネキシン V と PI で染色しフローサイトメトリーにより評価した。結果は平均 ± 標準誤差で表記した n=3. ( C ) は ( B ) をさらに Mdivi-1 ( 50 μM ) で刺激した。

#### 図 5 フローサイトメトリーによる細胞膜脱分極、ミトコンドリア酸化

##### ストレス、ミトコンドリア質量の増加の評価

細胞膜脱分極およびミトコンドリアの酸化ストレスとミトコンドリアの質量の増加は、Mdivi-1 によるアポトーシスの増強に先行する。( A ) A375 細胞を Mdivi-1 ( 25 ,50 μM ) 、TRAIL ( 100 ng/ml ) で 4 時間刺激し、bis-oxonol を用いた、フローサイトメトリーで細胞膜の脱分極を評価した。結果は蛍光強度で示し、平均 ± 標準誤差で表記した。n=3. ( B ) TRAIL ( 25 ,100 ng/ml ) 、Mdivi-1 ( 25 ,50 μM ) で 4 時間刺激し、MitoSOX ( 5 μM ) で染色した。37°C で、15 分反応させ、フローサイトメトリーの FL-2、FL-1 のチャンネルで、それぞれ赤、緑の蛍光を測定した。結果は  $F/F_0$  の形式で表記した。 $F_0$  は未処理の細胞を、 $F$  は処理した細胞を示しており、結果は平均 ± 標準誤差で表記した。n=3. ( C ) 同様に TRAIL ( 25 ,100 ng/ml ) 、Mdivi-1 ( 25 ,50 μM ) で刺激し 4 時間処理し、NAO ( 100 nM ) を

37°Cで15分反応させ蛍光を測定した。結果はヒストグラムで表し、M1、M2の細胞の割合を示した。

#### 図 6 フローサイトメトリーによる Mdivi-1 の正常細胞に対する影響の評価

Mdivi-1 の効果は腫瘍選択的である。(A) メラノサイトを TRAIL (25,100 ng/ml)、Mdivi-1 (25 μM) で24時間刺激した。アネキシン V、PI で染色し、フローサイトメトリーにより評価した。アネキシン V 陽性細胞をアポトーシス細胞とする。結果は平均 ± 標準誤差で表記した。n=3。(B) WI-38 細胞を TRAIL (25,100 ng/ml)、Mdivi-1 (12.5,25 μM) で24時間刺激した。同様にアネキシン V、PI で染色し、フローサイトメトリーにより評価した。(C) WI-38 細胞を DR-4、DR-5 のモノクローナル抗体、コントロールの抗体と 4°C で、30 分間反応させた。その後遠心分離し、PBS でサスペンドし、マウス IgG 抗体と 4°C で、30 分間反応させた。フローサイトメトリーの FL-2 チャネルで蛍光測定し、ヒストグラムで結果を示した。n=3。

#### 図 7 蛍光顕微鏡を用いた Mdivi-1 刺激によるミトコンドリアの形態変化の評価

Mdivi-1 による TRAIL 感作効果はミトコンドリアの形態変調による。(A) A375、(B) A549、(C) MG63 細胞をプレートに播種し、MitoTracker Red、Hoechst33342 で 37°C で、1 時間染色し洗浄した。Mdivi-1 (50 μM) で 30 分間処

理し、蛍光顕微鏡でミトコンドリアを観察した（1200倍、スケールは100  $\mu\text{m}$ ）。ミトコンドリアはMitoTracker Redで赤に、核はHoechst33342で青に染色されている。(D) A375細胞を6穴プレートに播種し、20 nMのDrp-1のsiRNAとコントロールのsiRNA (Ctrl siRNA) と反応させ、Lipofectamine RNAi/Max kitで37  $^{\circ}\text{C}$ で、5%  $\text{CO}_2$ インキュベーター内で72時間培養した。細胞は抗Drp1抗体でウエスタンブロッティングを行い、Drp1のレベルで評価した。コントロールとして、抗GAPDH抗体でも評価した。(E) 細胞をCtrl siRNA、Drp1 siRNA、Mdivi-1 (50  $\mu\text{M}$ ) で24時間刺激した。MitoTracker Red、Hoechst33342で染色し、蛍光顕微鏡で評価した（400倍、スケールは100  $\mu\text{m}$ ）。(F) A375、(G) A549細胞を24穴プレートに播種し、TRAIL (25, 100 ng/ml)、Thaps (1  $\mu\text{M}$ ) で24時間刺激し、アネキシンV、PIで染色しフローサイトメトリーにより評価した。結果は平均  $\pm$  標準誤差で表記した。n=3, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

## 参考文献

1. Almasan A and Ashkenazi A: Apo2L/TRAIL, apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 337-348, 2003.
2. Johnstone RW, Frew AJ and Smyth MJ: The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 782-798, 2008.
3. Wang S: The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene* 27: 6207-6215, 2008.
4. Gonzalez F and Ashkenazi A: New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 29: 4752-4765, 2010.
5. LeBlanc HN and Ashkenazi A: Apo2L/TRAIL and its death and decoy. *Cell Death Differ* 10: 66-75, 2003.
6. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ and Ashkenazi A: Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12: 612-620, 2000.
7. Dyer MJ, MacFarlane M and Cohen GM: Barriers to effective TRAIL-targeted therapy of malignancy. *J Clin Oncol* 25:4505-4506, 2007.
8. Dimberg LY, Anderson CK, Camidge R, Behbakht K, Thorburn A and Ford HL: On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance

- against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene* 32: 1341-1350, 2013.
9. Landes T and Martinou JC: Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1813: 540-545, 2011.
  10. Elgass K, Pakay J, Ryan MT and Palmer CS: Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833: 150-161, 2013.
  11. Hoppins S, Lackner L and Nunnari J: The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 751-780, 2007.
  12. Twig G and Shirihai OS: The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal* 14: 1939-1951, 2011.
  13. Rouzier C, Bannwarth S, Chausseot A, Chevrollier A, Verschueren A, Bonello-Palot N, Fragaki K, Cano A, Pouget J, Pellissier JF, Procaccio V, Chabrol B and Paquis-Flucklinger V: The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brain* 135: 23-34, 2012.
  14. Chen H, Chomyn A and Chan DC: Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280: 26185-26192, 2005.
  15. Chang CR and Blackstone C: Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann NY Acad Sci* 1201: 34-39, 2010.

16. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL and Youle RJ: The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1: 515-525, 2001.
17. Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL and Youle RJ: Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15: 5001-5011, 2004.
18. Arnoult D, Grodet A, Lee YJ, Estaquier J and Blackstone C: Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem* 280: 35742-35750, 2005.
19. Alirol E, James D, Huber D, Marchetto A, Vergani L and Martinou JC: The mitochondrial fission protein hFis1 requires the endoplasmic reticulum gateway to induce apoptosis. *Mol Biol Cell* 17: 4593-4605, 2006.
20. Estaquier J and Arnoult D: Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ* 14: 1086-1094, 2007.
21. Suen DF, Norris KL and Youle RJ: Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22: 1577-1590, 2008.
22. Sheridan C, Delivani P, Cullen SP and Martin SJ: Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome c release. *Mol Cell* 31: 570-585, 2008.

23. Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingberman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, Kurth MJ, Shaw JT, Hinshaw JE, Green DR and Nunnari J: Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell* 14: 193-204, 2008.
24. Suzuki Y, Inoue T, Murai M, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T and Ra C: Depolarization potentiates TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells: Role for ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and endoplasmic reticulum stress. *Int J Oncol* 41: 465-475, 2012.
25. Murai M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Ra C, Nishida S and Suzuki-Karasaki Y: Diallyl trisulfide sensitizes human melanoma cells to TRAIL-induced cell death by promoting endoplasmic reticulum-mediated apoptosis. *Int J Oncol* 41: 2029-2037, 2012.
26. Inoue T and Suzuki-Karasaki Y: Mitochondrial superoxide mediates mitochondrial and endoplasmic reticulum dysfunctions in TRAIL-induced apoptosis in Jurkat cells. *Free Radic Biol Med* 61: 273-284, 2013.
27. Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, Kiejda KA, Mhaidat N, Wang YF, Thorne R, Zhang XD and Hersey P: Tunicamycin sensitizes human melanoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 via the unfolded protein response. *Cancer Res* 67: 5880-5888, 2007.

28. Bortner CD, Gomez-Angelats M and Cidlowski JA: Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in anti-Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276: 4304-4314, 2001.
29. Nolte F, Friedrich O, Rojewski M, Fink RH, Schrezenmeier H and Körper S: Depolarisation of the plasma membrane in the arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)-and anti-CD95-induced apoptosis in myeloid cells. *FEBS Lett* 578: 85-89, 2004.
30. Yin W, Li X, Feng S, Cheng W, Tang B, Shi YL and Hua ZC: Plasma membrane depolarization and Na,K-ATPase impairment induced by mitochondrial toxins augment leukemia cell apoptosis via a novel mitochondrial amplification mechanism. *Biochem Pharmacol* 78: 191-202, 2009.
31. Suzuki-Karasaki M, Ochiai T and Suzuki-Karasaki Y: Crosstalk between mitochondrial ROS and depolarization in the potentiation of TRAIL-induced apoptosis in human tumor cells. *Int J Oncol* 44: 616-628, 2014.
32. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP and Beckman JS: Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15038-15043, 2006.
33. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Kashiwaya Y, Haskó G and Pacher P: Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 203-208, 2007.
34. Petit JM, Maftah A, Ratinaud MH and Julien R: 10-N-nonyl acridine orange



- interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. *Eur J Biochem* 209: 267-273, 1992.
35. Haga N, Fujita N and Tsuruo T: Mitochondrial aggregation precedes cytochrome c release from mitochondria during apoptosis. *Oncogene* 22: 5579-5585, 2003.
  36. Haga N, Fujita N and Tsuruo T: Involvement of mitochondrial aggregation in arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Cancer Sci* 96: 825-833, 2005.
  37. Lackner LL and Nunnari J: Small molecule inhibitors of mitochondrial division: tools that translate basic biological research into medicine. *Chem Biol* 17: 578-583, 2010.
  38. Rehman J, Zhang HJ, Toth PT, Zhang Y, Marsboom G, Hong Z, Salgia R, Husain AN, Wietholt C and Archer SL: Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J* 26: 2175-2186, 2012.
  39. Tochigi M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Ra C and Suzuki-Karasaki Y: Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation. *Int J Oncol* 42: 863-872, 2013.
  40. Halestrap AP and Brennerb C: The adenine nucleotide translocase: A central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* 10: 1507-1525, 2003.
  41. Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z and Nieminen AL: Mitochondrial calcium

- and the permeability transition in cell death. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1395-1401, 2009.
42. Hail N Jr: Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer. *Apoptosis* 10: 687-705, 2005.
43. Zhivotovsky B, Galluzzi L, Kepp O and Kroemer G: Adenine nucleotide translocase: a component of the phylogenetically conserved cell death machinery. *Cell Death Differ* 16: 1419-1425, 2009.
44. Skulachev VP: Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett* 397: 7-10, 1996.
45. Orrenius S: Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev* 39: 443-455, 2007.
46. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S and Zhivotovsky B: Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12: 913-922, 2007.
47. Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Neuzil J and Moreno-Sánchez R: Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger. *Mol Aspects Med* 31: 29-59, 2010.
48. Suzuki-Karasaki Y, Suzuki-Karasaki M, Uchida M and Ochiai T: Depolarization controls TRAIL sensitization and tumor-selective killing of cancer cells: crosstalk with ROS. *Front Oncol* (In press)

# 研 究 業 績

秋田 護

I	発表	①一般発表	13
		②特別発表	なし
II	論文	①原著論文	1 (共 1 )
		②症例報告	4 (共 4 )
		③総説	なし
III	著書		1

## I 発表

### ① 一般発表

1. 秋田護、鈴木元、清滝信正、斉藤修：THA 術後 9 年で両側反復性脱臼を生じた 1 例，第 36 回日本股関節学会学術集会，京都，2009 年 10 月
2. 秋田護、田中伸明、大幸俊三：人工股関節全置換術中にスクリューが骨盤内に迷入した一例，第 37 回日本股関節学会学術集会，福岡，2010 年 10 月
3. 矢作宏、久保村達也、澤田浩克、秋田護、萩原秀彦、萩原大士：大腿骨転子部骨折の手術体位と手技の工夫，第 37 回日本骨折治療学会，横浜，2011 年 7 月
4. 長谷川太志、矢作宏、久保村達也、澤田浩克、秋田護、徳橋泰明：足部に生じた骨関節結核の 1 例，第 52 回関東整形災害外科学会，横浜，2012 年 3 月
5. 秋田護、藤原恭子、吉田行弘、大幸英至、小島敏夫、谷口真史、永瀬浩喜：ヒト骨肉腫に対する PORPHYRIN 化合物の放射線増感効果の検討，第 10 回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会 秋のセミナー，東京，2012 年 10 月
6. 小島敏夫、秋田護、谷口真史、大幸英至、吉田行弘、徳橋泰明：四肢骨・軟部腫瘍に対して生体内吸収性骨接合剤（SuperFIXSORB）を用いて治療した 2 例，第 46 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会，東京，

2013年7月

7. 吉田行弘、秋田護、谷口真史、小島敏夫、大幸英至、徳橋泰明：腫瘍型人工関節置換術の注意点，第46回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会，東京，2013年7月
8. 谷口真史、藤原恭子、吉田行弘、大幸英至、小島敏夫、秋田護、大幸俊三、永瀬浩喜、徳橋泰明：E-box 配列を標的とした遺伝子発現抑制薬 pyrrole-imidazole polyamide による骨肉腫治療の検討，第46回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会，東京，2013年7月
9. 大幸英至、小島敏夫、谷口真史、秋田護、吉田行弘、Henry J Mnakin、Francis J Hornicek、Zhenfeng Duan：microRNA-1(miR-1)は Slug を標的とし脊索腫細胞の遊走能と浸潤能を抑制する，第11回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会 春のセミナー，静岡，2014年4月
10. 吉田行弘、秋田護、谷口真史、小島敏夫、徳橋泰明：小児悪性骨腫瘍に対する延長型人工関節の反省点，第87回日本整形外科学会学術集会，神戸，2014年5月
11. 吉田行弘、秋田護、谷口真史、小島敏夫、大幸英至、徳橋泰明：腫瘍型人工関節再置換術の原因とその対策，第47回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会，大阪，2014年7月
12. 吉田行弘、秋田護、谷口真史、小島敏夫、大幸英至、徳橋泰明：体幹部を中心に発生した原発性悪性骨・軟部腫瘍の治療戦略，第47回日本整

形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会，大阪，2014年7月

13. 秋田護、大川章裕、植松義直：環椎低形成を伴う頸椎症性脊髄症の1例，

第63回東日本整形災害外科学会，東京，2014年9月

② 特別発表 なし

## II 論文

### ① 原著論文

1. 吉田行弘、秋田護、小島敏夫、谷口真史、大幸英至、徳橋泰明：【人工関節置換術－最新の知見】特殊な疾患、高度の変形を伴う例に対する人工関節 腫瘍 小児悪性腫瘍に対する延長型人工関節の問題点，別冊整形外科；65：210-213，2014

### ② 症例報告

1. 秋田護、鈴木元、清滝信正、斉藤修：THA 術後 9 年で両側反復性脱臼を生じた 1 例，Hip Joint；36：666-668，2010
2. 中島智直、植松義直、加藤有紀、小川剛史、田中伸明、大幸英至、谷口眞、根本菜穂、岡村祐己、宮方啓之、秋田護、相馬大鋭、柳澤正彦、伊藤亜希子、大幸俊三：特発性腰椎硬膜外脂肪腫の 1 例，練馬医学会誌；17：129-131，2011
3. 秋田護、入内島崇紀、元島清香、徳橋泰明：膝前十字靭帯損傷の診断および術後評価について，日大医学雑誌；70-2：95-96，2011
4. 秋田護、田中伸明、大幸俊三：人工股関節全置換術中にスクリューが骨盤内に迷入した一例，Hip Joint；37：922-924，2011

### ③ 総説 なし

### Ⅲ 著書

1. 秋田護、青野抄子、池田迅、袖山雅子：臨床研修わたしたちのなんでも  
手帖改訂2版，メジカルビュー社，東京，2013