

# 論文概要 (Thesis Abstract)

- 論文題目 Mitochondrial reactive oxygen species and gastric cancer  
(ミトコンドリア由来活性酸素と胃がん)
- 

- 指導教員 兵頭 一之介  
人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 消化器病態医学分野 教授

(所属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

---

(氏名) 田村 磨聖

---

目的： 本研究は食塩やエタノールがミトコンドリア由来の活性酸素を誘発する環境因子となるか検討することを目的とする。活性酸素はがんの増殖、浸潤、転移に関与する因子であることが知られているが、ミトコンドリア由来の活性酸素とがんの浸潤の関係は不明瞭である。そこで本研究では、胃がん細胞の浸潤にミトコンドリア由来活性酸素が関与するか確認し、食塩やエタノールによりがん浸潤が促進される可能性を検討する。

対象と方法： 食塩(NaCl)およびエタノールが活性酸素誘発物質になるかラット由来胃粘膜細胞(RGM)を用いて検討した。また、誘発される活性酸素の発生源としてミトコンドリアが関与するか検討した。生細胞から発生する活性酸素を直接測定する電子スピン共鳴法(EPR)は、浮遊細胞を用いた方法が報告されているものの、接着細胞を用いた方法はほとんど報告されていない。そこで本研究では、生きた接着細胞由来の活性酸素を測定するための EPR 測定条件についても条件検討を行った。活性酸素産生の評価は EPR に加えて、活性酸素検出試薬 APF、あるいは細胞内で生じた活性酸素により増加する脂質過酸化の検出試薬 DPPP の蛍光強度を測定することにより行った。ミトコンドリアの膜電位測定には JC-1、ミトコンドリアの染色には MitoRed を用いた。

ミトコンドリア由来活性酸素ががん浸潤に関与するかは以下のように検討した。正常細胞として RGM、がん細胞として RGM を母株とするがん様変異細胞 RGK を用いた。また、ミトコンドリア由来活性酸素を特異的に消去することが知られているマンガンスーパーオキシドジスムターゼ(MnSOD)を恒常発現する RGK 細胞(RGK-MnSOD)を用いて In vitro で検討を行った。それぞれの細胞を用いた EPR の測定に加え、細胞の基本的な動きである細胞膜のラフリング頻度、水平方向の移動を示唆する Wound healing assay、浸潤能の評価として人工細胞間基質(マトリゲル)中への浸潤距離の測定を行った。

結果： 通常の細胞培養条件の約 2 倍となる 300 mM の NaCl を細胞に曝露すると、曝露 30 分後 EPR シグナルの増強に加え、APF および DPPP の蛍光強度が増加していた。また、MnSOD によりその活性酸素誘導は抑制された。エタノールを 1%、5%含有させた培地に細胞を 30 分曝露すると、NaCl 曝露の結果と同様に EPR シグナルの増強、APF および DPPP の蛍光強度の増加が見られた。このとき、APF と MitoRed による蛍光染色画像を撮像すると、APF 由来の蛍光と MitoRed 由来の蛍光が共局在していた。JC-1 により細胞を蛍光染色した結果、ミトコンドリアに傷害が生じたときに見られる緑色蛍光の増加(ミトコンドリア膜電位低下)が見られた。これらのことから NaCl およびエタノールは、ミトコンドリア由来の活性酸素産生を誘発する物質であることが示唆された。

一方、RGM および RGK 由来の活性酸素を EPR により測定した結果、EPR シグナルピークの高い順に RGK、RGK-MnSOD、RGM であった。また、ラフリング頻度、Wound healing assay、浸潤能の結果は、EPR シグナルピークの測定結果と同じ順であった。

考察： 300 mM の NaCl を曝露した細胞は、MnSOD を恒常発現させてミトコンドリア由来の活性酸素を消去することにより検出される活性酸素量が低下した。このことから、NaCl による活性酸素誘導はミトコンドリア由来であることが示唆された。1%、5%のエタノールを曝露した細胞は、JC-1 の染色結果からミトコンドリア傷害が生じており、APF と MitoRed の共局在がみられたことから、エタノールによる活性酸素の産生誘導はミトコンドリア由来であると考えられる。一方、

**MnSOD** によりミトコンドリア由来の活性酸素を消去することでがん細胞の浸潤が抑制されており、がんの悪性化にミトコンドリア由来の活性酸素が関与していると示唆された。

がんではミトコンドリアの電子伝達系に変異が入っていることが報告されており、その変異を起因として細胞内の活性酸素産生量が増加すると考えられている。本研究の **EPR** の測定結果はこれを支持する結果であった。**RGM** に比べて **RGK** の方が活性酸素をより多く産生していること、その差は **MnSOD** の恒常発現により低減することから、**RGK** ではミトコンドリア由来の活性酸素産生が増加していると示唆された。

以上の事から、食塩やエタノールは胃がんや肝臓がんの発癌リスクとして有名であるが、ミトコンドリア由来の活性酸素産生を誘導する環境因子として働き、がんに対して同様の活性酸素誘導によりがんの悪性化を促進する可能性がある。また、がん化した細胞では活性酸素の産生量が亢進しているため、活性酸素増加に伴い誘導される血中因子をがんマーカーとして使用できると考えられる。

結論： 食塩やエタノールはミトコンドリア由来の活性酸素産生を誘導する環境因子であり、がん悪性化を促進する可能性が示唆された。