

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

Acetic acid is an oxidative stressor in gastric cancer cells

(酢酸は胃癌細胞に対して酸化ストレスを惹起させる)

2 0 1 8

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

寺崎 正彦

目次

序論	2
第1章 本研究の背景.....	3
はじめに	3
1.1 胃癌の現状	3
1.2 癌の代謝	7
1.3 酢酸	11
1.4 先行研究	15
1.5 活性酸素	16
1.6 使用細胞	19
第2章 酢酸の酸化ストレスによる癌選択的細胞傷害.....	21
2.1 目的	21
2.2 対象と方法	22
2.3 実験結果	26
2.4 考察	28
図	30
第3章 総括	37
参考文献	38
謝辞	43
出典	44

序論

酢酸が有史に登場するのは紀元前 5000 年のバビロニアである。葡萄汁から形成されたワインを発見し、それが酢酸の発見と食品防腐剤としての使用につながったとされている。古代ギリシアにおいてヒポクラテスは、風邪や咳などの万能薬として酢を処方したとされており、古来より酢酸は人類の身近にあり有用なものとして用いられてきた。

酢酸は CH_3COOH で表されるモノカルボン酸の 1 種であり、広く食用品や試薬、工業品として用いられている。近年、モノカルボン酸の癌細胞特異的な代謝経路が着目されており様々な検討が行われている。中でも酢酸は癌細胞に選択的に取り込まれアセチル CoA となることが知られており、そのアセチル CoA はミトコンドリア内の TCA 回路を回転させる材料となる。また、TCA 回路からは活性酸素が産生されることも知られている。私の研究室では、酢酸曝露が胃癌細胞において癌細胞選択的に抗腫瘍効果をもたらしたことを以前報告したが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで私は酢酸の癌選択的な取り込みに着目して検討したところ、同投与が癌細胞選択的な活性酸素濃度増加をもたらすこと、その活性酸素による酸化ストレスが癌細胞選択的な細胞傷害をもたらすことを見いだした。

本稿では上記内容について詳細を記し、さらに今後の展望について述べる。

第1章 本研究の背景

はじめに

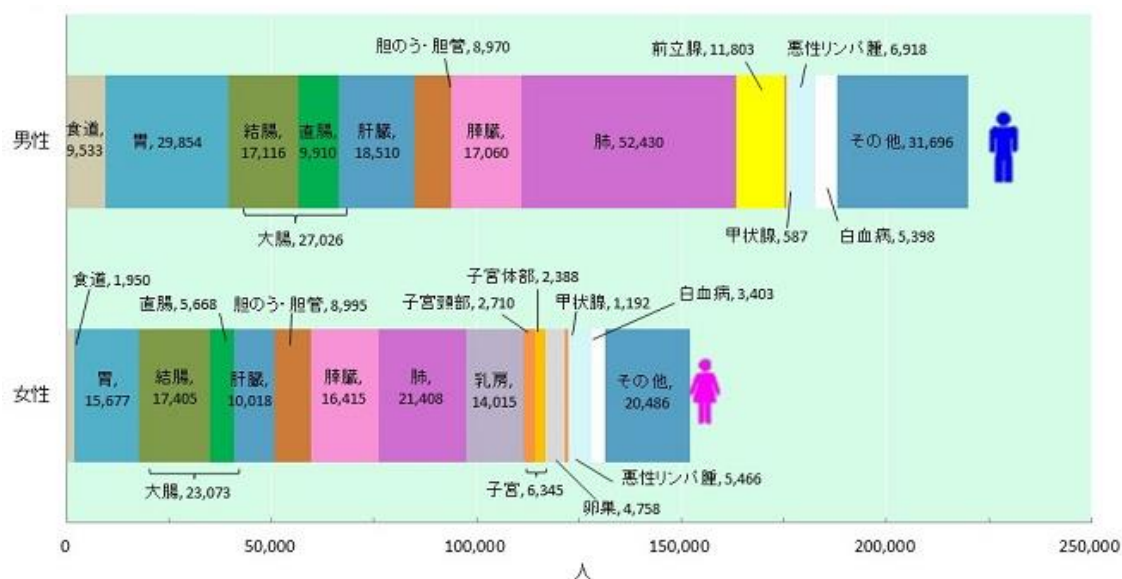
本章では私の研究分野である胃癌の現状について概説し、さらに研究テーマである癌と活性酸素についての概説、及び先行研究である酢酸による癌細胞の選択的障害を示した結果について記載する。さらに酢酸と癌細胞の関係について述べ、本研究で使用した細胞について紹介する。

1.1 胃癌の現状

1.1.1 罹患数と死亡数

2016年の日本人の胃癌による死亡数は男性で2位、女性で4位、全体で3位であり、罹患数については2014年では男性で1位、女性で3位、全体で3位と上位を占める。2016年の部位別癌死亡数では男性では肺に次ぐ2位、女性では4位となっている（図1）。後述するように、近年は上下水道の完備と冷蔵庫の普及・低塩分食・ヘリコバクター・ピロリ菌の除菌・内視鏡治療の発展による発症率及び死亡率の低下を認めてはいるものの、なお胃癌による死亡数は多く、既知の治療を発展させる必要がある。

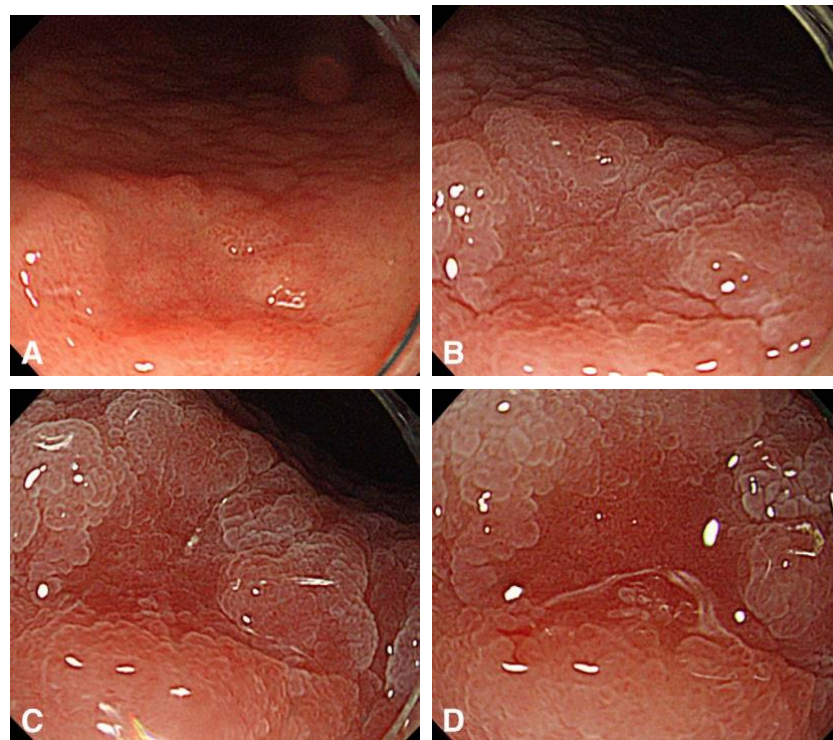
図1 部位別癌死亡数（2016年）



国立がん研究センターがん対策情報センターより

胃癌の早期診断は内視鏡的全切除による根治を可能とするため、より客観的かつ鋭敏な内視鏡診断法が望まれており、近年、上部消化管内視鏡診断において酢酸散布による癌領域診断が行われている。これは婦人科医がコルポスコピーで子宮頸部粘膜表面を観察する際に 3-5 %の酢酸を散布しそれにより白色化した円柱上皮を観察していたことを起源とする [1]。胃癌領域診断については、1.5 %の酢酸散布が行われる。これは、酢酸散布により酸に対する胃粘膜の防御反応によると思われる粘液産生が増加し、その酸による粘液の産生性が癌と非癌で異なるため、癌部分は非癌部分に比し酢酸による白色化の消失時間が早く、白色化の続く非癌部分との間に赤白のコントラストが生じる現象を利用している (図 2) [2]。このように酢酸は、正常細胞と癌細胞に対する反応がそれぞれ異なることを利用した診断法に現在日常的に用いられている。

図 2 酢酸散布による胃癌の領域診断 (参考文献 : 2 より引用)



A : 通常白色光による観察、B : 酢酸散布 5 秒後、C : 酢酸散布 10 秒後の拡大観察、
D : 酢酸散布 20 秒後の拡大観察。非癌部では白色化が継続するものの癌領域では白色化が消失し、不規則な微小血管パターンが観察できる。

1.1.2 病因

胃癌の病因としては、ヘリコバクター・ピロリ菌の持続感染や、喫煙や食塩の過剰摂取がリスクを高めると考えられている。ヘリコバクター・ピロリ菌は胃の粘膜に生息する螺旋形の細菌で、ウレアーゼという酵素を出して尿素からアンモニアを作り、強酸である胃の中でも生存している。感染時期は胃酸分泌や胃粘膜の免疫能の働きが不十分な幼少児期に感染すると考えられている。上下水道が完備されていない時代は不浄な生活用水に混入したピロリ菌による感染が疑われていたが、現在はピロリ菌感染者の唾液を介した感染が主たる経路と考えられている。現在の日本において生活環境は整備され、かつピロリ菌の除菌治療が一般的になってきており胃癌による死亡数は減少傾向となつてはいるものの、依然として罹患率、死亡数は上位を占めている。

1.1.3 病期別生存率

胃癌の病期別生存率は下記表 1 のように表される。早期での生存率は良好ではあるが、病期が進むにつれ生存率は低下し、**Stage IV** では **7.3 %**と極めて低くなる。内視鏡や外科治療適応外の症例では生存率が大きく低下するため、生存率を上昇させるために現在の治療からより効果のある治療が必要と考えられる。

表 1 病期別生存率

病期	症例数 (件)	5 年相対生存率 (%)
I	11,507	97.3
II	1,515	65.7
III	1,892	47.2
IV	3,255	7.3
全症例	18,514	73.1

全国がん（成人病）センター協議会の生存率共同調査 KapWeb（2016 年 2 月集計）より

1.1.4 治療

胃癌の治療は外科治療、内視鏡治療、化学療法の3つが中心となり、治療法は病期（Stage）に基づいて決定する（図3、表2）。前項と併せて考案すると、内視鏡治療や手術によって完全に摘除する以外癌の根治は困難であり、現在の抗癌剤治療の限界はどうしても存在すると考えられ、これをブレイクスルーする治療法が望まれている。そこで私は癌細胞と正常細胞の糖代謝の違いに着目した新しい治療法を確立すべく、細胞を用いた基礎的検討を行った。その詳細は次章以下に記載する。

図 3

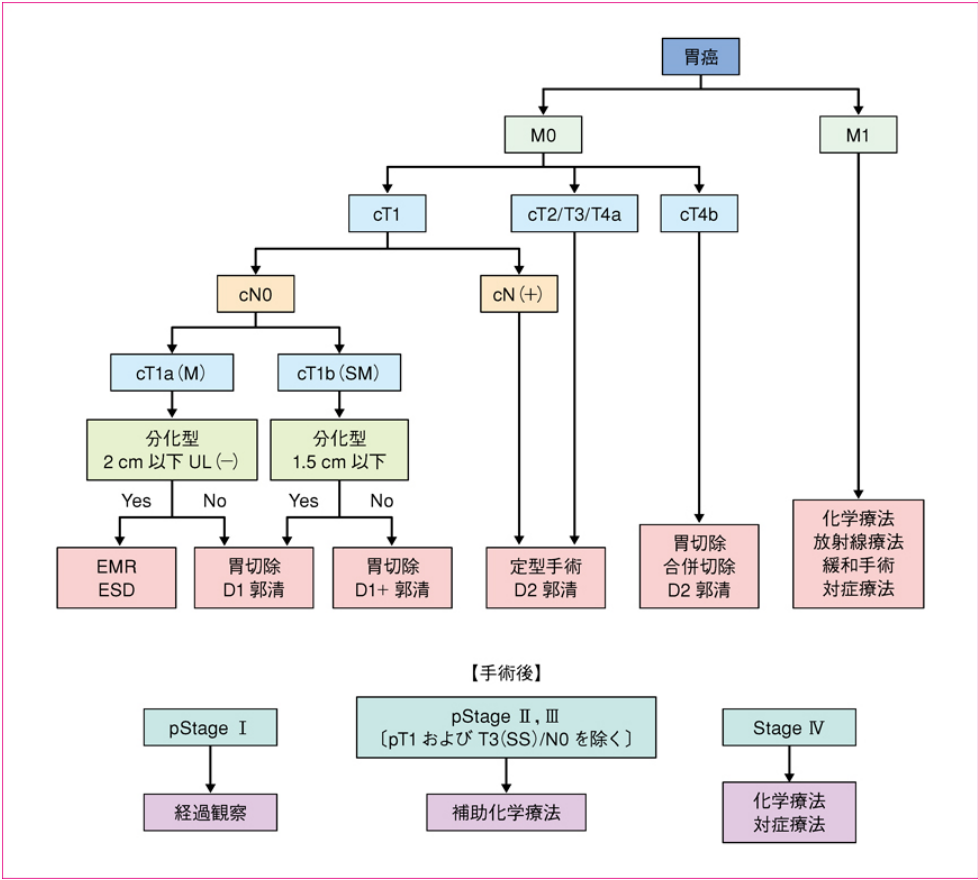


表 2

	N0	N1	N2	N3	M1
T1a (M), T1b (SM)	IA	IB	IIA	IIB	IV
T2 (MP)	IB	IIA	IIB	IIIA	IV
T3 (SS)	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
T4a (SE)	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IV
T4b (SI)	IIIB	IIIB	IIIC	IIIC	IV

胃癌治療ガイドライン第4版より

1.2 癌の代謝

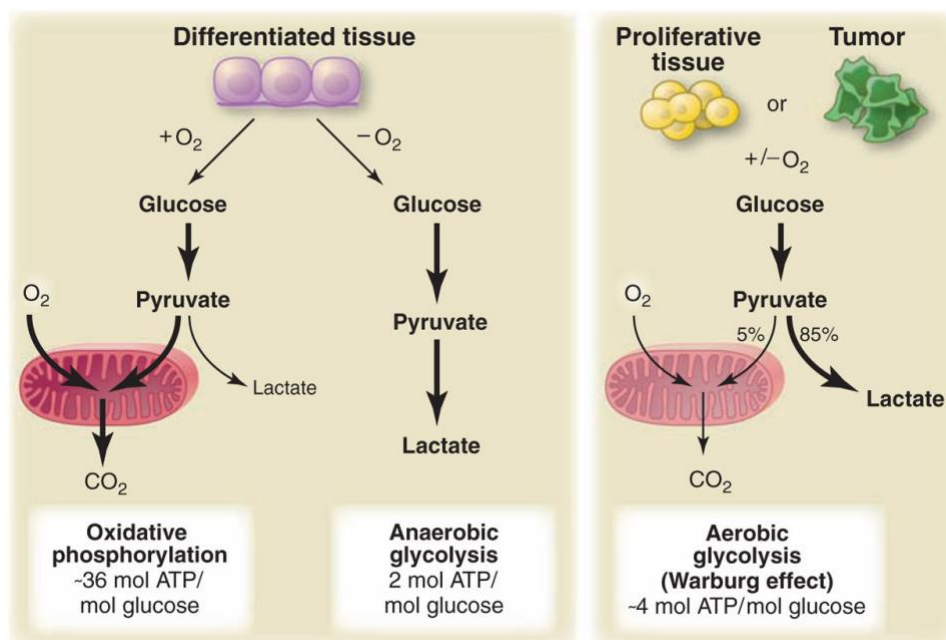
1.2.1 Warburg 効果



Otto Warburg 1883-1970

Warburg 効果とは Otto Warburg が 1956 年に発表した現象で、癌細胞は有酸素下においてもミトコンドリアの酸化的リン酸化（TCA 回路）よりも解糖系で ATP を産生するという現象である [3]。正常細胞は十分な酸素存在下において、グルコースはピルビン酸に異化された後ミトコンドリアへ入り、さらに TCA 回路を通過後、酸化的リン酸化を受けることにより 1 分子のグルコースから 36 分子と大量の ATP を産生する。低酸素環境下では酸化的リン酸化ではなく嫌氣的解糖によって 2 分子と少量の ATP を産生する。一方で癌細胞では酸素の有無に関わらず、酸化的リン酸化ではなく解糖系でグルコースから主に乳酸を作り ATP を産生する（図 4） [4]。この代謝特性は癌細胞生存の本質的選択圧力と考えられ、TCA 回路の約 100 倍の速さで代謝が進むと推定されている [5]。

図 4 正常細胞と癌細胞の代謝の違い（参考論文：4 より引用）



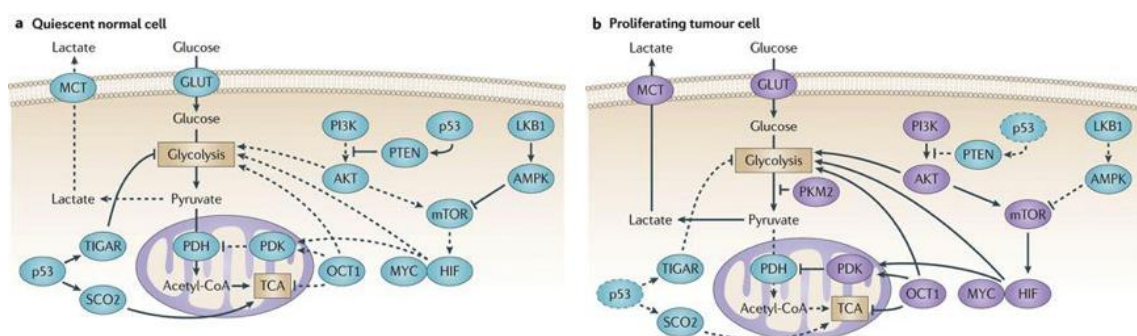
このため、癌細胞は糖消費量が正常組織に比べ多く [6] [7] [8]、その現象を臨床応用した例として癌領域の画像診断である PET-CT が挙げられる [9]。

癌細胞では解糖の亢進により乳酸が過剰に産生され、放出される。乳酸は単に解糖経路の終末代謝産物であるだけではなく、酸性の腫瘍環境を作り出し、癌細胞の遊走と浸潤、宿主免疫系からの回避、腫瘍血管新生の誘導や放射線耐性の獲得など、機能性分子として作動する [10]。解糖系の亢進とともに、その中間代謝産物のピルビン酸からアセチル CoA への異化の障害とそれに続く TCA 回路における酸化リン酸化の低下が観察される。その TCA 回路のエネルギー代謝不全に付随してミトコンドリア膜電位の過分極と過酸化水素の産生やシトクロム C の放出が低下する。これにより癌細胞は抗癌剤や放射線などの細胞死誘導刺激に不応性となる [11]。

1.2.2 代謝特性を利用した癌治療法

主たるエネルギー源を解糖経路に依存している癌細胞は見かけ上、その生存、増殖や浸潤には有利であるとはいえ、常に全力疾走しているかのような状態にある。このことは逆に、活発なエネルギー代謝は癌細胞の弱点であることを意味し、その経路の制御の解明は癌治療法の開発に結びつくことが期待される。この観点から、癌細胞のエネルギー代謝を制御する様々な細胞内シグナル経路の解明が進められており、Warburg 効果は PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase)、HIF (hypoxia inducible factor)、p53、MYC 及び AMPK (AMP-activated protein kinase)、LKB1 (liver kinase B1) などが調節因子として働くことが報告されている (図 5) [12]。

図 5 Warburg 効果を引き起こす細胞内シグナル経路 (参考文献: 12 より引用)

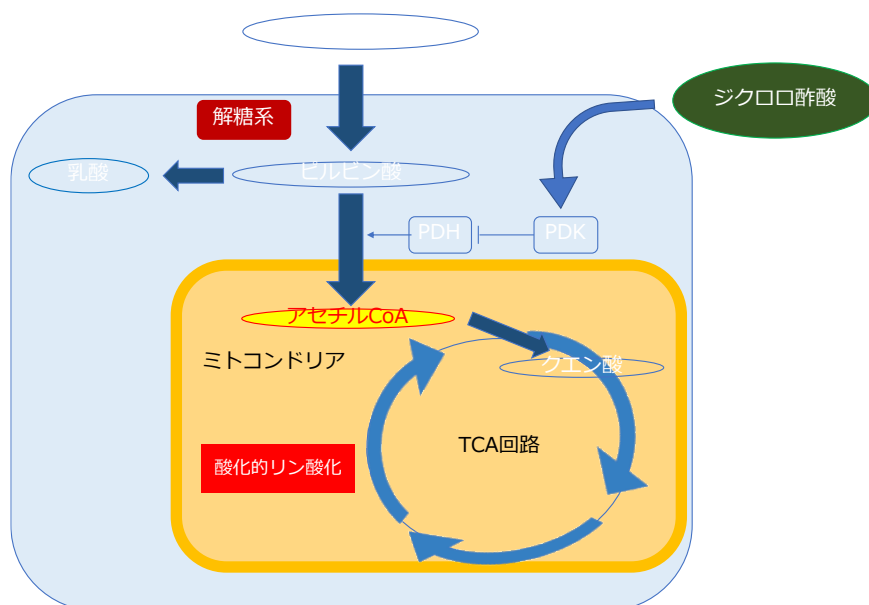


エネルギー代謝経路に直接的に作用して癌治療効果を示すことが示されている化合物として、ジクロロ酢酸が知られている。解糖系から TCA 回路における酸化リン酸化への移行の律速段階はピルビン酸からアセチル CoA への異化であり、これを触媒するのがピルビン酸脱水素酵素（pyruvate dehydrogenase；PDH）である。ジクロロ酢酸は、PDH を活性化して乳酸合成を抑制する少分子化合物として同定され、その作用点は PDH の抑制因子 PDK（PDH kinase）である。この作用に基づき、ジクロロ酢酸は乳酸アシドーシスをはじめとするミトコンドリア病の経口治療薬として以前から利用されている [13]。

多くの癌で PDK の発現が亢進していることに着目した研究により、ジクロロ酢酸は癌細胞の PDH 活性を回復させ、糖代謝を解糖優位な状態からより生理的な酸化リン酸化へシフトすることによりアポトーシスを誘導することが報告されている [14]（図 6）。ジクロロ酢酸の癌治療効果は細胞レベルで一致した結果は得られていないが、動物実験で腫瘍増殖の抑制効果が実証されつつあり [15]、現在は安価なジェネリック医薬品のジクロロ酢酸を用いて膠芽腫をはじめとする固形癌治療の臨床試験が実施されている [16] [17]。

私は日常的に食品として馴染みがあり、内視鏡的癌領域診断にも使用され安全性が担保されている酢酸に着目し、酢酸と癌代謝について検討を行った。

図 6 ジクロロ酢酸の作用経路



1.2.3 酢酸代謝

固形癌は、不完全な血管構築による血流不全から引き起こされる低酸素、低栄養、低 pH という微小環境からエピゲノムやエネルギー代謝変化、転移や浸潤能の促進を引き起こし、悪性化に寄与することが知られている。近年メタボローム解析により、低栄養、低 pH の腫瘍微小環境においてグルコース枯渇時に酢酸を代替の栄養源とする新たな癌特異的な代謝経路である酢酸代謝が見出された。

酢酸は炭素数 2 の脂肪酸で、霊長類で最も分子量の小さい栄養素の 1 つである。酢酸はアセチル CoA に容易に代謝されるが、この反応を触媒するのは acetyl CoA synthetase (ACSS) である。ACSS ファミリーには主にミトコンドリアに局在する ACSS1、主に細胞質に局在する ACSS2 がある。酢酸から生成されるアセチル CoA は、解糖系と TCA 回路を結ぶ中心的な代謝物である。

腫瘍における酢酸代謝に関しては 1950 年代に最初の報告がある [18]。酢酸は他の脂肪酸と同様に腫瘍でエネルギー源として使われるだけでなく、他の脂肪酸とは異なりグルコース濃度によらず代謝されることが報告された。近年では酢酸は正常組織に比べ脳腫瘍などの癌細胞で多く取り込まれ代謝されていることが報告されており [19]、酢酸 PET が癌の診断に有用であることが報告されている [20]。これは、酢酸は癌において選択的に取り込まれ代謝される重要な物質であることを示唆している。さらに、低酸素、低栄養環境下の乳癌や前立腺癌細胞の増殖や生存に寄与する酵素として ACSS2 が同定されており [21]、酢酸は栄養源供給が制限された状況においては脂肪酸やリン脂質合成における腫瘍な炭素供給源になり、この傾向は ACSS に増幅がある癌において特に顕著であることが明らかとなっている。

癌の酢酸代謝についてはこのように、現在様々な検討がなされているが、詳細なメカニズムについては未解明なものが多い。そのため私は癌の酢酸代謝について酸化ストレスによるメカニズムに着目し検討を進めることとした。

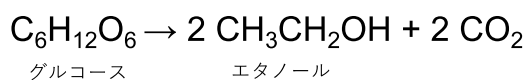
1.3 酢酸

1.3.1 酢の歴史

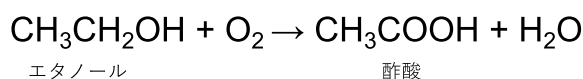
酢は紀元前 5000 年のバビロニアの宮廷において、ぶどう汁から形成されたワインを発見したことから最終的に酢の発見につながったとされており、その時代より酢は食品防腐剤として使用されていた。さらにヒポクラテスは紀元前 420 年に酢を創傷治療目的に酢酸を使用したとされている。酢は発酵性の炭水化物源をアルコール発酵させた後、酢酸発酵することにより作られる（図 7）。

図 7

・アルコール発酵



・酢酸発酵



原料はぶどう、りんご、なしなどの果実や米、麦などの穀物であり、原料によりフランスのワインビネガー、イタリアのバルサミコ酢、日本の米酢、イギリスのモルトビネガー等に分類され、全世界で日常的に調味料として利用されている。酢（vinegar）の語源はフランス語の *vin aigre* ; *vin*（ワイン）+ *aigre*（すっぱい）であり、アルコールが酸味をもつ液体に変化したものという意味である [22]。

1.3.2 食酢について

食酢については原料により様々な種類があり、日本においては農林水産省が規定する以下の表 3 のように定められる。

表 3 醸造酢の日本農林規格第 2 条より（昭和五十四年六月八日農林水産省告第八百一号）

用語	定義
食酢	醸造酢及び合成酢をいう。
醸造酢	次に掲げるものをいう。 1. 穀類（酒かす等の加工品を含む。以下同じ）、果実（果実の搾

	<p>汁、果実酒等の加工品を含む。以下同じ)、野菜(野菜の搾汁等の加工品を含む。以下同じ)、その他の農産物(さとうきび等及びこれらの搾汁を含む)若しくは蜂蜜を原料としたものろみ又はこれにアルコール若しくは砂糖類を加えたものを酢酸発酵させた液体調味料であって、かつ、氷酢酸又は酢酸を使用していないもの</p> <p>2. アルコール又はこれに穀類を糖化させたもの、果実、野菜、その他の農産物若しくは蜂蜜を加えたものを酢酸発酵させた液体調味料であって、かつ、氷酢酸又は酢酸を使用していないもの</p> <p>3. 1 及び 2 を混合したもの</p> <p>4. 1、2 又は 3 に砂糖類、酸味料(氷酢酸及び酢酸を除く)、調味料(アミノ酸等)、食塩等(香辛料を除く。以下同じ)を加えたものであって、かつ、不揮発酸、全糖又は全窒素の含有率がそれぞれ 1.0 %、10.0 %又は 0.2 %未満のもの</p>
合成酢	<p>次に掲げるものをいう。</p> <p>1. 氷酢酸又は酢酸の希釈液に、砂糖類、酸味料、調味料(アミノ酸等)、食塩等を加えた液体調味料であって、かつ、不揮発酸、全糖または全窒素の含有率がそれぞれ 1.0 %、10.0 %又は 0.2 %未満のもの</p> <p>2. 1 又は氷酢酸若しくは酢酸の希釈液に醸造酢を混合したもの</p>
穀物酢	<p>醸造酢のうち原材料として 1 種又は 2 種以上の穀類を使用したもの(穀類及び果実以外の農産物並びに蜂蜜を使用していないものに限る)で、その使用総量が醸造酢 1 L につき 40 g 以上であるものをいう。</p>
果実酢	<p>醸造酢のうち、原材料として 1 種または 2 種以上の果実を使用したもの(穀類及び果実以外の農産物並びに蜂蜜を使用していないものに限る)で、その使用総量が醸造酢 1 L につき果実の搾汁として 300 g 以上であるものをいう。</p>

米酢	穀物酢のうち、米の使用量が穀物酢 1 L につき 40 g 以上のもの（米黒酢を除く）をいう。
米黒酢	穀物酢のうち、原材料として米（玄米のぬか層の全部を取り除いて精白したものを除く）又はこれに小麦若しくは大麦を加えたもののみを使用したもので、米の使用量が穀物酢 1 L につき 180 g 以上であって、かつ、発酵及び熟成によって褐色又は黒褐色に着色したものをいう。
大麦黒酢	穀物酢のうち、原材料として大麦のみを使用したもので、大麦の使用量が穀物酢 1 L につき 180 g 以上であって、かつ、発酵及び熟成によって褐色又は黒褐色に着色したものをいう。
りんご酢	果実酢のうち、りんごの搾汁の使用量が果実酢 1 L のうち 300 g 以上のものをいう。
ぶどう酢	果実酢のうち、ぶどうの搾汁の使用量が果実酢 1 L のうち 300 g 以上のものをいう。

また、同第 3 条では、醸造酢の規格を酸度 4.0 %と規定しており、酸度とは酢酸換算値とし、次の算式によって算出した百分比とする。

$$\text{酸度 (\%)} = 0.03 \times (T - B) \times F/V \times 100$$

T：試料における 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム標準溶液の滴定量 (ml)

B：空試験における 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム標準溶液の滴定量 (ml)

F：0.5 mol/L 水酸化ナトリウム標準溶液の力価

V：試料採取量 (ml)

0.03：0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 ml に相当する酢酸の重量 (g)

つまり、酢の主成分は酢酸であることが示されている。

1.3.3 酢酸の生理機能

酢酸は、特に反芻動物の腸管において細菌による発酵生成物として生成され、その血中に高濃度で存在することが知られている [23]。ヒトにおいてもアルコールの代謝により肝臓で酢酸が生成されること、空腹時に脂肪酸から酢酸が生成されることが知られている [24]。酢酸は降圧作用を持つことが報告されており、これは酢の投与が食事中的酢酸がカルシウムの吸収を促進し、それによってレニン-アンギオテンシン系を阻害すると推測されている [25]。酢酸は高血糖に対しても食後インスリン感受性を改善させ、インスリン抵抗性のある患者または2型糖尿病患者に対しても効果があること [26]、外因性に酢酸を経口摂取すると血中に容易に移行し速やかに組織に吸収され代謝され、その過程で AMPK (AMP-activated protein kinase) を活性化し肥満の抑制、耐糖能の改善をもたらすという報告がある [27]。さらに酢酸の持つ抗腫瘍効果について、日本のきび酢がヒト白血病細胞のアポトーシスを誘導することや [28]、黒酢が G1 期細胞周期停止を引き起こし腫瘍細胞の増殖を抑制すること [29]が報告されている。

このように酢酸が癌を含む疾病に対して予防・治療効果を示すという報告は複数あるが、酢酸を用いて直接癌を治療しようという試みは今までなされていなかった。

1.4 先行研究

酢酸が癌にもたらす直接的な治療効果として、我々研究室が共同研究により行った先行研究として、酢酸曝露は癌細胞選択的細胞傷害を引き起こしたという報告がある [30]。これは酢酸による胃潰瘍モデルを用いた胃潰瘍の治療についての研究を進める中で見出されたものであり、酢酸を局所投与すると抗腫瘍効果をもたらすという結果であった。これは 0.1 から 0.5 %の酢酸を正常細胞と癌細胞にそれぞれ 10 分間曝露し、24 時間後の細胞生存率を測定したものであるが、酢酸の濃度依存的に癌細胞をより選択的に傷害するという結果であった(図 8、図 9)。しかし、その詳細なメカニズムについては不明であった。そこで、筑波大学消化器内科における研究テーマである酸化ストレスに着目し検討を進めることとした。

図 8

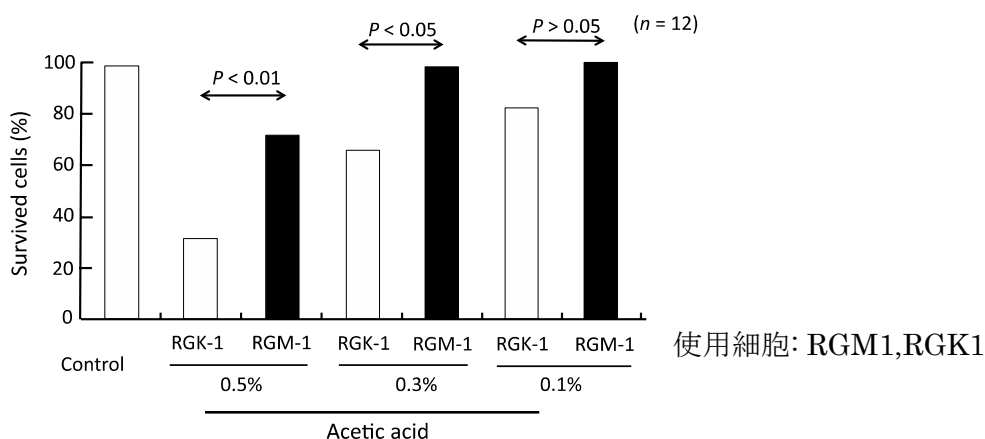
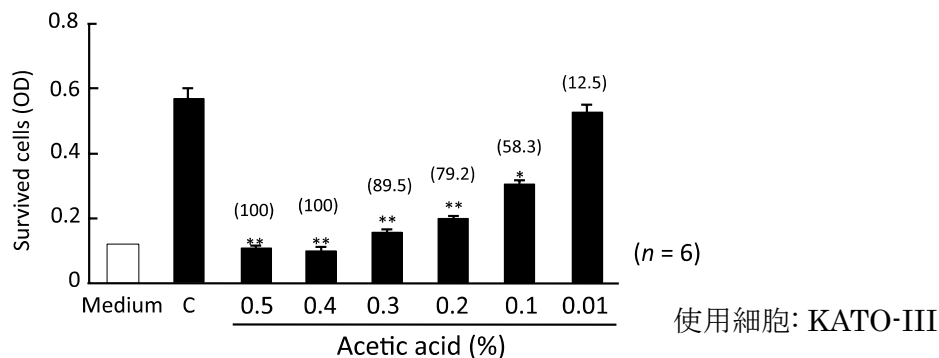


図 9



(図 8、図 9 ともに参考文献 : 30 より引用)

1.5 活性酸素

1.5.1 フリーラジカル、活性酸素、酸化ストレスについて

酸化ストレスとは、生体の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、前者に傾き、生体にとって好ましくない状態と定義されており、酸化反応（電子の移動反応）を伴って生体に与えられる刺激、シグナルである [31]。通常安定な分子の最外殻電子は 2 個の電子が対になって存在するが、まれに対になっていない電子がある。これを不対電子といい、この不対電子をもつ分子や原子をフリーラジカルという。不対電子は対になろうとするため、フリーラジカルは一般に不安定で反応性が大きい。酸素 O_2 は不対電子を 2 個持つバイラジカルというフリーラジカルであり、一定の反応性を示す。その生体内の代謝過程で 4 電子還元されるが、その過程あるいはエネルギー付与による電子の励起、遷移金属との結合により反応性がさらに高まる。このようにして生じる酸素分子より活性の高い酸素種を総称して活性酸素と呼び、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル (OH^{\cdot})、一重項酸素 (1O_2) の 4 種類が活性酸素種として定義されている [32]。上記定義に従えばフリーラジカルとされるのは酸素、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシルラジカル (OH^{\cdot}) である。

これらの活性酸素は通常環境下では吸収された酸素から生成される量はわずか 1% 以下であるとされるが、このわずかな活性酸素が細胞内に遊離すると細胞成分を無差別に酸化し障害を与える。活性酸素によって引き起こされた酸化ストレスは自然の老化現象の他に癌や神経疾患、糖尿病や肥満のような代謝異常等の様々な病態に関係している。

1.5.2 活性酸素、フリーラジカルの生成

フリーラジカルを生成する環境因子としては、放射線、紫外線、酒、タバコ等が知られており、こうした環境因子に接することによりフリーラジカルを生体内に取り込むことになる。さらに生体内ではミトコンドリア電子伝達系、好中球における殺菌作用のための NADPH oxidase 活性化、小胞体における蛋白の高次構造異常や非修飾時ストレスに対して産生される。

1.5.3 フリーラジカルの測定法

フリーラジカルの測定法で最も直接的なものは電子スピン共鳴法 (electron spin resonance ; ESR 法) である。ESR 法はフリーラジカルが有する小さな磁石としての性質を検出するものであり、特異性が高い。しかし一般的にフリーラジカルの寿命は短いので、常温においてそのまま検出することは難しい。そこでフリーラジカルを特別な化合物と反応させて寿命が長いラジカル酒に変換し、その変換されたラジカル種を ESR 法で検出する。ESR 法は着目するフリーラジカルに適したスピントラップ剤を用いられるが、酸化ストレス測定のためのスピントラップ剤としては、安定性の理由からニトロソ化合物 [5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド (DMPO)、5-ジエチルホスホノ-5-メチル-1-ピロリン-N-オキシド (DEPM-PO)、 α -フェニル-N-tert-ブチルニトロソ (PBN) 等] が多用される [33]。DMPO については、すでに多くのラジカル種に対して研究が行われ、超微細結合定数が求められており [34]、これらのデータを参照することで構造、すなわちもとのフリーラジカルの種類を推定できる [35]。反磁性の DMPO はヒドロキシルラジカルと反応し、比較的安定なニトロキシル基である常磁性 DMPO-OH を生成し [36] (図 10)、DMPO-OH は特徴的な 1 : 2 : 2 : 1 の 4 本線の ESR 信号を示すことが知られている (図 11) [37]。

図 10 DMPO とヒドロキシルラジカルの反応 (参考文献 : 36 より引用)

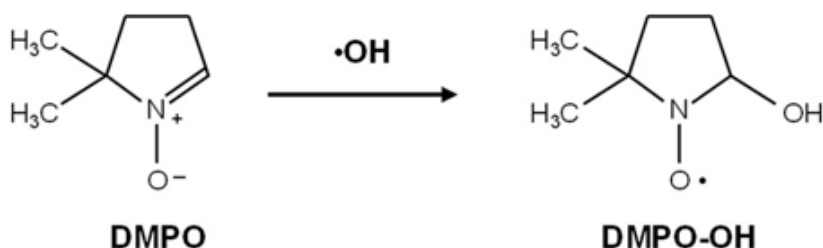
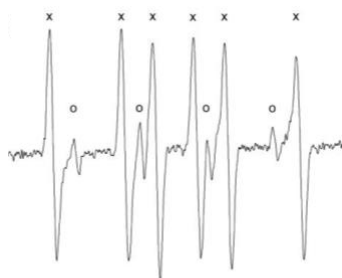


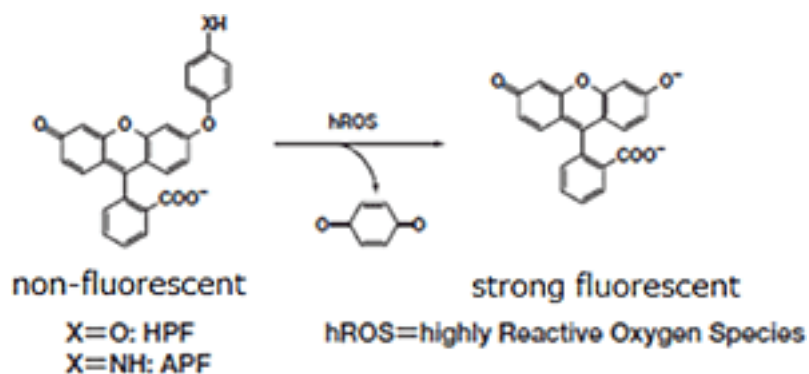
図 11 DMPO を用いたヒドロキシルラジカルの ESR スペクトラム (参考文献 : 37 より引用)



その他の測定法としては、化学プローブ法として蛍光プローブや化学発光プローブを用いた測定法があり、蛍光プローブとしては Hydroxyphenyl Fluorescein ; HPF や Aminophenyl Fluorescein ; APF が測定に有用である。HPF、APF は強い活性を持つ活性酸素種と反応すると、強蛍光性化合物であるフルオレセイン（励起波長 490 nm、蛍光波長 515 nm）が生成し、蛍光が観測できる（図 12）。

図 12

（五稜化薬株式会社 HP より引用）

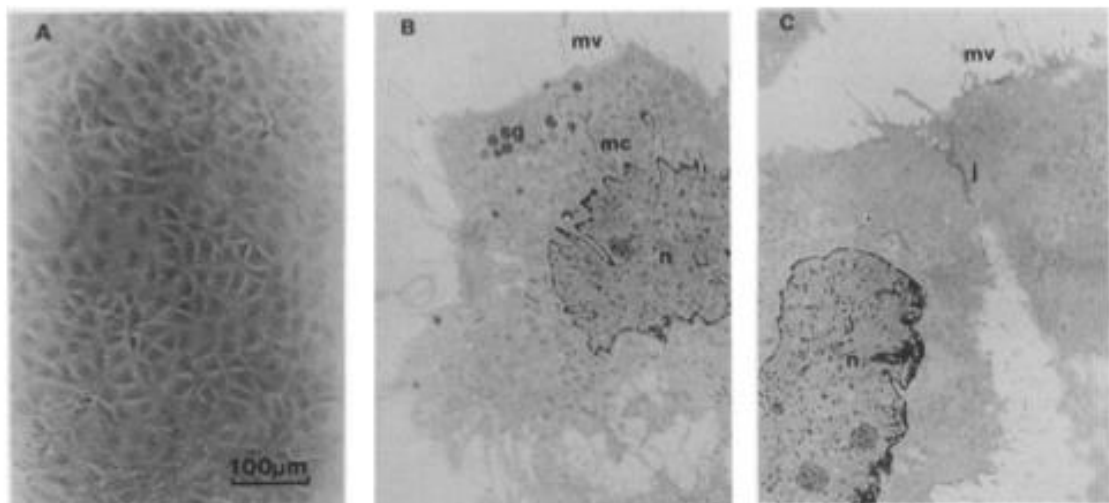


1.6 使用細胞

1.6.1 RGM1 細胞

RGM1 細胞は 1992 年に筑波大学消化器内科で樹立された細胞である [38]。生後 4 週の Wister 系ラット胃粘膜細胞から採取され株化された。2 倍体の非形質転換細胞系であり、PAS 染色陽性、主細胞の Bowie 染色陰性、壁細胞のコハク酸脱水素酵素活性陰性で、細胞質内サイトケラチンは陽性であった。また、透過型電子顕微鏡による観察においては、RGM1 細胞は細胞表面に微小絨毛を有し、細胞質には分泌顆粒を認めた。さらに細胞境界では細胞間接着構造を有し、RGM1 細胞は胃粘膜上皮であることが示されている (図 13)。

図 13 RGM1 細胞の形態 (参考文献 : 38 より引用)



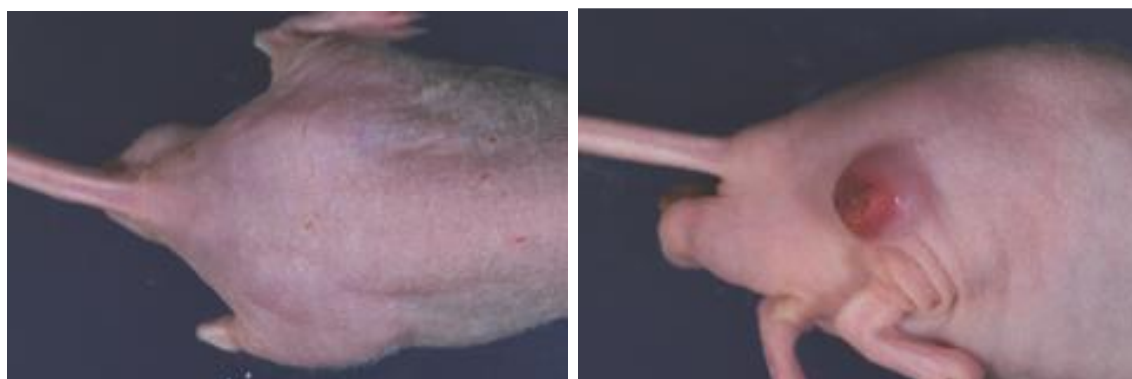
A : $\times 200$, B,C : $\times 7200$

mv : 微絨毛, n : 陥入核, sg : 分泌顆粒, mc : ミトコンドリア, j : 細胞間接着構造

1.6.2 RGK1 細胞

RGM1 細胞に化学発癌物質として知られている N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) を曝露し培養を続けることにより癌化させた細胞株である [39]。RGK1 細胞は非足場依存性増殖、腫瘍形成能、浸潤能を有しており、癌の性質を持つことが示されている (図 14)。

図 14



RGM1

RGK1

1.6.4 RGM-GFP 細胞

胃粘膜正常細胞である RGM1 細胞に蛍光タンパク遺伝子である GFP を導入した細胞である (図 15)。

1.6.5 RGK-KO 細胞

胃粘膜正常細胞の癌様変異株である RGK1 細胞に対して限界希釈法を用い得られたサブクローンである RGK36 細胞にクサビラオレンジ遺伝子を導入した細胞である (図 16)。

これら 2 種類の細胞を用いて共培養を行うことで、より生体に近い環境で細胞競合を含めた検討を行うことが可能となる [40]。

図 15

RGM-GFP

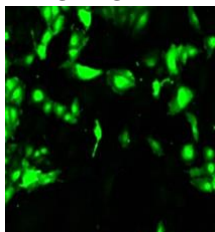
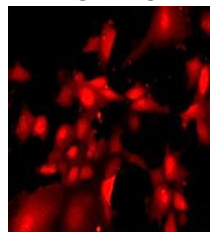


図 16

RGK-KO



第2章 酢酸の酸化ストレスによる癌選択的細胞傷害

本章では酢酸がもたらす抗腫瘍効果について酸化ストレスに着目し、正常細胞と癌細胞のそれぞれ独立した系と生理的な環境により近い状態である共培養系での検討を行った。さらに酢酸の癌選択的取り込みと活性酸素産生に関して、酢酸の取り込みに関与するトランスポーターである MCT 1 に着目し、その癌選択的細胞傷害についての結果を示す。

2.1 目的

癌細胞と正常細胞では解糖系や酸化的リン酸化の代謝が異なっている。また、癌細胞特異的な酢酸代謝について近年検討が進んでおり、中でも癌細胞に取り込まれた酢酸はアセチル CoA となり TCA 回路を回転させることが知られている。さらに、TCA 回路が回転すると活性酸素が産生される。我々は以前、酢酸を腫瘍細胞へ曝露した結果、癌細胞選択的に細胞傷害を引き起こすことを報告したが [35]、詳細なメカニズムについては不明であった。そこで私は酢酸の癌選択的な取り込みや、それにより生じる酸化ストレスに着目し、同じ遺伝子背景を持つ胃粘膜の正常細胞と癌細胞を用い、酢酸を曝露したときに生じる現象を、それぞれ独立した細胞系と共培養系を用いて検討した。

2.2 対象と方法

2.2.1 実験細胞

ラット由来胃粘膜正常細胞 (RGM1)、その癌様変異株細胞 (RGK1)、RGM1 に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子をトランスフェクトした RGM-GFP 細胞、RGK にクサビラオレンジタンパク質 (KO) 遺伝子をトランスフェクトした RGK-KO 細胞を用いた。

RGM1 および RGM-GFP 細胞を L- glutamine (Life Technologies Japan, Ltd.) を用いた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) / F12 培地中で培養し、RGK1 および RGK-KO 細胞は L-glutamine を有しない DMEM / F12 (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan) 培地中で培養した。培養培地は 10 % FBS (Biowest LLC, Kansas, MO) と 1 % penicillin/streptomycin (Life Technologies) を使用し、すべての細胞は 37 °C、5 % CO₂ インキュベーターで培養した。

2.2.2 試薬

Cell Counting Kit-8 および Diphenyl-1- pyrenylphosphine (DPPP) は DOJINDO LABORATORIES (Kumamoto, Japan) より、anti-monocarboxylate transporter 1 (MCT1) antibodies は Alpha Diagnostic International, Inc. (San Antonio, TX) より、anti-caspase 9 antibodies は Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA) より購入した。Radioisotope of [2-¹⁴C] - acetic acid sodium salt は American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO) より購入した。Acetic acid、hydrochloric acid、N-Acetyl-L-cysteine (NAC) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。12 % Bis Tris gels は Life Technologies Japan, Ltd. (Tokyo, Japan) より、Can Get Signal reagents は TOYOBO Co., Ltd. (Osaka, Japan) より購入し、5,5-dimethyl-1- pyrroline-N-oxide (DMPO) は LABOTEC Co., Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。

2.2.3 細胞毒性試験

細胞増殖試験は、Cell Counting Kit-8 を使用した。RGM1 または RGK1 細胞を 96 穴プレート上で 24 時間、1 穴あたり 1×10^4 個の濃度で培養後、培地を 0, 1, 2, 5, 10, 20 μM の酢酸を含む培地に交換し、37 °C で 24 時間培養した。培養後、培地を 10 % Cell Counting Kit-8 試薬を含む培地と交換した。37 °C で 1 時間培養後、DTX 880 マルチモードマイクロプレートリーダー (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

2.2.4 RGM-GFP、RGK-KO 共培養系での実験

正常細胞と癌細胞の蛍光を用いた共培養系 [38]を用いた。共培養皿は 31,250 個/cm² (各細胞型につき 15,625 個/cm²) で調整した。24 時間のインキュベーション後、細胞を塩酸または酢酸に 0, 1, 2, 5, 10, 20 μM で 24 時間曝露した後、培地を新しい培地と交換した。細胞がコンフルエントに達するまで、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞を毎日観察した。

2.2.5 RI ラベルした酢酸の取り込み実験

放射性同位体標識酢酸 (acetic acid [²⁻¹⁴C] sodium salt: RI 酢酸) を用いて酢酸の細胞内取り込みを調べた。細胞を 6 穴プレート上で 1 穴あたり 1×10^5 個で播種し一晩培養した。その後培地を 5 μM の RI 酢酸を含む新鮮な培地と交換し、37 °C で 24 時間培養した。培養後、細胞を PBS で洗浄し、RIPA 緩衝液を細胞溶解のために添加し、溶解物を液体シンチレーション液 (Pico-Fluor 40) を含むバイアルに集めた後、液体シンチレーションカウンター (LSC-7200; Hitachi Aloka Medical, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて放射線量を測定した。

2.2.6 脂質過酸化測定

脂質酸化は DPPH を用いて測定を行った。RGK1 細胞を 31,250 個/cm² の 4 チャンバースライド上で培養し、一晩インキュベートした。細胞を 50 μM の NAC を含む 5 μM の酢酸または 5 μM の酢酸に 24 時間曝露した後、培地を 10 μM の DPPH を含む培地に交換した。15 分間インキュベート後、細胞を

PBS で 2 回洗浄し、352 nm で励起し 380 nm の蛍光波長を測定した。

2.2.7 Western blotting による MCT1 及び Caspase9 の発現測定

各細胞からの 15 μ l の細胞溶解液を NuPAGE LDS Sample buffer (Life Technologies Japan, Ltd.) を用いて調整し、70 $^{\circ}$ C で 10 分間煮沸した。ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) のために、細胞溶解物を NuPAGE Novex 12 % Bis-Tris gels のウェルに充填した。gel を 200 V で 30 分電気泳動させ、タンパク質を 2.0 mA/cm² で 60 分間電気泳動することによりポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Millipore Co., Burlington, MA) に転写した。サンドイッチイムノアッセイは Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) を用いた [41] [42]。PVDF 膜は 15 ml のブロッキング試薬 (PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal) でブロッキングを行い、1 次抗体として抗ラット MCT-1 抗体 (Alpha Diagnostic Intl. Inc., San Antonio, TX) 及び抗ラット Caspase9 抗体 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 に加え、membrane を溶液とともに 60 分間静置した。維持抗体溶液を吸引した後、membrane を PBST (PBS ; Wako + 0.1% Tween-20) 15 ml で 3 回洗浄した。2 次抗体としてホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合ウサギ IgG 抗体を Can Get Signal immunoreaction enhancer solution 2 に加え、60 分反応させた。membrane を最終的に Lumina Forte Western HRP Substrate (Millipore) に浸し、Image Quant LAS 4000 (GE Health Care Japan, Tokyo, Japan) を用いて発光を測定した。 β アクチンをコントロールとして測定した。

2.2.8 ESR による活性酸素測定

生存細胞を用いて ESR (Electron spin resonance) によって細胞内活性酸素を測定した [43]。細胞をコンフルエントになるまでスライドグラスで培養した後、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ インキュベーター内で 60 分間 5 μ M 酢酸含有培地で培養した。そのスライドグラスを ESR 測定用組織グラス (Radical Research Inc., Tokyo, Japan) へ載せ、ESR 測定用溶液 (5 mM succinic acid, 5 mM malic acid, 5 mM D-glutamic acid, and 5 mM NADH, 5.9 % v/v DMPO) 80

μ l を組織ガラスに添加し、JEOL-TE X-band spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) を用いて ESR スペクトルを測定した。測定条件は 10 mW incident microwave power、0.1 mT modulation width、8 min sweep time、7.5 mT sweep width、0.1 s time contrast、333.5 mT center field、15 mT scan range とした。測定データの解析は Win-Rad Radical Analyzer System (Radical Research) を用いた。

2.2.9 統計解析

本実験の統計処理は SPSS (IBM Corp., Armonk, NY) を用い、検定は Tukey 法を用いた。

2.3 実験結果

2.3.1 酢酸による癌選択的な細胞毒性

酢酸に曝露させた RGM1 及び RGK1 細胞の生存率を測定した。2 または 5 μ M の酢酸投与により RGM1 細胞よりも RGK1 細胞の細胞死の程度が大きく増加し、有意差を示した (図 1)。他の濃度では癌細胞選択的な毒性は観察されなかった。

2.3.2 RGM-GFP、RGK-KO 共培養系における癌選択的な細胞毒性

正常細胞 (RGM-GFP) と癌細胞 (RGK-KO) の対となる蛍光細胞を用いた共培養系で酢酸の癌細胞選択的な毒性について検討した。酢酸は癌細胞選択的に細胞毒性を示したが、塩酸はそのような効果を示さなかった (図 2)。塩酸処理下では、RGM-GFP および RGK-KO 細胞の細胞面積は時間とともに増加したが、72 時間を超えると RGM-GFP の面積は減少した (図 2 B)。正常細胞/癌細胞増殖比も経時的に減少した (図 2C)。対照的に、2 及び 5 μ M の酢酸は癌細胞の増殖を阻害したが、正常細胞は増殖を続けた (図 2D および E)。1 μ M 未満の濃度で使用的した場合、酢酸は劇的な効果は示さず、10 μ M を超えると 48 時間以内に細胞死を引き起こした (図 2E)。正常細胞/癌細胞増殖比は、5 μ M 酢酸に曝露した後 120 時間で増加し、この増加は 2 μ M または他の濃度では見られず、5 μ M のみで生じた (図 2F)。したがって 5 μ M の酢酸投与は細胞競合により正常細胞が癌細胞を排除するという結果となり、癌選択的な細胞毒性のための最適濃度であった。

2.3.3 酢酸の癌選択的な取り込み

癌選択的な細胞毒性を確認するために、RI 酢酸 (^{14}C -酢酸) を用いて酢酸の細胞内取り込みを測定した。RGK1 の酢酸の細胞内取り込みは、RGM1 のものより約 3 倍大きかった (図 3)。さらに、MCT1 の発現は酢酸の曝露後に増加し、RGM1 と比較して RGK1 でより高くなる傾向があった (図 4)。これらの結果は、酢酸が MCT1 発現を誘導することによって細胞内に蓄積されることを示唆した。

2.3.4 酢酸のアポトーシス誘導

活性酸素量は、生細胞を用いて ESR によって測定した。ESR シグナルの強度は、酢酸曝露によって RGM1 および RGK1 両細胞において増加した (図 5)。活性酸素量は RGM1 よりも RGK1 が多く、酢酸処理後にさらに増加を認めたことから、酢酸が細胞の活性酸素産生を誘導したことを示した。さらに、cleaved caspase 9 の発現は酢酸処理後に RGM1 と比較して RGK1 で増強傾向を認めた (図 6)。これらの結果から、酢酸が細胞の活性酸素産生を刺激することにより癌細胞選択的アポトーシスを誘導することを示した。

2.3.5 酢酸の脂質過酸化誘導と抗酸化剤によるその抑制

酢酸による酸化ストレスを測定するために DPPH を用いて脂質過酸化の測定を行った。酢酸投与群において蛍光強度の増加を認め (図 7)。さらにその蛍光は NAC によって抑制された。この結果は、酢酸が酸化ストレスを介し脂質過酸化を誘導することを示した。

2.4 考察

本研究では、 $5\ \mu\text{M}$ の酢酸投与は酸化ストレスにより癌選択的細胞毒性を誘導することを実証した。

RGM-GFP および RGK-KO 細胞の共培養において $5\ \mu\text{M}$ の酢酸が癌選択的細胞毒性を引き起こし、酢酸は RGM1 よりも RGK1 に有意に多く取り込まれ、酢酸曝露後の MCT1 発現は増加した。さらに酢酸は RGM1 および RGK1 における活性酸素産生を刺激し、特に RGK1 細胞における cleaved caspase 9 の発現増強をもたらした。これらの結果は、癌選択的細胞毒性は RGM1 と RGK1 の間の酢酸の取り込み及び活性酸素産生量の差異によって引き起こされることを示した。

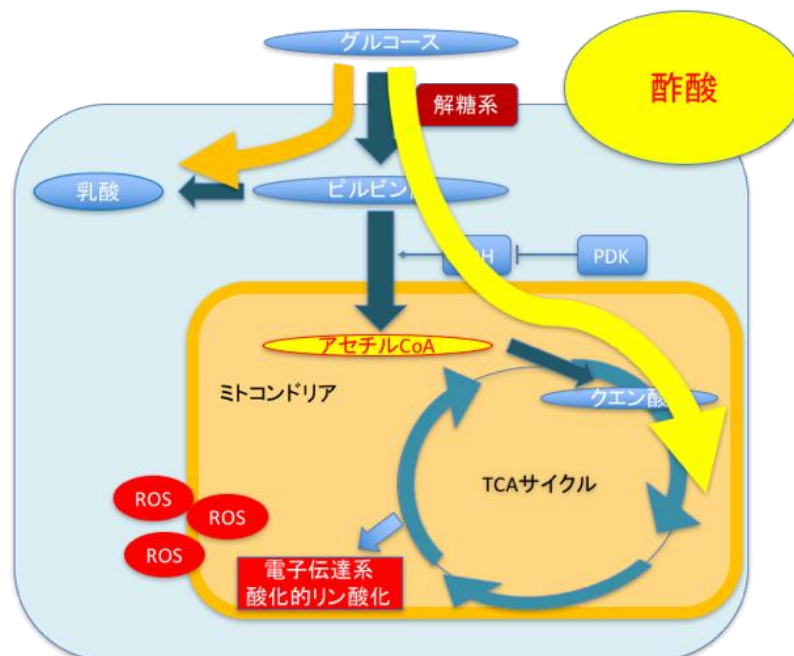
私の研究室の以前の研究では、pH 3 または 4 の酸性条件でミトコンドリア機能障害およびその後のアポトーシスを介して活性酸素の産生を誘導することを報告した [44]。特筆すべきこととして、培地中の 0.1 % および 0.01 % 酢酸はそれぞれ pH が 6.8 および 7.4 であったが、本研究で使用した $5\ \mu\text{M}$ の酢酸は 0.01 % 未満であり、溶液の pH は 7.4 を維持していた。したがって、酢酸の細胞毒性効果は pH に依存しないことが示された。

癌の代謝は酸素存在下においても嫌気性解糖を用いるとされており、これは Warburg 効果として知られている [3] [4]。一方で癌特異的な解糖優位の代謝経路をジクロロ酢酸はピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ活性を抑制し、酸化的リン酸化へ代謝をシフトする結果、癌細胞のアポトーシスを生じることが知られている [14]。酢酸が好氣的代謝によって酸化ストレスを誘導するとしたら、本研究における癌選択的細胞毒性は細胞代謝によって説明することができる。低酸素環境にある癌細胞においては、酢酸は脂肪酸合成のために必要なアセチル CoA の合成に重要な役割を果たし [45]、 ^{11}C 酢酸を用いた陽電子放出断層撮影法 (PET) は臨床においても癌細胞は酢酸の取り込みが亢進していることを利用し前立腺癌や腎細胞癌、膀胱癌、肝細胞癌等の診断に有用であるという報告もあり [46]、癌細胞は酢酸を選択的に取り込むとされている。さらにその癌細胞に取り込まれた酢酸はアセチル-CoA に代謝され酸化的リン酸化を起こし、癌細胞は酸化ストレスによりアポトーシスを起こす。このように、正常細胞と癌細胞では酢酸取り込みの経路は異なり、ある濃度の酢酸の存在下では

活性酸素産生増加による細胞障害を引き起こすことが考えられる。

癌細胞は栄養が制限された状況で生存のために酢酸を必要とするが [47]、その取り込みにより、ある濃度の酢酸では逆に酸化ストレスを引き起こし自身の細胞傷害を引き起こすことが本研究で示された。本研究では $5 \mu\text{M}$ の酢酸が RGK1 細胞でアポトーシスを引き起こし、共培養系の実験では 120 時間の処理後に正常細胞である RGM1 細胞の増殖を促進した。細胞はその時点ではコンフルエントであり、低酸素状態及び栄養制限状態を示した。培養条件は 120 時間で新鮮な培地に交換した後で変化し、培養培地の交換は酢酸誘発細胞傷害の第 2 のトリガーとなるようだった。癌細胞は酢酸の存在及び培養条件に応じて代謝を切り替えることができると考えられるが、これらのメカニズムを完全に解明するためにはさらなる検討が必要である。

正常細胞よりも癌細胞へ集積した酢酸は、活性酸素産生を増加させることにより癌選択的細胞毒性を誘導した。本研究結果は酢酸の癌選択的細胞毒性に影響を及ぼすメカニズムについて重要な洞察となった。



図

図1 酢酸による癌選択的な細胞毒性

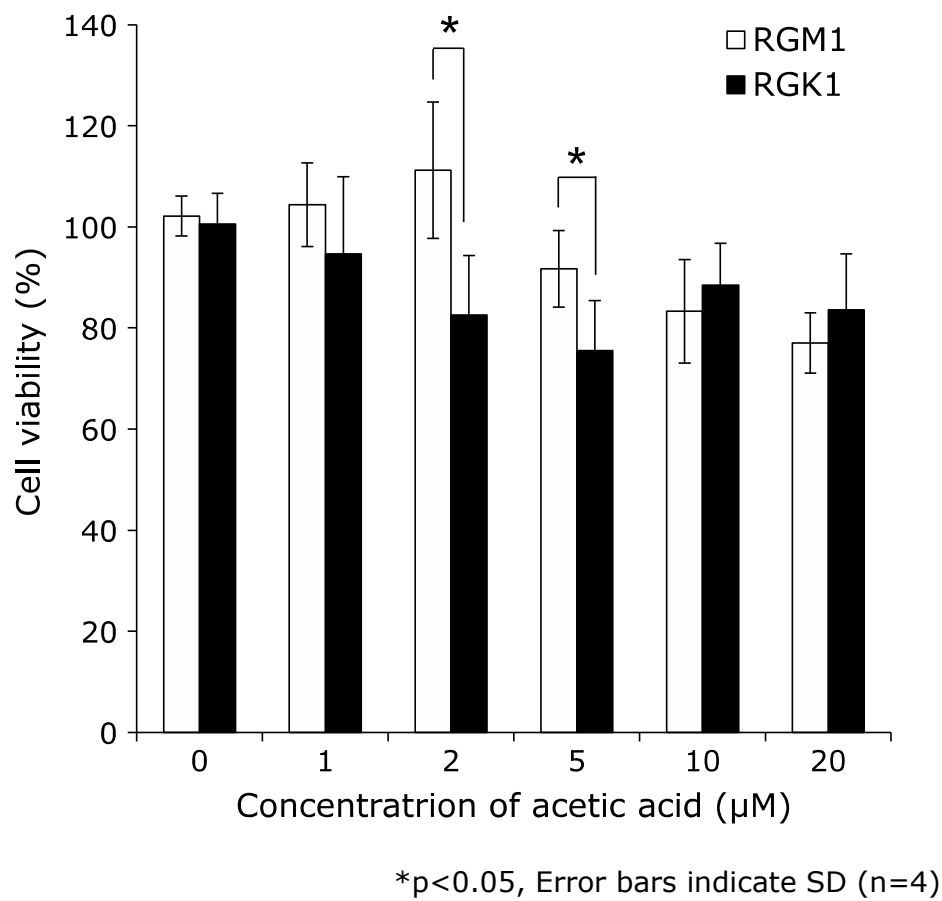


図2 RGM-GFP、RGK-KO 共培養系における癌選択的細胞毒性

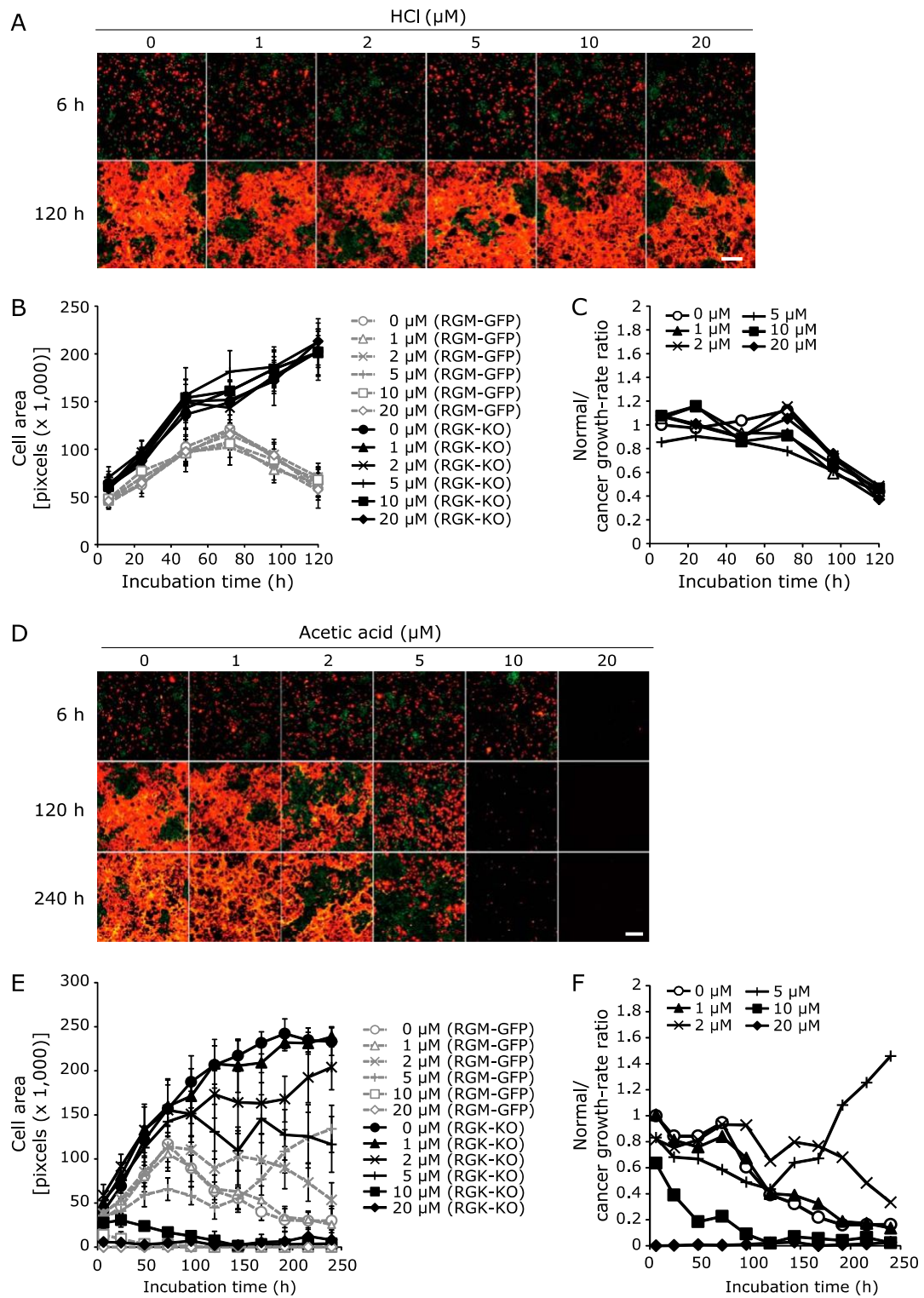


図3 酢酸の癌選択的な取り込み

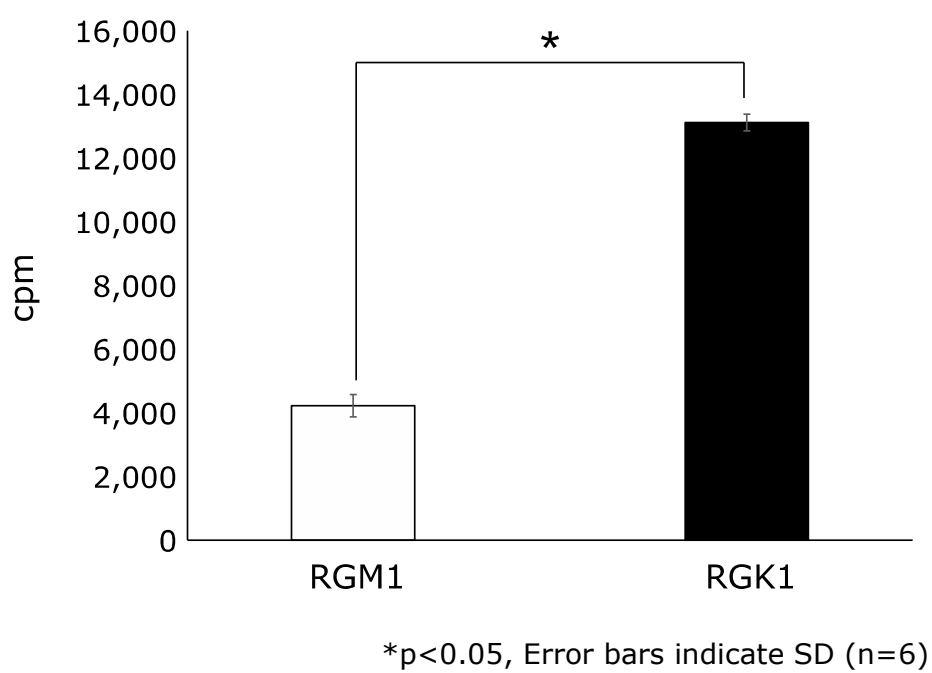


図4 酢酸曝露による MCT1 の発現亢進

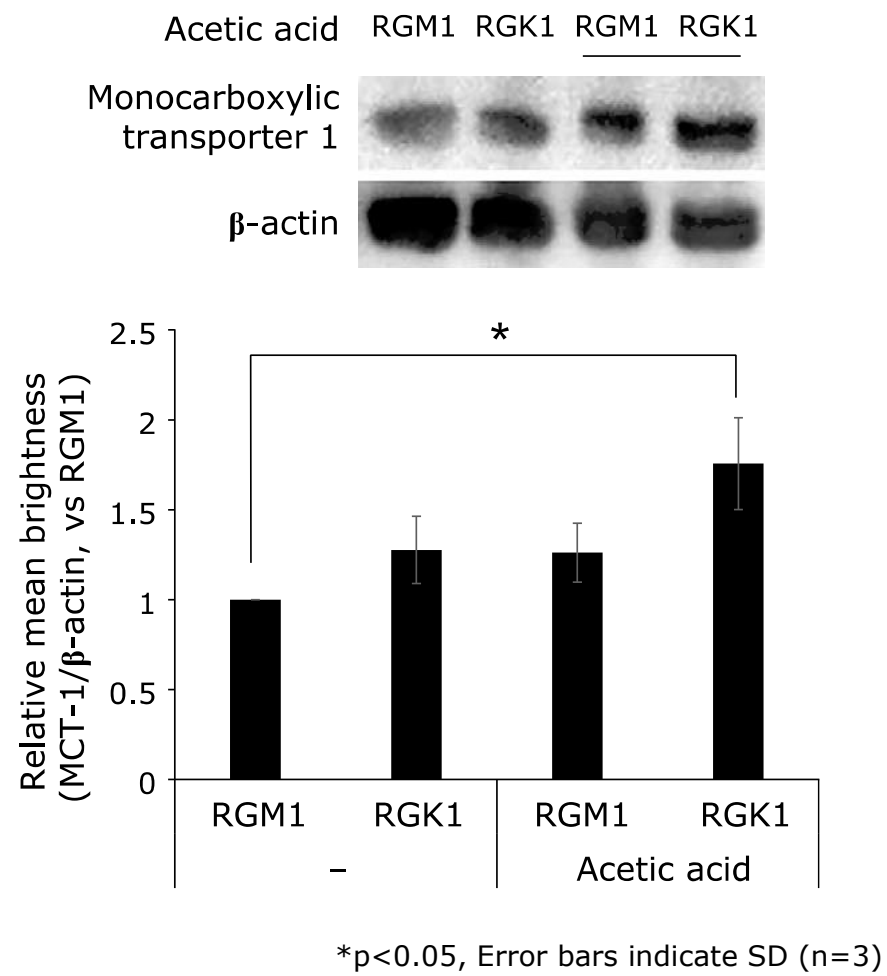


図5 酢酸による癌選択的活性酸素産生増加

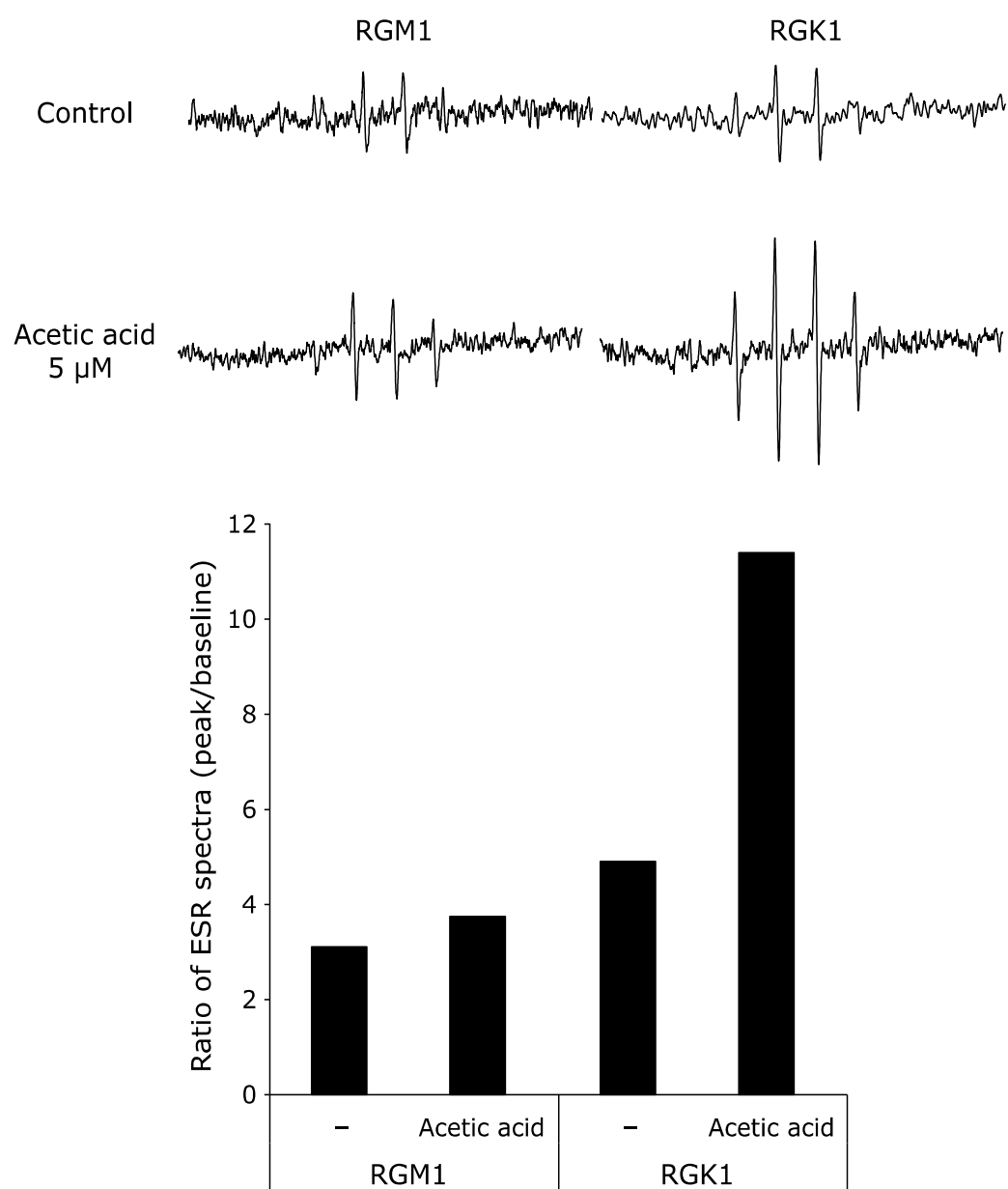
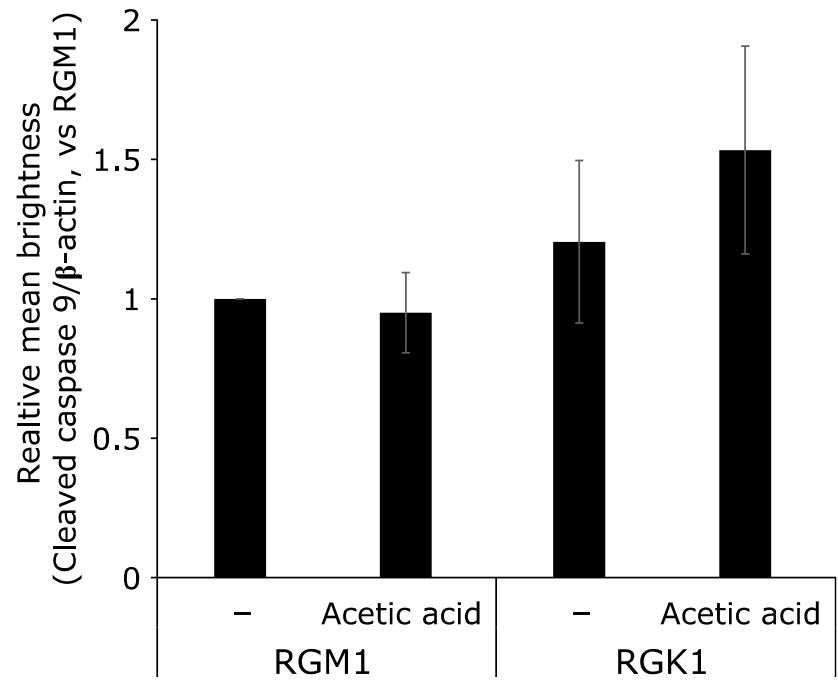
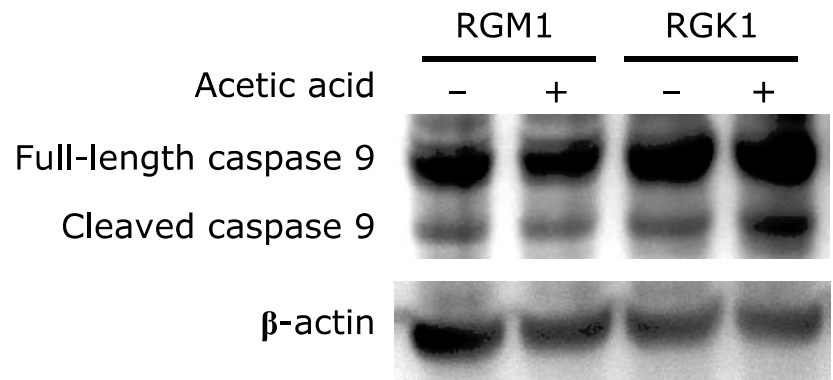
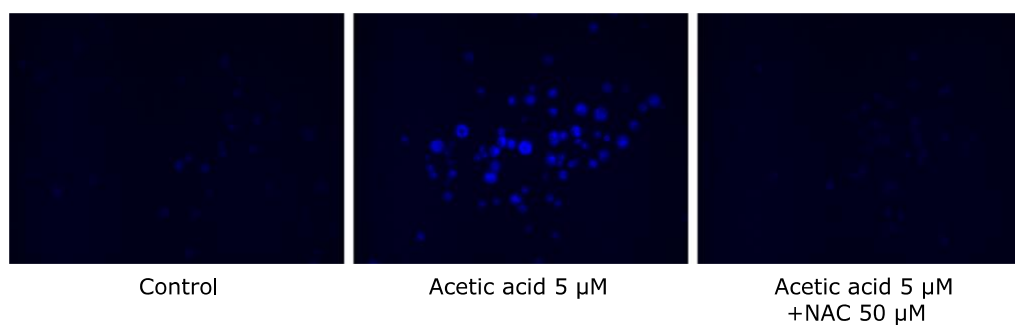


図 6 酢酸暴露によるアポトーシス誘導



Error bars indicate SD (n=3)

図7 酢酸による脂質過酸化の誘導



第3章 総括

私は本研究により酢酸曝露による癌選択的細胞傷害は、癌細胞に選択的に取り込まれた酢酸が活性酸素の産生を増加させ、酸化ストレス的に引き起こされたことを示した。近年、癌の酢酸代謝についての検討が進んでおり、癌は酢酸を積極的に取り込み増殖のための栄養とするとされているが、一方で、ある濃度の酢酸投与は酸化ストレスの増加から細胞傷害を引き起こすという本研究の結果は非常に興味深いものだと考える。

今後の展望としては、癌の酢酸代謝に関係する MCT1 と活性酸素の関係についてさらなる検討を行い、MCT1 の制御により抗癌剤の増強効果が得られるかどうかを検討したい。さらに、酢酸が活性酸素産生を促すという本研究結果を発展させ、我々の研究室のもう一つの研究テーマである光線力学療法の増強効果についても研究を進め、今後の癌治療の発展に貢献していきたいと考える。

なお本稿の第2章は別紙参考論文のように Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 誌に掲載されている[*]。

[*] Terasaki M, Ito H, Kurokawa H, Tamura M, Okabe S, Matsui H, et al. Acetic acid is an oxidative stressor in gastric cancer cells. J Clin Biochem Nutr. 2018;63(1):36-41.

参考文献

- 1) Guelrud M, Herrera I, Essenfled H, Castro J. Enhanced magnification endoscopy: a new technique to identify specialized intestinal metaplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc.* 2001;53(6):559-65.
- 2) Yagi K, Aruga Y, Nakamura A, Sekine A, Umezu H. The study of dynamic chemical magnifying endoscopy in gastric neoplasia. *Gastrointest Endosc.* 2005;62(6):963-9.
- 3) Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309–314
- 4) Vander Heiden, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324: 1029–1033.
- 5) Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science.* 2001;292(5516):504-7.
- 6) Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004;4(11):891-9.
- 7) Kim JW, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res.* 2006;66(18):8927-30.
- 8) Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* 2008;13(6):472-82.
- 9) Beyer T, Townsend DW, Brun T, et al. A combined PET/CT scanner for clinical oncology. *J Nucl Med* 2000;41:1369-1379.
- 10) Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res.* 2011;71(22):6921-5.
- 11) Samudio I, Fiegl M, Andreeff M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res.* 2009;69(6):2163-6.
- 12) Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):85-95.
- 13) Stacpoole PW, Nagaraja NV, Hutson AD. Efficacy of dichloroacetate as a

- lactate-lowering drug. *J Clin Pharmacol*. 2003;43(7):683-91.
- 14) Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*. 2007;11(1):37-51
 - 15) Papandreou I, Golasova T, Denko NC. Anticancer drugs that target metabolism: Is dichloroacetate the new paradigm? *Int J Cancer*. 2011;128(5):1001-8.
 - 16) Michelakis ED, Webster L, Mackey JR. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer*. 2008;99(7):989-94.
 - 17) Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(4):267-77.
 - 18) Medes G, Friedmann B, Weinhouse S. Fatty acid metabolism. VIII. Acetate metabolism in vitro during hepatocarcinogenesis by p-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res*. 1956;16(1):57-62.
 - 19) Mashimo T, Pichumani K, Vemireddy V, Hatanpaa KJ, Singh DK, Sirasanagandla S, et al. Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases. *Cell*. 2014;159(7):1603-14.
 - 20) Yoshii Y, Furukawa T, Oyama N, Hasegawa Y, Kiyono Y, Nishii R, et al. Fatty acid synthase is a key target in multiple essential tumor functions of prostate cancer: uptake of radiolabeled acetate as a predictor of the targeted therapy outcome. *PLoS One*. 2013;8(5):e64570
 - 21) Schug ZT, Peck B, Jones DT, Zhang Q, Grosskurth S, Alam IS, et al. Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell*. 2015;27(1):57-71.
 - 22) Johnston CS, Gaas CA. Vinegar: medicinal uses and antiglycemic effect. *MedGenMed*. 2006;8(2):61.
 - 23) Ballard FJ. Supply and utilization of acetate in mammals. *Am J Clin Nutr*. 1972;25(8):773-9.

- 24) Knowles SE, Jarrett IG, Filsell OH, Ballard FJ. Production and utilization of acetate in mammals. *Biochem J.* 1974;142(2):401-11.
- 25) Kondo S, Tayama K, Tsukamoto Y, Ikeda K, Yamori Y. Antihypertensive effects of acetic acid and vinegar on spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001;65(12):2690-4.
- 26) Johnston CS, Kim CM, Buller AJ. Vinegar improves insulin sensitivity to a high-carbohydrate meal in subjects with insulin resistance or type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27(1):281-2
- 27) Yamashita H, Maruta H, Jozuka M, Kimura R, Iwabuchi H, Yamato M, et al. Effects of acetate on lipid metabolism in muscles and adipose tissues of type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009;73(3):570-6.
- 28) Mimura A, Suzuki Y, Toshima Y, Yazaki S, Ohtsuki T, Ui S, et al. Induction of apoptosis in human leukemia cells by naturally fermented sugar cane vinegar (kibizu) of Amami Ohshima Island. *Biofactors.* 2004;22(1-4):93-7.
- 29) Nanda K, Miyoshi N, Nakamura Y, Shimoji Y, Tamura Y, Nishikawa Y, et al. Extract of vinegar "Kurosu" from unpolished rice inhibits the proliferation of human cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2004;23(1):69-75.
- 30) Okabe S, Okamoto T, Zhao CM, Chen D, Matsui H. Acetic acid induces cell death: an in vitro study using normal rat gastric mucosal cell line and rat and human gastric cancer and mesothelioma cell lines. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29 Suppl 4:65-9.
- 31) 吉川敏一. 京府医大誌 2011;120(6), 381-391
- 32) 吉川敏一 (1997). フリーラジカルの科学 講談社サイエンティフィク pp.3-14
- 33) 吉川敏一 (2008) 酸化ストレスの医学 診断と治療社
- 34) Buettner GR. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radic Biol Med.* 1987;3(4):259-303.
- 35) Nakagawa H, Ohyama R, Kimata A, Suzuki T, Miyata N. Hydroxyl radical

- scavenging by edaravone derivatives: Efficient scavenging by 3-methyl-1-(pyridin-2-yl)-5-pyrazolone with an intramolecular base. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(23):5939-42.
- 36) Matsumoto C, Sekine-Suzuki E, Nyui M, Ueno M, Nakanishi I, Omiya Y, et al. Analysis of the antioxidative function of the radioprotective Japanese traditional (Kampo) medicine, hangeshashinto, in an aqueous phase. *J Radiat Res*. 2015;56(4):669-77.
- 37) Althoff F, Benzing K, Comba P, McRoberts C, Boyd DR, Greiner S, et al. Abiotic methanogenesis from organosulphur compounds under ambient conditions. *Nat Commun*. 2014;5:4205.
- 38) Kobayashi I, Kawano S, Tsuji S, Matsui H, Nakama A, Sawaoka H, et al. RGM1, a cell line derived from normal gastric mucosa of rat. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1996;32(5):259-61.
- 39) Shimokawa O, Matsui H, Nagano Y, Kaneko T, Shibahara T, Nakahara A, et al. Neoplastic transformation and induction of H⁺,K⁺ -adenosine triphosphatase by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the gastric epithelial RGM-1 cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2008;44(1-2):26-30.
- 40) Tamura M, Matsui H, Hyodo I, Tanaka J, Miwa Y. Fluorescence-based co-culture of normal and cancerous cells as an indicator of therapeutic effects in cancer. *Eur J Pharm Sci*. 2014;63:1-7.
- 41) Tamura M, Matsui H, Tomita T, Sadakata H, Indo HP, Majima HJ, et al. Mitochondrial reactive oxygen species accelerate gastric cancer cell invasion. *J Clin Biochem Nutr*. 2014;54(1):12-7.
- 42) Ito H, Tamura M, Matsui H, Majima HJ, Indo HP, Hyodo I. Reactive oxygen species involved cancer cellular specific 5-aminolevulinic acid uptake in gastric epithelial cells. *J Clin Biochem Nutr*. 2014;54(2):81-5.
- 43) Mukohda M, Ueno S, Kamibayashi M, Okada M, Yamawaki H, Hara Y. Influences of organic solvents on CYPMPO-electron spin resonance spectra in in vitro radical generating systems. *J Vet Med Sci*.

- 2010;72(12):1547-50.
- 44) Matsui H, Nagano Y, Shimokawa O, Kaneko T, Rai K, Udo J, et al. Gastric acid induces mitochondrial superoxide production and lipid peroxidation in gastric epithelial cells. *J Gastroenterol.* 2011;46(10):1167-76.
- 45) Kamphorst JJ, Chung MK, Fan J, Rabinowitz JD. Quantitative analysis of acetyl-CoA production in hypoxic cancer cells reveals substantial contribution from acetate. *Cancer Metab.* 2014;2:23.
- 46) Grassi I, Nanni C, Allegri V, Morigi JJ, Montini GC, Castellucci P, et al. The clinical use of PET with (11)C-acetate. *Am J Nucl Med Mol Imaging.* 2012;2(1):33-47.
- 47) Comerford SA, Huang Z, Du X, Wang Y, Cai L, Witkiewicz AK, et al. Acetate dependence of tumors. *Cell.* 2014;159(7):1591-602.

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々に御指導、御協力をいただきました。

研究全体の御指導、御校閲を賜った筑波大学消化器内科 兵頭一之介教授に深い謝意を評します。日常の研究の場において直接の御指導御鞭撻をいただいた筑波大学消化器内科 松井裕史先生に心より感謝申し上げます。

また、研究室において直接実験手技や意義深い討論やアドバイスを頂いた鹿児島大学大学院医歯薬総合研究科 伊藤紘先生、大阪大学核物理研究センター 田村磨聖先生、筑波大学消化器内科 黒川宏美先生に感謝の意を評します。

日々の研究生生活をともに過ごし切磋琢磨した筑波大学消化器内科 日下部涼子先生、俣野大介先生に深謝します。

最後に、ここまで私を心身ともに支えてくれた家族に心より感謝致します。

出典

本学位論文では Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 2018 Jul;63(1):36-41. doi: 10.3164/jcfn.17-49. に掲載された論文の内容を日本酸化ストレス学会からの許可を得て再利用している。