

東京電機大学

博士論文

Ridaifen-B の抗癌作用と抗動脈硬化作用の解析

Analysis of anti-cancer action and anti-arteriosclerotic
effect of Ridaifen-B

2019年3月

岩澤 卓弥

目次

第1部 第1章 緒言	
1-1. アポトーシス	4
1-2. オートファジー	5
1-2-1. 非選択的オートファジー	7
1-2-2. 選択的オートファジー	8
1-2-2-1. p62/SQSTM1	8
1-2-3. マイトファジー	9
1-2-3-1. Parkin と PINK1	9
1-2-4. リポファジー	10
1-2-4-1. 脂肪滴	11
1-3. Tamoxifen	12
1-4. Ridaifen	14
第1部 第2章 RID-B 及び RID 構造類縁体によるアポトーシスの検出	
2-1. 背景	16
2-2. 実験方法	
2-2-1. 細胞培養	17
2-2-2. 細胞に対する薬剤の作用方法	17
2-2-3. MTT assay	17
2-2-4. フローサイトメトリー	17
2-2-5. ウェスタンブロット法	18
2-2-6. 統計的解析	18
2-3. 結果	
2-3-1. MTT assay による RID-B と RID 構造類縁体の細胞傷害性	19
2-3-2. フローサイトメトリーによる Sub-G1 期細胞の検出	19
2-3-3. ウェスタンブロット法による Caspase-3 の活性化の検出	20
2-3-4. フローサイトメトリーによるミトコンドリア膜電位解析	21
2-4. 考察	21
第1部 第3章 RID-B 及び RID 構造類縁体によるオートファジーの検出	
3-1. 背景	23
3-2. 実験方法	
3-2-1. 細胞培養	23
3-2-2. 細胞に対する薬剤作用方法	23
3-2-3. ウェスタンブロット法	23
3-2-4. 共焦点顕微鏡観察	24
3-3. 結果	

3-3-1.	ウェスタンブロット法によるオートファジーの検出.....	25
3-3-1-1.	オートファゴソームマーカーLC3-IIの検出.....	25
3-3-1-2.	オートファジーフラックスの検出.....	25
3-3-1-3.	RID-B誘導オートファジーにおけるAtg5の相関性.....	26
3-3-2.	共焦点顕微鏡によるオートリソソームの検出.....	26
3-3-3.	リソソーム解析.....	27
3-3-3-1.	共焦点顕微鏡によるリソソーム形成の検出.....	27
3-3-3-2.	ウェスタンブロット法によるリソソーム形成の検出.....	28
3-3-3-3.	カテプシンB酵素活性の検出.....	28
3-3-3-4.	ウェスタンブロット法によるカテプシンB活性化体の検出.....	29
3-4.	考察.....	30
第1部 第4章 RID-B及びRID構造類縁体によるマイトファジーの検出		
4-1.	背景.....	32
4-2.	方法	
4-2-1.	細胞の培養.....	32
4-2-2.	細胞に対する薬剤の作用方法.....	32
4-2-3.	共焦点顕微鏡観察.....	32
4-2-4.	ウェスタンブロット.....	33
4-2-5.	MTT assay.....	33
4-2-6.	SRB assay.....	34
4-2-7.	フローサイトメトリー.....	34
4-3.	結果	
4-3-1.	蛍光基質によるマイトファジーの検出.....	34
4-3-2.	ウェスタンブロットによるp53とParkinの検出.....	36
4-3-3.	マイトファジーと細胞傷害の相関.....	37
4-3-3-1.	HepG2細胞とHep3B細胞への細胞傷害性の比較.....	37
4-3-3-2.	マイトファジー阻害による細胞傷害性への影響.....	38
4-3-3-3.	MEF細胞への細胞傷害性の比較.....	38
4-3-4.	フローサイトメトリーによるミトコンドリアROSの検出.....	39
4-4.	考察.....	40

第2部 第1章 緒言	
1-1. アテローム性動脈硬化	41
1-1-1. LDL受容体とコレステロール代謝	41
1-1-2. SREBP	42
1-2. 抗動脈硬化薬	43
第2部 第2章 RID-Bの抗動脈硬化作用の検討	
2-1. 背景	46
2-2. 方法	
2-2-1. 細胞培養	46
2-2-2. 細胞に対する薬剤の作用方法	47
2-2-3. 共焦点顕微鏡観察	47
2-2-4. ウェスタンブロット	48
2-2-5. リアルタイムPCR法	49
2-3. 結果	
2-3-1. 細胞内コレステロール蓄積の検出	49
2-3-2. 蓄積コレステロールの由来	50
2-3-3. LDL取り込み能解析	50
2-3-3-1. LDL受容体発現の解析	51
2-3-3-2. LDL受容体転写活性の解析	52
2-3-4. SREBP転写活性の解析	52
2-3-4-1. SREBP-2の活性化検出	53
2-3-4-2. SREBP-2切断の検出	53
2-3-5. スタチンとの作用機序の比較	54
2-3-5-1. メバロン酸添加時におけるLDL受容体発現の検出	54
2-3-5-2. メバロン酸添加時におけるオートファジー誘導の検出	55
2-4. 考察	56
第2部 第3章 総合討論	58
参考文献	64
謝辞	76

第1部 第1章 緒言

1-1. アポトーシス

通常生体内では、恒常性を維持するため老化した細胞は速やかに除去され、新しい細胞へと置き換えられる。一方、ウイルスに感染した細胞、癌化した細胞はリンパ球などの白血球細胞によって攻撃され体内から除去される。このように生体内では毎日、個体をよりよい状態に保つために引き起こされるプログラムされた細胞死によって、数億の細胞が死滅する(1)。このような細胞死はアポトーシスと呼ばれている。1885年に **Flemming** はラットの卵胞においてアポトーシスを始めて発見した(2)。1972年に **Kerr** は肝虚血時に死細胞の染色体が細くなることを発見し、生物学における細胞死の一つとしてアポトーシスと名付けた(1)。

アポトーシスは固体の生命を維持するために、遺伝子により制御された能動的な細胞死である。細胞の異常増殖による癌化や何らかの異常が生じた際にアポトーシスが誘導され、不要な細胞を除去し、正常な細胞が維持される(3)。この過程では、カスパーゼといわれる一群のプロテアーゼが順次、活性化され、種々の細胞内コンポーネントを切断し、細胞膜湾曲、核の凝縮と断片化を引き起こし、死へと導かれる。また、アポトーシスの最終段階では染色体 DNA がヌクレオソーム単位へと断片化される。cysteine aspartic acid protease(カスパーゼ)はアポトーシスにおけるシグナル伝達機構の上流および下流で働くシステインプロテアーゼであり、部位特異的に切断されて活性化状態になり、更に他の分子を切断し活性化に導く、現在は14種が同定されており、このうちカスパーゼ-11はマウスでのみ同定されているがヒトでは相同体としてカスパーゼ-4,-5が同じ役割をしていると考えられ、自然免疫応答やパイロトーシスに関与していることが知られている(4, 5)。カスパーゼ-13はウシでのみ同定されている(6)。さらにアポトーシスを誘導するカスパーゼはアポトーシス誘導を開始するイニシエーターカスパーゼ(カスパーゼ-2, -8, -9, -10)とアポトーシスを実行するエフェクターカスパーゼ(カスパーゼ-3, -6, -7)に分けられている(6)。カスパーゼ-3は caspase-activated DNase(CAD)を活性化し、アポトーシスに特異的なDNAのヌクレオソーム単位での断片化を誘導する(1)。

アポトーシスは内因性経路と外因性経路に大別され、前者の経路はミトコンドリアを介する経路で Bcl-2 family によって制御されている。Bcl-2 family にはアポトーシスを誘導するタンパク(Bax, Bcl-XS, Bad, Bak)とアポトーシスを抑制するタンパク(Bcl-2, Bcl-XL, A1, Mcl-1, BAG-1)があり、作用が反するタンパク同士でヘテロダイマーを形成している(7, 8)。Bax が作用するためには Bcl-2 との相対量が重要であり、Bcl-2 と Bax がヘテロダイマーを形成している状態から、Bax が過剰になることで Bax のホモダイマーが形成されるとアポトーシスが誘導され、Bcl-2 が過剰になることで Bcl-2 のホモダイマーが形成されると細胞は生き延びる(9)。そのため、Bcl-2 や Bcl-XL の過剰発現は抗癌剤によるアポトーシスから回避させ、抗癌剤に対して耐性させる(10, 11, 12)。ミトコンドリア外膜には

voltage-dependent anion channel(VDAC)があり、シトクロム C がここから放出され、ミトコンドリア膜電位が低下し、細胞内活性酸素の上昇と細胞膜リン脂質の酸化が惹起される(13、14)。細胞質に放出されたシトクロム C と Apaf-1 が複合体を形成し、イニシエーターカスパーゼであるカスパーゼ-9 を活性化し下流のエフェクターカスパーゼであるカスパーゼ 3、6、7 を活性化することでアポトーシスが誘導される(15)。外因性経路は、デスレセプター(DR1、DR2、DR3、DR4、DR5、DR6)にデス因子(TNF、Fas-L、TRAIL)が結合するとシトクロム C の放出は起こらずにカスパーゼ-8 の活性化を介してカスパーゼ-3 を活性化してアポトーシスを誘導する(16、17、18)。

細胞膜の脂質二重膜の構成リン脂質である phosphatidylserine(PS)はアミノリン脂質トランスロカーゼにより、ATP のエネルギーで細胞質側に移動されているが、アポトーシスの進行に伴い、この反応が止まるため PS は細胞表面に露出する。マクロファージは、この細胞表面に露出した PS を認識してアポトーシス細胞を貪食するため、アポトーシス細胞の内容物は周囲に分散されることがない。細胞死にはアポトーシスとは形態学的、生化学的特徴から異なるネクローシスがある(19、20)。ネクローシスは、細胞が膨張し、最終的には細胞の内容物が周囲に漏出することで周辺細胞に炎症を惹起してしまうため、これまでの抗癌剤や放射線治療における副作用として考えられている。アポトーシスによって腫瘍の形成と成長が未然に防がれており、アポトーシスが正常に機能しないことで癌細胞は腫瘍を形成するので、アポトーシスが自ら引き起こせない癌細胞に対してアポトーシスを誘導させる薬剤の効果は抗癌作用として用いられている。本研究では、アポトーシスを誘導する化合物の構造的特徴と癌細胞の防御機構を解明することを目的とした。

1-2. オートファジー

オートファジーは元来、細胞が飢餓状態に陥った際に自らの細胞内構成成分をアミノ酸レベルにまで分解し、再利用する細胞保護的な作用である(21)。まず、細胞内に隔離膜が生成され、細胞内小器官や異常タンパク質などを取り込み、オートファゴソームが形成される。そこへ加水分解酵素を含むリソソームが融合することでオートリソソームとなり、リソソーム酵素によって取り込んだ細胞内小器官、タンパク質が分解される(21)。現在、唯一のオートファジーマーカーとして用いられている LC3 は細胞質で翻訳後、直ちに C 末端を切断され LC3-I となる。LC3-I はオートファジー進行に伴い phosphatidylethanolamine(PE)と結合し、LC3-II となってオートファゴソーム膜に繋がれる(図 1) (21)。

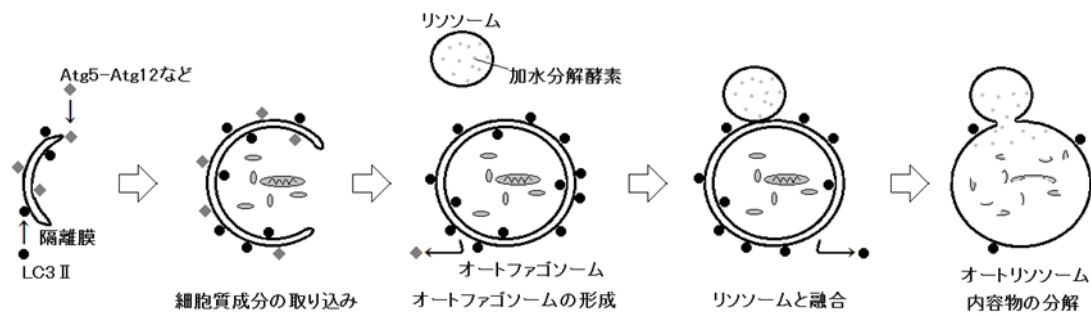


図 1. オートファジー

LC3 はオートファジー誘導によってその発現増強、リソソームとの共局在、LC3-I から LC3-II への変換が見られる。これは各細胞内小器官を特異的に取り込み分解するマイトファジーやペキソファジーといったあらゆるオートファジーに共通してみられる現象である(22)。

オートファジーの歴史は、1963 年に Christian によって自己の構成成分を分解する細胞内過程としてオートファジーという言葉が導入された(23)。1967 年には Christian と Deter が絶食したラットの肝臓でグルカゴンにより誘導されるオートファジーを観察した(24)。1973 年に Bolender と Weibel は細胞小器官が選択的にオートファジーによって分解されることを初めて見出した(25)。1993 年以降、Ohsumi は酵母によるアプローチから分子機構解明を進め、1997 年に最初のオートファジー関連遺伝子である ATG1 を同定した(26)。2001 年には Mortimore によって肝臓において正常な生理状態ではオートファジーがバルクなタンパク質を非選択的に分解する主要な経路であることが証明された(27)。

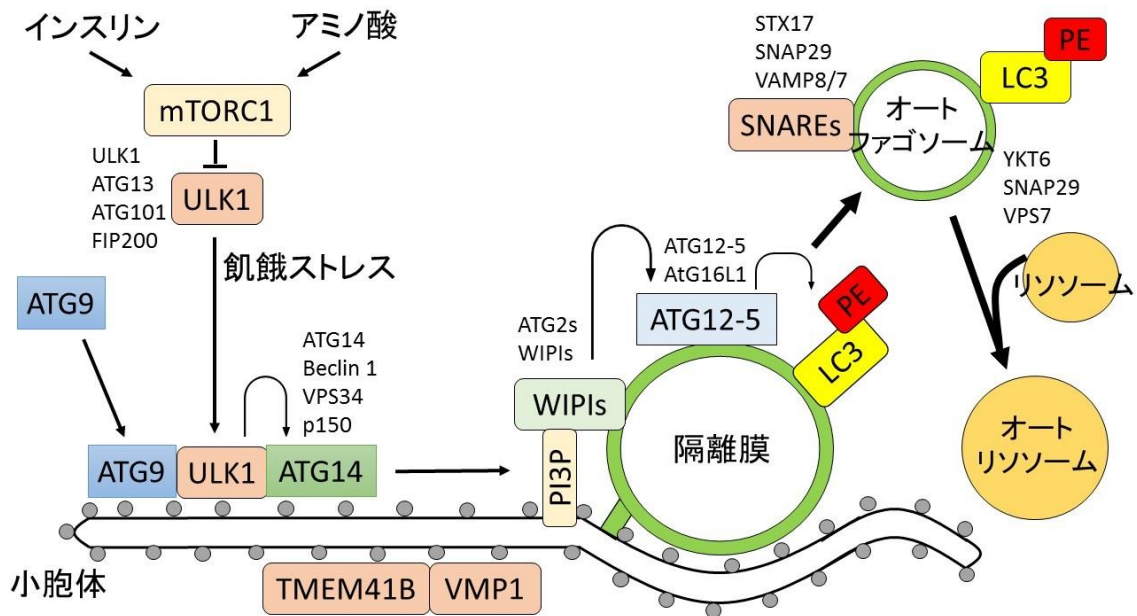


図 2. オートファジーの分子機構

これまでに酵母遺伝学によって 35 のオートファジー関連分子である ATG 分子が同定されている(28、29、30)。ATG1-10、12-14、16-18、29、31 がオートファゴソーム形成に必須であり、ATG 分子は機能的役割から、ATG1/ULK 複合体、クラス IIIPI3 キナーゼ複合体、ATG9、ATG2-18 複合体、ATG12-ATG5 複合体、ATG8/LC3-PE 結合体に分けられている。

1-2-1. 非選択的オートファジー

非選択的オートファジーは、主に栄養飢餓によって誘導される。細胞内の栄養シグナルは、mTORC1 複合体を介したリン酸化シグナルにより制御されており、豊栄養条件化ではインスリンやアミノ酸により mTORC1 が活性化されることでタンパク合成や細胞成長が促進されている。mTORC1 は ULK1 複合体(ULK1-ATG13-FIP200-ATG101)と直接結合してオートファジーを抑制しているが飢餓時には ULK1 複合体は小胞体膜へ ATG9 と移動し、小胞体膜状に局在化する。クラス IIIPI3 キナーゼ複合体(ATG14-Beclin 1-VPS34-p150)は、ULK1 複合体依存的に小胞体膜状に局在化することで PI3P を産生し、下流で機能する PI3P 結合タンパク質 WIPI 複合体(ATG2-WIPI)などのオートファゴソーム形成起点への局在化を促す。隔離膜の伸長には現在 2 種類のユビキチン様結合システムが必要であると考えられている。まず ATG12 が E1 酵素 ATG7、E2 酵素 ATG10 を介して ATG5 と共有結合し、ATG12-ATG5 結合体は ATG16L1 と複合体を形成して隔離膜の外側に局在する。隔離膜が閉じてオートファゴソームになるときに ATG12-ATG5-ATG16L1 複合体は隔離膜から離脱する。次に前駆体 LC3 が合成後、システインプロテアーゼである ATG4 により C 末端が切断され、グリシン残基を露出した LC3- I form になる。LC3-I は E1 酵素 ATG7、E2 酵素 ATG3、ATG12-ATG5 複合体が E3 酵素様の働きをして、PE と共有結合し、LC3-PE(LC3-

II form)になる。LC3-IIは隔離膜やオートファゴソームに局在し隔離膜の伸長と閉じる働きを行っている。そのためオートファゴソームマーカーとして広く利用されている。オートファジーが誘導されている条件化で細胞質中にはLC3-IIを含む小胞構造の増加が観察される。しかし、オートファゴソームの蓄積はリソソームの阻害によっても引き起こされるためオートファジー誘導とリソソーム阻害のどちらに起因するのか区別する必要がある。その後オートファゴソームにSTX17やYKT6がリクルートされ、リソソームとの融合を誘導する。オートファジーが生じると、主要な産物としてアミノ酸が供給され、細胞質中に十分量のアミノ酸が供給されるとmTORC1が活性化され、オートファジーは不活性化する。

1-2-2. 選択的オートファジー

1-2-2-1. p62/SQSTM1

オートファゴソームには選択性が無く、ターゲットを選択的に分解するときは分解される物質とオートファゴソームをつなぐアダプタータンパク質が必要となる。現在最も有名なアダプタータンパク質はp62/Sequestosome1(p62/SQSTM1)である。p62/SQSTM1は1996年にShinによってヒトのリンパ球におけるチロシンキナーゼp56lckのSH2ドメインに結合するタンパク質として発見された(31)。p62/SQSTM1はaPKC、RIP、TRAF6などのシグナル伝達を担う様々な分子と相互作用することが報告されている。また、KomatsuとPankivはp62/SQSTM1とオートファゴソーム膜形成に関わるLC3と結合ドメインを持つことから相互作用し、オートファジーによって選択的に分解される基質であることを明らかにした(32、33)。そしてユビキチン鎖と結合するドメインを有しており、Ser407とSer403がリン酸化されるとポリユビキチン鎖との親和性が上昇し、脱分極したミトコンドリアやポリユビキチン化されたタンパク質の凝集体などをオートファジーに導くことが知られている。肝臓特異的オートファジー欠損マウスにおいて、肥満症、メタボリックシンドロームの誘導やp62/SQSTM1が過剰に蓄積し、ユビキチン・p62/SQSTM1陽性の封入体が形成されている。さらに、アルコール性肝炎、脂肪肝、肝癌患者組織においてもユビキチン・p62/SQSTM1陽性封入体が観察されることから、疾患の発症におけるオートファジーとp62/SQSTM1代謝の関係が研究されている。mTORC1によってp62/SQSTM1のSer349がリン酸化されるとp62/SQSTM1とKeap1との親和性が増し、Keap1と結合していたNrf2が離れて核移行シグナルを誘導する。Nrf2はストレス応答転写因子としてストレス耐性遺伝子の発現亢進やp62/SQSTM1の遺伝子発現亢進も誘導しポジティブフィードバック機構として働くことが知られている(34、35、36)。Keap1と結合したリン酸化p62/SQSTM1はLC3 Interacting Region(LIR)を介して、LC3と相互作用することでオートファジーのターゲットとして分解される。選択的オートファジーの破綻は様々な疾患と関連しており、肝癌では恒常的にp62/SQSTM1のSer349がリン酸化されており、Nrf2が持続的に活性化しているため抗がん剤などのストレスに耐性がある。また、家族性パーキ

ンソン病やアルツハイマー病ではタンパク質の凝集体や脱分極したミトコンドリアの除去が行えず、神経細胞がダメージを受け脳機能の低下が起こる(37)。

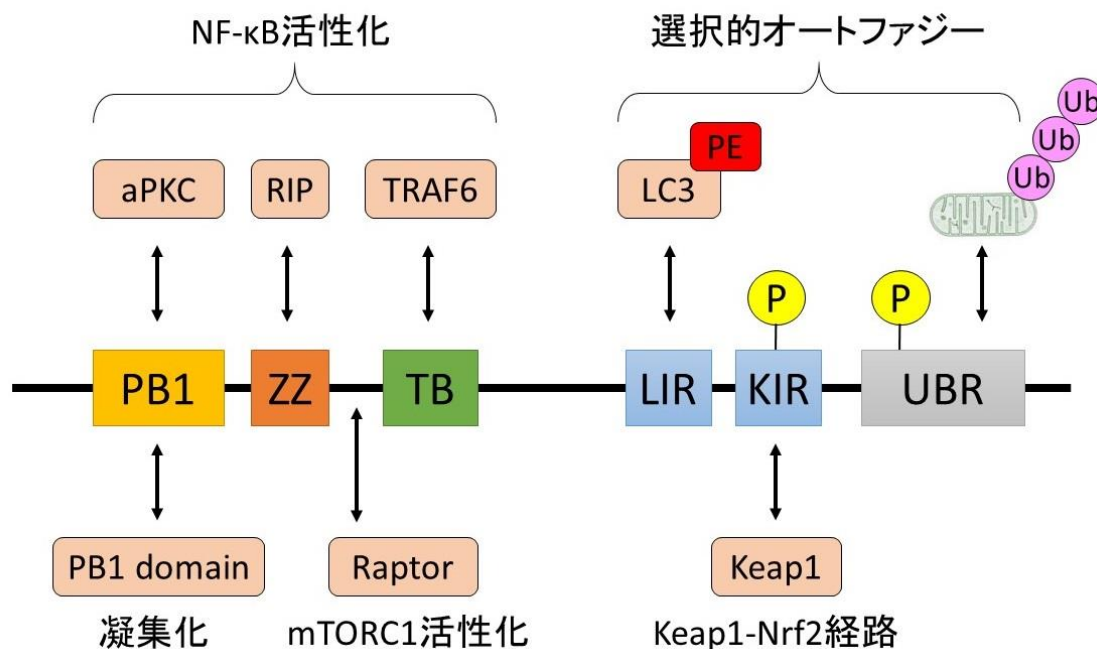


図 3. p62/SQSTM1 のドメイン構造

p62/SQSTM1 はグルタミン酸、プロリン含量が高く複数のタンパク質と相互作用を介して細胞内シグナル伝達を調整する多機能タンパク質である。

1-2-3. マイトファジー

マイトファジーは、オートファジーを介したミトコンドリアの選択的分解機構であり、異常なミトコンドリアや古くなったミトコンドリアの代謝に関与していると考えられている。1957年に Clark が電子顕微鏡観察によってミトコンドリアがオートファジーによって分解されていることを発見した(38)。ミトコンドリアは、酸化リン酸化によって細胞が消費するエネルギー産生の他に、脂肪酸のβ酸化やアポトーシスの制御など様々な働きをしている。一方、ミトコンドリアは細胞内で最大の活性酸素(reactive oxygen species : ROS)産生オルガネラであり、自身が産生した ROS により絶えず酸化ストレスに暴露されている。そのためミトコンドリア内では抗酸化酵素により ROS の影響を軽減し、傷害を受けたミトコンドリア DNA やタンパク質は修復・分解することで品質管理を行っている。この品質維持能力を上回る傷害をミトコンドリアが受けた際に、細胞はオートファジーを利用して機能不全に陥ったミトコンドリアを分解して品質管理を行っていると考えられている。

1-2-3-1. Parkin と PINK1

マイトファジーの実行には、パーキンソン病原因遺伝子である PARK2 と PINK1/PARK6

にそれぞれコードされる Parkin と PTEN-induced putative kinase protein 1 (PINK1)が重要な役割を果たしている(39)。まず、ミトコンドリアが脱分極して不良ミトコンドリアになると PINK1 がミトコンドリア上に安定して局在し、PINK1 に Parkin が結合することでミトコンドリア外膜上に Parkin が集積する。次に、PINK1 が Parkin の UBL ドメイン内の Ser65 をリン酸化することでユビキチンリガーゼ活性を活性化し、不良ミトコンドリアの外膜にユビキチンが付与され、このユビキチンが認識されることでマイトファジーが実行されると考えられている(40、41、42)。

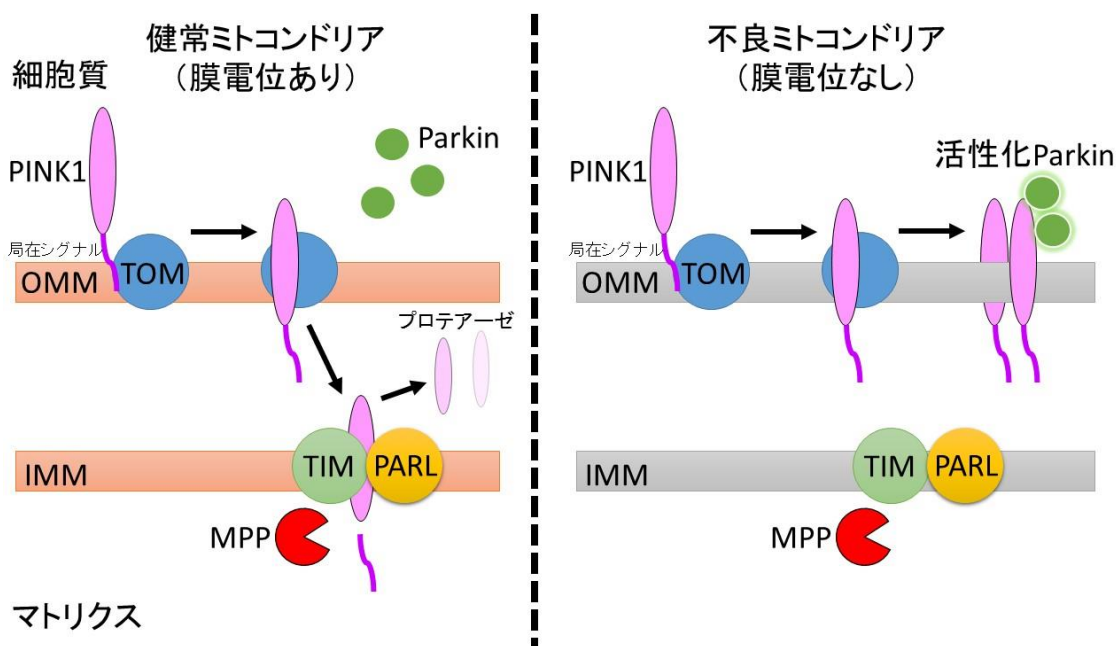


図4. 不良ミトコンドリアにおける PINK1 蓄積メカニズム

健全なミトコンドリアでは PINK1 は、ミトコンドリア外膜(OMM)の TOM 複合体を介してミトコンドリア内膜(IMM)の TIM 複合体に輸送される。その後 PINK1 の膜貫通ドメインの Ala103 と Phe104 の間が mitochondrial processing peptidase(MPP)および presenilin-associated rhomboid-like protease(PARL)によって切断され、N 末端が欠失形態の PINK1 は細胞質に放出されて分解される(43、44)。この連続的な輸送及び分解サイクルによって健全なミトコンドリアでは PINK1 の局在は低レベルで維持されている。しかし、ミトコンドリアの脱分極が起きると TIM 複合体によるミトコンドリア内膜への輸送が阻害され、PINK1 は TOM 複合体と 2:1 のモル比でミトコンドリア外膜上に未切断の状態で蓄積する(45、46)。

1-2-4. リポファジー

2009 年に Singh は肝細胞の脂肪滴がオートファジーによって分解されることを発見し、リポファジーと名付けられた(47)。リポファジーは脂肪滴内部または脂肪滴近傍で形成されたオートファゴソームが脂肪滴を取り込み、オートファゴソームはリソソームと融合し、

オートリソソームとなり、コレステロールエステルは酸性リパーゼの作用を受けて分解される。

1-2-4-1. 脂肪滴

細胞内における脂質のほとんどは脂肪滴に貯蔵されており、栄養飢餓時に脂肪酸に分解されて β 酸化を介してエネルギーに変換される。脂肪滴は、コレステロールエステル、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロールなどの脂質エステルでコア部分が形成されており、脂肪細胞以外の細胞ではコレステロールエステルが主成分であり、表面はリン脂質一重層覆われている(48)。リン脂質一重層にはホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルコリンなどが含まれている(図5)。脂肪滴に貯蔵されている脂質エステルの分解は、脂肪トリグリセリドリパーゼ(ATGL)によってトリアシルグリセロールを加水分解し、ジアシルグリセロールになり、ホルモン感受性リパーゼ(HSL)によってさらに加水分解されるが、脂肪滴に存在するタンパク質である Perilipin、ADRP、TIP47、CGI-58 によって制御されている(49)。

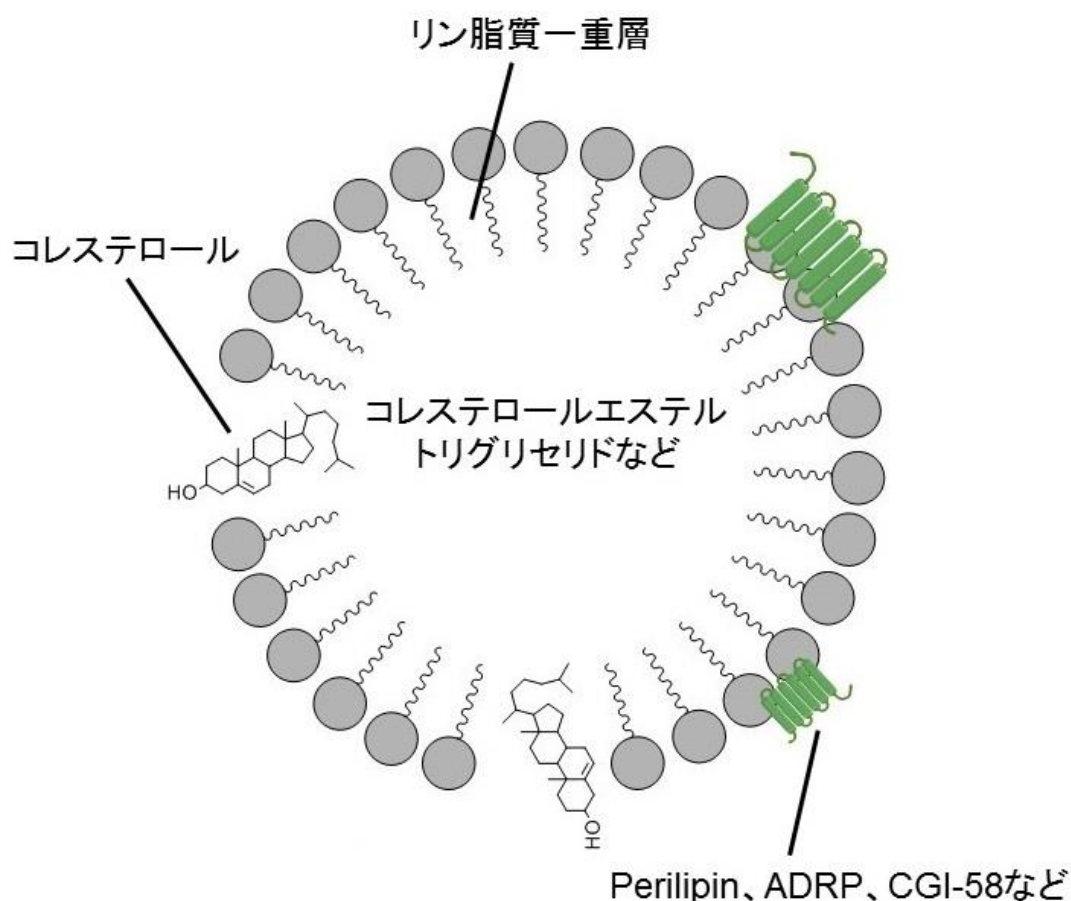


図5. 脂肪滴の構造

中心に脂質エステルによるコアがあり、その周囲をリン脂質一重層が覆い、Perilipin、ADRP、CGI-58などの脂肪滴タンパク質がアンカーとして存在している。

TAM は、ヒトの肝臓で第 1 相反応、第 2 相反応を受ける(図 7)。主要な代謝体である N-Desmethyltamoxifen は CYP3A4 と CYP3A5 を触媒として形成され、CYP2D6、CYP1A1、CYP1A2、CYP2C19、CYP2B6 も関与していると考えられている(62、63、64)。さらに N-Desmethyltamoxifen は CYP2D6 による水酸化の対象となり、活性型代謝体である Endoxifen に変換される(65、66)。もう 1 つの活性型代謝体である 4-Hydroxytamoxifen は CYP2D6、CYP3A4、CYP2C9、CYP2B6、CYP2C19 などによって触媒されて TAM の 4 位水酸化かフェニル環の para 位での水酸化によって生成される(64、67、68、69、70)。CYP2B6 と CYP2D6 は他のフェニル環の 4' 位で水酸化を起こすことで 4'-Hydroxytamoxifen になり、4'-Hydroxy-N-desmethyltamoxifen になる。また、他の水酸化代謝産物として CYP3A4 によって α -Hydroxytamoxifen が生産される(62、63、71、72)。CYP1B1、CYP2B6、CYP2C19 によって 4-Hydroxytamoxifen は異性化されて cis-4-Hydroxytamoxifen になる。Tamoxifen の代謝には水酸化だけでなく flavin-containing monooxygenase(FMO) 1 と 3 による N-酸化のルートもあり、この反応は CYP2A6、CYP1A1、CYP3A4 などに還元されて Tamoxifen が生成する反応と共に起こる(73、74)。第 2 相反応では、硫酸化とグルクロン酸抱合が主なメカニズムであり、4-Hydroxytamoxifen は UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼである UGT1A4、UGT2B15、UGT2B7、UGT1A8 によって O-グルクロン酸抱合され 4-Hydroxytamoxifen-O-glucuronide が生産される(75、76、77)。Endoxifen は UGT1A10 と UGT1A8 によってグルクロン酸抱合されて Endoxifen-O-glucuronide になる。スルフォタランスフェラーゼである SULT1E1、SULT1A1、SULT2A1 によって 4-Hydroxytamoxifen は硫酸化されて 4-Hydroxytamoxifen-sulfate になる(74、78)。

1-4. Ridaifen

Ridaifen(RID)は TAM から派生した類縁体であり、TAM の合成において産生されてしまう構造異性体の除去プロセスの簡略化や ER 非依存的なアポトーシスに注目してスクリーニングされた類縁体が RID-B である(図 8)。新規抗癌物質のスクリーニングに用いられる JFCR panel と呼ばれる 39 種の癌細胞株に RID-B を作用させ、癌細胞ごとの感受性パターンからその活性を測定したところ、TAM よりも強い癌細胞増殖抑制活性を示し、低濃度で細胞死を誘導することが明らかになった(79)。また、COMPARE 解析により既存の抗癌剤との相同性が低いため、薬剤耐性のある癌細胞などにも効果が期待される。他にも、RID-B がオートファジーを引き起こすことが明らかになっている(80、81)。しかしながら RID-B は、癌細胞に対してオートファジーやアポトーシスを誘導するが RID-B の持つどのような構造的特徴がオートファジー及びアポトーシスを誘導しているかは未だに明らかになっていない。本研究では、新規に合成された RID-B の構造類縁体を用いてオートファジー、アポトーシスを引き起こす構造的特徴およびオートファジー、アポトーシスとの関係を明ら

かにすることを目的とした。

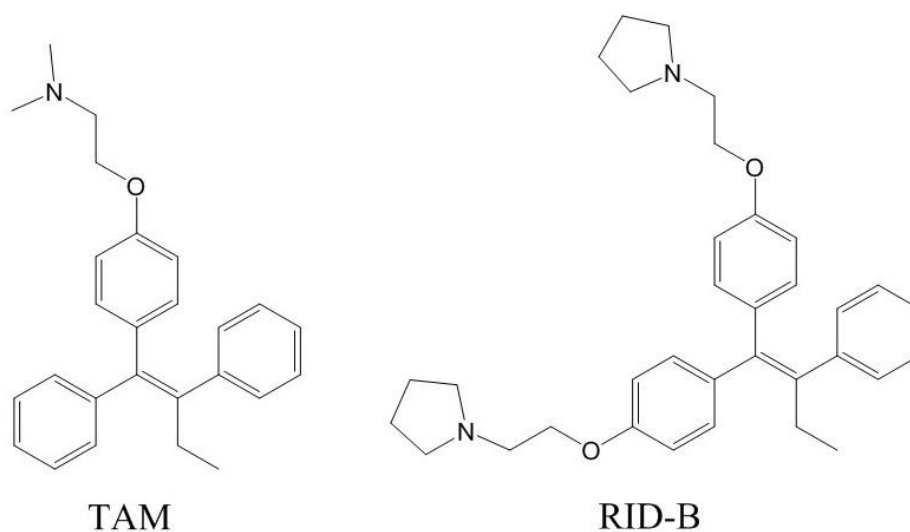


図 8. Tamoxifen と Ridaifen-B の構造

RID-B は TAM のアミンをピロリジンに置換し、4 位にもピロリジン側鎖を付加させることで CYP2D6、CYP3A4、CYP2C9、CYP2B6、CYP2C19 などによって水酸化されることが無いため ER とは結合しにくいと考えられ、対称型となり合成における異性体を分離する工程が要らない。

第1部 第2章 RID-B および RID 構造類縁体のアポトーシスの検出

2-1. 背景

これまでに RID-B が Jurkat 細胞に対してアポトーシスを誘導することが報告されている。抗癌剤や紫外線、活性酸素による酸化ストレスなど様々な刺激によって Bax および Bak の活性化を通じてミトコンドリアの膜透過性を亢進させ、ミトコンドリア内膜と外膜の間に局在するアポトーシス誘導タンパク質であるシトクロム C や second mitochondria-derived activator of caspases(Smac)/Diablo を細胞質に放出させる。Bcl-2 ファミリータンパク質はミトコンドリアの膜透過性を制御することでアポトーシス誘導タンパク質の細胞質への放出を抑制する(82)。細胞質に放出されたシトクロム C と Apaf-1 が複合体を形成し、イニシエーターカスパーゼであるカスパーゼ 9 を活性化し下流のエフェクターカスパーゼであるカスパーゼ 3、6、7 を活性化することでアポトーシスが誘導される(15)。Bcl-2 を過剰発現した細胞に対して RID-B の誘導するアポトーシスが抑制されることから RID-B はミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導すると考えられている。しかしながら、RID-B の誘導するアポトーシスの分子機構やどのような構造的特徴がアポトーシスに関与しているのかは明らかになっていない。そこで新規 RID 構造類縁体を合成することで構造活性相関を行った。RID-B には CYP2B6、CYP2D6、CYP2C19 によって代謝され得る可能性のあるフェニル基が存在しているためフェニル基を持たない化合物として RID-SB シリーズを合成した。合成は東京理科大学椎名研究室が行った。また、RID-B が TAM と大きく異なる構造である 2 本のピロリジン側鎖の関係を検討するために 1 本欠いた構造類縁体も合成した(図 9)。

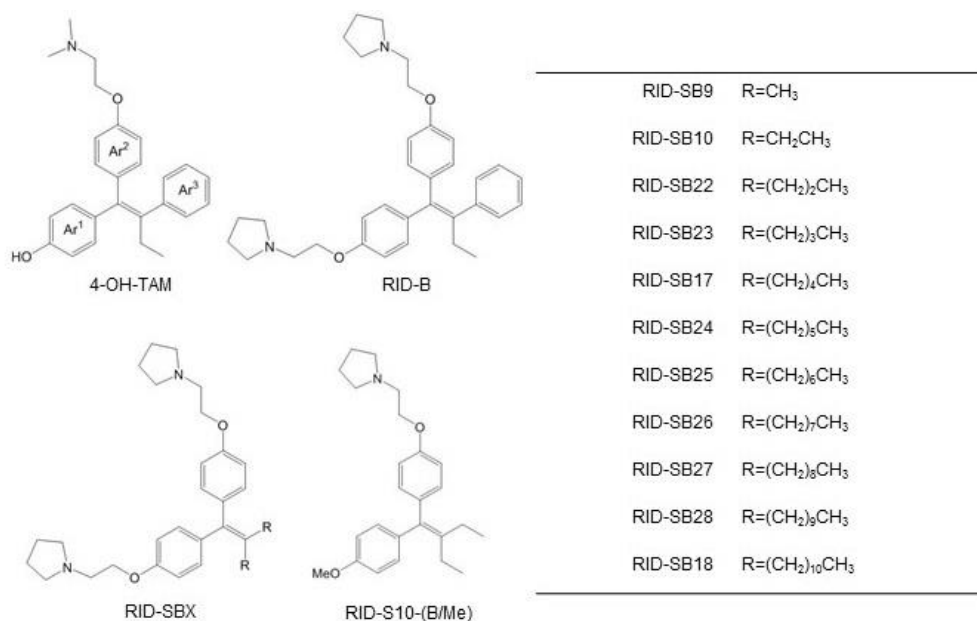


図 9. RID 構造類縁体

2-2. 実験方法

2-2-1. 細胞培養

HepG2 細胞の培養には DMEM 培地(Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose)(Sigma) 10 g/L、5 mM HCl(Wako)、3.5 μ M 2-メルカプトエタノール(Wako)、100mg/L ストレプトマイシン(Thermo Scientific)、100U/mL ペニシリン(Thermo Scientific)、2 g/L NaHCO₃ (Wako) を用い非働化済みの FBS を 10%になるように添加し、0.02 μ m フィルターを通して滅菌したものを用いた。また培養条件は、インキュベーター(ESPEC)内で CO₂ 濃度 5%、37 °C で培養を行った。

2-2-2. 細胞に対する薬剤の作用方法

直径 100 mm 細胞培養ディッシュ(Thermo Scientific)を用い、DMEM 培地 10 mL 中に 1×10^6 cells/dish となるように播種し、RID-B 及び RID 構造類縁体を 3 μ M で 24 h、CO₂ 濃度 5%のインキュベーター内で 37°C で作用させた。RID-B 及びその他の RID 類縁体は東京理科大学理学部椎名勇教授より提供された。これらの薬剤は全て Ethanol (Wako)を溶媒とした。

2-2-3. MTT assay

96 well plate(Thermo Scientific)を用い、DMEM 培地 80 μ L 中に 1×10^4 cells/well となるように播種し、一晩、37 °C、5% CO₂ 下で培養し、細胞を 96 well plate に接着させた。RID-B 及び RID 構造類縁体を 2~40 μ M で 23 h、CO₂ 濃度 5%のインキュベーター内で 37°C で作用させた時点で 5mg/ml MTT 溶液 (Wako) を 10 μ L ずつ各 well に添加し、37°C で 1 h 作用させた。上清を捨て、DMSO (Wako) を 100 μ L ずつ加え、マイクロプレートリーダー (Awareness Technology) を用いて、570 nm の吸光度を測定した。

2-2-4. フローサイトメトリー

細胞は RID-B 及び RID 構造類縁体を作用させた後、PBS によって、5 min、4 °C、300 g で遠心洗浄を行い上清を除去後、70%エタノールで 30 min、-20 °C で冷やして固定し、5 min、4 °C、300 g で遠心後、上清を除去した。0.1% Triton X-100(Wako)に懸濁して 50 μ g/mL RNaseA を加えて室温で 15 min 置き、5 μ g/mL Propidium iodide を加えて暗所で 10 分作用させた。作用後、フローサイトメーターである FACS Calibur (Becton Dickinson)で細胞

周期を測定した。

ミトコンドリア膜電位を測定する際は、細胞は RID-B 及び RID 構造類縁体を作用させた後、PBS によって、5 min、4 °C、300 g で遠心洗浄を行い上清を除去後、DMEM 培地と 100 nM 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC₆)(Molecular Probes)を加えて暗所、37 °C、5%CO₂インキュベーターで 15 min 作用させた。作用後、PBS で 3 回洗浄し、フローサイトメーターである FACS Calibur で測定した。

2-2-5. ウェスタンブロット法

2-2-2. で示した方法で RID-B 及び RID 構造類縁体を細胞に作用させた。作用終了後、上清を除去し、リン酸生理緩衝液(PBS)で洗浄し、可溶化液 (50 mM HEPES (Dojindo) , 150 mM NaCl (Wako) , 10% glycerol (Wako) , 1% Triton X-100 (Wako) , 1.5 mM MgCl₂ (Wako) , 1 mM EGTA (Dojindo) , 1% protease inhibitor cocktail (Sigma)、pH7.5) で可溶化を行った。細胞は 20 min 氷上に静置し、15 min、4°C、14,000 g で遠心を行い上清をタンパク質サンプルとして回収した。サンプルはドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動法(SDS-PAGE)によりタンパク質を分離した。SDS-PAGE には分離用ゲルとして 12%アクリルアミドゲルを用い、濃縮用ゲルは 4%を用いた。サンプルはそれぞれ 20 µg/well となるように調整し、sample application buffer (10% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl(pH6.8), 20% glycerol, bromophenol blue)をサンプルと等量を加えたのち、100 °C、3 min 加熱した。各 well には 20 µL のサンプルを加え泳動を行った。条件は、50 V, 30 min から 100 V, 90 min を行った。泳動後のゲルは親水処理を施したポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜へタンパク質を転写した。親水処理はメタノールに 30 s, 超純水に 3 min, ブロッキングバッファー(48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycine, 1.3 mM SDS, 20% methanol)に 3 min 順次浸していった。転写後、ブロッキング液(3% skimmed milk)を 1 h 作用させ、1:1000 の割合で希釈した一次抗体液 rabbit anti-caspase-3、(Santa cruz)、rabbit anti-β-actin(Cell Signaling Technology)を作用させた。二次抗体 anti-rabbit IgG- Horseradish peroxidase (HRP) (Cell Signaling Technology)を 1:2000 の割合で希釈し作用させ、PBS で 5 回洗浄した。洗浄終了後、Pierce ECL Western Blotting Substrate を 1 min 作用させ、ImageQuant LAS 4000(GE Healthcare)によってタンパク質を検出した。

2-2-6 統計的解析

有意差検定にはスチューデント *t* 検定を用いて行い、検定の結果が $p < 0.05$ であるとき、統計的に有意であるとみなした。

2-3. 結果

2-3-1. MTT assay による RID-B と RID 構造類縁体の細胞傷害性

RID-B のフェニル基をアルキル鎖にすることで、どの程度細胞傷害性に影響が生じるか MTT assay を用いて HepG2 細胞の生存率より検討した。表 I に RID-B 及びその構造類縁体を作用させたときの細胞生存率が 50% となるときの濃度を示す IC₅₀ 値を算出してまとめた。その結果、RID-B に対し、側鎖のアルキル鎖が 2~7 である RID-SB10, SB22, SB23, SB17, SB24, SB25 は同等の細胞傷害性を有していた。しかし、側鎖のアルキル鎖が短い RID-SB9 や側鎖のアルキル鎖が長い RID-SB26~SB18 の細胞傷害性は減弱することが明らかになった。さらに、RID-SB10 が 2 つ持つピロリジン構造が 1 つしかない RID-SB10 構造類縁体である RID-S10-(B/Me) の細胞傷害性は非常に弱いことが明らかになった。

表 I . RID-B 及び RID 構造類縁体の細胞傷害性

compound name	IC ₅₀ (μM)	Clog P	alkyl chain length
RID-B	2.45 ± 0.23	8.19	
RID-SB9	8.35 ± 2.41	6.62	1
RID-SB10	2.71 ± 1.03	7.68	2
RID-SB22	4.68 ± 1.98	8.73	3
RID-SB23	2.64 ± 0.53	9.79	4
RID-SB17	2.59 ± 0.30	10.85	5
RID-SB24	3.96 ± 0.95	11.91	6
RID-SB25	4.96 ± 0.88	12.97	7
RID-SB26	15.11 ± 3.38	14.02	8
RID-SB27	36.54 ± 16.99	15.08	9
RID-SB28	32.83 ± 16.80	16.14	10
RID-SB18	16.65 ± 3.99	17.20	11
RID-S10-(B/Me)	34.80 ± 9.78	6.90	2

HepG2 細胞に RID-B 及び RID 構造類縁体を 2~40 μM で 24 h 作用させた後、MTT assay にて細胞傷害率を測定した。化合物の脂溶性を示す値である ClogP 値は ChemBioDraw Ultra 13.0 にて算出した。

2-3-2. フローサイトメトリーによる Sub-G1 期細胞の検出

アポトーシスの特徴として、細胞の形態変化(細胞膜変性、水泡様変形)、核クロマチンの形態変化(アポトーシス小体形成、凝縮、断片化)、DNA の断片化などがある。アポトーシ

スを起こしている細胞では低分子 DNA が漏出し、Propidium iodide に染色される DNA 量が少なくなり、G1 期よりも低い DNA 含有量を示す細胞をフローサイトメトリーで検出することが可能であり Darzynkiewicz と Bedner は Sub-G1 期の検出がアポトーシスを同定する方法として有効であると報告している(83、84)。ウェスタンブロットでは RID-B 及び RID 構造類縁体によってカスパーゼの開裂(活性化)を確認した。さらにフローサイトメトリーによって RID-B および RID-B 構造類縁体の RID-SB10~SB25 は Sub-G1 期の細胞が検出された(図 10)。よって本実験に用いた RID-B および RID-B 構造類縁体も HepG2 細胞にエフェクターカスパーゼのカスパーゼ-3 を活性化させ、アポトーシスを誘導することが示唆された。

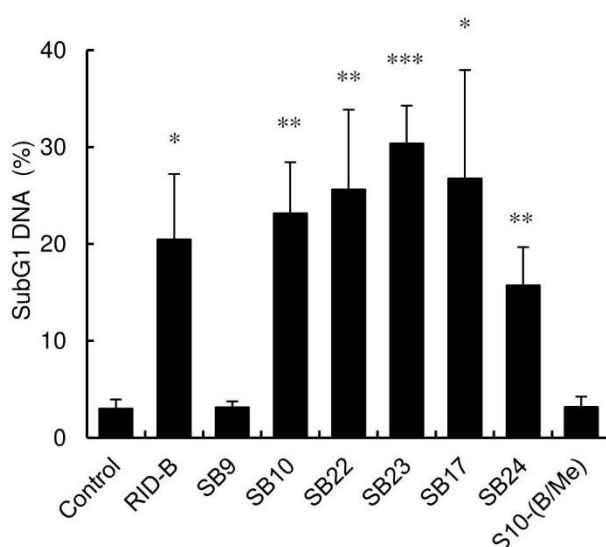


図 10. Sub-G1 期細胞の検出

HepG2 細胞に最終濃度が 3 μ M になるように RID-B 及び RID 構造類縁体を添加し、24 h 作用させた。その後、Propidium iodide で DNA を染色しフローサイトメトリーによって Sub-G1 期細胞を検出した。* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005。

2-3-3. ウェスタンブロット法による Caspase-3 の活性化の検出

この RID-B 構造類縁体の細胞傷害性が、RID-B 同様アポトーシスによるものかどうか確認するため、アポトーシスの指標の 1 つである caspase-3 の開裂による活性化を検出した。図 11 より、RID-B および RID-B 構造類縁体の RID-SB10~SB25 までは開裂されて生じた活性型の caspase-3 のバンドがみられたことから、RID-B 構造類縁体も RID-B 同様カスパーゼを介したアポトーシスを誘導することが推察された。また、RID-SB9、RID-S10-(B/Me) は caspase-3 の開裂が起きなかった。



図 11. RID-B 及び RID 構造類縁体による caspase-3 の活性化

HepG2 細胞に最終濃度が 3 μ M になるように RID-B 及び RID 構造類縁体を添加し、24 h 作用させた。その後、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、anti caspase-3 Antibody でウェスタンブロッティングによってカスパーゼの開裂状態を解析した。

2-3-4. フローサイトメトリーによるミトコンドリア膜電位解析

アポトーシス時のミトコンドリアからシトクロム C が放出する際にミトコンドリア膜透過性遷移孔が開き、ミトコンドリア膜の電位差($\Delta\Psi_m$)が消失することが知られている(85、86)。そこでシアニン系のミトコンドリア膜電位感受性色素である DiOC₆ を用いて RID-B 及び RID 構造類縁体を添加したときのミトコンドリア膜電位への影響を確認した(図 12)。細胞傷害性の高い化合物はミトコンドリア膜電位の低下を引き起こすことが明らかになった。

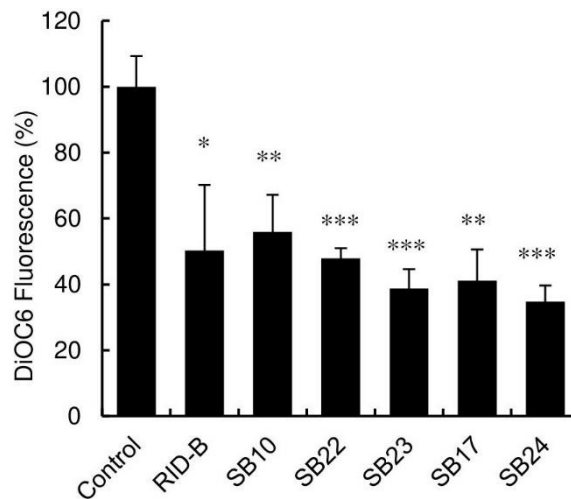


図 12. RID-B 及び RID 構造類縁体によるミトコンドリア膜電位の低下

HepG2 細胞に最終濃度が 3 μ M になるように RID-B 及び RID 構造類縁体を添加し、24 h 作用させた。その後、DiOC₆ 染色し、蛍光をフローサイトメトリーで解析した。* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005.

2.4. 考察

RID-B を作用させると HepG2 細胞に対してアポトーシスを誘導する。本実験の結果、RID-B は側鎖のアルキル鎖が細胞傷害性に影響を与えること、細胞傷害性には二つのピロリジン側鎖が必要であることが示唆された。また、アポトーシスが誘導されるとミトコンドリアからシトクロム C の放出と同時にミトコンドリア膜電位の低下が起こるが、細胞傷害性の高い RID 構造類縁体は膜電位低下を引き起こし、切断を受けた活性化したカスパーゼ-3 が検出できた。さらに CAD が DNA をヌクレオソーム単位(180 bp)で切断し生成するが CAD の活性化はカスパーゼ-3 の活性化が必要であり、アポトーシス時に観察できる Sub-G1 期の細胞が検出できたことから RID-B と同様にアポトーシスを誘導していることが明らかになった。このアポトーシスを図 9 の 4-OH-TAM の Ar³ に対応するフェニル基が無い RID-SB10、RID-SB17 も誘導していることからアポトーシス誘導にはフェニル基が必要ないことが示唆された。化合物は一般的に脂溶性が高くなるほど細胞膜を通過しやすくなるため活性が高くなると考えられているためアルキル鎖を長くすることで脂溶性の増加を試みたが、細胞傷害性と脂溶性の相関性は得られなかった(87)。また、RID-SB26 よりアルキル鎖が長い RID 構造類縁体は急激に細胞傷害性が低下したが、これは非エンドサイトーシス性の物質の取り込みでは一般的に分子量 700 が限界であるため、分子量 631 の RID-SB26 は分子量が大きくなりすぎて細胞に取り込まれなくなってしまったと考えられる。以上の結果より、RID 構造類縁体は HepG2 細胞に対しミトコンドリア膜電位を低下させ、下流のカスパーゼ-3 を活性化させるとともにアポトーシスを誘導していた。

第1部 第3章 RID-B 及び RID 構造類縁体によるオートファジーの検出

3-1. 背景

RID-B は Jurkat 細胞に対してオートファジーを誘導する(81)。しかしながら誘導されているオートファジーがどのように誘導されているのか、必要な構造的特徴は明らかになっていない。肝癌細胞はオートファジーをよく起こす細胞であり、オートファジー研究は肝癌細胞で最も行われている。よって本章では HepG2 細胞を用いてオートファジーに必要な構造的特徴を調べることを試みた。

オートファゴソーム構成タンパク質である LC3-II は、オートファジーの誘導に依存して細胞内に一時的に蓄積することからオートファジーのマーカーとして利用されているが、リソソームの阻害などにもよって蓄積してしまうため、LC3-II の蓄積だけではオートファジー誘導の有無が決定できず、オートファジーの研究においてリソソームなどの分解系の活性を評価することも重要である。そこで RID-B が誘導するオートファジーにおけるオートファジーフラックスやリソソーム活性、リソソーム分解酵素であるカテプシン B の酵素活性も検討した。

3-2. 実験方法

3-2-1. 細胞培養

実験に用いた HepG2 細胞の培養は 2-2-1.項に詳述した。MEF 細胞も HepG2 細胞と同様の方法で培養した。

3-2-2. 細胞に対する薬剤の作用方法

直径 60 mm 細胞培養ディッシュ(Thermo Scientific)を用い、DMEM 培地 5 mL 中に 0.5×10^6 cells/dish となるように播種し、一晚培養してディッシュに接着させた。RID-B 及び RID 構造類縁体を 1 μ M で、E64d(10 μ g/mL)と pepstatin A(10 μ g/mL)で、24 h、CO₂ 濃度 5%のインキュベーター内で 37 °C で作用させた。

3-2-3. ウェスタンブロット法

3-2-2. で示した方法で RID-B 及び RID 構造類縁体を細胞に作用させた。作用終了後、上清を除去し、リン酸生理緩衝液(PBS)で洗浄し、可溶化液 (50 mM HEPES(Dojindo), 150 mM NaCl(Wako), 10% glycerol(Wako), 1% Triton X-100(Wako), 1.5 mM MgCl₂(Wako), 1

mM EGTA(Dojindo), 1% protease inhibitor cocktail(Sigma)、pH7.5) で可溶化を行った。細胞は 20 min 氷上に静置し、15 min、4 °C、14,000 *g* で遠心を行い上清をタンパク質サンプルとして回収した。サンプルはドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動法(SDS-PAGE)によりタンパク質を分離した。SDS-PAGE には分離用ゲルとして 15%または 12%アクリルアミドゲルを用い、濃縮用ゲルは 4%を用いた。サンプルはそれぞれ 20 μ g/well となるように調整し、sample application buffer(10% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl(pH6.8), 20% glycerol, bromophenol blue)をサンプルと等量を加えたのち、100 °C、3 min 加熱した。各 well には 20 μ L のサンプルを加え泳動を行った。条件は、50 V, 30 min から 100 V, 90 min を行った。泳動後のゲルは親水処理を施したポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜へタンパク質を転写した。親水処理はメタノールに 30 s, 超純水に 3 min, ブロッキングバッファー(48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycine, 1.3 mM SDS, 20% methanol)に 3 min 順次浸していった。転写後、ブロッキング液(3% skimmed milk)を 1 h 作用させ、1:1000 の割合で希釈した一次抗体液 rabbit anti-LC-3(Cell Signaling Technology)、rabbit anti-p62/SQSTM1(MBL ライフサイエンス)、rabbit anti-LAMP1(Cell Signaling Technology)、mouse anti-Cathepsin B(Santa cruz)、rabbit anti- β -actin(Cell Signaling Technology)を作用させた。二次抗体 anti-rabbit IgG-Horseradish peroxidase(HRP)(Cell Signaling Technology)または anti-mouse IgG-Horseradish peroxidase(HRP)(Cell Signaling Technology)を 1:2000 の割合で希釈し作用させ、PBS で 5 回洗浄した。洗浄終了後、Pierce ECL Western Blotting Substrate を 1 min 作用させ、ImageQuant LAS 4000(GE Healthcare)によってタンパク質を検出した。

3-2-4. 共焦点顕微鏡

0.01% Poly-L-lysine コートした ϕ 15mm Microscope Cover Glass(松浪硝子)を 12 穴プレート(Corning)内で 1.0×10^5 cells/well に調整した HepG2 細胞を一晩、37 °C、5% CO₂ 下で培養し、0.01% Poly-L-lysine コートした ϕ 15mm Microscope Cover Glass に HepG2 細胞を接着させた。そこへ、3-2-2. で示した方法で RID-B 及び RID 構造類縁体を細胞に作用させた。その後、PBS で 2 回洗浄し、1.0 nM LysoTracker Red(TaKaRa Bio)含有培地で 37 °C、5% CO₂ 下で 1 h 培養し、リソソームを標識した。その後、PBS で 2 回洗浄し、4% Paraformaldehyde で 20 min 細胞を固定した。PBS で 2 回洗浄し、0.1% Triton X-100 を添加し、7 min 室温で透過処理を行った。PBS で 3 回洗浄し、3 % BSA-PBS を加えて 30 min 室温で静置してブロッキング処理をした。1:100 rabbit anti-LC3(Cell signaling technologies)を 37 °C で 1 h 反応させ、0.5% BSA-PBS で洗浄後 100 倍希釈した Alexa Fluor 488 標識 goat anti-rabbit IgG Antibody(Life technologies)で 37 °C の条件下で 60 min 蛍光標識した。

3-3. 結果

3-3-1. ウェスタンブロット法によるオートファジーの検出

3-3-1-1. オートファゴソームマーカーLC3-IIの検出

RID-B はオートファジーを誘導することから(63)、RID-B 構造類縁体も同様にオートファジーを誘導するのか、オートファジー進行に伴い PE と結合する LC3 の I 型から II 型への遷移をウェスタンブロッティングで検出した。結果、RID-SB9~SB25 は LC3 の II 型への遷移が確認できた(図 13)。

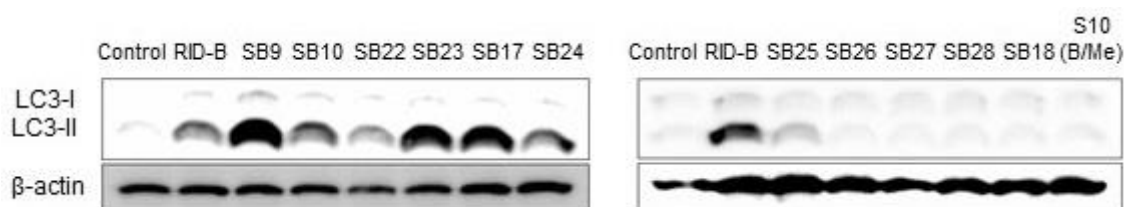


図 13. ウェスタンブロットによる LC3-II の検出

HepG2 細胞に RID-B 及び RID 構造類縁体を $1 \mu\text{M}$ になるように添加し、24 h 作用させた後、細胞を可溶化させた。15%アクリルアミドゲルを用い、ウェスタンブロット法によって LC3 の遷移状態を解析した。LC3-II は PE が結合するため分子量は大きくなるが PE が疎水性であるため、LC3-I より速く泳動するため LC3-I の下部に LC3-II のバンドを確認することができる。

3-3-1-2. オートファジーフラックスの検出

LC3-II の蓄積が確認できたことからオートファジーが誘導されてオートファゴソームが形成されていることが示唆されたが、オートファジーの分解まで行われているかは区別することができない。そこでシステインプロテアーゼ阻害剤の E64d とアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤の pepstatin A でオートファジーの分解を阻害し、分解の前後を比較することでオートファジーの分解が行われているのか判断することにした。RID-B と RID-SB10 を作用させた HepG2 細胞では E64d と pepstatin A を併用することでより LC3-II が蓄積し、差が確認できた。しかし、RID-SB17 は差が確認できなかった。また、p62/SQSTM1 は選択的オートファジーにおける分解のターゲットになる。LC3-II と同様に RID-B 及び RID-SB10 作用時に差が確認できた(図 14)。

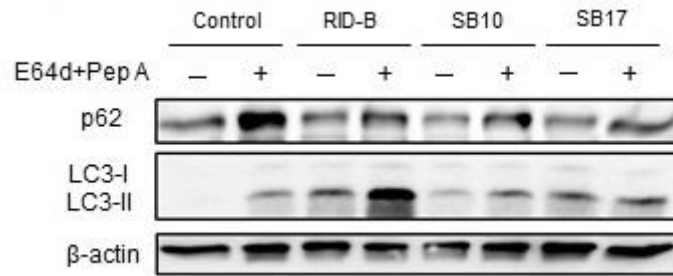


図 14. オートファジーフラックスアッセイ

HepG2細胞にRID-B及びRID構造類縁体を1 μM に、リソソーム酵素阻害剤としてE64dとpepstatin Aをそれぞれ10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ なるように添加し、24 h作用させた後、細胞を可溶化させた。阻害剤未作用サンプルも作成し、15%アクリルアミドゲルを用い、ウェスタンブロット法によってLC3-IIの遷移状態及びp62の量を解析した。

3-3-1-3. RID-B誘導オートファジーにおけるAtg5の相関性

オートファジーはAtgファミリーによって制御される。そこでRID-B及びRID構造類縁体が誘導していたLC3-IIの蓄積はAtgファミリーに制御されているのかを検討するためにMEF Atg5^{+/+}細胞とMEF Atg5^{-/-}細胞に作用させたところMEF Atg5^{+/+}細胞にのみLC3-IIの蓄積が確認できた(図 15)。

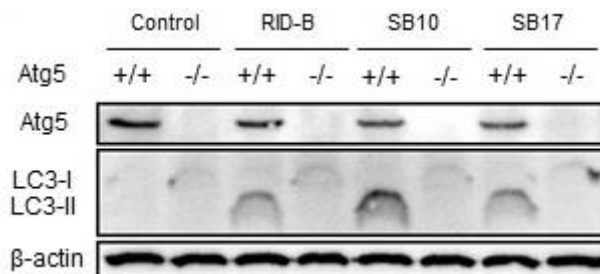


図 15. MEF細胞に対するオートファジー誘導の検出

MEF Atg5^{+/+}細胞とMEF Atg5^{-/-}細胞にRID-B及びRID構造類縁体を1 μM になるように添加し、24 h作用させた後、細胞を可溶化させた。15%アクリルアミドゲルを用い、ウェスタンブロット法によってLC3-IIの遷移状態及びAtg5の量を解析した。

3-3-2. 共焦点顕微鏡によるオートリソソームの検出

オートファジーにより隔離膜が形成された後、リソソームと融合しオートリソソームとなる。RID-Bを作用させるとLC3とリソソーム(Lysotracker)の共局在が確認できた(図 16)。

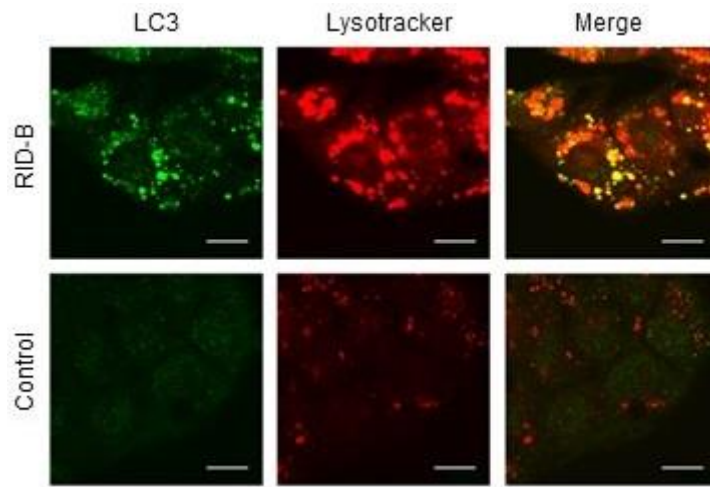


図 16. オートリソソーム形成の検出

HepG2 細胞に RID-B を 1 μ M で 24 h 作用させた後、Lysotracker でリソソームを染色し、LC3 を免疫蛍光染色して共焦点顕微鏡によりオートリソソーム形成を観察した。

3-3-3. リソソーム解析

3-3-3-1. 共焦点顕微鏡によるリソソーム形成の検出

RID 構造類縁体の RID-SB10 はオートファジーを誘導したが、RID-SB17 のオートファジーフラックスは亢進していなかった。そこでオートファジーフラックスに関するリソソームへの影響を検討していった。リソソーム膜タンパク質である LAMP1 を免疫蛍光染色し、細胞内の酸性小胞を Lysotracker で染色したところ RID-B 及び RID-SB10 はリソソームを増加させていたが RID-SB17 には変化は見られなかった(図 17)。

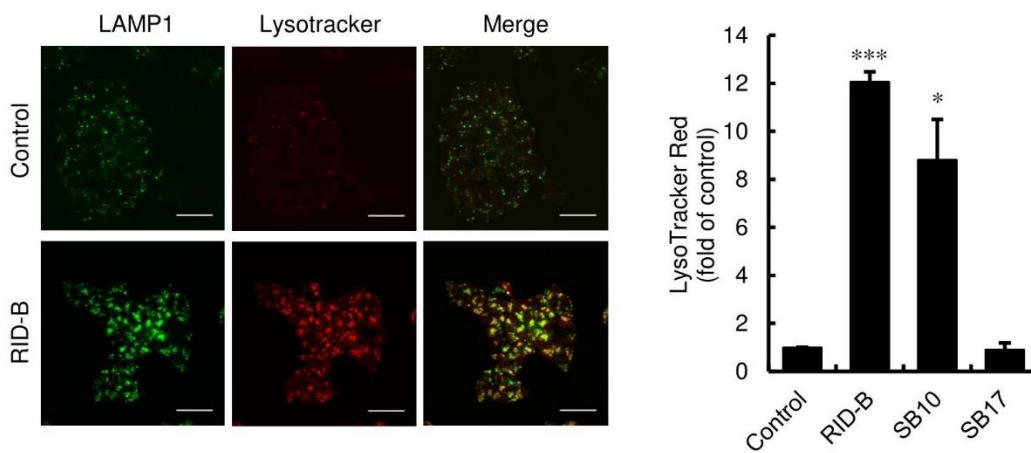


図 17. 共焦点顕微鏡によるリソソーム形成の検出

HepG2 細胞に RID-B を 1 μ M で 24 h 作用させた後、Lysotracker でリソソームを染色し、LAMP1 を免疫蛍光染色して共焦点顕微鏡によりリソソーム形成を観察した。 $*p<0.05$, $***p<0.005$.

3-3-3-2. ウェスタンブロット法によるリソソーム形成の検出

リソソーム膜タンパク質である LAMP1 をウェスタンブロットで定量化したところ共焦点顕微鏡で観察した結果と同様に RID-B 及び RID-SB10 では増加し、RID-SB17 では変化は見られなかった(図 18)。

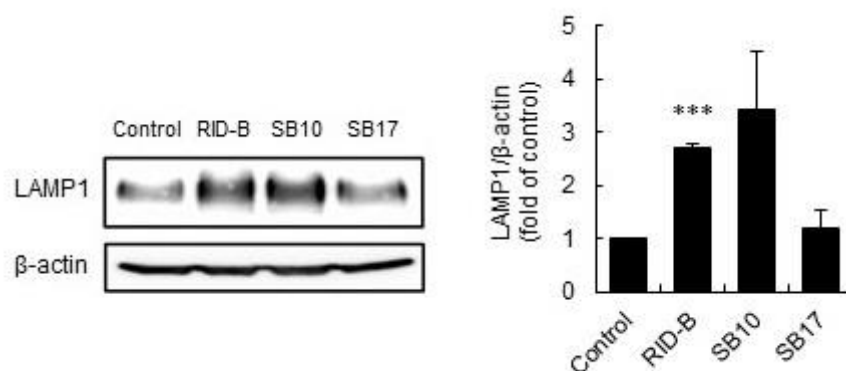


図 18. ウェスタンブロット法によるリソソーム形成の検出

HepG2 細胞に RID-B 及び RID 構造類縁体を 1 μ M になるように添加し、24 h 作用させた後、細胞を可溶化させた。12%アクリルアミドゲルを用い、ウェスタンブロット法によって LAMP1 の量を解析した。 $***p<0.005$.

3-3-3-3. カテプシン B 酵素活性の検出

リソソームの活性化には、リソソームの形成だけでなく消化活性が向上することも重要である。そこで消化活性を検討するため、リソソーム内の分解酵素であるカテプシン B によって基質特異的に加水分解されて蛍光を発する Magic Red-Cathepsin B を用い、酵素活性を観察した。RID-B 及び RID-SB10 を作用させると顕著なカテプシン B の活性化が確認できたが RID-SB17 では変化は見られなかった(図 19)。

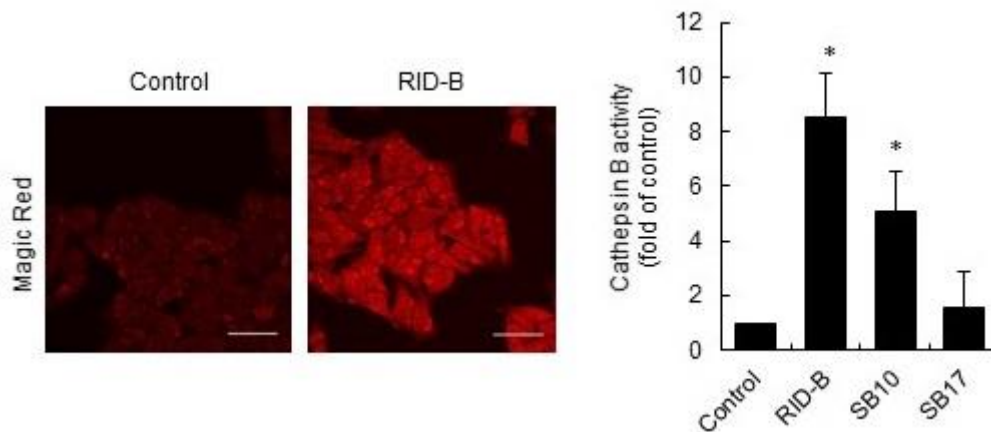


図 19. Magic Red 染色によるカテプシン B 酵素活性の検出

HepG2 細胞に RID-B 及び RID 構造類縁体を 1 μ M で 24 h 作用させた後、Magic Red-Cathepsin B 含有培地で培養して共焦点顕微鏡によりカテプシン B の酵素活性を観察した。* $p < 0.05$.

3-3-3-4. ウェスタンブロット法によるカテプシン B 活性化体の検出

カテプシン B 酵素活性の増加の際には酵素自体の活性化が促進されたのか、あるいは酵素量が増加したのかを検討するためにウェスタンブロット法にてカテプシン B の酵素量を確認した。RID-B 及び RID-SB10 を作用させると pro 体と活性化体の増加が確認できた(図 20)。

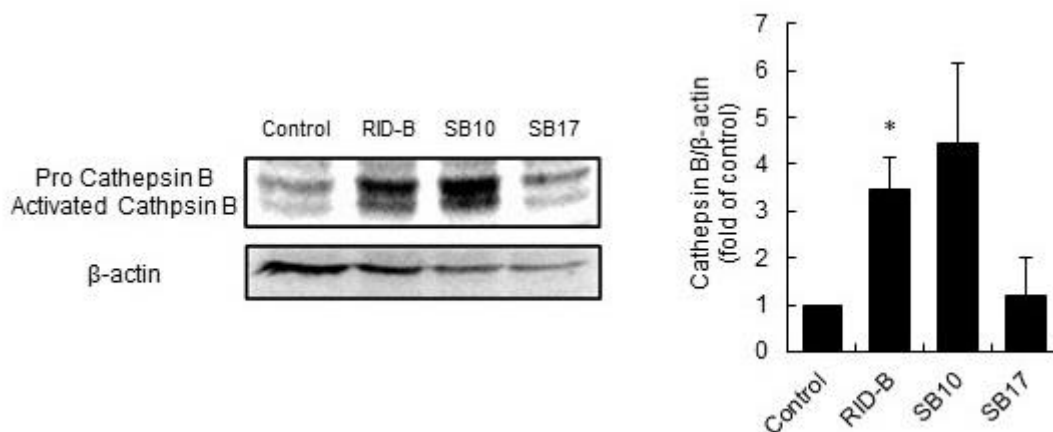


図 20. ウェスタンブロット法によるカテプシン B 活性化体の検出

HepG2 細胞に RID-B 及び RID 構造類縁体を 1 μ M になるように添加し、24 h 作用させた後、細胞を可溶化させた。12%アクリルアミドゲルを用い、ウェスタンブロット法によって Cathepsin B の量を解析した。pro 体 Cathepsin B は 37kDa であり、活性化体の

activated Cathepsin B は 25kDa である。* $p < 0.05$ 。

3.4. 考察

前章ではアポトーシスの誘導について検討を行ったところ RID-SB10~25 は細胞傷害性に大きな差は無くカスパーゼ-3 を介したアポトーシスを誘導していることが明らかになった。本章では RID-B が Jurkat 細胞に対してオートファジーを誘導することが明らかになっているためオートファジー誘導について構造活性相関を検討した。オートファジーが誘導されると LC3 が II 型の LC3-II へと遷移するためウェスタンブロットで確認した結果、RID-B だけでなく RID-SB9~SB25 も LC3-II の遷移が確認できたことからオートファジーを誘導していると考えられる。また、RID-SB26~SB18 の構造類縁体はオートファジーを誘導しておらず、やはり分子量が大きい細胞に取り込まれていないと考えられる。さらにピロリジン側鎖が 1 本欠けた RID-S10-(B/Me) はオートファジーを誘導していないことから RID-B 様の活性には 2 本のピロリジン側鎖が必要であると考えられる。LC3-II の蓄積が確認できたことからオートファジーが誘導されてオートファゴソームが形成されていることが示唆されたが、この結果だけではオートファジーの分解まで行われているかは区別することができない。そこでシステインプロテアーゼ阻害剤の E64d とアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤の pepstatin A でオートファジーの分解を阻害し、分解の前後を比較することでオートファジーの分解が行われているのか判断することにした。ウェスタンブロットの結果より RID-B を作用させた HepG2 細胞では E64d と pepstatin A を併用することにより LC3-II が蓄積し、差が確認できたことからオートファジーフラックスを亢進していると考えられる。構造活性相関については MTT assay の結果、細胞傷害性が同等であり LC3-II の蓄積が確認できた RID-SB10 と RID-SB17 の誘導するオートファジーを比較していくことで検討した。興味深いことに RID-SB10 はオートファジーフラックスを亢進しているのに対して RID-SB17 ではオートファジーフラックスの亢進が起きていなかった。RID-SB10 と RID-SB17 の作用は異なる可能性が示唆された。また、オートファジーは Atg ファミリーに制御されているため RID-B、RID-SB10 及び RID-SB17 の誘導するオートファジーに Atg5 が関与するのか MEF Atg5^{+/+}細胞と MEF Atg5^{-/-}細胞が誘導するオートファジーを検討した結果、MEF Atg5^{+/+}細胞でのみ LC3-II の遷移が確認できたことから Atg5 に依存したオートファジーを誘導しており MEF Atg5^{-/-}細胞にはオートファジーを誘導しないと考えられる。オートファジーによって隔離膜が形成された後、リソソームと融合しオートリソソームとなり内容物の分解をもって完了するためオートリソソームの形成を LysoTracker によりリソソームを染色し、隔離膜の構成タンパクである LC3 を免疫蛍光染色した。共焦点顕微鏡観察の結果、リソソームと LC3(隔離膜)の共局在が確認できたことからオートリソソーム形成も行われていると考えられる。通常、オートファジーが誘導され

ると細胞内の消化活性が向上しリソソーム形成が増加する。RID-B と RID-SB10 を HepG2 細胞に作用させるとリソソーム膜構成タンパク質である LAMP1 の増加と Lysotracker で染色される細胞内酸性小胞が増加することから消化活性が向上していると考えられる。しかし、RID-SB17 を作用させた HepG2 細胞ではリソソーム形成の増加が確認できず、オートファジーフラックスを亢進していないことと関連していると考えられる。リソソームの形成だけでなくリソソーム内消化酵素の 1 つであるカテプシン B の酵素活性とタンパク質量を検討したところ RID-B 及び RID-SB10 では酵素活性の増加と酵素量の増加が確認できたが RID-SB17 では確認できなかった。これらの結果から RID-B 及び RID-SB10 はオートファジーに伴いリソソーム形成の増加と消化酵素の増加により消化活性が向上しオートファジーを完了していると推察できる。しかし、脂溶性の高い RID-SB17 はリソソームが活性化しないためオートファジーフラックスが亢進せずオートファジー不全を誘導していると考えられる。また、RID-B 及び RID-SB10 を作用させてオートファジーフラックスを検討した際に p62 も差が見られたことからオートファジーの中でも選択的オートファジーを誘導していることが示唆された。

第1部 第4章 RID-B 及び RID 構造類縁体によるマイトファジーの検出

4-1. 背景

前章では、RID-B 及び RID 構造類縁体がオートファジーを誘導していることを LC3-II の遷移やオートファジーフラックスアッセイにより検討した。前章の実験結果の中で RID-B 及び RID-SB10 は p62 のフラックスに差があることから選択的オートファジーを誘導している可能性が示唆された。以前に RID-B はミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導することが報告されており、ミトコンドリア傷害を誘導することが明らかになっている(63)。本章では、RID-B がミトコンドリア傷害を誘導することによってミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーが誘導されているのではないかと推察し、マイトファジーの検出や p53 が欠損しているためマイトファジーを誘導しやすい Hep3B 細胞を用いることでマイトファジーであるかを検討した。

4-2. 方法

4-2-1. 細胞培養

実験に用いた HepG2 細胞の培養は 2-2-1. 項に詳述した。MEF 細胞、Hep3B 細胞も HepG2 細胞と同様の方法で培養した。MEF 細胞は東京大学医学部分子生物学分野の水島昇教授より提供された。

4-2-2. 細胞に対する薬剤の作用方法

直径 60 mm 細胞培養ディッシュ(Thermo Scientific)を用い、DMEM 培地 5 mL 中に 0.5×10^6 cells/dish となるように播種し、一晚培養してディッシュに接着させた。RID-B 及び RID 構造類縁体を 1 μ M で 24 h、CO₂ 濃度 5% のインキュベーター内で 37 °C で作用させた。

4-2-3. 共焦点顕微鏡観察

0.01% Poly-L-lysine コートした ϕ 15mm Microscope Cover Glass(松浪硝子)を 12 穴プレート(Corning)内で 1.0×10^5 cells/well に調整した HepG2 細胞を一晚、37 °C、5% CO₂ 下で培養し、0.01% Poly-L-lysine コートした ϕ 15mm Microscope Cover Glass に HepG2 細胞を接着させた。接着後、無血清 DMEM 培地で 2 回洗浄し、無血 DMEM に 100 nM Mtpagy Dye(Dojindo)を加え、37 °C、5% CO₂ 下で 30 min 培養しミトコンドリアに結合

させた。無血清 DMEM 培地で 2 回洗浄し、10%FBS 入り DMEM を加えた。そこへ、4-2-2. で示した方法で RID-B 及び RID 構造類縁体を細胞に作用させた。その後、PBS で 2 回洗浄し、1.0 μ M Lyso Dye(Dojindo)含有培地で 37 °C、5% CO₂ 下で 30 min 培養し、リソソームを標識した。その後、PBS で 2 回洗浄して共焦点顕微鏡にて観察した。

4-2-4. ウェスタンブロット法

4-2-2. で示した方法で RID-B 及び RID 構造類縁体を細胞に作用させた。作用終了後、上清を除去し、リン酸生理緩衝液(PBS)で洗浄し、可溶化液 (50 mM HEPES(Dojindo), 150 mM NaCl(Wako), 10% glycerol(Wako), 1% Triton X-100(Wako), 1.5 mM MgCl₂(Wako), 1 mM EGTA(Dojindo), 1% protease inhibitor cocktail(Sigma)、pH7.5) で可溶化を行った。細胞は 20 min 氷上に静置し、15 min、4 °C、14,000 *g* で遠心を行い上清をタンパク質サンプルとして回収した。サンプルはドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動法(SDS-PAGE)によりタンパク質を分離した。SDS-PAGE には分離用ゲルとして 12%アクリルアミドゲルを用い、濃縮用ゲルは 4%を用いた。サンプルはそれぞれ 20 μ g/well となるように調整し、sample application buffer(10% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl(pH6.8), 20% glycerol, bromophenol blue)をサンプルと等量を加えたのち、100 °C、3 min 加熱した。各 well には 20 μ L のサンプルを加え泳動を行った。条件は、50 V, 30 min から 100 V, 90 min を行った。泳動後のゲルは親水処理を施したポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜へタンパク質を転写した。親水処理はメタノールに 30 s, 超純水に 3 min, ブロッキングバッファー(48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycine, 1.3 mM SDS, 20% methanol) に 3 min 順次浸していった。転写後、ブロッキング液(3% skimmed milk)を 1 h 作用させ、1:1000 の割合で希釈した一次抗体液 rabbit anti-p53(EnoGene)、mouse anti-parkin(abcam)、rabbit anti- β -actin(Cell Signaling Technology)を作用させた。二次抗体 anti-rabbit IgG- Horseradish peroxidase(HRP)(Cell Signaling Technology)または anti-mouse IgG- Horseradish peroxidase(HRP)(Cell Signaling Technology)を 1:2000 の割合で希釈し作用させ、PBS で 5 回洗浄した。洗浄終了後、Pierce ECL Western Blotting Substrate を 1 min 作用させ、ImageQuant LAS 4000(GE Healthcare)によってタンパク質を検出した。

4-2-5. MTT assay

96 well plate(Thermo Scientific)を用い、DMEM 培地 80 μ L 中に 1×10^4 cells/well とするように播種し、一晩、37 °C、5% CO₂ 下で培養し、細胞を 96 well plate に接着させた。RID-B 及び RID 構造類縁体を 2,4 μ M、E64d(10 μ g/mL)と pepstatin A(10 μ g/mL)を併用して 23 h、CO₂ 濃度 5%のインキュベーター内で 37 °C で作用させた時点で 5 mg/ml MTT

溶液 (Wako) を 10 μ L ずつ各 well に添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 h 作用させた。上清を捨て、DMSO (Wako) を 100 μ L ずつ加え、マイクロプレートリーダー (Awareness Technology) を用いて、570 nm の吸光度を測定した。

4-2-6. SRB assay

96 well plate(Thermo Scientific)を用い、DMEM 培地 100 μ L 中に 1×10^4 cells/well となるように播種し、一晩、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で培養し、細胞を 96 well plate に接着させた。RID-B 及び RID 構造類縁体を 12 μ M で 24 h、CO₂ 濃度 5% のインキュベーター内で 37 $^{\circ}$ C 作用させた時点でトリクロロ酢酸(ナカライテック)を 10% となるように添加して 1 h、4 $^{\circ}$ C で細胞を固定した。超純水で 3 回洗浄し、0.4%SRB(Sigma)を加え 10 min、室温で染色した。1%酢酸で 3 回洗浄し、plate を一晩乾燥させ、150 μ L の 10 mM Tris を加えてマイクロプレートリーダー(Awareness Technology)を用いて、550 nm の吸光度を測定した。

4-2-7. フローサイトメトリー

細胞は RID-B 及び RID 構造類縁体を作用させた後、PBS によって、5 min、4 $^{\circ}$ C、300 g で遠心洗浄を行い上清を除去後、DMEM 培地と 5 μ M MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator (Molecular Probes)を加えて暗所、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーターで 10 min 作用させた。作用後、PBS で洗浄し、フローサイトメーターである FACS Calibur で測定した。

4-3. 結果

4-3-1. 蛍光色素によるマイトファジーの検出

ミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーを検出するために Mtphagy Dye(Dojindo)を用いた。まず、Mtphagy Dye はミトコンドリア膜電位依存的に集積し化学結合をする。その後ミトコンドリア傷害が誘導され、マイトファジーが誘導されていきオートリソソームを形成し、酸性条件化になると蛍光を発する色素である(図 21)。

HepG2 細胞に RID-B 及び RID 構造類縁体を作用させて Mtphagy Dye を用いてマイトファジーの検出を試みたところ、前章でオートファジーを誘導していた RID-B 及び RID-SB10 で Mtphagy Dye の赤色蛍光が観察できたことからマイトファジーを誘導していることが示唆された。また RID-SB17 では赤色蛍光は観察できなかった(図 22)。

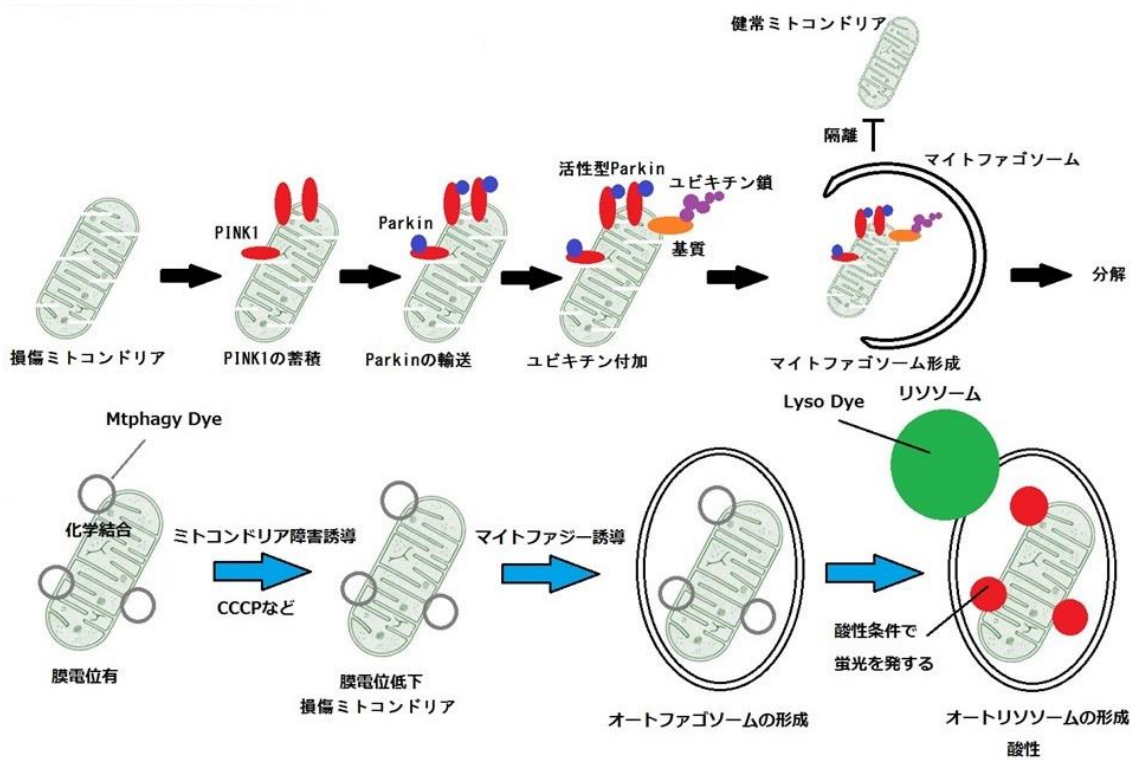


図 21. マイトファジー検出の原理

Mtpagy Dye は 2016 年に開発された新規マイトファジー検出試薬であり、マイトファジーの最終段階であるリソソームと融合した状態になると赤色蛍光を発することでマイトファジーを可視化することができる(88)。

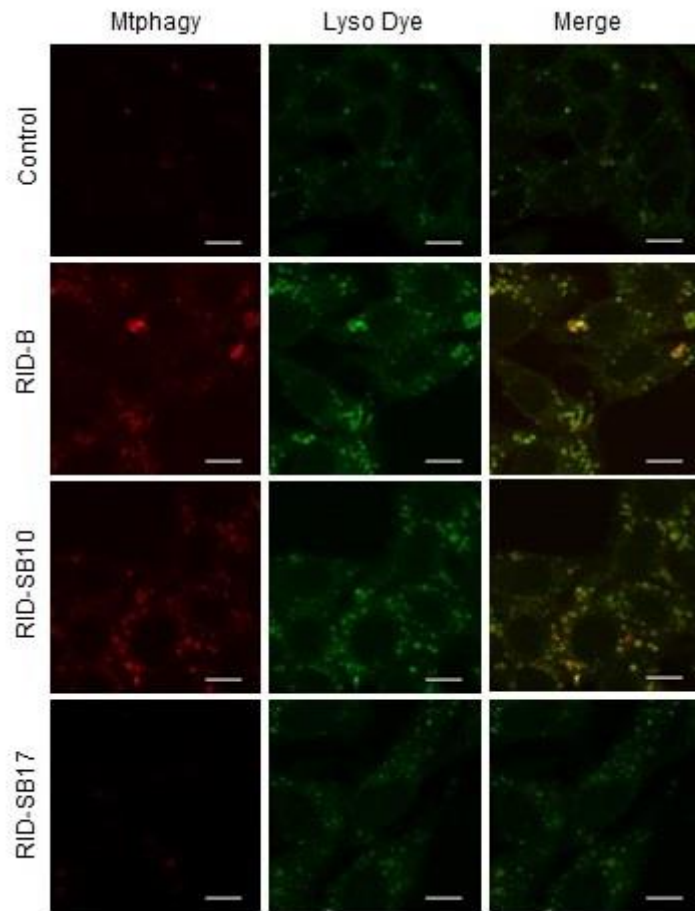


図 22. 共焦点顕微鏡によるマイトファジーの検出

Mtphagy Dye をミトコンドリアに結合させた HepG2 細胞に RID-B 及び RID 構造類縁体を $1 \mu\text{M}$ で 24 h 作用させた後、Lyso Dye 含有培地で培養して共焦点顕微鏡によりマイトファジー由来のオートリソソームを観察した。

4-3-2. ウェスタンブロットによる p53 と Parkin の検出

マイトファジーが誘導されるには Parkin が必須であり、Parkin の量と働きによってマイトファジーはコントロールされている。Parkin と癌抑制遺伝子である p53 には相互作用が知られており、p53 が細胞質で Parkin の RING0 ドメインと結合して Parkin のミトコンドリア移行を阻害することでマイトファジーを阻害する(89)。Hep3B 細胞も肝癌細胞であるが p53 が欠損しているためマイトファジーを誘導しやすいことが知られている。そこで HepG2 細胞と Hep3B 細胞の p53 と Parkin の発現レベルを比較したところ Hep3B は p53 が欠損していることが明らかとなり、どちらの細胞も Parkin が発現していることが確認できた(図 23)。

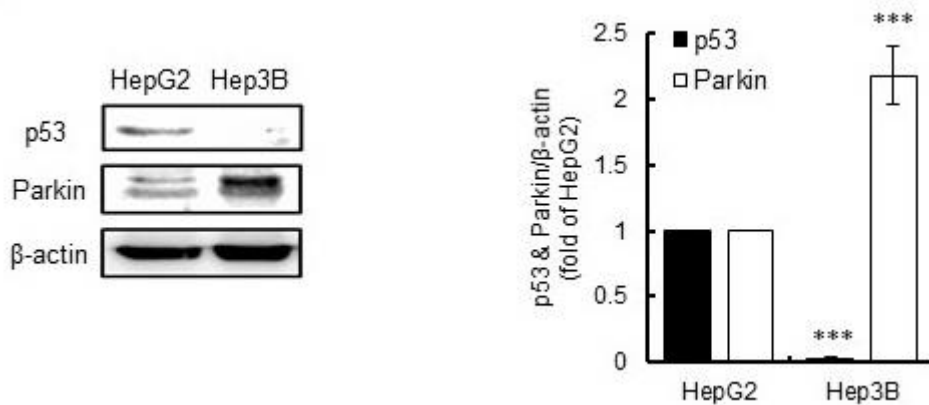


図 23. HepG2 細胞と Hep3B 細胞の p53 及び Parkin 発現比較

HepG2 細胞と Hep3B 細胞を可溶化させた。12%アクリルアミドゲルを用い、ウェスタンブロット法によって p53 及び Parkin の量を解析した。また、Image J にて定量化した。***p<0.005.

4-3-3. マイトファジーと細胞傷害の相関

4-3-3-1. HepG2 細胞と Hep3B 細胞への細胞傷害性の比較

4-3-2.の実験結果から HepG2 細胞と Hep3B 細胞では Hep3B 細胞の方がマイトファジーを誘導しやすい細胞であると考えられる。そこで RID-B を作用させて細胞傷害性を比較したところマイトファジーを誘導しやすい Hep3B 細胞の方がより抵抗性があることが確認できた(図 24)。

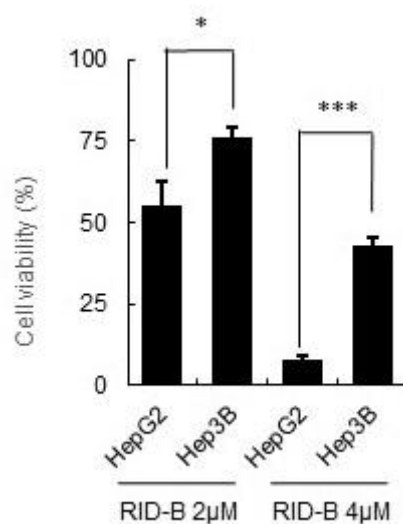


図 24. HepG2 細胞と Hep3B 細胞への細胞傷害性の比較

HepG2 細胞と Hep3B 細胞に RID-B 及び RID 構造類縁体を 2 μM または 4 μM で 24 h

作用させた後、MTT assayにて細胞傷害率を測定した。 $*p<0.05$, $***p<0.005$ 。

4-3-3-2. マイトファジー阻害による細胞傷害性への影響

4-3-3-1.の結果よりマイトファジーを誘導しやすいHep3B細胞はRID-Bに対して抵抗性があることが明らかとなった。E64dとpepstatin Aを併用してマイトファジーを阻害してRID-BをHep3B細胞に作用させたところ細胞傷害性が増強した(図25)。

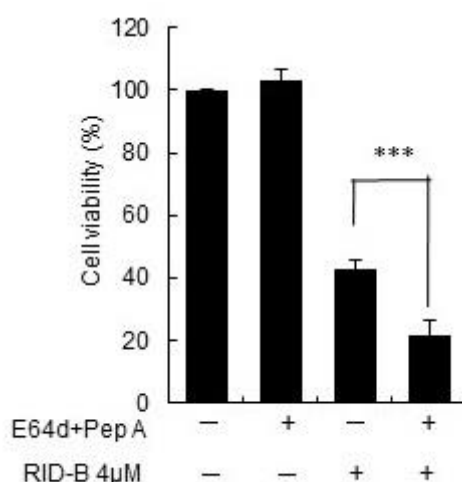


図25. マイトファジー阻害による細胞傷害性の比較

Hep3B細胞にRID-Bを4μMとマイトファジー阻害剤としてE64dとpepstatin Aをそれぞれ10μg/mLなるように添加し、で24h作用させた後、MTT assayにて細胞傷害率を測定した。 $***p<0.005$ 。

4-3-3-3. MEF細胞への細胞傷害性の比較

4-3-3-1.と4-3-3-2.の結果よりRID-Bが誘導するマイトファジーと細胞傷害性には関係があることが示唆されたため、次に3-3-1-3.の結果よりマイトファジーを誘導できるMEF Atg5^{+/+}細胞と誘導できないMEF Atg5^{-/-}細胞に対してRID-B及びRID構造類縁体の細胞傷害性を比較した。マイトファジーはミトコンドリアを分解してしまうためミトコンドリア活性を評価するMTT assayでは正確な傷害性を比較できないと考え、タンパク質量で細胞増殖率を評価するSRB assayを行った。結果、RID-B及びRID-SB10はマイトファジーを誘導できるMEF Atg5^{+/+}細胞の方がより抵抗性があることが確認できた。しかし、RID-SB17の細胞傷害性にはどちらの細胞も抵抗性の差が確認できなかった(図26)。

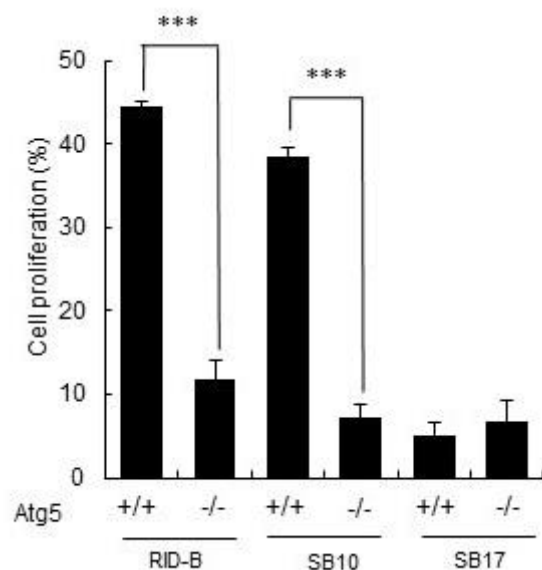


図 26. MEF 細胞への細胞傷害性の比較

MEF Atg5^{+/+}細胞と MEF Atg5^{-/-}細胞に RID-B 及び RID 構造類縁体を 12 μ M で 24 h 作用させた後、SRB assay にて細胞増殖率を測定した。***p<0.005.

4-3-4. フローサイトメトリーによるミトコンドリア ROS の検出

マイトファジーが誘導されていることからミトコンドリアに傷害が起きているため、過度な活性酸素種(ROS)を発生させて細胞傷害を引き起こしていると考えられる。そこで RID-B 及び RID 構造類縁体を作用させたときのミトコンドリア特異的 ROS を測定した。結果、ミトコンドリア ROS を発生させていることが確認できた(図 27)。

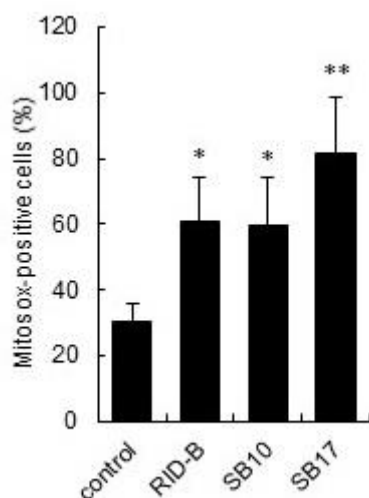


図 27. フローサイトメトリーによるミトコンドリア ROS の検出

HepG2 細胞に最終濃度が 3 μ M になるように RID-B 及び RID 構造類縁体を添加し、24 h 作用させた。その後、MitoSOX Red 染色し、蛍光をフローサイトメトリーで解析した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4-4. 考察

前章で RID-B と RID-SB10 はオートファジーを誘導していることが明らかとなったが、Mtpagy Dye 染色により RID-B と RID-SB10 はオートファジーの中でもミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーを誘導していることが推察された。また、オートファジー不全を起こす RID-SB17 はマイトファジーを誘導していないと考えられる。マイトファジーは、一般的には様々な要因で傷害を受けて不良ミトコンドリアとなったミトコンドリアが細胞に対してアポトーシスなどの細胞傷害を誘導するため、不良ミトコンドリアを分解し細胞自身を守ろうとする防御機構であると考えられている。そこで RID-B の誘導する細胞傷害性とマイトファジーには関係性があると考え検討したところ HepG2 細胞よりマイトファジーを誘導しやすい Hep3B 細胞には抵抗性があること、E64d と pepstatin A でマイトファジーを阻害すると細胞傷害性が増強すること、マイトファジーが誘導できない MEF Atg5^{-/-} 細胞には MEF Atg5^{+/+} 細胞よりも強力に作用することが明らかとなった。また、RID-B はミトコンドリア ROS を発生させていることからミトコンドリア傷害を誘導していると考えられる。これらの結果から RID-B はミトコンドリア傷害を起こし、この傷害に対して防御機構としてマイトファジーが誘導されて癌細胞は薬剤に抵抗していると考えられる。RID-SB10 の細胞傷害性は RID-B と同様にマイトファジーによって抵抗されていると考えられるが RID-SB17 はマイトファジーを誘導しておらずミトコンドリア傷害と共にオートファジー不全を引き起こすためマイトファジーによって抵抗を受けずに細胞傷害性を誘導できると考えられる。

第2部 第1章 緒言

1-1. アテローム性動脈硬化

アテローム性動脈硬化症は 1575 年に Fallopius によって動脈が骨のように変化すると最初に報告された疾患である(90)。その後、1755 年に Haller によってアテローム(atheroma)性動脈硬化症と名づけられた(90)。疾患としての症状は動脈の内側に粥状隆起が発生し、血栓が生じることやその破片から塞栓が起こり、血流が遮断されてしまい、酸素や養分が輸送できずに脳梗塞や心筋梗塞、狭心症などの様々な致死的な症状を引き起こす。

血中内を循環しているリポタンパク質は血液中に不要な脂質を運搬する役割があり、1949 年に Gofman によって血漿中には 5 種類のリポタンパク質があることが報告された(91)。比重により軽い順番から chylomicron(CM)、very low density lipoprotein(VLDL)、intermediate density lipoprotein(IDL)、low density lipoprotein(LDL)、high density lipoprotein(HDL)と呼ばれている。chylomicron は食事中に摂取された脂質から小腸で合成されてリンパ管から血液に入り、肝臓に運ばれる。肝臓では取り込んだ脂質とメバロン酸経路によって合成されたコレステロールなどの脂質から VLDL を合成し血中に分泌される。分泌された VLDL は循環中に中性脂肪が分解され、引き抜かれていくことで粒子中のコレステロールの割合が高くなり LDL となる。この LDL は抹消組織へのコレステロール輸送の役割があるが、不安定であり酸化及びアセチル化しやすい。LDL は肝臓にある LDL 受容体によって肝臓に取り込まれ、VLDL、HDL の合成などに利用される。酸化した LDL やアセチル化した LDL はマクロファージのスカベンジャー受容体によって取り込まれてしまう。マクロファージは変性した LDL を分解することができず泡沫化していき、特に血管内膜下で泡沫化してしまうとマクロファージは血管に戻ることができず溜まり細胞死を起こす。細胞死を起こしたマクロファージに溜まった LDL に含まれていたコレステロールや中性脂肪がそのまま沈着してしまい内膜が厚くなり隆起(プラーク)を形成することでアテローム性動脈硬化症を発症すると考えられている。

1-1-1. LDL 受容体とコレステロール代謝

LDL 受容体は細胞表面に存在するコーテッド・ピットに局在している。LDL 受容体に結合した LDL は受容体と共に細胞内にエンドサイトーシスされて取り込まれ、クラスリンによって 36 面体構造のコーテッド・ベシクルが作られる。その後クラスリンが外れることで、コーテッド・ベシクルが互いに融合して初期エンドソームを形成する。このエンドソームの膜にはプロトンポンプが存在しており、エンドソーム内の pH を次第に下げていき pH が低下することによって LDL と LDL 受容体は解離し、リサイクリング・ベシクルによって細胞膜に戻る。エンドソーム内の LDL はリソソームで分解され、最も多く含まれているコ

レステロールエステルが遊離コレステロールとなり小胞体に輸送される。供給されたコレステロールは細胞膜の合成やステロイドホルモンの合成、胆汁酸の合成などに利用される。また、遊離コレステロールが小胞体に輸送されると後述する sterol regulatory element-binding protein(SREBP)によって制御されているコレステロールの生合成の律速酵素である 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A 還元酵素(HMG-CoAr)遺伝子と LDL 受容体遺伝子の転写を抑制する。LDL 受容体は小胞体で *N*結合糖を有する 120kDa の前駆体として翻訳され、ゴルジ体で *O*結合糖ドメインが糖鎖の修飾を受け、160kDa の *N*結合糖と *O*結合糖を有する単一ポリペプチドとなり、細胞表面のコーテッド・ピットに運ばれる。ドメインの構造としては、LDL 結合ドメイン、EGF 前駆体相同ドメイン、*O*結合糖ドメイン、細胞膜貫通ドメイン、細胞質ドメインの 5 つのドメインで構成されている。このうち LDL 結合ドメインは *N* 末端に存在し、システインに富む 40 アミノ酸の配列が 7 回繰り返した構造をしている。*O*結合糖ドメインにはセリンとスレオニンが局在しており、*O*結合糖によって修飾を受ける(92)。

1-1-2. SREBP

SREBP-1 は Brown らによって 1993 年に LDL 受容体遺伝子の転写を制御していることが報告され、1994 年に Wang によって SREBP-2 が発見された(93、94)。SREBP-1 は脂肪酸制御、SREBP-2 はコレステロール代謝制御の役割があり、2 ヶ所の膜貫通ドメインを持っており合成直後は小胞体膜上に膜タンパク質として局在している(95)。SREBP は小胞体膜上に存在している状態では転写因子として働くことは無く、8 回膜貫通ドメインを持つ SREBP cleavage-activating protein(SCAP)が小胞体膜上で細胞質側に飛び出た C 末端と SREBP の C 末端が結合した二量体を形成する(96)。SCAP には sterol-sensing domain(SSD)があり、小胞体にコレステロールが多い状態だと SSD にコレステロールが結合することで 6 回膜貫通ドメインを持つ小胞体膜タンパク質の INSIG と結合した三量体を形成することで小胞体膜に留まっている(97、98)。コレステロールが枯渇すると INSIG との結合が解除され SREBP-SCAP 二量体となって COP II 複合体の構成因子である Sec24 に結合して輸送小胞の膜を経由して小胞輸送によってゴルジ体に輸送される(99)。ゴルジ体の内腔側に活性部位を持つ 1 回膜貫通型膜タンパク質のセリンプロテアーゼである site 1 protease(S1P)によって SREBP の 2 ヶ所の膜貫通ドメインの間をつなぐループ部位が切断される(100)。ループ部位で切断されると SREBP は *N* 末端部分と *C* 末端部分に分かれ、*N* 末端部分の構造が変わり、細胞質に突き出た部位が site 2 protease(S2P)によって切断される(101)。2 ヶ所の膜貫通ドメインの近傍が切断され、転写因子機能に必須な basic helix-loop-helix leucine zipper(bHLH-Zip)領域を持つ *N* 末端側が核移行し、LDL 受容体、HMG CoA 合成酵素、HMG CoAr の遺伝子の sterol regulatory element(SRE)配列に結合することで転写活性化される。さらに LDL 受容体の遺伝子には SRE 領域の近傍にユビキ

タスな転写因子 Sp1 結合部位があり、Sp1 と SREBP は協調的に転写を促進する(図 28)。SRE 配列は SREBP-2 遺伝子にも存在し、SRE 配列の近傍にユビキタスな転写因子である NF-Y が結合することで自己転写活性化を引き起こす(102)。

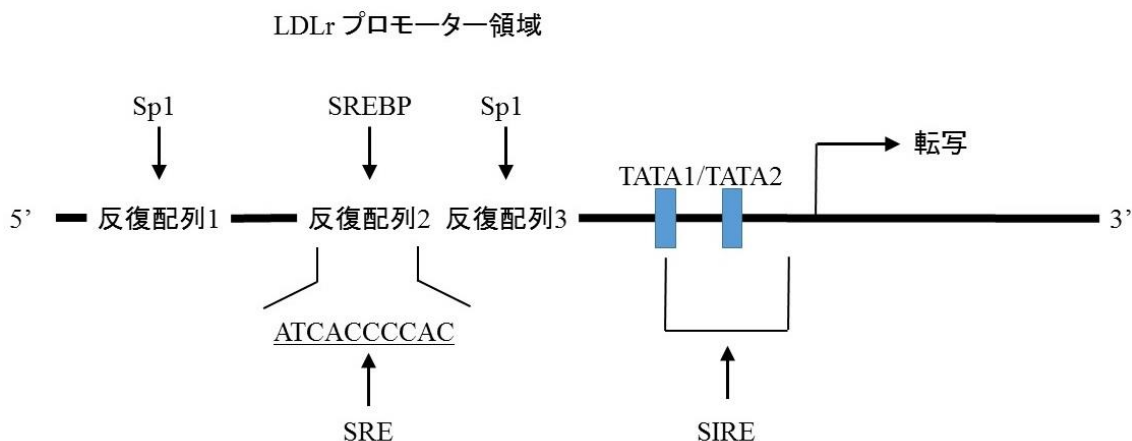


図 28. LDL 受容体のプロモーター領域

SREBP はロイシンジッパー領域を介してホモ二量体を形成して DNA 上の SRE 領域と結合することで転写活性化を行う(103)。その両端には Sp1 が結合する領域がある。

その後 SREBP は、Lys 残基がユビキチン化修飾を受けて速やかにプロテアソームによって分解される(104、105)。また、一部の SREBP は small ubiquitin-like modifier(SUMO)化を受けて転写因子活性を抑制する(102)。したがって SREBP による LDL 受容体の転写活性化はユビキチン化による分解、SUMO 化による活性抑制を受けるため一過的である。

1-2. 抗動脈硬化薬

肝臓におけるコレステロール生合成経路で HMG-CoA 還元酵素は、HMG-CoA からメバロン酸への変換反応を触媒する律速酵素である。最も多く利用されている抗動脈硬化及び高脂血症治療薬であるスタチンは、HMG-CoA 還元酵素を拮抗的に阻害してメバロン酸の生成を抑制することで内因性コレステロールの低下を引き起こす(図 29)。その結果 1-6-2. で述べた SREBP が活性化し LDL 受容体の転写活性化が促進され、肝臓における LDL の取り込み能力が向上することで血中の LDL が減る。血中 LDL が減ることによって変性する LDL も減るためアテローム性動脈硬化症における予防や治療に効果を示す(106、107、108)。HMG-CoA 還元酵素阻害薬は 1973 年に Endo によって *Penicillium citrinum* から初めてメバスタチンが発見され、これまでに 8 種類(ロバスタチン、ピタバスタチン、アトルバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン、ロバスタチン)が製品化している(109)。しかしながらスタチンにも横紋筋融解症、末梢神経障害、ミオパシー、肝機能障害、血小板減少などの副作用が知られており、特に脂溶性の高いセリバ

スタチンは横紋筋融解症による死亡例が確認されたため自主回収された(110、111、112、113)。これらの副作用にはコレステロール生合成における代謝中間体や、代謝中間体の **Farnesyl diphosphate** から別の経路で合成される **Coenzyme Q₁₀** が減少することによって引き起こされると考えられている(114、115)。

スタチンは、抗動脈硬化薬として利用されているが癌の発生や進行を抑制する効果が報告されている(116、117)。スタチンの誘導する抗癌作用には癌細胞特異的なアポトーシスとオートファジーが関与していることが示唆されているが未だに決定的な報告はない。**RID-B** にも肝癌細胞に対する脂質の蓄積など抗動脈硬化薬に似た作用を有していることが明らかになりつつあるので、**RID-B** に抗動脈硬化薬としての作用が認められるのか、スタチンと作用が異なるのか、さらに抗動脈硬化作用を有する構造的特徴を同定することを本研究の2つ目の目的とした。

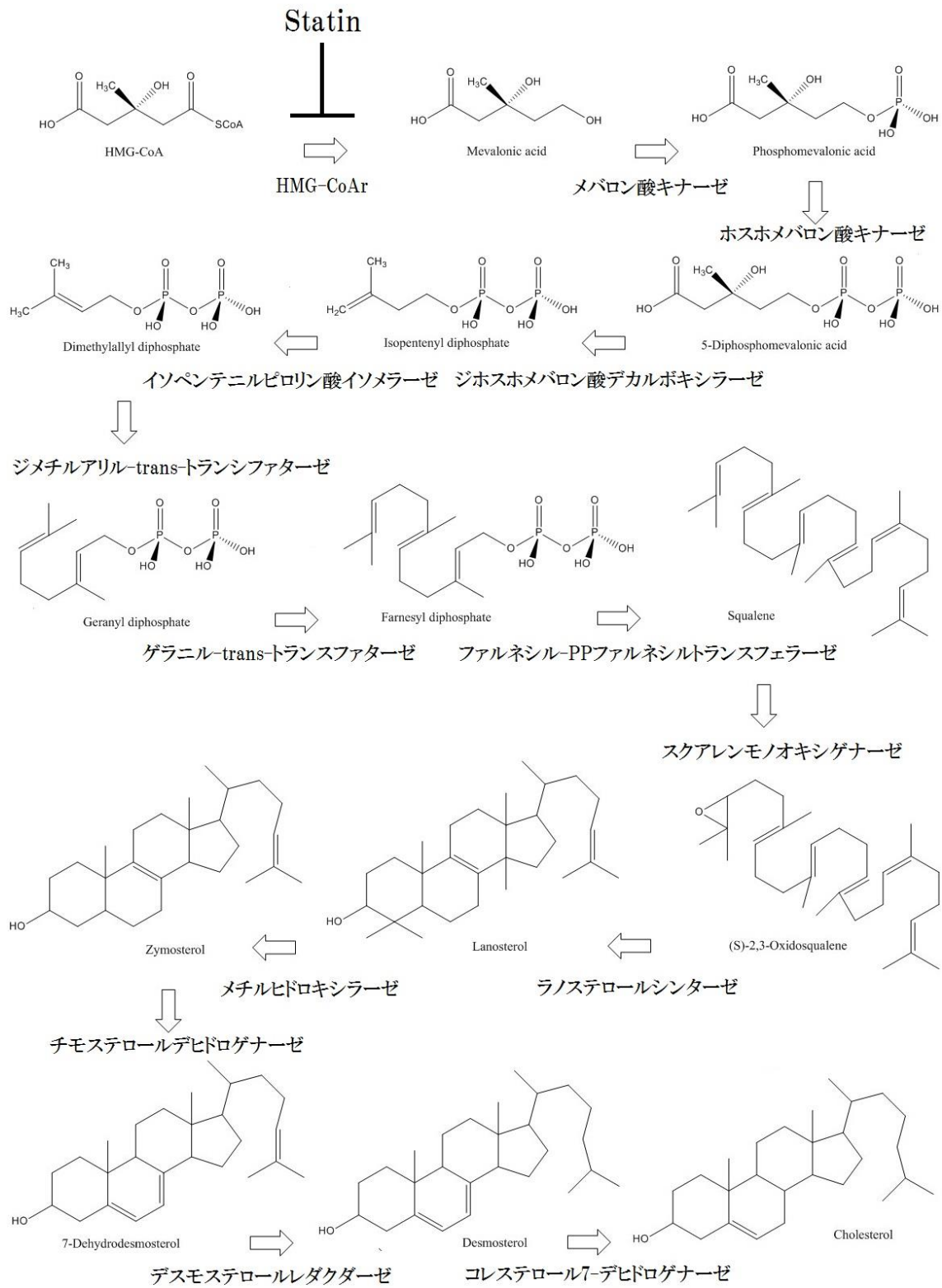


図 29. コレステロール生合成経路

第2部 第2章 RID-Bの抗動脈硬化作用の検討

2-1. 背景

現在の動脈硬化に対する治療戦略として最も有効な手段は、動脈硬化の原因である LDL を効率よく肝細胞に取り込ませることである。スタチンは 1-7. で述べた作用で LDL 受容体の量を増加させて細胞外の LDL 取り込みを促進させることで動脈硬化に効果を発揮する (図 30)。RID-B も細胞傷害が起きない濃度で作用させると肝細胞に対してコレステロール蓄積を誘導することから、細胞外から脂質の取り込みを促進することでコレステロールの蓄積が生じているのではないかと推察し、抗動脈硬化作用を有しているのか検討した。

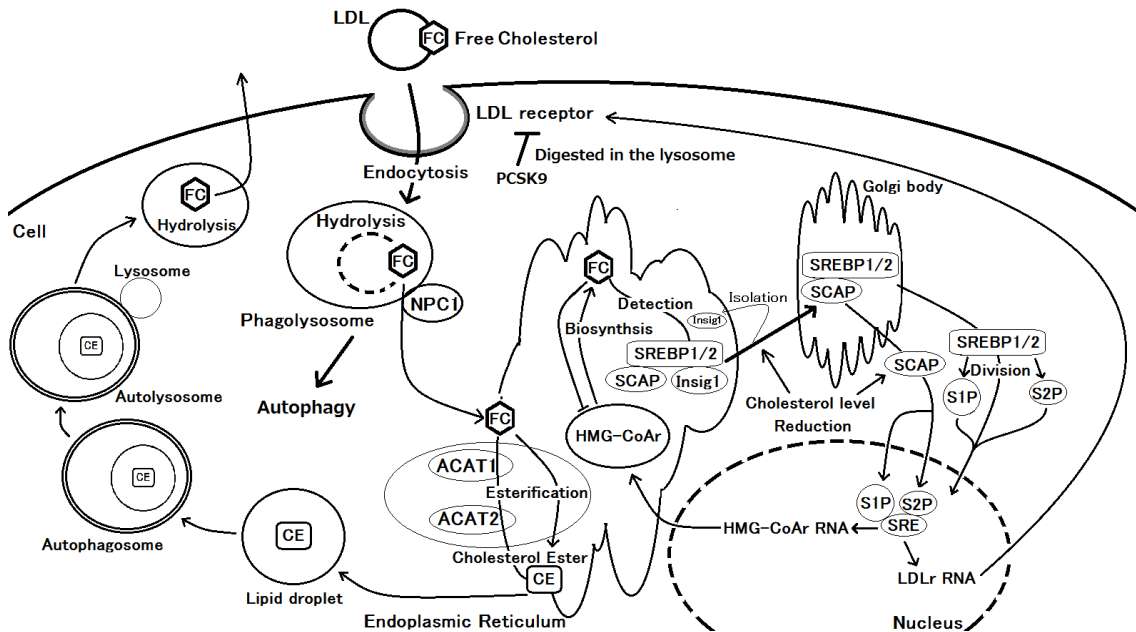


図 30. 肝細胞におけるコレステロール代謝

LDL 受容体に結合した LDL は受容体と共に細胞内にエンドサイトーシスされて取り込まれ、初期エンドソームを形成する。エンドソーム内の LDL はリソソームで分解され、含まれている遊離コレステロールが niemann-pick disease type C1(NPC1)によって小胞体に輸送される。輸送されたコレステロールの一部は acetyl-coenzyme A:cholesterol acetyltransferase(ACAT)1 と ACAT2 によってエステル化され、脂肪滴を形成する。コレステロールの生合成は SREBP によって制御されている。SREBP と SCAP は小胞体膜上で二量体を形成しているが、SCAP には SSD があり、小胞体にコレステロールが多い状態だと、SSD にコレステロールが結合し、INSIG と結合した三量体を形成することで小胞体膜に留まっている。コレステロールが枯渇すると INSIG との結合が解除され SREBP-SCAP 二量体となって小胞輸送によってゴルジ体に輸送される。ゴルジ体で SREBP は切断され、核移行し、LDL 受容体、HMG CoA 合成酵素、HMG CoAr の遺伝子の SRE 配列に結合す

ることで転写活性化される。

2-2. 方法

2-2-1. 細胞培養

実験に用いた HepG2 細胞の培養は 2-2-1.項に詳述した。無血清への馴化は下記の割合で培地内 FBS を希釈していき 24 日目に無血清培地とし、馴化させた(表 II)。無血清培地は DMEM(Sigma) 10 g/L、5 mM HCl(Wako)、3.5 μ M 2-メルカプトエタノール(Wako)、20mg/L ストレプトマイシン(Thermo Scientific)、20U/mL ペニシリン(Thermo Scientific)、2 g/L NaHCO₃ (Wako)、10mg Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Supplement(Sigma) を用い 0.02 μ m フィルターを通して滅菌したものを用いた。

表 II. 無血清培地への馴化手順

日数(総計)	0	4	8	13	18	24
無血清:10%FBS	0:1	3:1	15:1	63:1	255:1	1:0

2-2-2. 細胞に対する薬剤の作用方法

直径 60 mm 細胞培養ディッシュ(Thermo Scientific)を用い、DMEM 培地 5 mL 中に 0.5×10^6 cells/dish となるように播種し、一晚培養してディッシュに接着させた。RID-B 及び RID 構造類縁体、Pitavastatin、Cytochalasin B を 1 μ M で、24 h、CO₂ 濃度 5%のインキュベーター内で 37 $^{\circ}$ C で作用させた。

2-2-3. 共焦点顕微鏡観察

0.01% Poly-L-lysine コートした ϕ 15mm Microscope Cover Glass(松浪硝子)を 12 穴プレート(Corning)内で 1.0×10^5 cells/well に調整した HepG2 細胞を一晚、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で培養し、0.01% Poly-L-lysine コートした ϕ 15mm Microscope Cover Glass に HepG2 細胞を接着させた。そこへ、5-2-2. で示した方法で RID-B を細胞に作用させた。その後、PBS で 2 回洗浄し、0.5% Hoechst 33342(Dojindo)含有培地で 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で 10 min 培養し、核を標識した。その後、PBS で 2 回洗浄し、4% Paraformaldehyde で 20 min 細胞を固定した。PBS で 2 回洗浄し、0.1% Triton X-100 を添加し、7 min 室温で透過処理を行った。PBS で 3 回洗浄し、3% BSA-PBS を加えて 30 min 室温で静置してブロッキング処理をした。1:100 rabbit anti-SREBP(Novus biologicals)を 37 $^{\circ}$ C で 1 h 反応させ、0.5% BSA-PBS で洗浄後 100 倍希釈した Alexa Fluor 488 標識 goat anti-rabbit IgG

Antibody(Life technologies)で 37 °Cの条件下で 1 h 蛍光標識した。

細胞内のコレステロールを染色する際は、RID-B 作用後に PBS で 2 回洗浄し、1.0 nM LysoTracker Red(TaKaRa Bio)含有培地で 37 °C、5% CO₂ 下で 1h 培養し、リソソームを標識した。その後、PBS で 2 回洗浄し、4% Paraformaldehyde で 30 min 細胞を固定した。PBS で 2 回洗浄し、Filipin 溶液(25 µg/mL Filipin III、10% FBS)を 37 °Cで 1 h 反応させ、PBS で洗浄後、共焦点顕微鏡で観察した。

細胞に DiI-LDL(Alfa Aesar)を取り込ませる際は、無血清培地に馴化させた HepG2 細胞に RID-B 作用後の 3 h に 5 µg の DiI-LDL を添加し 3 h 取り込ませた。その後 PBS で 2 回洗浄し、1.0 nM LysoTracker Red(TaKaRa Bio)含有培地で 37 °C、5% CO₂ 下で 1 h 培養し、4% Paraformaldehyde で 30 min 細胞を固定した。PBS で 2 回洗浄し、Filipin 溶液(25 µg/mL Filipin III、10% FBS)を 37 °Cで 1 h 反応させ、PBS で洗浄後、共焦点顕微鏡で観察した。

2-2-4. ウェスタンブロット法

2-2-2. で示した方法で RID-B 及び RID 構造類縁体を細胞に作用させた。作用終了後、上清を除去し、リン酸生理緩衝液(PBS)で洗浄し、可溶化液 (50 mM HEPES(Dojindo), 150 mM NaCl(Wako), 10% glycerol(Wako), 1% Triton X-100(Wako), 1.5 mM MgCl₂(Wako), 1 mM EGTA(Dojindo), 1% protease inhibitor cocktail(Sigma)、pH7.5) で可溶化を行った。細胞は 20 min 氷上に静置し、15 min、4 °C、14,000 *g* で遠心を行い上清をタンパク質サンプルとして回収した。サンプルはドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動法(SDS-PAGE)によりタンパク質を分離した。SDS-PAGE には分離用ゲルとして 12%アクリルアミドゲルを用い、濃縮用ゲルは 4%を用いた。サンプルはそれぞれ 20 µg/well となるように調整し、sample application buffer(10% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl(pH6.8), 20% glycerol, bromophenol blue)をサンプルと等量を加えたのち、100 °C、3 min 加熱した。各 well には 20 µL のサンプルを加え泳動を行った。条件は、50 V, 30 min から 100 V, 90 min を行った。泳動後のゲルは親水処理を施したポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜へタンパク質を転写した。親水処理はメタノールに 30 s, 超純水に 3 min, ブロッキングバッファー(48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycine, 1.3 mM SDS, 20% methanol)に 3 min 順次浸していった。転写後、ブロッキング液(3% skimmed milk)を 1 h 作用させ、1:1000 の割合で希釈した一次抗体液 rabbit anti-LDLr(abcam)、rabbit anti-SREBP(Novus biologicals)、rabbit anti-β-actin(Cell Signaling Technology)を作用させた。二次抗体 anti-rabbit IgG-Horseradish peroxidase(HRP)(Cell Signaling Technology)を 1:2000 の割合で希釈し作用させ、PBS で 5 回洗浄した。洗浄終了後、Pierce ECL Western Blotting Substrate を 1 min 作用させ、ImageQuant LAS 4000(GE Healthcare)によってタンパク質を検出した。

2-2-5. リアルタイム PCR 法

2-2-2. で示した方法で RID-B 及び RID 構造類縁体を細胞に作用させた。作用終了後、上清を除去し、リン酸生理緩衝液(PBS)で洗浄し、TRIzol Reagent(Thermo)を加えてピペティングしてクロロホルム(Wako)を加えて 10 min、4 °C、12,000 g で遠心を行い、水相を回収した。水相に 2-プロパノール(Wako)を加えて 10 min、4 °C、12,000 g で遠心を行い、上清を捨て、75%エタノール(Wako)を加えて 10 min、4 °C、12,000 g で遠心を行い、上清を捨てて沈殿物を超純水に溶かして RNA サンプルとした。RNA サンプルを RT-PCR Master mix(1×PSRT buffer、1 mM dNTP、1 µM Oligo dT Primer、10 U RRI、50 U primescript、1000 ng RNA サンプル)で混ぜ合わせて 42 °C、30 min、70 °C、15 min で RT-PCR を行いサンプルを cDNA にした。qPCR Master mix(400 nM Forward primer、400 nM Reverse primer、1×GeneAce SYBR qPCR Mix α、50 ng cDNA サンプル)を混ぜ合わせて Stage1 (95 °C、10 min)×1 回、Stage2 (95 °C、30 sec→60 °C、60 sec)×45 回、Stage3 (95 °C、15 sec→60 °C、20 sec→95 °C、15 sec)×1 回の 3 step PCR を ABI PRISM 7000(Applied Biosystems)によって反応させ、Stage2 の蛍光を測定した。

表Ⅲ. プライマー一覧

GAPDH	Forward	5V-ATCATCAGCAATGCCTCCTG-3V
	Reverse	5V-CTGCTTCACCACCTTCTTGA-3V
LDLr	Forward	5V-ACTGCGAAGATGGCTCGGATG-3V
	Reverse	5V-CATCTGACCAGTCCCGGCAGT-3V
SREBP-1c	Forward	5V-GCAGGGGTAGGGCCAACGGCCT-3V
	Reverse	5V-CATGTCTTCGAAAGTGCAATCC-3V
SREBP-2	Forward	5V-CTCTGACCAGCACCCACACT-3V
	Reverse	5V-CACACCATTACCAGCCATAAG-3V

2-3. 結果

2-3-1. 細胞内コレステロール蓄積の検出

細胞内の遊離型コレステロールを特異的に染色することができるポリエン系抗真菌薬である Filipin III を用いて細胞内のコレステロールを染色し、局在箇所の候補としてリソソームであると推察し、リソソームを LysoTracker 染色し共焦点顕微鏡を用いて細胞内の局在を観察した。RID-B を作用させるとリソソームにコレステロールが蓄積していることが確認できた(図 31)。

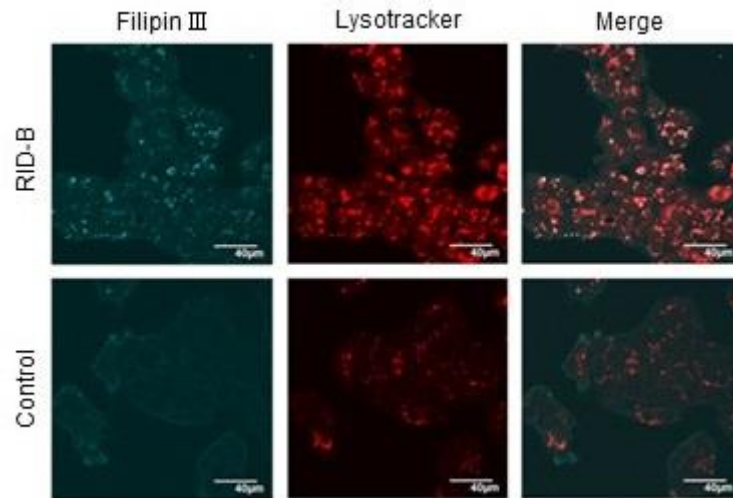


図 31. 細胞内コレステロール蓄積の検出

HepG2 細胞に RID-B を 1 μM で 24 h 作用させた後、Lysotracker 含有培地で培養して Filipin 染色を行い、共焦点顕微鏡により遊離型コレステロールとリソソームの局在を観察した。

2-3-2. 蓄積コレステロールの由来

コレステロールの代謝には細胞外から取り込まれたコレステロールか、細胞内で生合成されたコレステロールがあり、RID-B によって蓄積するコレステロールがどちらに由来するコレステロールなのか明らかにするために、無血清培養することで、細胞外にリポタンパク質が無い状況を作り RID-B がコレステロール蓄積を誘導するのか検討したところ、コレステロールの蓄積は確認できなかった(図 32)。

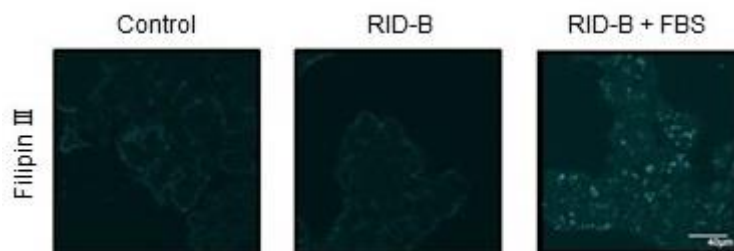


図 32. 蓄積コレステロールの由来

無血清に馴化させた HepG2 細胞に RID-B を 1 μM で 24 h 作用させた後、Filipin 染色を行い、共焦点顕微鏡により遊離型コレステロールを観察した。

2-3-3. LDL 取り込み能解析

コレステロールを最も含有しているリポタンパク質は LDL であり、LDL を取り込む能力を測定するために蛍光色素である DiI を封入した LDL を用いて取り込み能を測定したところ、RID-B を作用させると LDL の取り込みが増強することが確認できた(図 33)。

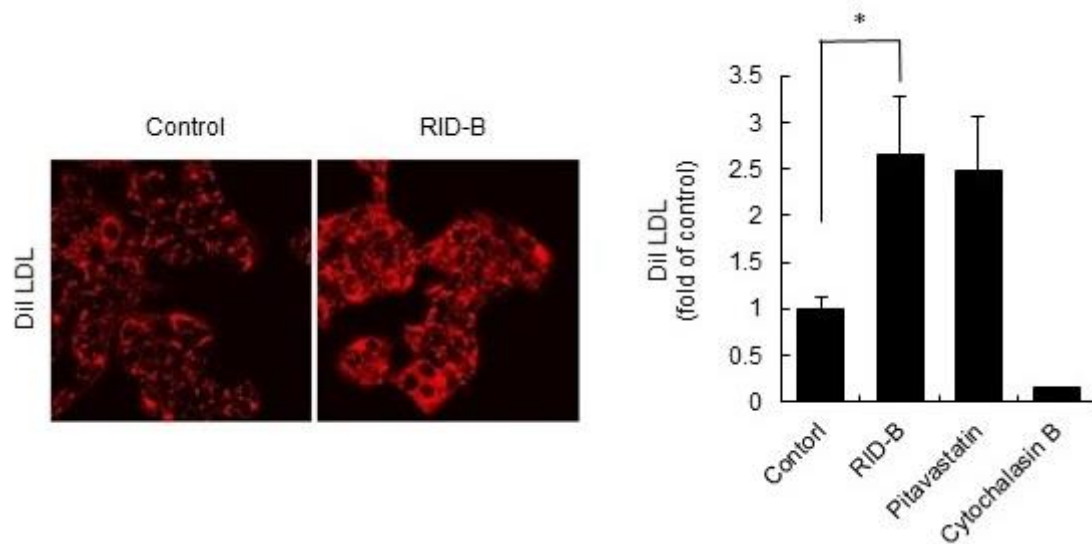


図 33. LDL 取り込み能解析

無血清に馴化させた HepG2 細胞に RID-B 及び Pitavastatin、Cytochalasin B を 1 μ M で 24 h 作用させた後、DiI-LDL を 3 h 取り込ませて共焦点顕微鏡により取り込まれた DiI-LDL を観察した。* p <0.05.

2-3-3-1. LDL 受容体発現の解析

LDL は細胞外から取り込まれるときに受容体を介して取り込まれるため、スタチンなどの抗動脈硬化薬は LDL 受容体を増加させる作用を有している。RID-B の LDL 取り込みの増加も LDL 受容体が関与していると推察し、LDL 受容体の量の時間変化を検討したところ 12 h から 16 h をピークに LDL 受容体の増加が確認できた(図 34)。



図 34. LDL 受容体発現の解析

HepG2 細胞に RID-B を 1 μ M になるように添加し、1 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h 作用させた後、細胞を可溶化させた。12%アクリルアミドゲルを用い、ウェスタンブ

ロット法によって LDL 受容体の量を解析した。

2-3-3-2. LDL 受容体転写活性の解析

RID-B を作用させると LDL 受容体の増加が確認できたことから、この LDL 受容体の増加が mRNA 発現増加によるか検討するために、LDL 受容体の mRNA の発現の時間変化をリアルタイム PCR 法にて定量化した。結果、4 h~8 h 作用時に転写活性化が確認できた(図 35)。

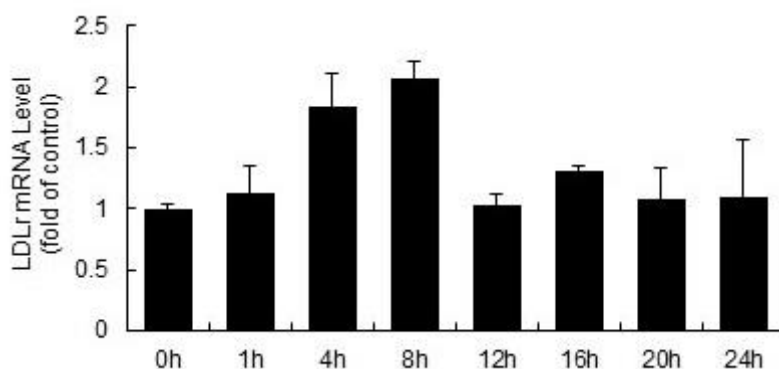


図 35. LDL 受容体転写活性の解析

HepG2 細胞に RID-B を 1 μ M になるように添加し、1 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h 作用させた後、細胞から mRNA を抽出した。リアルタイム PCR 法によって LDLr の mRNA を定量化した。

2-3-4. SREBP 転写活性の解析

LDL mRNA を転写活性化させる転写因子として SREBP が知られており、SREBP も SREBP によって自己転写活性を誘導するため SREBP である SREBP-1c と SREBP-2 の mRNA の発現の時間変化をリアルタイム PCR 法にて定量化した。RID-B を作用させると特に SREBP-2 は 4 h から 8 h をピークに発現の増加が確認できた(図 36)。

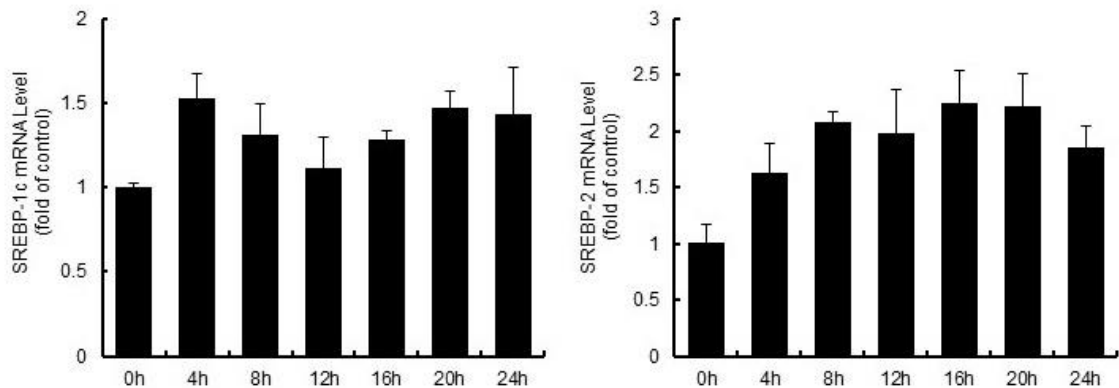


図 36. SREBP 転写活性の解析

HepG2 細胞に RID-B を $1 \mu\text{M}$ になるように添加し、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h 作用させた後、細胞から mRNA を抽出した。リアルタイム PCR 法によって LDLr の mRNA を定量した。

2-3-4-1. SREBP-2 の活性化検出

LDL 受容体 mRNA の増加と SREBP mRNA の増加が確認できたことから SREBP が切断されて転写活性因子である SRE として核周辺へ集積するか免疫蛍光染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。RID-B を作用させると核周辺に集積することが確認できた(図 37)。

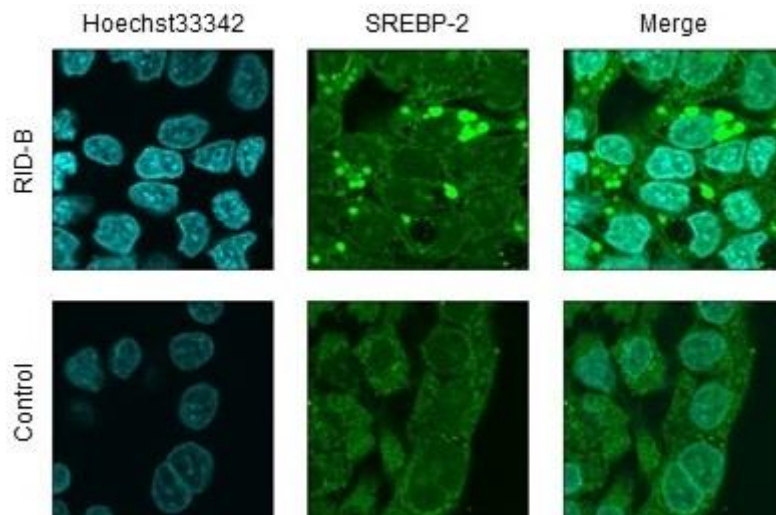


図 37. SREBP-2 の活性化検出

HepG2 細胞に RID-B を $1 \mu\text{M}$ で 24 h 作用させた後、Lysotracker でリソソームを染色し、LAMP1 を免疫蛍光染色して共焦点顕微鏡によりリソソーム形成を観察した。

2-3-4-2. SREBP-2 切断の検出

LDL 受容体 mRNA の増加と SREBP mRNA の増加が確認できたことから SREBP が切断されて転写活性因子である SRE として核周辺へ集積するか免疫蛍光染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。RID-B を作用させると核周辺に集積することが確認できた(図 38)。

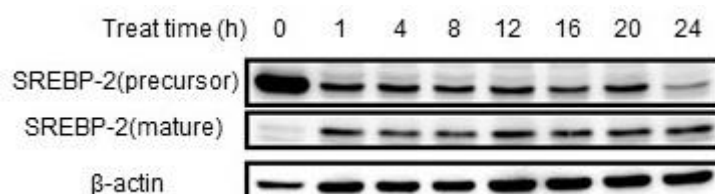


図 38. SREBP-2 切断の検出

HepG2 細胞に RID-B を 1 μ M になるように添加し、1 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h 作用させた後、細胞を可溶化させた。12%アクリルアミドゲルを用い、ウェスタンブロット法によって SREBP-2 の切断状態を解析した。SREBP-2(precursor)は 120 kDa であり、ゴルジ体で切断された SREBP-2(mature)は 68 kDa である。

2-3-5. スタチンとの作用機序の比較

スタチンは HMG-CoA 還元酵素を阻害することでメバロン酸の産生が行われなくなるためコレステロールの生合成が阻害される。そこでメバロン酸を添加することでスタチンを作用させてもコレステロールの生合成が行われるため、代謝産物を添加することでスタチンと作用機序が異なるのか検討した。

2-3-5-1. メバロン酸添加時における LDL 受容体発現の検出

スタチンを作用させてもメバロン酸を添加することでコレステロールの生合成が行われるため抗動脈硬化作用が打ち消されることが知られている。RID-B が HMG-CoA 還元酵素を阻害することで抗動脈硬化作用を有しているのか検討するためにメバロン酸を添加してウェスタンブロット法にて LDL 受容体の量を比較した。結果、メバロン酸を添加すると Pitavastatin の作用が減弱することが明らかになったが RID-B の作用ではメバロン酸を添加しても作用の減弱は確認できなかった(図 39)。

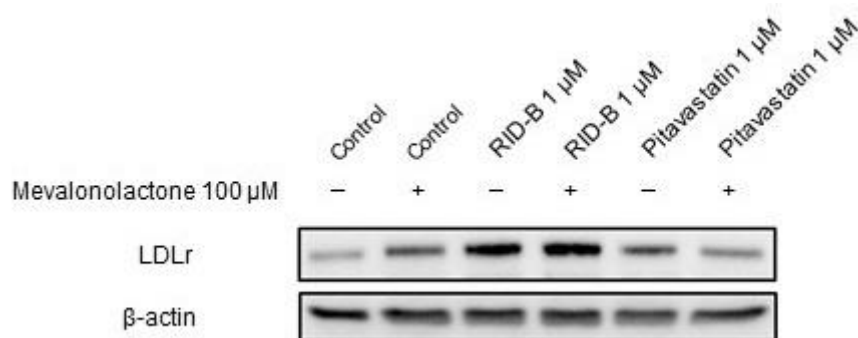


図 39. メバロン酸添加時における LDL 受容体発現の検出

HepG2 細胞に RID-B 及び Pitavastatin を 1 μM 、Mevalonolactone を 100 μM になるように添加し、24 h 作用させた後、細胞を可溶化させた。12%アクリルアミドゲルを用い、ウェスタンブロット法によって LDL 受容体の量を解析した。

2-3-5-2. メバロン酸添加時におけるオートファジー誘導の検出

スタチンはコレステロールの生合成の阻害と共にオートファジーを誘導することが知られている(101、102)。スタチンが誘導するオートファジーは未だにその詳細が明らかになっていないが HMG-CoA 還元酵素を阻害することによってコレステロール生合成の過程で産生されるゲラニルゲラニルニリン酸が枯渇することで誘導されると考えられている(103)。そこでスタチンとの作用を比較するためにメバロン酸添加におけるオートファジー誘導への影響を検討した。結果、メバロン酸を添加すると Pitavastatin 作用では LC3-II の蓄積が control と同レベルまで低下したことからオートファジーがメバロン酸によって阻害されたが、RID-B の誘導するオートファジーはメバロン酸添加によって阻害されなかった(図 40)。

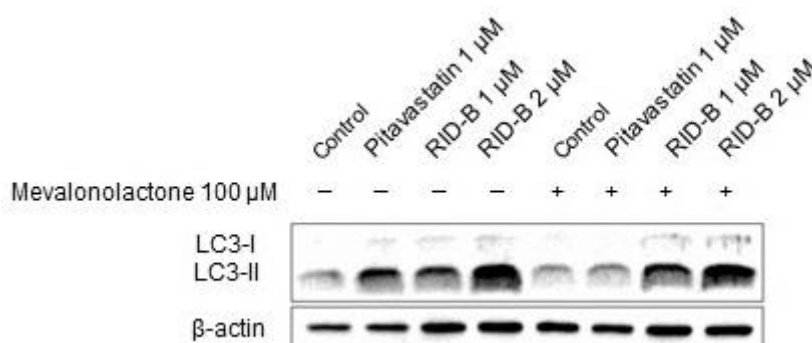


図 40. メバロン酸添加時におけるオートファジー誘導の検出

HepG2 細胞に RID-B 及び Pitavastatin を 1 μM または 2 μM 、Mevalonolactone を 100 μM になるように添加し、24 h 作用させた後、細胞を可溶化させた。15%アクリルアミドゲルを用い、ウェスタンブロット法によって LC3 の遷移状態を解析した。

2-4. 考察

RID-B は抗癌作用があるため抗癌剤として研究されてきた(80、81)。しかし、細胞傷害が起きない低濃度で作用させるとリソソームにコレステロールの蓄積を誘導することから、蓄積したコレステロールの由来を検討したところ細胞外コレステロールであることが明らかとなったことから、RID-B は細胞外のコレステロールのキャリアーであり、リポタンパク質である LDL の取り込みを促進する能力があると示唆された。そこでヒト LDL に赤色蛍光色素である DiI を封入した DiI-LDL を 3 h 取り込ませることで取り込み能を検討したところ、RID-B を作用させると DiI-LDL の取り込み能が亢進していることが明らかとなった。また、Cytochalasin B を添加しエンドサイトーシスを阻害すると DiI-LDL は取り込まれなくなることから DiI-LDL はエンドサイトーシスによって取り込まれていると考えられる。この結果より Filipin 染色により細胞内に蓄積しているように観察できたコレステロールは細胞外から取り込みが促進した結果、観察された現象であり、RID-B には抗動脈硬化作用があることが明らかとなり、抗動脈硬化薬であるスタチンと同様な作用を有していると考えられる。そこで詳細な抗動脈硬化作用の詳細を検討するために LDL の取り込みに関与する LDL 受容体の発現を検討したところ RID-B を作用させることで LDL 受容体の発現が増加することが確認できたことから LDL 受容体の転写活性に関与する SREBP を活性化していると推察された。SREBP はゴルジ体で切断されて SRE となり、自己転写活性化や核周辺への集積が確認できる。そこで SREBP の自己転写活性化をリアルタイム PCR により検討したところ自己転写活性化が確認できた。さらに核周辺への集積を免疫蛍光染色による共焦点顕微鏡観察にて検討したところ核周辺への集積が確認できた。そして SREBP の切断はウェスタンブロットにて検討したところ SREBP の切断が確認できたことから RID-B はスタチンと同様な抗動脈硬化作用を有していると考えられる。また、スタチンは HMG-CoA 還元酵素を阻害することで LDL 受容体を増加させるが RID-B も HMG-CoA 還元酵素を阻害していることで LDL 受容体の増加を引き起こしているのか検討するために、コレステロール生合成において HMG-CoA 還元酵素によって産生されるメバロン酸を添加し、LDL 受容体を増加させるか比較した。Pitavastatin を作用させた HepG2 細胞は LDL 受容体を増加させるが、メバロン酸を添加することで HMG-CoA 還元酵素が阻害されていてもコレステロール生合成が行われるため LDL 受容体の増加が起きないことが確認できた。しかし、RID-B を作用させた HepG2 細胞ではメバロン酸を添加しても LDL 受容体が増加していたことから、HMG-CoA 還元酵素を阻害した結果、LDL 受容体が増えているのではないと示唆された。さらにスタチンとの作用を比較するためにオートファジー誘導に着目した。スタチンはコレステロールの生合成の阻害と共にオートファジーを誘導することが報告されている(118、119)。スタチンが誘導するオートファジーは未だにその詳細が明らかになっていないが HMG-CoA 還元酵素を阻害することによってコレステロール生合成の過程で産生されるグラニルグラニルニリン酸が枯渇することで誘導されると考えられている

(120)。メバロン酸経路が阻害されるとオートファジーが誘導されるため、メバロン酸を添加することでオートファジーは誘導されなくなる。そこで、メバロン酸を添加することで RID-B の誘導するオートファジーへの影響を検討した。Pitavastatin を作用させた HepG2 細胞では LC3-II の蓄積が確認できたことからオートファジーが誘導されていると考えられ、メバロン酸を添加すると減少することからオートファジーが誘導されなくなったと考えられる。RID-B を作用させるとメバロン酸を添加しても LC3-II の蓄積が減少しないことから、メバロン酸を添加してもオートファジーを誘導できていると考えられる。上記の結果と考察より、RID-B の誘導する抗動脈硬化作用はスタチンとは異なり HMG-CoA 還元酵素を阻害していないと考えられ、コレステロールの生合成を阻害している場合は HMG-CoA 還元酵素よりも下流の酵素を阻害しているか、全く異なる経路にて SREBP-2 の活性化を介した LDL 受容体の増加を誘導していると考えられる。

第2部 第3章 総合討論

RID-B はカスパーゼ-3 を活性化しアポトーシスを誘導する。本実験でも肝癌細胞株 HepG2 細胞に対し、RID-B を作用させるとカスパーゼ-3 の開裂を確認した。さらに、PI 染色によって Sub-G1 期細胞の確認や DiO6 法によるミトコンドリア膜電位の低下の確認をした。RID 構造類縁体でもアポトーシス誘導の確認を行ったところ RID-SB10、RID-SB22、RID-SB23、RID-SB17、RID-SB24 においてカスパーゼ-3 を活性化させ、Sub-G1 期の細胞が増え、ミトコンドリアの膜電位が低下していたことからアポトーシスを誘導することが確認できた。RID-SB10~RID-SB24 はフェニル基が無い RID 構造類縁体であり、diethyl (SB10)、dipropyl (SB22)、dibutyl (SB23)、dipentyl (SB17)、dihexyl (SB24) とアルキル鎖が長くなることから脂溶性が高くなる。脂溶性が高くなるほど細胞膜を通過しやすくなるため細胞傷害性が高くなると考え、脂溶性の増加を試みたが細胞傷害性と脂溶性の相関性は得られなかった(87)。しかし、RID-SB25 より脂溶性の高い、RID-SB26、RID-SB27、RID-SB28、RID-SB18 は急激に細胞傷害性が低下した。これは脂溶性が高すぎるため培地に溶けることができているか、分子量が大きくなりすぎ細胞に取り込まれなくなってしまったと考えられる。また、4位のピロリジン側鎖を欠いた RID-S10-(B/Me) では細胞傷害性やアポトーシスの誘導をしないことが確認できた。この結果より RID-B の誘導するアポトーシスにはフェニル基は必要ないが、2本のピロリジン側鎖が必須であることが分かった。

RID-B はオートファジーを誘導する。本実験でもオートファジーを起こしやすく、オートファジー研究で頻繁に利用されている肝癌細胞株 HepG2 細胞に対し、RID-B を作用させると LC3-II の遷移によるオートファジーの誘導が確認できた。興味深いことに RID 構造類縁体作用による LC3-II の遷移を確認したところ細胞傷害性が低い RID-SB9 においても LC3-II の遷移が確認できた。オートファジーとアポトーシスには密接な関係があり、オートファジーによってアポトーシスが誘導されることやアポトーシスに対する抵抗としてオートファジーが誘導されることがあり、細胞死において正負のどちらの役割もこなすことができる。RID-SB9 がオートファジーを誘導していたことから、オートファジーによってアポトーシスが誘導されているのではなく、アポトーシスに対してオートファジーが誘導されている防御機構として働いていることが推察された。RID-SB10~RID-SB24 でもオートファジー誘導が確認できた。しかし RID-S10-(B/Me) では LC3-II の遷移が確認できなかったことからオートファジーの誘導においてもフェニル基は必要ないが、2本のピロリジン側鎖が必須であることが分かった。RID-B 及び RID 構造類縁体を作用させると LC3-II の蓄積が確認できたことからオートファジーが誘導されてオートファゴソームが形成されていることが示唆されたが、オートファジーの分解まで行われているかは区別することができない。そこでシステインプロテアーゼ阻害剤の E64d とアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤の pepstatin A でオートファジーの分解を阻害し、分解の前後を比較することでオートファジーの分解が行われているのか判断するオートファジーフラックスを確認した。RID-B

と RID-SB10 を作用させた HepG2 細胞では E64d と pepstatin A を併用することでより LC3-II が蓄積し、差が確認できた。しかし、RID-SB17 は差が確認できなかった。RID-SB10 と RID-SB17 の作用は異なる可能性が示唆された。また、p62/SQSTM1 は選択的オートファジーにおける分解のターゲットになる。LC3-II と同様に RID-B 及び RID-SB10 を作用させると差が確認できた。RID-B を作用させ LC3-II を免疫蛍光染色し、Lysotracker でリソソームを染色し局在を確認したところ共局在しておりオートリソソームを形成していることが確認できた。また、オートファジーは Atg ファミリーに制御されているため RID-B、RID-SB10 及び RID-SB17 の誘導するオートファジーに Atg5 が関与するのかマウス胎児線維芽細胞株 MEF Atg5^{+/+}細胞と MEF Atg5^{-/-}細胞が誘導するオートファジーを検討した。MEF Atg5^{+/+}細胞でのみ LC3-II の遷移が確認できたことから Atg5 に依存したオートファジーを誘導しており MEF Atg5^{-/-}細胞にはオートファジーを誘導しないと考えられる。通常、オートファジーが誘導されると細胞内の消化活性が向上しリソソーム形成が増加する。RID-SB10 と RID-SB17 の作用を比較するためにリソソームに対する影響を検討した。RID-B と RID-SB10 を HepG2 細胞に作用させるとリソソーム膜構成タンパク質である LAMP1 の増加と Lysotracker で染色される細胞内酸性小胞が増加することから消化活性が向上していることが確認できた。しかし、RID-SB17 を作用させた HepG2 細胞ではリソソーム形成の増加が確認できず、オートファジーフラックスを亢進していないことと関連していると考えられる。リソソームの形成だけでなくリソソーム内消化酵素の 1 つであるカテプシン B の酵素活性とタンパク質量を検討したところ RID-B 及び RID-SB10 では酵素活性の増加と酵素量の増加が確認できたが RID-SB17 では確認できなかった。これらの結果から RID-B 及び RID-SB10 は作用が似ておりオートファジーに伴いリソソーム形成の増加と消化酵素の増加により消化活性が向上しオートファジーを完了していると考えられる。しかし、脂溶性の高い RID-SB17 はリソソームが活性化しないためオートファジーフラックスが亢進せずオートファジー不全を誘導していると考えられる。また、RID-B 及び RID-SB10 を作用させてオートファジーフラックスを検討した際に p62 も差が見られたことからオートファジーの中でも選択的オートファジーを誘導していることが示唆された。

よって RID-B が誘導しているオートファジーが選択的オートファジーであるのか明確にするために RID-B がミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導することに注目した。傷害を受けたミトコンドリアはミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーによって分解されて品質管理されている。RID-B はミトコンドリア傷害を引き起こすことが報告されているためマイトファジーによって傷害を受けたミトコンドリアが分解されていると考えられる。本実験でもミトコンドリア傷害が誘導されているのか MitoSOX Red 染色し、フローサイトメーターで確認したところミトコンドリアから ROS の発生が確認でき、ミトコンドリア傷害の誘導が確認できた。そこで、マイトファジーを検出するため、Mtphagy Dye 染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。RID-B と RID-SB10 はマイトファジーを誘導していることが確認できたが、RID-SB17 を作用させてもマイトファジーの誘導は確

認できなかった。RID-Bの誘導するミトファジーの役割を検討するために HepG2 細胞よりミトファジーを誘導しやすいと知られている Hep3B 細胞に RID-B を作用させたところ HepG2 よりも抵抗性があることが確認できた。さらに E64d と pepstatin A でミトファジーを阻害すると細胞傷害性が増強することが確認できた。そしてミトファジーが誘導できない MEF Atg5^{-/-}細胞には MEF Atg5^{+/+}細胞よりも強力に細胞傷害を誘導することが明らかとなった。これらの結果から RID-B はミトコンドリア傷害を起こし、この傷害に対して防御機構としてミトファジーが誘導されて癌細胞は薬剤に抵抗していると考えられる。RID-SB10 の細胞傷害性は RID-B と同様にミトファジーによって抵抗されていると考えられるが RID-SB17 はミトファジーを誘導しておらずミトコンドリア傷害と共にオートファジー不全を引き起こすためミトファジーによって抵抗を受けずに細胞傷害性を誘導できると考えられる。ここまでの結果より、RID 構造類縁体のオートファジーフラックスにおいて脂溶性が関与していることが考えられる。RID-SB10 と RID-SB17 を比較すると脂溶性が低い方がオートファジーフラックスを亢進しやすくオートファジーによって細胞に抵抗されやすいと考えられ、RID-SB9 はオートファジーを誘導していたがアポトーシスを誘導していなかったのは細胞傷害よりもオートファジーによる防御機構が上回っているためだと推察される。RID-B や RID 構造類縁体はカチオン性両親媒性化合物であり、カチオン性両親媒性化合物はリソソームに集積しリソソームの pH を上昇させることが報告されている(121、122)。リソソームは様々な消化酵素を持っており、カチオン性両親媒性化合物の影響が酵素の最適 pH と一致せず、酵素活性が低下する。カチオン性両親媒性化合物は正電荷であるため負電荷のリソソーム酸性リン脂質のリン酸基に静電相互作用し結合しやすいが、結合及び集積にはリソソーム静電相互作用だけではなく脂溶性が関与することが報告されている(123、124、125)。RID 構造類縁体の中でも脂溶性の高い RID-SB17 はリソソームへ集積しリソソーム阻害を誘導していると考えられる。RID 構造類縁体のアルキル鎖の長さを変えることでオートファジーによる分解能をコントロールできると考えられる(図 41)。そのため、ミトファジーによって抵抗を示す癌細胞には RID-B や脂溶性の低い RID 構造類縁体ではなく RID-SB17 のように脂溶性の高い RID 構造類縁体が有効であると示唆された。また、ミトファジーを阻害すると RID-B の細胞傷害性が増強したことから抗癌治療において低濃度で細胞死を誘導できるようになるため副作用の低下などミトファジー阻害剤の併用の有効性も示唆された。

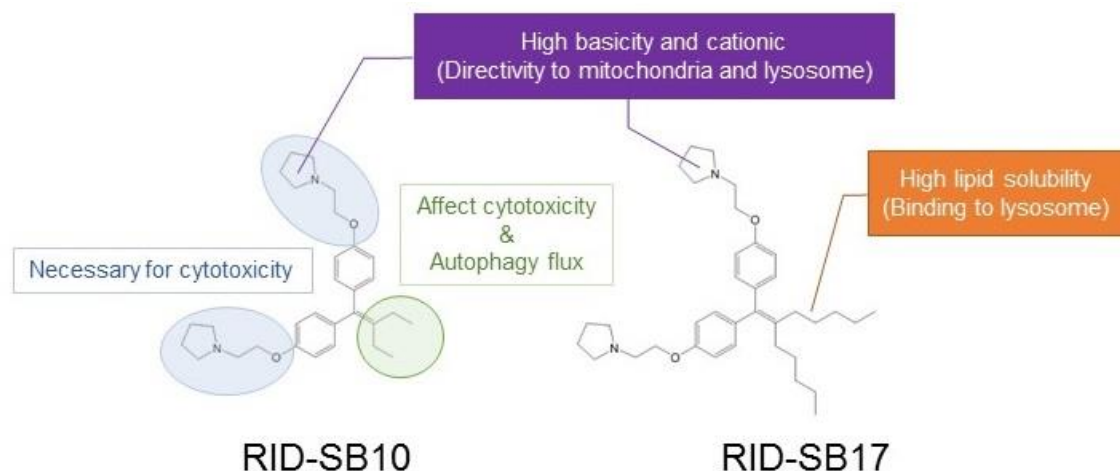


図 41. RID 構造類縁体の構造活性相関

細胞傷害性には 2 本のピロリジン側鎖が必要であり、アルキル鎖の長さを変えることで脂溶性が変わり、オートファジーによる分解能を変えることができる。

TAM は脂質代謝に影響を与えることが報告されている(126)。そこで RID-B を、細胞傷害が起きない低濃度で作用させるとリソソームにコレステロールの蓄積を誘導することが確認できた。蓄積したコレステロールの由来を明らかにするために無血清馴化した HepG2 細胞に細胞外に脂質がない無血清条件化で Filipin 染色をした。無血清条件化では RID-B を作用させてもコレステロールの蓄積が起こらず、蓄積していたコレステロールは細胞外コレステロールであることが明らかとなった。細胞外のコレステロールは不溶性であるためリポタンパク質に包まれた状態で存在している。最もコレステロールを含有しているリポタンパク質は LDL であり、LDL の取り込みがコレステロールの蓄積に関与していると推察し、ヒト LDL に赤色蛍光色素である DiI を封入した DiI-LDL を 3 h 取り込ませることで取り込み能を検討したところ、RID-B を作用させると DiI-LDL の取り込み能が亢進していることが明らかとなった。この結果より Filipin 染色により細胞内に蓄積しているように観察できたコレステロールは細胞外から取り込みが促進した結果、観察された現象であり、RID-B には抗動脈硬化作用があることが明らかとなった。抗動脈硬化薬であるスタチンも LDL の取り込みを促進させる作用があり、同様な作用を有していると考えられる。そこで詳細な抗動脈硬化作用の詳細を検討するために LDL の取り込みに関与する LDL 受容体の発現をウェスタンブロット法及びリアルタイム PCR 法で検討したところ RID-B を作用させることで LDL 受容体のタンパク質、mRNA の発現が増加することが確認できた。LDL 受容体の転写活性に関与する SREBP を活性化していると推察された。SREBP の自己転写活性化をリアルタイム PCR により、核周辺への集積を免疫蛍光染色による共焦点顕微鏡観察にて、SREBP の切断はウェスタンブロットにて検討した。RID-B の作用により SREBP の自己転写活性化、核周辺への集積、SREBP の切断が確認できたことから RID-B はスタ

チンと同様な抗動脈硬化作用を有していると考えられる。また、スタチンは HMG-CoA 還元酵素を阻害することで LDL 受容体を増加させる。RID-B も HMG-CoA 還元酵素を阻害することで LDL 受容体の増加を引き起こしているのか検討するために、コレステロール生合成において HMG-CoA 還元酵素によって産生されるメバロン酸を添加し、LDL 受容体を増加させるか比較した。Pitavastatin を作用させた HepG2 細胞はメバロン酸を添加することで HMG-CoA 還元酵素が阻害されていてもコレステロール生合成が行われるため LDL 受容体の増加が起きないことが確認できた。しかし、RID-B を作用させた HepG2 細胞ではメバロン酸を添加しても LDL 受容体が増加していたことから、HMG-CoA 還元酵素を阻害した結果、LDL 受容体が増えているのではないと示唆された。さらにスタチンとの作用を比較するためにオートファジー誘導に着目した。スタチンはコレステロールの生合成の阻害と共にオートファジーを誘導することが報告されている(118、119)。スタチンが誘導するオートファジーは未だにその詳細が明らかになっていないが HMG-CoA 還元酵素を阻害することによってコレステロール生合成の過程で産生されるグラニルグラニルニリン酸が枯渇することで誘導されると考えられている(120)。メバロン酸経路が阻害されるとオートファジーが誘導されるため、メバロン酸を添加することでオートファジーは誘導されなくなる。そこで、メバロン酸を添加することで RID-B の誘導するオートファジーへの影響を検討した。Pitavastatin を作用させた HepG2 細胞ではオートファジーが誘導されなかった。RID-B を作用させるとメバロン酸を添加してもオートファジーを誘導していることが確認できた。上記の結果と考察より、RID-B の誘導する抗動脈硬化作用はスタチンとは異なり HMG-CoA 還元酵素を阻害していないと考えられ、コレステロールの生合成を阻害している場合は HMG-CoA 還元酵素よりも下流の酵素を阻害しているか、全く異なる経路にて SREBP-2 の活性化を介した LDL 受容体の増加を誘導していると考えられる。近年スタチンは、抗動脈硬化薬としての作用だけではなく癌細胞に対して特異的にアポトーシスを誘導することから抗癌剤としても研究されている(116、117)。コレステロール生合成におけるメバロン酸経路では様々な代謝産物が合成され、中でも Farnesyl diphosphate から別の経路で合成される Coenzyme Q₁₀ はミトコンドリアでの ATP 合成に必要であり、抗酸化機能を有しミトコンドリアにおいて脂質の過酸化に伴う酸化ストレスを軽減しているため、Coenzyme Q₁₀ が減少するとミトコンドリア傷害を受ける(127、128、129、130)。スタチンによってコレステロールの生合成を阻害すると Coenzyme Q₁₀ も減少することが報告されている(131、132、133、134、135)。スタチンはミトコンドリア傷害を誘導することが示唆されており、オートファジーが誘導されることが報告されている(136)。スタチンの抗癌作用はオートファジーを阻害することで増強することも報告されており、スタチンの抗癌作用は RID-B と似ていると考えられる(118、119、120)。RID-B は抗動脈硬化作用があることから HMG-CoA 還元酵素の下流の酵素を阻害することで Coenzyme Q₁₀ の枯渇によってミトコンドリア傷害を誘導し、抗癌作用を示している可能性が示唆された。

よって本実験の結果、RID-B にはミトコンドリア傷害を介した抗癌作用と SREBP-2 の

活性化を介した抗動脈硬化作用があることが明らかになった。

参考文献

- 1) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26:239-257, 1972.
- 2) Flemming W. Studien uber regeneration der gewebe. *Arch Mikr Anat* 24:50-91, 1885.
- 3) Majno G, Joris I: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146:3-15, 1995.
- 4) Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, Hu L, Shao F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature.* 514 (7521):187-192, 2014.
- 5) Hagar JA, Miao EA. Detection of cytosolic bacteria by inflammatory caspases. *Current Opinion in Microbiology.* 17:61-66, 2014.
- 6) Chai J, Shi Y. Apoptosome and inflammasome: conserved machineries for caspase activation. *Natl. Sci. Rev.* 1(1):101-118, 2014.
- 7) Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, Kroemer G. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 92(13):1042-1053, 2000.
- 8) Salah-eldin A, Inoue S, Tsuda M, Matsuura A. Abnormal intracellular localization of Bax with a normal membrane anchor domain in human lung cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res.* 91(12):1269-1277, 2000.
- 9) Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 74(4):609-619, 1993.
- 10) Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, Archimbaud E, Magaud JP, Guyotat D. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood.* 81(11):3091-3096, 1993.
- 11) Miyashita T, Reed JC. bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.* 52(19):5407-5411, 1992.
- 12) Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, Yoshida K, Bharti A, Yuan ZM, Saxena S, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(13):6939-6942, 1997.
- 13) Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 75(2):241-51, 1993.
- 14) Korsmeyer SJ, Yin XM, Oltvai ZN, Veis-Novack DJ, Linette GP. Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochim Biophys Acta.* 1271(1):63-66, 1995.

- 15) Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*. 54:1024-1033, 2005.
- 16) Chauhan D, Pandey P, Ogata A, Teoh G, Krett N, Halgren R, Rosen S, Kufe D, Kharbanda S, Anderson K. Cytochrome c-dependent and -independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem*. 272(48):29995-29997, 1997.
- 17) Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 14(22):5579-5588, 1995.
- 18) Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365, 1997.
- 19) Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 19(1):107-120, 2012.
- 20) Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Baehrecke EH, Bazan NG, Bertrand MJ, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Campanella M, Candi E, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, Di Daniele N, Dixit VM, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Fimia GM, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Joseph B, Jost PJ, Kaufmann T, Kepp O, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lugli E, Madeo F, Malorni W, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Meier P, Melino S, Mizushima N, Moll U, Muñoz-Pinedo C, Nuñez G, Oberst A, Panaretakis T, Penninger JM, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Ravichandran KS, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Shi Y, Simon HU, Stockwell BR, Szabadkai G, Tait SW, Tang HL, Tavernarakis N, Tsujimoto Y, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Villunger A, Wagner EF, Walczak H, White E, Wood WG, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*. 22(1):58-73, 2015.
- 21) Zhifen Y, Daniel JK. Mammalian autophagy core molecular machinery and

- signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biol.* 22:124-131, 2010.
- 22) Jan AKW. Kiel Autophagy in unicellular eukaryotes. *The Royal Society Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365:819-830, 2010.
- 23) Christian de D, Robert W. Functions of Lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28:435-492, 1966.
- 24) Russell LD, Pierre B, Christian de D. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J. Cell Biol.* 35:11-16, 1967
- 25) Robert PB, Ewald RW. A morphometric study of the removal of phenobarbital-induced membranes from hepatocytes after cessation of treatment. *J. Cell boil.* 56(3):746-761, 1973.
- 26) Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 192:245-250, 1997.
- 27) Mortimore GE, Kadowaki M. Regulation of protein metabolism in liver in *Handbook of Physiology.* Oxford University Press. 7(2):553-577, 2001.
- 28) Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27:107-1032, 2011.
- 29) Daniel JK, James MC, William AD, Scott DE, Sakai Y, Ignacio VS, Andrei S, Suresh S, Michael T, Marten V, Ohsumi Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell.* 5(4):539-545, 2003
- 30) Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(7):458-467, 2009.
- 31) Joung I, Strominger JL, Shin J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:5991-5995, 1996.
- 32) Komatsu, M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell.* 131(6):1149-1163, 2007.
- 33) Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 282(33):24131-24145, 2007.
- 34) Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of

Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12:213-223, 2010.

35) Lau A, Wang XJ, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, Sun Z, White E, Zhang DD. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol. Cell Biol.* 30(13):3275-3285, 2010.

36) Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Øvervatn A, McMahon M, Hayes JD, Johansen T. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J. Biol. Chem.* 285(29):22576-22591, 2010.

37) Ramesh BJ, Lamar Seibenhener M, Peng J, Strom AL, Kemppainen R, Cox N, Zhu H, Wooten MC, Diaz-Meco MT, Moscat J, Wooten MW. Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration. *J. Neurochem.* 106(1):107-120, 2008.

38) Clark SL Jr. J. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *Biophys. Biochem. Cytol.* 3(3):349-362, 1957.

39) Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183:795-803, 2008.

40) Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8(1):e1000298, 2010.

41) Kondapalli C, Kazlauskaitė A, Zhang N, Woodroof HI, Campbell DG, Gourlay R, Burchell L, Walden H, Macartney TJ, Deak M, Knebel A, Alessi DR, Muqit MM. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol.* 2(5):120080, 2012.

42) Shiba FK, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, Hattori N. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci. Rep.* 2:1002, 2012.

43) Jin SM, Lazarou M, Wang C, Kane LA, Narendra DP, Youle RJ. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J. Cell Biol.* 191:933-942, 2010.

44) Meissner C, Lorenz H, Weihofen A, Selkoe DJ, Lemberg MK. The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *J. Neurochem.* 117:856-867, 2011.

45) Lazarou M, Jin SM, Kane LA, Youle RJ. Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev. Cell.* 22:320-333, 2012.

46) Okatsu K, Uno M, Koyano F, Go E, Kimura M, Oka T, Tanaka K, Matsuda N. A

dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *J. Biol. Chem.* 288:36372-36384, 2013.

47) Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 458(7242):1131-1135, 2009.

48) Fujimoto T, Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol.* 130(2):263-279, 2008.

49) Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res.* 48(12):2547-2559, 2007.

50) Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin. Cancer Res.* 9:1980-1989, 2003.

51) Kuiper GG, Enmark E, Peltö HM, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:5925-5930, 1996.

52) Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature.* 320:134-139, 1986.

53) Dahlman WK, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol. Rev.* 58:773-781, 2006.

54) Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet.* 351(9114):1451-1467, 1998.

55) Jordan VC. Metabolites of tamoxifen in animals and man identification, pharmacology, and significance. *Breast Cancer Res. Treat.* 2:123-138, 1982.

56) Coezy E, Borgna JL, Rochefort H. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res.* 42:317-323, 1982.

57) Robertson DW, Katzenellenbogen JA, Long DJ, Rorke EA, Katzenellenbogen BS. Tamoxifen antiestrogens. A comparison of the activity, pharmacokinetics, and metabolic activation of the cis and trans isomers of tamoxifen. *J Steroid Biochem.* 16:1-13, 1982.

58) Buck MB, Coller JK, Mürdter TE, Eichelbaum M, Knabbe C. TGFβ2 and Tβ2RII are valid molecular biomarkers for the antiproliferative effects of tamoxifen and tamoxifen metabolites in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 107:15-24, 2008.

59) Ferlini C, Scambia G, Marone M, Distefano M, Gaggini C, Ferrandina G, Fattorossi A, Isola G, Panici PB, Mancuso S. Tamoxifen induces oxidative stress and apoptosis in

- oestrogen receptor-negative human cancer cell lines. *Br. J. Cancer.* 79:257-63, 1999.
- 60) Kang Y, Cortina R, Perry RR. Role of c-myc in tamoxifen-induced apoptosis estrogen-independent breast cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 88:279-84, 1996.
- 61) Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell.* 23:927-937, 1998
- 62) Boocock DJ, Brown K, Gibbs AH, Sanchez E, Turteltaub KW, White IN. Identification of human CYP forms involved in the activation of tamoxifen and irreversible binding to DNA. *Carcinogenesis.* 23:1897-1901, 2002.
- 63) Collier JK, Krebsfaenger N, Klein K, Wolbold R, Nussler A, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, Mürdter TE. Large interindividual variability in the in vitro formation of tamoxifen metabolites related to the development of genotoxicity. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 57:105-111, 2004.
- 64) Crewe HK, Notley LM, Wunsch RM, Lennard MS, Gillam EM. Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab. Dispos.* 30:869-874, 2002.
- 65) Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310:1062-1075, 2004.
- 66) Johnson MD, Zuo H, Lee KH, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* 85:151-159, 2004.
- 67) Collier JK, Krebsfaenger N, Klein K, Endrizzi K, Wolbold R, Lang T, Nüssler A, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, Mürdter TE. The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the 21 potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 54:157-167, 2002.
- 68) Crewe HK, Ellis SW, Lennard MS, Tucker GT. Variable contribution of cytochromes P450 2D6, 2C9 and 3A4 to the 4-hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 53:171-178, 1997.
- 69) Dehal SS, Kupfer D. CYP2D6 catalyzes tamoxifen 4-hydroxylation in human liver. *Cancer Res.* 57:3402-3406, 1997.
- 70) Mani C, Gelboin HV, Park SS, Pearce R, Parkinson A, Kupfer D. Metabolism of the antimammary cancer antiestrogenic agent tamoxifen. I. Cytochrome P-450-catalyzed

- N-demethylation and 4-hydroxylation. *Drug Metab. Dispos.* 21:645-656, 1993.
- 71) Kim SY, Suzuki N, Santosh Laxmi YR, Rieger R, Shibutani S. Alpha-hydroxylation of tamoxifen and toremifene by human and rat cytochrome P450 3A subfamily enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 16:1138-1144, 2003.
- 72) Notley LM, Crewe KH, Taylor PJ, Lennard MS, Gillam EM. Characterization of the human cytochrome P450 forms involved in metabolism of tamoxifen to its alpha-hydroxy and 4-dihydroxy derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* 18:1611-1618, 2005.
- 73) Hodgson E, Rose RL, Cao Y, Dehal SS, Kupfer D. Flavin-containing monooxygenase isoform specificity for the N-oxidation of tamoxifen determined by product measurement and NADPH oxidation. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14:118-120, 2000.
- 74) Parte P, Kupfer D. Oxidation of tamoxifen by human flavin-containing monooxygenase (FMO) 1 and FMO3 to tamoxifen-N-oxide and its novel reduction back to tamoxifen by human cytochromes P450 and hemoglobin. *Drug Metab. Dispos.* 33:1446-1452, 2005.
- 75) Nishiyama T, Ogura K, Nakano H, Ohnuma T, Kaku T, Hiratsuka A, Muro K, Watabe T. Reverse geometrical selectivity in glucuronidation and sulfation of cis- and trans-4-hydroxytamoxifens by human liver UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. *Biochem. Pharmacol.* 63:1817-1830, 2002.
- 76) Ogura K, Ishikawa Y, Kaku T, Nishiyama T, Ohnuma T, Muro K, Hiratsuka A. Quaternary ammonium-linked glucuronidation of trans-4-hydroxytamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, by human liver microsomes and UDPglucuronosyltransferase 1A4. *Biochem. Pharmacol.* 71:1358-1369, 2006.
- 77) Sun D, Sharma AK, Dellinger RW, Blevins-Primeau AS, Balliet RM, Chen G, Boyiri T, Amin S, Lazarus P. Glucuronidation of active tamoxifen metabolites by the human UDP glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Dispos.* 35:2006-2014, 2006.
- 78) Falany JL, Pilloff DE, Leyh TS, Falany CN. Sulfation of raloxifene and 4-hydroxytamoxifen by human cytosolic sulfotransferases. *Drug Metab. Dispos.* 34:361-368, 2006.
- 79) Shiina I, Sano Y, Nakata K, Kikuchi T, Sasaki A, Ikekita M, Nagahara Y, Hasome Y, Yamori T, Yamazaki K. Synthesis and pharmacological evaluation of the novel pseudo-symmetrical tamoxifen derivatives as anti-tumor agents. *Biochem. Pharmacol.* 75:1014-1026, 2008.
- 80) Nagahara Y, Shiina I, Nakata K, Sasaki A, Miyamoto T, Ikekita M. Induction of mitochondria-involved apoptosis in estrogen receptor-negative cells by a novel tamoxifen derivative, ridaifen-B. *Cancer Sci.* 99:608-614, 2008.
- 81) Nagahara Y, Takeyoshi M, Sakemoto S, Shiina I, Nakata K, Fujimori K, Wang Y,

- Umeda E, Watanabe C, Uetake S, Yamori T, Dan S, Yoshimi Y, Shinomiya T, Ikekita M. Novel tamoxifen derivative Ridaifen-B induces Bcl-2 independent autophagy without estrogen receptor involvement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435:657-663, 1999.
- 82) Tsujimoto Y, Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J. Cell Physiol.* 195:158-167, 2003.
- 83) Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry.* 13:795-808, 1992.
- 84) Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry.* 35:181-95, 1999.
- 85) Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 16:395-419, 1998.
- 86) Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene.* 17:3225-3236, 1998.
- 87) Nakai J, Kawada K, Nagata S, Kuramochi K, Uchiro H, Kobayashi S, Ikekita M. A novel lipid compound, epolactaene, induces apoptosis: its action is modulated by its side chain structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1581:1-10, 2002.
- 88) Iwashita H, Torii S, Nagahora N, Ishiyama M, Shioji K, Sasamoto K, Shimizu S, Okuma K. Live Cell Imaging of Mitochondrial Autophagy with a Novel Fluorescent Small Molecule. *ACS Chem. Biol.* 12(10):2546-2551, 2017.
- 89) Hoshino A, Mita Y, Okawa Y, Ariyoshi M, Iwai-Kanai E, Ueyama T, Ikeda K, Ogata T, Matoba S. Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. *Nat. Commun.* 4:2308, 2013.
- 90) Schwartz CJ, Mitchell JR. The morphology, terminology and pathogenesis of arterial plaques. *Postgrad. Med. J.* 38:25-34, 1962.
- 91) Gofman JW, Lindgren FT, Elliott H. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J. Biol. Chem.* 179(2):973-9, 1949.
- 92) Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell.* 39(1):27-38, 1984.
- 93) Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell.* 75:187-197, 1993.
- 94) Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:11603-11607, 1993.
- 95) Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein J.L. SREBP-1, a membrane-bound

- transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*. 77:53-62, 1994.
- 96) Hua X, Nurturff A, Goldstein JL, Brown MS. Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell*. 87:415-426, 1996.
- 97) Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 96:11041-11048, 1999.
- 98) Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 124:35-46, 2006.
- 99) Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS. Insig required for sterol-mediated inhibition of SCAP/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* 280:26483-26490, 2005.
- 100) Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, Brown MS. Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and control lipid composition of animal cells. *Mol. Cell*. 2:505-514, 1998.
- 101) Rawson RB, Zelenski NG, Nijhawan D, Ye J, Sakai J, Hasan MT, Chang TY, Brown MS, Goldstein JL. Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol. Cell*. 1:47-57, 1997.
- 102) Sato R, Inoue J, Kawabe Y, Kodama T, Takano T, Maeda M. Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* 271:26461-26464, 1996.
- 103) Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109(9):1125-1131, 2002.
- 104) Hirano Y, Yoshida M, Shimizu M, Sato R. SREBPs are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26S proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 276:36431-36437, 2001.
- 105) Giandomenico V, Simonsson M, Gronroos E, Ericsson J. Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Mol. Cell Biol.* 23:2587-2599, 2003.
- 106) Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*. 279(20):1615-1622, 1998.
- 107) Havel RJ, Rapaport E. Management of primary hyperlipidemia. *N. Engl. J. Med.*

332(22):1491-1498, 1995.

108) Jukema JW, Bruschke AV, van Boven AJ, Reiber JH, Bal ET, Zwinderman AH, Jansen H, Boerma GJ, van Rappard FM, Lie KI. Effects of lipid lowering by pravastatin on progression and regression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to moderately elevated serum cholesterol levels. The Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS). *Circulation*. 91(10):2528-2540, 1995.

109) Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* 29(12):1346-1348, 1976.

110) Weise WJ, Possidente CJ. Fatal rhabdomyolysis associated with simvastatin in a renal transplant patient. *Am. J. Med.* 108(4):351-352, 2000.

111) Alexandridis G, Pappas GA, Elisaf MS. Rhabdomyolysis due to combination therapy with cerivastatin and gemfibrozil. *Am. J. Med.* 109(3):261-262, 2000.

112) Kubota T, Fujisaki K, Itoh Y, Yano T, Sendo T, Oishi R. Apoptotic injury in cultured human hepatocytes induced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 67(12):2175-2186, 2004.

113) Charatan F. Bayer decides to withdraw cholesterol lowering drug. *Br. Med. J.* 323(7309):359, 2001

114) Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Díaz C, Hernández G, Egido J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ. Res.* 83(5):490-500, 1998.

115) Nakagawa H, Mutoh T, Kumano T, Kuriyama M. Tyrosine phosphorylation of the catalytic subunit p110 of phosphatidylinositol-3 kinase induced by HMG-CoA reductase inhibitor inhibits its kinase activity in L6 myoblasts. *FEBS Lett.* 508(1):53-56, 2001.

116) Kobayashi Y, Kashima H, Wu RC, Jung JG, Kuan JC, Gu J, Xuan J, Sokoll L, Visvanathan K, Shih IeM, Wang TL. Mevalonate Pathway Antagonist Suppresses Formation of Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma and Ovarian Carcinoma in Mouse Models. *Clin. Cancer Res.* 21(20):4652-4662, 2015.

117) Martirosyan A, Clendening JW, Goard CA, Penn LZ. Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance. *BMC Cancer.* 10:103, 2010.

118) Parikh A, Childress C, Deitrick K, Lin Q, Rukstalis D, Yang W. Statin-induced autophagy by inhibition of geranylgeranyl biosynthesis in prostate cancer PC3 cells. *Prostate.* 70(9):971-981, 2010.

119) Toepfer N, Childress C, Parikh A, Rukstalis D, Yang W. Atorvastatin induces

- autophagy in prostate cancer PC3 cells through activation of LC3 transcription. *Cancer Biol. Ther.* 12(8):691-699, 2011.
- 120) Araki M, Maeda M, Motojima K. Hydrophobic statins induce autophagy and cell death in human rhabdomyosarcoma cells by depleting geranylgeranyl diphosphate. *Eur. J. Pharmacol.* 674(2-3):95-103, 2012.
- 121) Ishizaki J, Yokogawa K, Ichimura F, Ohkuma S. Uptake of imipramine in rat liver lysosomes in vitro and its inhibition by basic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294:1088-1098, 2000.
- 122) Tietz PS, Yamazaki K, LaRusso NF. Time-dependent effects of chloroquine on pH of hepatocyte lysosomes. *Biochem. Pharmacol.* 40:1419-1421, 1990.
- 123) Kubo M, Gardner MF, Hostetler KY. Binding of propranolol and gentamicin to small unilamellar phospholipid vesicles. Contribution of ionic and hydrophobic forces. *Biochem. Pharmacol.* 35:3761-3765, 1986.
- 124) Kuroda Y, Watanabe Y, Shibukawa A, Nakagawa T. Role of phospholipids in drug-LDL bindings as studied by high-performance frontal analysis/capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30:1869-1877, 2003.
- 125) Ma JY, Ma JK, Weber KC. Fluorescence studies of the binding of amphiphilic amines with phospholipids. *J. Lipid Res.* 26:735-744, 1985.
- 126) Vinitha R, Thangaraju M, Sachdanandam P. Effect of tamoxifen on lipids and lipid metabolising marker enzymes in experimental atherosclerosis in Wistar rats. *Mol. Cell Biochem.* 168(1-2):13-19, 1997.
- 127) Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* 20(6):591-598, 2001.
- 128) Rotig A, Appelkvist EL, Geromel V, Chretien D, Kadhon N, Edery P, Lebeideau M, Dallner G, Munnich A, Ernster L, Rustin P. Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet.* 356(9227):391-395, 2000.
- 129) Boitier E, Degoul F, Desguerre I, Charpentier C, François D, Ponsot G, Diry M, Rustin P, Marsac C. A case of mitochondrial encephalomyopathy associated with a muscle coenzyme Q10 deficiency. *J. Neurol. Sci.* 156(1):41-46, 1998.
- 130) Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta.* 1271(1):195-204, 1995.
- 131) Folkers K, Langsjoen P, Willis R, Richardson P, Xia LJ, Ye CQ, Tamagawa H. Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87(22):8931-8934, 1990.
- 132) Colquhoun DM, Jackson R, Walters M, Hicks BJ, Goldsmith J, Young P, Strakosch

- C, Kostner KM. Effects of simvastatin on blood lipids, vitamin E, coenzyme Q10 levels and left ventricular function in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* 35(4):251-258, 2005.
- 133) Mabuchi H, Higashikata T, Kawashiri M, Katsuda S, Mizuno M, Nohara A, Inazu A, Koizumi J, Kobayashi J. Reduction of serum ubiquinol-10 and ubiquinone-10 levels by atorvastatin in hypercholesterolemic patients. *J. Atheroscler. Thromb.* 12(2):111-119, 2005.
- 134) Watts GF, Castelluccio C, Rice-Evans C, Taub NA, Baum H, Quinn PJ. Plasma coenzyme Q (ubiquinone) concentrations in patients treated with simvastatin. *J. Clin. Pathol.* 46(11):1055-1057, 1993.
- 135) Ghirlanda G, Oradei A, Manto A, Lippa S, Uccioli L, Caputo S, Greco AV, Littarru GP. Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Pharmacol.* 33(3):226-229, 1993.
- 136) Andres AM, Hernandez G, Lee P, Huang C, Ratliff EP, Sin J, Thornton CA, Damasco MV, Gottlieb RA. Mitophagy is required for acute cardioprotection by simvastatin. *Antioxid. Redox Signal.* 21(14):1960-1973, 2014.

謝辞

本研究は東京電機大学において2014年4月より2019年2月にわたり行なったもので、その間終始懇篤な指導を与えられた東京電機大学理工学部細胞生化学研究室の長原礼宗教授に対し、ここに謹んで感謝の意を表します。なお研究に際し多大の便宜を与えられた東京電機大学理工学部の川井悟教授、田中真人教授、刀祢重信特任教授、足立直也准教授、四宮貴久先生また第1部の第2章で述べたRID-Bとその類縁体を提供して下さった東京理科大学理学部応用化学科の椎名勇教授に深厚なる謝意を表します。最後に、研究遂行を支え、応援してくれた両親に心から感謝いたします。