

腹水癌細胞のエネルギー代謝に関する研究*

第 3 編

腹水癌細胞における脂質過酸化反応と脂肪酸組成

岡山大学医学部病理学教室 (主任: 妹尾左知丸教授)

西 風 桂 子

〔昭和41年5月23日受稿〕

先に著者は Ehrlich 腹水癌細胞および AH-130 腹水肝癌細胞のミトコンドリアを正常な機能を営む状態で分離する事に成功し、そのミトコンドリアは ADP/O 比も呼吸調節も正常ラットあるいはマウス肝のミトコンドリアのそれにほぼ近く、又ピリジヌクレオチドの酸化還元反応も正常ラットミトコンドリアのそれと殆んど変る所なく、さらにミトコンドリアエネルギー代謝調節に共役して示される low amplitude swelling²⁾ もその度合はひくいながらも認められる事を明らかにした。しかし、このような正常な機能を保持した腹水癌細胞のミトコンドリアでは、 Fe^{++} 、GSH+GSSG、アスコルビン酸等の薬物で誘起されるミトコンドリア内の脂質過酸化反応は殆んど起らず、従つてそれに伴うミトコンドリア容積変化も殆んど認められない事を明らかにし³⁾、この様な特異性はミトコンドリア膜を構成する脂質組成の変動に起因すると考えられた。従つてこの特異性の究明にはミトコンドリア膜の脂質組成の分析が必要であると考えられるが、intact なミトコンドリアを大量に分離する方法の確立にいたつてない現在、腹水癌細胞ミトコンドリア自体の脂質組成を分析する事は極めて困難である。然しミトコンドリア脂質組成は多くの場合細胞自体の脂質組成に近値を示すので、細胞全体の脂質過酸化反応および脂質組成について研究する事は、少なからずミトコンドリア内でのこれらの現象を究明する一つの助けになると考えられる。本論文ではこの様な見解の下で、Ehrlich 腹水癌、AH-130 腹水肝癌細胞とラットやマウスの種々臓器における Fe^{++} 、GSH+GSSG、アスコルビン酸等で誘起される脂質過酸化反応を比較検討し、さらに一部のものの脂肪酸組成の分析を行ない、癌細胞では脂質過酸化反応が低下し、それが高度不飽和脂肪酸の減少に原因する事を示唆する

結果を得たので報告する。

実験材料および方法

使用した動物は DDN 系マウス、および白鼠でこれらの脳、心、腎、肝、脾を断頭放血後直ちに取出し、冷却した 0.15M KCl-0.02M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に入れ、ポッターガラスホモゲナイザーにてホモゲネートを作り、その一定量をさらに上記緩衝液で稀釈し、それに一定量の GSH+GSSG や、 Fe^{++} や、アスコルビン酸を添加し、25°C に incubate 後形成された脂質過酸化物量を測定した⁴⁾。

Ehrlich 腹水癌細胞および AH-130 腹水肝癌細胞は移植後 1 週間ないし 9 日目の細胞を Scholefield⁵⁾ の方法で分離し、血球の混入を除き、テフロンホモゲナイザーにてホモゲネートとし、上記組織の場合と同様な方法で脂質過酸化反応を測定した。なお測定値は TBA color 反応による混定値をホモゲネート mg 蛋白当り形成されたマロンアルデヒド (MA) のモル数で示した。

ミトコンドリアの分離は前報¹⁾と同様である。脂質過酸化反応の基質となる細胞内高度不飽和脂肪酸組成は Folch^ら⁷⁾の方法に応じ、総脂質を抽出、 N_2 気流中で乾燥し、それに 20ml の 3 規定 NaOH-ethanol を加え、4 時間リフラックスを行つて完全鹼化し脂肪酸を分離した。この脂肪酸は N_2 気流中で乾燥し、ジアゾメタンにてメチルエステルとしてガスクロマトグラフにて分析した。用いたガスクロマトグラフは島津製モデル Ge-IB 型の水素炎ディテクターをもつ高感度の装置で、カラムは 60~80 ムッシュの 10% の succinate polyester を使用した。

蛋白質量の測定は Kjeldahl 法⁸⁾によつた。なお各実験に使用した試薬は総べて試薬特級で、それらは

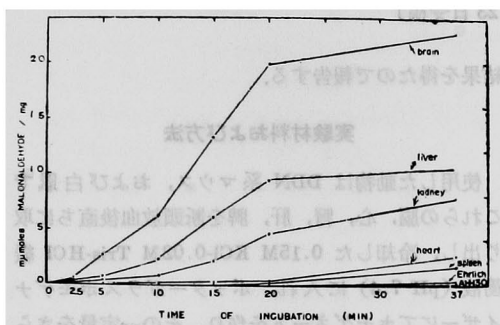
* 文部省科学研究費による。

いずれも脱イオン水に溶解して使用した。

実験結果

0.15M KCl-0.02M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中でホモゲナイズした各臓器のホモゲネートを Fe^{++} とともに incubate した場合, 図1に示す様に臓器

Fig. 1. Lipid peroxidation of various organs of rat by Fe^{++} (40 μ M). For the reaction refer to the second report³.



によつて形成される過酸化脂質量は異なる。即ち形成されたマロンアルデヒド量は脳において最も高く、肝、腎、心、脾の順に減少する。又、形成速度は反応初期にわづかの潜伏期があり、それに続いて約20分迄は急激で、その後はゆるやかである。これらの器管に比較して、AH-130 腹水肝癌細胞や Ehrlich 腹水癌細胞でのマロンアルデヒド形成量ははるかに少なく、20分迄は殆んどその形成を認めない。この様な Fe^{++} で誘起されるマロンアルデヒド形成反応の傾向は GSH (3 mM)+GSSG (2.5 mM) で誘起される場合にも観察される (図2)。しかし Ehrlich 腹水癌細胞は Fe^{++} 誘起の場合よりややマロンアルデヒド形成は多いが、AH-130 腹水肝癌細胞では全くその形成は認められない。

今、ラットの各臓器について種々薬物と 25° で

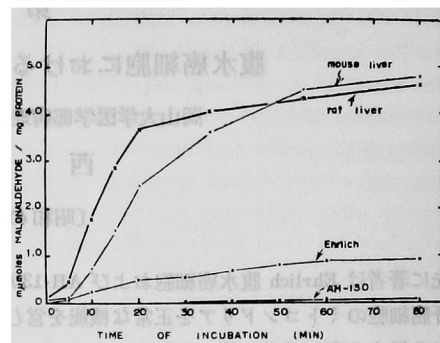
Table 1. Effect of various reagents on the formation of lipid peroxide in various organs of rat (incubated for 80 min. at 25°C)

For the reaction refer to the second report³.

Reagents	Formed malonaldehyde μ moles/mg protein				
	Liver	Brain	Heart	Kidney	Spleen
Control	0.46	0.85	0.09	0.37	0.16
Fe^{++} (40 μ M)	7.25	15.80	2.59	4.63	0.28
GSH (2.5mM)	0.61	3.93	0.77	2.16	0.46
GSSG+GSH (3mM, 2.5mM)	4.80	13.10	5.03	9.80	4.25
Ascorbate (0.3mM)	6.41	3.10	0.37	1.57	0.69

Fig. 2. Lipid peroxidation of cancer and liver cells in the presence of GSSG (3mM), and GSH (2.5mM).

For the reaction refer to the second report³.



incubate した場合形成されるマロンアルデヒド量を mg 蛋白当りで比較すると表1の如くであり、臓器によつて処理した薬物のマロンアルデヒド形成促進作用が異つている事がわかる。即ち、GSH+GSSG による形成量は一般に各臓器を通じて高値を示し、脳での形成量が最も著しく、次いで腎、心が高いが、肝では最低値の脾に近い値を示している。これに反して Fe^{++} の促進作用は脳が最も高く、肝、腎、心、脾の順に低下し、脾臓での形成は極めてわづかである。又アスコルビン酸の促進作用は肝が最も高く、次いで脳、腎、脾、心の順に小さい。このような現象は臓器によりそれぞれマロンアルデヒド形成の機構が異なるか、又は阻害剤、あるいは antioxidant の存在によるかであると考えられるが、その反応機構は全く不明である。

同じ様な現象は両腹水癌細胞においても観察される (表2)。即ち、これらの細胞ではマロンアルデヒド形成は GSH+GSSG により最も高値を示し、次いでアスコルビン酸、 Fe^{++} の順に形成促進作用は減弱する。しかし、表1と比較しても明らかな如く、

Table 2. Effect of various reagents on the formation of lipid peroxide in cancer and liver cells (incubated for 80 min. at 25°C)
For the reaction refer to the second report³⁾.

Reagents	Formed malonaldehyde mμmoles/mg protein			
	Mouse		Rat	
	Liver	Ehrlich	Liver	AH-130
Control	0.64	0.144	0.51	0.03
Fe ⁺⁺ (40μM)	11.30	0.278	9.20	0.09
GSH(2.5mM)	1.16	0.32	0.82	0.07
GSSG ₊ GSH(3mM, 2.5mM)	6.37	0.93	5.20	0.125
Ascorbate(0.3mM)	8.25	0.177	7.11	0.036

各薬物によるマロンアルデヒド形成量は常に正常臓器のそれより低く、特に AH-130 腹水肝癌細胞ではラット肝細胞と比較して著しい低値を示している事は注目すべきことであろう。この傾向は前報³⁾で報告した癌細胞ミトコンドリアでのマロンアルデヒド形成の度合とよく一致している。ちなみに今同一ラット肝組織のホモゲネートと、それらホモゲネートから分離されたミトコンドリアについて Fe⁺⁺, GSH+GSSG, アスコルビン酸添加によるマロンアルデヒド形成量を比較して見ると表 3 に示す如く、

いずれの場合でも蛋白量当りのマロンアルデヒド形成量はミトコンドリアが高値を示している。しかも細胞(表 2)とミトコンドリア(第 2 編, 表 2)で薬物による脂質過酸化反応促進の度合が異なっている。

この様な脂質過酸化反応の細胞や薬物による差の原因は一つにはこの反応の基質である脂肪酸組成の変動が考えられる。今マウスおよびラット肝、ならびに Ehrlich 腹水癌細胞および AH-130 腹水肝癌細胞の構成脂肪酸を分析して見ると、表 4 の如くで

Table 3. Comparison of malonaldehyde formation of liver homogenate and liver mitochondria by various reagents at 25°C.
For the reaction refer to the second report³⁾.

Reagents	Time of incubation (min)	Malon aldehyde mμmoles/mg protein	
		Rat liver homogenate	Rat liver mitochondria
Fe ⁺⁺ (40μM)	80.0	7.25	
	5.0		30.4
GSSG, GSH(3mM, 2.5mM)	80.0	4.80	
	12.0		12.9
Ascorbate(0.3mM)	80.0	6.41	
	27.0		50.8

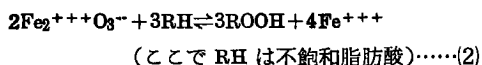
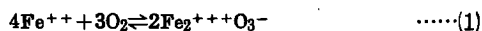
Table 4. Fatty acid composition of cancer and liver cells analyzed by gaschromatography.
For the reaction refer to the second report³⁾.

Group	C ₁₆ :0	C ₁₈ :1	C ₁₈ :0	C ₁₈ :1	C ₁₈ :2	C ₁₈ :2	C ₂₀ :poly
Mouse liver	24.3	3.2	18.0	15.2	25.5	3.7	8.6
Ehrlich	24.1	7.3	18.6	19.8	21.1	3.9	1.9
Rat liver	25.2	2.3	13.1	15.4	22.7	1.4	12.1
AH-130	26.6	1.5	25.7	22.1	18.5	1.3	2.5

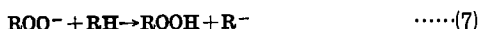
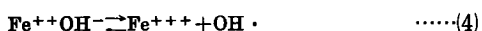
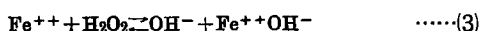
ある。即ち、これらの分析値からも明らかな如く、腹水癌細胞の C_{20} : poly は著しく低値を示し、これが脂質過酸化反応低下の原因になっていると考えられる。

考 察

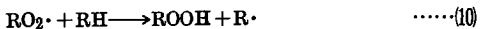
脂質過酸化反応の機構が明らかにされていない現在、ここに得られた結果からその機構を論ずる事は困難であろう。然し、この反応が酵素的反応であるか又は非酵素的反応であるかと云う事は極めて重要な問題であり、それについてはいくつか考察出来る結果がある。今非酵素反応における脂質過酸化反応を示すと次の如くである。即ち一般に高度不飽和脂肪酸は非酵素的に自動酸化を行ない、その反応は金属による触媒反応とラジカル反応とが考えられている。例えば



様な金属イオンでの触媒反応で過酸化脂質が形成される場合と、X線照射その他過酸化物存在による次の様なラジカル反応経過で過酸化脂質が形成される。

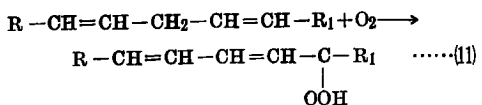


この場合 OH^- はX線照射で直接水の分解でも形成される。脂肪酸自体が直接ラジカルを形成する場合も考えられる。即ち



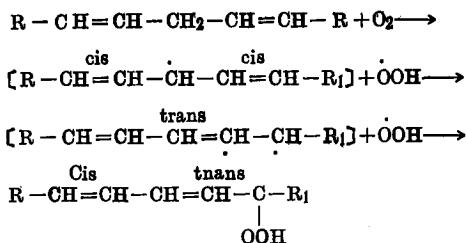
これらは何れも R^\cdot による連鎖反応で過酸化脂質は経時的に形成される⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。

又、もし酵素的反応とすれば、主に lipoxidase によると考えられ、その反応は



の様に cis, cis, 1,4-pentadiene と酸素とが反応して過酸化脂質が形成される。今この反応を詳しく書

くと、



のラジカル反応である¹³⁾。しかも生体内ではほとんどの脂質は cis 型で lipoxidase の反応は容易に起り得る。従つて、ここに得られた結果が自己触媒や自動酸化によるものか、lipoxidase によるものかを決定する事は大切な問題である。

本実験で得られた結果からこの問題を考察すれば、先づ臓器により薬物の感受性が異なる事と、in vitro の非酵素反応で形成される過酸化脂質反応が極めてゆるやかであるのに反して、細胞のホモゲネートやミトコンドリアで反応が極めてすみやかである事がこの反応が単なる非酵素的反応でない事を示す様に思われる。しかし生体内には vitamin E の様な antioxidant の存在もあり、又逆にヘモグロビン、チトクローム、その他ヘマチンの様な触媒作用をもつもの¹⁰⁾の存在が数多く知られており、結論的には、この反応を酵素反応であるか否か決定するに到らない。

次に癌細胞の脂質過酸化反応の低下がこれら酵素活性の減少によるか又は脂肪酸組成によるかと云う問題に対し、本研究で得られた結果は、少なくとも脂質過酸化反応の基質である高度不飽和脂肪酸の減少がこの原因になっている事を示している。この組織ホモゲネートの脂肪酸組成の変化がそのままミトコンドリアで示される Fe^{++} 等による脂質過酸化反応の低下や膨潤度合の低下の原因でなると結論出来ないにしてもミトコンドリア脂質の変更は充分推察出来るし、それが膨潤低下の原因に関係している事も考えられる。

一般に細胞内膜構造は lipo-protein のミセルで構成され¹¹⁾、これら膜様物質中、脂質含量は極めて高く、蛋白量当りにして見ればホモゲネートよりミトコンドリアの方がはるかに脂質含量は高い。従つてミトコンドリアの方が脂質過酸化物形成度合が大きい事は理解出来るし、又この反応が脂質含量への依存性も大きい事を示すと考えられる。

この様な脂質過酸化反応は単にミトコンドリアのみならずマイクロゾームでも観察され、その場合は

NADH の酸化還元共役して金属イオンを要求し反応が起る。この場合にも癌細胞での過酸化反応はほとんど示されない事が Ernster ら¹⁵⁾ によつて明らかにされている。

又この様な脂質過酸化反応は一般に細胞分裂が盛んな組織では特に少なく¹⁰⁾、癌細胞で特に少ない事は細胞の増殖機構と高度不飽和脂肪酸の間に密接な関係がある事を示唆するものであり、今後この方面の研究がさらに発展すれば癌細胞の特性をより明らかに出来ると考えられる。

結 論

- 1) 腹水癌細胞 (AH-130 肝癌, Ehrlich 癌) および正常ラット, マウス各臓器の Fe⁺⁺, GSH+GSSG, アスコルビン酸による脂質過酸化反応を行ない次の様な結果を得た。
- 2) 癌細胞は正常な脳, 肝, 心, 腎, 脾組織に比して過酸化脂質形成量が極めて少ない。

文

- 1) 西風桂子: 腹水癌細胞のエネルギー代謝に関する研究. I. 腹水癌細胞ミトコンドリアの分離及びその性状, 岡山医学会雑誌. 投稿中
- 2) Packer, L: Size and shape transformations correlated with oxidative phosphorylation in mitochondria, I. Swelling-Shrinkage mechanisms in intact mitochondria, J. Cell Biol., 18, 487, 1963.
- 3) 西風桂子: 腹水癌細胞のエネルギー代謝に関する研究. II. 腹水癌細胞ミトコンドリアの脂質過酸化反応と膨潤, 岡山医学会雑誌, 投稿中
- 4) Bernheim, T., Bernheim, M. L. and Wilbur, K. M.: The relation between thiobarbituric acid and oxidation products of certain lipid, J. Biol. Chem., 174, 257, 1948.
- 5) Ottolengh, A.: Interaction of ascorbic acid on mitochondrial lipid, Arch. Biochem. Biophys., 79, 355, 1959.
- 6) Scholefield, P. G.: Studies on fatty acid oxidation. VI. The effect of fatty acids metabolism of Ehrlich ascites Carcinoma cells, Cancer Res., 18, 1026, 1958.
- 7) Folch, F., Lees, M. and Stanley, G. H. S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, J.

3) 脂質過酸化反応は臓器によりその度を異にし, 又薬物の種類によつて, それぞれ過酸化脂質形成度を異にする。

4) 脂質過酸化反応はホモゲネートよりミトコンドリアの方が著しい。

5) 過酸化脂質形成の度は臓器の脂肪酸組成にある程度左右され, 癌細胞では特に C₂₀: poly の不飽和脂肪酸が減少し, これが脂質過酸化反応低下の一因になっている。

6) 以上の実験結果から癌細胞より分離したミトコンドリアの脂質過酸化反応やそれに伴う膨潤度の低下について考察を加え, さらにこの反応の酵素依存性についても考察した。

謝 辞

本論文作成にあたり御指導たまわつた妹尾左知丸教授, 並びに癌研代謝部内海耕徳助教授に心から感謝の意を表します。

献

- Biol. Chem., 226, 497, 1957.
- 8) Clark, E. P.: in "Semimicro quantitative organic analysis" Academic press, New York, 1943, P. 42.
- 9) 本城市次郎, 雀英哲: 放射線生物学, 化学の領域, 18, 1, 1964.
- 10) Tappel, A. L., Boyer, P. D., and W. O. Lundberg: The relation mechanism of soy bean lipoxidase, J. Biol. Chem., 199, 269, 1952.
- 11) Haining J. L. and B. Axelord: Induction period in the lipoxidase-catalized oxidation of linoleic acid and its abolition by substrate peroxide, J. Biol. Chem., 232, 193, 1958.
- 12) 内海耕徳: ミトコンドリアの膨潤-収縮と脂質代謝, 生化学, 37, 749, 1965.
- 13) Tappel, A. L.: "Lipase" in the enzyme, Vol. 8, Academic press, New York, 1963, P. 275.
- 14) Richardson, S. H., Hultin, O. H., and Green, D. E.: Structural protein of membrane systems. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 50, 821, 1963.
- 15) Hochstein, P. and Ernster, L.: ADP-activated lipid peroxidation coupled to the TPNH Oxidase system of microsomes, Biochem. Biophys. Res. Comm., 12, 388, 1963.

Studies on the energy metabolism of ascites tumor cells

III. Lipid peroxidation and the components of lipids from ascites tumor cells

By

Keiko NISHIKAZE

Department of pathology, Okayama University Medical School

SUMMARY

The mitochondria isolated from ascites tumor cells have a specific characteristic different from those isolated from normal liver cells, i. e. they do not react with ferrous ion, GSH with GSSG and ascorbic acid, showing no increase in lipid peroxide formation and no swelling. From the viewpoint that this characteristic of tumor cell mitochondria may be due to the specific lipid compositions of mitochondrial membrane, the author tried to analyze the components of lipids of tumor cells comparing with those of brain, liver, heart, kidney and spleen from normal animals.

The following have been revealed ;

1. The tumor cells are very low in peroxide formation in the presence of the reducing agents comparing to those from the normal tissues, though the grade of peroxide formation is different in each tissues and by the agents used, and is rather lower in homogenate than in intact mitochondria.

2. Chemical analysis revealed that the lipids from tumor cells is low in unsaturated fatty acid contents, especially C₂₀-polyene contents than those from normal cells. This will be responsible for the low level in lipid peroxidation of the tumor cells.

3. On the basement of the these results discussions has been made on the lipid peroxidation of mitochondria of tumor cells and related mitochondrial swelling under the consideration of enzymic activities.
