

ドコサヘキサエン酸の CYP 代謝物による  
心臓由来 H9c2 細胞死誘導メカニズムに関する研究

平成 30 年度

北海道医療大学大学院薬学研究科

遠 藤 朋 子

## 略語表

本文では、以下の略を使用した.

ADP	adenosine diphosphate (アデノシン二リン酸)
ATP	adenosine triphosphate (アデノシン三リン酸)
BSA	bovine serum albumin (牛血清アルブミン)
COX	cytochrome <i>c</i> oxidase (シトクロム <i>c</i> 酸化酵素)
CS	citrate synthase (クエン酸合成酵素)
CYP	cytochrome P450 (シトクロム P450)
DHA	docosaheptaenoic acid (ドコサヘキサエン酸)
DiHDPEs	dihydroxydocosapentaenoic acids (ジヒドロドコサペンタエン酸)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium (ダルベッコ変法イーグル培地)
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, Ellman 試薬
DTT	dithiothreitol (ジチオトレイトール)
EDPs	epoxydocosapentaenoic acids (エポキシドコサペンタエン酸)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
FBS	fetal bovine serum (牛胎児血清)
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ)
LPS	lipopolysaccharide (リポ多糖)
MSPPOH	N-(methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)-benzenehexanamide
NCM	neonatal cardiomyocyte (新生児心臓細胞)
PBS	phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体)
PUFAs	polyunsaturated fatty acids (多価不飽和脂肪酸)
PVDF	polyvinylidene fluoride transfer membrane (ポリフッ化ビニリデン膜)
sEH	soluble epoxide hydrolase (可溶性エポキシド水酸化酵素)
SPT	serine palmitoyltransferase (セリン パルミトイル転移酵素)
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
TMRE	tetramethylrhodamine methylester (テトラメチルローダミン メチルエステル)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane (トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン)



本学位論文は、以下の原著論文を基礎としたものである。

DHA and 19,20-EDP induce lysosomal-proteolytic-dependent cytotoxicity through de novo ceramide production in H9c2 cells with a glycolytic profile.

Endo T., Samokhvalov V., Darwesh A.M., Khey K.M.W., El-Sherbeni A.A., El-Kadi A.O.S., Machida T., Hirafuji M., Seubert J.M.

*Cell Death Discovery*, **4**, 88 (2018).

# 目次

序論	1
本論	7
第1章 DHA 及び 19,20-EDP によるエネルギー代謝経路依存性 H9c2 細胞死誘導作用	
第1節 緒言	7
第2節 方法	8
第3節 結果	14
第1項 H9c2 細胞の分化の確認	14
第2項 H9c2 細胞のエネルギー代謝経路の検討	15
第3項 H9c2 細胞生存率に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響	19
第4項 ミリオシン存在下での H9c2 細胞生存率に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響	20
第5項 20S プロテアソーム活性に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響	21
第4節 考察	22
第2章 H9c2 細胞のセラミド含量及びミトコンドリア機能に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響	
第1節 緒言	25
第2節 方法	26
第3節 結果	30
第1項 セラミド含量に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響	30
第2項 クエン酸合成酵素及びシトクロム <i>c</i> 酸化酵素タンパク質発現に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響	31
第3項 クエン酸合成酵素及びシトクロム <i>c</i> 酸化酵素活性に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響	32
第4項 ATP 産生量に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響	33
第5項 ミトコンドリア障害に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響	34
第4節 考察	35

第 3 章 H9c2 細胞のリソソーム活性に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響

第 1 節 緒言 . . . . . 37

第 2 節 方法 . . . . . 38

第 3 節 結果 . . . . . 39

第 1 項 リソソーム蛍光強度に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響 . . . . . 39

第 4 節 考察 . . . . . 42

総括 . . . . . 44

謝辞 . . . . . 47

引用文献 . . . . . 48

## Abstract

**Introduction:** The benefit of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the reduction of cardiovascular disease has been recognized for many years. Epoxydocosapentanoic acids (EDPs) produced by cytochrome P450 (CYP) epoxygenase from docosahexaenoic acids (DHA) as well as DHA, is known to have significant biological effects, which can differ between cell types and pathology, but how they work is still unclear. Previously, it is reported that DHA and 19,20-EDP cause significant cytotoxicity in H9c2 cells with an increased ceramide production through *de novo* synthesis pathway. In this study, we investigated the mechanism of the effect of DHA and 19,20-EDP induced cell death under glycolysis or oxidative phosphorylation condition.

**Results and discussion:** H9c2 cells cultured under normal (25 mM) glucose conditions had lower O<sub>2</sub> consumption and higher lactate production indicating a more glycolytic phenotype compared to cells under low (5.5 mM) glucose conditions. Both DHA and 19, 20-EDP markedly reduced cell viability in cells cultured in normal glucose. Co-treatment of DHA with a CYP epoxygenase inhibitor prevented cell death, suggesting that the cells death is attributable to 19, 20-EDP, the CYP metabolite of DHA. Co-treatment of myriocin, a potent inhibitor of the *de novo* synthesis of ceramide pathway also prevented the cell death. Under low glucose conditions, DHA and 19, 20-EDP had no significant effect on the cell viability. Under normal glucose condition, both DHA and 19, 20-EDP significantly increased ceramide content, especially in lysosomal and mitochondrial fractions. Both DHA and 19, 20-EDP significantly decreased the activities of citrate synthase and cytochrome *c* oxidase which are key enzymes for mitochondrial functions, and myriocin significantly reversed the DHA- and 19, 20-EDP-induced inhibitory effect. Both DHA and 19, 20-EDP significantly increased the intensity of LysoTracker Green fluorescence, which reflects lysosomal activity, under normal glucose conditions, while inhibiting ceramide synthesis by myriocin reduced 19,20-EDP-induced intensity. Both DHA and 19, 20-EDP-induced intensity was reduced by MG-132, a cell-permeable potent proteasome inhibitor.

**Conclusion:** As the novelty of this study, these results demonstrate that DHA and 19,20-EDP induce cell death in H9c2 cells with a glycolytic metabolic profile through a lysosomal-proteolytic mechanism.

## 序論

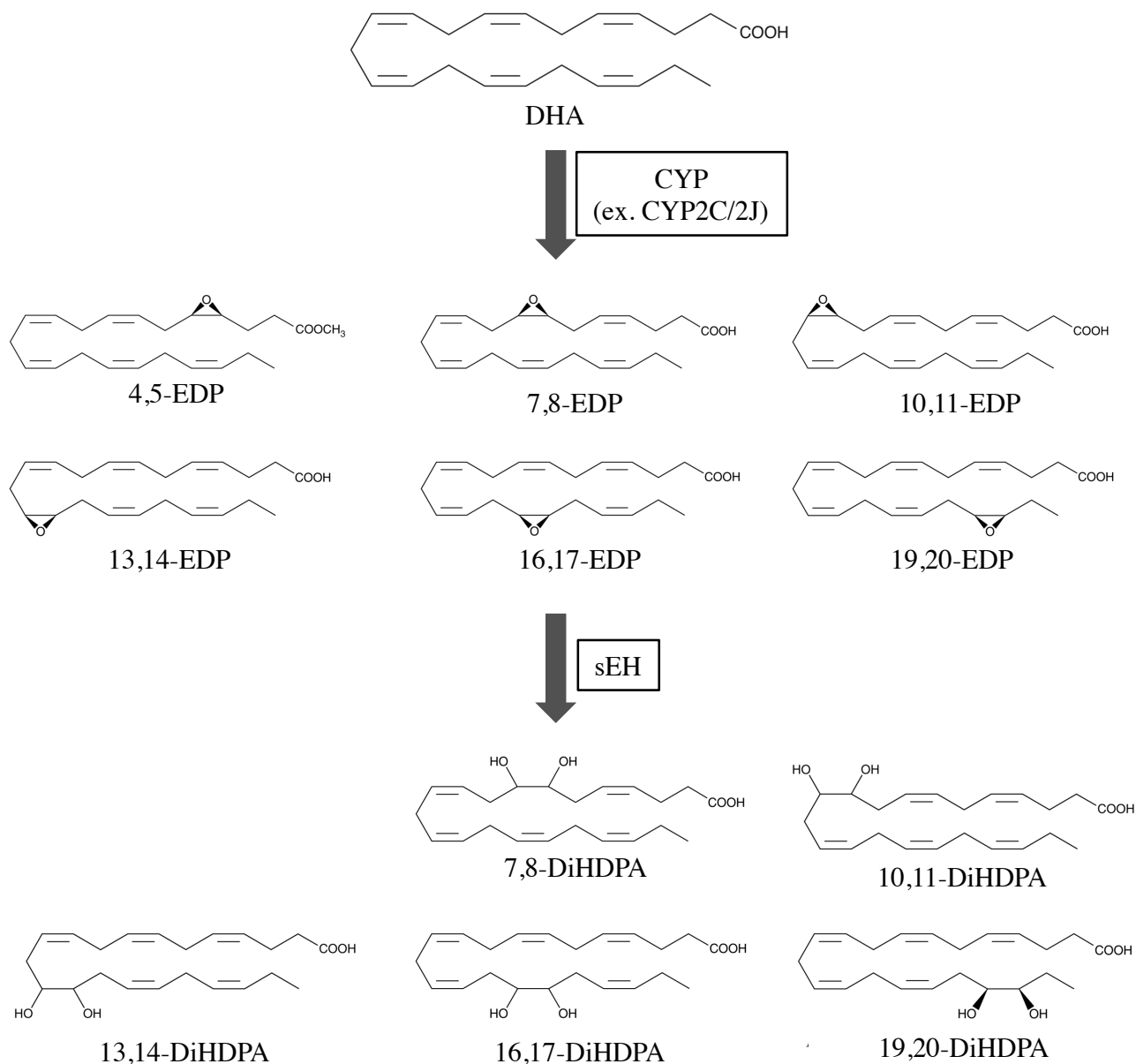
多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids: PUFAs) は分子中に二重結合を 2 つ以上もつ不飽和脂肪酸であり、二重結合が始まる位置によって n-3 系、n-6 系などに大別される。n-3 系 PUFAs には、 $\alpha$ -リノレン酸 ( $\alpha$ -linolenic acid: C18:3 n-3)、エイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acids: EPA, C20:5 n-3)、ドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid: DHA, C22: 6 n-3, Fig. 1) などがあり、これらの生体内含有量が不足することで皮膚障害などが発症することから、厚生労働省では食餌摂取基準の目安値を設定している。<sup>1)</sup> 特に DHA が不足することで、脳の神経伝達、遺伝子発現などが大きな影響を受け、様々な生理機能の低下を起こす。<sup>2,3)</sup> 現在までに DHA は、血清脂質濃度低下作用、血小板凝集抑制作用<sup>4)</sup> を始め、循環器疾患、<sup>5)</sup> 加齢黄斑変性症、<sup>6)</sup> 視力低下、<sup>7)</sup> 認知症<sup>8,9)</sup> への予防効果や、骨密度の増加、<sup>10)</sup> がん細胞の増殖及び転移抑制、<sup>11,12)</sup> 乳幼児の脳や神経の発育の促進<sup>13)</sup> などの作用をもつと報告されている。さらに、医薬品として脂質異常症における肝臓のトリグリセリド (triglyceride: TG) 含量の低下、及び脂肪酸・TG 合成経路の酵素活性の低下を目的に、EPA 及び DHA 含有のロトリガ® (武田薬品工業) が用いられている。このように、DHA は多くの生理機能を担うだけでなく、幅広い疾患の治療にも有効であることが報告されている一方、これらの詳細な機序は不明な点も多い。

近年、これまで DHA の生理作用として知られていた作用の一部が、体内で DHA から代謝・生成される脂質メディエーターによるものであることが明らかになり、その代謝物の生理作用を解明する研究が盛んに行われている。例えば、DHA は、15-リポキシゲナーゼ (lipoxygenase: LOX) によって水酸化を受け、その後エポキシド中間体を経てレゾルビン D (D-series resolvins: RvD) 及びプロテクチン D1 (protectin D1: PD1) などへ変換される。<sup>14)</sup> これらの物質は、好中球の遊走抑制作用及び炎症性サイトカインの産生抑制作用などを示す内因性の抗炎症作用物質として機能する。これまでに、DHA を摂取させたマウスの腎臓を虚血再灌流処置すると、RvD 及び PD1 の産生量が増加して腎障害の保護機能を示すことが報告されている。<sup>15)</sup> また、H1N1 型インフルエンザウィルスに感染させたヒト肺胞基底上皮腺がん細胞の A549 細胞において、PD1 はインフルエンザウィルスの核タンパク質 mRNA 発現を抑制し、このウィルス力価を減少させる。<sup>16)</sup>

一方、PUFAs はシトクロム P450 (cytochrome P450: CYP) によっても代謝される。n-3 系 PUFAs は主に、CYP1A/2C/2E/2J/2U によりエポキシ化され、CYP4A/4F により加水分解される。<sup>17)</sup> これまでに、哺乳類では肝臓と腎臓で CYP2C、心臓で CYP2J が豊富に存在することが報告されており、<sup>18)</sup> DHA は CYP2C/2J によりエポキシ化を受けてエポキシドコサペンタエン酸 (epoxydocosapentaenoic acids: EDPs, Fig. 1) へと変換される。EDPs は、抗炎症作用、オートファジー誘導作用、血管新生作用などにおいて、DHA そのものよりも高い活性を有することが明らかになってきた。<sup>19-22)</sup> DHA が有する二重結合をそれぞれエポキシ化することで 6 つの位置異性体 4, 5-EDP, 7, 8-EDP, 10, 11-EDP, 13, 14-EDP, 16, 17-EDP, 19, 20-EDP が生成される (Fig. 1)。<sup>23)</sup> EDPs の中でも 19,20-EDP が生体内での含有量が最も多く、心臓血管系細胞に豊富に存在することから、心臓血管系での 19,20-EDP の役割が注目されている。<sup>19, 22-25)</sup> また、EDPs は可溶性エポキシド水酸化酵素 (soluble epoxide hydrolase: sEH) によって活性をほとんど持たないジヒドロキシドコサペンタエン酸 (dihydroxydocosapentaenoic acids : DiHDPEs) へと加水分解される (Fig. 1)。<sup>26)</sup>

DHA は、培養 HL-1 心房筋細胞のリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) による細胞毒性に対して保護作用を示す。この機序には DHA から代謝された 19, 20-EDP が Sirtuin 1 を活性化することでミトコンドリア機能を保護する作用が関係している。<sup>27, 28)</sup> また、Qadhi らは、ラット心筋芽細胞である H9c2 細胞において、DHA が 10 から 100  $\mu$ M まで濃度依存的に細胞生存率を低下させ、ミトコンドリア機能を障害、断片化させる一方で、同濃度の DHA が初代培養ラット新生児心臓細胞 (neonatal cardiomyocyte: NCM) の細胞生存率には影響を与えないことを明らかにした。<sup>29)</sup> さらに、Samokvalov らは、この DHA による H9c2 細胞生存率低下が、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\delta$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$ : PPAR  $\delta$ ) 阻害薬である GSK 3787 及びセラミド *de novo* 合成酵素の初発律速酵素のセリンパルミトイル転移酵素 (serine palmitoyl transferase: SPT) 阻害薬であるミリオンにより解除されることを見出し、DHA による H9c2 細胞死への影響に PPAR $\delta$  及びセラミドが重要な役割を果たしていることを報告した。<sup>30)</sup> また、DHA は、カスパーゼ 3 活性を上昇させることから、アポトーシスが細胞死誘導の機序の 1 つと考えられる。<sup>30)</sup> さらに Samokvalov らは、1  $\mu$ M の 19, 20-EDP が、先の 100  $\mu$ M の DHA による細胞生存率低下作用に匹敵する作用を有することも明らかにし、EDPs が DHA よりも高い生理活性を有することを示した。<sup>30)</sup> 以上のことから、DHA 及び EDPs は心臓細胞の中でも特に H9c2 細胞に対

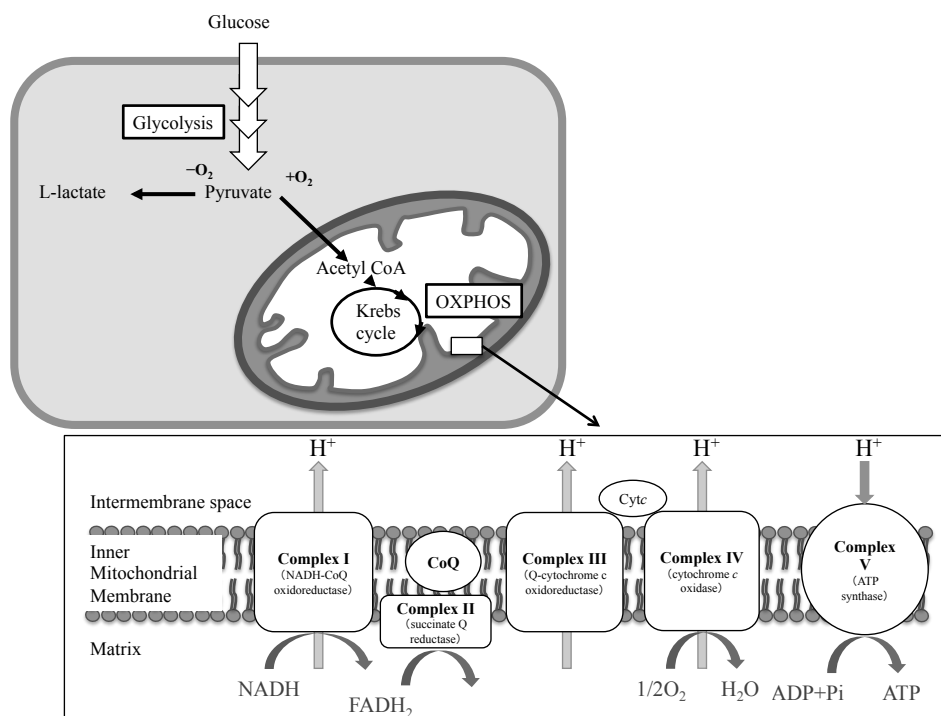
して細胞生存率の低下を誘導する一方、前述した HL-1 細胞や NCM には影響せず、むしろ細胞生存率を回復させる作用を有することが明らかにされた。



**Fig. 1. Chemical Structures of DHA and CYP-derived Metabolites.**

Docosahexaenoic acids: DHA, epoxydicosapentaenoic acids: EDPs, dihydroxydicosapentaenoic acids: DiHDPA, soluble epoxide hydrolase: sEH

一般的に細胞は、主に ATP からエネルギーを産生するが、代表的な ATP 産生経路として解糖系、クレブス回路及び電子伝達経路からなる酸化的リン酸化系（oxidative phosphorylation: OXPHOS）がある。典型的な好氣的条件の細胞では、グルコースは細胞質内で解糖系によって多段階からなる代謝を受けてピルビン酸を生成する過程で 2 分子の ATP を産生する。ピルビン酸はミトコンドリア内のクレブス回路にて呼吸基質であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) やフラビンアデニンジヌクレオチド ( $\text{FADH}_2$ ) を生じる。これらは、ミトコンドリア内膜に存在する 4 つの電子伝達系の呼吸鎖複合体 (I-IV) で  $\text{NAD}^+$  及び  $\text{FAD}^+$  に酸化され、生じたプロトン ( $\text{H}^+$ ) が内膜側から外膜側へ流入する際に電気化学ポテンシャル差を形成する。この  $\text{H}^+$  の能動輸送に共役して、ATP 合成酵素（複合体 V）により ADP と無機リン酸（inorganic phosphorus: Pi）から ATP が合成される（Fig. 2）。この呼吸基質の酸化に伴う 36 分子の ATP の合成経路が酸化的リン酸化経路である。一方で、嫌氣的な条件の場合、解糖系により生じたピルビン酸はミトコンドリアへ移行せず、乳酸脱水素酵素によって乳酸へと生成される。また、がん細胞や高頻度に分裂する細胞においては、好氣的な状態であってもピルビン酸が乳酸を生成する Warburg 効果が知られている。<sup>31)</sup>

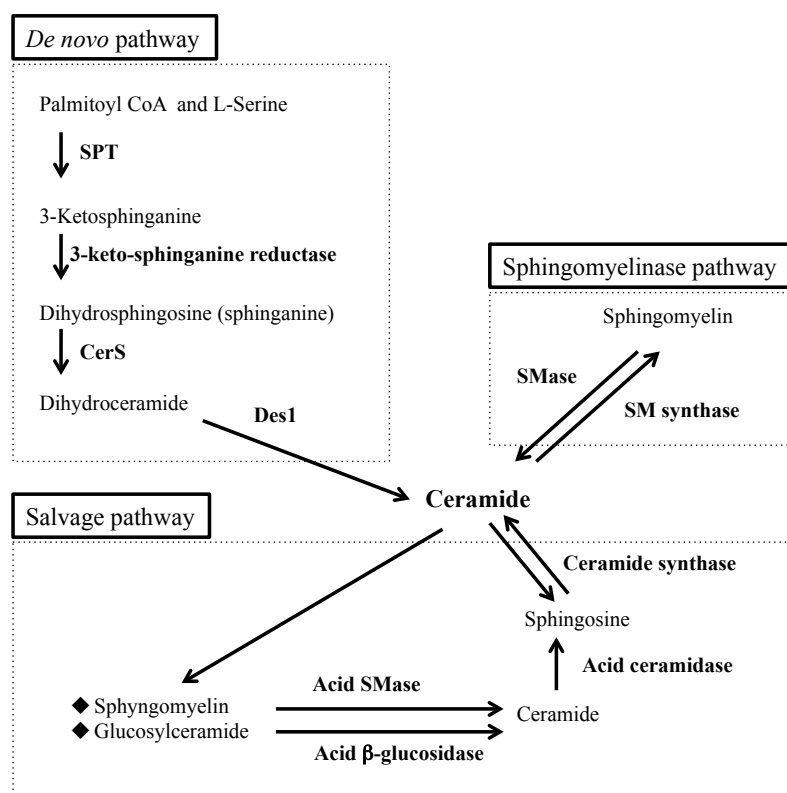


**Fig. 2. Cell Metabolism Pathways for ATP Production.**

OXPHOS: oxidative phosphorylation



セラミドは、スフィンゴシンを基本骨格としたスフィンゴ脂質群の中でも、さまざまな細胞応答を調節するための重要な脂質メディエーターである。生体内では *de novo* 合成経路、スフィンゴミエリナーゼ経路、サルベージ（再利用）経路の大きく三つの経路より合成される（Fig. 3）。<sup>32)</sup>



**Fig. 3. Pathways of Ceramide Synthesis.**

serine palmitoyltransferase: SPT

(dihydro) ceramide synthase: CerS

dihydroceramide desaturase: Des1

sphingomyelinase: SMase

sphingomyelin: SM

*De novo* 合成経路では、L-セリンとパルミトイル CoA が基質として初発律速酵素である SPT によって縮合され、その後 3-ケトスフィンガニン還元酵素、セラミド合成酵素 ((dihydro) ceramide synthase: CerS)、ジヒドロセラミド不飽和化酵素 (dihydroceramide desaturases: Des1) による酵素反応を経てセラミドが合成される。<sup>32)</sup> スフィンゴミエリナーゼ経路では、細胞膜中のスフィンゴミエリンにスフィンゴミエリン加水分解酵素 (sphingomyelinase: SMase) が作用することでセラミドが遊離・合成される。サルベージ経路は、スフィンゴ脂質（スフィンゴミエリンやグルコシルセラミド）として貯蔵されていたものが、リソソームなどの酸性環境下で酸性 SMase や酸性  $\beta$  グルコシダーゼによってセラミドとなり、一度スフィンゴシンとなり再びセラミドが合成される。<sup>32)</sup> セラミドは、細胞膜を構成する脂質として

のみならず、細胞分裂周期、細胞分化、老化の経路を調節する重要な情報伝達分子であり、その機序にミトコンドリアが関与していることが近年明らかにされてきた。<sup>33)</sup> 従来、セラミドは小胞体膜上の細胞質側で合成された後、各細胞小器官に輸送されと考えられてきた。<sup>32)</sup> しかし、スフィンゴ糖脂質としてミトコンドリアへ輸送されたものが、ミトコンドリア内のセラミド合成酵素によって、セラミドへと合成されている可能性も考えられている。<sup>34, 35)</sup> 実際に、セラミドによるミトコンドリアへの影響についての研究がいくつか報告されている。セラミド類似体 (LCL124) は、膵臓がん細胞のミトコンドリアに蓄積し、ミトコンドリアの脱分極を介したアポトーシスを誘導する。<sup>36)</sup> 細胞透過性を持つセラミド類似体 (C<sub>2</sub>-ceramide) は、ラット心臓由来の初代細胞のミトコンドリア内膜の複合体 III を阻害する。<sup>37)</sup> さらに、合成酵素の一種である CerS の処理をして内因的に生成したセラミド類似体 (C<sub>18</sub>-ceramide) が、扁平上皮がん細胞株である UM-SCC-22A のミトコンドリア外膜に蓄積し、オートファジーの指標である LC-3 タンパク質の発現を誘導する。<sup>38)</sup>

前述の通り、これまでの研究で DHA 及び 19,20-EDP が H9c2 細胞の生存率を低下させ、その機序にセラミドが関与している可能性がある。<sup>30)</sup> H9c2 細胞は、BDIX ラット心臓から単離した不死化心筋芽細胞であり、通常 10% 牛胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) を含む培地で培養される。<sup>39, 40)</sup> この条件で培養される H9c2 細胞内は、酸化的リン酸化よりも解糖系で優位なエネルギー産生がなされている。<sup>41)</sup> また、この細胞は培地中の血清含有量を 10% から 1% へ減少させ、さらに、レチノイン酸 (retinoic acid: RA) を添加すると高確率で筋管細胞へ分化する。<sup>42, 43)</sup> また、HL-1 細胞や NCM は酸化的リン酸化経路優位なエネルギー代謝経路を有しているため、エネルギー代謝経路の違いによって DHA 及び 19,20-EDP の作用が異なることが考えられる。<sup>28, 29)</sup>

本研究の目的は、DHA 及び 19, 20-EDP による H9c2 細胞の細胞死誘導メカニズムを明らかにすることである。そのため、第 1 章では、培養条件を変えることでエネルギー代謝経路を変化させた H9c2 細胞における DHA 及び 19,20-EDP の細胞死誘導作用を検討した。第 2 章では、H9c2 細胞のセラミド含有量とその局在及びミトコンドリア機能に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響を検討した。第 3 章では、H9c2 細胞のリソソーム活性化に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響を検討した。

# 本論

## 第1章 DHA 及び 19,20-EDP によるエネルギー代謝経路依存性 H9c2 細胞死誘導作用

### 第1節 緒言

DHA は H9c2 細胞の細胞生存率を低下させるが、この作用は CYP エポキシゲナーゼ阻害薬である N-methylsulphonyl-6-(2-propargyloxy-phenyl) hexanamide (MSPPOH) により抑制されることから、この作用の本体は EDPs であると考えられている。<sup>30)</sup> 一方で、DHA は HL-1 細胞や NCM の細胞生存率に影響を与えない。<sup>29,30)</sup> なぜ細胞の種類によって DHA 及び 19,20-EDP の作用が異なるのかを含め、これらの作用の詳細な機序は未だ不明である。

H9c2 細胞は通常、グルコース 25 mM (normal glucose: NG) を含有する培地で未分化な状態で培養され、この条件下では解糖系が優位なエネルギー代謝経路を有している。<sup>41)</sup> 一方で、グルコースのかわりにガラクトースを含有する培地で培養するか、もしくは培地へ添加する血清を減らして RA を添加することで H9c2 細胞を分化させると、ミトコンドリアに依存した酸化的リン酸化経路が優位なエネルギー代謝経路になる。<sup>41,42,44,45)</sup> そこで第1章では、NG またはグルコース 5.5 mM (low glucose: LG) を含有する培地でそれぞれ培養した H9c2 細胞及び NG 含有培地の血清濃度を 10% から 1% に変更、さらに RA を添加し筋管細胞へと分化させた H9c2 細胞のエネルギー代謝経路の特徴について検討した。また、NG 及び LG を含有する培地で培養した H9c2 細胞の生存率に及ぼす DHA 及び 19,20-EDP の影響について検討した。

## 第2節 方法

### 1) 使用細胞

H9c2 細胞を American Type Culture Collection (VA, USA) より購入し, 16 代目より培養を開始した. 培養容器としてベントキャップタイプの 75 cm<sup>2</sup> フラスコ (Corning, NY, USA) を用い, 培養液として 10% 牛胎児血清 (FBS; Sigma-Aldrich, ON, Canada), 1% ペニシリン, ストレプトマイシン, ファンギゾン (Penicillin-streptomycin-fungizone: PSF; Life Technologies, CA, USA) を含有した 25 mM グルコースの Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地を使用した. 播種した細胞を, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> ガス通気下, インキュベーター (Forma Scientific CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator; Forma Scientific, Inc., USA) 内で 2-3 日おきに培養液を交換しながら培養した. セミコンフルエントに達した細胞を 0.25% トリプシン- 0.53 mM エチレンジアミン四酢酸

(ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid: EDTA) 溶液を用いたトリプシン処理法により継代した. 継代細胞がセミコンフルエントに達した後, 同様にトリプシン処理を行い, グルコース濃度が 25 mM (NG) または 5.5 mM (LG) を含有する 2 種類の DMEM を用いてそれぞれ継代培養し, コンフルエントに達した細胞を実験に用いた. 実験には継代数 40 代までの細胞を使用した. また, 細胞を分化させるため, 継代の際に 25 mM グルコース含有の DMEM に 1% PSF, 1% FBS, さらにエタノールに溶解させた RA 10 nM を添加し培養した. コンフルエントに達した細胞を実験に用いた.

### 2) 使用薬物及び試薬

実験に使用した 19, 20-EDP 及び MSPPOH は Cayman Chemical (MI, USA) より, DHA, ミリオシン, RA, トリス (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol: Tris), 塩化ナトリウム (NaCl), フッ化ナトリウム (NaF), ピロリン酸ナトリウム, ジチオトレイトール ((2S,3S)-1,4-bis(sulfany)butane-2,3-diol: DTT), グリシン, EDTA, 10-[4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenoxy]decan-1-ol (Triton-X100), 牛血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA), ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecylsulfate: SDS), ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20), アジ化ナトリウム (NaN<sub>3</sub>), HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO), 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate

(CHAPS) は Sigma-Aldrich より、プロテインアッセイ濃縮色素試薬、12%ミニプロティアン<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> プレキャストゲルは BIO-RAD Co. (CA, USA) , ウサギ抗トロポニン T 抗体, Western Blot の内標準タンパク質としてのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の抗体であるウサギ抗 GAPDH 抗体及び西洋わさび過酸化酵素 (Horseradish peroxidase: HRP) 標識マウス抗ウサギ IgG 抗体は Cell Signaling Technology (MA, USA) , DMEM, 0.25% トリプシン- 0.53 mM EDTA 溶液, 10×Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) パウダーは Invitrogen (ON, Canada) , Pierce<sup>™</sup> Protease and Phosphate Inhibitor Mini Tablets, PageRuler<sup>™</sup> Prestained Pierce Ladder は Thermo Fisher Scientific (MA, USA) , イモビロンポリフッ化ビニリデン膜 (polyvinyl defluoride transfer membrane: PVDF 膜) は Millipore Co. (MA, USA) , ECL Western Blotting Detection Reagents は GE Healthcare UL Ltd. (Buckinghamshire, UK) より購入したものを使用した. その他の試薬はすべて特級規格または生化学分析用を Sigma-Aldrich より購入して使用した.

### 3) 細胞の薬物処理

細胞がコンフルエントに達する 24 時間前に培地を交換した際に、各種薬物を添加し、さらに 24 時間培養した. 各薬物はエタノール又はメタノールに溶解させて調製した. コントロール群にも、薬物処理群と同濃度の溶媒 (エタノール又は DMSO) を添加した.

### 4) 細胞の可溶化法

細胞を冷却した PBS で 3 回洗浄後、可溶化液 (20 mM トリス塩酸 pH 7.4, 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM ピロリン酸ナトリウム, 0.25 M スクロース, 1% Triton-X100, 1 mM DTT) 10 mL あたり Pierce<sup>™</sup> Protease and Phosphate Inhibitor Mini Tablets 1 錠を 10 cm ディッシュあたり 1,000  $\mu$ L 加え、室温で 2 分間振とう後、氷上でスクレーパーにて回収してマイクロチューブへ移した. 攪拌後、氷上に 15 分間放置し、15,000×g で遠心した. 上清を回収してシリンジで懸濁後、液体窒素中にて急速冷却し、その後-80℃で保管した.

## 5) タンパク質定量法

可溶化液のタンパク質質量測定は、Bradford 法<sup>46)</sup> に準拠した。96 穴プレートを用いて、1 穴に 10  $\mu\text{L}$  の脱イオン蒸留水 (deionized distilled water: ddH<sub>2</sub>O) を加え、可溶化液を 2  $\mu\text{L}$  入れた。プロテインアッセイ濃縮色素試薬を 5 倍希釈したものを 200  $\mu\text{L}$  添加し、Multiscan EX リーダー (Thermo Fisher Scientific) にて 5 分間で振とうさせ、594 nm の吸光度を測定した。標準物質として既知濃度の BSA (脂肪酸不含) を用いて同様の操作をして得た検量線から可溶化液のタンパク質質量を求めた。

## 6) トロポニン T タンパク質発現の検出 (Western blot 法)

タンパク質 25  $\mu\text{g}$  を含む可溶化試料に、5 倍濃縮サンプルバッファーを全量の 5 分の 1 量を加えて 100°C の水浴で 5 分間煮沸した。その後、12% ミニプロティアン® TGX™ プレキャストゲルを使用して各ウェルに 15  $\mu\text{L}$  の可溶化試料を添加し、泳動バッファー (25 mM トリス塩酸 pH 8.3, 190 mM グリシン, 0.1% SDS) を用いて泳動した。泳動用マーカー色素は Pierce Ladder を用いた。泳動用装置としてミニプロティアン Tetra セル (BIO-RAD Co.) を用いた。また、分子量既知の標準タンパク質を同時に泳動してその移動度から試料タンパク質の分子量を求めた。泳動終了後、ゲル内のタンパク質を転写バッファー (25 mM トリス塩酸 pH 8.3, 190 mM グリシン) 中、25 V の定電圧で冷却しながら通電させ、0.2  $\mu\text{m}$  の PVDF 膜へ転写した。非特異的な吸着を防ぐため、この PVDF 膜を Tris based saline with Tween 20 (TBS-T; 20 mM トリス塩酸, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, ddH<sub>2</sub>O を HCl により pH 7.6 に調節) に 5% BSA 及び 0.05% NaN<sub>3</sub> を加えて調節したブロッキングバッファーにて室温で 1 時間ブロッキングした。TBS-T で 4 回洗浄後、5% BSA 及び 0.05% NaN<sub>3</sub>/TBS-T でそれぞれ 1,000 倍に希釈したウサギ抗トロポニン T 抗体, 3,000 倍に希釈したウサギ抗 GAPDH 抗体を室温で 2 時間または 4°C で一晩処理した。その後、TBS-T で 4 回洗浄した。次いで、5% スキムミルク/TBS-T で 5,000 倍に希釈した HRP 標識マウス抗ウサギ IgG 抗体と PVDF 膜を室温で 1 時間反応させた。反応後、PVDF 膜を TBS-T で 5 分間 4 回洗浄後、ECL Western Blotting Detection Reagents で化学発光させ、Fuji film Super RX (FUJIFILM Co., 東京) に露光した。トロポニン T と GAPDH はそれぞれ 40 kDa, 37 kDa にそれぞれ単一のバンドとして現れた。相対バンド強度は Image J ソフトウェア (NIH, MD, USA)

を用いたデンシメトリーによって計測した。

#### 7) 酸素消費量の測定

細胞外酸素消費 (oxygen consumption rate: OCR) は, O<sub>2</sub> Consumption Assay (Abcam, ON, Canada) を用いて測定した。96 穴プレートに 1 穴あたり  $4 \times 10^6$  細胞 / 200  $\mu$ L を播種し, コンフルエントに達するまで培養した。培地を除去し, 新たな培地を 150  $\mu$ L 加えた。各穴に ddH<sub>2</sub>O で調節した Extracellular O<sub>2</sub> Consumption 試薬を 10  $\mu$ L 加えた。最後に High Sensitivity Mineral Oil を 100  $\mu$ L 加えて封をした。37°C に設定したプレートリーダー (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, VT, USA) で, 90 分間 Ex/Em = 380/650 nm の蛍光強度を 1 分半の間隔で 60 分間プロットして OCR を算出した。

#### 8) 乳酸値の測定

培地中の乳酸値は, L-Lactate Assay Kit (Cayman Chemical) を用いて測定した。コンフルエントに達した細胞の培地をエッペンドルフチューブに 500  $\mu$ L 採取し, 0.5 M メタリン酸試薬 500  $\mu$ L を加えて, 4°C で 5 分間, 10,000 $\times$ g にて遠心した。その後 5 M 炭酸カリウム溶液 50  $\mu$ L を加え, さらに 4°C で 5 分間 10,000 $\times$ g にて遠心した。上清 20  $\mu$ L を採取して 96 穴プレートに入れ, Assay Buffer 100  $\mu$ L, Cofactor Mixture 20  $\mu$ L, Fluorometric Substrate 20  $\mu$ L, Enzyme Mixture 40  $\mu$ L を加えて室温で 20 分間反応させた後, プレートリーダーにて Ex/Em = 540/595 nm の蛍光強度を測定した。標準物質には既知濃度の L-乳酸を用いて同様の操作をして得た検量線から, 培地中の乳酸値を求めた。

#### 9) ADP/ATP 比の算出

細胞中の ADP/ATP 比は, ADP/ATP Ratio Assay Kit (Sigma-Aldrich) を用いて算出した。96 穴プレートに 1 穴あたり  $4 \times 10^6$  細胞 / 200  $\mu$ L を播種し, コンフルエントに達するまで培養した。その後培地を除去し, ATP reagent (Assay Buffer, substrate, Co-substrate, ATP enzyme) 90  $\mu$ L を添加して混和, 室温で 1 分間静置後, ATP 量を反映するルシフェラーゼ発光 (RLU<sub>A</sub>) を, プレートリーダーを用いて測定した。さらに,

室温で 10 分間静置後、ルシフェラーゼ発光を再度測定し ( $RLU_B$ ) , これを ADP 測定の際の基礎 ATP 量とした. 次に ADP reagent 5  $\mu$ L を添加し, 室温で 1 分間静置後, ADP 量を反映するルシフェラーゼ発光 ( $RLU_C$ ) を測定した. ADP/ATP 比は,  $(RLU_C - RLU_B) / (RLU_A)$  より計算し求めた.

#### 10) NAD/NADH 比の算出

NAD/NADH 比は, NAD/NADH-Glo<sup>TM</sup> Assay (Promega, WI, USA) を用いて算出した. 96 穴プレートに 1 穴あたり  $4 \times 10^6$  細胞 / 200  $\mu$ L を播種し, コンフルエントに達するまで培養した. Luciferin Detection Reagent を Reconstitution Buffer 10 mL で溶解させ, ルシフェリン検出試薬を調整した. NAD Cycling Enzyme を ddH<sub>2</sub>O 275  $\mu$ L で調整した. ルシフェリン検出試薬 1 mL に Reductase 5  $\mu$ L, Reductase Substrate 5  $\mu$ L, NAD Cycling Enzyme 5  $\mu$ L, NAD Cycling Substrate 25  $\mu$ L を添加して NAD/NADH-Glo<sup>TM</sup> Detection Reagent を調整した. 1 穴 50  $\mu$ L 残して培地を除き NAD/NADH-Glo<sup>TM</sup> Detection Reagent 50  $\mu$ L を添加することで, 暗闇で室温, 30 分間静置後, プレートリーダーにて NADH の存在下, Reductase がプロルシフェリン基をルシフェリンへと還元した際のルシフェラーゼ発光を測定した.

#### 11) 細胞生存率の測定

細胞生存率は, RealTime-Glo<sup>TM</sup> MT Cell Viability Assay (Promega) を用いて測定した. 6 穴プレートに 1 穴あたり  $4 \times 10^6$  細胞 / 2 mL となるように細胞を播種し, コンフルエント直前の細胞に薬物処理を行い, さらに 24 時間培養した. 非細胞透過性の NanoLuc<sup>®</sup> Enzyme 2  $\mu$ L 及び MT Cell Viability Substrate 2  $\mu$ L を DMEM 996  $\mu$ L 加え,  $2 \times$  RealTime-Glo<sup>TM</sup> とした. 1 穴 50  $\mu$ L 残して培地を除き,  $2 \times$  RealTime-Glo<sup>TM</sup> 50  $\mu$ L を添加し, 室温で 10 分間静置後, プレートリーダーにてルシフェラーゼ発光を測定した.



## 12) 20S プロテアソーム活性の測定

$2 \times 10^5$  細胞 / 2 mL となるように 6 穴プレートに細胞を播種し、コンフルエント直前に薬物刺激を行い、さらに 24 時間培養した。その後、回収した細胞を 4°C で 12 分間、 $1,500 \times g$  にて遠心した。上清を除き、ペレットに細胞可溶化液 (50 mM HEPES pH 7.4, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) 200  $\mu$ L を添加し溶解させた。さらに 4°C で 20 分間、 $1,500 \times g$  で遠心した後の上清をサンプルとした。96 穴プレートにサンプル, Assay Buffer, ddH<sub>2</sub>O, 20S プロテアソームに特異的に作用するペプチド基質である Suc-LLVY-7-Amino-4-methylcoumarin (CHEMICON Inc., MA, USA) を含む基質液を加えて暗所で 37°C にて 1 時間静置し、遊離した 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) をプレートリーダーにて Ex/Em = 380/460 nm で測定した。既知濃度の AMC を用いて同様の操作をして得た検量線から 20S プロテアソームの活性を求めた。

## 13) 統計処理

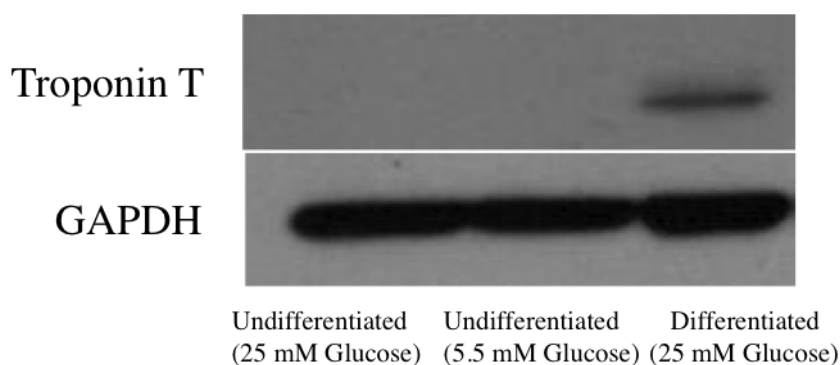
統計学的処理は、すべて Prism 5 (Version 5.0a) を用いて行った。多群間の比較は、一元配置の分散分析 (One-way analysis of variance: One-way ANOVA) で行い、その後 Bonferroni 検定を行った。危険率 5% 未満 ( $P < 0.05$ ) を統計学的に有意とみなした。

### 第3節 結果

#### 第1項 H9c2 細胞の分化の確認

序論でも述べたように, H9c2 細胞は培地中の血清を通常の 10% から 1% へ減少させるか, または RA を培地中に添加することで筋管細胞へと分化する.<sup>41)</sup> 本実験では, NG を含有する培地に 1% 血清, さらに RA (10 nM) を添加した培地で H9c2 細胞を 2 週間培養することで細胞を分化させた.

まず, 本実験条件で H9c2 細胞が分化しているかを, トロポニン T 発現を指標に検討した. 10% 血清を含む NG 含有培地及び LG 含有培地で培養した細胞ではトロポニン T の発現は認められなかったが, 分化させた細胞ではトロポニン T の発現が認められた (Fig. 4).

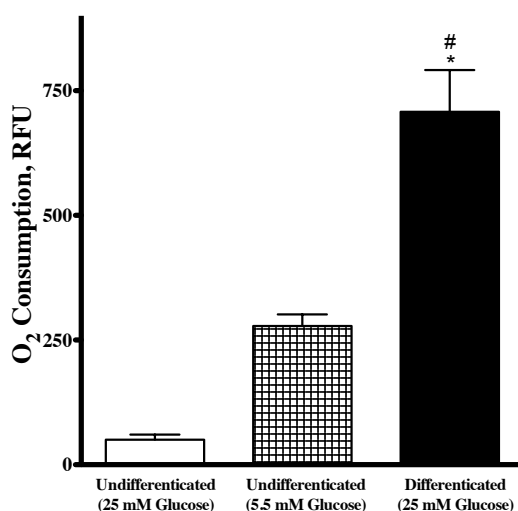


**Fig. 4. Expression of Troponin T in H9c2 Cells.**

Undifferentiated H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose or 5.5 mM glucose supplemented with 10% FBS. Differentiated H9c2 cells were cultured in DMEM containing 25 mM glucose supplemented with 1 % FBS and 10 nM RA for 2 weeks.

## 第2項 H9c2 細胞のエネルギー代謝経路の検討

H9c2 細胞は通常、酸素をほとんど消費しない解糖系を主としたエネルギー代謝経路を示すと報告されている。<sup>41)</sup> NG 含有培地及び LG 含有培地で培養した細胞の基礎酸素消費量はそれぞれ、 $50 \pm 14.5$  及び  $278 \pm 23.35$  (RFU) であり、有意差はないものの、LG 含有培地で培養した細胞は、NG 含有培地で培養した細胞と比べて約 5 倍の酸素が消費されていた。一方、分化させた細胞の酸素消費量は、NG 含培地及び LG 含有培地で培養した未分化の細胞と比べて有意に高値を示した (Fig. 5)。



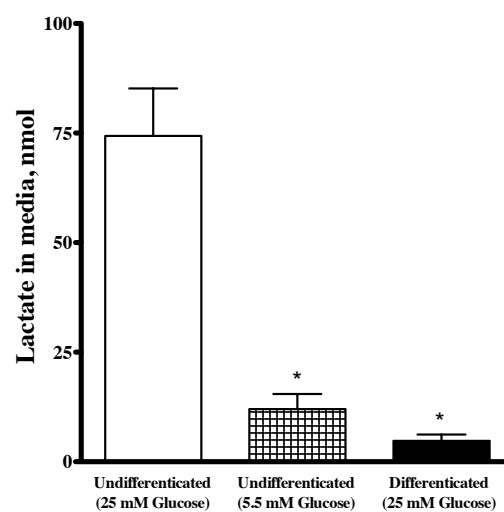
**Fig. 5. Oxygen Consumption of H9c2 Cells.**

Undifferentiated H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose or 5.5 mM glucose supplemented with 10% FBS. Differentiated H9c2 cells were cultured in DMEM containing 25 mM glucose supplemented with 1 % FBS and 10 nM retinoic acids for 2 weeks.

RFU: relative fluorescent unit. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3). \*P < 0.05 vs.

Undifferentiated (25 mM glucose), #P < 0.05 vs. Undifferentiated (5.5 mM glucose).

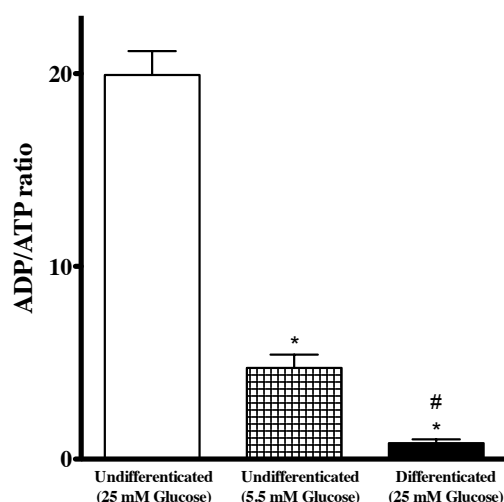
乳酸は、解糖系により産生されたピルビン酸がミトコンドリアへ流入しない場合、細胞質内で乳酸脱水素酵素により産生される。NG 含有培地で培養した細胞から遊離された乳酸値と比較して、LG 含有培地で培養した細胞及び分化させた細胞から遊離された乳酸値は、著明に低値を示した (Fig. 6)。LG 含有培地で培養した細胞における乳酸値が、分化させた細胞と同程度であったことから、LG 含有培地で培養すると、分化させなくても分化細胞と同様にミトコンドリアを利用したエネルギー産生がなされているのではないかと考え、続いて各培養条件で培養した細胞での ADP/ATP 比、NAD/NADH 比を検討した。



**Fig. 6. Lactate Production from H9c2 Cells.**

Undifferentiated H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose or 5.5 mM glucose supplemented with 10% FBS. Differentiated H9c2 cells were cultured in DMEM containing 25 mM glucose supplemented with 1 % FBS and 10 nM RA for 2 weeks. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  vs. Undifferentiated (25 mM glucose).

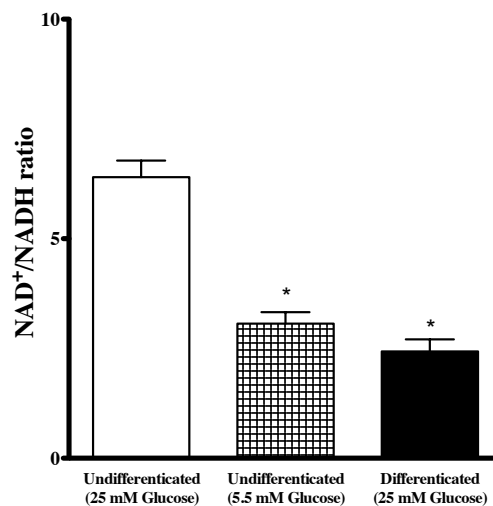
細胞のエネルギー産生効率を表す ADP/ATP 比は、基質である ADP 量と、ATP 合成酵素により ADP と Pi から合成される ATP 量を測定してその比から求められる。LG 含有培地で培養した細胞の ADP/ATP 比は、NG 含有培地で培養した細胞の ADP/ATP 比と比較して著明に減少した (Fig. 7)。また、分化細胞の ADP/ATP 比は、LG 含有培地で培養した細胞よりもさらに低い値を示した。



**Fig. 7. ADP/ATP Ratio in H9c2 Cells.**

Undifferentiated H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose or 5.5 mM glucose supplemented with 10% FBS. Differentiated H9c2 cells were cultured in DMEM containing 25 mM glucose supplemented with 1 % FBS and 10 nM RA for 2 weeks. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3). \*P < 0.05 vs. Undifferentiated (25 mM glucose), #P < 0.05 vs. Undifferentiated (5.5 mM glucose).

NAD は、電子受容体として作用する酸化型 ( $\text{NAD}^+$ ) と、電子供与体として作用する還元型 ( $\text{NADH}$ ) の 2 つの状態を循環している。解糖系とクレブス回路において産生された  $\text{NADH}$  は、電子伝達系において  $\text{NAD}^+$  へと変換される際に ATP が産生される。また、嫌氣的解糖系において乳酸が産生される際に  $\text{NADH}$  から  $\text{NAD}^+$  が産生されることから、 $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  比を求めることでも細胞のエネルギー産生効率が推測できる。そこで、LG 及び NG 含有培地で培養した H9c2 細胞の  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  比を検討した。LG 含有培地で培養した細胞及び分化細胞の  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  比は、NG 含有培地で培養した細胞の  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  比と比較して著明に減少した (Fig. 8)。

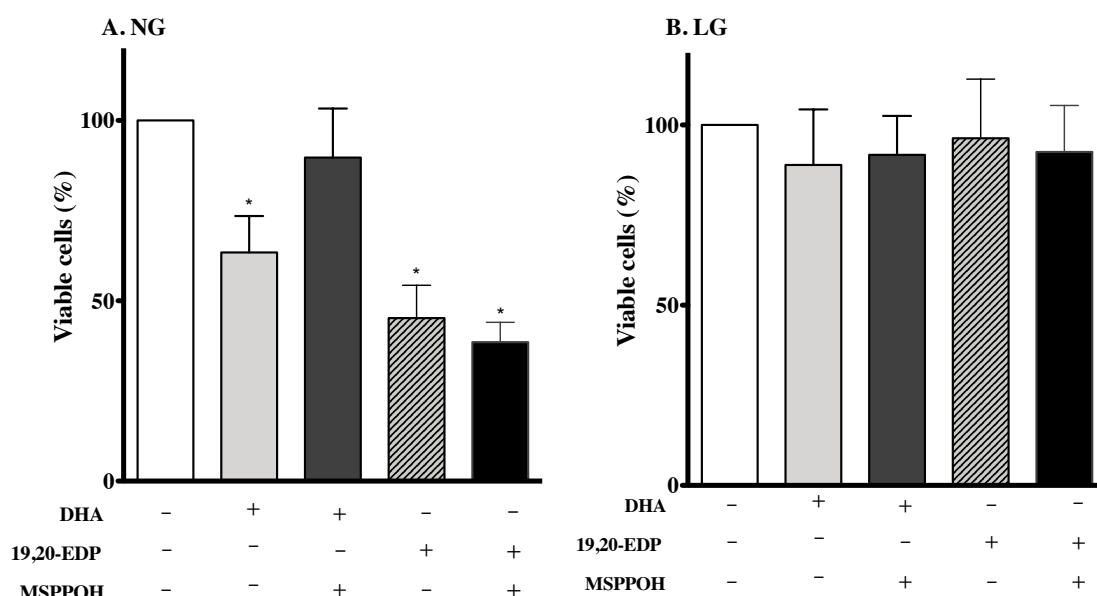


**Fig. 8.  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  Ratio in H9c2 Cells.**

Undifferentiated H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose or 5.5 mM glucose supplemented with 10% FBS. Differentiated H9c2 cells were cultured in DMEM containing 25 mM glucose supplemented with 1 % FBS and 10 nM RA for 2 weeks. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  vs. Undifferentiated (25 mM glucose).

### 第3項 H9c2 細胞生存率に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響

第2項の検討により，NG 及び LG 含有培地で培養した H9c2 細胞では異なるエネルギー代謝経路を示すことが示された．そこで次に，NG 及び LG 含有培地にて培養した H9c2 細胞生存率に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響を検討した．DHA (100  $\mu$ M) 及び 19, 20-EDP (1  $\mu$ M) は，NG 含有培地で培養した細胞の生存率をそれぞれ単独で有意に減少させた (Fig. 9A) ．また，DHA による細胞生存率の有意な低下は，CYP エポキシゲナーゼ阻害薬である MSPPOH の存在下ではみられなかった (Fig. 9A) ．一方で，LG 含有培地で培養した細胞では DHA 及び 19,20-EDP の影響がみられなかった (Fig. 9B) ．

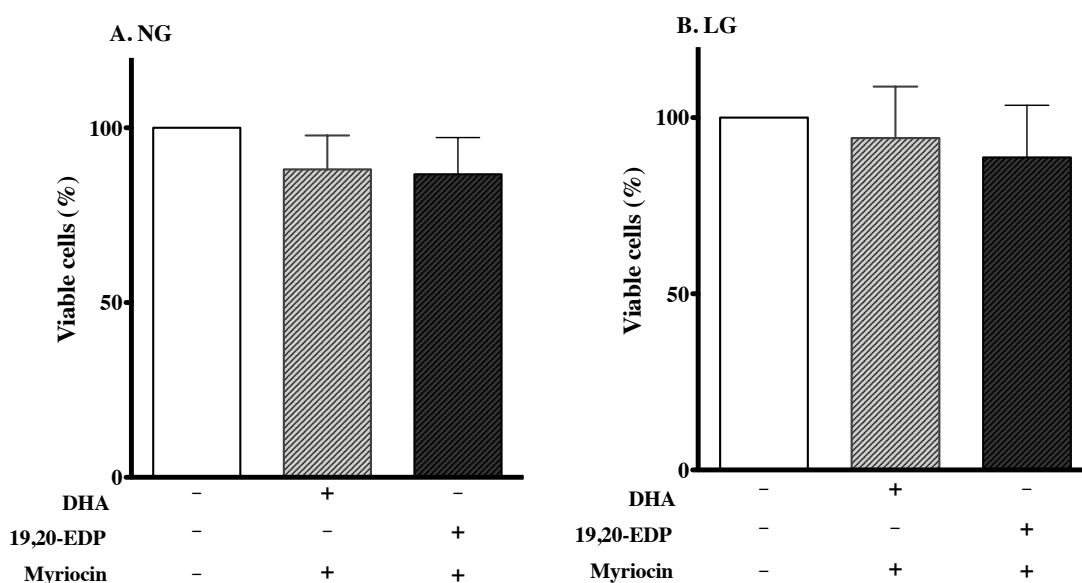


**Fig. 9. DHA and 19, 20-EDP Induce Cytotoxicity under Glycolytic Conditions.**

H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose (NG; A) or 5.5 mM glucose (LG; B), and treated with DHA (100  $\mu$ M), 19, 20-EDP (1  $\mu$ M) or MSPPOH (50  $\mu$ M). Results were represented as a percentage taking none-treated group (control) to be 100%. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3). \*P < 0.05 vs. non-treated group.

#### 第4項 ミリオシン存在下での H9c2 細胞生存率に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響

序論で述べたように, Samokvalov らは DHA による H9c2 細胞の細胞生存率の低下は, セラミドの *de novo* 合成経路阻害薬であるミリオシン存在下ではみられないことを報告している.<sup>30)</sup> そこで, 本研究では NG 及び LG 含有培地で培養した細胞において, DHA 及び 19, 20-EDP による細胞生存率の低下に及ぼすミリオシンの影響を検討した. その結果, ミリオシン存在下では DHA 及び 19, 20-EDP は細胞生存率に影響を与えなかった (Fig. 10A, B).



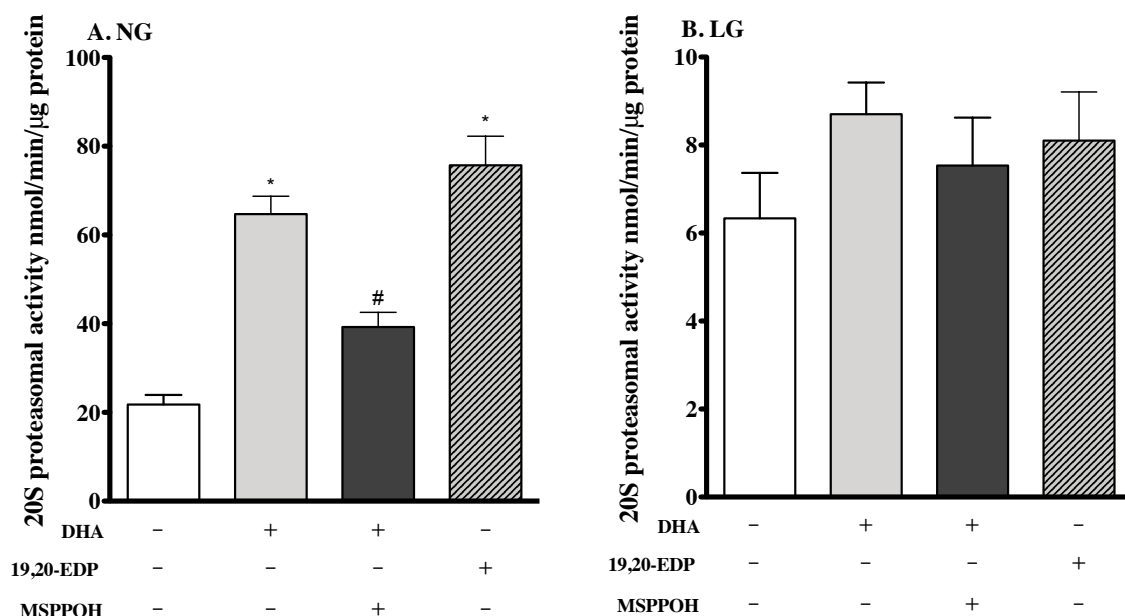
**Fig. 10. DHA and 19, 20-EDP-induced Cytotoxicity is Attenuated by an Inhibitor of *de novo* Ceramide Synthesis under Glycolytic Conditions.**

H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose (NG; A) or 5.5 mM glucose (LG; B), and treated with DHA (100  $\mu$ M), 19, 20-EDP (1  $\mu$ M) or Myriocin (1  $\mu$ M). Results were represented as a percentage taking none-treated group (control) to be 100%. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3).



## 第5項 20S プロテアソーム活性に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響

プロテアソームは、ユビキチン化および損傷を受けたタンパク質の分解を促進することにより細胞恒常性の維持に寄与する。<sup>47)</sup> NG 含有培地で培養した細胞の 20S プロテアソームの活性は, LG 含有培地で培養した細胞と比較してコントロールレベルで高い活性がみられた。さらに DHA 及び 19, 20-EDP は, NG 含有培地で培養した細胞における 20S プロテアソーム活性を有意に上昇させ, DHA によるその活性上昇作用は MSPPOH 存在下ではみられなかった (Fig. 11A) 。 また, LG 含有培地で培養した細胞では, DHA 及び 19, 20-EDP による影響はみられなかった (Fig. 11B) 。



**Fig. 11. DHA and 19, 20-EDP Induce 20S Proteasomal Activity under 25 mM Glucose.**

H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose (NG; A) or 5.5 mM glucose (LG; B), and treated with DHA (100 μM), 19, 20-EDP (1 μM) or MSPPOH (50 μM). Results were represented as a percentage taking none-treated group (control) to be 100%. Data are expressed as mean ± SEM (n = 3). \*P < 0.05 vs. non-treated group, #P < 0.05 vs. DHA alone.

## 第4節 考察

第1章では、培地中のグルコース含有量が異なった状態で培養した未分化 H9c2 細胞におけるエネルギー代謝経路を検討し、さらにこれらの条件で培養した細胞の生存率に及ぼす DHA 及び 19,20-EDP の影響を検討した。

トロポニン T は心筋の筋原線維を構成するタンパク質の一種で、心筋細胞の収縮機構において重要な役割を果たす。実際、トロポニン T は H9c2 細胞を分化させた心筋細胞でのみ発現がみられた。一方で、未分化 H9c2 細胞では NG 含有培地及び LG 含有培地でトロポニン T の発現が確認されなかったことから、グルコースを 25 mM から 5.5 mM へ変更しても未分化細胞としての形態を保つことが明らかとなった。なお、ラットの坐骨神経から単離した単一神経線維を用いた実験においてグルコース濃度を 30 mM まで変化させても細胞内イオン濃度に大きな影響が認められないという報告からも、<sup>48)</sup> 25 mM 及び 5.5 mM グルコースを使用した本実験においてもグルコース濃度の変化による細胞の浸透圧への影響は少ないと考えられる。

NG 含有培地で培養された細胞と比較して、LG 含有培地で培養した細胞の酸素消費量は高く、乳酸産生量は低値を示した。従って、グルコース濃度を下げることによって、NG 条件でみられた解糖系優位なエネルギー代謝経路が、酸素を消費する酸化的リン酸化経路へと変換される可能性が考えられた。ATP は解糖系で 2 分子、クレブス回路で 2 分子、電子伝達系で 36 分子産生される。また、NADH も解糖系で 2 分子、ピルビン酸からアセチル CoA を合成する際に 2 分子、クレブス回路で 6 分子産生される。前述した通り、ATP 及び NADH はそれぞれ ADP 及び  $\text{NAD}^+$  から産生される。これらは解糖系よりもミトコンドリアを利用した酸化的リン酸化経路で効率よく産生されることから、ADP/ATP 比及び NAD/NADH 比はミトコンドリアを利用したエネルギー代謝系になると低値を示す。事実、NG 含有培地で培養した細胞の ADP/ATP 比及び NAD/NADH 比は、細胞を分化させることで有意に低下した。興味深いことに、未分化細胞でも LG 含有培地で培養した細胞ではこれらの比が有意に減少することが明らかとなり、分化させなくてもグルコース濃度を減少させることで H9c2 細胞のエネルギー代謝経路は、ミトコンドリアを利用する酸化的リン酸化経路に変換されることが明らかとなった。

さらに、Samohvalov らの報告と一致して、<sup>30)</sup> 解糖系が優位な NG 含有培地の未分化 H9c2 細胞で DHA (100  $\mu\text{M}$ ) 及び 19,20-EDP (1  $\mu\text{M}$ ) が細胞死を誘導し、DHA の H9c2 細胞の

生存率低下は、CYP エポキシゲナーゼを阻害することで解除されたことからその主たる作用は EDPs であると考えられた。19,20-EDP もまた解糖系が優位な増殖性をもつヒト臍静脈内皮細胞 HUVEC においても、細胞増殖を抑制することが報告されている。<sup>49)</sup> 一方で、LG 含有培地においては DHA 及び 19,20-EDP による細胞生存率への影響がみられなかった。このことは Qadhi らによる DHA (100  $\mu$ M) は酸化リン酸経路が優位なエネルギー代謝経路を有する NCM において細胞生存率に影響がみられないという報告<sup>29)</sup> と一致する。また、酸化リン酸化経路を主たるエネルギー代謝経路とする心臓 HL-1 細胞においては、19, 20-EDP は LPS により誘導される細胞障害を保護する。<sup>28)</sup>

NG 含有培地での DHA 及び 19,20-EDP による細胞死は、ミリオシン存在下ではみられなかった。ミリオシンは、SPT を抑制することで *de novo* 合成経路を抑制する。従って、DHA 及び 19,20-EDP による細胞死の作用にはセラミド *de novo* 合成経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。リン脂質の一種であるセラミドは、アポトーシス誘導及び炎症に関するシグナル分子として作用し、細胞の生死を決定づける上で大きな役割を果たしている。<sup>50)</sup> DHA はラット初代培養肝細胞において SPT を活性化してセラミド量を増加させることが報告されている。<sup>30,51)</sup> DHA は、PPAR のリガンドであることが報告されており、<sup>52)</sup> また、高脂肪食摂取ラット心臓では、PPAR $\alpha$ 活性化を介した SPT 活性化がセラミド蓄積するという報告もある。<sup>53)</sup> 従って、DHA 及び 19,20-EDP による H9c2 細胞死誘導作用の機序に、PPAR $\delta$ の活性化を介したセラミド *de novo* 合成経路の活性化の亢進が関与していることが考えられた。

プロテアソームは、ユビキチン化及び損傷を受けたタンパク質を分解・除去する触媒 20S コアと、2つの 19S 調節サブユニットからなる巨大なタンパク質分解酵素複合体であり、タンパク質分解を調節することによって細胞増殖及びホメオスタシスを維持する。<sup>47)</sup> 特に、がん細胞などの活発な細胞増殖を伴い解糖系が優位な細胞でプロテアソームが高い活性をもつことが知られている。<sup>54)</sup> 従って、NG 含有培地で培養した細胞が LG 含有培地で培養した細胞と比べてコントロールレベルでのプロテアソーム活性が高値を示したことは、NG 含有培地で培養するとは解糖系優位なエネルギー代謝系になり、LG 含有培地で培養すると酸化リン酸化優位なエネルギー代謝系になることを支持すると考えられた。また、NG 含有培地で培養した細胞において DHA 及び 19,20-EDP で 20S プロテアソームが高値を示したことは、細胞内にユビキチン化タンパク質が増加してオルガネラに蓄積していること

を示している。プロテアソームの活性化は、細胞のアポトーシスやオートファジーを招くことから、<sup>22,55)</sup> このことが DHA 及 19,20-EDP による細胞死誘導作用機序の一部として関与している可能性が考えられた。

以上、第 1 章では H9c2 細胞を LG 含有培地で培養すると、分化することなくエネルギー代謝経路が酸化的リン酸化経路になることを明らかにした。さらに、DHA 及び 19,20-EDP は解糖系優位なエネルギー代謝経路の細胞で特異的に細胞死を引き起こすこと、その機序にセラミド *de novo* 合成系及びプロテアソームの活性化が関与することを明らかにした。

## 第2章 H9c2 細胞のセラミド含量及びミトコンドリア機能に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響

### 第1節 緒言

第1章では、Samokhavalov らの報告と一致して、<sup>30)</sup> DHA 及び 19,20-EDP が NG 含有培地で培養した H9c2 細胞の生存率を有意に抑制することを示した。また、この DHA 及び 19,20-EDP による細胞死誘導作用は、ミリオシンによって抑制されたことから、その作用メカニズムに細胞内でのセラミド *de novo* 合成が主要な役割を担っていることが示唆された。実際、細胞内のセラミド量の変化は、細胞の生死を決定づけるほどの重要な因子であることが報告されており、特にミトコンドリア機能への影響が注目されている。事実、セラミドアナログである N-アセチルスフィンゴシンは、ラット心臓組織でのミトコンドリアの電子伝達系複合体 III の酵素活性を低下させることが報告されている。<sup>37)</sup>

そこで第2章では、NG 含有培地及び LG 含有培地で培養した未分化 H9c2 細胞における DHA 及び 19,20-EDP によるセラミドの含有量とその局在を検討した。さらに、DHA 及び 19,20-EDP によるミトコンドリア機能への影響とセラミド *de novo* 合成系の関与について詳細に検討した。

## 第2節 方法

### 1. 使用細胞

第1章第2節1)に準じた.

### 2. 使用薬物及び試薬

実験に使用した EDTA, オルトバナジン酸ナトリウム, フッ化ナトリウム, アプロプチニン, ロイペプチン, ペプスタチン, 2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン, グリコールエーテルジアミン四酢酸 (ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid: EGTA) , タウリン, ラクトビオン酸, 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid : DTNB) , オキサロ酢酸, MG-132 は Sigma-Aldrich より, 3-(4,5-Dimethylthial-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) は Thermo Fisher Scientific より, アセチル CoA, 塩化マグネシウム六水和物は Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) より, ウサギ抗クエン酸合成酵素 (citrate synthase: CS) 抗体, マウス抗シトクロム *c* 酸化酵素 (cytochrome *c* oxidase: COX) 抗体, HRP 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体は Cell Signaling Technology より, reduced cytochrome *c* は Abcam より購入した. 上記以外は第1章第2節2) に準じた.

### 3. 細胞の薬物処理

第1章第2節3)に準じた.

### 4. 細胞分画法

細胞を  $175\text{ cm}^2$  フラスコで培養, 試薬処理後にトリプシン処理法により回収した. 細胞を  $4^\circ\text{C}$  で 10 分間,  $700\times g$  で遠心分離し, 冷却 PBS で洗浄後, 再び  $4^\circ\text{C}$  で 10 分間,  $700\times g$  で遠心分離した. 上清を除去し, ペレットにホモジネート緩衝液 (250 mM スクロース, 10 mM トリス塩酸, 1 mM EDTA, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 1 mM フッ化ナトリウム, 10  $\mu\text{g/L}$  アプロプチニン, 2  $\mu\text{g/L}$  ロイペプチン, 100  $\mu\text{g/L}$  ペプスタチン) を加えて氷上にてホモジネートし,  $4^\circ\text{C}$  で 10 分間,  $700\times g$  で遠心分離し, この際のペレットを細胞膜画分とした. 上清をさらに  $4^\circ\text{C}$  で 20 分間,  $10,000\times g$  で遠心

分離し，ペレットをリソソーム/ミトコンドリア画分とした．

## 5. セラミド量の測定

セラミド脂質の抽出は，Bose 及び Kolenick の方法を参考に行った．<sup>56)</sup> 0.4% NaCl 溶液 300  $\mu$ L 及びクロロホルム-メタノール-1N HCl (100 : 100 : 1, v / v / v) 混合物 1 mL を細胞膜画分，リソソーム/ミトコンドリア画分それぞれに添加し，室温で 20 分間 Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いて攪拌させた．さらに室温，20,000  $\times$  g で 2 分間遠心分離後，有機層に用時調製した 0.5  $\mu$ g / mL 2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン (メタノール-0.1%酢酸溶液) を加えて内部標準とした．次いで，遠心濃縮機 (Savant DNA 120 SpeedVac<sup>®</sup> Concentrators; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で蒸発乾固した残留物をメタノールにて再溶解させて，4 $^{\circ}$ C，6,000 $\times$  g で 1 分間遠心してセラミド含有の脂質を抽出した．LC/MS 分析法は，Sahle らの方法を参考に行った．<sup>57)</sup> 高速液体クロマトグラフには 2795 separations module (Waters, MA, USA) ，質量分析装置には Waters ZQ 4000 (Waters) を用いた．分離カラムは Alltima HP C18 カラム (150  $\times$  2.1 mm, Thermo Fisher Scientific Inc.) ，イオン化法はポジティブ (正イオン) モードを使用し，質量電荷比はセラミド及び4-メトキシベンゾフェノンをそれぞれ  $m/z = 342.4$  及び 213.1 として検出した．カラム温度 35 $^{\circ}$ C，試料注入量は 35  $\mu$ L とした．移動相にはメタノール-テトラヒドロフラン-水-酢酸 (80 : 10 : 10 : 0.2, v / v / v / v) とし，アイソクラティック法で送液した．データ取得中の質量分析計のイオン源温度を 120 $^{\circ}$ C，脱溶媒室温度を 275 $^{\circ}$ Cにした．コーン電圧をセラミド及び4-メトキシベンゾフェノンそれぞれ 25 V 及び 15 V に設定した．キャピラリー電圧を 4.0 kV に設定した．別に分析した既知濃度のセラミドの標準試料より作成した検量線を用いて計算し，次いでタンパク質量で補正し，可溶性タンパク質あたりのセラミド濃度とした．

## 6. ミトコンドリア障害の検出

96 穴プレートに 1 穴あたり  $4 \times 10^6$  細胞 / 200  $\mu$ L となるように細胞を播種し，コンフルエント直前の細胞に薬物処理を行い，さらに 24 時間培養した．培養液中に MTT を 0.5 mg/mL となるように溶解した DMEM を，各穴に 150  $\mu$ L 添加して，5% CO<sub>2</sub>，37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした．その後，ジヒドロキシ酵素により還元されたホルマザ

ン結晶を抽出するため、DMEM を除去し、イソプロパノール 150  $\mu\text{L}$  を加えて室温で 30 分間静置することで結晶を溶解した。ホルマザン色素を 595 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。

## 7. ATP 産生量の測定

ATP 産生量は、ATP Bioluminescent Assay Kit (Sigma-Aldrich) 及び ATP Assay Kit (Abcam) を用いて測定した。これらのキットは、ホタルルシフェラーゼ発光法に基づいて D-ルシフェリンがルシフェラーゼ、マグネシウムイオン存在下で ATP と反応した後、酸素分子と反応して励起状態のオキシルシフェリンを生成し、基底状態に戻る際に発した光を測定するものである。細胞を 175  $\text{cm}^2$  のフラスコで培養し、コンフルエントに達したものをトリプシン処理して回収し、Sorvall Legend RT<sup>+</sup> Centrifuge (Thermo Scientific) にて 700  $\times g$  で遠心分離した。冷却 PBS で一度洗浄後、さらに 700  $\times g$  で遠心分離して上清を除去し、ペレットを Respiration buffer (0.5 mM EGTA, 3 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 20 mM タウリン, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM HEPES, 1 g/L BSA, 60 mM potassium-lactobionate, 0.3 mM DTT, pH 7.1) 600  $\mu\text{L}$  で懸濁したものをサンプルとして利用した。ATP Bioluminescent Assay Kit は、ATP Assay Mix (lyophilized powder containing luciferase, luciferin,  $\text{MgSO}_4$ , DTT, EDTA, BSA and tricine buffer salts) を、緩衝溶液で 25 倍に薄めてマイクロチューブに 50  $\mu\text{L}$ , サンプル 50  $\mu\text{L}$  を等量混合させて使用した。ATP Assay Kit は ATP reaction mix (ATP assay buffer, ATP probe, ATP converter, developer mix) 50  $\mu\text{L}$ , サンプル 50  $\mu\text{L}$  を加えて等量混合させて使用した。ルシフェリンと ATP がルシフェラーゼによりオキシルシフェリンへと変換された際に発した発光強度を、プレートリーダーを用いて測定した。

## 8. 細胞の可溶化法

第 1 章第 2 節 4) に準じた。

## 9. タンパク質定量法

第 1 章第 2 節 5) に準じた。



## 10. CS 及び COX 発現の検出

第 1 章第 2 節 6)に準じた。なお、CS 及び COX の検出には、それぞれ PVDF 膜を 5% BSA 及び 0.05%  $\text{NaN}_3$ /TBS-T でブロッキングし、一次抗体として 1,000 倍に希釈したウサギ抗 CS 抗体、10,000 倍に希釈したマウス抗 COX 抗体を使用した。二次抗体として 5% スキムミルク/TBS-T で 5,000 倍に希釈した HRP 標識のマウス抗ウサギ IgG 抗体及びウサギ抗マウス IgG 抗体を使用した。CS 及び COX はそれぞれ 52 kDa, 17 kDa にそれぞれ単一のバンドとして検出された。

## 11. CS 及び COX 活性の測定

CS 及び COX 活性の測定は、Spinazzi らの方法に従った。<sup>58)</sup> 細胞を  $175\text{ cm}^2$  のフラスコで培養し、コンフルエントに達したものをトリプシン処理して回収し、 $700\times g$  で遠心分離して冷却 PBS で一度洗浄した。さらに  $700\times g$  で遠心分離して上清を回収して残ったペレットを、Respiration buffer (0.5 mM EGTA, 3 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 20 mM タウリン, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM HEPES, BSA 1 g, 60 mM potassium-lactobionate, 0.3 mM DTT, pH 7.1) 600  $\mu\text{L}$  で懸濁し、凍結融解処理を行った。CS 活性の測定をするために 1.5 mL のディスポセルに ddH<sub>2</sub>O 300  $\mu\text{L}$ , 200 mM Tris (pH 8.0) with Triton X-100 500  $\mu\text{L}$ , 10 mM アセチル CoA 30  $\mu\text{L}$ , 1 mM DTNB 100  $\mu\text{L}$ , 希釈サンプル 10  $\mu\text{L}$  を調整した。セルを、37°C に保たれた分光光度計 (Lamda25; Perkin Elmer, USA) に移し、412 nm の吸光度を測定し、これをベースラインとした。その後、10 mM オキサロ酢酸 50  $\mu\text{L}$  を加えて酵素反応を開始させ、412 nm の吸光度測定した CS 活性を DTNB のモル吸光係数  $13.6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  を用いて算出した。COX 活性を測定するために 1.5 mL のディスポセルに ddH<sub>2</sub>O 400  $\mu\text{L}$ , 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 250  $\mu\text{L}$ , 1 mM reduced cytochrome c 50  $\mu\text{L}$  を入れた。セルを 37°C に保たれた分光光度計にて 550 nm の吸光度を測定し、これをベースラインとした。その後、希釈サンプル 20  $\mu\text{L}$  を加え、550 nm の吸光度を測定した。COX 活性は、cytochrome c のモル吸光係数  $18.5\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  を用いて算出した。

## 12. 統計処理

第 1 章第 2 節 13)に準じた。

### 第3節 結果

#### 第1項 セラミド含量に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響

未分化 H9c2 細胞より粗膜画分及びリソソーム/ミトコンドリア画分を分離・調製し、それぞれのセラミド含有量を測定した。DHA 及び 19, 20-EDP は、いずれも NG 含有培地条件下において粗膜画分及びリソソーム/ミトコンドリア画分のセラミド含有量を有意に増加させた。特に、リソソーム/ミトコンドリア画分での増加作用は顕著であり、粗膜画分の含有量より高値を示した。また、ミリオシンの存在下では、19,20-EDP によるこの増加作用はいずれの画分においても著明に抑制された。一方で、LG 含有培地条件下では、DHA 及び 19,20-EDP はセラミド含量に影響を与えなかった。

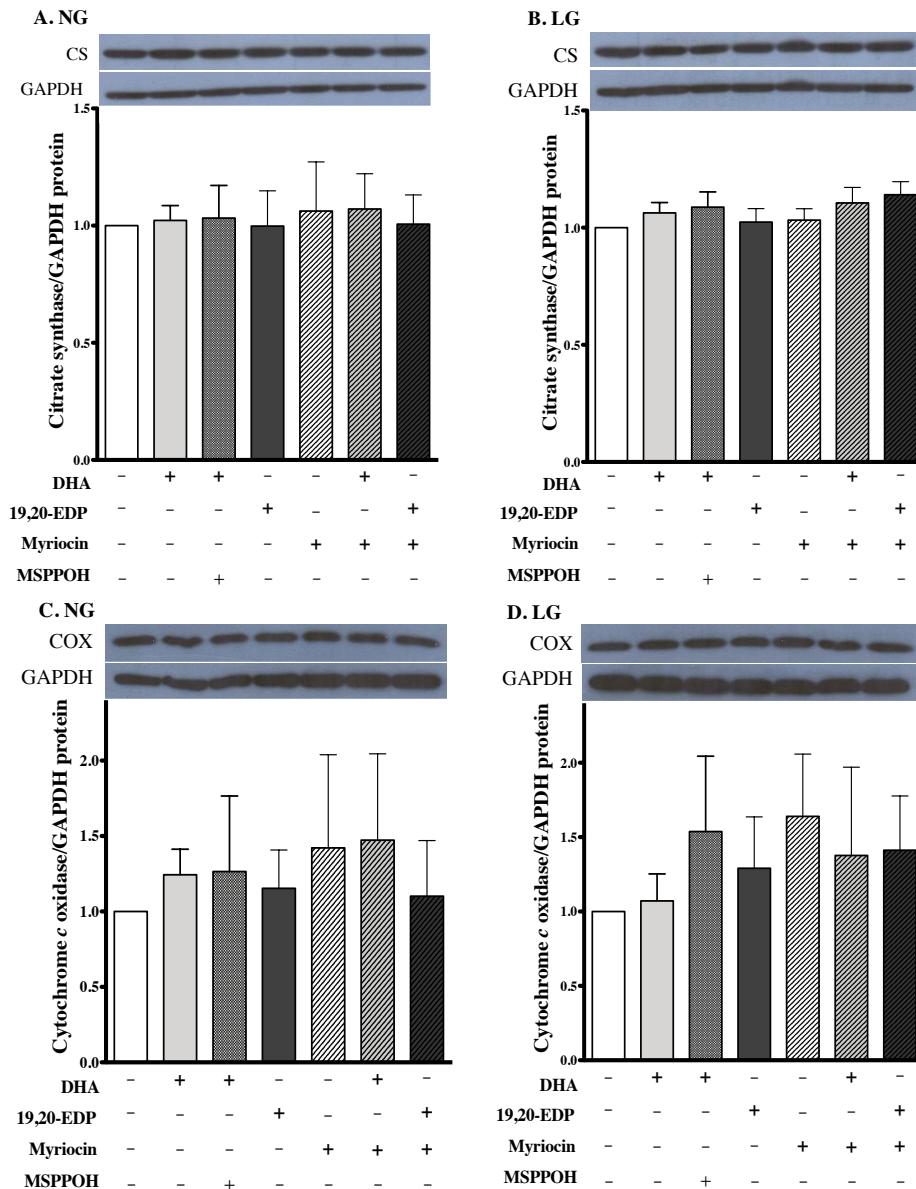
**Table. 1 DHA and 19, 20-EDP Accelerate Ceramide Accumulation Shifted to Lysosome/Mitochondria under Normal Glucose Condition.**

	Crude Membrane		Lysosome/mitochondria	
	NG	LG	NG	LG
	Ceramide Concentration (nmol/μg protein)			
<b>Control</b>	32.81 ± 1.9	14.27 ± 0.62	1.45 ± 1.27	1.14 ± 0.79
<b>DHA</b>	54.26 ± 1.73*	20.85 ± 0.87	470.73 ± 15.94*	0.25 ± 0.09
<b>19, 20-EDP</b>	50.50 ± 4.63*	16.44 ± 0.52	601.73 ± 23.9*	0.40 ± 0.21
<b>19, 20-EDP + myriocin</b>	18.23 ± 7.57†	11.78 ± 0.24	64.20 ± 63.85†	0.37 ± 0.22

LC/MS analysis was employed to measure the accumulation of ceramide in crude membrane fraction and lysosome/mitochondria fraction. H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose (NG) or 5.5 mM glucose (LG), and treated with DHA (100 μM), 19, 20-EDP (1 μM) or myriocin (1 μM). Data are expressed as mean ± SEM (n = 4). \*P < 0.05 vs. Control, †P < 0.05 vs. 19, 20-EDP alone.

第2項 クエン酸合成酵素及びシトクロム *c* 酸化酵素タンパク質発現に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響

DHA 及び 19, 20-EDP は, ミトコンドリアで ATP 産生に関与する酵素である CS 及び COX タンパク質発現に影響を及ぼさなかった. また, ミリオシン, MSPPOH の共存下においても, DHA 及び 19, 20-EDP は CS 及び COX タンパク質発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 12).

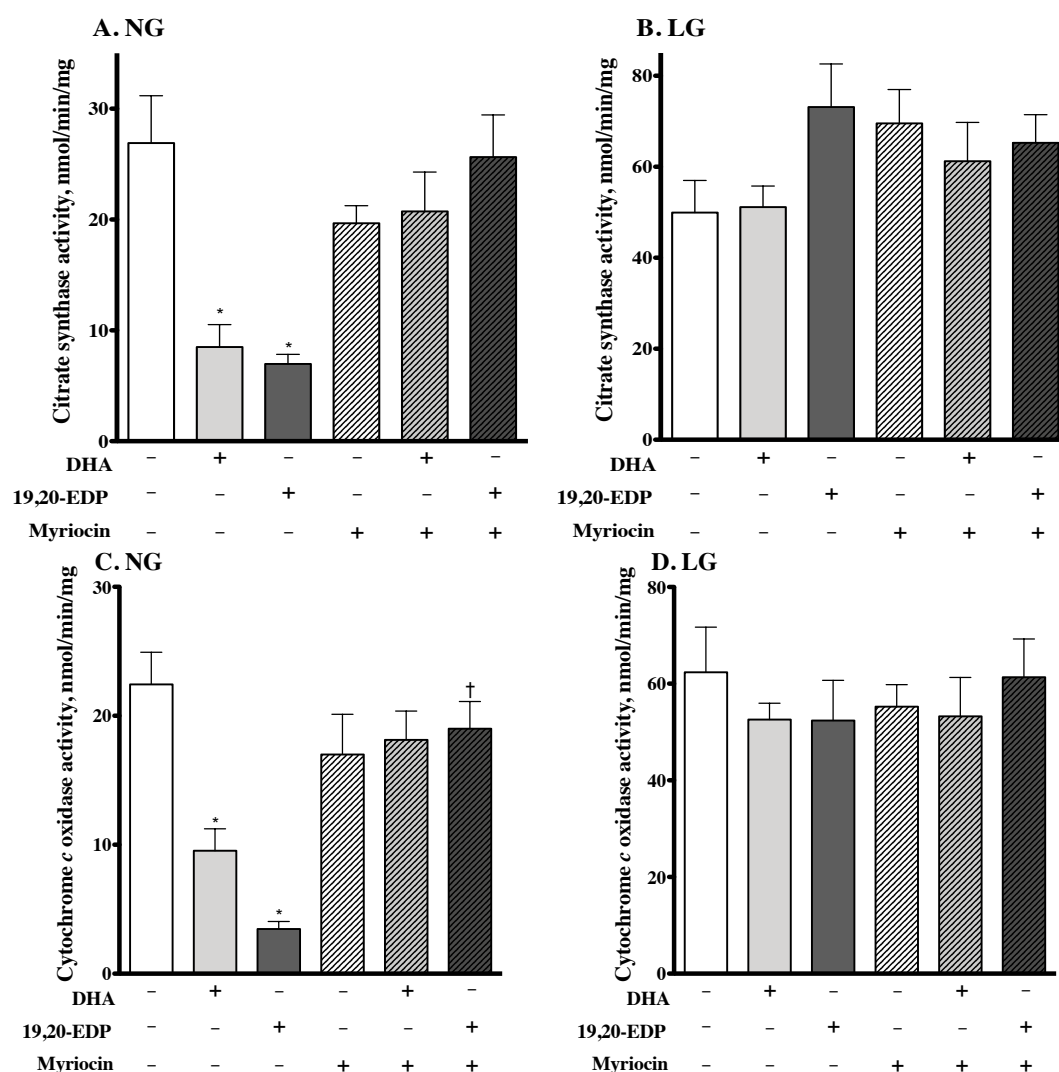


**Fig. 12. Protein Expression of Citrate Synthase and Cytochrome *c* Oxidase in H9c2 Cells.**

H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose (NG; A, C) or 5.5 mM glucose (LG; B, D), and treated with DHA (100  $\mu$ M), 19, 20-EDP (1  $\mu$ M), myriocin (1  $\mu$ M) or MSPPOH (50  $\mu$ M). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3).

### 第3項 クエン酸合成酵素及びシトクロム *c* 酸化酵素活性に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響

一方, DHA 及び 19,20-EDP は, NG 含有培地で培養した細胞において, CS 及び COX の酵素活性を有意に抑制した (Fig. 13A, C) . また, この酵素活性抑制作用は, ミリオシン存在下ではみられなかった (Fig. 13 A, C) . DHA 及び 19,20-EDP は, LG 含有培地条件下においては酵素活性に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 13 B, D) .

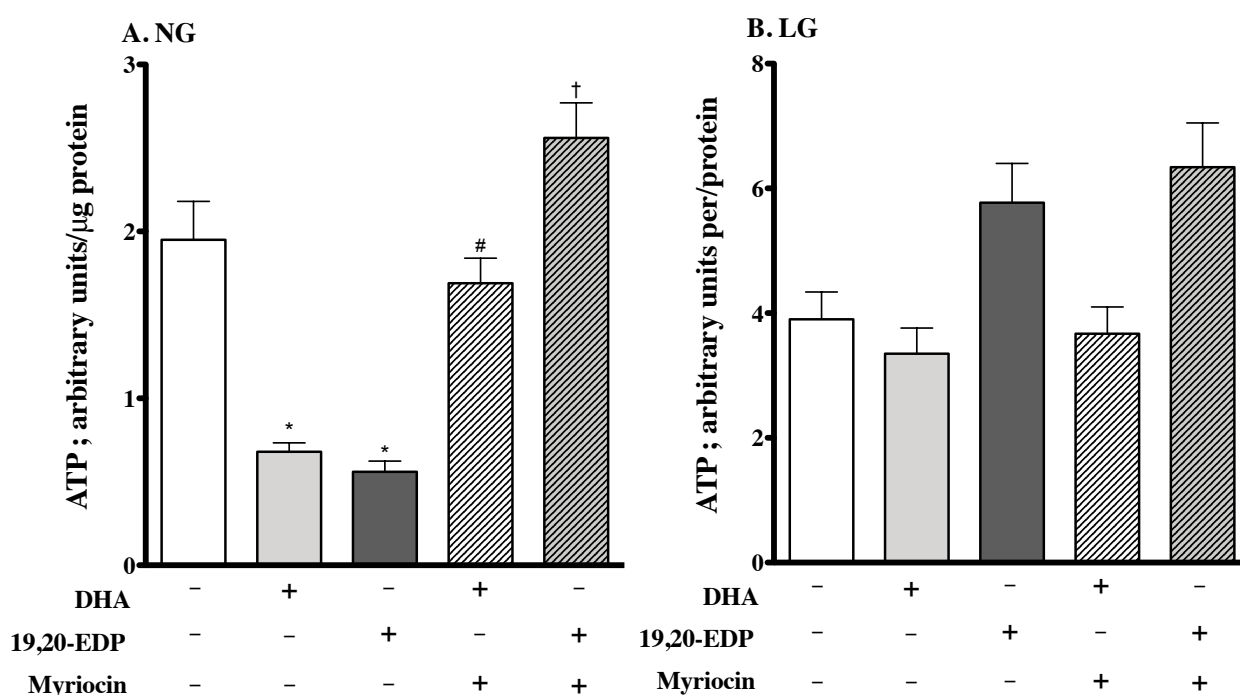


**Fig. 13. Citrate Synthase and Cytochrome *c* Oxidative Enzyme Activity in H9c2 Cells.**

H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose (NG; A, C) or 5.5 mM glucose (LG; B, D), and treated with DHA (100  $\mu$ M), 19, 20-EDP (1  $\mu$ M) or myriocin (1  $\mu$ M). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3). \*P < 0.05 vs. non-treated group, †P < 0.05 vs. 19,20-EDP alone.

#### 第4項 ATP 産生量に及ぼす DHA 及び 19, 20-EDP の影響

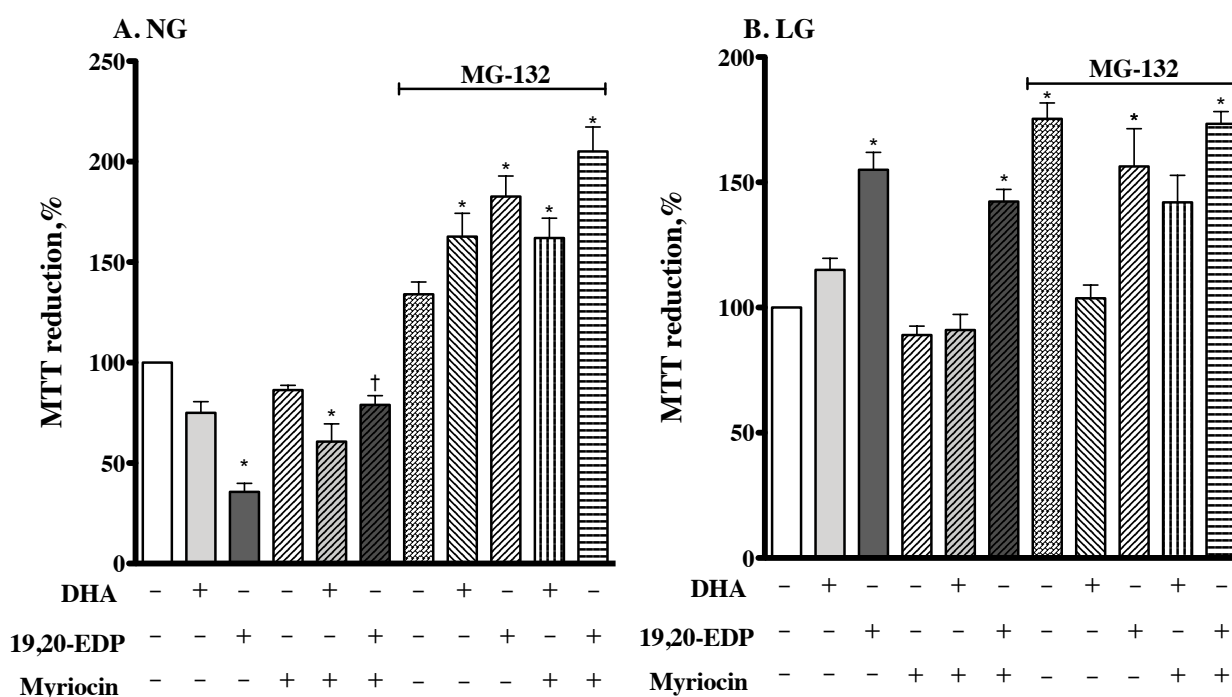
CS 及び COX 酵素活性が低下したことから、細胞内でその大部分をミトコンドリアが担っている ATP 産生量について検討したところ、NG 含有培地で培養した細胞の基礎 ATP 産生量は、LG 含有培地で培養した細胞と比較して約 2 分の 1 であった (Fig. 14A, B) . また、DHA 及び 19,20-EDP は、NG 含有培地で培養した細胞の ATP 産生量を有意に抑制し、ミリオシン存在下ではこの抑制作用がみられなかった (Fig. 14A) . 一方、LG 含有培地で培養した細胞では、DHA 及び 19,20-EDP は、ミリオシンの有無に関わらず ATP 産生量に影響を与えなかった (Fig. 14B) .



**Fig. 14. DHA and 19, 20-EDP Decrease ATP Production under 25 mM Glucose in H9c2 Cells.** H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose (NG; A) or 5.5 mM glucose (LG; B), and treated with DHA (100  $\mu$ M), 19, 20-EDP (1  $\mu$ M) or myriocin (1  $\mu$ M). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3). \*P < 0.05 vs. non-treated group, #P < 0.05 vs. DHA alone, †P < 0.05 vs. 19, 20-EDP alone.

## 第5項 ミトコンドリア障害に及ぼす DHA 及び 19,20-EDP の影響

MTT は、生細胞のミトコンドリアによって還元されホルマゼンとなるが、死細胞では還元されない。DHA は、NG 含有培地で培養した細胞の MTT 還元率を抑制する傾向を示し、19,20-EDP はこれを有意に抑制した。また、ミリオシン存在下では 19,20-EDP による MTT 還元率抑制作用がみられなかった。さらに、プロテアソーム阻害薬である MG-132 (1  $\mu$ M) 存在下では DHA 及び 19,20-EDP 共にその作用がみられなかった (Fig. 15A)。一方、LG 含有培地条件下では、19,20-EDP は、ミリオシン及び MG-132 の有無に関わらず MTT 還元率を有意に上昇させた (Fig. 15B)。



**Fig. 15. 19,20-EDP Induces Mitotoxicity under 25 mM Glucose in H9c2 Cells.**

H9c2 cells were cultured in DMEM containing either 25 mM glucose (NG; A) or 5.5 mM glucose (LG; B), and treated with DHA (100  $\mu$ M), 19, 20-EDP (1  $\mu$ M), myriocin (1  $\mu$ M) or MG-132 (1  $\mu$ M). Results were represented as a percentage taking none-treated group (control) to be 100%. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3). \*P < 0.05 vs. non-treated group, †P < 0.05 vs. 19, 20-EDP alone.

### 第3節 考察

第2章では、NG 及び LG 含有培地で培養した未分化 H9c2 細胞における細胞内セラミドの局在に及ぼす DHA 及び 19,20-EDP の影響を検討した。さらに、DHA 及び 19,20-EDP によるミトコンドリア機能への影響とセラミド *de novo* 合成系の関与について詳細に検討した。

DHA 及び 19,20-EDP が、NG 含有培地で培養した H9c2 細胞において細胞内セラミド含量を有意に増加させることは、既に Smokhvalov らによって報告されている。<sup>30)</sup> また、Kang らは、エネルギー代謝経路が解糖系が優位であるヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、低酸素条件下で細胞死が起こされる際に *de novo* 合成経路の SPT が活性化し、細胞内セラミド含量が増加していることを報告している。<sup>59)</sup> 本研究により、DHA 及び 19,20-EDP が NG 含有培地で培養した H9c2 細胞において特にリソソーム/ミトコンドリア分画でセラミド含量が著増すること、LG 含有培地で培養すると DHA 及び 19,20-EDP はセラミド含量に影響を与えないことを初めて明らかにした。従って、DHA 及び 19,20-EDP による *de novo* 合成経路の亢進は、解糖系優位な条件が必須であることが示唆された。さらに、NG 含有培地で培養した H9c2 細胞において、19,20-EDP によって増加した細胞内セラミド含量がミリオシンによって有意に減少されたことから、本実験においても 19,20-EDP による SPT への影響が重要であることが考えられた。DHA 及び 19,20-EDP は、主たるエネルギー代謝系がミトコンドリアを利用する酸化リン酸化経路である LG 含有培地で培養した細胞の細胞生存率に影響を与えない一方、ミトコンドリアを主たるエネルギー代謝経路としない解糖系優位な状態の細胞において特異的に細胞死を引き起こすという一見、矛盾した作用を現す大きな要因であると考えられた。

本章では続いて、ミトコンドリア機能に及ぼす DHA 及び 19,20-EDP の影響を詳細に検討した。まず、DHA 及び 19,20-EDP が NG 含有培地で培養した細胞においてのみ CS 及び COX 活性を低下させることを明らかにした。CS 及び COX はいずれも ATP 産生に関わる酵素であり、実際に DHA 及び 19,20-EDP によってその産生量が低下した。これらの酵素活性及び ATP 産生量の低下は、ミリオシン存在下ではみられなかったため、セラミド *de novo* 合成亢進のためリソソーム/ミトコンドリア画分に異常に蓄積したセラミドが原因であることが明らかとなった。セラミドのミトコンドリアへの蓄積は、シトクロム *c* の細胞質への遊離を促進、ミトコンドリアのオートファジー（マイトファジー）の誘導、ミトコ

ンドリア断片化の促進などを引き起こすことが報告されている。<sup>38,59)</sup> また、DHA は、ヒト白血病細胞である Jurkat 細胞やラット初代培養肝細胞においてもセラミド含量を増加させ、生存細胞数を減少させることが報告されている。<sup>51,61)</sup> Jurkat 細胞において、10  $\mu$ M DHA によるセラミド含量の変化は 6 時間で最大となり、その後徐々に減少する。<sup>61)</sup> 従って、本実験条件でも 24 時間以前に量的変化が起きていることも想定される。また、解糖系優位なエネルギー代謝系を示すがん細胞や高増殖能を有する細胞では、ミトコンドリアクレブス回路の異常によりクエン酸がミトコンドリア外に放出されるとの報告もあり、<sup>62)</sup> 本結果で得られた CS 活性の異常と関連しているのではないかと考えられた。一方、DHA 及び 19,20-EDP は、CS 及び COX のタンパク質発現には有意な影響を与えなかった。虚血性心疾患モデルラットの心臓非障害部位においても酵素活性の低下がタンパク質発現の低下に先行していることが報告されていることから、<sup>63)</sup> 本実験系においても薬物処理後 24 時間以降においてはタンパク質発現も低下すると考えた。これら DHA 及び 19,20-EDP によるミトコンドリア機能の異常は、MTT 法によっても確認された。MTT 法は、通常、細胞増殖/生存の確認に用いられるが、その原理として MTT 還元率が生細胞のミトコンドリア量に依存することが応用されている。従って、その還元率はミトコンドリア障害の直接的な指標になり得る。19,20-EDP は、NG 含有培地で培養した細胞においてセラミド *de novo* 合成依存的にミトコンドリア障害を誘導することが明らかとなった。一方、本実験条件で DHA は、若干のミトコンドリア障害を起こす傾向を示したものの有意な影響を与えなかった。この理由は不明であるが、CS、COX、ATP を指標にした実験結果からも、DHA はミトコンドリアになんらかの障害を与えている可能性が高く、DHA が H9c2 細胞のミトコンドリアの断片化及び膜電位の低下を引き起こすという報告を支持するものと考えられた。<sup>29)</sup> また、19,20-EDP によってみられた MTT 還元率の低下は、プロテアソーム阻害薬の存在下ではみられなかった。第 1 章では、DHA 及び 19,20-EDP が 20S プロテアソームを活性化することを明らかにしており、その活性化がミトコンドリア障害に関連していることが示唆された。

以上、第 2 章では、DHA 及び 19,20-EDP は、解糖系優位なエネルギー代謝系を示す細胞においてのみ、セラミド *de novo* 合成を亢進しミトコンドリア障害を引き起こすことを明らかにした。また、その機序に DHA 及び 19,20-EDP により活性化されたプロテアソームが関連していることが示唆された。



### 第3章 H9c2 細胞リソソーム活性に及ぼす DHA 及び 19,20-EDP の影響

#### 第1節 緒言

第2章において、DHA 及び 19,20-EDP が NG 含有培地で培養した細胞においてのみ、セラミド *de novo* 合成が亢進し、特にミトコンドリア、リソソーム画分でのセラミド含量を増加させること、このセラミド含量の増加がミトコンドリア機能を障害することを明らかにした。リソソームは、酸性環境下で作用する加水分解酵素を数十種類含む細胞小器官である。リソソームは、エンドサイトーシスによって細胞外から取り込まれた物質や老化した細胞小器官の細胞内消化（オートファジー）を調節する。近年、オートファジーの分子機構が急速に明らかにされ、特定のタンパク質やミトコンドリア、ペルオキシソームなどの細胞内小器官を選択的に除去する選択的オートファジー機構も明らかにされている。特に損傷したミトコンドリアをオートファジーにより選択的に除去する経路は、マイトファジーと呼ばれる。

そこで第3章では、DHA、19,20-EDP によりセラミド含量が著増した画分に含まれるリソソーム活性に及ぼす DHA 及び 19,20-EDP の影響を検討した。

## 第2節 方法

### 1. 使用細胞

第1章第2節1)に準じた。

### 2. 使用薬物及び試薬

テトラメチルローダミン エチルエステル (TMRE) は Sigma-Aldrich より, Hoechst® 33342 は Thermo Fisher Scientific より, LysoTracker® Green DND-26 は Life Technologies より購入して使用した。上記以外は第1章第2節2) に準じた。

### 3. 細胞の薬物処理

第1章第1節3)に準じた。

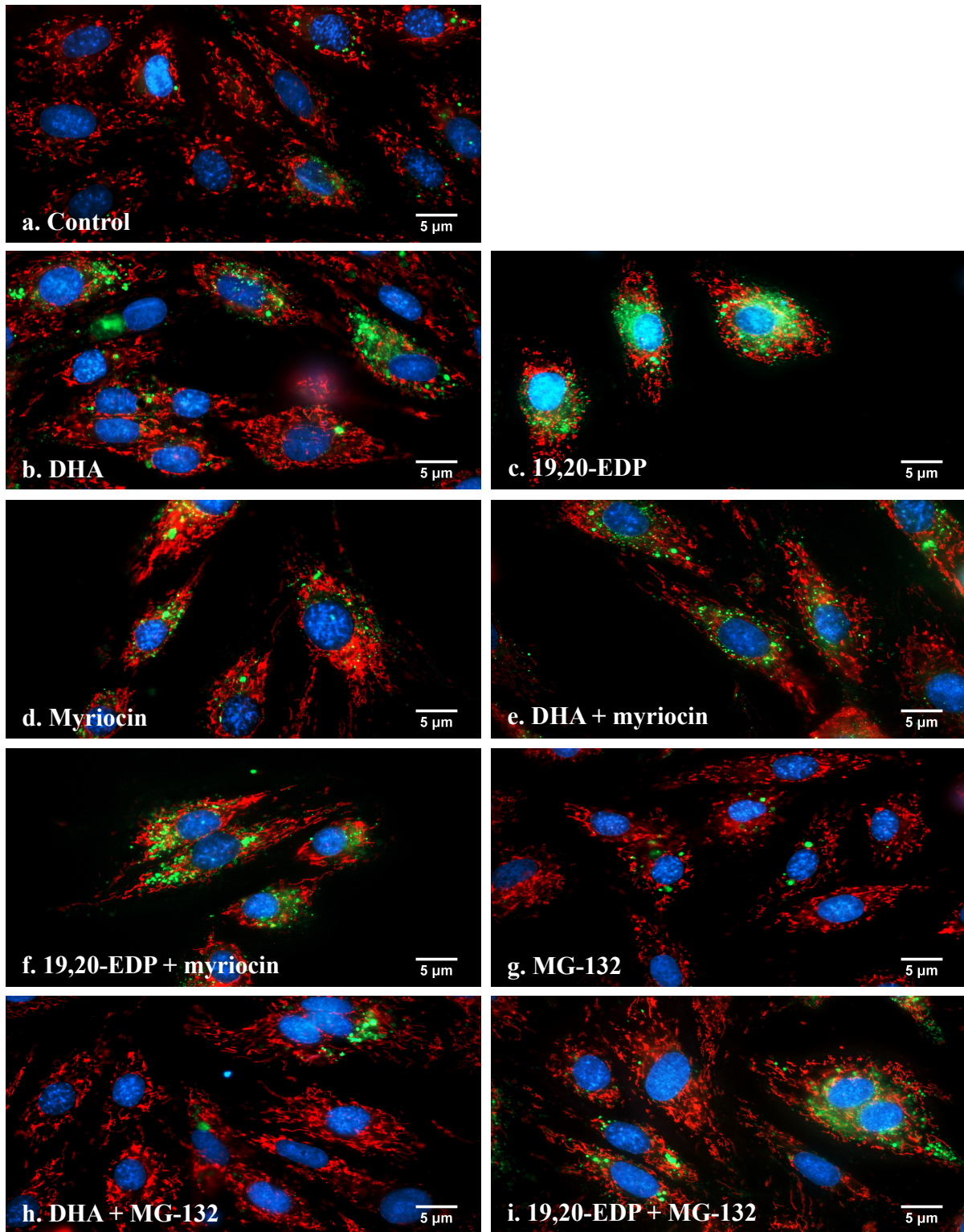
### 4. 蛍光顕微鏡観察

細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (MatTek Corporation, MA, USA) で培養した。ミトコンドリアの染色には TMRE (100 nM) ®, 核の染色には Hoechst® 33342 (1 µM) を, リソソームの染色には LysoTracker® Green DND-26 (10 nM) を用い, これら試薬を含有した溶液で細胞を 30 分間染色した。LED ランプを搭載した冷却電荷結合素子 (Charge Coupled Device: CCD) カメラ (浜松ホトニクス, 静岡県) を備えた Zeiss Axio Observer ハイエンド倒立顕微鏡 (ZEISS, Oberkochen, Germany) で 63×オイル浸漬対物レンズを使用して細胞を観察, 撮影した。

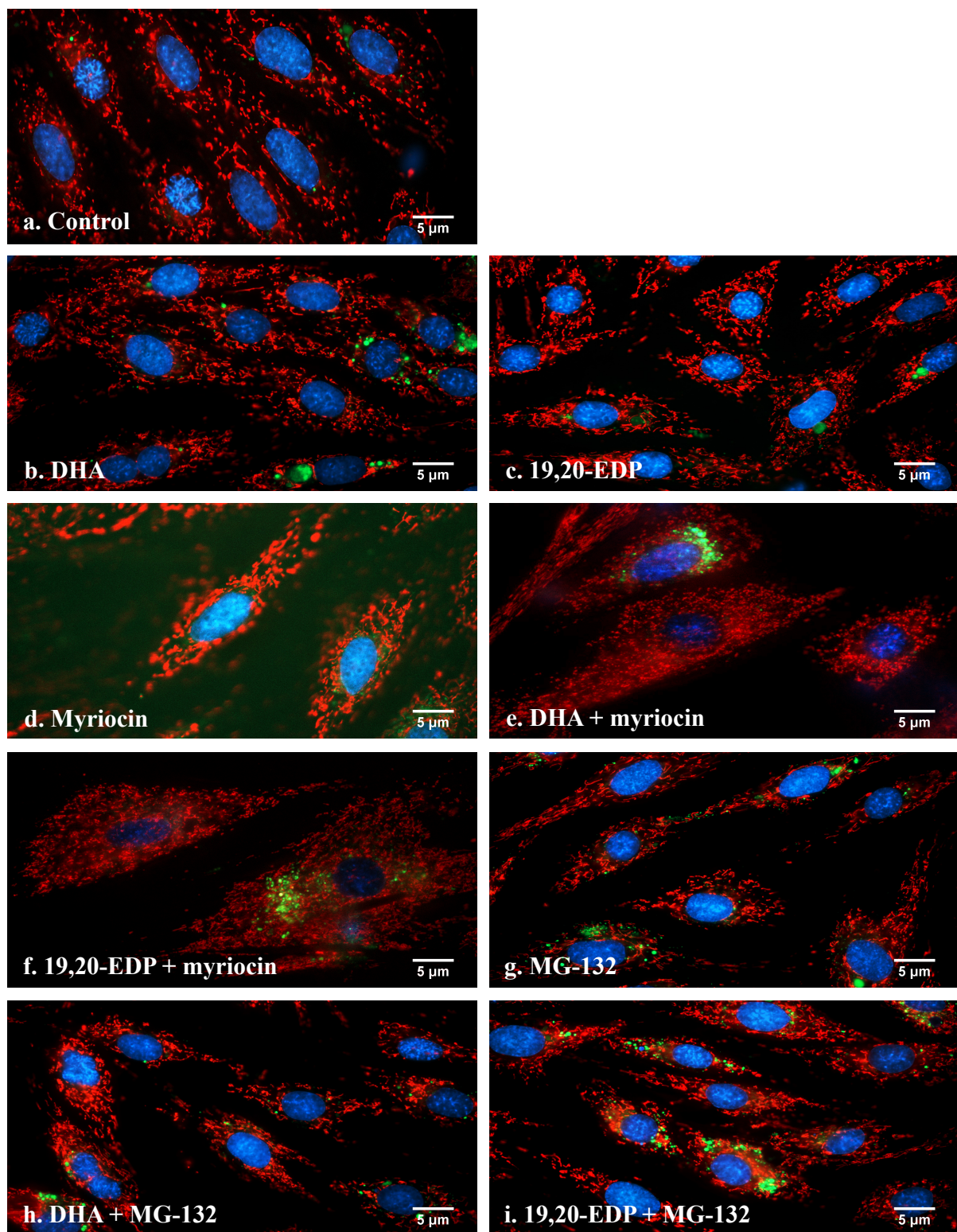
### 第3節 結果

#### 第1項 リソソーム蛍光強度に及ぼす DHA 及び 19,20-EDP の影響

LysoTracker<sup>®</sup> Green は、生細胞の細胞小器官の中でも酸性液性を示すものを特異的に標識し蛍光発光するので、その蛍光強度は酸性環境のリソソームの活性の指標となる。DHA 及び 19,20-EDP は、NG 含有培地で培養した細胞においてコントロールと比べて強いリソソーム蛍光強度を示した (Fig.16b, c) 。また、ミリオシン及びプロテアソーム阻害薬である MG-132 の単独処理は、リソソームの蛍光強度に影響を与えなかった (Fig. 16d, g) 。DHA 及び 19,20-EDP 処理によって認められた強い蛍光強度は、ミリオシン及び MG-132 の存在下では抑制された (Fig. 16e, f, h, i) 。一方で、DHA 及び 19,20-EDP は、LG 含有培地で培養した細胞のリソソームの蛍光強度に大きな影響を与えなかった (Fig. 17) 。



**Fig. 16. DHA and 19, 20-EDP Induce Lysosomal Formation under 25 mM Glucose Condition.** H9c2 cells were cultured in DMEM containing 25 mM glucose (NG) treated with DHA (100 μM), 19, 20-EDP (1 μM), myriocin (1 μM) or MG-132 (1 μM).



**Fig. 17. DHA and 19, 20-EDP Have No Effect on Lysosomal Formation under 5.5 mM Glucose Condition.**

H9c2 cells were cultured in DMEM containing 5.5 mM glucose (LG) treated with DHA (100 μM), 19, 20-EDP (1 μM), myriocin (1 μM) or MG-132 (1 μM).



#### 第4節 考察

第3章では、NG 及び LG 含有培地で培養した未分化 H9c2 細胞でのリソソーム活性化に及ぼす DHA 及び 19,20-EDP の影響を検討した。その結果、DHA 及び 19,20-EDP は、NG 含有培地でのみリソソーム活性を上昇させ、その上昇に、セラミド *de novo* 合成経路及びプロテアソームが関与していることが明らかとなった。従って、DHA 及び 19,20-EDP によってセラミドの蓄積を介して障害されたミトコンドリアを、リソソームを利用して消去しようとするマイトファジーが引き起こされていることが示唆された。これまでに、DHA が多くのがん細胞においてオートファジーを誘導して、最終的に細胞死を引き起こすことが報告されている。DHA は、乳がん細胞である MCF-7 細胞では PPAR  $\gamma$  を活性化して、オートファジー誘導タンパク質 Beclin-1 発現を誘導する。<sup>64)</sup> また DHA は、結腸がん細胞である SW620 細胞でもオートファジー関連遺伝子 SQSTM1 発現を増加させる。<sup>65)</sup> さらに筆者らは、オートファジー検出用蛍光プローブを用いた実験において、19,20-EDP が NG 含有培地で培養した細胞でのオートリソソームの形成を促進し、これをミリオシンが有意に抑制することを確認している。しかし、実際 DHA 及び 19,20-EDP が、マイトファジーを引き起こすかについてはさらなる研究が必要である。

DHA 及び 19,20-EDP によるリソソームの活性化はまた、プロテアソーム阻害薬 MG-132 によっても抑制された。プロテアソームは巨大な分子構造をもつ分子複合体からなるプロテアーゼで、細胞内では主にユビキチン化されたタンパク質を分解する。第1章及び第2章において DHA 及び 19,20-EDP が、NG 含有培地で培養した細胞の 20S プロテアソーム活性を有意に上昇させ、DHA 及び 19,20-EDP によるミトコンドリア障害を MG-132 が抑制することを明らかにした。これらのことから DHA 及び 19,20-EDP はプロテアソーム活性を上昇させミトコンドリア機能を障害すること、このことがさらにリソソーム活性の上昇と関連していることが示唆された。リソソームの部分的な透過性の亢進が、プロテアソームによる細胞死を引き起こすことが報告されている。<sup>33)</sup> また、子宮頸がん細胞 SiHa 細胞において、MG-132 は DHA によるオートファジーの進行を抑制する。<sup>66)</sup> このことから DHA 及び 19,20-EDP による細胞死にはオートファジーとプロテアソームが協同して関与することが強く示唆された。

以上、第3章では、DHA 及び 19,20-EDP は、解糖系優位なエネルギー代謝系を示す細胞においてのみ、リソソーム活性を上昇させることを明らかにした。また、その機序に、セ

ラミド *de novo* 合成経路及びプロテアソームが関連していることが示唆された.

## 総括

n-3 系 PUFA である DHA は、幅広い生理機能を有することからその不足が多くの疾患の原因となることが多い。近年、これまで DHA の生理作用として知られていた作用の一部が、体内で DHA から代謝・生成される脂質メディエーターによるものであることが明らかになり、その代謝物の生理作用を解明する研究が盛んに行われている。DHA は、CYP によっても代謝され 6 つの位置異性体をもつ EDPs が生成されるが、その中でも 19,20-EDP が生体内での含有量が最も多く、心臓血管系細胞に豊富に存在することから、心臓血管系での 19,20-EDP の役割が注目されている。<sup>19, 23-25, 27)</sup> DHA あるいは 19,20-EDP は、正常心臓由来細胞においては細胞生存率に影響を与えないだけでなく、LPS などによって誘導される細胞死に対しては拮抗作用を示す一方、不死化心筋芽細胞である H9c2 細胞を細胞死へと導く。<sup>29, 30)</sup> この DHA あるいは 19,20-EDP による H9c2 細胞死誘導作用に PPAR $\delta$ あるいはセラミドが関与すること、ミトコンドリア障害が関与することが示唆されているが、詳細な機序は不明であった。

本研究では、DHA 及び 19,20-EDP による H9c2 細胞の細胞死誘導メカニズムを探索するため、培養条件を変えることでエネルギー代謝経路を変化させた H9c2 細胞における DHA 及び 19,20-EDP の細胞死誘導作用を検討した。さらに H9c2 細胞のセラミド含有量とその局在及びミトコンドリア機能、リソソーム活性に及ぼす DHA 及び 19,20-EDP の影響を検討した。

1. 培地中に含まれるグルコース濃度を通常の 25 mM (NG) から 5.5 mM (LG) に変更した際の細胞のエネルギー代謝系を検討した。NG 及び LG 含有培地で培養した H9c2 細胞ともに、分化した筋芽細胞に特徴的にみられるトロポニン T を発現せずに未分化な状態が保たれていた。一方、LG 含有培地で培養した細胞での酸素消費量は、NG 含有培地で培養した細胞よりも高値を示し、乳酸産生量、ADP/ATP 比、NAD/NADH 比は、分化させた細胞と匹敵するほどの低値を示したことから、培地中のグルコース濃度を低下させることで細胞のエネルギー代謝系が解糖系から酸化的リン酸化経路に変換されることが明らかとなった。さらに、NG 及び LG 含有培地で培養した H9c2 細胞の生存率に及ぼす DHA 及び



19,20-EDP の影響を検討した。その結果、NG 含有培地で培養した細胞のみで DHA 及び 19,20-EDP の細胞生存率が低下し、この作用はセラミド *de novo* 合成系を阻害することにより解除された。このことから、DHA 及び 19,20-EDP は解糖系優位なエネルギー代謝系を有する細胞に選択的に細胞死を誘導する作用を発揮し、その機序にセラミド *de novo* 合成系が重要であることが示唆された。また、DHA による H9c2 細胞死は、CYP エポキシゲナーゼ阻害薬の併用により解除されたことから、細胞死誘導作用の一部は、EDP によるものであることが明らかとなった。

2. NG 及び LG 含有培地で培養した H9c2 細胞のセラミド局在性を検討するため、細胞より粗膜画分、リソソーム/ミトコンドリア画分を分離・調製し、それぞれのセラミド含量に及ぼす DHA 及び 19,20-EDP の影響を検討した。その結果、DHA 及び 19,20-EDP は NG 含有培地で培養した H9c2 細胞においてのみリソソーム/ミトコンドリア画分のセラミド含量を著明に増加させ、この増加はセラミド *de novo* 合成系を抑制することで解除された。このことから、DHA 及び 19,20-EDP はセラミド *de novo* 合成系を亢進し、特にリソソーム及びミトコンドリア画分にセラミドを蓄積させることを明らかにした。さらに NG 含有培地で培養した H9c2 細胞において DHA 及び 19,20-EDP は、ミトコンドリアにおいて ATP 産生に関わる酵素活性を抑制し、ATP 産生量を減少させた。これらの作用もセラミド *de novo* 合成酵素阻害薬で解除された。また、DHA 及び 19,20-EDP によるミトコンドリア障害は、プロテアソーム阻害薬で有意に抑制された。以上の結果から、DHA 及び 19,20-EDP は、解糖系優位なエネルギー代謝系を示す細胞においてのみ、セラミド *de novo* 合成を亢進しミトコンドリア障害を引き起こすことが明らかになった。また、その機序に DHA 及び 19,20-EDP により活性化されたプロテアソームが関連していることが示唆された。

3. NG 及び LG 含有培地で培養した未分化 H9c2 細胞でのリソソーム活性化に及ぼす DHA 及び 19,20-EDP の影響を検討した。その結果、DHA 及び 19,20-EDP は、NG 含有培地でのみリソソーム活性を上昇させた。この上昇は、セラミド *de novo* 合成酵素阻害薬で解除された。このことから、DHA 及び 19,20-EDP によってセラミドの蓄積を介して障害されたミトコンドリアを、リソソームを利用して消去しようとするマイトファジーが引き起こされていることが示唆された。さらにプロテアソームがリソソーム活性化に関与していることが明らかになり、DHA 及び 19,20-EDP による細胞死にはオートファジーとプロテアソームが協同して関与することが強く示唆された。

以上、本研究は、DHA 及び 19,20-EDP が、H9c2 細胞のように解糖系優位なエネルギー代謝系を示す細胞の細胞死を引き起こすことを明らかにした。これまで DHA あるいは EDPs は、例えばがん細胞のような異常な細胞に対して細胞毒性を示す一方、正常な細胞に対しては毒性を示さないことは多く報告されている。本研究では、エネルギー代謝経路を変化させた同一の細胞を使用したことで、DHA 及び EDPs はエネルギー代謝経路依存的に細胞毒性を示すことが明らかとなった。また、その機序にセラミド *de novo* 合成の亢進、リソソーム/ミトコンドリア画分への蓄積、ミトコンドリア障害、リソソーム活性の上昇が関与していることを見出した。本研究により、DHA 及び EDPs の新たな生理作用が見出され、このことが DHA 及び EDPs を応用した創薬開発の基礎的知見になり得ると期待される。

## 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究に際し終始懇切なご指導ご鞭撻を賜りましたカナダ・アルバータ大学薬学部 John M. Seubert 教授に心より感謝の意を表します．

本研究を遂行するにあたり，有益なご鞭撻を賜りました北海道医療大学 平藤雅彦名誉教授及び北海道医療大学大学院薬学研究科薬理学分野 町田拓自准教授に心より感謝の意を表します．また，実験に御協力を賜りましたカナダ・アルバータ大学薬学部 Victor Samokhvalov 博士をはじめ，御協力頂きました Seubert 研究室の Lockhart K. Jamieson, Ahmed M. Darwesh, Haitham E. El-Sikhry 博士, Kevin M.W. Khey ならびに Ayman O.S. El-Kadi 博士, Ahmed A. El-Sherbeni 博士に深く感謝致します．

本論文作成に際し有益な御助言を頂きました北海道医療大学大学院薬学研究科 飯塚健治教授，岡崎克則教授，浜上尚也准教授に心より感謝致します．

本研究に際し，終始多大なる御協力と暖かい御支援を賜りました北海道医療大学薬学部薬理学講座（薬理学）の皆様には感謝致します．

最後に終始暖かく見守ってくれた家族をはじめとしたすべての方に心から感謝致します．

平成 31 年 3 月 21 日

北海道医療大学大学院薬学研究科

遠藤朋子

## 引用文献

- 1) 農林水産省ホームページ, 脂質による健康影響  
([http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/trans\\_fat/t\\_eikyou/fat\\_eikyou.html](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/trans_fat/t_eikyou/fat_eikyou.html)) cited 11 January (2019).
- 2) Bjerve K.S., Fougner K.J., Midthjell K., Bonna K., n-3 fatty acids in old age. *J. Intern. Med. Suppl.*, **731**, 191-196 (1989).
- 3) Holman R.T., Johnson S.B., Hatch T.F., A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am. J. Clin. Nutr.*, **35**, 617-623 (1982).
- 4) Harris W.S., Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J. Lipid Res.*, **30**, 785-807 (1989).
- 5) Mozaffarian D., Wu J.H., Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **58**, 2047-2067 (2011).
- 6) Chua B., Flood V., Rochtchina E., Wang J.J., Smith W., Mitchell P. Dietary fatty acids and the 5-year incidence of age-related maculopathy. *Arch. Ophthalmol.*, **124**, 981-986 (2006).
- 7) Jeffrey B.G., Weisinger H.S., Neuringer M., Mitchell D.C., The role of docosahexaenoic acid in retinal function. *Lipids*, **36**, 859-871 (2001).
- 8) van Gelder B.M., Tijhuis M., Kalmijn S., Kromhout D., Fish consumption, n-3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: the Zutphen Elderly Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, **85**, 1142-1147 (2007).
- 9) Beydoun M.A., Kaufman J.S., Sloane P.D., Heiss G., Ibrahim J., n-3 Fatty acids, hypertension and risk of cognitive decline among older adults in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Public Health Nutr.*, **11**, 17-29 (2008).
- 10) Hogstrom M., Nordstrom P., Nordstrom A., n-3 Fatty acids are positively associated with peak bone mineral density and bone accrual in healthy men: the NO<sub>2</sub> Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, **85**, 803-807 (2007).
- 11) Rahman M., Veigas M., Williams P.J., Fernandes G., DHA is a more potent inhibitor of breast cancer metastasis to bone and related osteolysis than EPA. *Breast Cancer Res. Treat.*, **141**, (2013).

- 12) Yun E.J., Song K.S., Shin S., Kim S., Heo J.Y., Kweon G.R., Wu T., Park J.I., Lim K., Docosahexaenoic acid suppresses breast cancer cell metastasis by targeting matrix-metalloproteinases. *Oncotarget*, **7**, 49961-49971 (2016).
- 13) Lauritzen L., Brambilla P., Mazzocchi A., Harslof L.B., Ciappolino V., Agostoni C., DHA Effects in Brain Development and Function. *Nutrients*, **8**, (2016).
- 14) Schwanke R.C., Marcon R., Bento A.F., Calixto J.B., EPA- and DHA-derived resolvins' actions in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Pharmacol.*, **785**, 156-164 (2016).
- 15) Duffield J.S., Hong S., Vaidya V.S., Lu Y., Fredman G., Serhan C.N., Bonventre J.V., Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. *J. Immunol.*, **177**, 5902-5911 (2006).
- 16) Morita M., Kuba K., Ichikawa A., Nakayama M., Katahira J., Iwamoto R., Watanebe T., Sakabe S., Daidoji T., Nakamura S., Kadowaki A., Ohto T., Nakanishi H., Taguchi R., Nakaya T., Murakami M., Yoneda Y., Arai H., Kawaoka Y., Penninger J.M., Arita M., Imai Y., The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell*, **151**, 112-125 (2013).
- 17) Jamieson K.L., Endo T., Darwesh A.M., Samokhvalov V., Seubert J.M., Cytochrome P450-derived eicosanoids and heart function. *Pharmacol. Ther.*, **179**, 47-83 (2017).
- 18) Zeldin D.C., Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J. Biol. Chem.*, **276**, 36059-36062 (2001).
- 19) Arnold C., Markovic M., Blossey K., Wallukat G., Fischer R., Dechend R., Konkel A., von Schacky C., Luft F. C., Muller D. N., Rothe M., Schunck W.H., Arachidonic acid-metabolizing cytochrome P450 enzymes are targets of w-3 fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **285**, 32720-32733 (2010).
- 20) Morisseau C., Inceoglu B., Schmelzer K., Tsai H.J., Jinks S.L., Hegedus C.M., Hammock B.D., Naturally occurring monoepoxides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are bioactive antihyperalgesic lipids. *J. Lipid Res.*, **51**, 3481-3490 (2010).

- 21) Ulu A., Harris T.R., Morisseau C., Miyabe C., Inoue H., Schuster G., Dong H., Iosif A.M., Liu J.Y., Weiss R.H., Chiamvimonvat N., Imig J.D., Hammock B.D., Anti-inflammatory effects of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids and soluble epoxide hydrolase inhibitors in angiotensin-II-dependent hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **62**, 285-297 (2013).
- 22) Samokhvalov V., Alsaleh N., El-Sikhry H.E., Jamieson K.L., Chen C.B., Lopaschuk D.G., Carter C., Light P.E., Manne R., Falck J.R., Seubert J.M., Epoxyeicosatrienoic acids protect cardiac cells during starvation by modulating an autophagic response. *Cell Death Dis.*, **4**, e885 (2013).
- 23) Morin C., Fortin S., Rousseau E., 19,20-EpDPE, a bioactive CYP450 metabolite of DHA monoacylglyceride, decreases  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in human pulmonary arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**, H1311-1318 (2011).
- 24) Shearer G.C., Harris W.S., Pedersen T.L., Newman J.W., Detection of omega-3 oxylipins in human plasma and response to treatment with omega-3 acid ethyl esters. *J. Lipid Res.*, **51**, 2074-2081 (2010).
- 25) Wang D., Dubois R.N., Epoxyeicosatrienoic acids: a double-edged sword in cardiovascular diseases and cancer. *J. Clin. Invest.*, **122**, 19-22 (2012).
- 26) Van Rollins M., Frade P.D., Carretero O.A., Oxidation of 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid by hepatic and renal microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **966**, 133-149 (1988).
- 27) Samokhvalov V., Jamieson K.L., Vriend J., Quan S., Seubert J.M., CYP-epoxygenase metabolites of docosahexaenoic acid protect HL-1 cardiac cells against LPS-induced cytotoxicity through SIRT1. *Cell Death Discov.*, **1** (2015).
- 28) Samokhvalov V., Jamieson K.L., Fedotov I., Endo T., Seubert J.M., SIRT is required for EDP-mediated protective responses toward hypoxia-reoxygenation injury in cardiac cells. *Front. Pharmacol.*, **7**, 124 (2016).
- 29) Qadhi R., Alsaleh N., Samokhvalov V., El-Sikhry H., Bellenger J., Seubert J.M., Differential responses to docosahexaenoic acid in primary and immortalized cardiac cells. *Toxico. Lett.*, **219**, 288-297 (2013).

- 30) Samokhvalov V., Zlobine I., Jamieson K.L., Jurasz P., Chen C., Lee K.S., Hammock B.D., Seubert J.M., PPAR $\delta$  signaling mediates the cytotoxicity of DHA in H9c2 cells. *Toxicol. Lett.*, **232**, 10-20 (2015).
- 31) Vander Heiden M.G, Cantley L.C, Thompson C.B., Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, **324**, 1029-1033 (2009).
- 32) Bikman B.T., Summers S.A., Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J. Clin. Invest.*, **121**, 4222-4230 (2011).
- 33) He X., Schuchman E.H., Ceramide and ischemia/reperfusion injury. *J. Lipids*, **2018**, 3646725 (2018).
- 34) El Bawab S., Roddy P., Qian T., Bielawska A., Lemasters J.J., Hannun Y.A., Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 21508-21513 (2000).
- 35) Ardail D., Popa I., Alcantara K., Pons A., Zanetta J.P., Louisot P., Thomas L., Portoukalian J., Occurrence of ceramides and neutral glycolipids with unusual long-chain base composition in purified rat liver mitochondria. *FEBS Lett.*, **488**, 160-164 (2001).
- 36) Beckham T.H., Lu P., Jones E.E., Marrison T., Lewis C.S., Cheng J.C., Ramshesh V.K., Beeson G, Beeson C.C., Drake R.R., Bielawska A., Bielawski J., Szulc Z.M., Ogretmen B., Norris J.S., Liu X., LCL124, a cationic analog of ceramide, selectively induces pancreatic cancer cell death by accumulating in mitochondria. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **344**, 167-178 (2013).
- 37) Gudz T.I., Tserng K.Y., Hoppel C.L., Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24154-24158 (1997).
- 38) Sentelle R.D., Senkal C.E., Jiang W., Ponnusamy S., Gencer S., Selvam S.P., Ramshesh V.K., Peterson Y.K., Lemasters J.J., Szulc Z.M., Bielawski J., Ogretmen B., Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 831-838 (2012).
- 39) Kimes B.W., Brandt B.L., Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res.*, **98**, 367-381 (1976).

- 40) Hescheler J., Meyer R., Plant S., Krautwurst D., Rosenthal W., Schultz G., Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ. Res.*, **69**, 1476-1486 (1991).
- 41) Pereira S.L., Ramalho-Santos J., Branco A.F., Sardao V.A., Oliveira P.J., Carvalho R.A., Metabolic remodeling during H9c2 myoblast differentiation: relevance for in vitro toxicity studies. *Cardiovasc. Toxicol.*, **11**, 180-190 (2011).
- 42) Menard C., Pupier S., Mornet D., Kitzmann M., Nargeot J., Lory P., Modulation of L-type calcium channel expression during retinoic acid-induced differentiation of H9c2 cardiac cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 29063-29070 (1999).
- 43) Sardao V.A., Oliveira P.J., Holy J., Oliveira C.R., Wallace K.B., Vital imaging of H9c2 myoblasts exposed to tert-butylhydroperoxide--characterization of morphological features of cell death. *BMC Cell Biol.*, **8**, 11 (2007).
- 44) Marroquin L.D., Hynes J., Dykens J.A., Jamieson J.D., Will Y., Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol. Sci.*, **97**, 539-547 (2007).
- 45) Rana P., Nadanaciva S., Will Y., Mitochondrial membrane potential measurement of H9c2 cells grown in high-glucose and galactose-containing media does not provide additional predictivity towards mitochondrial assessment. *Toxicol. In Vitro.*, **25**, 580-587 (2011).
- 46) Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 47) Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L., Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 801-847 (1996).
- 48) Takigawa T., Yasuda H., Shigeta Y., Kitasato H., Nerve dysfunction and compensatory role of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump in high glucose condition: Voltage clamp analysis in rat signal myelinated fiber, *J. Japan Diab. Soc.*, **38**, 431-438 (1995).
- 49) Zhang G., Panigrahy D., Mahakian L.M., Yang J., Liu J.Y., Stephen Lee K.S., Wettersten H.I., Ulu A., Hu X., Tam S., Hwang S.H., Ingham E.S., Kieran M.W., Weiss R.H., Ferrara K.W., Hammock B.D., Epoxy metabolites of docosahexaenoic acid (DHA) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **110**, 6530-6535 (2013).



- 50) Park T.S., Hu Y., Noh H.L., Drosatos K., Okajima K., Buchanan J., Tuinei J., Homma S., Jiang X.C., Abel E.D., Goldberg I.J., Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *J. Lipid Res.*, **49**, 2101-2112 (2008).
- 51) Lu C.Y., Li C.C., Liu K.L., Tsai C.W., Lii C.K., Chen H.W., Docosahexaenoic acid down-regulates phenobarbital-induced cytochrome P450 2B1 gene expression in rat primary hepatocytes via the sphingomyelinase/ceramide pathway. *J. Nutr. Biochem.*, **21**, 338-344 (2010).
- 52) Gani O.A., Sylte I., Molecular recognition of docosahexaenoic acid by peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid-X receptor  $\alpha$ . *J. Mol. Graph. Model*, **27**, 217-224 (2008).
- 53) Baranowski M., Blachnio A., Zabielski P., Gorski J., PPAR $\alpha$  agonist induces the accumulation of ceramide in the heart of rats fed high-fat diet. *J. Physiol. Pharmacol.*, **58**, 57-72 (2007).
- 54) Naujokat C., Hoffmann S., Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab. Invest.*, **82**, 965-980 (2002).
- 55) Watanabe M., Funakoshi T., Unuma K., Aki T., Uemura K., Activation of the ubiquitin-proteasome system against arsenic trioxide cardiotoxicity involves ubiquitin ligase Parkin for mitochondrial homeostasis. *Toxicology*, **322**, 43-50 (2014).
- 56) Bose R., Kolesnick R., Measurement of ceramide levels by the diacylglycerol kinase reaction and by high-performance liquid chromatography-fluorescence spectrometry. *Methods. Enzymol.*, **322**, 373-378 (2000).
- 57) Sahle F.F., Lange S., Dobner B., Wohlrab J., Neubert R.H., Development and validation of LC/ESI-MS method for the detection and quantification of exogenous ceramide NP in stratum corneum and other layers of the skin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **60**, 7-13 (2012).
- 58) Spinazzi M., Casarin A., Pertegato V., Salviati L., Angelini C., Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.*, **7**, 1235-1246 (2012).
- 59) Kang M.S., Ahn K.H., Kim S.K., Jeon H.J., Ji J.E., Choi J.M., Jung K.M., Jung S.Y., Kim D.K., Hypoxia-induced neuronal apoptosis is mediated by *de novo* synthesis of ceramide through activation of serine palmitoyltransferase. *Cell. Signal.*, **22**, 610-618 (2010).
- 60) Birbes H., El Bawab S., Hannun Y.A., Obeid L.M., Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *FASEB J.*, **15**, 2669-2679 (2001).

- 61) Siddiqui R.A., Jenski L.J., Harvey K.A., Wiesehan J.D., Stillwell W., Zaloga G.P. Cell-cycle arrest in Jurkat leukaemic cells: a possible role for docosahexaenoic acid. *J. 1Biochem.*, **371**, 621-629 (2003).
- 62) Kuznetsov A.V., Javadov S., Sickinger S., Frotschnig S., Grimm M., H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1853**, 276-284 (2015).
- 63) Akhnokh M.K., Yang F.H., Samokhvalov V., Jamieson K.L., Cho W.J., Wagg C., Takawale A., Wang X., Lopaschuk G.D., Hammock B.D., Kassiri Z., Seubert J.M., Inhibition of soluble epoxide hydrolase limits mitochondrial damage and preserves function following ischemic injury. *Front. Pharmacol.*, **7**, 133 (2016).
- 64) Rovito D., Giordano C., Vizza D., Plastina P., Barone I., Casaburi I., Lanzino M., De Amicis F., Sisci D., Mauro L., Aquila S., Catalano S., Bonofiglio D., Ando S., Omega-3 PUFA ethanolamides DHEA and EPEA induce autophagy through PPAR $\gamma$  activation in MCF-7 breast cancer cells. *J. Cell Physiol.*, **228**, 1314-1322 (2013).
- 65) Pettersen K., Monsen V.T., Hakvag Pettersen C.H., Overland H.B., Pettersen G., Samdal H., Tesfahun A.N., Lundemo A.G., Bjorkoy G., Schonberg S.A., DHA-induced stress response in human colon cancer cells - Focus on oxidative stress and autophagy. *Free Radic. Biol. Med.*, **90**, 158-172 (2016).
- 66) Jing K., Song K.S., Shin S., Kim N., Jeong S., Oh H.R., Park J.H., Seo K.S., Heo J.Y., Han J., Park J.I., Han C., Wu T., Kweon G.R., Park S.K., Yoon W.H., Hwang B.D., Lim K., Docosahexaenoic acid induces autophagy through p53/AMPK/mTOR signaling and promotes apoptosis in human cancer cells harboring wild-type p53. *Autophagy*, **7**, 1348-1358 (2011).