

抗マラリア薬アルテスネートによる水素イオン
および酸素分子依存活性酸素種生成機序の解明と
細胞毒性に関する研究

2018 年

津田 勝範

目次

緒言

第一章 実験方法、実験試薬

- 1.細胞培養実験と試薬添加・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
- 2.酸素濃度変化時の細胞毒性の検討・・・・・・・・・・ 6
- 3.EPR 法による測定方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7
- 4.アルテスネートによる鉄の還元作用の測定・・・・・・・・ 8
- 5.DMSO トラップ法によるヒドロキシルラジカルの定 ・・・・・ 9
- 6.統計・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9

第二章 実験結果

- 1.種々の酸素濃度におけるアルテスネート刺激細胞毒性 ・・・・・ 10
- 2.TPC の酸化によるニトロキシドラジカルの EPR 測定 ・・・・・ 12
- 3.アルテスネートによる鉄(III)の還元と TPC ラジカルの生成・・・・・・・・ 14
- 4.アルテスネートと鉄により生成する酸化種の同定 ・・・・・ 20
- 5.エダラボンを用いた、アルテスネートによる細胞死の抑制効果の検討・・・・・・・・ 24

第三章 考察・まとめ ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26

第四章 参考論文 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

本論文では以下の略語を用いた

ROS	Reactive Oxygen Species(活性酸素種)
TPC	2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamide(2,2,5,5-テトラメチル-3-ピロリン)
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド)
HepG2	ヒト肝癌由来細胞株
FBS	Fetal Bovine Serum(ウシ胎児血清)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium(ダルベッコ改変イーグル培地)
DMSO	Dimethyl sulfoxide(ジメチルスルホキシド)
EPR	Electron Paramagnetic Resonance(電子スピン共鳴)
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine(2,4 ジニトロフェニルヒドラジン)
HPLC	high performance liquid chromatography(高速液体クロマトグラフィー)
PBS	Phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

緒言

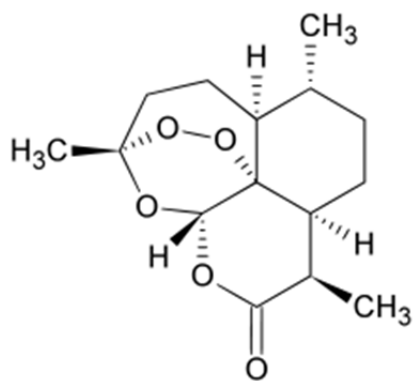
マラリアは、*Plasmodium falciparum* という原虫によって発症し¹、蚊によって媒介される感染症である。蚊の唾液腺から原虫が体内に入り込むと肝臓に取りこまれ、そこで数千倍に増殖し、次いで原虫は肝細胞から血中に放出され、続いて赤血球に侵入し、赤血球の破壊とそれに引き続いた貧血をもたらす、重症の場合は死に至る。現在マラリアは 100 カ国余りで流行しており、世界保健機構 (WHO) の推計によると、2 億人以上の罹患者(2015)と 429,000 の死亡者があると報告されている²。WHO は、熱帯寄生虫によって引き起こされる合併症のないマラリアの治療のためのアルテミシニンを中心とした組み合わせ療法 (ACTs) を推奨している³。

この ACT 治療では、アルテミシニン、例えばアルテスネートやアルテスネーターと、従来からの抗マラリア薬であるメフロキン、ピペラキン、アモディアキン、ルメファントリンの複合薬を組み合わせたもので、有用性と副作用の少なさから推奨されている。ここで用いられるアルテミシニンは古くからマラリアの治療に用いられていた漢方薬の一種であるヨモギ属植物 (*Artemisia annua*) から 1971 年に発見された化合物で、分子内に過酸化構造を有し⁴、その構造は抗マラリア活性に必須と言われている⁵。これらアルテミシニン誘導体のマラリア原虫に対する作用機序は明らかにされていないが、マラリア原虫細胞食胞で生成されるヘムとアルテミシニン誘導体との反応で生じたフリーラジカルによるマラリア原虫の傷害が推定されている⁶⁻¹⁰。

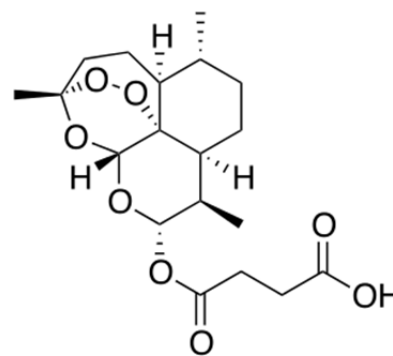
ところで最近ではアルテミシニン誘導体はマラリアの治療だけではなく、癌細胞に選択的に抗腫瘍活性を発揮することが報告されるようになり¹¹⁻¹⁸、抗腫瘍薬剤の創薬シーズとして注目を集めるようになりつつある。アルテミシニン誘導体の抗腫瘍活性機序としては、アポトーシスの誘導、血管新生抑制作用、活性酸素種生成増加による HIF-1 α 活性化の阻害、直接的 DNA 損傷が報告されており、多くの場合、活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)生成が関与している¹¹。

しかしながら、アルテミシニン誘導体からの ROS 生成メカニズム、また、生成する ROS の種類等はほとんど判っていない。そこで本研究では、水溶性のアルテミシニン誘導体であるアルテスネートを用い、ROS 生成と細胞毒性の関連について検討した。

アルテスネートの抗腫瘍活性には鉄(II)が必要という先行報告がある¹¹。また癌細胞は、ワーグブルグ (Warburg) 効果と呼ばれる特徴的な代謝現象を示すことが知られており⁴⁵、豊富な酸素の存在下であってもグルコースから乳酸を産生するため、癌細胞周辺では pH が低下することが報告されている。一般的な細胞条件下では酸素分圧 0.2 気圧だが、体内の正常酸素分圧は 0.05 気圧、癌細胞周辺では酸素分圧 0.01 気圧ほどであると報告²²されている。この時の酸素分圧は 1 気圧純酸素を 1.0 とした値である。これらの事を踏まえ、アルテスネートからの ROS 産生および細胞毒性メカニズムについて、主に水素イオン濃度、酸素分圧の点からも検討を行った。



アルテミシニン



アルテスネート

実験方法

1. 細胞培養実験と試薬添加

アルテスネートは東京化成工業（東京）、TPC はシグマ・アルドリッチ(ML,USA)、DMPO はラボテック社（東京）、HepG2 細胞は ATCC(VA、USA) より購入した。またエダラボンは田辺三菱製薬株式会社(東京) から恵与された。その他のすべての試薬は、特に記載のない限り、和光純薬（大阪）、東京化学工業（東京）、または関東化学（東京）から分析等級のものを購入した。

細胞は 10% FBS、1%ペニシリンーストレプトマイシンを含む DMEM 培地で 5% CO₂, 95% air の条件で培養し、低酸素下の条件での培養はマルチガスインキュベーター (MCO-5M、三洋、東京)を用い 5% CO₂-95air(20% O₂), 5% CO₂-90% N₂(5% O₂)もしくは 5% CO₂-94% N₂ (1% O₂)、37°Cで 3 日間培養したのち、実験に用いた。低酸素下で細胞を刺激する実験では、刺激する試薬類はそれぞれの低酸素下で 30 分以上インキュベートしたものを用いた。アルテスネート、TPC、ビピリジン(BP)は DMSO に溶解し、DMSO の最終濃度は 0.1% 以下になるようにした。また、対照群には同濃度の DMSO を添加した。鉄は用時 0.2% 希塩酸に溶解して用いたほか、エダラボンは蒸留水で溶解し、細胞に添加する場合は濾過滅菌を行った。

2. 酸素濃度変化時の細胞毒性の検討

細胞生存率は MTT アッセイで評価した。HepG2 細胞は 96-well の培養プレート (Falcon, BD, Franklin Lakes, NJ) に、 1×10^4 cells/well の割合で撒き、24 時間後に種々の濃度のアルテスネートを添加し、72 時間、各酸素分圧下で培養した後試薬を添加し、同一の酸素分圧下で更に 28 時間インキュベートした。その後 0.2 mg/mL（最終濃度）の MTT を添加し、2 時間インキュベートした。この時 MTT は PBS 溶液で希釈したものを使用した。

生成したホルモザンを SDS(sodium dodecyl sulphate) (最終濃度 10%) と塩酸(最終濃度 0.5 mM) で溶解しマイクロプレートリーダー (Thermo Scientific, Wilmington, DE, US) を用い、波長 570/630 nm で測定した。細胞生存率はアルテスネートの濃度が 0 の生存率を 100% としたときの相対比で求めた。エダラボン存在下の細胞生存率の検討では、HepG2 細胞 (1×10^4 細胞/mL) を 0.2 気圧 O₂ 下で 24 ウェル組織培養プレート中で 48 時間インキュベートし、次いで細胞培養培地を交換後、示された濃度のエダラボンを添加し、その 30 分後にアルテスネート (最終濃度 250 μ M) と鉄(III)–8 ヒドロキシキノリン(8HQ) 錯体 (鉄の最終濃度 100 μ M) を添加し、4 時間インキュベートした。その後、細胞生存率を MTT アッセイによって評価した。鉄(III)–8HQ 錯体は、Lehnen-Beyel らの方法に従って調製した¹⁹。この時用いた試薬のうち PBS と 8HQ 以外はすべて用事調製にて使用した。

3. EPR 法による測定方法

電子スピン共鳴装置(Electron Paramagnetic Resonance: EPR)を用いて、EPR-スピントラッピング法でアルテスネートからの ROS 生成を観察した。EPR の測定は室温下で実施した。試料は 3 本の 10 μ L ガラス製の毛細管 (ドラモンド社、PA,USA) に充填し、それらを石英チューブに移して測定を行った。すべての溶液を EPR 測定の前に混合して、図の説明文に示す最終濃度とし、反応を鉄の添加によって開始した。嫌気下での試料の調製は、反応液を予めアルゴンガスで脱気しておき、それらを窒素ガスを満たした嫌気バックの中で混合と毛細管への充填を行い、両端をヘマトクリット毛細血管用ツール用粘土(Termo, 東京)を用いシールした。すべての EPR スペクトルを収集するために、ER4103 キャビティを有する Bruker EMXPlus EPR 分光計 (Bruker Biospin, Osaka Japan) を用いた。超微細結合定数とラジカル濃度は、コンピュータプログラム Winsim を用いて得られた²⁰。他の個々の条件は、図の脚注に示す。また、一部の実験には DMSO の代わりに ¹³C₂-DMSO を用いた。

<測定条件>

マイクロ波出力: 10 mW

変調振幅: 2.0 gauss

時定数: 0.08 sec

スキャン時間: 120 sec

スキャン範囲: 100 gauss

4. アルテスネートによる鉄の還元測定

アルテスネートにより鉄(III)から生成された鉄(II)の生成は、BPと鉄(II)との反応によって形成される鉄(II)-BP錯体で確認した。アルゴンガスを15分通気することで脱気した試料を、アルゴンガスで置換した分光嫌気セル内で混合し、鉄(II)-BP錯体に基づく522 nmの吸光度を経時的に測定した。この時、最終濃度はアルテスネート5 mM、FeCl₃ 0.1 mM、BP 30 mMである。鉄を加えた直後を0分とし測定を行った。アルテスネートとBPはDMSOに希釈し、また鉄(II)及び鉄(III)は希塩酸で希釈し用事調製にて作成し実験に用いた。鉄(II)の濃度は鉄(II)-BPのモル吸光度係数(8600 M⁻¹・cm⁻¹)から算出した。還元速度は経時的な522 nmの吸光度変化を記録したグラフの0→2分における線の傾きから算出した。

<測定条件>

測定機械: U-3900H

可視領域(340-800nm): ハロゲンランプ

スキャン速度: 120nm/min

スキャン間隔: 10min

測定温度: 室温

測定範囲: 400-750 nm

5. DMSO トラップ法によるヒドロキシルラジカル(hydroxyl radical: $\bullet\text{OH}$)の定量

$\bullet\text{OH}$ の生成を明らかにするために、我々は、Tai らの DMSO トラップ法を改変した方法を用いた²¹。100 mM DMSO、1.6 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、8 mM アルテスネート、および 0.24 mM DNPH を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 4.0) を室温で 150 分間静置し、その後 HPLC で測定を行った。HPLC は、100 μl の吸入ループを備えた EiCOM EP-300 ポンプ (Eicom Co., Kyoto Japan)、および分離は、GL Sciences Inertsil ODS-SP (4.6 \times 150 mm) カラムで行った。移動相は、30 mM クエン酸ナトリウムを含む 277 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.75) : メタノール = 1 : 3 を使い、0.45 μm フィルター (Millipore, Bedford, MA, USA) で濾過して用いた。HPLC 分析は、1.0 ml/min の流速のもと、アイソクラティック条件下でカラムオープン (EiCOM ATC-300) を用いて 40°C で実施し、検出は酸化電圧で + 800 mV に設定した ECL 検出器 (EiCOM ECD-300) を、フルスケール 0.5 nA AUFS の条件で使用した。

6. 統計

差の統計的有意性は、Dunnett または Turkey-Kramer の検定、Independent-Sample t 検定、Paired-Sample t 検定、または Wilcoxon のマッチドペア検定によって決定した。p < 0.05 は統計的に有意とした。

第二章 実験結果

1.種々の酸素分圧におけるアルテスネート刺激細胞毒性

アルテスネートは、鉄(II)共存下で各種細胞に対して細胞毒性を示すことが報告されている¹¹。アルテスネートをヒト培養肝癌細胞株である HepG2 細胞に酸素分圧 0.2 気圧、0.05 気圧、0.01 気圧で 28 時間接触させたところ、アルテスネートは濃度依存的に細胞毒性を示すことが明らかとなった。(Fig. 1) ところで、多くの体組織では酸素分圧は 0.05 気圧と報告されており、また、癌細胞周辺の酸素分圧では 0.01-0.02 気圧であると報告²²されている。そこで、培養条件をこれらの酸素分圧を変えて同様の実験を行ったところ、低酸素分圧 (0.01 気圧 O₂) では 0.05 気圧 O₂ の培養条件と比べて、アルテスネートの濃度依存的にアルテスネートによる細胞毒性が減弱した。(Fig. 1)

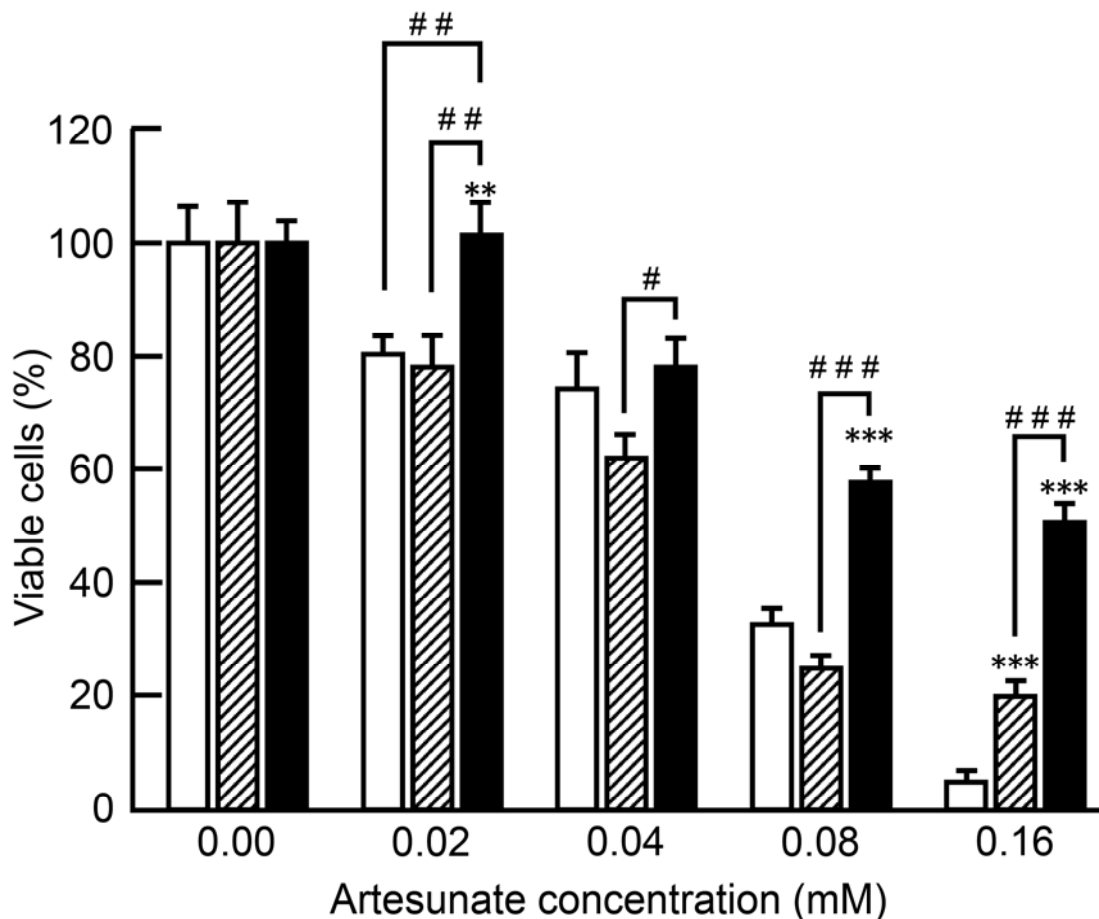
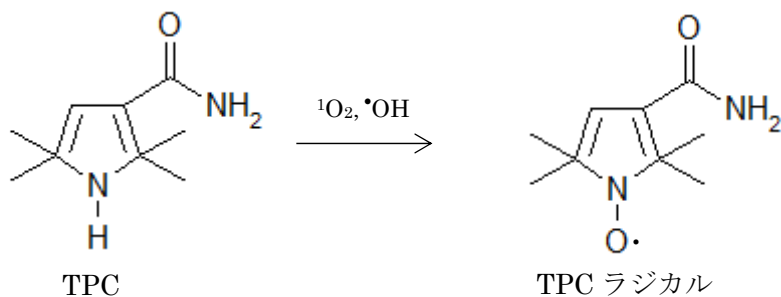


Figure 1 : アルテスネート-鉄(II)による細胞毒性におよぼす酸素分圧の影響

HepG2 細胞 (1×10^4 細胞/ mL) を 0.2 気圧 O₂ 下で 96 ウェル組織培養プレート中で 24 時間インキュベートし、次いで 0.2 気圧 O₂ (白色カラム)、0.05 気圧 O₂ (斜線カラム) および 0.01 気圧 O₂ (黒色カラム) で 72 時間処理した。細胞培養培地を交換し、示された濃度のアルテスネートを 0.1 mM の鉄(II)と共に添加し、次いで示された酸素分圧下でさらに 28 時間インキュベートした。その後、細胞生存率を MTT アッセイによって評価した。MTT アッセイは実験項目の内容に従って行った。生存細胞の割合をパーセンテージで示し、各酸素分圧でアルテスネートなしでインキュベートした HepG2 細胞からのホルモザンのレベルを 100% とした。値は平均±SE (n=8) である。*、** および *** は、各アルテスネート濃度の酸素分圧 0.2 気圧 における細胞生存率と比較して、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ および $p < 0.001$ を示す。#、##、### は群間における $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ および $p < 0.001$ を示す。

2. TPC の酸化によるニトロキシドラジカルの EPR 測定

TPC はそれ自身では EPR シグナルを持たないが、TPC は $\cdot\text{OH}$ および一重項酸素($^1\text{O}_2$) によって酸化されるとニトロキシドラジカルとなり(Scheme 1)、特徴的な 3 本線からなる EPR シグナルを示す。そこで TPC を用いて、アルテスネート由来のラジカルを測定した。50 mM の TPC と、4 mM の銅、鉄(II)、鉄(III)を加え、直ちに EPR を測定したところ、好氣的条件下で TPC ラジカルは鉄(II)単独で確認でき(Fig. 2G)、このシグナルは 4 mM のアルテスネート共存で増大した(Fig. 2H)。TPC ラジカルの生成に対し、銅イオンはアルテスネートの有無にかかわらず、影響を与えなかった (Fig. 2C,D)。また、鉄(III)はアルテスネートが共存することによってわずかに TPC ラジカルの増加が見られた (Fig. 2E,F)。一方、嫌氣的条件下では鉄(II)単独および鉄(II)-アルテスネート由来の TPC ラジカルは見られなかった (Fig. 2J,K)。



Scheme 1: TPC 酸化による TPC ラジカルの生成

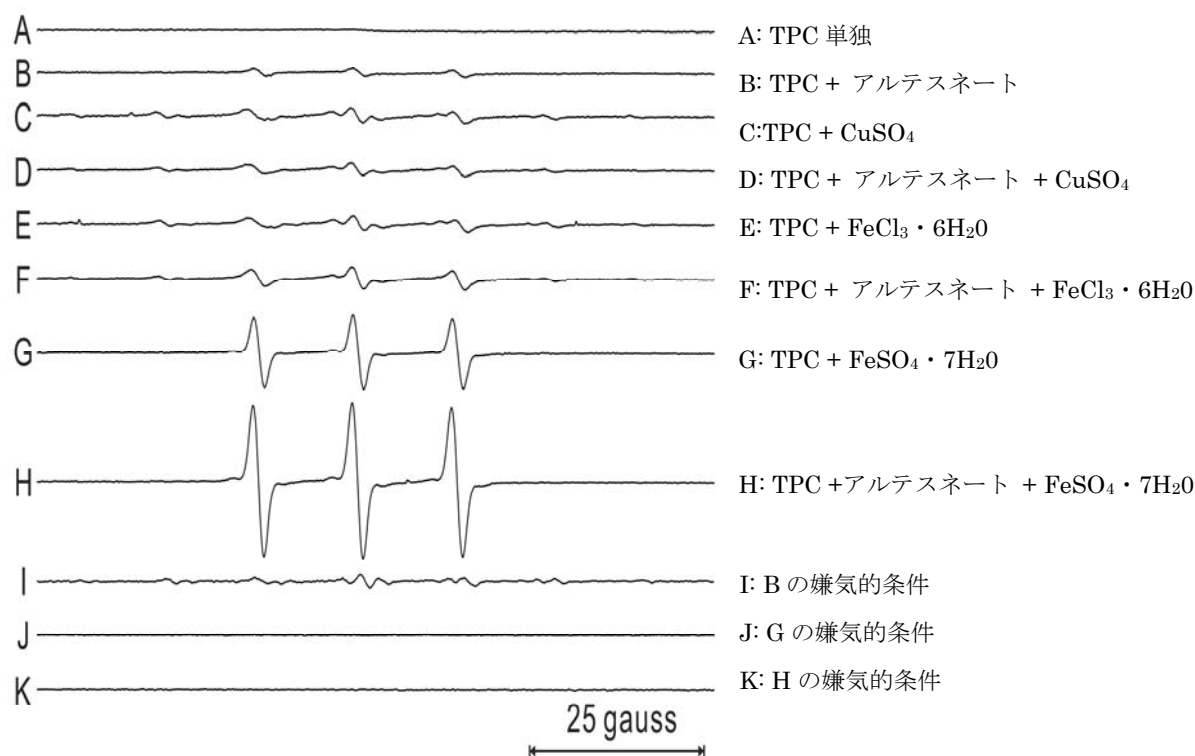


Figure 2: アルテスネートと各種金属による TPC ラジカルの EPR スペクトル

A: TPC 単独、B: TPC + アルテネート、C: TPC + CuSO₄、D: TPC + アルテスネート + CuSO₄、E: TPC + FeCl₃ · 6H₂O、F: TPC + アルテスネート + FeCl₃ · 6H₂O、G: TPC + FeSO₄ · 7H₂O、H: TPC + アルテスネート + FeSO₄ · 7H₂O、I: B と同じだが嫌氣的条件、J: G と同じだが嫌氣的条件、K: H と同じだが嫌氣的条件。

200 mM アルテスネート (DMF に溶解)、500 mM TPC (水で溶解)、および 200 mM の金属 (FeCl₃ · 6H₂O、FeSO₄ · 7H₂O、そして CuSO₄ を 0.2% HCl で溶解) を調製し、DMF を溶媒として、最終濃度をそれぞれ 20 mM、50 mM、そして 4 mM とした。次いで、EPR 分光法によって TPC ラジカルを測定した。

EPR 分光器の設定は、10 mW のマイクロ波出力、2.0 gauss の変調振幅、100 kHz の変調周波数、0.08 sec の時定数、120 sec のスキャン時間、1 × 10⁴ の受信機ゲイン、および 100 gauss のスキャン範囲で行った。

3. アルテスネートによる鉄(III)の還元と TPC ラジカルの生成

鉄(III)単独(Fig. 2E)と比べ、鉄(III)とアルテスネートによる TPC ラジカルの増大が確認(Fig. 2F)できた。また、鉄(II)単独(Fig. 2G)より、アルテスネート共存下(Fig. 2H)で鉄(II)の TPC ラジカルが増大したことから、アルテスネートには鉄(III)の還元能がある事が予測された。そこで、鉄(II)の指示薬である BP を用い、嫌氣的条件下でアルテスネートによる鉄(III)の還元能を検討した。Fig. 3 に示す様に、嫌氣的条件下でアルテスネートと鉄(III)を反応させると鉄(II) -BP 由来の 522 nm に吸収極大を持つ吸光スペクトルが観察され、このスペクトルは経時的に増加することが示された。アルテスネート単独および鉄(III)単独では、BP の吸光度の変化は起きなかった。(data not shown)

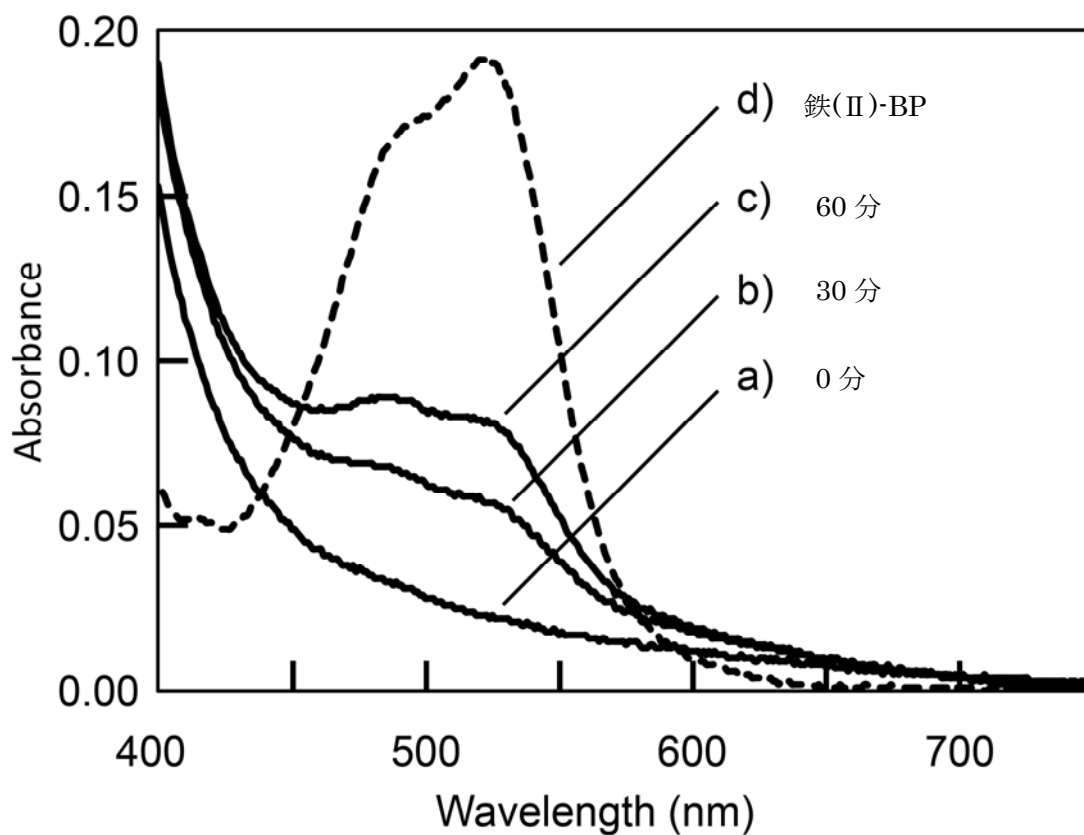
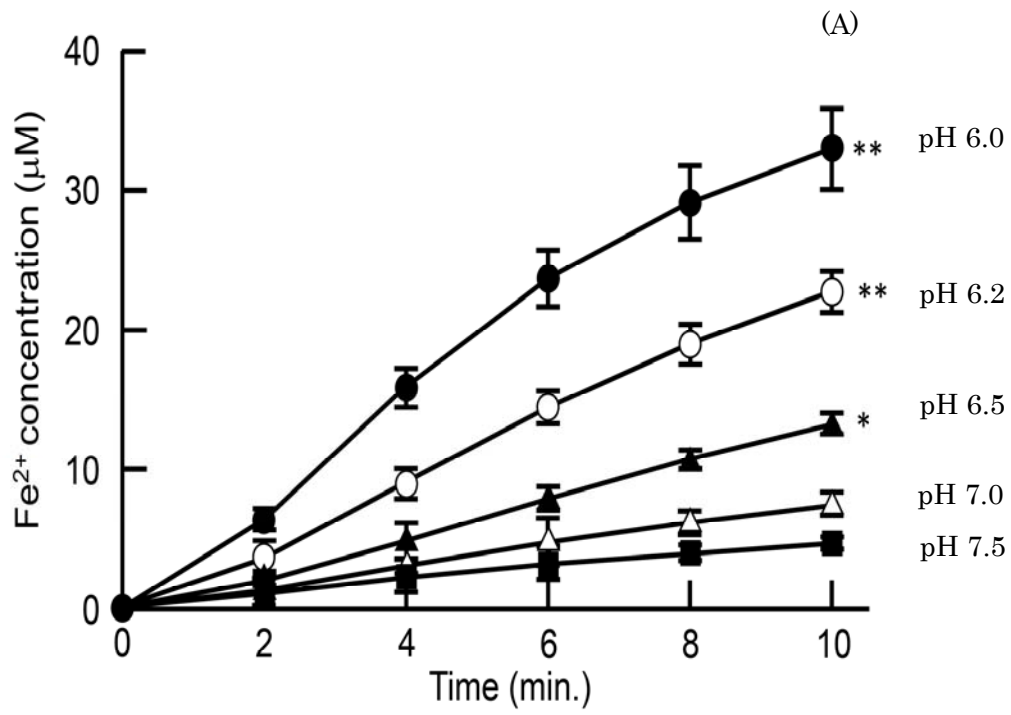


Figure 3: 嫌気性条件下でのアルテスネートの存在下での鉄(III)の還元による鉄 BP 錯体の吸収スペクトルの変化

全ての試料溶液 (200 mM アルテスネート(DMSO で溶解)、300 mM BP (DMSO で溶解)、50 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.2% HCl で溶解)、50 mM FeSO_4 (0.2% HCl で溶解)) をアルゴンガスを通気し 15 分間脱気した。2.7 mL の蒸留水をセプタムシールキャップを備えた石英分光測定嫌気セルに入れ、アルゴンガスを 15 分間バブリングすることによって脱気した。試薬 (最終濃度はアルテスネート 5 mM、 FeCl_3 0.1 mM、BP 30 mM) を添加して 0 (a)、30 (b)、60 (c) 分後に、嫌気性条件下で測定した。破線 (d) は、 FeCl_3 の代わりに 0.025 mM の FeSO_4 を添加して得られる鉄(II)-BP 錯体の真のスペクトルを表す。

次に、アルテスネートによる鉄(III)の還元に対する水素イオン濃度の影響について検討した。嫌氣的条件下、アルテスネートと鉄(III)を種々の pH 溶液中で反応させると、Fig. 4A に示したように検討した全ての水素イオン濃度において経時的に鉄(III)の還元が起き、また鉄(II)の生成は酸性側で促進されることが示された。このとき、水素イオン濃度と鉄(II)還元速度の間には良好な直線関係が見出された(Fig. 4B)($r^2=0.9959$)。

ところで鉄(II)は自動酸化によって酸化力の高い ferryl species、もしくは $\bullet\text{OH}$ のような酸化種を生成すると共に、鉄(III)になることが知られている²⁴。Figs 3,4 の結果から、過剰量のアルテスネートと鉄をインキュベーションすると、生成した鉄(III)が鉄(II)に還元を受け、持続的に自動酸化によって酸化種を生成することが予想された。



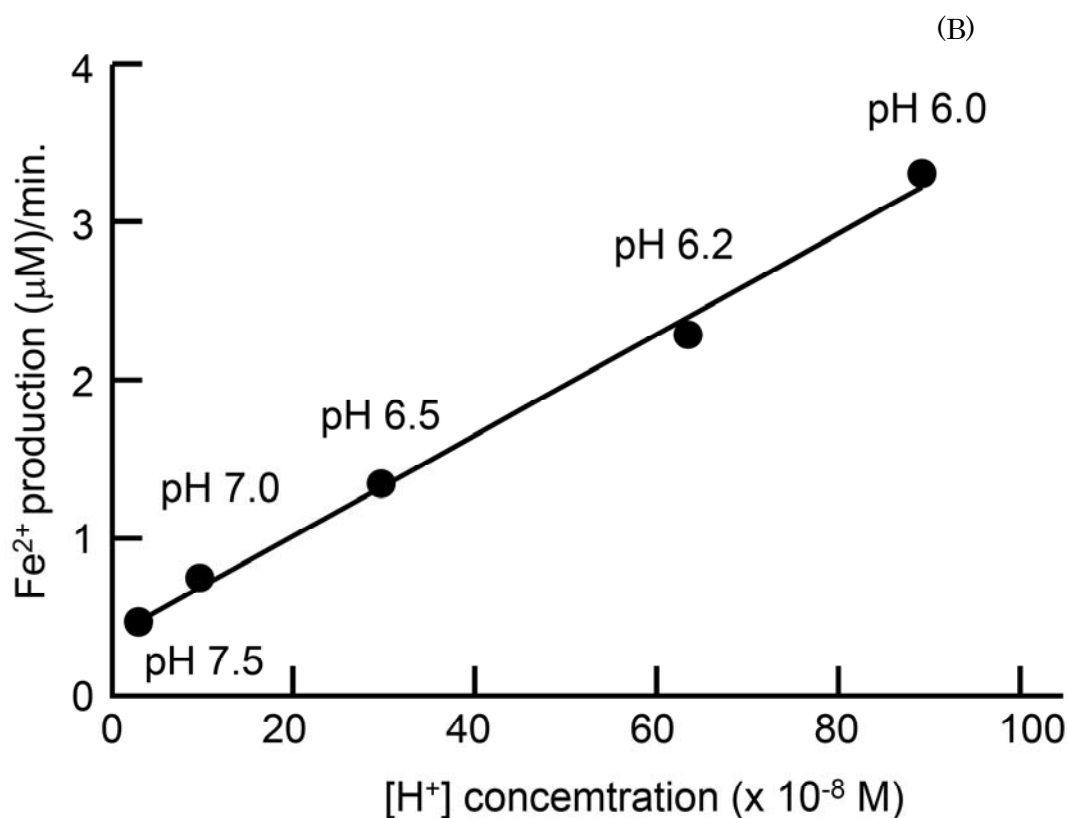


Figure 4: 生理的水素イオン条件下でのアルテスネートより鉄(III)から鉄(II)への還元について。(A)水素イオン濃度の違いによる鉄(II)生成に与える影響、(B)水素イオン濃度と鉄(II)生成速度の関係
鉄(II)濃度は、522 nm における鉄(II)-(BP)₃ のモル吸光係数(8600 M⁻¹ · cm⁻¹)を用いて計算した。すべての試料溶液(200 mM アルテスネート(DMSO で溶解)、300 mM BP(DMSO で溶解)、200 mM FeCl₃ · 6H₂O (0.2% HCl で溶解))をアルゴンガスを15分間通気し脱気した。

(A) 2.7 mL の1%HEPES(pH は6.0-7.5)を、セプタムシールキャップ付き石英分光測定セルに入れ、アルゴンガスを15分間通気し脱気した。嫌気的条件下で試薬(最終濃度は5 mM のアルテスネート、0.2 mM の FeCl₃、30 mM の BP)を添加し、混合後、指示された時間に522 nm での吸光度を測定した。(黒丸: pH 6.0, 白丸: pH 6.2, 黒三角: pH 6.5, 白三角: pH 7.0, 黒四角: pH 7.5)

実験は3回繰り返し、平均±S.E.で示す。*,**,***はそれぞれ、pH7.5 に対して p<0.05, p<0.01, p<0.001 で有意差があることを示している。

(B) 縦軸は Fig. 4A から得られた各 pH 溶液中の鉄(II)の形成速度を示し、横軸は各 pH における水素イオン濃度を示す。相関係数は0.9959であった。

そこで、経時的な TPC ラジカル生成を EPR で測定したところ、Fig. 5 に示したように、鉄(II)は勿論、鉄(III)でも持続的に TPC ラジカルが生成し続ける事が明らかとなった。一方鉄(II)、鉄(III)単独ではアルテスネートが共存している場合のような TPC ラジカルの生成増加が見られなかった。

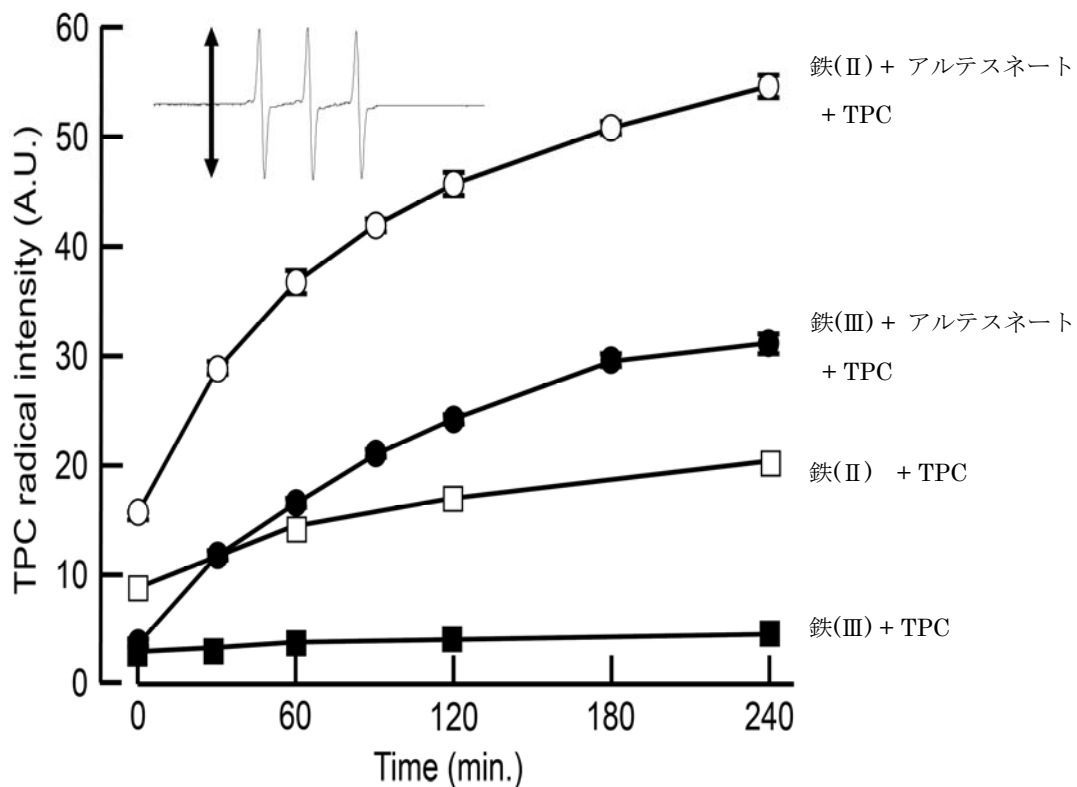


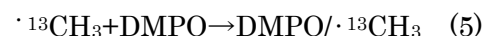
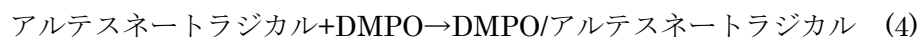
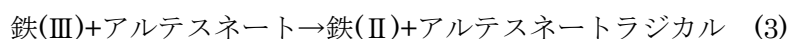
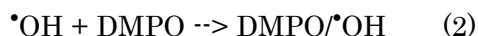
Figure 5: 鉄(II)、鉄(III)とアルテスネートによる TPC ラジカル生成の経時的変化
 50 mM TPC、4 mM 鉄、10 mM アルテスネートを含む DMF 溶液を調製し、混合直後(0min)、30、60、120、240 分後に反応液を採取し生成される TPC ラジカルを EPR 装置で測定した。得られた TPC ラジカル(図左上)のピーク高さを TPC ラジカル濃度と規定し、経時的な TPC ラジカル生成を検討した。白丸：鉄(II)+アルテスネート+TPC、黒丸：鉄(III)+アルテスネート+TPC、白四角：鉄(II)+TPC、黒四角：鉄(III)+TPC
 実験は 3 回行い、平均±SE で示す。

4. アルテスネートと鉄により生成する酸化種の同定

アルテミシニン誘導体と鉄(II)で、 $\cdot\text{OH}$ の生成が熱力学的に推定されていることから²⁵、DMSO トラッピング法^{21,26}による EPR 法と、HPLC によって $\cdot\text{OH}$ の生成を確認する実験を行った。溶媒として DMSO が含まれるとき、DMSO に $\cdot\text{OH}$ が反応すると、拡散律速の速度でメチルラジカル($\cdot\text{CH}_3$)が生成することが知られている²⁷。ここで、DMSO の2つの炭素原子を ^{13}C にした $^{13}\text{C}_2$ -DMSO を用いると $\cdot^{13}\text{CH}_3$ が生成する。



$\cdot\text{CH}_3$ はラジカル体であるが、寿命が短いことから EPR では直接観察できないため、ラジカルの寿命を延ばすスピントラップ剤を用いることで EPR を測定することが可能となる。そこで、ラジカルトラップ剤として DMPO を用い、生成した $\cdot\text{CH}_3$ の検出を行った。500 mM の $^{13}\text{C}_2$ -DMSO と 5 mM のアルテスネート、2 mM の鉄(II)を混合し、500 mM の DMPO を加えて直ちに EPR を測定したところ、超微細結合定数 $a^{\text{N}}=16.01$ と $a^{\text{H}}=22.64$ ガウス(Figs. 6A,B 白丸)、と $a^{\text{N}}=14.81$ 、 $a^{\text{H}}=14.48$ ガウス (Figs. 6A,B 黒丸)、 $a^{\text{N}}=16.20$ と $a_{\beta}^{\text{H}}=23.70$ 、 $a_{\beta}^{13\text{C}}=7.50$ ガウス((Figure 6A,B 白三角)が観察され、それぞれ DMPO/アルテスネートラジカル、DMPO/ $\cdot\text{OH}$ 、DMPO/ $\cdot^{13}\text{CH}_3$ と同定された。これらのラジカルが観測されたメカニズムは次のように考えられる。



ところで Fig. 6C で鉄(II)と DMPO からは一般的には鉄(II)の自動酸化により $\cdot\text{OH}$ が生成し DMPO 共存下で、DMPO/ $\cdot\text{OH}$ が観察されるはずであるが、それが観察できなかった

理由として鉄(II)による DMPO/ \cdot OH の分解が考えられた^{40,41}。

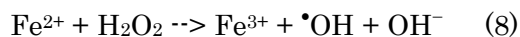
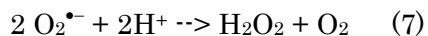
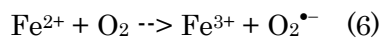


Fig. 6B は上記超微細結合係数を用いて得られたコンピューターシミュレーションである。一方で、生成した $\cdot\text{CH}_3$ は酸素分子と反応して $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$ を生成し、更にホルムアルデヒドとメタノールに分解されるが、このとき生成するホルムアルデヒドは 2,4-dinitrophenylhydrazine(DNPH)と反応しヒドラゾンを生じることから^{42,43}、この反応を利用して $\cdot\text{OH}$ 生成を確定するため HPLC でヒドラゾンを測定した。

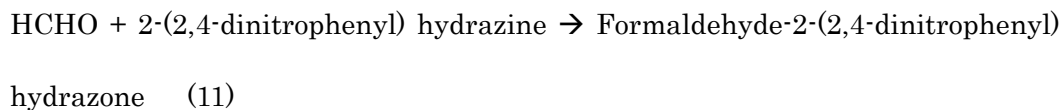
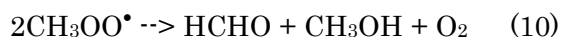
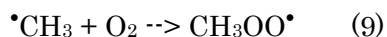
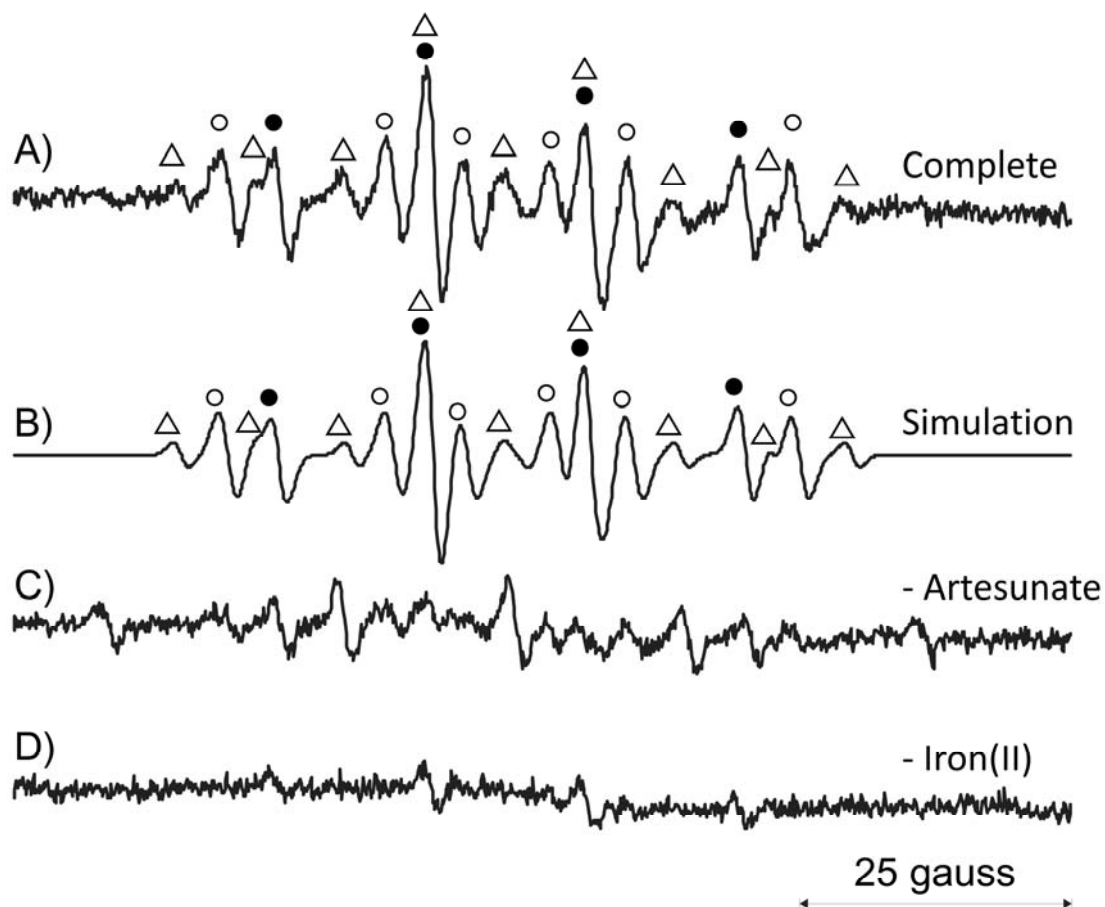


Fig. 7 に示すように、鉄(II)だけでもヒドラゾン化合物である formaldehyde-2-(2,4-dinitrophenyl)hydrazone が生成したが、アルテスネートが共存することでその生成は有意に増加した。また、鉄(III)においてアルテスネートが共存すると、その生成が有意に増すことが示された。



超微細結合定数 $a^N=16.01$ と $a^H=22.64$ ガウス(白丸) \Rightarrow DMPO/アルテスネートラジカル

$a^N=14.81$ 、 $a^H=14.48$ ガウス (黒丸) \Rightarrow DMPO/ \bullet OH

$a^N=16.20$ と $a_\beta^H=23.70$ 、 $a_\beta^{13C}=7.50$ ガウス(白三角) \Rightarrow DMPO/ $^{13}\text{CH}_3$

Figure 6: スピントラップ剤 DMPO によって捕捉された、 $^{13}\text{C}_2$ -DMSO 溶液中のアルテスネートと鉄(II)由来のスピンアダクトの EPR スペクトル

A : 5 mM のアルテスネート、2 mM の鉄(II)、および 1 M の DMSO を、500 mM の DMPO 水溶液に混ぜた時の EPR スペクトル。

B : スペクトル A から得られた超微細結合定数 $a^N = 16.01$ 、 $a_\beta^H = 22.64$ ガウスの DMPO /アルテスネートラジカル及び $a^N = 14.81$ 、 $a^H = 14.48$ ガウスの DMPO / \bullet OH そして $a^N=16.20$ と $a_\beta^H=23.70$ 、 $a_\beta^{13C}=7.50$ ガウスの DMPO/ $^{13}\text{CH}_3$ に基づくコンピューターシミュレーション。

C : A の条件からアルテスネートを除いたときの EPR スペクトル

D : A の条件から鉄(III)を除いたときの EPR スペクトル

全ての EPR 測定は、好氣的条件下で行った。

EPR 分光器の設定は、Fig. 2 と同じである。

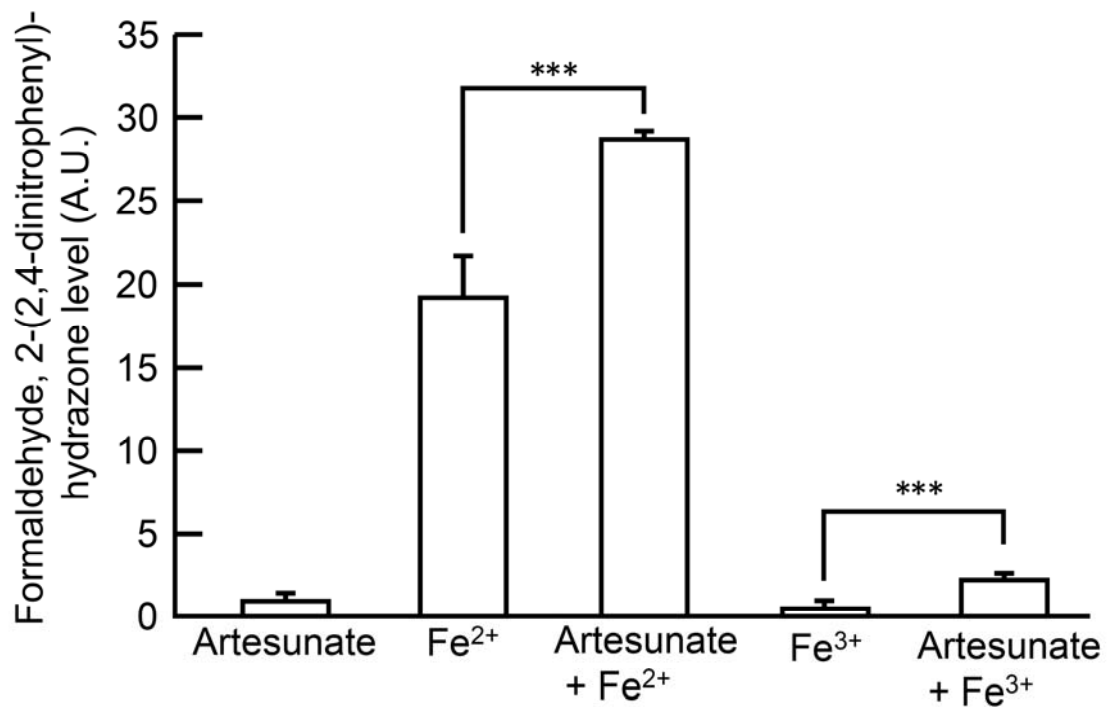
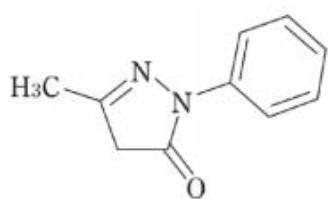


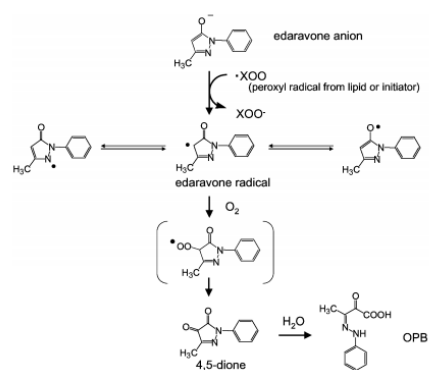
Figure 7: アルテスネートの有無が、DMSO 由来ホルムアルデヒド生成に与える影響の検討
 1.6 mM の鉄(II)および 8 mM アルテスネートのいずれか、または両方を、100 mM の DMSO および 0.2 mM の DNPH を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH4.0) に加え、室温で 150 分間インキュベートし、次いで、実験方法に記載されているように HPLC カラムに導入した。Formaldehyde,2-(2,4-dinitrophenyl)-hydrazone の生成は、標品との retention time で確認した。実験は 3 回繰り返し、平均±S.E.で表示している。***は p<0.001 で有意差があることを示している。

5. エダラボンによる、アルテスネートによる細胞死の抑制効果の検討

エダラボンは、 $\bullet\text{OH}$ ³¹と過酸化水素に対する強い消去活性、そして弱いスーパーオキシド消去活性を持つことが報告され、また最近一重項酸素に対しても消光活性を示すことが明らかにされている。現在、エダラボンは、 $\bullet\text{OH}$ による細胞死を強力に抑制する薬剤として、脳虚血性疾患の治療に臨床で用いられている。HepG2細胞を0.2 mMのアルテスネートおよび0.1 mMの鉄(III)と共にインキュベートすると、細胞生存率が40%まで有意に低下した。この培養液中にエダラボンを共存させると、細胞死がエダラボンの濃度依存的に有意に細胞生存率が改善した(Fig. 8)。



エダラボン



エダラボンによる $\bullet\text{OH}$ 消去機序

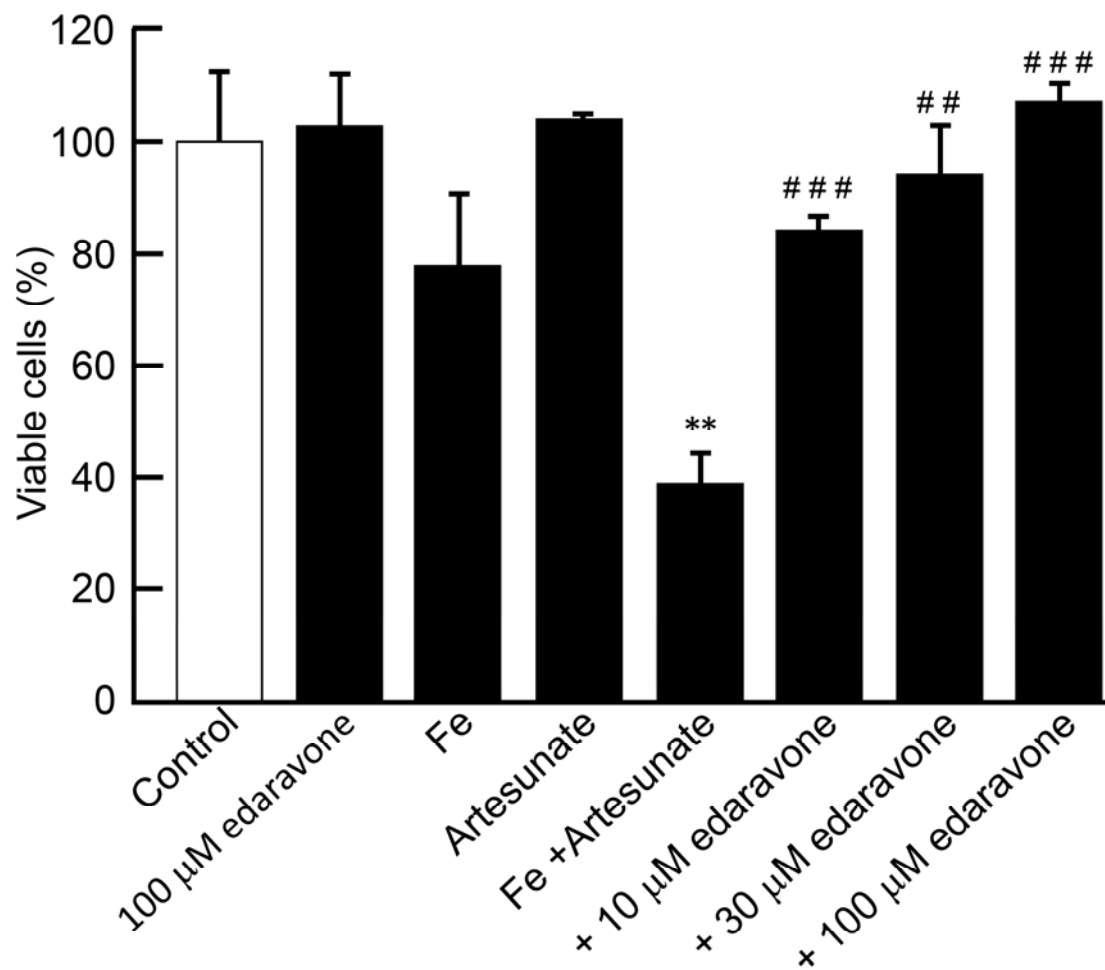


Figure 8: 鉄(III)-アルテスネート鉄誘発細胞死に及ぼすエダラボンの影響

MTT アッセイは実験項の内容に従って行った。

図の縦軸は無処理の細胞と比較した生存細胞の割合を示し、アルテスネートなしでインキュベートした HepG2 細胞からのホルモザンのレベルを 100%とした。実験は 8 回繰り返し、値は平均±SE で示した。

**はコントロール群と比べ $p < 0.01$ であることを、また、##、###は鉄(III)-アルテスネート群に対する有意差を示す。($p < 0.01$ 、 $p < 0.001$)

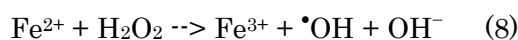
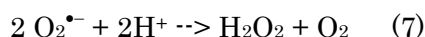
第3章 考察・まとめ

考察

本研究では、アルテスネートによる細胞毒性は酸素分圧に依存すること、アルテスネートは鉄(III)を鉄(II)に還元する能力を有すること、そして還元能力は酸性条件下で促進されることを明らかにした。アルテスネート、アルテミシニン、およびそれらの誘導体は、抗マラリア薬として現在広く用いられており、その作用機序として鉄(III)によりアルテスネート誘導体中の *endo-peroxide* が鉄(II)により開裂して生じる炭素ラジカルが、マラリア原虫に対するアルキル化種として抗マラリア活性を発揮するとされている³⁴。一方でこれとは別にアルテスネートは、抗癌剤として応用が進められている³⁵。アルテスネートによる抗腫瘍活性のメカニズムとしては、ROS生成を介したアポトーシス^{11, 36}、細胞周期の停止³⁷、p38活性化と細胞内カルシウムの増加³⁸が言われているが、メカニズムの詳細はわかっていないため臨床応用が遅れている。ところで興味深いことに、Fig. 1で示したように、酸素分圧が低いとアルテスネートの細胞毒性は有意に抑制された。このことは、酸素分子の存在がアルテスネートの細胞毒性発揮に関与することを示唆している。Ohgamiらは、高圧酸素療法で用いられる高酸素濃度の条件で、アルテミシニンのMolt-4ヒト白血病細胞に対する細胞毒性が有意に高まることを見出し、高圧酸素療法とアルテミシニンの併用は、効果的な抗癌化学療法戦略である可能性を報告している³⁹。さらに近年、アルテスネートの抗腫瘍活性にはROSが関与していることが報告された^{11, 36}。

酸素分子からは、スーパーオキシドアニオンラジカル、過酸化水素、 $\bullet\text{OH}$ 、そして一重項酸素などのROSが作られるが、アルテスネートの場合、どのROSが細胞毒性に関わっているかは十分検討されていない。アルテスネートは *endoperoxide bridge* 構造を有し、この構造は鉄と反応すると一重項酸素を生成することが報告されている⁴⁰。そこで、このことを確かめるため、まず初めに一重項酸素、 $\bullet\text{OH}$ によって一電子酸化され、TPCラジカルを

生成する TPC²³ を用いて EPR シグナルを観察したところ、Fig. 2H に見られるように、酸素分子と鉄(II)とアルテスネートが共存すると、アルテスネート単独(Fig. 2B)や鉄(II)単独(Fig. 2G)と比べて TPC ラジカルの増大が確認できた。好氣的条件下では、鉄(II)と TPC だけでも TPC ラジカルが生成したが(Fig. 2G)、これは鉄(II)の自動酸化によって生成する[•]OH⁴¹ もしくは同様の酸化力を持つ Ferryl(Fe(IV)=O) のような[•]OH 様物質^{24,42} によるためと考えられる。



ところで、嫌氣的条件下ではアルテスネートと鉄(II)からの TPC ラジカルが確認できなかったことから(Fig. 2K)、TPC ラジカルの生成には酸素分子が関与しない endoperoxide bridge からの一重項酸素ではなく、溶存酸素が必要であることが示唆された。ところで、この実験を通して、鉄(III) (Fig. 2E) またはアルテスネート単独(Fig. 2B) と比較して、鉄(III)とアルテスネートが TPC ラジカルの生成をわずかに増加させることを見出した(Fig. 2F)。鉄(III)は、カルボン酸部位を有する化合物で還元されて鉄(II)を生成することが知られていること^{43,44} また、アルテスネートがカルボキシル基を有することから、この TPC ラジカルの増大は鉄(III)から鉄(II)への還元が起きたのではないかと仮説を立て、鉄(II)の指示薬である BP を用い、アルテスネートによる鉄(III)の還元活性を調べた。その結果、Fig. 3 に示す様に、鉄(III)とアルテスネートを混合すると経時的に鉄(II)-BP 錯体由来の 522nm の吸収が出現したことから、アルテスネートによる鉄(III)還元活性が見出された。さらに、この還元活性は溶液の水素イオン濃度に依存しており、酸性側で促進されることが示され (Fig. 4A)、さらに、水素イオン濃度と鉄(II)の生成速度との間には良い直線関係があることが示された ($r^2=0.9959$) (Fig. 4B)。そこで、好氣的条件下で鉄(III)とアルテスネートによる TPC ラジカルの生成を見たところ、混合直後、TPC ラジカルは極僅かしか観察されなか

ったが、経時的に TPC ラジカルが増大することが示され(Fig. 5)、アルテスネートは鉄(II)だけで無く、鉄(III)でも鉄(II)への還元を通じて酸化能のある活性酸素種を生成している事が示された。

癌細胞は、ワールブルグ (Warburg) 効果と呼ばれる特徴的な代謝現象を示すことが知られており⁴⁵、豊富な酸素の存在下であってもグルコースから乳酸を産生するため、細胞外アシドーシスは癌細胞の特徴として報告されている。これらのことを考え合わせると、癌細胞周囲の低 pH 環境下ではアルテスネートによる鉄(III)の還元を促進し、細胞毒性の高い鉄(II)が生成しやすいことが考えられる。Figs 2,5 の結果から、アルテスネートと鉄による TPC ラジカル生成には酸素分子が関与すること、また TPC ラジカルは TPC が酸化されることによって生成することから、次にこの反応に関わる活性酸素種の同定を行った。まず初めに酸素由来ラジカルを補足して特異的な EPR シグナルを与えるスピントラップ剤である DMPO を用い、好氣的条件下で鉄(II)とアルテスネートからの活性酸素種を測定した。アルテスネートと鉄(II)を 1M ¹³C₂-DMSO 水溶液に溶解して EPR を測定したところ、Fig.6 に示したように DMPO/¹³CH₃ 付加体と DMPO/[•]OH 付加体および DMPO/アルテスネートラジカルが確認できた。DMPO/¹³CH₃ の出所は、¹³C₂-DMSO である。一方、アルテスネートが無いと、この DMPO スピンアダクトは極僅かしか観察されなかった(Fig. 6C)。また、中間体として生成している O₂^{•-}と DMPO の複合体である DMPO/ O₂^{•-}由来の EPR シグナルも観察されなかったが、これは[•]OH や[•]CH₃ ラジカルと比較して、DMPO/ O₂^{•-}付加体の補足効率が悪いと思われる⁴⁸。

ところで、Butler らは、アルテシミニンと鉄(II)で、peroxide 結合が開裂し、アルコキシルラジカルが生成することを報告しており、そのときの超微細結合定数として a^N=15.7, a^H=22.5 ガウスを報告している⁷。この値は今回の実験で得られた a^N=16.01, a^H=22.64 ガウスとほぼ同じであることから DMPO/アルテスネートラジカルと同定した。Fig. 6 における a^N = 16.20 ガウス、a_β^H = 23.70 ガウスおよび a_β^{13C}=7.50 ガウスの EPR シグナル帰属を更

に明確にするため、DMSO から $\bullet\text{OH}$ によって生成するギ酸を HPLC で定量する、DMSO トラッピング法を行った。その結果、DMSO が $\bullet\text{OH}$ によって酸化され $\bullet\text{CH}_3$ ラジカルを経て生成するホルムアルデヒドと DNPH が反応して生じる formaldehyde-2-(2,4-dinitrophenyl)hydrazone の生成が鉄(II)、鉄(III)ともにアルテスネートの共存によって有意に増加したことから(Fig. 7)、鉄とアルテスネートによる、 $\bullet\text{OH}$ の生成が更に確かめられた。結果として、アルテスネートは、酸素の存在下で鉄(II)の自己酸化を促進して $\bullet\text{OH}$ または $\bullet\text{OH}$ 様活性酸素種を生成し、鉄(III)を鉄(II)に還元することによってこの反応を促進することを見出した。そしてこれらの反応は微酸性～酸性条件下(pH 6.0~pH 4.0)で促進される可能性が示唆された。

Fig. 1 に示すアルテスネートおよび鉄による細胞毒性が $\bullet\text{OH}$ によるものであれば、強力な $\bullet\text{OH}$ スカベンジャーであるエダラボンによって鉄とのアルテスネートによる細胞死が抑制されることが予想された。実際、Fig. 8 に示すように、生存細胞の割合はエダラボンによって濃度依存的に回復していることが明らかとなった。これは、少なくとも部分的に、鉄とアルテスネートの場合には $\bullet\text{OH}$ または $\bullet\text{OH}$ 様活性酸素種が細胞毒性に寄与することを説明している。

まとめ

以上の結果より、アルテスネートの細胞毒性は、鉄(II)だけでなく鉄(III)でも引き起こされること、その機序としてアルテスネートが鉄(III)を鉄(II)に還元することまたこの反応は酸性条件で促進することが示唆された。また生成している ROS は、酸化活性の高い $\bullet\text{OH}$ もしくは $\bullet\text{OH}$ 様活性酸素種を生成していることが示された。Denison はエンタルピーの計算によって、アルテシミン誘導体と鉄(II)からの反応による $\bullet\text{OH}$ の生成を予測し、その生成量が生理活性と相関することを述べており²⁵、これは本論文の結果と一致する。さらに、ア

アルテスネートの抗腫瘍活性には抗酸化剤である N-アセチルシステイン^{68,11} やアスコルビン酸¹⁰ により減弱することが報告されており、このことは酸化反応が抗腫瘍活性に関わっていることを示している。また、 $\cdot\text{OH}$ または $\cdot\text{OH}$ 様化合物による細胞毒性は、細胞に対し物理的な障害を引き起こすことから耐性が生じないことが推定され、これはアルテシミニンおよびその誘導体は癌及びマラリアのいずれにおいても耐性の発達が観察されないと言う報告¹⁶とも一致する。 $\cdot\text{OH}$ 生成の点から考えると、アルテスネートの細胞毒性は鉄（価数に関係ない）、酸素分子、そして低 pH という条件が必要であることが明らかとなった。アルテスネートは抗マラリア薬だけでなく抗腫瘍薬としても研究されているが、今回の知見は薬効の増大と副作用低減の点から有用であると考えている。

第四章 參照論文

- 1) Sherman IW. Biochemistry of Plasmodium (malarial parasites). *Microbiol Rev*, **43**, 453-495 (1979).
- 2) WHO. "World Malaria Report 2016." <<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>>.
- 3) WHO. Guidelines for the treatment of malaria. Third edition. (2015).
- 4) Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, **228**, 1049-1055 (1985).
- 5) Asano M, Iwahashi H. Determination of the structures of radicals formed in the reaction of antimalarial drug artemisinin with ferrous ions. *European journal of medicinal chemistry*, **127**, 740-747 (2017).
- 6) Meshnick SR, Taylor TE, Kamchonwongpaisan S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev*, **60**, 301-315 (1996).
- 7) Butler AR, Gilbert BC, Hulme P, Irvine LR, Renton L, Whitwood AC. EPR evidence for the involvement of free radicals in the iron-catalysed decomposition of qinghaosu (artemisinin) and some derivatives; antimalarial action of some polycyclic endoperoxides. *Free radical research*, **28**, 471-476 (1998).
- 8) Avery MA, Gao F, Chong WK, Mehrotra S, Milhous WK. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 1. Synthesis and comparative molecular field analysis of C-9 analogs of artemisinin and 10-deoxoartemisinin. *Journal of medicinal chemistry*, **36**, 4264-4275 (1993).
- 9) Berman PA, Adams PA. Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. *Free radical biology & medicine*, **22**, 1283-1288 (1997).
- 10) Pradines B, Rolain JM, Ramiandrasoa F, Fusai T, Mosnier J, Rogier C, Daries W, Baret E, Kunesch G, Le Bras J, Parzy D. Iron chelators as antimalarial agents: in vitro activity of diccatecholate against Plasmodium falciparum. *J Antimicrob Chemother*, **50**, 177-187 (2002).
- 11) Efferth T, Giaisi M, Merling A, Krammer PH, Li-Weber M. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells. *PloS one*, **2**, e693 (2007).
- 12) Ooko E, Saeed MEM, Kadioglu O, Sarvi S, Colak M, Elmasaoudi K, Janah R, Greten HJ, Efferth T. Artemisinin derivatives induce iron-dependent cell death (ferroptosis) in tumor cells. *Phytomedicine*, **22**, 1045-1054 (2015).
- 13) Eling N, Reuter L, Hazin J, Hamacher-Brady A, Brady NR. Identification of

- artesanate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Oncoscience*, **2**, 517-532 (2015).
- 14) Button RW, Lin F, Ercolano E, Vincent JH, Hu B, Hanemann CO, Luo S. Artesunate induces necrotic cell death in schwannoma cells. *Cell Death Dis*, **5**, e1466 (2014).
 - 15) Berdelle N, Nikolova T, Quiros S, Efferth T, Kaina B. Artesunate induces oxidative DNA damage, sustained DNA double-strand breaks, and the ATM/ATR damage response in cancer cells. *Mol Cancer Ther*, **10**, 2224-2233 (2011).
 - 16) Efferth T. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, **8**, 85-97 (2005).
 - 17) Tran TH, Nguyen TD, Poudel BK, Nguyen HT, Kim JO, Yong CS, Nguyen CN. Development and Evaluation of Artesunate-Loaded Chitosan-Coated Lipid Nanocapsule as a Potential Drug Delivery System Against Breast Cancer. *AAPS PharmSciTech*, **16**, 1307-1316 (2015).
 - 18) Zhang YJ, Gallis B, Taya M, Wang S, Ho RJ, Sasaki T. pH-responsive artemisinin derivatives and lipid nanoparticle formulations inhibit growth of breast cancer cells in vitro and induce down-regulation of HER family members. *PLoS one*, **8**, e59086 (2013).
 - 19) Dell'Eva R, Pfeffer U, Vene R, Anfosso L, Forlani A, Albini A, Efferth T. Inhibition of angiogenesis in vivo and growth of Kaposi's sarcoma xenograft tumors by the anti-malarial artesunate. *Biochemical pharmacology*, **68**, 2359-2366 (2004).
 - 20) Huang XJ, Ma ZQ, Zhang WP, Lu YB, Wei EQ. Dihydroartemisinin exerts cytotoxic effects and inhibits hypoxia inducible factor-1alpha activation in C6 glioma cells. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, **59**, 849-856 (2007).
 - 21) Li PC, Lam E, Roos WP, Zdzienicka MZ, Kaina B, Efferth T. Artesunate derived from traditional Chinese medicine induces DNA damage and repair. *Cancer research*, **68**, 4347-4351 (2008).
 - 22) Miyamoto L, Yagi Y, Hatano A, Kawazoe K, Ishizawa K, Minakuchi K, Tomita S, Tsuchiya K. Spontaneously hyperactive MEK-Erk pathway mediates paradoxical facilitation of cell proliferation in mild hypoxia. *Biochimica et biophysica acta*, **1850**, 640-646 (2015).
 - 23) Lehnen-Beyel I, Groot HD, Rauen U. Enhancement of iron toxicity in L929 cells by D-glucose: accelerated(re-)reduction. *The Biochemical journal*, **368**, 517-526 (2002).
 - 24) Jen JF, Leu MF, Yang TC. Determination of hydroxyl radicals in an advanced oxidation process with salicylic acid trapping and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **796**, 283-288 (1998).

- 25) Duling DR. Simulation of multiple isotropic spin-trap EPR spectra. *J Magn Reson B*, **104**, 105-110 (1994).
- 26) Tsuchiya K, Akai K, Tokumura A, Abe S, Tamaki T, Takiguchi Y, Fukuzawa K. Oxygen radicals photo-induced by ferric nitrilotriacetate complex. *Biochimica et biophysica acta*, **1725**, 111-119 (2005).
- 27) Eguchi LA, Saltman P. Kinetics and mechanisms of metal reduction by hemoglobin. 1. Reduction of iron(III) complexes. *Inorganic chemistry*, **26**, 3665-3669 (1987).
- 28) Tai C, Peng JF, Liu JF, Jiang GB, Zou H. Determination of hydroxyl radicals in advanced oxidation processes with dimethyl sulfoxide trapping and liquid chromatography. *Analytica chimica acta*, **527**, 73-80 (2004).
- 29) Goldring C, Casini AF, Maellaro E, Del Bello B, Comporti M. Determination of 4-hydroxynonenal by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Lipids*, **28**, 141-145 (1993).
- 30) Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine*, **15**, 1239-1253 (2011).
- 31) Erecińska M, Silver IA. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respiration Physiology*, **128**, 263-276 (2001).
- 32) Clavo B, Robaina F, Morera J, Ruiz-Egea E, Perez JL, Macias D, Carames MA, Catala L, Hernandez MA, Gunderoth M. Increase of brain tumor oxygenation during cervical spinal cord stimulation. Report of three cases. *Journal of neurosurgery*, **96**, 94-100 (2002).
- 33) Nakamura K, Ishiyama K, Ikai H, Kanno T, Sasaki K, Niwano Y, Kohno M. Reevaluation of analytical methods for photogenerated singlet oxygen. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, **49**, 87-95 (2011).
- 34) Reinke LA, Rau JM, McCay PB. Characteristics of an oxidant formed during iron (II) autoxidation. *Free radical biology & medicine*, **16**, 485-492 (1994).
- 35) Denisov E. An important role of intramolecular free radical reactions in antimalarial activity of artemisinin and its analogs. *Organic & biomolecular chemistry*, **9**, 4219-4225 (2011).
- 36) Tsuchiya K, Jiang JJ, Yoshizumi M, Tamaki T, Houchi H, Minakuchi K, Fukuzawa K, Mason RP. Nitric oxide-forming reactions of the water-soluble nitric oxide spin-trapping agent, MGD. *Free radical biology & medicine*, **27**, 347-355 (1999).
- 37) Bardouki H, da Rosa MB, Mihalopoulos N, Palm WU, Zetzsch C. Kinetics and mechanism of the oxidation of dimethylsulfoxide (DMSO) and methanesulfinate (MSI⁻) by OH radicals in aqueous medium. *Atmospheric Environment*, **36**,

- 4627-4634 (2002).
- 38) Meshnick SR, Yang YZ, Lima V, Kuypers F, Kamchonwongpaisan S, Yuthavong Y. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **37**, 1108-1114 (1993).
 - 39) Abe S, Kirima K, Tsuchiya K, Okamoto M, Hasegawa T, Houchi H, Yoshizumi M, Tamaki T. The reaction rate of edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186)) with hydroxyl radical. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, **52**, 186-191 (2004).
 - 40) Yamazaki I, Piette LH. ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe²⁺ ions with H₂O₂-reactive species in oxygen toxicity in biology. *The Journal of biological chemistry*, **265**, 13589-13594 (1990).
 - 41) Makino K, Hagiwara T, Imaishi H, Nishi M, Fujii S, Ohya H, Murakami A. DMPO spin trapping in the presence of Fe ion. *Free radical research communications*, **9**, 233-240 (1990).
 - 42) Oliva-Teles MT, a PP₁, Delerue-Matos CM, Alvim-Ferraz MCM. Determination of free formaldehyde in foundry resins as its 2,4-dinitrophenylhydrazone by liquid chromatography. *Analytica chimica acta*, **467**, 97-103 (2002).
 - 43) Zegota H. High-performance liquid chromatography of methanol released from pectins after its oxidation to formaldehyde and condensation with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of chromatography. A*, **863**, 227-233 (1999).
 - 44) Yamamoto T, Yuki S, Watanabe T, Mitsuka M, Saito KI, Kogure K. Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. *Brain research*, **762**, 240-242 (1997).
 - 45) Ren Y, Wei B, Song X, An N, Zhou Y, Jin X, Zhang Y. Edaravone's free radical scavenging mechanisms of neuroprotection against cerebral ischemia: review of the literature. *Int J Neurosci*, **125**, 555-565 (2015).
 - 46) Li Y. Qinghaosu (artemisinin): chemistry and pharmacology. *Acta pharmacologica Sinica*, **33**, 1141-1146 (2012).
 - 47) Gomes MF, Faiz MA, Gyapong JO, Warsame M, Agbenyega T, Babiker A, Baiden F, Yunus EB, Binka F, Clerk C, Folb P, Hassan R, Hossain MA, Kimbute O, Kitua A, Krishna S, Makasi C, Mensah N, Mrango Z, Olliaro P, Peto R, Peto TJ, Rahman MR, Ribeiro I, Samad R, White NJ, Study 13 Research G. Pre-referral rectal artesunate to prevent death and disability in severe malaria: a placebo-controlled trial. *Lancet*, **373**, 557-566 (2009).
 - 48) Kremsner PG, Krishna S. Antimalarial combinations. *Lancet*, **364**, 285-294 (2004).
 - 49) Kremsner PG, Taylor T, Issifou S, Kombila M, Chimalizeni Y, Kawaza K, Bouyou

- Akotet MK, Duscha M, Mordmuller B, Kusters K, Humberg A, Miller RS, Weina P, Duparc S, Mohrle J, Kun JF, Planche T, Teja-Isavadharm P, Simpson JA, Kohler C, Krishna S. A simplified intravenous artesunate regimen for severe malaria. *The Journal of infectious diseases*, **205**, 312-319 (2012).
- 50) Nealon C, Dzeing A, Muller-Romer U, Planche T, Sinou V, Kombila M, Kremsner PG, Parzy D, Krishna S. Intramuscular bioavailability and clinical efficacy of artesunate in gabonese children with severe malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **46**, 3933-3939 (2002).
- 51) Krishna S, Uhlemann AC, Haynes RK. Artemisinin: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, **7**, 233-244 (2004).
- 52) Krishna S, Ganapathi S, Ster IC, Saeed ME, Cowan M, Finlayson C, Kovacsevics H, Jansen H, Kremsner PG, Efferth T, Kumar D. A Randomised, Double Blind, Placebo-Controlled Pilot Study of Oral Artesunate Therapy for Colorectal Cancer. *EBioMedicine*, **2**, 82-90 (2015).
- 53) Hou J, Wang D, Zhang R, Wang H. Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: in vitro and in vivo activity, chemosensitization, and mechanisms of action. *Clin Cancer Res*, **14**, 5519-5530 (2008).
- 54) Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P, Chatterjee M. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in Leishmania donovani promastigotes. *J Med Microbiol*, **56**, 1213-1218 (2007).
- 55) Mu D, Zhang W, Chu D, Liu T, Xie Y, Fu E, Jin F. The role of calcium, P38 MAPK in dihydroartemisinin-induced apoptosis of lung cancer PC-14 cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, **61**, 639-645 (2008).
- 56) Ohgami Y, Elstad CA, Chung E, Shirachi DY, Quock RM, Lai HC. Effect of hyperbaric oxygen on the anticancer effect of artemisinin on molt-4 human leukemia cells. *Anticancer research*, **30**, 4467-4470 (2010).
- 57) Cassileth BR, Yeung KS, Gubili J, ebrary Inc. Herb-drug interactions in oncology. McGraw-Hill Medical ; McGraw-Hill distributor ,, New York,London, p.^pp. xvi, 769 p. (2010).
- 58) Kachur AV, Tuttle SW, Biaglow JE. Autoxidation of ferrous ion complexes: a method for the generation of hydroxyl radicals. *Radiat Res*, **150**, 475-482 (1998).
- 59) Shen X, Tian J, Li J, Li X, Chen Y. Formation of the excited ferryl species following fenton reaction. *Free Radical Bio Med*, **13**, 585-592 (1992).
- 60) Chao CC, Aust AE. Photochemical reduction of ferric iron by chelators results in DNA strand breaks. *Archives of biochemistry and biophysics*, **300**, 544-550 (1993).

- 61) Kosaka H, Katsuki Y, Shiga T. Spin trapping study on the kinetics of Fe²⁺ autoxidation: formation of spin adducts and their destruction by superoxide. *Archives of biochemistry and biophysics*, **293**, 401-408 (1992).
- 62) Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*, **123**, 309-314 (1956).
- 63) Morishima H, Washio J, Kitamura J, Shinohara Y, Takahashi T, Takahashi N. Real-time monitoring system for evaluating the acid-producing activity of oral squamous cell carcinoma cells at different environmental pH. *Scientific reports*, **7**, 10092 (2017).
- 64) Gerweck LE, Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer research*, **56**, 1194-1198 (1996).
- 65) Schornack PA, Gillies RJ. Contributions of cell metabolism and H⁺ diffusion to the acidic pH of tumors. *Neoplasia*, **5**, 135-145 (2003).
- 66) Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free radical biology & medicine*, **22**, 885-888 (1997).
- 67) Bull C, Fee JA, O'Neill P, Fielden EM. Iron-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-catalyzed superoxide dismutation revisited: an explanation of why the dismutase activity of Fe-EDTA cannot be detected in the cytochrome c/Xanthine oxidase assay system. *Archives of biochemistry and biophysics*, **215**, 551-555 (1982).
- 68) Du JH, Zhang HD, Ma ZJ, Ji KM. Artesunate induces oncosis-like cell death in vitro and has antitumor activity against pancreatic cancer xenografts in vivo. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, **65**, 895-902 (2010).

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多くのご支援、ご指導を賜りました、指導教員である徳島大学薬学部 土屋浩一郎教授および宮本理人助教に甚大なる謝辞を表します。厳しいご指導いただくこと、また時には優しく励まされたことを通して得た事柄は、今後の努力の糧になるものであります。本研究にご協力いただきました、徳島大学医学部薬理学分野 玉置俊晃教授、池田康将准教授、堀ノ内裕也助教、徳島大学医学部保健学科検査学分野 濱野修一准教授、その他卒業生の皆さまに感謝いたします。