

がん細胞の酸化ストレス耐性を支える 代謝物質の探索

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科

飯野 慧子

論文要旨

細胞は、酸化ストレスを防ぐ複数の機構を備えており、特にがん細胞は効率的な抗酸化機構を持つと考えられている。近年、この抗酸化機構への代謝物の関与が見出され、グルタチオン代謝による酸化還元状態の調節機構などが注目を浴びている。一方で研究対象となる代謝物はごく一部に限られており、細胞の酸化ストレス抵抗性に寄与する代謝機構がまだ埋もれている可能性がある。そこで本研究では、網羅的代謝物データを用いるメタボローム解析を通し、細胞の酸化ストレス耐性に寄与する代謝機構の探索を行った。酸化ストレス抵抗性に寄与する物質のスクリーニングを目的とし 18 種のがん細胞株の定常時のメタボロームデータと H_2O_2 感受性データを比較した。結果、 H_2O_2 に抵抗性のある細胞株で顕著に物質が多かった 25 物質を同定でき、そのうち中心炭素代謝系路上の物質 11 種が H_2O_2 を還元して除去することを *in vitro* で確かめた。さらに高濃度グルコース条件下で、細胞内の解糖系とペントースリン酸経路の代謝物を増加させた細胞は、 H_2O_2 負荷に対する細胞内 H_2O_2 上昇の抑制と生存率の回復が確認された。以上の結果をまとめると、がん細胞の抗酸化作用には GSH だけでなく還元能を持つ中心炭素代謝経路の物質も寄与しており、酸化ストレス刺激があった場合にも代謝物が瞬時に反応して酸化物を除去し、細胞内の酸化還元状態の維持に寄与している可能性がある。

キーワード

メタボロミクス, 還元性代謝物, がん, 過酸化水素

1. 概要

過酸化水素 (H_2O_2) 負荷した細胞のメタボロームデータと遺伝子発現データの解析から、抗酸化機構としてのグルタチオン代謝の重要性が確認された。しかし、メタボローム解析によって明らかになったペントースリン酸経路 (PPP) や TCA 回路関連の代謝物量の短時間内的変化に関しては、その重要性や変動の原因は分からないままである。本研究で示した物質の多くは、酵母や大腸菌に対する酸化ストレス負荷時にも短時間内で変動することが明らかになっており (Ralsler, et al., 2009; Rui, et al., 2010), 幅広い生物種において共通したストレス応答を反映しているように考えられる。

我々は、PPP や TCA 回路を含む多くの物質の時系列変化が、還元型グルタチオン (GSH や) spermidine など既知の抗酸化物質と同じタイミングであることに着目した。細胞内に、活性酸素種 (ROS) と酸化還元反応を起こす還元性代謝物が多量含まれている可能性は十分に考えられ、この短時間内に動く物質の中には、細胞の酸化ストレス耐性に寄与している還元性代謝物が存在する可能性がある。意外にも、これまで知られているごく一部の還元性代謝物をのぞくと、その他数千ある代謝物について還元能と酸化ストレス耐性への関係は調べられていない。我々は、 H_2O_2 耐性に寄与する還元性代謝物が存在すると仮説を立て、細胞の H_2O_2 耐性を支える還元性代謝物質のスクリーニングを行った。スクリーニングでは、複数の細胞株における定常状態のメタボロームデータを取得し、各細胞株の H_2O_2 感受性と相関のある物質を選出することにした。

実験ではまず、我々の用いた 18 株のがん細胞株について H_2O_2 感受性を調べた。次にこれらの細胞の定常状態のメタボロームデータを取得し、 H_2O_2 感受性に相関する物質を選出した。結果、 H_2O_2 感受性の低い細胞において、顕著に細胞内物質が多い 25 分子を同定した。さらに、スクリーニングした 25 物質について *in vitro* で還元作用を調べ、そのうち還元性が確かめられた 10 個の中心炭素代謝関連物質について、細胞内での酸化物の生成と、細胞内で増加させた時の H_2O_2 耐性能の向上を確認し、還元性代謝物の H_2O_2 感受性への寄与を提唱した。代謝物による還元作用は、素早く ROS 分子を除去できる速攻性と通常状態へ速やかに回復できる点で有利だと考えられる。

2. 手法

2.1. 細胞培養

細胞は American Type Culture Collection (ATCC ; Manassas, VA, USA), JCRB 細胞バンク (大阪, 日本), 理研細胞バンク (茨城, 日本), 国立がん研究センター (千葉, 日本) から入手した。培養液は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM ; Sigma-Aldrich

Co. LLC, MO, USA) に、100 U/mL のペニシリン G, 0.1 mg/mL のストレプトマイシン, 10%のウシ胎児血清を添加して使用し、全ての培養を 5%CO₂, 37°C の条件下で行った。

2.2. 細胞生存率の測定

生存率の計測には MTT アッセイを用いた。詳細な方法は第 3 章で述べている (P. 10)。各がん細胞株の H₂O₂ 感受性試験では、感受性の指標として、ストレス負荷から 24 時間後に生存率が 50%になる H₂O₂ 濃度 (EC₅₀ (50 % Effective Concentration)) を求めた。全ての細胞は 96 穴プレートで 1 穴 1.5 × 10⁴ 個になるように播種し、培養は 5%CO₂, 37°C の条件で培養した。

2.3. グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の活性測定

GPx の活性測定には、Gluthathione Peroxidase Activity Assay Kit (BioVision, Inc., Milpitas, CA, USA) を利用した。本キットでは GPx の働きで生成された酸化型グルタチオン (GSSG) が、グルタチオンリダクターゼによって GSH に変換されるとき NADPH の消費率を測定することで GPx の活性を測定する。細胞は 6 穴プレートに播種し、細胞密度が 80%程度になる時点で細胞を回収した。

2.4. H₂O₂ 還元能の測定

代謝物の H₂O₂ 還元能を *in vitro* で調べた。チューブ内で H₂O₂ と物質の純粋水溶液をそれぞれ最終濃度が 70 μM と 9.5 mM になるように混和し、37°C で 30 分静置した。その後、反応溶液中の H₂O₂ 濃度を測定し、代謝物を入れていない対象サンプルと比較して H₂O₂ 除去率を確認した。H₂O₂ の測定には BIOXYTECH H₂O₂ Assay Kit (フナコシ, 東京, 日本) を使用した。

2.5. 細胞内 H₂O₂ 測定

細胞内の H₂O₂ 測定には CM-H₂DCFDA (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) を用いた。CM-H₂DCFDA は細胞内に取り込まれ、H₂O₂ 存在下でエステラーゼにより分解され蛍光を発する。細胞は 96 穴マイクロプレート (黒) にまき、測定時には、PBS で 2 回洗浄後、7μM に調整した CM-H₂DCFDA-hanks 液 150μL に置換して 5 分以上培養してから蛍光を測定した。さらにそこに H₂O₂ を添加し、数ポイントに渡り蛍光強度を測定した。なお測定において励起は 492 nm, 発光は 528 nm で行った。

2.6. キャピラリー電気泳動-時間飛行型質量分析装置 (CE-TOFMS) による解析
細胞内代謝物の抽出および, CE-TOFMS による測定とデータの解析は, 第 3 章で述べた手法に準じた (P. 10).

3. 結果

3.1. H₂O₂ 感受性に寄与する代謝物候補のスクリーニング

始めに, 異なる細胞株 18 種についての H₂O₂ 感受性と, H₂O₂ の主要な還元酵素である GPx の活性を調べた (表 1). H₂O₂ 耐性は EC₅₀ の値で比較し, 結果, KP3 細胞と MKN7 細胞が他の細胞に比べ顕著に H₂O₂ 感受性が低く, 逆に AsPC-1 細胞, HeLa 細胞, PC14 細胞の H₂O₂ 感受性が高かった. また, H₂O₂ 感受性試験に用いたいくつかの細胞について GPx の活性を調べたが, H₂O₂ 感受性との間に関連性は見られず, 抗酸化酵素の活性が直接 H₂O₂ 感受性に関与しないことを示した. この結果は, 酸化ストレス感受性の異なる細胞間で抗酸化酵素の活性測定を行い, 酸化ストレス感受性差と酵素活性の間に関連がないことを示した先行研究の結果と一致している (Marklund, et al., 1982).

表 1. 様々ながん細胞株における H₂O₂ 感受性および GPx の活性.

Cancer Cell	Tissue	EC ₅₀ [mM]	GPx [mU/mg protein]
MKN7	stomach	1.38	28.7 (± 2.8)
KP3	pancreas	1.21	28.2 (± 2.8)
A431	unknown	0.60	35.2 (± 1.3)
BxPC-3	pancreas	0.54	
MKN74	stomach	0.54	25.5 (± 1.6)
DLD-1	colon	0.53	
A549	lung	0.51	17.8 (± 1.2)
HT29	colon	0.50	56.7 (± 0.4)
MKN28	stomach	0.48	20.4 (± 2.6)
HepG2	liver	0.47	50.9 (± 0.2)
Panc-1	pancreas	0.44	
KMRC-1	kidney	0.43	
MCF-7	breast	0.42	11.0 (± 0.6)
ACHN	kidney	0.41	58.2 (± 4.2)
PSN-1	pancreas	0.38	22.9 (± 1.0)
PC14	lung	0.34	
HeLa	cervix	0.33	33.3 (± 2.0)
AsPC-1	pancreas	0.32	12.0 (± 0.5)

EC₅₀ は H₂O₂ 負荷から 24 時間後に細胞生存率が 50% になる濃度を示す.

GPx 活性の 【】 内の値は, 4 回の独立な試行間の標準誤差を示す.

次にそれぞれの細胞の通常培養下でのメタボロームデータを取得した。18種の細胞株のうち、9株以上で同定できた物質は94種あった。細胞株間の代謝プロファイルの違いを調べるために主成分分析を行ったところ、 H_2O_2 感受性試験で顕著に感受性が低かったKP3とMKN7がスコアプロット上で他の細胞株と分離し、この2細胞が他の細胞株と異なる代謝プロファイルを持つことを示唆した(図1A)。 H_2O_2 感受性と相関する物質を抽出するため、 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-EC}_{50}$ の値と各代謝物質との間の相関係数を計算し、 H_2O_2 感受性と高い相関を示す代謝物を抽出した。そうしたところ、25の物質が $\text{H}_2\text{O}_2\text{-EC}_{50}$ に正に相関($r > 0.5$, $P < 0.05$)する物質として抽出され(図1B)、それらの物質が H_2O_2 耐性の高いKP3とMKN7に顕著に多いことが分かった(図1C)。一方、 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-EC}_{50}$ と逆相関にある物質はなく、ここまでのスクリーニングによって、25物質を H_2O_2 感受性に寄与する物質候補とした。

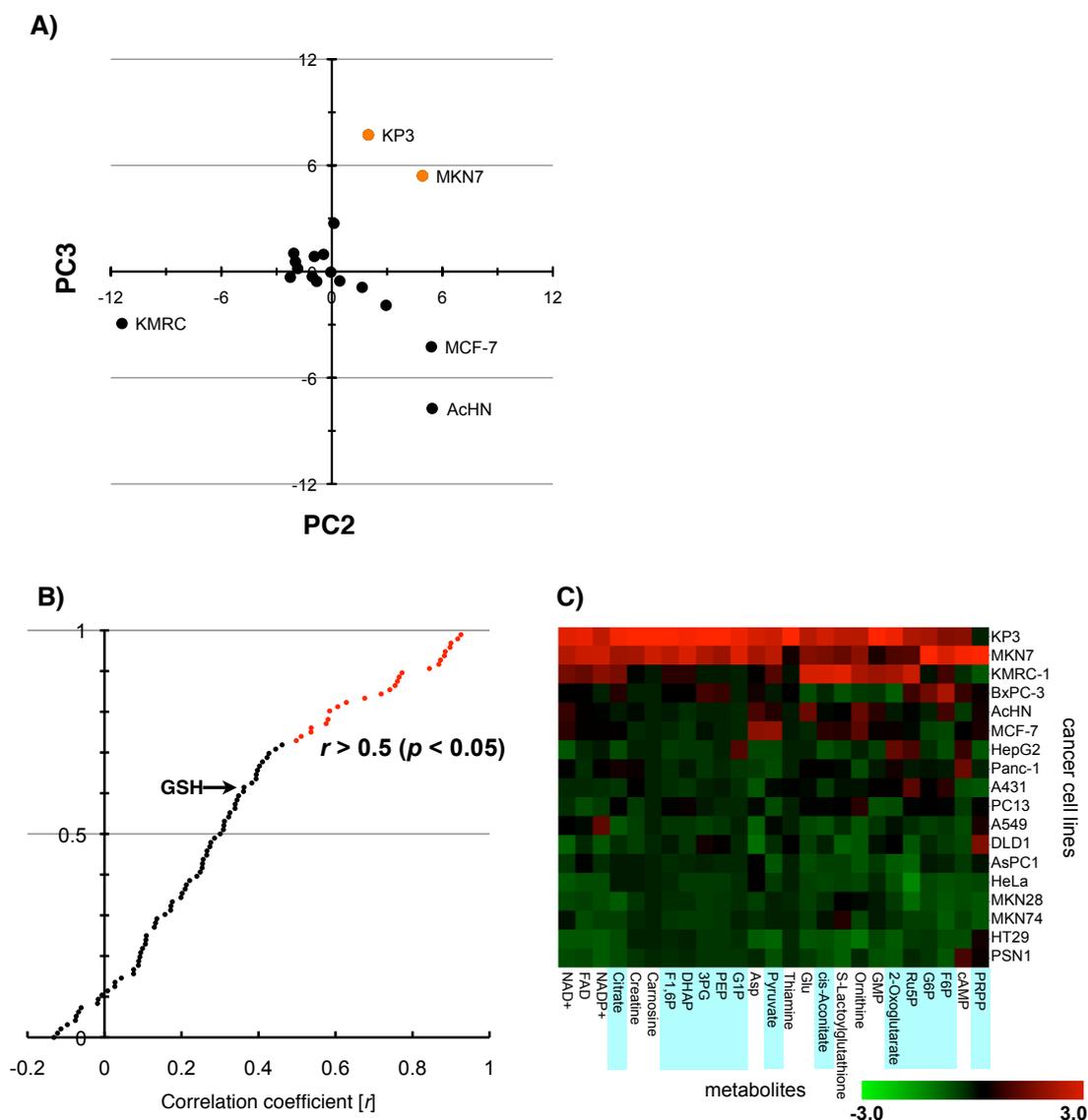


図 1. 細胞の H_2O_2 耐性能に相関する代謝物のスクリーニング. (A) がん細胞株 18 種の主成分分析. 分析では, 9 株以上で検出された代謝物 94 物質のデータを用いた. 主成分 3 までの累積寄与率は 74.4%であった. (B) 各細胞株の H_2O_2 -EC₅₀ と, 細胞内代謝物量の間で計算した相関係数の分布. 赤いドットで示した物質は H_2O_2 -EC₅₀ との相関係数が 0.5 以上の物質で, 25 の物質がこれに該当した. (C) EC₅₀ と高い相関を示した物質をヒートマップに表した. 値は物質ごとに z 値に変換してあり, 数値が高い程単位細胞内あたりの物質が多い.

3.2. スクリーニングされた 25 物質の還元作用の検証

H_2O_2 - EC_{50} とメタボロームデータとの比較で選択した 25 の物質が、 H_2O_2 を還元する作用を持つか *in vitro* で調べた。チューブ内で H_2O_2 と各物質の純粋水溶液を混和し、一定時間後の H_2O_2 除去率を調べることでその還元能を確かめた。前項で選出した 25 物質それぞれについて還元性を調べた結果、解糖系および PPP 上の glucose 6-phosphate (G6P), fructose 6-phosphate (F6P), fructose 1,6-diphosphate (F1,6P), dihydroxyacetone phosphate (DHAP), 3-phosphoglycerate (3PG), pyruvate, ribulose 5-phosphate (Ru5P), phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP)。そして TCA 回路上の 2-oxoglutarate, *cis*-aconitate。その他 FAD, thiamine, cAMP, NAD の計 13 種の物質について還元性が示された (図 2A)。これらの物質のうち、解糖系, PPP, TCA 回路の物質に Ru5P を加えた 10 種の中心代謝経路上の物質の還元能について H_2O_2 濃度が 50% になる値を EC_{50} として求めたところ, pyruvate を始め複数の物質が高い還元力を示し、特に pyruvate, PRPP, Ru5P, 2-oxoglutarate については、既知の還元性物質である GSH と spermidine よりも H_2O_2 除去作用が高かった。還元性を調べた物質の一細胞あたりの細胞内濃度はおおよそ 0.1~1 mM 程度であり、本研究で EC_{50} として求めた濃度よりかなり低い濃度で保持されている。そのため、細胞内で実際に酸化還元反応が起きているかは断言が難しい。一方で、細胞内に存在する H_2O_2 も数 nM から数 μM であることと、抗酸化物質として働くことが知られている spermidine と比較し、調べた物質の多くが同等以上の還元能を示していることから、細胞内で実際に酸化還元反応が起きている可能性はある。

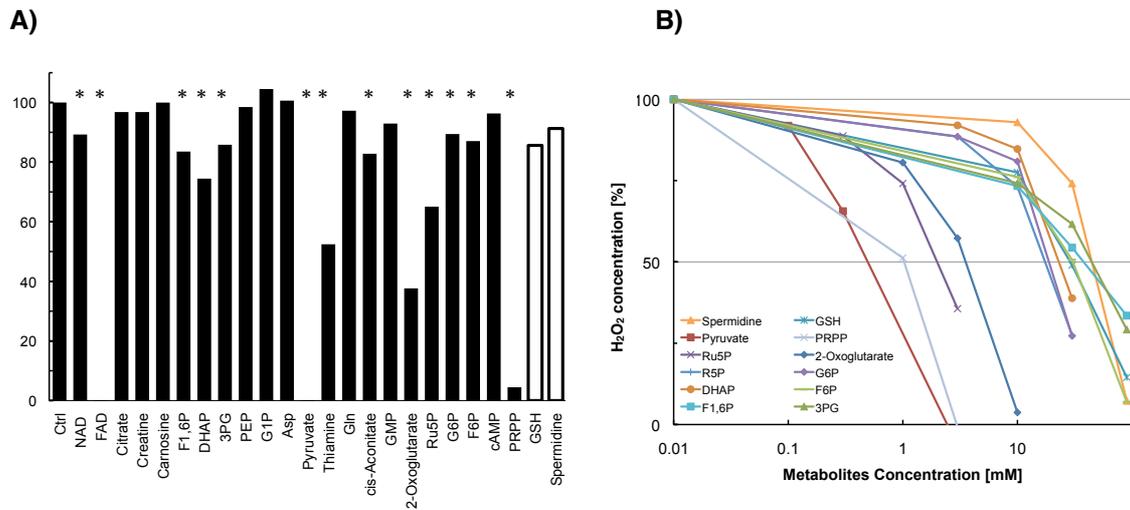


図 2. 各代謝物による H₂O₂ 還元能の測定. (A) *In vitro* にて各物質の H₂O₂ 除去作用を確認した. *印のついた物質は H₂O₂ 除去作用が認められた物質. 縦軸は代謝物を添加していない対照サンプル (Ctrl) を 100 としたときの比を示しており, GSH と spermidine をポジティブコントロールとしておいた (白抜き). 各物質と H₂O₂ はそれぞれ最終濃度が 9.5 mM と 70 μ M になるように混合した. (B) 還元能が確認された物質のうち, 中心炭素代謝に関わる物質の還元能を, 代謝物の濃度を変えて調べた.

表 2. 中心代謝経路上の物質の H₂O₂ 還元能

Metabolite	EC ₅₀ [mM]
Spermidine	51.7
GSH	29.3
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>	
Pyruvate	0.9
PRPP	1.0
Ru5P	2.3
2-Oxoglutarate	4.0
R5P	20.1
G6P	21.5
DHAP	25.1
F6P	30.9
F1,6P	42.6
3PG	51.5

EC₅₀ は混和した H₂O₂ を 50% 除去する物質の濃度を示している.

3.3. 還元性代謝物と H₂O₂ との反応で生成される酸化物の探索

In vitro で還元性を示した物質は、H₂O₂ との反応で酸化され別の分子になっているはずである。例えば、ピルビン酸は酸化されると acetate になり、2-oxoglutarate は酸化されると succinate になることが知られている (Andrae, et al., 1985; Bunton, 1949)。そのため、*in vitro* で代謝物と H₂O₂ を反応させた溶液中では、新しい生成物ができているはずである。我々は、この酸化還元反応によってできる酸化物に着目し、*in vitro* でできた酸化物を細胞内でも確認することで、*in vitro* で示した H₂O₂ 除去作用が細胞内でも起きていることを支持したいと考えた。そこでまず始めに、*in vitro* で各物質 (G6P, F6P, Ru5P, R5P, PRPP, 3PG, DHAP, F1,6P, 2-oxoglutarate, pyruvate) の純粋水溶液と H₂O₂ を反応させた溶液のメタボロームデータを取得し、酸化物候補を調べた。酸化物候補のピーク選出の基準として、⊖代謝物の濃度依存的に物質量が変化することと、⊖アイソトープが存在することをチェックし、結果、各純物質について平均 10 個の候補ピークが残った。この候補ピークと同じピークを、H₂O₂ 負荷したがん細胞のメタボロームデータから探索し、細胞に負荷した H₂O₂ 濃度に依存して代謝物量が増える 6 物質を酸化物候補として挙げることもできた (図 3)。この解析では、H₂O₂ 非感受性の KP3 細胞と MKN 7 細胞、および H₂O₂ 感受性株の HeLa 細胞を用いたが、酸化物の物質量について、HeLa 細胞でのみ、H₂O₂ 濃度が 1 mM の時の酸化物の量が、H₂O₂ 濃度が 0.5 mM の時に比べ少なかった。

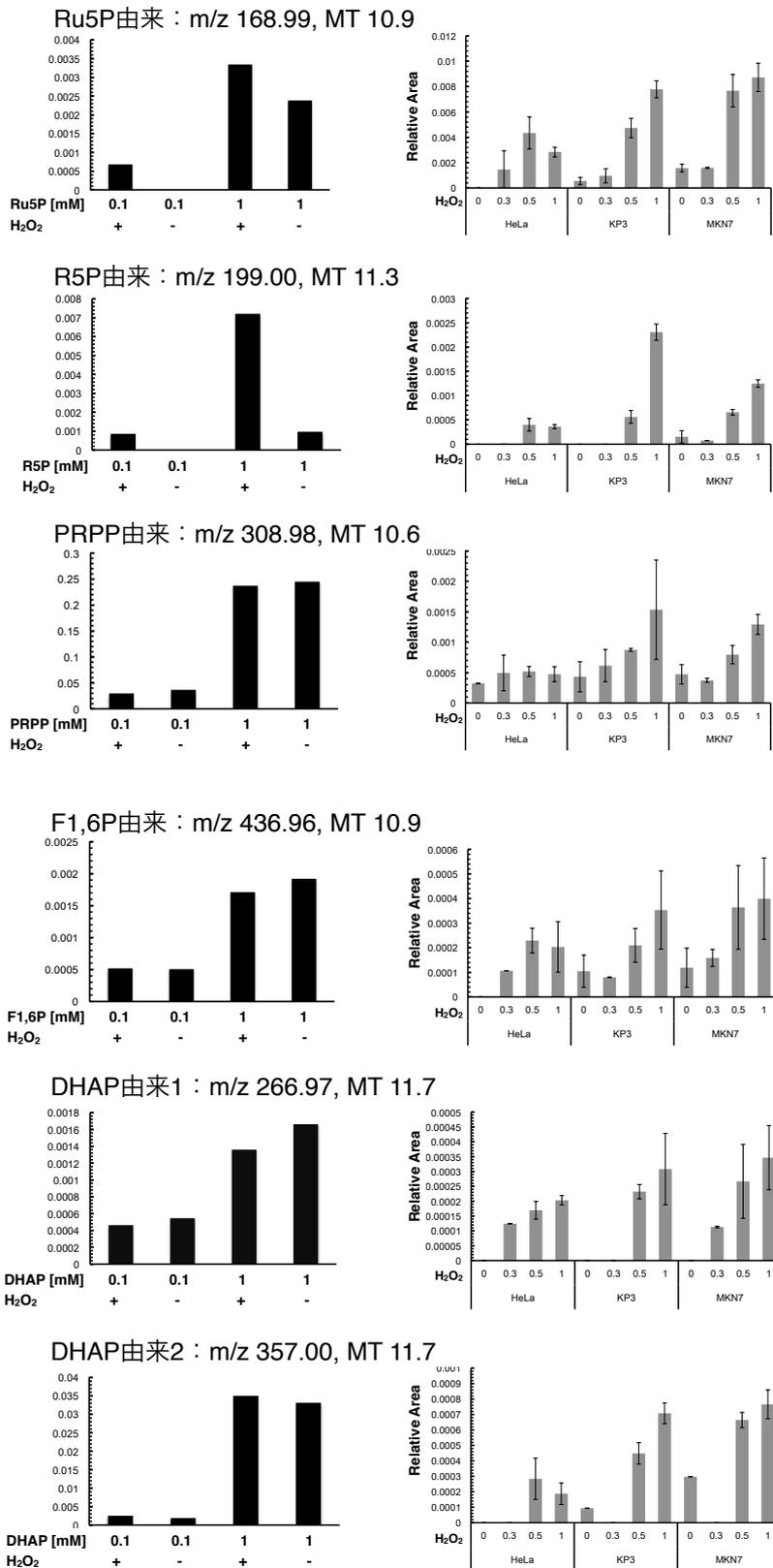


図 3. 代謝物と H₂O₂ の反応生成物の探索. 左列には *in vitro* で得られた生成物質の物質質量を示している. 0.1 または 1 mM の物質と H₂O₂ を混ぜ 24 時間後に混合液を測定した. 右列には HeLa 細胞, KP3 細胞, MKN7 細胞に H₂O₂ を負荷してから 6 時間後の時点で, *in vitro* で確認され, かつ負荷した H₂O₂ 濃度に比例して物質質量が増えた物質を示した. エラーバーは試行数 3 回の標準偏差を表す.

3.4. 中心炭素代謝経路上の物質の上昇による H₂O₂ 感受性の変化

これまでの結果より、中心炭素代謝経路上の物質が H₂O₂ 感受性の低い細胞に多く、その多くが還元性を持つことが示された。そこで次に、細胞内の中心炭素代謝上の物質の量を変えた時に H₂O₂ 感受性が変化するか調べた。まず中心炭素代謝関連物質の量を変化させるため、濃度を変えたグルコース条件下で KP3 細胞と HeLa 細胞を培養し、一定時間後の代謝物量を調べた。結果、培地中グルコース濃度を変えた細胞株間では、実験開始から 3 時間経過したところで細胞内の代謝物量に違いが生じることが確かめられ、実験開始から 12 時間経過した地点では、低濃度グルコースで培養した細胞に比べ、高濃度グルコース条件下で培養した細胞で解糖系上流の代謝物量が総じて多くなり、その傾向は KP3 でより顕著だった (図 4)。このとき、GSH や ATP については、培地中グルコース濃度の違いによる細胞内量の違いは見られなかった。培地中グルコース濃度によって、細胞内の中心代謝経路上の物質量を調節できることが確認できたので、次に、高濃度グルコースと低濃度グルコースで培養した細胞それぞれに H₂O₂ を負荷し、負荷直後の細胞内 H₂O₂ 濃度の上昇と 48 時間後の生存率を調べた。結果、高濃度グルコース条件下で培養した細胞内では H₂O₂ の上昇を抑制し (図 5A)、H₂O₂ 負荷に対する 48 時間後の細胞生存率が高くなった (図 5B)。以上の結果より、解糖系上の物質の上昇が H₂O₂ 耐性の向上に寄与することを示した。

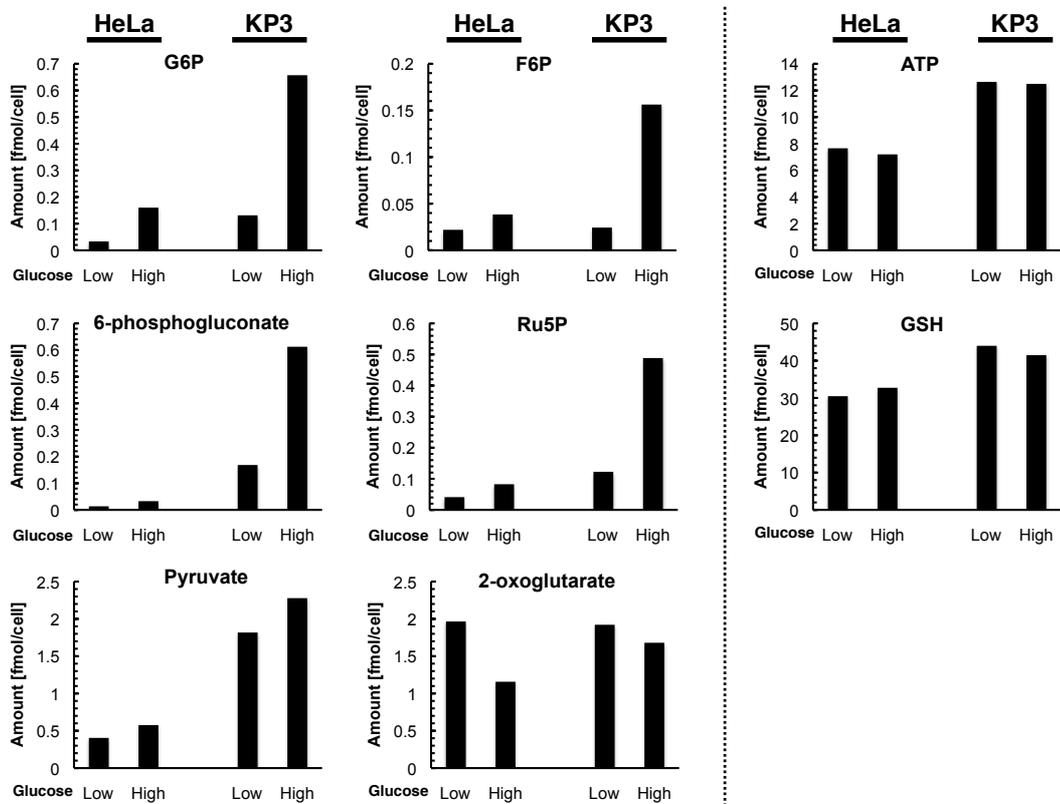


図 4. 培地中グルコース濃度を変えて培養した時の細胞内代謝物量の変化. 培地中グルコースを低グルコース (1 g/L) か高グルコース (4.5 g/L) に調整し, 培地交換してから 12 時間後の細胞内代謝物量を測定した. 図には HeLa 細胞と KP3 細胞における各代謝物量を示した.

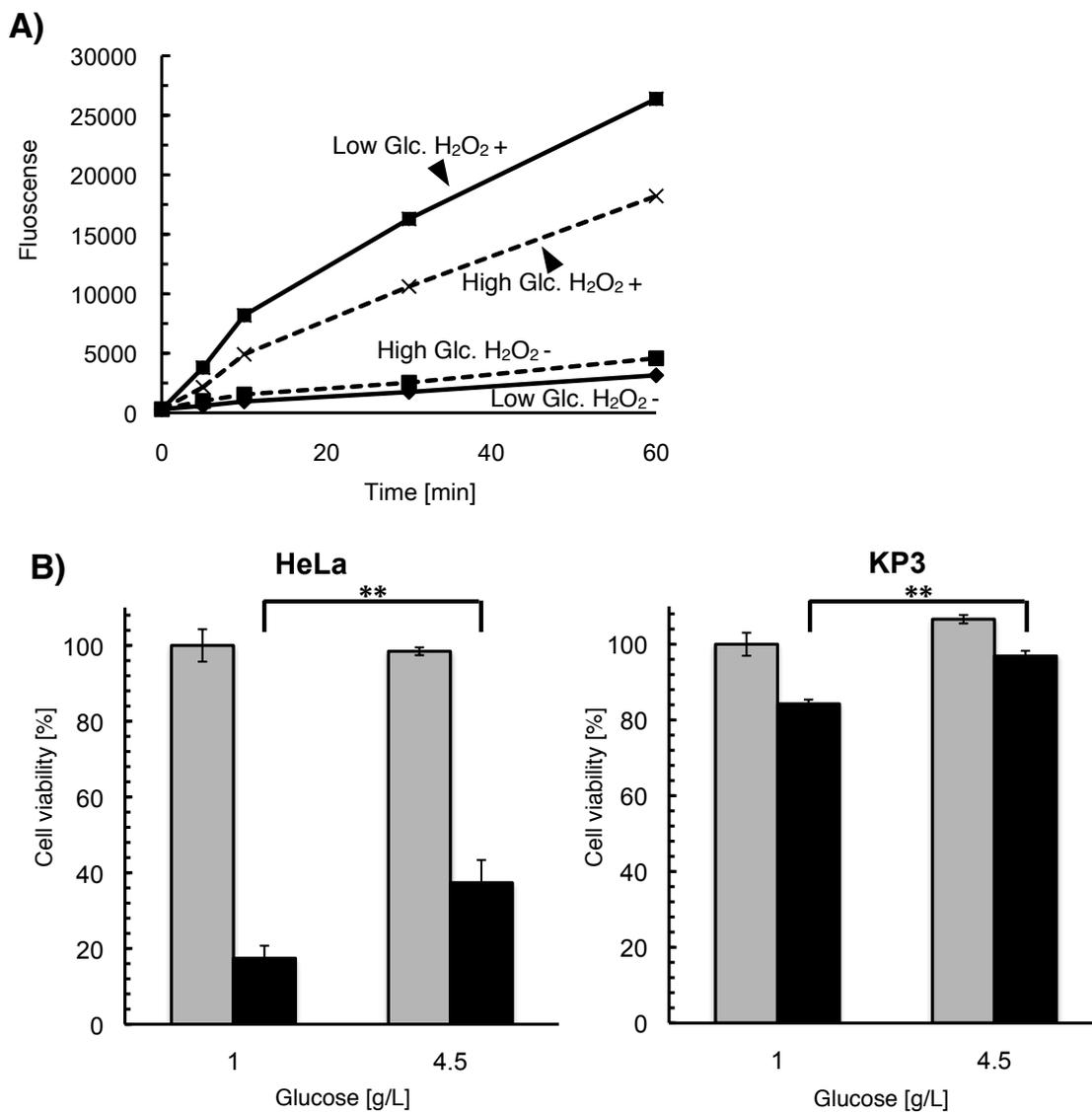


図 5. 培地中グルコース濃度の違いによる H₂O₂ 対性能の変化. (A) H₂O₂ 負荷後の細胞内 H₂O₂ 濃度の変化. 細胞はあらかじめ 1 g/L (Low. Glc.) か 4.5 g/L (High Glc.) のグルコース培地で培養し, 6 時間後に 7 μM の CM-H₂DCFDA 入り Hanks 液に培地交換した上で 1 mM になるよう H₂O₂ を培地に添加した. (B) H₂O₂ 負荷後の細胞生存率. 細胞はあらかじめ 1 g/L か 4.5 g/L のグルコース培地で培養し, 6 時間後に 0.1 mM になるよう H₂O₂ を培地に添加し, 48 時間後の細胞生存率を MTT によって求めた. エラーバーは異なる 3 回の試験間の標準偏差を示す. **: P < 0.01

4. 考察

本章ではまず 18 種の細胞それぞれについて H_2O_2 感受性を調べ、KP3 細胞と MKN7 細胞が極めて低い感受性を示し、一方で、これらの細胞の H_2O_2 感受性差に GPx の活性は関与していないことを示した (表 1). この H_2O_2 感受性とそれぞれの細胞株における定常時のメタボロームデータを比較したところ、KP3 細胞と MKN7 細胞で顕著に物質が多い物質が存在し (図 1C), その多くが還元作用を示すことが分かった (図 2, 表 2). さらに還元性が確かめられた 10 個の中心炭素代謝関連物質について、細胞内での酸化物の生成と (図 3), 細胞内で増加させた時の H_2O_2 耐性能の向上を確認し (図 5), 細胞の H_2O_2 耐性能に還元性物質が寄与していることを提唱した.

今回示した物質の還元作用について、物質構造の面から考えると、G6P や F6P は還元糖であり、開環した状態で露出するアルデヒド基が還元作用を持つと考えられる. この過程に基づくと G1P は開環した状態でもアルデヒド基を持たず還元性を示さないはずだが、*in vitro* の実験でこれが証明された (図 2A). 酸化物の探索では、これら G6P や F6P の酸化物は、アルデヒド基が酸化された物質だと予測しメタボロームデータを調べたが、該当するピークは見つけられなかった. この要因として、アルデヒド基が酸化されたことで極性が下がり、CE-TOFMS による測定では検出できなかったためと考えられる. 本研究では、*in vitro* と細胞内のデータの合致から 6 個のピークを酸化物と判断したが、これらのピークを同定し、化学反応の面も踏まえ、細胞内の酸化還元作用の妥当性について議論することが必要である. pyruvate や 2-oxoglutarate についてはケトカルボニル基が還元されることが知られており、この部位が還元されることで pyruvate は acetate に、2-oxoglutarate は succinate になることが報告されている (Andrae, et al., 1985; Bunton, 1949; Liu, et al., 2011). また、pyruvate については培地中に添加することで酸化ストレス耐性が上昇することが示されており (Desagher, et al., 1997), 細胞内に用意に取り込まれる物質であることから、細胞内で抗酸化的に働いている可能性が高い. acetate については、キットや LC-MS を用いて細胞内外の酢酸量を測定する必要がある.

H_2O_2 感受性株である HeLa 細胞は、 H_2O_2 非感受性株 KP3 細胞に比べると、高濃度グルコース条件下でのグルコース取り込み能は弱く (図 4), また、酸化物候補の生成量も少なかった (図 3). この違いが酸化ストレス感受性差にも影響を与えている可能性もあり得る.

今回のスクリーニングで見つかった物質は、いずれも細胞内基礎代謝物としてよく知られた物質であり、なぜその還元性が問われてこなかったのか不思議である. この理由はおそらく、細胞内でこれらの物質を同定することが難しかったためではないだろうか. 今回提示した物質のうち、これまで報告がある pyruvate や 2-oxoglutarate につい

でも、培地添加の影響を示しているのみで、細胞内でその酸化還元反応が起こっているか調べられた研究はない。R5Pなどは、培地中に添加しても細胞内に取り込まれないので、細胞内の増加と酸化ストレスの関係性を証明することができなかつたと考えられる。この点、我々はメタボローム解析技術を用いることで、細胞内での中心炭素代謝経路上の物質の変化や酸化物の探索を行うことができた。がん細胞は、積極的にグルコースを取り込むことが知られているが、本研究の結果は、そうした積極的なグルコース消費が中心炭素代謝経路上の物質の増加につながることを示唆した。さらに、高濃度グルコース条件下における積極的なグルコース取り込みが、 H_2O_2 耐性を上昇させたことは、グルコース消費の促進が、抗酸化機構として機能する可能性を示した。グルコースの積極的な消費は、がん細胞や、未分化細胞などの増殖が早い細胞で見られる形質として知られている (Newsholme, et al., 1985)。現在、その理由に中心炭素代謝を通じた細胞成長分子の生産があげられているが、それに加え、酸化還元状態の調節をする上でもグルコースの積極的消費が一役買っているのかもしれない。

5. 結論

本研究では酸化ストレス耐性の異なる細胞のメタボロームデータを比較することで、 H_2O_2 耐性に寄与する物質のスクリーニングを行った。結果、中心炭素代謝上の物質が還元作用を持ち、これらの物質が多くなると、細胞の H_2O_2 耐性があがることを示した。今回示した物質について、還元作用を持つことはこれまで着目されておらず、今後、中心炭素代謝の調節が、酸化還元状態の維持機構も担っていることが立証されれば、がん細胞特異的に見られる代謝制御の機能に関する新しい知見となり得る。

参考文献

- Andrae, U., Singh, J. and Ziegler-Skylakakis, K. (1985) Pyruvate and related alpha-ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity, *Toxicol Lett*, **28**, 93-98.
- Bunton, C.A. (1949) Oxidation of Alpha-Diketones and Alpha-Keto-Acids by Hydrogen Peroxide, *Nature*, **163**, 444-444.
- Desagher, S., Glowinski, J., and Premont, J. (1997) Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity, *The Journal of Neuroscience*, **17**, 9060-9067.
- Liu, J., et al. (2011) Metabolomics of oxidative stress in recent studies of endogenous and exogenously administered intermediate metabolites, *Int J Mol Sci*, **12**, 6469-6501.
- Marklund, S.L., et al. (1982) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase,

manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues, *Cancer Res*, **42**, 1955-1961.

Newsholme, E.A., Crabtree, B. and Ardawi, M.S. (1985) The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells, *Biosci Rep*, **5**, 393-400.

Ralser, M., *et al.* (2009) Metabolic reconfiguration precedes transcriptional regulation in the antioxidant response, *Nat Biotechnol*, **27**, 604-605.

Rui, B., *et al.* (2010) A systematic investigation of Escherichia coli central carbon metabolism in response to superoxide stress, *BMC Syst Biol*, **4**, 122.

業績

国際学会発表

Iino, K., Kitagawa, M., Soga, T., Tomita, M., Metabolomic responses of cancer cells against H₂O₂-induced oxidative stress, 8th International Conference of the Metabolomics Society, WA USA. (2012/6/25-28)

国内学会・シンポジウム発表

飯野慧子, 北川光洋, 曾我朋義, 富田勝, メタボローム解析によるがん細胞内抗酸化物質の探索, 第7回メタボロームシンポジウム, 鶴岡. (2012/10/10-12)

Iino, K., Kitagawa, M., Soga, T., Tomita, M., Remarkable antioxidative properties of central carbon intermediates in cancer cells identified by CE-TOFMS-based metabolomics, 第35回日本分子生物学会年会, 福岡. (2012/12/11-14)