

学 位 論 文  
Doctor's Thesis

論文題名： 固型腫瘍モデルにおける一酸化窒素によるヘムオキシゲナーゼ-1 の発現と  
その抗アポトーシス効果

(Antiapoptotic Effect of Heme Oxygenase-1 Induced by Nitric Oxide in Experimental Solid Tumor)

著 者 名 : 田 中 真 一 郎  
Shinichiro Tanaka

指導教官名 : 外科学第二教授  
小 川 道 雄

微生物学教授  
前 田 浩

審査委員名 : 小児科学担当教授 遠 藤 文 夫

分子遺伝学担当教授 森 正 敬

生化学第一担当教授 三 浦 洵

腫瘍医学担当教授 佐 谷 秀 行

2002 年度

## 目 次

要旨	5
発表論文一覧	8
謝辞	9
略語一覧	10
第 1 章 研究の背景と目的	11
第 2 章 材料および実験方法	14
2.1 動物	14
2.1.1 ラット	
2.1.2 マウス	
2.1.3 ウサギ	
2.2 細胞	14
2.3 固型腫瘍の作成と観察	15
2.3.1 AH136B 腫瘍	
2.3.2 S-180 腫瘍	
2.3.3 VX-2 腫瘍	
2.4 試薬の調整	16
2.4.1 HO 阻害剤	
2.4.2 ビリルビン	
2.4.3 カスパーゼ 3 阻害剤	
2.4.4 NO ドナー	
2.4.5 nitric oxide synthase (NOS)阻害剤	
2.5 試薬の投与方法	17
2.5.1 <i>in vitro</i>	
2.5.2 <i>in vivo</i>	
2.6 固型腫瘍の虚血モデル	18

2.7	TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の検出	20
2.7.1	標本の準備	
2.7.2	TUNEL 染色	
2.7.3	アポトーシス陽性細胞の評価	
2.8	Heme oxygenase (HO)活性の測定	21
2.9	培養上清中のビリルビン濃度の測定	22
2.10	カスパーゼ 3 活性の測定	22
2.10.1	準備	
2.10.2	カスパーゼ 3 活性の測定	
2.11	固型腫瘍の NO 測定	23
2.11.1	マイクロダイアライシス法を用いた NO 測定	
2.11.1.1	機材	
2.11.1.2	方法	
2.11.2	電子スピン共鳴 (ESR) による NO の測定	
2.12	腫瘍血流の測定	25
2.13	ウェスタンブロッティング	25
2.13.1	準備	
2.13.2	ウェスタンブロッティング	
2.14	統計処理	27
第 3 章	実験結果	28
3.1	固型腫瘍および正常臓器の HO 活性の測定	28
3.1.1	ラット AH136B 腫瘍	
3.1.2	マウス S-180 腫瘍	
3.1.3	ウサギ VX-2 腫瘍	
3.2	ZnPP IX 動注による AH136B 固型腫瘍の治療実験	30
3.3	AH136B 固型腫瘍における ZnPP IX 誘発性アポトーシス	30

3.4	ZnPP IX、CuPP IX 投与後の AH136B 固型腫瘍の HO 活性	33
3.5	AH136B 培養細胞における ZnPP IX 誘発性アポトーシス	33
3.6	ZnPP IX、CuPP IX 処理後の AH136B 培養細胞の HO 活性	36
3.7	ZnPP IX 処理後の AH136B 培養細胞のカスパーゼ 3 活性	36
3.8	ビリルビンによる ZnPP IX 誘導性アポトーシス抑制作用	38
3.9	AH136B 培養上清中のビリルビン濃度の測定	38
3.10	AH136B 固型腫瘍における NO の測定	40
3.10.1	マイクロダイアライシス法による NO の測定	
3.10.2	ESR による NO の測定	
3.11	ZnPP IX および L-NAME 投与後の AH136B 固型腫瘍血流の測定	42
3.12	AH136B 培養細胞・固型腫瘍における HO-1 および HSP70 タンパクの発現	44
3.12.1	熱ショックによる HO-1 および HSP70 タンパクの誘導	
3.12.2	NO ドナーによる HO-1 および HSP70 タンパクの発現変化	
3.12.3	ZnPP IX による HSP70 タンパクの発現変化	
3.12.4	AH136B 固型腫瘍における HO-1 および HSP70 タンパクの発現	
3.12.5	虚血モデルにおける HSP70 タンパクの発現変化	
3.13	消化器癌臨床症例における HO 活性の測定	47
第 4 章	考察	50
4.1	総論	50
4.2	ビリルビンの抗酸化作用	51
4.3	CO による抗アポトーシスと ZnPP IX の血流阻害作用	52
4.4	HO-1 由来の鉄の生理学的意義	53
4.5	AH136B 腫瘍における HSP70 の生理学的意義	54
4.6	AH136B 固型腫瘍における NO 産生の腫瘍生物学的意義	55

4.7 カスパーゼ 3 の活性化	55
4.8 ZnPP IX の直接的作用	56
第 5 章 結語	57
参考文献	59

## 要旨

過剰な nitric oxide (NO) などの酸化ストレスに対する heme oxygenase-1 (HO-1) の誘導は、生体における重要な自己防御システムの一つである。そこで今回私は、HO-1 がもたらす腫瘍増殖における腫瘍細胞保護作用のメカニズムについて、特に腫瘍の増殖過程に生ずる酸化ストレスなどによって引き起こされる腫瘍細胞のアポトーシスに焦点をあてて解析を行った。

ラットの肝癌細胞である AH136B 固型腫瘍あるいはその培養細胞を HO-1 の競合阻害剤である亜鉛プロトポルフィリン IX (zinc protoporphyrin IX : ZnPP IX) にて処理したところ、*in vitro* でも *in vivo* の系においても HO 活性の低下に伴い腫瘍細胞の著明なアポトーシス誘導が認められた。また、その際腫瘍細胞のカスパーゼ 3 の活性は有意に上昇しており、さらに ZnPP IX と同時にカスパーゼ 3 の特異的阻害剤も加えて培養した場合、アポトーシスはコントロールレベルまで抑制された。一方、HO-1 によるヘム代謝の重要な分解産物であるビリルビンを加えた場合、10 nM オーダーの低濃度でも、ZnPP IX 誘発性のアポトーシスが有意に抑制された。さらに興味あることに、AH136B 固型腫瘍において過剰に産生される NO が、腫瘍細胞の HO-1 の発現を upregulate していることも明らかになった。一方、AH136B 固型腫瘍の発育は ZnPP IX 投与により著明に抑制され、その際 ZnPP IX は固型腫瘍における NO の産生や、腫瘍血流、HSP70 の発現などには影響を及ぼさなかった。これらの知見は、ZnPP IX が腫瘍細胞の HO-1 の抑制を介して、その細胞保護作用を損ない腫瘍細胞にアポトーシスを誘導することを示している。

さらに、マウスのサルコーマ-180 (S-180) 固型腫瘍や、ウサギの VX-2 固型腫瘍における HO 活性が、それぞれの正常肝組織の HO 活性よりも有意に高い値を示し、また、ヒトの胃癌、大腸癌組織も同様に正常粘膜組織よりも有意に高い HO 活性を有していた。このことは AH136B のみならず、様々な腫瘍組織に普遍的に HO-1 が高発現し、その発育において重要な役割を担っていること

を示唆するものである。

固型腫瘍はその旺盛な増殖のため、常に過酷な虚血状態や酸化ストレスに曝露されている。そのような発育環境にあつて腫瘍細胞は HO-1 を発現し、その抗アポトーシス作用や細胞保護作用を介して腫瘍増殖を維持しているものと思われた。

## ABSTRACT

Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) may provide an important protective response of the cells against oxidative damage including excessive nitric oxide (NO). It is, therefore, suggested that the tumor cell growth is sustained by HO-1 expressed in the solid tumors. In the present study, we further investigated the mechanism of cytoprotection of HO-1 in the tumor growth, focusing on the apoptosis caused by oxidative stress occurring during solid tumor growth in rats. Interestingly, HO inhibitor; zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX) treatment of the AH136B (rat acetic hepatoma) resulted in an extensive apoptotic changes of the tumor cells both in *in vivo* and *in vitro*. At the same time, the caspase-3 activity was increased significantly. Moreover, ZnPP IX-induced apoptosis was inhibited completely by simultaneous incubation with caspase-3 specific inhibitor. Alternatively, bilirubin partially abrogated the ZnPP IX-induced apoptosis. However this apoptosis inducing effect of ZnPP IX was not attributed to the NO production, tumor blood flow or heat shock protein 70 (HSP70) expression. From these findings, we propose that HO-1 may function as an antiapoptotic defense system of the tumor, and thus it may have important protective and beneficial effects for tumor cells against oxidative stress induced by NO produced during a rapid solid tumor growth *in vivo*.



## 発表論文一覧

1. Tanaka, S., Akaike, T., Fang, J., Beppu, T., Ogawa, M., Tamura, F., Miyamoto, Y. and Maeda, H.  
Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour.  
*British Journal of Cancer* 2003 (in press)
2. Doi, K., Akaike, T., Fujii, S., Tanaka, S., Ikebe, N., Beppu, T., Shibahara, S., Ogawa, M. and Maeda, H.  
Induction of haem oxygenase-1 by nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth.  
*British Journal of Cancer* 80(12): 1945-1954, 1999.
3. 田中真一郎, 西野博仁, 赤池孝章, 小川道雄 「マイクロダイアリシス法」.  
生体内一酸化窒素(NO)実験プロトコール, 共立出版(東京), p258-262, 2000年
4. Tanaka, S., Akaike, T., Wu, J., Fang, J., Sawa, T., Ogawa, M., Beppu, T. and Maeda, H.  
Modulation of tumor-selective vascular blood flow and extravasation by the stable prostaglandin I<sub>2</sub> analogue beraprost sodium.  
*Journal of Drug Targeting* 2003 (in press)
5. 前田 浩, 田中真一郎 「感染と癌におけるカリクレイン・キニン系の役割」, 血管と内皮, vol. 10, no. 1, メディカルレビュー社(東京), p42-52, 2000年

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました熊本大学医学部微生物学講座、前田浩教授、熊本大学医学部外科学第二講座、小川道雄教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、論文作成および日頃の研究の中で貴重な御教示、御指導を頂きました熊本大学医学部微生物学講座、赤池孝章助教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、御助言、御協力を頂きました別府透先生、土居浩一先生をはじめ、熊本大学医学部微生物学講座研究室、熊本大学医学部外科学第二講座研究室内の諸氏に心より感謝いたします。

## 略語一覧

CO	carbon monoxide
CuPP IX	copper protoporphyrin IX
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTCS	<i>N</i> -(dithiocarboxy) sarcosine
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EPR	enhanced permeability and retention
ESR	electron spin resonance
FCS	fetal calf serum
HO-1	heme oxygenase-1
HO-2	heme oxygenase-2
HSP32	heat shock protein 32
HSP70	heat shock protein 70
ICE	interleukin-1 $\beta$ converting enzyme
iNOS	inducible nitric oxide synthase
L-NAME	<i>N</i> <sup><math>\omega</math></sup> -nitro-L-arginine methyl ester
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
PBS	10 mM phosphate-buffered saline
PMSF	phenylmethane sulfonyl fluoride
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SMT	<i>S</i> -methylisothiurea sulfate
SNAP	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acetyl penicillamin
SnPP IX	tin protoporphyrin IX
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling
ZnPP IX	zinc protoporphyrin IX

## 第 1 章 研究の背景と目的

固型腫瘍は、様々な増殖因子、血管新生因子、プロテアーゼ、ホルモンレセプターなどを発現し、その旺盛な増殖を維持していると考えられている。しかし、固型腫瘍は、宿主の免疫応答、一酸化窒素 (nitric oxide; NO) などによってもたらされる酸化ストレスや、虚血ストレスなどの過酷な環境に常に曝されており、腫瘍細胞自身になんらかの防御機構が発現されていることが予想される。そこで私は、様々なストレスによって誘導されるヘムオキシゲナーゼ-1 (heme oxygenase-1; HO-1) に着目し、その固型腫瘍における病態生理学的意義について研究を行った。

HO は、ヘム分解における律速酵素であり、ヘムを分解して、ビリベルジン (biliverdin)、一酸化炭素 (carbon monoxide; CO)、鉄イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ ) を産生する。さらに、そのビリベルジンは、ビリベルジンレダクターゼ (biliverdin reductase) によってビリルビン (bilirubin) に還元される (Tenhunen et al., 1968)。また、HO には主に 2 つのアイソフォームが存在することが知られており、それぞれ HO-1、HO-2 と呼ばれている。HO-1 は、1969 年に Tenhunen らによりはじめて報告された誘導型の発現を示すアイソフォームであり、分子量 32kDa で脾臓で最も活性が高い。様々な組織・細胞より、基質であるヘム (Tenhunen et al., 1970) や、紫外線 (Keyse and Tyrrell, 1989) ・重金属 (Mitani et al., 1993) ・熱ショック (Shibahara et al., 1987) ・低酸素 (Motterlini et al., 2000) ・NO (Foresti et al., 1997; Foresti and Motterlini, 1999; Bouton and Demple, 2000) 等のストレス刺激によって誘導されるため、現在では最も鋭敏なストレスタンパク質として認識されている。また HO-1 は HSP32 (熱ショックタンパク質 32) の別名でも知られている。最終代謝産物であるビリルビンは、生体内において、強力な抗酸化物質であることが知られており (Abraham et al., 1988)、HO-1 がビリルビン生成を介して様々な酸化ストレスに対して抗酸化的防御作用を発揮しているも

のと考えられている。一方、HO-2は、1988年に Maines らによって報告された構成型の発現を示すアイソフォームであり、主に脳組織や、精巣に発現している (Maines, 1997)。

NOは、生体内において NO synthase (NOS) により L-アルギニンを基質として合成され、血管平滑筋弛緩因子、神経情報伝達物質、生体防御因子など、様々な生理活性を発揮するガス状のラジカル分子として知られている (Furchgott and Vanhoutte, 1989; Choi, 1993; Moncada and Higgs, 1993)。特に、宿主由来の誘導型 NO 合成酵素 (inducible nitric oxide synthase; iNOS) によってもたらされる高濃度の NO は、様々な腫瘍細胞に対して傷害作用を発揮する生体防御因子として報告されてきた (Hibbs et al., 1988; Bastian et al., 1994; Lepoivre et al., 1994)。一方で、各種腫瘍細胞および固型腫瘍において iNOS を含めた各種アイソフォームの NOS の高発現が示されており (Maeda et al., 1994; Bastian et al., 1994; Cobbs et al., 1995; Thomsen et al., 1994)、NOS の発現がむしろ腫瘍の悪性度を高めるという報告もある (Thomsen et al., 1995; Cobbs et al., 1995)。実際我々はこれまで、固型腫瘍局所で産生される NO が、その旺盛な増殖にポジティブに関与していることを報告してきた (Doi et al., 1996)。さらに、NO による腫瘍血管透過性亢進作用 (Maeda et al., 1994; Wu et al., 1998)、免疫抑制作用 (Lejeune et al., 1994)、アポトーシス抑制作用 (Ambs et al., 1998)、腫瘍血管新生作用 (Fukumura and Jain, 1998)、転移促進作用 (Shi et al., 1999) など知られている。しかしながら、NO や、NO 由来の活性酸化窒素種が過剰に産生されると、それ自身の持つ高い反応性により生体内の様々な細胞へ傷害作用を発揮することも事実である (Akaike et al., 2000; Fujii et al., 1999; Xie and Fidler, 1998)。このような知見より、腫瘍組織における過剰な NO 産生に伴う細胞傷害作用に対して、腫瘍細胞が自らを防御する何らかのシステムを有していることが予想される。そこで今回私が注目したものが、ストレスタンパクとして知られている HO-1 である。ヒト肺癌細胞 (Lee and Ho, 1994)、ヒト脳腫瘍細胞 (Hara et al., 1996; Takahashi et al., 1996)、ヒト肝癌細胞 (Mitani et al., 1990) 等を用いた実験で、NO や重金

属などのストレス刺激によって HO-1 が誘導されることが報告されており、また、ヒト腎癌 (Goodman et al., 1996, 1997) やヒト前立腺癌 (Maines and Abrahamsson, 1996) 等においては、正常組織よりも腫瘍組織において有意に高い HO-1 の発現が認められている。以前我々も、iNOS 由来の NO によって、ラット AH136B 固型腫瘍組織において HO-1 が誘導されていることを明らかにしており (Doi et al., 1999)、これらの報告からも、HO-1 が様々なストレスに対し防御的に作用し、腫瘍の増殖に深く関与していることが示唆される。実際我々は、HO の競合阻害剤である亜鉛プロトポルフィリン IX (zinc protoporphyrin IX; ZnPP IX) を担癌ラットに投与することによって、その固型腫瘍の増殖が有意に抑制されることを報告している (Doi et al., 1999)。しかしながら、このような HO-1 による腫瘍細胞保護作用のメカニズムについては未だ不明な点が多い。

一方最近、心移植における移植片の血管内皮細胞のアポトーシスが HO-1 の過剰発現によって抑制されたり (Soares et al., 1998; Hancock et al., 1998)、腫瘍壊死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ ) 誘発性の線維芽細胞のアポトーシスが HO-1 の強制発現によって制御されている (Petrache et al., 2000) など、HO-1 の抗アポトーシス作用が注目されている。そこで本研究においては、HO-1 による腫瘍細胞保護作用のメカニズムを解明するために、ラットの肝癌 AH136B 腫瘍モデルを作成し、腫瘍発育に伴って生ずる NO や酸化ストレスによって誘発される腫瘍細胞のアポトーシスと HO-1 の抗アポトーシス作用に焦点をあてて解析を行った。

## 第 2 章 材料および実験方法

### 2.1 動物

全ての動物実験は、熊本大学医学部附属動物資源開発研究センターの実験指針に基づいて、熊本大学医学部微生物学教室動物実験室にて行った。

#### 2.1.1 ラット

全て雄性のドンリュウラット（クリーン）を SLC, Inc. (Shizuoka, Japan) より購入した。腫瘍継代には 60 g（3 週齢）、腫瘍移植には 160-180 g（6 週齢）を使用した。

#### 2.1.2 マウス

全て雄性、5-6 週齢の ddY マウスを SLC より購入した。

#### 2.1.3 ウサギ

全て雌性、1.6 kg の New Zealand White rabbit を SLC より購入した。

### 2.2 細胞

AH136B（ラット腹水肝癌細胞）は、60 g ドンリュウラットの腹腔内で毎週継代した（Doi et al., 1996）。18 G 針にて腹腔を穿刺し、15-20 ml の血性腹水を

採取し、その 1 ml を次のラットの腹腔内に投与した。また、*in vitro* では、採取した細胞を  $80\times g$ 、3 分間遠心分離した後、10 mM phosphate buffered saline (PBS pH 7.4) で洗浄し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  存在下で、10% fetal calf serum (FCS) および 0.5% non essential amino acid (nEAA) 添加 Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM; GIBCO, Grand Island, NY) で培養した。細胞濃度は  $5\times 10^5/\text{ml}$  とし、6 ウェルプレート、または  $75\text{ cm}^2$  のフラスコ (Falcon, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) で培養した。

## 2.3 固型腫瘍の作成と観察

### 2.3.1 AH136B 腫瘍

継代ラットの腹腔より採取した AH136B 細胞を PBS にて洗浄した後、D-MEM にて  $5\times 10^7/\text{ml}$  に調整し、160-180 g のドンリュウラットの足背に、0.2 ml ( $1\times 10^7$  cells) ずつ皮下注射した。移植後約 2 週間で長径 10-15 mm 大の半球状の固型腫瘍として認められた。腫瘍径は、最長径 (a) とそれに直交する径 (b) を測定し、腫瘍体積を  $a\times b^2\times \pi/6$  で算出した。

### 2.3.2 S-180 腫瘍

S-180 (マウス sarcoma 細胞) は、ddY マウスの腹腔内で少なくとも 2 世代継代した細胞を用いた。ddY マウスの腹腔内より採取した細胞を  $80\times g$ 、3 分間遠心分離した後、PBS にて洗浄し、D-MEM にて  $1\times 10^7/\text{ml}$  の濃度に調節した。ddY マウスの背部皮下に  $2\times 10^6$  ずつ 2 箇所 S-180 を移植し、固型腫瘍を作成した。腫瘍は 1 週間で約 1 cm の球状の固型腫瘍として確認できた。



### 2.3.3 VX-2 腫瘍

熊本大学第一外科、今野俊光先生より分与頂いた VX-2 は、Rous と Beard (1935)によって報告された rabbit Shope papilloma 由来の癌である。New Zealand White rabbit をペントバルビタール (30 mg/kg) 麻酔下に開腹し、1.5 mm 角の VX-2 固型腫瘍を肝左葉の皮膜下に移植した。2 週間後には約 1-1.5 cm 大の肝表面に突出する固型腫瘍として認めた。

## 2.4 試薬の調整

### 2.4.1 HO 阻害剤

HO の競合阻害剤である zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX, Sigma-Aldrich Fine Chemicals, St. Louis, MO, USA) および tin protoporphyrin IX (SnPP IX, Frontier Scientific Inc., Logan, UT, USA) は、まず 100% dimethyl sulfoxide (DMSO; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) にて溶解後、10 倍量の 0.01 M NaOH を加えた。*in vitro* 投与時は、最終濃度を 1 mM (10% DMSO, 0.01 M NaOH) とし、適宜 10% DMSO, 0.01 M NaOH 溶液にて、必要な濃度に希釈調整した。また、*in vivo* 投与時は、最終濃度を 500 µg/ml (10% DMSO, 0.01 M NaOH) に調整した。

一方、copper protoporphyrin IX (CuPP IX, Frontier Scientific Inc., Logan, UT, USA) は、ZnPP IX と同じメタロポルフィリンの一種でありながら、HO 阻害作用がないか、もしくは非常に弱いと報告されているため (Drummond and Kappas, 1981; Zakhary et al., 1996)、ZnPP IX のネガティブコントロールとして使用した。溶解方法は、ZnPP IX の場合と同様とした。また、いずれの溶液も使用前まで遮光保存した。

#### 2.4.2 ビリルビン

ビリルビン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) は、0.01 M NaOH にて 1 mM 溶液を作成し、必要に応じて 0.01 M NaOH にて希釈した。また、この場合も遮光保存した。

#### 2.4.3 カスパーゼ 3 阻害剤

カスパーゼ 3 選択的阻害剤 (Ac-Asp-Met-Gln-Asp-H(aldehyde); Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan) は、10% sucrose, 0.1% CHAPS, 10 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mg/ml ovalbumin 含有 100 mM HEPES-KOH buffer (pH 7.5) にて溶解した。

#### 2.4.4 NO ドナー

S-nitroso-N-acetyl penicillamin (SNAP; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) は 100% DMSO に、propylamine NONOate ( $\text{CH}_3\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2^+\text{CH}_3$  (P-NONOate, Dojindo Laboratories) は 0.1 M NaOH にそれぞれ溶解した。

#### 2.4.5 nitric oxide synthase (NOS) 阻害剤

*N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)、および S-methylisothiourrea sulfate (SMT; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) は、いずれも生理食塩水にて溶解し、6 mg/ml に調節した。

### 2.5 試薬の投与方法

### 2.5.1 *in vitro*

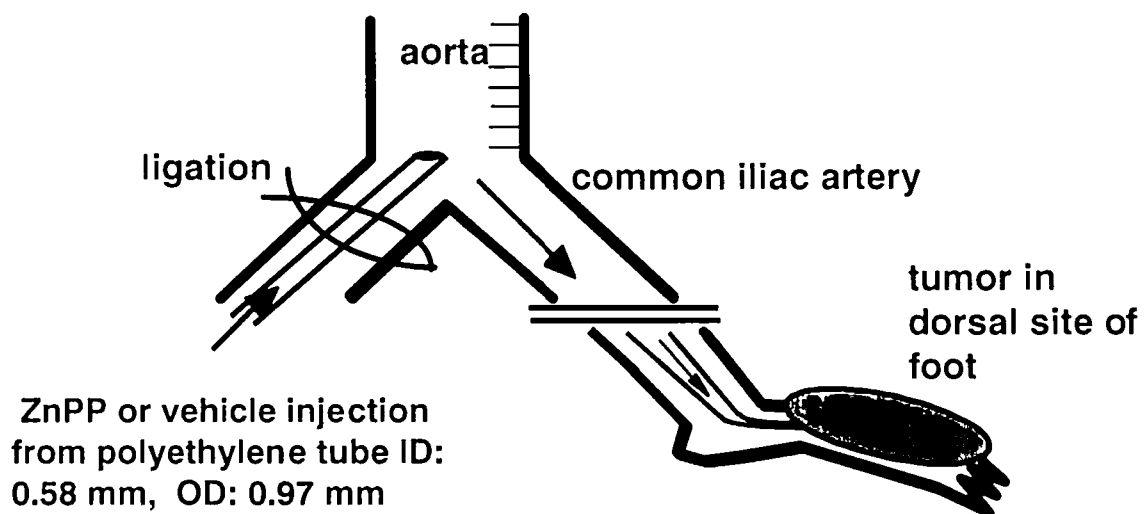
ZnPP IX、SnPP IX、CuPP IX、ビリルビン、カスパーゼ 3 阻害剤、NO ドナーは、前述の方法で溶解し、目標濃度の 10 倍濃度の溶液を作成し、AH136B 腫瘍細胞の培養液中にそれぞれトータル量の 1/10 量を投与した。

### 2.5.2 *in vivo*

ZnPP IX および CuPP IX の投与は、AH136B 細胞を足背に移植して 7 日目もしくは 14 日目の担癌ラットに対して行った。図 1 に示すように、ジエチルエーテル麻酔下に開腹し、腫瘍反対側の総腸骨動脈（腫瘍の栄養血管）を露出させ、外径 1 mm のポリエチレンチューブをカットダウンにて挿入固定した。そのチューブに 23 G 針を接続し、500  $\mu$ g/ml に調整した ZnPP IX または CuPP IX 溶液を 500  $\mu$ g/kg ワンショットで緩やかに注入した。また、NOS 阻害剤においては、腫瘍細胞移植後 11 日目の担癌ラットに対して、6 mg/ml に調整した溶液を、無麻酔下に 6 mg/kg/day を 5 日間連続で腹腔内に投与した。ただし、腫瘍血流測定の場合は、6 mg/kg をワンショットにて動脈内投与した。尚、コントロールとしては、それぞれ溶媒のみを同様の方法で投与した。

## 2.6 固型腫瘍の虚血モデル

腫瘍移植後 14 日目の担癌ラットを、ジエチルエーテル麻酔下に開腹し、腫瘍側の総腸骨動脈（腫瘍の栄養血管）を露出させ、これを絹糸にて結紮した。コントロールは開腹および血管剥離操作のみとした。



**図1 AH136B固型腫瘍に対するZnPP IXの経動脈的投与方法**  
 ラットをジエチルエーテル麻酔下に開腹し、腫瘍反対側の総腸骨動脈（腫瘍の栄養血管）を露出させ、外径1 mmのポリエチレンチューブをカットダウンにて挿入固定した。そのチューブに23 G針を接続し、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したZnPP IX溶液を500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ワンショットで緩やかに注入した。

## 2.7 TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の検出

### 2.7.1 標本の準備

ZnPP IX、SnPP IX、CuPP IX、ビリルビン、カスパーゼ 3 阻害剤を投与して 24 時間培養した後、細胞を回収し、PBS にて 2 回洗浄し、再度 PBS に浮遊させた細胞をスライドガラス上に薄くひろげ、室温にて一昼夜風乾させた。固型腫瘍の場合は、ZnPP IX または CuPP IX 投与後 24 時間に脱血後、腫瘍を摘出し、Tissue-Tek OCT compound (Miles, Elkhart, IN) で包埋し直ちにドライアイスで凍結して、使用時まで -80°C で保存した。クリオスタット (Leica CM 1800) を用いて厚さ 6  $\mu$ m の凍結切片を作成し、室温にて一昼夜風乾させた。

### 2.7.2 TUNEL 染色

染色の全行程は、以下に示す通り TACS™ 2 TdT-Blue Label In Situ Apoptosis Detection Kit (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA) の添付マニュアルに従った。

1. 4%ホルムアルデヒド/PBS にて 10 分固定
2. PBS にて洗浄 10 分 1 回
3. Proteinase K Solution を PBS にて 20  $\mu$ g/ml に調整し、室温で 15 分反応
4. 2%過酸化水素/メタノール溶液にて 5 分 (内因性ペルオキシダーゼ阻害)
5. PBS にて洗浄 1 分 1 回
6. terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) Labeling Buffer に浸し、室温で 5 分
7. ラベリング反応液 (TdT Enzyme、Co<sup>2+</sup> Cation Stock、TdT dNTP Mix を含む TdT Labeling Buffer) を標本に載せ、37°Cの湿潤箱の中で 60 分反応
8. 反応停止 buffer に浸し、室温で 5 分反応
9. PBS にて洗浄 5 分 2 回
10. Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) Solution を標本に載せ、室温で 10 分

反応

11. PBS にて洗浄 2 分 2 回

12. TACS Blue Label™ solution を標本に載せ、室温で約 2 分程度反応

13. 純水にて洗浄 2 分 2 回

14. Nuclear Fast Red にてカウンター染色約 1 分

15. 純水にて軽く洗浄し、90、95、100%のアルコール系列でそれぞれ 2 分ずつ

脱水

16. p-キシレンに浸し、Permount (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) にて封入

### 2.7.3 アポトーシス陽性細胞の評価

光学顕微鏡にて、暗青色に染色された細胞をアポトーシス陽性細胞と判断した。*in vitro* の培養系では、 $\times 100$  倍視野において 4 視野中の全細胞数に対するアポトーシス陽性細胞数の割合を算出し、アポトーシス陽性率 (%) とした。また、*in vivo* の固型腫瘍の場合は、4 視野中のアポトーシス陽性細胞数をカウントし、 $1\text{ mm}^2$  中の陽性細胞数に換算した (陽性細胞数/ $\text{mm}^2$ )。

### 2.8 heme oxygenase (HO) 活性の測定

PBS にて 2 回洗浄した細胞、または摘出した固型腫瘍、肝臓、脾臓に対し、10 倍量の 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 10  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin 含有 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) をホモジネート緩衝液として加え、ポリトロノホモジナイザーにて氷上でホモジナイズした。4°C、 $10,000\times g$  にて 30 分間遠心分離し、さらに上清を 4°C、 $105,000\times g$  にて 60 分間遠心分離した。得られたミクロソーム画分に、細胞もしくは固型腫瘍と等量の 100 mM potassium

phosphate buffer (pH 7.4) を加え、ソニケーターにて 2 秒間ソニケーションを行い、懸濁液とした。Lowry 法にてタンパク濃度を測定し、以下の順番で反応混合液を作成した。

1. ミクロソーム画分 (タンパク量として 1 mg)
2. サイトソール画分 (ビリベルジンレダクターゼの供給源として、ラットの肝臓を同様に分画したものを用いる。タンパク量として 1 mg)
3. 90 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)
4. 333  $\mu$ M NADPH
5. 33  $\mu$ M hemin

総量を 1 ml とし、37°C 下で、15 分間反応させた後、0.01 M HCl を 33  $\mu$ l 加え反応を停止させた。クロロホルムを 1 ml 加え、静置しても層が分離しない程度までよく攪拌し、8,000  $\times g$  にて再び層分離させた。そして下層のクロロホルムの吸光度を分光光度計にて測定し、465 nm と 530 nm との差より、抽出されたビリルビンの濃度を算出した。モル吸光係数は、40  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  を用いた。最終的に、タンパク質 1 mg あたり、1 時間反応させた時のビリルビン産生量 (nmol bilirubin/h/mg protein) を HO の活性とした。

## 2.9 培養上清中のビリルビン濃度の測定

ZnPP IX 100  $\mu$ M または vehicle を加えて 24 時間培養した後、培養上清を採取し、培養上清に 1/8 量のクロロホルムを加え、vortexing した後 12,000 rpm にてクロロホルムを分離した。分離したクロロホルムの吸光度を分光光度計にて測定し、465 nm と 530 nm との差より、抽出されたビリルビンの濃度を算出した。モル吸光度係数には、40  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  を用いた。

## 2.10 カスパーゼ 3 活性の測定

カスパーゼ 3 活性の測定は、既報に準じて行った (Enari et al., 1996)。

### 2.10.1 準備

ZnPP IX にて 24 時間処理した細胞およびそのコントロールを 2 回 PBS にて洗浄した後、50 mM KCl, 5 mM Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20  $\mu\text{M}$  cytochalasin B, 1 mM PMSF, 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, 1  $\mu\text{g/ml}$  pepstatin A, 50  $\mu\text{g/ml}$  antipain 含有 50 mM PIPES-NaOH (pH 7.0) 抽出緩衝液を加え、凍結融解を 4 回くり返し、cell lysate を調整した。4°C、13,000  $\times g$  で 30 分間遠心分離し、上清を-80°Cで保存した。

### 2.10.2 カスパーゼ 3 活性の測定

保存したサンプルのタンパク量を Lowry 法にて測定し、10 % sucrose, 0.1 % CHAPS, 10 mM DTT, 0.1 mg/ml ovalbumin 含有 100 mM HEPES-KOH buffer (pH 7.5)にて 36  $\mu\text{g}$  に調整し、1  $\mu\text{M}$  MOCac-Asp-Glu-Val-Asp-Ala-Pro-Lys (Dnp) - $\text{NH}_2$  fluorescent substrate (Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan) を加えて 30°C、30 分間反応させた後の蛍光強度 (328 nm, 392 nm) を測定した。また、同じサンプルに、Ac-Asp-Met-Gln-Asp-H (aldehyde) caspase-3 inhibitor (Peptide Institute) を 10  $\mu\text{M}$  加えて反応させた時の蛍光強度を測定し、加えない時の蛍光強度から差し引いてカスパーゼ 3 の活性とした。

## 2.11 固型腫瘍の NO 測定



### 2.11.1 マイクロダイアライシス法を用いた NO 測定

マイクロダイアライシス法は、既報を参考に (Ohta et al., 1994)、以下の方法で行った。

#### 2.11.1.1 機材

マイクロダイアライシスプローブ：貫通型、透析膜部内径 0.2 mm、外径 0.22 mm、膜長 5 mm、材質 セルロース、分子量カットオフ値 50 kDa (Eicom, Kyoto, Japan)

透析ポンプ：マイクロシリンジポンプ (ESP-64, Eicom)

シリンジ：HAMILTON 社製 1 ml

#### 2.11.1.2 方法

腫瘍移植後 14 日目の固型腫瘍に対し、ZnPP IX 投与前と投与 24 時間後（投与法は前述）、ジエチルエーテル麻酔下に、ダイアライシスを行った。固型腫瘍は比較的硬い組織であるため、24G のエラスター針を用い、それを先に腫瘍内を貫通させた後それをガイドとしてマイクロダイアライシスプローブを留置し、最後にエラスター針のみを抜去した。シリコン性のコネクターを用いてプローブとシリンジを接続し、Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (11 mM glucose, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7.4) を透析液として用い、流速 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  で透析を開始した。平衡状態に達するまで、このまま約 30 分程度安静に放置した。その後 15 分間透析を行い、透析液を回収した。回収した透析液は直ちに凍結保存 ( $-20^\circ\text{C}$  以下) し、後日高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて透析液中の  $\text{NO}_2^-$  および  $\text{NO}_3^-$  の濃度を測定した (Akaike et al, 1997)。

### 2.11.2 電子スピン共鳴 (ESR) による NO の測定

腫瘍移植後 14 日目の固型腫瘍に対し、ZnPP IX 投与 24 時間後（投与法は前述）の NO 産生を、ジチオカーバメート-Fe 錯体を NO のスピントラップ剤として、ESR 法により直接測定した (Akaike et al., 1996)。

担癌ラットの後肢に、*N*-(dithiocarboxy) sarcosine (DTCS) (180 mg/kg) と FeSO<sub>4</sub> (40 mg/kg) の混懸液を筋肉内投与し、その 30 分後にジエチルエーテル麻酔下に固型腫瘍を摘出し、石英サンプル管に入れ、液体窒素中で凍結した。ESR の測定は X-band ESR spectrometer (Bruker ESP 380E; Rheinstene, Germany) を用いて、110 K で行った。ESR の測定条件は、microwave power 20 mW、modulation amplitude 0.5 mT で、磁場は TCNQ-Li salt ( $g=2.00252$ ) を用いて校正した。

### 2.12 腫瘍血流の測定

腫瘍移植後 14 日目の固型腫瘍に対し、ZnPP IX および L-NAME を投与した時の血流の変化を経時的に測定した。投与前および、投与後 1、3、6、12、24 時間に、ジエチルエーテル麻酔下に、ニードル型のレーザードップラープローブ (Advance, model NS, 幅:1.0 mm、長さ:5 mm, Tokyo, Japan) を直接腫瘍に穿刺し、レーザードップラーフローメーター (Advance Laser Flow Meter, ALF21) にてデータ解析を行った。ここで得られた血流は、毛細血管レベルの血流を反映しており、組織 100 mg 中における 1 分間あたりの血流として表現した (ml/min/100 mg tissue)。

### 2.13 ウェスタンブロッティング

HO-1 および HSP70 タンパクの変動を解析するために、ウエスタンブロッティングを行った。

### 2.13.1 準備

HO-1 および HSP70 両者におけるポジティブコントロールとして、42°C下で 30 分間培養した後（熱ショック）、37°Cに戻し、さらに 6 時間培養した細胞を用いた。このコントロール細胞と、ZnPP IX または NO ドナーで 6 時間処理した細胞（投与方法は前述）を PBS にて 2 回洗浄した後、0.4 M NaCl, 10% glycerol, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin and 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)含有 20 mM Hepes (pH 7.5)を抽出緩衝液として加え、凍結融解を 4 回くり返し、cell lysate を調整した。4°C、13,000×g で 30 分間遠心分離し、上清を-80°Cで保存した。また、ZnPP IX および NOS 阻害剤で処理して 24 時間後の固型腫瘍（投与法は前述）、虚血処理後 24、48 時間（処理法は前述）およびそのコントロールに対しては、組織の 3 倍量の 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 2 mM PMSF and 10 µg/ml leupeptin 含有 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)をホモジネート緩衝液として加え、ポリトロンホモジナイザーにて氷上でホモジナイズした。4°C、10,000×g にて 30 分間遠心分離し、上清の半分は HSP70 用にそのまま-80°Cで保存した。残りの半分は HO-1 用にさらに 4°C、105,000×g にて 60 分間遠心分離した。得られたミクロソーム画分に、固型腫瘍の 1/3 量の 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)を加え、ソニケーターにて 2 秒間ソニケーションを行い、-80°Cで保存した。

### 2.13.2 ウエスタンブロッティング

タンパク 25 µg を HSP70 は 10%、HO-1 は 12%の SDS ポリアクリルアミドゲ

ルにて電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、セミドライ法にて Immobilon™ polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Co., Ltd., Bedford, MA) に転写した。2% bovin albumin、5% スキムミルク含有 tris buffered saline (TBS) にて室温にて 60 分間ブロッキングした後、HSP70 に対しては、抗ラット HSP70 マウスモノクローナル抗体 (SPA-810, Stressgen, Victoria, BC, Canada)、HO-1 に対しては、抗ヒト HO-1 ラビットポリクローナル抗体 (OSA-150, Stressgen, Victoria, BC, Canada) にて、それぞれ、1000 倍、5000 倍の濃度で 4°C、一晩反応させた。Tween 20 TBS (TTBS) にて、15 分間 3 回洗浄した後、1000 倍濃度の 2 次抗体 (HSP70 ; 抗マウス IgG 抗体、HO-1 ; 抗ラビット IgG 抗体) にて室温 60 分間反応させた。再度 TTBS にて、15 分間 3 回洗浄した後、ECL system (Amersham International plc, Buck, UK) を用いて目的のタンパクを検出した。

#### 2.14 統計処理

統計学的有意差は two-tailed unpaired *t*-test (ヒト症例のみ paired *t*-test) および ANOVA を用いて検討した。*P* 値は 0.05 未満を有意とした。

## 第 3 章 実験結果

### 3.1 固型腫瘍および正常臓器の HO 活性

#### 3.1.1 ラット AH136B 腫瘍

図 2A に、AH136B 腫瘍細胞移植後 14 日目における固型腫瘍と、肝臓および脾臓の HO 活性を示した。それらの活性は、固型腫瘍 :  $5.254 \pm 0.796$ 、肝臓 :  $2.057 \pm 0.718$ 、脾臓 :  $5.369 \pm 1.487$  nmol bilirubin/h/mg protein で、本固型腫瘍は脾臓とほぼ同レベルで、肝臓と比較し有意に高い活性を示した。また、反応液中に HO 阻害剤である ZnPP IX を  $30 \mu\text{M}$  加えた場合、この活性はいずれの組織においても 90%以上の抑制率を示した。この結果より、本固型腫瘍において、HO は何らかのメカニズムによって発現誘導されており、何らかの生理作用を発揮しているものと考えられた。

#### 3.1.2 マウス S-180 腫瘍

図 2B に、S-180 腫瘍細胞移植後 14 日目における固型腫瘍と、肝臓の HO 活性を示した。その結果、固型腫瘍 :  $2.773 \pm 0.290$ 、肝臓 :  $1.328 \pm 0.130$  nmol bilirubin/h/mg protein で、本固型腫瘍も AH136B の場合と同様に肝臓と比較し有意に高い活性を示した。ただし、活性値そのものは AH136B よりも低値を示した。

#### 3.1.3 ウサギ VX-2 腫瘍

図 2C に、VX-2 腫瘍片移植後 14 日目における固型腫瘍と、肝臓の HO 活性

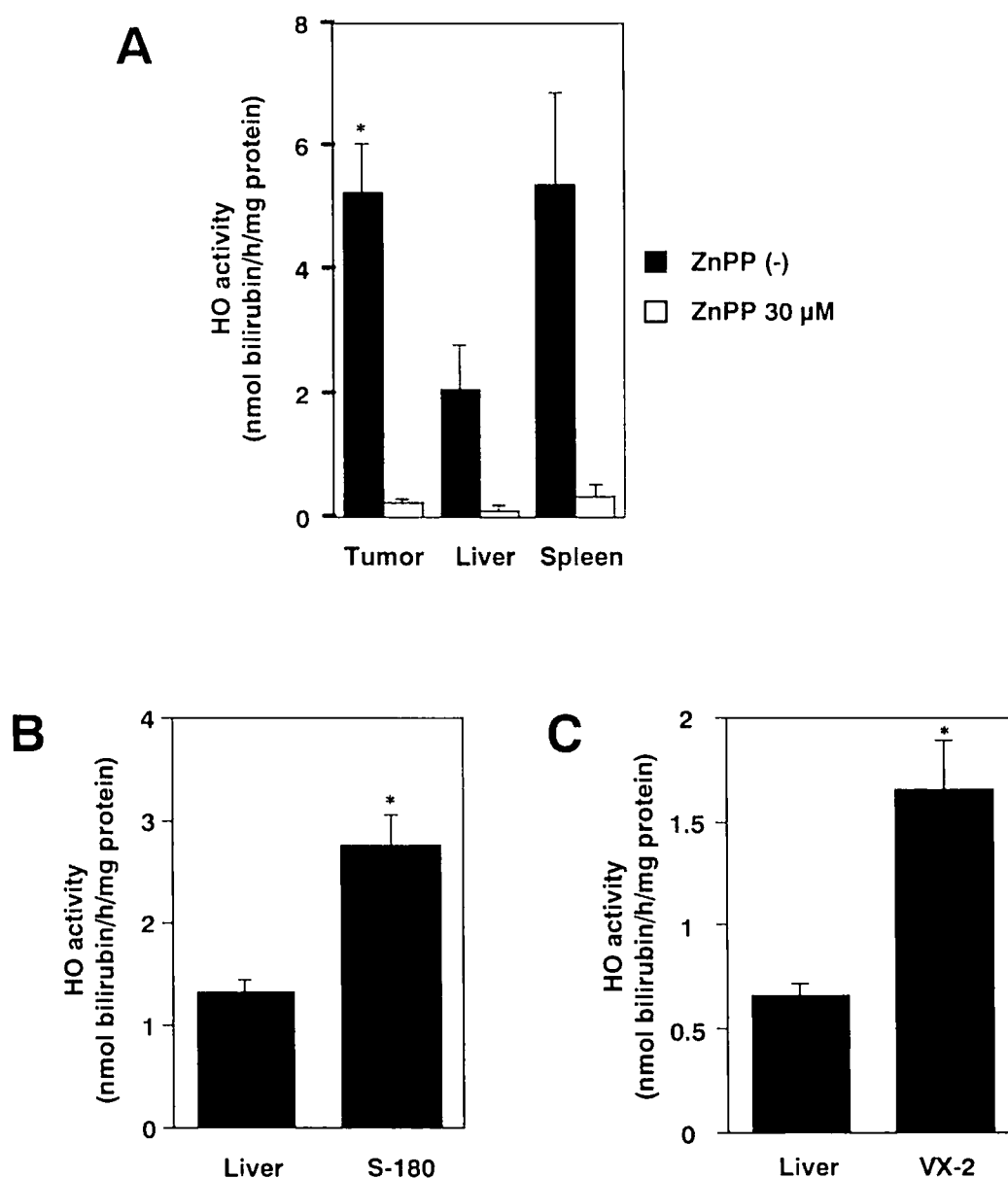


図2 ラット、マウス、ラビットにおける腫瘍のHO活性

(A) ドンリュウラットの正常肝臓、正常脾臓および足背移植後14日目のAH136B固型腫瘍のHO活性を示した。(＊印： $P < 0.05$ 対正常肝臓、全て $n=8$ )  
 (B) ddYマウスの正常肝臓および背部に移植後14日目のS-180固型腫瘍のHO活性を示した。(＊印： $P < 0.01$ 対正常肝臓、全て $n=8$ ) (C) New Zealand White rabbitの正常肝臓および移植後14日目のVX-2固型腫瘍のHO活性を示した。(＊印： $P < 0.01$ 対正常肝臓、全て $n=8$ )

を示した。その結果、固型腫瘍：1.658 ± 0.397、肝臓：0.663 ± 0.110 nmol bilirubin/h/mg protein で、やはり本固型腫瘍も AH136B や S-180 の場合と同様に肝臓と比較し有意に高い活性を示した。ただし、活性値そのものは AH136B よりも低値を示した。

### 3.2 ZnPP IX 動注による AH136B 固型腫瘍の治療実験

AH136B 固型腫瘍において、HO-1 が保護的に作用しているか否かを確かめるために、本腫瘍細胞を足背に移植して7日目の固型腫瘍担癌ラットに対し、ZnPP IX (500 µg/kg) または vehicle (溶媒、コントロール) を経動脈的に投与した後の腫瘍の発育経過を観察した。その結果を図3に示した。非常に興味深いことに、コントロール群がその後も順調に腫瘍の増殖を示したのに対し、ZnPP IX 投与群においては、投与後の増殖が有意に抑制された。この知見より、本固型腫瘍においては、HO が腫瘍増殖に深く関与していることが示された。

### 3.3 AH136B 固型腫瘍における ZnPP IX 誘発性アポトーシス

AH136B 固型腫瘍担癌ラットに対し、ZnPP IX (500 µg/kg)、CuPP IX (500 µg/kg) または vehicle (溶媒、コントロール) を投与して24時間後の腫瘍組織のTUNEL染色像を図4Aに示した。コントロール (a) と CuPP IX (c) 投与後の腫瘍組織においては、ほとんどアポトーシス陽性細胞を認めないのに対して、ZnPP IX (b) 投与後の腫瘍組織には、暗青色に染色されるアポトーシス陽性細胞の散在を認めた。

これを方法で述べた通り定量化した結果、コントロール群 (14 ± 2 /mm<sup>2</sup>) および CuPP IX 投与群 (20 ± 4 /mm<sup>2</sup>) に対し、ZnPP IX 投与群において有意

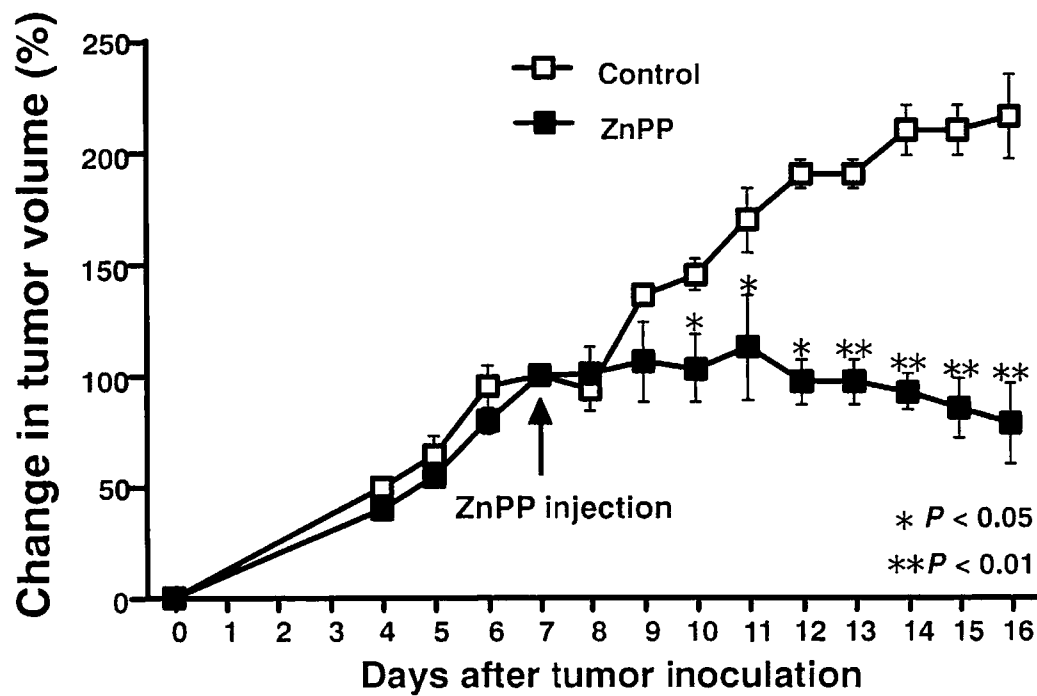
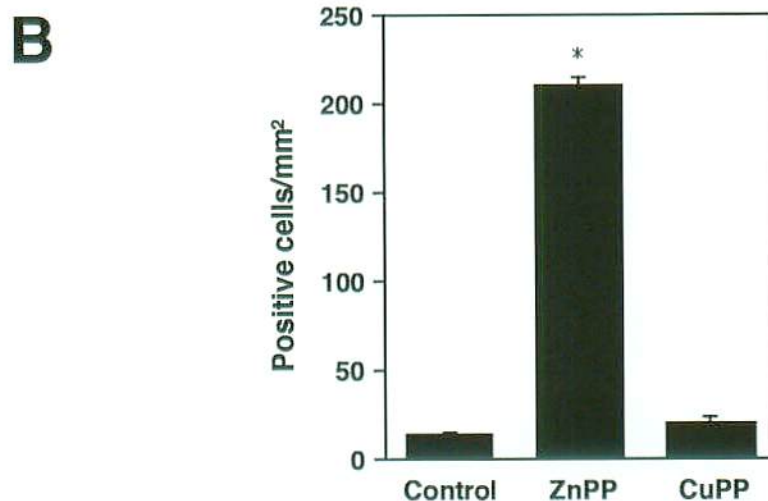
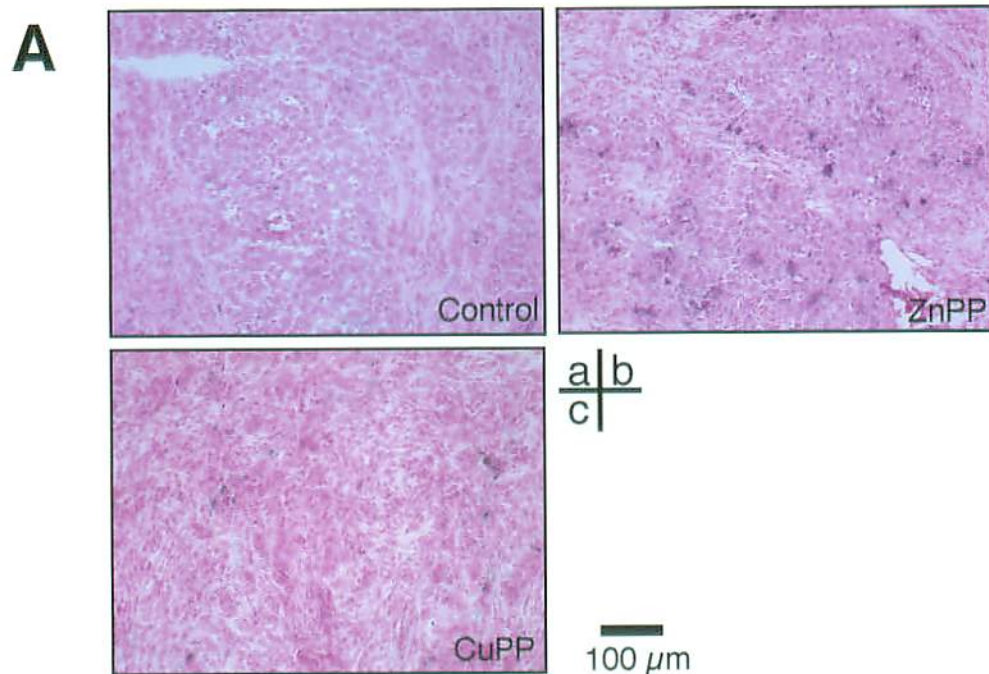


図3 AH136B固型腫瘍増殖におけるZnPP IXの治療効果

AH136B細胞をラットの足背に移植して7日目の固型腫瘍担癌ラットに対し、vehicle (コントロール) もしくはZnPP IX (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を図1のようにそれぞれ総腸骨動脈より投与した。(\*印:  $P < 0.05$ 、\*\*印:  $P < 0.01$  対コントロール群、両群とも  $n=4$ )





**図4 AH136B固型腫瘍におけるZnPP IXによるアポトーシスの誘導**  
 AH136B細胞を皮下移植して14日目の固型腫瘍担癌ラットに対し、vehicle (A; a)、ZnPP IX (500  $\mu$ g/kg i.a.) (A; b)、CuPP IX (500  $\mu$ g/kg i.a.) (A; c) をそれぞれ経動脈的に投与して24時間後のTUNEL染色を (A) に示した。(B) には、それを定量化した結果を示した。それぞれの標本について異なる4視野 ( $\times 100$ 倍) におけるTUNEL陽性細胞数をカウントし、1 mm<sup>2</sup>あたりのTUNEL陽性細胞数に換算した。(\*印:  $P < 0.01$ ) (すべて  $n=3$ )

にアポトーシス陽性細胞数の増加 ( $210 \pm 6 / \text{mm}^2$ ) を認めた (図 4B)。

### 3.4 ZnPP IX、CuPP IX 投与後の AH136B 固型腫瘍の HO 活性

3.3 と同様の処理を行った固型腫瘍における HO 活性を測定した結果を図 5 に示した。その結果、CuPP IX 投与群 ( $10.1 \pm 0.8 \text{ nmol bilirubin/h/mg protein}$ ) は、コントロール群 ( $9.6 \pm 0.5 \text{ nmol bilirubin/h/mg protein}$ ) とほぼ同レベルであったのに対し、ZnPP IX 投与群 ( $6.0 \pm 1.0 \text{ nmol bilirubin/h/mg protein}$ ) においては、有意に HO 活性が抑制されていた。

### 3.5 AH136B 培養細胞における ZnPP IX 誘発性アポトーシス

AH136B 細胞を  $0.1 \sim 100 \mu\text{M}$  ZnPP IX、 $0.1 \sim 100 \mu\text{M}$  SnPP IX、 $100 \mu\text{M}$  CuPP IX および vehicle (コントロール) にて 24 時間培養した時のアポトーシス陽性率を図 6A に示した。方法に述べた通り、 $\times 100$  倍 4 視野中の総細胞数における TUNEL 陽性細胞数の割合をアポトーシス陽性率とした。その結果、CuPP IX 群 ( $8.1 \pm 1.3 \%$ ) はコントロール群 ( $6.6 \pm 3.8 \%$ ) とほぼ同レベルであったのに対し、ZnPP IX 群では、 $1 \mu\text{M}$  以上で濃度依存性に有意にアポトーシスが誘導され ( $1 \mu\text{M}: 19.6 \pm 0.3\%$ ,  $10 \mu\text{M}: 27.1 \pm 0.6\%$ ,  $100 \mu\text{M}: 46.7 \pm 4.2\%$ )、SnPP IX 群も同様であった。しかし、ZnPP IX  $100 \mu\text{M}$  と同時にカスパーゼ 3 阻害剤 ( $1 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ) を加えて培養した場合は、アポトーシス陽性率はコントロールレベルまで抑制された ( $1 \mu\text{M}: 7.5 \pm 1.2\%$ ,  $10 \mu\text{M}: 7.1 \pm 1.5\%$ )。

また、ZnPP IX、SnPP IX および CuPP IX で同様に処理した時の生細胞率をトリパンブルー染色にて定量した。その結果、やはりアポトーシス陽性率とは逆に、ZnPP IX および SnPP IX 濃度依存性に生細胞率の低下を認めた (図 6A,B

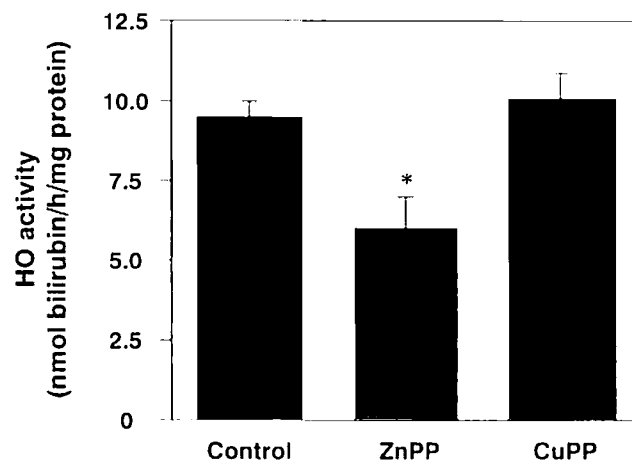


図5 AH136B固型腫瘍におけるZnPP IX、CuPP IX投与後のHO活性

図4と同様に、AH136B固型腫瘍担癌ラットに対し、vehicle、ZnPP IX (500  $\mu\text{g/kg}$  i.a.)、CuPP IX (500  $\mu\text{g/kg}$  i.a.) をそれぞれ経動脈的に投与して24時間後の固型腫瘍のHO活性を測定した。（\*印： $P < 0.05$ 対コントロール群・CuPP IX群、全て $n=5$ ）

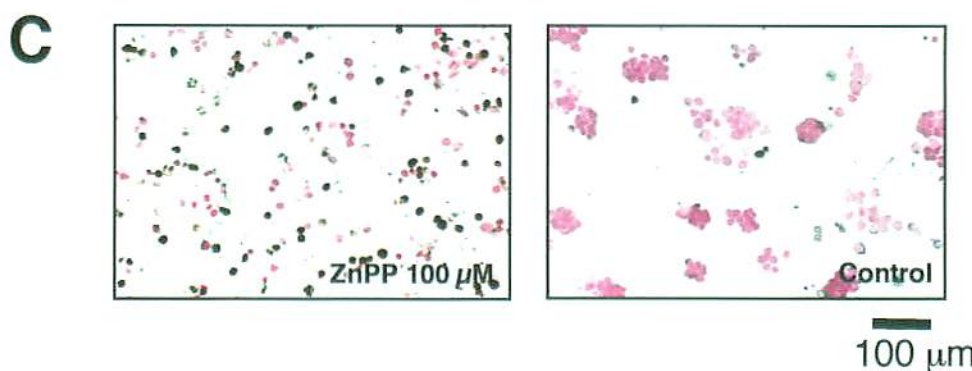
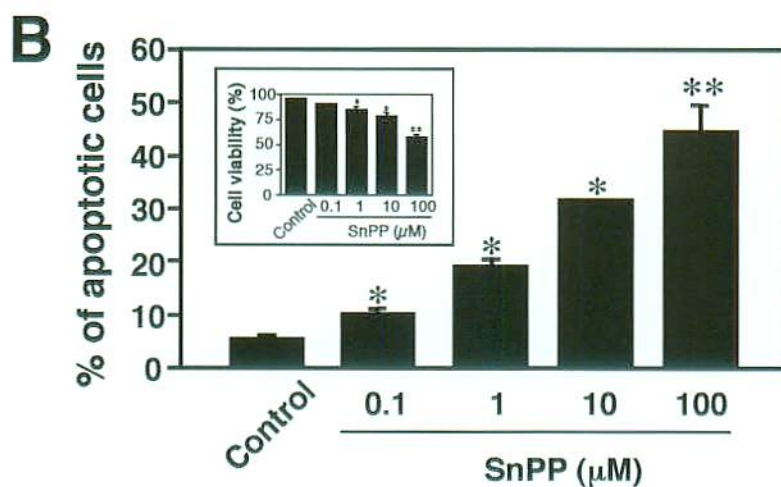
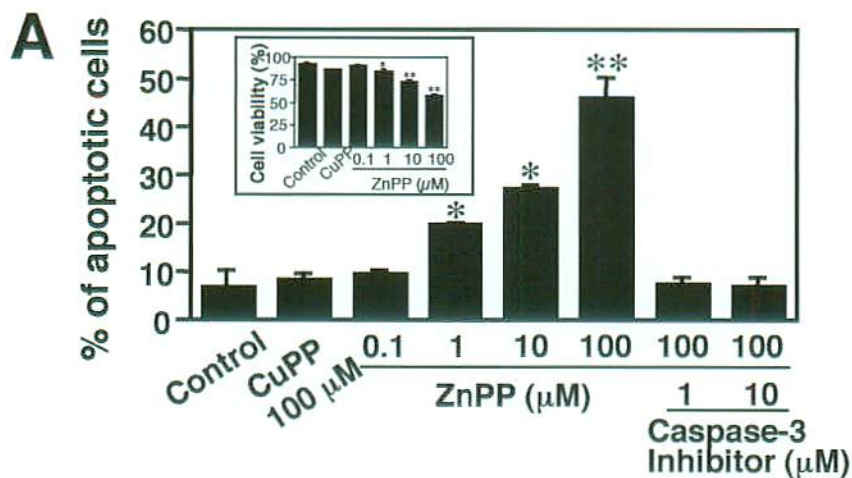


図6 AH136B腫瘍細胞におけるZnPP IX、CuPP IX処理後のTUNEL染色

(A) AH136B細胞を、ZnPP IX (0.1-100  $\mu$ M)、CuPP IX (100  $\mu$ M)、カスパーゼ3阻害剤 (1-10  $\mu$ M) にて24時間培養した後TUNEL染色を行った。それぞれの標本の異なる4視野 ( $\times 100$ 倍率) における全細胞数および全TUNEL陽性細胞数をカウントし、その合計でTUNEL陽性率を算出した。(\*印:  $P < 0.05$  対コントロール群・CuPP IX群、全て  $n=3$ ) Insetには、ZnPP IX (0.1-100  $\mu$ M)、CuPP IX (100  $\mu$ M) にて処理した時の細胞生存率を示した。細胞の生存はトリパンプブルー染色にて確認した。(\*印:  $P < 0.05$ 、\*\*印:  $P < 0.01$  対コントロール群・CuPP IX群、全て  $n=4$ ) (B) Aと同様にSnPP IXにて培養した場合のTUNEL染色結果を示した。(\*印:  $P < 0.05$ 、\*\*印:  $P < 0.01$  対コントロール群全て  $n=4$ ) (C) ZnPP IX 100  $\mu$ Mおよびコントロールにおける実際のTUNEL染色像を示した。

Inset)。

図 6C には、コントロールと ZnPP IX 100  $\mu$ M における実際の TUNEL 染色像を示した。コントロールにおいては、ほとんどの細胞が島状の発育を示し、極わずかの TUNEL 陽性細胞しか認められないのに対し、ZnPP IX 処理後はほとんど島状形成がなく、多数の暗青色に染色される TUNEL 陽性細胞が認められた。

### 3.6 ZnPP IX、CuPP IX 処理後の AH136B 培養細胞の HO 活性

3.5 と同様の処理を行った AH136B 細胞の HO 活性を図 7 に示した。その結果、1  $\mu$ M 以上の ZnPP IX 処理にて、濃度依存性に有意な HO 活性の低下を認めた (コントロール:  $0.92 \pm 0.067$ 、0.1  $\mu$ M:  $0.81 \pm 0.023$ 、1  $\mu$ M:  $0.59 \pm 0.041$ 、10  $\mu$ M:  $0.40 \pm 0.014$ 、100  $\mu$ M:  $0.08 \pm 0.004$  nmol bilirubin/h/mg protein)。一方、CuPP IX 100  $\mu$ M 処理では HO 活性に有意な変化は認められなかった (CuPP IX:  $0.88 \pm 0.067$  nmol bilirubin/h/mg protein)。この結果は、3.5 に示したアポトーシス陽性率と逆の相関を示した。つまり、HO 活性の低下に伴い、アポトーシス陽性率が上昇していた。また、これは固型腫瘍の場合とも一致する結果であった。

### 3.7 ZnPP IX 処理後の AH136B 培養細胞のカスパーゼ 3 活性

図 6 に示したように、ZnPP IX によって誘導された AH136B 培養細胞のアポトーシスは、カスパーゼ 3 阻害剤によって有意に抑制されたため、次に AH136B 細胞を ZnPP IX 処理した時のカスパーゼ 3 活性を測定した。3.3 と同様に、100  $\mu$ M ZnPP IX、およびそれに加え 1  $\mu$ M または 10  $\mu$ M のカスパーゼ 3 阻害剤にて

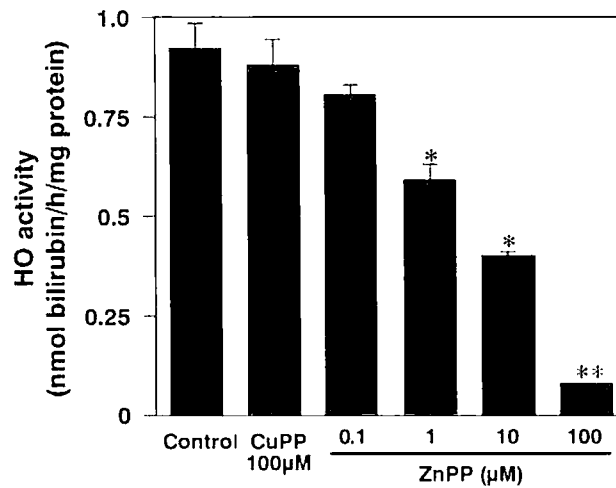


図7 AH136B腫瘍細胞におけるZnPP IX、CuPP IX処理後のHO活性  
 図6と同様に、AH136B細胞を、ZnPP IX (0.1-100 μM)、CuPP IX (100 μM) およびvehicleにて24時間培養した後HO活性の測定を行った。（\*印： $P < 0.05$ 、\*\*印： $P < 0.01$ 対コントロール群・CuPP IX群、全て $n=3$ ）

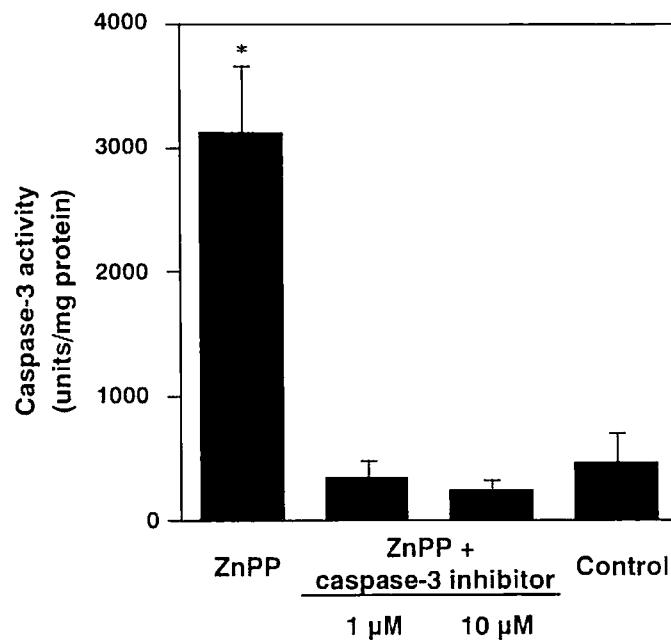


図8 AH136B腫瘍細胞におけるZnPP IX処理後のカスパーゼ3活性  
 AH136B細胞を、ZnPP IX (100 μM)、ZnPP IX (100 μM) +カスパーゼ3阻害剤 (1-10 μM) およびvehicleにて24時間培養した後のカスパーゼ3活性の測定を行った。蛍光基質を用い測定した。（\*印： $P < 0.05$ 対コントロール群・カスパーゼ3阻害剤群、全て $n=3$ ）

24 時間培養した後のカスパーゼ 3 活性を測定した。図 8 に示す通り、100  $\mu$ M ZnPP IX で処理した場合は、コントロールに比較して有意に高いカスパーゼ 3 活性を認めた (ZnPP IX: 3120.4  $\pm$  550.3、コントロール: 471.3  $\pm$  230.6 units/mg protein)。一方、ZnPP IX に 1  $\mu$ M または 10  $\mu$ M のカスパーゼ 3 阻害剤を加えた場合は、共にコントロールレベルと有意差を認めなかった (1  $\mu$ M: 349.1  $\pm$  141.0、10  $\mu$ M: 239.8  $\pm$  81.6 units/mg protein)。これは、図 6 におけるアポトーシス陽性率の結果と一致しており、このことより、ZnPP IX によってもたらされるアポトーシスは、カスパーゼ 3 の活性化を介しているものと考えられた。

### 3.8 ビリルビンによる ZnPP IX 誘発性アポトーシスの抑制作用

ZnPP IX による AH136B 細胞のアポトーシス誘導のメカニズムを解析にする目的で、HO-1 の代謝産物であるビリルビンを培養液中に加え、その効果を調べた。図 9 に、100  $\mu$ M ZnPP IX に様々な濃度のビリルビンを同時に加えて 24 時間培養した後のアポトーシス陽性率を示した。その結果、ビリルビン 1 nM では有意な変化を認めなかったが、10 nM 以上で、アポトーシス陽性率の低下を認めた。これより、本腫瘍細胞においては、HO-1 の代謝によって産生されるビリルビンがアポトーシス抑制性に作用している可能性が示唆された。しかし、その効果には濃度依存性は認められず、ビリルビン 100  $\mu$ M にてもアポトーシス陽性率はコントロールレベルまで完全には抑制されなかったため、ZnPP IX 誘発性のアポトーシスには、ビリルビンのみならず、その他の HO 代謝産物も関与している可能性がある。

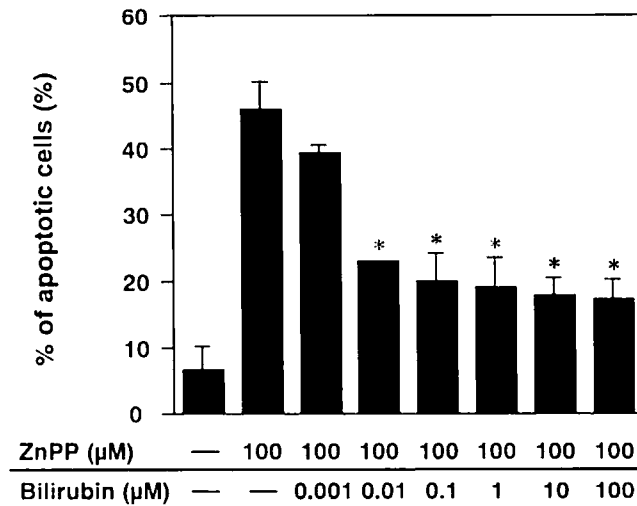


図9 AH136B腫瘍細胞におけるZnPP IX誘導性アポトーシスのビリルビンによる抑制効果

AH136B細胞を、ZnPP IX (100 μM)、ZnPP IX (100 μM) +ビリルビン (0.001-100 μM) およびvehicleにて24時間培養した後にTUNEL染色を行った。TUNEL陽性率は、図6と同様にそれぞれの標本の異なる4視野 (×100倍率) における全細胞数および全TUNEL陽性細胞数をカウントし、その合計で算出した。 (\*印:  $P < 0.05$  対ZnPP IXのみ群、全て  $n=3$ )

表1 AH136B腫瘍細胞培養上清中のビリルビン濃度の測定

AH136B細胞を、ZnPP IX (100 μM) およびvehicleにて24時間培養した後の培養上清中のビリルビン濃度を示した。 (\*印:  $P < 0.05$  対コントロール群、全て  $n=3$ )

	ビリルビン (nM)	SE
コントロール	17.5	2.5
ZnPP IX (100 μM)	3.3 *	1.7



### 3.9 AH136B 培養上清中のビリルビン濃度の測定

3.8 に示したように、10  $\mu\text{M}$  以上のビリルビンにて ZnPP IX 誘導性のアポトーシスが抑制されたため、コントロールおよび ZnPP IX 100  $\mu\text{M}$  における実際の培養上清中のビリルビン濃度を測定した。その結果、表 1 に示したように、コントロールでは  $17.5 \pm 2.5 \text{ nM}$ 、ZnPP IX 100  $\mu\text{M}$  では  $3.3 \pm 1.7 \text{ nM}$  であり、ZnPP IX 100  $\mu\text{M}$  にて、有意に培養上清中のビリルビン濃度が低下した ( $P < 0.05$ )。つまり HO 活性の阻害により AH136B 細胞によるビリルビン産生が抑制されたものと考えられる。

### 3.10 AH136B 固型腫瘍における NO の測定

以前、ZnPP IX が直接的に iNOS を阻害する (Wolff et al., 1996) と報告された。そこで、ZnPP IX によるアポトーシス誘導における NO の関与の有無をみるために、ZnPP IX 投与による腫瘍内 NO の変化を以下の方法で測定した。

#### 3.10.1 マイクロダイアライシス法による NO の測定

ZnPP IX 500  $\mu\text{g/kg}$  を動注前とその 24 時間後にマイクロダイアライシスを行い、透析液中の  $\text{NO}_2^-$  と  $\text{NO}_3^-$  を HPLC にて測定した。その結果、図 10 に示す通り、本固型腫瘍においては ZnPP IX 投与によって、有意な NO 産生の変化は認められなかった。

#### 3.10.2 ESR による NO の測定

マイクロダイアライシスの場合と同様に、ZnPP IX 500  $\mu\text{g/kg}$  またはその

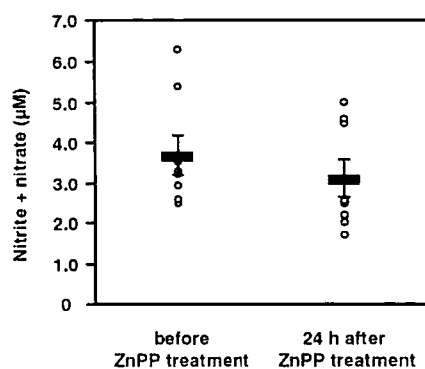


図10 マイクロダイアライシスによるAH136B固型腫瘍のNO産生の観察

ZnPP IX 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ を動注前と動注24時間後に、Eicom社の貫通型ダイアライシスプローブを固型腫瘍に直接留置し、マイクロダイアライシスを行った。透析液にはKrebs-Henseleit bicarbonate bufferを用い、流速2  $\mu\text{l}/\text{min}$ で15分間透析を行った。回収した透析液中の $\text{NO}_2^-$ と $\text{NO}_3^-$ をHPLCにて測定した。

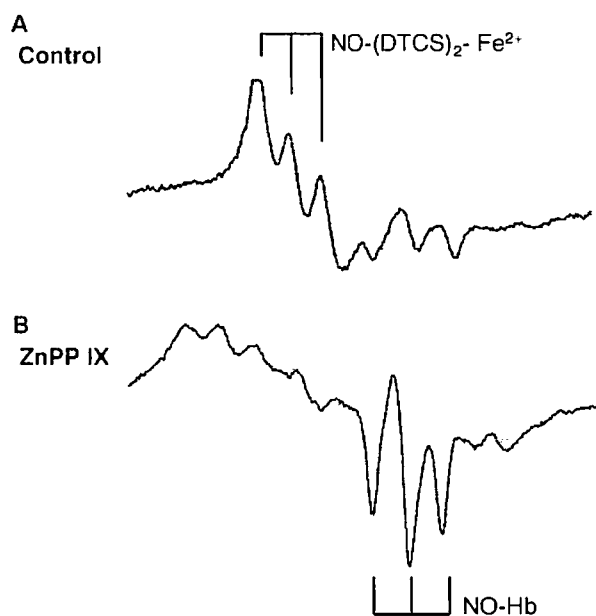


図11 ESRによるAH136B固型腫瘍のNO産生の観察

ZnPP IX 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (B) またはそのvehicle (A) を動注して24時間後の固型腫瘍のNOをESRにて測定した。NOの産生は、スピントラップ剤としてDTCS-Fe<sup>2+</sup>のニトロシルアダクトとして検出した。DTCS-Fe<sup>2+</sup>投与30分後に固型腫瘍を摘出し、X-band Bruker ESR spectrometer (ESP 380E) により、110 KでESRを測定した。

vehicle を動注して 24 時間後の固型腫瘍の NO を ESR にて測定した。NO の産生は、DTCS-Fe<sup>2+</sup>のニトロシルアダクトとして検出した。その結果、図 11 に示す通り、コントロール群 (vehicle) においては、3 本線の hyper fine structure を伴った大きな NO の DTCS-Fe<sup>2+</sup>付加体由来の ESR シグナルを認めた。それに対し、ZnPP IX 投与群においては、明らかな NO の DTCS-Fe<sup>2+</sup>付加体由来の ESR シグナルは認められず、それに置き換わるかのごとく、NO ヘモグロビン由来の強いシグナルを認めた。よって、コントロールと比較した場合、ZnPP IX 投与群では、NO の産生量が減少しているというよりも、何らかの原因で DTCS が腫瘍局所において機能できない環境になっているものと考えられた。

以上、マイクロダイアライシスの結果も踏まえて、少なくとも本固型腫瘍においては、ZnPP IX による明らかな iNOS 抑制作用を示すことができなかった。よって、ZnPP IX による本腫瘍に対するアポトーシス誘導のメカニズムにおいては、NO の関与は否定的と考えられた。

### 3.11 ZnPP IX および L-NAME 投与後の AH136B 固型腫瘍血流の測定

NO は、腫瘍組織を含む様々な組織で血流の維持に関与していることが広く知られている。一方、HO の代謝反応によって生ずる一酸化炭素 (CO) も、肝組織における重要な内因性の血流調節因子であることが報告されている (Suematsu et al., 1994, 1995)。よって、本固型腫瘍においても、NO のみならず CO も血流維持に関与している可能性がある。そこで、その可能性を確かめるために、ZnPP IX (500 µg/kg) または NOS 阻害剤である L-NAME (6mg/kg) を経動脈的に投与した時の腫瘍血流の変化を経時的に測定した。それぞれ投与直後の代表的な血流計の波形を図 12A に示した。L-NAME 投与後は、急速に血流の低下を認めたのに対し、ZnPP IX 投与後は、ほとんど波形の変化は認められなかった。図 12B には、経時的な血流の変化を示したが、L-NAME 投与群で

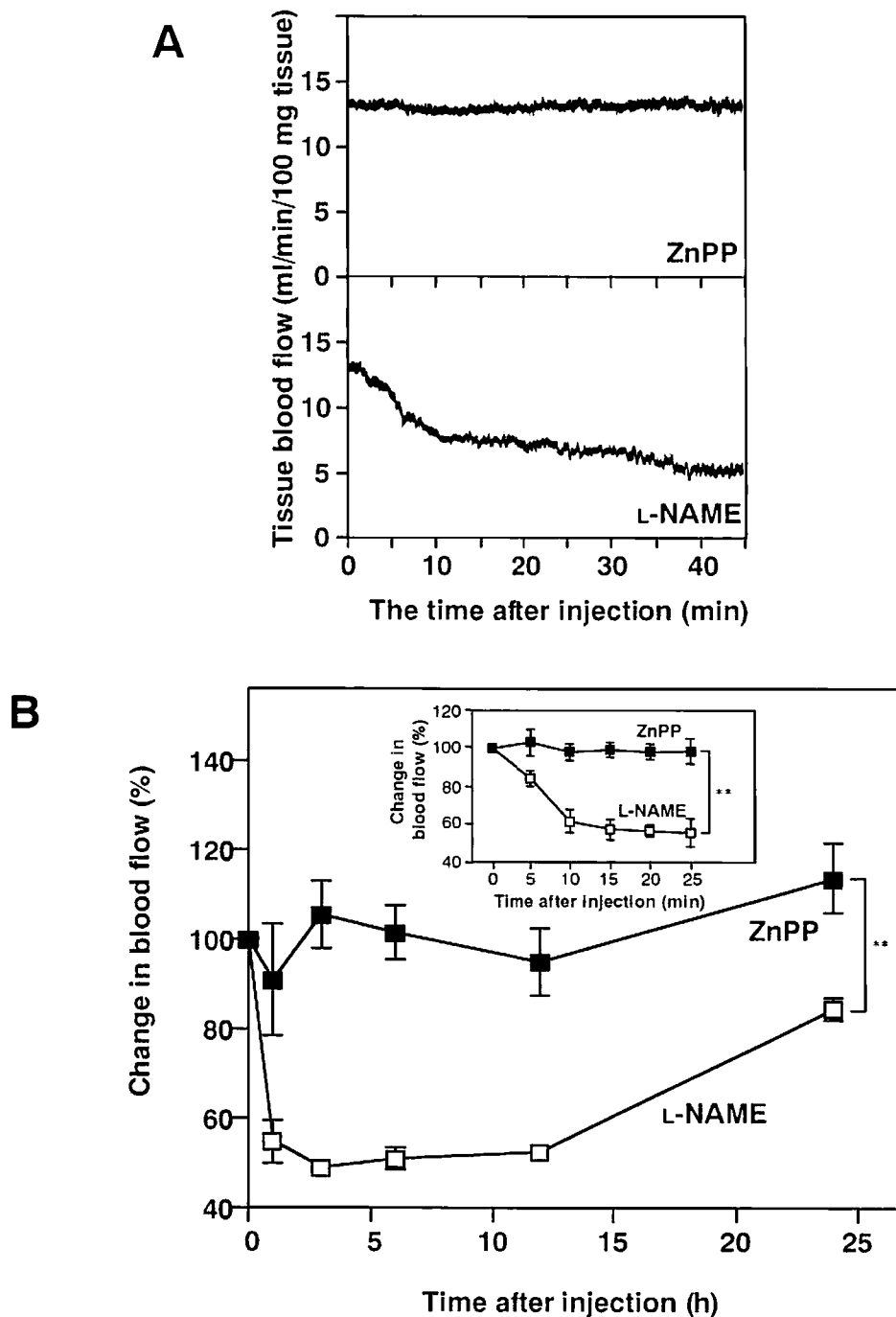


図12 レーザードップラーによるAH136B固型腫瘍の血流の観察  
ZnPP IX 500  $\mu$ g/kgまたはL-NAME 6 mg/kgを動脈投与した時の血流をニードル型のレーザードップラープローブ(Advance)およびレーザードップラーフローメーター(Advance)を用いて測定した。(A)には、投与直後からの連続的な血流の変化を示した。(B)には、投与前および、投与後1、3、6、12、24時間におけるそれぞれの血流を経時的に示した。血流は、毛細血管レベルの血流を反映しており、組織100 mg中における1分間あたりの血流として表現した(ml/min/100 mg tissue)。( \*\*印:  $P < 0.05$  全て  $n=3$  )

は、1 時間で 45%の著明な血流の低下を認め、しかも 12 時間後まで持続したのに対し、ZnPP IX 投与群では、24 時間後まで有意な変化を認めなかった。以上より、本固型腫瘍においては、血流の維持が主に NO によって担われており、CO はほとんど関与していないものと考えられた。

### 3.12 AH136B 培養細胞・固型腫瘍における HO-1 および HSP70 タンパクの発現

HO-1 は、別名熱ショックタンパク(heat shock protein 32: HSP32)として知られており、その他の熱ショックタンパク同様、やはり熱ショックによって誘導されることが知られている。そこで、ZnPP IX 誘発性アポトーシスの発現におけるその他の熱ショックタンパクの関与について検討するため、今回特に HSP70 に着目して、その発現をウエスタンブロッティング法にて検出した。

#### 3.12.1 熱ショックによる HO-1 および HSP70 タンパクの誘導

図 13A に示すように、HO-1 および HSP70 は本腫瘍細胞においては無刺激の状態でも高発現していることがわかった。さらに、熱ショックを加えた場合は、両者共に発現の増強を認めた。

#### 3.12.2 NO ドナーによる HO-1 および HSP70 タンパクの発現変化

HSP70 は、HO-1 と同様に、NO によって誘導されることがすでに報告されている。そこで、本腫瘍細胞にける HSP70 発現に対する NO の影響を検討するため NO ドナーを用いて解析した。HO-1 については、図 13A 上段に示す通り、10  $\mu$ M、100  $\mu$ M の SNAP および P-NONONOate 刺激によって、濃度依存性に発現の

増強を認めた。しかし、HSP70 においては、下段に示す通り、いずれの NO ドナー刺激によっても、発現に明らかな変化は現れなかった。

### 3.12.3 ZnPP IX による HSP70 タンパクの発現変化

HSP70 は、HO-1 と同様、種々の細胞においてアポトーシスを抑制すると報告されているため、今回の ZnPP IX による本腫瘍細胞のアポトーシス誘導機構において HSP70 タンパクレベルに変化があるかどうかを調べた。その結果を図 13A 下段に示すが、100  $\mu$ M ZnPP IX 刺激によっても、HSP70 はほとんど変化しないことがわかった。さらに、図 13B に示す通り、固型腫瘍においても 500  $\mu$ g/kg ZnPP IX 投与にて HSP70 タンパクに変化は認められなかった。よって、ZnPP IX による本腫瘍のアポトーシス誘導のメカニズムには少なくとも HSP70 の関与は否定的であると考えられた。

### 3.12.4 AH136B 固型腫瘍における HO-1 および HSP70 タンパクの発現

本固型腫瘍組織においては、図 10、11 にも示した通り、高濃度の NO が常に産生されている。*in vitro* においては、NO ドナーによって HO-1 は誘導されるが HSP70 は誘導されないことを前に示したが、固型腫瘍レベルで NOS を阻害した場合にはどう変化するかを調べた。NOS 阻害剤としては、L-NAME および SMT の二種類を使用し、それぞれ 6 mg/kg/day を 5 日間腹腔内投与した。その結果、図 13B に示す通り、HO-1 においては L-NAME、SMT 両者でその発現が抑制されたが、HSP70 においては逆に L-NAME、SMT 両者でその発現が増強した。これは、局所における NO の低下に伴う血流障害による二次的な変化である可能性が考えられる。それを証明するために次の実験を行った。

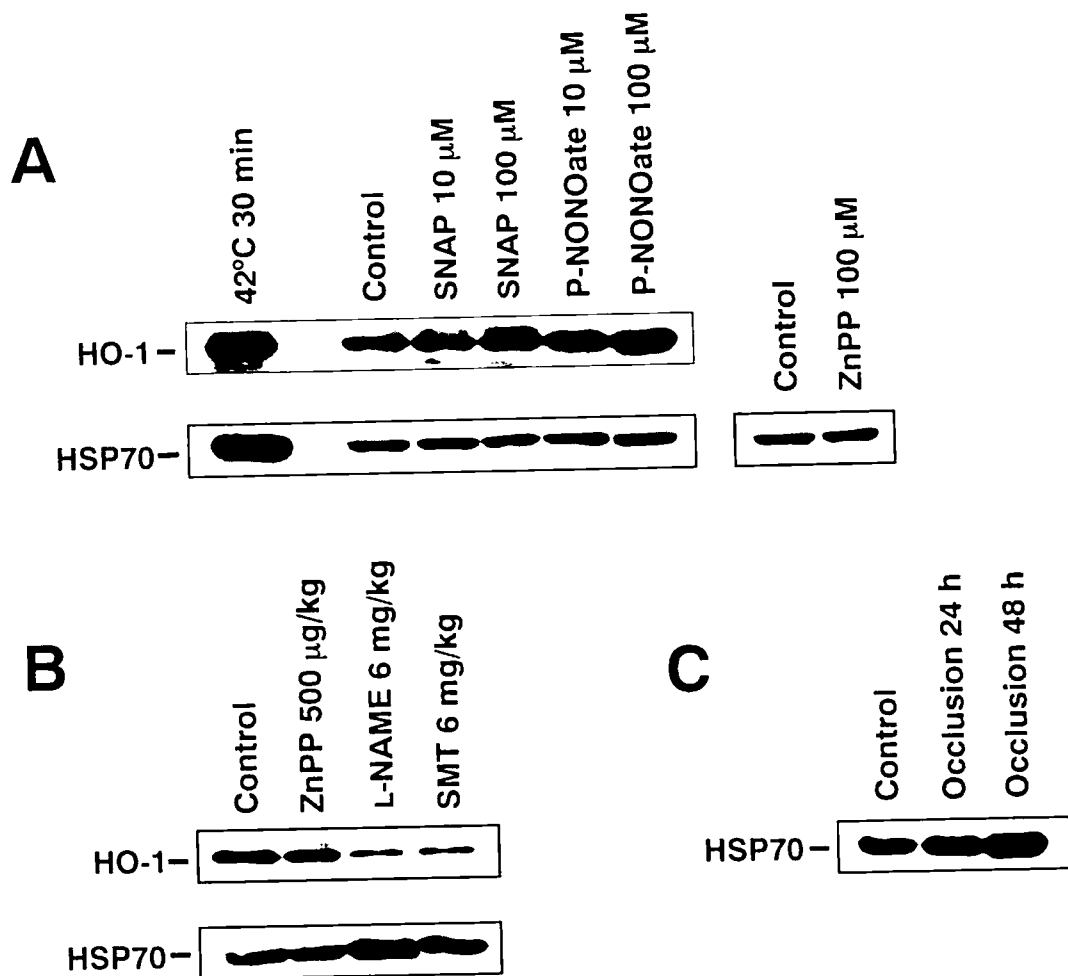


図13 AH136B細胞および固型腫瘍におけるHO-1、HSP70タンパクの発現動態

(A) AH136B細胞を、SNAP (10-100  $\mu$ M)、NOC7 (10-100  $\mu$ M)、ZnPP IX (100  $\mu$ M) 生理食塩水 (コントロール) にて6時間培養した時のHO-1およびHSP70タンパクの発現をWestern blottingにて解析した。また、42°Cにて30分間培養した後37°Cにて6時間培養したものをポジティブコントロールとした。

(B) AH136B固型腫瘍担癌ラットに対して、ZnPP IX (500  $\mu$ g/kg i.a.)、L-NAME (6 mg/kg/day 5日間i.p.)、SMT (6 mg/kg/day 5日間i.p.) を投与した後のHO-1およびHSP70タンパクの発現をWestern blottingにて解析した。コントロールには生理食塩水 (5日間i.p.) を投与した。(C) ラット足背に作成したAH136B固型腫瘍の栄養血管である大腿動脈を結紮して虚血モデルを作成した。血管結紮後24および48時間に腫瘍を採取し、HSP70タンパクの発現をWestern blottingにて解析した。コントロールにはシャム手術を行った。全てのWestern blotting には、抗ヒトHSP70モノクローナル抗体および、抗ラットHO-1ポリクローナル抗体を用いた。また、全ての実験は3回ずつ行ったが、いずれも同様の結果であった。

### 3.12.5 虚血モデルにおける HSP70 タンパクの発現変化

足背に作成した固型腫瘍の栄養動脈である大腿動脈を結紮することにより、虚血モデルを作成した。その結果、図 13C に示す通り、時間とともに 48 時間目まで HSP70 の発現の増強を認めた。以上のように、本腫瘍においては、HO-1 は、その発現制御に NO が優位に作用している可能性が示唆されたが、HSP70 の場合は、その発現に NO はほとんど関与しておらず、熱ショックや虚血などのその他のメカニズムによって優位に制御されているものと考えられた。

### 3.13 消化器癌臨床症例における HO 活性の測定

熊本大学第二外科において手術を施行された胃癌 6 例、大腸癌 6 例、肝細胞癌 2 例について、それぞれの腫瘍組織および非腫瘍組織（胃癌・大腸癌の場合は摘出標本中の病巣より最も離れた正常粘膜を採取した。肝細胞癌の場合は病巣より最も離れた非腫瘍肝組織を採取した。）を約 5 mm 角ずつ採取し、HO 活性を測定した。採取の都合上進行癌のみと限定した。また、ポジティブコントロールには、脾合併切除を行った別の胃癌症例の脾臓を用いた。その結果を表 2 に示した。

まず胃癌症例については、6 例中 5 例が腫瘍組織における HO 活性が正常組織に比較して高い結果となり、統計学的にも、腫瘍組織と正常組織との間には HO 活性に有意な差が認められた ( $P<0.05$ )。しかし、症例によってその値は一定しておらず、また、組織型との明らかな相関も認められなかった。

大腸癌症例については、6 例全例が腫瘍組織の HO 活性の方が高く、やはり有意の差を認めた ( $P<0.05$ )。また、胃癌症例とは少し異なり、症例による値のばらつきが少ない印象を受けた。しかし、やはり組織型との明らかな相関は認められなかった。



一方、肝細胞癌症例においては、胃癌、大腸癌とは異なり、逆に腫瘍組織において HO 活性の低下が認められた。しかしながら、HO 活性そのものはむしろ胃癌や大腸癌よりも高く、非腫瘍組織においても何らかのストレスが加わっている可能性が考えられた。事実、当症例は C 型慢性肝炎患者であり、その炎症ストレスにより非腫瘍肝組織において恒常的に HO-1 の発現が高まっていることが推察された。

表2 臨床症例における固型腫瘍のHO活性

熊本大学第2外科において手術を施行された進行胃癌、大腸癌、肝細胞癌症例の腫瘍および正常組織のHO活性を示した。

症例 No.	年齢	性	組織型 <sup>*</sup>	HO活性 (nmol bilirubin/h/mg protein)		
				腫瘍組織(A)	非腫瘍組織(B)	A/B
				<i>P</i> <0.05 (paired t-test)		
胃癌						
1	36	F	well	1.077	0.466	2.311
2	68	M	mod	1.441	1.578	0.913
3	67	F	por	2.293	1.753	1.308
4	83	M	por	1.058	0.565	1.873
5	64	F	por	0.957	0.901	1.062
6	47	M	sig	1.905	1.414	1.347
				<i>P</i> <0.05 (paired t-test)		
大腸癌						
1	74	F	well	1.202	0.771	1.559
2	71	F	well	1.734	0.731	2.372
3	58	M	mod	1.059	0.711	1.489
4	70	M	mod	1.600	0.480	3.333
5	66	F	mod	1.803	1.678	1.074
6	41	M	por	2.071	0.766	2.704
肝細胞癌						
1	77	M	mod	2.634	5.049	0.522
2	86	M	mod	4.812	5.091	0.953
脾臓 (positive control)					8.179	

\* well : well differentiated adenocarcinoma  
mod : moderately differentiated adenocarcinoma  
por : poorly differentiated adenocarcinoma  
sig : signet ring cell carcinoma

## 第 4 章 考察

### 4.1 総論

最近、正常細胞・組織のみならず、様々な腫瘍細胞や固型腫瘍においても HO-1 の発現に関する報告がみられるようになってきた。しかしながら、腫瘍における HO-1 発現の意義は、ほとんど明らかにされていない。そこで我々は、その発現誘導、アポトーシスあるいは血流の抑制という観点から、腫瘍における HO-1 の病態生理学的意義について解析を行った。

HO-1 のアポトーシスへの関与については、最近、血管内皮細胞や線維芽細胞などにおける TNF- $\alpha$  誘発性のアポトーシスに対し、HO-1 が抑制的に作用していると報告されている (Soares et al., 1998; Petrache et al., 2000)。これらの報告は、AH136B 固型腫瘍に対する ZnPP IX の抗腫瘍増殖効果が、HO-1 のもつ抗アポトーシス作用の阻害によりもたらされていることを示唆するものである。実際、AH136B 腫瘍細胞を HO 阻害剤である ZnPP IX で処理することにより著明にアポトーシス誘導が認められた。さらに、HO-1 の代謝における最も重要な産物の一つであるビリルビンを、ZnPP IX とともに培養液中に投与すると、有意にアポトーシスが低下した。この知見は、本腫瘍細胞において高発現されている HO-1 がその代謝産物であるビリルビンの生成を介して抗アポトーシス作用を発揮していることを示している。

また、ZnPP IX 処理にて、AH136B 細胞内のカスパーゼ 3 活性は有意に上昇しており、カスパーゼ 3 阻害剤の同時投与によってその活性は完全に抑制された。従って、HO-1 によるアポトーシス抑制作用は、カスパーゼカスケードを抑制することにより発現されているものと考えられた。

一方、HO-1 のヘム分解における重要な産物である CO は、NO と同様に血管拡張作用を持つことが報告されており、固型腫瘍においても CO が血流調節因

子として機能する可能性もある。そこで、HO-1 の腫瘍血流への関与をみるために、ZnPP IX 投与による腫瘍局所の血流の変化を解析した。その結果、NOS 阻害剤の投与では劇的な腫瘍血流の低下を認めたにもかかわらず、ZnPP IX の投与によっては腫瘍血流には影響は認められなかった。従って、少なくとも本固型腫瘍においては、HO-1 のヘム分解作用によって生ずる CO の血流維持作用への関与はなく、ZnPP IX による腫瘍増殖抑制効果は、HO-1 の抗アポトーシス作用の抑制によりもたらされているものと思われた。

また、HO-1 のみならず他の熱ショックタンパクの腫瘍発育における役割を検討した。そのため、HO-1 と同様に様々な細胞において発現が指摘され、しかも抗アポトーシス作用を持つと報告されている HSP70 (Schlesinger, 1990; Xu et al., 1997; Jaattela et al., 1992; Mosser et al., 1997; Jaattela et al., 1998) についてその発現を調べた。その結果、AH136B においては、NO によってその発現に変動を認めず、むしろ虚血刺激によってその発現が調節されていた。また、ZnPP IX によって HSP70 タンパクレベルは変動を示さず、ZnPP IX 誘発性のアポトーシスにおいては HSP70 の関与は否定的であると考えられた。

以上より、HO-1 は AH136B 腫瘍細胞および固型腫瘍において、その抗アポトーシス作用により自己を防御することでその増殖を維持していることが示唆された。

#### 4.2 ビリルビンの抗酸化作用

ZnPP IX によって誘導されたアポトーシスは、ビリルビンを加えることにより是正されたことを示した。ビリルビンはヒトの血清中で最も強い抗酸化作用を示し、組織中に最も豊富に存在する内因性の抗酸化物質であると報告されている (Gopinathan et al., 1994)。事実、ビリルビンは、各種抗酸化物質の中でも、活性酸素や過酸化ラジカルに対して最も強い消去活性を示す (Farrera et al., 1994)。また、活性酸素種が、種々の炎症反応やアポトーシスを誘導すること

は広く知られていることであり (Buttke and Sandstrom, 1994)、ビリルビンが proapoptotic な活性酸素種を抑制することにより抗アポトーシス活性を発揮することも推察される。その他、ビリルビンは、パーオキシナイトライトによるタンパクの過酸化を抑制したり (Minetti et al., 1998)、過酸化水素による神経細胞傷害を抑制する (Dore et al., 1999) など、様々な組織や細胞において保護的に作用しているものと考えられる。

しかしながら、一方ではビリルビンは新生児の血清中に蓄積し、黄疸を引き起こすという toxic な側面も持ち合わせている物質である。特に、その血清中濃度が高くなると、ビリルビンは選択的に大脳基底核に沈着し、神経毒性を発揮する。これがいわゆる核黄疸である (Gourley, 1997)。それでは、なぜ新生児には生理的に黄疸が生ずるのだろうか。生理的黄疸においてビリルビンは毒性域には達しないレベルで保護的作用を示しているかもしれない (Newman and Maisels, 1992)。私の実験でも、ビリルビンが ZnPP IX によってもたらされるアポトーシスの発生率を有意に抑制したが、その抑制率にはあまり明確な濃度依存性が認められなかった。すなわち、ビリルビンの濃度が、10 nM~100  $\mu$ M まで、いずれも同程度のアポトーシス抑制率を示した。このデータを支持するように、ビリルビンによる神経細胞保護作用が、250 nM 以上の濃度で減弱してくることが報告されている (Dore et al., 1999)。

#### 4.3 CO による抗アポトーシスと ZnPP IX の血流阻害作用

HO-1 の抗アポトーシス作用には、ビリルビンのみならず、HO-1 の酵素代謝産物である一酸化炭素 (CO) が関与している可能性もある。事実、TNF- $\alpha$  刺激により誘導される線維芽細胞や血管内皮細胞のアポトーシスが、CO の暴露によって抑制されたり (Petrache et al., 2000; Brouard et al., 2000)、低濃度の CO に暴露することによって、高圧酸素ストレスによる肺傷害を軽減させることができる (Otterbein et al., 1999) という報告もある。従って、私の実験において、

ZnPP IX によって誘導されたアポトーシスがビリルビンによって完全に是正されなかった原因としては、CO の関与が示唆されるところである。

また CO は、元来神経伝達物質の一つとして注目されてきたものであるが、最近では、肝臓の微少循環における内因性の循環調節因子としても注目されている (Suematsu et al., 1994, 1995)。さらに、ZnPP IX が、HO-1 抑制作用とは無関係に腫瘍血流を低下させる作用があると報告されている (Tozer et al., 1998)。そこで、ドップラー血流測定器を用いて、ZnPP IX 投与による腫瘍血流の変化を観察した。その結果、L-NAME を投与したラットの腫瘍血流は急速な低下を示したのに対し、ZnPP IX を投与しても、腫瘍の血流はほとんど大きな変化を示すことなく経過した。このことより、私の用いた固型腫瘍モデルにおいては、CO よりも NO が優位に血流の調節を行っているのではないかと考えられる。すなわち、本固型腫瘍における ZnPP IX による抗腫瘍効果のメカニズムにおいて、CO/NO の阻害あるいは ZnPP IX による直接的な血流阻害は関与していないものと思われた。

#### 4.4 HO-1 由来の鉄の生理学的意義

HO-1 によるヘム代謝では、ヘムが分解されて、ビリベルジン、CO のみならず、鉄イオン( $\text{Fe}^{2+}$ )も産生される。鉄イオンは、フェントン反応により、ヒドロキシラジカルを産生するなど、酸化反応を触媒する作用を有している (Gutteridge et al., 1981, 1982)。このような、生体にとっては有害な反応性鉄イオンを産生する HO-1 が、過剰に発現された場合は必ずしも利点ばかりとは言えない、つまり、「諸刃の刃」とも言える二面性を示すことも指摘されている (Suttner and Dennery, 1999; Dennery et al., 1997; da, Silva et al., 1996; Suttner et al., 1999)。すなわち、ヘムと反応性鉄とのバランスが HO-1 の抗酸化作用を左右するものであり、比較的低レベルの HO-1 の誘導では、細胞内の反応性鉄イオンの濃度も低く、酸化傷害も軽減できるが、それに反して高度の HO-1 が誘

導されると、反応性鉄イオンが蓄積するため、結果的に酸化ストレスの上昇を来し、細胞傷害作用を示すことも予想される (Suttner and Dennery, 1999)。

#### 4.5 AH136B 腫瘍における HSP70 の生理学的意義

そこで我々は、この HO-1 発現の二面性を補う防御機構が存在するのではないかという仮説をたて、HO-1 と同じく、熱ショックタンパクファミリーの一つとして広く研究されている HSP70 (Schlesinger, 1990; Xu et al., 1997) について解析した。その結果、本腫瘍細胞および固型腫瘍において、HSP70 タンパクの高発現を認め、HSP70 が HO-1 とともに本腫瘍における様々なストレスに対し細胞保護的に作用しているものと思われた。しかしながら、本固型腫瘍においては HO-1 と HSP70 は、多少異なる発現の制御をうけている様であった。例えば NO ドナーにより HO-1 の発現は増強したのに対し、HSP70 はほとんど変化を示さなかった。また、*in vivo* では、NOS 阻害剤により HO-1 の発現は減弱したが、それとは反対に HSP70 の発現はやや増強した。すなわち、HO-1 は NO によって発現誘導されているものと考えられるが、HSP70 については、少なくとも本腫瘍細胞においては NO による直接的な発現の調節はほとんど受けていないものと考えられる。むしろ HSP70 の発現は腫瘍組織における虚血ストレスがその誘導因子となっているものと思われる。事実、HSP70 が虚血や低酸素刺激によって誘導されることが報告されている (Mestril et al., 1994; Uehara et al., 1999)。

さらに、ZnPP IX 誘発性のアポトーシスへの HSP70 の関与についても検討したが、ZnPP IX 投与によって HSP70 レベルは有意に変動しなかった。この結果は、SnPP IX が、HSP70 の産生に影響を及ぼさなかったという以前の報告 (Kim et al., 1997) と一致するものであった。このようなデータは、本腫瘍細胞および固型腫瘍における ZnPP IX 誘発性のアポトーシスにおいて、HSP70 の直接的な寄与はないことを示している。

#### 4.8 AH136B 固型腫瘍における NO 産生の腫瘍生物学的意義

これまで述べてきた通り、AH136B 固型腫瘍は、常に高濃度の NO を産生しており (Doi et al., 1996)、この NO によって血流が維持され、また、HO-1 の発現誘導を介して腫瘍の急速な増殖を可能にしている。その他にも、NO は固型腫瘍において血管透過性を亢進させる作用や (Wu et al., 1998)、新生血管における血流の調節作用をもつと報告されている (Tozer et al., 1997)。さらに、NO がヒト B 細胞 (Mannich et al., 1994) や、TNF- $\alpha$  にて処理した血管内皮細胞 (Dimmeler et al., 1997) や、微小管作用系抗癌剤によって処理されたヒト神経芽腫細胞 (Ogura et al., 1998) などにおいて、アポトーシスを抑制しているという報告もある。NO は、チオールをニトロソ化することが知られており、ある種のタンパク質のシステイン残基のニトロソ化が、そのタンパク質の機能を修飾することが明かとなっている (Stamler, 1994)。実際、NO の抗アポトーシス作用のメカニズムとして、アポトーシスにおける細胞内プロテアーゼカスケードの最終段階に存在するカスパーゼ 3 の活性中心に存在するシステイン残基のニトロソ化が、その活性を阻害していることが示唆されている (Ogura et al., 1998)。一方、ZnPP IX が、時間および濃度依存性に全ての NOS アイソフォームを不活化させると報告されている (Wolff et al., 1996)。そこで、私の固型腫瘍モデルにおいて、ZnPP IX 誘発性アポトーシスが、ZnPP IX の直接的な NOS 阻害に起因しているかどうかについて検討した。その結果、いずれの解析においても、ZnPP IX による NOS 抑制を示すデータは得られなかった。これらの知見は、本固型腫瘍モデルにおいては NO が HO-1 の発現誘導を介して抗アポトーシスを発揮しているが、NO による HO-1 の誘導は ZnPP IX によっては損なわれないことを示している。

#### 4.7 カスパーゼ 3 の活性化



ほとんどのアポトーシスは、カスパーゼカスケードの活性化によって引き起こされるが、本腫瘍細胞における ZnPP IX 誘発性のアポトーシスにおいても、カスパーゼカスケードの活性化が起こっているか否かをみるために、その最終段階に位置しているカスパーゼ 3 (Martin and Green, 1995) の活性を測定した。その結果、ZnPP IX 刺激によって、本腫瘍細胞中のカスパーゼ 3 活性は有意に上昇していた。また、ZnPP IX と伴にカスパーゼ 3 の特異的阻害剤を加えて培養した場合は、有意にアポトーシス陽性率の低下を認めた。このことは、HO-1 がカスパーゼ 3 の上流でカスパーゼカスケードの活性化を抑制していることを示唆するものである。しかしながら、そのメカニズムの詳細については未だ不明であり、今後この点に関してさらなる研究が必要と考えられる。

#### 4.8 ZnPP IX の直接的作用

ZnPP IX は、その HO 活性阻害とは無関係に直接的な細胞障害作用を持つとも報告されている (Lutton *et al*, 1997)。そこで同じ HO 阻害剤の一つであり、直接的な細胞障害作用を示さない (Yang *et al*, 2001) と報告されている SnPP IX も用いて解析を行ったが、その抗アポトーシス作用は ZnPP IX と同様の結果を示した。すなわち、本腫瘍細胞における ZnPP IX 誘発性のアポトーシスは、ZnPP IX の直接的作用ではなく、HO 活性阻害作用を介したものであることが示された。

## 第 5 章 結語

固型腫瘍は、その旺盛な増殖を維持するために、あらゆる因子を産生し、浸潤・転移をくり返している。本研究においては、その因子の一つとして HO-1 の有する細胞保護作用に着目して様々な角度から解析を行った。その研究成果として、HO-1 がその強力な抗アポトーシス作用を介して腫瘍細胞の自己防御因子として重要な役割を演じることが明かとなった。図 14 に、AHI36B 細胞における酸化ストレスに対する HO-1 の細胞保護作用のメカニズムをスキームにまとめた。今回の知見を踏まえて、今後さらに HO という新たな分子を標的としたユニークな癌化学療法が展開することが期待されるものである。

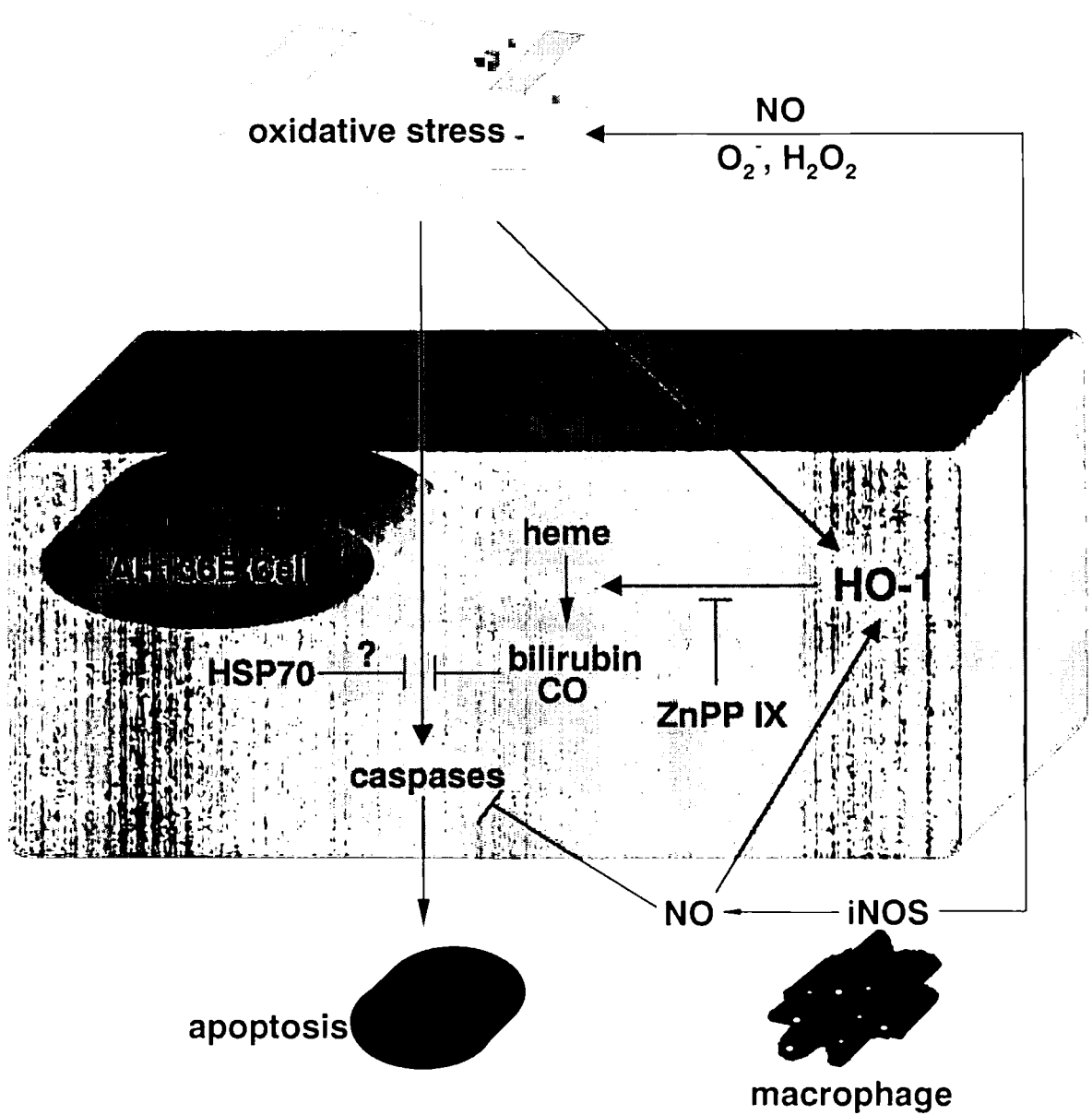


図14 AH136B細胞における酸化ストレスに対するHO-1の細胞保護作用のメカニズム

## 参考文献

**Abraham, N. G., Lin, J. H., Schwartzman, M. L., Levere, R. D. and Shibahara, S.** The physiological significance of heme oxygenase. *Int. J. Biochem.*, 20: 543-558, 1988.

**Akaike, T., Noguchi, Y., Ijiri, S., Setoguchi, K., Suga, M., Zheng, Y. M., Dietzschold, B. and Maeda, H.** Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 2448-2453, 1996.

**Akaike, T., Inoue, K., Okamoto, T., Nishino, H., Otagiri, M., Fujii, S. and Maeda, H.** Nanomolar quantification and identification of various nitrosothiols by high performance liquid chromatography coupled with flow reactors of metals and Griess reagent. *J. Biochem.*, 122: 459-466, 1997.

**Ambs, S., Merriam, W. G., Ogunfusika, M. O., Bennett, W. P., Ishibe, N., Hussain, S. P., Tzeng, E. E., Geller, D. A., Billiar, T. R. and Harris, C. C.** p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. *Nat. Med.*, 4: 1371-1376, 1998.

**Bastian, N. R., Yim, C. Y., Hibbs, J. B. Jr. and Samlowski, W. E.** Induction of iron-derived EPR signals in murine cancers by nitric oxide. Evidence for multiple intracellular targets. *J. Biol. Chem.*, 269: 5127-5131, 1994.

**Bouton, C. and Demple, B.** Nitric oxide-inducible expression of heme oxygenase-1 in human cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 32688-32693, 2000.

**Brouard, S., Otterbein, L. E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F. H., Choi, A. M. K. and Soares, M. P.** Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med.*, 192: 1015-1025, 2000.

**Buttke, T. M. and Sandstrom, P. A.** Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today*, 15: 7-10, 1994.

**Choi, D. W.** Nitric oxide: foe or friend to the injured brain? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 9741-9743, 1993.

**Cobbs, C. S., Brenman, J. E., Aldape, K. D., Bredt, D. S. and Israel, M. A.** Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res.*, 55: 727-730, 1995.

**da, Silva, J. L., Morishita, T., Escalante, B., Staudinger, R., Drummond, G., Goligorsky, M. S., Lutton, J. D. and Abraham, N. G.** Dual role of heme oxygenase in epithelial cell injury: contrasting effects of short-term and long-term exposure to oxidant stress. *J. Lab. Clin. Med.*, 128: 290-296, 1996.

**Dennery, P. A., Sridhar, K. J., Lee, C. S., Wong, H. E., Shokoohi, V., Rodgers, P. A. and Spitz, D. R.** Heme oxygenase-mediated resistance to oxygen toxicity in hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 272: 14937-14942, 1997.

**Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M. and Zeiher, A. M.** Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J. Exp. Med.*, 185: 601-607, 1997.

**Doi, K., Akaike, T., Horie, H., Noguchi, Y., Fujii, S., Beppu, T., Ogawa, M. and Maeda, H.** Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. *Cancer*, 77: 1598-1604, 1996.

**Doi, K., Akaike, T., Fujii, S., Tanaka, S., Ikebe, N., Beppu, T., Shibahara, S., Ogawa, M. and Maeda, H.** Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br. J. Cancer*, 80: 1999.

**Dore, S., Takahashi, M., Ferris, C. D., Zakhary, R., Hester, L. D., Guastella, D. and Snyder, S. H.** Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 2445-2450, 1999

**Drummond, G. S. and Kappas, A.** Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6466-6470, 1981.

**Enari, M., Talanian, R. V., Wong, W. W. and Nagata, S.** Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature*, 380: 723-726, 1996.

**Farrera, J. A., Jauma, A., Ribo, J. M., Peire, M. A., Parellada, P. P., Roques-Choua, S., Bienvenue, E. and Seta, P.** The antioxidant role of bile pigments evaluated by chemical tests. *Bioorg. Med. Chem.*, 2: 181-185, 1994.

**Foresti, R., Clark, J.E., Green, C.J. and Motterlini, R.** Thiol compounds interact with nitric oxide in regulating heme oxygenase-1 induction in endothelial cells. Involvement of superoxide and peroxynitrite anions. *J. Biol. Chem.*, 272: 18411-18417, 1997.

**Foresti, R. and Motterlini, R.** The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radic. Res.*, 31: 459-475, 1999.

**Fukumura, D. and Jain, R. K.** Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer Metastasis Rev.*, 17: 77-89, 1998.

**Furchgott, R. F. and Vanhoutte, P. M.** Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.*, 3: 2007-2018, 1989.

**Goodman, A. I., Choudhury, M., da Silva, J. L., Jiang, S. and Abraham, N. G.** Quantitative measurement of heme oxygenase-1 in the human renal adenocarcinoma. *J. Cell. Biochem.*, 63: 342-348, 1996.

**Goodman, A. I., Choudhury, M., da Silva, J. L., Schwartzman, M. L. and Abraham, N. G.** Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 214: 54-61, 1997.

**Gopinathan, V., Miller, N. J., Milner, A. D. and Rice-Evans, C. A.** Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Lett.*, 349: 197-200, 1994.

**Gourley, G. R.** Bilirubin metabolism and kernicterus. *Adv. Pediatr.*, 44: 173-229, 1997.

**Gutteridge, J. M., Rowley, D. A. and Halliwell, B.** Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Detection of 'free' iron in biological systems by using bleomycin-dependent degradation of DNA. *Biochem. J.*, 199: 263-265, 1981.

**Gutteridge, J. M., Rowley, D. A. and Halliwell, B.** Superoxide-

dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of 'catalytic' iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids. *Biochem. J.*, 206: 605-609, 1982.

**Hancock, W. W., Buelow, R., Sayegh, M. H. and Turka, L. A.** Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat. Med.*, 4: 1392-1396, 1998.

**Hara, E., Takahashi, K., Tominaga, T., Kumabe, T., Kayama, T., Suzuki, H., Fujita, H., Yoshimoto, T., Shirato, K. and Shibahara, S.** Expression of heme oxygenase and inducible nitric oxide synthase mRNA in human brain tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 224: 153-158, 1996.

**Hibbs, J. B. Jr., Taintor, R. R., Vavrin, Z. and Rachlin, E. M.** Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 157: 87-94, 1988.

**Jaattela, M., Wissing, D., Bauer, P.A. and Li, G.C.** Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J.*, 11: 3507-3512, 1992.

**Jaattela, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T. and Egeblad, M.** Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.*, 17: 6124-6134, 1998.

**Keyse, S.M. and Tyrrell, R.M.** Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 99-103, 1989.

**Kim, Y. M., de Vera, M. E., Watkins, S. C. and Billiar, T. R.** Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.*, 272: 1402-1411, 1997.

**Lee, T. C. and Ho, I. C.** Expression of heme oxygenase in arsenic-resistant human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res.*, 54: 1660-1664, 1994.

**Lejeune, P., Lagadec, P., Onier, N., Pinard, D., Ohshima, H. and Jeannin, J. F.** Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. *J. Immunol.*, 152: 5077-5083, 1994.

**Lepoivre, M., Flaman, J. M., Bobe, P., Lemaire, G. and Henry, Y.** Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. *J. Biol. Chem.*, 269: 21891-21897, 1994.

**Lutton, J. D., Abraham, N. G., Drummond, G. S., Levere, R. D. and Kappas, A.** Zinc porphyrins: potent inhibitors of hematopoiesis in animal and human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 1432-1436, 1997.

**Maeda, H., Noguchi, Y., Sato, K. and Akaike, T.** Enhanced vascular permeability in solid tumor is mediated by nitric oxide and inhibited by both new nitric oxide scavenger and nitric oxide synthase inhibitor. *Jpn. J. Cancer Res.*, 85: 331-334, 1994.

**Maines, M. D.** Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.*, 2: 2557-2568, 1988.

**Maines, M. D. and Abrahamsson, P. A.** Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology*, 47: 727-733, 1996.

**Maines, M. D.** The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37: 517-554, 1997.

**Mannick, J. B., Asano, K., Izumi, K., Kieff, E. and Stamler, J. S.** Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell*, 79: 1137-1146, 1994.

**Martin, S. J. and Green, D. R.** Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, 82: 349-352, 1995.

**Mestril, R., Chi, S. H., Sayen, M. R. and Dillmann, W. H.** Isolation of a novel inducible rat heat-shock protein (HSP70) gene and its expression during ischaemia/hypoxia and heat shock. *Biochem. J.*, 298: 561-569, 1994.

**Minetti, M., Mallozzi, C., Di Stasi, A. M. and Pietraforte, D.** Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma. *Arch. Biochem. Biophys.*, 352: 165-174, 1998.



**Mitani, K., Fujita, H., Sassa, S. and Kappas, A.** Activation of heme oxygenase and heat shock protein 70 genes by stress in human hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166: 1429-1434, 1990.

**Mitani, K., Fujita, H., Fukuda, Y., Kappas, A. and Sassa, S.** The role of inorganic metals and metalloporphyrins in the induction of haem oxygenase and heat-shock protein 70 in human hepatoma cells. *Biochem. J.*, 290: 819-825, 1993.

**Moncada, S. and Higgs, A.** The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, 329: 2002-2012, 1993.

**Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Denis-Larose, C. and Massie, B.** Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 5317-5327, 1997.

**Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R., Calabrese, V., Clark, J.E. and Green, C.J.** Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.*, 275: 13613-13620, 2000.

**Newman, T. B. and Maisels, M. J.** Evaluation and treatment of jaundice in the term newborn: a kinder, gentler approach. *Pediatrics*, 89: 809-818, 1992.

**Ohta, K., Araki, N., Shibata, M., Hamada, J., Komatsumoto, S., Shimazu, K. and Fukuuchi, Y.** A novel in vivo assay system for consecutive measurement of brain nitric oxide production combined with the microdialysis technique. *Neurosci. Letters*, 176: 165-168, 1994.

**Ogura, T., DeGeorge, G., Tatemichi, M. and Esumi, H.** Suppression of anti-microtubule agent-induced apoptosis by nitric oxide: possible mechanism of a new drug resistance. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 199-205, 1998.

**Otterbein, L. E., Mantell, L. L. and Choi, A. M.** Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 276: L688-L694, 1999.

**Petrache, I., Otterbein, L. E., Alam, J., Wiegand, G. W. and Choi, A.M.** Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 278: L312-L319, 2000.

**Rous, P. and Beard, J. W.** The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J. Exp. Med.*, 62: 523-548, 1935.

**Schlesinger, M. J.** Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.*, 265: 12111-12114, 1990.

**Shi, Q., Huang, S., Jiang, W., Kutach, L. S., Ananthaswamy, H. N. and Xie, K.** Direct correlation between nitric oxide synthase II inducibility and metastatic ability of UV-2237 murine fibrosarcoma cells carrying mutant p53. *Cancer Res.*, 59: 2072-2075, 1999.

**Shibahara, S., Muller, R.M. and Taguchi, H.** Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J. Biol. Chem.*, 262: 12889-12892, 1987.

**Soares, M. P., Lin, Y., Anrather, J., Csizmadia, E., Takigami, K., Sato, K., Grey, S. T., Colvin, R. B., Choi, A. M., Poss, K. D. and Bach, F. H.** Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat. Med.*, 4: 1073-1077, 1998.

**Stamler, J.S.** Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78: 931-936, 1994.

**Suematsu, M., Kashiwagi, S., Sano, T., Goda, N., Shinoda, Y. and Ishimura, Y.** Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205: 1333-1337, 1994.

**Suematsu, M., Goda, N., Sano, T., Kashiwagi, S., Egawa, T., Shinoda, Y. and Ishimura, Y.** Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J. Clin. Invest.*, 96: 2431-2437, 1995.

**Suttner, D. M. and Dennery, P. A.** Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J.*, 13: 1800-1809, 1999.

**Suttner, D. M., Sridhar, K., Lee, C. S., Tomura, T., Hansen, T. N. and Dennery, P. A.** Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells. *Am. J. Physiol.*, 276: L443-L451, 1999.

**Takahashi, K., Hara, E., Suzuki, H., Sasano, H. and Shibahara, S.** Expression of heme oxygenase isozyme mRNAs in the human brain and induction of heme oxygenase-1 by nitric oxide donors. *J. Neurochem.*, 67: 482-489, 1996.

**Tenhunen, R., Marver, H.S. and Schmid, R.** The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61: 748-755, 1968.

**Tenhunen, R., Marver, H. S. and Schmid, R.** Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 244: 6388-6394, 1969.

**Tenhunen, R., Marver, H.S. and Schmid, R.** The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J. Lab. Clin. Med.*, 75: 410-421, 1970.

**Thomsen, L. L., Lawton, F. G., Knowles, R. G., Beesley, J. E., Riveros-Moreno, V. and Moncada, S.** Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res.*, 54: 1352-1354, 1994.

**Thomsen, L. L., Miles, D. W., Happerfield, L., Bobrow, L. G., Knowles, R. G. and Moncada, S.** Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br. J. Cancer*, 72: 41-44, 1995.

**Tozer, G. M., Prise, V. E. and Chaplin, D. J.** Inhibition of nitric oxide synthase induces a selective reduction in tumor blood flow that is reversible with L-arginine. *Cancer Res.*, 57: 948-955, 1997.

**Tozer, G. M., Prise, V. E., Motterlini, R., Poole, B. A., Wilson, J. and Chaplin, D. J.** The comparative effects of the NOS inhibitor, N omega-nitro-L-arginine, and the haemoxygenase inhibitor, zinc protoporphyrin IX, on tumour blood flow. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 42: 849-853, 1998.

**Uehara, T., Kaneko, M., Tanaka, S., Okuma, Y. and Nomura, Y.** Possible involvement of p38 MAP kinase in HSP70 expression induced by hypoxia in rat primary astrocytes. *Brain Res.*, 823: 226-230, 1999.

**Wolff, D. J., Naddelman, R. A., Lubeskie, A. and Saks, D. A.** Inhibition of nitric oxide synthase isoforms by porphyrins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 333: 27-34, 1996.

**Wu, J., Akaike, T. and Maeda, H.** Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res.*, 58: 159-165, 1998.

**Xie, K. and Fidler, I. J.** Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. *Cancer Metastasis Rev.*, 17: 55-75, 1998.

**Xu, Q., Hu, Y., Kleindienst, R. and Wick, G.** Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. *J. Clin. Invest.*, 100: 1089-1097, 1997.

**Yang, G., Nguyen, X., Ou, J., Rekulapelli, P., Stevenson, D. K. and Dennery, P. A.** Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis. *Blood*, 97: 1306-1313, 2001.

**Zakhary, R., Gaine, S. P., Dinerman, J. L., Ruat, M., Flavahan, N. A. and Snyder, S. H.** Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 795-798, 1996.