

総 説

ミトコンドリア障害細胞における酸化ストレス感受性と細胞膜動態

富田 和男,^a 桑原 義和,^{a,b*} 高 裕子,^{a,c} 並河 英紀,^d 西谷 佳浩,^c 漆原 佑介,^e
山西沙祐里,^{a,f} 古川みなみ,^{a,f} 宮脇 正一,^f 栗政 明弘,^b 福本 学,^g 佐藤 友昭^a

Plasma Membrane Status against Oxidative Stress Sensitivity in Mitochondria Damaged Cells

Kazuo TOMITA,^a Yoshikazu KUWAHARA,^{a,b*} Yuko TAKASHI,^{a,c} Hideki NABIKA,^d
Yoshihiro NISHITANI,^c Yusuke URUSHIHARA,^e Sayuri YAMANISHI,^{a,f} Minami FURUKAWA,^{a,f}
Shouichi MIYAWAKI,^f Akihiro KURIMASA,^b Manabu FUKUMOTO,^g and Tomoaki SATO^a

^aDepartment of Applied Pharmacology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences:

^bDivision of Radiation Biology and Medicine, Faculty of Medicine, Tohoku Medical and Pharmaceutical University:

^cDepartment of Restorative Dentistry and Endodontology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences: ^dDepartment of Material and Biological Chemistry, Faculty of Science, Yamagata University:

^eLaboratory for Radiation Biology, Graduate School of Medicine, Tohoku University: ^fDepartment of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences:

^gDepartment of Molecular Pathology, Tokyo Medical University.

(Received November 20, 2017)

Oxidative stress is a harmful state for the cell. The state arises from exposure to high levels of reactive oxygen species (ROS). ROS is a key molecule in maintaining cell proliferation, inflammation and cell death. ROS is also involved in aging and causes many diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, cancer, diabetes mellitus and periodontal disease. The primary site of ROS generation *in vivo* is mitochondria. Mitochondria have its own DNA (mtDNA) that encodes a part of oxidative phosphorylation component proteins in mitochondria, and mtDNA damage by ROS causes neurodegenerative diseases and various types of cancer. Therefore, these damaged cells will provide valuable cell models to study oxidative stress and overcome ROS derived diseases. To analyze the mechanism of oxidative stress and ROS derived diseases, mtDNA depleted cells (ρ^0 cells) are developed by treating low dose ethidium bromide. ρ^0 cells do not have mtDNA, can't survive without pyruvate and uridine, produce little amount of ATP, sensitive to oxidative stress and generate higher ROS compared with parental cell. In this review, we describe the cellular response by oxidative stress such as radiation and hydrogen peroxide using ρ^0 cells. We also discuss the relationship among oxidative stress sensitivity, mitochondria damage and plasma membrane status.

Key words — Plasma membrane, Oxidative Stress, Hydrogen peroxide Sensitivity, Mitochondria, ρ^0 cell

1. はじめに

酸化ストレスとは、生体内において活性酸素種 (ROS) などによる酸化反応が抗酸化作用を上回り、細胞などに有害な作用を及ぼしている状態と定義されている。酸化ストレスを生じさせる ROS は、生体内において体内に侵入してきた細菌など

に対し殺菌作用を示すことで生体を感染から守る一方、がん、歯周病、アルツハイマー、パーキンソン病といった多くの疾患の形成や、老化促進に関与するといわれている。¹⁻⁴⁾ また、生体や細胞の外から放射線や薬物などの酸化ストレスを与えるると細胞内の ROS が増大し、その量が過剰である場合、細胞膜の脂質が過酸化され、最終的に細胞は死に至る。⁵⁾ 生体内において、ROS の主な生成場所はミトコンドリアであり、ミトコンドリアおよびミトコンドリア DNA (mtDNA) の障害により ROS 産生が亢進し疾病を引き起こすことが明らかとなっている。⁶⁻⁸⁾

福島原発事故を契機に、外部からの低線量放

^a 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科応用薬理学分野, ^b 東北医科薬科大学医学部放射線基礎医学教室, ^c 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科保存学分野, ^d 山形大学理学部物質生命化学科, ^e 東北大学大学院医学系研究科放射線生物学分野, ^f 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科矯正学分野, ^g 東京医科大学 医学部分子病理学講座

*e-mail: y-kuwahara@tohoku-mpu.ac.jp

放射線に対する生物影響, すなわち環境からの酸化ストレスと健康への因果関係についての関心も非常に高まってきている。⁹⁾ 低線量放射線による動物や人体への影響は, ホルミシス効果も含めまだ確実にはわかっていないが, これらストレス応答メカニズムを明らかにすることは, 疾病の治療のみならず, 健康な生活を送るためにも非常に重要なテーマである。

ROSは疾病を引き起こすだけでなく, がんをはじめとした疾病の治療にも利用されている。放射線を照射し治療することはもとより, がんの放射線感受性を高めるためにROSの一つである過酸化水素 (H_2O_2) が増感剤としても用いられている。^{10,11)} これは, 低酸素状態のがん細胞に H_2O_2 を酸素ドナーとして供給することによって細胞の周りに酸素ができ, 放射線に対する感受性が高まるという酸素効果によるものである。

本総説では, 筆者らの研究成果を含め, 放射線や H_2O_2 によってもたらされた酸化ストレスによる細胞応答について, ミトコンドリアの関与や細胞膜の状態との関連についての知見を加え概説する。

2. 酸化ストレスと抗酸化システム

ROSには, 酸素から電子の還元を受けた結果生じる活性酸素 (O_2^-), H_2O_2 , ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$), 一重項酸素 (1O_2) 等があり, いずれも非常に反応性に富む物質である。細胞内の活性酸素生成の場は主にミトコンドリアといわれ, ミトコンドリア電子伝達系から漏れ出た電子により酸素が還元され O_2^- が産生される。産生された O_2^- は

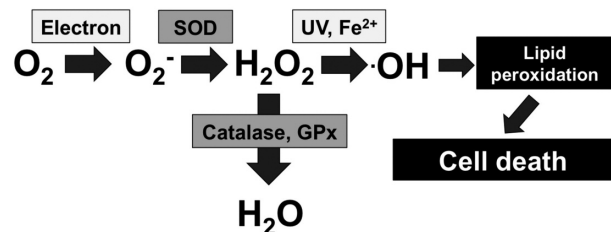


Fig. 1. Production and degradation of ROS in cells. Electrons from the mitochondrial respiratory chain react with oxygen (O_2) present in the cells and produce superoxide (O_2^-). Superoxide and water become H_2O_2 by SOD. Generally, H_2O_2 turns into harmless water by catalase or GPx. However, Fenton reaction generates $\cdot OH$ under environment where abundant iron (Fe^{2+}) exists around H_2O_2 . $\cdot OH$ is highly reactive and cause lipid peroxidation. Lipid peroxidation causes cell death.

Superoxide dismutase (SOD) の働きにより H_2O_2 を生じ, カタラーゼなどの分解酵素により水に戻る。しかしながら, 水分子に電離放射線が照射されたり, H_2O_2 に UV が照射されたりすると, 非常に反応性の高い $\cdot OH$ が生じる。また, H_2O_2 の近くに鉄が過剰にあるとフェントン反応が起き, 2 価の鉄イオンと H_2O_2 が反応し $\cdot OH$ が生じる (Fig. 1)。近年, 鉄過剰による細胞死の一つとしてフェルトローシスという細胞死が提唱され,¹²⁻¹⁴⁾ このフェントン反応によって生じる $\cdot OH$ が過酸化した脂質の蓄積を引き起こし, 最終的には細胞死が起こるといふ一連の流れが明らかとなりつつある。

細胞には内外からの酸化ストレスに対する複数の防御機構が存在している。酸化ストレスにより生じた ROS から身を守る防御機構を大別すると

- 1) ROS の活性を消去する酵素であるカタラーゼや SOD など
- 2) 生じた ROS を補足して安定化させるビタミン C や E, ポリフェノール類など
- 3) ROS によって損傷を受けた部位を修復させる DNA 修復酵素など

となる。1) については, 生体内の構成要素が ROS により損傷を受ける前に, その酵素活性により ROS の活性を消去するシステムである。この中には, グルタチオンが電子供与体となる Glutathione Peroxidase 群 (GPx) や Peroxiredoxin (Prx) などといった抗酸化酵素群も含まれ, Prx はこの酵素活性以外に, ROS の 1 つである過酸化水素の細胞内感知レセプターとして働くことも明らかとなっている。¹⁵⁾ 2) については, 抗酸化物質とよばれる一連の物質で, 狭義には活性酸素を消去する還元作用を持った低分子化合物である。自らが ROS の標的となることで, 他の分子が次々にラジカルとなる連鎖反応を抑える。ビタミン類など生体内で作ることができないものは食品などから摂取する必要があり, 生体内で不足すると酸化ストレスに対する抵抗性が弱まると考えられる。3) については, ROS によって既に損傷を受けた DNA, タンパク質, 脂質などの生体内分子を修復する機構である。これらの機能が不全となると, 最終的に細胞死が引き起こされる。¹⁶⁾

3. 酸化ストレスと細胞死との関連

細胞死には, アポトーシス, ネクローシス (ネクロプトーシス), オートファジー, フェルトローシ

スなど様々な形態がある。^{14,17)} 例えばアポトーシスの場合、クロマチン凝集が起き核の断片化が観察されるので、細胞内に複数の凝集したクロマチン構造が見られた場合、アポトーシスと判断するが、一般に細胞死が見られたといった場合、上記のいずれか、もしくは複数の形態をとり、細胞の生存率が低下、もしくは細胞が死滅した状態をいう。酸化ストレスによる細胞応答については様々な報告があるが、筆者らが正常神経前駆細胞を用い、放射線照射による mtDNA 傷害、脂質の過酸化、アポトーシスについてそのエンドポイントを調べたところ、コントロールに比べ有意にそれらの指標が増加するのは 1Gy 以上の照射であった。しかしながら、DNA アレイおよび定量 PCR により、それ以下の線量である 0.5 Gy および 0.1 Gy の照射によってもアポトーシス関連遺伝子などの発現に変化が起きていた。¹⁸⁾ さらに神経芽腫細胞を用い、アポトーシス、ネクロプトーシス、オートファジーといった細胞死に関連する遺伝子発現変化を指標にごく低線量 (0.1 mGy, 1 mGy) の放射線照射による影響を調べた結果、多くの遺伝子は発現が抑制されていたが、アポトーシスに関係する遺伝子のうち、*APAF1* と *BCL2* の発現は有意に上昇していた。¹⁹⁾ また、国際宇宙ステーション内で 14 日もしくは 28 日培養した細胞における ATP 産生や遺伝子発現変化を調べた結果、宇宙で培養した細胞は ATP 産生が抑制され、遺伝子発現も地上コントロールと比べ変化していた。^{20,21)} これらのことより、ごく弱い酸化ストレスによっても、老化や死へ向かっての反応を示すということが示唆された。ただし、このような弱い酸化ストレスにおいては、細胞内の抗酸化酵素や修復機構などが働き、結果として細胞死という表現形はとらないと考えられる。

また、肝がん細胞 HLE を用いてミトコンドリアに存在する活性酸素除去酵素である Manganese superoxide dismutase (MnSOD) を過剰発現させると、放射線による細胞死 (アポトーシス) の抑制がみられた。²³⁾ さらに膀胱がん細胞株 KP4 を用いて低酸素状態から再酸素化する実験を行ったところ、KP4 は再酸素化によりアポトーシスが引き起こされていた。このアポトーシスは MnSOD をミトコンドリアに過剰発現することにより抑制された。²³⁾ これらのことから一般的ながん細胞では、ミトコンドリア由来活性酸素と細胞死、特にアポ

トーシスとの強い相関があると考えられる。

4. 活性酸素とミトコンドリア

ミトコンドリアは、動物細胞において核以外に DNA (mtDNA) が存在する唯一の器官である。ヒトの mtDNA は 16,569 塩基からなり、ここにミトコンドリア電子伝達系の構成要素のうちの 13 の遺伝子と 2 つの rRNA, 22 個の tRNA がコードされている。この遺伝子はミトコンドリアにおける好氣的な ATP の合成に必須で、個体としては mtDNA なしで生きて行くことはできない。培養細胞系においては、mtDNA を欠失させた ρ^0 細胞が存在しているが、この細胞はピルビン酸とウリジンを追加する特別な条件での培養が必要である。ヒト細胞における ρ^0 細胞は、King らにより樹立され、²⁴⁾ 低濃度のエチジウムブロマイド処理で比較的容易に樹立できることから、現在では多くの研究室にて多様な ρ^0 細胞が樹立され研究が行われている。筆者らが mtDNA の欠失した ρ^0 細胞および mtDNA の一部 (約 5 Kb) が欠失した細胞 (BH3.12) を用い、ミトコンドリアの局在を Mitotracker, 内在性の ROS を Hydroxyphenyl Fluorescein (HPF) にて検討した結果、 ρ^0 および BH3.12 細胞から発生している ROS は Mitotracker の発現とほぼ一致しており、かつ、親株と比べ放出している ROS の量が多かった。⁸⁾ また、ミトコンドリアに局在する O_2^- を除去する酵素である MnSOD を過剰発現させることにより、このミトコンドリア由来 O_2^- 生成が抑えられた。⁸⁾ さらに、 ρ^0 細胞における遺伝子発現をマイクロアレイにて解析した結果、mtDNA コード遺伝子のみならず、分子シャペロンをはじめとする核ゲノムにコードされる遺伝子発現も変化していた。²⁵⁾ これらのことは、mtDNA 障害によるミトコンドリア由来 ROS の発現亢進がミトコンドリアだけでなく核にコードされる遺伝子発現制御にも影響を与えていることを示唆している。

5. ミトコンドリア障害と酸化ストレス感受性

mtDNA は核 DNA に比べ酸化ストレスによる障害を受けやすく、また様々な形で障害を受けることが知られている。例えば、A3243G 変異などの点突然変異 (MELAS などを発症)、mtDNA の一部が欠失もしくは重複 (CPEO を発症)、mtDNA コピー数の減少 (老化や心筋梗塞を引き起こす) な

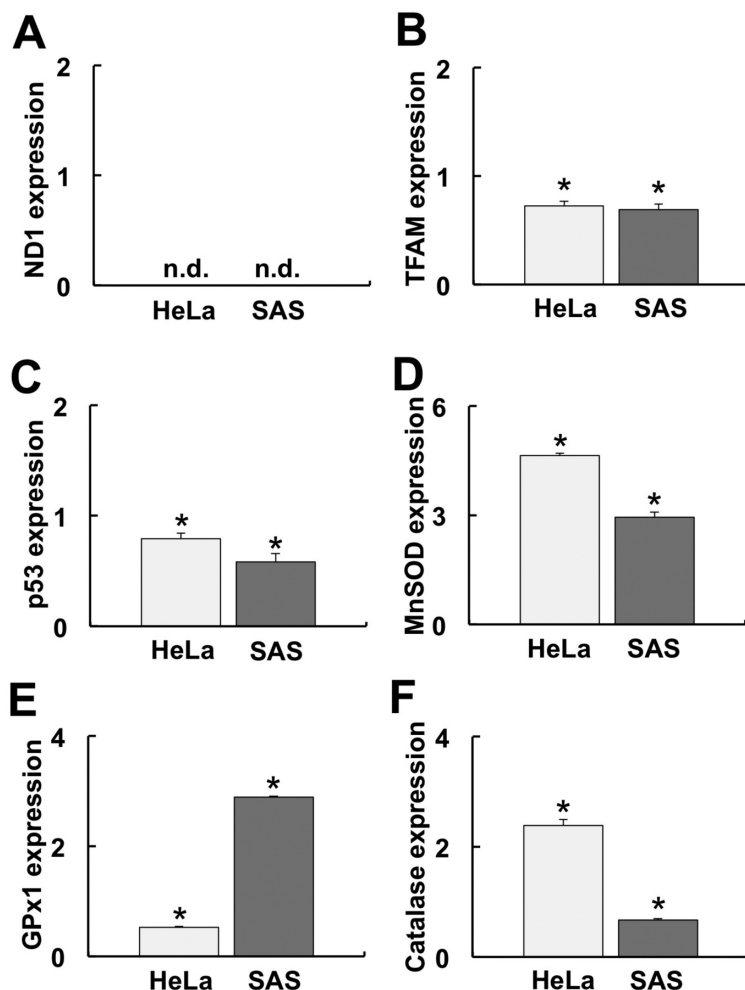


Fig. 2. Gene expressions in ρ^0 cells. Ratio of parental cell gene expressions and ρ^0 cell gene expressions are shown. A: Gene expression ratio of ND1 (mtDNA encoded gene). Gene expression of ND1 in ρ^0 cells was undetectable. B: Gene expression ratio of TFAM (transcription factor of mtDNA). Gene expression of TFAM in ρ^0 cells was down-regulated. C: Gene expression ratio of p53 (apoptosis suppressing gene). Gene expression of p53 in ρ^0 cells was down-regulated. D: Gene expression ratio of MnSOD (mitochondrial superoxide dismutase). Gene expression of MnSOD in ρ^0 cells was up-regulated. E, F: Gene expression ratio of GPx1 and catalase (enzyme that turns hydrogen peroxide into water). These gene expressions in ρ^0 cells were individually changed, but constant tendency were not seen. n.d.: not detected. *: statistically significant difference was seen between ρ^0 cells and parental cells ($p < 0.05$ by Student's t-test).

どである。このような mtDNA 障害は、いわゆる電子伝達系酵素欠損症を招き、ミトコンドリア機能低下、すなわちミトコンドリア障害を引き起こし、不完全な電子伝達系からより多くの活性酸素が漏れ出すことにより臨床症状や老化が起きると考えられている。前出の ρ^0 細胞は、この mtDNA 障害のもっともシビアなモデルとして使用されている。近年になって、mtDNA の障害は、ミトコンドリア病と総称される一連の疾患だけでなく、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患、てんかん、自閉症、がんや糖尿病など、より一般的な疾患と関係していることが次々と明らかとなってきた。^{7,26)} そして、これらの疾患は ROS を

原因とする疾患と重複するものも多い。mtDNA 突然変異と ROS の発生および疾病との直接的な関連については、mtDNA の突然変異により ROS が過剰産生されるタイプとされないタイプのモデルマウスを作製した実験で、ROS が過剰産生される mtDNA を導入したタイプでのみ糖尿病やがんが発症するという報告がある。²⁷⁾ このことから、mtDNA 障害によって引き起こされるミトコンドリア障害の少なくとも一部に関しては、ROS が誘導され、それが疾病を引き起こす原因となっていると考えられる。^{27,28)} さらに、老化に伴い mtDNA 量自体は増加するものの mtDNA コード遺伝子から転写された mtRNA の発現が減少することによ

り、mtRNA/mtDNAの比率が減少することもわかっている。²⁹⁾以上より、mtDNA障害による細胞応答メカニズムを明らかにすることは、さまざまな疾病を克服するための重要な足がかりになると考えられる。しかしながら、その詳細についてはいまだ不明な点が多い。筆者らは子宮頸がん細胞株であるHeLaおよび舌がん細胞株であるSASから前出のKingら²⁴⁾の方法にならい ρ^0 細胞を樹立した。樹立した ρ^0 細胞について、mtDNAコード遺伝子であるNADH dehydrogenase 1 (ND1)の発現を調べたところ、ND1は検出されなかった(Fig. 2A)。次に、これら細胞の酸化ストレス感受性を調べるために過酸化水素処理を行ったところ、 ρ^0 細胞は親株に比べ過酸化水素に対して感受性を示した。³⁰⁾ ρ^0 細胞における酸化ストレス感受性については、酵母とテラトカルシノーマにおいても親株に比べ過酸化水素に対して感受性を示すとの報告がある。^{31,32)}また、mtDNAの転写因子であるMitochondrial Transcription Factor A (TFAM)の発現も下がっており(Fig. 2B)、アポトーシス抑制遺伝子であるp53の発現も低下していた(Fig. 2C)。抗酸化酵素群の発現については、ミトコンドリアに局在するMnSODの発現は増大していたが、GPxやカタラーゼの遺伝子発現は細胞により発現が異なっていた(Fig. 2D-F)。さらに、カタラーゼの酵素活性を調べたところ、カタラーゼ酵素活性は ρ^0 細胞において上昇していた。³⁰⁾これらのことから、 ρ^0 細胞において内在性の抗酸化酵素活性は過酸化水素処理に対する感受性を規定する主要な因子ではないと考えられた。 ρ^0 細胞はミトコンドリアの電子伝達系が不全となり、 ρ^0 細胞におけるATP量が親株に比べ有意に減少していることがわかっている。そこで、細胞膜上に存在し、ATP依存的にイオン濃度勾配を形成するATPaseの発現量を検討したところ、親株と ρ^0 細胞で、その発現量に違いが見られた。細胞膜構成要素の発現に違いが見られたため、細胞膜状態を調べた。膜電位依存的に蛍光を発する色素であるDiBAC₄(3)を用いて細胞膜電位を調べた結果、 ρ^0 細胞においては、親株に比べ細胞膜電位が低下していた。³⁰⁾また最近、過酸化水素を特異的に認識する蛍光色素であるHYDROPTMが開発され、内在性の過酸化水素を顕微鏡下でとらえることが可能になった。この試薬を用いて、過酸化水素処理時における細胞内の過酸化水素量の変化を経時的に検出した。そ

の結果、親株においては過酸化水素処理後2時間で内在性の過酸化水素量の増大を認めたが、1時間までは細胞内過酸化水素量は増加しなかった。それに対して ρ^0 細胞においては、過酸化水素処理後1時間で細胞内の過酸化水素量の増大が見られた(Fig. 3)。³⁰⁾一方、過酸化水素処理前の親株および ρ^0 細胞の膜の状態を代表的な脂質の過酸化物マーカーであるHNE抗体を用いて免疫染色を行ったところ、親株細胞に比べて、 ρ^0 細胞では脂質の過酸化が増大していた(Fig. 4)。さらに、プレリミナリーではあるが、我々が行った安定同位元素を用いた実験により、安定同位元素入りの過酸化水素処理1時間で、 ρ^0 細胞においては細胞内の安定同位元素量が親株に比べて増加するという結果を得ている。これらのことから、ミトコンドリア障害細胞では細胞内活性酸素量が増大しているため、細胞膜自体が既に過酸化状態であり、脆弱かつストレス物質を透過させやすい状態であると考えられる。このような状態で過酸化水素などの酸化ストレスを受けると、膜を透過した過酸化水素が細胞内に多量に流れ込み、細胞内ROSのさらなる上昇が起こり、細胞死が引き起こされると推察される。

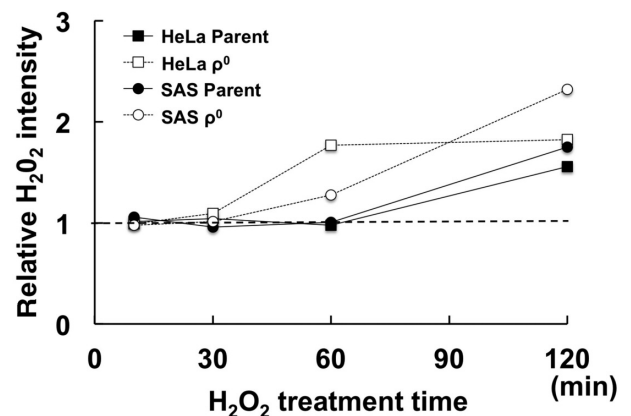


Fig. 3. Internal H₂O₂ amount analyzed by HYDROPTM. Internal H₂O₂ was visualized using HYDROPTM (Goryo Chemical Inc., Hokkaido, Japan). Cells were treated with 50 μ M H₂O₂ for 10 min, 20 min, 1 h and 2 h. After washing H₂O₂ with medium, cells were subjected to 2.5 μ M HYDROPTM at 37°C for 20 min. After washing HYDROPTM with medium, fluorescence images were obtained using a BZ-8000 fluorescence microscope (KEYENCE Corporation, Osaka, Japan). Fluorescence intensities were measured using ImageJ and relative H₂O₂ amount were calculated (average intensity of H₂O₂ treated cell / average intensity of H₂O₂ non-treated cell). Internal H₂O₂ amount increased only in ρ^0 cells after 1 h H₂O₂ treatment. When H₂O₂ treatment was extended for 2 h, increase in internal H₂O₂ was observed both in ρ^0 cells and parental cells.

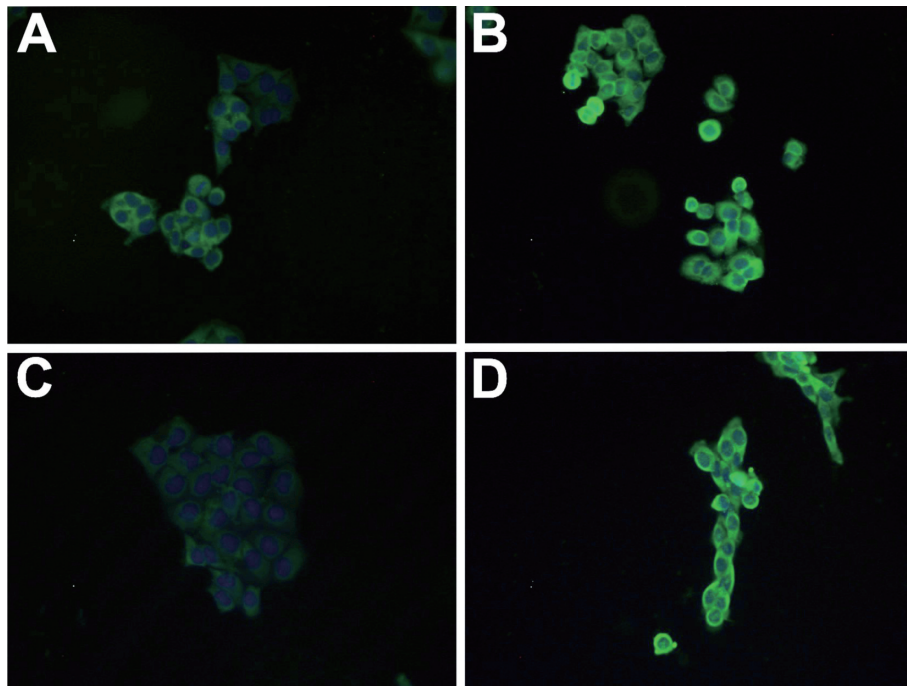


Fig. 4. HNE staining in HeLa and SAS ρ^0 cells. One of the most major membrane lipid peroxidation products, HNE was detected using HNE antibody (Japan institute for the control of aging: JaICA., Shizuoka, Japan; 1:200 dilution). Fixed cells were visualized using HNE antibody and Alexa 488 goat anti mouse IgG (Thermo Fisher Scientific; 1:200 dilution). Nuclei were counterstained with DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A: HeLa parental cell. B: HeLa ρ^0 cells. C: SAS parental cell. D: SAS ρ^0 cells. In both ρ^0 cells, higher HNE staining was observed than parent cells.

おわりに

ミトコンドリア DNA を欠失した細胞は酸化ストレスに感受性であり, その感受性は内在性のカタラーゼの酵素活性よりもむしろ膜電位や膜の過酸化の状態によって規定される可能性が示唆された。今後は, 膜電位や脂質の過酸化状態以外に, 過酸化水素の膜透過性や細胞膜上にある構成タンパク質発現量の変化などを調べていく予定である。これにより, これまでに明らかとなっている活性酸素とミトコンドリア障害の関係に加え, 細胞膜状態の変化の知見も加わり, がん細胞のストレス応答メカニズムがさらに解明されていくと考えられる。酸化ストレスに対する細胞応答機構と細胞膜との関連が明らかになれば, 膜状態を変化させ, 放射線や抗がん剤に対する感受性をコントロールする新たな薬剤の開発にもつながり, がん克服へさらなる一歩を踏み出すことができると期待される。

謝辞 本研究は科研費 16K11513 の助成を受けて行った。

利益相反

開示すべき COI はない。

REFERENCES

- 1) Al Shahrani M., Heales S., Hargreaves I., Orford M., *J Clin Med*, **6**(11), (2017).
- 2) Davalli P., Mitic T., Caporali A., Lauriola A., D'Arca D., *Oxid Med Cell Longev*, **3565127** (2016).
- 3) He F., Zuo L., *Int J Mol Sci*, **16**(11), 27770–27780 (2015).
- 4) Waddington R.J., Moseley R., Embery G., *Oral Dis*, **6**(3), 138–151 (2000).
- 5) Idelchik M.D.P.S., Begley U., Begley T.J., Melendez J.A., *Semin Cancer Biol*, **47**, 57–66 (2017).
- 6) Ogura A., Oowada S., Kon Y., Hirayama A., Yasui H., Meike S., Kobayashi S., Kuwabara M., Inanami O., *Cancer Lett.*, **277**, 64e71 (2009).
- 7) Wallace D.C., Fan W., Procaccio V., *Annu Rev Pathol*, **5**, 297–348 (2010).
- 8) Indo H.P., Davidson M., Yen H.C., Suenaga S., Tomita K., Nishii T., Higuchi M., Koga Y., Ozawa T., Majima H.J., *Mitochondrion*, **7**(1-2), 106–118 (2007).
- 9) Urushihara Y., Kawasumi K., Endo S., Tanaka K., Hirakawa Y., Hayashi G., Sekine T., Kino Y., Kuwahara Y., Suzuki M., Fukumoto M., Yamashiro

- H., Abe Y., Fukuda T., Shinoda H., Isogai E., Arai T., Fukumoto M., *PLoS One*, **11**(5), e0155069 (2016).
- 10) Fang Y., Moore B.J., Bai Q., Cook K.M., Herrick E.J., Nicholl M.B., *Anticancer Res.*, **33**(5), 1799–1807 (2013).
- 11) Kariya S., Sawada K., Kobayashi T., Karashima T., Shuin T., Nishioka A., Ogawa Y., *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, **75**(2), 449–454 (2009).
- 12) Stockwell B.R., Friedmann Angeli J.P., Bayir H., Bush A.I., Conrad M., Dixon S.J., Fulda S., Gascón S., Hatzios S.K., Kagan V.E., Noel K., Jiang X., Linkermann A., Murphy M.E., Overholtzer M., Oyagi A., Pagnussat G.C., Park J., Ran Q., Rosenfeld C.S., Salnikow K., Tang D., Torti F.M., Torti S.V., Toyokuni S., Woerpel K.A., Zhang D.D., *Cell*, **171**(2), 273–285 (2017).
- 13) Jiang L., Kon N., Li T., Wang S.J., Su T., Hibshoosh H., Baer R., Gu W., *Nature*, **520**(7545), 57–62 (2015).
- 14) Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., Skouta R., Zaitsev E.M., Gleason C.E., Patel D.N., Bauer A.J., Cantley A.M., Yang W.S., Morrison B. 3rd, Stockwell B.R., *Cell*, **149**(5), 1060–1072 (2012).
- 15) Irokawa H., Tachibana T., Watanabe T., Matsuyama Y., Motohashi H., Ogasawara A., Iwai K., Naganuma A., Kuge S., *Sci Rep.*, **6**, 33536 (2016).
- 16) Finkel T., Holbrook N.J., *Nature*, **408**(6809), 239–247 (2000).
- 17) Kuwahara Y., Urushihara U., Saito Y., Yamamoto Y., Tomita K., Sato T., Yamamoto F., Kurimasa A., Fukumoto M., *Journal of Tohoku Medical and Pharmaceutical University*, **63**, 63–70 (2016).
- 18) Tomita K., Iwashita Y., Indo H., Hayata I., Ozawa T., Majima H.J., *Free Rad Bio Med.*, **33**(S1), S429 (2002).
- 19) Indo H.P., Tomiyoshi T., Suenaga S., Tomita K., Suzuki H., Masuda D., Terada M., Ishioka N., Gusev O., Cornette R., Okuda T., Mukai C., Majima H.J., *J Clin Biochem Nutr.*, **57**(2), 98–104 (2015).
- 20) Majima H.J., Indo H.P., Suzuki H., Tomita K., Ishioka N., Shimazu T., Yano S., Tanigaki F., Nagamatsu A., Masuda D., Imaoka A., Shibata Y., Abiko Y., Kishida S., Minobe E., Kameyama M., *Space Utiliz Res.*, **28**, 199–200 (2012).
- 21) Majima H.J., Indo H.P., Tomita K., Iwashita Y., Suzuki H., Masuda D., Shimazu T., Higashibata A., Izumi R., Hasegawa Y., Ishioka N., *Space Utiliz Res.*, **25**, 37–38 (2009).
- 22) Motoori S., Majima H.J., Ebara M., Kato H., Hirai F., Kakinuma S., Yamaguchi C., Ozawa T., Nagano T., Tsujii H., Saisho H., *Cancer Res.*, **61**(14), 5382–5388 (2001).
- 23) Hirai F., Motoori S., Kakinuma S., Tomita K., Indo H.P., Kato H., Yamaguchi T., Yen H.C., St Clair D.K., Nagano T., Ozawa T., Saisho H., Majima H.J., *Antioxid Redox Signal.*, **6**(3), 523–535 (2004).
- 24) King M.P., Attardi G., *Science*, **246**(4929), 500–503 (1989).
- 25) 富田和男, DNA マイクロアレイ法を用いた ρ^0 細胞における遺伝子発現変化, 第2回日本ミトコンドリア研究会年会, 2002年12月19日, 東京
- 26) Taylor R.W., Turnbull D.M., *Nat Rev Genet.*, **6**(5), 389–402 (2005).
- 27) Hashizume O., Shimizu A., Yokota M., Sugiyama A., Nakada K., Miyoshi H., Itami M., Ohira M., Nagase H., Takenaga K., Hayashi J., *Proc Natl Acad Sci USA.*, **109**(26), 10528–10533 (2012).
- 28) Ishikawa K., Takenaga K., Akimoto M., Koshikawa N., Yamaguchi A., Imanishi H., Nakada K., Honma Y., Hayashi J., *Science*, **320**(5876), 661–664 (2008).
- 29) Barrientos A., Casademont J., Cardellach F., Estivill X., Urbano-Marquez A., Nunes V., *Mol Brain Res.*, **52**(2), 284–289 (1997).
- 30) Tomita K., Kuwahara Y., Takashi Y., Tsukahara T., kurimasa A., Fukumoto M., Nishitani Y., Sato T., *Biochem Biophys Res Commun.*, **490**(2), 330–335 (2017).
- 31) Grant C.M., MacIver F.H., Dawes I.W., *FEBS Lett.*, **410**, 219–222 (1997).
- 32) Cardoso S.M., Rego A.C., Penacho N., Oliveira C.R., *Neurochem Int.*, **45**, 693–698 (2004).

