

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 6 月 25 日現在

機関番号：27301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21310

研究課題名(和文)非環式レチノイドによるオートファジー制御メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of mechanism underlying autophagy control by acyclic retinoid

研究代表者

岡本 恭子 (Okamoto, Kyoko)

長崎県立大学・看護栄養学部・助教

研究者番号：40714853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：悪性新生物(癌)は年月を重ね顕在化する疾患であり、平均寿命が延伸傾向にある日本では死因の常に1位になっている。本研究で用いたゲラニルゲラノイン酸(GGA)は医療用ハーブなどに存在する非環式レチノイドの1つである。ヒト肝癌細胞株においてGGAにより細胞死を誘導することを見出し、その細胞死にはオートファジー制御や小胞体ストレスという現象が介在していることが示唆された。本研究ではその際のメカニズムについて一部を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2016年にノーベル生理学・医学賞を受賞した大隅栄誉教授のオートファジーの研究はアルツハイマー病、癌、脂質代謝異常など様々な疾患、病態との関与が示唆されており、現在もその作用機序などについて盛んに研究がおこなわれている分野である。しかし、そのオートファジーの詳細なメカニズムや小胞体ストレスとの関連などは学術的にはまだ解明されていない部分も多い。そのため、本研究のような基礎研究はそのメカニズムの解明の一助となると考えられる。また、GGAを発癌予防薬のモデルとみなし、細胞死誘導メカニズムを解明することは癌の治療および発癌予防の一助になると考えている。

研究成果の概要(英文)：In recent decades, malignant tumor (cancer) has always been the leading cause of death in developed countries including Japan, where the average life span tends to be prolonged. Geranylgeranoic acid (GGA) used in this study is one of acyclic retinoids, found in some medical herbs. We found that GGA induces cell death in human hepatoma cell lines and that GGA-induced cell death is caused by the controlled autophagy triggered by endoplasmic reticulum stress. In the present study, we illustrated part of the cellular mechanism of GGA-induced cell death in hepatoma cells for cancer prevention.

研究分野：細胞生化学

キーワード：オートファジー 小胞体ストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

本研究で用いたハーブなどの植物に含まれているテルペノイド代謝産物の一つであり、非環式レチノイドの一つでもある天然化合物のゲラニルゲラノイン酸（GGA）の類縁物である4,5-dehydroGGAは開発中の我が国独自の肝癌再発抑制薬であり、国際的にも注目されていた（Hong & Sporn, *Science*, 1997）。プラセボを用いた二重盲検第II相臨床試験（肝癌根治後の1年間投与、600 mg/日）において、副作用を示すことなく肝癌の再発を抑制し、延命効果が示された（Muto et al, *N. Engl. J. Med.*, 1996, 1999）。

我々の研究室ではGGAによる細胞死誘導の分子メカニズムの解析をしており、ヒト肝癌細胞株においてミトコンドリア内膜電位差の減少（Shidoji et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997）やテロメラーゼの発現抑制（Shiratori, Shidoji et al, *J. Hepatol.*, 2002）、抗酸化酵素PHGPx遺伝子の導入によるGGA誘導性細胞死の阻害などを示した（Shidoji, Okamoto et al, *J. Cell. Biochem.*, 2005）が、GGAによる細胞死誘導の詳細なメカニズムは依然として不明であった。そこで、GGAによる細胞死誘導の分子機構の全面的解明を目的に、shRNA発現ベクターライブラリーを用いた遺伝子ノックダウン法により、GGA誘導性細胞死に必須の遺伝子の網羅的探索を行い、その結果、GGAによる細胞死誘導に必須の遺伝子としてオートファジー（macroautophagy）関連遺伝子が検出された。

GGA処理1時間後にオートファジーの指標となる、オートファゴソームの蓄積が示唆され、GGAが誘導するオートファゴソームの蓄積は、ライソソームと融合しない不完全なオートファジーであり、このことが細胞死につながる事が示唆された。

オートファジーと細胞死の関係についての研究は、研究開始当初急速に進んでいた。（Kohli et al, *Autophagy*. 2013）。しかし、オートファジーは本来、細胞生存のためのメカニズムと認識されており、細胞死のメカニズムとしては不明な点が多かった。事実、オートファジーが関連して発癌を抑制するものと促進するものがあり、細胞死に関する共通した見解が得られていなかった（Levine & Kroemer, *Cell*, 2008）。

2. 研究の目的

GGAの肝癌細胞に対する細胞死誘導作用について、その分子メカニズムをヒト肝癌由来細胞株（HuH-7、Hep3B、HepG-2、PLC/PRF/5）を用いてオートファジー調節を介した細胞死の誘導という観点から解明し、肝癌予防（再発抑制）栄養素としてのGGAの臨床研究へ展開するための基礎的研究基盤を確立することを主要な目的とした。

3. 研究の方法

(1)オートファジーはMicrotubule-associated Protein 1 Light Chain 3（LC3）が顆粒状（puncta）になることで判定できる。様々なヒト肝癌由来細胞株（HuH-7、Hep3B、HepG-2、PLC/PRF/5）を用いて、オートリソソーム（オートファゴソームとリソソームの融合）を解析できる新しいプローブ tandem-fluorescent RFP-GFP-LC3の発現クローンを作製し、オートファジーの最終段階の解析を行った。この発現クローンは共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 LSM-700 に Live-cell Imaging 用チャンバーを設置し、観察を行った。飢餓状態などの刺激により観察されるLC3の蛍光のパターンによって、ほとんど蛍光がみられない場合はオートファジーが生じていない状態、赤色の蛍光のLC3 punctaはオートリソソームが形成された完全なオートファジー応答が生じている状態、黄色いLC3 punctaがみられる場合はオートファゴソームとリソソームが融合していない、不完全なオートファジー応答が生じている状態と判別ができる。

(2)オートファジーの誘導はアミノ酸欠乏によるものが主である。しかし、この条件は正常細胞にも誘導が生じる。そのため、癌細胞が正常細胞よりも糖代謝によるエネルギー産生を行っている事に着目し、(1)で作成した様々なヒト肝癌由来細胞株からグルコースを培地中から除いても生存するヒト肝癌由来細胞株を選択した。

(3)GGA添加によるオートファジー調節はリソソームに作用していることが示唆されたため、リソソームとオートファゴソームの融合に関与すると考えられているRAB7に着目した。GGA添加後のRAB7の細胞内の局在を共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡によって、たんぱく質量の変化などをウェスタンブロット法によって検証した。

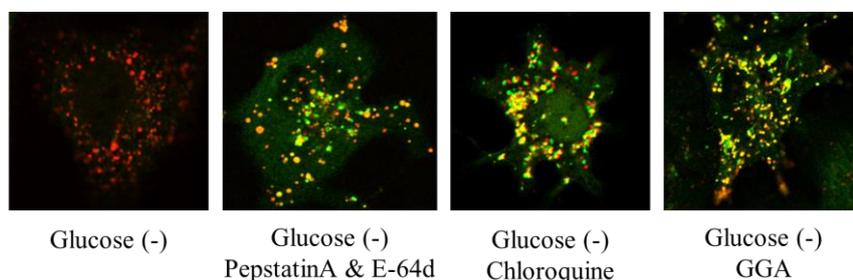
(4)リソソームの機能についても検証するためCathepsin B（CTSB）の酵素活性を測定した。脂肪細胞での報告では、CTSBの酵素活性の増加は、リソソーム膜の不安定性“lysosomal destabilization”を引き起こし、細胞死誘導の引き金になることが報告されている。そこで、CTSBの酵素活性を選択的に測定する蛍光試薬を用いて共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡によって観察した。

(5)GGA添加後、数時間以内に小胞体ストレスが生じることが報告されている（Iwao et al, *PLOS One*, 2015）。しかしその作用はオレイン酸によって阻害を受ける。そこでオレイン酸の働きの一つとして知られている脂肪滴の知形成についてGGA添加時とオレイン酸との共添加による影響について脂肪滴を選択的染色する蛍光試薬を用いて、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡に

て観察した。

4. 研究成果

(1) グルコースを培地から除き tandem-fluorescent RFP-GFP-LC3 の発現クローンのヒト肝癌細胞株を培養すると、下図のように赤色の蛍光の LC3 puncta が生じ、リソソームの分解酵素の阻害剤 (PepstatinA & E-64d もしくは Chloroquine) を添加した際は、黄色い LC3 puncta がみられた。GGA を添加した際も黄色い LC3 puncta がみられ、リソソームの分解酵素の阻害もしくはリソソームとオートファゴソームの融合阻害をしていることが示唆された。グルコース除去培地では HuH-7 細胞が最もオートファジーを起こしやすかった。そのため以降の結果は HuH-7 細胞を用いた研究結果を述べる。



図：オートファジーフラックスアッセイ

(2) GGA 添加後数時間以内にたんぱく質量の増加、細胞内局在の変化がみられた。細胞内の局在では GGA 添加前は細胞質にまんべんなく局在しているが、添加後は顆粒状に集まっていき、LC3 puncta と共局在しているように観察された。しかし免疫沈降法により、グルコース欠乏によるオートファジー誘導時には LC3 と RAB7 の結合が示唆され、GGA 添加後の LC3 と RAB7 は結合が確認されなかった (論文作成の為、図は未掲載とする)。これらのことから、GGA 添加によって、リソソームとオートファゴソームの融合阻害はより明確になったと考えられた。

(3) GGA 添加の数時間以内 CTSB の酵素活性が高くなったことが、蛍光試薬の蛍光強度の増加によって観察された (論文作成の為、図は未掲載とする)。CTSB の活性上昇に伴いリソソーム膜の不安定性が増し、オートオートファゴソームとの融合が阻害されていることが考えられた。これらの事から、GGA はリソソーム中の CTSB 活性を増加させ、リソソームの機能不全を誘導することにより、本来生存に働くオートファジーが完遂できないため、細胞死を誘導することが示唆された。

(4) オレイン酸を HuH-7 細胞に添加すると、24 時間以内に大きな脂肪滴が数多く形成されることが、脂肪滴に選択的に取り込まれる蛍光試薬によって検出された。48 時間経過するとそのサイズと数は更に増大した。GGA 単独の添加では、脂肪滴の形成はほとんど見られなかった。しかし、オレイン酸との共添加ではオレイン酸の単独の添加同様の脂肪滴の形成がみられた (論文作成の為、図は未掲載とする)。これらの事から、オレイン酸による GGA が誘導する小胞体ストレスなどの阻害には、この脂肪滴の形成が関与しているのではないかと考えられる。GGA は非環式レチノイドと呼ばれるように、レチノイドの一種であり、all-trans-retinoic acid から派生したものであり、油脂類に親和性がある。そのため GGA はオレイン酸添加による脂肪滴の形成時に脂肪滴に取り込まれ、細胞内で作用できなくなるのではないかと考えている。今後は脂肪滴を分離し、その中の成分を質量解析などによって検証したいと考えている。

GGA によるオートファジー制御には小胞体ストレスが介在していることが示唆されており、我々が普段の食事で摂取しているオレイン酸によって GGA の作用が阻害されることが明らかになっている。通常口にしていてものが抗がん剤などに対しても同じように阻害する可能性があるのではないかと考え、GGA を発癌予防薬のモデルとみなして、細胞死誘導、またその阻害メカニズムを解明することは癌の治療および発癌予防の解明へとつなげていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 10 件)

- ① Kyoko Okamoto, Haruna Sekiguchi, Konomi Hisazumi, Yoshihiro Shidoji
Effects of geranylgeranoic acid, its derivative or several fatty acids on lipid droplet dynamics in human hepatoma-derived cell HuH-7 cells. 第 41 回日本分子生物学会年会、横浜、2018 年 11 月 29 日
- ② 四童子好廣、岡本恭子
多価不飽和分枝鎖脂肪酸による癌細胞のパイロトーシスの誘導、シンポジウム 10, 「疾患と脂質の PITFALL」. 第 40 回日本臨床栄養学会総会、東京、2018 年 10 月 7 日

- ③ Kyoko Okamoto, Yoshihiro Shidoji
Study on Geranylgeranoic acid (GGA)-induced Incomplete Response of Autophagy. Consortium of Biological Sciences 2017、神戸、2017年12月7日
- ④ 岡本恭子, 四童子好廣
ゲラニルゲラノイン酸 (GGA) が誘導するヒト肝癌細胞のオートファジーの不完全応答に関する研究. 第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016年12月2日
- ⑤ 岡本恭子, 四童子好廣
ゲラニルゲラノイン酸 (GGA) の細胞死誘導メカニズムに関する研究. 第27回日本レチノイド研究会学術集会、東京、2016年、10月23日
- ⑥ 岡本恭子, 四童子好廣
ゲラニルゲラノイン酸が誘導するオートファジーの不完全な応答における RAB7 の関与. 第89回日本生化学会大会、仙台、2016年、9月26日
- ⑦ Kyoko Okamoto, Yoshihiro Shidoji
Upregulation of RAB7 during geranylgeranoic acid-induced incomplete autophagic response. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015)、神戸、2015年12月2日
- ⑧ Kyoko Okamoto, Chieko Iwao, Yoko Sakimoto, Yoshihiro Shidoji
Molecular Mechanism of Geranylgeranoic Acid-induced Cell Death. 3rd International Conference on Retinoids、岐阜、2015年10月21日
- ⑨ 岡本恭子, 四童子好廣
ゲラニルゲラノイン酸が誘導する不完全オートファジー応答における RAB7 の増加. 第25回イソプレノイド研究会例会、2015年9月14日
- ⑩ 岡本恭子, 崎元陽子, 四童子好廣
ゲラニルゲラノイン酸誘導性オートファジーの不完全応答における RAB7 の役割. 日本ビタミン学会第67回大会、奈良、2015年6月6日

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：四童子 好廣

ローマ字氏名：Shidoji Yoshihiro

研究協力者氏名：岩尾 千恵子

ローマ字氏名：Iwao Chieko