

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01950

研究課題名(和文) アルデヒド脱水素酵素が関与するNADPH/葉酸代謝異常と発がん・腫瘍進展機構

研究課題名(英文) Tumorigenesis and tumor progression mechanisms induced by aldehyde dehydrogenases associated NADPH and folate metabolism.

研究代表者

佐々木 雅人 (Sasaki, Masato)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30396527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：テトラヒドロ葉酸(THF)代謝は、核酸合成やNADPH産生、エピジェネティック制御など、細胞内の様々な反応に重要な役割を果たす。そこで、THF代謝系酵素であるALDH1L1、および、ALDH1L2に着目し、それらの発現亢進や酵素活性の減弱による影響を検討した。NADP+/NADPH比とその影響変動により影響を受ける活性酸素種量には、大差は見られなかった。一方、THF代謝系とリンクしたグリシンやセリン代謝系に影響を及ぼすことが判明した。さらに、一部のヒストンタンパク質のメチル化状態に違いが見られ、エピジェネティックな遺伝子発現への関与も予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

THF代謝は、古くから抗悪性腫瘍薬などの治療薬の標的となるなど、その重要性が指摘されている。一方、THF前駆体である葉酸やTHF代謝と密接に関連するビタミンB12の摂取量とがん発症との相関については、一様な見解が得られていない。その背景に、THF代謝関連遺伝子群の発現や遺伝子多型との関連が示唆されている。ALDH1L1、および、ALDH1L2についても、がん抑制遺伝子としての機能を有することがいくつか報告されているが、十分な証明には至っていない。本研究成果によりこれら分子とTHF代謝の相関が明らかとなることで、新規の分子標的治療薬の創生や、適切な治療薬の選択等が可能となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Tetrahydrofolate (THF) metabolism has an important roles for nucleic acid synthesis, NADPH production and epigenetic regulations. We focused on ALDH1L1 and ALDH1L2 which are one of THF metabolism enzymes. Wild-type or dominant negative ALDH1L1/2 expression did not influence for NADP+/NADPH ratio and reactive oxygen species amount. On the other hand, de novo glycine and serine synthesis which are highly related for THF metabolism were relatively fluctuated by ALDH1L1/2 expression. Furthermore, some of lysine residues on the histone H3 protein showed altered methylation status. These results imply that ALDH1L1/2 associated THF metabolism regulates epigenetic gene expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん代謝 活性酸素種 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

テトラヒドロ葉酸(THF)、及び、THF誘導体はチミジル酸やプリン合成のみならず、ビタミンB₁₂と共同的にS-アデノシルメチオニン(AdoMet)の合成に関与し、AdoMetは細胞内メチル化反応のメチル基ドナーとして寄与するため、DNAやヒストンタンパク質などのメチル化(エピジェネティック制御)にも重要な役割を果たす。そのため、メトトレキサート等の葉酸代謝拮抗薬は、これらの機構を阻害する結果、抗腫瘍活性を発揮すると考えられている。葉酸代謝を仲介する酵素群の一つである細胞質局在型アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーメンバー1(ALDH1L1)とミトコンドリア局在型ALDH1L2は、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸(10-fTHF)とNADP⁺から、THFとNADPHを産生する。近年、細胞内NADPHの~40%が、これらの葉酸代謝系により産生されることが報告された(Fan J. *et al.*, *Nature*, 2014)。NADPHは、酸化型のグルタチオン(GSH)やアスコルビン酸、チオレドキシシン(Trx)などの抗酸化物質の還元利用され、それらのリサイクリングに重要な役割を果たす。NADPHは、ALDH1L1/2の他に、主にペントースリン酸経路や、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼによる反応で産生され、活性酸素種(ROS)レベルの制御に寄与していると考えられる。NADPH産生の減弱から抗酸化物質の酸化・還元バランスに異常をきたす場合があることから、NADPH産生反応系の障害は、細胞内の酸化・還元維持機構に影響をおよぼすと考えられる。そこで、葉酸代謝系が、(1) がんの治療標的となり得る代謝系であること、(2) NADPH産生の重要な反応系であること、の二つの理由からALDH1L1、および、ALDH1L2に着目し、その発現レベルや酵素活性の異常が細胞の恒常性維持や、発がん・腫瘍進展に寄与するか否かを検討することを想起した。

2. 研究の目的

準備的な検討から、多くの腫瘍組織でALDH1L1の発現が減弱していること、複数のヒト由来がん細胞株においてもALDH1L1、および、ALDH1L2の発現が減少していること(図1参照)、さらに、ALDH1L1高発現の乳がん患者の無再発生存期間が優位に延長することを見出していた。ALDH1L1、および、ALDH1L2が、がん抑制遺伝子として機能することが予想されるが、その機構がTHFの代謝異常によるのか、NADPH産生減少によるのか、それとも両者が関与するのかわかりませんでした。以上の背景を基に、本研究ではALDH1L1、および、ALDH1L2の両分子機能、並びに、その細胞生物学的な寄与を明らかにし、それら分子が発がんや腫瘍進展性にどのように影響するのか、そして、代謝系にどのような変化をもたらすのかを解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

複数のヒト由来がん細胞株をからRNAを採取し、ALDH1L1、および、ALDH1L2の発現レベルを調べた。

野生型(WT)、並びに、酵素活性を欠くドミナントネガティブ変異体(MT)のALDH1L1、および、ALDH1L2発現ベクターを構築した。上記調査結果をもとに、発現レベルに応じていくつかの細胞株を選択し、安定発現株を樹立した。樹立した細胞株を用いて、以下の検討を行った。

- (1) 腫瘍形成能やがん細胞株の増殖・細胞死などにおよぼす影響。加えて、細胞種(発現レベル)毎による影響の違い。
- (2) NADPHレベルや抗酸化物質・分子の酸化還元状態、ROS産生。
- (3) 細胞内代謝の変化(メタボローム解析)。
- (4) DNAやヒストンのメチル化状態の変化(エピジェネティック変化)。

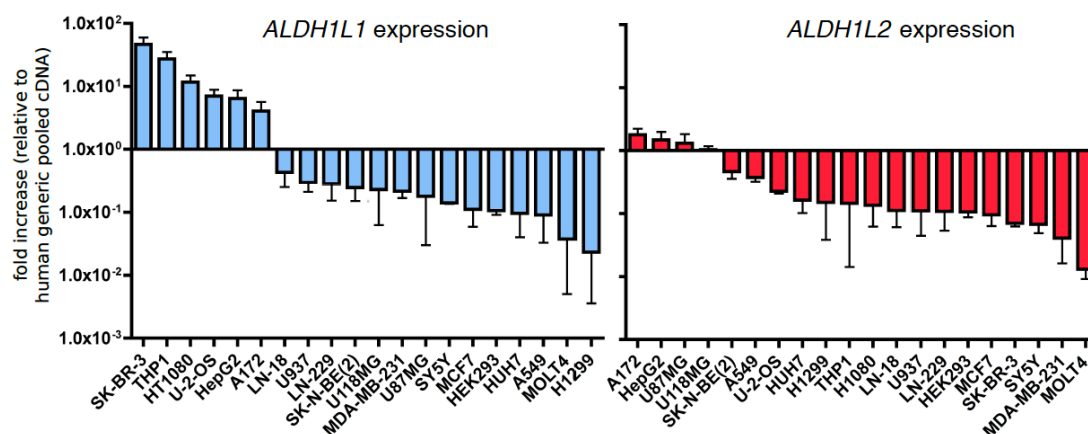


図1 がん細胞株におけるALDH1L1/2発現

4. 研究成果

ヒト正常組織由来の cDNA をコントロールとして用い、20 種類の細胞株における *ALDH1L1*、および、*ALDH1L2* の発現レベルを調べた結果、*ALDH1L1* は 6 細胞腫で、*ALDH1L2* は 4 細胞腫でコントロールよりも発現が高かったが、その他の細胞株では発現が低かった (図 1)。由来する腫瘍組織ごとには一定の傾向は見られなかった。この結果から、*ALDH1L1*、および、*ALDH1L2* の両分子共に発現の低い肝がん由来細胞株 HUH-7 を用いて、*ALDH1L1*、および、*ALDH1L2* の WT、並びに、MT の安定発現株を樹立した。

樹立した安定発現株は、*ALDH1L1* と *ALDH1L2* 間、又、WT と MT 間の比較において、増殖性に顕著な差は見られなかった。細胞内代謝への影響を調べる目的で、 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 比を調べたが、予想に反し大差は見られず、*ALDH1L1*、および、*ALDH1L2* タンパク質の酵素活性や発現の変動による NADPH 産生を調整する機構の存在が示唆された。同様に、細胞内 ROS 量の定量を行ったが、 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 比の結果と矛盾せず、ROS 量に大きな違いは見られなかった。

次に、*ALDH1L1*、および、*ALDH1L2* の発現の変動が葉酸代謝のみならず、細胞内代謝全体に及ぼす影響を調べる目的で、メタボローム解析を実施した。いくつかの代謝系において特徴的な変化が見られたが、中でも、葉酸代謝系との関連が強い、*de novo* のセリンやグリシンの代謝系に大きな変化が観察された。

葉酸代謝系はメチオニンサイクルを介し、AdoMet の産生にも関与することから、ヒストン H3 タンパク質を中心としたリジン残基のトリメチル化状態を調べた。その結果、*ALDH1L1*、および、*ALDH1L2* の発現がヒストン H3 タンパク質の Lys9 や Lys27 のトリメチル状態に影響を及ぼすことが判明した。

これらの結果は主に、非ストレス環境下で得られた結果であるため、現在、酸化ストレス負荷時や、葉酸枯渇／葉酸代謝拮抗薬処理時などのストレス環境下における影響を調べている。また、HepG2 細胞や、U-2-OS 細胞の安定発現株も樹立しており、上記研究同様、解析を進めている。加えて研究を進める中で、*ALDH1L1*、および、*ALDH1L2* タンパク質が酵素活性に依存してユビキチン化修飾を受けることを見出し、現在そのメカニズムについても検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木雅人, 豊嶋翔子, 熊谷莉歩, 樋川美優, 山形由紀子, 田中大, 伊藤文恵, 柴田信之
2. 発表標題 ALDH1L1/2 遺伝子のがん抑制遺伝子として可能性についての検討
3. 学会等名 第57回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木雅人, 豊嶋翔子, 熊谷莉歩, 山形由紀子, 樋川美優, 高野萌, 大橋弥生, 富塚綾, 伊藤文恵, 田中大, 柴田信之
2. 発表標題 テトラヒドロ葉酸代謝酵素ALDH1L1/2 遺伝子発現が活性酸素レベルやエピジェネティック制御に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金澤和康, 佐々木雅人, 佐藤絵理香, 佐川舜乙, 武山亜美, 伊藤文恵, 田中大, 柴田 信之
2. 発表標題 葉酸代謝酵素ALDH 1 L1/2のユビキチン修飾による活性調節機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 一男 (Yamamoto Kazuo) (70255123)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	