

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08292

研究課題名(和文) ノンジェノミックな新規レチノイン酸作用機構の解明とその応用研究

研究課題名(英文) Elucidation of novel non-genomic mechanisms of retinoic acid action and its applications

研究代表者

高橋 典子 (Takahashi, Noriko)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50277696

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)：レチノイン酸(RA)はがん・生活習慣病の治療において注目される。本研究では核内受容体とは異なるノンジェノミックなRA作用機構であるレチノイル化(RAによるタンパク質修飾)について検討を行った。アクチン重合を制御するRhoGDI、アクチン結合タンパク質である-アクチニン、プロテインキナーゼA(PKA)の調節サブユニットのレチノイル化の生理的意義は、各タンパク質を安定化し、本来の機能を高めることであった。また、レチノイル化がPKAを核に移行させ、遺伝子発現調節に重要なヒストンを含む核内タンパク質のリン酸化を促す、また、ヒストンの異化を高めるノンジェノミックなRA作用を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RA修飾によるタンパク質の構造変化で安定性・局在性・酵素活性等が変わる点はRA受容体とは異なることから、レチノイル化は新しい情報伝達機構となる。本研究でレチノイル化がPKA、ヒストン、細胞骨格関連タンパク質の安定性に変化を与え、本来の機能を増大させ、RA作用を発現させることを示した。レチノイル化PKAを介するヒストンのリン酸化経路を基にレチノイル化ヒストン経路を実証し、RAによるエピジェネティクス制御作用という新規な概念を提案することは、従来のRA受容体経路を補完することを証明できるという学術的意義を与える。また、この新規経路を基にして、がんや生活習慣病の治療薬の開発が行える社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Retinoic acid (RA) is an important nutrient that has been drawing attention from the viewpoint of prevention and treatment of cancer and lifestyle-related diseases etc. Using human leukemia cells, we investigated retinoylation (protein modification by RA), which is a non-genomic mechanism of action of RA that is different from nuclear receptors. We elucidated the physiological roles of the retinoylated proteins, RhoGDI, which regulates actin polymerization, -actinin, an actin-binding protein and regulatory subunits of protein kinase A (PKA). We found that retinoylation stabilizes each protein and enhances their function. In addition, we provided evidence that retinoylation translocates PKA to the nucleus, promoting phosphorylation of nuclear proteins including histones that are important for gene expression regulation, and that it enhances histone catabolism. These findings help elucidate non-genomic mechanisms of RA action.

研究分野：生化学

キーワード：レチノイン酸 レチノイル化 タンパク質修飾 シグナル伝達 プロテインキナーゼA ノンジェノミック

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン A の活性型である RA は抗癌、抗肥満、成長促進、皮膚粘膜形成、免疫調節等、多種多様な作用を持つミラクルな生理活性物質である。特に RA は、ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL60 細胞) に対し強力な細胞分化誘導能を持つことから、急性前骨髄球性白血病患者 (APL) の治療に使われている。

RA の作用機構は RA 核内受容体 (RAR) と RA の複合体のみで説明される。しかしながら、RA 応答が非常に速いこと、RAR への親和性が弱いレチノイドでも RA と同様の作用を示すこと等、不明な点も多い。そこで、新しい RA 作用機構に関する研究が行われ、RA によるタンパク質の修飾反応 (レチノイル化) が発見された。レチノイル化は *in vitro*、*in vivo* と広範囲に見られ、ほとんどのレチノイル化タンパク質は核内に存在し、そのひとつがシグナル伝達において主要な役割を演じる cAMP 依存性リン酸化酵素 (プロテインキナーゼ A、PKA) の調節サブユニット (RII α) であることが明らかにされた。そして、レチノイル化 PKA は核内に移行し、核内タンパク質をリン酸化して分化を誘導している可能性も示された。これによって、RAR で説明できなかった RA と cAMP 生成誘導薬プロスタグランジン E₂ の併用における RA のプライミング効果をうまく説明することができた。よって、PKA がレチノイル化されることで核に移行し、核内 PKA が cAMP と結合して核内タンパク質をリン酸化して遺伝子の転写調節を行う機構が示唆された。PKA 以外に、細胞形態の制御因子である G タンパク質 Rho の解離阻害因子 RhoGDI β 、アクチン結合タンパク質の α -アクチニン、ヒストンがレチノイル化されている。

2. 研究の目的

本研究においては、RA による翻訳後タンパク質修飾 (レチノイル化) と核内タンパク質機能変化に焦点をあて、次の事柄を明らかにする。1) 新規レチノイル化タンパク質高感度検出法 (RA 抗体法) を用いて、新規核内レチノイル化タンパク質を検出・同定する。また、レチノイル化タンパク質として同定した RhoGDI β 、 α -アクチニンの RA 処理による影響を調べ、レチノイル化の生理的意義を解明する。2) 核内レチノイル化 PKA による核内タンパク質のリン酸化を調べ、RA 処理後 PKA により新たにリン酸化される新規核内リン酸化タンパク質を同定する。転写調節因子・転写共役因子等のリン酸化も検討する。3) ヒストンの各種修飾と RA 作用との関連性を解明するため、各ヒストンの修飾への RA の影響を調べる。4) RA 修飾部位を明らかにするため、ヒストンの修飾部位特異的変異体遺伝子を作製・導入した HL60 細胞の RA 作用を調べ、RA 抗体法で解析する。そして、RA のエピジェネティクス制御作用を解明するため、レチノイル化シグナル分子、およびレチノイル化核内タンパク質の機能変化と、RA の細胞作用との関連性を解析する。

以上のように、本研究では従来とは異なる視点から RA の作用機構を解明して新しいノンジェノミックなシグナル伝達エピジェネティクス制御機構を明らかにすることを目的とし、得られた知見に基づく新薬及び治療法の開発を最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) HL60 細胞の画分の調製: HL60 細胞 (2×10^7 細胞) を氷冷した Lysis Buffer B (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DDT, 1 mM NaF, 10 mM Glycerophosphate, 0.2 mM PMSF, 1% Protease inhibitor cocktail) で懸濁し、氷上に 10 分放置した。10% Nonidet P-40 を加えて穏やかに攪拌後、遠心 (4°C, 1,000 \times g, 5 min) し、上清を細胞質画分とした。沈殿に Lysis Buffer C (20 mM HEPES pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 10% Glycerol, 10 mM Glycerophosphate, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 1% Protease inhibitor cocktail) を加え、氷上に静置後、遠心分離 (13,000 \times g, 4°C, 10 min) し、得られた上清を核画分とした。ヒストン画分は酸抽出により調製した。

(2) 二次元-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2D-PAGE): 2D-PAGE は O'Farrell らの方法に準じた。RA 処理した HL60 細胞 (4×10^6 cells) の乾燥残渣は、9.5 M 尿素, 2% NP-40, 2% ampholytes (pH 4-7 及び pH 3.5-10) 及び 5% 2-mercaptoethanol を含む等電点電気泳動用緩衝液に溶解した。一次元目は 2% ampholyte を含む等電点ゲルを用いた。二次元目は、10% アクリルアミドゲルを使用した。泳動後のゲルは SYPRO で染色、或いは免疫染色法 (下記 (3)) を行い ECL Plus で可視化した。

(3) 免疫染色法: 試料タンパク質を一次元-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (1D-PAGE) 或いは 2D-PAGE により分離後、ゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写溶液 (40 mM Tris-glycine, 20% methanol, 0.1% SDS) を用いセミドライトランスファー装置で転写した。膜をブロッキング後、0.1% Tween 20 含有 PBS (PBS-T) で希釈した各種一次抗体溶液中に室温で 2 時間放置した。膜を洗浄後、HRP 標識二次抗体と室温でインキュベーションし、ECL Plus Western Blotting Kit で可視化した。

(4) RA 処理した HL60 細胞の画分調製: RA 処理 HL60 細胞 ($1.0 \sim 2.0 \times 10^9$ cells) に 0.005% Tween 20 含有 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) を 2~3 ml 加え懸濁後、ポリトロンホモジナイザーを用いて均一破碎した。このホモジネートを 100,000 \times g, 60 分間遠心し、得られた上清を可溶性画分とし、-80°C で保存した。また沈殿物は、0.005% Tween 20 と 10% CHAPS を含有する 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) に懸濁溶解後、再びポリトロンホモジナイザーで破碎した。その後 100,000 \times g, 60 分間遠心し、得られた上清は沈殿画分とした。

(5) 陰イオン交換樹脂 (Mono Q) による細胞タンパク質の分離: Mono Q カラムは、2 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA を含む 20 mM Potassium phosphate buffer (pH 6.8) で平衡化した。上記 (4) で調製した可溶性画分または沈殿画分をカラムに添加し、0-1 M NaCl の直線濃度勾配でタンパク質を溶出した。

(6) リン酸化タンパク質、レチノイル化タンパク質の MS 解析: 2D-PAGE によりタンパク質を分離し、抗体で検出したリン酸化タンパク質、レチノイル化タンパク質を含むゲルを切り出す。ゲルから抽出したタンパク質を質量分析 (MS) 解析、或いは Orbitrap 質量分析で解析し、データベース検索を行うことで、タンパク質を同定した。

(7) RT-PCR: 未処理、RA 処理した HL60 細胞から抽出した mRNA (2.5 µg) に 5×VILO™ Reaction Mix, 10×SuperScript Enzyme Mix を用いて cDNA の合成を行った。各遺伝子と β-actin に対する特異的プライマーと Blend Taq polymerase を用い、cDNA を template として PCR 法を行った。PCR 産物を 2% アガロースゲル電気泳動を使用して分離し、エチジウムブロマイド溶液で染色・撮影後、バンド強度を数値化した。

(8) 免疫沈降法: タンパク質総抽出液は、抗体-Protein G Mag Sepharose と共に 4 °C で一晚穏やかに攪拌後、遠心で分離した。得られた複合体を PBS で 3 回洗浄後、Sample buffer [62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 2% SDS; 10% glycerol; 5% 2-ME; 0.0025% bromophenol blue] に溶解し、100 °C で 5 分間加熱処理した。これを免疫染色法による目的タンパク質の検出に用いた。

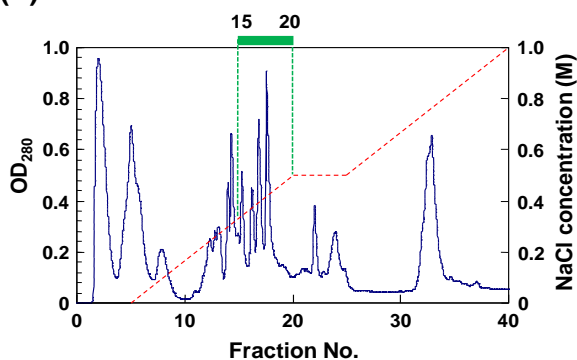
(9) 遺伝子の導入: ヒストン H2B、H3、H2A、H4 の野生型および変異体を作製し、発現ベクターに組み込み、プラスミドを調製した。HL60 細胞にプラスミドをエレクトロポレーション法を用いて導入し、培養した。回収した細胞から酸抽出で得られたヒストンに対し、免疫染色或いは免疫沈降法を行い、ヒストンの野生型および変異体の発現を確認した。

4. 研究成果

(1) 新規レチノイル化タンパク質の同定とレチノイル化の生理的意義の解明:

RA 処理した HL60 細胞中のタンパク質を Mono Q カラムにより分離した (Fig. 1A)。各フラクションに含まれるタンパク質を、1D-PAGE により分離し、RA 特異的抗体を用いて免疫染色 (RA 抗体法) を行ったところ、既に同定されているレチノイル化タンパク質に加え、いくつかのレチノイル化タンパク質を検出した (Fig. 1B)。即ち、タンパク質 a は G タンパク質 Rho の解離阻害因子 RhoGDIβ、タンパク質 b は PKA の調節サブユニット RIIα、タンパク質 c は中間径フィラメントで細胞骨格タンパク質であるビメンチン、タンパク質 d はアクチン結合タンパク質のアクチニンを RA 抗体法で確認することができた。放射標識 RA を用いる従来法で同定した RIIα とビメンチンは、RA 抗体法でも検出することができた。

Fig. 1 (A)



(B)

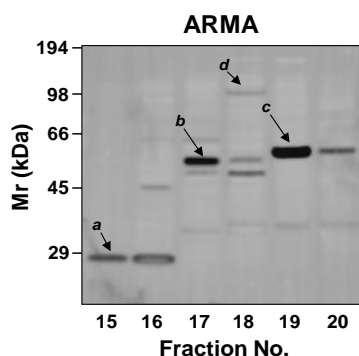


Fig. 2

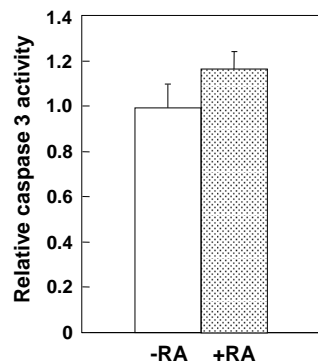
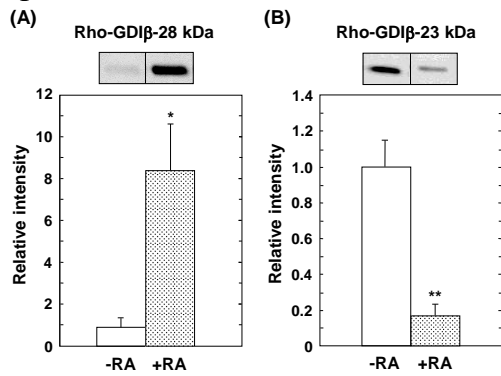


Fig. 3

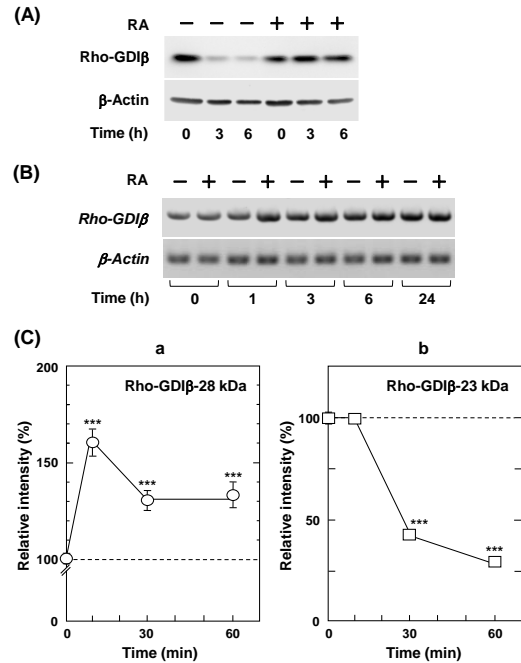


RA 抗体法で新たに同定したレチノイル化タンパク質 Rho-GDIβ (分子量 28 kDa) について、RA の影響を検討した。以前の研究において、分子量 28 kDa の Rho-GDIβ は Caspase-3 によって 23 kDa と 5 kDa に切断され、アポトーシスを引き起こすことが知られている。RA を処理した

HL60 中の Caspase-3 活性は未処理に比べて有意な変化はなく (Fig. 2)、アポトーシスの指標であ

る DNA の断片化も起こっていなかった。また、RA 処理は未処理に比べて、有意に 28 kDa-Rho-GDI β の発現量をを増加させ、23 kDa-Rho-GDI β の発現量を減少させた (Fig. 3)。次いで、RA 処理、

Fig. 4



未処理の細胞にタンパク質合成阻害剤シクロヘキサミドを処理し経時的な 28 kDa-Rho-GDI β タンパク質量の変化を調べたところ、未処理の場合に見られた経時的な減少は RA 処理によって抑制されていた (Fig. 4A)。その際、28 kDa-Rho-GDI β の mRNA レベルは RA 処理によって影響を受けなかった (Fig. 4B)。また、RA 処理後、Rho-GDI β の RA による分解抑制は、30 分以内と非常に早い段階で起こっていることが明らかとなった (Fig. 4C)。

レチノイル化タンパク質である α -アクチニンに関しても同様の検討を行った。Mono Q カラムで部分精製した α -アクチニンと免疫沈降法を用いて、レチノイル化 α -アクチニンを確認した。RA 処理した細胞の α -アクチニン遺伝子の発現量は未処理細胞と比べ変化なかった。これに対し、 α -アクチニンタンパク質の発現量は未処理細胞では経時的に減少傾向を示したものの、RA 処理細胞ではほとんど変わらなかった。そこで、RA 処理後の細胞にシクロヘキサミド処理を行い、経時的な α -アクチニンタンパク質量の変化を調べたところ、未処理の場合の減少は RA 処理によって抑えられた。この分解抑制に、ユビキチン化が関与していた。以上のことから、タ

ンパク質の分解を阻害することが、レチノイル化の生理的意義である可能性が示唆された。

(2) 核内レチノイル化 PKA によりリン酸化される核内タンパク質の同定と生理的役割の解明：

HL60 細胞中の PKA の調節サブユニット RII α が RA 処理によってレチノイル化されること、および、レチノイル化 RII α が核に局在することは既に報告した。また、HL60 細胞への RA 処理は、RII α のタンパク質発現レベルを増加させたが、触媒サブユニット C α のタンパク質発現には影響を及ぼさないこと、RII α の mRNA 発現レベルを変えないことが分かった。

RA 処理後の細胞にシクロヘキサミド処理を行い、経時的に RII α タンパク質量を調べたところ、未処理の場合には減少するが、RA 処理した場合には多少の減少はあるものの維持していた (Fig. 5)。また、RA 処理によりユビキチン化 RII α タンパク質量の減少が見られたことから、この RA による RII α タンパク質の分解抑制に、ユビキチン化が関わっていることが判明した (Fig. 6)。また、RA 処理により核内 PKA 活性は約 1.5 倍に有意に増加したことから、レチノイル化 RII α と触媒サブユニットから構成される 4 量体 PKA が RA 処理により核で増加し、核内タンパク質のリン酸化を促進させ、細胞分化を促進することが明らかとなった (Fig. 7)。以上のことから、タンパク質の分解を阻害すること、および、核内での PKA によるタンパク質のリン酸化促進が、レチノイル化の生理的役割である可能性が示唆された。

Fig. 5

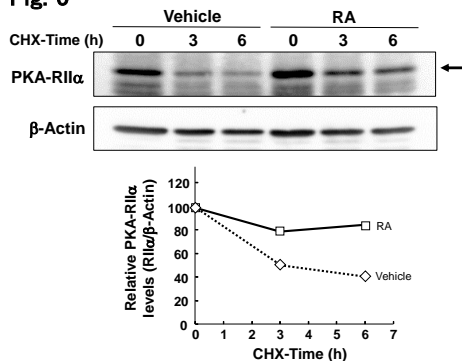


Fig. 6

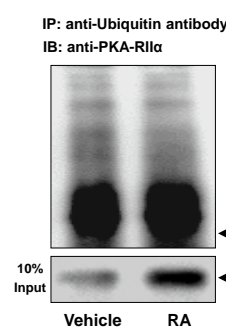
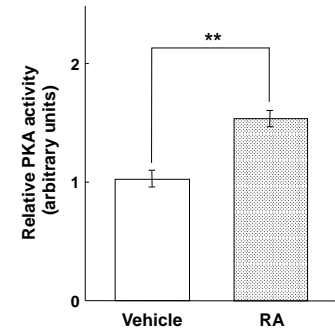


Fig. 7



次に、リン酸化される核内タンパク質を調べるため、核画分中のタンパク質を分離後、抗リン酸化-PKA 基質抗体を用いて PKA によりリン酸化されたタンパク質を検出し MS 解析を行い同定した。以前の研究で、RA 処理により顕著に増加し、PKA リン酸化阻害剤 PKAI の前処理で阻害される 4 つの核内リン酸化タンパク質 ① 25 kD, pI 4.7、② 32.5 kD, pI 5.5、③ 42.6 kD, pI 5.8、④ 55 kD, pI 6.1 を見出している。RA 処理した細胞から核画分を調製し、duplicate の 2D-PAGE で核内タンパク質を分離した。ゲル 1 中のタンパク質を膜に転写後 SYPRO 液で染色し、その後抗リン酸化-PKA 基質抗体を用いて免疫染色を行った。ゲル 2 中のタンパク質を SYPRO 液で染色した後、両ゲルのスポットを照らし合わせて PKA によりリン酸化された核内リン酸化タン

パク質スポットを特定した。このスポットのゲルを切り出し、タンパク質を抽出後、MS解析を行った。その結果、転写調節・スプライシング因子等と同定された。また、この因子の抗体を用いて免疫沈降を行い、抗リン酸化-PKA-基質抗体で免疫染色を行ったところ、バンドを検出した。また、その下流の調節因子の発現はRA処理により変化し、細胞分化は促進されたが、PKA阻害剤の処理により、その変化は解除され、細胞分化は抑制された。従って、今回同定した因子はRA処理により核内でレチノイル化PKAによりリン酸化を受け、遺伝子発現を調節して細胞分化に関わっていることを証明することができた。

(3) RA処理によるヒストン修飾の変化とRA修飾部位の解明：

未処理、RA処理したHL60細胞を細胞質画分と核画分に分画後、両画分中のヒストンレベルを抗ヒストン抗体と1D-PAGEを用いて免疫染色を行い検討した。ヒストンタンパク質は電気泳動上では分子量ではなく荷電に依存して移動するが、未処理およびRA処理した核画分には17kDa辺りにヒストンのバンドを確認したが、細胞質画分には見られなかった。これに対し、未処理の細胞質画分には17kDa辺りにヒストンのバンド見られないが、RA処理の細胞質画分には15kDa辺りにヒストンのバンドが認められた。以上の結果から、RA処理によりヒストンの異化(代謝・修飾等)が促進され、核に移行せずに細胞質に留まったものと考えられた。RA処理の場合のみ異化物が細胞質画分に見られることから、レチノイル化が関与している可能性がある。

HL60細胞から単離したヒストンは、PKAによりリン酸化され、RA処理によりそのリン酸化は増加し、アセチル化は減少することを明らかとした。

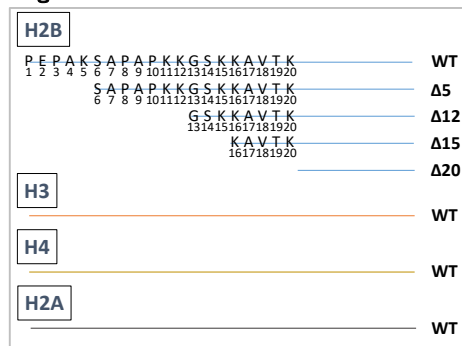
HL60細胞において、ヒストンがRAにより修飾されエピゲノムの変動に影響する可能性がある。しかしながら、ヒストンの分子種(H2A、H2B、H3、H4)と修飾するアミノ酸の種類は明らかではない。そこで、ヒストンの欠失変異体発現プラスミドを作製し、HL60細胞に導入して、タンパク質を発現させた(Fig. 8)。ヒストンH2Bの野生型と変異体(Δ5、Δ12、Δ20)、および、ヒストンH3の野生型の発現プラスミドでは、タンパク質の発現を確認することができた。しかしながら、H2BのΔ15、ヒストンH4、および、ヒストンH2Aの発現は確認できなかった。発現を確認できたヒストン変異体を用いてレチノイル化部位の同定を進めるとともに、発現確認できていないプラスミドに関しては再構築して作製している。

以上の結果から、レチノイル化タンパク質として同定されたRhoGDIβとα-アクチニンは、RA処理により両者ともタンパク質の分解が抑えられ、安定化することが明らかとなった。RhoGDIβの場合、アポトーシス誘導の原因となる23kDa-Rho-GDIβの発現量が減少したことから、レチノイル化がアポトーシスを抑制し、細胞分化の方向に誘導している可能性が示唆された。α-アクチニンの場合、RAによる細胞分化過程で発現量が増加することから、アクチン重合を促進させ細胞骨格の変化を促す起因となる可能性が示された。これらの事象がレチノイル化の生理的意義と考えられるが、RhoGDIβとα-アクチニンにおけるRA修飾部位を特定し、その変異体を発現させることでより確かなものとなる。

レチノイル化タンパク質として同定されたPKAのRIIαについては、上記の2つのレチノイル化タンパク質と同様、RA処理によりRIIαが安定化されPKAによるリン酸化が増大する。これに加え、レチノイル化RIIαは核内に存在し、核内のPKA活性がRA処理により増加することから、核内タンパク質のリン酸化が促進される。その標的タンパク質(基質)として、転写調節・スプライシング因子等やヒストンが同定されたことから、細胞分化に直結すると考えられる。

ヒストンはレチノイル化もPKAによるリン酸化も受ける。RA処理によりヒストンのリン酸化とレチノイル化を促すことで、クロマチンリモデリング-遺伝子発現調節系を調節し、細胞分化に繋がる可能性が考えられた。ヒストン(H2A、H2B、H3、H4)のアセチル化はリシン(Lys)、リン酸化はセリン(Ser)、スレオニン(Thr)、チロシン(Tyr)、ユビキチン化はリシン(Lys)、メチル化はリシン(Lys)、アルギニン(Arg)を修飾する。リン酸化、アセチル化、メチル化は4種のヒストンのいくつかのアミノ酸上に起こるのに対し、ユビキチン化はヒストンH2AとH2Bのひとつのリシン(Lys)にしか起こらない。ヒストンのRA修飾部位を決定することで、リン酸化修飾の変化との連携が解明され、アセチル化との関連も判明する。このように、レチノイル化が間接的、直接的にヒストンタンパク質の修飾変化を引き起こす新しいエピジェネティクス調節機構は非常に興味深い。RA処理は、白血病細胞HL60の細胞形態と核の形をドラスティックに変化させ、正常細胞に機能分化させ、がん細胞の増殖を止める。レチノイル化タンパク質は、形と機能に関わるタンパク質をターゲットとしている。これらのシグナル分子の細胞内動態を詳細に解明し、エピジェネティクス調節機構への関与を明らかにし、得られた新しい知見を基に、新薬の開発、新規治療法・予防法の確立を目指す。

Fig. 8



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kake Takamichi, Imai Masahiko, Takahashi Noriko	4. 巻 28
2. 論文標題 Effects of carotene on oxazolone induced atopic dermatitis in hairless mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 1044 ~ 1050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.14003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imai, M., Yokoe, H., Tsubuki, M., and Takahashi, N.	4. 巻 42
2. 論文標題 Growth inhibition of human breast and prostate cancer cells by cinnamic acid derivatives and their mechanism of action.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 1134-1139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-01002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi, N., Kake, T., Hasegawa, S., and Imai, M.	4. 巻 68
2. 論文標題 Effects of Post-administration of β -Carotene on Diet-induced Atopic Dermatitis in Hairless Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Oleo Sci.	6. 最初と最後の頁 763-802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess19092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Izumisawa, T., Kaneko, T., Soma, M., Imai, M., Wakui, N., Hasegawa, H., Horino, T., and Takahashi, N.	4. 巻 42
2. 論文標題 Augmented renal clearance of vancomycin in hematologic malignancy patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 2089-2094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00652	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Noriko, Imai Masahiko	4. 巻 63
2. 論文標題 Analysis of post-translational modification by electrophoresis? New developments on the functional analysis of retinoylated proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Electrophoresis Letters	6. 最初と最後の頁 35-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2198/electroph.63.35	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa S., Imai M., Yamasaki M., Takahashi N., and Fukui T	4. 巻 495
2. 論文標題 Transcriptional regulation of acetoacetyl-CoA synthetase by Sp1 in neuroblastoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 652-658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.068.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hidaka M., K, Tsushima S., Uchida C., Takahashi K., Takahashi N., Tsubuki M., Hara Y., Uchida T.	4. 巻 499
2. 論文標題 Food polyphenols targeting peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 681-687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.03.212.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li C., Imai M., Yamasaki M., Hasegawa S., and Takahashi N.	4. 巻 40
2. 論文標題 Effects of pre- and post-administration of vitamin A on the growth of refractory cancers in xenograft mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 486-494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b16-00933.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Li C., Imai M., Hasegawa S., Yamasaki M., and Takahashi N.	4. 巻 40
2. 論文標題 Growth inhibition of refractory human gallbladder cancer cells by retinol, and its mechanism of action.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 495-503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b16-00934.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi N., Koyama S., Hasegawa S., Yamasaki M., and Imai M.	4. 巻 27
2. 論文標題 Anticancer efficacy of p-dodecylaminophenol against high-risk and refractory neuroblastoma cells in vitro and in vivo.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem Lett.	6. 最初と最後の頁 4664-4672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2017.09.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa S., Imai M., Yamasaki M., Takahashi N., and Fukui T.	4. 巻 495
2. 論文標題 Transcriptional regulation of acetoacetyl-CoA synthetase by Sp1 in neuroblastoma cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 652-658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.068.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa S., Imai M., Yamasaki M., Takahashi N., and Fukui T.	4. 巻 495
2. 論文標題 Transcriptional regulation of acetoacetyl-CoA synthetase by Sp1 in neuroblastoma cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 652-658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.068.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa S., Imai M., Yamasaki M., Takahashi N., and Fukui T.	4. 巻 495
2. 論文標題 Transcriptional regulation of acetoacetyl-CoA synthetase by Sp1 in neuroblastoma cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 652-658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.068.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計62件(うち招待講演 3件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 齋藤大輔、今井正彦、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 -Actininタンパク質の安定化とレチノイル化
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井正彦、齋藤大輔、泉澤友宏、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 抗がん剤による乳がん及び前立腺がん細胞に対する増殖抑制作用に及ぼす抗菌剤の効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川晋也、今井正彦、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 ヒトにおけるケトン体代謝酵素の新規スプライシングバリエーションの同定
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎正博、長谷川晋也、今井正彦、高橋典子
2. 発表標題 臭化難燃剤 (TBBP-A) が分化前後の脂肪細胞の脂質 - ケトン体代謝経路へ与える影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sarah Altman, Masahiko Imai, Noriko Takahashi, Terrence R. Burke
2. 発表標題 Examination of aminophenol-containing compounds designed as antiproliferative agents and potential atypical retinoids
3. 学会等名 Spring 2019 ACS National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋典子
2. 発表標題 ビタミン A の多様な機能と創薬
3. 学会等名 化学最前線2019：神奈川大学 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋典子、小森悠、齋藤大輔、長谷川晋也、山崎正博、今井正彦
2. 発表標題 Fenretinide誘導体によるメラニン合成阻害機構
3. 学会等名 フォーラム2019：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井正彦、齋藤大輔、横江弘雅、津吹政可、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 難治がんに対するcinnamate誘導体による細胞増殖抑制作用
3. 学会等名 フォーラム2019：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川晋也、今井正彦、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 トリグリセリド代謝におけるケトン体利用酵素の役割
3. 学会等名 フォーラム2019：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎正博、長谷川晋也、今井正彦、高橋典子
2. 発表標題 臭化難燃剤TBBP-Aが培養脂肪細胞の脂質・ケトン体代謝に対して与える影響の検討
3. 学会等名 フォーラム2019：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤大輔、今井正彦、高橋典子
2. 発表標題 核内タンパク質のPKAによるリン酸化
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井正彦、齋藤大輔、長谷川晋也、山崎正博、横江弘雅、津吹政可、高橋典子
2. 発表標題 乳がん及び前立腺がん細胞に対するケイヒ酸誘導体の増殖抑制作用
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川晋也、柳下衛平、今井正彦、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 胆汁酸代謝経路におけるケトン体代謝酵素の役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎正博、長谷川晋也、今井正彦、高橋典子
2. 発表標題 臭化難燃剤 (TBBP-A) が前駆脂肪細胞の脂質-ケトン体代謝経路へ与える影響の検討
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤大輔、今井正彦、高橋典子
2. 発表標題 レチノイル化 γ -actininに関する研究
3. 学会等名 第30回日本レチノイド研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井正彦、齋藤大輔、泉澤友宏、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 抗菌剤によるがん細胞に対する増殖抑制作用
3. 学会等名 第30回日本レチノイド研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川晋也、今井正彦、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 レチノイン酸により誘導されるケトン体代謝が神経細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 第30回日本レチノイド研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井健太郎、高橋勝彦、紺澤咲乃、細屋泉、高橋典子、東伸昭
2. 発表標題 メチオニンコリン欠乏食誘発NASHモデルマウスに対するレチノイン酸の効果
3. 学会等名 第20回Pharmacology-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、高橋典子
2. 発表標題 脂質代謝におけるケトン体利用酵素の役割
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 高橋典子、山王豊盛、齋藤大輔、長谷川晋也、今井正彦
2. 発表標題 RA処理したHL60細胞において増加する核内PKA基質
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 齋藤大輔、山王豊盛、今井正彦、長谷川晋也、高橋典子
2. 発表標題 RA処理したHL60細胞中の核内リン酸化タンパク質
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 今井正彦、泉澤友宏、齋藤大輔、高橋典子
2. 発表標題 抗菌剤によるがん治療薬のドラッグリポジショニング創薬
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 Noriko Takahashi, Chuan Li, Shinya Hasegawa, Masahiro Yamasaki, and Masahiko Imai
2. 発表標題 Anti-cancer activity of vitamin A against refractory cancers
3. 学会等名 FASEB/The 4th International Conference on Retinoids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋典子、今井正彦
2. 発表標題 電気泳動による翻訳後修飾の解析：タンパク質レチノイル化の機能解析に関する新展開
3. 学会等名 第69回日本電気泳動学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体代謝酵素の欠損が神経細胞の発達に与える影響
3. 学会等名 フォーラム2018：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋典子、李川、長谷川晋也、山崎正博、今井正彦
2. 発表標題 担がんマウスにおける生体内ビタミン A 濃度の変化
3. 学会等名 フォーラム2018：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋典子、酒井亜沙子、長谷川晋也、山崎正博、今井正彦
2. 発表標題 RA 処理によるプロテインキナーゼ A の安定化と細胞内局在の変化
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体代謝を介したレチノイン酸による神経細胞の分化誘導
3. 学会等名 第29回日本レチノイド研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井正彦、小山俊平、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 MYCN発現の異なる神経芽腫に対するアミノフェノール誘導体の抗腫瘍作用
3. 学会等名 第29回日本レチノイド研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井正彦、神田純、中澤昂平、大野実沙紀、岸野菜央子、横江弘雅、津吹政可、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 Caffeic acid phenethyl ester 誘導体によるがん細胞増殖抑制作用
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎正博、清田龍毅、春園莉咲、新関由希乃、宮地さき、今井正彦、長谷川晋也、高橋典子
2. 発表標題 臭化難燃剤TBBP-Aによる白色脂肪細胞の脂質・ケトン体代謝経路への影響の検討
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳下 衡平、長谷川 晋也、山崎 正博、今井 正彦、高橋 典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がコレステロール代謝に与える影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川 晋也、山崎 正博、今井 正彦、福井 哲也、高橋 典子
2. 発表標題 ケトン体代謝酵素の欠損が脳神経系に与える影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 典子、稲垣 志穂、久賀田 早紀、布施 智朗、今井 正彦
2. 発表標題 2型糖尿病ラットの内臓脂肪因子におけるビタミンA の影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 大輔、今井 正彦、長谷川 晋也、山崎 正博、高橋 典子
2. 発表標題 細胞分化時に細胞骨格構成成分アクチニンに及ぼすレチノイン酸の影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井正彦、神田純、中澤昂平、大野実沙紀、岸野菜央子、横江弘雅、津吹政可、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 Caffeic acid phenethyl ester 誘導体によるがん細胞増殖抑制作用
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriko Takahashi, Asako Sakai, and Masahiko Imai
2. 発表標題 Modulation of PKA during RA-induced leukemia cell differentiation
3. 学会等名 JSPS Core-to-core Program Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiko Imai, Rumi Egawa, and Noriko Takahashi
2. 発表標題 Retinoids induce cell differentiation and cell death in neuroblastoma
3. 学会等名 JSPS Core-to-core Program Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤大輔、今井正彦、山王豊盛、山田千穂、高橋典子
2. 発表標題 レチノイン酸のアクチニンタンパク質に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋典子、小山俊平、長谷川晋也、山崎正博、今井正彦
2. 発表標題 難治神経芽腫に対する p-アミノフェノールの抗腫瘍作用
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井正彦、小澤翼、高橋典子
2. 発表標題 脂質異常症治療薬のオートファジー誘導作用
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎正博、松本莉奈、宮脇祐太、守屋俊治、八柄雅子、長谷川晋也、高橋典子
2. 発表標題 臭化難燃剤 TBBP-A による白色脂肪細胞の質的变化とケトン体利用経路への影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳下衛平、長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がコレステロール代謝に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がマウスの神経細胞に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がマウスの神経細胞に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がマウスの神経細胞に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がマウスの神経細胞に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がマウスの神経細胞に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がマウスの神経細胞に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がマウスの神経細胞に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がマウスの神経細胞に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がマウスの神経細胞に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がマウスの神経細胞に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素の欠損がマウスの神経細胞に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋典子、掛貴達、長谷川晋也、山崎正博、今井正彦
2. 発表標題 マグネシウム欠乏食を摂取したマウス皮膚に及ぼすβ-カロテンの影響
3. 学会等名 フォーラム2017：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体利用酵素のノックアウトマウスの解析
3. 学会等名 フォーラム2017：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山崎正博、松本莉奈、宮脇祐太、守屋俊治、八柄雅子、松林実歩子、長谷川晋也、高橋典子
2. 発表標題 臭化難燃剤 TBBP-A がケトン体利用経路に対して与える影響の検討
3. 学会等名 フォーラム2017：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井正彦、李川、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 難治がんに対するビタミンAの抗腫瘍作用及びそのメカニズムの探索
3. 学会等名 第28回日本レチノイド研究会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井正彦、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 天然物関連化合物による難治がんに対する抗がん作用
3. 学会等名 第28回日本レチノイド研究会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋典子、山田千穂、榎本穂那実、山王豊盛、齋藤大輔、長谷川晋也、山崎正博、今井正彦
2. 発表標題 RAによる顆粒球様細胞分化における α -actininの変化
3. 学会等名 ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山崎正博、尾崎正太郎、長谷川晋也、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 食事誘導性肥満が脂肪組織のケトン体利用経路に対して与える影響の検討
3. 学会等名 ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋 勝彦、片桐 啓暁、清水 愛、和泉田 有望、福田 翔大、高橋 典子、内田 隆史、東 伸昭
2. 発表標題 アミノ酸による脂肪細胞のPin1活性化調節
3. 学会等名 ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋典子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版 (監修：井上國世)	5. 総ページ数 7
3. 書名 食品・バイオにおける最新の酵素応用：ビタミンAの抗癌作用メカニズムと翻訳後修飾反応レチノイル化	

〔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	今井 正彦 (Imai Masahiko) (40507670)	星薬科大学・薬学部・講師 (32676)	
研究 分 担 者	長谷川 晋也 (Hasegawa Shinya) (60386349)	星薬科大学・薬学部・講師 (32676)	