

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590230
 研究課題名（和文） RNAi ライブラリーによるゲラニルゲラノイン酸の抗腫瘍作用機構の網羅的解析
 研究課題名（英文） Genome-wide analysis on a molecular mechanism underlying anti-tumor action of geranylgeranoic acid
 研究代表者
 四童子 好廣 (SHIDOJI YOSHIHIRO)
 長崎県立大学・看護栄養学部・教授
 研究者番号：00111518

研究成果の概要：ゲラニルゲラノイン酸 (GGA) の抗腫瘍作用のメカニズムの1つとして、ヒト全ゲノム由来 RNAi ライブラリーを用いて肝癌培養細胞に対する細胞死誘導に関与する遺伝子の解析を行い、カスパーゼ非依存性で、しかもミトコンドリア依存性のオートファジーを伴う細胞死であることを、ライブセルイメージングや生化学的手法を駆使して細胞生物学的に明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生化学・細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：RNAi ライブラリー、オートファジー、イソプレノイド、癌予防

1. 研究開始当初の背景

(1) コロンビア大学の Weinstein のグループは、4,5-didehydroGGA による肝癌細胞の増殖抑制は CyclinD1 の発現抑制によるものと主張した。

(2) 東京大学の小俣らのグループは、4,5-didehydroGGA の肝癌細胞に対する効果を網羅的に解析し、増殖抑制効果に FGF 受容体の発現抑制が重要であるとした。
 (3) 東北大学の佐上らのグループは、マウス

胸腺の系で GGA が生合成される可能性を示し、その代謝産物 2,3-dihydroGGA に細胞死誘導活性や脂肪的誘導活性のあることを示した。

- (4) 一方、RNAi ライブラリーに関しては、国内外の試薬メーカーから種々の shRNA 発現ライブラリーが市販されるようになった。特に、Open Systems 社の shRNAmir ベクターは、本研究に用いたものに最も類似している。

2. 研究の目的

- (1) GGA による細胞死誘導の分子メカニズムの解明のために、ヒト全ゲノムから作製した shRNA 発現ライブラリーを用いて、細胞死誘導に関与する遺伝子の網羅的解析を行うことを目的とした。
- (2) 癌遺伝子 bcl-2 遺伝子の導入による GGA 誘導性細胞死の阻害効果の解析。

3. 研究の方法

- (1) ヒト bcl-2 cDNA を組換えた pcDNA3.1/bcl-2 を構築し、ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞に導入し、bcl-2 遺伝子を構成的に発現しているクローン HuH-7/bcl-2 を樹立した (図 1)。(文献①) 図から明らかなように、対照として樹立した HuH-7/neo 細胞には bcl-2 遺伝子は、mRNA レベルでも(panel A)、タンパク質レベルでも(panel B) 全く発現していなかったが、HuH-7/bcl-2 細胞では、いずれのレベルにおいても発現が確認できた。また、bcl-2 蛋白の発現はミトコンドリア画分に局在していた。

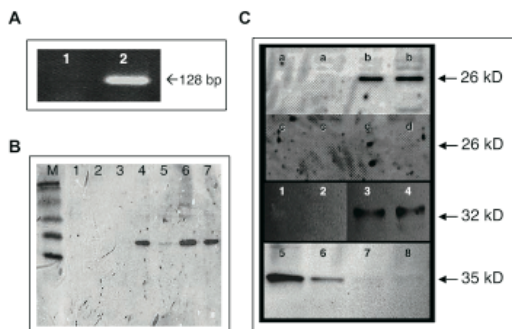


図 1 : 癌遺伝子 bcl-2 構成的発現肝癌細胞 HuH/bcl-2 細胞株の樹立

A; HuH-7/neo (lane1) または HuH-7/bcl-2 細胞 (lane2) から調製した total RNA を用いた bcl-2 mRNA の RT(reverse transcriptase)-PCR. B; HuH-7/neo の 3 つのクローン (lanes 1~3) と HuH-7/bcl-2 の 4 つのクローン (lanes 4~7) の細胞溶解液を用いた bcl-2 抗体によるウェスタンブロット. C; HuH-7/neo (lanes a, 3,

7) と HuH-7/bcl-2 細胞 (lanes b, 4, 8) のミトコンドリア画分並びに HuH-7/neo (lanes c, 1, 5) と HuH-7/bcl-2 細胞 (lanes d, 2, 6) のポストミトコンドリア画分を用いたウェスタンブロット。抗 bcl-2 抗体 (lanes a, b, c, d)、抗 porin 抗体 (lanes 1, 2, 3, 4)、抗 LDH 抗体 (lanes 5, 6, 7, 8)。

- (2) GGA を HuH-7/bcl-2 細胞とその対照細胞 HuH-7/neo 細胞に添加し、遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析した。
- (3) ヒト全ゲノム由来 shRNA 発現ライブラリーを用いて、GGA 抵抗性クローンを複数樹立した。
- (4) GGA 抵抗性クローンの遺伝子工学的解析を行った。

4. 研究成果

- (1) bcl-2 導入細胞株 HuH-7/bcl-2 の樹立：ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 に bcl-2 癌遺伝子を導入し、構成的に発現する細胞株を、その対照細胞株 HuH-7/neo と共に得た。HuH-7/bcl-2 細胞は解糖系が亢進し、グルコース依存性が強いことが判明した (図 2)。(文献①) すなわち、図 2 から明らかなように、HuH-7/bcl-2 細胞は HuH-7/neo 細胞に比べて、より迅速に培地中のグルコースを消費し、それに呼応して乳酸の産生分泌をより早期に観察された。また、図には示していないが、HuH-7/neo 細胞が観察期間中生存し続けたのに対して、HuH-7/bcl-2 細胞は、培養 9 日目に急激に細胞死を遂げた。

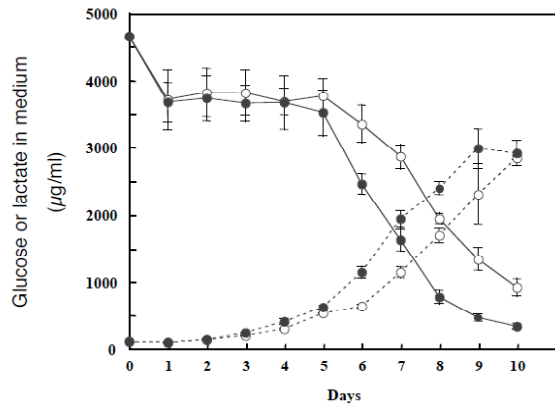


図 2 : HuH-7/neo 並びに HuH-7/bcl-2 細胞におけるグルコース消費と乳酸産生の経時的変動

HuH-7/neo (白丸) と HuH-7/bcl-2 (黒丸) を 4500 mg/L グルコースを含む DME 培地で培養し、培地を交換することなく、培地中のグルコース (実線) と乳酸 (破線) を経時的に定量した。

- (2) HuH-7/bcl-2 細胞は、GGA による細胞死誘導に対して抵抗性を示し、GGA によって誘導されるミトコンドリア内膜電位の喪失に対しても抵抗性を示した (図

3)。(未発表)図から明らかなように、HuH-7/neo 細胞は、GGA の濃度に依存して MitoTrackerRed で測定されるミトコンドリア内膜電位が低下した。一方、HuH-7/bcl-2 細胞は GGA 処理に対して抵抗性を示し、GGA の濃度を 10 μ M まであげても、大部分の細胞の膜電位は維持されていた。

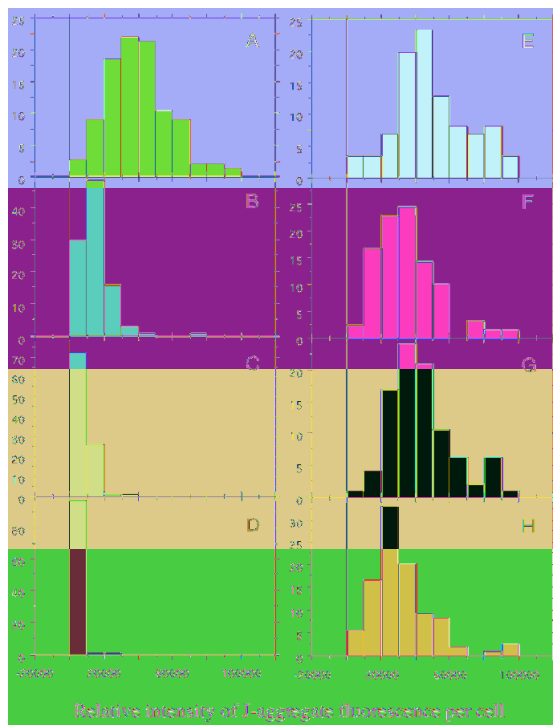


図 3 : HuH-7/neo 並びに HuH-7/bcl-2 のミトコンドリア内膜電位に与える GGA の効果

HuH-7/neo (A~D) と HuH-7/bcl-2 (E~H) に異なる濃度の GGA (A,E: 0 μ M, B,F: 1 μ M, C,G: 5 μ M, D,H: 10 μ M) を添加し、1 時間後にミトコンドリアの内膜電位を測定した。横軸は内膜電位の大きさの相対的値、縦軸は細胞数。

- (3) ヒト全ゲノム由来 shRNA 発現ライブラリーを用いて、GGA 抵抗性クローンをおよそ 60 個程度得た。現在、これらの個々のクローンの遺伝子解析を行っている。今後、数年かかる予定である。
- (4) 得られた GGA 抵抗性クローンの shRNA の塩基配列から、その標的のゲノム配列を BLAST 探索すると、caspase などのアポトーシスの実行遺伝子に相当するものは一切見つからず、ATG4, ATG5, Beclin, LC3, ATG11, ATG14 などのオートファジー関連遺伝子の近傍の塩基配列が検出された。

GGA により誘導される細胞死にはオートファジーが何らかの形で関与しているものと考えられた。

- (5) マウス LC3 遺伝子を EGFP (enhanced green fluorescent protein) で標識した plasmid を用いて、HuH-7/LC3 細胞を樹立し、Live-cell imaging 技術により、生細胞におけるオートファゴソームの形成を可視化した。一般に、多くの細胞はアミノ酸欠乏の培地で培養するとオートファジーを起こし、オートファゴソームの形成が観察されるといわれている。ところが、HuH-7/LC3 細胞はアミノ酸の含まれていない HANKS 培地で培養してもオートファゴソームは観察されなかった。ところが、アミノ酸リッチな DME 培地に GGA を添加すると、添加後 15 分以内にオートファゴソームの形成が誘導され、16 時間後まで、オートファゴソームは蓄積した。しかも、PI3K の阻害剤である Wortmannin 処理により GGA によるオートファゴソームの蓄積は阻害された (図 4)。(投稿中)

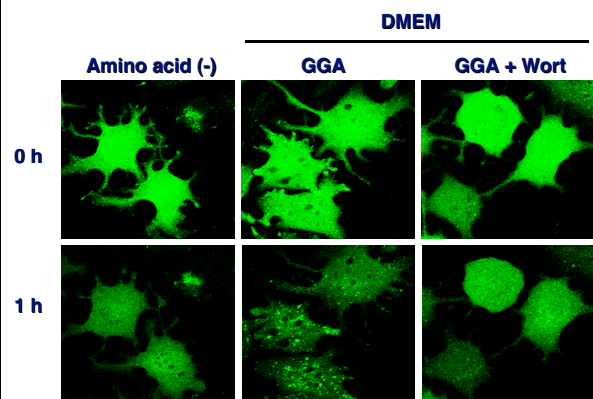


図 4 : HuH-7/LC3 細胞における GGA 誘導性オートファゴソームの観察

HuH-7/LC3 細胞は、アミノ酸欠乏状態にしてもオートファゴソームは観察されなかったが、アミノ酸リッチな DME 培地に GGA を添加するとオートファゴソームが観察された。さらにこのオートファゴソームの形成は PI3 キナーゼの阻害剤である Wortmannin の共存により阻害された。

- (6) ウェスタンブロッティングにより、オートファジー関連遺伝子産物の細胞内動態を解析すると、GGA 添加 15 分後には LC3-I から LC3-II への変換がみられ、16 時間後まで LC3-II の蓄積が観察された。すなわち、GGA 処理により速やかに Cytosol 中に溶存している LC3-I にホスファチジルアミンが付加した LC3-II が生成され、単離膜の形成がなされたものと考えられる。単離膜の生成に関与する

ATG4 や Beclin, ATG7 などの細胞内レベルは GGA 添加後 1 時間までは増加したが、その後 16 時間後まで徐々に減少した (図 5)。ところ、図 5 から明らかなように、p62 タンパクは GGA 処理後 30 分から増加し始め、その後 24 時間まで蓄積した。p62 タンパクは、scaffold protein として知られているが、LC3 結合ドメインとユビキチン結合ドメインを保持した興味あるタンパクである。しかも、肝炎や肝硬変、肝癌などでの発現亢進が報告されていること、細胞毒性があることなど GGA による細胞死誘導において興味深い遺伝子である。(投稿中)

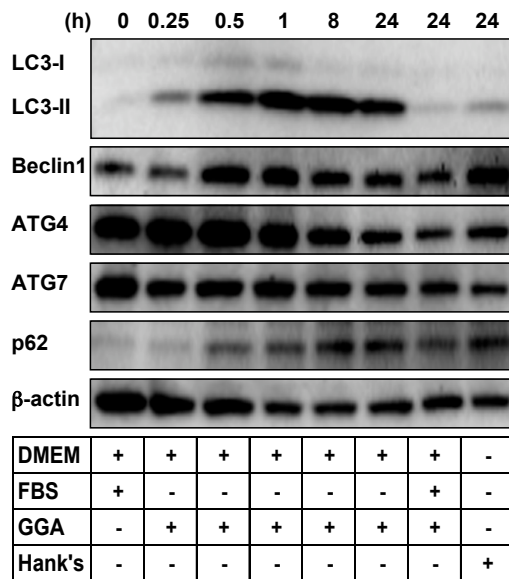


図 5 : HuH-7 細胞における GGA 添加後のオートファジー関連遺伝子の発現の経時的変動

それぞれの特異的抗体を用いて、GGA 添加後のオートファジー関連遺伝子の発現の変動をウェスタンブロットにより観察した。

(7) コロンビア大学の Weinstein のグループと同様に、GGA によっても CyclinD1 の細胞内含量が劇的に減少することを見出した。しかも、その効果は図 6 から明らかなように、極めて迅速で GGA 添加後 30 分にはその効果が認められた。GGA 誘導体による Cyclin D1 の down-regulation に関してはすでに報告があるが、Weinstein らの 4,5-didehydroGGA による観察 (24 時間後に半減) とは異なり、GGA は非常に迅速に CyclinD1 を減少させた。

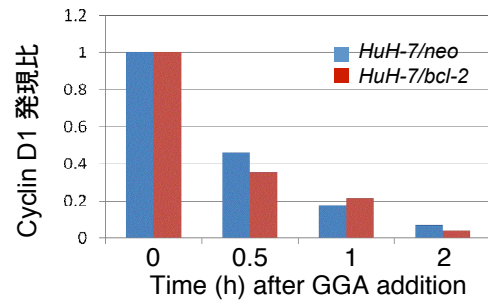


図 6 : ウェスタンブロットング法により測定した CyclinD1 の細胞内含量の GGA 添加後の経時的変動

GGA 処理により HuH-7/neo 並びに HuH-7/bcl-2 細胞のいずれにおいても Cyclin D1 含量は、ほぼ同じ程度に減少した。

Cyclin D1 の細胞内含量はユビキチン・プロテアソームによる分解系によって調節されていることが知られているので、20S プロテアソームの阻害剤 MG132 の効果を観察した。その結果、図 7 に示したように、GGA の抑制効果が半減した。つまり、GGA によるプロテアソーム系の亢進が考えられるが、それ以外の転写調節なども関与している可能性が考えられる。現在、そのメカニズムを解析中である。

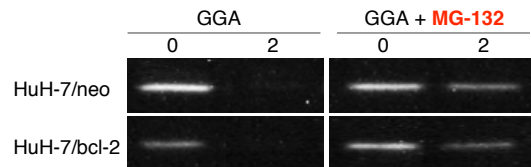


図 7 : GGA 処理による Cyclin D1 タンパクの劇的減少に対するプロテアソーム阻害剤 MG-132 の抑制効果

MG-132 の共存により HuH-7/neo 並びに HuH-7/bcl-2 細胞のいずれにおいても GGA 誘導性 Cyclin D1 含量の減少は、抑制された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Okamoto K, Muraguchi T, Shidoji Y.: Enhanced Glucose Requirement in Human Hepatoma-derived HuH-7 Cells by Forced Expression of the bcl-2 Gene. *J Clin Biochem Nutr.* 43(2): 101-108. 2008. 査読あり
- ② Kodaira Y, Kusumoto T, Takahashi T, Matsumura Y, Miyagi Y, Okamoto K, Shidoji Y., Sagami H.: Formation of lipid droplets induced by 2,3-dihydrogeranylgeranoic acid distinct from

geranylgeranoic acid. *Acta Biochim Pol.* 54(4): 777-782. 2007. 査読あり

- ③ 四童子好廣、岡本恭子：細胞内におけるアルブミン合成系の制御：転写因子。栄養-評価と治療, 24(2): 118-122, 2007. 査読なし

[学会発表] (計 14 件)

- ① 下西祥平、四童子好廣：グラニルグラノイン酸による HuH-7 細胞の細胞死誘導メカニズムの解析。第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会 合同大会 2008 年 12 月 10 日、神戸
- ② 野田恒平、四童子好廣：PC12 細胞における GGA による神経栄養因子 BDNF 遺伝子発現の上方調節。第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会 合同大会 2008 年 12 月 10 日、神戸
- ③ Yoshihiro Shidoji, Kyoko Okamoto: Induction of LC3-II accumulation in human hepatoma-derived HuH-7 cells by geranylgeranoic acid. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 30 日、名古屋
- ④ 四童子好廣、岡本 恭子、三岳麻衣子、小林聖子、下西祥平：Geranylgeranoic acid によるオートファゴソーム蓄積の誘導。第 18 回ドリコールおよびイソプレノイド研究会、2008 年 8 月 30 日、仙台
- ⑤ 岡本 恭子、四童子好廣：Geranylgeranoic acid によるオートファゴソーム蓄積の誘導。日本ビタミン学会第 60 回大会、2008 年 6 月 14 日、仙台
- ⑥ 四童子好廣、井上 紗貴：非環式レチノイドによる p53 標的遺伝子 TIGAR の発現調節。日本ビタミン学会第 60 回大会、2008 年 6 月 14 日、仙台
- ⑦ 三岳麻衣子、四童子好廣、大森正英：動物細胞におけるグラニルグラノイン酸の生合成。日本ビタミン学会第 60 回大会、2008 年 6 月 14 日、仙台
- ⑧ Kyoko Okamoto、Yoshihiro Shidoji：Autophagy-related genes were revealed by genome-wide survey with RNAi library for functional genes in geranylgeranoic acid-induced cell death. 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会 合同大会 2007 年 12 月 12 日、横浜
- ⑨ Kyoko Okamoto、Yoshihiro Shidoji：Geranylgeranoic acid-induced auto-

phagy in human hepatoma-derived HuH-7 cells. 第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 3 日、横浜

- ⑩ 四童子好廣、岡本恭子：ヒト全ゲノム由来 shRNA 発現ライブラリーを用いた非環式レチノイドの網羅的機能解析 (1)。日本ビタミン学会第 59 回大会、2007 年 5 月 25 日、佐世保
- ⑪ 岡本恭子、四童子好廣：ヒト全ゲノム由来 shRNA 発現ライブラリーを用いた非環式レチノイドの網羅的機能解析 (2)。日本ビタミン学会第 59 回大会、2007 年 5 月 25 日、佐世保
- ⑫ 下西祥平、四童子好廣：非環式レチノイド、グラニルグラノイン酸(GGA)による miR-17-5p 発現調節。日本ビタミン学会第 59 回大会、2007 年 5 月 25 日、佐世保
- ⑬ 小林聖子、四童子好廣：非環式レチノイドによる p53 ターゲット遺伝子 PUMA の発現調節。日本ビタミン学会第 59 回大会、2007 年 5 月 25 日、佐世保
- ⑭ 三岳麻衣子、四童子好廣、小川弘子、上馬場和夫：ウコン錠摂取後の非環式レチノイド・グラニルグラノイン酸の血中濃度の変動。日本ビタミン学会第 59 回大会、2007 年 5 月 25 日、佐世保

[図書] (計 1 件)

- ① 香川靖雄、四童子好廣：建帛社、ゲノムビタミン学 ― 遺伝子対応栄養教育の基礎 ― (日本ビタミン学会監修) B5 版、222 ページ、2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

四童子 好廣 (SHIDOJI YOSHIHIRO)

長崎県立大学・大学院人間健康科学研究科・教授

研究者番号：00111518

(2)研究協力者

岡本 恭子 (OKAMOTO KYOKO)

長崎県立大学・大学院人間健康科学研究科・博士

後期課程学生 (現 NIH, NIEHS, Laboratory of

Pulmonary Biology, Cell Biology Group, Post-

Doctral Fellow under Dr Jetten A)