

令和 5 年 9 月 29 日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03079

研究課題名(和文)蛋白質相互作用制御因子としてのDHA機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of DHA's function as a protein interaction regulatory factor

研究代表者

山田 秀俊(Yamada, Hidetoshi)

帝京科学大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：70511955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RACK1とDHAの相互作用に着目しDHAの抗がん作用解明に取り組んだ。本研究において、RACK1とPKC α またはPKC β との相互作用抑制効果が、脂肪酸の中でもDHA特異的は作用であること、DHAがPKC α とRACK1の細胞内局在を変化させること、DHAによる抗腫瘍効果がPKC α 発現細胞において発揮されること、DHAはPKCシグナル伝達を抑制することを新たに見出した。これらの結果は、これまで知られていなかった、DHAの抗がん作用に関する新たな作用機序であり、DHAがPKC α シグナル依存的に細胞増殖を行う細胞に特に有効である可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、DHAの抗がん作用に関する新たな作用機序を示す結果であり、脂肪酸や脂肪酸代謝物によるがんの予防や治療に関する新たな知見である。さらに、DHAがPKC α シグナル依存的に細胞増殖を行う細胞に特に有効である可能性を示唆していることから、がん治療の新たな可能性を示す研究である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the interaction between RACK1 and the omega-3 fatty acid DHA, aiming to elucidate the anti-cancer effects of DHA. Through our research, we discovered that the inhibitory effect on the interaction between RACK1 and either PKC α or PKC β is a DHA-specific action among fatty acids. Furthermore, we found that DHA alters the intracellular localization of PKC α and RACK1, the anti-tumor effect of DHA is expressed in PKC α -expressing cells, and DHA inhibits PKC signal transduction. These results provide a novel mechanism of action for DHA's anti-cancer effect, previously unknown, suggesting that DHA may be particularly effective in cells that undergo cell proliferation dependent on PKC α signaling.

研究分野：農芸化学、脂質生化学

キーワード：DHA RACK1 PKC α 抗がん作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂質は3大栄養素の1つであり、植物由来のリノール酸(LA)やアルファリノレン酸(ALA)は体内で合成できないために必須脂肪酸と呼ばれる。脂肪酸は鎖状のモノカルボン酸であり炭素数と二重結合の位置および数で分類される。オメガ()3脂肪酸や6脂肪酸というのは、最初の二重結合がメチル基から数えて何番目の炭素にあるかで分類した呼び名であり、LAは6脂肪酸、ALAは3脂肪酸に分類される。ヒトは食品から摂取したLAからアラキドン酸(ARA)を合成し、炎症メディエーター前駆体として利用する。ALAからは3脂肪酸のエICOSAPENTAENOIC ACID(EPA)とDHA(図1)を合成し、炎症収束メディエーターの前駆体として利用している。

デンマーク人とイヌイットを対象とした疫学研究を発端として、EPA・DHA摂取による心臓疾患予防効果が見出され、魚油由来のEPA・DHAが世界中で利用されている。EPA・DHAの作用機構としては、肝臓でのトリアシルグリセロール(TAG)抑制とEPA・DHA代謝物による炎症抑制がよく理解されているが、作用機構が解明されていない生理作用も多く存在する。我々はEPA・DHAの新たな作用機序解明を目指し、DHAのメラノーマ細胞に対する増殖抑制効果について解析した。マウス由来メラノーマ細胞株(B16F10)はDHAを25 μ M添加し培養すると細胞増殖が抑制される。一方で、DHA以外の脂肪酸ではB16F10細胞増殖は抑制されない。また、ヒト正常メラノサイトにおいてはDHAによる細胞増殖抑制は観察されない。DHAによるメラノーマ特異的な細胞増殖抑制の作用機序を解明するために、DHAを固定した磁気ビーズを用いて相互作用蛋白質解析を行い、Receptor of Activated Kinase C(RACK1)とDHAの相互作用を見出した。RACK1は足場蛋白質で、活性型Protein Kinase C(PKC)と結合することで、PKCの細胞膜への移動とPKCによってリン酸化を受ける蛋白質とPKCの相互作用を促進し、PKCシグナルを正に制御する。PKC活性化剤のPhorbol12-myristate13-acetate(PMA)添加によってDHAによるメラノーマ細胞増殖抑制がキャンセルされたことから、DHAによるメラノーマ細胞増殖はPKCシグナル抑制を介していると考えられた。さらに、DHAによるRACK1-PKC相互作用抑制について生物発光エネルギー転移法(NanoBRET)を用いて解析し、DHAがRACK1とPKCの相互作用を抑制することを見出した。これらの結果は、DHAがRACK1に結合することで、RACK1-PKC相互作用を抑制し、PKCシグナル抑制に働くことを示唆する結果であった。

DHA: C22:6 (4,7,10,13,17,19)

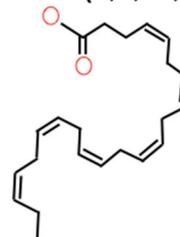


図1. DHAの構造

2. 研究の目的

DHAには腫瘍形成と転移抑制作用が報告されているが、作用機序は未解明のままである。本研究ではRACK1-PKC相互作用抑制に着目し、DHAによる抗がん作用機序の解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

1) 脂肪酸の構造とRACK1-PKC相互作用抑制効果解析

NanoLuc標識したRACK1及びHaloTag標識したPKC及びの発現ベクターをB16F10細胞にリポフェクション方で導入し、脂肪酸添加によるBRETシグナル変化を解析した。

2) DHAによるPKC及びRACK1蛋白質局在変化の解析

PKC抗体、RACK1抗体を用いてDHA添加もしくは非添加の条件で培養したB16F10細胞内のPKCとRACK1局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3) PKC蛋白質発現とDHAによる抗腫瘍作用の関係解析

解析には、B16F10, HeLa, HepG2, NIH-3T3, DLD1細胞を用いた。PKC蛋白質発現はウェスタンブロット法を用いて解析した。DHAによる抗腫瘍効果は、DHAを添加して培養24時間後の細胞数を測定することで評価した。

4) T細胞白血細胞に対するDHAの作用解析

解析には、3種のT細胞白血細胞株Jurkat, MolT-4F, CCRF-CEMを用いた。PKC蛋白質発現はウェスタンブロット法で、DHAの抗腫瘍増殖作用は細胞数を測定することで評価した。

4. 研究成果

1) 脂肪酸の構造とRACK1-PKC相互作用抑制効果解析

RACK1とPKC、PKCとの相互作用抑制効果について、脂肪酸9種類: ミリスチン酸(14:0)、パルミチン酸(16:0)、ステアリン酸(18:0)、オレイン酸(18:1)、リノール酸(18:2)、リノレン酸(18:3)、アラキドン酸(20:4)、EPA(20:5)、DHA(22:6)の作用を解析した。

RACK1 と PKC 、PKC との相互作用抑制効果を示したのは DHA のみであった。このことから、RACK1 と PKC 及び PKC との相互作用抑制効果は DHA 特異的であることが明らかになった。

2) DHA による PKC 及び RACK1 蛋白質局在変化の解析

DHA によって細胞増殖が抑制されるメラノーマ細胞株 (B16F10) における PKC 発現を解析したところ、PKC 発現は観察されず、PKC 発現が観察された。このことから、DHA による PKC 蛋白質局在変化の解析は、PKC を対象として実施した。B16F10 細胞を 1 μ M の PMA で刺激した場合に、PKC の細胞膜への移行が観察された。一方で、PMA と共に 50 μ M の DHA を加えた場合には、PKC の細胞膜への移行が抑制された。PKC 蛋白質の細胞膜への移行に RACK1 が関わっていることが知られており、DHA は PKC と RACK1 の相互作用を抑制することで PKC の細胞膜移行を抑制したと考えられる。また、B16F10 細胞において RACK1 は核周辺部に局在しているが、PMA 刺激によって細胞質に広く分布が変化した。しかしながら、PMA と DHA を同時に添加した場合には、PMA による RACK1 の局在変化も抑制された。このことから、DHA は PMA 刺激による RACK1 の細胞内局在変化も抑制することが明らかとなった。

3) PKC 蛋白質発現と DHA による抗腫瘍作用の関係解析

DHA による腫瘍増殖抑制作用は、がん細胞株に広く観察される減少ではなく、DHA による抗腫瘍効果が発揮されるがん細胞株とそうではないがん細胞株が存在する。そこで、メラノーマ細胞株 (B16F10)、子宮頸がん細胞株 (HeLa)、肝がん細胞株 (HepG2)、大腸がん細胞株 (DLD1)、正常線維芽細胞株 (NIH-3T3) における PKC 蛋白質発現と DHA による腫瘍増殖抑制効果について解析し、B16F10 細胞株のみに PKC が認められ、DHA によって細胞増殖が抑制されることを明らかにした。さらに、B16F10 細胞においては、PKC によるリン酸化の主要基質である JNK のリン酸化レベルが DHA によって低下することを見出した。この結果は、DHA による腫瘍細胞増殖とがん細胞における PKC の関連を示唆する結果である。

4) T 細胞白血細胞に対する DHA の作用解析

PKC 発現と DHA の抗腫瘍効果についてさらに検討するため、T 細胞白血病細胞株に対する DHA の作用を解析した。PKC は T 細胞受容体の活性化シグナルを細胞内に伝達する鍵分子の一つであり、T 細胞の増殖と成熟に必須の分子であることがよく知られている。そこで、T 細胞白血病細胞株 3 種に対する DHA の作用を検討したところ、B16F10 細胞に対するよりも強く細胞増殖を抑制することを見出した。3 つの T 細胞株全てにおいて、PKC 蛋白質発現と DHA による細胞増殖抑制が観察された。これらの結果は、DHA による抗腫瘍効果が PKC シグナル依存的に細胞増殖しているがん細胞において発揮される可能性を強く示唆する結果である。

本研究において、RACK1 と PKC または PKC との相互作用抑制効果が、脂肪酸の中でも DHA 特異的は作用であること、DHA が PKC と RACK1 の細胞内局在を変化させること、DHA による抗腫瘍効果が PKC 発現細胞において発揮されること、DHA は PKC シグナル伝達を抑制することを新たに見出した。これらの結果は、これまで知られていなかった、DHA の抗がん作用に関する新たな作用機序であり、DHA が PKC シグナル依存的に細胞増殖を行う細胞に特に有効である可能性を示している。

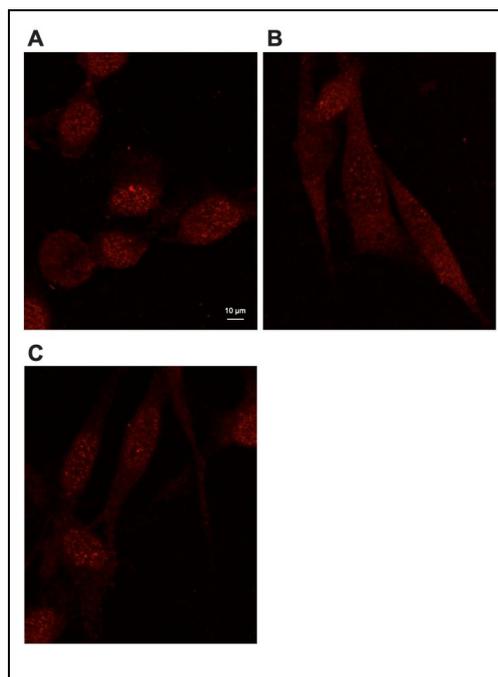
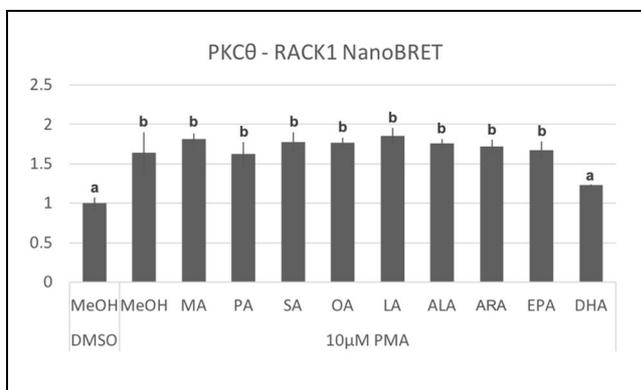


図 3. DHA による RACK1 蛋白質局在の変化。

B16F10 細胞における RACK1 蛋白質の局在を蛍光免疫染色法にて解析。A: PMA 非添加、B: 1 μ M PMA 添加、C: 1 μ M PMA 添加と同時に 50 μ M DHA 添加。試薬添加 6 時間後の細胞を解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada Hidetoshi, Kumagai Kanako, Uemura Aiko, Yuki Sayaka	4. 巻 84
2. 論文標題 <i>Euphausia pacifica</i> as a source of 8<i>R</i>-hydroxy-eicosapentaenoic acid (8<i>R</i>-HEPE), 8<i>R</i>-hydroxy-eicosatetraenoic acid (8<i>R</i>-HETE) and 10<i>R</i>-hydroxy-docosahexaenoic acid (10<i>R</i>-HDHA)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 455 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1691912	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 Yuki Sayaka, Uemura Aiko, Hakozaiki Mayuka, Yano Akira, Abe Masato, Misawa Yoshihisa, Baba Naomichi, Yamada Hidetoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of a novel enzyme from <i>E. pacifica</i> that acts as an eicosapentaenoic 8R-LOX and docosahexaenoic 10R-LOX	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77386-3	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 Uesugi Shota, Hakozaiki Mayuka, Kanno Yuko, Takahashi Honoka, Kudo Yui, Kimura Ken-ichi, Yamada Hidetoshi, Yano Akira	4. 巻 85
2. 論文標題 A yeast-based screening system identified bakkenolide B contained in <i>Petasites japonicus</i> as an inhibitor of interleukin-2 production in a human T cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2153 ~ 2160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab130	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 Ishida Nanae, Yamada Hidetoshi, Hirose Masamichi	4. 巻 13
2. 論文標題 <i>Euphausia pacifica</i> (North Pacific Krill): Review of Chemical Features and Potential Benefits of 8-HEPE against Metabolic Syndrome, Dyslipidemia, NAFLD, and Atherosclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3765 ~ 3765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13113765	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 Yamada Hidetoshi, Uemura Aiko, Miyasaka Raimu	4. 巻 87
2. 論文標題 8(<i><i>R</i></i> -Hydroxyeicosapentaenoic acid (8(<i><i>R</i></i> -HEPE) induces transcription of cholesterol efflux receptors via activation of liver X receptor in macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 584 ~ 591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbad025	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yamada H, Miyasaka R, Igata S and Uemura A.
2. 発表標題 Docosahexaenoic acid inhibits interaction of RACK1 with PKC and represses melanoma and T cell leukemia cell proliferation
3. 学会等名 22nd International Congress of Nutrition in Tokyo (ICN Tokyo) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田秀俊、植村亜衣子
2. 発表標題 DHAによるメラノーマ細胞増殖抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 日本脂質生化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部アキ、中川和也、杉山梢、山田秀俊
2. 発表標題 プラズマローゲンによるフェロトーシス抑制
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田秀俊、植村亜衣子、齋藤麻希、石田奈々恵、揖斐実歩、弘瀬雅教
2. 発表標題 8R-HEPEによる動脈硬化抑制作用
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井形早希、榎本結衣、宮坂らいむ、山田秀俊
2. 発表標題 ドコサヘキサエン酸(DHA)によるT細胞白血病細胞の増殖抑制
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------