

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07021

研究課題名(和文) レチノイン酸の新たなノンジェノミック作用機構の解明とその応用研究

研究課題名(英文) Elucidation of new non-genomic mechanisms of action of retinoic acid and their 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：微量栄養素ビタミンAの活性型であるレチノイン酸(RA)は抗がん剤として注目される。本研究では核内受容体とは別の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)を検討した。アクチン結合タンパク質である-アクチニンや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、タンパク質の安定化や局在性の変化を引き起こし本来とは異なる役割を果たすことであることが判明した。また、核内のレチノイル化PKAが遺伝子発現調節に重要なスプライシング調節因子やヒストンをリン酸化し、細胞分化・増殖抑制に導くノンジェノミックなRA作用機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レチノイル化は、RAとタンパク質が共有結合することでタンパク質の構造変化を引き起こすRA修飾であり、安定性・局在性・酵素活性等に変化を与えることから、RA受容体とは異なる新しい情報伝達機構である。本研究で、レチノイル化が細胞骨格関連タンパク質-アクチニンの安定性と局在性に変化を与えることを示す。また、核内レチノイル化PKAによりリン酸化される基質としてスプライシング調節因子SF2を同定し、細胞分化・増殖抑制経路を実証する。さらに、核レチノイル化ヒストンによるエピジェネティクス制御の提案は、RA受容体経路の補充という学術的意義を与える。この新経路を基にした抗がん剤開発は大きな社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Retinoic acid (RA) is an essential bodily nutrient that is attracting increasing attention for its potential value in the prevention and treatment of cancer and lifestyle-related diseases. Using human leukemia cells, we investigated retinoylation (protein modification by RA), which is a non-genomic mechanism of RA action that differs from its nuclear receptor-mediated actions. We elucidated physiological roles of retinoylation of the actin-binding protein -actinin and the regulatory subunit of protein kinase A (PKA). We found that retinoylation stabilizes and changes the localization of each protein and that nuclear retinoylated PKA phosphorylates splicing regulatory factors and histones. These nuclear proteins are important for gene expression regulation, and promoting cell differentiation and suppression of proliferation. Our results support non-genomic actions of RA.

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

## 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 は必須微量栄養素であり、その活性型であるレチノイン酸 (RA) は、成長促進、皮膚粘膜形成、免疫調節等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、RA 応答が秒・分単位と非常に速いこと、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、核内受容体以外の経路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。

レチノイル化が *in vitro* および *in vivo* で見られ、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 (PKA-RII $\alpha$ ) であることが明らかにされた。レチノイル化 PKA が核内に移行し、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は、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 E<sub>2</sub> 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。従って、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、細胞形態制御因子であるアクチン結合タンパク質の  $\alpha$ -アクチニンやエピジェネティクス制御因子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、RA 受容体を介さないノンジェノミックな制御経路を解明するため、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。レチノイル化タンパク質として同定した  $\alpha$ -actinin の RA 処理による影響を詳細に調べ、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、或いは、PKA によるリン酸化が増加するタンパク質を同定し、細胞分化・増殖抑制との関連性を解明する。(3) ヒストンの各種修飾とレチノイル化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。ヒストンの RA 修飾アミノ酸を特定するため、ヒストン修飾部位特異的変異体遺伝子導入細胞を作製し RA 作用を調べ、RA 抗体法でレチノイル化ヒストン解析を行い、RA のエピジェネティクス制御作用を解明する。

このように、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 細胞の培養・薬物処理法 : HL60 細胞は、10% FBS、10 mM HEPES を添加した RPMI 1640 培地中、インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>、37°C) を用いて培養を行った。細胞数はコールターカウンターを用いて測定し、細胞密度  $1 \times 10^5$  cells/ml で継代した。対数増殖期にある HL60 細胞を遠心分離 (4°C, 200 $\times$ g, 10 min) で回収し、D-PBS (-) で 2 回洗浄後、初期濃度が  $2 \times 10^5$  cells/ml になるように無血清培地 [10 mM HEPES, 5  $\mu$ g/ml insulin, 5  $\mu$ g/ml transferrin 含有 RPMI 1640 培地] に懸濁し、播種した。薬物処理は、RA を培養液に添加し (最終濃度: 0.1, 0.4, 1  $\mu$ M)、対照にはエタノールを添加 (最終濃度: 0.1%) した後、24 時間培養後、細胞を回収した。MG132 を培養液に添加し (最終濃度: 5  $\mu$ M)、対照にはエタノールを添加 (最終濃度: 0.1%) した後、4 時間培養後、細胞を回収した。RA との薬物併用処理では、RA と 0.4  $\mu$ M PKA 阻害剤 Myr-PKI (PKA Inhibitor 14-22 Amide Myristoylated) (Sigma) (最終濃度: 0.4  $\mu$ M) 或いは 2 nM Mcl-1L 阻害剤 S63845 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) (最終濃度: 2 nM) を培養液に添加し、対照にはエタノールを添加 (最終濃度: 0.1%) した後、48 時間培養後、細胞を回収した。

(2) 細胞分画法 : HL60 細胞 ( $2 \times 10^7$  細胞) を氷冷した Lysis Buffer A (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EGTA, 10 mM glycerophosphate, 1 mM NaF, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSEF, 0.5% 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 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 10% Glycerol, 10 mM Glycerophosphate, 1 mM NaF, 1 mM PMSEF, 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。

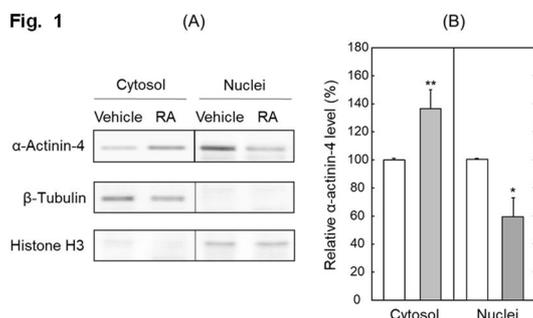
(3) 二次元-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2D-PAGE) : 2D-PAGE は O'Farrell らの方法に準じた。RA 処理した HL60 細胞 ( $4 \times 10^6$  cells) の乾燥残渣は、9.5 M 尿素, 2% NP-40, 2% ampholytes (pH 4-7 及び pH 3.5-10) 及び 5% 2-mercaptoethanol を含む等電点電気泳動用緩衝液に溶解した。一次元目は 2% ampholyte を含む等電点ゲルを用いた。二次元目は、10% PAGE を使用した。泳

- 動後のゲルは SYPRO で染色、或いは免疫染色法 (下記 (5)) を行い ECL Plus で可視化した。
- (4) **免疫沈降法**: RA 処理及びエタノール処理した HL60 細胞から調製した総可溶化液 (100  $\mu\text{g}$  of protein) を Buffer B [10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM glycerophosphate, 1 mM NaF, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 1% protease inhibitor cocktail] で希釈し、試料タンパク質を input と免疫沈降用に分けた。これに Anti-Multi Ubiquitin mAb-Agarose (MBL) を 10  $\mu\text{L}$  加え 4  $^\circ\text{C}$  で一晚振盪後、遠心分離 (4  $^\circ\text{C}$ , 2,500 $\times g$ , 5 min) で目的のタンパク質を沈殿させた。この沈殿物を Buffer B で 4 回洗浄後、Sample buffer [63 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.005% bromophenol blue (BPB)] に溶解し、一次元-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (1D-PAGE) を行った。これに抗 SF2 抗体を結合させた Protein G Mag Sepharose (GE Healthcare) を 15  $\mu\text{L}$  加え 4  $^\circ\text{C}$  で一晚振盪した後、磁気ラックによって目的のタンパク質が結合した磁気ビーズを得た。この磁気ビーズを Buffer B で 4 回洗浄後、Sample buffer [63 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.005% BPB] に溶解し、1D-PAGE を行った。
- (5) **免疫染色法**: 試料タンパク質を 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。
- (6) **RA 処理した HL60 細胞の画分調製**: RA 処理 HL60 細胞 (1.0~2.0 $\times 10^9$  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  $^\circ\text{C}$  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。
- (7) **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 (6) 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。
- (8) **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。
- (9) **RT-PCR**: 未処理、RA 処理した HL60 細胞から抽出した mRNA (2.5  $\mu\text{g}$ ) に 5 $\times$ VILO<sup>TM</sup> Reaction Mix, 10 $\times$ SuperScript Enzyme Mix を用いて cDNA の合成を行った。各遺伝子と  $\beta$ -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。
- (10) **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。
- (11) **統計解析**: 結果は各群の平均  $\pm$  標準偏差 (SD) を表す。データ解析には Prism 6 を使用し、データの統計的有意性は Student の  $t$  検定または Dunnett's の多重比較検定によって評価した。危険率 5% 未満 ( $*p < 0.05$ )、1% 未満 ( $**p < 0.01$ ) 及び 0.1% 未満 ( $***p < 0.001$ ) を有意差ありとした。

#### 4. 研究成果

##### (1) **新規レチノイル化タンパク質 $\alpha$ -アクチニンにおけるレチノイル化の生理的意義の解明**:

HL60 細胞には  $\alpha$ -actinin-1 と  $\alpha$ -actinin-4 のアイソフォームが発現し、 $\alpha$ -actinin-4 はがん細胞で過剰に発現していることが知られている。また、 $\alpha$ -actinin-4 が核移行することや転写因子と相互作用することも報告されており、細胞のシグナル伝達への  $\alpha$ -actinin-4 の関与が示唆されている。



以前 Mono Q カラムを使用して分離し RA 抗体法で検出したレチノイル化タンパク質 (分子量 98 kDa) の精製標品に対しアミノ酸配列解析を行い、得られた 3 種類のペプチドのアミノ酸配列をデータベースで検索したところ、アクチン結合タンパク質の  $\alpha$ -actinin であることが判明した。このレチノイル化  $\alpha$ -actinin の生理的意義を解明する過程において、 $\alpha$ -actinin-4 のみがレチノイル化されていることが分かったことから、RA による  $\alpha$ -actinin-4 の細胞内局在の変化やタンパク質の安定性について検討を行った。

先ず、RA による  $\alpha$ -actinin-4 の細胞内局在の変化を調べるため、細胞質画分と核画分の  $\alpha$ -actinin-4 量を免疫染色法で測定したところ、細胞質画分では、未処理細胞と比較して、RA 処理は  $\alpha$ -actinin-4 量を増加させたが、核画分では  $\alpha$ -actinin-4 量を減少させた (Fig. 1)。この結果は共焦点

顕微鏡を用いた蛍光免疫染色法で得られた結果と一致していた。以上のことから、RA が  $\alpha$ -actinin-4 の細胞内局在を核から細胞質に変化させることが分かった。次に、RA による  $\alpha$ -actinin-4 発現量への影響を調べるため、RA 処理による  $\alpha$ -actinin-4 発現量の経時的な変化を免疫染色法で測定したところ、未処理に比べて、RA 処理は  $\alpha$ -actinin-4 タンパク質発現量を時間依存的に増加させた。これに対し、RA 処理は  $\alpha$ -actinin-4 の mRNA 発現量に影響を及ぼさなかった。さらに、未処理及び RA 処理した HL60 細胞にタンパク質合成阻害剤 cycloheximide を処理し、 $\alpha$ -actinin-4 発現量を免疫染色法で測定したところ、未処理細胞では時間依存的に減少したのに対し、RA 処理細胞では、未処理での減少を有意に抑制した (Fig. 2)。よって、RA は  $\alpha$ -actinin-4 タンパク質を安定化させることが明らかとなった。この  $\alpha$ -actinin-4 量の減少がタンパク質分解により起こるものと推測し、次にユビキチン化による分解について検討した。タンパク質の分解には、ユビキチンがタンパク質に結合し、選択的にプロテアソームで分解されることが知られている。そこで、 $\alpha$ -actinin-4 タンパク質の分解におけるユビキチン化の関与について調べるため、未処理及び RA 処理細胞から抽出した総タンパク質を、抗 Multi-ubiquitin 抗体で免疫沈降した後、抗  $\alpha$ -actinin-4 抗体を用いて検出を行った。その結果、ユビキチン化  $\alpha$ -actinin-4 タンパク質は、RA 処理により顕著に減少していた (Fig. 3)。よって、HL60 細胞への RA 処理により、 $\alpha$ -actinin-4 のユ

Fig. 2

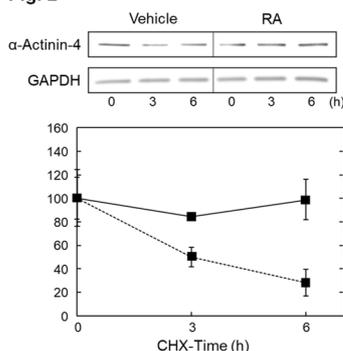


Fig. 3

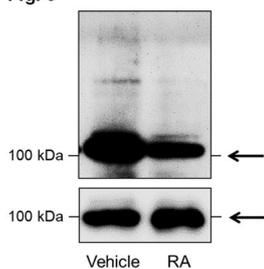
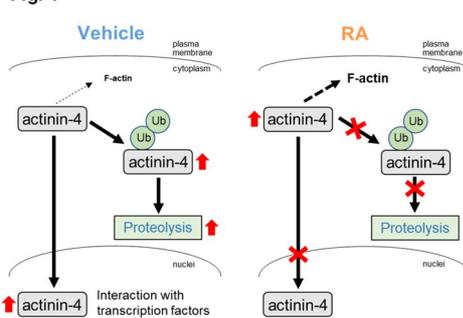


Fig. 4



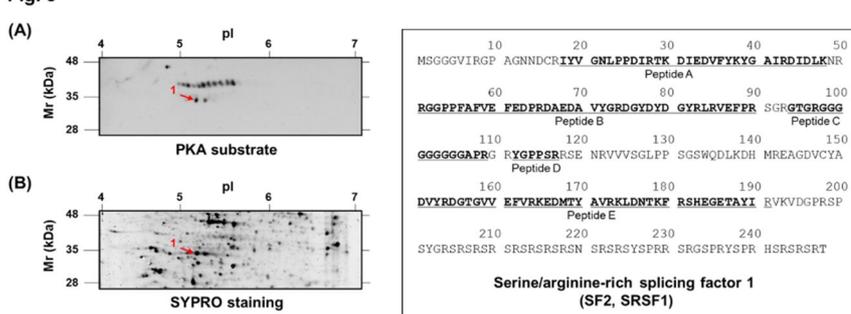
ビキチン化が抑制されることが示唆された。以上の結果から、HL60 細胞において、RA 処理により  $\alpha$ -actinin-4 はレチノイル化されることで核から細胞質に局在を変化させ、さらに安定化されてタンパク質量が増加する可能性を明らかにした (Fig. 4)。

(2) 核内レチノイル化PKAによりリン酸化される核タンパク質SF2の同定と生理的役割の解明:

PKA は cAMP 依存性のリン酸化酵素で、細胞骨格形成、細胞周期、細胞分化の進行において重要な役割を果たす。HL60 細胞において、PKA-RII $\alpha$  は RA 処理によりレチノイル化されることを報告した。また、RA 処理により PKA-RII $\alpha$  は核に局在を変化させること、触媒サブユニットである PKA-C $\alpha$  も RII $\alpha$  同様に、RA 処理した細胞で核に多く局在していたことから、PKA は四量体の形で核移行した可能性を示したことから、核内での PKA によるタンパク質のリン酸化が増加することを推測した。そこで、これらに該当するタンパク質を解析した。

まず、HL60 細胞から核画分を分画し、リン酸化 PKA 基質を免疫染色法で測定したところ、未処理と比較して、RA 処理は核画分中のリン酸化 PKA 基質量を増加させたことから、RA により核に移行した PKA が核内タンパク質のリン酸化を増加させることが明らかとなった。次に、RA 処理で増加した核内リン酸化 PKA 基質を明らかにするため、核タンパク質を二次元電気泳動で

Fig. 5



分離した後、質量分析によるタンパク質の同定を行ったところ、スプライシング調節因子である SF2 が同定された (Fig. 5)。

SF2 はエクソンの欠失を抑制して、スプライシングバリエーションができることを抑える機能を

持ち、PKA によってリン酸化されると、その機能が抑制される。そこで、SF2 の PKA によるリン酸化を確認するため、免疫沈降法を用いて解析を行ったところ、SF2 の PKA によるリン酸化は、RA 処理によって増加していたことから、RA 処理により、PKA を介して SF2 の機能が抑制されることが分かった。

前述したエクソンの欠失抑制を受けるタンパク質に Bcl-2 ファミリーの Mcl-1L とそのスプライシングバリエーション Mcl-1S があり、SF2 が Mcl-1S の生成を抑えている。Mcl-1S は Mcl-1L に結合してその機能を阻害する。そこで、RA 処理或いは RA と PKA 阻害剤の併用処理の Mcl-1S のタンパク質量と細胞分化への影響を検討した。RA 処理によって、Mcl-1S と分化指標である CD11b の発現は増加し、この増加は PKA 阻害剤 Myr によって抑えられたことから (Fig. 6)、Mcl-

1S が細胞分化に深く関わることが示唆された。

さらに、Mcl-1S の Mcl-1L 阻害機能が細胞分化に必須であることを明らかにするため、Mcl-1S と

Fig. 6

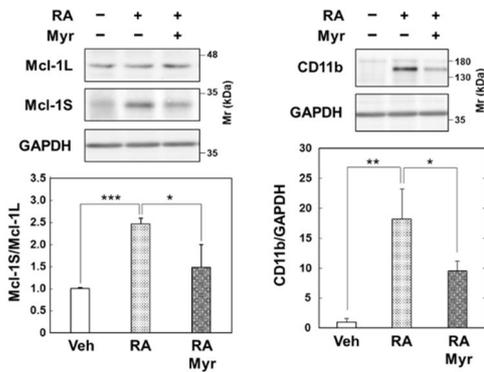


Fig. 7

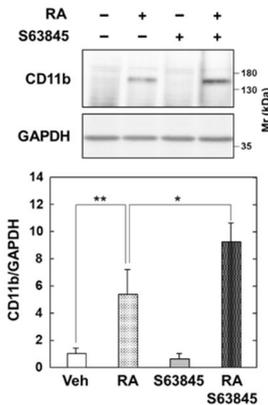
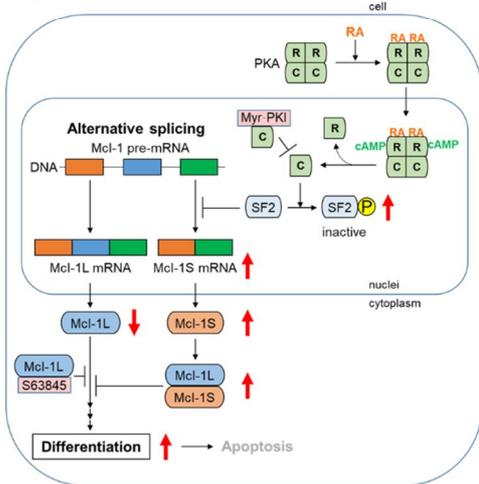


Fig. 8



同様に Mcl-1L を阻害する Mcl-1L 阻害剤を用いて検討を行った。未処理、RA 処理、RA 及び Mcl-1L 阻害剤を併用処理した HL60 細胞に発現している細胞分化指標 CD11b のタンパク質量を測定した。その結果、RA 処理による CD11b 量は、Mcl-1L 阻害剤 S63845 併用によってさらに増加することから (Fig. 7)、Mcl-1L 阻害剤が RA 誘導分化を促進させることが明らかになった。よって、Mcl-1S の機能である Mcl-1L の阻害は白血病細胞の分化に重要であることが示唆された。

以上の結果から、HL60 細胞において、RA 処理によって PKA は、細胞質から核に移行し、核タンパク質のリン酸化を増大させること、レチノイル化 PKA によってリン酸化される核タンパク質に SF2 があり、SF2 が PKA によりリン酸化されることによって不活化し、スプライシングを抑制できなくなるため、そのため、スプライシングバリエーション Mcl-1S が増加し、Mcl-1S が Mcl-1L に結合し、Mcl-1L 機能 (抗アポトーシス作用) を阻害することで、HL60 細胞の RA 誘導分化・増殖抑制を促進することが判明した (Fig. 8)。また、Mcl-1L 阻害剤が RA 誘導分化を促進することから、Mcl-1L の阻害剤が白血病治療薬開発に繋がることを示唆した。

(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：

真核生物の DNA は、核内においてヒストンに結合して、クロマチンに組込まれている。コアヒストン (H2A、H2B、H3、H4) は、それぞれ 2 分子から編成される 8 量体で、約 147 塩基対の DNA を巻き付けヌクレオソームを形成する。このコアヒストンタンパク質の C 末端側鎖はヌクレオソームの構造形成に関与するのにに対し、N 末端側鎖を構成する 20~30 のアミノ酸はヌクレオソームから突き出ており、数々の翻訳後修飾のターゲットとなる。ヒストンの N 末端側のリジン残基にアセチル基、N 末端側のセリン残基にリン酸基、H2A、H2B の C 末端側のリジン残基にユビキチン基、H3、H4 の N 末端側のアルギニン・リジン残基にメチル基が共有結合しており、これら修飾は DNA の転写、複製、修復の制御に関与している。そこで、レチノイル化の各種ヒストン修飾への関与を調べるため、未処理と RA 処理した HL60 細胞から酸抽出により単離したヒストンを 1D-PAGE や塩基性タンパク質解析用 RFHR 二次元電気泳動法により分離後、今回は修飾部位特異的な抗ヒストン抗体と抗総ヒストン抗体を用いた免疫染色を行い、RA の各ヒストンの発現への影響を解析した。

まず、遺伝子発現調節に深く関わる H3 と H2B について、H3、アセチル化 (Lys9/14)-H3、H2B、アセチル化 (Lys5)-H2B に対する抗体と 1D-PAGE を用いて検討を行ったところ、未処理に比べて RA 処理ではアセチル化 (Lys5) H2B 発現量は減少したが、アセチル化 (Lys9/14) H3 発現量は有意な変化を示さなかった。次に、ユビキチン化 (Lys120)-H2B に対する抗体を用いて検討したところ、その発現量は未処理に比べて RA 処理で減少傾向を示した。さらに、リン酸化-H3 とリン酸化-H2B に対する抗体を用いて検討したところ、両発現量は未処理に比べて RA 処理で有意に増加していた。また、抗 PKA 基質抗体を用いて検討したところ、RA 処理した H3 と H2B は染色され、その発現量は増加していた。一方、未処理と RA 処理した細胞から単離したヒストンを抗 RA 抗体と抗リン酸化ヒストン抗体を用いて RFHR で解析したところ、レチノイル化或いはリン酸化の RFHR パターンは異なっていた。以上の結果から、RA 処理はヒストン修飾、特にリン酸化に大きな変化を与えることが明らかとなった。以前、ヒストンの欠失変異体発現プラスミドを構築し HL60 細胞に導入・発現させてレチノイル化部位の同定することを計画していたが、欠失変異体がレチノイル化酵素の基質にならずレチノイル化されない可能性が考えられたので、点変異体作成に切り替えるかを再考している。

以上、レチノイル化は、 $\alpha$ -actinin の局在を核から細胞質に変化させ、安定化させる、また PKA を核内に移動させスプライシング調節因子 SF2 やヒストンのリン酸化を促進し、細胞分化・増殖抑制を促すことを明らかにした。今後、より詳細な検討を行い、レチノイル化による新規エピジェネティクス調節機構を解明し、新薬の開発、新規治療法・予防法の確立を目指していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Chingle R. M., Imai M., Altman S., Saito D., Takahashi N., and Burke T. R.	4. 巻 82
2. 論文標題 Examination of aminophenol-containing compounds designed as antiproliferative agents and potential atypical retinoids.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 117214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2023.117214	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 該当する
1. 著者名 Imai M., Izumisawa T., Saito D., Hasegawa S., Yamasaki M., and Takahashi N.	4. 巻 46
2. 論文標題 Effects of antibacterial agents on cancerous cell proliferation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 661-671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b22-00674	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 Yamasaki M., Hasegawa S., Ozaki S., Imai M., Saito D., and Takahashi N.	4. 巻 13
2. 論文標題 High-Fat-Diet Suppressed Ketone Body Utilization for Lipogenic Pathway in Brown Adipose Tissues.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo13040519	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 Saito D., Imai M., Hasegawa S., Yamasaki M., and Takahashi N.	4. 巻 1869
2. 論文標題 A splicing factor phosphorylated by protein kinase A is increased in HL60 cells treated with retinoic acid.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.	6. 最初と最後の頁 119142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2021.119142	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 Takahashi N., Saito D., Hasegawa S., Yamasaki M., and Imai M.	4. 巻 230
2. 論文標題 Vitamin A in health care: Suppression of growth and induction of differentiation in cancer cells by vitamin A and its derivatives and their mechanisms of action.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacol. Ther.	6. 最初と最後の頁 107942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2021.107942	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 Takahashi N.	4. 巻 45
2. 論文標題 Inhibitory effects of vitamin A and its derivatives on cancer cell growth not mediated by retinoic acid receptors.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 1213-1224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00315	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 Saito D., Imai M., Yamada C., and Takahashi N.	4. 巻 1868
2. 論文標題 Changes in the levels of $\alpha$ -actinin-4 in differentiating human myeloid leukemia cells induced by retinoic acid.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.	6. 最初と最後の頁 118968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2021.118968	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 Yamasaki M., Hasegawa S., Imai M., Fukui T., and Takahashi N.	4. 巻 4
2. 論文標題 Browning Effect of Brominated Flame Retardant, TBBP-A, on Undifferentiated Adipocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Rep.	6. 最初と最後の頁 41-46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.4.1_41	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 Izumisawa, T., Wakui, N., Kaneko, T., Soma, M., Imai, M., Saito, D., Hasegawa, H., Horino, T., Takahashi, N	4. 巻 43
2. 論文標題 Increased Vancomycin Clearance in Patients with Solid Malignancies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 1081-1087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00083	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	4. 巻 19
2. 論文標題 Isolation and characterization of human acetoacetyl-CoA synthetase splice variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene Reports	6. 最初と最後の頁 100665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.genrep.2020.100665	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35件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今井正彦、小山俊平、齋藤大輔、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 神経芽腫に対するFenretinide誘導体の抗腫瘍作用
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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 ケトン体代謝酵素欠損マウスの脳における遺伝子発現の網羅的解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎正博、長谷川晋也、今井正彦、尾崎正太郎、高橋典子
2. 発表標題 高脂肪食が褐色脂肪細胞組織の脂質・ケトン体利用経路に与える影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋典子
2. 発表標題 ビタミンAとがん：ビタミンAとその誘導体によるがん細胞の増殖抑制とその作用機序
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演）
4. 発表年 2022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（TBPP-A）が培養脂肪細胞の褐色化に与える影響の検討
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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 PKAによるスプライシング調節因子SRSF1のリン酸化とレチノイン酸誘導HL60細胞分化
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井正彦、高林優夏、田中理絵、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 ビタミンAの乳がん細胞の抗酸化システムに及ぼす影響
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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 スプライシング調節因子SRSF1のリン酸化とレチノイン酸誘導HL60細胞分化
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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 脳におけるアセトアセチル CoA 合成酵素の役割
3. 学会等名 フォーラム2021：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋典子
2. 発表標題 ビタミンAとがん：ビタミンAとその誘導体によるがん細胞の増殖抑制とその作用機序
3. 学会等名 日本薬学会関東支部会受賞記念オンライン講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 11. 今井正彦、筒井知香華、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 がん細胞の細胞増殖に及ぼす抗菌剤の影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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 スプライシング調節因子SF2のPKAによるリン酸化はレチノイン酸誘導細胞分化を調節する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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 脂質代謝異常とケトン体代謝酵素の関係
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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) による脂肪細胞の脂質代謝活性化効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021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 難治がんに対するケイヒ酸誘導体による細胞増殖抑制作用およびその機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021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 HL60細胞分化誘導時の p38タンパク質の変化
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋典子、齋藤大輔、長谷川晋也、山崎正博、今井正彦
2. 発表標題 GAPDH タンパク質のレチノイン酸処理による変化
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021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 高脂肪食負荷による脂質代謝異常に対するケトン体代謝酵素欠損の影響
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井正彦、李川、齋藤大輔、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 胆のうがん細胞に対する retinol による増殖抑制機構の解析
3. 学会等名 第32回日本レチノイド研究会学術集会
4. 発表年 2021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 レチノイン酸による HL60 細胞の分化における PKA によるタンパク質のリン酸化
3. 学会等名 第32回日本レチノイド研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋典子、齋藤大輔、長谷川晋也、山崎正博、今井正彦
2. 発表標題 活性型ビタミン A 誘導細胞分化におけるアクチン結合型タンパク質
3. 学会等名 フォーラム2021：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021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 培養脂肪細胞の脂質代謝に対して臭化難燃剤 (TBBP-A) が与える影響の検討
3. 学会等名 フォーラム2021：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川晋也、森島玲雄、今井正彦、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 マクロファージの炎症応答におけるアセトアセチル CoA 合成酵素の役割
3. 学会等名 フォーラム2021：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021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 抗がん剤による胆嚢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141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋典子、齋藤大輔、今井正彦
2. 発表標題 -カロテンとその代謝物の作用と疾病予防・治療への応用
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（招待講演）
4. 発表年 2021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 PKA によりリン酸化される RA 処理 HL60 細胞のタンパク質
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井正彦、李川、齋藤大輔、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 悪性腫瘍におけるビタミンA の変化と作用
3. 学会等名 第31回日本レチノイド研究会学術集会
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 脳組織におけるケトン体代謝の役割
3. 学会等名 第31回日本レチノイド研究会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋典子、亀岡優梨、齋藤大輔、長谷川晋也、山崎正博、今井正彦
2. 発表標題 HL60細胞におけるレチノイン酸結合タンパク質の同定
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020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 HL60細胞分化誘導時の -アクチニンタンパク質の変化
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井正彦、齋藤大輔、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 スタチンによる難治がん細胞増殖抑制作用に関する研究
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
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 脂質代謝経路に対するケトン体代謝酵素欠損の影響
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020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 細胞分化誘導時の -アクチニンタンパク質の変化
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
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 培養脂肪細胞へ臭化難燃剤 (TBBP-A) が与える影響の細胞分化前後での比較検討
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
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	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)	

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
---------	---------