

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：27301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617020

研究課題名(和文)非環式レチノイドによる肝癌の予防

研究課題名(英文)Prevention of human hepatoma with acyclic retinoids

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：非環式レチノイドの1つであるゲラニルゲラノイン酸(GGA)の肝癌予防作用における細胞死誘導メカニズムを細胞および分子レベルで解析した。GGAは肝癌細胞に対して初期autophagyを誘導するが、autolysosomeの形成に至らない不完全なautophagy応答を誘導した。GGAによる初期autophagy誘導のメカニズムを解析した結果、肝癌細胞ではGGA処理後15分以内に、1)変異p53蛋白の核内移行、2)ミトコンドリアにおけるO<sub>2</sub>-の産生亢進、3)小胞体ストレス応答(UPR)などが観察された。GGAによる小胞体UPRを介した初期autophagyの誘導を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cellular mechanism underlying acyclic retinoid of geranylgeranoic acid (GGA)-mediated induction of cell death in human hepatoma cells was investigated. In hepatoma cells, GGA induces initial autophagy, but incomplete autophagic response, which lacks autolysosome formation. As a cellular mechanism of GGA-induced initial autophagy, we observed 1) nuclear translocation of mutant p53, 2) hyperproduction of superoxide, and 3) unfolded protein response (UPR) in ER. The present study revealed that GGA induce initial autophagy through ER-UPR, which may result in cell death.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：総合栄養科学

キーワード：オートファジー 非環式レチノイド ゲラニルゲラノイン酸 オートファゴソーム 細胞死 癌予防

## 1. 研究開始当初の背景

Geranygeranoic acid (GGA)の誘導体である4,5-didehydroGGAによる肝癌再発予防の臨床研究が報告され、1996年には肝癌の再発が有意に押さえられ(文献1)、1999年には術後7年目の延命率が有意に上昇することが示された(文献2)。

GGAや4,5-didehydroGGAは、肝癌細胞の培養系で細胞死を誘導すること(文献3)から、肝癌再発予防に有効であるものと考えられている。

### 文献

- 1) Muto et al: Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* **334**:1561-1567, 1996.
- 2) Muto et al: Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid in patients with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* **340**: 1046-1047, 1999.
- 3) Nakamura et al: Apoptosis in human hepatoma cell line induced by 4,5-didehydro geranylgeranoic acid (acyclic retinoid) via down-regulation of transforming growth factor- $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun.* **219**:100-4, 1996.

## 2. 研究の目的

GGAは天然のジテルペノイド化合物の1つであり、植物細胞ばかりでなく動物細胞にも存在する可能性が考えられている。GGAによる肝癌細胞に対する細胞死誘導機構の詳細を解明することにより、GGAの生理的役割を明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### 1) 共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡による生細胞の観察:

リアルタイムにautophagyのフローを観察するために、GFPで標識したLC3遺伝子(autophagosomeのマーカー)やGFPとRFPをタンデムに標識したLC3遺伝子(autophagosomeとautolysosomeを区別するマーカー)をヒト肝癌由来細胞株HuH-7に導入した安定株をそれぞれ作製し、GGAを添加後、LC3蛋白の局在とその環境を標識した蛍光の強度と色相により判定した。

### 2) 共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡による免疫蛍光染色像の観察:

細胞死に関連した遺伝子産物p53蛋白のGGA処理による細胞内局在の変化を、免疫蛍光染色を行った後、共焦点レーザー走査蛍光

顕微鏡により観察した。

### 3) 小胞体ストレス応答(UPR)の解析:

小胞体ストレスに伴うunfolded protein response (UPR)の1つであるXBP1 mRNAの小胞体におけるsplicingをunspliced/spliced formに特異的なプライマーを作製して、定量的RT-qPCRにより測定した。

### 4) その他:

SDS-PAGE, cross-linking SDS-PAGE, Blue Native gradient PAGEなどの電気泳動後、種々の抗体を用いたwestern blotting、細胞内ATP濃度の測定による生細胞数の計測などを行った。

## 4. 研究成果

### 1) GGAによる不完全なautophagy応答

ヒト肝癌由来細胞株HuH-7細胞をGGA(10 $\mu$ M)処理すると、24時間以内に細胞死が誘導されるが、そのメカニズムの1つとして音ファジーの関与が考えられた。そこで、HuH-7/GFP-LC3細胞を樹立し、autophagosomeの観察を行ったところ、GGA処理(24時間後)により大量のautophagosomeの蓄積をみた(図1)。

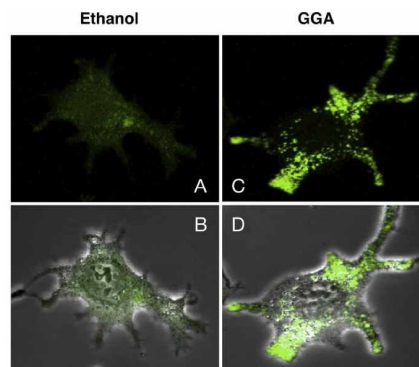


図1 .GGA処理によるautophagosomeの蓄積 (A,B:エタノール対照、C,D:GGA 10  $\mu$ M)

また、電子顕微鏡により細胞内の微細構造を観察すると、図2に示したようにGGA処理細胞において、形態学的にearly/initial autophagic vacuoleと判定される構造の蓄積が観察された。

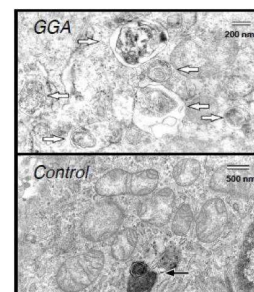


図2 .GGA処理によるearly/initial autophagic vacuoleの蓄積

以上の形態学的観察から、ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞は、GGA 処理により autophagy が誘導されることが初めて明らかになった。

Autophagy 誘導の詳細を解析すると、GGA 処理による autophagosome の形成誘導は GGA 添加後 30 分程度で観察され、極めて速やかに誘導されることが判明した。その後、細胞死が観察される 48 時間後まで autophagosome は蓄積されたままであった (図 3)。

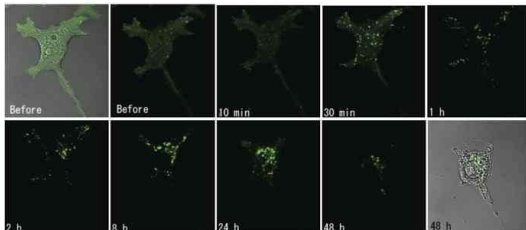


図 3 .GGA 処理による autophagosome の誘導 (Time-lapse live-cell imaging により撮影)

LC3 蛋白は、western blotting により解析すると、phosphatidylethanolamine の結合した autophagosome 結合型の LC3-II が GGA 処理後 30 分から増加しその後 8 時間目まで増加を続け、24 時間まで減少することはなかった (図 4)。また、autophagy によって分解されていると考えられている p62/SQSTM 蛋白は GGA 処理後、時間の経過と共に蓄積され、autophagy の機能の障害が示唆された (図 4)。

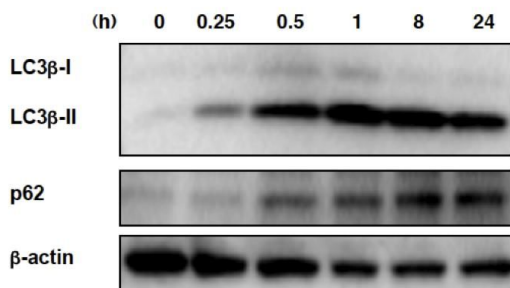


図 4 .GGA 処理による LC3-II と p62 の蓄積

そこで、autophagy flux を形態学的に解析することのできる GFP-RFP タンデム標識型の LC3 遺伝子を導入した HuH-7/RFP-GFP-LC3 細胞を作製して、GGA の効果を観察した。その結果、図 5 に示したように、この細胞はグルコース飢餓の状態で培養すると、エネルギー源の低下に対する応答として autophagy が進行し、RFP-GFP-LC3 の粒 (puncta) は赤色となり GFP の蛍光が消光していることを示した。これは、GFP 蛋白が pH 依存性の蛍光色素蛋白で、しかも酸性環境で蛍光性を失う性質を反映しているものと考えられている。即ち、赤色に見える LC3 の粒は、もはや autophagosome ではなく酸性のオルガネラである lysosome と融合した autolysosome であることを示している。さらに、グルコース飢餓の状態で、

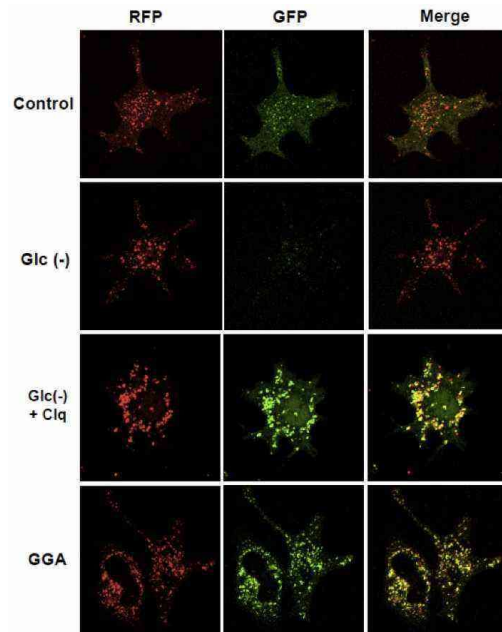


図 5 .GGA 処理による Autophagy Flux の障害

lysosome の阻害剤である chloroquine (lysosome 蓄積性塩基性試薬) を共存させると、autolysosome の形成は障害されることから、GFP の蛍光性は維持され、赤色と緑色の混合した黄色の粒が蓄積した (図 5 下から 2 段目)。

一方、GGA 処理した細胞では、lysosome 阻害剤を共存させていないにもかかわらず、赤色と緑色の粒は増加し、グルコース飢餓に chloroquine を共存させた場合と同様に黄色の粒が蓄積した (図 5 最下段)。

以上のことから、GGA は HuH-7 細胞に速やかに autophagosome の形成を誘導するが、その後 autolysosome の融合には至らない autophagy の不完全な応答であることが明らかになった。

## 2) GGA による細胞質 p53 の核移行

ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞は、p53 遺伝子に変異 (Y220C) を持つ heterozygote で、p53 蛋白は細胞質に大量に蓄積され、核への移行が障害されている。しかしながら、p53 の knockdown により GGA による細胞死誘導効果は有意に減弱された (図 6)。

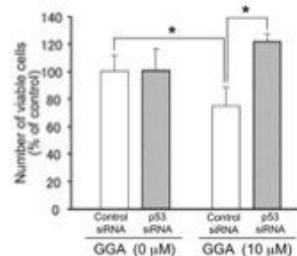


図 6 .p53-knockdown による GGA の細胞死誘導効果の減弱



そこで、我々は GGA による HuH-7 細胞に対する細胞死誘導に変異 p53 蛋白がどのようにかわるかを、その局在から解析した。

その結果、GGA 処理により細胞質に蓄積した p53 蛋白は、迅速に核内に移行した(図 7)。

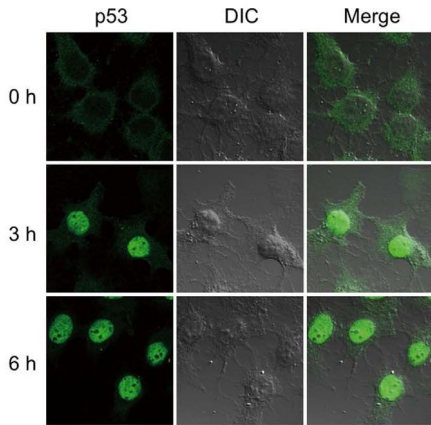


図 7 .GGA 処理による変異 p53 蛋白の核移行

しかも、GGA 処理前の細胞質に蓄積した p53 蛋白は、網状に分布し細胞内膜系との結合性が推定された。

そこで、細胞質の p53 蛋白の native form を解析するために Blue-native gradient PAGE により post-mitochondria 画分の蛋白を分離後、p53 蛋白の western blotting を行ったところ、post-mitochondria 画分の p53 蛋白は、大部分が PAGE に入らないほど巨大な複合体になっていることが示唆された(図 7)。

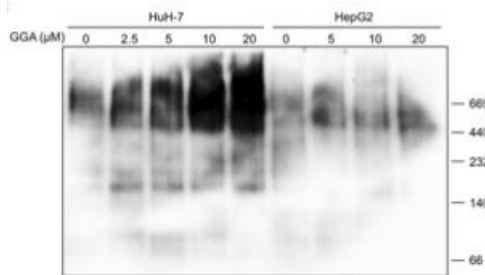


図 8 .GGA 処理による細胞質 p53 蛋白の native form の変化

ところが、post-mitochondria 画分に GGA を添加し静置した後、同様の電気泳動を行うと、図 7 に示したように分子サイズが 440-700 kD 程度のところに p53 蛋白が泳動され、GGA の濃度依存的に増加した。この GGA により遊離されてくる巨大な複合体については、未だ不明であるが、免疫共沈降や cross-linking PAGE などの実験結果から、ユビキチンリガーゼ活性が知られている PARC や細胞骨格蛋白のチュブリンなどが含まれていることが分かっている。

一般に、細胞質の p53 は autophagy を阻害

し、核内に移行した p53 は転写因子として autophagy 関連遺伝子の発現を誘導するといわれている。したがって、HuH-7 細胞の場合、細胞質に蓄積された p53 蛋白が果たして autophagy を阻害しているかどうかは不明であるが、GGA 処理に伴い速やかな p53 蛋白の核移行が観察されることから、少なくとも autophagy 誘導の許容条件(permissive effect)を作り出しているものと考えられる。

### 3) GGA による小胞体ストレス応答の誘導

GGA 処理により p53 蛋白が核に移行したことにより autophagy の許容条件が産み出されたとしても、ではどのようにして GGA は HuH-7 細胞に autophagy を誘導するのだろうか？

そこで、我々は post-mitochondria 画分に存在すると思われる GGA の標的部位として小胞体を想定し、GGA による小胞体ストレス応答(unfolded protein response: UPR)の有無を XBP1 mRNA の splicing により解析した。その結果、図 9 に示したように、GGA は極めて速やかに XBP1u mRNA(unspliced form) を減少させ、XBP1s mRNA(spliced form)を増加させた。

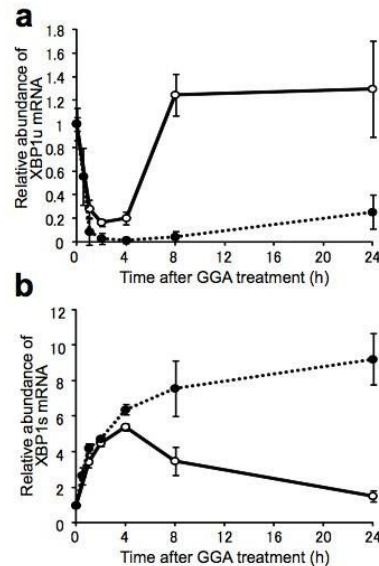


図 9 .GGA 処理による XBP1 mRNA の splicing (白丸実線:GGA 10 μM, 黒丸破線:GGA 20 μM)

しかも、10 μM GGA の処理では、8 時間後には XBP1u mRNA のレベルが回復し、XBP1s mRNA のレベルも減少し始め、24 時間後にはほぼ元のレベルに回復したが、20 μM の処理ではそのような回復現象は見られず、XBP1u mRNA は減少したまま、XBP1s mRNA レベルは高値のままであった(図 9)。

現在、詳細に研究中であるが XBP1u mRNA の splicing を触媒する小胞体に局在する酵素 IRE1 の特異的阻害剤である 4 μ 8 C を前処理すると、GGA による LC3-II 蛋白の蓄積誘導が抑制されることから、GGA によって引き起こされる UPR の 1 つである XBP1u mRNA のスプライシングが、autophagy 誘導の引き金に

なっている可能性が考えられる。

今後、GGA による小体ストレス応答誘導のメカニズムならびに autolysosome 形成障害のメカニズムを解析することにより、GGA による細胞死誘導の全体的なメカニズムを明らかにして行くつもりである。

#### 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 10 件)

- 1) Ishiguro T, Morita-Fujimura Y, Shidoji Y, Sagami H.: Dolichol biosynthesis: The occurrence of epoxy dolichol in skipjack tuna liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.079. (査読有)
- 2) Iwao C, Shidoji Y.: Induction of nuclear translocation of mutant cytoplasmic p53 by geranylgeranoic acid in a human hepatoma cell line. *Sci Rep*. 2014; **4**: 4419. doi: 10.1038/srep04419. (査読有)
- 3) Sakane C, Okitsu T, Wada A, Sagami H, Shidoji Y.: Inhibition of lysine-specific demethylase 1 by the acyclic diterpenoid geranylgeranoic acid and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; **444**: 24-29. (査読有)
- 4) Kamiyama H, Kakoki K, Shigematsu S, Izumida M, Yashima Y, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Sano T, Shidoji Y, Kubo Y.: CXCR4-tropic, but not CCR5-tropic, human immunodeficiency virus infection is inhibited by the lipid raft-associated factors, acyclic retinoid analogs, and cholera toxin B subunit. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013; **29**: 279-288. (査読有)
- 5) Krinsky DJ, Shidoji Y, (他 1762 名): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012; **8**: 445-544. (査読有)
- 6) Shimonishi S, Muraguchi T, Mitake M, Sakane C, Okamoto K, Shidoji Y.: Rapid downregulation of cyclin D1 induced by geranylgeranoic acid in human hepatoma cells. *Nutr Cancer*. 2012; **64**: 473-480. (査読有)
- 7) Mitake M, Shidoji Y.: Geranylgeraniol oxidase activity involved in oxidative formation of geranylgeranoic acid in human hepatoma cells. *Biomed Res*. 2012; **33**: 15-24. (査読有)
- 8) Okamoto K, Sakimoto Y, Imai K, Senoo H,

Shidoji Y.: Induction of an incomplete autophagic response by cancer-preventive geranylgeranoic acid (GGA) in a human hepatoma-derived cell line. *Biochem J*. 2011; **440**: 63-71. (査読有)

- 9) Muraguchi T, Okamoto K, Mitake M, Ogawa H, Shidoji Y.: Polished rice as natural sources of cancer-preventing geranylgeranoic acid. *J Clin Biochem Nutr*. 2011; **49**: 8-15. (査読有)
- 10) Sakane C, Shidoji Y.: Reversible upregulation of tropomyosin-related kinase receptor B by geranylgeranoic acid in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurooncol*. 2011; **104**: 705-713. (査読有)

[学会発表](計 21 件)

- 1) 岩尾千絵子、岡本恭子、四童子好廣：ゲラニルゲラノイン酸 (GGA) による小胞体ストレス応答を介した初期オートファジーの誘導。第 7 回オートファジー研究会，静岡，2013 年 12 月
- 2) Kana Deguchi, Chiharu Sakane, Yoshihiro Shidoji: Cytoprotective effects of curcumin and geranylgeranoic acid on human neuroblastoma SH-SY5Y cells. 第 36 回日本分子生物学会年会，神戸，2013 年 12 月
- 3) Shota Maki, Hiroshi Sagami, Yoshihiro Shidoji: Effects of (S)-2,3-dihydroGGA and dolichoic acid on lipid droplets dynamics in human hepatoma-derived cells. 第 36 回日本分子生物学会年会，神戸，2013 年 12 月
- 4) Chieko Iwao, Yoshihiro Shidoji: Geranylgeranoic acid (GGA)-induced initial autophagy through unfolded protein response (UPR). 第 36 回日本分子生物学会年会，神戸，2013 年 12 月
- 5) Yoshihiro Shidoji, Chieko Iwao, Kyoko Okamoto: Initiation of autophagy through unfolded protein response during cancer-preventive geranylgeranoic acid-induced cell death of human hepatoma cells. 20th International Congress of Nutrition, Granada (Spain), September 2013
- 6) Yoshihiro Shidoji, Chiharu Sakane, Hiromichi Ohta: Flow injection assay for measuring lysine specific demethylase-1 (LSD1) activity by time-of-flight mass spectrometry. 20th International Congress of Nutrition, Granada (Spain), September 2013
- 7) 牧翔太、佐上博、四童子好廣：種々の非環式レチノイドがヒト肝癌由来細胞株の脂肪滴動態に与える影響。日本農芸化学会・日

本ビタミン学会 2013 年度 合同広島大会, 広島, 2013 年 9 月

- 8) 四童子好廣: ゲラニルゲラノイン酸の分化誘導作用と細胞死誘導作用. シニアシンボジウム「レチノイドの新しいターゲット-ノンジェノミック」 日本レチノイド研究会 第 24 回学術集会, 東京, 2013 年 8 月
- 9) Chieko Iwao, Kyoko Okamoto, Yoshihiro Shidoji: Geranylgeranoic acid (GGA)-induced initial autophagy through unfolded protein response (UPR). 日本レチノイド研究会 第 24 回学術集会, 東京, 2013 年 8 月
- 10) Shota Maki, Hiroshi Sagami, Yoshihiro Shidoji: Effects of geranylgeranoic acid analogs on lipid droplet dynamics in human hepatoma-derived cells lines. 日本レチノイド研究会 第 24 回学術集会, 東京, 2013 年 8 月
- 11) 坂根千春, 四童子好廣: ヒト神経芽腫由来 SH-SY5Y 細胞におけるゲラニルゲラノイン酸による RET 遺伝子の発現誘導. 日本レチノイド研究会 第 24 回学術集会, 東京, 2013 年 8 月
- 12) 四童子好廣, 坂根千春, 太田博道: TOF/MS 分析計を用いたリシン特異的脱メチル化酵素-1 (LSD1) 活性の測定. 日本ビタミン学会第 65 回大会, 東京, 2013 年 5 月
- 13) 岩尾 千絵子, 岡本恭子, 四童子好廣: ゲラニルゲラノイン酸による小胞体ストレス応答を介した初期オートファジーの誘導. 日本ビタミン学会第 65 回大会, 東京, 2013 年 5 月
- 14) 坂根千春, 四童子好廣: 非環式レチノイドによる RET の活性化を介した BDNF 受容体 TrkB 遺伝子の発現調節. 日本ビタミン学会 第 65 回大会, 東京, 2013 年 5 月
- 15) Chieko Iwao, Seiko Kobayashi, Yoshihiro Shidoji: Nuclear translocation of the mutant p53 transactivated the PUMA gene by geranylgeranoic acid in human hepatoma-derived HuH-7 cells. Miami 2013 Winter Symposium, The Molecular Basis of Metabolism and Nutrition, Miami, Florida (USA), February 2013
- 16) Chiharu Sakane, Yoshihiro Shidoji: Geranylgeranoic acid induced Trk-B expression through upregulation of RET in neuroblastoma SH-SY5Y cells. Miami 2013 Winter Symposium, The Molecular Basis of Metabolism and Nutrition, Miami, Florida (USA), February 2013
- 17) Shota Maki, Haruna Sekiguchi, Hiroshi Sagami, Yoshihiro Shidoji: Effects of (S)-2,3-dihydroGGA and dolichoic acid on dynamics of

lipid droplets in human hepatoma-derived HuH-7 cells. 第 35 回日本分子生物学会年会, 博多, 2012 年 12 月

- 18) Chieko Iwao, Seiko Kobayashi, Yoshihiro Shidoji: Nuclear translocation of the mutant p53 and transcriptional activation of the PUMA gene induced by geranylgeranoic acid (GGA) in human hepatoma-derived HuH-7 cells. 第 35 回日本分子生物学会年会, 博多, 2012 年 12 月
- 19) Yoshihiro Shidoji, Kyoko Okamoto, Yoko Sakimoto, Chieko Iwao: Autophagic events during geranylgeranoic acid-induced cell death of human hepatoma cells. 6th International Symposium of Autophagy, Nago (Okinawa), October 2012
- 20) 岩尾 千絵子, 小林聖子, 井上紗貴, 四童子好廣: ゲラニルゲラノイン酸(GGA)による p53 タンパクの再活性化. 日本ビタミン学会第 64 回大会, 岐阜, 2012 年 6 月
- 21) 三岳麻衣子, 四童子好廣: ゲラニルゲラノイン酸の生合成に関与する GGOH オキシダーゼはモノアミンオキシダーゼ B. 日本ビタミン学会第 64 回大会, 岐阜, 2012 年 6 月

〔図書〕(計 2 件)

- 1) Yoshihiro Shidoji: Chapter 12. Geranylgeranoic acid induces incomplete autophagy but leads to the accumulation of autophagosomes in human hepatoma cells. in *AUTOPHAGY -Cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection and aging-*, **Volume 3**, Section II, Role of autophagy in disease. pp.174-183, M. A. Hayat (ed), Elsevier Inc. New York. 2014. DOI: 10.1016/B978-0-12-405529-2.00012-3
- 2) 小川弘子, 四童子好廣: 「医用機能性食品ガイドブック」日本機能性食品医用学会監修, 医歯薬出版, Part2 第 4 章 ビタミン A とカロテノイド, 108-117, 2012

〔その他〕

ホームページ等 準備中

## 6. 研究組織

### (1) 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