

令和元年6月18日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16598

研究課題名(和文)ヘキサナール臭を介した情報伝達と臭気の制御

研究課題名(英文)Research of hexanal induced signaling mechanism in B16 melanoma cells

研究代表者

石川 雄樹(Yuki, Ishikawa)

東京海洋大学・学術研究院・博士研究員

研究者番号：50638004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メラノーマ由来培養細胞のB16細胞で生じるヘキサナール誘導性カルシウム応答及びその下流で生じる情報伝達の機構について、カルシウムイメージング、分子生物学的手法などにより検討した。B16細胞で確認されるヘキサナール誘導性カルシウム応答は、ヘキサナールをリガンドとしてカルシウム応答を起こすTRPA1チャネルやヘキサナールを認識する嗅覚受容体など、これまでに報告されているものとは異なる未知の担体を介して生じていることが示唆された。またガンモデルマウスにヘキサナールを投与するとガン細胞の重量が増加することから、ヘキサナール受容を介した細胞内情報伝達は、ガン進行を促進する方向に働くことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、ある種のガン細胞では、生体内で生じるヘキサナールを特異的に認識する、これまでに報告のない分子機構を有し、それがガンの成長・促進に関与しうる可能性が示唆された。今後ガンの制御に関わる因子の一つとして、ヘキサナールを介した情報伝達経路という、これまでほとんど着目されてこなかったターゲットの存在が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this research, we investigated that mechanism of hexanal-induced calcium response in B16 melanoma cells. TRPA1 channel and olfactory receptors that of reported hexanal reception molecules were not involved in calcium response of B16 melanoma cells. On the trials of tumor model mouse experiment using B16 cells administration to tail vein, tumor weight was gained by hexanal exposure. The results suggest that some kind of cancer cells has a signaling pathway via unknown molecule that activated by hexanal.

研究分野：生化学 食品化学 水産化学

キーワード：ヘキサナール メラノーマ B16細胞 カルシウム応答 n-6系脂質

1. 研究開始当初の背景

ガンや糖尿病、トリメチルアミン尿症などある種の疾患を罹患している患者において、体内の代謝異常によりそれぞれ独特の臭気性物質の生成が知られている。そのような臭気性物質の中でも、ある種のガン患者から多く検出される臭気成分として炭素数 6 の直鎖状アルデヒドであるヘキサナールが報告されている。申請者はこれまでの研究で、メラノーマ由来培養細胞の B16 細胞がヘキサナールを含む直鎖状アルデヒドを特異的に認識して細胞内カルシウムイオン濃度上昇を引き起こす受容機構を有していることを発見した (Ishikawa et. al. 2011)。この応答はヘキサナールと同じく炭素数 6 の直鎖状脂肪酸やアルコール分子では細胞応答を起こさないことから、生体内で生じるヘキサナールなどの直鎖状アルデヒドを極密に感知する極めてユニークな受容体タンパク質であると考えられるがこの実体については未だ明らかではない。これらのことより、ある種のガンにおいては何かの方法によりヘキサナールを増加させている。発生したヘキサナールをガン細胞自体が認識し、何かしらの作用を引き起こす可能性がある。ことが考えられた。

2. 研究の目的

このため本研究においては、(1) B16 細胞で確認される、ヘキサナール誘導性カルシウム応答について、その特性を明らかにすることを通じ、最終的に受容機構の解明を行う。(2) ガン細胞によるヘキサナールの発生機構について明らかにすることにより、臭気を抑制するための方法を検討する。及び(3) ヘキサナール受容を介した情報伝達系がガンの進行に及ぼす影響について明らかにする。ことを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

(1) B16 細胞に発現するヘキサナール受容担体の特定

B16 細胞で確認されるヘキサナール誘導性カルシウム応答について、その機構に關する受容担体を明らかにすることを目的として、これまでに報告のされているヘキサナール受容体として知られている嗅覚受容体、及びヘキサナールにより活性化されカルシウムイオン流入を引き起こすイオンチャネルである TRPA1 について、特異的アゴニスト及び阻害剤を用いカルシウムイメージング法および PCR 法による発現確認から評価した。また、B16 細胞には複数の亜種が存在するため、これらを含めた複数の培養細胞に対しヘキサナール投与を行い、この応答に關する受容担体を発現する細胞・組織の特徴について検討を加えた。B16 細胞などメラノサイトに由来する細胞種で特異的に高発現することが知られている転写因子である MITF について、NCBI データベースに登録されている遺伝子配列をもとにノックアウト用 gRNA を設計し、CRISPR-Cas9 法を用いてノックアウト株を作製し、カルシウム応答、及びその下流で生じるタンパク質リン酸化についてウエスタンブロット法で評価した。

(2) ガンにおけるヘキサナールの発生機構

B16 細胞によるヘキサナール生成機構については接触阻害を起こさず正常細胞に近い性質を有している培養細胞として 3T3-L1 脂肪前駆細胞を比較対象に用い培地中に発生するヘキサナール量を GC/MS 法で測定した。細胞内で生じる活性酸素量について特異的蛍光プローブである DCFDA を細胞に取り込ませた後、蛍光顕微鏡観察を行い細胞から生じる蛍光強度より評価した。また臭気抑制作用のある物質を評価するためのヘキサナール臭気モデルマウスを作製することを目的として C57/B16 系統マウスに対し 10mM のヘキサナール/PBS 溶液 100 μ l を経口・腹腔内・皮下・尾静脈それぞれの方法で投与し、採取した血液中のヘキサナール量を測定し、モデルマウス作製のために最も適した方法を検討した。

(3) ヘキサナール受容機構を介した情報伝達系がガンの進行に及ぼす影響

C57/B16 系統マウスの尾静脈から B16 細胞を投与し 肺へのガン転移モデルマウスを作製した。モデルマウスに対し、コントロールとして PBS を用い、1mM 及び 10mM ヘキサナールを 3 日おきに投与し 20 日目に解剖した。ガンが転移した肺組織の臓器重量及び肝臓への転移数測定を行い、ヘキサナールがガンに及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

申請者はこれまでの検討において、由来組織の異なる (肝臓・腎臓・卵巣・免疫系など) 培養細胞を用いてヘキサナール誘導性カルシウム応答が生じるかについて、検討を行っているが何れにおいてもメラノーマを由来とする B16 細胞以外ではカルシウム応答は起こらないことを確認している。本研究期間中には、これまでに検討で使用していた B16 細胞株の一種 (B164A5 株) 以外に亜種の B16F1 株、B16F10 株及び、これまでに検討していなかった臓器・組織を由来とする培養細胞数種 (MCF7, K562, C6) を入手してヘキサナール投与により細胞内カルシウム応答が生じるか検討を行った。この結果、今回新たに用いた B16 亜種の F1, F10 株ではこれまでに用いていた 4A5 株同様にカルシウム応答が確認できたものの、その他の培養細胞では応答が確認されなかった。また、ヘキサナールをリガンドとして認識する受容担体として、Olfactory

database (<https://senselab.med.yale.edu/ordb/>)を用いたリガンドサーチからピックアップした嗅覚受容体 5 種類 (Olf2r2, 64, 124, 168, 620) 及び、近年になりヘキサナールを認識することが報告されたイオンチャネルの TRPA1 があるため、これらについて、PCR 法で発現の有無を確認したところ、いずれも確認されなかった。また TRPA1 については選択的なアゴニスト・アンタゴニストが存在するためこれらの投与を行った。アゴニストとして用いたアリルイソチオシアネートの投与では、TRPA1 陽性細胞で確認される 1-100 μ M の濃度で全くカルシウム応答が見られなかった。同様に選択的アンタゴニストの AP-18 共存下においてのヘキサナール投与により B16 細胞でカルシウム応答が認められた。以上のことから、B16 細胞で発現するヘキサナール受容担体は、これまでに報告されているヘキサナール受容担体とは異なる未知のものであること、及び限られた細胞・組織で特異的に発現するタンパク質によるものと考えられ、その発現は B16 細胞の由来となるメラノサイトに関連するものであることが考えられた。これらのことからメラノーマで高発現が認められ、メラノサイト分化のマスターレギュレーター分子として知られている転写因子の MITF (Microphthalmia transcription factor) がヘキサナール受容担体の発現制御に関与している可能性について検討を行うこととした。CRISPR-Cas9 によるノックアウト株を作製し、細胞応答から評価した。

MITF ノックアウトをした培養細胞において、ウエスタンブロット法で MITF がタンパク質レベルで欠失していることを確認した。ヘキサナール投与によるカルシウム応答及びその下流で生じる MAPK タンパク質リン酸化により評価したところ、カルシウム応答・及び MAPK タンパク質リン酸化は消失せず、むしろ増加する傾向であることが確認された。このことより MITF はヘキサナール受容担体の発現に直接かかわっているわけではないものの、間接的に発現を抑制するような形で何かしらの関与をしていることが考えられた。

ガンによるヘキサナール生成機構の検討については、ヘキサナール生成基質としてアラキドン酸エチルを細胞培養培地中に添加し、培地中のヘキサナール濃度を定量したところ、B16 細胞の培養培地中ヘキサナール量が 3T3-L1 細胞と比べ有意に高かった。脂質より生じるヘキサナールの発生経路については、活性酸素種によるラジカル反応から起こる自動酸化と酵素的代謝による経路が考えられる。活性酸素種特異的な蛍光プローブである DCFDA を用いた検討では、両細胞種間において発生する活性酸素量には大きな違いが見られなかったため、B16 細胞は酵素的経路によりヘキサナールを発生させることが考えられた。そこでアラキドン酸からヘキサナールを生成する酵素である 15-リポキシゲナーゼに対する阻害剤である PD146176 を添加して培養を行ったところ、検出されるヘキサナール量が著しく減少した。以上からガン細胞より発生するヘキサナール生成機構の一部として酵素的な要因が関与していることが示唆された。一方、ヘキサナール臭気モデルマウスを作製する目的で、マウスに対しヘキサナールを経口・腹腔内・皮下・尾静脈それぞれの方法で投与したが、いずれも検出されるヘキサナール量が 2 時間以内に通常レベルにまで低下していたため、モデルマウスの作製が困難であった。その原因として、アルデヒドデヒドロゲナーゼなどの酵素による代謝、あるいはアルデヒド基を介したタンパク質アミノ基への付加反応などが生体内で生じていることが考えられた。しかしながら以上の結果より、実際にヘキサナールの生成及び臭気が確認されるガン患者のケースにおいてはこれらの作用を上回るようなヘキサナール生成が恒常的に起こっていることが示唆された。

ヘキサナール受容機構を介した情報伝達系がガンの進行に及ぼす影響を検討するために、ガンモデルマウスを作製しヘキサナール投与を行った。コントロールと比較して 1mM 及び 10mM 投与区で、ガンの成長による肺重量の増加、肝臓への転移率の増加傾向が認められた。これまでの検討で *in vitro* 系においてもヘキサナール投与によりガンの進行に関与する遺伝子の発現が上昇するという結果が得られていたため、今回の結果はそれを支持するものであった。以上本研究により、B16 細胞には生体内で生じるヘキサナールを直接的に認識する未知の受容担体が存在し、それを介した情報伝達系はガンの進行を促進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Jade Pahila, Yuki Ishikawa, and Toshiaki Ohshima. Effects of Ergothioneine-Rich Mushroom Extract on the Oxidative Stability of Astaxanthin in Liposomes. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 3491-3501 67(12)(2019)

〔学会発表〕(計 10 件)

石川雄樹, 大島敏明, 潮秀樹. ヘキサナールが B16 細胞の細胞内タンパク質リン酸化に及ぼす影響. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016)

笠原万有璃, 石川雄樹, 星剛流, 長阪玲子. 小胞体ストレスによる魚類の筋分化促進に関する研究. 平成 29 年度日本水産学会春季大会 (2017)

堀由歩, 石川雄樹, 長阪玲子, 横山雄彦. ノリに含まれる非タンパク質構成アミノ酸 teneaic acid の体内動向. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017)

末武綾子, 石川雄樹, 長阪玲子. ストレス条件下における糖質嗜好性の変動. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017)

Jade PAHILA, Yuki ISHIKAWA, Toshiaki OHSHIMA. Effects of ergothioneine-rich mushroom extract on the stability of liposomal astaxanthin under oxidation-induced conditions. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム (2017) 国際共著/国際学会

石川雄樹, 大島敏明, 潮秀樹. ヘキサナールを介したマウスメラノーマ B16 細胞の転移機 2017 年度生命科学系学会合同年次大会

石川雄樹, 大島敏明, 潮秀樹. B16 細胞におけるヘキサナール誘導性細胞内情報伝達に及ぼす MITF 遺伝子ノックアウトの影響

第 41 回日本分子生物学会年会

湯山珠璃, 石川雄樹, 大島敏明. 米糠を用いた麹菌による (2S)-2-(trimethylaminio)-3-[2-(hydroseleno)-1H-imidazole-5-yl] propanoic acid anion の生合成. 第 18 回糸状菌分子生物学コンファレンス (2018)

小田部里紗, 金城春菜, 山田真菜美, 石川雄樹, 長阪玲子. 沖縄県産アオリイカのイカスミの女性ホルモン様作用について. 平成 30 年度日本水産学会春季大会 (2019)

湯山珠莉, 山崎薫, 石川雄樹, 長阪玲子, 大島敏明. かつお節に含まれるエルゴチオネイン. 平成 30 年度日本水産学会春季大会 (2019)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

アウトリーチ活動の一環として, TBS ラジオ「アフター6ジャンクション」3月18日の特集(こく味・うま味とは何か? - 味覚研究最前線特集 - 20:00-20:50 頃)に出演し, 最近の味覚に関する研究動向について解説した. その一部で本研究に関連する, 脂質成分による生体内情報伝達についても取り上げた.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。