

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14412

研究課題名(和文)オートファジーを制御する機能性成分の作用機序解析

研究課題名(英文) Investigation for the mechanism of autophagy induced by functional components

研究代表者

藤井 俊輔(藤井俊輔)(Fujii, Shunsuke)

長崎国際大学・私立大学の部局等・講師

研究者番号：10610165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、牛蒡子エキスが有する肝臓がん細胞(HepG2)の増殖抑制作用の機序を明らかにすることを目的とした。牛蒡子に含まれるアルクチン(Arc)とアルクチゲニン(AG)はオートファジーを抑制的に制御することで、HepG2における細胞増殖抑制能を発揮していることを明らかにした。さらなる解析を進めるために、Arcおよび、AGに対するモノクローナル抗体(mAb)の作成に着手した。その結果、Arcおよび、AGを特異的に認識するmAbを産生するハイブリドーマ細胞株を樹立し、本mAbを用いたアッセイ系の確立に向け種々の条件検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品や天然物が有する機能性は、その作用がブロードであることや成分間の相互作用などを原因として、機能性成分が標的とする分子を特定することが困難である場合が多い。本研究の成果によって、モノクローナル抗体を解析ツールとした作用解析技術の一端を構築することに成功した。

本研究の究極的な目標は、明確な科学的エビデンスに基づく有用性と安全性が担保された機能性食品の開発に貢献し得るモデル研究を確立することである。さらに本研究課題の完結は、本研究分野のみならずケミカルバイオロジーや創薬科学分野等、幅広い研究分野に適用可能であり、種々の研究領域の技術発展に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanism of the growth inhibitory function of liver cancer cells (HepG2) using extract of *Arctium lappa*. We found that the suppressed proliferation of HepG2 cells via autophagy inhibition by Arc and AG contained in *Arctium lappa*. In order to proceed with further investigation, we attempted to prepare the monoclonal antibody against Arc and AG (anti-Arc/AG mAb). A hybridoma cell line was established and was given the anti-Arc/AG mAb that specifically recognized Arc and AG. Currently, it is under development the analytical method using the mAb.

研究分野：食品機能学、分析化学

キーワード：オートファジー モノクローナル抗体 アルクチゲニン アルクチン ELISA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは異常タンパク質の蓄積防止や栄養飢餓に対する対応等、生体における恒常性維持に関わる「自食」機構でありながら、無秩序なオートファジーの促進は細胞死を引き起こす。近年、食品成分であるアスコルビン酸や多価不飽和脂肪酸 (DHA、EPA) がヒト膵臓がん細胞においてオートファジーを制御し、細胞増殖抑制に関わることが報告された。この様に食品中の五大栄養素をはじめとする既知の食品成分が持つ三次機能の他に、多様な三次機能を持つ物質が多数存在し、その機能性が徐々に明らかになりつつある。

申請者が所属する研究室では、約 150 種の食品や薬用植物のエキス及び、約 200 種の化合物ライブラリを保有している。初期スクリーニングとして牛蒡子 (ごぼうの果実) エキス及び、その主薬効成分であるアルクチン (Arc; 図 1) が、肝がん細胞においてオートファジー関連マーカーである LC3B 及び、実行因子である P-Beclin1 の発現を強め、オートファジーを制御し、ヒト肝臓がん細胞 (HepG2) の増殖を抑制することを見出している (図 2)。また、通常の食用部位である根部や葉部 (葉ごぼう) にも Arc の存在が認められている。以上のことから、Arc が有するオートファジー制御機能は、食品中の非栄養素成分が有する三次機能として極めて興味深いものである。

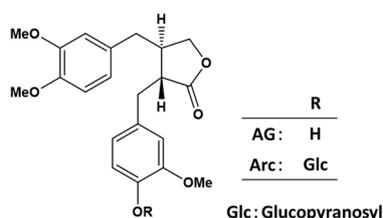


図 1. Arc および、AG の化学構造

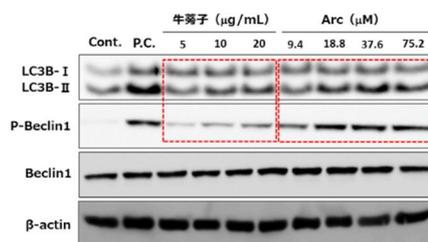


図 2. 牛蒡子及び、Arc のオートファジー制御機

2. 研究の目的

食品中の機能性成分や天然物の効果、安全性は、これまでの食経験や疫学調査、介入試験等によって評価されているが、それと同時に作用機序の解明や標的分子の同定といった、詳細な科学的エビデンスの構築が切望されている。しかしながら、食品成分や機能性成分が持つ様々な生理作用は、作用機構が単一ではなくブロードであることや、複数成分間における相互作用によって生じている場合が考えられるため、機能性成分の細胞内への取り込みや蓄積、挙動、代謝物のモニタリング、標的分子の同定等、詳細な作用機序の解明には至っていないのが現状である。即ち、機能性成分の細胞内及び生体内での作用機構を探索することは極めて重要であり、天産物や健康食品等の安全性や有用性を担保する上で必要であると考えられる。

本研究では、モノクローナル抗体 (mAb) を研究基盤として、これまで解析が困難であった食品成分等の天然物が有する機能性の詳細な解析を行い、標的タンパク質の同定、分子レベルでの作用機序の解明を目指す。したがって、今回確立する mAb を研究基盤とした作用機序解析技術は、本研究分野のみならずケミカルバイオロジーや創薬科学分野等、幅広い研究分野に適用可能であり、これにより様々な生理活性物質の作用メカニズム解明の「モデル研究」へと昇華させることも可能であると考えている。以上のことから、本研究課題では mAb を研究基盤とすることで、Arc の標的分子を同定し、「Arc はどのような作用機序でオートファジーを制御し得るか？」について解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖抑制試験

粉末状の牛蒡子にメタノールを加え、室温にて 24 時間攪拌することによって抽出を行った。その後、上清を回収し、メタノールを除去後、牛蒡子エキスを得た。得られたエキスは DMSO を用いて 100 mg/mL の濃度になるように調製し、-20 で保存した。HepG2 は 10%FBS を含む DMEM 培地で 5%CO₂、37 で培養した。細胞増殖抑制試験は、HepG2 を 96 well プレートに播種後(0.9 × 10⁴ cell/well) 牛蒡子、Arc および、そのアグリコンであるアルクチゲニン(AG) で処理し 24 時間培養した。その後、MTT 法で細胞増殖抑制作用の評価を行った。

(2) オートファジー関連タンパク質の検出

HepG2 を 6 cm dish に播種し(1.0 × 10⁶ cell/dish) 培地にサンプルを添加した。また、飢餓によって誘導されるオートファジーへの影響を調べるために、FBS および、アミノ酸不含 DMEM 培地で培養することで、飢餓状態へと誘導した。サンプル処理後、細胞を回収しプロテアーゼインヒビターを含む RIPA lysis buffer で細胞溶解液を調製した。種々のオートファジー関連タンパク質の発現は、各タンパク質に対する特異的抗体を用いて Western Blot 法で検出を行った。

さらに、アポトーシス誘導因子(Caspase-3、PARP)の発現と活性化についても Western Blot 法を用いて解析を行った。

(3) 抗 Arc mAb 産生ハイブリドーマ細胞株の樹立

Arc は分子量が小さく免疫原性をもたないハプテン分子である。そこで、Arc の糖鎖を過ヨウ素酸ナトリウムを用いて酸化的に開裂し、塩基性条件下でキャリアタンパク質との複合体を調製した。調製した Arc-キーホルリンペットヘモシアニン(KLH)は免疫原として、Arc-ヒト血清アルブミン(HSA)は ELISA に用いる固相化抗原として用いた。

Arc-KLH を用いて 2 週間毎にマウスに対して免疫感作を施した。血中の抗体誘導の確認は ELISA にて行った。十分な血中抗体価の上昇を確認したマウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞懸濁液を調製後、マウスミエローマ細胞(SP2/0)とポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。つづいて、ハイブリドーマ細胞の選択培養と限界希釈法によるクローニングを実施した。

(4-1) 抗 Arc mAb の精製

クローニングを行ったハイブリドーマ細胞は順次、大量培養へと移行し、抗 Arc mAb を含む細胞培養上清を得た。得られた培養上清は限外ろ過にて濃縮後、アフィニティカラムを用いて精製を行い、粉末状の安定した抗 Arc mAb を得た。

(4-2) 抗 Arc mAb の特徴づけ

抗 Arc mAb の感度および、交差反応性の確認は、Arc-HAS を固相化抗原とした間接競合 ELISA(icELISA)により行った。まず、Arc-HSA を 2 μg/mL で 96 well イムノプレートに固相化した。T-PBS を用いて 3 回の洗浄(以下、「洗浄」)を行ったのち、非特異的な吸着を抑制するために 5%スキムミルクでブロッキングを施した。次に種々の濃度の Arc または、AG と適宜希釈を行った抗 Arc mAb または、ハイブリドーマ細胞培養上清を各 well に分注し、競合反応を行った。洗浄後、HRP 標識二次抗体を添加した。洗浄後、基質として ABTS 溶液を加え、405 nm における吸光度を測定した。

また、交差反応性試験は、Arc のアグリコンである AG を競合物質として用いて、前述の icELISA により行い、Weiler らの方法に基づいて交差反応性を精査した。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖抑制試験

牛蒡子メタノールエキスを用いて細胞増殖抑制試験を MTT 法で評価を行ったところ、牛蒡子エキス濃度依存的に HepG2 の増殖抑制作用を示した。次に、牛蒡子の主要成分である Arc および AG を用いて同様の実験を行った結果、牛蒡子メタノールエキスと同様に HepG2 細胞の増殖を抑制した。また、Arc よりも AG の方がより強力な細胞増殖抑制作用を示すことを見出した。

(2) オートファジー関連タンパク質の検出

Arc および、AG の HepG2 における細胞増殖抑制作用がオートファジーに関連する現象なのかを精査するために、オートファジー関連タンパク質の検出を行った。その結果、Arc および、AG は LC-3B、SQSTM/p62 (p62) の発現増加作用を示した。p62 はオートファジーの進捗状況を反映するタンパク質として知られている。すなわち、p62 はオートファゴソーム形成時においてその内部に存在するが、オートファジーの進行に伴って最終的に分解される。したがって、p62 が減少または、定常であればオートファジーは促進的に、増加していれば、オートファジーを阻害的に制御していることが考えられる。そこで、強い細胞増殖抑制作用を示した AG を用いて HepG2 細胞を処理し、経時的な p62 の変動を観察した。その結果、AG 処理により p62 が経時的に増加する現象をとらえたことから、AG はオートファジーを阻害することで HepG2 における細胞増殖抑制作用を示すことが示唆された。

次に、詳細な作用機序解析を行うために、オートファジー上流阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) と下流阻害剤である chloroquine (CQ) を用いて、AG との作用機序の比較を行った。その結果、CQ とは異なる挙動を示し、3-MA に類似した結果を示したことから、AG はオートファジーの早期段階を阻害していることが示唆された (図 3)。

さらに、HepG2 を飢餓培地で培養し、飢餓状態に誘導することで促進されるオートファゴソーム形成と p62 のリン酸化 (Ser349) の関連を調べた結果、p62 のリン酸化を AG が阻害する現象をとらえた。したがって、AG はオートファゴソーム形成前でオートファジーを阻害していることを見出した (図 4)。

一方で、AG の細胞増殖抑制作用におけるアポトーシスの関与を調べるために、アポトーシス誘導因子 (Caspase-3、PARP) の活性化について精査したところ、コントロールとして用いたエトポシドは、Caspase-3 および、PARP を活性化したが、AG にはその作用がみられなかった。以上のことから、AG の細胞増殖抑制能は、オートファジー阻害作用に強く起因することが推察された。

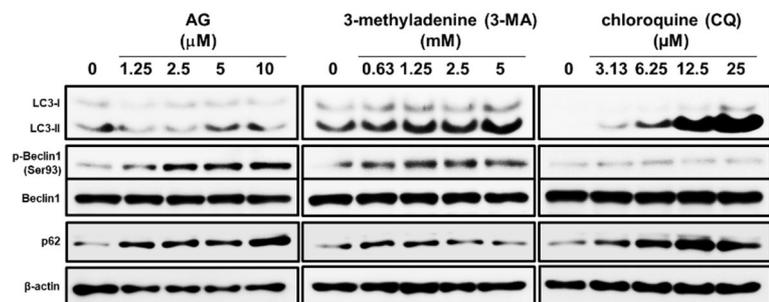


図 3. オートファジー阻害剤と AG の作用機序の比較

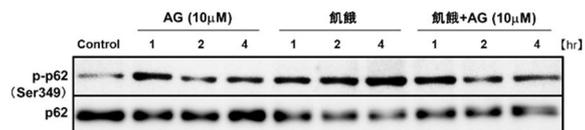


図 4. AG の飢餓誘導 p62 リン酸化への影響

(3) 抗 Arc mAb 産生ハイブリドーマ細胞株の樹立

Arc-KLH を用いて免疫感作を施したマウスの脾臓細胞と SP2/0 細胞を用いて細胞融合を行い、抗 Arc mAb を産生し得るハイブリドーマ細胞 31 株を見出した(図 5)。次に、これらの株が産生する mAb の性質や、細胞増殖の早さをパラメーターとしてハイブリドーマ細胞株の選抜を行ったところ、Arc とそのアグリコンであるアルクチゲニン(AG)に対して高い特異性を有するハイブリドーマ細胞株 3 株(3C10、4H12、15H1)の樹立に成功した。

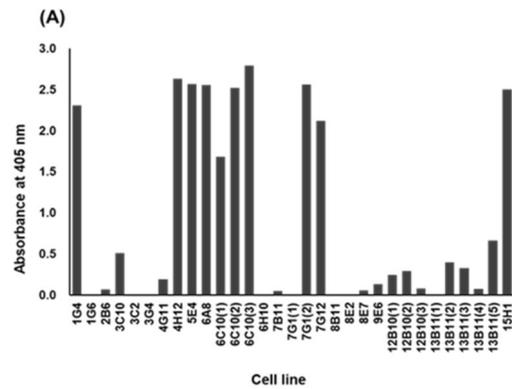


図 5. mAb 産生能を有する 31 種の細胞株

(4) 抗 Arc mAb の精製および、特徴づけ

樹立したハイブリドーマ細胞株 3 株の培養上清を一次抗体として用いて、icELISA における遊離の AG (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に対する阻害率を算出した。その結果、ハイブリドーマ細胞 3C10、4H12、および 15H1 の遊離 AG に対する阻害率は、それぞれ 88.6%、82.6%、80.0%であり、最も高い阻害率を示した株は 3C10 であった。次に、各ハイブリドーマ細胞株を大量培養へと移行し、培養上清をアフィニティカラムで精製することで粉末状の安定した mAb の獲得を目指した。しかしながら、4H12 の細胞株において大量培養途中で mAb の産生能が何らかの理由で消失した。また、最も高い阻害率を示した 3C10 においては、後述する 2 つの問題が生じた。

mAb の産生量が極めて少ないこと、精製後、バッファーに由来する塩類を取り除く透析の過程において、高い凝集性を示すという mAb の物性が問題となり、3C10 株が産生する mAb の獲得が難航した。そこで、再度 3C10 株のクローニングを実施したところ、単クローン化が不十分で、複数の細胞が混在している可能性が見いだされた。そのため、の問題点を解決すべく、3 回のクローニングを実施し、安定した mAb を産生するハイブリドーマ細胞株の樹立に成功した。

現在、15H1 株が産生する mAb(粉末状)の獲得には至っているが、ハイブリドーマ細胞 3C10 は大量培養を実施しており、培養上清からの mAb 精製を急ぐとともに、本 mAb を用いた icELISA の確立を進めることが急務である。また、Arc および AG の HepG2 における細胞増殖抑制作用が、Arc および、AG が細胞内に取り込まれて生じる現象であるかを、確立した icELISA を用いて精査する。さらに、細胞内のどの分子をターゲットとしているのかについて、本 mAb を用いた解析を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uto Takuhiro, Ohta Tomoe, Yamashita Akihisa, Fujii Shunsuke, Shoyama Yukihiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Liquiritin and Liquiritigenin Induce Melanogenesis via Enhancement of p38 and PKA Signaling Pathways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicines	6. 最初と最後の頁 68 ~ 68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/medicines6020068	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井俊輔、江浜理穂、太田智絵、正山征洋、宇都拓洋
2. 発表標題 オノニン及びホルモノネチンに対するモノクローナル抗体作製と免疫化学的分析手法の確立
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保伸哉、小森ひさ、藤井俊輔、太田智絵、正山征洋、宇都拓洋
2. 発表標題 牛蒡子に含まれる Arctigenin のオートファジー制御を介したがん細胞増殖抑制作用
3. 学会等名 日本生薬学会 第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保伸哉、小森ひさ、藤井俊輔、太田智絵、藤田英明、正山征洋、宇都拓洋
2. 発表標題 ゴボウシ成分Arctigeninのオートファジー阻害の作用機序解析
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019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
研究協力者	正山 征洋 (Shoyama Yukihiko)		
研究協力者	宇都 拓洋 (Uto Takuhiro)		
研究協力者	大久保 伸哉 (Okubo Shinya)		
研究協力者	太田 智絵 (Ohta Tomoe)		

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