

氏 名：岡本 恭子
学位の種類：博士（栄養学）
学位記番号：博甲第1号
学位授与年月日：平成20年4月15日
学位授与の要件：学位規程第3条第3項該当
論文題目：Pivotal Roles of Autophagy and Apoptosis in Cancer Chemoprevention
癌の化学予防におけるオートファジーとアポトーシスの役割について
論文審査委員：主査 教授 奥 恒行
副査 教授 山口 義彦
教授 大曲 勝久

博士論文要旨

Pivotal Roles of Autophagy and Apoptosis in Cancer Chemoprevention

癌の化学予防におけるオートファジーとアポトーシスの役割について

D054011 岡本 恭子

ゲラニルゲラノイン酸 (GGA) は末端にカルボキシル基を持ち 4 つのイソプレンから成る直鎖状の化合物である。GGA の類縁体で、4・5 位の炭素から 2 つの水素原子を除いた 4,5-dehydro GGA は実験動物において発癌を抑制し、第 2 相臨床試験では肝癌の二次初発発癌 (SPT) に対し化学予防効果を示す事が知られている。現在、全国レベルの大規模な第 2・3 相臨床試験が行われている。そこで、いくつかの細胞培養系を用いて、GGA による癌の化学予防のメカニズムを解析した。

低濃度 (0.5-5 μM) GGA はモルモット由来細胞株 104C1 細胞に細胞死を誘導したが、human phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx もしくは GPx4) 遺伝子を導入し樹立した 104C1/O4C 細胞には同じ条件下で細胞死を誘導しなかった。5 μM の GGA は添加後 2 時間で 104C1 細胞にミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の消失を誘導し、6 時間でアポトーシスによる細胞死を誘導した。一方、104C1/O4C 細胞では 10 μM の GGA 添加後、24 時間までは $\Delta\Psi_m$ や細胞の形態に全く変化が見られなかった。superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) 選択的プローブである dihydroethidine (DHE) は GGA 添加後 15 分に両方の細胞で直ちに酸化された。過酸化水素 (過酸化水素 [H_2O_2]/リン脂質ヒドロペルオキシド [LOOH]) 選択的プローブである 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) は 2.5 μM の GGA 添加 104C1 細胞において 4 時間後に強く酸化されたが、104C1/O4C 細胞では 10 μM の GGA 存在下でも DCF は酸化されなかった。104C1 細胞

において、GGAは $\cdot\text{O}_2^-$ やそれに続く $\text{H}_2\text{O}_2/\text{LOOH}$ の過剰産生を誘導し、次に $\Delta\Psi_m$ の消失を導き、最終的にアポトーシスによる細胞死に至ると考えられた「参考文献 1」。当初、GGAや4,5-dehydro GGAは細胞内のレチノイン酸結合タンパク質と結合する非環式レチノイドとして分類された。さらに、両化合物はレチノイン酸受容体(RARs)やレチノイドX受容体(RXR_s)のようなレチノイド受容体に対するリガンド活性を有することが後にわかった。ヒト急性全骨髄球性白血病由来細胞株のHL-60細胞はレチノイン酸と同様にGGA刺激によって好中球へ分化した。GGAの2・3位の炭素に2つの水素原子を加えた2,3-dihydro GGAによる刺激の場合、好中球への分化は見出されなかったが、脂肪滴の形成が誘導された「参考文献 2」。

最近の研究では、オートファジーを起こしている細胞において脂肪滴や活性酸素種(ROS)の蓄積・産生が観察されている。参考文献 1で、GGAはミトコンドリアを介してROSの蓄積による細胞死を誘導し、参考文献 2では2,3-dihydro GGAによる脂肪滴の形成を見出した。さらにGGAが誘導する細胞死への理解をさらに深めるために、ヒト肝癌由来細胞株であるHuH-7細胞でGGAによる細胞死を誘導する際にオートファジーが生じるかを観察した。HuH-7細胞ではGGAによって $\Delta\Psi_m$ が消失し、クロマチンの濃縮が起こる。しかし、 $\Delta\Psi_m$ の消失の原因とされるcytochrome cのミトコンドリア外への漏出は見出されなかった。Green fluorescent protein(GFP)にmicrotubule-associated protein 1 light chain 3(LC3)が融合したタンパク質を細胞内に安定発現させ、緑色の蛍光が粒状になることでオートファジーが生じたことを視覚的に観察することができる。10 μM のGGA添加後60分でHuH-7/GFP-LC3細胞において細胞質に粒状の緑色蛍光が観察された。GGAがこの粒状の形態を誘導する際、LC3 β -I(活性型LC3前駆体、18kDa)がLC3 β -II(オートファゴソーム膜結合型LC3、16kDa)へ変化することがWestern blottingで観察された。このLC3 β -IIはGGA添加後24時間で、過剰な蓄積が観察された。phosphatidylinositol-3-kinase(PI3K)の阻害剤であるwortmannin(WM)をGGAと同時に添加することによってGGAが誘導するLC3の細胞学的そして生化学的変化は阻止される。Beclin1、ATG4、ATG7などのその他のオートファジーに関連しているタンパク質はGGA添加後その細胞内レベルが維持されていた。GGAによってHuH-7細胞でミトコンドリア内の $\cdot\text{O}_2^-$ がGGA添加直後に発生することがMitoSOX(ミトコンドリア内の $\cdot\text{O}_2^-$ 選択的プローブ)によって見出された。また、WMの添加はGGAによる $\cdot\text{O}_2^-$ 産生を抑えた。これらの結果により、GGAはHuH-7細胞においてWM感受性のオートファジーを誘導し、LC3 β -IIの過剰蓄積をもたらすことがみいだされた「参考文献 4」。

癌遺伝子産物の1つであるBcl-2(B-cell lymphoma 2)は、ミトコンドリアや小胞体に作用して、アポトーシスやオートファジーを抑えることが知られている。そこで、GGAによる細胞死誘導のメカニズムを詳細に解析するために、HuH-7細胞に

bcl-2 遺伝子を強制的に発現させた HuH-7/*bcl-2* 細胞を樹立した。Bcl-2 はミトコンドリア外膜や小胞体に発現が見られるため、GGA が誘導する $\Delta\Psi_m$ の消失やオートファジーの誘導などを阻害するか否か、今後の研究が必要である「参考文献 3」。

以上を要約すると、本研究において GGA は添加直後の細胞において $\cdot O_2^-$ を産生することを見出した。次にそのことが GGA が過酸化化物などの ROS の過剰産生を誘導し、ROS によって損傷を受けたミトコンドリアを除去するためにオートファジーを起こす引き金になると思われる。しかし、GGA によって誘導されるオートファジーは LC3 β -II の過剰蓄積という不完全なものとなるため、オートファジー本来の生存目的が達成されず、カスパーゼ非依存的な細胞死につながるものと考えた。