

氏 名：岩尾 千絵子  
学位の種類：博士（栄養学）  
学位記番号：博甲第6号  
学位授与年月日：平成28年3月1日  
学位授与の要件：学位規程第3条第3項該当  
論文題目：‘Studies on Molecular Mechanisms of Geranylgeranoic Acid-induced Cell Death in Human Hepatoma Cells’  
「ヒト肝癌細胞におけるゲラニルゲラノイン酸による細胞死誘導の分子メカニズムに関する研究」  
論文審査委員：主査 教授 森田 茂樹  
副査 教授 大曲 勝久  
副査 講師 松澤 哲宏

## 「ヒト肝癌細胞におけるゲラニルゲラノイン酸による細胞死誘導の分子メカニズムに関する研究」

‘Studies on Molecular Mechanisms of Geranylgeranoic Acid-induced Cell Death in Human Hepatoma Cells’

長崎県立大学大学院人間健康科学研究科栄養科学専攻  
岩尾千絵子

ゲラニルゲラノイン酸（GGA）は、自然界に存在する有機化合物で、ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞に細胞死を誘導する。その詳細な細胞死誘導メカニズムは、解明されていない。しかし、ミトコンドリア膜電位の低下やクロマチンの凝集などが細胞死誘導に関与している事が明らかになっている。さらに、最近では GGA によって誘導されるオートファジーの不完全な応答も細胞死に関与している可能性が示され、注目されている。

本研究では細胞死誘導のメカニズムをより詳細に解明するために、癌抑制遺伝子 p53 および小胞体ストレス応答、オートファジーに着目して研究を行ったので報告する。

p53 は癌抑制遺伝子で、種々のストレスによりその発現が誘導され、細胞周期の停止や細胞死の誘導に深く関わっている。p53 の標的遺伝子として、アポトーシスを誘導する PUMA、解糖系を抑制する TIGAR、電子伝達系の複合体 IV (COX) の合成に必須な SCO2 などが報告されている。HuH-7 細胞においては、p53 が変異していることが知られている。また、癌細胞は正常細胞と異なりエネルギー源を糖質に強く依存しており、酸素分圧の高い条件で培養しても培地に含まれるグルコースを解糖系で利用している(Warburg 効果)。そこで、GGA の p53 への影響を検討した。

本研究の結果、GGA は PUMA、TIGAR、SCO2 のタンパク質レベルでの上昇を引き起こす事が明らかになった。しかし PUMA は mRNA レベルでの上昇も観察されたが、TIGAR および SCO2 においては mRNA レベルでの変化は観察されなかった。更に、p53 コンセンサス配列でのレポーターアッセイを行ったところ、GGA 濃度依存的にルシフェラーゼの活性が減少している事が確認された。

よって、p53 標的遺伝子のタンパク質レベルの上昇は p53 の転写因子としての働きが関与しているわけではない可能性も考えられた。しかし、p53 のノックダウンを行うと、GGA 誘導性細胞死が緩和されたことから、GGA の誘導する細胞死には p53 が非常に重要な働きをしている事が示唆された。

そこで GGA 誘導性細胞死において p53 がどのような働きをしているのかを調べた。その結果、HuH-7 細胞において変異 p53 は通常細胞質に蓄積されており、GGA を添加することで核に移行することが明らかとなった。細胞質に存在する p53 がなくなることがオートファジーの引き金になるという報告があり、この GGA による p53 の核への移行は GGA によるオートファジーの誘導に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。また、セルフリー実験において HuH-7 細胞の細胞質に蓄積している変異 p53 は、CUL9/PARC や 348,900g、90 分の遠心で分離される細胞小器官などと非常に大きな複合体を形成していることが分かった。それが GGA を添加することで、巨大複合体から GGA の濃度依存的に p53 が解離され、核への移行形態に変化していることが明らかになった。

さらに、代謝に関連する TIGAR および SCO2 のタンパク質の上昇を受けて、代謝産物の解析を行ったところ、GGA 添加により時間依存的に細胞内のフルクトース 6 リン酸(F6-P)の上昇、フルクトース 1,6 ニリン酸 (F1,6-DP) の減少、NADH の上昇が観察され、解糖系から呼吸へとエネルギー産生経路が変化している可能性があった。これは、Warburg 効果を改善していると考えられる。

次に、オートファジーを誘導するシグナルの一つとして、小胞体ストレス応答(UPR)を調べた。UPR の 3 つの経路のうち IRE1  $\alpha$  および PERK 経路は GGA によって活性化されたが、ATF6  $\alpha$  経路は変化がなかった。またこの 2 つの経路の活性化はオレイン酸との共処理において、抑制された。これはパルミチン酸誘導性 UPR に見られるような"脂質誘導性 UPR"の特徴と非常に類似しており、GGA は"脂質誘導性 UPR"を引き起こすことが新たに明らかとなった。しかし、パルミチン酸は飽和脂肪酸であるのに対し、GGA は多価不飽和脂肪酸である点、およびパルミチン酸は 400  $\mu$  M 以上で UPR を引き起こすのに対し、GGA は 5  $\mu$  M と非常に低濃度で UPR を誘導する点が異なっていた。さらに、GGA とオレイン酸の共処理は、GGA 誘導性細胞死を完全に抑制し、LC3  $\beta$  -II の蓄積も抑制したことから、オートファジー誘導性細胞死の上流にこの脂質誘導性 UPR が存在することが明らかになった。また、これはオレイン酸メチルと共処理した際にも観察されたことから、リン脂質などのオレイン酸の代謝産物ではなく、オレイン酸自身が GGA による UPR 誘導を阻害し、細胞死を抑制していることが明らかになった。

一方、IRE1  $\alpha$  エンドヌクレアーゼ抑制剤である 4  $\mu$  8c を共処理すると、XBP1 のスプライシングは 4  $\mu$  8c 濃度依存的に抑制されたが、LC3  $\beta$  -II の蓄積は抑制されなかったことから、XBP1 スプライシング自体が GGA の誘導するオートファジー誘導性細胞死の引き金になるのではなく、他の UPR シグナルが重要である可能性も示された。

以上のことから、GGA により誘導されるオートファジーの不完全な応答を介した細胞死の誘導メカニズムは、①初めのシグナルとして非常に速い時間に UPR を引き起こし、②小胞体などと細胞質で巨大複合体を形成している変異 p53 を核に移行させ、③TIGAR や SCO2 タンパク質を上昇させ、④代謝を解糖系から呼吸へと変化させる可能性が示された。