

氏 名：藪田 末美  
学位の種類：博士（栄養学）  
学位記番号：博甲第7号  
学位授与年月日：平成30年3月19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 Geranylgeranoic Acid-induced Cell Death : with Special Attention to Pyroptosis in Human Hepatoma Cell Death’  
「ゲラニルゲラノイン酸誘導性細胞死に関する研究-特にヒト肝癌細胞におけるパイロトーシスについて-」  
論文審査委員：主査 教授 森田 茂樹  
副査 准教授 駿河 和仁  
副査 准教授 飛奈 卓郎

## ゲラニルゲラノイン酸誘導性細胞死に関する研究-特にヒト肝癌細胞におけるパイロトーシスについて-

‘Studies on Geranylgeranoic Acid-induced Cell Death : with Special Attention to Pyroptosis in Human Hepatoma Cell Death’

長崎県立大学大学院人間健康科学研究科栄養科学専攻  
藪田 末美

博士前期課程における、 $\beta$ カロテン開裂酵素 *BCO1* 遺伝子の高発現型多型の人々は、カロテン摂取が増加するとテロメア長短縮を促進するという疫学的解析結果ならびに先行研究から、レチノイドによる肝癌細胞のテロメア長短縮のメカニズムの研究に着手した。その結果、テロメア配列の転写物である *TERRA* の細胞内レベルが、非環式レチノイド・ゲラニルゲラノイン酸（GGA）によって経時的に減少することを見出した。また、*TERRA* を結合することが知られているクロマチン蛋白の1つである *KDM1A* の局在が、GGA 処理により核から核外に移行することを明らかにした。*TERRA* や *KDM1A* は炎症によるテロメア長短縮や細胞死誘導を、それぞれ抑制することが知られている。そこで、GGA の癌細胞に対する細胞死誘導機序を炎症に着目して詳細に解析することにした。

GGA 添加によって誘導される細胞死については、これまでに、GGA 添加後 15 分と非常に早い時間に小胞体ストレス応答（unfolded protein response: UPR）が誘発されること、ミトコンドリア膜電位差の減少、ミトコンドリアにおける活性酸素種(ROS)の産生亢進、クロマチン凝集、またオートファジーの不完全応答などが知られている。これらは GGA による細胞死誘導に関連があるかもしれないが、細胞死そのもののメカニズムではない。さらに先行研究を遡ると、GGA による細胞死はカスパーゼ 1 の阻害剤により完全に抑制されることが報告されている。カスパーゼ 1 は最近、炎症性細胞死（パイロトーシス）に関与していることが明らかにされた。そこで、本研究では、GGA

による肝癌細胞の細胞死のメカニズムを、パイロトーシスに焦点を当て解析した。

まず、ヒト肝癌細胞株において、GGA は、カスパーゼ 1 活性を添加 5~8 時間後にかけて顕著に増加させた。カスパーゼ 1 の活性化には、インフラマソームの活性化、その priming が必要である。インフラマソームの priming を誘導することが知られている転写因子 NF- $\kappa$ B は、GGA 処理により速やかに活性化され核内に移行し、priming の指標とされている *NLRP3* 遺伝子の mRNA レベルが激しく増大した。カスパーゼ 1 の標的の 1 つである gasdermin D (GSDMD) が切断された後、その N 末端断片 (GSDMD-N) が細胞膜に移行し細胞膜に穴をあけることにより、パイロトーシスによる細胞死が実行されるという最新の仮説が提唱されている。そこで、GGA による GSDMD の局在を観察したところ、GGA 添加で GSDMD の細胞膜への移行が観察された。GGA はヒト肝癌細胞において、*NLRP3* インフラマソームを介してパイロトーシスを誘導する可能性が強く示唆された。

次に、GGA によるインフラマソームの priming の誘導について、その分子メカニズムを検討した。インフラマソームの priming は前述した通り、NF- $\kappa$ B の活性化によって惹起される。この NF- $\kappa$ B は、膜表面のレセプターからのシグナルによって活性化されることが知られている。そこで、膜表面レセプターの一つである Toll-like receptors (TLRs) に着目した。ヒト TLR は 1 から 10 まで存在するが、肝細胞の癌化に伴い、*TLR2*、4、9 の発現量が増加することが報告されている。まず、これらの発現量を調べたところ、*TLR2* mRNA 量は GGA 添加で時間依存的に増加し、*TLR4* も 24 時間でその発現量は増加した。しかし、*TLR9* は変化が見られなかった。次に、GGA 添加で発現量の増加がみられた *TLR2* inhibitor (*o*-vanillin) または *TLR4* inhibitor (VIPER) を GGA と共処理すると、VIPER 共処理において GGA 誘導性細胞死が完全に抑制された。さらに、GGA により誘導される UPR、インフラマソーム priming およびミトコンドリアにおける ROS 産生も VIPER 共処理により抑制された。このことから、GGA 誘導性細胞死は、*TLR4* を介している可能性が強く示唆された。

しかしながら、詳細に解析すると、カスパーゼ 1 が活性化される以前に GSDMD の細胞膜への移行が観察された。ここで、カスパーゼ 1 の活性化はいわゆるインフラマソームの canonical 経路であるが、インフラマソームの活性化には non-canonical 経路も存在する。Non-canonical 経路ではカスパーゼ 1 の paralog であるカスパーゼ 4 が関与しており、このカスパーゼ 4 も GSDMD を切断し、GSDMD-N が細胞膜に移行し、その後 *NLRP3* インフラマソームの活性化が起こることが報告されている。そこで、GGA によるカスパーゼ 4 の活性化を検討したところ、添加 1~5 時間後まで immunoblotting によりカスパーゼ 4 の活性型が検出された。これは GSDMD-N の検出や GSDMD の細胞膜への移行の時期と一致する。以上のことから、GGA 添加により、1) カスパーゼ 4 が活性化され、GSDMD-N の細胞膜への移行、その後、2) カスパーゼ 1 が活性化され、パイロトーシスによる細胞死誘導につながる可能性が示唆された。

以上を要約すると、本研究は、GGA によるヒト肝癌細胞に対する細胞死誘導は、*TLR4* を介したパイロトーシスによるものであることを初めて明らかにした。GGA は *TLR4* シグナルを介してインフラマソームの priming を起こすと同時に UPR を誘導し、その結果カスパーゼ 4 が活性化され、そのことが原因となるインフラマソームの活性化に伴うカスパーゼ 1 の活性化が、GGA 誘導性細胞死に重要な役割を果たしている可能性が示された。