

氏 名：坂根 千春  
学位の種類：博士（栄養学）  
学位記番号：博甲第3号  
学位授与年月日：平成26年8月26日  
学位授与の要件：学位規程第3条第3項該当  
論文題目：‘Non-genomic Actions of Diterpenoid Acids: with Special Reference to Differentiation Induction of Human Neuroblastoma and Hepatoma Cells’  
「ジテルペノイド酸のノンゲノミック作用 —特にヒト神経芽腫ならびにヒト肝癌細胞に対する分化誘導について—」  
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 講師 飛奈 卓郎

## ジテルペノイド酸のノンゲノミック作用 —特にヒト神経芽腫ならびにヒト肝癌細胞に対する分化誘導について—

‘Non-genomic Actions of Diterpenoid Acids: with Special Reference to Differentiation Induction of Human Neuroblastoma and 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  
坂根 千春

イソプレノイド経路の代謝産物であるジテルペノイド酸は、さまざまな生物活性を示すことが知られている。ATRA (all-*trans* retinoic acid) はジテルペノイド酸の一つで、レチノイドとして転写因子のリガンドとなり、標的遺伝子の転写制御によってその生理作用を発揮する（これをレチノイド作用という）。1978年に、Stricklandらが、多能性細胞株であるマウス奇形腫由来 F9 細胞に対する ATRA の分化誘導作用を初めて報告して以来、ATRA は癌細胞に対する分化誘導因子として研究されている。これらの基礎的研究の成果は ATRA による分化誘導療法として臨床応用されているが、他の抗癌剤と同様に ATRA も深刻な副作用を示し、高脂血症や肺組織の線維化、脳圧の亢進など（レチノイン酸症候群）を引き起こすのでその使用は限定的である。

Muto らは、レチノイド作用をもち副作用の少ない化合物の探索を行い、環状構造をもたない合成ジテルペノイド酸の一種である Peretinoin (4,5-didehydro geranylgeranoic acid) にレチノイド作用があることを示し、さらに肝癌細胞や神経芽腫細胞を肝細胞や神経細胞に特徴的な遺伝子発現をする細胞に誘導することを報告した。Peretinoin の母化合物となるジテルペノイド酸 GGA (geranylgeranoic acid) はウコンや五味子などの食用・薬用ハーブ中に見出され、ATRA や Peretinoin と同様に分化誘導因子として抗腫瘍作用をもつことが明らかになっている。

ATRA や GGA の持つレチノイド作用は、「ゲノミック作用」として知られている。これは、ATRA や GGA の核内受容体が「ゲノム上の応答配列」に結合し、リガンド依存性の転写（調節）因子として作用することを表している。ATRA や GGA の生物活性は、これまではこのゲノミック作用に

よって説明されてきた。しかしながら、ゲノミック作用では説明できない現象も ATRA や GGA によって誘導されることが次第に明らかになっている。これらゲノミック作用では説明できない現象の分子メカニズムを明らかにするために、ATRA や GGA の作用点が DNA の塩基配列に依存しない「ノンゲノミック作用」に、近年、研究者の関心が集まっている。そこで、本研究では、GGA の分化誘導作用の分子メカニズムについて、ノンゲノミック作用に焦点を当てて解析した。

はじめに、ヒト肝癌細胞において GGA が細胞周期促進因子の cyclin D1 (遺伝子名 *CCND1*) の細胞内含量を急激に減少させたことを示した。GGA は (1) 細胞内 *CCND1* mRNA 量の減少は誘導せず (2) タンパク分解機構の抑制条件下でも細胞内 cyclin D1 量を減少させ、(3) 翻訳抑制条件下でのみその効果が消失したことから、翻訳の抑制制御を介して cyclin D1 量を減少させたと推測された。しかも GGA による翻訳抑制は細胞に添加後 30 分以内に観察されることから、GGA による cyclin D1 の翻訳抑制調節は、レチノイドの応答配列を介さないノンゲノミック作用によるものであり、結果的に癌細胞に終末分化 (細胞周期の停止) を誘導する可能性が示唆された。

次に、神経芽腫細胞に対する GGA の分化誘導作用についてその分子メカニズムを検討した。細胞増殖の抑制、細胞塊の消失と神経様突起の伸展、および神経細胞の分化マーカーの一つである neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 (*NTRK2*) 遺伝子の発現の誘導を指標として、GGA はある種の神経芽腫細胞に対して神経細胞への分化誘導能をもつことが示された。その際、GGA はレチノイドの核内受容体の一つである retinoic acid receptor, beta (*RARB*) 遺伝子の発現を時間依存的に亢進したが、*RARB* 遺伝子を knockdown しても *NTRK2* 発現誘導効果が抑制されなかったこと、*NTRK2* 遺伝子のプロモーターを組換えたレポーターアッセイにより GGA によるプロモーター活性の調節が観察されなかったことなどから、GGA の *NTRK2* 遺伝子の発現誘導がレチノイド受容体などの転写因子を介さないノンゲノミック作用である可能性が強く示唆された。

そこで、GGA の *NTRK2* 遺伝子発現に対するノンゲノミック作用の分子機構を以下の 2 つの側面から解析することにした。すなわち、(1) クロマチン構造に影響を及ぼすことによって遺伝子の転写調節をすることが知られているヒストン H3K4 のメチル化修飾の変化と、(2) 転写因子複合体の翻訳後修飾を制御するシグナル伝達の調節を介した転写調節を検討した。その結果、GGA は *NTRK2* 遺伝子上流の H3K4 ジメチル・トリメチル化を亢進させ、クロマチンを転写因子が結合しやすい開放構造に導くこと、そのメカニズムの 1 つとしてヒストン脱メチル化酵素の 1 つである lysine-specific demethylase 1A (*KDM1A*) 活性を GGA が直接阻害することを示した。一方、転写抑制因子の 1 つである methyl CpG binding protein 2 (*MeCP2*) の翻訳後修飾を解析したところ、GGA 処理によって速やかに *MeCP2* のリン酸化が誘導されたこと、*MeCP2* 標的遺伝子の一つである受容体型チロシンキナーゼ ret proto-oncogene (*RET*) 遺伝子の発現が上昇したことなどが明らかになった。さらに、*RET* 阻害剤によって GGA の *NTRK2* 遺伝子発現誘導効果が消失したことから、GGA が *RET* 上流のシグナル伝達の活性化により *NTRK2* 遺伝子の発現を制御する可能性があることが示唆された。以上のことから、GGA はヒストン脱メチル化酵素の阻害によるクロマチン構造の変化と、シグナル伝達を介した転写抑制因子のリン酸化による転写抑制機構の解除の 2 つの独立したメカニズムにより、*NTRK2* 遺伝子の発現を高い状態に維持する可能性が示された。

以上を要約すると、本研究は、GGA の肝癌細胞と神経芽腫細胞に対する分化誘導メカニズムを解析し、GGA による *CCND1* 遺伝子の翻訳抑制や、ヒストン H3K4 メチル化亢進によるクロマチン構造の変化、*MeCP2* 転写抑制因子のリン酸化による転写抑制の解除などのノンゲノミック作用を初めて明らかにした。最近の研究では、GGA がヒト肝癌細胞において、オートファジー不全を誘導することや、細胞質に異常に蓄積した p53 の核内輸送を誘導することが示されている。これらもノンゲノミック作用と考えられ、GGA の抗腫瘍作用を考える上で、ノンゲノミック作用の意義は今後ますます大きくなると思われる。