

哺乳動物肝細胞における非環式ジテルペノイド GGA 代謝産物の同定 — 特にリン脂質画分の解析

研究期間 平成 29 年度

研究代表者名 四童子 好廣

共同研究者名 岡本恭子・佐上博・田端佑規

・ はじめに

肝臓は、全世界の癌による死亡（年間癌死数 880 万人）の中で肺癌（169 万人）に次いで 2 番目に多い癌（78 万 8 千人）である（WHO, Media Centre; Cancer Fact Sheet, February 2018, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>）。しかも、肝臓の死亡原因の大半が肝臓治療後の再発によるものである。我が国の肝臓患者は C 型肝炎ウイルスの感染者が多く、インターフェロンのような抗ウイルス薬などにより治療・予防が行われているが、高額な医療費を必要とするものであり、広汎で継続的な肝臓予防対策とは言えない。実際、ウイルス対策が行われている米国など欧米先進国では肝臓の罹患数は最近の 10 年間で増加傾向にある（Jemal et al: Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2014, Featuring Survival. *J Natl Cancer Inst* (2017) **109**(9): dx030）。そこで、食事・飲酒や薬剤摂取、運動など日常生活の変更による発癌しにくい体質の研究をすることは、究極の癌予防として重要である。

ゲラニルゲラノイン酸（GGA）は、肝臓根治後の患者 80 名を被験者にした臨床試験において、1 年間の服用（経口投与）により 5 年後の肝臓再発が有意に抑制されることを示した 4,5-dehydroGGA の母化合物である（Muto et al.: *N. Engl. J. Med.* 334: 1561–1567, 1996; Muto et al.: *N. Engl. J. Med.* 340: 1046–1047, 1999）。GGA は図 1 のような化学構造をした炭素数 20、不飽和結合 4 つの分枝鎖脂肪酸の 1 種であるが、同じジテルペノイドのレチノイド（ATRA）などのビタミン類とは異なり、我々ヒトの体内でメバロン酸から生合成される可能性が考えられる。

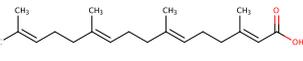
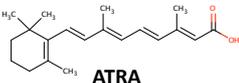
	 <p style="text-align: center;">GGA</p>	 <p style="text-align: center;">ATRA</p>
生理活性	<ul style="list-style-type: none"> ・神経細胞分化誘導 ・肝臓細胞死誘導 ・マウス発癌抑制作用 	<ul style="list-style-type: none"> ・神経細胞分化誘導
自然界	<ul style="list-style-type: none"> ・ウコン、レモングラス等植物に含有 	(-)
哺乳動物での生合成	<ul style="list-style-type: none"> ・MVA経路由来？ 	(レチノールから変換)

図 1. ゲラニルゲラノイン酸（GGA）の化学構造と生物活性

GGA はイソプレン単位 4 つからなるイソプレノイドの 1 つであり、動物細胞では、アセチル CoA からメバロン酸を經由して合成されるイソペンテニルピロリン酸 (IPP: C5) をドナーとして、イソプレノイドの基本単位が順次と付加されることにより種々の大きさのイソプレノイドが合成され、4 つのイソプレン単位が重合したゲラニルゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) から GGA が合成される (図 2)。

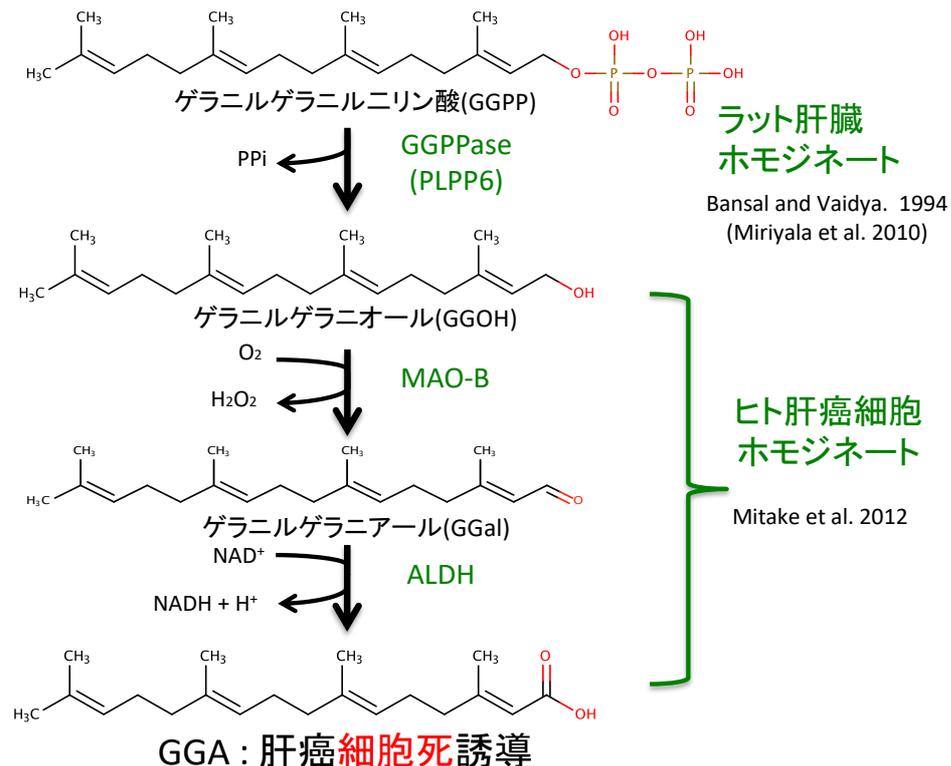


図 2. ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) から GGA への酵素反応

GGPP は、ミトコンドリアの電子伝達系の脂質担体であるユビキノン(コエンザイム Q10) となったり、糖タンパク合成における糖鎖キャリアであるドリコールなどに代謝されたり、蛋白質のシステイン残基のゲラニルゲラニル化の基質となることが知られているが、それ以外の代謝経路はあまり研究されていない。

我々は、動物細胞で生合成される GGPP が脱リン酸化され、ゲラニルゲラニオール(GGOL) となった後、GGA へと酸化される代謝経路が存在することを提唱している。本研究計画では、GGOL から GGA に変換される酵素反応の一部を解析すると共に、生合成された GGA がリン脂質画分にエステル化されることを示す。

・ 研究内容

I. ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞における GGA 含量に与える MAOB 遺伝子ノックダウンの効果

昨年度の研究成果により、HuH-7 細胞は通常の培養時に細胞から GGA が検出されることが判明している。そこで、GGA の生合成経路の一端を明らかにする目的で、GGOH を酸化して GGA 合成の前駆物質であるゲラニルゲラニルアルデヒドを生成すると考えられる MAOB 遺伝子のノックダウンを行なうと、この HuH-7 細胞に観察される GGA の量がどのように変化するかを検討する。

II. ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞におけるエステル型 GGA の検出

一般に、細胞内の脂肪酸は、遊離型で存在しているのは一部で、多くは、トリアシルグリセロールやコレステロールエステル、リン脂質としてエステル化されている。そこで、細胞内 GGA についても、遊離型のみではなく、エステル型として脂質画分に存在しているか、TLC などを用いて検討する。

・ 研究結果

I. ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞における GGA 含量に与える MAOB 遺伝子ノックダウンの効果

HuH-7 細胞の培養系に MAOB siRNA を添加すると、MAOB 遺伝子の発現（細胞内 mRNA レベル）は著しく低下し、ノックダウンされた。添加前の通常の培養条件では観察された GGA のピーク（**図 3A**）が、MAOB 遺伝子のノックダウンにより**図 3B**に示したように低下した。このことは、MAOB 遺伝子の発現が、細胞内の内因性 GGA の生合成に関係していることを示唆するものである。

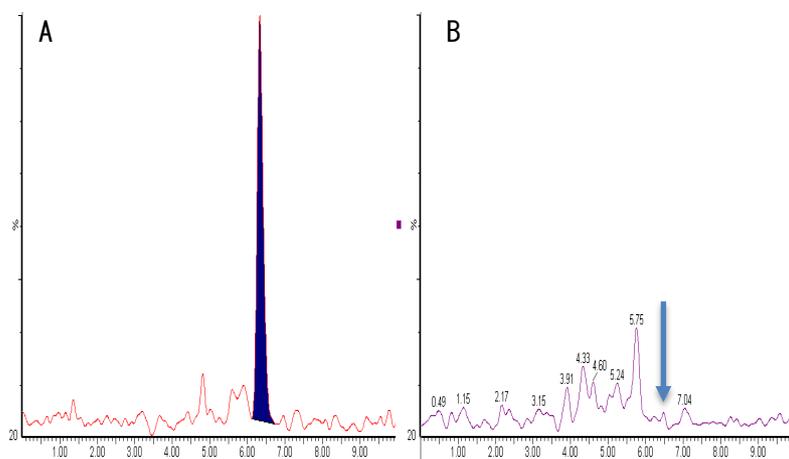


図 3. MAOB 遺伝子のノックダウンによる細胞内 GGA の減少

II. ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞におけるエステル型 GGA の検出

スクアレン合成酵素の阻害剤 ZAA により HuH-7 細胞内に内因性 GGA が蓄積する状態を作製したのち、総脂質抽出を行い、総脂質を薄層クロマトグラフィー(TLC)で分離後、各画分をアルカリ加水分解後、GGA を解析しエステル型 GGA の存在を検証した (図 4)。

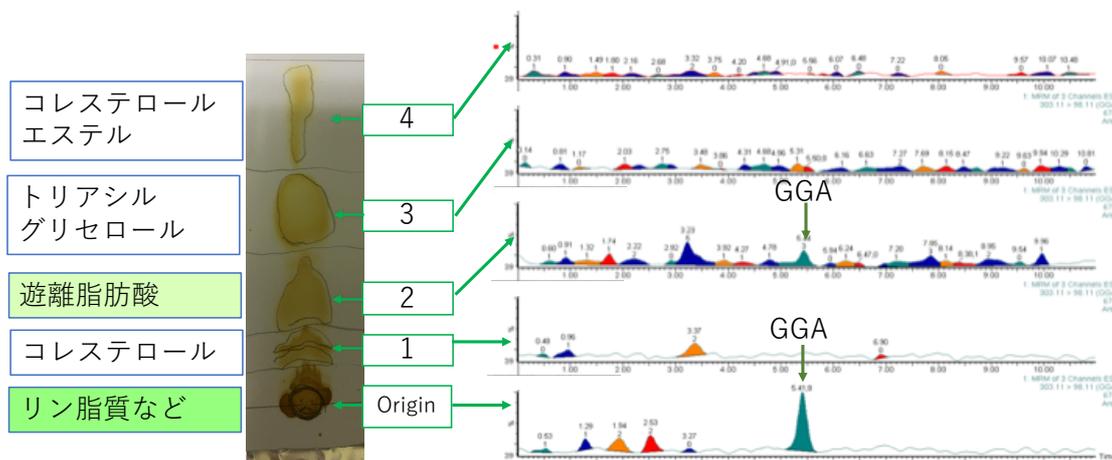


図 4. TLC を用いた総脂質の分離とエステル型 GGA の検出

図 4 左から明らかなように、HuH-7 細胞の総脂質は TLC 上で、コレステールエステル、トリアシルグリセロール、遊離脂肪酸、コレステロール、リン脂質の 5 つに分離された。右側のパネルは、LC/MS/MS のクロマトグラムを示したものであるが、遊離脂肪酸画分とリン脂質画分に GGA が検出された。遊離脂肪酸画分の GGA はアルカリ加水分解する前から検出されているので遊離 GGA と考えられる。一方、リン脂質画分の GGA はアルカリ加水分解により検出されるので、リン脂質としてエステル化されているものと考えている。現在、リン脂質のどの分子種に GGA が含まれるかを検討している。

・ おわりに

以上の結果から、肝癌抑制作用のある GGA は、ヒトの細胞においてもメバロン酸代謝経路を介して生合成される GGPP から GGOH を経て、MAOB による酸化により生合成されることが示された。また、GGA は生合成されたのち、その一部がエステル型となって、おそらくリン脂質画分に取り込まれることが示された。今後、この代謝経路が発癌過程でどのような変動を示すか、どのような栄養素が GGA の代謝経路を活性化するかなどの研究を通して、GGA による癌予防の栄養腫瘍学を完成させたい。