

＜非環式レチノイドによるヒト肝癌細胞におけるオートファジー制御メカニズムの解析＞

研究年度 平成 31 年度

研究期間 平成 31 年 4 月～令和 2 年 3 月

研究代表者名 岡本恭子

共同研究者名 四童子好廣

【背景】 ゲラニルゲラノイン酸 (GGA) は、ハーブ類などに見出されるジテルペノイドの一つで、発癌過程の細胞に細胞死を誘導すると考えられている。我々は GGA によって誘導される細胞死誘導のメカニズムには、オートファジーの不完全な応答が関与していると考えている。飢餓ストレスなどによりオートファジーが誘導され、オートファゴソームを形成し (Early Stage)、その後リソソーム と融合しオートリソソームとなる。オートリソソームの内容物はリソソームの加水分解酵素によって分解され、エネルギー源として供給される (Late Stage)。しかし、GGA が誘導するオートファジーでは、オートリソソームが形成されないことを見出している。そこで、オートファジーにおいて最終的な分解過程を担うリソソームの機能に注目し研究を行った。

【方法】 本研究ではヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞に GGA を添加し、オートファジーのマーカーとして広く用いられている、LC3 たんぱく質 (LC3) を LSM700 を用いたイメージングによってオートファジーフラックスを評価した。Green Fluorescence Protein (GFP) は酸性環境 (オートリソソーム形成時) で蛍光が消失するが、Red Fluorescence Protein (RFP) は消失しないという性質を活かし、mRFP-GFP-LC3 を発現する HuH-7 細胞を樹立し、使用した。オートファゴソームが形成されると細胞内では LC3 は黄色い顆粒状の蛍光として観察され、オートリソソームが形成されると LC3 は赤い顆粒状の蛍光として観察される。一方、リソソームの機能を検証するため Cathepsin B たんぱく質 (CTSB) の酵素活性を Magic Red™ Cathepsin B Assay Kit により測定した。酵素活性が高くなると赤い蛍光が強くと検出されることで評価することができる。脂肪細胞での報告ではあるが CTSB の酵素活性の増加は、リソソーム膜の不安定性 lysosomal destabilization を引き起こし、前アポトーシス状態となることが示唆されている。

【結果・考察①】 GGA 添加 2 時間後には黄色い蛍光の顆粒状 LC3 が観察され、24 時間後も同様の LC3 が観察された。赤い蛍光の顆粒状の LC3 は観察されず、オートファゴソームが蓄積した状態であることが示唆された (図 1)。GGA 添加 5 時間後から経時的に赤い蛍光が強くなる傾向がみられ (図 2)、CTSB の酵素活性が高くなり、リソソーム膜の不安

定性が増し、オートリソソームの形成に障害が生じていることが示唆された。これらのことから、GGA の作用によりオートファジーの不完全な応答が誘導され、本来生存に働くオートファジーが完遂できないため、細胞死に至るのではないかと考えた。そこで、より CT SB の関与を明らかにするため、CT SB の特異的阻害剤 CA-074 を用いて GGA による細胞死抑制効果を検証した。

【結果・考察②】 CT SB の特異的阻害剤 CA-074 の作用により、GGA による細胞死はある程度抑制がみられたが、有意差はなかった（図 3）。このため、CT SB の活性化以外にも GGA による細胞死誘導に関与するメカニズムが存在する可能性が示唆された。そこでかねてより考えていたパイロトーシスを介した細胞死も検討するため、パイロトーシスの始まりに関与する Toll-like receptor 4 たんぱく質（TLR4）と最終的に活性化される Caspase1 たんぱく質（CASP1）について検討した。

【結果・考察③】 TLR4 の特異的阻害剤 VIPER の作用により、GGA による細胞死は有意に阻害された（図 3）。また、GGA 添加の 5 時間後には CASP1 の活性化が見出され、GGA によって HuH-7 細胞にパイロトーシスを介した細胞死が誘導されることが示唆された（図 4）。GGA による細胞死誘導には CT SB の活性化に伴う、リソソームの不安定化によるオートファジーの不完全な応答を誘導すること、また GGA によるパイロトーシスを介した細胞死誘導もみられ、単一のメカニズムではなく、いくつかのメカニズムが混在して細胞死を誘導している可能性が示唆された。

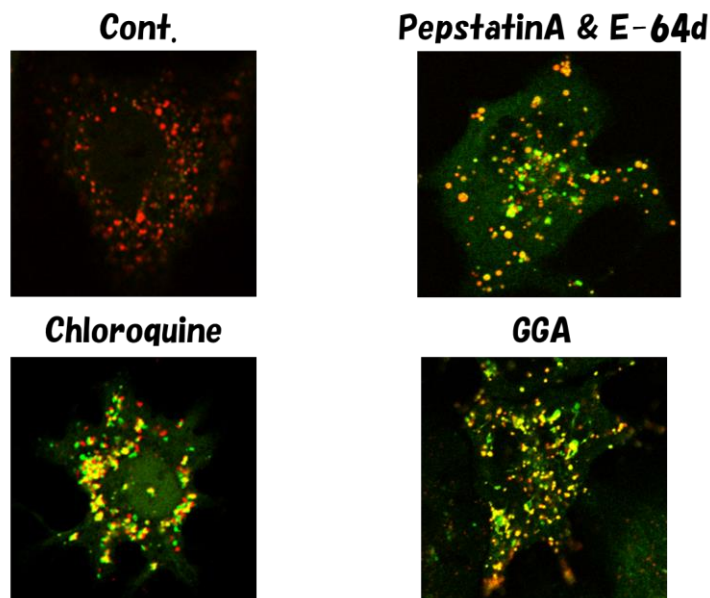


図1：オートファゴソーム形成の阻害剤であるクロロキン、ペプスタチンAとE-64dの作用と同様に、GGA添加2時間後には黄色い蛍光の顆粒状LC3が観察された。

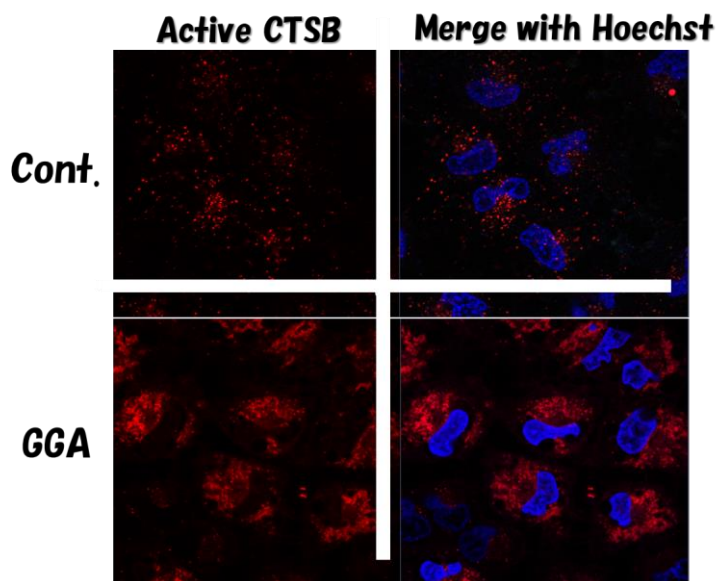


図2：活性型CTSBはGGA添加の5時間後にアップレギュレートされ、リソソーム機能が障害され、オートリソソームの形成が阻害されていることが示唆された。

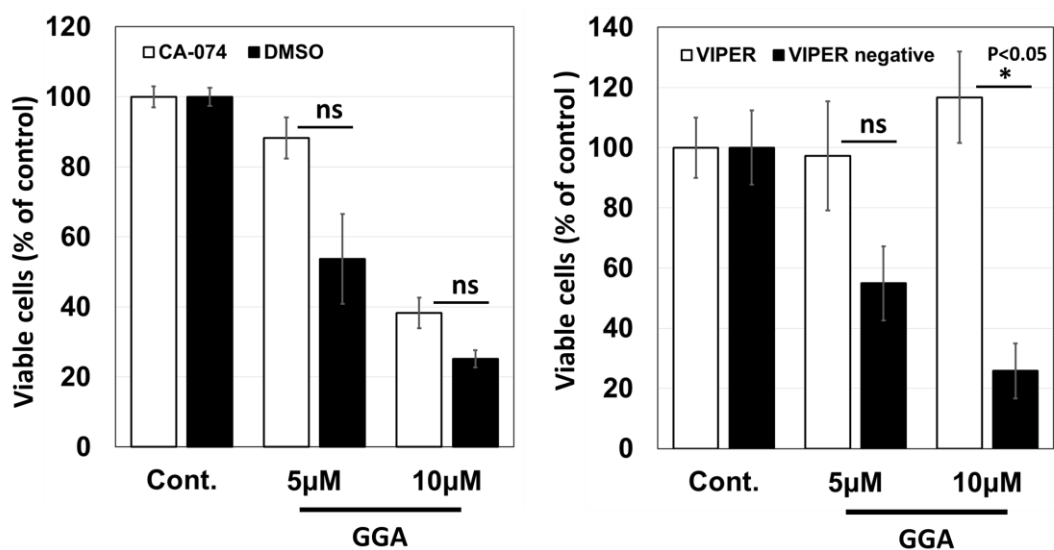


図3：HuH-7においてCTSB阻害剤CA-074はGGAによる細胞死をわずかに抑制したが有意差はなかった。TLR4阻害剤VIPERはGGAによる細胞死を優位に抑制した。

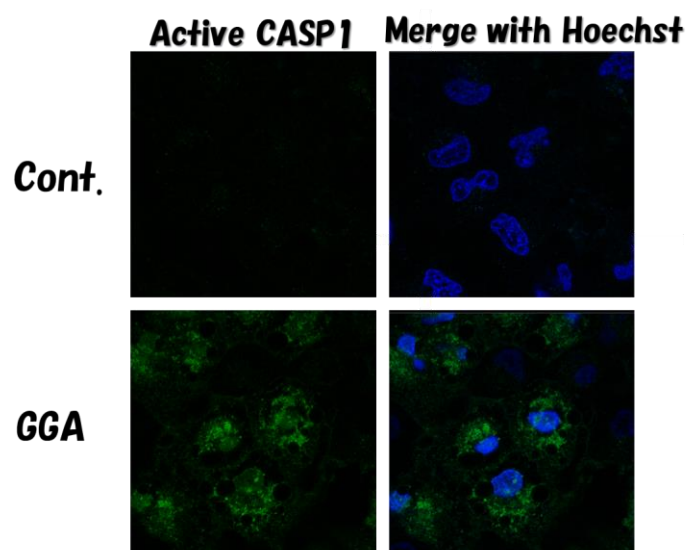


図4：パイロトーシスを示唆するCASP1はGGA添加の5時間後に活性化されることが見出された。