

ヒト肝癌細胞における非環式ジテルペノイド GGA の極性代謝産物の同定

研究期間 平成 30 年度

研究代表者名 四童子 好廣

・ はじめに

最新の WHO の報告によると、2018 年の全世界の癌による死亡者数は 960 万人に達し、6 人に 1 人は癌で死んでいることになる。中でも、癌による死亡原因の中では肺癌が最も多く 176 万人、次いで大腸癌が 86.2 万人、胃癌が 78.3 万人と続き、4 番目に多いのが肝癌で 78.2 万人となり、乳癌による死亡者数 62.7 万人より多い（International Agency for Research on Cancer: World Cancer Factsheet, 12 September 2018; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>）。しかも、肝癌の死亡原因の大半が肝癌治療後の再発によるものである。我が国の肝癌患者は 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や B 型肝炎ワクチンなどにより治療・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、広汎で継続的な肝癌予防対策とは言えない。実際、カナダ、アメリカ合衆国、オーストラリア、ニュージーランド、フランス、スイス、イタリア、スペインなど欧米先進国では肝癌の罹患数は最近の 10 年間で増加傾向にある（Bertuccio P. et al: Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality. *J Hepatol.* **67**: 302–309, 2017; McGlynn K et al: Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis.* **18**: 223-238, 2015）。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り発癌しにくい体質にすることは、究極の癌予防としてなお重要であるとされている。

ゲラニルゲラノイン酸（GGA）は、肝癌根治後の患者 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 年後の肝癌再発が有意に抑制されることを示した 4,5-dehydroGGA（薬剤名：ペレチノイン）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、レチノイド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。

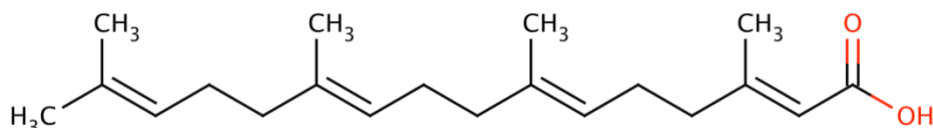


図 1. ゲラニルゲラノイン酸（GGA）の化学構造

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 からメバロン酸を経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、その異性体であるジメチルアリルピロリン酸（DMAPP:C5）をシードとして、イソプレノイドの基本単位が順次、鎖状に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するとゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP）が合成される（図 2）。

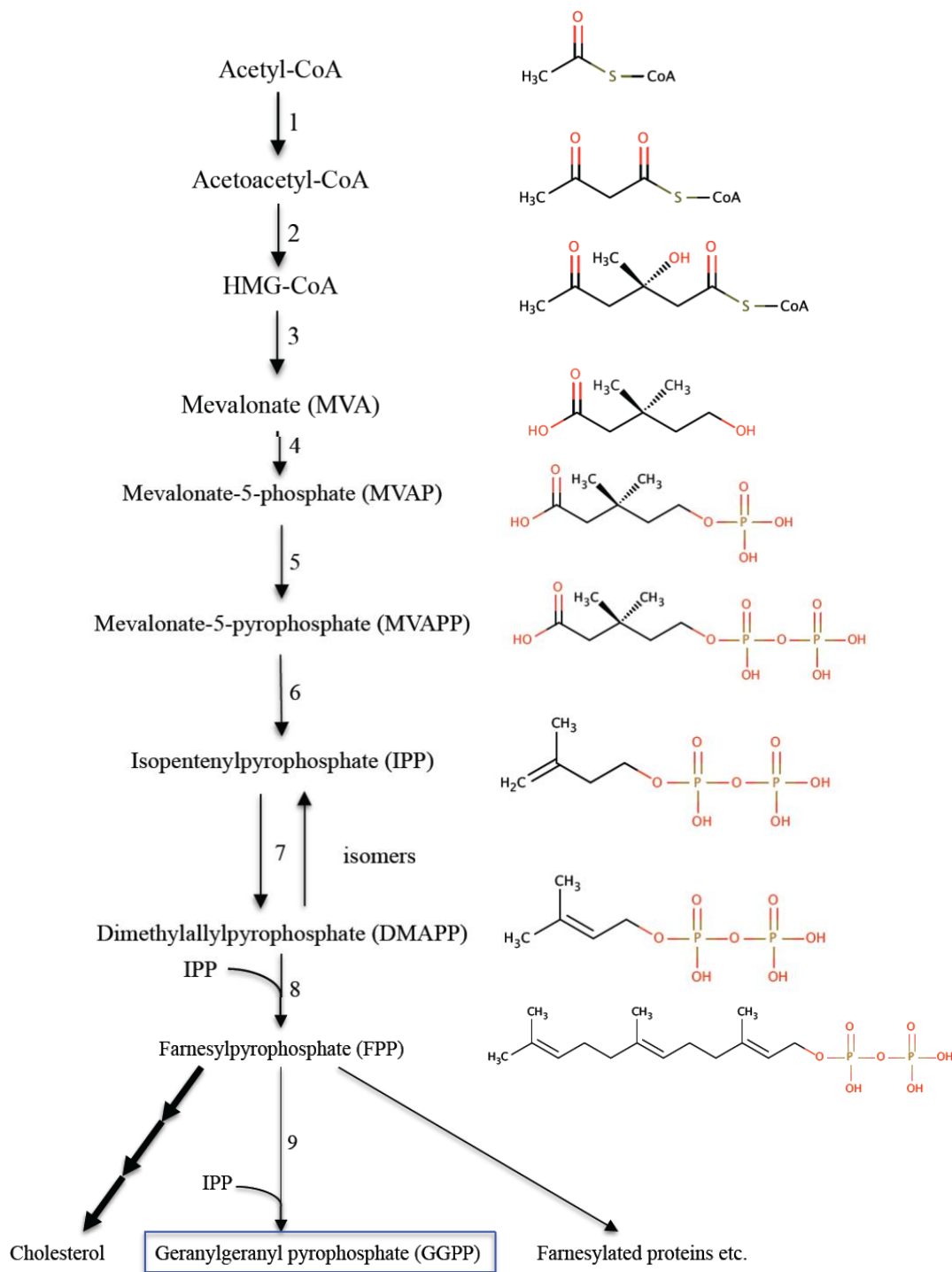


図 2. メバロン酸代謝経路によるゲラニルゲラニルピロリン酸の生合成

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ドナー基質となることが知られている。

我々は、動物細胞でも生合成される GGPP が脱リン酸化され、ゲラニルゲラニオール(GGOH) 経て GGA へと酸化されることを解明してきた。これは、ちょうど脂溶性ビタミンの 1 つであるレチノールがレチノイン酸へと酸化され活性代謝産物となることと類似している。レチノイン酸の中で、9-*cis* レチノイン酸は RXR のリガンドとして注目されて来たが、生理的濃度が低いことから内因性のリガンドとしては疑問視する研究者もいた。ところが最近、9-*cis*-13, 14-ジヒドロレチノイン酸が生体内に比較的高濃度に存在し RXR を活性化することから、真の内因性リガンドではないかと考えられている (Rühl R et al: 9-*cis*-13,14-dihydroretinoic acid, a new endogenous mammalian ligand of retinoid X receptor and the active ligand of a potential new vitamin A category: vitamin A5. *Nutr Rev.*, 76: 929-941, 2018)。レチノイン酸の 13 位, 14 位の炭素 (GGA では 2 位, 3 位に相当) に水素を添加する酵素はレチノール飽和化酵素と呼ばれている。一方、ポリプレノールのアルファイソプレレン単位を飽和化する酵素・SRD5A3 は GGOH の 2 位 3 位の炭素に水素を添加し、2, 3 ジヒドロ GGOH に代謝する可能性が考えられる。2, 3 ジヒドロ GGOH は、さらに代謝され 2, 3 ジヒドロ GGA (図 3) が生成される代謝経路が存在するものと仮説を立てることができる。

本研究計画では、こうして動物細胞でも生合成される GGPP が脱リン酸化され、ゲラニルゲラニオール (GGOH) 経て GGA ばかりではなく、2, 3 ジヒドロ GGA に代謝されることを、肝癌細胞由来の細胞株を用いて示すつもりである。

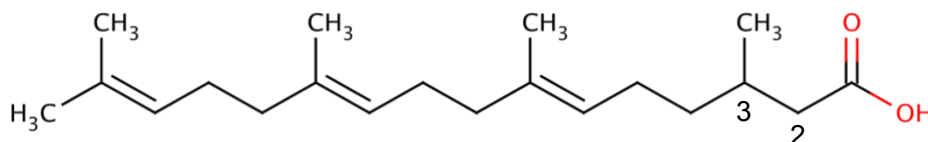


図 3. 2, 3-ジヒドロ GGA の化学構造

・ 研究内容

I. 安定同位元素 ^{13}C 標識メバロノラクトンによる 2, 3-ジヒドロ GGA の代謝標識実験

昨年度の学長裁量研究において、 ^{13}C 標識メバロノラクトンによる GGA の代謝標識実験を行い、想定通りの結果をうることができた。そこで、今回は、ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞において、スタチン共存下に ^{13}C で標識したメバロノラクトンを細胞培養の培地に添加し、2, 3-ジヒドロ GGA に焦点を合わせて、2, 3-ジヒドロ GGA が ^{13}C で標識されるかどうかを質量分析計により分析し、結果をえた。

II. Wistar 系雄ラットにおける 2, 3-ジヒドロ GGA の臓器分布

Wistar 系雄ラット (10 週齢、5 匹、24 時間絶食) の各臓器中の 2, 3-ジヒドロ GGA を LC/MS/MS で定量し、GGA の臓器分布と比較した。

・ 研究結果

I. 安定同位元素 ^{13}C 標識メバロノラクトンによる 2,3-ジヒドロ GGA の代謝標識

実験 I でメバロノラクトンから GGA の合成を観察する際、プラバスタチンによる内因性メバロン酸の合成を阻害し、なおかつ ZAA によりコレステロール合成系への流れをブロックしておくことと効率よく GGA の合成を観察できることが示されたので、同じ条件下で ^{13}C 標識メバロノラクトンを用いて、2,3-ジヒドロ GGA が代謝標識されるかどうかを、Isotopomer Spectral Analysis (ISA) により検証した。

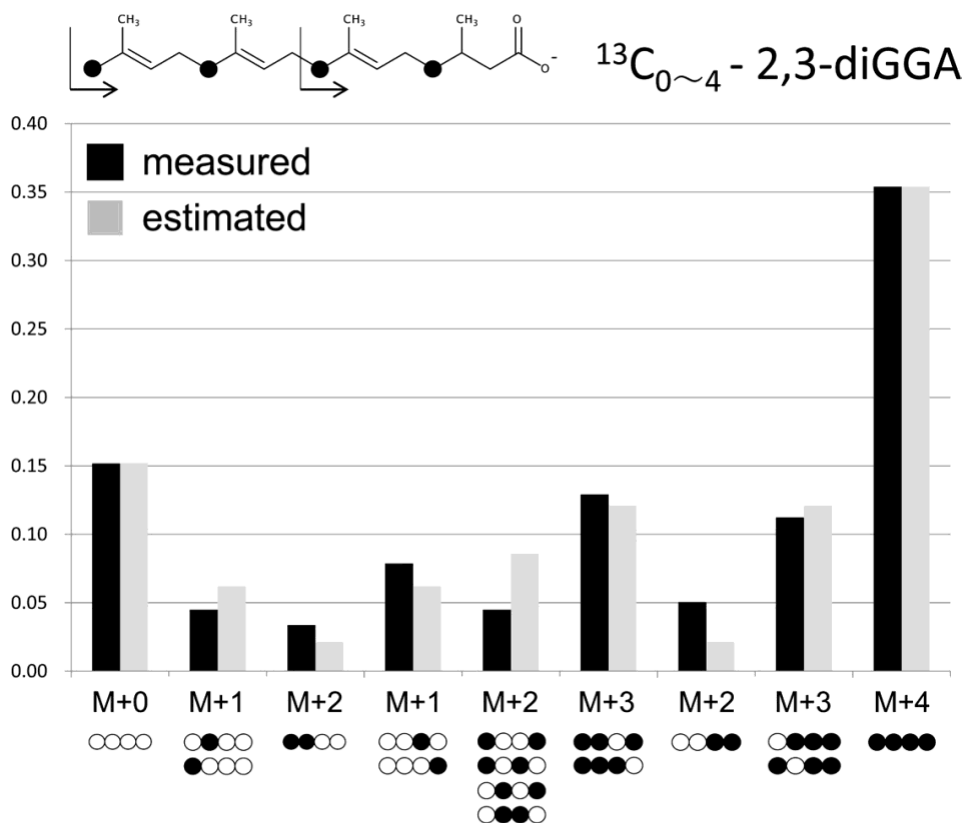


図 4. ^{13}C -メバロノラクトンによる 2,3-ジヒドロ GGA の代謝標識の ISA

図 4 は ^{13}C で標識された 2,3-ジヒドロ GGA を質量分析計 (MS/MS) で検出し、質量数の組み合わせの異なる 2,3-ジヒドロ GGA の頻度を観測値と生合成モデルからの推測値を示している。実際には、M+0 から M+4 までの 5 つの isotopologue と、さらに白丸と黒丸の 4 つの並びを示した isotopomer の組み合わせで示している。図 4 から明らかなように、 ^{13}C で標識された 2,3-ジヒドロ GGA が生合成モデルに適合するように観測され、2,3-ジヒドロ GGA のメバロン酸からの生合成を示すことができた。

II. Wistar 系雄ラットにおける 2,3-ジヒドロ GGA の臓器分布

Wistar 系雄ラット（10 週齢、5 匹、24 時間絶食）の各臓器中の 2,3-ジヒドロ GGA を LC/MS/MS で定量した結果を、図 5 に示す。

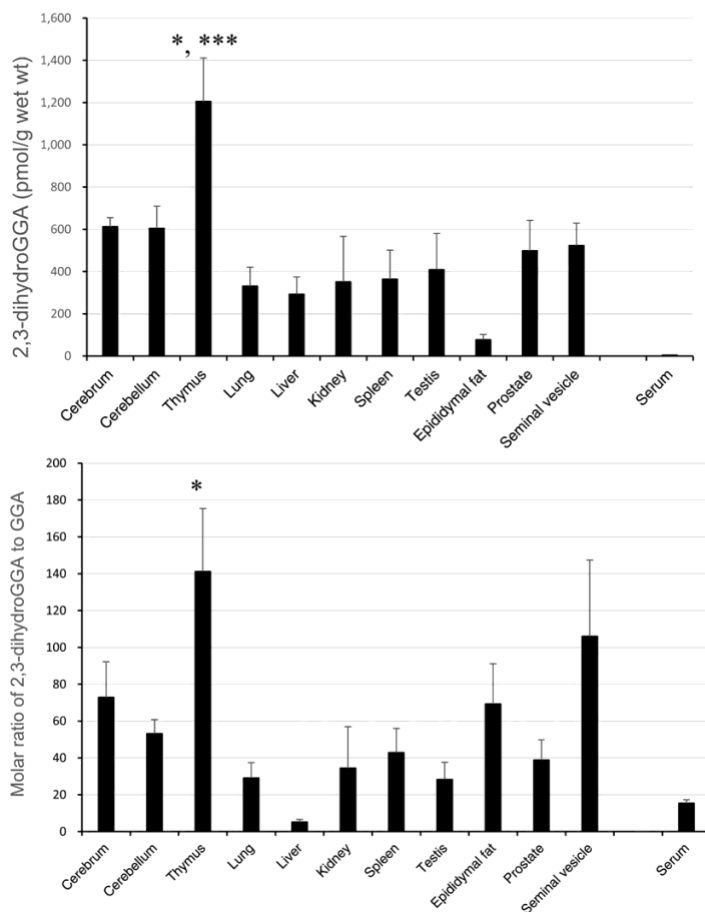


図 5. Wistar 系雄ラットの 2,3-ジヒドロ GGA の臓器分布

図 5 上段から明らかなように、2,3-ジヒドロ GGA は血清を含めてラットの分析した全ての臓器に検出され、中でも胸腺の細胞内濃度が最も高く、他の臓器の 2 倍または 2 倍以上の濃度であった。2,3-ジヒドロ GGA は、分析した全ての臓器で GGA の濃度よりも高く、特に胸腺では GGA の 140 倍程度の濃度で存在した（図 5 下段）。これは、*in vitro* で胸腺細胞の培養系に GGOH を添加すると、GGA よりも 2,3-ジヒドロ GGA が顕著に検出されたという報告（Kodaira Y et al: Formation of (R)-2,3-dihydrogeranylgeranoic acid from geranylgeraniol in rat thymocytes. *J Biochem.*, **132**:327-334, 2002）と矛盾しない結果であった。2,3-ジヒドロ GGA に胸腺における生理学的役割に興味もたれる。

・ おわりに

以上の結果から、臨床試験により肝発癌抑制作用が示されている 4, 5-dihydroGGA (ペレチノイン) の母化合物である GGA は、ヒトの細胞においてもアセチル CoA を出発物質とするメバロン酸代謝経路を介して生合成されると同時に、2, 3-ジヒドロ GGA にも代謝されることが確実に示された。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、2, 3-ジヒドロ GGA が GGA と異なる作用を示すのかどうか、どのような栄養素が GGA と 2, 3-ジヒドロ 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。