

## イソプレノイド化合物によるパイロトーシス誘導メカニズムに関する研究

研究年度 平成 31 年度

研究期間 平成 31 年度～令和 元年度

研究代表者名 四童子好廣

共同研究者名 岡本恭子

### ・ はじめに

申請者は21年前に本学に赴任してから、肝癌予防効果のある非環式レチノイドの1つであるゲラニルゲラノイン酸(GGA)がウコンなどのハーブにあることを世界に先駆けて発見し、報告した(1)。その後、GGAによる肝癌予防作用のメカニズムの研究に着手し、オートファジーの不完全応答(2)、小胞体ストレス応答(3)、エピジェネティック酵素の核外移行(4)などの細胞内イベントを介して、最終的に肝癌細胞に細胞死を引き起こすことを明らかにしてきた。本学における研究の最終年度に、GGAによる細胞死のメカニズムを、パイロトーシスの誘導という観点から分子レベルで完全に解明することを本研究の目的とした。なお、本研究の目的が達成されることにより、肝癌予防に適切な食事や運動などのライフスタイルの提唱が可能となることを究極の目的としている。

### ・ 研究内容

#### I. GGA 誘導性細胞死における TLR4 シグナルの関与：

上に述べたように、GGA による肝癌細胞死には、小胞体ストレス応答とそれによって引き起こされるオートファジーの不完全応答が関与していることはこれまでの研究で解明されている。しかし、肝癌細胞を GGA 処理するとどのようなメカニズムで小胞体ストレス応答が誘導されるのかは明らかにされていなかった。今回、細胞表面に局在する自然免疫に関与すると考えられている TLR4 (Toll-like receptor-4)によるシグナル伝達が、GGA による小胞体ストレス応答の原因になっていることが明らかにされた。TLR4 シグナルは小胞体ストレスの誘導ばかりではなく、GGA によるミトコンドリアにおけるスーパーオキシドの産生亢進にも関与し、細胞死を誘導していることが明らかにされた。

#### II. 小胞体ストレス応答による Non-canonical Pyroptosis の関与：

GGA は TLR4 シグナルを誘発し、小胞体ストレス応答を引き起こすことが示された。小胞体ストレス応答は、ATF4 の活性化などによりオートファジーを誘導する

が、GGA によるオートファジーの誘導は不完全応答となることが知られている。そこで、小胞体ストレス応答の GGA 誘導性細胞死の関係を解析するために、Caspase-4(CASP4)の活性化と、その基質である GasderminD (GSDMD)の切断を確認し、遺伝子に制御された細胞死の 1 つである Non-canonical Pyroptosis のメカニズムが作動しているかどうかを解明した。

### III. GGA 誘導性細胞死における Canonical Pyroptosis の関与 :

GGA による小胞体ストレス応答を介した Non-canonical な細胞過程は、GGA 添加後 1 時間から 3 時間目をピークに 5 時間後まで続く。しかし、この間に細胞死の兆候は観察されない。そこで、LDH の細胞外への遊離を細胞死の指標にして細胞死と並行して変動する細胞成分を検索したところ、CASP1 の活性化が最も良く相関した。CASP1 の活性化は inflammasome によって行われるので、その priming を観察したところ、GGA 添加後 3 時間で NLRP3 遺伝子の発現増加、8 時間後に IL-1B 遺伝子の発現増加が観察され、Canonical Pyroptosis のメカニズムによる細胞死が起こっているものと推察された。

### IV. GGA 誘導性 Pyroptosis の形態学的特徴 :

GGA は肝癌細胞に対して TLR4 シグナルを介して小胞体ストレス応答を誘発し、小胞体に局在する CASP4 の活性による GSDMD の切断と細胞膜への移行が観察されたが、そのままでは細胞死に至らず、NLRP3-inflammasome の priming と活性化により CASP1 が活性化され、LDH の遊離を伴う細胞死が観察された。そこで、GGA 誘導性細胞死の形態学的特徴を細胞の live imaging を経時的に解析することにより考察した。

## ・ 研究結果

### ・ TLR4 シグナルを介した GGA 誘導性細胞死 :

図 1A に示したように、GGA による肝癌細胞死は、TLR4 の特異的阻害ペプチドである VIPER により完全にブロックされ、C34 や TAK242 などの TLR4 阻害剤分子化合物でも一部 GGA 誘導性細胞死は抑制された。さらに、図 1B では、TLR4 遺伝子をノックダウンしても GGA 誘導性細胞死は完全に阻害されることから、GGA による肝癌細胞死には、TLR4 シグナルが必須であることが示された。

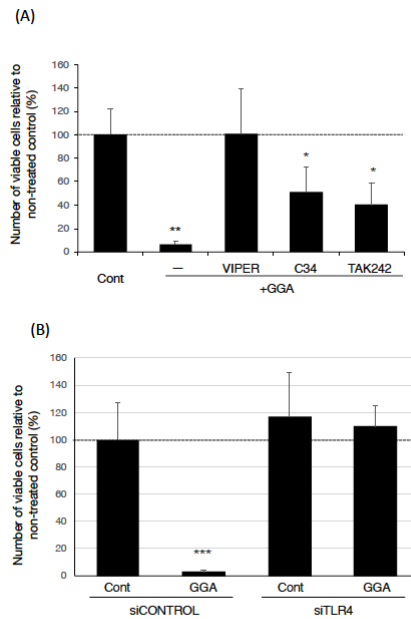


Figure 1. TLR4 is involved in GGA-induced cell death in HuH-7 cells.

GGA による炎症性転写因子 NF- $\kappa$ B タンパクの核内移行 (図 2 A) や、ミトコンドリアにおけるスーパーオキシドの産生亢進 (図 2 B) やも、VIPER により抑制されることから、GGA により惹起される TLR4 シグナルは、これらのプロセスにも関与していることが示された。

一方、抗酸化ビタミンの 1 つである  $\alpha$  トコフェロールは、前者には効果がないが、後者に対しては完全に抑制し (図 2)、GGA による細胞死も抑制したことから、ミトコンドリアにおけるスーパーオキシドの産生亢進が細胞死には重要な因子になっていることが示された。

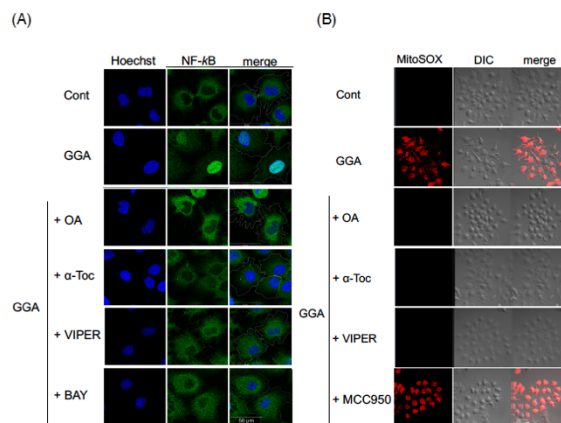


Figure 2. GGA-mediated hyperproduction of mitochondrial superoxide induces nuclear translocation of NF- $\kappa$ B through TLR4 signaling.

・ GGA による小胞体ストレス応答を介した Non-canonical Pyroptosis :

GGA 誘導性小胞体ストレス応答の指標として XBP1 mRNA の小胞体におけるスプライシングおよび DDIT3 遺伝子の発現増加を解析すると、これらのいずれも、VIPER により阻害されたことから、GGA により誘発される小胞体ストレス応答は TLR4 シグナルを介したものであることが示された。そこで、小胞体ストレス応答の直接的な誘導剤である Thapsigargin を用いたところ、GGA とほぼ同様に、小胞体に局在する CASP4 の活性化の速やかな活性化が観察された (図 3 A,B,C)。また、CASP4 の基質の 1 つである Gasdermin D (GSDMD) の切断を確認し、細胞死の観察される前に GSDMD の細胞膜への移行が観察された (図 3 D,E,F)。

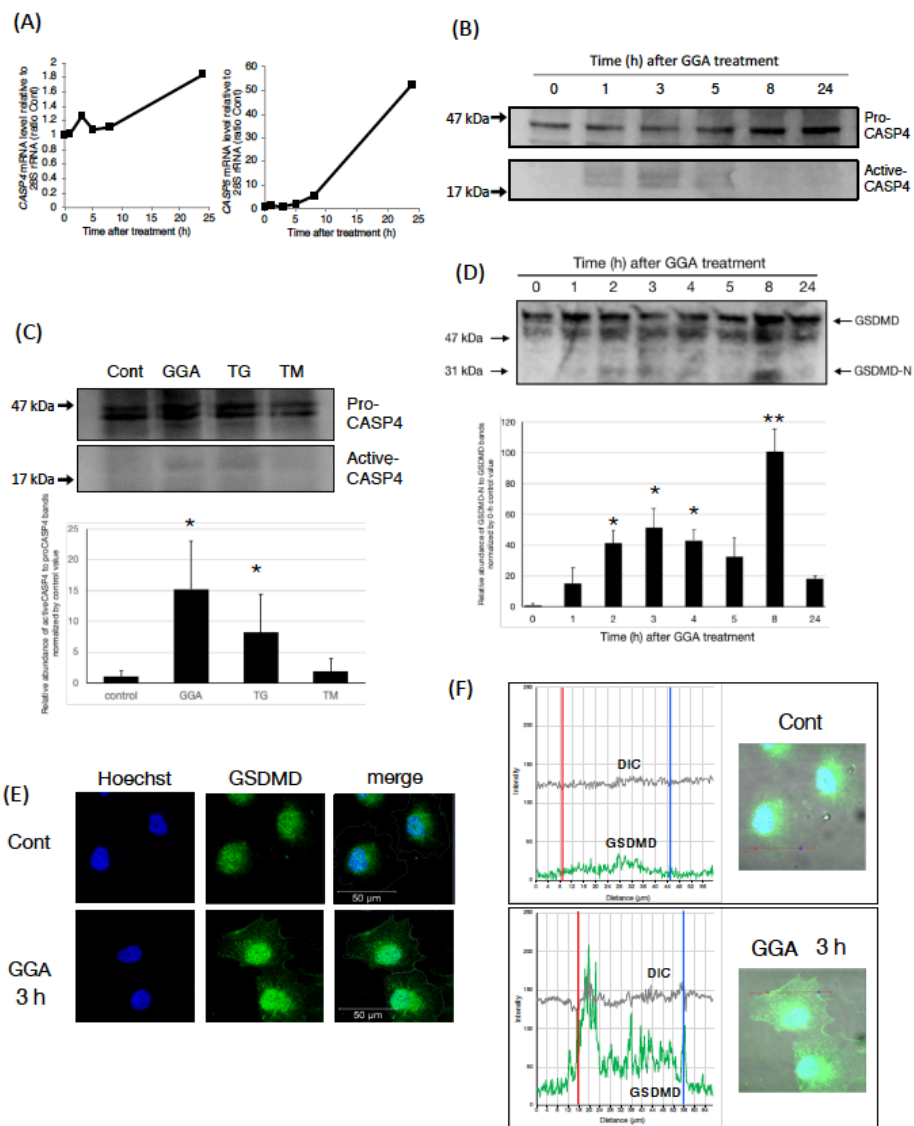


Figure 3. GGA-induced UPR activates caspase-4 and induces plasma-membrane translocation of GSDMD in HuH-7 cells.

・ GGA により誘導される Canonical Pyroptosis :

GGA 添加後、培地中に遊離した LDH 活性を経時的に測定したところ、図 4 AB に示したように、CASP1 の活性化が最も良く相関した。しかも、GGA による CASP1 の活性化は、TLR4 の特異的阻害剤 VIPER で完全にキャンセルされ、脂質誘導性小胞体ストレス応答の阻害剤であるオレイン酸でも阻害され、さらに NLRP3 inflammasome の阻害剤 MCC950 でも有意に阻害された (図 4 C)。一方、CASP4 の特異的阻害剤を共処理すると、GGA による CASP1 の活性化が阻害されたことから、Non-canonical なプロセスが、CASP1 の活性化に必要であると示唆された (図 4 D)。GSDMD は、GGA 処理 8 時間後には細胞膜だけではなく、細胞質全体に顆粒状に局在していた (図 4 F)。

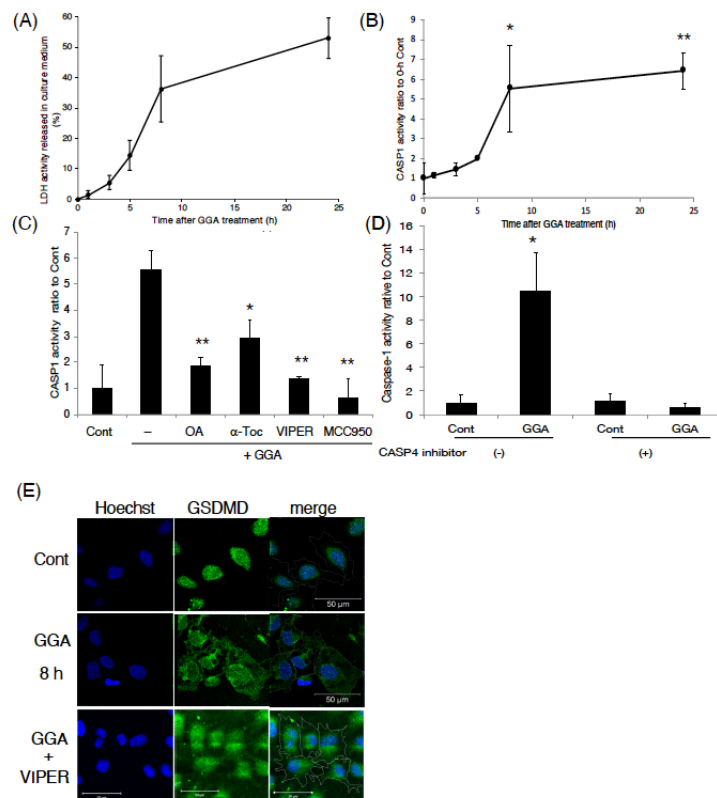


Figure 4. GGA induces caspase-1 activation after caspase-4 activation.

一般に、CASP1 の活性化は inflammasome によって行われるので、その priming を観察したところ、GGA 添加後 3 時間で NLRP3 遺伝子の発現増加、8 時間後に IL-1B 遺伝子の発現増加が観察され、Canonical Pyroptosis のメカニズムによる細胞死が起こっているものと推察された (図 5)。

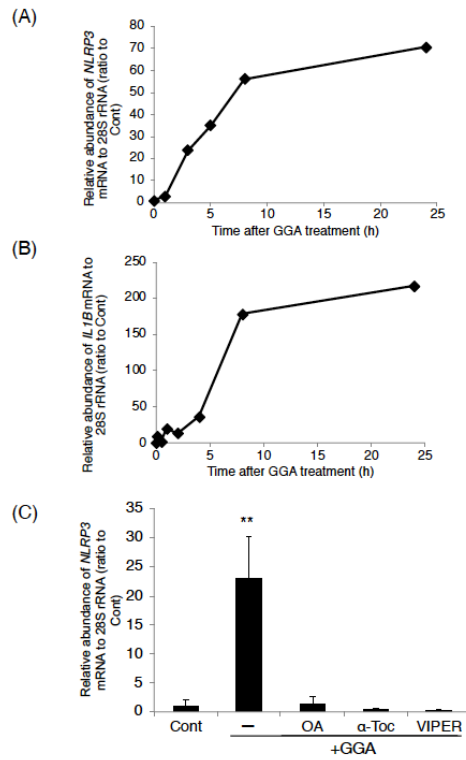


Figure 5. GGA induces priming of NLRP3 inflammasome through TLR4.

また、GGAによるNLRP3 mRNAレベルの増加は、TLR4阻害剤VIPERにより完全に抑制された（図5C）。

• GGA 誘導性 Pyroptosis の形態学的特徴：

GGA 誘導性細胞死の形態学的特徴を細胞の live imaging を経時的に解析すると、図 6 に示したように GGA 処理後、3 時間程度経過すると、細胞膜にブルブが生じ、6 時間前後には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇とともに、大きなバルーンが形成され、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の急激な低下とともに細胞は動かなくなり、LDH の遊離の経時的変動から推察すると細胞死に至ったものと考えられた。

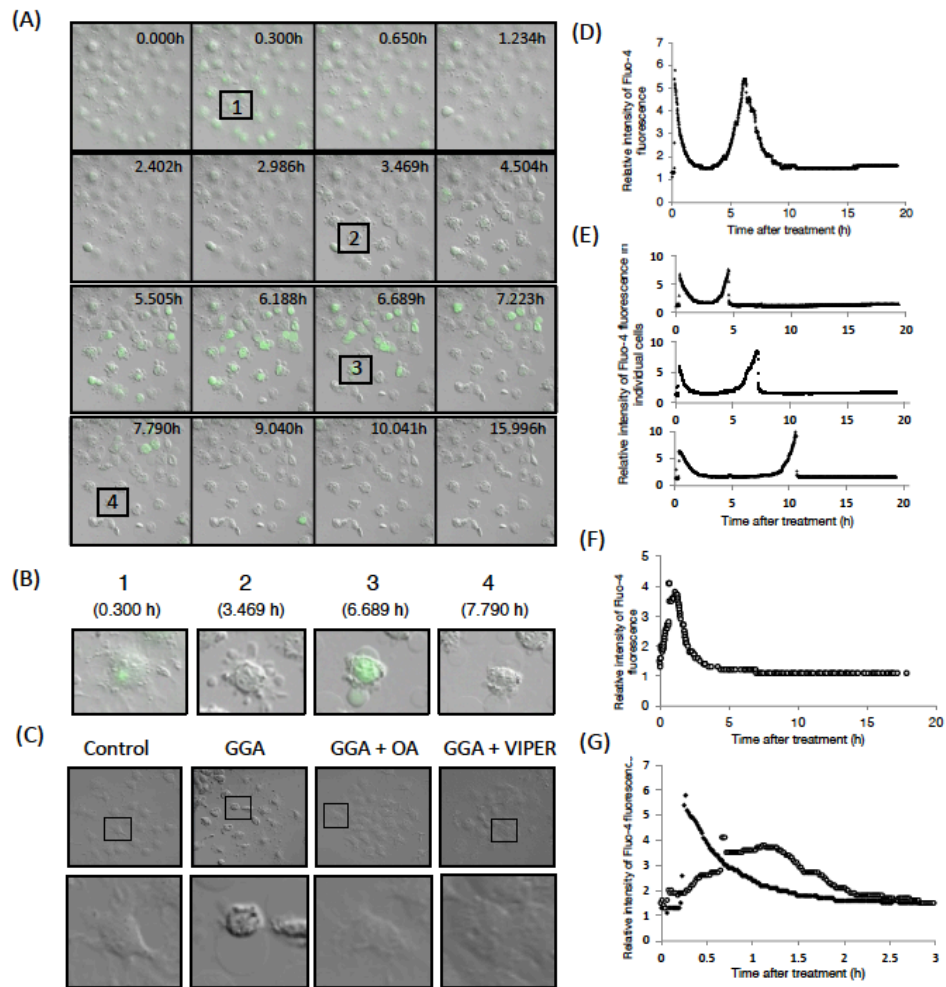


Figure 6. Time-series of live imaging of Fluo-4 AM loaded HuH-7 cells after GGA treatment.

・ おわりに

我々は、GGA による肝癌再発抑制のメカニズムとして、発癌細胞の細胞死誘導を提唱してきた。そのメカニズムとして当初、アポトーシスを仮説として解析を行なったが、CASP3 の活性化は観察することができず、典型的なアポトーシス機構によるものではないことがわかった。その後、GGA による肝癌細胞死には、オートファジーの不完全応答や、それを引き起こす小胞体ストレス応答などの細胞過程が観察されたが、いずれも細胞死そのもののメカニズムとしては不明のままであった。

今回、図 7 に示したように、GGA 添加後の細胞内プロセスを経時的に並べると、

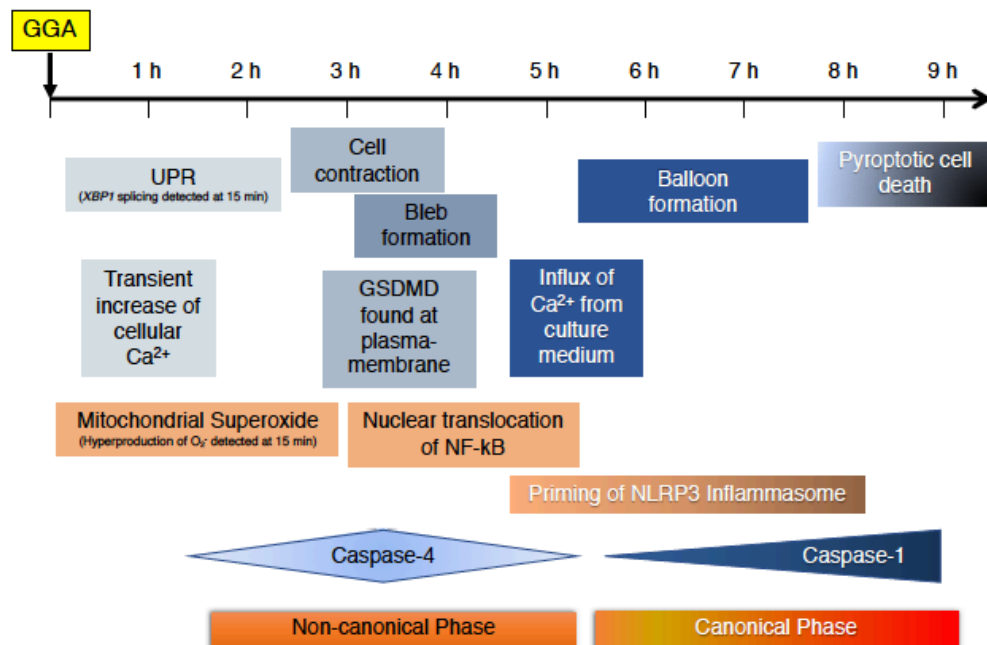


Figure 7. Timeline of the cellular events during GGA-induced cell death in human hepatoma cells.

全ての事象が、TLR4 依存的であり、小胞体ストレス応答とミトコンドリアにおけるスーパーオキシドの産生亢進が GGA 添加後、速やかに惹起され、小胞体局在型の CASP4 の活性化と GSDMD の断片化、炎症性転写因子 NF-κB の核内移行と NLRP3 inflammasome の priming などが連続して起こり、最終的に CASP1 の活性化による Pyroptosis 機構による細胞死を観察することができた。

今後、細胞内 GGA 濃度を高めるような栄養条件を探索することにより、より効率的な肝癌予防の可能性を目指すことが可能となる研究の礎となった。



・ 引用文献

1. Shidoji, Y., and H. Ogawa. 2004. Natural occurrence of cancer-preventive geranylgeranoic acid in medicinal herbs. *J. Lipid Res.* **45**: 1092–1103.
2. Okamoto, K., Y. Sakimoto, K. Imai, H. Senoo, and Y. Shidoji. 2011. Induction of an incomplete autophagic response by cancer-preventive geranylgeranoic acid (GGA) in a human hepatoma-derived cell line. *Biochem. J.* **440**: 63–71. [online]  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787360>.
3. Iwao, C., and Y. Shidoji. 2015. Polyunsaturated branched-chain fatty acid geranylgeranoic acid induces unfolded protein response in human hepatoma cells. *PLoS One.* **10**: e0132761.
4. Yabuta, S., and Y. Shidoji. 2019. Cytoplasmic translocation of nuclear LSD1 (KDM1A) in human hepatoma cells is induced by its inhibitors. *Hepatic Oncol.* **6**: HEP13.