

1

2

宮崎大学・農学部

3

教授

2001年

4

山崎正夫

九州大学大学院博士課程修了

5



2001-2002年

6

日本学術振興会特別研究員

7

2002-2004年

8

オーム乳業株式会社

9

2004年-

10

宮崎大学農学部

11

12 リポ酸をモデルとした機能性食品成分の“off” 13 応答に関する研究

14

【緒言】

15

16 申請者は機能性を持つ食品成分によるシグナル伝達の誘発の裏には、すべからく“off”応答を
17 惹起するための手だてが存在すると考えている。このような“off”応答の実体は食品成分個別に
18 評価をする必要があるが、本研究では α リポ酸(LA)というツールを用い、その存在と実体を
19 検証することを目標としている。LAは構造内に環状ジスルフィド結合を有する中鎖脂肪酸で
20 ある。LAは食品機能性成分の一種として知られており、レバーやホウレンソウなどに多く含
21 まれ、細胞内で還元されるとDihydro lipoic acid (DHLA)という強力な抗酸化物質となる体内で
22 合成されるビタミン様物質である。申請者は、これまでにLAの抗ガン作用について着目し、
23 *ras*形質転換細胞に対する選択的増殖抑制効果と β 1-integrinの発現低下効果を持つことを示した
24 1)。当初、申請者はLAの作用はその抗酸化活性に依存していると推定したが、2)、抗酸化活性
25 がLAより高いとされるDHLAやオクタン酸が活性を持たないことから、1,2-dithiolane構造に
26 依存的かつ抗酸化活性非依存的な作用が想定された3)。1,2-dithiolane構造は1種の5員環構造
27 であり、この部分構造がLAの作用機序として重要と考えた。5員環構造を有する生体脂質分
28 子としてプロスタグランジン(PG)類が挙げられ、面白いことにLAはPG受容体と相互作用す
29 る可能性が指摘されている。そこで、本研究ではLAの抗ガン活性のスイッチ on-off 機構とし
てPG類との相互作用について検証した。

30

【方法】

31

32 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団(Osaka Japan)からヒト膀胱ガン細胞であるT24細胞
33 (JCRB0711)を購入し、10%牛胎児血清含有RPMI-1640培地を用いて培養した。本試験にお
34 いてはT24細胞を 3.5×10^3 cells/cm²の密度で細胞播種し、24時間前培養を行った。その後、種々
のサンプルを添加し1~24時間培養した。

35

細胞表面 β 1-integrinの解析にはフローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡による

1 観察を行った。培養終了後、細胞を回収し FITC 標識抗 β 1-integrin 抗体溶液で 4、30 分反応さ
2 せた。解析直前に 25 μ g/mL のヨウ化プロピジウム (PI) 溶液に懸濁させ、フローサイトメトリ
3 ー解析時には死細胞を解析対象から排除した。共焦点レーザー顕微鏡観察用にガラスボトムデ
4 イッシュで細胞を培養後、4% paraformaldehyde で細胞固定した。0.5% Triton 含有 PBS で細胞膜
5 の透過処理後に 10% BSA/PBS でブロッキングした。FITC 標識抗体 β 1-integrin 抗体溶液および
6 Hoechst33342 溶液で β 1-integrin および核を染色し、50% Glycerol で封入し、LSM 700 共焦点レ
7 ザースキャン顕微鏡 (ZEISS) を用いて観察した。蛍光色素の励起は 350 nm (Hoechst33342), 488
8 nm (FITC)を使用した。

9 細胞遊走試験ではコンフルエント直前になるまで培養した細胞の一部を 200 μ L チップの先端で
10 引っ掻き、接着している細胞の一部を剥がした。無血清培地に交換し 3-12 時間培養後に剥がし
11 た部分に移動してくる細胞の面積を Image J ソフトウェアを用いて測定した。

12 ウエスタンブロット解析用サンプルとして、培養終了後に細胞を回収し、細胞溶解後、2 x
13 Sample buffer と混合させ 100°C, 5 min 煮沸し変性させたものを用いた。タンパク質濃度の定量
14 には BCA Protein assay kit を使用した。SDS-PAGE によりタンパク質を分離後 PVDF 膜に転写さ
15 せた。0.05% Tween-20, 3% スキムミルク含有 Tris buffered saline (T-TBS) でブロッキングした。
16 T-TBS に抗リン酸化 FAK, FAK, β -actin 抗体希釈し反応させた後、HRP 標識抗マウス IgG, HRP
17 標識抗ラビット IgG を二次抗体として反応させた。バンドの検出には ECL prime を使用し、化
18 学発光を ImageQuantTM LAS 4000 を用いて検出した。

19 【結果および考察】

20 T24 細胞を 24 時間 LA 処
21 理したところ、細胞の遊走お
22 よび浸潤能が有意に抑制さ
23 れた。また、同時に細胞表面
24 からは β 1-integrin の発現が顕
25 著に低下していた。また、LA
26 処理時間が短い場合、細胞内
27 β 1-integrin の総発現量は変化
28 をしなかったが、処理時間が
29 24 時間を超えると β 1-integrin
30 の総発現量が低下する傾向

31 にあった。一方で、細胞表面の β 1-integrin の発現低下作用は非常に速やかであり、LA 処理わず
32 か 1 時間で有意に低下することが示された。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察結果から、
33 β 1-integrin は LA 処理後 1 時間で顕著に細胞内に極在を変化することが明らかとなった (Fig. 1)。

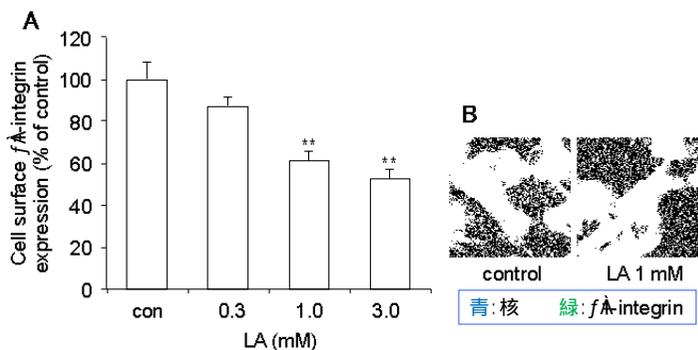


Fig. 1 f リガ酸 (LA) による β 1-integrin 発現低下作用

A: 0, 0.3, 1.0, 3.0 mM LA で T24 細胞を 1 時間処理後、細胞表面 β 1-integrin 発現をフローサイトメトリーで解析 n=3 ** $p < 0.01$.

B: 0, 1.0 mM LA で T24 細胞を 1 時間処理後、 β 1-integrin 極在を共焦点レーザー顕微鏡で観察

1 次に、LA の上記のような効果に PG
 2 受容体が関与する否かについて、3 種の
 3 PG 受容体である EP1, EP2, EP4 のアンタ
 4 ゴニストを用い LA とのβ1-integrin 発現
 5 に対する併用効果を確認した。いずれの
 6 アンタゴニストも単独では影響がなく、
 7 LA と併用した際に、LA の効果を緩和す
 8 る傾向があった (Fig. 2)。しかし、いず
 9 れのアンタゴニストも単独の効果は顕
 10 著ではなく、少なくとも LA の作用が特
 11 定の PG 受容体を介するものではないこ
 12 とが示唆された。次に PGE₂ と LA の共
 13 存効果について検証した。その結果、
 14 PGE₂ は単独処理で細胞表面β1-integrin 発
 15 現も亢進することが明らかとなった。ま
 16 た、LA と PGE₂ 処理によって細胞表面
 17 β1-integrin 発現量は LA 単独処理と同程
 18 度に減少した (Fig. 3)。

19 LA は T24 細胞の遊走を顕著に抑制す
 20 ることを上述したが、この効果に対する
 21 LA と PGE₂ の効果について検証した。処
 22 理時間6, 12時間でLAにより遊走は有意
 23 に抑制されたが、PGE₂ 処
 24 理では逆に有意に上昇し
 25 た。またこれらの両者の共
 26 存によってコントロール
 27 に近い遊走能を示した
 28 (Fig. 4)。

29 最後にβ1-integrin シグナ
 30 ル伝達経路を解析するた
 31 め、FAK のリン酸化にお
 32 よぼす影響について検討

33 した。LA は FAK リン酸化を顕著に抑制し、PGE₂ は促進傾向を見せた。また、両者の共存によ
 34 って PGE₂ 処理による FAK リン酸化誘導は完全に消失した。この傾向は Fig.3 に見られる細胞
 35 表面β1-integrin 発現に対する影響と良く一致する結果であった。

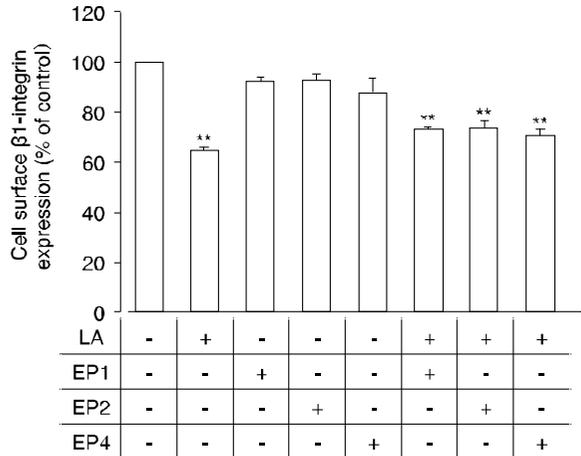


Fig. 2 α-リボ酸 (LA) とプロスタグランジン受容体アンタゴニストの併用によるβ1-integrin発現低下作用
 EP1, EP2, EP4アンタゴニストおよびLAでT24細胞を1時間処理後、細胞表面β1-integrin発現をフローサイトメトリーで解析 n=3 **p<0.01.

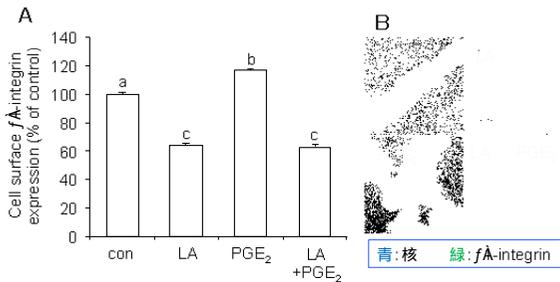


Fig. 3 fAリボ酸 (LA) のPGE₂によるfA-integrin発現促進作用への拮抗
 A; LAおよびPGE₂でT24細胞を1時間処理後、細胞表面fA-integrin発現をフローサイトメトリーで解析 n=3. 異なる文字間で有意差有り, p<0.05.
 B; LAおよびPGE₂でT24細胞を1時間処理後、fA-integrin極在を共焦点レーザー顕微鏡で観察

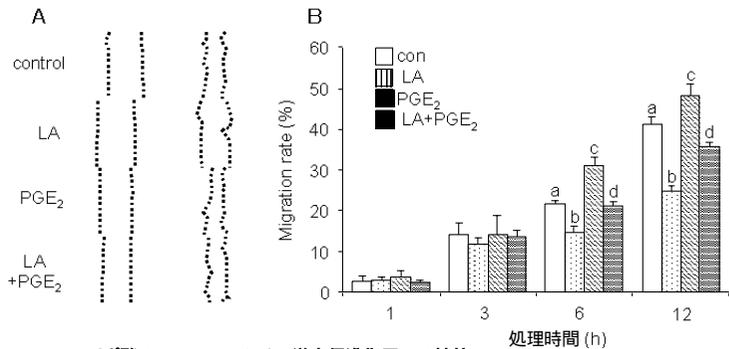


Fig. 4 fAリボ酸 (LA) のPGE₂による遊走促進作用への拮抗
 A; LAおよびPGE₂でT24細胞を1-12時間処理後、細胞遊走を定量化 (B)
 n=3. 異なる文字間で有意差有り, p<0.05. 典型的な遊走パターンをAに示した。

1 以上の結果より、LA は T-24 細胞において、
2 細胞表面に存在する $\beta 1$ -integrin を内在化させ
3 ることで、細胞接着や細胞運動を抑制するこ
4 とが明らかとなった。この細胞応答は極めて
5 速やかなものであり、LA 処理 1 時間後には
6 明確に認められるものであることから、細胞
7 表面分子との相互作用によって速やかに引
8 き起こされる減少と推察された。また、
9 $\beta 1$ -integrin 発現量は細胞全体で検出した時に、
10 LA 処理後 24 時間以降で減少する傾向があり、
11 細胞内に内在化された $\beta 1$ -integrin はリサイク
12 ルされるのではなく、分解経路に入ることが
13 推察される。次に、この短時間で誘発される
14 細胞表面分子を推定することを試みた。これ
15 まで LA の標的分子は明確でなかったが、PG

16 受容体の相互作用を指摘する報告がある⁴⁾。さらには、PG 受容体の阻害によってガン細胞にお
17 ける細胞運動が抑制されることが報告されており、PG 受容体と LA との関連を想定した。その
18 結果、 PGE_2 による integrin 発現亢進や integrin シグナルの活性化は LA でキャンセルされることが
19 が示された。このことは、LA が PGE_2 の作用に拮抗的に働き、それ自身が integrin 発現や integrin
20 シグナルを抑制することを示唆しており、PG 受容体のアンタゴニストがこのような作用を持つ
21 ののではないかと考えた。その結果、 PGE_2 受容体である EP1, EP2, EP4 アンタゴニスト単独の効
22 果はなかったものの、これらのアンタゴニストは LA の作用に弱く拮抗することが示された。
23 以上の結果から、LA は PGE_2 受容体リガンドとして働くことはないことが示されたものの、
24 PGE_2 受容体を少なくとも一部介した作用機序を持っている可能性が示された。従って、LA の
25 作用を on にするスイッチとして少なくとも一部を PGE_2 受容体がになうと推察され、それに伴
26 って細胞表面ではダイナミックなエンドサイトーシスが誘導され、それに伴って $\beta 1$ -integrin が
27 細胞表面から消失することが推察された。面白いことに、著者らは $\beta 1$ -integrin だけでなく CD44
28 の細胞表面発現が低下する可能性を示すデータを得ることが出来た。この分子はヒアルロン酸
29 の受容体として知られ、LA がヒアルロン酸に対する細胞応答を抑制することも明らかにした。
30 これらを総合すると、 PGE_2 受容体およびさらなる未知の LA 感知分子は、細胞表面タンパク質
31 のダイナミックな再構築を誘発する因子であることが想定される。このような細胞応答は LA
32 に対する細胞応答を一時的に off 状態にするのみならず、再構築によって影響を受ける分子を
33 標的とする様々な外的成分や因子に対する感受性を大きく変化させることを示唆しており、食
34 品機能化学的な観点からは LA と他の食品成分との『食べ合わせ』による機能性変化を理解す
35 る上で重要な情報と考えられる。

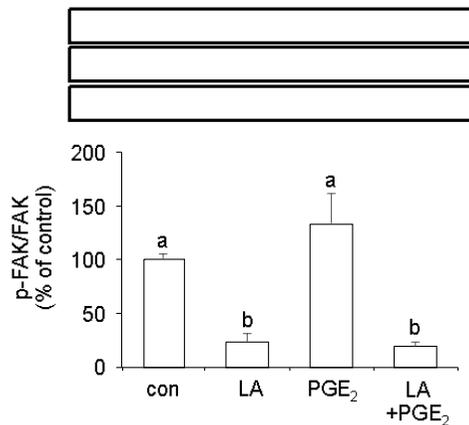


Fig. 5 f_2 リガ酸 (LA) の PGE_2 によるintegrinシグナル促進作用への拮抗

A; LAおよび PGE_2 でT24細胞を1時間処理後、リン酸化FAK, FAK, f Actinをウエスタンブロットで検出し、バンド強度を定量化した。n=3, 異なる文字間で有意差有り, $p < 0.05$. 典型的な遊走パターンを上に表示した。

1 **【参考文献】**

- 2 1) Yamasaki M, et al. Alpha lipoic acid selectively inhibits proliferation and adhesion to fibronectin of
3 *v-H-ras*-transformed 3Y1 cells J Clin Biochem Nutr 50, 234-240, 2012
- 4 2) Yamasaki, M. et al. Dihydro-alpha-lipoic acid has more potent cytotoxicity than alpha-lipoic acid. In Vitro
5 Cell Dev Biol Anim 45, 275-280, 2009
- 6 3) Yamasaki, M. et al. The importance of 1,2-dithiolane structure in α -lipoic acid for the downregulation of
7 cell surface β 1-integrin expression of human bladder cancer cells. Biosci Biotechnol Biochem 78,
8 1939-1942, 2014
- 9 4) Salinthon, S. et al. Lipoic acid stimulates cAMP production via G protein-coupled receptor-dependent and
10 -independent mechanisms. J Nutr Biochem 22, 681 -690, 2011

11 **【謝辞】**

12 本研究の遂行にあたり、研究助成いただきましたサッポロ生物科学振興財団に厚く御礼申し上げ
13 ます。