



講師
吉田 達士

経歴
2007年：米国 FDA 研究員
2009年：東京医科歯科大学 難治疾患
研究所 病態細胞生物学 助教、講師
2014年～現職

海産食用カロテノイドの生理機能解析

1. 背景と目的

カロテノイドは天然の色素成分であり、野菜、果物、魚介類や海藻など様々な食材に含まれる。また、食品に添加する成分としても利用され、サッポロ CotoCoto オレンジマーマレードにも色素として添加されている。カロテノイドは色素としての役割だけでなく、脂質代謝改善作用、抗肥満作用、抗腫瘍作用、抗酸化作用、抗炎症作用などの機能性を有することが報告されている (1)。本研究者は、日本人の食生活になじみの深い昆布やワカメなどの褐藻類に含まれる海産食用カロテノイドであるフコキサンチンが遺伝子発現制御を介してがん細胞の増殖抑制効果を有すること (2)、牡蠣やホヤに含まれるカロテノイドであるハロシンチアキサンチンが抗腫瘍性サイトカインの機能増強効果を有すること (3) を報告してきた。本研究では、食品・飲料の付加価値を高めるため、食用カロテノイドの新たな機能性を解明することを目的とした。

当研究室では Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) についての検討を行っているという背景があった。RUNX1 は血球分化調節に関わる転写因子であり (4)、急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia [AML]) においては染色体転座によって ETO 遺伝子と融合し、RUNX1-ETO を発現することによって機能失活している (5)。また、転座だけでなく点突然変異による機能喪失も報告されている。更には、骨髄異形成症候群においても RUNX1 遺伝子の変異が認められている (6)。重要なことに、RUNX1 の片アレルの不活化によって発病リスクが高まることから、正常なアレルからの発現制御により発病を抑制できることが期待される。しかしながら、RUNX1 の発現制御についてはまだ詳細に

は解明されていないことから所属研究室では RUNX1 発現制御の解明を試みている。今回は、この RUNX1 の発現調節に食用カロテノイドが関わらないか、また、白血病細胞に対する影響はどのようなものがあるか、解明を試みた。

2. 方法

2-1 ウェスタンブロッティング法

培養細胞を RIPA buffer で処理し細胞抽出液を調製した。SDS-PAGE によって細胞抽出液中のタンパク質を分離し、ニトロセルロース膜へ転写した。2%牛血清アルブミンを含む TBS-T buffer にてブロッキングし、一次抗体を 4℃一晩反応させた。次に、二次抗体を室温 1 時間反応させた。ECL 試薬 (GE healthcare) によって抗体が反応したタンパク質部分を発光させ、LAS500 イメージアナライザー (GE healthcare) を用いて検出した。

2-2 mRNA 発現量解析

培養細胞を Isogen 試薬 (Nippon gene) で処理し、totalRNA を抽出した。逆転写酵素 SuperscriptIV (Thermo Fisher Scientific) によって cDNA を合成した。作成した cDNA を鋳型として、特異的 primer set、Thunderbird Sybr qPCR kit (Toyobo) を用いてリアルタイム PCR を行い、標的遺伝子の mRNA 発現量を解析した。

2-3 細胞増殖解析

培養細胞を種々のカロテノイドで処理した後、トリパンブルー液を添加した。顕微鏡観察によってトリパンブルー色素の取り込みを評価し細胞増殖に対する影響を解析した。

2-4 細胞周期解析

培養細胞を 0.1% Triton-X100 含有 PBS に懸濁して裸核した。核内 DNA を Propidium iodide (PI) 染色し、FACS CantoII (Becton Dickinson) を用いて細胞周期を解析した。

2-5 LDH assay

培養細胞に Cytotoxicity LDH Assay kit-WST (Dojindo) の Working solution を加え 30 min インキュベートした。Stop solution を加えて反応を停止させプレートリーダーを用いて測定した。

3. 結果と考察

昆布やワカメ等の食用褐藻類に含まれるカロテノイドであるフコキサンチンを Jurkat T 細胞白血病細胞に投与し、Western blotting 法による RUNX1 発現に対する影響を調べ

た。RUNX1 タンパク質量はフコキサンチンの濃度依存的に減少していることが観察された (図 1)。一方で、RUNX1 の mRNA の変化を qPCR 法によって調べた結果、mRNA 量は減少していなかった (図 2)。これらの結果より、フコキサンチンは RUNX1 をタンパク質レベルで制御していることが示唆された。タンパク質の分解制御システムとしてはユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー系が知られている。プロテアソーム阻害剤である MG132 またはオートファジー阻害剤であるクロロキンをフコキサンチンと同時に投与しても RUNX1 タンパク質量の減少は抑制されなかった。これらのタンパク質分解システムとは異なる方法でフコキサンチンは RUNX1 タンパク質量を調節していると考えられた。

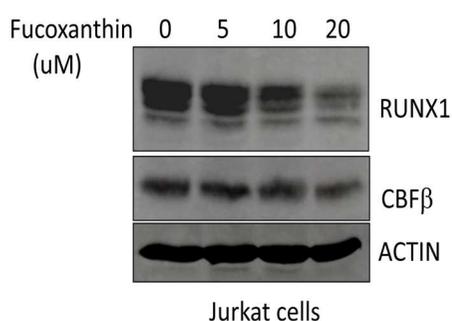


図 1 RUNX1 タンパク質発現解析

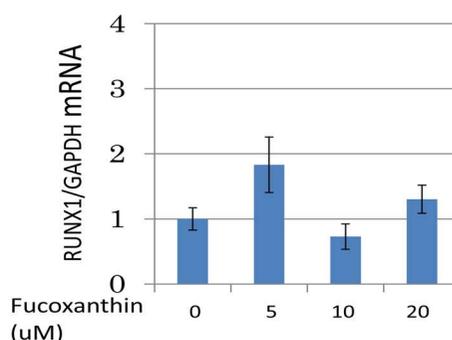


図 2 RUNX1 mRNA 発現解析

Jurkat をフコキサンチン処理した時の、細胞増殖に対する影響を調べた。フコキサンチン処理 24 時間後に細胞数を顕微鏡下で計測した。また、その際に、細胞膜の透過性の変化をトリパンブルー色素で染色することによって調べた。その結果、全細胞数としてはフコキサンチン処理によって少し減少した。そして約半数の細胞がトリパンブルー陽性細胞となっていた (図 3)。また、細胞質に存在する酵素 LDH の培養液への放出を調べた。フコキサンチン処理によって LDH が細胞外へ移動していることが観察された (図 4)。次に、フコキサンチンを Jurkat 細胞に投与した際の細胞死および細胞周期への影響を調べた。フコキサンチン処理では顕著な細胞周期の変化は見られず、また細胞死の時に生じる Sub-G1 期の増加も見られなかった (図 5)。細胞内へのトリパンブルーの取り込みや LDH の培養液への放出が起こっていたことから、フコキサンチン処理によって Jurkat 細胞の細胞膜の透過性が亢進していることが示された。このような結果は、他のカロテノイドである β -cryptoxanthin や β -carotene では見られなかった。細胞膜透過性亢進の結果が、RUNX1 のタンパク質の減少と関連するか調べるために、緑色蛍光タンパク質と融合させた RUNX1 を発現させるプラスミド (EGFP-RUNX1) を構築した。これを用いて、フコキサンチン処理時の RUNX1 タンパク質の挙動を解析する予定である。

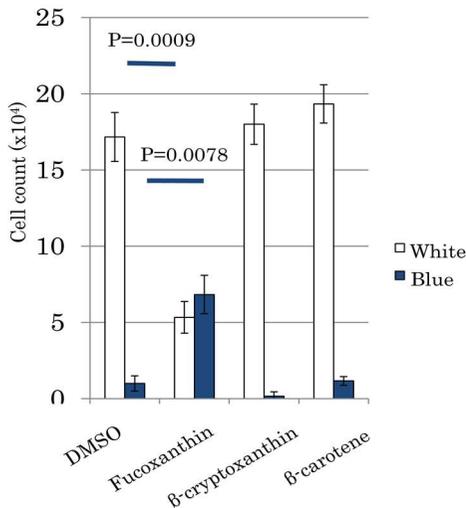


図3 細胞数の測定 (Jurkat)

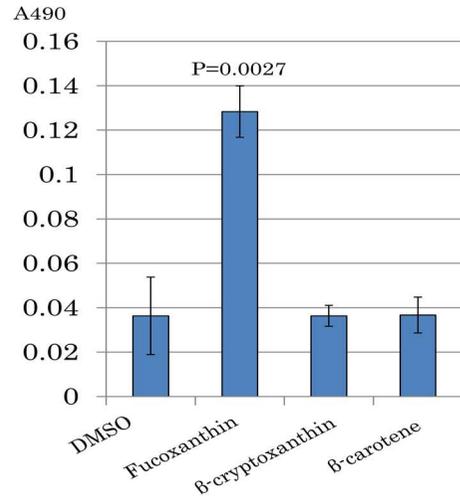


図4 LDH assay (Jurkat)

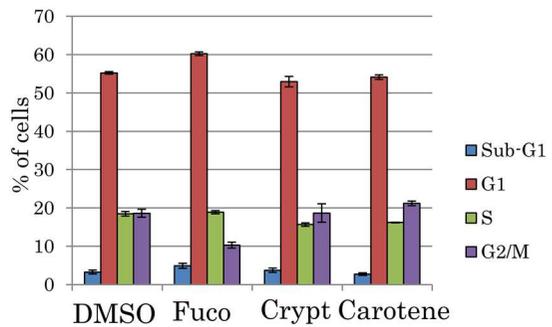
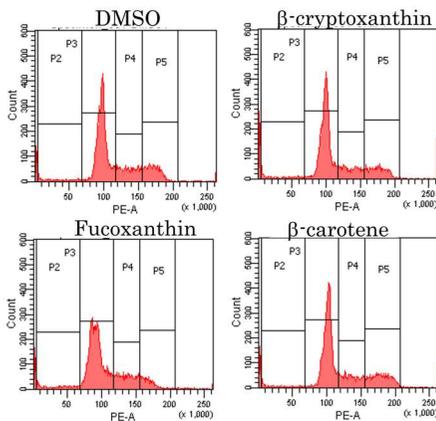


図5 細胞周期の解析 (Jurkat)

次に、RUNX1-ETO 遺伝子を発現する急性骨髄性白血病細胞へのフコキサンチンの影響を調べた。染色体転座 t(8:21)を有し RUNX1-ETO 遺伝子を発現している急性骨髄性白血病患者から樹立された Kasumi-1 細胞を用いて実験を行った。フコキサンチン処理した Kasumi-1 細胞をトリパンブルー染色し、細胞数計測をした結果、大部分の細胞がトリパンブルー陽性となり縮こまった細胞形態が観察された (図6)。LDH assay を行ったところ、フコキサンチン処理により LDH が培地中に放出されていることを確認した (図7)。次に、細胞周期に対する影響を調べた。Kasumi-1 細胞をフコキサンチン処理することによって 80%程の細胞が Sub-G1 期に移行していた (図8)。

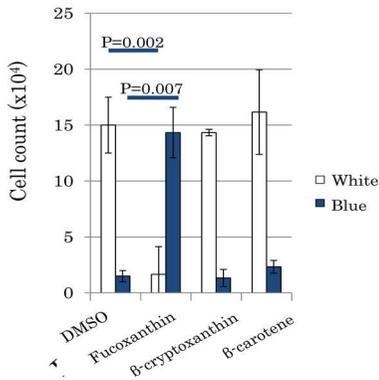


図6 細胞数の測定 (Kasumi-1)

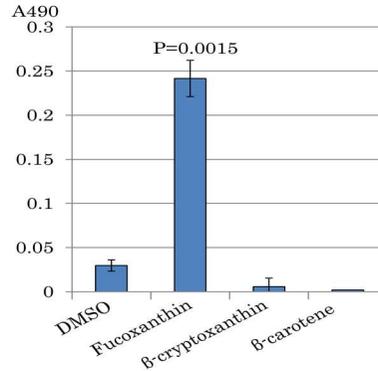


図7 LDH assay (Kasumi-1)

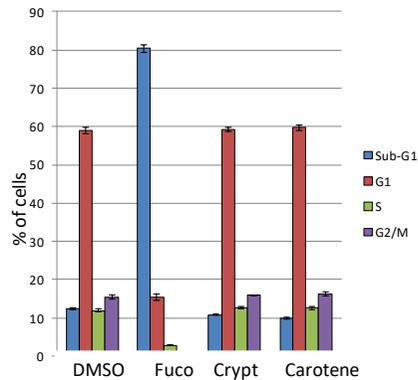
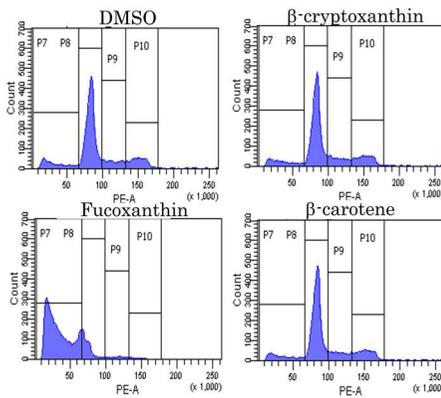


図8 細胞周期の解析 (Kasumi-1)

細胞死にはアポトーシス (TypeI)、オートファジー細胞死 (TypeII)、ネクローシス (TypeIII) がある。アポトーシスではカスパーゼによって活性化された DNA 分解酵素が活性化して DNA の断片化が生じ、Sub-G1 期の増加がみられる。そこで、フコキサンチン処理による Kasumi-1 細胞の細胞死がアポトーシスか調べるため、カスパーゼ阻害剤 z-VADfmk と併用処理をした。その結果、フコキサンチンが誘導する細胞死はアポトーシスの実行因子であるカスパーゼの阻害剤によって抑制できなかった (図 9)。フコキサンチンは Kasumi-1 細胞に対してアポトーシスとは異なる特殊な細胞死を誘導していると考えられた。

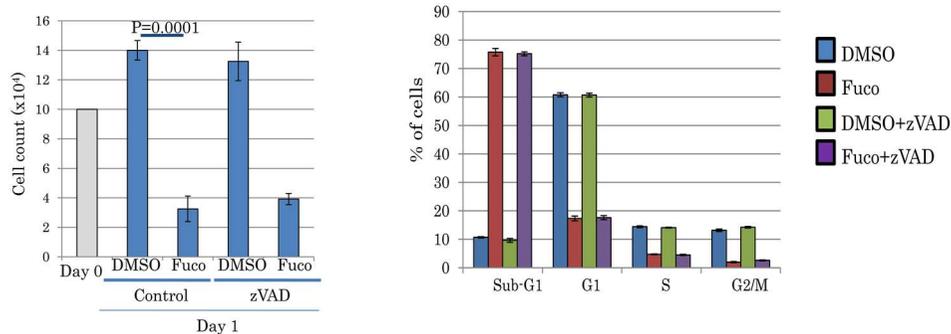


図9 フコキサンチンによるカスパーゼ非依存的細胞死誘導

以上をまとめると、フコキサンチンは血球分化を制御する転写因子 RUNX1 をタンパク質レベルで調節することが示された。また、フコキサンチンは細胞膜の透過性を亢進させていた。RUNX1 に異常を持つ急性骨髄性白血病に対してフコキサンチンは顕著に細胞死を誘導したが、従来のアポトーシスとは異なる細胞死を誘導していることが示唆された。

4. 謝辞

本研究を実施するにあたり、御支援いただいたサッポロ生物科学振興財団に深く感謝申し上げます。

5. 引用文献

- (1) D'Orazio N, Gemello E, Gammone MA, de Girolamo M, Ficoneri C, Riccioni G. Fucoxanthin: a treasure from the sea. *Mar Drugs*. 2012 ;10(3):604-16.
- (2) Das SK, Hashimoto T, Shimizu K, Yoshida T, Sakai T, Sowa Y, Komoto A, Kanazawa K. Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. *Biochim Biophys Acta*. 2005 ;1726(3):328-35.
- (3) Yoshida T, Maoka T, Das SK, Kanazawa K, Horinaka M, Wakada M, Satomi Y, Nishino H, Sakai T. Halocynthiaxanthin and peridinin sensitize colon cancer cell lines to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Mol Cancer Res*. 2007 ;5(6):615-25.
- (4) Okuda T, Takeda K, Fujita Y, Nishimura M, Yagyu S, Yoshida M, Akira S, Downing JR, Abe T. Biological characteristics of the leukemia-associated transcriptional factor AML1 disclosed by hematopoietic rescue of AML1-deficient embryonic stem cells by using a knock-in strategy. *Mol Cell Biol*. 2000 ;20(1):319-28.

(5) Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 ;88(23):10431-4.

(6) Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Takeuchi K, Maki K, Ogawa S, Chiba S, Mitani K, Hirai H. Mutations of the AML1 gene in myelodysplastic syndrome and their functional implications in leukemogenesis. Blood. 2000 ;96(9):3154-60.