

令和5年度 牛乳乳製品健康科学 学術研究 報告書

乳製品特有の脂肪酸ルーメン酸による抗腫瘍作用の

作用機構解析

氏名 平田 祐介

所属研究機関 東北大学大学院薬学研究科

2024年5月13日

要旨

ルーメン酸は、ウシやヤギなどの反芻動物の胃の中の微生物の酵素反応によって産生される共役脂肪酸（複数の炭素-炭素間二重結合が隣接した構造を持つ脂肪酸：conjugated-linoleic acid (CLA)）である。その異性体である 10-CLA とともに、牛乳・ヨーグルト・チーズなどの乳製品中に特に豊富に存在する。古くから様々な効能が知られ、特にその抗腫瘍作用に関する多くの報告がなされてきたが、その具体的な作用機構は不明であった。我々は最近、これらの CLA ががん細胞に取り込まれると、新規プログラム細胞死「フェロトーシス」を惹起することを見出した。フェロトーシスは、鉄依存的な脂質過酸化が起点となって引き起こされる細胞膜破壊を伴う細胞死であり、鉄や活性酸素を豊富に含むがん細胞の感受性が特に高いことが報告されており、新たながん治療薬開発の上で有力な創薬ターゲットとして着目されている。しかしその一方で、フェロトーシスは、神経変性疾患や肝・腎臓をはじめとした臓器障害など、様々な疾患発症・増悪の要因になることから、フェロトーシス誘導剤をがん治療に応用する上で、正常細胞に対する副作用が少なく、かつがん細胞に対する有効性・選択性が高い薬剤の開発・創出が必須となる。ルーメン酸や 10-CLA は、乳製品から日常的に摂取しており、安全性が非常に高い食品中成分である上に、がん細胞をフェロトーシスによって選択的に殺傷できる作用を有するという点で、副作用の少ない理想的な抗がん剤となり得るが、詳細なフェロトーシス誘導機構については未解明である。また、CLA 感受性が高いがん細胞種を特定し、がん細胞選択的なフェロトーシスの誘導効率を高める工夫も必要となる。そこで本研究では、上記の課題解決のため、日常的な乳製品の摂取による潜在的ながんの予防・治療効果を明らかにし、その効果を最大限発揮するための食生活や生活習慣の工夫・改善策も併せた提案を目指すことで、乳製品を通して国民の健康長寿増進に貢献することを目的とした。

ヒト繊維肉腫 HT1080 細胞、ヒト肺がん細胞 A549 細胞にルーメン酸、10-CLA を処置すると、濃度依存的に細胞死が引き起こされ、過酸化脂質の消去剤 ferrostatin-1 や鉄キレーター-deferoxamine の共処置によって、細胞死がキャンセルされた。CLA 処置時に、過酸化脂質の蓄積に伴って、glutathione peroxidase 4 (GPX4)のタンパク質分解が起きており、この分解は、シャペロン介在性オートファジーの阻害剤 CDDO、あるいはミトコンドリアにおける活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) の消去剤 mite-TEMPO の共処置で抑制された。CLA 処置時には、ミトコンドリアにおける ROS および lipid ROS の増大が認められた。以上の結果から、ルーメン酸や 10-CLA などの CLA は、細胞に取り込まれたのちにミトコンドリアに蓄積し、ROS/lipid ROS を産生することで GPX4 の CMA 分解を誘導し、フェロトーシスを惹起することが明らかになった。なお、CLA による抗がん作用は、がん細胞種間で感受性が大きく異なっており、HT1080、A549 以外の 6 種類の由来の異なるがん細胞では、10-CLA を高濃度で処置しても、細胞死が認められなかった。予備的データから、血清中に、CLA 感受性を規定する重要因子が存在することが判明しており、今後は当該因子の特定を進めるとともに、CLA による抗がん作用が効率よく発揮できる条件の同定と、そのがん予防・治療への応用を目指していきたい。

1. 緒言

共役脂肪酸とは、その炭素骨格中の複数の二重結合が共役（隣接）した部分構造を持つ脂肪酸の呼称であり、その代表的なものとして、リノール酸およびリノレン酸の異性体である共役リノール酸（conjugated-linoleic acid: CLA）と共役リノレン酸が知られる。ルーメン酸などの共役リノール酸（Fig. 1）は、ウシをはじめとする反芻動物の胃の中に存在する共生微生物によって酵素的に産生される一方、 α -エレオステアリン酸などの共役リノレン酸は、桐の種子をはじめ、一部の植物中に豊富に存在することが知られている。なお、いずれの共役脂肪酸にも、少なくとも1つ以上のトランス型二重結合が存在することから、共役脂肪酸は、天然由来のトランス脂肪酸に分類される（Fig. 1）。

本研究で特に着目した CLA には、抗腫瘍作用、抗肥満作用、インスリン抵抗性や動脈硬化症の改善作用など、様々な有益な作用が報告されており、例えば、乳製品中に豊富に存在するルーメン酸およびその異性体の1つ 10-CLA（Fig. 1）は、サプリメントなどとして利用されてきた経緯がある¹。本研究で着目した CLA の代表的な作用である抗腫瘍作用については、古くから着目され研究がなされており、アポトーシス誘導によるものであると考えられてきた^{2,3}。しかしながら、細胞死誘導機構について、一貫した結論が出ておらず、不明な点が残されていた。

本研究ではまず、様々なトランス脂肪酸、シス脂肪酸（生体内で合成される通常の脂肪酸）を細胞に単独処置した際の細胞生存率を解析した。その結果、興味深いことに、代表的な CLA であるルーメン酸のみ、顕著な細胞死の誘導が認められた。この細胞死は、アポトーシスの阻害剤（Z-VAD）では全く抑制されなかった一方、フェロトーシスの阻害剤 ferrostatin-1（過酸化脂質の消去剤）によって顕著に抑制されたことから、フェロトーシスによるものであることが示唆された。フェロトーシスは、鉄依存的な脂質過酸化反応が起点となって引き起こされる制御性細胞死の1つである。がん細胞は一般に、鉄や活性酸素を多く含むことなどから、フェロトーシスに脆弱であることが知られており、新規創薬ターゲットとして非常に注目されている。以上の背景・経緯を踏まえ、本研究では、ルーメン酸などの CLA によるフェロトーシス誘導機構について、詳細な解析を行った。

2. 方法

2.1. 試薬

本実験では以下の試薬を使用した。Ferrostatin-1 は Sigma より購入した。CDDO (2-amino-5-chloro-N,3-dimethylbenzamide) は Wako より購入した。moto-TEMPO (MT)、MG132 は Santa Cruz より購入した。Z-VAD はペプチド工業より購入した。Rucaparib は Selleck より購入した。Erastin、デフェロキサミン (DFO)、Triacsin C (Tri C)、Perhexiline は Cayman より購入した。Chloroquine (CQ)、CCCP は Nakalai Tesque より購入した。Liperfluo、mitoPeDPP は Dojindo より購入した。LipiRADICAL Green は Funakoshi より購入した。MitoSOX は Invitrogen より購入した。

2.2. 細胞培養

本研究で使用した細胞は 5%CO₂-95%空気を気相として 37 °C の CO₂ インキュベーター (BIO LABO) 内で培養した。HEK293A、HEK293T、A549、MEF 細胞は 5% FBS、HT1080、DU145、PC3、MCF-7、DLD1 細胞は 10% FBS を含む DMEM (Nacalai Tesque) で維持、継代して使用した。MDA-MB-468 は 10% FBS を含む RPMI 1640 (Nacalai Tesque) で維持、継代して使用した。

2.3. 脂肪酸の調製

エイラジン酸 (Sigma)、リノール酸、リノエライジン酸、(10E,12Z)-CLA (10-CLA)、(9Z,11E)-CLA (RA)、(9Z,11Z)-CLA (ZZ)、(Cayman Chemical)、トランスバクセン酸 (Olbracht Serdary Research Laboratories) をそれぞれ 0.1 N NaOH に 70 °C で溶解し、100 mM に調製した。さらに、fatty acid-free BSA (Sigma, pH7.4) を 55 °C、10 分間反応させることにより抱合し、5 mM 脂肪酸ストック溶液 (10% BSA) とした。このストック溶液を、BSA の終濃度が 1%となるように希釈し、細胞への処置に用いた。

2.4. フローサイトメトリー

12-well プレートに播種した細胞を刺激した後、下記の ROS 検出プローブを加えた DMEM FBS (-) にメディアウムチェンジし、37°Cで 30 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、トリプシン処理によって細胞を回収し、PBS に懸濁したものを、フローサイトメーター (CytoFLEX, Beckman Coulter) で蛍光強度を測定することにより ROS 産生量を算出した。フローサイトメトリーには EC800 (Sony) を、データ解析には CytoExpert を使用した。

プローブ	対象	濃度	励起波長	蛍光波長
LiperFluo	過酸化脂質	1 μM	488 nm	525 nm
LipiRADICAL green	過酸化脂質	2 μM	488 nm	525 nm

mitoPeDPP	ミトコンドリア膜過酸化脂質	0.5 μ M	488 nm	525 nm
MitoSOX	ミトコンドリア ROS	5 μ M	488 nm	585 nm

2.5. Real-time PCR

細胞からの RNA 抽出は、Sepasol-RNAI (Nacalai Tesque) を用いて行った。24-well プレートに播種し刺激した細胞に 200 μ L Sepasol-RNA I を加え、室温で 20 分振盪して細胞を溶解した。これに 100 μ L chloroform/isoamylalcohol (50:1) を加えてよく混合し、3 分静置した後、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 15 分遠心して上層を回収した。そこに等量の 2-propanol を加えてよく攪拌し、室温で 10 分静置した。その後、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分遠心し、70% ethanol でペレットを洗浄後、風乾し、DEPC 処理水 (Nuclease free water) (Nacalai Tesque) に溶解した。RNA 濃度は OD₂₆₀ を測定することにより算出した。cDNA 合成には、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用した。抽出した 1000 ng の RNA を 5 μ L、5 μ L の 2 \times RT master mix*を加え、サーマルサイクラーにて、25 $^{\circ}$ C で 10 分、37 $^{\circ}$ C で 120 分、さらに 85 $^{\circ}$ C で 5 分反応させた。合成した cDNA を TE buffer で 5 倍希釈して用いた。Real-time PCR は Luna Universal Probe qPCR Master Mix Mix (New England Biolabs) を使用し、反応液を下記のように調製して Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (タカラバイオ) を用いて行った。反応は、95 $^{\circ}$ C で 2 分処理後、変性を 95 $^{\circ}$ C で 15 秒、アニーリングおよび伸長反応を 60 $^{\circ}$ C で 1 分とし、これを 40 サイクル行った。

2.6. Western blot

1% protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) および 0.5% phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) を加えた DISC Lysis-Tx1 buffer (20mM Tris-Hcl [pH7.4], 150mM NaCl, 1% Triton-X100, 10% Glycerol) にて細胞溶解後、遠心して得られた各上清に 6 \times sample buffer*を加え、98 $^{\circ}$ C で 3 分間加熱し、サンプルとした。SDS-PAGE は、9%あるいは 14% ポリアクリルアミド分離ゲルに 4%ポリアクリルアミド濃縮ゲルを重層したゲルを作製し、電気泳動に用いた。調製したサンプルを定電流にて電気泳動し、サンプル中のタンパク質をアクリルアミドゲル上で分離した。ゲルから polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Immobilon-P; Merck Millipore) にタンパク質を転写し、5% スキムミルクを含む TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で室温にて 1 時間以上ブロッキングした後、5% スキムミルクまたは 5% BSA で希釈した一次抗体で 4 $^{\circ}$ C にて一晚反応させた。その後、5% スキムミルクを含む TBS-T で希釈した二次抗体で室温にて 1 時間反応させた。検出は Enhanced Chemiluminescence (ECL) システム (Merck Millipore) にて行った。一次抗体として、抗 GPX4 抗体 (Abcam)、抗 LC3 抗体 (MBL)、抗 LAMP2 抗体、抗 ATG5 抗体 (Santa Cruz)、抗- β -Actin 抗体 (Wako) を使用した。二次抗体として、いずれも HRP 標識した抗 mouse IgG 抗体、抗 rabbit IgG 抗体、抗 rat IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた。

2.7. 細胞生存率の測定 (PMS/MTS assay)

96-well プレートに播種した細胞を刺激した後、PMS/MTS (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxyphenyl) -2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium, inner salt/phenazine methosulfate) assay (Cell Titer 96 Cell Proliferation Assay, Promega) 混合液 (20:1) を加え 37°C でインキュベートし、マイクロプレートリーダー (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation) で 490 nm の吸光度を測定することにより細胞生存率を算出した。

2.8. 細胞死率の測定 (LDH assay)

LDH assay は、LDH-Cytotoxic Test Kit (Wako) を用いて、メーカーのプロトコルに従って実施した。96-well プレートに播種した細胞を刺激した後、測定の前 30 分に 0.2% Tween20 を処置し、完全に細胞膜を破壊した細胞の培養上清中に放出された LDH の活性レベルを 100%として、各サンプル上清中に放出された LDH の活性レベルから細胞死率を算出した。マイクロプレートリーダーにより 570 nm における吸光度を測定した。

2.9. ノックダウン (siRNA transfection)

6 well-plate に細胞を播種し、over night (o/n) 後にトランスフェクションを行った。siRNA (10 μM) 1~2 μL と、siRNA と等量の Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) を Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) に加え、総量 50 μL とし、ボルテックスにより攪拌して 20 分間静置したのち、培養上清中に全量を添加した。トランスフェクションから 48 時間後に細胞をプレートから剥がして播種し直し、o/n 後に薬物処理を行った。使用した siRNA (Gene Design) の配列は以下の通りである。なお、Negative control siRNA として non-targeting siRNA pool (Dharmacon) を用いた。

Gene	Sequence (5'→3')
ACSL1 #1	CAUAGUGAGCGAUUGUUCA
ACSL1 #2	GUGUGAAAGGGCCAAAUGU
ACSL4	GAUCUAGUGAAGUUACAAG
ATG5 #1	UCCAACUUGUUUCACGCUAUA
ATG5 #2	CUAGGAGAUCUCCUCAAGAA

2.10. LAMP2A 欠損細胞の作製

LAMP2A 欠損細胞の作製には、CRISPR/Cas9 システムを用いた。guide RNA (gRNA)

は、CRISPR direct を利用して設計した。gRNA (5'- AGCTGTGCGGTCTTATGCAT -3') を lentiCRISPRv2 plasmid にクローニングし、packaging plasmid Pax2 および envelope plasmid pVSV-G と共に HEK293T 細胞にトランスフェクションした。回収した上清により HT1080 細胞に感染し、puromycin 耐性によりセレクションした後に、限界希釈法によってクローン化した。LAMP2A 欠損は、抗 LAMP2 抗体を用いたウェスタンブロットにより行った。

2.11. GSH 量の測定

12-well プレートに播種した細胞を刺激した後、5% TCA (trichloroacetic acid with 5 mM EDTA) を 200 μ L 加え、セルスクレーパーを用いて細胞を回収した。細胞懸濁液を 3000 g、4°C で 10 分遠心して得られた上清を別のサンプルチューブに回収し、1 M potassium borate buffer (pH 10.5) with 5 mM EDTA を 350 μ L、および 0.2% SBD-F (7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid ammonium) (SH 定量用蛍光試薬) を 50 μ L 加えた後、60°C で 30 分加熱した。室温まで冷ました後、4 M HCl を 50 μ L 加えて反応を停止し、これをサンプルとした。サンプルの測定は HPLC を用いて行い、SBD-F の蛍光強度をモニタリングした (励起波長: 384 nm, 蛍光波長: 516 nm) [100]。

Column	ODS-80TM (東ソー)
Buffer	0.1 M citrate buffer (pH 3.2)
Flow rate	1 mL/min
Detector	Ex: 384 nm, Em: 516 nm

2.12. 統計解析

各実験で得られた値は平均値および標準偏差を算出した。有意差検定には GraphPad Prism (ver. 9.5.1) を使用した。二群間の有意差検定には Student's *t* 検定を用いた。多群間の有意差検定には、一元配置分散分析 (One-way ANOVA) あるいは二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) の後に、Tukey-Kramer 法または Dunnett 法による多重比較検定を行った。有意水準は両側 5% 以下とした。NS, not significant; **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001。

3. 結果

3.1. ルーメン酸は抗腫瘍作用を有する

ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 に対して、共役リノール酸のルーメン酸 (RA) を含む、様々なトランス脂肪酸、シス脂肪酸 (Fig. 1) を単独処置した際の細胞生存率を調べた。その結果、食品中に存在する主要なトランス脂肪酸であるエライジン酸 (EA)、リノエライジン酸 (LEA)、パルミトエライジン酸 (PEA)、トランスバクセン酸 (TVA)、およびオレイン酸 (OA)、リノール酸 (LA) などのシス脂肪酸は、いずれも細胞毒性を示さなかったのに対し、RA は同濃度の処置で細胞生存率が顕著に低下した (Fig. 2a)。今回比較検討した脂肪酸は、いずれも炭素数 18 であるが、特に、LEA と LA については、二重結合の数が 2 つで、RA と同数である。したがって、RA は、共役型二重結合依存的に、強力に細胞死を誘導することが示唆された。

3.2. CLA による細胞死誘導作用の濃度依存性およびタイムコースの解析

そこで次に、RA を含む CLA 構造異性体について、細胞死誘導能の強弱を調べた (Fig. 2b)。その結果、いずれの異性体においても濃度依存的に顕著な細胞死が誘導されたが、10-CLA の方が RA よりも僅かに細胞死誘導能が高く、すべての二重結合をシス型に置換した異性体 ZZ (Fig. 1) で、細胞死誘導能が最も低かった。また、細胞死のタイムコースについても解析したところ、4 時間を境に細胞死が誘導されることが判明した (Fig. 2c)。

3.3. CLA が誘導する細胞死はフェロトーシスである

CLA によって誘導される細胞死の様式を調べるため、各種制御性細胞死の阻害剤を CLA と共処置した際の細胞生存率を解析した。その結果、Z-VAD (アポトーシス阻害剤)、Rucaparib (パータナトス阻害剤) の共処置では細胞死が全く抑制されず、nec-1 (ネクロトーシス阻害剤) の共処置では部分的な抑制が認められた (Fig. 2d)。一方、Fer-1 (フェロトーシス阻害剤) を共処置した場合には、細胞死がほぼ完全に抑制された。なお、nec-1 はオフターゲット効果によりフェロトーシスを抑制することが過去に報告されており⁴、実際に過去の文献と同様、その改良版である nec-1s の共処置では、細胞死は全く抑制されなかった (Fig. 2e)。したがって、CLA が誘導する細胞死はフェロトーシスであることが示唆された。この細胞死がフェロトーシスであることをさらに裏付けるために、フェロトーシス阻害剤として汎用される鉄キレーター deferoxamine (DFO)、ACSL 阻害剤 Triacsin C (Tri C) を使用したところ、いずれの共処置によっても、10-CLA 処置時の細胞死がほぼ完全に抑制された (Fig. 2f)。また、フェロトーシスは過酸化脂質 (Lipid ROS) の蓄積によって惹起される細胞死であることから、2 種類の過酸化脂質検出プローブ Liperfluo および LipiRADICAL Green を用いて、CLA 処置時の細胞内過酸化

脂質量についても解析した結果、いずれを用いた場合も有意に増大していることが判明した (Fig. 2g-h)。以上の結果から、CLA の処置によって過酸化脂質の蓄積、およびそれに伴うフェロトーシスが誘導されることが示唆された。

3-4. CLA は GPX4 のタンパク質分解を誘導する

CLA によるフェロトーシス誘導機構を探るため、これ以降、活性がより強く認められた 10-CLA を主に利用して解析を行なった。フェロトーシスの最も重要な防御因子である GPX4 (Glutathione peroxidase 4) に着目した。GPX4 は、還元型グルタチオン (GSH) を補酵素として膜リン脂質中の過酸化脂質を恒常的に還元し、無害なアルコールへと変換することで、過酸化脂質の蓄積を防ぎ、細胞の生存を維持している^{5,6}。何らかの要因で GSH が枯渇、あるいは GPX4 の活性や発現が低下すると、過酸化脂質が蓄積し、フェロトーシスが惹起される^{5,6}。そこでまず、CLA 処置時の細胞内 GSH 量を調べたところ、有意な低下は認められなかったことから、CLA は細胞内 GSH 量には影響を与えないことが判明した (Fig. 3a)。次に、CLA 処置時の GPX4 のタンパク質発現をウェスタンブロットにより解析した結果、細胞死が起き始めるより前から (Fig. 2c)、CFA の処置時間依存的に GPX4 の発現量低下が認められた (Fig. 3b)。この時、GPX4 の mRNA レベルに変動は認められなかったことから (Fig. 3c)、GPX4 は CLA 処置に伴って細胞内において分解を受け、タンパク量が減少することが示唆された。

3-5. CLA はシャペロン介在性オートファジーによる GPX4 分解を促進する

細胞内には 2 つの主要なタンパク質分解機構が存在する⁷。1 つは、ユビキチン-プロテアソーム分解系で、標的タンパク質に付加されたユビキチン (Ub) 鎖をプロテアソームが認識し、ATP 依存的に分解する系で、もう 1 つは、オートファジー-リソソーム分解系である。そこで、10-CLA 処置時の GPX4 の分解が、いずれの分解系によるものか、プロテアソーム阻害剤 MG132、リソソーム阻害剤 Chloroquine (CQ) を共処置することで検証した。その結果、MG132 処置時には GPX4 の分解が全く抑制されなかった一方で (Fig. 4a)、CQ 処置時には顕著に抑制されたことから (Fig. 4b)、10-CLA 処置時に GPX4 はリソソーム分解されることが示唆された。オートファジーにはさらに 3 つの様式が存在していることが知られている⁸。それぞれ、マクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーと呼ばれ、前者 2 つは標的タンパク質を内包するオートファゴソームと呼ばれる隔離膜の形成、およびその隔離膜上に LC3-II というタンパク質の蓄積を伴うことが特徴的である⁸。一方、シャペロン介在性オートファジー (CMA: chaperone-mediated autophagy) は、隔離膜の形成を伴わず、KFERQ-like モチーフと呼ばれる特定のアミノ酸配列を有するタンパク質が、HSP90 などのシャペロン分子およびリソソーム上の receptor である LAMP2A を介して、分解基質としてリソソーム内部に直接取り込まれて分解される、LC3 非依存的な分解機構である⁸。10-CLA 処置時に、わずかに LC3-II の蓄積が認められたことから (Fig. 4a)、GPX4 の分解

におけるマクロオートファジー/ミクロオートファジーの関与が示唆された。そこで、両様式のオートファジーに必須のオートファジー関連タンパク質 *ATG5*⁹ をノックダウンした条件下で解析を行なったところ、細胞死、GPX4 の分解いずれも全く抑制されなかった。したがって、マクロオートファジー/ミクロオートファジーはこの現象に関与しないことが示唆された (Fig. 4c)。一方、CMA の阻害剤である CDDO の共処置、あるいは、LAMP2A を欠損した細胞では、10-CLA 処置時の細胞死および GPX4 分解の抑制が認められたことから (Fig. 5a-c)、CLA によるフェロトーシス誘導には、GPX4 の CMA 依存的な分解が重要であることが判明した。

3-6. CLA はミトコンドリアに蓄積し、ROS/lipid ROS の産生を介して GPX4 分解を促進する

CLA がどのようにして CMA を介して GPX4 の分解を誘導しているのか、その作用点を明らかにするため、CLA を含む多様な脂肪酸の体内動態を制御する ACSL ファミリー (acyl-CoA synthetase long-chain family) に着目した。ACSL ファミリーは脂肪酸に補酵素 CoA を付加し、アシル CoA を合成する酵素群である。中でも、ACSL1,4 は脂肪酸代謝において重要な役割を担っており、例えば、ミトコンドリアの脂肪酸は ACSL1 によりアシル化されることで、CPT1/2 (carnitine palmitoyltransferase 1/2) というミトコンドリア外膜上のトランスポーターからミトコンドリア内に取り込まれる¹⁰。一方、ACSL4 は主に細胞膜上に局在しており、特に膜リン脂質に豊富なアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸をより選択的にアシル化する酵素であることから、フェロトーシス促進的に働くことが知られている¹¹。そこで、ACSL1/4 の CLA 誘導性細胞死への寄与について調べるため、各々の mRNA をターゲットとした siRNA を利用したノックダウン実験を行った。その結果、Erastin (GSH 枯渇によりフェロトーシスを誘導する薬剤) 処置時には、過去の報告と一致して *ACSL4* ノックダウンによってのみ細胞死が抑制されたのに対し、10-CLA 処置時細胞死は、*ACSL1/4* いずれのノックダウンによっても顕著に抑制された (Fig. 6a-b)。この結果より、CLA は ACSL1 を介してミトコンドリアに取り込まれて蓄積することで、細胞死を引き起こす可能性を想定した。特に、ミトコンドリアは主要な ROS 産生源でもあることから、CLA のミトコンドリア蓄積は、ミトコンドリアで ROS 産生を引き起こすことで、CMA を誘導するのではないかと考えた。この可能性について検証するため、まずはミトコンドリア ROS を特異的に検出可能な蛍光プローブ mitoSOX を用いてミトコンドリア ROS レベルを測定したところ、10-CLA 処置によりミトコンドリア ROS レベルの顕著な増大が認められた (Fig. 7a)。そこで次に、ミトコンドリア外膜上の脂肪酸トランスポーターある CPT1/2 の阻害剤 Perhexiline を共処置して解析したところ、CQ 共処置時と同程度に細胞死が抑制された (Fig. 7b)。さらに、ミトコンドリア ROS 特異的な消去剤である mitoTEMPO (MT) 共処置時には、細胞死 (Fig. 7c)、過酸化脂質レベル (Fig. 7d)、GPX4 の分解 (Fig. 7e) のいずれも顕著に抑制された。また、ミトコンドリアにおける脂質過酸化を特異的に検出可能な蛍光プ

ローブ mitoPeDPP を用いて、ミトコンドリア膜上の過酸化脂質レベルを測定したところ、これまでの結果と相関して、顕著な増大が認められた (Fig. 7f)。これらの結果から、CLA は ACSL1 および CPT1/2 依存的にミトコンドリアに取り込まれ、ミトコンドリア ROS/lipid ROS 産生を引き起こすことで、CMA 依存的な GPX4 分解を促進し、フェロトーシスを誘導することが示唆された。

3-7. CLA に対する感受性はがん細胞種によって大きく異なる

CLA に対する感受性が高いがん種の同定を目指して、さまざまながん細胞株に対して 10-CLA を処置した際の細胞生存率を評価した。その結果、ヒト繊維肉腫 HT1080 の感受性が最も高く (LC50: 23 μ M)、次がヒト肺がん細胞 A549 (LC50: 78 μ M) であった (Table 1)。その他に検討を行った、DU145、PD3 (前立腺がん細胞)、MCF7、MDA-MB-468 (乳がん細胞)、DLD1 (大腸がん細胞)、HeLa (子宮頸がん細胞) については、500 μ M の 10-CLA 処置でも細胞生存にはほとんど影響がなく、細胞死が起きなかった (Table 1)。これらの結果から、がん細胞種によって、CLA の感受性が大きく異なることが明らかになった。なお、がん由来の細胞ではない、MEF (マウス胎児線維芽細胞) や HEK293A (ヒト胎児腎臓由来細胞) についても、500 μ M の 10-CLA 処置では細胞生存に影響は認められなかった。

4. 考察

本研究より、CLA は細胞に取り込まれたのちにミトコンドリアに蓄積し、ROS/lipid ROS を産生することで GPX4 の CMA 分解を誘導し、フェロトーシスを惹起することが明らかになった (Fig. 8)。予備的な脂質解析のデータから、CLA を処置した HT1080 細胞中では、cytosol とミトコンドリアで CLA が同等量存在することが示唆されている。ミトコンドリアは、細胞内に占める体積が 10% に満たないことを考慮すると¹²⁻¹⁴、ミトコンドリアには CLA や約 10 倍程度濃縮されて存在すると考えられ、このように高濃度蓄積した CLA が、何らかの機構でミトコンドリア内での ROS 産生を引き起こすものと想定される。

CLA 蓄積によってミトコンドリアで産生された ROS/lipid ROS が、どのようにして CMA 依存的な GPX4 分解を引き起こすのかは、現在のところ不明である。CCCP (ミトコンドリア脱共役剤) は、ミトコンドリアで ROS を産生する代表的な薬剤の一つであるが、興味深いことに、CCCP 処置時にも GPX4 分解が起きることが判明しており、ミトコンドリアにおける ROS 産生は、CMA 依存的な GPX4 分解の重要なトリガーとして作用している可能性がある。

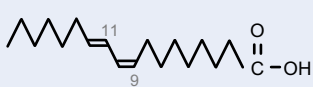
CLA に対する感受性は、今回テストしたがん細胞種の中では、HT1080 と A549 で特に高いことが分かったが、なぜ他のがん細胞種に耐性があるのかについては、今後検証を行なっていく必要がある。CLA のミトコンドリアにおける蓄積、ROS 産生、GPX4 分解の有無を細胞種間で比較することで、どのステップにがん細胞種間で差があるのか特定した上で、感受性の差を生み出している遺伝的背景の違いや遺伝子発現プロファイルの違いなどを明らかにしていきたい。予備的な検討から、細胞培養に使用するウシ胎児血清 (FBS) の由来の違いにより、CLA 感受性が大きく異なることが分かっており、血清成分中の CLA 感受性を規定する因子について、今後特定を目指すとともに、CLA 耐性のあるがん種で細胞死を惹起できるような工夫や改善が可能かどうか、検討を行っていきたい。

5. 結語

本研究成果により、ルーメン酸や 10-CLA などの共役リノール酸 (CLA) が、特にがん細胞において制御性細胞死フェロトーシスを引き起こす作用とその分子機構の一端が明らかになった。また、がん細胞種間で、CLA の感受性が大きく異なっており、繊維肉腫や肺がんなど、特定のがん由来の細胞種で特に細胞死を効率よく惹起できたことから、これらのがん種を標的とした予防・治療に対する CLA の将来的な応用が期待される。また、CLA 感受性を規定する血清中因子についても特定を進め、CLA による抗がん作用が効率よく発揮できる条件の同定とその応用を目指していきたい。

トランス脂肪酸

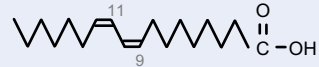
共役脂肪酸 (CLA)



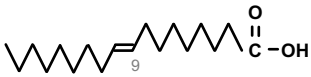
9Z,11E-CLA
(ルーマン酸, C18:2 c9,t11)



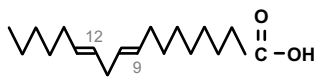
10E,12Z-CLA
(10-CLA, C18:2 t10,c12)



9Z,11Z-CLA
(ZZ, C18:2 c9,c11)



エライジン酸
(EA, C18:1 t9)



リノエライジン酸
(LEA, C18:2 t9,t12)

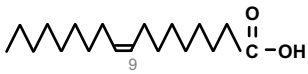


トランスバクセン酸
(TVA, C18:1 t11)



パルミトエライジン酸
(PEA, C16:1 t9)

シス脂肪酸



オレイン酸
(OA, C18:1 c9)



リノール酸
(LA, C18:2 c9,c12)

Fig. 1 本研究で利用した脂肪酸

構造中の数字 (グレー) は二重結合の位置を示す。括弧内は、左から順に、本文中における略称、炭素数、二重結合の数、二重結合の位置・シス/トランスの幾何異性を表す。t or E: trans, c or Z: cis

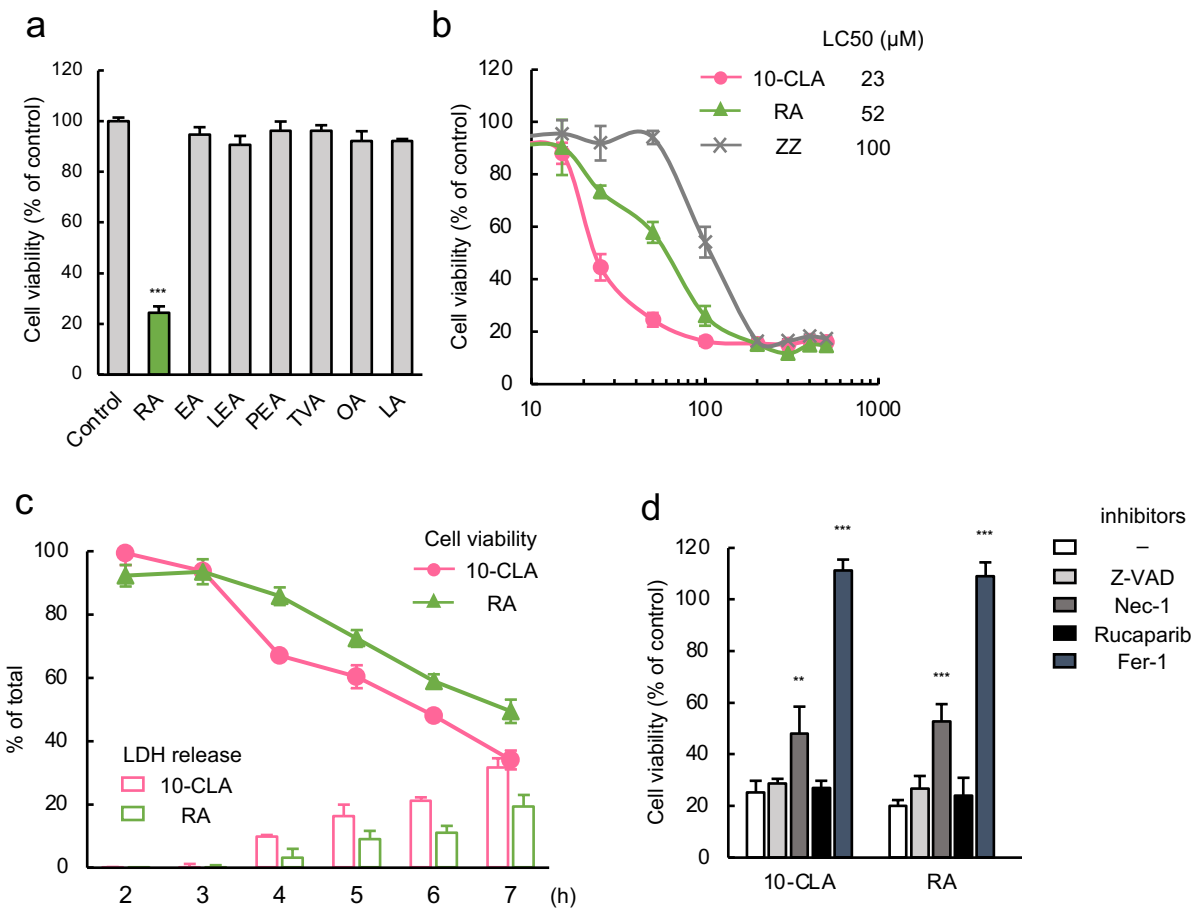


Fig. 2 CLAはフェロトーシスを誘導する

- (a) HT1080細胞に200 μMの各種脂肪酸を24時間処置し、細胞生存率を解析した。
- (b) HT1080細胞にCLA「10-CLA (trans-10, cis-12), RA (cis-9, trans-11), ZZ (cis-9, cis-11)」のいずれかを図示した濃度で24時間処置し、細胞生存率および濃度依存曲線を求めた。LC50: lethal concentration 50 (50%致死濃度)
- (c) HT1080細胞に200 μM 10-CLA/RAを図示した時間処置し、PMS/MTS assayにより細胞生存率(折れ線グラフ)を、LDH assayにより細胞死率(棒グラフ)を解析した。
- (d) HT1080細胞に20 μM Z-VAD、30 μM Nec-1、1 μM Rucaparib、5 μM Fer-1のいずれかを30分前処置後、200 μM 10-CLA/RA処置24時間後に細胞生存率を解析した。

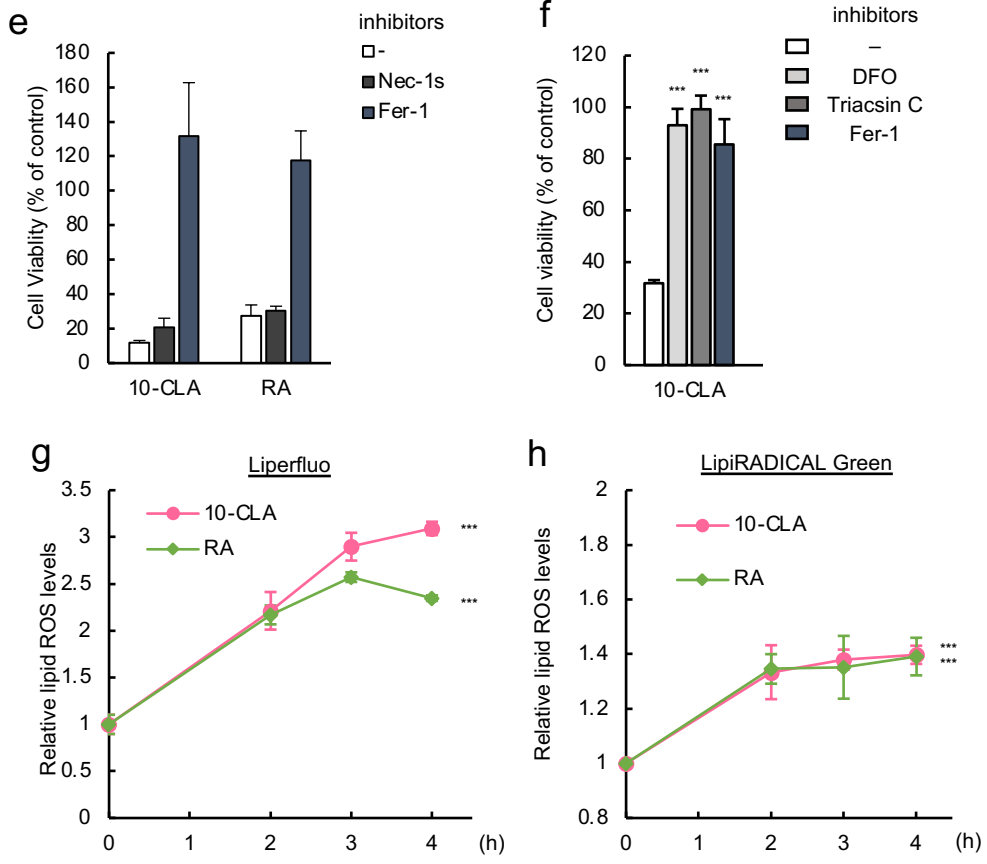


Fig. 2 CLAはフェロトーシスを誘導する (続き)

(e) HT1080細胞に30 μ M Nec-1s、5 μ M Fer-1のいずれかを30分前処置後、200 μ M 10-CLA/RA処置24時間後に細胞生存率を解析した。

(f) HT1080細胞に100 μ M DFO、5 μ M Triacsin C、5 μ M Fer-1のいずれかを30分前処置後、200 μ M 10-CLA/RA処置24時間後に細胞生存率を解析した。

(g-h) HT1080細胞に200 μ M 10-CLA/RAのいずれかを図示した時間処置した。その後、過酸化脂質蛍光プローブ Liperfluor (g)、LipiRADICAL Green (h)をそれぞれ30分間処置した後、緑色蛍光をフローサイトメトリーにより検出し、相対強度を求めた。

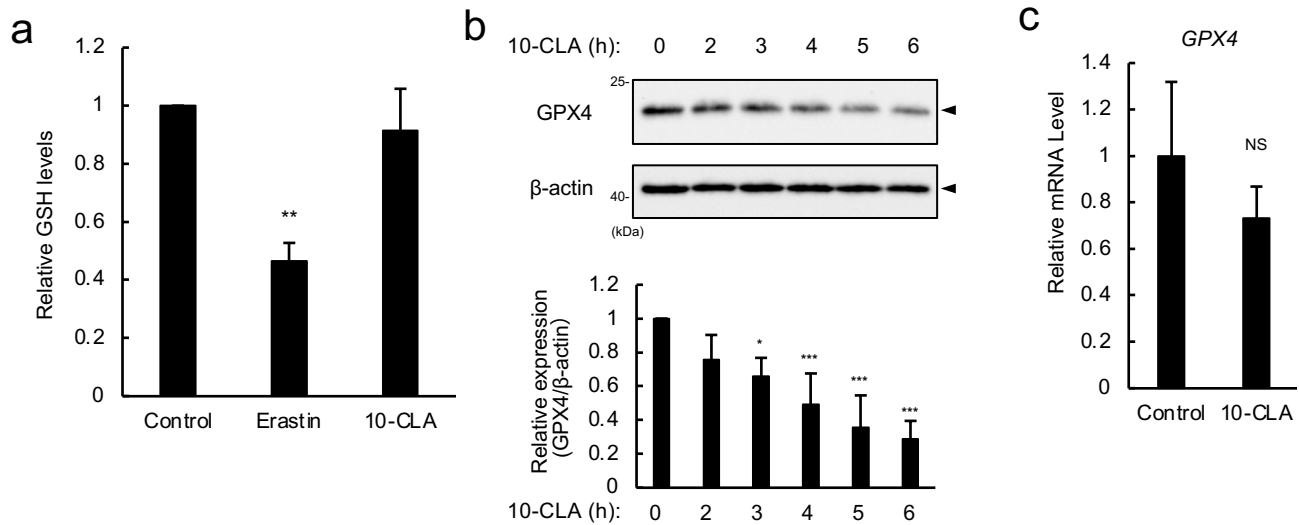


Fig. 3 CLAはGPX4のタンパク質分解を誘導する

- (a) HT1080細胞に200 μ M 10-CLAを4時間処置した。その後、HPLCにより細胞内GSH量を定量し、相対量を求めた。
 (b) HT1080細胞に200 μ M 10-CLAを図示した時間処置した後に細胞を回収した。タンパク調製後、各種抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い、GPX4の発現量を定量した。
 (c) HT1080細胞に200 μ M 10-CLAを4時間処置した際のGPX4遺伝子の発現誘導をqRT-PCRにより解析した。

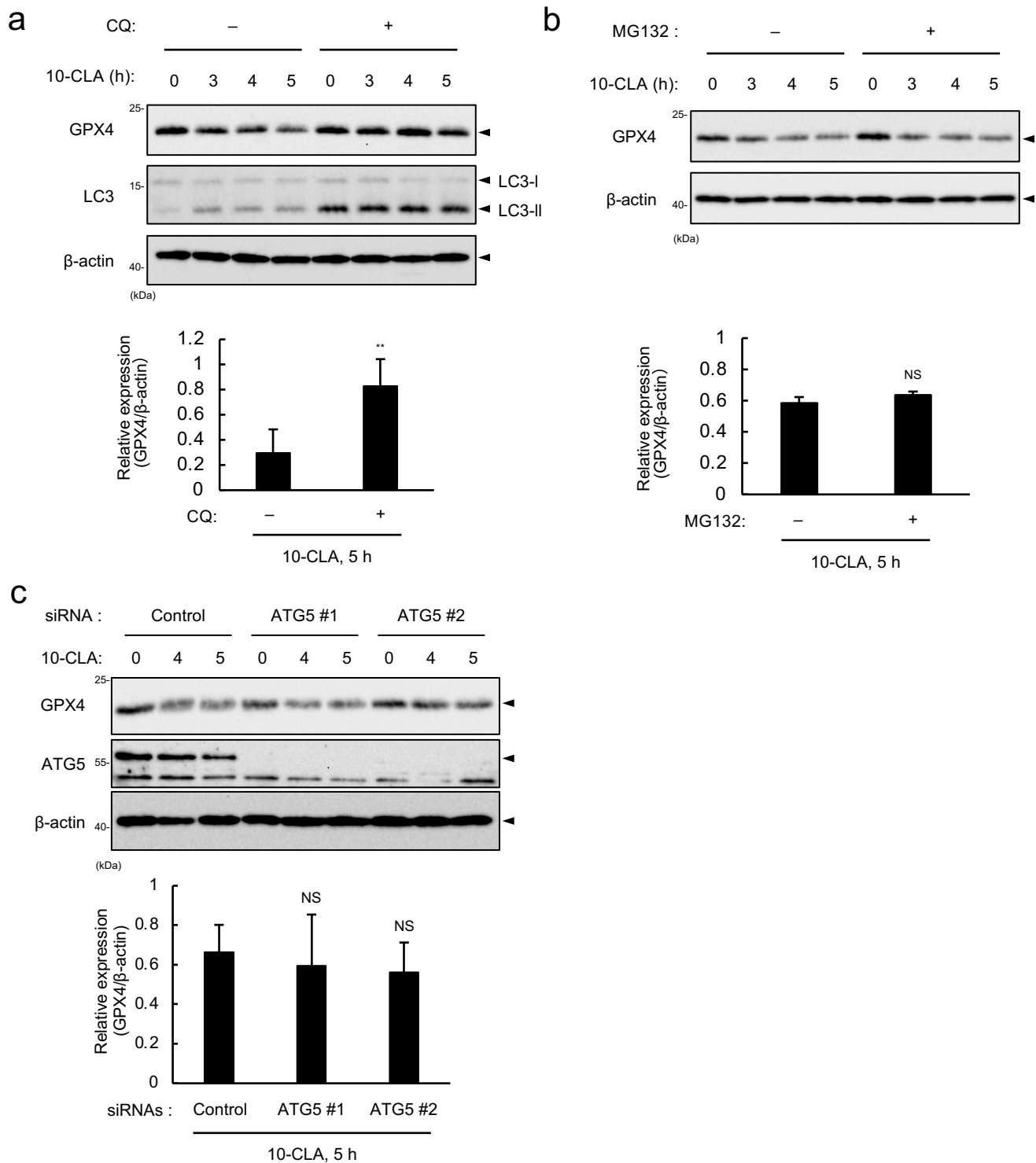


Fig. 4 CLAはGPX4のリソソーム分解を誘導する

(a-c) HT1080細胞に20 μ M CQ (a)、5 μ M MG132 (b)を30分前処置、あるいはATG5のノックダウンを行ったのちに(c)、200 μ M 10-CLAを図示した時間処置した後に細胞を回収した。タンパク調製後、各種抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

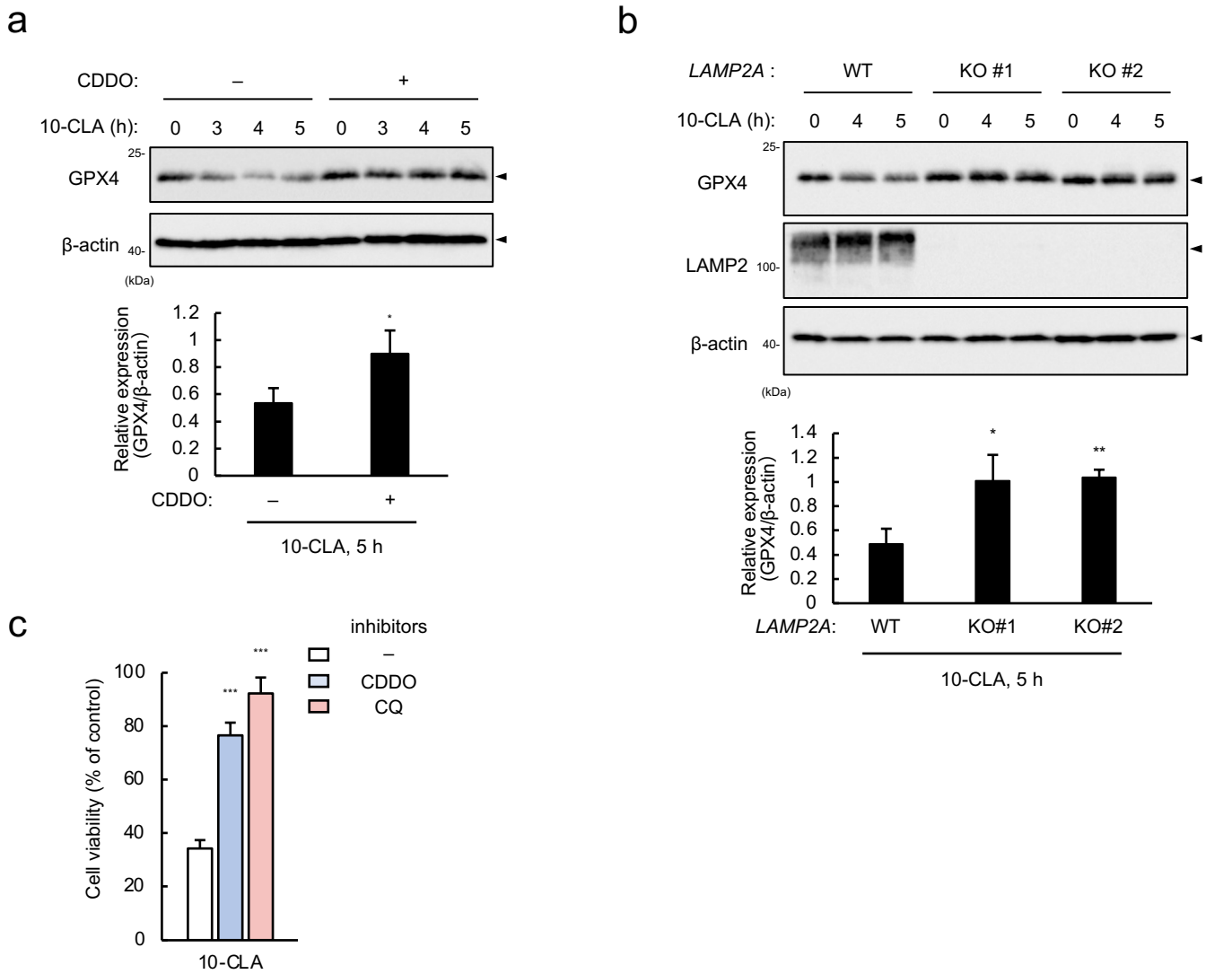


Fig. 5 CLAはGPX4のCMA分解を誘導する

- (a) HT1080細胞に5 μ M CDDOを30分前処置し、200 μ M 10-CLAを図示した時間処置した後に細胞を回収した。タンパク調製後、各種抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。
- (b) HT1080細胞 (WTおよびLAMP2A KO細胞) に 200 μ M 10-CLAを図示した時間処置した後に細胞を回収した。タンパク調製後、各種抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。
- (c) HT080細胞に5 μ M CDDO、20 μ M CQのいずれかを30分前処置し、100 μ M 10-CLA処置24時間後にPMS/MTS assayにより細胞生存率を解析した。

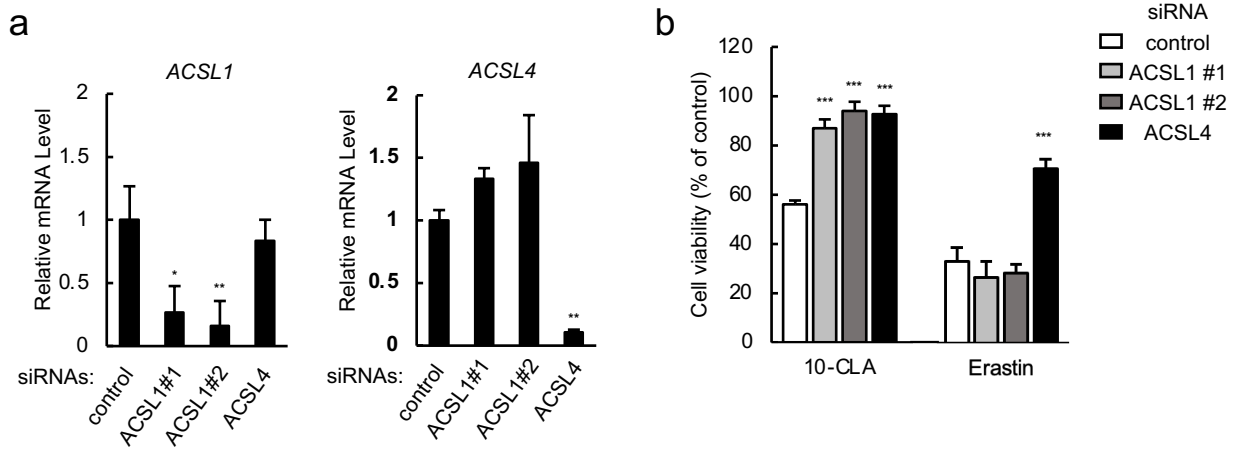


Fig. 6 CLAによる細胞死はACSL1/4の両方に依存する

(a) *ACSL1/4*をKDしたHT1080細胞における*ACSL1/4*の遺伝子の発現量をqRT-PCRにより解析した。

(b) *ACSL1/4*をKDしたHT1080細胞に200 μ M 10-CLA、20 μ M Erastinのいずれかを24時間処置し、PMS/MTS assayにより細胞生存率を解析した。

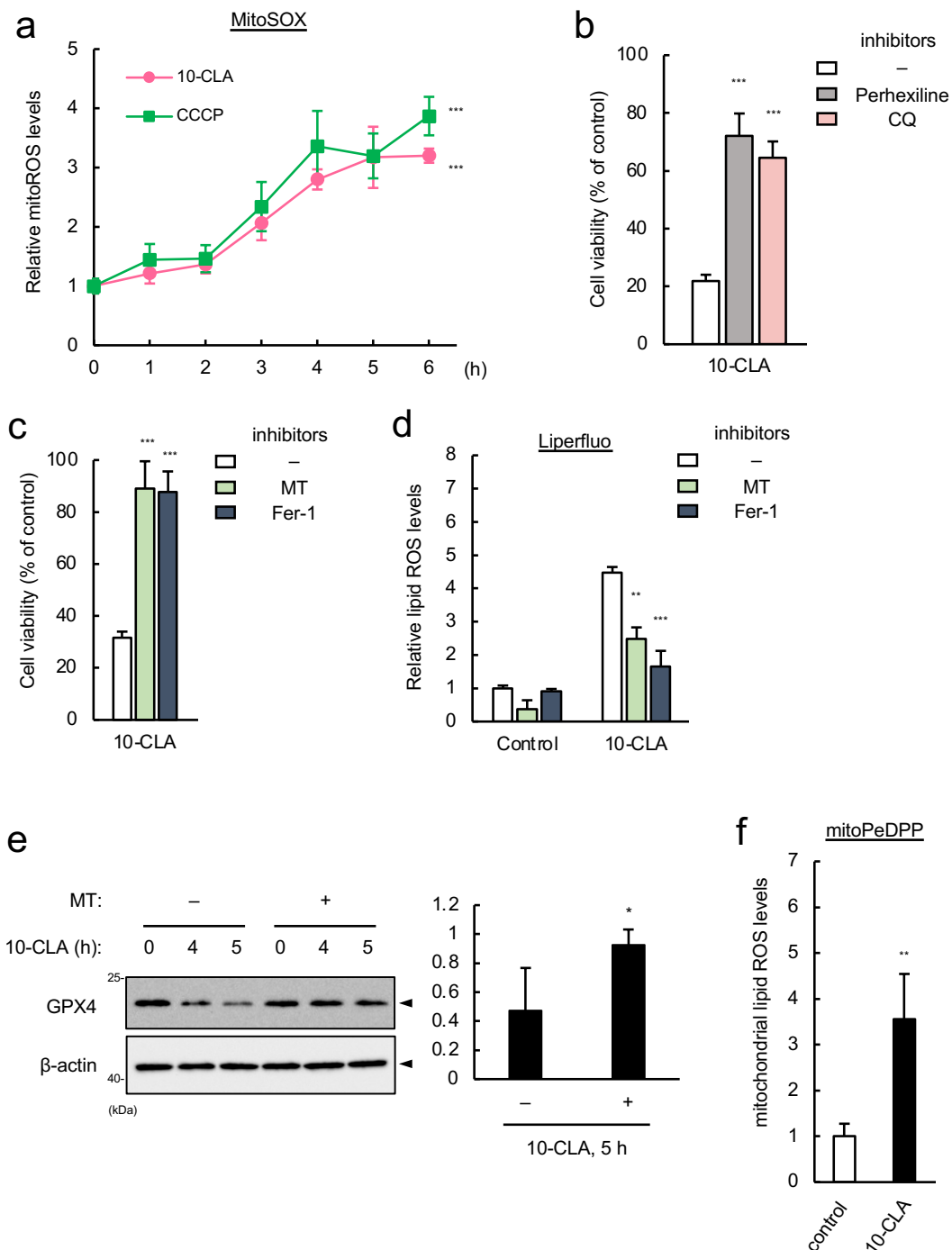


Fig. 7 CLAによる細胞死はACSL1/4の両方に依存する

- (a) HT1080細胞に200 μ M 10-CLA、10 μ M CCCPのいずれかを図示した時間処置し、ミトコンドリアROS蛍光プローブ mitoSOXを30分間処置した後、赤色蛍光をフローサイトメトリーにより検出し、相対強度を求めた。
- (b) HT1080細胞に7.5 μ M Perhexiline、20 μ M CQのいずれかを30分前処置後、100 μ M 10-CLA、10 μ M ESA処置24時間後にPMS/MTS assayにより細胞生存率を解析した。
- (c) HT1080細胞に20 μ M MT、5 μ M Fer-1のいずれかを30分前処置後、100 μ M 10-CLA処置24時間後にPMS/MTS assayにより細胞生存率を解析した。
- (d) HT1080細胞に20 μ M MT、5 μ M Fer-1のいずれかを30分前処置後、200 μ M 10-CLAを4時間処置し、過酸化脂質蛍光プローブLiperfluを30分間処置した後、緑色蛍光をフローサイトメトリーにより検出し、相対強度を求めた。
- (e) HT1080細胞に20 μ M MTを30分前処置し、200 μ M 10-CLAを図示した時間処置した後に細胞を回収した。タンパク調製後、各種抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。
- (f) HT1080細胞に200 μ M 10-CLAを4時間処置し、ミトコンドリア上の過酸化脂質を特異的に標識できる蛍光プローブ mitoPeDPPを30分間処置した後、緑色蛍光をフローサイトメトリーにより検出し、相対強度を求めた。

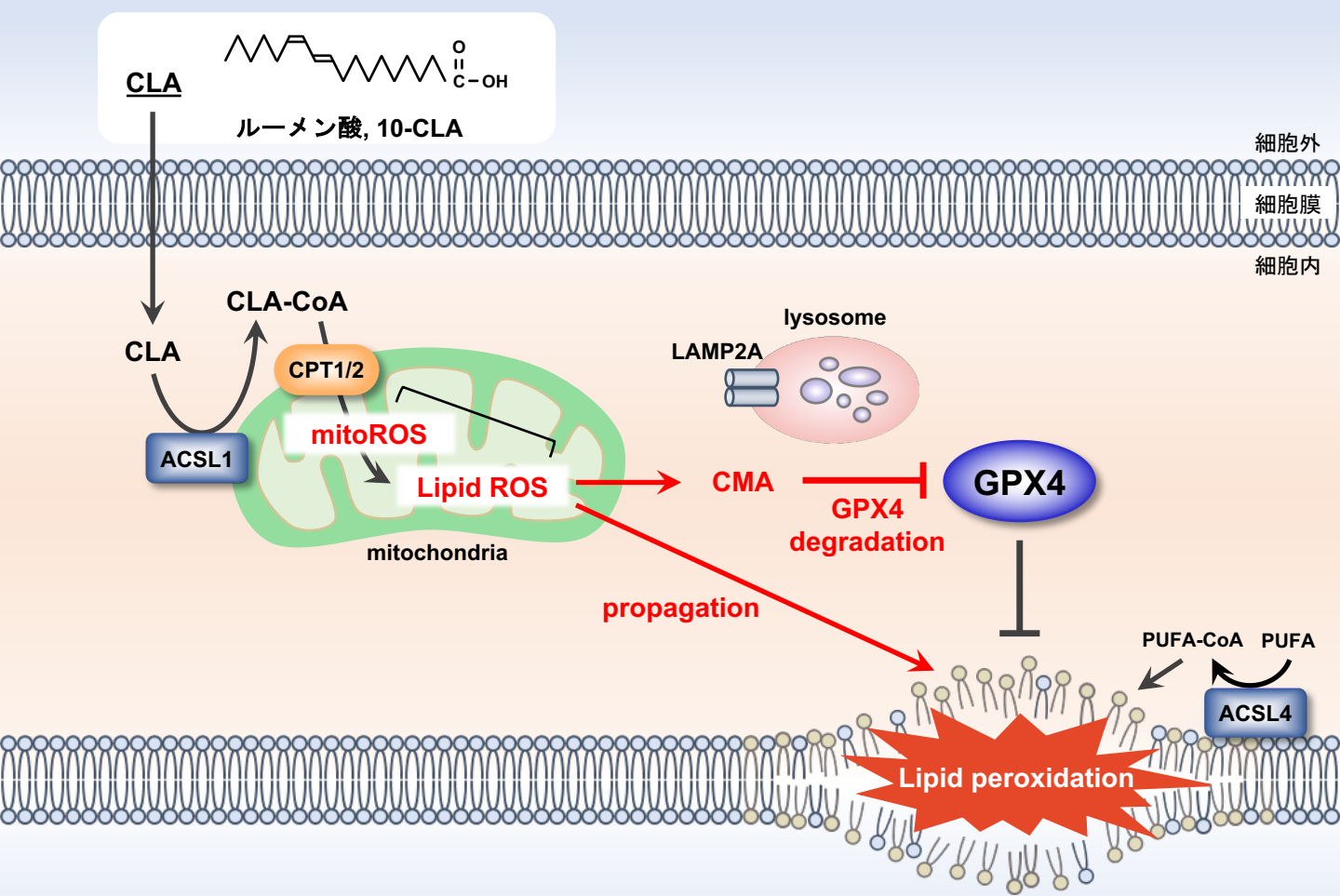


Fig. 8 本研究から想定されるCLAによる抗がん作用の分子機構モデル

Table 1. CLA感受性のがん細胞種間の違い

各種がん細胞株に0-500 μ M 10-CLAを24時間処置後にPMS/MTS assayにより細胞生存率を解析した後、LC50（生存率が50%になる培地中10-CLA濃度）を求めた。

細胞種	由来するがん	LC50
HT1080	繊維肉腫	23
A549	肺がん	78
DU145	前立腺がん	>500
PC3	前立腺がん	>500
MCF7	乳がん	>500
MDA-MB-468	乳がん	>500
DLD1	大腸がん	>500
HeLa	子宮頸がん	>500

引用文献

- 1 Benjamin, S. & Spener, F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutr Metab (Lond)* **6**, 36, doi:10.1186/1743-7075-6-36 (2009).
- 2 den Hartigh, L. J. Conjugated Linoleic Acid Effects on Cancer, Obesity, and Atherosclerosis: A Review of Pre-Clinical and Human Trials with Current Perspectives. *Nutrients* **11**, doi:10.3390/nu11020370 (2019).
- 3 Dhar Dubey, K. K., Sharma, G. & Kumar, A. Conjugated Linolenic Acids: Implication in Cancer. *J Agric Food Chem* **67**, 6091-6101, doi:10.1021/acs.jafc.9b01379 (2019).
- 4 Yuk, H., Abdullah, M., Kim, D. H., Lee, H. & Lee, S. J. Necrostatin-1 Prevents Ferroptosis in a RIPK1- and IDO-Independent Manner in Hepatocellular Carcinoma. *Antioxidants (Basel)* **10**, doi:10.3390/antiox10091347 (2021).
- 5 Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060-1072, doi:10.1016/j.cell.2012.03.042 (2012).
- 6 Yang, W. S. *et al.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* **156**, 317-331, doi:10.1016/j.cell.2013.12.010 (2014).
- 7 Dikic, I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem* **86**, 193-224, doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044908 (2017).
- 8 Kaushik, S. & Cuervo, A. M. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 365-381, doi:10.1038/s41580-018-0001-6 (2018).
- 9 Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol* **22**, 407-417, doi:10.1016/j.tcb.2012.05.006 (2012).
- 10 Qu, Q., Zeng, F., Liu, X., Wang, Q. J. & Deng, F. Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer. *Cell Death Dis* **7**, e2226, doi:10.1038/cddis.2016.132 (2016).
- 11 Kagan, V. E. *et al.* Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol* **13**, 81-90, doi:10.1038/nchembio.2238 (2017).
- 12 Chevrollier, A. *et al.* Standardized mitochondrial analysis gives new insights into mitochondrial dynamics and OPA1 function. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 980-988, doi:10.1016/j.biocel.2012.03.006 (2012).
- 13 Shomorony, A. *et al.* Combining quantitative 2D and 3D image analysis in the serial block face SEM: application to secretory organelles of pancreatic islet cells. *J Microsc* **259**, 155-164, doi:10.1111/jmi.12276 (2015).
- 14 McQuate, A., Knecht, S. & Raible, D. W. Activity regulates a cell type-specific mitochondrial phenotype in zebrafish lateral line hair cells. *Elife* **12**, doi:10.7554/eLife.80468 (2023).