

HepG2細胞の増殖抑制におけるアミノレブリン酸の効果

Effect of aminolevulinic acid on inhibition of HepG2 cell proliferation

横山 芽衣子^{*1§}、泉 可也^{*2}、田中 徹^{*3}、志塚 ふじ子^{*4}
Meiko Yokoyama, Yoshiya Izumi, Toru Tanaka, Fujiko Shizuka

Abstract: The importance of apoptosis response on cancer cells has become a focal point of cancer research. However, little information is available on the apoptotic effects of aminolevulinic acid (ALA). The purpose of this study was to explore the influence of ALA on HepG2 cell proliferation. HepG2 cells were cultivated for four days in media supplemented with ALA (ALA+) and without ALA (ALA-). Phase contrast micrographs were taken every day, and the number of cells was counted. Cytochrome C oxidase activity was analyzed in the mitochondrial membrane, as well as outside the membrane. Compared with ALA-, ALA+ showed suppression of HepG2 cell proliferation and increased cytochrome C oxidase activity outside the mitochondrial membrane. The present results suggest that ALA elevate apoptosis by increasing release of cytochrome C from mitochondria.

Keywords: Aminolevulinic acid, HepG2 cell, Apoptosis, Cytochrome C oxidase, mitochondrial membrane permeability

1. はじめに

アミノレブリン酸 (ALA) は、生物に広く存在するアミノ酸の一種である。生体内ではミトコンドリア中のグリシンとスクシニル CoA が ALA シンターゼの作用で縮合した結果生じるアミノケトンであり、テトラピロール化合物の共通前駆体として働いている。テトラピロール化合物は生体反応に重要な役割を果たすものが多い。例えば、鉄と結合すればヘムを構成してヘモグロビンの原料となり、コバルトと結合すればビタミン B₁₂ を形成する。植物においては、マグネシウムと結合すればクロロフィルとなる。このように ALA は動植物にとって非常に重要なアミノ酸といえる。

ALA はミトコンドリア内で生成されるため、動植物性の食品全般に含まれている。動物性食品では、イカ、タコ、牛肉など、植物性食品では緑黄色野菜であるホウレンソウやカイワレ大根、ピーマン、トマトなどに多く含まれている。またワイン、酢、日本酒などの発酵食品にも多く含まれているが、特に焼酎粕やビール酵母に多く含まれている。

ALA はヘモグロビンやヘムタンパク質の主要な

構成要素であり、生体内では約 60-70 g 存在すると考えられている。私たちは ALA を食物から 1 日に 0.05-2 mg 程度摂取しており、上部消化管から速やかに吸収される¹⁾。一方、体内で生合成される ALA は 1 日あたり 600 mg 程度であり、ビリルビン代謝により排出されるヘムタンパク質を補っている。しかし生合成された ALA はテトラピロール化合物の合成抑制作用を有するため速やかに代謝され、血液中には約 1 mg しか存在しない。過剰摂取や過剰投与の場合は、尿中に排出され、体内のホメオスタシスを保っている。

日本においてがんは、昭和 56 年以降死因順位が常に第 1 位である。平成 20 年では全死亡者に占める割合は、第 2 位の心疾患の割合が 15.9% に対し、がんは 30.0% に達しており、がんの割合が非常に高いことが明らかである²⁾。入院患者数においても、がんは精神および行動の障害、循環器系の疾患に次ぐ第 3 位である³⁾。がん治療は高額で長期に及ぶため、医療費は全体の約 12% を占め、3 兆円以上にもものほり⁴⁾、深刻な社会問題となっている。そのためがんの予防・治療法の確立が求められている。

現在、ALA は塩酸塩としてがん治療に用いられ

*1 長野県短期大学 客員研究員 *2 株式会社 Biomaterial in Tokyo *3 SBI ファーマ株式会社

*4 長野県短期大学 生活科学科 健康栄養専攻

§ 連絡先 〒380-8525 長野県長野市三輪 8-49-7 TEL 026-234-1221 FAX 026-235-0026

ている。ALA 塩酸塩のがん治療への応用として脳腫瘍における光線力学的診断PDP (Photo Dynamic Diagnosis) への利用がある⁵⁻⁷⁾。通常、経口投与されたALAは粘膜細胞や皮膚細胞など正常細胞に取り込まれヘムに代謝されるが、嫌気代謝下のがん細胞ではヘムを合成せず中間代謝産物であるプロトポルフィリンⅣ (PPIX) としてがん細胞に特異的に蓄積する。PPIXは、特定波長の光を照射すると組織内にて蛍光を発するため、蛍光をマーカーとしてがん部位をより簡易に特定することができ、悪性腫瘍の摘出手術において非常に有用な手段となっている。

このようにALA塩酸塩はがん治療に有効であるが、ALAやその代謝産物のがん細胞にどのような作用を有しているかについての報告は少なく、そのメカニズムについては明らかではない。そこで、本研究では、肝臓がん細胞由来のHepG2細胞を用い、ALAがアポトーシスに及ぼす影響を考察することで、ALAのがん細胞増殖抑制効果およびそのメカニズムについての検討を行った。

2. 方法

(1) 試料

試料としてALA塩酸塩を用いた。

(2) 細胞の調整

HepG2ヒト肝がん細胞は、株式会社アステック(日本)にて継続培養を行っているものを使用した。細胞は、10%牛胎児血清(Invitrogen Co., CA)、1%ペニシリンストレプトマイシン(Invitrogen Co.)およびグルコース溶液を添加したDulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, MO)培地に懸濁し、酸素濃度10%、グルコース終濃度5.0 g/Lの条件下で3日間前培養した。

(3) 培養スケジュール

培地中のグルコース濃度を5.0 g/Lとし、培養1日毎にALA濃度が0.15 μ MとなるようにALAを追加添加(ALA+)し、4日間培養した。同様にALA無添加群(ALA-)も4日間培養した。培養1日毎に培地上清を分取し、位相差顕微鏡で観察した。

(4) 位相差顕微鏡観察

培養1日毎に位相差顕微鏡にて観察を行った。顕微鏡は140万画素モノクロCCDカメラである

DMI3000BおよびQJCAM (Leica Camera AG, Germany)を用い、対物レンズ10倍にて観察を行った。

(5) 細胞数のカウント

各ディッシュからそれぞれ培地100 μ Lを抜き取り、カウントに用いた。NucleoCounter (Chemometec, Denmark)を用い、死細胞数および全細胞数をカウントした。

(6) シトクロムCオキシダーゼ活性測定

細胞からミトコンドリア分画タンパクを単離し、シトクロムCオキシダーゼ活性を測定した。培養4日目の培地を600 \times gで5分間遠心分離したものを培地上清とした。培地上清からミトコンドリア分画を採取するためにミトコンドリア単離キットMITOISO2 (Sigma-Aldrich)を用いた。ミトコンドリア分画のタンパク濃度測定にはBradford法を採用し、Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., IL)を用いた。分光光度計にはV-520 (Jasco Co., Japan)を用い、595 nmにて測定した。シトクロムCオキシダーゼ活性は、ミトコンドリア活性キットKC310100 (コスモバイオ株式会社, 日本)を用いた。プレートリーダーにはTRIAD (DYNEX Technologies, Inc., VA)を用い、1分間あたりのA550減少値を計測した。

(7) 解析

データの解析にはt検定を用いた。有意水準は5% ($p < 0.05$)とした。

3. 結果

(1) 細胞形態観察

位相差顕微鏡による観察結果をFig. 1に示す。ALA-と比較してALA+では細胞数が明らかに少なかった。一方、細胞の構造に大きな差異は観察されなかった。

(2) 細胞密度

4日間HepG2細胞を培養した結果、ALA添加の有無による死細胞密度の違いは観察されなかった。しかしALA添加により生細胞密度の増加が抑制された(Fig. 2)。これらの結果より、ALA添加によりHepG2細胞の生存率が低下したことがわかった。

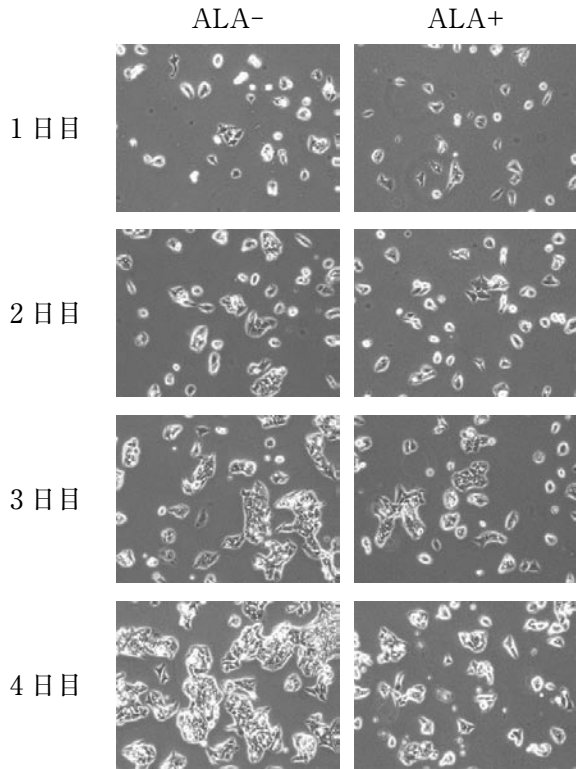


Fig. 1 細胞形態

位相差顕微鏡下（対物レンズ10倍）で観察した。

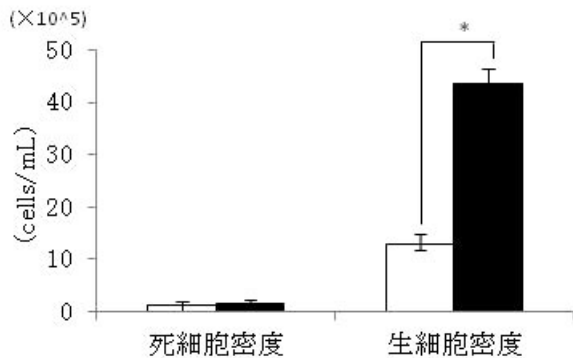


Fig. 2 死細胞密度および生細胞密度

左のカラム（□）は ALA- 群、右のカラム（■）は ALA+ 群を示す。値は平均値 ± 標準偏差で示した。
*は $p < 0.05$ を示す。

左のカラム（■）はミトコンドリア膜外のシトクロム C オキシダーゼ活性、右のカラム（□）はミトコンドリア全体におけるシトクロム C オキシダーゼ活性を示す。値は平均値 ± 標準偏差で示した。
*は $p < 0.05$ を示す。

(3) シトクロム C オキシダーゼ活性

ミトコンドリア分画タンパク質 1 mg 当たりのシトクロム C オキシダーゼ活性値を Fig. 3 に示す。ミトコンドリア全体における活性は、ALA- と比較して ALA+ で有意に ($p < 0.05$) 低い値を示した。

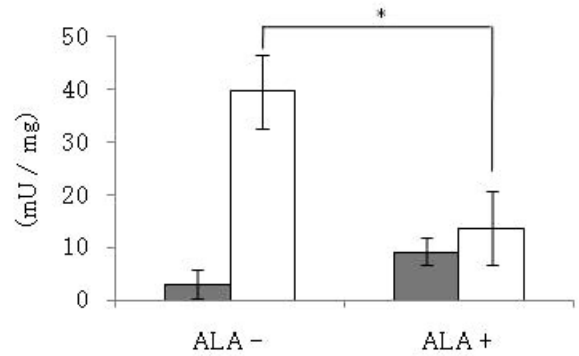


Fig. 3 シトクロム C オキシダーゼ活性

一方、ミトコンドリア膜外の活性値は ALA+ で増加し、ミトコンドリア膜の透過性亢進が示唆された。

4. 考察

がんは治療困難な疾病であり、日本国内のみならず世界中で社会問題となっている。近年、がんの早期発見の可能性が増大し、新薬の開発が進んでいるにも関わらず、がんによる死亡率は減少していない。その原因として、治癒が困難な上、再発や転移を繰り返すことがあげられる。正常細胞にはアポトーシスと呼ばれる細胞が自発的に死に至るメカニズムが働いている。しかし、がん細胞ではアポトーシスが起こりにくくなっているが、そのメカニズムについては十分には解明されていない。がんの治療として抗がん剤や放射線の使用があげられるが、これらはがん細胞にアポトーシスを起こさせることで効果を発揮する。そのためがん細胞のアポトーシスの破綻は、抗がん剤や放射線治療が効きにくい理由の一つであり、がん細胞の治療には、アポトーシス正常化が効果的であると考えられる。そこで、本研究では、肝臓がん細胞由来の HepG2 細胞において、ALA がアポトーシスにおよぼす影響について検討した。

現在、アポトーシスに関わる分子がいくつか発見されている。アポトーシス抑制作用を持つ Bcl-2 もその一つである^{8,9)}。Bcl-2 はミトコンドリア膜に局在し機能を発揮する分子である。一方、がん抑制遺伝子として p53 が知られている¹⁰⁾。p53 は主に転写因子として作用し、下流遺伝子を活性化する役割を担っている。DNA 損傷などの刺激により p53 が活性化されると、p53 はその下流でアポトーシス促進に働く標的遺伝子等の発現を誘導する。この遺伝子産物はミトコンドリアに作用し、ミトコンドリアの膜透過性が亢進し、膜間スペースに存在するアポトーシス誘導蛋白質であるシトクロム C などの分子が細胞質に漏出する。漏出したシトクロム C は、

ATP、Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) と共に caspase-9 を活性化する。活性型 caspase-9 は caspase-3 を活性化しアポトーシスが実行される¹¹⁾。P53 は Bcl-2 発現に対して抑制的に作用し、これらアポトーシス誘導蛋白質の細胞質への漏出を調節することによってアポトーシスシグナルの主要な鍵をにぎっている¹²⁾。本研究においては、ALA 投与はミトコンドリアの膜透過性亢進によりミトコンドリア内のシトクロム C オキシダーゼ活性を低下させ、アポトーシスシグナルであるミトコンドリアからのシトクロム C 放出の増加が考えられ、ALA には HepG2 細胞のアポトーシス亢進作用を有することが示唆された。その結果、ALA+ 群では細胞増殖が抑制された。

がん発症のリスクファクターとして、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) がある。スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)、 H_2O_2 、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) の総称である ROS は、反応性に富み生体内における分子の酸化還元状態を容易に変化させ、生体のがんをはじめとした様々な疾病や老化などを誘発させる。一方で、抗がん剤治療誘発性の DNA 損傷により生成した ROS がアポトーシスに関与するとの報告もある^{13,14)}。私たちは、これまで正常ラットや褐色脂肪細胞などを用いて ALA 添加がシトクロム C オキシダーゼを含む電子伝達系に関わる Complex I、II、III および IV の遺伝子発現を増加させる事を明らかにしてきた (未発表)。正常細胞では、効率よく ATP を合成するために好氣的な代謝が主であるが、その代償としてミトコンドリアが ROS の主たる発生源となっている。しかし正常細胞では、生体防御機能として ROS 消去システム (抗酸化作用) を有しており、細胞質やミトコンドリアに多く存在するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やグルタチオンペルオキシダーゼ、ペルオキシソームに存在するカタラーゼなどによって酸化からの防御がなされる。一方、がん細胞では酸素が十分な状況であっても嫌氣的に ATP 産生を行っている。この理由については未だ十分には解明されていないが、北中らはミトコンドリアが関与するアポトーシス促進物質である Bax、Bak が活性化するためには、好氣的代謝が重要な役割を担っていると報告している¹⁵⁾。つまり、がん細胞は効率の悪い嫌氣的代謝を行う事により ROS の発生やアポトーシスを抑制し、細胞死を免れていることも考えられる。

がん細胞はアポトーシスという細胞の自然死を防御するとともに、増殖を続けるため、再発と転移を繰り返す。そのためがん細胞のアポトーシス亢進を

促す作用は、有効ながん治療法の一つであると考えられる。本実験において ALA の添加によりアポトーシスの亢進が確認されたことは、がん治療における ALA の有効性を示唆する。そのメカニズムはミトコンドリアの膜透過性亢進によるシトクロム C 放出の増加が関与していることが示唆される。しかし、ALA 添加によりミトコンドリア全体のシトクロム C オキシダーゼ活性が ALA 無添加と比較して低下した理由は明らかではない。膜透過の亢進によりシトクロム C が細胞質に漏出したためか、がん細胞において好氣的代謝である電子伝達系が抑制されたのか、または異なる機構により活性が低下したのかを解明するとともに、アポトーシスに関わるメカニズムのさらなる検討が必要であると考えている。

参考文献

- 1) Frolund S, Marquez OC, Larsen M, Brodin B, Nielsen CU. Delta-aminolevulinic acid is a substrate for the amino acid transporter SLC36A1 (hPAT1). *Br J Pharmacol* 2010; 159: 1339-53.
- 2) 平成 20 年人口動態調査 厚生労働省
- 3) 平成 20 年患者調査 厚生労働省
- 4) 平成 20 年度国民医療費 厚生労働省
- 5) Hinnen P, de Rooij FW, van Velthuysen ML, et al. Biochemical basis of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation: a study in patients with (pre) malignant lesions of the oesophagus. *Br J Cancer* 1998; 78: 679-82.
- 6) Datta SN, Loh CS, MacRobert AJ, Whatley SD, Matthews PN. Quantitative studies of the kinetics of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in bladder transitional cell carcinoma. *Br J Cancer* 1998; 78: 1113-8.
- 7) Zheng W, Olivo M, Soo KC. The use of digitized endoscopic imaging of 5-ALA-induced PPIX fluorescence to detect and diagnose oral premalignant and malignant lesions in vivo. *Int J Cancer* 2004; 110: 295-300.
- 8) Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier GG, Dixit VM. Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. *J Biol Chem* 1996; 271:4 573-6.
- 9) Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996; 88: 386-401.
- 10) Seki H, Kanegane H, Iwai K, et al. Ionizing radiation induces apoptotic cell death in human TcR-gamma/delta+ T and natural killer cells without detectable p53 protein. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2914-7.
- 11) Ling YH, Liebes L, Zou Y, Perez-Soler R. Reactive

-
- oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 33714-23.
- 12) Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* 2003; 195: 158-67.
- 13) Hiraoka W, Vazquez N, Nieves-Neira W, Chanock SJ, Pommier Y. Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *J Clin Invest* 1998; 102: 1961-8.
- 14) Barbi de Moura M, Vincent G, Fayewicz SL, et al. Mitochondrial respiration - an important therapeutic target in melanoma. *PLoS One* 2012; 7: e40690.
- 15) Tomiyama A, Serizawa S, Tachibana K, et al. Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors Bax and Bak. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1462-73.

(平成 24 年 10 月 1 日受付、平成 24 年 11 月 28 日受理)