

ゲノムストレス応答性に細胞分裂方向  
を制御する RhoGDI $\beta$  の研究

県立広島大学大学院

総合学術研究科

生命システム科学専攻

博士論文

令和4年3月

(2022年)

土井 捺実

## 【目次】

要旨.....	5
第1章 緒言.....	8
第2章 紫外線誘発分裂方向異常について	
2. 1 研究背景.....	12
2. 2 材料と方法.....	13
2. 3 結果.....	14
2. 4 まとめと考察.....	19
第3章 紫外線誘発分裂方向と RhoGDI $\beta$	
3. 1 研究背景.....	21
3. 2 材料と方法.....	22
3. 3 結果.....	24
3. 4 まとめと考察.....	30
第4章 RhoGDI $\beta$ 発現抑制物質探索 ～アスコルビン酸誘導体～	
4. 1 研究背景.....	32
4. 2 材料と方法.....	33
4. 3 結果.....	36
4. 4 まとめと考察.....	43
第5章 RhoGDI $\beta$ 発現抑制物質探索 ～天然物素材～	
5. 1 研究背景.....	45
5. 2 材料と方法.....	46
5. 3 結果.....	48
5. 4 まとめと考察.....	52

第6章 細胞分裂方向に対するアッケシソウ抽出液の効果	
6. 1 研究背景.....	54
6. 2 材料と方法.....	55
6. 3 結果.....	56
6. 4 まとめと考察.....	62
第7章 研究総括.....	64
引用文献.....	67
謝辞.....	74
発表論文等の業績.....	75

【英語題名】

RhoGDI $\beta$ , physiological functions and potentials for diagnostic and therapeutic applications

【略語】

Rho : Ras homolog family member protein

GTP : Guanosine-5'-triphosphate

GDP : Guanosine-5'-diphosphate

GEF : guanine nucleotide exchange factor

GAP : GTPase-activating protein

GDI : guanine nucleotide dissociation

Cdc42 : Cell Division Cycle 42

Rac1 : Rac Family Small GTPase 1

UV : ultraviolet

ECM : Extracellular Matrix

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

mRNA : messenger RNA

qRT-PCR=quantitative RT-PCR

2-OctadecylAA : 2-*O*-Octadecylascorbic acid

## 【要旨】

本研究では、細胞分裂方向を制御するシグナルスイッチ調節分子 RhoGDI $\beta$  の生理的な役割に注目した。特に、ゲノムストレス応答性に 3 型カスパーゼの働きによって発現する N 末切断産物  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  の標的化を目指した創薬研究を行った。

RhoGDI $\beta$  は、アクチン細胞骨格系を中心とした様々な細胞機能発揮のための細胞内シグナル伝達経路に位置する分子スイッチ (Rho ファミリー低分子量 G タンパク質) のスイッチング機能を制御する。すなわち、その主要な役割は、細胞の状況に応じた適切な分子スイッチのオンとオフにある。また、ゲノムストレスに曝された上皮細胞において、RhoGDI $\beta$  は、活性化 3 型カスパーゼの働きにより、変様型である N 末を欠失した RhoGDI $\beta$  ( $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$ ) へと変化する。この変様型の  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  は、分子スイッチのひとつ Rac1 を制御する機能に加えて、別のスイッチである Cdc42 を制御する機能を持つ。Rac1 は細胞運動の活性制御に機能し、Cdc42 は細胞の分裂方向を介した運動の方向性決定機能を持つ。 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  は、ゲノムストレス応答性に、Cdc42 を制御する。

第 1 章では、緒言として研究背景を述べる。

第 2 章では、上皮組織由来細胞の紫外線誘発分裂方向異常について述べる。

ヒト子宮頸部癌由来の HeLa 細胞を用いた解析を行った。基底膜は、ヒトの上皮組織において、幹細胞の生存とその分裂のニッチである。すなわち、基底膜上でのみ上皮細胞は増殖する。マトリゲル (再構成基底膜) 上で培養した HeLa 細胞では、紫外線 (UVC) 照射により、分裂の方向性が乱れることを見つけた。非照射時における分裂方向は、培養面に対して水平であるのに対して、紫外線照射された場合、水平維持した分裂方向が減少し、分裂方向異常が出現する。

第 3 章では、上皮組織由来細胞の紫外線誘発分裂方向異常と RhoGDI $\beta$  の関係について述べる。

マトリゲル上の HeLa 細胞は、紫外線照射によって、分裂方向の異常が表れる。この時、RhoGDI $\beta$  の発現を shRNA (Short hairpin RNA、低分子ヘアピン型 RNA) によってノックダウンした場合、紫外線誘発分裂方向異常は阻止された。また、活性化 3 型カスパーゼ非切断型の RhoGDI $\beta$ -D19A (19 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換) を強制発現させた場合にも、紫外線誘発分裂方向異常は阻止された。更に、Cdc42 ノックダウン細胞では、分裂方向異常が恒常的に出現するが、一方、恒常的活性化型の Cdc42-G12V (12 番目のグリシンをバリニンに置換)

を強制発現させた場合、紫外線誘発分裂方向異常は阻止された。すなわち、紫外線誘発分裂方向異常は、 $\Delta N$ -RhoGDI $\beta$  発現により Cdc42 が阻害されることにより生じ、RhoGDI $\beta$  発現を抑制することによって、この異常は阻止可能であることがわかった。

第4章では、RhoGDI $\beta$  発現を抑制するアスコルビン酸誘導体の探索について述べる。

アスコルビン酸は、皮膚組織の紫外線によるダメージを軽減し、種々の誘導体が開発されている。それゆえ、RhoGDI $\beta$  を分子標的とした創薬のための候補分子としての探索ソースとして魅力的であると考えた。アスコルビン酸と15種類の誘導体について、HeLa 細胞を用いて qRT-PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) 法により RhoGDI $\beta$  発現抑制効果を調べた結果、脂溶性誘導体である 2-O-octadecylascorbic acid (2-OctadecylAA) に効果のあることがわかった。また、紫外線誘発分裂方向異常は、2-OctadecylAA 処理により抑制された。2-OctadecylAA は、その開発名が CV-3611 であり、齧歯類の肝癌モデルにおいて発癌抑制効果のあることが知られる。その作用機作は、抗酸化活性では説明がつかなかった。RhoGDI $\beta$  は癌転移関連分子であり、癌の進展に深く関わっていることが知られており、本研究により、ここに、RhoGDI $\beta$  発現抑制を介した新しい 2-OctadecylAA の発癌抑制機序が示唆された。

第5章では、RhoGDI $\beta$  発現を抑制する天然物素材の探索について述べる。

化粧品素材天然物ライブラリーから105種類の素材について、HeLa 細胞を用いた qRT-PCR 法により RhoGDI $\beta$  発現抑制効果を調べた。その結果、12種類の候補素材について効果のあることが見つかった。この内、RhoGDI $\beta$  発現抑制効果が高く、皮膚への効能が知られ、耐塩性植物としてその耐塩性獲得に RhoGDI が活発に機能しているアッケシソウに注目した。

第6章では、皮膚扁平上皮組織の細胞分裂方向に対するアッケシソウ抽出液の効果について述べる。

アッケシソウ抽出液は、マトリゲル上の HeLa 細胞に対して、RhoGDI $\beta$  発現を抑制し、紫外線誘発分裂方向異常を阻止した。そこで、皮膚扁平上皮組織の細胞分裂方向への効果を調べる目的から、試験管内皮膚扁平上皮組織分化モデルを用いて、その基底層における細胞分裂方向の紫外線照射による効果とアッケシソウ抽出液の影響を調べた。その結果、細胞分裂方向の異常が紫外線によって生じたが、アッケシソウ抽出液には、その異常を阻止する効果が認められ

た。また、重層扁平上皮形成における形態観察を行ったところ、紫外線による重層化の乱れは、アッケシソウ抽出液によって阻止された。

第7章では、本研究の総括を述べる。

紫外線などのゲノムストレスによって生じる上皮組織の細胞分裂方向異常と、その結果生じる組織構築や恒常性の乱れが、RhoGDI $\beta$  発現抑制により防御可能であり、実際にスクリーニングにより幾つかの有効な創薬候補を見つけたことは、今後、化粧品や医薬品の開発分野における貢献が期待出来る。

# 第 1 章

## 緒言

Rho ファミリーG タンパク質は、アクチン細胞骨格構成、微小管動態、小胞輸送および細胞周期進行を含む、様々な細胞プロセスにおける分子スイッチとして機能しており[1-5]、22 を超える Rho ファミリータンパク質がヒトで存在している[6]。Rho タンパク質のレギュレーターには、Rho グアニンヌクレオチド交換因子 (RhoGEF)、RhoGTPase 活性化タンパク質 (RhoGAP)、および RhoGDP 解離阻害剤 (RhoGDI) の3つのクラスがあり、69 以上の RhoGEF と 59 の RhoGAP、そして3つの RhoGDI がヒトでは同定されている[7]。(RhoGEF はスイッチを ON にすることで、上流から来たシグナルを下流に伝達する働きをする。一方、RhoGAP はスイッチを OFF にすることで、上流からシグナルが来たとしても、下流にシグナルを伝わらないように働く[8, 9]。それとは別に、スイッチの ON・OFF の微妙な調節を行うのが RhoGDI である[10]。RhoGDI は、①解離活性：GDP-Rho ファミリータンパク質を細胞膜から取り出す。②保持活性：細胞質内に不活性な GDP-Rho ファミリータンパク質を保持する。③リクルート活性：状況に応じて不活性 GDP-Rho ファミリータンパク質を活性型にして補填する、という3つの働きがある[10]。このように RhoGEF、RhoGAP、そして RhoGDI が、それぞれアクセル役、ブレーキ役、クラッチ役を担うことで、シグナルの伝達をコントロールしている[11]。

上記で述べた RhoGDI は、ヒトにおいて  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の3種類が存在している[12]。RhoGDI $\alpha$  はほぼ全ての臓器で発現がみられる。また、RhoGDI $\gamma$  は特に脳、肺、膵臓、腎臓および精巣での限られた場所でしか発現がみられない[13]。これに対し RhoGDI $\beta$  は、血球系細胞や上皮系細胞で発現が見られ、その活性制御などががん転移と深く関連することが知られている[14-19]。

3種類の RhoGDI はよく似てはいるが、別の遺伝子座からコードされた遺伝子であり、特に RhoGDI $\beta$  のみが3型カスパーゼ切断サイトを持っている。例えば電離放射線や紫外線などのゲノムストレスを受けた細胞内において、ミトコンドリア、9型カスパーゼを経由して3型カスパーゼの活性化が起こる。3型カスパーゼの活性化は、細胞がゲノムストレスなどに曝された時に起こる現象で、細胞死 (アポトーシス) を実行する[20-22]。一方で、細胞死を免れた細胞のその後の再増殖過程にも活性化された3型カスパーゼは重要な機能を持つ[23-27]。正常上皮角化細胞 (keratinocytes) では、亜致死線量の紫外線照射 (sublethal UV irradiation) によって、3型カスパーゼ活性化により RhoGDI の19番目のアスパ

ラギン酸部位で切断され、変様型である N 末を欠失した RhoGDI $\beta$  ( $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$ ) が発現する[28, 29]。

この RhoGDI $\beta$  の発現が見られる上皮系細胞が構築する組織には様々な構造があるが、特に紫外線などの外界刺激を頻繁に受ける皮膚においては重層扁平上皮構造をとることが知られている[30]。基底膜という薄い膜が全身を覆う様に存在しているが、これは上皮組織（外部）と結合組織（内部）などを隔てる細胞外マトリックスである。この基底膜上に並んでいるのが幹細胞であり、幹細胞が対称分裂、非対称分裂を行うことで、上皮組織が作られていく。幹細胞が対称分裂（幹細胞分裂）することにより、幹細胞の補填が行われ、非対称分裂（分化分裂）することで皮膚の層が作られる[30-36]。皮膚の層は基底膜をはじめ、幹細胞が並ぶ基底層、免疫細胞などが存在している有棘層、角質細胞の前段階の顆粒層、そして皮膚の最も外側に位置する角層が秩序正しく並ぶことで、皮膚組織を形作っている。それらの細胞は上へ上へ押し上げられることで、やがて垢となって剥がれ落ちていくのだが[31]、このような機構が何らかの影響により乱れてしまい、重層扁平上皮構造のホメオタシスが崩れ、美肌が損なわれると考えられているのである。

本論文では、上皮系細胞の分裂方向を制御する RhoGDI $\beta$  の生理的な役割に注目し、RhoGDI $\beta$  を分子標的とした創薬のための基礎研究を行った。ゲノム損傷後の細胞内で発現する  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  は、切断前の RhoGDI $\beta$  が Rac1 制御を制御する役割から細胞内局在を変えてしまい、Cdc42 と結合、細胞分裂方向の異常を招来させる。RhoGDI $\beta$  が抑制することで細胞の分裂方向性の回復や、天然物化合物によるその効果の証拠を提示し、化粧分野でのさらなる研究や、放射線照射後の医療薬としての可能性を示すことを目的とした。

## 第 2 章

### 紫外線誘発分裂方向異常について

## 2. 1 研究背景

ヒトの上皮組織は重層扁平上皮構造をとり、基底膜上に幹細胞が並ぶ基底層、免疫細胞なども存在している有棘層、角化する前段階の顆粒層、そして一番外側に位置する角質層からなっている。基底層に存在する幹細胞が対称分裂することで、幹細胞が補填され、分化分裂をすることで上皮組織の補充をする。それらは上へと細胞が押し上げられることで、最終的に角化細胞は垢として剥がれ落ちる。このような細胞の分裂方向の正しい制御様式により、上皮組織のホメオタシス（恒常性）は保たれる[31]。つまり、細胞分裂方向を適切に制御することは、多細胞生物の組織発生と恒常性にとって重要である[37]。逆に言えば、細胞の分裂方向の異常は組織の発達障害、ホメオタシスと整合性の喪失、ひいてはがんを引き起こす可能性がある[38-40]。

本研究では DNA 損傷後の上皮細胞における細胞分裂方向の異常について解明を行った。

## 2. 2 材料と方法

### 1. 細胞

ヒト子宮頸部がん由来細胞である HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞は全て DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium) に 10%ウシ胎児血清を添加した培地で、37°C、5%CO<sub>2</sub>濃度の条件のインキュベーターで培養を行った。

### 2. UVC 照射

対数増殖期の細胞に、1.0 J/m<sup>2</sup> の殺菌灯を室温にて UVC (254 nm) 照射を行った。総線量は 10 J/m<sup>2</sup> であり、clonogenic assay で測定した場合、細胞生存率は 4.3% (SD ± 2.8%) であった。

### 3. ダブルサイミジン法

細胞周期を同調させるために、対数増殖期にある細胞を、3.5cm のマトリゲルでコーティングされたガラス底シャーレに 4.2×10<sup>5</sup> cells/dish (高密度) で、また 4.2×10<sup>4</sup> cells/dish (低密度) で播種した。24 時間後、細胞を 2.5mM のチミジンで 16 時間の処理を、8 時間の間隔を開け合計 2 回処理した。その後 wash を行い、同調した細胞を、チミジンを含まない培地で 8.5 時間培養し、実験に使用した。

### 4. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた間接免疫蛍光法

ダブルサイミジン法で同調させた細胞を 4%パラホルムアルデヒドで処理した。その後 Triton X-100 で透過処理し、ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、サンプルを抗  $\gamma$ -チューブリン抗体 (Sigma-Aldrich; T6557) および Alexa Fluor 568 結合二次抗体をインキュベートした。同時に、DNA は Hoechst 33258 で染色した。染色されたサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡を使用して分析を行った。

### 5. 統計

分裂方向角度の有意な分散は、F 検定を使用して分析した。p < 0.05 は、統計的に有意な差を示すと見なした。

## 2. 3 結果

### 1. 細胞分裂角度の算出

x-y 平面を  $0.5\mu\text{m}$  間隔でスキャンし、中期細胞の z スタック画像をデジタル 3 次元構築により再構成した。また、2つのセントロソームの位置は、z スタック画像を使用して定義され、分裂角度 ( $\alpha^\circ$ ) は、x-z 面から見たマトリゲル面を基準とした線と、2つのセントロソーム間を結ぶ線によってできる直角三角形から逆三角関数を使って計算を行った。各実験では、50 の中期細胞で観察を行った。(図 1)

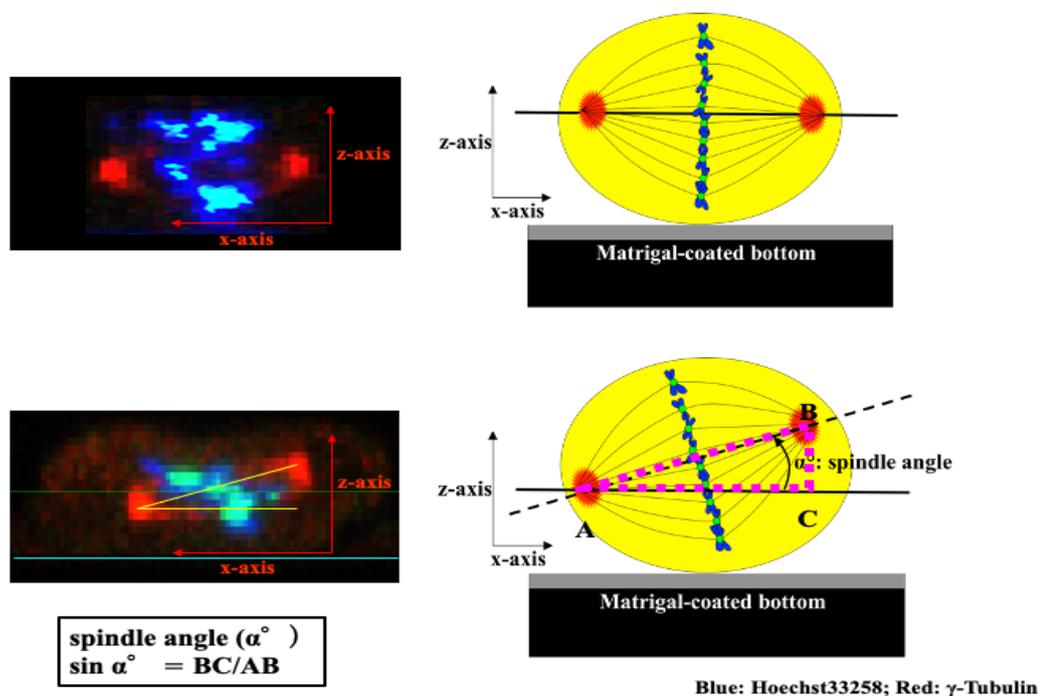


図 1. 細胞角度の算出方法

左はデジタル 3 次元構築後の x-z 軸面の細胞の画像である。上が正常細胞で、下は分裂方向性が乱れている細胞。分裂角度 ( $\alpha^\circ$ ) は、次の式を使用して 2 つのスピンドルポールの位置に基づいて計算された。:  $BC / AB = \sin\alpha$

## 2. シャーレ基底面への ECM の検討および細胞密度の検討

細胞と基質の接着は、正常な細胞分裂方向性に必要であることが知られている。皮膚に最も多く含まれている I 型コラーゲン、基底膜の主要成分である IV 型コラーゲン、再構成基底膜であるマトリゲルの 3 種類の細胞外マトリックスタンパク質が細胞分裂方向性に及ぼす影響を調べた。その結果、マトリゲルへの接着時が最も基底膜への細胞方向性が水平であることがわかった。(図 2-A, B) また細胞を高密度で播種して細胞間接着を形成すると、分裂方向性異常は抑制された。このことから、細胞方向性異常抑制には、マトリゲルおよび細胞間接着が必要ということが証明された。したがって、以降の実験は、高密度条件下でマトリゲルコーティングガラスシャーレを使用して実施した。(図 2-C, D)

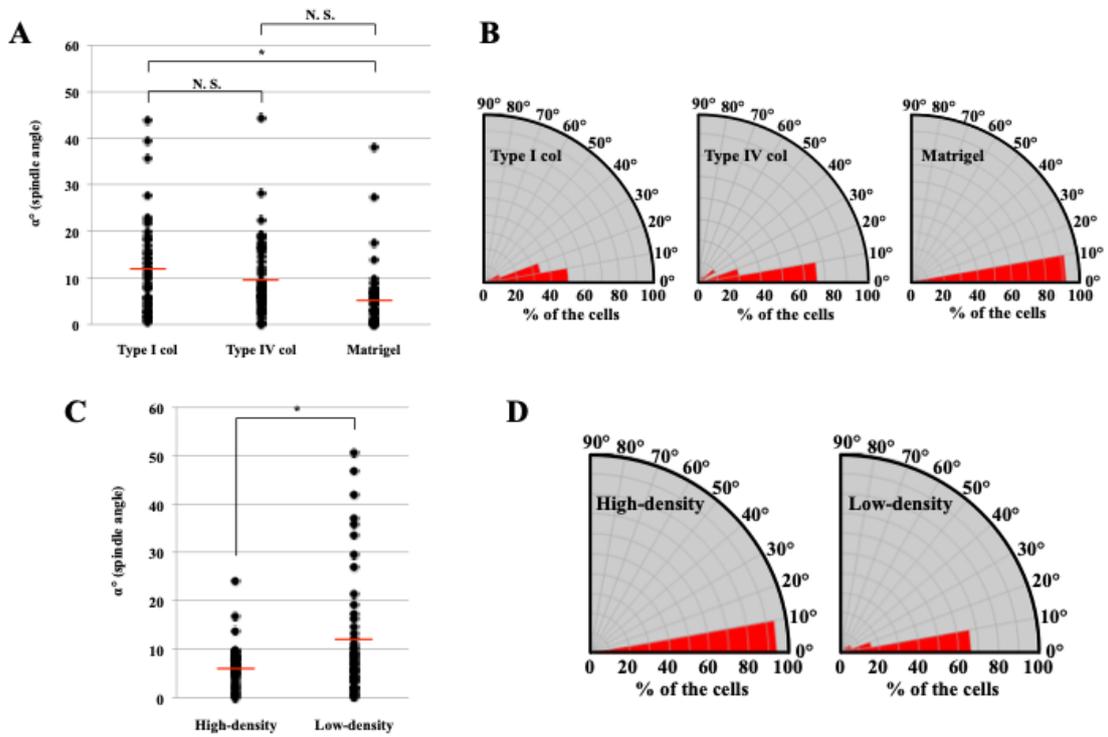


図2. シャーレ基底面 ECM および細胞密度の影響

(A) 細胞外マトリックスタンパク質の細胞分裂方向性への影響。I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、およびマトリゲルでコーティングされたガラスシャーレ上で培養された HeLa 細胞における分裂角度を 50 細胞で観察を行った。赤い水平線で示される平均角度は、I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、マトリゲルでそれぞれ  $11.98 \pm 10.24^\circ$ 、 $9.76 \pm 8.04^\circ$ 、 $5.70 \pm 6.75^\circ$ であった。\* ( $p < 0.005$ )。

(B) (A) のローズプロット。

(C) 細胞密度における、細胞分裂方向性の影響。水平の赤い線で示される平均角度は、高密度と低密度でそれぞれ  $6.68 \pm 4.16^\circ$ と  $12.06 \pm 12.70^\circ$ であった。\* ( $p < 0.12$ )

(D) (C) のローズプロット。

### 3. 細胞に対するイマチニブの影響

Abl キナーゼは、HeLa 細胞のスピンドルオリエンテーションを調節することが知られている[41, 42]。マトリゲルコーティングガラスシャーレでのスピンドルオリエンテーションアッセイの有効性をさらに確認するために、Abl キナーゼ阻害剤であるイマチニブが細胞分裂方向性に及ぼす影響を調べた。イマチニブは抗がん剤として開発されたチロシンキナーゼ阻害薬である。HeLa 細胞を 0.5 $\mu$ M および 5.0 $\mu$ M のイマチニブで 4 時間処理すると、紡錘体の配向不良が誘発され、この方法が信頼できることを示している。(図 3)

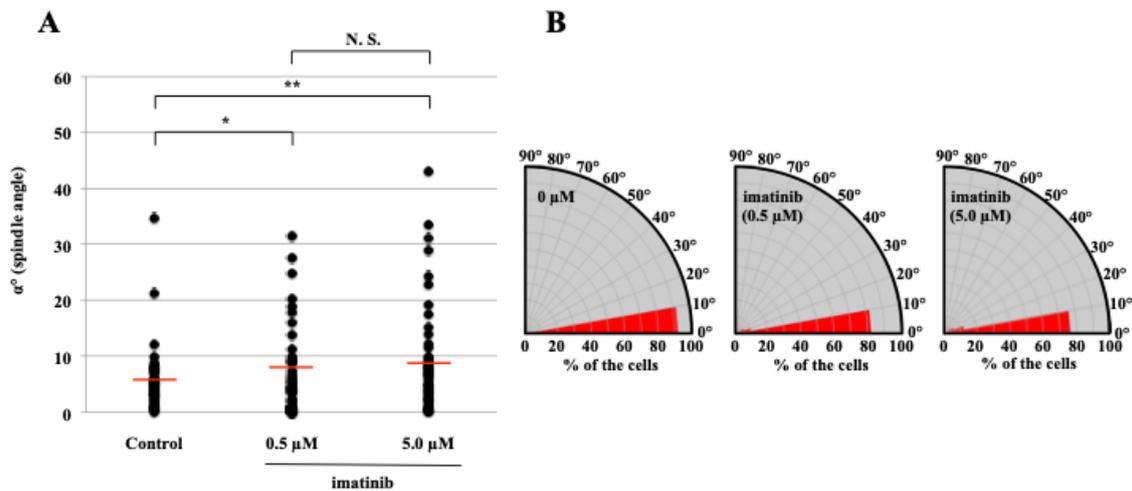


図 3. イマチニブの細胞分裂方向性への影響

(A) イマチニブによる細胞分裂方向性への影響。赤い水平線で示される平均角度は、0  $\mu$ M、0.5  $\mu$ M、5.0  $\mu$ M でそれぞれ  $5.74 \pm 5.70^\circ$ 、 $6.09 \pm 7.68^\circ$ 、 $8.86 \pm 9.55^\circ$ であった。\* ( $P < 0.05$ )、\*\* ( $P < 0.0005$ )。

(B) (A) のローズプロット。

#### 4. 紫外線の影響

HeLa 細胞への UVC 照射により、細胞分裂方向性は照射されていない群と比べ、有意な差が見られた。また、先行論文にあるイマチニブは細胞分裂方向の乱れを生じさせるものとしているが[41, 42]、紫外線照射ではより大きな細胞分裂方向性の乱れを生じさせることがわかった。(図 4)

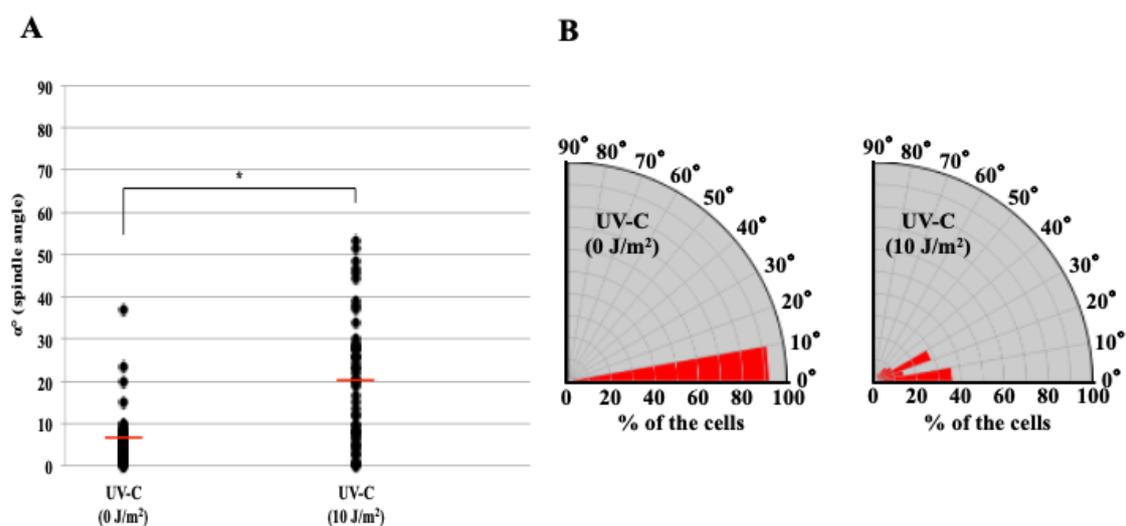


図 4. 紫外線照射による細胞分裂方向への影響

(A) 紫外線による細胞分裂方向への影響。赤い水平線で示される平均角度は  $6.18 \pm 6.32^\circ$ 、 $20.38 \pm 14.99^\circ$ であった。

(B) (A) のローズプロット。

## 2. 4 まとめと考察

基底面の接着因子のコートにより、細胞分裂方向は基底面に対して水平を保つようになる。また、基底面への接着因子検討において、マトリゲルコートされたシャーレでは、コラーゲンのみをコートしたシャーレよりも細胞の分裂方向は最も水平方向を保つことが分かった。細胞分裂方向性については、先行論文にある細胞の分裂方向の乱れを生じさせるイマチニブに比べ、紫外線照射された細胞の方が、より細胞分裂方向を乱れさせることが分かった。今回の結果は、紫外線が細胞分裂方向性の乱れに関して影響を及ぼすと結論する。

第 3 章  
紫外線誘発分裂方向異常と  
RhoGDI $\beta$  について

### 3. 1 研究背景

RhoGDI $\beta$  は上皮系細胞で発現が見られ、また、ゲノムストレスを受けると 3 型カスパーゼが活性化し、19 番目のアスパラギン酸部位で切断され、N 末欠失型変様 RhoGDI $\beta$  ( $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$ ) が出現する[28, 29]。この  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  はそれまで Rac1 の制御因子としての働きから、細胞内局在を変え、細胞の極性を制御する分子スイッチである Cdc42 と結合し阻害することが分かっている[43]。

本章では、第 2 章で示された紫外線誘発細胞方向性異常と、RhoGDI $\beta$  との関連を調べた。

### 3. 2 材料と方法

#### 1. 細胞

ヒト子宮頸部がん由来細胞である HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞は全て DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium) に 10%ウシ胎児血清を添加した培地で、37°C、5%CO<sub>2</sub>濃度の条件のインキュベーターで培養を行った。

#### 2. 使用したステーブルクローン

本研究で使用したステーブルクローンを表 1 に示す。以前に取得された、哺乳類発現ベクター-pcDNA3.1 / His-Xpress に全長の RhoGDI $\beta$  を発現する full-1、RhoGDI $\beta$  切断フォームである  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  を発現する  $\Delta$ N-1 をトランスフェクションしたものを使用した。また、RhoGDI $\beta$  をノックダウンするために、HeLa 細胞に ARHG の 5' 非翻訳領域 (5'-UTR) 配列 (GGCTGATCAAGAGATAGGCAGTGCA、GAATGCTGCTCAAGTTGGCTGATCA、および CCTTCCTGTTCTAACTGCCAGTACT) を標的とする哺乳類のショートヘアピン RNA (shRNA) ベクター-pcDNATM6.2-GW / miR をトランスフェクションしたものを使用した。さらに 20 個の安定したクローンを単離し、ここで使用するクローン (スクランブル、sh-RhoGDI $\beta$ ) を、免疫ブロットにより RhoGDI $\beta$  発現レベルに基づいて選択した。さらに選択したクローンである sh-RhoGDI $\beta$  に、野生型 RhoGDI $\beta$  および 19 番目のアスパラギン酸部位をアラニンに変異させた、非切断型 RhoGDI $\beta$  用の哺乳類発現ベクター-pcDNA3 をさらにトランスフェクトした。再び 20 個の安定したクローンが得られ、ここで使用したクローン (sh-RhoGDI $\beta$ + WT、sh-RhoGDI $\beta$ + D19A) は、免疫ブロットによって RhoGDI $\beta$  発現レベルに基づいて選択されました。また empty (sh-RhoGDI $\beta$ +empty) も確立され、それを使用した[43]。(表 1)

#### 3. Cdc42 活性測定

細胞内活性 Cdc42 は、p21 活性化キナーゼ-アガロースビーズ (G-LISA; Cytoskeleton, Inc., コロラド州デンバー) を用いたプルダウンアッセイによって定量的に測定が行われた。

#### 4. 免疫ブロット

培養した細胞や、組織サンプルは、SDS-sample buffer (25mM Tris-HCl pH 6.8、5% glycerol, 2.5% 2-mercaptoethanol, 1% SDS, protease inhibitor cocktail (Sigma 社)) を用い、氷上中で、10 秒を 3 回ソニケーションし、タンパク質抽出をした。その後 4°C、1 分間 15,000rpm で遠心し、その上清のタンパク質濃度を Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad 社) を用いて、サンプルが 20 $\mu$ g 量になるように SDS-sample buffer で調整を行った。100°Cで 3 分間熱処理を行った後、12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動、その後、Immobilom-P membrane (Millipore 社) にタンパク質を転写させた。その後、メンブレンを 1 次抗体で反応させ、2 次抗体と反応させた後、ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham 社) を使って、X 線フィルムに感光させ、タンパク質の発現を調べた。1 次抗体には、抗 Xpress (#R910-25; Invitrogen, Carlsbad, CA)、抗 RhoGDI $\beta$  抗体 (sc-6047, Santa Cruz Biotechnology 社)、抗  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  抗体 (#97A1015, Active Motif 社)、抗 RhoGDI $\alpha$  抗体 (sc-360, Santa Cruz Biotechnology 社) を用いた。2 次抗体には、HRP 標識した抗ラビット、抗マウスもしくは抗ゴート抗体 (Amersham Biosciences 社) を用いた。

#### 5. 統計

分裂方向角度の有意な分散は、F 検定を使用して分析した。p < 0.05 は、統計的に有意な差を示すと見なした。また、スチューデントの t 検定を使用して、Cdc42 活性測定の前平均値を比較した。

表 1. 実験に使用した stable clone

Strain no.	Name of the cell line	Plasmid transfected	Parent cells
1	empty-1	pcDNA3.1/His-Xpress	HeLa
2	full-1	pcDNA3.1/His-Xpress-RhoGDI $\beta$	HeLa
3	$\Delta$ N-1	pcDNA3.1/His-Xpress- $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$	HeLa
4	scrambled	pcDNATM6.2-GW/miR	HeLa
5	sh-RhoGDI $\beta$	pcDNATM6.2-GW/miR- sh-RhoGDI $\beta$	HeLa
6	sh-RhoGDI $\beta$ + empty	pcDNA3	sh-RhoGDI $\beta$
7	sh-RhoGDI $\beta$ + WT	pcDNA3-RhoGDI $\beta$	sh-RhoGDI $\beta$
8	sh-RhoGDI $\beta$ + D19A	pcDNA3-RhoGDI $\beta$ (D19A)	sh-RhoGDI $\beta$

### 3. 3 結果

#### 1. ΔN-RhoGDIβ の発現が HeLa 細胞の細胞分裂方向性に与える影響

平均細胞分裂角度は、empty、RhoGDIβ 発現細胞、および ΔN-RhoGDIβ 発現細胞でそれぞれ 7.87°、9.34°、および 18.61°であった。ΔN-RhoGDIβ 発現細胞の分裂方向は他のクローンよりも有意に高かった。(図 5)

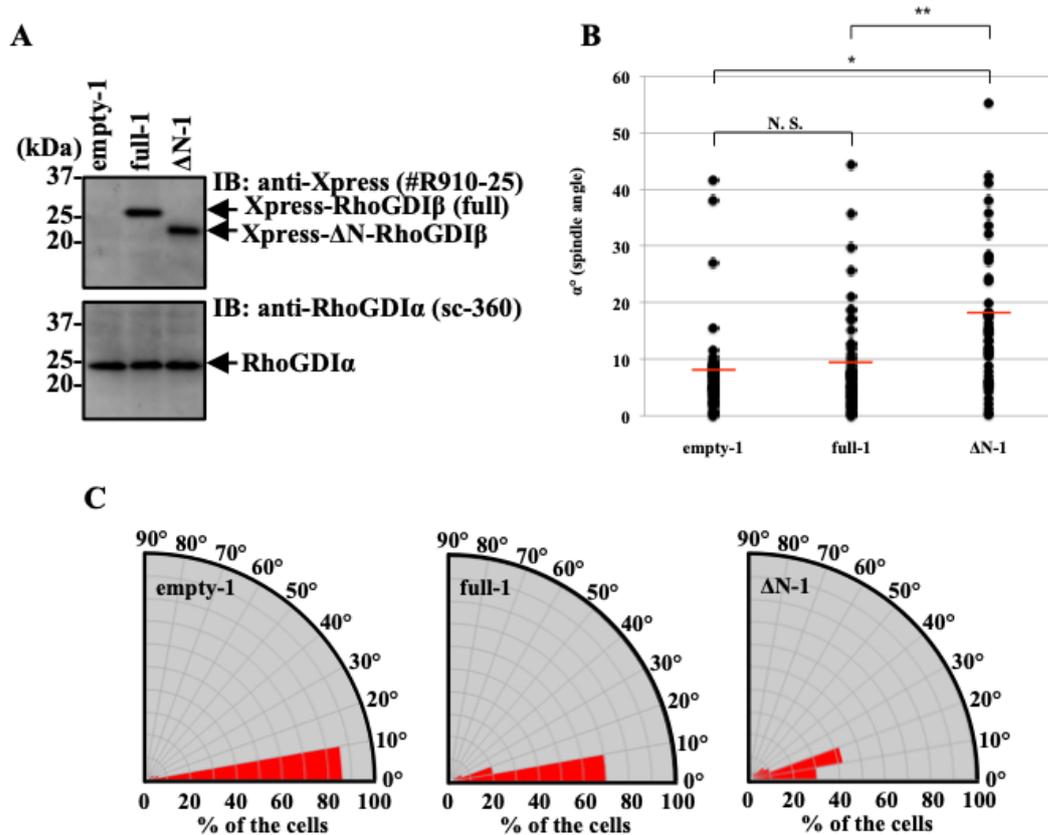


図 5. RhoGDIβ および ΔN-RhoGDIβ 発現細胞の分裂方向性

(A) コントロール細胞 (empty-1)、Xpress タグ付き完全長 RhoGDIβ 発現細胞 (full-1)、および Xpress タグ付き ΔN-RhoGDIβ 発現細胞 (ΔN-1) の発現の、抗 Xpress および抗 RhoGDIα 抗体を用いた免疫ブロット法による確認。

(B) 赤い水平線で示される平均角度は、クローン「empty-1」、「full-1」、「ΔN-1」でそれぞれ 7.87±8.17、9.34±9.14、18.61±15.86°であった。

(C) (B) のローズプロット

## 2. 紫外線と RhoGDI $\beta$ との関連

次に問題の紫外線などのゲノム損傷について調べた。前章の紫外線の影響の実験と同じように、細胞に紫外線を 10 J/m<sup>2</sup> 照射した。その後の再増殖の過程にある細胞をダブルサイミジン法で細胞周期を同調させ観察を行った。細胞の中には単極分裂 (monopolar) や、三極分裂 (tripolar / mulchpolar) が出現することがある。しかし、観察はこれらを除いた二極分裂 (bipolar) の細胞のみで行った。スクランブルでは紫外線によりゲノムが損傷すると、細胞分裂方向が振れるが、sh-RhoGDI $\beta$  では、紫外線を照射しても、分裂方向の乱れは抑えられていた。したがって、紫外線誘発細胞分裂方向性の乱れは、RhoGDI $\beta$  発現阻害により、抑制可能であることが分かった。(図 6)

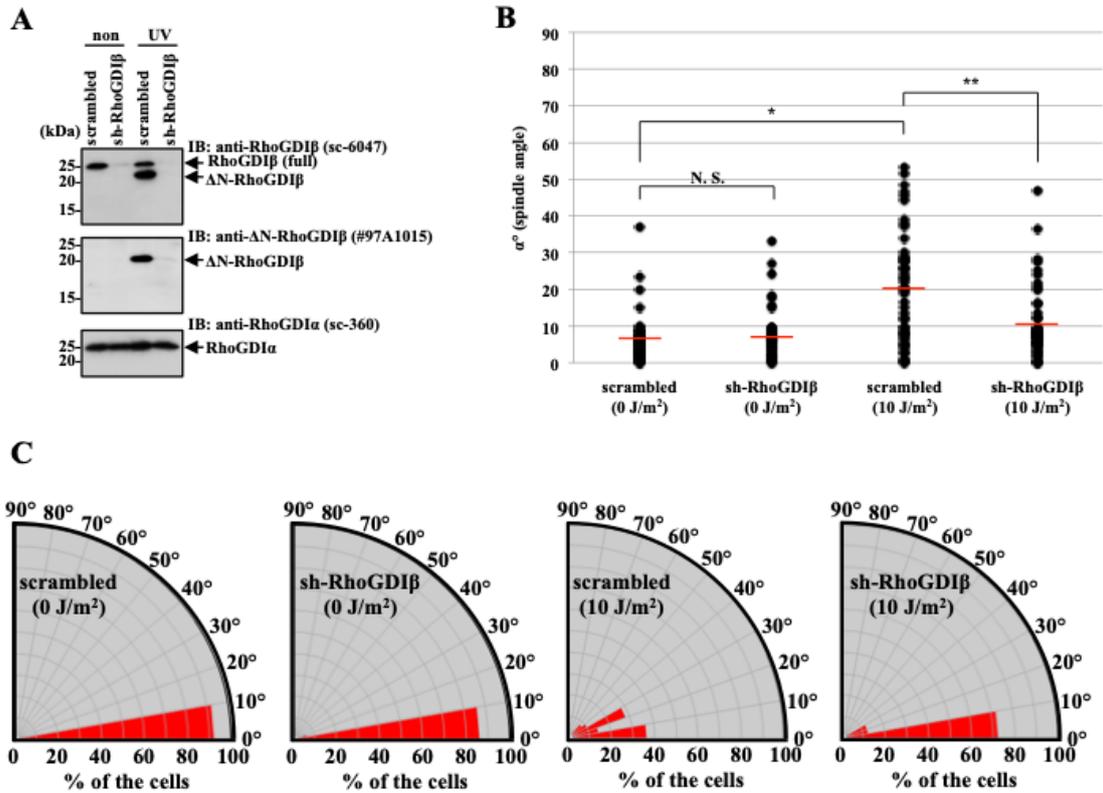


図 6. 紫外線誘発分裂方向異常と RhoGDIβ

(A) 安定したクローンにおける抗 RhoGDIβ 抗体、ΔN-RhoGDIβ 抗体および抗 RhoGDIα 抗体を用いた免疫ブロット法による確認。

(B) 赤い水平線で示される平均角度は、非照射クローンの「スクランブル」、  
「sh-RhoGDIβ」、および UVC 照射クローンの「スクランブル」と「sh-RhoGDIβ」  
6.18±6.32°、7.25±6.86°、20.38±14.99°、10.57±9.58°であった。\* p < 10<sup>-7</sup>、\*\* P < 0.005。

### 3. Cdc42 の活性測定

$\Delta N$ -RhoGDI $\beta$  は、Rac1 の制御因子の働きから局在性を変え、Cdc42 に結合し、阻害する。そこで紫外線を照射された際の Cdc42 の活性を測定した。その結果、コントロールにおいて紫外線を照射された際、Cdc42 の活性阻害が見られた。しかし、RhoGDI $\beta$  をノックダウンさせた細胞では Cdc42 の活性阻害は抑制された。さらに、RhoGDI $\beta$  のノックダウン細胞に野生型 RhoGDI $\beta$  を移入させたものではその効果を減弱させてしまうが、19 番目のアスパラギン酸部位をアラニンに変異させた非切断型の RhoGDI $\beta$  では、阻害効果を生じることはなかった。(図 7)

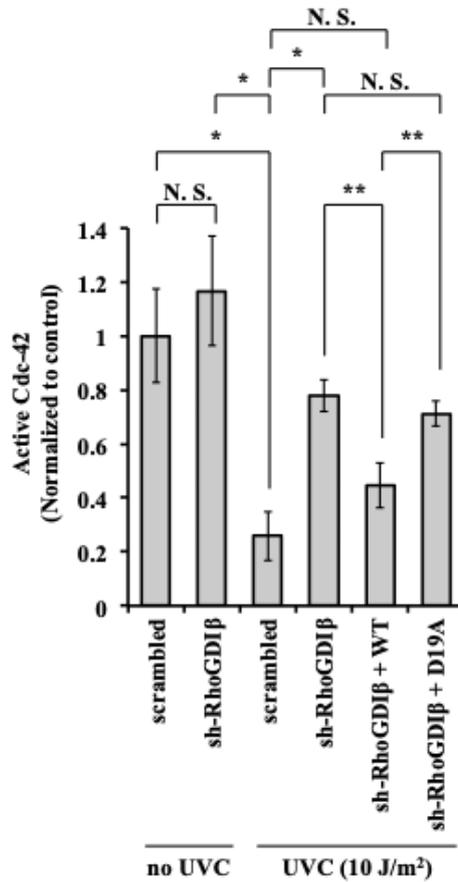


図 7. Cdc42 活性の測定

有糸分裂紡錘体の UVC 誘発性の誤配向は、 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  を介した Cdc42 阻害によって媒介される。RhoGDI $\beta$  ノックダウンは、UV 照射細胞における Cdc42 阻害を緩和する。UVC 照射および非照射中期同期細胞（クローン「スクランブル」、「sh-RhoGDI $\beta$ 」、「sh-RhoGDI $\beta$ + WT」、および「sh-RhoGDI $\beta$ + D19A」）からの細胞溶解物を分析して、活性 Cdc42 の総レベルを G-LISA を用いて決定した。値は平均 $\pm$ SD を示す。\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ 。

#### 4. Cdc42 活性と分裂方向性の乱れの関係

Cdc42 活性の抑制は、 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  が細胞分裂方向性を乱す主要なメカニズムである可能性がある。安定したクローンを使用して、恒常的に活性な Cdc42 の変異体発現 (Cdc42-G12V) により、UVC 照射細胞および生存細胞での 3 型カスパーゼ活性化によって引き起こされる N 末端切断 RhoGDI $\beta$  を介した細胞分裂方向性の乱れを抑制できるかどうかをテストした。UVC 照射後の  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  発現細胞で誘導された細胞分裂方向性の乱れが観察され、恒常的に活性のある Cdc42 の過剰発現によって抑制されました。(図 8)

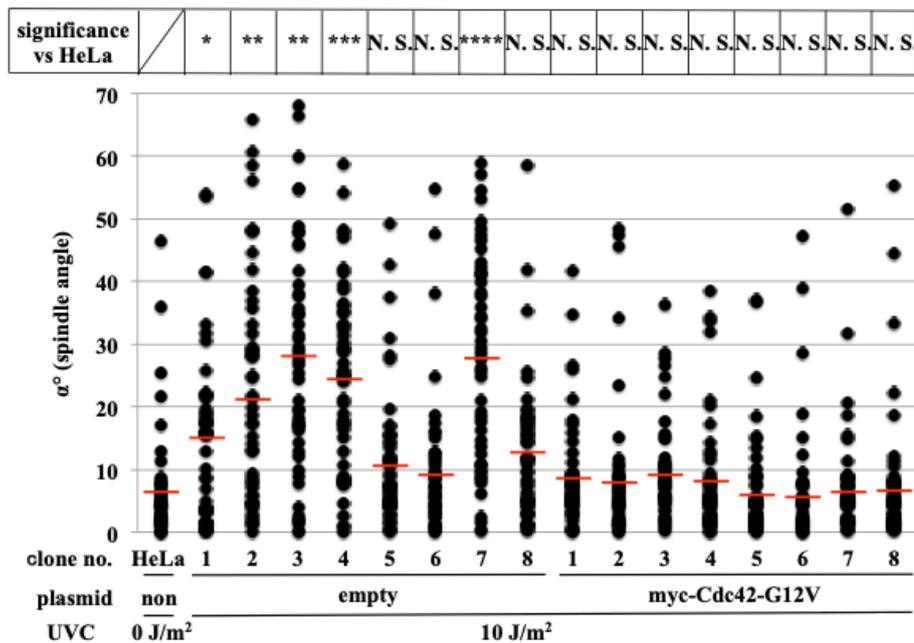


図 8. 恒常性活性型変異体 Cdc42-G12V

恒常的活性型変異の Cdc42 を強制発現させて、常に Cdc42 活性が高い状態での紫外線誘発細胞分裂方向性異常を観察した。その結果、RhoGDI $\beta$  や  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  が発現している細胞や、RhoGDI $\beta$  をノックダウンした細胞においても、紫外線による分裂方向性の異常は見られなかった。

### 3. 4 まとめと考察

RhoGDI $\beta$  は Rac1 活性に優先的に結合、調節を行う[28, 44, 45]。活活性型 3 型カスパーゼを含む細胞では、アポトーシスの実行に関与しない  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  がアップレギュレーションされる[43]。以前の発見と一致して、 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  は UVC 照射細胞において Cdc42 阻害剤として機能する[43]。つまり、紫外線誘発細胞分裂方向性の乱れは、RhoGDI $\beta$  がゲノムストレスにより切断され  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  が発現することで生じること、RhoGDI $\beta$  をノックダウンした細胞では、 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  の発現が阻害されることで分裂方向性が乱れること、さらに、紫外線誘発細胞分裂方向性の乱れは、 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  が Cdc42 を阻害することにより起きることが分かった。したがって、RhoGDI $\beta$  の発現を阻害することでその現象は抑制することが可能であることが示唆された。

## 第 4 章

# RhoGDI $\beta$ 発現抑制物質探索 ～アスコルビン酸誘導体～

#### 4. 1 研究背景

前章では  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  の発現により、細胞分裂方向性の異常を生じることを解明した。

そこで切断前の RhoGDI $\beta$  を抑制することができれば、 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  の抑制もできると考え、RhoGDI $\beta$  の発現抑制物質探索を行った。そこで注目したのがアスコルビン酸 (ascorbic acid / Vitamin C) とその誘導体である[46-48]。アスコルビン酸は美肌や健康に関する研究が世界的に広く行われており[48-54]、また、広島県の特産品であり、日本生産量 1 位を誇るレモンに多く含まれている[55]。水溶性ビタミンであり、体内のコラーゲン産生に必須であり、また、抗炎症、老化防止、抗酸化といった、様々な効果を発揮することが知られている[48-54]。

本章では、アスコルビン酸とその誘導体酸誘導体に焦点を当て、HeLa 細胞での RhoGDI $\beta$  発現抑制のスクリーニングテストを行い、RhoGDI $\beta$  を分子標的とすることができる物質の探索、解明を行った。

## 4. 2 材料と方法

### 1. 細胞

ヒト子宮頸部がん由来細胞である HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞は全て DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium) に 10%ウシ胎児血清を添加した培地で、37°C、5%CO<sub>2</sub>濃度の条件のインキュベーターで培養を行った。

### 2. 試薬

本研究で試験したアスコルビン酸およびその誘導体 AA およびその誘導体 15 種類を表 1 に示す。AA、D-エリソルビン酸および L-アスコルビン酸 2-リン酸セスキマグネシウム塩水和物は、和光純薬工業、東京化学工業、およびシグマケミカルからそれぞれ購入した。2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸と 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-D-エリソルビン酸は林原生化学研究所から提供された。表 2 に記載されているその他の化合物は、再結晶によって合成および精製された。(表 2)

### 3. スクリーニング試験

RhoGDI $\beta$  の発現を抑制する化合物をスクリーニングするために、HeLa 細胞を使用して行った。処理濃度は致死濃度の 1/100 とし、24 時間処理を行った。次に細胞を回収し、Qiagen RNeasyKit を使用して RNA を抽出した。リアルタイム定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) を、ワンステップ TB Green PrimeScrip RT-PCR キット II (Takara) を使用してサーマルサイクラーダイスリアルタイムシステムで実行し、メッセンジャーRNA (mRNA) 発現レベルの変化を分析した。スクリーニングは RhoGDI $\alpha$  (*ARHGDI $\alpha$* ) および RhoGDI $\beta$  (*ARHGDI $\beta$* ) 転写産物は、次の特定のプライマーペアを使用して分析しました。RhoGDI $\alpha$  forward : 5'-CAGGTTCT ATCTCCCCGTCA-3'、RhoGDI $\alpha$  reverse : 5'-TGAGGTGACTTGAGTTTTGGC-3'、RhoGDI $\beta$  forward : 5'-ATTCTCTCAGGTG-3'、RhoGDI $\beta$  reverse : 5'-TCTCTTGTGTCGTTTACAGTG-3'。結果は、しきい値点だけでなく増幅曲線全体を考慮した 2nd Derivative Maximam 法を使用して計算した。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*GAPDH*) をハウスキーピングコントロールとして使用し、各アッセイに負の逆転写反応を含めた。相対転写レベルは、*GAPDH* に対して定量化された。データは、モック細胞と化合物処理

細胞の相対的な転写レベル間の発現の倍数変化として示している。

#### 4. 免疫ブロット

培養した細胞や、組織サンプルは、SDS-sample buffer (25mM Tris-HCl pH 6.8、5% glycerol, 2.5% 2-mercaptoethanol, 1% SDS, protease inhibitor cocktail (Sigma 社)) を用い、氷上中で、10 秒を 3 回ソニケーションし、タンパク質抽出をした。その後 4°C、1 分間 15,000rpm で遠心し、その上清のタンパク質濃度を Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad 社) を用いて、サンプルが 20 $\mu$ g 量になるように SDS-sample buffer で調整を行った。100°Cで 3 分間熱処理を行った後、12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動、その後、Immobilom-P membrane (Millipore 社) にタンパク質を転写させた。その後、メンブレンを 1 次抗体で反応させ、2 次抗体と反応させた後、ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham 社) を使って、X 線フィルムに感光させ、タンパク質の発現を調べた。1 次抗体には、抗 RhoGDI $\beta$  抗体 (sc-6047, Santa Cruz Biotechnology 社)、抗  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  抗体 (#97A1015, Active Motif 社)、抗 RhoGDI $\alpha$  抗体 (sc-360, Santa Cruz Biotechnology 社)、抗  $\alpha$ -Tubulin 抗体 (CLT9002, Cedarlane 社) を用いた。2 次抗体には、HRP 標識した抗ラビット、抗マウスもしくは抗ゴート抗体 (Amersham Biosciences 社) を用いた。現像された各ブロットのバンド強度の定量化は、密度プロファイルの測定に広く使用されている Java ベースの画像解析パッケージである ImageJ を使用した。

#### 5. X 線照射

指数関数的に成長する細胞は、X 線発生器 (135 kVp) を使用して 4mA で 0.5 mm Al と 0.5mm Cu フィルターを使用して照射した。その時の Victoreen 電離箱で測定された線量率は 0.5Gy / min であった。

#### 6. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた間接免疫蛍光法

ダブルサイミジン法で同調させた細胞を 4%パラホルムアルデヒドで処理した。その後 Triton X-100 で透過処理し、ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、サンプルを抗  $\gamma$ -チューブリン抗体 (Sigma-Aldrich; T6557) および Alexa Fluor 568 結合二次抗体をインキュベートした。同時に、DNA は Hoechst 33258 で染色した。染色されたサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡を使用して分析を行った。

## 7. 統計

統計値間の差は、スチューデントの t 検定を使用して分析され、 $p < 0.05$  は統計的に有意な差を示している。分裂角度の有意な分散は、マンホイットニーU 検定によって分析され、 $p < 0.05$  は統計的に有意な差を示している。

表 2. アスコルビン酸誘導体一覧

No.	Abbreviation	Compound name	Con. ( $\mu\text{M}$ )
1	AA	L-ascorbic acid	100
2	EA	D-erythorbic acid	100
3	AA-2G	2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid	500
4	EA-2G	2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-D-erythorbic acid	500
5	AA-2P	L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate	500
6	2-EthylAA	2-O-ethyl-L-ascorbic acid	100
7	2-DodecylAA	2-O-dodecyl-L-ascorbic acid	10
8	2-OctadecylAA	2-O-octadecyl-L-ascorbic acid	10
9	3-EthylAA	3-O-ethyl-L-ascorbic acid	100
10	3-DodecylAA	3-O-dodecyl-L-ascorbic acid	10
11	3-OctadecylAA	3-O-octadodecyl-L-ascorbic acid	10
12	6-sOcta-AA-2G	6-O-octanoyl-2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid	250
13	6-bOcta-AA-2G	2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-6-O-(2-propylpentanoyl)-L-ascorbic acid	250
14	6-sDode-AA-2G	6-O-dodecanoyl-2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid	250
15	6-bDode-AA-2G	2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-6-O-(2-pentylheptanoyl)-L-ascorbic acid	250

### 4. 3 結果

#### 1. スクリーニング結果

薬剤による RhoGDI $\beta$  発現抑制効果を見るために、15 種類のアスコルビン酸とその誘導体でスクリーニングを行った。(図 9-A) qRT-PCR によって *GAPDH* 発現に対する *ARGDIA* と *ARGDIB* の発現を定量し、未処理コントロールの *GAPDH* 発現を基準とした相対的な発現量として表している。(図 9-B) その結果、8 番の化合物である、2-*O*-octadecylascorbic acid (2-OctadecylAA) に発現抑制が見られた。また、免疫ブロットでも、アスコルビン酸とその誘導体のスクリーニングを行ったところ、8 番目の化合物である、2-OctadecylAA 同様の結果が得られた。(図 9-C, D)

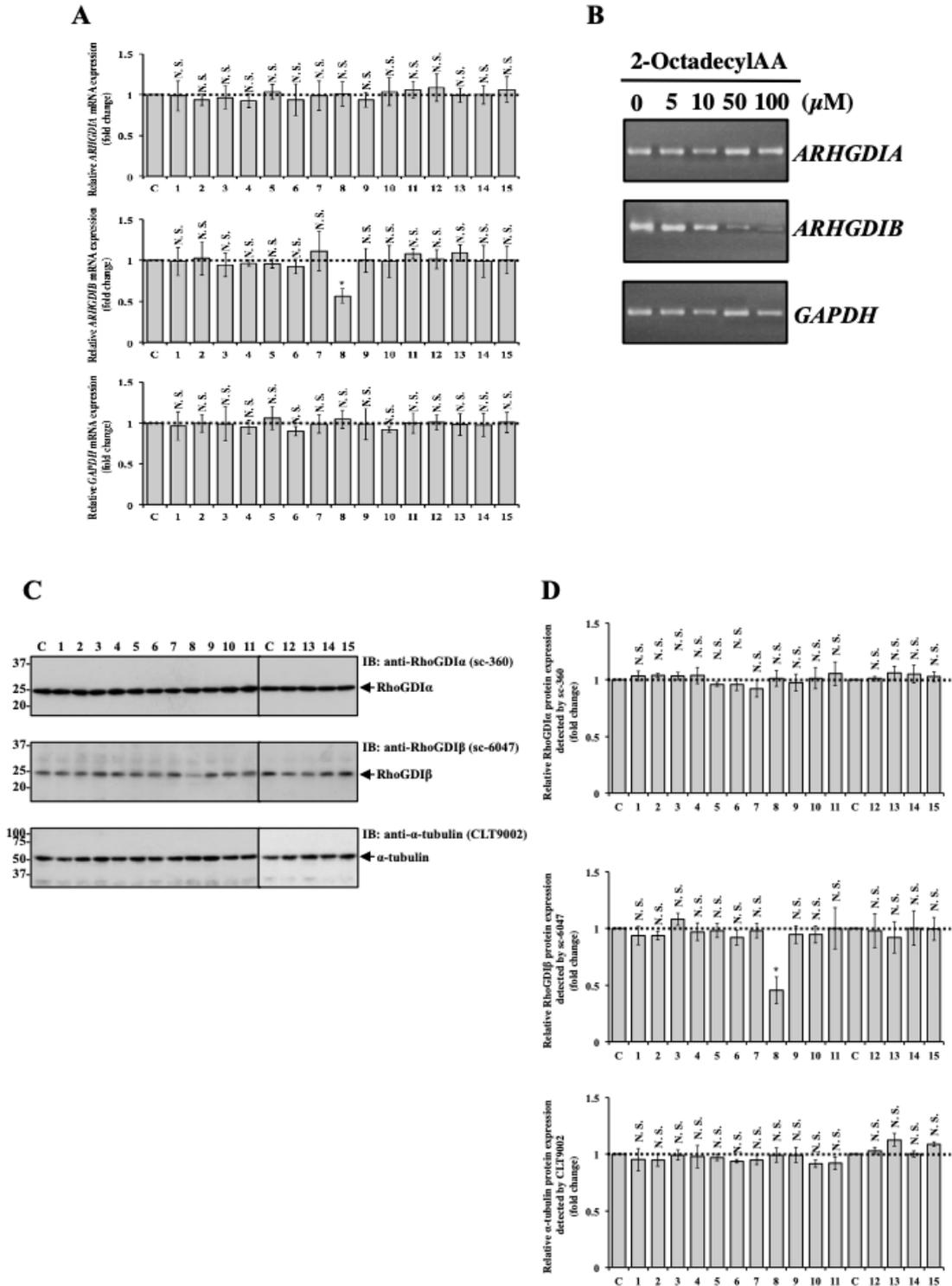


図9. qRT-PCR と免疫ブロットの結果

(A) RhoGDI $\alpha$ 、RhoGDI $\beta$ 、およびグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) のメッセンジャーRNA (mRNA) 発現レベルに対するアスコルビ

ン酸 (AA) およびその誘導体の影響。\*有意差 ( $p < 0.02$ )。

(B) RhoGDI $\alpha$ 、RhoGDI $\beta$ 、および GAPDH の mRNA 発現レベルに対する 2-OctadecylAA の用量依存的効果。

(C) RhoGDI $\alpha$ 、RhoGDI $\beta$ 、および  $\alpha$ -チューブリンのタンパク質発現レベルに対する AA およびその誘導体の影響。代表的な免疫ブロットを示す。

(D) (C) で示されたタンパク質のタンパク質アバンドンスイムノブロッティングからの相対バンド密度のデンストメトリー定量分析。上：sc-360 によって検出された RhoGDI $\alpha$  の定量分析。中：sc-6047 によって検出された RhoGDI $\beta$  の定量分析。下：CLT9002 によって検出された  $\alpha$ -チューブリンの定量分析。\*有意差 ( $p < 0.02$ )。

## 2. 2-OctadecylAA による放射線照射後の RhoGDI $\beta$ 発現に対する影響

電離放射線照射後の RhoGDI $\beta$  と、 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  の発現を調べるために、照射してから経時的に 21 日まで細胞を回収した (図 10-A)。それらの細胞を免疫ブロットし、RhoGDI $\beta$  と  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  の発現を見たところ、照射後 13 日目までその発現が持続していた。また、2-OctadecylAA を処理した細胞で免疫ブロットを行ったところ、非照射時では 2-OctadecylAA 処理により RhoGDI $\beta$  の発現の低下が見られた。また、照射時には 2-OctadecylAA で RhoGDI $\beta$  と  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  の発現低下が見られた。(図 10-B)。

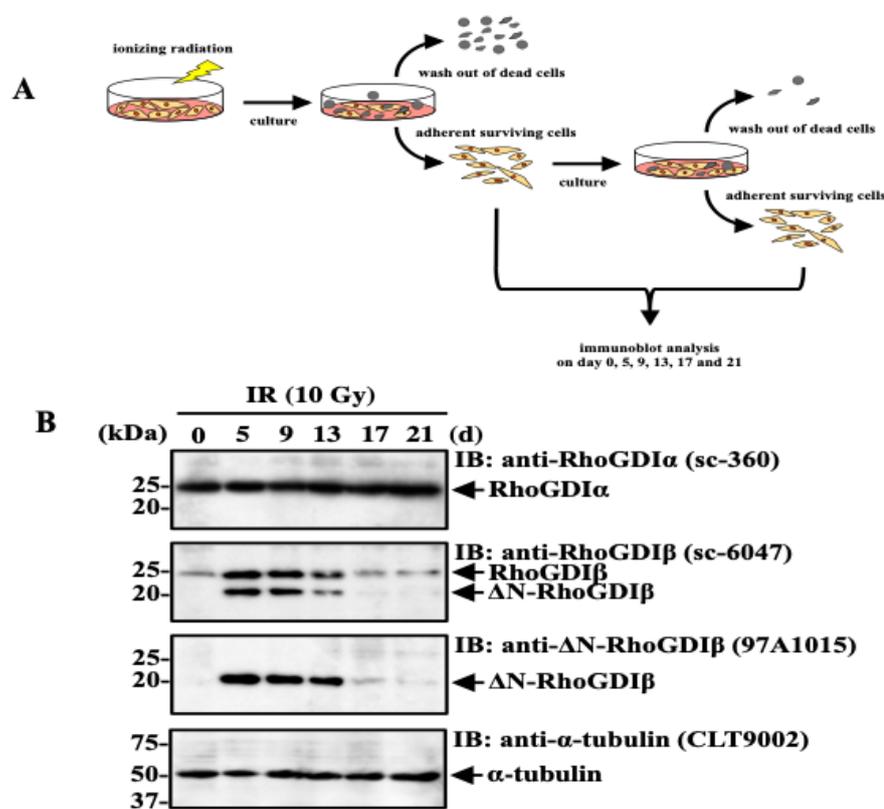


図 10. 電離放射線による RhoGDI $\beta$  発現の影響と 2-OctadecylAA

(A) 照射後の生存細胞の収集を示す概略図。

(B) 照射細胞および生存細胞における RhoGDI $\beta$  および  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  のタンパク質発現レベル。免疫ブロットのローディングコントロールとして  $\alpha$ -チューブリンを使用した。代表的な免疫ブロットを示す。

3. 2-OctadecylAA による電離放射線照射後の細胞分裂方向に対する影響  
電離放射線照射後の「9 日目」の細胞をダブルサイミジン法で同調し、アスコルビン酸と 2-OctadecylAA 処理をした分裂期細胞の観察を行い、分裂方向の影響を調べた。その結果、電離放射線照射されたコントロールと AA を処理した細胞では、分裂方向が乱れていたが、2-OctadecylAA では放射線照射されても、分裂方向の乱れは抑制されているのが分かった。(図 11)

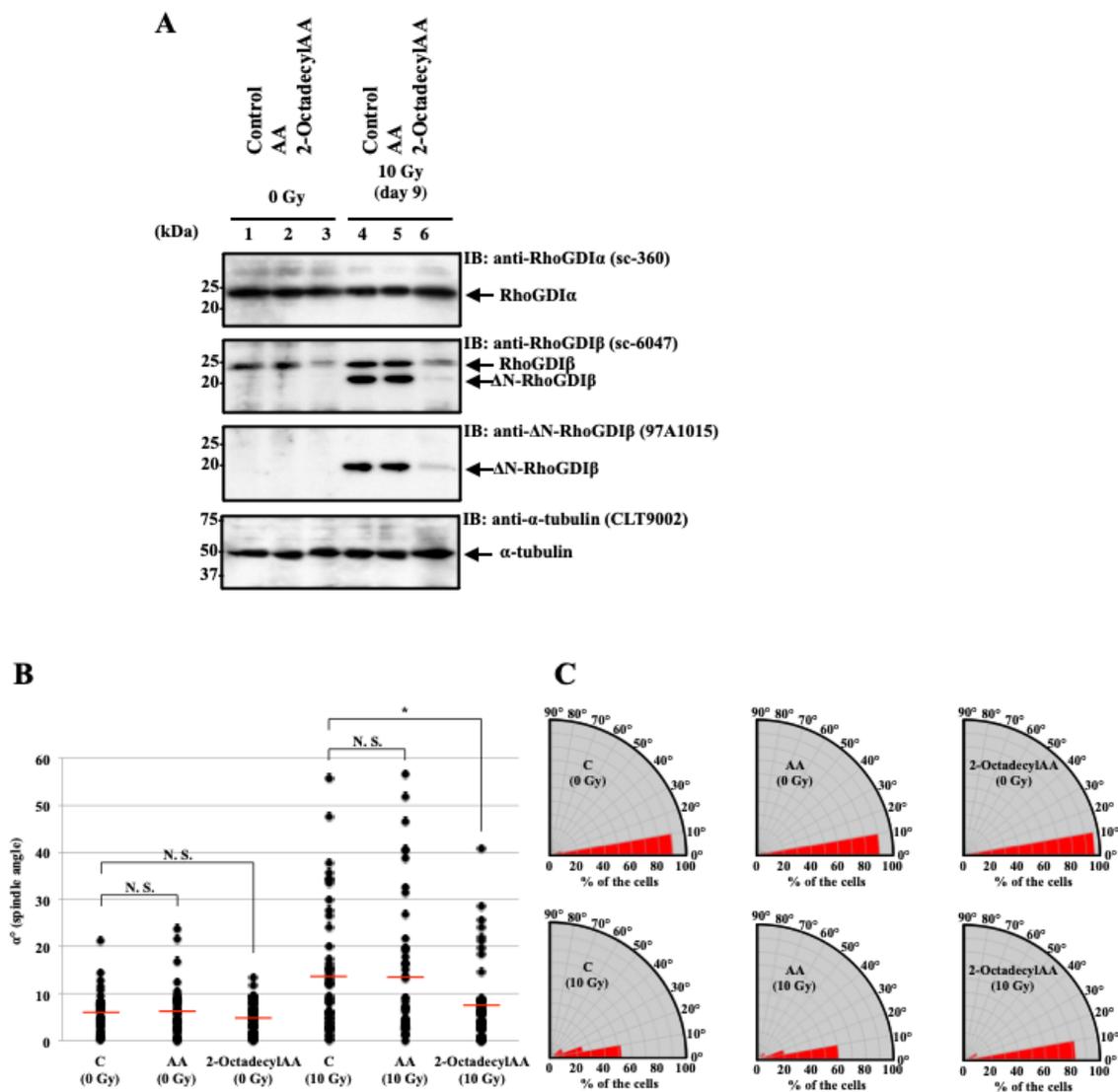


図 11. 電離放射線による分裂方向の影響と 2-OctadecylAA

(A) RhoGDI $\alpha$ 、RhoGDI $\beta$ 、および  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  のタンパク質発現レベルに対する 2-OctadecylAA の効果。免疫ブロットのローディングコントロールとして  $\alpha$ -チューブリンを使用した。未処理の非照射細胞 (レーン 1)、AA 処理の非照射細胞 (レーン 2)、2-OctadecylAA 処理の非照射細胞 (レーン 3)、未処理の照射細胞 (レーン 4)、AA 処理の照射細胞 (レーン 5)、および 2-OctadecylAA 処理照射細胞 (レーン 6)。代表的な免疫ブロットを示す

(B) 2-OctadecylAA が X 線照射によって引き起こされた紡錘体の誤配向に及ぼす影響。 (A) 未処理の非照射 (C、0 Gy)、AA 処理の非照射 (AA、0 Gy)、2-OctadecylAA 処理の非照射 (2-OctadecylAA、0 Gy)、未処理の照射 (C、10 Gy)、

AA 処理照射 (AA、10 Gy)、および 2-OctadecylAA 処理照射 (2-OctadecylAA 10 Gy) 細胞。赤い水平線で示されている平均角度は左より  $5.91 \pm 4.06^\circ$ 、 $6.17 \pm 4.93^\circ$ 、 $4.97 \pm 3.34^\circ$ 、 $13.93 \pm 13.09^\circ$ 、 $13.64 \pm 14.53^\circ$  および  $8.15 \pm 8.47^\circ$ 。\*有意差 ( $p < 0.02$ )。  
(C) (B) のローズプロット。

#### 4. 4 まとめと考察

qRT-PCR と免疫ブロットの結果、脂溶性誘導体である 2-OctadecylAA に効果のあることが分かった。転写や翻訳の段階で RhoGDI $\beta$  の発現が下がることが考えられる。また電離放射線誘発細胞分裂方向異常は、コントロールや AA 処理で起こっていたものの、2-OctadecylAA 処理により抑制された。RhoGDI $\beta$  の発現が下げられ、分裂方向異常が抑制されている可能性がある。

2-OctadecylAA は親油性であり[56]、マウスおよびラットモデルにおける肝細胞癌の発症の予防に有効であると報告されている[57, 58]。その効果は、AA のような抗酸化活性に起因していると言われていたが、本研究の結果は、2-OctadecylAA が強力な抗酸化剤ではなく、アポトーシス後の紡錘体配向を調節し、アポトーシス後の代償性増殖において、RhoGDI $\beta$  シグナル伝達の重要な阻害作用を有することを示した。このことから、肝細胞癌の発生に対する 2-OctadecylAA の効果は、RhoGDI $\beta$  が部分的に関わっている可能性がある。

第 5 章  
RhoGDI $\beta$  発現抑制物質探索  
～天然物素材～

## 5. 1 研究背景

前章では、アスコルビン酸とその誘導体にフォーカスを当てて RhoGDI $\beta$  抑制物質の探索を行ってきたが、本章では、ヒトの皮膚組織構築改善の期待が持てる天然物素材でスクリーニングを行い、RhoGDI $\beta$  を分子標的とした新たな物質の探索を行った。

## 5. 2 材料と方法

### 1. 細胞

ヒト子宮頸部がん由来細胞である HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞は全て DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium) に 10%ウシ胎児血清を添加した培地で、37°C、5%CO<sub>2</sub>濃度の条件のインキュベーターで培養を行った。

### 2. スクリーニング試験

RhoGDI $\beta$  の発現を抑制する化合物をスクリーニングするために、HeLa 細胞を使用して行った。Qiagen RNeasyKit を使用して RNA を抽出し、リアルタイム定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) を、ワンステップ TB Green PrimeScrip RT-PCR キット II (Takara) を使用してサーマルサイクラーダイスリアルタイムシステムで実行し、メッセンジャーRNA (mRNA) 発現レベルの変化を分析した。スクリーニングは RhoGDI $\alpha$  (ARHGDI $\alpha$ ) および RhoGDI $\beta$  (ARHGDI $\beta$ ) 転写産物は、次の特定のプライマーペアを使用して分析しました。RhoGDI $\alpha$  forward : 5'-CAGGTTCTATCTCCCCGTCA-3'、RhoGDI $\alpha$  reverse : 5'TGAGGTGACTTGAGTTTTGGC-3'、RhoGDI $\beta$  forward : 5'-ATTCTCTCAGGTG-3'、RhoGDI $\beta$  reverse : 5'-TCTCTTGTGTCGTTTACAGTG-3'。結果は、しきい値点だけでなく増幅曲線全体を考慮した 2nd Derivative Maximam 法を使用して計算した。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) をハウスキーピングコントロールとして使用し、各アッセイに負の逆転写反応を含めた。相対転写レベルは、GAPDH に対して定量化された。データは、モック細胞と化合物処理細胞の相対的な転写レベル間の発現の倍数変化として示している。

### 3. 免疫ブロット

培養した細胞や、組織サンプルは、SDS-sample buffer (25mM Tris-HCl pH 6.8、5% glycerol, 2.5% 2-mercaptoethanol, 1% SDS, protease inhibitor cocktail (Sigma 社)) を用い、氷上中で、10 秒を 3 回ソニケーションし、タンパク質抽出をした。その後 4°C、1 分間 15,000rpm で遠心し、その上清のタンパク質濃度を Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad 社) を用いて、サンプルが 20 $\mu$ g 量になるように SDS-sample buffer で調整を行った。100°Cで 3 分間熱処理を行った後、12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動、その後、Immobilom-P membrane (Millipore 社)

にタンパク質を転写させた。その後、メンブレンを1次抗体で反応させ、2次抗体と反応させた後、ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham 社) を使って、X線フィルムに感光させ、タンパク質の発現を調べた。1次抗体には、抗 RhoGDI $\beta$  抗体 (sc-6047, Santa Cruz Biotechnology 社)、抗  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  抗体 (#97A1015, Active Motif 社)、抗 RhoGDI $\alpha$  抗体 (sc-360, Santa Cruz Biotechnology 社)、抗  $\alpha$ -Tubulin 抗体 (CLT9002, Cedarlane 社) を用いた。2次抗体には、HRP 標識した抗ラビット、抗マウスもしくは抗ゴート抗体 (Amersham Biosciences 社) を用いた。現像された各ブロットのバンド強度の定量化は、密度プロファイルの測定に広く使用されている Java ベースの画像解析パッケージである ImageJ を使用した。

### 5. 3 結果

#### 1. 1次スクリーニング

ヒト皮膚組織改善への用途が期待されている各種天然物素材 105 種類（セレクトリックバイオ社供給の Natural Product Library）を qRT-PCR で RhoGDI $\beta$  の発現量を確認した（表 3）。その結果、ラン、シアバターノキ種子、モニミア、水ナス果実エキス、加水分解コメエキス、アッケシソウ、トウキンセンカ、ヤナギラン花、オウゴン、乳酸桿菌、ライ麦種子、ジャスミン、ムラサキウマゴヤシの 13 種において、RhoGDI $\beta$  の発現レベルを下げる事が分かった。（図 12）。

表3. 1次スクリーニング結果

105種類の天然物素材の1次スクリーニング結果。数値が100の時、RhoGDIβ発現が100%であることを示す。RhoGDIβの発現量が60%未満のものは赤字になっている。

抽出液番号	RhoGDIβ発現量	
未処理 (清煤のみ)	100	1
1	100.4	1.004
2	101	1.01
3	101.4	1.014
4	97.5	0.975
5	43.7	0.437
6	107.9	1.079
7	108.2	1.082
8	108.1	1.081
9	97.2	0.972
10	99.7	0.997
11	98.8	0.988
12	106.4	1.064
13	107.5	1.075
14	99.9	0.999
15	44.5	0.445
16	97	0.97
17	96.3	0.963
18	41.9	0.419
19	100.9	1.009
20	107.7	1.077
21	40.6	0.406
22	102.4	1.024
23	101.8	1.018
24	102.2	1.022
25	23	0.23

26	106.3	1.063
27	27.3	0.273
28	103.2	1.032
29	105	1.05
30	97.6	0.976
31	96.9	0.969
32	40.2	0.402
33	95.1	0.951
34	39.8	0.398
35	103.2	1.032
36	100.8	1.008
37	103.5	1.035
38	102.7	1.027
39	104.4	1.044
40	100.6	1.006
41	108.3	1.083
42	105.9	1.059
43	101.2	1.012
44	101.1	1.011
45	38.9	0.389
46	98.4	0.984
47	108.2	1.082
48	102.8	1.028
49	95.5	0.955
50	103.1	1.031
51	91.2	0.912

抽出液番号	RhoGDIβ発現量	
52	102.5	1.025
53	102.2	1.022
54	107.1	1.071
55	62.7	0.627
56	97.9	0.979
57	106.8	1.068
58	100.9	1.009
59	105.4	1.054
60	98.7	0.987
61	95.3	0.953
62	97.3	0.973
63	94.2	0.942
64	63.4	0.634
65	96.7	0.967
66	108.7	1.087
67	106.2	1.062
68	107.8	1.078
69	108.7	1.087
70	102.7	1.027
71	105.3	1.053
72	97.7	0.977
73	99.9	0.999
74	101.7	1.017
75	102.8	1.028
76	103.2	1.032
77	103.9	1.039
78	106.4	1.064
79	102.6	1.026

80	101.8	1.018
81	99.6	0.996
82	95.1	0.951
83	92.4	0.924
84	94.1	0.941
85	100.6	1.006
86	98.4	0.984
87	97.6	0.976
88	97.3	0.973
89	96.8	0.968
90	65.2	0.652
91	91.1	0.911
92	104.2	1.042
93	97.4	0.974
94	107.9	1.079
95	96.2	0.962
96	103.9	1.039
97	61.9	0.619
98	97	0.97
99	102.5	1.025
100	66.8	0.668
101	95.7	0.957
102	98.1	0.981
103	95.4	0.954
104	100	1
105	99.6	0.996

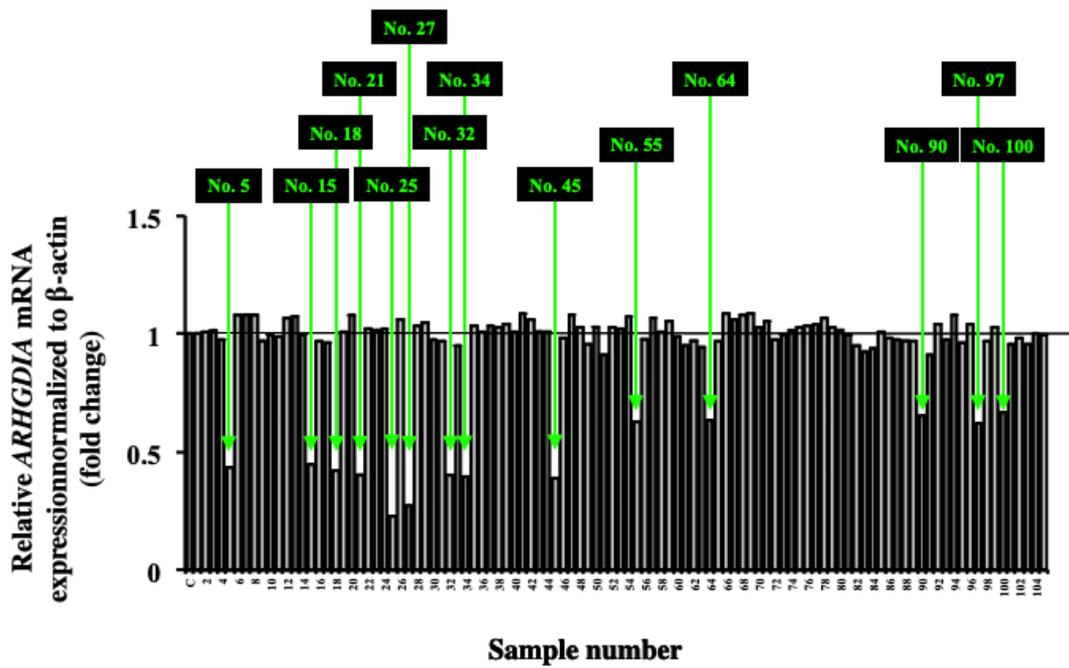


図 12. 各種天然物素材による RhoGDI $\beta$  発現抑制の効果

表 2 の結果をグラフにした。13 種において、RhoGDI $\beta$  の発現レベルを下げる  
ことが分かった。

## 2. 2次スクリーニング

1次スクリーニングの結果から得られた、RhoGDI $\beta$ の発現抑制をした13種の天然物素材を用いて、免疫ブロットによる2次スクリーニングを行った。その結果、1種によってRhoGDI $\beta$ の発現の増強があったほか、5種では50%以下の抑制効果が見られた。

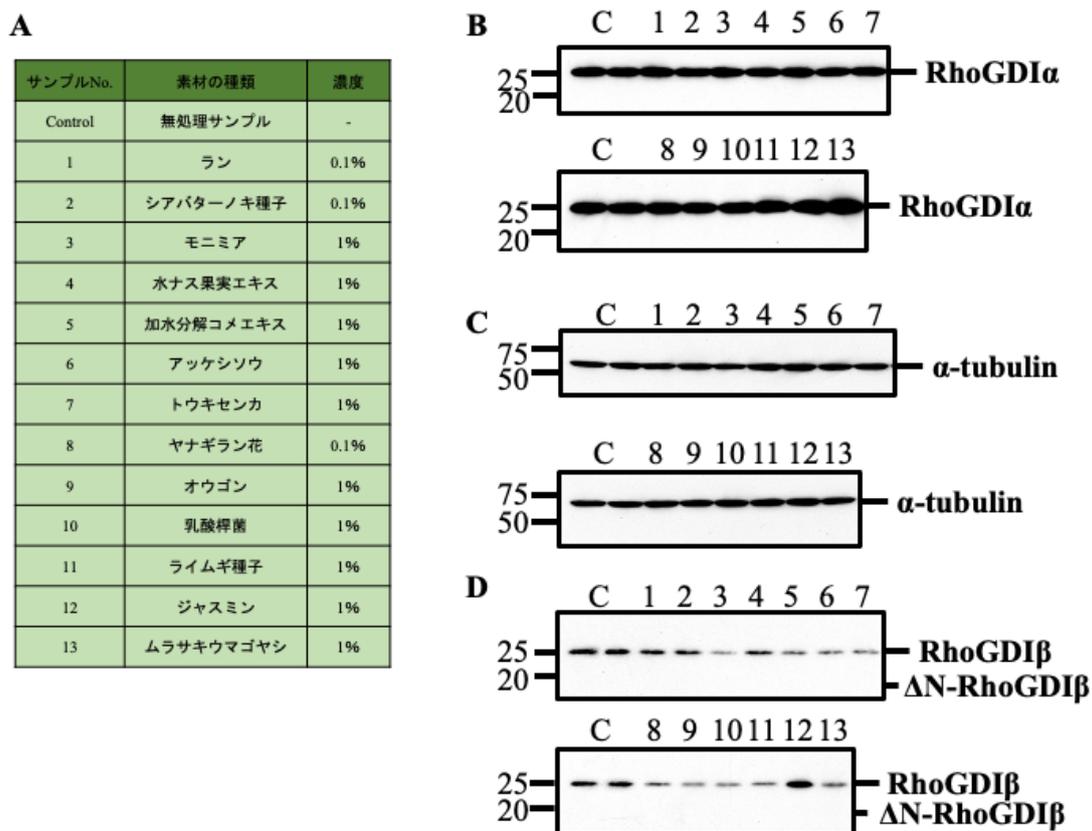


図 13. 2次スクリーニングサンプル表

- (A) 2次スクリーニングで使用したサンプル。  
 (B) RhoGDI $\alpha$ のタンパク質発現レベルに対する各種天然物の影響。  
 (C)  $\alpha$ -チューブリンのタンパク質発現レベルに対する各種天然物の影響。  
 (D) RhoGDI $\beta$ 、 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$ およびタンパク質発現レベルに対する各種天然物の影響。

#### 5. 4 まとめと考察

HeLa 細胞を用いた qRT-PCR 法により RhoGDI $\beta$  発現抑制効果を調べた。その結果、ラン、シアバターノキ種子、モニミア、水ナス果実エキス、加水分解コメエキス、アッケシソウ、トウキンセンカ、ヤナギラン花、オウゴン、乳酸桿菌、ライ麦種子、ジャスミン、ムラサキウマゴヤシの 13 種において RhoGDI $\beta$  の発現抑制が見られた。また、12 種を用いて免疫ブロットを行ったところ、5 種において 50%以下の抑制効果が見られた。この内、RhoGDI $\beta$  発現抑制効果が高く、耐塩性植物としてその耐塩性獲得に RhoGDI が活発に機能しているアッケシソウについて注目した[59]。

## 第 6 章

# 細胞分裂方向に対する アッケシソウ抽出液の効果

## 6. 1 研究背景

前章では RhoGDI $\beta$  の発現抑制が期待できる数種類の天然物素材のうち、RhoGDI $\beta$  発現抑制効果が高く、耐塩性植物としてその耐塩性獲得に RhoGDI が活発に機能しているアッケシソウについて注目した[59]。

アッケシソウ (*Salicornia europaea*、*S. herbacea* としても知られる) は、食用の塩生植物の双子葉植物である。日本では北海道東部の厚岸湾および瀬戸内海、主に岡山県、愛媛県の県境域に自生が確認されているが、絶滅危惧種に指定されている。シーアスパラガスとも呼ばれており、料理の用途に加えて、抗酸化作用、抗炎症作用、抗高血糖作用、および抗高脂血症作用を持つと言われ、近年では健康食品としても知られている[60-62]。

本章では、アッケシソウ抽出液が上皮組織構築の改善になるかどうかを検討する *in vitro* 皮膚分化モデルを用いた細胞極性の紫外線による影響の検討を行った。

## 6. 2 材料と方法

### 1. *S.europaea* 抽出液

北海道厚岸町のアッケシソウから抽出された水性抽出液を使用した。30%の3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノールを使用して抽出されたこの抽出液は、プレスパース社（米国ニュージャージー州サマセット）から購入した。

### 2. *in vitro* 皮膚分化モデルによる分析

さまざまな市販の *in vitro* ヒト皮膚モデルでテストしたところ、EPI-200（MatTek、米国マサチューセッツ州アッシュランド）が多層で高度に分化した皮膚に最適で最も信頼性の高いモデルであることが分かったため、実験に使用した。3D 培養細胞を UVB（100 mJ/cm<sup>2</sup> および 200 mJ/cm<sup>2</sup>）に曝露した後、アッケシソウ抽出液（0.03%、0.1%、および 0.3%）で処理した。培地交換は、アッケシソウ抽出液の有無にかかわらず 2 日ごとに行い、3D 培養細胞は 10 日後に回収した後、ホルマリン固定、パラフィン包埋、切片作成を行った。断面をヘマトキシリンエオシン染色し、光学顕微鏡下で観察を行った。各実験で中期の 25 細胞で測定し、合計 80 回の観察を行った。

### 3. 統計

統計値間の差は、スチューデントの t 検定を使用して分析され、 $p < 0.05$  は統計的に有意な差を示している。分裂角度の有意な分散は、マンホイットニー U 検定によって分析され、 $p < 0.05$  は統計的に有意な差を示している。

## 6. 3 結果

### 1. 基底層幹細胞の形態変化

基底層幹細胞の分裂角度解析方法は、**Anaphase** の細胞が明確に分裂角度を測定可能であったため、この時期の姉妹染色分体を線で結んで、基底膜との角度から分裂方向の角度を割り出した。基準として、基底膜に対して分裂方向が水平であった場合を  $0^\circ$  (幹細胞分裂)、垂直であった場合を  $90^\circ$  (分化分裂) とした。分化した細胞は、今後扁平上皮細胞としての運命を辿ることとなる。

また、傾きがある場合  $\alpha$  度として計測するが、分裂方向が  $0^\circ$ 、あるいは  $90^\circ$  から乱れており、重層扁平上皮構造の乱れに繋がるのがマウス胎児を用いたこれまでの研究からわかっている。

これらを踏まえて結果を見てみると、基底層幹細胞の形態は、コントロールでは、UVB 照射で分裂方向が乱れるが、UVB 照射とアッケシソウ抽出液を処理したものでは分裂方向の乱れが抑制されていることが分かった。

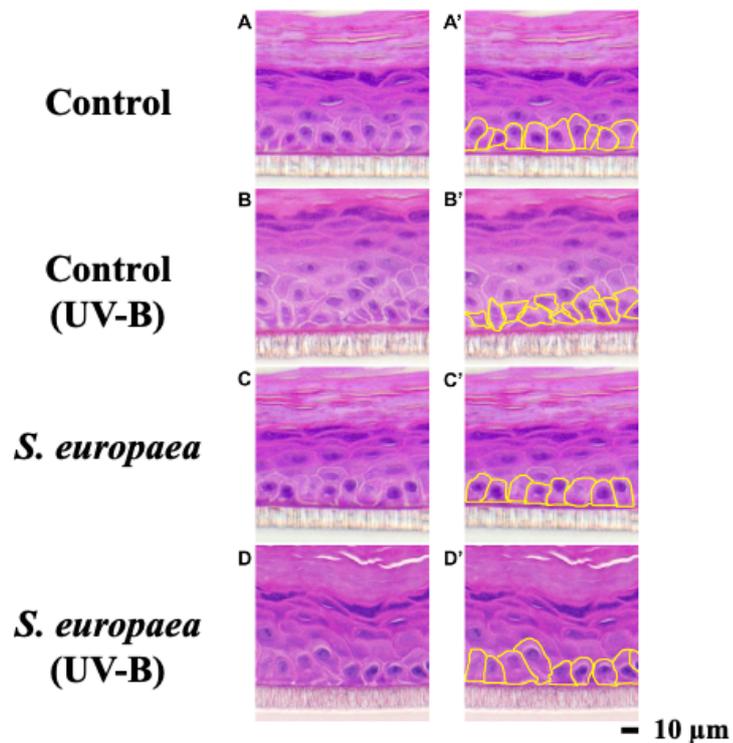


図 14. 基底層幹細胞形態変化

UVB に照射された表皮細胞の形態の改善。 *in vitro* 皮膚分化モデルにおけるヘマトキシリンエオシン染色後の光学顕微鏡画像。右側は幹細胞を黄色い枠で囲っている。

## 2. 基底層幹細胞の分裂角度

紫外線照射による細胞分裂角度の乱れと、アッケシソウ抽出液処理による影響の解析を行った。その結果、紫外線、特に  $200 \text{ mJ/cm}^2$  照射を行った細胞の分裂角度は、未照射の群と比較して、水平方向と垂直方向の分裂細胞の数が大きく減少しているのが分かった。つまり、細胞分裂角度は紫外線照射によって大きく乱れるということが分かった。しかし、アッケシソウ抽出液処理群では、その分裂報告の乱れは緩和されていることが分かった。(図 15, 16)

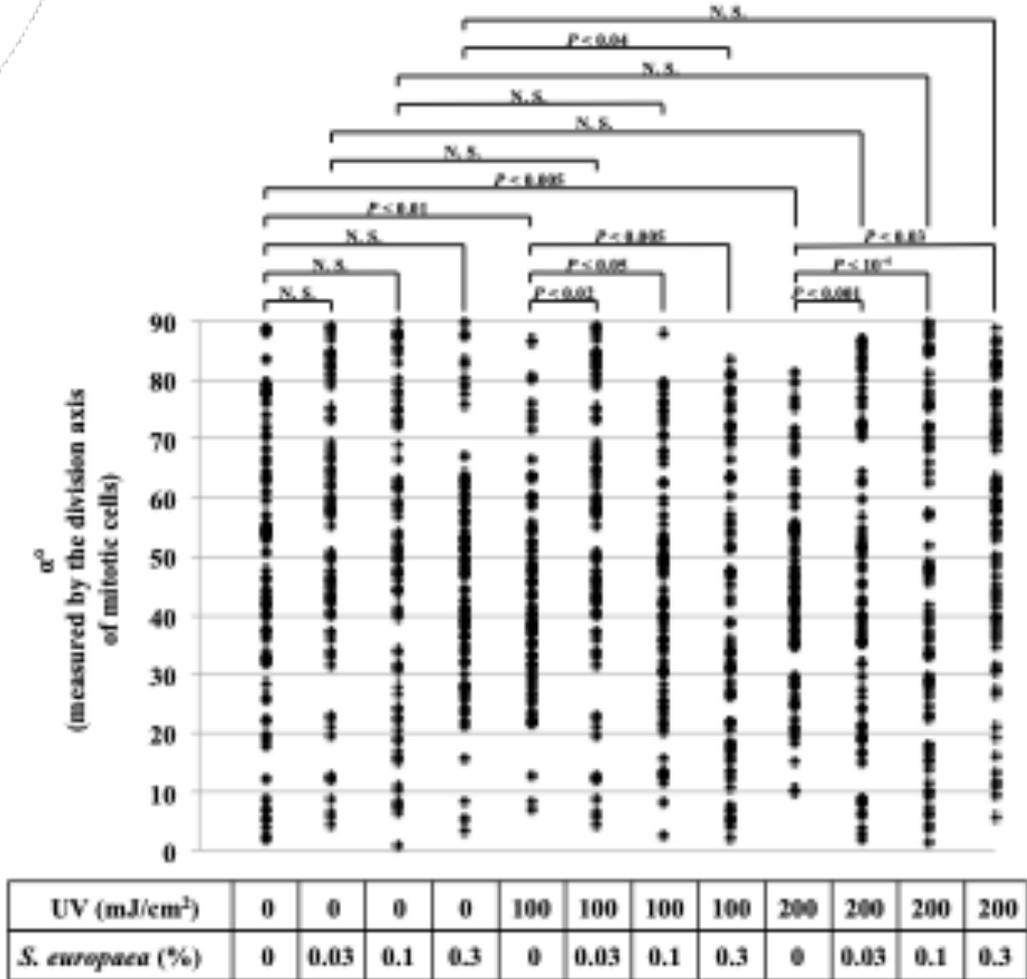


図 15. 細胞分裂角度分布

細胞の分裂角度 ( $\alpha^\circ$ ) のプロット。UVB 照射線量とアッケシソウ抽出液のそれぞれ異なる線量や濃度で処理を行った。

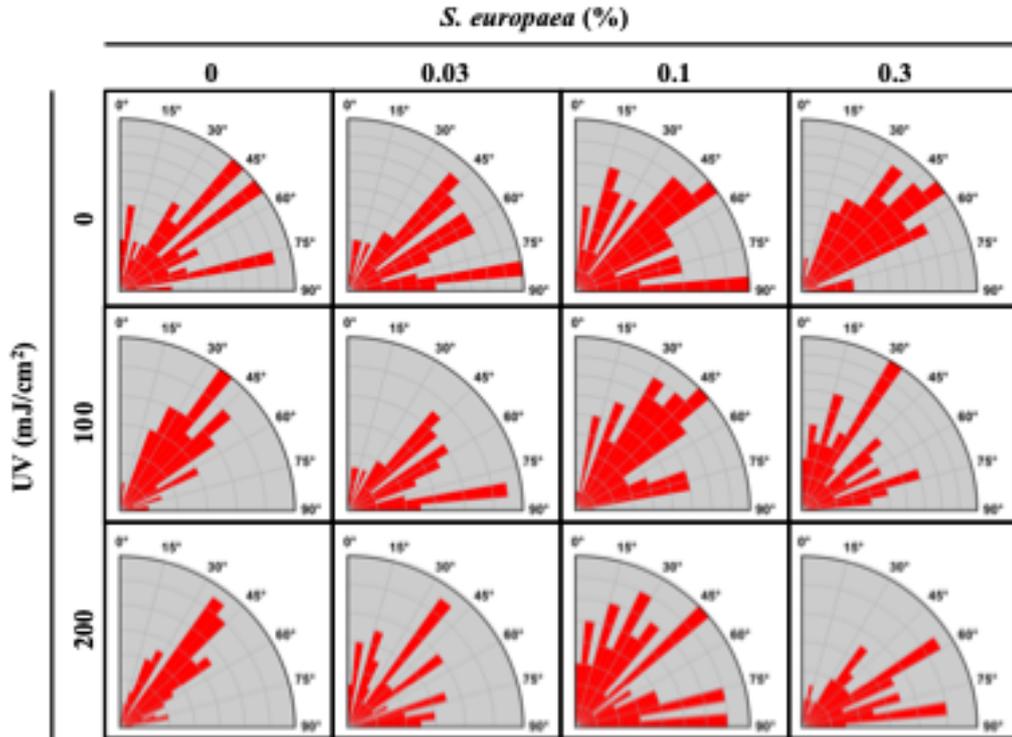


図 16. 細胞分裂角度分布のローズプロット

細胞の分裂角度 ( $\alpha^\circ$ ) のローズプロット。アッケシソウ抽出液処理をしたものは、垂直および水平の分裂角度の減少がみられた。

### 3. 重層扁平上皮構造の改善

紫外線照射により細胞の分裂方向の異常が起きることによる重層構造の変化を観察した。その結果、紫外線照射群では、細胞分裂方向の異常だけでなく、重層扁平上皮構造の乱れを引き起こしているのが分かった。一方、アッケシソウ抽出液処理群では、紫外線照射による乱れが抑制されていた。

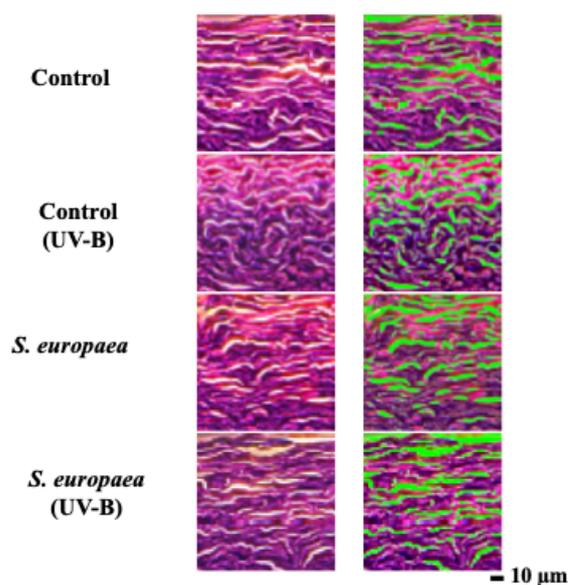


図 17. 重層扁平上皮構造の改善

分化中に UVB にさらされた皮膚重層扁平上皮構造の画像。右側は各層の形態学的な特徴を緑色で示している。

#### 6. 4 まとめと考察

試験管内皮膚扁平上皮組織分化モデルを用いて、アッケシソウ抽出液の影響を調べた結果、細胞分裂方向の異常が紫外線によって生じたが、アッケシソウ抽出液には、その異常を阻止する効果が認められた。また、重層扁平上皮構造の形成における形態観察を行ったところ、アッケシソウ抽出液によって紫外線による重層化の乱れは阻止された。

# 第7章

## 研究総括

細胞分裂方向を適切に制御することは、多細胞生物の組織発生とホメオスタシスにとって重要であり、平面における細胞極性のパターン形成や上皮組織における上皮層かなど、組織構築の様々な面で役割を果たしているのが知られている[35, 41, 63, 64]。

例えば、皮膚上皮において基底膜に対して水平方向に分裂する幹細胞分裂と垂直に分裂する分化分裂の 2 種類の正しい分裂方向によって、組織構築とホメオスタシスは常に保たれている[33, 34, 65]。しかし、この分裂に乱れが生じると、組織の発達、ホメオスタシスの崩壊、肌の肌理や荒れ、果ては病気といった生理学的な異常を起こすことにつながる[38-40]。そのため、細胞の分裂の方向性の制御というのは常に正しく在らねばならない[66]。

放射線や紫外線などの DNA 損傷を引き起こすゲノムストレスを細胞が受けると、様々な正常組織に影響を与える。例えば、アポトーシスや、細胞死を実行しなくても細胞の組織修復のプロセス、例えば DNA 損傷チェックポイント、複製ストレス、スピンドルアセンブリチェックポイントなど、DNA 損傷の応答の研究は熱心にされてきた[67-71]。一方でアポトーシスを免れて生き残った細胞が再増殖する際、そのスピンドルオリエンテーション、細胞分裂方向性を調節するメカニズムは現在までほとんど分かっていなかった。

ここで示した我々の研究は、細胞の極性に関わる Cdc42 に対し、ゲノムストレス損傷後に RhoGDI $\beta$  が 3 型カスパーゼによって切断されて出現する  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  によって起こる直接的な証拠を提示することができた。第 2 章で示した結果より提唱するメカニズムは次の通りである。細胞がゲノム損傷を受けると 3 型カスパーゼが活性化するが、その時に上皮細胞や造血系細胞に特異的に発現が見られる RhoGDI $\beta$  の切断が行われる。切断された RhoGDI $\beta$  は N 末端側を欠失した  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  となる。もともと Rac1 の制御因子として働いている RhoGDI $\beta$  が、 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  となることでその細胞局在性を変更し Cdc42 に特異的に結合、阻害する[29]。これにより、細胞分裂方向性の異常が起こると考えられる。また、RhoGDI $\beta$  はがんの転移と浸潤に関わるがん転移関連因子としても知られており、先ほど述べた Rac1 の制御を行なっている。ヒトの腫瘍の大部分に放射線治療や化学療法が行われているが、それらは腫瘍細胞における 3 型カスパーゼを活性化させ、 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  の発現を誘発させている。したがって、これらの治療の生存腫瘍細胞では  $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$  は、Cdc42 とその下流シグナル伝達経路を介して、浸潤能や転移能の獲得に寄与する可能性がある[16, 17, 43-45,

72-74]。つまり、 $\Delta N$ -RhoGDI $\beta$  によって引き起こされる細胞分裂方向性の異常は主要組織における DNA 損傷後の Cdc42 阻害を介した代償性の増殖、および上皮から間葉への移行を促進してしまう役割を持っている可能性がある。

第 3 章の結果により、上皮系細胞の RhoGDI $\beta$  の発現を抑制することで、 $\Delta N$ -RhoGDI $\beta$  の発現の低下、および Cdc42 の活性の阻害を阻止することが可能であることが示された。これにより、RhoGDI $\beta$  を分子標的とした新たな化粧品分野での応用が期待できると考えられた。実際に第 4 章から第 6 章で示したアスコルビン酸誘導体や天然物素材では RhoGDI $\beta$  の転写、翻訳レベルでの発現低下および DNA 損傷後の細胞分裂方向性の改善が見られた。これは、医療における放射線照射後の腫瘍細胞の浸潤、転移にも応用ができるのではないかと考えられる。

今後の課題としては、アッセシソウ抽出液による紫外線誘発細胞分裂方向異常の改善が  $\Delta N$ -RhoGDI $\beta$  を介しているのか、ということ。また、2-OctadecylAA でも、アッセシソウと同じように試験管内皮膚扁平上皮組織文化モデルで効果が見られるかどうか。これらは、HeLa 細胞で RhoGDI $\beta$  強制発現やノックダウンをすることで実験を行ってきたが、実際の皮膚でこのような実験を行うことは現段階では難しい。2-OctadecylAA について、これまでの報告ではアスコルビン酸にはない肝がん抑制効果がモデル動物で観察されているが、 $\Delta N$ -RhoGDI $\beta$  の発現抑制によるものなのかどうかということ。

そして、最後に  $\Delta N$ -RhoGDI $\beta$  を指標としたヒトの生理状態の診断への応用のひとつとして、電離放射線が照射されたかどうか調べる方法の開発を行っている。 $\Delta N$ -RhoGDI $\beta$  がゲノムストレスによって活性化された 3 型カスパーゼに切断される現象を応用しているものである。つまり、被曝してしまった際のバイオマーカーとして使えるのではないか、ということを提案したい。

電離放射線は、被曝ししたとしても痛みや痒みなどの五感で感じることはできない[75]。実際に広島・長崎の原爆被爆者さんや、チェルノブイリ原発事故、福島第 1 原子力発電所の事故で被災された方を例にとっても、物理学的推計と、内部への核物質の吸収量による物理学的な被曝推計によっており、実際にどの程度生理的に被曝ダメージを受けたのかを知る解析方法は完全に確立されていない。現在、生物学的線量測定と言われるこの種の解析方法は、血液中の白血球の減少のみ実用化されており、染色体異常の数、特に **Dicentric** (二動原体) を調べる方法が発展途上にある[76]。しかし、高度な知識やテクニックが必要と

されるものだったり、生体試料によっては侵襲性を伴うものだったり、長期の生体の生理学的状態を診断するにはやはり難しいところである。

そこで、ゲノムストレスによって発現する  $\Delta N$ -RhoGDI $\beta$  を指標とした被曝線量計測方法を提唱する。実際にマウスを使った少量の血液を用いて、免疫ブロットによる  $\Delta N$ -RhoGDI $\beta$  の発現を確認する手法を確立している。これが、ヒトにも応用することができれば、新たな生物学的線量測定方法の一つとしてどの測定方法よりも簡便で、侵襲性も少なく、臨床応用できると考えている。

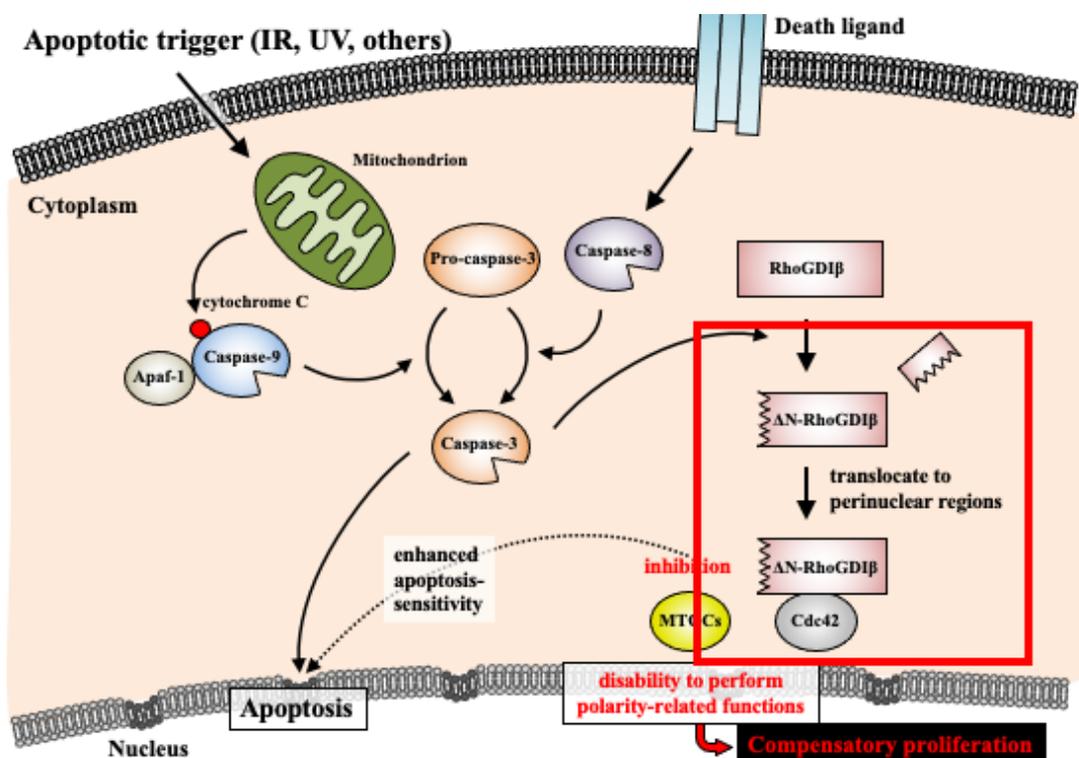


図 18. アポトーシスと  $\Delta N$ -RhoGDI $\beta$  発現メカニズム

放射線などのゲノム損傷は、3型カスパーゼを活性化する。生き残った細胞において RhoGDI $\beta$  は、活性化された3型カスパーゼによって切断され、その結果生成物である  $\Delta N$ -RhoGDI $\beta$  が細胞内に蓄積される。このメカニズムを利用し、放射線に暴露してしまっても生物学的に被曝を評価できる。

## 【引用文献】

1. Sit, S.-T., and Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science* **124**, 679-683.
2. Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 690-701.
3. Hanna, S., and El-Sibai, M. (2013). Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cellular Signalling* **25**, 1955-1961.
4. Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42 - the centre of polarity. *Journal of Cell Science* **117**, 1291-1300.
5. David, M., Petit, D., and Bertoglio, J. (2014). Cell cycle regulation of Rho signaling pathways. *Cell Cycle* **11**, 3003-3010.
6. Boureux, A., Vignal, E., Faure, S., and Fort, P. (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* **24**, 203-16.
7. Rossman, K. L., Der, C. J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 167-180.
8. Dovas, A., and Couchman, J. R. (2005). RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* **390**, 1-9.
9. Zhang, B., Zhang, Y., Dagher, M. C., and Shacter, E. (2005). Rho GDP dissociation inhibitor protects cancer cells against drug-induced apoptosis. *Cancer Res* **65**, 6054-62.
10. Garcia-Mata, R., Boulter, E., and Burridge, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 493-504.
11. 達家雅明, 藤., 岡本茉佑美, 堀正人, 杉原由佳, 直原寛, 仲尾次浩一, 濱田和彦, 菅裕, and 嶋本文雄 (2016). RhoGDI  $\beta$  を分子標的とした応用生命科学の可能性. *生命環境学術雑誌* **8**.
12. Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013). Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews* **93**, 269-309.
13. Sasaki, T., and Takai, Y. (1998). The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 641-5.

14. Cho, H. J., Baek, K. E., and Yoo, J. (2010). RhoGDI2 as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* **14**, 67-75.
15. Gildea, J. J., Seraj, M. J., Oxford, G., Harding, M. A., Hampton, G. M., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., Conaway, M. R., and Theodorescu, D. (2002). RhoGDI2 is an invasion and metastasis suppressor gene in human cancer. *Cancer Res* **62**, 6418-23.
16. Griner, E. M., and Theodorescu, D. (2012). The faces and friends of RhoGDI2. *Cancer Metastasis Rev* **31**, 519-28.
17. Niu, H., Li, H., Xu, C., and He, P. (2010). Expression profile of RhoGDI2 in lung cancers and role of RhoGDI2 in lung cancer metastasis. *Oncol Rep* **24**, 465-71.
18. Ota, T., Maeda, M., Suto, S., and Tatsuka, M. (2004). LyGDI functions in cancer metastasis by anchoring Rho proteins to the cell membrane. *Mol Carcinog* **39**, 206-20.
19. Scherle, P., Behrens, T., and Staudt, L. M. (1993). Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7568-72.
20. Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* **68**, 383-424.
21. McIlwain, D. R., Berger, T., and Mak, T. W. (2015). Caspase Functions in Cell Death and Disease: Figure 1. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**, a026716.
22. Nowsheen, S., and Yang, E. S. (2012). The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Experimental Oncology* **34**, 243-54.
23. Boland, K., Flanagan, L., and Prehn, J. H. (2013). Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3. *Cell Death & Disease* **4**, e725-e725.
24. Donato, A. L., Huang, Q., Liu, X., Li, F., Zimmerman, M. A., and Li, C.-Y. (2014). Caspase 3 Promotes Surviving Melanoma Tumor Cell Growth after Cytotoxic Therapy. *Journal of Investigative Dermatology* **134**, 1686-1692.
25. Galluzzi, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2011). Caspase-3 and prostaglandins signal for tumor regrowth in cancer therapy. *Oncogene* **31**, 2805-2808.

26. Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F.-F., O'Sullivan, B., He, Z., Peng, Y., Tan, A.-C., Zhou, L., Shen, J., Han, G., Wang, X.-J., Thorburn, J., Thorburn, A., Jimeno, A., Raben, D., Bedford, J. S., and Li, C.-Y. (2011). Caspase 3–mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nature Medicine* **17**, 860-866.
27. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2014). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death & Differentiation* **22**, 526-539.
28. Ota, T., Maeda, M., Sakita-Suto, S., Zhou, X., Murakami, M., Takegami, T., and Tatsuka, M. (2006). RhoGDIbeta lacking the N-terminal regulatory domain suppresses metastasis by promoting anoikis in v-src-transformed cells. *Clin Exp Metastasis* **23**, 323-34.
29. Zhou, X., Suto, S., Ota, T., and Tatsuka, M. (2004). Nuclear translocation of cleaved LyGDI dissociated from Rho and Rac during Trp53-dependent ionizing radiation-induced apoptosis of thymus cells in vitro. *Radiat Res* **162**, 287-95.
30. Ragkousi, K., and Gibson, M. C. (2014). Cell division and the maintenance of epithelial order. *J Cell Biol* **207**, 181-8.
31. Blanpain, C., and Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 207-17.
32. Gillies, T. E., and Cabernard, C. (2011). Cell division orientation in animals. *Curr Biol* **21**, R599-609.
33. Kulukian, A., and Fuchs, E. (2013). Spindle orientation and epidermal morphogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**, 20130016.
34. Lechler, T., and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* **437**, 275-80.
35. Morin, X., and Bellaiche, Y. (2011). Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev Cell* **21**, 102-19.
36. Xie, W., and Zhou, J. (2017). Regulation of mitotic spindle orientation during epidermal stratification. *J Cell Physiol* **232**, 1634-1639.
37. Garzon-Coral, C., Fantana, H. A., and Howard, J. (2016). A force-generating machinery maintains the spindle at the cell center during mitosis. *Science* **352**, 1124-7.
38. Li, H., Kroll, T., Moll, J., Frappart, L., Herrlich, P., Heuer, H., and Ploubidou, A. (2017). Spindle Misorientation of Cerebral and Cerebellar Progenitors Is a

- Mechanistic Cause of Megalencephaly. *Stem Cell Reports* **9**, 1071-1080.
39. Noatynska, A., Gotta, M., and Meraldi, P. (2012). Mitotic spindle (DIS)orientation and DISease: cause or consequence? *J Cell Biol* **199**, 1025-35.
  40. Pease, J. C., and Tirnauer, J. S. (2011). Mitotic spindle misorientation in cancer--out of alignment and into the fire. *J Cell Sci* **124**, 1007-16.
  41. Matsumura, S., Hamasaki, M., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Sato, M., Nishida, E., and Toyoshima, F. (2012). ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin. *Nat Commun* **3**, 626.
  42. Matsumura, S., and Toyoshima, F. (2012). ABL1 joins the cadre of spindle orientation machinery. *Cell Struct Funct* **37**, 81-7.
  43. Fujiwara, M., Okamoto, M., Hori, M., Suga, H., Jikihara, H., Sugihara, Y., Shimamoto, F., Mori, T., Nakaoji, K., Hamada, K., Ota, T., Wiedemuth, R., Temme, A., and Tatsuka, M. (2016). Radiation-Induced RhoGDIbeta Cleavage Leads to Perturbation of Cell Polarity: A Possible Link to Cancer Spreading. *J Cell Physiol* **231**, 2493-505.
  44. Jiang, Y. S., Maeda, M., Okamoto, M., Fujii, M., Fukutomi, R., Hori, M., Tatsuka, M., and Ota, T. (2013). Centrosomal localization of RhoGDIbeta and its relevance to mitotic processes in cancer cells. *Int J Oncol* **42**, 460-8.
  45. Wu, Y., Moissoglu, K., Wang, H., Wang, X., Frierson, H. F., Schwartz, M. A., and Theodorescu, D. (2009). Src phosphorylation of RhoGDI2 regulates its metastasis suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5807-12.
  46. Mešćić Macan, A., Gazivoda Kraljević, T., and Raić-Malić, S. (2019). Therapeutic Perspective of Vitamin C and Its Derivatives. *Antioxidants (Basel)* **8**.
  47. Pullar, J. M., Carr, A. C., and Vissers, M. C. M. (2017). The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients* **9**.
  48. Ravetti, S., Clemente, C., Brignone, S., Hergert, L., Allemandi, D., and Palma, S. (2019). Ascorbic Acid in Skin Health. *Cosmetics* **6**.
  49. Abdullah, M., Jamil, R. T., and Attia, F. N. (2021). Vitamin C (Ascorbic Acid). In "StatPearls" StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
  50. Panich, U., Tangsupa-a-nan, V., Onkoksoong, T., Kongtaphan, K., Kasetsinsombat, K., Akarasereenont, P., and Wongkajornsilp, A. (2011). Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation

- of antioxidant defense and nitric oxide system. *Arch Pharm Res* **34**, 811-20.
51. Pinnell, S. R., Yang, H., Omar, M., Monteiro-Riviere, N., DeBuys, H. V., Walker, L. C., Wang, Y., and Levine, M. (2001). Topical L-ascorbic acid: percutaneous absorption studies. *Dermatol Surg* **27**, 137-42.
  52. Stamford, N. P. (2012). Stability, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives. *J Cosmet Dermatol* **11**, 310-7.
  53. Telang, P. S. (2013). Vitamin C in dermatology. *Indian Dermatol Online J* **4**, 143-6.
  54. Tripathi, R., Singh, B., Bisht, S. S., and Pandey, J. (2009). L-ascorbic acid in organic synthesis: An overview. *Current Organic Chemistry* **13**, 99-122.
  55. 農林水産省 (2017). 種類別栽培状況 かんきつ類・かんきつ類以外の果樹. 政府の統計窓口 (*e-Stat*) .
  56. Tai, A., Goto, S., Ishiguro, Y., Suzuki, K., Nitoda, T., and Yamamoto, I. (2004). Permeation and metabolism of a series of novel lipophilic ascorbic acid derivatives, 6-O-acyl-2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acids with a branched-acyl chain, in a human living skin equivalent model. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 623-7.
  57. Kushida, H., Wakabayashi, K., Suzuki, M., Takahashi, S., Imaida, K., Sugimura, T., and Nagao, M. (1992). Suppression of spontaneous hepatocellular carcinoma development in C3H/HeNCrj mice by the lipophilic ascorbic acid, 2-O-octadecylascorbic acid (CV-3611). *Carcinogenesis* **13**, 913-915.
  58. Shimpo, K., Takahashi, H., Tsuda, H., Hibino, T., Kawai, K., Kimura, C., Nagatsu, T., and Fujita, K. (1996). Inhibition of hepatocellular carcinoma development and erythrocyte polyamine levels in ODS rats fed on 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene by hemicalcium ascorbate, 2-O-octadecylascorbic acid, and ascorbyl palmitate. *Cancer Detect Prev.* **20(2)**, 137 - 145.
  59. Zhang, H., Han, B., Wang, T., Chen, S., Li, H., Zhang, Y., and Dai, S. (2012). Mechanisms of plant salt response: insights from proteomics. *J Proteome Res* **11**, 49-67.
  60. Hwang, J. Y., Lee, S. K., Jo, J. R., Kim, M. E., So, H. A., Cho, C. W., Seo, Y. W., and Kim, J. I. (2007). Hypolipidemic effect of *Salicornia herbacea* in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res Pract* **1**, 371-5.

61. Kim, Y. A., Kong, C. S., Um, Y. R., Lim, S. Y., Yea, S. S., and Seo, Y. (2009). Evaluation of *Salicornia herbacea* as a potential antioxidant and anti-inflammatory agent. *J Med Food* **12**, 661-8.
62. Sung, J. H., Park, S. H., Seo, D. H., Lee, J. H., Hong, S. W., and Hong, S. S. (2009). Antioxidative and skin-whitening effect of an aqueous extract of *Salicornia herbacea*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 552-6.
63. Dewey, E. B., Taylor, D. T., and Johnston, C. A. (2015). Cell Fate Decision Making through Oriented Cell Division. *Journal of Developmental Biology* **3**, 129-157.
64. Poulson, N. D., and Lechler, T. (2010). Robust control of mitotic spindle orientation in the developing epidermis. *J Cell Biol* **191**, 915-22.
65. Kulukian, A., Holland, A. J., Vitre, B., Naik, S., Cleveland, D. W., and Fuchs, E. (2015). Epidermal development, growth control, and homeostasis in the face of centrosome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E6311-20.
66. Liu, N., Matsumura, H., Kato, T., Ichinose, S., Takada, A., Namiki, T., Asakawa, K., Morinaga, H., Mohri, Y., De Arcangelis, A., Geroges-Labouesse, E., Nanba, D., and Nishimura, E. K. (2019). Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing. *Nature* **568**, 344-350.
67. Bartek, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 238-45.
68. Pedersen, R. S., Karemire, G., Gudjonsson, T., Rask, M. B., Neumann, B., Heriche, J. K., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Gerlich, D. W., Lukas, J., and Lukas, C. (2016). Profiling DNA damage response following mitotic perturbations. *Nature Communications* **7**, 13887.
69. Sharma, V., Khurana, S., Kubben, N., Abdelmohsen, K., Oberdoerffer, P., Gorospe, M., and Misteli, T. (2015). A BRCA1-interacting lncRNA regulates homologous recombination. *EMBO Reports* **16**, 1520-34.
70. Sole, C., Nadal-Ribelles, M., de Nadal, E., and Posas, F. (2015). A novel role for lncRNAs in cell cycle control during stress adaptation. *Curr Genet* **61**, 299-308.
71. Toledo, L., Neelsen, K. J., and Lukas, J. (2017). Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion. *Mol Cell* **66**, 735-749.
72. Choi, M. R., Groot, M., and Drexler, H. C. (2007). Functional implications of caspase-mediated RhoGDI2 processing during apoptosis of HL60 and K562

- leukemia cells. *Apoptosis* **12**, 2025-35.
73. Koh, S. A., Kim, M. K., Lee, K. H., Kim, S. W., and Kim, J. R. (2014). RhoGDI2 is associated with HGF-mediated tumor invasion through VEGF in stomach cancer. *Clin Exp Metastasis* **31**, 805-15.
74. Yi, B., Zhang, Y., Zhu, D., Zhang, L., Song, S., He, S., Zhang, B., Li, D., and Zhou, J. (2015). Overexpression of RhoGDI2 correlates with the progression and prognosis of pancreatic carcinoma. *Oncol Rep* **33**, 1201-6.
75. Sureka, C. S., and Armpilia, C. (2017). "Radiation Biology for Medical Physicists," CRC Press.
76. Nakano, M., Kodama, Y., Ohtaki, K., Itoh, M., Delongchamp, R., Awa, A. A., and Nakamura, N. (2009). Detection of stable chromosome aberrations by FISH in A-bomb survivors: comparison with previous solid Giemsa staining data on the same 230 individuals. *International Journal of Radiation Biology* **77**, 971-977.

## 【謝辞】

本学位論文をまとめるにあたり、終始多大なるご指導・ご教授を賜りました県立広島大学生命環境学部生命科学科の達家雅明教授に厚く御礼申し上げます。

また、大変お忙しい中、副査として本学位論文へのご高見を賜るとともに、ご教示を頂きました県立広島大学生命環境学部生命科学科の齋藤靖和教授、県立広島大学生命環境学部生命科学科の菅裕教授、県立広島大学生命環境学部生命科学科の吉野智之准教授に心より感謝いたします。

そして、本研究遂行に際し多くのご協力を承りました県立広島大学生命環境学部生命科学科ゲノム制御システム生物学研究室の皆さん、同研究室の卒業生の皆さんに深く感謝の意を表します。

【発表論文等の業績】

発表論文

1. Doi, Natsumi; Kunimatsu, Yuuki; Fujiura, Kouhei; Togari, Hiro; Minagi, Kenji; Nakaoji, Koichi; Hamada, Kazuhiko; Achim, Temme; Tatsuka, Masaaki. RhoGDIbeta affects HeLa cell spindle orientation following UVC irradiation, *J. Cell. Physiol.* 2019, 234(9), 15134-15146. doi: 10.1002/jcp.28154.
2. Doi, Natsumi; Togari, Hiro; Minagi, Kenji; Nakaoji, Koichi; Hamada, Kazuhiko; Tatsuka, Masaaki. Protective Effects of Salicornia europaea on UVB-Induced Misoriented Cell Divisions in Skin Epithelium. *Cosmetics.* 2020, 7(2), 44. doi:10.3390/cosmetics7020044.
3. Doi, Natsumi; Togari, Hiro; Minagi, Kenji; Iwaoka, Yuji; Tai, Akihiro; Nakaoji, Koichi; Hamada, Kazuhiko; Tatsuka, Masaaki. 2-O-Octadecylascorbic acid represses RhoGDI $\beta$  expression and ameliorates DNA damage-induced abnormal spindle orientations. *J. Cell. Biochem.* 2021, 122(7), 739-751. doi: 10.1002/jcb.29908.
4. Doi, Natsumi; Yamada, Yoshifumi; Toyoshima, Misaki; Kondo, Yuki; Nakaoji, Koichi; Hamada, Kazuhiko; Tatsuka, Masaaki. Facial Treatment with 3-O-Cetyl Ascorbic Acid for Improvement of Skin Texture: Uptake, Effectiveness, and In Vitro Carcinogenicity Assessment. *Cosmetics.* 2021, 8(2), 38. doi:10.3390/cosmetics8020038.

## 学会発表等

1. 土井捺実、藤原守、牛衛夢宇、有留和輝、太田隆英、達家雅明  
3型カスパーゼ依存的代償性増殖誘導シグナル分子としての RhoGDI $\beta$  機能の解析  
第13回神戸ワイン城シンポジウム, 神戸, 2016.12
2. 藤原守、土井捺実、牛衛夢宇、有留和輝、太田隆英、達家雅明  
RhoGDI $\beta$ による放射線応答シグナルの解明  
第13回神戸ワイン城シンポジウム, 神戸, 2016.12
3. 有留和輝、藤原守、牛衛夢宇、土井捺実、野下俊朗、嶋本文雄、太田隆英、達家雅明  
紅茶による発がん抑制効果の機構解析  
第13回神戸ワイン城シンポジウム, 神戸, 2016.12
4. 藤原守、土井捺実、太田隆英、達家雅明  
変様型 RhoGDIbeta : 電離放射線全身照射のバイオマーカーとしての有用性  
第76回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017.9
5. 藤原守、土井捺実、國松優喜、藤裏航平、達家雅明  
電離放射線照射後に出現する変様型 RhoGDIbeta の機能解析とその被曝検査への応用  
三朝・人形峠 Seminar, 鳥取, 2017.11
6. 土井捺実、國松優喜、藤裏航平、藤原守、達家雅明  
RhoGDI $\beta$  の Src によるリン酸化の転移形質発現における役割研究  
第27回日本がん転移学会学術集会・総会, 横浜, 2018.7
7. 土井捺実、國松優喜、藤裏航平、藤原守、達家雅明  
RhoGDI $\beta$  の Src によるリン酸化の転移形質発現における役割研究  
県立広島大学オープンキャンパス 学生ポスターセッション, 広島, 2018.7

8. 土井捺実, 國松優喜, 藤裏航平, 達家雅明  
ヒト角化細胞の分裂方向性に対する RhoGDI $\beta$  の影響  
第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2018.9
9. 土井捺実, 國松優喜, 藤裏航平, 達家雅明  
ゲノム損傷後の RhoGDIbeta の想定されている生理機能とは  
島根三瓶山 Seminar, 島根, 2018.11.25~2018.11.27
10. 土井捺実, 國松優喜, 藤裏航平, 戸賀里飛郎, 三奈木健司, 達家雅明  
RhoGDI $\beta$  による癌腫分裂軸制御: 細胞外基質との関係  
第 28 回日本がん転移学会学術集会・総会, 鹿児島, 2019.7
11. 土井捺実, 達家雅明  
細胞分裂軸制御研究: ゲノム損傷ストレス後の再増殖過程における異常招来機構  
六ヶ所村セミナー, 青森, 2019.9.24-2019.9.25
12. 土井捺実, 戸賀里飛郎, 三奈木健司, 達家雅明  
癌転移抑制遺伝子 RhoGDI $\beta$  研究: 癌腫細胞の分裂軸異常招来機構  
第 78 回日本癌学会学術総会, 京都, 2019.9.28
13. 土井捺実, 國松優喜, 藤裏航平, 戸賀里飛郎, 三奈木健司, 達家雅明  
Src によるリン酸化 RhoGDI $\beta$  の Rac1 活性阻害効果について  
第 29 回日本がん転移学会学術集会・総会, 神戸, 2020.07.16-2020.07.17
14. 土井捺実, 戸賀里飛郎, 三奈木健司, 達家雅明  
癌転移関連分子 RhoGDI $\beta$  研究: 発現抑制材の開発  
第 79 回日本癌学会学術総会, 広島, 2020.10.1-2020.10.3

## 修了プログラム

### 1. 土井捺実

原子力規制人材育成事業（長崎大学原爆後障害医療研究所）「大学等放射線施設による緊急モニタリングプラットフォーム構築のための教育研究プログラム」

## 課外活動

### 1. 三朝・人形峠 Seminar

三朝溪泉閣，人形峠環境技術センター，鳥取，2017.11.19～2017.11.21

### 2. Field Monitoring Seminar Fukushima

福島県環境創造センター，福島大学環境放射能研究所，川俣町山木屋モニタリングフィールド

福島，2018.8.23～2018.8.24

### 3. 島根三瓶山 Seminar

池田鉦泉，島根県立三瓶自然館サヒメル，国立三瓶青少年の家

島根，2018.11.25～2018.11.27

### 4. 六ヶ所村 Seminar

（株）日本原燃再処理事業施設，（公）環境科学技術研究所

青森，2019.9.24～2019.9.25

### 5. Field Monitoring Seminar Fukushima 2019

東京電力廃炉資料館，東京電力福島第一原子力発電所，いこいの村なみえ，富岡町文化交流センター学びの森

福島，2019.8.18～2019.8.20

### 6. 原子力災害緊急モニタリング AUTUMN SEMINAR

長崎大学歯学部・アイソトープ実験施設

長崎，2019.10.28～2019.10.29