

研究紹介

イソチオシアネートによる
がんの化学予防の可能性中村 宜 督
(生物資源化学講座)Isothiocyanates as Novel Cancer
Chemopreventive Agents and
Their Underlying Molecular MechanismsYoshimasa Nakamura
(Department of Bioresources Chemistry)

A promising group of compounds that have a chemopreventive property are isothiocyanates (ITCs). ITCs have been shown to induce apoptosis in various cancer cell lines and experimental rodents. Multiple signal-transduction pathways as well as apoptosis intermediates have been also postulated. We recently clarified the molecular mechanism underlying the relationship between cell cycle arrest and apoptosis induced by benzyl isothiocyanate (BITC), a major ITC compound isolated from papaya. The exposure of cells to BITC resulted in the inhibition of the G₂/M progression that coincided with not only the up-regulated expression of the G₂/M cell cycle arrest-regulating genes but also the apoptosis induction. Conversely, treatment with an excessive concentration of BITC resulted in an abortive apoptotic pathway without DNA ladder formation. This commentary will review the biological impact of cell death induction by BITC as well as other ITCs and the involved signal transduction pathways.

Key words : isothiocyanates, cancer chemoprevention, apoptosis, cell cycle arrest, necrosis.

緒 言

野菜全般の摂取と健康状態に関する疫学的研究は、近年数多く報告されており、様々な疾患リスクの低減だけでなく、通常健康状態に関しても野菜の有効・有用性が示唆されている。その一方で、食生活の欧米化の着実な進行から、肉食・魚介類の順調な消費の伸びに対し、野菜消費量が減少の一途を辿っている。特に、若年齢層

を中心とした世代の野菜消費量の減少が顕著であり、生活習慣病の若年齢化との相関から、社会問題として注目を浴びつつある。例えば、野菜を十分に摂取出来れば所要量の確保が容易なビタミンである葉酸であるが、新生児の神経管閉鎖障害の最近の増加から、妊娠初期の女性の摂取不足に厚生労働省が警鐘を鳴らしている。また、昨今の栄養・健康情報の氾濫とサプリメント（栄養補助食品、健康補助食品）市場の急激な成長により、サプリメントを利用しておけば普段の食生活はないがしろにしても構わないという風潮に歯止めがかからなくなっている。野菜の摂取を推奨していくためには、人の健康と野菜摂取との関連を科学的かつ体系的に解明・整理にすることが今一度必要である。野菜中に含まれる、より具体的な機能性成分の性質や分布を正確に理解し、健康維持や疾病予防への寄与を明らかにすることができれば、より健全な「日本型食生活」への回帰を目指した野菜の消費拡大の一助となることはいうまでもない。それゆえ、これからの食品機能の基盤的研究が果たす役割は極めて重要であるといえる。

食品機能の基盤的研究のなかで、現在最も体系的に進んでいる研究分野として、がん予防に関する研究が挙げられる。発がんの原因物質の排除と発がん抑制物質の積極的な摂取が「がんの化学予防」の基本戦略であるが、数多くの疫学的研究や動物実験の成果から、野菜や果物などの植物性食品の摂取が予防に有効であるといわれて久しい。特に、1990年代に米国で「デザイナーフーズ」計画がスタートしたことをきっかけとして、十数年にわたるこれまでの研究は、がん予防に有望な素材・成分の化学的解明、動物実験成績や基本的作用機構に関する知見の蓄積だけでなく、その他の疾病をターゲットとした食品機能研究の進展に大きく寄与してきた。その一方で、 β -カロテンのヒト介入試験での不成功から、食品成分による疾病予防法確立への道は決して平坦なものではないことも浮彫りとなった。現在、がんの化学予防研究は、ヒトにおける有効性をどのように評価して行くかを共通課題とし、体内動態や遺伝子発現の網羅的、体系的解析などのより詳細な分子レベルでの研究へと進展を遂げつつあり、筆者も例に漏れず研究標的をシフトしてきた。また、これまで有効とされてきた素材・成分の再評価、品種改良などによる有効成分（活性及び含量）の増強素材の開発、より偏りの少ない食事・栄養指導など、網羅すべき課題の広がりにより、食品化学分野は新展開の局面を迎えている。

イソチオシアネートの化学とがん予防

筆者らは、機能性食品成分の生物学的、生理学的意義に興味を持ち、これらに関する分子レベルでの基礎的デ

ータを蓄積する目的で、食品を起源とする生体防御応答活性化因子に関する研究を展開してきた。近年、注目しているイソチオシアネート (ITC: isothiocyanate) 類は、疫学的研究などから現在最もがん予防効果の期待される食品成分である。辛子油という名で古くから知られる ITC 類は、特異な官能基 (ITC 基: $-N=C=S$) を有する化合物の総称で、特徴的な芳香を持つ辛味成分である。ITC 類は、特にアブラナ科植物を中心に普遍的に含まれているが、側鎖の違う百数十もの類縁体が報告されており²⁾、黒マスタード、ワサビに多く含まれる allyl ITC, キャベツ、クレソンに含まれる phenethyl ITC, ブロッコリーの sulforaphane, ダイコンの 4-(methylthio)-3-butenyl ITC などが著名である (Fig. 1)。ITC 類は、glucosinolate (辛子油配糖体) から thioglucosidase の働きによって、糖の脱離、Lossen 型転位反応を経て生成する。つまり、ITC 類はアブラナ科植物の組織を磨砕した時に生ずる刺激性の強い香味成分であり、時にはその強い風味はヒトの食欲を増進させるものである。

ITC 類の化学的特徴として、その特異的な構造から容易に想像されるように、ITC 基の炭素原子の電子不足状態から求核性物質、即ちアミンや水などの付加を受けやすく、このような付加反応を経て辛味や生理活性を失う。その一方で、ITC 類は glutathione (GSH) など求核性チオール化合物とも容易に付加物を形成し、BITC によるプロテアーゼ papain の活性阻害は、活性中心の cysteine 残基の修飾によることが古くから知られている³⁾。また、解毒酵素遺伝子の転写活性化を司る分子内センサータンパク質が反応性の高いチオール基を有し、親電子化合物によるこのチオール基のアルキル化によって、転写因子の核内移行が促進すること⁴⁾、タンパク質内チオール基のアルキル化剤との反応性は、チオール基の pKa 値と相関すること⁵⁾などが証明されている。このように、タ

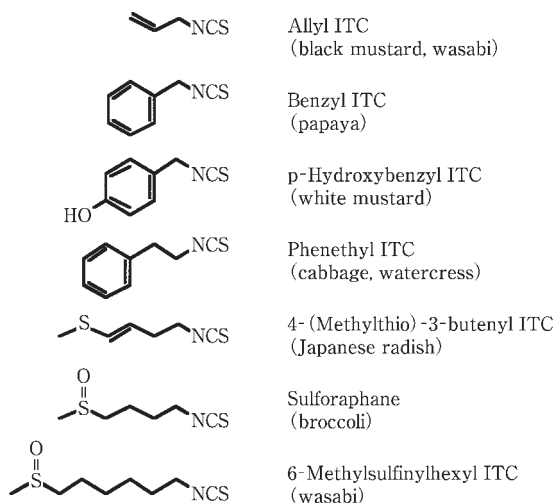


Fig. 1 Chemical structures of the naturally occurring isothiocyanate (ITC) compounds.

ンパク質中のシステイン残基を含めた生体内チオールとの選択的な反応が、ITC 類の持つ様々な生理活性において重要な役割を果たしており (Fig. 2)、がん予防作用への関与も容易に想像されるが、潜在的な標的を含めて、未だ不明な点が多く残されている。

我々の研究グループでは数年前に、ITC 類の一つである benzyl ITC (BITC) を、強力な第II相解毒酵素誘導物質としてパパイヤ果実から単離し⁶⁾、ITC 類の持つ強力で多彩な生理活性に魅了された。究極発がん物質の無毒化や内因性抗酸化作用に重要な役割を果たす、この第II相解毒酵素系 (GSH transferase, UDP-glucuronosyltransferase, etc.) を介した生体防御応答の活性化は、これまでに最も研究の進んでいる ITC 類の発がん抑制メカニズムであり、疫学的研究からもヒトのがん予防への関与が示唆されている。ITC 類を含めた解毒酵素誘導物質の作用メカニズムは、これまでにほぼその全容が明らかになりつつある。その詳細は成書に譲る^{7,8)}が、最近の知見をまとめると、解毒酵素誘導物質は、①解毒酵素遺伝子発現抑制因子である Keap1 の特定のシステイン残基と直接、或いは活性酸素を介して反応することで、立体構造を大きく変化させ、転写因子 Nrf 2 との解離を促進する、②Nrf 2 タンパク質の発現を転写レベルで上昇させる、③Nrf 2 のプロテアソーム系による分解を抑制する、などの機構が示唆されている。以上のように、解毒酵素誘導による生体防御応答の活性化機構が明らかにされ、この機構を活性化する食品成分はがん予防戦略を考える上で極めて重要なターゲットの一つであるとの認識が深まっている。

その一方で最近、我々の研究グループでは新たな生体内抗酸化経路の関与を示唆する実験結果を得ている⁹⁾。炎症過程で過剰に産生した活性酸素は、がん抑制遺伝子の特異的失活や潜在的腫瘍細胞の選択的増殖を誘導することが知られている。そこで、我々は培養細胞及びマウスを用いて、炎症性白血球由来活性酸素産生実験を確立し^{10,11)}、BITC の効果を検討した。その結果、BITC は

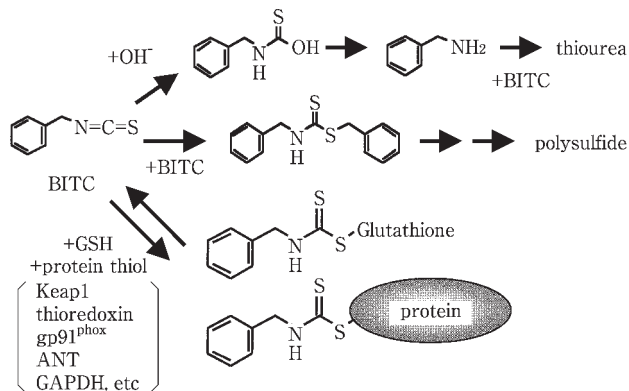


Fig. 2 Proposed pathways of the BITC metabolism and degradation.

NADPH oxidase に依存したスーパーオキシドの産生を有意に阻害し、電子伝達を担う NADPH oxidase 構成蛋白質 gp91^{PHOX} に対する BITC の求電子的な修飾が酵素活性阻害のメカニズムであることを強く示唆する結果を得た⁹⁾。一方、BITC は炎症惹起により一過的に集積した白血球の消失を促進すること、この消失にはアポトーシス誘導が関与していることも観察した¹²⁾。これをきっかけに現在、ITC 類による細胞生理学的応答の分子機構に関する研究を本格的に展開している。

イソチオシアネートによるアポトーシス誘導作用

ITC 類の発がん抑制に関連する生理作用として、アポトーシスが解毒酵素誘導と並んで近年注目されるようになってきた。ITC 類の様々ながん細胞に対するアポトーシス誘導作用がこれまでに数多く報告されているが、筆者らもミトコンドリア経路を介した caspase-3 依存性アポトーシスを BITC が誘導することを見出し¹³⁾、その分子機構に興味を持った。その一方で、細胞死誘導活性を有する薬剤 (抗がん剤) や食品成分には、正常組織・細胞への毒性、傷害といった副作用が危惧されているが、実際、細胞内の BITC 濃度が高くなり過ぎると、活性酸素種の生成が起り^{13,14)}、細胞死形式がネクロシスへと移行することも観察していた¹³⁾。この高濃度投与より誘導される活性酸素は、ITC 類による腎臓、膀胱での臓器特異的な発がん促進作用のメカニズムとして注目されている¹⁵⁾。我々の研究グループではこの点を考慮に入れ、ITC 類はがん細胞に対して特異的にアポトーシスを誘導できるのか、また、その特異性や細胞死形式を決定している分子は何なのか、に焦点を絞って研究をはじめた。

この一連の研究を始めるにあたって、BITC の細胞死誘導に対する感受性が、細胞種だけでなく、細胞数、或いは細胞の増殖状態によって異なるという点にも着目した。まず最初に、対数増殖期という細胞分裂が活発な細胞への感受性を証明するために、BITC 投与による細胞周期の状態とアポトーシスとの関連を、特にフローサイトメトリーを駆使して、詳細に解析した。これまでに ITC 類が細胞周期停止活性を示すという報告は存在したが、アポトーシス誘導との関連については推察の域を出ていなかった。そこで、ヒト T 細胞性白血病細胞 Jurkat を用いた解析から、BITC によるアポトーシス誘導は G₂/M 期停止細胞からの特異的な誘導であり、この細胞周期停止とアポトーシスは連続した一連の現象であることを始めて明らかにした (Fig. 3)¹⁶⁾。次に、これらの制御機構の解明を、mitogen-activated protein kinase (MAPK) に焦点を当てて検討した。その結果、p38 MAPK の活性化は不活性型リン酸化 cdc 2 の蓄積を亢進し、その結果として G₂/M 期進行阻害が生じていること、また、細胞周期同調法を用いた解析から、BITC は G₂/M 期特異的かつ c-Jun N-terminal kinase (JNK) 依存

的に Bcl-2 をリン酸化することで、Bcl-2 の持つ抗アポトーシス機能の低下を引き起こしていることを見出した (Fig. 4)。すなわち、BITC によるアポトーシス誘導は、JNK と p38 MAPK のそれぞれ協調的な制御による特定の細胞周期 (G₂/M) 特異的な現象であることを明らかにすることができた。

この細胞周期とアポトーシスに関する新しい知見は、前述の細胞の増殖状態に影響を受けたという予備的な観察結果とともに、細胞周期の進行/停止により BITC に対する感受性が変化するのではないかと、細胞周期を制御する分子によって調節を受けているのではないかと、という新しい作業仮説を我々に与えた。そこで次に、ヒト大腸由来正常繊維芽細胞株を用いて、無血清培養や接触阻害によって細胞周期を前同調し、BITC に対する細胞死感受性を検討した。その結果、細胞数や血清の存在に関

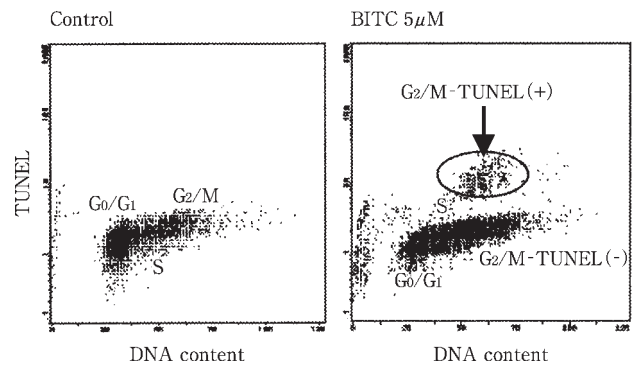


Fig. 3 G₂/M-arrested cells are sensitive to undergoing apoptotic BITC stimulation. Cell cycle distribution of the apoptotic cells was analyzed by a flow cytometer. Jurkat cells were untreated (left panel) or treated with 5 μM BITC for 12 h (right panel). Fixed cells were labeled by TUNEL and PI, and then analyzed using a flow cytometer. Bivariate distributions (scattergrams) represent the intensity of TUNEL versus PI (DNA content).

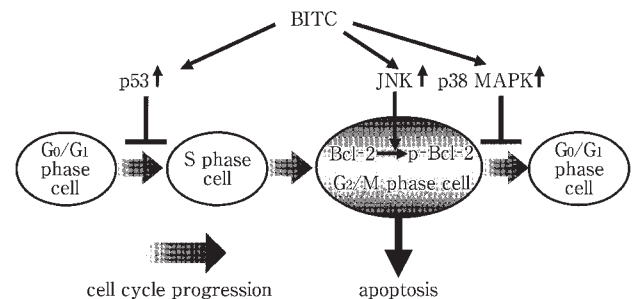


Fig. 4 A plausible mechanism for the BITC-induced cell cycle arrest and apoptosis. The BITC-induced p38 activation inhibits cell cycle progression into the G₀/G₁ phase. The JNK activation in the G₂/M-arrested cells phosphorylates the Bcl-2 protein, which leads to the enhanced susceptibility of the cells to apoptosis.

ならず、G₀/G₁休止細胞は BITC に抵抗性を示し、増殖性細胞のみ選択的に細胞死が誘導された (Miyoshi et al., 投稿中)。休止細胞では、細胞周期制御において最も重要な分子である p53 のリン酸化、蓄積が著しく増加していたことから、BITC の細胞死シグナルに対する p53 の役割を明らかにする目的で、p53-siRNA ベクターを用いた p53 発現低下細胞系における影響を検討した。その結果、対照群と比較して p53 発現低下細胞では、G₁-S 期進行が阻害されず、BITC 処理による有意なアポトーシス誘導の亢進が認められた。以上から、休止細胞における p53 の活性化は G₁ 期で細胞周期を停止することで、BITC の G₂/M 期特異的細胞死シグナルに対して抵抗性を示すことを明らかにした。この結果は、生体内において大部分の正常細胞が休止状態にあること、また p53 はがんにおいて最も高頻度に変異していることなどから、増殖性を維持しているがん細胞への選択的なアポトーシス誘導活性の可能性を示している。ITC 類のアポトーシス誘導作用に対する感受性は、p53 のみに依存している訳ではなく、細胞内 GSH 濃度や GST 活性にも影響を受けることが知られているが、本研究で示したデータは、副作用の少ないがん予防アプローチを考える上で極めて重要な知見であると考えている。

結 語

現在、ITC 類をはじめとする解毒酵素誘導物質が、少なくともがんの予防に関して、現在最も期待される食品成分の一つであることは間違いない。それゆえ、解毒酵素誘導の観点からの野菜の再評価、新規物質や食素材の探索、さらには解毒酵素誘導物質高含有野菜の創成を、これからの課題として挙げておきたい。例えば、パパイアは、優れたビタミン C 供給源 (完熟果実 100 g 中に 50 mg 含まれており、1 日に必要な摂取量の 50% が確保できる) であるだけでなく、β-カロテン、β-クリプトキサンチン、ゼアキサンチン、リコピンの 4 種のカロテノイドを生食 100 g 中に 0.5 mg 以上含む唯一の果物であるが¹⁷⁾、これらの抗酸化性栄養素に加えて、ブロッコリーとほぼ同等の ITC 類を含有することを一連の研究から明らかにした。この特徴は他の果物に例を見ないことから、古代には「メディカルフルーツ」と呼ばれていたパパイアの民間薬の利用に関する科学的根拠を与えるだけでなく、高機能性果物・野菜としての応用が期待される。我々の研究グループでも更なる機能性食品成分の探索研究を続けている¹⁸⁻²⁰⁾。

今回紹介した生理作用の発現には、ITC 類の構造的特徴である反応性の高い ITC 基が重要な役割を果たしていることや、それぞれに特異的なターゲット分子が存在することも示唆されているが、その反面、細胞内に ITC 類が高濃度に存在すると非特異的な生体内チオール化合物の修飾により、毒性が発現することも明白となっている。

それゆえ、ITC 類の応用を考える上では、ITC 類 (或いはそれを含む野菜) を経口摂取した際の生体内での濃度が重要となる。これまでの薬物動態学的研究からは、ブロッコリーやクレソン等の野菜として摂取した場合、生体内に存在する ITC 類は生理的に不活性な抱合体の形で存在し、最大でも数 mM のオーダーにしか達しないとされている^{21,22)}。我々が得ている *in vitro* の結果を踏まえると、毒性を発現するためには通常の食事の数十倍の摂取が必要であり、非現実的であると思われる。しかしながら、緑黄色野菜の摂取が健康維持に有効であることが信憑性の高いものと受け入れられつつある反面、その一方で不十分な野菜の摂取を有効成分のサプリメントで補おうという観点も定着しつつある。特定の野菜の主要成分である単一な化合物を用いた様々な機能性研究がその追い風になっているが、食品として摂取する場合は全く異なる代謝・体内動態を示すことは明白であり、サプリメントの毒性学的研究の進展が早急に望まれる。ITC 類も例にもれず、高用量での臓器特異的な毒性が明らかになりつつあることから、「サプリメントがある故に普段の食生活を疎かにしても構わない」という考え方に警鐘を鳴らしながら、基礎的な研究では ITC 類の代謝物が示す細胞応答や毒性発現に関するさらなる分子機構研究を今後行っていきたいと考えている。

謝 辞

ITC 類のアポトーシス研究の進展に多大な貢献を頂いた三好規之博士 (現東京大学医科学研究所) に心より感謝致します。

参 考 文 献

- 1) 大澤俊彦 (編) : がん予防食品開発の新展開 — 予防医学におけるバイオマーカーの評価システム —. シーエムシー出版, 東京 (2005)
- 2) Fahey, J. W., A. T. Zalcman and P. Talalay : The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, **56**, 5-51 (2001)
- 3) Tang, C. S. and W. J. Tang : Inhibition of papain by isothiocyanates. *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 510-520 (1976)
- 4) Dinkova-Kostova, A. T., W. D. Holtzclaw, R. N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto and P. Talalay : Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11908-11913 (2002)
- 5) LeMaster, D. M. : Structural determinants of the catalytic reactivity of the buried cysteine of Escherichia coli thioredoxin. *Biochemistry*, **35**, 14876-14881 (1996)
- 6) Nakamura, Y., Y. Morimitsu, T. Uzu, H. Ohigashi, A. Murakami, Y. Naito, Y. Nakagawa, T. Osawa and K. Uchida : A glutathione S-transferase inducer from papaya in the cultured normal rat liver epithelial cell line : Rapid screening, identification and structure-activity relationship of isothiocyanate. *Cancer Lett.*, **157**, 193-200 (2000)
- 7) 中村宜督 : 野菜による解毒酵素誘導と生体内での抗酸化機能の

- 向上. 食の科学, **317**, 17-24 (2004)
- 8) 内田浩二, 森光康次郎: 食品による解毒酵素の誘導とがん予防. 食品成分のはたらき (山田耕路編), 朝倉書店, 東京, pp. 46-58 (2004)
 - 9) Miyoshi, N., S. Takabayashi, T. Osawa and Y. Nakamura: Benzyl isothiocyanate inhibits excessive superoxide generation in inflammatory leukocytes: Implication for prevention against inflammation-related carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **25**, 567-575 (2004)
 - 10) Nakamura, Y., A. Murakami, Y. Ohto, K. Torikai, T. Tanaka and H. Ohigashi: Suppression of tumor promoter-induced oxidative stress and inflammatory responses in mouse skin by a superoxide generation inhibitor 1'-acetoxychavicol acetate. *Cancer Res.*, **58**, 4832-4839 (1998)
 - 11) Nakamura, Y., Q. Feng, T. Kumagai, K. Torikai, H. Ohigashi, T. Osawa, N. Noguchi, E. Niki and K. Uchida: Ebselen, a glutathione peroxidase mimetic seleno-organic compound, as a multifunctional antioxidant: Implication for inflammation-associated carcinogenesis. *J. Biol. Chem.*, **277**, 2687-2694 (2002)
 - 12) Nakamura, Y., N. Miyoshi, S. Takabayashi and T. Osawa: Benzyl isothiocyanate inhibits oxidative stress in mouse skin: Involvement of attenuation of leukocyte infiltration. *BioFactors*, **21**, 255-257 (2004)
 - 13) Nakamura, Y., M. Kawakami, A. Yoshihiro, N. Miyoshi, H. Ohigashi, K. Kawai, T. Osawa and K. Uchida: Involvement of the mitochondrial death pathway in chemopreventive benzyl isothiocyanate-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **277**, 8492-8499 (2002)
 - 14) Nakamura, Y., H. Ohigashi, S. Masuda, A. Murakami, Y. Morimitsu, Y. Kawamoto, T. Osawa, M. Imagawa and K. Uchida: Redox regulation of glutathione S-transferase induction by benzyl isothiocyanate: Correlation of enzyme induction with the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res.*, **60**, 219-225 (2000)
 - 15) Akagi, K., M. Sano, K. Ogawa, M. Hirose, H. Goshima and T. Shirai: Involvement of toxicity as an early event in urinary bladder carcinogenesis induced by phenethyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, and analogues in F344 rats. *Toxicol. Pathol.*, **31**, 388-396 (2003)
 - 16) Miyoshi, N., K. Uchida, T. Osawa and Y. Nakamura: A link between benzyl isothiocyanate-induced cell cycle arrest and apoptosis: Involvement of mitogen-activated protein kinases in the Bcl-2 phosphorylation. *Cancer Res.*, **64**, 2134-2142 (2004)
 - 17) 中村宜督: ホンバイヤ. がん予防食品開発の新展開 — 予防医学におけるバイオマーカーの評価システム —, pp. 302-310, シーエムシー出版, 東京 (2005)
 - 18) Miyoshi, N., Y. Nakamura, Y. Ueda, M. Abe, Y. Ozawa, K. Uchida and T. Osawa: Dietary ginger constituents, galanals A and B, are potent apoptosis inducers in Human T lymphoma Jurkat cells. *Cancer Lett.*, **199**, 113-119 (2003)
 - 19) Nakamura, Y., M. Miyamoto, A. Murakami, H. Ohigashi, T. Osawa and K. Uchida: A phase II detoxification enzyme inducer from lemongrass: Identification of citral and involvement of electrophilic reaction in the enzyme induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 593-600 (2003)
 - 20) Nakamura, Y., C. Yoshida, A. Murakami, H. Ohigashi, T. Osawa and K. Uchida: Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, activates phase II drug metabolizing enzymes. *FEBS Lett.*, **572**, 245-250 (2004)
 - 21) Chung, F. L., M. A. Morse, K. I. Eklind and J. Lewis: Quantitation of human uptake of the anticarcinogen phenethyl isothiocyanate after a watercress meal. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **1**, 383-388 (1992)
 - 22) Ye, L., A. T. Dinkova-Kostova, K. L. Wade, Y. Zhang, T. A. Shapiro and P. Talalay: Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clin. Chim. Acta.*, **316**, 43-53 (2002)