

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	環境生命科学研究科
専攻 Division	農生命科学専攻
学生番号 Student No.	77425601
氏名 Name	安部 奈緒美

学位論文題目 Title of Thesis (学位論文題目が英語の場合は和訳を付記)

Identification of plausible targets for antiproliferation by benzyl isothiocyanate in colorectal cancer cells
(ベンジルイソチオシアネートの大腸がん細胞増殖抑制作用に寄与する分子標的の同定)

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

大腸がんは男性で三番目、女性で二番目に多いがんであり、欧米諸国においてその発生率が高い傾向にある。近年の食の欧米化により、日本の大腸がん患者数も増加の一途をたどっている。イソチオシアネート (ITC) 類はアブラナ科野菜に由来する含硫低分子化合物で、ITC 類を含有する食事の摂取が大腸がんを含む様々ながんの発症リスクと逆相関していることから、有力ながん予防剤として期待されている。これまでに、パパイヤやクレソンに由来するベンジル ITC (BITC) は大腸がん細胞の増殖を抑制することが報告されているが、その分子機構については未だ不明な点が多い。そこで、本研究は、BITC による大腸がん細胞増殖抑制作用の分子機構を解明することを目的とした。

BITC の分子標的の同定は BITC の作用機構の解明に大きく貢献する。ITC 類は求電子反応性を有するため、細胞内タンパク質の求核性アミノ酸残基と共有結合することが報告されている。しかし、ITC 類の機能性に対応していそうな初期の段階で生成する ITC の Cys 付加体は不安定であることに加え、ITC 類の結合特異性があまり高くないことから、プロテオーム解析により ITC 類の機能性に深く関連した結合標的を同定することは困難であった。そこで、BITC が細胞増殖を抑制するという表現型に基づいた分子標的のスクリーニングを行うため、出芽酵母を使用した。真核細胞のモデル生物である出芽酵母は、ヒトの細胞と比べて「低コスト・簡便・迅速」なスクリーニングを行なうことができるため、これまでに薬剤標的の探索に広くもちいられてきた。さらに、酵母はヒトと同様の細胞分裂や DNA 修復の機構を持つことから、BITC の細胞増殖抑制作用に関わる標的分子を探索する上で特に適していると考えた。そこで本研究では、genome-wide multi-copy plasmid collection が導入された出芽酵母を用いて、過剰発現により酵母に BITC 耐性を与える遺伝子の同定を試みた。さらに、ヒト大腸がん細胞株を用いて、同定した遺伝子の細胞増殖抑制作用におけるヒトでの役割を調査した。酵母がもつ全遺伝子を網羅的に過剰発現した酵母を用いてスクリーニングを行った結果、動原体構成タンパク質の一つをコードする *MTW1* を含む 12 の遺伝子を、BITC 耐性に貢献する遺伝子の候補として同定した。そこで、*Mtw1* のヒトホモログである *Mis12* の過剰発現とノックダウンが BITC による細胞増殖抑制作用に与える影響をヒト大腸がん由来 HCT-116 細胞において調査した。その結果、BITC による細胞増殖抑制作用は *Mis12* の過剰発現により弱められ、*Mis12* のノックダウンにより強められた。また、10 μ M 以上の BITC は *Mis12* のタンパク質発現を減少させ、その効果はプロテアソーム阻害剤との共処理により打ち消された。以前の研究で、*Mis12* のノックダウンが M 期における細胞周期進行を遅延させることと、BITC が G₂/M 期停止を誘導し、

G₂/M 期の細胞特異的にアポトーシス細胞死を誘導することが報告されていることから、BITC は Mis12 レベルの減少を介して M 期の細胞数の割合を増加させることにより、BITC のアポトーシス誘導効果を高めているのではないかと考えた。この仮説を検証するために、細胞周期分布を調査した結果、BITC による G₂/M 期停止作用は Mis12 のノックダウンにより強められ、Mis12 の過剰発現により完全に抑えられた。また、BITC によるアポトーシス誘導作用は Mis12 のノックダウンにより強められ、Mis12 の過剰発現により部分的に弱められた。一方で、Mis12 のノックダウンは単独で G₂/M 期停止を誘導したが、アポトーシスを誘導しなかった。これらの結果から、Mis12 レベルの減少は G₂/M 期停止を誘導し、BITC 誘導性アポトーシスへの細胞の感受性を高めることによって、BITC によるヒト大腸がん細胞の増殖抑制作用に貢献することが示唆された。

次に、大腸がんにより特異的に発現する分子に着目して、BITC が細胞増殖を抑制する分子機構の解明を試みた。ほとんどの大腸がん細胞では、ある種の遺伝子変異により恒常的に β -catenin が過剰発現している。過剰発現した β -catenin は、cyclin D1 などの細胞増殖に関わる遺伝子の発現を持続的に誘導することで大腸腫瘍の形成を促進するものと理解されている。さらに最近、炎症などに関わる転写因子 Nuclear factor- κ B (NF- κ B) の誘導は、 β -catenin による cyclin D1 遺伝子の転写を下方制御することが見出され、 β -catenin に対する新たな制御因子として注目されつつある。また、BITC はマクロファージや好塩基球において、NF- κ B 経路の修飾を介して抗炎症作用を示すことが報告されている。そこで本研究では、BITC の大腸がん細胞増殖抑制作用における NF- κ B の役割を調査した。ヒト大腸がん細胞 HT-29 において siRNA により NF- κ B p65 サブユニットをノックダウンさせたところ、5 μ M までの低濃度 BITC への感受性が有意に弱まり、アポトーシス細胞死を誘導する 10 μ M 以上の高濃度 BITC への感受性には影響を与えなかった。このことから、低濃度の BITC は NF- κ B 依存的に細胞増殖を抑制することが示唆された。これに対応して、BITC は NF- κ B シグナル分子のリン酸化や p65 の核内移行、NF- κ B の転写活性の増加を誘導し、NF- κ B 経路を活性化させた。また、BITC は cyclin D1 のプロモーター配列への β -catenin の結合を弱め、 β -catenin 依存的な cyclin D1 の転写を抑制した。さらに、共免疫沈降実験から、p65 と β -catenin が直接的に相互作用する可能性が示唆された。さらに、他の大腸がん細胞株を用いて、BITC による NF- κ B 経路の活性化が同様に見られるか検討したところ、腫瘍抑制遺伝子 p53 が変異している大腸がん細胞では BITC による NF- κ B 経路の活性化が認められたが、p53 野生株の大腸がん細胞では観察されなかった。以上の結果から、BITC は NF- κ B 経路の活性化を介して β -catenin 依存的な cyclin D1 の転写を阻害することにより、p53 欠損大腸がん細胞の細胞増殖を特異的に抑制することが示唆された。

本研究では、BITC による大腸がん細胞増殖抑制作用の標的分子として、Mis12 と NF- κ B を異なる研究戦略により新たに同定し、「高濃度 BITC による Mis12 減少を介した G₂/M 期停止とそれに伴うアポトーシスへの感受性増大」と「低濃度 BITC による NF- κ B 経路の活性化を介した β -catenin/cyclin D1 経路の抑制」という分子機構を明らかにした。今回得られた成果は、BITC のもつ健康機能特性の科学的な根拠を提供し、新しい分子基盤に基づいた機能性食品やサプリメント開発に大きく貢献するものと確信している。また、大腸がん細胞の増殖抑制作用において鍵となる分子メカニズムを解明したことから、NF- κ B の活性化による β -catenin/cyclin D1 経路の制御を標的とした大腸がん選択的抗がん剤の開発に大きく貢献することが期待される。