

氏名	安部 奈緒美		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	農学		
学位授与番号	博甲第5374号		
学位授与の日付	平成28年 3月25日		
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)		
学位論文の題目	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)		
論文審査委員	教授 中村 宜督	教授 村田 芳行	准教授 守屋 央朗

学位論文内容の要旨

パパイヤ由来の成分ベンジルイソチオシアネート (BITC) は、がん予防剤として期待されている。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、その分子機構には不明な点が多く存在する。そこで本研究では、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。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、真核細胞のモデル生物である出芽酵母を使用した。まず、過剰発現により出芽酵母に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。BITCによる細胞増殖抑制作用は*Mtw1*のヒトホモログである*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。さらに、細胞周期解析の結果、BITCはG₂/M期における細胞周期停止を誘導し、その効果は*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はアポトーシス細胞死を誘導し、その効果は*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*レベルの減少が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遺伝子の転写を抑制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。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NF- κ Bをノックダウンさせたところ、低濃度BITCへの感受性が有意に弱まり、細胞死を誘導する高濃度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。この結果に対応して、BITCは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。これは、p65と β -cateninの直接的な相互作用を介して起こる可能性が示された。さらに、他の大腸がん細胞株でもBITCによるNF- κ B経路の活性化が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のみでBITCによるNF- κ B経路の活性化が認められた。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で、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の大腸がん細胞増殖抑制作用の分子標的として、*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。この成果は、BITCの健康機能特性の科学的根拠を提供し、大腸がん細胞増殖制御の鍵分子機構を解明したことから、機能的食品や新規抗がん剤の開発への貢献が期待される。

論文審査結果の要旨

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化合物で、大腸がん細胞の増殖を顕著に抑制するが、その分子機構には不明な点が多い。本研究は、benzyl ITC (BITC) 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を目的としている。

まず、酵母がもつ全遺伝子を網羅的に過剰発現した出芽酵母を用いて、BITC耐性を与える遺伝子の同定を試みた。その結果、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。さらに、Mtw1及びそのヒトホモログMis12の逆遺伝学的解析により、Mtw/Mis12は細胞周期修飾とアポトーシス感受性増大を介して、BITCの酵母及び大腸がん細胞株での細胞増殖抑制作用に貢献することを明らかにした。

続いて、大腸がん細胞特異的増殖因子 β -cateninとの機能的相互作用が近年示唆されているNuclear factor- κ B (NF- κ B) に着目し、BITCの細胞増殖抑制作用における役割を調査した。その結果、BITCはNF- κ B核内移行を誘導し、 β -cateninとの直接的相互作用を介してcyclin D1の転写を阻害すること、この作用はp53欠損大腸がん細胞に選択的であることを明らかにした。正常細胞ではp53や β -cateninの機能が正常であるため副作用の可能性が極めて少ないこと、スルフォラファンなどの脂肪族イソチオシアネートは観察されず、BITCに特異的な作用であることも示唆した。

本研究成果は、食品成分 BITC のもつ機能性の科学的な根拠を提供すると共に、大腸がん細胞の増殖抑制作用においてカギとなる新しい分子メカニズムを解明した。また、今後の研究の進展により、食品成分のもつ機能性・安全性への科学的理解に大きく貢献することが期待される。従って、本研究内容は、学術的な価値のみならず、実用に結びつく技術の礎となるものであり、本審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位論文に値するものと判断した。