

氏名 たかしな みちのり
高階 道德

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 196 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
東西統合医学専攻

学位論文題目 Different effects of resveratrol on cell death mediated by
apoptosis and autophagy depending on the type of human cancer
cells
(レスベラトロールはヒトがん細胞腫により異なった細胞死効果を示す)

論文審査委員

(主査) 教授 近藤 隆
(副査) 教授 一條 裕之
(副査) 教授 戸邊 一之
(副査) 教授 杉山 敏雄
(指導教員) 教授 服部 裕一

論文内容の要旨

〔目的〕

レスベラトロールは葡萄の皮、桑の実、落花生等70種類以上の植物に含まれているポリフェノールで真菌感染、病虫害や悪天候に対する防衛反応として生成される抗酸化物質である。レスベラトロールには長寿遺伝子SIRT1活性化による寿命延長効果があるとして注目を浴びてきたが、現在はSIRT1自体に寿命を延ばす作用は無いと考えられている。しかし、レスベラトロールには抗炎症効果や抗酸化作用を有し、糖尿病やアルツハイマー病等の神経変性疾患への効果が期待される。中でも白血病、乳がん、膀胱がん、結腸がん等に対し抗がん作用としての効力を示すという報告が数多くある。そこで、本研究では様々なヒトがん細胞を用い、レスベラトロールが細胞死を誘導するメカニズムを解明することを目的として検証を行った。

〔方法並びに成績〕

まず、MTT assayを行い各種ヒトがん細胞についてレスベラトロールの抗生存効果の変化を検証した。U937細胞やMOLT-4細胞のような白血病細胞ではレスベラトロールは強く生存率を低下させた。ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞、ヒト肝がん由来HepG2細胞、ヒト肺胞基底上皮腺がん由来A549細胞は中等度の生存率低下を認め、ヒト結腸がん由来Caco-2細胞、SW480細胞、ヒト大腸がん由来HCT116細胞についてはレスベラトロールによる生存率への影響は殆ど確認できなかった。フローサイトメトリー法によるアポトーシス解析ではU937細胞とMOLT-4細胞がレスベラトロール処置後24時間で濃度依存的な後期アポトーシスを引き起こし、HepG2細胞とMCF-7細胞では早期アポトーシスが誘導された。フローサイトメトリー法による結果と一致して、DNA断片化についてもレスベラトロール処置後24時間でU937細胞とMOLT-4細胞にのみ確認出来た。この結果に対しSIRT1とAMPKの関与を検証するためにSIRT1阻害薬EX-527、AMPK阻害薬compound Cを用いてMTT assayを行ったが、これらによるレスベラトロール誘導性の細胞死への影響は認められなかった。

しかし、U937細胞とMOLT-4細胞の白血病細胞と乳がん細胞であるMCF-7細胞ではアポトーシスの程度に違いがあることからレスベラトロールによるシグナル経路について検証した。U937細胞とMOLT-4細胞ではAkt活性化が減少し、Baxの細胞質からミトコンドリアへの移行が生じた。一方でMCF-7細胞では特にAkt活性化が減少する傾向は認められなかった。また、PDK1はAktのリン酸化に関わる分子である。PDK1自身の活性化をレスベラトロール刺激し確認したが、U937、MOLT-4そしてMCF-7細胞ではPDK1活性化に影響は見られなかった。オートファジー関連分子LC3Bについて、レスベラトロールによるLC3B-I から LC3B-IIへの移行はU937、MOLT-4、MCF-7細胞で確認出来た。また、同関連分子p62はU937細胞でのみ上昇する傾向にあり、MOLT-4細胞についてATG5は時間経過により上昇、Beclin-1は有意な減少を認めた。U937細胞やMCF-7細胞のATG5、p62、Beclin-1レベルにはレスベラトロールは影響を与えなかった。すなわち、オートファジー関連分子に対するレスベラトロールの効果は一様ではなく、レスベラトロールによる細胞死効果とも一致しなかった。

〔総括〕

結論として、我々はレスベラトロールがヒト固形がん細胞よりもヒト白血病細胞において Akt 活性化の

抑制を介したアポトーシス細胞死を誘導することを示した。PDK1 は Akt を活性化させると言われているがレスベラトロール刺激で PDK1 自体の活性化に影響は無かったことから、別の Akt 活性化経路にレスベラトロールが関与すると思われる。

PTEN は PI3K-Akt 系の機能を抑制する役割を持ち、多くの悪性腫瘍などでは PTEN が不活化される事からがん抑制遺伝子とも言われている。mTORC2 は Akt を活性化させるが PDK1 とは別のリン酸化部位を介した Akt 活性化を引き起こす。Ras は転写や細胞増殖、細胞の運動性の獲得のほか、細胞死の抑制など数多くの現象に関わっている分子である。がん細胞では細胞増殖が促進されているが、それにはこの Ras タンパク質が常に活性化した状態が原因とも考えられている。以上、これらのタンパクにレスベラトロールが影響を与えていると考え、今後研究を進めていく。

また、レスベラトロールはヒトがん細胞でオートファジーを誘導するがその作用がヒトがん細胞の細胞死を強く誘導することを説明できる十分な証拠は今回得られなかった。

レスベラトロールは動物に対し薬理作用を得るのに十分な高用量で投与した場合でも毒性は無い。一般的な食事に含まれるこの天然成分は本質的に毒性が低く、合成薬と比較しても予期せぬ有害事象を起こさせない事で、より高い安全性をもたらしている。レスベラトロールの僅かな潜在的抗白血病活性は、マウス骨髄性白血病細胞株を移植したマウスでの *in vivo* 実験で示唆されているが、我々の結果はレスベラトロールが白血病の発症予防に有益であること、そしてヒト白血病に対して従来の化学療法と併用出来る補助剤としての両方の可能性を持つことが示唆された。

学位論文審査の要旨

【目的】

レスベラトロールはスチルベン誘導体ポリフェノール的一种で、食品では赤ぶどうの果皮や落花生の皮などに含まれている。レスベラトロールは赤ワインに含まれることから、フレンチパラドックスとの関連が指摘されており、心血管関連疾患の予防効果が期待されている。また、種を超えた寿命延長作用を有するとして、大きな注目を集めている。さらに、レスベラトロールは、抗がん、抗動脈硬化、抗肥満、抗糖尿病、抗炎症などの有益な効果が動物実験で数多く報告され、現在はサプリメントとしても市販されてアメリカを中心に市場を拓いている。レスベラトロールの抗がん作用については、1997年頃から世界中で注目されるようになったが、その作用メカニズムの報告に関しては極めて多様でまだ十分な解明には至っていない。

そこで高階道徳君は、種々のヒトがん細胞株を用いて、レスベラトロールによるがん細胞死機構について検討し、薬理学的見地から、レスベラトロールの標的分子の同定を試みた。

【材料と方法】

ヒトがん細胞株として、白血病細胞(U937細胞, MOLT-4細胞), 乳がん細胞(MCF-7), 肝がん細胞(HepG2), 肺胞基底上皮腺がん細胞(A549), 大腸がん細胞(Caco-2, SW480, HCT116)を用いた。がん細胞死は、MTT assay, フローサイトメトリー法, TUNEL assay, アガロースゲル電気泳動によるDNAラダー検出法で評価した。アポトーシスやオートファジーによる細胞死のシグナル経路に関わる分子の発現や活性については、Western blot 解析あるいはreal-time PCR法で検討した。レスベラトロールによるがん細胞死は、1~100 μ Mの濃度を用いて、投与後24~48時間で解析した。

【結果】

MTT assayにより各種ヒトがん細胞株についてレスベラトロールの抗生存効果の変化を検証した。白血病細胞ではレスベラトロールは強く生存率を低下させたが、乳がん細胞, 肝がん細胞, 肺腺がん細胞では中等度の生存率の低下を認め、3種の大腸がん細胞ではいずれもレスベラトロールによる生存率への影響は殆ど確認できなかった。

FITC-Annexin Vおよびヨウ化プロピジウム (PI)を用い、早期および後期のアポトーシスをフローサイトメトリー法により解析すると、白血病細胞ではレスベラトロール処置後24時間で濃度依存的な後期アポトーシスを引き起こしたのに対し、乳がん細胞と肝がん細胞では早期アポトーシスが誘導された。これらの結果と一致して、TUNEL

assay およびアガロースゲル電気泳動による DNA ラダー検出法による DNA 断片化についても調べたところ、レスベラトロール処置後 24 時間で白血病細胞にのみ認められた。

レスベラトロールは、長寿遺伝子産物 SIRT1 とセリン/スレオニンキナーゼである AMPK を活性化することが知られているが、レスベラトロールより約 1000 倍強力な SIRT1 活性化薬 SIRT1720 ではがん細胞死の誘発は認められず、また、SIRT1 阻害薬 EX-527, AMPK 阻害薬 compound C の存在によって、レスベラトロール誘導性の細胞死が阻害される影響は認められなかったことから、SIRT1 と AMPK はレスベラトロールのがん細胞死効果には関与しないと示唆される。

細胞生存シグナルの中でも重要な役割をもつ Akt の活性化について検討したところ、白血病細胞では、レスベラトロール投与により、Akt の発現量には変化はないがその活性化は有意に減少した。さらに、Akt 抑制の結果として、アポトーシス誘発性 Bcl-2 ファミリーメンバーの Bax の細胞質からミトコンドリアへの移行が生じ、チトクローム c 放出と、caspase-3 が断片化され活性化された。しかし、乳がん細胞や肝がん細胞では Akt 活性化の減少は認められなかった。このことから、レスベラトロールは Akt の上流にある分子に作用してがん細胞死を引き起こすものと想定される。

オートファジー関連分子 LC3B について、レスベラトロールによる LC3B-I から LC3B-II への移行の有無は、2 種の白血病細胞でも異なっており、乳がん細胞では認められた。また、選択的オートファジーにおける主要なアダプタータンパク質である p62 は白血病細胞のうち U937 細胞でのみ上昇する傾向にあり、MOLT-4 細胞では、オートファジー必須遺伝子 ATG5 はレスベラトロール投与後時間依存性により上昇、一方オートファジー主要調節因子 Beclin-1 は有意な減少を認めた。U937 細胞や MCF-7 細胞の ATG5, p62, Beclin-1 レベルにはレスベラトロールは影響を与えなかった。すなわち、オートファジー関連分子に対するレスベラトロールの効果は一様ではないことから、レスベラトロールによる細胞死誘導におけるオートファジーの関与は少ないものと考えられる。

【総括】

レスベラトロールは動物に対し薬理作用を得るのに十分な高用量で投与した場合でも毒性は無く、より高い安全性を有した有用なポリフェノールである。高階君は、本研究により、レスベラトロールがヒト固形がん細胞よりもヒト白血病細胞において、Akt 活性化の抑制を介した機序でアポトーシス細胞死を誘導することを明らかにした。本研

究は、レスベラトロールの標的分子が Akt の上流に存在することを示したものであり、Akt 上流分子を標的としたレスベラトロール誘導体の開発に道を拓くものと思われる。検討を今後に残すが、本研究成果は腸管から高い割合で吸収される一方でそのほとんどはすぐ代謝されてしまうレスベラトロールの欠点を補強して、白血病発症予防やヒト白血病に対して従来の化学療法と併用出来る補助剤を創出できる可能性を示し、将来の創薬に大いに貢献する知見を有することから、その内容は高く評価できる。よって本審査会は、審査の結果より本論文が博士（医学）の学位に十分値すると判定した。