

氏 名 ぼく きんらん  
**朴 今蘭**

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 131 号

学位授与年月日 平成 26 年 3 月 21 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 医学領域 博士課程  
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **The molecular mechanisms and gene expression profiling for shikonin-induced apoptotic and necroptotic cell death in U937 cells**  
**(U937 細胞におけるシコニン誘導アポトーシス及びネクロプトーシス分子機構と遺伝子発現プロファイリング)**

論文審査委員

(主査)	教授	服部	裕一
(副査)	教授	森	寿
(副査)	教授	野口	京
(副査)	教授	嶋田	豊
(指導教員)	教授	近藤	隆

# 論文内容の要旨

## 目的

シコニン、ムラサキ科の漢方薬草から抽出した天然のナフトキノンで、様々な癌細胞においてアポトーシスとネクロプトーシスの両方とも誘導する。しかし、これら両細胞死の誘導に関する詳細な分子機構および関連する遺伝子は、いまだに明らかではない。

本研究では、シコニンがヒトリリンパ腫細胞株(U937)細胞において用量依存的にアポト-シス及びネクロプトーシスを誘導するメカニズムと関連遺伝子発現の解析を目的とし、異なる濃度で処理した時、シコニンが誘導するそれぞれの細胞死に関連するシグナル伝達機構及び関連遺伝子の発現変化を比較検討した。

## 方法並びに成績

1. 実験にはヒトリリンパ腫細胞株である U937 細胞を用い、シコニンがアポトーシス及びネクロプトーシスを誘導する条件を検討した。U937 細胞をシコニン用量依存的に処理し、DNA 断片化を測定した結果、シコニン 1  $\mu$ M で DNA 断片化は処理後 6 時間に最高 (53.7%) となり、シコニン 10  $\mu$ M では DNA 断片化がほぼ観察されなかったことから、アポトーシスの測定はシコニン 1  $\mu$ M、ネクロプトーシスの測定はシコニン 10  $\mu$ M を用い、処理後 6 時間培養した時点で細胞死の測定を行った。
2. 次に U937 細胞をシコニン 1  $\mu$ M 処理して 6 時間後、細胞内活性酸素(ROS)産成の増加、ミトコンドリア膜電位の低下を認めたともに、アポトーシス関連タンパク質の Noxa と tBid の発現増加及び Cytochrom c の放出、Caspase-3、-8 の顕著な活性を認めた。更に、汎用カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK の前処理によりシコニンが誘導したアポトーシスが有意に抑制された。これらの結果は、低濃度のシコニンで処理した際、活性化した

Caspase-8 が Bid を活性化し、ミトコンドリア膜電位の低下及び Cytochrom c の放出を促進し、それに引き続き Caspase-3 活性化を介してアポトーシスを誘導することを示した。興味深いことに、カスパーゼ非依存的な細胞死はシコニン 10  $\mu\text{M}$  処理で誘導され、SYTOX<sup>®</sup>グリーン染色による解析と乳酸脱水素酵素(LDH)の放出増加によって確認された。さらに Nec-1 は、SYTOX<sup>®</sup>グリーン染色と LDH 漏出を有意に抑制しが、Z-VAD-FMK 前処理による影響はなかった。従って、低濃度のシコニン誘導アポトーシスはミトコンドリアーカスパーゼ経路に依存し、高濃度のシコニン誘導ネクロプトーシスは従来型のアポトーシス情報伝達経路を介しないものと考えられる。

3. 細胞透過性外因性グルタチオン(GSH)は、1  $\mu\text{M}$  のシコニン誘導したアポトーシスをほぼ完全に抑制し、10  $\mu\text{M}$  シコニンで誘導したネクロプトーシスをアポトーシスに転向させた。この結果は、酸化ストレスはアポトーシスだけではなく、ネクロプトーシスにも重要な役割を果たしていることを示した。
4. 遺伝子発現プロファイリングでは、353 遺伝子がシコニン 1  $\mu\text{M}$ 、85 遺伝子がシコニン 10  $\mu\text{M}$  それぞれ up-regulation 遺伝子として同定された。これらの遺伝子の中で transcription factor (ATF3)と DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT3) の発現が 1  $\mu\text{M}$  シコニン処理で顕著に増加し、シコニン 10  $\mu\text{M}$  処理では tumor necrosis factor (TNF)の発現が主に増加した。

## 総括

本研究では、U937 細胞においてシコニンが用量依存的にアポトーシスとネクロプトーシスを誘導する事に注目し、分子機構及び関連遺伝子発現の解析を目的とした。その結果、低濃度のシコニン誘導アポトーシスはミトコンドリアを介したカスパーゼ経路に依存することが判明した。一方、高濃度のシコニン誘導ネクロプトーシスでは TNF 発現の

up-regulation と下流のアポトーシス経路の不活化を明らかにした。更に細胞内の GSH 減少に反映される酸化ストレスがシコニン誘導した細胞死の様式転換に大きく関与していることを示した。

従来、癌細胞でのアポトーシス誘導を癌治療に結び付ける試みが続けられてきた。本研究成果は、シコニンより誘導されるアポトーシスに加えて、異なる細胞死様式であるネクロトーシスの分子機構についても新たな情報を提供する。また、癌細胞において、シコニンがアポトーシス以外の細胞死プログラムの活性化を誘導することが明らかとなり、新たな細胞死を標的とした抗癌戦略の可能性を示したものといえる。

## 学位論文審査の要旨

シコニンとは、ムラサキ科の漢方生薬から抽出した天然のナフトキノンで、様々な癌細胞においてアポトーシスとネクロプトーシスの両者を誘導する。しかしながら、これら両細胞死の誘導に係る詳細な分子機構および関連する遺伝子については、解明されていない。

そこで朴今蘭さんは、シコニンがヒトリンパ腫細胞株(U937)細胞において濃度依存的にアポト-シス及びネクロプトーシスを誘導するメカニズムと関連遺伝子発現の解析を目的とし、異なる濃度で処理した時、シコニンが誘導するそれぞれの細胞死に係るシグナル伝達機構及び関連遺伝子の発現変化を明らかにしようと試みた。

### 【方法および結果】

(1) 実験にはヒトリンパ腫細胞株である U937 細胞を用い、シコニンがアポトーシス及びネクロプトーシスを誘導する条件を検討した。U937 細胞をシコニン用量依存的に処理し、DNA 断片化を測定した結果、シコニン 1  $\mu\text{M}$  で DNA 断片化は処理後 6 時間に最高 (53.7%) となり、シコニン 10  $\mu\text{M}$  では DNA 断片化がほぼ観察されなかったことから、アポトーシスの測定はシコニン 1  $\mu\text{M}$ 、ネクロプトーシスの測定はシコニン 10  $\mu\text{M}$  を用い、処理後 6 時間培養した時点で細胞死の測定を行った。

(2) U937 細胞をシコニン 1  $\mu\text{M}$  処理したときには 6 時間後で、細胞内活性酸素(ROS)産生の増加およびミトコンドリア膜電位の低下とともに、アポトーシス関連タンパク質の Noxa と tBid の発現増加、cytochrome c の放出、caspase-3 および-8 の活性化が認められた。さらに、汎用カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK の前処理によりシコニンが誘導したアポトーシ

スが有意に抑制された。これらの結果は、低濃度のシコニンで処理した際、活性化した caspase-8 が Bid を活性化し、ミトコンドリア膜電位の低下さらには cytochrome c の放出を促進し、それに引き続き caspase-3 活性化を介してアポトーシスを誘導することを示唆する。興味深いことに、カスパーゼ非依存的な細胞死がシコニン 10  $\mu\text{M}$  処理で誘導され、それは SYTOX<sup>®</sup>グリーン染色による解析と乳酸脱水素酵素(LDH)の放出増加によって確認された。さらに necrostatin-1 は、SYTOX<sup>®</sup>グリーン染色と LDH 漏出を有意に抑制したが、Z-VAD-FMK 前処理による影響はなかった。したがって、低濃度のシコニン誘導アポトーシスはミトコンドリアーカスパーゼ経路に依存し、高濃度のシコニン誘導ネクロプトーシスは従来型のアポトーシス情報伝達経路を介しないものと結論された。

(3) 細胞透過性外因性グルタチオン(GSH)は、1  $\mu\text{M}$  のシコニンで誘導したアポトーシスをほぼ完全に抑制し、10  $\mu\text{M}$  シコニンで誘導したネクロプトーシスをアポトーシスに転換させた。この結果から、酸化ストレスはアポトーシスだけではなく、ネクロプトーシスにも重要な役割を果たしていることが示された。

(4) 遺伝子発現プロファイリングでは、353 遺伝子がシコニン 1  $\mu\text{M}$ 、85 遺伝子がシコニン 10  $\mu\text{M}$  で up-regulation される遺伝子として同定された。これらの遺伝子の中で transcription factor (ATF3)と DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT3) の発現が 1  $\mu\text{M}$  シコニン処理で顕著に増加し、シコニン 10  $\mu\text{M}$  処理では tumor necrosis factor (TNF) の発現が主に増加していた。

#### 【総括】

朴今蘭さんは、U937 細胞においてシコニンが濃度依存的にアポトーシスとネクロプト

ーシスを誘導することに着目し、その分子機構及び関連遺伝子発現の解析を試みた。その結果、低濃度のシコニン誘導アポトーシスはミトコンドリアを介したカスパーゼ経路に依存することを明らかにした。一方、高濃度のシコニンが誘導するネクロプトーシスでは TNF 発現の up-regulation と下流のアポトーシス経路の不活化が関係していることを見出した。さらに細胞内の GSH 減少に反映される酸化ストレスがシコニンで誘導した細胞死の様式転換に大きく関与していることを示した。

従来、癌細胞でのアポトーシス誘導を癌治療に結び付ける試みが続けられてきているが、本研究成果は、シコニンにより誘導されるアポトーシスに加えて、異なる細胞死の様式であるネクロプトーシスの分子機構についても新たな情報を提供する。また、癌細胞において、シコニンがアポトーシス以外の細胞死プログラムの活性化を誘導することが明らかとなり、新たな細胞死を標的とした抗癌戦略の可能性を示したものといえる点は高く評価できる。よって本審査員会は、審査の結果より本論文が博士（医学）の学位に相当する内容を有すると判定した。