

学 位 論 文 要 旨

氏 名 水本 裕子

題 目 ブナシメジ(*Hypsizigus marmoreus*)由来ポリテルペンの HL-60 細胞における
アポトーシス誘導機構
(Mechanism of Apoptosis Induced by Polyterpene from Buna-shimeji
(*Hypsizigus marmoreus*) in HL-60 Cells)

本研究では、担子菌の一種であるブナシメジに特徴的に含まれるポリテルペン・ヒプシジプレノール A₉ の抗腫瘍作用を解明することを目的に、ヒト培養がん細胞に対するアポトーシス誘導作用ならびにその作用機構について研究をおこなった。

ブナシメジの子実体から精製したヒプシジプレノール A₉ を数種類のがん細胞の培養液に添加し細胞の増殖能を調べたところ、ヒト前骨髄性白血病細胞株 (HL-60)、ヒト急性 T 細胞性白血病細胞株 (Jurkat)、ヒト結腸腺癌細胞株 (HCT116, HT-29) の増殖を強く抑制した。

HL-60 細胞の培養液にヒプシジプレノール A₉ を添加し培養すると、4 時間内にアポトーシス小体が観察され、蛍光色素 Hoechst 33342 染色によって核の断片化が認められた。また、アガロースゲル電気泳動においてはヌクレオソーム単位で切断された DNA の断片化がラダー状のバンドとして検出された。フローサイトメトリーにより経時的な hypodiploid 細胞の増加が認められたことから、ヒプシジプレノール A₉ は HL-60 細胞に対して速やかにアポトーシスを誘導することで、その増殖を強く抑制することが示された。

ヒプシジプレノール A₉ のアポトーシス誘導現象についてさらに詳細に調べたところ、ヒプシジプレノール A₉ は濃度依存的に HL-60 細胞内のカスパーゼ-2、-3、-8、-9 を活性化し、カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK がヒプシジプレノール A₉ の増殖抑制作用を濃度依存的に緩和した。

また、蛍光試薬 JC-1 を用いてミトコンドリアの膜電位について検討したところ、ヒプシジプレノール A₉ が濃度依存的にミトコンドリアの膜電位の低下を引き起こすことが明らかとなった。

さらにヒプシジプレノール A₉ による HL-60 細胞の増殖抑制作用を cAMP 誘導体である DBcAMP は濃度依存的に緩和し、ヒプシジプレノール A₉ による核の断片化も抑制した。加えて、細胞内 cAMP 濃度を高める forskolin や IBMX もヒプシジプレノール A₉ による細胞増殖抑制作用を緩和した。

以上の結果から、ヒプシジプレノール A₉ の抗腫瘍作用はがん細胞へのアポトーシス誘導によるものであり、その作用はカスパーゼ依存的で、ミトコンドリアの膜電位の低下、細胞内 cAMP 経路の抑制が関与していることが示された。

学 位 論 文 要 旨

氏 名

Hiroko Mizumoto

題 目

Mechanism of Apoptosis Induced by Polyterpene from Buna-shimeji
(*Hypsizigus marmoreus*) in HL-60 Cells

(ブナシメジ(*Hypsizigus marmoreus*)由来ポリテルペンの HL-60 細胞における
アポトーシス誘導機構)

To elucidate anti-tumor action of distinct component, hypsiziprenol A₉ (polyterpene) contained in *Hypsizigus marmoreus*, a Japanese edible mushroom, apoptosis of human cancer cell lines induced by hypsiziprenol A₉ and the mechanism of the its action were closely examined.

When several human cancer cell lines were cultured in the presence of hypsiziprenol A₉ isolated from fruit body of this mushroom, proliferative capacity of acute promyelocytic leukemia cell line (HL-60), acute T cell leukemia cell line (Jurkat), colorectal carcinoma cell line (HCT116) and colorectal adenocarcinoma cell line (HT-29) strongly was inhibited.

In HL-60 cells after hypsiziprenol A₉ treatment within 4 hours, formation of apoptotic bodies was observed. Hoechst 33342 staining showed nuclear fragmentation and chromatin condensation in HL-60 cells treated with hypsiziprenol A₉. Nucleosomal DNA laddering, a hallmark of apoptosis, was detected using agarose gel electrophoresis. It was confirmed that hypsiziprenol A₉ increased hypodiploid cells in a time-dependent manner by flow cytometric analysis.

Moreover, detailed study showed that hypsiziprenol A₉ activated caspase-2, -3, -8 and -9 in a dose-dependent manner in HL-60 cells. Pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) attenuated anti-proliferation effect of hypsiziprenol A₉ in a dose-dependent manner.

The cAMP analogue (DBcAMP) attenuated anti-proliferation effect of hypsiziprenol A₉ in a dose-dependent manner and inhibited nuclear fragmentation in HL-60 cells treated with hypsiziprenol A₉. Agents of both forskolin and IBMX which elevated intracellular cAMP levels also attenuated inhibition proliferation of HL-60 cells by hypsiziprenol A₉.

Thus, it is concluded from these results that hypsiziprenol A₉ inhibits the growth of cancer cells by inducing apoptosis. Furthermore, it is cleared that this apoptosis is depend on caspases, and involved in a loss of mitochondrial membrane potential and down-modulation of cAMP signaling pathway in HL-60 cells.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	水本 裕子
審査委員	主査 鹿児島 大学 客員教授 加藤 郁之進
	副査 鹿児島 大学 客員教授 浅田 起代蔵
	副査 鹿児島 大学 教授 杉元 康志
	副査 鹿児島 大学 教授 青木 孝良
	副査 佐賀 大学 教授 渡邊 啓一
審査協力者	
題 目	ブナシメジ (<i>Hypsizigus marmoreus</i>) 由来ポリテルペンの HL-60 細胞におけるアポトーシス誘導機構 (Mechanism of Apoptosis Induced by Polyterpene from Buna-shimeji (<i>Hypsizigus marmoreus</i>) in HL-60 Cells)
<p>我々日本人は、古くからキノコを食用とする習慣を持つ。キノコは食品の一次機能としての栄養機能に加え、二次機能としての嗜好性をも満たしている。さらに近年、食品の三次機能として生体調節機能という概念が確立され、疾病の緩和や治療という観点からもキノコが注目されている。本研究ではブナシメジ (<i>Hypsizigus marmoreus</i>) から単離された抗腫瘍成分であるポリテルペン (ヒプシジプレノール A₉ : hypsiziprenol A₉) の抗腫瘍作用のメカニズム解析を行った。その結果、白血病細胞に対するアポトーシスの誘導現象の証明やその誘導機構の解明をおこなうことができ、食品を用いた疾病予防や治療への応用開発に寄与した。</p> <p>本研究で得られた結果の骨子は以下の通りである。</p> <p>まず、ヒプシジプレノール A₉ が培養がん細胞の増殖能に与える影響を調べ、さらに HL-60 細胞を用いてアポトーシス誘導作用について詳細な検討をおこなった。ヒプシジプレノール A₉ を HL-60 細胞に添加して培養すると、濃度依存的、経時的にその増殖が強く抑制され、4 時間内にアポトーシス小体が観察され、蛍光色素 Hoechst 33342 染色によって核の断片化が認められた。また、アガロースゲル電気泳動においてはヌクレオソーム単位で切断された DNA</p>	

の断片化がラダー状のバンドとして検出された。加えて、フローサイトメトリーにより経時的な hypodiploid 細胞の増加が認められたことから、ヒプシジプレノール A₉ は HL-60 細胞に対して速やかにアポトーシスを誘導することで、その増殖を強く抑制することが示された。

ヒプシジプレノール A₉ のアポトーシス誘導現象についてさらに詳細に調べたところ、ヒプシジプレノール A₉ は濃度依存的に HL-60 細胞内のカスパーゼ-2、-3、-8、-9 を活性化し、カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK がヒプシジプレノール A₉ の増殖抑制作用を濃度依存的に緩和した。また、蛍光試薬 JC-1 を用いてミトコンドリアの膜電位について検討したところ、ヒプシジプレノール A₉ が濃度依存的にミトコンドリアの膜電位の低下を引き起こすことが明らかとなった。さらにヒプシジプレノール A₉ による HL-60 細胞の増殖抑制作用を cAMP 誘導体である DBcAMP は濃度依存的に緩和し、ヒプシジプレノール A₉ による核の断片化も抑制した。加えて、細胞内 cAMP 濃度を高める forskolin や IBMX もヒプシジプレノール A₉ による細胞増殖抑制作用を緩和した。

すなわち、ヒプシジプレノール A₉ の抗腫瘍作用はがん細胞へのアポトーシス誘導によるものであり、その作用はカスパーゼ依存的で、ミトコンドリアの膜電位の低下、細胞内 cAMP 経路の抑制が関与していることが示された。

以上のように、本論文でまとめた研究は、高齢化社会に突入するわが国において、キノコ資源を活かした疾患の予防や治療分野への利用、さらには医薬品開発応用に大きく貢献するものである。したがって、博士（農学）の学位論文として十分な価値を持つと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	水本 裕子
審査委員	主査 鹿児島 大学 客員教授 加藤 郁之進
	副査 鹿児島 大学 客員教授 浅田 起代蔵
	副査 鹿児島 大学 教授 杉元 康志
	副査 鹿児島 大学 教授 青木 孝良
	副査 佐賀 大学 教授 渡邊 啓一
審査協力者	
実施年月日	平成20年12月26日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="checkbox"/> 答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成20年12月26日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

水本 裕子

[質問 1] 正常な細胞に対してヒプシジプレノール A9 はアポトーシスを誘導しないのか？

[回答 1] これまでの報告では、20 μ M ヒプシジプレノール A9 で 6 時間処理した正常マウス由来の脾臓細胞の核の観察では、核の DNA 断片化は観察されず、アポトーシスが誘導されなかった結果があります。また、動物の経口投与実験において大量摂取しても健康状態に異常がない（体重減少や異常な脱毛などが無い）ことが確かめられています。よって、ヒプシジプレノール A9 は正常な細胞にはアポトーシスを誘導せず、HL-60 細胞などの腫瘍細胞にアポトーシスを特異的に誘導している可能性が考えられると思います。

[質問 2] ブナシメジ由来テルペンの含有量はどのくらいか？

[回答 2] 一般のブナシメジには 0.43 mg/g（乾燥重量）、タカラバイオ株式会社保有の菌株 K-3128 には 1.55 mg/g（乾燥重量）程度の含有量があります。マイタケ、エノキタケ、シイタケからはテルペンは検出されず、ブナシメジ特有の成分と考えられています。

[質問 3] ブナシメジのアセトン溶出画分に含まれる 4 種類のテルペンについてヒプシジプレノール A9 以外の他のブナシメジ由来テルペンの構造は？

[回答 3] それは学位論文の中に記載しています。いずれもブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*) に特有の成分であると考えられ、構造がよく似ています。

[質問 4] 抗腫瘍作用を調べる動物実験で、餌に使用したブナシメジ由来テルペンの配合割合 (%) は？

[回答 4] ブナシメジ子実体乾燥粉末 5%、または 10% 混合相当量のテルペンが配合されていました。事前にブナシメジ子実体乾燥粉末を 5%、または 10% 配合した混餌投与の実験をおこなっているので（水谷ら、日本食品科学工学会誌第 53 巻第 1 号 p55~61 2006 年）、それと比較できるように、つまり、もし抗腫瘍作用のあるテルペンが採取できていれば、以前の実験と同様の結果が得られるはずである、という予想を基に計画された配合比率です。

[質問5] 抗腫瘍作用を調べる動物実験で、マウスにがん細胞を移植する方法について説明せよ？

[回答5] この実験では、CDF1 マウスを用いて腹水継代した IMC carcinoma 細胞 (5×10^6 個) を麻酔下で、CDF1 マウスの皮下に移植しています。

[質問6] forskolin はアデニル酸シクラーゼをどのように活性化しているのか？

[回答6] アデニル酸シクラーゼには主に4つのドメイン (M1、M2、C1、および C2) があり、C1、C2 ドメインに含まれるサブドメインの C1a と C2a が、ATP の結合と触媒活性に関与しています。C1a と C2a は 50% 以上の相同性があり、互いに逆向きに配向して広範囲で接触しており、この境界面に結合部位が2カ所存在します。片方の部位で ATP が反応し、もう片方の部位で forskolin が結合します。forskolin が C1 ドメインと C2 ドメインの結合を強くすることで、ATP から cAMP へ変換する速度を増加させて活性化しています。

[質問7] 本研究で提唱したヒプシジプレノール A9 の作用機作についてまだ詰めなくてはいけないと思われるが、どのような戦略が考えられるか？

[回答7] 一連の予想される経路の中で、関連が示唆される因子の変動について一つ一つ確認していく必要があります。具体的には、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (cAMP-dependent protein kinase: PKA) 活性の抑制、cAMP 応答配列結合タンパク質 (cyclic AMP responsive element binding protein: CREB) のリン酸化の抑制、*bcl-2* 発現の抑制、cytochrome c のミトコンドリアから細胞質への遊離、CAD の働き (DNA の切断) を阻害する ICAD (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) の分解、DNA 修復関連酵素 PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) の分解などが確認できれば、推定した部分の経路は証明できると考えられます。

[質問8] ヒプシジプレノール A9 には cAMP の合成阻害あるいは分解促進の作用があると考えられるが、アポトーシス誘導の影響にはどちらが大きいと考えているか？それを知るためにどのような実験をすればよいか？

[回答8] 本研究の実験結果だけでは判断することができないので、まず、ヒプシジプレノール A9 による細胞内 cAMP レベルの変動を確認します。もし、細胞内 cAMP レベルが低下したならば、cAMP の合成・分解、あるいは、それよりも上流にヒプシジプレノール A9 が作用した可能性が考えられます。ヒプシジプレノール A9 が直接 cAMP の合成・分解酵素に作用するかどうかについては、試験管内でヒプシジプレノール A9 の存在下、非存在下でのア

デニル酸シクラーゼ、ホスホジエステラーゼ、各々の酵素活性を測定することで確かめることができると考えられます。一方、ヒプシジプレノール A9 によって細胞内 cAMP レベルに変動がなかった場合は、ヒプシジプレノール A9 は cAMP の合成・分解には直接的には作用せず、cAMP よりも下流で作用している可能性があり、前述したような PKA の活性、CREB のリン酸化、*bcl-2* 発現などを確認していくことで、どの因子に働きかけているのか、さらに追跡できると考えられます。

[質問 9] ヒプシジプレノール A9 以外の食品成分が DBcAMP を介したアポトーシス抑制の報告があるのか？

[回答 9] DBcAMP による細胞生存能の緩和については、抗がん剤のタキソール、エトポシドの他に、植物由来トリテルペンであるウルソール酸の報告があります（ウルソール酸はビワの葉やローズマリーに含まれている成分で、化粧品に使用されている）。

[質問 10] 今回の発表以外にヒプシジプレノール A9 の報告はあるのか？

[回答 10] 肝がん細胞（HepG2）について、ヒプシジプレノール A9 が細胞周期を G1 期で停止させて増殖を抑制するという報告があります(Chang JS. et al., *Cancer Lett.*, 212(1), 7-14, 2004)。一方、HL-60 細胞においては細胞周期の停止は見られず、短時間で hypodiploid 細胞が増加し、アポトーシスが引き起こされたという報告もあり、ヒプシジプレノール A9 の作用機作には細胞の種類によって異なる可能性が考えられます。他に、ヒプシジプレノール A9 が結核菌の増殖抑制を示す報告もあります(Akihisa T. et al., *Biol Pharm Bull.*, 28(6), 1117-1119, 2005)。