

学 位 論 文 要 旨

氏 名	サウイトリー ウォンタンティンタン
題 目	分枝鎖脂肪酸 (13-methyltetradecanoic acid) の乳ガン細胞に対する細胞毒性に関する研究 [Study on the cytotoxicity of branched-chain fatty acid (13-methyltetradecanoic acid) to human breast cancer cells]
<p>メチル分枝をもつ分枝鎖脂肪酸や分枝鎖脂肪アルコールは乳製品或いは発酵食品に含まれており、抗ガン活性をもつことが報告されている。本研究では乳癌細胞に対する分枝鎖脂肪酸 (3-methyltetradecanoic acid, 13-MTD) の細胞毒性とその発現機構について検討した。</p> <p>まず、抗ガン活性発現における分枝鎖脂肪酸の炭素鎖の役割を明らかにするため、特殊な炭素鎖構造をもつ脂肪酸の乳ガン細胞脂質への取り込みと細胞毒性との関連性について検討した。主鎖の炭素数は同一で化学構造が異なる脂肪酸の細胞毒性を比較すると、分枝鎖脂肪酸についてのみ乳ガン細胞に対する細胞毒性が認められ、分枝鎖の化学構造が細胞毒性と関連していることが示された。さらに分枝鎖脂肪酸の細胞毒性の強さはリン脂質中の濃度と相関することも示され、細胞内での蓄積が毒性発現の原因であることも示唆された。</p> <p>次いで、分枝鎖脂肪酸の抗腫瘍活性と脂肪酸生合成阻害の関連性について追究した。13-MTD を培地に添加すると遊離脂肪酸及び脂肪酸エステルへの¹⁴C-酢酸の取り込みが阻害され、13-MTD は脂肪酸生合成を阻害していることが示された。脂肪酸生合成系酵素に対する基質レベルでの分枝鎖脂肪酸の影響を検討した。13-MTD は脂肪酸生合成酵素とアセチル CoA カルボキシラーゼ活性並びにグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を阻害し、脂肪酸生合成酵素活性及び系への基質供給を減少させることにより、13-MTD は総合的に脂肪酸生合成を低下させていることが示された。</p> <p>さらに、毒性発現機構について検討した。13-MTD は乳ガン細胞のグリセロ脂質中に6時間以内に飽和レベルまで取り込まれ、アポトーシスを誘導するが、カスパーゼの活性及び遺伝子発現には影響はみられなかった。またカスパーゼインヒビターを添加しても 13-MTD の毒性は軽減されなかった。しかしながら、13-MTD はミトコンドリア膜の電位差を消失させ、アポトーシス誘導因子の放出を促進していることが示された。これらのことから 13-MTD はミトコンドリアを介したカスパーゼ非依存性の経路により乳ガン細胞のアポトーシスを誘導していることが示唆された。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Sawitree WONGTANGTINTHARN
題 目	Study on the cytotoxicity of branched-chain fatty acid (13-methyltetradecanoic acid) to human breast cancer cells [分枝鎖脂肪酸 (13-methyltetradecanoic acid) の乳ガン細胞に対する細胞毒性に関する研究]

Branched chain fatty acids have been shown to have anticancer effect. This study describes the cytotoxic effect of 13-methyltetradecanoic acid (13-MTD) on breast cancer cells and its mechanism actions.

Incorporation of unusual fatty acids into cellular lipids of breast cancer cells and its relevance to cell cytotoxicity was studied. Cytotoxicities of branched chain fatty acids were stronger than those of cycloalkyl or hydroxy fatty acids. Thus, of the fatty acid studied, only branched chain fatty acids exhibited cytotoxicity against breast cancer cells. These observations suggested that the branched carbon chain structure bears some relevance with its cytotoxicity. Furthermore, concentration of the branched chain fatty acid in the phospholipid correlated with the strength of cytotoxicity, suggesting that the cytotoxicity was induced by the cellular accumulation of these fatty acids.

Incubation of breast cancer cells with 13-methyltetradecanoic acid (13-MTD) significantly reduced the [^{14}C]-acetate incorporation into free fatty acid and fatty acid esters, showing the inhibition of fatty acid biosynthesis by this fatty acid. Examination of the steps of fatty acid biosynthesis found that 13-MTD slightly inhibited fatty acid synthetase and acetyl-CoA carboxylase, and significantly the glucose-6-phosphate dehydrogenase which was the main NADPH generating system in breast cancer cells. The present study thus suggests that 13-MTD synthetically lowers the fatty acid biosynthesis by reducing the precursors, in addition to its direct inhibitory effect on fatty acid synthetase.

Treatment of SKBR-3 cells with 13-MTD lowered the cell viability and induced apoptosis. Proportion of 13-MTD in the glycerolipids increased to saturation level within 6 hours. Triacylglycerol contained 13-MTD in higher concentration than phospholipid with positional preference to sn-2. 13-MTD caused no changes in the caspase activity and its gene expression. Furthermore, addition of caspase-inhibitor to culture medium did not prevent the cells from the cytotoxicity of 13-MTD. No-increase in the cellular calcium level was also noted with 13-MTD treatment. However, 13-MTD disrupted the mitochondrial integrity in 4 hours, and increased the nuclear translocation of apoptosis inducing factor.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	サウイトリー ウォンタンティンタン
審査委員	主査 琉球 大学 教授 屋 宏典
	副査 琉球 大学 助教授 和田 浩二
	副査 佐賀 大学 教授 柳田 晃良
	副査 宮崎 大学 教授 福田 亘博
	副査 鹿児島 大学 教授 林 國興
審査協力者	
題 目	Study on the cytotoxicity of branched-chain fatty acid (13-methyltetra-decanoic acid) to human breast cancer cells (分枝鎖脂肪酸 (13-methyltetradecanoic acid) の乳ガン細胞に対する 細胞毒性に関する研究)
<p>メチル分枝をもつ分枝鎖脂肪酸や分枝鎖脂肪アルコールは乳製品或いは発酵食品に含まれており、アポトーシス誘導による抗ガン作用を有することが <i>in vitro</i> 並びに動物実験で証明されている。しかしながら、分枝鎖脂肪酸の作用様式の詳細については不明な点が多い。本研究では乳ガン細胞に対する分枝鎖脂肪酸 (13-methyltetradecanoic acid, 13-MTD) の細胞毒性とその発現機構について以下の点を明らかにした。</p> <p>まず、抗ガン活性発現における分枝鎖脂肪酸の炭素鎖の役割を明らかにするため、特殊な炭素鎖構造をもつ脂肪酸の乳ガン細胞脂質への取り込みと細胞毒性との関連性について検討した。主鎖の炭素数は同一で化学構造が異なる脂肪酸の細胞毒性を比較すると、分枝鎖脂肪酸についてのみ乳ガン細胞に対する細胞毒性が認められ、分枝鎖の化学構造が細胞毒性と関連していることが示された。また、分枝鎖脂肪酸の炭素鎖の長さも毒性に影響することを明らかにした。さらに分枝鎖脂肪酸の細胞毒性の強さはリン脂質中の濃度と相関することも示され、細胞内での蓄積が毒性発現の原因であることが示唆された。</p>	

一般的にガン細胞においては脂肪酸合成が亢進しており、脂肪酸生合成の阻害はガン細胞においてアポトーシスを誘導することが知られている。分枝鎖脂肪酸も脂肪酸代謝特に脂肪酸生合成に影響する可能性が考えられたので、分枝鎖脂肪酸の抗腫瘍活性と脂肪酸生合成阻害の関連性について追究した。13-MTD を培地に添加すると遊離脂肪酸及び脂肪酸エステルへの $[^{14}\text{C}]$ -酢酸の取り込みが阻害され、13-MTD は脂肪酸生合成を阻害していることが示された。これらの知見を裏付けるために、脂肪酸生合成系酵素に対する基質レベルでの分枝鎖脂肪酸の影響を検討した。13-MTD は脂肪酸生合成酵素とアセチル CoA カルボキシラーゼ活性並びにグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を阻害した。これらのことから、13-MTD は脂肪酸生合成酵素活性及び系への基質供給を減少させることにより総体的に脂肪酸生合成を低下させているものと考えられた。

最後に、13-MTDの毒性発現機構について検討した。13-MTDは乳ガン細胞のグリセロ脂質中に6時間以内に飽和レベルまで取り込まれ、アポトーシスを誘導するが、カスパーゼの活性及び遺伝子発現には影響はみられなかった。またカスパーゼインヒビターを添加しても13-MTDの毒性は軽減されなかった。しかしながら、13-MTDはミトコンドリア膜の電位差を消失させ、アポトーシス誘導因子の放出を促進していることが確認された。これらのことから13-MTDは細胞内に取り込まれた後ミトコンドリアを介したカスパーゼ非依存性の経路により乳ガン細胞のアポトーシスを誘導していることが明らかになった。

以上のことから、本論文は分枝鎖脂肪酸がカスパーゼ非依存性のシグナル伝達系を介して乳ガン細胞のアポトーシスを誘導することを初めて明らかにし、カスパーゼ誘導型の抗ガン剤に耐性を示す癌に対する新たな治療薬等の開発に貢献する知見を提示しており、博士（学術）の学位論文として十分価値があると判定した。

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	サウイトリー ウォンタンティンタン
審査委員	主査 琉球 大学 教授 屋 宏典
	副査 琉球 大学 助教授 和田 浩二
	副査 佐賀 大学 教授 柳田 晃良
	副査 宮崎 大学 教授 福田 亘博
	副査 鹿児島 大学 教授 林 國興
審査協力者	
実施年月日	平成18年 1月13日

試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)

 口答・筆答

主査及び副査は、平成18年1月13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。

以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(学術)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。また、本研究は農学と薬学の両領域にまたがり、学際的内容を多く含むことから博士(学術)の学位に相当すると判定した。

学位申請者 氏名	サウイトリー ウォンタンティンタン
-------------	-------------------

[質問 1] 共役リノール酸及び分枝鎖脂肪酸いずれもガン細胞のアポトーシスを誘導するが、同じ脂肪酸なのに作用機構が異なるのはなぜか？

[解答 1] 質問の核心については明答できないが、現時点まで明確になっていることは CLA では明らかにカスパーゼ経路であるのに対して分枝鎖脂肪酸はカスパーゼ非依存性であることと、ミトコンドリアからのアポトーシス誘導因子の放出に対する影響に差があることである。これらの差異は両脂肪酸の物理化学的性質の違いに由来する可能性があると考えている。

[質問 2] 培養系に添加した脂肪酸の可溶化はどのようにやっているのか？

[解答 2] 緩衝液に界面活性剤である Tween80 を添加して可溶化させている。

[質問 3] 13-MTD が脂肪酸合成と同時にミトコンドリアにも影響していると述べたが、CLA ではどうなのか？ CLA もミトコンドリアに取り込まれるがその違いについてどう考察するか？

[解答 3] 細胞内への取り込みを調べた実験から、CLA は明らかにリン脂質への取り込み量が多い。従って、ミトコンドリア膜への影響も CLA が強いことが予想され、この取り込み率の差が、膜の流動性或いは構造に対する影響の差となって現われているのかも知れない。ミトコンドリアからのアポトーシス誘導因子の放出は細胞により或いは刺激の種類により必ずしも一様ではなく、13-MTD の場合はチトクローム C よりも AIF の放出が優先される可能性が考えられる。

[質問 4] アポトーシスの検出に DNA ラダーの検出は見なかったのか？

[解答 4] 他の研究者により 13-MTD による DNA の断片化を検出したデータが既に報告されているので特に検討していない。本研究ではアポトーシスの発現機構に焦点をあてた。

[質問 5] 13-MTD の代謝に影響する代謝酵素の基質特異性に関する報告はあるか？

[解答 5] CLA については試験管或いは生体内での酵素の基質特異性に関する報告があると思われるが、13-MTD に関する報告はない。

[質問 6] 13-MTD についての動物実験は行われているのか？

[解答 6] 他の実験者がやって、よい結果が得られている。

[質問 7] 正常細胞とガンで比較しているが、また比較的作用濃度が高いようだが実際の利用についてはどうなのか？

[解答 7] 動物実験において副作用がないことが組織学的に証明されているので正常細胞に対する影響は比較的すくないと考えている。また作用濃度については、CLA と異なり飽和脂肪酸であるため量的に多くなっても、酸化の心配がない点で特に問題はないと判断している。

[質問 7] 13-MTD は細胞内のトリグリセリドにどの程度取り込まれるのか？

[解答 7] トリグリセリドの 50% 程度まで取り込まれた。

[質問 8] ミトコンドリア破壊されれば当然細胞は死ぬが、ミトコンドリアの破壊と AIF 移行のどちらが先か？

[解答 8] ミトコンドリア膜の状態及び細胞増殖率については 4 時間以降のデータをとっている。それ以前すなわち、1~4 時間のタイムコースを取っていないので明確な結論は得られていない。今後、検討したい。

[質問 9] 13-MTD が及ぼす COX2、NFKB の発現に対する影響は調べていないのか？

[解答 9] 本研究においてはカスパーゼ経路が焦点となっており、検討していない。

[質問 10] 他の分枝鎖脂肪酸について同様の報告があるのか？

[解答 10] 12 メチルテトラデカン酸について、抗腫瘍活性をもつことが 2003 年に報告されている。