

(学位第9号様式)

No. 1

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	矢野敏史
審査委員	主査 鹿児島大学・教授 侯 徳興
	副査 鹿児島大学・教授 イブラヒム ヒッサム
	副査 琉球大学・教授 屋 宏典
	副査 鹿児島大学・教授 小松 正治
	副査 鹿児島大学・助教 坂尾 こず枝
審査協力者	
実施年月日	平成31年1月15日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・ <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成31年1月15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	矢野敏史
[質問 1]	大腸がんにおいては <i>p53</i> 遺伝子の変異は多く見られるということであるが、これらの変異に伴う P53 タンパク質の機能に変化はあるのか。
[回答 1]	<i>p53</i> 遺伝子変異の多くは DNA 結合領域で見られ、転写活性化機能が喪失することが知られている。しかし、変異によっては、P53 はむしろがん進行を促進するような新しい機能を獲得すること (gain-of-function) も知られている。
[質問 2]	DNA 断片化等のデータを見る限り、6-MSITC によるアポトーシス誘導は HCT116 <i>p53</i> <sup>-/-</sup> 細胞よりも HCT116 <i>p53</i> <sup>+/+</sup> 細胞の方が少し強いと感じる。6-MSITC は P53 を介してもアポトーシスを誘導しているのではないか。
[回答 2]	抗がん剤における P53 のリン酸化活性化は極めて顕著であり、また、12 時間以内の短時間に活性化されることが示されている。一方で、6-MSITC 処理した HCT116 <i>p53</i> <sup>+/+</sup> 細胞においては、24 時間以降に P53 タンパク質レベルの増加やリン酸化活性化が少し見られている。このような後期の P53 タンパク質レベルの増加やリン酸化活性化は、細胞死後のクリアランス機構に深く関与していることが報告されている。よって、6-MSITC も同様の作用があるのではないかと推察される。しかし、本研究における 6-MSITC 処理 48 時間においては、両細胞におけるアポトーシス誘導に差は見られなかった。これは有意差検定の結果とも合致する。以上のことから、6-MSITC におけるアポトーシス誘導においては、P53 は主要な因子ではないと考えている。
[質問 3]	6-MSITC によるヒト大腸がん細胞における <i>p53</i> 非依存的なアポトーシス誘導の研究は、今後どのように展開されるか。また、6-MSITC による抗がん作用の分子作用機序のターゲットとしては何が考えられるか。
[回答 3]	最初期遺伝子 <i>egr1</i> に着目している。EGR1 は細胞増殖等に関与する転写因子であるが、近年、がん抑制遺伝子としても注目されており、P53 と同様にアポトーシス関連遺伝子を標的としていることが報告されている。6-MSITC 類似化合物である Sulforaphane においては、EGR1 を介した乳がん細胞の増殖抑制効果が報告されているが、詳細な機構等はまだ分かっていない。実際に、6-MSITC は 3 時間という早期に顕著な EGR1 のタンパク質レベルの増加が両細胞とも示されており、今後研究を進めていく予定である。

- [質問 4] 6-MSITC はヒト大腸がん細胞では細胞増殖抑制効果・細胞死誘導が示されているが、正常大腸細胞においても同様の作用はあるのか。
- [回答 4] 本研究においては、正常大腸細胞に対する 6-MSITC の作用については検証しておらず、今後検証する必要があると考えている。一方、6-MSITC 類似化合物である Sulforaphane においては、正常大腸細胞に対して HCT116 *p53*<sup>+/+</sup> 細胞を選択的に細胞死誘導することが報告されており、6-MSITC も同様の結果が得られることが期待される。
- [質問 5] 6-MSITC による ERK1/2 を介した *p53* 非依存的アポトーシス誘導という結果が得られているが、大腸がんにおいては恒常的 ERK1/2 活性化の強度と悪性度・ステージの進行は比例するという報告がある。6-MSITC による ERK1/2 活性化は抗がん作用の観点からどのようにとらえているか。
- [回答 5] 本研究は、がん予防の観点から 6-MSITC のアポトーシス誘導機構を解析し、ERK1/2 経路の活性化が重要な役割を果たすという結果を得た。しかし、既に活性化された ERK1/2 をさらに活性化することは難しく、悪性のがん細胞においては ERK1/2 の活性化の感受性が低いという報告がある。この点からも、6-MSITC はダメージを受けた細胞等のがん化初期の段階で効果があるものと考えており、食品の機能性成分である点も踏まえて、がん予防における効果としてとらえている。
- [質問 6] 細胞内に流入した多くの 6-MSITC は、グルタチオン抱合によるメルカプツール酸経路を経て代謝されると考えられるが、その代謝産物は大腸がん細胞に対して何か影響を及ぼすか。
- [回答 6] 6-MSITC ではないが、イソチオシアネート類のメルカプツール酸経路代謝物である N-アセチルシステイン-イソチオシアネートも抗がん作用をもつことが報告されている。
- [質問 7] イソチオシアネート類はタンパク質を直接化学的に修飾することが知られているが、この際タンパク質の機能はどのように変化するのか。
- [回答 7] イソチオシアネート類は特にタンパク質のシステイン残基（チオール基）に結合することで、多くの場合タンパク質の機能を喪失させると報告されている。特に  $\alpha$ -Tubulin においては、イソチオシアネート類が化学的に修飾することで凝集体をつくり、最終的にタンパク質分解を引き起こすことが報告されている。6-MSITC においても、40  $\mu$ M という高濃度において  $\alpha$ -Tubulin の分解が示されており、他のイソチオシアネート類同様の作用をもっていると考え

えられる。

[質問 8] 6-MSITC はその構造から、タンパク質を化学的に修飾することが考えられる。化学的観点から、6-MSITC によるアポトーシス誘導における最初の標的タンパク質は何であると推察されるか。

[回答 8] 6-MSITC のアポトーシス誘導における最初の標的タンパク質は今のところ分かっておらず、今後の研究対象と考えている。一方で、イソチオシアネート類が脱リン酸化酵素に直接結合し機能を喪失させることで、リン酸化酵素を活性化するという報告がある。40  $\mu\text{M}$  という高濃度の 6-MSITC は ERK1/2、JNK、p38、AKT と様々なリン酸化酵素を活性化させることが示されている。脱リン酸化酵素を 6-MSITC の標的タンパク質として今後着目していく。

[質問 9] 6-MSITC を 48 時間処理した際のアポトーシス誘導という現象を解析しているが、その間に細胞へ流入した 6-MSITC の蓄積、代謝、またその産物の排出等が起きると考えられる。6-MSITC の細胞における動態はどのようなものであるか。

[回答 9] 本研究において検証はしていないが、他の文献等の結果より、イソチオシアネート類は 0.5~3 時間ほどで細胞内蓄積がピークに達し、6 時間後には代謝物として排出されることが分かっている。このことから、早期の段階で 6-MSITC のアポトーシス誘導のシグナルが動いていると推察している。

[質問 10] アポトーシス関連タンパク質の網羅的解析において、HCT116 *p53*<sup>+/+</sup> 細胞と HCT116 *p53*<sup>-/-</sup> 細胞で発現に差異が認められるタンパク質もあるが、6-MSITC において両細胞で細胞増殖抑制効果やアポトーシス誘導に差が見られなかったことをどのように考えているか。

[回答 10] FAS タンパク質レベルの増加や IAPs タンパク質レベルの減少等、HCT116 *p53*<sup>+/+</sup> 細胞において 6-MSITC の効果が少し強く見られるタンパク質もあった。一方で、P21 タンパク質レベルの増加等、むしろ HCT116 *p53*<sup>-/-</sup> 細胞において 6-MSITC の効果が強く見られるタンパク質もあった。両細胞において 6-MSITC の効果に差は見られなかったが、シグナル経路や分子作用機序は異なる可能性がある。しかし、6-MSITC のアポトーシス誘導において P53 が主要な因子ではないことから、6-MSITC による *p53* 非依存的なアポトーシス誘導が主要な機構として働いているものと考えている。

[質問 11] 6-MSITC によってデスレセプター 5 のタンパク質レベルの増加が認められているが、膜上に発現していると考えてもよいか。

また、レセプターとして機能し、6-MSITC のアポトーシス誘導に真に関与しているかどうかの検証としてデスレセプター5 のノックダウン等の実験が必要ではないか。

[回答 11] 本研究では、細胞全体におけるデスレセプター5 のタンパク質レベルを示してきた。確かに、デスレセプター5 はレセプターであるので、膜上に存在することが重要になる。一般に、デスレセプター5 のタンパク質が増加することでアポトーシスが誘導されることは報告がある。しかし、siRNA を用いたデスレセプター5 のノックダウン等によって、6-MSITC が誘導したデスレセプター5 のタンパク質増加がアポトーシスに主要な経路として関与しているかの検証は必要であると考えている。

[質問 12] 炭素骨格のみを側鎖にもつアルキルイソチオシアネートである Hexyl isothiocyanate (HITC) においては *p53* 依存的な細胞増殖抑制効果が示されたことから、6-MSITC による *p53* 非依存的な細胞増殖抑制効果におけるメチルスルフィニル基の重要性について考察をしている。一方、同じく炭素骨格のみを側鎖にもつ芳香族イソチオシアネートである Benzyl isothiocyanate (BITC) 等は *p53* 非依存的な細胞増殖抑制効果が示されていた。この違いは何であるか。また、ミトコンドリアの酵素活性を示す MTT assay だけでなく、細胞数をカウントするトリパンブルー法等他の実験手法を用いて再検証するのはどうか。

[回答 12] 薬理作用上、ベンゼン環を有する化合物はその疎水性相互作用によりタンパク質をより標的としやすい。実際、 $\alpha$ -Tubulin に対する結合効果は BITC が強いことが報告されている。よって、 $\alpha$ -Tubulin 等の細胞増殖等に必要なたんぱく質を分解させることで、細胞分裂等、増殖を抑えているのではないかと考えている。また、処理したイソチオシアネートの種類によって、細胞の状態が両細胞間で異なることもあったので、トリパンブルー法によって細胞数すなわち純粋な細胞増殖を検証することは非常に意義深いと考えている。加えて、メチルスルフィニル基の重要性においては、6-MSITC と HITC (C<sub>6</sub>) だけでなく、Sulforaphane (4-MSITC) と Butyl isothiocyanate (C<sub>4</sub>) 等さらなる検証が必要であると考えている。