

カッラウリ由来の香気成分による  
大腸癌細胞の分化誘導に関する研究

**Studies on the differentiation-inducing ability of the aroma compounds isolated  
from *Cucumis melo* var. *conomon* on RCM-1 colorectal cancer cells**

上村 美優

2023 年

## 目次

総合緒言.....	1
第1章 カツラウリに由来する含硫化合物がヒト大腸癌細胞株 RCM-1 に対して誘導するドーム形成の化学的・分子生物学的基盤.....	5
1. 1. 緒言.....	5
1. 2. 材料及び方法.....	7
1. 2. 1. 試薬.....	7
1. 2. 2. 細胞株と培養条件.....	7
1. 2. 3. ドーム形成検定法.....	8
1. 2. 4. ALP 活性.....	9
1. 2. 5. MTA の処理法.....	9
1. 2. 6. マイクロアレイ解析.....	9
1. 2. 7. RT-PCR.....	10
1. 2. 8. 遺伝子機能解析.....	11
1. 2. 9. イムノブロット解析.....	11
1. 2. 10. 統計解析.....	12
1. 3. 結果.....	13
1. 3. 1. MTPE 及び MTAE 類似化合物の構造活性相関解析.....	13
1. 3. 2. MTA によるドーム形成に關与する候補遺伝子を絞り込むためのマイクロアレイ解析.....	14
1. 3. 3. RT-PCR 及びイムノブロット解析によるマイクロアレイデータの検証...16	
1. 3. 4. 細胞周期阻害剤によって促進される RCM-1 細胞のドーム形成.....17	

1. 4.	考察	20
1. 5.	図表	25
第 2 章	カツラウリに由来する含硫化合物誘導体・MTA が引き起こす RCM-1 の分化とアポトーシスの生理学的基盤	41
2. 1.	緒言	41
2. 2.	材料及び方法	43
2. 2. 1.	試薬	43
2. 2. 2.	細胞培養	43
2. 2. 3.	ドーム形成検定法	43
2. 2. 4.	ALP 活性	44
2. 2. 5.	CCK-8 検定	44
2. 2. 6.	トリパンブルー排除法	44
2. 2. 7.	イムノブロット解析	44
2. 2. 8.	DNA 断片化	45
2. 2. 9.	カスパーゼ 3/7 蛍光検定	45
2. 2. 10.	統計解析	46
2. 3.	結果	47
2. 3. 1.	RCM-1 細胞のドーム形成に対する MTA の濃度及び時間依存性	47
2. 3. 2.	RCM-1 細胞のドーム形成に対する MTA と BA の協調的な影響	48
2. 3. 3.	高濃度 MTA によって誘導される RCM-1 細胞のアポトーシス	50
2. 3. 4.	RCM-1 細胞のドーム形成に対するアポトーシス誘導剤 AD と 5-FU の影響	51

2. 4. 考察.....	53
2. 5. 図表.....	58
総合考察.....	66
引用文献.....	69
要旨.....	83
Summary.....	85
謝辞.....	87

## 総合緒言

世界レベルでみたヒトの死因の第2位は「がん」であり、2018年には960万人、つまり6人に1人ががんで死亡したと見積もられている（WHO）。100種類以上に分類されるがんの中で大腸癌は、最も一般的に見つかるがんのひとつで、がんを原因とするヒトの死の順位4位に位置する。大腸癌患者の数は性別を問わず非常に多く、また、多くのケースで自覚症状が中後期ステージ（II期以降）まで殆どあるいは全く見られないため、膵臓癌と同様に“沈黙の病”と呼ばれる（Brenner et al., 2016; Moreno et al., 2016）。今日まで、がんの治療には、外科的手術や化学療法、放射線療法等の様々な方法が用いられてきた（Miller et al., 2019）。上記の治療法は、がんの種類・部位・ステージに応じて単独または組み合わせで用いられ、様々ながんの治療で成果を上げてきた。しかし、患者はしばしば酷い副作用に苦しめられることになる（Dickens and Ahmed, 2021）。副作用は、細胞傷害性の抗癌剤や放射線が、腫瘍細胞に加えて活発に分裂する正常細胞に対しても影響するため起こると考えられている。さらに、治療の末に生き残った腫瘍細胞は、治療薬や放射線に対する耐性を獲得し、より攻撃的になるため、がんの再発をもたらす要因の一つとなる（Johnson et al., 2014; Vasan et al., 2019）。

上述した一般的・標準的な治療法の代替法に「分化誘導療法」がある。がんの分化誘導療法は、化学薬剤を用いてがん細胞の異常な増殖や代謝の機構を再プログラミングして、細胞が本来持つ生活環、すなわち統制の取れた増殖、終末分化、老化、そして最終的にはアポトーシスなどの細胞死をもたらす正常な経路を回復させることを目的とする。このことにより、がんの症状（病徴）の緩和が期待される（Sugihara and Saya, 2013; Lin et al., 2018; Sell and Ilic, 2019）。また、分化誘導療法は従来法と異なり、正常細胞を殺さずに腫瘍組織を分化した組織に変えることを主目的とするため、有害な副作用に対する軽減効果も見込ま

れる。これまでに分化誘導療法が最も成功した例は、*all-trans* retinoic acid (ATRA) を用いた急性前骨髄球性白血病の治療である (Huang et al., 1988; Nowak et al., 2009)。液性がんに対する治療の成功例とは対照的に固形がんに関する知見は少ない (Yu and Ding, 2020)。このことは、液性がんと比較して固形がんの遺伝的背景や性質が複雑であることに起因すると考えられている。しかしながら、これまで固形腫瘍の分化誘導に関する研究も継続的に行われてきた。例えば、cAMP や酪酸 (butyric acid, BA)、ATRA などのレチノイド、15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2:天然) 及び rosiglitazone (ROSI:合成) を含む peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) アゴニストは、様々な固形腫瘍細胞株の分化を誘導することが認められている (Cox et al., 1999; Orchel et al., 2005; Cerbone et al., 2007; Yang et al., 2012)。これらの報告は、固形腫瘍に対して分化誘導療法を適用することが理論的に可能であることを示唆する。将来的に、固形腫瘍を対象とした分化誘導療法を開発するためには、十分な薬理学的効果を持つと同時に副作用が少ない新規化合物 (化学薬剤) を見つけ、さらにそれら化合物ががん細胞の分化を導く経路を明らかにする必要があると考えられる。

ヒト大腸癌細胞株 RCM-1 は、高分化型直腸腺癌と診断された大腸癌組織から樹立された細胞株である (Kataoka et al., 1989)。RCM-1 細胞は、絨毛様の構造であるドームを自然に形成する (Nakamura et al., 2008)。ドームは、頂端膜から基底外側膜への一方向性の液体輸送により、単層細胞と培養フラスコ表面との間に液体が局所的に蓄積することで生じる 3 次元的な多細胞構造である (Rabito et al., 1980; Kirkland, 1985)。このような構造は肺腺癌、乳腺癌、大腸腺癌などの腫瘍に由来する培養細胞や、腎臓上皮などの正常組織に由来する培養細胞でよく観察される (Lever, 1979; Rizzino et al., 1982; Kirkland, 1985)。さらに、ドームは既知の分化誘導剤 (化学薬剤) に応答して形成されることも報告されている (Lever, 1979; Augeron and Laboisie, 1984)。したがって、経上皮輸送及び細胞極性の研究においては、

ドーム形成やドーム自体が、多くの細胞株における分化の形態学的マーカーとして利用されてきた。なぜならば、一方向の流体移動は、大腸や腎臓の分化した上皮組織に見られる活発な経上皮輸送を模倣していると考えられるからである (Rabito et al., 1980; Kirkland, 1985; Oberleithner et al., 1990; Su et al., 2007; Prasad et al., 2019)。

植物は、様々な生物活性を有する天然化合物の宝庫である (Seca and Pinto, 2018)。植物は自身の健康と生存率を高めるために多種多様な二次代謝物 (secondary metabolites) を生産しており、それらの生理学 (薬理学) 的活性はヒトや動物の病気を制御する上でも有益である (Kabera et al., 2014)。実際に 1940 年代以降に承認された抗がん剤の約 50% は、天然化合物自体もしくは、半合成または完全に合成されたそれらの類縁化合物で、その中には、ビンクリスチンやホモハリングトニンなどの植物由来の化合物も含まれる (Newman and Cragg, 2016; Seca and Pinto, 2018)。共同研究者の中村らは、京都の伝統野菜・カッラウリ (*Cucumis melo* var. *conomon*) の完熟果実から RCM-1 細胞株におけるドーム形成を促進する含硫化合物、3-メチルチオプロピオン酸エチルエステル (3-methylthiopropionic acid ethyl ester, MTPE) (Nakamura et al., 2008) とメチルチオ酢酸エチルエステル (methylthioacetic acid ethyl ester, MTAE) を単離した (Nakamura et al., 2010)。しかしながら、上記の含硫化合物の化学特性、及びこれらにより誘導されるドーム形成の分子メカニズムは不明である。

そこで本研究では、まず、MTPE 及び MTAE をリード化合物とした構造活性相関解析を行った。その結果、分子量が最小、且つ最も強いドーム形成誘導能を持つ含硫物質としてメチルチオ酢酸 (methylthioacetic acid; MTA) を特定することに成功した。また、網羅的遺伝子発現解析及び薬理学的解析により MTA によるドーム形成誘導には細胞周期制御遺伝子 *CDC25A* と *CCNE2* の発現抑制が関与することを見出した (第 1 章)。続いて、生理学・分子生物学的解析を実施したところ MTA がドーム形成を誘導すると同時に、各種の腸分化

マーカーの増加をもたらすことが明らかとなった。この結果は、MTA が RCM-1 細胞をドームに分化させる能力を持つこと、すなわち RCM-1 細胞に対する「分化誘導剤」として機能しうることを示唆する。また、MTA による RCM-1 細胞の分化は、構造が類似する BA による経路を介している可能性を見出した。さらに、MTA が RCM-1 細胞の分化誘導をもたらすことに加え、高濃度（4 mM 以上）ではアポトーシスを誘導することも明らかにした（第 2 章）。本論文では、これらの結果に基づいて MTA と分化及びアポトーシスとの関連性について考察する。



# 第 1 章 カツラウリに由来する含硫化合物がヒト大腸癌細胞株 RCM-1 に対し て誘導するドーム形成の化学的・分子生物学的基盤

## 1.1. 緒言

植物は、生理活性を有する天然化合物の宝庫であり、これまでに多くの植物化合物（ファイトケミカル）に由来する抗がん剤が開発されてきた（Newman and Cragg, 2016; Seca and Pinto, 2018）。共同研究者の中村らは、ヒト大腸癌細胞株 RCM-1 で形成されるドームと呼ばれる分化組織様構造体の数を指標としたスクリーニングにより、京都の伝統野菜・カツラウリ（*Cucumis melo* var. *conomon*）の完熟果から構造がよく似た 2 つの硫黄化合物 3-methylthiopropionic acid ethyl ester（MTPE）と methylthioacetic acid ethyl ester（MTAE）を単離した（Nakamura et al., 2008; Nakamura et al., 2010）。さらに、MTPE については、ドーム形成を誘導することに加えて、生化学的分化マーカーのアルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase, ALP）の活性を上昇させることも明らかになっている（Nakamura et al., 2008）。しかしながら、カツラウリ由来の 2 化合物、MTPE と MTAE のドーム形成誘導能に関する化学特性もドーム形成誘導の分子メカニズムも不明のままである。

本章では、まず上記 2 化合物がドーム形成を引き起こす化学的基盤を明らかにするため、MTPE と MTAE を含む 37 種の類似化合物を用いて構造活性相関解析を行い、RCM-1 細胞のドーム形成に作用する最小ユニットと必須部分について検討した。また、これら含硫化合物が RCM-1 細胞株においてドーム形成を引き起こす分子メカニズムを明らかにすべく、類似化合物中で最も強いドーム誘導活性を示した methylthioacetic acid

(MTA) を用いて網羅的遺伝子解析を行った。さらにドーム形成に関わると考えられる候補遺伝子の産物を標的とした薬理的解析を行った。

## 1.2. 材料及び方法

### 1.2.1. 試薬

MTA は Matrix Scientific (Elgin, SC, USA) から、MTPE と MTAE は Avocado Research Chemicals, Ltd. (Heysham, Lancashire, UK) から購入した。Methoxyacetic acid、3-methylthiopropionic acid 及び methylthioacetic acid methyl ester は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。その他、特に記載がないものは、Fujifilm Wako Pure Chemical Corp. (Osaka, Japan) から購入した。細胞周期阻害剤 purvalanol A と NSC95397 はそれぞれ Cosmo Bio Co., Ltd. (Tokyo, Japan)、Merck KGaA (Darmstadt, Germany) から購入した。構造活性相関解析には、京都府立大学機能分子合成化学研究室で合成された下記化合物（精製度 95% 以上）を用いた： mercaptoacetic acid ethyl ester、mercaptoacetic acid propyl ester、mercaptoacetic acid butyl ester、mercaptopropionic acid ethyl ester、mercaptopropionic acid methyl ester、mercaptopropionic acid propyl ester、methylthioacetic acid propyl ester、3-methylthiopropionic acid propyl ester、4-methylthiobutyric acid、4-methylthiobutyric acid methyl ester、4-methylthiobutyric acid ethyl ester、5-methylthiovaleric acid、5-methylthiovaleric acid methyl ester、5-methylthiovaleric acid ethyl ester、ethylthioacetic acid ethyl ester、ethylthioacetic acid methyl ester、ethylthioacetic acid propyl ester、3-ethylthiopropionic acid、3-ethylthiopropionic acid methyl ester、3-ethylthiopropionic acid ethyl ester、4-ethylthiobutyric acid、4-ethylthiobutyric acid methyl ester、4-ethylthiobutyric acid ethyl ester、propylthioacetic acid、propylthioacetic acid methyl ester、3-propylthiopropionic acid、3-propylthiopropionic acid ethyl ester。

### 1.2.2. 細胞株と培養条件

RCM-1 細胞株は Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB0256) から、Ehrlich 細胞株は RIKEN Cell Bank (RCB0142, Tsukuba, Ibaraki, Japan) から分譲された。WB-F344 細胞株はノースカロライナ大学 (USA) の J.W. Grisham 博士と M.S. Tsao 博士から、CoCM-1 細胞株は宮崎大学の H. Kataoka 博士から分与された。また HCT116 細胞株は、ベイラー医科大学 (USA) の M. Brattain 博士から分与された。WB-Ha-ras、WB-neu、WBsrc-neo2、WB-myc/ras、MSU-2、Ming の各細胞株はミシガン州立大学 (USA) から、BxPC3、HaPT1、HPD1NR の各細胞株は奈良県立医科大学から分譲された。KNC 細胞株は京都府立大学の Y. Nakamura 博士によって確立された (Nakamura et al., 2005)。RCM-1、Ehrlich、CoCM-1、BxPC3、HaPT1、HPD1NR の各細胞は RPMI 1640 培地と Ham's F12 培地 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を 1 : 1 で混和し、ウシ胎児血清 (FBS; Biowest, Nuaille, France) と抗生物質ゲンタマイシン (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) の終濃度がそれぞれ 10%、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように添加した培地を用いて培養した。WB-Ha-ras 細胞は 5% FBS、WB-neu と WB-myc/ras の両細胞は 7% FBS、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ゲンタマイシンを添加した改変 Eagle 培地 (modified Eagle's medium ; Gibco, NY, USA) を用いて培養した。KNC 細胞は 10% FBS を含む DKFSFM 培地 (defined keratinocyte serum free medium; Gibco) を用いて培養した。その他の細胞は、FBS の終濃度が 10%になるように添加した改変 Eagle 培地を用いて培養した。すべての細胞は、CO<sub>2</sub> 濃度が 5%、37°C の条件下で培養した。

### 1. 2. 3. ドーム形成検定法

96 穴プレートの各穴に細胞数が  $1.0 \times 10^5$  もしくは  $1.5 \times 10^5$  になるように RCM-1 細胞を播種し、80%コンフルエントになるまで培養した。続いて、種々の濃度に調製した上述の化合物を投与し、48 時間処理した。培養後、倒立顕微鏡 ZEISS Axiovert 25 microscope

(Oberkochen, Germany) を用いてドーム数を計測した。ドーム誘導能の指標として ED<sub>50</sub> 値を導入した。ED<sub>50</sub> 値は、対照区と比較して 1.5 倍にドーム数を増加させる化合物の濃度と定義し、化合物のドーム誘導活性の強弱を推定するために用いた。

#### 1.2.4. ALP 活性

ALP 活性の測定は LabAssay ALP キット (Fujifilm Wako Pure Chemical Corp.) を用いて行った。簡潔に手順を記述すると、薬剤処理が行われた細胞を PBS で 2 回洗浄した後、0.3% Nonidet P-40 を含む基質溶解液を添加して超音波ホモジナイザー (10 秒) で細胞を破碎した。細胞溶解液に ALP 基質 *p*-nitrophenylphosphate を加え、37°C で 15 分間反応させた。ALP 活性は、マイクロプレートリーダー Mithras LB 940 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany) を用いて波長 405 nm の吸光度を計測することで求めた。細胞溶解液のタンパク質濃度の測定は Protein Assay Bradford Reagent (Fujifilm) を用いて行った。

#### 1.2.5. MTA の処理法

RCM-1 細胞に対する MTA の処理は以下の通り行った。RCM-1 細胞が 80% コンフルエントになった時点で 1 mM の MTA を投与し、実験ごとに定めた時間培養することで MTA を処理した。マイクロアレイ、RT-PCR、イムノブロット解析では、MTA を加えた培地で培養後、MTA を含まない培地に置き換えて細胞を回収するまで培養を行った。対照区では、MTA の溶解に用いたアセトニトリル (終濃度 0.1%) を処理した。行った全ての実験において、ドーム数の増加を確認することで MTA の効果を確認した。

#### 1.2.6. マイクロアレイ解析

網羅的遺伝子発現解析のためのマイクロアレイは Affymetrix Japan K.K. (Tokyo, Japan) に委託した。マイクロアレイに供試する RNA は MTA 処理した RCM-1 細胞から SV Total RNA Isolation System (Promega Corp., Madison, WI, USA) を用いて抽出した。遺伝子の発現相対比のヒートマップは MULTIEXPERIMENT VIEWER software version 4.9.0 (The Institute for Genomic Research, Rockville, MD, USA) (Saeed et al., 2003) を用いて作成した。

### 1. 2. 7. RT-PCR

逆転写酵素の供給元のプロトコールに従い、RCM-1 細胞から抽出した RNA を鋳型として逆転写反応を行った。反応液 50  $\mu$ L に含まれるのは【RNA (2.5  $\mu$ g)、1 $\times$ RT 緩衝液、0.5 mM dNTP、5  $\mu$ M Oligo (dT) プライマー、40 U の RNase 阻害剤、及び 200 U の GeneAce 逆転写酵素 (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan)】である。続いて、得られた cDNA (1  $\mu$ L) を PCR 反応に供試した。反応液 20  $\mu$ L に含まれるのは【1 $\times$ Green GoTaq Flexi Buffer、0.3 mM dNTP、2.0 mM MgCl<sub>2</sub>、各プライマー 0.4  $\mu$ M、及び 1 U の GoTaq DNA ポリメラーゼ (Promega Corp.)】である。PCR 反応は以下の通り行った。まず 95°C で 1 分間保温することで鋳型 DNA を変性し、【98°C で 10 秒間、64–67°C で 30 秒間、72°C で 15 秒間】からなる反応を 23–35 サイクル行った。最後に伸長反応を終了させるため 72°C で 7 分間保温した。CCNE2 遺伝子の PCR 増幅に用いたプライマーセットは、5'-AGGAAA ACTACCCAGGATGTCA-3' と 5'-ATCAGGCAAAGGTGAAGGATTA-3'、一方、CDC25A 遺伝子の増幅には 5'-ACCGTCACTATGGACCAGC-3' と 5'-TTCAGAGCTGGACTACATCC-3' を用いた。また、内在性コントロールとして用いた *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* 遺伝子の増幅には 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' と 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3' を用いた。臭化エチジウム染色した PCR 産物 (DNA) の蛍光強度は IMAGEJ software

(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, The National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて計測した。各遺伝子の発現レベルは *GAPDH* の発現レベルで補正後、処理開始時 (0 時間) の相対値として示した。

#### 1.2.8. 遺伝子機能解析

MTA の投与により発現が変動した遺伝子の Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析と Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 経路解析は、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) を用いて行った (Huang et al., 2009a, 2009b; Sherman et al., 2009)。同様に、遺伝子セットコレクション 'c5.bp.v7.1.symbols.gmt' 及び 'c2.cp.kegg.v7.1.symbols.gmt' を用いて Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (v4.1.0, <http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) を行った。

#### 1.2.9. イムノブロット解析

10% SDS-PAGE により RCM-1 細胞溶解液に含まれるタンパク質を分子量ごとに分けた後、ポリ (フッ化ビニリデン) メンブレンに転写した。次に、0.1% Tween 20 と 5% スキムミルクを含む PBS で 1 時間ブロッキング反応を行った後、1 次抗体を含む同溶液とともに室温で 2 時間保温した。用いた 1 次抗体は cyclin E2 (CCNE2, 1:2000, Merck KGaA)、CDC25A (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA)、actin (1:2000, Life Technologies) である。メンブレンを洗浄後、さらに 2 次抗体を含む同溶液とともに室温で 1 時間保温した。Cyclin E2 検出用の 2 次抗体には抗ニワトリ IgY (Life Technologies) を、CDC25A 及びアクチンの検出用の 2 次抗体には、抗マウス IgG (SeraCare Life Sciences, Inc., MA, USA) を

用いた。最後に PBS を用いて洗浄することで余分な 2 次抗体を除いた。シグナルの検出は以下の通り行った。Cyclin E2 タンパク質のシグナルは、enhanced chemiluminescence detection system (GE Healthcare, IL, USA) を用いてタンパク質バンドから発せられる化学発光で X 線フィルムを感光することで検出した。一方、CDC25A タンパク質のシグナルは、WSE-7120 EzWestLumi plus 試薬 (Ez-Capture MG; ATTO Co., Tokyo, Japan) を用いて化学発光させたタンパク質バンドを直接 CCD イメージングシステム Ez-Capture MG (ATTO) で検出した。

#### 1.2.10. 統計解析

図表では、各種実験で得られたドーム数を平均値と標準偏差で表している。統計学的な有意差は、一元配置分散分析後、Dunnett 検定もしくは Tukey-Kramer 検定を行うことで定めた。



### 1.3. 結果

#### 1.3.1. MTPE 及び MTAE 類似化合物の構造活性相関解析

カツラウリ由来の含硫化合物、MTPE と MTAE は RCM-1 細胞のドーム形成を促進する (Nakamura et al., 2008; Nakamura et al., 2010)。そこで、これらの化合物内でドーム形成に重要な部位 (構造) を特定するため、MTPE と MTAE を含めた 37 種類の類似化合物を用いて構造活性相関解析を行った (Table 1, 2)。供試した化合物のうち、化合物 **1–12** (MTPE 及び MTAE を含む) は RCM-1 細胞に対して明確なドーム誘導活性を示した (Table 1)。一方、化合物 **13–37** はドーム誘導活性を全く示さなかった (Table 2)。化合物 **1–12** のドーム誘導活性の強さは、活性の強い方から **2 > 6 > 3 > 5 > 7 > 9 > 4 (MTAE) > 8 (MTPE) > 11 > 1 > 10 > 12** と続いた。そこで、これらの化合物を高活性グループ 8 種 ( $ED_{50} < 1$  mM, 化合物 **2–9**) と低活性グループ 4 種 ( $ED_{50} > 1$  mM, 化合物 **1** 及び **10–12**) に分類した。化合物 **10** ( $ED_{50} = 1.65$  mM) を除き、 $R_1$  ポジションにメチル基を有する化合物はすべて高活性グループに属していた。一方、低活性グループの 3 つの化合物 (**1**, **11**, **12**) は、 $R_1$  ポジションのメチル基が水素原子またはエチル基に置換されていた。高活性グループの 8 種の化合物では、 $R_2$  ポジションのメチレン鎖の炭素数は 1 以下であり、 $R_3$  ポジションのアルキル基の炭素数は 3 以下であった。さらに、ドーム誘導活性が  $R_3$  ポジションのアルキル基の炭素数により周期的に変動したことから、アルキル基長の違いによる偶奇効果が示唆された。

MTA (化合物 **2**) は、37 種類の類似化合物の中で最も強いドーム誘導活性 ( $ED_{50} = 0.13$  mM) を持つと同時に、分子量が最も小さかった (Table 1)。このことから、MTA はドーム形成を誘導するための最小単位と考えられた。また、MTA を含めた高活性グループに属する 8 種がメチルチオ基 ( $-SCH_3$ ) を持つことから、メチルチオ基はドーム形成の誘導に

重要な機能を果たすと推測された。そこで、この仮説を検証するために、硫黄原子が酸素、窒素、または炭素に置き換わった MTA 類似化合物を用いてさらに構造活性相関解析を続けた。Table 3 に示すように、硫黄原子を含まない 3 つの類似化合物（化合物 **2a-2c**）は、供試した濃度範囲でドーム形成を促進することはなかった。この結果から、メチルチオ基は強いドーム誘導活性を発揮するために必要と考えられた。しかし、後述するように酪酸 (butyric acid, BA) も限られた濃度範囲で RCM-1 細胞のドーム形成を促進した（第 2 章）ので、メチルチオ基はドーム形成誘導に必須な構造とまでは言えないのかもしれない。

MTPE は、RCM-1 細胞のドーム形成を促進すると共に、生化学的分化マーカーの一つである ALP 活性を上昇させることが報告されている (Nakamura et al., 2008)。そこで、MTA を投与した RCM-1 細胞で ALP 活性を測定してみたところ、MTA 処理 4 日目に ALP 活性が上昇した。また、ALP の誘導効果は MTPE よりも強かった (Fig. 1)。「ドームが分化組織であるかどうか？」という疑問に対する回答は第 2 章で明らかにするが、これまでの結果は MTA が RCM-1 細胞の分化を誘導することを示唆する。そこで、カツラウリ由来の含硫化合物によるドーム形成の機構解明を目指した以後の実験では、MTPE や MTAE などの天然物に代え、MTA を使用することにした。また、安定してドームを形成する濃度 1 mM を標準濃度とした。

### 1.3.2. MTA によるドーム形成に関与する候補遺伝子を絞り込むためのマイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は、MTA により誘導されるドーム形成に関わる遺伝子候補を絞り込む上で有効である。そこで、マイクロアレイ解析を実施するにあたり、まず確実に RCM-1 細胞のドーム形成を誘導する MTA の処理時間を検討した。Fig. 2 に示すように、

80%コンフルエントになった RCM-1 細胞を 1 mM の MTA で 6 時間処理した後、MTA を含まない培地に置き換えて、処理開始時から数えて 48 時間まで培養した。その結果、対照区と比べて MTA 処理区ではドーム数が約 6 倍に増加した。MTA 処理時間を 6 時間から 12 時間、24 時間へと延長するとドーム数はさらに増加した。このことから、MTA 処理を 6-24 時間施せば、十分にドーム形成を誘導できることが分かった。そこで、マイクロアレイ解析に供試する RNA は、以下の通り MTA 処理を施した細胞から調製した。まず、80%コンフルエントになった RCM-1 細胞に 1 mM MTA を添加し、6 時間、12 時間、ないし 18 時間培養後、MTA を含まない培地に置き換えて、処理開始時から数えて 24 時間目まで培養した。この時点ではドームの形成はほとんど観察されなかった。

MTA 処理により発現が変動する遺伝子を網羅的に同定するために GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) を用いてマイクロアレイ解析を実施した。供試した全 54,675 個のプロープのうち 20,954 個が検出され、このうち、MTA 処理 0 時間と比較して、MTA を 18 時間まで処理した場合には 537 遺伝子 ( $\log_2$  ratio < 1.5) の発現が減少し、117 遺伝子 ( $\log_2$  ratio > 1.5) の発現が増加していた (Fig. 3)。次に、これらの遺伝子をデータ解析ツールである DAVID に取り込み、GO エンリッチメント解析を行った。その結果、発現減少した 537 遺伝子を供試した時には、GO カテゴリー‘生物学的プロセス (biological process)’の中から 64 タームが選ばれた ( $P < 0.05$ )。また、64 タームの中には細胞周期制御に関わるタームが 6 個含まれており、MTA 処理により発現減少する 45 遺伝子が含まれていた (Table 4)。選ばれた 64 タームで最もエンリッチされていたタームは‘rRNA processing ( $P$ -value = 2.3E-15, 1 番目)’であった。しかし、‘DNA replication ( $P$ -value = 1.9E-9, 2 番目)’、‘DNA replication initiation ( $P$ -value = 8.7E-7, 3 番目)’及び‘G1/S transition of mitotic cell cycle ( $P$ -value = 2.3E-4, 8 番目)’の 3 タームも、選抜された 64 タームのうちの上

位 10 タームに含まれていた (Fig. 4A)。対照的に、発現が増加した 117 遺伝子でエンリッチされた GO タームはわずか 5 個で、DNA 複製や細胞周期に関わるタームは含まれていなかった (Fig. 4B)。一方、DAVID (解析ツール) を用いた KEGG 解析においては、発現が減少した遺伝子群 (537 遺伝子) を供試した際に 10 個の KEGG 経路がエンリッチされ、その中には 'cell cycle ( $P$ -value=9.1E-4, 2 番目)' と 'DNA replication ( $P$ -value=1.1E-2, 6 番目)' が含まれていた (Fig. 4C)。対照的に、発現が増加した遺伝子群 (117 遺伝子) を供試した時には、DNA 複製と細胞周期に関わる KEGG 経路は全くエンリッチされなかった (Fig. 4D)。GSEA 解析においても 'DNA replication (GO & KEGG)', 'DNA replication initiation (GO)', 'cell cycle (KEGG)' がエンリッチされており、DAVID を用いた解析の結果と一致していた (Fig. 4E-4H)。これらの結果から、MTA によって誘導されるドーム形成は、MTA により発現が増加する遺伝子群というより、減少する遺伝子群と深い関連があると考えられた。つまり、網羅的な視点で考えると MTA は、ある種の遺伝子 (群) の発現を抑制することでドーム形成を誘導していると考えられた。

興味深いことに、MTA によって下方制御される 13 種の細胞周期関連遺伝子は、GO エンリッチメント解析と KEGG 経路解析で共通してエンリッチされた (Table 5)。さらに、13 のうちの 8 遺伝子は GO ターム 'G1/S transition of mitotic cell cycle' に含まれていた。8 遺伝子の中で、*CCNE2* (-6.61 倍、0 vs 18 時間) と *CDC25A* (-5.47 倍、0 vs 18 時間) は MTA によって最も強く下方制御され、*minichromosome maintenance complex component 4 (MCM4)* (-4.95 倍、0 vs 18 時間)、*cell division cycle 6 (CDC6)* (-4.70 倍、0 vs 18 時間) が続いた (Table 5)。

### 1.3.3. RT-PCR 及びイムノブロット解析によるマイクロアレイデータの検証

cyclin E2 (CCNE2) タンパク質と CDC25A タンパク質は、細胞分裂から細胞分化へのゲートウェイ（玄関口）と考えられている G1 期のチェックポイントで協調的に働き、細胞周期を進める (Blomen and Boonstra, 2007; Pfeuty et al., 2008)。そこで、MTA によるドーム形成との関連性を明らかにするため、CCNE2 と CDC25A の発現を mRNA とタンパク質の両水準で調べることにした。

上述の通り、マイクロアレイ解析により、MTA が CCNE2 と CDC25A の発現を強く抑制することが示されたので、RT-PCR 法を用いて、MTA が 2 遺伝子の mRNA を下方制御するかどうか検証した。Fig. 5A に示すように CCNE2 と CDC25A の mRNA レベルは、MTA の処理時間に依存して減少した。さらに臭化エチジウムで染色した PCR 産物 (DNA) が放つ蛍光を定量化して比較したところ、MTA による CCNE2 mRNA 量の時間依存的減少パターンは、マイクロアレイと RT-PCR でよく似ていた (Fig. 5B)。対照的に、RT-PCR による CDC25A mRNA 量の減少はマイクロアレイと比較して緩やかであった (Fig. 5C)。以上の結果から、MTA は確かに CCNE2 と CDC25A の両遺伝子の発現を mRNA 水準で下方制御することが分かった。

mRNA 量とタンパク質量の消長は必ずしも一致するわけではないことが知られている。そこで、MTA が cyclin E2 (CCNE2) と CDC25A タンパク質量を下方制御するか明らかにするため、イムノブロット解析を行った。Fig. 6 にみられるように、MTA で処理された RCM-1 細胞内の両タンパク質量は時間依存的に減少した。この結果は、MTA が CCNE2 と CDC25A の両遺伝子の発現を抑制することで、結果的にタンパク質量が減少したことを示唆する。

#### 1.3.4. 細胞周期阻害剤によって促進される RCM-1 細胞のドーム形成

MTA によるドーム形成に対する cyclin E2 と CDC25A の関与をさらに検証するため、cyclin-dependent kinases (CDKs; CDK1 及び CDK2) の阻害剤である purvalanol A (Gray et al., 1998) と CDC25 ファミリー (CDC25A/B/C) の阻害剤 NSC95397 (Lazo et al., 2002) を用いて薬理的解析を行った。NSC95397 は、直接 CDC25A ホスファターゼに結合して酵素活性を阻害すると考えられる。一方、purvalanol A は cyclin E2 タンパク質に直接結合できないが、G1 期に形成される cyclin E2-CDK2 複合体に結合し、不活性化すると期待される。Table 6 に示すように、purvalanol A を 2.8–90 nM の範囲で投与すると、平均ドーム数は対照区と比較して約 1.3–2.1 倍増加した。幾らかの例外はあるが、ほとんどの場合、カツラウリからドーム誘導物質をスクリーニングする際に用いた基準 (ドーム数が対照区の 1.5 倍増加) を超えていた (Nakamura et al., 2008)。Purvalanol A は 45 及び 90 nM で強いドーム形成誘導能を示した。一方、NSC95397 を 0.9–30  $\mu$ M の濃度範囲で処理したときの平均ドーム数は対照区と比較して約 1.8–3.5 倍増加し、1.9 及び 15  $\mu$ M で最も強いドーム形成誘導能を示した。したがって、使用濃度を無視して述べるならば NSC95397 は purvalanol A よりも強いドーム誘導活性を持つと考えられた。実際に、15  $\mu$ M の NSC95397 (3.5 倍) は、45 及び 90 nM purvalanol A (2.0–2.1 倍) と比較して約 1.7 倍高い活性を示した。但し、ドーム形成をもたらす濃度範囲が両者で 2 桁以上異なっていたことは、解釈をする際に考慮する必要がある。

続いて、薬理的相互作用を明らかにするため MTA (1 mM) と NSC95397 (15  $\mu$ M) または purvalanol A (45 nM) を RCM-1 細胞に同時投与した。MTA と NSC95397 の同時投与 (約 6.2 倍) はそれぞれの単独処理 (MTA : 約 4.8 倍、NSC95397 : 約 3.7 倍) と比べてドーム数を増加させた (Table 7)。この結果は、RCM-1 細胞のドーム形成に対する MTA と NSC95397 の関係が相乗的ではなく、相加的または部分的に拮抗的であることを示唆する。

したがって、MTA が NSC95397 とは無関係な経路でドーム形成を誘導するという考えとは反する。一方、purvalanol A は MTA によって誘導されるドーム形成にほとんど影響しなかったため、薬理学的実験から MTA と purvalanol A の間の関係性を推察することはできなかった。

#### 1.4. 考察

本研究では、ヒト大腸癌細胞株 RCM-1 に対してドーム形成を誘導するカツラウリ由来の香気成分 MTPE と MTAE (Nakamura et al., 2010) の類似化合物のうち、MTA がドーム形成誘導に必要な基本単位であること、また、供試した 37 種の類似化合物の中で最も強いドーム形成誘導能を持つことを明らかにした。加えて、網羅的発現解析を通じて、MTA は細胞周期制御や DNA 複製に関連する多数の遺伝子の発現を抑制することも明らかにした。さらに、薬理的解析を通じて、MTA によるドーム形成には細胞周期制御遺伝子である *CDC25A* (おそらく *CCNE2* も) の発現低下が関与する可能性を示した。

ドーム形成を誘導するために必要な部位を MTPE や MTAE、それらの類似化合物の構造内に求めることは、ドームの形成機構を解き明かす上で不可欠な研究過程と考えられる。筆者は、詳細な構造活性相関解析を行うことで、ドーム形成に必要な官能基や構造上の特徴を見出すことに成功した。まず、高いドーム誘導活性を有するすべての化合物 (**2-9**) の  $R_1$  ポジションがメチル基であることから、メチル基は強い活性を発揮する上で重要であることを明らかにした (Table 1)。すなわち、 $R_1$  ポジションのメチル基が水素原子やエチル基に置換された化合物 (**1, 11, 12**) ではドーム誘導活性が低下した。一方、その他の官能基に置換された化合物のほとんどは活性を示さなくなった (Table 1, 2)。また、 $R_1$  ポジションにメチル基を有する高活性グループ (化合物 **2-9**) では  $R_2$  ポジションにメチレン鎖を持つ、或いは  $R_2$  ポジション自体が存在しなかったことから、 $R_1$  と  $R_2$  の両ポジションともドーム誘導に重要であると考えられた。加えて、 $R_2$  ポジションのメチレン鎖をエチレン鎖もしくはトリメチレン鎖に置換したところ、活性は低下または完全に消失した。したがって、 $R_2$  ポジションがメチレン鎖もしくは何も有しない状態で  $R_1$  ポジションがメチル基であることは、



高いドーム誘導活性に必要であると考えられた。また、R<sub>3</sub> ポジションが水素原子である化合物 (2, 6, 11) ではアルキル基を有する化合物 (3-5, 7-9, 12) と比較してそれぞれ高い活性を示す傾向があることから、R<sub>3</sub> ポジションの官能基もドーム誘導活性の強さに関与していると考えられた。さらに、R<sub>3</sub> ポジションの炭素数が奇数の化合物 (3, 5, 7, 9) は偶数の化合物 (4, 8) と比較して高い活性を示したことから、アルキル基の偶奇効果も考えられた。これらの結果は、R<sub>3</sub> ポジションの水素原子とアルキル基はドーム誘導に重要であり、アルキル基の長さや偶奇性が活性の強さを決める要因の一つであることを示唆する。MTA の硫黄原子を酸素、窒素、炭素に置換したところ (化合物 2a-2c)、供試した濃度範囲でドーム誘導活性が完全に失われたことから、硫黄原子はドーム形成の誘導に関与すると考えられた (Table 3)。以上のことから、筆者は MTA が強いドーム形成誘導能を発揮する上で必要とされる基本単位であると結論付けた。

遺伝子発現の異常はがんの特徴の一つであるので、MTA が RCM-1 腫瘍細胞の遺伝子発現プログラムに好影響を及ぼす、あるいは一部を回復させることによってドーム形成を促進したとの考えは合理的である (Bradner et al., 2017)。この考えと一致するように、マイクロアレイ解析は、MTA が多数の遺伝子 (654) の発現に確かに影響を与え、そのうち 82.1% (537) では発現が減少し、残りの 17.9% (117) では発現が増加することを明らかにした (Fig. 3)。発現が減少する遺伝子の数と増加する遺伝子の数に大きな偏りがあったことから、ドーム形成は MTA 処理により発現が増加する遺伝子よりも減少する遺伝子と関係が深いと考えられた。興味深いことに、発現が抑制された 45 遺伝子は細胞分裂や細胞増殖に関連する 6 つの GO タームに分類された (Table 4)。さらに、これらの遺伝子の半分以上 (29) は、G1/S 移行 (4) や DNA 複製 (14)、及びその両方 (7) などの細胞周期の早期過程で役割を担う遺伝子であった。G1 期は、細胞増殖の静止、分化、老化及びアポ

トーススなどの細胞死につながる細胞運命を決めるゲートウェイであると考えられている (Blomen and Boonstra, 2007; Pfeuty et al., 2008)。したがって、G1 期及び S 期で機能する一部の因子を暗号化する遺伝子の発現抑制は MTA によるドーム形成に関与する可能性が高いと考えられる。G1 期進行の重要な制御因子である CDC25A と cyclin E2 は、MTA によって mRNA とタンパク質の両水準で発現が抑制されたことから、ドーム形成過程に関与する因子の有力候補と考えられた (Table 5, Fig. 5, 6)。

CDC25A ホスファターゼはリン酸基を除去することによって CDK2 キナーゼを活性化する。その結果、CDK2 は G1 期の進行を促進する (Blomberg and Hoffmann, 1999; Vigo et al., 1999)。一方、cyclin E2 は CDK2 キナーゼと複合体を形成し、細胞周期依存的にキナーゼ活性を調節する。この複合体は、retinoblastoma protein、SMAD family member 3、CREB-binding protein/p300、E2F transcription factor 5 などの標的タンパク質のリン酸化を介して G1/S 期の移行を制御することが報告されている (Hinds et al., 1992; Matsuura et al., 2004; Morris et al., 2000; Ait-Si-Ali et al., 1998)。ヒト cyclin E には、E1 と E2 の 2 つのタイプが存在する。これまでの知見の多くは cyclin E1 の研究に由来するが、cyclin E2 も細胞周期の過程で cyclin E1 と同様の役割を果たしていると考えられている (Payton and Coats, 2002)。CDC25A と cyclin E2 は CDK2 をそれぞれ標的、パートナーとして共有するため、協調して G1 期の進行を促進すると想像される。さらに、CDC25A は肝細胞がん、肺がん、喉頭がん、頭頸部扁平上皮がん (Xu et al., 2003; Wu et al., 1998; Fraczek et al., 2007; Gasparotto et al., 1997)、cyclin E2 は乳がんと胃がん (Payton et al., 2002; Kumari et al., 2016) などの様々ながん細胞で大量に蓄積することが報告されている。免疫ブロット解析は、他の細胞株と比較して RCM-1 細胞で cyclin E2 タンパク質が多く蓄積していることを示した (Fig. 7)。

未解明の問題は、MTA が *CDC25A* や *CCNE2*、またはその両方の発現抑制を介してドーム形成を誘導しているかどうかという点である。筆者が行った薬理的解析はこの問題に幾らか答えている。すなわち、MTA 非存在下で CDC25 阻害剤 (NSC95397) を 0.9–30  $\mu\text{M}$  で処理すると、RCM-1 細胞のドーム数が増加した (Table 6)。さらに、MTA (1 mM) と NSC95397 (15  $\mu\text{M}$ ) の同時投与は、ドーム形成に対する 2 化合物の薬理的相互作用が相乗的ではなく、むしろ相加的あるいは部分的に拮抗的であることを示している (Table 7)。したがって、MTA と NSC95397 が全く異なる経路でドーム形成に影響を与えている可能性は低いと考えられた (Roell et al., 2017)。NSC95397 は、ヒト *CDC25A/B/C* の触媒活性を阻害することが報告されている (Lazo et al., 2002)。NSC95397 は、これまで主に *CDC25B* 及び *CDC25C* に影響を与えることによって G2/M 停止を引き起こすと報告されてきたが (Nilsson and Hoffmann, 2000; Lazo et al., 2002; Aoyagi et al., 2005)、RCM-1 細胞では G1/S 期への移行で働く *CDC25A* を阻害することで G1 期停止をもたらし、さらにドーム形成を誘導したと考えられる。NSC95397 (20  $\mu\text{M}$ ) はヒト前立腺癌細胞株 PC-3 及び LNCap において、プロテアソーム経路を介して *CDC25A* の分解を促進すると報告されている (Nemoto et al., 2004)。したがって、MTA は *CDC25A* 遺伝子の発現を抑制することで、*CDC25A* のタンパク質量を低下させ (Fig. 6)、ドーム形成を促進するとも考えられる。しかしながら、NSC95397 による *CDC25B/C* の阻害はドーム形成に間接的な影響をもたらす可能性もあるため、解釈は慎重に行うべきである。

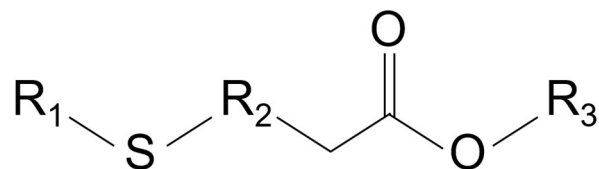
CDK2 と cyclin E2 は G1 期で複合体を形成すると考えられている (Lauper et al., 1998; Gudas et al., 1999)。したがって、purvalanol A による CDK1/2 の阻害 (Gray et al., 1998) は、間接的に cyclin E2 の働きを抑制すると想像された。もし、MTA が *CCNE2* 遺伝子の発現抑制を介してドーム形成を誘導しているならば、purvalanol A 処理もドーム形成を

促進すると期待された。実際、purvalanol A は MTA 非存在下でドーム形成を促進したが、NSC95397 に比べてその効果は低かった (Table 6)。考えうる理由の一つに、purvalanol A が G1 期で働く cyclin E/CDK の他に、cyclin B/CDK1 (M期) や cyclin A/CDK2 (S・G2 期) の機能を阻害し、様々な期において細胞周期を停止させたことが考えられる。Cyclin E は G1 期の CDC25A の標的であることが報告されているため (Hoffmann et al., 1994)、CCNE2 が依然として MTA によって誘導されるドーム形成に関与する因子である可能性は否定できない。

以上の結果から、MTA は G1 期の重要な細胞周期制御因子である *CDC25A* (おそらく *CCNE2* も) の発現抑制と、そのことに起因する機能抑制を介して、RCM-1 細胞のドーム形成を促進する可能性が示唆された (Fig. 8)。本研究で得られた結果は、MTA によるドーム形成誘導の分子メカニズムの解明に寄与すると考えられるが、取り組むべき研究はまだ数多く残されている。今後、種々の細胞周期阻害剤を用いた薬理的な解析と *CDC25A* や *CCNE2* のノックダウン細胞株を用いた分子遺伝学的研究を行う必要があると考えられる。さらに、MTA が RCM-1 以外の大腸癌細胞株に対してドームを形成するかどうかが検証する必要もある。将来的に MTA に基づく分化誘導剤を開発したり、さらに同化合物を用いた大腸癌に対する新規治療法を開発したりするためには、MTA によるドーム形成のメカニズムの全容解明は不可欠と考えられる。

## 1.5. 图表

Table 1. Analogs of MTPE and MTAE with dome formation-inducing activity.



Compound					ED <sub>50</sub> *	
No.	Name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	(mM)	M <sub>r</sub>
1	Mercaptopropionic acid ethyl ester	H	CH <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1.32	134
2	Methylthioacetic acid (MTA)	CH <sub>3</sub>	-	H	0.13	106
3	Methylthioacetic acid methyl ester	CH <sub>3</sub>	-	CH <sub>3</sub>	0.38	120
4	Methylthioacetic acid ethyl ester (MTAE)	CH <sub>3</sub>	-	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0.61	134
5	Methylthioacetic acid propyl ester	CH <sub>3</sub>	-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0.39	148
6	3-Methylthiopropionic acid	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	H	0.35	120
7	3-Methylthiopropionic acid methyl ester	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	0.50	134
8	3-Methylthiopropionic acid ethyl ester (MTPE)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0.71	148
9	3-Methylthiopropionic acid propyl ester	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0.52	162
10	4-Methylthiobutyric acid	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	H	1.65	134
11	Ethylthioacetic acid	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-	H	1.07	120
12	Ethylthioacetic acid methyl ester	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-	CH <sub>3</sub>	1.72	134

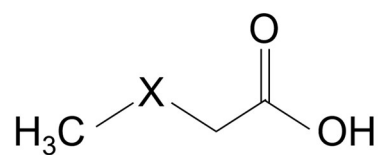
\*ED<sub>50</sub> means the lowest dose needed to induce a 50% increase of the number of domes over the control.

Table 2. Analogs of MTPE and MTAE with undetectable dome formation-inducing activity.

Compound					ED <sub>50</sub> *	
No.	Name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	(mM)	M <sub>r</sub>
13	Mercaptoacetic acid	H	-	H	ND	92
14	Mercaptoacetic acid methyl ester	H	-	CH <sub>3</sub>	ND	106
15	Mercaptoacetic acid ethyl ester	H	-	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	ND	120
16	Mercaptoacetic acid propyl ester	H	-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	ND	134
17	Mercaptoacetic acid butyl ester	H	-	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	ND	148
18	Mercaptopropionic acid	H	CH <sub>2</sub>	H	ND	106
19	Mercaptopropionic acid methyl ester	H	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	ND	120
20	Mercaptopropionic acid propyl ester	H	CH <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	ND	148
21	4-Methylthio butyric acid methyl ester	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	ND	148
22	4-Methylthio butyric acid ethyl ester	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	ND	162
23	5-Methylthiovaleric acid	CH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	H	ND	148
24	5-Methylthiovaleric acid methyl ester	CH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	CH <sub>3</sub>	ND	162
25	5-Methylthiovaleric acid ethyl ester	CH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	ND	176
26	Ethylthioacetic acid ethyl ester	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	ND	148
27	Ethylthioacetic acid propyl ester	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	ND	162
28	3-Ethylthiopropionic acid	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub>	H	ND	134
29	3-Ethylthiopropionic acid methyl ester	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	ND	148
30	3-Ethylthiopropionic acid ethyl ester	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	ND	162
31	4-Ethylthiobutyric acid	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	H	ND	148
32	4-Ethylthiobutyric acid methyl ester	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	ND	162
33	4-Ethylthiobutyric acid ethyl ester	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	ND	176
34	Propylthioacetic acid	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-	H	ND	134
35	Propylthioacetic acid methyl ester	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-	CH <sub>3</sub>	ND	148
36	3-Propylthiopropionic acid	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	CH <sub>2</sub>	H	ND	148
37	3-Propylthiopropionic acid ethyl ester	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	CH <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	ND	176

\*ED<sub>50</sub> means the lowest dose needed to induce a 50% increase of the number of domes over the control.

Table 3. MTA derivatives subjected to structure–activity relationship analysis.



Compound			ED <sub>50</sub> *
No.	Name	X	(mM)
<b>2</b>	Methylthioacetic acid (MTA)	S	0.13
<b>2a</b>	Methoxyacetic acid	O	ND
<b>2b</b>	Sarcosine	N	ND
<b>2c</b>	Butyric acid	C	ND

\*ED<sub>50</sub> means the lowest dose needed to induce a 50% increase of the number of domes over the control.

Table 4. Enriched GO terms related to cell cycle control for the genes downregulated by MTA.

GO term	P-value	Gene	
		number	Gene symbol (probe set ID)
DNA replication (GO:0006260)	1.9E-09	21	<i>ATR</i> (209902_at), <i>BARBD1</i> (242655_at, 205345_at), <i>POLA2</i> (204441_s_at), <i>POLE3</i> (208828_at), <i>GINS2</i> (221521_s_at) , <i>GINS3</i> (218719_s_at), <i>RBMI4</i> (204178_s_at), <i>RECQL4</i> (213520_at), <i>TIPIN</i> (219258_at), <i>CDC25A</i> (1555772_a_at), <i>CDC6</i> (203967_at, 203968_s_at), <i>CINP</i> (217598_at), <i>DTL</i> (218585_s_at, 222680_s_at), <i>MCM10</i> (220651_s_at, 223570_at), <i>MCM9</i> (219673_at), <i>MCM3</i> (201555_at), <i>MCM4</i> (222037_at, 212141_at), <i>MCM5</i> (216237_s_at), <i>NFIB</i> (213033_s_at), <i>TBRG1</i> (225818_s_at), <i>TWINK</i> (218590_at)
DNA replication initiation (GO:0006270)	8.7E-07	9	<i>POLA2</i> (204441_s_at), <i>CDC6</i> (203967_at, 203968_s_at), <i>CCNE1</i> (213523_at), <i>CCNE2</i> (205034_at, 211814_s_at), <i>MCM10</i> (220651_s_at, 223570_at), <i>MCM3</i> (201555_at), <i>MCM4</i> (222037_at, 212141_at), <i>MCM5</i> (216237_s_at), <i>PURA</i> (229167_at)
G1/S transition of mitotic cell cycle (GO:0000082)	2.3E-04	11	<i>POLA2</i> (204441_s_at), <i>SKP2</i> (210567_s_at), <i>CDC25A</i> (1555772_a_at), <i>CDC6</i> (203967_at, 203968_s_at), <i>CUL2</i> (203078_at), <i>CCNE1</i> (213523_at), <i>CCNE2</i> (205034_at, 211814_s_at), <i>MCM10</i> (220651_s_at, 223570_at), <i>MCM3</i> (201555_at), <i>MCM4</i> (222037_at, 212141_at), <i>MCM5</i> (216237_s_at)
Regulation of cell cycle (GO:0051726)	3.9E-03	10	<i>E2F2</i> (228361_at), <i>JUN</i> (201466_s_at), <i>SKP2</i> (210567_s_at), <i>CDC25A</i> (1555772_a_at), <i>CCNE1</i> (213523_at), <i>CCNE2</i> (211814_s_at, 205034_at), <i>CDK12</i> (225691_at), <i>CDKLI</i> (235512_at), <i>DTL</i> (218585_s_at, 222680_s_at), <i>PES1</i> (202212_at)
Cell proliferation (GO:0008283)	2.2E-02	17	<i>CDV3</i> (213548_s_at), <i>E2F8</i> (219990_at), <i>PAK1IP1</i> (218886_at), <i>POLR3G</i> (206653_at), <i>SKP2</i> (210567_s_at), <i>WDR12</i> (241687_at), <i>AREG</i> (205239_at), <i>BYSL</i> (203612_at), <i>CDC25A</i> (1555772_a_at), <i>MCM10</i> (223570_at, 220651_s_at), <i>PES1</i> (202212_at), <i>PA2G4</i> (208676_s_at), <i>RAC1</i> (1567457_at), <i>SLC29A2</i> (204717_s_at), <i>TRIM27</i> (210541_s_at), <i>UHRF1</i> (225655_at), <i>MYC</i> (202431_s_at)
Positive regulation of DNA endoreduplication (GO:0032877)	4.9E-02	2	<i>PRELID1</i> (224232_s_at), <i>MYC</i> (202431_s_at)



Table 5. MTA-downregulated genes related to cell cycle control.

Gene symbol	Probe set ID	Fold change <sup>a</sup>			GO term	KEGG pathway
		6 h	12 h	18 h		
<i>CCNE2</i>	205034_at	1.07	-2.43	-6.61	DNA replication initiation, G1/S transition of	Cell cycle
	211814_s_at	-1.14	-2.97	-4.52	mitotic cell cycle, regulation of cell cycle	
<i>CDC25A</i>	1555772_a_at	-1.26	-4.56	-5.47	DNA replication, G1/S transition of mitotic cell cycle, regulation of cell cycle, cell proliferation	Cell cycle
<i>MCM4</i>	212141_at	-1.50	-1.65	-4.95	DNA replication, DNA replication initiation,	DNA replication, Cell cycle
	222037_at	-1.16	-1.65	-3.31	G1/S transition of mitotic cell cycle	
<i>CDC6</i>	203968_s_at	-1.04	-1.66	-4.70	DNA replication, DNA replication initiation,	Cell cycle
	203967_at	1.06	-1.64	-4.27	G1/S transition of mitotic cell cycle	
<i>E2F2</i>	228361_at	-1.57	-1.88	-4.27	regulation of cell cycle	Cell cycle
<i>SKP2</i>	210567_s_at	-1.64	-1.83	-4.05	regulation of cell cycle, cell proliferation	Cell cycle
<i>CCNE1</i>	213523_at	-1.29	-2.57	-3.98	DNA replication initiation, G1/S transition of	Cell cycle
					mitotic cell cycle, regulation of cell cycle	
<i>POLA2</i>	204441_s_at	-1.21	-1.60	-3.64	DNA replication, G1/S transition of mitotic cell cycle	DNA replication
<i>MCM3</i>	201555_at	-1.32	-1.84	-3.29	DNA replication, DNA replication initiation, G1/S transition of mitotic cell cycle	DNA replication, Cell cycle
<i>MCM5</i>	216237_s_at	-1.11	-1.67	-3.29	DNA replication, DNA replication initiation, G1/S transition of mitotic cell cycle	DNA replication, Cell cycle
<i>MYC</i>	202431_s_at	-2.19	-2.43	-2.96	cell proliferation, positive regulation of DNA endoreduplication	Cell cycle
<i>POLE3</i>	208828_at	-1.83	-2.46	-2.90	DNA replication	DNA replication
<i>ATR</i>	209902_at	-1.55	-2.02	-2.85	DNA replication	Cell cycle

<sup>a</sup> Fold change means the fluctuation in gene expression relative to the initial value (= 1.00) for each gene.

Table 6. Dome formation triggered by two cell cycle inhibitors, purvalanol A and NSC95397.

Chemical	Average dome number <sup>a</sup>	Fold increase <sup>b</sup>
MTA (mM)		
1	16.2**	5.4
Purvalanol A (nM)		
2.8	4.8	1.6
5.6	5.1	1.7
11.3	3.8	1.3
22.5	5.2	1.7
45	6.1	2.0
90	6.2	2.1
NSC95397 (μM)		
0.9	6.3	2.1
1.9	9.8**	3.3
3.8	5.4	1.8
7.5	6.2	2.1
15	10.4**	3.5
30	7.6*	2.5

<sup>a</sup> The value is the average dome number in the well of a 96-well plate of 12 tests.

<sup>b</sup> Fold increase means the relative increase in dome number over that of the mock treatment (= 1.0).

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

Table 7. Dome formation triggered by co-application of MTA with Purvalanol A or NSC95397.

Chemical	Average dome number <sup>a</sup>	Fold increase <sup>b</sup>	Group <sup>c</sup>
DMSO	4.1	1.0	A
1 mM MTA (1 mM)	19.6	4.8	C
Purvalanol A (45 nM)	5.7	1.4	A
NSC95397 (15 $\mu$ M)	15.5	3.7	B
Purvalanol A + MTA	18.4	4.5	C
NSC95397 + MTA	25.6	6.2	D

<sup>a</sup> The value is the average number of dome formed in a well of a 96-well plate (n = 31 or 32).

<sup>b</sup> Fold increase means the relative increase in dome number over that of the mock treatment (= 1.0).

<sup>c</sup> The same capital letter indicates no significant difference ( $P < 0.01$ , determined by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD test).

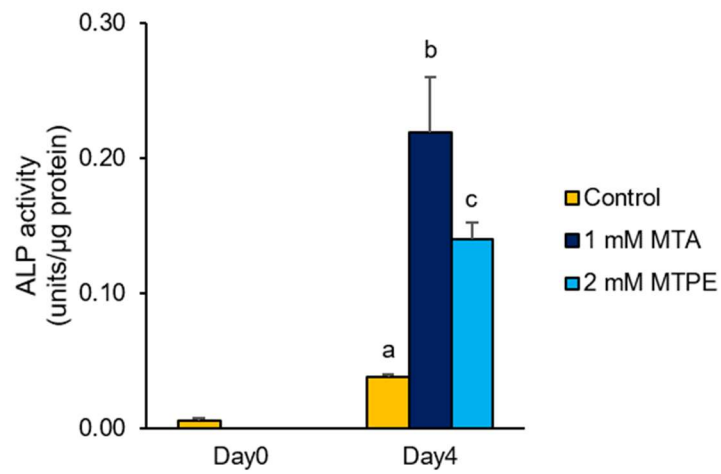


Fig. 1. Increased ALP activity by administration of MTA or MTPE in RCM-1 cells. RCM-1 cells ( $1 \times 10^5$ ) were seeded into 96-well plates and cultured to near confluency. The cells were then incubated for 4 days with 1 mM MTA or 2 mM MTPE. In a control experiment, the cells were incubated without the chemicals (0.1% acetonitrile). ALP activity was measured by a spectrophotometric method using LabAssay™ ALP kit. The values of each group show mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three experiments. Values with different letters are significantly different by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD test ( $P < 0.01$ ).

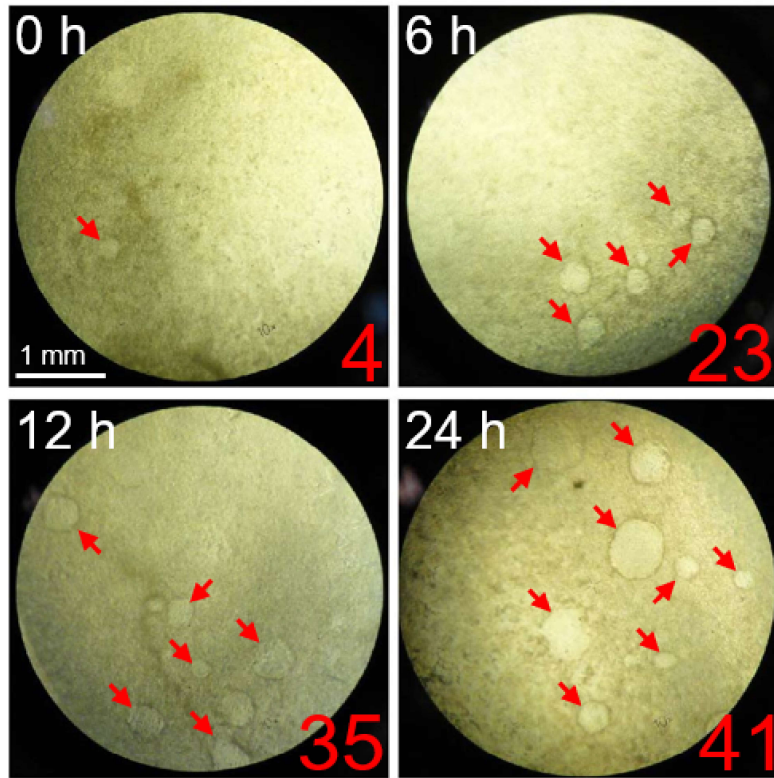


Fig. 2. MTA enhancement of dome formation in RCM-1 cell culture. MTA (1 mM) was applied to nearly confluent RCM-1 cells cultured in for the indicated hours (h), followed by additional culture in MTA-free medium until 48 h after MTA addition. Micrographs show the domes (arrows) formed in a 24-well plate with their numbers. Scale bar indicates 1 mm.

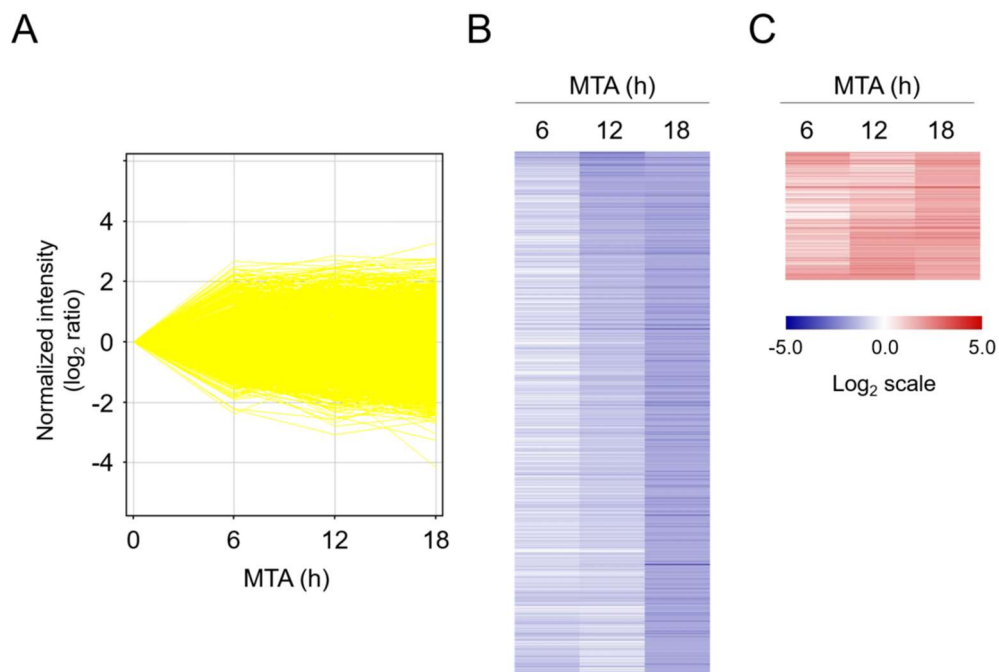


Fig. 3. Microarray analysis of gene expression profiles in MTA-treated RCM-1 cells. RCM-1 cells were treated with 1 mM MTA for the indicated times (h), and then cultured in medium without the chemical for up to 24 h. The total RNA isolated from the cells was then subjected to microarray analysis. The gene expression profiles are depicted in two different manners. In the line graph (A), each line indicates the expression patterns of individual genes that corresponded to 20,954 probes with fluorescence intensities over the threshold. Heatmaps (B and C) of genes expressed differentially upon MTA treatment are shown in the range from lower (blue) to higher expression (red), the levels of which reached less than one fourth ( $\log_2$  ratio  $< -1.5$ ) (B) or more than 4-fold ( $\log_2$  ratio  $> 1.5$ ) (C) at 18 h relative to the initial values.

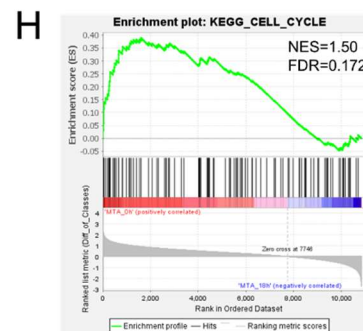
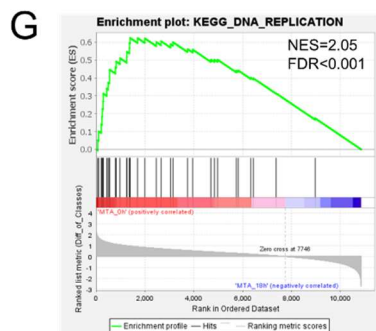
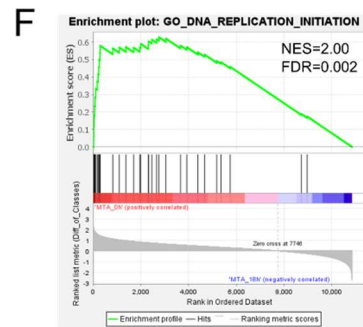
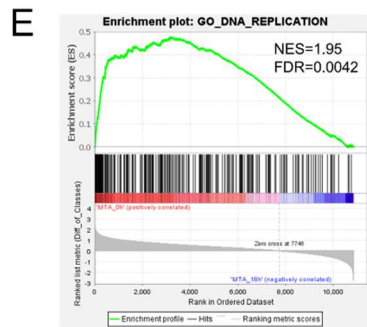
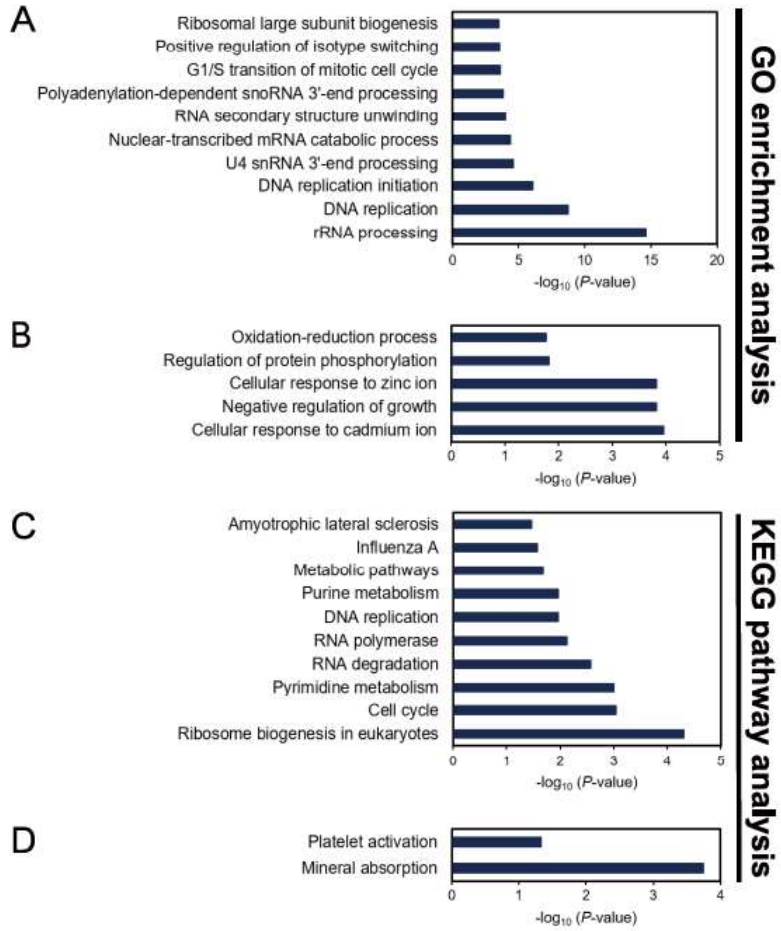


Fig. 4. Gene function analyses of differentially expressed genes in MTA-treated RCM-1 cells. GO enrichment analysis (A, B) and KEGG pathway analysis (C, D) were performed using DAVID on the 537 (565 probes) and 117 genes (138 probes) that showed significantly reduced ( $\log_2$  ratio  $< -1.5$ ) and increased ( $\log_2$  ratio  $> 1.5$ ) expression levels following MTA treatment, respectively. GSEA was further performed to confirm the enrichment of GO terms and KEGG pathways via DAVID. Graph (A) shows the top 10 GO terms among 64 enriched terms in the “biological process” class for the downregulated genes, whereas graph (B) shows all five GO terms for the upregulated genes. Graphs (C) and (D) show respectively all 10 enriched KEGG pathways for the downregulated genes and all two pathways for the upregulated genes. The GO terms and KEGG pathways with  $P$ -value  $< 0.05$  were listed in decreasing order of the  $P$ -value. Graphs (E, F, G, H) show GSEAs having the significant enrichment of the gene sets involved in DNA replication (E; GO), DNA replication initiation (F; GO), DNA replication (G; KEGG) and cell cycle (H; KEGG). NES, normalized enrichment score; FDR, false discovery rate.



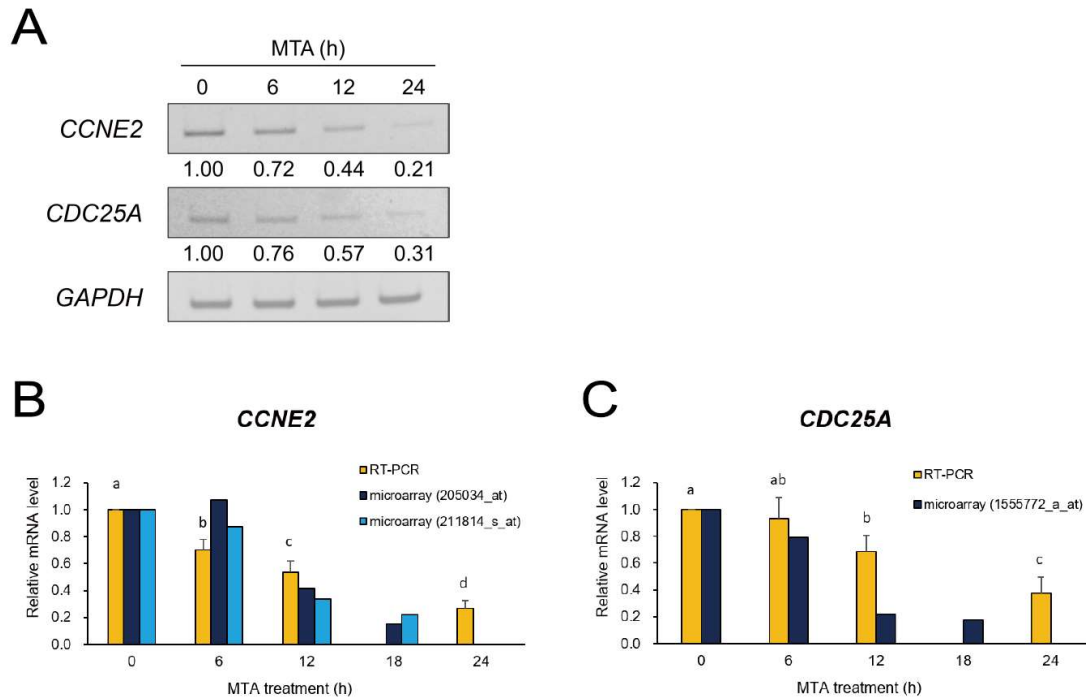


Fig. 5. RT-PCR verification of the MTA-mediated downregulation of *CCNE2* and *CDC25A*. RT-PCR was performed to confirm the reduction in *CCNE2* and *CDC25A* mRNA expression that was screened in the microarray analysis. Following MTA treatment for the indicated hours, the total RNA was subjected to RT-PCR. The electrophoretically separated PCR bands were stained with ethidium bromide, and representative gel images (A) of three replicates are shown. The numbers under the photographs show the fluorescence intensity of each band relative to an initial value (= 1.00), which was calculated after normalization against *GAPDH* as a reference. The bar graphs show the fluctuations of the *CCNE2* (B) and *CDC25A* (C) expression levels obtained independently by the RT-PCR and microarray analyses. The relative mRNA levels determined by RT-PCR represent mean  $\pm$  SD of three experiments. Values with different letters are significantly different by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer HSD test ( $P < 0.01$ ). The characters in parentheses indicate the probe set ID of the microarray.

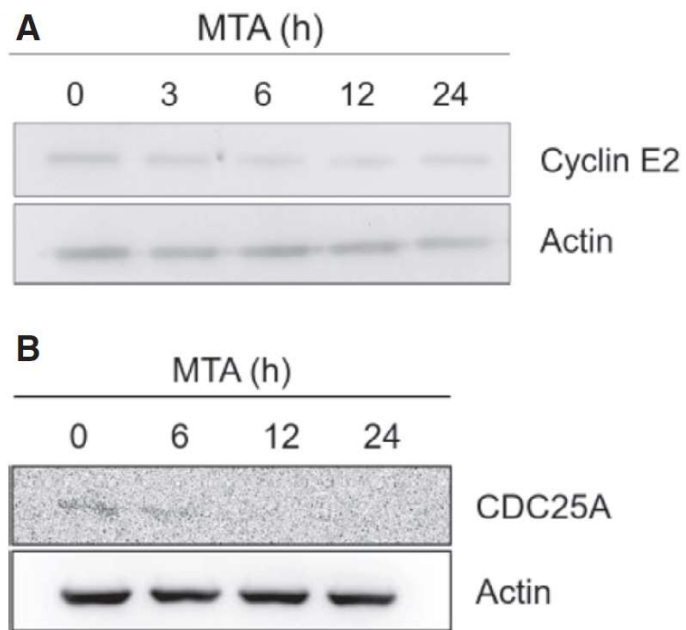


Fig. 6. MTA-induced reduction of the cyclin E2 and CDC25A proteins in RCM-1 cells. Following MTA treatment for the indicated hours, proteins extracted from the cells were applied to immunoblotting with the respective amounts of 3.75  $\mu\text{g}$  (per each lane) for detecting cyclin E2 (A) and 30  $\mu\text{g}$  for CDC25A (B). The photographs show the immunologically detected proteins together with actin as a reference.

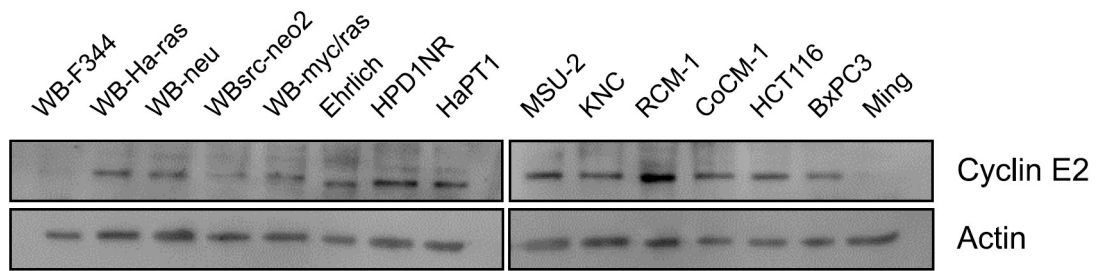


Fig. 7. Cyclin E2 accumulation in various mammalian cells. Immunoblotting was performed to examine cyclin E2 accumulation in different non-transformed and transformed mammalian cell lines. The following cell lines were used: WB-F344, WB-F344 rat liver epithelial cells; WB-Ha-ras, v-Ha-ras-transformed WB; WB-neu, neu-transformed WB; WBsrc-neo2, v-src-transformed WB; WB-myc/ras, myc/ras-transformed WB; Ehrlich, Ehrlich ascite tumor cells; HPD1NR, transplantable pancreatic ductal cancer cells; HaPT1, hamster pancreatic cancer cells; MSU-2, human foreskin fibroblast cells; KNC, human well-differentiated colon cancer cells; RCM-1, human well-differentiated rectal cancer cells; CoCM-1, human moderately differentiated colon cancer cells; HCT116, human poorly differentiated colon cancer cells; BxPC3 and Ming, human pancreatic cancer cells.

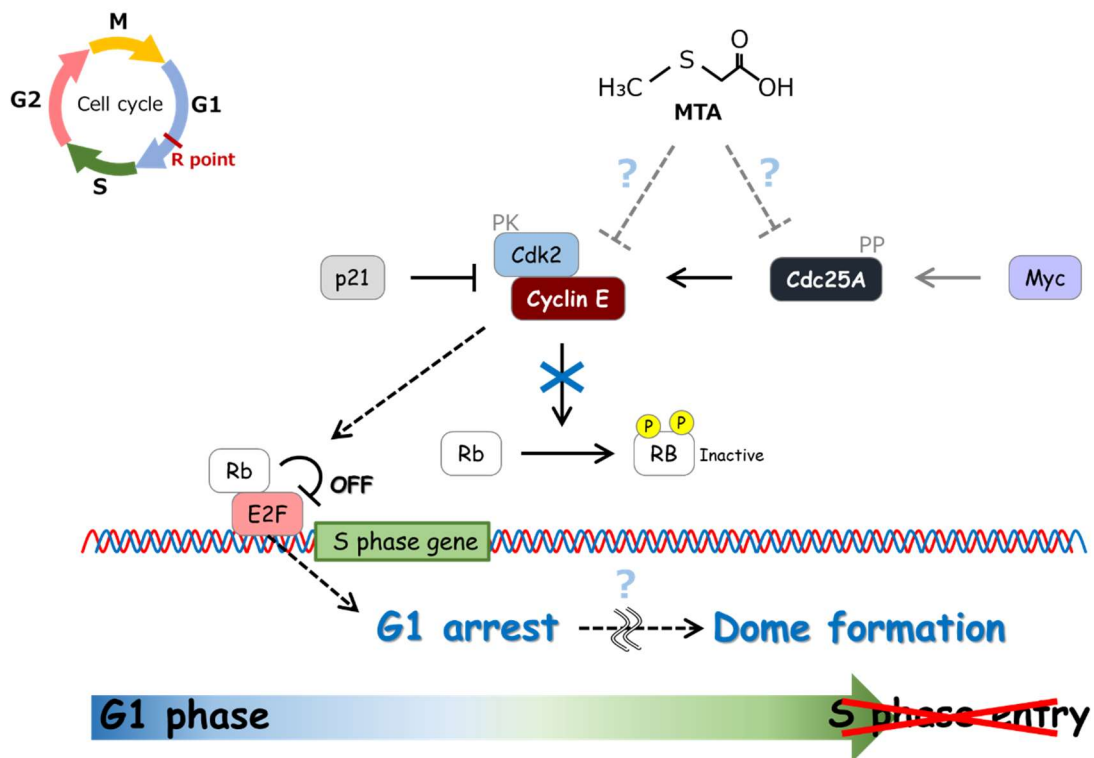


Fig. 8. Working model of MTA pathway toward dome formation in RCM-1 cells. Dashed arrows and dashes blunt ends mean the proposed signal flow from MTA. Arrows and blunt ends mean the positive and negative effects on the reaction, respectively. Arrows and blunt ends in black color indicate the regulation at protein (enzyme activity) level while they in gray indicate the regulation at transcription level. Abbreviations: p21, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; cdk2, cyclin-dependent kinase 2; Cdc25A, dual specificity phosphatase CDC25A; Myc, proto-oncogene Myc; Rb, RB transcriptional corepressor; E2F, transcription activator E2F

## 第 2 章 カツラウリに由来する含硫化合物誘導体・MTA が引き起こす RCM-1 の分化とアポトーシスの生理学的基盤

### 2.1. 緒言

絨毛様の構造であるドームは、頂端膜から基底外側膜への一方向性の液体輸送により、単層細胞と培養フラスコ表面との間に液体が局所的に蓄積することで生じる 3 次元的多細胞構造である (Rabito et al., 1980; Kirkland, 1985)。ドームは肺腺癌、乳腺癌、大腸腺癌などの腫瘍に由来する培養細胞や、腎臓上皮などの正常組織に由来する培養細胞によく観察される (Lever, 1979; Rizzino et al., 1982; Kirkland, 1985)。加えて、ドームは既知の分化誘導剤に応答して形成されることも報告されている (Lever, 1979; Augeron and Labois, 1984)。これまで、多くの細胞株においてドーム (あるいはドーム形成) は分化の形態学的マーカーとして利用されてきた (Rabito et al., 1980; Kirkland, 1985; Oberleithner et al., 1990; Su et al., 2007; Prasad et al., 2019)。実際に Caco-2 や HT-29 などの一般的な大腸癌細胞株においても、ドームは形態学的分化マーカーとして使われている (Lever, 1979; Fantini et al., 1986; Gum et al., 1987; Zucchi et al., 2002)。

ヒト大腸癌細胞株 RCM-1 は、高分化型直腸腺癌と診断された大腸癌組織から樹立された細胞株である (Kataoka et al., 1989)。また、RCM-1 細胞は培養を続けるだけで、ある頻度でドームを形成することが知られている (Nakamura et al., 2008)。筆者らのグループは RCM-1 細胞で形成されるドーム数の増加を指標として、カツラウリから香気性化合物である MTPE と MTAE を、スペアミント (*Mentha spicata*) からモノテルペンであるピペリテノンオキシド (piperitenone oxide, PO) を単離してきた (Nakamura et al., 2008; Nakamura et al., 2010; Nakamura et al., 2014)。さらに、第 1 章で記述したように、MTPE や MTAE 類似化合

物（37 種）の中から最も強いドーム誘導能を持ち、且つ分子量が最も小さな含硫化合物、MTA の同定に成功した。筆者らは、長年 RCM-1 のドームを分化マーカーと考えて利用してきたわけであるが、MTPE や MTA を投与して長時間（96 時間）培養すると、ドームが形成されることと並行して、生化学的分化マーカーである ALP 活性が増加する（第 1 章; Nakamura et al., 2008）こと以外、ドームを信頼できるマーカーとして利用するための証拠をもたない。

本章では、まず RCM-1 細胞におけるドーム形成を信頼できる形態学的分化マーカーとして位置付けるために、MTA がドーム形成を誘導する条件下で種々の分化マーカーの挙動を調査した。その結果、RCM-1 で形成されるドームも Caco-2 や HT-29 の場合と同じく形態的分化マーカーとして利用可能であることが明らかになった。また、本系を利用して、MTA が RCM-1 細胞の分化とアポトーシスの両方を誘導できること、MTA による分化誘導は BA の場合と似ていることを明らかにした。さらに、既知の分化誘導剤とアポトーシス誘導剤を用いた薬理的解析により、分化とアポトーシスの関係が極めて近いことが分かった。

## 2.2. 材料及び方法

### 2.2.1. 試薬

本研究で用いた 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2, Calbiochem-Novabiochem Corp., CA, USA)、5-fluorouracil (5-FU) 及び rosiglitazone (ROSI, Tokyo Chemical Industry)、actinomycin D (AD, AdipoGen Life Sciences Inc., CA, USA) を 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) に、BA (Tokyo Chemical Industry) を DMSO または水に溶解した。その他の試薬の使用は、第 1 章の材料及び方法 (1.2) に準じた。

### 2.2.2. 細胞培養

本研究で使用したヒト大腸癌細胞株 RCM-1 の細胞培養は、基本的に第 1 章の材料と方法 (1.2) で記述した方法に従って行った。但し、実験目的ごとに少し条件を変えた。例えば、トリパンブルー排除法及びイムノブロット解析に供試する際には、RCM-1 細胞を 24 穴プレートに 1 穴当たり  $5.8 \times 10^5$  播種し、その他の実験に供試する際には 96 穴プレートに 1 穴当たり  $1.0 \times 10^5$  播種し、80%コンフルエントになるまで培養した。その後、実験ごとに定めた濃度と時間で MTA 処理を行った。

### 2.2.3. ドーム形成検定法

ドーム形態の観察及びドーム数の測定は、第 1 章の材料及び方法 (1.2) に準じて行った。ドーム面積の計測は、ImageJ ソフトウェア (<https://imagej.nih.gov/ij/>, National Institutes of Health, MD, USA) を用いて行った。

#### 2.2.4. ALP 活性

ALP 活性の測定は第 1 章の材料及び方法 (1.2) に準じて行った。

#### 2.2.5. CCK-8 検定

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan)

を用いて RCM-1 細胞の生存率を生化学的に評価した。簡単に手順を説明すると、まず、細胞培養液 100–200  $\mu\text{L}$  あたり 10  $\mu\text{L}$  の CCK-8 溶液を添加し、37  $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間保温した。続いて、マイクロプレートリーダー Mithras LB 940 を用いて、波長 450 nm の光を照射した際の反応液の吸光度を測定した。

#### 2.2.6. トリパンプルー排除法

トリパンプルー排除法により RCM-1 細胞の生存率を細胞化学的に評価した。簡単に手順を説明すると、まず、0.25%トリプシン処理を行い、MTA 処理した RCM-1 細胞をプレート表面から剥離して回収した。続いて、回収した細胞懸濁液と 0.4%トリパンプルー溶液を 1:4 で混和し、3 分間室温で保温した。最後に、血球計算盤 (Bürker-Türk) を用いて、顕微鏡下で染色細胞 (死細胞) 数と未染色細胞 (生細胞) 数を計測した。

#### 2.2.7. イムノブロット解析

イムノブロット解析は、基本的に第 1 章の材料及び方法 (1.2) に準じて行った。

1 次抗体には、anti-cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP; 1:1,000, #5625, Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA)、anti-dipeptidyl peptidase 4 (DPP4; 1:1,000, #67138, Cell Signaling Technology)、anti-Krüppel-like factor 4 (KLF4; 1:500, #12173, Cell Signaling Technology)、anti-



villin (1:500, 66096-1-Ig, Proteintech Group, Inc., IL, USA)、anti- $\beta$ -actin (1:10,000, 66009-1-Ig, Proteintech)を用いた。一方、2次抗体には horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (goat anti-rabbit IgG, 1:3,000, #7074, Cell Signaling Technology; sheep anti-mouse IgG, 1:5,000, NA931, GE Healthcare)を用いた。タンパク質のバンドは、WSE-7120 EzWestLumi plus solution (ATTO Co., Tokyo, Japan) と ケミルミネセンス CCD イメージングシステム (Ez-Capture MG; ATTO) を用いて検出した。

#### 2.2.8. DNA 断片化

ヒストンと結合した DNA の断片化の検定は、Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> キット (Cat no. 11774425001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて行った。供給元の指示書にしたがって反応を行った後、マイクロプレートリーダーMithras LB 940 を用いて、反応液の吸光度 (テスト波長 405 nm, リファレンス波長 490 nm) を測定した。続いて、吸光度の減算値 (=テスト波長の値-リファレンス波長の値) を算出した。得られた減算値は、サンプルに含まれる総タンパク質量で補正した。

#### 2.2.9. カスパーゼ 3/7 蛍光検定

カスパーゼ 3/7 活性の測定は Caspase-3/7 Fluorescence Assay Kit (Cat no. 10009135, Cayman Chemical Co., MI, USA) を用いて行った。供給元の指示書にしたがって反応を行った後、マイクロプレートリーダーInfinite 200 PRO (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland) を用いて、蛍光値 (励起波長 485 nm, 蛍光波長 535 nm) を測定した。得られた蛍光値は、サンプルに含まれる総タンパク質量で補正した。

#### 2.2.10. 統計解析

図表で用いた数値データは、各実験で得られた値を平均値と標準偏差で表している。統計学的な有意差は、一元配置分散分析後、Dunnett 検定もしくは Tukey-Kramer 検定を行い比較した ( $P < 0.05$ )。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. RCM-1 細胞のドーム形成に対する MTA の濃度及び時間依存性

筆者は、MTA が RCM-1 細胞のドーム形成を強く促進することを報告した（第 1 章）。しかしながら、MTA によるドーム形成誘導の生理学的な特性やメカニズムは不明のままである。そこで、筆者は、ドーム形成をもたらす MTA の濃度や処理時間を生理学的に調査した。加えて、既知の腸分化マーカーに対する MTA の影響を調べた。Fig. 9A に示すように、MTA を RCM-1 細胞に投与し、培養 48 時間目に計測したところ、ドーム数は MTA 濃度の上昇に伴って徐々に増加し、1 mM でピークを迎え、その後減少した。そして、4 mM の MTA 処理をした際には、全くドームは観察されなくなった。続いて、MTA をさらに長く処理した際（72 と 96 時間）のドーム数を計測した（Fig. 9B）。1 mM と 2 mM の MTA で処理した時、ドーム数は 48 時間目に比べ、72 時間でも 96 時間でも増加していた。しかし、96 時間目では、72 時間目よりも僅かにドーム数が減少する傾向が見られた。また、2 mM に比べて、1 mM の MTA を処理した時の方が常にドーム数は多かった。

MTA を RCM-1 細胞に長時間（96 時間）処理すると、生化学的な分化マーカーとして知られる ALP 活性が増加することが分かっている（第 1 章）。そこで、ALP 活性と MTA が誘導するドーム形成との関係を検証するため、MTA を投与後 0、24、48、72、96 時間目に ALP 活性を測定した。Fig. 9C に示すように、ALP 活性は MTA の有無にかかわらず、培養時間の経過とともに増加した。しかしながら、ドームの形成が常に観察される MTA 投与後 48、72、96 時間目では、未処理細胞に比べて MTA 処理細胞で ALP 活性が常に高かった。また、4 mM の処理と比べて、1 mM と 2 mM の MTA で処理された細胞では、ALP 活性が有意に高かった（Fig. 9C）。前述のように、1 mM と 2 mM の MTA が顕著にドーム形成を誘

導するのに対して、4 mM の MTA は全くドーム形成を誘導しなかった。このことから、ALP 活性の増加は MTA によるドーム形成の誘導と密接に関連すると考えられた。加えて、1 mM の MTA が 2 mM よりも多くのドームの形成を誘導したにも関わらず、2 mM の MTA は 1 mM よりも ALP 活性を強く誘導した。興味深いことに、2 mM MTA が誘導するドームの平均面積は、1 mM MTA の場合と比較して大きいことが分かった (Fig. 9D)。

続いて、MTA が腸分化に関する既知の分子マーカー DPP4、villin、及び KLF4 のタンパク質量に影響するか評価するためイムノブロット解析を行った (Dudouet et al., 1987; Coudrier et al., 1988; Darmoul et al., 1992; Imai et al., 1992; Katz et al., 2002; Flandez et al., 2008; Hu et al., 2011)。Fig. 9E に示すように、MTA 処理細胞では、処理後 48 時間と 72 時間目に上記 3 つのマーカータンパク質量の有意な増加がみられた。一方、MTA 未処理細胞では、ほとんど増加がみられなかった。イムノブロットの結果は、ALP 活性の上昇 (Fig. 9C) と共に、MTA が未分化状態にある RCM-1 の細胞塊をドームへと分化誘導させたことを示唆する。

### 2.3.2. RCM-1 細胞のドーム形成に対する MTA と BA の協調的な影響

BA 及び PPAR $\gamma$  アゴニストは、様々な細胞株でドーム形成とアポトーシスを促進することが報告されている (Gum et al., 1987; Heerd et al., 1994; Litvak et al., 1998; Shimada et al., 2002; Buda et al., 2003; Orchel et al., 2005; Cerbone et al., 2007; Shin et al., 2009; Tsuda et al., 2010)。第 1 章で記述した通り、筆者らの従前の研究では BA 処理した RCM-1 細胞でドーム数の増加は観察されなかった。しかし、今回、筆者が再調査したところ、BA が非常に限られた濃度域でドーム形成を促進することが明らかになった (Fig. 10A, 10B)。0-8 mM の BA を RCM-1 細胞に投与したところ、ドーム数の増加は 0.1 mM でわずかに観察されたことを

除き、ほとんど見られなかった (Fig. 10A)。得られた結果は、従前の結果と矛盾することはなかった。また、BA は 1 mM 以上の濃度でドーム形成を阻害した。実際に、BA を 2 mM 以上投与すると RCM-1 細胞の細胞形態は異常になり、増殖もコンフルエントまで達しなかった (Fig. 14A)。さらに、アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ 3/7 活性が顕著に増加したことから (Fig. 15)、高濃度の BA を処理した RCM-1 細胞ではアポトーシスが起きたと考えられた。0.1 mM の BA を処理した細胞でわずかなドーム数の増加が観察されたため、濃度範囲を狭め 0–250  $\mu$ M の BA を供試した (Fig. 10B)。50  $\mu$ M 及び 100  $\mu$ M BA を処理した細胞のドーム数はわずかに増加していたが、未処理細胞と比べて統計学的有意差は認められなかった。一方、250  $\mu$ M の BA 処理はドーム数を未処理細胞の 4.6 倍に増加させた。このことから、前述のように BA は非常に限られた濃度範囲 (250  $\mu$ M 前後) でドーム形成を促進すると結論付けた。

PPAR $\gamma$  アゴニストである 15d-PGJ2 と ROSI は、試験に用いた濃度範囲 (15d-PGJ2 : 0–20  $\mu$ M、ROSI : 0–300  $\mu$ M) でドームの形成を促進しなかった (Fig. 10C, 10D)。興味深いことに、15d-PGJ2 は 1  $\mu$ M 以上で、ROSI は 0.1  $\mu$ M 以上でドーム形成を顕著に抑制した。RCM-1 細胞の増殖は 15d-PGJ2 の場合 50  $\mu$ M で、ROSI の場合 200  $\mu$ M 及び 300  $\mu$ M で遅れはじめ、ともにコンフルエントに達しなかった (Fig. 14B, 14C)。

次に、RCM-1 細胞のドーム形成に対する MTA と BA の関連性を明らかにするため、MTA (0.1、0.25、1 mM) と BA (0.1、0.25 mM) を同時投与した。Fig. 10E で示すように、0.1 mM BA と 0.1 mM または 0.25 mM MTA の同時投与は、それぞれの単独処理と比較してドーム数を相加的に増加させた。一方で、0.25 mM BA と 0.1 mM または 0.25 mM MTA の同時投与では相加的な効果は見られなかった。さらに、0.25 mM BA は 1 mM MTA によって促進されるドーム形成を阻害した。このときドーム数は、両薬剤を処理していない RCM-

1 細胞でみられる数より多かったが、MTA と BA をそれぞれ単独で処理した細胞で見られるドーム数よりも少なかった。

### 2.3.3. 高濃度 MTA によって誘導される RCM-1 細胞のアポトーシス

MTA が RCM-1 細胞の生存率や死に影響するか否か、またどの程度影響するかは不明のままである。RCM-1 の細胞集団中の生細胞の割合を推定するために CCK-8 検定を行った。Fig. 11A に示したように、MTA の濃度が増加するにつれて生細胞の割合は減少した。生細胞の割合は、MTA を 0.5 mM 以下の濃度で処理した場合にはほとんど変化しなかったが、1 mM と 2 mM の MTA で処理した時には低下していた。また、4 mM で処理したとき、生細胞の割合は未処理細胞の約 60%まで低下し、その際、ドーム形成は全く起きなかった (Fig. 9A)。次に、トリパンブルー排除法を行い、死細胞数を推定した (Fig. 11B)。興味深いことに、MTA 非存在下においても RCM-1 細胞の約 30%はトリパンブルーによって染色された。このことは、RCM-1 細胞の培養 (48 時間) を続けるだけで、自然に細胞死が生じていることを示唆する。一方、MTA 存在下では、死細胞の割合は MTA の濃度が増加するにつれて徐々に増加した。そして、MTA 濃度が 4 mM に達すると、死細胞の割合は約 50%にまで上昇した。これらの結果は、MTA がドーム形成を促進するだけでなく細胞生存活性を抑制し、最終的に細胞死に至らしめることを示す。また、MTA を 4 mM 以上で処理した際には、RCM-1 細胞の細胞形態の異常が見られた (Fig. 14D)。

MTA によって引き起こされる RCM-1 の細胞死にアポトーシス経路が関与するかどうか検証するため、最初に MTA 処理した細胞を用いて DNA の断片化を調査した (Fig. 12A)。常にドームが形成される 1 mM 及び 2 mM MTA を投与した時 (Fig. 9A, 9B)、未処理細胞と比較して断片化した DNA 量はわずかに増加していた。一方、4 mM 以上の MTA を処

理した細胞では、未処理細胞と比べて、断片化した DNA 量は 3 倍に達していた。次に、カスパーゼ 3/7 蛍光検定法を用いて MTA 処理した細胞のカスパーゼ活性を測定した (Fig. 12B)。カスパーゼ 3/7 活性は、DNA の断片化の場合と同様に MTA によって濃度依存的に増加した。カスパーゼ 3/7 活性は、1 mM の MTA を投与した RCM-1 細胞でわずかに誘導され、MTA 濃度の増加 (0–6 mM) に伴って増加し続けた。MTA による RCM-1 細胞の細胞死がアポトーシス経路を介していることをさらに裏付けるため、イムノブロット解析によりアポトーシスのマーカーとして知られる切断 PARP タンパク質の蓄積量を調べた。Fig. 12C に示すように、切断 PARP タンパク質は 1 mM の MTA を処理した細胞でわずかに検出された。そして、切断 PARP タンパク質レベルは MTA 濃度に依存して増加し、4–6 mM の MTA を処理した細胞で最大となった。以上の結果は、MTA によって引き起こされる RCM-1 細胞の細胞死がアポトーシス経路を介していることを強く支持する。

#### 2.3.4. RCM-1 細胞のドーム形成に対するアポトーシス誘導剤 AD と 5-FU の影響

MTA が低濃度 (0.1–2 mM) で RCM-1 細胞のドーム形成を誘導し、高濃度 ( $\geq 4$  mM) ではアポトーシス経路を介して細胞死をもたらすことが分かった。そこで、既知のアポトーシス誘導剤、AD と 5-FU のドーム形成に対する影響を調べた。未処理と比べて、AD は 0.001  $\mu$ M 及び 0.01  $\mu$ M でドーム数を増加させた。しかし、0.1  $\mu$ M 以上の濃度ではドームの形成を完全に抑制した (Fig. 13A)。0.1  $\mu$ M 以上の AD を処理した際には、RCM-1 細胞の増殖はコントロールに達することはなかった (Fig. 14E)。また、期待通り、AD (1  $\mu$ M) を処理した RCM-1 細胞では、カスパーゼ 3/7 活性が上昇していた (Fig. 15)。一方、5-FU は限られた濃度範囲 (1–50  $\mu$ M) でドーム数を増加させた。特に 10  $\mu$ M で顕著なドーム数の増加がみられた (Fig. 13B)。しかし、5-FU によるドーム形成誘導能は AD と比べて低かった。また、

AD とは対照的に 5-FU は RCM-1 細胞の増殖 ( $\leq 200 \mu\text{M}$ ) やカスパーゼ 3/7 活性 ( $200 \mu\text{M}$ ) に対して大きな影響を与えなかった (Fig. 14E, 15)。



## 2.4. 考察

RCM-1 細胞で形成されるドーム数の増加を指標として、カツラウリ (*C. melo* var. *conomon*) から MTPE や MTAE、スペアミント (*M. spicata*) から PO などの生理活性物質が単離されてきた (Nakamura et al., 2008; Nakamura et al., 2010; Nakamura et al., 2014)。さらに、37 種の MTPE と MTAE 類似化合物の中で、MTA は RCM-1 細胞に対して最も強いドーム形成誘導能を持つことが明らかになった (第 1 章)。ドームは、様々な細胞株において形態学的分化マーカーとして使われてきた (Lever, 1979; Fantini et al., 1986; Gum et al., 1987; Zucchi et al., 2002) が、RCM-1 細胞で形成されるドームはまだ信頼できるマーカーとしては認められていない。唯一の証拠は、MTPE や MTA を長時間 ( $\geq 96$  時間) 処理した RCM-1 細胞で、ALP 活性が増加したことである (第 1 章; Nakamura et al., 2008)。したがって、ドームが RCM-1 細胞の分化と関連があるか否か、また、どの程度分化と関係するかという点を明らかにすることは大変興味深い。筆者は、MTA (0.125–1 mM) が濃度及び時間依存的に RCM-1 細胞のドーム形成を促進し、同様に ALP 活性も増加させることを明らかにした (Fig. 9A–9C)。さらに、4 mM の MTA は、全く逆に作用すること、すなわちドーム形成を阻害し、ALP 活性を低下させることを明らかにした。ドーム数の増加が ALP 活性の上昇と相関するという結果は RCM-1 細胞でみられるドームやドーム形成が形態学的分化マーカーと見做すことができることを示唆する。2 mM の MTA を投与した RCM-1 細胞では、1 mM を投与した際と比べてドーム数の増加が少なかったにも関わらず、ALP 活性の上昇はより大きかった (Fig. 9A–9C)。MTA により誘導されたドームの面積は 1 mM と比べて 2 mM MTA の方が大きかったことから (Fig. 9D)、MTA による ALP 活性の上昇は形成されるドーム数に加えてドーム面積を反映していると考えられた。

イムノブロット解析により、腸分化に関する既知の分子マーカー3種、DPP4 と villin、KLF4 のタンパク質量が 1 mM の MTA 処理によって増加すること、そして、これらの蓄積時期が MTA 投与後 48 時間から 72 時間目、すなわち、ドームが形成される時期と一致することが明らかになった (Fig. 9E)。DPP4 と villin は、それぞれ、セリンプロテアーゼと微絨毛を裏打ちする細胞骨格タンパク質であり、HT-29 などの大腸癌細胞株でみられる刷子縁に存在することが知られている (Coudrier et al., 1988; Darmoul et al., 1992)。また、MTA は ALP 活性を上昇させた (Fig. 9C) が、ALP は正常な腸組織の刷子縁に蓄積することが報告されている (Domar et al., 1992)。これらの結果から、MTA は RCM-1 大腸癌細胞株の細胞を分化させ、微絨毛を有する腸細胞様の細胞に変えたと推測された。一方、KLF4 は腸の杯細胞の終末分化に必要なジンクフィンガー転写因子である (Katz et al., 2002)。したがって、MTA は RCM-1 細胞を数種類の細胞 (腸細胞や杯細胞など) に分化させる能力を持つのかもしれない。以上の結果は、RCM-1 細胞で形成されるドーム (及びドーム形成) が、長く研究に利用されてきた HT-29 と Caco-2 などの大腸癌細胞株でみられるドーム (Fantini et al., 1986; Mariadason et al., 2000) と同様に、信頼できる形態的分化マーカーとして利用可能であることを強く支持する。また、MTA が RCM-1 細胞の分化を誘導することが裏付けられた。加えて、カツラウリに由来する MTPE や MTAE も、スペアミントに由来する PO も RCM-1 細胞に対するドーム形成誘導能を持つので、MTA と同様に RCM-1 細胞に対する分化誘導剤であることが明らかとなった。

短鎖脂肪酸 (C4) である BA は、ヒトの生体内では主に食物繊維の腸内細菌による発酵で生じ (Mortensen et al., 1988)、腸内に数ミリモル濃度で存在すると云われている (Cummings, 1981)。2 mM の BA 処理は LS174T や Caco-2 などの大腸癌細胞株でドーム形成を促進すると報告されている (Gum et al., 1987; Mariadason et al., 2000)。しかし、第 1 章

で記述した通り、他の大腸癌細胞株に対して分化誘導する濃度（数 mM）の BA を処理しても RCM-1 細胞でドーム形成は見られなかった（Table 3）。しかし、筆者が再度調査したところ、BA は 100 から 250  $\mu$ M の低濃度かつ狭い濃度範囲でドームを誘導することが明らかになった（Fig. 10B）。この結果は、LS174T や Caco-2 などの大腸癌細胞株と比べて RCM-1 細胞株が BA に対して感受性が高いことを示している。MTA は BA とよく似た構造を持ち、唯一の違いは 3 位の原子が MTA では硫黄（S）、BA では炭素（C）であることである。0.125 から 2 mM の MTA で RCM-1 細胞を処理するとドーム数が増加した（Fig. 9A）。さらに、MTA と BA の同時投与は低濃度同士（0.1 mM BA と 0.1 または 0.25 mM MTA）でドーム形成に対して相加効果を示した（Fig. 10E）。これらの結果は MTA と BA が少なくとも部分的に同一もしくは類似の経路を介して RCM-1 細胞のドーム形成をもたらすことを示唆する。MTA は BA よりも毒性が低く、RCM-1 細胞株に対して広範囲の濃度で分化誘導能を示したことから、RCM-1 と性質が似た幾つかの大腸癌細胞種の分化を誘導することに適していると考えられた（Fig. 9, 10B）。PPAR $\gamma$  アゴニストである 15d-PGJ2 と ROSI は、Caco-2 細胞のドーム形成を促進することが報告されている（Cerbone et al., 2007）。しかし、PPAR $\gamma$  アゴニストは RCM-1 細胞のドーム形成を誘導しなかった。このことから、RCM-1 細胞株では PPAR $\gamma$  を介した分化経路が妨げられている、もしくは失われていると考えられた（Fig. 10C, 10D）。以上の結果をまとめると、分化誘導剤の効果や機構を研究するためには、用いる分化誘導剤（化合物）とがん細胞株の組み合わせが重要であると考えられた。

BA、15d-PGJ2、ROSI など分化誘導剤の一部は大腸癌細胞株に対してアポトーシスを誘導することが報告されている（Orchel et al., 2005; Cerbone et al., 2007; Shin et al., 2009）。MTA を 2.5 mM 以上の濃度で RCM-1 細胞に投与すると、細胞は形態異常を示すようになり、4 mM の MTA 処理ではドーム形成が阻害され、ALP 活性は低下した（Fig. 9A–9C, 14D）。

細胞生存率検定とアポトーシスマーカー解析は、MTA が 2 mM 以上で RCM-1 細胞のアポトーシスを誘導することを強く示唆する (Fig. 11, 12)。したがって、MTA は RCM-1 細胞株に対して分化とアポトーシスの両プロセスを誘導する能力を持つと考えられる。このことは、BA が HT-29 株や SW620 株に対して (Heerdt et al., 1994; Orchel et al., 2005)、また、15d-PGJ2 が HT-29 株や Caco-2 株に対して (Shimada et al., 2002; Cerbone et al., 2007) 分化とアポトーシスを誘導できるとよく似ている。また、BA の場合 2 mM 以上で、15d-PGJ2 の場合 50  $\mu$ M で、ROSI の場合 200  $\mu$ M 以上で RCM-1 細胞の増殖を遅延させた (Fig. 14A–14C)。さらに、BA と 15d-PGJ2 は RCM-1 細胞のカスパーゼ 3/7 活性を増加させた (Fig. 15)。これらの結果から、MTA のみならず BA 及び 15d-PGJ2 も RCM-1 細胞に対してアポトーシスを誘導したと考えられた。上記とは裏表の関係になるが、アポトーシス誘導剤として知られる AD (1  $\mu$ M 及び 10  $\mu$ M) と 5-FU (10  $\mu$ M) は RCM-1 細胞のドーム形成を促進した (Fig. 13)。以上の結果から、分化とアポトーシスの両プロセスは互いに密接に関連していると考えられた。これら 2 つのプロセスを繋ぐメカニズムは現在のところ不明であるが、上記の薬剤によって引き起こされる分化とアポトーシスは類似の経路を介して達成されるのかもしれない。

MTA による分化誘導とアポトーシス誘導の分子メカニズムはいまだ不明のままである。上述のように、構造的によく似た MTA と BA は RCM-1 細胞の分化とアポトーシスを濃度依存的に誘導した。このことから、MTA と BA は同一あるいは類似の経路を介して RCM-1 の分化とアポトーシスを引き起こしたとも考えうる。カツラウリ由来の香気成分の誘導体である MTA は摂取されない限り、ヒトの腸内には存在しないと想像される。一方、BA は腸ルーメンに数 mM オーダーで存在する。したがって、常に BA に晒されている腸の上皮細胞は分化やアポトーシスをもたらす BA 経路を進化させており、MTA がこういった

既存の BA 経路を利用（ハイジャック）したとも考えられる（Hamer et al., 2008）。

MTA が分化とアポトーシスを誘導することを示したのは筆者らの研究が初めてである。対照的に BA に関する研究は、これまで数多く為されてきたため、分化及びアポトーシスに関する広範な知識が蓄積されている。事実、BA は様々な細胞内プロセス、例えば、細胞周期の制御（Heerdt et al., 1997; Litvak et al., 1998）、ヒストン脱アセチル化酵素阻害を介したエピジェネティック制御（Davie, 2003）、シグナル伝達制御（Bordonaro et al., 2002; Orchel et al., 2005）、酸化制御（Domokos et al., 2010）に関与することが分かっている。したがって、MTA 経路の解明を効率的に進めるための現実的な方法の一つは、MTA が BA 関連プロセスに影響を与えるかどうか、またどの程度影響するかを明らかにすることである。いずれにせよ、MTA による分化誘導やアポトーシス誘導のメカニズムを明らかにすること、すなわち MTA 経路の解明は MTA を用いた癌の新しい治療法を開発するために不可欠と考えられる。

## 2.5. 图表

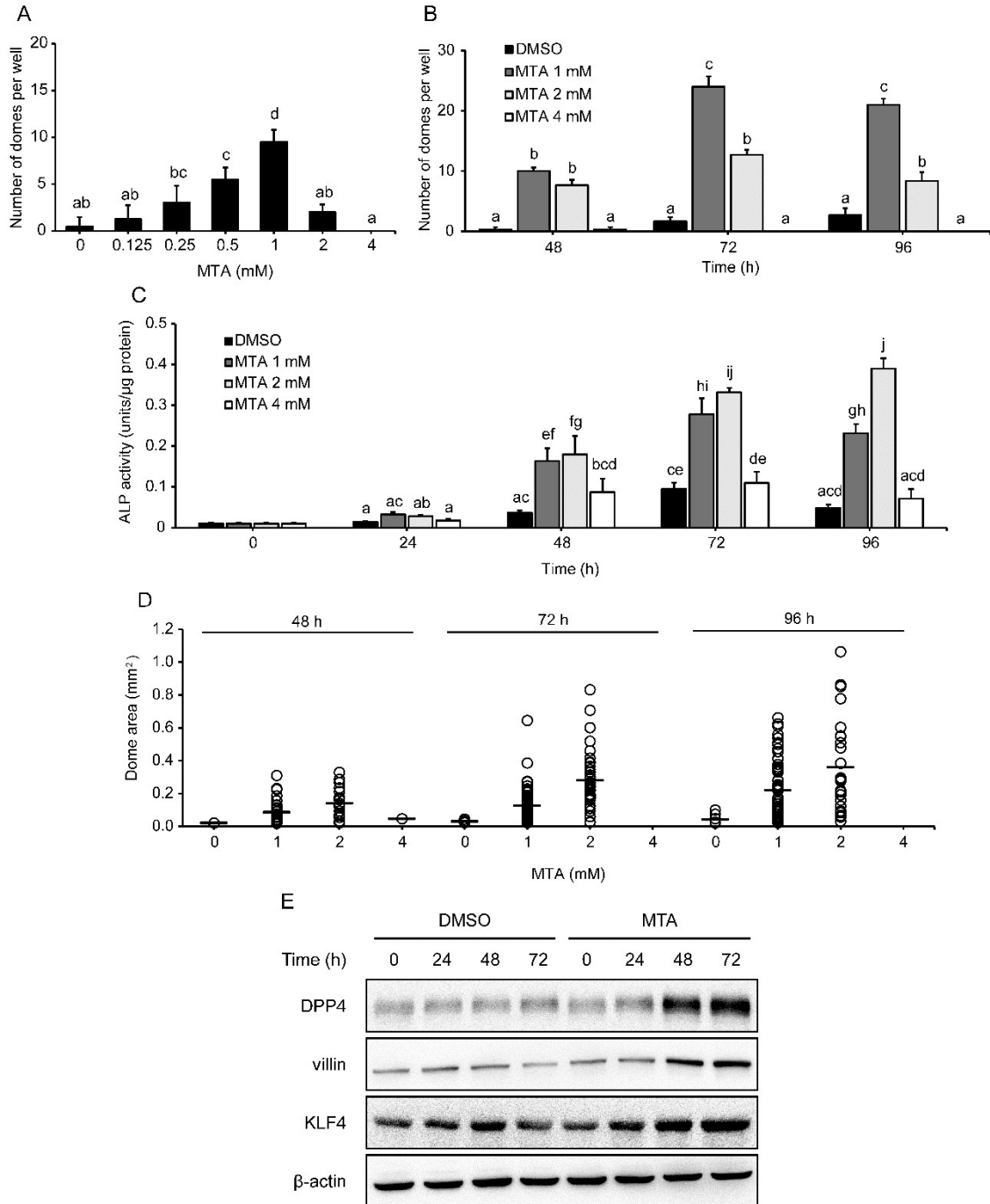


Fig. 9. Domes generated in the RCM-1 cell culture as markers of morphological differentiation. RCM-1 cells were cultured with different doses of MTA for specified durations. (A and B) The number of domes formed during the early (A; 48 h) and late (B; 48, 72, and 96 h) stages of MTA treatment. (C) ALP activity fluctuated with MTA treatment. (D) Surface area of the dome affected by MTA. The horizontal bars show the mean area of the individual domes formed in the same treatment. (E) Three differentiation marker proteins, DPP4, villin, and KLF4, accumulated in the presence of 1 mM MTA. Immunoblotting was performed as described in the Materials and Methods, and  $\beta$ -actin was used as a control for equal loading of the proteins. The data are presented as mean (S.D.) ( $n \geq 3$ ). Alphabetical letters indicate statistically significant differences among the MTA treatments.

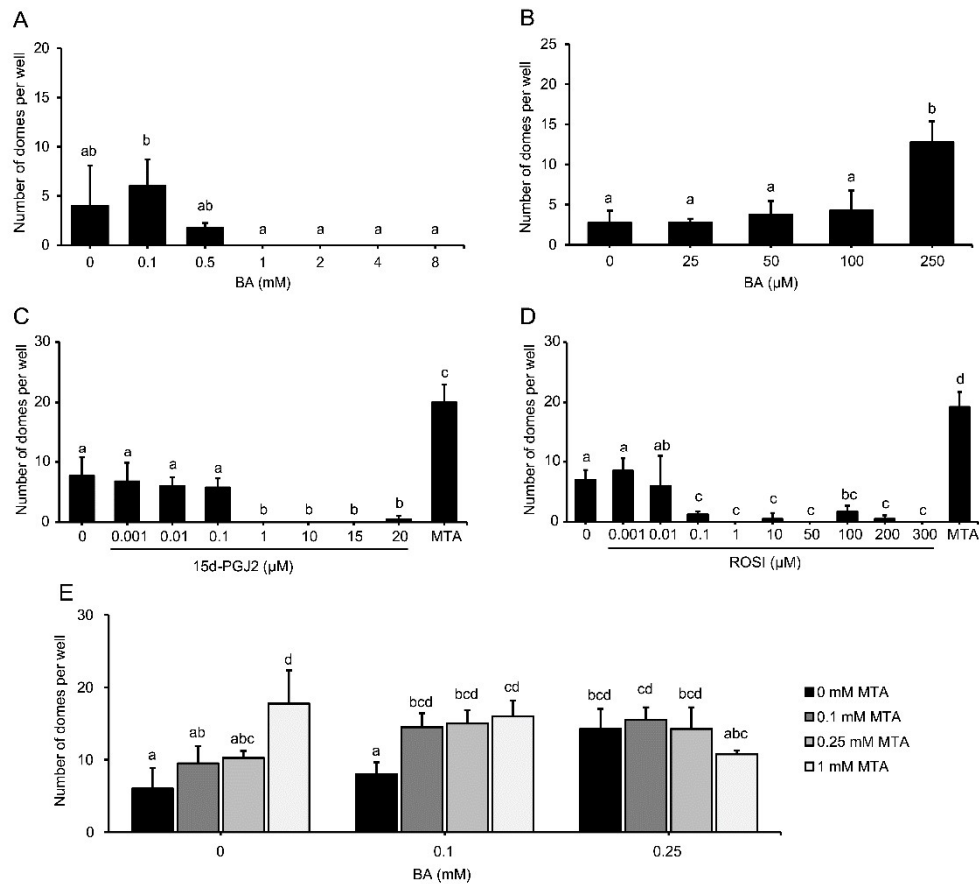


Fig. 10. Effect of BA and PPAR $\gamma$  agonists on dome formation in the RCM-1 cell culture and the relationship between BA and MTA. RCM-1 cells were incubated for 48 h with one of the three differentiation inducers: BA and PPAR $\gamma$  agonists (15d-PGJ2 and ROSI) at the concentrations indicated in the graphs. (A and B) The number of domes formed in the BA-treated culture (0-8 mM in A; 0-250  $\mu$ M in B). (C and D) The number of domes formed in the PPAR $\gamma$  agonist-treated culture (0-20  $\mu$ M of 15d-PGJ2 in C; 0-300  $\mu$ M of ROSI in D). (E) The number of domes increased by the simultaneous administration of BA (either 0.1 or 0.25 mM) with MTA (0.1, 0.25, or 1 mM). Data are presented as mean (S.D.) ( $n = 4$ ). Different alphabetical letters indicate statistically significant differences among the treatments.



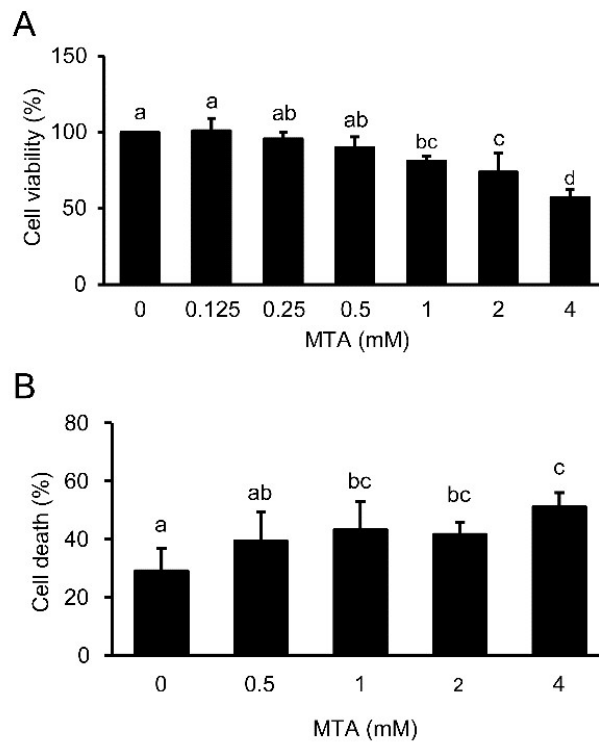


Fig. 11. Effect of MTA on the viability and death of RCM-1 cells. RCM-1 cells were cultured with different doses of MTA for 48 h. (A) Cell viability determined using the CCK-8 assay. Data are presented as mean (S.D.) ( $n = 4$ ). (B) Cell death determined by the trypan blue exclusion assay. Data are presented as mean (S.D.) ( $n = 8$ ). Different alphabetical letters in the graphs (A and B) indicate statistically significant differences among the samples.

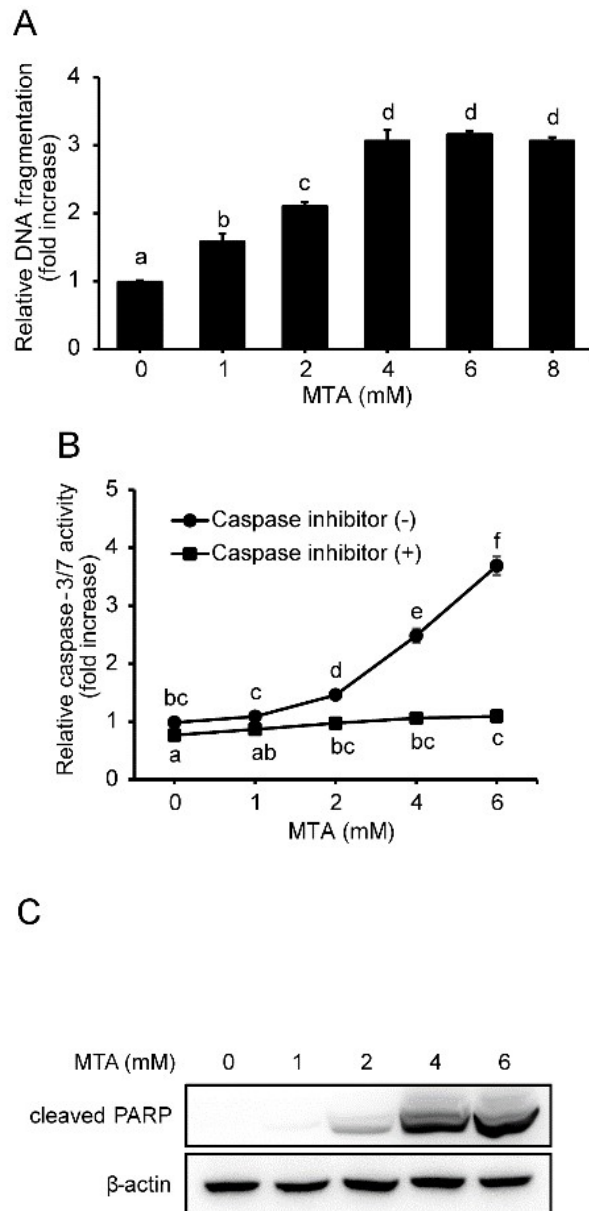


Fig. 12. Effect of MTA on the apoptotic markers in RCM-1 cells. RCM-1 cells were treated with different doses of MTA for 48 h. (A) DNA fragmentation determined using Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>. (B) Caspase-3/7 activity determined using a Caspase-3/7 Fluorescence Assay Kit. This assay was concomitantly carried out with or without a caspase-3/7 inhibitor to determine the specificity of enzyme activity. (C) Accumulation of the cleaved PARP protein as revealed by immunoblotting. Each value in the graphs (A and B) is expressed as a fold-increase relative to that of the mock control. The data are presented as mean (S.D.) ( $n = 3$ ). Different alphabetical letters indicate significant differences among the samples.  $\beta$ -Actin was used as a control for equal protein loading.

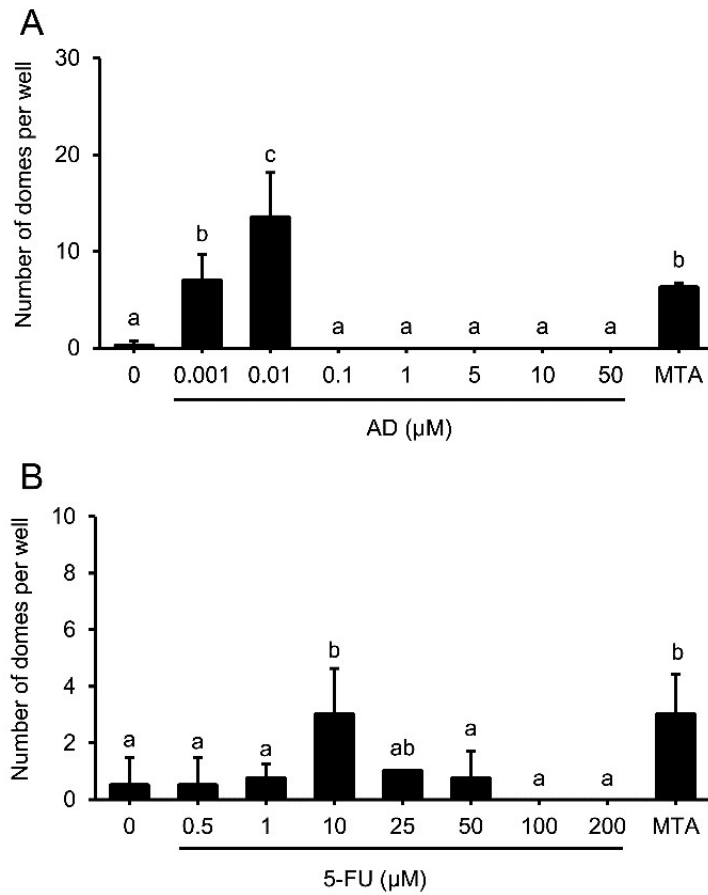


Fig. 13 . Effect of two apoptosis inducers, AD and 5-FU, on dome formation. RCM-1 cells were cultured with different doses of two apoptosis inducers, AD and 5-FU for 48 h. The number of domes formed in the chemical-treated culture (0-50  $\mu\text{M}$  for AD in A; 0-200  $\mu\text{M}$  for 5-FU in B). The presentation styles align with those in Fig. 9.

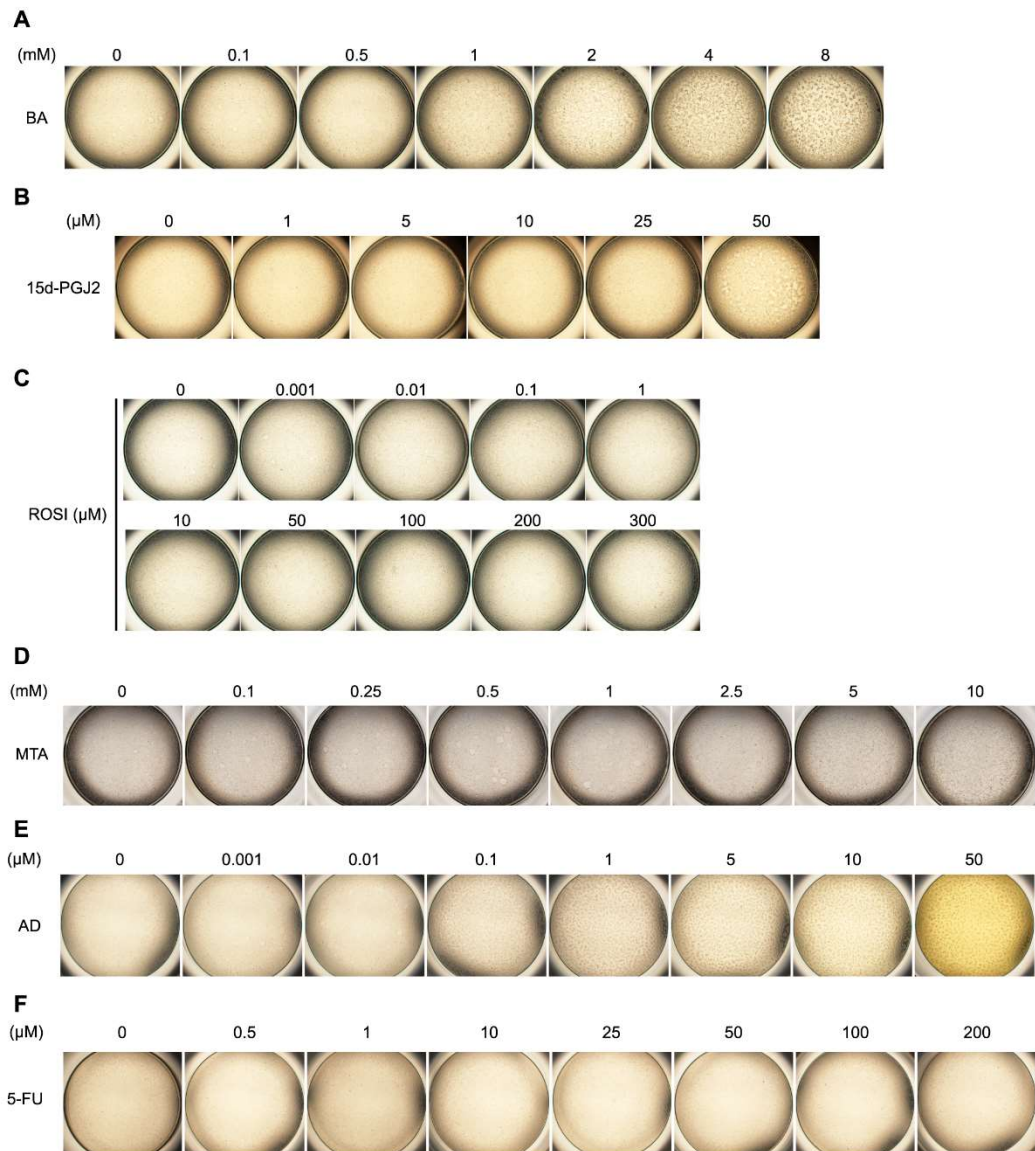


Fig. 14. Effect of different chemicals on RCM-1 cell growth. RCM-1 cells were cultured with one of the following chemicals for 48 h at different concentrations. Representative micrographs of the RCM-1 cell culture treated with either BA (A), 15d-PGJ2 (B), ROSI (C), MTA (D), AD (E), or 5-FU (F) in the 96-well culture plates are shown.

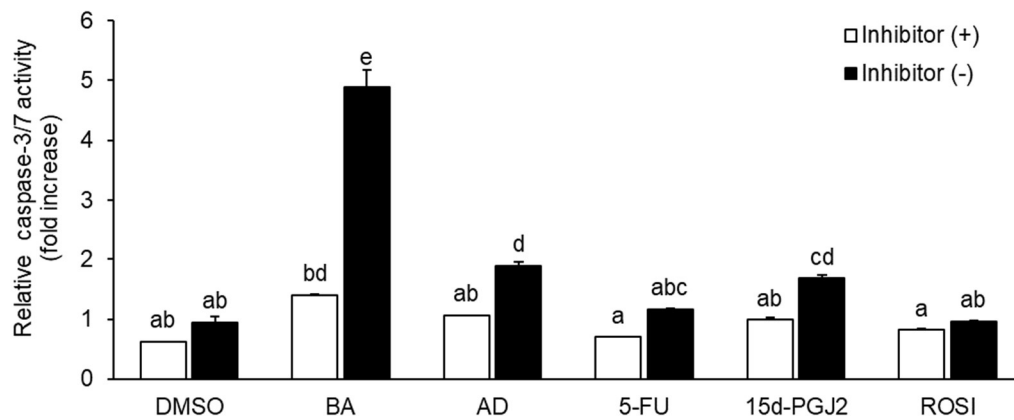


Fig. 15. Effect of different chemicals on caspase-3/7 activity. RCM-1 cells were cultured with DMSO 0.1% (mock control), 2 mM BA, 1  $\mu$ M AD, 200  $\mu$ M 5-FU, 50  $\mu$ M 15d-PGJ2, and 300  $\mu$ M ROSI for 48 h. Caspase-3/7 activity was determined using a Caspase-3/7 Fluorescence Assay Kit. The detailed experimental conditions are referred to Fig. 11 legend. The data are presented as mean (S.D.) ( $n = 3$ ). Different alphabetical letters indicate significant differences among the samples.

## 総合考察

本研究は、カツラウリの完熟果から単離された香気成分である MTPE や MTAE がヒト大腸癌細胞株 RCM-1 のドーム形成を誘導する際に必要な構造（官能基など）を特定すること、また、これら含硫化合物がドーム形成を導く分子メカニズムを解明することを目的として行われた。この研究を通じて、筆者は以下に示す9つの知見を得た。そこで、それぞれについて個別に概括する。

- (1) MTPE や MTAE の類似化合物 37 種を用いた構造活性相関解析により、ドーム形成において、メチル基を持つこと ( $R_1$  ポジション)、メチレン鎖の炭素数が 2 以下であること ( $R_2$  ポジション)、アルキル基の炭素数が 3 以下であること ( $R_3$  ポジション) が重要であることを明らかにした。また、強いドーム形成の誘導には、メチルチオ基が関与することも分かった。
- (2) 37 種の類似化合物の中で、MTA は最も強いドーム誘導能を持ち、且つ分子量が最も小さいことが分かった。したがって、MTA はドーム形成を誘導する含硫化合物の最小単位と考えられた。
- (3) MTA を処理した RCM-1 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、網羅的（総合的）な視点から MTA は遺伝子発現を促進するよりも抑制する方向に導くことが分かった。発現が抑制される遺伝子の中には、細胞周期や DNA 合成を制御する遺伝子が多く含まれた。その中で、G1 期で細胞周期を進める *CDC25A* と *CCNE2* (cyclin E2 を暗号化) の発現抑制が顕著であった。G1 期は、細胞を静止期、終末分化、老化及びアポトーシスに導く細胞運命決定のゲートウェイ（玄関口）と考えられている (Blomen and Boonstra, 2007; Pfeuty et al., 2008)。また、マウス骨格筋由来筋芽細胞株 C2C12 では *CDC25A* の発現抑制が筋分化に関与することが示唆され

- ている (Sarkar et al., 2010)。こういったことから類推すると、MTA は *CDC25A* (おそらく *CCNE2* も) の発現を抑制することで細胞周期を G1 期で停止させ、ドーム形成を誘導しているのかもしれない。
- (4) 細胞周期制御因子に対する阻害剤を用いた薬理的解析により、*CDC25* の阻害剤 NSC95397 の単独投与は RCM-1 のドーム形成を顕著に促進することが分かった。一方、cyclin E2/CDK2 複合体の阻害剤 purvalanol A の単独投与も RCM-1 細胞のドーム形成を僅かに促進した。これらの結果から *CDC25A* の遺伝子発現が抑制されること、つまり機能不全になることと MTA によるドーム形成には何らかの関係があると考えられた。また、cyclin E2 も *CDC25A* ほどではないが、このプロセスに関与すると考えられた。
- (5) MTA が RCM-1 のドーム形成を誘導する条件下で各種の分化マーカーの挙動を調査したところ、MTA によるドーム形成と分化マーカー量に正の相関があることが分かった。このことから、RCM-1 で形成されるドームは、他の細胞株の場合と同様に形態学的分化マーカーとしての利用が可能であると考えられた。
- (6) 研究当初、既知の分化誘導剤である BA は RCM-1 細胞のドーム形成を誘導しないと思われたが、再検証の結果、BA も限られた濃度範囲 (100–250  $\mu$ M) で RCM-1 のドーム形成を誘導することが分かった。
- (7) MTA と BA は構造がよく似ており、同じ濃度域でドーム形成を促進したことから、両化合物は同一またはよく似た経路で RCM-1 の分化を誘導していると考えられた。
- (8) RCM-1 細胞に MTA を比較的低濃度 (0.1–2 mM) で処理するとドームが形成され、逆に高濃度 ( $\geq$  4 mM) で処理するとアポトーシスが誘導されることが分かった。

た。このことから、MTA は、濃度に依存して2つの役割（分化誘導能とアポトーシス誘導能）を持つと考えられた。

(9) RCM-1 細胞に対して、既知の分化誘導剤（BA と 15d-PGJ2）はアポトーシスを、アポトーシス誘導剤（AD と 5-FU）はドーム形成を誘導することが分かった。

MTA の結果（8）と合わせて考えると、上記の結果は、分化とアポトーシス細胞死の経路が密接に関連していることを示唆する。

上述のように本研究は、カツラウリ由来の香気成分（含硫化合物）による細胞分化誘導と細胞死誘導の化学的・生理学的・分子生物学的な性質の一部の解明に寄与できたと考えるが、まだ、これらの物質が導く分化やアポトーシスの分子メカニズムの全容解明にはほど遠い。例えば、MTA の直接の標的因子も、MTA が *CDC25A* 及び *CCNE2* の発現を抑制する機構も分かっていない。これらの疑問に対する答えを見つけることも含め、今後も地道に研究を続けていくことで MTA 経路の解明に努めていきたい。そして、MTA 他含硫化合物を基盤とした薬剤が、将来的に大腸癌に対する分化誘導療法や従来化学療法に使われることを夢見ている。



## 引用文献

- Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F. X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J. A., Robin, P., Knibiehler, M., Pritchard, L. L., Ducommun, B., Trouche, D. and Harel-Bellan, A. (1998). Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature*, **396**(6707), 184-186.
- Aoyagi, Y., Masuko, N., Ohkubo, S., Kitade, M., Nagai, K., Okazaki, S., Wierzba, K., Terada, T., Sugimoto, Y. and Yamada, Y. (2005). A novel cinnamic acid derivative that inhibits Cdc25 dual-specificity phosphatase activity. *Cancer science*, **96**(9), 614-619.
- Augeron, C. and Laboisse, C. L. (1984). Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer research*, **44**(9), 3961-3969.
- Blomberg, I. and Hoffmann, I. (1999). Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G1/S transition and leads to premature activation of cyclin E-and cyclin A-dependent kinases. *Molecular and cellular biology*, **19**(9), 6183-6194.
- Blomen, V. A. and Boonstra, J. (2007). Cell fate determination during G1 phase progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**(23), 3084-3104.
- Bordonaro, M., Lazarova, D.L., Augenlicht, L.H. and Sartorelli, A.C. (2002): Cell type- and promoter-dependent modulation of the Wnt signaling pathway by sodium butyrate. *Int J Cancer*, **97**(1), 42-51.

Bradner, J. E., Hnisz, D. and Young, R. A. (2017). Transcriptional addiction in cancer.

Cell, **168**(4), 629-643.

Brenner, H., Jansen, L., Ulrich, A., Chang-Claude, J. and Hoffmeister, M. (2016).

Survival of patients with symptom-and screening-detected colorectal cancer.

Oncotarget, **7**(28), 44695.

Buda, A., Qualtrough, D., Jepson, M. A., Martines, D., Paraskeva, C. and Pignatelli,

M. (2003). Butyrate downregulates alpha2beta1 integrin. a possible role in the

induction of apoptosis in colorectal cancer cell lines. Gut, **52**(5), 729-734.

Cerbone, A., Toaldo, C., Laurora, S., Briatore, F., Pizzimenti, S., Dianzani, M.U.,

Ferretti, C. and Barrera, G. (2007). 4-Hydroxynonenal and PPARgamma

ligands affect proliferation, differentiation, and apoptosis in colon cancer cells.

Free Radic Biol Med, **42**(11), 1661-1670.

Coudrier, E., Arpin, M., Dudouet, B., Finidori, J., Garcia, A., Huet, C., Pringault, E.,

Robine, S., Sahuquillo-Merino, C. and Louvard, D. (1988). Villin as a

structural marker to study the assembly of the brush border. Protoplasma,

**145**(2), 99-105.

Cox, M.E., Deeble, P.D., Lakhani, S. and Parsons, S.J. (1999). Acquisition of

Neuroendocrine Characteristics by Prostate Tumor Cells Is Reversible:

Implications for Prostate Cancer Progression. Cancer Res, **59**(15), 3821-3830.

Cummings, J. H. (1981). Short chain fatty acids in the human colon. Gut, **22**(9), 763.

Darmoul, D., Lacasa, M., Baricault, L., Marguet, D., Sapin, C., Trotot, P., Barbat, A.

and Trugnan, G. (1992). Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in

enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(7), 4824-4833.

Davie, J.R. (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr*, **133**(7), 2485S-2493S.

Dickens, E. and Ahmed, S. (2021). Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)*, **39**(4), 215-220.

Domar, U., Nilsson, B., Baranov, V., Gerdes, U. and Stigbrand, T. (1992). Expression of intestinal alkaline phosphatase in human organs. *Histochemistry*, **98**(6), 359-364.

Domokos, M., Jakus, J., Szeker, K., Csizinszky, R., Csiko, G., Neogrady, Z., Csordas, A. and Galfi, P. (2010). Butyrate-induced cell death and differentiation are associated with distinct patterns of ROS in HT29-derived human colon cancer cells. *Dig Dis Sci*, **55**(4), 920-30.

Dudouet, B., Robine, S., Huet, C., Sahuquillo-Merino, C., Blair, L., Coudrier, E. and Louvard, D. (1987). Changes in villin synthesis and subcellular distribution during intestinal differentiation of HT29-18 clones. *J Cell Biol*, **105**(1), 359-369.

Fantini, J., Abadie, B., Tirard, A., Remy, L., Ripert, J.P., el Battari, A. and Marvaldi, J. (1986). Spontaneous and induced dome formation by two clonal cell

populations derived from a human adenocarcinoma cell line, HT29. *J Cell Sci*, **83**, 235-249.

Flandez, M., Guilmeau, S., Blache, P. and Augenlicht, L.H. (2008). KLF4 regulation in intestinal epithelial cell maturation. *Exp Cell Res*, **314**(20), 3712-3723.

Fraczek, M., Wozniak, Z., Ramsey, D. and Krecicki, T. (2007). Expression patterns of cyclin E, cyclin A and CDC25 phosphatases in laryngeal carcinogenesis. *European archives of oto-rhino-laryngology*, **264**(8), 923-928.

Gasparotto, D., Maestro, R., Piccinin, S., Vukosavljevic, T., Barzan, L., Sulfaro, S. and Boiocchi, M. (1997). Overexpression of CDC25A and CDC25B in head and neck cancers. *Cancer Res*, **57**(12):2366-8.

Gray, N. S., Wodicka, L., Thunnissen, A. M. W., Norman, T. C., Kwon, S., Espinoza, F. H., Morgan, D. O., Barnes, G., LeClerc, S., Meijer, L., Kim, S.H., Lockhart, D.J. and Schultz, P.G. (1998). Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science*, **281**(5376), 533-538.

Gudas, J. M., Payton, M., Thukral, S., Chen, E., Bass, M., Robinson, M. O. and Coats, S. (1999). Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers. *Molecular and Cellular Biology*, **19**(1), 612-622.

Gum, J.R., Kam, W.K., Byrd, J.C., Hicks, J.W., Slesinger, M.H. and Kim, Y.S. (1987). Effects of sodium butyrate on human colonic adenocarcinoma cells. Induction of placental-like alkaline phosphatase. *J Biol Chem*, **262**(3), 1092-1097.

- Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J. and Brummer, R.J. (2008). The role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*, **27**(2), 104-19.
- Heerdt, B.G., Houston, M.A. and Augenlicht, L.H. (1994). Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res*, **54**(12), 3288-3293.
- Heerdt, B.G., Houston, M.A. and Augenlicht, L.H. (1997). Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell Growth Differ*, **8**(5), 523-32.
- Hinds, P. W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S. I., and Weinberg, R. A. (1992). Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*, **70**(6), 993-1006.
- Hoffmann, I., Draetta, G. and Karsenti, E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *The EMBO journal*, **13**(18), 4302-4310.
- Hu, R., Zuo, Y., Zuo, L., Liu, C., Zhang, S., Wu, Q., Zhou, Q., Gui, S., Wei, W. and Wang, Y. (2011). KLF4 Expression Correlates with the Degree of Differentiation in Colorectal Cancer. *Gut Liver*, **5**(2), 154-159.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2009a). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*, **37**(1), 1-13.

- Huang, D. W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2009b). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, **4**(1), 44-57.
- Huang, M.E., Ye, Y.C., Chen, S.R., Chai, J.R., Lu, J.X., Zhoa, L., Gu, L.J. and Wang, Z.Y. (1988). Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, **72**(2), 567-572.
- Imai, K., Maeda, M., Fujiwara, H., Kariya, M., Takakura, K., Kanzaki, H. and Mori, T. (1992). Dipeptidyl peptidase IV as a differentiation marker of the human endometrial glandular cells. *Hum Reprod*, **7**(9), 1189-1194.
- Johnson, B.E., Mazor, T., Hong, C., Barnes, M., Aihara, K., McLean, C.Y., Fouse, S.D., Yamamoto, S., Ueda, H., Tatsuno, K., Asthana, S., Jalbert, L.E., Nelson, S.J., Bollen, A.W., Gustafson, W.C., Charron, E., Weiss, W.A., Smirnov, I.V., Song, J.S., Olshen, A.B., Cha, S., Zhao, Y., Moore, R.A., Mungall, A.J., Jones, S.J.M., Hirst, M., Marra, M.A., Saito, N., Aburatani, H., Mukasa, A., Berger, M.S., Chang, S.M., Taylor, B.S. and Costello, J.F. (2014). Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science*, **343**(6167), 189-193.
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R. and He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol*, **2**(7), 377-392.

- Kataoka, H., Nabeshima, K., Komada, N. and Koono, M. (1989). New human colorectal carcinoma cell lines that secrete proteinase inhibitors in vitro. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, **57**(3), 157-165.
- Katz, J. P., Perreault, N., Goldstein, B.G., Lee, C. S., Labosky, P.A., Yang, V. W. and Kaestner, K. H. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development*, **129**(11), 2619-2628.
- Kirkland, S. C. (1985). Dome formation by a human colonic adenocarcinoma cell line (HCA-7). *Cancer Research*, **45**(8), 3790-3795.
- Kumari, S., Prasad, S. B., Yadav, S. S., Kumar, M., Khanna, A., Dixit, V. K., Nath, G., Singh, S. and Narayan, G. (2016). Cyclin D1 and cyclin E2 are differentially expressed in gastric cancer. *Medical Oncology*, **33**(5), 1-10.
- Lauper, N., Beck, A. R., Cariou, S., Richman, L., Hofmann, K., Reith, W., Slingerland, J. M. and Amati, B. (1998). Cyclin E2: a novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle. *Oncogene*, **17**(20), 2637-2643.
- Lazo, J. S., Nemoto, K., Pestell, K. E., Cooley, K., Southwick, E. C., Mitchell, D. A., Furey, W., Gussio, R., Zaharevitz, D. W., Joo, B. and Wipf, P. (2002). Identification of a potent and selective pharmacophore for Cdc25 dual specificity phosphatase inhibitors. *Molecular pharmacology*, **61**(4), 720-728.

- Lever, J.E. (1979). Inducers of mammalian cell differentiation stimulate dome formation in a differentiated kidney epithelial cell line (MDCK). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(3), 1323-1327.
- Lin, B., Srikanth, P., Castle, A.C., Nigwekar, S., Malhotra, R., Galloway, J.L., Sykes, D.B. and Rajagopal, J. (2018). Modulating Cell Fate as a Therapeutic Strategy. *Cell Stem Cell*, **23**(3), 329-341.
- Litvak, D.A., Evers, B.M., Hwang, K.O., Hellmich, M.R., Ko, T.C. and Townsend, C.M. Jr. (1998). Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1. *Surgery*, **124**(2).
- Mariadason, J. M., Rickard, K. L., Barkla, D. H., Augenlicht, L. H. and Gibson, P. R. (2000). Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. *Journal of cellular physiology*, **183**(3), 347-354.
- Matsuura, I., Denissova, N. G., Wang, G., He, D., Long, J. and Liu, F. (2004). Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature*, **430**(6996), 226-231.
- Miller, K.D., Nogueira, L., Mariotto, A.B., Rowland, J.H., Yabroff, K.R., Alfano, C.M., Jemal, A., Kramer, J.L. and Siegel, R.L. (2019). Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, **69**(5), 363-385.
- Moreno, C. C., Mittal, P. K., Sullivan, P. S., Rutherford, R., Staley, C. A., Cardona, K., Hawk, N. N., Dixon, W. T., Kitajima, H. D., Kang, J., Small, W. C.,



Oshinski, J. and Votaw, J. R. (2016). Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. *Clin Colorectal Cancer*, 15, 67-73.

Morris, L., Allen, K. E. and La Thangue, N. B. (2000). Regulation of E2F transcription by cyclin E–Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nature cell biology*, 2(4), 232-239.

Mortensen, P. B., Holtug, K. and Rasmussen, H. S. (1988). Short-chain fatty acid production from mono-and disaccharides in a fecal incubation system: implications for colonic fermentation of dietary fiber in humans. *The Journal of nutrition*, 118(3), 321-325.

Nakamura, Y., Chang, C. C., Mori, T., Sato, K., Ohtsuki, K., Upham, B. L. and Trosko, J. E. (2005). Augmentation of differentiation and gap junction function by kaempferol in partially differentiated colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 26(3), 665-671.

Nakamura, Y., Hasegawa, Y., Shiota, K., Suetome, N., Nakamura, T., Chomnawang, M.T., Thirapanmethee, K., Khuntayaporn, P., Boonyariththongchai, P., Wongs-Aree, C., Okamoto, S., Shigeta, T., Matsuo, M., Park, E.Y. and Sato, K. (2014). Differentiation-inducing effect of piperitenone oxide, a fragrant ingredient of spearmint (*Mentha spicata*), but not carvone and menthol, against human colon cancer cells. *J Funct Foods*, 8, 62-67.

- Nakamura, Y., Nakayama, Y., Ando, H., Tanaka, A., Matsuo, T., Okamoto, S., Upham, B.L., Chang, C.C., Trosko, J.E., Park, E.Y. and Sato, K. (2008). 3-Methylthiopropionic acid ethyl ester, isolated from Katsura-uri (Japanese pickling melon, *Cucumis melo* var. *conomon*), enhanced differentiation in human colon cancer cells. *J Agric Food Chem*, **56**(9), 2977-2984.
- Nakamura, Y., Watanabe, S., Kageyama, M., Shirota, K., Shirota, K., Amano, H., Kashimoto, T., Matsuo, T., Okamoto, S., Park, E.Y. and Sato, K. (2010). Antimutagenic; differentiation-inducing; and antioxidative effects of fragrant ingredients in Katsura-uri (Japanese pickling melon; *Cucumis melo* var. *conomon*). *Mutat Res*, **703**(2), 163-168.
- Nemoto, K., Vogt, A., Oguri, T. and Lazo, J. S. (2004). Activation of the Raf-1/MEK/Erk kinase pathway by a novel Cdc25 inhibitor in human prostate cancer cells. *The Prostate*, **58**(1), 95-102.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, **79**(3), 629-661.
- Nilsson, I. and Hoffmann, I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Progress in cell cycle research*, 107-114.
- Nowak, D., Stewart, D. and Koeffler, H.P. (2009). Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood*, **113**(16), 3655-3665.
- Oberleithner, H., Vogel, U. and Kersting, U. (1990). Madin-Darby canine kidney cells. I. Aldosterone-induced domes and their evaluation as a model system. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, **416**(5), 526-532.

- Orchel, A., Dzierzewicz, Z., Parfiniewicz, B., Weglarz, L. and Wilczok, T. (2005).  
Butyrate-induced differentiation of colon cancer cells is PKC and JNK  
dependent. *Dig Dis Sci*, **50**(3), 490-498.
- Payton, M. and Coats, S. (2002). Cyclin E2, the cycle continues. *The international  
journal of biochemistry & cell biology*, **34**(4), 315-320.
- Payton, M., Scully, S., Chung, G. and Coats, S. (2002). Deregulation of cyclin E2  
expression and associated kinase activity in primary breast tumors. *Oncogene*,  
**21**(55), 8529-8534.
- Pfeuty, B., David-Pfeuty, T. and Kaneko, K. (2008). Underlying principles of cell fate  
determination during G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell cycle*, **7**(20),  
3246-3257.
- Prasad, H., Dang, D. K., Kondapalli, K. C., Natarajan, N., Cebotaru, V. and Rao, R.  
(2019). NHA2 promotes cyst development in an in vitro model of polycystic  
kidney disease. *The Journal of Physiology*, **597**(2), 499-519.
- Rabito, C. A., Tchao, R., Valentich, J. and Leighton, J. (1980). Effect of cell-  
substratum interaction on hemicyst formation by MDCK cells. *In vitro*, **16**(6),  
461-468.
- Rizzino, A., Gonda, M. A. and Rapp, U. R. (1982). Dome formation by a retrovirus-  
induced lung adenocarcinoma cell line. *Cancer Research*, **42**(5), 1881-1887.
- Roell, K. R., Reif, D. M. and Motsinger-Reif, A. A. (2017). An introduction to  
terminology and methodology of chemical synergy—perspectives from across  
disciplines. *Frontiers in pharmacology*, **8**, 158.

- Saeed, A., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. T. amd Quackenbush, J. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, **34**(2), 374-378.
- Sarkar, S., Dey, B. K. and Dutta, A. (2010). MiR-322/424 and-503 are induced during muscle differentiation and promote cell cycle quiescence and differentiation by down-regulation of Cdc25A. *Molecular biology of the cell*. **21**(13), 2138-2149.
- Seca, A.M.L. and Pinto, D. (2018). Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. *Int J Mol Sci*, **19**(1).
- Sell, S. and Ilic, Z. (2019). Comparison of survivor scores for differentiation therapy of cancer to those for checkpoint inhibition: Half full or half empty. *Tumour Biol*, **41**(9), 1010428319873749.
- Shimada, T., Kojima, K., Yoshiura, K., Hiraishi, H. and Terano, A. (2002). Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut*, **50**(5), 658-664.
- Shin, S.W., Seo, C.Y., Han, H., Han, J.Y., Jeong, J.S., Kwak, J.Y. and Park, J.I. (2009). 15d-PGJ2 induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated

inactivation of Akt in leukemia and colorectal cancer cells and shows in vivo antitumor activity. *Clin Cancer Res*, **15**(17), 5414-5425.

Su, H. W., Yeh, H. H., Wang, S. W., Shen, M. R., Chen, T. L., Kiela, P. R., Ghishan F.K. and Tang, M. J. (2007). Cell confluence-induced activation of signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) triggers epithelial dome formation via augmentation of sodium hydrogen exchanger-3 (NHE3) expression. *Journal of Biological Chemistry*, **282**(13), 9883-9894.

Sugihara, E. and Saya, H. (2013). Complexity of cancer stem cells. *Int J Cancer*, **132**(6), 1249-1259.

Tsuda, H., Ochiai, K., Suzuki, N. and Otsuka, K. (2010). Butyrate, a bacterial metabolite, induces apoptosis and autophagic cell death in gingival epithelial cells. *J Periodontal Res*, **45**(5), 626-634.

Vasan, N., Baselga, J. and Hyman, D.M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, **575**(7782), 299-309.

Vigo, E., Müller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M. C. and Helin, K. (1999). CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Molecular and cellular biology*, **19**(9), 6379-6395.

World Health Organization (WHO). Cancer. Retrieved from

[https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1). Accessed July 18, 2022.

Wu, W., Fan, Y. H., Kemp, B. L., Walsh, G. and Mao, L. (1998). Overexpression of cdc25A and cdc25B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is

not associated with overexpression of c-myc. *Cancer research*, **58**(18), 4082-4085.

Xu, X., Yamamoto, H., Sakon, M., Yasui, M., Ngan, C. Y., Fukunaga, H., Morita, T., Ogawa, M., Nagano, H., Nakamori, S., Sekimoto, M., Matsuura, N. and Monden, M. (2003). Overexpression of CDC25A phosphatase is associated with hypergrowth activity and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Clinical cancer research*, **9**(5), 1764-1772.

Yang, Q.J., Zhou, L.Y., Mu, Y.Q., Zhou, Q.X., Luo, J.Y., Cheng, L., Deng, Z.L., He, T.C., Haydon, R.C., He, B.C. (2012). All-trans retinoic acid inhibits tumor growth of human osteosarcoma by activating Smad signaling-induced osteogenic differentiation. *Int J Oncol*, **41**(1), 153-160.

Yu, C. and Ding, S. (2020). Therapeutic strategies targeting somatic stem cells: Chemical approaches. *Bioorg Med Chem*, **28**(24), 115824.

Zucchi, I., Bini, L., Albani, D., Valaperta, R., Liberatori, S., Raggiaschi, R., Montagna, C., Susani, L., Barbieri, O., Pallini, V., Vezzoni, P. and Dulbecco, R. (2002). Dome formation in cell cultures as expression of an early stage of lactogenic differentiation of the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(13), 8660-8665.

## 要旨

病気によるヒトの死因で「がん」は世界2位にランクされ、2018年には960万人、つまり6人に1人ががんによって死亡したと見積もられている。100種類以上あるがんの中で大腸癌を発症する人は性別を問わず多い。がんの治療には外科的手術や化学療法、放射線療法等が使われ、多くの患者を救ってきた。しかし、副作用に苦しめられる患者も多い。このような背景から、副作用が少ない新たな治療法や抗がん剤の開発が求められている。筆者らのグループは、高分化型のヒト大腸癌細胞株 RCM-1 が作るドームの数の増加を指標として、京都の伝統野菜カツラウリ (*Cucumis melo* var. *conomon*) から2種類の含硫物質、3-methylthiopropionic acid ethyl ester (MTPE) と methylthioacetic acid ethyl ester (MTAE) を単離した。しかし、これらの化合物がドーム形成を導くために必要な生理化学的特性も、ドーム形成の分子機構も分かっていない。

筆者は、構造活性相関解析により MTPE と MTAE の類似化合物 37 種の中で methylthioacetic acid (MTA) が、最も強力なドーム誘導能を持つと同時に、分子量が最も小さいことを明らかにした。このことは、MTA がドーム形成に必要な最小ユニットであることを示している。マイクロアレイ解析は、MTA が DNA 複製や細胞周期に関連する多くの遺伝子の発現を低下させること、その中でも *cell division cycle 25A* (*CDC25A*) や *cyclin E2* (*CCNE2*) の発現を著しく低下させることを明らかにした。さらに薬理的解析から *CDC25A* 阻害剤 NSC95397 は、MTA 非存在下で RCM-1 細胞のドーム形成を著しく促進することが分かった。一方、*cyclin E2/CDK2* 複合体の阻害剤 purvalanol A も、NSC95397 ほどではないがドーム形成を促進した。このことから *CDC25A* (おそらく *CCNE2* も) の発現抑制は MTA によるドーム形成誘導の重要なステップの一つであると想像された。また、

MTA はドームを誘導する条件で、腸分化マーカー4種（ALP 活性、DPP4、villin、KLF4）の上昇をもたらした。この結果から RCM-1 細胞で形成されるドームは分化（様）組織と考えられた。そこで、さらに特性調査を続けたところ、MTA は濃度依存的にドーム形成（分化）（0.1–2 mM）を促進することが分かった。また、MTA と酪酸（BA）の同時投与によってドーム形成が相加的に高められたことから、MTA と BA は同一または類似の経路を介して RCM-1 細胞の分化を誘導すると推察された。さらに高い濃度（2 mM 以上）で MTA を処理するとアポトーシスマーカー3種（DNA の断片化、カスパーゼ 3/7 活性、PARP 切断）が上昇した。以上のことから、MTA は RCM-1 細胞のドーム分化を誘導するのみならず、アポトーシスを誘導することが明らかになった。加えて、既知の分化誘導剤（BA と 15d-PGJ2）とアポトーシス誘導剤（Actinomycin D と 5-fluorouracil）は、RCM-1 細胞に対してそれぞれアポトーシスとドーム形成を引き起こした。MTA の結果と合わせて、このことは、分化誘導とアポトーシス誘導の間には密接な関連があることを示唆する。以上の結果から、分化とアポトーシスの両方を導ける MTA は、大腸癌の分化誘導療法や標準治療法の薬剤候補になりうると考えられた。



## Summary

Cancer is the second leading cause of human death globally, accounting for an estimated 9.6 million deaths, or one in six deaths, in 2018. Among over 100 types of cancers, colorectal cancer is very common regardless of gender. To date, different medical treatments, including surgery, chemotherapy, and radiation therapy, have been employed as cancer therapies, but the toxicity thereof has led to many patients suffering the side effects. Against this background, a new approach and anti-cancer agent with low side effects must be developed for cancer therapies. A human colorectal cancer cell line, RCM-1, was established from a colon cancer tissue diagnosed as a well-differentiated rectum adenocarcinoma. RCM-1 cells spontaneously form ‘domes’ resembling villiform structures. Two sulfur-containing compounds from *Cucumis melo* var. *conomon* (Katsurauri), referred to as 3-methylthiopropionic acid ethyl ester (MTPE) and methylthioacetic acid ethyl ester (MTAE), can convert the unorganized cell mass into domes in the RCM-1 cell culture. However, the underlying molecular mechanisms and physiochemical property of such dome formation remain unclear.

Herein, we performed a structure–activity relationship analysis and found that methylthioacetic acid (MTA) was the lowest molecular weight compound and the most potent dome-inducing activity among 37 MTPE and MTAE analogs, indicating that MTA is the minimum unit required to induce dome formation. According to our microarray analysis, MTA caused down-regulation of many genes involved in DNA replication and cell cycle control, with the *cell division cycle 25A* (*CDC25A*) and *cyclin E2* (*CCNE2*) genes being the most significantly reduced. Pharmacological analysis showed that the administration of two cell-cycle inhibitors for inactivating

CDC25A phosphatase (NSC95397) and the cyclin E2/cyclin-dependent kinase 2 complex (purvalanol A) increased the number of domes independently of MTA. Altogether, our results indicate that MTA induces dome formation via the downregulation of *CDC25A* and possibly *CCNE2* being important steps in this process. Dome formation in cell culture has been shown to partially mimic the differentiated function of colon and kidney and is recognized as a morphological differentiation marker. However, the domes developed in RCM-1 cell culture have not been validated as a reliable marker yet. Our results demonstrated that MTA (not more than 2 mM) differentiates the unorganized cell mass into the dome in RCM-1 cell culture by disclosing the correlation between dome formation and several intestinal differentiation markers such as alkaline phosphatase activity and the protein levels of dipeptidyl peptidase 4, villin, and Krüppel-like factor 4. Dome formation in RCM-1 cell culture was additively enhanced by the simultaneous administration of MTA and butyric acid (BA), suggesting that MTA directs the differentiation of RCM-1 cells, potentially through the same or similar pathway(s) shared with BA. Notably, a high dose of MTA (2 mM or more) elevated several apoptosis markers, such as DNA fragmentation, caspase-3/7 activity, and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase. Altogether, in addition to RCM-1 cell differentiation, MTA can trigger the apoptosis. These results indicate that MTA is a potential anticarcinogenic agent applicable in differentiation therapy and traditional chemotherapy against colorectal cancers.

## 謝辞

本研究の遂行並びに本論文の執筆にあたり、終始熱心なご指導・ご助言を賜りました鹿児島大学農学部岡本繁久准教授に心から感謝申し上げます。また、ご多忙の中、本論文の審査並びに数々のご助言を賜りました鹿児島大学農学部の橋本文雄教授、佐賀大学農学部の石丸幹二教授、鹿児島大学農学部の加治屋勝子准教授、鹿児島大学農学部の坂尾こず枝助教に深く感謝いたします。

共同研究者の鹿児島大学の松尾友明名誉教授、京都府立大学文学部の中村考志教授、同大学生命環境学部の佐々木梓沙博士には数々の貴重なご助言とご指導を賜りました。ここに感謝の意を表します。

動物細胞株の取り扱い方や保存に関して有益なご助言を賜りました鹿児島大学農学部の大久津昌治准教授に厚く感謝申し上げます。

最後に、個々の実験でお世話になった鹿児島大学植物生命工学研究室ならびに京都府立大学食品科学研究所の学生諸氏に深く感謝いたします。