

## 《和 文》

学位論文要旨	
氏名	谷川 俊祐
題目	ケルセチンの癌化学予防作用の分子機構に関する研究 (Molecular Mechanism of Cancer Chemopreventive Effects by Quercetin)
<p>多くの研究によって、植物性の食品中には、発癌の予防や癌の進行を抑制する化合物が多く含まれており、それらの成分は癌の化学予防に有効であることが疫学的研究により示されてきた。タマネギやリンゴなどの果物や野菜に多く含まれるケルセチンは、フラボノイドに分類される典型的なポリフェノール化合物である。これまでの研究によって、ケルセチンは、強い抗酸化能を持つことから、癌予防能及び癌細胞の増殖抑制能を有することが分かってきたが、その作用の分子機構は未だ明らかではない。本研究は、ケルセチンによる細胞保護機能の亢進及び癌細胞増殖抑制の分子機構を解析し、ケルセチンの癌化学予防作用を明らかにすることを目的とした。</p> <p>細胞保護機構において、転写因子 Nrf2 及び細胞質タンパク質 Keap1 (いわゆる Nrf2/Keap1 システム) は、重要な役割を果たす因子である。Nrf2/Keap1 システムは、抗酸化剤応答配列 (ARE/EpRE) を仲介し、細胞内抗酸化酵素遺伝子群の発現を統括的に制御する。Nrf2 は、細胞質において Keap1 と結合し、ユビキチン-プロテアソーム機構によって分解制御される転写因子であることから、Nrf2 の安定化及び核内移行が、細胞保護機構の活性化に不可欠である。ケルセチンによる抗酸化酵素 (NQO1) の発現分子機構を検討した結果、ケルセチンは、①Nrf2 mRNA の発現促進、②Nrf2 タンパク質のユビキチン化及び分解速度の抑制、③Keap1 タンパク質の分解促進を引き起こした。これらの作用によって Nrf2 の安定化及び核内移行を促進し、ARE を仲介した NQO1 の発現を促進することを明らかにした。さらに、Nrf2 及び Keap1 の siRNA を用いて、ケルセチンによる ARE の活性化には、Nrf2/Keap1 システムの制御が必要であることを実証した。従って、ケルセチンは、Keap1 の抑制及び Nrf2 の安定化を通して、ARE を仲介した抗酸化酵素遺伝子群の発現を促進することにより、細胞保護機能を亢進させることができた。</p> <p>細胞増殖機構において、癌抑制遺伝子 p53 は、細胞周期の調節及びアポトーシスの誘導を制御する重要な細胞内分子である。しかし、多くの癌細胞において、ユビキチン-プロテアソーム機構による p53 の不活性化が、共通の現象として見られることから、p53 の安定化及び再活性化は、癌細胞の増殖抑制に有効な手法であると考えられている。ケルセチンによる癌細胞の増殖抑制効果を、p53 正常型のヒト肝癌細胞 HepG2 において検討した結果、ケルセチンは、①p53 タンパク質のリン酸化及び発現促進、②p53 タンパク質のユビキチン化及び分解速度の抑制、③p53 mRNA の分解抑制、④細胞周期及びアポトーシスに関する p53 下流の遺伝子発現の制御を通して、p53 の安定化及び活性化を促進し、癌細胞の増殖抑制及びアポトーシスを誘導することが明らかになった。また、p53 の siRNA を HepG2 に導入することによって、ケルセチンによる p53 の再活性化が、アポトーシスの誘導及び細胞増殖抑制効果に必要であることを実証した。この結果より、ケルセチンは、p53 の再活性化を促進し、細胞周期の停止及びアポトーシスを誘導することが明らかになった。</p> <p>以上の研究結果は、ケルセチンの癌化学予防作用を細胞内分子レベルで明らかにし、食品成分による癌の化学予防に新たな知見を提供するものである。</p>	

## 《英文》

学位論文要旨	
氏名	Shunsuke Tanigawa
題目	Molecular Mechanism of Cancer Chemopreventive Effects by Quercetin (ケルセチンの癌化学予防作用の分子機構に関する研究)
<p>Polyphenols are a group of plant chemical substances, characterized by the presence of more than one phenolic group. Epidemiological studies have shown the consumption of vegetables and fruits are associated with a reduced risk of cancers. Several lines of studies have shown that polyphenols possess antioxidant properties, which are considered to account for disease-preventing effects of diets high in polyphenols. However the precise molecular mechanism is not clarified yet. This study is conducted to elucidate the chemopreventive effects of quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxylflavone), which is a typical polyphenolic compound widely distributed in fruits and vegetables, especially with high concentrations in onions, apples, tea, broccoli and red wine. The mechanisms were investigated at cellular and molecular levels by targeting several key steps involved in anti-carcinogenesis such as cytoprotection and apoptosis induction of cancer cells.</p> <p>Nrf2/Keap1 system plays an important role in cytoprotection against oxidative stresses such as ROS and environmental stress. Polyphenols are found to possess antioxidant properties and interact with cellular defense systems through the antioxidant responsive/electrophile responsive element (ARE/EpRE) although the precise mechanism by which how polyphenols influence transcriptional factor complex to target ARE is poorly understood. To clarify the mechanism of cytoprotective role, the action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated <i>NQO1</i> gene expression by quercetin were investigated. Molecular data revealed that quercetin activated Nrf2/ARE-mediated <i>NQO1</i> transactivation through novel mechanisms. Quercetin not only enhanced the steady-state level of Nrf2 at both transcriptional and post-translational levels, but also reduced the steady-state level of Keap1 through 26S proteasome-independent degradation. Silencing Nrf2 or Keap1 with their siRNA dramatically affected ARE activity induced by quercetin, suggesting that both Nrf2 up-regulation and Keap1 down-regulation induced by quercetin are essential for ARE-mediated <i>NQO1</i> activation.</p> <p>In many cancers that retain wild-type p53, there is evidence for defects in the mechanisms that allow activation of p53. Reactivation of p53 has been suggested to be an effective strategy for cancer therapy in wild-type p53 retained tumor cells. To further explore the role of quercetin in cancer chemoprevention, reactivation of p53 in HepG2 cells retaining wild-type p53 was challenged by quercetin. The results showed that quercetin inhibited the proliferation of HepG2 cells through the induction of cell cycle arrest and apoptosis. Molecular data revealed that quercetin induced p53 phosphorylation and total p53 protein. Consequently, quercetin stimulated p21 expression and suppressed cyclin D1 expression in the favor of cell cycle arrest. Moreover, quercetin also increased the ratio of Bax/Bcl-2 in the favor of apoptosis in such treatment. Interestingly, quercetin inhibited p53 ubiquitination and extended the half-life (<math>t_{1/2}</math>) of p53 from 74 min to 184 min. Quercetin also inhibited p53 mRNA degradation at post-transcription. Silencing p53 with p53 siRNA significantly abrogated p53-dependent gene expression and apoptotic induction, revealing that quercetin stabilizes p53 at both mRNA and protein levels to reactivate p53-dependent cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells.</p> <p>In summary, quercetin could enhance cytoprotective activity by up-regulating Nrf2 expression and down-regulating Keap1, and induce cancer cells apoptosis by reactivating p53 at the post-transcription. These findings provide a novel mechanism by which quercetin may exhibit cytoprotective and anti-cancer effects, and will give new insights to understand the chemopreventive function of quercetin.</p>	

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	谷川 俊祐
審査委員	主査 鹿児島 大学 准教授 侯 德興
	副査 鹿児島 大学 教授 藤井 信
	副査 鹿児島 大学 教授 林 征一
	副査 鹿児島 大学 教授 徳永 正雄
	副査 佐賀 大学 教授 渡邊 啓一
審査協力者	
題目	Molecular Mechanism of Cancer Chemopreventive Effects by Quercetin (ケルセチンの癌化学予防作用の分子機構に関する研究)
<p>ケルセチンは、タマネギやリンゴなどの果物や野菜に多く含まれているフラボノイドに属する代表的なポリフェノール化合物である。これまでの研究では、ケルセチンは、強い抗酸化能を持ち、細胞癌化抑制および癌細胞の増殖抑制能を有することが報告されているが、その作用の分子機構は未だ明らかではない。本研究では、ヒト肝癌細胞を用いてケルセチンの細胞保護能および癌細胞増殖抑制能の分子機構について解析を行った。得られた研究結果の概要は次の通りである。</p> <p>まず、ケルセチンによる細胞保護能の有無およびその分子機構を明らかにするため、細胞内抗酸化酵素遺伝子群の発現を統括的に制御するNrf2/Keap1システムについて検討した。ケルセチンは、正の制御因子Nrf2のmRNA発現を促進し、またNrf2タンパク質のユビキチン化および分解を抑制した。一方、ケルセチンは、負の制御因子Keap1のタンパク質分解を促進し、またはそのタンパク質を修飾し、不活性化させた。これらの作用によってNrf2の安定化および核内移行を促進し、抗酸化応答配列（ARE）を仲介した抗酸化酵素遺伝子NQO1の発現を促進することを明らかにした。さらに、RNA干渉（siRNA）手法を用いて、Nrf2およびKeap1の発現を阻止した状態で、ケルセチンによるAREの活性化</p>	

効果を検討した。Nrf2 siRNA を導入した場合には、ARE の活性化が見られず、Keap1 siRNA を導入した場合には、ARE の活性化が上昇した。したがって、ケルセチンは、正の制御因子 Nrf2 の安定化および負の制御因子 Keap1 の抑制により、ARE を介した抗酸化酵素遺伝子群の発現を促進し、細胞保護機能を発揮することが明らかとなった。

つぎに、ケルセチンによる癌細胞増殖抑制能の有無およびその分子機構を明らかにするため、細胞増殖に重要な役割を果たす癌抑制遺伝子 p53 およびその下流遺伝子の発現制御について検討した。ケルセチンは、p53 mRNA の分解を抑制し、p53 タンパク質のリン酸化および発現を促進した。さらにケルセチンは、p53 タンパク質のユビキチン化および分解を抑制した。これにより、細胞周期制御に関する遺伝子 p21 の発現を上昇させ、Cyclin D1 の発現を抑制することによって細胞周期を停止させた。また、ケルセチンは、アポトーシスを促進する遺伝子 Bax の発現を上昇させ、アポトーシスを抑制する遺伝子 Bcl2 の発現を抑制することによって細胞アポトーシスを誘導した。さらに、p53 siRNA を HepG2 に導入し、p53 の発現を阻止した状態では、ケルセチンによる細胞周期停止およびアポトーシス誘導が見られなかった。したがって、ケルセチンは、p53 を標的にし、そのタンパク質の安定性を促進し、細胞周期の停止およびアポトーシスの誘導を引き起こすことが明らかとなった。

さらに、ケルセチンによる Nrf2 および p53 のユビキチン化抑制について検討した。ケルセチンは、Cul3 や HDM2 などのユビキチン E3 リガーゼの発現を抑制することを突き止めた。よって、ケルセチンは、ユビキチン E3 リガーゼの発現を抑制することによって転写制御因子の安定性を高め、癌化学予防作用を発揮することが示唆された。

以上のように、本研究は、ケルセチンによる細胞保護機能の亢進および癌細胞増殖抑制の分子機構が細胞・遺伝子レベルで明らかとなり、ケルセチンによる癌の化学予防に新たな知見を提供する成果が得られた。特に、ケルセチンによる転写制御因子のユビキチン化抑制の発見は、ポリフェノールなどの食品成分の機能性研究に新しい分野を開くものであり、本論文は博士の学位論文として十分価値のあるものと判断した。

## 最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	谷川 俊祐				
	主査 鹿児島 大学 准教授 侯 德興				
	副査 鹿児島 大学 教授 藤井 信				
審査委員	副査 鹿児島 大学 教授 林 征一				
	副査 鹿児島 大学 教授 徳永 正雄				
	副査 佐賀 大学 教授 渡邊 啓一				
審査協力者					
実施年月日	平成 19 年 12 月 27 日				
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）					口答・筆答

主査及び副査は、平成19年12月27日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。

以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（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。

学位申請者 氏名	谷川 俊祐
[質問1]細胞内におけるケルセチンの作用始点はどこにあると考えられるか。	
[回答]細胞内分子機構におけるケルセチンの作用始点として、Nrf2/Keap1システムにおけるKeap1タンパク質のコンホメーション変化の誘導、さらに、アポトーシス誘導機構におけるHDM2タンパク質の不活性化が考えられる。また、最近の研究報告から細胞内酸化還元バランスの遷移（GSHの低下）が、ケルセチンの細胞保護作用及びアポトーシス誘導の分子作用始点となっていることが考えられる。	
[質問2]様々な天然化合物があるが、その結合タンパク質を検索する実験法にはどのような方法があるか。また、それによって同定された標的分子にはどのようなものがあるか。	
[回答]プロテオーム解析が主流であると考えられるが、最近の研究によって、セファロースビーズに天然化合物を固定化し、細胞内タンパク質と沈降反応させることによって、天然化合物に結合するタンパク質をスクリーニング及び同定する手法が確立されつつある。この方法は、タンパク質と低分子化合物との直接的な結合の検出を可能にした手法であることと、比較的簡易な手法であることから注目を集めている。この方法によって同定されたタンパク質として、MAP kinase経路の上流に位置するMEK1及びPI3 kinaseがある。	
[質問3]ケルセチン処理によって、Nrf2のmRNA発現量が増加していたが、ケルセチンはNrf2のプロモーターも制御するのか。	
[回答]Nrf2のプロモーター領域にはARE配列にコンセンサスな領域が保存されていることが明らかとなっていることから、ケルセチンは、Nrf2のプロモーターも制御している可能性があると考えられる。	
[質問4] Nrf2/Keap1システムにおける実験で、ARE活性化におけるケルセチンの濃度は40μMであるが、体内においてその濃度は実現可能か。	
[回答]経口摂取によるケルセチンの血中濃度は、最大で12μMに達することが明らかとなっている。本研究において、ケルセチン処理濃度5μMからNrf2の発現が促進されたことから、体内においてもNrf2/Keap1システムを活性化し、AREの転写活性を促進することが可能であると考えられる。	
[質問5]Nrf2のARE配列への結合にはMafKが必要だが、なぜMafKのARE配列への結合は増えないのか。	
[回答]Nrf2は単独ではARE配列に結合できず、ARE配列に結合したMafKに結合するこ	

とでAREの転写活性を促進することが明らかになっている。ケルセチン処理によって増加したNrf2のARE配列への結合は、ARE配列に結合したMafKに結合するNrf2の量が増加したためであると考えられる。以上の点から、ARE配列に結合するMafKの量は、ケルセチン処理によって増加しないと考えられる。

[質問6]AREを活性化する化合物として、フラボノイド類以外にどのような化合物があるか。

[回答]フラボノイド類以外の化合物では、イソチオシアネート類、テルペン類及びスティルベン類が報告されており、特に、ワサビの成分である6-MITCがAREを活性化することが本研究室の成果によって明らかとなっている。

[質問7]Nrf2の核内移行について調べていたが、核内輸送メカニズムにはどのようなものがあるか、また、核内移行する分子は他にどのようなものがあるか。

[回答]Nrf2の核内輸送は、Crm1経路によって制御されることが明らかになっており、核内移行する分子は、NLS (Nuclear localization signal)または、NES (Nuclear export signal)配列を持つことが分かっている。本研究の分子標的であるNrf2、p53及びHDM2はNLS及びNESの両方を持ち、Keap1はNESを持っていることが明らかになっている。

[質問8]siRNAを用いた実験で、Keap1はタンパク質レベルで著しくノックダウンできていたが、Nrf2はKeap1ほどの効果が見られていない。この理由として何が考えられるか。

[回答]siRNAの導入による目的遺伝子の発現抑制の効率は、siRNAの設計や質に依存する。Keap1のsiRNAは、報告のあった配列と同じsiRNAを合成して実験に用いたが、Nrf2はアルゴリズム解析によって設計されたsiRNAを用いたため、Keap1ほどの抑制効果がみられなかつたと考えられる。

[質問9]他のフラボノイドと比べ、ケルセチンはARE活性化誘導能が高いのか。

[回答]これまでの報告から、ケルセチンは、お茶に含まれるカテキン類と比べ4～5倍ほど高いARE活性化誘導能を持っていることが分かっている。

[質問10]自然界ではフラボノイド類は配糖体として存在しており、体内ではどのように代謝されるのか。

[回答]配糖体として摂取されたフラボノイド類は、ナトリウム依存性のグルコース輸送体によって血管内に取り込まれ、β-グルコシダーゼによって糖が外れる。アグリコンとなったフラボノイド類は、肝臓のカテコール-O-メチル基転移酵素(COMT)によってメチル化されることが分かっている。

[質問11] ケルセチンはヒトでは作られないことから、生体にとっては異物として認識されていることが考えられるが、この点についてどのように考えているか。

[回答] 生体が天然化合物を異物として認識する場合、異物代謝酵素（いわゆる第一相解毒酵素）によって代謝される。しかし、フラボノイド類は、第一相解毒酵素群の発現を抑制する一方で、第二相解毒酵素群の発現を促進することから、ケルセチンは、細胞内分子レベルにおいて異物と認識されるのではなく、細胞保護作用を持つと考えられる。

[質問12] HepG2ではp53が活性化してアポトーシスが起こるが、正常な肝細胞ではアポトーシスは起こるのか。

[回答] 本研究において、正常細胞を用いて検討を行っていないが、正常細胞におけるp53の活性化は、UV照射やROSの産生によって起こる。損傷を受けたDNAが修復不可能な場合、正常細胞でもp53の制御によってアポトーシスが起こる。ケルセチンは、ROS産生を抑制することから、正常細胞においてアポトーシスを誘導する可能性は低いことが考えられる。

[質問13] p53の再活性化はあるが、HepG2でp53のレベルが低いのはmRNAが不安定であることが原因か。

[回答] HepG2細胞において、p53のmRNAが不安定であることもp53不活性化の原因の一つであることが考えられるが、p53のユビキチンE3リガーゼであるHDM2タンパク質が恒常に発現していることから、p53タンパク質が不安定になっていることも原因であると考えられる。

[質問14] ケルセチンは、どのように正常細胞と癌細胞を識別するのか。

[回答] これまでの研究によって、ユビキチンE3リガーゼの過剰発現が、癌化の一因であることが明らかにされてきた。ケルセチンは、ユビキチンE3リガーゼの発現及び活性を抑制することから、ユビキチンE3リガーゼを過剰発現した癌細胞に対して有効に働くと考えられる。

[質問15] HepG2細胞内で発現したp53タンパク質は変異していないか。

[回答] 多くの癌細胞のp53遺伝子を解析した報告によって、HepG2のp53遺伝子及びタンパク質は変異していないことが明らかとなっている。