

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 宇都 拓洋

題 目

6-(メチルスルフィニル)ヘキシル イソチオシアネートによる抗炎症及び抗癌作用の分子機構に関する研究：シクロオキシゲナーゼ-2及び誘導型一酸化窒素合成酵素を標的分子として  
(Molecular Mechanisms of Anti-inflammatory and Anti-cancer Effects of 6-(Methylsulfinyl)hexyl Isothiocyanate: Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase as Target Molecules.)

6-(メチルスルフィニル)ヘキシル イソチオシアネート (6-MITC) は、ワサビに含まれる辛味成分である。近年、*in vivo* 及び *in vitro* 実験により 6-MITC が抗癌活性をもつことが確認されているが、その詳しい分子機構は解明されていない。

前炎症性酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 及び誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) は、それぞれ過剰なプロスタグランジン及び一酸化窒素の合成に関与し、発癌や炎症等に重要な役割を果たしている。本研究は、6-MITC による抗炎症及び抗癌作用の分子機構を解明するために、リポポリサッカライド (LPS) で刺激したマウスマクロファージ RAW264 細胞を用い、6-MITC による COX-2 及び iNOS の抑制効果及びその分子機構の解析を行った。

6-MITC は LPS 誘導性プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 及び一酸化窒素 (NO) 産生、さらに COX-2 及び iNOS 発現を濃度依存的に抑制した。シグナル伝達系及び転写因子を解析したところ、6-MITC はシグナル伝達因子 ERK、p38 kinase による転写因子 CREB 及び C/EBP $\delta$  の活性化、またシグナル伝達因子 Jak2 に仲介される C/EBP $\delta$  及び JNK-AP-1 の活性化を抑制することで、LPS 誘導性 COX-2 発現を抑えていることが明らかとなった。一方、iNOS 発現抑制は Jak2 を介した JNK-AP-1 活性化を抑制することで引き起こされていると考えられた。6-MITC は LPS の細胞膜レセプター結合には影響しないことから、MAPK 及び Jak2 上流の細胞内因子が 6-MITC の標的であると示唆された。

さらに RAW264 細胞において、LPS と同様にインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 及び 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) も COX-2 発現を誘導した。6-MITC による COX-2 抑制効果を調べたところ、6-MITC は LPS 及び IFN- $\gamma$  誘導性 COX-2 発現は抑制するが、TPA 誘導性 COX-2 発現は抑制しなかった。分子メカニズムの解析により、LPS 及び TPA は COX-2 プロモーターの NF- $\kappa$ B、C/EBP 及び CRE を含むコア領域を介して COX-2 発現を誘導しているが、IFN- $\gamma$  はコア領域より上流の領域を仲介していることが明らかとなった。さらに 6-MITC は LPS 誘導性 CREB、C/EBP $\delta$  そして AP-1 活性化は強く抑制するが、TPA 誘導性 CREB 及び AP-1 活性化は抑制しなかった。IFN- $\gamma$  はこれらの転写因子を活性化しなかった。これらの結果から、COX-2 発現機構は誘導剤により異なり、6-MITC による LPS 及び IFN- $\gamma$  誘導性 COX-2 発現の抑制は、それぞれ異なる経路で行われていることが示唆された。

以上のことより、6-MITC は転写レベルで強い COX-2 及び iNOS 発現阻害効果を持つことが明らかとなった。これらの結果は、6-MITC の抗炎症及び抗癌作用を示すはじめての分子生物学的エビデンスであり、ワサビの持つ抗炎症・抗癌機能の解明に大きく貢献するものである。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Takuhiko Uto
題 目	<p>Molecular Mechanisms of Anti-inflammatory and Anti-cancer Effects of 6-(Methylsulfinyl)hexyl Isothiocyanate: Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase as Target Molecules.</p> <p>(6-(メチルスルフィニル)ヘキシル イソチオシアネートによる抗炎症及び抗癌作用の分子機構に関する研究：) シクロオキシゲナーゼ-2及び誘導型一酸化窒素合成酵素を標的分子として</p>
<p>6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MITC) is a chemopreventive compound occurring in wasabi (<i>Wasabia japonica</i> (Miq.) Matsumura), which is a typical Japanese pungent spice. Several studies have reported that 6-MITC has anti-cancer activity <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>, but the molecular mechanism is not elucidated yet.</p> <p>Cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) are important enzymes that mediate inflammatory processes. Excess up-regulations of COX-2 and iNOS have been associated with several types of cancers as well as inflammatory disorders. To clarify the mechanism underlying the anti-inflammatory and anti-carcinogenic action of 6-MITC, the effects of 6-MITC on the expression of COX-2 and iNOS in lipopolysaccharide (LPS)-activated RAW264 macrophages were investigated. 6-MITC showed a dose-dependent inhibition of LPS-induced production of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and nitric oxide (NO), and expression of COX-2 and iNOS. Molecular analysis demonstrated that 6-MITC blocked LPS-induced COX-2 expression by suppressing the activation of ERK/p38 kinase-mediated CREB and C/EBP<math>\delta</math>, and Jak2-mediated C/EBP<math>\delta</math> and AP-1. On the other hand, 6-MITC suppressed iNOS expression through the inhibition of Jak2-mediated JNK signaling cascade with the attendant to AP-1 activation. These inhibitory actions of 6-MITC were not caused by the influence on LPS binding to cell membrane receptors, suggesting that 6-MITC might target intracellular factors such as upstream of MAPK or Jak2.</p> <p>Moreover, interferon-<math>\gamma</math> (IFN-<math>\gamma</math>) or 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) also activated COX-2 expression in RAW264 cells. 6-MITC suppressed LPS- or IFN-<math>\gamma</math>-induced COX-2 expression, but did not suppress TPA-induced COX-2. Molecular analysis showed that LPS and TPA activated the cellular signaling to core elements of COX-2 promoter including NF-<math>\kappa</math>B, C/EBP and CRE sites, but IFN-<math>\gamma</math> activated the cellular signaling to upstream site of core elements. Moreover, LPS-induced activation of CREB, AP-1 and C/EBP<math>\delta</math> were markedly suppressed by 6-MITC, whereas TPA-induced CREB and AP-1 activation were not blocked by 6-MITC. On the other hand, IFN-<math>\gamma</math> did not activate these transcriptional factors. These results suggest that LPS, IFN-<math>\gamma</math> and TPA activate COX-2 induction by the different mechanisms, and the inhibitory effects of 6-MITC on LPS and IFN-<math>\gamma</math>-induced COX-2 expression were mediated by different pathways.</p> <p>In conclusion, 6-MITC has strongly inhibitory effects of COX-2 and iNOS expression at the signaling level and at the transcription factor/promoter levels. These findings provide a novel mechanism by which 6-MITC may exhibit anti-inflammatory and anti-cancer effects, and will give new insights into understanding for chemopreventive function of 6-MITC at molecular level.</p>	

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	宇都 拓洋
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 藤井 信
	副査 鹿児島大学 助教授 侯 徳興
	副査 佐賀大学 教授 柳田 晃良
	副査 琉球大学 教授 安田 正昭
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
審査協力者	
題 目	<p>Molecular Mechanisms of Anti-inflammatory and Anti-cancer Effects of 6-(Methylsulfinyl)hexyl Isothiocyanate: Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase as Target Molecules</p> <p>〔6-(メチルスルフィニル)ヘキシル イソチオシアネートによる抗炎症及び抗癌作用の分子機構に関する研究：シクロオキシゲナーゼ-2及び誘導型一酸化窒素合成酵素を標的分子として〕</p>
<p>6-(メチルスルフィニル)ヘキシル イソチオシアネート (6-MITC) は、ワサビに含まれる辛味成分である。近年、<i>in vivo</i> 及び <i>in vitro</i> 実験により 6-MITC が抗癌活性をもつことが確認されているが、その詳しい分子機構は解明されていない。</p> <p>前炎症性酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 及び誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) は、それぞれ過剰なプロスタグランジン及び一酸化窒素の合成に関与し、発癌や炎症等に重要な役割を果たしている。本研究は、6-MITC による抗炎症及び抗癌作用の分子機構を解明するために、リポポリサッカライド (LPS) で刺激したマウスマクロファージ RAW264 細胞を用い、6-MITC による COX-2 及び iNOS の抑制効果及びその分子機構の解析を行った。得られた研究結果の概要は次の通りである。</p>	

6-MITC は LPS 誘導性プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 及び一酸化窒素 (NO) 産生、さらに COX-2 及び iNOS 発現を濃度依存的に抑制した。シグナル伝達系及び転写因子を解析したところ、6-MITC はシグナル伝達因子 ERK、p38 kinase による転写因子 CREB 及び C/EBP $\delta$ の活性化、またシグナル伝達因子 Jak2 に仲介される C/EBP $\delta$ 及び JNK-AP-1 の活性化を抑制することで、LPS 誘導性 COX-2 発現を抑えていることが明らかとなった。一方、iNOS 発現抑制は Jak2 を介した JNK-AP-1 活性化を抑制することで引き起こされていると考えられた。6-MITC は LPS の細胞膜レセプター結合には影響しないことから、MAPK 及び Jak2 上流の細胞内因子が 6-MITC の標的であると示唆された。

さらに RAW264 細胞において、LPS と同様にインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 及び 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) も COX-2 発現を誘導した。6-MITC による COX-2 抑制効果を調べたところ、6-MITC は LPS 及び IFN- $\gamma$ 誘導性 COX-2 発現は抑制するが、TPA 誘導性 COX-2 発現は抑制しなかった。分子メカニズムの解析により、LPS 及び TPA は COX-2 プロモーターの NF- $\kappa$ B、C/EBP 及び CRE を含むコア領域を介して COX-2 発現を誘導しているが、IFN- $\gamma$ はコア領域より上流の領域を仲介していることが明らかとなった。さらに 6-MITC は LPS 誘導性 CREB、C/EBP $\delta$ そして AP-1 活性化は強く抑制するが、TPA 誘導性 CREB 及び AP-1 活性化は抑制しなかった。IFN- $\gamma$ はこれらの転写因子を活性化しなかった。これらの結果から、COX-2 発現機構は誘導剤により異なり、6-MITC による LPS 及び IFN- $\gamma$ 誘導性 COX-2 発現の抑制は、それぞれ異なる経路で行われていることが示唆された。

以上のように、6-MITCは転写レベルで強いCOX-2及びiNOS発現阻害効果を持つことが明らかとなった。これらの結果は、6-MITCの抗炎症及び抗癌作用を示すはじめての分子生物学的エビデンスであり、ワサビの持つ抗炎症・抗癌機能の解明に大きく貢献するものである。したがって、本論文は博士の学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	宇都 拓洋
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 藤井 信
	副査 鹿児島大学 助教授 侯 徳興
	副査 佐賀大学 教授 柳田 晃良
	副査 琉球大学 教授 安田 正昭
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
審査協力者	
実施年月日	平成 17年 12月 26日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査および副査は、平成17年12月26日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>その結果、審査委員会は、申請者が大学院連合農学研究科博士課程修了者としての学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに足る十分な資格を持つものと判定した。</p>	

学位申請者  
氏 名

宇都 拓洋

[質問 1] 細胞レベルで6-MITCがシグナル伝達系を抑制することが詳細に示されたが、酵素レベルではどうなのか？ 6-MITCはMAPKの酵素活性を抑制するのか？

[回答 1] 本研究において、*in vitro*系で6-MITCの酵素活性への影響は検討しなかった。6-MITCはすべてのMAPK (ERK、p38及びJNK) のリン酸化を抑制することから、6-MITCはMAPKの酵素活性に直接影響するのではなく、MAPKを制御する上流因子に影響を与えていると考えられる。

[質問 2] 動物レベルでの抗癌・抗炎症の役割を考えたとき、6-MITCの消化吸収や血中への取り込みはどうなっているのか？

[回答 2] 6-MITCの消化吸収に関する報告はない。しかし6-MITCの類似化合物であるイソチオシアネートの消化吸収に関する論文は発表されている。例えば、200 $\mu$ molのイソチオシアネートを含むブロッコリースプラウトをヒトに投与したところ、8時間後の尿中に58.3  $\pm$  2.6 %のイソチオシアネートが排出された。また、74 $\mu$ molの西洋ワサビ中のイソチオシアネートを経口投与したところ10時間後の尿中に42  $\pm$  5 %のイソチオシアネートが排出されたという報告もある。これらの報告より、摂食した6-MITCの約半分は体内に取り込まれると考えられる。さらに最近の研究で、50 $\mu$ molの4-MITCをラットに経口投与したところ、4時間後に血漿中の4-MITCの濃度が約20 $\mu$ Mになったと報告されている。本研究において使用した6-MITCの濃度はすべて20 $\mu$ M以下であることから、培養細胞の条件と同じく、経口投与後の生体内においても6-MITCが十分その機能を発揮できる濃度に達することができると思われる。

[質問 3] 2-、4-、6-及び8-MITCを用いた実験結果より、MITCの炭素鎖が長くなるとCOX-2及びiNOSの抑制効果が大きくなったが、さらに炭素鎖が長くなればより強い抑制効果は期待できるのか？

[回答 3] MITCの炭素鎖が長くなるのに比例して細胞毒性が強くなると考えられるため、抗炎症及び癌予防効果を持つ化合物としては好ましくない。

[質問 4] 6-MITCにはアポトーシス誘導効果はあるのか？

[回答 4] 前立腺癌、肝癌、膵臓癌及び大腸癌などの培養細胞において、6-MITCや4-MITCがアポトーシスを誘導することが報告されている。

[質問 5] 6-MITCは一つのシグナル伝達系を抑えるのではなく、MAPKやJak2活性化など複数の経路を抑えるMulti-functionとして働くがその理由はどう考えているか？

[回答 5] イソチオシアネート類はグルタチオンと結合し細胞内に高濃度蓄積される。このグルタチオン結合型イソチオシアネートが、酸化ストレスの抑制、細胞増殖阻害、抗炎症及び抗感染などの多彩な機能を発揮すると報告されている。このことから、細胞内に高濃度蓄積されたグルタチオン結合型6-MITCがMulti-functionとして働き、複数の抗癌・抗炎症のシグナル伝達系に影響を及ぼしていると考えられる。今後、グルタチオン結合型6-MITCがCOX-2及びiNOSシグナル伝達系に与える影響を検討する必要がある。

[質問 6] 食品成分によるCOX-2及びiNOS抑制のメカニズムは、NF- $\kappa$ B活性化を抑制することで引き起こされるという報告が多い。6-MITCはNF- $\kappa$ Bに関与しないが、どのように考えているか？

[回答 6] 確かにカプサイシンやエピガロカテキンなどの多くの食品成分はNF- $\kappa$ B活性化を抑制することでCOX-2及びiNOSを抑制すると報告されている。6-MITCはNF- $\kappa$ B活性化を抑制しないことから、6-MITCは新しいタイプのCOX-2及びiNOS阻害効果を持つ食品成分といえる。

[質問 7] 細胞中の6-MITCの濃度はどの程度と考えられるか？

[回答 7] 本研究では、細胞内の6-MITCの濃度は確認していない。しかし、イソチオシアネートはグルタチオンと結合することで、細胞外と比べて100倍から200倍の濃度で細胞内に蓄積するという報告がある。本研究において、6-MITCの濃度は16 $\mu$ M以下で使用していることから、6-MITCの細胞内濃度は、1.6~3.2mMに達すると予想される。