

審査の結果の要旨

氏名 侯 徳 興

アントシアン (anthocyan、花青素) は、フラボノイド系色素の一種で、花や果実における赤、青および紫などの多様な色調を発現する一群の化合物であり、自然界に広く分布している植物色素である。アントシアンはアントシアニジン (anthocyanidin) とアントシアニン (anthocyanin) の総称名であり、結合糖がはずれたアグリコン (aglycon) をアントシアニジン、その配糖体をアントシアニンと呼ぶ。アントシアンの癌予防効果については、疫学調査や動物実験などにより示唆されているが、細胞および分子レベルでの解析はほとんどなされていない。代謝実験ではアントシアンが経口投与後、配糖体の形で吸収され、血中に移行することが報告されており、アントシアンが吸収されて生体調節機能を果たすことが予想される。

一方、発癌は多段階を経て起こるが、基本的には、変異原物質や発癌物質によるイニシエーション過程とプロモーターによる損傷細胞の癌化プロモーション過程を経て前癌細胞になる。さらに前癌細胞がプログレッションによって癌に至る。その過程に多くの分子イベントやメディエーターが関与していることと考えられている。本研究は、多段階発癌に深く関与する細胞形質転換、炎症およびアポトーシス等についてアントシアンの作用およびその分子機構を解析した。

1. アントシアンの細胞形質転換の抑制作用およびその分子機構の解析

細胞形質転換解析のモデル系として知られるマウス新生児上皮細胞 (JB6) は、発癌プロモーター (TPA 等) による細胞増殖に関する細胞内シグナル伝達系 (MAPK) や癌原遺伝子 (AP-1 等) が活性化され、細胞形質転換を引き起こす。数種類のアントシアニンに細胞形質転換抑制作用があることを確認し、その抑制作用にはアントシアニジンの構造が深く関与することを示唆した。次に、主要な6種類のアントシアニジンを用いて構造と活性の関連を検討した。Delphinidin, cyanidin および petunidin のようなB環に2つ以上の水酸基を持つアントシアニジンは、細胞形質転換および AP-1 転写活性を著しく抑制した。一方、pelargonidin, peonidin および malvidin は、そのような構造を持たず、抑制作用を示さなかった。さらに、最も強い抑制作用を示した delphinidin を用いてその抑制作用の分子機構を細胞内シグナル伝達系および転写制御の方面から解析した。Delphinidin が、MAP キナーゼである ERK および JNK のリン酸化を特異的に阻害したが、p38 のリン酸化を阻害しなかった。その上流の MAPK キナーゼへの阻害作用も同様な結果が得られた。しかし、細胞形質転換抑制作用を示さなかった peonidin は MAP キナーゼに対する阻害

作用が認められなかった。以上の結果から、delphinidin が、細胞内シグナル伝達系 p38 の経路を介せずに ERK および JNK の経路を介して AP-1 の転写活性を阻害し、TPA 誘発性細胞形質転換を抑制することが明らかとなった。

2. アントシアンのシクロオキシゲナーゼ-2 の抑制作用およびその制御機構の解析

シクロオキシゲナーゼ(cyclooxygenase, COX)は、アラキドン酸からプロスタグランジン類の合成を触媒する律速酵素であり、二つのアイソフォームが存在する。COX-1 は胃粘膜、腸、腎臓および血小板など多くの組織に常に存在し、主として生体の恒常性維持機構にはたらくプロスタグランジンを産生する。COX-2 は主として炎症部位で誘導された炎症性サイトカインやリポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) などに反応して、炎症や癌などに関わるプロスタグランジンを産生する。

本研究は、マウスマクロファージ RAW264 細胞を用いてアントシアンの LPS 誘発性 COX-2 発現の抑制作用およびその分子機構を解析した。アントシアンは、COX-2 たんぱく質の発現を抑制した。次に、主要な 5 種類のアントシアニジンを用いて構造と活性の関連を検討した。Delphinidin および cyanidin のような B 環に 2 つ以上の水酸基を持つアントシアニジンは、COX-2 たんぱく質の発現を著しく抑制した。しかし、pelargonidin, peonidin および malvidin は、そのような構造を持たずに COX-2 タンパク質の発現に対する抑制作用を示さなかった。さらに、最も強い抑制作用を示した delphinidin を用いてその抑制作用の分子機構を転写因子および MAP キナーゼシグナル伝達系から解析した。Delphinidin は、COX-2 を制御する転写因子において I κ B の分解、c-Jun のリン酸化、p65 および C/EBP δ の核内移行をそれぞれ抑制したが、CREB のリン酸化や C/EBP β の核内移行は抑制しなかった。また、delphinidin は LPS 誘発性 MAPK (ERK, JNK および p38) のリン酸化を濃度依存的に抑制した。MAPK インヒビターを用いて COX-2 の阻害特異性を調べた結果、U0126、SP600125 および SB203580 はすべて COX-2 たんぱく質の発現を特異的に抑制した。以上の結果より、delphinidin は MAPK のシグナル伝達系を介して転写因子 NF- κ B、C/EBP δ および AP-1 の活性化を抑制することによって、COX-2 の発現を制御していることが示唆された。

3. アントシアンの癌細胞アポトーシス誘導作用およびその分子機構の解析

ヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL-60) を用いてアントシアンのアポトーシス誘導作用を検討した。まず、主要な 6 種類のアントシアニジンを用いて構造と活性の関連を検討した。Delphinidin、cyanidin および petunidin のような B 環に 2 つ以上の水酸基を持つアントシアニジンは、HL-60 細胞のアポトーシスを顕著に誘導した。一方、pelargonidin, peonidin および malvidin は、そのような構造を持たず、誘導作用を示さなかった。さらに、最も強い誘導作用を示した delphinidin およびその配糖体 delphinidin 3-sambubioside を用いてその誘導作用の分子機構を解析した。活性をもつアントシアンは、濃度および時間的に HL-60 細胞に活性酸素を産生させ、ストレスシグナル伝達経路の JNK リン酸化および c-Jun の発現を誘導した。その結果、ミトコンドリアの膜電

位低減、シトクロム *c* の放出および Bid のトランケーションを引き起こすことによって、アポトーシス実行系であるタンパク質分解酵素カスパーゼが活性化され、DNA 断片化が誘導された。一方、抗酸化剤 NAC やカタラーゼはアントシアンによる活性酸素の産生、JNK のリン酸化、カスパーゼの活性化および DNA の断片化などをすべて抑制した。これらの結果により、誘導活性をもつアントシアンが活性酸素-JNK 経路を介したミトコンドリアの機能障害によって HL-60 細胞のアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

本研究において、アントシアンが細胞形質転換抑制作用、LPS 誘発性 COX-2 の発現抑制作用およびヒト急性前骨髄性白血病細胞のアポトーシス誘導作用があることを明らかにした。さらに、これらの作用発現にはアントシアニジンの B 環水酸基の数が少なくとも 2 つ以上必要であることを示した。さらに、分子機構として、活性酸素および細胞シグナル伝達系 MAPK を介した転写因子 AP-1、NF- κ B や C/EBP δ の制御と深く関わっていることを示唆した。以上のように、アントシアンの癌化学予防作用を細胞・分子レベルで初めて明らかにした研究であり、博士(薬学)の授与に値するものと判断した。