



Title	Regulation of apoptosis related factors in intrinsic signaling pathway by myricetin in vitro [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	檀, 功勳
Citation	北海道大学. 博士(環境科学) 甲第13260号
Issue Date	2018-06-29
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/71164">http://hdl.handle.net/2115/71164</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	GONG_XUNTAN_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文審査の要旨

博士 (環境科学)

氏名 檀 功勳

審査委員	主査	准教授	藏崎 正明
	副査	教授	沖野 龍文
	副査	教授	野呂 真一郎
	副査	准教授	豊田 和弘
	副査	名誉教授	田中 俊逸
	副査	教授	斎藤 健

(大学院保健科学研究院)

### 学位論文題名

Regulation of apoptosis related factors in intrinsic signaling pathway by myricetin *in vitro*  
(ミリセチンによる内因性シグナル伝達経路のアポトーシス関連因子の試験管内での調節)

毎日摂取する野菜および果物に豊富に含まれているポリフェノール類はその抗酸化作用により心臓病の軽減、抗炎症作用あるいは糖尿病の症状軽減などの効果がすでに多くの研究によって明らかにされている。しかし、近年、ポリフェノールのもう一つの効果が注目されている。つまり、ポリフェノール類には抗酸化作用だけではなく酸化促進作用 (Prooxidant 活性) もあり、その作用により抗癌作用を示すことが期待されている。

本研究で注目したミリセチンは、果実に広く存在し、老化や病気から人体を保護する強力な抗酸化作用を示すことが示されてきた。しかしながら、ミリセチンの酸化促進作用に関してはその報告の数はまだ少なく、その詳細な機構は依然として不明なままである。本研究では、ミリセチンの酸化促進機構を明らかにするため、ラット腫瘍細胞およびヒト乳がん細胞の2つの細胞株を用意し、それらの細胞をミリセチンを介して細胞死に導くシグナル伝達経路を明らかにした。

神経細胞のモデルにも用いられるPC12細胞は、ラット副腎髄質腫細胞である。この細胞に、最大40  $\mu\text{M}$ まで様々な濃度でミリセチンを曝露したところいかなる細胞毒性も示さなかった。しかし、アポトーシスを起こす無血清条件下で0.1および1  $\mu\text{M}$ の濃度でミリセチンを曝露したところ、起こしたアポトーシスを促進する効果がトリパンブルー染色法による細胞生残率およびDNA抽出後のアガロース電気泳動法によって確認された。アポトーシスを起こす経路は数多く報告されているが、主に内因性経路と外因性経路の二種に大別されている。無血清培地によりPC12細胞にアポトーシスは内因性経路の活性化によって誘導されることが報告されている。この経路に沿ってp53, Bax, Bcl-2, 細胞質中のシトクロムcおよびカスパーゼ-9量をウェスタンブロット法で調べたところ、無血清処理によりそれらの因子はアポトーシス抑制因子であるBcl-2以外はすべて発現が有意に増加していた。無血清に加えて0.1および1  $\mu\text{M}$  という低い濃度のミリセチンを同時に曝露することでそれらの因子は無血清の実験群に比べてさらに有意に増加しており、ミリセチンは内因性のアポトーシス経路の因子

を増加させることで無血清培地が誘導したアポトーシスを増強していることが明らかになった。つまり褐色細胞腫の一種であるPC12細胞においてミリセチンはそれ単体では細胞死を誘導することはできなかったが、他の細胞死に導く要因による効果を増大させる働きがあることが確認された。

一方、多くのポリフェノール類に近年、抗がん作用があることが報告され注目を集めている。ミリセチンにも、他のポリフェノールのようなヒトがん細胞に対する抗がん作用が有るか無いかをまず確認した。ヒト乳がん細胞であるMCF-7細胞に対しミリセチンは明らかな細胞毒性を示し、MTTアッセイによりIC50を決定すると、48時間後に29.5  $\mu$ Mであった。この値は他のポリフェノール類のがん細胞におけるIC50値より二倍以上低い（より高い抗がん作用を有する）値であった。また、細胞内の還元型グルタチオン量を測定することでがん細胞内の酸化状態がミリセチン投与により亢進していることが示された。このことより、ミリセチンが、がん細胞内でプロオキシダント活性を示している可能性が考えられた。酸化状態の亢進およびNF- $\kappa$ Bの不活性化によりp53がミリセチン未処理細胞群に比べて大幅に増加していることが確かめられた。p53の活性化は、内因性のアポトーシス経路を活性化させ、シトクロムcの放出によってアポトーシスを実行するためのシグナル伝達を誘導する。その伝達経路に沿って、ミリセチン曝露MCF-7細胞において、p53の上昇によりプロアポトーシス因子であるBaxの発現が増大し、抗アポトーシス因子であるBcl-2が減少した。続いてApaf1が活性化することにより、アダプター分子Apaf-1と結合する遊離サイトゾルシトクロムcの増加を意味し、アポトーシス実行因子であるカスパーゼ3を活性化したことが確認された。本研究により、ヒト乳がん細胞におけるミリセチンのアポトーシス誘導は、ほかのポリフェノール類よりも低い濃度で、酸化状態が更新することを引き金に内因性経路を活性化させて起こることが証明された。

がんは現在人類の主要な死亡原因の1つだが、その治療のために副作用の少ない抗がん剤を開発することが求められている。ミリセチンは従来、抗酸化作用によりアンチエイジング等の働きがあることが報告されていたが、本研究により、ミリセチンの潜在的な酸化促進活性機能が証明され、ミリセチンの抗がん剤あるいは抗がん剤との併用をする薬剤としての可能性が示された。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。