HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ajwain and its phenolic compound, carvacrol improve cadmium-induced apoptosis in PC12 cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Subrata, Banik
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第13888号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78561
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Subrata_Banik_review.pdf, 審査の要旨



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士（環境科学）　　氏 名 Subrata Banik

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　教 授　齋 藤 健 （保健科学研究院）

学 位 論 文 題 名

Ajwain and its phenolic compound, carvacrol improve cadmium-induced apoptosis in PC12 cells
（Ajwainとそのフェノール化合物であるカルバクロールは、PC12細胞におけるカドミウム誘導アポトーシスを改善する）

今日、環境は多くの種類の環境汚染物質の脅威に晒され、各地で多くの汚染が報告されています。特に、鉛（Pb）、カドミウム（Cd）および水銀（Hg）等の重金属は、生体に取り込まれますと生理機能を損傷し重篤な障害を引き起こすため、世界中で大きな懸念事項となっています。ことに、Cdは多くの食品に含まれているため、人体に容易に取り込まれ、数多くの障害の原因ともなっています。そのうちの一つが、日本の富山県で起きたイタイイタイ病です。Cdの急性および慢性曝露は、肺、肝臓、消化器系、生殖器系および心臓血管系を含む疾患を引き起こし、代謝および生理学的毒性を誘発する可能性があります。 Cdが及ぼす毒性の関与するパターンは非常に複雑ですが、多くの研究者により、生体内におけるCd毒性の発現機構を明らかにするために様々な研究が為されています。しかし、Cd毒性を緩和する薬物療法またはキレート剤を用いた療法は未だ確立されていません。そのため、Cdの毒性を緩和あるいは減衰させる薬剤を探索、あるいは開発することが強く求められています。

一方、食事を介した重金属毒性の緩和へのアプローチ、伝統的な薬草、あるいは天然物を利用する解毒作用等は、副作用のない重金属毒性に対するより良い予防手段として機能することが期待されています。本研究の目的は、Ajwain（*Trachyspermumammi* L.）種子のエタノール抽出物とそのフェノール化合物であるカルバクロールがCd誘発細胞毒性、酸化ストレス、およびそれに起因するアポトーシスにどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることです。さらに、Cd毒性軽減の分子機構の解明も試みています。

Ajwain（AE）は南アジアで人気のあるスパイスであり、歴史的に炎症、毒性、神経、生殖器または呼吸器疾患などの多くの疾病の治療に使用されてきました。これらの疾病における症状は、Cd毒性の発現にもよく見られるものです。第2章では、AEのエタノール抽出物のPC12細胞におけるCd誘導細胞毒性およびアポトーシスに対する改善効果を明らかにしました。最初に、AEの非毒性用量を決定して、その非毒性容量の範囲でCd（5または10 μM）との同時曝露を行なって、48時間後のAEのCd毒性低減の効果を観察しました。 AEの安全であるが最も効果的な用量（240 μg / mL）は、Cdで処理したPC12細胞の生残率を大幅に上昇

させました。細胞の生残率と培地中の乳酸脱水素酵素（LDH）活性の結果から、AEはCdによる細胞毒性を低下させ、細胞膜を保全することが示されました。Cd曝露されたPC12細胞では酸化ストレス上昇とアポトーシスの誘導が観察されました。つまりCd曝露により、細胞内還元型グルタチオン（GSH）レベルが増加し、DNAのラダーパターンが出現したのです。AEは、GSHレベルを増加させることで細胞の酸化状態を大幅に改善し、Cdにより誘導されたDNA断片化を減少させました。さらに、ウエスタンブロットの結果は、AEがアポトーシス促進因子であるBaxのCd誘導性発現を上方制御し、抗アポトーシス因子Bcl-2、Bcl-xLおよびNF-κBの発現も上方制御したことを明らかにしました。このことにより、Cd曝露によるミトコンドリアから細胞質へのシトクロムcの誘導放出は、AEとの同時曝露により有意に減少しました。Cdによって増加したカスパーゼ-3の発現も、AEによって有意に減少しました。これらのすべての結果から、AEはP12細胞においてCd誘発細胞毒性とアポトーシスを減少させることが確認されました。

AEのこのエタノール抽出物は、これまでのAEのアルコール抽出物ですでに報告されているように、カルバクロール（イソチモール）が主要フェノール化合物として多量に含まれていることが分かっています。さらに、本研究でも、AEのLC-MS分析プロファイルの最大ピークがカルバクロールであることが確かめられました。したがって、研究の次の目的は、AEのCd誘発細胞毒性およびアポトーシスに対する改善効果がカルバクロールによるものかどうかを明らかにすることになります。

以前の研究では、カルバクロールが高い抗酸化能を示し、*in vivo*および*in vitro*で様々な毒性物質に対する保護効果を示したことがすでに報告されています。第3章では、PC12細胞でのCd誘発細胞毒性およびアポトーシスに対するカルバクロールの効果を調べました。まず、PC12細胞におけるカルバクロールの非毒性濃度が、200 μM以下であることが分かりました。100 μMカルバクロールとCd（10 μM）と48時間共曝露すると、Cd曝露により低下した細胞生存率が大幅に改善しました。また、この条件下で、Cd曝露により上昇したLDHレベルが低下し、GSHレベルとグルタチオン還元酵素の発現が増加しました。カルバクロールは、Cdにより誘導されるDNA断片化も減少させました。Cd曝露細胞のアポトーシス率は、カルバクロールの同時曝露により大幅に減少しました。カルバクロールの同時曝露は、Cdによるmtor、Akt、NF-κB、ERK-1、およびNRF2の発現を下方制御しました。さらに、カルバクロールは、カスパーゼ3の切断、シトクロムcの細胞質への放出量、およびアポトーシス誘導因子（AIF）の発現を減少させました。さらに、カルバクロールは、Cdとの同時曝露時にPC12細胞でメタロチオネインの発現を上方制御しました。全体として、カルバクロールはCd誘発細胞毒性を大幅に低下させることが明らかになりました。

本学位論文の結論として、4章でAE抽出物はCd誘導細胞毒性を改善し、その効果はAEに含まれるポリフェノールの1種であるカルバクロールが大きく担っていることを述べています。今後、Ajwainあるいはその主要なポリフェノールであるカルバクロールが副作用のないCd毒性緩和剤として用いられることが期待されます。

審査委員一同は，これらの成果を評価し，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充分な資格を有するものと判定しました。