



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Effects of environmental factors on the pro-oxidant properties of epigallocatechin gallate [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Bondad, Serene Ezra Corpus
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第14632号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83610
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	BONDAD_Serene_Ezra_Corpus_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士 (環境科学)

氏名 Serene Ezra Corpus Bondad

審査委員	主査	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	荒木 敦子 (大学院保健科学研究院)

学位論文題名

Effects of environmental factors on the pro-oxidant properties of epigallocatechin gallate
(エピガロカテキンガレートの酸化促進特性に対する環境要因の影響)

酸素は生命を維持する重要な分子であるにもかかわらず、強い毒性をもつことが広く知られている。我々は遠い過去にミトコンドリアを介して酸素によりエネルギーを得るシステムを手に入れた代償に、酸素により老化し、酸素によりDNAが損傷し、あるいは癌などの致死的な疾病に見舞われ死に至る運命が義務づけられている。生体内の抗酸化物質は、そのような酸素の利点と危険性のバランスを保つ上で重要な役割を果たしてきた。しかし、私たちが本来有している抗酸化物質が酸素による毒性に対処できない場合、食品などから抗酸化物質を補給する必要がある。主に緑茶に含まれるエピガロカテキンガレート (EGCG) などのポリフェノール類は、その抗酸化作用が最も広く研究され、健康上の有益である点が数多く報告されているため、多くの人々の関心を集めている。しかし、その一方、EGCGが酸化促進効果も発揮していることが近年報告され始めており、この矛盾の起る機構あるいは酸化促進効果を引き起こすような状況の解明が注目されている。本研究は、EGCGの抗酸化能から酸化促進能への切り替えの機構がどのようなきっかけで起こり得るのかを明らかにするため、主に加熱によるEGCGの変化、毒性の強い物質および他の抗酸化剤とEGCGの共存、およびEGCGの作用する細胞種の違いなどの環境要因の関与を通じて、EGCGの酸化促進効果の有無とその分子機構を調べることを目的とした。

第2章では、強い環境毒性が知られるカドミウム (Cd) 存在下での、EGCGと抗酸化能を有することが良く知られているL-アスコルビン酸 (ビタミンC) との相互作用に焦点をあてた。実験の結果からEGCG単独、L-アスコルビン酸単独、およびその2つの組み合わせはPC12細胞に細胞毒性を引き起こさなかった。しかし、Cdが存在する場合、L-アスコルビン酸はその抗酸化特性によりCd誘発毒性を改善するにも関わらず、意外なことにEGCGはCdの毒性を増幅し、酸化促進していることが窺えた。ウェスタンブロット法の解析により、L-アスコルビン酸はオートファジー因子を活性化させることによりCd毒性を緩和しているが、EGCGではオートファジーを介したアポトーシスを起こしていることが明らかになった。また、EGCGとL-アスコルビン酸の共曝露はCd毒性に対しその緩和効果が強化されるのではなく、拮抗的に働いている可能性が示された。

第3章では、EGCGなどのポリフェノール類が金属イオン (Cdなど) の存在下で酸化する

という以前の発見から着想を得て、Cdとの同時曝露の前に、加熱によりEGCGの酸化を誘発することで、2章において観察されたEGCGおよびCdの共曝露による細胞毒性強化が減弱するのではないかと仮説のもとに実験が行われた。しかし、結果は予想に反し、加熱されたEGCGは、Cdと組み合わせた場合、その細胞毒性を同程度かむしろ強化することが明らかになった。共曝露下での活性酸素種（ROS）量、およびウェスタンブロット法によるオートファジー及びアポトーシス因子の発現量の結果から、非加熱および加熱EGCGが細胞死を増強するためにオートファジー関連因子群に異なる発現形態を引き起こしたことが明らかになった。第3章の結果から、EGCGの細胞への影響は単純ではなく、その化学的活性、おそらくその構造の変化に由来する活性の変化に依存していることが推察された。

第4章では、MCF-7乳癌細胞に対するEGCGの酸化促進作用による抗癌効果の可能性に着目した。さらに3章において加熱による構造変化がある可能性が示されたことから、MCF-7細胞に対する抗癌活性が、加熱または非加熱EGCGによる処理の違いで変わるのか否かも明らかにすることを目的とした。その結果、LC/MS分析により、加熱時間に応じてEGCG量が減少し、いくつかの種類の変性体が加熱時間に応じて生成されることが示された。これは、EGCGの酸化が変性の形成を起こすという以前の研究の結果を裏付けている。MCF-7細胞は、EGCGで処理した後、生存率、細胞数、および膜の完全性の有意な低下を示した。細胞内ROS、過酸化脂質量およびアポトーシス因子の測定から、EGCGが細胞内でROS量を増加させ脂質過酸化を誘発し、アポトーシス細胞死を誘導していることが明らかになった。しかし、EGCGの加熱時間に応じて、ROSの生成量が有意に低下し、抗酸化関連酵素および還元型グルタチオンが有意に増加した。このことは、3章とは逆に加熱時間が長くなると、MCF-7細胞内でEGCGの酸化促進能が減弱することを示している。なぜこのような逆の現象が起こるのかは今後さらなる研究が必要であるが、3つの章すべてで、EGCGは、細胞毒であるCdの存在下および癌細胞内で酸化促進効果を示すことが認められた。以上の結果をまとめると、EGCG活性は通常の細胞においては抗酸化能を示すが、その細胞が毒に曝され正常な働きができなくなったり、癌細胞に変化するなどした時は速やかにその細胞を除去できるように酸化促進に切り替わっていることが示唆される。今後さらに、その濃度、付随する化学物質、細胞株、および状態（熱分解など）などを細かく観察し切り替え機構の解明が行われることが期待される。

生体の酸化に対する防御機構の解明はこれまで多くの研究の目標であったが、ポリフェノール類の酸化促進により、癌細胞や損傷した細胞の除去が行われるという考えは比較的新しい概念である。EGCGが酸化防止から酸化促進に（あるいはその逆に）いつどのように切り替わるかについての詳細はまだ完全には理解されていないが、この研究は、その契機になり得る。

審査委員一同は、これらの成果を評価し、また、大学院博士課程における申請者の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。