

表紙

食物成分による細胞内シグナル伝達系分子の調節

2014 年

奈良女子大学大学院 人間文化研究科

博士後期課程 共生自然科学専攻

北岸靖子

# 食物成分による細胞内シグナル伝達系分子の調節

2014 年

奈良女子大学大学院 人間文化研究科

博士後期課程 共生自然科学専攻

北岸靖子

## 目次

序章	2
第1章 がん細胞に対する食品成分の作用	13
第2章 がん抑制遺伝子産物 PTEN の機能	35
第3章 NAFLD における PI3K / AKT / PTEN 経路の役割	58
第4章 PPAR に関連する PI3K / AKT / PTEN 経路が神経保護に働く	72
第5章 まとめと今後の展望	87
謝辞	110
発表論文	111

## 序章

これまでの研究と本研究の着想に至った経緯、研究の  
材料と方法

## これまでの研究の背景、研究目的と独創的な点

RNA 干渉を研究ツールとして活用したり医学的に応用したりすることは広く試みられ、国内外で顕著な成果が上がっている。RNA 干渉とは線虫で発見された遺伝子発現の新しい制御機構であり (Fire et al. Nature 1998)、その作用の鍵を担っているのが Dicer である。2006 年頃からミツバチが大量に失踪する現象が米国やヨーロッパなどの各地で起こっている。いわゆる CCD (蜂群崩壊症候群: Colony Collapse Disorder) であるが、大量死する原因はいまだ判然としない。現在有力なのは、強力な殺虫剤や環境変化 (温暖化や電磁波) によるストレスなど複数の要因が重なってミツバチの免疫力が弱ったうえに、イスラエル急性麻痺ウイルス (IAPV) に感染したことが原因だとする説である (Bromenshenk et al. PLoS One. 2010)。CCD に見舞われた巣箱のミツバチでは、細胞内の重要なタンパク質製造装置であるリボソームの破壊量が多く、殺虫剤にも菌の感染にも栄養不良にも対応できていない。この問題解決をさらに進めるためには、ミツバチ細胞を用いた分子生物学的なアプローチが不可欠である。

これまでのところミツバチ細胞株の樹立の報告はなく、材料の安定供給ができないことが研究進展の妨げとなっている (Hunter WB In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2010)。また、分子生物学的な解析には細胞への遺伝子導入が不可欠であるが、多くの実験に使用する市販の遺伝子導入試薬は高価である。ウイルスベクターによる遺伝子導入は非常に導入効率が高いものの、操作が煩雑であり、多種類の調整遺伝子を導入するには不向きである。従って、限られた遺伝子解析しかできない制約がある。

ミツバチ細胞に遺伝子を発現させて不死化できれば、ミツバチ細胞株が樹立できると考えられる。ミツバチ細胞における遺伝子発現のためのプロモーターや不死化遺伝子の選択がポイントである。この研究と並行して、同安価で効率の高い遺伝子導入試薬を自力で開発すれば、その後の遺伝子機能解析に必要な量を賄うことができる。

本研究の目的は、ミツバチ細胞株の樹立である。また本研究に必要な遺伝子導入試薬も、食用油をベースとした低毒性で導入効率の高い独自のリポフェクション試薬を開発する。樹立した細胞における RNA 干渉のメカニズムを追求する。そして、正常細胞内遺伝子制御機構に RNA interference (RNAi; RNA 干渉) が備わっていることをウイルス感染対策などに医薬・農薬として応用することが研究目的である。

セイヨウミツバチ幼虫 (*Apis Mellifera*) から得られた初代培養細胞に、種々の遺伝子 (*v-src*, *c-erbB2*, *p53*, *tob*, *EGFR* など) の発現プラスミドを独自に開発している遺伝子導入試薬を用いて導入し、15%牛胎児血清添加グレース培地・30°C恒温槽における培養条件で長期継代培養を試みる。このリポフェクション試薬は、研究室内で共同開発し改良してきた中で、最も効率が高く低毒性のものを用いる。継代できた培養細胞のゲノムを抽出し、導入遺伝子やミツバチ固有の遺伝子プライマーを用いた PCR (polymerase chain reaction) で増幅し、ミツバチ細胞由来であることを確認する。対照としてヒト培養細胞株ゲノム遺伝子を用いた PCR 解析も行った。また、細胞内における Dicer など RNAi に関連する分子発現も調べた。

本研究は、RNA 干渉を用いた新しい概念で、細胞外からのウイルス制御を可能とする技術を開発する点に特色がある。これまで研究のネックになっていた細胞株の樹立や長期細胞培養の必要性は、CCD の出現以降極めて高い。ヒトがん研究で明らかになっているオンコジーンの機能を本研究でミツバチ細胞に応用する点が独創的である。樹立した細胞を用いて、次の RNA 干渉による細胞内情報伝達経路の修飾とミツバチ細胞への応用へと展望を開くことができる。本研究はその基盤となる重要な研究である。この技術は今後の医学や生化学領域の研究開発にも画期的な進歩をもたらす可能性が高い。RNA 干渉の高い特異性から変異遺伝子の siRNA が正常細胞に取り込まれても作用しないことに着眼点があるが、類似の先

行研究はミツバチ細胞では特でない。今後起こり得る有害な未知のウイルス感染症に対しても素早い対応が可能となる。この方法が有効ならば、がんやウイルス感染などの難治性疾患についても治療の糸口を提供できる。また、本研究成果がもたらす正確な科学情報や遺伝子技術革新は産業界や医学界への貢献も大きい。

### 研究経過と得られた結果と本博士論文研究の着想に至る経過

RNA 干渉を研究ツールとして活用することやその生化学的応用は広く試みられ、国内外で顕著な成果が上がっている。そこで、RNA 干渉のミツバチ細胞などにおけるウイルス感染症への農学的応用を目指した。すでに、食用成分をベースとした細胞に低毒性である新規遺伝子導入試薬を用いることにより、特定の遺伝子 (c-myc など) が導入されたミツバチ初代培養細胞は継代培養が可能となった。また、RNA 干渉を惹起させる DNA カセットを考案し、非コード RNA がどのようなメカニズムで働くのかという課題に対して、エフェクター分子の同定を踏まえて、非コード RNA の動作原理を解析した。さらに、遺伝子と試薬の混和溶液を霧状にして噴霧し、同時に強力な赤外線照射を行うことで、1メートル以上離れたシャーレ上の培養細胞に遺伝子導入できる装置を開発中である。種々の動物種でのフィールド応用も可能と考えられ、技術移転の可能性が高い。GFP 遺伝子を精製し (1mg 以上) トランスフェクションに使用可能な状態で保存している。実際に浮遊 DAUDI 細胞を用いて GFP 遺伝子を導入したところフローサイトメーターでおよそ 15% の導入効率が得られた。現在も赤外線の波長や強度を変えつつ至適な条件を整えているが、これまでの実験結果から、遺伝子導入効率は、赤外線電球によって照射した場合、Jurkat や Daudi ヒト浮遊細胞での検討結果、およそ 20% の上昇が確認された。赤外線照射による遺伝子導入効率の増加は、単に研究用途のみならず、蛋白質発現 DNA やマイクロ RNA などの細胞調節機能誘導を介して、種々のウイルス感染対策などに使用できる。ヒトへの応用ばかりではなく、ペットや農作物などへの利用も十分可能であり、開発が進展すれば産業への社会貢献も大きいと思われる。この点に関し RNA 干渉などのアレルギーへの応用について総説論文を発表している。

食用成分をベースとした細胞に低毒性である新規遺伝子導入試薬を用いることにより、特定の遺伝子 (c-myc) が導入されたミツバチ初代培養細胞は、遺伝子導入後およそ 8 か月を超える時点においても継代培養が可能となった。樹立したミツバチ細胞は公表済である

(Kitagishi et al. *In vitro Cell. Dev. Biol. Animal* 2011)。ゲノム PCR 解析から、この継代培養細胞は確かにミツバチ由来であると同時に IAPV 感染は陰性であったので、以後の研究に十分活用できる。また、新たに開発した新規遺伝子導入試薬は従来のもものと同等以上の遺伝子導入効率が認められるうえ、コストは極めて低い画期的なものである。一般的に困難とされている浮遊細胞への遺伝子導入も成功し、ヒト B 細胞由来の Daudi 細胞で GFP 発現細胞株を容易に作製できた。この遺伝子導入試薬開発については、共著者論文として発表した (Yoshida et al. *Int J Curr Res* 2010)。

細胞内でのシグナル伝達系を中心に RNAi の機能解析も行った。さて、食欲不振や拒食症は医学的にも重要な問題を含み治療が難しい。古来様々な香辛料の適度の摂取が、こうした場合に安全な食欲増進効果をもたらし、一部に良好な結果を得てきたことが知られている。近年のバイオ研究から、食欲の調節には短鎖ペプチドなどからなる摂食ホルモンが重要な役割を担っていることが明らかになっている。紫外線や放射線あるいは発がん物質などによる DNA 損傷は、遺伝子変化や染色体異常の引き金になる。これらの蓄積は老化や発がんに関係していることが、DNA 修復分子の機能解析によって明らかになっている (PNAS 108:1525-30, 2011)。通常は損傷した DNA は DNA 修復分子群によって補修されるが、そのメカニズムは複雑でまだ完全には解明されていない。国内外における研究成果から、DNA 修復機構には様々な分子群が関与している。また、食要因での DNA 損傷やエピジェネティッ

クな制御が報告されている (J Nutr. 133S3:96573, 2003, Ext Biol Med. 232:176-83, 2007)。これら分子群遺伝子に着目し、DNA 修復分子群の遺伝子発現の制御や変化がどのようなメカニズムで起こるのかをエピジェネティックな解析を加えていくと共に、環境要因とりわけ食環境との関わりを解明して、食健康の増進に資することが目的である。免疫系に關与する新しい食欲関連メカニズムや食欲因子 (食成分やマイクロ RNA など) が明らかになる。世界中で薬味や調味料として用いられてきた香辛料やハーブの大部分は安全な食品であり、医薬品のもたらす副作用などをそれほど考慮することなく、また早期に食生活への応用が可能な実用性を有する研究といえる。香辛料の食欲増進効果を科学的に検証し、摂食障害やがんの化学治療などによって免疫力の低下が著しいケースに、適切で安全な食事療法を提案することにある。マイクロ RNA の解析は斬新であり、細胞生物学的にも未知の知見をもたらす可能性が高い。PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor)や ER(estrogenreceptor)などの転写活性化を介した免疫増強メカニズムの分子基盤を明らかにすることで (Curr Med Chem. 2010;17:1450-1467) 食健康の細胞生化学的理解にも貢献することが示唆されており、本博士論文研究の着想に至った。

①エピジェネティックな変異が遺伝子に起こると、ゲノムの正確性維持が損なわれることが多数報告されている(Adv. Genet. 70:309-323, 2010)。そして DNA メチル化は遺伝子発現制御や DNA 修復系において重要な役割を果たすため、これらの遺伝子を、本エピジェネティック解析のコアに据えて研究を進める。メチル化の過剰もしくは過少はいずれも発がんに関わることも明らかになっているが、特にがん抑制遺伝子もしくはそのプロモーターの過剰なメチル化は予後不良と相関している。既に発がんに関わる 1000 近い遺伝子がエピジェネティックな制御を受けていることが確認されており、エピジェネティックな変異をもたらす機構の制御は新たな発がん抑制法として注目されている(Front Biosci 17:2682-94, 2011)。RNA 干渉を用いた DNA 修復分子群のノックダウンも DNA 修復機構の解明の有効な解析手段と考えている。標的細胞での作用点の明確化が期待できることが、一般的な生化学研究と比し独創的な点である。老化や発がんは、高齢化社会を迎えた現代日本人すべての重大な関心事である。これらは互いに類似した病態機構を示しており、免疫システムの関与も大きい。本研究の裏にある成果が、タンパク質機能の新たな理解と疾病への対策を生み出す。

②エピジェネティックな変化は遺伝子変化と異なり可逆的であるため、エピジェネティックな変化をもたらした病的な状態は回復できる可能性がある。このため、DNA 修復分子群の変化をもたらす老化や発がんのリスクを低減するための有効かつ効果的な方法が浮上してくる。既に脱メチル化剤は抗がん剤として成功している。転写因子受容体が刺激されると細胞核内の遺伝子発現調節系が活動し、種々の遺伝子発現が調節される。特定の食品成分刺激がもたらす遺伝子発現解析することにより、新たな食品の機能性が明らかになる。

## 本論文全般における実験方法と材料

分子生物学的な手法の多くは、参考文献などに記載されている常法に従った。また、独自のリポフェクション試薬は、研究室内で共同開発し改良してきた中で、最も効率が高く低毒性のものを用いた。

### A. 1. 遺伝子精製

当研究室にて独自に作製・保存されているプラスミドを再度精製し、実験に使用した。本研究で用いたプラスミドは、インビトロジェン株式会社の、C 末端に GFP の付いた pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO と、N 末端に GFP の付いた pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO の vector (資料 1) に各 Doppel 遺伝子断片が組み込まれている。

## 1) Materials

LB broth (+Amp)	3ml
TE buffer	600μl
7x Lysis buffer	100μl
Neutralization buffer	350μl
Endo wash buffer	200μl
Zyppy wash buffer	400μl
Elution buffer	30μl

(7x Lysis buffer から Elution buffer は Zyppy plasmid mini prep kit の付属品)

## 2) Methods

- ① -20 度にて保存されている目的のプラスミドを持つ大腸菌を無菌操作にて LB broth (+Amp) に植菌し、37°C、over night で振盪する
- ② ①で培養した大腸菌から 1ml を採取したものをエッペンドルフチューブに移し、10000rpm にて遠心した上清を捨ててペレットを作製する。同じチューブを用いて 3 回繰り返す、3ml 相当のペレットを作製したチューブに TE buffer を加えて懸濁させる。
- ③ 37°Cインキュベーター内にて温めておいた 7x Lysis buffer を加え、4~6 回ほど攪拌し、2 分以内に Neutralization buffer を加えて更に攪拌する。
- ④ 11000~16000rpm にて 4 分間遠心する。
- ⑤ ④の上清を Kit 付属のチューブに取り付けたカラムに通して、15 秒間遠心する。
- ⑥ ⑤のフロースルー液を捨て、カラムをチューブに再度セットし、Endo wash buffer を加えて 15 秒間遠心する。
- ⑦ Zyppy wash buffer を加えて 30 秒間遠心する。
- ⑧ カラムを新しいエッペンドルフチューブにセットし、37°Cインキュベーター内にて温めておいた Elution buffer をカラムの中央に注入し、1 分間放置した後 15 秒間遠心する。

## A. 2. 細胞培養

### 【本研究で使用した培養細胞】

HEK293 (human, Primary embryonal kidney: ヒト胎児由来腎臓細胞)

Daudi cell, K562 cell, Jurkat cell

## 1) Materials

- medium  
RPMI1640 もしくは  
Dulbecco' s modified Eagle medium (DMEM) に 5% の calf serum を入れ、medium 500ml につきペニシリン、ストレプトマイシン 1ml を加えたものを使用した。
- 0.5mM EDTA PBS  
Trypsin-PBS-EDTA、cell banker
- グレース培地+15% fetal calf serum

## 2) Methods

### ◎継代

一週間に 2 回、顕微鏡でシャーレを見て、あまり細胞が増えていなかったら、DMEM を吸引し、新しい DMEM に変える。細胞が増殖し、密度がかなり高くなっていたら、次の手順で細胞を剥がして継代する。

- ① DMEM を吸引し、0.5mM EDTA PBS で洗う。

- ② trypsin-PBS-EDTA を適量入れ、37°Cに置く。
- ③ 新しいシャーレに DMEM を入れ、そこに剥がれた細胞を加える。

#### ◎凍結・保存

trypsin-PBS-EDTA で細胞を剥がした後、セラムチューブに細胞と等量の細胞保存液 (cell banker) を加え、液体窒素中に保存する。

#### ◎融解

- ① 凍結・保存しておいた細胞のセラムチューブを 37°C 恒温槽で急速に解凍させる。
- ② DMEM をセラムチューブに直接加え、なるべく泡を立てないようにピペティングして混ぜる。
- ③ ②をそのまますべて DMEM の入った新しいシャーレに加える。

### A. 3. 遺伝子導入

本研究では、株式会社 Invitrogen の Lipofectamine という試薬を用いて細胞に DNA を導入するリポフェクション法を採用した。リポフェクション法は、正に荷電しているリポソームと DNA が、負に荷電している細胞膜に融合するという性質を利用して導入する方法である。DNA を初め、mRNA などを効率よく導入できる。

#### 1) Materials

- 3.5cm ディッシュ
- Lipofectamine 各 1 $\mu$ l
- DNA solution (A. 2. において遺伝子導入用に精製したもの) 0.5~2.0 $\mu$ l
- DMEM (serum free, pscm free)
- DMEM (5%cs, pscm free)

#### 2) Method

##### ◎遺伝子導入前の準備

遺伝子導入前日に、導入する数の 3.5cm ディッシュに細胞を等分に分注する。

- ① 細胞をトリプシン処理する
- ② ①を適量の DMEM (5%cs, pscm free) に懸濁させ、ピペットで吸い取る。
- ③ ②を 2.0ml の DMEM (5%cs, pscm free) を加えておいたディッシュへ等量に分注し、over night で細胞を接着させる。

##### ◎遺伝子導入

- ① 遺伝子導入するディッシュの数だけマイクロチューブを取り出し、各々に DMEM (serum free, pscm free) を 100  $\mu$ l 入れ、その後だいたい 1.6 $\mu$ g になる量の DNA solution (agarose 電気泳動の際にマーカーとサンプルの濃さと比較することにより濃度を計算する) を 0.5~2.0 $\mu$ l 加えて混ぜる。
- ② Lipofectamine を①のチューブに 1 $\mu$ l ずつ加えよく混ぜ、37°C、20 分間インキュベートする。
- ③ ディッシュに分注した細胞を PBS で洗い、②を加えて細胞表面によくなじませた後、medium を 1ml 加え、37°C に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れる。
- ④ ③の作業から 1.5 時間後、ディッシュの中の medium を全て吸引し、DMEM (5%cs, pscm 入り) を 2ml 入れる。24~72 時間後に発現が見られる。

### A. 4. UPS 分解阻害

#### 1) Materials

ALLN (DMSO にて溶解し、25mM に調節した)	3.5cm ディッシュ 1 枚につき 1~2 $\mu$ l
RIPA buffer	各 1ml

## 2) Methods

ALLN は、ユビキチン・プロテアソーム系のタンパク質分解 (UPS 分解) を阻害する試薬である。これを遺伝子導入の際に培養細胞に添加することで、細胞内で生じるタンパク質の UBS 分解が阻害され、ポリユビキチン化されたタンパク質が細胞内に蓄積するかどうかを検討する。

遺伝子導入直後に添加すると毒性により細胞が死んでしまうので、遺伝子導入 1 日後に添加し、2 日後に RIPA buffer を 1ml 加えて細胞抽出液を回収してチューブに移し、15000rpm・10 分間遠心した上清を-80℃にて保存し、これを次の実験のサンプルとした。

### B. 1. 免疫沈降および抗 Ub 抗体を使用したウエスタンブロット法 (IP Western Blot)

#### 1) Materials

##### ◎免疫沈降

RIPA buffer	
抗 GFP 抗体 (chicken 由来)	各 1 $\mu$ l
Protein G sepharose (20%エタノールに溶解)	70 $\mu$ l (3 サンプル分)

##### ◎ウエスタンブロット法/SDS-PAGE

###### • Lower gel (10%)

Lower buffer	3ml
30% polyacrylamide	3.3ml
H <sub>2</sub> O	6.7ml
10%APS	100 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l

###### • Upper gel

Upper buffer	2ml
30% polyacrylamide	1.2ml
H <sub>2</sub> O	4.8ml
10%APS	60 $\mu$ l
TEMED	12 $\mu$ l

- ① Lower gel を混ぜて泳動装置のガラス板の間に流し込み、その上に 100%EtOH を入れ、境界面を平らにする。
- ② 固まったら、100%EtOH を取り出し、つづいて Upper gel を流し込み、EtOH で拭いたコームをさす。
- ③ 固まったら泳動装置にセットして、1×running buffer を装置内に流し込み、gel の下端にたまった泡を注射器で取り除く。コームの溝をピペットで掃除する。

#### [Others]

1×running buffer  
 1×transfer buffer  
 1×TBST  
 ブロッキング剤 (2.5%スキムミルク/1×TBST)

Methanol  
Membrane  
17chr paper  
3mmchr paper  
抗ユビキチン (Ub) 抗体 (一次抗体：マウス由来)  
抗マウス抗体 (二次抗体)  
Can Get Signal 1&2 (TOYOBO 社・抗体希釈液)  
ウエスタンブロッティング用発色液

## 2) Methods

### ◎免疫沈降

- ① RIPA buffer にて細胞を溶解・遠心して回収した上清をサンプルとし、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存したものを3本1組として用意し、室温で溶解する。以降の作業は全て氷上または $4^{\circ}\text{C}$ にて行う。
- ② Protein G sepharose を1ml の RIPA buffer を加えたマイクロチューブ内に懸濁する。
- ③ 3000rpm にて FLASH させ、上清をピペットマンを使って捨て、新しい RIPA buffer を0.95ml 程度加える。この作業を3回繰り返し、総量が1ml 程度になる Protein G sepharose 液を調製する。
- ④ ①で用意したサンプルのチューブに③を100 $\mu\text{l}$  ずつ分注し、キャップをはめて $4^{\circ}\text{C}$ 内ローテーターで20分間混和させ、Protein G sepharose に特異的な物質を結合させる。
- ⑤ 新しいマイクロチューブをサンプル数用意し、抗 GFP 抗体を1 $\mu\text{l}$  ずつ壁面を使って分注する。
- ⑥ ④の混和が終了したサンプルを3000rpm にて FLASH し、上清を⑤のチューブに加える。
- ⑦ 再びキャップをはめて $4^{\circ}\text{C}$ 内ローテーターで90分回転混和する。
- ⑧ 混和終了後、各チューブに Protein G sepharose 液を220 $\mu\text{l}$  程度、等量に分注する。
- ⑨ 再びキャップをはめて $4^{\circ}\text{C}$ 内ローテーターで30~120分攪拌する。
- ⑩ 3000rpm で FLASH した上清を捨て、RIPA buffer を800 $\mu\text{l}$  加えて3回攪拌し、3000rpm にて FLASH し、上清を捨てて、Protein G sepharose を洗浄する。この洗浄作業を4回繰り返す。
- 11 最後の洗浄時は上清を面から1mm 程度の水位になるように吸い取り、2 $\times$ Sample buffer を30 $\mu\text{l}$  ずつ分注する。
- 12 沸騰している湯の中で3分間加熱し、5分ボルテックスしたものをウエスタンブロッティングのサンプルとして使用する。

### ◎ウエスタンブロッティング/SDS-PAGE

- ① SDS PAGE gel にサンプルを注入後、Upper gel 通過時は130V の電圧をかけ、Lower gel との境界面まで流す。
- ② Lower gel 通過時には240V の電圧をかけ、Lower gel の下端から5mm 上まで泳動させる。
- ③ 泳動終了後、gel を取り出し1 $\times$ transfer buffer で10分間 wash する。
- ④ membrane を methanol に2分浸し、その後1 $\times$ transfer buffer に浸し、その上に3mmchr paper をのせておく。また、⑤のトランスファーで使う17chr paper も1 $\times$ transfer buffer で浸しておく。
- ⑤ トランスファー装置に、下から順に17chr paper を3枚、3mmchr paper 1枚、membrane、gel、3mmchr paper 1枚、17chr paper を3枚となるように重ねていく。この作業は、各々一枚ずつ重ね、トランスファー中に membrane が焦げてしまわないようにその都度1 $\times$

transfer buffer をかけていく。

⑥ トランスファーの準備ができたなら、トランスファー装置で電流を 90 分間流す。

⑦ 終了後、membrane を取り出し、表面 (gel と接触していた側) を上にしてブロッキング剤に浸す (室温にて 60 分間振蕩、または 4°C にて over night)

⑧ きれいに洗浄されたプラスチックケースに 2ml の Can Get Signal solution 1 を置き、その中に一次抗体 1.0  $\mu$ l を入れてよく混ぜる。このとき泡が立っていたらピペットですべて取り除いておく。

⑨ membrane の表面と抗体液が接触するように membrane を浸し、室温で 60 分間置く。30 分毎に membrane を一度持ち上げ、抗体液を満遍なく接触させる。

⑩ 60 分経過後、membrane を取り出して 1×TBST の入ったケースに移し、9min×3 回 wash する。

⑪ きれいに洗浄されたプラスチックケースに 2ml の Can Get Signal solution 2 を置き、その中に二次抗体 1.0  $\mu$ l を入れてよく混ぜる。このとき泡が立っていたらピペットですべて取り除いておく。

⑫ membrane の表面と抗体液が接触するように membrane を浸し、室温で 60 分間置く。30 分毎に membrane を一度持ち上げ、抗体液を満遍なく接触させる。

⑬ 60 分経過後、membrane を取り出して 1×TBST の入ったケースに移し、7 分×3 回 wash する。

⑭ プラスチックケースに発色液を 2ml 置き、membrane の表面が下になるようにして発色液によくつけ、遮光して 5~30 分間、発色を待つ。

#### C. 1. 免疫沈降および抗 HSP70 抗体を使用したウエスタンブロット法 (IP Western Blot)

※免疫沈降は B. 1. と同様の手順で行った。また、ウエスタンブロット法については使用する一次抗体を抗 HSP70 抗体へと変更して同様の作業を行った。

#### 使用した試薬など

##### ◎vector

- ・ pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (株式会社 Invitrogen)
- ・ pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO (株式会社 Invitrogen)

##### ◎LB broth (+Amp)

NaCl	5g
Bacto yeast extract	5g
Bacto tryptone	10g
H <sub>2</sub> O	to 10

※オートクレーブ後、0.1g の ampicillin を加え、室温保存。

##### ◎PBS (株式会社コスモバイオ)

##### ◎細胞培養液

##### \*medium

- ・ D-MEM(High glucose) (株式会社 Wako)

##### \*serum

- ・ Bovine Serum (株式会社 Invitrogen)
- ・ Calf Serum (株式会社 Invitrogen)
- ・ one shotTMFetal Bovine Serum (株式会社 Invitrogen)

##### \*抗生剤

- ・ ペニシリンストレプトマイシン (pcsm) 液 (株式会社 SIGMA)

※medium は、用途に合わせて 5~15%の serum を加え、遺伝子導入用以外は抗生剤を 1ml/500ml 加え、4℃保存。

◎0.5mM EDTA PBS

250mM EDTA                    2ml  
PBS                                1000ml

※オートクレーブ後、室温保存。

◎trypsin-PBS-EDTA

0.2% trypsin  
0.02% EDTA  
PBS

※フィルター滅菌後、4℃保存。

◎cell banker (NZK BIOCHEMICALS)

◎RIPA buffer

Sodium Deoxycholate            10g  
Triton X 100                      10ml  
PMSF                                最終濃度 0.2mM  
Tris (pH7.3)                      最終濃度 50mM  
H<sub>2</sub>O                                  to 1000ml

◎30%acrylamide

acrylamide                        58g  
N, N' - methylene bisacrylamide 2g  
H<sub>2</sub>O                                  to 200ml

※4℃保存。

◎10%APS

ammonium persulfate    0.4g  
H<sub>2</sub>O                                to 4ml

※4℃保存。

◎Lower buffer

1.5M Tris(pH8.8)            160ml  
10%SDS                         8ml  
H<sub>2</sub>O                                to 200ml

※室温保存。

◎Upper buffer

0.5M Tris(pH6.8)            160ml  
10%SDS                         8ml  
H<sub>2</sub>O                                to 200ml

※室温保存。

◎10×running buffer

Tris (powder)                30.3g

glycine                    144g  
SDS                        10g  
H<sub>2</sub>O                        to 1000ml  
※室温保存。

◎10×transfer buffer

Tris (powder)            30.3g  
glycine                    144.1g  
H<sub>2</sub>O                        to 1000ml  
※室温保存。

◎10×TBST

2MTris-HCl (pH7.2~7.6) 100ml  
NaCl                      87.66g  
H<sub>2</sub>O                        to 1000ml  
TritonX 100              15ml  
※室温保存。

◎2×Sample buffer (SB)

Upper buffer            10.4ml  
10%SDS                 23.6ml  
100% glycerol            8ml  
2-ME                      4ml  
BPB                        ~2mg  
H<sub>2</sub>O                        34ml  
※4℃保存。

◎Marker

- rainbow marker (BIO RAD, Amersham)

◎Western blotting 発色液 (HRP 発色法)

- TMB Ez West Blue for HRP (株式会社 ATTO)

◎antibody

\* 抗 GFP 抗体

- 一次抗体 : GFP (Santa Cruz Biotechnology)
- 二次抗体 : Anti-chicken HRP-linkd IgG (H&L) (Cell signaling technology)

## 第 1 章

### がん細胞に対する食品成分の作用

## 1-1 がん細胞に対するシグナル伝達系の調節

効果的な薬の発展のために研究が行われているが、がんの死因は今のところ大きいままだ。ハーブががんや他の慢性の病気の進行を防ぐことの可能性を示した。現在、RUN 可能な抗がん剤の開発の可能性を探究するために包括的に調査されている。より多くの情報が回答と標的分子について特定のハーブのために必要とされる。ある種の薬草と細胞をがんから守る腫瘍抑制分子の間には関係があるように思われる。その抗がんの役割に対する特定のフォーカスと分子機構が、この分野のさらなる研究のために、ハーブに関する最近の研究の進歩を最初に要約する。

古来より、多くのハーブが健康上の利点のために使われてきた[1-3]。薬草は治療の特性のために使われたのだ。薬理的に有用な薬の多くが薬用植物のような天然資源から得られることは、広く認識された事実である[4,5]。そこで、ハーブでかつてない新たな薬分子を捜すことは合理的だ。実際に、ハーブによって得られた化合物から魅力的な可能性を見出せた。生薬生産物は、健康を改善するために補助栄養剤として提供される。ハーブが健康促進において興味深い可能性を引き起こす間に、より多くの情報が反応と標的分子について特定のハーブのために必要とされる。

疫学的事実が多数の抗がんの特徴で食事の構成要素として同じくハーブを示す[6]。薬草から利益を達成するための適切な戦略を定義することは重要だと思われる。研究がハーブアポトーシス遺伝子を抑制し、そしてアポトーシス遺伝子を活性化することができることを示す[7,8]。それらの有効性に理論的根拠を提供することに対して、薬草のアクティブなコンポーネントの組織的な特徴描写とメカニズムは重要だ。そのために、バイオ工学が有効性の証拠を提供して、ハーブの使用に有効な化合物を得た。薬草とある種の腫瘍抑制分子の間には遺伝子発現と翻訳後の修正のフォーカスに基づいて再検討されている。

アジア諸国では、昔から生薬が悪性腫瘍を治療するために用いられてきた[9]。生の野菜やハーブやスパイスをより多く摂取している人は、がんになるリスクが低いことが示された[10]。実際に、ハーブあるいはスパイスが抗がん作用を持っていることが実証された[11]。例えば、クルクミン（カレーターメリック粉の成分）の消費は結腸がんの発生率の低さに関係しているという報告がある[12]。加えて、etoposideのような多くの細胞毒素の化学療法物質や分子がハーブから精製される。2つのメカニズムがハーブとスパイスの抗がん作用に対して責任があるために提案されました。1つは細胞毒素の効果によって直接的に働き、そしてもう1つは免疫学の modulatory の動きを通して間接的に働く。がん細胞の発生は細胞あるいは細胞のアポトーシスの抑制の異常な拡散によって経路をもたせられるかもしれません。多くの種類の遺伝子のがん細胞の増殖あるいはアポトーシス調節に関係している。近年、免疫調節に対して影響のある、ある種のハーブの有効成分の1つは、合成多糖体の形であることが判明した[13]。

細胞増殖と細胞死のバランスは様々なシグナル伝達形の調節を通して維持されているのだが、それが崩壊すると、腫瘍の発生が早まる恐れがある。同じくプログラム細胞死として知られているアポトーシスは、DNA 損傷を含む様々な細胞傷害によって引き起こされる[14]。様々な細胞増殖とアポトーシスの情報伝達経路は、がん遺伝子とがん抑制遺伝子（例えば p53 とその下流の因子）の間で複雑なネットワーク上に作られることが示された[15]。例えば、腫瘍抑制因子 p53 は様々な遺伝子の発現をコントロールし、細胞増殖と情報伝達経路の調整において重要な役割を果たす。DNA 損傷後の細胞内の p53 の蓄積が誘導を細胞周期停止とアポトーシスに導く。加えて、p53 は損傷を受けた DNA の修復に関係しており、突然変異の蓄積を防ぎ、腫瘍発育を抑制する[16]。腫瘍細胞の拡散とアポトーシスは、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の調整を通して、薬、放射線、薬草などのような様々な要因と経路からの影響を受ける。ある種の植物が伝統的習慣からがん治療のために使われ

たように、それらの有効性を評価するためには更なる研究が必要だ。そこでの有効性は分子機構に基づいている。

腫瘍抑制分子の活性化と不活性化が細胞をがんから守る。がん抑制遺伝子が機能を失うとき、細胞は他の遺伝的障害と共にがん化するかもしれない。がん抑制遺伝子が DNA 損傷修理、細胞増殖、細胞分化、細胞遊走とプログラム細胞死を含めて様々な細胞の活動を調節する (図 1-1)。重要な腫瘍抑制機構は p53 腫瘍抑制機構だ。腫瘍を抑制する遺伝子は他にも Rb、PTEN、p21WAF1、p27KIP1、APC などが挙げられる (図 1-2) [17]。これらの遺伝子の劣性の特徴は両方の対立遺伝子上に突然変異があることだ。p53 遺伝子産物は細胞周期の進行を阻止する転写要因だ。p53 遺伝子の突然変異はしばしば多くのヒトのがんで見いだされ、変化は遺伝子の限られた領域で局地的に制限される [18]。発がんの間に、p53 は突然変異の結果として不活性化される。そしてそれは標的遺伝子を活性化することも、腫瘍を抑制することもできない。2つのタイプの p53 遺伝子、野生型 p53 遺伝子と突然変異種 p53 遺伝子がある [19]。がん性の p53 突然変異は通常、残っている野生型遺伝子の上に突然変異種タンパク質をもたらす。さらに、多くの突然変異型 p53 の形は優勢のネガティブ活性化をもたらし、発がん性を増加することもある [20]。p53 のこれらの活動は同じく翻訳後修飾によって調節される。リン酸化とアセチル化、細胞内局在化と他の細胞のタンパク質付きの相互作用は p53 の機能に影響を与える可能性が高い [21]。酸化ストレスと DNA 損傷にさらされている細胞では、例えばその安定化と活性化を促進する様々な翻訳後修飾を通して、p53 はそのユビキチンリガーゼ MDM2 を分離する [22]。Rb 遺伝子産物の Rb 遺伝子変化あるいは機能的な不活性化が同じく数種類のがんで報告された。pRb のリン酸化は細胞周期に従ってサイクリン依存のキナーゼによって調節される [23]。リン酸化された野生型 pRb は核マトリックスと強固に結合しており、細胞増殖の抑制において重要であるようだ。過剰リン酸化は pRb の不活性化の生理学的メカニズムだ [24]。多くの細胞周期調節分子がそのリン酸化状態を通して pRb の機能を調整する。G1 サイクリンとサイクリン依存のキナーゼのアクティブ複合体がそのリン酸化を通して pRb を非活性化する一方、p21WAF1 と p27KIP1 がサイクリン依存のキナーゼを抑制する [25]。pRb タンパク質は G1 後期でサイクリン依存のキナーゼによって不活性化されるまで、S 期に必要な転写因子と他のタンパク質の機能を妨げるようだ。G1 期で調節されなかった pRb の不活性化は、細胞変化の基礎をなす普遍的なメカニズムに起因しているかもしれない。可逆性のあるタンパク質リン酸化が細胞内シグナリングの調節で中心的役割を果たすように、リン酸化を調節するメカニズムの調節不全はがんの発生と維持において重要な役割を果たすかもしれない。悪性変異における特定のタンパク質ホスファターゼの役割に研究の焦点が合わせられた [26]。

がん細胞の表現型は、遺伝子発現における遺伝性の状態を変えるかもしれないエピジェネティックなイベントから生ずるかもしれない。がん抑制遺伝子のエピジェネティックな停止は確立した発がん性プロセスで [27]、がん治療のためにがん抑制遺伝子の再活性化が注目されている。DNA のメチル化のようなエピジェネティックな変化も、通常組織分化と器官形成の連続的な不可逆イベントと関連があるようだ [28]。CpG アイランドの過剰メチル化 (DNA 塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックなイベント) はがん抑制遺伝子を非活性化する代替メカニズムとなり、発がんの主な原因となる [29]。ヒストン脱アセチル化とメチル化の結果、CpG アイランドの過剰メチル化が遺伝子の活動停止の状態を確立する。多くのデータが、がんの進行の初期に CpG アイランドの過剰メチル化が起こることを示している [30]。

多くのハーブに抗腫瘍活性がある。ハーブの抗腫瘍効果について、病院からの報告もある [31]。他方、多くの種類のがん抑制遺伝子のがん細胞の細胞増殖とアポトーシスの調節に関係していることが判明している。ハーブと腫瘍抑制因子の間には大きな関係があるか

もしれない。(図 1-3)

### 種々の代表的がん抑制遺伝子産物の特徴とハーブなどとの関連について

#### p53

コガネバナはがんの化学療法において免疫増強剤として用いられる。治療後に変化した細胞のタンパク質発現によって、細胞の成長抑制とアポトーシスがその細胞毒性の潜在的なメカニズムであることが判明した。アポトーシスの増加と関係がある重要なタンパク質のがん細胞における p53 の発現量が増加した[32]。シナサイカチの棘も、G2/M期に細胞増殖の減少と細胞周期停止の増加を示す薬草として用いられる。細胞周期の停止は p53 の増加とサイクリン B1 の減少と関連づけられる[33]。カンライト (Coix の種からの抽出物) を摂取しても、野生型 p53 遺伝子の mRNA レベルは増加する。カンライトが腫瘍細胞のアポトーシスを誘発するかもしれない p53 タンパク質の半減期を延長すると想定される[34]。ジンセノシド (アメリカの朝鮮人参の成分の1つ) がバックスタンパク質の発現量を増加し、p53 腫瘍抑制分子を活性化して細胞死を誘発する[35]。p53 のノックアウトはアポトーシスを飛躍的に減少させる。そして、がん細胞でジンセノシドによって誘発されるアポトーシスに p53 が関与していることを示唆する。チモキノン (ブラックシードに最も多く含まれている物質) は抗元作用のある食事由来の化学的予防物質だ。チモキノンによるアポトーシスは p53 mRNA と p53 の下流の標的遺伝子の発現増加と結び付けられる[36]。p53 に特異的な抑制剤による治療は p21WAF1 の発現量を初期状態に戻し、細胞周期の停止とアポトーシスを抑制する。以上のことから、チモキノンによるアポトーシス効果は p53 と関連付けられる。

#### Rb

ホオノキノール (東洋のハーブ・シナホオノキの成分) の摂取は、G0-G1 期細胞周期を停止させ、濃度と時間依存的な方法でヒトの前立腺がん細胞 PC-3 と LNCaP の生存能力を減少させる。ホオノキノールを投与された PC-3 細胞と LNCaP 細胞は E2F1 の転写活動の抑制と関連した全体の網膜芽細胞腫タンパク質 (Rb) の顕著な減少を示した[37]。トリプトリド (ハーブ・Tripterygium wilfordii hook F からの抽出物) は抗増殖性でアポトーシス前駆機能を示す。トリプトリドへの暴露が p21 (cip1) の発現量を増加させ、pRb リン酸化を減少させた[38]。Acanthopanax gracilistylus (薬草) は MT2、Raji、HL60、TMK-1、HSC2 といったいくつかのがんの細胞株の拡散を抑制する[39]。細胞増殖抑制のメカニズムは G(0)/G(1)期における細胞周期の停止を伴う。それは、酸化された pRb タンパク質の減少と Cdk2 と Cdk4 の減少を伴う。Licochalcone はハーブ・甘草の根から抽出される新たなエストロゲン・フラボノイドで、様々なヒトの細胞株で抗腫瘍活性を示す。Licochalcone も pRb (特に S780 のリン酸化) を抑制し、転写調節因子 E2F、サイクリン D1、Cdk4、Cdk6 の発現量を減少させる[40,41]。同様に、ケーブアロエ抽出物由来のジクロロメタンが細胞増殖を抑制する。これは pRb リン酸化の減少とも結び付けられる[42]。複数のハーブから成る抗炎症性薬品 Zyflamend は pRb タンパク質のリン酸化を減少させる[43]。

#### PTEN

ホオノキノールはヒトの内皮細胞の血管新生作用を弱めることが判明している。ヒトの内皮細胞は Akt リン酸化の発現低下と PTEN (染色体 10 番上で削除されるホスファターゼとテンシン相同体) の発現上昇によって信号を送っている PI3K/Akt/mTOR (哺乳類におけるラパマイシンの標的分子) を弱めることができる [44,45]。mTOR 抑制剤ラパマイシンとホオノキノールの組み合わせががん細胞のアポトーシスを誘発することに対して相乗効果を生む。クルクミン (ウコンの根茎から取れる有効成分) は抗がん作用を持つ。PTEN はクルクミンによって誘発されたアポトーシスを強めるのに対し、非活性の PTEN

(G129E と G129R) は クルクミンによって誘発されたアポトーシスを抑制する[46]。In vitro の研究によって、クルクミンとレスベラトロールが相乗的に細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘発することが明らかとなった[47]。リン酸化された Akt、サイクリン D1、mTOR、アンドロゲン受容体を含む標的分子は、PTEN の活性化の結果生じる化合物によって発現減少する。このことは、ある種のハーブが PTEN の機能を通じてがん発生率を減らすかもしれないことを示唆している。しかし、ローズマリーに含まれているある要素が K562 骨髄細胞系細胞で PTEN の発現を抑制する[48]。

#### **p21WAF1 と p27KIP1**

シナホオノキの抽出物が培養された泌尿器のがん細胞で細胞増殖を抑制する。細胞増殖の抑制は G1 細胞周期の停止と関連している。シナホオノキによる治療が CDK 抑制因子である p21WAF1 と p27 KIP1 の発現を増加させる[49]。p21WAF1 によって生成されたタンパク質は、細胞の成長を弱めることができる複合体を形成するために、環状タンパク質 Cdk2 と増殖している細胞核抗原と結合できる。シナホオノキの抽出物による細胞の成長抑制は p21WAF1 の発現を通して p38 MAP キナーゼの活性化とも関連づけられるようだ [49]。p38 MAP キナーゼに特異的な抑制剤が p21WAF1 の発現を抑制する。バイカリン (ハーブから抽出されたフラボノイド化合物) は多数の経路を通じてがん細胞でアポトーシスと腫瘍抑制を誘発することが知られている。バイカリンは前立腺がんを含む悪性腫瘍のための補助療法に用いることができるかもしれない。バイカリンは LNCaP と PC3 前立腺がん細胞系の増殖を抑制する。同時に、バイカリンは LNCaP 細胞内でサイクリン依存キナーゼ抑制剤、p27 Kip1 の発現を増加させる[50]。血管平滑筋細胞にシナサイカチの棘のエタノール抽出物を添加すると、細胞周期における G2 / M 期で細胞が抑制されて、細胞の成長が抑制される。これは p21WAF1 の発現上昇と関係している[51]。p21WAF1 の発現は p38 MAPK に特異的な抑制剤 SB203580 によって抑制される。p53 タンパク質の発現を上昇させる一方で、カンライトは p21WAF1 の発現量を上昇させることもできる。このことは、カンライトが p53 に依存する経路を通してがん細胞のアポトーシスを誘発できることを示唆している。しかし、トウヒレン属の酢酸エチル抽出物の投与は、PC3 細胞において、G1 期細胞周期の停止とアポトーシスによって成長を抑制する。また、この処置は p53 経路から独立している p21WAF1 と p27KIP1 の発現を誘発する[52]。興味深いことに、p38 の活性化が食物成分によって影響を受ける。(図 3-3、図 3-4、図 3-5)

#### **APC**

トリコサンチン (ハーブから抽出される生理活性因子) を投与すると、HeLa 細胞で腺腫様多発結腸ポリープ (APC) のがん抑制遺伝子の mRNA とタンパク質発現が上昇した [53]。メチル化に特異的な PCR (MSP) によって、トリコサンチンが HeLa 細胞で脱メチル化を促進すること、この脱メチル化は DNMT1 の発現減少と DNMT1 酵素の活動減少によって付随して起こることが明らかになった。トリコサンチンはメチル化によって抑制されたがん抑制遺伝子を再び発現させることができる。それはがんの臨床治療において脱メチル化物質として用いることができる。Carnosol (ローズマリーの成分) は、E-カドヘリンに媒介される接着性を強化し、β-カテニンチロシンリン酸化を抑制する能力によって、APC によって誘発される発がんを防ぐ[54]。carnosol の摂取が腸のがん細胞の成長を抑制するかもしれない。

以上より、薬草のがんの治療に有効かもしれないことが判明した。ここに述べた情報は、がんの治療に用いられているハーブの臨床的使用に起因する分子機構に更なる洞察を提供するかもしれない。これはがんのような病気の合理的な治療の発達の根拠を表すかもしれない。このような研究は、治療に対する個々のがん患者の反応を予測するのにも役立つと考えられる。天然ハーブ由来の物質を用いた薬の開発は、従来の製薬パターンと異なる形

でアプローチされるべきだ。化学構造の解明は、化学的に合成された化合物に相当する薬理学的かつ分子生物学的調査を可能にする。しかし、どのがん患者の個別の症例が提案された治療に反応するか予測することはできない。個々に適用された腫瘍治療の概念は伝統的な生薬のために重要だ。がん治療の有効性の向上と正常組織に与える副作用の緩和のために、近い将来、ハーブの影響に対する詳細なメカニズムは広範囲から調査されるべきだと思われる。

図 1-1

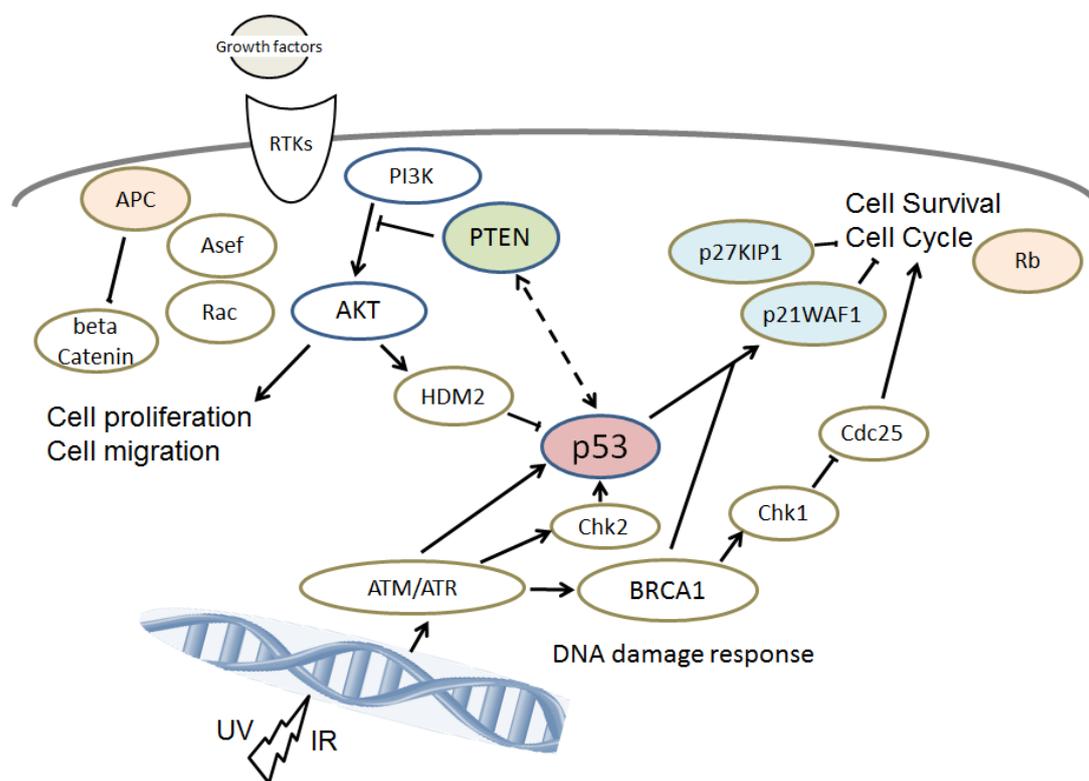


図 1-1  
p53、Rb、PTEN、BRCA1 などのがん抑制遺伝子産物を介した細胞内シグナル伝達系を示す。

図 1-2

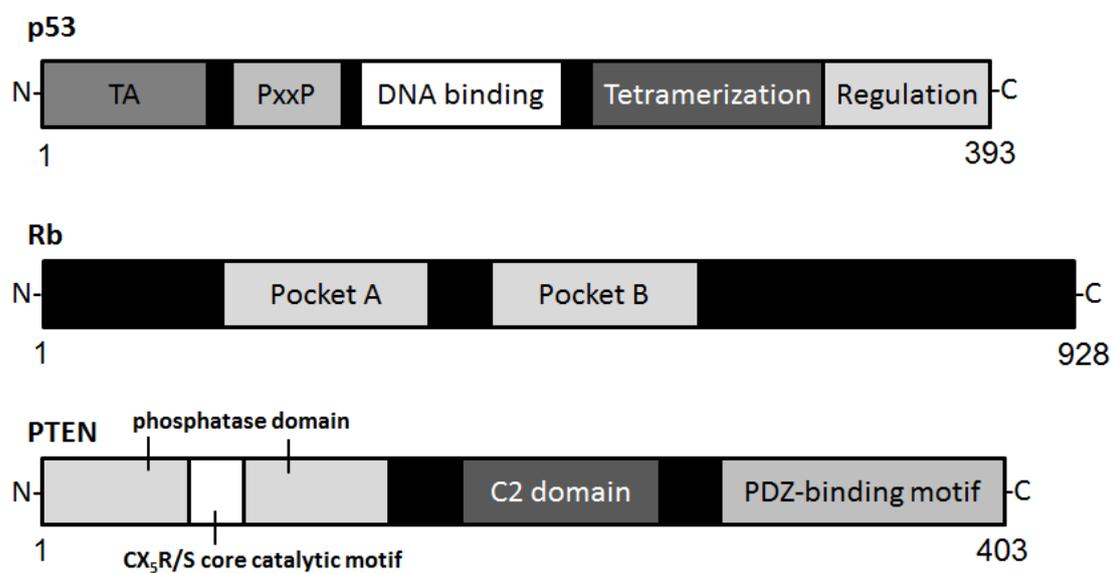


図 1-2  
p53、Rb、PTEN の蛋白質構造模式図

図 1-3

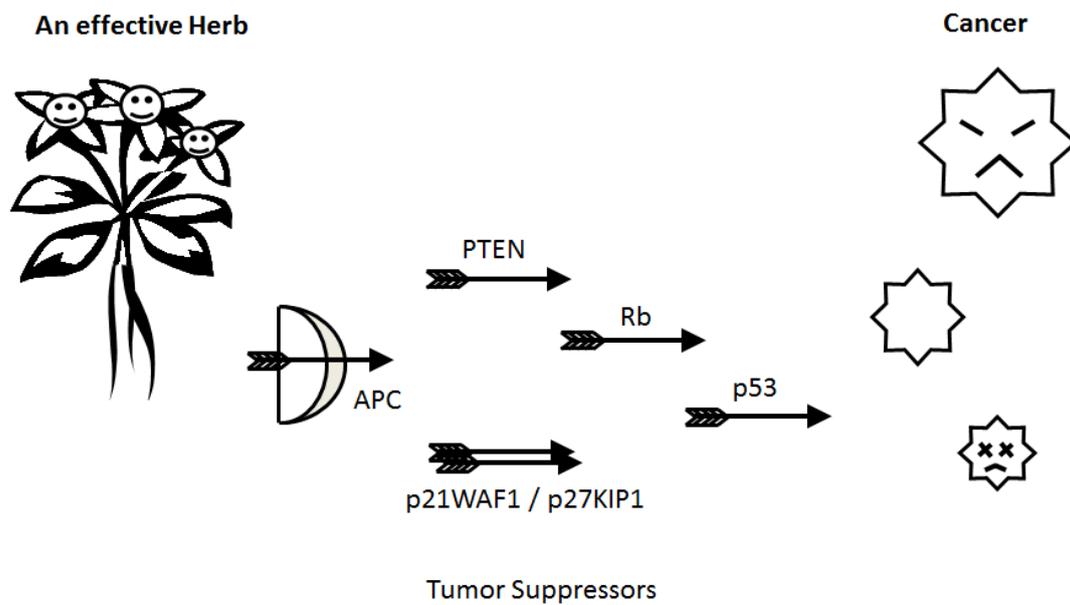


図 1-3

ハーブや薬草などががん抑制遺伝子を活性化することによって引き起こされる抗がん作用のイメージ図。たとえば、あるハーブによってがん抑制遺伝子の発現量が増加した場合、そのハーブは抗腫瘍活性があるということになる。

## 1-2 PPAR 受容体やビタミン D 受容体とがん細胞の情報伝達経路

核受容体ファミリーは2つのグループに分けられる。第一のグループはエストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロンとミネラルコルチコイド受容体を含み[56]、第二のグループはビタミン D 受容体 (VDR)、甲状腺受容体 (TR)、レチノイン酸受容体 (RAR)、レチノイド X 受容体 (RXR) とペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPARs) を含む[57]。受容体の第二グループは互いにヘテロダイマーを形成することができて、遺伝子上のレベルで適切なリガンドと相互作用することを通して、機能することができる[56,57]。特に、PPARs と VDR は多くの病気の理解と治療のための主要な研究目標だ[58]。リガンドを通して、PPARs と VDR は RXR でヘテロダイマーを組織し、様々なヒトのがんに抗腫瘍効果を誘発する[59]。そのため、これらの経路はがんの治療と予防で重要な役割を果たすかもしれない。さらに PPAR 情報伝達経路を調整することは発がんを抑制する斬新な戦略かと思われる。

PPARs は、脂肪酸の酸化や輸送や DNA 結合性ヘテロダイマー複合体の形成を通してタンパク質を調整している代謝を含む、哺乳類の代謝の遺伝子の調節に関与している、リガンドを活性化された転写因子だ[60-62]。これらの受容体は細胞の拡散と分化、腫瘍の促進、アポトーシスと免疫反応および炎症にも関連していることが示された。遺伝的かつ機能的に、PPAR アイソフォーム、PPARs (PPAR  $\alpha$  と PPAR  $\beta/\delta$  と PPAR  $\gamma$ ) の違いが記述された。PPAR  $\alpha$  が、成人の肝臓、心臓、腎臓、大腸、骨格の筋肉のように、脂肪酸を分解する組織の高いレベルで発現する[63]。PPAR  $\beta/\delta$  mRNA は、消化管と胎盤で発現が変化する[64]。PPAR  $\gamma$  は主に脂肪組織と免疫機構で発現し[65]、細胞分化と新陳代謝において重要となる。特に DNA 結合ドメインとリガンド結合ドメインで、すべての異なる PPARs サブタイプは組織分布のはっきりしたパターンを示し、他のスーパーファミリーと組織上高い相同関係を共有する[60,62,66] (図 1-4)。それぞれのアイソタイプは異なる遺伝子の産物だ。Retinoic X 受容体 (RXR) は PPAR の機能的なパートナーだ。RXR  $\alpha$  と PPAR  $\gamma$  は新陳代謝の病気で強く作用し、糖尿病治療薬のための重要な目標ともなっている。RXR  $\alpha$  と PPAR  $\gamma$  の同時活性化は、共にグルコースと脂質代謝に影響をもたらすと考えられる [67]。PPARs のそばの転写調節はレチノイド X 受容体 (RXR) でヘテロダイマー化を必要とする (図 1-5)。PPARs は感応的な遺伝子のプロモーター領域に存在している様々な PPAR 反応要素 (PPREs) に結合する[68]。生体内における PPARs の選択的な活動は、利用可能な共同因子のそれぞれの時点に、相互作用から生じる。RXRs は多種多様な遺伝子の転写に影響を与えうる。なぜなら、PPARs は PPAR s や VDR や TR などを含む他の関連した核内受容体と、ホモダイマーあるいはヘテロダイマーとして DNA 上の特定の部位に結合することによって、遺伝子の転写を活性化できるからだ[69-71]。様々な化合物が PPARs リガンドと認知された。合成のリガンドの間で、フィブレートとチアゾリジンジオンはそれぞれ PPAR  $\alpha$  と PPAR  $\gamma$  へ作用する [72]。PPAR  $\alpha$  に特異的なリガンド (8S-HETE) と PPAR  $\gamma$  に特異的なリガンド (PGJ と 15-deoxy-delta12 と 14 プロスタグランジン J2) とペルオキシゾーム増殖因子 (clofibrate) はすべて PPAR  $\alpha$  と PPAR  $\gamma$  両方の発現を誘発できる[73-75]。エコノサイド (脂質低下薬) と抗糖尿病の薬を含む種々な PPAR リガンドが発見されている [76,77]。PPAR  $\gamma$  はプロスタグランジンとロイコトリエンによっても活性化する[78]。不飽和脂肪酸 (リノール酸、リノレン酸とアラキドン酸を含む) のような天然リガンドの他に、多数の合成 PPAR リガンドが識別された。インスリン抵抗性改善薬とイブレート (bezafibrate と clofibrate) の一種である、チアゾリジンジオン (トログリタゾンとピオグリタゾン) のような薬が臨床的に用いられている。それは脂質降下薬として用いられ、PPARs に結合している[79]。リガンドが認識される場合、リガンド結合領域の構造的な変化は活性化補助因子タンパク質または抑制因子タンパク質を

補充する。これらのタンパク質は標的遺伝子の転写活動を開始させるタンパク質複合体と関連している[80,81]。

ビタミン D の栄養学的な形態は 1,25 (OH) 2D3 (calcitriol) (ビタミン D の活性化した形 (aVitD)) とされている[82]。 aVitD の効果の多くは核に局在する VDR によって行なわれていると思われる。VDR のリガンドは受容体を複製する以前に発見された。VDR は親近感の高いホルモン受容体であり、RXR の複製を許容しないパートナーだ[83]。VDR と結合したリガンドは、VDR-RXR が最も効果的に DR 3 反応エレメントと結合する場所での直接的な活性化を含む種々な分子機構を経由して、遺伝子発現を調節できる[84]。VDR の機能は内部の部品でカルシウム吸収を促進して、骨の通常ミネラル添加を可能にするために適切な血清カルシウムとリン酸塩濃度を維持するのに欠かせない[85]。それは骨芽細胞と破骨細胞による骨の成長と再合成のためにも必要だ。VDR は人体におけるたいていの組織で発現する。また、ビタミン D は多くの生活習慣病、がん、自己免疫疾患、伝染病と心臓血管病のリスクを減少させることにおいて重要な役割を果たす[86]。ビタミン D2 (エルゴカルシフェロール) はヒトでビタミン D ステータスを高め、ビタミン D3 として同様な形式で代謝される。紫外線 B (UVB) が皮膚を通過すると、ビタミン D3 が皮膚で合成される[87]。正常細胞とがん細胞を含む様々な細胞で、aVitD と遺伝経路によって調節された VDR は、細胞増殖と細胞分化を調節する。VDRE はヒトのビタミン D24-ヒドロキシラーゼ (CYP24) を含むビタミン D 反応遺伝子と報告された[88,89]。ビタミン D 代謝の不活性化は 24-ヒドロキシ化で重要な酵素である CYP24 によって引き起こされる。

PPARs と VDR はレチノイド X 受容体 (RXR) を有するヘテロダイマーを形成できる。VDR と PPAR はいずれも主要なヘテロダイマー化パートナー、RXR を求めており、標的遺伝子の複雑な転写調節が期待されるかもしれない [90,91]。VDR はビタミン D と関連しており、RXR でヘテロダイマーを形成して、標的遺伝子のビタミン D 反応要素 (VDREs) への結合を通じて活動を開始する。脂肪細胞で、ビタミン D と VDR が PPAR $\gamma$  活性化と脂肪生成の両方を抑制する[90,92]。ヒトの PPAR 促進者での効力がある VDRE がある[93]。それで、PPAR は VDR と PPAR 情報伝達経路がそれぞれの転写調節因子 mRNA レベルの交差調節レベルで相互に結び付けられる反応遺伝子だ。この交差調節は同様のヘテロダイマー化パートナー、RXR と VDREs の存在と ペルオキシソーム増殖因子反応要素 (PPREs) のために競合するかもしれない。PPAR リガンドとビタミン D 類似物両方が腫瘍進行と細胞の分化に関連することが知られている。リガンドを通じた活性化の後、PPARs と VDR の形態は変化して安定化し、結合の分裂と転写活性化補助因子の産出をもたらす。PPARs と VDR は、いずれかが他の活動に影響を与えることが可能であるという双方向性を持つ。PPAR $\gamma$  が VDR に結合し、ビタミン D によって介在されたトランス活性化を抑制することも判明している[94]。遺伝子発現能力のために重要であり、細胞増殖、細胞分化、免疫反応、アポトーシスを含む様々な細胞の機能のために多重の重要な遺伝子を調節する。VDR と PPARs の情報伝達経路は多数のがん細胞ラインで相互に結び付けられる[95,96]。しかし、VDR と PPAR 情報伝達経路の間の完全なメカニズムはまだ解明されていない。もし解明されたなら、aVitD や他のビタミン D リガンドによる PPAR 情報伝達経路の活性化から、がんの治療または予防のために新たな展望が見出されるかもしれない。

一般に、非ステロイド系の核受容体のがん発達において主要な役割を果たす。PPARs リガンドの抗増殖性効果が異なる細胞系で実証された。現在糖尿病の治療に用いられている Thiazolidinedione (PPAR リガンド) ががん細胞の増殖を抑制する[97,98]。加えて、PPAR 活性化に対応するリガンド (例えば、fenofibrate) は Akt シグナリングの発現低下によって転移の可能性を減少させる [99]。これらの抗増殖効果は PPAR に依存する経路を通して調整される。そのため、PPAR 情報伝達経路を調整することは発がんとその進行を抑制する戦略で重要だ。ビタミン D は前立腺から生じる細胞系を含む様々ながん細胞タイ

プで抗増殖性効果を引き出す。抗がんのメカニズムは、転移の抑制と同様、細胞周期停止、分化の促進、血管形成の抑制を含む。aVitD は、p27kip1 と p21cip1 のような サイクリン依存性キナーゼ抑制剤の発現を増加させることによって、細胞周期の G1/S チェックポイントに対する重要な抑制効果を及ぼす[100]。細胞の腫瘍が抑制される際、aVitD もまた様々な悪性疾患を静止させる [101,102]。また、ビタミン D と AKT 抑制剤が細胞サイクルの誘導を通して相乗的に前立腺がんの成長を抑制する[103]。そのメカニズムには、ビタミン D によってEカドヘリンが発現上昇する一方、腫瘍浸潤が抑制と、セリン・プロテイナーゼの発現抑制を含む転移抑制も含まれる [104]。VDR 遺伝子は上皮間葉転移 (EMT) プロモーターに働きかける [105]。VDR と PPARs の標的遺伝子を考えると、これらの核要因は種々なメカニズムを経由して正常細胞とがん細胞の拡散と分化を調整するかもしれない。リガンド と PPAR と VDR 情報伝達経路に影響を与えている他の物質や分子は、様々なヒトのがんで腫瘍の抑圧的な活動を調整することによって、化学的予防効果があるかもしれない[96]。今後、PPARs と VDR ががんの悪性さを抑制してするかどうか、研究によって明らかにされる必要がある。VDR と RXRs と PPARs における遺伝子のエピジェネティックなイベントが必要とされるかもしれない[106]。

PPARs と VDR の情報伝達経路は様々な細胞の機能のために多重の重要な遺伝子を調節する。従って、この研究の調査結果はがんの治療や予防のために新たな展望を見出すかもしれない (図 1-6)。ビタミン D による PPAR $\gamma$  の発現調節における細胞的かつ分子的メカニズムの包括的な解明を進めるため、より深い研究が必要だ。がん細胞における PPARs や RXRs や VDR の機能のより深い研究は、クリティカルな発がん性があるプロセスに共通の経路を示し、重要ながんの研究に興味あるフォーカスを提供するかもしれない。PPARs と VDR が及ぼす複雑なメカニズムを解明するために、機能的なゲノムのアプローチを使った研究が必要だ。PPAR と VDR 情報伝達経路の間の繋がり、がん治療の新たな化学療法の合成に役立つかもしれない。

図 1-4

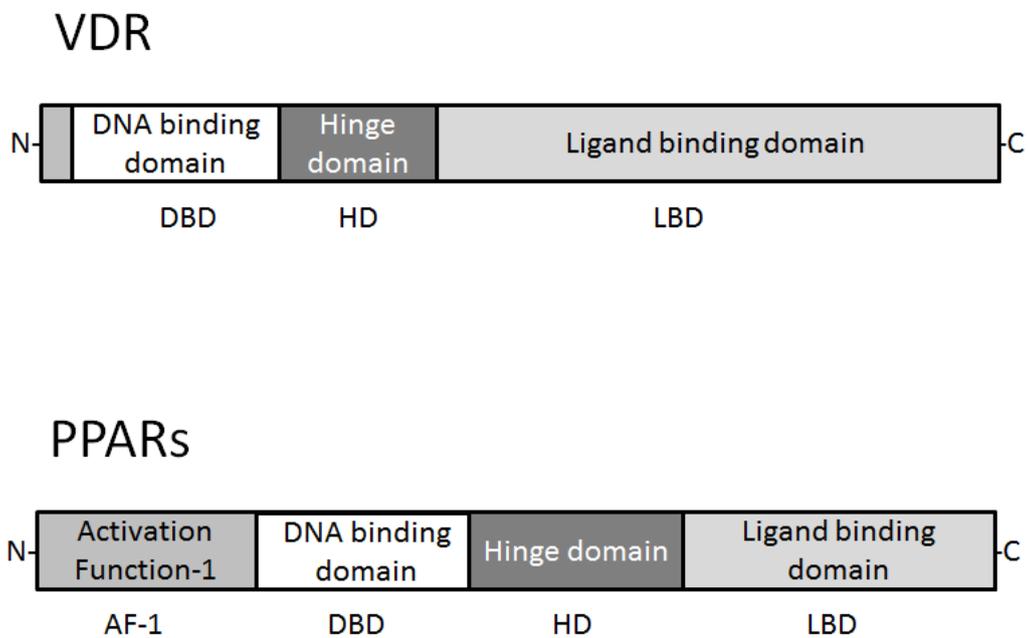


図 1-4  
VDR と PPAR タンパク質の構造模式図。重要なドメインのみを表記。

図 1-5

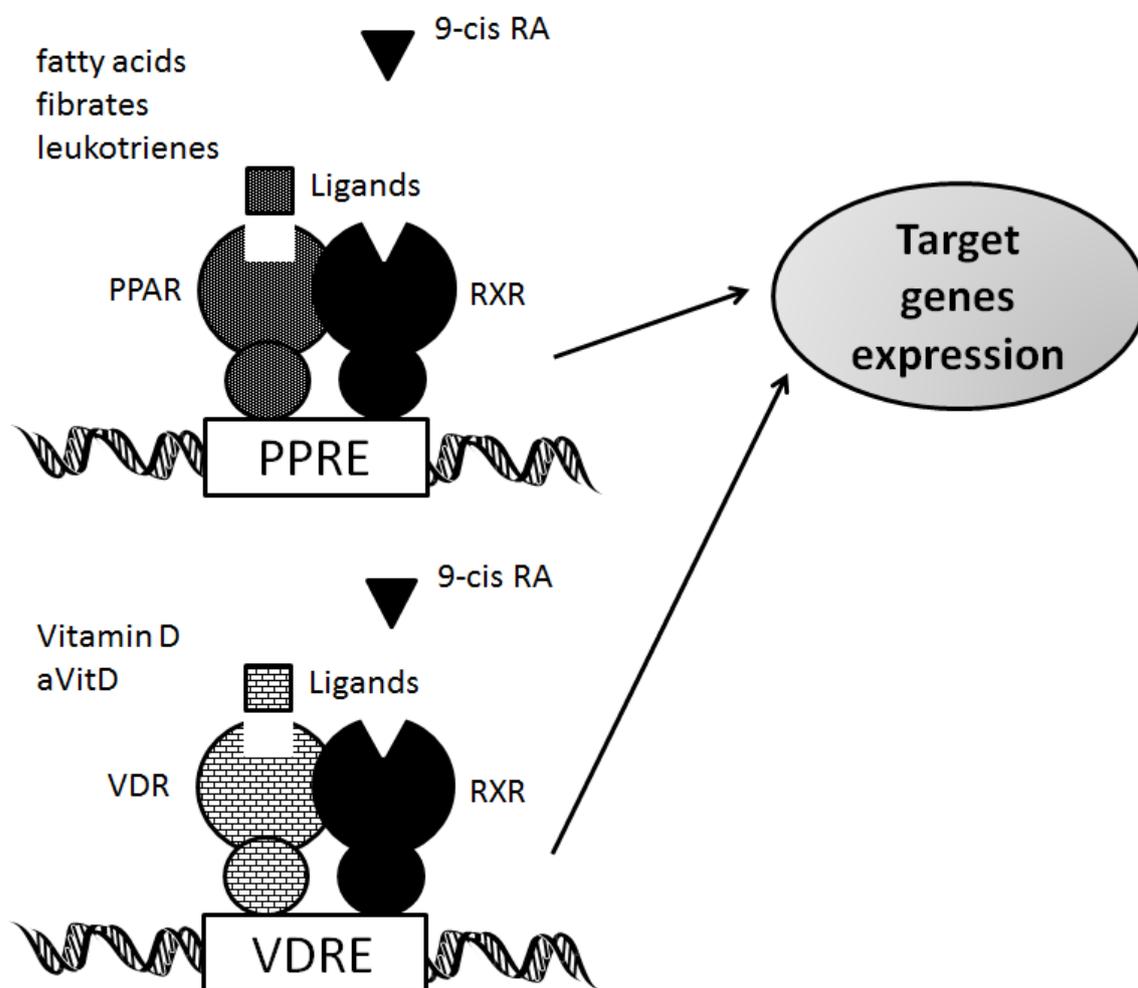


図 1-5

VDR のメカニズムと PPARs の核内の動きのモデル。他の核ホルモン受容体に類似して、リガンドが転写調節因子を活性化したとき、VDR と PPARs は行動を共にする。ビタミン A やビタミン D や脂肪酸などの場合、核内受容体のヘテロダイマーを介して標的遺伝子の発現を調節していることが判明している。

図 1-6

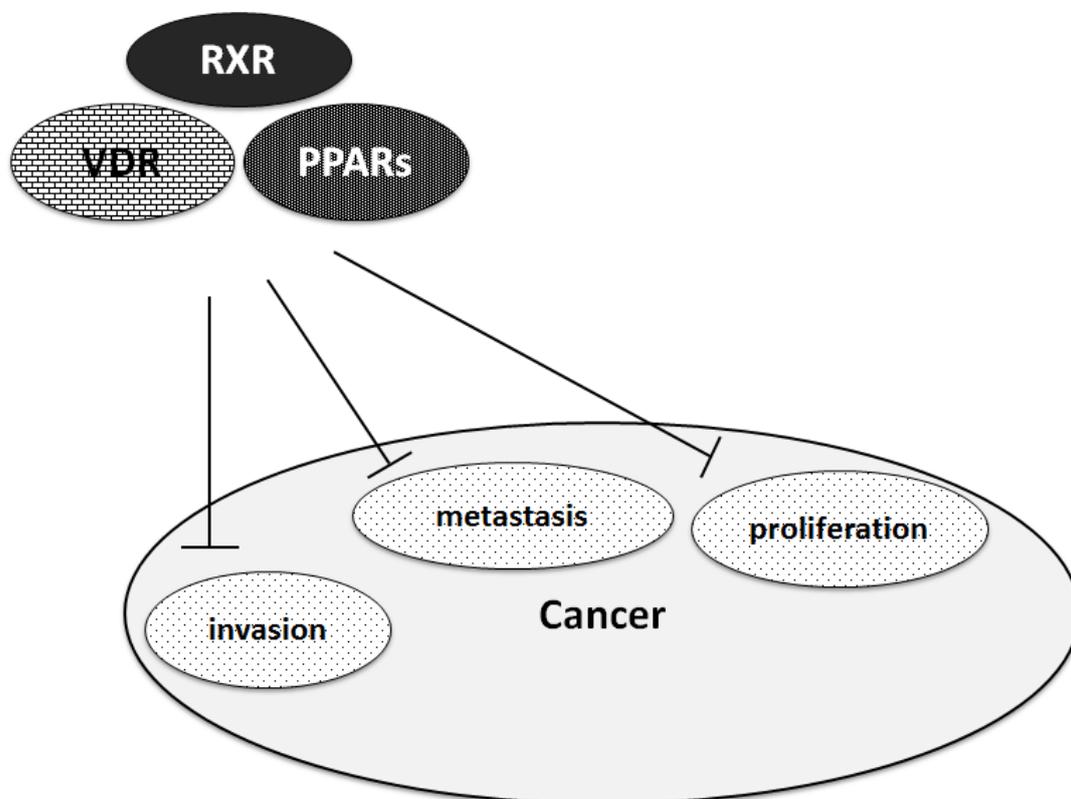


図 1-6  
VDR や RXR ・ PPARs が果たすがんの抑制での役割。 Hammerheads は抑制。

## 1 章の参考文献

- [1] Chauhan NS, Sharma V, Thakur M, and Dixit VK, "Curculigo orchioides: the black gold with numerous health benefits," *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, vol. 8, no. 7, pp. 613-623, 2010.
- [2] May BH, Zhang AL, Zhou W, Lu CJ, Deng S, and Xue CC, "Oral herbal medicines for psoriasis: a review of clinical studies," *Chin J Integr Med*, vol. 18, no. 3, pp. 172-178, 2012.
- [3] Butt MS, and Sultan MT, "Ginger and its health claims: molecular aspects," *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 51, no. 5, pp. 383-393, 2011.
- [4] Zong A, Cao H, and Wang F, "Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research," *Carbohydr Polym*, vol. 90, no. 4, pp. 1395-1410, 2012.
- [5] Efferth T, and Koch E, "Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy," *Curr Drug Targets*, vol. 12, no. 1, pp. 122-132, 2011.
- [6] Kaefer CM, and Milner JA, "The role of herbs and spices in cancer prevention," *J Nutr Biochem*, vol. 19, no. 6, pp. 347-361, 2008.
- [7] Zhang HT, Luo H, Wu J et al., "Galangin induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial pathway," *World J Gastroenterol*, vol. 16, no. 27, pp. 3377-3384, 2010.
- [8] Zhang Y, and Liu D, "Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function," *Eur J Pharmacol*, vol. 670, no. 1, pp. 325-332, 2011.
- [9] Efferth T, Miyachi H, and Bartsch H, "Pharmacogenomics of a traditional Japanese herbal medicine (Kampo) for cancer therapy," *Cancer Genomics Proteomics*, vol. 4, no. 2, pp. 81-91, 2007.
- [10] Sieri S, Krogh V, Pala V et al., "Dietary patterns and risk of breast cancer in the ORDET cohort," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 13, no. 4, pp. 567-572, 2004.
- [11] Wang S, Wu X, Tan M et al., "Fighting fire with fire: poisonous Chinese herbal medicine for cancer therapy," *J Ethnopharmacol*, vol. 140, no. 1, pp. 33-45, 2012.
- [12] Singh S, and Khar A, "Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy," *Anticancer Agents Med Chem*, vol. 6, no. 3, pp. 259-270, 2006.
- [13] Vogelzang NJ, Raghavan D, and Kennedy BJ. "VP-16-213 (etoposide): the mandrake root from Issyk-Kul." *Am J Med*. vol. 72, no.1, pp. 136-144, 1982.
- [14] Zhu XL, Chen AF, and Lin ZB, "Ganoderma lucidum polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice," *J Ethnopharmacol*, vol. 111, no. 2, pp. 219-226, 2007.
- [15] Sesti F, Tsitsilonis OE, Kotsinas A, and Trougakos IP, "Oxidative stress-mediated biomolecular damage and inflammation in tumorigenesis," *In Vivo*, vol. 26, no. 3, pp. 395-402, 2012.
- [16] Schinzel AC, and Hahn WC, "Oncogenic transformation and experimental models of human cancer," *Front Biosci*, vol. 13, pp. 71-84, 2008.
- [17] O'Neil N, and Rose A, "DNA repair," *WormBook*, vol. 13, pp. 1-12, 2006.
- [18] Bilanges B, and Stokoe D, "Mechanisms of translational deregulation in human tumors and therapeutic intervention strategies," *Oncogene*, vol. 26, no. 41, pp. 5973-5990, 2007.
- [19] Freed-Pastor WA, and Prives C, "Mutant p53: one name, many proteins," *Genes Dev*, vol. 26, no. 12, pp. 1268-1286, 2012.
- [20] Liu YY, "Resuscitating wild-type p53 expression by disrupting ceramide glycosylation: a novel approach to target mutant p53 tumors," *Cancer Res*, vol. 71, no. 20, pp. 6295-6299, 2011.
- [21] Goh AM, Coffill CR, and Lane DP, "The role of mutant p53 in human cancer," *J Pathol*, vol. 223, no. 2, pp. 116-126, 2011.

- [22] Bode AM, and Dong Z, "Post-translational modification of p53 in tumorigenesis," *Nat Rev Cancer*, vol. 4, no. 10, pp. 793-805, 2004.
- [23] Wang X, "p53 regulation: teamwork between RING domains of Mdm2 and MdmX," *Cell Cycle*, vol. 10, no. 24, pp. 4225-4229, 2011.
- [24] Hatakeyama M, and Weinberg RA, "The role of RB in cell cycle control," *Prog Cell Cycle Res*, vol. 1, pp. 9-19, 1995.
- [25] Adams PD, "Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1471, no. 3, M123-M133, 2001.
- [26] Altavilla G, Staffieri A, Busatto G, Canesso A, Giacomelli L, and Marioni G, "Expression of p53, p16INK4A, pRb, p21WAF1/CIP1, p27KIP1, cyclin D1, Ki-67 and HPV DNA in sinonasal endophytic Schneiderian (inverted) papilloma," *Acta Otolaryngol*, vol. 129, no. 11, pp. 1242-1249, 2009.
- [27] Clemens MJ, "Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation," *Oncogene*, vol. 23, no. 18, pp. 3180-3188, 2004.
- [28] Ren J, Singh BN, Huang Q et al., "DNA hypermethylation as a chemotherapy target," *Cell Signal*, vol. 23, no. 7, pp. 1082-1093, 2011.
- [29] Hu XL, Wang Y, and Shen Q, "Epigenetic control on cell fate choice in neural stem cells," *Protein Cell*, vol. 3, no. 4, pp. 278-290, 2012.
- [30] Spike BT, and Macleod KF, "The Rb tumor suppressor in stress responses and hematopoietic homeostasis," *Cell Cycle*, vol. 4, no. 1, pp. 42-45, 2005.
- [31] von Zeidler SV, Miracca EC, Nagai MA, and Birman EG, "Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers," *Int J Mol Med*, vol. 14, no. 5, pp. 807-811, 2004.
- [32] Lu Y, Zhang BY, Jia ZX, Wu WJ, and Lu ZQ, "Hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis and caspase-8 and Bcl-2 expression induced by injectable seed extract of *Coix lacryma-jobi*," *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, vol. 10, no. 3, pp. 303-307, 2011.
- [33] Gao J, Morgan WA, Sanchez-Medina A, and Corcoran O, "The ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* and the active compounds induce cell cycle arrest and apoptosis including upregulation of p53 and Bax in human lung cancer cells," *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 254, no. 3, pp. 221-228, 2011.
- [34] Lee SJ, Park K, Ha SD, Kim WJ, and Moon SK, "Gleditsia sinensis thorn extract inhibits human colon cancer cells: the role of ERK1/2, G2/M-phase cell cycle arrest and p53 expression," *Phytother Res*, vol. 24, no. 12, pp. 1870-1876, 2010.
- [35] Lu Y, Li CS, and Dong Q, "Chinese herb related molecules of cancer-cell-apoptosis: a minireview of progress between Kanglaite injection and related genes," *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 27, pp. 31, 2008.
- [36] Li B, Zhao J, Wang CZ et al., "Ginsenoside Rh2 induces apoptosis and paraptosis-like cell death in colorectal cancer cells through activation of p53," *Cancer Lett*, vol. 301, no. 2, pp. 185-192, 2011.
- [37] Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C et al., "Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism," *Int J Oncol*, vol. 25, no. 4, pp. 857-866, 2004.
- [38] Hahm ER, and Singh SV, "Honokiol causes G0-G1 phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells in association with suppression of retinoblastoma protein level/phosphorylation and inhibition of E2F1 transcriptional activity," *Mol Cancer Ther*, vol. 6, no. 10, pp. 2686-2695, 2007.

- [39] Tao R, Lu L, Zhang R, Hu J, Ni J, and Shen W, "Triptolide inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and cell cycle progression via attenuation of ERK1/2 and Rb phosphorylation," *Exp Mol Pathol*, vol. 90, no. 2, pp. 137-142, 2011.
- [40] Shan BE, Zeki K, Sugiura T, Yoshida Y, and Yamashita U, "Chinese medicinal herb, *Acanthopanax gracilistylus*, extract induces cell cycle arrest of human tumor cells in vitro," *Jpn J Cancer Res*, vol. 91, no. 4, pp. 383-389, 2000.
- [41] Fu Y, Hsieh TC, Guo J et al., "Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 322, no. 1, pp. 263-270, 2004.
- [42] Xiao XY, Hao M, Yang XY et al., "Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis," *Cancer Lett*, vol. 302, no. 1, pp. 69-75, 2011.
- [43] Kametani S, Oikawa T, Kojima-Yuasa A et al., "Mechanism of growth inhibitory effect of cape aloe extract in ehrlich ascites tumor cells," *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, vol. 53, no. 6, pp. 540-546, 2007.
- [44] Yang P, Cartwright C, Chan D, Vijjeswarapu M, Ding J, and Newman RA, "Zyflamend-mediated inhibition of human prostate cancer PC3 cell proliferation: effects on 12-LOX and Rb protein phosphorylation," *Cancer Biol Ther*, vol. 6, no. 2, pp. 228-236, 2007.
- [45] Liu H, Zang C, Emde A et al., "Anti-tumor effect of honokiol alone and in combination with other anti-cancer agents in breast cancer," *Eur J Pharmacol*, vol. 591, no. 1-3, pp. 43-51, 2008.
- [46] Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, and Baile CA, "Enhanced effects of xanthohumol plus honokiol on apoptosis in 3T3-L1 adipocytes," *Obesity (Silver Spring)*, vol. 16, no. 6, pp. 1232-1238, 2008.
- [47] Shankar S, and Srivastava RK, "Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulolylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer," *Int J Oncol*, vol. 30, no. 4, pp. 905-918, 2007.
- [48] Narayanan NK, Nargi D, Randolph C, and Narayanan BA, "Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice," *Int J Cancer*, vol. 125, no. 1, pp. 1-8, 2009.
- [49] Yoshida H, Okumura N, Kitagishi Y, Nishimura Y, and Matsuda S, "Ethanol extract of Rosemary repressed PTEN expression in K562 culture cells," *Int J appl Boil pharm Technol*, vol. 2, pp. 316-322, 2011.
- [50] Lee SJ, Kim HM, Cho YH et al., "Aqueous extract of *Magnolia officinalis* mediates proliferative capacity, p21WAF1 expression and TNF-alpha-induced NF-kappaB activity in human urinary bladder cancer 5637 cells; involvement of p38 MAP kinase," *Oncol Rep*, vol. 18, no. 3, pp. 729-736, 2007.
- [51] Dong LH, Wen JK, Miao SB et al., "Baicalin inhibits PDGF-BB-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation through suppressing PDGFR $\beta$ -ERK signaling and increase in p27 accumulation and prevents injury-induced neointimal hyperplasia," *Cell Res*, vol. 20, no. 11, pp. 1252-1262, 2010.
- [52] Lee SJ, Park SS, Kim WJ, and Moon SK, "Gleditsia sinensis thorn extract inhibits proliferation and TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 expression in vascular smooth muscle cells," *Am J Chin Med*, vol. 40, no. 2, pp. 373-386, 2012.
- [53] Way TD, Lee JC, Kuo DH et al., "Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by *Saussurea involucreta*, a rare traditional Chinese medicinal herb, in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells," *J Agric Food Chem*, vol. 58, no. 6, pp. 3356-3365, 2010.

- [54] Huang Y, Song H, Hu H, Cui L, You C, and Huang L, "Trichosanthin inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced gene expression in human cervical cancer cells," *Mol Med Report*, vol. 6, no. 4, pp. 872-878, 2012.
- [55] Moran AE, Carothers AM, Weyant MJ, Redston M, and Bertagnolli MM, "Carnosol inhibits beta-catenin tyrosine phosphorylation and prevents adenoma formation in the C57BL/6J/Min/+ (Min/+) mouse," *Cancer Res*, vol. 65, no. 3, pp. 1097-1104, 2005.
- [56] Hu X; Funder JW. The evolution of mineralocorticoid receptors. *Mol Endocrinol*. **2006**, 20, 1471-1478.
- [57] Pérez E; Bourguet W; Gronemeyer H; de Lera AR. Modulation of RXR function through ligand design. *Biochim Biophys Acta*. **2012**, 1821, 57-69.
- [58] Carlberg C; Dunlop TW. An integrated biological approach to nuclear receptor signaling in physiological control and disease. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. **2006**, 16, 1-22.
- [59] Ditsch N; Mayr D; Lenhard M; Strauss C; Vodermaier A; Gallwas J; Stoeckl D; Graeser M; Weissenbacher T; Friese K; Jeschke U. Correlation of thyroid hormone, retinoid X, peroxisome proliferator-activated, vitamin D and oestrogen/progesterone receptors in breast carcinoma. *Oncol Lett*. **2012**, 4, 665-671.
- [60] Schulman IG. Nuclear receptors as drug targets for metabolic disease. *Adv Drug Deliv Rev*, **2010**, 62, 1307-1315.
- [61] Wahli W; Michalik L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol Metab*, **2012**, 23, 351-363.
- [62] Becker J; Delayre-Orthez C; Frossard N; Pons F. Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases? *Fundam Clin Pharmacol*, **2006**, 20, 429-447.
- [63] Ringseis R; Eder K. Influence of pharmacological PPARalpha activators on carnitine homeostasis in proliferating and non-proliferating species. *Pharmacol Res*, **2009**, 60, 179-184.
- [64] Wagner KD; Wagner N. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions. *Pharmacol Ther*, **2010**, 125, 423-435.
- [65] Cipolletta D; Feuerer M; Li A et al. PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature*, **2012**, 486, 549-553.
- [66] Giaginis C; Tsantili-Kakoulidou A; Theocharis S. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the control of bone metabolism. *Fundam Clin Pharmacol*, **2007**, 21, 231-244.
- [67] Zhang H; Xu X; Chen L; Chen J; Hu L; Jiang H; Shen X. Molecular determinants of magnolol targeting both RXR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . *PLoS One*, **2011**, 6, e28253.
- [68] Temple KA; Cohen RN; Wondisford SR; Yu C; Deplewski D; Wondisford FE. An intact DNA-binding domain is not required for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) binding and activation on some PPAR response elements. *J Biol Chem*, **2005**, 280, 3529-3540.
- [69] Clarke SD; Thuillier P; Baillie RA; Sha X. Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors. *Am J Clin Nutr*, **1999**, 70, 566-571.
- [70] Nezbedova P; Brtko J. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inducible transcription factor and its role in the vitamin D action," *Endocr Regul*, **2004**, 38, 29-38.
- [71] Wolf G. Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X receptor? *Nutr Rev*, **2006**, 64, 532-538.
- [72] Benz V; Kintscher U; Foryst-Ludwig A. Sex-Specific Differences in Type 2 Diabetes Mellitus

- and Dyslipidemia Therapy: PPAR Agonists. *Handb Exp Pharmacol*, **2012**, 214, 387-410.
- [73] Forman BM; Tontonoz P; Chen J; Brun RP; Spiegelman BM; Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma, *Cell*, **1995**, 83, 803-812.
- [74] Morosetti R; Servidei T; Mirabella M; Rutella S; Mangiola A; Maira G; Mastrangelo R; Koeffler HP. The PPARgamma ligands PGJ2 and rosiglitazone show a differential ability to inhibit proliferation and to induce apoptosis and differentiation of human glioblastoma cell lines. *Int J Oncol*, **2004**, 25, 493-502.
- [75] Yu Z; Schneider C; Boeglin WE; Brash AR. Epidermal lipoxygenase products of the hepoxilin pathway selectively activate the nuclear receptor PPARalpha. *Lipids*, **2007**, 42, 491-497.
- [76] Kouroumichakis I; Papanas N; Zarogoulidis P; Liakopoulos V; Maltezos E; Mikhailidis DP. Fibrates: therapeutic potential for diabetic nephropathy? *Eur J Intern Med*, **2012**, 23, 309-316.
- [77] Friedland SN; Leong A; Filion KB et al. The cardiovascular effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Am J Med*, **2012**, 125, 126-133.
- [78] Ibabe A; Herrero A; Cajarville MP. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by PPAR(alpha)- and PPAR(gamma)-specific ligands and by 17beta-estradiol in isolated zebrafish hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, **2005**, 19, 725-735.
- [79] Baker PR; Lin Y; Schopfer FJ; Woodcock SR; Groeger AL; Batthyany C; Sweeney S; Long MH; Iles KE; Baker LM; Branchaud BP; Chen YE; Freeman BA. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Biol Chem*, **2005**, 280, 42464-42475.
- [80] Yu S; Reddy JK. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta*, **2007**, 1771, 936-951.
- [81] Waku T; Shiraki T; Oyama T; Morikawa K. Atomic structure of mutant PPARgamma LBD complexed with 15d-PGJ2: novel modulation mechanism of PPARgamma/RXRalpha function by covalently bound ligands. *FEBS Lett*, **2009**, 583, 320-324.
- [82] Hansen CM; Binderup L; Hamberg KJ; Carlberg C. Vitamin D and cancer: effects of 1,25(OH)2D3 and its analogs on growth control and tumorigenesis. *Front Biosci*. **2001**, 6, D820-D848.
- [83] Ebert R; Schütze N; Adamski J; Jakob F. Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease. *Mol Cell Endocrinol*, **2006**, 248, 149-159.
- [84] Jensen TJ; Henriksen LO; Sølvesten H; Kragballe K. Inhibition of the 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced increase in vitamin D receptor (VDR) levels and binding of VDR-retinoid X receptor (RXR) to a direct repeat (DR)-3 type response element by an RXR-specific ligand in human keratinocyte cultures. *Biochem Pharmacol*, **1998**, 55, 767-773.
- [85] Shirazi L; Almquist M; Malm J; Wirfält E; Manjer J. Determinants of serum levels of vitamin D: a study of life-style, menopausal status, dietary intake, serum calcium, and PTH. *BMC Womens Health*, **2013**, 13, 33.
- [86] Wacker M; Holick MF. Vitamin D - effects on skeletal and extraskelatal health and the need for supplementation. *Nutrients*, **2013**, 5, 111-148.
- [87] Malley RC; Muller HK; Norval M; Woods GM. Dietary vitamin D alters the response of the skin to UVB-irradiation depending on the genetic background of the mice. *Photochem Photobiol Sci*, **2013**, 12, 536-545.
- [88] Luo W; Hershberger PA; Trump DL; Johnson CS. 24-Hydroxylase in cancer: impact on vitamin D-based anticancer therapeutics. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2013**, 136, 252-257.

- [89] Deeb KK; Trump DL; Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*, **2007**, 7, 684-700.
- [90] Wood RJ. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutr Rev*, **2008**, 66, 40-46.
- [91] Mulholland DJ; Dedhar S; Coetzee GA; Nelson CC. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev*, **2005**, 26, 898-915.
- [92] Narvaez CJ; Simmons KM; Brunton J; Salinero A; Chittur SV; Welsh JE. Induction of STEAP4 correlates with 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulation of adipogenesis in mesenchymal progenitor cells derived from human adipose tissue. *J Cell Physiol*, **2013**, 228, 2024-2036.
- [93] Dunlop TW; Väisänen S; Frank C; Molnár F; Sinkkonen L; Carlberg C. The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor. *J Mol Biol*, **2005**, 349, 248-260.
- [94] Alimirah F; Peng X; Yuan L; Mehta RR; von Knethen A; Choubey D; Mehta RG. Crosstalk between the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and the vitamin D receptor (VDR) in human breast cancer cells: PPAR $\gamma$  binds to VDR and inhibits 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 mediated transactivation. *Exp Cell Res*, **2012**, 318, 2490-2497.
- [95] Sertznig P; Seifert M; Tilgen W; Reichrath J. Activation of vitamin D receptor (VDR)- and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-signaling pathways through 1,25(OH)(2)D(3) in melanoma cell lines and other skin-derived cell lines. *Dermatoendocrinol*, **2009**, 1, 232-238.
- [96] Sertznig P; Seifert M; Tilgen W; Reichrath J. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and vitamin D receptor (VDR) signaling pathways in melanoma cells: promising new therapeutic targets? *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2010**, 121, 383-386.
- [97] Bambury RM; Iyer G; Rosenberg JE. Specific PPAR gamma agonists may have different effects on cancer incidence. *Ann Oncol*, **2013**, 24, 854.
- [98] Terrasi M; Bazan V; Caruso S; Insalaco L; Amodeo V; Fanale D; Corsini LR; Contaldo C; Mercanti A; Fiorio E; Lo Re G; Cicero G; Surmacz E; Russo A. Effects of PPAR $\gamma$  agonists on the expression of leptin and vascular endothelial growth factor in breast cancer cells. *J Cell Physiol*, **2013**, 228, 1368-1374.
- [99] Grabacka M; Plonka PM; Urbanska K; Reiss K. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down-regulation of Akt. *Clin Cancer Res*, **2006**, 12, 3028-3036.
- [100] Wang QM; Jones JB; Studzinski GP. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells. *Cancer Res*, **1996**, 56, 264-267.
- [101] Tosetti F; Ferrari N; De Flora S; Albini A. Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *FASEB J*, **2002**, 16, 2-14.
- [102] Lee HJ; Liu H; Goodman C; Ji Y; Maehr H; Uskokovic M; Notterman D; Reiss M; Suh N. Gene expression profiling changes induced by a novel Gemini Vitamin D derivative during the progression of breast cancer. *Biochem Pharmacol*, **2006**, 72, 332-343.
- [103] Axanova LS; Chen YQ; McCoy T; Sui G; Cramer SD. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and PI3K/AKT inhibitors synergistically inhibit growth and induce senescence in prostate cancer cells. *Prostate*, **2010**, 70, 1658-1671.
- [104] Kouchi Z; Fujiwara Y; Yamaguchi H; Nakamura Y; Fukami K. Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type II beta is required for vitamin D receptor-dependent E-cadherin expression in SW480 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **2011**, 408, 523-529.
- [105] Xiong M; Gong J; Liu Y; Xiang R; Tan X. Loss of vitamin D receptor in chronic kidney

disease: a potential mechanism linking inflammation to epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol*, **2012**, 303, F1107-F1115.

- [106] Battaglia S; Maguire O; Thorne JL; Hornung LB; Doig CL; Liu S; Sucheston LE; Bianchi A; Khanim FL; Gommersall LM; Coulter HS; Rakha S; Giddings I; O'Neill LP; Cooper CS; McCabe CJ; Bunce CM; Campbell MJ. Elevated NCOR1 disrupts PPARalpha/gamma signaling in prostate cancer and forms a targetable epigenetic lesion. *Carcinogenesis*, **2010**, 31, 1650-1660.

## 第 2 章

### がん抑制遺伝子産物 PTEN の機能

## 2-1 老化とがんにおける PTEN の レドックス制御

細胞は連続的に活性酸素 (ROS) にさらされる。ROS は病原体への細胞反応の間だけでなく、ミトコンドリア酸化性代謝の間にも発生する。それはシグナル分子として、細胞増殖、分化、アポトーシス、転移を含む種々な生理学的プロセスを調整する[1-3]。さらに ROS によるタンパク質と脂質の酸化が健康の重要な決定要素となる。多くの実験によって、ROS が哺乳動物の細胞で細胞の老化を決定する役割を担っていることが判明した [4]。酸化ストレスの増加は高分子の破損を増加させ、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、肥満、がんといった種々の病気に関係する[5] (図 2-1)。内因性 ROS は、主に ATP の形でエネルギーを生産するために酸化的リン酸化を行うプロセスでミトコンドリアから発生する[6]。加えて、ROS は細胞内の酸化酵素によって生産される。炎症は組織における ROS の主要源だ。DNA を含む細胞内の高分子を損傷する前に、ROS を中和することは、細胞にとって重要だ。過剰な ROS によって引き起こされた DNA 損傷が修復されないまま放置された場合、オキシデオキシグアノシンが産出される[7,8]。突然変異の蓄積がいくつかの老化プロセスの主な原因であり、酸化ストレスは老化および老化に関連するテロメアを短くすることが知られている[9,10]。ROS の増加に対する異常な反応が健康と老化に影響を与えるものと思われる。ROS はいくつかの重要な酵素の活動を修正し、アクチン細胞骨格 (細胞遊走の癒着と刺激) を再編する。ROS は、PKC、MAPK、PI3K、チロシンホスファターゼ、PTEN といった標的分子の可逆的な調節を通して影響を及ぼすのかもしれない[11]。しかし、ROS によるシグナル分子の最初の調節系についての詳細は判明していない。細胞の ROS 代謝はレドックス・メカニズムに関係している様々なタンパク質によって調節される。

いくつかの情報伝達経路の適切な操作は、いくつかの増殖因子と ROS の産出を誘発するサイトカインの働きに依存する[12]。酸化ストレスに応じて酸化ストレス抑制遺伝子の発現を活性化し、酸化防止の役割を担う。がん抑制遺伝子が DNA 損傷の修復、細胞周期の停止、細胞増殖、細胞分化、転移とアポトーシスを含む様々な細胞の活動を調節するのだが、PTEN は様々なヒトのがんで突然変異や欠損が認められるがん抑制遺伝子だ[13]。PTEN の活性化が細胞に ROS を減らすよう命令する PI3K/AKT を調整することも判明している[14]。

ヒトの PTEN は、403 アミノ酸リーディングフレームを開けるよう指示する 5.5kb mRNA をコード化している染色体 10q23.3 上で、9つのエクソンから成る[15,16]。翻訳産物はテンシンと相同性のある 53kDa のタンパク質とチロシン脱リン酸化酵素タンパク質だ。PTEN は初期の胚形成を通して偏在的に発現する[17]。ペルオキシソーム増殖因子は PPAR $\gamma$  を活性化し、がん抑制遺伝子 p53 が PTEN の発現を上昇させることができる[18,19]。興味深いことに、ローズマリーからの抽出物を K562 細胞 (白血病の培養細胞) に添加すると、PTEN の発現が抑制される[20]。PTEN プロモーターのメチル化は、PTEN 遺伝子の転写を停止する[21]。酵素の PTEN 活性化は、リン酸化やアセチル化や酸化を含む翻訳後の調節によって調節される[22]。PTEN 遺伝子はしばしば突然変異し、ヒトのがんで機能を失う。ヘテロ接合喪失の研究によって、PTEN が進行したがんでは重要な役割を果たすことが示唆された[23]。腫瘍の PTEN 遺伝子の変化は予後診断と結び付けられる[24]。PTEN ヘテロ接合マウスも多くのがんを進行させるが、それと対照的に、PTEN の過剰発現は G1 静止を促進することによって、細胞増殖の抑制を誘発する[25]。

図 1-2 に PTEN タンパク質の概要の構造を示す。PTEN タンパク質は N ターミナルホスファターゼと C ターミナル C2 とドメインを結合している PDZ (PSD-95、DLG1、ZO-1) から成る。PTEN CX5R (S/T)モチーフは、PTEN ホスファターゼ活性のために重要な 3 つの基本的な残基で触媒中心部を囲む活性部位に存在する。そのような構造をしているため、

PTEN は PIP3 のような酸性リン脂質基板に対する結合性を有する。PTEN 脂質ホスファターゼ活性化は細胞増殖とアポトーシスと転移を調節している PIP3 レベルの調節を通して AKT キナーゼ経路を調節する。加えて、AKT 活性化が低酸素誘導因子 1 を (HIF 1) 安定化に導くのに対し、PTEN は低酸素によって調節された HIF 1 安定化を弱める[26]。HIF 1 は低酸素状態に適応するために重要な遺伝子の転写調節のために重要な要素である。変異体 PTEN の不安定性と HIF1 分解の減少はタンパク質の相互作用を伴うことが知られている[27]。

PIP3 は生存キナーゼ AKT に合図する受容体チロシンキナーゼを調節する PI3K 経路の主要な 2 番目の因子だ。PTEN は PIP3 を PIP2 に変換することを通して、PI3K/AKT の活動をネガティブに調節する。膜で PIP3 レベルが増加すると、共存のために AKT のような PH ドメインを含むタンパク質が生成され、キナーゼによってリン酸化と活性化がもたらされる[28]。活性化した AKT は、細胞生存、細胞サイクリング、血管形成、代謝に関するタンパク質をリン酸化する。そのような活性化シグナルに対し、PTEN は PIP3 の基底レベルを維持する調節機構として働く。細胞の増殖と生存と運動性の増加は、PIP3 レベルの増加と関連した細胞への主な影響だ。PIP3 レベルの増加は腫瘍形成にも繋がる。実際に、PI3K/AKT 経路の調節不全が多くのがんで見られた[29]。PTEN は PIP3 を脱リン酸化することにより、腫瘍を抑圧する効果を及ぼす。そして、それによって AKT 活性化といくつかの経路をネガティブに調節する。PIP3 レベルの上昇はがん細胞の増殖に有利だが、腫瘍で PTEN 遺伝子に突然変異が起こって非活性化することはよくあることのように。興味深いことに PTEN の発現は食物成分によって変化しうることが見出されている(図 2-2、図 2-3)。

PPARs は核ホルモン受容体 スーパーファミリーに属する転写因子である。ゲノム DNA の感応的な成分は脂質輸送を含む脂質代謝とエネルギーホメオスタシスに関係している様々な遺伝子に見いだされる[30]。その発現は老化によって変化する。3 つのサブタイプ PPAR $\alpha$  と PPAR $\delta$  (これは PPAR $\beta$  としても知られている) と PPAR $\gamma$  が識別された。異なる PPARs の活性化が 3 つの PPAR サブタイプの特定の生物活性を説明するかもしれない。脂肪酸はミトコンドリアの酸化を通して必要な酵素の発現上昇を誘導する PPARs と相互作用することができる[31]。それから、脂質オーバーロードが ROS の産出量を増やす[32]。PPARs がミトコンドリア生合成と呼吸と ROS の解毒で不可欠であることから、この経路の欠陥はミトコンドリア障害の原因となるようだ。例えば、PPAR $\gamma$  情報伝達経路は多くのミトコンドリア機能不全を改善する[33]。PPAR $\gamma$  の活性化は PTEN の調節によって子宮内膜の細胞の拡散を減少させる。加えて、siRNA による PTEN のノックダウンは、細胞の老化に加えて ROS の生成においても PPAR $\delta$  による効果をなくした[34]。さらに、リガンドを活性化された PPAR $\delta$  は PTEN の発現を上昇させ、PI3K/AKT 経路を抑制する。活性化された PPAR $\delta$  も PTEN の発現上昇によって、誘発された老化に抵抗する。そして、それは血管の細胞で ROS の産出量を減らす。マンガンスーパーオキシドジスムターゼがレスベラトロールによって誘発されることが報告されている。レスベラトロールは核内移行と SIRT1 の活性化によって PPAR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  を活性化するかもしれない [35]。イースト相同物 Sir2 として知られている哺乳類の SIRT1 は、長命と多様な代謝プロセスに関与する脱アセチル化酵素だ[36]。酵素活性は細胞のエネルギーによって調節されるかもしれない。また、SIRT1 は酸化防止剤ステータスと関係のある、ある種の肥満のために重要な調節因子として機能するかもしれない。PTEN は Lys 402 (COOH ターミナル PDZ ドメイン結合モチーフ) 上でアセチル化され、PTEN の機能を調節する際にアセチル化の潜在的役割を示す[37]。SIRT1 の脱アセチル化は主に PTEN の脱アセチル化の原因となる。そのため、SIRT1 が不足すると PTEN のような標的分子のアセチル化レベルが上昇する。SIRT1 は代謝疾患を含む加齢に関連した病気に有用な治療法を提示するかもしれない。正常組織と比

較して、SIRT1 はがん組織で過剰に発現する。このことは、SIRT1 が腫瘍プロモーターの役割を果たすかもしれないことを示唆している [38]。実際に、SIRT1 は PI3K/AKT 情報伝達経路を通して肝臓がんを促進する。加えて、SIRT1 は PTEN のアセチル化を減少させ、その脱アセチル化依存の方法で機能経路を非活性化する [39]。

ウェルナー症候群は早期老化や発がん率の上昇などで特徴付けられる病気で、まれな常染色体疾患であり、RecQ によく似た DNA ヘリカーゼの WRN タンパク質の機能異常によって発症する [40]。二倍体繊維芽細胞株は短命で、広範囲のゲノムが不安定だ。WRN タンパク質は DNA 修復、複製、転写、テロメアの維持に関与しているヘリカーゼだ。テロメアでの酸化 DNA 損傷を含む DNA 損傷修復メカニズムには、WRN が不可欠だ。WRN はヘリカーゼのプロセス終了とエキソヌクレアーゼの活動のために、破損した二本鎖修復メカニズムを最適化する。3'-5' ヘリカーゼの活性化に加えて、WRN タンパク質はエキソヌクレアーゼも活性化することが判明した [41]。また、RNAi ノックダウンによる WRN タンパク質の除去が細胞の老化表現と DNA 損傷を速める [42]。WRN タンパク質の枯渇は HIF1 複合体の安定化と活性化も増加させる [43]。HIF1 は老化の分子機構にも関連している。WRN が欠乏した状態で HIF1 の活性化が起こると、ミトコンドリアで ROS が生成される。WRN タンパク質がミトコンドリアの ROS 生産に影響を与えることによって、HIF1 活性化を調整することが判明している。PI3K/AKT 経路の活性化が HIF1 を安定化するのに対し、PTEN は HIF1 の安定化を弱める。PTEN の突然変異も HIF1 を不安定にする。WRN 相同体のヘリカーゼドメインを欠いたマウスは、野生型に比べてより短命であるのに加えて、ワーナー症候群の表現型の特徴を多く示す [44]。ビタミン C の補充が WRN 変異型マウスを延命し、いくつかの異常から回復させる [45]。AKT 相同体の削除は年齢依存的な欠陥を保護することから、PTEN/AKT 経路を調整することによって時期尚早な老化症候群を治療できるかもしれない。PTEN の発現による PI3K/AKT 情報伝達経路の抑制によって、年齢依存の DNA 損傷が回避できるかもしれない。種々ながんがワーナー症候群で観察されている。

PTEN の触媒活動は ROS によって調整される。そして細胞の PTEN ホスファターゼ活性は酸化ストレスによって抑制される [46]。PTEN の不活性化は細胞の PIP3 レベルを増加させ、原形質膜における PIP3 の蓄積と AKT を含む PIP3 の下流の標的での活性化を引き起こす。そして、細胞内 ROS を増加させるために機能的な役割を示す。それに加えて、PI3K/AKT シグナリングの活性化が細胞生存に関わるいくつかの遺伝子の発現を増やすようだ。大型食細胞の内因性オキシダントの生産が細胞内の PTEN を非活性化するが、これは下流に合図するオキシダント依存的な活性化と関連する [47]。ROS レベルが PTEN のリン酸化や不活性化と連動して網膜の色素上皮細胞で増加するとの報告がある [48]。細胞内のリン酸化 PTEN の不活性化と結果として生じる AKT の活性化は、酸化防止剤による治療で抑制される。ROS は PTEN 不活性化を調節するが、PTEN の発現には影響を及ぼさないようだ。他方、ミトコンドリアの PTEN タンパク質レベルが N-アセチルシステインによって減少され、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって増加される [49]。ミトコンドリアにおける PTEN の増加は細胞内でより多量の ROS を生産させるかもしれない。しかし、精製された PTEN を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> へ暴露すると、時間と濃度に依存して PTEN の不活性化をもたらされる [50]。種々なシステイン突然変異体の分析によって、PTEN の活性部位内の Cys 残基が特に酸化する間に二硫化物結合を形成することが判明した [51]。ROS が制御されていない場合、PTEN 機能を抑制すると細胞が増殖するかもしれない。実際、PTEN の不活性化は前立腺がんの腫瘍化に関連している。これは PIP3 とオキシダントが産出される発がん性のプロセスに何らかの示唆を与えるかもしれない。

老化の特徴の 1 つは、ROS による DNA 損傷の蓄積である。この DNA 損傷は通常の新陳代謝と炎症反応の間に産出される。ROS はポイントミューテーションや削除といったゲ

ノムの変化を誘発し、がん抑制遺伝子を抑制したりがん遺伝子を活性化したりすることが知られている。p53もまたROSの生産を促進し、アポトーシスに関与する[52]。ROSは老化においても重要であり、ROSを増加させるp53標的遺伝子も老化において重要な役割を果たすかもしれない。ROSがPTENを調節できるように、ROSの調整におけるPTENの役割はフィードバックループの一部を成しているかもしれない。早期老化においては、AKT/ROS/p53経路を通してアポトーシスが腫瘍抑制分子PTENの欠損を補っている。さらに、ROSの増加はインスリン抵抗性を軽減するよう合図しているインスリンの強化にも繋がる。ROS依存的なインスリンシグナリングの増加は、PTENの酸化と抑制を引き起こす。代謝の調節におけるPTENの重要性を考慮すると、PTENを糖尿病と老化に関連づけているものは多いかもしれない。ROSとPTEN経路を経由した老化の間にある関係のより深い理解が、新薬発見のためにROSによって調節された老化経路への手がかりを提供するかもしれない。

図 2-1

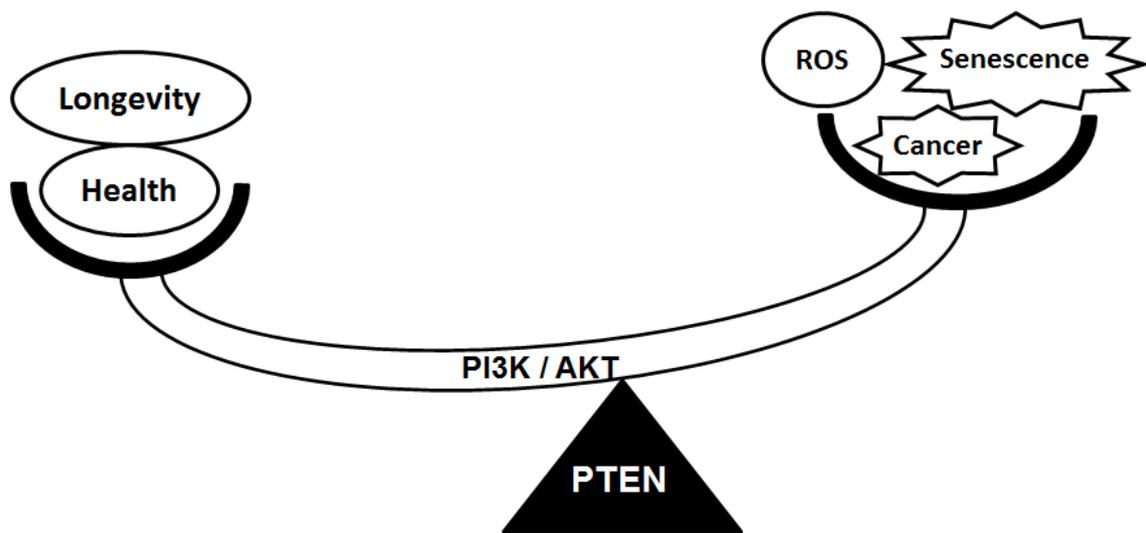


図 2-1

PI3K と AKT と PTEN のバランスで、健康か、がん或いは老化が規定されているとの報告がある。

図 2-2

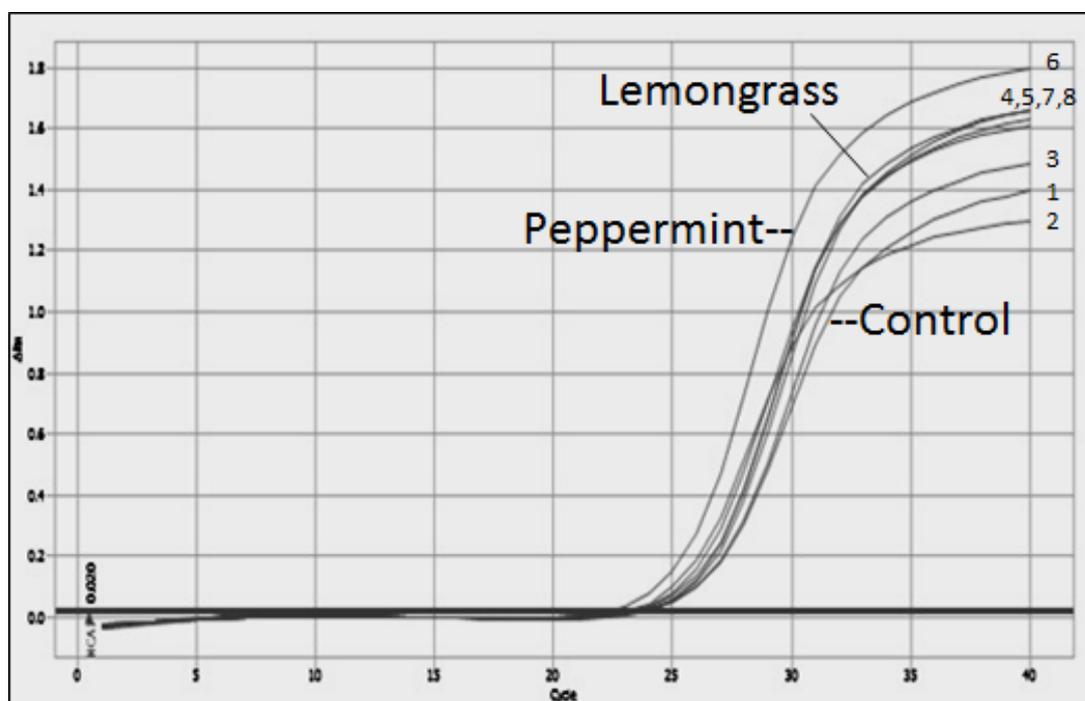


図 2-2

レモングラスやペパーミントのエタノール抽出液で JMJD1B の遺伝子発現変化が起こることをリアルタイム PCR で確認した。

図 2-3

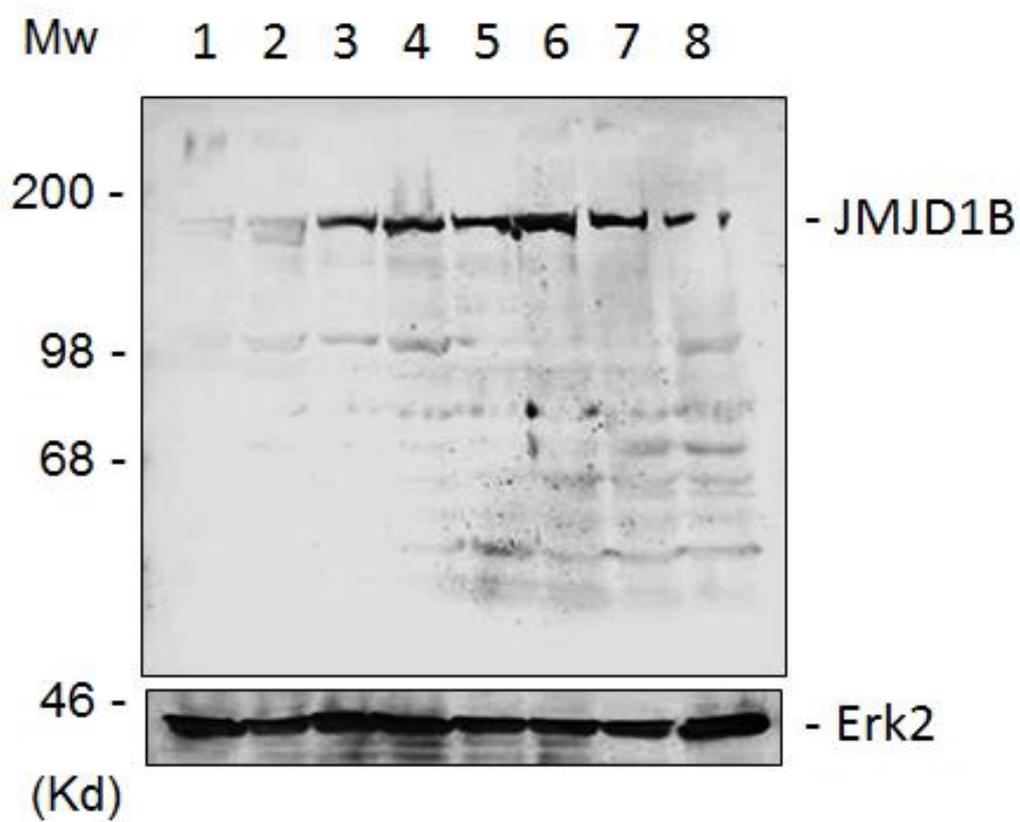


図 2-3  
レモングラスやペパーミントのエタノール抽出液で JMJD1B の遺伝子発現変化が起こることをウエスタンブロット法で確認した。

## 2-2 ホルモンががん細胞間の関係と DNA を修復する

DNA 修復と DNA 損傷反応遺伝子での遺伝子欠陥がしばしばがん発生率を増加させる。欠陥はホルモン情報伝達経路の変調とも結び付けられる。DNA 修復活動の調節におけるエストロゲンの直接的な役割は重要だ。ホルモンに依存する病気からホルモンに依存しない病気へのがんの進行の分子的な研究も同じく重大な問題のままだ。

乳房と前立腺のがんはホルモンが応答するタイプのがんであることが知られている[53]。がん細胞の増殖を促進することにおいて、ホルモンが何らかの役割を果たしていることを示す証拠が多数ある。ホルモンに依存する病気からホルモンに依存しない病気へのある種のがんが、がんのマネージメントで重大な問題を有したままだ。最近、研究によって DNA 修復の欠陥とホルモン受容体の喪失の相関関係が報告された[54]。DNA 修復システムの調整はホルモンに依存しないがん発生に貢献することができる。発がんホルモンとホルモンの内分泌、そして DNA 修復システムの間に関係があるかもしれない。(図 2-4) がんはいくつかの分子の変更によってより浸潤性が高く治療に対する抵抗力の強い性質を得ることができる複雑な病気だ。DNA 複製エラーが高い DNA 重複と共に蓄積するから、変異は増加した増殖性活動で細胞に存在する[55-57]。しかし、細胞にはゲノムに起こる様々な現象に応じてゲノムの完全性を維持するための仕組みがある。ゲノムの条件の下で、DNA 損傷チェックポイントを作動させることによって、細胞は正常な細胞周期ではなくなる[58-60]。チェックポイントは破損した DNA 傷害から細胞周期調節まで情報を伝達するプロセスの役割を果たす。例えば、毛細血管拡張症によって突然変異する ATM はがんリスクの増加と結び付けられた[61,62]。ATM は、DNA 修復経路に関連していたがん抑制遺伝子産物 p53 と BRCA1 を含めて、DNA 損傷に応じて多くのタンパク質をリン酸化するチェックポイント キナーゼだ。正常な細胞が DNA 修復機械の種々なメカニズムのバランスを示す。p53 腫瘍抑制分子は細胞増殖を阻止したり、アポトーシスを誘導することができるゲノムのストレスに対する細胞の反応に関係しているいくつかの DNA 修復経路を調節したりする[63]。p53 が同じく DNA 修復とアポトーシスに関係しているタンパク質をコード化している遺伝子の転写調節における重要な役割を果たすから、p53 の修正は細胞運命の重要な決定要素であるように思われるかもしれない。発がん性がある進行の間に、p53 は突然変異させられるか、すべてのヒトのがんの半分近くで削除され、正常に機能できなくなる[64,65]。BRCA1 は重要な役割として乳がん卵巣がんリスクで識別されるいくつかの遺伝子の発現を調節する。BRCA1 は細胞増殖のゲノムの完全性とコントロールの維持管理と関係がある DNA 修復と組換えプロセスに関係している[66]。大抵の BRCA1 突然変異種がんがホルモンの要因が BRCA1 突然変異種がんの病因に関与するかもしれない[67,68]。本当に、ホルモンの治療が困難な病気への移行に関する根本的な分子機構の理解は、効果的な治療と予防の戦略の発展に欠かせない。

ある種のホルモンが細胞増殖を促進するので[69]、ホルモンへのさらなる曝露は任意の遺伝子のエラーを発展させる機会を促進する。加えて、cytochrome p450 酵素によって触媒作用を起こされたある種のホルモン酸化代謝産物が、DNA が突然変異に導くという状態で、不安定な付加物を形成することができる[70]。さらに、新陳代謝のプロセスはゲノム DNA への酸化ダメージの原因となる活性酸素生成物を作り出す。絶え間ない mutagenic 可能性はがんの発生に寄与するかもしれません。実際に、エストロゲンへの長期の曝露は乳がん発症リスクの増加と強く関連付けられる。(図 2-5) エストロゲンは主にエストロゲンの様々な動きを調節するエストロゲン受容体に結合する。他方、アンドロゲンは、DNA 損傷の反応を活性化することによって、アポトーシスを誘導するかもしれない[71]。BRCA1 タンパク質は乳房の上皮細胞拡散がエストロゲン受容体を抑制することによって、経路に介在したことを隠すよう機能するかもしれない。最近の研究によって、DNA 修復

欠陥と特定のホルモン受容体の喪失の間に相関関係があることが示された[54]。エストロゲンは単に乳房の成長と分化に欠くことができないだけでなく、p53 活動をも活性化する[72]。発がんあるいは抗がんのためのホルモンの双方向性の機能は将来解決されるべきだ。

p53 は多くの遺伝子を調節する鍵となる転写調節因子であり、ゲノムの不安定から保護する。p53 遺伝子の突然変異は乳がんが頻繁で見られ、それは程度が低い予後診断と結び付けられる。FAK (チロシンキナーゼ) が乳がんを含む様々なヒトの腫瘍で過度に発現する[73]。FAK は細胞運動性の重要な分子で、その過剰発現は転移性の増加と結び付けられる。FAK 発現はエストロゲンに応じて p53 に依存する形で減少させられた[74]。p53 突然変異細胞における FAK の発現低下の損失がエストロゲンの刺激によって増加した侵略能力と関連づけられる。このように、p53 は FAK の重要な下方の調整器で、乳がんにおける p53 機能の喪失はエストロゲンに反応するがんの転移性に関係するかもしれない。p53 下流にある転写標的の1つ、p21/WAF-1 は DNA 損傷に応じてエストロゲンによって治療された細胞で増加する。p53 はホルモンと DNA 修復によって調節される遺伝子によって結ばれたネットワークの中で中心を形成するかもしれない。p53 とアンドロゲン受容体信号の間における相互干渉は p53 の活性化が前立腺がんがホルモン療法の抗がん効果を増大させるかもしれないことを示唆している[75]。

大豆イソフラボンとクルクミンを同時に摂取すると前立腺特異抗原の血清レベル (PSA) が減少する[76]。この組み合わせは ATM の発現とリン酸化に影響を及ぼし、前立腺がん細胞の増殖を抑制する。テストステロン (アンドロゲン) が前立腺がんの最初の変異を押えるかもしれない DNA 損傷反応の活性化を増大させる。ビタミンDもまた、がんを予防する活動を示す。ビタミンDが DNA 損傷を保護するという証拠がある[77]。ビタミン D は ATM や Rad50 のような DNA 二重鎖切断 (DSBs) を修復する DNA 修復遺伝子の発現量を増やし、ストレスによってダメージを受けた DNA や発がんから細胞を守る[78]。

DNA 修復メカニズムの DNA 損傷反応遺伝子そして/あるいは発現低下の遺伝子欠陥が発がん[79]に導くことができるゲノムの不安定を促進する[79]。細胞にはゲノムの安定性の維持管理と発がんの抑制のために多数の DNA 修復メカニズムが設置されている。哺乳動物の細胞で利用可能な標準的な DNA 修復経路が homologous 修理や非 homologous と単一ストランド修復などを含む[80]。それらは DSBs を修復する異なる経路だ。DNA 修復システムは正常細胞とがん細胞両方の生存に欠かせない。情報伝達経路のセットが DSBs を検出し、DNA 修復生存あるいはプログラム細胞死を調節している。主な DNA 損傷認識分子は ATM で[81]、それは p53 と BRCA1 を含む、DNA 損傷に応じて多くのタンパク質をリン酸化するチェックポイント キナーゼ だ (図 2-6)。これらの重要な分子の概要の構造を図 2-7 に示す。不完全な DNA 修復箇所が増加すると、物質や分子にダメージを与える DNA への細胞の過敏症だ。DNA 修復経路の抑制が発がん性の突然変異のある箇所での生存に必要なとされるメカニズムを阻止するように思われる。DNA に損傷を与えている物質や分子が DNA 修復欠陥でがん細胞における治療の効果に關与する[82]。DNA 修復箇所に関係している遺伝子の発現を調節することによってがん治療を強めることに対し、ヒストンの修正と DNA のメチル化といったエピジェネティックなメカニズムが注目されている[83]。

ストレスによって引き起こされた活性化を通して、p53 は細胞の遺伝子の完全性を守る標的遺伝子の発現を誘発する。p53 遺伝子は、p53 ががんを防ぐのにおいて重大な役割を果たし、多数のがん組織でしばしば突然変異させられる。突然変異種 p53 が突然変異タイプによって機能を喪失するか機能を獲得するタンパク質として分類されることができ[84]。野生型 p53 は標準的な生理学の条件下では活性化せず、DNA に損傷を与えている様々なストレスのタイプに応じて活性化する。p53 活性化は既存の腫瘍性病変の復帰を引き起こすかもしれないことから、がんの予防を進展させることにおいて重要となるかも

しれない[85]。DNAが修復されなければ、p53によってプログラム細胞死が引き起こされる。p53タンパク質はある特定のストレスに応じてリジンのアセチル化、チロシンのニトロ化とセリン/トレオニン残基のリン酸化といった翻訳後の修飾を誘導する[86]。加えて、多数のメカニズムが特定の転写標的でp53の選択性を決定するp53活動を調節することが明らかにされた。p53の転写の影響で、p21WAF-1がp53依存型[87]と関連経路[88]両方において重要な役割を果たすことが知られている。p21WAF1はサイクリン依存のキナーゼ（CDK）コンプレックスとの相互作用を通して細胞周期の進行を抑制する。

BRCA1もまた、その機能ががんの進行を妨げるがん抑制遺伝子の基準を満たす。BRCA1遺伝性の乳がんは、DNA修復経路の欠陥を有するがんの1タイプだ[89]。突然変異は細胞内で増加したゲノムの不安定性と関係しており、それは他の重要な遺伝子の突然変異を促進させる。研究によって、DNA損傷信号、DNA修復プロセスと細胞周期チェックポイントにおけるBRCA1の機能的な役割が確立された[90]。これらの機能的な役割と一貫して、BRCA1で不十分な細胞が極端なゲノムの不安定と染色体の逸脱を示す。BRCA1遺伝子突然変異は散発的な乳がんや卵巣がんでは稀にしか見られないが、BRCA1タンパク質の発現は散発的な症例でしばしば減少している[91]。BRCA1 cDNAは1863のチンクフィンガーモチーフと2つの一般に信じられている核局在化が信号を送るアミノ末端を持っているタンパク質をコード化する（図2-7）。アミノ末端領域はE3ユビキチンリガーゼ活動を所有する[92]。そしてカルボキシル・ターミナルドメインは特定のphospho-タンパク質に結合することに関与する[93]。細胞周期の制御におけるBRCA1の役割は、種々のサイクリンやCDKsと相互に作用する能力によって、CDKs抑制剤p21WAF-1とp53を活性化すると判明した。BRCA1は、分子にダメージを与えているDNAへ晒された後、過剰リン酸化する。そして、BRCA1の特定の機能はリン酸化によって調節されるようだ[94]。DNA損傷反応の調節における役割のほかに、BRCA1タンパク質はエストロゲン受容体とアンドロゲン受容体と相互に作用して、それらの活動、抑制的なエストロゲン受容体 $\alpha$ 活動と刺激的なアンドロゲン受容体活動を調節する[95]。それで、BRCA1の突然変異は各タイプのホルモンに応答するがんの調節的なリスクを上げる。つまり、BRCA1の突然変異を持つ人に対し、ホルモンは強烈ながんリスクの要因となる。

ホルモンとエストロゲン、プロゲステロンとアンドロゲンのような、発がんホルモンに関係しているそのレセプター信号は特定のホルモン受容体によってしばしば発がんの発生と促進に関係する。多くの候補遺伝子がホルモン合成や活性化や分泌作用を含むような乳がんや前立腺がんのバイオマーカーとして認知されている[96]。さらに、ホルモン療法が一般にがん細胞増殖を調節し、ホルモン関連の病気で生存確率を上げる。例えば、抗エストロゲンはエストロゲン受容体に対して陽性の乳がんでは効率的だ。そしてアンドロゲンの剥離治療は進行した前立腺がんに対してよく行われる。しかし、がん細胞における難治性のホルモンへの移行が重要な臨床上の問題のまま残っており、それらの治療法の利点を制限している。

エストロゲンは乳房の上皮の拡散と分化で重要な役割を果たすだけでなく、心臓血管の脳と骨新陳代謝で多様な細胞のプロセスを調節する[97]。加えて、いくつかの正常細胞とがん細胞がエストロゲン受容体を発現する。それらの拡散は今度はDNA損傷が存在するという可能性を増やすエストロゲンによって促進されます。エストロゲンへの慢性的な曝露がエストロゲン受容体陽性の細胞において発がんの要因となる。しかし、エストロゲンもまた、BRCA1を含むDNA損傷を修復できる遺伝子の発現を刺激する（図2-5）。乳がんの進行におけるDNA修復欠陥がホルモン独立への移行で見られるかもしれない。エストロゲンに結びついたレセプターは二量体化し、クロマチンと結合する。二量体の受容体はDNA配列のモチーフ（エストロゲン反応要素）に直接結合する。ER $\alpha$ とER $\beta$ という

2つのエストロゲン受容体がある。ER $\alpha$ が増殖性であると思われるのに対し、ER $\beta$ の活性化がアポトーシスを誘導すると思われる。DNA修復において重要なタンパク質、MSH2がER $\alpha$ の効力がある共同活性剤であることが知られている[98]。ER $\beta$ レベルの増加が乳がんリスクの減少と結び付けられるかもしれない[99]。その証拠に、ER $\beta$ の発現が減少すると前立腺がんのリスクが増加すると示している調査結果がある。ER $\beta$ はER $\alpha$ の動作に反することによって、細胞の拡散を抑制するかもしれない[100]。大豆のような植物に存在しているエストロゲンのような化合物であるゲニステインへの曝露が、後々乳がんになるリスクを減少させる[101]。BRCA1の発現は、BRCA1がゲニステインのがん・保護の効果に介在することにおいて役割を果たすかもしれないことを示唆して、思春期にゲニステインに曝露された乳線に影響する。しかし成人期に大豆を大量に摂取しても、乳がんになるリスクは軽減しない。加えて、生理的に高いレベルのエストロゲンが発がんを促進すると思われる。幼少期と青春期は特に乳がんを発症するか否かの感受性が高い期間であるかもしれない。DNA修復経路とその幼少期と成人期における相違について、より深い理解が必要だ。

前立腺がんのリスク要因はホルモンのメカニズムを通して作用するかもしれない。なぜならアンドロゲンホルモン活性化を阻害する薬はがんリスクを減らすからだ。加えて、ある種の散発的な前立腺がんの症例が、アンドロゲン活性化とその情報伝達経路に関係している遺伝子の多型性に関連づけられる[102,103]。アンドロゲンは正常な前立腺の成長をコントロールすることに関与していることが分かっている。アンドロゲン受容体は男性の生理学で重大な役割を果たす核受容体スーパーファミリーのリガンドで活性化する転写調節因子で、その信号もアンドロゲンに反応する遺伝子の転写を調節することによって発がんが進行の原因となる。アンドロゲン感受的な遺伝子の1つ、PSAは前立腺がん治療の診断と評価のために用いられる臨床的に重要なマーカーだ[104]。アンドロゲンに感受性のある前立腺がんの進行の過程で、がん細胞の過半数はまだアンドロゲン受容体を発現するが、多くの場合それは突然変異させられる。アンドロゲン受容体の発現低下がプログラム細胞死を誘発し、がん細胞増殖を抑制する。そのために、合図しているアンドロゲンが前立腺がん予防と治療のための重要な目標として認知された。

エストロゲン受容体活動における変化もまた、前立腺がんリスクを変化させるかもしれない[105]。チロシンキナーゼ抑制剤としてもよく知られているゲニステインのようなフィトエストロゲンの消費量の増加は前立腺がんリスクの減少と関連付けられた[106]。フィトエストロゲンは遊離基を探し出すことによって、活性酸素生成物から細胞を守る。これに加えて、フィトエストロゲンはGSK-3 $\beta$ の発現量を増やすことによって $\beta$ -カテニンと結合しているGSK-3 $\beta$ を強化してアポトーシスを誘導し[107]、前立腺がん細胞の増殖を抑制することができることを示唆している。フィトエストロゲンは同じく分裂促進因子活性化キナーゼ(MAPK)経路で分子を抑制することが判明している[108]。さらに、それは前立腺がんではTGF- $\beta$ によってp38-MAPKの活性化を阻止できて[109]、がん細胞の侵入と転移を防ぐ。MSH2タンパク質の発現低下が前立腺がんの発生のリスクの増加と関連している場合、前立腺がん細胞におけるMSH2タンパク質の発現低下は全体的な再発のない間隔と相関関係がある[110]。MSH2の発現はp53の発現と関連があり、それはERの発現にネガティブに関係する[111]。MSH2遺伝子の発現低下は進行性の乳がん前立腺がんからのホルモン独立と関連付けられた。予後診断と関連づけられるように思われるPMS2は前立腺がん患者で上昇する[112,113]。PMS2の過剰発現はDNA損傷耐性を高めるかもしれない。

ホルモン情報伝達経路はネットワークに信号を送る複雑な経路だ。DNA修復システムは破損したヌクレオチドの認識と修理を通してゲノムの正確性を維持する過程を編集している非常に節約されたDNAだ。細胞増殖とDNA修復機能の間の矛盾はDNAエラーの蓄積

のため発がんを誘発するのかもしれない。DNA 修復機械におけるヒトの腫瘍感受性遺伝子の役割は、ヒトのがんのリスク、診断、予防と治療を予測するための方法の発展のために重要だ。例えば、ホルモンの調節が腫瘍感受性遺伝子産物 BRCA1 の発現の一因となることから、BRCA1 突然変異の乳がんのホルモン予防が効果的かもしれない。他の分子の経路の発見はホルモン独立の基本的なメカニズムをより深く理解する助けになるだろう。あるエビデンスによると、食事に含まれているセレン、ビタミンD、ビタミンE、リコピンと大豆食品には、がんを抑制する効果がある[114,115]。トマトに含まれるカロチノイドであるリコピンは前立腺がんに対する有効な保護意識が強い食事の要因であるように考えられており、DNA 損傷を防ぐために活性酸素生成物を探し出すことによって、酸化防止剤の役割を果たす。より多量のリコピンを摂取すると、前立腺がんになるリスクが顕著に減少することが示されている。

図 2-4

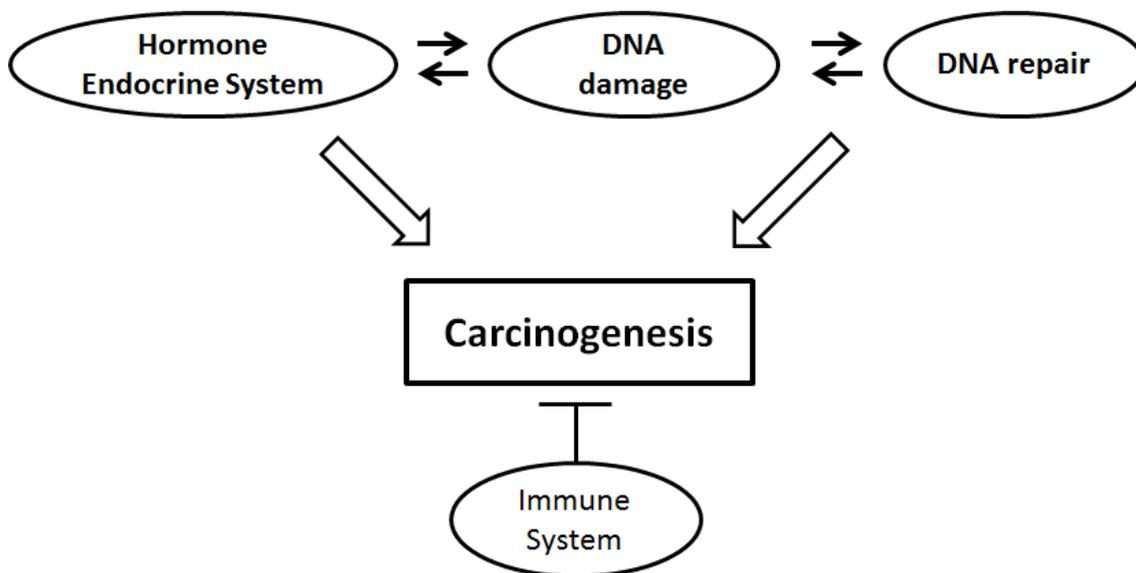


図 2-4

発がんホルモン内分泌と DNA 損傷 DNA 修復システムとの関連性。

図 2-5

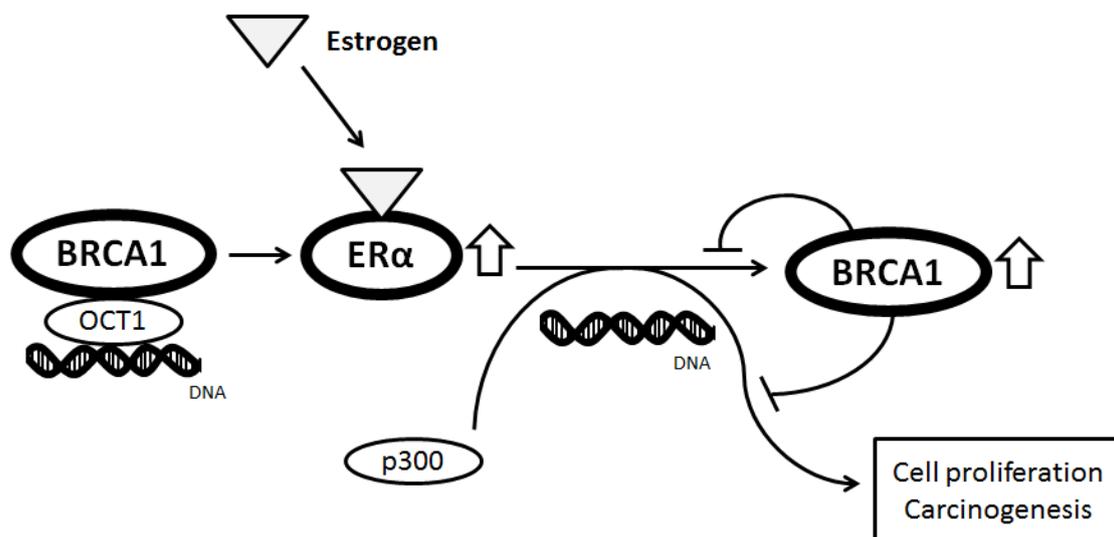


図 2-5

BRCA1 と ER $\alpha$  の間の関連。BRCA1 が転写調節因子、OCT1 に依存する方法で ER $\alpha$  の発現を調節する。転写活性補助因子 p300 を含む ER $\alpha$  転写メカニズムによって、エストロゲン刺激は BRCA1 の発現を増やす。また、BRCA1 タンパク質は下流の遺伝子を媒介する ER $\alpha$  を抑制する。エストロゲンやイソフラボンの場合、核内のエストロゲンレセプターを介して遺伝子発現が変化することが知られている。

図 2-6

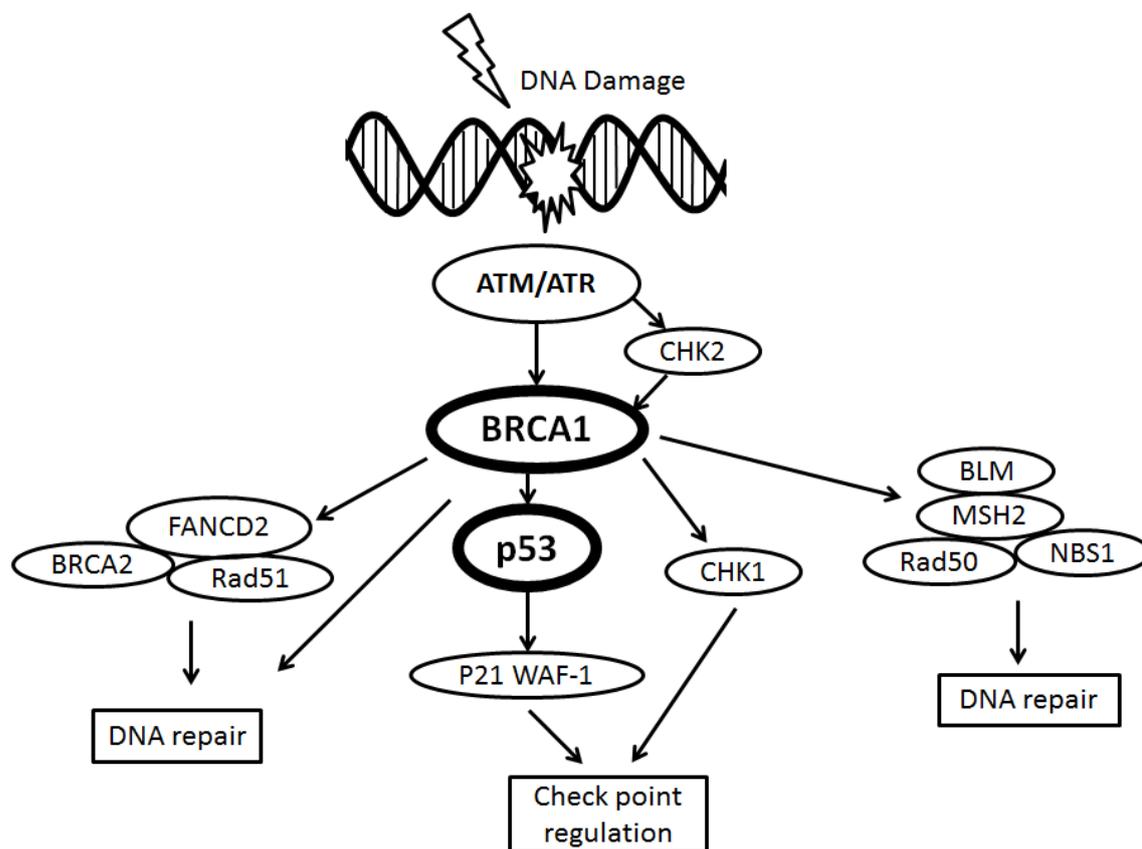


図 2-6  
DNA 修復系の概観と細胞周期チェックポイント情報伝達経路との関連。

図 2-7

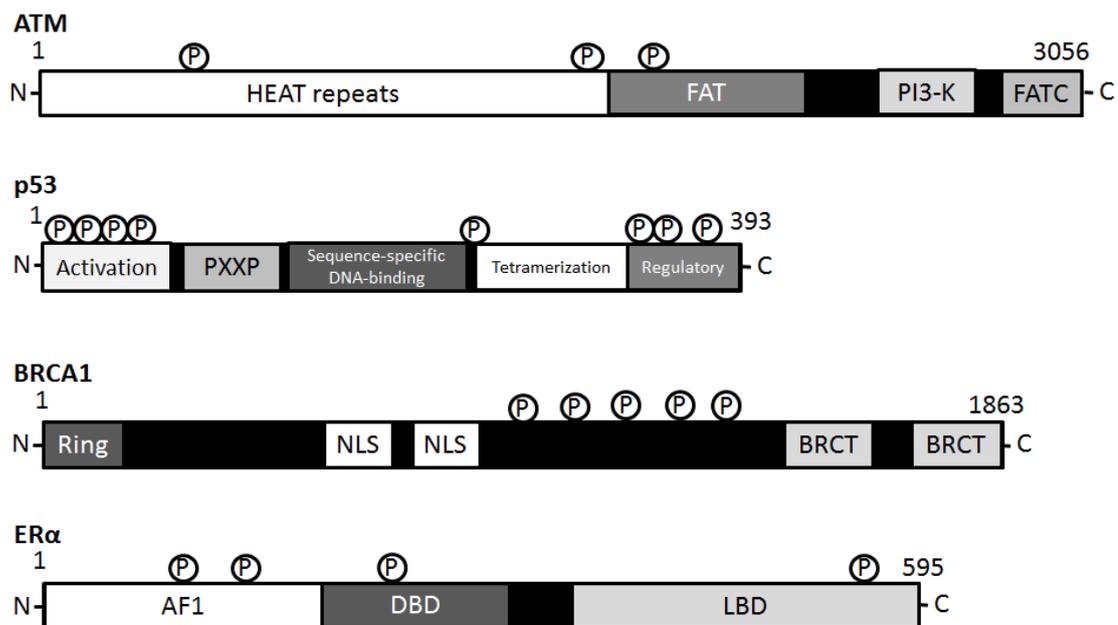


図 2-7

ATM、p53、BRCA1 と ER $\alpha$  タンパク質のドメイン構造を示している概略図。

## 2 章の参考文献

- [1] Al-Gubory KH, Fowler PA and Garrel C: The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1634-1650, 2010.
- [2] Zhang Y, Du Y, Le W, Wang K, Kieffer N and Zhang J: Redox control of the survival of healthy and diseased cells. *Antioxid Redox Signal* 15: 2867-2908, 2011.
- [3] Scatena R: Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. *Adv Exp Med Biol* 942: 287-308, 2012.
- [4] Leonarduzzi G, Sottero B, Testa G, Biasi F and Poli G: New insights into redox-modulated cell signaling. *Curr Pharm Des* 17: 3994-4006, 2011.
- [5] Roberts CK and Sindhu KK: Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci* 84: 705-712, 2009.
- [6] Ballard JW: *Drosophila simulans* as a novel model for studying mitochondrial metabolism and aging. *Exp Gerontol* 40: 763-773, 2005.
- [7] Shubassi G, Robert T, Vanoli F, Minucci S and Foiani M: Acetylation: a novel link between double-strand break repair and autophagy. *Cancer Res* 72: 1332-1335, 2012.
- [8] Murray JM, Stiff T and Jeggo PA: DNA double-strand break repair within heterochromatic regions. *Biochem Soc Trans* 40: 173-178, 2012.
- [9] Babizhayev MA, Vishnyakova KS and Yegorov YE: Telomere-dependent senescent phenotype of lens epithelial cells as a biological marker of aging and cataractogenesis: the role of oxidative stress intensity and specific mechanism of phospholipid hydroperoxide toxicity in lens and aqueous. *Fundam Clin Pharmacol* 25: 139-162, 2011.
- [10] Saretzki G and Von Zglinicki T: Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 959: 24-29, 2002.
- [11] Li ZY, Yang Y, Ming M and Liu B: Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 414: 5-8, 2011.
- [12] Azad N, Rojanasakul Y and Vallyathan V: Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11: 1-15, 2008.
- [13] Asai T, Liu Y, Bae N and Nimer SD: The p53 tumor suppressor protein regulates hematopoietic stem cell fate. *J Cell Physiol* 226: 2215-2221, 2011.
- [14] Xu J, Tian W, Ma X, *et al*: The molecular mechanism underlying morphine-induced Akt activation: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. *Cell Biochem Biophys* 61: 303-311, 2011.
- [15] Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Murakami M, Nishimura Y and Matsuda S: PI3K/AKT/PTEN Signaling as a Molecular Target in Leukemia Angiogenesis. *Adv Hematol* 2012: 843085, 2012.
- [16] Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Nishimura Y and Matsuda S: Alternative splicings on p53, BRCA1 and PTEN genes involved in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 413: 395-399, 2011.
- [17] Croushore JA, Blasiolo B, Riddle RC, *et al*: Ptena and ptenb genes play distinct roles in zebrafish embryogenesis. *Dev Dyn* 234: 911-921, 2005.
- [18] Teresi RE, Shaiu CW, Chen CS, Chatterjee VK, Waite KA and Eng C: Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPARgamma by Lovastatin and Rosiglitazone. *Int J Cancer* 118: 2390-2398, 2006.

- [19] Harikumar KB and Aggarwal BB: Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle* 7: 1020-1035, 2008.
- [20] Yoshida H, Okumura N, Kitagishi Y, Nishimura Y and Matsuda S: Ethanol extract of Rosemary repressed PTEN expression in K562 culture cells. *Int J appl Boil pharm Technol* 2: 316-322, 2011.
- [21] Mueller S, Phillips J, Onar-Thomas A, *et al*: PTEN promoter methylation and activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in pediatric gliomas and influence on clinical outcome. *Neuro Oncol* 14: 1146-1152, 2012.
- [22] Singh G and Chan AM: Post-translational modifications of PTEN and their potential therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 11: 536-547, 2011.
- [23] Tysnes BB and Mahesparan R: Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *J Neurooncol* 53: 129-147, 2001.
- [24] Zhu X, Qin X, Fei M, *et al*: Combined Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) Loss and Fatty Acid Synthase (FAS) Overexpression Worsens the Prognosis of Chinese Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* 13: 9980-9991, 2012.
- [25] Weng LP, Brown JL and Eng C: PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet* 10: 599-604, 2001.
- [26] Carver DJ, Gaston B, Deronde K and Palmer LA: Akt-mediated activation of HIF1 in pulmonary vascular endothelial cells by S-nitrosoglutathione. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 255-263, 2007.
- [27] Li YM, Zhou BP, Deng J, Pan Y, Hay N and Hung MC: A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells. *Cancer Res* 65: 3257-3263, 2005.
- [28] Howes AL, Arthur JF, Zhang T, *et al*: Akt-mediated cardiomyocyte survival pathways are compromised by G alpha q-induced phosphoinositide 4,5-bisphosphate depletion. *J Biol Chem* 278: 40343-40351, 2003.
- [29] Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL and Ciruelos EM: The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29: 751-759, 2010.
- [30] Fruchart JC: Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 205: 1-8, 2009.
- [31] Schreurs M, Kuipers F and van der Leij FR: Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes Rev* 11: 380-388, 2010.
- [32] Ruggiero C, Ehrenshaft M, Cleland E and Stadler K: High-fat diet induces an initial adaptation of mitochondrial bioenergetics in the kidney despite evident oxidative stress and mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E1047-E1058, 2011.
- [33] Pipatpiboon N, Pratchayasakul W, Chattipakorn N and Chattipakorn SC: PPAR $\gamma$  agonist improves neuronal insulin receptor function in hippocampus and brain mitochondria function in rats with insulin resistance induced by long term high-fat diets. *Endocrinology* 153: 329-338, 2012.
- [34] Kim HJ, Ham SA, Kim MY, *et al*: PPAR $\delta$  coordinates angiotensin II-induced senescence in vascular smooth muscle cells through PTEN-mediated inhibition of superoxide generation. *J Biol Chem* 286: 44585-44593, 2011.
- [35] Das UN: A defect in the activity of Delta6 and Delta5 desaturases may be a factor predisposing to the development of insulin resistance syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 72: 343-350, 2005.

- [36] Lee J and Kemper JK: Controlling SIRT1 expression by microRNAs in health and metabolic disease. *Aging (Albany NY)* 2: 527-534, 2010.
- [37] Ikenoue T, Inoki K, Zhao B and Guan KL: PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain. *Cancer Res* 68: 6908-6912, 2008.
- [38] Choi HN, Bae JS, Jamiyandorj U, *et al*: Expression and role of SIRT1 in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 26: 503-510, 2011.
- [39] Qu Y, Zhang J, Wu S, Li B, Liu S and Cheng J: SIRT1 promotes proliferation and inhibits apoptosis of human malignant glioma cell lines. *Neurosci Lett* 525: 168-172, 2012.
- [40] van Brabant AJ, Stan R and Ellis NA: DNA helicases, genomic instability, and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1: 409-459, 2000.
- [41] Li B, Reddy S and Comai L: Sequence-specific processing of telomeric 3' overhangs by the Werner syndrome protein exonuclease activity. *Aging (Albany NY)* 1: 289-302, 2009.
- [42] Szekely AM, Bleichert F, Nümann A, *et al*: Werner protein protects nonproliferating cells from oxidative DNA damage. *Mol Cell Biol* 25: 10492-10506, 2005.
- [43] Labbé A, Lafleur VN, Patten DA, *et al*: The Werner syndrome gene product (WRN): a repressor of hypoxia-inducible factor-1 activity. *Exp Cell Res* 318: 1620-1632, 2012.
- [44] Massip L, Garand C, Turaga RV, Deschênes F, Thorin E and Lebel M: Increased insulin, triglycerides, reactive oxygen species, and cardiac fibrosis in mice with a mutation in the helicase domain of the Werner syndrome gene homologue. *Exp Gerontol* 41: 157-168, 2006.
- [45] Massip L, Garand C, Paquet ER, *et al*: Vitamin C restores healthy aging in a mouse model for Werner syndrome. *FASEB J* 24: 158-172, 2010.
- [46] Barbieri SS, Ruggiero L, Tremoli E and Weksler BB: Suppressing PTEN activity by tobacco smoke plus interleukin-1beta modulates dissociation of VE-cadherin/beta-catenin complexes in endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 732-738, 2008.
- [47] Leslie NR, Bennett D, Lindsay YE, Stewart H, Gray A and Downes CP: Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J* 22: 5501-5510, 2003.
- [48] Kim JW, Kang KH, Burrola P, Mak TW and Lemke G: Retinal degeneration triggered by inactivation of PTEN in the retinal pigment epithelium. *Genes Dev* 22: 3147-3157, 2008.
- [49] Zu L, Zheng X, Wang B, *et al*: Ischemic preconditioning attenuates mitochondrial localization of PTEN induced by ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: H2177-H2186, 2011.
- [50] Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W and Rhee SG: Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 277: 20336-20342, 2002.
- [51] Matsuda M, Takeshita K, Kurokawa T, *et al*: Crystal structure of the cytoplasmic phosphatase and tensin homolog (PTEN)-like region of *Ciona intestinalis* voltage-sensing phosphatase provides insight into substrate specificity and redox regulation of the phosphoinositide phosphatase activity. *J Biol Chem* 286: 23368-23377, 2011.
- [52] Maillet A and Pervaiz S: Redox regulation of p53, redox effectors regulated by p53: a subtle balance. *Antioxid Redox Signal* 16: 1285-1294, 2012.
- [53] Folkler EJ and Dowsett M: Influence of sex hormones on cancer progression. *J Clin Oncol* 28: 4038-4044, 2010.
- [54] Martin L, Coffey M, Lawler M, Hollywood D and Marignol L: DNA mismatch repair and the transition to hormone independence in breast and prostate cancer. *Cancer Lett* 291: 142-149, 2010.
- [55] Xu Y and Price BD: Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle* 10: 261-267, 2011.

- [56] Crasta K, Ganem NJ, Dagher R, Lantermann AB, Ivanova EV, Pan Y, et al.: DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 482: 53-58, 2012.
- [57] Rodriguez GP, Romanova NV, Bao G, Rouf NC, Kow YW and Crouse GF: Mismatch repair-dependent mutagenesis in nondividing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 6153-6158, 2012.
- [58] Vurusaner B, Poli G and Basaga H: Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radic Biol Med* 52: 7-18, 2012.
- [59] Hanel W and Moll UM: Links between mutant p53 and genomic instability. *J Cell Biochem* 113: 433-439, 2012.
- [60] Jones RM and Petermann E: Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem J* 443: 13-26, 2012.
- [61] Smith J, Tho LM, Xu N and Gillespie DA: The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 108: 73-112, 2010.
- [62] Hennequin C, Quero L and Favaudon V: DNA repair and tumour radiosensitivity: focus on ATM gene. *Bull Cancer* 98: 239-246, 2011.
- [63] Molchadsky A, Rivlin N, Brosh R, Rotter V and Sarig R: p53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention. *Carcinogenesis* 31: 1501-1508, 2010.
- [64] Muller PA, Vousden KH and Norman JC: p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol* 192: 209-218, 2011.
- [65] Essmann F and Schulze-Osthoff K: Translational approaches targeting the p53 pathway for anti-cancer therapy. *Br J Pharmacol* 165: 328-344, 2012.
- [66] Karve TM, Li X and Saha T: BRCA1-mediated signaling pathways in ovarian carcinogenesis. *Funct Integr Genomics* 12: 63-79, 2012.
- [67] Berstein LM: Endocrinology of the wild and mutant BRCA1 gene and types of hormonal carcinogenesis. *Future Oncol* 4: 23-39, 2008.
- [68] Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Nishimura Y and Matsuda S. Alternative splicings on p53, BRCA1 and PTEN genes involved in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 413: 395-399, 2011.
- [69] Mueck AO and Sitruk-Ware R: Nomegestrol acetate, a novel progestogen for oral contraception. *Steroids* 76: 531-539, 2011.
- [70] Bolton JL and Thatcher GR: Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* 21: 93-101, 2008.
- [71] Comstock CE and Knudsen KE: The complex role of AR signaling after cytotoxic insult: implications for cell-cycle-based chemotherapeutics. *Cell Cycle* 6: 1307-1313, 2007.
- [72] Lu S, Becker KA, Hagen MJ, Yan H, Roberts AL, Mathews LA, et al.: Transcriptional responses to estrogen and progesterone in mammary gland identify networks regulating p53 activity. *Endocrinology* 149: 4809-4820, 2008.
- [73] Golubovskaya VM, Conway-Dorsey K, Edmiston SN, Tse CK, Lark AA, Livasy CA et al.: FAK overexpression and p53 mutations are highly correlated in human breast cancer. *Int J Cancer* 125: 1735-1738, 2009.
- [74] Anaganti S, Fernández-Cuesta L, Langerød A, Hainaut P and Olivier M: p53-Dependent repression of focal adhesion kinase in response to estradiol in breast cancer cell-lines. *Cancer Lett* 300: 215-224, 2011.
- [75] Lee HJ, Chattopadhyay S, Yoon WH, Bahk JY, Kim TH, Kang HS, et al.: Overexpression of hepatocyte nuclear factor-3alpha induces apoptosis through the upregulation and accumulation

- of cytoplasmic p53 in prostate cancer cells. *Prostate* 70: 353-361, 2010.
- [76] Ide H, Tokiwa S, Sakamaki K, Nishio K, Isotani S, Muto S, et al.: Combined inhibitory effects of soy isoflavones and curcumin on the production of prostate-specific antigen. *Prostate* 70: 1127-1133, 2010.
- [77] Welsh J: Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 523: 107-114, 2012.
- [78] Ting HJ, Yasmin-Karim S, Yan SJ, Hsu JW, Lin TH, Zeng W, et al.: A positive feedback signaling loop between ATM and the vitamin D receptor is critical for cancer chemoprevention by vitamin D. *Cancer Res* 72: 958-968, 2012.
- [79] Kelly GL and Strasser A: The essential role of evasion from cell death in cancer. *Adv Cancer Res* 111: 39-96, 2011.
- [80] Natarajan AT and Palitti F: DNA repair and chromosomal alterations. *Mutat Res* 657: 3-7, 2008.
- [81] Bhatti S, Kozlov S, Farooqi AA, Naqi A, Lavin M and Khanna KK: ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. *Cell Mol Life Sci* 68: 2977-3006, 2011.
- [82] Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Nishimura Y, Iseki S and Matsuda S: Against Lung Cancer Cells: To Be, or Not to Be, That Is the Problem. *Lung Cancer Int* doi:10.1155/2012/659365, in press, 2012.
- [83] Gigeck CO, Chen ES, Calcagno DQ, Wisnieski F, Burbano RR and Smith MA: Epigenetic mechanisms in gastric cancer. *Epigenomics* 4: 279-294, 2012.
- [84] Martinez-Rivera M and Siddik ZH: Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type p53. *Biochem Pharmacol* 83: 1049-1062, 2012.
- [85] Stegh AH: Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - the promises, challenges and perils. *Expert Opin Ther Targets* 16: 67-83, 2012.
- [86] Kim DH, Kundu JK and Surh YJ: Redox modulation of p53: mechanisms and functional significance. *Mol Carcinog* 50: 222-234, 2011.
- [87] Gartel AL: p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm? *Biofactors* 35: 161-164, 2009.
- [88] Ocker M and Schneider-Stock R: Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1367-1374, 2007.
- [89] Osborne MP: Chemoprevention of breast cancer. *Surg Clin North Am* 79: 1207-1221, 1999.
- [90] Roy R, Chun J and Powell SN: BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 12: 68-78, 2011.
- [91] Prado A, Andrades P and Parada F: Recent developments in the ability to predict and modify breast cancer risk. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63: 1581-1587, 2010.
- [92] Ohta T, Sato K and Wu W: The BRCA1 ubiquitin ligase and homologous recombination repair. *FEBS Lett* 585: 2836-2844, 2011.
- [93] Leung CC and Glover JN: BRCT domains: easy as one, two, three. *Cell Cycle* 10: 2461-2470, 2011.
- [94] Ouchi T: BRCA1 phosphorylation: biological consequences. *Cancer Biol Ther* 5: 470-475, 2006.
- [95] Kotsopoulos J and Narod SA: Androgens and breast cancer. *Steroids* 77: 1-9, 2012.
- [96] Dumitrescu RG: Epigenetic markers of early tumor development. *Methods Mol Biol* 863: 3-14, 2012.
- [97] Centrella M and McCarthy TL: Estrogen receptor dependent gene expression by osteoblasts - direct, indirect, circumspect, and speculative effects. *Steroids* 77: 174-184, 2012.
- [98] Wada-Hiraike O, Yano T, Nei T, Matsumoto Y, Nagasaka K, Takizawa S, et al.: The DNA mismatch repair gene hMSH2 is a potent coactivator of oestrogen receptor alpha. *Br J Cancer*

- 92: 2286-2291, 2005.
- [99] Murphy LC and Leygue E: The role of estrogen receptor- $\beta$  in breast cancer. *Semin Reprod Med* 30: 5-13, 2012.
- [100] Warner M and Gustafsson JA: The role of estrogen receptor beta (ERbeta) in malignant diseases--a new potential target for antiproliferative drugs in prevention and treatment of cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 396: 63-66, 2012.
- [101] Lamartiniere CA: Timing of exposure and mammary cancer risk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7: 67-76, 2002.
- [102] Shaik AP, Jamil K and Das P: CYP1A1 polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Urol J* 6: 78-86, 2009.
- [103] Cancel-Tassin G and Cussenot O: Prostate cancer genetics. *Minerva Urol Nefrol* 57: 289-300, 2005.
- [104] AgoulNIK IU and Weigel NL: Androgen receptor action in hormone-dependent and recurrent prostate cancer. *J Cell Biochem* 99: 362-372, 2006.
- [105] Purohit A and Foster PA: Steroid sulfatase inhibitors for estrogen- and androgen-dependent cancers. *J Endocrinol* 212: 99-110, 2012.
- [106] Banerjee S, Li Y, Wang Z and Sarkar FH: Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett* 69: 226-242, 2008.
- [107] Park S and Choi J: Inhibition of beta-catenin/Tcf signaling by flavonoids. *J Cell Biochem* 110: 1376-1385, 2010.
- [108] Power KA and Thompson LU: Can the combination of flaxseed and its lignans with soy and its isoflavones reduce the growth stimulatory effect of soy and its isoflavones on established breast cancer? *Mol Nutr Food Res* 51: 845-856, 2007.
- [109] Sánchez Y, Amrán D, Fernández C, de Blas E and Aller P: Genistein selectively potentiates arsenic trioxide-induced apoptosis in human leukemia cells via reactive oxygen species generation and activation of reactive oxygen species-inducible protein kinases (p38-MAPK, AMPK). *Int J Cancer* 123: 1205-1214, 2008.
- [110] Langeberg WJ, Kwon EM, Koopmeiners JS, Ostrander EA and Stanford JL: Population-based study of the association of variants in mismatch repair genes with prostate cancer risk and outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19: 258-264, 2010.
- [111] Lacroix-Triki M, Lambros MB, Geyer FC, Suarez PH, Reis-Filho JS and Weigelt B: Absence of microsatellite instability in mucinous carcinomas of the breast. *Int J Clin Exp Pathol* 27: 22-31, 2010.
- [112] Norris AM, Woodruff RD, D'Agostino RB Jr, Clodfelter JE and Scarpinato KD: Elevated levels of the mismatch repair protein PMS2 are associated with prostate cancer. *Prostate* 67: 214-225, 2007.
- [113] Chen Y, Wang J, Fraig MM, Henderson K, Bissada NK, Watson DK, et al.: Alterations in PMS2, MSH2 and MLH1 expression in human prostate cancer. *Int J Oncol* 22: 1033-1043, 2003.
- [114] Van Poppel H and Tombal B: Chemoprevention of prostate cancer with nutrients and supplements. *Cancer Manag Res* 3: 91-100, 2011.
- [115] Kristal AR, Arnold KB, Neuhauser ML, Goodman P, Platz EA, Albanes D, et al.: Diet, supplement use, and prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. *Am J Epidemiol* 172: 566-577, 2010.

## 第 3 章

### NAFLD における PI3K / AKT / PTEN 経路の役割

## NAFLD における PI3K / AKT / PTEN 経路の役割

アルコールを含まない脂肪肝臓病 (NAFLD) は肝臓病状の最も普通の形態であり、肥満と2型糖尿病のリスク増加と結び付けられる広範囲の脂肪肝臓病を表すメタボリックシンドロームと結び付けられる。非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は肝臓のメタボリックシンドロームを意味し、世界的な健康問題になっている。NAFLD は非アルコール性脂肪肝から非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) まで及び、肥満や二型糖尿病やメタボリックシンドロームとも関係している[1-5]。インスリン抵抗が肝細胞内の体脂肪蓄積を誘発し、肝臓をより病気にかかりやすくするようだ [6]。加えて、活性酸素生成物 (ROS)、内毒素、炎症性サイトカインが病気を進行させる[7]。タバコの煙、汚染物質、糖尿病、高血圧と高コレステロール血症といったいくつかのストレス因子がすべて病気へのリスク要因であることは知られている[8,9]。脂肪肝臓浸潤の hepatic インスリン抵抗状態は遊離脂肪酸 (FFA) の増加によって特徴づけられ、酸化ストレスを増やす。なお、FFA は脂肪毒性を引き起こし、内皮依存的な血管拡張を損なう。更なる新陳代謝のリスク要因に、レプチン、アディポネクチン、プラスミノゲン活性剤抑制剤 (PAI-1) が含まれる。そして、それは酸化ストレスの増加と共に内皮機能不全を導く[10]。炎症と繊維形成は密接に関連しており、NAFLD 研究の主な目的だ。しかし、NAFLD の正確な分子的発病メカニズムはいまだ不明確だ。

炎症は病気の背後にある主要な理由だと思われており、線維症と以降の肝硬変を進行させるかもしれない [11,12]。なぜなら、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) と セリンスレオニンキナーゼ AKT (プロテインキナーゼ B としても知られている) が重要な炎症性サイトカインの調節によって免疫細胞を活性化させるようなので[13]、PI3K / AKT 情報伝達経路の変化は、NAFLD の特定の治療効果の原因となるかもしれない。PTEN の生理的機能は PI3K の活性化によって作られた2番目のメッセンジャーを脱リン酸化することであり、それによって PI3K の下流に合図するインスリンの分泌量を減少させたり発現を止めたりする[14]。

肝細胞アポトーシスと関連する酸化ストレスの状態が ROS に誘導されて細胞に影響を及ぼすことから、PI3K / AKT / PTEN 経路が NAFLD の発病において重要な役割を果たすと考えられている[15,16]。実際、肝細胞アポトーシスは NASH への単純な脂肪症の進行に関係する病因の重要な要素であるかもしれない[17]。ROS は炎症性サイトカインと細菌の侵入に対する細胞反応だけでなく、ミトコンドリア酸化性代謝の間にも生成される[18,19]。酸化ストレスが ROS をアンバランスにする。ROS は様々なプロセスで MAP キナーゼ、PI3K、PTEN とタンパク質チロシン脱リン酸化酵素を含めて分子間で相互作用する[20]。そして、酸化ストレスが高分子の損傷をもたらす、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、がんや老化といった種々な病気とも関連しており、それは NAFLD を含む合併症とも結び付けられる。酸化ストレスは AKT を含むセリン/トレオニン・キナーゼ系に関する一連のストレス経路を活性化することができ、それはインスリンに弊害を及ぼす[21]。実際、実験データはインスリン感受性と ROS レベルの逆の関係を示唆する[22,23]。酸化性環境下では、インスリン抵抗β細胞機能不全、耐糖能異常とミトコンドリア機能障害が進行し、糖尿病に至りうる。高血糖症とカロリー摂取量をコントロールすることによって、酸化ストレスは軽減することができる [24]。

肝臓に特有の PTEN の発現量不足は肝臓脂肪症、炎症と線維症に関係しているかもしれない。実際に、PTEN 欠乏マウスが NASH における生化学的かつ組織学的な証拠を持つことが知られている[25]。この動物モデルの NASH のためのメカニズムは脂質生成の増加と炎症と線維症が原因であるという報告がある。低酸素状態下では、NASH を発症しかかっている PTEN 欠乏マウスで観察された変化が速まる[26]。PTEN 欠乏細胞における

AKT の活性化は GSK3 $\beta$  のリン酸化を導く。GSK3 $\beta$  は休止細胞で活性化しているが、リン酸化によって非活性化される[27]。GSK3 $\beta$  は、 $\beta$ -カテニン、核因子 $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、AP-1、NF-AT、CREB を含む転写因子の集合の調節に関連づけられる[28]。GSK3 $\beta$  の活性変化はサイトカイン発現に対する種々な影響を引き起こす。PI3K の活性化はタイプ I インターフェロン、IL-12、TNF- $\alpha$  といった炎症誘発物の産出を抑制する。つまり、PI3K と mTOR は抗炎症性サイトカインを上方修正するように思われる[29,30]。

PI3K 経路は新陳代謝と細胞増殖と細胞生存を制御していることで知られている[31]。PI3K の活性化した形態ががん遺伝子であるように、PI3K の活性化と突然変異は一般に多くの種類のヒトのがんで見いだされる[31,32]。哺乳動物の細胞の PI3K は構造、分布、活性化のメカニズムに基づいて3つのクラスに分けられることができるファミリーを形成する[33]。クラス I PI3K は異なる関連アダプターに基づいてクラス IA とクラス IB に分割される。クラス IA PI3K は受容体チロシンキナーゼによって活性化され、クラス IB PI3K はGタンパク質共役受容体によって活性化される。これらの PI3K は p85 のような調節サブユニットと p110 のような触媒サブユニットから成り立つヘテロダイマーだ。PI3K によって発生したリン脂質第2メッセンジャーは細胞内信号が導入される間の多数のステップで一般に働いている。AKT は PI3K の主要な下流の標的だ。ヒトの AKT は AKT1、AKT2、AKT3 という3つのアイソフォームを有する[34]。PIP3 (PI3K の産物) は AKT と結合して AKT の膜を補充し、lekstrin homology (pH) ドメイン領域を通してホスホイノシチド依存性キナーゼ 1 (PDK1) にも結合する。そして、PDK1 はキナーゼ領域(AKT1の Thr 308)で AKT をリン酸化する。AKT の完全な活性化のために、PDK2 による AKT のカルボキシル・ターミナル調整領域 (AKT1 のセリン 473) 内のリン酸化が必要だ[35]。予測された AKT1 タンパク質の機能と構造は判明している。いったん活性化されると、AKT は細胞質と核へ移動する。そして、そこで様々な細胞の機能を調節するために、多くの下流の標的をリン酸化したり活性化したり抑制したりする (図 1-1)。AKT は TSC2 tuberin タンパク質をリン酸化することによって結節性硬化症 1 (TSC1) と TSC2 複合体の GTPase を活性化しているタンパク質 (GAP) の活動を抑制し、mTOR 複合体の蓄積と活性化に至る[36]。mTOR はリボソーム・タンパク質 S6 キナーゼのリン酸化と、翻訳開始要素 eIF4E を分泌させる真核生物の翻訳開始要素 4E-結合タンパク質 1 を調整する[37]。肝臓に特有の p70 S6 キナーゼの減少が肝臓脂肪症と体系的なインスリン抵抗から保護する[38]。GSK3 もまた、初めにインスリン受容体刺激に応じてグリコーゲン合成を調整する役割を果たしていることを最初に確認されたセリン/トレオニン・キナーゼだ。この分子はグリコーゲン生成の調節に加えて、細胞増殖やプログラム細胞死、胚形成と二十四時間周期の同調に関係していることも示されている[39]。

PTEN は PI3K の活性化に対抗するタンパク質ホスファターゼ活性と脂質ホスファターゼ活性を持っている二重選択性のホスファターゼだ[40,41]。ヒトのゲノムにおける PTEN の位置は染色体 10q23.3 の上で9つのエクソンから成る。そして、403のアミノ酸がリーディングフレームを開けるように指定する 5.5kb の mRNA をコード化する。翻訳産物はテンシンとチロシンホスファターゼ (PTPs) に対して相同性のある 53kDa のタンパク質だ。予測された PTEN タンパク質の概要の構造を図 1-2 に示す。PTEN はホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸塩(PIP3)をホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸(PIP2)に変換することを通じて PI3K / AKT の活動をネガティブに調節する。PPAR 受容体 $\gamma$ 、p53 をも活性化する。そして転写調節因子 2 の活性化は PTEN を転写して発現量を増加させる一方、TGF  $\beta$ 、NF- $\kappa$ B、JUN は PTEN の発現を下方調節する。興味深いことに、ローズマリー抽出物は K562 白血病の培養細胞において PTEN の発現を抑制する[42]。PTEN の活性化はリン酸化やアセチル化や酸化を含む転写後の調節によって調節されることもある[43]。PTEN タンパク質はN末端ホスファターゼと C 末端 C2 から成り、PDZ

(PSD-95、DLG1、ZO-1)が領域を結び付けている。PTEN CX5R (S/T)モチーフは PTEN 脂質ホスファターゼ活性化のために重要な3つの塩基性残基内で触媒信号を囲む活性部位の範囲に存在する。その構造は PTEN に PIP3 のような酸性リン脂質基板に対する選択を与える。PTEN の C-領域はタンパク質分解に関係している2つのドメイン (proline、グルタミン酸、セリン、スレオニン) の連続を含む[44]。AKT の活性化が HIF-1 $\alpha$  を安定化するのに対し、PTEN は低酸素を調節された HIF-1 $\alpha$  の安定化を弱める[45]。突然変異 PTEN の不安定と HIF1 $\alpha$  退廃の縮小はタンパク質相互作用を伴うことが知られている。PTEN のリン酸化によって調節されたカゼインキナーゼ II の抑制が PTEN の活性化を増加させ、AKT の活動を縮小させる[46]。

2型糖尿病は膵臓の $\beta$ 細胞の機能の衰退によって特徴づけられる。 $\beta$ 細胞内におけるインスリン信号が $\beta$ 細胞の機能維持において重要な役割を果たすことが知られている。基本条件下で、PTEN 欠損によって拡張されたインスリン-PI3K 信号は $\beta$ 細胞集団を増加させる[47]。膵臓の細胞内で PTEN が欠乏しているマウスで、拡散増加とアポトーシス減少のために $\beta$ 細胞集団が増加した。特に、PTEN の機能と脂肪細胞に特有の脂肪酸結合タンパク質 FABP4 の関係は $\beta$ 細胞の信号において興味深い[48]。FABP4 への PTEN の相互作用は脂質代謝の調節と細胞分化におけるこのホスファターゼの役割を示唆する[49]。このようにして、PTEN の削除を標的とする組織がインスリン受容組織でインスリン感受性を向上させて糖尿病を防ぐ。加えて、PTEN は $\beta$ 細胞内で剥離を合図しているインスリン/インスリン様成長因子-1のインスリン抵抗モデルで発現上昇することが知られている[50]。膵臓のランゲルハンス島における PTEN の発現量は2型糖尿病のモデルでも上昇する[51]。さらに、PTEN は *in vitro* と *in vivo* 両方でインスリンによって刺激されたブドウ糖取り込みの重要な負調節因子だ[52]。PTEN の部分的な縮小も拡張されたインスリン感受性と耐糖能を引き出すのには十分だ。それで、PTEN は $\beta$ 細胞の機能に重大な弊害を及ぼす。したがって、2型糖尿病での PTEN は $\beta$ 細胞の悪化を防ぐために治療の目標となり得た。

PIP3 を PIP2 に変換することを通して、PTEN はネガティブに PI3K/AKT 信号の動きを調節する。膜における PIP3 レベルの増加は、共存するために AKT や PDK-1 といった PH 領域を含有するタンパク質を発生させ、キナーゼによってリン酸化と活性化がもたらされる[53]。AKT と PTEN のレベルによって影響を受けている細胞周期調節にはフォークヘッド転写因子とグリコーゲンシンターゼキナーゼ (GSK) が含まれている[54]。それで、PTEN は PIP3 の基底レベルを維持する。低酸素状態だと、S6 リボソーム・タンパク質のリン酸化が促進される。S6 リボソーム・タンパク質は PI3K/AKT/PTEN/mTOR 情報伝達経路に属しており、この経路が活性化すると、p70 S6 キナーゼによってリン酸化される。p70 S6 キナーゼから、インスリン抵抗促進のためにメカニズムを示している上流の IRS (インスリン受容体基質) /PI3K/PDK1/AKT インスリン情報伝達経路まで、負のフィードバックループが働くことが示された[55]。PI3K/AKT 信号は NOS と GSK3  $\beta$  といったいくつかの下流の標的によって血管形成をも調節するかもしれない。そして、それは VEGF 転写活性化を誘発する HIF-1 $\alpha$  の発現を一般に上方させる。GSK3  $\beta$  の抑制は HIF-1 $\alpha$  発現量を増加させることができ、 $\beta$ -カテニン活性化を促進する。低酸素下では、安定性が増加することから HIF-1 $\alpha$  の生産が誘発され、HIF-1 $\alpha$  に依存して VEGF 発現を誘発する[56]。

NAFLD を発症している動物で、炎症フォーカス、酸化ストレスの増加、高い血清肝臓酵素レベル、調節不全の肝臓脂質代謝、炎症性サイトカイン、肝臓内のアポトーシス細胞を含む組織学的な変化が見られる。興味深いことに、グレリンの処理が PI3K/AKT 経路の修復を伴うそれらの肝損傷を改善する[57]。グレリン治療だけでは、健康なマウスの肝臓に影響を及ぼさなかった。その一方で、PTEN の過剰発現がインスリンシグナリングを

減少させることが示された。インスリンシグナリングは AKT の活性化を減少させ、細胞膜へ GLUT4 を移行させる。また、インスリン抵抗と NAFLD への進行を抑制する (図 3-1) [58-60]。それと対照的に、PTEN の発現低下がインスリンに応じて増加したブドウ糖の取り込みにおいて反対の効果を及ぼす[61]。しかし、逆説的に、PTEN の欠損が NAFLD と肝臓がんを起こす[62]。このパラドックスのメカニズムはまだ解明されていない。PTEN 欠損マウスで、PI3K/AKT 活動を上方制御するために、肝細胞内でトリグリセリドの合成と貯蔵量が増やされる。PTEN 活性化が欠如すると、肝細胞脂肪酸取り込みの増加と脂肪酸合成の増加が起こるかもしれない (図 3-1) [63]。

現在、PI3K/AKT シグナリングへの抑制剤は次に示すとおりだ。Pan-PI3K 抑制剤、(ワートマニンと LY294002) が一般にがん細胞増殖を抑制するために用いられる。ワートマニンは菌性の産物で、p110 $\alpha$  触媒サブユニットの節約された Lys802 に共有結合相互作用することによって、その効果を及ぼす。ワートマニンと LY294002 両方が mTOR のような PI3K 関連のキナーゼで交差反応して、それらを抑制する。p110 $\delta$  に特異的な抑制剤 (IC486068) が血管腫瘍の破壊を進める。ペリホシンは細胞膜を通じた AKT の移動を抑制する。Inositol pentakisphosphate (PI3K/AKT 抑制剤の 1 つ) もまた、腫瘍の成長と血管形成を抑制する。9-methoxy-2-methylellipticinium acetate、インダゾール・ピリジン A-443654、アイソフォームに特有の canthine アルカロイドの類似体などのようにいくつかの他の AKT 遮断薬もまた、識別されてがん細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することを示された[64]。ラパマイシンのような mTOR 抑制剤とその類似物は FK506 結合性タンパク質-12 に結合することによって、mTOR の活性化を抑制する[65]。そして、それは AKT を含む上流の分子を活性化することができる[66]。グアノシンは PI3K/AKT/GSK3 シグナリングや抗酸化体酵素 HO-1 の誘導によってミトコンドリア酸化ストレスから保護する [67]。動物モデルにおいて、メラトニンも AKT 依存的な HO-1 の発現を通して出血を伴うショックによって引き起こされる損傷を防止する。PI3K/AKT/GSK3 シグナリングの活性化は単に HO-1 の発現を上昇させるだけでなく、この経路の保護の影響は HO-1 の効果に結び付けられるかもしれない。糖尿病や NAFLD の治療のために、これらの物質や分子の潜在的な効果を利用したり、最適な治療を行ったり、これらの抑制剤との組み合わせを応用したりすることは重要だ。

NAFLD は主に遺伝的な傾向と環境要因の相互作用によって調節された多因子性の病気だ。炎症と NAFLD の間に、PI3K/AKT/GSK3/mTOR 経路を含む普通の経路があるかもしれない。NAFLD の変化を示す PI3K/AKT/PTEN/GSK3/mTOR の正確な細胞内メカニズムの理解は、NAFLD に対してより効果的な新しい治療のアプローチの開発に対する斬新な洞察を提供することができるだろう。

図 3-1

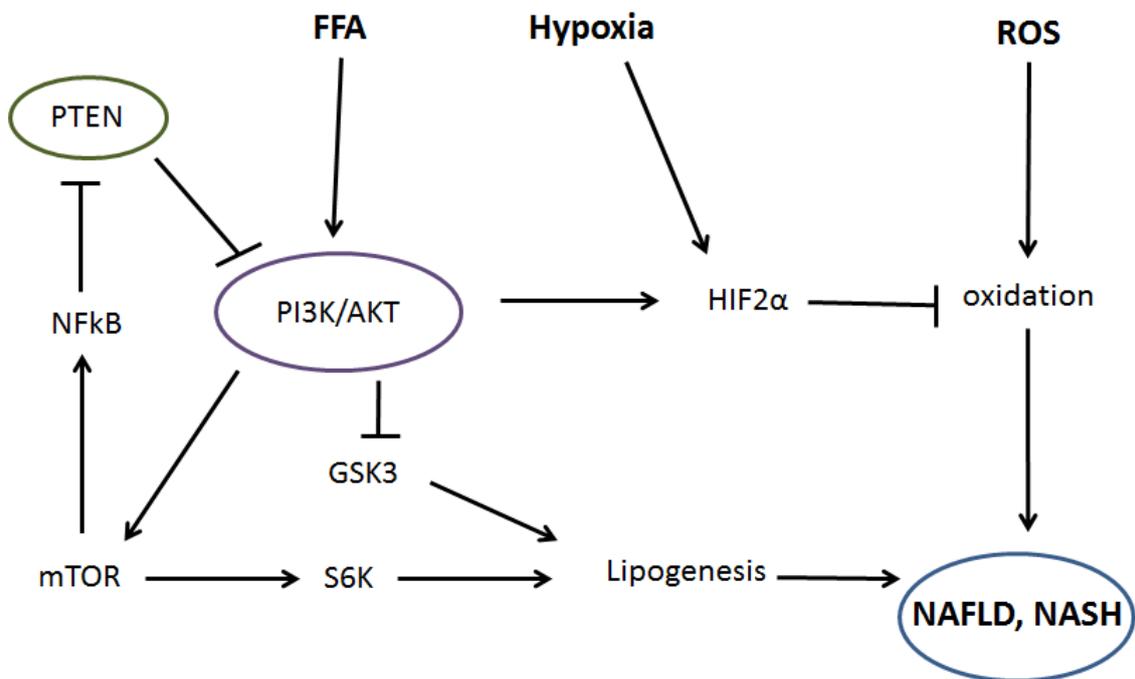


図 3-1

PI3K、AKT、PTEN、GSK3 は代謝経路に関係し、遊離脂肪酸（FFA）や低酸素や ROS の作用を受けて、NAFLD や NASH といった肝臓病に関与している。

図 3-2

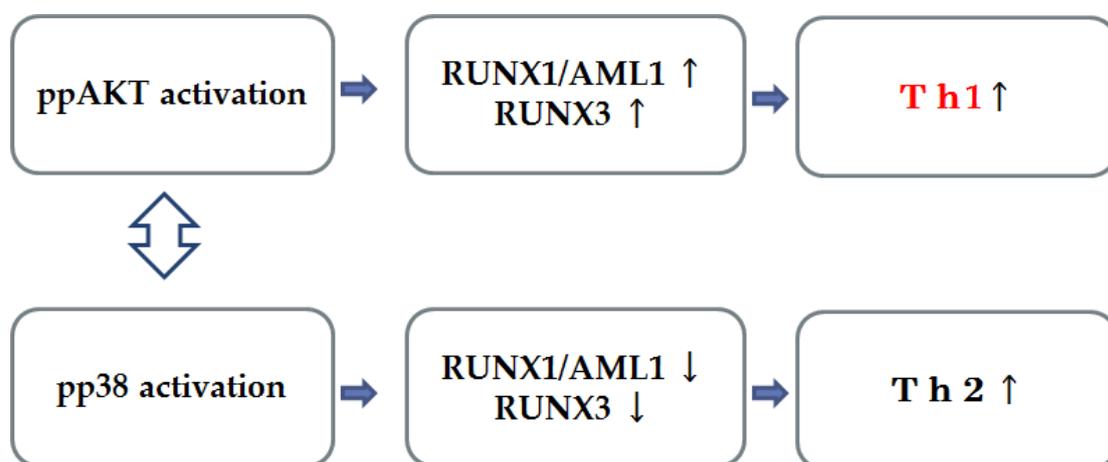


図 3-2

T 細胞は Th1 細胞と Th2 細胞に分化し、どちらが優位になるかで花粉症や喘息を発症しやすくなるかどうか決定されると考えられている。通常はこの 2 種類の細胞は相互にバランスを保って免疫応答を制御しているが、なんらかの原因で Th1 細胞が過剰になると細胞性免疫が優位になり、その反対に Th2 細胞が多くなると液性免疫が優位になる。すなわち、Th2 細胞に分化するものが多いと抗体の生産量が増え、花粉症を発症しやすくなると考えられている。また、いったん Th1 細胞か Th2 細胞に分化したものは初期化することはない。AKT が活性化すると、RUNX1 や AML1、RUNX3 の遺伝子発現の上昇を通して免疫細胞である Th1 細胞の活性化が起こり、花粉症の症状が緩和されると考えられる。また、AKT の活性化は p38 キナーゼの活性化と相反しており、p38 キナーゼの活性化が起こると、RUNX の遺伝子発現の低下を通して、免疫細胞の Th2 の活性化が引き起こされる。

図 3-3

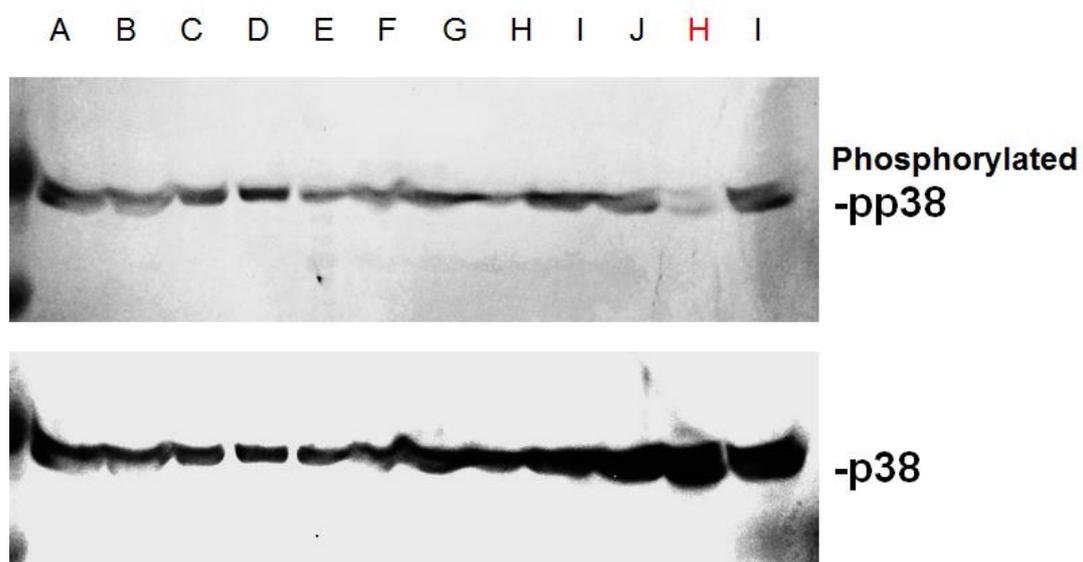


図 3-3

リン酸化した p 38 キナーゼと p 38 キナーゼのウエスタブロット解析の結果。H では、他のものと比較して p38 キナーゼの発現量が多いにもかかわらず pp38 の発現量が少ないことから、p38 キナーゼの活性化が抑制されたことが分かる。すなわち、H のハーブ抽出液は p38 キナーゼの活性化を抑制すると考えられる。

図 3-4

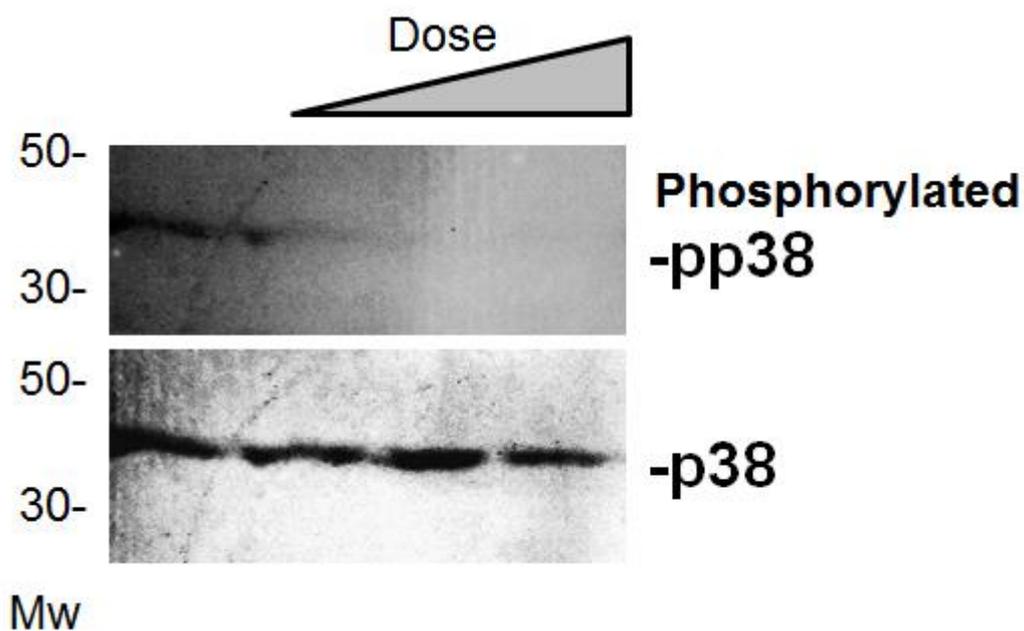


図 3-4

リン酸化した p 38 キナーゼと p 38 キナーゼのウエスタンブロット解析。一番左が control、右に行くに従ってハーブ抽出液 H の添加量を多くした。p38 の発現量がほとんど変化していないことから、細胞数ほどのサンプルも同程度存在すると考えられるが、H の添加量が多ければ多いほど pp38 の発現量は少なくなっている。すなわち、ハーブ抽出液 H は p38 キナーゼの活性化を量依存的に抑制していると言える。

図 3-5

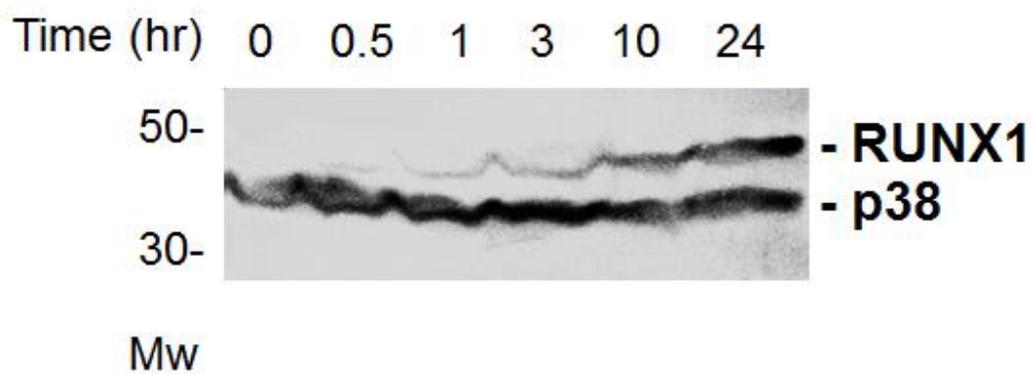


図 3-5

RUNX1 と p 38 キナーゼのウエスタンブロット解析。ハーブ抽出液 H は p38 キナーゼの発現量は変化させず、RUNX1 を時間依存的に発現させることが分かる。

### 3 章の引用文献

- [1] Souza MR, Diniz Mde F, Medeiros-Filho JE, and Araújo MS, “Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease,” *Arq Gastroenterol*, vol. 49, no. 1, pp. 89-96, 2012.
- [2] Yilmaz Y, “NAFLD in the absence of metabolic syndrome: different epidemiology, pathogenetic mechanisms, risk factors for disease progression?” *Semin Liver Dis*, vol. 32, no. 1, pp. 14-21, 2012.
- [3] Alisi A, Feldstein AE, Villani A, Raponi M, and Nobili V, “Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a multidisciplinary approach,” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 9, no. 3, pp. 152-161, 2012.
- [4] Shyangdan D, Clar C, Ghouri N et al., “Insulin sensitisers in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review,” *Health Technol Assess*, vol. 15, no. 38, pp. 1-110, 2011.
- [5] Smith BW and Adams LA, “Non-alcoholic fatty liver disease,” *Crit Rev Clin Lab Sci*, vol. 48, no. 3, pp. 97-113, 2011.
- [6] Jornayvaz FR and Shulman GI, “Diacylglycerol activation of protein kinase C $\epsilon$  and hepatic insulin resistance,” *Cell Metab*, vol. 15, no. 5, pp. 574-584, 2012.
- [7] Chen X, Zhang C, Zhao M et al., “Melatonin alleviates lipopolysaccharide-induced hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in mice,” *J Pineal Res*, vol. 51, no. 4, pp. 416-425, 2011.
- [8] Mallat A and Lotersztajn S, “Cigarette smoke exposure: a novel cofactor of NAFLD progression?” *J Hepatol*, vol. 51, no. 3, pp. 430-432, 2009.
- [9] Filippatos TD and Elisaf MS, “Role of ezetimibe in non-alcoholic fatty liver disease,” *World J Hepatol*, vol. 3, no. 10, pp. 265-267, 2011.
- [10] Fitzpatrick E, Dew TK, Quaglia A, Sherwood RA, Mitry RR, and Dhawan A, “Analysis of adipokine concentrations in paediatric non-alcoholic fatty liver disease,” *Pediatr Obes*, vol. 7, no. 6, pp. 471-479, 2012.
- [11] Garcia-Ruiz C, Marí M, Colell A, Morales A, and Fernandez-Checa JC, “Metabolic therapy: lessons from liver diseases,” *Curr Pharm Des*, vol. 17, no. 35, pp. 3933-3944, 2011.
- [12] Pettinelli P, Obregón AM, and Videla LA, “Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease,” *Nutr Hosp*, vol. 26, no. 3, pp. 441-450, 2011.
- [13] Weichhart T and Säemann MD, “The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications,” *Ann Rheum Dis*, vol. 67 Suppl 3, pp. iii70-iii74, 2008.
- [14] Peyrou M, Bourgoin L, and Foti M, “PTEN in non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis and cancer,” *Dig Dis*, vol. 28, no. 1, pp. 236-246, 2010.
- [15] Trauner M, Claudel T, Fickert P, Moustafa T, and Wagner M, “Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism,” *Dig Dis*, vol. 28, no. 1, pp. 220-224, 2010.
- [16] Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK et al., “High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo,” *Biochem J*, vol. 417, no. 1, pp. 183-193, 2009.
- [17] Gambino R, Musso G, and Cassader M, “Redox balance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and therapeutic opportunities,” *Antioxid Redox Signal*, vol. 15, no. 5, pp. 1325-1365, 2011.
- [18] Rocha M, Herance R, Rovira S, Hernández-Mijares A, and Victor VM, “Mitochondrial dysfunction and antioxidant therapy in sepsis,” *Infect Disord Drug Targets*, vol. 12, no. 2, pp. 161-178, 2012.

- [19] Hulsmans M, Van Dooren E, and Holvoet P, "Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis," *Curr Atheroscler Rep*, vol. 14, no. 3, pp. 264-276, 2012.
- [20] Li ZY, Yang Y, Ming M, and Liu B, "Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 414, no. 1, pp. 5-8, 2011.
- [21] Blandino-Rosano M, Chen AY, Scheys JO et al., "mTORC1 signaling and regulation of pancreatic  $\beta$ -cell mass," *Cell Cycle*, vol. 11, no. 10, pp. 1892-1902, 2012.
- [22] Wang X and Hai CX, "ROS acts as a double-edged sword in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: is Nrf2 a potential target for the treatment?" *Mini Rev Med Chem*, vol. 11, no. 12, pp. 1082-1092, 2011.
- [23] Mellor KM, Ritchie RH, and Delbridge LM, "Reactive oxygen species and insulin-resistant cardiomyopathy," *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 37, no. 2, pp. 222-228, 2010.
- [24] Rains JL and Jain SK, "Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes," *Free Radic Biol Med*, vol. 50, no. 5, pp. 567-575, 2011.
- [25] Watanabe S, Horie Y, and Suzuki A, "Hepatocyte-specific Pten-deficient mice as a novel model for nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma," *Hepatol Res*, vol. 33, no. 2, pp. 161-166, 2005.
- [26] Piguat AC, Stroka D, Zimmermann A, and Dufour JF, "Hypoxia aggravates non-alcoholic steatohepatitis in mice lacking hepatocellular PTEN," *Clin Sci (Lond)*, vol. 118, no. 6, pp. 401-410, 2009.
- [27] Mulholland DJ, Dedhar S, Wu H, and Nelson CC, "PTEN and GSK3 $\beta$ : key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer," *Oncogene*, vol. 25, no. 3, pp. 329-337, 2006.
- [28] Die L, Yan P, Jun Jiang Z, Min Hua T, Cai W, and Xing L, "Glycogen synthase kinase-3  $\beta$  inhibitor suppresses Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced CD40 expression by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B activation in mouse osteoblasts," *Mol Immunol*, vol. 52, no. 1, pp. 38-49, 2012.
- [29] Haidinger M, Poglitsch M, Geyeregger R et al., "A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation," *J Immunol*, vol. 185, no. 7, pp. 3919-3931, 2010.
- [30] Cherla RP, Lee SY, Mulder RA, Lee MS, and Tesh VL, "Shiga toxin 1-induced proinflammatory cytokine production is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway," *Infect Immun*, vol. 77, no. 9, pp. 3919-3931, 2009.
- [31] Sheppard K, Kinross KM, Solomon B, Pearson RB, and Phillips WA, "Targeting PI3 kinase/AKT/mTOR signaling in cancer," *Crit Rev Oncog*, vol. 17, no. 1, pp. 69-95, 2012.
- [32] Aksamitiene E, Kiyatkin A, and Kholodenko BN, "Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance," *Biochem Soc Trans*, vol. 40, no. 1, pp. 139-146, 2012.
- [33] Hawkins PT, Stephens LR, Suire S, and Wilson M, "PI3K signaling in neutrophils," *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 346, pp. 183-202, 2010.
- [34] Hers I, Vincent EE, and Tavaré JM, "Akt signalling in health and disease," *Cell Signal*, vol. 23, no. 10, pp. 1515-1527, 2011.
- [35] Chan TO and Tsichlis PN, "PDK2: a complex tail in one Akt," *Sci STKE*, vol. 2001, no. 66, pp. pe1, 2001.
- [36] Kwiatkowski DJ, "Rhebbling up mTOR: new insights on TSC1 and TSC2, and the pathogenesis of tuberous sclerosis," *Cancer Biol Ther*, vol. 2, no. 5, pp. 471-476, 2003.

- [37] Huo Y, Iadevaia V, and Proud CG, "Differing effects of rapamycin and mTOR kinase inhibitors on protein synthesis," *Biochem Soc Trans*, vol. 39, no. 2, pp. 446-450, 2011.
- [38] Bae EJ, Xu J, Oh DY et al., "Liver-specific p70 S6 kinase depletion protects against hepatic steatosis and systemic insulin resistance," *J Biol Chem*, vol. 287, no. 22, pp. 18769-18780, 2012.
- [39] Gao C, Hölscher C, Liu Y, and Li L, "GSK3: a key target for the development of novel treatments for type 2 diabetes mellitus and Alzheimer disease," *Rev Neurosci*, vol. 23, no. 1, pp. 1-11, 2011.
- [40] Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Murakami M, Nishimura Y, and Matsuda S, "PI3K/AKT/PTEN Signaling as a Molecular Target in Leukemia Angiogenesis," *Adv Hematol*, vol. 2012, pp. 843085, 2012.
- [41] Song MS, Salmena L, and Pandolfi PP, "The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 13, no. 5, pp. 283-296, 2012.
- [42] Yoshida H, Okumura N, Kitagishi Y, Nishimura Y, and Matsuda S, "Ethanol extract of Rosemary repressed PTEN expression in K562 culture cells," *Int J appl Biol pharm Technol*, vol. 2, pp. 316-322, 2011.
- [43] Singh G and Chan AM, "Post-translational modifications of PTEN and their potential therapeutic implications," *Curr Cancer Drug Targets*, vol. 11, no. 5, pp. 536-547, 2011.
- [44] Georgescu MM, "PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control," *Genes Cancer*, vol. 1, no. 12, pp. 1170-1177, 2010.
- [45] Li YM, Zhou BP, Deng J, Pan Y, Hay N, and Hung MC, "A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells," *Cancer Res*, vol. 65, no. 8, pp. 3257-3263, 2005.
- [46] Barata JT, "The impact of PTEN regulation by CK2 on PI3K-dependent signaling and leukemia cell survival," *Adv Enzyme Regul*, vol. 51, no. 1, pp. 37-49, 2011.
- [47] Stiles BL, Kuralwalla-Martinez C, Guo W et al., "Selective deletion of Pten in pancreatic beta cells leads to increased islet mass and resistance to STZ-induced diabetes," *Mol Cell Biol*, vol. 26, no. 7, pp. 2772-2781, 2006.
- [48] Gorbenko O, Panayotou G, Zhyvoloup A, Volkova D, Gout I, and Filonenko V, "Identification of novel PTEN-binding partners: PTEN interaction with fatty acid binding protein FABP4," *Mol Cell Biochem*, vol. 337, no. 1-2, pp. 299-305, 2010.
- [49] Tsuda M, Inoue-Narita T, Suzuki A, Itami S, Blumenberg M, and Manabe M, "Induction of gene encoding FABP4 in Pten-null keratinocytes," *FEBS Lett*, vol. 583, no. 8, pp. 1319-1322, 2009.
- [50] Vellai T, McCulloch D, Gems D, and Kovács AL, "Effects of sex and insulin/insulin-like growth factor-1 signaling on performance in an associative learning paradigm in *Caenorhabditis elegans*," *Genetics*, vol. 174, no. 1, pp. 309-316, 2006.
- [51] Wang L, Liu Y, Yan Lu S et al., "Deletion of Pten in pancreatic  $\beta$ -cells protects against deficient  $\beta$ -cell mass and function in mouse models of type 2 diabetes," *Diabetes*, vol. 59, no. 12, pp. 3117-3126, 2010.
- [52] Wong JT, Kim PT, Peacock JW et al., "Pten (phosphatase and tensin homologue gene) haploinsufficiency promotes insulin hypersensitivity," *Diabetologia*, vol. 50, no. 2, pp. 395-403, 2007.
- [53] Howes AL, Arthur JF, Zhang T et al., "Akt-mediated cardiomyocyte survival pathways are compromised by G alpha q-induced phosphoinositide 4,5-bisphosphate depletion," *J Biol Chem*, vol. 278, no. 41, pp. 40343-40351, 2003.

- [54] Liu S, Liu S, Wang X et al., "The PI3K-Akt pathway inhibits senescence and promotes self-renewal of human skin-derived precursors in vitro," *Aging Cell*, vol. 10, no. 4, pp. 661-674, 2011.
- [55] Robinson KA and Buse MG, "Mechanisms of high-glucose/insulin-mediated desensitization of acute insulin-stimulated glucose transport and Akt activation," *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 294, no. 5, pp. E870-E881, 2008.
- [56] Ahluwalia A and Tarnawski AS, "Critical role of hypoxia sensor--HIF 1  $\alpha$  in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing," *Curr Med Chem*, vol. 19, no. 1, pp. 90-97, 2012.
- [57] Li Y, Hai J, Li L et al., "Administration of ghrelin improves inflammation, oxidative stress, and apoptosis during and after non-alcoholic fatty liver disease development," *Endocrine*. 2012 Jul 29. [Epub ahead of print]
- [58] Nakashima N, Sharma PM, Imamura T, Bookstein R, and Olefsky JM, "The tumor suppressor PTEN negatively regulates insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes," *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 12889-12895, 2000.
- [59] Ono H, Katagiri H, Funaki M et al., "Regulation of phosphoinositide metabolism, Akt phosphorylation, and glucose transport by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) in 3T3-L1 adipocytes," *Mol. Endocrinol*, vol. 15, pp. 1411-1422, 2001.
- [60] Lo YT, Tsao CJ, Liu IM, Liou SS, and Cheng JT, "Increase of PTEN gene expression in insulin resistance," *Horm Metab Res*, vol. 36, no. 10, pp. 662-666, 2004.
- [61] Tang X, Powelka AM, Soriano NA, Czech MP, and Guilherme A, "PTEN, but not SHIP2, suppresses insulin signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in 3T3-L1 adipocytes," *J Biol Chem*, vol. 280, pp. 22523-22529, 2005.
- [62] Stiles B, Wang Y, Stahl A et al., "Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 101, pp. 2082-2087, 2004.
- [63] Byrne CD, "Hypoxia and non-alcoholic fatty liver disease," *Clin Sci (Lond)*, vol. 118, no. 6, pp. 397-400, 2009.
- [64] Neubauer NL, Ward EC, Patel P et al., "Progesterone receptor-B induction of BIRC3 protects endometrial cancer cells from AP1-59-mediated apoptosis," *Horm Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 170-181, 2011.
- [65] Zhou H, Luo Y, and Huang S, "Updates of mTOR inhibitors," *Anticancer Agents Med Chem*, vol. 10, no. 7, pp. 571-581, 2010.
- [66] Gibbons JJ, Abraham RT, and Yu K. "Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth," *Semin Oncol*, vol. 36, Suppl 3, pp. S3-S17, 2009.
- [67] Dal-Cim T, Molz S, Egea J et al., "Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway," *Neurochem Int*, vol. 61, no. 3, pp. 397-404, 2012.

## 第 4 章

# PPAR に関連する PI3K / AKT / PTEN 経路が神経 保護に働く

## PPAR に関連する PI3K / AKT / PTEN 経路が外傷性の脳傷害で神経保護に働く

PI3K / AKT / PTEN 経路は、細胞増殖を促進し、アポトーシスを抑制することによって細胞耐久性を強化し、神経保護において中枢的役割を果たすことが知られている。PTEN はその脂質ホスファターゼ活性化を通してネガティブに PI3K / AKT 経路を調節し、糖尿病とアルツハイマー病を含むいくつかの他の病気にも関係している。外傷性の脳傷害は死亡率が高く、世界的な健康上の問題となっている[1,2]。結果として生じる脳症は複雑な病理学的プロセスだが、有害なカスケードの主な原因は細胞レベルのミトコンドリアの損傷である場合がある[3]。活性酸素生成物 (ROS) とカスパーゼとアポトーシスがミトコンドリア損傷の主な原因であるかもしれない。外傷性の脳傷害は脳障害による永久的な空間学習機能障害と運動疾患を伴う[4]。我々は外傷性の脳傷害の治療のために認可されている薬物療法を受けない。外傷による影響を悪化させる損傷の後、大多数の外傷後神経変性が病理生理学的なカスケードによって引き起こされるという事実、効果的な治療の可能性が見出される。実験的な外傷性の脳傷害で明らかとなったメカニズムの1つは、活性酸素によって誘発された脂質とタンパク質と核酸への酸化ダメージを伴う[3,5]。外傷性の脳傷害の新たな治療法を見出すには神経保護のメカニズムの解明が必要だ[5]。ROS は病原体に対する細胞応答の間だけでなく、ミトコンドリア酸化性代謝の間にも生成される。それはシグナル分子としての役割を果たし、細胞増殖、分化、アポトーシス、転移を含む種々な生理学的プロセスを調節する[6-8]。加えて、ROS によるタンパク質と脂質の酸化が脳の健康における重要な決定要素となる。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) オキシダーゼは、虚血性期間に ROS を産出する複合体だ。それは ATP の形でエネルギーを作り出す酸化的リン酸化プロセスの間にミトコンドリアから生成される内因性 ROS の主要源でもある[9]。加えて、ROS は細胞内 オキシダーゼによって生産される。炎症は組織内で ROS と関係がある。ROS が細胞内高分子に損傷を与える前に、ROS を中和することが重要だ。ROS が効果を及ぼすと考えられているメカニズムの1つは、PKC、MAPK、PI3K、チロシンホスファターゼ、PTEN といった標的分子の可逆的な調節を通じたものであるかもしれない[10]。しかし、ROS によるシグナル分子の最初の調節についてはほとんど解明されていない。細胞の ROS 代謝はレドックス・メカニズムに関係している様々なタンパク質によって調節される。

外傷性の脳傷害は重要な病気や死と関連付けられる致命的な神経性の損傷だ。効果的な処置がないため、外傷性脳障害における脳機能障害の予防は公衆衛生における懸念事項となっている。食事のように変更可能な生活要因を含む疫学的研究によって、いくつかの潜在的な予防が示唆された[11]。研究によって、食事の選択が外傷性脳障害の神経保護において重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかし、栄養の摂取と神経保護の関係の疫学的分析は複雑で、1つの要素が主要な役割を果たすということはない。ヒトの食事の複雑さ（特に種々な栄養分や食物の影響における高い相乗的または拮抗的な相互関係）は、それらの異なる影響を調べることを困難にする。加えて、生活における多くの要因が脳機能に影響を与えることから、いくつかの処置は外傷性脳障害で脳機能障害の予防において効果があるかもしれない。ここでは、特に高価不飽和のオメガ3脂肪酸 (PUFAs) と PI3K / AKT / PTEN 経路におけるクルクミンの役割に焦点を合わせて、潜在的な保護要因と外傷性脳障害の原因に関連づけられている研究を再検討することを主な目的とする。また、いくつかの食事要因がシグナルを下流に伝達する際どのように関連するパートナーと結合するのか、そして病気関連の生物学にとって何を意味しているのか、現在の研究を要約する。

外傷性の脳障害によって誘発された ROS の減少は、BBB ディスラプション（神経細胞

の死と小膠細胞の活性化)を減少させる。この事実から、外傷性の脳傷害による神経細胞死を減少させるために有効な治療法が見出されるかもしれない [12]。加えて、酸化ストレスに対していくつかの抗酸化遺伝子の発現を上昇させることによって、腫瘍抑制タンパク質に抗酸化作用を及ぼすことも判明した。がん抑制遺伝子は DNA 損傷修復、細胞周期停止、細胞増殖、細胞分化、転移、アポトーシスを含む多様な細胞の活動を調節する [13]。PTEN は様々なヒトのがんでしばしば欠損や突然変異が見られるがん抑制遺伝子だ。PTEN の発現量が上昇すると、細胞に ROS 産生を減少させるよう合図している PI3K/AKT が調整される [14]。PIP3 は生存キナーゼ AKT に信号を送る受容体チロシンキナーゼを調節する PI3K 経路の 2 番目の主要な因子である。PTEN は PIP3 から PIP2 へ変換することを通じて、PI3K/AKT の活動をネガティブに調節する。膜上で PIP3 レベルが増加すると、AKT のような PH ドメイン含有タンパク質が細胞膜上に局在化され、キナーゼによって調節されたリン酸化と活性化がもたらされる [15]。活性化した AKT は、神経保護 (図 4-1、図 4-2) のために細胞生存や細胞周期や血管形成や代謝に関わる標的タンパク質をリン酸化する。PI3K の抑制がシナプスにホメオスタシス AMPA 受容体の伝達を阻止するという研究結果から、シナプス・スケーリングにおける PI3K/AKT の役割が示された [16]。AKT とマーカーに信号を送っているリボソーム S6K の明確な分離は、脳の病理学上のプロセスに関与している [17]。PS1 のリン酸化は細胞表面における発現を低下させる。そして、それは PI3K/AKT 細胞生存信号の活動を低下させる。PS1 は低酸素誘導因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) の誘導をも調節する [18]。したがって、GSK3 $\beta$  の異常な活性化は神経細胞の生存能力を減少する [19]。言い換えると、GSK3 $\beta$  の過剰な活性化を伴う AKT の選択的な発現低下は、脳機能障害の発症に関係しているかもしれない [20]。最近、AKT の活性化が神経変性病で治療的役割を果たすかもしれないことが判明した [21]。興味深いことに、GSK3 $\beta$  の発現レベルも各種食物成分によって変化することが判明している (図 4-3、図 4-4、図 4-5)。

PI3K/AKT 経路の遮断装置 PTEN は神経機能で重要な役割を果たすことが知られている。そのレベルはアルツハイマー認知症 (AD) を発症している脳で減少した [22,23]。PTEN は PIP3 から PIP2 への変換を通じて、PI3K/AKT シグナリングの活性をネガティブに調節する。PIP3 は生存キナーゼ AKT の上流にある受容体チロシンキナーゼを調節する PI3K 経路上の主要な因子である。膜上の PIP3 レベルが増加すると、PDK-1 と共同で AKT のような PH 結合タンパク質が局在化される。そして、キナーゼによってリン酸化と活性化が起こる [24]。活性化した AKT は、細胞生存と細胞分裂周期と代謝に関連する標的タンパク質をリン酸化する。AKT と PTEN の影響を受けている細胞周期調節因子には、フォークヘッド転写因子と GSK3 が含まれる [25,26]。PTEN は活性化を示しているそれらのために閾値を下まわって PIP3 の基底レベルを維持する調節器として働く。細胞が細胞外マトリックスとのコンタクトを失う時、PTEN はプログラム細胞死シグナルの誘導においても重要な役割を果たす [27]。PI3K/AKT と AD の生理的機能と病因の重要な PTEN を含む情報伝達経路で、PS は重要な役割を果たすかもしれない [28]。PTEN はパーキンソン病のような病気にも関係しているかもしれない [29]。

多種多様な合成物が PPARs リガンドであると特定された。n-3 PUFAs は、PPAR $\alpha$  と PPAR $\gamma$  を含む遺伝子転写因子を調節することによって、新陳代謝のリスク要因の大部分に有益な影響を及ぼす [30]。インスリンの感度を高める薬ピグタリオン (PPAR $\gamma$  作用薬) で細胞を刺激すると、ROS 情報伝達経路が弱まる [31]。外傷性の脳傷害でインスリンシグナルの調節不全を修正することは、潜在的な治療法の発見に繋がるかもしれない。PPARs タンパク質の概要の構造を図 1-4 に示す。リガンドは PPAR 反応要素 (PPREs) において、レチノイド X 受容体 (RXR) と結合したヘテロダイマーとして PPARs バインドを活性化した。これは感応的な遺伝子のプロモーター領域で見られる反応だ [32] (図 1-5)。レチノイン酸は 2 種類の受容体、レチノイン酸受容体 (RARs) とレチノイド X 受容体

(RXRs)の動きを通して、細胞増殖、細胞分化、形態形成、再生と発育を含む広範囲の生理的プロセスにも影響を及ぼす[33]。PPAR/RXRヘテロダイマーによる転写調節もまた、共同調節複合体で相互作用を必要とする[34]。このように、生体内PPARsの選択的な働きは、利用可能な共同因子の各々の時点で、相互作用から生じる。PPAR $\gamma$ のヘテロダイマーの結合パートナー、レチノイドX受容体(RXR)に効く治療薬を用いると、RXR $\alpha$ 活性化によって調節されるA $\beta$ の取り込みが増加する[35]。PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ ヘテロダイマーを同時に活性化することは外傷性の脳傷害の予防に有効かもしれない。また、PPAR $\gamma$ が関与するシグナリングシステムがニューラルネットワークを復元するようだ[36]。

II型糖尿病は膵臓の $\beta$ 細胞の機能によって特徴づけられる。 $\beta$ 細胞内でインスリンシグナリングが $\beta$ 細胞の機能を維持する上で重要な役割を果たすことが知られている。基本条件下で、PTENの欠如を誘発するインスリン-PI3Kの発現増加は、 $\beta$ 細胞数を増加させる[37]。PTENの機能と脂肪細胞に特異的な脂肪酸を結合するタンパク質FABP4の関係は、 $\beta$ 細胞のシグナリングに関係があるようだ[38]。FABP4へのPTENの相互作用は脂質代謝と細胞分化の調節において、このホスファターゼへの役割を示す[39]。PTENを削除する組織がインスリン感受性のある組織内でインスリン感受性を高め、糖尿病を防ぐ[40]。他方、PPARsのリガンドが経口糖尿病薬として使われる[41]。PTENは哺乳類で初期の胚形成を通して遍在する[42]。興味深いことに、ローズマリー抽出物をK562白血病の培養細胞に添加すると、PTEN発現が抑制される[43]。PTENタンパク質の概要の構造を図1-2に示す。PTENタンパク質はNターミナルホスファターゼとCターミナルC2とドメインを結合しているPDZ(PSD-95、DLG1とZO-1)から成る。PTENCX5R(S/T)モチーフはPTEN脂質ホスファターゼ活性化のために重要な3つの基本的な残基で触媒サイトを囲む活性部位の中に存在する。その構造はPTENにPIP3のような酸性リン脂質基板の選択を与える。主要なニューロンで抗アポトーシスのPI3K/AKT経路を活性化すると、PTENが抑制されて神経保護に働くことが判明している[44]。

In vivoの研究によって、クルクミンが未知の分子機構を通してマウスでアミロイド $\beta$ 関連の病状を減らすことが判明した[45]。クルクミンはシナプスの構造と柔軟性を改善し、学習能力と記憶能力を高めることができる[46]。クルクミンの保護によって、インターロイキン-1b(炎症性サイトカイン)の発現が極端に減少する[47]。クルクミンはアクアポリン4の導入を逆転させる。アクアポリン4は、頭部外傷後に見られる細胞浮腫の発達に関与するアストロサイト・ウォーター・チャンネルだ[47]。クルクミンは培養されたアストロサイトにおいて、NF $\kappa$ Bのp50とp65サブユニットの活性化を減少させることによって、アクアポリン4によって誘発されるIL-1bの発現を抑制する。興味深いことに、クルクミンはラットで流動性の衝撃を与えた後、シナプスの可塑性と認識機能を強化する[48]。このことは、クルクミンが外傷性の脳傷害後に有効な治療薬となり得るかもしれないことを示唆している。クルクミンによる神経保護はPI3K/AKT情報伝達経路によって調節されるかもしれない[49]。

ゲニステイン(大豆に多く含まれているフィトエストロゲン)はリンパ系細胞でユビキチン1の発現抑制を通してプレセニリンの発現を低下させる[50]。ゲニステインには種々ながん細胞に効果がある抗腫瘍活性がある。ゲニステインはエストロゲンのような効能を有しており、これはADの可塑性にも有効だ[51]。ゲニステインはAkt経路の抑制によってヒトの骨肉腫にゲムシタビンの抗がん効果を増強する[52]。レスベラトロールも抗AD物質として有益であるようだ[53]。レスベラトロールを投与すると、A $\beta$ の影響が抑制され、マクロファージ上のフィブリンA $\beta$ に対する炎症誘発が妨げられた[54]。n-3 PUFAsは最適な細胞機能に関連している生理学的役割を持つ生物学的な活性脂肪酸だ。この活性脂肪酸の最も単純な物質、 $\alpha$ -リノレン酸はエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)といった、生物学的により活動的で長いn-3 PUFAsに変換される。いくつ

かの研究によって、n-3 PUFAs を含む種々な PPAR リガンドの正体が判明した [55,56]。加えて、リノール酸と  $\gamma$ -リノレン酸が PPAR  $\delta$  を抑制した [57]。すべての異なる PPAR サブタイプ (PPARs ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )) は DNA 結合ドメインとリガンドと結合するドメインで、上位物質と高度な構造的相同関係を共有する。PPAR リガンドが炎症や他の代謝性の病気のための潜在的治療となっている。オメガ 3 の不飽和脂肪酸は、AD の予防策となりうることが判明している [58]。レチノイン酸は RAR と RXR の行動を通して様々な生理学的プロセスに影響を与える。RAR  $\alpha$  情報伝達経路への刺激は、A  $\beta$  を除去して AD を治療するのに有効かもしれない [59]。レチノイン酸は大人の脳内でシナプスの可塑性と記憶に欠かせないホメオスタシス制御に関与するという重要な役割を果たしている。レチノイドは細胞分化と神経突起の成長を含む細胞調節のプロセスに関与するビタミン A 誘導体であり、A  $\beta$  の処理にも影響するかもしれない [60]。以上のことから、ある特定の食事によって神経保護が可能であろう。

ROS の増加はインスリン抵抗性を減らすインスリンシグナリングを強化できる。ROS 依存のインスリンシグナリングが増加すると、PTEN が酸化し、抑制される。脳傷害のある患者に対し、栄養状態が生化学指標の変更をもたらすかもしれない。クルクミン、レチノイン酸、n-3 PUFAs はいくつかの細胞レベルに効果を及ぼすと考えられる。食事は通常、相乗的または敵対的に作用するかもしれない脂質や栄養の複雑な組み合わせから成る。これらの食物の多面的な特性の 1 つは、PI3K/AKT/PTEN 経路の調整を通して病気を治療する可能性を示した。PTEN 関連の病気の治療のために、潜在的な治療法が提供されるかもしれない。これらの重要な分子は、転写やタンパク質の安定化やリン酸化などを含む多数のレベルで調節されるかもしれない。治療と新たな治療の効果的な計画のために、これらの調節を正確に理解しなければならない。正確な分子構造を理解し、適切な食事量が脳機能の改善と関係があるかどうか決定し、脳の健康維持における役割を決定するために、更なる研究が必要だ。長期の臨床研究が外傷性の脳傷害の治療の効果を確定させるかもしれない。

図 4-1

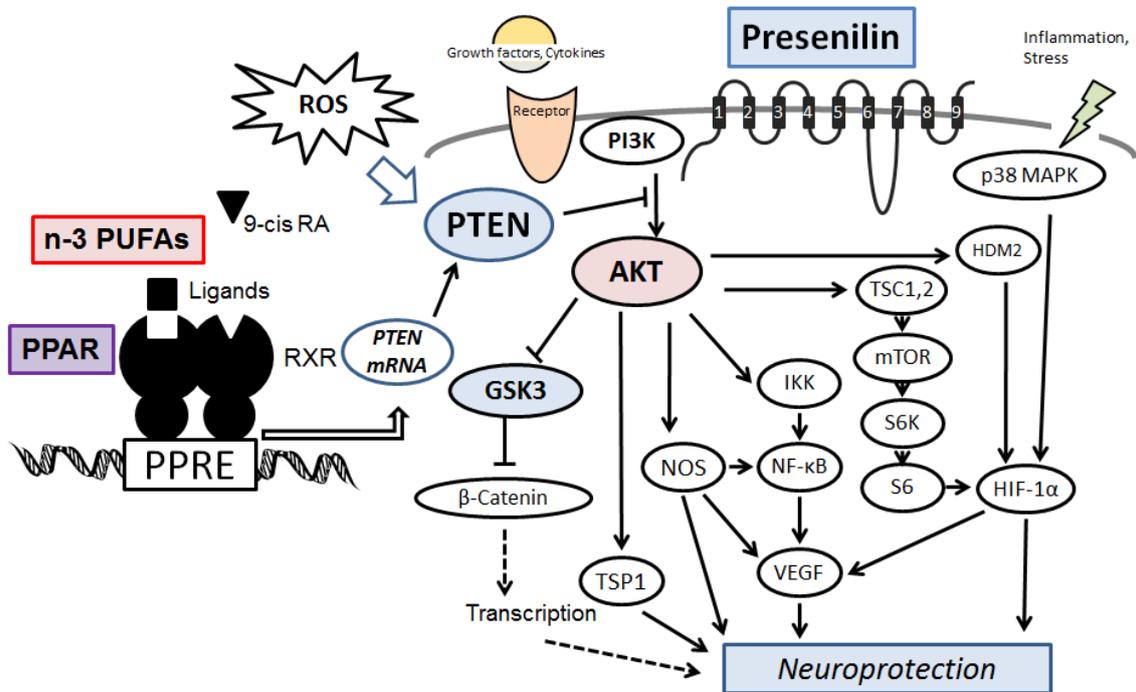


図 4-1

PTEN、PI3K、AKTなどの経路とPPARsの関連性。他の核内ホルモン受容体に類似して、リガンドが転写調節因子を活性化した場合、PPARsは作用する。ROSによる制御がない場合、PTEN機能を抑制することによって、細胞増殖に寄与するかもしれない。PTEN、PI3K、AKTの調節上の経路はプレセニリンの機能にも関与しているかもしれない。Hammerheadsは抑制を意味する。

図 4-2

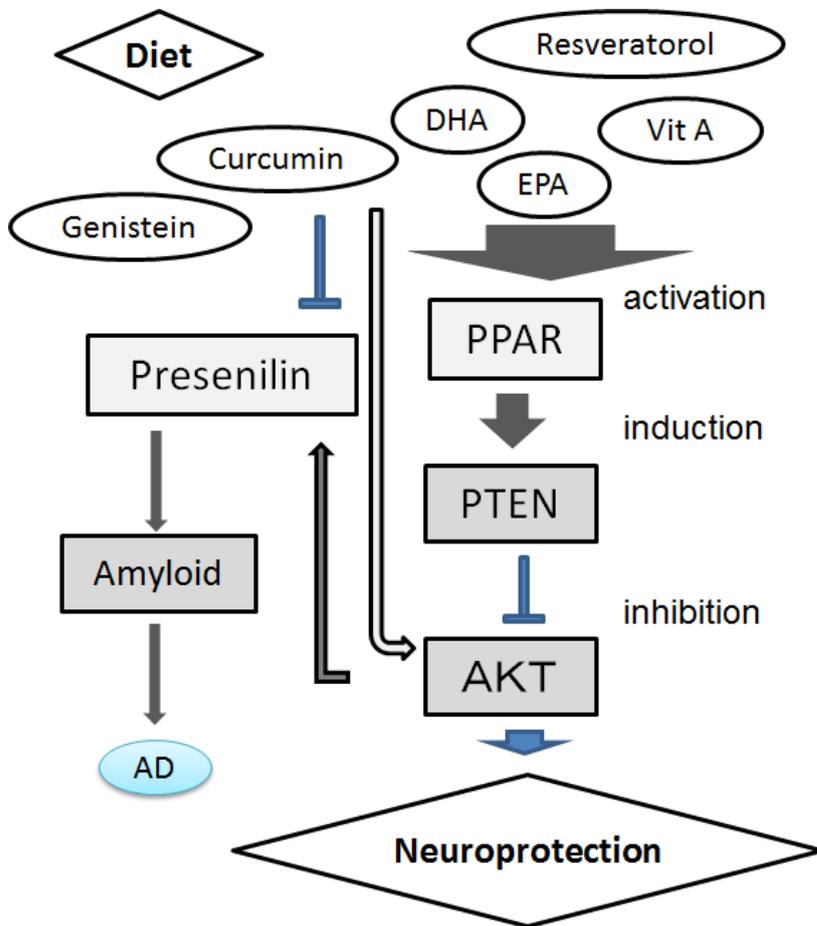


図 4-2

アルツハイマー病などの神経疾患において、PPAR や PTEN の経路と様々の食物成分が関与していることを示すイメージ図。

図 4-3

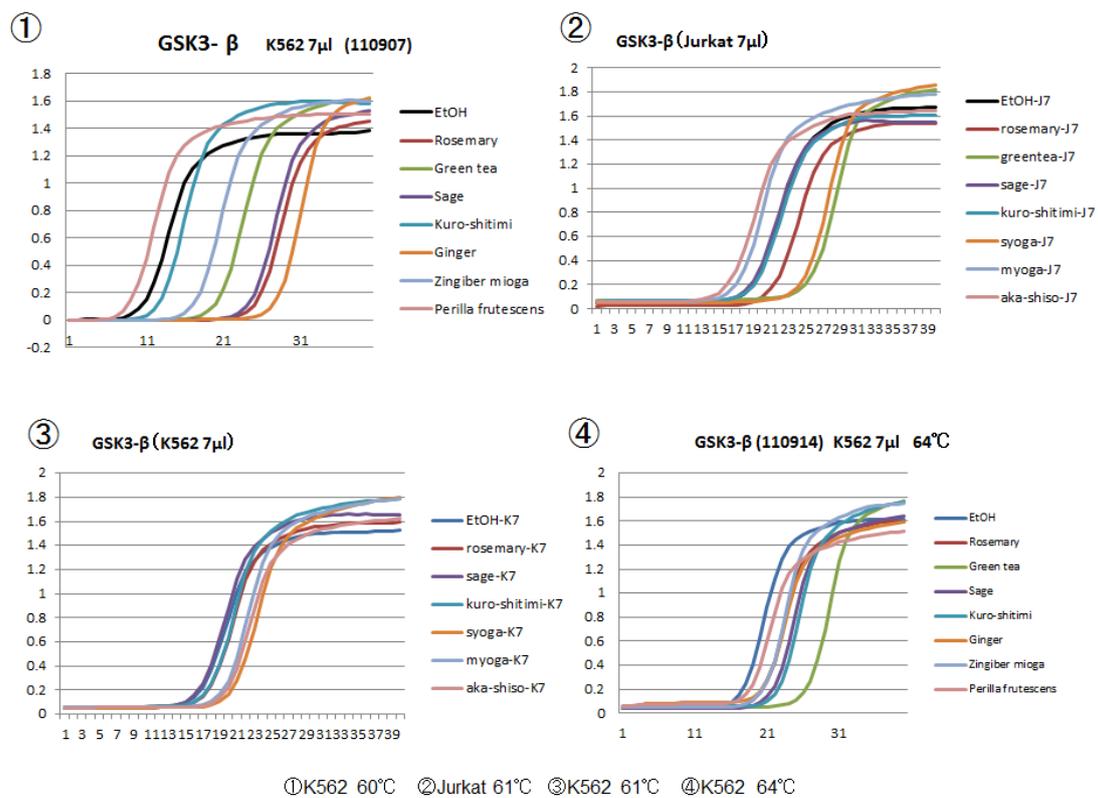


図 4-3

リアルタイム PCR で解析したところ、食物成分によって GSK3 β の遺伝子発現が変化した。

図 4-4

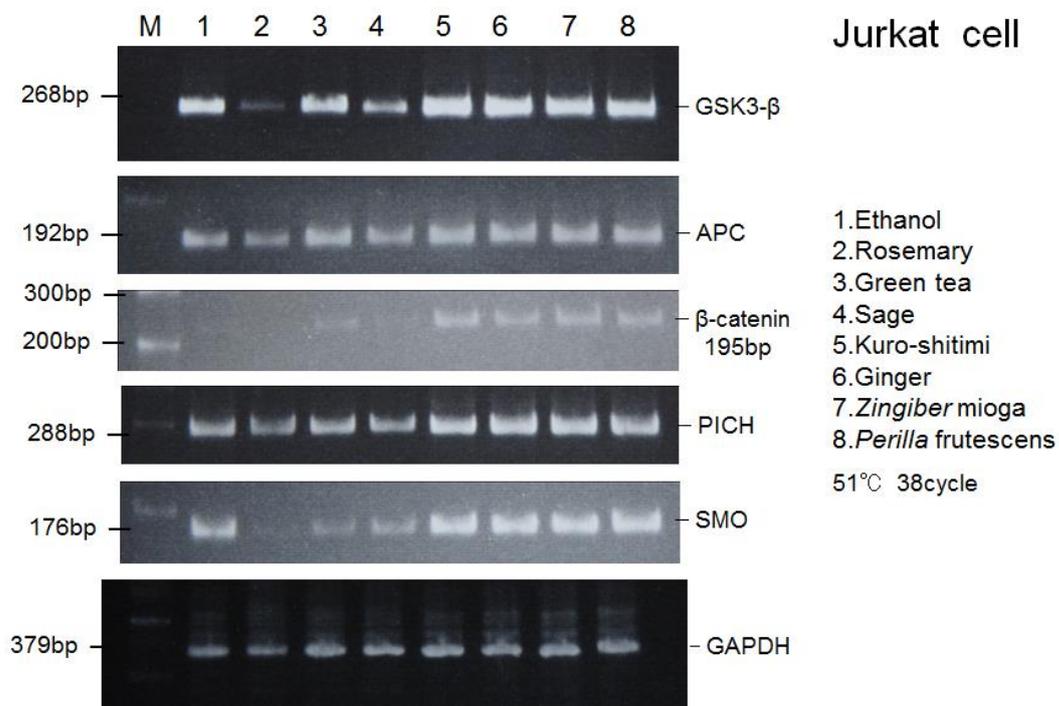


図 4-4

様々な食物をエタノールにつけて成分を抽出し、その抽出液で Jurkat 細胞を刺激した後、PCR 解析を行った。その結果、GSK3β の遺伝子発現などが食物成分によって変化することが分かった。

図 4-5

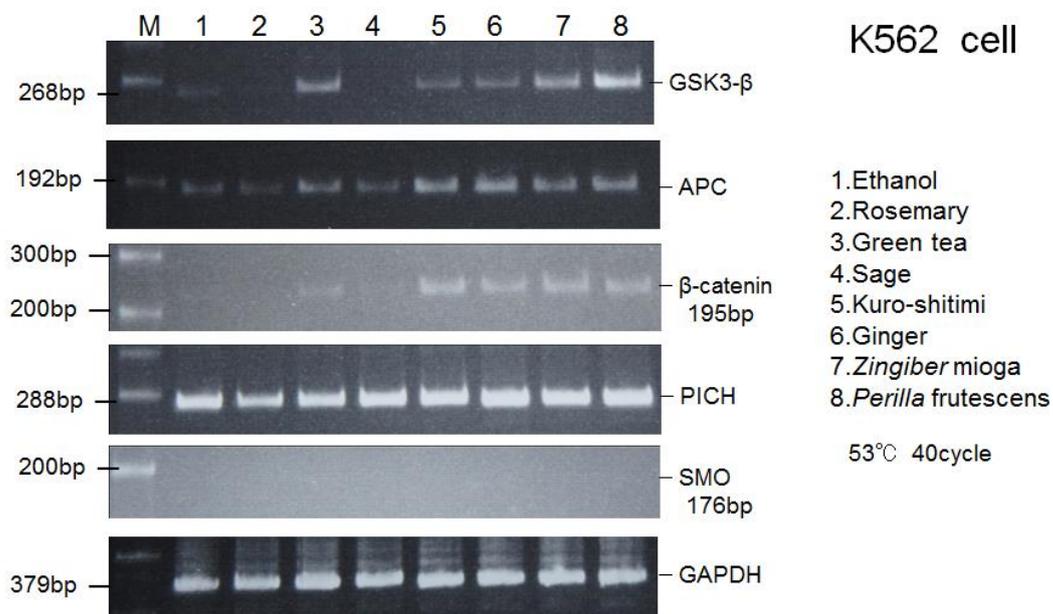


図 4-5

様々な食物をエタノールにつけて成分を抽出し、その抽出液で K562 細胞を刺激した後、PCR 解析を行った。その結果、GSK3 $\beta$  などの遺伝子発現が食物成分によって変化することが分かった。

#### 4 章の参考文献

- [1] Xiong Y, Mahmood A, Chopp M: **Animal models of traumatic brain injury.** *Nat Rev Neurosci* 2013, 14:128-42.
- [2] Levin H, Smith D: **Traumatic brain injury: networks and neuropathology.** *Lancet Neurol* 2013, 12:15-6.
- [3] Cheng G, Kong RH, Zhang LM, Zhang JN: **Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies.** *Br J Pharmacol* 2012, 16:699-719.
- [4] Song SX, Gao JL, Wang KJ, Li R, Tian YX, Wei JQ, Cui JZ: **Attenuation of brain edema and spatial learning deficits by the inhibition of NADPH oxidase activity using apocynin following diffuse traumatic brain injury in rats.** *Mol Med Rep* 2012, doi: 10.3892/mmr.2012.1147
- [5] Hellmich HL, Rojo DR, Micci MA, Sell SL, Boone DR, Crookshanks JM, DeWitt DS, Masel BE, Prough DS: **Pathway analysis reveals common pro-survival mechanisms of metyrapone and carbenoxolone after traumatic brain injury.** *PLoS One* 2013, 8:e53230.
- [6] Al-Gubory KH, Fowler PA, and Garrel C: **The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes.** *Int J Biochem Cell Biol* 2010, 42:1634-1650.
- [7] Zhang Y, Du Y, Le W, Wang K, Kieffer N, and Zhang J: **Redox control of the survival of healthy and diseased cells.** *Antioxid Redox Signal* 2011, 15:2867-2908.
- [8] Scatena R: **Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation.** *Adv Exp Med Biol* 2012, 942:287-308.
- [9] Ballard JW: **Drosophila simulans as a novel model for studying mitochondrial metabolism and aging.** *Exp Gerontol* 2005, 40:763-773.
- [10] Coleman CG, Wang G, Faraco G, Marques Lopes J, Waters EM, Milner TA, Iadecola C, Pickel VM: **Membrane trafficking of NADPH oxidase p47(phox) in paraventricular hypothalamic neurons parallels local free radical production in angiotensin II slow-pressor hypertension.** *J Neurosci* 2013, 33:4308-4316.
- [11] Li ZY, Yang Y, Ming M, and Liu B: **Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 414: 5-8.
- [12] Gillette-Guyonnet S, Secher M, Vellas B: **Nutrition and neurodegeneration: epidemiological evidence and challenges for future research.** *Br J Clin Pharmacol* 2013, 75:738-755.
- [13] Choi BY, Jang BG, Kim JH, Lee BE, Sohn M, Song HK, Suh SW: **Prevention of traumatic brain injury-induced neuronal death by inhibition of NADPH oxidase activation.** *Brain Res* 2012, 1481:49-58.
- [14] Asai T, Liu Y, Bae N, and Nimer SD: **The p53 tumor suppressor protein regulates hematopoietic stem cell fate.** *J Cell Physiol* 2011, 226:2215-2221.
- [15] Xu J, Tian W, Ma X, et al.: **The molecular mechanism underlying morphine-induced Akt activation: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species.** *Cell Biochem Biophys* 2011, 61:303-311.
- [16] Howes AL, Arthur JF, Zhang T et al.: **Akt-mediated cardiomyocyte survival pathways are compromised by G alpha q-induced phosphoinositide 4,5-bisphosphate depletion.** *J Biol Chem* 2003, 278:40343-40351.
- [17] Hou Q, Zhang D, Jarzylo L, Haganir RL, Man HY: **Homeostatic regulation of AMPA receptor expression at single hippocampal synapses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008,

- 105:775-780.
- [18] Damjanac M, Rioux Bilan A, Paccalin M et al.: **Dissociation of Akt/PKB and ribosomal S6 kinase signaling markers in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.** *Neurobiol Dis* 2008, **29**:354-367.
- [19] De Gasperi R, Sosa MA, Dracheva S, Elder GA: **Presenilin-1 regulates induction of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ : altered activation by a mutation associated with familial Alzheimer's disease.** *Mol Neurodegener* 2010, **5**:doi: 10.1186/1750-1326-5-38.
- [20] Uemura K, Kuzuya A, Shimozone Y et al.: **GSK3beta activity modifies the localization and function of presenilin 1.** *J Biol Chem* 2007, **282**:15823-15832.
- [21] Ryder J, Su Y, Ni B: **Akt/GSK3beta serine/threonine kinases: evidence for a signalling pathway mediated by familial Alzheimer's disease mutations.** *Cell Signal* 2004, **16**:187-200.
- [22] Cheng B, Martinez AA, Morado J, Scofield V, Roberts JL, Maffi SK: **Retinoic acid protects against proteasome inhibition associated cell death in SH-SY5Y cells via the AKT pathway.** *Neurochem Int* 2013, **62**:31-42.
- [23] Haas-Kogan D, Stokoe D: **PTEN in brain tumors.** *Expert Rev Neurother* 2008, **8**:599-610.
- [24] Gupta A, Dey CS: **PTEN, a widely known negative regulator of insulin/PI3K signaling, positively regulates neuronal insulin resistance.** *Mol Biol Cell* 2012, **23**:3882-3898.
- [25] Howes AL, Arthur JF, Zhang T et al.: **AKT-mediated cardiomyocyte survival pathways are compromised by G alpha q-induced phosphoinositide 4,5-bisphosphate depletion.** *J Biol Chem* 2003, **278**:40343-40351.
- [26] Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, Signoretti S, Loda M, Sellers WR: **Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:8969-8982.
- [27] Mulholland DJ, Dedhar S, Wu H, Nelson CC: **PTEN and GSK3beta: key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer.** *Oncogene* 2006, **25**:329-337.
- [28] Fournier MV, Fata JE, Martin KJ, Yaswen P, Bissell MJ: **Interaction of E-cadherin and PTEN regulates morphogenesis and growth arrest in human mammary epithelial cells.** *Cancer Res* 2009, **69**:4545-4552.
- [29] Zhang H, Liu R, Wang R, Hong S, Xu H, Zhang YW: **Presenilins regulate the cellular level of the tumor suppressor PTEN.** *Neurobiol Aging* 2008, **29**:653-660.
- [30] Rochet JC, Hay BA, Guo M: **Molecular insights into Parkinson's disease.** *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012, **107**:125-188.
- [31] Hajjar T, Meng GY, Rajion MA et al.: **Omega 3 polyunsaturated fatty acid improves spatial learning and hippocampal peroxisome proliferator activated receptors (PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ ) gene expression in rats.** *BMC Neurosci* 2012, **13**:doi: 10.1186/1471-2202-13-109.
- [32] Yuan X, Zhang Z, Gong K, Zhao P, Qin J, Liu N: **Inhibition of reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinases pathway by pioglitazone attenuates advanced glycation end products-induced proliferation of vascular smooth muscle cells in rats.** *Biol Pharm Bull* 2011, **34**:618-623.
- [33] Chandra V, Huang P, Hamuro Y et al.: **Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA.** *Nature* 2008, **456**:350-356.
- [34] Tarrade A, Rochette-Egly C, Guibourdenche J, Evain-Brion D: **The expression of nuclear retinoid receptors in human implantation.** *Placenta* 2000, **21**:703-710.
- [35] Michalik L, Auwerx J, Berger JP et al.: **International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors.** *Pharmacol Rev* 2006, **58**:726-741.
- [36] Yamanaka M, Ishikawa T, Griep A, Axt D, Kummer MP, Heneka MT: **PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ -induced**

- and CD36-mediated microglial amyloid- $\beta$  phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice.** *J Neurosci* 2012, **32**:17321-17331.
- [37] Denner LA, Rodriguez-Rivera J, Haidacher SJ et al.: **Cognitive enhancement with rosiglitazone links the hippocampal PPAR $\gamma$  and ERK MAPK signaling pathways.** *J Neurosci* 2012, **32**:16725-16735a.
- [38] Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CY, Karlo JC, Zinn AE, Casali BT, Restivo JL, Goebel WD, James MJ, Brunden KR, Wilson DA, Landreth GE: **ApoE-directed therapeutics rapidly clear  $\beta$ -amyloid and reverse deficits in AD mouse models.** *Science* 2012, **335**:1503-1506.
- [39] Stiles BL, Kuralwalla-Martinez C, Guo W et al.: **Selective deletion of Pten in pancreatic beta cells leads to increased islet mass and resistance to STZ-induced diabetes.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:2772-2781.
- [40] Gorbenko O, Panayotou G, Zhyvoloup A, Volkova D, Gout I, Filonenko V: **Identification of novel PTEN-binding partners: PTEN interaction with fatty acid binding protein FABP4.** *Mol Cell Biochem* 2010, **337**:299-305.
- [41] Tsuda M, Inoue-Narita T, Suzuki A, Itami S, Blumenberg M, Manabe M: **Induction of gene encoding FABP4 in Pten-null keratinocytes.** *FEBS Lett* 2009, **583**:1319-1322.
- [42] Stiles B, Wang Y, Stahl A et al.: **Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity [corrected].** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:2082-2087.
- [43] Lecka-Czernik B: **Alelitazar, a dual PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  agonist for the potential oral treatment of type 2 diabetes mellitus.** *IDrugs* 2010, **13**:793-801.
- [44] Knobbe CB, Lapin V, Suzuki A, MAKTW: **The roles of PTEN in development, physiology and tumorigenesis in mouse models: a tissue-by-tissue survey.** *Oncogene* 2008, **27**:5398-5415.
- [45] Yoshida H, Okumura N, Kitagishi Y, Nishimura Y, Matsuda S: **Ethanol extract of Rosemary repressed PTEN expression in K562 culture cells.** *Int J appl Biol pharm Technol* 2011, **2**:316-322.
- [46] Delgado-Esteban M, Martin-Zanca D, Andres-Martin L, Almeida A, Bolaños JP: **Inhibition of PTEN by peroxynitrite activates the phosphoinositide-3-kinase/Akt neuroprotective signaling pathway.** *J Neurochem* 2007, **102**:194-205.
- [47] Fuentealba RA, Liu Q, Kanekiyo T, Zhang J, Bu G: **Low density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes anti-apoptotic signaling in neurons by activating Akt survival pathway.** *J Biol Chem* 2009, **284**:34045-34053.
- [48] Chen LM, Xiong YS, Kong FL, Qu M, Wang Q, Chen XQ, Wang JZ, Zhu LQ: **Neuroglobin attenuates Alzheimer-like tau hyperphosphorylation by activating Akt signaling.** *J Neurochem* 2012, **120**:157-164.
- [49] Zhang C, Browne A, Child D, Tanzi RE: **Curcumin decreases amyloid-beta peptide levels by attenuating the maturation of amyloid-beta precursor protein.** *J Biol Chem* 2010, **285**:28472-2880.
- [50] Sharma S, Ying Z, Gomez-Pinilla F: **A pyrazole curcumin derivative restores membrane homeostasis disrupted after brain trauma.** *Exp Neurol* 2010, **226**:191-199.
- [51] Laird MD, Sukumari-Ramesh S, Swift AE, Meiler SE, Vender JR, Dhandapani KM: **Curcumin attenuates cerebral edema following traumatic brain injury in mice: a possible role for aquaporin-4?** *J Neurochem* 2010, **113**:637-48.
- [52] Wu Q, Chen Y, Li X: **HDAC1 expression and effect of curcumin on proliferation of Raji cells.** *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2006, **26**:199-201.

- [53] Wang R, Li YH, Xu Y, Li YB, Wu HL, Guo H, Zhang JZ, Zhang JJ, Pan XY, Li XJ: **Curcumin produces neuroprotective effects via activating brain-derived neurotrophic factor/TrkB-dependent MAPK and PI-3K cascades in rodent cortical neurons.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010, **34**:147-53.
- [54] Ma QL, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ, Chen PP, Hudspeth B, Chen C, Zhao Y, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM: **Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin.** *J Neurosci* 2009, **29**:9078-9089.
- [55] Yoshida H, Okumura N, Nishimura Y, Kitagishi Y, Matsuda S: **Turmeric and curcumin suppress presenilin 1 protein expression in Jurkat cells.** *Exp Ther Med* 2011, **2**:629-632.
- [56] Kadish I, van Groen T: **Lesion-induced hippocampal plasticity in transgenic Alzheimer's disease mouse models: influences of age, genotype, and estrogen.** *J Alzheimers Dis* 2009, **18**:429-445.
- [57] Liang C, Li H, Shen C, Lai J, Shi Z, Liu B, Tao HM: **Genistein potentiates the anti-cancer effects of gemcitabine in human osteosarcoma via the downregulation of Akt and nuclear factor- $\kappa$ B pathway.** *Anticancer Agents Med Chem* 2012, **12**:554-63.
- [58] Villaflores OB, Chen YJ, Chen CP, Yeh JM, Wu TY: **Curcuminoids and resveratrol as anti-Alzheimer agents.** *Taiwan J Obstet Gynecol* 2012, **51**:15-525.
- [59] Huang TC, Lu KT, Wo YY, Wu YJ, Yang YL: **Resveratrol protects rats from A $\beta$ -induced neurotoxicity by the reduction of iNOS expression and lipid peroxidation.** *PLoS One* 2011, **6**:e29102.
- [60] Li F, Gong Q, Dong H, Shi J: **Resveratrol, a neuroprotective supplement for Alzheimer's disease.** *Curr Pharm Des* 2012, **18**:27-33
- [61] Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE: **Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease.** *Neurochem Int* 2009, **54**:111-118.
- [62] Capiralla H, Vingtdeux V, Zhao H et al.: **Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and A $\beta$ -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B/STAT signaling cascade.** *J Neurochem* 2012, **120**:461-472.
- [63] Kouroumichakis I, Papanas N, Zarogoulidis P, Liakopoulos V, Maltezos E, Mikhailidis DP: **Fibrates: therapeutic potential for diabetic nephropathy?** *Eur J Intern Med* 2012, **23**:309-316.
- [64] Friedland SN, Leong A, Filion KB et al.: **The cardiovascular effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists.** *Am J Med* 2012, **125**:126-133.
- [65] Fu J, Zhang XW, Liu K et al.: **Hypolipidemic activity in Sprague-Dawley rats and constituents of a novel natural vegetable oil from Cornus wilsoniana fruits.** *Food Sci* 2012, **77**:H160-H169.
- [66] Donohue MC, Aisen PS: **Mixed model of repeated measures versus slope models in Alzheimer's disease clinical trials.** *J Nutr Health Aging* 2012, **16**:360-364.
- [67] Shah R: **The role of nutrition and diet in Alzheimer disease: a systematic review.** *J Am Med Dir Assoc* 2013, **14**:398-402.
- [68] Swanson D, Block R, Mousa SA: **Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life.** *Adv Nutr* 2012, **3**:1-7.
- [69] Calon F: **Omega-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease: key questions and partial answers.** *Curr Alzheimer Res* 2011, **8**:470-478.

- [70] Goncalves MB, Clarke E, Hobbs C et al.: **Amyloid  $\beta$  inhibits retinoic acid synthesis exacerbating Alzheimer disease pathology which can be attenuated by an retinoic acid receptor  $\alpha$  agonist.** *Eur J Neurosci* 2013, doi: 10.1111/ejn.12142. [Epub ahead of print]
- [71] Lerner AJ, Gustaw-Rothenberg K, Smyth S, Casadesus G: **Retinoids for treatment of Alzheimer's disease.** *Biofactors* 2012, **38**:84-89.

## 第5章

### まとめと今後の展望

細胞内物質輸送と遺伝子発現及びエピジェネティクス

## 5-1 細胞極性と膜輸送に関係しているタンパク質

PI3K の下流にあるいくつかの分子が、RUFY ファミリータンパク質のような小胞関連の RUN タンパク質と相互に作用することによって、細胞内物質輸送に関係している。細胞のコンポーネントと構造の非対称の組織化が細胞両極性と呼ばれる。(図 5-1) 細胞両極性の樹立はシグナル伝達カスケード [1]、細胞内膜輸送[2]、分化に関連している細胞骨格の動力学[3] を含む多くのプロセスを必要とする。そして、それは種々な細胞質の有機体の分化や増殖や形態形成に関連する [4]。細胞の分極化が細胞で適切に作用することが必要だ。例えば、神経細胞における軸索突起の存在はシグナルの流れる方向を決定する。下方制御されたタンパク質の最初の輸送がクラスリンによる内部移行とエンドソームの細胞内腔への並べ替えによって行なわれることが知られている[5]。細胞両極性の異常調節は発育障害とがんを引き起こす [6]。細胞両極性設立と細胞の膜通過の間の関連が研究によって明らかになった[2,7]。また、エンドソームによって関連づけられたタンパク質の機能は細胞両極性に関連していた[8]。エンドソームの膜輸送の方向と選択性は、タンパク質受容体 (低分子 GTPases) とホスホイノシチドを含む種々な膜に関連する因子によって調節される [9,10]。

RUN ドメイン (RPIP8、UNC-14、NESCA タンパク質から名付けられた[11]) は、低分子 GTPase スーパーファミリーのエフェクターとして機能するかもしれない[12,13]。RUN ドメインは膜輸送に関係している[13]。これは、GTP 結合タンパク質に特徴的な機能でおよそ 200 のアミノ酸できているタンパク質モチーフである[11]。シーケンス分析から、RUN ドメインは球形構造のコアを構成するいくつかのブロックから成ると予測された。RUN ドメインの全体的な結晶構造は 8 つの  $\alpha$  螺旋で構成されている 1 つの球形から成る鑿の形を取っている [14]。しかし、それは GTPase を結び付ける RUN ドメインの唯一の機能ではない。RUN ドメインはモータータンパク質を含むある種の分子に結合し、糸状のネットワークとの相互作用に関わっているのかもしれない[13]。NESCA、NGF によって調節された情報伝達経路でのシグナルのアダプタータンパク質は N 末端において RUN ドメインを含む[12]。NESCA の RUN ドメインは 9 つの螺旋から成り、それは他の RUN ドメインを含有するタンパク質に似ている [15]。NESCA の核内再局在は突然変異に不可欠だということが示されている[12]。NESCA の RUN ドメインは、他の RUN ドメインと比較して推定される GTPase と相互作用しているインタフェースにおいて、異なる表面上の静電気分布を有している[15]。NESCA の RUN ドメインは TrkA の下流にあるシグナル分子、H-Ras と結合できる。このことは、NESCA が NGF・TrkA 情報伝達経路に関わっていることを示唆している[15]。

RUN ドメインを含むタンパク質はエンドソームの融合を促進することが示されており、これは小胞輸送において重要だ。加えて、RUN ドメインはディタージェントに溶けないエンドソームのマイクロドメインの局在化のために必要とされるようだ[12,13]。野生型と変異体タンパク質を用いたいくつかの生化学的な実験によって、RUN タンパク質と繊維状物質間にある物理的な相互作用が確認された[13]。低分子 GTPases と RUN タンパク質とモータータンパク質の関連は細胞内で多孔状のタンパク質を輸送する上で、これらのタンパク質に新機能を反映するかもしれない。オートフォゴソームを微小管分子モーターと Rab7 に連結させるアダプターとして、FYCO1 が機能すると報告された。そして、それはファゴソームの輸送と融合に関連している[16]。カゼイン-1 は kinesin heavy chain と kinesin light chain で構成されたヘテロテトラマーだ。UNC-14、RUN ドメインタンパク質はカゼイン-1 と結合して、シナプス小胞局在性を調節する[17]。UNC-14 も Ras のよう複数 GTPase 情報伝達経路で重要な役割を果たすと予測される[18]。RUN ドメインがしばしば Rab 系の低分子 GTPases の調節に関係しているタンパク質で見いだされることから、

RUN ドメインは Rab を介する膜輸送に関係していることが示唆された。低分子 GTPases とモータータンパク質には RUN ドメイン関連のメカニズムに起因している共通機能があるように思われる。

RUN と FYVE ドメインを含むものとして指定される RUFY タンパク質ファミリーはアミノ末端 RUN ドメインとカルボキシル・ターミナル FYVE ドメインを含み、それは初期のエンドソームの膜にあるホスファチジルイノシトール 3-リン酸塩と結合する[19]。実際に、RUFY タンパク質は主に初期のエンドソームに局所化される。RUFY タンパク質はしばしばチロシンによってリン酸化され、リン酸化部位の不足している変異体はエンドソームに到達できない[19]。Rab10、Rab11、Rab14、RUFY タンパク質が脂肪細胞と骨格の筋肉で Glut4 を運搬する上で重要な役割を果たすことが示唆された[20]。シーケンスとゲノム分析によって、RUFY ファミリーが4種類のタンパク質から構成されていることが判明した。

RUFY1 (別名、RABIP4 または ZFYVE12) は細胞質と初期のエンドソーム膜に局在する 708 のアミノ酸タンパク質だ [19,21]。RUFY1 は精巣や肺や脳や腎臓でよく見られる Etk タンパク質キナーゼの下流のエフェクターであることが確認された。RUFY1 は PIP3 を含むリン脂質小胞を結びつけるために機能し、初期のエンドソームの膜輸送に関与する [19]。FYVE フィンガードメインによって示される PIP3 結合モジュールを含むタンパク質によって、PI3K シグナリングの下流の結果が調節される。多くの FYVE ドメインを含むタンパク質はエンドソームで局所化されて、エンドサイトーシスで重要な役割を果たす [22]。Etk の SH3 と SH2 ドメインを通して Etk は RUFY1 と相互作用し、RUFY1 の Tyr-281 と Tyr-292 をリン酸化する。それはエンドソームの局在化に不可欠だ [19]。Etk は PI3K の下流のエフェクターとして、エンドサイトーシスの調節において重要な役割を果たす。2つの螺旋状のコイルのドメインも RUFY1 のエンドソームの局在化を決定する [23]。PI3K 抑制剤 ワートマニン は RUFY1 のエンドソームの局在化を阻止する [23]。Rab14 は RUFY1 との GTP 依存的なインタラクションに関わる [24]。活性化した Rab14 はエンドソームの膜上で RUFY1 を調節し、Rab4 はエンドソームの融合を促す [24]。Rab14 はエンドソームに新たな RUFY1 を蓄積する主要な決定要素であるようだ。そして、FYVE ドメインは PIP3 が濃縮された初期エンドソーム内で RUFY1 の機能を助けるかもしれない [24]。Rab14 と RUFY1 は Rab4 に依存的な選別エンドソームに関係しており、RUFY1 によって調節された初期のエンドソームの拡大が Rab4 との相互作用を必要とする [25]。Rab4 がリサイクリングエンドソームや選別エンドソームの上に存在する一方、RUFY1 は選別エンドソーム内に存在する [26]。このようにして、リサイクリングエンドソームから選別エンドソームへの輸送路が確保されている。RUFY1 は Glut1 タンパク質の局在化の運動パラメータを変化させることができる [26]。

RABIP4R または ZFYVE13 としても知られている RUFY2 は、2つの二重コイル構造のドメインによって切り離される RUN ドメインとカルボキシル末端 FYVE zinc finger を含む [27]。RUFY2 は核に局在し、脳と肺と精巣に発現する。RUFY1 同様、RUFY2 も種々な細胞プロセスの調節に関係しているチロシンキナーゼである Etk と相互作用する [19]。RUFY2 のカルボキシルドメインは Rab33A の抑制形に結合する [28]。RIPX または SINGAR1 として知られている RUFY も海馬ニューロンで局在化され、成長円錐と軸索で蓄積される [29]。RUFY3 は余分な軸索の形成を抑制することによって、神経細胞の両極性の安定を保証する。RUFY3 も RUN ドメインを含有し、Ras のような多くの GTPase 情報伝達経路で重要な役割を果たすようだ。Rab5 は RUFY3 と GTP に依存的に相互作用する。RUFY3 は活性化している Rab5 に結合でき、Rap2 に若干の影響を及ぼす [30]。RUFY3 が異なる 2つの低分子 GTPases のためにドッキングタンパク質として作用するかもしれない。酸化 LDL を含む免疫の複合体がヒトの U937 単核球細胞における RUFY3 の遺伝子

発現に影響を与えるという報告がある[31]。RUFY4 はRUNドメインとFYVE zinc fingerドメインを含む571のアミノ酸タンパク質だ[32]。RUFY4も亜鉛イオンの付着に参与していると考えられている。RUFY2やRUFY4が十分に特徴づけられていないように、正確な細胞内機能についてはあまり知られていない。

エンドソームの輸送は時空間的に規律正しいプロセスだ。エンドソームは小胞を形成するために膜から内側へ向かって伸びることができる。そして、それは遅発型のゴルジ複合体からエンドサイトーシスと生合成の輸送物によって細胞表面から輸送物を受け取る[33]。エンドサイトーシスによる輸送は、広範囲の発達過程において必要不可欠な多くの情報伝達経路の重要な要素であることが知られている[34]。加えて、エンドソームの輸送は様々な細胞基質と膜に結合したタンパク質の連続的な作用によって調節される[35]。膜輸送の間に起きる主要な出来事の多くが、研究によって解明された。例えば、Rab系の低分子GTPasesやそのエフェクター、Ca<sup>2+</sup>レベル、ホスホイノシチドは極めて重要かもしれない。これまでの研究によって、神経伝達において、エキソサイトーシスの膜融合における最後の工程はCa<sup>2+</sup>の流入によって誘発されることが明らかになった[36]。

同様に、ホスホイノシチドがRab系タンパク質の作用と結合因子のために重要であることが知られている[37]。細胞膜チャネルはRabタンパク質とホスホイノシチドによって調節されることが知られている[38]。ホスホイノシチドは小胞の特長と膜輸送の方向を決定する分子である。特にPIP3は初期のエンドソームの膜輸送に欠かせない[39]。PIP3は哺乳動物の細胞において多量のエフェクタータンパク質を持っており、哺乳動物の細胞すべてにFYVEやpHドメインのようなPIP3結合モチーフが含まれている[40]。PIP3によるこれらのエフェクターの選択的な補充は、侵入してくる小胞とエンドソームのための指向性が確立されるメカニズムを決定するかもしれない。このように、PIP3はエンドソームの成熟と細胞内小器官による融合イベントのために重要だ[41]。同様に、ワートマニン(PI3K抑制剤)によるPIP3合成の中断が内部の小胞の形成とエンドソームの成熟に影響を及ぼす[42]。ホスホイノシチドがGTPasesの活動を調節するためにホスホイノシチド結合タンパク質を産出する間、GTPasesは酵素を代謝しているPIPの活動を抑制する。

真核生物細胞は膜輸送経路を調節するために低分子GTPasesの多様なファミリーを発達させた。エフェクタータンパク質と共に、Rabタンパク質とRapタンパク質は小胞形成や結合や融合の様々な状況を調整する[43,44]。膜融合と小胞形成を促進し、初期のエンドサイトーシス経路で重要な役割を果たすため、いくつかのRabタンパク質はエフェクターを補充する。Rabタンパク質は、膜通過を調節するために、グアニン・ヌクレオチド依存的な変更メカニズムを用いる[45]。グアニンと結合することによって、ヌクレオチドはRadを活性化するタンパク質を交換する。ある特定のエフェクターは活性化したRadタンパク質の局所的なドメインを定義したり維持したりするのを助けるフィードバックループを確立するために作用する。それから、Radタンパク質は他のエフェクター分子を捕捉するのに役立つ。最近の実験結果によって、既知のRabエフェクターの数が増加した。Rabエフェクターにはソーティングアダプター、結合因子、脂質キナーゼと脂質ホスファターゼが含まれる。これらはアクセプター・コンパートメントの表面に存在する。これらの異なる作用はGTP結合状態で特定のRabsに結合するエフェクター分子の多様な集合によって実行される[45]。脂質キナーゼがさらに小胞の特長と膜輸送の方向を定義するためにホスホイノシチドを作成する間、結合因子は受容体膜上で分子と相互作用することによって小胞融合を調節する。加えて、Rabシグナル伝達機構が膜通過に方向性を示す[45]。

Rabタンパク質は特定の細胞小器官膜タンパク質で分類され、細胞小器官のアイデンティティを定義するために基本的なタグを確立する。Rab4、5、9のようなエンドソームのRabタンパク質が局在化とエフェクタータンパク質付きの機能的な相互作用によって特徴づけられる[46]。Rab4とRab11が別の経路を経由して初期のエンドソームから細胞表面

まで受容体のリサイクリングを調節する[47]。Rab4 は初期のエンドソームレベルで機能し、Rab11 はリサイクリングエンドソームを通して物質の輸送に関係している[48]。Rab4 も脂肪細胞と骨格の筋肉と心筋細胞で Glut4 を輸送する重要な物質だ[49]。Rab5 がクラスリンによって調節されたエンドサイトーシスとエンドソーム融合において重要な役割を果たす[50]。EEA1 (Rab5 エフェクター) が初期のエンドソームで選択的に補充されるのに対し、Rab5 はクラスリンで覆われた小胞と初期のエンドソームへ対照的に配布される[51]。Rab5 は初期のエンドソーム内で局地化される。対照的に、Rab7 は終期のエンドソームとリソソームで局地化される[52]。エンドソームの輸送も低分子 GTPase Rab6 によってコントロールされる。低分子 GTPase Rab6 は多数の無関係なエフェクターを補充することでゴルジレベルで小胞輸送を調節する。(図 5-2) エフェクター Rab6IP1 の 378 残基内部の断片を有する複合体での Rab6-GTP の結晶構造が解明された[53]。Rab6 の柔軟性は組成的に異なる  $\alpha$ -螺旋形の二重コイルの認識を調整する。そして、そのコイルはエフェクター作用で Rab6 の混乱状態を改善する[53]。Rab8 がゴルジ複合体から血漿膜への細胞外への膜輸送で重要な役割を果たす[54]。Rab8 はオプチニューリンによってミオシン VI と関係しており、Rab8-オプチニューリン-ミオシン VI 複合体は分泌胞を原形質膜に提示することに関与するかもしれない[55]。Rab9 はゴルジネットワークに輸送と関わっている [56]。Rab11 とアクチン動的関係の膜輸送と調節で役割を果たす Rab11 系の相互作用しているタンパク質 3 も糸状ビリオンの形成に必要な [57]。Rab11 も血漿膜に戻るエンドソームのリサイクルに関与する。Rab14 は食胞と初期のエンドソーム融合に関連していた。Rab1 もゴルジ複合体に局地化される。Rab27A は Slac2-a によって、間接的にメラノソーム上に myosin Va を認識する[58]。Rab27B、Rab27A の密接に関連したアイソフォームも Alac2c / MyRIP を経由して Myosin Va. / VIIa と関連付けられる[59]。Rab27 と Slac2c / MyRIP は、アクチン細胞骨格で分泌顆粒の相互作用を調節する複合体の一部であり、エキソサイトーシスの調節に関与する。Rab35 が神経突起の派生物を調節する。それはアクチンの力に対する直接的な影響によるものだ [60]。

ラップタンパク質 (Rap1a、-1b、-2a、-2b) は Ras と密接な関係がある低分子 GTPases だ。Rap1 はインテグリンの作用による細胞接着やカドヘリンの作用による細胞間結合構造の調節といった様々な細胞のプロセスに関係している。アクチン重合の重要な活性剤である Rap 系タンパク質とプロフィリン II の間の相互作用が Rgl3 (RalGDS 関連のタンパク質) によって調節されることが明らかになった[61]。RAPL (Rap1 を関連付ける分子) が微小管上で局地化し、活性化した Rap1 と RAPL は血管内皮細胞の方向移動を調節する [62]。Rap2 はアクチンフィラメントに直接結合することによって、血小板細胞骨格と相互作用する。アクチンフィラメントはアクチンの単量体ではなく重合体だ[63]。アクチンフィラメントと Rap2 の相互作用は結合したヌクレオチドから独立している。

真核生物細胞は小胞輸送経路を調節するために多様な範囲の Rab GTPases を生み出した。Rab6 と結合相手である DENND5 (RUN ドメインタンパク質) はゴルジレベルでの小胞のやり取りに関係している[64]。DENND5 の RUN ドメインはソーティングネキシンとの関係を通してゴルジで分極化された輸送における重要な役割を果たす[65]。ソーティングネキシンは物質の分類を組織化することにおいて基本的な役割を担っているホスホイノシチド結合性タンパク質だ[66]。RUN ドメインタンパク質と関係がある低分子 GTPases も、このようにしてモータータンパク質や糸状分子と結合する。低分子 GTPases が膜輸送に欠かせないのと同様、アクチンの再構築も重要だ。アクチンは粒子接着時に重合させられて、膜を拡張させる。アクチン関連のタンパク質の多くは食細胞のカップで濃縮されて、食菌作用で重要な役割を果たす[67]。それは膜輸送を調節するために機能的な相互作用を構成するエフェクター分子に対する低分子 GTPase タンパク質の相互作用による。しかし、エフェクターによって引き出された生物学的な役割の細部は判明していない。

アルツハイマー病を含む神経変性病で時々不完全なエンドソームの輸送が見られる。細胞小器官ホメオスタシスを保証するためにエンドソームの輸送が必要だ。情報伝達経路における膜輸送の機能的な有意性は確立されなければならない。実際、タンパク質を含むRUNドメインはこの分野の研究で重要視されている。ある種の細胞骨格成分に豊富に含まれるエンドソームのマイクロドメインで RUFY タンパク質が活性化されるかもしれない。膜輸送の間の RUFY タンパク質の局在化は動的であるようだ。特定の運動情報が必要とされるが、RUFY と Rab タンパク質はエンドサイトーシスで抑制機能を有しているかもしれない。それは神経細胞のシステムにおける Rab15 のケースに類似している[68]。この抑制はエンドソーム・リサイクリングの負の調節から生じた。同様に、RUFY3 が余剰の軸索の形成を抑制することによって、神経細胞の両極性の強さを確実にするかもしれない。RUFY3 がどのように余剰の軸索の形成を抑制するか分子的な詳細は、今後調査されるべき重要な課題だ[29,69]。正確なメカニズムの解明は、膜通過の調節におけるこれらのタンパク質の生理学的役割への新しい洞察を提供するだろう[13]。また網羅的なマイクロアレイによる解析などで遺伝子発現変化からアプローチすることも有用と考えられる。(図 5-2、図 5-3)

図 5-1

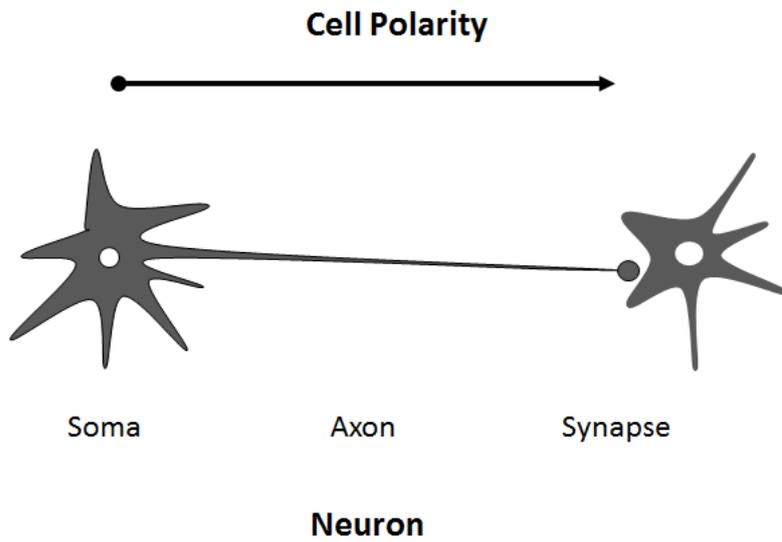


図 5-1

多くの場合、細胞両極性が観察されるが、神経細胞は非対称だ。それは生化学的な構成や機能と異なっている。矢印が両極性の方向を示している。

図 5-2

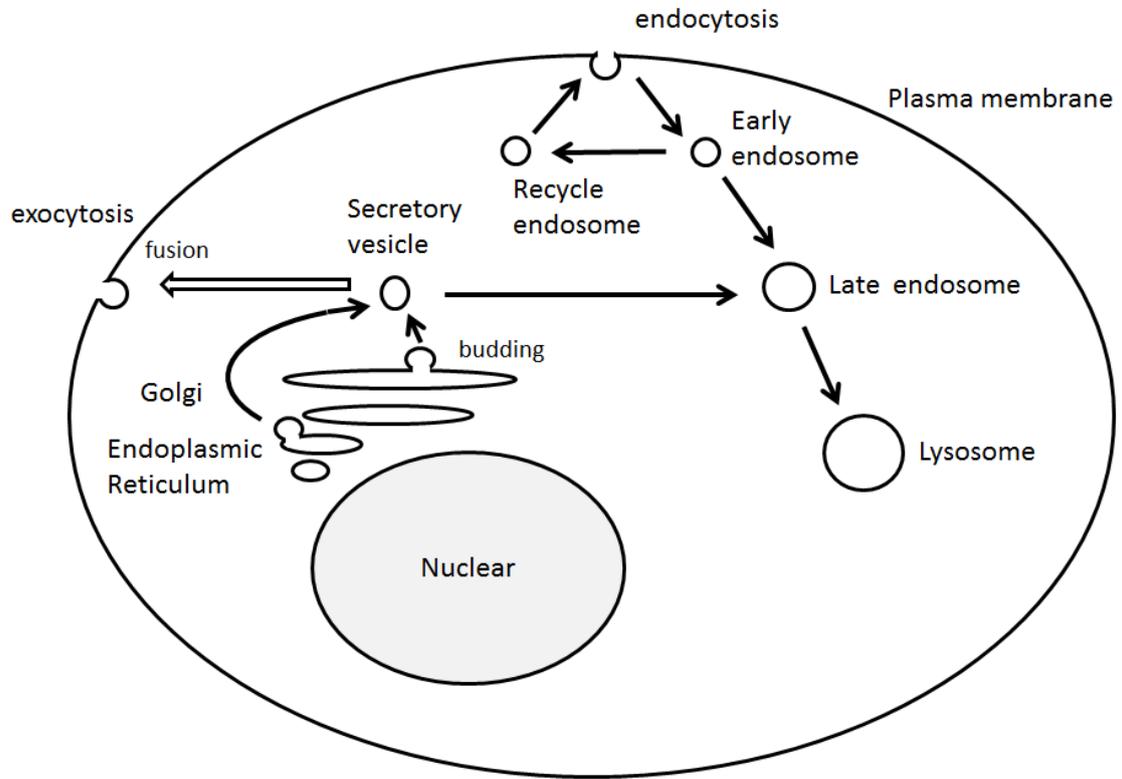


図 5-2

細胞内の小胞輸送のイラスト。 簡略化のため、一部輸送ルート省略した。

図 5-3

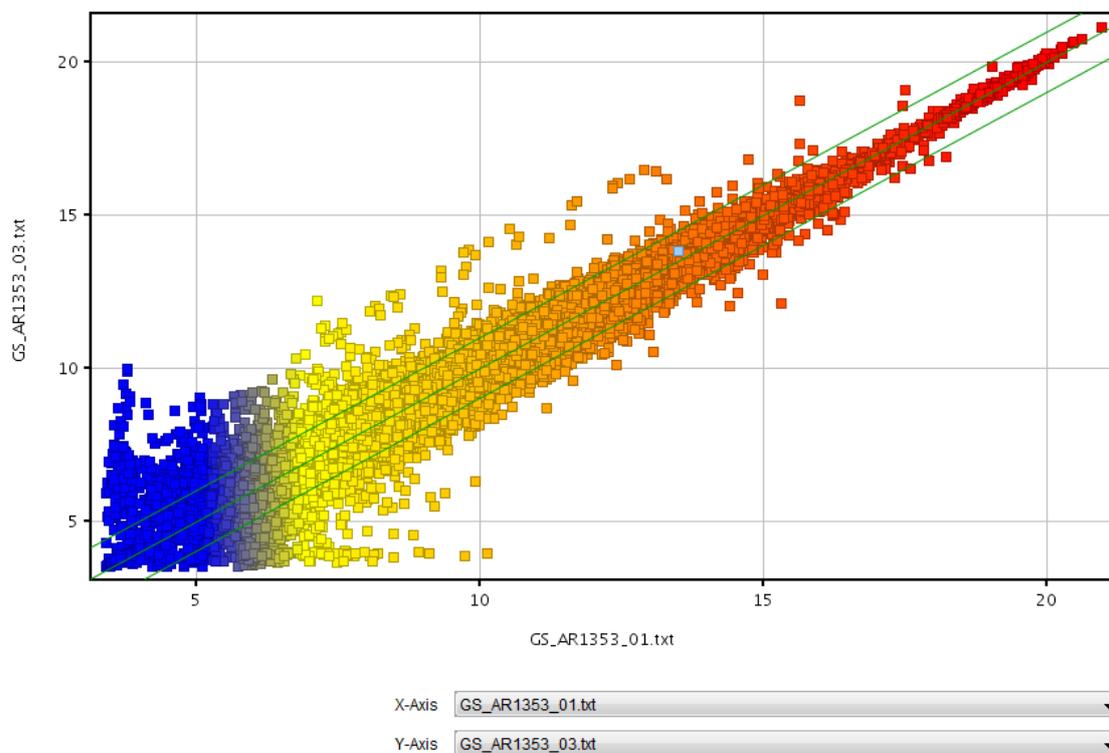


図 5-3

柿渋などの抽出液で細胞を刺激した後、マイクロアレイを用いた遺伝子発現の解析を行った結果。横軸をコントロールとして、縦軸は刺激によってどのように遺伝子発現が変化したかを示している。遺伝子の発現量に変化がなければ、斜めの直線になる。

図 5-4

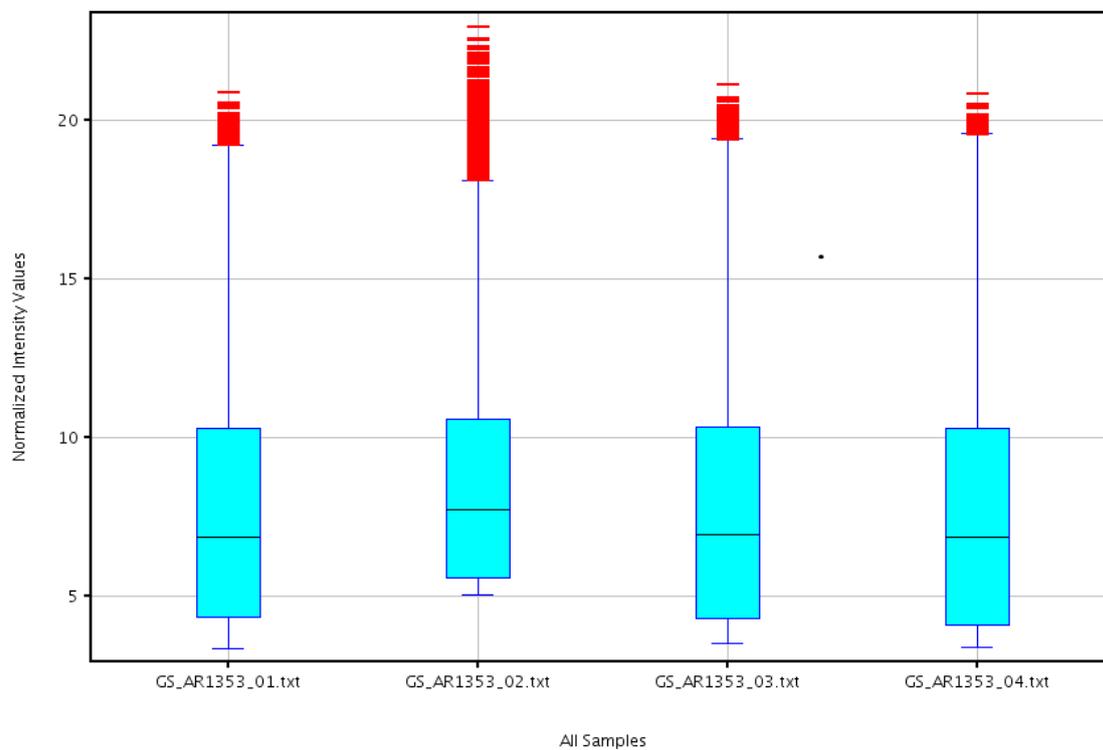


図 5-4

柿渋などの抽出液で細胞を刺激した後、マイクロアレイを用いた遺伝子発現の解析を行った結果。一番左端がコントロール。

## 5-2 DNA 修復系のジェネティックな変化とエピジェネティックな変化ががん化と関連している

酸化ストレスの増加が細胞の損傷をもたらす。DNA 損傷を修復するために、細胞には細胞周期の進行を抑制して DNA 修復を誘導するプロセスを引き起こす多数の DNA 修復メカニズムが備わっている [70,71]。酸化ストレスによって引き起こされるメカニズムの 1 つは、PI3K や PTEN といったいくつかのキナーゼを含む標的分子の可逆的な調節を通してもたらされるかもしれない [72]。加えて、主な DNA 損傷認識分子は血管拡張性失調症で変異が見出される原因遺伝子 (ATM) だ。ATM は DNA 損傷に応じて p53 と BRCA1 を含む多くのタンパク質をリン酸化するチェックポイントキナーゼだ (図 5-5)。p53 タンパク質はゲノムストレスと DNA 損傷に対する細胞の応答に関係していくつかの情報伝達経路を調節する鍵となる転写調節因子だ。ストレスによって引き起こされた活性化を通して、p53 が細胞の遺伝子の完全性を守る標的遺伝子の発現を誘発する [73,74]。多くの研究によって、腫瘍抑制タンパク質が酸化ストレスに応じて抗酸化遺伝子の発現を上昇させていることが明らかとなった。腫瘍抑制因子は DNA 損傷の修復、細胞周期の停止、細胞の増殖、細胞の分化、転移とアポトーシスを含む多様な細胞の活動を調節する [75]。正常な細胞では、DNA 修復におけるこれらのメカニズムの間で絶妙なバランスが保たれている。ATM の突然変異は発がんリスクの増加と関係がある。加えて、p53 と BRCA1 ががん抑制遺伝子の突然変異ががんの原因となることも知られている。

しばしば DNA 修復の欠陥によってゲノムが不安定になる。哺乳動物の細胞に備わっている標準的な DNA 修復経路には、相同修復、非相同の末端結合、一本鎖アニーリングなどが含まれている。それらは DNA 二本鎖の欠陥 (DSBs) を修復する異なる経路だ [76]。DNA 修復は通常細胞とがん細胞両方の生存に欠かせない。精巧な情報伝達経路の 1 つが DSBs を発見し、DNA 修復を行って生き残るかプログラム細胞死を誘発するかを決定する [77,78]。がんを治療するために DNA に損傷を与えている物質や分子は、アポトーシスによって引き起こされる細胞死を誘発する物質だ。基礎科学における最近の研究から、発がんに関する重要な分子の働きが判明した。発がん性のある DNA 損傷とがんにおける細胞の応答の観点から、DNA 修復分子とがん抑制遺伝子産物 (p53、BRCA1、PTEN) の機能や相互関係を要約する (図 5-6)。

DNA 修復システムは、破損したヌクレオチドの認識して修復することによってゲノムの正確性を維持する、保存性の高い DNA 編集プロセスだ。DNA 損傷反応遺伝子の欠陥や DNA 修復メカニズムの発現低下はゲノムの不安定を促進し、その結果、発がんに至ることもある [79]。細胞にはゲノムの安定性を維持するために複数の DNA 修復メカニズムが備わっている。主な DNA 損傷認識分子は ATM で [80]、それは DNA 損傷に応じて p53 と BRCA1 を含む多くのタンパク質をリン酸化するチェックポイントキナーゼだ (図 5-5)。DNA 修復が不完全だと、物質や分子にダメージを与える DNA への細胞過敏症が起こる [81]。DNA 修復経路の抑制は、発がん性の突然変異のあるところで生存に必要なメカニズムを阻止するようだ。DNA 修復に関わっている遺伝子の発現を調節することによってがん治療を進めるには、ヒストンの修飾と DNA のメチル化といったエピジェネティックメカニズムに注目しなければならないようだ [82]。p53 はストレスによって引き起こされた活性化を通して、細胞の遺伝子の完全性を守る標的遺伝子の発現を誘発する。p53 は抗がんにおいて重大な役割を果たしており、しばしば多数のがん組織で p53 遺伝子の突然変異が見られる。突然変異した p53 は、突然変異タイプによって、機能を喪失したか新たな機能を得たタンパク質として分類される [83]。野生型 p53 は標準的な生理学的条件の下で活性化しておらず、DNA に損傷を与える様々なストレスのタイプに応じて活性化する。p53 の活性化は既存の腫瘍性病変を後退させるかもしれないことから、がん予防において重要であるかもしれ

ない[84]。DNA 修復機能が十分機能していないと、p53 によってプログラム細胞死が誘発される [85]。このように、p53 は DNA 修復とアポトーシスにおける役割を通してゲノムの安定性の維持に重要な役割を果たしている。

BRCA1 も、がんの発生を抑制するがん抑制遺伝子だ。突然変異は細胞内においてゲノムの不安定性の増加と関連しており、ゲノムの不安定性は他の重要な遺伝子の突然変異率と関わっている。研究によって、DNA 損傷シグナリングや DNA 修復プロセスや細胞周期チェックポイントにおける BRCA1 の機能的な役割が確立された[86]。これらの機能的な役割と一貫して、BRCA1 が不足している細胞ではゲノムの不安定性と染色体の逸脱が多く見られる。BRCA1 cDNA がチンクフィンガーモチーフと推定上 2 つの核局在化信号を持つ 1863 アミノ酸タンパク質をコード化する。アミノ末端領域には E3 ユビキチンリガーゼ活性があり[87]、カルボキシルターミナルドメインは特定のリン酸化タンパク質に結合することに関与する[88]。BRCA1 は分子にダメージを与える DNA へ晒された後、過剰リン酸化する。また、BRCA1 の特定の機能はリン酸化によって調節されるようだ [89]。以上より、DNA 修復レベルはがんの斬新な治療様式となるかもしれない。生存かアポトーシスかは、DNA 損傷と DNA 修復レベルの間のバランスによって決定されるのだが、それががんの治療に大きく関わってくるかもしれない。

p53 は標準的な生理学的条件下で活性化しておらず、DNA 損傷を含む様々な細胞ストレスに応じて活性化する。p53 は低酸素や酸化性ストレスなどのようなストレスによって核内で誘発されたり、活性化されたりもする。加えて、p53 はストレスに応じて翻訳後修飾される[90]。p53 タンパク質は細胞増殖の調節に関する多くの情報伝達経路に関係しており、p53 の活性化を調節するのに関わっている多くのメカニズムが明らかにされた。それは特定の転写標的のために p53 の選択性を決定し、結果として p53 の活性化をコントロールする。p53 を活性化できる多くの分子が発見された。DNA 二重鎖の修復に 53BP1 が影響を与えることが判明した[91,92]。多くの p53 転写標的の間で、p21WAF1 は p53 に依存する経路とそうでない経路の両方において重要な役割を果たすことが知られている [93]。p21 WAF1 はサイクリンと CDK 複合体との相互作用を通して細胞周期の進行を抑制する。研究によって、すべてのヒトのがんの半分近くで p53 が突然変異を起こしたり欠損したりしていることが判明した。これは、p53 ががんを防ぐことにおいて重大な役割を果たすことを示唆している。腫瘍の進行中に、p53 はしばしば突然変異させられて正常な機能を損なう。突然変異によって得られた機能を含む細胞の調節物質によって引き起こされる p53 の活性化は、初期の腫瘍性病変を後退させるかもしれない。そのため、がん予防の研究において重要であるかもしれない。

がん抑制遺伝子 BRCA1 での突然変異は、乳がんと卵巣がんの進行するリスクを増加させる [94]。特に、BRCA1 遺伝性の乳がんは DNA 修復経路の欠陥を持つがんの一種だ。がん感受性遺伝子 BRCA1 の一つの対立遺伝子の突然変異はヒトの乳房上皮細胞における増ゲノムの不安定性の増加と関連しており[95]、それは他の重要な遺伝子の突然変異を促進する。BRCA1 のいくつかの機能が DNA 修復における役割を含む腫瘍抑制活動に関係しているのかもしれない。BRCA1 の遺伝子の突然変異は卵巣がんではほとんど見られないが、BRCA1 タンパク質の発現量はしばしば減少している。チェックポイントを活性化するために、BRCA1 は BRCA2、Rad50、Rad51 と共に重要な役割を果たす [96]。例えば、BRCA1 は Rad51 (バクテリアの RecA タンパク質と関係がある DNA リコンビナーゼ) と共に局地化される。標的分子にダメージを与えている DNA に曝露された後、BRCA1 タンパク質は過剰リン酸化されることから、BRCA1 の機能は DNA 損傷に応じて調節されているようだ。化学療法にダメージを与えている DNA と結合するとき、ポリ ADP リボースポリメラーゼの薬理的抑制は特定の DNA 修復経路で突然変異して腫瘍細胞の死を誘発する。化学療法や放射線治療によってダメージを受ける DNA を強化するべく、BRCA1 突然変異を

持っている患者の治療のためにポリ ADP リボースポリメラーゼ抑制剤が研究された [97,98]。細胞周期制御における BRCA1 の役割は、種々なサイクリンおよびサイクリン依存キナーゼと相互作用する能力があることが判明した。BRCA1 は CDK を抑制する p21 と p53 腫瘍抑制タンパク質を活性化させ、細胞周期チェックポイントをコントロールするいくつかの遺伝子を調節する。

PTEN 遺伝子はヒトのがんでしばしば突然変異して削除される、がん抑制遺伝子だ。ヒトゲノムにおける PTEN は、染色体 10q23.3 上で 9 つのエクソンから成る。これは 403 アミノ酸リーディングフレームを開くよう指定する 5.5kb の mRNA をコード化している [99,100]、初期の肺形成で偏在している。翻訳産物はテンシンとタンパク質チロシン脱リン酸化酵素に相同性のある 53kDa タンパク質だ。PTEN の活性化は、細胞の PIP3 レベルを増加させるいくつかのがんの発症に関係している [102]。PIP3 レベルによって活性化した PI3K/AKT シグナリングが、細胞生存のためにいくつかの遺伝子の発現を増やす。PTEN と p53 が転写やタンパク質レベルで相互作用し、互いを調節することが知られている (図 5-5)。これは生存と死を切り替えるための重要な制御機構だ。この相互干渉はしばしば互いに拮抗的な経路で起こる。そして、その経路にはしばしばもう一つのがん抑制遺伝子 MDM2 が含まれる。この相互干渉は、がんに関係する重要な遺伝子の表出に対する更なる調整に用いられるかもしれない。PTEN が p53 の安定性を調節し、それ自身の転写活動をも調節することも明らかとなった。PTEN と p53 の複合体は p53 DNA の結合と転写活動を強める [103]。p53 の重要な機能は、細胞周期停止に関与している重要なタンパク質・21waf1 の合成を増やすかもしれない感応性の高い遺伝子で特定の DNA に共通する配列に結合することによって、転写調節因子の役割を果たすことだ [104]。p53 の転写標的には PTEN もある。p53 が PIP3 の生産を間接的に抑制する方法の一つは、PTEN の発現を誘発することだ [105]。p53 と AKT は反対の方法でアポトーシスのプロセスに影響を及ぼす。AKT はリン酸化を通して Bad のようなプロ・アポトーシスタンパク質を抑制することによって、細胞を生存させる [106]。タンパク質翻訳後修飾と同様に遺伝子の転写にも関与している AKT と p53 も相互干渉している。p53 が間接的に PIP3 生産を抑制する方法の一つは、PI3K の触媒サブユニットを抑制することだ。PTEN の発現によって誘発された p53 の発現が、p53-PTEN 相互干渉を引き起こし、AKT 経路の細胞生存を抑制する。PTEN は標的遺伝子転写のために必要とされる p53 アセチル化の維持管理のためにも必要だ [107]。

G1/S や G2/M 移行のコントロールに関与している下流の因子に従って行動することによって、成長因子を活性化させる AKT シグナリングは細胞周期の進行を促進する。研究によって、AKT も DNA 損傷反応とゲノム安定性の調整に関与していることが明らかになった [108]。従って、AKT は複雑な方法で下流のシグナルに変更される。また、PTEN も AKT に依存しない方法で p53 経路とのその相互作用を通して、DNA 損傷修復と DNA 損傷反応に重大な役割を果たす [109]。さらに、核内 PTEN は p53 に依存する方法で腫瘍の発達を抑制する。核内 PTEN が酸化ダメージから細胞を保護し、発がんを調節する独特の役割を果たすことが示唆された [110]。PTEN の腫瘍抑制シグナリングは、p53 タンパク質の安定化を通して腫瘍を抑制することもある。PTEN は物理的に p53 と相互作用して、その現象を防ぐことが知られている。ミスセンス変異と相関関係のある PTEN の不安定化はタンパク質の相互作用を含むことが示された。ユビキチンによって調節されたプロテアソームの減少 (タンパク質レベルをコントロールする普通のメカニズム) によって、PTEN は調節されるかもしれない。

突然変異や削除といったゲノム上の変化によってがん抑制遺伝子が機能を失うと、細胞は他の遺伝的変化と共にがん化するかもしれない。がん細胞の表現型もまた、遺伝子発現を変化させるかもしれないエピジェネティックイベントから生ずるかもしれない。がん抑制遺伝子のエピジェネティックな沈黙は、確立された発がん性のプロセスにおいて修正可

能だ[111]。通常、特に重要なエピジェネティックな修正は、DNA のメチル化、ヒストンのアセチル化、脱アセチル化とヒストンのメチル化によって他と異なるようにマークされる[114]。異なる環境が異なる細胞の修正のパターンを引き起こす。エピジェネティックメカニズムと相互作用して、クロマチンの圧縮と転写調節因子へのアクセスしやすさを変更することによって、特定の段階で起こる一時的な栄養上の刺激、または生物物理学的や生化学的な刺激が、遺伝子発現に影響を与えるかもしれない[115]。実際、がん抑制遺伝子の mRNA とタンパク質の発現量は、薬やホルモンによる治療あるいは食事の後に増加する。例えば、ローズマリーからの抽出物は、K562 細胞（白血病の培養細胞）において、PTEN 発現を抑制する[116]。そのメカニズムを介して特定のがんを予防することが可能であるかもしれないことから、ローズマリーの抽出物の効果は DNA 修復において注目された。がん細胞のゲノムは不完全な DNA の修復の結果発生する。がん細胞に対する理解が、生物の細胞内経路を標的とすることを可能にした。いくつかの研究から、がんの治療における DNA 修復酵素抑制剤の役割が評価された [117,118]。今後、DNA にダメージを与える物質と DNA 修復分子の組み合わせが抗がん効果を持っているかどうか、研究されるべきである。

図 5-5

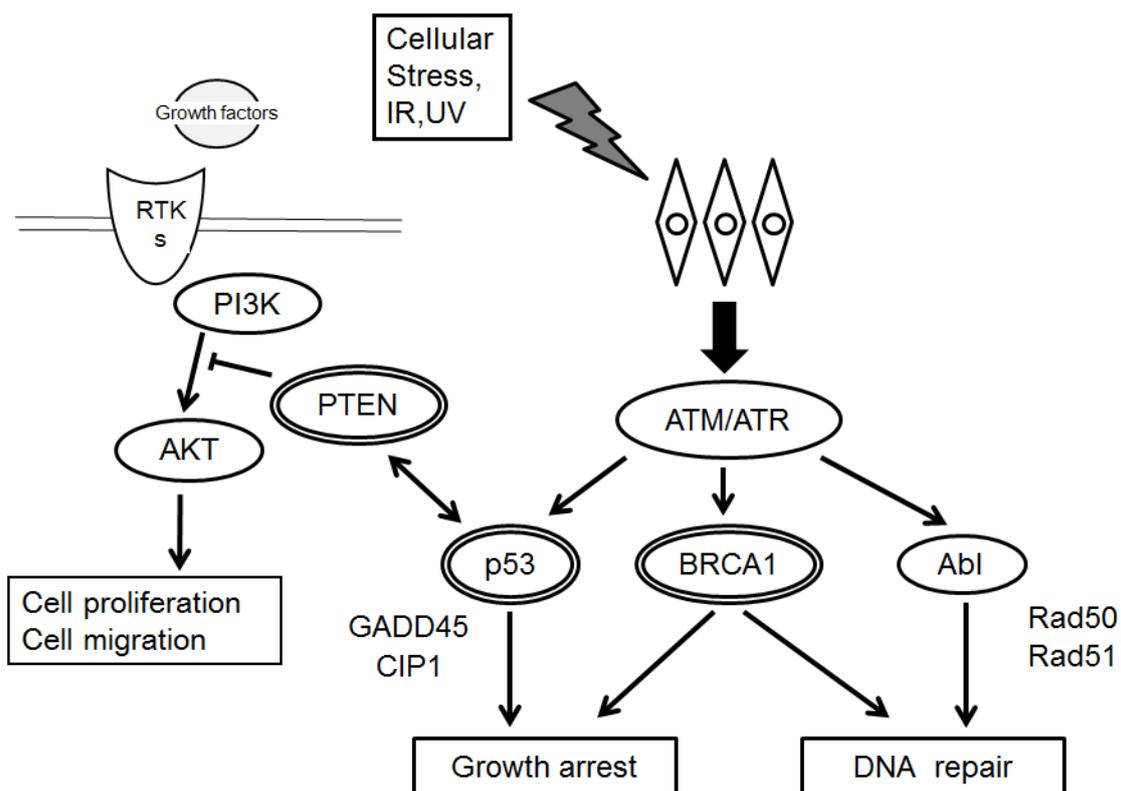


図 5-5

細胞増殖における DNA 修復と細胞周期系の情報伝達経路。

図 5-6

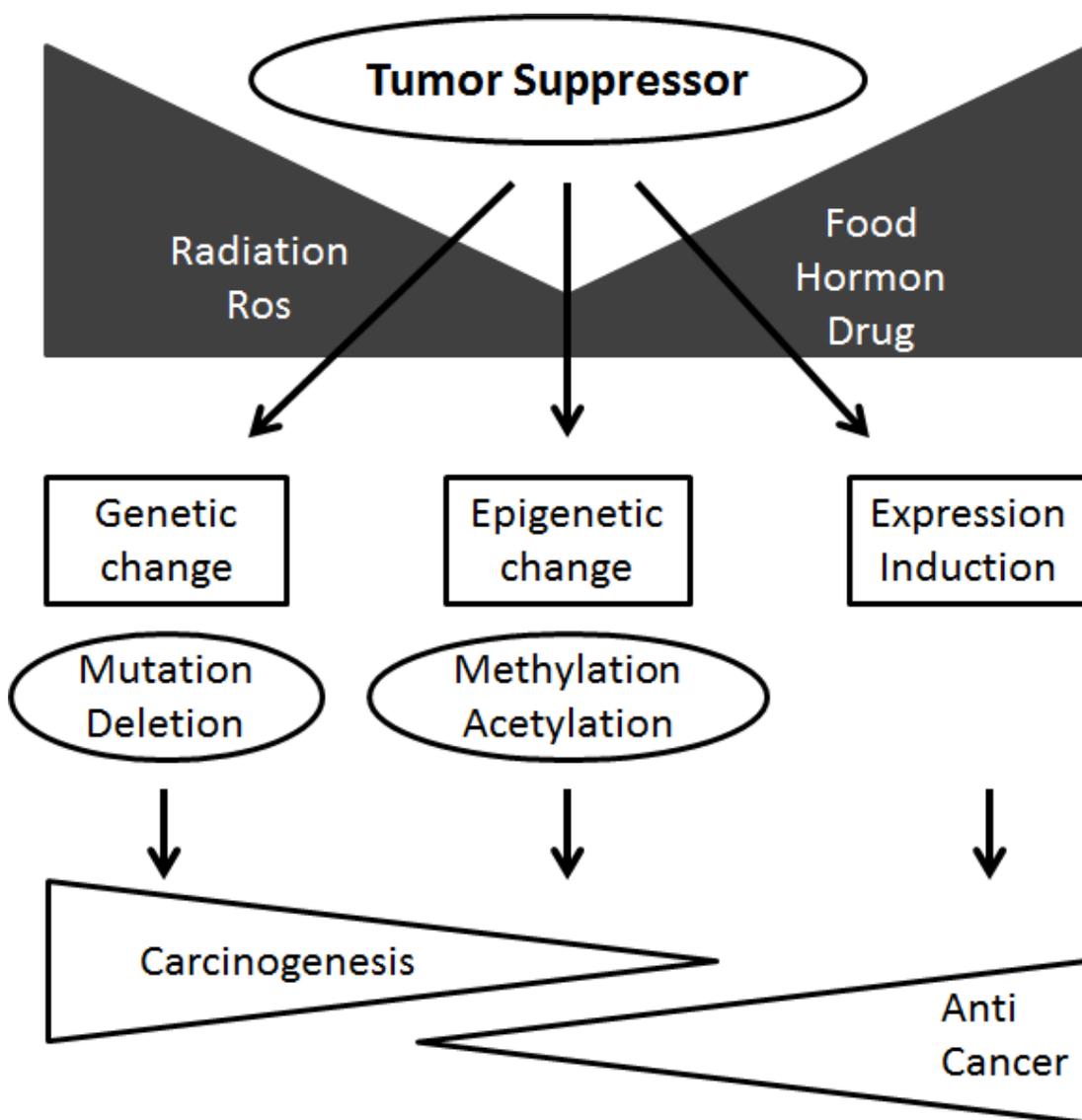


図 5-6

がん細胞におけるがん抑制遺伝子発現調整は DNA 修復活動を変化させるかもしれない。元抑制遺伝子の発現は遺伝的に、あるいはエピジェネティックに、あるいは転写の変化によって調節される。DNA 修復系の発現低下はゲノムの不安定に寄与する。

## 5 章の参考文献

- [1] Happé, H.; de Heer, E.; Peters, D.J. Polycystic kidney disease: the complexity of planar cell polarity and signaling during tissue regeneration and cyst formation. *Biochim Biophys Acta*. 2011, 1812, 1249-1255.
- [2] Santiago-Tirado, F.H.; Bretscher, A. Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol*. 2011, 21, 515-525.
- [3] Baum, B.; Georgiou, M. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol*. 2011, 192, 907-917.
- [4] Wu, G.; Ge, J.; Huang, X.; Hua, Y.; Mu, D. Planar cell polarity signaling pathway in congenital heart diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2011, 2011, 589414.
- [5] Traub, L.M. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009, 10, 583-596.
- [6] Martin-Belmonte, F.; Perez-Moreno, M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011, 12, 23-38.
- [7] Layton, A.; Savage, N.S.; Howell, A.S.; Carroll, S.Y.; Drubin, D.G.; Lew, D.J. Modeling vesicle traffic reveals unexpected consequences for Cdc42p-mediated polarity establishment. *Curr Biol*. 2011, 21, 184-94.
- [8] Golachowska, M.R.; Hoekstra, D.; van IJzendoorn, S.C. Recycling endosomes in apical plasma membrane domain formation and epithelial cell polarity. *Trends Cell Biol*. 2010, 20, 618-626.
- [9] Tóth, D.J.; Tóth, J.T.; Gulyás, G.; Balla, A.; Balla, T.; Hunyady, L.; Várnai, P. Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *J Cell Sci*. 2012, 125(Pt 9), 2185-97.
- [10] Horgan, C.P.; McCaffrey, M.W. Endosomal trafficking in animal cytokinesis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012, 4, 547-55.
- [11] Callebaut, I.; de Gunzburg, J.; Goud, B.; Mornon, J.P. RUN domains: a new family of domains involved in Ras-like GTPase signaling. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26, 79-83.
- [12] MacDonald, J.I.; Kubu, C.J.; Meakin, S.O. Nesca, a novel adapter, translocates to the nuclear envelope and regulates neurotrophin-induced neurite outgrowth. *Cell Biol*. 2004, 164, 851-862.
- [13] Yoshida, H.; Kitagishi, Y.; Okumura, N.; Murakami, M.; Nishimura, Y.; Matsuda, S. How do you RUN on? *FEBS Lett*. 2011, 585, 1707-1710.
- [14] Kukimoto-Niino, M.; Takagi, T.; Akasaka, R.; Murayama, K.; Uchikubo-Kamo, T.; Terada, T.; Inoue, M.; Watanabe, S.; Tanaka, A.; Hayashizaki, Y.; Kigawa, T.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S. Crystal structure of the RUN domain of the RAP2-interacting protein x. *J Biol Chem*. 2006, 281, 31843-31853.
- [15] Sun, Q.; Han, C.; Liu, L.; Wang, Y.; Deng, H.; Bai, L.; Jiang, T. Crystal structure and functional implication of the RUN domain of human NESCA. *Protein Cell*. 2012, 3, 609-617.
- [16] Pankiv, S.; Alemu, E.A.; Brech, A.; Bruun, J.A.; Lamark, T.; Overvatn, A.; Bjørkøy, G.; Johansen, T. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol*. 2010, 188, 253-269.
- [17] Sakamoto, R.; Byrd, D.T.; Brown, H.M.; Hisamoto, N.; Matsumoto, K.; Jin, Y. The *Caenorhabditis elegans* UNC-14 RUN domain protein binds to the kinesin-1 and UNC-16 complex and regulates synaptic vesicle localization. *Mol Biol Cell*. 2005, 16, 483-96.
- [18] Ogura, K.; Goshima, Y. The autophagy-related kinase UNC-51 and its binding partner UNC-14 regulate the subcellular localization of the Netrin receptor UNC-5 in *Caenorhabditis elegans*. *Development*. 2006, 133, 3441-3450.
- [19] Yang, J.; Kim, O.; Wu, J.; Qiu, Y. Interaction between tyrosine kinase Etk and a RUN domain-

- and FYVE domain-containing protein RUFY1. A possible role of ETK in regulation of vesicle trafficking. *J Biol Chem.* 2002, 277, 30219-30226.
- [20] Larance, M.; Ramm, G.; Stöckli, J.; van Dam, E.M.; Winata, S.; Wasinger, V.; Simpson, F.; Graham, M.; Junutula, J.R.; Guilhaus, M.; James, D.E. Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *J Biol Chem.* 2005, 280, 37803-37813.
- [21] Fouraux MA.; Deneka M.; Ivan V.; van der Heijden A.; Raymackers J.; van Suylekom D.; van Venrooij WJ.; van der Sluijs P.; Pruijn GJ. Rabip4' is an effector of rab5 and rab4 and regulates transport through early endosomes. *Mol Biol Cell.* 2004, 15, 611-624.
- [22] Simonsen A.; Wurmser AE.; Emr SD.; Stenmark H. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.* 2001, 13, 485-492.
- [23] Mari M.; Macia E.; Le Marchand-Brustel Y.; Cormont M. Role of the FYVE finger and the RUN domain for the subcellular localization of Rabip4. *J Biol Chem.* 2001, 276, 42501-42508.
- [24] Yamamoto, H.; Koga, H.; Katoh, Y.; Takahashi, S.; Nakayama, K.; Shin, H.W. Functional cross-talk between Rab14 and Rab4 through a dual effector, RUFY1/Rabip4. *Mol Biol Cell.* 2010, 21, 2746-2755.
- [25] Mari M.; Monzo P.; Kaddai V.; Keslair F.; Gonzalez T.; Le Marchand-Brustel Y.; Cormont M. The Rab4 effector Rabip4 plays a role in the endocytotic trafficking of Glut 4 in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Sci.* 2006, 119, 1297-1306.
- [26] Cormont, M.; Mari, M.; Galmiche, A.; Hofman, P.; Le, Marchand-Brustel, Y. A FYVE-finger-containing protein, Rabip4, is a Rab4 effector involved in early endosomal traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, 98, 1637-1642.
- [27] 22. Barbe, L.; Lundberg, E.; Oksvold, P.; Stenius, A.; Lewin, E.; Björling, E.; Asplund, A.; Pontén, F.; Brismar, H.; Uhlén, M.; Andersson-Svahn, H. Toward a confocal subcellular atlas of the human proteome. *Mol Cell Proteomics.* 2008, 7, 499-508.
- [28] Fukuda M.; Kobayashi H.; Ishibashi K.; Ohbayashi N. Genome-wide investigation of the Rab binding activity of RUN domains: development of a novel tool that specifically traps GTP-Rab35. *Cell Struct Funct.* 2011, 36, 155-170.
- [29] Mori, T.; Wada, T.; Suzuki, T.; Kubota, Y.; Inagaki, N. Singar1, a novel RUN domain-containing protein, suppresses formation of surplus axons for neuronal polarity. *J Biol Chem.* 2007, 282, 19884-19893.
- [30] Yoshida, H.; Okumura, N.; Kitagishi, Y.; Shirafuji, N.; Matsuda, S. Rab5(Q79L) interacts with the carboxyl terminus of RUFY3. *Int J Biol Sci.* 2010, 6, 187-189.
- [31] Hammad, S.M.; Twal, W.O.; Barth, J.L.; Smith, K.J.; Saad, A.F.; Virella, G.; Argraves, W.S.; Lopes-Virella, M.F. Oxidized LDL immune complexes and oxidized LDL differentially affect the expression of genes involved with inflammation and survival in human U937 monocytic cells. *Atherosclerosis.* 2009, 202, 394-404.
- [32] Kimura, K.; Wakamatsu, A.; Suzuki, Y.; Ota, T.; Nishikawa, T.; Yamashita, R.; Yamamoto, J.; Sekine, M.; Tsuritani, K.; Wakaguri, H.; Ishii, S.; Sugiyama, T.; Saito, K.; Isono, Y.; Irie, R.; Kushida, N.; Yoneyama, T.; Otsuka, R.; Kanda, K.; Yokoi, T.; Kondo, H.; Wagatsuma, M.; Murakawa, K.; Ishida, S.; Ishibashi, T.; Takahashi-Fujii, A.; Tanase, T.; Nagai, K.; Kikuchi, H.; Nakai, K.; Isogai, T.; Sugano, S. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res.* 2006, 16, 55-65.
- [33] Pfeffer, S.R. Multiple routes of protein transport from endosomes to the trans Golgi network. *FEBS Lett.* 2009, 583, 3811-3816.

- [34] González-Gaitán, M. Endocytic trafficking during *Drosophila* development. *Mech Dev.* 2003, 120, 1265-1282.
- [35] Bakhru SH.; Altiok E.; Highley C.; Delubac D.; Suhan J.; Hitchens TK.; Ho C, Zappe S. Enhanced cellular uptake and long-term retention of chitosan-modified iron-oxide nanoparticles for MRI-based cell tracking. *Int J Nanomedicine.* 2012, 7, 4613-4623.
- [36] Monck, J.R.; Fernandez, J.M. The exocytotic fusion pore and neurotransmitter release. *Neuron.* 1994, 12, 707-716.
- [37] Zaid, H.; Antonescu, C.N.; Randhawa, V.K.; Klip, A. Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. *Biochem J.* 2008, 413, 201-215
- [38] Saxena SK.; Kaur S. Regulation of epithelial ion channels by Rab GTPases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006, 351, 582-587.
- [39] Kanamarlapudi V. Centaurin- $\alpha$ 1 and KIF13B kinesin motor protein interaction in ARF6 signalling. *Biochem Soc Trans.* 2005, 33, 1279-1281.
- [40] Saito, K.; Tautz, L.; Mustelin, T. The lipid-binding SEC14 domain. *Biochim Biophys Acta.* 2007, 1771, 719-726.
- [41] Stenmark, H.; Gillooly, D.J. Intracellular trafficking and turnover of phosphatidylinositol 3-phosphate. *Semin Cell Dev Biol.* 2001, 12, 193-199.
- [42] Shisheva, A. Phosphoinositides in insulin action on GLUT4 dynamics: not just PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008, 295, E536-E544.
- [43] Lundquist E.A. Small GTPases. *WormBook.* 2006, 17, 1-18.
- [44] Yang, H.; Sasaki, T.; Minoshima, S.; Shimizu, N. Identification of three novel proteins (SGSM1, 2, 3) which modulate small G protein (RAP and RAB)-mediated signaling pathway. *Genomics.* 2007, 90, 249-260.
- [45] Grosshans, B.L.; Ortiz, D.; Novick, P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103, 11821-11827.
- [46] Mohrmann, K.; van der Sluijs, P. Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases. *Mol Membr Biol.* 1999, 16, 81-87.
- [47] Jones, M.C.; Caswell, P.T.; Norman, J.C. Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2006, 18, 549-557.
- [48] Nachury, M.V.; Seeley, E.S.; Jin, H. Trafficking to the ciliary membrane: how to get across the periciliary diffusion barrier? *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010, 26, 59-87.
- [49] Foster, L.J.; Klip, A. Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000, 279, C877-C890.
- [50] Cavalli, V.; Corti, M.; Gruenberg, J. Endocytosis and signaling cascades: a close encounter. *FEBS Lett.* 2001, 498, 190-196.
- [51] Hayakawa, A.; Hayes, S.; Leonard, D.; Lambright, D.; Corvera, S. Evolutionarily conserved structural and functional roles of the FYVE domain. *Biochem Soc Symp.* 2007, 74, 95-105.
- [52] Wang, T.; Ming, Z.; Xiaochun, W.; Hong, W. Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. *Cell Signal.* 2011, 23, 516-521.
- [53] Recacha, R.; Boulet, A.; Jollivet, F.; Monier, S.; Houdusse, A.; Goud, B.; Khan, A.R. Structural basis for recruitment of Rab6-interacting protein 1 to Golgi via a RUN domain. *Structure.* 2009, 17, 21-30.
- [54] Dugani, C.B.; Klip, A. Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep.* 2005, 6, 1137-1142.
- [55] Chibalina, M.V.; Roberts, R.C.; Arden, S.D.; Kendrick-Jones, J.; Buss, F. Rab8-optineurin-myosin VI: analysis of interactions and functions in the secretory pathway.

- Methods Enzymol. 2008, 438, 11-24.
- [56] Chia, P.Z.; Gasnereau, I.; Lieu, Z.Z.; Gleeson, P.A. Rab9-dependent retrograde transport and endosomal sorting of the endopeptidase furin. *J Cell Sci.* 2011, 124, 2401-2413.
- [57] Bruce, E.A.; Digard, P.; Stuart, A.D. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation. *J Virol.* 2010, 84, 5848-5859.
- [58] Kuroda, T.S.; Itoh, T.; Fukuda, M. Functional analysis of slac2-a/melanophilin as a linker protein between Rab27A and myosin Va in melanosome transport. *Methods Enzymol.* 2005, 403, 419-431.
- [59] Westbroek, W.; Lambert, J.; De, Schepper, S.; Kleta, R.; Van, Den, Bossche, K.; Seabra, M.C.; Huizing, M.; Mommaas, M.; Naeyaert, J.M. Rab27b is up-regulated in human Griscelli syndrome type II melanocytes and linked to the actin cytoskeleton via exon F-Myosin Va transcripts. *Pigment Cell Res.* 2004, 17, 498-505.
- [60] Chua, C.E.; Lim, Y.S.; Tang, B.L. Rab35--a vesicular traffic-regulating small GTPase with actin modulating roles. *FEBS Lett.* 2010, 584, 1-6.
- [61] Xu, J.; Shi, S.; Matsumoto, N.; Noda, M.; Kitayama, H. Identification of Rgl3 as a potential binding partner for Rap-family small G-proteins and profilin II. *Cell Signal.* 2007, 19, 1575-1582.
- [62] Kinashi, T.; Katagiri, K. Regulation of lymphocyte adhesion and migration by the small GTPase Rap1 and its effector molecule, RAPL. *Immunol Lett.* 2004, 93, 1-5.
- [63] Kardassis, D.; Murphy, C.; Fotsis, T.; Moustakas, A.; Stournaras, C. Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases. *FEBS J.* 2009, 276, 2947-2965.
- [64] Fernandes H.; Franklin E.; Jollivet F.; Bliedtner K.; Khan AR. Mapping the interactions between a RUN domain from DENND5/Rab6IP1 and sorting nexin 1. *PLoS One.* 2012, 7, e35637.
- [65] Wassmer T.; Attar N.; Harterink M.; van Weering JR.; Traer CJ.; Oakley J.; Goud B.; Stephens DJ.; Verkade P.; Korswagen HC.; Cullen PJ. The retromer coat complex coordinates endosomal sorting and dynein-mediated transport, with carrier recognition by the trans-Golgi network. *Dev Cell.* 2009, 17, 110-122.
- [66] Cullen PJ.; Korswagen HC. Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nat Cell Biol.* 2011, 14, 29-37.
- [67] Fehrenbacher, K.; Huckaba, T.; Yang, H.C.; Boldogh, I.; Pon, L. Actin comet tails, endosomes and endosymbionts. *J Exp Biol.* 2003, 206, 1977-1984.
- [68] Strick, D.J.; Elferink, L.A. Rab15 effector protein: a novel protein for receptor recycling from the endocytic recycling compartment. *Mol Biol Cell.* 2005, 16, 5699-5709.
- [69] Maher-Laporte, M.; Berthiaume, F.; Moreau, M.; Julien, L.A.; Lapointe, G.; Mourez, M.; DesGroseillers, L. Molecular composition of staufen2-containing ribonucleoproteins in embryonic rat brain. *PLoS One.* 2010, 5, e11350.
- [70] Frame FM, Maitland NJ (2011) Cancer stem cells, models of study and implications of therapy resistance mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 720: 105-118.
- [71] Athar M, Elmets CA, Kopelovich L (2011) Pharmacological activation of p53 in cancer cells. *Curr Pharm Des.* 17: 631-639.
- [72] Li ZY, Yang Y, Ming M, and Liu B (2011) Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 414: 5-8.
- [73] Bykov VJ, Lambert JM, Hainaut P, Wiman KG (2009) Mutant p53 rescue and modulation of p53 redox state. *Cell Cycle.* 8: 2509-2517.

- [74] Liu B, Chen Y, St Clair DK (2008) ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med.* 44: 1529-1535.
- [75] Asai T, Liu Y, Bae N, and Nimer SD (2011) The p53 tumor suppressor protein regulates hematopoietic stem cell fate. *J Cell Physiol.* 226: 2215-2221.
- [76] Gostissa M, Alt FW, Chiarle R (2011) Mechanisms that promote and suppress chromosomal translocations in lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 29: 319-350.
- [77] Al-Ejeh F, Kumar R, Wiegman A, Lakhani SR, Brown MP, Khanna KK (2010) Harnessing the complexity of DNA-damage response pathways to improve cancer treatment outcomes. *Oncogene.* 29: 6085-6098.
- [78] Krystof V, Uldrijan S (2010) Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Curr Drug Targets.* 11: 291-302.
- [79] Kelly GL and Strasser A (2011) The essential role of evasion from cell death in cancer. *Adv Cancer Res.* 111: 39-96.
- [80] Bhatti S, Kozlov S, Farooqi AA, Naqi A, Lavin M, and Khanna KK (2011) ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. *Cell Mol Life Sci.* 68: 2977-3006.
- [81] Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Nishimura Y, Iseki S, and Matsuda S (2012) Against Lung Cancer Cells: To Be, or Not to Be, That Is the Problem. *Lung Cancer Int* doi:10.1155/2012/659365, in press.
- [82] Gigeck CO, Chen ES, Calcagno DQ, Wisniewski F, Burbano RR, and Smith MA (2012) Epigenetic mechanisms in gastric cancer,” *Epigenomics.* 4: 279-294.
- [83] Martinez-Rivera M and Siddik ZH (2012) Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type p53. *Biochem Pharmacol.* 83: 1049-1062.
- [84] Stegh AH (2012) Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - the promises, challenges and perils. *Expert Opin Ther Targets.* 16: 67-83.
- [85] Zawacka-Pankau J, Krachulec J, Grulkowski I, Bielawski KP, and Selivanova G (2008) The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: recent advances. *Toxicol Appl Pharmacol.* 232: 487-497.
- [86] Roy R, Chun J, and Powell SN (2011) BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer.* 12: 68-78.
- [87] Ohta T, Sato K, and Wu W (2011) The BRCA1 ubiquitin ligase and homologous recombination repair. *FEBS Lett.* 585: 2836-2844.
- [88] Leung CC and Glover JN (2011) BRCT domains: easy as one, two, three. *Cell Cycle.* 10: 2461-2470.
- [89] Ouchi T (2006) BRCA1 phosphorylation: biological consequences. *Cancer Biol Ther.* 5: 470-475.
- [90] Kim DH, Kundu JK, Surh YJ (2011) Redox modulation of p53: mechanisms and functional significance. *Mol Carcinog.* 50: 222-234.
- [91] Aly A, Ganesan S (2011) BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J Mol Cell Biol.* 3: 66-74.
- [92] Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Takata M, Tauchi H (2008) Current topics in DNA double-strand break repair. *J Radiat Res.* 49: 93-103.
- [93] Lo PK, Lee JS, Sukumar S (2012) The p53-p21WAF1 checkpoint pathway plays a protective role in preventing DNA rereplication induced by abrogation of FOXF1 function. *Cell Signal.* 24: 316-324.
- [94] Chionh F, Mitchell G, Lindeman GJ, Friedlander M, Scott CL (2011) The role of poly adenosine diphosphate ribose polymerase inhibitors in breast and ovarian cancer: current status and future

- directions. *Asia Pac J Clin Oncol*. 7: 197-211.
- [95] Konishi H, Mohseni M, Tamaki A, Garay JP, Croessmann S, Karnan S, Ota A, Wong HY, Konishi Y, Karakas B, Tahir K, Abukhdeir AM, Gustin JP, Cidado J, Wang GM, Cosgrove D, Cochran R, Jelovac D, Higgins MJ, Arena S, Hawkins L, Luring J, Gross AL, Heaphy CM, Hosokawa Y, Gabrielson E, Meeker AK, Visvanathan K, Argani P, Bachman KE, Park BH (2011) Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108: 17773-17778.
- [96] Rebbeck TR, Mitra N, Domchek SM, Wan F, Chuai S, Friebel TM, Panossian S, Spurdle A, Chenevix-Trench G; kConFab, Singer CF, Pfeiler G, Neuhausen SL, Lynch HT, Garber JE, Weitzel JN, Isaacs C, Couch F, Narod SA, Rubinstein WS, Tomlinson GE, Ganz PA, Olopade OL, Tung N, Blum JL, Greenberg R, Nathanson KL, Daly MB (2009) Modification of ovarian cancer risk by BRCA1/2-interacting genes in a multicenter cohort of BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Res*. 69: 5801-5810.
- [97] Orlando L, Schiavone P, Fedele P, Calvani N, Nacci A, Cinefra M, D'Amico M, Mazzoni E, Marino A, Sponziello F, Morelli F, Lombardi L, Silvestris N, Cinieri S (2012) Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP): rationale, preclinical and clinical evidences of its inhibition as breast cancer treatment. *Expert Opin Ther Targets*. 16: S83-S89.
- [98] Banerjee S, Kaye S (2011) PARP inhibitors in BRCA gene-mutated ovarian cancer and beyond. *Curr Oncol Rep*. 13: 442-449.
- [99] Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Murakami M, Nishimura Y, and Matsuda S (2012) PI3K/AKT/PTEN Signaling as a Molecular Target in Leukemia Angiogenesis. *Adv Hematol*. 2012: 843085.
- [100] Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Nishimura Y, and Matsuda S (2011) Alternative splicings on p53, BRCA1 and PTEN genes involved in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 413: 395-399.
- [101] Croushore JA, Blasiolo B, Riddle RC et al. (2005) Ptena and ptenb genes play distinct roles in zebrafish embryogenesis. *Dev Dyn*. 234: 911-921.
- [102] Barbieri SS, Ruggiero L, Tremoli E, and Weksler BB (2008) Suppressing PTEN activity by tobacco smoke plus interleukin-1beta modulates dissociation of VE-cadherin/beta-catenin complexes in endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28: 732-738.
- [103] Freeman DJ, Li AG, Wei G et al. (2003) PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*. 3: 117-130.
- [104] Lo PK, Lee JS, and Sukumar S (2012) The p53-p21WAF1 checkpoint pathway plays a protective role in preventing DNA rereplication induced by abrogation of FOXF1 function. *Cell Signal*. 24: 316-324.
- [105] Puszyński K, Hat B, and Lipniacki T (2008) Oscillations and bistability in the stochastic model of p53 regulation. *J Theor Biol*. 254: 452-465.
- [106] Sen P, Mukherjee S, Ray D, and Raha S (2003) Involvement of the Akt/PKB signaling pathway with disease processes. *Mol Cell Biochem*. 253: 241-246.
- [107] Li AG, Piluso LG, Cai X, Wei G, Sellers WR, and Liu X (2006) Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN. *Mol Cell*. 23: 575-587.
- [108] Quevedo C, Kaplan DR, and Derry WB (2007) AKT-1 regulates DNA-damage-induced germline apoptosis in *C. elegans*. *Curr Biol*. 17: 286-292.
- [109] Ming M, and He YY (2012) PTEN in DNA damage repair. *Cancer Lett*. 319: 125-129.
- [110] Bonavida B, and Baritaki S (2011) The novel role of Yin Yang 1 in the regulation of

- epithelial to mesenchymal transition in cancer via the dysregulated NF- $\kappa$ B/Snail/YY1/RKIP/PTEN Circuitry. *Crit Rev Oncog*. 16: 211-226.
- [111] Ren J, Singh BN, Huang Q et al. (2011) DNA hypermethylation as a chemotherapy target. *Cell Signal*. 23: 1082-1093.
- [112] Ribarska T, Bastian KM, Koch A, and Schulz WA (2012) Specific changes in the expression of imprinted genes in prostate cancer--implications for cancer progression and epigenetic regulation. *Asian J Androl*. 14: 436-450.
- [113] Abramowitz LK and Bartolomei MS (2012) Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. *Curr Opin Genet Dev*. 22: 72-78.
- [114] Issa JP (2010) Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*. 24: 317-330.
- [115] Martino DJ and Prescott SL (2010) Silent mysteries: epigenetic paradigms could hold the key to conquering the epidemic of allergy and immune disease. *Allergy*. 65: 7-15.
- [116] Yoshida H, Okumura N, Kitagishi Y, Nishimura Y, and Matsuda S (2011) Ethanol extract of Rosemary repressed PTEN expression in K562 culture cells. *Int J appl Boil pharm Technol*. 2: 316-322.

## 謝辞

本研究にあたり、指導教官である松田覚教授には貴重なご助言とご指導を賜りました。また、実験を進める上で、理学部の小林真弓さんと和田葉子さんからは多大なご助力をいただきました。植野洋志教授、小倉裕範教授との対話も、研究を進めていく上で重要な示唆を与えてくれました。あらゆる面でサポートしてくれた家族にも、深く感謝しています。最後になりましたが、本研究に際してお世話になったすべての方に厚く御礼申し上げます。有難うございました。

## 発表論文

## 本学位論文に関連する査読付き公表済論文

### 1 章

1. Protection against Cancer with Medicinal Herbs via Activation of Tumor Suppressor. **Kitagishi Y**, Kobayashi M, Matsuda S. **J Oncol**. 2012;2012:236530. doi: 10.1155/2012/236530.
2. Peroxisome proliferator-activated receptor and vitamin d receptor signaling pathways in cancer cells. Matsuda S, **Kitagishi Y**. **Cancers**. 2013 Oct 21;5(4):1261-70. doi: 10.3390/cancers5041261.

### 2 章

3. Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cancer and aging. **Kitagishi Y**, Matsuda S. **Int J Mol Med**. 2013 Mar;31(3):511-5. doi: 10.3892/ijmm.2013.1235.
4. Defective DNA repair systems and the development of breast and prostate cancer. **Kitagishi Y**, Kobayashi M, Matsuda S. **Int J Oncol**. 2013 Jan;42(1):29-34. doi: 10.3892/ijo.2012.1696.

### 3 章

5. Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Matsuda S, Kobayashi M, **Kitagishi Y**. **ISRN Endocrinol**. 2013;2013:472432. doi: 10.1155/2013/472432.

### 4 章

6. Diets involved in PPAR and PI3K/AKT/PTEN pathway may contribute to neuroprotection in a traumatic brain injury. **Kitagishi Y**, Matsuda S. **Alzheimers Res Ther**. 2013 Sep 26;5(5):42.

### 5 章

7. RUFY, Rab and Rap Family Proteins Involved in a Regulation of Cell Polarity and Membrane Trafficking. **Kitagishi Y**, Matsuda S. **Int J Mol Sci**. 2013 Mar 21;14(3):6487-98. doi: 10.3390/ijms14036487.

## その他のこれまでに公表した査読付き論文

1. Function and characteristics of PINK1 in mitochondria. Matsuda S, **Kitagishi Y**, Kobayashi M. **Oxid Med Cell Longev**. 2013;2013:601587. doi: 10.1155/2013/601587.
2. Expression and Function of PPARs in Placenta. Matsuda S, Kobayashi M, **Kitagishi Y**. **PPAR Res**. 2013;2013:256508. doi: 10.1155/2013/256508.
3. Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses. **Kitagishi Y**, Kobayashi M, Kikuta K, Matsuda S. **Depress Res Treat**. 2012;2012:752563. doi: 10.1155/2012/752563.
4. Long-term cultivation of in vitro Apis mellifera cells by gene transfer of human c-myc proto-oncogene. **Kitagishi Y**, Takahashi J, Matsuda S. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**. 2011 Aug;47(7):451-3. doi: 10.1007/s11626-011-9431-6.
5. Peppermint up-regulated JMJD1B protein expression in Daudi culture cells. **Kitagishi Y**, Nishimura Y, Okumura N, Matsuda S. **Int. J. Curr. Res**. 3: 365-368, 2011.