

学位論文題名

ROLE OF LYCOPENE AND β -CAROTENE IN
OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS DUE TO
CATECHOL ESTROGENS AND PEROXYNITRITE

(catechol estrogens および peroxynitrite がひき起こす
酸化ストレスに対するリコピンおよび β カロチンの作用)

学位論文内容の要旨

活性酸素種および活性窒素種は慢性炎症、癌、血管および神経性疾患など、さまざまな疾病をひき起こすことが報告されている。Superoxide は 4 位水酸化 estradiol などの catechol estrogen の代謝過程においても生成され、また、superoxide および nitric oxide から生成される peroxynitrite は estrogen との共存によって発癌を亢進させる可能性が指摘されている。しかしながら、estrogen がひき起こす癌を亢進させる nitric oxide の作用は不明な点が多い。そこで、本研究では catechol estrogen による DNA 傷害や変異原性に peroxynitrite がどのように関与するのか、その過程を明らかにすることを目的として本研究を行った。

また、近年、活性酸素種や活性窒素種に対する防御能を有するとして、機能性食品が注目を集めている。そこで、機能性成分であるカロテノイド、リコピンや β カロチンについて、その抗発癌作用や変異原作用の機構を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、前立腺癌由来 LNCaP 細胞を用いた研究を行った。dihydrorhodamine (DHR) は H_2O_2 や peroxynitrite によって蛍光を発する。catechol estrogen に LNCaP 細胞を曝露すると蛍光レベルが上昇するが、nitric oxide 単独では DHR の蛍光強度に変化は見られなかった。しかし、catechol estrogen と nitric oxide の共存下では、DHR 蛍光は相加的な上昇を示した。また、DHR 蛍光は peroxynitrite のスカベンジャーである uric acid によって顕著な阻害を受けた。一方、SOD (superoxide dismutase) や catalase 存在下では DHR 蛍光の弱い抑制が見られ、catechol estrogen と nitric oxide 曝露によって発生するメインの活性分子が peroxynitrite であることがわかった。また、LNCaP 細胞を nitric oxide のドナーである NOC5 と 4 位水酸化 estradiol に曝露することによって、有意に DNA ダメージが増加することがコメットアッセイによって明らかとなった。

第 2 章では、4 位水酸化 estradiol と nitric oxide を共曝露することで、単独曝露よ

りも DNA 傷害が促進されること、リコピンや β カロチンが、4 位水酸化 estradiol と nitric oxide が引き起こした DNA ダメージや変異原性を抑制することを plasmid DNA を用いた in vitro 実験系や V79 細胞 (チャイニーズハムスター線維芽細胞) を用いたコメットアッセイによって明らかにした。

第 3 章では、V79 細胞を用いたヒポキサンチンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ (HRPT) 試験から、リコピンや β カロチンが peroxynitrite による変異原性を抑制することを示した。また nitric oxide ドナーである SIN-1 を曝露した V79 細胞において、これらのカロテノイドは、チロシン残基のニトロ化による nitrotyrosine の生成を抑制することも抗体を用いた免疫染色からわかった。

以上の結果から、本研究では、in vitro、細胞 in vivo の両試験系において、catechol estrogen と nitric oxide によって peroxynitrite が生成され、DNA を傷害することを明らかにした。また、活性窒素種による DNA 傷害や蛋白のニトロ化を、機能性成分カロテノイドであるリコピンや β カロチンが抑制することを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査 教授 藤田正一
副査 教授 桑原幹典
副査 助教授 稲波 修
副査 助教授 石塚 真由美

学位論文題名

ROLE OF LYCOPENE AND β -CAROTENE IN OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS DUE TO CATECHOL ESTROGENS AND PEROXYNITRITE

(catechol estrogens および peroxynitrite がひき起こす
酸化ストレスに対するリコピンおよび β カロチンの作用)

活性酸素種および活性窒素種は慢性炎症、癌、血管および神経性疾患など、さまざまな疾病をひき起こすことが報告されている。Superoxide は 4 位水酸化 estradiol などの catechol estrogen の代謝過程においても生成され、また、superoxide および nitric oxide から生成される peroxynitrite は estrogen との共存によって発癌を亢進させる可能性が指摘されている。しかしながら、estrogen がひき起こす癌を亢進させる nitric oxide の作用は不明な点が多い。そこで、カンボウエイ・マヨブ・ムザンデュ氏は、catechol estrogen による DNA 損傷や変異原性に peroxynitrite がどのように関与するのか、その過程を明らかにすることを目的として本研究を行った。

また、近年、活性酸素種や活性窒素種に対する防御能を有するとして、機能性食品が注目を集めている。そこで、機能性成分であるカロテノイド、リコピンや β カロチンについて、その抗発癌作用や変異原作用の機構を明らかにすることを目的とした。

第1章では、前立腺癌由来 LNCaP 細胞を用いた研究を行った。dihydrorhodamine (DHR) は H_2O_2 や peroxynitrite によって蛍光を発する。catechol estrogen に LNCaP 細胞を曝露すると蛍光レベルが上昇するが、nitric oxide 単独では DHR の蛍光強度に変化は見られなかった。しかし、catechol estrogen と nitric oxide の共存下では、DHR 蛍光は相加的な上昇を示した。また、DHR 蛍光は peroxynitrite のスカベンジャーである uric acid によって顕著な阻害を受けた。一方、SOD (superoxide dismutase) や catalase 存在下では DHR 蛍光の弱い抑制が見られ、catechol estrogen と nitric oxide 曝露によって発生するメイン

の活性分子が peroxynitrite であることが強く示唆された。また、LNCaP 細胞を nitric oxide のドナーである NOC5 と 4 位水酸化 estradiol に曝露することによって、有意に DNA 損傷が増加することがコメットアッセイによって明らかにした。

第 2 章では、4 位水酸化 estradiol と nitric oxide を共曝露することで、単独曝露よりも DNA 損傷が促進されること、リコピンや β カロチンが、4 位水酸化 estradiol と nitric oxide が引き起こした DNA 損傷を抑制することを、plasmid DNA を用いた *in vitro* 実験系や V79 細胞（チャイニーズハムスター線維芽細胞）を用いたコメットアッセイによって明らかにした。また、V79 細胞を用いたヒポキサンチンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ (HRPT) 試験から、4 位水酸化 estradiol が変異原性を増加させることを示した。

第 3 章では、plasmid DNA を用いた *in vitro* 実験系や V79 細胞のコメットアッセイによって、リコピンや β カロチンが nitric oxide ドナー SIN-1 の産生する peroxynitrite による DNA 損傷を抑制することを示した。また SIN-1 を曝露した V79 細胞において、これらのカロテノイドは、チロシン残基のニトロ化による nitrotyrosine の生成を抑制することも抗体を用いた免疫染色から明らかにした。

以上の結果から、カンボウエイ・マヨブ・ムザンデュ氏は、*in vitro*、細胞 *in vivo* の両試験系において、catechol estrogen と nitric oxide によって peroxynitrite が生成され、DNA を損傷することを明らかにした。また、活性窒素種による DNA 損傷や蛋白質のニトロ化を、機能性成分カロテノイドであるリコピンや β カロチンが抑制することを明らかにした。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者カンボウエイ・マヨブ・ムザンデュ氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規程による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。