

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	Ganesan Ponesakki
論文題目	Studies on the characterization of molecular mechanisms underlying the anti-angiogenic and apoptosis-inducing potentials of marine algal carotenoids（海藻カロテノイドによる血管新生抑制およびアポトーシス誘導の分子機構解明に関する研究）		
（論文内容の要旨）			
黄色から赤色を呈する脂溶性色素であるカロテノイドは、動物、植物、微生物などに幅広く分布している。海洋生物には、陸上生物とは異なる特徴的なカロテノイドが存在しており、その機能性に関する研究が近年活発に進められてきている。特に、ワカメ、コンブ、ヒジキ、モズクなどの褐藻類に多く含まれているフコキサンチンについて、抗ガン作用、抗肥満作用、抗糖尿病作用などの多くの新規な機能性が報告され、機能性食品素材として大いに注目されている。一方、緑藻に特有のカロテノイドであるシフォナキサンチンの機能性に関しては、これまで全く注目されておらず、知見はほとんどない。このような海藻由来のカロテノイドは、再生可能である未利用の海洋生物資源として期待され、その高度利用のために、新規機能性の探索と作用機序の解明が重要である。そこで本論文では、海藻由来カロテノイドの健康機能に着目した。とくに近年注目されている血管新生およびアポトーシスに与える影響について評価を行い、それらの作用機構の解明を試みた。本論文の内容は以下のように要約される。 1. 血管新生とは、血管が新しく形成される現象のことであり、悪性腫瘍や糖尿病性網膜症、リウマチ、肥満など様々な病態に深く関わっていることから、その抑制物質の開発が期待されている。そこで、緑藻由来シフォナキサンチンの新規機能性として、血管新生に与える影響について評価した。培養細胞としてヒト臍帯静脈内皮由来細胞（HUVEC）を用いた評価の結果、シフォナキサンチンはHUVECの管腔形成を強力に抑制することを初めて見出した。このとき、HUVECの増殖はシフォナキサンチンにより有意に抑制されたが、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）存在下におけるHUVECの遊走に対する抑制効果は認められなかった。さらにより生体に近い評価法であるラット動脈片を用いたex vivoのアッセイにおいても、動脈片からの毛細血管様の微細血管の伸長に対してシフォナキサンチンは有意な抑制作用を示した。本研究により、シフォナキサンチンの極めて強力な血管新生抑制作用が初めて見出された。 2. シフォナキサンチンの血管新生抑制の作用機序について、血管内皮細胞のシグナル伝達経路に着目し、すでに血管新生抑制作用が見出されている褐藻由来フコキサンチンと比較して調べた。その結果、シフォナキサンチンとフコキサンチンは、繊維芽細胞増殖因子（FGF-2）とその受容体であるFGFR-1のmRNA発現を有意に抑制した。			

このとき、シフォナキサンチンはフコキサンチンよりも低濃度で抑制作用を示した。さらにFGF-2の転写を制御する因子であるEGR-1の発現も有意に抑制されたが、VEGFの受容体であるVEGFR-2には影響を与えなかった。これらの結果から、シフォナキサンチンとフコキサンチンは、VEGFを介した経路ではなく、FGF-2を介したシグナル伝達経路に影響を与えることで血管新生抑制作用を示すことが明らかとなった。さらに詳細な作用機序を解明するために、FGF-2存在下での血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を調べたところ、シフォナキサンチンとフコキサンチンはこれらを有意に抑制した。一方で、高等植物に多く含まれているルテイン、ビオラキサンチン、ネオキサンチンには管腔形成抑制作用は認められず、海藻由来のシフォナキサンチンやフコキサンチンに特有の作用であることが示された。また、シフォナキサンチンとフコキサンチンは、FGF-2を介したERK1/2やAktの活性化（リン酸化）を有意に抑制することが明らかとなった。さらにマウスの鼠蹊部にマトリゲルを注入したin vivoのアッセイにおいても、シフォナキサンチンとフコキサンチンによって血管新生が有意に抑制されることを見出した。

3. シフォナキサンチンとフコキサンチンを含む11種類のカロテノイドを用いて、ヒト白血病由来HL-60細胞に対する細胞致死活性を調べた。その結果、シフォナキサンチンは用いたカロテノイドの中で最も強力な活性を示した。TUNEL法による評価、カスパーゼ3の活性化、Bcl-2の発現低下などから、シフォナキサンチンによって誘導される細胞死はアポトーシスであることが明らかとなった。そこで、すでにガン細胞に対するアポトーシス誘導作用が知られているフコキサンチンと比較し、その作用機構について調べた。シフォナキサンチンはフコキサンチンに比べて、強力かつ速やかにアポトーシスを誘導することが見出された。その理由として、細胞へ取り込まれる速度がより大きいことが一因であると考えられた。また、シフォナキサンチンは、ガン細胞に特異的にアポトーシスを誘導することから近年注目されているTRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) に対する受容体の一つであるDR5の発現を有意に増加させることも明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

海洋生物に含まれるカロテノイドは、陸上生物由来のものとは異なる特徴を有し、再生可能である未利用の海洋生物資源として期待されている。一方、その高度利用のためには、新規機能性の探索と作用機序の解明が重要である。本論文は、海藻由来カロテノイドの健康機能に着目して、血管新生およびアポトーシスに与える影響について評価し、それらの作用機構の解明を行ったものである。評価される点は以下の通りである。

1. 培養細胞およびex vivoのアッセイを用いて、緑藻由来シフォナキサンチンが強力な血管新生抑制作用を示すことを初めて明らかにした。

2. 緑藻由来シフォナキサンチンと褐藻由来フコキサンチンの血管新生抑制の作用機序について、血管内皮細胞を用いて検討した。これらのカロテノイドは、FGF-2を介したERK1/2とAktの活性化（リン酸化）を阻害し、内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を抑制することを明らかにした。これらの効果は、陸上植物由来のカロテノイドでは示されず、海藻由来のシフォナキサンチンとフコキサンチンに特異的であることを示した。さらにマトリゲルを用いたin vivoのアッセイでもシフォナキサンチンとフコキサンチンは血管新生抑制作用を示すことを明らかにした。

3. シフォナキサンチンはヒト白血病由来HL-60細胞に対して、強力なアポトーシス誘導作用を示すことを明らかにした。フコキサンチンに比べ、シフォナキサンチンは細胞により速やかに取り込まれ、そのために強力かつ迅速な効果を示すことが見出された。さらにシフォナキサンチンはTRAIL受容体であるDR5の発現を増加させることを明らかにした。

以上のように、本論文は、緑藻由来シフォナキサンチンが血管新生を抑制し、ガン細胞に対してアポトーシスを誘導すること、またそれらの機構を褐藻由来フコキサンチンと比較しつつ、初めて明らかにしたものである。本論文の成果は多様な藻類由来カロテノイドの新たな用途開発に道を開くものであり、海洋生物生産利用学、水産化学、食品機能学の発展に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成23年7月26日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降