

氏名(国籍)	ウイドウドウ (インドネシア)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第4773号		
学位授与年月日	平成20年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Molecular and functional insights to aging and cancer using cellular senescence and induction of premature senescence as model systems (自然細胞老化およびそのモデルシステム誘導性細胞老化を利用した老化とがんの分子機能解析)		
主査	筑波大学教授	理学博士	岡村直道
副査	筑波大学講師	博士(理学)	小林麻己人
副査	筑波大学講師	博士(理学)	松田学
副査	筑波大学講師	博士(医学)	柳川徹

論文の内容の要旨

目的：安全で効果的な抗がん剤を開発するには、細胞の老化と細胞のがん化の分子機構を解明する事が必要であると考えられる。また、両現象に共通して関与している遺伝子は、細胞周期、ストレス応答、細胞骨格、アポトーシスなどの機能を担っている。本研究は、それらの中からがん治療の標的になり得る遺伝子を探索することを目的として、インド伝統医学に用いられ、抗がん作用が知られている Ashwagandha の葉抽出物のがん細胞特異的な細胞死誘導効果の機序と、DNA 脱メチル化剤 5AZA-dC によるがん細胞の増殖抑制機構の解析を行った。

対象と方法：Ashwagandha (*Withania somnifera* (L.) Dunal) いまインドアーユルベータ医学で rasayana に分類される植物で、天然薬剤として様々な健康促進効果を持つと信じられている。また、Adaptogen (適応促進因子) として免疫調節、抗炎症、抗リウマチ、抗菌、抗酸化、抗糖尿病、抗がんなど幅広い効果が示されている。しかしながら、これら効果の科学的な証明は不十分である。そこで、細胞培養系を用いて Ashwagandha 葉抽出物の抗がん効果を検証した。

結果と考察：まず、Ashwagandha 葉抽出物 (i-Extract) はヒトがん細胞に対して特異的に強い細胞毒性を示すが、ヒト正常細胞には弱い毒性しか示さないことを見出した。また、クロマトグラフィーによって、i-Extract 中のがん抑制効果を持つ物質：がん抑制因子 i-Factor (cancer inhibitory factor) を精製し、Withanone と同定した。i-Factor は正常細胞には低毒性であり、ヌードマウスへ移植したがんの抑制効果もあることが明らかとなった。

次に、i-Factor の作用機構を明らかにするため、i-Extract を i-Factor および F1 ~ F5 に分画して、それらががん細胞死を導く経路を、関連する遺伝子約 100 種類の発現を抑制する shRNA (small-interference hairpin RNA) を用いて解析した。その結果、i-Extract とその分画が少なくとも 5 つの異なる経路、(viz, p53 経路, GM-CFS 経路, death receptor 経路, アポトーシス, G2-M DNA ダメージ制御経路) によってがん細胞を死滅させるという知見を得た。また、p53 とモータリンの相互作用を調べたところ、i-Extract, iFactor, 画分 F1

と F4 がモータリン-p53 間の結合を妨げ、アポトーシスを誘導する p53 の活性を再び取り戻させる結果となった。画分 F2, F3 ならびに F5 は、モータリン-p53 経路と別の機構で細胞増殖抑制に関与していると考えられた。以上の結果から、i-Extract 中の i-Factor, 画分 F1 と F4 は抗モータリン分子と考えられ、安全ながん治療剤の開発に発展することが期待された。

一方、遺伝子プロモーター領域の過剰なメチル化は遺伝子発現の抑制を引き起こし、がん発生の進行に関与していることが知られている。DNA メチルトランスフェラーゼはゲノムのメチル化を引き起こす主要な酵素であるが、その阻害剤として知られる 5-aza-2' deoxycytidine (5AZA-dC) は、骨髄異形成症候群 (MDS) の治療に使われている。まだ完全には明らかになっていない 5AZA-dC の作用機序を解明するために、ランダム遺伝子抑制リボザイムで骨がん細胞を処理し、その後 5AZA-dC で処理して増殖抑制効果が減弱するリボザイムクローンを検索した結果、Pex19p とモータリンの 2 つのシャペロンが選択された。この実験結果から、これらのシャペロンは 5AZA-dC による遺伝子の脱サイレンシングを促進している可能性があると考えた。また、モータリンと Pex19p が高発現しているがん細胞が 5AZA-dC に対して非常に感度が高いこと、増殖抑制効果を持つ p16^{INK4A} および p21^{WAF1} の発現レベルが上昇することも明らかになった。これら遺伝子の発現を抑制した状態では、5AZA-dC はヒト骨がん細胞に対して細胞増殖抑制を誘導しなかった。さらに、5AZA-dC がモータリンと直接結合することを発見し、5AZA-dC がモータリンの二次構造を変化させてその機能を変え、細胞死を惹起している可能性が示唆された。モータリンは多くのがん細胞で多量に発現しているが、低濃度の 5AZA-dC が、モータリンを介してがん細胞に特異的に細胞老化を誘導する可能性が考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、Ashwagandha 葉に含まれるがん細胞特異的に毒性を示す化合物を分離同定してその作用機序の一端を解明すると共に、5AZA-dC の新しい作用機構としてモータリンを介する細胞増殖抑制経路が存在することを明らかにしたものである。いずれの場合にも細胞増殖抑制や細胞死の調節機構にモータリンが関与し、がん抑制因子 p53 との相互作用が大切な調節点であることを明確に示したものと高く評価できる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。