

| | | | |
|---------|---|----------|-------|
| 氏名（本籍） | Babita SHASHNI（インド共和国） | | |
| 学位の種類 | 博 士（生物工学） | | |
| 学位記番号 | 博 甲 第 7116 号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成26年 7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 | 生命環境科学研究科 | | |
| 学位論文題目 | Identification and Functional Validation of Novel Ligands of PPAR gamma - Therapeutic Implications for Breast Cancer (PPARガンマ新規リガンドの同定と機能検証 - 乳癌治療との関連) | | |
| 主査 | 筑波大学准教授 | 博士（理学） | 内海 真生 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 工学博士 | 長崎 幸夫 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 工学博士 | 王 碧昭 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 博士（生物工学） | 楊 英男 |

論 文 の 要 旨

乳癌は、世界的に高い罹患率と死亡率を示す癌である。早期発見、効果的な内分泌療法、病態生理の分子的理解の進歩にもかかわらず、患者の多くが薬物療法に副作用を示し、患者の約30%が薬剤耐性を持つ疾患を再発している。このため、臨床、分子特性に基づいた高い有効性と低毒性の代替治療の開発が求められている。ここにおいて現在、腫瘍の発生・進行だけでなく、転移などの腫瘍形成において重要な役割を担っているリガンドによる転写因子の調節を含む新しい治療法が注目されている。ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ （PPARガンマ）は、核内受容体であり、乳癌細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが判明しつつあるが、乳癌の生化学的、分子メカニズム的、および病態生理におけるPPARガンマの関与は不明である。そこで本研究では乳癌に対する新しい治療法確立を目指し、PPARガンマのモチーフ予測、ならびにPPARガンマアゴニストであるコーヒー成分HHQ、およびIbrutinibに関してヒト乳癌細胞株におけるPPARガンマリガンド、解糖およびプロアポトーシス遺伝子に対しての調節効果を研究した。

まず初めに、乳癌への関与が報告されている2,332遺伝子についてペルオキシソーム増殖因子応答要素（PPRE）モチーフの予測解析を行った。その結果、218の遺伝子についてPPRE（DR1/DR2）やPPARに関連する保存モチーフ（PACM）を有することが見出された。さらに、新規で重要な遺伝子を同定するために疾患遺伝子ネットワークおよび遺伝子オントロジー解析を行い、タンパク質-タンパク質相互作用のネットワークを構築した。また、ATP生産工程の解糖経路（ホスホグリセリン酸キナーゼ1（PGK1）、およびピルビン酸キナーゼM2（PKM2））にある二つの遺伝子を同定し、2種類の乳癌細胞株を材料にPPARガンマの活性化によってそれらの抑制が起こることを確認した。一連の分析から、この抑制はATPレベルとアポトーシスの低下とに関連することが示唆された。

次に、乳癌リスクと生存に影響を与える可能性があるいくつかの化合物が含まれるコーヒーについて、成分の一つであるヒドロキシヒドロキノン（HHQ）をターゲットとして潜在的なPPARガンマリガンドかどうかを検討した。その結果、HHQが乳癌細胞のPPARガンマ依存性経路を介した解糖系およびプロアポトーシス遺伝子に対して調節作用を示す、すなわちHHQがPPARガンマのリガンドであることを明らかにした。この結果はPPARガンマリガンドが乳癌治療のための潜在的治療薬として役立つことを明確に示唆するものであり、HHQの抗乳癌活性（in vitro）の最初の報告である。

癌細胞の代謝特性は、正常細胞のものとは有意に異なっている。従って、代謝要求のための解糖経路に対する癌細胞の増加した依存性は、選択的かつ効率的に解糖の薬理的阻害によって癌細胞を死滅さ

せる治療戦略の設計のための基礎を提供することに繋がることから、新薬候補であるIbrutinibの抗癌活性について検討した。その結果、Ibrutinibが乳癌細胞株に対してクローン原性ポテンシャルの遅延作用を持つことが判明した。また、分子生物学的解析からIbrutinibが大幅に減少し、PPARガンマ依存性のシグナル経路を介して解糖系酵素（PGK1、PKM2）を調節していることが判明した。さらに、解糖系酵素の抑制は、総ATPレベルを低下させ、ミトコンドリア膜電位の有意な低下とカスパーゼ依存性アポトーシスを誘導させたことが示唆された。以上の結果は、解糖系酵素（PGK1、PKM2）のPPARガンマ依存的ダウンレギュレーションによるヒト乳癌細胞株に対するIbrutinibの細胞毒性効果の最初の報告であり、Ibrutinibが乳癌治療のための潜在的治療薬として役立つことを強く示している。

審 査 の 要 旨

本論文は「PPARガンマ新規リガンドの同定と機能検証 - 乳癌治療との関連」と題して、世界中の多くの人が罹患し死亡している乳癌について、従来療法の持つ副作用や再発といった問題の少ない新しい治療法の確立を目指し、腫瘍の発生・進行だけでなく、転移などの腫瘍形成において重要な役割を担っているリガンドに注目して一連の実験および解析が行われた。

著者は、まず、乳癌に関与する2,332遺伝子を対象にペルオキシソーム増殖因子応答要素（PPRE）モチーフ解析を行い、218遺伝子に保存モチーフが存在することを明らかにした他、疾患遺伝子ネットワークおよび遺伝子オントロジー解析を行うことで乳癌細胞増殖に関与する新規重要遺伝子を同定している。また、ヒト乳癌細胞を用いた実験を行い、PPARガンマによって遺伝子発現抑制が起こることを明らかにしている。以上の結果は、細胞のエネルギー経路およびヒト乳癌治療における分子メカニズムを理解する上で重要な知見を提供するものであり優れた研究成果である。

次に、コーヒー成分ヒドロキシルヒドロキノン（HHQ）とIbrutinibについてPPARガンマリガンドとしての機能的検証をin vitroアッセイ、クローン原性アッセイ、免疫ブロット法、定量RT-PCR法などの手法を用いて実施し、HHQおよびIbrutinibに細胞のエネルギー代謝経路を調節しアポトーシス効果により乳癌細胞の増殖抑制効果があることを世界で初めて明らかにしている。現在、PPARガンマのアゴニストが、炎症、糖尿病、肥満、統合失調症および癌に対する新たな潜在的に有効な治療として注目されつつあるが、著者の一連の研究は乳癌の新治療法確立へ必要な新規知見を提示する成果であり、学術的だけでなく社会的にも重要なものであり、今後の発展が期待される成果である。

平成26年6月2日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。