

氏名（本籍）	Imen SAMET		
学位の種類	博 士（学術）		
学位記番号	博 乙 第	2719	号
学位授与年月日	平成 27 年 1 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題	Differentiation Induction of Human Leukemia Cells and Normal Hematopoietic Stem Cells by Olive Leaf Extract Components (オリーブ葉成分によるヒト白血病細胞および造血幹細胞の分化誘導特性)		
主査	筑波大学教授	博士(農学)	磯田博子
主査	筑波大学教授	Ph.D.	田島淳史
副査	筑波大学教授	工学博士	中嶋光敏
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	韓 峻奎

論 文 の 要 旨

白血病細胞が分化・成熟能を失うことに基づいて、分化誘導療法は、分化のプロセスを再開し、白血病細胞をアポトーシス経路に誘導するための新しい治療法として期待されている。本研究は、オリーブ葉からの新規分化誘導剤の開発を目的として、さらに、細胞運命決定のエフェクターとしての培養ヒト造血幹細胞におけるオリーブ葉由来機能性成分の利用の可能性について検討した。

オリーブの葉は、チュニジアの品種の中から生産量の多い 5 品種を採取した。その中で、*Chemlali* 品種オリーブ葉抽出物に、ヒト慢性骨髄性白血病 K562 細胞増殖抑制効果が確認され、特に、チュニジア Sfax 地域で採取された *Chemlali* 品種のオリーブ葉エタノール抽出物は、最も高い増殖抑制効果を示した。解析の結果、*Chemlali* オリーブ葉エタノール抽出物は、骨髄性白血病 K562 細胞の細胞周期を停止させ、単球/マクロファージ系に分化を誘導するとともに、アポトーシスも誘導することが明らかとなった。続いてマイクロアレイにより、当該現象に関するメカニズム解析を行った。K562 細胞の単球/マクロファージ系系統への分化において *IFI16*, *EGR1*, *NFYA*, *FOXP1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL8* の遺伝子発現変動を確認した。アポトーシス細胞数の増加において、*CASP6*, *CASP8*, *DFFA*, *BID* のプロアポトーシスの遺伝子を上方制御し、アポトーシス抑制遺伝子 *BCL2* とカスパーゼ阻害遺伝子を下方制御した。さらに、*Chemlali* 品種のオリーブ葉エタノール抽出物による分化とアポトーシス誘導効果には、JNK 経路と NF-kappaB 経路間の cross-talk が関与することが明らかとなった。

次に、オリーブ葉抽出物の主たる化合物がヒト造血幹細胞に与える分化誘導効果について検証した。主たる化合物である Oleuropein, Apigenin 7-glucoside, Luteolin 7-glucoside を、単独もしくはオリーブ葉抽出物含有濃度に合わせた組み合わせにより処理した結果、ヒト造血幹細胞は、異なるタイプの血球細胞に分化誘導された。3つの化合物の組み合わせ処理は、単球/マクロファージとリンパ球分化を促進し、一方、巨核球と赤血球系統への分化誘導を抑制した。この現象は、最も多く含まれる Oleuropein の作用に起因すると考えられる。マイクロアレイ解析から、Wnt シグナル伝達経路(*FZD5*, *FZD3*)、Notch 経路(*NOTCH2*, *MFNG*, *APH1B*)、TGF-beta 経路(*TGFBR2*, *SMAD4*)関連遺伝子を上方制御することが明らかとなった。細胞接着、運動性、膜輸送に関与する遺伝子 (*CD46*, *MEF2C*, *CD58*, *NAMPT*, etc.)と同様

に、Bリンパ球とTリンパ球の分化に関与する遺伝子の上方制御も確認された。Apigenin 7-glucosideは赤血球と巨核球系に分化を誘導し、骨髄性細胞への分化を抑制した。一方Luteolin 7-glucosideは、赤血球と骨髄性細胞への双方の分化を誘導した。Apigenin 7-glucosideとLuteolin 7-glucoside処理によって誘導された赤血球分化は、ヘモグロビン遺伝子(α -hemoglobin, β -hemoglobin and γ -hemoglobin)、赤血球転写因子 *GATA11* の発現上昇、メチルセルロース培養におけるBFU-EおよびCFU-GEMMの数の増加によって確認した。

これらの知見は、オリーブ葉抽出物およびその化合物による、白血病細胞と造血幹細胞双方における分化誘導効果にエビデンスをもたらし、がんに対する食品由来補完治療シーズの開発を促進するものである。すなわち、移植のための造血幹細胞と前駆細胞の生成プロトコルの最適化により、また、治癒を促進するための内在性幹細胞の活性化により、再生医療への貢献に寄与する可能性を示すものである。

審 査 の 要 旨

白血病における化学療法の問題解決に向けて、新たなアプローチがこの30年間に検討されている。既に先行研究として成功例が報告されているが、分化誘導剤に対する抵抗性の獲得だけでなく、長期の使用による副作用の問題などが残されている。これらの問題に対処するため、造血幹細胞の移植と血液細胞成分の輸血が近年臨床で使用されており、広範囲の血液学的疾病の救命手法であることが示されている。そのため、造血幹細胞から分化誘導した血球細胞増殖に対する取り組みは、活発な研究分野である。本博士論文作成研究は、オリーブ成分によるヒト造血幹細胞分化誘導作用を発見し、そのエビデンスの獲得に取り組んだものであり、高いオリジナリティーが認められた。

平成26年9月16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（学術）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。