

氏名	黄 川		
学位の種類	博 士 (生物工学)		
学位記番号	博 甲 第 7593 号		
学位授与年月日	平成 28年 1月 31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	アシュワガンダ葉由来のMethoxyWithaferinAとWithaferinAの生理活性の比較		
主査	筑波大学教授	博士 (農学)	張 振亜
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	内海 真生
副査	筑波大学准教授	博士 (生物工学)	楊 英男
副査	国立研究開発法人産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門首席研究員	博士 (農学)	レヌー ワダワ

論 文 の 要 旨

アシュワガンダ (*Withania somnifera*) は、インドの伝統的アーユルヴェーダ医学に由来する薬草の一つで、古くから「若返りの妙薬」として用いられ、滋養強壮や健康維持のために使われてきた。現在までに同定された主なアシュワガンダの有効成分はステロイドラクトン類とステロイドグラス類に分類される。このステロイドラクトン類の中に、WithaferinA, WithanolideA, Withanoside と Withanone などの成分が同定され、その中の Withaferin A (WA) は、がん細胞増殖抑制効果があると報告されている。Withaferin A の分子構造の近いメトキシ化合物 (2,3 - dihydro -3-methoxywithaferin A, mWA) に対し、その細胞毒性の分子メカニズムはいまだに究明されていない。本研究の目的はアシュワガンダ葉抽出物から分子構造が同定された成分である MethoxyWithaferinA について、WithaferinA と比較し、一連のヒト正常細胞とヒトがん細胞アッセイを行い、MethoxyWithaferinA の生理活性を究明し、MethoxyWithaferinA の生物資源としての有効利用や新規機能性素材の開発の可能性を検討したものである。

ヒトがん細胞 U2OS に対し、細胞分子機構アッセイを通して、以下のことを明確にした。1. WA による処理組は、がん細胞の細胞周期進行への抑制作用があることが示唆されたが、mWA による処理組は標的タンパク質 p53 と p21 の影響が少ないため、がん細胞の細胞周期進行への抑制作用が少ないと観察された。2. WA による処理組は酸化的ストレス応答因子の NRF2 の発現量を減少させるため、がん細胞の酸化ストレス耐性の低下が示唆されたが、mWA による処理組では、がん細胞の酸化ストレス耐性を低下させる効果が低いと考える。3. WA による処理組は DNA 障害修復因子の PARP、Gadd45 の発現量を減少させるため、がん細胞の DNA 障害修復を阻止し、mWA による処理組は細胞 DNA 障害修復因子 PARP の影響が小さく、Gadd45 の発現量が増加させたため、がん細胞 DNA 障害修復の促進作用が示唆された。4. WA による処理組はアポトーシスに促進する因子の Bax の発現量を増加させ、抑制因子 Bcl-2 の発現量を減少させるため、がん細胞のアポトーシスの促進が示唆されたことに対し、mWA による処理組はアポトーシスに関連する因子の、Bax の影響が少なく、Bcl-2 の発現量が増加したため、がん細胞のアポトーシスの抑制が示唆された。以上のことから、ヒトがん細胞において、細胞周期進行、酸化的ストレス応答、DNA 障害修復、アポトーシスの分子機構が既知の Withaferin A の分子機構と異なることを初めて明らかにした。細胞生存アッセイとコロニー形成アッセイ結果では、mWA はがん細胞の増殖障害が小さいことが確認できた。

ヒト正常細胞 TIG3 について、以下のことを明確にした。1. WA による処理組は標的タンパク質 p53 と p21 を活性化したため、正常細胞の細胞周期進行への抑制作用があることが示唆された。mWA による処理組は

標的タンパク質 p53 と p21 の影響が少ないため、正常細胞の細胞周期進行への抑制作用が小さいと考えられる。2. WA による処理組は酸化ストレス応答因子の NRF2 の発現量を減少させるため、正常細胞の酸化ストレス耐性の抑制効果が示唆されたが、mWA による処理組は酸化ストレス応答因子の NRF2 の発現量を増加させるため、正常細胞の酸化ストレス耐性を増加させる効果があることが示唆された。3. WA による処理組は DNA 障害修復因子の PARP、Gadd45 の発現量を減少させるため、正常細胞の DNA 障害修復を阻止することが示唆されたことに対し、mWA による処理組は細胞 DNA 障害修復因子 PARP の発現量が増加させたため、正常細胞 DNA 障害修復の促進効果が示唆された。4. WA による処理組はアポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現量が減少させるため、正常細胞のアポトーシスの促進が示唆されたことに対し、mWA による処理組はアポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現量を増加させたため、正常細胞のアポトーシスの抑制が示唆された。つまり、ヒト正常細胞において、細胞周期進行、酸化ストレス応答、DNA 障害修復、アポトーシスの分子機構が既知の Withaferin A の分子機構と異なることを初めて明らかとした。細胞生存アッセイとコロニー形成アッセイの結果、WA を投入した組は 0.3 μ g/ml の濃度から、コロニー形成率が 13%以下になり、正常細胞の増殖障害が大きく、mWA を投入した組では、その 10 倍の 3.0 μ g/ml の濃度で、コロニー形成率が 20%に維持した。WA を投入した組と比べ、正常細胞の増殖障害が非常に小さいことが確認できた。

また、今回の細胞生存アッセイにより、Methoxywithaferin A の濃度が 0.6~6 μ g/ml の範囲で、正常細胞の保護作用があることを確認した。今までの報告では、似たようなアシュワガンダ成分の Withanone と一定の割合で WA と併用し、正常細胞への毒性が WA の単独使用の場合より緩和されたことは明らかにされていた。今後、mWA の正常細胞の保護作用を着目し、WA と併用することによって正常細胞への毒性を低減する効果が十分期待できると考える。

審 査 の 要 旨

本研究の目的はアシュワガンダ葉抽出物から分子構造が同定された成分である MethoxyWithaferinA について、WithaferinA と比較し、一連の正常ヒト細胞とヒトがん細胞アッセイを行い、MethoxyWithaferinA の生理活性を究明した。ヒトがん細胞及びヒト正常細胞において、細胞周期進行、酸化ストレス応答、DNA 障害修復、アポトーシスの分子機構が既知の Withaferin A の分子機構と異なることを初めて明らかにした。本研究は貴重な実験データが得られ、MethoxyWithaferinA の生物資源としての有効利用や新規機能性素材の開発のために、科学的かつ技術的な助言が提供できた点をオリジナリティに富む研究として高く評価できる。

平成 27 年 1 月 22 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および最終試験を行い、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断された。

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。