

氏名	于 躍 (Yue YU)		
学位の種類	博 士 (環境学)		
学位記番号	博 甲 第	7 9 4 5	号
学位授与年月日	平成 28年	9月	23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	Cytotoxicity of Ashwagandha Derived Withaferin A to Human Cancer Cells: Molecular Insights into the Response of Telomerase Plus and Minus Cell (アシュワガンダ由来ウィザフェリンAのヒト癌細胞に対する細胞毒性: テロメラーゼ発現と非発現細胞の応答に対する分子洞察)		
主査	筑波大学 教授	博士 (農学)	張 振亜
副査	筑波大学准教授	工学 博士	雷 中方
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	山路 恵子
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

ガンは複雑な病気で、腫瘍を抑制するたんぱく質の失活によりシグナリング経路、発ガン遺伝子および幾つかの後成的なメカニズムの機能で多面的なネットワークにより調節される。通常の細胞と異なり、ガン細胞は、末端小粒長を維持して反復可能な死亡率をテロメラーゼまたは選択的末端小粒伸び (ALT) 経路により克服され、細胞の老化やアポトーシスの誘導を阻害される。また、多岐な生物学的プロセスにも関与した小さな非翻訳分子マイクロ RNAs (miRNAs) は重要で、miRNA 発現量は様々なガンと相関し、これらの遺伝子は腫瘍抑制者とガンの遺伝子として機能すると考えられる。一方、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、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グトン類とステロイドグラス類に分類される。このステロイドラグトン類の中に、Wi-A に関してテロメラーゼまたは他の末端小粒の延長 (alternative lengthening of telomeres : ALT) をターゲットに miRNA によって調節される分子機構がいまだに解明されていない。

審査対象論文の研究は、WithaferinAの抗ガン性能、特に末端小粒長の維持とmiRNAの制御の機能を研究し、今後のWi-Aベースの新薬のスクリーニングや設計のための情報を提供することを目的として行ったものである。本研究の方法として、同質遺伝子的細胞、テロメラーゼ細胞 (JFCF-6B)、テロメラーゼ・マイナスALT (JFCF-1L) 細胞などをWi-Aの末端小粒維持に対する特定の効果の究明に用いた。また、ALT (U20S) 細胞と数種のガン細胞ラインを薬物処理の効果やmiRNA機能の評価に使用した。

生物学的分析: 細胞生存率をMTT法で評価した。また、細胞周期配分とアポトーシス誘導の評価にフローサイトメータを用いた。タンパク質の発現量と局在化をウェスタンブロット法とimmunofluorescence染色法で解析した。細胞ベースの機能喪失スクリーニングを用いてmiR-335を同定し、哺乳類動物細胞の発現ベクトルにクローン化した。リアルタイムPCRを用いてmiRNAとmRNAの発現量を調べた。

本研究の結果は下記の通りである。

1) Wi-Aの末端小粒の維持に対する影響を検討した結果、1. Wi-AはALT細胞に対し強い細胞障害性を引き起こしたこと、2. Wi-Aが低濃度の場合はALT細胞のアポトーシスを誘発したこと、3. Wi-Aは、ALT細胞のAPBsなどの表現型の抑制を引き起こしたこと、4. Wi-Aは、ALT細胞における末端小粒機能障害を引き起こしたこと、5. Wi-Aは、ALT細胞でMRN合成のタンパク質のダウンレギュレーションを引き起こしたこと、等を明らかにした。

2) Wi-AのmiRNAレギュレーションに対する影響が検討された結果、1. DNA脱メチル化剤5-Aza-dCによって老化を誘発されていない細胞のmiR-335がアップレギュレーションされたこと、2. miR-335は成長抑制を誘導することによって、DNA脱メチル化剤5-Aza-dCにより誘発された老化が緩和されたこと、3. miR-335はp16INK4AとpRBに影響し、DNA脱メチル化剤5-Aza-dCにより誘発された老化が緩和されたこと、4. miR-335はCARFをターゲットとして、DNA脱メチル化剤5-Aza-dCにより誘発された老化が緩和されたこと、5. Wi-Aは、miR-335の誘導を通して、テロメラーゼ・プラス細胞増殖を妨げたことなどが明らかにされている。

本研究の結論として、Wi-Aはテロメラーゼ・プラス細胞及びテロメラーゼマイナス（ALT）細胞に対し毒性を示し、特にテロメラーゼマイナス細胞に対し毒性が強い。また、間接的にDNAの損傷誘導、末端小粒機能障害及びMRN複合体のダウンレギュレーションによってALT細胞末端小粒維持の阻害を引き起している。一方、miR-335は腫瘍形成を抑制するものであることが確認されており、CARFをターゲットにしたmiR-335過剰発現量は、細胞増殖を遅らせたことを明らかにした。さらに、Wi-Aはテロメラーゼ・プラス細胞のmiR-335発現量を増加し、テロメラーゼ・プラス・ガン細胞に対する抑制効果があると考えられた。

本研究は初めて、ガン細胞における幾つかの通常のターゲット以外に、Wi-AのALTに特有の末端小粒維持のメカニズム、miR-335発現量について研究したものである。将来、Wi-Aはガンの治療に有望な天然化合物として期待されている。

## 審 査 の 要 旨

本研究は WithaferinA の抗ガン性能、特に末端小粒の維持と miRNA の制御の機能に着目し、Wi-A の末端小粒の維持に対する影響や Wi-A の miRNA レギュレーションに対する影響を究明したものである。テロメラーゼまたはテロメラーゼマイナス（ALT）細胞の末端小粒のどちらの破壊でも DNA 二本鎖切断を誘発するシグナリングで老化またはアポトーシスにつながると想定し、研究を進めた。テロメラーゼの有無にかかわらず同遺伝子型細胞を使って、Wi-A がテロメラーゼマイナス（ALT）細胞により強い細胞毒性を引き起こしたこと、Wi-A の暴露から生じる G2/M 阻止とアポトーシスは、テロメラーゼマイナス（ALT）細胞に特有であったことや Wi-A を処理した場合、MRN 複合体の Myc 調停転写抑制を誘発されたことなどを明らかにした。本研究は初めて、アシュワガンダ由来 Wi-A のヒトガン細胞に対する細胞毒性、テロメラーゼ発現と非発現細胞の応答に対する分子機構を究明し、ガン細胞における幾つかの通常のターゲット以外に、Wi-A の ALT に特有の末端小粒維持のメカニズム、miR-335 発現量について明らかにした。本研究の結果は、末端小粒の維持と miRNA 調節の面で、Wi-A の抗ガン性能の新しい根拠を提供した。将来的に Wi-A ベースの新薬スクリーニングや設計に有用な情報として考えられる。インドの伝統的医薬として使用されてきた薬草であるアシュワガンダ由来の天然物化合物に重要な機能が発見された本研究は、野生植物の多大な価値を示唆するものであり、生物資源の利活用や環境学分野においても重要な知見を提供したと言える。また、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 28 年 7 月 19 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（環境学）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。