

氏名	佐野 修		
学位の種類	博士(生物科学)		
学位記番号	博甲 第 8570 号		
学位授与年月日	平成 30年 3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	Screening of Small Molecule Regulators of Autophagy and Establishment of Mode of Action Analysis Method of Anti-cancer Drugs (ケミカルスクリーニングを駆使したオートファジー制御化合物の探索と、抗がん剤の薬効機序解析手法の確立)		
主査	筑波大学准教授	博士(理学)	中野賢太郎
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	千葉 親文
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	桑山 秀一
副査	筑波大学教授	博士(医学)	千葉 智樹

論 文 の 要 旨

本論文では、著者はケミカルスクリーニングの方法を組み、それを活用することで、オートファジーの素過程の制御機構、及びがん細胞代謝システムの解明に取り組んでいる。本論文の第一章では、オートファジーに着目した研究について述べられている。オートファジーは、栄養源や血清の飢餓時、また老化やストレスなどにより細胞内に不要なタンパク質が蓄積した際に、誘導される細胞内自食作用であり、哺乳類ではオートファジーの異常は神経変性やがんなどの疾患を惹起することが知られている。著者は、より詳細にオートファジーの素過程をモニターし、オートファジー制御にかかわる因子を同定する目的で、LC3に加え、p62、Rab7、及びLAMP2などのオートファジーの別段階の進行に働くタンパク質をマーカーに利用した、オートファジーを可視化・定量化する系を構築したことを述べている。この細胞評価系を用いて、著者は作用機序が既知の約1,500種類の化合物の中から、11種類のヒット化合物を取得するのに成功した。それらのうち10種類はターゲットが既知の化合物であり、それらの標的全てがオートファジーの素過程の進行と密接な関係をもつタンパク質であることを著者は確認した。一方、ターゲット不明のvacuolin-1については、その薬剤処理した細胞の画像情報を元に、細胞形態を数値化するアルゴリズムを開発し、それを用いたクラスタリング解析により調べている。その結果、著者はvacuolin-1がホスファチジルイノシトールのリン酸化に関与する脂質キナーゼPIKfyveの阻害薬であるYM201636と同じクラスタに属することを発見した。そこで著者は、vacuolin-1がPIKfyveと結合するか生化学実験を行い、vacuolin-1が強力にPIKfyveを阻害することを示した。さらに著者は、vacuolin-1で処理した細胞では、オートファジーが阻害されることを明らかにした。

本論文の第2章において、著者は、Serine palmitoyl transferase (SPT)の阻害剤ががん細胞の増殖を抑制するメカニズムについて、ケミカルスクリーニング解析を行ったことを報告している。HCC4006細胞にSPT阻害薬(myriocin等)を処理した結果、カスパーゼの活性化は認められず、ネクローシスの指標である細胞外への乳酸脱水素酵素(LDH)の流出が認められた。さらに、このLDHの流出はネクローシスの阻害剤によって抑制されたため、SPT阻害剤がHCC4006細胞に特異的にネクローシスを誘導すると著者は結論した。次に著者は、SPT阻害剤によるがん細胞増殖抑制のメカニズムを解析した。まず著者は共同研究者と協力し、細胞内の様々な代謝経路で働く約1,500種類の生体分子に作用する、合計3,000種類の化合物からなるライブラリーを作製した。そして著者は、HCC4006細胞にSPT阻害剤とこのライブラリーの化合物を共投与し、SPT阻害剤による細胞増殖抑制をキャンセルする化合物をスクリーニングした。その結果、著者は32種類のヒット化合物を見出すのに成功した。これらについて、著者はパスウェイ解析ソフトで検討し、プロスタグランジンの代謝経路がSPT阻害剤の作用機序に関与している可能性を見出した。プロスタグランジンはアラキドン酸がCOX-2によって代謝されることで生じる活性脂質種である。そこで著者は、化合物構造の異なるCOX-2阻害剤の投与やsiRNAによるCOX-2の発現抑制を試み、SPT阻害薬によるHCC4006細胞の細胞死の誘導が抑制されることを示した。以上の結果から、著者はCOX-2/プロスタグランジンの代謝経路の活性化が誘導されやすいようながん種においては、SPTの阻害薬が抗がん剤として有効である可能性を提唱した。

本論文を通して、著者はケミカルスクリーニングや細胞画像のアルゴリズムの開発を行い、オートファジーの制御機構の解明や、抗がん剤の効率的な作用機序の解明につながる成果をあげた。最後に著者は、本研究成果が未知の生命現象の理解に貢献するだけでなく、医療に役立つ化合物の探索と活用方法を提示した点でも意義があると結んでいる。

審 査 の 要 旨

本論文で著者は、細胞画像のアルゴリズムの開発とそれを利用したケミカルスクリーニングを活用し、オートファジーを制御する低分子化合物の同定に成功し、得られた低分子化合物の作用機序を解明した。さらにケミカルスクリーニングを利用して、抗がん剤の作用機序を解明する新しい手法を確立し、それまで不明であったSPT阻害薬の作用機序にプロスタグランジンの代謝経路が関与している点を指摘した。この発見は、プロスタグランジンの代謝経路の活性化が誘導されやすいようながん種においては、SPT阻害薬が抗がん剤として有効である可能性を示した点で医学的にも価値が高い。このように著者による本研究の成果は、未知の生命現象の理解や医療に有効な化合物の探索と活用方法を提示した点で、その功績は極めて大きい。

平成30年1月29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(生物科学)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。