

氏名	周 思奇		
学位の種類	博 士 (理学)		
学位記番号	博 甲 第 9 0 4 7 号		
学位授与年月日	平成 3 1 年 3 月 2 5 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	Physiological Effect of Organic Acid on Melanocytes and Melanoma Cells (メラニン細胞およびメラノーマ細胞に対する有機酸の生理作用)		
主査	筑波大学准教授	理学博士	坂本 和一
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	三浦 謙治
副査	筑波大学教授	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

## 論 文 の 要 旨

本論文は、ミトコンドリアの TCA サイクルにおける有機酸に着目し、メラニン産生細胞のメラニン合成に対する有機酸の生理作用とその作用機序に関する解析を行い、その成果について論述したものである。メラニン、メラニン細胞 (メラノサイト) により産生される色素で、皮膚や髪の毛の、または中枢神経系の灰白質の色素として働いている。ヒトの表皮では、メラニンの産生は主に紫外線により誘導され、表皮ケラチノサイトの活性酸素種 (ROS) による DNA 損傷から細胞を保護する役割を果たしている。一方、メラニンの過剰産生は ROS を発生させ、メラノーマの原因の一つとなっている。したがって、メラノサイトにおけるメラニン産生の絶妙な調節が細胞内の ROS による影響とメラノーマ癌細胞の発生を制御している。本論文で著者は、細胞内 ROS 生成に関わるミトコンドリアのエネルギー産生経路 (TCA 回路) に着目し、主要産物である有機酸によるメラニン産生とメラニン合成の作用機序について解析を行った。本論文は、マウス B16F10 メラノーマ細胞におけるピルビン酸およびピルビン酸エチルのメラニン産生に対する生理作用と作用機序を明らかにし、さらにヒト HMV-II および G-361 メラノーマ細胞とマウス B16F10 メラノーマ細胞およびヒト正常メラノサイト NHEM における ROS 産生およびメラニン産生に対するクエン酸の生理作用を明らかにすることを目的にした。

本論文の第一部で著者は、ピルビン酸 (PA) とピルビン酸エチル (EP) に着目し、マウス B16F10 メラノーマ細胞のメラニン産生に対する PA と EP の生理作用を解析している。その結果、著者は、PA と EP が B16F10 メラノーマ細胞におけるメラニン産生を顕著に抑制し、しかもメラニン産生のプロモーターである  $\alpha$ -MSH またはフォルスコリン (Fsk) 存在下でも顕著にメラニンの産生を抑制することを明らかにした。さらに著者は、メラニン合成の中心的働きをする触媒酵素 tyrosinase とその転写因子 Microphthalmia 随伴転写因子 (MITF) の発現が PA と EP により阻害されることを明らかにした。さらに著者は、ERK、PI3K および GSK3  $\beta$  の各阻害剤を用いて、メラニン合成系経路に対する PA と EP の作用を解析した。その結果、

著者は、AKT または GSK3 $\beta$  の各阻害剤が PA と EP のメラニン産生阻害効果を完全または部分的に遮断したことから、PA と EP が AKT/GSK3 $\beta$  の経路を介してメラニン産生を抑制していると結論づけている。一方、著者は、ERK 阻害剤はメラニン産生に対する EP の抑制効果を部分的に阻害したが、PA の抑制効果は阻害しなかったことから、EP は部分的に ERK 経路を介してメラニン産生の抑制に関わっていると述べている。

本論文の第二部で著者は、クエン酸 (CA) に着目し、マウス B16F10 メラノーマ細胞やヒト HMV-II および G-361 メラノーマ細胞、およびヒト正常メラノサイト NHEM の各細胞を用いて、メラニン産生や ROS 産生、および細胞死に対する CA の生理作用を解析している。その結果、著者は、CA がヒト正常メラノサイト NHEM、ヒトメラノーマ細胞 HMV-II および G-361 ではメラニン産生を顕著に抑制したものの、マウス B16F10 細胞では逆にメラニン産生を促進したことを明らかにしている。著者は、この傾向はタンパク質レベルでも同様で、CA が MITF と tyrosinase の発現をヒト NHEM 細胞では低下させ、マウス B16F10 細胞では増加させたと述べている。さらに著者は、CA が細胞内 ROS の産生をヒト NHEM 細胞では減少させ、マウス B16F10 細胞では増加させたことを明らかにした。また著者は、DPPH 解析により、CA が細胞外で化学的抗酸化能力を持たないことを見出した。さらに著者は、CA が正常細胞よりも癌細胞において生存率をより低下させたと述べている。

本論文で著者は、(1) ピルビン酸およびピルビン酸エチルがマウスメラノーマ細胞において PI3K/AKT 経路を介して MITF や tyrosinase の発現を抑制し、メラニン産生を顕著に抑制する事実を明らかにした。さらに著者は、(2) メラニン産生や ROS 産生に対するクエン酸の生理作用はヒトとマウスの細胞では大きく異なり、ヒト正常メラノサイトやヒトメラノーマ細胞では MITF や tyrosinase の遺伝子発現、メラニン産生、および ROS 産生などが抑制されるものの、マウスメラノーマ細胞では真逆の効果を示すことを明らかにしたと述べている。

## 審 査 の 要 旨

本論文は、生体内のエネルギー産生に関わる主要な有機酸に着目し、メラニン産生細胞のメラニン合成に対する有機酸の生理作用とその作用機序に関する解析を行い、(1) ピルビン酸とピルビン酸エチルが、マウスメラノーマ癌細胞 B16F10 におけるメラニン産生とそれに関わる MITF/tyrosinase 遺伝子の発現を顕著に抑制すること、さらに (2) クエン酸が、ヒト正常メラノサイトとヒトメラノーマ細胞ではメラニン産生や ROS の産生を抑制し、一方マウスメラノーマでは増加させることから、ヒトとマウスの細胞ではメラニン産生細胞に対するクエン酸の作用が大きく異なる事実を明らかにしたものである。本論文は、ヒトやマウスのメラニン産生細胞におけるメラニンや ROS の産生に対する有機酸の生理作用と作用機序の一部を明らかにしたもので、細胞生物学的にも大きな意義があるばかりでなく、皮膚の色素異常疾患の治療に向けた薬剤治療法開発の道を開くもので、その功績は極めて大きい。

平成 31 年 1 月 28 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 (理学) 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。