



Title	山椒熱水抽出物により誘導されるオートファジー細胞死に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	野崎, 怜雄
Citation	北海道大学. 博士(臨床薬学) 甲第13184号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/69526
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Reo_Nozaki_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(臨床薬学) 氏名 野崎 怜雄

学位論文題名

山椒熱水抽出物により誘導されるオートファジー細胞死に関する研究

大建中湯は、3つの生薬（乾姜、人参、山椒）の熱水抽出成分と膠飴からなる漢方薬である。現在、最も多く処方されている漢方薬であり、主に術後イレウス発生を防止する目的で処方される。山椒 (*Zanthoxylum piperitum*) は日本固有種で、漢方薬の構成生薬として利用されてきた。これまで当研究室グループは山椒主要成分 hydroxy- α -sanshool が腸管上皮細胞の TRPA1 チャンネルを介して腸管運動や腸管血流を増加させることを明らかにしてきた。さらに、腸管神経細胞の KCNK9 カリウムチャンネルを抑制して細胞膜電位を上昇させることで神経細胞の易刺激性を高めることも明らかにしてきた。当研究室グループとシカゴ大学で共同で行った大建中湯のヒト大腸癌細胞異種移植モデルでは、未公表ながら腫瘍抑制効果を観察している。さらに、大腸癌発癌モデルマウスにおいて大建中湯の癌抑制効果を明らかにしてきた。しかしながら、大建中湯の癌増殖抑制効果および発癌抑制効果の発現機序については明らかとなっていない。

これまでに本研究室では大建中湯の癌増殖抑制および発癌抑制について、各構成生薬の癌細胞への影響を検討してきた。その先行研究から、山椒成分に癌増殖抑制作用がある可能性が強く示唆された。更に、大建中湯の薬物動態試験結果から山椒の主要成分が大量かつ急速に血中に移行することにも着目し、山椒熱水抽出物 (*Zanthoxylum Fruits Extract*、以下 ZFE) の癌細胞に対する影響を明らかにすることを目的として研究を行った。

1. ZFE が各種癌細胞形態および細胞増殖に与える影響の解析

始めに ZFE が各種癌細胞の形態に及ぼす変化を検討した。実験には由来の異なる以下の癌細胞を用いた、DLD-1 (大腸癌)、HepG2 (肝臓癌)、A549 (肺癌)、MCF-7 (乳癌)。また、正常細胞として IEC-6 (ラット小腸) を用いた。ZFE で 24 時間処理した細胞を光学顕微鏡で観察すると、DLD-1, HepG2 の細胞質に多量の空胞構造が確認された。A549, MCF-7, IEC-6 ではこのような変化は確認されなかった。次に、ZFE を添加した細胞の増殖活性を測定した。その結果、DLD-1, HepG2 では増殖率が有意に減少した。また、A549, MCF-7, IEC-6 には増殖に影響を及ぼさなかった。DLD-1 を用いて、トリパンブルー染色における生死判定、生細胞数の計測を行ったところ、ZFE が DLD-1, HepG2 に細胞死を引き起こすことが明らかとなった。以後、ZFE が引き起こす細胞死の機序について、DLD-1 を用いて解析を行うこととした。

2. ZFE が引き起こす細胞死とオートファジーに関する解析

ZFE が引き起こす細胞死の種類を解析するため、アポトーシスの指標であるカスパーゼの

関与を調べたところ、ZFE はカスパーゼ 3/7 活性に影響を及ぼさなかった。形態学上の違いから分類されている主要なプログラム細胞死として、アポトーシス、ネクロプトーシス、オートファジー細胞死の3つが挙げられるがこれまでの形態学的な検討とカスパーゼ活性測定の結果から、オートファジー細胞死の可能性に着目した。

始めに ZFE によって引き起こされた空胞構造がオートファジーによるものかを解析するため、電子顕微鏡による微細形態の観察を行った。その結果、オートファジーに特徴的なオートファゴソームやオートリソソーム構造が観察された。更に、オートファジーマーカーである LC3-II のウェスタンブロットの結果から ZFE がオートファジーを亢進することが明らかとなった。

次に、ZFE が引き起こすオートファジーと細胞死との関連性を調べるため、siRNA を用いてオートファジー必須遺伝子の一つである ATG5 のノックダウン (KD) を実施し検討を行った。ATG5 を KD した DLD-1 に ZFE を添加すると、コントロールと比較し空胞形成は減少した。さらに、ATG5 の KD は ZFE による細胞死を軽減することが明らかとなった。これらのことから ZFE が引き起こす細胞死がオートファジー細胞死である可能性が強く示唆された。

3. ZFE が引き起こすオートファジー細胞死に関するシグナル伝達経路の解析

ZFE が引き起こすオートファジー細胞死に関するシグナル伝達経路の解析を行ったところ、ZFE がストレス応答性 MAPK である JNK を活性化することが明らかとなった。さらに JNK 阻害剤を用いて、ZFE が細胞増殖とオートファジーに及ぼす影響を検討したところ、JNK 阻害剤がオートファジーマーカー LC3-II 発現量および空胞形成を抑制した。同時に JNK 阻害剤によって ZFE の引き起こすオートファジー細胞死が抑制されることが明らかとなった。以上のことから、ZFE が引き起こす細胞死には JNK の活性化が必要であることが明らかとなった。

本研究では山椒熱水抽出物 ZFE が癌細胞の細胞質に異常な空胞形成および細胞死を引き起こすことを足掛かりに解析を進め、以下の3つの点を明らかにした。

- ① ZFE は癌細胞のオートファジーを過剰に亢進し細胞死を引き起こす
- ② ZFE によって引き起こされる細胞死はオートファジー細胞死である
- ③ ZFE によって引き起こされるオートファジー細胞死には JNK の活性化を必要とする

現在臨床で用いられている多くの抗がん剤は癌細胞へのアポトーシス誘導が主流である。しかし、多くの癌細胞では p53 遺伝子変異などの要因によりアポトーシス感受性が低下している。また、癌細胞では正常細胞よりもオートファジーに依存的な代謝をすと言われ、癌細胞のオートファジーを標的とした治療法は有効な手段であると考えられている。癌のオートファジーの標的治療法として、オートファジー阻害剤と抗癌剤を組み合わせた臨床試験は既に行われている。一方で、オートファジー細胞死を利用した治療法は未だ臨床応用に至っていない。本研究では ZFE が癌細胞に対し、JNK 依存性オートファジー細胞死を誘導することを世界で初めて明らかにした。本成果は、オートファジー細胞死を標的とした臨床応用に向け、抗癌剤開発のシーズとなる可能性を見出した。