



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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13184号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/69526
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Reo_Nozaki_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 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

	主 査	教 授	武田 宏司
審査担当者	副 査	教 授	井関 健
	副 査	准教授	小林 正紀
	副 査	講 師	中川 宏治

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

博士学位論文審査等の結果について（報告）

3種の生薬（乾姜、人参、山椒）と膠飴から構成される大建中湯は、わが国において消化管の器質的あるいは機能的障害に対して広く使用されている。最近、大腸癌モデルマウスにおいて、大建中湯が発癌を抑制することが報告された。しかしながら、その明確な機序は明らかにされていない。本論文において、著者は大建中湯の構成生薬の一つである山椒に注目し、その熱水抽出物（*Zanthoxylum Fruits Extract*, 以下 ZFE）のヒト由来の各種癌細胞株に対する抗腫瘍効果とその機序について検討した。

最初にヒト由来の各種細胞株を用い、ZFE が各種癌細胞の増殖および細胞形態に及ぼす影響を検討した。解析対象とした DLD-1（大腸癌）、Caco-2（大腸癌）、WiDr（大腸癌）、HepG2（肝臓癌）、A549（肺癌）、MCF-7（乳癌）のなかで、DLD-1、Caco-2 および HepG2 において、ZFE 処理は細胞増殖の有意な抑制と細胞死を引き起こした。また光学顕微鏡による観察により、ZFE は細胞質において多量の空胞形成というきわめて特異な形態変化を引き起こすことが明らかとなった。一方、IEC-6（ラット由来正常腸上皮細胞）に対して、ZFE は細胞増殖、細胞形態ともに明らかな影響を及ぼさなかった。

次に、DLD-1 を用い、ZFE が誘導する細胞死の機序について解析をおこなった。まず、アポトーシスの関与を調べたが、ZFE はカスパーゼ 3/7 活性に影響を及ぼさなかったことから、カスパーゼ依存性アポトーシスの関与は否定された。また、光学顕微鏡による形態観察からネクロシスは否定的であった。著者は、ZFE が細胞質に特異な空胞形成を引き起こすことに注目し、オートファジー細胞死の可能性を検討した。電子顕微鏡による超微形態学的な解析の結果、ZFE によって誘導された空胞構造はオートファゴソームおよびオートリソソームであることが強く示唆された。さらに、オートファジーマーカーである LC3 のウェスタンブロッティングにおいて、ZFE 処理により LC3-II の増加が認められた。以上の結果から、ZFE は DLD-1 に対してオートファジーを誘導することが明らかとなった。次に ZFE による細胞死にオートファジーが関与しているかを明らかにするため、siRNA を用いてオートファジー必須遺伝子の一つである ATG5 のノックダウンをおこなった。DLD-1 に対する ATG5 siRNA 処理は、コントロールと比較し ZFE による空胞形成を著明に抑制し、細胞死を有意に軽減さ

せた。以上より、ZFEにより引き起こされる細胞死はオートファジー細胞死であると結論された。

ZFEが誘導するオートファジー細胞死のメカニズムをさらに解明するため、細胞内シグナル伝達経路の解析を行った。その結果、ZFEはストレス応答性MAPキナーゼである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がオートファジーおよび細胞死に及ぼす影響を検討したところ、JNK阻害剤はZFEによる空胞形成および細胞死を抑制した。以上の結果から、ZFEはJNKの活性化を介してDLD-1にオートファジー細胞死を誘導することが明らかとなった。

これを要するに、著者は、山椒熱水抽出物が、ヒト大腸癌細胞DLD-1をはじめとする複数の癌細胞株に対し、特異な空胞形成をともなったJNK依存性オートファジー細胞死を誘導するとの新知見を得たものである。本研究で得られた知見は、大腸癌をはじめいまだ治癒の困難な各種進行癌に対する新規治療法の開発に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（臨床薬学）の学位を授与される資格あるものと認める。