

早稲田大学審査学位論文

博士（人間科学）

概要書

六君子湯の抗酸化ストレス作用及び
新たながん治療標的としての DNA ポリメラーゼシータ
に関する研究

Studies of antioxidative effects of Rikkunshito and DNA
polymerase theta as a new cancer therapy target

2020 年 7 月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

王 梓

WANG, ZI

研究指導担当教員： 千葉 卓哉 教授

本研究は老化を遅らせ、健康寿命を延長することを目的とし、老化を遅らせる方法の解明に重要で、老化研究の核心をなすカロリー制限(Calorie restriction, CR)、抗酸化能、DNA修復及びがんの治療法について考察した。具体的には、CR模倣物の候補である六君子湯の抗酸化効果及び抗老化効果に関する研究と、DNA修復酵素であるDNAポリメラーゼシータ (DNA polymerase theta, PolQ) を標的にしたがんの新たな治療法に関する研究の二つの研究を行った。

第一章では、老化を引き起こす要因である酸化ストレス及びDNA修復エラーの蓄積について概説し、寿命を延長できる方法であるCRとの関連性について簡単に紹介した。最後に本研究の構成について説明した。

第二章では、CRの抗老化効果及び寿命延長効果のメカニズムを概説し、CR模倣物の候補である六君子湯のCR模倣効果を抗酸化ストレス作用を中心に検証した。CRは抗酸化能、遺伝子修復能、ミトコンドリア機能などを向上させることで寿命延長に寄与していることが示唆されたが、ヒトでの実行が難しいとされているため、食事制限せずにCRの効果を模倣できるCR模倣物の特定が重要である。CRの効果は食欲亢進作用を持つ神経ペプチドであるニューロペプチド Y (Neuropeptide Y, Npy) の発現亢進に依存していることが報告されているため、Npyの発現を亢進させる物質はCR模倣物になる可能性が高い。この仮説に従い、我々は古来より食欲不振の改善に使われ、現在はがん治療の後の食欲回復にも応用されている伝統的な漢方薬である六君子湯に注目した。六君子湯はNpyの発現を上昇させ、食欲を亢進させることが知られている。したがって、六君子湯はNpyの発現亢進を介してCRの効果を模倣できる可能性が高い。六君子湯のCR模倣効果及びその効果とNpyの関連性を検証するために、我々は六君子湯をNpy KOマウス及びNpy WTマウスに投与し、自由摂食の状態で飼育した。ヒトの中年期にあたる、82-89週齢のマウスを用いた。自然老化の過程で寿命について解析した結果、予想に反しNpy KOマウス及びNpy WTマウスの両者において六君子湯投与による寿命延長は見られなかった。次に、六君子湯がCRの抗酸化能を亢進させる効果を模倣できるかについて検証するため、我々は六君子湯を若年期のマウスに投与し、薬剤により強い酸化ストレスを与えた。強い酸化ストレスがかけられている状態においても、六君子湯の投与による生存率の上昇が認められなかった。しかし、遺伝子の発現の変化を調べた結果、六君子湯の投与は抗酸化能に関連する遺伝子である *Glutathione s-transferase m3 (Gstm3)* 及び *Heme oxygenase 1 (Hmox1)* の発現、ミトコンドリア機能に重要な遺伝子である *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

coactivator 1-alpha (Pgc-1a) の発現、そして遺伝子修復に関与する遺伝子である *p21* の発現を有意に亢進させた。さらに、酸化ストレスのタンパク質マーカーである Nitrotyrosine (3-NT) 及び Hydroxynonenal (HNE) の発現レベルを調べた結果、六君子湯の投与によって酸化ストレスの蓄積が有意に減少したことが認められた。以上の結果から、六君子湯の投与は分子レベルで CR の抗酸化ストレス作用を模倣できることが明らかになった。

第三章では、DNA 修復経路について概説し、Microhomology-mediated end joining (MMEJ) 修復経路とがん細胞の増殖との関連性について考察した。MMEJ 経路の中心的なタンパク質である PolQ ががん細胞で過剰発現していることが報告されており、MMEJ 修復経路はがん細胞の抗がん剤への抵抗性に関連していることが示唆されている。MMEJ 修復経路のメカニズムを解明するために、我々は MMEJ 経路によって DNA の切断が修復された際に、緑色蛍光を発するレポーター細胞系を構築した。MMEJ 経路が DNA の二本鎖の切断及び一本鎖の切断の両方の修復に PolQ 依存的に関与していることが明らかになり、我々は PolQ に依存する MMEJ 修復経路が複製ストレスによる DNA 二本鎖の切断の修復に重要であるモデルを提唱した。MMEJ 修復経路が PolQ に依存して、複製ストレスをかけるような抗がん剤による DNA ダメージを修復し、抗がん剤に対する抵抗性を発揮している可能性が示唆された。次に、我々はヒト骨肉腫由来の U2OS 細胞の PolQ 機能を抑制し、複製ストレスをかける抗がん剤を異なる濃度で細胞に投与した。48 時間後に生存率を解析した結果、PolQ の機能が抑制された U2OS 細胞は各投与濃度において生存率が低下し、抗がん剤への感受性が高くなることが明らかになった。また、PolQ の機能が抑制された細胞では複製ストレスによる DNA の断片化が有意に増加することもコメットアッセイの結果によって明らかになった。さらに、我々は難治性がんとしてされている乳がん由来の BT-474 細胞及び MB-MDA-436 細胞を用い、PolQ 機能を抑制し、複製ストレスをかける抗がん剤を異なる濃度で細胞に投与した。48 時間後に生存率を解析した結果、PolQ の機能抑制によって乳がん細胞も抗がん剤に対して高い感受性を示した。また、DNA の断片化も PolQ の機能抑制によって有意に増加した。以上の結果から、PolQ の機能抑制と抗がん剤の投与を合わせることは様々な種類のがん細胞で適用できる汎用性のある新しいがん治療法になる可能性が示唆された。

第四章では、二つの研究の成果をまとめ、総合的に考察し、今後の課題について論じた。これらの研究成果が健康寿命の延長に繋ぎ、超高齢社会が抱える諸問題の解決に貢献できることが期待される。