

早稲田大学審査学位論文

博士（人間科学）

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

目次

略語リスト	3
第一章 はじめに	5
第二章 カロリー制限模倣物の候補である六君子湯の抗酸化効果に関する研究	
2-1 序論	7
2-2 材料と方法	10
2-3 結果	15
2-4 考察	19
第三章 DNA 修復酵素である DNA ポリメラーゼシータを標的にしたがんの新たな治療法に関する研究	
3-1 序論	24
3-2 材料と方法	28
3-3 結果	33
3-4 考察	35
第四章 結語	39
謝辞	41
参考文献	42
図	53

略語リスト

Atm, Ataxia-telangiectasia-mutated

Atr, Ataxia telangiectasia and rad3 related

Brca1, Breast cancer susceptibility gene 1

BW, body weight

Cpt1a, Carnitine palmitoyltransferase 1a

CRISPR-Cas9, Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins 9

DNA ポリメラーゼシータ (PolQ, DNA polymerase theta)

DNA ポリメラーゼベータ (PolB, DNA polymerase beta)

eGFP, Enhanced green fluorescent protein

FACS, Fluorescence-activated cell sorting

FoxO, Forkhead box O

gRNA, guide RNA

Gstm3, Glutathione s-transferase m3

Gstp2, Glutathione s-transferase p2

Her2, Human epidermal growth factor receptor 2

Hmox1, Heme oxygenase 1

HNE, Hydroxynonenal

Hprt, Hypoxanthine phosphoribosyltransferase

HU, Hydroxyurea

H2AX, H2A histone family member X

ICR, Institute of cancer research

Lig1, DNA ligase 1

Lig3, DNA ligase 3

MMEJ, Microhomology-mediated end joining

MRN 複合体 (Mre11-Rad50-NBS1 complex)

Pgc-1a, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PI3K/Akt, Phosphoinositide 3-kinase /Akt

SAMP8, Senescence-accelerated mice prone 8

SDSA, Synthesis-dependent strand annealing

shRNA, small hairpin RNA

SPF, specific pathogen free

3-NT, 3-nitrotyrosine

3-ニトロプロピオン酸 (3NPA, 3-nitropropionic acid)

インスリン/インスリン様成長因子 (insulin/IGF-1, Insulin/Insulin-like growth factors)

エトポシド (Etop, Etoposide)

カロリー制限 (CR, Calorie restriction)

カンプトテシン (CPT, Camptothecin)

自由摂食 (AL, ad libitum)

相同組み換え (HR, homologous recombination)

ドキソルビシン (DXR, doxorubicin)

ニューロペプチド Y (Npy, Neuropeptide Y)

ノックアウト (KO, Knock Out)

非相同末端結合 (NHEJ, non-homologous end joining)

マイクロホモロジー (MH, Microhomology)

野生型 (WT, Wild type)

六君子湯 (RKT, Rikkunshito)

第一章 はじめに

現代医学の発達に伴い、古くから人々を苦しめてきた様々な病気の治療法が見つかり、人類はより良質な生活を手に入れてきた。そして人類の平均寿命も 1960 年の 52.58 歳から 2017 年の 72.38 歳に大幅に延長された (World Bank Open Data, 2018)。しかし、誰も避けることができず、いずれ直面しなければならない問題が存在している。それは老化と死である。老化とは成熟期以降の生体機能の衰退を意味し、がん、II 型糖尿病、心血管疾患、そして神経変性疾患などを引き起こす要因の一つであり (Luo J et al., 2020)、やがて人々に死を招く。また、これらの病気は長期間の治療や介護を必要とするものが多く、その発症により、健康寿命が短縮され、健康寿命と平均寿命の間に差が生じる。健康寿命とは自律的に日常生活ができ、介護などが必要ではない健康な期間のことであり、内閣府の令和元年版高齢社会白書によれば、日本における健康寿命と平均寿命の差は、男性では 2016 年時点で 8.84 年あり、女性は 12.35 年もある (内閣府、2019)。この差は老化による健康問題が如何に深刻であることを示すほか、生産力の大きな低下及び莫大な介護費用・医療費が必要な年数をも表している。そのため、老化のメカニズムを解明し、老化を遅らせる方法を研究することは非常に重要かつ緊急を要する課題となった。人類共通の根本的な願望である不老長寿の実現のみならず、超高齢化社会が抱える人間科学的な諸問題を解決するためにも、老化及び老化関連疾患の発症メカニズムの解明とその制御方法の開発は重要な研究課題である。

老化を引き起こす要因として、フリーラジカル説、エラー蓄積説などが提唱されている。フリーラジカルとは不対電子を持つ分子で、非常に反応しやすい性質を持ち、脂質、タンパク質、そして DNA に反応し、細胞、組織にダメージを与える (Pham-Huy LA et al., 2008)。フリーラジカルは、生体外の要因として、紫外線の刺激によって皮膚で生成することが報告されている (Gonzalez S and Pathak MA, 1996)。生体内では、主にミトコンドリアの電子伝達系によるエネルギー産生の過程で生成される (Balaban RS et al., 2005)。ミトコンドリア機能が正常な場合、スーパーオキシドディスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ペルオキシレドキシニンなどの抗酸化酵素の働きによって活性酸素種が消去され、最終的に水に還元される (Balaban RS et al., 2005)。しかし、加齢に伴いミトコンドリアの DNA に突然変異が蓄積され、ATP の生成能力及び抗酸化酵素の活性が低下し、消去されなかった活性酸素種が細胞障害を引き起こし、さらにアポトーシスも誘導される

(Chistiakov DA et al., 2014)。そのため、ミトコンドリアの機能維持及び生体の抗酸化能は老化と強く関連していることが示唆されている。

老化を遅らせ寿命を延長させる方法として最も注目されているのは、カロリー制限 (Calorie restriction, CR) である。1935 年、McCay らがラットに対して食餌量が通常量の 70% になるように CR を行ったところ、寿命が延長されることが報告された (McCay CM et al., 1935)。その後、線虫からマウスまでの様々な動物種で CR の抗老化効果及び寿命延長効果が確認された (Shimokawa I et al., 2008)。さらに、アカゲザルによる実験でも CR による寿命延長が確認され、がんの発症率も CR によって低下することが確認された (Mattison JA et al., 2017)。しかし、社会性が強く、精神的ストレスの蓄積も懸念されるヒトでは CR の実行が難しいため、実際に摂取カロリーを制限しなくとも CR の抗老化及び寿命延長効果が得られるようなカロリー制限模倣物の研究が必要になる。

一方、エラー蓄積説とは損傷された DNA が修復されず、DNA の変異及び異常タンパク質がある程度蓄積された場合、細胞老化及びアポトーシスが誘導されるという説である。DNA が放射線や活性酸素種、化学物質などによって切断または欠損された場合、p53 ファミリータンパク質の活性化によって DNA 修復因子が活性化され、DNA が修復される (Lakin ND et al., 1999)。しかし、修復にエラーが発生した場合、DNA が元通りに修復されず、染色体が不安定になり、DNA の変異及び異常タンパク質が蓄積される。このようなエラーの蓄積によってゲノムが不安定になり、細胞周期の停止やアポトーシスが誘導され、さらに細胞ががん化するリスクも上昇する (Maynard S et al., 2015; Nicolai S et al., 2015)。また、DNA 修復に関連するタンパク質の変異によって、ウェルナー症候群など、老化の徴候が早期に認められる早老症が引き起こされることも知られている (Martin GM, 1996; Schumacher B et al., 2008)。そのほか、前述の CR は DNA の正確な修復を促進し、加齢による DNA 損傷、変異の蓄積を減少し、老化関連疾患の発症を減少させることが知られており (Heydari AR et al., 2007)、CR と DNA 修復の関連性が強く示唆されている。

本研究では、以上で述べたような抗酸化能、カロリー制限模倣物、DNA 修復、そしてがんなどの老化研究の核心的な部分に着目し、「カロリー制限模倣物の候補である六君子湯の抗酸化効果に関する研究」(第二章)及び「DNA 修復酵素である DNA ポリメラーゼシータを標的にしたがんの新たな治療法に関する研究」(第三章)の二つの研究を行った。

第二章 カロリー制限模倣物の候補である六君子湯の抗酸化効果に関する研究

2-1 序論

2-1-1 カロリー制限による寿命延長効果

前述のように、CRの寿命延長効果及び抗老化効果は様々な生物種で確認された。そのメカニズムにはまだ不明な点が多いが、インスリン/インスリン様成長因子 (Insulin/Insulin-like growth factors, insulin/IGF-1) 経路の活性抑制と関連していることが報告されている (Shimokawa I et al., 2008)。Insulin/IGF-1 シグナルは糖・脂質代謝を調節する重要なシグナル経路で、寿命にも深く関連していることが明らかになっている (Brown-Borg HM, 2015)。insulin/IGF-1 シグナルは高栄養状態で活性化され、その下流にある Phosphoinositide 3-kinase /Akt (PI3K/Akt) シグナルが活性化され、細胞周期の進行やタンパク質合成が促進され、アポトーシスが抑制される (Rommel C, 2001)。また、PI3K/Akt シグナルは抗酸化能に重要な転写因子である Forkhead box O (FoxO) ファミリーをリン酸化し、核外へ移行させることによって不活性化させる (Jung HJ et al., 2015)。このことから、insulin/IGF-1 シグナルは FoxO を不活性化し、抗酸化能を抑制する働きを持つことが示唆された。さらに、insulin/IGF-1 シグナルの抑制は線虫、ショウジョウバエ、マウスなどの寿命を延長させることが報告されており (Kenyon CJ, 2010)、ヒトの長寿者がコントロール群に比較して IGF-1 受容体の変異が多く、insulin/IGF-1 シグナルが低下していることも報告されている (Tazearslan C et al., 2012)。CRによる低栄養状態は、寿命を負に制御する insulin/IGF-1 シグナルを不活性化することで寿命延長効果を得ている可能性が示唆されている。

CRは、ミトコンドリア機能に重要である *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Pgc-1a)* の肝臓での発現を亢進させることも報告されている (Chiba T et al., 2009)。Pgc-1a はグルコースの取り込みを亢進させ、脂肪酸酸化に重要な遺伝子である *Carnitine palmitoyltransferase 1a (Cpt1a)* の発現を上昇させることで脂肪酸の代謝を活性化する機能を有している (Du Q et al., 2019)。さらに肝臓、脂肪組織、そして筋肉でのミトコンドリア生合成を促進する作用を持ち、ミトコンドリアの機能維持や抗酸化能にも重要な役割を持っている (Anderson RM et al., 2008)。さらに、CRは、酸化ストレス応答や発がんの抑制に重要な転写因子である Nrf2 を肝臓で活性化させることも明らかになっている (Pearson KJ et al., 2008)。CRによって Nrf2 の抑制因子である Keap1 と Nrf2 の結

合が解除されると、Nrf2 は核内へ移行し、*Glutathione s-transferase m3 (Gstm3)*、*Glutathione s-transferase p2 (Gstp2)*、*Heme oxygenase 1 (Hmox1)* などを含む酸化ストレス防御能に関連する遺伝子の発現を誘導する (Abed DA et al., 2015; Chanas SA et al., 2002; Miyazaki Y et al., 2014)。また、CR による Nrf2 の制御は、細胞周期の進行を抑制して DNA 修復経路を誘導する *p21* にも関連する。酸化ストレス下では、CR によって *p21* の肝臓及び海馬での発現が亢進されることも報告されている (Yamaza H et al., 2010)。

CR による寿命延長効果は、サーチュイン経路と関連していることも報告されている (Guarente L, 2008)。サーチュイン経路の研究は酵母菌の *Sir2* 遺伝子から始まり、*Sir2* は NAD⁺ に依存するヒストン脱アセチル化酵素であることが明らかにされ、酵母菌の寿命と強く関連していることが報告された (Imai S et al., 2000)。哺乳類では *Sir2* のオーソログであるサーチュインファミリー (Sirtuin family) と呼ばれる *Sirt1* から *Sirt7* までの 7 種類の遺伝子が存在し、特に *Sirt1* に関する研究が盛んに行われてきた。*Sirt1* は、Pgc-1a を介してミトコンドリアの機能を亢進させ、肝臓及び筋肉で脂肪酸の酸化を促進する作用が報告されている (Chang HC and Guarente L, 2014)。また、*Sirt1* の発現亢進が脂肪細胞によって分泌され、抗炎症作用及びインスリン感受性を高める作用を持つアディポネクチンを増やすことが明らかになっており、CR もアディポネクチンの分泌を増やす作用が報告されている (Qiang L et al., 2007; Ding Q et al., 2012)。さらに *Sirt1* は抗酸化能に重要である FoxO ファミリーの活性化にも重要な働きを持っている (Guarente L, 2008)。CR は NAD⁺ を増加させ、NAD⁺ の NADH に対する割合を上昇させることで *Sirt1* の活性を上昇させる (Canto C and Auwerx J, 2013)。さらに、CR は *Sirt1* の発現を脳、脂肪組織、腎臓、肝臓など様々な組織で亢進させることが報告されている (Cohen HY et al., 2004)。また、*Sirt1* ノックアウト (Knock Out, KO) マウスでは CR を行っても寿命が延長しないことや CR による遺伝子発現変化が *Sirt1* KO によって認められなくなることも報告されており (Boily G et al., 2008, Mercken EM et al., 2014)、CR とサーチュイン経路の関連性が強く示唆されている。

以上で述べたように、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ている (図 1)。しかし、ヒトで長期間の CR を実行することは困難であり、精神的なストレスも大きい。したがって、摂取カロリーを実際に制限しなくとも CR の抗老化効果を模倣できるような CR 模倣物の特定

が重要な課題になる (Ingram DK et al., 2006)。CRによって摂食行動が亢進することから (Anton SD et al., 2009)、我々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) に着目した。

2-1-2 カロリー制限模倣物の候補である六君子湯と摂食を制御する Npy の関連性
Npyは強い摂食促進作用を持ち、主に視床下部の弓状核に存在し、胃から分泌されるホルモンであるグレリンによって発現が亢進され (Kohno D et al., 2003)、insulinシグナルによって発現が抑制される (Sato I et al., 2005)。グレリンは空腹時に発現が上昇し、胃酸の分泌及び胃の蠕動を促進し、インスリンの分泌を抑制する作用を持っている (Broglia F et al., 2013)。CRによってグレリンの血中レベルが上昇し、弓状核におけるNpyの発現は上昇することが報告されている (Chiba T et al., 2009)。さらに、Npy KOによってCRの寿命延長効果、抗酸化能の亢進効果及びがんの抑制効果が認められなくなることが明らかになった (Chiba T et al., 2014)。そのため、Npyの発現を亢進させる物質はCR模倣物になる可能性が非常に高い。

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使用されている伝統的な漢方薬である六君子湯 (Rikkunshito) に注目した。六君子湯は人参、蒼朮、半夏、茯苓、陳皮、そして甘草の六種類の生薬に大棗、生姜を配合した漢方薬で、血中グレリン濃度を上げることで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 (Fujitsuka N and Uezono Y, 2014)。したがって、六君子湯はNpyの発現亢進を介して、CRの寿命延長効果、抗酸化能を亢進させる効果などを模倣できる可能性が高い。最近の研究では、寿命が短いマウスであるKlothoマウス、認知機能の低下を早期に示す老化促進モデルマウスであるSAMP8 (Senescence-accelerated mice prone 8) マウス、そして16か月齢以上のICR (Institute of cancer research) マウスに六君子湯を長期投与した結果、オスのマウスの寿命が延長され、Sirt1の発現が視床下部において上昇することが報告された (Fujitsuka N et al., 2016)。本稿の六君子湯に関する研究では、自然老化の過程での六君子湯投与がCRの寿命延長効果を模倣し、そのCR模倣効果がNpyに依存しているかについて解析した。さらに、六君子湯は酸化ストレスを負荷した状態において、CRの抗酸化能を亢進させる効果を模倣または増幅できるか否かについて考察した。

2-1-3 研究の概要と構成

本研究は以下の三つの実験で構成される。

実験1では、六君子湯が自然老化の過程でCRの寿命延長効果を模倣できるかどうかを解析した。六君子湯のCR模倣効果とNpyの関連性を検証するために、Npy野生型(Wild type, WT)マウス及びNpyKOマウスに六君子湯を投与し、寿命を測定した。また、体重、脂肪組織の重量、血中パラメータなども測定した。そのほか、予備実験として、C57BL/6マウスを用いて、六君子湯投与によるグレリンの血中濃度及びNpyの発現変化を確認した。実験1及び予備実験のマウスの飼育、寿命解析及び各種パラメータの測定は長崎大学の下川功先生の指導の下で小松利光博士が行った。データの統計解析は筆者が行った。

実験2では、六君子湯の投与がCRの抗酸化能を上昇させる効果を模倣できるか否かについて検証した。C57BL/6マウスに六君子湯を投与し、一定期間飼育した後に酸化ストレスを与えた。生存率、体重減少率、血中パラメータなどを計測し、肝臓での遺伝子発現量、酸化ストレスの蓄積などを測定した。

実験3では、脂質代謝にストレスがかけられている状態で六君子湯がCRの抗酸化効果を増幅できるか検証した。脂質代謝にストレスを与えるためにマウスに高脂肪食を摂取させた。マウスを自由摂食(AL)、軽度のCRまたは六君子湯を摂取する軽度のCRの状態に飼育し、酸化ストレスを与えた。生存率、体重減少率などを計測し、肝臓、心臓での遺伝子発現量、酸化ストレスマーカーなどを測定した。六君子湯の投与と軽度のCRを合わせることで強いCRと同じ抗酸化効果が得られるか否かについて考察した。実験2及び実験3は千葉卓哉先生の指導の下で筆者が行った。

2-2 材料と方法

2-2-1 マウスの飼育

本研究の実験動物の取り扱いに関しては、すべて早稲田大学と長崎大学の動物実験に関する審査委員会の承認を得ている(承認番号:2019-A112、早稲田大学動物実験審査委員会)。

実験1では、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)及びTaconic Farms (Germantown, NY, USA)からそれぞれ購入したオスのNpyKO(129S-Npy^{tm1Rpa/J})マウスとメスのNpyWT(129S6/SvEvTac)マウスを用いて、NpyKOマウスとNpyWTマウスを作製した。マウ

スの飼育は長崎大学の先導生命科学研究支援センターの飼育施設で行われ、温度 22-25°C、12 時間の明暗サイクル、SPF (specific pathogen free) 環境下で飼育された。餌は固形飼料の CRF-1 (オリエンタル酵母工業、東京) を使用し、AL の状態でオスの *Npy* KO マウス及び *Npy* WT マウスを飼育した。ヒトの中年期をシミュレーションするため、82-89 週齢のマウスを用いた。マウスを六君子湯投与なし (AL) の群及び六君子湯 (RKT) 投与あり (AL+RKT) の群 (n=19-20) に分け、AL 群には CRF-1 を与え、AL+RKT 群には六君子湯 (ツムラ、東京) 粉末を CRF-1 に 2% 重量比で混ぜた飼料を与えた。飲料水は水道水を用いた。12 週間飼育後、グレリン、IGF-1、そしてアディポネクチンの血中レベルを測定するために血漿サンプルを採取した (n=6-8)。14 週間飼育後、組織重量を測定するために、一部のマウスの体重を測定して安楽死させた後、白色脂肪組織及び褐色脂肪組織を採取した (n=4)。臓器サンプルが採取されていないマウスは飼育を継続し、自然死までの寿命を記録した。また、六君子湯によるグレリンの血中濃度及び *Npy* 発現量の変化を確認する予備実験では、10 週齢のオス C57BL/6 マウス (日本チャールス・リバー、神奈川) を使用した。マウスの飼育は温度 22-25°C、12 時間の明暗サイクル、SPF 条件下で AL の状態で行われた。マウスは AL 群及び AL+RKT 群に分けられ、AL 群には CRF-1 を与え、AL+RKT 群には六君子湯粉末を CRF-1 に 2% 重量比で混ぜた餌を与えた。14 週間飼育後、グレリンの血中濃度及び *Npy* の視床下部での遺伝子発現量を調べるために、マウスを安楽死させ、血漿サンプル及び脳を採取し、凍結保存した (n=3-5)。

実験 2 では、14-16 週齢のオス (20 匹) 及びメス (17 匹) C57BL/6 マウスを使用し、飼育は株式会社ケー・エー・シーに委託した。マウスは温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、照明時間 7:00-19:00、SPF 条件下で AL の状態で飼育した。馴化期間の餌は CRF-1 を使用し、7 日間の馴化が終了後、マウスを六君子湯投与なし (AL) 群 18 匹 (オス 10 匹、メス 8 匹) 及び六君子湯投与あり (AL+RKT) 群 19 匹 (オス 10 匹、メス 9 匹) に分けた。AL 群には CRF-1 を与え、AL+RKT 群には六君子湯粉末を CRF-1 に 2% 重量比で混ぜた飼料を与えた。飲料水は水道水を用いた。毎日マウスの状態観察を行い、週に 2 回摂食量を計測し、週に 1 回体重を測定した。六君子湯投与 14 週間後に酸化ストレスを与えた (酸化ストレス処理については 2-2-2 を参照)。

実験 3 では、16-18 週齢のオス (13 匹) 及びメス (21 匹) C57BL/6 マウスを使用して、飼育は株式会社ケー・エー・シーで行われた。マウスは温度 18-28°C (許容範囲)、湿度 30-

80% (許容範囲)、照明時間 7:00-19:00、SPF 条件下で飼育された。馴化期間の餌は CRF-1 を用いた。6 日間の馴化が終了後、マウスを自由摂食・六君子湯投与なし (AL) 群 7 匹 (オス 0 匹、メス 7 匹)、隔日給餌・六君子湯投与なし (CR) 群 13 匹 (オス 6 匹、メス 7 匹)、そして隔日給餌・六君子湯投与あり (CR+RKT) 群 14 匹 (オス 7 匹、メス 7 匹) の 3 つの群に分けた。代謝ストレスを負荷するために、AL 群にはペレット状で脂肪分が 60% カロリー比の高脂肪飼料 HFD-60 (オリエンタル酵母工業) を与え、AL の状態で飼育した。CR 群にも HFD-60 を与え、隔日給餌の方法で飼育し、軽度の CR 状態にした。CR+RKT 群には、六君子湯粉末を HFD-60 に 2%重量比で混ぜた飼を与え、隔日給餌の方法で飼育した。毎日マウスの状態観察を行い、2 日ごとに摂食量を計測し、週に 1 回体重を測定した。六君子湯投与 15 週間後に酸化ストレスを与えた (酸化ストレス処理については 2-2-2 を参照)。(図 2)

2-2-2 サンプル採取と酸化ストレス処理

実験 1 及び予備実験では、血漿、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、そして脳のサンプルを採取し、液体窒素で急速凍結した後に -80°C で保存した。

実験 2 では、六君子湯投与 14 週間後に 3-ニトロプロピオン酸 (3-nitropropionic acid; 3NPA) (和光純薬、大阪) を投与量 75 mg/kg body weight (BW) で週 2 回マウスに腹腔内投与した。3NPA はミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素を阻害することで、活性酸素種を生成させ、酸化ストレスを発生させる (Sheng ZJ et al., 2012)。オスマウスは 3NPA を 2 回投与した 30 分後に、2.5%イソフルラン吸入麻酔下にて心臓から全採血によって安楽死させ、肝臓サンプル及び血漿を採取し、液体窒素で急速凍結し -80°C で保存した。臓器サンプルはリアルタイム PCR 及びウェスタンブロットの実験に用いた。メスマウスは 3NPA 投与 5 週目から、投与量を 150 mg/kg BW に増加させた。20%の体重減少と体温の低下を死亡の基準にし、死亡するまで体重、摂食量の測定や状態観察を行い、個体の死亡時刻を記録した。

実験 3 では、グレリンの血中濃度を測定するため、六君子湯投与 12 週間後にマウスの血漿サンプルを採取し、液体窒素で急速凍結し -80°C で保存した。六君子湯投与 15 週間後にドキソルビシン (doxorubicin; DXR) (和光純薬) を投与量 6 mg/kg BW で週 2 回腹腔内投与した。DXR は NADPH オキシダーゼを介して酸化ストレスを発生させることから、

強い心毒性を有している (Asensio-Lopez MC et al., 2017) 。DXR を 7 回投与した翌日に CR 及び CR+RKT 群のオスを麻酔下で、心臓から全採血を行うことで安楽死させた。心臓及び肝臓サンプルを採取し、液体窒素で急速凍結し-80°Cで保存した。臓器サンプルはリアルタイム PCR 及びウェスタンブロットに用いた。AL 群及び CR、CR+RKT 群のメスは個体が死亡するまで投与を継続し、体重、摂食量の測定や状態観察を行った。20%の体重減少と体温の低下を死亡の基準にし、個体の死亡日を記録した。(図 2)

2-2-3 血漿パラメータの測定

実験 1 では、以下のキットを使用し、プロトコルに従って各血漿パラメータを測定した。血中グレリンの濃度を測定するために、Active ghrelin ELISA kit (LSI メディエンス、東京) を使用した。血中 IGF-I 濃度を測定するために、Mouse/Rat IGF-1 immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用した。そしてアディポネクチンを測定するために、アディポネクチン ELISA キット (大塚製薬、東京) を使用した。

実験 2 では、グルコース CII-テストワコー (和光純薬) を使用し、キットのプロトコルに従って血漿グルコース濃度を測定した。吸光度は ChroMate® Microplate Reader Model 4300 (AWARENESS TECHNOLOGY, Palm City, FL, USA) を用いて 545 nm の波長で測定した。また、トリグリセライド E-テストワコー (和光純薬) を使用し、キットのプロトコルに従い酵素法で血中トリグリセライド濃度を測定した。吸光度は 600 nm の波長で測定した。

実験 3 では、血漿サンプルを用いて Active ghrelin ELISA kit で血漿グレリン濃度を測定した。

2-2-4 リアルタイム PCR

予備実験では、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて、プロトコルに従って脳サンプルから total RNA を抽出した。そして、Transcription Reagents Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) を用いて、RNA サンプルを cDNA に逆転写した。実験 2 及び実験 3 では、心臓及び肝臓サンプルを用いて、氷の上で 15000 rpm、30 秒×3 回ホモジナイズを行い、RNeasy Plus Universal Kits (QIAGEN) を使用し RNA を抽出した。そして、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher) を使い、RNA サンプルを cDNA に逆転写した後、EASY Dilution (for Real Time PCR) (タカラバイオ、滋賀) で希釈した。

MilliQ 水、Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Thermo Fisher) 、Taqman Primer & Probe (Thermo Fisher) と cDNA サンプルを混ぜて、反応液を調製した。抗酸化能、脂質代謝、細胞周期の制御、ミトコンドリア生合成及び寿命延長に関連する各遺伝子の発現量を調べるために、ABI PRISM 7900HT Sequence Detector (Thermo Fisher) または ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Thermo Fisher) を用いてリアルタイム PCR を行い、スタンダードを用いた検量線で遺伝子の発現を定量し、結果を解析した。各遺伝子の発現量は、*18S ribosomal RNA (18S rRNA)* または *Actin Beta (ACTB)* の発現量で標準化した。

使用した Taqman Primer & Probe は以下である。 *Npy* (Mm03048253_m1), *Gstm3* (Mm00833923_m1), *Hmox1* (Mm00516005_m1), *Sirt1* (Mm01168521_m1), *p21* (Mm04207341_m1), *Cpt1a* (Mm01231183_m1), *Pgc-1a* (Mm01208835_m1), *Gstp2* (Mm01231544_g1)

2-2-5 ウェスタンブロット

肝臓または心臓組織サンプルを T-PER Tissue Protein Extraction (Thermo Fisher) で溶かし、氷の上で 15000 rpm、30 秒×3 回ホモジナイズし、完全に粉砕した。タンパク質の分解や脱リン酸化を防ぐため、T-PER に Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) や Protease Inhibitor Cocktail, animal component free (SIGMA-ALDRICH) を 1% の量を添加した。4 °C、10000 rpm の条件で 10 分間遠心し、タンパク質を抽出した。タンパク質濃度は Quick Start Bradford 1×Dye Reagent (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) や TaKaRa BCA Protein Assay Kit (タカラバイオ) を用いて ChroMate® Microplate Reader Model 4300 により波長 600 nm の吸光度を測定し、前述のインヒビターを入れた T-PER で濃度調整した。プロトコルに従って 2-Mercaptoethanol (BIO-RAD) と 2x Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD) で調製した Sample Buffer とタンパク質を 1 : 1 で混和させ、100 °C で 5 分間加熱した。

TGX FastCast Acrylamide Kit, 7.5% (BIO-RAD) 及び TEMED (BIO-RAD) 、Ammonium Persulfate (APS) (BIO-RAD) を使用し、7.5%ゲルを作製した。10x Tris/Glycine/SDS Buffer (BIO-RAD) を MilliQ 水で 10 倍希釈し、1x running buffer を調製した。電気泳動装置は Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD) を使用し、定電圧 200 V で 30 分間電気泳動を行った。転写用メンブレンは Immun-Blot PVDF Membranes for Protein Blotting (BIO-RAD) を用い、

濾紙は Whatman CHROMATOGRAPHY PAPER (GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks, UK) を使用した。転写装置は Trans-Blot Turbo Transfer system (BIO-RAD) を使い、電圧 25 V 以下、電流 1.0 A の条件で 30 分間転写した。10x TBS (BIO-RAD) を MilliQ 水で 10 倍希釈し、Polyoxyethylene 20 Sorbitan Monolaurate (和光純薬) を終濃度 0.1% になるように添加し TBS-T を調製し、転写後のメンブレンを TBS-T で 10 分 3 回洗浄した。Blocking One (ナカライテスク、京都) を使用し、20 分間ブロッキングした。

1 次抗体を Blocking One で 1 : 1000 に希釈し、メンブレンと 4 °C で 16 時間以上、振とう反応させた。その後、TBS-T で 10 分 3 回洗浄し、2 次抗体を Blocking One で 1 : 5000 に希釈し、メンブレンと 1 時間室温で振とう反応させた。免疫ブロットには以下の抗体を使用した。1 次抗体 : Anti - Nitrotyrosine (39B6) Antibody (mouse) (Santa Cruz, Dallas, TX, USA), Anti - 4-HNE (P-16) Antibody (goat) (Santa Cruz), Anti - β -Tubulin Antibody (mouse) (和光純薬)。2 次抗体 : Anti-mouse IgG(H+L) (和光純薬)、donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz)。

2 次抗体と反応した後、10 分 3 回洗浄し、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher) を使用し発光させ、LAS3000 (富士フィルム、東京) で撮影した。

2 - 2 - 6 統計解析

統計解析は IBM SPSS Statistic 22 及び Microsoft Office Excel 2007 を用いて、一元配置分散分析、反復測定分散分析、t 検定、3NPA 投与の有無、RKT 投与の有無の 2 つの要素または *Npy* の遺伝子型、RKT 投与の有無の 2 つの要素で二元配置分散分析を行った。生存率のデータについては Kaplan-Meier 法を用いて log rank test で解析した。Post-hoc test は Tukey 法を用いた。遺伝子発現に関する結果では、異常値をグラブス検定によって棄却した。棒グラフと折れ線グラフは平均値と標準偏差を示し、 $p < 0.05$ を統計的に有意とした。t 検定で有意差が認められたものは * で示した。一元配置分散分析で有意差が認められたものは異なるアルファベット間で示し、二元配置分散分析で有意差が認められたものは線と * で示した。

2 - 3 結果

2 - 3 - 1 グレリンの血中濃度及び *Npy* の発現量

図3にグレリンの血中濃度及び脳での *Npy* の発現量の結果を示した。14週間の六君子湯投与により、AL+RKT群のグレリンの血中濃度はAL群より有意に高かった(図3A)。そして、AL+RKT群の脳での *Npy* 発現量もAL群より有意に高かった(図3B)。

2-3-2 寿命、体重及び組織重量(実験1)

ALの状態で飼育された *Npy* WT マウス及び *Npy* KO マウスは両方とも、六君子湯の投与による寿命延長が認められなかった(図4A,B)。六君子湯投与14週間後の体重、白色脂肪組織及び褐色脂肪組織の重量を散布図で示した(図5A-C)。二元配置分散分析を行った結果、体重、白色脂肪組織の重量、そして褐色脂肪組織の重量が六君子湯の投与によって有意な減少が認められた(図5A-C, $p<0.01$)。遺伝子型による作用及び遺伝子型と六君子湯の交互作用は認められなかった。

2-3-3 血中パラメータの濃度(実験1)

六君子湯投与12週間後におけるグレリン、IGF-1、そしてアディポネクチンの血漿濃度を散布図で示した(図5D-F)。二元配置分散分析を行った結果、六君子湯の投与によってグレリンの血中レベルが有意に上昇し、アディポネクチンの血中レベルが有意に減少したことが認められた(図5D, F, $p<0.05$)。六君子湯の投与によるIGF-1の血中濃度の有意な変化は認められなかった。また、三つのパラメータにおいて遺伝子型による作用及び遺伝子型と六君子湯の交互作用は認められなかった。

2-3-4 体重、摂食量の推移及び血漿グルコース濃度、血漿トリグリセライド濃度の変化(実験2)

実験2におけるマウスの体重はオスとメスに分けて示した(図6A)。反復測定分散分析を行った結果、オス、メスともに、AL群とAL+RKT群の間に有意差が認められなかった。15週齢からの摂食量をオス、メス別で示した(図6B)。オス、メスともに、AL群とAL+RKT群の間に有意差は認められなかった。

3NPA投与後及び投与する前の血漿グルコース濃度及び血漿トリグリセライド濃度について二元配置分散分析を行った結果、3NPA投与によって、血漿グルコース濃度は有意に上昇し、血漿トリグリセライド濃度は有意に減少した(図7A, B, $p<0.05$)。

2-3-5 3NPA 投与後の生存率及び体重減少率 (実験 2)

AL 群の平均寿命±標準偏差は 23.5 ± 10.8 日であり、AL+RKT 群は 25.0 ± 13.3 日であった (図 7 C)。AL 群と AL+RKT 群の間に有意差は認められなかった。

3NPA を 2 週間投与した後の体重と 3NPA を投与する前の体重から体重減少率を算出し、棒グラフで示した (図 7 D)。AL 群と AL+RKT 群を比較し、有意差は認められなかった。

2-3-6 肝臓での遺伝子発現 (実験 2)

酸化ストレスが負荷された状態では、AL+RKT 群の *Gstm3* 及び *Hmox1* の発現量は、AL 群に比較して有意に高かった (図 8 A, B, $p < 0.05$)。しかし、長寿遺伝子である *Sirt1* の発現量について、両群の間に有意差は認められなかった (図 8 C)。細胞周期の進行を抑制し、DNA 修復を促進する *p21* の発現量は、AL+RKT 群の方が AL 群より有意に亢進した (図 8 D, $p < 0.05$)。さらに、ミトコンドリアの生合成に重要で、脂質代謝を促進する遺伝子である *Pgc-1a* の発現量も AL+RKT 群は AL 群に比較して有意に亢進した (図 8 E, $p < 0.05$)。一方、*Pgc-1a* の下流に存在し、脂肪酸酸化を促進する *Cpt1a* の発現量では両群の間に有意差は認められなかった (図 8 F)。

2-3-7 肝臓での酸化ストレスタンパク質マーカーの発現 (実験 2)

3-nitrotyrosine (3-NT) は酸化ストレスによるタンパク質のチロシン残基のニトロ化によって生成されるため、タンパク質の酸化ストレスマーカーとして使用した。Hydroxynonenal (HNE) は、酸化ストレスによって酸化された脂質である過酸化脂質の分解物である。酸化された脂質の量の指標として使用されている。

酸化ストレスが負荷された状態では、3-NT レベルは AL+RKT 群の方が AL 群に比較して有意に低かった (図 9 A, $p < 0.05$)。HNE レベルは両群の間に有意差が認められなかったが、AL+RKT 群の方が AL 群に比較して少ない傾向が示された (図 9 B)。

2-3-8 体重、摂食量の推移及びグレリンの血中レベル (実験 3)

実験 3 におけるマウスの体重をオス、メス別に示した (図 10 A)。反復測定分散分析を

行った結果、オスでは、CR と CR+RKT 群の間に有意差が認められなかった (図 1 0 A 左)。メスでは、DXR 投与前まで AL 群の体重が徐々に増加し、CR の 2 群より有意に高いことが明らかになったが、CR と CR+RKT 群の間に有意差が認められなかった (図 1 0 A 右)。摂食量もオス、メス別で示した (図 1 0 B)。オスの CR と CR+RKT 群の間に摂食量の差が認められなかった (図 1 0 B 左)。メスのマウスでは、CR の 2 群の摂食量が AL 群の約 80% 程度になり、軽度の CR が認められたが、CR と CR+RKT 群の間に摂食量の差が認められなかった (図 1 0 B 右)。

六君子湯投与 12 週間後の血漿グレリン濃度をオス、メス別に示した (図 1 1 A)。t 検定及び一元配置分散分析を行った結果、CR+RKT 群の血漿グレリン濃度はほかの群より有意に高いことが明らかになった。

2-3-9 DXR 投与後の生存率及び体重減少率 (実験 3)

DXR を投与したマウスの生存曲線から、AL 群の平均寿命±標準偏差は 27.0 ± 12.4 日になり、CR 群は 56.6 ± 4.5 日になり、CR+RKT 群は 51.3 ± 5.0 日になった (図 1 1 B)。CR の 2 群が AL 群より生存率が有意に高かったが、CR の 2 群の間に有意差はなかった (図 1 1 B)。

マウスの DXR 投与前の体重や投与 1 週間後の体重から、体重の減少率を算出した (図 1 1 C)。一元配置分散分析を行った結果、DXR 投与 1 週間後、各群の体重が著しく下がり、CR の 2 群は AL 群に比較して体重減少が有意に抑制されたが、CR と CR+RKT 群の間に有意差はなかった (図 1 1 C, $p < 0.05$)。六君子湯投与による DXR 投与後の生存率の増加及び体重減少率の抑制は、認められなかった。

2-3-10 肝臓での遺伝子発現及び酸化ストレスのタンパク質マーカーの発現 (実験 3)

酸化ストレスがかけられている状態では、*Gstp2* 及び *Sirt1* の発現量は、CR 群に比較して CR+RKT 群の方が有意に高かった (図 1 2 A, B, $p < 0.05$)。*Hmox1* の発現量は、両群の間に有意差がなかった (図 1 2 C)。

ウェスタンブロット法により 3-NT 及び HNE を検出した結果、3-NT 量及び HNE 量は両方とも CR+RKT 群の方が CR 群より有意に低かった (図 1 3 A, B, $p < 0.05$)。

2-3-11 実験3の心臓での遺伝子発現及び酸化ストレスのタンパク質マーカーに関する結果

酸化ストレスがかけられている状態では、*Gstp2* 及び *Hmox1* の発現は、いずれも CR と CR+RKT 群の間に有意差は見られなかった (図 1 4 A, B)。ウェスタンブロット法で 3-NT, HNE の発現を検出した結果、いずれも CR と CR+RKT 群の間に有意差は認められなかった (図 1 4 C, D)。

2-4 考察

2-4-1 自然老化の過程での六君子湯投与による CR 模倣効果及び *Npy* との関連性に関する考察

実験 1 では、AL の状態でマウスを飼育し、自然老化の過程で六君子湯の投与による寿命延長効果について解析した。前述のように CR の効果は *Npy* に依存し、グレリンの血中レベルを上昇させ、*Npy* の発現を亢進させることで様々な抗老化効果を得る可能性があるため、六君子湯の CR 模倣効果も *Npy* に依存している可能性がある。六君子湯とグレリン及び *Npy* の関連性を確かめる実験の結果から、六君子湯の投与は確かにグレリンの血中レベルを上昇させ、*Npy* の発現を亢進させることが認められた (図 3)。そのため、我々は六君子湯を *Npy* WT と *Npy* KO マウスに投与し、その CR 模倣効果を検証した。自然老化の過程で寿命について解析した結果、我々の予想通りに、*Npy* KO マウスでは六君子湯の投与による寿命延長効果が認められなかった。しかし、WT マウスにおいても六君子湯による寿命延長効果が見られなかった (図 4 A, B)。一方、最近の研究では、六君子湯による寿命延長効果が *Klotho* マウス、SAMP8 マウス、そして 16 か月齢以上の ICR マウスを用いた実験で確認された (Fujitsuka N et al., 2016)。*Klotho* マウスは *Klotho* 遺伝子が欠損したマウスで、短寿命、動脈硬化、皮膚の萎縮などの老化の表現型を示す (Kuro-o M et al., 1997)。*SAMP8* マウスは認知機能の低下、神経変性、免疫機能不全を早期に示す老化促進モデルマウスで (Kawamata T et al., 1998)、酸化ストレスへの感受性が高くなり、酸化ストレスの蓄積が多いことが報告されている (Poon HF et al., 2004)。そのため、六君子湯は常に酸化ストレスなどで老化が促進されている状態では、抗酸化能を上昇させ寿命を延長させることができる可能性がある。しかし、上記の研究では正常な ICR マウスにおいても六君子湯による寿命延長が確認された。我々の研究結果と一致しない原因として、

Fujitsuka らの研究に比較して我々の研究では六君子湯投与の量が 2-4 倍高く、六君子湯の投与量が重要である可能性が挙げられる。また、ICR マウスのがん発症率が低いことが報告されており (Eaton G et al., 1980)、六君子湯はがんを抑制する効果が低く、がんの発症率が通常であるマウスの寿命を延長できない可能性もある。六君子湯による寿命延長効果のマウスの系統特異性が示唆された。また、六君子湯は我々の期待通りにグレリンの血中レベルを上昇させたが、CR と同じように IGF-1 の血中レベルを減少させ、アディポネクチンの血中レベルを上昇させることができなかった (図 5)。そのため、自然老化の過程で六君子湯をマウスに投与し、グレリンを介して Npy の発現を亢進させることでは、CR の抗老化効果を模倣するには十分ではないことが示唆された。

2-4-2 強い酸化ストレスの状態下での六君子湯投与による抗酸化効果に関する考察

自然老化の過程で六君子湯の投与は CR の寿命延長効果を模倣できなかったが、酸化ストレスを受けている状態で CR のように抗酸化能を亢進させ、寿命を延長させる可能性が示唆された。そのため、我々は実験 2 でマウスに 3NPA を投与し、酸化ストレスをかけ、六君子湯の CR 模倣効果について抗酸化能を中心に考察した。3NPA はミトコンドリアの機能障害を引き起こし、酸化ストレスを発生させる他、大脳の線条体にダメージを与えることでハンチントン病を引き起こす神経毒としても知られている (Mirandola SR et al., 2010)。Npy は神経保護作用を持ち、化学物質による神経毒性を抑制することも報告されている (Xapelli S et al., 2006)。CR は神経保護作用を誘導することが報告されており (Anson RM et al., 2003; Mattson MP, 2000)、その神経保護作用は CR による Npy の発現上昇と関連していると考えられる (Chiba T et al., 2014)。

実験 2 では、マウスの体重及び摂食量の六君子湯投与による変化が見られなかった (図 6 A,B)。食欲不振状態では、六君子湯は食欲を亢進させる効果を有しているが、健康で食欲が正常な状態では食欲を亢進させないことが報告されており (Ohno T et al., 2001; Matsumura T et al., 2000)、我々の実験結果と一致している。また、グルコース及びトリグリセライドの血中レベルを解析した結果、3NPA の投与によってグルコースの血中レベルが有意に増加し、トリグリセライドの血中レベルが有意に減少することが明らかになった (図 7)。血中のグルコースはインスリンによって細胞に取り込まれることが知られてお

り、酸化ストレス状態ではインスリンシグナルが抑制されていることが示唆された。前述のように、insulin/IGF-1 シグナルは DNA 修復経路を抑制する作用を持ち、強い酸化ストレスがかけられている状態では、DNA 修復経路を活性化させるために insulin/IGF-1 シグナルが抑制されたことが考えられる。さらに、トリグリセライドの血中レベルが減少したことから、酸化ストレス下では脂質の合成が抑制され、エネルギー源が脂質にシフトしていることも示唆された。しかし、六君子湯投与による作用が認められず、六君子湯が酸化ストレス状態下で代謝へどのように影響するかは代謝に関連する遺伝子の発現レベルを調べる必要がある。

六君子湯の投与は Npy の発現を上昇させることで、CR の抗酸化能を亢進させる効果及び神経保護作用を模倣し、3NPA 投与後の寿命を延長させることが期待されたが、六君子湯投与による生存率の変化は認められなかった (図 7 C)。3NPA の投与量を 150 mg/kg BW に増やした後、生存率の急激な低下が見られ、酸化ストレスが強すぎた可能性が考えられる。また、六君子湯は抗がん剤による酸化ストレス、認知症など様々なストレスによる食欲不振を改善できることが報告されている (Ohno et al., 2011) 。そのため、六君子湯の投与によって、酸化ストレスによる体重減少が抑えられることが予想された。しかし、3NPA 投与 2 週間後に体重を比較した結果、六君子湯の投与による体重減少率の抑制は認められなかった (図 7 C)。六君子湯の投与は強い酸化ストレスを除去できず、体重減少による衰弱を抑制できなかつたため、3NPA 投与後の寿命を延長できなかつたと考えられる。

個体レベルでは六君子湯による抗酸化能の上昇が認められなかった。しかし、肝臓における遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で解析した結果、酸化ストレスがかけられている状態では、Nrf2 の下流に存在し、酸化ストレス除去に関連する遺伝子である *Gstm3* と *Hmox1* の発現が六君子湯の投与によって有意に上昇したことが明らかになった (図 8 A,B)。六君子湯は CR の Nrf2 を活性化させる効果を模倣し、分子レベルで抗酸化能を上昇させたことが示唆された。長寿遺伝子である *Sirt1* の発現は六君子湯投与による変化が見られなかったが、細胞周期の進行を抑制し、DNA 修復に関連する遺伝子である *p21* の発現が六君子湯の投与によって有意に上昇した (図 8 C, D)。強い酸化ストレスがかけられている状態では、CR は *p21* の発現を亢進させることが報告されており (Yamaza H et al., 2010) 、六君子湯の投与は CR を模倣し、酸化ストレスによって損傷を受けた DNA の修復能力を亢進させることが示唆された。さらに、六君子湯の投与によって、ミトコンドリ

アの生合成や機能維持に重要な遺伝子である *Pgc-1a* の発現が有意に上昇した (図 8 E)。六君子湯はミトコンドリアの正常な機能を維持することで、活性酸素種の消去能を高めたと考えられる。*Pgc-1a* の下流に存在する脂肪酸の酸化に関連する遺伝子である *Cpt1a* の発現は、六君子湯投与による変化が認められなかったが (図 8 F)、白色脂肪組織及び褐色脂肪組織の重量が六君子湯投与によって有意に減少したことから、六君子湯による脂質代謝への作用は組織特異性がある可能性が示唆され、さらなる研究が必要になる。

肝臓の総タンパク質抽出液を用いてタンパク質の酸化ストレスマーカーである 3-NT をウェスタンブロット法で調べた結果、六君子湯の投与によってタンパク質の酸化ストレスの蓄積が有意に減少することが明らかになった (図 9 A)。脂質過酸化の指標である HNE は、有意差が認められなかったが、六君子湯によって減少する傾向が見られた (図 9 B)。以上の結果から、六君子湯投与は個体レベルでは 3NPA 投与後の寿命を延長しなかったが、分子レベルでは抗酸化能、DNA 修復能、ミトコンドリア機能維持に重要な遺伝子の発現を亢進させ、タンパク質への酸化ストレスの蓄積を減少させることが明らかになった。

2-4-3 抗酸化能における六君子湯の CR 増幅効果に関する考察

実験 3 では六君子湯が軽度の CR による抗酸化効果を増幅できるかどうかを確認するため、六君子湯をマウスに投与し、隔日給餌で飼育した。さらに、六君子湯の脂質代謝における作用を解明するため、餌は高脂肪食を使用し、代謝ストレスを与えた。また、酸化ストレス誘導剤を DXR に変更し、DXR によって誘導される酸化ストレス状態における六君子湯の抗酸化効果を考察した。DXR は代表的なアンスラサイクリン系抗癌剤で、トポイソメラーゼ II を阻害することで、がん細胞の DNA 複製にストレスをかけ、増殖を止める効果を持っている。また、ミトコンドリアで酸化ストレスを発生させ、強い心毒性を持っていることも知られている。

体重のデータを解析した結果、AL 群の体重は CR の 2 群より有意に重いことが確認されたが、CR と CR+RKT 群の間に有意差はなかった (図 10 A)。摂食量のデータを解析した結果、CR の 2 群の摂食量は AL 群の約 80% になり、軽度の CR 状態が認められたが、六君子湯による影響は認められなかった (図 10 B)。軽度の CR 状態においても、六君子湯によって食欲が亢進されないことが明らかになった。また、グレリンの血中レベルのデータを解析した結果、CR+RKT 群の方が CR 群より有意に高いことが明らかになった (図 11 A)。そのため、六君子湯は軽度の CR よりもグレリンの発現を亢進させることで、CR

の効果を増幅できる可能性が示唆された。しかし、DXR 投与後の生存率及び体重減少率の結果から、CR の 2 群は AL 群より生存率が有意に高く、体重減少率は有意に低いことが明らかになったが、六君子湯による生存率のさらなる上昇及び体重減少率の抑制が認められなかった (図 1 1 B, C)。個体レベルでは、六君子湯の投与は CR による抗酸化効果を増幅できないことが示唆された。

実験 2 と同じく、肝臓における六君子湯の分子レベルでの抗酸化効果を遺伝子発現及びタンパク質の酸化ストレスマーカーにより調べた。その結果、六君子湯の投与によって *Gstp2* の発現は有意に上昇したが、*Hmox1* の発現には有意差が認められなかった (図 1 2 A, C)。そして、3-NT 及び HNE を測定した結果、CR+RKT 群は CR 群に比べて有意に発現レベルが低いことが明らかになった (図 1 3 A, B)。そのため、軽度の CR と六君子湯を合わせることにより、CR の抗酸化効果が一部増幅されることが示唆された。ヒトで 30% の CR を実行することが困難な場合、軽度な CR と六君子湯の摂取を合わせることで強い CR と同じ効果が得られる可能性が示された。また、CR+RKT 群の酸化ストレスの蓄積は CR 群より少ないにもかかわらず、*Hmox1* の発現量に有意差がなかったことから、DXR によって誘導される酸化ストレスへの応答は *Hmox1* よりも *Gstp2* が寄与している可能性が示唆された。

一方、心臓のサンプルを用いて同様に抗酸化能に関連する遺伝子及びタンパク質の酸化ストレスマーカーの発現を解析した結果、CR 群と CR+RKT 群の間に有意差は認められなかった (図 1 4)。DXR は強い心毒性を持っており、心筋症を引き起こすことが知られている。心臓で六君子湯が CR の抗酸化効果を増幅できなかったことは、生存率や体重減少率に差がなかったことと関連している可能性が示唆された。

2-4-4 まとめ

これらの結果より、我々は以下の仮説を提唱した (図 1 5)。カロリー制限はグレリンのレベルを上昇させ、レプチンのレベルを抑制することで、視床下部での *Npy* の発現を亢進させる。それが上流での強いシグナルになり、肝臓では *Gstm3*, *Hmox1* などの抗酸化能に関連する遺伝子、長寿遺伝子である *Sirt1*、DNA 修復を促進する遺伝子である *p21*、ミトコンドリアの機能維持に重要で、脂質代謝を促進する遺伝子である *Pgc-1a* 及び脂肪酸の酸化を促進する *Cpt1a* の発現が亢進される。CR のこのような遺伝子発現の制御によ

って、抗酸化能、DNA 修復機能、脂質代謝及びミトコンドリアの生合成が亢進し、寿命が延長される。そして六君子湯は CR と同様に、グレリンのレベルを上昇させ、視床下部での Npy の発現を亢進させる。それによって、酸化ストレスがかけられている状態では、肝臓で *Gstm3*, *Hmox1*, *p21*, *Pgc-1a* などの遺伝子発現が亢進され、CR の寿命延長効果の一部、特に抗酸化能を模倣または増幅することが示唆された。しかし、酸化ストレスが強すぎた場合、個体レベルでの生存率を上昇させるには不十分であったと考えられる。

第三章 DNA 修復酵素である DNA ポリメラーゼシータを標的にしたがんの新たな治療法に関する研究

3-1 序論

3-1-1 DNA の修復機序と発がんの関連性

染色体の不安定性は DNA の変異及び異常タンパク質を蓄積させ、細胞ががん化するリスクを上昇させる。染色体を不安定にさせる主な原因として、放射線、化学物質、そして活性酸素種などによる DNA 二重鎖の切断が挙げられる (Jasin, M and Rothstein R, 2013)。このような切断された DNA 二重鎖を修復するために、主に相同組み換え (homologous recombination, HR) と非相同末端結合 (non-homologous end joining, NHEJ) という二種類の DNA 修復機序が存在している (Symington LS and Gautier J, 2011)。HR は、同じ DNA 配列を持つ姉妹染色分体を利用する修復経路で、相同性を有する DNA を組み換えることによって修復する前と同じ配列に復元することができる。まず、細胞周期チェックポイントに重要な Ataxia-telangiectasia-mutated (Atm) タンパク質が二重鎖の切断を感知し、DNA 修復経路が起動される (Paull TT and Lee JH, 2005)。エンドヌクレアーゼ活性を有する MRN 複合体 (Mre11-Rad50-NBS1 complex) が活性化され、切断された DNA 末端で 5'側の一本鎖 DNA を切除し、3'側の一本鎖を露出させる (Takeda S et al., 2007)。露出された一本鎖 DNA は HR に重要な役割を持つ Rad51 タンパク質と結合することで、姉妹染色分体で相同配列を検索し、姉妹染色分体を鋳型として DNA の複製を行う (Jasin M and Rothstein R, 2013)。欠損した配列を復元した後に切断された末端とアニーリングし、DNA ポリメラーゼの働きによって DNA 合成が行われる。複製された DNA が DNA リガーゼによって元の鎖と結合し、元の配列通りに修復される。この修復モデルは Synthesis-dependent strand annealing (SDSA) と呼ばれ、有糸分裂を行う細胞が HR で DNA を修復する時、主に SDSA

が行われる (Andersen SL and Sekelsky J, 2010)。

一方、NHEJ 修復経路は鋳型 DNA を必要とせず、二重鎖の切断がある DNA の切断末端を繋ぐことで DNA を修復する経路である。NHEJ 経路では、まず DNA 結合タンパクである Ku70 と Ku86 のヘテロ二量体が二重鎖の切断を感知し、DNA の切断末端と結合する。さらに、DNA ポリメラーゼとヌクレアーゼ両方の活性を持つ Artemis : DNA-PKcs と呼ばれる複合体は Ku ヘテロ二量体と結合し、DNA の末端を相補性があるように編集する。最後に、XRCC4-DNA ligase IV-XLF 複合体が前述の複合体に結合し、DNA の切断末端を連結する (Brandsma I and Gent DC, 2012)。NHEJ 経路では切断末端の編集を伴うため、修復時に塩基の欠失が蓄積されやすい (Lieber MR, 2011)。HR による修復は正確であるが、姉妹染色分体の存在が必要であるため、DNA 複製が行われる細胞周期である S 期の後半から G2 期の間を除き、不可能だと考えられている。それに対して NHEJ による修復は正確ではない場合が多いが、すべての細胞周期において実行可能で、素早く DNA を修復することが可能である。そのため、HR と NHEJ はともに不可欠な DNA 修復経路であり、各経路に重要な遺伝子の機能が欠損すると、エラーの蓄積により染色体が不安定になり、発がんや老化につながる可能性が高いと示唆される。例えば、Rad51 の活性に関連する *Breast cancer susceptibility gene 1 (Brca1)* の欠損は乳がんの発症リスクを上昇させることが知られており (Miki Y et al., 1994)、Ku70 の欠損は胸腺リンパ腫を引き起こし、Ku80 の欠損は老化を促進することが報告されている (Li H et al., 2007)。

上記に加え近年では、Microhomology-mediated end joining (MMEJ) と呼ばれる比較的になんて発見された DNA 修復経路が注目されるようになった。MMEJ は代替的 NHEJ とも呼ばれており、NHEJ と同じ姉妹染色分体を鋳型 DNA とする必要がなく、その代わりにマイクロホモロジー (Microhomology, MH) が必要になる。マイクロホモロジーとは、長さが 2-20 塩基対 (bp) である短い相同配列を指しており、MMEJ 経路は切断された DNA の末端近くにあるマイクロホモロジーを利用する。MMEJ による修復は Ku 複合体に依存せず、MRN 複合体が DNA 切断末端に直接結合し、DNA 一本鎖の切除が行われ、マイクロホモロジーを露出させる (Seol JH et al., 2017)。その後、マイクロホモロジーがアニーリングされ、余分な塩基は DNA 修復エンドヌクレアーゼである ERCC1-XPF 複合体によって除去される。最後に、DNA ヘリカーゼと DNA ポリメラーゼの両方の活性を持つ DNA ポリメラーゼシータ (DNA polymerase theta, PolQ) 及び DNA リガーゼである DNA ligase 1

(Lig1)と DNA ligase 3 (Lig3) によって DNA の合成が行われ、欠損している部分が修復される (Seol JH et al., 2017)。

MMEJ 経路に関してまだ解明されていない部分が多く、HR と NHEJ に比べて行われる頻度が低く、生体内における主な作用もまだ未解明であるが、NHEJ 経路と競合していることが報告されている (Brinkman EK et al., 2018)。さらに、マイクロホモロジーを露出させるために NHEJ よりも取り除かれる塩基数が多いため、DNA 修復エラーが非常に蓄積されやすいと考えられる。がん細胞の染色体を研究した結果、DNA が修復された部位にマイクロホモロジーが著しく多いことが明らかにされている (Chiarle R et al., 2015; Stephens PJ et al., 2009)。そのため、MMEJ と発がん及び腫瘍形成は関連していることが強く示唆された。一方、がん抑制効果が報告されている CR は腎臓及び肺における NHEJ 活性の加齢による減少を回復できることが報告されている (Um JH et al., 2003)。したがって、CR は比較的正確な DNA 修復経路である NHEJ の活性を上昇させ、NHEJ 経路と競合する MMEJ 経路の活性を減少させることでがん抑制効果を得ている可能性が示唆された。MMEJ 経路の活性を抑制できる薬剤は六君子湯と同じく CR の一部の効果を模倣できる CR 模倣物になる可能性が考えられる。我々はがんの新たな治療法を開発するために、MMEJ とがん細胞の DNA 修復の関連性に着目し、MMEJ のメカニズム及びその中心的な役割を担うタンパク質である PolQ について研究を行った (図 1 6)。

3-1-2 DNA 修復酵素である PolQ とがん細胞の抗がん剤に対する耐性

PolQ は前述のように DNA ヘリカーゼと DNA ポリメラーゼの両方の活性を持っており、MMEJ による DNA 修復を促進し、HR による DNA 修復を抑制することが報告されている (Mateos-Gomez PA et al., 2015)。そのヘリカーゼ活性が MRN 複合体によるマイクロホモロジーの露出に寄与しているかについてはまだ定説がないが、マイクロホモロジーの探索やアニーリングを促進する作用が報告されており (Kent T et al., 2015)、MMEJ 経路に不可欠なタンパク質である。なお、*PolQ* KO マウスは DNA の二重鎖切断を誘導するようなストレス、例えば放射線または抗がん剤であるブレオマイシンに対する感受性が高くなることが報告されており (Yousefzadeh MJ et al., 2014)、MMEJ 経路は DNA に強いダメージを与えるストレスによる損傷を防御するため、素早く DNA を修復する経路である可能性が示唆された。また、様々ながん細胞で *PolQ* が過剰発現し、*PolQ* の発現上昇はゲノ

ムを不安定化させることが明らかになっている (Kawamura K et al., 2004; Higgins GS et al., 2010)。特に、乳がん細胞の約 70%では、通常細胞の 5 倍以上に *PolQ* の発現が増加している (Lemee F et al., 2010)。乳がんは女性の中でもっとも一般的な固形がんで、国立がん研究センターのデータによれば、2016 年では乳がんの女性の罹患数は 94848 名に達し、部位別の罹患数の第一位を占めている (国立がん研究センター、2016)。乳がんの中ではエストロゲンに依存しているタイプが 7 割もあり、エストロゲン枯渇のようなホルモン療法で治療できるが、治療中にエストロゲンの代償的なシグナルが乳がん細胞の増殖を刺激するなど抵抗性を獲得しやすく、再発率も高い (Hayashi S and Kimura M, 2015)。また、通常の抗がん剤に対しても抵抗性を示しやすく (Moiseenko et al., 2017)、難治性がんの一つとされている。さらに、そのような過剰発現は HR 機能が欠損しているがん細胞と欠損していないがん細胞の両方に見られ (Lemee F et al., 2010; Goulet de Rugy T et al., 2016)、がん細胞は *PolQ* の過剰発現に依存して、抗がん剤による DNA ダメージを MMEJ 経路で修復し、抗がん剤への耐性を獲得している可能性が示唆された。

抗がん剤にはがん細胞の DNA にダメージを与える DNA 複製阻害剤が多く存在している。がん細胞が頻繁に行っている DNA 複製にストレスをかけ、複製フォークを崩壊させることで DNA 二重鎖を切断し、複製を中断させることで細胞死を誘導することができる。そのため、本稿の *PolQ* に関する研究では、*PolQ* に依存する MMEJ 修復経路のメカニズムを研究し、崩壊した複製フォークの修復との関連性について考察した。さらに、がん細胞の抗がん剤への耐性が *PolQ* に依存しているかについて検証するために、*PolQ* をノックダウンしたヒト骨肉腫由来の U2OS 細胞及び乳がん細胞に複製ストレスをかける抗がん剤を投与し、その生存率及び DNA ダメージを解析した。

3-1-3 研究の概要と構成

DNA 修復の MMEJ 修復経路とがん細胞の増殖との関連性に着目し、本研究を行った。MMEJ 修復経路のメカニズムを解明するために、我々は MMEJ の修復によって緑色蛍光を発するレポーター細胞系を構築し、Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins 9 (CRISPR-Cas9) システムで DNA の切断を誘導した。蛍光を計測し、MMEJ 修復経路の新たなモデルを提唱した。また、*PolQ* とがん細胞の抗がん剤に対する抵抗性の関連性を解明するために、U2OS 細胞を用い、*PolQ* をノックダウンし、さ

らに *PolQ* KO 細胞も作製した。*PolQ* 機能が欠損した U2OS 細胞に DNA の複製阻害を起こす抗がん剤を投与、または DNA 複製フォークの保護作用を持つ *Ataxia telangiectasia and rad3 related (Atr)* の発現を抑制し、細胞の生存率及び DNA 傷害の蓄積を測定した。*PolQ* の機能抑制によって U2OS 細胞の抗がん剤に対する感受性が上昇するか否かについて解析を行った。

さらに、抗がん剤への耐性を獲得しやすいとされている乳がん由来の細胞である BT-474, MB-MDA-436 細胞において *PolQ* の機能を阻害し、U2OS 細胞と同じように複製ストレスをかけ、複製フォークの崩壊を起こすような抗がん剤などを投与した。細胞の生存率及び DNA 傷害の蓄積を測定し、乳がん細胞の抗がん剤に対する抵抗性が *PolQ* に依存しているかについて考察した。これらの実験の結果から、我々は *PolQ* の機能抑制と合わせて DNA 複製を阻害する抗がん剤を投与する新たながん治療法を提案した。

本研究は千葉研究室の共同研究者であるアメリカ Scripps 研究所の Xiaohua Wu 先生のご指導の下で筆者が実験及びデータ解析を行った。

3-2 材料と方法

3-2-1 細胞培養、トランスフェクション及びインフェクション

U2OS 細胞、293T 細胞、BT-474 細胞、MB-MDA-436 細胞、MB-MDA-231 細胞及び MCF7 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入し、10%のウシ胎児血清 (GeminiBio, West Sacramento, CA, USA) 及び 1%の抗生物質 (Thermo Fisher) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Thermo Fisher) を使用して、5% CO₂、37 °C の条件で培養した。*PolQ* KO U2OS 細胞の *PolQ* 遺伝子のエクソン 3 及びエクソン 14 に塩基の挿入または欠失があり、フレームシフトが起こっていることが確認されている。

遺伝子発現をノックダウンするために、small hairpin RNA (shRNA) レンチウイルスベクターを 293T 細胞にリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。トランスフェクションには、2x HEPES buffer (12 mM Dextrose, 50 mM HEPES, 10 mM KCl, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄•2H₂O) 及び終濃度が 125 mM である CaCl₂ を使用した。トランスフェクション 12 時間後に 293T 細胞の培養液を最終濃度が 12.5 mM である HEPES (Thermo Fisher) を含む培養液に交換し、48 時間培養した。培養上清で目的の細胞を培養し、shRNA レンチウイルスを細胞に導入した。CRISPR-Cas9 で DNA の切断を誘導するために、guide RNA (gRNA) と Cas9 タンパク質を複合したプラスミドを目的の細胞にポリエチレンジオキシエチレンに

よってトランスフェクションした。

3-2-2 使用したプラスミド

shRNA レンチウイルスベクターは Addgene (Watertown, MA, USA) から購入した pLKO.1-blast (Addgene no. 26655) を使った。特定の遺伝子をノックダウンするための標的配列を以下に記した。 *PolQ*, ACAACAACCCTTATCGTAAAG; *Atr*, CGAGACTTCTGCGGATTGCAG。また、ノックダウンのコントロールとして、標的配列を入れていない空ベクターを使用した。

DNA の二本鎖切断を誘導する CRISPR-Cas9 ベクターは Addgene から購入した pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene no. 62988) を用いた。一本鎖の切断を誘導するため、野生型の Cas9 (Cas9-WT) ベクターの Cas9 タンパク質において 10 番目のアスパラギン酸をアラニンに変異させた、Cas9-D10A ベクターを作製した。

3-2-3 MMEJ 修復経路のレポーターの構造及び蛍光シグナルの定量

MMEJ 修復経路のメカニズムを解明するために、DNA の切断が誘導され、MMEJ によって修復されれば、Enhanced green fluorescent protein (eGFP) を発現し、緑色の蛍光を発するレポーター細胞系を U2OS 細胞で構築した。全長 720 bp の eGFP の翻訳配列を前半と後半の二つの部分に分け、後半配列の前に前半配列の最後の 9 bp と同じ配列を入れることで、相同配列であるマイクロホモロジーを作成した。DNA の切断を誘導できるように、マイクロホモロジーの間に Cas9 システムが認識できる gRNA の標的配列を入れた。DNA の切断が Cas9 システムによって誘導され、MMEJ による DNA 修復が行われれば、マイクロホモロジーの間の配列が欠損し、二つのマイクロホモロジーがアニーリングされ、全長の eGFP タンパク質が発現される。また、MMEJ 経路以外の DNA 修復で eGFP タンパク質が発現されることを防ぐため、eGFP の前半の配列の後ろに終止コドンを入れた(図 17)。

ノックダウン処理または標的配列を入れていない空ベクターを発現させたコントロールの細胞に Cas9 プラスミドをトランスフェクションし、DNA の切断を誘導した 5-7 日後、細胞を Trypsin 0.05% EDTA (Thermo Fisher) でトリプシン処理した。Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Thermo Fisher) で細胞を再懸濁し、BD Accuri C6 フロー

サイトメーター (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて Fluorescence-activated cell sorting (FACS)法により緑色蛍光を発する細胞の割合を測定した。

3-2-4 リアルタイム PCR

回収した細胞を用いて、氷上でホモジナイズし、RNeasy Mini Kit を使い、プロトコルに従って RNA を抽出した。そして、iScript cDNA Synthesis kit (BIO-RAD) を使い、RNA サンプルを cDNA に逆転写した。MilliQ 水、SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BIO-RAD)、プライマー (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) と cDNA サンプルを混ぜ、*PolQ* の発現量を調べるために CFX96 Real-Time System (BIO-RAD) を用いてリアルタイム PCR を行い、 $\Delta \Delta Ct$ 法で遺伝子発現を定量し、結果を解析した。*PolQ* の発現量は *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt)* の発現量で標準化した。使用したプライマーの配列を以下に記した。*PolQ*-F, 5'-CACACTGCTACAGGACGAATAA; *PolQ*-R, 5'-AGGTGGGCTTTCTCCTACTA; *Hprt*-F, 5'-CTGGCGTCGTGATTAGTGAT; *Hprt*-R, 5'-CTCGAGCAAGACGTTTCAGTC。

3-2-5 ウェスタンブロット

Atr 及び Ku70 タンパク質を検出するために、回収した細胞を NETN バッファー (100 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 0.5 mM EDTA, 0.5% NP-40) に溶解した。また、H2A histone family member X (H2AX) のリン酸化 (γ -H2AX) を検出するために、回収した細胞を RIPA バッファー (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) で溶解した。泳動サンプルを作製し、電気泳動及びメンブレンへの転写を行った (2-2-5 参照)。使用した抗体を以下に記した。

1 次抗体 : Atr Antibody, A300-138A (BETHYL LABORATORIES, Montgomery, TX, USA)、Ku70 Antibody (E-5) (Santa Cruz)、Purified anti-H2A.X Phospho (Ser139) Antibody (BioLegend, San Diego, CA, USA)

2 次抗体 : Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)、Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch)

ECL Western Blotting Detection Reagents (GE healthcare, Chicago, IL, USA) を用いて発光さ

せ、Precision High Contrast Western Blotting Film (BioPioneer, San Diego, CA, USA)でフィルムに露光させてシグナルを検出した。

3-2-6 薬物処理及び細胞生存率の計測

U2OS 細胞、*PolQ* KO U2OS 細胞及び *PolQ* をノックダウンした U2OS 細胞を 5000 個/well の量で 96 well plate に播種した。播種された細胞にエトポシド (Etoposide, Etop)を 0, 4, 8, 16, 24 μM の異なる濃度で投与し、カンプトテシン (Camptothecin, CPT)を 0, 0.008, 0.016, 0.032, 0.128, 0.512 μM の異なる濃度で投与した。Etop 及び CPT は両方とも DNA トポイソメラーゼの機能を抑制する抗がん剤である。DNA は超らせん構造を取っており、複製または mRNA へ転写するときは DNA トポイソメラーゼの機能によって DNA を切断し、超らせん構造を一時的に解く必要がある。DNA トポイソメラーゼには I 型と II 型の二種類があり、I 型は一本鎖を切断し、II 型は二本鎖を切断する。切断された DNA は DNA トポイソメラーゼによって再結合される。Etop はトポイソメラーゼ II の機能を阻害し、切断された DNA の再結合を阻害することで、DNA に複製ストレスを与える (Vesela E et al., 2017)。CPT はトポイソメラーゼ I と複合体を形成することで DNA の再結合を阻止し、一本鎖の切断を誘導し、複製フォークを崩壊させる (Vesela E et al., 2017)。また、播種された細胞に Atr 抑制剤である VE822 を 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5 μM の異なる濃度で投与した。前述のように Atr は複製フォークの保護作用を有するため、Atr の機能抑制も複製フォークの崩壊を起こし、細胞に複製ストレスを与える (Vesela E et al., 2017)。薬剤処理 48 時間後に、細胞の培養液を廃棄し、DPBS で細胞を一回洗浄した。CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, Madison, WI, USA) を室温で溶かし、1 well につき、10 μl の MTS 試薬と 50 μl の DMEM を混ぜた。混合液を 96 well plate に入れ、細胞培養と同じ条件で 2 時間培養した。生存している細胞の数によって MTS 混合液の色が変化するため、 μQuant (BioTek, Winooski, VT, USA) を用いて、波長 490 nm の吸光度を測定し、細胞の生存率を計算した。

MDA-MB-231 細胞、MCF7 細胞、*PolQ* をノックダウンまたはノックダウンしていない BT-474 細胞及び MDA-MB-436 細胞にも同じ薬剤を投与した。細胞を 5000 個/well の量で 96 well plate に播種し、Etop を 0, 5, 10, 20, 50, 100 μM の濃度で投与し、CPT を 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 μM の濃度で投与し、VE822 を 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5 μM の濃度で投与した。U2OS

細胞と同じく、薬剤処理 48 時間後に細胞を CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)で処理し、細胞の生存率を測定した。

また、リボヌクレオチドレダクターゼの活性を阻害し、dNTP のレベルを減少させることで DNA の複製及び修復を阻害する抗がん剤である Hydroxyurea (HU)を 2 mM の濃度で U2OS 細胞及び *PolQ* をノックダウンした U2OS 細胞に投与した。HU は DNA の合成を抑制し、複製ストレスを与えることにより DNA 二重鎖の切断を形成する。投与 24 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロット法で DNA ダメージのマーカである γ -H2AX を検出した。そのほか、VE822 を 2 μ M の濃度で BT-474 細胞に投与し、48 時間後に細胞サンプルを回収し、中性コメットアッセイで DNA の断片化を定量した (3-2-7 に参照)。

3-2-7 中性コメットアッセイ

DNA 二本鎖切断の蓄積を可視化し、定量するために、細胞を用いて中性コメットアッセイを行った。細胞をトリプシン処理し、 10^6 個/ml の濃度に DPBS で再懸濁した。再懸濁した細胞を 20 μ l 分取し、濃度 0.8%の低融点アガロース DPBS 溶液 600 μ l に入れた。低融点アガロース DPBS 溶液は凝固しないように、37 $^{\circ}$ C で保温した。細胞を含む低融点アガロース溶液を 60 μ l 取り、スライドガラスに載せ、4 $^{\circ}$ C で 15 分間放置し、凝固させた。凝固したことを確認し、溶解バッファー (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10) にスライドガラスを入れ、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させ、細胞を溶解させた。スライドガラスを 4 $^{\circ}$ C に冷やした泳動バッファー (300 mM sodium acetate, 100 mM Tris, pH 8.3) に入れ、4 $^{\circ}$ C、25 V の条件で電気泳動を 30 分間行った。そして、スライドガラスを 4 $^{\circ}$ C の 70%エタノールに入れ、30 分間放置した。スライドガラスを取り出し、4 $^{\circ}$ C で 1 時間風乾させた。1 μ l の SYBR Green を 30 ml の TE バッファー (1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl pH 8) に入れて染色液を調製し、スライドガラスを室温で 30 分間染色した。37 $^{\circ}$ C で 30 分間乾燥させ、蛍光顕微鏡を用いて観察した。DNA は緑色に染色され、顕微鏡下では断片化されていない DNA の塊からなる丸い頭部と断片化された DNA からなる長い尾部の二つの部分が観測された。頭部と尾部の長さの比率 (Tail moment) を CometScore version 2.0 で定量し、統計解析を行った。Tail moment の値から DNA 断片化の進行度が判断できる。

3-2-8 統計解析

中性コメットアッセイの統計解析は Microsoft Office Excel 2016 を用いて、一元配置分散分析を行った。箱ひげ図に全てのデータをプロットし、 $p < 0.05$ を統計的に有意とした。有意差が認められたものは異なるアルファベット間で示した。

3-3 結果

3-3-1 DNA の二本鎖または一本鎖の切断の MMEJ による修復を定量した結果

MMEJ 修復経路の U2OS リポーター細胞系を利用し、Cas9-WT で DNA の二本鎖の切断を誘導し、FACS 解析により蛍光を発する細胞の割合を測定した結果、MMEJ 修復が行われ、eGFP が発現されたことが明らかになった (図 1 8 A)。また、Cas9-D10A で DNA の一本鎖の切断を誘導した場合でも、eGFP が僅かに発現することが示された (図 1 8 B)。さらに、PolQ をノックダウンした細胞を使い、Cas9-WT または Cas9-D10A で DNA の二本鎖または一本鎖の切断を誘導し、FACS で解析した結果、eGFP を発現する細胞が両方とも PolQ のノックダウンによって減少したことが明らかになった (図 1 8 A, B)。PolQ のノックダウン効率を示すため、PolQ のリアルタイム PCR の結果を示した (図 1 8 C)。

3-3-2 MMEJ による DNA の一本鎖の切断の修復モデル

以上の結果から、我々は PolQ 依存的な MMEJ による DNA の一本鎖の切断を修復するモデルを提唱した (図 1 9)。複製フォークでの一本鎖の切断が DNA 複製の進行を止め、複製フォークが崩壊し、断裂した二本鎖 DNA と一本鎖の切断を持つ二本鎖 DNA が形成される。反対側から始まった DNA 複製フォークも同時にこの位置まで進行し、再度複製フォークが崩壊し、切断された二本鎖 DNA が形成される。DNA 二本鎖の切断を持つ DNA になり、PolQ 依存的な MMEJ によって修復される。

3-3-3 U2OS 細胞の抗がん剤に対する感受性と PolQ の関連性

U2OS 細胞及び PolQ KO U2OS 細胞の Etop または CPT 投与後の生存率を解析した結果、投与濃度の増加とともに細胞の生存率が減少したことが確認された。さらに、各濃度において細胞の生存率が PolQ 機能の欠損によって低下した (図 2 0 A, B)。KO による補償応答の影響を減らすため、我々は U2OS 細胞及び PolQ をノックダウンした U2OS 細胞に同じ濃度の Etop 及び CPT を投与し、生存率を解析した。その結果、PolQ がノックダウンされた細胞の生存率がコントロールの細胞より低いことが明らかになった (図 2 0 C, D)。PolQ のノックダウン効率をリアルタイム PCR の結果で示した (図 2 0 E)。

3-3-4 U2OS 細胞の DNA 二重鎖切断の蓄積と PolQ の関連性

HU 投与後のコントロールの U2OS 細胞及び *PolQ* がノックダウンされた U2OS 細胞の DNA の損傷マーカーである γ -H2AX の発現を検出した。その結果、HU の投与によって、 γ -H2AX の発現が両方の細胞で著しく上昇し、*PolQ* がノックダウンされた U2OS 細胞では U2OS 細胞に比較してさらに上昇した (図 2 1 A)。また、*Atr* を U2OS 細胞及び *PolQ* KO U2OS 細胞でノックダウンし、複製ストレスをかけた結果、*Atr* と *PolQ* の両方の機能を抑制することで γ -H2AX の発現が上昇することが示された (図 2 1 B)。*Atr* をウェスタンブロットで検出し、*Atr* がノックダウンされていることを示した (図 2 1 B)。

さらに、*Atr* を U2OS 細胞及び *PolQ* KO U2OS 細胞でノックダウンし、中性コメットアッセイで断片化の DNA を確認した結果、*Atr* と *PolQ* の機能が両方抑制された方の DNA の断片化が他のグループに比べて有意に増加した (図 2 2)。

3-3-5 PolQ の機能が抑制された U2OS 細胞での Atr 抑制剤への感受性

U2OS 細胞及び *PolQ* KO U2OS の VE822 投与後の生存率を解析した結果、細胞の生存率が投与濃度の増加とともに減少し、各濃度において *PolQ* KO 細胞の生存率が WT 細胞よりも低かった (図 2 3 A)。また、VE822 を U2OS 細胞及び *PolQ* がノックダウンされた U2OS 細胞に投与した結果、各濃度において *PolQ* がノックダウンされた方の生存率が低いことが確認された (図 2 3 B)。

3-3-6 乳がん細胞の抗がん剤に対する感受性と PolQ の過剰発現の関連性

乳がん細胞である BT-474 細胞、MB-MDA-436 細胞、MB-MDA-231 細胞及び MCF7 細胞を用いて *PolQ* の発現をリアルタイム PCR 法で確認した。その結果、BT-474 細胞、MB-MDA-436 細胞の *PolQ* の発現量がほかの細胞種より高かった (図 2 4 A)。また、これらの細胞に Etop 及び CPT を異なる濃度で投与し、生存率を解析した結果、各細胞種の生存率が投与濃度の上昇とともに減少した。さらに、*PolQ* の発現が高い BT-474 細胞及び MB-MDA-436 細胞が各濃度において MB-MDA-231 細胞及び MCF7 細胞より高い生存率を示した (図 2 4 B, C)。

次に、我々は BT-474 細胞、MB-MDA-436 細胞及び *PolQ* がノックダウンされた BT-474

細胞、MB-MDA-436 細胞に異なる濃度の Etop 及び CTP を投与した。その結果、各濃度において *PolQ* がノックダウンされた細胞の生存率がコントロールの細胞の生存率より低いことが明らかになった (図 2 5 A, B)。

3-3-7 *PolQ* 機能が抑制された乳がん細胞の Atr 抑制剤に対する感受性

コントロールの BT-474 細胞、MB-MDA-436 細胞及び *PolQ* がノックダウンされた BT-474 細胞、MB-MDA-436 細胞の VE822 投与後の生存率を解析した。その結果、*PolQ* 機能が抑制された BT-474 細胞及び MB-MDA-436 細胞は VE822 に対する感受性が上昇し、生存率が減少した (図 2 5 C, D)。BT-474 細胞及び MB-MDA-436 細胞の *PolQ* のノックダウン効率がリアルタイム PCR の結果で示された (図 2 5 C, D)。

VE822 投与後の BT-474 細胞の DNA の損傷マーカーである γ -H2AX を測定した結果、VE822 の投与によって γ -H2AX の発現が上昇した。VE822 が投与された方では *PolQ* のノックダウンによって γ -H2AX の発現がさらに上昇したことも示された (図 2 6 A)。さらに、DNA の断片化を中性コメットアッセイで定量した結果、VE822 の投与と *PolQ* のノックダウンを合わせることによって DNA の断片化が有意に上昇した (図 2 6 B)。

3-4 考察

3-4-1 *PolQ* に依存する MMEJ 修復のメカニズムに関する考察

MMEJ 修復経路は代替的 NHEJ と呼ばれており、HR または NHEJ の機能が欠損している場合に使われる修復経路であると考えられていた。しかし、U2OS 細胞、ヒト初代線維芽細胞及びヒト乳腺上皮細胞を用いた研究では、MMEJ 修復は HR 及び NHEJ が正常な細胞でも行われ、その割合は HR の 10-20%であることが報告されている (Truong LN et al., 2013)。通常の状態では U2OS 細胞の MMEJ 経路の活性が NHEJ 経路より低い、放射線照射された状態では、MMEJ 経路の活性が著しく増加することも報告されている (Dutta A et al., 2017)。さらに、*PolQ* が欠損しているマウスは放射線に対する感受性が高くなることも明らかになっている (Yousefzadeh MJ et al., 2014)。MMEJ 修復経路は Ku タンパク質及び選択的に塩基の編集を行う Artemis : DNA-PKcs 複合体に依存せず、素早くマイクロホモロジーを露出させ、*PolQ* 及び DNA リガーゼの活性で DNA を修復することが可能である。以上のことから、MMEJ は染色体の安定性に強いダメージを与えるようなストレスに即時的に対応するための修復経路であることが示唆された。我々のレポーター細胞系を用

いた実験結果から、MMEJ は DNA の二本鎖の切断の修復のみならず、DNA の一本鎖の切断の修復にも関与していることが明らかになった (図 1 8)。そして、二本鎖の切断及び一本鎖の切断の両方の MMEJ による修復が PolQ に依存していることも明らかになった (図 1 8)。従来の研究では、DNA の一本鎖の切断は XRCC1, DNA ポリメラーゼベータ (DNA polymerase beta) 及び Lig3 の複合体によって効率よく修復され (Caldecott KW, 2008)、MMEJ 経路が関与しないと考えられていた。そのため、我々は DNA の一本鎖の切断が DNA 複製の過程で複製フォークの崩壊を引き起こし、DNA の二本鎖の切断が誘導され、PolQ 依存的に MMEJ 経路によって修復されるモデルを提唱した (図 1 9)。DNA の二本鎖の切断が複製フォークの崩壊によって形成された場合、姉妹染色分体が存在し、HR による修復も可能であるため、MMEJ による修復の割合が減少し、蛍光の検出が少なくなると考えられる (図 1 8)。以上述べたように、MMEJ 経路は複製フォークの崩壊などの複製ストレスを伴う DNA の切断を修復することで、染色体の安定性を影響するような強いダメージに対応していることが示唆された。そして、その修復活性が PolQ に依存していることが明らかになった。

3-4-2 U2OS 細胞の抗がん剤への感受性と PolQ の関連性に関する考察

前述のように、PolQ が過剰発現しているがん細胞が多く、MMEJ 経路の活性が高いことが報告されている。がん細胞では頻繁に DNA の複製が行われており、そのため、Etop, CPT 及び HU のような複製フォークの崩壊を引き起こし、がん細胞に複製ストレスをかける抗がん剤が多数存在している。しかし、がん細胞は抗がん剤に対して抵抗性を示す場合が多く、がん治療の問題点とされている (Vasan N et al., 2019)。MMEJ 経路は PolQ の活性に依存し、がん細胞で複製ストレスによる DNA の二本鎖の切断を効率よく修復している可能性が示唆されている。そのため、がん細胞の抗がん剤への抵抗性が PolQ に依存している可能性が示唆された。

Etop の投与による複製ストレスが U2OS 細胞の細胞死を誘導できることが確認された (図 2 0 A, C)。また、各濃度において PolQ の機能抑制が U2OS 細胞の Etop に対する感受性を上昇させたことが明らかになった。Etop の投与による複製ストレスが引き起こした DNA ダメージが PolQ 依存的に MMEJ 経路によって修復されたことが示唆された。PolQ の機能抑制と抗がん剤の投与を合わせることで、通常の抗がん剤の投与方法より効率

よく U2OS 細胞の細胞死を誘導できる可能性が示され、新たながんの治療法が示唆された。さらに、CPT を異なる濃度で投与した結果、PolQ の機能抑制による U2OS 細胞の生存率の減少が Etop の実験よりも著しかった。0.5 μ M の濃度では、PolQ の機能抑制によって U2OS 細胞の生存率が半分以下になった (図 2 0 B, D)。Etop と CPT は両方とも複製ストレスをかける抗がん剤であるが、Etop は DNA の二本鎖の切断を誘導することに対して、CPT はトポイソメラーゼ I の機能を阻害することで DNA の一本鎖の切断を誘導する。従って、二本鎖の切断による複製ストレスが引き起こす DNA ダメージより、PolQ は我々が提唱したモデルで述べたような一本鎖の切断によるフォークの崩壊が引き起こした DNA ダメージの修復により深く関与している可能性が示唆された。また、KO 及びノックダウンの両方で生存率の低下が確認されたため、この効果は gRNA または shRNA のオフターゲットによるものではないと考えられる。

HU を U2OS 細胞及び *PolQ* がノックダウンされた U2OS 細胞に投与し、または *Atr* を U2OS 細胞及び *PolQ* KO 細胞でノックダウンし、複製フォークにストレスをかけ、DNA ダメージを確認した。その結果、PolQ の機能抑制によって DNA ダメージの検出が多くなることが明らかになった (図 2 1)。 γ -H2AX は DNA の二本鎖の切断が修復されると脱リン酸化されるので、PolQ の機能が抑制された場合、複製ストレスによって形成された DNA 二本鎖の切断が修復されず、そのまま蓄積されることが示された。さらに、コメットアッセイで DNA の断片化を確認した結果、*PolQ* の欠損は複製ストレスによる DNA の断片化の形成を有意に増加することが明らかになった (図 2 2)。以上で述べたように、HU の投与または *Atr* の機能抑制によって DNA 二本鎖の切断が形成され、PolQ の機能抑制によって修復されなかった二本鎖の切断が蓄積される。さらに DNA の断片化が引き起こされ、最終的には細胞死が誘導されることが示唆された。また、今までの研究では、*Atr* の機能抑制は HR 機能が欠損しているがん細胞に毒性を示すことが報告された (Krajewska M et al., 2014)。我々の研究では、*Atr* の抑制剤である VE822 の投与と PolQ の機能抑制を合わせることで、HR 機能が正常である U2OS 細胞においても生存率の低下が見られ (図 2 3)、VE822 が汎用性のある新たな抗がん剤である可能性が示唆された。

3-4-3 乳がん細胞の抗がん剤への感受性と PolQ の関連性に関する考察

Etop または CPT を投与された乳がん細胞の生存率を解析した結果、BT-474 細胞及び

MDA-MB-436 細胞は他の乳がん細胞より強い抵抗性を示し、100 μ M の Etop 及び 5 μ M の CPT を 48 時間投与しても、50%以上の生存率が維持された (図 2 4 B, C)。PolQ のリアルタイム PCR の結果では、BT-474 細胞及び MDA-MB-436 細胞の PolQ の発現量が他の乳がん細胞より高く (図 2 4 A)、抗がん剤に対する強い抵抗性が PolQ の過剰発現に由来する可能性が示唆された。さらに、我々は PolQ がノックダウンされた BT-474 細胞及び MDA-MB-436 細胞の Etop, CPT 及び VE822 に対する感受性が高くなる結果を示した (図 2 5 A-D)。乳がん細胞では、PolQ の過剰発現によって MMEJ の活性が高く、複製ストレスに誘導された DNA の損傷が素早く修復され、細胞死が抑制され、抗がん剤に対する抵抗性が獲得されたことが示唆された。VE822 投与後の DNA ダメージを BT-474 細胞を用い、 γ -H2AX の検出及びコメットアッセイで定量した結果、PolQ のノックダウンによって修復されていない DNA の切断が蓄積され、DNA の断片化が PolQ がノックダウンされていない細胞より有意に上昇することが明らかになった (図 2 6)。VE822 の投与によって PolQ の機能が抑制されていない細胞においても DNA の断片化の有意な上昇が見られた。そのため、VE822 の投与による複製フォークの崩壊は BT-474 細胞の DNA にダメージを与え、細胞死を誘導する有効な手段であると考えられる。さらに、VE822 の投与による DNA ダメージが PolQ の機能抑制によって増強され、VE822 の投与と PolQ の機能抑制を合わせることが乳がん治療の新たな効率的な治療法になる可能性が強く示唆された。

乳がんにはトリプルネガティブと呼ばれるタイプがあり、女性ホルモンの受容体であるエストロゲン受容体及びプロゲステロン受容体が陰性で、細胞増殖を刺激する Human epidermal growth factor receptor 2 (Her2) タンパクが過剰発現している乳がん細胞を意味する。女性ホルモンの依存せずに増殖し、過剰発現している Her2 によって増殖速度も速いため、有効な治療標的がなく、治療が難しいとされている。本研究で使われた MDA-MB-436 細胞はトリプルネガティブタイプであるため、PolQ の機能抑制はトリプルネガティブタイプの乳がん治療の新たな標的になる可能性が示唆された。また、強い複製ストレスがかけられている状態では、HR 機能が正常である BT-474 細胞の生存率が PolQ の機能抑制によって低下し、HR 機能が欠損している MDA-MB-436 細胞の生存率も低下した。そのため、PolQ に依存している MMEJ 経路は補償的な DNA 修復経路ではなく、HR 経路よりも早く複製ストレスに応答するための修復経路であることが示唆された。従って、PolQ の機能抑制と複製ストレスをかける薬剤の投与を合わせることは、がん細胞の HR 機能の

有無に関連せず、適用できる細胞種の範囲が広い新たながん治療法になる可能性が示唆された。さらに、正常細胞では MMEJ 修復経路の活性が弱いため、PolQ の機能抑制が通常の細胞の DNA 修復に与える影響が小さいと考えられ、がん細胞特異的にダメージを与える治療標的になる可能性が示唆された。

3-4-4 まとめ

PolQ に依存している MMEJ 修復経路が複製ストレスによる DNA の二本鎖切断に重要であることが明らかになった。MMEJ 経路は強い DNA ダメージに素早く対応できる DNA 修復経路であるが、塩基の欠損を伴う修復であるため、発がんリスクが上昇する。さらにがん細胞では MMEJ 経路の活性が高く、抗がん剤による DNA ダメージが PolQ 依存的に修復されていることが示唆された。PolQ KO または *PolQ* がノックダウンされたヒト骨肉腫由来の U2OS 細胞及び乳がん細胞に抗がん剤を投与し、生存率を解析した結果、PolQ の機能抑制はがん細胞の DNA の断片化を促進し、抗がん剤への感受性を高めることが明らかになった。PolQ の機能を抑制できる薬剤は MMEJ 経路の活性を低下させることで CR のがん抑制効果を模倣でき、六君子湯と同じく CR 模倣物になる可能性が考えられる。さらに、PolQ の機能抑制はがん治療の新たな標的になり、PolQ の機能抑制と抗がん剤の投与を合わせることは汎用性のあるがんの新しい治療法となる可能性が示された。

第四章 結語

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、老化研究の中心的な部分である CR、抗酸化能、DNA 修復及びがんの治療法について考察した。

第二章では、六君子湯の投与が CR の効果を模倣できるかについて抗酸化能を中心に考察した。CR は抗酸化能、遺伝子修復能、ミトコンドリア機能などを亢進させることで寿命延長に寄与していることが示唆されている。ヒトで長期間の CR を実行することは困難であるため、摂取カロリーを実際に制限せずに CR の抗老化効果を模倣できるような CR 模倣物の特定が重要である。

CR の寿命延長効果が *Npy* に依存していることが報告されており、六君子湯の投与は CR と同じように *Npy* の発現を上昇させたが、自然老化の過程において寿命を延長させることができなかった。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。個体レベルでは六君子湯の CR 模倣効果が見られなかったが、遺伝子の発現及び酸化ストレスのタンパク質マーカーを調べた結果、六君子湯の投与は抗酸化能及びミトコンドリア機能に重要な遺伝子の発現を亢進させ、酸化ストレスの蓄積を減少させたことが明らかになった。そのため、六君子湯は分子レベルで CR の抗酸化能を上昇させる効果を模倣できることが示唆された。六君子湯は酸化ストレス下での生存率を上昇させなかった原因として、酸化ストレスが強すぎたことが考えられ、今後は弱い酸化ストレス下での六君子湯の CR 模倣効果について検討する必要がある。

第三章では、がん細胞の抗がん剤への抵抗性と PolQ の関連性について考察した。がん細胞では DNA 修復の際に大きな塩基の欠損を伴う MMEJ 経路の活性が高くなっており、MMEJ の中心的なタンパク質である PolQ も過剰発現しているため、PolQ とがん細胞の DNA 修復活性が強く関連していることが示唆された。さらに、PolQ の機能抑制を介して MMEJ 経路の活性を減少させる薬剤は CR のがん抑制効果を模倣できる可能性も示唆された。我々の研究では、PolQ に依存する MMEJ 修復経路は複製ストレスによる DNA の切断の修復に重要であることが明らかになった。がん細胞では PolQ の過剰発現によって抗がん剤による DNA ダメージが修復され、抗がん剤への抵抗性が獲得されたことが示唆された。U2OS 細胞及び乳がん細胞の抗がん剤への感受性が PolQ の機能抑制によって上昇し、PolQ の機能抑制と抗がん剤の投与を合わせることは新たながん治療法になる可能性が示された。今後は通常の細胞を用い PolQ の機能を抑制し、抗がん剤を投与し、PolQ の機能抑制が通常の細胞に影響せず、がん細胞特異的に抗がん剤への感受性を上昇させることができるかについて検討する必要がある。

本研究の成果によって、六君子湯を摂取することで、ヒトでの実行が難しいとされている CR の効果を実際に摂取カロリーを制限せずに獲得できる可能性が示唆された。また、PolQ を標的にした、長年日本人の死因の第一位を占めているがんの新たな治療法も本研究によって示された。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。

謝辞

本研究の遂行及び学位論文の作成にあたり、多くの方々に感謝の意を表したいと思えます。学部3年生から学術的な面及び生活的な面の両方からご指導、ご支援をくださった千葉卓哉先生に心より深く御礼を申し上げます。また、この度副査を務めてくださった永島計先生及び原太一先生に深く感謝いたします。六君子湯に関する研究の実験1のマウスの飼育、寿命解析、各種パラメータ及び遺伝子発現の計測は長崎大学の下川功先生のご指導の下で小松利光博士に行って頂き、心より感謝いたします。PolQに関する研究は千葉研究室の共同研究者であるアメリカ Scripps 研究所の Xiaohua Wu 先生のご指導の下で行われました。Xiaohua Wu 先生に深く感謝いたします。また、近藤嘉高先生、大畑佳久博士及び千葉研究室の皆様から多くの助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

Abed DA, Goldstein M, Albanyan H, Jin H, Hu L. Discovery of Direct Inhibitors of Keap1-Nrf2 Protein-Protein Interaction as Potential Therapeutic and Preventive Agents. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Jul;5(4):285-99.

Andersen SL and Sekelsky J. Meiotic versus mitotic recombination: two different routes for double-strand break repair: the different functions of meiotic versus mitotic DSB repair are reflected in different pathway usage and different outcomes. *Bioessays*. 2010 Dec;32(12):1058-66.

Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, Braun KH, O'Connor CE, Prolla TA, Weindruch R. Dynamic Regulation of PGC-1 α Localization and Turnover Implicates Mitochondrial Adaptation in Calorie Restriction and the Stress Response. *Aging Cell*. 2008 Jan;7(1):101-11.

Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, Ingram DK, Lane MA, Mattson MP. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):6216-20.

Anton SD, Han H, York E, Martin CK, Ravussin E, Williamson DA. Effect of Calorie Restriction on Subjective Ratings of Appetite. *J Hum Nutr Diet*. 2009 Apr;22(2):141-7.

Asensio-López MC, Soler F, Pascual-Figal D, Fernández-Belda F, Lax A. Doxorubicin-induced oxidative stress: The protective effect of nicorandil on HL-1 cardiomyocytes. *PLoS One*. 2017 Feb 28;12(2):e0172803.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):483-95.

Boily G, Seifert EL, Bevilacqua L, He XH, Sabourin G, Estey C, Moffat C, Crawford S, Saliba S, Jardine K, Xuan J, Evans M, Harper ME, McBurney MW. Sirt1 Regulates Energy Metabolism and Response to Caloric Restriction in Mice. *PLoS One*. 2008 Mar 12;3(3):e1759.

Brandsma I and Gent DC. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr*. 2012 Nov 27;3(1):9.

Brinkman EK, Chen T, de Haas M, Holland HA, Akhtar W, van Steensel B. Kinetics and Fidelity of the Repair of Cas9-Induced Double-Strand DNA Breaks. *Mol Cell*. 2018 Jun 7;70(5):801-813.

Broglio F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, Maccario M, Deghenghi R, van der Lely AJ, Ghigo E. Effects of Ghrelin on the Insulin and Glycemic Responses to Glucose, Arginine, or Free Fatty Acids Load in Humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Sep;88(9):4268-72.

Brown-Borg HM. The Somatotrophic Axis and Longevity in Mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015 Sep 15;309(6):E503-10.

Caldecott KW. Single-strand Break Repair and Genetic Disease. *Nat Rev Genet*. 2008 Aug;9(8):619-31.

Cantó C and Auwerx J. Caloric Restriction, SIRT1 and Longevity. *Trends Endocrinol Metab*. 2009 Sep;20(7):325-31.

Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, McWalter GK, McLellan LI, Elcombe CR, Henderson CJ, Wolf CR, Moffat GJ, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Loss of the Nrf2 Transcription Factor Causes a Marked Reduction in Constitutive and Inducible Expression of the Glutathione S-transferase *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm1*, *Gstm2*, *Gstm3* and *Gstm4* Genes in the Livers of Male and Female Mice. *Biochem J*. 2002 Jul 15;365(Pt 2):405-16.

Chang HC and Guarente L. SIRT1 and Other Sirtuins in Metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2014 Mar;25(3):138-45.

Chiarle R, Zhang Y, Frock RL, Lewis SM, Molinie B, Ho YJ, Myers DR, Choi VW, Compagno M, Malkin DJ, Neuberger D, Monti S, Giallourakis CC, Gostissa M, Alt FW. Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell.* 2011 Sep 30;147(1):107-19.

Chiba T, Tamashiro Y, Park D, Kusudo T, Fujie R, Komatsu T, Kim SE, Park S, Hayashi H, Mori R, Yamashita H, Chung HY, Shimokawa I. A key role for neuropeptide Y in lifespan extension and cancer suppression via dietary restriction. *Sci Rep.* 2014 Mar 31;4:4517.

Chiba T, Komatsu T, Nakayama M, Adachi T, Tamashiro Y, Hayashi H, Yamaza H, Higami Y, Shimokawa I. Similar Metabolic Responses to Calorie Restriction in Lean and Obese Zucker Rats. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Oct 15;309(1-2):17-25.

Chistiakov DA, Sobenin IA, Revin VV, Orekhov AN, Bobryshev YV. Mitochondrial Aging and Age-Related Dysfunction of Mitochondria. *Biomed Res Int.* 2014;2014:238463.

Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. Calorie Restriction Promotes Mammalian Cell Survival by Inducing the SIRT1 Deacetylase. *Science.* 2004 Jul 16;305(5682):390-2.

Ding Q, Ash C, Mracek T, Merry B, Bing C. Caloric Restriction Increases Adiponectin Expression by Adipose Tissue and Prevents the Inhibitory Effect of Insulin on Circulating Adiponectin in Rats. *J Nutr Biochem.* 2012 Aug;23(8):867-74.

Du Q, Tan Z, Shi F, Tang M, Xie L, Zhao L, Li Y, Hu J, Zhou M, Bode A, Luo X, Cao Y. PGC1 α /CEBPB/CPT1A Axis Promotes Radiation Resistance of Nasopharyngeal Carcinoma Through Activating Fatty Acid Oxidation. *Cancer Sci.* 2019 Jun;110(6):2050-2062.

Dutta A, Eckelmann B, Adhikari S, Ahmed KM, Sengupta S, Pandey A, Hegde PM, Tsai MS, Tainer JA, Weinfeld M, Hegde ML, Mitra S. Microhomology-mediated End Joining Is Activated in Irradiated Human Cells Due to Phosphorylation-Dependent Formation of the XRCC1 Repair Complex. *Nucleic Acids Res.* 2017 Mar 17;45(5):2585-2599.

Eaton GJ, Johnson FN, Custer RP, Crane AR. The Icr:Ha(ICR) mouse: a current account of breeding, mutations, diseases and mortality. *Lab Anim.* 1980 Jan;14(1):17-24.

Fujitsuka N and Uezono Y. Rikkunshito, a Ghrelin Potentiator, Ameliorates Anorexia-Cachexia Syndrome. *Front Pharmacol.* 2014 Dec 10;5:271.

Fujitsuka N, Asakawa A, Morinaga A, Amitani MS, Amitani H, Katsuura G, Sawada Y, Sudo Y, Uezono Y, Mochiki E, Sakata I, Sakai T, Hanazaki K, Yada T, Yakabi K, Sakuma E, et al. Increased ghrelin signaling prolongs survival in mouse models of human aging through activation of sirtuin1. *Mol Psychiatry.* 2016 Nov;21(11):1613-1623.

González S and Pathak MA. Inhibition of Ultraviolet-Induced Formation of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Erythema and Skin Photosensitization by *Polypodium Leucotomos*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1996 Apr;12(2):45-56.

Goulet de Rugy T, Bashkurov M, Datti A, Betous R, Guitton-Sert L, Cazaux C, Durocher D, Hoffmann JS. Excess Polθ functions in response to replicative stress in homologous recombination-proficient cancer cells. *Biol Open.* 2016 Oct 15;5(10):1485-1492.

Guarente L. Mitochondria--a Nexus for Aging, Calorie Restriction, and Sirtuins? *Cell.* 2008 Jan 25;132(2):171-6.

Hayashi S and Kimura M. Mechanisms of Hormonal Therapy Resistance in Breast Cancer. *Int J*

Clin Oncol. 2015 Apr;20(2):262-7.

Heydari AR, Unnikrishnan A, Lucente LV, Richardson A. Caloric restriction and genomic stability. *Nucleic Acids Res.* 2007 Oct 16;35(22):7485-96.

Higgins GS, Harris AL, Prevo R, Helleday T, McKenna WG, Buffa FM. Overexpression of POLQ confers a poor prognosis in early breast cancer patients. *Oncotarget.* 2010 Jul;1(3):175-84.

Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional Silencing and Longevity Protein Sir2 Is an NAD-dependent Histone Deacetylase. *Nature.* 2000 Feb 17;403(6771):795-800.

Ingram DK, Zhu M, Mamczarz J, Zou S, Lane MA, Roth GS, deCabo R. Calorie Restriction Mimetics: An Emerging Research Field. *Aging Cell.* 2006 Apr;5(2):97-108.

Jasin M and Rothstein R. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Nov 1;5(11):a012740.

Jung HJ, Suh Y. Regulation of IGF -1 Signaling by microRNAs. *Front Genet.* 2015 Jan 13;5:472.

Kawamata T, Akiguchi I, Maeda K, Tanaka C, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Age-related changes in the brains of senescence-accelerated mice (SAM): association with glial and endothelial reactions. *Microsc Res Tech.* 1998 Oct 1;43(1):59-67.

Kawamura K, Bahar R, Seimiya M, Chiyo M, Wada A, Okada S, Hatano M, Tokuhisa T, Kimura H, Watanabe S, Honda I, Sakiyama S, Tagawa M, O-Wang J. DNA polymerase theta is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. *Int J Cancer.* 2004 Mar;109(1):9-16.

Kent T, Chandramouly G, McDevitt SM, Ozdemir AY, Pomerantz RT. Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase θ . *Nat Struct Mol Biol.*

2015 Mar;22(3):230-7.

Kenyon CJ. The Genetics of Ageing. *Nature*. 2010 Mar 25;464(7288):504-12.

Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T. Ghrelin Directly Interacts With neuropeptide-Y-containing Neurons in the Rat Arcuate Nucleus: Ca²⁺ Signaling via Protein Kinase A and N-type Channel-Dependent Mechanisms and Cross-Talk With Leptin and Orexin. *Diabetes*. 2003 Apr;52(4):948-56.

Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997 Nov 6;390(6655):45-51.

Krajewska M, Fehrmann RS, Schoonen PM, Labib S, de Vries EG, Franke L, van Vugt MA. ATR Inhibition Preferentially Targets Homologous Recombination-Deficient Tumor Cells. *Oncogene*. 2015 Jun;34(26):3474-81.

Lakin ND and Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*. 1999 Dec 24;18:7644-7655.

Lemée F, Bergoglio V, Fernandez-Vidal A, Machado-Silva A, Pillaire MJ, Bieth A, Gentil C, Baker L, Martin AL, Leduc C, Lam E, Magdeleine E, Filleron T, Oumouhou N, Kaina B, et al. DNA polymerase theta up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 27;107(30):13390-5.

Li H, Vogel H, Holcomb VB, Gu Y, Hasty P. Deletion of Ku70, Ku80, or both causes early aging without substantially increased cancer. *Mol Cell Biol*. 2007 Dec;27(23):8205-14.

Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:181-211.

Life expectancy at birth. World Bank Open Data. 2018.

Luo J, Mills K, le Cessie S, Noordam R, van Heemst D. Ageing, Age-Related Diseases and Oxidative Stress: What to Do Next? *Ageing Res Rev.* 2020 Jan;57:100982.

Martin GM. Genetic Modulation of the Senescent Phenotype of Homo Sapiens. *Exp Gerontol.* Jan-Apr 1996;31(1-2):49-59.

Mateos-Gomez PA, Gong F, Nair N, Miller KM, Lazzerini-Denchi E, Sfeir A. Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature.* 2015 Feb 12;518(7538):254-7.

Matsumura T, Arai M, Yonemitsu Y, Maruoka D, Tanaka T, Suzuki T, Yoshikawa M, Imazeki F, Yokosuka O. The traditional Japanese medicine Rikkunshito increases the plasma level of ghrelin in humans and mice. *J Gastroenterol.* 2010 Mar;45(3):300-7.

Mattison JA, Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Kemnitz JW, Roth GS, Ingram DK, Weindruch R, de Cabo R, Anderson RM. Caloric Restriction Improves Health and Survival of Rhesus Monkeys. *Nat Commun.* 2017 Jan 17;8:14063.

Mattson MP. Emerging neuroprotective strategies for Alzheimer's disease: dietary restriction, telomerase activation, and stem cell therapy. *Exp Gerontol.* 2000 Jul;35(4):489-502.

Maynard S, Fang EF, Scheibye-Knudsen M, Croteau DL, Bohr VA. DNA Damage, DNA Repair, Aging, and Neurodegeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Sep 18;5(10):a025130.

McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The Effect of Retarded Growth Upon the Length of Life Span and Upon the Ultimate Body Size.

Mercken EM, Hu J, Krzysik-Walker S, Wei M, Li Y, McBurney MW, de Cabo R, Longo VD. SIRT1 but Not Its Increased Expression Is Essential for Lifespan Extension in Caloric-Restricted Mice. *Aging Cell*. 2014 Feb;13(1):193-6.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994 Oct 7;266(5182):66-71.

Mirandola SR, Melo DR, Saito A, Castilho RF. 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *J Neurosci Res*. 2010 Feb 15;88(3):630-9.

Miyazaki Y, Shimizu A, Pastan I, Taguchi K, Naganuma E, Suzuki T, Hosoya T, Yokoo T, Saito A, Miyata T, Yamamoto M, Matsusaka T. Keap1 Inhibition Attenuates Glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Apr;29(4):783-91.

Moiseenko F, Volkov N, Bogdanov A, Dubina M, Moiseyenko V. Resistance Mechanisms to Drug Therapy in Breast Cancer and Other Solid Tumors: An Opinion. *F1000Res*. 2017 Mar 17;6:288.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A Role for Ghrelin in the Central Regulation of Feeding. *Nature*. 2001 Jan 11;409(6817):194-8.

Nicolai S, Rossi A, Di Daniele N, Melino G, Annicchiarico-Petruzzelli M, Raschellà G. DNA Repair and Aging: The Impact of the p53 Family. *Aging (Albany NY)*. 2015 Dec;7(12):1050-65.

Ohno T, Yanai M, Ando H, Toyomasu Y, Ogawa A, Morita H, Ogata K, Mochiki E, Asao T, Kuwano

H. Rikkunshito, a traditional Japanese medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in humans. *Clin Exp Gastroenterol.* 2011;4:291-6.

Paull TT and Lee JH. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle.* 2005 Jun;4(6):737-40.

Pearson KJ, Lewis KN, Price NL, Chang JW, Perez E, Cascajo MV, Tamashiro KL, Poosala S, Csiszar A, Ungvari Z, Kensler TW, Yamamoto M, Egan JM, Longo DL, Ingram DK, Navas P, de Cabo R. Nrf2 Mediates Cancer Protection but Not Prolongevity Induced by Caloric Restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 19;105(7):2325-30.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.* 2008 Jun;4(2):89-96.

Poon HF, Joshi G, Sultana R, Farr SA, Banks WA, Morley JE, Calabrese V, Butterfield DA. Antisense directed at the A β region of APP decreases brain oxidative markers in aged senescence accelerated mice. *Brain Res.* 2004 Aug 20;1018(1):86-96.

Qiang L, Wang H, Farmer SR. Adiponectin Secretion Is Regulated by SIRT1 and the Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase Ero1-L Alpha. *Mol Cell Biol.* 2007 Jul;27(13):4698-707.

Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Mediation of IGF-1-induced Skeletal Myotube Hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 Pathways. *Nat Cell Biol.* 2001 Nov;3(11):1009-13.

Sato I, Arima H, Ozaki N, Watanabe M, Goto M, Hayashi M, Banno R, Nagasaki H, Oiso Y. Insulin Inhibits Neuropeptide Y Gene Expression in the Arcuate Nucleus Through GABAergic Systems. *J Neurosci.* 2005 Sep 21;25(38):8657-64.

Schumacher B, Garinis GA, Hoeijmakers JH. Age to Survive: DNA Damage and Aging. *Trends Genet.* 2008 Feb;24(2):77-85.

Seol JH, Shim EY, Lee SE. Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutat Res.* 2018 May;809:81-87.

Shimokawa I, Chiba T, Yamaza H, Komatsu T. Longevity Genes: Insights From Calorie Restriction and Genetic Longevity Models. *Mol Cells.* 2008 Nov 30;26(5):427-35.

Spiegelman BM. Transcriptional Control of Mitochondrial Energy Metabolism Through the PGC1 Coactivators. *Novartis Found Symp.* 2007;287:60-3; discussion 63-9.

Stephens PJ, McBride DJ, Lin ML, Varela I, Pleasance ED, Simpson JT, Stebbings LA, Leroy C, Edkins S, Mudie LJ, Greenman CD, Jia M, Latimer C, Teague JW, Lau KW, Burton J, et al. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature.* 2009 Dec 24;462(7276):1005-10.

Symington LS and Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet.* 2011;45:247-71.

Takeda S, Nakamura K, Taniguchi Y, Paull TT. Ctp1/CtIP and the MRN complex collaborate in the initial steps of homologous recombination. *Mol Cell.* 2007 Nov 9;28(3):351-2.

Tazearslan C, Huang J, Barzilai N, Suh Y. Impaired IGF1R Signaling in Cells Expressing Longevity-Associated Human IGF1R Alleles. *Aging Cell.* 2011 Jun;10(3):551-4.

Truong LN, Li Y, Shi LZ, Hwang PY, He J, Wang H, Razavian N, Berns MW, Wu X. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination Share the Initial End Resection Step to Repair DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci U S*

A. 2013 May 7;110(19):7720-5.

Um JH, Kim SJ, Kim DW, Ha MY, Jang JH, Kim DW, Chung BS, Kang CD, Kim SH. Tissue-specific changes of DNA repair protein Ku and mtHSP70 in aging rats and their retardation by caloric restriction. *Mech Ageing Dev.* 2003 Aug-Sep;124(8-9):967-75.

Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A View on Drug Resistance in Cancer. *Nature.* 2019 Nov;575(7782):299-309.

Xapelli S, Agasse F, Ferreira R, Silva AP, Malva JO. Neuropeptide Y as an endogenous antiepileptic, neuroprotective and pro-neurogenic peptide. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 2006 Nov;1(3):315-24.

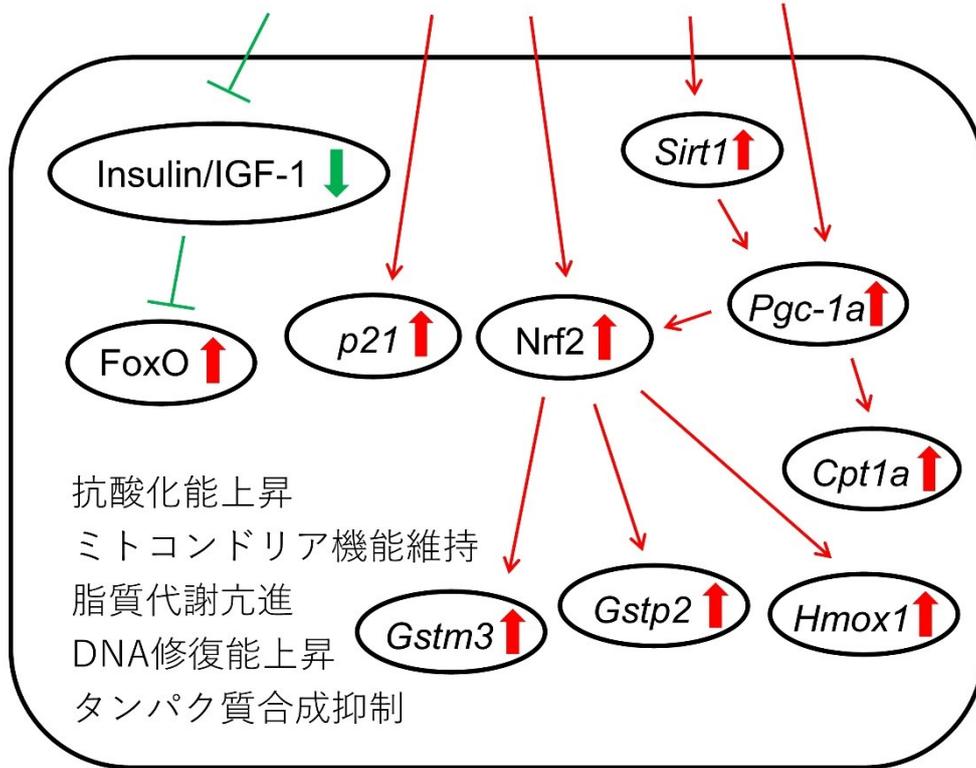
Yamaza H, Komatsu T, Wakita S, Kijogi C, Park S, Hayashi H, Chiba T, Mori R, Furuyama T, Mori N, Shimokawa I. FoxO1 Is Involved in the Antineoplastic Effect of Calorie Restriction. *Aging Cell.* 2010 Jun;9(3):372-82.

Yousefzadeh MJ, Wyatt DW, Takata K, Mu Y, Hensley SC, Tomida J, Bylund GO, Doublie S, Johansson E, Ramsden DA, McBride KM, Wood RD. Mechanism of suppression of chromosomal instability by DNA polymerase POLQ. *PLoS Genet.* 2014 Oct 2;10(10):e1004654.

国立がん研究センター「最新がん統計」2016.

内閣府「令和元年版高齢社会白書」2019. p28.

カロリー制限



寿命延長

図1 カロリー制限 (Calorie restriction, CR) によるシグナル伝達

CR によって、Insulin/IGF-1 シグナルが抑制され、タンパク質の合成が抑制され、抗酸化能に重要な Forkhead box O ファミリー (FoxO) が活性化される。また、酸化ストレス応答に重要な転写因子である Nrf2 が活性化され、下流に存在する酸化ストレス除去能を持つ *Glutathione s-transferase m3 (Gstm3)*, *Glutathione s-transferase p2 (Gstp2)*, *Heme oxygenase1 (Hmox1)* の発現が上昇する。そのほか、DNA 修復を制御し、Nrf2 の活性にも関与する p21 の発現が上昇し、DNA 修復能が亢進する。さらに、長寿遺伝子である *Sirtuin1 (Sirt1)* 及びミトコンドリア機能に重要である *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Pgc-1a)* の発現も上昇し、脂質代謝やミトコンドリア生合成も亢進される。これらのシグナル伝達によって、CR が寿命延長に関与していると考えられている。

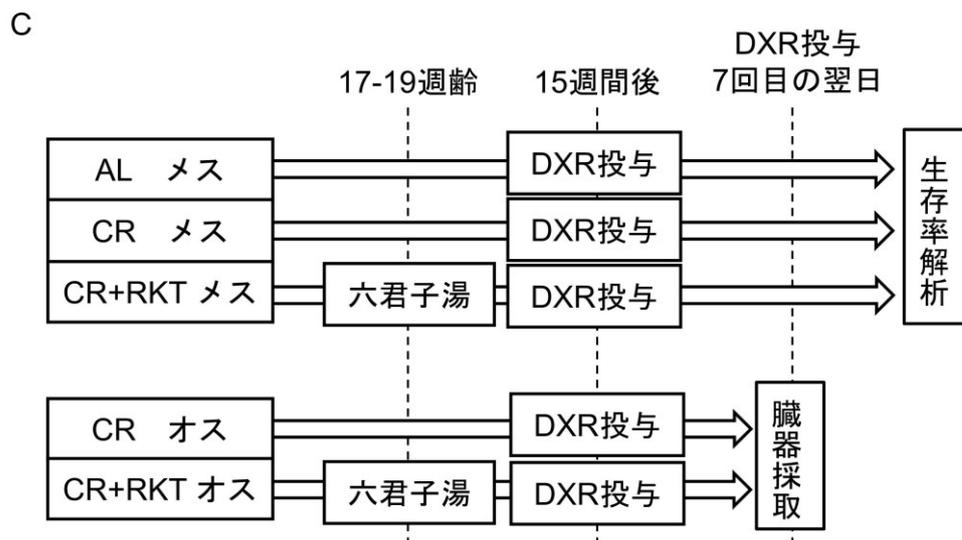
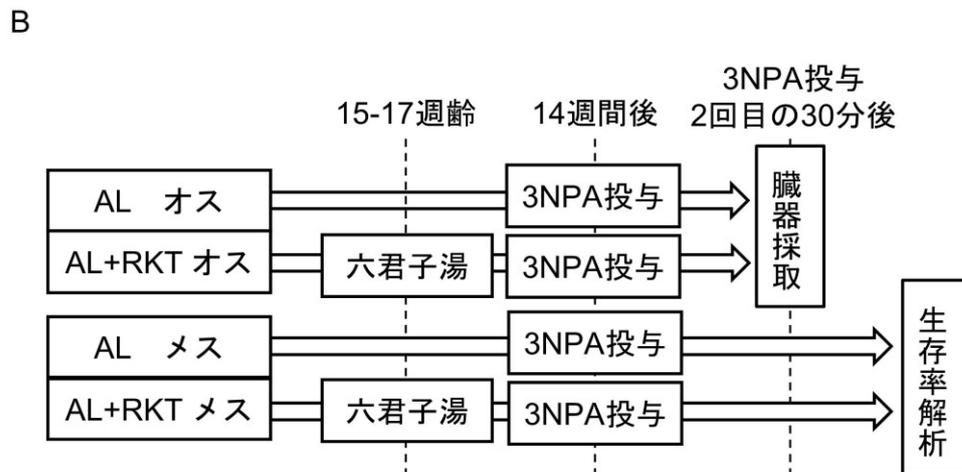
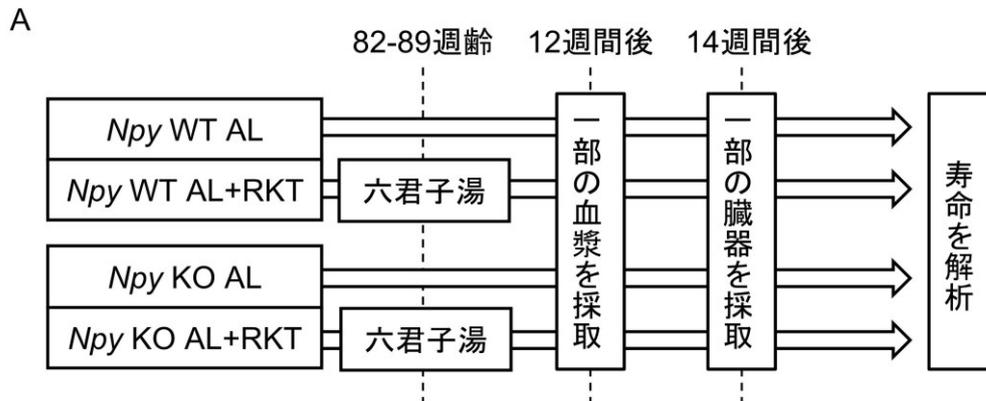


図2 マウスの飼育スケジュール

(A) 実験1の飼育スケジュール。82-89週齢の *Npy* WT マウス及び *Npy* KO マウスに六君子湯 (Rikkunshito, RKT) を投与し、自由摂食(AL)の状態で飼育した。12週間後に一部のマウスの血漿サンプルを採取し、六君子湯による血中パラメータの変化を解析した。14週間後に一部のマウスの組織サンプルを採取し、六君子湯による臓器重量の変化を解析した。最後に、六君子湯と遺伝子型による寿命の変化を解析した。(B) 実験2の飼育スケジュール。14-16週齢のマウスを1週間馴化し、六君子湯を投与し、ALの状態を飼育した。14週間後に3-nitropropionic acid (3NPA) を投与し、酸化ストレスをかけた。3NPA投与2回後にオスのマウスの臓器サンプルを採取した。メスのマウスに3NPAを投与し続け、生存率を解析した。(C) 実験3の飼育スケジュール。16-18週齢のマウスを1週間馴化し、六君子湯を投与し、ALまたはCRの状態を飼育した。餌は高脂肪食を使った。15週間後にdoxorubicin (DXR) を投与し、酸化ストレスをかけた。DXR投与7回後にオスのマウスの臓器サンプルを採取した。メスのマウスにDXRを投与し続け、生存率を解析した。

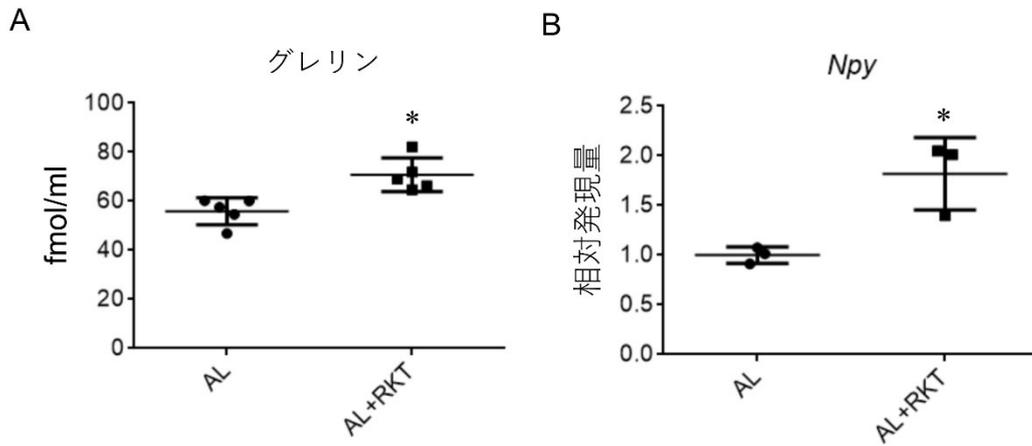


図3 予備実験のグレリンの血中レベル及び *Npy* の脳での発現

(A) AL+RKT 群のグレリンの血中レベルは AL 群より有意に高かった ($p < 0.05$, $n = 5$)。

(B) AL+RKT 群の脳での *Npy* の発現は AL 群より有意に高かった ($p < 0.05$, $n = 3$)。t 検定を行った結果が表示された(*, $p < 0.05$)。

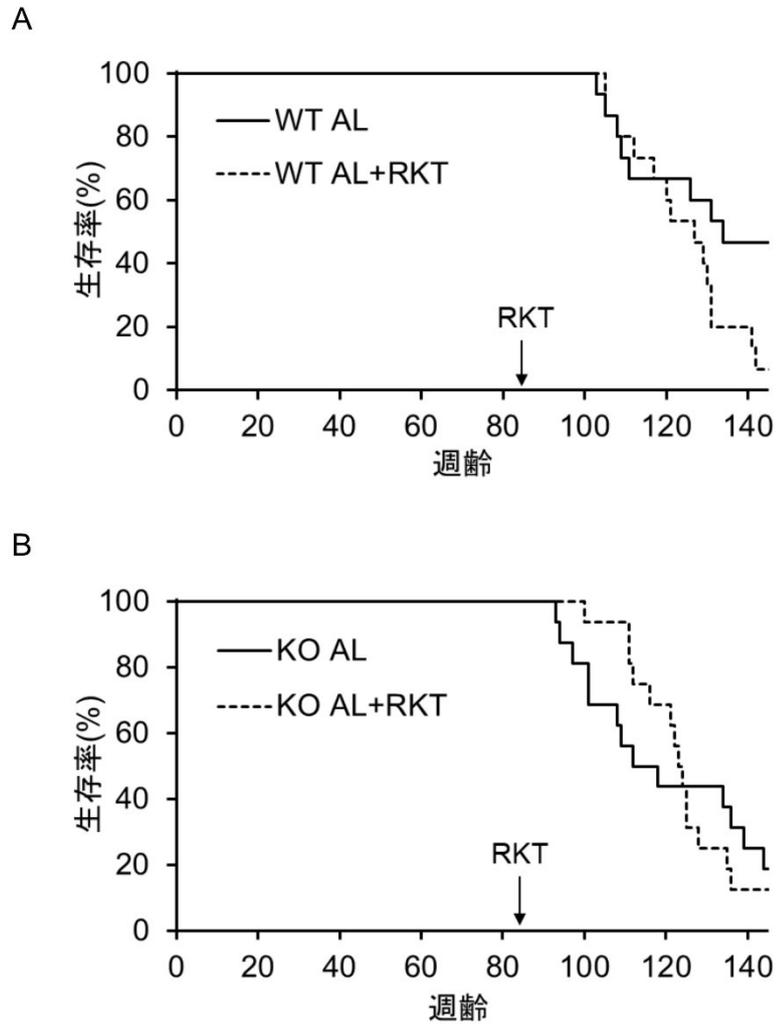


図4 *Npy* WT 及び *Npy* KO マウスの寿命 (実験1)

(A, B) オスの *Npy* WT マウス (A) 及び *Npy* KO マウス (B) の寿命。実線で六君子湯が投与されていない WTAL 群及び KOAL 群の寿命を示し、破線で六君子湯が投与された WTAL+RKT 群及び KOAL+RKT 群の寿命を示した。六君子湯投与開始の週齢を矢印で表した。log rank test の結果、*Npy* WT 及び *Npy* KO マウス両方において AL と AL+RKT 群の間に有意差がなかった (n=15-16)。

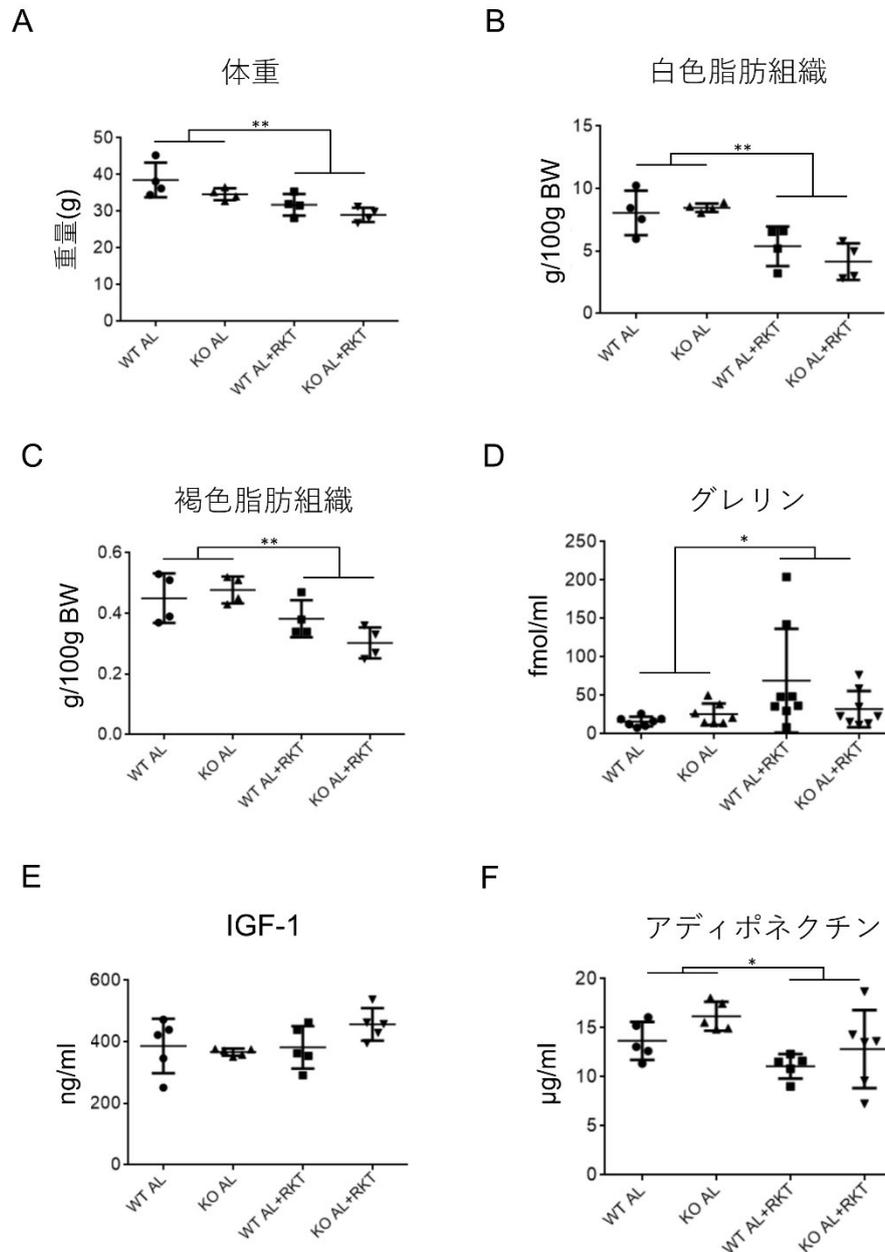
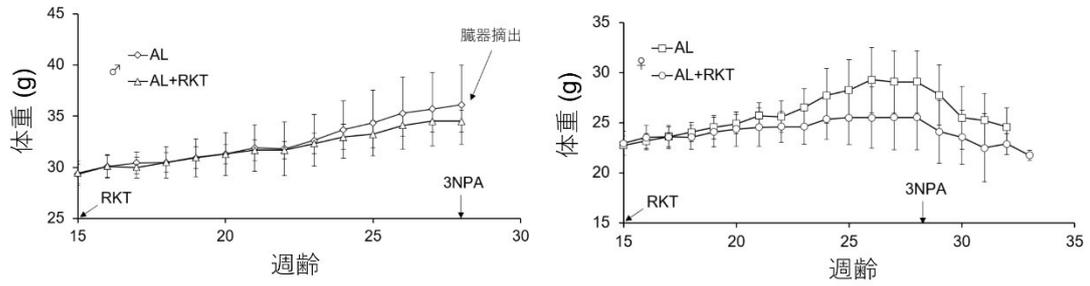


図5 *Npy* WT 及び *Npy* KO マウスの体重、組織重量及び血中パラメータの六君子湯投与による変化 (実験1)

(A) 六君子湯投与 12-14 週間後の体重。(B,C) 白色脂肪組織及び褐色脂肪組織の重量。(D,E,F) グレリン、IGF-1、アディポネクチンの血中レベル。二元配置分散分析で解析した結果、体重、白色脂肪組織及び褐色脂肪組織の重量、グレリン及びアディポネクチンの血中レベルで六君子湯の投与による効果が認められた。遺伝子型による効果及び交互作用が認められなかった。(n=4-8, *, p<0.05, **, p<0.01)。BW, Body Weight. IGF-1, Insulin-like growth factors.

A



B

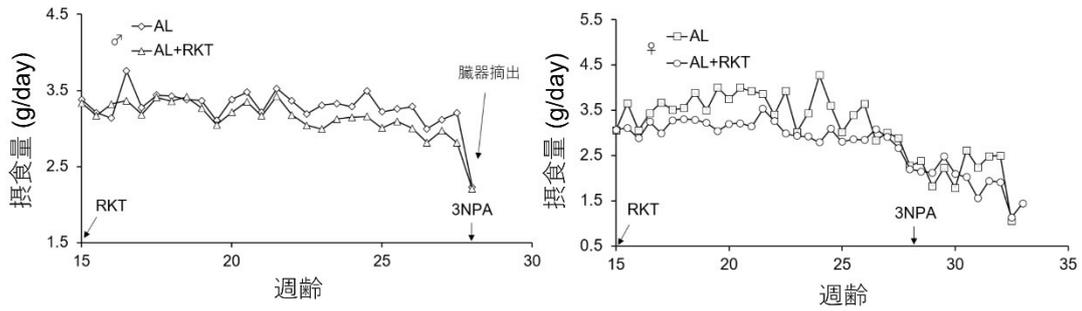


図6 体重及び摂食量の推移（実験2）

(A, B) オス、メス別の AL 群及び AL+RKT 群の体重 (A) 及び摂食量 (B) のデータ (n=8-10)。左はオスのマウスのデータを示し。右はメスのマウスのデータを示した。◇はオスの AL 群、△はオスの AL+RKT 群、□はメスの AL 群、○はメスの AL+RKT 群を示した。オスのマウスは 3NPA 投与 2 回後にサンプル採取された。反復測定分散分析を行った結果、AL 及び AL+RKT 群の間に有意差がなかった。

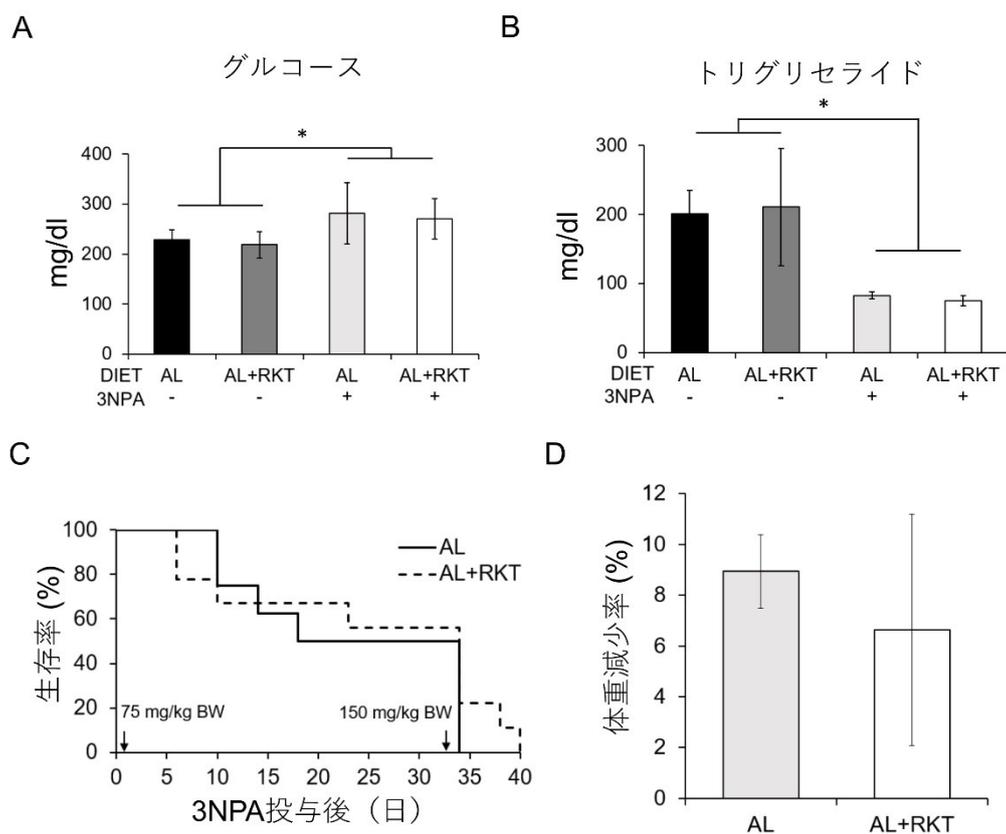


図7 3NPA 投与後のグルコース及びトリグリセライドの血中レベル、生存率、体重減少率（実験2）

(A, B) 3NPA 投与前及び投与後の AL 群及び AL+RKT 群のオスのマウスのグルコース (A) 及びトリグリセライド (B) の血中レベル。二元配置分散分析で解析した結果、グルコース及びトリグリセライドの血中レベルで 3NPA の投与による効果が認められた。六君子湯の投与による効果及び交互作用が認められなかった ($n=5$, *, $p<0.05$)。 (C) 3NPA 投与後のメスのマウスの生存率 ($n=8-10$)。実線で AL 群を示し、破線で AL+RKT 群を示した。3NPA 投与の濃度と投与開始の時間をグラフに示した。log rank test の結果、AL 群、AL+RKT 群の間に有意差が認められなかった。 (D) 3NPA 投与 2 週間後のメスのマウスの体重減少率 ($n=5-6$)。AL 群、AL+RKT 群の間に有意差が認められなかった。

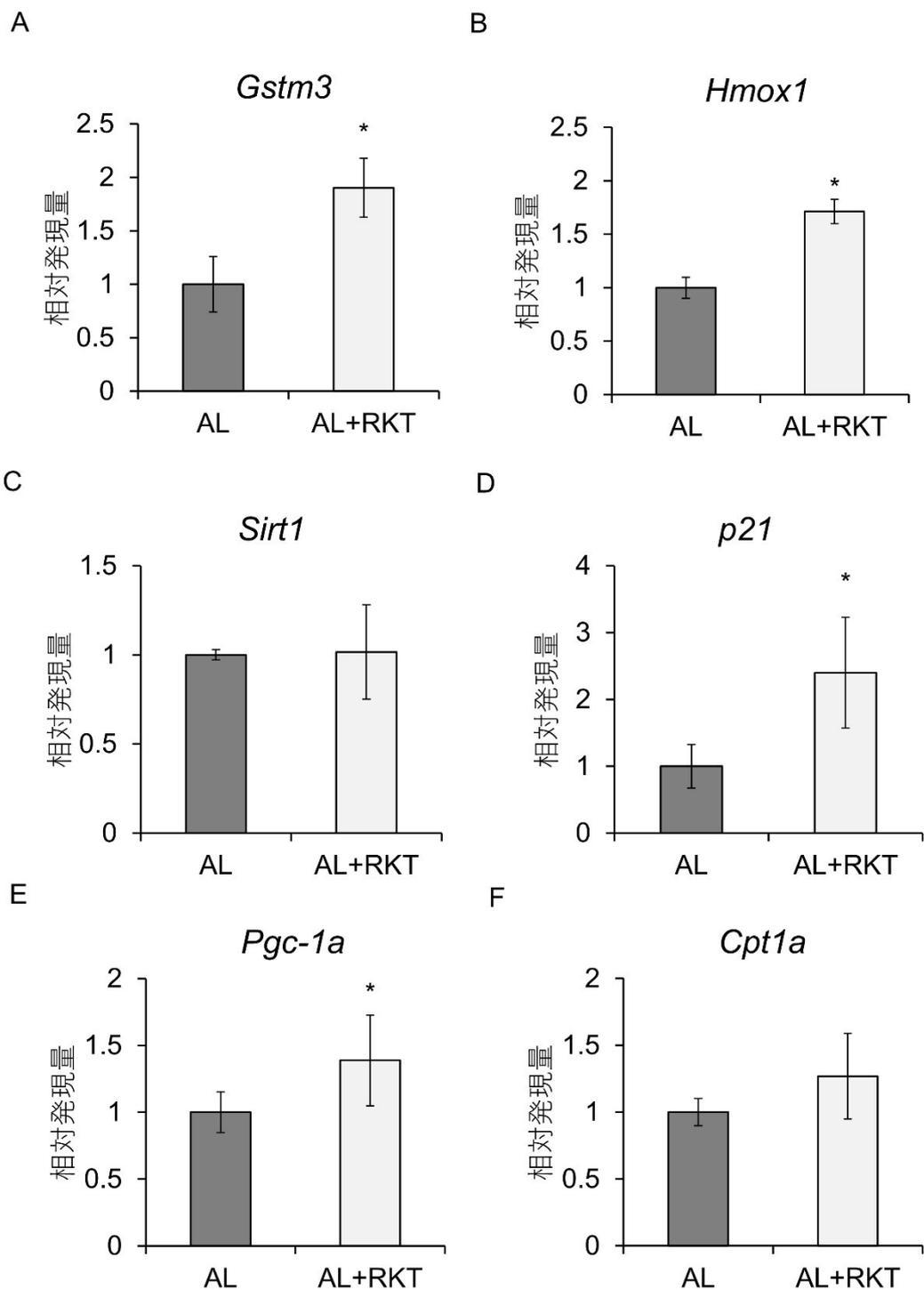


図8 肝臓での遺伝子発現 (実験2)

(A-F) 3NPA 投与後の肝臓での *Gstm3*, *Hmox1*, *Sirt1*, *p21*, *Pgc-1a*, *Cpt1a* の発現。AL 群の発現量を 1 にし、t 検定の結果を示した(n=4-5, *, p<0.05)。 *Gstm3*, *Glutathione s-transferase m3*; *Hmox1*, *Heme oxygenase1*; *Sirt1*, *Sirtuin1*; *Pgc-1a*, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*; *Cpt1a*, *Carnitine palmitoyltransferase 1a*.

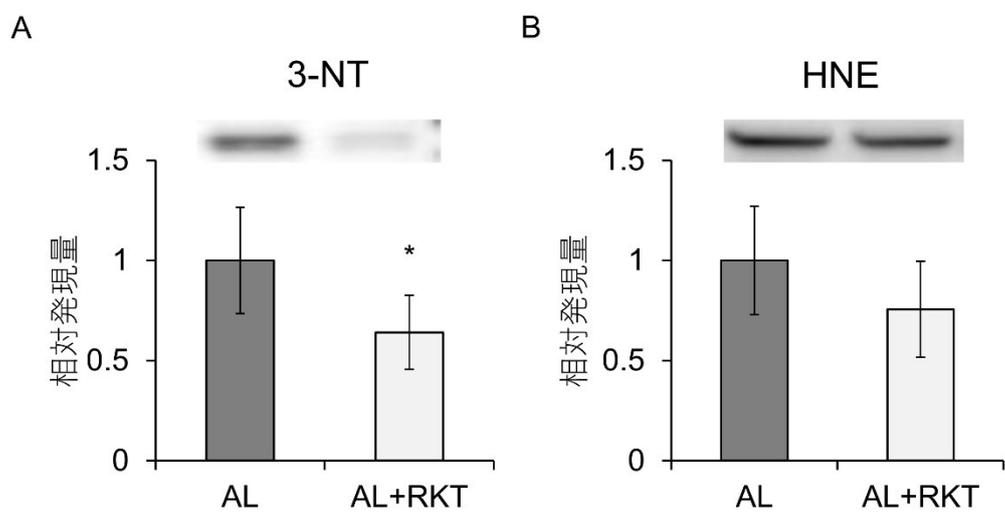


図9 肝臓での酸化ストレスのタンパク質マーカーの発現 (実験2)

(A, B) 3NPA 投与後の肝臓での 3-nitrotyrosine (3-NT) 及び Hydroxynonenal (HNE) の発現。AL 群の発現量を 1 にし、t 検定の結果を示した (n=5, *, p<0.05)。ウェスタンブロットの写真をグラフの上を示した。

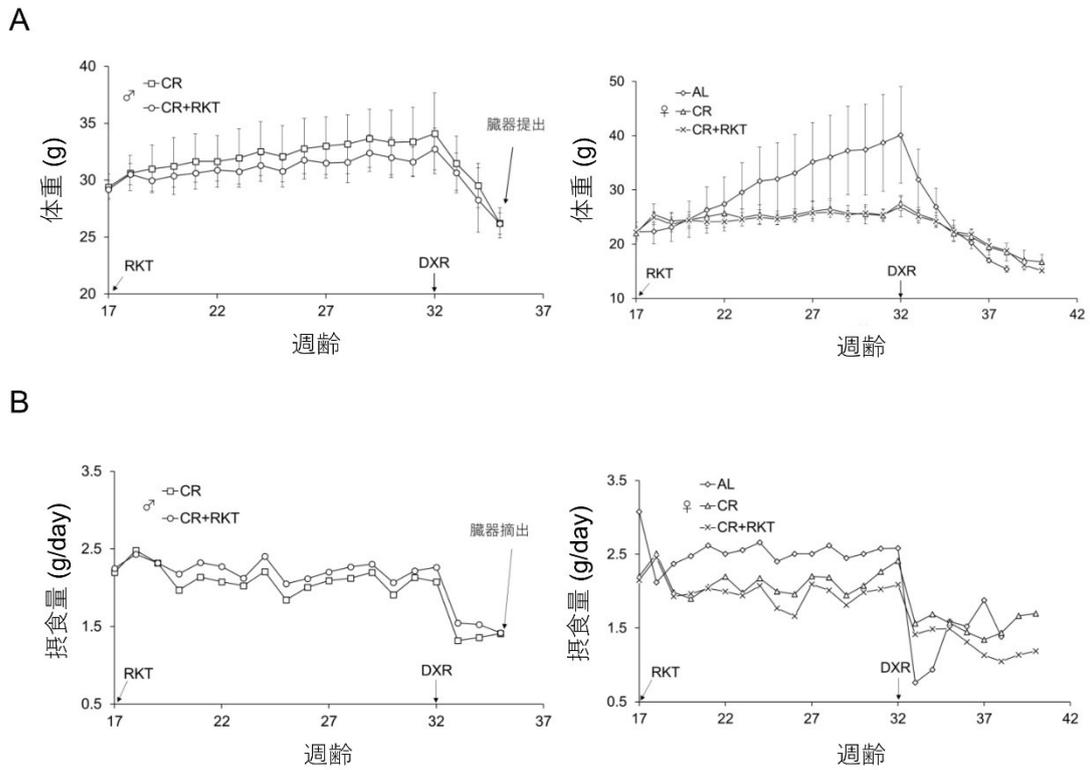


図10 体重、摂食量の推移（実験3）

(A, B) オス、メス別の AL 群、CR 群及び CR+RKT 群の体重 (A) 及び摂食量 (B) (n=6-7)。左はオスのマウスのデータを示し、右はメスのマウスのデータを示した。□はオスの CR 群、○はオスの CR+RKT 群、◇はメスの AL 群、△はメスの CR 群、×はメスの CR+RKT 群を示した。反復測定分散分析を行った結果、AL 群の体重は CR の 2 群より有意に高いことが認められた ($p<0.05$)。六君子湯投与による有意差が認められなかった。

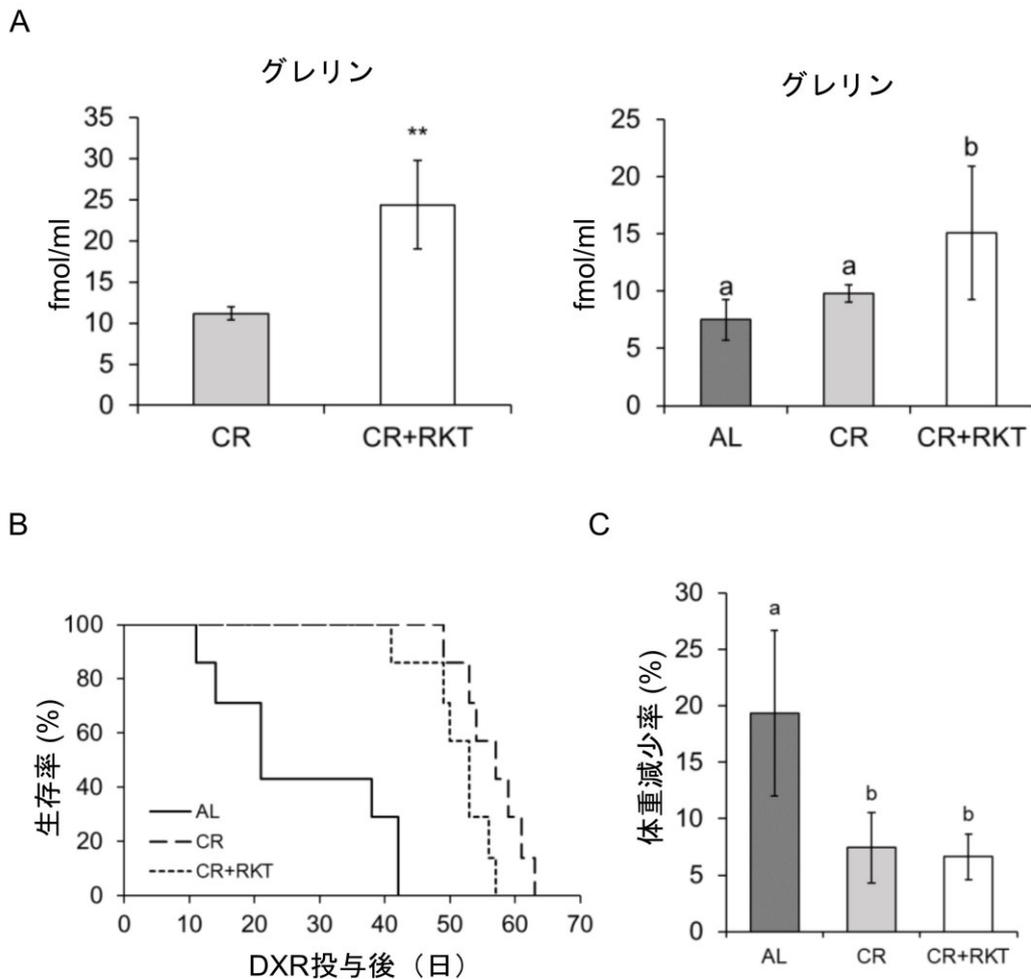


図 1 1 グレリンの血中レベル、DXR 投与後の生存率及び体重減少率（実験 3）
 (A) グレリンの血中レベルがオス（左）、メス（右）別で示された（ $n=5-7$ ）。 t 検定（左）の結果（**、 $p<0.01$ ）と分散分析（右）の結果（ $p<0.05$ ）を示した。(B) DXR 投与後のメスのマウスの生存率（ $n=7$ ）。実線で AL 群を示し、破線で CR 群を示し、点線で CR+RKT 群を示した。log rank test で解析した結果、AL 群に比較して CR の 2 群の生存率が有意に高いことが認められた（ $p<0.01$ ）。六君子湯投与による有意差が認められなかった。(C) DXR 投与 1 週間後のメスのマウスの体重減少率（ $n=6-7$ ）。分散分析の結果を異なるアルファベット間で示した（ $p<0.05$ ）。

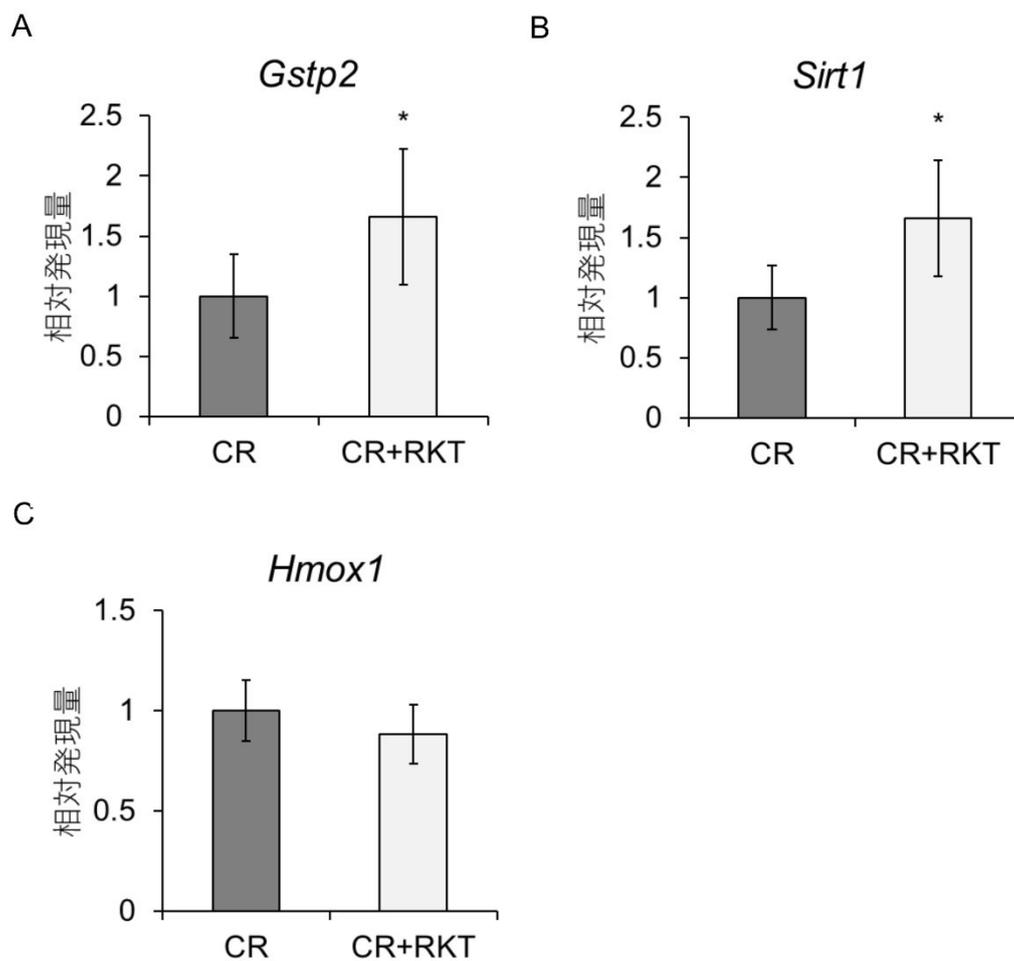


図 1 2 肝臓での遺伝子発現 (実験 3)

(A-C) DXR 投与後の肝臓での *Gstp2*, *Sirt1*, *Hmox1* の発現 (n=5)。CR 群の発現量を 1 にし、t 検定の結果を示した(*, p<0.05)。 *Gstp2*, *Glutathione s-transferase p2*.

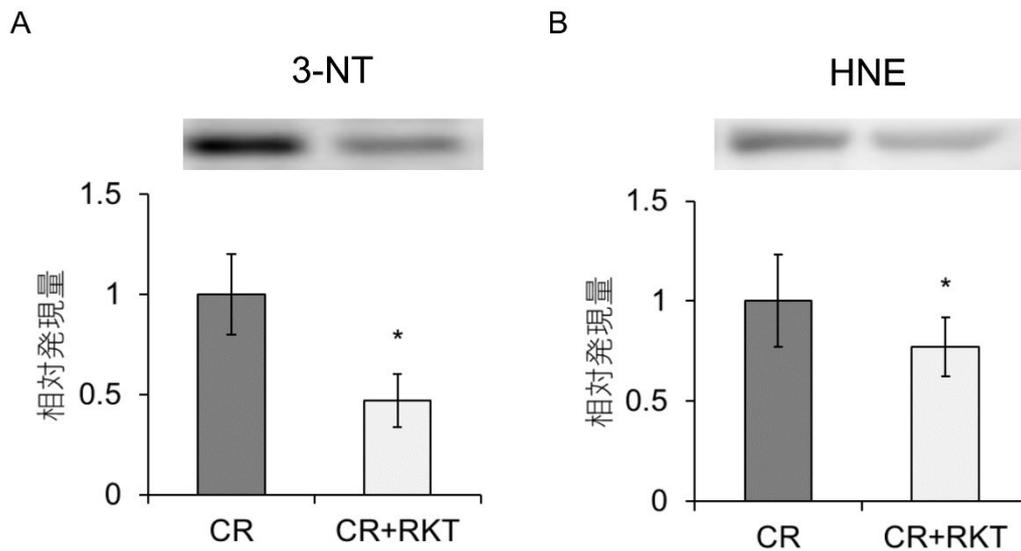


図13 肝臓での酸化ストレスのタンパク質マーカーの発現 (実験3)

(A, B) DXR 投与後の肝臓での 3-NT (A)及び HNE (B)の発現 (n=5)。CR 群の発現量を 1 にし、t 検定の結果を示した(*, $p < 0.05$)。ウェスタンブロットの写真をグラフの上を示した。

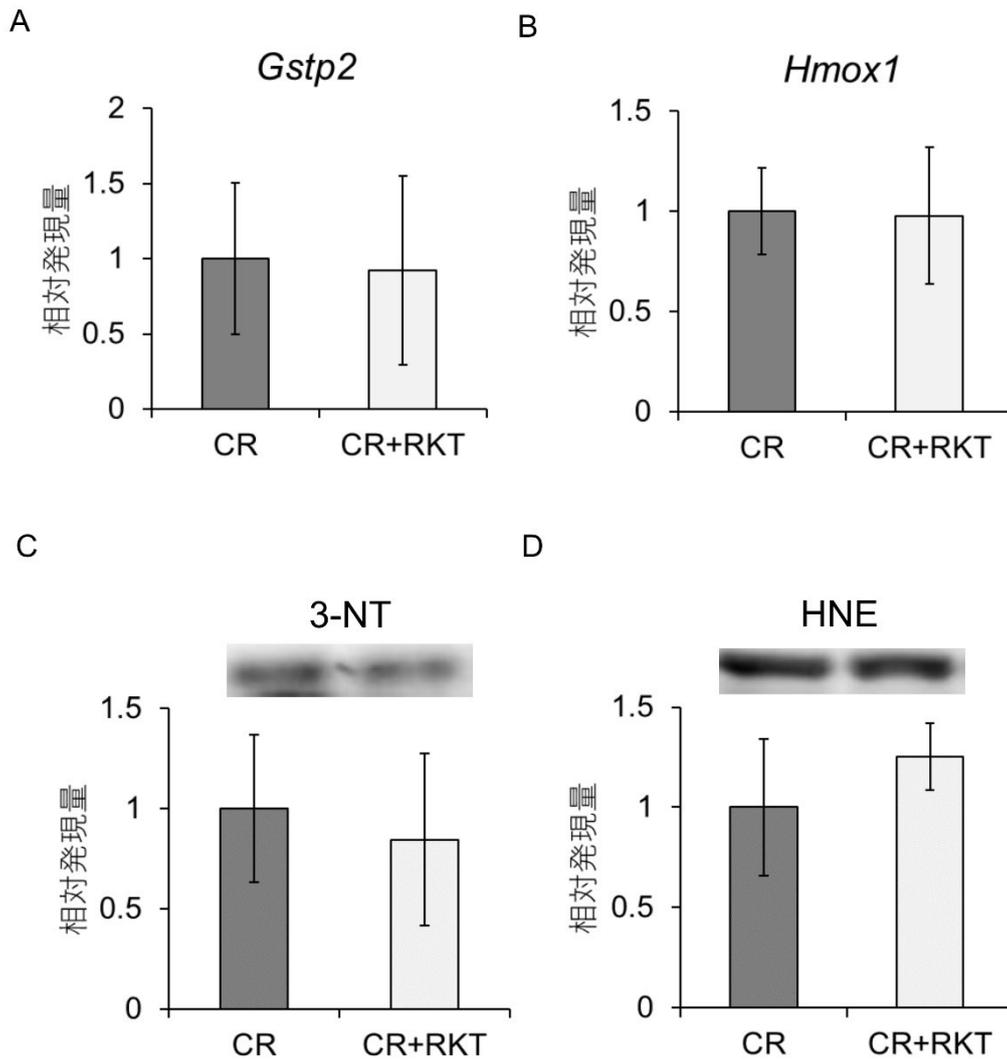


図1 4 心臓での遺伝子及び酸化ストレスのタンパク質マーカーの発現変化 (実験 3)
 (A,B) DXR 投与後の心臓での *Gstp2*, *Hmox1* の発現 (n=5)。CR 群の発現量を 1 にし、t 検定を行った結果、有意差が認められなかった。(C, D) DXR 投与後の心臓での 3-NT 及び HNE の発現 (n=5)。CR 群の発現量を 1 にし、t 検定を行った結果、有意差が認められなかった。ウェスタンブロットの写真をグラフの上を示した。

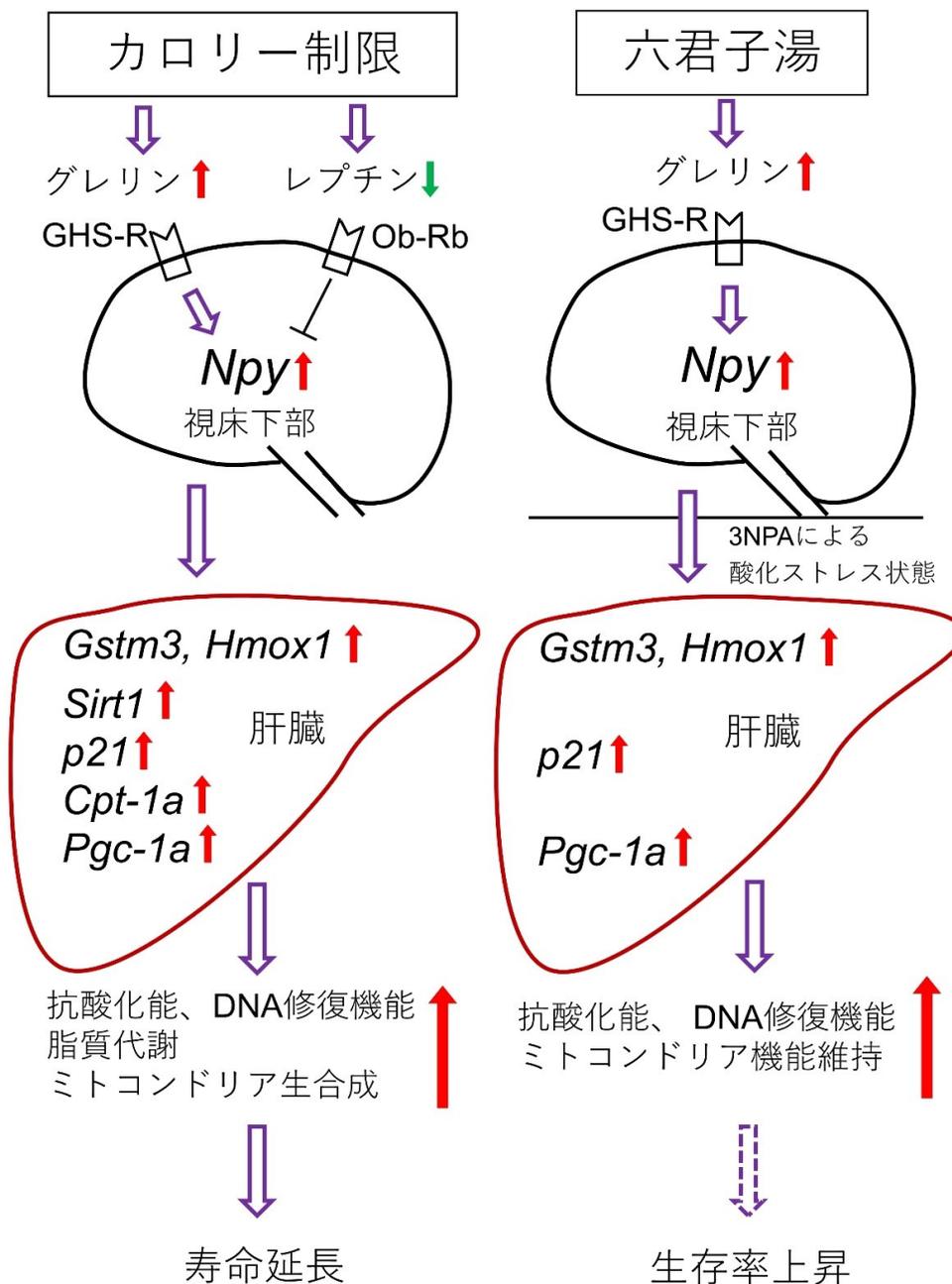


図 1 5 六君子湯の CR 模倣効果に関する仮説

CRによって変化するシグナル伝達及び六君子湯の投与によって変化するシグナル伝達に関する仮説を図にまとめた。六君子湯はNpyの発現を亢進させることを介し、酸化ストレスがかけられている状態でGstm3, Hmox1, p21及びPgc-1aの発現を上昇させ、CRの抗酸化ストレス作用を模倣できることが示唆された。GHS-R: growth hormone secretagogues receptor (グレリン受容体)、Ob-Rb (レプチン受容体)。

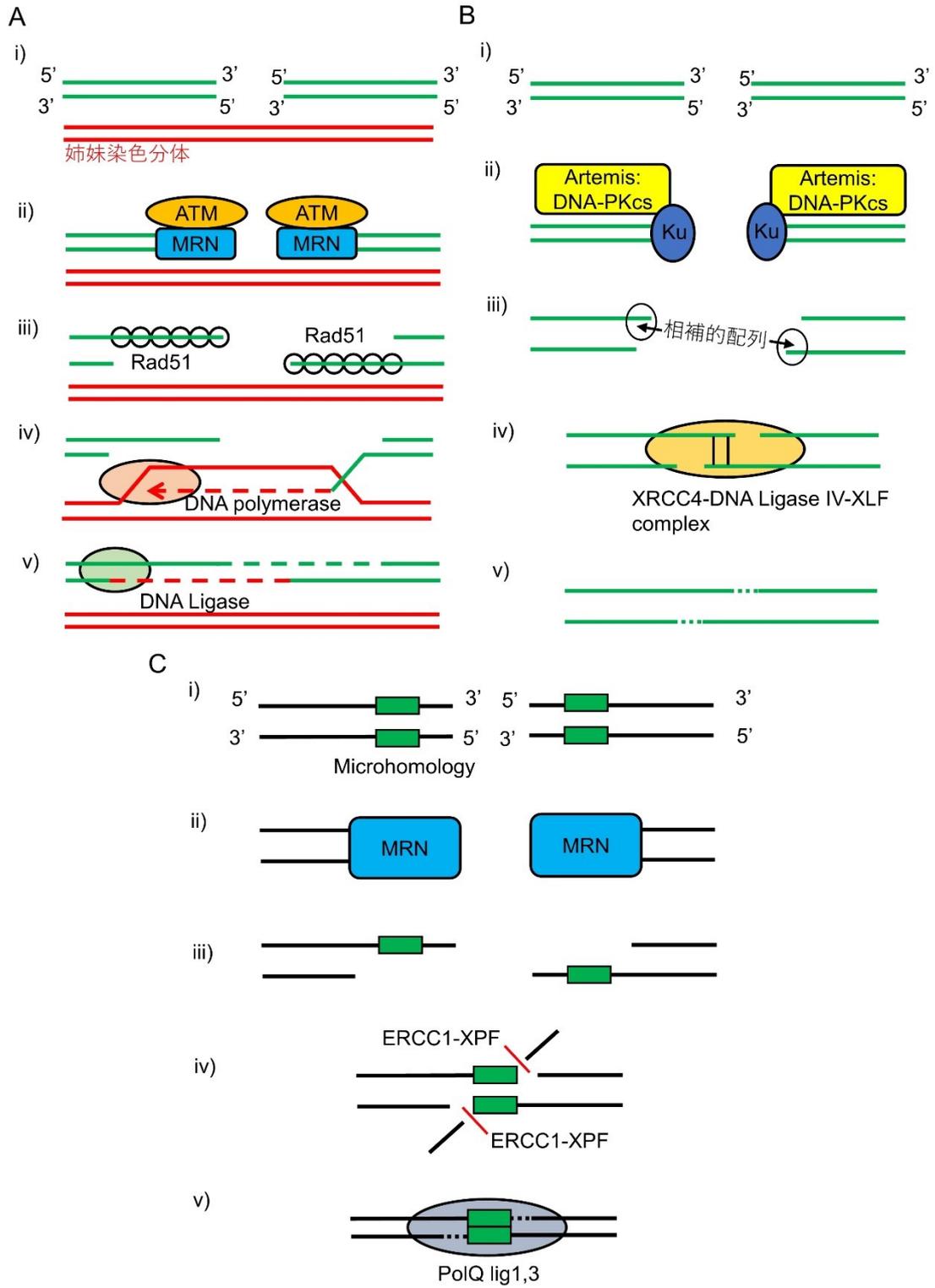


図 1 6 DNA 修復の機序

(A) Homologous recombination (HR) による DNA 修復の Synthesis-dependent strand annealing (SDSA)モデル。HR による修復は DNA 複製によって生成された姉妹染色分体が必要である。Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) タンパクが DNA 二重鎖の切断を感知し、切断末端において Mre11-Rad50-NBS1 complex (MRN) 複合体の切除によって一本鎖が露出される。Rad51 タンパクが露出された一本鎖と結合し、姉妹染色分体で相同配列を検索し、姉妹染色分体を鋳型として DNA ポリメラーゼの働きによって複製を開始する。DNA リガーゼによって元の鎖と結合し、DNA が元の配列通りに修復される。(B) Non-homologous end joining (NHEJ) による修復モデル。Ku 複合体が DNA 切断末端と結合し、Artemis : DNA-PKcs 複合体をリクルートする。Artemis : DNA-PKcs 複合体によって切断末端が編集され、結合可能な相補的配列ができる。XRCC4-DNA Ligase IV-XLF 複合体によって DNA の結合や合成が行われ、DNA が修復されるが、欠損を伴う可能性がある。(C) Microhomology-mediated end joining (MMEJ) による修復モデル。切断末端の両側に短い相同配列（マイクロホモロジー、Microhomology, MH）が存在する場合、MMEJ による修復が行われることがある。MRN 複合体によって一本鎖が切除され、マイクロホモロジーが露出される。マイクロホモロジーの検索が行われ、余分な塩基が ERCC1-XPF 複合体によって切除され、DNA polymerase theta (PolQ) 及び Lig1, 3 の活性でマイクロホモロジーのアニーリングと足りない部分の DNA 合成が行われる。素早い DNA 修復が可能であるが、塩基配列の欠損を伴う可能性が極めて高い。

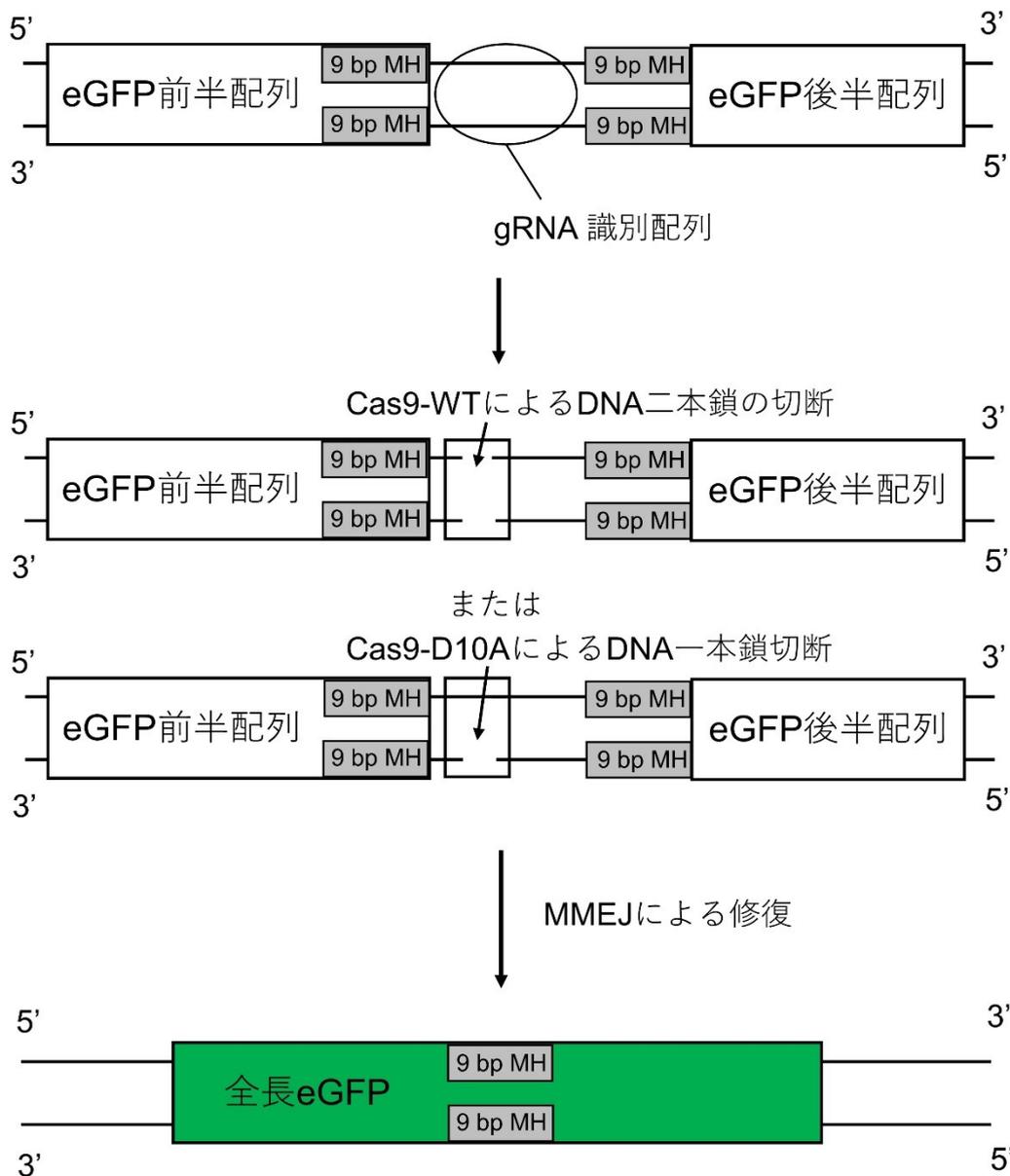


図 1 7 MMEJ 修復経路のレポーターの構造

Enhanced green fluorescent protein (eGFP) の配列を前半と後半に分け、前半の最後の 9 bp を後半の前に挿入し、配列の相同性を持つマイクロホモロジーを作成した。そして、MH の間に Cas9 システムが識別可能な guide RNA (gRNA) 配列を挿入し、Cas9-WT または Cas9-D10A によって DNA の二本鎖の切断または一本鎖の切断が誘導可能になった。切断された DNA が MMEJ 修復経路によって修復された場合、MH がアニーリングされ、全長型の eGFP が発現される。

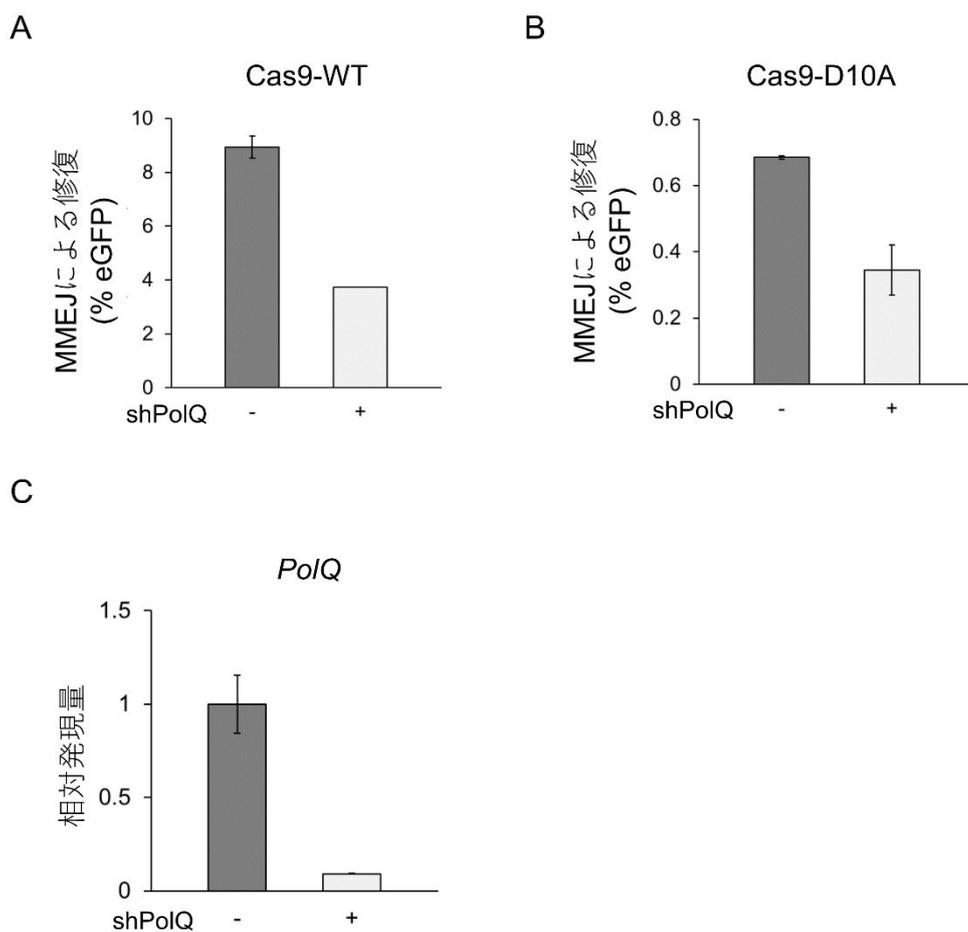


図 18 DNA の二本鎖または一本鎖の切断の MMEJ による修復

(A, B) MMEJ 修復レポーター細胞系を用い、eGFP を発現する細胞の割合を Fluorescence-activated cell sorting (FACS) 法で定量した結果。PolQ をノックダウンし、Cas9-WT (A) または Cas9-D10A (B) で DNA の二本鎖または一本鎖の切断を誘導した。ノックダウンのコントロールとして、標的配列を入れていない空ベクターを使用した。(C) PolQ の遺伝子発現量。ノックダウンされていない細胞の PolQ の発現量を 1 にした。各実験は 3 回以上行われた。

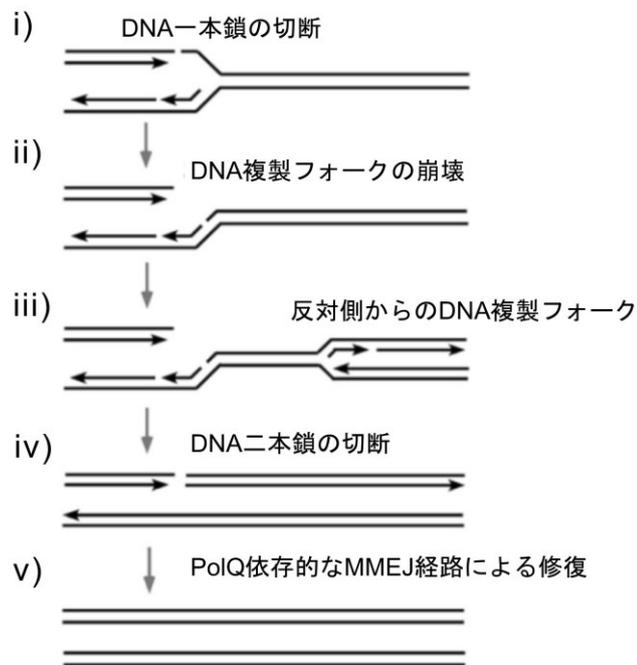


図 1 9 MMEJ による DNA の一本鎖の切断の修復モデル

i) DNA 複製フォークが DNA の一本鎖の切断部位に進行する。ii) 一本鎖の切断で DNA 複製フォークが崩壊する。iii) 断裂した二本鎖 DNA と一本鎖の切断を持つ二本鎖 DNA が形成され、反対側からの DNA 複製フォークが進行してくる。iv) 一本鎖の切断で DNA 複製フォークが崩壊し、再び断裂した二本鎖 DNA が形成され、二本鎖の切断を持つ DNA が形成される。v) DNA の二本鎖の切断が *PolQ* 依存的な MMEJ 経路によって修復される。

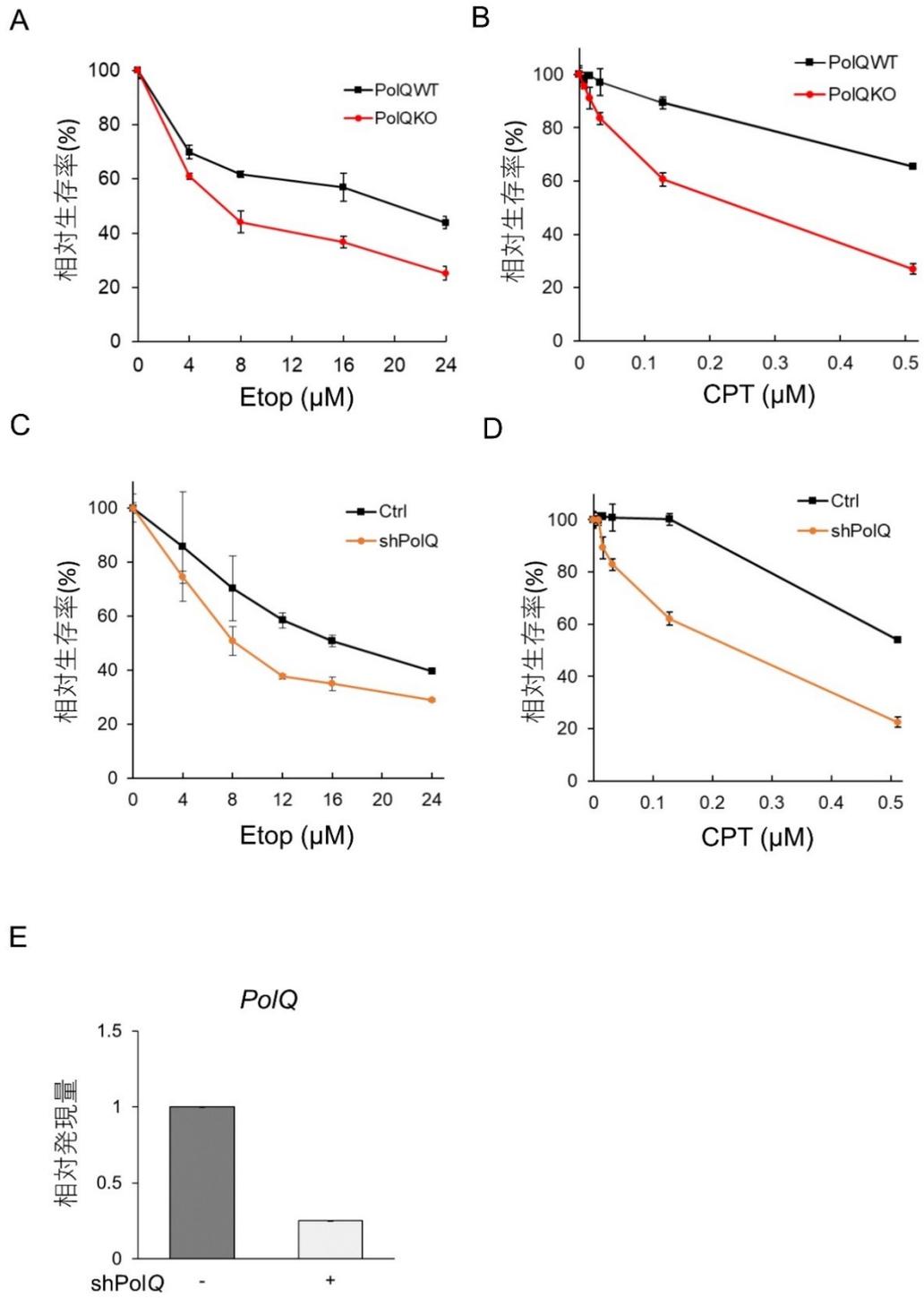


図 2 0 Etoposide (Etop) または Camptothecin (CPT)で処理された細胞の生存率

(A,B) 異なる濃度の Etop (A) または CPT (B) で処理された *PolQ* WT 及び *PolQ* KO U2OS 細胞の相対生存率。□で *PolQ* WT、○で *PolQ* KO 細胞を表した。投与濃度が 0 μ M の細胞の生存率を 100 %にした。(C,D) 異なる濃度の Etop (C) 及び CPT (D) で処理されたコントロールの細胞及び *PolQ* がノックダウンされた U2OS 細胞の相対生存率。□でコントロール細胞 (Ctrl)、○で *PolQ* がノックダウンされた細胞 (sh*PolQ*) を表した。Ctrl 細胞に標的配列を入れていない空ベクターを発現させた。投与濃度が 0 μ M の細胞の生存率を 100%にした。(E) *PolQ* の遺伝子発現量。ノックダウンされていない細胞の *PolQ* の発現量を 1 にした。各実験は 3 回以上行われた。

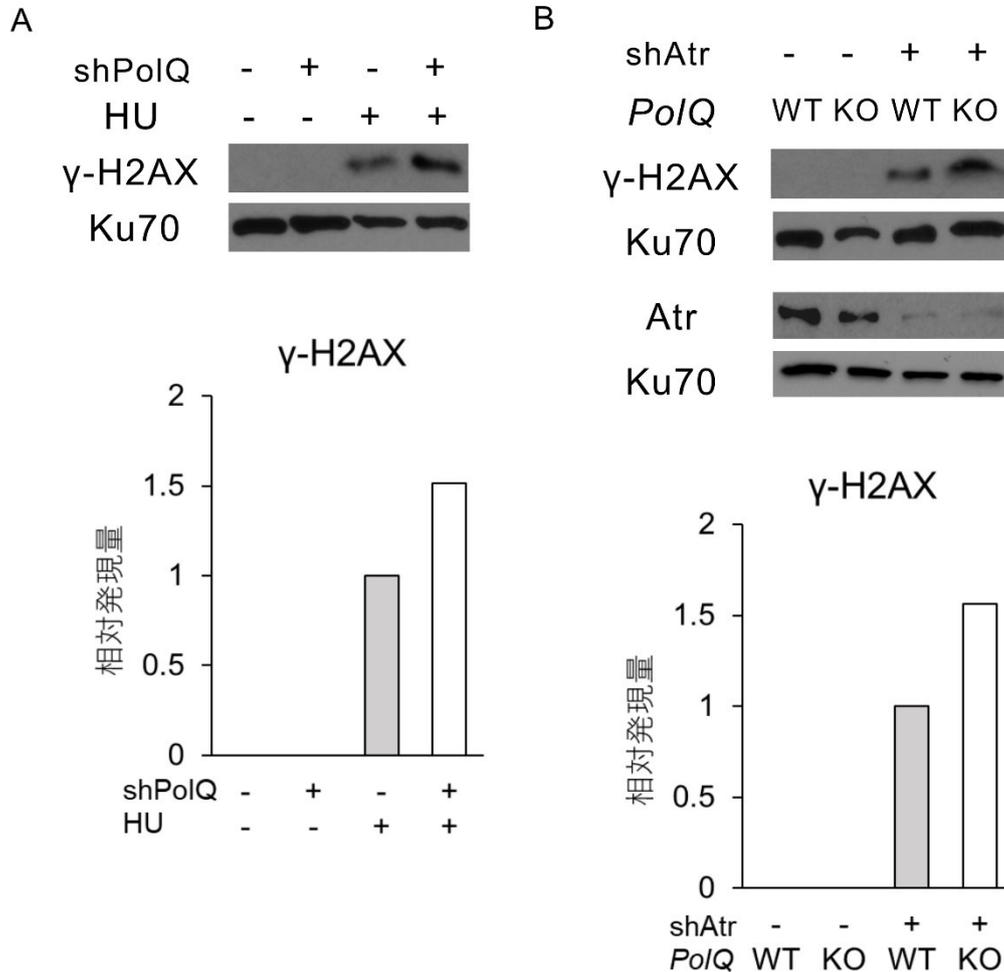


図 2 1 Hydroxyurea (HU) 処理または *Ataxia telangiectasia and rad3 related (Atr)* ノックダウン処理された細胞の DNA 損傷マーカーの検出

(A) HU で処理されたまたは処理されていないコントロールの細胞及び *PolQ* がノックダウンされた U2OS 細胞での Gamma H2A histone family member X (γ -H2AX) の発現。HU で処理されたコントロールの細胞での発現量を 1 にした。(B) *Atr* がノックダウンされたまたはノックダウンされていない *PolQ* WT 及び *PolQ* KO U2OS 細胞での γ -H2AX の発現。*Atr* がノックダウンされた *PolQ* WT 細胞での発現量を 1 にした。ウェスタンブロットの写真をグラフの上を示した。

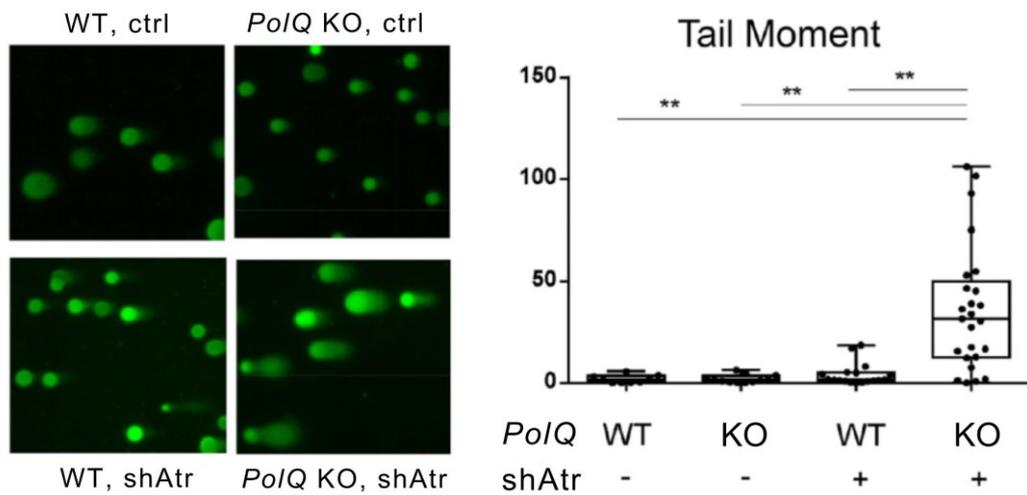


図2 2 *Atr* ノックダウン処理された細胞の中性コメットアッセイ

Atr がノックダウンされたまたはノックダウンされていない *PolQ* WT 及び *PolQ* KO U2OS 細胞の中性コメットアッセイの結果を示した。蛍光写真を用い、蛍光スポットの頭部と尾部の長さの比率 (Tail moment) を定量し、箱ひげ図で表し、分散分析の結果を*で示した (n=9-25, **, p<0.01)。

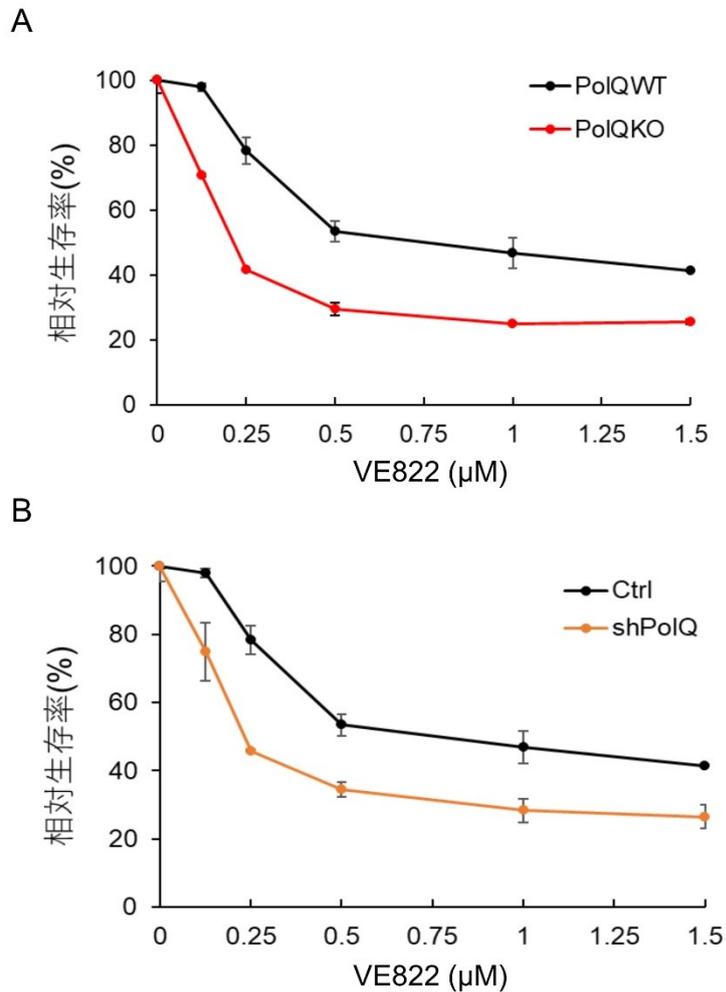


図 2 3 VE822 で処理された細胞の生存率

(A) 異なる濃度の VE822 で処理された *PolQ* WT 及び *PolQ* KO U2OS 細胞の相対生存率。□で *PolQ* WT、○で *PolQ* KO 細胞を表した。投与濃度が 0 μM の細胞の生存率を 100%にした。(B) 異なる濃度の VE822 で処理された²³コントロールの細胞及び *PolQ* がノックダウンされた U2OS 細胞の相対生存率。□でコントロール細胞 (Ctrl)、○で *PolQ* がノックダウンされた細胞 (sh*PolQ*) を表した。Ctrl 細胞に標的配列を入れていない空ベクターを発現させた。投与濃度が 0 μM の細胞の生存率を 100%にした。各実験は 3 回以上行われた。

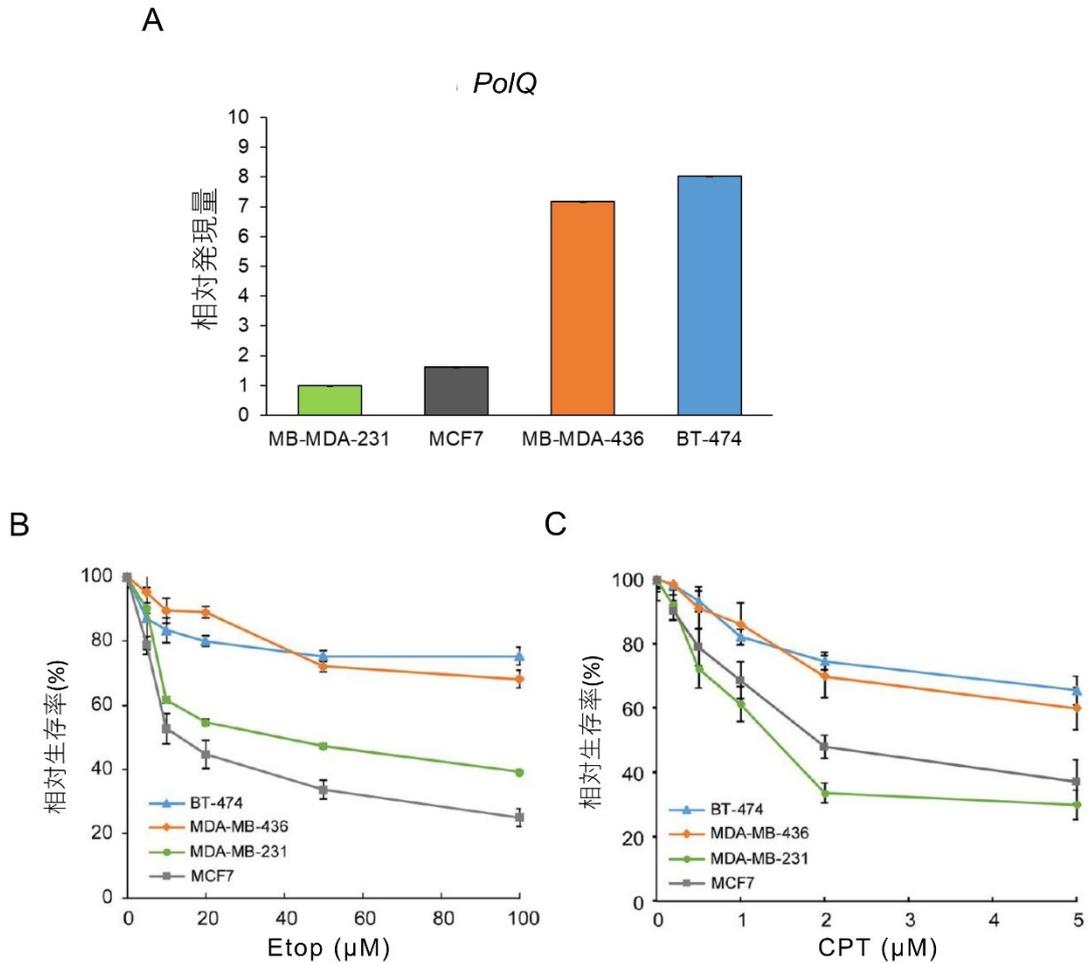


図 2 4 乳がん細胞での *PolQ* の発現及び Etop または CPT で処理された細胞の生存率
 (A) MB-MDA-231, MCF7, MB-MDA-436 及び BT-474 細胞での *PolQ* の遺伝子発現量。MB-MDA-231 細胞での発現量を 1 にした。(B,C) 異なる濃度の Etop (B) または CPT (C) で処理された BT-474, MDA-MB-436, MDA-MB-231, MCF7 細胞の相対生存率。異なる色及び△で BT-474 細胞、◇で MDA-MB-436 細胞、○で MDA-MB-231 細胞、□で MCF7 細胞を表した。投与濃度が 0 μM の細胞の生存率を 100 % にした。各実験は 3 回以上行われた。

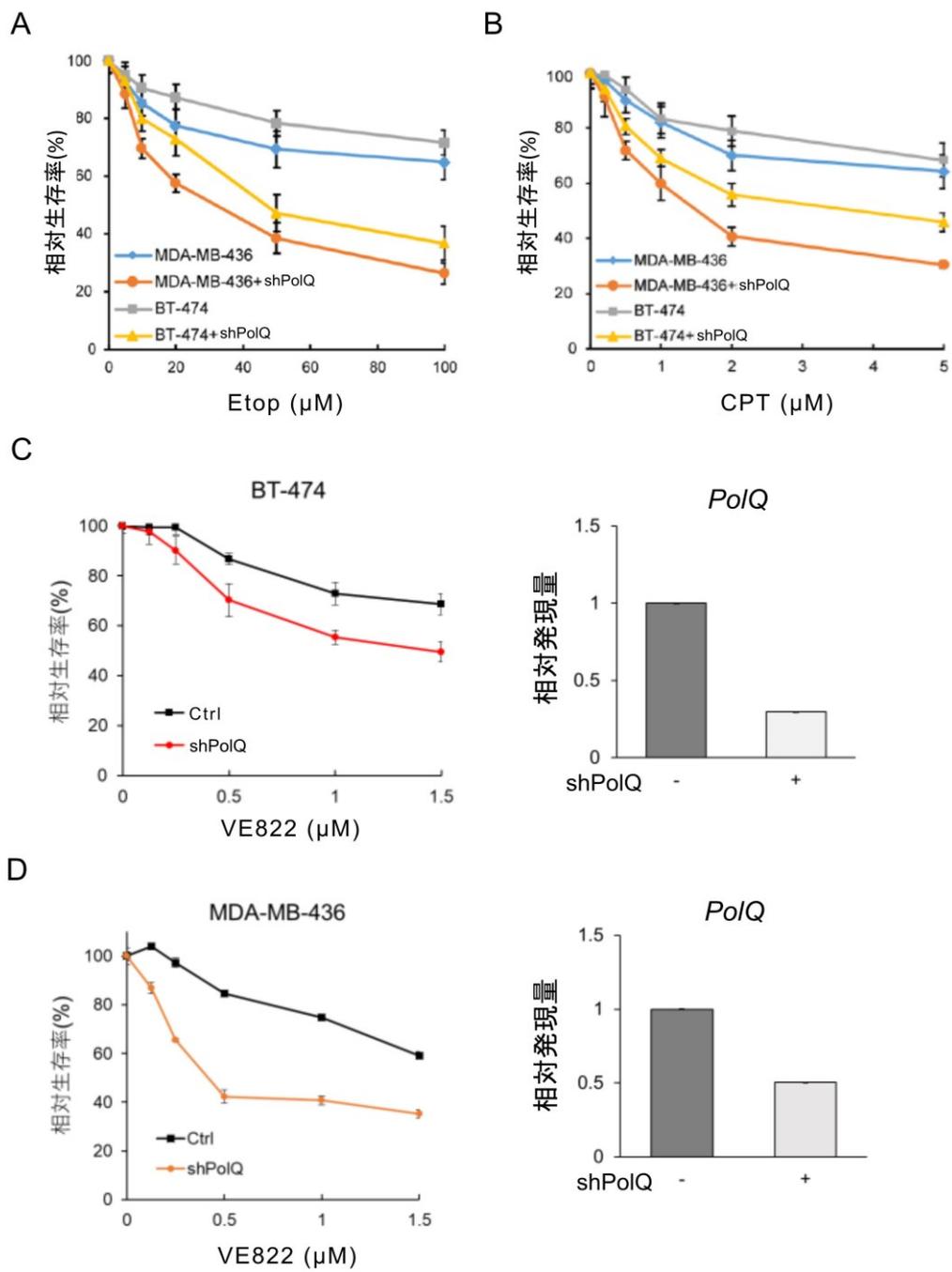
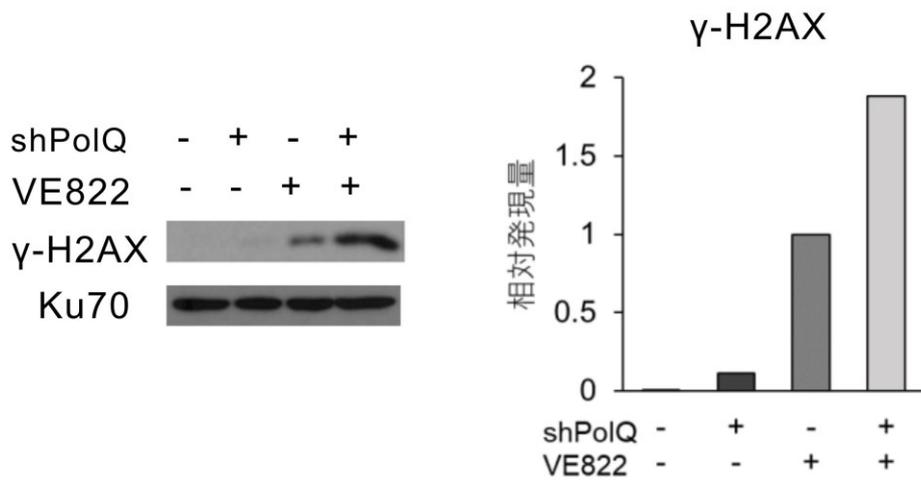


図 2 5 Etop, CPT または VE822 で処理された BT-474 及び MDA-MB-436 細胞の生存率 (A,B) 異なる濃度の Etop (A) または CPT (B) で処理された BT-474, MDA-MB-436 細胞及び、*PolQ* がノックダウンされた BT-474, MDA-MB-436 細胞の相対生存率。異なる色及び◇でコントロールの MDA-MB-436 細胞、○で *PolQ* がノックダウンされた MDA-MB-436 細胞、□でコントロールの BT-474 細胞、△で *PolQ* がノックダウンされた BT-474 細胞を表した。(C) 異なる濃度の VE822 で処理された BT-474 細胞及び *PolQ* がノックダウンされた BT-474 細胞の相対生存率。□でコントロール細胞 (Ctrl)、○で *PolQ* がノックダウンされた細胞 (sh*PolQ*)を表した。(D) 異なる濃度の VE822 で処理された MDA-MB-436 細胞及び *PolQ* がノックダウンされた MDA-MB-436 細胞の相対生存率。□でコントロール細胞 (Ctrl)、○で *PolQ* がノックダウンされた細胞 (sh*PolQ*)を表した。各実験は投与濃度が 0 μ M の細胞の生存率を 100%にし、コントロール細胞に標的配列を入れていない空ベクターを発現させた。各実験は 3 回以上行われた。

A



B

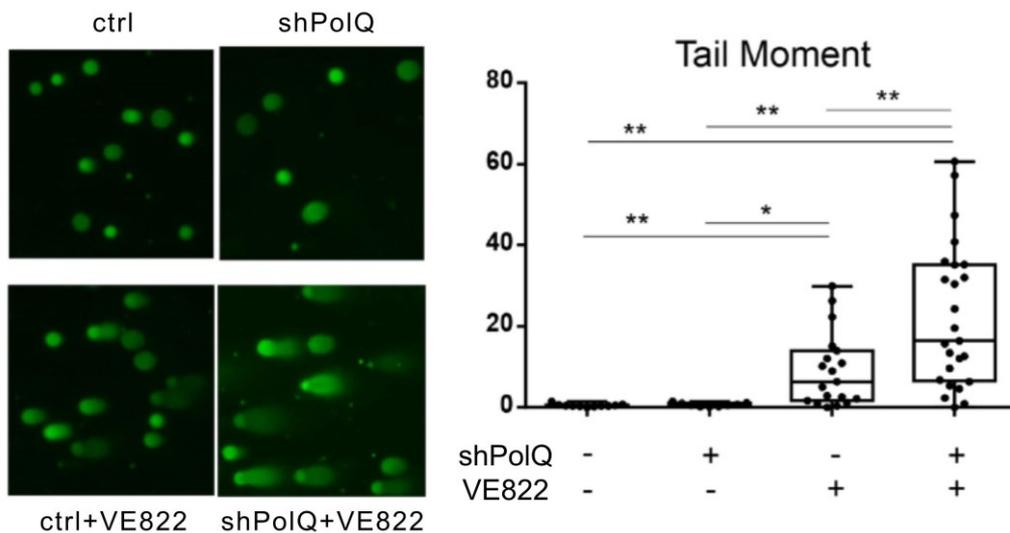


図 2 6 VE822 で処理された細胞の DNA 損傷マーカーの検出及び中性コメットアッセイ (A) VE822 で処理されたまたは処理されていないコントロールの細胞及び *PolQ* がノックダウンされた BT-474 細胞での γ -H2AX の発現。VE822 で処理されたコントロールの細胞での発現量を 1 にした。(B) VE822 で処理されたまたは処理されていないコントロールの細胞及び *PolQ* がノックダウンされた BT-474 細胞の中性コメットアッセイの結果を示した。蛍光写真を用い、蛍光スポットの頭部と尾部の長さの比率 (Tail moment) を定量し、箱ひげ図で表し、分散分析の結果を*で示した (n=9-25, *, p<0.05, **, p<0.01)。