

博士学位審査 論文審査報告書（課程内）

大学名 早稲田大学
 研究科名 大学院人間科学研究科
 申請者氏名 王 梓
 学位の種類 博士（人間科学）
 論文題目（和文） 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
 論文題目（英文） Studies of antioxidative effects of Rikkunshito and DNA polymerase theta as a new cancer therapy target

公開審査会

実施年月日・時間 2020年 6月 19日 ・ 14:00-15:30

実施場所 早稲田大学 所沢キャンパス 100号館 第一会議室

論文審査委員

	所属・職位	氏名	学位（分野）	学位取得大学	専門分野
主査	早稲田大学・教授	千葉 卓哉	博士（医学）	京都大学	実験病理学
副査	早稲田大学・教授	永島 計	博士（医学）	京都府立医科大学	環境生理学
副査	早稲田大学・教授	原 太一	博士（医学）	九州大学	食品科学、 分子細胞生物学

論文審査委員会は、王梓氏による博士学位論文「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」について公開審査会を開催し、以下の結論を得たので報告する。

公開審査会では、まず申請者から博士学位論文について30分間の発表があった。

1 公開審査会における質疑応答の概要

申請者の発表に引き続き、以下の質疑応答があった。

1.1 質問：カロリー制限の制限量を定める基準となる摂取カロリーはどのように決定されたか？比較対象となる自由摂食群は動物にとっては、疾病リスクの高い環境ではないか？

応答：自由摂食群の摂食量を平均し、カロリー制限群の摂食量を決定した。確かにどちらの群も摂食量が結果に影響を与える可能性はある。

1.2 質問：カロリー制限時の応答において、NPYは血中濃度の上昇が重要であるのか、あるいは視床下部での発現上昇が重要であるのか？また、六君子湯投与によってNPY発現にフィードバック制御がかかる可能性はないか？

応答：今回の研究ではどちらのNPY発現が重要かは解析していない。14週間投与後においてもNPYの発現が亢進されていたことから、フィードバック制御の可能性は低いと考える。

- 1.3 質問：ストレスマーカーがどの臓器で早期に発現してくるかを調べた研究はあるか？

応答：様々なストレスマーカーが知られているが、体系的、網羅的に調べられた研究はほとんどないと思われる。

- 1.4 質問：NPYの上昇率はカロリー制限時と比較して、今回の実験ではどの程度の違いがあるのか。六君子湯投与による上昇率が低いためにカロリー制限と同様な寿命延長効果が見られなかった可能性はないか？

応答：六君子湯の投与でも、カロリー制限と同程度のNPY発現亢進が見られたと考えている。

- 1.5 質問：カロリー制限によって寿命延長効果が見られた実験3について、酸化ストレス以外の原因が死因となっているために、六君子湯の効果が見られなかった可能性はないか？

応答：投与した薬剤による心毒性が原因となっている可能性が考えられる。

- 1.6 質問：酸化ストレスの誘導が強すぎたために六君子湯の効果が見られなかったとあるが、実験1の自然老化の過程においても効果が見られなかった点をどう説明するのか。使用したマウスの系統が関連しているのではないか？

応答：実験1と実験2, 3では使用したマウスの系統が異なるため、結果も異なっていた可能性はある。

- 1.7 質問：NPYKOマウスの六君子湯投与群で、120週齢程度までは寿命が延びているようにも見受けられるがどのように解釈するのか？

応答：用いた統計手法では有意差が見られなかったことから、あまり注目はしていなかったが、系統による酸化ストレス耐性の違いとあわせて今後の検討課題であると考えている。

- 1.8 質問：カロリー制限の寿命延長効果において、どの臓器、組織での応答が重要であると考えているか？

応答：まだ定説はないが、肝臓では抗酸化能力の増強、および脂肪代謝亢進が見られるなど、カロリー制限の作用との関わりが深い。また、腫瘍を形成しやすい臓器が重要である可能性もある。

- 1.9 質問：POLQの機能阻害が正常細胞の損傷修復に影響する可能性はないか？増殖速度の特に速いがん細胞に効果的ということか？

応答：POLQが関与するのは代替的な修復経路と考えられており、正常細胞への影響は限定的と考える。相同組み換え修復機能が異常ながん細胞では、POLQの抑制により増殖阻害作用が期待できる。

- 1.10 質問：POLQが直接DNA修復に関わるデータは示されなかったが、そのような報告は既にあるのか。単に二本鎖DNAの保護に働いているのではないか？

応答：確かにPOLQが二本鎖DNAを切断から保護している可能性もあるが、これまで

にPOLQは主に修復そのものに関連していると報告されている。

- 1.11 質問：POLQが老化と関連して発現が変化するなど、老化におけるPOLQの役割に関するデータはあるか？

応答：まだそのような研究は行われていない。今後の検討課題である。

2 公開審査会で出された修正要求の概要

- 2.1 博士学位論文に対して、以下の修正要求が出された。

2.1.1 研究1と研究2の関連性をより明確にする必要がある。

2.1.2 研究1へのコントリビューションが明確になるようにすること。

2.1.3 略語に関する一覧を記載すること。

2.1.4 参考文献リストの順序を正しく並び替えること。

- 2.2 修正要求の各項目について、本論文最終版では以下の通りの修正が施され、修正要求を満たしていると判断された。

2.2.1 指摘に従い、研究1と研究2の関連性がより明確に記述された。

2.2.2 指摘に従い、コントリビューションについて記述された。

2.2.3 指摘に従い、略語一覧が記述された。

2.2.4 指摘に従い、参考文献リストが修正された。

3 本論文の評価

- 3.1 本論文の研究目的の明確性・妥当性：本研究では、老化及び老化疾患としてのがんに関する実験病理学的、分子生物学的研究を実施し、人々の健康寿命の延伸とQOL向上を目指した研究が行われた。老化を遅延させる介入方法として、漢方薬である六君子湯に着目し、そのカロリー制限模倣物としての評価が多角的に行われ、さらにがん治療標的として忠実度の低いDNA修復酵素であるPOLQの機能阻害に着目した研究が行われた点は、研究の目的として妥当であり、明確であると考えられる。

- 3.2 本論文の方法論（研究計画・分析方法等）の明確性・妥当性：本論文は、六君子湯の抗老化作用に関して、実験動物を用いた寿命解析と、抗酸化作用に関する解析がなされた。さらに難治性がん細胞株を用いて、DNA修復酵素であるPOLQのCRISPR/Cas9システムを用いた機能阻害が、抗がん剤感受性を増強させるか否かについて解析された。これらの研究手法は最新の研究成果に基づく技術等が応用されており、その研究計画及び分析手法は妥当であると考えられる。

なお、本論文で実施した実験の手続きについては、早稲田大学「動物実験審査委員会」の承認を取得し（2017-A091, 2018-A059, 2019-A112）、適正な動物実験の実施、および生物実験安全管理規程、生物実験安全管理規程（動物実験）施行細則に定められた適正な動物実験施設の管理がなされた上で実施したとしており、倫理的な配慮が十分になされていると評価した。

- 3.3 本論文の成果の明確性・妥当性：本論文では、六君子湯をマウスの餌に混ぜて投与することにより、細胞レベルでは抗酸化能及びミトコンドリア機能を活性化し、タンパク質やDNAの酸化傷害を抑制するが、個体寿命の延長には寄与しないこと

が明らかにされた。また POLQ の機能阻害は、抗がん剤抵抗性の DNA 修復を抑制し、二本鎖 DNA の切断を増加させることで、がん細胞の増殖を抑制することが明らかにされた。これらの成果は明確であり、研究内容は妥当であったと考える。

3.4 本論文の独創性・新規性：本論文は、以下の点において独創的である。

3.4.1 六君子湯投与による細胞レベルでの抗酸化効果には組織特異性が示唆され、先行研究との比較により、用量依存性及び系統特異性など、様々な要因がその作用に影響する可能性を示したことには新規性がある。また、DNA 複製ストレスによる一本鎖 DNA 切断が、複製フォークの崩壊と二本鎖 DNA の切断を誘導し、その修復に POLQ が関与することを示し、複製ストレスを与える抗がん剤投与と POLQ 阻害を同時に行うことで、がんの新たな治療法を提案したことは独創的であると考えられる。

3.5 本論文の学術的意義・社会的意義：本論文は以下の点において学術的・社会的意義がある。

3.5.1 六君子湯は臨床現場において食欲不振の治療薬としてすでに用いられており、その生体作用について新たな示唆を与えた。難治性がんに対する新たな治療戦略を示し、潜在的に既存の薬剤の利用価値を高めた。これらのことより、本研究の学術的意義は大きく、その社会的意義も大きい。

3.6 本論文の人間科学に対する貢献：本論文は、以下の点において、人間科学に対する貢献がある。

3.6.1 六君子湯投与が細胞レベルでの抗酸化作用を示した点、及びがん治療の新標的として POLQ の重要性を示した点から、人々の健康寿命の延伸と QOL 向上に資する基礎研究であり、人間科学に対する貢献がある。

3.7 不適切な引用の有無について：本論文について類似度を確認したうえで精査したところ、不適切な引用はないと判断した。

4 学位論文申請要件を満たす業績（予備審査で認められた業績）および本論文の内容（一部を含む）が掲載された主な学術論文・業績は、以下のとおりである。

- Wang Z, Komatsu T, Ohata Y, Watanabe Y, Yuan Y, Yoshii Y, Park S, Mori R, Satou M, Kondo Y, Shimokawa I, Chiba T (2020). Effects of rikkunshito supplementation on resistance to oxidative stress and lifespan in mice. *Geriatr Gerontol Int*, 20(3):238-247.
- Wang Z, Song Y, Li S, Kurian S, Xiang R, Chiba T, Wu X (2019). DNA Polymerase theta (POLQ) is important for repair of DNA double-strand breaks caused by fork collapse. *J Biol Chem*, 294(11):3909-3919.

5 結論

以上に鑑みて、申請者は、博士（人間科学）の学位を授与するに十分値するものと認める。

以上