

## 論文審査の結果の要旨

ゲラニルゲラノイン酸 (GGA) はヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞に細胞死を誘導する。近年、GGA によって誘導されるオートファジーの不完全な応答が細胞死に関与している可能性が示され、注目されている。論文提出者は、GGA の細胞死誘導のメカニズムを、より詳細に解明するために、癌抑制遺伝子 p53 および小胞体ストレス応答、オートファジーに着目して研究を行った。

1) HuH-7 細胞において、p53 は変異しているが、p53 の標的遺伝子にはアポトーシスを誘導する PUMA、解糖系を抑制する TIGAR、電子伝達系の複合体IV(COX)の合成に必須な SCO2 がある。そこで、GGA の p53 への影響を検討した。GGA は PUMA、TIGAR、SCO2 のタンパク質レベルでの上昇を引き起こす事を明らかにした。PUMA は mRNA レベルでの上昇も観察されたが、TIGAR および SCO2 においては mRNA レベルでの変化は観察されなかった。一方、p53 のノックダウンを行うと、GGA 誘導性細胞死が緩和されたことから、GGA の誘導する細胞死には p53 が非常に重要な働きをしている事が示唆された。

2) GGA を添加すると、細胞質に蓄積されている変異 p53 が核に移行することを明らかにした。この GGA による p53 の核への移行は GGA によるオートファジーの誘導に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。また、セルフリー実験において HuH-7 細胞の細胞質に蓄積している変異 p53 は、CUL9/PARC や 348,900g、90 分の遠心で分離される細胞小器官などと非常に大きな複合体を形成していることが分かった。それが GGA を添加することで、巨大複合体から GGA の濃度依存的に p53 が解離され、核への移行形態に変化していることを明らかにした。

3) 代謝に関連する TIGAR および SCO2 のタンパク質の上昇を受けて、代謝産物の解析を行ったところ、GGA 添加により時間依存的に細胞内のフルクトース 6 リン酸(F6-P)の上昇、フルクトース 1,6 ニリン酸(F1,6-DP)の減少、NADH の上昇が観察され、解糖系から呼吸へとエネルギー産生経路が変化している可能性が考えられた。癌細胞はエネルギー源を糖質に強く依存しており、酸素分圧の高い条件で培養しても培地に含まれるグルコースを解糖系で利用している(Warburg 効果)が、GGA は、この Warburg 効果を改善していると考えられた。

4) オートファジーを誘導するシグナルの一つとして、小胞体ストレス応答(UPR)を解析した。UPR の3つの経路のうち IRE1 $\alpha$  および PERK 経路は GGA によって早い時期に活性化されたが、ATF6 $\alpha$  経路は変化がなかった。またこの2つの経路の活性化はオレイン酸との共処理において、抑制された。さらに、GGA とオレイン酸の共処理は、GGA 誘導性細胞死を完全に抑制し、LC3  $\beta$ -II の蓄積も抑制したことから、オートファジー誘導性細胞死の上流に脂質誘導性 UPR が存在することが明らかになった。また、これはオレイン酸メチルと共処理した際にも観察されたことから、リン脂質などのオレイン酸の代謝産物ではなく、オレイン酸自身が GGA による UPR 誘導を阻害し、細胞死を抑制していることが明らかになった。一方、IRE1 $\alpha$  エンドヌクレアーゼ抑制剤である 4 $\mu$ 8c を共処理すると、XBP1 のスプライシングは 4 $\mu$ 8c 濃度依存的に抑制されたが、LC3  $\beta$ -II の蓄積は抑制されなかったことから、XBP1 スプライシング自体が GGA の誘導するオートファジー誘導性細胞死の引き金になるのではなく、他の UPR シグナルが重要である可能性も示された。

以上、本論文は、GGA により誘導されるオートファジーの不完全な応答を介した細胞死の誘導メカニズムが、初めのシグナルとして非常に速い時間に UPR を引き起こすこと、小胞体などと細胞質で巨大複合体を形成している変異 p53 を核に移行させること、TIGAR や SCO2 タンパク質を上昇させること、代謝を解糖系から呼吸へと変化させることが関与していることを示した。単に、GGA の癌抑制作用を見出すにとどまらず、その分子メカニズムを解明したことは、GGA の臨床応用の発展におおいに寄与する業績であることを認める。以上より、本研究は博士の学位(栄養学)の授与に値するものと考えられる。