

## 論文審査の結果の要旨

藪田氏は、初めに抗酸化栄養素の代謝に関与しているβカロテン開裂酵素(BCO1)遺伝子多型別に、抗酸化栄養素摂取量と口腔粘膜相対テロメア長(RTL)との関連について解明している。そこでは、βカロテンがレチノールに変換されやすい遺伝子型の人においてカロテン摂取量とRTLに負の相関がみられたことから、レチノイドがRTLに何らかの影響を及ぼしているのではないかと考え、ヒト肝癌由来細胞株を用いて、レチノイン酸のテロメア長に及ぼすメカニズムについても検討している。その結果、癌細胞のテロメラーゼ活性に対して、レチノイドや非環式レチノイドであるゲラニルゲラノイン酸(GGA)がTERRA(telomeric repeat-containing RNA)を介して関与することを解明している。その後、GGAの癌細胞に対する作用機序に着目した。

GGAがヒト肝癌細胞株HuH-7に細胞死を誘導する機序として、小胞体ストレス応答(UPR)、ミトコンドリアの活性酸素産生、オートファジーの不完全な応答が関与することが知られているが、細胞死そのもののメカニズム解明には至っていないため、本研究では、GGAによる肝癌細胞死のメカニズムを、パイロトーシスを主なターゲットとして解析し、以下の結果を得ている。

1) ヒト肝癌細胞株(HuH-7)において、GGAは、カスパーゼ1活性を添加後5時間から8時間にかけて顕著に増加させた。カスパーゼ1の活性に関与するNF-κBの核内への移行及びNLRP3遺伝子発現の増大を確認した。また、GGAはgasdermin D(GSDMD)の細胞膜への移行を促進した。このことから、GGAはヒト肝癌細胞において、NLRP3インフラマソームを介してパイロトーシスを誘導する可能性が強く示唆された。

2) NF-κBは、膜表面のレセプターからのシグナルによって活性化されることが知られているため、Toll-like receptors (TLRs)に着目した研究を行っている。GGA誘導性細胞死は、TLR4の阻害剤で共処理すると、完全に抑制された。さらに、GGAにより誘導されるUPR、インフラマソームprimingおよびミトコンドリアにおけるROS産生も、TLR4阻害薬共処理により抑制された。これらのことから、GGA誘導性細胞死は、TLR4を介している可能性が示唆された。

3) GGAによるカスパーゼの活性化をさらに詳細に検討している。カスパーゼ1の活性化はいわゆるインフラマソームのcanonical経路であるが、インフラマソームの活性化にはnon-canonical経路も存在する。Non-canonical経路ではカスパーゼ1のparalogであるカスパーゼ4が関与しており、このカスパーゼ4もGSDMDを切断し、GSDMD-Nが細胞膜に移行し、その後NLRP3インフラマソームの活性化が起こることが報告されている。そこで、GGAによるカスパーゼ4の活性化を検討したところ、添加後1時間から5時間目までimmunoblottingによりカスパーゼ4の活性型が検出された。これはGSDMD-Nの検出やGSDMDの細胞膜への移行の時期と一致する。以上のことから、GGA添加により、カスパーゼ4が活性化され、GSDMD-Nの細胞膜への移行、その後、カスパーゼ1が活性化され、パイロトーシスによる細胞死誘導につながる可能性が示唆された。

以上、本論文は、GGAによるヒト肝癌細胞に対する細胞死誘導は、TLR4を介したパイロトーシスによるものであることを初めて明らかにした。GGAはTLR4シグナルを介してインフラマソームのprimingを起こすとともにUPRを誘導し、カスパーゼ4を活性化し、カスパーゼ1を活性化することを見出し、そのことがGGA誘導性細胞死に重要な役割を果た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の臨床応用に大いに貢献する業績であることと考えられる。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する。