

氏名	ウスハヤル ナランドラム USUKHBAYAR, Narandulam
本籍（国籍）	モンゴル国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 849 号
学位授与年月日	令和 5 年 9 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
学位論文題目	3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene のフェロトーシス様細胞死誘導による抗がん作用メカニズムの解析 (Anti-cancer effect of 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene through inducing ferroptosis-like cell death)
学位審査委員	主査 岩手大学教授 木村 賢一 副査 岩手大学准教授 斎藤 靖史 副査 弘前大学准教授 坂元 君年 副査 山形大学准教授 小林 翔 副査 岩手大学客員准教授 上杉 祥太

論文の内容の要旨

3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene (EDBD) は、抗がん剤の探索を目的とした遺伝子変異酵母 WCTR312A (*cdc2-1 rad9Δ*) 株における生育回復性を指標に、山菜のモミジガサ (*Cacalia delphiniifolia*) の葉と花、並びにボウナ (*Cacalia hastata*) の葉から単離された生物活性物質である。EDBD は、39 種がん細胞パネルスクリーニング (JFCR39) の中で、HBC-5 (乳がん) と HT-29 (大腸がん) と HCI-H522 (肺がん) と Lox-IMVI (メラノーマ) の 4 種のがん細胞に対して、特に強い活性を示す。さらに、Lox-IMVI を移植したゼノグラフトマウスモデルにおいて、腫瘍体積増加を抑制した。一方で、EDBD は鉄イオンによってエンドパーオキシサイドが開裂することで、不安定なラジカル中間体 (活性本体) を介して生物活性を示すことが明らかになっている。

細胞レベルでは、HL60 細胞において p38 MAPK の活性化を介して内因性アポトーシス経路の活性化、DR4 を介して外因性アポトーシス経路活性化した。その結果、カスパーゼの活性化、染色体の凝縮、並びに DNA の断片化などのアポトーシスのホールマーク現象を引き起こした。しかしながら、EDBD による細胞死の形態はアポトーシスを誘導するカムプトテシン (Cpt) とは異なる細胞死の形態を示した。その作用を調べた結果、EDBD は脂質過酸化を介してネクローシス様の細胞死を誘導していると考えられた。一方で、鉄イオン依存的で脂質過酸化を伴う現象は、近年提唱されているフェロトーシスの特徴でもある。従って、本研究では EDBD のフェロトーシス様作用メカニズムを解明することを目的とし、第 1 章では HL60 細胞においてフェロトーシス様作用のメカニズム

を解析、第 2 章では乳がん細胞においてフェロトーシス誘導剤で、抗炎症薬として知られているスルファサラジン (SSZ) との相乗効果の検証を行った。

まず、第 1 章では、EDBD の細胞死誘導メカニズムに着目して研究を進めた。その結果、EDBD は鉄イオン依存的に脂質過酸化を誘導すること、EDBD による細胞死を抑制する阻害剤 (DFOM、Fer-1、VE、IM-54) は、EDBD による脂質過酸化を抑制すること、さらに EDBD は過酸化脂質を還元する酵素である GPX4 のタンパク質発現を抑制すること、並びに GPX4 の活性に使用される細胞内 GSH を低下させることなどを新たに発見した。これらの結果から、EDBD は鉄イオン依存的な脂質過酸化を誘導するとともに、GPX4 の活性を抑制することでフェロトーシス様の細胞死を誘導することを明らかにした。

次に、第 2 章では、EDBD の応用性に着目し、難治療がんの乳がんにおいて有望な抗がん剤候補である SSZ のフェロトーシス誘導作用を増幅するかを検証した。その結果、EDBD は乳がん細胞でもフェロトーシス様の細胞死を誘導すること、また、予想したように SSZ のフェロトーシス誘導作用を増幅し相乗効果を示すことを明らかにした。この相乗効果は、HBC-5 と MDA-MB-231 細胞ではフェロトーシス様作用であること、一方で MCF-7 細胞では、鉄イオン非依存的な脂質過酸化を介する細胞死を誘導することが示唆された。尚、EDBD は正常細胞においても細胞毒性を示しているが、SSZ の作用は増幅しないことが確認された。

抗がん治療薬は激しい副作用を伴うことや、がんが不均一性であること、並びに薬剤耐性を獲得することなどから、二つ以上の抗がん剤によるコンビネーション治療が注目されている。その中で、食用植物 (山菜のモミジガサ) の成分である EDBD が、抗がん剤候補である SSZ と相乗効果を見せたことは、抗がん剤としての可能性を呈示する成果である。尚、コンビネーション治療は、薬剤の副作用を和らげるために二つ以上の薬剤を低濃度で用いる治療でもある。従って、EDBD は正常細胞で毒性を示すとしても、使用する濃度設定によっては応用できる可能性がある。実際に、0.75 μ M EDBD と 0.25 mM SSZ は、WI-38 ではわずかな細胞生存率の抑制 (細胞生存率 80% 以上) を示しているが、HBC-5 細胞においては細胞生存率を 29% まで抑制していた。このことから、EDBD はフェロトーシスをターゲットにする抗がん治療薬候補としても期待できることが示唆された。

本研究では、HL60 細胞において EDBD の細胞死誘導作用のメカニズムを解明し、乳がん細胞でも、HL60 と同じくフェロトーシス様作用で抗がん作用を示すことを明らかにした。EDBD は、SSZ の作用を増強し相乗効果を見せることと、フェロトーシスは抗がん治療の有望なターゲットであることから、EDBD の抗がん剤としての可能性が高まった。一方で、EDBD はこれまでには無い独特な作用によりフェロトーシス様作用を誘導することから、細胞死誘導剤として細胞死のメカニズム解明に応用できる可能性も示唆された。本研究成果は、難治療病であるトリプルネガティブ乳がん (TNBC) に対する抗がん剤の開発研究、及び抗がん剤の開発を目的とした細胞死の研究に貢献できることが期待できる。

論文審査の結果の要旨

ビスボラン型セスキテルペンエンドパーオキサイド化合物である 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene (EDBD) は、抗がん剤の探索を目的とした遺伝子変異酵母 WCTR312A (*cdc2-1 rad9Δ*) 株における生育回復性を指標に、山菜のモミジガサ (*Cacalia delphiniifolia*) の葉と花、並びにボウナ (*Cacalia hastata*) の葉から研究室で単離した。EDBD は、鉄イオン依存的に脂質過酸化を誘導すること、並びに、EDBD による細胞死を抑制する阻害剤 (DFOM、Fer-1、VE、IM-54) は、EDBD による脂質過酸化を抑制することを、C11-BODIPY^{581/591} で染色後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。さらに EDBD は、過酸化脂質を還元する酵素である GPX4 のタンパク質発現を抑制することをウェスタンブロッティング法で、また、GPX4 の活性に使用される細胞内のグルタチオン (GSH) 量を低下させることを新たに発見した。これらの結果から、EDBD は鉄イオン依存的な脂質過酸化を誘導するとともに、GPX4 の活性を抑制することで、フェルトーシス様の細胞死を誘導することを明らかにした。

次に EDBD の応用に着目し、難治療がんの乳がんにおいて有望な抗がん剤候補で、System x_c^- を阻害してフェルトーシスを誘導するスルフォサラジン (sulfasalazine: SSZ) の作用を増幅するか否かを検証した。その結果、EDBD は乳がん細胞でもフェルトーシス様の細胞死を誘導すること、また、予想したように SSZ のフェルトーシス誘導作用を増幅し、相乗効果を示すことを明らかにした。この相乗効果は、HBC-5 と MDA-MB-231 細胞ではフェルトーシス様作用であること、一方で MCF-7 細胞では、鉄イオン非依存的な脂質過酸化を介する細胞死を誘導することが示唆された。尚、EDBD は正常細胞においても細胞毒性を示しているが、SSZ の作用は増幅しないことが確認された。

本研究では、HL60 細胞において EDBD の細胞死誘導作用のメカニズムを解明し、乳がん細胞でも、HL60 細胞と同じくフェルトーシス様作用で抗がん作用を示すことを明らかにした。また、EDBD は SSZ の作用を増強し相乗効果を示すことから、EDBD の抗がん剤としての利用の可能性が高まった。一方で、EDBD はこれまでには無い独特な作用によりフェルトーシス様作用を誘導することから、細胞死誘導剤として細胞死のメカニズム解明に応用できる可能性も示唆された。本研究成果は、難治療病であるトリプルネガティブ乳がん (TNBC) に対する抗がん剤の開発研究、及び抗がん剤の開発を目的とした細胞死の研究に貢献できることが期待できる。

よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士 (農学) の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1) Usukhbayar N, Takano Y, Uesugi S, Muroi M, Osada H, Kimura K (2023)

3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene induces ferroptosis-like cell death through lipid peroxidation. *Free Radical Research*, **57**, 208-222.

2) Usukhbayar N, Uesugi S, Kimura K (2023)

3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene (EDBD) and sulfasalazine synergistically induce ferroptosis in breast cancer cell lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press.