

京都大学	博士 (医科学)	氏名	裴庭胤
論文題目	Reversible Regulation of Cell Cycle-Related Genes by Epigallocatechin Gallate for Hibernation of Neonatal Human Tarsal Fibroblasts (新生児足趾皮膚線維芽細胞に対するエピガロカテキンガレートによる細胞周期関連遺伝子の発現調節)		
(論文内容の要旨) これまでのポリフェノールに関する研究はその大部分が抗酸化効果、抗癌効果、抗菌効果等に関するものであった。最近ポリフェノールの一種であるエピガロカテキンガレート(以下 EGCG) が細胞や組織の保存に効果があることが確認され、引き続き関連する研究を行っているが、保存効果の詳しいメカニズムの詳細はまだ知られてなかった。そこで、本研究では EGCG の保存効果の機序は細胞周期に関する遺伝子の発現調節に関係しているものと考え、ヒト線維芽細胞を用いて EGCG の作用機序を遺伝子レベルで検討した。さらに、細胞・組織の保存剤として EGCG の安全性も確認するため、EGCG 処理後に洗浄した後の遺伝子の発現変化を調べた。 多趾症 1 歳男子の足趾皮膚から初代培養した線維芽細胞に EGCG を処理して細胞周期に関する遺伝子を中心に遺伝子の発現変化を検討した。EGCG 処理期間は 24 時間、処理濃度は 100 $\mu\text{g/ml}$ とした。溶液中の EGCG から発生する過酸化水素の毒性を抑えるため、カタラーゼ 20 $\mu\text{g/ml}$ を添加した。24 時間処理後に洗浄し、また 48 時間培養したときの EGCG 処理前後の細胞周期、および DNA, RNA, タンパク質の発現変化をフローサイトメトリー、マイクロアレイ、RT-PCR, Western blot. の方法で分析した。未処理細胞、24 時間 EGCG 処理後に洗浄して培養した細胞、および洗浄せずに EGCG が共存した状態で培養した細胞の増殖を 8 日まで調べ、EGCG の細胞に及ぼす影響を検討した。さらに、EGCG が細胞膜を通過し、細胞内に浸透して細胞質及び核まで影響を与えることを確認するため、FITC 蛍光標識した EGCG を添加処理して細胞内への浸透を共焦点顕微鏡により検討した。 培養実験過程の全体的な細胞増殖は EGCG 処理により未処理細胞の 70%以下に抑制され、洗浄しないと増殖の抑制が継続したが、洗浄して培養することにより徐々に増殖が再開され 8 日目になると未処理細胞のレベルに回復することが確認された。細胞周期の分布は EGCG 処理で S、G ₂ /M 期の細胞が減少すると共に G ₀ /G ₁ 期の細胞が増加したが、洗浄後に元の細胞周期の分布に戻ることを確認した。遺伝子の発現変化は G ₁ /S 期に関する cyclin D1, cyclin E2, CDK2, CDK6 などが相対的に少し抑制され、48 時間内に元のレベルに戻ったが、G ₂ /M 期に関する cyclin A, cyclin B1, CDK1 などは強く抑制され回復速度が遅くなる傾向が見られた。マイクロアレイの結果からは EGCG 処理で全体的な遺伝子の発現が変化したが、洗浄後には正常の様子に戻ることを確認された。さらに、EGCG が細胞質と核に分布したことを確認し、EGCG が細胞成長と細胞周期に関するメカニズムの調節に影響を与えることが示唆された。 このような実験結果から EGCG は細胞周期などに関する遺伝子の発現の調節効果があり、細胞や組織の保存に有用であることが確認された。			

(論文審査の結果の要旨)

近年、緑茶ポリフェノールの一種であるエピガロカテキンガレート(以下 EGCG)が細胞や組織の保存に効果があることが確認され、引き続き関連する研究が行われているものの、保存効果に関するメカニズムの詳細はまだ解明されていない。そこで、本研究では EGCG 保存効果の機序は細胞周期に関する遺伝子の発現調節に関係しているものと考え、ヒト線維芽細胞を用いて EGCG の作用機序を遺伝子レベルで検討した。また、EGCG の安全性も EGCG 処理後に洗浄した後の遺伝子の発現変化で確認した。

EGCG 処理で細胞増殖が抑制され、洗浄しないと増殖の抑制が継続したが、洗浄して培養することにより、徐々に増殖が再開され 8 日目には正常細胞のレベルに回復することが確認された。細胞周期と遺伝子発現の結果から EGCG 処理により細胞周期の G₁/S 期は相対的に低く抑制され、48 時間内に元のレベルに戻ったが、G₂/M 期は強く抑制され回復速度が遅くなる傾向が見られた。全体的な遺伝子の発現も EGCG 処理で変化したが、洗浄後には正常に戻ることを確認された。また、FITC 蛍光標識した EGCG が細胞内に浸透して分布したことを確認し、EGCG が細胞増殖と細胞周期に関するメカニズムの調節に影響を与えることが示唆された。

以上の研究は、細胞や組織の保存に関する EGCG 添加効果の解明に貢献し、細胞及び組織の保存に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医科学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 21 年 1 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降