



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1641号
学位記番号	第1176号
氏名	前田 祐三
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	<p>Apigenin induces apoptosis by suppressing Bcl-xL and Mcl-1 simultaneously through signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling in colon cancer (大腸癌においてアピゲニン¹はSTAT3シグナルを介して、Bcl-xLとMcl-1を抑制することによりアポトーシスを誘導する)</p> <p>International Journal of Oncology</p>
論文審査担当者	<p>主査： 城 卓志 副査： 高橋 智，瀧口 修司</p>

【背景】

大腸癌は現在世界中で増加してきており、主な癌関連死因の 1 つである。これまでに新たな抗癌剤や分子標的治療薬が開発されてきたにもかかわらず、切除不能な再発癌や進行癌に対しては治療効果が不十分であり、様々な副作用も解決すべき課題となっている。

Apigenin は多くのフルーツや野菜に含まれるポリフェノールの一種であり、これまでにいくつかの癌種で細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導する効果があることが報告されている。さらに、正常細胞に対する毒性が少ないことも報告されている。しかし、これまでに大腸癌における **apigenin** の抗腫瘍効果、およびその機序に関して詳細に検討した報告はなく、いまだ不明のままである。

【目的】

今回、我々は **apigenin** の大腸癌におけるアポトーシス誘導効果・機序を詳細に検討し、**apigenin** が有効な治療選択肢となり得るかを検討する。

【方法】

4 種類の大腸癌細胞株 (HT29,DLD-1,COLO320,HCT116) を用いて実験を行った。まず様々な濃度の **apigenin** を投与し、WST-1 assay, BrdU assay で細胞増殖に及ぼす影響を、Cell death ELISA でアポトーシスに及ぼす影響を評価した。さらにウェスタンブロッティングを用いてアポトーシスの指標である **PARP** の断片化の変化を検討した。

Apigenin のアポトーシス誘導メカニズムに抗アポトーシス **Bcl-2** ファミリー蛋白が関与していると推測し、**apigenin** 刺激に伴う **Bcl-2** ファミリー蛋白の発現変化を検索した。さらに、このメカニズムに抗アポトーシス蛋白が関与していることを証明するために、**siRNA** を用いて抗アポトーシス蛋白を単独または同時にノックダウンし、細胞増殖・アポトーシスに及ぼす影響を評価した。

抗アポトーシス **Bcl-2** ファミリー蛋白の上流シグナルとして **STAT3**、**STAT5** が関与していると推測し、1) **STAT3**、**STAT5** のリン酸化、2) **siRNA** による **STAT3** のノックダウン、3) **IL-6** 刺激による **STAT3** シグナルの活性化、などの手法を用いて **apigenin** によるアポトーシス誘導メカニズムの詳細を検討した。

【結果】

今回検討した 4 種類の大腸癌細胞株すべてにおいて、**apigenin** は濃度依存性に細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。また抗アポトーシス蛋白である **Bcl-xL** と **Mcl-1** の発現は濃度依存的に抑制され、これらの蛋白を **siRNA** で同時に抑制することにより、細胞増殖の著明な抑制とアポトーシスの増強を認めた。

Apigenin 投与にて **STAT3** のリン酸化は抑制され、さらに **siRNA** で **STAT3** をノックダウンすることにより **Bcl-xL** と **Mcl-1** はともに抑制された。このことから **apigenin** は **STAT3** シグナルを介して **Bcl-xL** と **Mcl-1** を抑制している可能性が示唆された。

さらに **IL-6** 刺激によって **STAT3** のリン酸化、および **Bcl-xL** と **Mcl-1** の発現の増強が認められた。しかし **apigenin** 暴露下では **IL-6** 刺激によって活性化された **STAT3** のリン酸化、抗アポトーシス蛋白の発現はほぼ完全に抑制された。

【結論】

以上の結果から、**apigenin** は **STAT3** シグナルを介して **Bcl-xL** と **Mcl-1** を同時に抑制し大腸癌細胞に強いアポトーシスを誘導することが判明した。本研究によって **apigenin** が大腸癌に

対する有効な治療法になりうることが証明されたのみならず、大腸癌に対して **Bcl-xL** と **Mcl-1** が有効な治療ターゲットとなりうることも証明された。さらに、**STAT3** シグナルを強く抑制する効果が認められたことから、**apigenin** には **STAT3** シグナルをターゲットとした新たな分子標的治療薬としての役割も期待される。

論文審査の結果の要旨

ポリフェノールの一種であり、抗腫瘍効果を示す apigenin に対し、大腸癌におけるアポトーシス誘導効果・機序の検討効果の研究報告がなされた。

【方法・結果】

4 種類の大腸癌細胞株を用いて実験を行った。様々な濃度の apigenin を投与し、WST-1 assay, BrdU assay で細胞増殖に及ぼす影響を、Cell death ELISA でアポトーシスに及ぼす影響を評価したところ、apigenin は濃度依存性に細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。さらにウェスタンブロッティングにて PARP の断片化の変化を検討したところ、濃度依存的に PARP の断片化を認めた。Apigenin のアポトーシス誘導メカニズムに抗アポトーシス Bcl-2 ファミリー蛋白が関与していると推測し、apigenin 刺激に伴う Bcl-2 ファミリー蛋白の発現変化を検索したところ、Bcl-xL と Mcl-1 の発現は濃度依存的に抑制された。さらに、siRNA を用いて抗アポトーシス蛋白を単独または同時にノックダウンしたところ、siRNA で同時に抑制することにより、細胞増殖の著明な抑制とアポトーシスの増強を認めた。抗アポトーシス Bcl-2 ファミリー蛋白の上流シグナルとして STAT3、STAT5 が関与していると推測し、1) STAT3、STAT5 のリン酸化、2) siRNA による STAT3 のノックダウン、3) IL-6 刺激による STAT3 シグナルの活性化、などの手法を用いて apigenin によるアポトーシス誘導メカニズムの詳細を検討したところ、apigenin 投与にて STAT3 のリン酸化は抑制され、さらに siRNA で STAT3 をノックダウンすることにより Bcl-xL と Mcl-1 はともに抑制された。また apigenin 暴露下では IL-6 刺激によって活性化された STAT3 のリン酸化、抗アポトーシス蛋白の発現はほぼ完全に抑制された。

【結論】

以上の結果から、apigenin は STAT3 シグナルを介して Bcl-xL と Mcl-1 を同時に抑制し大腸癌細胞に強いアポトーシスを誘導することが判明した。本研究によって apigenin が大腸癌に対する有効な治療法になりうるということが証明されたのみならず、大腸癌に対して Bcl-xL と Mcl-1 が有効な治療ターゲットとなりうることも証明された。さらに、apigenin には STAT3 シグナルをターゲットとした新たな分子標的治療薬としての役割も期待される。

主査から、①apigenin は細胞にどのように作用しているか、②in vivo の実験を行っているかなど、計 7 項目の質問があった。

副査の高橋先生からは、①細胞株の選択根拠となった KRAS、BRAF 以外の Genetic Background はあるか、②アポトーシスの中間経路（カスパーゼカスケードなど）は評価しているか、③STAT3 の抑制は inhibitor でなく、siRNA で行った理由は何かなど、計 15 項目の質問がなされた。

副査の瀧口先生からは①効果がなかった大腸癌細胞株で実験を行ったか、その他の癌種の細胞株ではどうであったか、②抗癌剤の組み合わせとして、どのような種類の抗癌剤を考えているか、またどういう実験を組むかについて質問がなされた。

これらの質問に対し、一部返答に窮することもあったが、おおむね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究はフラボノイドである apigenin が大腸癌に対して増殖抑制効果を有することを示し、そのメカニズムとして STAT3 シグナル経路不活性化を介した Bcl-xL, Mcl-1 抑制によるアポトーシス亢進が関与していることを明らかにした。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は、博士（医学）の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者	主査	城 卓 志	副査	高 橋 智	瀧 口 修 司
---------	----	-------	----	-------	---------