



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1932号
学位記番号	第1362号
氏名	佐橋 秀典
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	<p>Urolithin A targets the AKT/WNK1 axis to induce autophagy and exert anti-tumor effects in cholangiocarcinoma (胆管癌における天然由来ウロリチン A の AKT/WNK1 シグナル伝達経路を介したオートファジー活性化を伴う抗腫瘍効果の検討)</p> <p>Frontiers in oncology (2022), 12:963314.</p>
論文審査担当者	<p>主査： 瀧口 修司 副査： 稲垣 宏, 飯田 真介</p>

.....

【背景・目的】

ウロリチン A (UA) は天然由来ポリフェノールであるエラジタンニンやエラグ酸が腸内細菌で代謝され生じる代謝産物で、抗炎症作用や抗酸化作用を有することが知られている。近年前立腺癌や大腸癌、膵臓癌などで抗腫瘍効果が報告され注目されている。UA の薬物動態を示すデータでは、UA は腸肝循環により胆汁及び血液中に長時間とどまり、少しずつ尿排泄されると報告されている。一方、胆管癌は進行癌で診断されることの多い予後不良な癌の一つである。有用な化学療法は限られており、新規治療薬の開発が望まれる。胆管癌は胆汁及び血中の二つの側面で暴露される特殊な環境で発育する癌であり、腸肝循環する UA において強い抗腫瘍効果が期待される。そこで、UA を用いた胆管癌における抗腫瘍効果について検討する。また、UA は神経や筋疾患に対しオートファジーを誘導し治療薬となり得る可能性があることが示唆されている。本研究では UA の抗腫瘍効果について、癌におけるオートファジー活性化による細胞死の観点からも検討し、メカニズムの解明を行う。

【方法】

In vitro 実験で、胆管癌細胞株 (HuCCT-1, SSP-25) を用いて UA が細胞増殖能、遊走能、浸潤能に与える影響の評価を行った。また、フローサイトメトリー解析やウエスタン・ブロッティング法にて、UA による細胞周期、アポトーシス、オートファジーの変化を検討した。*In vivo* 実験では、ヌードマウスにヒト胆管癌細胞株 HuCCT-1 を皮下移植したモデルを作成し、UA 20mg/kg を 5 週間 (週 3 回投与) 経口投与して抗腫瘍効果を検証した。また、皮下異種移植腫瘍モデルにおける UA 投与に関連したオートファジーについて、ウエスタン・ブロッティング法を行い検討した。抗腫瘍効果の機序を明らかにするため、リン酸化アレイに基づき UA によるシグナル伝達経路の変化とオートファジーに関与する因子を検索した。本研究で得られた結果はスチューデント t 検定もしくはマン・ホイットニー U 検定により分析され、P 値<0.05 を統計学的に有意な差であると見なした。

【結果】

胆管癌細胞株 HuCCT-1 及び SSP-25 に UA を投与すると、濃度依存性に細胞増殖能が抑制された。フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析では、UA を投与した 24、48、72 時間後で G2/M arrest を認めた。スクラッチアッセイでは UA 40 $\mu\text{mol/L}$ 投与にて遊走能の有意な低下を、トランスウェル浸潤アッセイでは UA 40 $\mu\text{mol/L}$ 投与により浸潤能の有意な低下を認めた。細胞死についてアネキシン V を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシス解析を行ったが、本研究では UA 投与によるアポトーシス誘導は確認できなかった。一方、オートファジーに着目し検証すると、ウエスタン・ブロッティング法で UA 投与によりオートファゴソームのマーカである LC3-II 蛋白の発現増加を、また蛍光免疫染色では LC3-II を含むオートファゴソーム形成が観察され、UA がオートファジーに寄与していることが分かった。さらに、クロロキンをを用いたオートファジーフラックスアッセイでは、UA の併用投与で LC3-II 蛋白の発現増加が確認され、UA が胆管癌細胞株においてオートファジーを誘導することが明らかになった。

In vitro で得た結果よりヒト胆管癌細胞株 HuCCT-1 で皮下移植モデルを作成し動物実験を行うと、UA 治療群で腫瘍体積および重量の有意な減少(P<0.01)がみられ、動物実験においても UA

の抗腫瘍効果を実証することができた。免疫組織染色では UA 治療群において Ki-67 陽性細胞数の有意な減少($P < 0.01$)がみられ、腫瘍増殖能の抑制が確認できた。ウエスタン・ブロッティング法では UA 治療群で LC3-II 蛋白の発現増加($P < 0.05$)を認め、動物実験においても UA がオートファジーに寄与していることが明らかになった。

UA が抗腫瘍効果を発揮する機序を明らかにするため、リン酸化アレイに基づく検証を行うと AKT 及び WNK1 のリン酸化低下を認めた。また UA による LC3-II 蛋白の発現は、WNK1 をノックダウン(±UA)した時のシグナルと同レベルであり、UA は WNK1 を介したオートファジーを誘導している可能性があると考えられた。以上より UA は AKT リン酸化を低下させることで細胞周期停止や細胞増殖能抑制に寄与し、さらに AKT リン酸化の低下が WNK1 リン酸化を低下することでオートファジーを誘導し腫瘍生存低下に関わる可能性がある結論付けた。

【結語】

UA は胆管癌において AKT/WNK1 シグナル伝達経路を介したオートファジー誘導を主な機序として抗腫瘍効果を発揮することが示唆され、新規治療薬として期待できる薬剤の一つと考えられた。

.....

論文審査の結果の要旨

【背景・目的】ウロリチン A (UA) は天然由来ポリフェノールであるエラジタンニンやエラグ酸が腸内細菌で代謝され生じる代謝産物である。近年前立腺癌や大腸癌、膵臓癌で抗腫瘍効果が報告され注目されている。UA は腸肝循環により胆汁及び血液中に長時間とどまり少しずつ尿排泄されると報告されており、胆管癌では胆汁及び血中の二つの側面から抗腫瘍効果が期待される。そこで、UA を用いた胆管癌における抗腫瘍効果について検討した。

【方法】胆管癌細胞株を用いて UA による細胞増殖能の変化、遊走能・浸潤能の変化について評価を行った。抗腫瘍効果の機序として、細胞周期、アポトーシス、オートファジーについて検討した。*In vivo* の実験では、ヌードマウスにヒト胆管癌細胞株 HuCCT-1 を皮下移植したモデルを作成し、UA 20mg/kg を 5 週間 (週 3 回投与) 経口投与して抗腫瘍効果を確認した。さらにメカニズム解明のため、リン酸化アレイに基づき UA によるシグナル伝達の変化を検索した。

【結果】UA 40 μ M 投与により、胆管癌細胞株において G2/M arrest を伴う細胞増殖能の低下を認め、遊走能及び浸潤能も抑制された。UA 投与によるアポトーシスは認めなかったが、LC3-II 蛋白の発現増加及び蛍光免疫染色におけるオートファゴソーム形成が観察され、UA でオートファジーが誘導されていることを明らかにした。*In vivo* では、UA 投与群で抗腫瘍効果 ($P < 0.01$) を認め、LC3-II 蛋白の発現増加を認めた。リン酸化アレイに基づくメカニズム解析では、UA 投与は mTOR のリン酸化には寄与しない一方で AKT・WNK1 のリン酸化の低下を認め、UA が WNK1 を介したオートファジーを誘導する可能性が示唆された。

【結語】UA は胆管癌において AKT/WNK1 シグナル伝達経路を介したオートファジー誘導を主な機序として抗腫瘍効果を発揮することが示唆され、新規治療薬として期待できる薬剤の一つと考えられた。

【審査内容】主査の瀧口教授からは、①オートファジー活性化に着目した抗がん剤には何があるのか、②オートファジー活性化による side effect は問題ないのか、③ウロリチン A が効果的な他の癌腫には何が考えられるのか、などにつき計 7 項目の質問があった。第一副査の稲垣教授からは、①胆管癌と膵臓癌のウロリチン A の効果の違いをどのように考えるか、②胆汁成分の中で癌に影響を与える物質はあるのか、③癌細胞に対してオートファジーはどのような影響を及ぼすと考えられるのか、など計 8 項目にわたり質問がなされた。第二副査の飯田教授からは、①マウスに経口摂取したウロリチン A の血中濃度について解析は行ったのか、②AKT 阻害剤や IGF-1 受容体阻害剤でもウロリチン A と同様にオートファジーを誘導する効果を得られるのか、③胆管癌の分子標的薬になりうる遺伝子変異には何がありどれくらいの頻度あるのか、など計 7 項目にわたり質問がなされた。これらの質問に対し、一部返答に窮することもあったが概ね的確に回答し、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、ウロリチン A 投与によるシグナル伝達の変化 (AKT/WNK1 axis) 及びオートファジーを含む細胞死について解析することにより、ウロリチン A が胆管癌増殖抑制に一定の効果があることを見出し、新規治療薬の候補になる可能性があることを示した。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 瀧口 修司 教授 副査 稲垣 宏 教授 飯田 真介 教授