

氏名（本籍）	山田紀子	（愛知県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1162号	
学位授与日付	令和3年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Quercetin suppresses the migration of hepatocellular carcinoma cells stimulated by hepatocyte growth factor or transforming growth factor- α : Attenuation of AKT signaling pathway.	
審査委員	（主査）教授	長岡 仁
	（副査）教授	清水 雅仁 教授 中川 敏幸

論文内容の要旨

天然のポリフェノールであるフラボノイドは、食用植物に広く含まれている機能性成分である。フラボノイドのうち主要なフラボノールである quercetin は、特にタマネギに多く含まれ、心血管疾患のリスクを低下させるほか、さまざまな組織に由来するがん細胞に対し抗がん作用を示すことが報告されている。肝細胞がん（HCC）において、外科的手術や肝移植などの治療は近年進歩しているが、体内を循環する腫瘍細胞を原因とする転移や再発が非常に多く、HCC 患者の生存率は依然として低い。HCC 細胞の遊走と浸潤に関して、これまで hepatocyte growth factor (HGF)/c-mesenchymal-epithelial transition factor receptor (c-MET) および transforming growth factor- α (TGF- α)/epidermal growth factor receptor (EGFR) により誘導される mitogen-activated protein kinases (MAPKs) および AKT シグナル伝達経路の活性化が関与していることが明らかにされている。一方、quercetin およびその誘導体である myricetin は、HCC 細胞に対する増殖抑制作用が報告されているが、細胞遊走に対する作用については明らかではなかった。本研究では、HGF および TGF- α によるヒト HCC 由来 HuH7 細胞の遊走に対するフラボノール、特に quercetin の影響を検討した。

【対象と方法】

細胞の遊走能に関し、ヒト HCC 由来 HuH7 細胞を、10%牛胎仔血清を含む RPMI1640 培地で培養後、無血清とし quercetin (0, 3, 5, 7 μ M), myricetin (7 μ M) および isokaempferide (7 μ M) で前処置後、HGF (30 ng/ml) または TGF- α (10 ng/ml) で刺激し、Boyden chamber 法を用いて解析した。c-MET, EGFR, p38 MAPK, AKT, phosphoinositide 3-kinase (PI3K) のリン酸化に関し、10%牛胎仔血清を含む RPMI1640 培地で、細胞を3日間培養後、培地を無血清とし、24時間後、quercetin (0, 10, 30 μ M), myricetin (10 μ M) で1時間の前処置を行い、HGF (30 ng/ml) または TGF- α (30 ng/ml) で刺激し、その後細胞を回収し、Western blot 法で解析を行った。

【結果】

Quercetin は、HGF によるヒト HCC 由来 HuH7 細胞の遊走を 3, 5, 7 μ M で、TGF- α による遊走を 5, 7 μ M で用量依存的に抑制した。加えて myricetin も HGF および TGF- α による細胞遊走を 7 μ M で抑制した。一方、不活性型フラボノールである isokaempferide は、HGF および TGF- α による細胞遊走

に何ら影響を及ぼさなかった。Quercetin および myricetin は、c-MET および EGFR の自己リン酸化に何ら影響を及ぼさなかった。Quercetin は、HGF および TGF- α による p38 MAPK のリン酸化に何ら影響を及ぼさなかったが、HGF および TGF- α による AKT のリン酸化は濃度依存的に 30 μ M で有意に抑制した。また、myricetin も HGF および TGF- α による AKT のリン酸化を 10 μ M で有意に抑制した。加えて quercetin は、HGF および TGF- α による PI3K のリン酸化を 30 μ M で有意に抑制した。一方、isokaempferide は、HGF および TGF- α による AKT のリン酸化に何ら影響を及ぼさなかった。

【考察】

フラボノールである quercetin および myricetin は、HGF および TGF- α によるヒト HCC 由来 HuH7 細胞の遊走を抑制することを示した。先行研究では、HuH7 細胞の遊走における細胞内シグナル伝達に関して、HGF および TGF- α は PI3K/AKT および p38 MAPK を介して促進することを明らかにしている。Quercetin と myricetin は、HGF および TGF- α の受容体チロシンキナーゼの自己リン酸化に何ら影響しなかった。一方、quercetin は、HGF または TGF- α による p38 MAPK の活性化にも何ら影響しなかったが、AKT の活性化を抑制した。さらに、myricetin も HGF および TGF- α による AKT の活性化を有意に抑制した。細胞内シグナル伝達においては、PI3K が AKT の上流で機能していることが知られている。Quercetin は、HGF および TGF- α による PI3K の活性化も顕著に抑制した。以上の結果から、quercetin および myricetin は、p38 MAPK シグナル伝達経路ではなく、AKT シグナル伝達経路の阻害により HGF および TGF- α による HuH7 細胞の遊走を抑制することが示唆された。以上の知見より、フラボノールが HCC の転移および再発に対する予防薬の候補となり得ることが示唆された。

【結論】

フラボノールである quercetin は、p38 MAPK ではなく AKT のシグナル伝達経路を阻害することにより、HGF および TGF- α による HCC 細胞の遊走を抑制することが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 山田紀子は、ヒト肝細胞がん由来 HuH7 細胞においてフラボノールである quercetin が AKT シグナル伝達経路を阻害することで、HGF および TGF- α による肝細胞がん細胞の遊走を抑制することを明らかにした。本研究の成果は、肝細胞がんの転移および再発に対する予防や治療戦略に新たな知見をもたらし、薬理学、腫瘍学および栄養学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Noriko Yamada, Rie Matsushima-Nishiwaki, Osamu Kozawa : Quercetin suppresses the migration of hepatocellular carcinoma cells stimulated by hepatocyte growth factor or transforming growth factor- α : Attenuation of AKT signaling pathway

Archives of Biochemistry and Biophysics 682, 108296 (2020). doi:10.1016/j.abb.2020.108296.