

博士(医学) 山田 貴 教

論文題目

Guggulsterone suppresses bile acid-induced and constitutive caudal-related homeobox 2 expression in gut-derived adenocarcinoma cells

(ガグルステロンは消化管由来腺癌細胞において、caudal-related homeobox 2 の基礎発現、並びに胆汁酸による増強時の発現を抑制する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ガグルステロンは、ガグル樹脂より抽出されるポリフェノールであり、インド伝承医学(アユールベエダ)では、肥満や関節炎の治療薬として長く使用されてきた。近年、ガグルステロンのこれらの効果が実験的に確認されると共に、抗炎症効果に加え、抗腫瘍効果が知られる様になった。またその効果発現には、胆汁酸受容体(FXR, farnesoid X receptor)への拮抗作用を介したものが報告され、注目されている。

一方、転写因子である caudal-related homeobox 2 (Cdx2)は、消化管の発生・発達制御に関わると共に、消化管発癌に重要な役割を担っていると考えられ、胆汁酸の消化管への関わりの主要な経路の一つと考えられている。また、消化管上皮においては、胆汁酸が Cdx2 の発現を増強することが示されている。しかし、Cdx2 の制御、特に薬剤による制御についての検討は乏しい。そこで、ガグルステロンの抗腫瘍効果の一機序を明らかにし、消化管発癌の化学予防法につながる薬剤を探求することを目的として、消化管上皮(特に癌細胞)におけるガグルステロンによる Cdx2 発現の制御について検討した。

[材料ならびに方法]

消化管腺癌細胞株として、Bic-1 細胞を用い、胆汁酸およびガグルステロンの暴露を行った。FXR と Cdx2 の発現は、ウエスタン・ブロットを用い評価した。Cell viability を MTT assay、細胞周期をフローサイトメトリーで評価した。Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)活性は、Electromobility shift analysis (EMSA)で評価した。

[結果]

Bic-1 細胞において、FXR, Cdx2 は各々発現を認めた。胆汁酸の中では、コール酸(CA)、グルコケノデオキシコール酸(GCDCA)に比し、デオキシコール酸(DCA)およびケノデオキシコール酸(CDCA)は、Bic-1 細胞において Cdx2 発現を強く増強した。また、DCA と CDCA は 100 μ M までの濃度において、濃度依存性に Cdx2 発現を増強した。(それぞれコントロールに対し 196 %(p=0.003) および 346 %(p=0.02))

低濃度のガグルステロン(5 μ M)の暴露は、DCA と CDCA の存在下で増強された Cdx2 発現を有意に抑制した(それぞれ胆汁酸暴露に対し 32 %(p=0.01) および 44 %(p=0.02))。同濃度のガグルステロン(5 μ M)は、胆汁酸非存在下においても、Cdx2 発現を有意に抑制した(コ

ントロールに対し 54 %($p=0.03$)。

5 μ M までの低濃度のガグルステロンは、Bic-1 細胞において cell viability および細胞周期に影響を及ぼさなかった。CDCA は NF- κ B 活性を増強したが、5 μ M までの濃度のガグルステロンは、胆汁酸存在下および非存在下において NF- κ B 活性に影響を及ぼさなかった。

[考察]

本研究は以下の点を明らかにした。(1)胆汁酸受容体 (FXR) を発現する消化管腺癌細胞 Bic-1 において、胆汁酸 DCA と CDCA は Cdx2 の発現を強く増強した。(2)ガグルステロンは、胆汁酸の存在下、非存在下いずれにおいても、Cdx2 発現を抑制した。(3)5 μ M までの低濃度のガグルステロンは、cell viability および細胞周期、NF- κ B 活性に影響を及ぼさなかった。即ち、ガグルステロンが、cell viability や細胞周期、NF- κ B 活性とは独立した FXR を介した系により、Cdx2 の発現を抑制することが示された。Cdx2 が、消化管発癌に重要な位置を占める物質であることから、本研究の結果は、ガグルステロンが Cdx2 制御により消化管発癌に対し化学予防的に働く可能性を示した。

FXR を発現する消化管腺癌細胞 Bic-1 において、FXR への親和性が他の胆汁酸に比較し強いと報告されている DCA と CDCA で Cdx2 の発現が強く増強された点は注目すべきであり、胆汁酸による Cdx2 発現に FXR の活性化が関与していることを支持する。本研究において、5 μ M までの低濃度のガグルステロンは、高濃度 (20-50 μ M) おいて、既に報告されている細胞周期の停止およびアポトーシス誘導、NF- κ B 活性の抑制作用を示さなかった。低濃度のガグルステロンでは、Cdx2 発現制御機序として、高濃度の作用と独立した機序が働いている可能性が高いと考えられた。

ガグルステロンが有する Cdx2 の制御作用が化学予防あるいは治療薬として有用であるか否かの *in vivo* の実験系による検討が必要と考えられる。

[結論]

ガグルステロンが、FXR を介する経路により Cdx2 の制御を行う事が確かめられた。Cdx2 をターゲットとする新たな消化管癌化学予防として用いる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

ガグル樹脂由来のポリフェノールであるガグルステロンは、胆汁酸受容体 (FXR, farnesoid X receptor) への拮抗作用を有し、抗炎症効果や抗腫瘍効果を発揮する。申請者らは、本研究において FXR の下流シグナルとなり、消化管の発生・発達制御や消化管発癌に重要な役割を担う転写因子 caudal-related homeobox 2 (Cdx2) に対してのガグルステロンの作用を検討し、消化管発癌の化学予防法の可能性を探求した。

本研究では、消化管腺癌細胞株である Bic-1 細胞を、胆汁酸およびガグルステロンに暴露し、FXR と Cdx2 の発現をウエスタン・ブロットにより評価した。さらに、cell viability を

MTT assay、細胞周期をフローサイトメトリー、nuclear factor-kappa B (NF- κ B)活性を electromobility shift analysis (EMSA)で評価した。その結果、(1)胆汁酸受容体 (FXR) を発現する消化管腺癌細胞 Bic-1 において、胆汁酸であるデオキシコール酸 (DCA) およびケノデオキシコール酸 (CDCA) は Cdx2 の発現を強く増強した。(2)ガグルステロンは、胆汁酸の存在下、非存在下いずれにおいても、Cdx2 発現を抑制した。(3)5 μ M までの低濃度のガグルステロンは、cell viability および細胞周期、NF- κ B 活性に影響を及ぼさなかった。

申請者らは本研究により、ガグルステロンが cell viability や細胞周期、NF- κ B 活性とは独立して、Cdx2 の発現を抑制することを明らかにした。Cdx2 は消化管発癌に重要な役割を果たしており、本研究の結果は、ガグルステロンが Cdx2 制御により消化管発癌に対し予防的に働く可能性を示したものとして高く評価される。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 渡邊 裕司
副査 大西 一功 副査 和田 英俊