

論文内容の要旨

論文提出者氏名 奥田佳一郎

論文題目

Honokiol Prevents Non-Alcoholic Steatohepatitis-Induced Liver Cancer
via EGFR Degradation through the Glucocorticoid Receptor-MIG6 Axis.

論文内容の要旨

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) はメタボリックシンドロームに関連する疾患として重要性が増しているが、NASH からの肝発癌の機序については未だ十分な解明がなされておらず、現状で治療薬や発癌予防薬は存在しない。ヒト NASH 発癌を模倣した遺伝子改変マウスモデルである Mup-uPA マウスは、高脂肪食を投与すると NASH を発症し、その後肝細胞癌 (HCC) の併発を来す。

Mup-uPA マウスに生後 6 週から高脂肪食を投与し、同 32 週から 8 週間天然低分子化合物であるホノキオール (HNK) を投与したところ、control 群に比して HCC の腫瘍径と個数が有意に低下した。このメカニズムを解明するために、ヒト肝癌細胞株 Hep3B、Huh6 の培地に HNK を添加し解析を行った。また、臨床的関連性を評価するためにヒト HCC 患者背景肝組織と非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) 患者肝組織についても検討した。Mup-uPA マウス背景肝においては上皮成長因子受容体 (EGFR) の発現が亢進していたが、HNK 投与により mRNA・タンパク質レベルでの発現が抑制されたため、この知見に着目して解析を進めた。

Hep3B 細胞に HNK (0-30 μ M) を投与したところ、細胞増殖は HNK 濃度依存性に抑制され、mRNA・タンパク質レベルで EGFR 発現が低下し、ERK や S6K、S6 など下流シグナルのリン酸化も抑制された。既報では ERBB receptor feedback inhibitor1 (ERRFI1) 遺伝子がコードする mitogen-inducibile gene6 (MIG6) タンパクが EGFR に作用し、エンドソーム・リソソームへ誘導することで分解を促進することが報告されており、また *ERRFI1/MIG6* はグルココルチコイドレセプター (GR) が活性化し核内へ移行することで発現誘導される。この GR/MIG6 経路を介した EGFR 分解機構に着目し、Hep3B、Huh6 細胞にデキサメタゾン (DEX) 100nM を positive control として HNK 20 μ M を添加し蛍光染色で評価したところ、DEX 投与時と同様に GR の核移行が確認された。mRNA・タンパク質レベルでも *ERRFI1/MIG6* の発現が濃度依存性に増加し、EGFR の発現が抑制された。さらに CRISPR/CAS9 で MIG6 を KO した Hep3B、Huh6 細胞で検討したところ、Wild Type に比べ KO 群では HNK による EGFR 抑制の程度は低下し、細胞増殖抑制効果が減弱した。またリソソームでの EGFR 分解について、EGF 50ng/ml で EGFR を過剰発現させた Hep3B、Huh6 細胞に HNK 20 μ M 並びに HNK 20 μ M+リソソーム阻害剤バフィロマイシン A1 (BMA) を添加し蛍光染色で比較した結果、BMA 併用群に比して HNK 単独投与群で EGFR の減少を認めた。これらより、HNK は GR/MIG6 経路の活性化によりリソソームでの EGFR 分解を促進することで、肝癌細胞の増殖を抑制する可能性が示された。

併せてヒト HCC31 例の背景肝について免疫染色を行ったところ、EGFR と GR の発現には負の相関が見られた。また NAFLD 患者 105 名の肝 ERRFI1 発現と NASH の特徴である肝組織の炎症・風船状腫大・線維化との関連を解析したところ、NASH への進展例では、ERRFI1 発現が低下していることが

示された。

以上の結果より、HNK や関連する化合物による GR/MIG6 を介した EGFR の分解促進という新しいアプローチにより、早期に EGFR 関連シグナルに介入することで、ヒト慢性肝疾患の進行や HCC の治療につながり、さらに予防できる可能性があると考えられた。