

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 24 日現在

機関番号：32663

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12329

研究課題名(和文) 新たな発がん理論に基づくがん予防食素材のスクリーニングシステムの構築

研究課題名(英文) Establishment of a screening system to select cancer preventive ingredient based on a new carcinogenesis theory

研究代表者

矢野 友啓 (YANO, TOMOHIRO)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：50239828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：新しい発がん理論であるがん幹細胞理論に基づいた前立腺がんの一次および二次予防に有効な予防食素材をスクリーニングするシステムの構築を目的とした。新たな三次元培養法とがん幹細胞形成選択培地を用いて、sphere形成能を指標にした前立腺がん幹細胞分離法の構築に成功した。この分離した前立腺がん幹細胞を用いて、すでに前立腺がん予防食素材としての可能性が示されているアナー由来のトコトリエンール(delta-tocotrienol 90%以上含有)に強力な前立腺がん幹細胞抑制作用があることが示された。以上、本研究を通じて、がん幹細胞理論に基づいた新たな前立腺がん予防食素材のスクリーニング法が構築された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I tried to establish the system which screened preventive ingredients which was effective for the primary and second prevention of the prostate cancer based on cancer stem cell theory that was a new carcinogenesis theory. Using the new three-dimensional culture method and a special medium to stimulate cancer stem cell formation, I succeeded in the establishment of the prostate cancer stem cell separation method with sphere formation ability as an index. Utilizing this isolated prostate cancer stem cell, I showed that annatto tocotrienol (delta-tocotrienol more than 90% component), which the possibility as prostate cancer preventive ingredient had been already shown in previous studies, could be effective to inhibit prostate cancer stem cell growth. Through this study, I established the screening system to select new prostate cancer preventive ingredients based on a cancer stem cell theory.

研究分野：がん病態制御学

キーワード：がん幹細胞 前立腺がん がん予防食素材

1. 研究開始当初の背景

2015年の前立腺がんの部位別予測がん罹患数は98,400人である。また、前立腺がんの罹患率は年々増加しており、年齢階級別がん罹患率は60歳以上で大きく増加している。超高齢社会を迎えた日本において、前立腺がん罹患率はさらに増加していくことが予測されている。さらに、前立腺がんは最終的にホルモン非依存性の悪性型に変化し、抗がん剤や放射線への耐性を持ち、根治が非常に困難になる。したがって、新たな予防法の構築が急務になっている。

2. 研究の目的

腫瘍組織の不均一性を説明する仮説の一つとして、自己複製能と多分化能を持つ少数の腫瘍細胞が全体を構成するというがん幹細胞仮説が提唱されている。このがん幹細胞ががんの発生、再発の原因とされ、がん予防・治療にはがん幹細胞の抑制が不可欠とされている。そこで本研究では、がん幹細胞の生存環境である低酸素条件下でのがん幹細胞の生存抑制を介した前立腺がんの新たな予防につながる新規がん予防食素材のスクリーニング法の構築を目的とした。

3. 研究の方法

アンドロゲン非依存性前立腺がん細胞株PC-3及びDU-145、アンドロゲン依存性前立腺がん細胞株LNCaPの3種類の前立腺がん細胞株を用いて、3次元培養によりスフェロイド(Spheroid)形成能を検討した。次に、形成したSpheroidのがん幹細胞性をがん幹細胞マーカー発現、抗がん剤抵抗性、腫瘍形成能の3点から評価した。

通常酸素分圧条件下(Normoxia)及び低酸素分圧条件下(Hypoxia)での前立腺がん細胞の親株とがん幹細胞様(Cancer stem-like)細胞のアナトー由来トコトリエノール(AT3)処理後の細胞生存活性をWST-1法で測定し

た。

低酸素応答機構の重要な因子である低酸素誘導因子HIFs(HIF-1 α 、HIF-2 α)のタンパク発現レベルをNormoxia及びHypoxiaと比較し、AT3処理による影響をWestern Blot法で解析した。また、HIFsの阻害剤を用いてHIFsの阻害が細胞生存活性に与える影響を検討した。

HIFsを安定化することが報告されている非受容体型キナーゼ(SFKs)の活性化レベル(Src-P)について、Normoxia及びHypoxiaでの比較、AT3処理の影響を検討した。さらに、SFKsの阻害剤(PP2)を用いてSFKsの阻害が細胞生存活性に与える影響を検討した。また、PP2処理によるSFKsの活性阻害下でのHIFsのタンパク発現レベルを解析した。

4. 研究成果

3次元培養によりPC-3、LNCaP細胞でSpheroidが形成された。また、がん幹細胞マーカーのmRNA発現レベルを解析したところ親株と比べてCancer stem-likeな細胞で発現が増加した。さらに、Cancer stem-likeな細胞と親株に対する抗がん剤の細胞生存活性に及ぼす影響を検討した。親株の細胞生存活性は抗がん剤の濃度依存的に抑制したが、Cancer stem-likeな細胞の細胞生存活性はDocetaxelの影響を受けなかった。BALB/c nude miceにPC-3 stem-likeな細胞とPC-3細胞を移植し、腫瘍重量を測定した。PC-3細胞に比べてPC-3 stem-like cellでは高い腫瘍形成能を有した。従って、私たちの構築した3次元培養法により形成させたSpheroidには、がん幹細胞性を持つ細胞画分が濃縮されたと考えられた。

AT3はNormoxia及びHypoxiaでPC-3、LNCaP細胞の親株及びがん幹細胞の細胞生存活性を濃度依存的に抑制した。AT3はHypoxiaにおいても抗がん作用を発揮することができる有望な抗前立腺がん成分であ

ることが推測された。

低酸素応答機構において中心的な役割を担う HIFs に着目し、Normoxia、Hypoxia、AT3 処理群でそのタンパク発現レベルを解析した。その結果、Hypoxia で HIFs の発現が増加し、AT3 処理により HIFs の発現が減少した。AT3 が HIFs の発現抑制を介して前立腺がん幹細胞の低酸素応答機構を阻害している可能性が示唆された。また、YC-1 (HIF-1 α 、2 α とともに阻害)、BAY 87-2243 (HIF-1 α のみ阻害)、HIF-2 Antagonist 2 (HIF-2 α のみ阻害) の 3 種類の HIFs 阻害剤を用いて、Hypoxia での HIFs の阻害が細胞生存活性に与える影響を検討したところ、YC-1、BAY 87-2243 の各処理群で濃度依存的に細胞生存活性が減少した。一方、HIF-2 Antagonist 2 の処理群では細胞生存活性への影響は確認されなかった。この結果から Hypoxia での前立腺がん幹細胞の生存において HIF-2 α よりも HIF-1 α の関与が大きいことが考えられた。HIFs を安定化することが報告されている SFKs について、その活性化レベルを Src-P 発現レベルで検討した。Src-P 発現レベルは Hypoxia で増加し、AT3 処理により減少する傾向が見られた。また、Hypoxia で PP2 は濃度依存的に細胞生存活性抑制効果を示し、Hypoxia での前立腺がん幹細胞に対する AT3 の細胞生存活性抑制機構の一つとして、SFKs の活性化阻害が関与している可能性が示された。また、PP2 処理による SFKs 活性阻害下で HIFs のタンパク発現レベルの減少傾向が見られた。これらの結果から、AT3 は SFKs の活性化の阻害を介して HIFs の安定化を阻害し、Hypoxia での前立腺がん幹細胞の生存シグナルを阻害していることが推測された。

まとめると、AT3 は Hypoxia において HIFs の発現レベルの抑制を介して、前立腺がん幹細胞を抑制した。AT3 はがん幹細胞を標的とした前立腺がんの根本的予防に有効な成分

になる可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1 公益財団法人 がん研究振興財団: がんの統計 15 巻, 2015、14-16
- 2 山中 伸弥, 中内 啓光: 幹細胞, 朝倉書店, 2012、11-124

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- 1 Shiozawa N, Sugahara R, Namiki K, Sato C, Ando A, Sato A, Virgona N, Yano T. Inhibitory effect of a redox-silent analogue of tocotrienol on hypoxia adaptation in prostate cancer cells、査読有、Anticancer Drugs. 28, 2017, 289-297.
DOI:10.1097/ CAD.0000000000000460
- 2 Sugahara R, Sato A, Uchida A, Shiozawa S, Sato C, Virgona N, Yano T. Annatto Tocotrienol Induces a Cytotoxic Effect on Human Prostate Cancer PC3 Cells via the Simultaneous Inhibition of Src and Stat3. 査読有、J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)、61, 2015, 497-501.
DOI: 10.3177/jnsv.61.497

[学会発表](計 7 件)

- 1 塩澤伸哉、佐藤洋美、矢野友啓、がん幹細胞仮説に基づく前立腺がんの TRF による根本的予防の検討、第 28 回ビタミン E 研究会、2017.1.21-22、東洋大学白山キャンパス 125 周年記念ホール(東京都文京区)
- 2 Shiozawa N, Sato H, Yano T, Possibility of prostate cancer prevention with targeting cancer stem theory, JCA2016, 2016.10.6-8, パシフィコ横浜(神奈川県

- 横浜市)
- 3 塩澤伸哉、佐藤洋美、矢野友啓、がん幹細胞仮説に基づく前立腺がん予防の可能性、第 68 回ビタミン学会、2016.6.17-18、富山国際会議場(富山県富山市)
 - 4 Shiozawa N, Sato H, Yano T, Possibility of prostate cancer prevention based on cancer stem cell theory, 2016 AACR, 2016.4.16-20, New Orleans, LA, USA
 - 5 塩澤伸哉、菅原綾介、佐藤知晶、矢野友啓、がん幹細胞を標的にした tocotrienol-rich fraction による前立腺がん予防の可能性、第 27 回ビタミン E 研究会、2016.1.8-9、香川県民ホール(香川県高松市)
 - 6 塩澤伸哉、矢野友啓、がん幹細胞を標的とした前立腺がん予防法の可能性、第 62 回日本栄養改善学会、2015.9.24-26、福岡国際会議場(福岡県福岡市)
 - 7 Shiozawa S, Sugahara R, Sato H, Uchida A, Sato A, Ota M, Yano T, A possible role of tocotrienol-rich fraction as an anti-cancer agent in prostate cancer, 12th Asia Congress of Nutrition, 2015.5.14-18, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

- 1 塩澤伸哉、佐藤洋美、矢野友啓、ビタミン E 研究会、がん幹細胞を標的としたアナトー由来トコトリエノールによる前立腺がん予防の可能性、ビタミン E 研究の進歩 XVII、2016、111-117

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.toyo.ac.jp/site/dfls/yano.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 友啓 (YANO TOMOHIRO)
東洋大学・食環境科学部・教授
研究者番号: 50239828

(2) 研究分担者

佐藤 洋美 (SATO HIROMI)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 30506887

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()