

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15377

研究課題名(和文) 新たに発見された発がん要因に対する予防法の開発

研究課題名(英文) Development of the cancer preventive strategy against a newly identified risk factor

研究代表者

飯泉 陽介 (Iizumi, Yosuke)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20533178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がんゲノムプロジェクトの成果として、細胞内の酵素APOBEC3Bが様々な癌で認められる遺伝子変異の直接原因であることが明らかになってきた。本研究では、この遺伝子変異の原因であるAPOBEC3Bを減少させることで、がん予防に寄与しうる天然化合物をスクリーニングした。その結果、APOBEC3BをmRNAレベルで減少させることができる天然化合物を2つ発見したが、それらの天然化合物はタンパク質レベルではAPOBEC3Bを減少させることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：As an achievement of cancer genome projects, a cellular enzyme, APOBEC3B, has been reported to be a critical cause of mutations found in various cancers. In this study, we performed the screening for natural compounds which contribute to cancer prevention by decreasing APOBEC3B. As a result, we found two natural compounds which can downregulate APOBEC3B at the mRNA level, whereas these compounds could not decrease APOBEC3B at the protein level.

研究分野：がん予防

キーワード：APOBEC3B がん予防 天然化合物 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

発がんは、正常細胞に遺伝子変異が蓄積することで引き起こされる。その遺伝子変異の原因としては、活性酸素や紫外線、喫煙、発がん性物質などが挙げられる。ところが、最近のがんゲノムプロジェクトにより、生体内に存在している APOBEC ファミリー酵素が、がんにおける遺伝子変異の原因であることが明らかになってきた。その中でも APOBEC3B に関しては、乳がん、膀胱がん、肺がん、頭頸部がん、子宮頸がんにおいて発現上昇し、p53 や c-Myc 遺伝子などに変異を導入していることが見出されている(Nature, 2013; 494: 366-370, Nat Genet., 2013; 45: 977-983)(図1)。

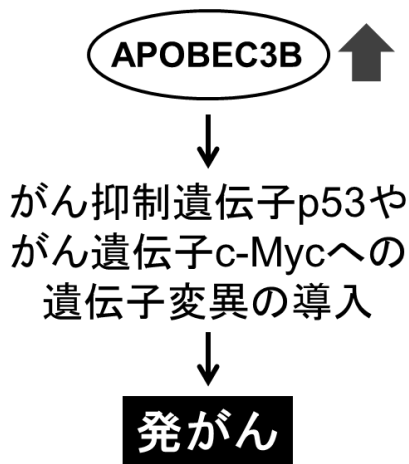


図1. 生体内変異原酵素 APOBEC3Bによる発がん

活性酸素に対しては抗酸化物質の摂取により、紫外線や喫煙、発がん性物質に対してはそれらの暴露を回避することにより、これらに起因する遺伝子変異、発がんはある程度予防可能ではあるが、APOBEC3B に関しては、生体内に元々存在しているため、逃れられることはできない。APOBEC3B による遺伝子変異を抑制できる新たながん予防法の開発が必要だ。

2. 研究の目的

これまでのがん予防戦略としては、紫外線や喫煙、発がん性物質などの暴露からの回避や、抗酸化物質の摂取による細胞内などで発生し遺伝子変異を導入する活性酸素の除去などが一般的であった。本研究では、最近見出された生体内に存在する変異原酵素 APOBEC3B に着目し、新規がん予防法を開発する。発がんにおける APOBEC3B の発現上昇メカニズムは、ほとんど明らかになっていないため、本研究ではスクリーニング系の構築から開始する。そして、APOBEC3B を発現低下させることで、APOBEC3B による遺伝子変異を抑制し、がん予防に貢献しうる食品成分の発見を目指す(図2)。

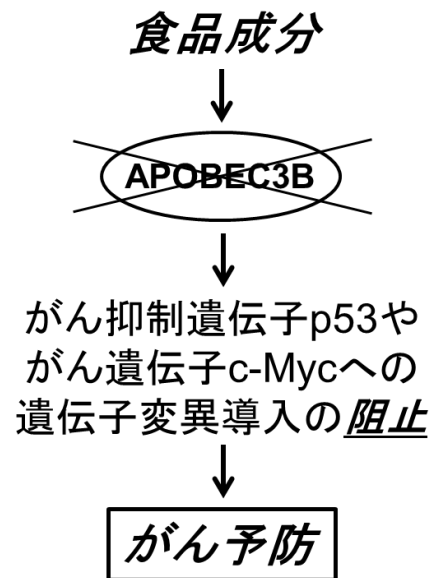


図2. APOBEC3Bを標的とした新規がん予防法

3. 研究の方法

(1) APOBEC3B 発現抑制食品成分のスクリーニング系の構築

初めに、生体内変異原酵素 APOBEC3B の発現を低下させる食品成分を探索するスクリーニング系を構築する。細胞株としては、APOBEC3B の高発現により、p53 遺伝子などに変異が存在する乳がん細胞株 HCC1569 などを用いた。定量 RT-PCR 法を用いて、安定して細胞内で発現している APOBEC3B の mRNA を検出できるか否かを検討した。

(2) APOBEC3B 発現抑制食品成分のスクリーニング

(1)で構築した定量 RT-PCR 法を用いたスクリーニング系を使用し、APOBEC3B の mRNA の発現を低下させる食品成分を探索した。食品成分のスクリーニングライブラリーとしては、市販の天然化合物ライブラリーを用いた。

(3) スクリーニングのヒット化合物の評価

スクリーニングにより見出された APOBEC3B の mRNA 量を低下させることができる天然化合物(ヒット化合物)に関して、まずは、定量 RT-PCR 法を用いて、発現抑制の濃度依存性を評価した。さらに、再現良く APOBEC3B の mRNA 量を低下させることができたヒット化合物に関しては、ウエスタンブロッティング法を用いて、細胞内の APOBEC3B タンパク質の発現を抑制できるか否かを評価した。また、APOBEC3B の mRNA 量を逆に増加させた化合物に関しても、その再現性と濃度依存性を評価した。

4. 研究成果

(1) APOBEC3B 発現抑制食品成分のスクリーニング系の構築

初めに、APOBEC3B の高発現により p53 遺伝子などに変異が存在する乳がん細胞株 HCC1569 を購入し、スクリーニング系の構築を行った。ところが、HCC1569 細胞の増えが悪く、多検体で解析を行う必要があるスクリーニングには適していないことがわかった。

そこで、所有している様々ながん細胞株を用いて、定量 RT-PCR 法により細胞内の APOBEC3B の mRNA の発現を検出した。その結果、培養の容易な細胞株の中で、安定して APOBEC3B の mRNA の発現を検出できるものとして、大腸癌細胞株 HT-29 を見出した。HT-29 細胞内の APOBEC3B の mRNA 量を指標とした系をスクリーニング系とした。

(2) APOBEC3B 発現抑制食品成分のスクリーニング

大腸癌細胞株 HT-29 を 6 well plate に培養し、市販の天然化合物ライブラリーの化合物を一つずつ添加した。24 時間後、HT-29 細胞を回収し、定量 RT-PCR 法を用いて APOBEC3B の mRNA 量を測定し、網羅的に変動を解析した(図 3)。

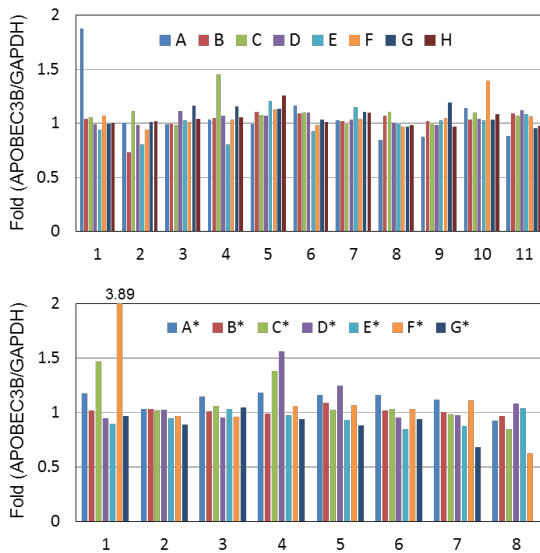


図3. APOBEC3B発現抑制天然化合物のスクリーニング

その結果、APOBEC3B の mRNA 量を減少させる天然化合物が 2 つ見出された。また、APOBEC3B の mRNA 量を逆に増加させる天然化合物も 4 つ見出された。

(3) スクリーニングのヒット化合物の評価

① APOBEC3B の mRNA 量を増加させた天然化合物の評価

(2)のスクリーニングにおいて、APOBEC3B の mRNA 量を増加させる可能性が見出された 4 つの化合物(A~D)に関して、10 μ M と 30 μ M の濃度で HT-29 細胞に添加し、再度 APOBEC3B

mRNA 量への影響を解析した(図 4)。

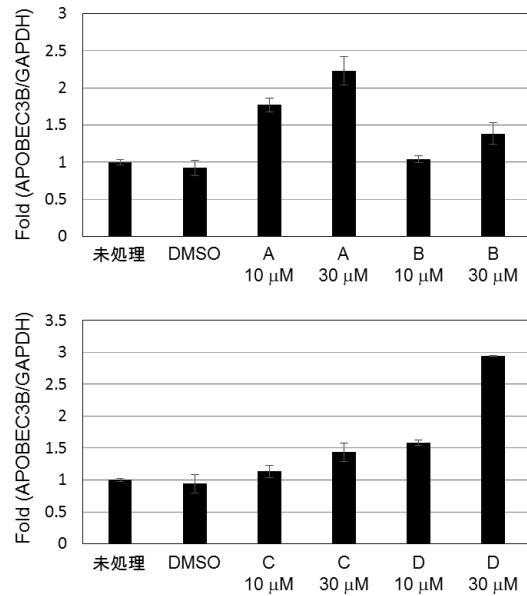


図4. APOBEC3BのmRNAを増加させた天然化合物の評価

その結果、再現良く、APOBEC3B の mRNA 量を 2 倍以上に増加させてしまう天然化合物が 2 つ(化合物 A, D)見出された(図 4)。これらの天然化合物は、遺伝子変異の原因になりうる APOBEC3B の発現を上昇させる可能性があるため、がん予防の観点から暴露を避けるべき化合物であるかもしれない。

② APOBEC3B の mRNA 量を減少させた天然化合物の評価

APOBEC3B の mRNA 量を減少させる可能性が見出された 2 つの化合物に関して、化合物 E を 25 μ M と 50 μ M で、化合物 F を 12.5 μ M と 25 μ M で HT-29 細胞に添加し、24 時間後、定量 RT-PCR 法を用いて APOBEC3B の mRNA 量への影響を評価した。その結果、低濃度側の濃度でも、APOBEC3B の mRNA 量を約半分に減少できることが明らかになった(図 5)。

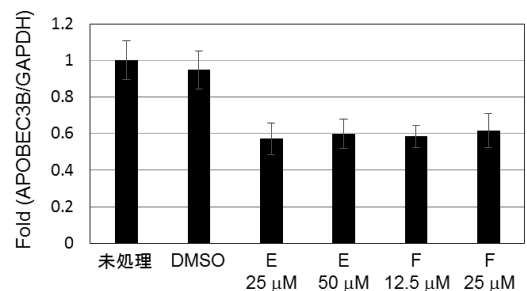


図5. APOBEC3BのmRNAを減少させた天然化合物の評価 (mRNAレベル)

そこで、これらの化合物を 24 時間添加した後、ウエスタンブロッティング法により細胞内の APOBEC3B タンパク質量への影響を解析した。その結果、添加 24 時間では APOBEC3B

タンパク質量を減少させることができないことが明らかになったため、さらに 48 時間でも評価したが APOBEC3B タンパク質量は減少しなかった(図6)。結果として、本研究の目標としていた APOBEC3B のタンパク質量を減少させる天然化合物は見出されなかった。

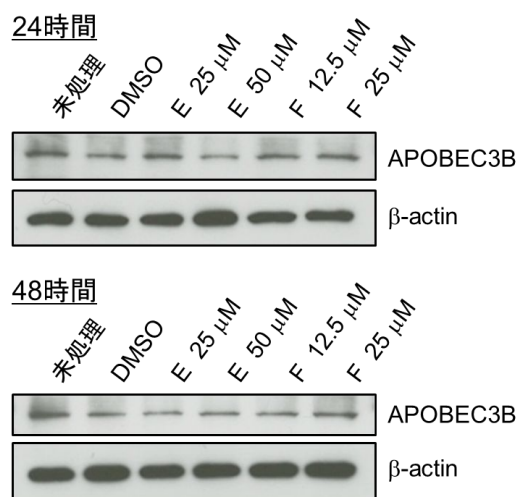


図6. APOBEC3BのmRNAを減少させた天然化合物の評価 (タンパク質レベル)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯泉 陽介 (Iizumi, Yosuke)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・
助教
研究者番号: 20533178

(2) 研究協力者

今井 綾香 (Imai, Ayaka)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・
大学院生

後居 和佳奈 (Goi, Wakana)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・
研究補助員