

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07793

研究課題名(和文) がん細胞特異的細胞死誘導効果を持つ新奇褐藻由来抽出物の抗腫瘍効果に関する基盤研究

研究課題名(英文) Basic study on antitumor effects of the extracts derived from novel brown algae with a cancer cell-specific cell death inducing effect.

研究代表者

照屋 輝一郎 (Teruya, Kiichiro)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：10273971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：酵素消化低分子化フコイダン抽出物(LMF)のがん細胞特異的な抗腫瘍効果の検討を行った。その結果、がん細胞におけるPD-L1の発現抑制効果をはじめ、がん形質がLMFにより抑制されることが確認された。各種抗がん剤とLMFの併用処理が有効であることが見出された。またデスレセプターFasやDR4 (TRAILR1)の発現誘導、Caspase-3, 8の活性化が認められ、アポトーシス誘導への関与が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、新奇褐藻由来抽出物である酵素消化低分子化フコイダン抽出物(LMF)がもつ、がん細胞特異的な抗腫瘍効果の検討を行ったものである。LMFによるがん細胞のがん形質抑制やがん細胞特異的なアポトーシスの誘導を明らかにしたことが学術的意義であり、抗がん剤とLMFの併用治療の有効性が示唆され、ゆきづまりを見せている化学療法の補助薬としての臨床応用が期待される点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Low molecular weight fucoidan extract (LMF) was examined the cancer cell-specific anti-tumor effects. As results, LMF treatment suppressed the expression of PD-L1, EGFR, and VEGF, etc. It was confirmed that LMF suppressed the properties of cancer cells. It was found that combined treatment of various anticancer drugs and LMF was effective. In addition, LMF enhanced the expression of death receptors Fas and DR4 (TRAILR1), and the activation of caspase-3 and 8 were observed by LMF treatment. It was suggested that LMF contributed the apoptosis induction in cancer cells.

研究分野：食品科学

キーワード：抗腫瘍効果 フコイダン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは我が国における死因の約 1/3 を占める。特に進行がんの治療は極めて難しいのが現状である。がん治療の三大療法である外科療法、放射線療法、化学療法のいずれも患者に対し副作用など強いストレスを与えるため免疫力を低下させ、場合によってはがんの進行を促進させることが知られている。副作用が少なく、多くの固形がんにも有効な新規の抗がん剤および抗がん治療補助剤の開発が喫緊の課題となっている。

フコイダンはコンブ、メカブ、モズクなどの褐藻類から有機酸で抽出される硫酸化フコースを主成分とする粘質多糖類の総称であり、がん細胞特異的アポトーシス誘導効果、血管新生抑制効果、腫瘍免疫増強作用の他、多彩な効果が報告されている。こうしたフコイダンの多面的な機能が、一面的に作用する分子標的医薬と異なり、変異しやすいがん細胞に対して効果的に作用すると考えられた。トンガ王国産モズク (*Cladosiphon novae-caledoniae* Kylin) フコイダンをグリコシダーゼなどで消化・低分子化した酵素消化低分子フコイタン抽出物 (以下、LMF) の臨床例として、肺への多発性転移を起こしたステージ IVb の末期肝臓がん患者が LMF のみの飲用で 2 ヶ月後に腫瘍マーカーが正常化し、半年後には転移がんを含めて全身からがんが完全に消失した 3 症例が、久留米大学医学部消化器内科より報告された [1]。

LMF は培養ヒト正常線維芽細胞 TIG-1 の増殖は抑制しなかったが、検討した全てのヒト由来がん細胞の増殖を顕著に抑制し、細胞死を誘導した。また、LMF 処理によりマンノース認識レクチンであるコンカナバリン A (ConA) に対する反応性のがん細胞特異的に増強され、がん細胞アポトーシスが増強された。LMF はがん細胞の転移・浸潤能と密接に関連する酵素 GnT-V および転写因子 Ets-1 の遺伝子発現を顕著に抑制した [2]。

2. 研究の目的

本研究では、がんの化学療法の補助食品としての応用を目的として、新奇褐藻由来抽出物である酵素消化低分子化フコイタン抽出物 (LMF) がもつ、がん細胞特異的な抗腫瘍効果の検討を行った。特に糖鎖機能改変機構に関わる LMF の生理機能、がん細胞形質に関わる LMF の生理機能の検討、ならびにがん細胞へのアポトーシス誘導に関わる LMF の生理機能の検討を行った。ならびにがん治療の現場において広く使用されている抗がん剤と LMF の併用により抗がん剤の副作用を軽減しつつ抗腫瘍効果を高めるといふ臨床上有用な医療法に対する基礎的知見を得ることも目的とした。

3. 研究の方法

酵素消化低分子化フコイタン抽出物 (LMF) は第一産業株式会社 (大阪) から入手したものを使用した。LMF を 8,000 × g、4 の条件下で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。これを 121、20 分間オートクレーブ滅菌したものを実験に用いた。実験にはヒト結腸腺がん由来 HCT116 細胞、ヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞、ヒト前骨髄性白血病由来 HL60 細胞、ヒト正常線維芽細胞 TIG-1 細胞を使用した。各細胞の増殖は細胞数の計測、ならびに WST-1 assay により測定した。細胞の遺伝子発現は RT-PCR により評価し、タンパク質発現は western blotting 等により評価した。

4. 研究成果

細胞ががん化すると糖鎖合成不全が起こり、腫瘍マーカーに利用されている様な変化した構造の糖鎖が発現する。糖鎖異常とがんの悪性形質には正の相関関係が見られることは古くから知られている。そこで、がんの悪性化への関与が報告されている β -1,6-GlcNAc 分岐鎖を生成する糖転移酵素 *N*-acetylglucosaminyltransferase V に注目し、その上流因子の Ets-1 のさらに上流にあるシグナル経路に及ぼす LMF の効果を検討した。糖転移酵素の制御因子である Ets-1 は Wnt/ β -カテニンシグナル系による制御が知られており、これらの分子の関与をタンパク質発現レベルで western blotting 法を用いて検討を行った。ヒト結腸腺がん由来 HCT116 細胞に LMF 処理を行い β -カテニン発現に及ぼす効果を検討したところ、LMF 処理における β -カテニンのタンパク質発現量変化はほとんど見られず、LMF 処理による糖転移酵素発現制御には他の制御因子の関与が示唆された。

抗がん剤と LMF の併用による抗がん効果の増強効果の検討を行った。臨床で広く使用されている白金製剤系抗がん剤の一つであるカルボプラチン (CBDCA) を HCT116 細胞へ処理する際に LMF の併用処理を行うとがん細胞の細胞死誘導効果を CBDCA と LMF が共同的に増強することが確認された (図 1)。そこで HCT116 細胞を用いて CBDCA と LMF の併用処理を行った場合の細胞周期解析を行った。その結果、CBDCA の単独処理では細胞周期の G₁ 期の減少と G₂/M 期の増加が誘導された。一方 LMF の単独処理では CBDCA 処理のような強い効果は見られなかった。CBDCA と LMF を併用処理した場合は CBDCA 単独処理よりも G₁ 期の減少と G₂/M 期の増加が顕著になっており、CBDCA が及ぼす効果を LMF 処理が増強しているという結果が得られた (表 1)。また併用処理時の Sub G₁ 期の増加は細胞死が強く誘導された結果と考えられた。ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 細胞に低レベル濃度 (10 μ g/mL 以下) の LMF 処理を行ったところ、細胞にアポトーシスは誘導されないものの HT1080 細胞が有するがん形質に対する抑制効果があることが明らかとなった。低レベル濃度の LMF 処理を行った HT1080 細胞において、上皮成長因子受容体 (EGFR)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、Rho A、そして Rho B の遺伝子発現を

定量 RT-PCR で評価したところ、Rho B を除く全ての遺伝子は下方制御され、Rho B は上方制御されていた (図 2)。がん化に伴い、EGFR 発現上昇、VEGF 発現上昇、Rho A 発現上昇、そして Rho B の発現低下が見られることが知られており、HT1080 細胞におけるこれらの遺伝子発現の変化は、低レベル濃度 LMF 処理が HT1080 細胞のがん形質に対して抑制効果を示したものと考えられた。

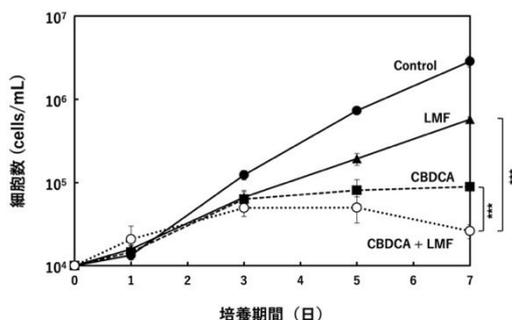


図 1. HCT116 細胞に対する LMF と CBDCA の細胞増殖抑制効果

HCT116 細胞に CBDCA 10 μ g/mL、LMF 1 mg/mL、CBDCA 10 μ g/mL + LMF 1 mg/mL の処理を行い、細胞数を測定した。 (***: $p < 0.001$)

表 1. HCT116 細胞の細胞周期解析結果

	Sub G ₁ (%)	G ₁ (%)	G ₂ /M (%)
Control	2.15	42	25.5
CBDCA 10 μ g/mL	<u>6.3</u>	<u>31.3</u>	<u>43.5</u>
LMF 1 mg/mL	4.1	36.1	21.5
CBDCA 10 μ g/mL + LMF 1 mg/mL	<u>20.2</u>	<u>13.7</u>	<u>57.5</u>

HCT116 細胞に CBDCA 10 μ g/mL、LMF 1 mg/mL の単独および併用処理を行い 72 時間培養した後、細胞周期解析を行った。

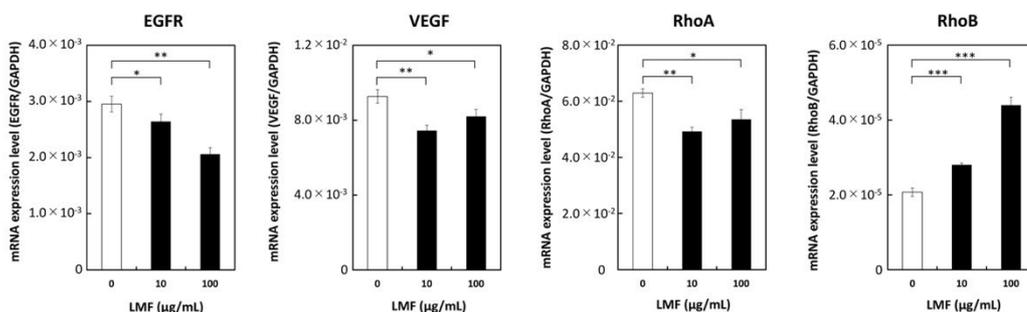


図 2. 低レベル濃度 LMF 処理が EGFR、VEGF、Rho A/B の遺伝子発現に及ぼす効果

LMF 処理 24 時間後の HT1080 細胞における mRNA 発現量を定量 Real-time PCR 法によって解析した。 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

さらに HT1080 細胞におけるこの低レベル LMF 処理はがん細胞が生体の免疫から回避するための PD-L1 の遺伝子発現を下方制御することが確認された (図 3)。この結果よりがん細胞の免疫チェックポイントを利用した免疫回避を抑制できる可能性が示唆された。

また、抗がん剤と LMF の併用による抗がん効果の増強効果の検討を行った。HT1080 細胞や他のがん細胞株において、抗がん剤カルボプラチン、パクリタキセル、ドキシソルピシン、ゲムシタピンと LMF の併用処理を行ったところ、併用処理を行うことでがん細胞死誘導効果が増強されることが確認されたが、抗がん剤の作用機構の違いやがん細胞株の種類によりがん細胞死誘導効果の感受性に違いがあることが確認された。

アポトーシス誘導に関わる LMF の生理機能の検討ではアポトーシス経路がよく知られているヒト前骨髄性白血病由来 HL60 細胞を使用し検討を行った。HL-60

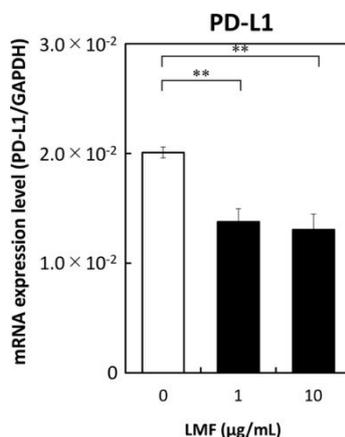


図 3. 低レベル濃度 LMF 処理が PD-L1 遺伝子の発現に及ぼす効果

LMF 処理 24 時間後の HT1080 細胞における mRNA 発現量を定量 Real-time PCR 法によって解析した。 (**: $p < 0.01$)

細胞に LMF 処理を行った後、アポトーシス実行の鍵となる Caspase-3 の活性化について検討したところ、活性型の Cleaved Caspase-3 の増加が確認された(図 4A)。また細胞外からのアポトーシスシグナルを中継する Caspase-8 に関して調べたところ、活性型の Cleaved Caspase-8 の増加が確認された(図 4B)。

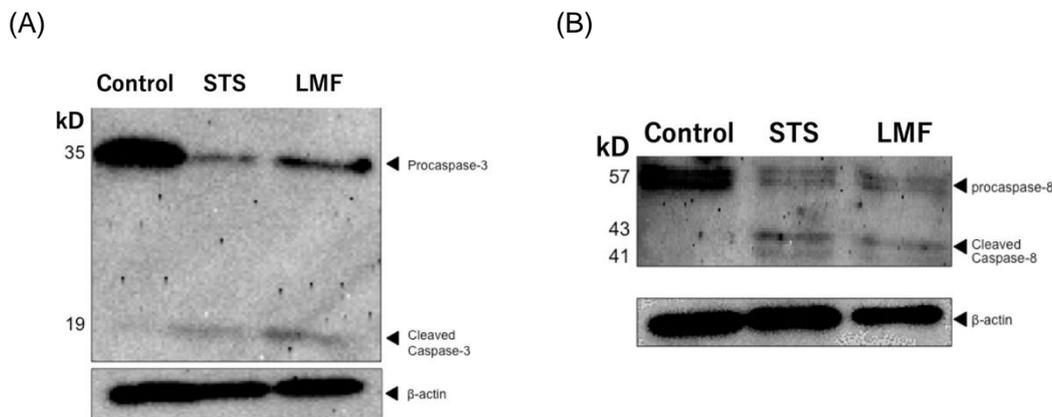


図 4. LMF 処理が Caspase 3 (A) および Caspase 8 (B) に及ぼす効果

LMF 処理 (1 mg/mL) 24 時間後の HL60 細胞の Caspase 3 (A) ならびに Caspase 8 (B) を western blotting 法によって解析した。(STS: 1 μ M Staurosporine 処理)

そこで細胞外からの細胞死を伝達するシグナル分子である TNF- α 、FasL、TWEAK、そして TRAIL などデスリガンドとそれらに対応するデスレセプターの mRNA の発現量を RT-PCR により調べた。主なデスリガンド/デスレセプターの組み合わせは、TNF- α /TNFR-1、FasL/Fas、TWEAK/DR3、TRAIL/DR4、DR5、未同定/DR6 である。RT-PCR の結果、LMF 処理時間に依存した TNF- α と TRAIL のデスリガンドの mRNA 発現増大が確認されたが FasL と TWEAK の発現は確認できなかった(図 5A)。デスレセプターに関しては、LMF 処理時間に依存した Fas と TRAIL レセプター DR4 の発現量増大が確認され、TNFR-1 では恒常的な発現が見られた(図 5B)。DR3、DR5、DR6 に関しては発現が確認できなかった。

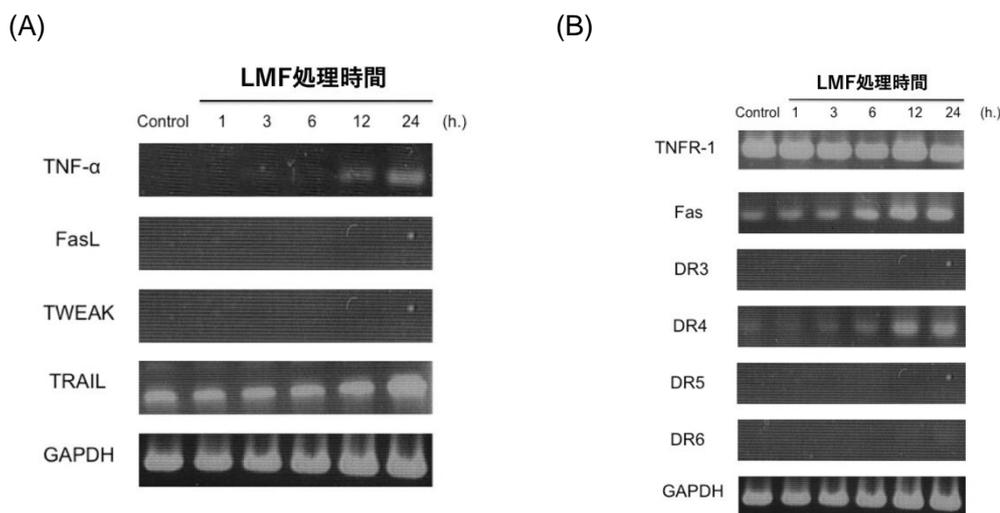


図 5. LMF 処理が HL60 細胞のデスリガンド遺伝子の発現 (A) およびデスレセプター遺伝子の発現 (B) に及ぼす効果

LMF 処理 1, 3, 6, 12, 24 時間後の HL60 細胞における各遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR 法によって解析した。

LMF 処理により時間依存的なデスレセプター Fas の発現が増大していたことから、Fas の中和抗体の処理で HL60 細胞のアポトーシスが阻害されるかを HL60 細胞の Caspase-3/7 活性の測定により検討した。FasL または LMF の単独処理で Caspase-3/7 活性の上昇が確認され、両者の併用で更なる Caspase-3/7 活性の上昇が認められた。Fas 中和抗体を用いた場合、Fas 中和抗体処理により FasL によるアポトーシス誘導は阻害されたが、LMF 処理による Caspase-3/7 活性の上昇は阻害されなかった(図 6)。その結果、LMF は FasL/Fas 以外の経路を主に使用することが考えられた。

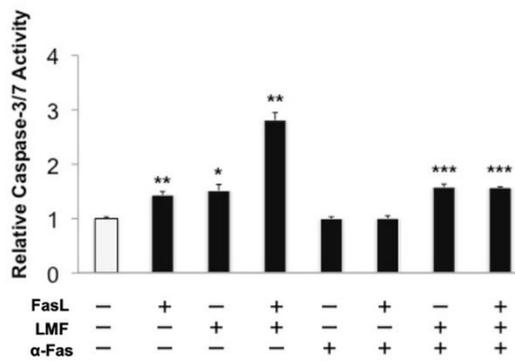


図 6. FasL タンパク質および Fas 中和抗体を用いた Fas シグナル伝達経路の関与

1 μg/mL FasL タンパク質、0.5 μg/mL Anti-Fas 中和抗体、および 0.5 mg/mL LMF を HL-60 細胞に 18 時間処理し、細胞の Caspase-3/7 活性を測定した。(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. Control)

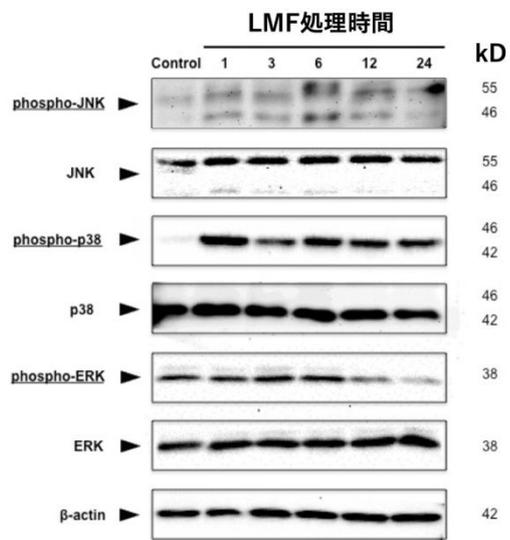


図 7. LMF 処理が HL60 細胞の MAP キナーゼリン酸化状態に及ぼす効果

LMF 処理 1, 3, 6, 12, 24 時間後の HL60 細胞の各 MAP キナーゼリン酸化状態を western blotting 法によって解析した。

また HL60 細胞への LMF 処理でアポトーシス関連タンパク質である Bax の発現増大と Bcl-2 の発現抑制も確認されたことより、ミトコンドリアを介したアポトーシスの関与も考えられた。また MAP キナーゼタンパク質のリン酸化状態を western blotting で検討した結果、処理 1 時間以内での p38 のリン酸化、および 6 時間をピークとした JNK のリン酸化が確認された。はタンパク質リン酸化が増加していたが ERK のタンパク質リン酸化は抑制されていた。一方、ERK は処理 6 時間以降でリン酸化レベルの減少が認められた (図 7)。

以上のように、本研究では LMF が持つがん細胞の糖鎖機能改変、抗がん剤併用時のがん細胞抑制の増強効果、がん細胞のがん形質の抑制効果、がん細胞へのアポトーシス誘導機構に関して新たな知見を得た。

< 参考文献 >

1. 高田ら：フコイダン投与が著効したステージ 4b 肝細胞癌の一例。第 42 回日本肝癌研究会，2006 年 7 月発表。
2. Teruya, K. et al.: Cancer Cell-specific Apoptosis Induction and Alteration of Cell Surface Sugar Chain Structures by Low Molecular Weight Fucoidan Extract. IUFOST 2014, 17th World Congress of Food Science and Technology, 2014 年 8 月発表。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Teruya Kiichiro, Kusumoto Yoshihiro, Eto Hiroshi, Nakamichi Noboru, Shirahata Sanetaka	4. 巻 17
2. 論文標題 Selective Suppression of Cell Growth and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in HT1080 Fibrosarcoma Cells by Low Molecular Weight Fucoidan Extract	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 421-421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/md17070421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hidenori Takahashi, Mitsuhiko Kawaguchi, Kunihiro Kitamura, Seiji Narumiya, Munenori Kawamura, Isamu Tengan, Shinji Nishimoto, Yasuo Hanamura, Yasuo Majima, Shuichi Tsubura, Kiichiro Teruya, Sanetaka Shirahata	4. 巻 17
2. 論文標題 An Exploratory Study on the Anti-inflammatory Effects of Fucoidan in Relation to Quality of Life in Advanced Cancer Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Integrative Cancer Therapie	6. 最初と最後の頁 282-291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1534735417692097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本 真奈、徳永 佐和、江藤 博、照屋 輝一郎
2. 発表標題 がん幹細胞に対する酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗がん剤の併用効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下 将人、本郷 玲奈、大友 剛、徳丸 浩一郎、照屋 輝一郎
2. 発表標題 発酵乳ケフィアが筋肉細胞に及ぼす効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大河内 公一、江藤 博、照屋 輝一郎
2. 発表標題 がん細胞の多剤耐性に及ぼす酵素消化低分子化フコイダン抽出物の効果
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大河内 公一、江藤 博、照屋 輝一郎
2. 発表標題 細胞多剤耐性に及ぼす酵素消化低分子化フコイダン抽出物の効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相星 晴佳、大友 剛、徳丸 浩一郎、白畑 實隆、照屋 輝一郎
2. 発表標題 発酵乳ケフィアが筋肉細胞のミトコンドリア機能に及ぼす効果
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立岩 宏彬、宮本 菜摘、江藤 博、白畑 實隆、照屋 輝一郎
2. 発表標題 酵素消化低分子化フコイダン抽出物とナタマメ抽出物の併用による抗腫瘍作用の増強
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎 健、江藤 博、白畑 實隆、照屋 輝一郎
2. 発表標題 酵素消化低分子化フコイダン抽出物とケトン体併用による抗腫瘍効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本郷 玲奈、松元 拓也、徳丸 浩一郎、白畑 實隆、照屋 輝一郎
2. 発表標題 発酵乳ケフィアが筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 照屋 輝一郎、白畑 實隆
2. 発表標題 酵素消化低分子化フコイダン抽出物はがん形質関連遺伝子の発現変化を誘導する
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考