

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05536

研究課題名(和文) がんの予後改善に向けた新戦略：食品成分による浮遊細胞へのアノキス誘導機序の検討

研究課題名(英文) The new strategy for improving of cancer prognosis - The investigation of the mechanism of food components inducing anoikis in floating cells-

研究代表者

遠藤 弘史 (Endo, Hiroshi)

滋賀県立大学・人間文化学部・准教授

研究者番号：30567912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：標準的ながん治療に用いられる抗癌剤や放射線照射は、上皮型癌細胞には大きな抑制効果を示すが、転移・再発の大きな要因である癌幹細胞(CSC)と間葉系に変化した癌細胞(EMT癌細胞)には効果が低いことが明らかとなってきた。がんの予後を決める転移や再発・浸潤は、CSCとEMT癌細胞に対して効果的に細胞死を誘導できるかが重要な課題となっている。本研究では食品成分であるクルクミンやヘスペレチンが上皮型癌細胞の癌細胞の増殖だけでなく、転移や浸潤に関わる因子の発現を抑制すること、およびその詳細な細胞内メカニズムを明らかとした。このことは、転移や再発を抑制する新たな機序の抗癌剤開発の可能性を有している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在日本人の死因の一位は悪性新生物であり、がんによる死亡者は増加の一途をたどっている。その主な理由として、外科的切除やがん化学療法、放射線治療などの標準治療によって局所的、一時的には縮小させることができるが、再発や転移を完全に抑制できないことが挙げられる。本研究では癌細胞の生存に関わる因子としてストレスタンパク質に着目し、これらの発現量を抑制することができる食品成分(クルクミン、ヘスペレチン等)を見出した。これらの成分は癌細胞の細胞死を誘導できるだけでなく、転移や再発も抑制することも明らかとした。このことは癌の転移や再発の抑制をターゲットとした抗癌剤の開発の基礎データになると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although anticancer drugs or irradiation which are used in standard of care for cancer have a significant inhibitory effect on epithelial-type cancer cells, they are less effective against cancer stem cells (CSCs) and mesenchymal-transformed cancer cells (EMT cancer cells), which are major factors in metastasis and recurrence. Metastasis, recurrence, and invasion are prognostic factors in cancer, and the ability to effectively induce cell death in CSC and EMT cancer cells is an important issue. In this study, we found that curcumin and hesperetin suppressed not only cancer cell proliferation but also the expression of factors involved in metastasis and invasion in epithelial cancer cells. These findings have potential for the development of anticancer drugs with novel mechanisms to inhibit metastasis and recurrence.

研究分野：病態栄養学

キーワード：がん転移 がん再発 食品成分 ストレスタンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本においてがんは1981年から死因の第一位であり、日本人の約3割ががんで亡くなっている。新しい医療技術や薬剤が開発されている現状にもかかわらず、がんによる死亡者は年々増加している。その主な理由として、がんは外科的切除やがん化学療法、放射線照射などによるコンベンショナルな治療によって局所的、一時的には縮小させることができるが、その後の再発や転位等を完全に抑制できないことが挙げられる。転移や再発の原因として、近年、癌幹細胞仮説が提唱されている。この仮説は、腫瘍組織には通常の癌細胞の他に癌幹細胞(CSC)が存在しており、このCSCは自己複製能を有して再発の大きな要因であることが示されている。CSCは抗がん剤に対する薬剤耐性能や放射線耐性能を獲得していることが知られており、がんの治療抵抗性の要因となっている。一方、癌細胞の浸潤メカニズムにおいては、上皮系の癌細胞が間葉系へとその性質を変えて(EMT)、原発巣から離れて周囲組織に入り込んでいくことが明らかとなっている。そのため、がんの予後の改善はCSCと、EMTをおこして治療抵抗性を獲得した癌細胞にどのように細胞死を誘導させるかが課題であった。

2. 研究の目的

本研究は、がんの予後に影響するCSCとEMTをおこした癌細胞の両方を併せてAnchorage-Independent Cancer Cell Group (AICCG)と呼び、食成分がAICCGに細胞死を誘導する詳細なメカニズム明らかにすること。さらに、*in vitro*、*in vivo*の両面から抗癌剤と食成分の併用による腫瘍抑制効果の検討を行う。一方、細胞の恒常性維持に重要な役割を担っている分子としてストレス蛋白質が知られている。我々は、これらストレス蛋白質の細胞内発現量は、食品中の様々な成分でも変化してくることに着目して研究を行ってきたところ、代表的なストレス蛋白質のHsp70や14-3-3蛋白質の発現量を変化させる食成分を見出しており、このことが癌細胞の細胞周期停止や細胞死誘導を引き起こしていることを学会等で報告してきた。そこで、これら食品成分の有するストレスタンパク質発現抑制効果により、CSCとEMT癌細胞に対しても細胞死を誘導する効果を発揮するか、またその詳細なメカニズムを明らかにすることを目的とした。このことは、がんの予後を改善する新たな機序の抗癌剤開発の基礎データとなることが期待できる。

3. 研究の方法

本研究では*in vitro*と*in vivo*の両面から解析を行った。

(1) *in vitro*での解析

食品成分が浮遊癌細胞に対して抑制効果を有するかを検討するため、A549とCaco-2の抗癌剤処理と食成分処理における浮遊生存細胞数を定量的に解析した。その方法として、細胞培養上清を遠心分離して食品成分および抗癌剤の処理時間と処理濃度を変えて、トリパンブルー染色による生存細胞数計測をおこなった。この時、用いる抗癌剤は臨床で用いられるのと同様にA549にはシスプラチン、Caco-2には5-FUとした。

次にA549とCaco-2細胞を通常通り接着培養してから懸濁し、poly-HEMAで低接着化処理したディッシュ、またはCORNING社やGreiner社の低接着表面製品に播種して浮遊培養をおこなった。これにより、癌細胞集団中に含まれるAICCGが効率よく回収できるので、MTTアッセイを用いてAICCGと上皮型癌細胞における抗癌剤と食成分による細胞増殖抑制作用の差を定量的に解析した。また、これらの増殖抑制効果が細胞内のどの分子によるものなのかをウェスタンブロット法およびRT-qPCR法を用いることで、定性的かつ定量的に解析した。

(2) *in vivo*での解析

*in vivo*転移・浸潤モデル(異所性モデル)の構築をおこなった。C57BL6マウスに 1×10^6 個のマウス由来肺がん細胞株のLLCを側背部皮下に注入し、10~12日間腫瘍を形成させる。腫瘍の形成が目視できたら、抗癌剤(シスプラチン)、食成分(クルクミン・カプサイシン・ヘスペレチン)、抗癌剤と食成分併用の4パターンを5~50 mg/kgになるよう連日、腹腔に注入し、腫瘍サイズを計測してその効果を評価した。その後、解剖して肺への転移を計測し、食品成分によるがん転移抑制効果を定量的に解析した。

4. 研究成果

我々はこれまでに、食品成分の一つであるクルクミンがヒト肺がん細胞株A549に対して、アポトーシスを誘導することで癌細胞の生存率を低下させることを報告してきた。このアポトーシスの誘導は、細胞内の生存シグナル分子Aktの発現低下と、その足場タンパク質と知られている14-3-3タンパク質の発現抑制に起因していることも明らかとした。このことに加えて、ク

クルクミンは AICCG に対しても、アポトーシスを惹起させ、その生存率を低下させていることも明らかとした(図1)。AICCG においても、PI3K/Akt 経路の活性化が確認され、クルクミンはこの経路を抑制することで、AICCG に対しても細胞死誘導を引き起こしていることが明らかとなった。がん細胞が足場に依存せずに生存するために EMT を起こすことが知られている。そこで、クルクミンが EMT に対してどのような影響を与えるかを検討したところ、タンパク質レベルで、上皮型マーカーである ZO-1 の発現量を増加させ、タンパク質レベルおよび遺伝子レベルで間葉系マーカーの N-cadherin の発現を抑制することを見出した。この変化は間葉系マーカーの転写因子である β -catenin の局在を核から細胞質へと変化させていることによると示唆された。

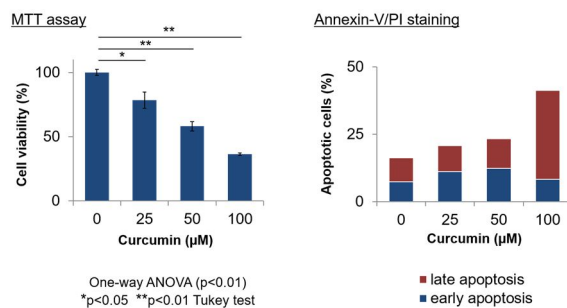


図 1

一方、クルクミンの CSC に与える影響を *in vitro* で解析を行った。A549 細胞はヒト肺がん細胞株であるので、CSC のマーカーとして CD133 を発現している細胞を CSC として検討を行った。その結果、A549 の細胞集団全体に対してクルクミンは 50 μM で、シスプラチン 20 μM と同等の細胞死誘導効果が認められた。この時、細胞集団中の CSC にのみ焦点を当てて解析を行ったところ、シスプラチンには CSC 抑制効果が認められなかったのに対して、クルクミンは CSC の数を 40%まで減少させていることが明らかとなった(図2)。この時、クルクミンは幹細胞マーカーである Sox2 と Oct4 の発現を抑制していることも見出した。

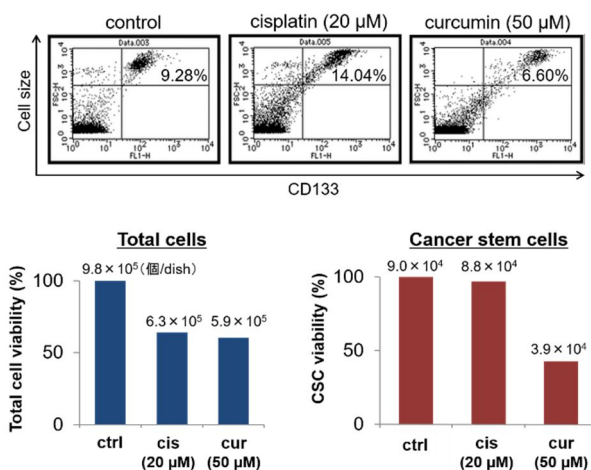


図 2

我々は、クルクミンによる上記の効果が、*in vivo* でも発揮されるのかを検討するため、マウスを用いて検討を行った。細胞はクルクミンが A549 と同様の効果を発揮することを確認したマウス肺がん細胞株 LLC を用いた。C57BL/6 マウスのメスの背部皮下に LLC を 1 × 10⁶ 個注入し、約一週間で蝕知できる腫瘍を形成させた。その後、クルクミンを 5 mg/kg になるように隔日投与し、腫瘍サイズと体重を計測した。コントロールはクルクミンを溶解させている DMSO 投与として、クルクミン群、コントロール群各 10 匹ずつ飼育した。21 日後にすべてのマウスを解剖し、皮下腫瘍サイズ、肺への転移巣数、肺重量、その他臓器への遠隔転移の有無等を評価した。その結果、原発巣のサイズと重量には有意な差は認められなかったが、肺への転移巣数において、クルクミン投与群で有意に減少していることが明らかとなった(data not shown)。

以上の事に加えて、本研究ではクルクミン以外にも癌細胞増殖を抑制する効果を有する食品成分や、CSC に対して高い現象効果を発揮する成分を見出している。このことは本研究により、これまでに存在しなかった癌の転移や浸潤を抑制する新たな機序の抗癌剤開発につながる知見を得たと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Endo Hiroshi, Inoue Izumi, Masunaka Kimiko, Tanaka Masaya, Yano Mihiro	4. 巻 84
2. 論文標題 Curcumin induces apoptosis in lung cancer cells by 14-3-3 protein-mediated activation of Bad	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2440～2447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1808443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高台 絢加、遠藤 弘史、日馬 亜希、矢野 仁康
2. 発表標題 カプサイシンによる新規癌細胞増殖抑制機構：14-3-3 を介した細胞周期停止機能についての解析
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 舛中 貴美子、遠藤 弘史、柘植 未来、矢野 仁康
2. 発表標題 クルクミンによる癌細胞死誘導メカニズムの解析ならびに浮遊癌細胞に対するアノイキス誘導効果の検討
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐草小夏、遠藤弘史、矢野仁康
2. 発表標題 ヘスベレチンの癌細胞及び癌幹細胞に対する新規抗癌作用の検討
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高台絢加, 遠藤弘史, 矢野仁康
2. 発表標題 カプサイシンによるp53-14-3-3 経路を介した細胞周期停止機能についての解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 舩中貴美子, 遠藤弘史, 矢野仁康
2. 発表標題 クルクミンによる浮遊癌細胞に対するアノキス誘導メカニズムの解析ならびに癌幹細胞抑制効果の検討
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤弘史・田中大也・佐草小夏・矢野仁康
2. 発表標題 ヘスペレチンの新規癌細胞増殖抑制機能：ストレス蛋白質 Hsp70の分解と細胞死誘導機能についての解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高村佳那・遠藤弘史・木村美海・矢野仁康
2. 発表標題 レスベラトロールによるHsp90発現抑制を介したp53活性化機構についての解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤弘史
2. 発表標題 ヘスベレチンの新規抗癌作用：癌細胞と癌幹細胞を標的とした解析
3. 学会等名 ヘスベリジン研究会 第10回研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高村佳那・遠藤弘史・木村美海・矢野仁康
2. 発表標題 レスベラトロールによるp53活性化機構の解析
3. 学会等名 第57回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高台絢加・遠藤弘史・日馬亜紀・矢野仁康
2. 発表標題 カプサイシンによる新規癌細胞増殖抑制機構：14-3-3sigmaを介した細胞周期停止機能についての解析
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 舩中貴美子・遠藤弘史・柘植未来・矢野仁康
2. 発表標題 クルクミンによる癌細胞死誘導メカニズムの解析ならびに浮遊癌細胞に対するアノイキス誘導効果の検討
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

滋賀県立大学 知のリソース
http://db.spins.usp.ac.jp/html/100000270_ja.html
知のリソース
http://db.spins.usp.ac.jp/html/100000270_ja.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------