

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16705

研究課題名(和文)日本の食文化に根差したフラボノイドによる膀胱発がん抑制

研究課題名(英文)Therapeutic effect of natural flavonoid on bladder cancer

研究代表者

飯田 啓太郎(Iida, Keitaro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：30713945

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):(1) T24は濃度依存性に増殖抑制効果を認めG2 arrestとp21の発現亢進、mTORの抑制効果を認めた。またROS産生の減少とチオレドキシン活性上昇を認め、PX-12投与により胞増殖抑制効果とmTOR抑制効果が減弱された。(2) ルテオリン投与群では膀胱癌の扁平上皮分化が抑制されていた($p<0.05$)。免疫染色では、Lut 20ppm、100ppmでKi67陽性率の低下とp-S6の発現レベルの低下を認めた。血中・尿中ルテオリン-3'-O-グルクロニド濃度はともにKi67陽性率、p-S6発現レベルと負の相関を認めた。さらに扁平上皮分化は血中濃度との相関を認めた($p<0.01$)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、膀胱癌におけるルテオリンに代表される天然食品由来の抗酸化フラボノイドの効果と安全性を立証できたため、高齢者でも安全に施行できる新たな治療法を提唱することができる。さらには食生活に根ざした食品からの摂取という点で、医療コストを抑制することもでき、予防医学の観点からも有益な研究であると言える。また、既存の薬剤との併用の可否や相乗効果についても今後検討に値すると考えられる。

研究成果の概要(英文):(1) Luteolin induced apoptosis and a dose-dependent reduction in the number of viable cells; it also increased thioredoxin activity and decreased intracellular ROS production. Luteolin downregulated phospho-S6 and they were canceled by thioredoxin inhibitor, PX-12. (2) In vivo analysis, no adverse effects were observed by oral intake of luteolin. Immunohistochemistry of tumors showed a decreased Ki67 index, and a reduction of p-S6 expression in the luteolin-treated group. Furthermore, the major findings on the metabolism of luteolin suggest that both plasma and urine luteolin-3'-O-glucuronide concentrations are strongly associated with the inhibition of cell proliferation and mTOR signaling. Moreover, a significant decrease in the squamous differentiation of bladder cancer is attributed to plasma luteolin-3'-glucuronide concentration.

研究分野：癌

キーワード：膀胱癌 フラボノイド 酸化ストレス mTOR チオレドキシン

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は、高齢者に好発する高悪性度の癌であり、最大のリスクは喫煙である。内視鏡下で完全切除しても約 80%が再発するため、医療コストが高い癌の一つである。膀胱癌の再発予防として BCG 膀胱内注入療法が確立されているが、副作用が強いため高齢者に対する適応は限られている。また膀胱内再発後の 10~30%は浸潤性癌へと進展するため、その予後は不良である。浸潤性膀胱癌の標準治療は、約 20 年前に確立されたシスプラチンを主体とする化学療法から変わっていない。その背景として、膀胱癌では高率に変異を有する特定の遺伝子がなく、数多くの遺伝子変異が混在しているため、特定の遺伝子を標的とした治療の確立は困難である。膀胱癌に対する分子標的薬の治験が今までに国内外で行われてきたが、従来の化学療法にとってかわる有効な薬剤が報告されていないのが現状である。

脂肪や牛肉の過剰摂取に伴って生じる、高インスリン血症、炎症性サイトカインの上昇や喫煙、老化といった病態は、正常細胞における酸化ストレスを増大させ、癌を発生させると考えられている。酸化ストレスは通常、処理酵素である Superoxide dismutase (SOD) や Glutathione peroxidase (GPX) といった制御因子によって抑制されており、制御因子の異常により、癌が進展することが解明されている。ルテオリンは天然フラボノイドの一種であり、日本で多く生産されているエゴマなどのシソ科の植物に多く含まれている。ルテオリンは、抗炎症作用のほか、天然フラボノイドの中でも特に強い抗酸化能を有している。私たちは、いち早くルテオリンの抗酸化作用に着目し、肝癌や前立腺癌においてその効果を検証してきた。今までに肺癌や大腸癌に対するルテオリンの抑制効果は報告されているが、膀胱癌抑制効果に注目した報告はない。

膀胱癌は、高齢者や喫煙者に好発し、病態に酸化ストレスが強く関わっていることが広く知られているが、それを治療標的とした薬剤は報告されていない。さらに膀胱癌患者における遺伝子の網羅的解析では、約 20%の患者に酸化ストレス関連遺伝子の変異が報告されており、酸化ストレスを標的とした治療薬の開発が期待されている。

私たちは、膀胱癌細胞株において、ルテオリン投与により細胞増殖が抑制されアポトーシスが誘導されていることを確認した。このことより、膀胱癌では、抗酸化剤としてのルテオリンが抑制効果を示すのではないかとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究において、膀胱癌におけるルテオリンに代表される天然食品由来の抗酸化フラボノイドの効果と安全性を検証することを目的とした。そのメカニズムを解明することで、高齢者でも安全に施行できる新たな治療法を提唱することができる。

3. 研究の方法

(1) 膀胱癌細胞株におけるルテオリン投与による抗腫瘍効果の検証

ヒト膀胱癌細胞株 T24、5637、RT4 において、ルテオリン投与下での増殖抑制効果を検討する。さらにフローサイトメトリーを用いてアポトーシスや細胞周期抑制が誘導されているかどうかを検討する。さらに細胞周期やアポトーシス、シグナル関連タンパクの発現変化を Western blotting を用いて検討した。

また T24 において、ルテオリン暴露に伴う細胞内 ROS とチオレドキシンの活性の変化を評価した。チオレドキシシン阻害剤 PX-12 を用いて、ルテオリン暴露に伴い変化したタンパク発現の変

化を検証した。

(2) 膀胱癌モデル動物におけるルテオリン経口投与による抗腫瘍効果の検証

A. 膀胱癌細胞株皮下移植モデルにおけるルテオリンの増殖抑制効果の検証

7週齢 KSN 雄ヌードマウスにラット膀胱癌細胞株 BC31 を皮下移植した。ルテオリン(100ppm)を混餌投与し、対照群にはコントロール食を投与した。各群はそれぞれ12匹とし、5週目後にサクリファイスした。

B. 膀胱癌発がんラットにおけるルテオリンの膀胱癌抑制効果の検証

6週齢の雄SDラットを用い、最初の10週間、0.05%のN-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN)を自由飲水として投与した。11週目からルテオリン(20ppm, 100ppm)を20週間混餌投与し、対照群にはコントロール食を投与した。各群はそれぞれ20匹とし、29週目に24時間尿を、サクリファイス時に血液サンプルを採取した。さらに血中と尿中の主なルテオリン代謝物であるルテオリン-3'-グルクロニド濃度を測定し、病理組織学的所見との相関を検討した。コントロール群の10匹とルテオリン100ppm群の中で血液・尿を測定十分量採取できた18匹を測定した。

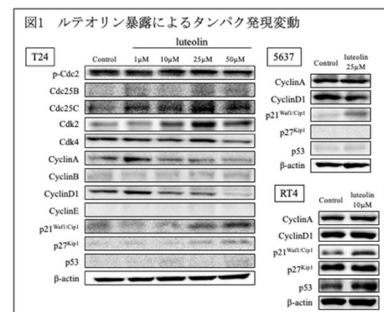
A、Bの動物実験系において、Ki67、p21、p-S6、CK5/6、GPX2(Glutathione peroxidase 2)の免疫染色を行うとともに、TUNEL染色にて細胞死シグナルの有無を検討する。また肺・肝臓・腎臓などの諸臓器も摘出し、重量及び組織変化を解析した。

4. 研究成果

(1)全ての細胞株において濃度依存性に増殖抑制効果を示した。フローサイトメトリーではアポトーシスの亢進とG2/M期でのcell cycle arrestを認めた。Western blotではp21の発現亢進とmTOR活性の指標となるphospho-S6(p-S6)の低下を認めた。

T24, 5637はp53変異株であり、p21の発現亢進作用にp53が関わっているかどうかを検証した。p53野生型のヒト膀胱癌細胞株RT4において、siRNAを用いてp53をノックダウンしルテオリンに暴露したところ、p21の発現亢進を認めた。以上よりルテオリンは、p53の発現に関わらずp21の発現亢進をきたすことが示された。

ルテオリン暴露に伴いチオレドキシン活性は上昇し、細胞内ROSは減少していた。そしてT24にルテオリンに暴露した後に、チオレドキシン阻害剤PX-12を加えると、mTOR活性の抑制作用がコントロールと比べて早期にキャンセルされた。以上よりルテオリンの増殖抑制効果のメカニズムは、チオレドキシンを介したmTOR活性の抑制であると考えられた。

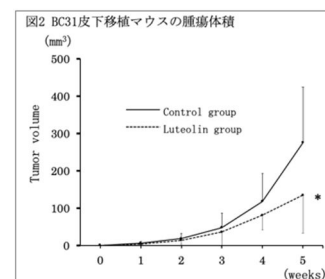


(2) 膀胱癌細胞株皮下移植モデル

腫瘍体積はルテオリン投与群で有意に小さく、腫瘍の免疫染色ではKi67陽性率の低下、TUNEL陽性細胞の上昇を認めた。さらに免疫染色ではルテオリン投与群ではp21の発現上昇とp-S6の発現低下を認めた。

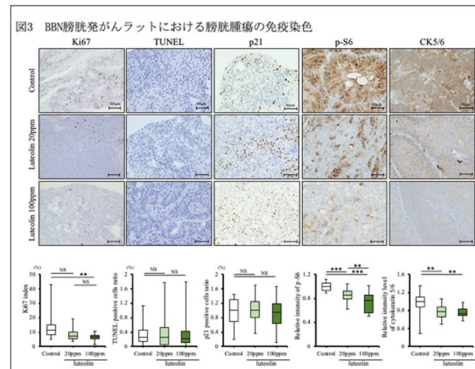
膀胱癌発がんラット

60匹全例で膀胱癌が認められ、ルテオリン投与群で腫瘍重量が小さい傾向を認めたが有意差はなかった。腫瘍の免疫染色では、ルテオリン投与群(20ppm, 100ppm)でKi67陽性率の低下とp-S6の発現レベルの低下を認めた。さらに扁平上皮分化を認



めたのはそれぞれ 16、12、8 匹（コントロール群、ルテオリン 20ppm 群、同 100ppm 群）であった ($p < 0.05$)。また扁平上皮分化のマーカである Cytokeratin5/6 の発現が、ルテオリン投与群 (20ppm、100ppm) において低下していた。以上よりルテオリンは有意に扁平上皮分化を抑制したと考えられた。血中・尿中ルテオリン-3'-グルクロニド濃度はともに Ki67 陽性率と中等度の負の相関を認め ($r = -0.31, p = 0.11$, $r = -0.41, p = 0.03$)、p-S6 発現レベルとは強い負の相関を認めた ($r = -0.60, p < 0.001$, $r = -0.62, p < 0.001$)。さらに扁平上皮分化との相関を検討したところ、血中濃度との相関を認めた ($p < 0.01$)。

本研究においてルテオリンは、膀胱癌に対して増殖抑制効果と扁平上皮分化抑制作用を有し、そのメカニズムとしてチオレドキシンを介した mTOR 抑制作用、p21 の発現亢進が認められた。ルテオリンは、天然食物由来の膀胱癌の治療薬としての可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagai Takashi, Naiki Taku, Iida Keitaro, Nozaki Satoshi, Etani Toshiki, Sugiyama Yosuke, Ando Ryosuke, Yanase Takahiro, Chaya Ryosuke, Moritoki Yoshinobu, Kobayashi Daichi, Akita Hidetoshi, Okamura Takehiko, Kawai Noriyasu, Yasui Takahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Skeletal muscle mass reduction velocity as a simple prognostic indicator for patients with metastatic urothelial carcinoma receiving second-line chemotherapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asian Pacific Journal of Cancer Prevention	6. 最初と最後の頁 2995-3000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31557/APJCP.2019.20.10.2995.	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 Etani Toshiki, Naiki Taku, Naiki-Ito Aya, Suzuki Takayoshi, Iida Keitaro, Nozaki Satoshi, Kato Hiroyuki, Nagayasu Yuko, Suzuki Shugo, Kawai Noriyasu, Yasui Takahiro, Takahashi Satoru	4. 巻 8
2. 論文標題 NCL1, A Highly Selective Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apoptosis and Autophagy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 E442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8040442	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 Naiki Taku, Naiki-Ito Aya, Iida Keitaro, Etani Toshiki, Kato Hiroyuki, Suzuki Shugo, Yamashita Yoriko, Kawai Noriyasu, Yasui Takahiro, Takahashi Satoru	4. 巻 9
2. 論文標題 GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 15847, 15859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24627.	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Naiki Taku, Naiki-Ito Aya, Etani Toshiki, Iida Keitaro, Ando Ryosuke, Nagai Takashi, Kawai Noriyasu, Takahashi Satoru, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Luteolin suppresses androgen receptor splice variant 7 expression via mirna recruitment in castration-resistant prostate cancer
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iida Keitaro, Naiki Taku, Nagai Takashi, Nozaki Satoshi, Etani Toshiki, Ando Ryosuke, Akita Hidetoshi, Okamura Takehiko, Kuhota Hiroki, Kawai Noriyasu, Yasui Takahiro
2. 発表標題 The impact of a past medical history of upper urinary tract urothelial carcinoma on failure cases of bacillus Calmette Gurin intravesical instillation therapy
3. 学会等名 34th Annual EAU Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naiki Taku, Naiki-Ito Aya, Etani Toshiki, Iida Keitaro, Ando Ryosuke, Nagai Takashi, Kawai Noriyasu, Takahashi Satoru, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Luteolin regulates AR-V7 expression via miRNA recruitment in castration-resistant prostate cancer
3. 学会等名 34th Annual EAU Cong (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯田 啓太郎、内木 拓、内木 綾、恵谷 俊紀、安藤 亮介、河合 憲康、高橋 智、安井 孝周
2. 発表標題 Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of thioredoxin activity and mTOR pathway (ルテオリンはチオレドキシン活性とmTORシグナルを介して膀胱がんの増殖抑制を引き起こす)
3. 学会等名 第78回癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯田 啓太郎、内木 拓、内木 綾、野崎 哲史、恵谷 俊紀、安藤 亮介、河合 憲康、高橋 智、安井 孝周
2. 発表標題 天然フラボノイド「ルテオリン」による膀胱がん抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯田 啓太郎、内木 拓、内木 綾、田中 勇太郎、恵谷 俊紀、安藤 亮介、河合 憲康、高橋 智、安井 孝周
2. 発表標題 ルテオリンの膀胱がん抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Keitaro Iida, Taku Naiki, Aya Naiki, Toshiki Etani, Ryosuke Ando, Noriyasu Kawai, Satoru Takahashi, Takahiro Yasui
2. 発表標題 Preventive and therapeutic effects of the natural flavonoid "luteolin" on bladder cancer.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 飯田 啓太郎、内木 拓、内木 綾、野崎 哲史、恵谷 俊紀、安藤 亮介、河合 憲康、戸澤 啓一、高橋 智、安井 孝周
2. 発表標題 天然フラボノイド「ルテオリン」による膀胱がん抑制メカニズムの解明。
3. 学会等名 第28回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2019年～2020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
---------------------------	-----------------------	----

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