

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17355

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーによるコーヒー成分の大腸癌予防メカニズムの解明

研究課題名(英文) Reserch into the mechanism how coffee prevents colorectal cancer using chemical biology approach

研究代表者

渡邊 元樹 (Watanabe, Motoki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40723581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コーヒー含有成分のカフェ酸が、複数のヒト大腸がん細胞株に対し、G1期細胞周期進行に重要なcyclin D1の発現を抑制し、コロニー形成を著明に抑制することを明らかにした。さらにケミカルバイオロジーの技術を用いて、カフェ酸の新規結合タンパク質としてPHB2とRPS5を同定した。siRNAによるPHB2及びRPS5の発現枯渇は、カフェ酸処理と同様に、cyclin D1の発現を抑制し、大腸がん細胞のコロニー形成を抑制した。以上より、カフェ酸は、大腸がん細胞内において、PHB2及びRPS5に結合し、cyclin D1の発現を減少させることで増殖抑制効果を示すと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、コーヒー含有成分のカフェ酸が大腸がん細胞内において、2種のタンパク質PHB2とRPS5に結合することにより、大腸がん細胞の増殖を抑制することを見出した。がんの一次予防において、飲食物や嗜好品の摂取習慣が発がんリスクに大きく影響することが明らかとされるなか、コーヒー含有成分によるがん抑制機序の一端を明らかにした本研究は、発がんの本質を理解し、理論的根拠に基づいた実践的ながん予防法を確立するうえにおいて、その意義は大きい。またコーヒーという嗜好品レベルから、分子レベルの作用機序に落とし込むことにより、PHB2やRPS5を標的とした他の食品成分に代替したがん予防の可能性も期待される。

研究成果の概要(英文)：In recent years, increasing attention has been paid to the correlation between coffee intake and the prevention of colorectal cancer (CRC) in epidemiological studies; however, the mechanism(s) how coffee may contribute to the prevention of CRC is not well characterized. Here we show that caffeic acid, a component of coffee, suppressed the colony formation of human colorectal cancer cells with reduction in the expression of cyclin D1, which is well known to be crucial to cell cycle progression in cancer cells. Furthermore, we identified novel two caffeic acid-binding proteins PHB2 and RPS5 using chemical biology approach. The depletions of PHB2 or RPS5 also reduced cyclin D1 and suppressed the colony formation of cells. Thus, we clarified the molecular mechanisms by which caffeic acid can bind and inhibit PHB2 and RPS5, resulting in downregulation of cyclin D1 and suppression of CRC cell growth.

研究分野：がん予防医学 腫瘍生物学 ケミカルバイオロジー

キーワード：がん予防 大腸がん ケミカルバイオロジー コーヒー カフェ酸 prohibitin2 ribosomal protein S5 cyclin D1

1. 研究開始当初の背景

本邦において大腸がんは、罹患率は悪性腫瘍のなかで第1位(2017年がん統計)、死亡率も第2位(2019年がん統計、女性では第1位)と国民の生命を脅かす悪性腫瘍として、その抜本的な予防対策の必要性が最も必要とされる疾患のひとつである。疫学的にも大腸がんの様々なリスク因子が解析されているなか、かねてより欧米では「コーヒーの常飲が大腸がんの発症リスク低下に寄与する」という報告が散見されおり(*Am.J.Epidemiol.* 147: 1043-1052, 1998, *Cancer Lett.* 244: 260-267, 2006)、欧米人と体形や生活習慣が異なる本邦においても、女性の結腸がんにおいて、コーヒー摂取によるリスク低下(*Int.J.Cancer* 121:1312-1318, 2007, *Int.J.Cancer* 15;143(2):307-316, 2018)や男性において大腸腺腫発生の抑制(*Eur.J.Cancer Prev.* 25: 388-394, 2016)が報告されており、そのがん予防効果に注目が寄せられている。しかしながら、その分子メカニズムについては十分解明されておらず、コーヒー摂取による大腸がん予防効果の全貌解明とエビデンス確立には、前述のコホート研究の継続に加え、実験系衛生学による作用機序研究の両輪が協調することが不可欠である。これまでコーヒーによるがん抑制効果のメカニズムのひとつとして、抗酸化作用によるものと想定されてきたが、明確なエビデンスは得られていない。がんの一次予防において、飲食物や嗜好品の摂取習慣が発がんリスクに大きく影響することが明らかとされるなか、コーヒーのがん抑制効果の分子メカニズムを明らかにする意義は、発がんの本質を理解するうえにおいても大きい。

2. 研究の目的

本研究課題は、コーヒー摂取による大腸がん予防効果の全貌解明とエビデンス確立に向けて、コーヒー含有成分による大腸がん予防の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。本研究課題はケミカルバイオロジーの先端技術を駆使して、コーヒーに含有される生理活性成分の大腸がん細胞内での結合タンパク質を同定することで、「コーヒーによる大腸がん予防メカニズム」を明らかにするものである。

3. 研究の方法

(1) 抗腫瘍効果を示すコーヒー含有成分の特定

コーヒー含有成分のなかで強い抗酸化力を示すポリフェノールとして、クロロゲン酸(chlorogenic acid)が注目されているが、クロロゲン酸は熱に不安定で容易に分解されるため、抗腫瘍性成分としてはたらくには疑問の余地がある。そのことを踏まえ、クロロゲン酸ならびにその分解産物であるカフェ酸(caffeic acid)とキナ酸(quinic acid)(図1)のいずれが大腸がん細胞に対し、増殖抑制効果を示すかについて、コロニー形成試験にて評価する。

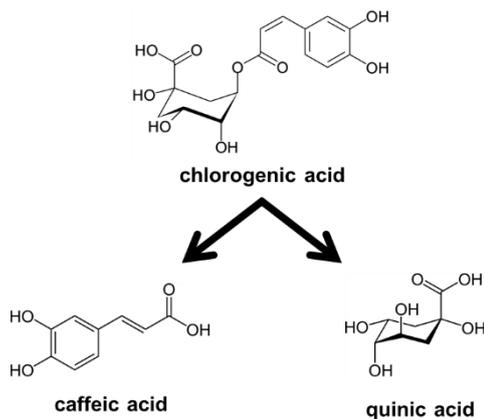


図1 クロロゲン酸とその分解産物

(2) 抗腫瘍性コーヒー含有成分の結合タンパク質の同定

上記(1)で特定したコーヒー含有成分をナノ磁性ビーズに固定化し、大腸がん細胞の細胞抽出液と混合し、その結合タンパク質を精製する。精製された結合タンパク質について、質量分析計(MALDI-TOF MS)を用いて同定する。

(3) RNA 干渉を用いた上記結合タンパク質の機能解析

上記(2)で同定した結合タンパク質を siRNA により発現抑制し、大腸がん細胞に対する増殖抑制効果の有無を評価する。さらに Connectivity Map (CMap)を用いたバイオインフォマティクス解析により、同定した結合タンパク質の下流シグナルや責任分子を特定する。

4. 研究成果

(1) カフェ酸はヒト大腸がん細胞のコロニー形成を抑制する

3種のヒト大腸がん細胞株 HT-29、HCT-15、HCT116 に対し、各濃度のクロロゲン酸、カフェ酸、キナ酸を処理後、コロニー形成について評価した結果、いずれの細胞に対しても、クロロゲン酸とカフェ酸は 300 μ M~500 μ M において、強いコロニー形成抑制作用を認めたのに対し、キナ酸処理ではいずれの細胞に対しても、コロニー形成には有意な影響は認めなかった(図2、クロロゲン酸のデータは割愛)。前述の通り、クロロゲン酸は熱に不安定であることから、クロロゲン酸のコロニー抑制効果も、その分解産物であるカフェ酸の作用を見ている可能性があると考え、以降の実験にはカフェ酸を用いて実験することとした。

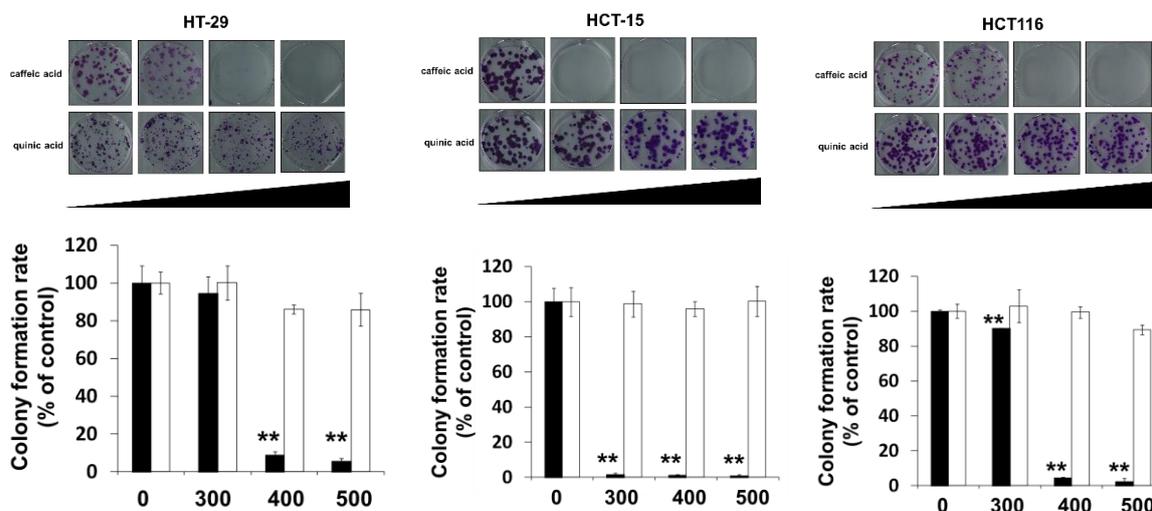
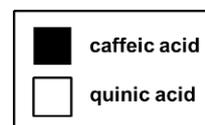


図2 カフェ酸およびキナ酸の大腸がん細胞に対するコロニー形成抑制効果

(上) 実際のコロニー染色像 (下) 各化合物処理後のコロニー形成率

(濃度単位: μ M, **, $p < 0.05$)



(2) カフェ酸は PHB2 と RPS5 に結合する

次にカフェ酸の大腸がん細胞内における標的タンパク質を同定するために、まずカフェ酸が有するフェノール性水酸基を、 K_2CO_3 を触媒として、多摩川精機社製リンカービーズのエポキシ環と共有結合させ固定化した(図3)。

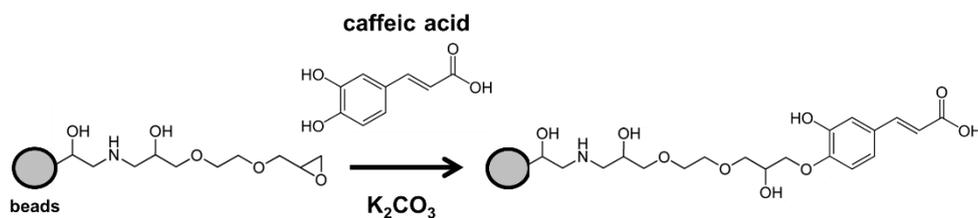


図3 カフェ酸のナノ磁性ビーズへの固定化

次に上記カフェ酸固定化ビーズと HCT-15 細胞の細胞抽出液とを反応後、カフェ酸結合タンパク質を精製し、銀染色にて検出した(次頁図4)。検出されたバンドのうち、再現性をもって MALDI-TOF MSにて同定されたタンパク質として、近年、がん関連タンパク質として注目されているミトコンドリア内膜タンパク質 PHB2 (prohibitin 2)とリボゾームタンパク質として知ら

れる RPS5 (ribosomal protein S5) の 2 種のタンパク質に注目することとし、それぞれのタンパク質の特異的抗体を用いた Western blotting においても、両タンパク質がビーズに固定化されたカフェ酸と結合することを確認した (図 5)。

(3) PHB2 および RPS5 の発現枯渇は大腸がん細胞のコロニー形成を抑制する

次に PHB2 ならびに RPS5 が大腸がんのコロニー形成に与える影響について、siRNA にてそれぞれのタンパク質を発現枯渇することにより、検証することとした。まず HCT-15 細胞に、各々異なる配列を対象とする 2 種の siRNA をそれぞれトランスフェクションし、両タンパク質のノックダウン効果を確認した (図 6)。次にこの siRNA による PHB2 ならびに RPS5 の発現枯渇条件において、コロニー形成について評価したところ、カフェ酸処理時と同様に (図 2)、いずれの細胞も著明なコロニー形成の抑制を認めた (図 7)。以上の結果から、カフェ酸は PHB2 および RPS5 に結合し、その機能を阻害することで、がん細胞の増殖を抑制すると考えられた。

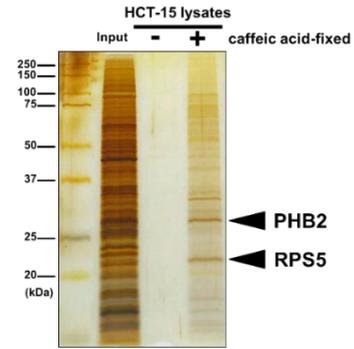


図 4 銀染色および MALDI-TOF MS によるカフェ酸結合タンパク質の同定

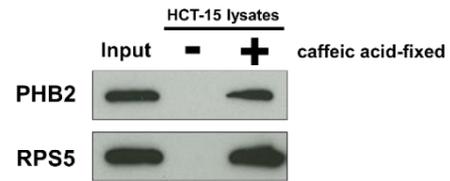


図 5 Western blotting によるカフェ酸結合タンパク質の同定

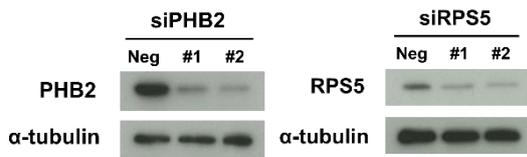


図 6 siRNA による PHB2 および RPS5 のノックダウン効果 (siRNA 導入 72 hr 後)
(左) siPHB2 (右) siRPS5

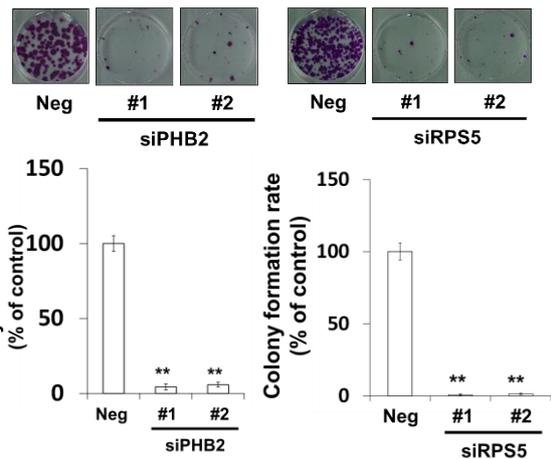


図 7 PHB2 および RPS5 の発現枯渇によるコロニー形成の抑制

(上) 実際のコロニー染色像 (下) 各 siRNA 導入後のコロニー形成率

(**; $p < 0.05$)

(4) Cmap 解析による PHB2 および RPS5 の下流シグナルの探索

次に Connectivity Map (CMap) を用いて、HT-29 細胞において、PHB2 ならびに RPS5 を発現枯渇した際に変動する遺伝子群について解析した。PHB2 の発現枯渇により影響する遺伝子群 357 個と、RPS5 の発現枯渇により影響する遺伝子群 263 個に共通する遺伝子 99 個についてパスウェイ解析を行ったところ、細胞周期、特に G1 期に関わる遺伝子群がエンリッチされた (図 8)。

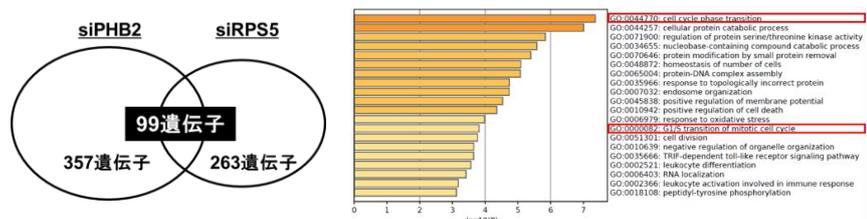


図 8 CMap 解析による siPHB2 および siRPS5 処理に対し、共通に変動する遺伝子群

(左) 解析対象の遺伝子群の概要 (右) 対象となる遺伝子群のパスウェイ解析

(5) カフェ酸処理ならびに PHB2, RPS5 の発現枯渇は cyclin D1 の発現を抑制する

次に Cmap 解析の結果から、PHB2 および RPS5 に共通する下流分子として、大腸がん細胞の増殖に重要な役割を果たし、また G1 期進行を司るうえで最も重要な分子のひとつである cyclin D1 に注目した。HCT-15 細胞に対し、カフェ酸処理ならびに siPHB2、siRPS5 処理後の cyclin D1 の発現について、Western blotting にて解析したところ、いずれの処理においても、cyclin D1 の発現低下を認めた (図 9)。以上の結果から、カフェ酸の結合タンパク質として同定された PHB2 と RPS5 の発現枯渇は、カフェ酸の挙動を分子の挙動レベルでも mimick していると考えられた。

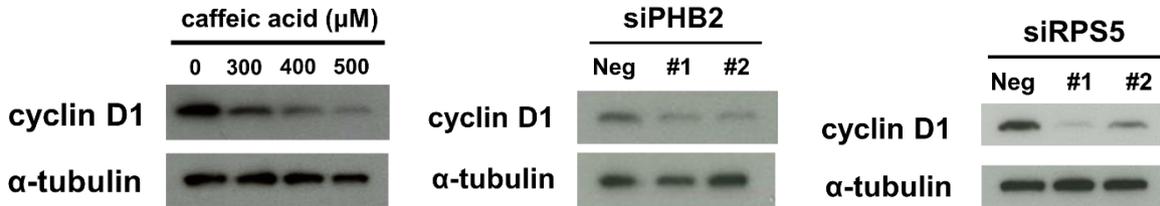


図 9 カフェ酸および siPHB2/RPS5 処理後の cyclin D1 の発現変化

(左) カフェ酸処理 (濃度単位: μM /処理時間 144 hr)

(中) siPHB2 処理 (siRNA 導入 72 hr 後) (右) siRPS5 処理 (siRNA 導入 72 hr 後)

(6) PHB2 と RPS5 は異なるメカニズムで、cyclin D1 の発現を制御する

次に PHB2 および RPS5 による cyclin D1 の発現制御機構の詳細を明らかにするため、siRNA による PHB2 および RPS5 の発現枯渇後の cyclin D1 mRNA (*CCND1*) の発現量について、リアルタイム RT-PCR にて解析した。HCT-15 細胞に対し、siPHB2 処理後、cyclin D1 は mRNA レベルでは有意な変動を示さなかったことに対し、siRPS5 処理では cyclin D1 は mRNA レベルでの減少を認めた (図 10)。以上の結果から、PHB2 は転写後レベル、RPS5 は転写レベルと、それぞれ異なるメカニズムで cyclin D1 の発現を調節しているものと考えられた (図 11)。

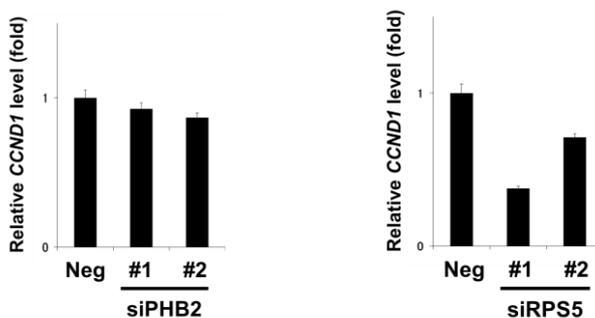


図 10 siPHB2/RPS5 処理後の cyclin D1 mRNA の発現変化

(左) siPHB2 処理 (siRNA 導入 72 hr 後)

(右) siRPS5 処理 (siRNA 導入 72 hr 後)

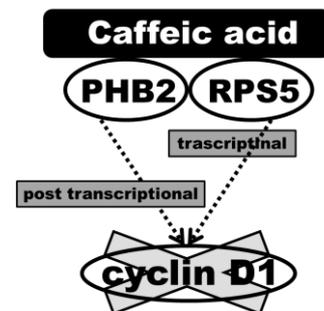


図 11 本研究により明らかとなった、カフェ酸結合タンパク質 PHB2 および RPS5 による cyclin D1 の二重制御機構

(6) 本研究課題の総括と今後の展望

以下に本研究課題の考察ならびに将来展望について総括する。

- ① コーヒー含有成分のうち、カフェ酸が抗腫瘍効果に重要な役割を果たすと考えられた。
- ② カフェ酸の新規結合タンパク質として PHB2 および RPS5 を同定した。
- ③ カフェ酸は PHB2 および RPS5 に結合することで、cyclin D1 の発現を抑制することが示唆された (図 11)。
- ④ コーヒーという嗜好品レベルから、分子レベルの作用機序に落とし込むことにより、PHB2 や RPS5 を標的とした他の食品成分を探索することで、新たな予防創薬シーズの発見につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------