

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19692

研究課題名（和文）がん抑制遺伝子の異常を狙い撃つ、新たながん予防戦略

研究課題名（英文）New Cancer Prevention Strategy; Targeting abnormal cancer suppressor genes

研究代表者

増田 光治（MASUDA, Mitsuharu）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：10305568

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：フラボノイド系を中心とした天然物について、WNTパスウェイが活性化しているAPC変異大腸がん細胞特異的に、増殖抑制作用を示すかどうかを評価した。その結果、100マイクロモル濃度で、両細胞株にも効果を示さないもの、両細胞株に同様に強力に作用するもの、どちらかの細胞株により強く作用するもの、予測される4パターンそれぞれの特徴を持つ化合物が選択された。しかし、APC変異細胞株に対する作用は特異性が低く、APC正常細胞との切り分けが不十分と判断した。構造の異なる化合物を増やすなどして、更なるスクリーニングなど検討が必要と判断した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がん罹患数は増加しており、その革新的な予防法開発は喫緊の課題である。がん抑制遺伝子APCの変異は大腸がんの主要なリスク因子の1つである。近年、典型的な遺伝子変異である短縮型APCに対してのみ特異的に作用し、その増殖を抑制する合成化合物が報告された。しかし、合成品であるため、臨床使用するには、ヒトでの有効性試験や安全性試験など、開発に必要な期間やコストなどが問題となる。そのため、天然物、食品成分で同様の作用を持つ物質が見つければ、短期間で、より安全な、がん抑制遺伝子異常を有する大腸がん予防法の確立が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We evaluated natural products, mainly flavonoids, for their growth inhibitory effects specifically on APC-mutant colon cancer cells in which the WNT pathway is activated. As a result, at 100 microM concentrations, compounds with each of the four predicted patterns were selected: those with no effect on both cell lines, those with equally potent effects on both cell lines, and those with stronger effects on either cell line. However, the specificity of the effects on APC mutant cell lines was not sufficient to separate them from APC normal cells. It was judged that further screening, such as increasing the number of compounds with different structures, was necessary.

研究分野：がん予防

キーワード：大腸がん 短縮型APC がん予防 天然物 スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの大腸がんは、がん抑制遺伝子 APC に変異が生じることから発生するとされている。他の多くのがん抑制遺伝子の変異とは異なり、APC の変異の多くは短縮型タンパク質を産生する。ヒト APC がん抑制遺伝子の欠損変異は、家族性腺腫性ポリポーシス(FAP)の原因であり、散発性大腸がんの約85%も APC 切断変異をもっている。

近年、短縮型 APC ががん特有の脂質代謝調節に強く関与している事、また、コレステロール合成阻害に働く、HMG-CoA リダクターゼ阻害薬スタチンや、EBP 阻害剤である新規合成化合物により、短縮型 APC を有する大腸がん細胞株を選択的に死滅させる報告が為されている。

しかし、長期投与が必要である予防戦略に置いて、安全性と有効性の兼ね合いから、現在、短縮型 APC による特異的脂質代謝調節を阻害し、“大腸がん予防”に用いることができる化合物・薬剤は存在しない。

2. 研究の目的

変異を有するがん抑制遺伝子の機能を標的とするという、新たな戦略によるがん予防研究を行う。また、正常細胞には影響しない、より安全な大腸がん予防法の開発を目指す。

そのために、短縮型 APC を有する細胞のみを選択的に死滅させる天然物、食品成分を探索し、動物実験で有効性を検証すると共に、有効成分の作用機序を検討する。

3. 研究の方法

(1)培養細胞を用いたスクリーニング:

(1-1) 種々の食品成分や天然物に対して、短縮型 APC を有するヒト大腸がん DLD-1 細胞を用いて、増殖抑制を指標とした一次スクリーニングを行う。

(1-2) 増殖阻害能が確認できた成分に対して、効果の強いものを中心に、正常型 APC を有するヒト大腸がん HCT116 細胞を用いて、増殖阻害能を指標とした二次スクリーニングを行う。二次スクリーニングでは、細胞増殖抑制能を示さない、もしくは殆ど示さないものを選択する。これにより、短縮型 APC を有する細胞にのみ増殖阻害を起こす成分が選択できる。

(1-3) 二次スクリーニングで選択された成分は、更に APC^{min} マウス腸管ポリープ由来細胞株に対する増殖抑制能と細胞死誘導能を確認する。APC^{min} マウスは、APC を短縮型 APC とした遺伝子改変マウスである。

(2)動物実験による検証:

(1)で選択した化合物について、短縮型 APC を有するヒト大腸がん細胞を免疫不全マウスに移植する Xenograft モデル(比較対照は正常型 APC を持つヒト大腸がん細胞)や APC^{min} マウスを用いたモデルでがん予防効果を検討する。

(3)短縮型 APC タンパク質の機能検証:

短縮型 APC タンパク質は、本来の機能である -カテニンタンパク質との結合部位を欠損しているが、残存する構造で他のタンパク質と結合できるため、短縮型 APC タンパク質が特異的に結合しているタンパク質を探索する。

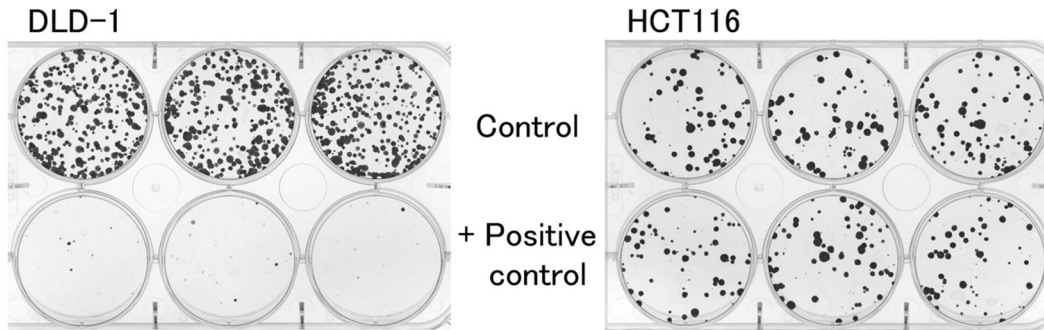
4. 研究成果

(1)評価にはコロニー形成抑制系を用いた。正常細胞から癌への変遷では、増殖制御に異常をきたした一つの正常細胞が無秩序に増殖を繰り返して癌化していく。そのため、単細胞にまでばらばらにした癌細胞を低密度で培養するコロニー形成抑制系は in vivo 発癌過程をより反映した in vitro 実験系といえる。また、短縮型 APC ががん細胞特有の脂質代謝に関与している事などから、コロニー形成抑制系での細胞株の培養には、UltraCulture(Lonza)+グルタミンによる無血清培地を用いた。

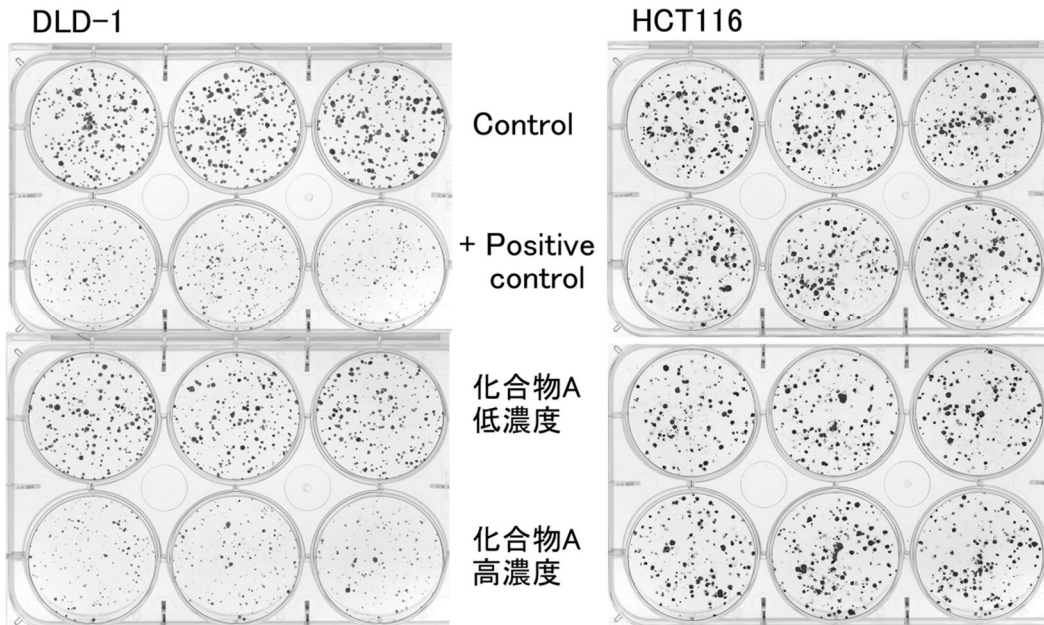
まず、評価系細胞のポジティブコントロールへの反応性を確認した。6well plate へ細胞を播種し、その1日後にポジティブコントロールを添加し、約2週間培養し、コロニー数やコロニーのサイズを比較した。その結果、評価した細胞株の内、短縮型 APC を有する細胞株 DLD-1 は、低濃度のポジティブコントロール試薬でコロニー形成が阻害された。一方、正常 APC を有する細胞株 HCT116 は、同じ濃度で阻害は認められなかった(図1)。

これにより、計画通り、この2細胞株を評価系で用いる事とした。

(2)前述の評価系により、カロテノイド類、フラボノイド類、アントシアニン類を中心に、その他を評価した。その結果、100 μ Mで、両細胞株にも効果を示さないもの、両細胞株に同様に強力に作用するもの、どちらかの細胞株により強く作用するもの、予測される4パターンに評価化合物が分類された。短縮型 APC を有する DLD-1 にのみ増殖抑制効果を示す化合物 A の例を示す(図2)。



(図1) 評価系細胞の確認



(図2) 化合物 A は、短縮型 APC 細胞 (DLD-1) のコロニー形成を抑制した。

このように、正常型 APC を有する大腸がん細胞株に対する効果と比較して、短縮型 APC を有する大腸がん細胞株に、増殖抑制効果を示す複数の天然物が選択できた。しかし、ポジティブコントロールと比較すると、スクリーニングで選択した化合物は、濃度を更に高めると正常型 APC 細胞株も増殖抑制するなど、短縮型 APC に対する特異性が低かった。

また、作用機序を検討するため、Western blot により、細胞増殖に係わる種々タンパクの発現・活性化を評価した。ポジティブコントロールでは増殖促進に働くリン酸化 AKT の量を減らす事、アポトーシスを促進する活性型である Cleaved caspase3 を増やす事などが確認出来たが、選択した天然物では、それらの分子の明確な変化を捉えられず、作用機序は未だ確認出来ていない。

尚、今回見出した化合物は、短縮型 APC 細胞株に対する特異性が詳細な検討に進むには不十分と判断し、当初、計画していた APC^{min} マウス腸管ポリープ由来細胞株に対する作用、また動物実験による有効性の検証は行わなかった。実用的な予防法の開発には、構造の異なる化合物を増やすなどして、更なるスクリーニングを実施し、より強力に短縮型 APC 細胞株にのみ作用する天然物を見出す必要がある。

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