

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05931

研究課題名(和文)フラボノイド類の乳がん転移予防効果を最大限に活かすには？

研究課題名(英文)How to maximize the preventive effect of flavonoids on breast cancer metastasis?

研究代表者

坂尾 こそ枝 (SAKAO, Kozue)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・助教

研究者番号：40713285

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)：フラボノイドの生理活性を効果的に増強し、より高い乳がん転移抑制効果を得る条件の探索を実施した。各種フラボノイドの代表化合物を用い、そのアセチル化誘導体を作成し、ヒト乳がん細胞に対する予防効果を遊走・浸潤・拡散抑制効果を評価したところ、ケルセチンと同等もしくはそれ以上に転移抑制効果を示すフラボノイドとしてアピゲニンならびにケンフェロールを選出することが出来た。アピゲニンに関しては、アセチル修飾により低濃度で、アポトーシス誘導を伴わない抑制効果を示すことが示唆された。フラボノイドの種類に合わせて、アセチル修飾の位置ならびに数を検討するとより効率的に乳がん転移予防効果が増強しうることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファイトケミカルを用いた血管新生ならびにがん転移の予防効果の研究はすでに国内外で盛んに実施されてきてはいるが、本研究のようにフラボノイドの誘導体を作成し、その生理活性を評価・解明する研究については、がん細胞の増殖抑制能や、抗がん活性についての評価・検証を行った報告はあるものの、転移抑制効果を評価したものはごく僅かである。よって、本研究の試行は、フラボノイドのがん転移抑制効果の研究においても十分に新しい知見を呈示しうるものとして意義の深い研究であると同時に、フラボノイドの誘導体として乳がん転移抑制効果との構造活性相関を初めて検証した研究として価値の高いものであると考える。

研究成果の概要(英文)：Effective enhancement of bioactivity of flavonoids and search for conditions to obtain higher inhibitory effect on breast cancer metastasis were conducted. Using representative compounds of various flavonoids, acetylated derivatives were prepared and screened for their preventive effects against human breast cancer cells by inhibiting migration, invasion, and diffusion. As a result, apigenin and kaempferol were selected as flavonoids with high potential to inhibit metastasis as much as or more than quercetin. As for apigenin, it was suggested that acetyl modification enables the inhibition of apoptosis without induction of apoptosis at low concentrations. Based on the correlation between the bioactivity and chemical structure, we found that the acetylation position and number of acetyl modifications in each type of flavonoid can enhance the preventive effect against breast cancer metastasis more efficiently.

研究分野：食品科学

キーワード：フラボノイド アセチル修飾 がん転移抑制

1. 研究開始当初の背景

フラボノイドは食品中の機能性化合物、特に果物や野菜などに多く存在するポリフェノールの代表例であり、近年、ファイトケミカル(植物栄養素)としても注目を集めている化合物の一つである。フラボノイドは、その化学構造の特徴からフラボノールやフラボン、フラバノン等に分けることができ、いずれも抗酸化や抗炎症、抗アレルギー作用、抗炎症作用などを有することが報告されているほか、がん細胞に対しては、増殖阻害、浸潤・転移抑制、抗変異原性、アポトーシスの誘導などの多くの報告が行われている。これらの生理活性にはフラボノイド間の化学構造の違いが大きく関与していることが知られており、それゆえ細胞特異性を示すことも多い。また、近年は申請者を含めた複数の研究が、フラボノイド誘導体には元来の生理活性よりも高い効果を示すものがあることを報告しており、これらの誘導体を用いた抗がん作用の解明が積極的に行われ始めている。

がんの治療を難しくする要素の中で、大きな障害の一つとなるのが「転移」である。特に、乳がんの転移は予後が悪いとされており、乳がん患者の死亡の主要な原因となっている。転移先がある程度限定されている胃がんや肝臓がん、転移の発見がしやすいとされる大腸がんに比べ、リンパ節、肺や骨に転移することの多い乳がんは、発見が困難であると共に、遠隔転移になると治療が難しくなる。また、近年の報告によると、原発巣がん由来するエキソソーム(前転移環境因子)が将来の転移先に取り込まれ前転移微小環境を形成することが転移誘引の一つであることが明らかになりつつある(Ayuko Hoshino et al. Nature (2015), Kaplan R. N. et al. Nature (2006))。この前転移微小環境の形成が、がんの“見えない転移”を成功させている元凶の一つであるならば、乳がんの転移を効果的に予防するには、原発巣である乳がん“そのもの”の転移を抑制するほか、転移先の臓器での微小環境形成を阻害し、定着を抑制することが必要となる。

2. 研究の目的

先行研究において、研究代表者はフラボノール型フラボノイドの代表的な化合物であるケルセチンのヒドロキシ基をアセチル化させることで、親化合物であるケルセチンよりも高い抗がん活性を獲得しうることを示し、その活性がアセチル修飾の位置や数に依存することを明らかにしてきた。そこで、本研究では、ケルセチン以外のフラボノイド類に対しても、アセチル修飾による生理活性の増加が期待できるかについて、その構造活性相関を明らかにすることを目指した。それらの生理活性増加において、特に乳がん転移予防効果を最大限に活かすための条件を見出すことを最大の目的とし、フラボノイドおよびアセチル化誘導体の有する転移抑制効果の作用機序の解明も目指した。

3. 研究の方法

(1) フラボノイド類のアセチル化ならびに構造決定：先行研究で実施したケルセチンのアセチル誘導体の合成手法(無水酢酸によるヒドロキシ基のアセチル化)を基盤に用い、各フラボノイドに合わせて反応時間・温度等を調整し、8種類のフラボノイド類から12種類のアセチル誘導体を合成した。各アセチル化合物の構造はNMR, IR, UV, MSスペクトル解析により決定した。

(2) サンプルのスクリーニング：がん細胞の遊走・浸潤・拡散の進行は、がん転移の指標の一つとなっている。そこで、ヒト由来乳がん細胞(MDA-MD-231ならびにMCF-7)を用い、がん細胞の遊走抑制効果を創傷治癒アッセイ(wound-healing assay)で、浸潤能抑制効果をtranswell invasion assayで、拡散阻害効果をcell viability (MTT) assayでそれぞれ測定し、がん転移の抑制効果を有するフラボノイド、または誘導体を評価・選出した。

(3) 転移がん定着予防効果の解明：血管内皮への腫瘍細胞の初期接着予防効果について、(2)の結果から抗転移効果が高いとされたフラボノイドおよびそのアセチル誘導体類を用い、IC50濃度およびその半分の濃度を用いて実施した。転移がん定着予防効果の評価法として、内皮細胞に対し、各サンプルを添加したのち、転移能力の高いMDA-MB-231細胞を共培養させ、その定着量をELISAキット(CytoSelect™ Tumor-endothelium Adhesion Assay: Cell Biolabs, Inc.)により定量的に測定した。

(4) 血管新生因子抑制効果の網羅的解析：新生血管を作るために、がんが血管新生因子と呼ばれるタンパク質をたくみに利用している。血管新生因子には様々な種類が報告されており、血管新生の各段階において、それぞれのタンパク質が深く関与する。そこで、ヒト由来乳がん細胞において、どの血管新生因子がフラボノイドおよびアセチル誘導体によって強く制御されているかを明らかにするために、メンブレン抗体アレイ(Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit: R&D Systems, Inc.)を用い、55種類のヒト血管新生関連因子に対する抑制効果を一斉に検出した。

(5) タンパク質発現レベルでの詳細なメカニズムの解析：がん細胞転移の重要なプロセスの一つである上皮から間葉への移行(EMT)の活性化抑制への関与を、ウェスタンブロッティング法を用いてタンパク質発現レベルでの解析を行った。

(6) 抗血管新生効果の詳細なメカニズムの解析：ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC 細胞）を用い、3 次元構造（管）を形成させ、血管新生抑制効果の評価を実施した。さらに、より生体内に近い血管新生能評価としてヒヨコ漿尿膜（CAM）アッセイの手法を用い、フラボノイドならびにアセチル誘導体が、がん由来エクソソームにより誘引される血管新生を抑制可能かについて評価した。

4. 研究成果

がん細胞の遊走・浸潤・拡散の進行は、がん転移の指標の一つとなっている。そこで、ヒト由来乳がん細胞（MDA-MD-231 ならびに MCF-7）を用い、16 種のフラボノイドとアセチル誘導体におけるがん細胞の遊走抑制効果を創傷治癒アッセイ（wound-healing assay）で、浸潤能抑制効果を transwell invasion assay で、拡散阻害効果を cell viability assay でそれぞれ測定し、いずれのフラボノイドまたは誘導体が、高いがん転移の抑制効果を有するかを評価・選出した。その結果、wound-healing assay および transwell invasion assay において、高い遊走抑制効果、抗浸潤能を示したケンフェロール、ケルセチン、ミリセチンならびにアピゲニンの 4 種類のフラボノイドについて、さらにアセチル基の修飾数の異なるアセチル化フラボノイド 4 種を新規合成し、再度、遊走・浸潤・拡散の各項目の抑制効果の評価を行った。それにより、計 5 種類の化合物（4Ac-Q, 4Ac-K, 5Ac-M, 2Ac-A, 3Ac-A）を再選出し、抗転移効果との構造相関の解明を試みた。

フラボン類とフラボノール類では、アセチル基の数による抗転移効果への寄与が異なる可能性が示唆されたことから、抗転移に関わる作用機序もそれぞれ異なる可能性を見出し、抗転移機構におけるアポトーシス誘導の関与の有無についてフローサイトメトリーを用いて評価した。結果、4Ac-K, 2Ac-A, 3Ac-A が高い転移抑制効果を示し、その中でも 3Ac-Q はアポトーシスが誘導されない低濃度においても、優位に転移抑制効果を示すことが明らかになった。そこで、低濃度で転移抑制能を顕著に示した 3Ac-Q およびその親化合物であるアピゲニンをを用い、転移性の強いがん細胞である MDA-MB231（ヒト乳がん）細胞の内皮細胞に対する接着能の抑制効果試験を実施したところ、アピゲニンおよび 3Ac-Q は MDA-MB231 細胞の内皮細胞への接着を効果的に抑制し、その強さは 3Ac-Q のほうが優位に高いことが明らかになった。

さらに、ヒヨコ漿尿膜（CAM）法を用い、MDA-MB231 細胞のエクソソームによる血管新生促進効果とフラボノイド類による抑制効果の関連性を評価した。MDA-MD-231 細胞由来のエクソソームにより新たな血管の形成が顕著に増加し、それらがアピゲニンのアセチル誘導体の添加により若干ではあるが抑制されることは確認できたが、卵殻外培養における CAM 上でのエクソソームの視覚化が研究期間内に樹立できなかつたため、詳細なメカニズム解明には至らなかった。

ケルセチンおよびそのアセチル誘導体においては、メンブラン抗体アレイを行い、55 種類のヒト血管新生関連因子に対する抑制効果を網羅的に検出した。その結果、アセチル化ケルセチンは Leptin の減少、Endostatin の増加をはじめとする血管新生関連タンパク質の発現に変化をもたらすことが明らかになった。また、より詳細の転移抑制のメカニズムを解明するために、がん細胞転移の重要なプロセスの一つである上皮から間葉への移行（EMT）の活性化の抑制への関与についてウェスタンブロッティング法を用いてタンパク質発現レベルでの解析を行った。結果、ケルセチンならびにアセチル化ケルセチンは MDA-MB-231 細胞において E-Cadherin の発現を 6 時間、24 時間で増加させ、Vimentin の発現を 24 時間で減少させた。また、E-Cadherin の発現を抑制する転写因子 Snail1 の減少が関与することも明らかになった。抗血管新生効果についてヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC 細胞）を用い、3 次元血管新生能評価を実施した。結果、ケルセチンならびにアセチル化ケルセチンは HUVEC を用いた VEGF 誘発管腔形成（血管新生）を抑制し、その効果はアセチル化誘導体の方が高かった。また、同 HUVEC 細胞において内皮膜に局在する CD31（血管新生に対する内皮細胞応答のメカノセンシング等の多様な役割を有する）を免疫蛍光染色で観測したところ、ケルセチンならびにアセチル化ケルセチン処理により減少したことから、CD31 発現抑制により血管内皮細胞の形成機能を失ったことが示唆された。

総じて、本研究では、浸潤の抑制効果がすでに報告されているケルセチンと同等もしくはそれ以上に転移抑制効果を示す可能性が高いフラボノイドとしてアピゲニンならびにケンフェロールを選出することが出来た。特にアピゲニンに関しては、アセチル修飾を行うことで、より低濃度でアポトーシス誘導を伴わない転移抑制効果を示すことが可能になることが示唆された。よって、本研究の探索目的であった「フラボノイド類の乳がん転移予防効果を最大限に活かす」ための条件の一つとして、フラボノイドの種類に合わせ、アセチル修飾の位置ならびに数を検討すると効果が増加することを提示しうる結果を得られた。

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 1件）

1. 著者名 Xie Kun, He Xi, Chen Keyu, Sakao Kozue, Hou De-Xing	4. 巻 11
2. 論文標題 Ameliorative effects and molecular mechanisms of vine tea on western diet-induced NAFLD	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 5976 ~ 5991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0fo00795a	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 Sakao, K., Hou DX	4. 巻 5
2. 論文標題 Effects and mechanisms of acylated flavonoid on cancer chemopreventive activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Pharmacol Rep	6. 最初と最後の頁 286-305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 牟禮野乃華、侯徳興、坂尾こず枝
2. 発表標題 ケルセチンのアセチル修飾の位置と数による生理活性の変化
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会（第332回講演会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村瑞樹、侯徳興、坂尾こず枝
2. 発表標題 ケルセチン亜鉛錯体の合成および生理活性評価
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会（第332回講演会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mizuki Nakamura, De-Xing Hou, Kozue Sakao
2. 発表標題 Synthesis and characterization of quercetin-zinc complexes and evaluation of in vitro anti-cancer activity.
3. 学会等名 Online International Symposium of FSMILE 2020-Current Trends on Food Processing, Safety and Nutrition. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keyu Chen, Kozue Sakao, De-Xing Hou
2. 発表標題 Garlic as potential prebiotics to prevent gut microbiota dysbiosis and dyslipidemia.
3. 学会等名 Online International Symposium of FSMILE 2020-Current Trends on Food Processing, Safety and Nutrition. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kozue Skao
2. 発表標題 Terpenes induce structure dependent autophagy and apoptosis in human colon cancer cells
3. 学会等名 7th International Conference on Food Factors(ICoFF2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kugimaru Tomoki, De xing Hou, Kozue Sakao
2. 発表標題 Application to in vitro by o/w emulsification of oily functional ingredient
3. 学会等名 7th International Conference on Food Factors(ICoFF2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanako Chazono, Taichi Hara, De-xing Hou, Kozue Sakao
2. 発表標題 Structure-activity relationship in programmed cell death induction mechanism of terpenes
3. 学会等名 7th International Conference on Food Factors(ICoFF2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦川大吾, 井形真也, 侯徳興, 坂尾こず枝
2. 発表標題 フラボノイドのアセチル誘導体による転移抑制能の評価
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部 2021年度合同鹿児島大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マンダリン類又はマンダリン類交雑種のオイル抽出成分の製造方法、美白剤、色素沈着症改善剤、美白用経口組成物及び色素沈着症改善用経口組成物	発明者 坂尾こず枝、山本雅史、侯徳興	権利者 国立大学法人鹿児島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-055807	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	侯 徳興 (Hou De-Xing) (90305160)	鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授 (17701)	

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