

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03926

研究課題名(和文)ポリフェノール類によるがん細胞におけるプロオキシダント効果の作用機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of prooxidant effect on cancer cells by polyphenols

研究代表者

細川 敏幸 (Hosokawa, Toshiyuki)

北海道大学・高等教育推進機構・名誉教授

研究者番号：00157025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト癌細胞由来であるHepG2およびCaco-2細胞に様々な濃度でレスベラトロールあるいはエピガロカテキンガレートを曝露した。その結果、濃度依存的に細胞死が増加し、酸化状態が亢進されていた。

ウェスタンブロット法等による解析により、ポリフェノール類の曝露でヒト癌細胞にオートファジーを經由してアポトーシスを誘導していることが確認できた。一方、ヒト正常肝細胞であるHUCPG細胞にレスベラトロールを曝露すると、アポトーシス因子の有意な変化は認められず、アポトーシスを誘導している兆候はなかった。

以上により、ポリフェノールを曝露した場合、癌細胞のみでアポトーシスを誘導していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的に年々増加している様々な癌の治療において化学療法は重要な選択肢の一つであるが、しばしばその重篤な副作用が大きな問題となっている。安全で副作用の少ない抗癌剤あるいは抗癌補助剤の開発は癌治療戦略において緊喫の学術的意義のある課題である。本研究で示された植物成分の一種であり毒性が少ないポリフェノール類が癌細胞にアポトーシスを誘導するという実験結果は将来の安全な抗癌補助剤の開発のための重要なステップになることが大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：HepG2 and Caco-2 cells derived from human cancer cells were exposed to various concentrations of resveratrol or epigallocatechin gallate. As results, cell viability of the human cancer cells exposed to the polyphenol was increased in a dose-dependent manner, and the oxidative state in the cells was enhanced.

Analyses by Western blotting and other biochemical and cell biological methods confirmed that exposure to polyphenols in the human cancer cells induced apoptosis via autophagy. On the other hand, when human normal hepatocytes, HUCPG cells, were exposed to resveratrol, no significant changes in apoptotic factors were observed, and there was no sign of apoptosis induction in the cells.

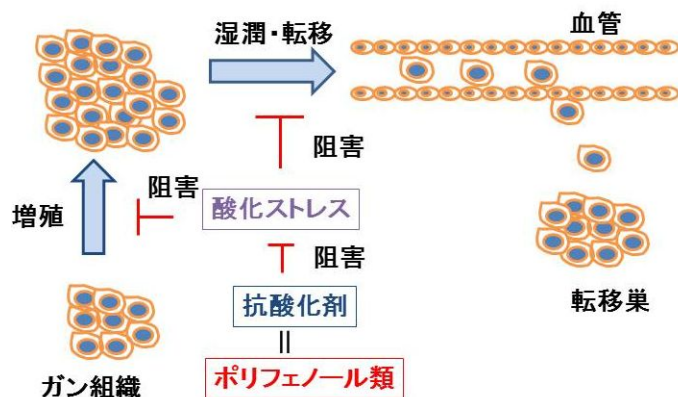
From these results, it was clarified that apoptosis was induced only in cancer cells when exposed to polyphenols.

研究分野：衛生学

キーワード：ポリフェノール 抗酸化作用 プロオキシダント作用 癌細胞 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

以前、ポリフェノール類の抗酸化作用の機構を調べていた際に、未分化細胞を用いて細胞にアポトーシスを誘導した系にポリフェノール類を加えた場合には、予想通り抗酸化作用を示して誘導されたアポトーシスを抑制する働きを示したが、未分化細胞にポリフェノール類を単独で加えると細胞死を引き起こすことがあることが本研究グループによる予備的な実験で明らかにされた。また、近年ガン細胞にポリフェノール類を作用させると細胞死あるいはアポトーシスを誘導することを示す論文がいくつか散見されるようになったが、その詳細な機構についてはいまだ不明のままである。2017年に公表されたレスベラトロールの抗癌作用に関するレビューですら、その抗癌作用は主として抗酸化機能から派生したものであるとの解説がなされているのみである (Chen et al., Nat Prod Res 20, 1-11, 2017)。しかし、通常、抗癌剤などはがん細胞に DNA



損傷を起こしたりアポトーシスを誘導したりしてがん細胞を死滅させるので、フリーラジカルを消去するような抗酸化剤の作用は、抗癌活性を弱めてしまうことになる(図1)。

とすると、ポリフェノール類が抗癌作用を発揮するには生体内酸化を亢進させるプロ

オキシダント活性をもつはずであるという仮説を立てた。つまり、ポリフェノール類は、正常細胞では抗酸化活性を発揮するが、癌細胞等においてはプロオキシダント活性を持つという考え方である。

2. 研究の目的

本研究の目的は前述したように、癌細胞内でポリフェノール類がどのように細胞死を誘導しているのかを明らかにし、それがプロオキシダント活性に依存していること、加えて正常細胞ではそのようなプロオキシダント活性は示さないことを立証することである。

これまでポリフェノール類は、抗酸化作用が注目され、それにより抗老化作用や糖尿病、高血圧等の成人病の予防およびフリーラジカル等の消去により発ガン過程を抑制する効果等が多く報告されてきたが、本研究ではそれとは認めてこられなかった逆の反応であるポリフェノール類のプロオキシダント機構を明らかにしようというものである。これまでに、ポリフェノール類が抗癌作用を示す論文はいくつか報告されている。しかし、その多くは、どのような機構で抗癌作用を示すのかを明確にしたものではなく、その作用が正常細胞ではどうなのかを併せて示した論文はほとんど無い。

ポリフェノール類のプロオキシダント活性とその機構が明らかにされることにより、重大な副作用を発生する抗癌剤を用いた治療において、天然ポリフェノールを用いることで有効性がより高く副作用の少ない新しい癌の治療法の開発の提案が可能になるのではないかと期待している。少なくとも、主抗癌剤以外にもう一つの抗癌剤を選ばなければならないセカンドラインの有力な候補に成り得ると考えている。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成させるために以下の実験を行った。

ヒトの肝癌細胞であるHepG2細胞およびヒト結腸癌細胞であるCaco-2細胞を選択し、ポリフェノール類としてフェノール構造の違いによる効果の差があることも考えられるためスチルベン類からレスベラトロールおよびフラボノイド類からエピガロカテキンガレートを選択し、どの細胞にそのくらいの量のポリフェノール類が細胞死を誘導するのかを明らかにする。

その細胞死誘導機構をウェスタンブロット法およびAnnexin V等を用いたフローサイトメトリー法などを用いて明らかにし、癌細胞におけるポリフェノール類の細胞死誘導機構を明確にする。

ヒト肝臓正常細胞、HUCPG細胞にポリフェノール類を曝露し、どのような生体反応を起こすのかを明らかにし、癌細胞との違いを明確にする。

4. 研究成果

HepG2 細胞および Caco-2 細胞へのレスベラトロールおよびフラボノイド類曝露

ポリフェノールとしてフラボノイド系からエピガロカテキンガレート、スチルベン系からレスベラトロールを選択し、ヒト肝細胞癌由来細胞である HepG2、ヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 細胞に様々な濃度範囲で曝露するとレスベラトロールは 80 μ M、エピガロカテキンガレートでは 50 μ M より高濃度で濃度依存的に細胞死が有意に増加し、細胞毒性の指標である培地中乳酸脱水素酵素量も同様な傾向で有意に増加した。細胞内酸化状態の指標である還元型グルタチオンの量はポリフェノール類投与量増加と共に有意に減少し、グルタチオン還元酵素は還元型グルタチオンを増加させるため有意に増加していた。以上の結果から、比較的低い濃度のポリフェノール類の曝露により癌細胞に細胞死を誘導することが明らかになった。

ポリフェノール類曝露によるヒト癌細胞死誘導機構の解明

ポリフェノール類曝露細胞より抽出された DNA はラダー状を示し、ポリフェノール曝露後の細胞抽出液において p53 および活性型 Caspase-3 および 7 の量が有意に増加していた。さらに Annexin V を用いたフローサイトメトリーを行うと後期アポトーシスが結位に増加し、これらの結果からガン細胞にポリフェノールを曝露による細胞死は最終的にアポトーシスを誘導していることによるものであると明らかになった。さらに mTor、活性型(リン酸化) mTor、Akt、活性型 Akt、NF κ B、LC3 量測定のためウェスタンブロット法などを行い、その結果、エピガロカテキンガレートあるいはレスベラトロールの曝露で HepG2 細胞および Caco-2 細胞にオートファジーを介したアポトーシスが起きていることが予測された。Caco-2 細胞ではエピガロカテキンガレート曝露により FOXO、XIAP および SIRT1 などが有意に低下していることが確認でき、負に制御された SIRT1 の活性化により、p53 が活性化されて細胞周期が停止し、FOXO、および XIAP が不活化されて細胞周期制御とその後の細胞増殖が妨げられることが推測された。

ヒト肝臓正常細胞、HUCPG 細胞にレスベラトロールを曝露

レスベラトロールを曝露した HepG2 細胞では、細胞生存率が有意に低下したが、同様にレスベラトロールを曝露した HUCPG の細胞生存率との間に有意な差は認められなかった。しかし HepG2 細胞では、アポトーシスの実行型カスパーゼである活性型 Caspase-3 がレスベラトロール曝露により有意に増加し、さらにオートファジーマーカーである LC3II が有意に増加した。また、80 および 160 μ M レスベラトロール曝露によりリン酸化 mTOR が有意に減少し、mTOR の

活性を示すリン酸化率が低下した。以上の結果から上にも述べたように HepG2 細胞ではレスベラトロール曝露によりオートファジーを介したアポトーシスを誘導していることが明らかになったが、一方、HUCPG 細胞ではこれらの変化は全く認められなかった。

以上により、ポリフェノールを曝露した場合、ガン細胞のみでアポトーシスを誘導していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 11件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mahmuda Akter, A.K.M. Atique Ullah, Subrata Banik, Md. Tajuddin Sikder, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito, Masaaki Kurasaki	4. 巻 199(9)
2. 論文標題 Green synthesized silver nanoparticles-mediated cytotoxic effect in colorectal cancer cells: NF- B signal induced apoptosis through autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological Trace Element Research	6. 最初と最後の頁 3272-3286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12011-020-02463-7	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 該当する
1. 著者名 Md. Shibliur Rahaman, Md. Mostafizur Rahman, Nathan Mise, Md. Tajuddin Sikder, Gaku Ichihara, Kabir M. Uddin, Masaaki Kurasaki, Sahoko Ichihara	4. 巻 289
2. 論文標題 Environmental arsenic exposure and its contribution to human diseases, toxicity mechanism and management	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 117940 (記事番号)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envpol.2021.117940	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 該当する
1. 著者名 Mahmuda Akter, Noriko Hirase, Md. Tajuddin Sikder, Md. Mostafizur Rahman, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito, Masaaki Kurasaki	4. 巻 232
2. 論文標題 Pb (II) remediation from aqueous environment using chitosan-activated carbon-Polyvinyl alcohol composite beads	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Water Air and Soil Pollution	6. 最初と最後の頁 272 (記事番号)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11270-021-05243-8	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 該当する
1. 著者名 Kaniz Fatima Binte Hossain, Mahmuda Akter, Md Mostafizur Rahman, Md Tajuddin Sikder, Shibliur Rahaman, Shojiro Yamasaki, Goh Kimura, Tomomi Tomihara, Masaaki Kurasaki, Takeshi Saito	4. 巻 18
2. 論文標題 Amelioration of Metal-Induced Cellular Stress by alpha-Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid through Antioxidative Effects in PC12 Cells and Caco-2 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph18042126	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 該当する

1. 著者名 Shin Sato, Yuuka Mukai	4. 巻 13
2. 論文標題 Modulation of chronic inflammation by quercetin: The beneficial effects on obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 421-431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/JIR.S228361	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 Kaniz Fatima Binte Hossain, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito, Masaaki Kurasaki	4. 巻 146
2. 論文標題 Amelioration of butylated hydroxytoluene against inorganic mercury induced cytotoxicity and mitochondrial apoptosis in PC12 cells via antioxidant effects	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fct.2020.111819	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 -

1. 著者名 Md Shiblur Rahaman, Shojiro Yamasaki, Kaniz Fatima Binte Hossain, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito, Masaaki Kurasaki,	4. 巻 144
2. 論文標題 Effects of curcumin, D-pinitol alone or in combination in cytotoxicity induced by arsenic in PC12 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fct.2020.111577	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 該当する

1. 著者名 Md Shiblur Rahaman, Subrata Banik, Mahmuda Akter, Md Mostafizur Rahman, Md Tajuddin Sikder, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito, Masaaki Kurasaki	4. 巻 200
2. 論文標題 Curcumin alleviates arsenic-induced toxicity in PC12 cells via modulating autophagy/apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecoenv.2020.110756	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 該当する

1. 著者名 Serene Ezra Corpus Bondad, Masaaki Kurasaki	4. 巻 198
2. 論文標題 Analysis of Cadmium, Epigallocatechin Gallate, and Vitamin C Co-exposure on PC12 Cellular Mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological Trace Element Research	6. 最初と最後の頁 627-635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12011-020-02097-9	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 -

1. 著者名 Akter Mahmuda, Ullah A. K. M. Atique, Rahaman Md. Shiblur, Rahman Md. Mostafizur, Sikder Md. Tajuddin, Hosokawa Toshiyuki, Saito Takeshi, Kurasaki Masaaki	4. 巻 30
2. 論文標題 Stability Enhancement of Silver Nanoparticles Through Surface Encapsulation via a Facile Green Synthesis Approach and Toxicity Reduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials	6. 最初と最後の頁 1956 ~ 1965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10904-019-01373-z	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 該当する

1. 著者名 Rahaman Md. Shiblur, Akter Mahmuda, Rahman Md. Mostafizur, Sikder Md. Tajuddin, Hosokawa Toshiyuki, Saito Takeshi, Kurasaki Masaaki	4. 巻 74
2. 論文標題 Investigating the protective actions of D-pinitol against arsenic-induced toxicity in PC12 cells and the underlying mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Toxicology and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 103302 ~ 103302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.etap.2019.103302	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 該当する

1. 著者名 Binte Hossain Kaniz Fatima, Rahman Md Mostafizur, Sikder Md Tajuddin, Hosokawa Toshiyuki, Saito Takeshi, Kurasaki Masaaki	4. 巻 192
2. 論文標題 Regulatory effects of dihydrolipoic acid against inorganic mercury-mediated cytotoxicity and intrinsic apoptosis in PC12?cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 110238 ~ 110238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecoenv.2020.110238	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 該当する

1. 著者名 Hossain Kaniz Fatima Binte, Hosokawa Toshiyuki, Saito Takeshi, Kurasaki Masaaki	4. 巻 207
2. 論文標題 Zinc-pretreatment triggers glutathione and Nrf2-mediated protection against inorganic mercury-induced cytotoxicity and intrinsic apoptosis in PC12 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 111320 ~ 111320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecoenv.2020.111320	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 該当する

1. 著者名 Hossain Kaniz Fatima Binte, Rahman Md Mostafizur, Sikder Md Tajuddin, Hosokawa Toshiyuki, Saito Takeshi, Kurasaki Masaaki	4. 巻 207
2. 論文標題 Selenium modulates inorganic mercury induced cytotoxicity and intrinsic apoptosis in PC12 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 111262 ~ 111262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecoenv.2020.111262	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 該当する

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 蔵崎正明, アクター マームーダ, 佐藤伸, 向井友花, 齋藤健, 細川敏幸
2. 発表標題 ポリフェノール類によるHepG2細胞におけるアポトーシス誘導機構
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Saito, T. Kawahara, T. Hosokawa, M. Kurasaki
2. 発表標題 Imbalance between ROS expression and their metabolic mechanisms causes accelerated aging in senescence accelerated mouse P10
3. 学会等名 8th International Symposium Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Kurasaki, M. Akter, S. Sato, Y. Mukai, T. Hosokawa, T. Saito
2. 発表標題 Epigallocatechin-3-gallate and resveratrol showed anticancer ability on HepG2 and Caco2 cells through intrinsic apoptosis pathway following autophagy
3. 学会等名 8th International Symposium Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Kurasaki, M. Akter, T. Saito, T. Hosokawa
2. 発表標題 Epigallocatechin-3-gallate induced anticancer efficiency on Caco2 cells through the inhibition of cell proliferation following apoptosis
3. 学会等名 Scottish Section Conference 2023 Diet and Health Inequalities (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎尚二郎、Ketema Rahel、大野由貴、小泉一成、戴寧、佐藤伸、蔵崎正明、細川敏幸、齋藤健
2. 発表標題 授乳期の母親の緑茶摂取は継続的な高脂肪摂取による仔ラットの肝臓資質蓄積を抑制する
3. 学会等名 第91回日本衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mahmuda Akter、細川敏幸、齋藤健、蔵崎正明
2. 発表標題 エピガロカテキン-3-ガレートの結腸直腸癌細胞における抗癌効果およびそのメカニズム
3. 学会等名 第91回日本衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野由貴、山崎尚二郎、Ketema Rahel、小泉一成、戴 寧、佐藤 伸、蔵崎正明、齋藤 健
2. 発表標題 母ラットの高脂肪食、緑茶抽出物が仔ラットのオートファジー機能へ及ぼす影響
3. 学会等名 第91回日本衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Bondad Serene Ezra Corpus、沖野龍文、齋藤 健、蔵崎正明
2. 発表標題 PC12細胞におけるエピガロカテキンガレート熱酸化生成物のカドミウム毒性に対する影響
3. 学会等名 第91回日本衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mahmuda Akter、齋藤健太郎、江良宙夢。細川敏幸、齋藤 健、蔵崎正明
2. 発表標題 PC12細胞における銀ナノ粒子の細胞毒性効果とそのメカニズム
3. 学会等名 第31回日本微量元素学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shunitz Tanaka, Masaaki Kurasaki, Masaaki Morikawa, and Yuichi Kamiya (eds.)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 1183
3. 書名 Design of Materials and Technologies for Environmental Remediation, Hdb Env Chem	

〔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
研究分担者	齋藤 健 (Saito Takeshi) (40153811)	北海道大学・保健科学研究所・客員研究員 (10101)	
研究分担者	佐藤 伸 (Sato Shin) (40310099)	青森県立保健大学・健康科学部・教授 (21102)	
研究分担者	向井 友花 (Mukai Yuuka) (60331211)	神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・教授 (22702)	
研究分担者	藏崎 正明 (Kurasaki Masaaki) (80161727)	北海道大学・地球環境科学研究所・客員研究員 (10101)	

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		
バングラデシュ	Jahangirnagar University		