

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05440

研究課題名(和文) 新たな機序の抗癌剤開発に向けて：食品成分の癌幹細胞抑制メカニズムの解析

研究課題名(英文) The development of anticancer drugs via novel function: Analysis of cancer stem cell suppression mechanisms of food component

研究代表者

遠藤 弘史 (Endo, Hiroshi)

滋賀県立大学・人間文化学部・准教授

研究者番号：30567912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：クルクミンとヘスペレチンは、癌細胞に対して抑制効果を発揮することが知られている。我々はこれまでにこれらの効果は、転写因子であるHSF1の抑制効果に基づくものであることを明らかにしてきた。HSF1は正常な細胞では、ストレスが加わった際に活性化し、細胞を細胞死から守る役割を担っている。一方、癌細胞においてHSF1は、常に活性化することで細胞死誘導から回避していることが知られている。さらに近年、HSF1は癌の再発や転移の大きな要因である癌幹細胞の維持にもかかわっていることが明らかとなった。本研究は、クルクミンとヘスペレチンがHSF1を抑制効果することで、癌幹細胞に対して抑制的に働くことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、日本人の死因第一位はがんであり、日本人の二人に一人はがんに罹患すると言われている。医療技術が発達してもがんによる死亡率が下らない大きな要因として、がんは転移や再発が防げないことがある。この転移・再発の原因として癌幹細胞の存在が注目されている。癌幹細胞は化学療法や放射線治療に対しても耐性を有していることも知られている。本研究では、この癌幹細胞に対して抑制効果を発揮する成分を食品中から見出し、新たな抗癌剤の候補として、その効果や作用機序を明らかとしており、次世代のがん治療の一つの候補となることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Curcumin and hesperetin are known to exert inhibitory effects on cancer cells. We have previously shown that these effects are based on the repressive effect of the transcription factor HSF1, which is activated upon stress in normal cells and protects cells from cell death. On the other hand, in cancer cells, HSF1 is known to evade cell death induction by being constantly activated. Recently, HSF1 has been shown to be involved in the maintenance of cancer stem cells, a major factor in cancer recurrence and metastasis. In this study, we found that curcumin and hesperetin act in an inhibitory manner against cancer stem cells through their inhibitory effects on HSF1.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：HSF1 癌幹細胞 ストレスタンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の主な治療法には、外科的切除・化学療法・放射線療法などが知られているが、外科的切除が可能な早期癌を除き、多くの進行癌においては遠隔臓器への転移や再発が認められることから、その根治は困難と考えられている。長年に渡る癌研究の成果に基づきその治療法の目覚ましい進歩が認められる一方、未だ、癌の転移・再発を抑制できる有効な治療方法は確立されていない。

(2) 我々はこれまで、癌の転移・再発にかかわる因子として HSF1 に着目しており、実際に、HSF1 は腫瘍形成や癌の進行に関与していることが分かっており、様々な癌種において、HSF1 の発現量と核への局在化が正常細胞と比較して著しく亢進していることが報告されている。さらに、当研究室ではいくつかの食品成分にこの HSF1 を抑制する効果を有するものを見出している。

2. 研究の目的

近年の数々の疫学研究の結果から、食生活による癌をはじめとする生活習慣病の予防効果が期待されるようになった。本研究の目的は、食品成分による HSF1 抑制が癌細胞の転移・再発を抑制するかどうか、癌幹細胞に着目することでその効果と作用メカニズムを明らかにすることである。

離れ HSF1 は三量体を形成する。その後核内へ移行し、DNA 結合部位である Heat Shock Element (HSE) へ結合することで、標的遺伝子の転写を制御する。HSF1 の転写活性はリン酸化によって制御されることが知られており、特に 326 番目のセリン残基(S326)がリン酸化されると転写活性が促進される。それ故、S326 のリン酸化は、HSF1 の活性化の指標として用いられているが、その促進メカニズムの詳細は未だ分かっていない。

3. 研究の方法

細胞増殖抑制効果は WST-8, MTT アッセイで、その機序は W.B.法, Annexin-V/PI 染色, JC-1 染色により解析した。EMT に与える影響は、ヘスペレチン添加又は RNAi 法によ

る HSF1 の発現抑制後，遊走及び浸潤能をそれぞれスクラッチ並びにボイデンチャンバーアッセイにより検討した．EMT 関連因子は RT-qPCR 法で解析を行った．CSCs に与える影響は，CD44 標識磁気ビーズにより CSCs を分離後，ヘスペレチンを添加し WST-8 アッセイにより細胞生存率を評価した．自己複製能へ与える影響は，スフェアにヘスペレチン又は HSF1 阻害剤を添加後，スフェア形成アッセイ並びに軟寒天コロニー形成アッセイにより検証した．

4．研究成果

(1) CSCs の有する自己複製能に着目し解析を行った．腫瘍の再形成においては CSCs の自己複製が起点となることから，自己複製能を阻害することは，癌の転移・再発の抑制に繋がる事が予想できる．そこで，ヘスペレチンが CSCs の自己複製能に与える影響について検討をおこなった．CSCs は，自己複製能と共にアノキス耐性能を有することから，細胞を低接着シャーレに無血清培地で浮遊培養することで，CSCs を豊富に含む sphere が形成される．そこでこれら sphere 形成能を評価することで，自己複製能を評価することができる．SW480 を低接着プレートに播種し無血清培地で 1 週間培養後，一度細胞を回収して再播種し，ヘスペレチン添加後さらに 1 週間培養した．直径が 100 μm 以上のものを sphere 形成ありと判定しその sphere 形成数を測定した．その結果，ヘスペレチン添加濃度依存的に sphere 形成数の有意な低下が認められた (図 1) ．

(2) これら SW480 による sphere 形成能に対する抑制効果から，ヘスペレチンは，SW480 の自己複製能に抑制的に作用していることが明らかとなった．また，自己複製能の低下と CSCs 特性の関係を検証するため，ヘスペレチン添加による，sphere

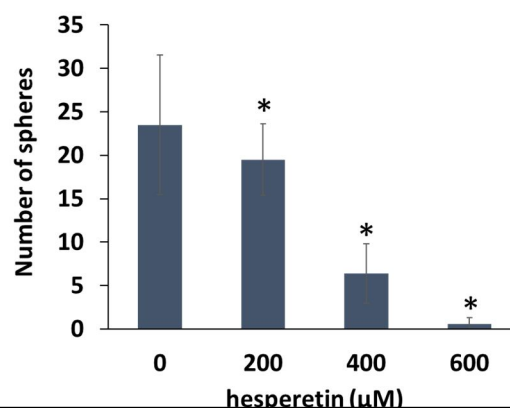


図 1 ヘスペレチンの sphere 形成抑制効果

における CSCs マーカー並びに CSCs 特性の維持に関わる遺伝子の mRNA 発現量に与える影響を RT-qPCR 法により解析した。その結果、ヘスペレチン添加により、CSCs マーカーである CD44 と DCLK1 の発現量の有意な減少が認められた(図 2)。また、自己複製能を含む CSCs 特性の維持に重要となる Sox2 と Nanog の発現量の有意な低下も認められた(図 3)。以上の結果から、ヘスペレチンは、SW480 において Sox2 や Nanog といった CSCs 特性の維持に重要な遺伝子の発現を低下させることで、自己複製能を抑制している可能性が示唆された。

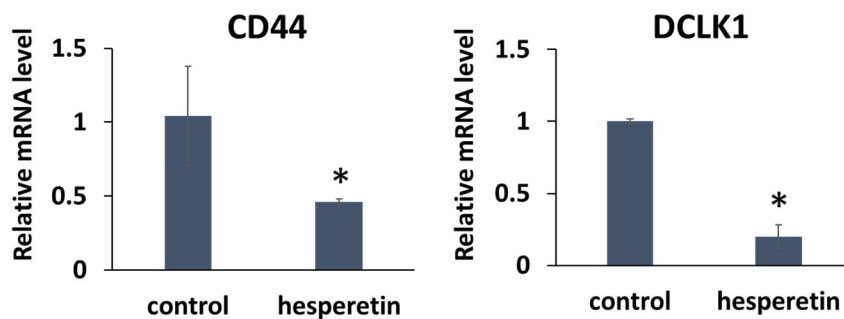


図 2 ヘスペレチンの癌幹細胞マーカー発現抑制効果

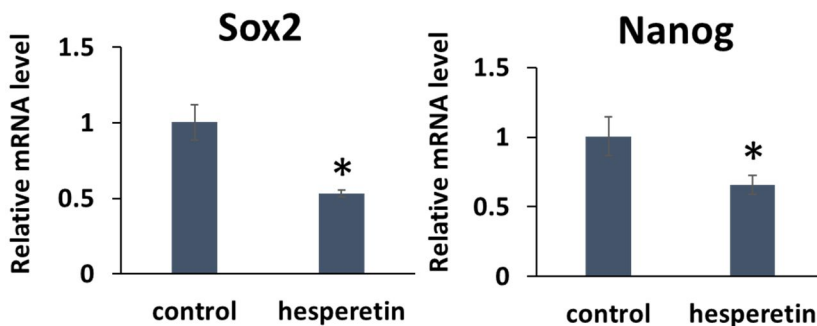


図 3 ヘスペレチンの幹細胞マーカー発現抑制効果

(3) これまでに、ヘスペレチンは CSCs 特性を低下させその自己複製能を抑制すること、また、ヘスペレチンは sphere における HSF1 の機能を阻害していることが明らかとなった。そこで次に、HSF1 の機能阻害が CSCs 特性並びにその自己複製能与える影響について解析を行った。HSF1 の機能を阻害するにあたり、siRNA によるノックダウンはその阻害効果が短時間で長期間を要する自己複製能の評価には適さないことから、HSF1 の阻害剤である

DTHIB を用いて検討を行った。まず，DTHIB による HSF1 の機能の阻害効果を確認するため，sphere に DTHIB を添加し 7 日間培養後，HSF1 によりその転写が調節されている Hsp70 の mRNA の発現量を RT-qPCR 法により解析した。その結果，DTHIB 添加により Hsp70 の有意な発現量の低下が認められ，DTHIB は，HSF1 の転写因子としての機能を抑制していることが確認された。続いて，DTHIB を添加し sphere 形成アッセイを行った。その結果，DTHIB 添加により sphere 形成能の有意な低下が認められた (図 4)。これら結果により，HSF1 の機能阻害により CSCs の自己複製能が抑制されていることが明らかとなった。さらに，sphere に DTHIB を添加し 7 日間培養後，RT-qPCR 法により Sox2 の mRNA 発現量を解析したところ，DTHIB 添加により Sox2 の発現量の有意な低下が認められた (図 5)。これらの結果は，HSF1 の機能阻害により Sox2 の転写が抑制されていることを示している。以上の結果から，ヘスペレチンは、HSF1 対してその機能を阻害することで Sox 2 の発現量を低下させ，これにより CSCs の自己複製能が抑制されていた可能性が示唆された。

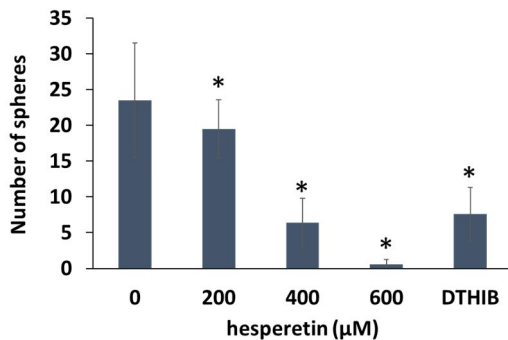


図 4 HSF1 阻害によるスフェア形成抑制効果

以上のことより，本研究ではヘスペレチンが大腸癌細胞に含まれる癌幹細胞を抑制することで，癌の悪性度を低下させることを明らかとした。このことは，新たな標的の抗がん剤の開発につながる重要な情報を得られたと考えている。

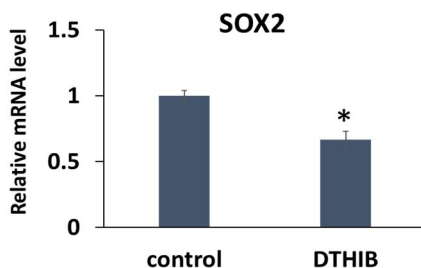


図 5 HSF1 阻害による SOX2 発現抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka Masaya, Endo Hiroshi, Sakusa Konatsu, Yano Mihiro	4. 巻 61
2. 論文標題 Hesperetin induces apoptosis in A549 cells via the Hsp70-mediated activation of Bax	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	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） 10.3892/ijo.2022.5433	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 黒川沙貴, 田中大也, 遠藤弘史, 矢野仁康
2. 発表標題 クルクミンが有するアノイキス誘導を介した癌転移抑制機能
3. 学会等名 第61回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒川沙貴, 田中大也, 遠藤弘史, 矢野仁康
2. 発表標題 クルクミンによる新規抗癌活性：アノイキス誘導を介した癌転移に対する抑制機能についての検討
3. 学会等名 第95回日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中大也, 遠藤弘史, 矢野仁康
2. 発表標題 ヘスベレチンによるHIF1 発現抑制を介したEMT抑制効果の検討
3. 学会等名 第95回日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Endo, Masaya Tanaka, Saki Kurokawa, Mihiro Yano
2. 発表標題 Curcumin suppresses cancer metastasis by inducing anoikis in cancer cells.
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaya Tanaka, Konatsu Sakusa, Hiroshi Endo, Mihiro Yano
2. 発表標題 Hesperetin attenuates cancer stemness properties by down-regulating the expression of heat shock factor 1 in non-small lung cancer cells.
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒川沙貴, 遠藤弘史, 矢野仁康
2. 発表標題 クルクミンが有する癌細胞転移に対する抑制機能についての解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中大也, 遠藤弘史, 矢野仁康
2. 発表標題 ヘスペレチンはHSF1を介して癌細胞の上皮間葉転換を抑制する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

滋賀県立大学 知のリソース
https://db.spins.usp.ac.jp/html/100000270_ja.html
滋賀県立大学 知のリソース
http://db.spins.usp.ac.jp/html/100000270_ja.html

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