

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659336

研究課題名（和文） 酪酸の癌予防効果を増強する新規分子標的併用予防法の開発

研究課題名（英文） Novel molecular-targeting prevention of cancer by sensitizing the effect of sodium butyrate

研究代表者

酒井 敏行 (SAKAI TOSHIYUKI)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20186993

研究成果の概要（和文）：食物繊維の癌予防効果は限定的である。その原因として、抗腫瘍免疫を担う TRAIL の発現が、食物繊維の代謝産物である酪酸によって抑制されるためではないかと考えた。TRAIL 発現誘導能を有する乳酸菌を併用することにより、酪酸の癌予防効果が増強できるか検討した。ヒト末梢血単核球とヒト癌細胞の共培養モデルにおいて、酪酸と乳酸菌の併用試験を行った結果、顕著な併用効果が認められた。しかしながら予想に反し、酪酸による TRAIL の発現量の減少は乳酸菌併用では十分に回復しなかった。さらに TRAIL 経路の阻害剤では、酪酸と乳酸菌の併用効果が減少しなかったことから、TRAIL 以外の因子が存在すると考えられる。本研究の成果として、酪酸による癌予防効果が乳酸菌の摂取により増強される可能性を示すことができた。今後、さらにこの現象のメカニズムの解析を進めていく。

研究成果の概要（英文）：The cancer protective efficacy of the dietary fiber is restrictive. One of the reasons is that the expression of TRAIL which works on the antitumor immunity is suppressed by the butyric acid which is the metabolism product of the dietary fiber. It is considered that the cancer protective efficacy of butyric acid could be increased by the combination with a TRAIL inducer, lactic acid bacterium. As a result of the combination of butyrate and lactic acid bacterium in the co-cultivation model of human peripheral blood mononuclear cells and the human cancer cells, a remarkable combination effect was observed. However, the decrease in the expression of TRAIL by butyrate was not fully restored by the combination with lactic acid bacterium unexpectedly. Furthermore, because the combination effect could not be inhibited by the inhibitor of the binding of TRAIL-DR5, it is considered that several factors except TRAIL exist. As a result of this study, it is possible that cancer protective efficacy with the dietary fiber was reinforced by the intake of the lactic acid bacterium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：癌、TRAIL、併用、酪酸

1. 研究開始当初の背景

酪酸は、食物繊維が腸内発酵を受け生成される短鎖脂肪酸の一種であり、大腸癌の予防などにおいて重要な役割を果たすと考えられてきた。実際、申請者らも、癌の増殖を抑

制する遺伝子である p21、p15、p18、p19、gadd45 や、癌細胞死（アポトーシス）を起こす DR5 の発現が酪酸などの HDAC 阻害剤によって顕著に誘導されることを種々の癌細胞で見出したことから、極めて強力な癌予防

効果が期待された (J. Biol. Chem, 272, 22199, 1997、Oncogene, 23, 6261, 2004、他 4 報)。疫学研究においても、食物繊維の摂取量と大腸癌リスクとの相関性の大規模調査が多数行われたが、期待に反して、食物繊維摂取と大腸癌リスクとの、はっきりとした相関関係は認められなかった (JAMA, 294, 2849, 2005 他)。そこで、酪酸が癌予防に関する多くの有利な分子変動を示すにも関わらず、単独では限定した効果しか示さない原因を見出し、それを補強することにより、より有力な分子標的予防戦略を構築しうるか検討することとなった。

TRAIL や TRAIL 受容体のノックアウトマウスは発癌率の増加を示すことから (J. Immunol., 175, 5586, 2005、J. Clin. Invest., 118, 100, 2008)、TRAIL は現在、癌予防戦略において最も重要な分子の一つであると考えられている。TRAIL は免疫担当細胞から放出され、TRAIL 受容体を発現している癌細胞に特異的にアポトーシスを誘導する。申請者らは酪酸がヒト癌細胞に対し TRAIL 受容体の発現量を増加させることにより強力なアポトーシスを誘導することを見出した (Oncogene, 23, 6261, 2004)。しかしながら、その後の研究によって、申請者らはこの酪酸が TRAIL の発現を抑制することを見出した。このことは HDAC 阻害剤が TRAIL 発現抑制作用を有しているという最近の報告とも矛盾しない (Immunobiology, 215, 756, 2010)。一方、申請者らは免疫細胞に食品 (漬物) 由来の乳酸菌を添加すると、サイトカインである IFN- α や IFN- γ を介して、TRAIL の発現が誘導されることを見出している (FEBS Lett., 584, 577, 2010)。このことから、乳酸菌を用いることで、酪酸により低下する TRAIL 発現量が補完でき、酪酸の癌予防効果を増強できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

日常摂取される食物繊維の癌予防効果を、食品に含まれる乳酸菌と併用することにより、申請者らが提唱する「癌の分子標的併用予防」を実践しうるか否かを、本研究により検証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞レベルにおける酪酸と乳酸菌の併用効果 (細胞死誘導効果) の検討

ヒト末梢血単核球 (PBMC) と癌細胞の共培養下で、酪酸と乳酸菌を添加する。各濃度や処理条件の検討を行い、最も癌細胞が死滅する条件を探す。培地中の TRAIL の濃度を ELISA で測定し、アポトーシス細胞の割合に関しては、フローサイトメーターを用いて定

量する。また、そのアポトーシスにおける TRAIL 経路の寄与を確認するため、TRAIL と TRAIL 受容体の結合を阻害する DR5/Fc キメラを用い、癌細胞の細胞死を阻害できるか否か検証する。

さらに、酪酸が癌細胞に対しアポトーシス関連因子群の発現量に与える影響を Western blotting にて検討する。

(2) 酪酸による TRAIL 発現抑制メカニズムの解明

酪酸によって、mRNA レベルで TRAIL 発現の抑制が認められたことから、直接、TRAIL 産生細胞が転写調節により発現抑制を受けているかをプロモーターアッセイにより調べる。酪酸の添加によって、TRAIL プロモーター活性に与える影響を検討する。変化が認められた場合、TRAIL プロモーター上の酪酸制御部位を明らかにし、酪酸による TRAIL 発現制御に関わる転写因子を解明する。

(3) HDAC 阻害活性を有する酪酸以外の食品成分での検討

酪酸の他にも、HDAC 阻害活性を有する食品成分として、ブロッコリーなどアブラナ科植物に多く含まれる sulforaphane (SFN)、ニンニクの成分である diallyl trisulfide (DATS)、diallyl disulfide (DADS) などが報告されていることから (Curr. Drug Targets, 7, 443, 2006)、酪酸と同様に HDAC 阻害活性を介しての癌細胞に対する TRAIL 受容体の発現増強作用を有する可能性がある。加えて、免疫細胞に対しては、TRAIL の発現抑制作用を有する可能性もあることから、酪酸と同様に上記 (1) の試験を行う。

4. 研究成果

(1) 細胞レベルにおける酪酸と乳酸菌の併用効果 (細胞死誘導効果) の検討

PBMC とヒト癌細胞の共培養モデルにおける、酪酸と乳酸菌の併用試験を行った。その結果、ヒト大腸癌細胞株において、酪酸の効果が乳酸菌の免疫賦活作用によって有意に増強されることを見出した (図 1)。

培地中の TRAIL 量は、酪酸添加によって有意に減少した。そこに乳酸菌を添加したところ、培地中 TRAIL 量は定常レベルにまでは回復した。しかしながら、乳酸菌のみを添加した条件ではコントロールに比較し、約 10 倍の顕著な TRAIL 量の増加が認められたことと比較すると、併用効果の認められた酪酸 3 mM 添加時には、乳酸菌による TRAIL 発現回復効果は、顕著とはいえない結果であった (図 2)。

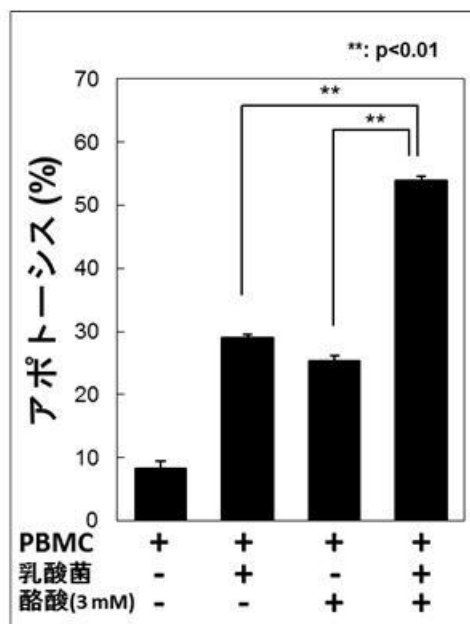


図1 ヒト大腸癌細胞に対する酪酸と乳酸菌の併用によるアポトーシス誘導効果 (PBMC共培養)

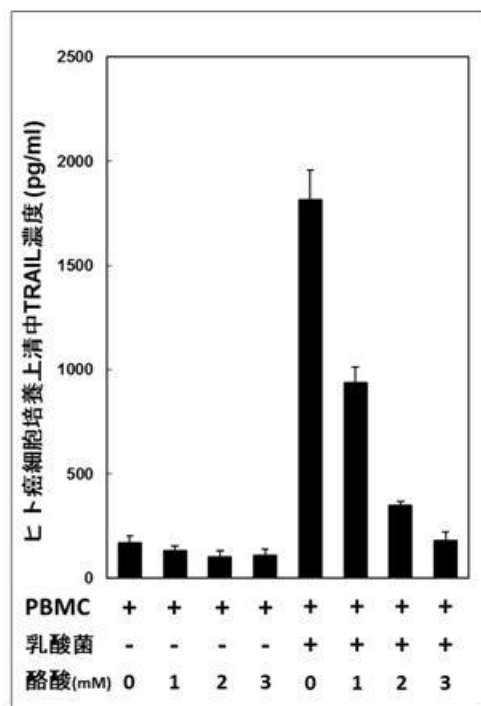


図2 酪酸と乳酸菌の併用による培養上清中TRAIL濃度の測定 (PBMC共培養)

TRAIL 受容体のキメラタンパク質を用いた阻害実験の結果、癌細胞の細胞死を阻害できなかったことから、酪酸と乳酸菌の顕著な併用効果は、TRAIL 以外の因子によるものと考えられる。この現象のメカニズムの一つとして、酪酸が癌細胞にアポトーシス感受性を高めていると考えられたことから、酪酸によるアポトーシス関連因子群の発現量の変化を検討した結果、アポトーシス誘導に寄与する

Bim、DR5 の発現誘導が認められた (図 3)。

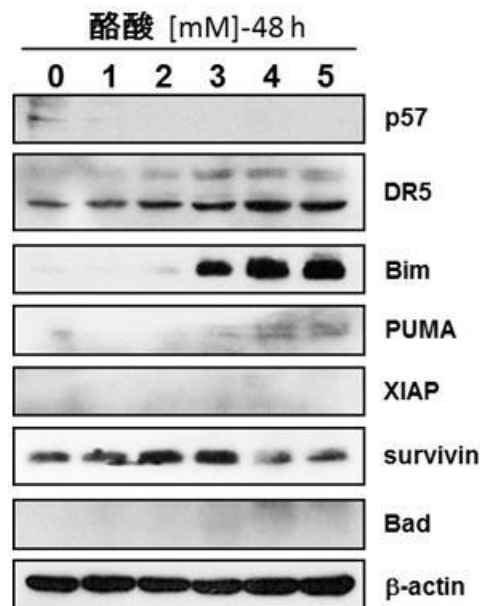


図3 ヒト癌細胞に対するアポトーシス関連因子発現量への酪酸の影響

(2) 酪酸による TRAIL 発現抑制メカニズムの解明

PBMC の代わりにヒト癌細胞をモデルとして用いた TRAIL プロモーターアッセイにより、酪酸の添加が TRAIL プロモーター活性に与える影響を検討した。TRAIL プロモーター活性化剤として、既報から IFN- α を用いた。その結果、今回の条件においては、IFN- α の効果に対し、酪酸による抑制傾向は認められたものの、有意差は認められなかった (図 4)。さらに条件検討の必要がある。

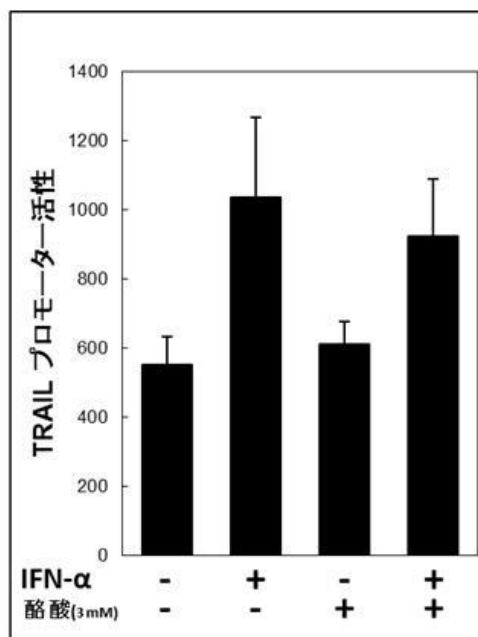


図4 酪酸のTRAILプロモーター活性への影響

(3) HDAC 阻害活性を有する酪酸以外の食品成分での検討

酪酸以外にも、HDAC 阻害活性を有する食品成分として、SFN、DATS について、酪酸と同様に上記(1)の試験を行った。PBMC とヒト癌細胞の共培養モデルにおける、SFN、および DATS と乳酸菌の併用試験を行った。

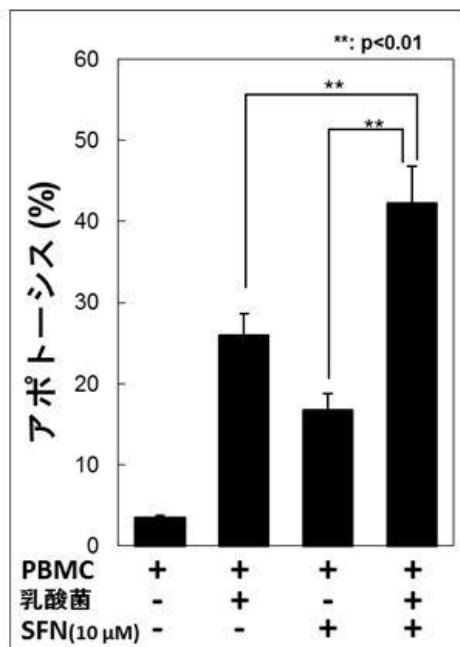


図5 ヒト大腸癌細胞に対するSFNと乳酸菌の併用によるアポトーシス誘導効果 (PBMC共培養)

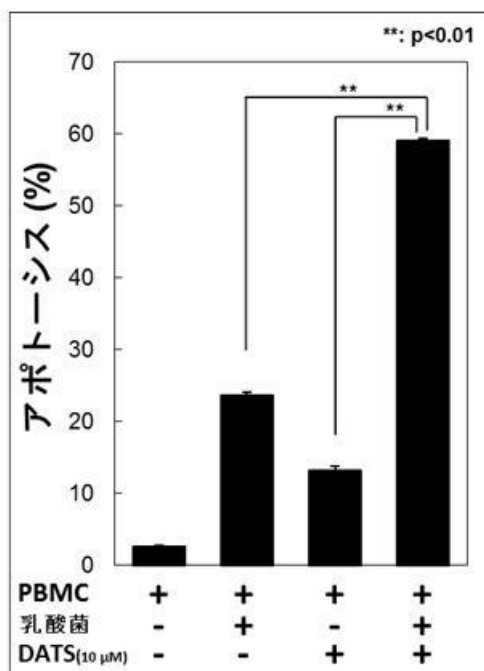


図6 ヒト大腸癌細胞に対するDATSと乳酸菌の併用によるアポトーシス誘導効果 (PBMC共培養)

その結果、ヒト大腸癌細胞株において、SFN、および DATS のそれぞれの効果が乳酸菌の免疫賦活作用によって有意に増強されることを見出した (図 5,6)。

最後に、癌細胞に対する TRAIL 感受性増強成分を新たに 2 種類、免疫細胞にする TRAIL 誘導成分を 1 種類見出し、報告することができた。これらの成分の併用効果や癌予防効果の検証、メカニズム解析も進めていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ①Masahide Shinnoh, Mano Horinaka, Takashi Yasuda, Sae Yoshikawa, Mie Morita, Takeshi Yamada, Tsuneharu Miki, Toshiyuki Sakai. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 shows antitumor effects by enhancing the release of TRAIL from neutrophils through MMP-8. International Journal of Oncology, 42, 903, 2013. 査読有
10.3892/ijo.2013.1790.
- ②Hiroya Taniguchi, Mano Horinaka, Tatsushi Yoshida, Kimihiro Yano, Ahmed E Goda, Shusuke Yasuda, Miki Wakada, Toshiyuki Sakai. Targeting the glyoxalase pathway enhances TRAIL efficacy in cancer cells by downregulating the expression of antiapoptotic molecules. Molecular Cancer Therapeutics, 11 2294, 2012. 査読有
10.1158/1535-7163.
- ③Jun Fujiwara, Yoshihiro Sowa, Mano Horinaka, Makoto Koyama, Miki Wakada, Tsuneharu Miki, Toshiyuki Sakai. The anti-obesity drug orlistat promotes sensitivity to TRAIL by two different pathways in hormone refractory prostate cancer cells. International Journal of Oncology, 40, 1483, 2012. 査読有
10.3892/ijo.2012.1353.

〔学会発表〕(計 6 件)

- ①堀中真野. 癌の分子標的予防の腫瘍免疫への応用. 日本衛生学会奨励賞受賞講演. 第 83 回日本衛生学会学術総会. 2013 年 03 月 26 日; 金沢.
- ②堀中真野, 谷口浩也, 吉田達士, 安田周祐, 酒井敏行. methylglyoxal による XIAP と survivin の発現抑制と、TRAIL 誘導性アポトーシスの増強. 第 83 回日本衛生学会学術総会. 2013 年 03 月 25 日; 金沢.
- ③堀中真野, 谷口浩也, 吉田達士, 安田周祐, 酒井敏行. メチルグリオキサールは癌細胞において XIAP や survivin の発現を減少させ、TRAIL 感受性を増強する. 第 12 回分子予防環境医学研究会. 2013 年 02 月 01 日; つくば.

- ④神農雅秀, 堀中真野, 上田崇, 木村泰典, 中村晃和, 本郷文弥, 三神一哉, 高羽夏樹, 河内明宏, 酒井敏行, 三木恒治. 酪酸菌による好中球からのTRAIL放出機構の解析とその臨床応用への検討. 第 100 回日本泌尿器科学会総会. 2012 年 04 月 23 日; 横浜.
- ⑤堀中真野, 神農雅秀, 三木恒治, 酒井敏行. 酪酸菌による TRAIL 誘導とその抗腫瘍効果の検討-第 2 報-. 第 82 回日本衛生学会学術総会. 2012 年 3 月 25 日; 京都.
- ⑥神農雅秀, 堀中真野, 三木恒治, 酒井敏行. 酪酸菌による好中球からの TRAIL 放出促進機構とその抗腫瘍効果の検討. 第 11 回分子予防環境医学研究会 2012 年 1 月 28 日; 岡山.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 敏行 (SAKAI TOSHIYUKI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：20186993

(2) 研究分担者

友杉 (堀中) 真野
(TOMOSUGI (HORINAKA) MANO)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：80512037

(3) 連携研究者

()

研究者番号：