

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：33916
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26860714
研究課題名(和文) 25(OH)D3によるガン細胞増殖抑制に関する研究

研究課題名(英文) Anti-proliferative effect of 25(OH)D3

研究代表者

宗網 栄二 (Eiji, Munetsuna)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：30600431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンDの細胞増殖抑制作用機構に関する研究を行った。従来の学説では活性型ビタミンDである1,25(OH)2D3が増殖抑制作用を有するとされていた。活性型ビタミンD3はCYP27B1による水酸化を経て合成される。つまりビタミンD3の作用にはCYP27B1が欠かせない。一方、申請者は以前、CYP27B1による水酸化を受けないビタミンD誘導体が細胞増殖抑制作用を示した。この知見を基に、生体内でCYP27B1による水酸化を受けていない25(OH)D3(非活性型)の生理活性を仮説し、本研究を行った。その結果、25(OH)D3も程度細胞増殖抑制作用を有する事を明らかとし、そのメカニズムも検討した。

研究成果の概要(英文)：According to current paradigm, it has been well established that 1,25(OH)2D3 is a active vitamin D that has anti-proliferative activity. 1,25(OH)2D3 is synthesized by CYP27B1. Namely, CYP27B1 plays important roles in biological activity of vitamin D3. While, the applicant reported that vitamin D3 metabolite that is not substrate for CYP27B1, has unique activity, suggesting the possibility that vitamin D3 may exert its activity without hydroxylation mediated by CYP27B1. Based on these findings, current study tried to examine the anti-proliferative effects of 25(OH)D3, that is a precursor of 1,25(OH)2D3. As expected, 1,25(OH)2D3 inhibit proliferation of human prostate cancer cell. Similar results were obtained with 25(OH)D3. Given the results of microarray, the mechanism was also examined. Consequently, several proteins such as cystatin D plays important roles in 25(OH)D3 action.

研究分野：生化学

キーワード：vitamin D3 25(OH)D3

1. 研究開始当初の背景

ビタミン D₃ は 25(OH)D₃ (プロホルモン) が 1 α ,25(OH)₂D₃ (活性型ビタミン D₃) に変換されて作用するというのが通説である。活性型ビタミン D₃ は細胞増殖抑制作用を持つため、ガン治療への応用が考案されてきた。しかし、全身投与すると高カルシウム血症が誘発される。またビタミン D-24 位水酸化酵素 (CYP24A1) による不活化を受けるため、作用時間が短いとされる。一方、申請者はプロホルモンとされて来た 25(OH)D₃ やその誘導体がヒト正常前立腺細胞の細胞増殖を抑える効果があることを証明した 25(OH)D₃ はカルシウム上昇作用が弱く、CYP24A1 による不活化を受けにくい。25(OH)D₃ を基盤にしたガン治療薬は副作用の少ないものになると期待される。

2. 研究の目的

本研究はガン細胞における 25(OH)D₃ の増殖抑制効果を調べる。そしてこの分子をベースにしたガン治療の可能性を探る。多くのガン細胞ではビタミン D を分解する酵素 (CYP24A1) が未知の機構で過剰発現している。25(OH)D₃ は CYP24A1 による不活性化を比較的受けにくいビタミン D である。しかし、CYP24A1 活性を抑え、25(OH)D₃ の不活化を防ぐ事は、増殖抑制作用を強め、効果時間の延長につながると予想される。CYP24A1 の良い阻害剤はない。そこで本研究では、過剰発現のメカニズム解明に取り組み、発現を抑制する為の標的を見つける。申請者の未発表のデータから、ガン細胞周囲の環境が転写活性化に重要であるらしい。その環境因子や細胞内シグナルを同定する。これらの因子を阻害することで 25(OH)D₃ のガン増殖抑制効果を一層強める。疫学的なデータでは、血中 25(OH)D₃ の減少は前立腺ガンリスクを上昇させる。このことは 25(OH)D₃ が減少すると十分量の活性型ビタミン D₃ が合成できない為と説明されてきた。しかし、申請者のヒト正常前立腺細胞での研究では、細胞内で 25(OH)D₃ から活性型ビタミン D₃ は極僅かしか合成されず、生理作用は弱かった。またガン細胞ではほとんど活性型ビタミン D₃ は検出されない。このことは 25(OH)D₃ 自体が直接、ガン細胞増殖に関わっていることを示唆する。これまで 25(OH)D₃ は単なるプロホルモンだと考

えられていた。本研究はビタミン D₃ の常識を覆し、それを応用する研究である。このように本研究では、生理活性がないと考えられて来た 25(OH)D₃ に焦点を当て、ガン細胞増殖抑制作用について明らかにする。また臨床応用を視野に入れて、より効果が持続する様に CYP24A1 の転写メカニズムについても取り組む。将来的には CYP24A1 発現を阻害しながら 25(OH)D₃ を投与する効果的なガン治療に発展させたい。

3. 研究の方法

CYP24A1 が過剰発現している細胞株 (前立腺ガン、皮膚ガンなど) を培養し、25(OH)D₃ によって増殖が抑えられるかを解析する。また、細胞内での代謝を調べたり、代謝に関わる酵素のノックダウン実験を行い、作用機構について解析する。

CYP27B1 ノックアウトマウス (活性型ビタミン D₃ を合成できないマウス) を DMBA 処理し、皮膚ガンの増殖が 25(OH)D₃ により抑えられるかを調べる。必要に応じてヌードマウスを用いてガンモデルマウス (前立腺ガン) を作成し、25(OH)D₃ を投与し、ガン増殖に与える影響を解析する。

細胞密度により CYP24A1 の発現が変化する仕組みを調べる。CYP24A1 発現に影響する環境因子を同定する。どのようなシグナルを介して転写活性化につながるか、またクロマチン構造の変化など CYP24A1 の転写活性化機構を解析する。

4. 研究成果

本研究の初年度では、25(OH)D₃ による細胞増殖作用を改めて検討した。実験ではヒト前立腺細胞株 (PZ-HPV-7) の細胞培養液中に 25(OH)D₃ を添加し、MTT アッセイを用いて細胞増殖能の変化を調べた。10 - 100 nM 処理により増殖は有意に抑えられた。またこのときビタミン D 受容体の標的遺伝子である CYP24A1 の mRNA 量を解析したところ、500 倍以上の増加が見られた。この現象は CYP27B1 をノックダウンさせた細胞でも見られた事から、25(OH)D₃ は CYP27B1 による活性型ビタミン D₃ への変換を受けなくても直接ビタミン D 受容体に結合し、その作用を引き起こす可能性が示された。

DNA マイクロアレイの結果から、25(OH)D3 による細胞増殖抑制にシスタチン D などが関与することが示唆されているので、これらタンパクの関与を調べた。ヒト前立腺細胞株に過剰発現させたところ、細胞増殖が有意に抑えられた。これらタンパクは 25(OH)D3 による細胞増殖抑制に関与するのかもしれない。また興味深いことに、シスタチン D はビタミン D3 による増殖抑制作用を受けにくい細胞株 (DU145) では、ビタミン D3 による転写活性化を受けないことがわかった。このメカニズムとして、プロモーターのメチル化が関与する可能性を考慮し、エピジェネティックな解析を試みたがうまく行かなかった。

また、本研究ではビタミン D を迅速に分解し、その作用を軽減させるタンパクである CYP24A1 が細胞密度により大きくかわることを見いだした。このことは細胞密度が上昇するにつれてビタミン D の影響が弱まることを示唆する。このときビタミン D 受容体が、ビタミン D 不存在かにも関わらず、核内に移行していた。ビタミン D 非依存的な転写活性化機構の存在が示唆された。

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 6 件)

1. High Fructose consumption and the epigenetics of DNA methylation

Eiji Munetsuna (分担執筆)

The Handbook of Nutrition, Diet and Epigenetics 2017 刊行予定

2. Circulating microRNAs in Graves' s Disease in Relation to Clinical activity.

Hiratsuka I, Yamada H, Munetsuna E Hashimoto S, Ito M (5 人中 3 番目)

Thyroid in press (査読有り)

3. Fructose intake during gestation and lactation differentially affects the expression of hippocampal neurosteroidogenic enzymes in rat offspring.

Mizuno G, Munetsuna E (共同筆頭) 他 9 名 (11 人中 2 番目: 共同筆頭著者)

Endocr Res in press (査読有り)

4. Stability of serum high-density

lipoprotein-microRNAs for

prenatal conditions. Ishikawa H, Yamada H, Taromaru N, Kondo K, Nagura A, Yamazaki M, Ando Y, Munetsuna E 他 3 名 (11 人中 8 番目)

Ann Clin Biochem in press (査読有り)

5. Fructose consumption induces hypomethylation of hepatic mitochondrial DNA in rats.

Yamazaki M, Munetsuna E, Yamada H 他 8 名 (11 人中 2 番目)

Life sciences 2016 149:146-52 (査読有り)

6. Metabolism and Action of

25-hydroxy-19-nor Vitamin D3 in Human Prostate Cells. Munetsuna E, Kittaka A, Chen TC, Sakaki T (4 人中 1 番目)

Vitam Horm 2016 100:357-77 (査読有り)

[学会発表](計 11 件)

1. 宗網栄二、母獣のフルクトース摂取が次世代の副腎コルチコステロン合成に及ぼす影響 日本内分泌学会 (2017)、ロームシアター京都

2. Kanako kondo, Hiroaki Ishikawa, Hiroya Yamada, Mirai Yamazaki, Yuri Murase, Genki Mizuno, Takeru Ota, Eiji Munetsuna, Koji Suzuki, Ryoji Teradaira, Koji Ohashi The establishment of simpler method for measuring HDL-miRNAs 14th Assi-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress (APFCB 2016)

3. Genki Mizuno, Hiroya Yamada, Mirai Yamazaki, Takeru Ota, Yuri Murase, Kanako Kondo, Eiji Munetsuna, Hiroaki Ishikawa, Koji Ohashi, Koji Suzuki Basic Study on DNA methylation analysis -Targeting Promoter Region of Cytokine Genes in Human Whole Blood 14th Assi-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress (APFCB 2016)

4. Yuri Murase, Eiji Munetsuna, Hiroya Yamada, Mirai Yamazaki, Kanako Kondo, Takeru Ota, Hiroaki Ishikawa, Ryoji Teradaira, Koji Suzuki, Koji Ohashi Maternal Fructose consumption alters gene expression involved in Hepatic Glucocorticoid Metabolism in Rat Offspring. 14th Assi-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress

(APFCB 2016)

5. 水野元貴、村瀬悠理、山崎未来、近藤奏子、太田駿留、山田宏哉、**宗網栄二**、石川浩章、寺平良治、鈴木康司、大橋鉦二
妊娠授乳期フルクトース過剰摂取モデルにおける仔の海馬酸化ストレス状態の解析 第63回日本臨床検査医学会学術集会 神戸ポートピアホテル
6. 近藤奏子、石川浩章、山崎未来、村瀬悠理、水野元貴、太田駿留、山田宏哉、**宗網栄二**、鈴木康司、寺平良治、大橋鉦二
血中HDL-miRNA測定法の確立 第63回日本臨床検査医学会学術集会 神戸ポートピアホテル
7. 山崎未来、山田宏哉、安藤嘉崇、近藤奏子、水野元貴、村瀬悠理、太田駿留、石川浩章、**宗網栄二**、鈴木康司、大橋鉦二
非アルコール脂肪性肝疾患モデル動物におけるmiR-20a,miR-27aの経時的変化 第56回日本臨床科学会学術集会 くまもと県民交流館パレア
8. 村瀬悠理、**宗網栄二**、山田宏哉、山崎未来、水野元貴、近藤奏子、太田駿留、石川浩章、寺平良治、鈴木康司、大橋鉦二
母獣フルクトース過剰摂取が仔のコルチコステロン代謝に及ぼす影響 第56回日本臨床科学会学術集会 くまもと県民交流館パレア
9. Koji Ohashi, Hiroya Yamada, Yoshitaka Ando, **Eiji Munetsuna**, Mirai Yamazaki, Genki Mizuno, Kanako Kondo, Hiroaki Ishikawa, Koji Suzuki, Ryoji Teradaira
High fructose consumption alters DNA methylation in rat liver 21st IFCC-EFLM EUROLAB PARIS 2015
10. Mirai Yamazaki, Koji Suzuki, Hiroya Yamada, Koji Ohashi, Naohiro Ichino, Hiroaki Ishikawa, Keisuke Osakabe, Keiko Sugimoto, **Eiji Munetsuna**, Genki Mizuno, Kanako Kondo, Takashi Inoue, Ryoji Teradaira
Serum levels of miR-20a and miR-27a are associated with NAFLD in a general population 21st IFCC-EFLM EUROLAB PARIS 2015
11. Hiroaki Ishikawa, Nao Taromaru, Kanako Kondo, Mirai Yamazaki, Genki Mizuno, Hiroya Yamada, Koji Suzuki, **Eiji Munetsuna**, Koji Ohashi, Ryoji Teradaira
Stability of HDL-miRNA for pre-analytical conditions

21st IFCC-EFLM EUROLAB PARIS 2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
宗網 栄二 (Eiji Munetsuna)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：30600431

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：
なし

(4)研究協力者
なし ()