

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07161

研究課題名(和文)スルフォラファンによる血管新生の抑制-オートファジー抑制による抗癌作用の解明

研究課題名(英文)The inhibition of autophagy potentiates anti-oncogenic and anti-angiogenic effect of sulforaphane by inducing apoptosis

研究代表者

西川 武司(Nishikawa, Takeshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00749799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮前駆細胞(EPCs)のスルフォラファン(SUL)濃度別のオートファジーの誘導の検討を行った。EPCsは通常状態でもオートファジーを強くおこしている状態であり、オートファジーを抑制するとそれだけでアポトーシスが強く誘導された。これは血管内皮細胞のSUL暴露の際にオートファジーを誘導し細胞死を逃れようとし、オートファジーを抑制することでアポトーシスを誘導し血管新生の抑制を示すという結果と異なっていた。大腸癌細胞株colon26はこれまでの報告と同様ではあったが、その変化は血管内皮細胞の結果と比較すると弱いことから、時間設定の変更などを行ったが、十分な反応を得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞および腫瘍新生血管内皮細胞が防御機構の一つとして誘導するオートファジーの阻害によりスルフォラファン(SUL)の抗腫瘍および抗血管新生効果は増強する。今回はマウスにおけるSULの抗腫瘍効果を確認した。しかし、もう一つの血管新生に関わる血管内皮前駆細胞におけるオートファジーは生存のために認められ、またマウス由来の大腸癌細胞株は十分なオートファジーを誘導できず十分な抗腫瘍効果を示せなかった。

研究成果の概要(英文)：Sulforaphane (SUL) is a kind of isothiocyanate. We investigated the pro-apoptotic effect on endothelial progenitor cells (EPCs) and colon26. EPCs induced autophagy strongly even under normal condition and the inhibition of autophagy under the condition without SUL induced strongly apoptosis. The response of EPCs is different from that of endothelial cells, which induced autophagy in response to the pro-apoptotic agent, SUL and the inhibition of autophagy potentiated the pro-apoptotic effect.

On the other hand, similar to endothelial cells, colon26 induced autophagy in response to SUL and the inhibition of autophagy potentiated the pro-apoptotic effect. But the response of colon26 was weaker than that of endothelial cells. So, we tried to changed the exposure time against SUL, but we could not reach enough pro-apoptotic effect of SUL by the inhibition of autophagy in colon26.

研究分野：大腸癌

キーワード：スルフォラファン オートファジー 血管内皮前駆細胞 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌予防薬または治療薬として注目されているスルフォラファン(SUL)の抗腫瘍効果は主にアポトーシス誘導によるものである。当科では SUL の抗腫瘍効果を増強する方法として癌細胞のオートファジーに注目した。すなわちオートファジー誘導を癌細胞の抗癌剤などに対する防御反応と仮定した場合、オートファジー阻害により抗腫瘍効果増強が期待できると考えた。高濃度の SUL は大腸癌のアポトーシスを誘導したが、より低濃度ではオートファジーが誘導された。オートファジー阻害により SUL のアポトーシス誘導効果が増強した。血管内皮細胞でも同様であり、抗がん治療及び抗血管新生療法へのオートファジー阻害薬の併用が有用と示唆された。

### 2. 研究の目的

今回、さらなる検討のため血管内皮前駆細胞及びマウス皮下腫瘍モデルへの進展のためマウス大腸癌細胞の colon26 を用いた in vitro の系の実験を行う。

### 3. 研究の方法

血管新生に関与している血管内皮前駆細胞の SUL 濃度別のオートファジーの誘導の検討を行う。また、オートファジー阻害によりこれまでの実験同様に SUL の濃度の低減化を認められるかの検討を行う。つまり、3-MA の存在下もしくは非存在下での SUL により誘導される Cell viability、Apoptosis、オートファジーの変化を評価する。次に、マウスの皮下腫瘍モデルを用いる前段階として、マウス大腸癌細胞の Colon26 における in vitro の系での実験を前述に依りて行っていく。この結果が得られた時点でマウス皮下腫瘍モデル作成の検討を行う。

血管内皮前駆細胞の分離及び培養方法：方法はすでに報告した方法(Ann Surg Oncol.2009;16(2):534-543)を用いる。

Cell viability の検討：MTS assay

Apoptosis の検討：FITC 標識 AnnexinV 及び Propidium Iodide (PI) (AnnexinV: FITC Apoptosis Detection Kit, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) の 2 重染色による Flow-cytometry を用いた検出

AVOs 形成の検出・観察(オートファジーの検討)：5  $\mu$ g/ml の acridine orange にて染色し、Flow-cytometry を用いて測定。また、蛍光顕微鏡対物 40 倍にて細胞の観察も合わせて行う

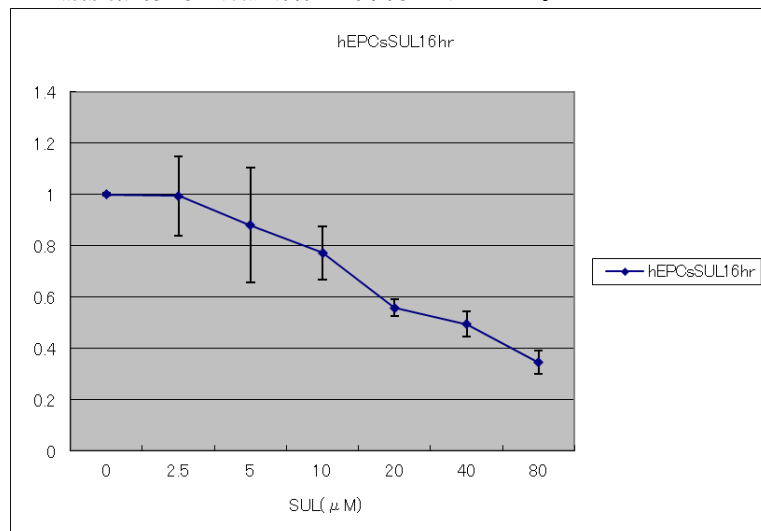
LC3 発現の検討(オートファジーの検討)：Western blotting による発現の検討、蛍光抗体を用いた LC3 の局在の検討

Capillary-like tube formation：SUL による血管内皮前駆細胞の基底膜マトリックス上での管腔形成への影響を評価する。Matrigel Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA) を均一にコーティングし行う。その後、位相差顕微鏡で管腔形成を観察する

### 4. 研究成果

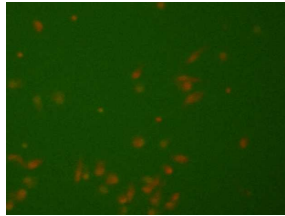
#### ・血管内皮前駆細胞

Cell viability の検討：これまでの血管内皮細胞と同様に SUL 処理 16 時間後で評価を行った。SUL 濃度依存的に細胞活性の抑制がみられた。



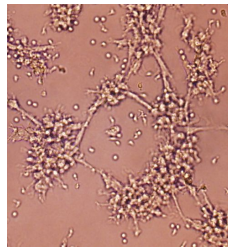
Apoptosis の検討：これまでの血管内皮細胞と同様に SUL 処理 16 時間後で、SUL 濃度依存的にアポトーシスの増加が認められた。ところが、3-MA を使用してオートファジーを阻害してやると、それだけで高度のアポトーシスを起こすことが判明した。

AVOs の形成：オートファジーが誘導されていることを示す AVOs 形成を蛍光顕微鏡でみてみると、通常培養状態ですでに AVOs 形成を起こしていることが判明した。(下記写真は通常培養状態のもの)

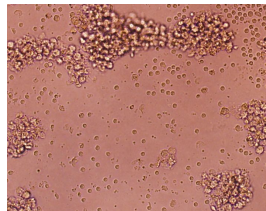


LC3 発現の検討：末梢血由来の EPCs は増殖をしないことがわかっている。そのため、今回複数回にわたり使用血液量を増やすなどして実験を行ったが、十分な蛋白量が得られず、実験を行ってみたが、検出することができなかった。

Capillary-like tube formation：SUL 濃度依存的な管腔形成の抑制を認めた。下記写真は SUL0 $\mu$ M のもの。



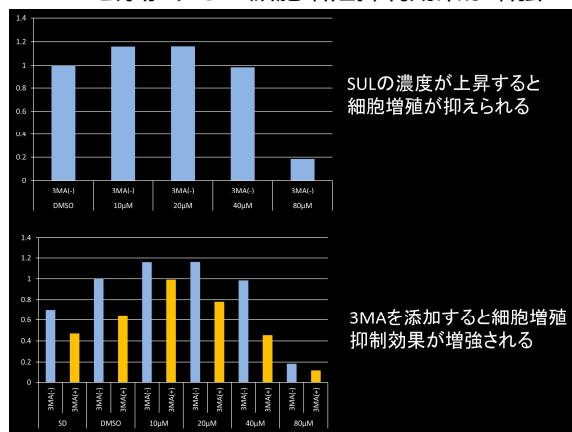
しかし、3-MA を加えると、SUL0 $\mu$ M でも管腔形成が強く抑制された(下記写真)。



こうした結果を受け、末梢血由来の EPCs は生存するという段階でオートファジーを起こしていることがわかった。この反応が骨髄由来細胞からの EPCs でも同様であるのかをみるために Balb/c マウスの大腿骨、脛骨由来の細胞から作成した EPCs を用いて検討を行おうと計画を行っている(C57BL6 マウスでの作成経験あり)。

#### ・マウス大腸癌細胞 Colon26

Cell viability の検討：SUL 濃度依存的に細胞増殖が抑えられることがわかった。80 $\mu$ M では強く抑制される。3-MA を添加すると細胞増殖抑制効果が増強されることがわかった。



Apoptosis の検討：SUL 濃度依存的にアポトーシスの割合が増えることが示された。3-MA を加えることで、わずかなアポトーシスの割合がふえることが示されたが、著明というほどの効果は得られなかった。

LC3 発現の検討：上記の結果をうけて、SUL によるオートファジーの誘導を検討するため LC3 の発現をみてみた。40 $\mu$ M ではごくわずかに LC3 の発現を認めるのみで、80 $\mu$ M で LC3 の発現をはっきりと認めた。



こうした結果を受け、時間設定などを様々に試してみたが、より低濃度の SUL でのオートファジーの誘導の確認は困難であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Okada S, Hata K, Kawai K, Yamamoto Y, Tanaka T, Nishikawa T, Sasaki K, Kaneko M, Emoto S, Murono K, Nozawa H. Association between KRAS G13D mutations and anastomotic recurrence in colorectal cancer: Two case reports. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Mar;98(12):e14781. doi: 10.1097/MD.00000000000014781.
2. Arakawa K, Hata K, Nozawa H, Kawai K, Tanaka T, Nishikawa T, Sasaki K, Shuno Y, Kaneko M, Hiyoshi M, Emoto S, Murono K, Sonoda H, Okada S, Ishihara S. Molecular Subtypes Are Frequently Discordant Between Lesions in Patients With Synchronous Colorectal Cancer: Molecular Analysis of 59 Patients. *Anticancer Res*. 2019 Mar;39(3):1425-1432. doi: 10.21873/anticancer.13258.
3. Miyake H, Murono K, Nagata H, Nozawa H, Kawai K, Hata K, Tanaka T, Nishikawa T, Shuno Y, Sasaki K, Ishihara S. Prognostic significance of doubling time in patients undergoing radical surgery for metachronous peritoneal metastases of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2019 Feb 9. doi: 10.1007/s00384-019-03259-5.
4. Emoto S, Nozawa H, Kawai K, Hata K, Tanaka T, Shuno Y, Nishikawa T, Sasaki K, Kaneko M, Hiyoshi M, Murono K, Ishihara S. Venous thromboembolism in colorectal surgery: Incidence, risk factors, and prophylaxis. *Asian J Surg*. 2019 Jan 22. pii: S1015-9584(18)30805-4. doi: 10.1016/j.asjsur.2018.12.013.
5. Hirata Y, Nozawa H, Kawai K, Hata K, Tanaka T, Nishikawa T, Otani K, Sasaki K, Kaneko M, Emoto S. The influence of neoadjuvant chemoradiation for lower rectal cancer on urinary function. *Asian J Surg*. 2019 Jan 7. pii: S1015-9584(18)30604-3. doi: 10.1016/j.asjsur.2018.11.004.
6. Kaneko M, Emoto S, Murono K, Sonoda H, Hiyoshi M, Sasaki K, Shuno Y, Nishikawa T, Tanaka T, Hata K, Kawai K, Nozawa H. Neoadjuvant imatinib therapy in rectal gastrointestinal stromal tumors. *Surg Today*. 2018 Nov 15. doi: 10.1007/s00595-018-1737-5.
7. Murono K, Nagata H, Ishimaru K, Emoto S, Kaneko M, Hiyoshi M, Sasaki K, Otani K, Shuno Y, Nishikawa T, Tanaka T, Hata K, Kawai K, Nozawa H, Muro K, Ishihara S. Safety of intraperitoneal paclitaxel combined with conventional chemotherapy for colorectal cancer with peritoneal carcinomatosis: a phase I trial. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019 Jan;83(1):145-150. doi: 10.1007/s00280-018-3714-5.
8. Shiratori H, Kawai K, Hata K, Tanaka T, Nishikawa T, Sasaki K, Kaneko M, Murono K, Emoto S, Morikawa T, Fukayama M, Nozawa H. Correlations between the Recurrence Patterns and Sizes of Lateral Pelvic Lymph Nodes before and after Chemoradiotherapy in Patients with Lower Rectal Cancer. *Oncology*. 2019;96(1):33-43. doi: 10.1159/000492493.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究協力者氏名：石原 聡一郎  
ローマ字氏名：ISHIHARA, soichiro  
所属研究機関名：東京大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：教授

研究協力者氏名：山口 博紀  
ローマ字氏名：YAMAGUCHI, hironori  
所属研究機関名：東京大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：登録研究員

研究協力者氏名：畑 啓介  
ローマ字氏名：HATA, keisuke  
所属研究機関名：東京大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：特任講師

研究協力者氏名：渡邊 聡明  
ローマ字氏名：WATANABE, toshiaki  
所属研究機関名：東京大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：教授

研究協力者氏名：野澤 宏彰  
ローマ字氏名：NOZAWA, hiroaki  
所属研究機関名：東京大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：准教授

研究協力者氏名：川合 一茂  
ローマ字氏名：KAWAI, kazushige  
所属研究機関名：東京大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：講師

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。