

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00857

研究課題名(和文)大豆イソフラボンの癌幹細胞抑制作用の解明とがん治療に向けた新しいアプローチ

研究課題名(英文)Elucidation of the inhibitory effect of soy isoflavones on cancer stem cells and a new approach towards cancer treatment

研究代表者

首藤 恵泉 (SHUTO, Emi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・講師

研究者番号：10512121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞の活性化に伴う慢性炎症は、メタボリックシンドローム発症の主要な成因であると同時に、癌遺伝子の活性化や癌の発症、進展に寄与している。これまで、大豆イソフラボンの免疫細胞および代謝病態へ作用することを検討してきたが、本研究は、大豆イソフラボンの癌代謝及び癌免疫への作用を明らかにすることを試みた。

癌幹細胞において大豆イソフラボンがどのような作用をするか注目した。3次元培養スフェロイド法を用いて検討したところ、大豆イソフラボンであるゲニステインにおいて、スフェロイド形成を有意に阻害することを見出した。本研究において、ゲニステインが癌代謝に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の抗癌剤を使用しても、臨床画像では指摘できないレベルで治療抵抗性の癌細胞が残存し、再発を誘導する。この癌細胞が幹細胞と似た性質を持つことから癌幹細胞として知られており、これを制御することが重要である。本研究は、癌幹細胞に注目し、大豆イソフラボンの作用機序を解明し、癌代謝及び癌免疫への作用を検証する。さらに、他の抗癌剤との併用をin vivoを含めて検討することを通じて、副作用が少ない食品機能成分の癌治療への参画といった創薬的な新しい可能性を検証する。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation associated with T cell activation is a major cause of the development of metabolic syndrome, and at the same time contributes to activation of oncogenes and the onset and progression of cancer. So far, we have investigated the effects of soy isoflavones on immune cells and metabolic pathologies, this study attempted to clarify the effects of soy isoflavones on cancer metabolism and cancer immunity.

We focused on how soy isoflavones effect in cancer stem cells. As a result of examination using the three-dimensional culture spheroid method, it was found that soy isoflavone genistein significantly inhibits spheroid formation. In this study, it was suggested that genistein is involved in cancer metabolism.

研究分野：栄養免疫

キーワード：大豆イソフラボン 癌幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

T細胞の活性化に伴う慢性炎症は、メタボリックシンドローム発症の主要な成因であると同時に、癌遺伝子の活性化やゲノム不安定性の誘導を通じ、癌の発症、進展に寄与している。従来の癌治療・癌研究は、癌遺伝子の活性化により癌が発症する過程を抑制することであったが、臨床的に十分な効果を得るには至っておらず、再発や転移が繰り返されることが多い。近年、癌研究は、癌遺伝子によって引き起こされる病態を修復することに注目している。Tak W Makによれば、癌遺伝子が引き起こす作用は、細胞内代謝の変化(ワールブルグ効果:癌代謝)と免疫システムの変化(免疫抑制作用による癌細胞の保護:癌免疫)に集約される(*Nat Rev Cancer*.11:85-95, 2011)。癌代謝とは、低酸素で誘導される嫌氣的解糖系が、癌細胞では低酸素でなくても亢進し、非効率的なエネルギー産生方法により様々な過酷な条件でも適応することである。癌免疫とは、癌細胞が免疫抑制細胞を誘導し、癌細胞を攻撃する細胞障害性T細胞(Cytotoxic T lymphocyte: CTL)からの攻撃から防御することである。メトフォルミンをはじめとする代謝拮抗薬が癌臨床において多大な効果を発揮することが報告され(*Cancer Res*.69:7507-7511, 2009)、免疫抑制細胞を阻害する免疫チェックポイント阻害剤の開発により末期癌状態における延命期間が画期的に伸びていることは(*Cancer Med*.5:1481-1491, 2016)、細胞内代謝及び免疫系の変化が癌の病態において極めて重要であることを裏付けている。

## 2. 研究の目的

近年、従来の抗癌剤を使用しても、治療抵抗性の癌細胞が臨床画像では指摘できないレベルで残存し、この治療抵抗性の癌細胞が、幹細胞の性格を有することから癌幹細胞として知られるようになった。癌組織の数%に満たない少数の癌幹細胞は、癌組織の司令塔として細胞内代謝及び免疫系の変化を主導し、また幹細胞の特性を生かし自身は強力な治療抵抗性を示すとともに、多くの細胞に分化して癌組織を保護する。血管内皮細胞に分化し腫瘍血管を誘導することや、免疫抑制細胞に分化してCTLによる攻撃から癌細胞を保護することは、癌の治療抵抗性・転移の本態と考えられ、癌幹細胞を制御することが癌治療において最重要とされている。

これまで、大豆イソフラボンの免疫細胞および代謝病態への作用を検討してきたことを基に、癌代謝および癌免疫への作用を明らかにすることを試みた。本研究は、癌幹細胞に着目し、大豆イソフラボンの癌代謝および癌免疫への作用を検証し、そのメカニズムを明らかにする。さらに、他の抗癌剤との併用を検討することにより、副作用が少ないことが期待される食品機能成分の癌治療への参画といった創薬的な新しい可能性を検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

癌治療において癌幹細胞を制御することは最優先と考える。そこで、癌幹細胞への効果を検討するために、共同研究先で確立されている癌幹細胞の幹細胞性(ステムネス)を検定するシステムを我々の研究室で展開し、大豆イソフラボンの癌幹細胞への効果を解析する。

### (1) 3次元培養スフェロイド法

3次元培養スフェロイド法とは、平面プレートを用い単層を形成する2次元細胞培養に対し、平面96wellプレートにアガロースゲルをひき傾斜を作成することより自然にスフェロイドを形成させる。3次元培養により比較的組織に近いスフェロイドを形成させる培養方法である(*Nat Protoc*.4:309-324, 2009)。これにより細胞間接着などを再現した生理的な組織に近い状態で薬物作用を検証することができる画期的な方法であり、多剤との組み合わせ効果を効率よく検証できることから、近年、大変注目されている。癌細胞によるスフェロイドでは中心部に癌幹細胞が配置されることが知られていることから、標的試薬を添加した後、死細胞を染

色することにより癌幹細胞もしくは癌非幹細胞の障害を共焦点レーザー顕微鏡のより評価することができる。この手法により、細胞表現マーカーが確立していない癌細胞においても解析することが可能である。本研究において、主にスフェロイド形成能が高いマウス乳癌細胞株 4T1 細胞を用いた。

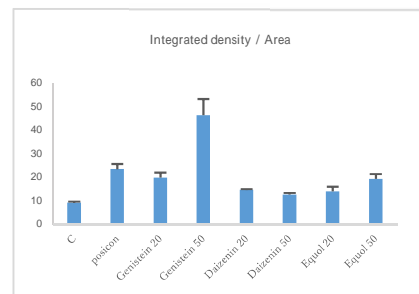
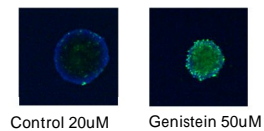
## (2) 癌幹細胞における大豆イソフラボンのメカニズムの探索

癌幹細胞において、いくつかの情報伝達経路 (Wnt, Notch, PTEN, Hedgehog, hippo など) が、その誘導や維持に必要であることが示されている。さらに、癌幹細胞を誘導することが知られている上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition : EMT) 関連転写因子 (snail, slug, twist, Zeb1, Zeb2 など) 幹細胞関連転写因子 (BMI-1, Nanog, KLF4, Oct4, Sox2, c-myc, Klf4 など) が明らかとなっている。これらの因子や情報伝達経路における大豆イソフラボンの作用について、single spheroid および 2D 培養細胞を用いて網羅解析を行う。各因子の遺伝子発現について検討した。また、各情報伝達因子のリン酸化などについては、Proteome Profiler (R & D systems) を用いて解析した。

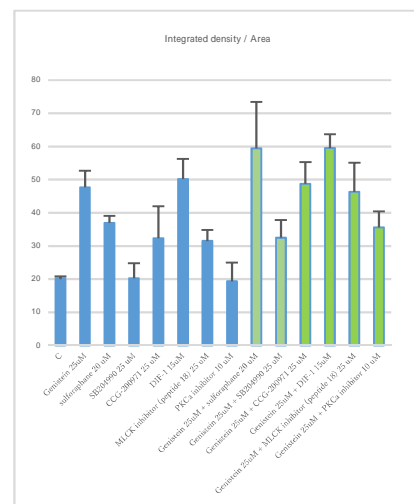
## 4. 研究成果

### (1) 3次元培養スフェロイド法を用いた大豆イソフラボンの癌幹細胞への効果

癌幹細胞の幹細胞性 (ステムネス) を検定するシステムの一つである 3次元培養スフェロイドによって大豆イソフラボンの効果について検討した。大豆イソフラボンの中でもゲニステインにおいて、死細胞が有意に増加することを明らかにし、さらにスフェロイドのサイズが縮小することを確認した。その効果は、既に知られている抗癌剤に匹敵するほどの癌幹細胞抑制効果を発揮しており、この知見は大変有益な効果である。一方、大豆イソフラボンであるダイゼインおよびエクオールには同様の効果は見られなかった。



(2) スフェロイドを作成し、大豆イソフラボンを添加後、スフェロイドを回収し mRNA を抽出し、real-time PCR により癌幹細胞関連遺伝子発現を検討したところ、大豆イソフラボン添加により EMT 関連遺伝子の減少傾向が認められたがさらなる解析が必要である。さらに、各情報伝達因子のリン酸化などについて、Proteome Profiler (R & D systems) を用いて解析したところ、DNA 損傷に応答する癌抑制遺伝子である Chk-2 のリン酸化の増加が認められた。



以上より、大豆イソフラボンが、乳癌細胞において癌幹細胞に作用すること、また DNA 損傷など複数のメカニズムを介して乳癌細胞に作用する可能性のあることを見出した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Nakamoto M, Omine M, Yun Y, Shuto E, Nakamoto A, Hata A, Aki N, Shikama Y, Bando Y, Ichihara T, Minamigawa T, Tamura A, Kuwamura Y, Funaki M, Sakai T.	4. 巻 28
2. 論文標題 Associations of dietary diversity with allergic diseases in Japanese workers: a cross-sectional study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asia Pac J Clin Nutr.	6. 最初と最後の頁 857-869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.6133/apjcn.201912_28(4).0023.	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 Nakamoto A, Mitani M, Urayama K, Maki A, Nakamoto M, Shuto E, Nii Y, Sakai T.	4. 巻 65
2. 論文標題 Nobiletin Enhances Induction of Antigen-Specific Immune Responses in BALB/c Mice Immunized with Ovalbumin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nutr Sci Vitaminol	6. 最初と最後の頁 278-282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.65.278.	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 Nakamoto M, Tanaka Y, Ono S, Nakamoto A, Shuto E, Sakai T.	4. 巻 66
2. 論文標題 Associations of marital and parental status and family members living together with health-related behaviors in Japanese young workers : a cross-sectional study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Med Invest	6. 最初と最後の頁 141-147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.66.141.	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 Mitani M, Minatogawa Y, Nakamoto A, Nakamoto M, Shuto E, Nii Y, Sakai T.	4. 巻 64
2. 論文標題 Sudachitin, polymethoxyflavone from Citrus sudachi, enhances antigen-specific cellular and humoral immune responses in BALB/c mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 158-163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.18-70. Epub 2018 Dec 5.	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 Nakamoto M, Shuto E, Nakamoto A, Hata A, Aki N, Shikama Y, Bando Y, Ichihara T, Minagawa T, Tamura A, Kuwamura Y, Funaki M, Sakai T.	4. 巻 27
2. 論文標題 Soy product and isoflavone intake associations with allergic diseases in Japanese workers: rhinitis, dermatitis and asthma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Asia Pac J Clin Nutr	6. 最初と最後の頁 1277-1285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.6133/apjcn.201811_27(6).0015.	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 Yang X, Nakamoto M, Shuto E, Hata A, Aki N, Shikama Y, Bando Y, Ichihara T, Minamigawa T, Kuwamura Y, Tamura A, Uemura H, Arisawa K, Funaki M, Sakai T	4. 巻 65
2. 論文標題 Associations between intake of dietary fermented soy food and concentrations of inflammatory markers: a cross sectional study in Japanese workers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Med Invest	6. 最初と最後の頁 74-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.65.74	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 Koerner SK, Hanai JI, Bai S, Jernigan FE, Oki M, Komaba C, Shuto E, Sukhatme VP, Sun L	4. 巻 126
2. 論文標題 Design and synthesis of emodin derivatives as novel inhibitors of ATP-citrate lyase	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Eur J Med Chem	6. 最初と最後の頁 920-928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmech.2016.12.018. Epub 2016 Dec 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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 首藤患泉、中本真理子、中本晶子、酒井徹
2. 発表標題 エクオールの前駆脂肪細胞3T3-L1に対する作用
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 首藤恵泉、中本真理子、中本晶子、酒井徹
2. 発表標題 食餌誘導性肥満マウスにおけるエクオール作用
3. 学会等名 第65回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 首藤恵泉、國松真由香、中本晶子、中本真理子、酒井徹
2. 発表標題 食餌誘導性肥満マウスにおけるエクオール作用
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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	酒井 徹  (SAKAI Tohru)  (40274196)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授   (16101)	
研究協力者	花井 順一  (HANAI Jun-ichi)		