

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10561

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳がん細胞に対するレスベラトロールによる新規治療・予防法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic and preventive strategy of resveratrol treatment in triple negative breast cancer cells

研究代表者

坂本 隆子 (Sakamoto, Takako)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：80196089

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)：トリプルネガティブ乳がん(TNBC)の特異的治療法は、遺伝性乳がんを除くと確立していない。そこで、TNBC細胞に対するレスベラトロール(RSV)の作用を検討し、TNBC治療・予防薬としての可能性を解明した。RSVは、MDA-MB-231及びBT549-Luc細胞の上皮様形態変化、細胞浸潤能の抑制、Bcl2阻害剤殺細胞効果の増強を誘導し、CDH1(E-カドヘリン)やCDKN1A(p21)遺伝子発現とヒストンアセチル化を増加させた。既報及びノックダウン実験から、両遺伝子の発現亢進が転移能の抑制や抗がん薬剤効果の増強に関与することが示唆され、TNBC治療・予防薬としてのRSVの可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TNBCは悪性度が高く予後不良であることから、新規治療・予防法の開発が望まれている。本研究では、複数のTNBC細胞を用い、エピゲノム制御作用があるRSVの治療・予防薬としての有用性とその分子機構を示すことができた。食品成分であるRSVと他の薬剤との併用効果や、RSV単剤での転移能抑制作用が解明されたことは、新規エピゲノム治療薬として食品成分の可能性を示すという学術的意義に加え、特異的治療法が確立していない疾患に対する新規治療戦略としての社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Triple negative breast cancer (TNBC), that defined by lacking of ER and PR expression and HER2 amplification, shows aggressive phenotype, although no specific therapy has been established, except for hereditary breast cancer. Therefore, a novel therapeutic strategy for TNBC is strongly desired. We thus investigated the anticancer effects of resveratrol (RSV), one of the grape-derived polyphenols, on TNBC cells. RSV induced epithelial-like morphological changes, suppressed invasion capacity, and increased cytotoxicity of Bcl2 inhibitor (ABT263) in MDA-MB-231 and BT549-Luc cells. It also increased expression and histone acetylation of CDH1 and CDKN1A tumor suppressive genes. Moreover, transfection of CDKN1A siRNA reduced ABT263-induced apoptosis in RSV-treated MDA-MB-231 cells. In conclusion, this study demonstrated a potential of RSV as a novel therapeutic and preventive agent for TNBC through increased cytotoxicity of ABT263 and inhibition of metastatic capacity of TNBC cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：トリプルネガティブ乳がん レスベラトロール 細胞形態 細胞浸潤能 Bcl2阻害剤 E-カドヘリン p21 ヒストンアセチル化

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) エストロゲンレセプター(ER)を標的とするホルモン療法薬やヒト上皮成長因子受容体 2 型 (HER2) を標的とする分子標的薬の開発により、乳がんの予後は改善してきた。しかし、ER や HER2 の発現がないトリプルネガティブ乳がん(TNBC)では、遺伝性乳がん症例を除くと有効な治療法は確立していない。近年、候補薬剤による ER の発現誘導を介し、TNBC 細胞のホルモン療法薬のタモキシフェンへの反応性が獲得されることが報告され、その遺伝子発現誘導機構にはエピゲノム制御が関与することが示唆された。このような興味深い研究が精力的に進められているが、更なる治療・予防戦略の開発が望まれている。

(2) 機能性食品成分のレスベラトロール(RSV)は、ブドウ果皮や赤ワインに含まれているポリフェノールで、様々な組織由来のがん細胞において抗腫瘍効果が報告されてきた。また、RSV はエピゲノム制御に関与するヒストン脱アセチル化酵素活性を抑制することが報告されている。更に、RSV は食品成分であることから、比較的安全性の高いエピゲノム治療薬として利用できる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、TNBC 新規治療・予防薬としての RSV の可能性を明らかにするため、RSV の TNBC 細胞に与える影響を評価した。特に、細胞形態、細胞遊走能・浸潤能、細胞老化、BCL2 阻害剤の殺細胞効果、及び乳がん関連遺伝子発現への作用を解析した。

3. 研究の方法

(1) 細胞形態：TNBC 細胞である MDA-MB-231 及び BT549-Luc 細胞に 10 μ M の RSV を作用させ、細胞形態の変化を位相差顕微鏡下で経時的に観察した。細胞は、間葉性形質の強い紡錘形のもの、上皮性形質の強い大型扁平のもの、細胞分裂中と考えられる球形のものに分類してカウントし、全体に占める割合を算出した。

(2) 細胞遊走能・浸潤能：MDA-MB-231 及び BT549-Luc 細胞に 10 μ M の RSV を 7 日間作用させ、遊走能を Cell Culture Insert を用いたミグレーションアッセイで、浸潤能を BioCoat Matrigel Invasion Chamber を用いたインベーションアッセイで解析した。

(3) 細胞老化：MDA-MB-231 及び BT549-Luc 細胞に 10 μ M の RSV を 7 日間作用させ、細胞老化の指標として β -ガラクトシダーゼ染色を行い、位相差顕微鏡下で観察後、染色陽性細胞をカウントすることで、その割合を算出した。

(4) BCL2 阻害剤の殺細胞効果：MDA-MB-231 及び BT549-Luc 細胞に 10 μ M の RSV を 7 日間作用させた後、BCL2 阻害剤である ABT263 を 1 μ M の濃度で 48 時間処理した。細胞をヘキスト 33342 で染色後、蛍光顕微鏡下で観察した。クロマチンの濃縮や核の断片化を認めたものをアポトーシス細胞としてカウントし、その割合を算出した。

(5) 乳がん関連遺伝子の発現：悪性度の高い乳がんが発現抑制が報告されている、*ESR1*(ER)、*CDH1*(E-カドヘリン)、*CDKN1A*(p21) の発現に対する RSV の作用を解析した。すなわち、MDA-MB-231 及び BT549-Luc 細胞に 10 μ M の RSV を 14 日間作用させ、遺伝子発現の経時変化を real time RT-PCR 法で解析した。また、RSV を 7 日間作用後のタンパク発現の変化は、ウェスタンブロットティングで検討した。

(6) 乳がん関連遺伝子発現のエピゲノム制御：RSV により発現変動が見られた遺伝子のヒストンアセチル化は、RSV を 7 日間作用させた後、クロマチン免疫沈降法を用いて検討した。また、DNA メチル化は、RSV を 14 日間作用させた後、パイサルファイトシーケンス法にて解析した。

(7) RSV による BCL2 阻害剤効果増強への乳がん関連遺伝子の関与：10 μ M の RSV を 6 日間作用させた後、RSV による発現誘導がみられた遺伝子について、siRNA を用いてノックダウンを行った。その後、1 μ M の ABT263 で 48 時間処理し、ヘキスト染色によりアポトーシス細胞の割合を算出した。

4. 研究成果

(1) 細胞形態：MDA-MB-231 及び BT549-Luc 細胞に RSV を作用させると、多数を占めていた間葉性形質の強い紡錘形の細胞の割合が減少し、上皮性形質の強い大型扁平の細胞の割合が増加した。このことから、RSV は、TNBC 細胞の上皮性形質への変化を誘導することが示唆された(図 1)。

(2) 細胞遊走能・浸潤能：MDA-MB-231 及び BT549-Luc 細胞に RSV を作用させると、遊走能の有意な減少と浸潤能の減少傾向を認めた(図 2)。このことから、RSV は TNBC 細胞の浸潤能・転移能を抑制する可能性が示された。

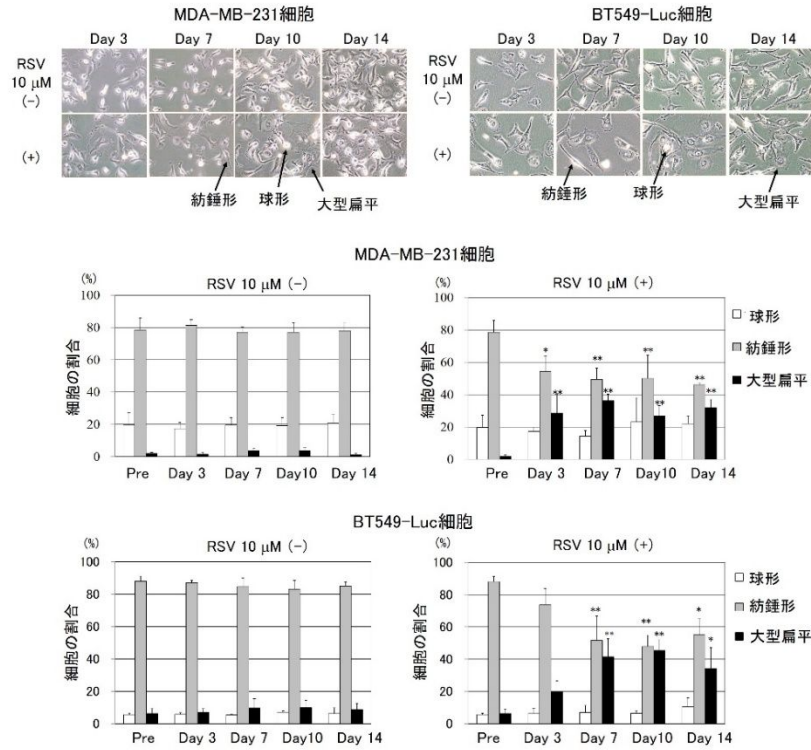


図 1 . RSV による TNBC 細胞の形態変化.
RSV による紡錘形の細胞の割合の減少と大型扁平の細胞の割合の増加を認めた。

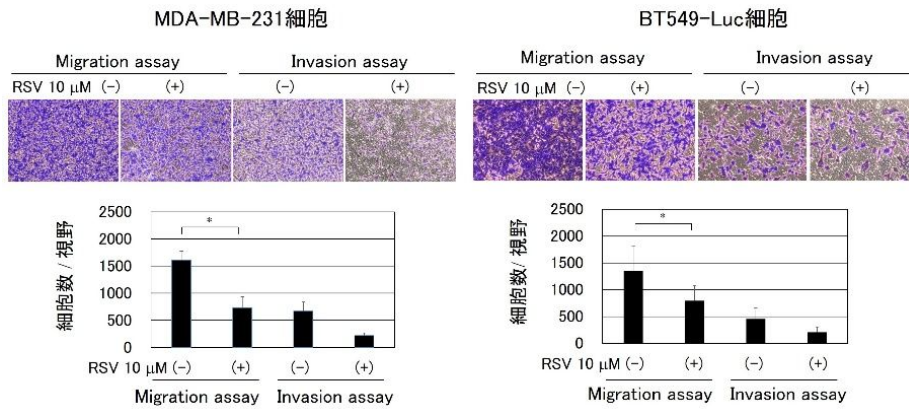


図 2 . RSV による TNBC 細胞の細胞遊走能・浸潤能の変化.
RSV による遊走能の有意な減少と浸潤能の減少傾向を認めた。

(3) 細胞老化：MDA-MB-231 細胞に RSV を作用させると、β-ガラクトシダーゼ染色陽性細胞が有意に増加し、細胞老化誘導が示唆された。一方、BT549-Luc 細胞では RSV の有無に関わらず、染色陽性細胞はみられなかった (図 3)。このことから、RSV による細胞老化誘導は、細胞毎に異なる可能性が考えられた。

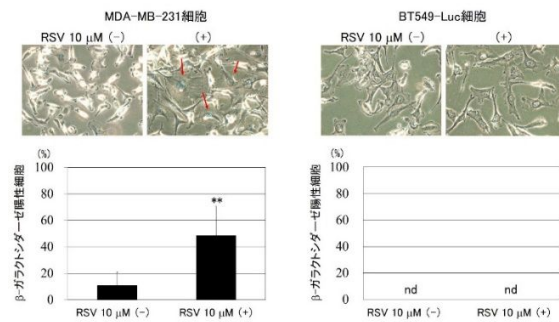


図 3 . RSV による TNBC 細胞の細胞老化への影響.
RSV は MDA-MB-231 細胞の細胞老化を誘導したが、BT549-Luc 細胞では RSV の有無に関わらず、染色陽性細胞はみられなかった。

(4) BCL2 阻害剤の殺細胞効果： MDA-MB-231 及び BT549-Luc 細胞に RSV を作用させた後、ABT263 で処理したところ、アポトーシス細胞の割合が有意に増加した(図 4)このことから、RSV は BCL2 阻害剤の殺細胞効果を増強することが示唆された。

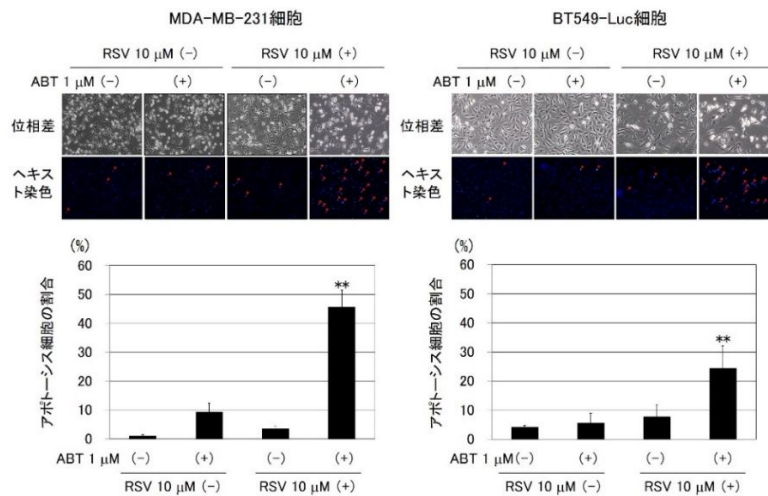


図 4 . RSV による TNBC 細胞の BCL2 阻害剤の殺細胞効果への影響.
RSV 処理細胞では、ABT263 存在下でアポトーシス細胞数の有意な増加を認めた。

(5) 乳がん関連遺伝子発現： MDA-MB-231 及び BT549-Luc 細胞に RSV を作用させ、*ESR1* (ER)、*CDH1* (E-カドヘリン)、*CDKN1A* (p21) の遺伝子発現変化を経時的に調べたところ、MDA-MB-231 細胞ではすべての遺伝子の発現が増加した。一方、BT549-Luc 細胞では、E-カドヘリン及び p21 遺伝子発現が増加した(図 5 上)。また、両細胞に共通し、E-カドヘリン及び p21 タンパク発現の増加がみられたが、ER タンパクはいずれの条件下でも検出されなかった(図 5 下)。

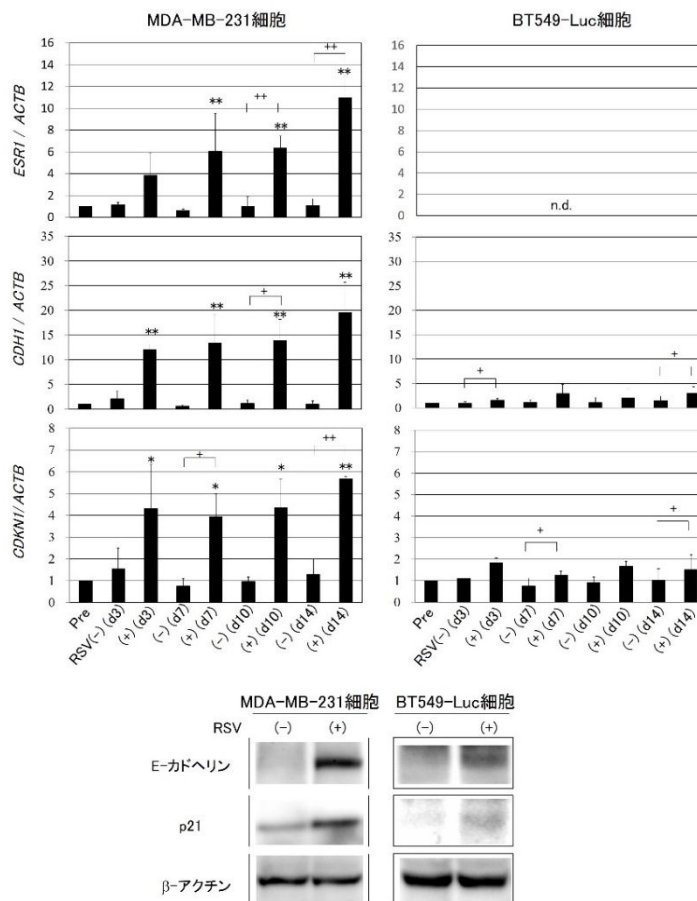


図 5 . RSV による TNBC 細胞の乳がん関連遺伝子発現への影響.
両細胞に共通し、RSV により E-カドヘリン及び p21 の発現が、
遺伝子レベル(上)、タンパクレベル(下)で増加した。

(6) 乳がん関連遺伝子のエピゲノム制御：MDA-MB-231 及び BT549-Luc 細胞に RSV を作用させると、E-カドヘリン及び p21 遺伝子のヒストンアセチル化が増加した(図6)。一方、E-カドヘリン遺伝子の DNA メチル化は、RSV による明らかな変化はみられなかった(図7)。このことから、RSV による遺伝子発現上昇の分子機構には、ヒストンアセチル化の増加が一部関与することが示唆された。

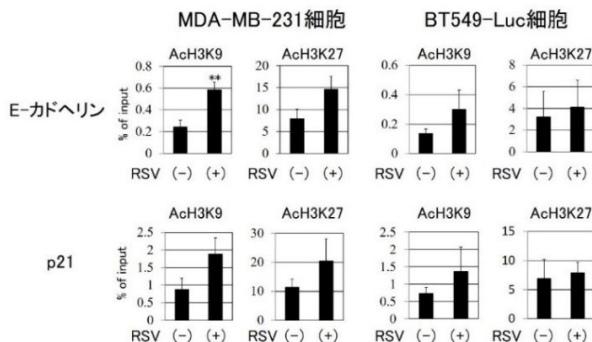


図6 . RSV による TNBC 細胞の乳がん関連遺伝子のヒストンアセチル化への影響 . RSV による E-カドヘリン及び p21 遺伝子のヒストンアセチル化の増加を認めた。

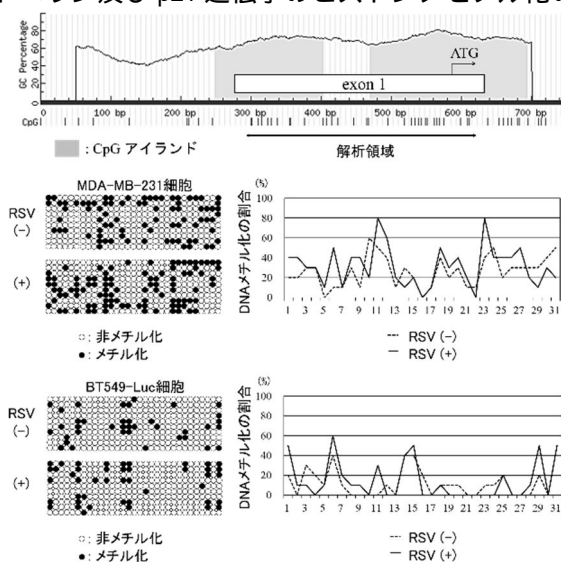


図7 . RSV による TNBC 細胞の E-カドヘリン遺伝子の DNA メチル化への影響 . いずれの細胞においても、RSV による DNA メチル化の明らかな変化はみられなかった。

(7) RSV による BCL2 阻害剤効果増強への乳がん関連遺伝子の関与：RSV を作用させた MDA-MB-231 細胞に siRNA を導入して *CDH1* (E-カドヘリン) または *CDKN1A* (p21) 遺伝子をノックダウンし、ABT263 依存的アポトーシスに対する RSV の作用を検討した。その結果、RSV 処理細胞の p21 遺伝子ノックダウンにより、ABT263 存在下のアポトーシス細胞の割合が有意に減少した(図8)。このことから、RSV による ABT263 の殺細胞効果の増強には、p21 遺伝子の発現誘導が関与することが示唆された。

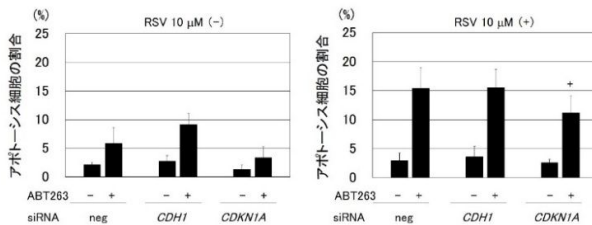


図8 . RSV による BCL2 阻害剤感受性増強への p21 の関与 p21 遺伝子をノックダウンした RSV 処理細胞では ABT263 によるアポトーシス細胞が減少した。

以上より、RSV は TNBC 細胞の遊走能・浸潤能の抑制や BCL2 阻害剤の殺細胞効果の増強等の多様な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなり、その分子機構には、E-カドヘリンや p21 ヒストンアセチル化の増加を介する発現誘導が関与することが示唆された。特に、RSV が ABT263 存在下で TNBC 細胞のアポトーシスを有意に増加させたことから、両薬剤の併用は、TNBC の新たな治療戦略として有望であることが示された(論文執筆中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazumi Shimamoto, Keiji Tanimoto, Takahiro Fukazawa, Hideaki Nakamura, Akinori Kanai, Hidemasa Bono, Hiromasa Ono, Hidetaka Eguchi, Nobuyuki Hirohashi	4. 巻 -
2. 論文標題 GLIS1, a novel hypoxia-inducible transcription factor, promotes breast cancer cell motility via activation of WNT5A.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgaa010	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 Takahiro Fukazawa, Keiji Tanimoto, Looniva Shrestha, Takeshi Imura, Shinya Takahashi, Taijiro Sueda, Nobuyuki Hirohashi, Eiso Hiyama, Louis Yuge	4. 巻 14
2. 論文標題 Simulated microgravity enhances CDDP-induced apoptosis signal via p53-independent mechanisms in cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0219363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0219363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masafumi Iida, Daichi Toyosawa, Misato Nakamura, Kouki Tsuboi, Emi Tokuda, Toshifumu Niwa, Takanori Ishida, Shin-ichi Hayashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Decreased ER dependency after acquired resistance to CDK4/6 inhibitors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-020-01090-3	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 Kanami Uchiumi, Kouki Tsuboi, Nozomi Sato, Takako Ito, Hisashi Hirakawa, Toshifumu Niwa, Yuri Yamaguchi, Shin-ichi Hayashi	4. 巻 26
2. 論文標題 Cancer stem-like properties of hormonal therapy-resistant breast cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 459-470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-018-00944-1	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 Kouki Tsuboi, Chiyuki Uematsu, Yuri Yamaguchi, Toshifumu Niwa, Shin-ichi Hayashi	4. 巻 26
2. 論文標題 Tumor microenvironmental growth factors induce long-term estrogen deprivation resistance in breast cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 748-757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12282-019-00978-z	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 坂本隆子、谷本圭司、江口英孝、佐々木駿太、坪井洸樹、林慎一、市原佐保子
2. 発表標題 食品成分レスベラトロールによるトリプルネガティブ乳がん細胞に対するBcl-2阻害剤の抗腫瘍効果の増強
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019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	谷本 圭司 (Tanimoto Keiji) (90335688)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教 (15401)	
研究分担者	林 慎一 (Hayashi Shin-ichi) (60144862)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	