

機関番号 : 24303
 研究種目 : 若手研究 (B)
 研究期間 : 2009~2010
 課題番号 : 21790556
 研究課題名 (和文) アブラナ科植物由来食品成分を用いた新規癌分子標的併用予防法の開発
 研究課題名 (英文) Molecular analysis of anti-proliferative effects against cancer cells treated with phytochemicals derived from cruciferous vegetables for development of novel molecular-targeting combinatory strategy for cancer prevention
 研究代表者
 与五沢 真吾 (YOGOSAWA SHINGO)
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号 : 70381936

研究成果の概要 (和文) : 食品成分による癌予防を実現するためには、複数成分の併用効果の高い組み合わせを見出し、そのメカニズムを解明することが重要である。本研究では、高い癌予防効果が期待されるアブラナ科植物由来成分に着目し、インドール-3-カルビノール (I3C) とブラシニンの癌細胞増殖抑制効果を解析した。特に I3C は、大豆に含まれるゲニステインや、プロポリス等に含まれるガラングインと併用処理すると癌細胞増殖抑制効果が増強することを見出し、その分子メカニズムについて、オートファジーや活性酸素種 (ROS) の関与を明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : To achieve desirable effects of dietary phytochemicals on cancer prevention, studies on effective combinations of phytochemicals and the molecular mechanisms might contribute to chemopreventive strategies. This study shows the anti-proliferative effects of components of the cruciferous vegetables believed to be useful for cancer prevention. In addition, combinations of indole-3-carbinol, one component of cruciferous vegetables, with genistein contained in soy or galangin contained in propolis were also shown to be effective for inhibition of growth of cancer cells accompanied with inhibition of autophagic process or accumulation of reactive oxygen species (ROS), respectively.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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 : 癌予防、食品成分、アブラナ科植物、細胞増殖抑制、細胞周期停止、アポトーシス、オートファジー、活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

1996 年の米ハーバード大学癌予防センターによる疫学調査報告をはじめとして、癌予防における食事の重要性が示唆されていた。米 NCI は、「癌予防効果が期待できる天然由

来食品」を疫学的データに基づいて選択し、抗癌効果の高い含有成分をスクリーニングし、臨床研究を通じて、実際の癌予防効果の評価を進めていたが、ブロッコリーやカリフラワー等のアブラナ科植物は、上述した「癌

予防効果が期待できる食品」に選ばれ、インドール-3-カルビノール (I3C) はその有効成分として、最も期待されているもののひとつである。動物実験でも癌予防効果が確認されており、その作用機構についても、細胞周期停止やアポトーシス誘導等多岐にわたり、分子レベルで解析が行なわれている。

一方で、食品成分による癌予防効果を考える上での大きな問題点は、たとえ有効と考えられる成分であっても、単一成分の投与では高濃度でないと十分な効果を示さない場合が多いことである。ヒトでの応用を考えた場合そのような高濃度を達成するのは困難で、仮に達成された場合でも、副作用の危険性が増す可能性を考慮しなくてはならない。そこで、単一成分よりも、複数成分の併用による癌予防戦略を考える方が現実的かつ実践的であると考えられている。

2. 研究の目的

アブラナ科植物由来成分の細胞増殖抑制効果、及び併用によりその効果を増強する成分を探索し、分子機構の解明を通して新しい癌予防法の開発を目指すことを目的とした。アブラナ科植物由来成分として、I3C は細胞死誘導と、細胞周期停止の両経路に働くため、細胞死誘導能のある食品成分に対しても、また細胞周期停止を促す食品成分に対しても、その効果を相乗的に増強できると考えられる (図 1)。そこで、この I3C と併用することで抗癌効果が増強される食品成分の探索とその分子メカニズムの解明を目指した。

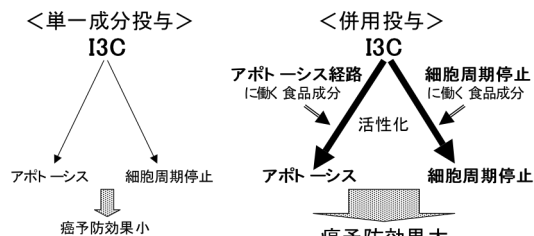


図 1 I3C と別の食品成分の併用による癌予防

3. 研究の方法

p53 が変異により失活し、p16 遺伝子が DNA メチル化され、遺伝子発現が抑制されているヒト大腸癌由来 HT-29 細胞を用い、主に以下のような手法を用いて研究を行った。

(1)細胞増殖測定

食品成分や薬剤を培養細胞の培地に直接添加し、24~72 時間後における濃度依存的な細胞増殖抑制効果を測定した。併用効果については、それぞれ単一成分で処理した場合に 50%以上の増殖抑制効果を示す有効用量以下で用い、濃度依存性、時間依存性に測定した。各単一成分での相加的な増殖抑制効果以上の効果がみられた組合せについて、併用効

果があったものと判定した。

(2)細胞周期・アポトーシス解析

(1)でみられた細胞増殖抑制効果が、細胞周期の停止か、アポトーシス (細胞死) の誘導によるものなのかを判定するために、フローサイトメーターを用いて解析した。

(3)細胞周期・アポトーシス制御因子の解析

(2)によって得られた解析結果に基づき、その分子機構の解明のために、可能性のある制御因子についてタンパク質レベル、mRNA レベルでその発現の変化について解析した。

(4)オートファジー解析

インドール-3-カルビノールとゲニステインの併用時における分子機構について、オートファジーの関与が考えられたため、オートファゴソームを検出、確認を行なった。オートファゴソームの蓄積した細胞の定量には、アクリジンオレンジを用いた。

(5)活性酸素種 (ROS) 測定

活性酸素種 (ROS) 検出試薬 CMH₂-DCFDA で細胞を処理し、フローサイトメーターを用いて細胞内蓄積量を測定した。

4. 研究成果

(1) I3C とゲニステインの併用による細胞死誘導効果 (雑誌論文④、学会発表⑤、⑥、⑫、⑬、⑮より)

ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞を用い、大豆由来成分ゲニステインと I3C を、それぞれ単独では細胞死を誘導しない濃度どうして併用すると、細胞死 (アポトーシス) が誘導される (図 2A) ことを見出しそのメカニズムを解析した。アポトーシスはカスパーゼ阻害剤により抑制されたことから、カスパーゼ依存性であると考えられた (図 2B)。また、多くの

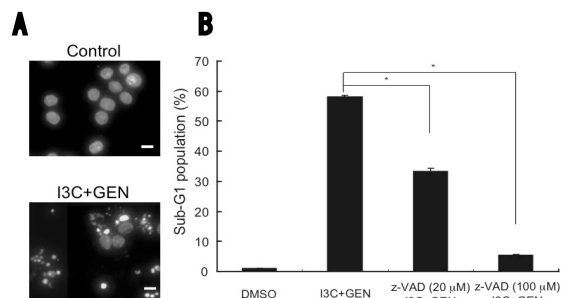


図 2 ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞の I3C 処理、ゲニステイン (GEN) 処理、I3C と GEN 併用処理時におけるアポトーシス誘導。A. DAPI による核染色。Control: 溶媒 (DMSO) による処理、I3C+GEN: I3C と GEN 併用処理 B. I3C と GEN 併用処理時におけるアポトーシスのカスパーゼ阻害剤 z-VAD による抑制

癌細胞で活性化されている細胞増殖シグナル伝達系のひとつである Akt 経路の阻害、及びその下流の抗アポトーシス因子の減少も確認された (図 3)。また、I3C とゲニスチンの併用処理により、オートファゴソムの蓄積が観察された。Akt 阻害剤により Akt 経路を阻害すると、オートファジーが誘導され、進行した (図 4)。しかし、I3C とゲニスチンの併用処理では、オートファジーは誘導さ

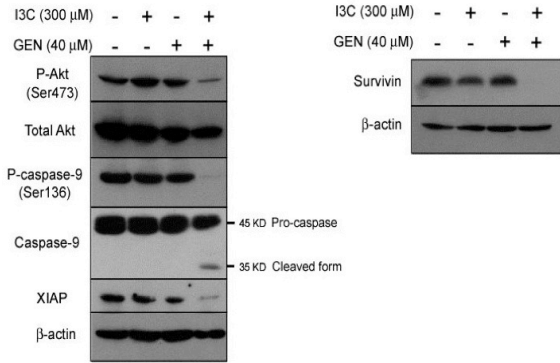


図 3 I3C とゲニスチン(GEN)の併用処理による Akt の不活性化、及びその下流で制御されているカスパーゼ 9 の活性化、抗アポトーシス因子 (XIAP、survivin) の発現減少

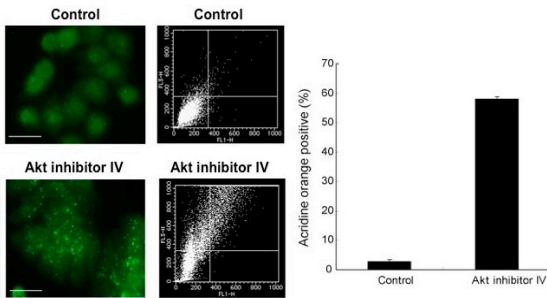


図 4 Akt 阻害剤(Akt inhibitor IV)によるオートファゴソムの細胞内蓄積. オートファゴソムのマーカー分子 (LC3) による細胞染色 (左)、アクリジンオレンジによるオートファゴソム蓄積細胞の FACS による解析結果 (中央) 及びその結果をグラフ化したもの (右)。

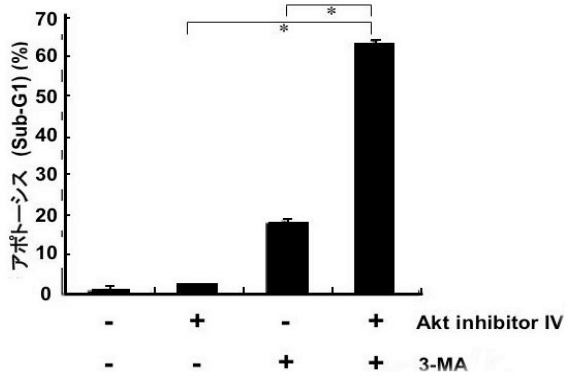


図 5 Akt 阻害剤 (Akt inhibitor IV) 及びオートファジー阻害剤 (3-MA) の併用によるアポトーシス増強

れたものの、オートファジーの進行は阻害されていることが判明した。そこで、Akt 経路の阻害剤と共に、オートファジー進行を阻害する薬剤 (3-MA) と同時に併用処理すると、アポトーシスの効果的な増強が観察された (図 5)。

以上より、I3C とゲニスチンを併用すると、Akt 経路と、オートファジー進行の両方が阻害され、アポトーシスが誘導されたのではないかと考えられる。動物実験等の検討が今後必要ではあるが、この組合せの有効性のみならず、Akt 経路の阻害とオートファジー進行を同時に阻害することが、有効な癌予防戦略となる可能性が示された。

(2) I3C とガラングンの併用による細胞死誘導効果 (学会発表③、⑨より)

I3C を蜂蜜やプロポリス等に多く含まれるフラボノールの一種、ガラングンと併用した場合に細胞死誘導効果が増強されることを見出した (図 6)。フローサイトメトリーにより細胞周期を解析すると、subG1 期の割合が増加していたことから、この効果はアポトーシス誘導効果が増強されることによると考えられた。その分子メカニズムについては現在解析中であるが、I3C とガラングンの併用処理により、細胞内に活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) の蓄積が観察されており、アポトーシス誘導との関連が考えられる。

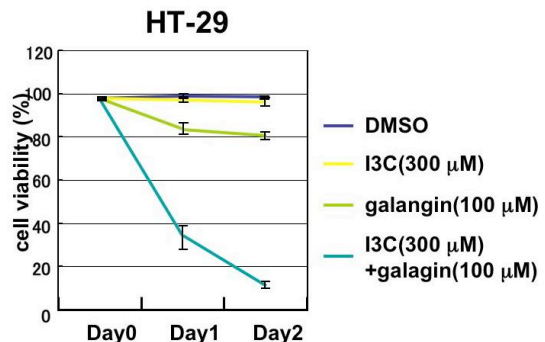


図 6 HT-29 細胞の I3C 処理、ガラングン処理、I3C とガラングン併用処理時における細胞死誘導増強効果。

ROS スカベンジャーによって ROS を減少させるとアポトーシスの割合が減少したことから (図 7)、I3C とガラングンを併用することにより細胞内 ROS が蓄積し、それがトリガーとなってアポトーシスが誘導されている可能性が示唆されている。同時に、転写因子 CREB の発現減少やその標的である抗アポトーシス分子の発現減少が観察されていることから、ミトコンドリア依存的な内在性経路の活性化が関与しているのではないかと考えられる。現在 CREB の依存性が高いと考えられる肺癌の細胞等も用いて、さらなる分子機構の解明に取り組んでいる。

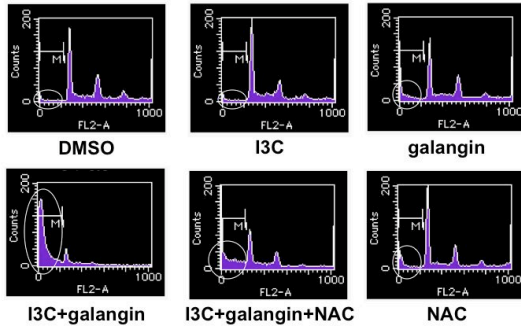


図7 HT-29細胞のI3C処理、ガラランギン処理、I3Cとガラランギン併用処理時における細胞死誘導増強効果。

(3) ブラシニンによる細胞増殖抑制効果 (学会発表②、⑧より)

I3C以外のアブラナ科植物成分として、ブラシニンの細胞増殖抑制効果についても検討を行った。ブラシニンは単独で細胞周期停止を誘導したが、今後ブラシニンと併用して効果のある成分についても探索し、分子機構を解析していく予定である。

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4件)

① Ohsaka Y, Yogosawa S, Nakanishi R, Sakai T, Nishino H. Polymorphisms in promoter sequences of the p15^{INK4B} and PTEN genes of normal Japanese individuals. **Biochemical Genetics**. 48, 2010, 970-986. 査読有

② Koyama M, Izutani Y, Goda AE, Matsui TA, Horinaka M, Tomosugi M, Fujiwara J, Nakamura Y, Wakada M, Yogosawa S, Sowa Y, Sakai T. Histone deacetylase inhibitors and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ synergistically induce apoptosis. **Clinical Cancer Research**. 16, 2010, 2320-2332. 査読有

③ Yasuda S, Yogosawa S, Izutani Y, Nakamura Y, Watanabe H, Sakai T. Cucurbitacin B induces G2 arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells. **Molecular Nutrition & Food Research**. 54, 2010, 559-565. 査読有

④ Nakamura Y, Yogosawa S, Izutani Y, Watanabe H, Otsuji E, Sakai T. A combination of indole-3-carbinol and

genistein synergistically induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by inhibiting Akt phosphorylation and progression of autophagy. **Molecular Cancer**. 8, 2009, 100. 査読有

[学会発表] (計15件)

① 与五沢真吾、安田周祐、山田恭正、曾和義広、酒井敏行、クルクミンの半量体デヒドロジングロンによる細胞増殖抑制効果、第81回日本衛生学会学術総会、2011.3.27、昭和大学(震災のため誌上開催)。

② 泉谷泰行、与五沢真吾、曾和義広、酒井敏行、大腸癌細胞株に対するブラシニンの細胞周期停止効果とその分子メカニズム、第10回分子予防環境医学研究会大会、2011.1.22、京都府立医科大学

③ 与五沢真吾、渡部公綱、瀧澤香織、曾和義広、酒井敏行、大腸癌細胞株に対するインドール-3-カルビノールとガラランギンの併用による細胞死増強、第10回分子予防環境医学研究会大会、2011.1.21、京都府立医科大学

④ 小山真、泉谷泰行、ゴードアハメッド、堀中真野、友杉充宏、中村吉隆、与五沢真吾、曾和義広、酒井敏行、HDAC阻害剤と15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂は相乗的にアポトーシスを引き起こす、第69回日本癌学会学術総会、2010.9.22、大阪国際コンベンションセンター

⑤ 与五沢真吾、中村吉隆、泉谷泰行、渡部公綱、酒井敏行、インドール-3-カルビノールとゲニステイン併用による、オートファゴソーム蓄積を伴う癌細胞死誘導、がん予防学術大会2010札幌、2010.7.16、北海道大学学術交流会館

⑥ 与五沢真吾、中村吉隆、泉谷泰行、渡部公綱、大辻英吾、酒井敏行、インドール-3-カルビノールとゲニステインの併用によるAkt経路及びオートファジー進行阻害を介したアポトーシス増強効果、第14回日本がん分子標的治療学会学術集会、2010.7.8、タワーホール船堀

⑦ 小山真、ゴードアハメッド、堀中真野、与五沢真吾、曾和義広、酒井敏行、HDAC阻害剤と15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂の併用療法は相乗的にアポトーシスを引き起こす、第14回日本がん分子標的治療学会学術集会、2010.7.8、タワーホール船堀

⑧ 泉谷泰行、与五沢真吾、渡部公綱、曾和義広、酒井敏行、大腸癌細胞株に対するブラシ

ニンの細胞周期停止効果とその分子メカニズム、第80回日本衛生学会学術総会、2010.5.10、仙台国際センター

⑨与五沢真吾、渡部公綱、瀧澤香織、曾和義広、酒井敏行、インドール-3-カルビノールとガラングンの併用による細胞死増強効果、第80回日本衛生学会学術総会、2010.5.10、仙台国際センター

⑩Koyama M, Izutani Y, Goda AE, Matsui TA, Horinaka M, Tomosugi M, Fujiwara J, Nakamura Y, Wakada M, Yogosawa S, Sowa Y, Sakai T. Histone deacetylase inhibitors and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ synergistically induce apoptosis. AACR 101st Annual Meeting 2010, 2010.4.21, Walter E. Washington Convention Center.

⑪安田周祐、与五沢真吾、泉谷泰行、中村吉隆、渡部公綱、酒井敏行、ククルビタシンBによるROS依存的な細胞周期停止とアポトーシスの誘導、第9回分子予防環境医学研究会大会、2010.1.22、東京大学

⑫与五沢真吾、中村吉隆、泉谷泰行、渡部公綱、酒井敏行、インドール-3-カルビノールとゲニステイン併用による癌細胞死増強効果、第9回分子予防環境医学研究会大会、2010.1.22、東京大学

⑬与五沢真吾、中村吉隆、安田周祐、泉谷泰行、酒井敏行、細胞死を誘導する食品成分の探索とその分子機構、第5回3大学連携研究フォーラム、1009.12.8、京都府立医科大学

⑭安田周祐、与五沢真吾、泉谷泰行、中村吉隆、酒井敏行、ククルビタシンBによる活性酸素種を介した細胞周期停止及びアポトーシスの誘導、第68回日本癌学会学術総会、2009.10.3、パシフィコ横浜

⑮与五沢真吾、中村吉隆、泉谷泰行、大辻英吾、酒井敏行、インドール-3-カルビノールとゲニステイン併用による細胞死増強効果とその分子機構、第68回日本癌学会学術総会、2009.10.3、パシフィコ横浜

[図書] (計2件)

①田村隆明、与五沢真吾、他、羊土社、無敵のバイオテクニカルシリーズ 改訂第3版遺伝子工学実験ノート上 DNA 実験の基本をマスターする、2010、76-105.

②田村隆明、与五沢真吾、他、羊土社、無敵の

バイオテクニカルシリーズ 改訂第3版遺伝子工学実験ノート下 遺伝子の発現・機能を解析する、2010、153-154, 179-199.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pubmed/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

与五沢 真吾 (YOGOSAWA SHINGO)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：70381936

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし