

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790547

研究課題名（和文） TRAIL 分泌促進成分による新規分子標的癌予防法の開発

研究課題名（英文） Novel molecular-targeting prevention of cancer by inducers of TRAIL release

研究代表者

友杉（堀中） 真野（TOMOSUGI (HORINAKA) MANO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80512037

研究成果の概要（和文）：

免疫賦活作用を有する物質を用い、ヒト好中球におけるTRAIL分泌促進効果を検討した結果、酪酸菌を見出した。酪酸菌は、好中球内に蓄積されたTRAILの細胞外への放出を促す働きを有していた。酪酸菌によるTRAIL分泌機構の解明を行った結果、TLRシグナルを介した経路であることと、MMP-8の関与が示唆された。酪酸菌単独投与で癌細胞に対する好中球の細胞傷害活性が増強し、さらにマウスに移植した腫瘍に対して、顕著な腫瘍増殖抑制効果を示した。現在までの成果をまとめ、国際誌へ投稿中である。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated whether several immunomodulators stimulated the release of TRAIL from PMNs. As a result, *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 (CBM588) increased soluble TRAIL levels in the culture supernatant of PMNs. Interestingly, TLR2/4 signaling pathway has been suggested to be important for the release of TRAIL by MMP-8. We demonstrated that CBM588 enhanced the cytotoxicity of PMNs against human bladder cancer cells. In addition, CBM588 has proven effective against cancer cells by inducing apoptosis *in vivo* as well as *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,600,000	480,000	2,080,000
23年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、TRAIL、DR5、アポトーシス、予防、タンパク質分泌機構、併用

## 1. 研究開始当初の背景

抗腫瘍性サイトカインの一種であるTRAILは、膜結合型と分泌型が存在する(図1)。特異的レセプターへの結合を介して多種のヒト癌細胞にアポトーシスを誘導するが、正常細胞には影響を及ぼさない。前臨床試験

では、組換え型可溶性TRAILの投与は明らかな全身的毒性なしに腫瘍退縮効果を示した(Walczak *et al.* EMBO J, 16, 5386, 1997)。この結果を受け、癌治療において重要とされ、現在も臨床試験が進められている。さらに興味深いことに、TRAILは癌予防においても極め

て重要であることが明らかにされた。すなわち、TRAIL をノックアウトしたマウスは発癌率の増加を示し (Zerfa *et al.* *J Immunol*, 175, 5586, 2005)、TRAIL レセプターの DR5 をノックアウトしたマウスも発癌率や癌転移率の増加を示した (Grosse-Wilde *et al.* *JCI*, 118, 100, 2008; Finnberg *et al.* *JCI*, 118, 111, 2008)。したがって、食品成分による TRAIL 経路の活性化は、癌予防戦略としても合理的かつ魅力的な方法である。

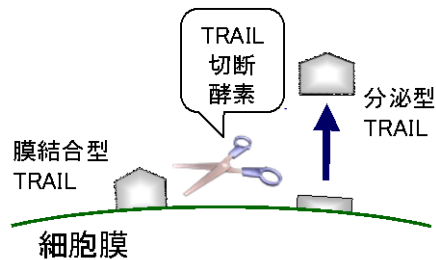


図1 細胞外へのTRAILの分泌

申請者らは、これまで、複数の成分を理論的に組み合わせることは、これからの癌予防における重要なポイントになりうると考え、分子メカニズムに基づいた併用予防法を、癌の「分子標的併用予防法」と名付け、その開発を目指した基礎研究を進めてきた。その中で、申請者は TRAIL のレセプターの一つである DR5 の発現誘導能を有する天然由来癌予防成分を数多く見出し、報告している。さらに、TRAIL の発現を増強する天然由来成分の探索を開始し、乳酸菌などの候補物質を見出すことに成功した (Horinaka *et al.*, *FEBS Lett*, 584, 577, 2010)。

本研究課題では、これまでとは視点を変え、新たに TRAIL の分泌機構に着目した。TRAIL の抗腫瘍性サイトカインとしての機能を最大限に発揮させるためには、発現量の増強だけでは不十分であり、細胞外への分泌を促す必要があるからである。内在性 TRAIL を介した TRAIL-DR5 経路を癌予防へ応用すると、これは非常に重要なポイントである。そこで、[1]DR5 発現誘導成分、[2]TRAIL 発現誘導成分との組み合わせに加えて、[3]TRAIL の分泌促進成分をさらに併用することで、生体内 TRAIL 濃度は増強し、ひいてはより効率的に癌細胞のみにアポトーシスを引き起こせるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

多くの膜結合型タンパク質は、特定のプロテアーゼによりその細胞外ドメインが細胞から遊離され周囲に分泌されることが知られている。このような活性は各種膜タンパク質の機能制御に関与し、細胞の基本的な生理

機能のみならず、癌においてもきわめて重要であることが解明されつつある (佐谷秀行, 細胞工学, 22, 614, 2003)。

膜結合型タンパク質である TRAIL も、膜結合型から分泌型に転換し、遊離すると考えられている (図 1) が、TRAIL の分泌機構は未だ明らかでない。しかしながら、前述のように、TRAIL を癌の予防へと応用するとなると、これは非常に重要なポイントであり、TRAIL の分泌機構の解明が必要とされる根拠である。

まず、未だに明らかにされていない TRAIL 分泌機構を解明する。その結果、得られた情報 (特定のプロテアーゼの関与など) も基にして、TRAIL 分泌促進成分を天然由来成分から探索する。さらに、DR5 発現誘導成分と TRAIL 発現誘導成分とを組み合わせた三者併用 (図 2) により、最も抗腫瘍効果、発癌予防効果の高い組み合わせを細胞レベル・動物レベルにおいて見出し、有効な癌予防法としての応用を検討する。

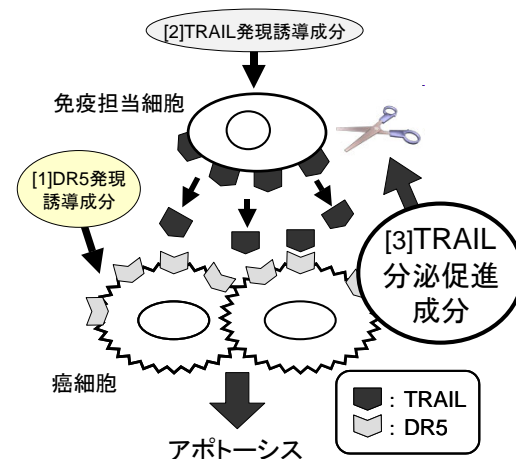


図2 研究目的

## 3. 研究の方法

### [TRAIL 分泌促進成分の探索]

BCG 添加により、好中球から TRAIL の分泌が促進されるという報告がある (Kemp *et al.*, *Blood*, 106, 3474, 2005)。一方で、食品成分においては TRAIL の分泌を促進する成分は未だ見出されていない。そこで、本研究において経口摂取可能な TRAIL 分泌促進成分を見出すことを目指す。まず、前述の TRAIL 分泌機構の解明の結果、得られた情報 (特定のプロテアーゼの関与など) を基にして、それらプロテアーゼの活性化を指標にすることにより、TRAIL 分泌促進成分を天然由来成分から探索する。BCG をポジティブコントロールとし、探索を行う。具体的には、培養上清中の TRAIL 量の測定で有意な増加を認めた成分について、さらに TRAIL mRNA 量の測定を行う。TRAIL mRNA の発現量には影響が認

められない場合、TRAIL の分泌促進に働いている可能性が考えられる。

#### [TRAIL 分泌機構の解明]

TRAIL と同じ TNF ファミリーに属するサイトカインである TNF- $\alpha$  の場合、特定のプロテアーゼの関与が報告されている (Black *et al*, Nature, 385, 729, 1997; Moss *et al*, Nature, 385, 733, 1997)。特異的な各種プロテアーゼ阻害剤を用いた阻害実験を行い、文献と照合しながら、目的となるプロテアーゼを絞込む。続いて、siRNA による阻害実験によって、TRAIL の分泌機構に寄与しているかを確かめる。

#### [TRAIL 分泌促進成分の免疫賦活作用 (アポトーシス増強効果) の検討 (*in vitro*) ]

ヒト好中球に TRAIL 分泌促進成分を投与し、6 時間後、培養上清を採取。これを癌細胞に添加し、癌細胞の細胞死をフローサイトメーターによって定量する。その細胞死がアポトーシスであるか検討するためにカスパーゼ阻害剤で処理し、細胞死を阻害できるか否か確認する。また、その細胞死における経路の寄与を確認するため、TLR 抗体や各種阻害剤を用い、癌細胞の細胞死を阻害できるか否か検証する。

#### [TRAIL 分泌促進成分の腫瘍増殖抑制効果の検討 (*in vivo*) ]

C3H マウスにマウス膀胱癌細胞を皮下移植し、TRAIL 分泌促進成分を定期的に投与し、腫瘍増殖抑制効果を示すか否か検討する。体内におけるマウス TRAIL の発現誘導を検証するため、ELISA 解析によって、血漿中 TRAIL 濃度を測定する。また、腫瘍におけるアポトーシス誘導を確認するため、腫瘍から抽出したタンパク質により、Western blotting を行い、caspase の活性化の検討を行う。

#### 4. 研究成果

免疫賦活作用を有することが明らかにされている種々の物質を用い、ヒト末梢血単核球と好中球における TRAIL 発現誘導効果および TRAIL 分泌促進効果を検討した。その結果、「TRAIL 分泌促進成分」の候補物質として酪酸菌 (*Clostridium butyricum* MIYAIRI 588) を見出すことに成功した。その物質は、TRAIL の発現には影響せず、好中球において蓄積された TRAIL の細胞外への放出を促す働きを有する。

酪酸菌による TRAIL 分泌機構の解明を行った結果、酪酸菌は、TLR シグナルを介して好中球において蓄積された TRAIL の細胞外への放出を促す働きを有することが判明した。さらに、阻害剤、siRNA を用いた阻害実験の結果、その分泌機構には MMP-8 の関与が示唆さ

れた。酪酸菌単独投与で癌細胞に対する細胞傷害活性が増強し、さらにマウスに移植した腫瘍に対する効果を検討したところ、顕著な腫瘍増殖抑制効果を示した。腫瘍部では、caspase-8 および caspase-3 の活性化が認められたことから、腫瘍増殖抑制効果は癌細胞に対するアポトーシス誘導に一部依存することが判明した。現在までの成果をまとめ、学会にて発表を行った。さらに論文としてまとめ、現在は国際誌へ投稿中である。

今後、さらに DR5 発現誘導成分と TRAIL 発現誘導成分との併用実験を進める。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 9 件)

① Mano Horinaka, Tatsushi Yoshida, Atsuko Kishi, Kaoru Akatani, Takashi Yasuda, Junji Kouhara, Miki Wakada, Toshiyuki Sakai. *Lactobacillus plantarum* induces TRAIL production and facilitates natural killer activity against cancer cells. AACR 102nd Annual Meeting 2011. 2011 年 4 月 4 日 ; Orlando, FL 32819, USA.

② 堀中真野. 食品成分を用いた TRAIL 経路活性化による新規癌予防戦略. 第 18 回日本がん予防学会 2011 年 6 月 21 日 ; 京都

③ 神農雅秀, 堀中真野, 高羽夏樹, 三木恒治, 酒井敏行. 酪酸菌による TRAIL 誘導とその抗腫瘍効果の検討. 第 81 回日本衛生学会学術総会. 2011 年 3 月 (東北地方太平洋沖地震のため、東京での開催は中止。HP 上での掲載により、開催とされた。)

④ 神農雅秀, 堀中真野, 木村泰典, 中村晃和, 本郷文弥, 三神一哉, 高羽夏樹, 河内明宏, 酒井敏行, 三木恒治. 酪酸菌による TRAIL 誘導とその膀胱癌治療への応用に関する検討. 第 99 回日本泌尿器科学会総会 2011 年 4 月 23 日 ; 名古屋

⑤ 神農雅秀, 堀中真野, 酒井敏行. 酪酸菌による好中球からの TRAIL 誘導とその抗腫瘍効果の検討. 日本がん分子標的治療学会第 15 回学術集会 2011 年 6 月 24 日 ; 東京

⑥ 神農雅秀, 堀中真野, 三木恒治, 酒井敏行. 酪酸菌による好中球からの TRAIL 誘導とその抗腫瘍効果の検討. 第 18 回日本がん予防

学会 2011 年 6 月 21 日；京都

⑦神農雅秀, 堀中真野, 本郷文弥, 高羽夏樹, 河内明宏, 三木恒治, 酒井敏行. The stimulation of Clostridium butyricum on neutrophils causes the release of TRAIL. (酪酸菌による好中球からの TRAIL 誘導とその抗腫瘍効果の検討.) 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 4 日；名古屋

⑧神農雅秀, 堀中真野, 三木恒治, 酒井敏行. 酪酸菌による好中球からの TRAIL 放出促進機構とその抗腫瘍効果の検討. 第 11 回分子予防環境医学研究会 2012 年 1 月 28 日；岡山

⑨堀中真野, 神農雅秀, 三木恒治, 酒井敏行. 酪酸菌による TRAIL 誘導とその抗腫瘍効果の検討-第 2 報-. 第 82 回日本衛生学会学術総会. 2012 年 3 月 25 日；京都

[図書] (計 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

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

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

友杉 (堀中) 真野 (TOMOSUGI  
(HORINAKA) MANO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80512037

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：