

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11155

研究課題名(和文)天然食品由来抗酸化フラボノイドの前立腺癌予防に関わる分子基盤

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for prostate cancer prevention induced by natural flavonoid

研究代表者

内木 拓(Naiki, Taku)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：50551272

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)：去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)は、薬物治療に耐性を示すことが多い。私たちはこれまで独自のCRPCモデルを用いて、酸化ストレス(ROS)制御機構がCRPCの増殖に強く関わることを証明してきた。そして今回、天然食品由来のフラボノイドであるルテオリンの抗酸化作用に着目し、新規治療法の樹立に向けた解析を行った。その結果ルテオリンはin vitro, in vivoどちらにおいても、CRPCの増殖抑制効果を認め、そのメカニズムはROSを介したアポトーシスの制御を柱とした分子ネットワークの変化であることが解明された。ルテオリンは有望な治療薬となる可能性があり、今回の解析に基づいた治療法の樹立が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果から、前立腺発がんや去勢抵抗性の増殖には、GPX2を中心とした酸化ストレス関連遺伝子が重要な働きをしていることが証明され、ルテオリンは経口摂取で前立腺癌の増殖を抑えることが判明した。今後、ルテオリンを主成分とした治療剤の開発や、日本人が日常で摂取する天然食品を効率よく摂取する方法の開発が可能であれば、新たな治療法の樹立につながると考えられる。さらに今回のルテオリンを用いた酸化ストレス調節法は、他臓器の癌においても応用が可能であることから、新たな発がん・進展抑制につながることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：Prostate cancer growth is androgen sensitive, therefore, the first-line therapy of prostate cancer is androgen deprivation therapy like castration. However, the therapeutic efficacy is limited and lead to castration resistant prostate cancer (CRPC). Previous study, we established the new CRPC model, and by analyzing them, we newly explored that oxidative stress induced mechanism was highly activated in CRPC. Therefore, in this study, we investigated the therapeutic efficacy of luteolin, which is one of natural flavonoids, in CRPC. As a result, luteolin suppressed CRPC growth both in vitro and in vivo, and the main mechanism of growth suppression was apoptosis regulated by ROS caused by the changes of molecular network. In conclusion, luteolin is promising chemotherapeutic agent for CRPC.

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 天然フラボノイド ルテオリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の全世界における罹患数は、男性悪性腫瘍中 2 番目に多く、年間約 90 万人の発症が報告されている。日本においても近年の罹患患者数の増加は著しく、その対策は急務である。前立腺癌は、特に高齢者に生じること、環境要因に強く影響されること、第一選択であるホルモン療法を行っても、約 2 年で効果がなくなること(去勢抵抗性)が知られている。近年、食生活等によって生体に引き起こされる酸化ストレスが、発がんや進展に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。これらの特徴から前立腺癌は、発がん予防が重要で、実践可能な疾患であると言える。しかし、これらの研究に必要な、ヒトの病態を再現した去勢抵抗性前立腺癌モデルはほとんどない。そのため、酸化ストレスと前立腺癌の関係には未解明な点が多く、有効な癌予防物質もない。以前私たちは、プロバシンプロモーターの下流に、SV40 ラージ T 抗原の遺伝子を結合して得られる PBSVT ジーンを SD ラットの受精卵に導入し、前立腺癌モデルラットを確立した。Transgenic rat for adenocarcinoma of the prostate (TRAP)と名付けられたこのモデルに発生する前立腺癌は、病理学的にヒトの前立腺癌に類似した点を多く認めた。そこで私たちは、このモデルラットから去勢抵抗性前立腺癌の転移モデルを新たに樹立し、発がんメカニズムの解析や癌予防物質の研究を行ってきた。さらに新たに cDNA マイクロアレイ解析を行い、去勢抵抗性の腫瘍で発現上昇を認め、これまで文献上報告のない遺伝子 Glutathione Peroxidase 2 (GPX2)を同定した。そして GPX2 は前立腺において、酸化ストレスを制御し、発がんや去勢抵抗性を獲得した増殖に促進的に関わることを明らかにし、前立腺癌の標的因子となりうることを証明してきた。

2. 研究の目的

上記の成果を踏まえて本研究では、天然食品に多く含まれる抗酸化フラボノイドであるルテオリンを用いて、GPX2 を制御し酸化ストレスの抑制効果を検証する。さらにその分子メカニズムを解明し、臨床応用にむけた足掛かりとする。

3. 研究の方法

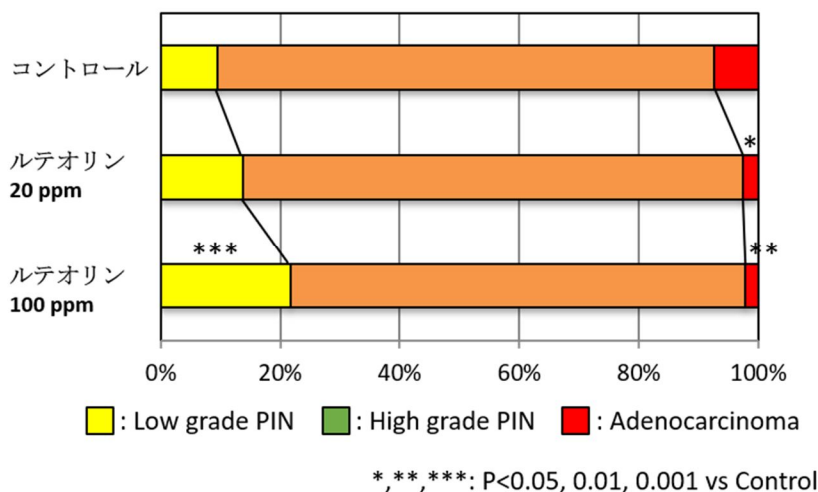
(1) TRAP モデルを用いて、20, 100 ppm の濃度で混餌投与する。対照群として、ルテオリンを投与しない群を設け、前立腺発がん抑制効果の検証を行う。前立腺組織は、前癌病変、癌病変に分けて検討する。さらに Ki67, TUNEL 免疫染色を行い、細胞増殖およびアポトーシスを評価する。酸化ストレス定量には、前立腺凍結組織の DHE 法によって評価する。また、前立腺組織から抽出した total RNA を用いて炎症性サイトカインの mRNA 発現量を RT-PCR により確認する。

(2) ラット去勢抵抗性前立腺癌細胞株 PCa1 にヌードマウス皮下に移植し(1)と同様にルテオリンの投与実験を行う。

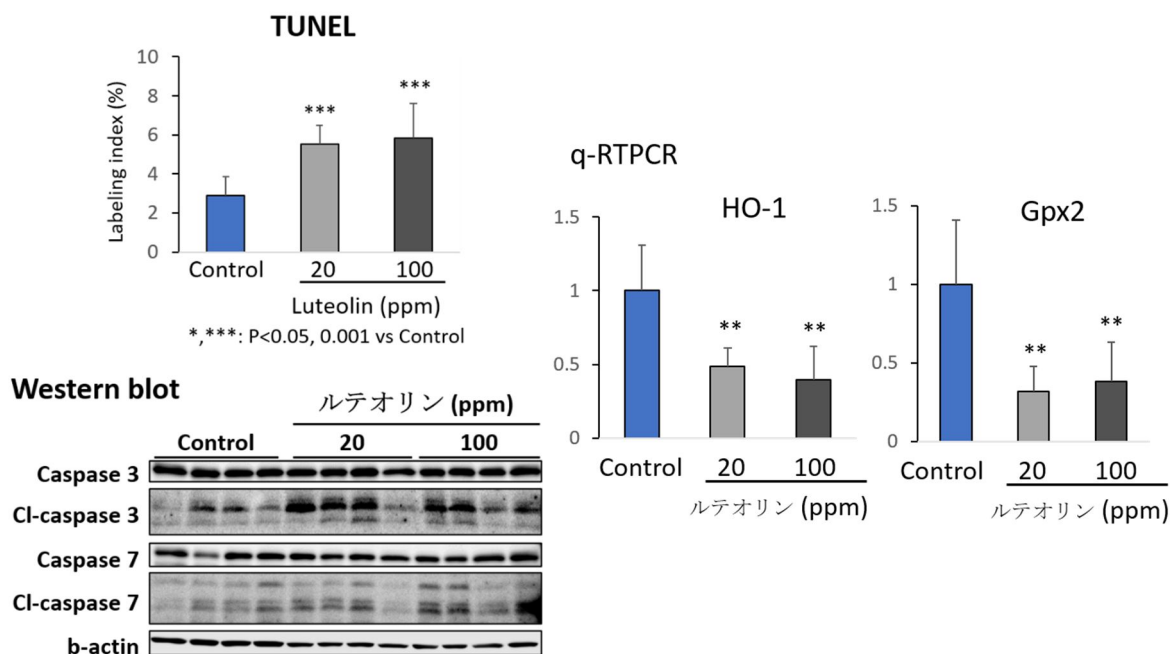
(3) 樹立細胞株 PCa1、及びヒト前立腺癌細胞株 22Rv1 を用いて、*in vitro*におけるルテオリンの投与実験を行う。その場合の細胞増殖に与える影響や、酸化ストレスの定量化を WST-1 アッセイや DCFH アッセイで評価する。そして、酸化ストレス制御機構である Superoxide dismutase(SOD)や GPX2 の活性を確認する。さらに、増殖活性が抑制された場合は、cell cycle やアポトーシス関連タンパクの発現変化を Western blotting および flowcytometry で評価する。

4. 研究成果

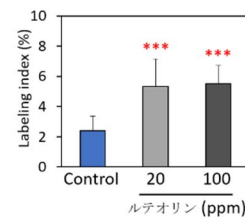
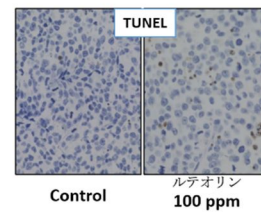
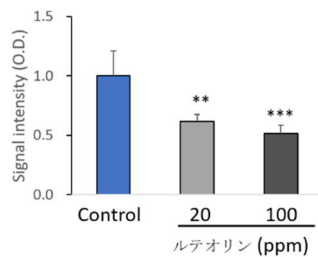
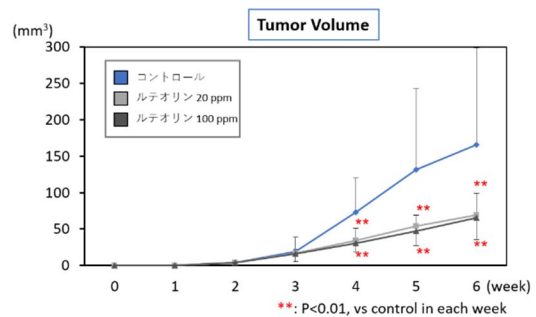
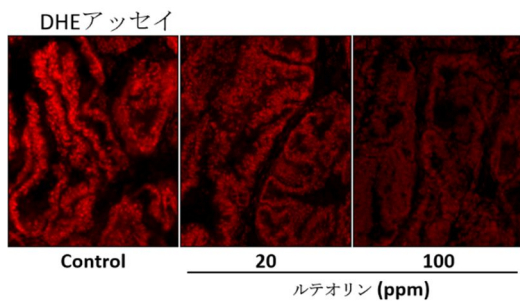
(1) TRAPモデルにおいて、前立腺におけるadenocarcinomaの比率が、ルテオリン投与によって有意に低下し、発がん抑制効果を認めた。(下図)



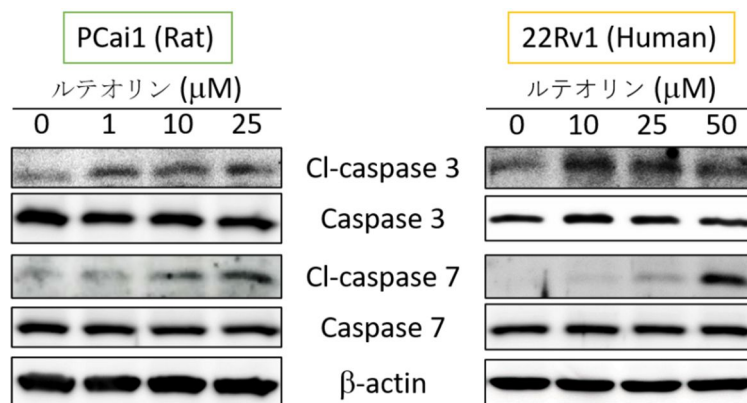
さらに、TUNEL染色では、ルテオリン投与によって有意にアポトーシスの誘導が認められ、Cleaved caspase 3や7の発現も上昇した。RTPCRによって、HO-1やGPX2などの酸化ストレス関連遺伝子の有意な発現変化を認めた。(下図)



さらに DHE アッセイによって、ルテオリン投与における ROS の有意な低下を認めた。(下図)
 (2) CRPC モデルにおいても、ルテオリンは濃度依存性に抗腫瘍効果を認め、アポトーシスの誘導が確認された。(下図)



(3) ラットおよびヒト CRPC 細胞株において、ルテオリンは濃度依存的に細胞増殖抑制効果を認め、*vivo* 同様に ROS の低下と酸化ストレス関連遺伝子に発現変化を認めた。さらに、cleaved caspase 3,7 を介したアポトーシスの誘導を認めた。(下図)



今回の研究成果から、前立腺発がんや去勢抵抗性の増殖には、GPX2 を中心とした酸化ストレス関連遺伝子が重要な働きをしていることが証明され、ルテオリンは経口摂取で前立腺癌の増殖を抑えることが判明した。

今後、ルテオリンを主成分とした治療剤の開発や、日本人が日常で摂取する天然食品を効率よく摂取する方法の開発が可能であれば、新たな治療法の樹立につながると考えられる。さらに今回のルテオリンを用いた酸化ストレス調節法は、他臓器の癌においても応用が可能であることから、新たな発がん・進展抑制につながることも期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 6件）

1. 著者名 Etani T, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki T, Iida K, Nozaki S, Kato H, Yagayasu Y, Suzuki S, Kawai N, Yasui T, Takahashi S.	4. 巻 8
2. 論文標題 NCL1, a highly selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, suppresses castration-resistant prostate cancer growth via regulation of apoptosis and autophagy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm8040442	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 Naiki T, Iida K, Etani T, Nagai T, Tanaka Y, Sugiyama Y, Ando R, Hamamoto S, Banno R, Nagata D, Kawai N, Yasui T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Gemcitabine and docetaxel as second-line chemotherapy in elderly patients with metastatic urothelial carcinoma: a retrospective analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Manag Res.	6. 最初と最後の頁 3669, 3677
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/CMAR.S172913. eCollection 2018.	査読の有無 無
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 Naiki T, Naiki-Ito A, Iida K, Etani T, Kato H, Suzuki S, Yamashita Y, Kawai N, Yasui T, Takahashi S.	4. 巻 9
2. 論文標題 GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 15847, 15859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.24627. eCollection 2018 Mar 23.	査読の有無 無
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 Naiki T, Naiki-Ito A, Iida K, Etani T, Kato H, Suzuki S, Yamashita Y, Kawai N, Yasui T, Takahashi S.	4. 巻 22
2. 論文標題 GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 15847-15859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.24627. eCollection 2018 Mar 23.	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 Nagai T, Naiki T (corresponding), Iida K, Etani T, Ando R, Hamamoto S, Sugiyama Y, Akita H, Kubota H, Hashimoto Y, Kawai N, Yasui T.	4. 巻 1
2. 論文標題 Early abiraterone acetate treatment is beneficial in Japanese castration-resistant prostate cancer after failure of primary combined androgen blockade.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Prostate Int	6. 最初と最後の頁 18-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pnrl.2017.07.001. Epub 2017 Aug 9.	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 Naiki T, Etani T, Naiki-Ito A, Fujii K, Ando R, Iida K, Nagai T, Sugiyama Y, Nakagawa M, Kawai N, Yasui T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Metastatic urothelial carcinoma with glandular differentiation that confirmed the response by autopsy specimen to second-line mFOLFOX6 (fluorouracil, oxaliplatin, and leucovorin) plus bevacizumab chemotherapy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Case Rep Oncol.	6. 最初と最後の頁 1057-1064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000484597. eCollection 2017 Sep-Dec.	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 Naiki T, Iida K, Kawai N, Etani T, Ando R, Nagai T, Tanaka Y, Hamamoto S, Hamakawa T, Akita H, Sugiyama Y, Yasui T.	4. 巻 2
2. 論文標題 A pilot study of gemcitabine and paclitaxel as third-line chemotherapy in metastatic urothelial carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Rural Med.	6. 最初と最後の頁 105-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2185/jrm.2940. Epub 2017 Nov 30.	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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Naiki T, Naiki-Ito A, Etani T, Iida K, Ando R, Nagai T, Kawai N, Takahashi S, Yasui T.
2. 発表標題 Luteolin regulates AR-V7 expression via miRNA recruitment in castration-resistant prostate cancer
3. 学会等名 European urological association annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naiki T, Naiki-Ito A, Etani T, Nagai T, Iida K, Ando R, Kawai N, Takahashi S, Yasui T.
2. 発表標題 Luteolin has protective role for castration-resistant growth in prostate cancer
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内木 拓, 恵谷 俊紀, 内木 綾, 飯田 啓太郎, 河合 憲康, 安井 孝周, 高橋 智.
2. 発表標題 エピゲノム変化を介した去勢抵抗性前立腺癌におけるオートファジー制御メカニズムの解明と新規治療法の開発.
3. 学会等名 第33回前立腺シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naiki T, Naiki-Ito A, Etani T, Iida K, Ando R, Nagai T, Kawai N, Takahashi S, Yasui T.
2. 発表標題 GPX2 is a prognostic marker and has the therapeutic potential through the regulation of oxidative stress in bladder cancer.
3. 学会等名 American Urological Association annual meetings (国際学会)
4. 発表年 2017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	安井 孝周 (Yasui Takahiro) (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	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	河合 憲康 (Kawai Noriyasu) (20254279)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	安藤 亮介 (Ando Ryosuke) (30381867)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	飯田 啓太郎 (Iida Keitaro) (30713945)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・臨床研究医 (23903)	
研究分担者	恵谷 俊紀 (Etani Toshiki) (30600754)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究分担者	高橋 智 (Takahashi Satoshi) (60254281)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	内木 綾 (Naiki Aya) (20509236)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	