

令和元年6月17日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19829

研究課題名(和文) NSAIDsによる大腸がん予防効果におけるCOX非依存的な作用機序の解明

研究課題名(英文) Study of the COX-independent mechanisms in the efficacy of prevention for colon carcinogenesis by NSAIDs

研究代表者

友杉 真野(堀中真野)(TOMOSUGI (HORINAKA), Mano)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80512037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、大腸がん予防効果が期待されるスリンドクスルフォンの標的分子の発見と作用機序の解明を試みた。スリンドクスルフォン固定化ビーズを作製し、大腸がん細胞を対象にスリンドクスルフォン結合タンパク質としてVDAC1とVDAC2を同定した。本研究結果より、スリンドクスルフォンがVDAC1およびVDAC2に結合し機能を阻害することでmTORC1経路を抑制し、cyclin D1の発現を低下させ、G1期停止を誘導している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、大腸がん予防効果が期待されているスリンドクスルフォンの新たな作用機序が明らかとなった。スリンドクスルフォンはVDAC1とVDAC2を直接の作用分子とし、大腸がん細胞の増殖を停止させている可能性を初めて示すものである。COX阻害作用を有さないスリンドクスルフォンの作用機序が解明されていくことは、さらに今後の大腸がん化学予防研究の発展に向けた貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Sulindac sulfone is the metabolite of sulindac, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), without anti-inflammatory activity. Sulindac sulfone has been reported to significantly reduce colorectal adenomatous polyps in clinical trials.

In this study, we showed for the first time that sulindac sulfone directly bound to voltage-dependent anion channel (VDAC) 1 and 2. Moreover, we found that sulindac sulfone induced cell cycle arrest and suppresses the mTORC1 pathway by binding and functionally inhibiting VDACS. There is a possibility that the VDAC might be one of the target molecules of sulindac sulfone for pharmacological actions, including chemopreventive effects against colon cancer.

研究分野：がん予防医学

キーワード：がん予防 大腸がん

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍(がん)の罹患率は年々上昇傾向にあり、診断技術や治療法の発達も進む一方で、がんは現在も死亡原因の一位であることから、『がんの予防』の重要性が高まっている(図1)。中でも、大腸がんは部位別罹患数の増加に加え、早期発見の困難さから、部位別死亡者数においても増加を続けている。国立がん研究センターの推計では、2015年の新規の大腸がん患者は、がん全体で最多の約13万6千人に達すると算出されており、大腸がん予防研究は我が国においても喫緊の課題である。近年、がん予防研究の中で、薬剤による「積極的がん化学予防」が注目されている。その最も代表的な研究が、「低用量アスピリンによる大腸がん化学予防研究」である。

「悪性腫瘍」は、我が国の
疾患別死亡原因の第一位

がん罹患率は上昇中↑
男性 63%、女性 47%
(国立がん研究センターの報告より)



国家的な克服課題

図1: 本研究課題の背景

世界各国の研究報告からも、アスピリンを始めとする非ステロイド性抗炎症剤(nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAIDs)に、大腸がん化学予防効果が期待されている。我が国においても、申請者の所属研究室の石川秀樹特任教授らによって、アスピリンが大腸の前がん病変である大腸ポリープの発生数を抑えたという結果が報告された(Gut, 2014;63:1755-9)。石川らは、多施設共同研究によって、現在も日本人を対象に、さらに大規模な臨床試験を進めている。

その他にも、数々の研究結果から、アスピリン以外のNSAIDsであるセレコキシブやスリダク、そしてスリダクの代謝物であるスリダクスルフォンにおいても同様の大腸がん化学予防効果が示唆されている。NSAIDsの主な作用機序は、シクロオキシゲナーゼ(cyclooxygenase; COX)活性の阻害であるが、近年、NSAIDsはCOX阻害作用以外の重要な作用を多数有しており、その総合的な効果により、様々ながん細胞への増殖抑制作用を示しているのではないかと議論されている。COX非依存的な作用機序については、古くより解析が行われているものの、決定的な標的分子の特定には至っていない。

2. 研究の目的

研究代表者は、本研究課題の研究協力者である青野とともに上で述べた「COX以外のNSAIDsの新規標的分子の解明」を目指し、研究を行ってきた。その研究の中で、スリダクスルフォンがヒト大腸がん細胞に対し細胞死誘導作用による増殖抑制効果を示すことを見出していた。さらに、スリダクスルフォンの直接標的分子として複数の候補分子を同定し、その一つである「分子X」の発現を抑制することでスリダクスルフォンの効果と同様、大腸がん細胞に対する細胞増殖抑制効果が生じることを見出していた。

本研究では、NSAIDsのCOX非依存的な作用を説明しうる、新規標的分子とその経路の解明によって、副作用を抑えた、がん化学予防薬の創製のヒントとなりうる機序解析を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題で用いるスリダクスルフォンは、COX阻害作用を有さない一方で、大腸がん化学予防効果が期待される研究結果が臨床試験からも示されており(Clin Cancer Res, 2000;6:78-89; Gut, 2006;55:367-73)、今回の研究目的に最も合致した化合物である。スリダクスルフォンの直接標的分子の一つとして見出した、上記の「分子X」の関与から検証を開始することとした。研究の結果より、引き続き標的候補分子の「VDAC1」「VDAC2」の関与の検証も行った。

3種類のヒト大腸がん細胞(HT-29、DLD-1、SW480)に対してスリダクスルフォンを処理し、増殖と細胞周期への影響をWST-8 assayおよびFACS解析により検証した。スリダクスルフォンによって挙動変化を示す細胞内シグナルをwestern blottingを用いて探索した。スリダクスルフォンを固定化したナノ磁性ビーズを用い、組換えタンパク質との結合反応実験を行った。標的候補の分子の発現をRNAi法によって抑制し、増殖・細胞周期・細胞内シグナルに対する影響をスリダクスルフォン処理実験と同様の手法で検証した。スリダクスルフォンによるVDACの機能阻害を検証するため、ADP/ATP ratio assayを用いて検証した。

4. 研究成果

(1) スリンダクスルフォンによるヒト大腸がん細胞の増殖抑制効果

ヒト大腸がん細胞(HT-29、DLD-1、SW480)に対してスリンダクスルフォンを処理し、細胞増殖への影響をWST-8 assayにより検証した。その結果、スリンダクスルフォンは3種類の大腸がん細胞すべてに対して、濃度依存的な増殖抑制作用を示した(図2)。

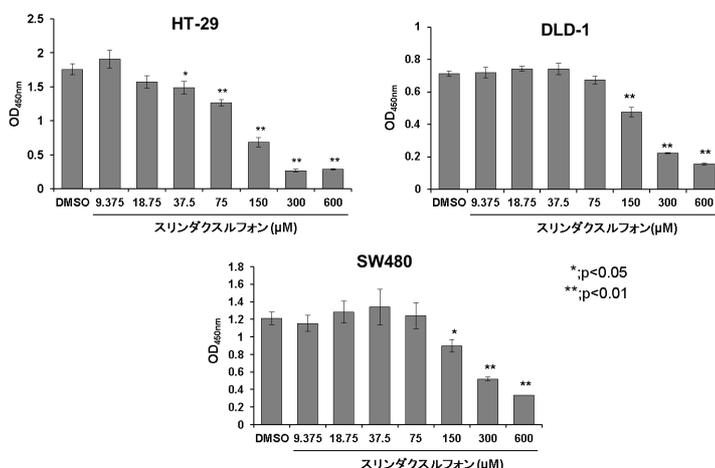


図2 スリンダクスルフォンは大腸がん細胞の増殖を抑制する

(2) スリンダクスルフォンによるヒト大腸がん細胞の細胞周期停止効果

ヒト大腸がん細胞(HT-29、DLD-1、SW480)に対してスリンダクスルフォンを処理し、細胞周期への影響をフローサイトメトリー解析により検証した。その結果、スリンダクスルフォンは3種類の大腸がん細胞すべてに対して、G1期での細胞周期停止を誘導することが確認された(図3)。

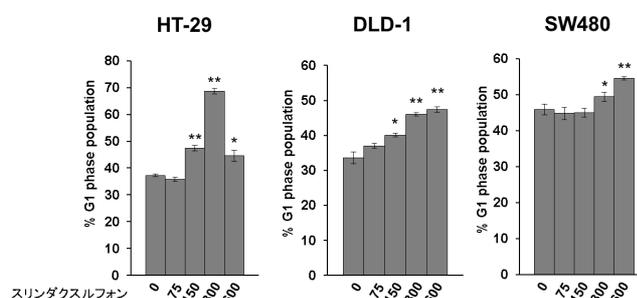


図3 スリンダクスルフォンは大腸がん細胞の細胞周期をG1期で停止させる

(3) スリンダクスルフォンによるヒト大腸がん細胞のmTOR経路抑制効果

ヒト大腸がん細胞(HT-29、DLD-1、SW480)に対してスリンダクスルフォンによって挙動変化を示す細胞内シグナルをwestern blottingを用いて探索した結果、G1-S期の進行において重要な役割を果たすタンパク質であるcyclin D1の減少が見られた。さらにcyclin D1のタンパク質の翻訳制御に関わるmTORCの基質である4E-BP1とp70S6Kのリン酸化状態が減弱していたことから、mTORC1経路の抑制も確認された(図4)。

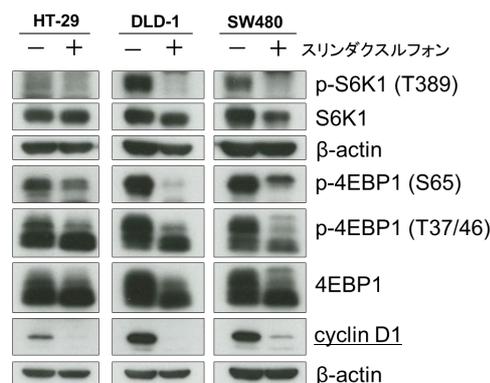


図4 スリンダクスルフォンは大腸がん細胞のmTORC1経路を抑制する

(4) スリンダクスルフォンと標的候補分子VDACとの結合反応実験

スリンダクスルフォンが示す増殖抑制作用を發揮する上で要となる責任分子の特定のため、ナノ磁性ビーズを用いてスリンダクスルフォン固定化ビーズを作製し、大腸がん細胞の溶解液と混合することでスリンダクスルフォン結合タンパク質の精製を行った。この精製サンプルに対してMALDI-TOF MSを用いたプロテオミクス解析を行った結果より、7つのスリンダクスルフォン結合タンパク質(Mitofilin、Tubulin β-chain、VDAC1、VDAC2、ANT2、NIPSNAP1、Derlin-1)の同定に成功した。

* 本研究課題の申請時、予備試験としてヒト大腸がん細胞を用い、スリンダクスルフォン結合タンパク質の精製を行った結果、複数のタンパク質を見出していた。平成29年度は、これらスリンダクスルフォン標的分子の候補の中から「分子X」の機能解析と、スリンダクスルフォンの作用への寄与について検討を行った。しかしながら、その後の検討の結果、「分子X」は、再現性をもってスリンダクスルフォンの作用への寄与がないことが確認された。そのため、再びスリンダクスルフォン結合タンパク質の結果から標的候補の選定に戻った。

それぞれのタンパク質に関する関連文献を調査した結果、ミトコンドリアの外膜タンパク質であるVDACの発現もしくは機能を阻害することで、mTORC1経路が抑制されたという

既報が確認されたことから、本研究ではVDAC1とVDAC2に着目し、さらなる解析を続けた。VDAC1とVDAC2が実際にスリンダクスルフォンに直接結合しているのかを確認するため、それぞれの組み換えタンパク質とスリンダクスルフォン固定化ビーズを用いた結合反応実験を行った。その結果、スリンダクスルフォンがどちらのVDACに対しても、個別に直接結合していることが明らかとなった。以上より、スリンダクスルフォンは細胞内においてVDACに直接作用し、その結果として、VDACの発現もしくは機能が阻害され、mTORC1経路の抑制に至っていると仮説をたてた。

(5) VDACの発現抑制によるヒト大腸がん細胞の増殖・細胞周期・mTORC1経路に対する影響

(4)の仮説を検証するため、大腸がん細胞HT-29におけるVDAC1とVDAC2の発現をRNAi法によって抑制し、増殖・細胞周期・mTORC1経路に対する影響をスリンダクスルフォン処理実験と同様の手法で検証した。その結果、VDAC1とVDAC2の発現を同時に抑制することで、HT-29細胞の増殖抑制が認められた。同様の条件で解析を続けたところ、G1期停止の誘導、cyclin D1の減少、mTORC1経路の抑制が確認された(図5、6)。スリンダクスルフォンを処理した際の大腸がん細胞で起こる現象とVDAC1とVDAC2の両タンパク質を枯渇させた際の現象が一致した。一方、3種類の大腸がん細胞において、スリンダクスルフォンの処理によってVDAC1とVDAC2の発現量の増減は認められなかったことから、スリンダクスルフォンがVDAC1とVDAC2のそれぞれに直接結合し、その機能を阻害することで大腸がん細胞内のmTORC1経路を抑制し、下流のcyclin D1の発現を低下させることでG1期停止を誘導している可能性が考えられた。

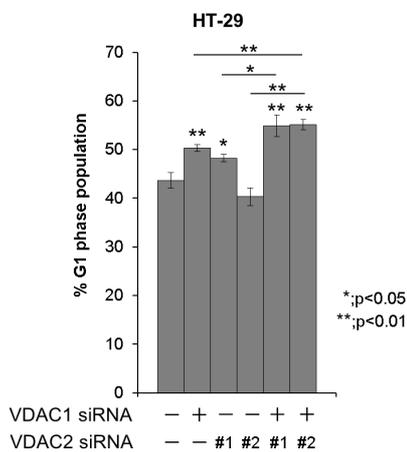


図5 VDACのノックダウンにより大腸がん細胞の細胞周期の停止が誘導される

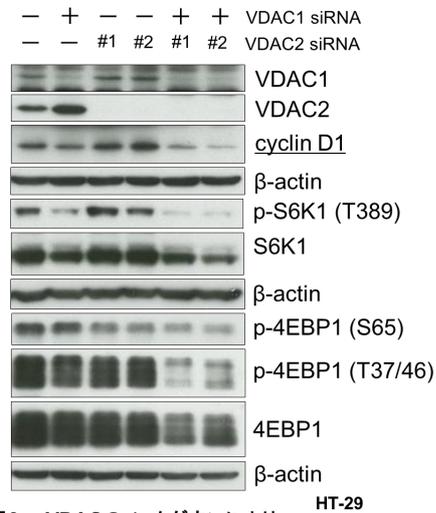


図6 VDACのノックダウンにより大腸がん細胞のmTORC1経路が抑制される

(6) スリンダクスルフォンによるATP産生阻害作用

最後に、スリンダクスルフォンによるVDACの機能阻害を検証するため、ADP/ATP ratio assayを用いて検証した。VDAC1およびVDAC2は、細胞質とミトコンドリアの間でADPやATPの流入を担っているチャンネルタンパク質である。そのため、VDACの機能が阻害された場合、細胞質内のATP量が減少しADP/ATPの比が上昇する。この現象がスリンダクスルフォン処理によって引き起こされるのか否かを検証した結果、スリンダクスルフォンの処理後、短時間で細胞内ATP量が減少し、ADP/ATP比が上昇することが確認された(図7)。よって、スリンダクスルフォンはVDACの機能を阻害している可能性が示唆された。

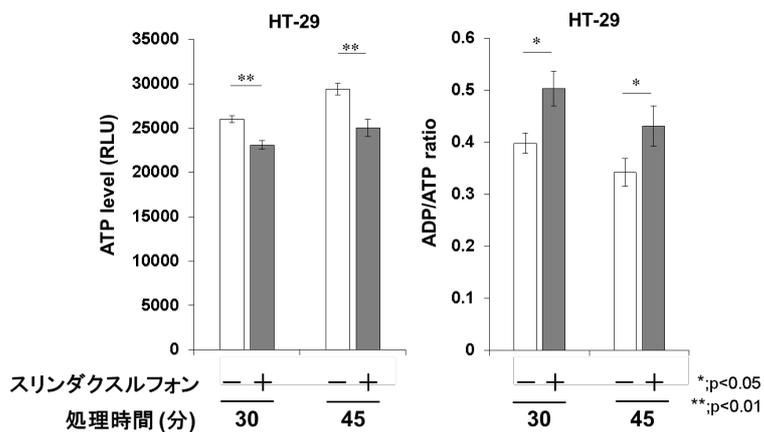


図7 スリンダクスルフォンはVDACの機能であるATP産生を阻害している

本研究の成果として、大腸がん予防効果が期待されるスリンダクスルフォンの新規分子標的の候補となる、7つの結合タンパク質を同定することに成功した。さらには、その内のミトコンドリアタンパク質であるVDAC1とVDAC2がスリンダクスルフォンと直接結合し、機能的に阻害されることで、スリンダクスルフォンが大腸がん細胞に対して示す増殖抑制作用の一端を担っている可能性を示唆する結果が得られた。その他の5つのタンパク質に関してもスリンダクスルフォンの作用を担っている可能性を秘めており、更なる解析が進むことで、新たな創薬シーズの創出に貢献し得ると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Aono Y, Horinaka M, Iizumi Y, Watanabe M, Taniguchi T, Yasuda S, Sakai T.
Sulindac sulfone inhibits the mTORC1 pathway in colon cancer cells by directly targeting voltage-dependent anion channel 1 and 2.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有
2018 Nov 10;505(4):1203-1210.
doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.050.

〔学会発表〕(計3件)

青野裕一, 堀中真野, 飯泉陽介, 渡邊元樹, 谷口知行, 安田周祐, 酒井敏行.
スリンダク代謝体の大腸腺腫形成抑制作用における新規標的分子の探索と作用機序の解析.
第89回日本衛生学会学術総会. 2019年2月3日; 名古屋. 口演.

青野裕一, 堀中真野, 飯泉陽介, 渡邊元樹, 谷口知行, 安田周祐, 酒井敏行.
新規スリンダクスルホン結合タンパク質VDACによる細胞周期制御のメカニズムの解析.
第18回分子予防環境医学研究会 2019年1月11日; 名古屋. 口演.

堀中真野.

食べて防ごう! がん化学予防への挑戦!
おかもやまバイオアクティブ研究会第53回シンポジウム. 招聘講演 2018年6月14日; 岡山.

〔図書〕(計0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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://fkpu-m-pubmed.com/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：青野 裕一

ローマ字氏名：(AONO, yuichi)

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。