

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11058

研究課題名(和文) 中皮腫幹細胞を標的とした新たな中皮腫予防に有効な機能性食素材の開発

研究課題名(英文) Establishment of new functional food ingredients which are effective for prevention of mesothelioma due to regulation of mesothelioma stem cells

研究代表者

矢野 友啓 (Yano, Tomohiro)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：50239828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中皮腫幹細胞を標的とした新規予防法構築の可能性を探るために、安全性が高くかつ抗がん活性が非常に高い代表的所機能性成分であるトコトリエノールの安定化誘導体(T3E)を用いて、その抗中皮腫作用を検討した。まず、3次元培養法を用いて、中皮腫幹細胞の濃縮とその培養法を樹立した。次にこの培養法を用いて、T3Eの抗中皮腫作用を検証した。その結果、T3Eは主に強力なプロテアソーム阻害作用とオートファジー阻害作用の両作用に、過剰な小胞体ストレスを引き起こし、最終的に抗がん剤耐性を示す中皮腫幹細胞に効果的な細胞死を誘導することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスベスト暴露により発生し、発生数が増加傾向にある難治性が高い中皮腫の新規予防法の開発が急務である。本研究では、中皮腫の根本的な発症要因とされ、中皮腫の難治性の原因とされる中皮腫幹細胞に対して、代表的な食由来の安全性が高いトコトリエノールの安定化誘導体(T3E)が顕著な殺細胞効果を示し、かつ、T3Eが既存の中皮腫治療薬として用いられている抗がん剤に対する中皮腫幹細胞の薬剤耐性を軽減できることを示した。この成果は、将来的に有効な中皮腫予防法の構築につながる重要な成果といえる。

研究成果の概要(英文)：In order to evaluate if a new preventive strategy for malignant mesothelioma could be established, due to regulation of mesothelioma stem cells, I estimated suppressive effect of T3E, a stable derivative of tocotrienol which was known as a representative ingredient of anti-cancer agent, on mesothelioma stem cells. Firstly, I succeeded in the establishment of a three-dimensional culture system to concentrate on mesothelioma stem cells from parental mesothelioma cells, and subsequently, I investigated whether T3E could act as an effective agent to regulate mesothelioma stem cells. Consequently, I clearly showed that T3E could act as a potential agent to induce cell death in mesothelioma stem cells which have chemo-resistance against conventional anti-mesothelioma agents, based on simultaneous inhibition of proteasome and autophagy.

研究分野：癌病態制御学

キーワード：中皮腫幹細胞 Tumorsphere 薬剤耐性 小胞体ストレス プロテオソーム オートファジー トコトリエノール誘導体 細胞死

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

一方、アスベストやカーボンナノチューブといった発がん性物質の曝露と発症リスクとの関連が報告されている悪性胸膜中皮腫は、発がん性物質の曝露から発症までの潜伏期間が平均 40 年と非常に長く、がんの中でも予後が極めて不良である。そして、既存の抗がん剤に抵抗性を示すことから新たな抗中皮腫療法の構築が求められている。

生体内腫瘍は、形態が不均一な細胞の集合体である。がん細胞の不均一性は、無秩序な血管新生や未熟な血管構造が作り出す酸素濃度の時間的・空間的な変化による低酸素領域の発生が原因の一つとされる。低酸素は「細胞・組織が必要とする酸素需要を酸素供給が下回った」状態のことを指し、酸素欠乏状態の腫瘍微小環境に存在するがん細胞は抗がん剤や放射線によるストレスを回避しながら、より悪性度が高く、治療抵抗性をもったがん細胞集団へと変化する。がん細胞における低酸素環境への適応は低酸素誘導因子 (HIFs) の安定化によって説明され、中でも HIF-1 α はがん細胞の薬剤耐性能や転移能に関連する治療抵抗性因子である。*in vitro* では、3次元 (3D) 細胞培養システムにより細胞塊 Spheroid を形成させることで *in vivo* 腫瘍の酸素勾配に起因する不均一性を模倣することができる。また、Spheroid はがんの発生や治療抵抗性に関わるがん幹細胞の特性を示すことが複数の研究者により証明されており、Spheroid におけるがん幹細胞化のメカニズム解析は、有効性の高い治療・予防法構築の足掛かりになる可能性を秘めている。

抗がん成分の多くは、がん細胞だけでなく、正常細胞にも副次的な作用をもたらすことが大きな問題であり、がん予防に用いることは困難である。近年、安全性の高い抗がん成分の一つとして、ビタミン E 同族体であるトコトリエノール (T3) が、強い抗がん作用を持ち、様々ながんに対する有望な抗がん成分として注目されてきた。しかし、T3 は生体内では安定性に欠け、抗がん作用レベルを維持できない。そこで当研究室において、T3 の安定化誘導体である

-T3 コハク酸エーテル誘導体 (T3E) を世界に先駆けて合成し、これまでに T3E はいくつかのがん細胞に対して、顕著な抗がん作用を示すことを明らかにしており、この T3E が新たな抗中皮腫成分として期待できる。それ故、中皮腫幹細胞を標的とした新規悪性中皮腫予防法を開発するために、T3E が有用な新規抗中皮腫成分となると推測した。

2. 研究の目的

本研究では、T3E による中皮腫幹細胞を標的とした効果的な新規中皮腫予防法開発の可能性を探るために、*in vitro* での 3次元培養法と幹細胞分離用培地を用いた中皮腫幹細胞の簡易分離法とその分離した細胞を用いた中皮腫幹細胞培養法の構築を行うと同時に、3次元培養で形成された Spheroid の幹細胞性 (低酸素適応、抗がん剤耐性とそれに関する因子の発現解析) の確認を行い、それに引き続き、T3E の持つ中皮腫細胞除去作用について、特に T3E の持つ幅広い抗がん作用の中で、がん幹細胞除去に有効と考えられるタンパク質管理の制御作用 (プロテアソーム及びオートファジー同時阻害による過剰な小胞体ストレス惹起による細胞死誘導作用) に着目し、T3E が中皮腫細胞除去成分として有効か検証し、最終的に中皮腫幹細胞を標的とした、T3E が抗中皮腫成分として臨床応用可能か検討する。

3. 研究の方法

すでに当研究室で使用実績があるがん幹細胞分離用培地を用いて、1週間 3次元培養後に形成された Spheroid を分離し、がん幹細胞性評価として、がん幹細胞性マーカー (CD26, CD44) の遺伝子発現レベルを qRT-realtime PCR 法で測定し、低酸素適応マーカー (HIF-1 α と HIF-2 α) および薬剤耐性マーカー (ALDH1A1, ABCG2) のタンパク質発現レベルをウエスタンブロット法で、また、その表現型として生存活性を WST-8 法で各々評価した。また、低酸素条件 (酸素濃度 1%) で 48 h 培養後、抗がん剤 Pemetrexed および Topotecan 処理し、さらに 24 h 低酸素条件で培養した細胞の生存活性を評価した。また、72 h までの低酸素培養における HIF-1、HIF-2 および薬剤耐性マーカー (ALDH1A1, ABCG2) のタンパク質発現レベルを測定した。さらに、Spheroid 由来の細胞の低酸素適応を評価するために、アネロパックを用いた低酸素条件下 (酸素濃度 1%未満) での生存活性を、通常の 2次元培養由来の細胞と WST-8 を用いて、比較評価した。

抗がん剤 (Cisplatin; Cis, Pemetrexed; Pem)、オートファジー阻害剤 (Chloroquine; CQ)、UPS 阻害剤 (Bortezomib; Bor) 処理に対する細胞生存活性への影響を WST-8 法で、ER ストレス (Bip, CHOP) とアポトーシス (cleaved-Caspase 3) のタンパク質発現をウエスタンブロット法で評価した。T3E の細胞毒性およびアポトーシス阻害剤 (zVAD-FMK; zVAD)、ネクロトーシス阻害剤 (Neclostatin-1; Nec-1) 処理後の T3E の細胞生存活性を WST-8 法で評価した。ER ストレス、オートファジーフラックス阻害剤としての利用可能性評価 (LC3B2/1, p62, p-6RSP)、ユビキチン化タンパク質の蓄積レベル (Ubiquitin; Ub) をウエスタンブロット法で評価した。T3E 処理によるプロテアソーム分解への影響を、発光法によりキモトリプシン様活性測定

により評価した。

各群間の統計的解析は one-way ANOVA と Dunnett ' s multiple-range test ない Students ' t-test で行い、5%水準で統計的有意差ありとした。

4 . 研究成果

3 次元培養で得られた Spheroid において HIF-1 α 及び HIF-2 α の発現が安定化し、この安定化が低酸素適応に貢献していることが明らかになった。また、Spheroid 形成により治療抵抗性関連のがん幹細胞マーカー (ALDH1A1, ABCG2) が高発現し、がん幹細胞表現型を獲得することが示唆された。また、正常酸素培養群と比較し、低酸素培養群 (低酸素 72 h 培養) において抗がん剤 Pemetrexed と Topotecan への耐性を有意に示した。また、低酸素培養群では HIF-1 α 及び HIF-2 α が安定化し、薬剤耐性マーカー (ALDH1A1, ABCG2) が高発現していた。さらに、HIF-1 α の特異的な阻害により、薬剤耐性マーカーがほぼ抑制された。すなわち、今回使用した低酸素条件下での中皮腫幹細胞の薬剤耐性は、HIF-1 α によりもたらされていることが明らかになった。以上、今回 3 次元培養法で形成させた Spheroid に中皮腫細胞由来の中皮腫幹細胞が濃縮できることが明らかになり、中皮腫の難治性要因として、低酸素条件に適応した中皮幹細胞の関与が推測された。

次に、当研究室で以前に抗中皮腫成分として報告した T3E が持つタンパク品質管理機構に対する作用を解析し、T3E が持つ中皮腫細胞に対する抑制効果とその機序の解析を行った。抗がん剤を処理した場合、Cis は濃度・時間依存的な細胞生存活性に影響を及ぼさず、Pem は濃度依存的な生存活性の低下を引き起こさなかった。併用処理した場合でも相乗効果は認められなかった。しかし、不良タンパク分解機構を阻害することで、中皮腫細胞において Bor もしくは CQ との併用処理により CHOP、cleaved-caspase 3 の発現が上昇し、ER ストレスを介したアポトーシスを誘発することが示された。さらに、Pem の感受性が増加した。よって、プロテアソーム活性とオートファジーの同時阻害による不良タンパク分解機構の阻害は、ER ストレスを介した抗中皮腫効果をもたらすが示唆された。

最後に、T3E の持つ抗中皮腫効果が、プロテアソーム活性とオートファジーの同時阻害による不良タンパク分解機構の阻害が関与しているか検証した。まず、T3E 24 時間処理後、中皮腫細胞における細胞生存活性の低下が認められた。また、T3E 処理による細胞生存活性の低下は、zVAD 処理下で有意な上昇を示したが、Nec-1 処理下では細胞生存活性に影響をもたらさなかったことから、T3E は悪性中皮腫細胞株に対してアポトーシスを特異的に引き起こしていることが示唆された。さらに、Bip、CHOP、LC3B 2/1 の発現が上昇したことから、ER ストレスとオートファゴソームの蓄積を誘導したことを確認した。そこで、T3E の不良タンパク分解機構に与える影響を検討したところ、オートファジーフラックスの後期阻害様効果をもたらすことが示唆された。さらに、T3E はキモトリプシン様活性の顕著な抑制効果と同時に、プロテオソーム阻害に対する耐性発現抑制 (プロテオソーム再生に関与する転写因子 Nrf-1 の活性化抑制で評価 : Nrf-1 のプロセッシング抑制及び活性型 Nrf-1 の核内移行の抑制) により、タンパク品質管理機構の破綻を惹起することが明らかになった。このことは、既存のプロテアソーム阻害剤 Bor に対して耐性を示す中皮腫細胞において、Nrf-1 が活性化されていたことから裏付けられた。よって、T3E は細胞内ストレス応答 (オートファジーおよびプロテアソーム活性) の破綻を介した過剰な ER ストレス惹起により、抗中皮腫効果を発揮することが示唆された。

以上まとめると、中皮腫細胞を 3 次元培養することにより形成された Spheroid には幹細胞性を有する細胞が多く含まれていることが判明し、今回確立した 3 次元培養法が中皮腫細胞集団から中皮腫幹細胞を濃縮するための有効な方法であることが明らかになった。また、中皮腫幹細胞は HIF-1 α 及び HIF-2 α の安定化を介して、低酸素適応を行い、その形質発現の 1 つとして薬剤耐性の獲得が示された。また、T3E は中皮腫細胞に対して、オートファジーおよびプロテアソーム活性の同時阻害による過剰な小胞体ストレスの惹起、すなわち、タンパク品質管理機構の破綻を介して、アポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。これらの結果は、T3E が有効な抗中皮腫成分として作用し、中皮腫幹細胞を標的とした新規中皮腫予防法開発にむけて、重要な新規成分となる可能性が示された。

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 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kaneko S, Yamazaki T, Kohno K, Sato A, Kato K, Yano T.	4. 巻 65
2. 論文標題 Combination effect of Bowman-Birk Inhibitor and alpha-tocopheryl succinate on prostate cancer stem-like cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 272-277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.65.272.	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 Sato A, Arai T, Fusegi M, Ando A, Yano T.	4. 巻 42
2. 論文標題 A redox-inactive derivative of tocotrienol suppresses tumor growth of mesothelioma cells in a xenograft model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1034-1037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00924.	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 Endo D, Kaneko S, Ishii K, Kohno K, Sato A, Nantiga V, Yano T.	4. 巻 26
2. 論文標題 The effect of Bowman-Birk inhibitor from soybeans on the sensitivity of prostate cancer stem-like cells to anti-androgen agent	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Science and Technology	6. 最初と最後の頁 553-559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/fstr.26.553	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 該当する
1. 著者名 Sato Ayami, Ueno Haruka, Fusegi Momoka, Kaneko Saki, Kohno Kakeru, Virgona Nantiga, Ando Akira, Sekine Yuko, Yano Tomohiro	4. 巻 102
2. 論文標題 A Succinate Ether Derivative of Tocotrienol Enhances Dickkopf-1 Gene Expression through Epigenetic Alterations in Malignant Mesothelioma Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmacology	6. 最初と最後の頁 26 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000489128	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 該当する

1. 著者名 石田達也、矢野友啓	4. 巻 95
2. 論文標題 喫煙による肺発がんに対するalpha-トコフェロールの抑制効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Endo D, Yano T, Kaneko S, Kato K, Amano T
2. 発表標題 A new preventive strategy for targeting gap junction in prostate cancer stem cells
3. 学会等名 The International Gap Junction Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伏木桃花、矢野友啓
2. 発表標題 T3Eは悪性中皮腫細胞の化学療法抵抗性を克服するために有効か？
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伏木桃花、河野翔、中野渡真奈、矢野友啓
2. 発表標題 タンパク関連メカニズムに焦点をあてたビタミンE誘導体T3Eの抗中皮腫作用の検討
3. 学会等名 第31回ビタミンE研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伏木桃花、矢野友啓
2. 発表標題 MTHFR C677T SNPは小胞体ストレスを介した抗中皮腫効果に影響を及ぼすか？
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Momoka Fusegi, Kakeru Kohno, Tomohiro Yano
2. 発表標題 Can MTHFR C677T SNP affect anti-mesothelioma effect via ER stress?
3. 学会等名 Sydney Cancer Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伏木桃花、河野翔、矢野友啓
2. 発表標題 ビタミンE誘導体による遺伝子多型に基づいた悪性中皮腫細胞死耐性の克服
3. 学会等名 第30回ビタミンE研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野翔、土屋 洸太、荒井恒毅、遠藤大輝、伏木桃花、太田昌子、矢野友啓
2. 発表標題 悪性中皮腫細胞株における低酸素誘導因子HIFを標的としたアナト 由来トコトリエノールの腫瘍抑制作用解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishii Y, Yano T
2. 発表標題 Can T3E overcome chemoresistance of mesothelioma cells via the inhibition of endoplasmic reticulum stress?
3. 学会等名 2020 annual meeting of JCA
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤大輝、矢野友啓
2. 発表標題 3次元培養システムによる悪性胸膜中皮腫スフェロイドとがん幹細胞性との関連性
3. 学会等名 2020年癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒井恒毅、矢野友啓
2. 発表標題 ビタミンE同族体の悪性胸膜中皮腫細胞への影響
3. 学会等名 2020年癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河野翔、矢野友啓
2. 発表標題 低酸素環境下の中皮腫細胞株を標的としたトコトリエノールの抗がん作用解析
3. 学会等名 第31回ビタミンE研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤大輝、矢野友啓
2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫スフェロイドの治療抵抗性上昇は低酸素ストレスに起因するか？
3. 学会等名 日本薬学会141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東洋大学研究者情報データベース http://ris.toyo.ac.jp/profile/ja.98c14e15691e141256190968aeb7164a.html 東洋大学分子食理学研究室ホームページ https://nutritionscience.web.fc2.com/

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------