

平成 21 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790406

研究課題名 (和文) INK4 ファミリー遺伝子発現誘導食品成分の探索

研究課題名 (英文) Screening for cancer chemopreventive agents which induce INK4 family members.

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：癌抑制遺伝子 p16 は様々な悪性腫瘍において失活しており、その類似遺伝子群と併せて INK4 ファミリーとよばれている。p16 が機能的に失活したヒト大腸癌由来細胞において、分子標的抗癌剤ゲフィチニブ及び新規 MEK 阻害剤である JTP-70902 が、INK4 ファミリーの一員である p15 を誘導して細胞増殖を抑制することを見出した。さらに、アブラナ科植物に含まれるインドール-3-カルビノールと大豆由来成分ゲニステインを組み合わせることで、効率的に細胞死 (アポトーシス) を誘導できること、ニガウリの苦み成分の一つクルビタシン B が活性酸素種 (ROS) 依存的に増殖を抑制することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

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：INK4 ファミリー、発癌リスク、癌予防、細胞周期、食品成分、癌抑制遺伝子、サイクリン依存性キナーゼ、分子標的予防

## 1. 研究開始当初の背景

p16 遺伝子は、非小細胞肺癌の約半数で異常が認められ、他にも乳癌、食道癌等様々な悪性腫瘍において失活しており、重要な癌抑制遺伝子と考えられている。更に、p16 と同様の活性を有する類似遺伝子として、p15、p18、p19 が相次いで発見され、総称して INK4 ファミリーと呼ばれている。これらの遺伝子産物はサイクリン依存性キナーゼ阻害物質

として、癌抑制遺伝子 RB 蛋白を活性化型 (脱リン酸化型) にすることにより、細胞増殖 (発癌) を抑制する。最近、遺伝子欠失マウスによる解析からも、INK4 ファミリーが癌抑制遺伝子として重要な役割を果たし得ることが判明した。さらに、喫煙や飲酒、ピロリ菌の感染などによる炎症、加齢などの環境要因によって INK4 ファミリー遺伝子が失活し、発癌リスクを増大させている可能性も指摘さ

れている。したがって失活した INK4 ファミリー遺伝子の発現を回復させることは、癌予防の分子的基盤を構築する上でたいへん重要と考えられる。

また、p16 遺伝子が突然変異や染色体欠失などで失われているにもかかわらず、p16 以外の INK4 ファミリー遺伝子は、正常に保たれている場合が多いといわれている。INK4 ファミリー遺伝子は、全てサイクリン依存性キナーゼ阻害作用を有し、機能的に同一であることが明らかとなっている。実際、p16 遺伝子が欠失した癌細胞に、外から p15、p18、p19 遺伝子を導入し発現させると、細胞増殖が顕著に抑制される。これらの知見は、p16 遺伝子に異常があっても、何らかの方法で他の INK4 ファミリー遺伝子の発現を誘導することにより、失った p16 遺伝子の機能が代償され、癌の進行や発症を抑制できる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

p53 と p16 が失活しているヒト癌細胞を用い、INK4 ファミリーの発現誘導物質を探索し、その機構を明らかにする。さらに、当研究室で解析された他の癌予防物質との併用効果を検討し、これらを用いたより効果的な分子標的癌予防法の確立を目指す。

## 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培養細胞 SW480、HT-29 を用いて、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。

### (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、オートファジーが関与している可能性が考えられた (4.研究成果欄で後述)。それに関連し、電子顕微鏡や特異的抗体を用いてオートファゴソームを検出、確認した。また、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)ROS 測定

クルルピタシン B による細胞増殖抑制効果の分子機構について、活性酸素種 (ROS) の関与が考えられた (4.研究成果欄で後述)。そこで、フローサイトメーターを用いてその細胞内蓄積量を測定した。

## 4. 研究成果

(1)p15 誘導成分として、分子標的抗癌剤ゲフィチニブを見出した (雑誌論文①より引用)。

上皮成長因子 (EGF) 受容体を標的とする分子標的抗癌剤ゲフィチニブ (イレッサ) のヒト大腸癌細胞における効果を検討した。ゲフ

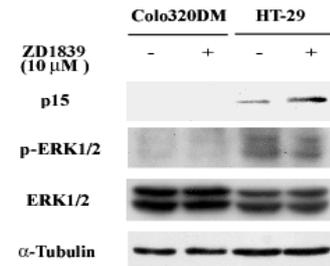


図 1 ゲフィチニブ (ZD1839) 処理による HT-29 細胞における p15 の誘導

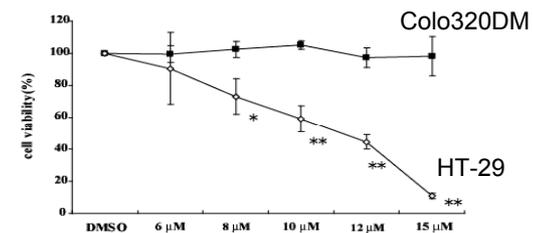


図 2 p15 が誘導されない Colo320DM 細胞と p15 が誘導される HT-29 細胞におけるゲフィチニブ感受性比較

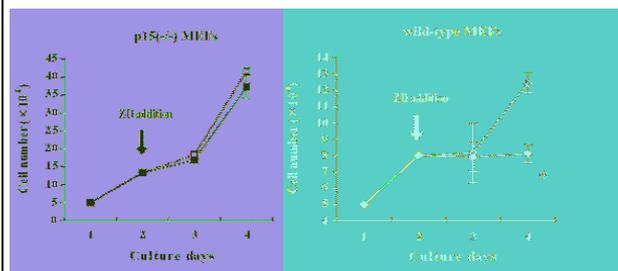


図 3 p15 ノックアウトマウス由来胚性線維芽細胞細胞 (MEF) と正常 MEF におけるゲフィチニブ感受性比較

ィチニブは、ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞において INK4 ファミリーのひとつ、p15 を誘導し (図 1)、癌抑制遺伝子 RB の脱リン酸化を促す事により細胞周期 G1 期停止が誘導される事を明らかにした。p15 の誘導機構としては、MEK 経路を介し、mRNA の安定性を増す事で発現が誘導されたと考えられた。また、p15 が誘導されない細胞 (Colo320DM) ではゲフィチニブに対し薬剤感受性が低下した事 (図 2)、p15 ノックアウト細胞では正常細胞と比較して感受性が低下すること (図 3) より、

細胞における p15 発現誘導能の有無が、ゲフィチニブの薬剤感受性に深く関係している可能性が示唆された。

(2) p15 誘導成分として、新規 MEK 阻害剤 JTP-70902 を見出した (雑誌論文②より引用)。

ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞を新規 MEK 阻害剤 JTP-70902 で処理すると、p15 の誘導、癌抑制遺伝子 RB の脱リン酸化の促進 (図 4)、細胞周期 G1 期停止の誘導 (図 5) などの結果、細胞増殖が抑制されることが示された。p15 を欠失した細胞では JTP-70902 の薬剤感受性が低下したことから、p15 発現誘導が JTP-70902 による細胞増殖抑制能の発揮に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

また、HT-29 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植した担癌マウスにおいて、JTP-70902 投与群では非投与群に比較して有意に腫瘍生長が抑制された (図 6)。このとき、腫瘍部において p15 の発現上昇が確認され、JTP-70902 が *in vivo* においても p15 の発現

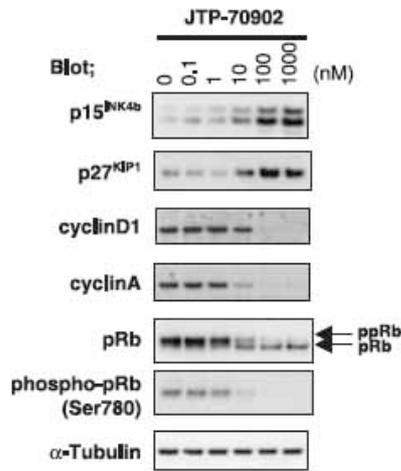


図 4 JTP-70902 による p15 の誘導。他に p27 の誘導、サイクリン D1、A の減少とともに、RB の脱リン酸化が観察された。

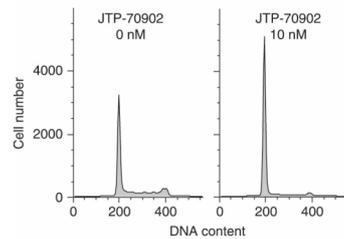


図 5 JTP-70902 による細胞周期 G1 期停止誘導

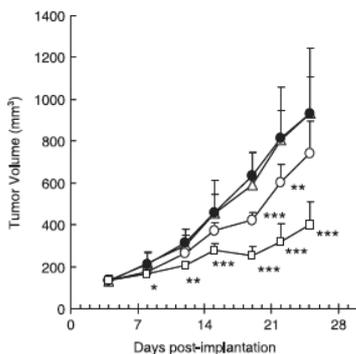


図 6 ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞移植マウスにおける JTP-70902 の腫瘍生長抑制効果

に腫瘍生長が抑制された (図 6)。このとき、腫瘍部において p15 の発現上昇が確認され、JTP-70902 が *in vivo* においても p15 の発現

誘導を介して抗癌性を発揮していることが示された。

(3) p15 を誘導するアブラナ科植物成分であるインドール-3-カルビノールとゲニステインを併用すると、強い細胞死が誘導されることを見出した (学会発表⑥より引用、現在論文投稿中)。

当研究室では、既にブロッコリー等のアブラナ科の野菜に多く含まれるインドール-3-カルビノール (I3C) が p15 を誘導することを報告している (Matsuzaki Y *et al.* *FEBS Lett.* (2004) 576:137-40)。今回、ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞を大豆由来成分のゲニステ

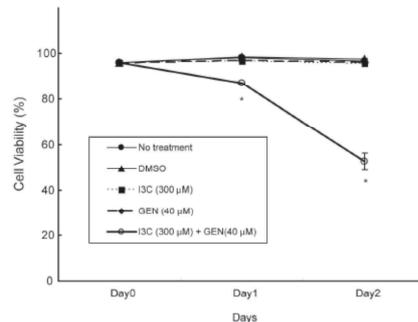


図 7 ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞の I3C 処理、ゲニステイン (GEN) 処理、I3C と GEN 併用処理による細胞増殖抑制効果

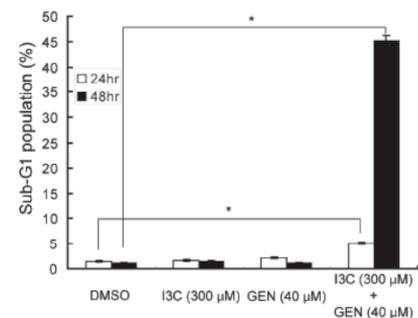


図 8 ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞の I3C 処理、ゲニステイン (GEN) 処理、I3C と GEN 併用処理時におけるアポトーシス増強効果

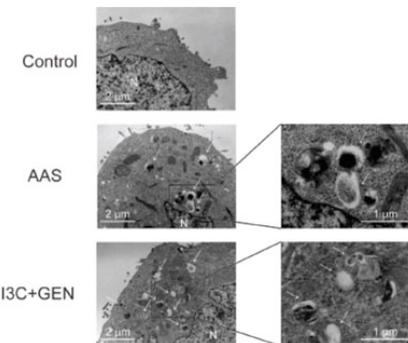


図 9 ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞のアミノ酸飢餓状態 (AAS)、I3C とゲニステイン (GEN) 併用処理時 (I3C+GEN) におけるオートファゴソームの蓄積 (電子顕微鏡像)

インで処理すると、p15 がタンパク質レベルで誘導されることを見出した。この両成分を併用すると、細胞増殖抑制効果が相乗的に増強された(図7)。フローサイトメトリー解析の結果、細胞死(アポトーシス)が増強されていることが判明した(図8)。またアポトーシスに先立ち、オートファジーが誘導されることも判明した(図9,10)。オートファジーは全ての脊椎動物に備わっている自己食メカニズムであり、酸素欠乏やアミノ酸飢餓、化学物質に対する反応等、さまざまなストレスで誘導されることが知られている。

さらに調べると、I3C とゲニステインの併用で誘導されたオートファジーは、その進行途中で阻害されることが判明した(図11)。このオートファジーの阻害がアポトーシスの誘導に参与している可能性が示唆された。またそれには多くの癌細胞で活性化されている細胞増殖シグナル伝達系

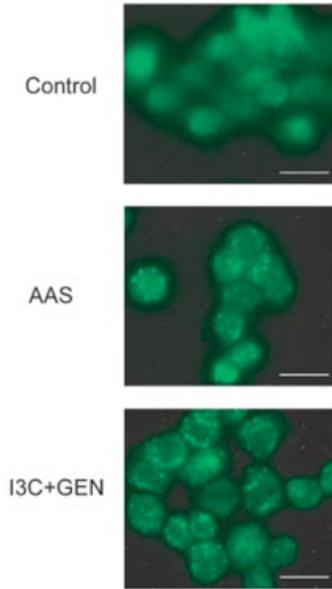


図10 ヒト大腸癌由来 HT29 細胞のアミノ酸飢餓状態(AAS)、I3C とゲニステイン(GEN)併用処理時(I3C+GEN)におけるオートファゴソームの蓄積(オートファゴソームに局在する LC3 抗体による免疫蛍光染色像)

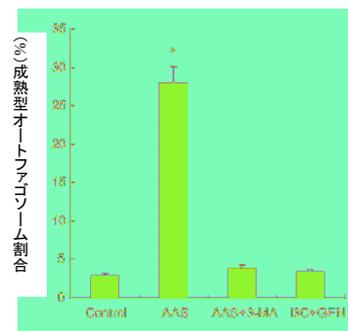


図11 ヒト大腸癌由来 HT29 細胞の I3C とゲニステイン(GEN)併用によるオートファゴソームの成熟阻害

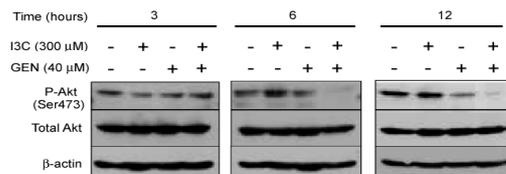


図12 I3C とゲニステイン(GEN)併用による Akt の不活性化

のひとつである Akt 経路の不活性化が関与していることも示された(図12)。

本研究により、I3C とゲニステインという食品成分同士の併用によって、効率的に細胞死が誘導されることを見出された。特に、Akt 経路を阻害する食品成分と、オートファジーを阻害する食品成分の併用が、食品成分による癌予防戦略上有効である可能性が示された。

(4) ニガウリ等の野菜に含まれる食品成分 ククルビタシン B が、p16 が失活したヒト大腸癌由来 SW480 細胞において細胞増殖抑制効果を示すことを見出した(雑誌論文③より引用)。

p16 が失活したヒト大腸癌由来 SW480 細胞において、ククルビタシン B(cucB) は 40-80nM の低濃度で高い細胞増殖抑制効果を発揮した(図13)。

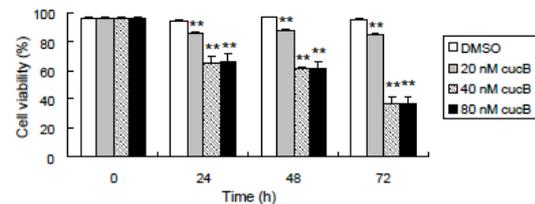


図13 ククルビタシン B(cucB) の SW480 細胞における増殖抑制効果

フローサイトメトリー解析の結果、cucB 処理した細胞は G2/M 期停止及びアポトーシスが誘導され、サイクリン B1 や CDC25C 等の G2/M 期移行に必要なタンパク質の発現低下や、アポトーシスに関する各種カスパーゼの活性化が観察された。また、cucB 処理によって細胞内における活性酸素種(ROS)の蓄積がみられた。ROS スカベンジャーである N-アセチルシステイン(NAC) を cucB と共に添

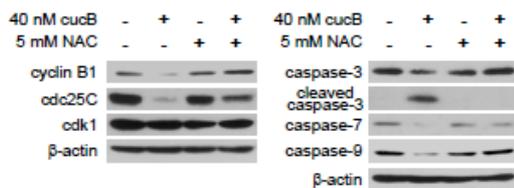


図14 ククルビタシン B(cucB) の細胞周期・アポトーシス調節因子の発現変化及び N-アセチルシステイン(NAC) による回復

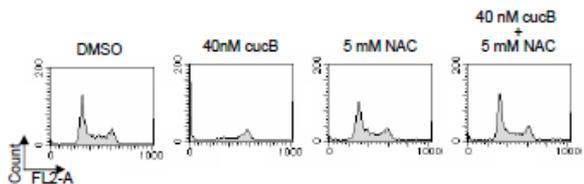


図15 SW480 細胞におけるククルビタシン B(cucB) による G2/M 期停止及びアポトーシス誘導の NAC による回復

加すると、G2/M期移行に必要なタンパク質の発現低下やカスパーゼの活性化が見られなくなり(図14)、細胞周期G2/M期停止やアポトーシスの誘導も起こらなくなった(図15)。このことから、cucBの細胞増殖抑制効果は細胞内ROS蓄積を介しておこる可能性が示唆された。

#### 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 3件)

① Koyama M, Matsuzaki Y, Yogosawa S, Hitomi T, Kawanaka M, Sakai T. ZD1839 induces p15<sup>INK4b</sup> and causes G1 arrest by inhibiting the MAPK/ERK pathway. *Molecular Cancer Therapeutics* (査読有) 6, 1579-1587 (2007).

② Yamaguchi T, Yoshida T, Kurachi R, Kakegawa J, Hori Y, Nanayama T, Hayakawa K, Abe H, Takagi K, Matsuzaki Y, Koyama M, Yogosawa S, Sowa Y, Yamori T, Tajima N, Sakai T. Identification of JTP-70902, a p15<sup>INK4b</sup>-inductive compound, as a novel MEK1/2 inhibitor. *Cancer Science* (査読有) 98, 1809-1816 (2007).

③ Yasuda T, Yogosawa S, Izutani Y, Nakamura Y, Watanabe H, Sakai T. Cucurbitacin B induces G<sub>2</sub> arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells. *Molecular Nutrition and Food Research* (査読有) 投稿中、掲載決定。

[学会発表] (計 7件)

① 与五沢真吾、酒井敏行 リソセリンによるG1期停止と、そのプロドラッグ「アロペスタチン」の抗癌剤による副作用軽減効果。第11回がん分子標的治療研究会総会。2007.7.5. 大阪国際交流センター

② 小山真、松崎洋一郎、与五沢真吾、人見敏明、酒井敏行。ゲフィチニブはMAPK/ERK経路の阻害によってp15<sup>INK4b</sup>を誘導し、G1期停止を引き起こす。第11回がん分子標的治療研究会総会。2007.7.6. 大阪国際交流センター。

③ 人見敏明、松崎洋一郎、与五沢真吾、小山真、酒井敏行。Transcriptional repression of the p15<sup>INK4B</sup> gene by Oct-1.

第66回日本癌学会学術総会。2007.10.4. パシフィコ横浜。

④ 小山真、松崎洋一郎、与五沢真吾、人見敏明、酒井敏行。Gefitinib induces p15<sup>INK4b</sup> and causes G1 arrest by inhibiting the MAPK/ERK pathway。第66回日本癌学会学術総会。2007.10.4. パシフィコ横浜。

⑤ Koyama M, Matsuzaki Y, Yogosawa S, Hitomi T, Kawanaka M, Sakai T. Gefitinib induces p15<sup>INK4b</sup> and causes G1 arrest by inhibiting the MAPK/ERK pathway. 2008 American Association for Cancer Research. 2008.4.15. San Diego, CA, U.S.A.

⑥ 中村吉隆、与五沢真吾、渡部公綱、安田周祐、泉谷泰行、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メカニズム。第79回日本衛生学会学術総会。2009.3.30. 北里大学白金キャンパス

⑦ 安田周祐、与五沢真吾、渡部公綱、中村吉隆、泉谷泰行、酒井敏行。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79回日本衛生学会学術総会。2009.3.30. 北里大学白金キャンパス

[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