

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03889

研究課題名(和文) TRAIL経路活性化とRB活性化によるヒ素発がんに対する予防戦略

研究課題名(英文) Preventive strategy against arsenic carcinogenesis by TRAIL pathway activation and RB activation

研究代表者

堀中 真野(Horinaka, Mano)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80512037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒ素が細胞の「免疫」と「MAPK経路」に及ぼす影響について検討した。ヒトリンパ球に対し、ヒ素は抗腫瘍性サイトカインTRAILの発現をmRNAレベルから著明に抑制した。TRAILの発現調節を担うTCR下流のMAPK経路はヒ素によって抑制された。TRAIL誘導成分により、ヒ素によるMAPK経路の抑制とTRAIL発現抑制は減弱した。

TRAIL発現を抑制する濃度のヒ素によって、ヒトがん細胞を標的細胞としたリンパ球の殺細胞効果の減弱が認められた。ヒトがん細胞におけるMAPK経路は、リンパ球への作用とは逆にヒ素によって活性化された。ヒ素は、がん細胞の悪性化に総合的に寄与す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

アジア諸国における井戸水の「ヒ素汚染」は発がんの環境要因の一つとして深刻な問題である。実践的ながん予防を目指すためには、その機序の解明と因果関係の証明が重要である。これまでも多くの疫学研究や基礎研究が実施され、ヒ素発がんの機構は明らかとされつつあるが、まだ十分とはいえない。本研究課題では、がん細胞を標的とすることに加え、がん細胞の排除に働く免疫の活性化・正常化を考慮に入れ、代表的がん抑制遺伝子である『RB』と、抗腫瘍性サイトカインである『TRAIL』に着目した研究を行った。本研究結果から、ヒ素発がんの予防法として、申請者らの研究実績を応用した分子標的予防戦略が提案できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we investigated the effects of arsenic on cellular "immunity" and the "MAPK pathway". In human lymphocytes, arsenic exposure markedly suppressed the expression of the anti-tumor cytokine TRAIL at both the mRNA and protein levels. Arsenic exposure suppressed the MAPK pathway downstream of the TCR, which regulates TRAIL expression. TRAIL expression inducers attenuated the suppression of MAPK pathway and TRAIL expression induced by arsenic exposure.

Arsenic exposure at a concentration that suppresses TRAIL expression reduced the cytotoxic effect of lymphocytes targeting human cancer cells. The MAPK pathway in human cancer cells was activated by arsenic exposure, contrary to its effect on lymphocytes. It was suggested that arsenic may comprehensively contribute to the malignant transformation.

研究分野：がん予防・がん治療

キーワード：がん予防 ヒ素 TRAIL RB

1. 研究開始当初の背景

地下水のヒ素汚染が深刻な地域では、高濃度ヒ素を井戸水から長期的に摂取することによる慢性的なヒ素中毒が蔓延している。慢性ヒ素中毒は世界各国の様々な地域で報告されており、1980年以降、バングラディッシュ、中国、インド、タイ、カンボジアといったアジア各地で特に多く確認されている。慢性ヒ素中毒は、皮膚黒色症や皮膚角化症だけでなく、皮膚がん、肺がん、膀胱がんなどを引き起こすことが知られている(図1)。多くの動物実験の結果から、ヒ素単独曝露では発がんには至らないことが報告されているものの、ヒ素の発がん作用は、発がんの促進作用に起因する可能性が示唆されている。



図1: 慢性ヒ素中毒との関連が報告されている発がん部位

対象となる地域では、各国の政府機関や国際チームによる支援活動として、現地調査・疫学研究や基礎研究が継続して行われている。飲用水の確保のため、設備の改修による水質の改善などの対策が進められている。しかしながら、ヒ素汚染は非常に広範囲に及んでおり、根絶にはさらに期間が必要とされている。衛生学領域の強みは、様々な分野の研究チームによる多様な角度からの疾患予防戦略を立てられることである。基礎研究の分野からも、この状況の改善に役立つ成果を発信できないだろうか、と考えたことから立案に繋がった。

国内外からの数々の基礎研究成果により、ヒ素による様々な細胞への影響が分子レベルで明らかとなってきた。その中で、本研究課題では、ヒ素によって引き起こされることが示唆されている、「免疫抑制」と「MAPK経路の活性化」に着目した(図2)。



図2: 既報から示唆されている細胞に対するヒ素の影響

2. 研究の目的

ヒ素曝露による細胞への影響の中で、免疫とMAPK経路への影響に着目し、特に、免疫細胞やがん細胞におけるTRAIL-DR5経路、細胞傷害活性に及ぼす影響の分子生物学的な検証を行うこととした。本研究では、以下に示す3つの仮説を基に、ヒ素による発がん促進の機序について検証した。

(1) 免疫抑制とTRAILについて

<ヒ素による免疫抑制作用はTRAILの発現に影響を及ぼしているか?>

TRAIL-DR5経路とは、がん細胞などに対する排除機構の一つである。TRAILは、活性化T細胞などの免疫細胞から産生され、がん細胞などで高発現している特異的受容体のDR5に結合し、細胞死(アポトーシス)を引き起こすサイトカインとして知られている(図3)。がん細胞特異性が高く、正常細胞への影響が少ないことから、発見当初より、がん治療への応用が注目され、現在も特異的抗体の開発などが進められている。さらに、TRAILやDR5のノックアウトマウスの長期的観察において、慢性炎症や、がんの発症が報告されたことから、TRAILは発がん予防に寄与している重要なサイトカインの一員であると考えられている(J Clin Invest 2008;118:100-10, J Clin Invest 2008;118:111-23, J Immunol 2005;175:5586-90)。申請者らは、がん予防の観点から、このTRAIL経路の活性化によるがん予防の実践を目指し、TRAIL受容体の発現を誘導するがん予防成分を多数見出し、報告してきた。さらにTRAILの発現を誘導する成分も報告している。

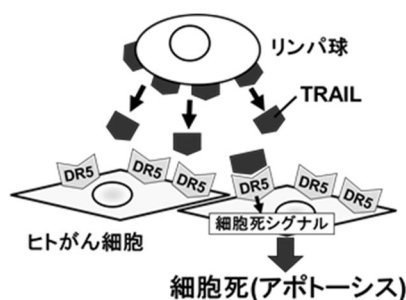


図3: 本研究課題の軸である「TRAIL-DR5経路」を介した細胞死誘導機序

一方、ヒ素の長期間曝露によって免疫抑制作用が認められることが報告されており、その結果として、TRAILの産生量も減少している可能性が考えられる。さらにリンパ球の中でも主要なTRAIL産生細胞であるT細胞がヒ素曝露によってPD-1などの共抑制分子の発現が亢進した、いわゆる疲弊状態にあるという可能性も考えられる。本研究課題では、これらの仮説について検討した(図4)。

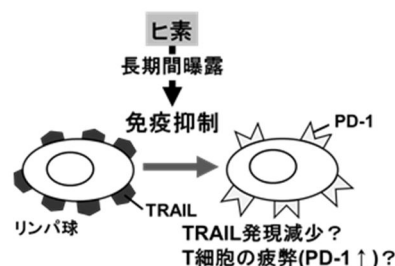
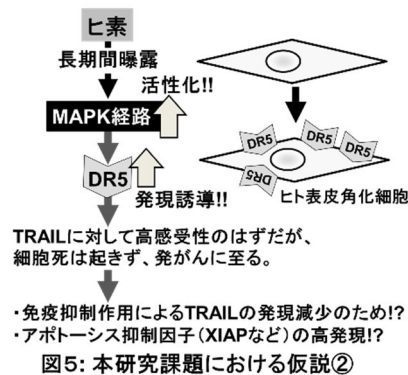


図4: 本研究課題における仮説①

(2) MAPK 経路と DR5、アポトーシス耐性について
 <ヒ素による MAPK 経路の活性化は DR5 の発現やアポトーシス耐性にも影響を及ぼす？>

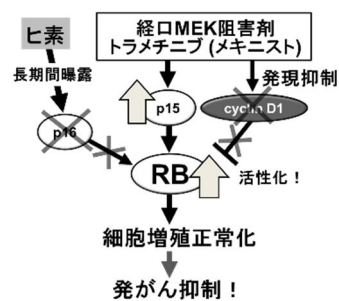
ヒ素を含む金属曝露によってヒト正常細胞において MAPK 経路が活性化し、異常増殖に至ることが報告されている (Br J Dermatol 2003; 149:1116-27)。一方、MAPK 経路活性化により、がん細胞において TRAIL 受容体である DR5 の発現が亢進することが報告されている (J Biol Chem 2012; 287:257-67)。すなわち、ヒ素曝露によって、MAPK 経路が活性化し、細胞が異常化した結果、ヒト表皮角化細胞では DR5 の発現が亢進した状態であると推測される。この状態の細胞は、本来であれば免疫細胞からの攻撃により、TRAIL の結合を介して排除されると考えられるが、実際にはアポトーシス耐性を獲得しており、異常な状態で増殖し続け、発がんに至っている。この、耐性の一つの機序が、免疫抑制作用による TRAIL の発現減少と考えられる (仮説)。さらに、別の可能性として、アポトーシス抑制因子の寄与も考えられる (図 5)。そこで本研究課題の仮説として、DR5 の発現状態の確認と、アポトーシス抑制因子 (XIAP など) の発現状態について検証を行う。ヒ素による発現増強が認められたアポトーシス抑制因子に対し、発現抑制成分を用い、アポトーシス耐性が解除されるか検討する。



(3) MAPK 経路と RB の失活について

<ヒ素による MAPK 経路活性化による細胞増殖促進に対し、RB 再活性化戦略は有効か？>

前述のヒ素の長期間曝露による細胞の異常増殖の分子機序として、ヒ素曝露によって MAPK 経路が活性化し、その結果、cyclin D1 の発現が誘導され、がん抑制遺伝子である RB がタンパク質レベルで失活することが報告されている (Br J Dermatol 2003; 149:1116-27)。さらに、ヒ素の長期間曝露により RB 活性化因子である p16 の発現が抑制され、やはり RB の失活に至ることが報告されている (J Appl Toxicol 2013; 33:951-8)。ヒ素曝露によって引き起こされる RB の失活が、本研究においても確認されたなら、経口 MEK 阻害剤トラメチニブなど、RB の再活性化成分の添加により、細胞増殖の正常化が生じるか検証する。



3. 研究の方法

【実験で検討するヒ素濃度について】

WHO の基準では、飲料水のヒ素濃度は 0.01 ppm 以下 (0.01 mg/L 以下) と定められているが、慢性ヒ素中毒患者の多い国の井戸水のヒ素濃度は、0.05 ~ 4 ppm (WHO の基準の 5 倍 ~ 400 倍) と報告されている。本実験で使用するヒ素として亜ヒ酸ナトリウム (NaAsO₂) を採用し、0.4 ~ 34.7 μM の間で検討することとした。

【ヒト PBMC の分離】

インフォームドコンセントを行った後 (RBMR-C-919)、正常成人血液よりヒト PBMC を比重遠心法により分離し、10% FBS の RPMI 培地で維持した。

【使用細胞】

ヒト表皮角化細胞 HaCaT、ヒト PBMC およびヒトがん細胞 MDA-MB-436 を使用した。

【生細胞数測定】

各細胞に対し、NaAsO₂ や TRAIL 誘導成分を培地に添加し、細胞増殖へ及ぼす影響を生細胞数測定試薬 (CCK-8) により検証した。

【分泌型 TRAIL 産生量の評価 (ELISA)】

培養上清中の TRAIL 量の測定には、Human TRAIL ELISA Kit (CD253) (ab46074) を使用した。

【膜型 TRAIL、PD-1 の評価 (FACS)】

細胞表面の膜型 TRAIL 量の測定には、BD Pharmingen PE Mouse Anti-Human CD253 を用い、PD-1 量の測定には、BD Pharmingen PE Mouse anti-Human CD279 (PD-1) を用いた。測定および解析には BD Accuri C6 Plus を使用した。

【TRAIL mRNA 量の評価 (Quantitative real-time RT-PCR)】

TRAIL mRNA 量の測定には、TaqMan probe TRAIL (Hs00234355_A1)を、内部標準として GAPDH (Hs02758991_g1)を使用した。QuantStudio 3 Real-Time PCR System にて測定・解析した。

[TRAIL および細胞内シグナル分子の発現量、リン酸化量の評価 (Western blotting)]

Western blotting では、下記の抗体を使用した。TRAIL (NB100-56518), pERK (#9101), ERK (#9102), pMEK (#9121), MEK (#9122), Raf-1 (C-20), DR5 (#8074), GAPDH (5GA), -actin (A5441)

[細胞傷害活性の評価 (共培養、Annexin-PI 染色)]

PBMC には NaAsO₂、TRAIL 誘導成分を添加し、24 時間の前培養にて曝露させた。標的細胞である MDA-MB-436 を播種した plate に Falcon カルチャー インサートを用いて、PBMC を共培養し、さらに 10 ng/mL リコンビナント TRAIL を NaAsO₂ で前処理した PBMC との共培養 well に添加した。24 時間後に MDA-MB-436 を回収し、Annexin-PI 染色にてアポトーシス細胞の割合を評価した。

4. 研究成果

*現在、論文化の段階であることから、データについては掲載しない。

[PBMC の増殖へのヒ素の影響]

NaAsO₂ の曝露濃度や曝露時間などの条件を振り、ヒト PBMC の増殖に及ぼす影響について、生細胞数測定により評価した。PBMC の増殖・生存率に影響のない濃度・時間の中で、以降の実験で使用する NaAsO₂ 濃度を決定した。

[分泌型 TRAIL へのヒ素の影響]

ヒト PBMC 培養上清中の soluble TRAIL (sTRAIL) 量に対する TRAIL 誘導成分と NaAsO₂ の影響を曝露 24 時間後、48 時間後に培養上清を回収し、検証した。TRAIL 誘導成分の添加によって sTRAIL の増強が確認された。同時に 2 μM NaAsO₂ を添加することで、sTRAIL 量は抑えられるものの、定常レベルと比較すると十分に高い値を維持できている。なお、定常レベルの培養上清中 sTRAIL 量に NaAsO₂ の影響は認められなかった。これに関しては、定常レベルの培養上清中の sTRAIL 量が ELISA のほぼ測定下限値であるため、NaAsO₂ の影響は評価が難しいと推察される。

[膜型 TRAIL、PD-1 の評価 (FACS)]

ヒト PBMC 細胞表面の TRAIL の発現量についても、上記の sTRAIL の評価と同条件の TRAIL 誘導成分と NaAsO₂ の曝露の影響を検証した。2 μM NaAsO₂ によって細胞表面 TRAIL 発現量は減少した。TRAIL 誘導成分の同時刺激によって、NaAsO₂ による TRAIL 発現減少は緩和された。なお、同一の条件下で検討した PD-1 の発現量に対する NaAsO₂ の影響は認められなかった。

[TRAIL mRNA 量の評価 (Quantitative real-time RT-PCR)]

ヒト PBMC における TRAIL mRNA の発現に対する TRAIL 誘導成分と NaAsO₂ の影響を検証した。2 μM NaAsO₂ によって曝露 24 時間後、48 時間後、TRAIL mRNA 発現量は減少していた。TRAIL 誘導成分によって TRAIL 発現減少は顕著に抑えられた。

[TRAIL および細胞内シグナル分子の発現量、リン酸化量の評価 (Western blotting)]

ヒト PBMC に対し、2 μM NaAsO₂ によって 24 時間後、48 時間後に Raf-1 の発現減少、MEK、ERK の脱リン酸化、TRAIL の発現減少も確認された。MAPK 経路の各シグナル分子の変化は、TRAIL 誘導成分によって、一定の回復が認められている。ヒト T 細胞の活性化応答を決定する細胞内シグナル伝達分子は様々であるが、その中で MAPK 経路へのヒ素の影響が報告されている。TRAIL の発現に対し、NaAsO₂ が及ぼす抑制作用の機序として、上流の MAPK 経路の抑制の結果であると考察される。

[HaCaT および MDA-MB-436 の増殖へのヒ素の影響]

HaCaT の増殖に対する NaAsO₂ の影響について、生細胞数測定により評価した。既報 (Carcinogenesis. 2003;24(11):1811-7) では、HaCaT 細胞に対し、NaAsO₂ の影響として細胞増殖の有意な亢進が報告されていたことから、その検証のため、既報の曝露濃度、時間以外にも種々条件を振って検討を行った。しかしながら、若干の増殖の亢進傾向が認められたものの、有意な効果ではなく、既報の再現を確認することができなかった。当初の研究背景の一つとして、NaAsO₂ による細胞の異常増殖の亢進について機序解析を行う予定であったが、この点については、以降の検証を実施しないこととした。

PBMC の細胞傷害活性における NaAsO₂ の影響と TRAIL の寄与を検討するために、TRAIL 高感受性の複数のヒトがん細胞を対象に標的細胞の選定を行った。その結果から、MDA-MB-436 が TRAIL に対する感受性を有しつつ、ヒ素に一定の耐性を有していることが判明し、以降の共培養試験に採用することとした。

[細胞傷害活性の評価（共培養、Annexin-PI 染色）]

標的細胞（MDA-MB-436）と PBMC を 24 時間、共培養した後、MDA-MB-436 のアポトーシス細胞の割合を検証した。まず、TRAIL 誘導成分による刺激を加えた PBMC との共培養によって、アポトーシスの割合は有意に増強した（細胞傷害活性の増強）。一方で、NaAsO₂ の影響により、アポトーシスの割合は有意に減弱した（細胞傷害活性の減弱）。リコンビナント TRAIL の追加（補填）により、その減弱分は回復したことから、NaAsO₂ による細胞傷害活性の減弱は、部分的に NaAsO₂ による TRAIL の産生抑制によるものと思われる。

[DR5 および細胞内シグナル分子の発現量、リン酸化量の評価（Western blotting）]

標的細胞（MDA-MB-436）に対し、2 μM NaAsO₂ によって 24 時間後、48 時間後に ERK のリン酸化レベルの増強、TRAIL 受容体の DR5 の発現増強が認められた。既報により DR5 ヒ素の曝露によって MAPK 経路の活性化が報告されていることから、この細胞株でも同様の影響が認められたと考えている。一方で、既報（J Biol Chem. 2012;287:257-67.）で MAPK 経路の活性化を介した DR5 の発現誘導については活性化変異型の RAS 下流が最も影響が大きいとされていたが、野生型であっても寄与があることを報告していた。今回の KRAS 野生型の MDA-MB-436 においても、MAPK 経路の亢進が DR5 の発現誘導に寄与していると考えている。また、アポトーシス抑制因子として XIAP、survivin の発現量への NaAsO₂ の影響についても検証したが、濃度依存的な変化は認められなかった。

なお、RB 活性への NaAsO₂ の影響についても検証を試みたが、細胞抗原と使用した抗体とが不適合であるのか、鮮明なバンドが検出されず、判断できない結果であった。さらに条件検討が必要である。

結果として重要なことは、ヒトがん細胞の MDA-MB-436 細胞に対し、NaAsO₂ は MAPK 経路を活性化させたが、一方でヒト PBMC に対しては MAPK 経路を抑制した。同一条件でも、対象細胞により、異なる影響が生じている。標的細胞である MDA-MB-436 は 2 μM NaAsO₂ によって DR5 の発現が増強しており、TRAIL に対し、高感受性の状態といえる。しかしながら、PBMC は 2 μM NaAsO₂ によって TRAIL の発現が抑制されており、細胞傷害活性が十分に発揮されない状況であると推察される。したがって、ヒ素曝露条件下では、リコンビナント TRAIL や TRAIL 誘導成分によって TRAIL を補うことで、がん細胞特異的な殺細胞効果の増強がより期待できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Imai A, Horinaka M, Aono Y, Iizumi Y, Takakura H, Ono H, Yasuda S, Taniguchi K, Nishimoto E, Ishikawa H, Mutoh M, Sakai T.	4. 巻 628
2. 論文標題 Salicylic acid directly binds to ribosomal protein S3 and suppresses CDK4 expression in colorectal cancer cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 110-115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.08.082.	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 -

1. 著者名 Mure K, Ishikawa H, Mutoh M, Horinaka M, Otani T, Suzuki S, Wakabayashi K, Sakai T; J-FAPP Study IV group.	4. 巻 2
2. 論文標題 Efficacy of low-dose aspirin in colorectal cancer risk prevention is dependent on ADH1B and ALDH2 genotype in Japanese familial adenomatous polyposis patients.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Res Commun	6. 最初と最後の頁 483-488
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2767-9764.CRC-22-0088.	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 -

1. 著者名 Takakura H, Horinaka M, Imai A, Aono Y, Nakao T, Miyamoto S, Iizumi Y, Watanabe M, Narita T, Ishikawa H, Mutoh M, Sakai T.	4. 巻 70
2. 論文標題 Sodium salicylate and 5-aminosalicylic acid synergistically inhibit the growth of human colon cancer cells and mouse intestinal polyp-derived cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 93-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.21-74.	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 -

1. 著者名 Mure K, Tomono S, Mure M, Horinaka M, Mutoh M, Sakai T, Ishikawa H, Wakabayashi K.	4. 巻 22
2. 論文標題 The combination of cigarette smoking and alcohol consumption synergistically increases reactive carbonyl species in human male plasma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22169043.	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 -

1. 著者名 Mutoh M, Yoshimura K, Fujii G, Nakamura T, Takeshita T, Wakabayashi K, Sakai T, Ishikawa H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Very long-term treatment with a Lactobacillus probiotic preparation, Lactobacillus casei strain Shirota, suppresses weight loss in the elderly	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12061599.	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 Yasuda S, Horinaka M, Sakai T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Sulforaphane enhances apoptosis induced by Lactobacillus pentosus strain S-PT84 via the TNF pathway in human colon cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letter	6. 最初と最後の頁 4253-4261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.10739.	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 増田光治, 堀中真野, 安田周祐, 森田美枝, 西幹栄美, 石川秀樹, 武藤倫弘, 酒井敏行
2. 発表標題 RB活性化果実飲料の発見
3. 学会等名 がん予防学術大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井綾香, 堀中真野, 青野裕一, 飯泉陽介, 高倉秀樹, 小野寿子, 谷口恵香, 安田周祐, 西幹栄美, 石川秀樹, 武藤倫弘, 酒井敏行
2. 発表標題 サリチル酸はヒト大腸がん細胞のRPS3に結合し、CDK4発現抑制と細胞周期のG1期停止を誘導する
3. 学会等名 がん予防学術大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀中真野, 酒井敏行
2. 発表標題 「先制医療」の実現に向けた戦略的研究
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 R B 活性化食品組成物	発明者 酒井 敏行、堀中 真野、増田 光治	権利者 京都府公立大学法人、築野食品工業株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-036535	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	安田 周祐 (Yasuda Shusuke) (10643398)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究分担者	酒井 敏行 (Sakai Toshiyuki) (20186993)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授 (24303)	
研究分担者	中尾 俊雅 (Nakao Toshimasa) (30829320)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員 (24303)	

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
---------	---------