

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05932

研究課題名(和文) 食品成分による新規抗癌活性：アノイクス誘導による癌細胞の浸潤・転移抑制機能の解析

研究課題名(英文) The novel anti-cancer activities of food components: the analysis about their inhibitory functions on the invasion, growth and metastasis of cancer cells via anoikis induction

研究代表者

矢野 仁康 (Yano, Mihiro)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号：40304555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食品成分による癌の浸潤・増殖・転移抑制効果について、*in vitro*並びに*in vivo*での解析を行った。まず、培養癌細胞を用いた解析により、食品成分のクルクミン、ヘスペレチン、レスベラトロール、カプサイシンは、癌幹細胞を含む足場非依存性癌細胞群に対するEMT抑制機能を介して、これら細胞にアノイクスを誘導(細胞傷害作用)する事で癌の浸潤・転移に抑制的に働く可能性が示唆された。さらにLLC細胞をマウスの肺へ生着させた自然肺転移モデルによる解析から、動物実験レベルでも、クルクミンは、癌の原発巣のみならず肺転移に対しても抑制的に機能している事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の浸潤の多くは、通常の癌細胞が、EMT(上皮間葉転換)を起こし遊離した後、アノイクス耐性を獲得する事で生じる足場非依存性の増殖と関係している。一方、癌の遠隔臓器への転移や再発は、これらアノイクス耐性細胞と癌細胞に混じる少数の癌幹細胞(CSC)からなる足場非依存性癌細胞群(以後AICCGと略記)が重要な役割を果たしている。最近、我々は、抗癌作用を持つ一部の食品成分には、アノイクス抑制分子である幾つかのストレス蛋白質の発現を著明に減少させる作用がある事を見出した。今回、これら食品成分によるAICCGに対するアノイクス誘導能を検証する事で、癌細胞の浸潤・転移に対する抑制機能について解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the inhibitory effects of food components on the invasion, growth and metastasis of cancer cells, *in vitro* and *in vivo*. First, it has been suggested that curcumin, hesperetin, resveratrol and/or capsaicin induce the anoikis in anchorage-independent growth cells including CSCs by undergoing epithelial-mesenchymal transition (EMT), consequently leading to the inhibition of cancer cell invasion, proliferation and metastasis. Furthermore, we found that curcumin prevents the metastasis of lung cancer cells using mouse lung carcinoma cells (LLC) and allograft model *in vivo*.

研究分野：細胞生物学

キーワード：癌幹細胞 細胞死 ストレス蛋白質 アポトーシス 上皮間葉転換 アノイクス

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞は、EMT(epithelial-mesenchymal transition)を起こし遊離した後、アノキス(細胞接着喪失のため誘導される細胞死)耐性を獲得する事で生じる足場非依存性の増殖を特徴としている。実際、癌の浸潤・転移・再発の原動力は、これらアノキス耐性細胞と癌細胞に混じる少数の癌幹細胞(CSC)からなる足場非依存性癌細胞群(以後 AICCG と略記)が重要と考えられている。これら AICCG は、既存の抗癌剤に対し強い抵抗性を示す事から、現在、抗癌剤を始め AICCG 傷害を誘導する手段の検索が行われているが、未だ有効な方法は見つかっていない。最近、天然物、中でもポリフェノール類を代表とする食品成分による EMT 抑制機能を介した CSC に対する傷害作用が報告された。これら食品成分は接着性の上皮型癌細胞に対して抗癌作用を発揮する事が分かっている事から、本研究では、これら食品成分が EMT 抑制機能を介して AICCG にアノキスを誘導し、癌の浸潤・転移抑制効果を発揮できるかその可能性について探った。

## 2. 研究の目的

AICCG の増殖抑制には、EMT の抑制並びに遊離癌細胞群に対するアノキス誘導が必要となる。最近、我々は、抗癌作用を持つ一部の食品成分には、アノキス抑制分子として知られている幾つかのストレス蛋白質の発現を著明に減少させる作用がある事を見出した。本研究では、これら食品成分によるアノキス誘導能を検証する事で、癌細胞の浸潤・転移を抑制できる新規抗癌物質開発の手掛りを探る事を目的とした。

## 3. 研究の方法

### <食品成分による、EMT や CSC が有する癌幹細胞性に対する抑制効果についての検討>

今回、柑橘系果物に含まれるヘスペレチンに着目しその EMT 抑制機能について検討を行った。これまで我々は、ヘスペレチンが転写因子である HSF-1 の発現抑制を介して細胞死を誘導し癌細胞増殖抑制効果を発揮することを報告してきた。一方、HSF-1 は、EMT に関与する幾つかのタンパク質の転写因子として機能する事から、本研究では、ヘスペレチンによる HSF-1 を介した EMT 抑制機能に基づいた癌細胞の浸潤・転移抑制機序、並びに、CSC が有する癌幹細胞性に対する抑制機構についての解析を行った。

【方法】ヘスペレチンをヒト肺癌細胞株 A549 に添加し、細胞遊走能に与える影響を検証した。次に、A549 を低接着シャーレで培養し EMT 獲得浮遊癌細胞を樹立させた後、ヘスペレチン添加または HSF-1 をノックダウンし、EMT マーカータンパク質の発現量を解析した。CSC に対する抑制効果は、A549 をヘスペレチン処理か HSF1 をノックダウンした後、癌幹細胞性に関わるタンパク質の発現量について解析を行った。ヘスペレチンの自己複製能へ与える影響は、低接着シャーレに無血清培地で培養し作成したスフェアを用いて検討した。

### <食品成分による足場非依存性癌細胞群に対するアノキス誘導効果についての解析>

我々のこれまでの解析から、クルクミンが、A549 に対して細胞死を誘導する事でその細胞増殖を抑制することを明らかにしてきた。そこで今回、アノキス耐性浮遊癌細胞及び CSC を用いて、クルクミンによるアノキス誘導を介した癌転移・再発抑制作用についての解析を行った。

【方法】浮遊癌細胞の解析には低接着シャーレを用いた。アノキスを含む細胞死誘導効果は Annexin-V/PI 染色により評価した。-catenin の局在は IF 法で解析した。癌幹細胞は、幹細胞マーカーである CD133 を蛍光染色し FACS を用いて検出した。

### <食品成分による癌の増殖・浸潤・転移抑制効果についての in vivo 解析>

今回、これまでの研究成果の生体への応用を試みるため、マウス肺癌由来の Lewis lung carcinoma (LLC)細胞をマウスの皮下に移植後肺への生着が認められた自然肺転移モデルを構築し、クルクミンによる *in vivo*での癌転移抑制効果について検証を行った。

【方法】最初に、LLC に対するクルクミンによるアノキス誘導効果と細胞遊走能に与える影響を *in vitro*で検証した。LLC にクルクミンを添加し、その細胞生存率と各タンパク質発現量の変化について解析を行った。アノキス誘導は、低接着プレートで培養した浮遊 LLC にクルクミンを添加後、WST-8 アッセイを用いて解析を行った。*in vivo*解析は、D-PBS に懸濁した  $1 \times 10^6$ 個の LLC を C57BL6 マウスの背部皮下に接種し担癌マウスを作成後、クルクミンを隔日で腹腔内に投与した。クルクミン投与 4 週間後に、原発巣の大きさと肺への転移巣数を計測した。

#### 4. 研究成果

##### 食品成分による癌細胞の EMT に対する抑制効果について

ヘスペレチンは A549 細胞に対してその遊走能や浸潤能を抑制する：食品成分による細胞遊走能に対する抑制効果は、Wound healing assay で解析した。ヘスペレチンは、コントロール群及び抗癌剤である CDDP(シスプラチン)処理群と比較して、遊走能を抑制していた。(結果は省略)。次に、浸潤能抑制効果を Transwell invasion assay で検証した所、ヘスペレチンによる浸潤能の著明な抑制効果が認められた(図1)。また、EMT 細胞に特徴的な細胞遊走能に対するヘスペレチンの影響をポイデンチャンバーを用いて解析した所、ヘスペレチン添加で有意な差が確認された(図2)。以上の結果、ヘスペレチンが細胞遊走能を抑制する事が明らかとなった。

ヘスペレチンは、HSF-1 を抑制する事で EMT を阻害している：HSF-1 の EMT での役割を明らかにするため、HSF-1 を RNAi でノックダウンさせ EMT 抑制がみられるか否かについて検討した。HSF-1 ノックダウンにより、図3に示すが如く、上皮系マーカーの発現量の増加と間葉系マーカーの発現量の減少が認められた。以上の結果より、HSF-1 発現の抑制が、浮遊癌細胞における EMT 獲得を阻害している可能性が示唆された。さらに、A549 に shHSF1 をトランスフェクションし、Transwell invasion assay により浸潤能を評価した所、shHSF1 を導入した細胞で著明な浸潤能の低下が認められた(図4)。HSF-1 に対する発現低下作用に加え今回の結果から、ヘスペレチンは、HSF-1 発現抑制作用を介して EMT を阻害している事が示唆された。

ヘスペレチンは、CSC の癌幹細胞特性を抑制する：A549 中の CD133 陽性細胞を用いて、ヘスペレチンによる CSC に対する抑制効果について解析を行った。400  $\mu$ M ヘスペレチン、または同程度の細胞生存率を示す 20  $\mu$ M CDDP で処理し、生細胞を計測した(図5.A)。その後、CSC マーカーである CD133 で染色し、フローサイトメーターにて CD133 陽性細胞を検出した(図5.B)。これらデータによる CD133 陽性細胞の割合から、各試薬処理後に生き残った CSC の細胞数をグラフ化した(図5.C)。ヘスペレチンは、CDDP とは異なり CD133 陽性細胞にも抑制効果を示した。次に、ヘスペレチンによる CSC 細胞抑制メカニズムを明らかにするため、HSF-1 に着目

図1

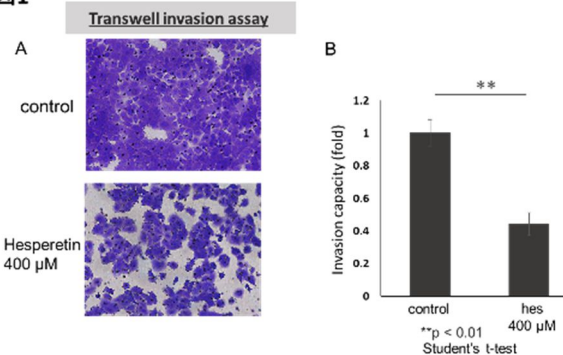


図1 A. A549 にヘスペレチン 400  $\mu$ M を処理して 48 時間培養後、マトリゲルでコーティングしたインサートに各群の細胞数を揃えて播種し、さらに 24 時間培養後、インサート裏に浸潤した細胞を染色し、蛍光顕微鏡を用いて撮影した。B. A で染色した細胞を計測し、各群の細胞数をグラフ化した。それぞれの値は、3 視野の画像それぞれの計測結果から得たものであり、Student's t-test にて P 値を算出した。

図2 Migration assay (Boyden chamber)

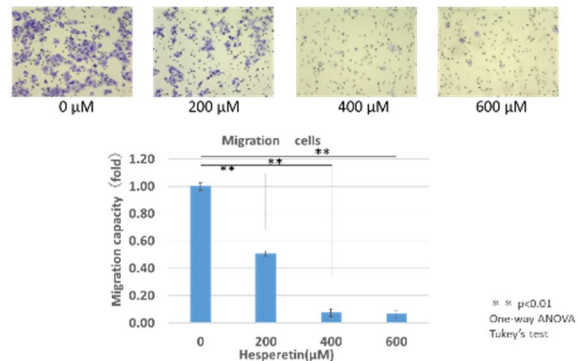


図2 A549 にヘスペレチン溶液 0, 200, 400, 600  $\mu$ M を添加し、48 時間後インサートに播種し、その 24 時間後染色し、細胞数を計測した。ヘスペレチン溶液 0  $\mu$ M の細胞数を 1 とし、相対値で評価した。\*\* $p < 0.01$  で有意差があることを示す(One-way ANOVA, Tukey's test)。

図3

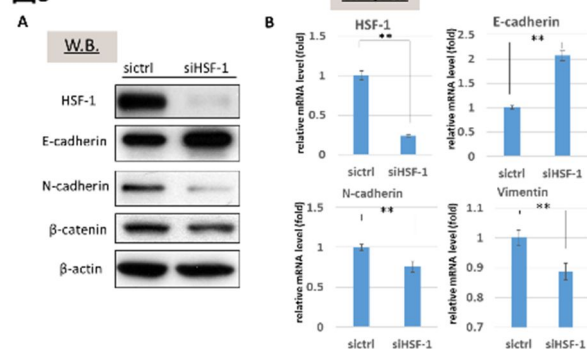


図3 HSF-1 をノックダウンすることにより、浮遊癌細胞において、上皮系マーカーの発現量が増加し、間葉系マーカーの発現量が減少した。  
A. 浮遊癌細胞において RNAi により HSF-1 をノックダウンし、ライセートを回収した。そのサンプルを用いて、HSF-1, E-cadherin, N-cadherin,  $\beta$ -catenin,  $\beta$ -actin の発現量を W.B. により測定した。  
B. 浮遊癌細胞において RNAi により HSF-1 をノックダウンし、RNA 回収した。そのサンプルを用いて RT-qPCR により HSF-1, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin を測定し、相対値で示した。\*\* $p < 0.01$  で有意差があることを示す(Student's T-test)。

し解析を行った .CSC の癌幹細胞特性については、A549 細胞を低接着シャーレで無血清培地に EGF などの成長因子下で培養し、細胞のスフェア形成能から評価を行った .ヘスペレチン処理により HSF1 や Sox2 の発現抑制が見られた (図 6 A) . Sox2 は自己複製に関与する因子であるため、Sox2 の抑制はスフェア形成にも影響を与えることが考えられる .次に、shHSF1 を導入した A549 を低接着プレートに無血清培地で培養してスフェアを形成させ、Sox2 の発現量を解析した所、接着型と同様に発現量の低下が認められた (図 6 B) .さらに、shHSF1 導入でのスフェア形成能を評価した所、著明なスフェア形成数の減少が認められた (結果は省略) .以上の結果から、ヘスペレチンは、CSC の癌幹細胞特性を抑制する機能を有する可能性が示唆された .

### 食品成分による足場非依存性癌細胞群に対するアノキス誘導効果についての解析

**クルクミンは A549 (浮遊癌細胞) の細胞生存率を低下させる:** アノキス耐性を獲得した癌細胞は、浮遊状態でも生存し続け血管を移動して遠隔への転移を引き起こす .今回、浮遊癌細胞に対するクルクミンの影響を検討するため、MTT assay で細胞生存率を測定した .浮遊培養開始 24 時間後にクルクミンを添加し、48 時間処理した A549 を用いた .MTT assay の結果、浮遊癌細胞においてもクルクミン添加濃度依存的に有意な細胞生存率の低下が認められた (図 7. A) .

**クルクミンは足場非依性癌細胞群に対してアノキスを誘導する:** クルクミンによる浮遊癌細胞に対する増殖抑制機序を明らかにするため、細胞死誘導作用を検証した .24 時間浮遊培養した A549 (浮遊 A549) にクルクミンを添加し、48 時間処理後、Annexin-V/PI 染色を用いてアポトーシス細胞の検出を行った .その結果、クルクミン添加濃度依存的にアポトーシス細胞が増加し、その細胞死誘導効果が示された (図 7. B) .以上の結果から、クルクミンは浮遊癌細胞に対しても細胞死を誘導する事で、その足場非依性的な増殖を抑制していることが明らかとなった .

**クルクミンは、浮遊癌細胞において 14-3-3 タンパク質の発現を抑制することでその細胞生存率を低下させる:** クルクミンによるアノキス誘導機序を明らかにするため、これまでアノキス誘導に関わる事が報告されてきた 14-3-3 タンパク質に着目した .

先ず、クルクミンで処理した浮遊 A549 での 14-3-3 タンパク質の発現量を WB にて検証した .その結果、複数のアイソフォーム ( , , ) でクルク

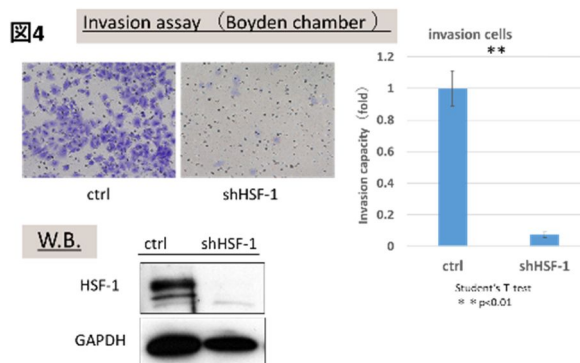


図 4 HSF-1 をノックダウンすることで、A549 の細胞浸潤能は抑制される .浮遊癌細胞においてベクター導入により HSF-1 をノックダウンし、48 時間後インサートに播種、その 24 時間後染色し、細胞数を計測した .ctrl の細胞数を 1 とし、相対値で評価した .\*\*p<0.01 で有意差があることを示す (Student's T-test) .

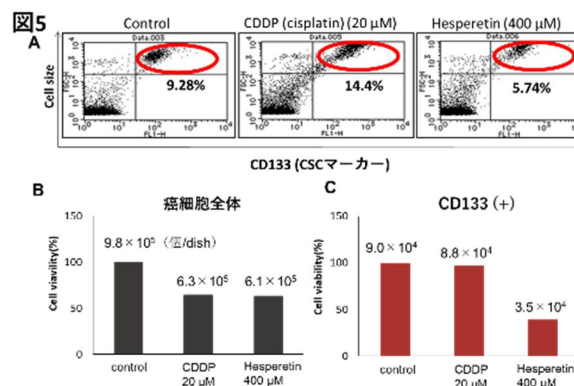


図 5 ヘスペレチンは、ヒト肺癌細胞株 A549 中の CD133 陽性細胞に対し、抑制効果を発揮する .A. A549 に CDDP、あるいはヘスペレチンを処理し、48 時間培養後、CD133 染色を行い、フローサイトメーターを用いて CD133 陽性細胞を検出した .B. 各試薬を処理した各群の生存細胞数を、ディスポーザブル細胞計数器を用いて計測し、グラフ化した .C. A で得られた CD133 陽性細胞の割合を B に外挿し、各群の CD133 陽性細胞数を算出しグラフ化した .

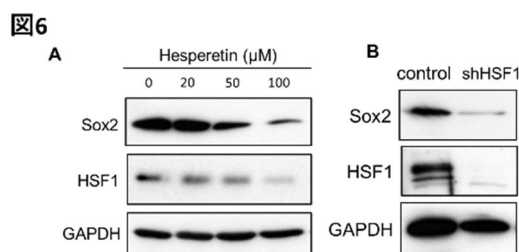


図 6 ヘスペレチンは、HSF1 発現抑制を介して自己複製能を阻害する .A. スフェアに各濃度のヘスペレチンを処理して 7 日間培養後、細胞を回収し、W.B.法により各種タンパク質の発現量を解析した .B. shHSF1 を導入したスフェアを回収し、W.B.法により各種タンパク質の発現量を解析した .



ミンによる発現量の低下が確認された(結果は省略). さらに, 14-3-3 の競合阻害剤の R18 を用いて浮遊癌細胞の増殖に与える影響について解析を行った. 浮遊癌細胞に R18 を 48 時間処理し細胞生存率を測定した所, R18 による浮遊癌細胞の有意な細胞生存率の低下が認められた(結果は省略). 以上の結果から, クルクミンは, 14-3-3 タンパク質の発現を抑制する事で浮遊癌細胞の細胞生存率を低下させている可能性が示唆された.

### 食品成分による癌の増殖・浸潤・転移抑制効果についての in vivo 解析

#### クルクミンは LLC (浮遊癌細胞) の細胞生存率を低下させる: 先ず, クルクミンが浮遊状態の

LLC に対してその細胞生存率を減少させるか否かについて検証を行った. LLC を低接着プレートで浮遊培養を行い, 培養開始後 24 時間でクルクミンを添加し, 48 時間処理後 WST8-assay により細胞生存率を測定した. その結果, 浮遊 LLC においてもクルクミン添加により, 細胞生存率の低下が認められた(図 8). 以上の結果から, クルクミンは, A549 浮遊癌細胞と同様に LLC 浮遊癌細胞においても, その足場非依的な増殖を抑制することが明らかとなった.

**クルクミンはマウス肺がん細胞の遊走を抑制する:** 次に, 転移の原因となる細胞遊走能に対しクルクミンが与える影響を調べるため, ボイデンチャンバーを用いて解析を行った. Migration assay により細胞遊走能を解析した所, クルクミン添加濃度依的に有意な差が見られたことから(結果は省略), クルクミンがマウス肺癌細胞 LLC の遊走を抑制することが明らかとなった.

**クルクミンによる癌転移抑制効果についての in vivo 解析:** マウスの右側背部皮下に LLC1×10<sup>6</sup> 個を接種し原発巣形成後, クルクミン投与を開始した. 4 週間後, 原発巣の大きさおよび転移巣の数について評価を行った. その結果, 原発巣の大きさおよび重さが, クルクミン投与群で減少していた. 肺への転移巣もクルクミン投与群で有意な減少が見られた(図 9). これらの結果から, in vivo においてもクルクミンが癌細胞の増殖および転移を抑制する可能性が示唆された.

図7

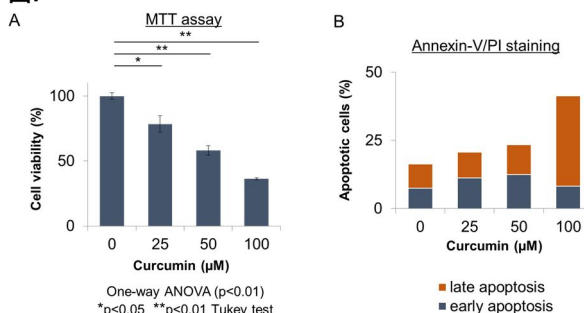


図7 クルクミンは, 浮遊癌細胞に対して細胞死を誘導することで, 増殖を抑制する.  
A. 浮遊 A549 にクルクミンを処理し 48 時間後, MTT assay により細胞生存率を測定した. それぞれの値は独立した 3 回の試行により算出した. 有意差は Tukey test 及び One-way ANOVA により算出した.  
B. 浮遊 A549 にクルクミンを処理し 48 時間後, Annexin-V/PI 染色を行い, フローサイトメーターを用いてアポトーシス細胞を検出した.

図8

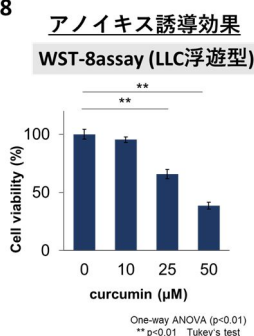


図8 浮遊 LLC にクルクミンを処理し 48 時間後, WST-8 assay により細胞生存率を測定した. それぞれの値は独立した 3 回の試行により算出した. 有意差は Tukey's t-test 及び One-way ANOVA により算出した.

図9

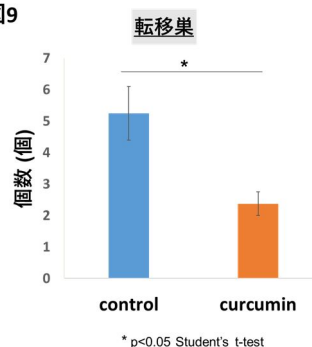


図9 in vivo における癌細胞増殖抑制効果肺転移巣について評価. 1mm 以上の転移巣の数を目視で計測した.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroshi Endo, Izumi Inoue, Kimiko Masunaka, Masaya Tanaka, and Mihiro Yano	4. 巻 84(12)
2. 論文標題 Curcumin induces apoptosis in lung cancer cells by 14-3-3-protein-mediated activation of Bad	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2440-2447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1808443.	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒川沙貴, 遠藤弘史, 矢野仁康
2. 発表標題 クルクミンが有する癌細胞転移に対する抑制機能についての解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中大也, 遠藤弘史, 矢野仁康
2. 発表標題 ヘスベレチンはHSF1を介して癌細胞の上皮間葉転換を抑制する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中大也, 遠藤弘史, 矢野仁康
2. 発表標題 ヘスベレチンはHSF1を介して癌細胞の上皮間葉転換を抑制する
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐草小夏, 遠藤弘史, 矢野仁康
2. 発表標題 ヘスベレチンはHSF1の発現を抑制して癌幹細胞特性を低下させる
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐草小夏, 田中大也, 遠藤弘史, 政所千智, 矢野仁康
2. 発表標題 ヘスベレチンの新規抗癌活性: HSF1抑制を介した癌幹細胞性減弱機能の解析
3. 学会等名 第 59 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高台絢加 遠藤弘史 日馬亜希 矢野仁康
2. 発表標題 カプサイシンによる新規癌細胞増殖抑制機構: 14-3-3 を介した細胞周期停止機能についての解析
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 舛中貴美子 遠藤弘史 柘植 未来 矢野仁康
2. 発表標題 クルクミンによる癌細胞死誘導メカニズムの解析ならびに浮遊癌細胞に対するアノイキス誘導効果の検討
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐草小夏 遠藤弘史 矢野仁康
2. 発表標題 ヘスベレチンの癌細胞及び癌幹細胞に対する新規抗癌作用の検討
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 舛中貴美子 遠藤弘史 矢野仁康
2. 発表標題 クルクミンによる浮遊癌細胞に対するアノキス誘導メカニズムの解析ならびに癌幹細胞抑制効果の検討
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高台絢加 遠藤弘史 矢野仁康
2. 発表標題 カプサイシンによるp53-14-3-3 経路を介した細胞周期停止機能についての解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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