

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09685

研究課題名(和文) ジテルペンによる前立腺癌進展制御機構の解明と新規化合物の開発

研究課題名(英文) Coffee diterpens inhibit prostate cancer progression

研究代表者

泉 浩二 (IZUMI, Kouji)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：80646787

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)：コーヒーは進行前立腺癌の進展を抑制する可能性が報告されているが、進展制御機構は明らかにされていない。数あるコーヒー成分の中でジテルペンであるカウエオールとカフェストールがヒト前立腺癌細胞に対し強力な増殖抑制効果を発揮した。これらジテルペンは我々が独自に樹立したDU145のパクリタキセル耐性株DU145-TxR(本株はドセタキセルに耐性を持つことを確認済み)と、DU145-TxRのカバジタキセル耐性株DU145-TxR-CxRに対しても有効であった。タキサン耐性には、ジテルペンのターゲットであるCCL2-CCR2の下流の2つのシグナル、STAT3およびAKTが関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では前立腺癌のカバジタキセル耐性機序の一端を明らかにした。この耐性機序はコーヒージテルペンであるカウエオールとカフェストールがターゲットとするCCL2-CCR2の活性化である。以前我々が明らかにした去勢感受性前立腺癌に対するジテルペンの有効性と併せて、前立腺癌の幅広い病期においてカウエオールとカフェストールが病勢進行を抑制することができる可能性が示唆された。現在行き詰まっている進行前立腺癌治療において新たな作用機序の治療法開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Coffee is reported to have an anti-cancer effect on advanced prostate cancer patients; however, there are no study showing its mechanism on cancer cells. Among a lot of ingredients in coffee, coffee diterpene, kahweol and cafestol showed a strong anti-proliferation effect on human prostate cancer cells. These diterpenes also showed anti-proliferation and anti-migration effects on DU145-TxR (paclitaxel-resistant DU145) and DU145-TxR-CxR (cabazitaxel-resistant DU145-TxR) cells. STAT3 and AKT existed in a downstream of CCL2-CCR2 which is a diterpene-targeted axis.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 ケモカイン 去勢抵抗性 タキサン抵抗性 コーヒー ジテルペン

1. 研究開始当初の背景

「がん」は日本人の死因第1位であり、年々罹患者数は増加している。中でも加齢や生活環境の欧米化が一因と考えられている前立腺癌の罹患者数は右肩上がり増加している。国立研究開発法人国立がん研究センターがん対策情報センターは前立腺癌が2014年の男性の癌罹患者数の第3位であったと発表した。現在、前立腺癌の多くが限局癌で発見されるが、前立腺癌新規診断症例の実に12%が転移を伴う進行癌であり、根治的治療の適応とはならない状態で発見されている(World J Urol 2016;34:261-7)。進行前立腺癌に対してはアンドロゲンとその受容体(androgen receptor: AR)を標的としたアンドロゲン除去療法(androgen-deprivation therapy: ADT)が標準的な治療と位置付けられている。しかし、ADTによりしばらくは病勢がコントロールされるが、大多数がADTの効かない状態、去勢抵抗性前立腺癌(castration-resistant prostate cancer: CRPC)となり、治療が難しい段階に達する。CRPCに対する新規治療が導入されているが、結局のところは癌の進行は抑えられないのが現状である。このような前立腺癌の治療と病勢の進行過程においては、どの段階においても病勢を食い止めるような治療が必要であり、また、それは安価で利用しやすいものであればなお好都合で、そのような治療法を探索することは社会的にも有益である。

コーヒーは多くの癌や慢性疾患において、病勢の改善効果が報告されている。前立腺癌については、日本人の大規模コホート研究のみならず、国外からの大規模な疫学研究、さらにメタ解析でもコーヒーの摂取がその発症を抑制すると報告されている(Br J Cancer 2013;108:2381-9, Carcinogenesis 2014;35:256-61)。さらに我々が注目したのが、前立腺癌患者約8000人を含む45万人を対象としたメタ解析において、コーヒーは進行前立腺癌への進展も抑制する可能性があることが明らかにされているという点である(Cancer Causes Control 2014;25:591-604)。「疾患に効果がある」あるいは「予防する」としばしば話題になる食物や健康食品とコーヒーが大きく異なるのは、アウトプットとして明らかな疫学的エビデンスが存在するという点である。嗜好品という括りの中で前向きランダム化試験の計画・実行には困難な点が多いものの、疫学的エビデンスも大規模かつ国際的で、その数も膨大である。

コーヒーには前立腺癌の進行を抑制する成分が含まれていると考えられるが、これまでのところ、コーヒーが前立腺癌の進行を抑制する機序を明らかにした研究はほとんどない。世界中で広く、日常的に摂取される飲料でありながら、前立腺癌進展制御機構が明らかにされていないということには驚くばかりであり、このメカニズムが解明されることにより患者のみならず社会全体が注目することが予想され、その影響は多大であると考えられる。食品類からの成分の同定により、有害事象の少ない、安価な新薬の開発に繋がる可能性もあり、早急に解明する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、数あるコーヒー成分の中から強力な抗前立腺癌作用を持つ成分を明らかにし、その作用機序を解明することで、CRPCを含めた前立腺癌に対する新規治療薬の開発を目指す。コーヒー成分を文献的に検討し、含有量や論文数等から以下の6つの成分を選抜した。カフェイン(caffeine): 最も知られた成分で様々な抗腫瘍効果が報告されている。クロロゲン酸(chlorogenic acid): コーヒー豆中にカフェインよりも多く含まれるポリフェノールで抗酸化作用を持つ。コーヒー酸(caffeic acid): クロロゲン酸の加水分解産物で、同様に抗酸化作用を持つ。トリゴネリン(trigonelline): アルカロイドで腫瘍効果がある。カウエオール(kahweol): ジテルペンに分類され抗腫瘍効果がある。カフェストール(cafestol): カウエオールと類似構造をもつジテルペン。

予備実験としてヒト前立腺癌細胞株PC-3とLNCaPを用いて増殖実験を行ったところカウエオールとカフェストールのみが強力な増殖抑制効果を発現した。カフェインには強い抗腫瘍効果があるものと予想しながら予備実験を行ったところ、カフェインには直接的効果がほとんどなく、ジテルペンだけが抗腫瘍効果を持っており、しかもその強さが破格であった。カウエオールとカフェストールがコーヒー成分における前立腺癌細胞に対する抗腫瘍効果の主体であると考えられるが、他の成分と比較しこれまであまり注目されていない。

文献的にはカフェストールが破骨細胞やマクロファージの活性を抑制することや(J Nat Prod 2015;78:1322-9)、カウエオールが内皮細胞からC-CケモカインであるCCL2の分泌を抑制すること(PLoS One 2011;6:e23407)が報告されている。当研究室では、CCL2をはじめとするケモカインが前立腺癌細胞からの自己分泌作用で去勢抵抗性およびタキサン系抗がん剤抵抗性獲得に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。また、カウエオールとカフェストールによってCCL2の受容体CCR2の発現も低下すること、上皮間葉移行(epithelial mesenchymal transition: EMT)関連遺伝子の一部が変化することなどを予備実験で明らかにしている。従って、ジテルペンにケモカイン等の抑制を介した免疫寛容状態抑制による前立腺癌進展抑制機構が存在するという可能性が強く考えられる。

本研究ではで CRPC 機序とカバジタキセル耐性機序におけるカウエオールとカフェストールの役割を明らかにしていく。DU145 のパクリタキセル耐性株 DU145-TxR (本株はドセタキセルに耐性を持つことを確認済み) と DU145-TxR のカバジタキセル耐性株 DU145-TxR-CxR については親細胞との遺伝子発現や表現型の違いなども明らかにしている (Izumi K, Mizokami A, Oncotarget 2018;9:16185-96)。現在行き詰まっている CRPC 治療において新たな作用機序の治療法開発につながると考えられる。

3. 研究の方法

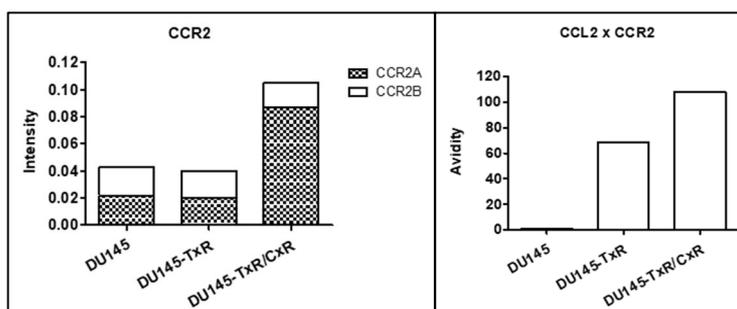
- (1) 普遍性・再現性確認：まず、複数のヒト前立腺癌細胞株 (PC-3, LNCaP, DU45, C4-2B) を用いて、カウエオールとカフェストールの増殖能・遊走能への効果を確認した。
- (2) さらに、DU145 のパクリタキセル耐性株 DU145-TxR とカバジタキセル耐性株 DU145-TxR-CxR についても、カウエオールとカフェストール投与による増殖能・遊走能に対する効果を確認した。
- (3) DU145-TxR と DU145-TxR-CxR の増殖能に関する耐性化には CCL2-CCR2 軸が関与することをすでに報告した (Natsagdorj A, Izumi K, et al. Cancer Sci. 2019;110:279-288)。本研究では遊走能・転移能についてもカウエオールとカフェストールのターゲットである CCL2-CCR2 軸が関与していることを確認するため、以前行った cDNA マイクロアレイの分析を行い、これら細胞株の遺伝子発現を比較した。さらにウェスタンブロットなどにより下流経路を明らかにした。
- (4) 正常細胞に対する影響 (毒性) について明らかにするためにヒト正常腎細胞株 HK-2 を用いて増殖試験を行った。

4. 研究成果

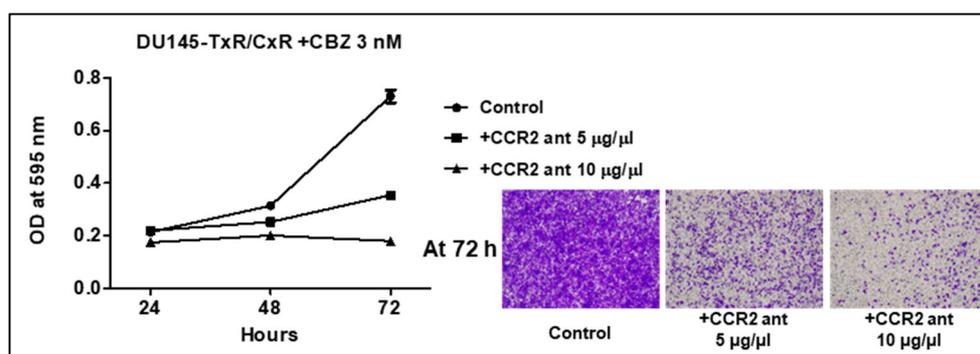
去勢抵抗性前立腺癌のモデルとして、アンドロゲン受容体の発現がないヒト前立腺癌細胞株 PC-3 および DU145、さらにアンドロゲン依存性ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP から樹立したアンドロゲン非依存性株 LNCaP-SF を用い、ジテルペンによる増殖能・遊走能の変化を検討した。カウエオールとカフェストールは濃度依存的にいずれの細胞株に対しても増殖および遊走を抑制した。さらにこれらのジテルペンは相乗効果を有することを確認した。

非常に興味深いことに、これらジテルペンは我々が独自に樹立した DU145-TxR に対しても抗腫瘍効果 (遊走能、増殖能いずれに対しても) を持つことが明らかになった。さらに DU145-TxR のカバジタキセル耐性株 DU145-TxR-CxR についても抗腫瘍効果 (遊走能、増殖能いずれに対しても) を持つことが明らかとなった。これらの結果は、まだ去勢抵抗性となっていない初期の前立腺癌の状態から、去勢抵抗性獲得後、さらには去勢抵抗性獲得後かつタキサン系抗癌剤耐性獲得後に至る、全ての前立腺癌の進行過程においてカウエオールとカフェストールが抗腫瘍効果をもつ可能性を示唆している。

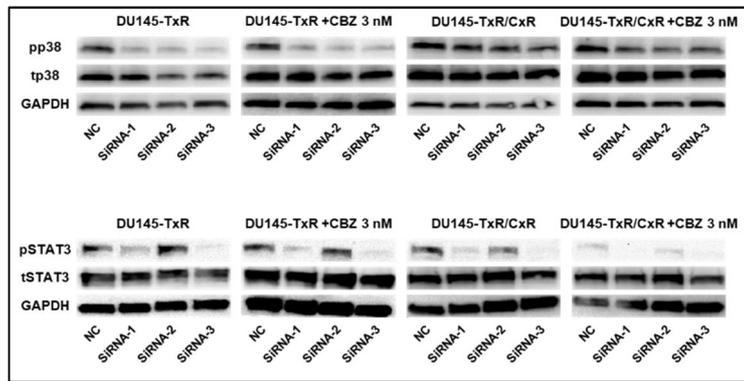
以前我々は、DU145-TxR と DU145-TxR-CxR を用いて、増殖能に対する耐性化機構としてカウエオールとカフェストールのターゲットである CCL2 が関わっていることを明らかにした。そこで、本研究では遊走・転移能についてフォーカスした。マイクロアレイでは CCL2 と CCR2 の発現から、シグナル強度として、親株の DU145 に比べ、DU145-TxR と DU145-TxR-CxR はそれぞれ約 70 倍、100 倍のシグナル強度があった (上図)。



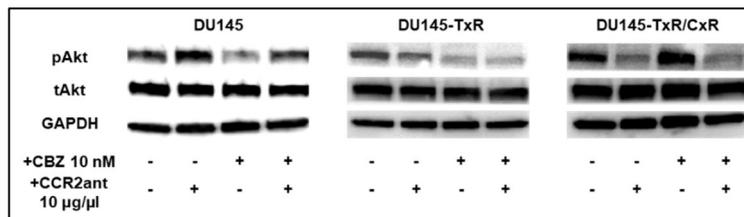
カバジタキセル存在下で DU145-TxR-CxR に CCR2 アンタゴニストを加えると遊走能を低下させた (右図)。



CCL2をノックダウンしたところ、DU145-TxRでp38およびSTAT3のリン酸化が抑制された。一方、DU145-TxR-CxRではp38のリン酸化の抑制はごく軽度であったが、pSTAT3のリン酸化の抑制は強力であり、カバジタキセル投与・非投与を問わず抑制されていた(右図、siRNAは3種の配列にて作成)。

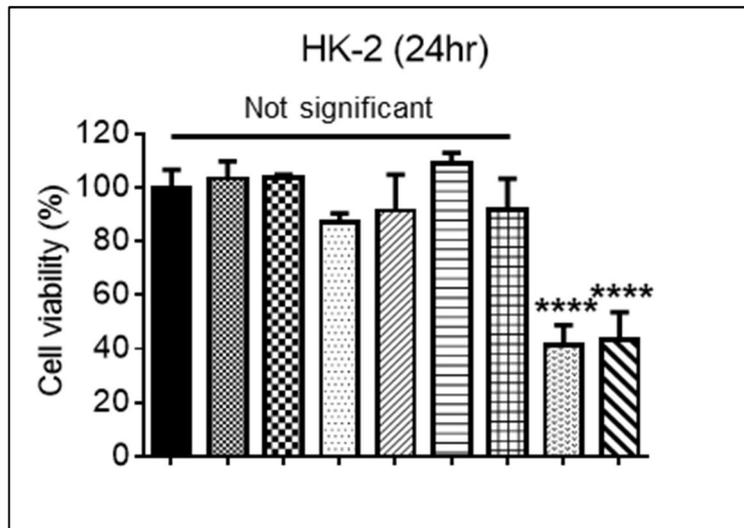


さらに興味深いことに、CCR2アンタゴニストで治療するとAKTのリン酸化も抑制され、カバジタキセルへの感受性が回復した(右図)。



これらの結果から、カウエオールとカフェストールのターゲットであるCCL2-CCR2の下流には2つのシグナルSTAT3およびAKTが関与していることが示唆された。

正常細胞に対する影響(毒性)について明らかにするために、ヒト正常腎細胞株HK-2を用いて増殖試験を行った。カウエオールとカフェストールは前立腺癌細胞に対して十分効果のある30µMまでの併用(Iwamoto H, Izumi K, et al. Prostate. 2019;79:468-479)では、HK-2に対する増殖抑制効果は認められず、単剤100µMにおいて有意に増殖抑制が認められた。この結果から、ジテルペン併用において毒性を認めることなく癌細胞に作用する至適濃度(30µM以下)が存在することが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Makino T, Izumi K, Hiratsuka K, Kano H, Shimada T, Nakano T, Kadomoto S, Naito R, Iwamoto H, Yaegashi H, Shigehara K, Kadono Y, Nakata H, Saito Y, Kyoko Nakagawa-Goto, Sakai N, Iwata Y, Wada T, Mizokami A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Anti-proliferative and anti-migratory properties of coffee diterpenes kahweol acetate and cafestol in human renal cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80302-4.	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 Makino T, Izumi K, Mizokami A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Undesirable Status of Prostate Cancer Cells after Intensive Inhibition of AR Signaling: Post-AR Era of CRPC Treatment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 414-414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9040414.	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 Iwamoto H, Kano H, Shimada T, Naito R, Makino T, Kadomoto S, Yaegashi H, Shigehara K, Izumi K, Kadono Y, Mizokami A.	4. 巻 35
2. 論文標題 Sarcopenia and Visceral Metastasis at Cabazitaxel Initiation Predict Prognosis in Patients With Castration-resistant Prostate Cancer Receiving Cabazitaxel Chemotherapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1703-1709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12430.	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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩本大旭、泉浩二、門本卓、内藤伶奈人、牧野友幸、八重樫洋、飯島将司、川口昌平、野原隆弘、重原一慶、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 コーヒージテルペンであるカーウェオールアセテートtpカフェストールは前立腺癌細胞の増殖と遊走を相乗的に阻害する
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩本大旭、泉浩二、ナッサグドルジアリウンボルト、門本卓、内藤伶奈人、牧野友幸、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 コーヒージテルペンであるkahweol acetateとcafestolは相乗作用で前立腺癌細胞の増殖と遊走を阻害する
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野友幸、泉浩二、岩本大旭、加納洋、島田貴史、門本卓、内藤伶奈人、八重樫洋、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 コーヒージテルペンKahweol acetateとcafestolは腎細胞癌の増殖・遊走を抑制する
3. 学会等名 第30回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉 浩二
2. 発表標題 アンドロゲン受容体シグナルの両価性
3. 学会等名 第36回前立腺シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧野友幸、泉浩二、岩本大旭、加納洋、島田貴史、門本卓、内藤伶奈人、八重樫洋、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 コーヒージテルペンkahweol acetateとcafestolのヒト腎細胞癌細胞に対する増殖・遊走抑制効果
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加納洋、泉浩二、Natsagdorj Ariunbold、福田理恵、神島泰樹、島田貴史、内藤伶奈人、牧野友幸、門本卓、岩本大旭、八重樫洋、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 CCL2-CCR2はアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞のカバジタキセル体制に関与する
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧野友幸、泉浩二、岩本大旭、加納洋、島田貴史、門本卓、内藤伶奈人、八重樫洋、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 コーヒージテルペン酢酸カーウェオールとカフェストールのヒト腎癌細胞における抗腫瘍効果についての検討
3. 学会等名 第71回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本大旭、泉浩二、内藤伶奈人、牧野友幸、門本卓、八重樫洋、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 新規アンドロゲン受容体シグナル伝達阻害薬とタキサン系抗癌剤は去勢抵抗性前立腺癌の内臓転移を誘発する
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	後藤 享子 (Goto Kyoko) (50180245)	金沢大学・薬学系・准教授 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	溝上 敦 (Mizokami Atsushi) (50248580)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	

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