

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15789

研究課題名（和文）食品成分による染色体分配機構を標的とした制がん効果に関する研究

研究課題名（英文）Research on the anti-cancer effects of the food ingredients targeting chromosome segregation system

研究代表者

叶 奈緒美（Kano, Naomi）

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：30780267

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）：細胞分裂の度に構成する染色体数が変動する「染色体不安定性（CIN）」は、多くのがん細胞の特徴として知られている。本研究では、染色体分配異常の誘導を伴って細胞増殖抑制効果を発揮する食品成分としてベンジルイソチオシアネート（BITC）を同定し、試験したヒト培養細胞株において、正常二倍体（非CIN）の細胞よりもCINの性質を有する細胞の方が、BITCによる染色体分配異常誘導と細胞増殖抑制を受けやすいことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体分配の制御機構はここ最近になって解明されてきたものが多く、食品成分がその機構にどのような影響を及ぼすかについてもよく分かっていなかった。本研究は、食品成分BITCが染色体分配異常を誘導し、さらにその作用が多くのがん細胞の特徴でもあるCINの性質を持つ細胞でより強く発揮され、細胞増殖抑制作用とも関連していることを示した点で学術的に価値がある。さらに、本研究の成果は、科学的根拠に基づいた、健康の維持・増進に効果的な食事の提案に貢献するだけでなく、制がん戦略の標的として注目されている染色体分配機構に作用する食品成分の同定は、新たな抗がん剤の開発にも貢献できるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells derived from solid tumors mostly display a high rate of chromosome segregation errors, called chromosomal instability (CIN). Here, we identified benzyl isothiocyanate (BITC) as a food ingredient exerts the anti-proliferative effect with the induction of chromosome segregation errors. We also clarified that, in the tested human cultured cell lines, the CIN cells have higher sensitivity to the induction of chromosome segregation errors and the anti-proliferation by BITC than the normal diploid cells (non-CIN cells).

研究分野：食品機能学

キーワード：染色体分配機構 食品成分 benzyl isothiocyanate cancer aneuploidy

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは未だに治療が難しく、我が国の死亡原因1位の疾患である。食事はがんを含む様々な疾患の発症リスクに大きな影響を与えており、食品中の様々な成分の中に制がん効果を発揮するものが同定されていることから、制がん効果のある食品を積極的に摂取することによりがんの発症を予防することが重要であると考えられている。これらの食品成分を健康の維持・増進に効果的に活用するためには、その作用機構を正しく理解する必要がある。これまでに我々の研究グループは、パパイヤに由来する食品成分ベンジルイソチオシアネート (BITC) が細胞周期停止およびアポトーシスを誘導し、がん細胞の増殖を抑制することを明らかにしてきた。我々の最近の研究では、BITC が動原体構成因子 Mis12 の発現量減少を介してがん細胞の増殖を抑制することを見出した。Mis12 欠損は有糸分裂期 (M 期) において染色体分配異常を誘導し、細胞周期遅延を引き起こすことから、BITC の Mis12 減少を介した細胞増殖抑制作用に、染色体分配異常の誘導が関与していることが予想された。

細胞は成長と分裂を繰り返すことで増殖する。細胞分裂が正しく行われるためには、M 期に染色体が等しく娘細胞に分配される必要がある。M 期において、紡錘体微小管が染色体のセントロメア領域に形成された動原体複合体に結合し、染色体は細胞の両極からの均衡のとれた張力により M 期プレートに整列することで、染色体分配がおこる。細胞にはこの張力が均衡状態に達するまで細胞周期を停止するスピンドルチェックポイントと呼ばれる機構が存在し、これにより姉妹染色分体の娘細胞への均等な分配が保障されている。しかし、多くのがん細胞では、関連分子の変異などの影響でこの染色体分配機構が脆弱であるため、細胞分裂の度に構成する染色体数が変動する「染色体不安定性 (CIN)」がみられ、CIN とがんの臨床的な悪性度の相関関係も報告されている。この CIN 細胞の弱点ともいえる染色体分配機構に負荷を与えることで、CIN 細胞選択的に増殖を抑制するという制がん戦略が現在注目されている。本研究では、これと同様のアプローチで制がん効果を発揮する食品成分を同定し、その詳細なメカニズムを解明しようと考えた。

2. 研究の目的

染色体分配調節作用を介して、多くの腫瘍でみられる CIN 細胞の増殖を効果的に抑制しうる食品成分を同定し、その作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。具体的には、候補となる食品成分として BITC に注目し、その細胞増殖抑制作用と染色体分配異常誘導作用について、CIN 細胞と非 CIN 細胞の間での応答の差異を検討することで、食品成分が染色体分配に影響を与え、CIN 細胞選択的に増殖抑制効果を発揮するかを明らかにしようとした。

3. 研究の方法

正常二倍体である非 CIN 細胞として、ヒト子宮頸がん細胞 hTERT-RPE1、ヒト胎児肺由来線維芽細胞 TIG-1、ヒト結腸がん細胞 HCT-116 を、CIN 細胞としてヒト子宮頸がん細胞 HeLa、ヒト結腸がん細胞 SW480 を用いて、次に示す BITC への各種細胞応答を CIN の有無で比較した。

- (1) 細胞増殖抑制作用は、各細胞に 0~100 μM の BITC を 48 時間処理し、MTT assay により細胞生存率を算出することにより評価した。
- (2) BITC の細胞増殖抑制作用に關与する、細胞周期停止作用およびアポトーシス誘導作用は、各細胞に 0~25 μM の BITC を 24 時間処理し、フローサイトメトリーを用いたヨウ化プロピジウム (PI) 染色による細胞周期分布解析および Annexin V-FITC/PI 二重染色によるアポトーシス解析により評価した。
- (3) 染色体分配異常誘導作用は、histone H2B-mCherry を安定的に発現する HCT-116 および HeLa に 0, 5, 10 μM の BITC を 1 時間処理した後、引き続き 23 時間処理しながら、温度 (37°C)、CO₂ 濃度 (5%)、適度な湿度を維持した状態で、共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより評価した。
- (4) 染色体分配異常誘導作用に關与する異数性誘導作用は、histone H2B-mCherry を安定的に発現する HCT-116 および HeLa に 0, 5, 10 μM の BITC を 24 時間処理した後、*in vitro* 小核試験により評価した。

4. 研究成果

(1) CIN の性質と BITC の細胞増殖抑制作用の關与

各細胞に 0~100 μM の BITC を処理し、48 時間後の細胞生存率を MTT assay により評価した結果、5 から 25 μM の濃度範囲において、非 CIN 細胞 (hTERT-RPE1、TIG-1、HCT-116) と比較して CIN 細胞 (HeLa、SW480) の方が BITC の細胞増殖抑制作用が顕著かつ有意に高かった。さらに、非 CIN 細胞よりも CIN 細胞の方が BITC の G₂/M 期停止作用およびアポトーシス誘導作用が高かった。これらの結果から、多くのがん細胞の特徴である CIN の性質をもつ細胞に対して、BITC がより低濃度で細胞増殖抑制効果を発揮することが示唆された。

(2) CIN の性質と BITC の染色体分配異常誘導作用の關与

Histone H2B-mCherry を安定的に発現する HCT-116 (非 CIN 細胞) および HeLa (CIN 細胞) に

0, 5, 10 μM の BITC を 1 時間処理し、その後 23 時間のあいだ、共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより、染色体分配の様子を観察した。その結果、BITC は HCT-116 と HeLa のどちらにおいても染色体分配異常を起こす細胞の割合を増加させたが、正常な染色体分配は HCT-116 細胞においてより高い割合で維持されていた。興味深いことに、BITC は HCT-116 細胞でのみ有糸分裂期に移行する細胞の割合を減少させた。さらに、BITC は HeLa 細胞において、M 期持続時間の大幅な延長だけでなく、mitotic catastrophe 様の表現型および mitotic cell death を顕著に誘導した。これらの結果から、BITC の染色体分配異常誘導作用が、CIN の性質により増強されることが示唆された。

(3) CIN の性質と BITC の異数性誘導作用の関与

Histone H2B-mCherry を安定的に発現する HCT-116 および HeLa に 0, 5, 10 μM の BITC を 24 時間処理した後、*in vitro* 小核試験により異数性誘導作用を評価した。

HCT-116 において、コントロール群では小核は検出されず、5 μM BITC 処理群では 1.9% の細胞で検出されたが、10 μM 処理群では検出されなかった。一方、HeLa において、コントロール群では 8.4%、5 μM BITC 処理群では 1.3% の細胞で小核が検出され、10 μM 処理群では検出されなかった。この結果から、BITC は CIN 細胞の異数性を減少させる一方で、非 CIN 細胞の異数性を僅かながらも増加させる可能性のあることが示された。

BITC による CIN 細胞での異数性減少作用に関しては、異数性のある細胞が BITC に対する感受性が高く、優先的に細胞死した可能性についても今後検討する必要があると考えられる。さらに、BITC による CIN 細胞での異数性増加作用に関しては、僅かな増加ではあるものの、異数性を維持したまま生存することで細胞ががん化する可能性も考えられるため、その後、異数性細胞が生存し続けるか、死滅するか、もしくは異数性の修正により正常二倍体に戻るかを明らかにする必要があると考えられる。

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 1件）

1. 著者名 Naomi Kanoh, Kunisue Narumi, Myojin Takumi, Chino Ayako, Munemasa Shintaro, Murata Yoshiyuki, Satoh Ayano, Moriya Hisao and Nakamura Yoshimasa	4. 巻 9
2. 論文標題 Yeast screening system reveals the inhibitory mechanism of cancer cell proliferation by benzyl isothiocyanate through down-regulation of Mis12	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-019-45248-2	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Naomi Abe-Kanoh
2. 発表標題 Food ingredient benzyl isothiocyanate suppresses the cell proliferation depending on chromosomal instability
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap (叶 奈緒美) https://researchmap.jp/abe-kanoh.naomi
--

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