

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目:若手研究(スタートアップ)  
 研究期間:2008 ~ 2009  
 課題番号:20890191  
 研究課題名(和文) TRAIL と microRNA を標的とした癌の「分子標的併用予防法」の開発  
 研究課題名(英文) Combination-oriented molecular-targeting prevention of cancer:  
 targeting TRAIL and microRNA.  
 研究代表者 堀中 真野(HORINAKA MANO)  
 京都府立医科大学・医学研究科・助教  
 研究者番号:80512037

## 研究成果の概要(和文):

miR-221/222はTRAIL耐性に寄与している。miR-221/222のプロモーター活性化レベルを評価するためのプラスミドを構築した。miR-221/222の発現抑制能を有する食品成分のスクリーニングに用いる予定である。

アポトーシス促進因子であるPUMAがmiR-221/222の新規標的遺伝子であることを見出した。TRAIL耐性機構とmiR-221/222との関連性を証明できるかもしれない。

TRAIL感受性増強成分として、新たに6種類の物質を見出し、論文発表した。さらに、TRAIL発現量を増強する成分として、乳酸菌を報告した。

## 研究成果の概要(英文):

miR-221/222 contributes to TRAIL resistance. I built plasmid to evaluate a promoter activation level of miR-221/222 for the screening of the food composition with the repressor activity of miR-221/222.

I found that PUMA was a new target gene of miR-221/222. TRAIL resistance mechanism and association with miR-221/222 might be proved.

As a TRAIL-sensitizing compounds, we found six kinds of materials newly. Furthermore, as the ingredient which enhanced TRAIL expression level, we reported lactic acid bacterium.

## 交付額

(金額単位:円)

|    | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|----|-----------|---------|-----------|
|    | 1,340,000 | 402,000 | 1,742,000 |
|    | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
|    |           |         |           |
| 総計 | 2,540,000 | 762,000 | 3,302,000 |

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:癌、microRNA、TRAIL、DR5、アポトーシス、予防、p53、食品成分

## 1. 研究開始当初の背景

癌予防効果を持つ代表的サイトカインである TRAIL は、癌細胞に特異的にアポトーシスを誘導する。しかしながら、多くの癌細胞

は、アポトーシス抑制機構の活性化によって TRAIL 誘導性アポトーシスを回避している。今後、この TRAIL 耐性の克服が癌予防における重要な課題である。また、最近の分子生物

学の進歩により、旧来の遺伝子群だけでなく、小分子 RNA である microRNA も、種々の病態において極めて重要な役割を持つことが明らかとされてきた。多くの論文で報告があるように、microRNA は癌においても重要な役割を果たしている。現在、ヒトで 500 種以上報告されている microRNA は細胞の増殖、分化、アポトーシスなどに重要な役割を担っている。最近、癌遺伝子や癌抑制遺伝子としての機能を持つ microRNA も数々報告されるに至り、その重要性はより強調されつつある。

## 2. 研究の目的

1. の背景から、本課題では、TRAIL の感受性に関与している microRNA に着目し、それらの発現を調節する食品成分を探索することにより、新たな癌予防法の開発を目指す。

TRAIL 耐性を増強するということが報告されている microRNA (miR-221, miR-222) の発現抑制成分を、種々の食品成分を対象に探索する。さらに、TRAIL 発現誘導成分も同様に探索を行う。これら microRNA 発現調節成分と TRAIL 発現誘導成分とを併用し、最も抗腫瘍効果、発癌予防効果の高い組み合わせを *in vitro*、*in vivo* において見出し、有効な癌予防法としての応用を提案する。また、なぜ miR-221、miR-222 が TRAIL 感受性を制御するのかという分子メカニズムの解析も行う。

## 3. 研究の方法

### [TRAILとmicroRNA発現調節成分との併用によるアポトーシス増強効果の解析]

TRAIL 耐性を増強するということが報告されている microRNA (miR-221, miR-222) の発現抑制成分の探索を目的として、まず評価系の構築を行った。大量スクリーニングを念頭においた場合、microRNA の発現量の変化を直接測定することは、時間・コストの面からも効率的ではない。そこで、microRNA がプロモーターレベルで発現調節を受けていることを利用することとした。まず、miR-221/222 高発現細胞株 Calu-1 のゲノム DNA から miR-221/222 のプロモーター予測配列を増幅し、ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミドを作製した。これを用いたルシフェラーゼアッセイによって、ルシフェラーゼの活性値を減少させる物質の探索を開始した。

### [miR-221/222 の標的遺伝子の解析]

miR-221/222 の標的となる遺伝子の解析を行った。pre-microRNA、アンチセンス核酸を用い、各 microRNA を強制発現、ないしは機能阻害させた場合に、種々のアポトーシス促進因子、アポトーシス抑制因子の発現量の変化との間に相関性があるか否かを検討した。また、miR-221/222 の標的となる遺伝子の候補に挙げられた遺伝子に、実際に miR-221/222

の結合配列が存在するか否か、データベースを用いて確認した。そこで、さらに miR-221/222 の標的遺伝子と認められた因子に関して、siRNA によってその因子の発現量を特異的に調節することで実際に TRAIL 感受性に関与しているかどうか検討した。

### [TRAIL 感受性増強成分・TRAIL 発現誘導成分の探索と、その分子機構の解析]

ヒト大腸癌細胞、ヒト前立腺癌細胞株などに対して、TRAIL 感受性を増強する成分を探索した。さらに、その分子機構の解析を行った。加えて、生体内 TRAIL の発現量を増強することは非常に有効な癌予防・癌治療につながると想定されることから、TRAIL 発現誘導成分の探索も行った。

## 4. 研究成果

### [TRAILとmicroRNA発現調節成分との併用によるアポトーシス増強効果の解析]

TRAIL 感受性を増強させるためには、miR-221/222 の発現量を下方制御することが重要であると考えた。そこで、miR-221/222 のプロモーター予測配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込み、活性化レベルを評価するためのプラスミドを構築した。miR-221/222 のプロモーターを下方制御する食品成分を探索することを目的とし、今後も実験を続けていく。

### [miR-221/222の標的遺伝子の解析]

まず TRAIL 耐性の癌細胞では、miR-221/222 の発現レベルが高いということが確認された。その機構の一つとして、p53 下流遺伝子でありアポトーシス促進因子である PUMA が miR-221/222 の標的遺伝子であることを示唆するデータが得られた。現在のところ、PUMA が miR-221/222 の標的遺伝子であるという報告は無く、新規性が非常に高い。さらに、PUMA が miR-221/222 による発現調節を受けているとすると、既報では説明しきれなかった TRAIL 誘導性アポトーシスへの耐性機構と miR-221/222 過剰発現との関連性が証明できるかもしれない。今後、さらに確認実験を進めていく。

### [TRAIL 感受性増強成分・TRAIL 発現誘導成分の探索と、その分子機構の解析]

DR5 発現誘導成分の検討において、尿酸合成阻害薬の allopurinol、抗血小板薬の dipyridamole、植物成分では、生薬オウゴン成分である baicalein、生薬カンゾウ成分である isoliquiritigenin、ダイコンやタマネギ成分である kaempferol に、それぞれ TRAIL 感受性増強効果を認めた。その分子機構の解

析を行った結果、DR5 発現誘導に起因することを明らかにした(発表論文 -、図)。また、真菌の代謝産物である chetomin の場合、アポトーシス抑制因子である XIAP の分解促進効果によって、TRAIL の感受性を増強することを見出した。この内容については、現在、論文投稿中である(図)。chetomin によって発現制御される microRNA についても解析していく予定である。

さらに、TRAIL の発現量を増強する成分として、乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) を報告した(発表論文)。今後、TRAIL に代わり、TRAIL 感受性増強成分と併用することでより安全性も高い癌予防法が提案できると考えられる。

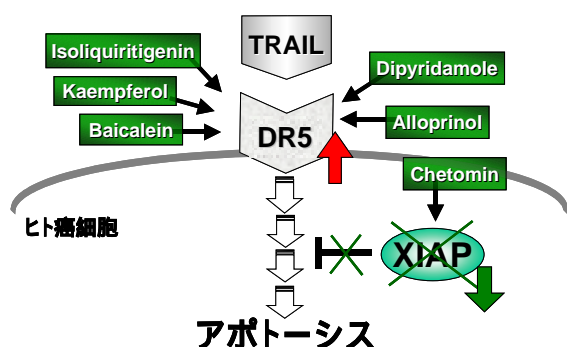


図 TRAIL 感受性増強成分と TRAIL の併用効果

本研究課題において報告された TRAIL 感受性増強成分、種々のヒト癌細胞に対し、TRAIL との併用によって強力なアポトーシス増強効果を示した。

## 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 7 件)

Horinaka M, Yoshida T, Kishi A, Akatani K, Yasuda T, Kouhara J, Wakada M, Sakai T. *Lactobacillus* strains induce TRAIL production and facilitate natural killer activity against cancer cells. *FEBS Letters* 584: 577-82, 2010, 査読有.

堀中真野、酒井敏行、食品成分による癌の「分子標的予防法」の開発、*FFIジャーナル*、213: 537-44, 2008, 査読無.

Yoshida T, Horinaka M, Takara M, Tsuchihashi M, Mukai N, Wakada M, Sakai T. Combination of isoliquiritigenin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in colon cancer HT29 cells. *Environmental Health and Preventive Medicine* 13: 281-7, 2008, 査読有.

Yasuda T, Yoshida T, Goda AE, Horinaka M, Yano K, Shiraishi T, Wakada M, Mizutani Y, Miki T, Sakai T. Anti-gout agent allopurinol

exerts cytotoxicity to human hormone-refractory prostate cancer cells in combination with TRAIL. *Mol Cancer Res* 6: 1852-60, 2008, 査読有.

Taniguchi H, Yoshida T, Horinaka M, Yasuda T, Goda AE, Konishi M, Wakada M, Kataoka K, Yoshikawa T, Sakai T. Baicalein overcomes TRAIL resistance via two different cell specific pathways in cancer cells but not in normal cells. *Cancer Res* 68: 8918-27, 2008, 査読有.

Yoshida T, Konishi M, Horinaka M, Yasuda T, Goda AE, Taniguchi H, Yano K, Wakada M, Sakai T. Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 129-33, 2008, 査読有.

Goda AE, Yoshida T, Horinaka M, Yasuda T, Shiraishi T, Wakada M, Sakai T. Mechanisms of enhancement of TRAIL tumoricidal activity against human cancer cells of different origin by dipyridamole. *Oncogene* 27: 3435-45, 2008, 査読有.

### [学会発表](計 14 件)

Horinaka M. Combination-oriented molecular-targeting prevention for cancer; combination with TRAIL and DR5 inducer. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 3 日、横浜

Yano K. Chetomin induces degradation of XIAP and enhances TRAIL sensitivity in urogenital cancer cells. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日、横浜

谷口浩也、バicalein は異なる 2 つの経路で DR5 発現を誘導し癌細胞特異的に TRAIL 誘導性アポトーシスを増強する、第 13 回日本がん分子標的治療学会学術総会、2009 年 6 月 26 日、徳島

堀中真野、バicalein による癌細胞特異的な DR5 遺伝子の発現誘導と TRAIL 感受性増強機構の解析、第 16 回がん予防学会、2009 年 6 月 17 日、愛知

堀中真野、イソリキリチゲニン はヒト大腸癌細胞に対して TRAIL 誘導性アポトーシスを増強する、第 79 回日本衛生学会学術総会、2009 年 3 月 30 日、東京

堀中真野、植物成分による分子標的癌予防の提案、第 9 回分子予防環境医学研究会、2009 年 1 月 23 日、東京

堀中真野、バicalein による癌細胞特異的な DR5 遺伝子の発現誘導と TRAIL 感受性増強機構の解析、第 13 回日本フードファクター学会、2008 年 11 月 17 日、東京

Goda A. Mechanisms of enhancement of

TRAIL tumoricidal activity against human cancer cells of different origin by dipyridamole. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋

Horinaka M. Lipoxygenase inhibitors induce DR5/TRAIL-R2 expression and sensitize malignant tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋

Taniguchi H. Baicalein overcomes TRAIL resistance via two different cell specific pathways in cancer cells but not in normal cells. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋

Yasuda T. Allopurinol enhances TRAIL-induced apoptosis through DR5 up-regulation in human prostate cancer cells. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋

Goda A. dipyridamole による p53 変異型腫瘍細胞株に対する TRAIL 感受性増強効果に関する検討. 第 12 回日本がん分子標的治療学会学術総会、2008 年 6 月 27 日、東京

堀中真野、NDGA による DR5 遺伝子の発現誘導と TRAIL 誘導性アポトーシスの増強、第 15 回がん予防学会、2008 年 5 月 23 日、福岡

酒井敏行、食品成分を用いた癌の「分子標的併用予防法」、第 15 回がん予防学会、2008 年 5 月 23 日、福岡

〔その他〕

ホームページアドレス

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pubmed/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

堀中 真野(HORINAKA MANO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80512037

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者