

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05934

研究課題名(和文) 過酸化脂質による癌の増悪化機構の分子基盤解析

研究課題名(英文) Effect of lipid hydroperoxide on cancer progression and its mechanism of action

研究代表者

永塚 貴弘 (Eitsuka, Takahiro)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：30445895

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)：過酸化脂質(2～10 $\mu$ M)を培地に添加して大腸癌細胞HCT116を24時間培養した結果、テロメラーゼ活性が濃度依存的に増大した。この分子機構として、過酸化脂質がMAPK経路の誘導を介して癌遺伝子c-Mycとテロメラーゼ触媒サブユニットhTERTを活性化させ、テロメラーゼの活性を亢進すると考えられた。がん患者由来のオルガノイドを活用して過酸化脂質による影響を調べたところ、大腸癌患者由来のオルガノイドにおいてもテロメラーゼの活性化が認められた。過酸化脂質とビタミンE(-トコフェロール)を大腸がん細胞に同時に処理することで、過酸化脂質によるテロメラーゼ活性化が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過酸化脂質による癌のテロメラーゼ活性化は過去に無い知見であり、抗酸化物質がその作用を抑制することも初めて明らかにしたことから、本研究の独自性・新規性は極めて高い。本研究により得られた成果は食品学、栄養学、生化学にとどまらず、薬学や医学の分野に大きく展開できると考えられ、高齢化が進む日本人の健康維持への貢献(健康寿命の延伸やQOL(quality of life)の向上)、さらには増大する国民医療費の抑制にもつながるため、社会的意義と波及性が極めて大きい。即ち、本研究成果は、超高齢社会に適した食事・医薬の創生に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Cellular telomerase activity was increased by lipid hydroperoxide (2-10  $\mu$ M) in HCT116 human colorectal cancer cells after culturing for 24 hours. As a molecular mechanism, lipid hydroperoxide activated the oncogene c-Myc and telomerase catalytic subunit hTERT via induction of the MAPK pathway, thereby enhancing telomerase activity. Utilizing organoids derived from cancer patients, we investigated the effects of lipid peroxide, and found that activation of telomerase was also observed in colorectal cancer organoids. Simultaneous treatment of HCT116 cells with lipid hydroperoxide and vitamin E (-tocopherol) inhibited telomerase activation by lipid hydroperoxide.

研究分野：食品機能学

キーワード：過酸化脂質 テロメラーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

当研究室では、老化・疾病に関わる過酸化脂質（リン脂質ヒドロペルオキシド（PCOOH）とその分解物）の化学と分子機構を究明し、機能性食品への応用研究を展開してきた。過酸化脂質を高感度に定量できる化学発光-HPLC装置を発明することで高脂血症、動脈硬化、高血糖、認知症、癌におけるPCOOHの異常蓄積を明らかにし、正確な定量に必要な過酸化脂質の高純度標品の合成や、過酸化脂質異性体解析のための質量分析（LC-MS/MS）法の開発により、世界の過酸化脂質研究の先頭に立って道を拓いてきた。

日本人の死因の第1位は癌であり、2人に1人が癌に罹ると見積もられていることから、国民病とも言える癌の対策は重要な課題である。古くから過酸化脂質の発癌への関与が示唆されており、過酸化脂質がフリーラジカルを発生させてDNAの酸化的損傷を誘発することで、遺伝子の変異が蓄積し、結果、癌細胞が発生すると考えられている。当研究室では、非炎症性で顕著な脂肪肝形成を伴うトランスジェニックマウスを用い、C型肝炎・肝癌ウイルスのコアタンパク質が強烈なフリーラジカルを生成し、PCOOHの高蓄積と同時にDNA変異を強く誘起することを発見した（*Cancer Res.* 61 (2001) 4365-4370）。即ち、この研究成果は、膜脂質過酸化と肝発癌の関わりを強く支持するものであった。

癌が進展するためには、癌細胞の発生（発癌）後の増殖過程において劣悪な環境（低酸素、低栄養など）に適応し、様々な悪性形質を獲得することが重要であり、この癌細胞の悪性化こそが、癌が致死性の疾病として恐れられている主因である。過酸化脂質による発癌の研究例は複数存在するが、癌の進展に与える影響についてはほとんど検証されていないことから、“過酸化脂質による癌の増悪化は起こり得るか？”を本研究課題の学術的問いに設定した。我々は、癌細胞に無限の増殖能を与え、腫瘍の悪性度（ステージ）と極めて高く相関する酵素テロメラーゼに着目し、過酸化脂質の影響を培養細胞試験により評価した結果、過酸化脂質のテロメラーゼ活性化作用を新たに見出した。そこで、過酸化脂質と癌の悪性化の関わりを解明するための生化学的研究を構想した。

### 2. 研究の目的

当研究室では、肝発癌モデルマウスでPCOOHの高蓄積を証明したが、過酸化脂質が癌の増悪化に与える影響は世界的にも未解明であり、テロメラーゼ活性化作用についても過去の報告は全く無い。これらの分子機構を解明することは、癌抑制、ひいては医療費抑制のための日常的な食品・栄養学的介入（栄養指導）への応用にも必須である。したがって、本研究では以下の課題解明を図ることを目的とした。

- (1) 過酸化脂質による癌細胞テロメラーゼの活性化とその分子メカニズム解明
- (2) 癌モデルに対する過酸化脂質の影響評価
- (3) 過酸化脂質による癌進展を抑制する食品成分の探索

### 3. 研究の方法

- (1) 過酸化脂質による癌細胞テロメラーゼの活性化とその分子メカニズム解明

PCOOHは血中では酸化したLDL（低比重リポタンパク質）に多く存在するが、酸化LDLと大腸癌との関連が疫学研究で示され、血中酸化LDLレベルが高値のヒトは、大腸癌リスクが約3倍に高まるとの報告がある（*Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13 (2004) 1781-1787）。そこで、培地にPCOOHを添加（2~10  $\mu\text{M}$ ）してヒト大腸癌細胞HCT116を24時間培養し、細胞内のテロメラーゼ活性をstretch-PCR法で測定した。過酸化脂質によるテロメラーゼ活性化機構を調べるために、PCOOHを処理したHCT116細胞からtotal RNAを抽出してリアルタイムPT-PCRで遺伝子発現を解析した。また、ウエスタンブロット法によりタンパク質発現に与える影響も評価した。

- (2) 癌モデルに対する過酸化脂質の影響評価

ヒト大腸癌患者由来のオルガノイド（ヒト癌組織の特性を保った細胞塊）を培養し、(1)と同様にPCOOHを24時間処理後、テロメラーゼ活性をstretch-PCR法で測定した。

- (3) 過酸化脂質による癌進展を抑制する食品成分の探索

HCT116細胞にPCOOHと食品成分を同時に添加して24時間培養後、テロメラーゼ活性を測定することで、PCOOHによるテロメラーゼの活性化を抑制する食品成分を探索した。なお、食品成分の処理濃度については、生理的な濃度（ヒトの血中濃度）を考慮に入れて培地に添加した。

### 4. 研究成果

- (1) 過酸化脂質による癌細胞テロメラーゼの活性化とその分子メカニズム解明

stretch-PCR法によって、テロメラーゼ活性は6塩基単位で長さの異なるDNAラダーとして検出された（図1A）。PCOOHを処理することでDNAラダーのシグナルが高くなったことから、PCOOHによるテロメラーゼの活性化が認められ、10  $\mu\text{M}$ のPCOOHによりテロメラーゼ活性が2倍に増大した（図1B）。

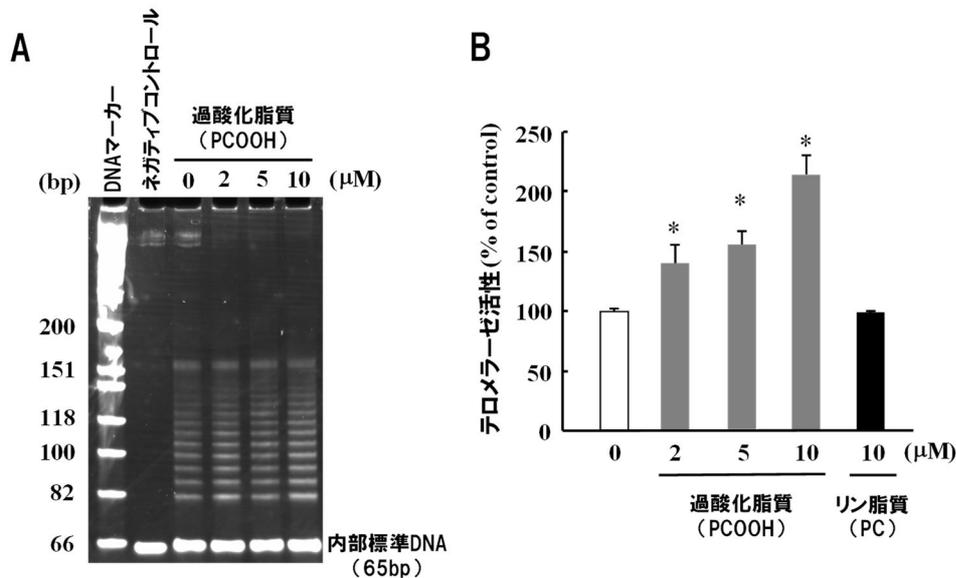


図1 PCOOHによる癌細胞テロメラーゼの活性化

テロメラーゼの活性化には触媒サブユニットである human telomerase reverse transcriptase (hTERT) の発現が深く関与しており、細胞のテロメラーゼ活性と hTERT の発現レベルは高く相関する。リアルタイム RT-PCR によって、PCOOH は hTERT の発現上昇を介してテロメラーゼを活性化することがわかった。hTERT のプロモーター領域には癌遺伝子 c-Myc が結合し、hTERT の発現を誘導することが知られている。また、c-Myc の活性はリン酸化を介して制御されているため、ウエスタンブロットにより c-Myc のリン酸化レベルを評価した。その結果、PCOOH は c-Myc のリン酸化 (Ser62) を誘導することが示唆された。酸化ストレスに応答する MAPK 経路 (特に ERK シグナル) は c-Myc のリン酸化に関与する。そこで、PCOOH による影響を調べたところ、PCOOH による MAPK 経路の誘導が認められた。以上のことから、PCOOH は酸化ストレスを誘導して MAPK 経路を活性化させ、c-Myc と hTERT を誘導することでテロメラーゼ活性を増加させることが示唆された (図2)。

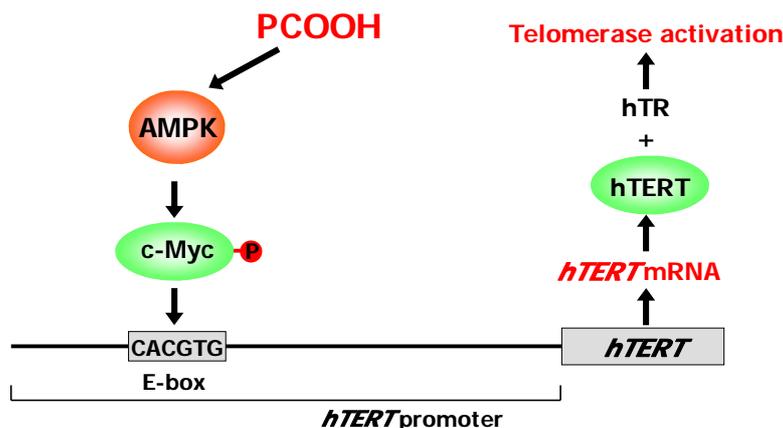


図2 PCOOHによるテロメラーゼ活性化機構

### (2) 癌モデルに対する過酸化脂質の影響評価

近年、癌の薬効評価への応用に注目を集めているオルガノイドに着目し、これを活用して PCOOH のテロメラーゼに対する効果を検証した。PCOOH を処理した大腸癌オルガノイドのテロメラーゼ活性を測定した結果、PCOOH によるテロメラーゼの活性増大が (1) の実験と同様に認められた。リアルタイム RT-PCR によって、大腸癌オルガノイドにおける hTERT の発現が PCOOH により誘導されることも明らかになった。

### (3) 過酸化脂質による癌進展を抑制する食品成分の探索

HCT116 細胞に PCOOH と食品成分を同時に添加し、PCOOH によるテロメラーゼの活性化を抑制する食品成分を探索したところ、抗酸化能を有する機能性成分が有効であることがわかった。例えば、 $\gamma$ -トコフェロールを PCOOH と添加することで、PCOOH による効果を  $\gamma$ -トコフェロールが

打ち消した（図 3）。以上より、抗酸化物質の積極的な摂取が PCOOH によるテロメラーゼ活性化作用を抑える可能性が示唆された。

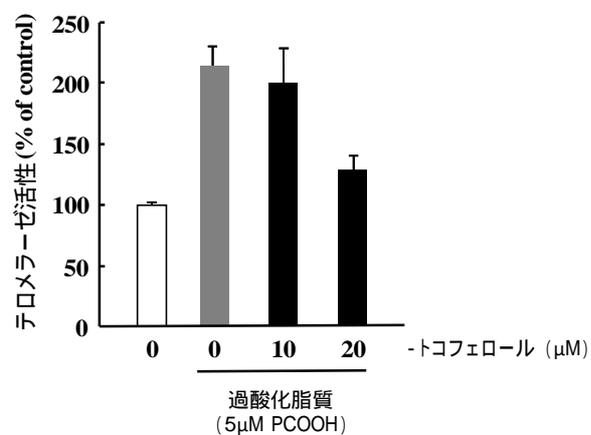


図 3 PCOOH によるテロメラーゼ誘導に対する α-トコフェロールの効果

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 2件）

1. 著者名 Nguma E, Yamashita S, Kumagai K, Otoki Y, Yamamoto A, Eitsuka T, Nakagawa K, Miyazawa T, Kinoshita M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Ethanolamine Plasmalogen Suppresses Apoptosis in Human Intestinal Tract Cells <i>in Vitro</i> by Attenuating Induced Inflammatory Stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 3140 ~ 3148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.0c05545	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 Tani Tetsuya, Eitsuka Takahiro, Katayama Masafumi, Nagamine Takashi, Nakaya Yumiko, Suzuki Hajime, Kiyono Tohru, Nakagawa Kiyotaka, Inoue-Murayama Miho, Onuma Manabu, Fukuda Tomokazu	4. 巻 15
2. 論文標題 Correction: Establishment of immortalized primary cell from the critically endangered Bonin flying fox ( <i>Pteropus pselaphon</i> )	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0234054
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0234054	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 Orimoto Ai, Katayama Masafumi, Tani Tetsuya, Ito Keiko, Eitsuka Takahiro, Nakagawa Kiyotaka, Inoue-Murayama Miho, Onuma Manabu, Kiyono Tohru, Fukuda Tomokazu	4. 巻 525
2. 論文標題 Primary and immortalized cell lines derived from the Amami rabbit ( <i>Pentalagus furnessi</i> ) and evolutionally conserved cell cycle control with CDK4 and Cyclin D1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1046 ~ 1053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.036	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1件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永塚貴弘
2. 発表標題 トコトリエノールのがん抑制作用とその高機能化に関する研究
3. 学会等名 ビタミン学会（招待講演）
4. 発表年 2020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	仲川 清隆  (Nakagawa Kiyotaka)  (80361145)	東北大学・農学研究科・教授   (11301)	
研究 分担者	伊藤 隼哉  (Ito Junya)  (50781647)	東北大学・農学研究科・助教   (11301)	

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