

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18913

研究課題名（和文）皮膚がん予防への応用に向けたヒノキチオールの新規標的分子の発見と作用機序の解明

研究課題名（英文）Discovery of Novel Target Molecules of Hinokitiol and Elucidation of Their Mechanism of Action for Application to Skin Cancer Prevention

研究代表者

青野 裕一（AONO, YUICHI）

関西学院大学・生命環境学部・助教

研究者番号：10806293

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）：日本における皮膚がんの罹患者数は年々増加傾向にあり、日焼け止め使用による従来の皮膚がん予防法に加えて、新たな予防法の発見が望まれている。その課題に対して、皮膚がんの発がん原因の一因とされる酸化ストレスからの保護効果を有する天然化合物ヒノキチオール（以下、HiOH）に着目した。その効果は、2面的なROS消去作用からなり、HiOHのイソプロピル基による直接的作用と、チオレドキシンシステムによる間接的作用の可能性が示された。これらの成果は、皮膚がん予防の発展に貢献し得る皮膚細胞における酸化ストレスからの保護作用のメカニズムの一端を明らかにするものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、天然成分ヒノキチオール（HiOH）の酸化ストレスに対する2面的な皮膚細胞保護効果の分子基盤の一部を明らかにすることができた。この成果をもとにHiOHが抗酸化作用を発揮する際に使用される細胞内分子ネットワークの全貌が明らかとなれば、新たな細胞内抗酸化経路やその責任分子の発見に繋がる可能性がある。また、HiOHの化合物としての構造において酸化ストレス消去に必要な部位が特定できれば、HiOH由来のより効果的な化合物の合成展開に対するヒントとなる可能性がある。これらが皮膚がん予防法の発展への貢献となり、皮膚がん罹患者の増加を止める一助となることを期待するものである。

研究成果の概要（英文）：The number of skin cancer patients in Japan is increasing every year, and it is hoped that a new preventive method will be discovered in addition to the conventional method of preventing skin cancer through the use of sunscreen. To address this issue, we focused on a natural compound, hinokitiol (hereafter referred to as HiOH), which has a protective effect against oxidative stress, which is considered to be one of the causes of skin cancer carcinogenesis. The effect consists of a two-faceted ROS scavenging action, with the possibility of a direct action by the isopropyl group of HiOH and an indirect action by the thioredoxin system. These results provide the mechanism of protection against oxidative stress in skin cells and its could contribute to the development of method for skin cancer prevention.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ヒノキチオール 皮膚がん予防 抗酸化作用 ケモプロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦における皮膚がんの年間罹患者数は増加傾向にあり、優れた治療薬の登場で患者の生存率も向上している。しかしながら、がん患者の精神的・身体的な負担や治療に係る費用の負担は大きく、皮膚がんの罹患自体を抑える「がん予防法」の重要性は依然として高いと言える。

現在、皮膚がん予防法としては、日焼け止め剤による皮膚がんのハイリスク因子である紫外線(UV)からの防御の有効性が示されている。その一方で、皮膚がんのリスクと日焼け止めの使用との間に期待された benefit は確認できなかったとする報告も存在する。このことから、申請者は紫外線からの防御(受動的な予防)に加えて、発がん過程初期の微小がんの殺傷および細胞内の防御機構の活性化を加えた能動的な予防が必要であると考えた。

以上の現状を踏まえ、研究代表者が着目したのが「ヒノキチオール」と呼ばれる台湾ヒノキの精油から発見された天然化合物である。ヒノキチオールは、非常に優れた抗菌作用を持ち、すでに皮膚に直接触れるヘルスケア商品や歯周疾患治療剤などにも使用され、その高い安全性が知られている。このヒノキチオールであるが、以下の2つの事例から能動的予防の条件を満たすと考えた。

(1) 皮膚がんを含む様々ながん細胞に対して細胞増殖抑制・細胞死誘導作用を示し、実験動物の腫瘍形成を抑制することが確認されている(発がん過程初期の微小がんの殺傷の可能性)。

(2) UV 暴露による発がん原因の一つとされる活性酸素種による酸化ストレスを、ヒノキチオールがラジカル消去作用を持つメタロチオネンの発現を惹起することで阻害し、細胞死を抑制する。また、UV 暴露によって誘導され発がんの促進に寄与するとされる表皮細胞内 DNA の過剰メチル化と UV 誘導性免疫抑制を、ヒノキチオールにより阻害可能であることが、マウスを対象にした検証から証明されている(細胞内の防御機構の活性化)。

よって、UV による皮膚がんの発がん過程に関与するとされる上記の現象を抑制可能なヒノキチオールは「皮膚がん化学予防」に有効な化合物と考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、皮膚がん化学に有効と考えられるヒノキチオールが直接作用する標的タンパク質をケミカルバイオロジーの手法を用いて同定し、ヒノキチオールが有する皮膚がん細胞に対する抗腫瘍効果および酸化ストレスからの保護効果の分子基盤を *in vitro*, *in vivo* 解析から明らかにすることで、ヒノキチオールの皮膚がんの腫瘍形成抑制作用の新たな分子メカニズムを解明することを目的としている。

この成果は、これまで発見されていなかった発がん抑制経路・方法の発見や、ヒノキチオール使用時の感受性予想、ヒノキチオールをもとにした、より効果の高いがん化学予防薬の開発に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒノキチオールが有する抗腫瘍効果を検証するため、ヒノキチオール処理したマウス悪性黒色腫株(B16)とヒト扁平上皮がん細胞株(HSC1)を用いた細胞増殖抑制アッセイおよび FACS による細胞周期・細胞死解析を行った。

(2) ヒノキチオールの酸化ストレスに対する細胞保護効果を検証するため、ヒノキチオールおよび過酸化水素(H_2O_2)処理したヒト正常角化細胞株(HaCaT)を用いて細胞増殖抑制アッセイ、ROS 産生量の解析を行った。

(3) ヒノキチオールが直接的に H_2O_2 を消去している可能性を検証するため、ヒノキチオール存在下での DAB アッセイを行った。

(4) ヒノキチオールの抗酸化作用を発揮する上で必要となる細胞内 ROS 消去系を特定するため、以下の検証を行った。 H_2O_2 ・ヒノキチオールを処理した HaCaT 細胞へのチオレドキシン還元酵素阻害剤(オラノフィン)添加実験を行った。また、チオレドキシン還元酵素の mRNA レベルの発現への影響を qRT-PCR によって解析した。さらにチオレドキシン還元酵素活性への影響を酵素活性アッセイを用いて検証した。

(5) ヒノキチオールの細胞保護効果における直接作用因子を探索するため、ヒノキチオール固定化ナノ磁性ビーズを作製する。さらに、このビーズを細胞抽出液と混合することでヒノキチオール結合タンパク質を精製し、質量分析にて得られたタンパク質の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) ヒノキチオールは皮膚がんへの抗腫瘍効果を検証するため、メラノサイトに由来する悪性黒色腫の細胞株である B16 細胞およびケラチノサイト由来上皮がんの細胞株である HSC1 を使用し、細胞増殖アッセイ (CCK8 アッセイ) を行った。この際、ヒノキチオールの構造のうち、抗腫瘍効果を発揮する上で重要な部位を特定するため、構造が類似したトロポロンと 2-メトキシトロポンを並行して作用させ、その効果を比較した。その結果、両細胞ともにヒノキチオールのみで増殖抑制作用を示し、B16 細胞・HSC1 細胞のそれぞれの IC50 は $8.26\ \mu\text{M}$ と $6.71\ \mu\text{M}$ であった。また、FACS 解析では、細胞周期の S 期停止が見られ、細胞死を誘導していた。

(2) 次に UV 暴露による発がん原因の一つとされる活性酸素種による酸化ストレス (本研究では H_2O_2 を使用) が、表皮細胞に与えるダメージに対するヒノキチオールの効果について検証を行った。検証方法は、 H_2O_2 を処理した HaCaT 細胞に対してヒノキチオールを前処理および同時処理し、24 時間後に細胞増殖アッセイ (CCK8 アッセイ) を行った。

その結果、 H_2O_2 処理によって引き起こされる HaCaT 細胞の生存率の低下が、ヒノキチオール (HiOH) の同時処理によって抑制されることを確認した (図 1)。この時、前処理ではその効果を発揮しないことも確認された。

また、(1)と同様の理由でトロポロン (Tp)・2-メトキシトロポ (mTp)、生体内にも存在し代表的な抗酸化物質であるアスコルビン酸 (VC)、ヒノキチオールと同じく金属キレート効果を持つ EDTA についても同様の検証を行った。その結果、ヒノキチオールのみが酸化ストレスからの細胞保護効果を示すことが明らかとなった (図 1)。

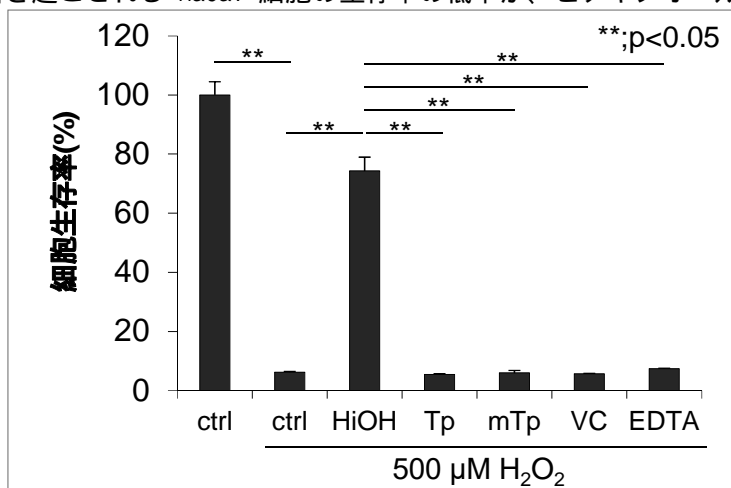


図 1. ヒノキチオールの酸化ストレスに対する細胞保護効果

以上の結果から、ヒノキチオールがアスコルビン酸のような代表的な抗酸化物質より強力な抗酸化作用を有しており、その効果は金属キレート効果・金属錯体形成に使用されるヒドロキシ基・カルボニル基ではなくイソプロピル基側の構造によって発揮されている可能性がある。また、この抗酸化作用は、 H_2O_2 とヒノキチオールが同時に存在している状況において発揮されることから直接的に H_2O_2 を無毒化している可能性が考えられた。

(3) (2)において、ヒノキチオールが H_2O_2 の直接的な消去作用を有している可能性が考えられたことから、DAB 反応を利用したアッセイを行い、その作用を評価した。方法は、DAB が HRP と H_2O_2 存在下で無色から茶色へと変色する反応を利用し、ヒノキチオールを加えることでこの変色反応が抑制されるかについて検証した。この時、測定には DAB 反応において値が大きく変動する 570 nm の吸光度を測定している。また、(2)で使用した化合物も同時に使用した。

その結果、ヒノキチオールが DAB 反応を抑制しており H_2O_2 を消去している可能性が考えられたが、興味深いことにその効果はアスコルビン酸よりも弱いものだった (図 2)。このことから、直接的な H_2O_2 消去作用のみでは細胞保護効果として不十分なもので、ヒノキチオールが有する抗酸化作用の一部であり、残りの部分は細胞が持つ酸化ストレス消去系の活性化によって発揮されているものと考えられた。

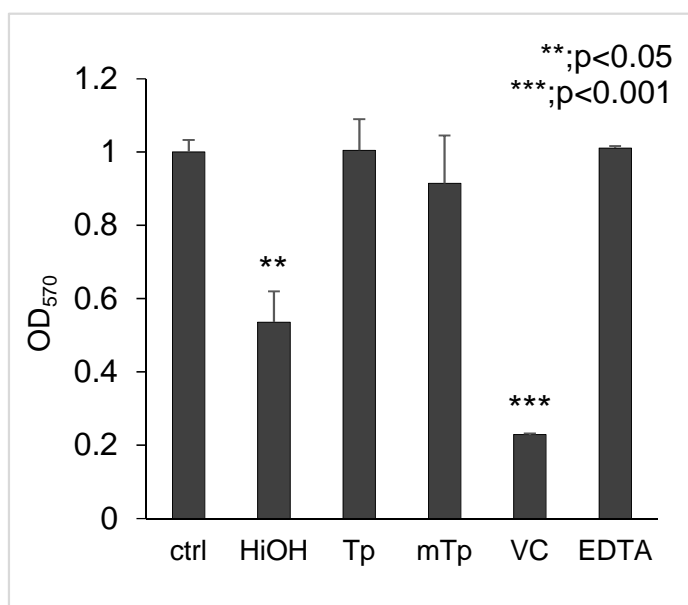


図 2. ヒノキチオールの H_2O_2 消去作用の検証

(4) ヒノキチオールが細胞保護効果を発揮する上で必要となる細胞内 ROS 消去系を特定するため、 H_2O_2 とヒノキチオールを同時処理した HaCaT 細胞に対してチオレドキシン還元酵素阻害剤 (オーラノフィン) 添加実験を行った。その結果、ヒノキチオールの細胞保護効果が減弱することが分かった (図 3)。

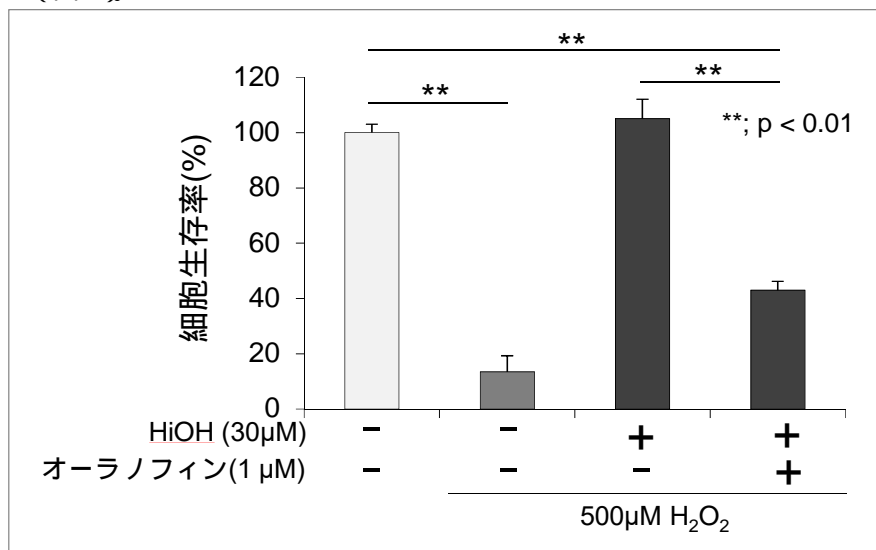


図 3. チオレドキシン還元酵素阻害剤によるヒノキチオールの細胞保護効果の減弱

次に、オーラのフィンの阻害ターゲットであるチオレドキシンレダクターゼの転写レベルでの発現量を qRT-PCR によって解析した。その結果、ヒノキチオールはその発現量を変化させないことが明らかとなった。このことから、チオレドキシンレダクターゼの酵素活性自体をヒノキチオールが活性化している可能性を考え、チオレドキシンレダクターゼ酵素活性アッセイを用いてヒノキチオールの影響を検証した。その結果、チオレドキシンレダクターゼの組み換えタンパク質に対してヒノキチオールを処理し酵素活性を測定したが、直接的に活性化されてはいなかった。しかしながら、HaCaT 細胞のライセートを用いた検証では、ヒノキチオールを作用させることでコントロールよりも高い値を示した。以上のことから、ヒノキチオールが何らかの分子を介して間接的に活性化している可能性が考えられた。

(5) 上記に示した作用を説明し得るヒノキチオールの直接作用因子を特定するため、ヒノキチオール固定化ナノ磁性ビーズの作製を試みた。そして、作製したビーズを用いて HaCaT 細胞の細胞溶解液と混合し、ヒノキチオール結合タンパク質の精製を行った。その結果、薄くはあるが精製タンパク質を得ることができた。右の図 4 は、その精製タンパク質サンプルを用いて銀染色を行った際の染色像である。得られた精製タンパク質を用いて質量分析を行い、ヒノキチオール結合タンパク質の同定を試みた。

その結果、残念ながらタンパク質の同定には至らなかった。銀染色の染色像ではバンドが得られていることから、今後、条件検討を重ね、ヒノキチオール結合タンパク質の同定を行い、論文を投稿予定である。

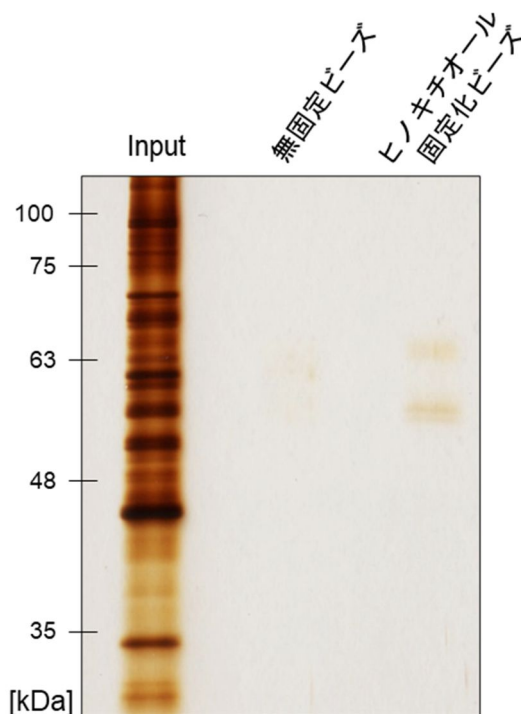


図 4. ヒノキチオール固定化ビーズによって得られたサンプルを用いた銀染色の染色像

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------