

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06632

研究課題名(和文)植物由来天然化合物によるPiezo1阻害を介した大腸ガン抑制と正常細胞の保護

研究課題名(英文)Colon cancer suppression and rescue of healthy cells through Piezo1 inhibition by natural compounds

研究代表者

高山 靖規 (Yasunori, Takayama)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：60711033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌細胞に発現する機械感受性イオンチャネルPiezo1は癌悪性化に関わっていることが示唆されている。本研究では天然化合物の一種であるリクイリチゲニンにPiezo1阻害効果、および大腸癌細胞の増殖抑制効果を発見した。そこで、Piezo1欠損大腸癌細胞において検討した結果、驚くべきことに野生株よりも高い増殖能を示すことが判明した。これらの結果は、未解明の大腸癌悪性シグナリングの存在を示しており、今後新たな抗がんターゲットが同定されることが期待される。なお、リクイリチゲニンはPiezo1欠損株においても細胞死を誘導した為、悪性度の高い大腸癌に対しても有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は世界では年間約90万人、本邦では約5万人を死に至らしめる疾患である。また、その死亡者は20歳代から後期高齢者まで生じており、決して特定の年代における問題ではない。その為、大腸癌の細胞生理機能に影響をもたらす化合物の探索や癌増殖抑制手段を発見することは非常に重要である。本研究では、漢方薬の生薬として頻用される甘草に由来するフラボノイドであるリクイリチゲニンが人為的とはいえ増悪させた大腸癌細胞をも死滅させたことから、将来的には進行癌であったとしても化合物投与により完治できる未来を切り開けるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Piezo1 which is a non-selective cation channel activated by mechanical stimuli on plasma membrane is reportedly involved in colon cancer proliferation. In this project, I found that a natural compound, liquiritigenin, inhibited the Piezo1 currents suppressed the proliferation of colon cancer cells. Therefore, I investigated the proliferation of Piezo1-deficient colon cancer cells. Intriguingly, Piezo1-deficient cancer cells showed more enhancement of the proliferation compared with wild type. This result suggested that there are unknown molecular mechanisms caused by Piezo1 deficit in the cancer exacerbation. Novel therapeutic targets could be identified in future. Additionally, liquiritigenin also induced the cell death in Piezo1-deficient colon cancer cells. This natural compound has the strong possibility as new anti-cancer drugs against more severe cancer cells.

研究分野：イオンチャネル

キーワード：大腸癌 フラボノイド Piezo1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸管上皮細胞などに発現する機械感受性イオンチャネル Piezo1 は細胞膜への機械刺激によって活性化するが、申請者らは過去に腸内細菌由来一本鎖 RNA によっても活性化し、細胞生理機能を惹起させることを報告していた。Piezo1 は細胞分裂の促進や細胞核に外力が加わった場合の細胞障害を抑制することが知られており、Piezo1 活性をコントロールすることは細胞生理機能に直接的に影響する。本研究ではフラボノイドの一種であるリクイリチゲニンが機械刺激により生じる Piezo1 電流を抑制することを事前検討において発見していた。Piezo1 は健全な細胞だけでなく大腸癌細胞に高発現することが知られており、このことは腸内細菌由来一本鎖 RNA により大腸癌が増悪し、それはリクイリチゲニンによって抑制されるを示唆する。

### 2. 研究の目的

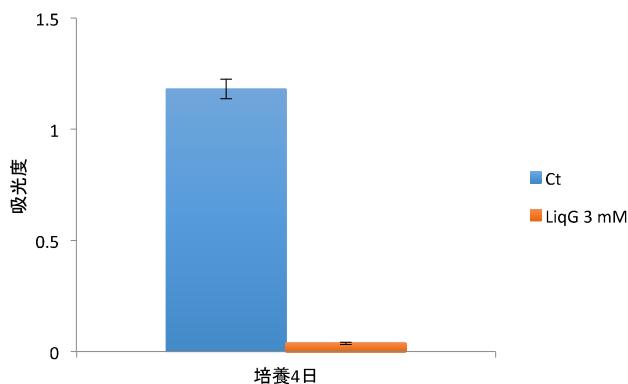
リクイリチゲニンによって大腸癌細胞の増殖が抑制されるのか検討する。

### 3. 研究の方法

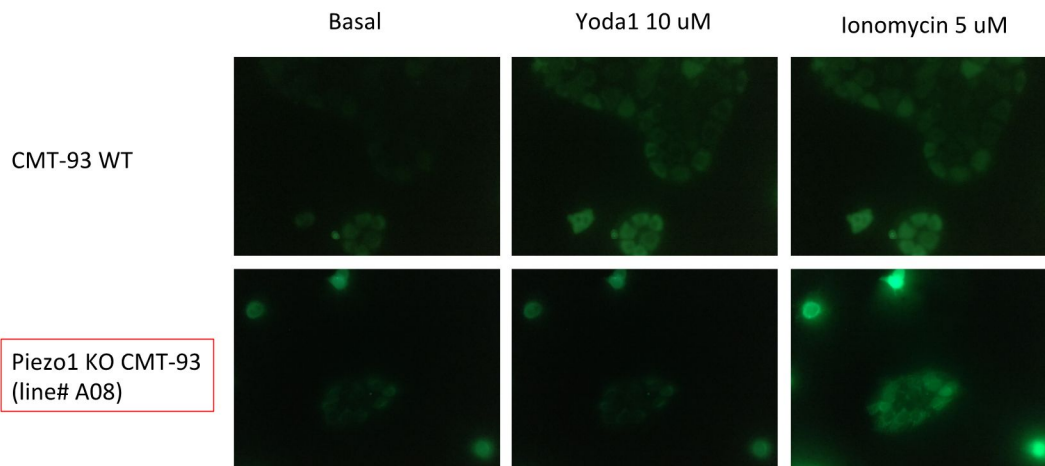
- (1) ホールセルパッチクランプ法による Piezo1 電流の観察とそれに対するリクイリチゲニンの薬理的解析。HEK293T 細胞にマウス Piezo1 をリポフェクションにより強制発現させ、細胞膜を記録電極で機械刺激した際に生じる電流を解析した。機械刺激は細胞中心に向かって斜め上 45° から 7  $\mu\text{m}$  押し込むことで行なった。
- (2) MTT アッセイによる大腸癌細胞死の定量。96well プレートにマウス大腸癌由来細胞 CMT-93 を播種し、2 日間通常培養した後、リクイリチゲニンを加えさらに 4 日間培養した。その後、MTT 試薬を用いて生細胞の度合いを吸光度計により解析した。
- (3) 大腸炎誘発モデルマウスにおけるリクイリチゲニンの薬理的検討。雄の C57BL6/NCr マウスに 3% デキストラン硫酸ナトリウム水を引水させ、大腸炎を引き起こさせた。この際、サンプル群の水にはリクイリチゲニンの前駆物質であるリクイリチンを混和した。
- (4) Piezo1 を欠損させたマウス大腸癌由来細胞 CMT-93 におけるカルシウムイメージングおよび MTT アッセイ。CRISPR-Cas9 によって Piezo1 を欠損させた CMT-93 細胞を作成し、Ca イメージングによる Piezo1 応答の消失と MTT アッセイによる細胞増殖の程度を解析した。

### 4. 研究成果

- (1) リクイリチゲニンは 300  $\mu\text{M}$  で Piezo1 を完全に抑制したが、100  $\mu\text{M}$  ではほとんど抑制効果が見られなかった。
- (2) リクイリチゲニンを 3 mM で加えると CMT-93 細胞は増殖することなく、ほぼ死滅した。この実験条件では大腸癌治療で用いられる抗がん剤（フルオロウラシル）は 50% 程度しか細胞死を引き起こさない。その為、フルオロウラシルが有効でない場合などではリクイリチゲニンが代替薬として効果的であることを示している。



- (3) 大腸癌モデルマウスにおける比較を病理学的視点から行ってみたが、vehicle 群とリクイリチン群との間に差は認められず、両群ともに同等の炎症所見が観察された。リクイリチンは配糖体であり、腸内細菌によって代謝されることでリクイリチゲニンが産生される。その為、リクイリチンの使用によって腸管特異的にリクイリチゲニンの影響を引き出すことができることを期待していたが、本実験の結果からリクイリチゲニン前駆物質を用いることの不確実性が明らかとなった。
- (4) カルシウムイメージングの結果、Piezo1 欠損株においては Piezo1 活性化剤 Yoda-1 による細胞内カルシウム濃度上昇が全く観察されなかった。



そこで野生株と欠損株の細胞増殖を MTT アッセイにより比較したところ、驚くべきことに欠損の方が高い増殖能を示した。現在、この分子機構について解析中であり、近い将来新たな大腸癌増悪シグナリングの解明が報告されるであろう。また、リクイリチゲニンは欠損株においても野生株同様に細胞死を引き起こすことから、悪性度の高い大腸癌にも効果的であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamanoi Yu, Lei Jing, Takayama Yasunori, Hosogi Shigekuni, Marunaka Yoshinori, Tominaga Makoto	4. 巻 6
2. 論文標題 TRPV3-ANO1 interaction positively regulates wound healing in keratinocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-04482-1	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 Kato Mami, Takayama Yasunori, Sunagawa Masataka	4. 巻 12
2. 論文標題 The Calcium-Activated Chloride Channel TMEM16A is Inhibited by Liquiritigenin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 786511
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.628968	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 Okumo Takayuki, Takayama Yasunori, Maruyama Kenta, Kato Mami, Sunagawa Masataka	4. 巻 12
2. 論文標題 Sensory-Immunologic Prospects for Complex Regional Pain Syndrome Treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 628968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.786511	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 Takayama Yasunori, Tominaga Makoto	4. 巻 39
2. 論文標題 Phosphorylated TRPV1 and ANO1 / TMEM16A interaction induced by low concentration of capsaicin or innocuous heat stimulation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PAIN RESEARCH	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11154/pain.39.1	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 Takayama Yasunori、Tominaga Makoto	4. 巻 121
2. 論文標題 Interaction between TRP channels and anoctamins	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceca.2024.102912	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yasunori Takayama, Kenta Maruyama, Takeshi Kondo, Mami Kato, Makoto Tominaga, Masataka Sunagawa
2. 発表標題 Investigation of Piezo1 inhibition by liquiritigenin, and anti-colon cancer
3. 学会等名 第100回 日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤川千啓, 高山靖規, 富永真琴, 赤瀬智子
2. 発表標題 プロポフォルの温度変化がヒトTRPA1活性化に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mami Kato, Yasunori Takayama, Masataka Sunagawa
2. 発表標題 TRPA1 and TMEM16A inhibitions by Estrogen
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤真未, 高山靖規, 砂川正隆
2. 発表標題 甘草由来フラボノイドおよびエストロゲンによるTMEM16A阻害
3. 学会等名 生理学研究所 痛みの研究会2021
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasunori Takayama, Mami Kato, Kenta Maruyama, Masataka Sunagawa
2. 発表標題 Currents of mechanosensitive channels induced by using single glass pipette
3. 学会等名 第99回 日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mami Kato, Yasunori Takayama, Masataka Sunagawa
2. 発表標題 The effects of estrogen on mouse and human TRPA1 currents
3. 学会等名 第99回 日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山靖規, 富永真琴
2. 発表標題 体温におけるリン酸化TRPV1とアノクタミン1の相互作用
3. 学会等名 第45回 日本疼痛学会
4. 発表年 2023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	丸山 健太  (Maruyama Kenta)  (60724119)	生理学研究所・生体機能調節研究領域・特任准教授    (63905)	

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