

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23689036

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーによる癌予防標的分子の網羅的同定と癌のテーラーメイド予防

研究課題名(英文)Comprehensive identification of cancer chemopreventive target molecules by Chemical Biology and the tailor-made prevention of cancer

研究代表者

飯泉 陽介 (Iizumi, Yosuke)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20533178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

研究成果の概要(和文)：多くの疫学研究や動物実験により、食品によるがん予防効果が示唆されてきたが、食品成分それぞれの直接の標的分子については、ほとんどわかっていなかった。今回、独自に開発したケミカルバイオロジーの手法を用いて、4つの代表的な食品成分について、結合タンパク質を網羅的に同定することに成功した。さらに、食品成分結合タンパク質のがん促進機能も複数発見し、食品成分による増殖抑制メカニズムを詳細に明らかにした。将来、食品成分結合タンパク質の発現量や遺伝子多型(個人差)の情報が、がんのテーラーメイド予防の実現に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Many epidemiological and animal model studies suggest the cancer chemopreventive effects of food. However, little is known about the direct molecular targets of food factors. In this study, we succeeded in comprehensively identifying the binding proteins of four representative food factors using our original Chemical Biology method. Moreover, we discovered novel cancer-promoting functions of these binding proteins and revealed the detailed mechanisms underlying growth inhibition by food factors. In the future, identification of food factor-binding proteins might realize the tailor-made prevention of cancer based on expression levels and SNPs of these binding proteins.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：がん予防 結合タンパク質 食品成分 ナノ磁性ビーズ 細胞周期 細胞死 質量分析 新規メカニズム

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における死因のトップは悪性腫瘍であり、生涯では男性の2人に1人が、女性の3人に1人が、がん罹患すると算出されており、有効ながん予防法の確立が急務である。

世界各国において、がん予防効果のある食品成分が探索され、その食品成分によるがん予防効果の分子機構について、様々な研究が行われている。それらの研究では、分子生物学などの発展により解明された発がんの分子機構に則り、その発がん機構に対して食品成分が影響を及ぼしうるか否かを検証している。しかし、現在の手法ではしらみつぶしに発がんの分子機構に関して検証していくしかなく、非常に時間がかかっている。また、既存の分子機構の枠を出ることはできず、狭い範囲での解析になっている。実際に、食品成分が細胞内のどのタンパク質に直接作用してがん予防効果を発揮しているかについては、ほとんど明らかにされていない。食品成分によるがん予防効果の全貌解明には程遠く、このままでは理論的に妥当ながん予防の実践は非常に難しいと考えられた。

## 2. 研究の目的

これまでに、多くの食品成分に対してがん予防効果が示唆されてきた。しかし、がん予防効果を発揮するために最も重要な食品成分の直接の標的分子は、ほとんど明らかにされていない(図1)。本研究では、がん予防効果が示唆されている食品成分について、食品成分が直接結合し作用するタンパク質(標的分子)を、ケミカルバイオロジーの手法(ナノ磁性ビーズ)を用いて網羅的に同定し、がん予防効果の詳細な分子機構を明らかにする。これにより、明確な分子機構に基づいたがん予防法、即ち「がんの分子標的予防法」の開発が可能になる。また、がん予防に役立つ新規細胞内分子機構も明らかになり、より強力な

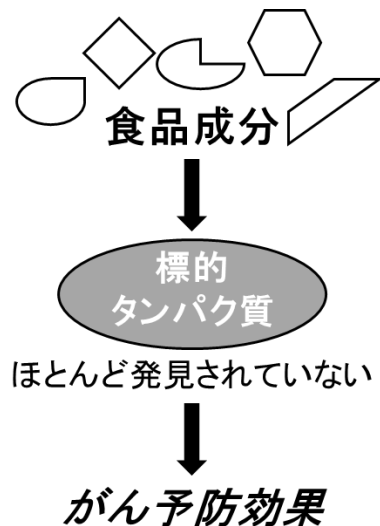


図1. 食品成分の標的タンパク質はほとんど発見されていない

がん予防食品成分の発見も期待される。さらに、標的分子の遺伝子多型(個人差)や発現量に基づいたがんのテーラーメイド予防の実現にも寄与しうると期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 食品成分による増殖抑制効果の解析

本研究では、代表的ながん予防食品成分である赤ワインに含まれているポリフェノールのレスベラトロール、スパイスのウコンに含まれているポリフェノールのクルクミン、海藻類に含まれているカロテノイドのフコキサンチン、緑茶に含まれているカテキンのエピガロカテキンガレートを対象とした。これら大腸癌細胞株 HT-29、前立腺癌細胞株 PC-3、乳癌細胞株 MCF-7 などに添加し、各種癌細胞株の増殖を WST-8 アッセイにより評価した。さらに、増殖抑制が確認された場合には、フローサイトメトリーを用いて、その増殖抑制が細胞周期停止によるものか、細胞死誘導によるものかを解析した。

### (2) ナノ磁性ビーズへの食品成分の固定化と食品成分結合タンパク質の精製(図2)

ナノ磁性ビーズへの固定化に関しては、各々の食品成分が有する官能基に適した固定化法を採用した。レスベラトロール、クルクミン、エピガロカテキンガレートは、炭酸カリウムを触媒として、エポキシ基を有するナノ磁性ビーズ(多摩川精機株式会社)に、それら食品成分のフェノール性水酸基を介して固定化した。フコキサンチン及びその生体代謝物フコキサンチノールの固定化には、京都薬科大学の赤路健一先生に助言をいただきながら開発した新規固定化法(unpublished data)を用いた。

各種細胞株を lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM DTT、0.5 mM PMSF) に溶解し、細胞抽出液を作製した。そして、この細胞抽出液と各々の食品成分を固定化したナノ磁性ビーズを混合し、4 で4時間反応させた。そして、3回 lysis buffer で洗浄したのち、SDS sample buffer により、これらのビーズに結合した食品成分結合タンパク質を溶出した。

### (3) 質量分析計(MALDI-TOF MS)による食品成分結合タンパク質の同定(図2)

(2)で溶出した結合タンパク質を SDS-PAGE により分子量で分画し、銀染色にて検出した。検出されたタンパク質をゲルごと切り出し、脱色、乾燥した。その後、このゲル片を還元・アルキル化したのち、修飾トリプシン(Promega)をゲル片にしみ込ませ、ゲル内消化を行った。消化されてできたペプチド断片を抽出し、ZipTip(Millipore)を用いて脱塩・濃縮し、AnchorChip(Bruker Daltonics)上で乾燥させた。そして、MALDI-TOF MS(Autoflex II, Bruker Daltonics)を用い

て、ペプチド断片の分子量を測定した。その後、見出されたペプチド断片の情報より、結合タンパク質を同定した。

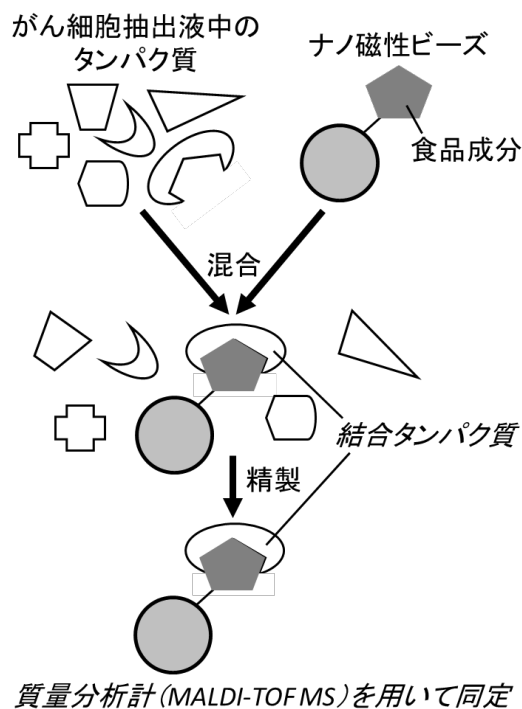


図2. ナノ磁性ビーズを用いた食品成分結合タンパク質の精製と同定

#### (4) RNAi 法を用いた食品成分結合タンパク質の機能解析と生理活性との比較

結合タンパク質に対して、特異的に設計された Stealth siRNA (Invitrogen) を RNAiMAX (Invitrogen) を用いて、各種細胞株に導入した。導入後、WST-8 アッセイにより増殖抑制効果を、フローサイトメトリーを用いて細胞周期、細胞死解析を、RIPA buffer で細胞を溶解し、ウエスタンブロット法によりタンパク質の発現解析を行った。そして、結合タンパク質の発現抑制及び食品成分の添加により引き起こされる変化を解析、比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 食品成分による増殖抑制効果

初めに、各食品成分を培養がん細胞に添加して、がん細胞の増殖への影響を WST-8 アッセイにより解析した。レスベラトロール、エピガロカテキンガレートは前立腺癌細胞株 PC-3 に、フコキサンチンは大腸癌細胞株 HT-29 に、クルクミンは乳癌細胞株 MCF-7 に添加した。すると、それぞれの食品成分による濃度依存性の増殖抑制効果が確認された。さらに、フローサイトメトリーによる細胞周期解析により、フコキサンチンによる G1 期での細胞周期停止、レスベラトロールとクルクミンによる細胞死の誘導が認められた。これらの結果より、使用した癌細胞株の中には、これらの食品成分が標的とするタンパク質が存在することが示唆された。

#### (2) 食品成分固定化ビーズを用いた食品成分結合タンパク質の精製と網羅的同定

食品成分の直接の結合タンパク質を精製、同定するために、ケミカルバイオロジー分野で用いられているナノ磁性ビーズに食品成分を固定化した。レスベラトロール、クルクミン、エピガロカテキンガレートは、以前に開発したポリフェノール固定化法 (Iizumi Y., *et al.*, PLoS One, 2013) を用いて、ナノ磁性ビーズに固定化した。フコキサンチンに関しては、独自で新規固定化法 (未発表) を開発し、ナノ磁性ビーズに固定化した。そして、(1) で標的タンパク質の存在が示唆された癌細胞株の細胞抽出液を調製し、食品成分固定化ビーズと混合し、結合タンパク質を精製した。すると、銀染色による検出により、それぞれの食品成分に対する結合タンパク質が複数見出された。見出された結合タンパク質を質量分析計を用いて解析することで、各食品成分に対する結合タンパク質を複数同定することに成功した。

#### (3) フコキサンチン結合タンパク質 FBP1 を介した、フコキサンチンによる増殖抑制メカニズムの解析

(2) において同定されたフコキサンチン結合タンパク質の中で、最も多く精製されてきたタンパク質を FBP1 (fucoxanthin-binding protein 1) と名付けた。RNAi 法を用いた FBP1 の発現抑制により、FBP1 の機能解析を行った。すると、フコキサンチン添加と同様に、FBP1 の発現抑制により、大腸癌細胞株 HT-29 の増殖抑制と G1 期での細胞周期停止が引き起こされた。その分子メカニズムを解析すると、

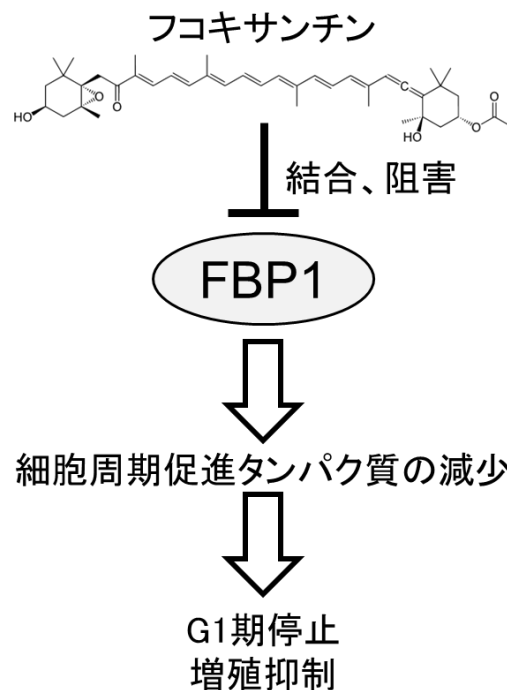


図3. フコキサンチンによる増殖抑制メカニズム

フコキサンチン添加及び FBP1 の発現抑制により、細胞周期を G1 期から S 期に移行するために必須であるタンパク質が減少していることが明らかになった。さらに、FBP1 によるその細胞周期進行に必須なタンパク質の安定化機構もわかってきた。このような結果より、フコキサンチンは FBP1 に結合し阻害することで、細胞周期の進行に必須であるタンパク質の発現を低下させ、がん細胞の増殖を抑制することが示唆された(図 3)。現在、論文投稿に向けて、詳細に FBP1 の機能解析を行っている。

#### (4) レスベラトロール結合タンパク質 RBP1 を介した、レスベラトロールによる増殖抑制メカニズムの解析

(2)において同定されたレスベラトロール結合タンパク質の中で、競合阻害実験により結合がより明確になったレスベラトロール結合タンパク質を RBP1 (resveratrol-binding protein 1)と名付けた。RNAi 法を用いて、前立腺癌細胞株 PC-3 において RBP1 の発現抑制を行い、RBP1 の機能解析を行った。すると、レスベラトロール添加と同様に、RBP1 の発現抑制により、細胞死を伴う PC-3 細胞の増殖抑制が引き起こされた。さらに、レスベラトロール添加及び RBP1 の発現抑制により、主要な増殖促進経路の一つが抑制されていることが明らかになった。このような結果より、レスベラトロー

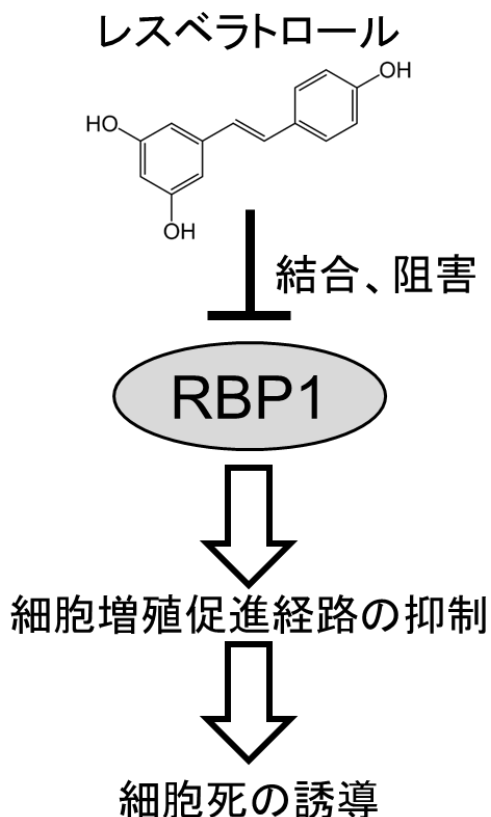


図4. レスベラトロールによる増殖抑制メカニズム

ルは RBP1 に結合し阻害することで、主要な増殖促進経路の一つを阻害し、細胞死を誘導することが示唆された(図 4)。現在、論文投稿中である。

#### (5) クルクミン結合タンパク質 CBP1 を介した、クルクミンによる増殖抑制メカニズムの解析

(2)において同定されたクルクミン結合タンパク質について、文献ベースで機能を調べた結果、炎症や細胞死抵抗性を制御する転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化するタンパク質 (CBP1: curcumin-binding protein 1 とする) が見つかった。乳癌細胞株 MCF-7 において、この CBP1 を発現抑制すると、クルクミン添加と同様に、NF- $\kappa$ B により発現誘導される抗アポトーシスタンパク質の発現が抑制され、細胞死が誘導された。現在、クルクミンがどのようにして CBP1 を阻害するのか、その詳細なメカニズムを解析している。

#### (6) 食品成分結合タンパク質から考えるがんのテーラーメイド予防の可能性

本研究により、代表的な食品成分に対する直接の標的タンパク質が明らかになってきた。直接の標的タンパク質であるため、これら FBP1 や RBP1 の発現量の差や遺伝子多型により、フコキサンチンやレスベラトロールの効果の強さが左右されることが考えられる。標的タンパク質の情報に基づいて、将来、がんのテーラーメイド予防ということも可能になってくるかもしれない。

### 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 5 件)

Sun Q, Yogosawa S, Iizumi Y, Sakai T, Sowa Y. "The alkaloid emetine sensitizes ovarian carcinoma cells to cisplatin through downregulation of bcl-xL." *Int J Oncol.* 46(1):389-94, 2015. 査読有 DOI: 10.3892/ijo.2014.2703

Iizumi Y, Oishi M, Taniguchi T, Goi W, Sowa Y, Sakai T. "The flavonoid apigenin downregulates CDK1 by directly targeting ribosomal protein S9." *PLoS One.* 8(8):e73219, 2013. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0073219

\*Oishi M, \*Iizumi Y, Taniguchi T, Goi W, Miki T, Sakai T. (\*Co-first author) "Apigenin sensitizes prostate cancer cells to Apo2L/TRAIL by targeting adenine nucleotide translocase-2." *PLoS One.* 8(2):e55922, 2013. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0055922

Hotta K, Nashimoto A, Yasumura E, Suzuki M, Azuma M, Iizumi Y, Shima D, Nabeshima R, Hiramoto M, Okada A, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Ito T, Ando H, Sakamoto S, Kabe Y, Aizawa S, Imai T, Yamaguchi Y, Watanabe H, Handa H. "Vesnarinone suppresses TNF $\alpha$  mRNA expression by inhibiting valosin-containing protein." *Mol Pharmacol.* 83(5):930-8, 2013. 査読有 DOI: 10.1124/mol.112.081935

Koyama M, Sowa Y, Hitomi T, Iizumi Y, Watanabe M, Taniguchi T, Ichikawa M, Sakai T. "Perillyl alcohol causes G1 arrest through p15<sup>INK4b</sup> and p21<sup>WAF1/Cip1</sup> induction." *Oncol Rep.* 29(2):779-84, 2013. 査読有 DOI: 10.3892/or.2012.2167

[学会発表](計10件)

飯泉陽介 他、がん分子標的予防の実現に向けて(シンポジウム・招待講演)、第85回日本衛生学会学術総会、2015年3月27日、和歌山県民文化会館(和歌山県・和歌山市)

飯泉陽介 他、ポリフェノール結合タンパク質同定法の開発と細胞周期制御機構の解析(口演)、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

飯泉陽介 他、ポリフェノール標的タンパク質同定法の開発と作用機序解明(口演)、第18回日本がん分子標的治療学会学術集会、2014年6月26日、TKPガーデンシティ仙台(宮城県・仙台市)

飯泉陽介 他、ケミカルバイオロジーを用いたポリフェノール標的タンパク質の同定法(ポスター発表)、第21回日本がん予防学会総会、2014年6月14日、国立がん研究センター築地キャンパス(東京都・中央区)

飯泉陽介 他、ポリフェノール結合タンパク質の比較によるアピゲニンの TRAIL 感受性増強機構の解明(口演)、第84回日本衛生学会学術総会、2014年5月26日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

飯泉陽介 他、ポリフェノール標的タンパク質の同定法とその応用(ポスター発表)、第84回日本衛生学会学術総会、2014年5月26日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

飯泉陽介 他、ポリフェノール標的タンパク質の同定法の開発(口演)、第13回分子予防環境医学研究会、2014年1月

31日、和歌山県民文化会館(和歌山県・和歌山市)

飯泉陽介 他、ポリフェノール結合タンパク質の同定と比較によるアピゲニンの TRAIL 感受性増強機構の解明(口演)、第20回日本がん予防学会総会、2013年7月6日、日本薬学会長井記念館(東京都・渋谷区)

飯泉陽介 他、ポリフェノール結合タンパク質の同定と比較による、アピゲニンの抗腫瘍性サイトカイン TRAIL 感受性増強機構の解明(口演)、第17回日本がん分子標的治療学会学術集会、2013年6月14日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

飯泉陽介 他、ケミカルバイオロジーを活用した抗癌剤開発と癌予防研究(ポスター発表)、日本ケミカルバイオロジー学会第6回年会、2011年5月25日、東京工業大学・大岡山キャンパス(東京都・目黒区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯泉 陽介 (Iizumi, Yosuke)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：20533178