

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790669

研究課題名（和文）発癌二大シグナル伝達経路を標的とした食品成分による分子標的癌予防法の開発

研究課題名（英文）Basic research for development of cancer prevention by inhibitory effect of food constituents on the signal transduction pathways associated with carcinogenesis

研究代表者

与五沢 真吾 (YOGOSAWA SHINGO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：70381936

研究成果の概要（和文）：細胞増殖を亢進するリン酸化シグナル伝達経路、MEK-ERK 経路と PI3K-Akt 経路は多くの癌細胞において異常亢進がみとめられている。近年、マウス発癌モデルによる研究から、これらの経路の異常亢進が発癌を促進することが示唆され、癌治療のみならず、癌予防においても重要な分子標的として注目されている。そこで、このシグナル伝達経路を食品成分により阻害し、癌細胞の増殖を抑制することを試みた。まず、キャベツやブロッコリー等のアブラナ科野菜に含まれるブラシニンに注目し、ヒト大腸癌細胞 HT-29 に対し PI3K-Akt 経路を阻害することにより細胞増殖を抑制すること、及びその分子メカニズムを解析した。また、MEK-ERK 経路阻害効果等が報告されているクルクミンの半量体であり、ショウガ等の含有成分であるデヒドロジゲロンの、ヒト大腸癌細胞に対する増殖抑制効果を見出し、それには細胞内における活性酸素種 (ROS) の蓄積が関与していることが判明した。また、ヒト子宮体癌 HEC-1A 細胞において、PI3K-Akt 経路阻害剤とヒストンデアセチラーゼ阻害剤の併用が有効であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：MEK-ERK or PI3K-Akt signal transduction pathways are accelerated in many cancers and considered to be the very important molecular targets not only for the cancer therapy but also for the cancer prevention. To develop a novel strategy for cancer prevention targeting the major signal transduction pathways associated with carcinogenesis by food constituents, growth inhibitory effect of brassinin or dehydrozingerone on human colon cancer cells was studied and the molecular mechanisms were analyzed. Brassinin, derived from cruciferous vegetables like cabbage or broccoli, repressed the growth of human colon cancer HT-29 cells mediated by inhibition of PI3K-Akt pathway. Dehydrozingerone, derived from a ginger, and is known as a structural half analogue of curcumin, which is known to inhibit MEK-ERK pathway. Dehydrozingerone repressed the growth of HT-29 cells in association with accumulation of intracellular reactive oxygen species (ROS). In addition, combination of a PI3K inhibitor with histone deacetylase inhibitor was shown to be useful for growth inhibition of human endometrial carcinoma HEC-1A cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：予防医学、食品成分、癌予防、細胞増殖シグナル伝達系

1. 研究開始当初の背景

我が国の癌死亡者数は増加の一途を辿り、画期的な癌予防法が求められている。癌細胞の最も重要な性質として、無秩序な細胞増殖と細胞死抵抗性があげられるが、細胞増殖因子及びその受容体を介して伝達される MEK-ERK 経路と PI3K-Akt 経路は殆どの癌で異常亢進が観察され、細胞周期の亢進と細胞死抵抗性を獲得して発癌へと導く二大経路と位置付けられている (*Clin. Cancer Res.* 15:4518, 2009)。実際に、抗癌剤開発において重要な標的と考えられ、ゲフィチニブ (イレッサ) をはじめとして現在も盛んに国際的な開発競争が繰り広げられている。さらに治療のみならず予防にも、これらの経路を標的とするものの有効性が示唆された (*Carcinogenesis* 28:2476, 2007、*Nature Med.* 16:665, 2010)。しかしながら、治療を目的に開発された分子標的抗癌剤は高価で副作用も強いため、癌予防を考える場合、分子標的抗癌剤の代わりに食品成分を用いることはできないかと考えた。

2. 研究の目的

癌予防効果が期待される食品成分の細胞増殖抑制効果を、発癌へと導く細胞増殖シグナル伝達経路の抑制という観点から、分子機構を解明し、科学的根拠に立脚した効果の高い、食品成分同士の組合せを見出す。本研究の成果が、食品成分による癌予防法に対する新たなエビデンスとなって、分子機構に立脚した合理的な適用が可能になれば、国民の食生活の改善、癌発生の予防、発症年齢の大幅遅延、癌による死亡者数の低下へと繋がることが期待される。

3. 研究の方法

癌抑制遺伝子 p53、癌遺伝子 Ras が変異しており、MEK-ERK 経路、PI3K-Akt 経路がともに活性化していると考えられるヒト大腸癌由来 HT-29 細胞を主に用いて、以下のような手法を用いて研究を行った。

(1) 細胞増殖測定

食品成分や薬剤を培養細胞の培地に直接添加し、24-72 時間後における濃度依存的な細胞増殖効果を WST-8 アッセイや ViaCount アッセイにより測定した。

(2) フローサイトメトリーによる細胞周期・

アポトーシス解析

細胞を裸核後、核内 DNA を染色し、フローサイトメーターを用いて細胞周期及びアポトーシス細胞の割合を解析した。

(3) イムノブロット解析

細胞内シグナル伝達経路に関わる各種キナーゼや基質タンパク質、細胞周期調節因子、アポトーシス調節因子について、細胞内におけるタンパク質レベルでの発現変化をイムノブロット解析により調べた。

(4) リアルタイム RT-PCR 解析

細胞内シグナル伝達経路に関わる各種キナーゼや基質タンパク質、細胞周期調節因子、アポトーシス調節因子について、リアルタイム RT-PCR 法により mRNA レベルでの発現変化について調べた。

(5) 遺伝子ノックダウン実験

(3)、(4) で変化のみられた因子の発現を siRNA を細胞にトランスフェクションすることにより特異的に阻害し、その因子が細胞増殖抑制、細胞周期停止、アポトーシス誘導等にどの程度関与しているのかを確認した。

(6) 遺伝子強制発現実験

(5) とは逆に、細胞増殖抑制効果に対する関与が考えられる因子を、発現ベクターを用いて細胞内で強制発現させることにより、その因子が細胞増殖抑制、細胞周期停止、アポトーシス誘導等にどの程度関与しているのかを確認した。

(7) 活性酸素種 (ROS) 測定

活性酸素種 (ROS) 検出試薬 CMH₂-DCFDA で細胞を処理し、フローサイトメーターを用いて細胞内蓄積量を測定した。

4. 研究成果

(1) ブラシニンは PI3K-AKT 経路阻害を介して細胞周期停止を誘導する (雑誌論文①, 学会発表②、⑥より)

ブロッコリー等のアブラナ科植物に含まれるフィトアレキシンの一種であるブラシニンの細胞増殖抑制効果のメカニズムの一部を解明した。ブラシニンをヒト大腸癌由来 HT-29 細胞に添加すると、濃度依存的に細胞増殖が阻害された。フローサイトメトリー解析を行うと、G1 期停止が濃度依存的に誘導されていた (図 1)。イムノブロット解析により、細胞周期 G1 期調節に関わる因子群の発現を調べると、CDK インヒビターである p21、p27 の発現が誘導されていることが判明した。さ

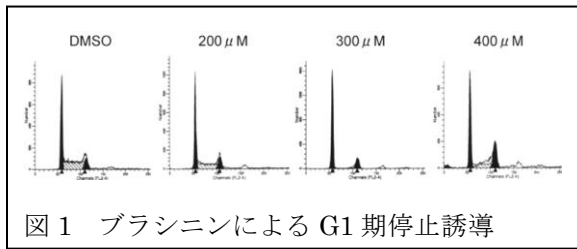


図1 ブラシニンによる G1 期停止誘導

らに、それに伴う癌抑制遺伝子 RB の脱リン酸化も観察された。リアルタイム RT-PCR 法により mRNA の発現量を調べると、p21 mRNA の発現上昇が観察された。siRNA を用いて p21、p27 の発現を抑制すると、ブラシニンによる G1 期停止誘導効果が有意に抑制された。また、ブラシニン処理により、多くの癌細胞で活性化されている細胞増殖シグナル伝達系の一つである、PI3K-Akt 経路が不活性化されていることが、イムノブロット法により判明した (図 2)。

PI3K-Akt 経路阻害剤

(LY294002、Akt IV) で処理すると、ブラシニン同様に G1 期停止誘導と、p21 および p27 の発現上昇が観察された。さらに、一過性に恒常的活性化型変異体 Akt を過剰発現させると、ブラシニンによる G1 期停止効果が有意に抑制された (図 3)。

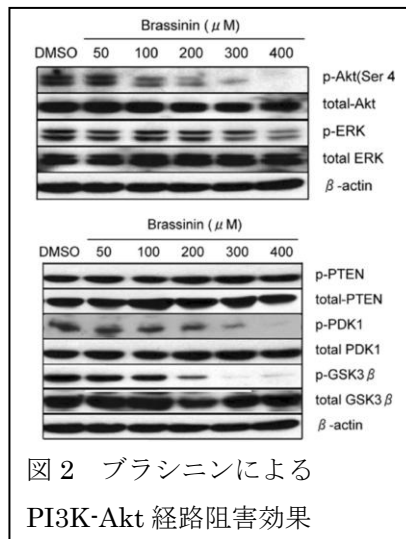


図2 ブラシニンによる PI3K-Akt 経路阻害効果

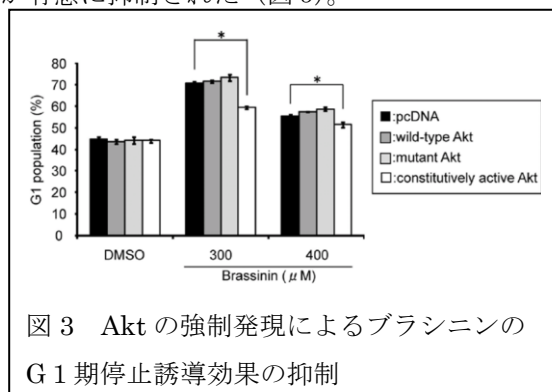


図3 Akt の強制発現によるブラシニンの G1 期停止誘導効果の抑制

以上の結果から、ブラシニンはヒト大腸癌細胞に対して PI3K-Akt 経路を阻害し、p21 および p27 の発現上昇を介して G1 期停止を誘導していると考えられた。本研究により、ブラシニンを PI3K-Akt 経路阻害効果のある食品成分として、癌予防に利用できる可能性が

示された。

(2)デヒドロジゲロンによる ROS 依存的な細胞増殖抑制効果 (雑誌論文③、学会発表③、④、⑤より)

デヒドロジゲロン (DHZ) はショウガ (*Zingiber officinale*) 根茎に多く含まれる辛味成分の一種として知られており、クルクミンの半量体の構造をしている。クルクミンはウコン等に含まれる黄色色素で、様々な細胞生物学的実験や動物実験により、癌予防効果をもっとも期待されている食品成分のひとつであり、抗酸化・抗炎症作用や MEK-ERK 経路阻害作用等が知られ、分子メカニズムについても多くの研究報告がある。一方で、DHZ の癌との関わりについての研究報告はこれまでほとんどなかったが、本研究によりその一端が明らかとなった。

ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞に対し、DHZ、クルクミンは共に濃度依存的に細胞増殖抑制効果を示した。ViaCount アッセイにより死細胞の割合を測定した結果、クルクミンにおいては細胞増殖抑制効果が観察される濃度で死細胞割合の上昇が観察されたが、DHZ 処理細胞では死細胞の割合がクルクミンのようには増加しなかったことから、DHZ による細胞増殖抑制の主な原因は、クルクミンとは対照的に、細胞死誘導ではないと考えられた

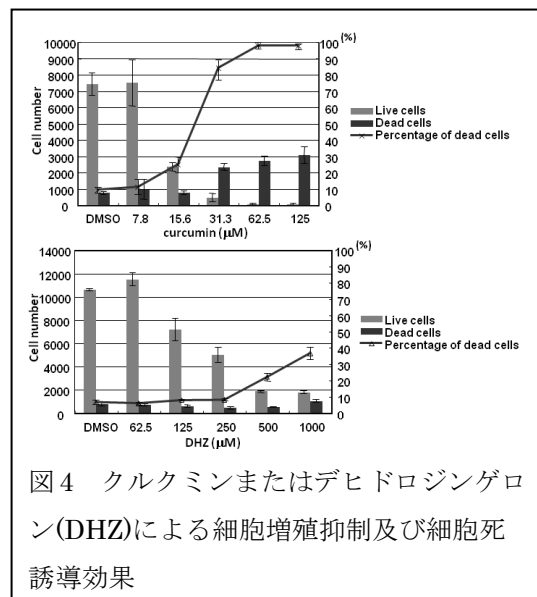


図4 クルクミンまたはデヒドロジゲロン(DHZ)による細胞増殖抑制及び細胞死誘導効果

(図 4)。細胞周期解析の結果、DHZ 処理により G2/M 期の割合は増加したが、アポトーシスについては顕著な変化がみられなかった。また、細胞内活性酸素種 (ROS) 検出プローブである CM-H₂DCFDA を用いて細胞内 ROS を測定すると、DHZ 処理による細胞内 ROS の蓄積が観察された。ROS スカベンジャーである N-アセチルシステイン (NAC) を DHZ と同時併用処理すると、細胞内 ROS 蓄積は DHZ 単独処理の場合と比較して減弱した。このとき細胞周

期を解析すると、G2/M 期停止が抑制されていた (図 5)。また、DHZ の異性体間での細胞増

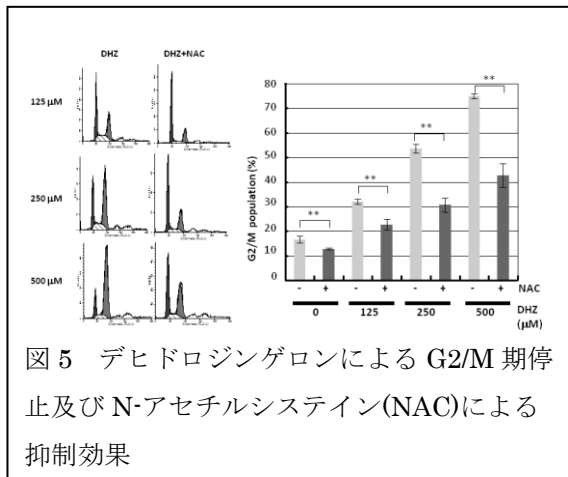


図 5 デヒドロジゲロンによる G2/M 期停止及び N-アセチルシステイン(NAC)による抑制効果

殖効果及び細胞内 ROS 蓄積効果を比較解析すると、両者の間に正の相関関係がみとめられた。

以上の結果から、HT-29 細胞に対する DHZ による細胞増殖抑制効果は、細胞内 ROS の蓄積によって引き起こされる細胞周期 G2/M 期停止を介して起こっているものと考えられた。本研究により、DHZ の癌細胞増殖抑制効果とその分子メカニズムが一部明らかになった。今後は研究を進展させ、DHZ をより適切かつ効果的に利用した癌予防法を考えていきたい。

(3)PI3K 阻害剤と HDAC 阻害剤による子宮体癌細胞におけるアポトーシス増強効果 (雑誌論文④より)

子宮体癌では、PI3K/Akt 経路が亢進している場合が多いといわれている。ヒト子宮体癌由来 HEC-1A 細胞においてイムノブロット法で調べると、MEK-ERK 経路と PI3K-AKT 経路の両方が活性化されていたため、MEK 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用を試みたが、PI3K 阻害剤の効果がみられただけで、両者の併用効果はみられなかった。そこで、HEC-1A 細胞においては、p53 も変異により失活している点に着目し、p53 が失活している癌に対して有効性が高いと考えられる HDAC 阻害剤との併用効果について検討した。LY294002 (PI3K 阻害剤)

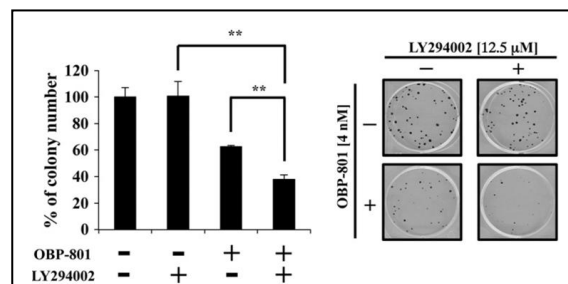


図 6 OBP-801、LY294002 の単独及び併用処理によるコロニー形成能の低下

単剤、OBP-801 (HDAC 阻害剤) 単剤もしくは併用処理により、濃度依存的に細胞増殖抑制効果が示された。コロニー形成能は、両者の併用により著しく抑制された (図 6)。フロー

サイトメーターを用いて解析すると、それぞれの単剤処理ではアポトーシスの増加はほぼ認められなかったが、併用処理により相乗的なアポトーシスの増加が認めら

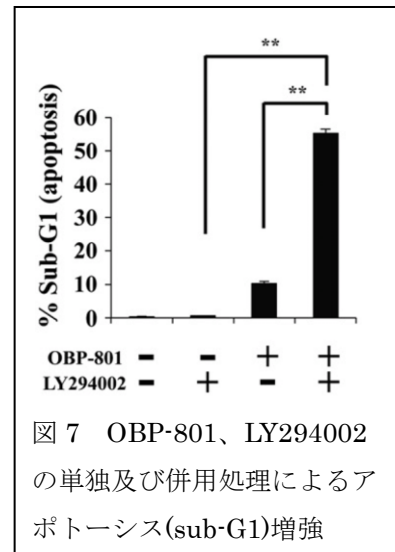


図 7 OBP-801、LY294002 の単独及び併用処理によるアポトーシス(sub-G1)増強

れた (図 7)。ウエスタンブロット解析によりアポトーシス関連タンパク質の発現を調べると、LY294002 と OBP-801 の併用処理により、pro-apoptotic な活性をもつ Bim の発現上昇と、カスパーゼ経路の活性化が観察され、Bim 発現を siRNA により低下させることによりアポトーシスが抑制された。また、細胞内活性酸素種 (ROS) 検出プローブである CM-H₂DCFDA を用いて細胞内 ROS を測定したところ、併用処理により細胞内 ROS の蓄積がみられた。ROS スカベンジャーである N-アセチルシステイン (NAC) を LY294002、OBP-801 併用処理時に加えると、細胞内 ROS の蓄積が減少し、Bim の発現上昇が抑制され、アポトーシスの割合も低下することが判明した。またマウス xenograft モデルを用いた in vivo の実験系においても、LY294002、OBP-801 併用群においては腫瘍増殖が抑制される傾向がみられた (図 8)。

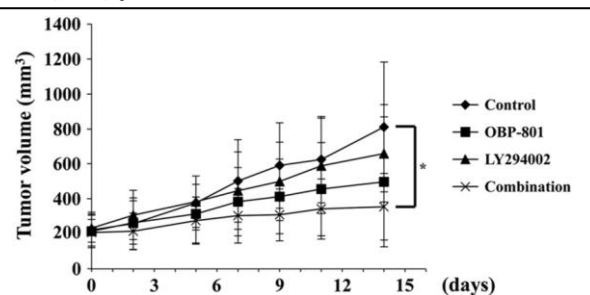


図 8 スードマウス皮下移植モデルにおける OBP-801、LY294002 の単独及び併用投与による腫瘍増殖抑制効果

以上より、子宮体癌 HEC-1A 細胞に対し、LY294002 と OBP-801 を併用することによる相乗的な細胞増殖抑制は、アポトーシス誘導効

果によるものであり、分子メカニズムとして細胞内 ROS の蓄積、Bim の活性化が関与している可能性が示唆された。PI3K 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用は、子宮体癌に対する有効な治療戦略となる可能性がある。今後はこの併用戦略が子宮体癌予防にも応用できる可能性について、まず、今回用いた PI3K 阻害剤と HDAC 阻害剤を、同様の生理活性をもった食品成分に代替できるかどうか、検討していく予定である。

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 4 件)

① Izutani Y, Yogosawa S, Sowa Y, Sakai T. Brassinin induces G1 phase arrest through increase of p21 and p27 by inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in human colon cancer cells, *International Journal of Oncology*, 査読有, 40, 2012, 816-824
DOI: 10.3892/ijo.2011.1246

② Tophkhane C, Yang SH, Jiang Y, Ma Z, Subramaniam D, Anant S, Yogosawa S, Sakai T, Liu WG, Edgerton S, Thor A, Yang X. p53 inactivation upregulates p73 expression through E2F-1 mediated transcription, *PLoS One*, 査読有, 7, 2012, e43564
DOI: 10.1371/journal.pone.0043564

③ Yogosawa S, Yamada Y, Yasuda S, Sun Q, Takizawa K, Sakai T. Dehydrozingerone, a structural analogue of curcumin, induces cell-cycle arrest at the G2/M phase and accumulates intracellular ROS in HT-29 human colon cancer cells, *Journal of Natural Products*, 査読有, 75, 2012, 2088-2093
DOI: 10.1021/np300465f

④ Yoshioka T, Yogosawa S, Yamada T, Kitawaki J, Sakai T. Combination of a novel HDAC inhibitor OBP-801/OBP-801 and a PI3K inhibitor LY294002 synergistically induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells due to increase of Bim with accumulation of ROS, *Gynecologic Oncology*, 査読有, 129, 2013, 425-432
DOI: 10.1016/j.ygyno.2013.02.008

[学会発表] (計 6 件)

① 与五沢真吾, 瀧澤香織, 孫琦, 曾和義広, 酒井敏行, インドール-3-カルビノールとガラングンの併用による細胞死増強, がん予防大会 2011 京都, 2011 年 6 月 21 日, 京都府立医科大学

② 与五沢真吾, 泉谷泰行, 曾和義広, 酒井敏行, Brassinin induces G1 phase arrest through increase of p21 and p27 by inhibition of PI3K/Akt signaling pathway, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 5 日, 名古屋国際会議場

③ 与五沢真吾, 山田恭正, 安田周祐, 瀧澤香織, 孫琦, 曾和義広, 酒井敏行, ショウガ由来成分デヒドロジゲロンによる細胞増殖抑制効果, 第 11 回分子予防環境医学研究会, 2012 年 1 月 28 日, 倉敷市民会館

④ 山田恭正, 与五沢真吾, 孫琦, 玉木友梨, 酒井敏行, デヒドロジゲロンのアナログによるヒト大腸がん細胞増殖抑制効果, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 24 日, 京都女子大学

⑤ 与五沢真吾, 山田恭正, 孫琦, 安田周祐, 瀧澤香織, 曾和義広, 酒井敏行, ショウガ由来成分デヒドロジゲロンは ROS 依存的に細胞増殖を抑制する, 第 82 回日本衛生学会学術総会, 2012 年 3 月 25 日, 京都大学

⑥ 与五沢真吾, 泉谷泰行, 曾和義広, 酒井敏行, ヒト大腸癌細胞におけるブラシニンの PI3K-Akt 経路を介する細胞周期停止誘導効果, 第 19 回日本がん予防学会, 2012 年 6 月 23 日, じゅうろくプラザ (岐阜市文化産業交流センター)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

与五沢 真吾 (YOGOSAWA SHINGO)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 70381936

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし