

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24614019

研究課題名(和文)食品含有成分による細胞死誘導リガンド耐性乳癌細胞の治療効果促進機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of anticancer mechanisms of dietary factors on cancer cells

研究代表者

福井 雅之(Fukui, Masayuki)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・研究員

研究者番号：60392502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々が日常摂取している食品成分にも抗癌作用を持つものが存在する。それら成分の内、ビタミンCと不飽和脂肪酸(PUFA)が示す癌細胞増殖抑制メカニズムを解析した。その結果、PUFAは細胞死誘導経路の活性化と同時にオートファジー誘導経路も活性化していた。オートファジーを抑制することでPUFAはより強く細胞死を誘導することを明らかにした。ビタミンCも細胞死誘導とオートファジーを同時に誘導していたが、ビタミンCが誘導するオートファジーは細胞死を誘導するために必要であった。今後、PUFAやビタミンCが誘導する癌細胞死におけるオートファジーの役割を考慮し、治療につなげていく工夫が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Some dietary ingredient have anti-tumor activity. Here, we investigated the mechanisms of anti-tumor activity induced by polyunsaturated fatty acid (PUFA) and vitamin C in vitro and ex vivo models. Both PUFA and vitamin C accumulated intracellular reactive oxygen species (ROS) and resulted in tumor cell death. In addition, we revealed that PUFA can concomitantly induce autophagy, and the induction of autophagy diminishes its ability to induce apoptotic cell death. On the other hand, we also showed that the autophagy activated by vitamin C contributes to caspase-independent cell death. It is therefore suggested that combination of PUFA with autophagy inhibitor may be a useful strategy in increasing the therapeutic effectiveness. Although more studies are needed, the observations made in this study provide an example for future study of the role of autophagy in mediating cell death under certain conditions.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Apoptosis Autophagy ビタミンC 不飽和脂肪酸 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

近年、我々は不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid: PUFA) の一種 DHA と EPA が経口投与により *in vitro* と *in vivo* においてヒト腫瘍細胞に対して細胞死を誘導する事を報告した。この細胞死誘導メカニズムは PUFA 処理により reactive oxygen species (ROS) が細胞内に蓄積し、カスパーゼ 8 の活性化を介してアポトーシスを誘導していた。また、動物実験モデルにおいてビタミン C の経口投与はエストロゲン依存的な腫瘍形成を強く抑制できる事が示されている。しかしながら、経口投与によるビタミン C が誘導する腫瘍細胞特異的な増殖抑制機構は未だ不明な点が多く残されている。高濃度ビタミン C は自身が酸化される事により抗酸化作用を示すが、同時に過酸化水素を大量に産生する。我々はヒト膵臓癌細胞株を用いた *in vitro* と *in vivo* 実験系においてビタミン C が酸化ストレスを誘導することを見出した。これらのことから、食品に含まれる成分を用いて腫瘍細胞特異的に酸化ストレスを誘導し、腫瘍細胞の増殖を抑制することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

癌細胞特異的に細胞死を誘導する事は非常に有効な抗癌治療に繋がる。TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は癌細胞特異的に細胞死を誘導するが、多くの乳癌細胞は TRAIL に対して抵抗性をしめす。そこで本研究では、我々が日常摂取するビタミン C や PUFA が細胞内 ROS の蓄積を誘導し、カスパーゼの活性化を増強することで TRAIL が誘導する癌細胞特異的な細胞死誘導効果を上昇させる可能性を *in vivo*、*in vitro* において検証する。本研究では、まず初めに PUFA とビタミン C それぞれが誘導する癌細胞死の詳細なメカニズムを解析する。最終的にこれらの成分が TRAIL 感受性を上昇させるメカニズムを解析し、これらビタミン C/TRAIL、PUFA/TRAIL の併用が TRAIL 抵抗性を持つ腫瘍に対して、副作用のない治療法となり得る事を示す。

3. 研究の方法

ビタミン C/TRAIL 或いは PUFA/TRAIL 併用の効果を検証するに先立ち、PUFA 単独、ビタミン C 単独の抗腫瘍効果のメカニズムを明らかにする。

(1) ヒト膵臓癌細胞を Athymic *nu/nu* マウスの皮下に移植したマウス xenograft モデルを用いて、*in vivo* での PUFA とビタミン C の経口投与による癌細胞増殖抑制効果を検証する。腫瘍細胞の増殖は腫瘍サイズを経時的に測定した。最終的に摘出した腫瘍組織の重量の比較も行い、腫瘍増殖抑制効果を検討した。

(2) PUFA やビタミン C が誘導する腫瘍細胞特異的な細胞死の誘導メカニズムを解明するために、*in vitro* 実験系においてヒト腫瘍培養細胞株を用いた細胞内シグナル伝達経

路の解析を行う。蛍光指示薬による細胞内 ROS の蓄積や、カスパーゼ阻害剤、オートファジー阻害剤を用いて細胞死誘導メカニズムを解明する。

4. 研究成果

(1) PUFA の一種 DHA と EPA がヒト膵臓癌細胞に細胞死を誘導することを *in vitro*、*in vivo* 両実験系で示した。その癌細胞誘導メカニズムは細胞内 ROS の蓄積によりカスパーゼ 8 が活性化されアポトーシスが誘導されることが判明した。また、EPA によりオートファジーが誘導されていることも明らかにした。EPA 処理された膵臓癌細胞内で誘導されるアポトーシスとオートファジーの関係を調べるために、オートファジーの誘導に関与する分子 Beclin1 をノックダウン (KD) した培養細胞を作成し、この細胞を用いて EPA によるアポトーシスの誘導を解析した。その結果、EPA 処理により Beclin1-KD 膵臓癌細胞はコントロール細胞より細胞死が強く誘導されていた。これらの結果から、EPA はヒト膵臓癌細胞に対してアポトーシス、オートファジー両誘導経路を活性化するが、このオートファジーは細胞死に対して抑制的に働いていることが判明した。今後、これらの結果をもとに EPA とオートファジー阻害剤の併用が膵臓癌細胞増殖抑制に有効かどうかを検証したい。この研究成果は国際誌 Journal of Cellular Biochemistry 2013, 114(1):192-203. において掲載された。

(2) ビタミン C がヒト膵臓癌細胞に細胞死を誘導することを *in vitro*、*in vivo* 両実験系で示した。ビタミン C 処理により細胞内 ROS の蓄積が増加し、細胞死を誘導していることが判明した。ビタミン C が誘導する細胞死は PUFA が誘導する細胞死とは異なり、カスパーゼ非依存的に誘導されていた。オートファジー阻害剤で処理した膵臓癌細胞にビタミン C を作用させたところ、細胞死は顕著に抑制された。このことから、ビタミン C が誘導するオートファジーはカスパーゼ非依存的な細胞死の誘導に関わっていることが示された。この研究成果は国際誌 Planta Medica に掲載されることが決定した。

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)

Masayuki Fukui, Noriko Yamabe, Hye-Joung Choi, Kishore Polireddy, Qi Chen, Bao Ting Zhu. Role of Bcl-2 and Beclin-1 in Ascorbate-induced Autophagy in Human Pancreatic Cancer. *Planta Medica* 査読有 2015, In Press.

Ki Sung kang, Noriko Yamabe, Yujing Wen, Masayuki Fukui, Bao Ting Zhu. Beneficial effects of natural phenolics on levodopa methylation and oxidative neurodegeneration. *Brain Research* 査読有

2013,1497:1-14.D0I:10.1016/j.brainres.2012.11.043.

Masayuki Fukui, Ki Sung Kang, Kazushi Okada, Bao Ting Zhu. EPA, an Omega-3 Fatty Acid, Induces Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells: Role of ROS Accumulation, Caspase-8 Activation, and Autophagy Induction. 査読有
Journal of Cellular Biochemistry 2013,114(1):192-203.D0I:10.1002/jcb.24354.

Xinmiao Fu, Pan Wang, Masayuki Fukui, Cheng Long, Linxiang Yin, Hye Joung Choi, Bao Ting Zhu. PDI is a major intracellular oestrogen-strage protein that modulates tissue levels of oestrogen in the pancreas. 査読有
Biochemical Journal 2012, 447:115-123. DOI:10.1042/BJ20120868

Masayuki Fukui, Hye Joung Choi, Bao Ting Zhu. Rapid generation of mitochondrial superoxide induces mitochondrion-dependent but caspase-independent cell death in hippocampal neuronal cells that morphologically resembles necroptosis. 査読有
Toxicology and Applied Pharmacology. 2012, 262(2):156-166. DOI: 10.1016/j.taap.2012.04.030.

〔学会発表〕(計 12 件)

(1) 梅村正幸、福井雅之、當山清悟、山崎雅俊、福井知穂、照屋尚子、田村敏生、中江進、岩倉洋一郎、松崎吾朗 マイコバクテリア感染における IL-17F 産生細胞の同定 第 88 回日本細菌学会総会、長良川国際会議場(岐阜市) 2015 年 3 月 26-28 日

(2) 山崎雅俊、梅村正幸、福井雅之、松崎吾朗 マイコバクテリア感染肺への CD4+T 細胞の動員に関するケモカイン/ケモカインレセプターの同定 第 88 回日本細菌学会総会、長良川国際会議場 岐阜市 2015 年 3 月 26-28 日

(3) UMEMURA Masayuki, FUKUI Masayuki, YAMASAKI Masatoshi, FUKUI Chiho, NAKAE Susumu, TAMURA Toshiki, MATSUZAKI Goro. Involvement of IL-33 in the protective immunity against lung mycobacterial infection. 第 43 回日本免疫学会総会、京都国際会議場(京都市) 2014 年 12 月 10-12 日

(4) 福井雅之、梅村正幸、山崎雅俊、福井知穂、照屋尚子、中江進、松崎吾朗 マイコバクテリア感染早期におけるインターロイキン(IL)-33の防御効果 第 67 回日本細菌学会九州支部総会、城山観光ホテル(鹿児島市) 2014 年 9 月 5-6 日

(5) 梅村正幸、福井雅之、當山清吾、山崎雅俊、福井知穂、照屋尚子、中江進、岩倉洋一郎、松崎吾朗 マイコバクテリア感染における IL-17 サイトカインファミリーの防御能 第 67 回日本細菌学会九州支部総会、城山観光ホテル(鹿児島市) 2014 年 9 月 5-6 日

(6) 福井雅之、梅村正幸、松崎吾朗 新規抗

肺結核ワクチン戦略による早期防御免疫応答の増強 第 25 回日本生体防御学会学術総会、東北大学片平さくらホール 2014 年 7 月 9-11 日

(7) 梅村正幸、福井雅之、福井知穂、中江進、松崎吾朗 IL-33 のマイコバクテリア感染防御免疫に対する増強効果 第 25 回日本生体防御学会学術総会、東北大学片平さくらホール 2014 年 7 月 9-11 日

(8) Masayuki Fukui, Masayuki Umemura, Takeshi Miyata, Tetsuya Harakuni, Takeshi Arakawa, Goro Matsuzaki. Combined vaccination of subcutaneous BCG and intranasal HBHA with cholera toxin enhances early protective immunity against pulmonary M. tuberculosis infection. IMMUNOLOGY 2014, American Association of Immunologists Annual Meeting, Pittsburgh, Pennsylvania,USA. 2014 年 5 月 2-6 日

(9) Masayuki Umemura, Seigo Touyama, Masayuki Fukui, Chiho Fukui, Susumu Nakae, Yoichiro Iwakura, Goro Matsuzaki. Role of IL-17 in chronic pulmonary mycobacterial infection. IMMUNOLOGY 2014, American Association of Immunologists Annual Meeting, Pittsburgh, Pennsylvania,USA. 2014 年 5 月 2-6 日

(10) Masayuki Fukui, Masayuki Umemura, Takeshi Miyata, Tetsuya Harakuni, Takeshi Arakawa, Goro Matsuzaki. Induction of early protective immunity against pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection in mice by combination of BCG priming vaccine and boosting mucosal vaccine with a recombinant mycobacterial antigen. Annual meeting of The Japanese Society for Immunology,2013. 幕張メッセ(千葉市) 2013 年 12 月 11-13 日

(11) 梅村正幸、當山清吾、福井雅之、福井知穂、中江進、岩倉洋一郎、松崎吾朗 マイコバクテリア感染肺における IL-17F 産生細胞の同定とその局在性 くまもと森都心プラザ プラザホール(熊本市) 2013 年 7 月 10-12 日

(12) Masayuki Fukui, Masayuki Umemura, Goro Matsuzaki. Eicosapentaenoic acid induces apoptosis in pancreatic cancer cells: Role of ROS accumulation, caspase 8 activation, and autophagy induction. IMMUNOLOGY 2013, American Association of Immunologists Annual Meeting, Honolulu, Hawaii,USA. 2013 年 5 月 3-7 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 雅之 (FUKUI, Masayuki)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・研究員

研究者番号：60392502

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：