

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659304

研究課題名(和文) MMP-8 分泌誘導成分による新規癌の「分子標的併用予防法」

研究課題名(英文) Novel molecular-targeting prevention of cancer by inducers of MMP-8 release

研究代表者

友杉 真野(堀中真野)(TOMOSUGI(HORINAKA), Mano)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80512037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)： TRAILは、癌細胞特異的にアポトーシスを誘導するサイトカインであり、癌予防に寄与している。申請者らは、TRAILの分泌機構としてMMP-8の関与を見出した。さらに、好中球のMMP-8放出を促進し、TRAIL放出を著明に促進する成分として酪酸菌を報告した(Int J Oncol, 42, 903, 2013)。さらなる分子標的癌予防法の提案を目指し、MMP-8、TRAILの産生を誘導する新たな癌予防食品成分を見出すことを第一の目的とした。免疫賦活作用を有する成分を中心に、複数の候補薬剤から探索を行った結果、本研究期間内では酪酸菌に比して十分な効果を有するものは見出すことができなかった。

研究成果の概要(英文)： TRAIL is cytokine which can induce apoptosis against cancer cells, and has contributed to cancer prevention. We found that matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) is one of the key factors responsible for the release of TRAIL, and we have shown that butyric acid bacterium promotes the release of MMP-8 and induces the release of endogenous TRAIL from neutrophils (Int J Oncol, 2013, 42:903). We therefore hypothesized that we could find the cancer preventive food factors by detecting factors to release MMP-8 with up-regulation of TRAIL. We then performed a screening for a variety of candidates such as the ingredients with immunostimulatory action. However, the candidate with sufficient effect was not found as compared with the butyric acid bacterium.

研究分野：医歯薬学

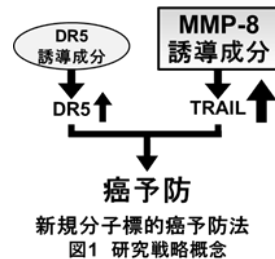
科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：マトリックスメタロプロテアーゼ 癌 TRAIL 免疫

1. 研究開始当初の背景

TRAIL や TRAIL 受容体をノックアウトしたマウスは発癌率の増加を示したことから、TRAIL は癌予防においても極めて重要であることが明らかにされた (*J. Immunol.*, 175, 5586, 2005, *JCI*, 118, 100, 2008, *JCI*, 118, 111, 2008)。また、癌治療においても注目されており、組換え型 TRAIL は、前臨床試験において明らかな毒性なしに腫瘍退縮効果を示したことから (*EMBO J.*, 16, 5386, 1997) 現在では臨床試験が進行中である。

申請者らは、癌予防戦略として TRAIL 経路に着目し、TRAIL 受容体の一つである DR5 の発現誘導能を有する天然由来癌予防成分を数多く見出し、報告している (*Horinaka et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 5, 945, 2006 など 18 報、図 1)。さらに、ヒトリンパ球から TRAIL の産生を誘導する成分として、乳酸菌 (*Horinaka et al.*, *FEBS Lett.*, 584, 577, 2010) と、ヒト好中球から TRAIL の分泌を誘導する成分として、酪酸菌 (*Int J Oncol.*, 42, 903, 2013) を見出した。



癌において、MMP は癌転移に寄与する酵素であり、MMP 阻害は浸潤転移抑制のキーと信じられてきた。その中で他の MMP とは異なり、MMP-8 に関してはノックアウトマウスで癌が発生したことから (*Nat. Genet.*, 35, 252, 2003)。

MMP-8 は例外的に癌予防に寄与していると考えられている。実際に、申請者らは、好中球において MMP-8 が TRAIL の分泌誘導に寄与していることを見出した (図 2,3, *Int J Oncol.*, 42, 903, 2013)。

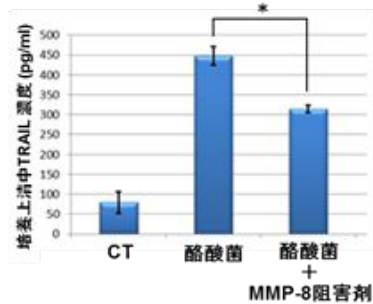


図2 ヒト好中球培養上清中において、酪酸菌によって増強された分泌型 TRAIL 量および MMP-8 阻害剤の影響
*: P<0.01

生体内における TRAIL は、膜結合型と分泌型で存在する (図 4) ことが知られていたが、その細胞外分泌機構は全く不明であった。

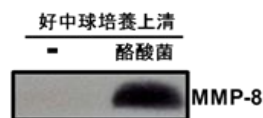


図3 好中球から培養上清中への MMP-8 の放出量が酪酸菌刺激によって増強される。



申請者らは、ヒト培養細胞を用いて TRAIL 強制発現細胞株を作成し、その細胞において siRNA を用いて MMP-8 の発現をノックダウンしたところ、上清中 TRAIL 量の顕著な減少を認めた。さらに、TRAIL のアミノ酸配列中の MMP-8 切断予測配列に変異を導入したところ、野生型 TRAIL の強制発現と比較し、顕著に上清中 TRAIL 量が減少したことから、TRAIL の細胞外分泌における MMP-8 の重要性を証明できた (*Int J Oncol.*, 42, 903, 2013)。

こういった背景から、今後、内在性 TRAIL 活性化を介した癌予防法の提案を目指すためには、TRAIL 切断酵素の活性化も重要であると考えられる。MMP-8 の活性化が TRAIL の分泌誘導につながるのであれば、MMP-8 が癌予防において新たな分子標的になりうる (図 1)。

2. 研究の目的

MMP-8 を活性化する成分および、DR5 の発現を誘導する成分を探索することにより、新規分子標的癌予防法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 好中球・末梢血単核球(PBMC)の分離

健康人ボランティアよりインフォームド・コンセントを得た後、採血を行い、polymorphs 溶液にて好中球を分離した。

(2) 薬剤処理

文献に基づいた免疫賦活成分を中心に、MMP-8 活性化候補薬剤を選出した (capsaicin および、成果記載の図 8 参照)。各種薬剤を用い、表記濃度で好中球、PBMC の培地に添加。好中球の場合、2 hr および 6 hr 後に細胞・細胞上清を回収。PBMC の場合、24 hr 後に細胞・細胞上清を回収した。

新規 DR5 誘導剤の探索には、ヒト大腸癌細胞株 HCT116 を用いた。

(3) ELISA による培養上清中 TRAIL の測定

2) で回収した細胞培養上清を遠心 (1000 rpm × 5 min, 4℃) し、浮遊細胞を除去後、-80℃ に保存。後日、Abcam 社 TRAIL ELISA kit により、上清中 TRAIL 量の測定を行った。

(4) Western blotting による培養上清中 MMP-8、TRAIL および細胞内 DR5 発現量の測定

MMP-8、TRAIL に関しては、2) で回収した好中球培養上清を用い、等量の 2 × SDS バッファーと混合し、加熱処理 (98℃, 5 min)。SDS-PAGE、transfer の条件は既報の通り (*Int J Oncol.*, 42, 903, 2013)。*ブロッキング条件を、8% スキムミルクに変更。

DR5 の場合、薬剤処理後 24 hr の HCT116 細胞を回収し、Western blotting に用いた。

4. 研究成果

(1) 候補薬剤の MMP-8 活性化能および TRAIL 産生促進能の評価

文献を基に、まず capsaicin に着目した。図 5 に示す濃度で好中球に処理し、2 hr 後、6 hr 後の培養上清サンプルの Western blotting により、MMP-8、TRAIL の産生（放出）量の変化について調べた（図 5、図 6）。

その結果、capsaicin 刺激後 6 hr のサンプルにおいては MMP-8 産生（放出）量の増加が認められたが、上清中 TRAIL の増強については認められなかった。

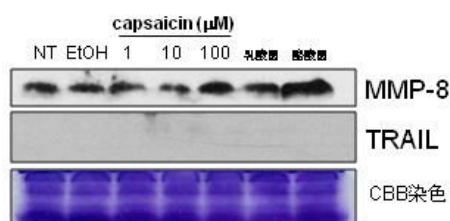


図5 薬剤添加後2 hrの好中球培養上清サンプル

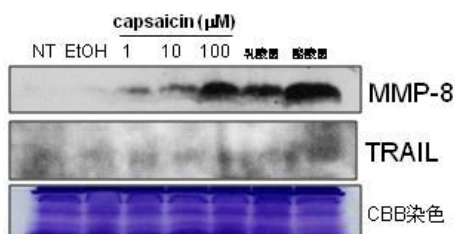


図6 薬剤添加後6 hrの好中球培養上清サンプル

一方、PBMC に対して capsaicin が TRAIL の産生促進作用を有するか否か、検証した（図 7）。その結果、陽性対照である乳酸菌に比しても、PBMC の TRAIL 産生を促進することはなかった。

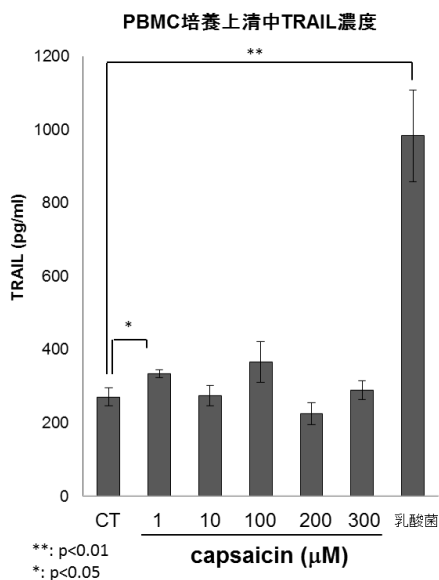


図7 薬剤添加後24 hrのPBMC培養上清サンプル

さらに、複数の候補薬剤を用い、同様の検討を行った。各種薬剤の添加濃度は、免疫担当細胞への作用濃度を参考に、2 点ずつ設定した（図 8）。その結果、上清サンプルを用いた Western blotting の結果、培養上清中 MMP-8、および TRAIL の相関性はあまり認められなかった。同じ培養上清サンプルを用いた TRAIL ELISA の結果では、陽性対照の酪酸菌以外では、好中球から TRAIL の放出を促進できた薬剤を見出すことができなかった（図 9、10）。その理由の一つとして、被験者ごとの好中球の分離条件が安定せず、改めて実験条件の見直しが必要とされた点もある。

本研究における結果として、図 9 で示されたように、酪酸菌と同等の MMP-8 放出促進成分候補が挙げられるものの、さらなる確認実験が必要である。

1 DMSO	13 metformin 10 μM
2 酪酸菌 50 μg/ml	14 metformin 100 μM
3 orlistat 10 μM	15 methyl glyoxal 40 μM
4 orlistat 100 μM	16 methyl glyoxal 400 μM
5 silibinin 10 μM	17 mebendazol 50 nM
6 silibinin 100 μM	18 mebendazol 500 nM
7 NDGA 10 μM	19 sulindac sulfide 10 μM
8 NDGA 100 μM	20 sulindac sulfide 100 μM
9 baicalein 8 μM	21 BGJ398 0.1 μM
10 baicalein 80 μM	22 BGJ398 1 μM
11 chetomin 20 nM	23 celecoxib 4.8 μM
12 chetomin 200 nM	24 celecoxib 48 μM

図8 評価薬剤一覧

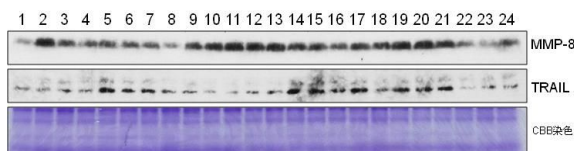


図9 薬剤添加後6 hrの好中球培養上清サンプル

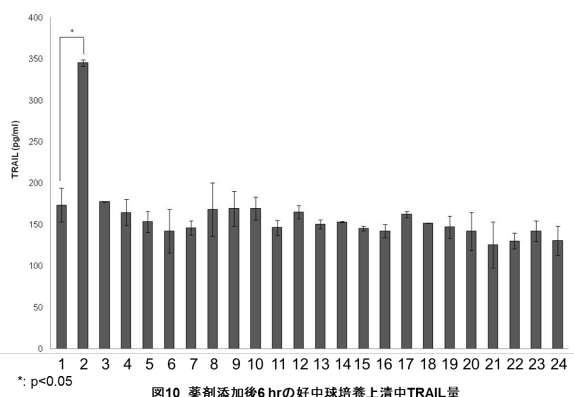


図10 薬剤添加後6 hrの好中球培養上清中TRAIL量

(2) DR5 発現誘導効果の評価

ヒト大腸癌細胞株 HCT116 に対し、DR5 発現誘導成分として、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の一種である ibuprofen を見出した (図 11)、TRAIL と併用することによって、癌細胞特異的なアポトーシス増強効果を有していた (図 12)。論文にまとめ、2013 年 11 月に雑誌に掲載された (*Oncol Rep.* 30, 2379, 2013)。

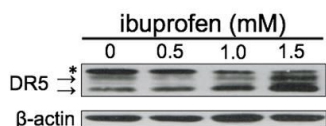


図11 ibuprofen添加後24 hrの HCT116細胞内DR5発現量の変化

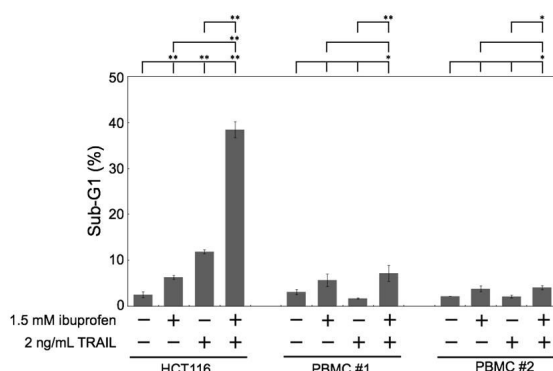


図12 HCT116細胞およびPBMCに対するibuprofenとTRAIL併用によるアポトーシス増強効果の検討

今後は、MMP-8 発現誘導成分の探索を続けながら、平行して、MMP-8 発現誘導成分として見出している「酪酸菌」を用い、酪酸菌と DR5 発現誘導成分である ibuprofen の併用効果の検討を進めることとする。その理由として、これまでに好中球の免疫賦活作用を介して癌細胞へのアポトーシス誘導効果を評価してきた系は、表在性膀胱癌細胞株を対象としたものであった。一方で、酪酸菌は、現在、経口の整腸剤として広く用いられている医薬品であることから、消化器系癌に対する酪酸菌の効能を評価することが、必要である。その併用薬剤として、経口の OTC 医薬品である ibuprofen を選択する予定である。

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 1 件)

Momoko Todo*, Mano Horinaka*, Mitsuhiro Tomosugi*, Ryoichi Tanaka, Haruna Ikawa, Yoshihiro Sowa, Hideki Ishikawa, Hitoshi Fujiwara, Eigo Otsuji, Toshiyuki Sakai
*equally contribution

Ibuprofen enhances TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation. *Oncol Rep.* 2013;30:2379-84. doi: 10.3892/or.2013.2713.

査読有

[学会発表](計 2 件)

藤堂桃子, 堀中真野, 友杉充宏, 田中良一, 井川陽菜, 曾和義広, 酒井敏行. イブプロフェンによる DR5 の発現誘導と TRAIL 誘導性アポトーシスの増強. 第 83 回日本衛生学会学術総会. 2013 年 3 月 25 日; 金沢

堀中真野, 藤堂桃子, 友杉充宏, 田中良一, 井川陽菜, 曾和義広, 石川秀樹, 藤原斉, 大辻英吾, 酒井敏行. 癌の「分子標的併用予防法」の開発 イブプロフェンによる DR5 遺伝子の発現誘導と TRAIL 誘導性アポトーシスの増強. 第 13 回分子予防環境医学研究会 2014 年 2 月 1 日; 和歌山

[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:
取得年月日:
国内外の別:

[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

友杉(堀中) 真野
(TOMOSUGI (HORINAKA), Mano)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 80512037

(2)研究分担者

()
研究者番号:

(3)連携研究者

()
研究者番号: