

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700824

研究課題名(和文)ポリフェノールによる腫瘍幹細胞制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of mechanisms in brain tumor stem cell regulation by polyphenol

研究代表者

池亀 由香 (IKEGAME, Yuka)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50402201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、食品由来物質であるポリフェノール化合物のレスベラトロール(RSV)を用い、悪性脳腫瘍における腫瘍幹細胞(CSCs)に対する抗腫瘍効果とその分子生物学的機序を、サーチュイン(SIRT)遺伝子群との関連も含めて解析することを目的に実施した。U87培養細胞での形態的变化および発現タンパク質の解析から(1)RSVがCSCsに対し分化誘導作用を呈してCSCsを減らすこと(2)RSVがSIRT遺伝子群(SIRT 1, 2, 3, 6)の発現状態に作用し、SIRT遺伝子群もRSVの抗腫瘍効果において幹細胞成分減少すなわち臨床的悪性度の低減や細胞死の分子機構に関与する可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Resveratrol (RSV) is a natural polyphenolic compound, present in plants and food made from plants, that can cross the blood-brain barrier. Glioblastoma (GBM) is the most malignant primary brain tumor, which is known to have cancer stem cells (CSCs). CSCs appear to be an important cause of GBM's formidable resistance to various therapies, such as chemical agents or radiation.

In the present study, RSV's anti-tumor effects against CSCs in GBM (U87 cells) and mechanisms including Sirtuin (SIRT) genes were indicated. The results from analyses of morphological changes and expressed proteins indicated: (1) RSV can induce GBM-CSC differentiation, which could make GBM more responsive to therapies; (2) RSV's anti-tumor effects on GBM may include mechanisms related to the activation or inactivation of SIRT genes (SIRT 1, 2, 3, 6) that induce CSC differentiation, which contribute to reduction of the malignancy, and cell death.

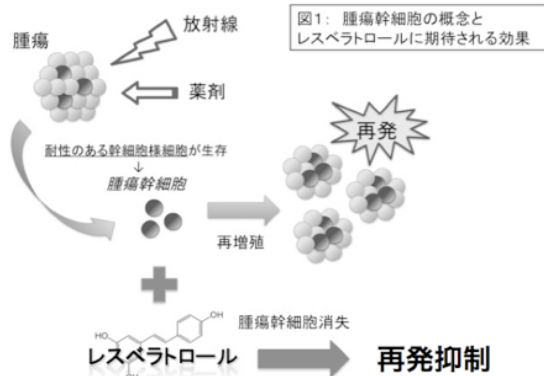
研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学・特殊栄養食品

キーワード：ポリフェノール 脳腫瘍幹細胞

1. 研究開始当初の背景

腫瘍幹細胞は、自己複製能、及び未分化性に由来する多分化能を持ち、二次腫瘍を形成することのできる細胞として定義されている。悪性腫瘍の治療において、初回治療後に再発をきたすことがしばしば難題となるが、このような薬剤や放射線への治療抵抗性を腫瘍幹細胞の性質により説明することが可能と考えられている (図1)。



腫瘍幹細胞が存在すると考えられている腫瘍のうち、膠芽腫は脳腫瘍のうちで最も悪性度が高い腫瘍の1つである。特に再発の制御は困難なことで知られており、脳腫瘍治療において50年来の課題と考えられてきた。近年、テモゾロミドの登場により、ようやく生存期間の改善がみられるようになったものの、依然難題として更なる治療法の開発が望まれている。

本研究では、膠芽腫の脳腫瘍幹細胞を標的とする候補物質として、食品由来物質を用いることで、従来の一般的な抗腫瘍薬より副作用の少ない治療法あるいは補助療法を提示できるのではないかと考えた。実際、海外で行われたPhase I 臨床試験において、健常成人において1回の経口摂取量が5gに達しても0.5gの摂取時と同様に軽度の消化器症状が少数認められたにとどまった(Boocock DJ, et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007)ことから、副作用の少ない治療となる可能性は十分期待される。

ポリフェノール化合物であるレスベラトロールは、これまでに種々の悪性腫瘍に対して抗腫瘍効果が示されている。また、脳腫瘍の薬物治療においては、脳組織に、多くの薬剤の通過を妨げる血液脳関門が存在するために困難を来すことがしばしばあるが、レスベラトロールは血液脳関門を通過できる(Abd El-Mohsen M, et al. Br J Nutr. 2006)。その上、レスベラトロールは、それ自身も抗腫瘍効果に関与するといわれるサーチュイン遺伝子群に作用することが示唆されている。

膠芽腫では、腫瘍幹細胞はCD133などの幹細胞系マーカーを発現すると言われる。本研

究申請時の状況では、このCD133陽性細胞に対し、レスベラトロールがその細胞数を減少させたという報告が1件(Filippi-Chiela E, et al. PLoS One. 2011)あったが、今後実際の治療に繋げるためには、レスベラトロールがいかなる機序で悪性脳腫瘍幹細胞に対して作用を発揮するのかを更に明らかにする必要があったと考えられた。

他方で、サーチュイン遺伝子群の発現状態がCD133陽性膠芽腫細胞の放射線への反応性に関与するという報告(hang CJ, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2009)もあり、サーチュイン遺伝子群へ作用するといわれるレスベラトロールがどのサーチュイン遺伝子を介して腫瘍幹細胞に作用しうるのかも検証が必要と思われた。

2. 研究の目的

本研究では、食品に含まれるポリフェノール化合物、特にサーチュイン遺伝子活性化物質ともいわれるレスベラトロールを用いた腫瘍幹細胞制御機構の解明を目的とした。

レスベラトロールが血液脳関門を通過できる特性を持つことから、最も悪性度の高い脳腫瘍である膠芽腫を対象とした。膠芽腫は、治療抵抗性の根源である脳腫瘍幹細胞を多く持つと言われ、その制御は最難関の課題である。

本研究によりレスベラトロールが悪性脳腫瘍幹細胞に与える抗腫瘍効果及びその機序を分子レベルで明らかにし、食品由来物質による、副作用の少ない新たな治療戦略の可能性を提示することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト膠芽種の細胞株であるU87細胞を用いて以下の解析を*in vitro*で行った。

1) 腫瘍幹細胞の幹細胞特性(stemness)に対するレスベラトロールの影響

- ①未分化能 (腫瘍マーカー陽性細胞数、sphere形成能、分化誘導耐性能)
 - ②自己複製能 (増殖能)
 - ③産生物質 (成長因子など)
- 以上の各性質への変化について評価した。

2) レスベラトロールの抗腫瘍効果機序

- ①細胞死/増殖抑制機序
- ②レスベラトロール添加によるサーチュイン遺伝子群の動態と抗腫瘍効果との関連

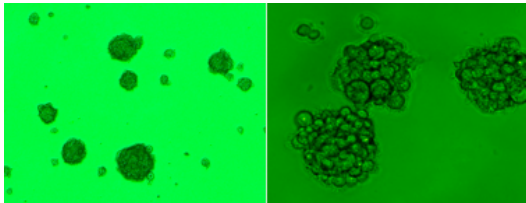
4. 研究成果

1) ①レスベラトロールは脳腫瘍幹細胞に対し、分化誘導作用を示す可能性がある。

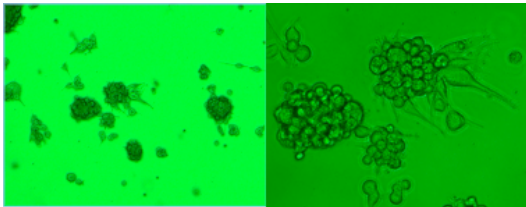
幹細胞培養条件 (培地組成: DMEM/Ham's

F-12, supplement B27, LIF 1000 u/ml, human recombinant EGF 10 ng/mL, human recombinant bFGF 20 ng/mL) でU87 細胞 1×10^6 個を 48 時間培養したところ、レスベラトロール添加濃度に応じて以下のような形態的变化が認められ、幹細胞の特徴である sphere の形成能が低下したばかりでなく、分化状態を示唆している紡錘形を示す接着細胞様細胞が増加した。

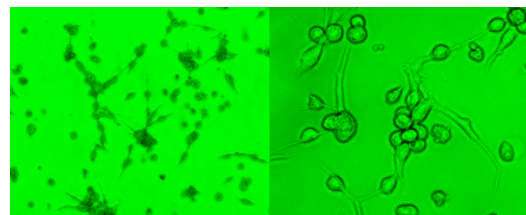
<0 μ M>



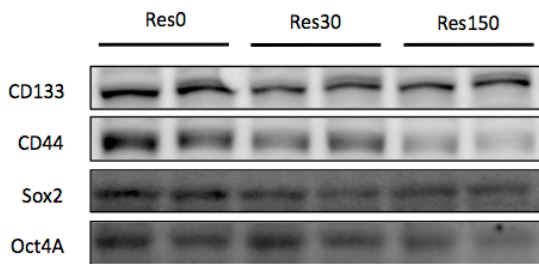
<30 μ M>



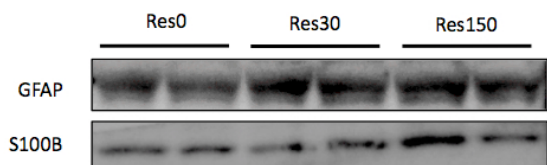
<150 μ M>



また、各種幹細胞系マーカータンパク質 (stemness 関連タンパク質) の発現量について、ウェスタンブロッティングにて確認を行うと、レスベラトロールの濃度依存性に発現が低下する傾向を認めた。



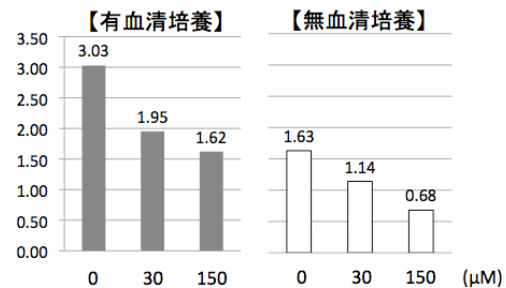
分化マーカータンパク質についてもウェスタンブロッティングを行い、分化細胞にみられるタンパク質が、培地へのレスベラトロール添加により発現が高くなる傾向が示唆された。



以上より、U87 細胞の幹細胞条件培養において、培地へのレスベラトロール添加により、stemness の減少及び分化状態が誘導されると考えられた。

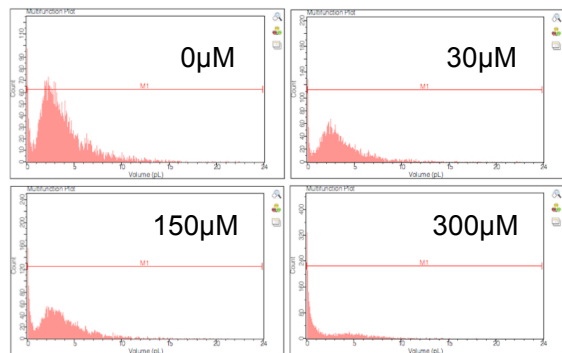
1) ②レスベラトロールは U87 細胞に対し、幹細胞条件でも分化条件でも増殖抑制作用を示す。

U87 細胞 1×10^6 個を幹細胞条件 (前述: 無血清培養) 及び分化条件 (DMEM low glucose, 10 % FBS : 有血清培養) で 96 時間培養したところ、両条件にて増殖の抑制と細胞数の減少を認めた。 (グラフ中の数字は $\times 10^6$)

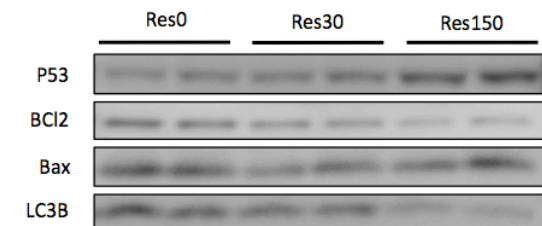


2) ①レスベラトロールは U87 細胞に対し、アポトーシス機構とオートファジー機構の双方に働いて生存を抑制する可能性がある。

U87 細胞 1×10^6 個を有血清培養で 48 時間培養し、Scepter 2.0 (Millipore 社) で細胞体積の分布変化を測定したところ、レスベラトロールの添加により、細胞数減少ばかりでなく、濃度依存性に細胞体積の減少も認めた。 (縦軸: 細胞数、横軸: 細胞体積)



細胞体積の減少を細胞死に関連すると考え、各種細胞死関連タンパク質の発現をみた。



ウェスタンブロッティングの結果において、アポトーシスの増加を示す Bax の直接の上昇は確認できなかったが、抗アポトーシス機構

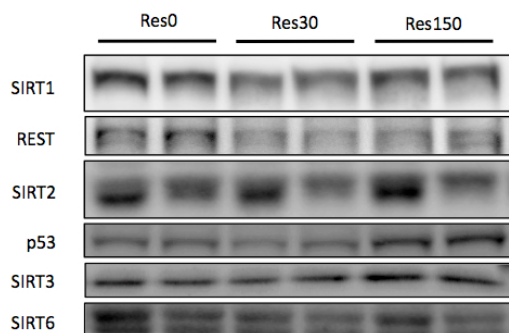
タンパク質である Bcl-2 の低下・アポトーシス誘導にはたらく p53 発現の上昇があり、アポトーシスの増加が起こっていることが推測された。一方、細胞数および細胞体積減少のもう 1 つの原因となりうるオートファジーの関連タンパク質においては、レスベラトロールにより LC3B の発現が低下した。

また、培養上清の LDH 測定により、レスベラトロール添加により LDH 量は減少していくことから、レスベラトロールはむしろネクローシスを減少させる可能性がある。

これらの結果から、細胞体積減少の主体はアポトーシスであることが考えられたものの、生存のための細胞死といわれるオートファジー機構も抑えることを示唆することから、アポトーシス機構に対しては正に、オートファジー機構に対しては負に働くことで総じて生存を抑制すると思われた。

2) ②レスベラトロールはサーチュイン遺伝子群に対して各々のサブタイプに応じて異なる作用を示し、各サーチュインタンパク質を介した機構によるルートによっても stemness や細胞死に關与する。

レスベラトロールのサーチュイン遺伝子群への作用の結果をみるため、U87 細胞 1×10^6 個を有血清培養で 4 8 時間培養してタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングを行った。

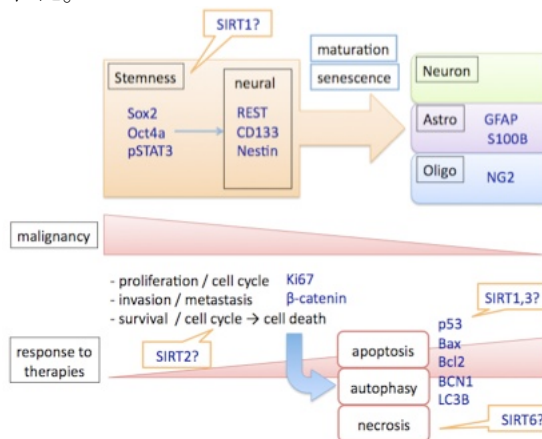


ヒトのサーチュイン遺伝子のサブタイプは 7 つと言われるが、それぞれが腫瘍に対してどう作用するかは組織によって異なり、各腫瘍ごとに検討が必要である。また、同一腫瘍においても異なる結果が報告されることもあり、慎重な検討の積み重ねが求められる。

膠芽腫細胞及び悪性脳腫瘍細胞では、大腸ガンなどの他の癌腫と異なり、サーチュイン 1 (Sirt1) の発現は上昇する傾向にあるようである。他方、正常神経幹細胞においても、Sirt1 の発現が知られていることから、Sirt1 は神経系細胞における stemness に關連している可能性がある。この背景を考慮すると、レスベラトロール添加により Sirt1 発現が低下傾向となることは、U87 細胞が stemness を失う傾向にあることを示唆していると考えられ、REST など幹細胞系タンパク質の発現が

減少していることに矛盾しない。

この他のサブタイプに対しても同様に解析を行ったが、Sirt1 と比較して他の Sirt タンパク質は発現量が少ないだけでなく、一定の結果を得ることが困難であった。このことは、他の報告間で結果が一致していない現状を反映しているかもしれないが、本研究中の解析を総合して下図のような関連が予想された。



< 結語 >

レスベラトロールは、U87 の細胞死機構を誘導して細胞数や増殖能を抑えたばかりでなく、腫瘍幹細胞に発現する幹細胞関連タンパク質の発現を抑えて細胞を分化傾向に導く作用を示し、腫瘍幹細胞の治療抵抗性を改善する可能性を示した。既報に加え本研究の成果からも、レスベラトロールには一般的な抗腫瘍効果、すなわちより分化段階にある腫瘍本体への効果だけでなく、再発や難治性の根源と考えられる腫瘍幹細胞成分に対しても有効であることが示唆される。また、その作用は、サーチュイン遺伝子群を含め、細胞内の多くの経路に多面的かつ臨機応変に作用することが推測された。

レスベラトロールはポリフェノール化合物に属した食品由来物質であり、臨床試験においてもこれまで重篤な副作用は報告されていない。この成果から、悪性脳腫瘍治療において、レスベラトロールに代表されるポリフェノールも身体への負担の少ない有効な補助療法として考慮されるべき手段の 1 つとなることが期待される。

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 2 件)

- ① Tsuruma K, Yamauchi M, Sugitani S, Otsuka T, Ohno Y, Nagahara Y, Ikegame Y, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H., Progranulin, a major secreted protein of mouse adipose-derived stem cells, inhibits light-induced retinal degeneration.,

Stem Cells Translational Medicine、
査読有、vol. 3、No. 1、2014、42-53
DOI: 10.5966/sctm.2013-0020

- ② Ikegame Y、Among mesenchymal stem
cells: for the best therapy after
ischemic stroke.、Stem Cell Research
& Therapy、査読有、vol. 4、No. 1、2013、
9(Epub ahead of print)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池亀 由香 (IKEGAME, Yuka)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50402201