

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460809

研究課題名(和文) 食品成分併用による発癌二大シグナル伝達経路の阻害を介した癌予防法の開発

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

研究代表者

与五沢 真吾 (Yogosawa, Shingo)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70381936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌予防効果の期待される食品成分は多数報告されている。だが単一成分では効果を発揮する濃度が高く、食品からの摂取ではその濃度に達成できない場合が多い。その理由は各成分が複合的に組み合わせたり効果を発揮するからだと考えられているが、検討は十分でない。そこで発癌に最も重要な経路のひとつに位置付けられているMEK-ERK経路とPI3K-Akt経路に着目し、大豆に由来するエコールとアブラナ科野菜の成分ブラシニンを併用すると、ヒト大腸癌細胞に細胞周期停止とアポトーシスが誘導され、細胞増殖が相乗的に抑制されることを見出した。また、生薬由来のエメチンとシスプラチンの併用がヒト卵巣癌細胞に有効であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The promising chemopreventive effects of food factors on malignant tumors have been reported extensively. However, desirable effects of treatment with a single agent mostly requires high doses, and there are many cases that are unachievable by an intake from food. It has been considered that various food-ingredients combined compositely show chemopreventive effects, but the evidence is still not enough. Paying attention to MEK-ERK and PI3K-Akt signal transduction pathways, considered to be one of the most important pathways for cancer development, it was shown that equol derived from soy, enhanced the inhibitory effect of brassinin, derived from brassica vegetables, on growth of human colon cancer cells via cell-cycle arrest and apoptosis. In addition, combination of emetine with cisplatin was shown to be useful for growth inhibition of human ovarian cancer cells.

研究分野：医歯薬学

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年々増加し、年間 35 万人以上が癌で命を失っていることから (人口動態統計によるがん死亡データ 1958~2011 年)、画期的な癌予防法の開発が求められている。発癌の過程における重要なイベントとして、細胞が無秩序な細胞増殖能と細胞死抵抗性を獲得することがあげられる。細胞増殖因子及びその受容体を介して細胞増殖シグナルを伝達する経路、MEK-ERK 経路と PI3K-Akt 経路は、ほとんどの癌で異常亢進が観察されており、その結果として細胞周期の亢進と細胞死抵抗性を獲得して発癌へと導かれると考えられている (Clin. Cancer Res. 15:4518, 2009)。この経路は癌の治療における重要な標的と考えられ、多くの分子標的抗癌剤が開発されている。癌予防においても、両経路の重要性が同様に示唆されているものの (Nature Med. 16:665, 2010)、治療のため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、予防へとそのまま適用することは不可能であると考えられる。

一方で、多くの疫学的研究成果から、食生活が発癌に深く関係すると考えられており、特に野菜や豆類などの摂取が発癌を予防する可能性が示唆されている。このような背景から、癌予防効果の期待される食品成分が数多く見出され、報告されてきた。しかしそれらの多くは単体で効果を発揮する濃度が高すぎるため、食品の摂取ではおよそ達成できない場合が多い。この乖離の原因として、食品中に含まれる有効成分は一種類ではなく、様々な成分が複合的に相互作用して機能しているのではないかと論じられるが、そのエビデンスとなるような研究についての報告はまだ十分ではない。

## 2. 研究の目的

併用により癌細胞の増殖抑制効果が増強される組み合わせを見出し、その分子機構を解明する。なかでも、発癌の過程に重要であると考えられる MEK-ERK 経路と PI3K-Akt 経路を抑制する成分に着目し、それぞれを併用することにより細胞増殖抑制効果の増強が起こる組み合わせを見出す。また、併用により癌細胞の増殖抑制効果が増強される場合として、抗癌剤の効果が弱い細胞を用い、併用により抗癌剤の感受性増強を図ることができる組み合わせについても検討する。

## 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 アッセイやコロニーフォーメーション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

細胞を界面活性剤により裸核後、核内 DNA をヨウ化プロピジウムにより染色し、フローサイトメーターを用いて細胞各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) 遺伝子ノックダウン実験

(3) 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、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。

### (5) カスパーゼ阻害実験

アポトーシスが誘導される時、カスパーゼの特異的阻害剤 z-VAD-fmk で処理することでアポトーシスが抑制されるかどうか調べることにより、アポトーシスのカスパーゼ依存性を検証した。

### (6) カスパーゼ活性測定

アポトーシス誘導時のカスパーゼ活性をカスパーゼ特異的基質の分解を蛍光プレートリーダーで測定することにより検証した。細胞数は生細胞の染色により補正した。

### (7) ミトコンドリア膜電位測定

試薬 JC-1 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) エコールとブラシニンの併用によるヒト大腸癌由来 HT-29 細胞の増殖抑制効果の増強 (学会発表③ほか、論文投稿準備中)

大豆の摂取は欧米よりアジア圏で多く、このことが大腸癌の発生率の高低と関係するのではないかといわれている。また大豆に含有するイソフラボン的一种ダイゼインは、腸内でエコールに代謝されるが、このエコールには MEK 活性の阻害効果が報告されている (JBC 282, 32856-86, 2007)。エコール産生能には個人差があるといわれており、これは腸内細菌叢の違いに由来すると考えられている。エコールはイソフラボン類の中でもエストロゲンレセプターへの結合が強く、抗癌

化性も高いなどの理由から現在健康食品として流通されている。特にエコール低産生者にとっては、エコールの摂取により健康増進を図ることができる可能性も考えられている。しかし発癌との関係については、現在までエビデンスの蓄積が十分ではない。

ブラシニンとはアブラナ科植物が産生するインドールであり、病原菌の侵入や紫外線などのストレス刺激により蓄積されるフィトアレキシン的一种として知られている。ブラシニンにはがん細胞の増殖抑制効果があり、PI3K-Akt 経路を阻害し、p21 や p27 の発現誘導を介して RB が脱リン酸化し、G1 期停止が生じるというメカニズムが研究代表者らにより示されている (IJO 40, 816-24, 2012)。

ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞において、このエコールとブラシニンをお互い単独では効果が弱い濃度で併用することにより、細胞増殖抑制効果が増強されることを見出した。

WST-8 アッセイにより、エコールがブラシニンによる細胞増殖抑制効果を増強させることが判明した (図 1)。アイソボログラム解析によりこの効果は相乗的と考えられた。フローサイトメトリーを用いて細胞周期を解析すると、エコールとブラシニンの併用処理により細胞周期 S 期の割合が減少しており、

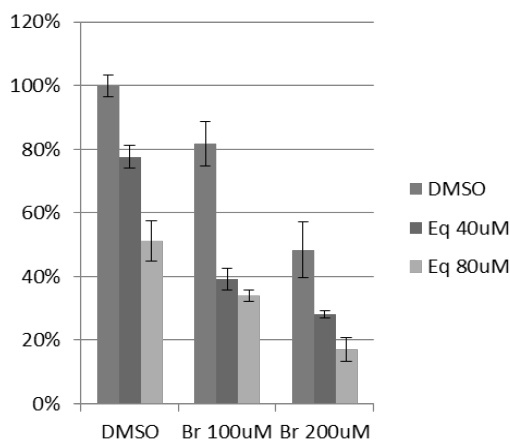


図 1 エコール(Eq)とブラシニン(Br)併用による細胞増殖抑制効果の増強

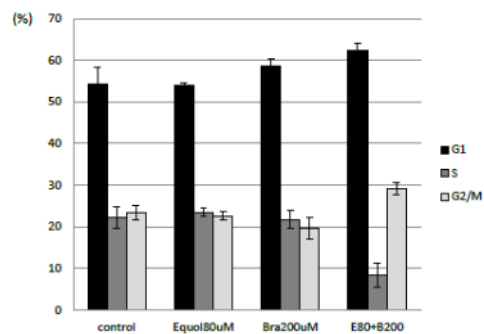


図 2 エコール(Eq)とブラシニン(Br)併用による細胞周期停止

細胞周期停止が生じていると考えられた (図 2)。このとき、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21 の発現誘導と癌抑制遺伝子産物 RB の脱リン酸化が免疫ブロット解析により

観察された (図 3)。p21 によりサイクリン依存性キナーゼが阻害され、その結果 RB のリン酸化も阻害されたと考えられる。

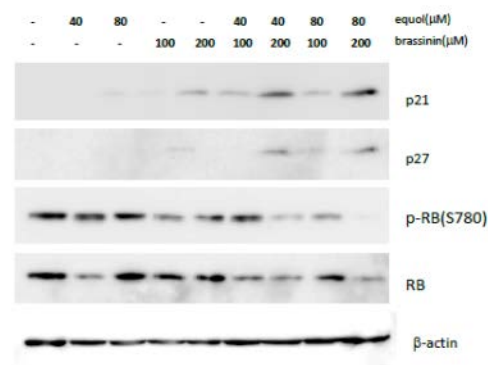


図 3 エコールとブラシニン併用による p21 の発現上昇と RB のリン酸化抑制

また処理時間が長い場合、フローサイトメトリーにより subG1 の割合の増加が観察された。このことから、併用処理によりアポトーシスの誘導も起こると考えられた。subG1 の割合の増加はカスパーゼの特異的阻害剤 z-VAD-fmk により抑制され (図 4)、併用時に

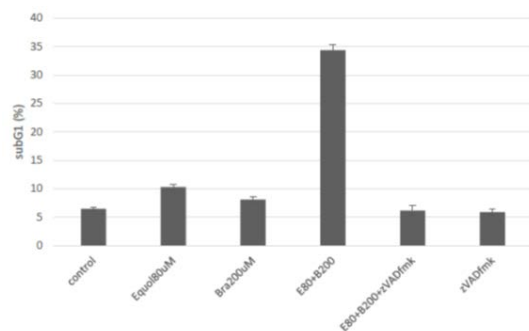


図 4 エコール(Eq)とブラシニン(Br)併用によるアポトーシス(subG1)の増加および z-VAD-fmk による抑制

カスパーゼ活性を測定すると、カスパーゼ活性の増加も観察されたことから、アポトーシスはカスパーゼ依存的に誘導されているのではないかと考えられた。また、免疫ブロット解析でも、実行カスパーゼであるカスパーゼ 3 の活性化がみられた。このとき、内在性経路の指標となるカスパーゼ 9 の活性化も同時にみられたことから、このアポトーシスはミトコンドリア依存性の内在性経路を欠いている可能性が考えられた。そこで、ミトコンドリアの膜電位を検出する JC-1 による細胞染色を行ったところ、エコールとブラシニンの併用処理を行った細胞でミトコンドリアの膜電位低下を示す染色パターンが得られ、上記の仮説を裏付ける結果が得られた。

以上より、エコールとブラシニンを、それぞれ単独では効果の弱い濃度どうしで併用処理すると、細胞増殖抑制効果の増強が起こること、そのメカニズムとしては p21 の発現誘導を伴う細胞周期停止と、ミトコンドリアを介する内在性経路の活性化によるカスパーゼ依存的なアポトーシスの誘導が考えら

れた。本研究はエコールとブラシニンの併用が癌予防に有効である可能性を示唆するだけでなく、野菜や豆類などの摂取の発癌予防に対する有効性を示している疫学的な報告に対し、分子レベルでのエビデンスとなりうる可能性がある。今後動物実験などによりさらなる検証をしていく必要がある。

(2) トコン等の生薬に含まれるエメチンの併用による、シスプラチンのヒト卵巣がん細胞 SKOV3 に対する細胞増殖抑制効果の増強(雑誌論文②より)

アメーバ赤痢の治療に使用されるトコンに含まれる天然アルカロイドの一種であるエメチンが、ヒト卵巣がん細胞 SKOV3 に対するシスプラチンの感受性を増強させることを見出した。エメチンを SKOV3 細胞に添加すると、5 $\mu$ M で bcl-xL の減少がイムノプロット解析によりみとめられたが、フローサイトメトリーによる subG1 の割合は低く、アポトーシスは軽微であると考えられた。一方、SKOV3 にシスプラチンを作用させると 20 $\mu$ M で G2/M 期停止が誘導されるが、subG1 の増加は弱くアポトーシスの誘導はこちらも軽微であると考えられた。エメチンとシスプラチンを併用すると、subG1 の割合が 72 時間で 60%程度まで増加し、この増加はカスパーゼの阻害剤 z-VAD-fmk により抑制された(図1)。

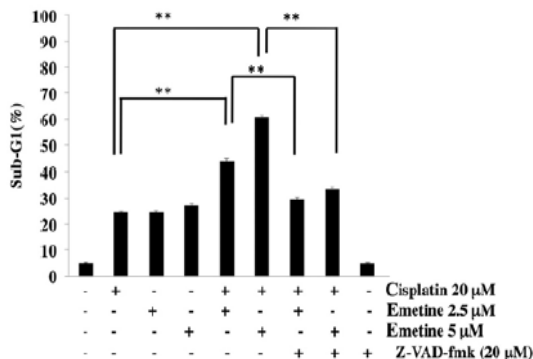


図1 エメチンとシスプラチン併用によるアポトーシス(subG1)の増加および z-VAD-fmk による抑制

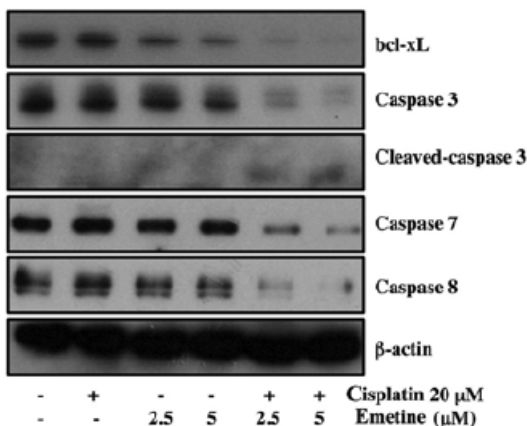


図2 エメチンとシスプラチン併用によるカスパーゼの活性化

またこのとき、カスパーゼの活性化も検出されたことから(図2)、エメチンとシスプラチンの併用処理により誘導されるアポトーシスはカスパーゼ依存的であると考えられた。併用による細胞増殖の抑制はコロニーフォーメーションアッセイでも観察された。またエメチン処理で発現の減少が観察された bcl-xL の発現を siRNA により低下させることによっても、シスプラチン処理によるアポトーシスが增加し、カスパーゼの活性化が伴っていた(図3)。以上の結果から、エメチンによるシスプラチンのアポトーシス増強には bcl-xL の発現現象が関与しており、この併用が卵巣がん治療に有用である可能性が示された。

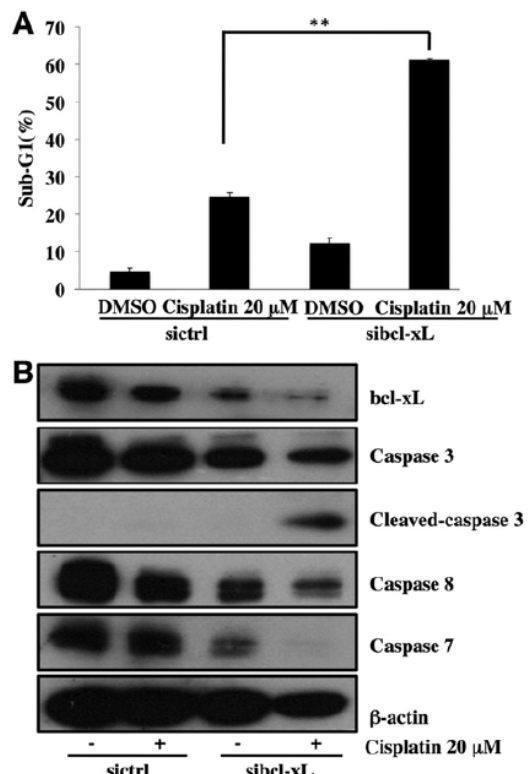


図3 bcl-xL のノックダウンによるシスプラチン誘導性アポトーシス(subG1)の増強(A)およびカスパーゼの活性化(B)

### 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 Yoshioka T, Yogosawa S, Yamada T, Kitawaki J, Sakai T. Combination of a novel HDAC inhibitor OBP-801/YM753 and a PI3K inhibitor LY294002 synergistically induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells due to increase of Bim with accumulation of ROS. *Gynecological Oncology*, 査読有, 2013

May;129(2):425-432.

DOI: 10.1016/j.ygyno.2013.02.008

- ② Sun Q, Yogosawa S, Iizumi Y, Sakai T, Sowa Y. The alkaloid emetine sensitizes ovarian carcinoma cells to cisplatin through downregulation of bcl-xL. *International Journal of Oncology*, 査読有, 2015 Jan;46(1):389-94.  
DOI: 10.3892/ijo.2014.2703.
- ③ Yanagisawa H, Kido T, Yogosawa S, Sato O, Sakae K, Suka M. Inadequate intake of zinc exacerbates blood pressure and renal function via superoxide radical-induced oxidative stress. *Biomedical Research on Trace Elements*, 査読有, 2015, 26:117-123.
- ④ 与五沢真吾, 柳澤裕之. 交替勤務制(シフトワーク)による発がんリスク上昇 *産業医学ジャーナル*, 査読無, 2016年3月, 39(2):85-88.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 与五沢真吾, 山田恭正, 安田周祐, Sun Qi, 滝澤香織, 酒井敏行, クルクミンの半量体構造をしたデヒドロジングロンは、細胞内 ROS の増加を伴いつつ、ヒト大腸癌細胞の増殖を抑制する 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜
- ② 吉岡崇, 与五沢真吾, 山田剛司, 北脇城, 酒井敏行, 子宮体癌細胞に対する新規 HDAC 阻害剤と PI3K 阻害剤併用による相乗的アポトーシス誘導効果の検討 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜
- ③ 与五沢真吾, 酒井敏行, 柳澤裕之, エコールとブラシニンの併用によるヒト大腸癌由来 HT-29 細胞の増殖抑制効果の増強 第 85 回日本衛生学会学術総会、2015 年 3 月 27 日、ホテルアバローム紀の国
- ④ 木戸尊将, 内匠正太, 関良子, 与五沢真吾, 須賀万智, 柳澤裕之 亜鉛欠乏と亜鉛過剰摂取における精巣マクロファージ炎症反応の検討 第 88 回日本産業衛生学会、2015 年 5 月 16 日、グランフロント大阪
- ⑤ 内匠正太, 木戸尊将, 関良子, 与五沢真吾, 須賀万智, 柳澤裕之 亜鉛欠乏及び過剰食が長寿遺伝子 Sirt1 の発現に及ぼす影響 第 88 回日本産業衛生学会、2015 年 5 月 16 日、グランフロント大阪
- ⑥ 与五沢真吾 食品成分によるがん予防の可能性 第 38 回日本産業衛生学会関東産業衛生技術部会研修会、2015 年 10 月 31 日、十文字学園女子大学
- ⑦ 関良子, 与五沢真吾, 須賀万智, 柳澤裕之 酸化亜鉛ナノ粒子のチャイニーズハムスター雌肺繊維芽細胞へ及ぼす小核の誘発と酸素ストレスの関与について 第

86 回日本衛生学会学術総会、2016 年 5 月 13 日、旭川市民文化会館

- ⑧ 小島原典子, 遠藤源樹, 福本正勝, 斉藤利恵, 對木博一, 品田佳代子, 与五沢真吾, 山口直人 科学的根拠に基づく復職ガイドランス作成の試み 第 89 回日本産業衛生学会、2016 年 5 月 27 日、福島市音楽堂

[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

東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座

[http://www.jikei.ac.jp/academic/course/14\\_hokeni.html](http://www.jikei.ac.jp/academic/course/14_hokeni.html)

東京慈恵会医科大学大学院医学研究科 環境保健医学

[http://www.jikei.ac.jp/univ/gradu/rsch/05\\_01.html](http://www.jikei.ac.jp/univ/gradu/rsch/05_01.html)

東京慈恵会医科大学環境保健医学講座

<http://square.umin.ac.jp/jikphem/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

与五沢 真吾 (YOGOSAWA, Shingo)  
東京慈恵会医科大学・医学部・環境保健医学講座・講師  
研究者番号: 70381936

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし