

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860466

研究課題名(和文) 新規癌予防法開発に向けた乳酸菌・植物成分併用による癌細胞死誘導の解析

研究課題名(英文) Sulforaphane enhances apoptosis induced by Lactobacillus via TNF-alpha pathway in human colon cancer cells.

研究代表者

安田 周祐 (YASUDA, SHUSUKE)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10643398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大腸癌細胞株HCT116、HT-29に末梢血単核細胞(PBMC)共培養下で乳酸菌とSFNを併用することでアポトーシスの誘導効果が著明に増強された。

PBMC共培養下でSFNと乳酸菌を併用した際にどのようなサイトカインが誘導されてくるのかELISAを用いて確認し、誘導されてくるサイトカインの受容体のFcキメラを用いることで、TNFがこのアポトーシスに参与していることが明らかになった。また、PBMC共培養下でSFNと乳酸菌を併用した際にcIAP-2などのアポトーシスを阻害するタンパク質の発現減少が確認されている。

研究成果の概要(英文)：Sulforaphane enhances apoptosis induced by Lactobacillus-stimulated PBMC in human colon cancer HCT116 cells and HT-29 cells. The apoptosis was considerably blocked by the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk, which indicated that apoptosis was caspase-dependent in both colon cancer cells. Furthermore, TNFR/Fc chimera significantly at least partially inhibited the apoptosis in both colon cancer cells.

The expression of cIAP-2 was significantly up-regulated by the co-culture with Lactobacillus-stimulated PBMC in both colon cancer cells. Interestingly, sulforaphane treatment suppressed the induction of cIAP-2 by the co-culture, and restored the cIAP-2 expression to the normal level almost. These results showed the relationship of TNF and cIAP-2 in the apoptosis by the combination.

研究分野：分子標的癌予防医学

キーワード：悪性腫瘍 TRAIL 癌予防 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、日本での死因は「悪性腫瘍」によるものが約30%に達し第一位となっている。申請者が所属している研究室ではこれまでに、複数の成分を理論的に組み合わせる分子メカニズムに基づいた併用予防法を、癌の「分子標的併用予防法」と名付け、その開発を目指した基礎研究を進めてきた。

(2) TRAILは、主に免疫担当細胞で発現される抗腫瘍性サイトカインで、標的細胞の細胞表面上に発現しているTRAIL受容体を介してアポトーシスを誘導する働きを担っている。

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(, ,)。当研究室でもヒトへの予防介入研究で効果を示した乳酸菌が、免疫担当細胞に作用してTRAILの発現誘導効果を持つことを見出し、報告している()。

(3) 一方、癌予防効果が期待されている食品由来成分として、ブロッコリーなどアブラナ科植物に多く含まれる sulforaphane (SFN)がヒト癌細胞に対し TRAIL 受容体の発現量を増加させることで TRAIL 誘導性アポトーシスを増強することを当研究室で見出している()。

そこで、この乳酸菌と SFN とを併用することでより効率的に癌細胞にアポトーシスを誘導できるのではないかと考え実験を行ったところ、大腸癌細胞株 HT29 に末梢血単核細胞 (PBMC) 共培養下で乳酸菌と SFN を併用することでアポトーシスの誘導効果が著明に増強された (図 1)。

この併用によるアポトーシスは TRAIL によるものと推察されたため、上清中の TRAIL 量を ELISA を用いて測定した。その結果、興味深いことに、SFN は乳酸菌の TRAIL 発現誘導効果を打ち消す作用を有することが判明した (図 2)。

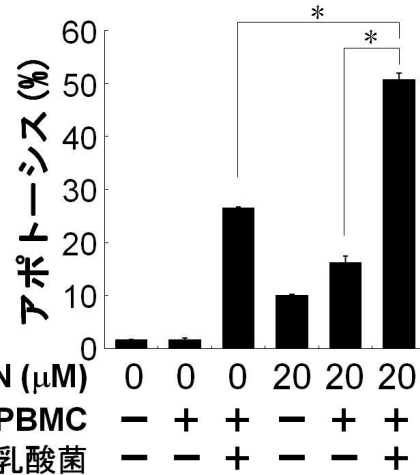


図 1 乳酸菌と SFN の併用効果

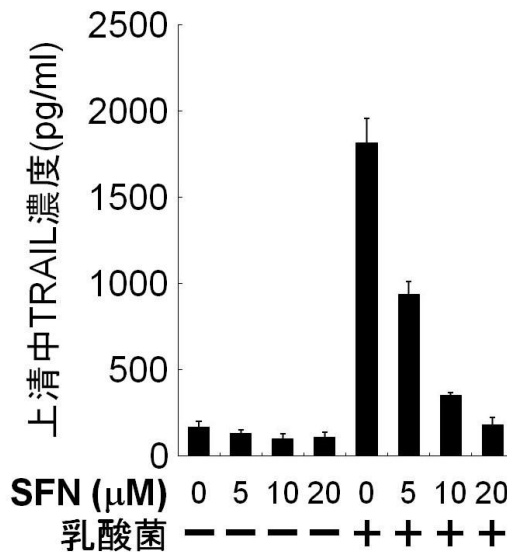


図 2 PBMC 共培養下での乳酸菌・SFN 併用時の上清中 TRAIL 量

(4) SFN はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害活性を有する食品成分としても報告されている()。さらに、HDAC 阻害剤は、強力な免疫抑制作用も有することが報告されている。今回、併用時に TRAIL 発現が抑制されたのも、SFN が持つ HDAC 阻害活性によるものと予想された。

以上より、SFN と乳酸菌でアポトーシス増強効果が見られたのは、TRAIL ではなく、SFN によって発現抑制を受けない、その他の「液性因子 X」が乳酸菌によって誘導されたためである可能性が考えられた。

本研究では、乳酸菌によって誘導される液性因子 X を同定することで、併用効果の分子メカニズムの解明を目指した。

2. 研究の目的

(1) サイトカインの一種である TRAIL は、癌細胞に特異的にアポトーシスを誘導する。免疫担当細胞を刺激して TRAIL 産生を誘導する乳酸菌と、TRAIL 受容体を発現誘導する植物成分 sulforaphane (SFN) とを併用したところ、TRAIL を介しないアポトーシス増強効果が見られ、液性因子 X の存在が示唆された。

そこで本研究では、液性因子 X を同定し、SFN、末梢血単核細胞 (PBMC)、乳酸菌の三者併用による細胞死誘導経路を解明することで TRAIL 耐性の悪性腫瘍にも応用できる食品成分による分子標的併用予防法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 乳酸菌によって誘導され、SFN で抑制されない「液性因子 X」の存在が示唆されたので、ELISArray および ELISA を用いて上清中に含まれる因子を同定した。

(2) 次に、(1)で誘導が見られた因子について、アポトーシスへの関与をフローサイトメトリーを用いて解析した。具体的には、DR5/Fc キメラ、Fas/Fc キメラ、TNFR/Fc キメラ、Granzyme B 阻害剤を使用することによるアポトーシスの減少を検討した。

(3) その後、乳酸菌、SFN 併用によるアポトーシス増強のメカニズムを解明するため、Western blot を行い、TNFR、XIAP、cIAP-2 といったアポトーシス関連因子の発現の増減を検証した。

4. 研究成果

(1) PBMC 共培養下で、乳酸菌と SFN を併

用した際の上清を用いて ELISArray を行った。その結果、乳酸菌処理で IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IFN γ 、IFN β 、TNF α 、GM-CSF、G-CSF が誘導されていた。

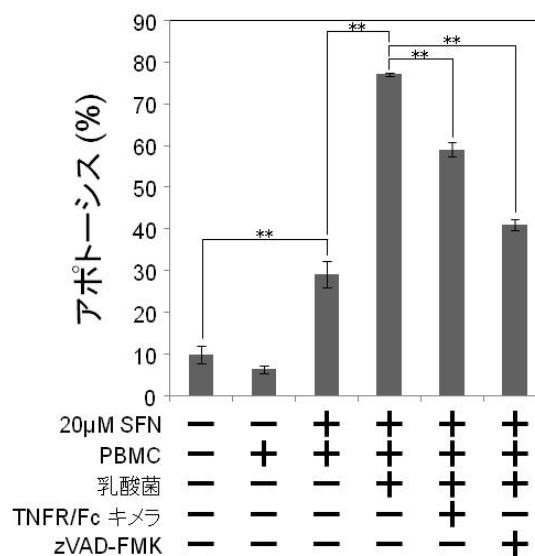


図 3 TNFR/Fc キメラによるアポトーシス誘導の阻害

(2) その中で、DR5/Fc キメラ、Fas/Fc キメラ、TNFR/Fc キメラ、Granzyme B 阻害剤を用いて確認したところ、TNF 受容体である TNFR/Fc キメラでのみアポトーシスの誘導に減弱が見られた (図 3)。

このことより、PBMC 共培養下での SFN、乳酸菌併用によるアポトーシスには TNF が関与していることが明らかになった。

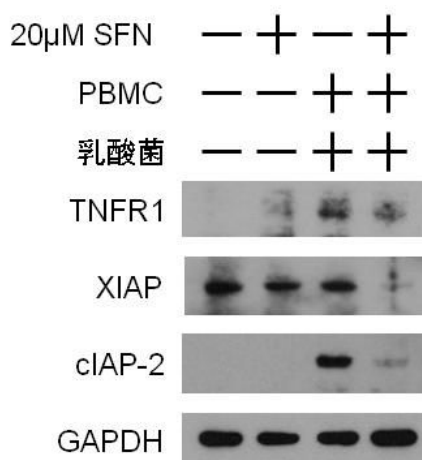


図 4 アポトーシス関連タンパク質

(3) PBMC 共培養下での SFN、乳酸菌併用によるアポトーシス関連タンパク質の発現量への影響を western blotting で解析した(図4)。その結果、PBMC 共培養下で乳酸菌を添加することで TNFR および、アポトーシス阻害分子である cIAP-2 の発現が増強した。それらの発現に加え、アポトーシスの阻害に働く XIAP の発現が SFN を併用することで著名に減少していた。

これらの結果より、PBMC に対して TNF の産生を誘導し、ヒト大腸がん細胞 HT-29 に対しては TNFR の発現誘導や抗アポトーシスに働く XIAP や cIAP-2 の発現を抑えることで併用効果が見られることが示唆された。

<引用文献>

J. Immunol., 175, 5586-90, 2005
J. clin. Invest., 118, 100-10, 2008
J. Clin. Invest., 118, 111-23, 2008
FEBS Lett., 584, 577-82, 2010
Carcinogenesis, 27, 1768-77, 2006
Curr. Drug Targets, 7, 443-52, 2006

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)

Horinaka M, Yoshida T, Tomosugi M, Yasuda S, Sowa Y, Sakai T., Myeloid zinc finger 1 mediates sulindac sulfide-induced upregulation of death receptor 5 of human colon cancer cells. *Sci Rep.*, 査読有, 8(4): 6000-7, 2014.

[学会発表](計 1 件)

安田 周祐、曾和 義広、橋本 博之、築野 卓夫、酒井 敏行. 米糠成分 -オリザノールの構成成分である各種フェルラ酸エステルの抗酸化作用の評価. 第 84

回 日本衛生学会総会 2014 年 5 月 27 日 ; 岡山

[図書](計 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 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 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

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安田 周祐 (YASUDA, Shusuke)

京都府立医科大学大学院・医学研究科・研究員

研究者番号 : 10643398

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：