

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350126

研究課題名(和文) ストレス蛋白質発現調節を軸とした、食品成分が有する新規発癌抑制機能についての解析

研究課題名(英文) The novel anti-cancer activities of food components via the modulation of stress proteins

研究代表者

矢野 仁康 (Yano, Mihiro)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号：40304555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、発癌予防効果を有する食品成分に備わる共通の新機能として、“熱ショック蛋白質発現調節による発癌抑制機能”の詳細を明らかにした。1つ目は、レスベラトロールやカプサイシンが、Hsp90に対する著明な発現低下作用を介して癌細胞分裂を停止させ癌細胞増殖抑制作用を発揮している事、2つ目は、クルクミンやヘスペレチンが、Hsp70 もしくは14-3-3蛋白質に対する発現低下作用を介して癌細胞死を誘導し癌細胞増殖抑制作用を発揮している事の発見が挙げられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found the novel anti-cancer activities of food components via the inhibition of heat shock proteins. First, it has been clarified that resveratrol and/or capsaicin stop the cancer cell cycle by suppressing the expression of Hsp90, consequently leading to the inhibition of cancer cell growth. Second, we have found that curcumin and/or hesperetin exhibit the anti-cancer activity by inducing the apoptosis in cancer cells via the inhibition of Hsp70 or 14-3-3 protein.

研究分野：病態栄養学

キーワード：熱ショック蛋白質 細胞死 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の癌化に伴う、Hsp70、Hsp90等の熱ショック蛋白質や14-3-3蛋白質などの細胞内での発現増強は、これら分子が有する細胞死抑制機能や細胞周期の制御異常と深く関わっている。熱ショック蛋白質は、従来の癌遺伝子の範疇には属さないが、癌細胞がその生存において強い依存性を示しながら、正常細胞では影響の少ない非癌遺伝子として癌の生存や増殖に重要な機能を担っている。熱ショック蛋白質は従来、細胞が熱や虚血等の様々な内的、外的ストレスに曝されるとその発現が誘導され、分子シャペロンとして、ストレスで生じた細胞内変性蛋白質の修復機構などストレス侵襲から細胞を保護する役割が知られてきた。

一方、これら熱ショック蛋白質や14-3-3蛋白質は、細胞死抑制機能に加え細胞周期の制御分子としての機能も知られており、ストレスで引き起こされる細胞死や細胞の増殖障害から細胞を保護する働きを有する。熱ショック蛋白質が示すこれらの機能は、癌細胞においては、結果的に、発癌及びその強い増殖浸潤能や転移を助長させる原因となる事から、これら蛋白質の発現並びにその機能を調節する事が出来れば、効果的な発癌予防や抗癌作用に繋がって行くと考えられている。

## 2. 研究の目的

最近の我々の解析から、これら熱ショック蛋白質や14-3-3蛋白質の癌細胞内での発現量は、食品中の様々な成分でも変化してくる事が分かってきた。例えば、発癌予防食品として知られてきたポリフェノール類(クルクミン、レスベラトロール、ヘスペレチン)や唐辛子の辛味成分のカプサイシンが、熱ショック蛋白質に対する著明な発現抑制効果を発揮するなど食成分の熱ショック蛋白質に対する影響は、今後、食品が示す発癌予防効果や発癌性に関わる極めて重要なファクターと成りえる。本研究では、熱ショック蛋白質の発現量を著明に減少させたこれら食品成分の、細胞分裂抑制効果と癌細胞死促進効果から、食品が有する新しい2つの発癌抑制メカニズムを明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究の方法

<食品成分が有する癌細胞周期制御機能の研究: Hsp90を介した癌細胞周期停止機能>

細胞周期は、細胞増殖過程(G1→S→G2→M→G1)の各時期特異的なサイクリン-サイクリン依存性キナーゼ(cdk)複合体の活性化により制御されており、癌細胞に特徴的な細胞の異常増殖は、そのチェックポイント機構(状況に応じて細胞周期を抑制させる機構)が障害されるために起こる。これら複合体の機能亢進シグナルは細胞周期を回転させる

アクセルとなり、逆に機能抑制シグナルはブレーキとなる。実際、cdkを阻害すると、癌細胞の細胞周期が停止し細胞増殖が抑制される。一方、Hsp90の発現増強は癌の悪性度と相関すると言われており、Hsp90の機能阻害は発癌抑制において有効な手段となりうる。Hsp90は、クライアント分子のcdc2やcdc37を介して、cdk4などのリン酸化酵素を安定化し癌細胞の増殖を促進させることが示唆されてきたが、細胞周期に果たすその役割はよく分かっていない。本研究では、発癌予防食品成分が有する癌細胞でのHsp90に対する著明な発現低下作用に基づき、チェックポイント制御機構を標的とした機能解析を通して、これら食品成分が発揮する発癌抑制メカニズムについて解析を行った。

<方法> ヒト大腸癌細胞株(CaCo2)とヒト肺胞上皮癌(A549)に対して、増殖抑制及びHsp90の発現低下作用を発揮したレスベラトロール、カプサイシンについて、その癌細胞周期制御機構を検証した。培養癌細胞(CaCo2、A549)を上記食品成分で処理後、フローサイトメーター(B.D FACS Calibur)によるDNA含量分析で求められた各周期(G1期、S期、G2&M期)の細胞の割合から、発癌予防食品成分による細胞周期停止効果を検証した。同時に、これらが、Hsp90の発現低下に基づいたものであるか明らかにするため、siRNAによるHsp90の特異的ノックダウンシステムを行い同様の効果を検証した。

<食品成分が有する癌細胞死誘導機能の研究: Hsp70と14-3-3蛋白質介した癌細胞死誘導機能>

これまでの我々の解析から、クルクミンやヘスペレチンによる癌細胞増殖抑制効果に伴うHsp70や14-3-3の発現低下は、これら食品成分がストレス蛋白質を介して細胞死誘導を促進している可能性を示唆している。本研究では、ミトコンドリアを介した細胞死誘導経路の中で、Hsp70や14-3-3による主な抑制ポイントに与える食品成分の影響を検証することで、その細胞死誘導メカニズムについて調べた。

<方法> クルクミンとヘスペレチンによるCaCo2及びA549に対する細胞死誘導効果を、アネキシンVをプローブとしてフローサイトメーターで確認後、次の2つのポイントから細胞死誘導メカニズムを検証した。

<Baxの活性化機構についての検討> Hsp70の細胞死抑制機能の一つに、細胞死誘導因子であるBaxに対する阻害作用がある。実験では、クルクミンかヘスペレチンで処理した癌細胞での活性化Baxの検出とBaxのミトコンドリア移行、並びに、ミトコンドリアの細胞死変化(チトクロームCの細胞質への流失、膜電位の低下)についての解析を行い、これら食品成分による細胞死促進メカニズムについて検証した。

<Badの活性化機構についての検討> 14-3-3

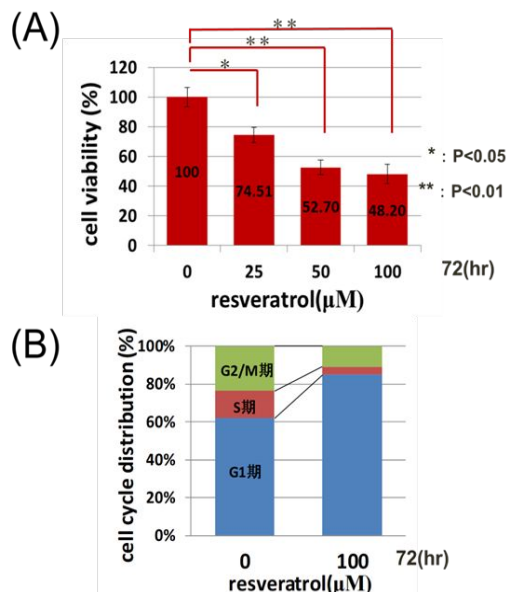
の細胞死抑制機能の一つに、細胞死誘導因子である Bad に対する阻害作用がある。実験では、クルクミンかヘスペレチンで処理した癌細胞での Bad のミトコンドリア移行、さらにこの移行の決め手となる Bad のリン酸化状態並びに 14-3-3 との相互作用について検証した。

#### 4. 研究成果

##### A. レスベラトロールによる癌細胞周期停止機能

レスベラトロールを、ヒト肺胞上皮癌細胞 (A549) に添加すると、その添加濃度依存的に A549 の細胞増殖が抑制された (図 1-A)。この時、フローサイトメーターを用いて細胞周期に与える影響を検討した所、A549 の G1 期での細胞周期停止が認められた (図 1-B)。

図 1

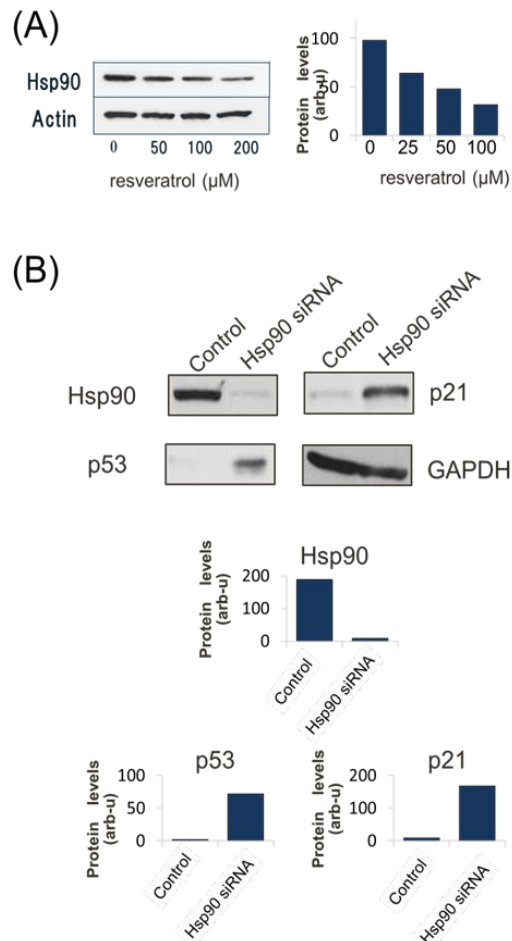


レスベラトロールは、A549細胞をG1期で停止させて増殖を抑制する  
 (A)肺癌細胞(A549)にレスベラトロールを0, 25, 50, 100 μMの濃度で細胞に添加し、72時間培養後、MTTアッセイを用いて細胞生存率を検討した  
 (B)肺癌細胞(A549)にレスベラトロールを0, 100 μMの濃度で細胞に添加し、72時間培養後、PIで染色してフローサイトメーターを用いて細胞周期の解析を行った

次に、レスベラトロールによる熱ショック蛋白質 (Hsp90) に与える影響を検討した所、図 2-A に示す様に、レスベラトロールの添加濃度に依存して、A549 における Hsp90 の発現量の低下が認められた。G1 期での細胞周期制御は、その上流の p53-p21 経路が重要である事が知られている。そこで、A549 での Hsp90 の発現量を、RNAi ノックダウンシステムを用いて特異的に減少させ p53-p21 経路に与える影響を検証した、図 2-B に示すごとく、Hsp90 の発現量を低下させると p53 と p21 の発現増強が認められたことから、p53-p21 の活性化が引き起こされている事が明らかとなった。以上の結果から、レスベラトロールは、Hsp90 の発現量を低下させることで、

A549 細胞を G1 期でその細胞周期を停止させ、癌細胞増殖抑制作用を発揮させている事が明らかとなった。

図 2

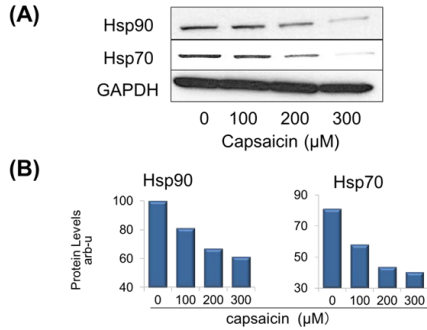


レスベラトロールはHsp90の発現を減少させp53-p21の発現を増加させる  
 (A)レスベラトロールを0, 25, 50, 100 μMの濃度で細胞に添加し、72時間培養後細胞溶解液を作成して、ウエスタンブロット法によりHsp90蛋白質の発現量を検討した。  
 (B)肺癌細胞(A549)にsi Hsp90を10 nM添加し、72時間培養後、細胞溶解液を作成して、Hsp90, p53, p21, GAPDHの発現量をウエスタンブロット法によりその発現量を検討し、その結果をImageJを用いてその黒化度をグラフ化した。

##### B. カプサイシンによる癌細胞周期停止機能

唐辛子の辛み成分であるカプサイシンも、レスベラトロールと同様に A549 細胞に対する増殖抑制効果が見られた。この時、フローサイトメーターを用いて細胞周期に与える影響を検討した所、A549 の G2/M での細胞周期停止が認められた。そこで、このカプサイシンの作用が、熱ショック蛋白質を介したものであるか否かを検証するため、Hsp90 と Hsp70 の発現量に与える影響を検討した。図 3 に示すごとく、カプサイシンは、A549 での Hsp90 と Hsp70 の発現量を著しく減少させた。

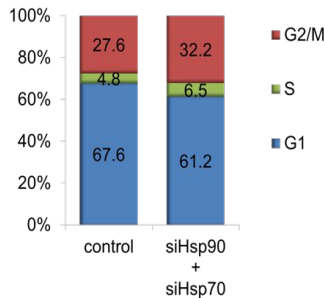
図 3



カプサイシンはHsp90とHsp70の発現量を低下させる  
A549細胞にカプサイシンを添加し、48時間培養した。  
(A)W.B.法によりHsp90とHsp70の発現量を検討した。  
(B)(A)をグラフ化したもの。

次に、これら熱ショック蛋白質の発現低下が、細胞周期停止機能にどの様に関わっているかを検証するため、A549 での Hsp90 と Hsp70 の発現量を、RNAi 法を用いてノックダウンさせ細胞周期に与える影響を検証した。その結果、Hsp90 もしくは Hsp70 を其々単独でその発現量を低下させても細胞周期停止は認められなかったが、Hsp90 と Hsp70 を両方ともノックダウンさせると G2/M での細胞周期停止が認められた(図 4)。これらの結果から、カプサイシンによる癌細胞周期停止機能は、Hsp90 と Hsp70 の両方の熱ショック蛋白質の発現量を低下させることで引き起こされていることが明らかとなった。

図 4



Hsp90とHsp70の発現を同時に抑制すると、細胞周期がG2/M期で停止する

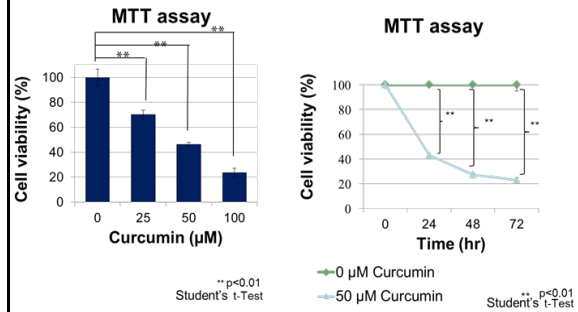
A549細胞に20 nMのsiControl又は10 nMのsiHsp90とsiHsp70を導入し、72時間培養後、PI染色を行い、FACSを用いて細胞周期を解析した。

### C. クルクミンによる癌細胞死誘導機能

クルクミンを A549 細胞に添加すると、その添加濃度及び添加時間に依存して細胞増殖が抑制されることが明らかとなった(図 5)。この細胞増殖抑制機能は、どの様なメカニズムで引き起こされるかを検証するため、クルクミンの細胞周期並びに細胞死に与える影響を検証した。フローサイトメーターを用いた解析では、クルクミンによる細胞周期停止作用は認められなかった。一方、Annexin-V/PI 染色を用いた解析により、クルクミンは、

A549 細胞に細胞死を誘導している事が明らかとなった。

図 5

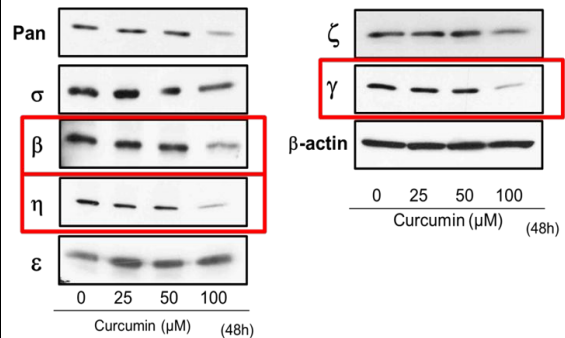


クルクミンは癌細胞の増殖を抑制する

肺癌細胞(A549)にクルクミンを0, 25, 50, 100 μMの濃度で細胞に添加し、48時間培養後、および、50 μMの濃度で時間依存的な細胞増殖抑制効果をMTTアッセイを用いて検討した。

このクルクミンによる細胞死が、実際にどの様なメカニズムで誘導されているのかを検証するため、次に、ミトコンドリアを介した細胞死誘導経路について解析を行った。その結果、クルクミンは、細胞死実行因子である Bax の活性化とミトコンドリア移行を、また Bad のミトコンドリア移行を促進していた。一方、これら実行因子のミトコンドリア移行には、14-3-3 蛋白質が重要である事が知られている。そこで、クルクミンによる 14-3-3 蛋白質に与える影響を検討した。その結果、図 6 に示す如く、クルクミンは幾つかの 14-3-3 蛋白質のアイソフォームの発現量を低下させている事が明らかとなった。

図 6



クルクミンは14-3-3蛋白質の発現を抑制する

肺癌細胞(A549)にクルクミンを0, 25, 50, 100 μMの濃度で細胞に添加し、48時間培養後、W.B.法により14-3-3蛋白質の発現量を解析した。

14-3-3 蛋白質のミトコンドリアを介した細胞死誘導経路での役割は、これら細胞死実行因子にリン酸化依存的に結合することで、そのミトコンドリア移行の抑制を介して細胞死を抑制する機能が知られている。Bad は、脱リン酸化されることでそのミトコンドリア移行が促進されるが、このリン酸化は Akt によって行われている。そこで、次にクルク

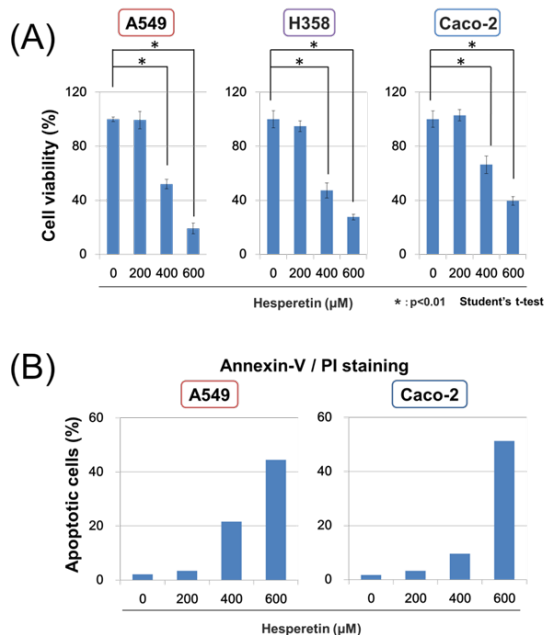


ミンによる Akt に与える影響を検討した。その結果、クルクミンは、Akt の発現量を抑制している事が明らかとなった。以上、クルクミンによる細胞死誘導は、Akt の発現量を低下させる事で Bad の脱リン酸化を促進する事、同時に、14-3-3 蛋白質の発現量を低下させることで Bad のミトコンドリア移行を促進し細胞死を誘導させている事が明らかとなった。

#### D. ヘスペレチンによる癌細胞死誘導機能

柑橘系に含まれている食品成分であるヘスペレチンには、強力な癌細胞増殖抑制効果があることが知られている。我々の今回の解析の結果、これはヘスペレチンによる癌細胞死誘導作用によるものである事が明らかとなった(図7)。

図 7



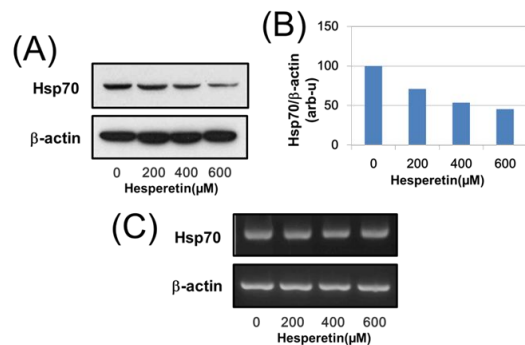
ヘスペレチンは、A549とCaco-2細胞に細胞死を誘導することで癌細胞の増殖を抑制する。

(A) 肺癌細胞(A549, H358)と大腸癌細胞(Caco-2)に、ヘスペレチンを0, 200, 400, 600 μMの濃度で細胞に添加し、48時間培養後、MTTアッセイを用いて細胞生存率を検討した。(B) A549, Caco-2細胞にAnnexin-V/PI染色し、FACSを用いて細胞死を検出した。

今回我々は、ヘスペレチンによるこの細胞死誘導が、熱ショック蛋白質である Hsp70 の発現低下によるものか否かについて検証した。その結果、ヘスペレチンはその濃度に依存して A549 細胞内の Hsp70 の発現量を著明に減少させている事が判明した(図8)。この時、Hsp70 の mRNA 量には変化が認められなかった事から、Hsp70 蛋白質の発現減少は分解によるものが考えられた。そこで、MG132 存在下に A549 をヘスペレチンで処理すると、Hsp70 の発現量の低下は認められなかった。これら結果は、ヘスペレチンによる Hsp70 の減少が、ユビキチンプロテアソーム系で分解されているためと考えられた。それ故、MG132 存在下に A549 をヘスペレ

チンで処理後、ユビキチン抗体で免疫沈降をおこなった。その結果、Hsp70 の共沈降が認められたことから、ヘスペレチンによる Hsp70 の発現量の低下は、分解によるものと考えられた。一方、Hsp70 を RNAi でノックダウンすると、A549 細胞に細胞死が誘導される事が確認された。以上の結果から、ヘスペレチンは、A549 細胞内の Hsp70 の発現量を低下させる事で、細胞死を誘導している事が明らかとなった。

図 8



ヘスペレチンは、A549細胞のHsp70発現量を低下させるが、Hsp70 mRNAレベルを変化させない。

A549細胞にヘスペレチンを添加し、48時間培養後、(A) W.B.法により、Hsp70の発現量を検討した。(B)は(A)をグラフ化したもの。(C) RT-PCR法でHsp70mRNA量を検討した。

#### 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 1 件)

1. Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3β-mediated β-catenin degradation in adherence junctions, with a resultant increase in membrane permeability. H Hiyoshi, IL Indalao, M Yano, K Yamane, E Takahashi, H Kido. Archives of Virology 160(1) pp225-234. 2015.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. レスベラトロールはストレス蛋白質 Hsp90 の発現量を低下させ、肺癌細胞の増殖を抑制する 遠藤弘史, 井上いずみ, 矢野仁康 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月

2. クルクミンによるミトコンドリア経路を介した肺癌細胞死誘導機能についての解析 井上いずみ, 藤田綾乃, 遠藤弘史, 矢野仁康 日本栄養・食糧学会 第 54 回近畿支部大会 2015 年 10 月

3. カプサイシンはストレス蛋白質 Hsp90 の発現量を低下させ、肺癌細胞の増殖を抑制する 野々山悠花, 横山はづき, 遠藤弘史, 矢野仁康 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月

4. クルクミンによるミトコンドリア経路を介した肺癌細胞死誘導機能についての解析 井上いずみ, 藤田綾乃, 遠藤弘史, 矢野仁康 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会合同大会 2015年12月
5. カプサイシンによるストレス蛋白質を介した肺癌細胞の増殖抑制機能 野々山悠花, 遠藤弘史, 矢野仁康 第70回日本栄養・食糧学会大会 2016年5月
6. レスベラトロールによる抗癌活性; Hsp90を介した癌細胞周期停止作用 遠藤弘史, 諸道由美, 井上いずみ, 野々山悠花, 矢野仁康 70回日本栄養・食糧学会大会 2016年5月
7. レスベラトロールによる新規抗癌活性メカニズム; Hsp90発現抑制によるp53-p21経路の活性化作用 遠藤弘史, 諸道由美, 井上いずみ, 矢野仁康 第89回日本生化学会大会 2016年9月
8. ヘスペレチンによるHsp70を介した癌細胞死誘導効果についての解析 田中大也, 遠藤弘史, 矢野仁康 第89回日本生化学会大会 2016年9月
9. カプサイシンによる新規発癌抑制メカニズム: 熱ショック蛋白質を介した細胞周期停止作用 野々山悠花, 遠藤弘史, 矢野仁康 第89回日本生化学会大会 2016年9月

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
 矢野 仁康 (Yano, Mihiro)  
 滋賀県立大学・人間文化学部・生活栄養  
 学科・教授  
 研究者番号: 40304555

(2) 研究分担者  
 ( )  
 研究者番号:

(3) 連携研究者  
 遠藤弘史 (Endo, Hiroshi)  
 滋賀県立大学・人間文化学部・生活栄養  
 学科・助教  
 研究者番号: 30567912

(4) 研究協力者  
 ( )