

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460792

研究課題名(和文) 食品成分による分子標的癌予防法の開発

研究課題名(英文) Development of molecular-targeting cancer prevention by means of food factors

研究代表者

吉田 達士 (YOSHIDA, TATSUSHI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80315936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：臨床開発中の抗腫瘍薬TRAILの問題点を克服するため、生体の内在性TRAILを発現誘導する食品成分を探索し、またその発現誘導メカニズムの解明を行った。TRAIL発現誘導食品成分をスクリーニングし、海産カロテノイド1種、フラボノイド1種、イソチオシアネート1種、脂肪酸代謝産物1種がTRAILの発現を上昇させることを見出した。また、食品成分以外の低分子化合物2種もTRAILの発現を誘導することを見出した。脂肪酸代謝産物がTRAILの発現誘導を行うメカニズムを解析し、転写因子RUNX1がIRF1と相互作用して協調的にTRAILの転写を制御していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：TRAIL is a promising anti-cancer agent but has still been going on clinical studies. To improve the TRAIL efficacy, I carried out the screening of food factors which could induce endogenous TRAIL expression and the analysis of the induction mechanism. Then, I found a marine carotenoid, a flavonoid, an isothiocyanate and a metabolite of fatty acid as TRAIL inducers. In addition, I found two low-molecular weight compounds except for food factors also up-regulated TRAIL expression. I elucidated the mechanism by which the fatty acid metabolite induced TRAIL expression. A transcription factor RUNX1 interacted with IRF1 and collaborated with it to up-regulation of TRAIL expression at the transcription level.

研究分野：分子生化学

キーワード：食品成分 癌 分子標的予防 TRAIL RUNX1 転写制御 IRF1

1. 研究開始当初の背景

TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) は TNF ファミリーに属するサイトカインである。TRAIL は、癌細胞に細胞死を誘導することができるが、一方、正常細胞にはほとんど影響を及ぼさないという特性から、有望な抗腫瘍薬として注目されている。可溶性リコンビナント TRAIL タンパクおよび TRAIL 受容体のアゴニスティック抗体を用いて、様々な腫瘍に対する臨床第 I, II 相試験が実施されている。しかしながら、抗腫瘍性効果としては未だ十分な成果は得られていない。この問題点として、(1) 癌細胞の TRAIL 耐性、(2) TRAIL タンパクの安定性と薬物送達と考えられた。

(1) の問題点に関して、代表者らは実際に多くの癌細胞が TRAIL 耐性であることを確認した。またその問題を克服する方法として、癌細胞における TRAIL 受容体 DR5 の発現を増加させて TRAIL 感受性を増強させる方法を考案し、そのような機能を有する、種々の食品成分を含む低分子化合物を多数発見し報告した。

2. 研究の目的

上記(2)の問題点を克服するため、生体の内在性 TRAIL を発現誘導する食品成分を探索し、またその発現誘導メカニズムを解明する。そして、今までに見出した DR5 発現誘導剤と併用させることによって TRAIL-DR5 経路を介した癌予防効果を増強させ「分子標的併用予防」を実践する。

3. 研究の方法

細胞培養

COS7、HeLa 細胞は 10% fetal bovine serum と 2 mmol/L glutamine を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (WAKO) で培養した。K562 細胞は 10% fetal bovine serum と 2 mmol/L glutamine を添加した RPMI 1640 (WAKO) で培養した。細胞は 37°C、5% CO₂ にて加湿して培養した。

遺伝子発現解析 (Q-PCR)

細胞から total RNA を ISOGEN(Nippon gene) によって抽出し superscript III (Thermo Fisher Scientific) で cDNA 化した。特異的プライマーと THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (TOYOBO)、StepOne Real-Time PCR System

(Applied Biosystems)によって PCR 反応を行い定量化した。

転写制御解析 (ルシフェラーゼアッセイ)

細胞に Lipofectamine2000(Thermo Fisher Scientific)を用いてレポータープラスミドと発現プラスミドをトランスフェクションした。48 時間後に細胞抽出液を調製し、dual-luciferase reporter assay (Promega) とを用いて転写活性を定量化した。

タンパク相互作用解析 (免疫沈降法)

COS7 細胞に RUNX1 と IRF1 の発現プラスミドを、Lipofectamine2000 を用いてトランスフェクションした。24 時間後に RIPA バッファで細胞抽出液を調製した。特異的抗体と protein G-sepharose を添加してタンパク複合体を精製した。免疫沈降物を Western blotting により検出した。

細胞内局在解析 (免疫染色法)

HeLa 細胞に RUNX1 と IRF1 の発現プラスミドを、Lipofectamine2000 を用いてトランスフェクションし、24 時間後にメタノール固定した。特異的抗体および蛍光標識二次抗体を反応させた。LSM510 (Zeiss)共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

(1) TRAIL 発現誘導食品成分の探索

食事に含まれる成分を培養癌細胞の培地に添加し、24 時間後の TRAIL 発現レベルを RNA 量の変化を指標として調べることによって TRAIL 発現誘導食品成分をスクリーニングした。その結果、海産カロテノイド 1 種、フラボノイド 1 種、イソチオシアネート 1 種、脂肪酸の代謝産物 1 種が TRAIL の発現を上昇させることを見出した。また、食品成分以外の低分子化合物 2 種も TRAIL の発現を誘導することを見出した。

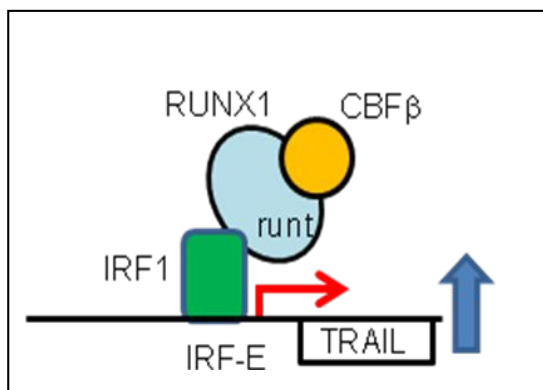
(2) TRAIL 発現誘導メカニズムの解析

脂肪酸代謝産物が TRAIL の発現を誘導するメカニズムを解析したところ、白血病関連転写因子 Runt-related transcription factor 1 (RUNX1)が TRAIL 同様に発現上昇していることを見出し、この転写因子との関連を調べた。RUNX1 はヒト急性骨髄性白血病において高頻度に検出される染色体転座 t(8;21)の切断点

からクローニングされた遺伝子である。多くの白血病において染色体転座による融合遺伝子の形成、点突然変異が報告されている。正常状態では、血球の分化に関わる遺伝子を標的として転写制御を行っている。

ヒト白血病細胞株に RUNX1 とその共役因子 CBF β を高発現させると TRAIL の mRNA レベルでの発現増加が認められた。そこで、更に詳細な発現制御メカニズムの解析を行った。

ヒト TRAIL プロモーターを調べたところ、2つのコンセンサス配列と2つのコンセンサス類似配列が見出された。TRAIL のプロモーター領域をルシフェラーゼアッセイ用プラスミドにサブクローニングしてルシフェラーゼアッセイを行った結果、RUNX1 は TRAIL プロモーターから転写レベルで発現調節していることが判明した。次に、これらのコンセンサス配列およびコンセンサス類似配列に RUNX1 が結合できない変異を導入して実験を行った。この結果、これらの配列は RUNX1 による転写制御には関係していないことがわかった。プロモーターの欠失変異体を用いて解析したところ、転写開始点付近に RUNX1 応答部位を見出した。この部位には Interferon-regulating factor1 (IRF1) 結合部位があったため、RUNX1 と IRF1 の相互作用に関して解析を行った。免疫沈降法により RUNX1 と IRF1 が会合すること、免疫染色法により両者が細胞内で共局在することを見出した。また、RUNX1 が TRAIL プロモーター上の IRF1 結合部位を介して IRF1 と協調して TRAIL の発現を誘導していることを発見した。これらの研究成果は論文投稿準備中である。



図：本研究で新たに見出した TRAIL 発現誘導モデル

(3) TRAIL 発現誘導剤と DR5 発現誘導剤の併用効果

白血病細胞株 K562 をホルボールエステル処理すると RUNX1 の発現増加とともに分化誘導することが報告されている。この系において、TRAIL の発現が RUNX1 依存的に増加することを見出した。また、TRAIL 発現誘導した細胞をフラボノイド、食物繊維の代謝産物で処理した子宮頸癌細胞と共培養させると、癌細胞の増殖を抑制することができた。これらの結果は本研究で計画していた、食品成分による分子標的予防法につながるものである。

今後、本研究で新たに発見した TRAIL 発現誘導成分の分子メカニズムを明らかにし、更に効果的な併用法を開発したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- 1) Mizutani S, Yoshida T, Zhao X, Nimer SD, Taniwaki M, Okuda T.
Loss of RUNX1/AML1 arginine-methylation impairs peripheral T cell homeostasis. **Br J Haematol.** Sep;170(6):859-73. (2015)
(査読有り)
- 2) 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.** Aug 8;4:6000 (2014) *contributed equally
(査読有り)

〔学会発表〕(計3件)

- 1) 吉田達士、山崎健太、忠垣憲次、
栗原康道、酒井敏行、奥田司
RUNX1/AML1 は TRAIL の転写制御に関与する
第 39 回日本分子生物学会年会
2016 年 12 月 2 日 横浜
- 2) Tatsushi Yoshida, Kenjiro Tadamaki, Kenta Yamasaki, Yasumichi Kuwahara, Toshiyuki Sakai, Tsukasa Okuda
A candidate target gene of RUNX1/AML1 transcription factor
第 78 回日本血液学会学術総会 2016 年
10 月 14 日、横浜

3) Tatsushi Yoshida, Yasumichi
Kuwahara, Toshiyuki Sakai, Tsukasa
Okuda Analysis of a transcriptional
target gene regulated by RUNX1/AML1
第 74 回日本癌学会学術総会 2016 年 10
月 8 日、横浜

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 達士 (Tatsushi Yoshida)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：80315936

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし