

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850084

研究課題名(和文)ケルセチン誘導体を用いたヒトがん細胞死誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文)Clarification of molecular mechanisms of the programmed cell death induced by quercetin derivatives in human colon carcinoma cells.

研究代表者

坂尾 こそ枝 (Sakao, Kozue)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・助教

研究者番号：40713285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ケルセチンのヒドロキシル基を化学修飾することで、直接的にその機能の検証を行うために、ケルセチンの3,7,3',4'位をアセチル基またはベンジル基で置換したケルセチン誘導体を合成し、これらの誘導体を用いたヒト大腸がん細胞(HCT116)におけるプログラム細胞死誘導のメカニズムの解明を行った。その結果、ケルセチンならびにアセチル化ケルセチンは有意にHCT116細胞の増殖を阻害した一方、ベンジル化ケルセチンはその機能を失っていた。また、ケルセチンならびにアセチル化ケルセチンによりミトコンドリア内活性酸素(ROS)が生じ、アポトーシスを誘導するほか、オートファジー誘導にも関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To directly demonstrate the role of hydroxyl groups, we have synthesized 3,7,3',4'-O-tetraacetylquercetin (4Ac-Q) and 3,7,3',4'-O-tetrabenzylquercetin (4Bn-Q), which are substituted the hydroxyl groups of quercetin with acetyl or benzyl groups. Treatment of HCT116 human colon carcinoma cells with quercetin and its derivatives revealed that 4Ac-Q and quercetin, but not 4Bn-Q, significantly inhibit cell viability. Apoptosis as characterized by DNA fragmentation, activation of caspase-3, and PARP cleavage, was detected in the cells treated with quercetin or 4Ac-Q, but not with 4Bn-Q. Mitochondrial ROS data showed that quercetin and 4Ac-Q contributed to superoxide generation, consequently causing apoptosis. Furthermore, quercetin as well as 4Ac-Q treatment also induced autophagy. Taken together, the present study demonstrates that quercetin and 4Ac-Q induces a mitochondrial ROS-mediated apoptosis and the autophagy in HCT116 human colon carcinoma cells.

研究分野：農学

キーワード：食品機能

1. 研究開始当初の背景

ケルセチンは食品中の機能性化合物、特に果物や野菜などに多く存在するフラボノイド系ポリフェノールの代表例であり、近年、フィトケミカル(植物栄養素)としても注目を集めている化合物の一つである。疫学調査および動物実験の結果においてケルセチンは強い抗酸化能を有し、がん予防効果を示すことが知られている。その機能はヒドロキシル基に由来することが報告されているが、いずれもヒドロキシル基の数が異なる、ケルセチンに類似した天然ポリフェノールを用いた比較実験により得られた知見であり、ヒドロキシル基の機能評価を直接的に行った報告はほとんどない。そこで本研究において申請者はケルセチンのヒドロキシル基を化学修飾することで、直接的にその機能の検証を行うことを主な目的とした。申請者はこれまでに、有機合成の手法を用いてケルセチンのヒドロキシル基をベンジル化、アセチル化、メチル化することによりケルセチン誘導体を得ており、これらの化合物の生物活性評価をヒト骨髄性白血病細胞(HL-60)における細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導能の評価により行い、ケルセチンのヒドロキシル基が細胞内活性酸素の生成に寄与し、HL-60細胞の増殖抑制およびアポトーシス細胞死の誘導に起因することを直接的に証明したと共にヒドロキシル基の修飾に伴いアポトーシス細胞死が増減し得ることを明らかにした(Sakao K et al., BioFactors, 2009)。また、申請者はケルセチン同様、高い抗酸化能を有し、多種のがん細胞の増殖抑制能を示すことが知られているアブラナ科野菜含有のイソチオシアネート(ITC)類化合物を用いた前立腺がん、乳がん細胞に対するプログラム細胞死誘導メカニズムの詳細な解明も行ってきており、その結果、同じITC化合物でも構造の一部が変われば細胞死のメカニズムが大きく変化すること、アポ

トーシス誘導が他のがん予防機構にも深い関与を示すこと、細胞実験と動物実験では細胞死の誘導機構が異なる場合があることなどを明らかにしてきた(Sakao K et al., Nutr. Cancer, 2013)。

申請者の報告も含め、天然由来の化合物はその構造の僅かな違いでさまざまな機能の変化を示すことが知られている。そのことを応用することで、各化合物が有する機能との構造活性相関に科学的根拠を提示する可能性を見出したため、本研究の着想に至った。また、がんの化学的予防の研究においてプログラム細胞死のメカニズムの解明は常に中心的な役割を占めており、その代表であるアポトーシス細胞死に加え、近年ではオートファジー細胞死およびその分子機構の解明が期待されている。本研究で用いたケルセチンはオートファジー誘導への関与が関心を集め始めており、分子機構の解明が非常に期待される化合物であることも本研究の課題と繋がった。

2. 研究の目的

本研究の主な目的はケルセチンのヒドロキシル基の機能性を直接的に評価すると共に、ヒト大腸がん細胞におけるプログラム細胞死誘導メカニズムを解明することである。ポリフェノールはフェノール性ヒドロキシル基を有する植物成分の総称であり、そのヒドロキシル基がもたらす機能性が注目を浴び続けている。申請者はこれまでにポリフェノールの代表例であるケルセチンのヒドロキシル基を修飾することで、がん細胞のアポトーシス細胞死が増減することを見出した。この結果を踏まえ、本研究においてはケルセチンの誘導体の合成誘導体のがん細胞に対する作用機序の解明、特にアポトーシス誘導能およびアポトーシスとは別のがん細胞制御機構である、オートファジーの関与を明らかにし、ケルセチンのヒドロキシル基の機能性を直接的に検証することを

目的とした。

3. 研究の方法

ヒドロキシル基を修飾したケルセチン誘導体を用い、ケルセチンのがん細胞への作用機構を直接的に解明するために以下の5項目に大別し、研究を遂行した(図1)。

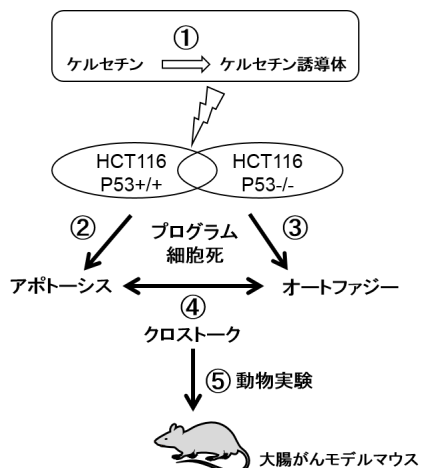


図1 研究方法の概略

ケルセチンのヒドロキシル基に修飾を施した誘導体の合成および構造決定。

得られた誘導体とケルセチンを用いたアポトーシス誘導能および分子機構の変化の解明。

がん制御機構に関与するオートファジーの分子機構の解明。

siRNA トランスフェクション法を用いたアポトーシスおよびオートファジーのクロストークの解明。

大腸がんモデルマウスを作成し、発がん抑制におけるケルセチンの有効性を解明。

特に および のケルセチン誘導体の生物活性作用機序の解明では、ヒト由来大腸がん細胞(HCT-116)に各ケルセチンの誘導体を添加し、ウェスタンブロッティング法を用いて、アポトーシスならびにオートファジー細胞死に関与する主要タンパク質の発現の増減をそれぞれ検討した。一方、Elisa Kitやフローサイトメトリーを用いて各サンプルのアポトーシスおよびオートファジー誘導の定量化を試みた。また、全ての実験においてがん抑制遺伝子p53が発現しているタイプおよびp53欠損タイプのHCT-116細胞を両

方用い、p53依存的なプログラム細胞死が誘導されるか否かについての検討を同時に行うことで、より詳細な分子機構の解明を遂行した。

4. 研究成果

先ずケルセチンの誘導体の合成を行い、主にNMR(核磁気共鳴)やIR(赤外吸収)スペクトル解析を用いて構造の特定を行った。その結果、アセチル化、メチル化、ベンジル化、されたケルセチン誘導体を得たが、本研究では実験に十分な量を容易に得られるアセチル化ケルセチン(4Ac-Q)およびベンジル化ケルセチン(4Bn-Q)を以後の実験に用いた。

生物活性作用機序の解明として、まず初めにHCT-116細胞に各ケルセチンの誘導体を添加し、その細胞増殖抑制能を検討した結果、ケルセチンおよび4Ac-Qにおいて有意な増殖抑制効果が得られた。一方、4Bn-Qは抑制効果を示さなかった。またアポトーシス誘導効果を検討した結果、ケルセチンおよび4Ac-Qを処理した場合、アポトーシス誘導の指標とされるDNA断片化およびcaspase-3の活性化、PARPの切断が得られたのに対し、4Bn-Qはその機能を失っていることが確認された。興味深いことに、いずれの測定においても、4Ac-Qはケルセチンよりも高い生物活性を示すことが分かった。アポトーシス誘導の作用機序の解明として、ミトコンドリア内活性酸素種(ROS)の産生量の測定ならびに、ROS阻害時のアポトーシス誘導能の変化を測定したところ、ケルセチンおよび4Ac-Q共にミトコンドリア内のROS産生を促進し、それがアポトーシス誘導に関与することが示唆された。また、ROS産生を介したアポトーシス誘導がケルセチンにおいては、がん抑制遺伝子p53依存的に起こるのに対し、4Ac-Q処理ではp53に依存しないことが明らかになった。

続いて、オートファジー誘導の定量化ならびにアポトーシス細胞死とオートファジー細胞死のクロストークの解明、さらに動物実

験を実施した。

まず、オートファジーのフラックスの有無を明瞭化するために、申請者は RFP-GFP-LC3 を発現させたヒト由来大腸がん細胞を用い、フローサイトメトリー法で解析を行った。結果、ケルセチンおよび 4Ac-Q 処理でオートファジーフラックスが確認されたのに対し、4Bn-Q はオートファジーを誘導しないことが明らかになった。次にアポトーシスとオートファジーのクロストーク機構を解明するにあたり、siRNA トランスフェクション法を用い、オートファジーに必須とされる Atg7 をノックダウンした。この条件下で、アポトーシス誘導能の変化についてフローサイトメトリーを用いて観測したところ、ケルセチンおよび 4Ac-Q を処理した両細胞におけるアポトーシス誘導の割合には変化が無く、ケルセチンおよび 4Ac-Q により誘導されるアポトーシスとオートファジーは互いに関与していない可能性が示唆された。また、動物実験では、サンプルを定期的に経口投与していたマウスに化学発がん物質であるアゾキシメタンの腹腔内投与および誘発大腸炎モデルに使用されるデキストラン硫酸ナトリウムの自由飲水を組み合わせ、大腸がんを誘発させる一方、さらに一定期間サンプルを投与し続けた。大腸の腫瘍の数や大きさを比較した結果、いずれもコントロールマウスに比べほとんど差がみられなかったが、ケルセチンに比べアセチル化ケルセチンを摂取させたマウスにおいて、わずかに腫瘍の数が少ない傾向が得られた。しかし、コントロール群における大腸がん誘発が顕著で無かったことから、動物実験に関しては今後さらに詳細な条件検討が必要と考えられる。

本研究で得られた結果のうち、特筆すべき点として、ケルセチンのヒドロキシル基をアセチル化することで、がん細胞抑制効果が増加することを見出したことが挙げられる。今後は、アセチル化による生物活性増強効果の

解明を視野に入れた研究も進める。

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)

[学会発表](計 6 件)

1. Kozue Sakao, Akimi Imamura, Taichi Hara, and De-Xing Hou. Quercetin derivatives induced programmed cell death in HCT116 human colon carcinoma. Food for Health International Conference 2016(FOHIC2016). March 21-23, 2016, Kagoshima, Japan.
2. Kozue Sakao and De-Xing Hou. Quercetin derivatives induced p53 independent apoptosis in HCT116 human colon carcinoma. International Conference on Polyphenols and Health (ICPH 2015) October 27-30, 2015, Tours, France.
3. 坂尾 こず枝、侯 徳興 : 「ケルセチン誘導体のヒト大腸がん細胞へのアポトーシス誘導による抗ガン作用」第 19 回日本フードファクター学会。平成 26 年 11 月 8 ~ 9 日、鹿児島大学、鹿児島
4. 黒江 宥治、坂尾 こず枝、侯 徳興 : ケルセチン及びその誘導体によるヒト大腸癌細胞のオートファジー誘導機構の解析。第 19 回日本フードファクター学会。平成 26 年 11 月 8 ~ 9 日、鹿児島大学、鹿児島
5. 野屋 靖奈、泊 奈緒子、坂尾 こず枝、侯 徳興 : 誘導体を用いたケルセチンの細胞抗酸化機構の解析。第 19 回日本フードファクター学会。平成 26 年 11 月 8 ~ 9 日、鹿児島大学、鹿児島
6. Kozue Sakao, Chiyomi Okuyama and De-Xing Hou: In vitro anticancer activity of quercetin derivatives by inducing apoptosis in HCT116 human colon carcinoma. 5th Annual Conference of American Council for Medicinally Active Plants. June 15-18, 2014, Fargo,

North Dakota, USA.

〔その他〕(計 1 件)

招待講演

1. Kozue Sakao and De-Xing Hou.
Apoptosis induction of Quercetin derivatives in human colon carcinoma cells. International Symposium on Current Advances in Radiobiology, Stem Cells and Cancer Research. February 19-21, 2015, New Delhi, India.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂尾 こず枝 (Kozue Sakao)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・助教

研究者番号：40713285