

平成30年 4月18日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07422

研究課題名(和文) 血管新生病を克服する食品開発に関する研究

研究課題名(英文) A study on the food development for the prevention of the angiogenesis

研究代表者

都築 毅 (Tsuduki, Tsuduki)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：00404848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍血管新生を予防するための食品開発のために、天然由来の共役脂肪酸に

注目し、血管新生抑制作用の作用機序を遺伝子発現レベルで究明することを目的とした。共役脂肪酸による血管新生の阻害メカニズムを培養細胞実験系で明確にし、管腔形成阻害作用、さらに管腔形成時に観察される血管内皮細胞の増殖や遊走を阻害することを明らかにした。そしてこれら共役脂肪酸の血管新生阻害作用の分子メカニズムを詳細に検討し、PPAR $\alpha$  を介したものであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the current study, the antiangiogenic effects of ESA were investigated in vitro. ESA also inhibited the formation of capillary-like networks by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and moderately inhibited HUVEC proliferation and migration in a dose-dependent manner. The mechanism by which ESA inhibited angiogenesis was through activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\alpha$ ) and induction of apoptosis in HUVEC. We thus demonstrated that, like troglitazone, ESA is a PPAR $\alpha$  ligand, and that it activates PPAR $\alpha$  induces apoptosis in HUVEC, and inhibits angiogenesis. Our findings suggest that ESA has potential use as a therapeutic dietary supplement and medicine for minimizing tumor angiogenesis.

研究分野：食品機能学

キーワード：血管新生 リノレン酸 エレオステアリン酸 共役リノレン酸 共役リノール酸 キリ ニガウリ

## 1. 研究開始当初の背景

天然には様々な脂肪酸が存在する。分子内に共役二重結合を有する共役脂肪酸は、抗癌作用を始め様々な生理機能を持つことが報告されている。私は以前、天然型共役脂肪酸であるエレオステアリン酸 (ESA) や共役エイコサペンタエン酸 (共役 EPA)、共役ドコサヘキサエン酸 (共役 DHA) に強い癌抑制効果があることを見出した。その時、共役脂肪酸を投与したマウスの癌組織では、内部が変色し、壊死を起こしていた。これは癌組織内部にまで栄養が行き届いていない状態であり、栄養を運ぶ血管が新生されていないと考えられた。よって、共役脂肪酸に血管新生を抑制する可能性が考えられた。癌の発生と進展には、血管系がさまざまな形で密接に関係している。癌が増殖するときには、宿主から癌組織に向かう血管の新生が重要なステップになる。現在、癌治療の目的で血管新生を抑制する成分が注目されている。そこで、共役脂肪酸の血管新生抑制効果を検討し、共役脂肪酸は強い血管新生抑制効果を有することを世界で始めて明らかとした。しかし、この共役脂肪酸の血管新生作用メカニズムを明らかにしていない。そこで、このような独創的な成果を基礎にして、研究計画を天然由来の共役脂肪酸の血管新生抑制作用の作用機序を遺伝子発現レベルで究明することおよび血管新生抑制活性の高い共役脂肪酸に着目し、臨床へ応用するのに十分な情報を揃えることを目的にした。

## 2. 研究の目的

血管新生は既存の血管から新たな血管ができる現象であり、内皮細胞の増殖、遊走および管腔形成の3過程を経て進む。この現象は癌、動脈硬化、糖尿病性網膜症、リュウマチ性関節炎などの多くの難治性疾患の発症と進展に深く関与する。たとえば癌の場合、新生血管から栄養を受け取ることで増殖し、この血管を通して転移す。したがって、血管新生をターゲットとした癌治療が近年注目を集めている。またこの様な血管新生病の食品成分・食品素材による予防は大きな社会的関心の的でもある。私は現在まで一貫して脂質の吸収・代謝と生理機能に関する研究を行ってきた。リノール酸やエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) といった非共役型の脂肪酸については数多く研究されているものの、共役脂肪酸は存在こそ知られているが、生理機能についてはまだ研究初期の段階であった。そこで、天然に存在する共役脂肪酸について、健康補助食品 (サプリメントなど) になりうることを期待して研究を行った。はじめに分析法の確立を試み、最も異性化が起こりにくい方法を確立した。次に酸化安定性についての検討をし、共役脂肪酸は非共役型の脂肪酸と比べて酸化されやすいこと、共役脂肪酸をトリグリセリド型にして抗酸化剤

を添加すれば酸化安定性は飛躍的に増大し、非共役型の脂肪酸より酸化安定性が増大することを明らかにした。次に、共役脂肪酸の吸収や代謝を検討し、共役脂肪酸が生体内の主に小腸と肝臓で、NADPH 依存性酵素により飽和化されることを明らかにした。共役脂肪酸の生理活性の検討も行った。共役脂肪酸の抗肥満作用を生体内外で検討し、共役脂肪酸は肝臓や脂肪組織の脂質量を低下させ、抗肥満作用を有することを見出した。さらに、共役脂肪酸の癌増殖抑制効果を生体内外で検討し、共役脂肪酸は強い癌増殖抑制効果を有することを明らかとした。その時、共役脂肪酸を投与したマウスの癌組織では、内部が変色し、壊死を起こしていた。これは癌組織内部にまで栄養が行き届いていない状態であり、栄養を運ぶ血管が新生されていないと考えられた。よって、共役脂肪酸に血管新生を抑制する可能性が考えられた。癌の発生と進展には、血管系がさまざまな形で密接に関係している。癌が増殖するときには、宿主から癌組織に向かう血管の新生が重要なステップになる。現在、癌治療の目的で血管新生を抑制する成分が注目されている。そこで、共役脂肪酸の血管新生抑制効果を試験し、共役脂肪酸は強い血管新生抑制効果を有することを世界で始めて明らかにした。そして、共役脂肪酸の癌抑制機構の一つとして血管新生阻害作用のあることを見いだした。しかし、この共役脂肪酸の血管新生作用メカニズムは明らかとなっていない。そこで、共役脂肪酸と血管新生の関係を遺伝子発現レベルで究明することおよび血管新生抑制活性の高い共役脂肪酸に着目し、臨床へ応用するのに十分な情報を揃えることを目的に、研究内容をさらに深化発展させた。

## 3. 研究の方法

本研究は平成 27-29 年度の3年間で行い、その間に、血管新生阻害作用が見出された共役脂肪酸の作用機構と実用性を培養細胞実験と動物実験で明確にするため、以下のとおり研究を行った。

天然由来の共役脂肪酸による血管新生阻害の機構を培養細胞実験にて遺伝子発現レベルで明らかにする。

活性の高い共役脂肪酸を見出し、血管新生阻害物質としての実用性を鶏胚漿尿膜法および移植癌動物実験で明確にする。

< 培養細胞系を用いた共役脂肪酸による血管新生の阻害メカニズムの解明 >

これまでの研究で、癌細胞を移植したヌードマウスに共役脂肪酸を経口投与すると、癌組織の著明な退縮作用をもたらすことを見出し、この癌組織退縮の機構として共役脂肪酸による血管新生阻害作用を明らかにしている。そこで、天然由来共役脂肪酸 (エレオステアリン酸など) による血管新生の阻害メカ

ニズムを培養細胞実験系で明確にする。方法としては、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、これをコラーゲンゲル間サンドイッチ法で三次元培養して管腔形成 (血管新生モデル) を評価する。これに、共役脂肪酸を作用させ、管腔形成の増減から血管新生阻害作用を調べる。この時、共役脂肪酸について、活性の高い物の同定を行う。

管腔形成阻害作用を確認できたら、管腔形成時に観察される血管内皮細胞の増殖、遊走に共役脂肪酸がどのような影響を与えるのか調べる。細胞増殖は WST-1 を用いて色素還元法を行い、細胞遊走は傷つけ法およびポイデンチャンパー法を用いて評価する。

これらを確認した後、内皮細胞から mRNA を抽出・精製して蛍光ラベル化後、DNA チップにより血管新生の阻害メカニズムを評価する。

#### < in vivo への展開と実用性の準備 >

共役脂肪酸 (活性が高かった異性体) の作用を生体モデル (in vivo) で評価する。方法としては、初めに鶏の胚形成期の血管形成に対する効果 (鶏胚漿尿膜法) を調べる。胚形成期の血管形成で分泌される血管新生因子は、腫瘍血管新生でも分泌される。したがって、鶏受精卵の漿尿膜上で形成される血管網を利用することで、血管新生への活性成分の影響を評価する。

そして、癌細胞を移植したヌードマウスの腫瘍の成長に付随して起こる血管新生への影響を調べる。このメカニズムを調べるために、腫瘍部位の MMPs や VEGF の mRNA 発現量、さらに HMG-CoA 還元酵素の障害、tyrosine kinase、酸化ストレスマーカーである PCOOH を調べる。

#### 4. 研究成果

本研究は上記のような方法を行ない、血管新生阻害作用が見出された共役脂肪酸の作用機構と実用性を培養細胞実験と動物実験で明確にした。これにより日本人の死因の 60% に関与する血管新生病といわれる動脈硬化症、糖尿病、癌を予防する食素材としての共役脂肪酸を明示できた。

天然由来の共役脂肪酸による血管新生阻害の機構を培養細胞実験にて遺伝子発現レベルで明らかにすることができた。

これまでの研究で、癌細胞を移植したヌードマウスに共役脂肪酸を経口投与すると、癌組織の著明な退縮作用をもたらすことを見出し、この癌組織退縮の機構として共役脂肪酸による血管新生阻害作用を明らかにしている。そこで、天然由来共役脂肪酸 (エレオステアリン酸など) による血管新生の阻害メカニズムを培養細胞実験系で明確にした。方法としては、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、これをコラーゲンゲル間サンドイッチ法で三次元培養して管腔形成 (血管新生モデル)

を評価し、これに、共役脂肪酸を作用させ、管腔形成の増減から血管新生阻害作用を調べ、共役脂肪酸について、活性の高い物の同定を行った。その結果、共役脂肪酸に強い血管新生抑制作用が見出された。特に共役トリエン結合をもつ脂肪酸が強い活性を有することを明らかにした。

管腔形成阻害作用が確認できたため、管腔形成時に観察される血管内皮細胞の増殖、遊走に共役脂肪酸がどのような影響を与えるのか調べた。細胞増殖は WST-1 を用いて色素還元法を行い、細胞遊走は傷つけ法およびポイデンチャンパー法を用いて評価した。その結果、共役脂肪酸に強い細胞増殖抑制作用や細胞遊走抑制作用が見出された。特に共役トリエン結合をもつ脂肪酸が強い活性を有することを明らかにした。

そして内皮細胞から mRNA を抽出・精製して蛍光ラベル化後、DNA チップにより血管新生の阻害メカニズムを評価した。多くの遺伝子が動き、定量 RT-PCR 法でも確かめた結果、VEGF 受容体の発現を阻害すること、その現象は PPAR を介したメカニズムであることが明らかになった。

活性の高い共役脂肪酸を見出し、血管新生阻害物質としての実用性を鶏胚漿尿膜法および移植癌動物実験で明確にできた。

共役脂肪酸 (活性が高かった異性体) の作用を生体モデル (in vivo) で評価した。方法としては、初めに鶏の胚形成期の血管形成に対する効果 (鶏胚漿尿膜法) を調べた。胚形成期の血管形成で分泌される血管新生因子は、腫瘍血管新生でも分泌されるため、鶏受精卵の漿尿膜上で形成される血管網を利用することで、血管新生への活性成分の影響を評価した。その結果、共役脂肪酸に強い胚形成期の血管形成抑制作用が見出された。特に共役トリエン結合をもつ脂肪酸が強い活性を有することを明らかにした。

そして、癌細胞を移植したヌードマウスの腫瘍の成長に付随して起こる血管新生への影響を調べた。その結果、共役脂肪酸に強い腫瘍成長抑制作用が見出された。特に共役トリエン結合をもつ脂肪酸が強い活性を有することを明らかにした。

このメカニズムを調べるために、腫瘍部位の MMPs や VEGF の mRNA 発現量、さらに HMG-CoA 還元酵素の障害、tyrosine kinase、酸化ストレスマーカーである PCOOH を調べた。その結果、共役脂肪酸は、MMPs や VEGF の mRNA 発現量を強く抑制することが明らかとなった。本研究により、共役トリエン型脂肪酸に強い血管新生抑制作用があることを明らかに出来た。共役脂肪酸による血管新生の阻害作用は申請者が世界ではじめて発見した知見であり、これを発展させて血管新生病を予防できる食品機能成分を明確にしようとする本研究の成果は独創的と思われる。とくに、実用化に耐えうる食品由来の血管新生調節物

質が見出されていない現在、本研究の成果は生化学、栄養学にとどまらず、薬学、医学の分野にも大きく展開できる可能性があり、その社会的意義は大きいと考えられる。本研究により、食素材に含まれている共役脂肪酸を活用することで癌、動脈硬化、糖尿病性網膜症、リュウマチ性関節炎など生活習慣病の根幹である血管新生病の予防に役立たせ、高齢社会の健康に貢献出来ると考えられる。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計2件)

1. E S, Yamamoto K, Sakamoto Y, Mizowaki Y, Iwagaki Y, Kimura T, Nakagawa K, Miyazawa T, Tsudoku T.

Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents colorectal cancer in mice.

J Clin Biochem Nutr. 査読あり

61(1):47-52. (2017)

doi: 10.3164/jcfn.16-94.

2. Yamamoto K, Iwagaki Y, Watanabe K, Nochi T, Aso H, Tsudoku T.

Effects of a moderate-fat diet that is enriched with fish oil on intestinal lipid absorption in a senescence-accelerated prone mouse model.

Nutrition. 査読あり

50:26-35. (2017)

doi: 10.1016/j.nut.2017.10.015.

〔学会発表〕(計1件)

1. 清水崇光、小林仁、大内謙二、都築毅  
マイタケによるヒト臍帯静脈内皮細胞の血管新生促進作用、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 17-20 日、京都女子大学(京都市)

〔図書〕(計0件)

特になし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

特になし

取得状況(計0件)

特になし

〔その他〕

ホームページ等

<http://tsudoku.sakura.ne.jp/index.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

都築 毅 (TSUDUKI TSUYOSHI)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：00404848

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし