

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11299

研究課題名(和文) 食品成分からの口腔がん予防活性化合物の探索法確立と単離同定

研究課題名(英文) Establishment of search method and isolation in oral cancer preventive active compounds from food ingredients

研究代表者

渋谷 恭之 (Shibuya, Yasuyuki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90335430

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)：現在、口腔前癌病変である口腔白板症の治療に有効な薬剤はない。そこで本研究では、食品由来の口腔白板症に対する予防活性化合物のスクリーニングを行った。活性化合物を見出すために天然資源からmRNAプロセッシングを阻害する新規化合物を容易に発見するモニタリング方法を確立した。その結果、大豆から抽出したイソフラボン画分はmRNAプロセッシング阻害活性を有することが判明した。さらにフラボノイドであるアピゲニン、ルテオリン、クリシンが強いmRNA成熟阻害活性を有することを見出した。また4-ニトロキノリン1-オキシド(4NQO)を用いた舌前癌病変のラットモデルを用いたところ、アピゲニンは口腔白板症を改善した。

研究成果の概要(英文)：Currently, there are no drugs effective for treating oral leukoplakia, which is an oral precancerous lesion. Accordingly, we have screened the oral leukoplakia preventive active compounds of dietary origin in the present study. To find out the active compounds, we have established a monitoring system which can serve to facilitate the discovery of novel compounds from natural resources that inhibit mRNA processing. AS a result, we found that the isoflavone fraction extracted from soybean possessed mRNA processing inhibitory activity. Moreover, we found that Apigenin, Luteolin and Chrysin which were flavonoids have the strong mRNA maturation inhibitory activity. Using a rat model of tongue precancerous lesion with 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO), it has been also demonstrated that apigenin improved the precancerous lesion.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔白板症 フラボノイド mRNA成熟阻害

1. 研究開始当初の背景

日本人における死因の第一位は30年以上にわたって「がん」である。これまでに様々な抗がん剤が開発されてきたにもかかわらず抜本的な解決には至っていないのは、がんの原因が様々であること、また発生する組織によって対処法が大きく異なることに起因する。このため個別の発生原因や組織の特徴に対応した治療法が求められている。

口腔は直接視診ができるため白板症などの前がん病変として早期に発見できるケースがある。治療法は切除が主体であるが、病変が広範囲に及ぶ場合には全ての病変を切除することが困難なため、経過観察せざるを得ない場合がある。しかし口腔白板症のがん化率は3.1~16.3%と言われており¹⁾、そのリスクは低いものではない。このためがん化を効果的に抑制する方法を確立することが急務である。

これまでに食品由来の化合物として緑黄色野菜中のカロチノイド、ニガウリ中の共役リノレン酸、緑茶中のカテキン類、ホウレンソウ中の糖脂質画分、ニンニクやタマネギ中レクチン活性画分、ワサビ中のイソチオシアネートなどには抗腫瘍活性があると報告されている。実際にカテキン類では口腔前がん病変におけるがん発症予防の研究がなされている。しかし、これまでの手法は伝統的に可能性が高いと目される食品から有効成分を同定するというものであり、臨床応用が期待できるほどの研究段階には至っていない。上記化合物は、がん細胞の増殖抑制を指標に単離され、その作用機序の解明が進められている。このため同様の手法を用いても、食品由来の新たな化合物が得られる可能性は低い。

近年、がん細胞を抑制するプロセスとして、新たに mRNA のプロセッシング過程(成熟過程)が注目されている。mRNA は転写後核内で mRNA スプライシングなどのプロセッシングを受けて成熟し細胞質に輸送されてタンパク質の鋳型となるが、プロセッシング未完了の mRNA は核内に滞留する。例えば優れた抗腫瘍活性を示す天然由来の抗がん化合物であるブラジエノライド B やスプライソスタチン A は、mRNA スプライシングの必須因子である SF3b に結合してスプライシングを阻害し細胞増殖を抑制する²⁾。さらに近年注目されているがん幹細胞の治療抵抗性にはスプライスパリアントが関与している可能性が指摘されている³⁾。これらの発見により mRNA 成熟過程を抗がん剤の創薬ターゲットにする動きが急速に高まりつつあった。

2. 研究の目的

食品において抗腫瘍活性を示す化合物の報告がなされているが、有効性が低いなどの理由から実際に臨床応用されているものは少ない。そこで抗腫瘍作用の新たなターゲットとして注目されている mRNA 成熟過程の阻害活性を指標にして探索を行えば、抗腫瘍活性を有する食品化合物を新規に、効率よく発見できる可能性が高い。それらをタブレット形態などに加工して、長期間口腔に滞留する工夫を行えば、口腔がんの発症を未然に防ぐ新たな方法が提案できる。

そこで本研究では、mRNA 成熟過程を阻害する化合物を食品の中から *in vitro* アッセイ系を用いて探索し、白板症などの前がん病変に対して高い発がん抑止力を持つ化合物として抽出後、臨床応用を目標にタブレット形態などに加工して *in vivo* での評価試験を展開することを目的とした。

3. 研究の方法

研究分担者の増田は mRNA 成熟過程を利用したアッセイ系を用いて mRNA プロセッシングを制御する因子の探索系を開発してきた⁴⁾。そこで、このアッセイ系を用いて食品化合物の抗腫瘍活性を確認する。なお本アッセイ系の信頼性は放線菌の代謝物から単離同定された低分子化合物で mRNA スプライシング阻害活性を有する Gex1A を用いて確認する。

RNA-FISH による mRNA の局在解析

RNA-Fluorescent *in situ* hybridization (RNA-FISH) を用いて、mRNA の挙動を確認する。簡潔に述べると、細胞をカバーガラス上で培養し、一方は Gex1A を細胞に添加してさらに適切な時間培養する。その後、PBS で洗浄し、10%ホルムアミドで固定化し、さらに 0.1% Triton X-100 で細胞を透過化する。これを 2 x SSC で洗浄し、Ambion 社の oligo-hybrid buffer で 1 時間処理する。その後、Cy3 で標識した oligo-dT と一晩ハイブリダイズする。翌日、2 x SSC、0.5 x SSC、0.1 x SSC で洗浄し、DAPI を用いて核を対比染色する。これを蛍光顕微鏡で観察する。Gex1A の処理をしない場合は mRNA が主として細胞質内に局在し、Gex1A 処理を行うとその局在が核内に移動する。

mRNA 成熟阻害活性における構造解析

上記 mRNA 成熟阻害活性を有する化合物について構造解析を行う。

活性化化合物の標的タンパク質の同定

ヒト培養細胞から抽出した核抽出液と活性化化合物を結合させた磁気ビーズを用いて相互作用する因子のアフィニティー精製を行う。共沈したタンパク質を質量分析にて解析し、次いでウェスタンブロットによる検証を行う。

活性化化合物による細胞増殖抑制試験

MTT 試験により、活性化化合物の腫瘍増殖抑制効果を検証する。

次世代シーケンサーによる標的遺伝子の網

量的解析

全 RNA を対象とした次世代シーケンサーによる解析を行い、パイオインフォマティクス解析から、活性化化合物によって各種スプライシング不全を生じた標的候補遺伝子を見出す。

in vivo における口腔がんの抑制効果の解析

4-nitroquinoline 1-oxide(4NQO)をラットに経口投与して自然発生的に口腔前がん病変を誘発させる。その後、活性化化合物を1日ごとに4NQOと交互に計120日間経口投与することにより、発がんの予防や抑制効果について評価する。

4. 研究成果

野菜や果物に含まれるフラボノイドに mRNA 成熟阻害活性を見出した。さらに RNA-FISH により、様々なフラボノイド類(フラボン、イソフラボン、フラバン、フラバノン、フラボノール、フラバノール、カルコン、アントシアニン)の mRNA 成熟阻害活性を評価した結果、アピゲニン、ルテオリン、クリシンに強い mRNA 成熟阻害活性を見出した。活性フラボノイド処理によって核スペクトルに mRNA の蓄積を引き起こす結果が得られ、スプライシング阻害が考えられた。

構造活性相関解析からフラボノイド A 環の 2 個の OH 基が必要であること、逆に C 環の OH 基は効果が大きく減弱すること、B 環には 2 個までの OH 基が活性に必須であることを見出した。

標的タンパク質の同定では mRNA スプライシングに働く U2 構成因子や U2AF65、U2AF35 といった mRNA スプライシング因子と強く結合することを見出した。

MTT 試験ではどの細胞株でも濃度・時間依存性に、これら活性フラボノイドは細胞増殖抑制効果を示すことが判明した。

次世代シーケンサーによる解析、パイオインフォマティクス解析から、活性フラボノイドによって各種スプライシング不全を生じた標的候補遺伝子を見出した。すべてのイントロンではなく特定のイントロン(例えば SRSF7 遺伝子のエキソン 5-6 の間のイントロン)のみスプライシングが阻害されていることを見出した。その他にも SRSF1(乳がん関連遺伝子)、CDCA7(先天性免疫不全疾患関連遺伝子)、PLXNB1(がん浸潤・転移関連遺伝子)、PINK1(家族性パーキンソン病関連遺伝子)などの細胞の増殖・生存やがんに関わる遺伝子のスプライシング不全を多数見出した。

また 4NQO を用いた舌前癌病変のラットモデルを用いたところ、アピゲニンは口腔白斑症を改善した。

引用文献

- 1) 科学的根拠に基づく口腔癌診療ガイドライン. 金原出版. 2013.
- 2) 小竹良彦、他. 細胞工学 29: 168-174, 2010.
- 3) Yae T, et al. Nat Commun. 3; 883, 2012.

- 4) Fujita K et al. Biosci Biotechnol Biochem. 76; 1248-1251, 2012.

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7件)

1. Kurata M, Morimoto M, Kawamura Y, Fouad Ali Mursi I, Momma K, Takahashi M, Miyamae Y, Kambe T, Nagao M, Narita H, Shibuya Y, Masuda S. Inhibition of mRNA maturation by compounds which have a flavonoid skeleton. Biochemistry and Molecular Biology. 査読有、2, 2017, 46-53.
2. Hasegawa T, Shibuya Y, Takeda D, Iwata E, Saito I, Kakei Y, Sakakibara A, Akashi M, Minamikawa T, Komori T. Prognosis of oral squamous cell carcinoma patients with level IV/V metastasis: An observational study. J Craniomaxillofac Surg. 査読有、45, 2017, 145-149. doi: 10.1016/j.jcms.2016.10.011.
3. 須藤満理奈, 倉田雅志, 千賀靖子, 宮本大模, 土持 師, 渋谷恭之. 初診時に口腔扁平苔癬と臨床診断した187例に関する検討. 日本口腔科学会雑誌. 査読有、66, 2017, 19-24.
4. Kurata M, Murata Y, Momma K, Mursi I, Takahashi M, Miyamae Y, Kambe T, Nagao M, Narita H, Shibuya Y and Masuda S. The isoflavone fraction from soybean presents the mRNA maturation inhibition activity. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 査読有、81:3, 551-554, 2016. doi: 10.1080/09168451.2016.1249451.
5. Shigeta T, Minamikawa T, Matsui T, Kakei Y, Akashi M, Hasegawa T, Sakakibara A, Shibuya Y, Komori T. Spindle cell carcinoma of the oral cavity: the impact of chemotherapy on pulmonary metastatic tumor doubling time. Kobe J Med Sci. 査読有、2015, 61(3): E64-70. <http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/61/E64.pdf>
6. Matsushita Y, Yanamoto S, Yamada S, Mori H, Adachi M, Takahashi H, Naruse T, Ikeda H, Shiraishi T, Minamikawa T, Shibuya Y, Komori T, Asahina I, and Umeda M. Correlation between degree of bone invasion and prognosis in

carcinoma of the mandibular gingiva: Soft tissue classification based on UICC classification. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology. 査読有、2015, 27(5): 631-636.
http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/bitstream/10069/35842/1/JOMS_MP27_631.pdf

7. 重田崇至, 南川勉, 明石昌也, 長谷川巧実, 榊原晶子, 松井太輝, 筧康正, 高橋佑輔, 渋谷恭之, 梅田正博, 古森孝英. 後方への進展なくルビエールリンパ節に転移を生じた口腔癌2例. 日本口腔腫瘍学会誌, 27, 1: 1-6, 2015.
http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=dy8ortu/2015/002701/001&name=0001-0006j&UserID=202.35.208.7&base=jamás_pdf

[学会発表](計7件)

1. Kurata M, Shibuya Y, Masuda S. The elucidation of the mechanism by which flavonoids inhibit mRNA processing. 15th INTERNATIONAL STUDENT SEMINAR. 2017.
2. 倉田雅志, 渋谷恭之, 増田誠司. mRNA成熟阻害活性を持つ食品由来成分の探索と作用機序の解明. 日本農芸化学会関西支部第498回講演会. 2017.
3. 倉田雅志, 増田誠司. mRNA成熟阻害活性を持つフラボノイドの作用機序の解明. 日本農芸化学会2017年度大会. 2017.
4. 倉田雅志, 千賀靖子, 増田誠司, 渋谷恭之. mRNA成熟阻害活性を持つ食品由来成分の探索と作用機序の解明. 第71回日本口腔科学会学術集会. 2017.
5. 森田麻希, 堀井幸一郎, 宮本大模, 倉田雅志, 青木尚史, 土持 師, 渋谷恭之. 口底癌再発例に対してS-1単独投与が著効した1例. 第42回日本口腔外科学会中部支部学術集会. 2017.
6. 定兼啓倫, 長谷川巧実, 渋谷恭之, 米澤奈津季, 武田大介, 高橋佑輔, 筧康正, 明石昌也, 南川 勉, 古土井春吾, 橋川和信, 古森孝英. 口腔扁平上皮癌患者の遠位レベル(level4, 5)への頸部リンパ節転移が予後に与える影響. 第34回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 2016
7. 高井美玲, 青木尚史, 堀井幸一郎, 山内千佳, 渋谷恭之. 舌白板症から癌化した

腺扁平上皮癌の1例. 第34回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 恭之 (SHIBUYA Yasuyuki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 90335430

(2) 研究分担者

増田 誠司 (MASUDA Seiji)
京都大学・生命科学研究所・准教授
研究者番号: 20260614

梅田 正博 (UMEDA Masahiro)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授
研究者番号: 60301280

青木 尚史 (AOKI Naofumi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 60747252

堀井 幸一郎 (HORII Kouichirou)
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・その他
研究者番号: 70571686