

令和元年6月12日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07880

研究課題名(和文) フコキサンチンによるがん予防効果を判定する唾液中の予防マーカー代謝物解析

研究課題名(英文) Analysis of salivary predictors evaluating cancer chemoprevention by fucoxanthin

研究代表者

寺崎 将 (Terasaki, Masaru)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：10391195

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)：大腸がん幹細胞様細胞を用いて、フコキサンチン(Fx)の活性代謝物フコキサンチノール(FxOH)におけるapoptosis誘導作用機序、及びその効果と相関する細胞内マーカー代謝物Glycine及びSuccinic acidを明らかにした。また、大腸がん幹細胞様細胞の担がんモデルマウスにおけるFx投与による腫瘍形成抑制作用と相関する腫瘍内代謝物Glycineを同定した。Fx及びFx高含有ワカメ(Fx-high wakame)を投与した大腸発がんモデルAOM/DSSマウスにおける腫瘍微小環境形成抑制効果と相関する唾液マーカー代謝物Glycineを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、FxOHによるがん幹細胞のapoptosis誘導機序、及びこの効果と相関する代謝物における重要な結果を得た。また、Fx及びFx-highワカメによるマウス大腸がん化学予防効果と相関する唾液代謝物に関する結果を得た。これらの成果は、今後、海藻や他の食品によるがん予防研究へ応用可能である。また、唾液メタボロームは、タンパク質や遺伝子発現と共に、がん予防効果を判別する指標となる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Fucoxanthinol (FxOH) is a strong anticancer metabolite of fucoxanthin (Fx). Glycine and succinic acid were good prognostic indicators of apoptosis induction to colorectal cancer stem cells-like cells by FxOH. Fx administration delays occurrence of tumors in xenograft mice by colorectal cancer stem cells-like cells with an anti-tumor predictor of glycine. Salivary glycine was a significant predictor for the attenuation of tumor microenvironment formation by Fx in AOM/DSS mice. Fx-high wakame could prevent formation of the tumor microenvironment with a salivary predictor of glycine of the Fx-high wakame function.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：がん化学予防 がん幹細胞 フコキサンチン フコキサンチノール カロテノイド メタボローム 代謝物 唾液

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内低分子代謝物(解糖系やクエン酸回路等)は、様々な刺激後の細胞内 End products であり、これらを網羅的に検出するメタボローム解析は、先天性疾患のスクリーニングに限らず、近年、がん等の生活習慣病の解析にも応用されるようになってきた。大腸がんは日本人男性の死因の第3位、日本人女性の第1位を占め、予防・治療法の開発が急務となっている。ヒト大腸がん組織では、正常組織と比べて、解糖系が亢進していること、及びコハク酸等のクエン酸回路の代謝物が有意に増加していることが明らかとなった(Hirayama *et al.* 2009)。また、大腸発がんモデル *Apc^{Min/+}* マウスの血漿、血清、結腸組織の GC-MS 解析では、Wild type と比べて、アミノ酸や Acyl-CoA 等の多くの代謝物が有意に増加していることが分かった (Dazard *et al.* 2014, Yoshie *et al.* 2012)。しかし、大腸がん構築の始原細胞として重要な大腸がん幹細胞における代謝物を解析した知見はほとんどない。一方、乳がん及び膵がん患者の唾液、血液、尿では、健康人と比べ、多くの代謝物が有意に増加していることが明らかとなった (Sugimoto *et al.* 2010, Nishiumi *et al.* 2010, Yu *et al.* 2013)。

がん予防が期待できる天然化合物は数多く報告されている。しかし、ヒトの長い食文化で培われた食生活をほとんど変えることなく、がん予防が期待できる天然化合物は僅かである。Fucoxanthin (Fx)は、構造中にエポキシ基とアレン基を有する高極性キサントフィルの一つであり、日本人や他のアジア人が日常的に摂取している多くの褐藻類に含まれている。Fx は、強力な抗がん・抗肥満・抗糖尿病作用等が報告されている(Nara *et al.* 2005, Maeda *et al.* 2005&2007, *etc.*)。Fx の安全性は確認されている(LD₅₀ = 2 g Fx-rich oil/kg b.w.)。最近、抗肥満・抗糖尿病効果を期待して Fx のヒト介入試験が行われた(結果は効果あり)。著者らは、多くの褐藻類のうち、Fx は特にワカメに豊富に含まれること、及びワカメの Fx 蓄積量を高める時期及び海域に関する重要な知見を発表した(Terasaki *et al.* 2009&2012)。ワカメには平均 0.2w/v% の Fx が含まれている。日本人は、一日あたり 1 g 乾重量(約 20 mg Fx 相当)のワカメを摂取している。褐藻類あるいはこの抽出物をヒトへ単回または毎日投与を行うと、血漿中に Fx の代謝産物の一つ Fucoxanthinol (FxOH)が 1~40 nM レベルで現れる(Asai *et al.* 2008, Yonekura *et al.* 2010, Hashimoto *et al.* 2012)。FxOH は Fx よりも培養系がん細胞へ強い増殖抑制作用を示す (Konishi *et al.* 2006, Terasaki *et al.* poster presentation 2006, Terasaki *et al.* 2013)。上記のように、Fx は日常的なワカメの摂取でがん予防が期待できる極めて稀な素材である。しかし、Fx またはワカメによるがん予防の分子機序についてはまだ未解明な点が多い。また、Fx によるがん予防効果において、予防予測因子として唾液に着目した知見はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は次の3点である。

(1) *in vitro* model 実験: ヒト大腸がん幹細胞様細胞を用いて、FxOH によるアポトーシス誘導作用機序、及びその効果と相関する細胞内マーカー代謝物を明らかにする。得られた結果を次に行う *in vivo* 試験の基礎的資料とする。

(2) Fx 投与実験: Fx を投与した発がんモデルマウスの大腸がん予防効果、大腸がん幹細胞発生抑制効果、他の腫瘍微小環境形成抑制効果を明らかにし、これらの効果と相関する唾液中のがん予防マーカー代謝物を明らかにする。

(3) ワカメ投与実験: ワカメを投与した発がんモデルマウスの大腸がん予防効果、大腸がん幹細胞発生抑制効果、他の腫瘍微小環境形成抑制効果を明らかにし、これらの効果と相関する唾液中のがん予防マーカー代謝物を明らかにする。

上記、(2)及び(3)の結果をもとに、Fx 及びワカメによる大腸がん予防効果を判定する唾液中の代謝物の基準を考案する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* model 実験: ヒト大腸がん細胞 HT-29 及び HCT116 細胞(親細胞; PC)を超低接着プレートと幹細胞培地(EGF、bFGF、B27 含有 DMEM-F12 培地)で2日間培養してがん幹細胞様細胞塊(Colonosphere; Csp)を作製した。Csp へ FxOH を添加し、apoptosis 誘導作用機序は、フローサイトメーターと Western blot 法を用いて解析した。細胞内代謝物は、細胞可溶化物へ内部標準を添加し、TMS 化して、GC-MS により量的変化を解析した。

(2) Fx 投与実験: ICR マウス(5週齢、雄)へ、Azoxymethane (AOM)と Dextrane sodium sulfate (DSS)を投与し(AOM/DSS マウス)、8週間飼育して発がんさせた。Fx-oil を、30 mg Fx/kg bw、及び 6 mg Fx/kg bw として胃内強制投与した。コントロール群は、Fx を懸濁している oil と同じ植物油を投与した。と殺の直前、唾液はピロカルピン投与により採取した。と殺後、大腸を採取して開腸し、粘膜上皮腫瘍を計数後、ホルマリン固定し、Hematoxylin and eosin-stained (HE) 及び未染色パラフィン包埋切片を作製した。腫瘍微小環境形成細胞の免疫組織化学染色は、(1) 大腸がん幹細胞: 一次抗体として、Anti-CD44-Alexa488 抗体及び Anti-EpCAM-APC 抗体、(2) がん関連繊維芽細胞: 非標識 Anti- α SMA 抗体及び Anti-rabbit-Alexa488 二次抗体、(3) 腫瘍関連

macrophage 及び樹状細胞: Anti-CD206-Alexa594 抗体を付加した。核を DAPI 染色し、共焦点顕微鏡を用いて各細胞のタンパク質発現を解析した。マウス唾液 100 μ L に対して内部標準を加え、代謝物の量的変化を GC-MS を用いて解析した。各ピークに相当する代謝物は、pmol metabolite/100 μ L saliva として換算した。

(3) ワカメ投与実験: 北海道函館市漁業組合の漁業士のご協力のもと、ワカメのローブ栽培を行った。ワカメを経時的に採取し、総脂質を抽出した。総脂質中の Fx 含量は、HPLC を用いて解析した。ICR マウス (5 週齢、雄) の AOM/DSS マウスを作製し、7 週間飼育した。Fx を高含有するワカメ (Fx-high wakame, 5 mg Fx/g wakame dw)、及び Fx 低含量ワカメ (Fx-low wakame, 3 mg Fx/g wakame dw) を粉碎機を用いて粉碎し、粉末通常餌料 (Grade: MF) と 1:5 で混ぜて混餌を調製した。1.5 g/匹/回として 15 時間与え、混餌を投与しない時は、固形 MF を与えた。コントロールとして粉末 MF を用いた。唾液採取法、大腸粘膜切片固定、免疫組織化学染色法、及び唾液代謝物解析法は、(2) と同様に行った。

4. 研究成果

(1) in vitro model 実験: HT-29 及び HCT116 由来 Csp へ FxOH を添加した結果、濃度依存的な増殖抑制及び apoptosis 様の細胞死が観察された。タンパク質発現を調べたところ、上皮間葉転換抑制、及び Integrin、Stat、MAPK signal 活性化抑制が認められ、apoptosis を起こしていることが明らかとなった。Csp 細胞内の代謝物を GC-MS を用いて調べた結果、両細胞とも、FxOH 添加により、Glycine 及びコハク酸の有意な減少 (0.1-0.5 倍) を認めた。これらの結果から、この 2 代謝物は Csp の apoptosis 誘導の予測マーカーとなる可能性が強く示唆された (Terasaki *et al. Anticancer Res* 2018 & *Oncol Rep* 2018)。次に、Csp の分散懸濁液をヌードマウスの皮下へ接種して担がんさせ、Fx を細胞接種前より投与して腫瘍発症率を調べた結果、Fx 投与群は、コントロール群と比較して、有意に腫瘍発症率の低下が認められた。と殺後、腫瘍を採取して代謝物を解析したところ、Glycine のみ Fx 投与により有意な低下が示された。この結果から、Glycine は、マウス腫瘍発症低下のマーカーとなる可能性が強く示唆された (Terasaki *et al. J Clin Biochem Nutr* 2019)。

(2) Fx 投与実験: AOM/DSS マウスの病理解析を行った結果、粘膜潰瘍、異形成、及び腫瘍の発症率や多重度は、Fx 投与により抑制傾向が認められた。AOM/DSS マウスの正常粘膜における腫瘍微小環境形成細胞群を共焦点顕微鏡を用いて解析したところ、Fx 投与群の大腸がん幹細胞様 CD44^{high}/EpCAM^{high} 細胞、大腸がん関連繊維芽細胞様 α SMA^{high} 細胞、及び腫瘍関連マクロファージ及び樹状細胞様 CD206^{high} 細胞は、コントロール群と比べ、有意な発生抑制効果が認められた。唾液代謝物を解析した結果、9 つの主要代謝物が同定され、グリシン含量のみ、Fx 投与群は、コントロール群と比べ、約 0.5 倍へ有意に抑制した。これらの結果、Fx 投与マウスにおける腫瘍微小環境形成抑制と相関する唾液マーカー代謝物としてグリシンを明らかにした (Terasaki *et al. IN VIVO* 2019)。

(3) ワカメ投与実験: 5 mg/g dw 以上の Fx を含む Fx-high ワカメを採取し、本ワカメ粉末と MF の混餌の準備に成功した。AOM/DSS マウスの病理解析を行った結果、と殺まで各群の体重、及び前がん病変である ACF 数に明瞭な違いはみられなかった。大腸正常粘膜組織における CD44^{high}/EpCAM^{high} 細胞、 α SMA^{high} 細胞、及び CD206^{high} 細胞を調べた結果、Fx-high ワカメ投与群は、コントロール群と比べ、有意な発生抑制効果が認められた。さらに、カスパーゼ 3 活性化細胞の増減を調べたところ、Fx-high ワカメ投与群は、Fx-low ワカメ投与群及びコントロール群と比べ、有意な増加が認められた。唾液代謝物を解析した結果、5 つの主要代謝物が同定され、グリシン含量のみ、Fx-high ワカメ投与群は、コントロール群と比べ、約 0.4 倍に抑制された。これらの結果、Fx-high ワカメ投与マウスにおける腫瘍微小環境形成抑制と相関する唾液マーカー代謝物としてグリシンを明らかにした (未発表)。

(2)-(3) の実験の結果、Fx または Fx-high ワカメ投与マウスにおける唾液グリシン含量が、コントロールマウスと比べ、約 0.4-0.5 倍へ減少した場合、がん予防効果が得られる可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Terasaki, M., Masaka, S., Fukada, C., Houzaki, M., Endo, T., Tanaka, T., Maeda, H., Miyashita, K., Mutoh, M. Salivary glycine is a significant predictor for the attenuation of polyp and tumor microenvironment formation by fucoxanthin in AOM/DSS mice. *IN VIVO*, 33, 365-374, 2019.
2. Terasaki, M., Matsumoto, N., Hashimoto, R., Endo, T., Maeda, H., Hamada, J., Osada, K., Miyashita, K., Mutoh, M. Fucoxanthin administration delays occurrence of tumors in xenograft mice by colonospheres, with an anti-tumor predictor of glycine. *J Clin Biochem Nutr*, 64, 52-58, 2019.
3. Tamura, S., Narita, T., Fujii, G., Miyamoto, S., Hamoya, T., Kurokawa, Y., Takahashi, M., Miki, K.,

- Matsuzawa, Y., Komiya, M., Terasaki, M., Yano, T., Mutoh, M. Inhibition of NF-kappaB transcriptional activity enhances fucoxanthinol-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Genes Environ*, 41, 1, 2019. [doi: 10.1186/s41021-018-0116-1]
4. Terasaki, M., Iida, T., Kikuchi, F., Tamura, K., Endo, T., Kuramitsu, Y., Tanaka, T., Maeda, H., Miyashita, K., Mutoh, M. Fucoxanthin potentiates anoikis in colon mucosa and prevents carcinogenesis in AOM/DSS model mice. *J Nutr Biochem*, 64, 198-205, 2019.
 5. Kuhara, K., Tokuda, K., Kitagawa, T., Baron, B., Tokunaga, M., Harada, K., Terasaki, M., Uehara, O., Ohta, T., Takai, R., Hamada, JI., Kobayashi, M., Shimo, T., Nagayasu, H., Kuramitsu, Y. CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) is down-regulated by active hexose-correlated compound in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res*, 38, 6107-6111, 2018.
 6. Terasaki, M., Mima, M., Kudoh, S., Endo, T., Maeda, H., Hamada, J., Osada, K., Miyashita, K., Mutoh, M. Glycine and succinic acid are effective indicators of the suppression of epithelial-mesenchymal transition by fucoxanthinol in colorectal cancer stem-like cells. *Oncol Rep*, 40, 414-424, 2018.
 7. Terasaki, M., Ogawa, Y., Endo, T., Maeda, H., Hamada, J., Osada, K., Miyashita, K., Mutoh, M. Glycine is a predictor for a suppressive effect of fucoxanthinol on colonosphere formation under hypoxia. *Anticancer Res*, 38, 2169-2179, 2018.
 8. Abe, T., Terasaki, M. Synthesis of Phaitanthrin E and tryptanthrin through amination/cyclization cascade. *Helv. Chim. Acta*, 101, e1700284, 2018.
 9. Terasaki, M., Maeda, H., Miyashita, K., Tanaka, T., Miyamoto, S., Mutoh, M. A marine bio-functional lipid, fucoxanthinol, attenuates human colorectal cancer stem-like cell tumorigenicity and sphere formation. *J. Clin. Biochem. Nutr*, 61, 25-32, 2017.
 10. Terasaki, M., Maeda, H., Miyashita, K., Mutoh, M. Induction of anoikis in human colorectal cancer cells by fucoxanthinol. *Nutr. Cancer*, 69, 1043-1052, 2017.
 11. Endo, T., Kimura, O., Terasaki, M., Fujii, Y., Haraguchi, K., Ohta, C., Koga, N., Kato Y. Growth-related changes in non-essential and essential metals in the liver of star-spotted smooth-hounds (dogfish) *Mustelus manazo* from the northern region of Japan. *Marine Environ Res*, 131, 156-161, 2017.

〔学会発表〕(計 10 件)

三木 洗平、田村秀哉、成田匠、寺崎将、藤井元、小宮雅美、鱧屋隆博、黒川友里絵、高橋麻衣子、松澤優衣、武藤倫弘、十島二郎、Fucoxanthiol と NF-κB 阻害剤の同時処理による apoptosis 増強作用、アグリ・バイオ公開シンポジウム、2018

成田匠、田村秀哉、寺崎 将、藤井元、小宮雅美、鱧屋隆博、黒川友里絵、高橋麻衣子、松澤優衣、三木 洗平、武藤倫弘、ヒト大腸がん由来細胞における Fucoxanthiol と NF-κB 阻害剤の共処理による apoptosis 誘導、第 25 回日本がん予防学会学術総会、2018

松本直也、橋本龍一、遠藤哲也、寺崎 将、フコキサンチンによる大腸がん幹細胞様細胞由来腫瘍発症抑制効果の指標となる唾液代謝物、日本薬学会第 138 年会、2018

Masaru Terasaki, Jun-ichi Hamada, Michihiro Mutoh, Metabolic markers related to suppression of epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells by fucoxanthinol, 第 76 回日本がん学会学術総会、2017

田村秀哉、寺崎 将、藤井 元、宮本真吾、小宮雅美、鱧屋隆博、黒川友理絵、高橋麻衣子、矢野友啓、武藤倫弘、ヒト大腸がん由来細胞に対する Fucoxanthin と NF-κB 阻害剤の併用によるアポトーシス誘導について、第 24 回日本がん予防学会学術総会、2017

美馬雅俊、工藤里紀、遠藤哲也、寺崎 将、代謝物プロファイルに基づく大腸がん幹細胞における Fucoxanthinol の EMT 抑制効果の解析、日本薬学会北海道支部第 144 例会、2016

小川ゆう姫、遠藤哲也、寺崎 将、低酸素環境がん幹細胞における Fucoxanthinol の代謝制御機構の解明、日本薬学会北海道支部第 144 例会、2016

小笠未遥、河野あやめ、遠藤哲也、寺崎 将、Fucoxanthinol による大腸がん細胞アノイクス誘導作用機序の解明、日本薬学会北海道支部第 144 例会、2016

奥村美佑、鎌田溪奈、遠藤哲也、寺崎 将、抗がん剤によるがん幹細胞様細胞形成抑制機序を予測する代謝物の解析、日本薬学会北海道支部第 144 例会、2016

寺崎 将、武藤倫弘、フコキサンチノールはがん幹細胞様細胞の腫瘍形成とスフィア形成を弱める、日本薬学会第 137 年会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：武藤 倫弘

ローマ字氏名：MUTOH, michihiro

所属研究機関名：国立研究開発法人国立癌研究センター

部局名：社会と健康研究センター

職名：室長

研究者番号(8桁): 30392335

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。