

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22773

研究課題名（和文）RB活性化能を有するがん予防成分を応用した動脈硬化予防戦略

研究課題名（英文）Basic research for prevention of arteriosclerosis by cancer preventive ingredients with RB activation ability

研究代表者

友杉 真野（堀中真野）（Tomosugi (Horinaka), Mano）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80512037

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000 円

研究成果の概要（和文）：申請者らはがん細胞に対し、増殖抑制効果やがん抑制遺伝子の活性化能を有する成分の探索を続けており、現在、一部は製品化に向けた段階にある。今回、がん以外の疾患モデルとして動脈硬化のプロセスにおける検討を目的とした。ヒト血管細胞に増殖因子を添加することで過剰な細胞増殖を誘導し、そこに、評価サンプルを添加した結果、過剰な細胞増殖のみを有意に抑制する結果が得られた。定常レベルの細胞増殖に対する影響は示さなかった。動脈硬化の進展に関与するマクロファージ活性化因子であるMCSFの発現誘導も抑制された。LPS刺激によるマウスマクロファージの過剰な増殖に対しても、有意な抑制効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の日本人の死因は「がん」と「循環器疾患」で半数を超えている。一方、様々な報告により、がん・循環器疾患のいずれの発症においても、共通した標的分子の影響が存在する可能性が十分に考えられる。その候補として、申請者らは代表的がん抑制遺伝子『RB』に着目した。本研究において検討したサンプルは、国内飲料企業との産学連携研究として商品化に繋げていく計画であり、基礎研究も継続していく。幅広い疾患予防のために貢献できる結果が出せることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have continued to search for food samples with a growth-inhibitory effect by activating the function of tumor-suppressor RB gene product on cancer cells. We examined whether the samples inhibited the growth of excessive and abnormal cell proliferation of human vascular cells induced by growth factors, in order to examine the effects of above samples in disease models other than cancer. As a result, we found that excessive vascular cell proliferation was significantly suppressed by the addition of the above samples. No effect of the samples was observed on steady-state vascular cell proliferation. Induced expression of MCSF, a macrophage activator, was also suppressed by the sample. A significant inhibitory effect was also observed on the excessive proliferation of mouse macrophages stimulated by LPS.

研究分野：予防研究

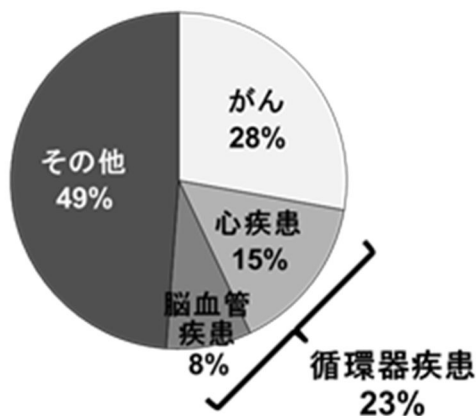
キーワード：予防 RB 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

日本国民の死因の第二位「心疾患」と第三位「脳血管疾患」の占める割合は、合計で死因全体の四分の一を占めており、第一位の「がん」に次ぐ要因となっている。近代の日本人は、生活習慣が明らかに欧米化しつつあり、がんと同等に予防・治療戦略が喫緊の課題とされているのが循環器疾患である。一方で、近年、様々な既報から、動脈硬化や、動脈硬化が原因となる脳梗塞などの疾病の発症が、代表的がん抑制遺伝子『RB』の失活の結果として生じる、細胞の増殖異常によることが示唆されている (Science 1995;267:518-22, J Mol Cell Cardiol 2008;45:610-6, Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:10254-9)。

RB は細胞の増殖を正常に維持する機能を有しており、多くのがんで普遍的に失活していることが知られている。申請者らは、RB の活性化ががんの予防・治療に有効であることを証明してきた。これまでの研究成果として、RB を再活性化しうる食品成分を同定してきた。日常的に摂取する野菜や果物には、数々の RB 活性化成分が含まれていることを示唆するものである。「がんを防ぐための新 12 か条」(国立がん研究センターがん予防・検診研究センター)で推奨されている「野菜と果物をとる」ことの有用性を、実験的に分子機序の側面から立証したことになる。

一方で、動脈硬化予防の一つの項目として、「野菜と果物をとる」ことが挙げられている(日本動脈硬化学会)それぞれの疾患の予防法として、RB 活性化成分を多く含む野菜や果物が推奨されているということは、RB 活性化食品が、がんの予防にも、動脈硬化の予防にも貢献できる可能性を示唆している。



【既報】

Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product.

Science. 1995;267:518-22.

活性化 RB の導入により、動脈硬化の原因となりうる血管平滑筋細胞の増殖が抑制された。がん以外での疾患で RB の活性化が有用であることを示した論文である。

2. 研究の目的

研究代表者らは、代表的がん抑制遺伝子『RB』の失活が最も重要な発がん機構であることを実験予防医学の立場から証明している。RB は細胞の増殖を正常に維持しており、RB の活性化が、日本人にとって主要な死因である、がんと循環器疾患に対する予防に対して有効である可能性があると考えられる。研究代表者らは、種々のがん予防食品成分が、がん細胞に対して RB を再活性化させることで細胞増殖を停止させ、がん予防効果を示すことも数多く報告している。本研究課題では、独自に見出した「RB 活性化能を有するがん予防成分」の動脈硬化に対する予防効果の可能性について検討することを目的とする。



3. 研究の方法

動脈硬化病変の進展のメカニズムは、以下のように報告されている。

高脂血症、高血圧など種々の傷害をうけて活性化した血管内皮細胞に血小板が付着する。

血管内皮細胞に接着分子や炎症性ケモカインの発現が誘導される。

血中の単球は内皮細胞に接着し、血管壁へ侵入しマクロファージに形質転換する。

単球由来マクロファージから PDGF などの増殖因子が分泌される。

PDGFによって中膜血管平滑筋細胞が内膜側へ遊走しつつ増殖する。

血管平滑筋細胞は増殖しながら細胞外マトリックスを産生し内膜肥厚病変を形成する。

そこで本研究では、これまでヒトがん細胞で評価を行ってきた系を用い、ヒト大動脈平滑筋細胞、ヒト大動脈内皮細胞、およびマウスマクロファージを対象とし、現在までの申請者の産学連携研究の成果として見出されてきたサンプルを評価に用いた。細胞の増殖刺激として血小板由来成長因子 (PDGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、LPS の添加条件の検討を行った。増殖刺激下において、細胞増殖抑制能の評価、炎症性ケモカインなどの発現量への影響の評価を実施した。

[細胞]

ヒト大動脈平滑筋細胞 (Human Aortic Smooth Muscle Cells (HAoSMC))

ヒト大動脈内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells (HAoEC))

BALB/c マウス由来マクロファージ (J774A.1)

[増殖刺激]

HAoSMC: 血小板由来成長因子 (PDGF)

HAoEC: 血管内皮増殖因子 (VEGF)

J774A.1: リポポリサッカライド (LPS)

[評価系]

細胞増殖抑制能の評価: WST-8 assay

細胞周期への影響: FACS

炎症性ケモカインの発現量への影響の評価: real time RT-PCR

4. 研究成果

【血管細胞の異常増殖に対する抑制効果】

ヒト大動脈平滑筋細胞 (HAoSMC)、ヒト大動脈内皮細胞 (HAoEC) を用い、増殖因子添加による過剰な細胞増殖に対し、評価サンプルのおよぼす影響を評価した。

HAoSMC に関するスケジュールは以下の通り。

細胞播種 (Day 1) 翌日、FBS (-) 培地に交換 (Day 2) 培地に対して 1/2560 量の評価サンプルを添加 (Day 3) 増殖刺激の PDGF を添加 (Day 4) 72 時間後に WST-8 assay にて細胞数を測定 (Day 7)

HAoEC に関するスケジュールは以下の通り。

細胞播種 (Day 1) 翌日、0.1%FBS 培地に交換 (Day 2) 培地に対して 1/5120 量の評価サンプルを添加 (Day 3) 増殖刺激の PDGF を添加 (Day 4) 24 時間後に WST-8 assay にて細胞数を測定 (Day 5)

その結果、評価サンプルの添加によって、増殖刺激下の過剰な増殖に対して有意な抑制効果を示した。一方で、正常な細胞増殖には有意な影響は認められなかった。

【炎症性ケモカインの発現への影響】

血中の単球は血管壁へ侵入しマクロファージに形質転換する。マクロファージは増殖因子 (PDGF 等) を産生し血管平滑筋細胞の遊走・増殖に関与する。M-CSF (マクロファージ・コロニー刺激因子) は単球からマクロファージへの分化や増殖を刺激する因子で、血管壁を構成する全ての細胞から分泌される。さらに内膜に遊走してきた血管平滑筋細胞自身も、M-CSF 受容体を発現し、マクロファージ様細胞に分化し、さらに動脈硬化が進展すると考えられている。

HAoSMC を播種 (Day 1) 翌日、FBS (-) 培地に交換 (Day 2) 評価サンプルを添加 (Day 3)

増殖刺激の PDGF を添加 (Day 4) 24 時間後に total RNA を回収 (Day 5) real time RT-PCR にて M-CSF の発現量比較を行った。内部標準には、18SrRNA 発現量を用いた。その結果、PDGF 刺激による M-CSF の発現誘導は、評価サンプルの添加によって抑制された。一方、炎症性ケモカインの CCL2 の発現量については、本試験の条件下では、評価サンプルによる抑制能は認められなかった。

【血管細胞の細胞周期に対する影響】

PDGF 刺激下の HAoSMC の細胞周期に対する評価サンプルの影響を FACS にて解析した。S 期の減少傾向と、Sub-G1 期の増加傾向が認められた。

【マクロファージの異常増殖に対する抑制効果】

BALB/c マウス由来マクロファージ (J774A.1) に対し、LPS 刺激によって増殖を亢進させ、評価サンプルの影響を検討した。

J774A.1 に関するスケジュールは以下の通り。

細胞播種 (Day 1) 翌日、5%FBS 培地に交換し、2 時間後に LPS と評価サンプルを添加 (Day 2) 24 時間後に WST-8 assay にて細胞数を測定 (Day 3)

その結果、LPS 刺激によって誘導される細胞数増加は評価サンプルによって抑制された。

【マクロファージの異常増殖に対する抑制効果】

マクロファージにおいて、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) はサイトカインや LPS などによって発現が誘導され、一酸化窒素 (NO) を生成する。また、NO は NF- κ B を活性化し、炎症へと導く。植物由来のフラボノイドには、LPS 刺激によって誘導される COX-2 や iNOS の発現に対し抑制効果を示すことが報告されている。マウスマクロファージである J774A.1 において、LPS 刺激下で誘導される COX-2 や iNOS の発現に対し、本研究課題の評価サンプルについて検証した。アピゲニンを陽性対照として、Western blotting により検討を行ったが、本試験では、評価サンプルによる COX-2 や iNOS の発現に対する抑制効果は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taniguchi K, Kageyama S, Moyama C, Ando S, Ii H, Ashihara E, Horinaka M, Sakai T, Kubota S, Kawauchi A, Nakata S.	4. 巻 -
2. 論文標題 -Glutamylcyclotransferase, a novel regulator of HIF-1 expression, triggers aerobic glycolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Gene Ther	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41417-020-00287-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chihara Y, Iizumi Y, Horinaka M, Watanabe M, Goi W, Morita M, Nishimoto E, Sowa Y, Yamada T, Takayama K, Sakai T.	4. 巻 56
2. 論文標題 Histone deacetylase inhibitor OBP-801 and amrubicin synergistically inhibit the growth of squamous cell lung carcinoma by inducing mitochondrial ASK1-dependent apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 848-856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2020.4969.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mutoh M, Yoshimura K, Fujii G, Nakamura T, Takeshita T, Wakabayashi K, Sakai T, Ishikawa H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Very long-term treatment with a Lactobacillus probiotic preparation, Lactobacillus casei strain Shirota, suppresses weight loss in the elderly	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12061599.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口恵香, 影山進, 茂山千愛美, 安藤翔太, 飯居宏美, 芦原英司, 堀中真野, 酒井敏行, 窪田成寿, 河内明宏, 中田晋
2. 発表標題 新規がん予防標的GGCTは、がん細胞にHIF-1 発現を誘導しワールブルク効果を促進する
3. 学会等名 第20回分子予防環境医学研究会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀中真野, 酒井敏行
2. 発表標題 「先制医療」の実現に向けた戦略的研究
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口恵香, 影山進, 茂山千愛美, 安藤翔太, 飯居宏美, 芦原英司, 堀中真野, 酒井敏行, 河内明宏, 中田晋
2. 発表標題 新規がん予防標的GGCTは、がん細胞にHIF-1 発現を誘導して好気性解糖を促進する
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	増田 光治 (Masuda Mitsuharu) (10305568)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究 分担者	酒井 敏行 (Sakai Toshiyuki) (20186993)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------