

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790428
 研究課題名（和文） p53, iNOS ノックアウトを用いたトコトリエノールの抗腫瘍作用機序解明
 研究課題名（英文） Anti-cancer effects of tocotrienol in p53, iNOS knock out fibrobrasts.
 研究代表者
 和田 小依里 (WADA SAYORI)
 京都府立大学・生命環境科学研究科・講師
 研究者番号：60420709

研究成果の概要（和文）：天然ビタミンEにはトコフェロールとトコトリエノールがある。トコトリエノールはトコフェロールと比較して生体活性が強く抗腫瘍効果を有するとされている。我々はトコトリエノールが大腸がん細胞に直接作用し caspase-3, -9 を介したアポトーシス誘導し細胞増殖抑制作用を有することを見出した。また、間質細胞はさまざまな化学物質を分泌しがん細胞の増殖を促進するが、トコトリエノールにはそれらを抑制し、間質細胞を介した大腸がん細胞の増殖を抑える作用を有することも見出した。これらのことから、トコトリエノールは大腸がん細胞への直接抑制作用のみならず、間質細胞を介した間接的ながん増殖抑制作用も有することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Tocotrienols is one class of natural compound of vitamin E, together with tocopherols. Previous studies showed that tocotrienols exert not only cardiovascular protective effects but also anti-cancer effects. We investigated the antitumor actions of tocotrienols both in colon epithelial cells and in stromal cells, since colorectal cancer is the third most common type of cancer.

In human colon adenocarcinoma HT29 cells, delta-tocotrienol induced apoptosis but not cell cycle arrest, and apoptosis was induced thought activating caspase-9, -3, and -7. Caspase inhibitors canceled the antiproliferative effect of tocotrienol.

Cyclooxygenase-2 produced by stromal cells has been reported to promote tumorigenic progression of intestinal epithelial cells. In mouse embryonic fibroblasts (MEFs), which were p53-deficient, delta-tocotrienol treatment reduced cyclooxygenase-2 proteins expression and prostaglandin E2 concentrations though lowering nitrite concentration.

These data suggest that tocotrienol appears to have direct antiproliferative effect on colon adenocarcinoma cells and indirect cyclooxygenase-2 suppressive effect on stromal cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：(1)トコトリエノール(ビタミンE) (2)大腸がん (3)間質細胞 (4)COX-2 (5)Caspase-3

1. 研究開始当初の背景

がんは依然として死因の第一位であり、がんの原因の 35%は食事に由来すると考えられている。がん発病前に予防する一次予防は、本人の QOL・コストの面においてもっとも効果が高い。食品因子の持つ抗腫瘍効果に焦点を当て、作用とメカニズムを解析し、「よりよい食品を摂取し食生活改善すること」を啓蒙することは非常に重要であると考えられる。

トコトリエノールの経口投与が乳がん等を抑制することはすでに報告されている (Nesaretnam et al. *Lipids*, 39, 459-467, 2004)。我々のグループは、トコトリエノールが二段階発症肺がんマウスモデル、自然発症肝がんマウスモデルの両方で腫瘍を抑制することを確認している。(Wada S et al. *Cancer Lett.*, 229, 181-191, 2005)。トコトリエノールの抗腫瘍作用の機序としては、(1) 抗酸化作用、(2) アポトーシス促進作用、(3) 細胞周期調節作用、(4) 血管新生抑制作用などが挙げられている(図1 Wada S, *Forum Nutr.*, 61, p.204-16, 2009)。一方、ヒト血清中のトコトリエノール濃度は非常に低く、0.3 μ M 程度であると報告されているため (Okabe et al. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66, 1768-1771, 2002)、経口摂取による抗腫瘍効果を期待するにはさらなる作用機序の解明と、ヒト生体内での消化・吸収・体内分布の解析が必要である。

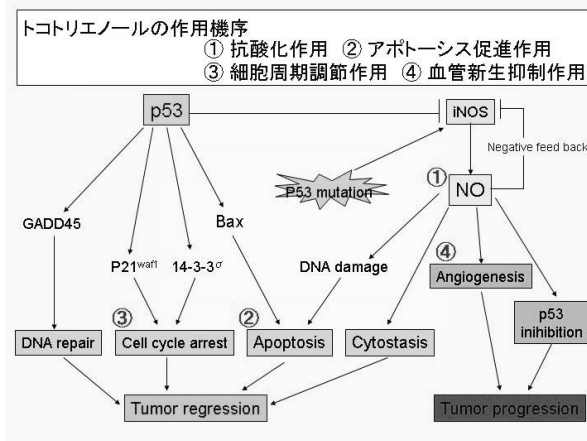


図1 トコトリエノールの作用機序

大腸がんでは、Cyclooxygenase-2 (Cox-2) が高度に発現しているが、大腸腺腫の時期にすでに間質細胞では Cox-2 が発現している。間質由来の Cox-2 が大腸上皮のがん化を促進していると考えられている (Oncogene 2002)。

間質細胞の Cox-2 発現をトコトリエノールにより抑制することが出来れば、大腸がん細胞の増殖を抑制するよりもより早い段階で腫瘍を抑制することが出来ると考えられる。

2. 研究の目的

(1) トコトリエノールが大腸がん細胞に直接及ぼす影響 (図2 ①)

トコトリエノールは種々のがん細胞の増殖抑制効果を有すると報告されている。 α -、 β -、 γ -、 δ -トコトリエノールの4種類のアイソフォーム間での細胞増殖抑制作用を比較し、もっとも強い作用を有するアイソフォームを同定する。また、トコトリエノールが細胞周期、アポトーシスに及ぼす影響を調べ、大腸がん細胞増殖抑制効果の作用メカニズムを解明する。

(2) 間質細胞由来の COX-2、NO に及ぼす間接的な抗腫瘍効果 (図2 ②)

各種がんで半数以上に p53 の変異が認められ、p53 は最も重要ながん抑制遺伝子であるとされている。一方、慢性炎症性疾患に伴う発がんでは iNOS が高頻度に発現しており、その産物である NO が発がん進行に重要な役割を果たすことが指摘されている。

前がん病変の大腸腺腫では、大腸上皮には COX-2 は発現していないが、筋線維芽細胞では COX-2 の発現が認められている。また、間質細胞由来の COX-2 は、ケミカルメディエーターを介して腸上皮細胞に作用し、細胞増殖やがん促進に関与するとされている。

トコトリエノールが p53 欠損線維芽細胞での COX-2 や iNOS の作用に及ぼす影響を解明する。さらに、間質細胞-がん上皮細胞間の相互作用を明らかにし、トコトリエノールが及ぼす影響を解明する。

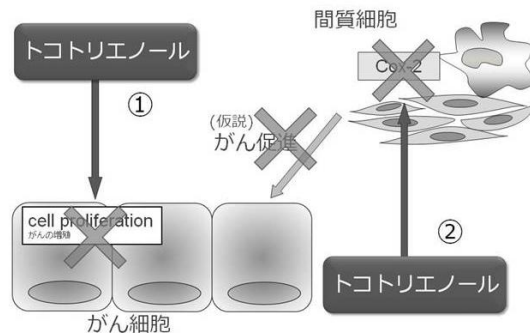


図2 トコトリエノールの抗腫瘍効果メカニズム仮説

3. 研究の方法

α -、 β -、 γ -、 δ -トコトリエノールはジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解し、各実験に用いた。

(1) トコトリエノールが大腸がん細胞に直接及ぼす影響

ヒト大腸がん細胞 (HT-29) およびマウス大腸がん細胞 (colon 26) 細胞を用いて実験を行った。

HT-29 細胞および colon 26 細胞を各濃度の α 、 β 、 γ 、 δ -トコトリエノールを添加して培養し72時間後にMTTアッセイにて生細胞の割合を評価した。

HT-29細胞に各濃度の δ -トコトリエノールを添加し、フローサイトメトリーにて細胞周期およびアポトーシスの評価を行った。

さらにウェスタンブロッティングを行い、トコトリエノールが caspase-3、caspase-9、caspase-7 の活性化に与える影響を調べた。

(2) 間質細胞由来の COX-2、NO に及ぼす間接的な抗腫瘍効果

p53 機能欠損マウス胎仔線維芽細胞 (MEFs) を用いて、以下の実験を行った。

MEFs 細胞にリポポリサッカライド (LPS) およびインターフェロン- γ (IFN- γ)、 δ -トコトリエノールを添加し、MTT アッセイで細胞毒性評価、ウェスタンブロッティングで COX-2、iNOS 等の腫瘍関連タンパクの発現評価、ELISA でプロスタグランジン E₂ (PGE₂)濃度測定、グリス試薬にて亜硝酸濃度測定を行った。

4. 研究成果

(1) トコトリエノールが大腸がん細胞に直接及ぼす影響

ヒト大腸がん HT-29 細胞では δ -トコトリエノールが最も強い腫瘍増殖抑制効果を示し、5 μ M 以上で有意差が見られた (図3)。

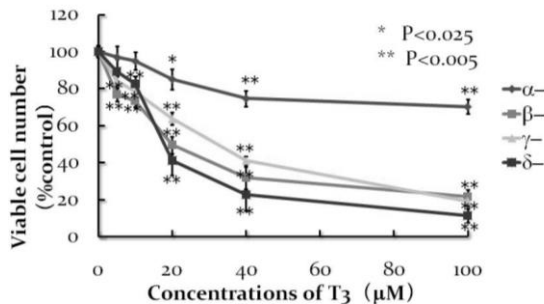


図3 ヒト大腸がん細胞 (HT-29)におけるトコトリエノールの細胞増殖抑制作用

メカニズムの一つとして Caspase-9、-3、-7 を介したアポトーシス誘導作用が考えられ、Caspase inhibitor の投与により、トコトリエノールの腫瘍増殖抑制効果はキャンセルされた。一方、 δ -トコトリエノールは細胞周期には影響を与えなかった。

マウス大腸がん colon 26 細胞でも、10 μ M 以上の δ -トコトリエノール添加で有意な細

胞増殖抑制効果を認めた。

これらの結果から、 δ -トコトリエノールは大腸がん細胞に直接作用し、caspase-9、-3、-7 を活性化することによりアポトーシスを引き起こすことが明らかになった。この機序が δ -トコトリエノールの大腸がん増殖抑制作用のメカニズムのひとつであることが確認された。

(2) 間質細胞由来の COX-2、NO に及ぼす間接的な抗腫瘍効果

MEFs 線維芽細胞では 5 μ M 以上の δ -トコトリエノール添加で有意な亜硝酸濃度の低下を認めた (図4)。また、2.5 μ M 以上の δ -

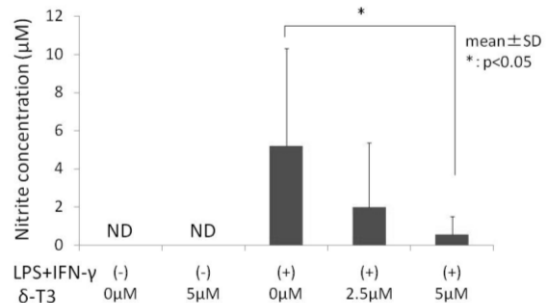


図4 マウス胎仔線維芽細胞(MEFs)における δ -トコトリエノールの亜硝酸濃度低下作用

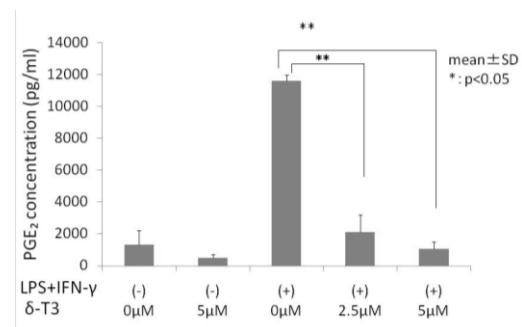


図5 マウス胎仔線維芽細胞(MEFs)における δ -トコトリエノールの PGE₂ 濃度低下作用

トコトリエノール添加は PGE₂ 濃度を有意に低下させた (図5)。

一方、タンパク発現では、 δ -トコトリエノールは濃度依存的に iNOS のタンパク発現を抑制したが、COX-2 発現には影響を及ぼさなかった (図6)。

現在、p53 欠損が iNOS を誘導し、iNOS とその産物である NO が Cox-2 をはじめとする各種のケミカルメディエータを誘発することを p53、iNOS ノックアウト細胞を用いて確認している(Wada S et al. the FEBS Journal, 275, Sup 1, 385,2008)。

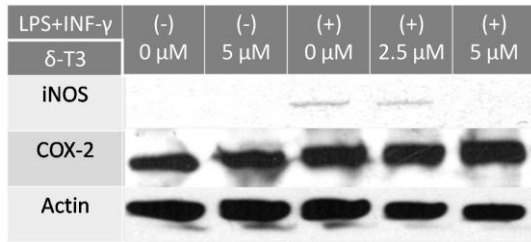


図6 マウス胎仔線維芽細胞(MEFs)における δ -トコリエノールが iNOS、COX-2 タンパク発現に及ぼす影響

トコリエノールは間質細胞において、i) iNOS のタンパク発現を抑制し、NO 産生を抑制している。ii) COX-2 の酵素活性を抑制し PGE₂ などの産生を抑制していることが明らかになった。また、PGE₂ 産生の抑制には NO を介したメカニズムが関与している可能性も示唆された。

トコリエノールは大腸がん上皮細胞に直接作用し、アポトーシスを介した細胞増殖抑制効果を有するだけでなく、間質細胞に作用し、NO や PGE₂ と言ったがん促進ケミカルメディエーターの産生を抑制する間接的作用を有することが明らかになった。

これらのトコリエノールの作用が複合し、腫瘍の進行・増殖・転移等を抑制している可能性が示唆された。

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 和田小依里, 吉川敏一, サプリメントの利用とアンチエイジング, ビタミン 83 (7), p.383-388, 2009. review 査読有
- ② 和田小依里, 吉川敏一, 特集: わが国における食品によるがん化学予防研究の現況と将来への展望、臨床研究の現況と将来, FFI ジャーナル Foods & Food Ingredients Journal of Japan, 214 (3) p.229-234, 2009 総説 査読無

[学会発表] (計 6 件)

- ① Wada S, Kawai M, Matsushita Y, Minami E, Naito Y, Yoshikawa T, Antiproliferative effects of Tocotrienols, 2009 ISNFF Conference and Exhibition, Golden Gateway Holiday Inn Hotel, San Francisco, CA, November 1-4 (Nov 3), 2009
- ② 和田小依里, 内藤裕二, 大島寛史, 吉川敏一, 誘導型一酸化炭素合成酵素と p53 による Cyclooxygenase-2 発現の調節, 第 9 回日本 NO 学会学術集会,

2009.5.8-9, 静岡

- ③ Wada S, Nouchi M, Naito Y, Yoshikawa T, Tumor preventing effects of tocotrienol in colon adenocarcinoma, 3rd International Congress on Food and Nutrition, Antalya, Turkey, p46, April 22-25, 2009.
- ④ Wada S, Ichikawa H, Naito Y, Nishino H, Yoshikawa T, Antineoplastic activity of tocotrienol, International Conference and exhibition on nutraceuticals and functional foods, Taichung, Taiwan, Abstract, p. 115, November 14-17, 2008
- ⑤ Wada S, Kokura S, Naito Y, Yoshikawa T, Suppression of cyclooxygenase-2 expression by tocotrienol in mice embryonic fibroblasts, 33rd FEBS Congress, Athens, Greece, the FEBS Journal, vol.275, Supplement1, p.385, June 28- July 3 (Jul 2), 2008
- ⑥ 和田小依里, 内藤裕二, 古倉聡, 吉川敏一, 誘導型 NO 合成酵素と p53 による Cyclooxygenase-2 の調節, 第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2008.6.19, 京都

[図書] (計 1 件)

- ① Yoshikawa T (ed): Food Factors for Health Promotion. Forum Nutr. Basel, Karger, 2009, vol 61, Wada S, Chemoprevention and Cancer, Chemoprevention of Tocotrienols: The Mechanism of Antiproliferative Effects, pp204-216.

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田小依里 (WADA SAYORI)
京都府立大学・生命環境科学研究科・講師
研究者番号: 60420709

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし