

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2012

課題番号：21500782

 研究課題名（和文） 腫瘍血管新生を抑制する食品成分の探索と
その抑制機構の分子細胞生物学的解析

 研究課題名（英文） A comprehensive search for antiangiogenic food factors and
molecular biological analysis of their mode of inhibition

研究代表者

太田 敏郎 (OHTA TOSHIRO)

静岡県立大学・食品栄養環境科学研究院・助教

研究者番号：40285193

研究成果の概要（和文）：固形腫瘍が増大するには栄養成分や酸素の供給が必要であり、そのために局所的な血管網の伸長（血管新生）が誘導されることが近年明らかにされている。こうした腫瘍血管新生の阻害が癌治療の新戦略として有効であることが臨床レベルで既に証明されており、これを応用して癌の予防・再発防止に利用できる食品を開発するための基礎研究を実施した。その結果、様々な植物抽出物やその活性成分が血管新生抑制活性を有することを示し、その血管新生抑制の分子メカニズムの比較を行った。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it has been shown that for solid tumors to grow continuously they need constant supply of nutrients and oxygen from the blood and they induce angiogenesis, a local expansion of blood vessel network, to achieve that goal. It has also been shown that inhibition of such tumor angiogenesis is a new and very effective strategy for cancer treatment. As an application of this new cancer-treating strategy, a basic research toward developing antiangiogenic foods that can be used to prevent cancer was conducted. As a result, various plant extracts and their active ingredients were shown to possess antiangiogenic activities and their modes of inhibition were compared.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活、癌予防、血管新生、食品成分

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管新生阻害による癌治療：固形腫瘍の増大には酸素や栄養素等の供給が必要であり、そのために腫瘍は正常血管を刺激して局所的な血管網の伸長（血管新生）を誘導するという説が Judah Folkman によって提唱され、様々な解析や関与タンパク質・遺伝子の発見

等を通して証明されてきた。血管新生は癌転移に関与していることも示され、血管新生阻害という新たな概念に基づく癌治療法開発が進められ、その成果として抗 VEGF 抗体 Avastin (bevacizumab) が化学療法と併用で進行性大腸癌患者に約 5 ヶ月の延命効果を持つことが米国の臨床試験で示された。この薬

剤は血管新生阻害薬として初の医薬品認可を2004年に米国で、2005年にヨーロッパで受け、日本でも「治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」の治療薬として2007年に承認されている。

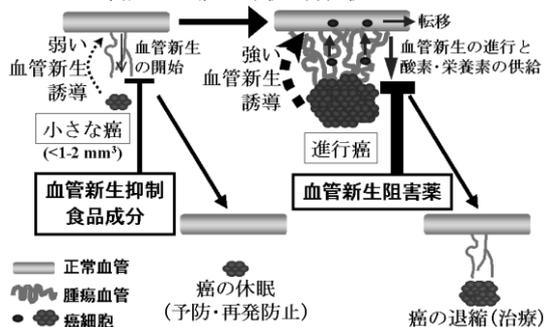
(2) 血管新生阻害薬の問題点：一方で血管新生阻害薬には問題点もあり、進行癌では血管新生誘導能が強いため臨床段階で実際に効果を示す薬剤が少なく、作用を強くすると副作用も強く出ることが指摘されている。逆に癌が小さい段階での弱い血管新生誘導ならば抑制作用が弱い物質でも効果があり、副作用も少ない可能性が高い。即ち、血管新生抑制は進行癌の治療よりも癌の予防や primary tumor 除去後の再発防止としての利用が最も有効であると考えられる。

(3) 食品成分による血管新生抑制の研究動向：お茶や茶カテキン類に癌予防・血管新生抑制効果があるという論文が以前発表され、本研究組織もこれまでに茶カテキン EGCg や resveratrol, quercetin 等のポリフェノール類の血管新生抑制作用の研究を行ってきた。さらに、プロポリスに含まれる artepillin C が血管新生抑制物質であることを明らかにした。また、キャベツ等アブラナ科植物に含まれる Indole-3-carbinol とその代謝産物 3,3'-Diindolylmethane が血管新生を抑制し血管内皮細胞にアポトーシスを誘導することも見出している。他に、香辛料を含む複数の植物抽出物、赤ワイン中のポリフェノール Gallic acid やトウガラシ辛味成分 Capsaicin の類縁体 Olvanil に活性があることも見出している。

2. 研究の目的

腫瘍血管新生の阻害は癌治療の有効な新戦略であることが、初の血管新生阻害薬 Avastin の成功によって既に臨床レベルで証明されている。この戦略を応用して癌の予防・再発防止に利用できる食品の開発を目指すことが本課題の全体構想である(図1)。これまでの成果を基に腫瘍血管新生抑制食品成分をさらに探索し、過去に選出した食品成分も含めてその抑制機構を主にタンパク質レベルで解明することを目的とする。

図1. 食品成分による腫瘍血管新生抑制を利用した癌の予防・再発防止



3. 研究の方法

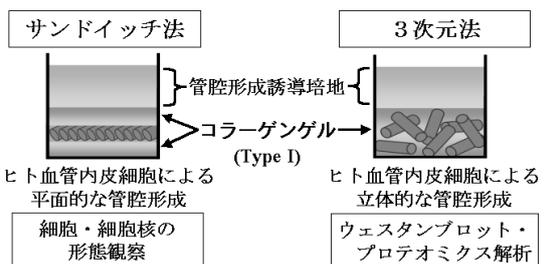
本課題の解析は、以下の流れで進めていく。

(1) 探索 (スクリーニング)：様々な植物抽出物や食品成分の血管新生抑制活性を *in vitro* (一次スクリーニング)、*in vivo* (二次スクリーニング) で評価し、新たな血管新生抑制食品成分を探索する。一次スクリーニングでは、*in vitro* ヒト血管新生モデル (上下2層のコラーゲンゲル間でヒト血管内皮細胞を平面的に培養するサンドイッチ法) を用いて管腔形成に対する抑制作用を指標にスクリーニングを行う (図2)。二次スクリーニングでは、*in vivo* における抑制作用について、肉腫由来の腫瘍細胞 S180 を封入したチャンバーをマウス背部に埋め込んで血管新生を誘導するマウス背部皮下法 (DAS 法) や鶏胚の発生過程で起こる血管新生を利用する鶏胚漿尿膜法 (CAM 法) を用いて検討する。補助データとして3種の細胞への増殖阻害作用も評価する。

(2) 活性成分の単離と同定：抑制活性を示した植物抽出物をカラムクロマトグラフィーによって分画する。サンドイッチ法を用い、*in vitro* 管腔形成抑制活性を指標に活性成分を単離・精製し、NMR や MS などの機器分析によりその構造を決定する。

(3) 分子機構の解明：ウェスタンブロット法によりアポトーシス・細胞内シグナル伝達関連タンパク質や管腔形成特異的タンパク質の変化を解析する。プロテオミクス手法で包括的・網羅的な解析も行い、機能や関与が未知のタンパク質についても解析する。さらに、ウェスタンブロット・プロテオミクス解析で変化が見られたタンパク質について特異的阻害剤や siRNA による遺伝子ノックダウンによる分子細胞生物学的解析を行い、その関与を証明する。

図2. *in vitro* ヒト血管新生モデル

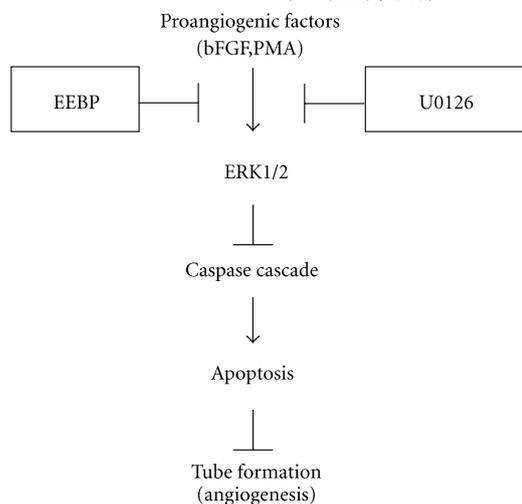


4. 研究成果

キャベツ等に含まれる Indole-3-carbinol、産地の異なる複数のプロポリス由来の化合物群、柑橘類に多く含まれるポリメトキシフラボノイドであるノビレチン、東南アジア原産のグネツム科植物メリンジョの種子抽出物とそれに多く含まれるレスベラトロール類縁体を主なサンプルとして、ERK1/2 や JNK、p38 等のシグナル伝達タンパク質と

caspase-3 や PARP, lamin A/C 等の caspase 経路を介したアポトーシス誘導マーカーに対してこれらの化合物がおよぼす変化をウェスタンブロット法によって解析し、血管新生抑制の分子メカニズムの比較を行った (図 3)。

図 3. プロポリスによる血管新生抑制機構



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 12 件)

1: Tsuchiya I, Hosoya T, Ushida M, Kunimasa K, Ohta T, Kumazawa S.

Nymphaeol-A Isolated from Okinawan Propolis Suppresses Angiogenesis and Induces Caspase-Dependent Apoptosis via Inactivation of Survival Signals.

Evid Based Complement Alternat Med. 査読有り

2013;2013:826245 (Epub 2013 Apr 24)

doi: 10.1155/2013/826245.

2: Kunimasa K, Ohta T, Tani H, Kato E, Eguchi R, Kaji K, Ikeda K, Mori H, Mori M, Tatefuji T, Yamori Y.

Resveratrol derivative-rich melinjo (Gnetum gnemon L.) seed extract suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and tumor angiogenesis.

Mol Nutr Food Res. 査読有り

2011

55(11):1730-4.

doi: 10.1002/mnfr.201100098.

3: Kunimasa K, Ahn MR, Kobayashi T, Eguchi R, Kumazawa S, Fujimori Y, Nakano T,

Nakayama T, Kaji K, Ohta T.

Brazilian Propolis Suppresses Angiogenesis by Inducing Apoptosis in Tube-Forming Endothelial Cells through Inactivation of Survival Signal ERK1/2.

Evid Based Complement Alternat Med. 査読有り

2011;2011:870753 (Epub 2010 Oct 31)

doi: 10.1093/ecam/nep024.

4: Kunimasa K, Ikekita M, Sato M, Ohta T, Yamori Y, Ikeda M, Kuranuki S, Oikawa T. Nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and angiogenesis in vivo.

Cancer Sci. 査読有り

2010

101(11):2462-9.

doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01668.x.

5: Kunimasa K, Kobayashi T, Kaji K, Ohta T.

Antiangiogenic effects of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane are associated with their differential regulation of ERK1/2 and Akt in tube-forming HUVEC.

J Nutr. 査読有り

2010

Jan;140(1):1-6.

doi: 10.3945/jn.109.112359.

[学会発表] (計 26 件)

1: 土屋育未, 太田敏郎, 牛田素子, 国政和宏, 吉田真奈美, 熊澤茂則

「沖縄産プロポリス中のプレニルフラボノイドの血管新生抑制活性に関する研究」

日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都)

2012 年 3 月

2: 土屋育未, 太田敏郎, 細谷孝博, 牛田素子, 国政和宏, 吉田真奈美, 熊澤茂則

「沖縄産プロポリスに含まれる nymphaeol の血管新生抑制活性に関する研究」

第 85 回日本生化学会大会 (福岡)

2012 年 12 月

3: 国政和宏, 池北雅彦, 佐藤真友美, 太田敏郎, 池田恵, 及川勉

「柑橘ポリメトキシフラボノイド、ノビレチンは血管新生に連結した内皮細胞機能および *in vivo* 血管新生を抑制する」

第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋)

2011 年 10 月

4: 幡野愛, 岡村直樹, 芦田朋哉, 田澤茂実,
荒木陽子, 太田敏郎, 熊澤茂則
「ブラジル産レッドプロポリスの血管新生
抑制活性」

2010年度日本農芸化学会大会 (東京)
2010年3月27-30日

5: Kumazawa S., Momose N., Murase M., Ohta T., Fukumoto S.

“Studies of prenylflavonoids from the
plant origin of Okinawa propolis.”

240th American Chemical Society National
Meeting and Exposition (Boston, USA)

2010年8月22-26日

6: 国政和宏, 江口良二, 太田敏郎

「メリンジョ (グネモンノキ) 種子エタノール
抽出物から単離したレスベラトロールダ
イマーの血管新生抑制作用」

第69回日本癌学会学術総会 (大阪)

2010年9月22-24日

7: 岡村直樹, 太田敏郎, 芦田朋哉, 吉田真
奈美, 加治和彦, 宇都義浩, 中田栄司, 堀
均, 熊澤茂則

「CAM法を用いた血管新生抑制活性に関する
研究」

2009年度日本農芸化学会大会 (福岡)

2009年3月27-29日

8: 牛田素子, 国政和宏, 太田敏郎, 福本修
一, 熊澤茂則, 加治和彦

「沖縄産プロポリスとその起源植物オオバ
ギによる血管新生抑制と内皮細胞アポトー
シス誘導の分子機構」

2009年度日本農芸化学会大会 (福岡)

2009年3月27-29日

9: Okamura N, Ohta T., Uto Y, Nakata E, Hori
H, Kumazawa S.

“Study of angiogenesis inhibition by
flavonoids using the Chorioallantoic
Membrane (CAM) assay.”

4th International Conference on
Polyphenols and Health (Harrogate, UK).

2009年12月7-11日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 敏郎 (OHTA TOSHIRO)

静岡県立大学・食品栄養環境科学研究所・
助教

研究者番号：40285193

(2) 研究分担者

熊澤 茂則 (KUMAZAWA SHIGENORI)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：10295561

(3) 連携研究者

國政 和宏 (KUNIMASA KAZUHIRO)

がん研究会・がん化学療法センター・特任
研究員

研究者番号：50534020