

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22228002

研究課題名(和文)分子疫学とケミカルバイオロジーを駆動力とする食品因子感知システムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of Sensory Systems for Food Factors in View of Molecular Epidemiology and Chemical Biology

研究代表者

立花 宏文(Tachibana, Hirofumi)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70236545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 143,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体が機能性食品因子を感知するための遺伝子(食品因子感知関連遺伝子)を同定するとともに食品因子の機能性発現機序との関係を解明した。食品因子摂取後の生体組織における食品因子ならびにその代謝物のin situ質量分析イメージングに成功した。食品因子感知関連遺伝子の発現が、摂取する食品因子やその摂取方法によって調節が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified several genes, molecules, pathways, and networks of sensory systems for food factors to exhibit their functionality by using genetic suppressor element methodology. We succeeded to develop a novel in situ label-free mass spectrometry imaging technique for visualizing food factors and their metabolites and visualized biotransformation of food factors within mammalian tissue micro-regions after oral dosing. We also validated sensory systems for food factors in view of molecular epidemiology.

研究分野：食品機能化学

キーワード：食品因子 分子疫学 感知システム フードケミカルバイオロジー センシング 機能性 カテキン

1. 研究開始当初の背景

我々の体は、さまざまな生体外シグナルに適切に応答しながら生体の恒常性を維持しており、病原細菌の侵入といった生体外シグナルは To11 様受容体などによって分子認識され、自然免疫系が発動する。これに倣えば、機能性食品因子も生体内の標的分子に相互作用することで、生体恒常性の維持に影響を及ぼす生体シグナル因子と捉えることができる。しかしながら、機能性食品因子の感知機構は未解明の状態であった。

2. 研究の目的

機能性食品因子を生体調節シグナル因子として捉え、その生体内における感知システムを明らかにすることで食品因子の保健作用のメカニズムを明らかにするとともに分子疫学的手法により食品因子の感知システムをヒトレベルにおいて実証することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 機能性食品因子の感知メカニズムの解明
機能性食品因子の生体内標的分子とその関連分子(機能性食品因子感知分子)を同定し、感知分子を介した食品因子の機能性発現機構を明らかにする。

(2) 機能性食品因子の生理機能発現の生体内イメージング

機能性食品因子がその感知分子にどのように分子認識されその作用が伝達されるのかを、細胞や生体組織においてリアルタイムで可視化する技術を開発する。

(3) 機能性食品因子のメタボロミクスと感知メカニズムの統合解析

機能性食品因子とその代謝物の時間・空間的な存在状態を解明する。

(4) 機能性食品因子感知システムの分子疫学的検証

機能性食品因子感知分子の発現と、その発現に対する食・生活習慣の影響を介入試験やコホート調査において明らかにする。

4. 研究成果

(1) 代表的な機能性食品因子の一つである緑茶カテキン EGCG がその感知レセプターである 67LR に結合後どのように感知されるのか、その細胞内シグナル伝達機構を解析し、cGMP や cAMP が EGCG センシングにおけるセカンドメッセンジャーとしての役割を担っていることを明らかにした。また、EGCG の感知から機能性発現に至る詳細な経路を解明した(図1、図2)。EGCG のがん細胞致死作用の誘導メカニズムに基づいた、従来の抗がん剤とは全く異なるコンセプトのがん治療法を発見した(本成果は掲載誌 J. Clin. Invest. の表紙に採択された。図3)。一方、遺伝子断片ライブラリーを用いた表現型スクリーニングから、大豆イソフラボン(ダイゼイン、イコール)、共役リノール酸(10t, 12c-CLA)

ならびにトコトリエノールの機能性発現に関与する感知関連分子を同定することに成功した。

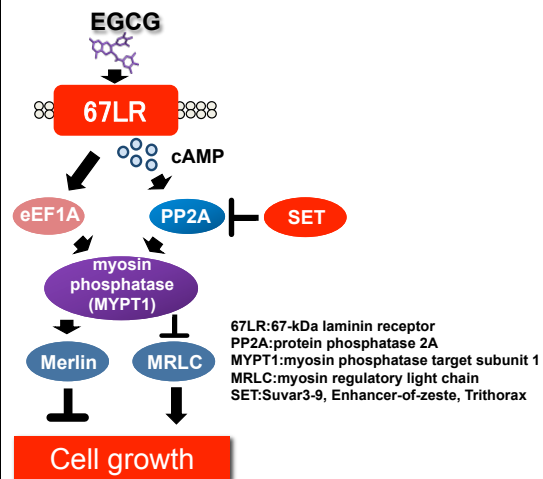


図1. 緑茶カテキン感知レセプター67LR を介した EGCG のメラノーマ増殖抑制機構

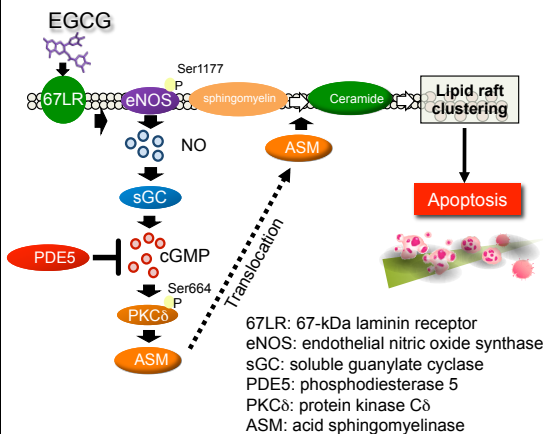


図2. 緑茶カテキン感知レセプター67LR を介した EGCG のがん細胞致死誘導機構

CURRENT ISSUE
February 2013



Cover story: A green tea polyphenol in combination therapy
On page 787 of this month's JCI, Kumazoe et al. report that the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) can bind to the 67-kDa laminin receptor (67LR) to promote cancer cell death in a cyclic GMP-dependent manner. They found that a phosphodiesterase 5 inhibitor, which increases cyclic GMP levels, potentiated EGCG-induced cell death through the 67LR pathway without affecting normal cells and that this combination therapy increased survival time in a mouse xenograft model.

図3. 掲載誌 J. Clin. Invest. の表紙で取り上げられた EGCG のがん細胞致死誘導機構

大豆イソフラボンの感知分子として同定した non-canonical な RNA ポリメラーゼが大豆イソフラボンによって活性化されることで、これまでに報告のない全く新しいタイプのノンコーディング RNA の発現が誘導され、

イソフラボンの機能性発現に重要な役割を担っていることを明らかにした。従来、大豆イソフラボンはファイトエストロゲンと呼ばれるように、その機能性はエストロゲン受容体 ER を介した作用として理解されてきたが、本発見は ER に依存しない大豆イソフラボンの機能性発現機構の存在を明らかにした。

(2) EGCG の各水酸基をメトキシ基に置換した EGCG ライブラリーを作製し、これら EGCG 誘導体のがん細胞増殖抑制作用ならびに EGCG 感知レセプター-67LR 依存性のシグナリング誘導能から、5 位ならびに 7 位の水酸基が EGCG の活性発現に関与していないことを見出した。また、EGCG の活性に関与しないこれら水酸基にリンカーを介して蛍光物質を付加することで、EGCG 感知レセプター-67LR 陰性の細胞には結合せず、67LR 陽性細胞にのみ特異的に結合する蛍光標識化 EGCG の作製に成功した (図 4)。

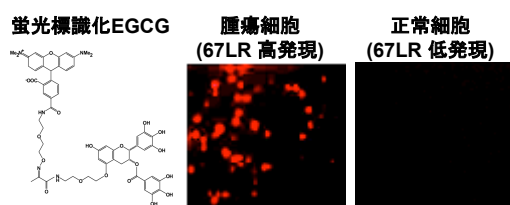


図 4. 蛍光プローブ化 EGCG を用いたがん細胞特異的可視化

(3) 非標識で低分子化合物を可視化できるマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング法 (MALDI-MSI) を開発し、これまで追跡不可能であった緑茶カテキン EGCG の組織内微小領域における分布情報の可視化を試み、低分子化合物の可視化で汎用されるマトリックスを含む 41 種類の化合物の中で、naphthalene 誘導体のみが EGCG を組織切片上で可視化できることを見出した。また、この naphthalene 誘導体を用い、EGCG を経口投与したマウスの肝臓と腎臓において EGCG ならびに EGCG 代謝物 (グルクロン酸抱合体および硫酸抱合体) を同時に *in situ* イメージングすることに世界に先駆けて成功した (図 5)。

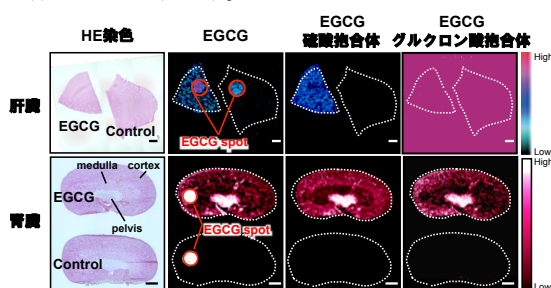


図 5. EGCG ならびにその代謝物 (グルクロン酸抱合体ならびに硫酸抱合体) の *in situ* 質量分析イメージング

また、この手法を用いて他のカテキン類のみならず加水分解型タンニン類、大豆イソフラボン類の各質量分析イメージングが可能であることを示した。

(4) 個人の生活習慣や生体パラメータ (血中脂質レベル、酸化ストレスマーカーレベルなど) とその発現量に相関のある食品因子感知関連遺伝子が存在することを明らかにした。また、緑茶の摂取形態、緑茶と併せて摂取する食品因子、緑茶の摂取制限、摂取する緑茶の品種が緑茶カテキン EGCG の感知システムに関与する 67LR、eEF1a、MYPT1 の各遺伝子発現量に影響を与えることを発見した。

また、大豆イソフラボンの摂取量と大豆イソフラボンによって発現が誘導され、その機能発現を担うノンコーディング RNA のヒト血漿中における発現量が正に相関することを見出した。

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 19 件)

1) Kumazoe, M., Fujimura, Y., Hidaka, S., Kim, Y., Murayama, K., Takai, M., Huang, Y., Yamashita, S., Miura, D., Wariishi, H., Maeda-Yamamoto, M., and Tachibana, H. Metabolic profiling-based data-mining for an effective chemical combination to induce apoptosis of cancer cells.

Sci. Rep., 査読有, 5, 9474 (2015).

DOI: 10.1038/srep09474.

2) Kim, YH., Yang, X., Yamashita, S., Kumazoe, M., Huang, Y., Nakahara, K., Won, YS., Murata, M., Lin, I., Yamada, K., and Tachibana, H. Pentagalloylglucose increases a population of T regulatory cells and inhibits IgE production in ovalbumin-sensitized mouse.

Int. Immunopharmacol., 査読有, 26, 30-36 (2015).

DOI: 10.1016/j.intimp.2015.02.025

3) Tsukamoto, S., Huang, Y., Umeda, D., Yamada, S., Yamashita, S., Kumazoe, M., Kim, YH., Yamada, K., and Tachibana, H. 67kDa-laminin receptor-dependent PP2A activation elicits melanoma-specific antitumor activity overcoming drug resistance.

J. Biol. Chem., 査読有, 289, 32671-32681 (2014).

DOI: 10.1074/jbc.M114.604983

4) Kim, YH., Fujimura, Y., Sasaki, M., Yang, X., Yukihiro, D., Miura, D., Unno, Y., Ogata, K., Nakajima, H., Yamashita, S., Nakahara, K., Murata, M., Lin, I., Wariishi, H., Yamada, K., and Tachibana, H. *In situ* label-free visualization of orally dosed strictinin within mouse kidney by

MALDI-MS imaging.

J. Agri. Food Chem., 査読有, 62, 9279-9285 (2014).

DOI: 10.1021/jf503143g

5) Kim, Y.H., Ninomiya, Y., Yamashita, S., Kumazoe, M., Huang, Y., Nakahara, K., Won, Y.S., Murata, M., Fujimura, Y., Yamada, K. and Tachibana, H. IL-4 receptor α in non-lipid rafts is the target molecule of strictinin in inhibiting STAT6 activation.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, 450, 824-830 (2014).

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.069

6) Kumazoe, M., Tsukamoto, S., Lesnick, C., Kay, N. E. Yamada, K., Shanafelt T. D. and Tachibana, H.

Vardenafil, a clinically available phosphodiesterase inhibitor, potentiates the killing effect of EGCG on CLL cells.

Br. J. Haematol., 査読有, 168, 610-613 (2014).

DOI: 10.1111/bjh.13135

7) Kumazoe, M., Sugihara, K., Tsukamoto, S., Huang, Y., Tsurudome, Y., Suzuki, T., Suemasu, Y., Ueda, N., Yamashita, S., Kim, Y-H., Yamada, K., and Tachibana, H.

67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis.

J. Clin. Invest., 査読有, 123, 787-799 (2013).

DOI: 10.1172/JCI64768

8) Suzuki, T., Hagihara, H., Tsurudome, Y., Tsukamoto, S., Kumazoe, M., Yamashita, S., Huang, Y., Nakahara, K., Maeda-Yamamoto, M., Shinoda, Y., Yamaguchi, W., Yamada, K. and Tachibana, H.

Green tea extract containing large amounts of methylated catechins lowers plasma and hepatic levels of triglycerides by downregulating expression of sterol regulatory element binding protein-1 and related molecules in high-fat/high-sucrose-fed mice.

Sci. Rep., 査読有, 3, 2749 (2013).

DOI: 10.1038/srep02749.

9) Kumazoe, M., Kim, Y., Bae, J.H., Takai, M., Murata, M., Suemasu, Y., Sugihara, K., Yamashita, S., Tsukamoto, S., Huang, Y., Nakahara, K., Yamada, K. and Tachibana, H. Phosphodiesterase 5 inhibitor acts as a potent agent sensitizing acute myeloid leukemia cells to 67-kDa laminin receptor-dependent apoptosis.

FEBS Lett., 査読有, 587, 3052-3057 (2013).

DOI: 10.1016/j.febslet.2013.07.041

10) Kim, Y.H., Fujimura, Y., Hagihara, T., Sasaki, M., Yukihira, D., Nagao, T., Miura, D., Saito, K., Tanaka, T., Wariishi, H., and

Tachibana, H. *In situ* label-free imaging for visualizing biotransformation of bioactive polyphenol.

Sci. Rep., 査読有, 3, 2805 (2013).

DOI: 10.1038/srep02805

11) Kim, Y.H., Nakayama, K., Tanino, S., Yoshimoto, M., Fujimura, Y., Yamada, K., and Tachibana, T.

1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose from tannic acid inhibits antigen-specific IgE production by inhibiting ϵ germline transcription induced by STAT6 activation.

FEBS Open Bio, 査読有, 3, 341-345 (2013)

DOI: 10.1016/j.fob.2013.07.008

12) Tsukamoto, S., Hirotsu, K., Kumazoe, M., Goto, Y., Sugihara, K., Suda, T., Tsurudome, Y., Suzuki, T., Yamashita, S., Kim, Y., Huang, Y., Yamada, K., and Tachibana, H.

Green tea polyphenol EGCG induces lipid raft clustering and apoptotic cell death by activating protein kinase C δ and acid sphingomyelinase through 67-kDa laminin receptor in multiple myeloma cells.

Biochem. J., 査読有, 443, 525-534 (2012).

DOI: 10.1042/BJ20111837

13) Tsukamoto, S., Yamashita, S., Kim, Y.H., Kumazoe, M., Huang, Y., Yamada, K., and Tachibana, H. Oxygen partial pressure modulates 67-kDa laminin receptor expression, leading to altered activity of the green tea polyphenol, EGCG.

FEBS Lett., 査読有, 586, 3441-3447 (2012).

DOI: 10.1016/j.febslet.2012.07.065

14) Fujimura, Y., Sumida, M., Sugihara, K., Tsukamoto, S., Yamada, K., and Tachibana, H.

Green tea polyphenol EGCG sensing motif on the 67-kDa laminin receptor.

PLoS ONE, 査読有, e37942, 7(5) (2012).

DOI: 10.1371/journal.pone.0037942

15) Yamashita, S., Yano, S., Tsukamoto, S., Kumazoe, M., Kim, Y-H., Yamada, K., and Tachibana, H. Isoflavones suppress the expression of the Fc ϵ RI high-affinity IgE receptor independently of estrogen receptor.

J. Agric. Food Chem., 査読有, 60, 8379-8385 (2012).

DOI: doi: 10.1021/jf301759s

16) Byun, E.-H., Omura, T., Yamada, K., and Tachibana, H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibites TLR2 signaling induced by peptidoglycan through the polyphenol sensing molecule 67-kDa laminin receptor.

FEBS Lett., 査読有, 585, 814-820 (2011).

DOI: 10.1016/j.febslet.2011.02.010

- 17) Fujimura, Y., Kurihara, K., Ida, M., Kosaka, R., Miura, D., Wariishi, H., Maeda-Yamamoto, M., Nesumi, A., Saito, T., Kanda, T., Yamada, K., and Tachibana, H. Metabolomics-Driven Nutraceutical Evaluation of Diverse Green Tea Cultivars. *PLoS ONE*, 査読有, e23426, 6(8) (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0023426
- 18) Tanaka, H., Yamanouchi, M., Miyoshi, H., Hirotsu, K., Tachibana, H., and Takahashi, T. Solid-phase synthesis of a combinatorial methylated epigallocatechin gallate library and their growth inhibitory effects on melanoma B16 cells. *Chem. Asian J.*, 査読有, 5, 2231-2248 (2010). DOI: 10.1002/asia.201000372
- 19) Lee, JH., Kishikawa, M., Kumazoe, M., Yamada, K. and Tachibana, H. Vitamin A enhances antitumor effect of a green tea polyphenol on melanoma by upregulating the polyphenol sensing molecule 67-kDa laminin receptor. *PLoS ONE*, 査読有, 5(6), e11051 (2010). DOI: 10.1371/journal.pone.0011051

[学会発表] (計 17 件)

- 1) 立花宏文: 第 12 回日本機能性食品医学会総会シンポジウム, 2014 年 12 月 13 日 (京都市) 「茶カテキンの機能性発現機構に基づいたがん治療戦略」
- 2) 立花宏文: 第 11 回日本カテキン学会年次学術大会特別講演, 2014 年 11 月 22 日 (東京都) 「緑茶カテキン感知レセプター発見から 10 年」
- 3) 立花宏文: 第 68 回日本栄養・食糧学会シンポジウム, 2014 年 5 月 31 日 (札幌市) 「緑茶カテキン感知力の分子的基盤とその疫学的検証」
- 4) 立花宏文: 第 21 回農芸化学会 Frontiers シンポジウム, 2014 年 3 月 30 日 (茨城県守谷市) 「食品因子を感知するしくみの解明を目指して」
- 5) 立花宏文: 平成 25 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会公開市民フォーラム, 2013 年 10 月 18 日 (福岡市) 「食の機能性を考えるー緑茶の保健機能を例に」
- 6) Kumazoe, M. and Tachibana, H.: 6th International Conference on cGMP generators, effectors and therapeutic implications, 2013 年 6 月 28 日 (Erfurt, Germany) 「67-kDa laminin receptor and cGMP induced cancer-selective apoptosis」
- 7) 立花宏文: 2012 Annual Conference & Exhibition Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, 2012 年 12 月 3 日 (Hawaii, USA) 「Enhancement of cancer preventive activity of green tea polyphenol

- EGCG based on the sensing system」
- 8) 立花宏文: The 6th International Niigata symposium on Diet and Health, 2012 年 10 月 17 日 (新潟市) 「Green tea polyphenol EGCG sensing for cancer prevention」
Hirofumi Tachibana
- 9) 立花宏文: 日本学術振興会レドックス・ライフイノベーション第 170 委員会, 2012 年 8 月 24 日 (栃木県那須塩原市) 「緑茶カテキンの機能性発現とレドックス」
- 10) 立花宏文: 日本がん予防学会シンポジウム, 2012 年 6 月 23 日 (岐阜市) 「がん予防食品因子を感知する分子的基盤」
- 11) 立花宏文: 日本農芸化学会大会シンポジウム, 2012 年 3 月 25 日 (京都市) 「フードファクターセンシング: 機能性食品因子の生体感知システム」
- 12) Tachibana, H.: International Conference on Food Factors 2011, 2011 年 11 月 20 日 (Taipei) 「Green tea polyphenol EGCG sensing」
- 13) 立花宏文: 第 27 回臨床フリーラジカル会議, 2010 年 12 月 4 日 (京都府) 「緑茶カテキンナリングと機能性発現」
- 14) 立花宏文: 平成 22 年度日本ビタミン学会ビタミン発見 100 周年記念講座, 2010 年 11 月 6 日 (福岡) 「お茶の中のカテキンの働きと健康増進」
- 15) 立花宏文: 日本小児歯科学会九州地方会シンポジウム, 2010 年 10 月 3 日 (福岡市) 「植物ポリフェノールの保健作用とそのしくみ」
- 16) Tachibana, H.: International symposium on Green Tea & The 77th Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology, 2010 年 6 月 17 日 (Inchon, Korea) 「Molecular basis for anti-allergic and inflammatory actions of green tea polyphenol EGCG」
- 17) 立花宏文: 日本酸化ストレス学会シンポジウム, 2010 年 6 月 25 日 (横浜市) 「緑茶カテキンナリングメディエーターとしての NO」

[図書] (計 7 件)

- 1) 立花宏文: 緑茶カテキンを生体が感知するしくみ, 食品因子による栄養機能制御, 芦田均, 立花宏文, 原博編, 建帛社, pp253-271 (2015)
- 2) 立花宏文: 緑茶カテキン感知力バイオマーカー, ニュートリゲノミクスを基盤としたバイオマーカーの開発-未病診断とテーラーメイド食品開発に向けて-, シーエムシー出版, pp97-104 (2014)
- 3) Tachibana, H.: Cellular sensing system for green tea polyphenol epigallocatechin gallate. *AGri-Bioscience Monographs*, 4, 19-35 (2014)
- 4) 立花宏文: 緑茶カテキン感知レセプター, 新版茶の機能-ヒト試験から分かった新たな

役割, 農村漁村文化協会, pp58-66 (2013)

5) Tachibana, H. : Green tea polyphenols in Allergic Remedies. Green Tea Polyphenols: Nutraceuticals of Modern Life, ed. Lekh R. Juneja, Tsutomu Okubo, and Theertham Rao, CRC Press, 233-250 (2013)

6) Byun, E-H., and Tachibana, H. : Chapter104-Molecular basis for down regulation of the inflammatory responses by epigallocatechin-3-gallate in macrophages. Tea in Health and Disease Prevention, ed. Preedy, VR., 1239-1248 (2012)

7) 立花宏文 : 茶ポリフェノール, 食品免疫・アレルギーの事典, 日本食品免疫学会編, 朝倉書店, pp358-363 (2011)

[産業財産権]

○出願状況 (計 6 件)

1) 名称: カテキンの機能性増強法

発明者: 立花宏文

権利者: 九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-132891

出願年月日: 2014年6月27日

国内外の別: 国内

2) 名称: 分子標的抗がん剤

発明者: 立花宏文

権利者: 九州大学

種類: 特許

番号: US application:61/605848

出願年月日: 2012年3月2日

国内外の別: 国外

3) 名称: 標的遺伝子の発現変化による食品機能成分及び医薬品感受性評価方法

発明者: 立花宏文、生田健次郎

権利者: 九州大学

種類: 特許

番号: 特許願 2012-011890

出願年月日: 2012年4月13日

国内外の別: 国外

4) 名称: COMBINATION OF EGCG OR METHYLATED EGCG AND A PDE INHIBITOR

発明者: 立花宏文

権利者: 九州大学

種類: 特許

番号: US application:13/806665

出願年月日: 2011年6月23日

国内外の別: 国外

5) 名称: トコトリエノールの抗がん作用標的遺伝子ならびにバイオマーカー及びその使用方法

発明者: 立花宏文

権利者: 九州大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2010/006705

出願年月日: 2010年11月15日

国内外の別: 国内

6) 名称: EGCG またはメチル化 EGCG と PDE 阻

害剤との組み合わせ

発明者: 立花宏文

権利者: 九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-142520

出願日: 2010年6月23日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/syokuryo/>

報道

1) 2013年1月26日「緑茶カテキンのがん細胞殺傷のしくみに基づいた新しいがん治療法の発見」に関する報道 (NHK, 朝日新聞, 読売新聞, 毎日新聞, 産経新聞, 時事通信, 共同通信, 日刊工業新聞等)

2) 2013年3月15日「緑茶カテキンの可視化-質量分析イメージング成功」に関する報道 (日経産業新聞)

受賞

1) 立花宏文 : Hot Topics Award at Annual Meeting of JSBBA 2013「蛍光プローブ化緑茶カテキン EGCG を用いたがん細胞特異的可視化」

2) 立花宏文 : Hot Topics Award at Annual Meeting of JSBBA 2013「質量分析イメージング法による緑茶カテキンおよびその代謝物の生体組織内分布情報の非標識可視化」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花宏文 (TACHIBANA, Hirofumi)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 70236545

(2) 研究分担者

藤村由紀 (FUJIMURA, Yoshinori)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号: 20390304

(3) 研究分担者

田中浩士 (TANAKA, Hiroshi)

東京工業大学・理工学研究科・准教授

研究者番号: 40334544

(4) 研究分担者

栗山進一 (KURIYAMA, Shinichi)

東北大学・災害科学国際研究所・教授

研究者番号: 90361071