

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710262

研究課題名(和文) ビタミンK誘導体のDNA合成酵素分子種特異的阻害活性による新規な抗癌機能性開発

研究課題名(英文) The development of anticancer effect by DNA polymerase inhibitory of vitamin K derivatives

研究代表者

栗山 磯子 (Kuriyama, Isoko)

神戸学院大学・栄養学部・研究員

研究者番号：50553749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンK誘導体およびそのアシル化化合物のDNA合成酵素(pol)分子種に対する選択的阻害活性を調査した。そして、本活性に基づく生理活性として抗がん作用を解析した。合成した化合物のうち、JugloneとPlumbaginで阻害を示し、がん細胞の増殖を抑制した。さらにUV照射との併用効果があり、その変異率を下げた。アシル化Plumbaginのpol阻害活性はC18:1 plumbaginがpol alphaおよびgammaを最も強く阻害し、さらにがん細胞の増殖を抑制した。その抗腫瘍活性は、C18:1 jugloneよりも強く、実験時の体重減少はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：It was investigated and analyzed the effect of vitamin K derivative and acylate compound on the inhibition of mammalian DNA polymerase (pol) species and anti-cancer. Juglone and plumbagin inhibited the activities of DNA pols and suppressed cellular proliferation. Juglone showed that the combined effect of UV-irradiation, furthermore the mutation rate of the treatment decreased. C18:1 plumbagin was the most strong inhibitor and suppressed the growth of colon cancer cells. C18:1 plumbagin showed more potent antitumor activity than its C18:1 juglone. There were no effects on body weight.

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：DNA合成酵素 ビタミンK 酵素阻害剤

1. 研究開始当初の背景

近年、高等生物、特に真核生物の DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ、pol) は新規分子種が発見され、その数は現在のところ 15 種類が知られている。これらの分子種は DNA の複製または修復を分業していると考えられるが、その機能についてはまだわかっていないことも多い。またがん細胞では、無秩序な DNA の合成が繰り返されており、特に複製型の pol 分子種 (pol α 、 δ 、 ϵ) は、癌組織・がん細胞で大量に発現して高活性であることが知られている。このような酵素の活性を直接的に阻害する物質は、がん細胞を死に至らしめることから、有効な新規医薬品または抗がん機能性食品になることが期待できる。また、特定の pol を選択的に阻害する物質は「分子プローブ」として生体内における pol 研究のツールとして使用できると考えられる。

近年、ビタミン D3、B6 や K2 といったビタミン自身やその誘導体に抗がん作用があることを報告した。そこでビタミン K1、K2、K3 の 3 種類について pol 阻害活性について調べたところ、ビタミン K3 が pol γ (ミトコンドリア DNA の複製に参与) を特異的に阻害し、細胞増殖を抑制することを見出した。ビタミン K とは、脂溶性のビタミンの 1 種でビタミン K₁ や K₂ は天然に存在することが知られている。その中でも、ビタミン K₂ は微生物が作り出すビタミンであり、人体内の腸内細菌によっても作り出され、側鎖部分の長さにより 4 種類存在することが知られている。また、ビタミン K は紫外線やビタミン C との併用効果がみられることが Jamison らによって報告されている (J. Nutr. 2001)。

2. 研究の目的

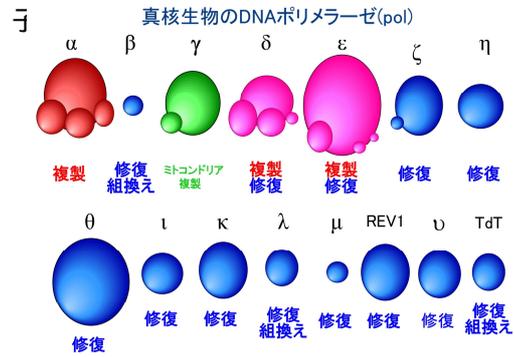
ビタミン K 誘導体から有効な新規医薬品または抗がん機能性食品、もしくは分子プローブとして生体内における DNA 合成酵素研究のツールの開発を目的とし、ビタミン K 誘導体による抗がん機能性の作用機序を以下の点について焦点を当てて進めていった。

- (1) 各種ビタミン K 誘導体の構造と pol 阻害活性の相関
- (2) ビタミン K 誘導体の酵素阻害活性とがん細胞増殖抑制活性との相関
- (3) (2) のメカニズム解析 (細胞周期解析・アポトーシス誘導・シグナル伝達機構の解明など)
- (4) 『紫外線との併用効果』、『抗腫瘍活性』、『抗炎症活性』等の機能性開発

3. 研究の方法

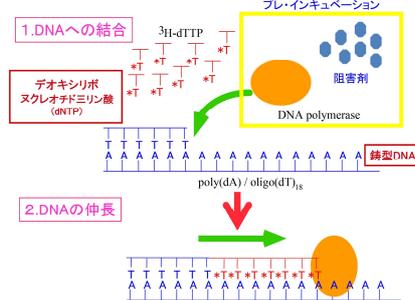
(1) pol 阻害活性試験

哺乳類など高等真核生物の pol は、pol α ~ ν と TdT の 15 種類の分子種が存在する【図 1】。そのうち精製されて活性がある pol 分



【図 1】真核生物の pol 分子種

in vitro の pol 活性測定は図 2 に示すような合成 DNA を基質として用いて、少量 (数 μ l) で DNA ポリメラーゼ活性測定方法 (プレ・インキュベーション) を行う。



【図 2】pol 活性測定方法

(2) 抗がん活性試験

ヒト由来がん細胞の増殖抑制活性測定：pol 阻害活性を合成したビタミン K3 誘導体を対象にして、WST-1 法により細胞増殖への影響を判定した。

抗腫瘍活性試験：ヌードマウス (Balb/c, nu/nu) へヒト由来の大腸がん細胞を移植させた後、pol 阻害物質を 1 日おきに腫瘍部位に皮下注射して、腫瘍の大きさの変化 (縮小) を経時的に観察した。

(3) 抗炎症活性試験

炎症マーカー産生抑制活性測定：ビタミン K3 誘導体の添加によるマウスマクロファージ RAW264.7 細胞の TNF- α 産生抑制を ELISA 法で定量した。

マウス耳抗炎症活性測定：マウス (ICR 系) の耳に起炎剤として TPA (12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate) を塗布して、pol 阻害物質の塗布による炎症 (浮腫) の消失を耳重量から測定した。

4. 研究成果

(1) ビタミン K 誘導体の化学合成

ビタミン K3 dimer (VK3 dimer)、Juglone、Plumbagin、Biplumbagin、2, 3-Dimethyl-1, 4-naphthoquinone の 5 種類を新たに合成した。

(2) pol 活性測定

各誘導体 20 μ M における pol 阻害は、VK3、VK3 dimer、Plumbagin、2, 3-Dimethyl-1, 4-naphthoquinone ではいずれの pol も阻害しなかった。Plumbagin は、pol η を約 20% 程度の残存活性まで阻害した。Juglone では、調べた pol 活性をいずれも 60% 以下まで阻害し、その中で最も強く pol η を阻害した。

(3) ヒトがん細胞増殖抑制試験

VK3、VK3 dimer、Juglone、plumbagin、Biplumbagin は 50 μ M でヒト大腸がん細胞 (HCT116 cells) の増殖を 10% 程度まで抑制した。

(4) メカニズム解析

細胞周期解析：ヒト大腸がん細胞を用いて PI 染色による FACS 解析をおこなったところ、30 μ M Juglone は細胞周期に影響しなかった。

アポトーシス解析：27 μ M Juglone を 24 時間培養後、FITC-Annexin V 染色による FACS 解析を行ったところ、5.1% アポトーシスを引き起こし、死細胞が 28.4% であった。

変異率：ウアバインアッセイを用いて調べたところ、ヒト大腸がん細胞 (HCT116 cells) において Juglone は変異率を下げた。そこで、pol η 欠損細胞を用いてコロニーアッセイを行った。その結果、pol η 存在細胞ではコロニー形成率が低下した。しかしながら、pol η 欠損細胞では変化が見られなかった。そこで損傷の程度を調べるために、コメットアッセイを行ったところ、pol η 存在細胞では DSB が減少し、pol η 欠損細胞では増加していた。これらの結果から、損傷乗り越え複製の正確さに何らかの影響を与えていることが考えられた。

(5) UV 照射との併用効果

ヒト大腸がん細胞 (HCT116 cells) を用いて、ビタミン K 誘導体 Juglone 添加と紫外線照射のどちらが先の方がより細胞増殖抑制が強いことをコロニーアッセイ法を用いて調査した。その結果、ビタミン K 誘導体 Juglone 添加が紫外線照射より先の方がより効果的であることがわかった。さらに、Juglone の濃度依存的に強い細胞増殖抑制を示した。

(6) アシル化 plumbagin

pol 阻害活性：C18:1 plumbagin が pol α および γ を最も強く阻害し、C22:6 plumbagin が pol κ および λ を最も強く阻害することがわかった。

がん細胞増殖抑制活性：C18:1 plumbagin が最も強くがん細胞の増殖を抑制することがわかった。その増殖抑制はアシル化 juglone と同程度のものだった。C22:6 plumbagin は TNF- α 産生抑制活性、マウス耳介抗炎症活性を示し、C22:6 juglone よりも強かった。さらに、C22:6 plumbagin は抗アレルギー活性も有していた。

抗腫瘍活性：C18:1 plumbagin は C18:1 juglone よりも強い抗腫瘍活性を示した。さらに、体重の減少はみられなかった。

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 17 件)

Kawamura M, Kuriyama I, Maruo S, Kuramochi K, Tsubaki K, Yoshida H, Mizushina Y. Anti-tumor effects of novel 5-O-acyl plumbagins based on the inhibition of mammalian DNA replicative polymerase activity. *PLoS One* **9**(2):e88736, 2014 査読有

Mizushina Y, Kuriyama I, Yoshida H. Inhibition of DNA polymerase and associated inflammatory activities of extracts from steamed germinated soybeans. *Food & Function* **5**:696-704, 2014 査読有

Mizushina Y, Kuriyama I, Yamazaki A, Akashi T, Yoshida H. Cycloartenyl trans-ferulate, a component of the bran byproduct of sake-brewing rice, inhibits mammalian DNA polymerase and suppresses inflammation. *Food Chem.* **141**(2):1000-1007, 2013 査読有

Mizushina Y, Kuriyama I, Nakahara T, Kawashima Y, Yoshida H. Inhibitory effects of γ -mangostin on mammalian DNA polymerase, topoisomerase, and human cancer cell proliferation. *Food Chem Toxicol.* **59**:793-800, 2013 査読有

Kuriyama I, Nakajima Y, Nishida H, Konishi T, Takeuchi T, Sugawara F, Yoshida H, Mizushina Y. Inhibitory effects of low molecular weight polyphenolics from *Inonotus obliquus* on human DNA topoisomerase activity and cancer cell proliferation. *Mol Med Rep.* **8**(2):535-542, 2013 査読有

Shiomi K, Kuriyama I, Yoshida H, Mizushina Y. Inhibitory effects of myricetin on mammalian DNA polymerase, topoisomerase and human cancer cell proliferation. *Food Chem.* **139**(1-4):910-918, 2013 査読有

Kuriyama I, Miyazaki A, Tsuda Y, Yoshida H, Mizushina Y. Inhibitory effect of novel somatostatin peptide analogues on human cancer cell growth based on the selective inhibition of DNA polymerase. *Bioorg Med Chem.* **21**(2):403-411, 2013 査読有

Mitoshi M, Kuriyama I, Nakayama H, Miyazato H, Sugimoto K, Kobayashi Y, Jippo T, Kanazawa K, Yoshida H, Mizushina Y. Effects of essential oils from herbal plants and citrus fruits on DNA polymerase inhibitory, cancer cell growth inhibitory, antiallergic, and antioxidant activities. *J Agric Food Chem.* **60**(45):11343-11350, 2012 査読有

Takao Y, Kuriyama I, Yamada T, Mizoguchi H, Yoshida H, Mizushima Y. Antifungal properties of Japanese cedar essential oil from waste wood chips made from used sake barrels. *Molecular Medicine Reports* 5(5):1163-1168, 2012 査読有

Maruo S, Kuriyama I, Kuramochi K, Tsubaki K, Yoshida H, Mizushima Y. Inhibitory effect of novel 5-O-acyl juglones on mammalian DNA polymerase activity, cancer cell growth and inflammatory response. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19(19):5803-5812, 2011 査読有

〔学会発表〕(計 39 件)

栗山磯子、河村萌、椿一典、倉持幸司、吉田弘美、水品善之 新規アシルプルンバギンの合成と抗がん・抗炎症・抗アレルギー活性 日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 27 - 30 日 明治大学

栗山磯子、水野武、赤木純一、横井雅幸、花岡文雄、吉田弘美、水品善之 DNA ポリメラーゼ を阻害するビタミン K3 誘導体と紫外線照射の併用効果の影響 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 - 6 日 神戸ポートアイランド

栗山磯子、吉田弘美、水品善之 DNA ポリメラーゼ を阻害するビタミン K3 誘導体は紫外線照射によるヒトがん細胞増殖抑制の併用効果が得られる 第 52 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 2013 年 10 月 26 日 滋賀県立大学

栗山磯子、山崎旭、明石貴裕、吉田弘美、水品善之 米ぬか成分の DNA 合成酵素阻害活性と健康機能性の探索 日本食品科学工学会第 60 回大会 2013 年 8 月 29 日 - 31 日 実践女子大学

栗山磯子、宮崎杏奈、津田裕子、吉田弘美、水品善之 新規ソマトスタチン由来ペプチドの DNA ポリメラーゼ 特異的阻害活性に基づくヒトがん細胞増殖抑制とアポトーシス誘導 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 24 日 - 28 日 東北大学

栗山磯子、宮崎杏奈、津田裕子、吉田弘美、坂口謙吾、水品善之 ソマトスタチン由来ペプチドによる DNA 合成酵素阻害活性とヒト由来がん細胞増殖抑制活性 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日 - 14 日 福岡

栗山磯子、山崎旭、明石貴裕、吉田弘美、水品善之 米糠から脂溶性の DNA 合成酵素阻害物質の単離・精製と健康機能性について 日本油化学会フレッシュマンサミット OSAKA2012 2012 年 11 月 11 日 近畿大学

栗山磯子、松並望、山崎旭、明石貴裕、吉田弘美、水品善之 米糠から単離・精製した DNA 合成酵素阻害活性成分の健康

機能性について 日本栄養食糧学会第 51 回近畿支部大会 2012 年 10 月 20 日 甲子園大学

栗山磯子、布施佑樹、西田浩志、小西徹也、吉田弘美、水品善之 カフェ酸とそのポリフェノール類縁体による DNA トポイソメラーゼ阻害活性とヒトがん細胞増殖への影響 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 22 日 - 26 日 京都女子大学

栗山磯子、水野武、丸尾紗也子、倉持幸司、椿一典、吉田弘美、坂口謙吾、水品善之 DNA ポリメラーゼを阻害するビタミン K3 誘導体は紫外線照射によるヒトがん細胞増殖抑制の併用効果が得られる 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日 - 16 日 横浜

栗山磯子、丸尾紗也子、倉持幸司、椿一典、水品善之、吉田弘美 脂肪酸結合ビタミン K3 誘導体の DNA 合成酵素阻害活性とがん細胞増殖抑制・抗炎症の活性 第 50 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 2011 年 10 月 15 日 近畿大学

〔図書〕(計 1 件)

栗山磯子 他、羊土社、栄養科学イラストレイテッド 食品学総論、2015、未定

〔産業財産権〕

出願状況(計 10 件)

名称：DNA 合成酵素阻害剤

発明者：水品善之、栗山磯子、吉田弘美、倉持幸司、河村萌

権利者：学校法人神戸学院、倉持幸司

種類：特許権

番号：特願 2013-189451

出願年月日：2013 年 9 月 12 日

国内外の別：国内

名称：抗癌活性を有する化合物

発明者：水品善之、栗山磯子、吉田弘美、菅原二三男、紙透伸治

権利者：学校法人神戸学院

種類：特許権

番号：特願 2013-61159

出願年月日：2013 年 3 月 23 日

国内外の別：国内

名称：新規ソマトスタチン由来ペプチド化合物並びに該化合物を含む DNA ポリメラーゼ阻害剤、抗癌剤及びアポトーシス誘導剤

発明者：水品善之、津田裕子、宮崎杏奈、栗山磯子、吉田弘美

権利者：学校法人神戸学院

種類：特許権

番号：特願 2012-244575

出願年月日：2012 年 11 月 6 日

国内外の別：国内

名称：DNA ポリメラーゼ阻害活性を有する化合物

発明者：水品善之、竹内倫文、紙透伸治、栗山磯子、菅原二三男、吉田弘美
権利者：学校法人神戸学院
種類：特許権
番号：特願 2012-066815
出願年月日：2012年3月23日
国内外の別：国内

名称：DNAポリメラーゼ阻害活性を有する新規化合物
発明者：水品善之、竹内倫文、紙透伸治、栗山磯子、菅原二三男、吉田弘美
権利者：学校法人神戸学院
種類：特許権
番号：特願 2012-066777
出願年月日：2012年3月23日
国内外の別：国内

名称：DNAポリメラーゼ阻害活性を有する新規化合物
発明者：水品善之、竹内倫文、紙透伸治、栗山磯子、菅原二三男、吉田弘美
権利者：学校法人神戸学院
種類：特許権
番号：特願 2012-066745
出願年月日：2012年3月23日
国内外の別：国内

名称：DNAポリメラーゼ阻害活性を有する新規化合物
発明者：水品善之、竹内倫文、紙透伸治、栗山磯子、菅原二三男、吉田弘美
権利者：学校法人神戸学院
種類：特許権
番号：特願 2012-066727
出願年月日：2012年3月23日
国内外の別：国内

名称：DNAポリメラーゼ阻害活性を有する新規化合物
発明者：水品善之、竹内倫文、紙透伸治、栗山磯子、菅原二三男、吉田弘美
権利者：学校法人神戸学院
種類：特許権
番号：特願 2012-066635
出願年月日：2012年3月23日
国内外の別：国内

名称：DNAポリメラーゼ阻害活性を有する新規化合物
発明者：水品善之、竹内倫文、紙透伸治、栗山磯子、菅原二三男、吉田弘美
権利者：学校法人神戸学院
種類：特許権
番号：特願 2012-066630
出願年月日：2012年3月23日
国内外の別：国内

名称：DNAポリメラーゼ阻害活性を有する新規化合物

発明者：水品善之、竹内倫文、紙透伸治、栗山磯子、菅原二三男、吉田弘美
権利者：学校法人神戸学院
種類：特許権
番号：特願 2012-066614
出願年月日：2012年3月23日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
栗山 磯子 (Kuriyama, Isoko)
神戸学院大学・栄養学部・研究員
研究者番号：50553749