

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 14 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580203

研究課題名(和文)食品成分によるDNA損傷応答反応の制御に関する研究

研究課題名(英文)The regulation of DNA damage response by foods or its ingredients

研究代表者

西田 浩志(NISHIDA, HIROSHI)

新潟薬科大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：60322541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において幾つかの食品成分等の候補からGomisin-Nと柿の葉のフラボノール(PLF)がチェックポイント活性を阻害する結果を得た。とくにPLFはATMの活性を阻害することで、ヒト癌細胞を移植したマウスの腫瘍組織に対する重粒子線による成長抑制作用を増感することが分かった。付随した試験においては、チャガで新たに発見した3,4-dihydroxybenzalacetoneがDNAポリメラーゼの活性を阻害して抗癌作用を示すことや、米糠に含まれるフェルラ酸とトコトリエノールが強い抗癌活性を示すこと、フォスファチジルコリン・ペルオキシドが強い細胞毒性を示すことなど、新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：ATM and ATR protein kinases play a crucial role in cellular DNA damage responses. The inhibition of these kinases and related molecules lead to an abolishment of one such signal pathways termed as "checkpoints". It is expected that the discovery of checkpoint modulator will be an effective assistance of anti-cancer therapy. We discovered several candidates from foods including resourses of traditional medicines. Gomisin-N and Persimmon leaf foavonols (PLF) inhibited ATR and ATM in vivo and in vitro, respectively. The inhibitory effect of PLF was observed in xenograft mice which irradiated with heavy ion carbon beam. Addition, we discovered some food stuffs which inhibit tumor cell growth such as 3,4-dihydroxybenzalacetone, feruic acid/gamma-tocotorienol and phosphatidylcholine peroxide. Here, we revealed anti-cancer effects of ingrients of foods, and clarified detailed mechanisms of intracellular signal regulation.

研究分野：Nutritional biochemistry

キーワード：ATM ATR Checkpoint food extracts flavonoid gomisin-N

1. 研究開始当初の背景

抗癌剤の多くは癌細胞の DNA 損傷を誘導したり DNA を修飾することで増殖抑制やアポトーシス誘導により腫瘍組織の縮小または成長阻害につながっている。しかし、癌細胞では特に DNA 損傷修復機構である『チェックポイント機構』が極めて高い活性を維持しており、治療による DNA 損傷を素早く修復することで生き抜く術を得ていることが多い。2000 年代前半から近年までに ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated; 毛細血管拡張性運動失調症原因遺伝子) や、ATR(AT and Rad3 related) や p53 がチェックポイント機構で重要な役割を演じていることが分かった。そのため、化合物によるチェックポイント活性制御により癌治療の増感作用が可能になることが示され、多くの研究者らが臨床応用への道を模索している。我々の研究から、生薬のひとつである五味子の成分 Schisandrin B (SchB) が ATR の活性を特異的に阻害し、癌治療増感剤のひとつとなる可能性を見出している。

我々は五味子に限らずチャガ、柿葉など、歴史的に抗癌活性を持つとされてきた食品をはじめ、複数の天然物由来の成分がチェックポイント活性を抑制する可能性が有ることをこれまでの研究結果から得ている。またその活性成分を分離・単離するには至っていないため、本研究において更なる研究を進めた。天然素材の新規性を検討し、臨床へ応用するための基礎データとしたい。有効成分をどのような形態で体内へ運ぶべきか(経口か静脈注射かなど)についても個々の成分でデータ作りを行う。

2. 研究の目的

抗癌剤の目的は癌細胞の DNA に直接傷害を与える、あるいは合成酵素活性を阻害することで細胞の成長を阻止することにある。しかし、癌細胞はしばしば治療耐性を獲得しており薬剤の効果を十分に発揮できないケースがある。我々は癌細胞の多くで高い活性を維持している『チェックポイント機構』と呼ばれる DNA 損傷修復機能を抑制することで抗癌剤の効果を増強させることを目的とした研究を行ってきた。生薬成分のひとつ Schisandrin B はチェックポイント機構における重要な酵素である ATR を特異的に阻害し、癌細胞の DNA 損傷修復活性を弱め、抗癌剤の作用を増強する結果を得たが、ATM を起点とした別経路の修復補償機能により十分な効果を得るに至らなかった。本研究では、治療の副作用軽減の観点から、食品などの天然の素材に着目してより特異的な増感作用を示す複数の化合物を探索する。抗癌剤の投与量減少や回数最小化(QOL 向上)を提案できる新たな機能性成分を提案する基礎的研究としたい。加えて、本研究で得られる食品成分すべてに関して、それ自身による癌細胞増殖

抑制作用や抗酸化作用など網羅的な機能解析を合わせて行うことで、今後の新たな研究展開にも結び付けたい。

3. 研究の方法

DNA 損傷チェックポイント活性(癌細胞の治療耐性要因)を制御する植物や生薬など複数の食品素材の探索を行い、活性画分の候補を複数個選別する。また、細胞内でのシグナル経路の評価と合わせて成分の評価を行う。得られた化合物または抽出物による抗癌剤治療の増感作用を明確化するため、ヒト癌細胞をマウスに移植する実験を行う。食品素材に由来する癌治療増感剤を提案するためのデータの蓄積を進める。さらに、関連する食品成分および抽出成分の新たな機能性についても随時検討した。チェックポイントシグナルに対する影響に加えて、食品成分および得られた抽出物や化合物それぞれについて、癌細胞増殖抑制作用、抗酸化活性、抗肥満作用、抗高血圧作用など、評価系として保持している実験系に対して、本研究で使用するすべての成分や化合物の機能性を網羅的に解析する試みを進めることにより、得られた資金の有効活用と研究成果の発展を図った。

各種抗癌剤に対する天然物の増感作用を細胞レベルで検討する。いずれも歴史的に抗癌作用があると考えられている材料を素材として用いる。我々は既に複数の研究(抗酸化研究)で度々使用しており、各種抽出過程や特定の化合物の精製に関する技術と情報を保有していることから、活性物質または抽出成分(ポリフェノール画分など)を得る作業は容易に進行できた。

DNA 損傷チェックポイント機構を活性化する化学療法に関連した薬剤として下記のような薬剤について解析する。癌細胞を抗癌剤で処理する場合、多くの場合で DNA 損傷が誘導される。たとえば DNA の 2 重鎖切断や 1 本鎖切断など、個々の薬剤によって特性が異なるし、チェックポイント機構の反応も各々で異なる。現在使用されている抗癌剤を広くカバーできるような実験系の作成が重要な情報となると考える。

代謝拮抗剤(5-FU など細胞の一本鎖切断薬剤)

トポイソメラーゼ阻害剤(ドキソルビシンなどの二重鎖切断薬剤)

各 DNA 損傷誘導薬剤に対して粗抽出物段階の天然物由来成分が精製段階でどのような効果的を示すか検討した。また、現在研究ベースで利用されている癌細胞では様々な変異や特性により、DNA 損傷応答反応もそれぞれ独特の反応を示すことがしばしばであるため、いくつかの細胞を用いてコロニーフォーメーション(生存率試験)、リン酸化抗体を用いた細胞内チェックポイントシグナル解析(ATM, p53, Chk1, SMC1, Brca1, Aurora)を行った。さらに、フローサイトメ

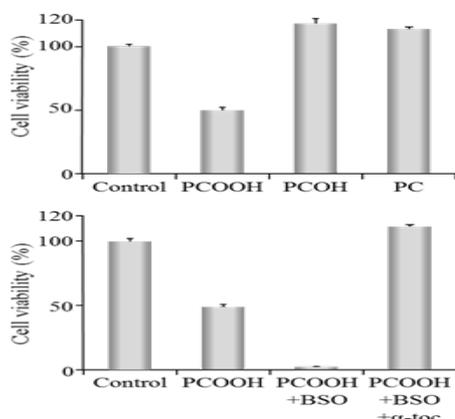
トリを用いた M 期チェックポイントの解析 (Histone-H3 のリン酸化評価) を行い、食品成分と化学療法薬剤について癌細胞死の関連性を詳細に検討した。チェックポイント阻害活性を効率良く発揮した食品成分について、動物レベルでの試験を行った。移植モデルとしてはマウス - マウスの実験系である Colon-26 マウス大腸癌細胞と Balb/c マウスを用いた同系移植実験により化合物によるチェックポイント阻害活性の生体での実現性を検証した。マウス - マウスの同系移植実験系を進展させ、ヒトの作用を想定した検討を行うが、その際はヒト胃癌細胞 MKN45 とヌードマウス (KSN/Slc) を用いた異種移植実験によって検討した。実験方法として、移植時には後背部に癌細胞を移植し、1 週間後に腫瘍組織が一定の大きさに到達したことを確認する。予め化合物を投与し、2 時間後に麻酔を施し化学療法薬剤の投与を行う。腫瘍組織の長径と短径を経日的に観察して腫瘍サイズとして記録する。治療後は動物生存率、腫瘍組織の容積を測定する。また、腫瘍組織片をタンパク質試料として前年度と同様のウエスタンブロット解析を行い、チェックポイント分子の活性を測定し増感効果の確認を行った。

4. 研究成果

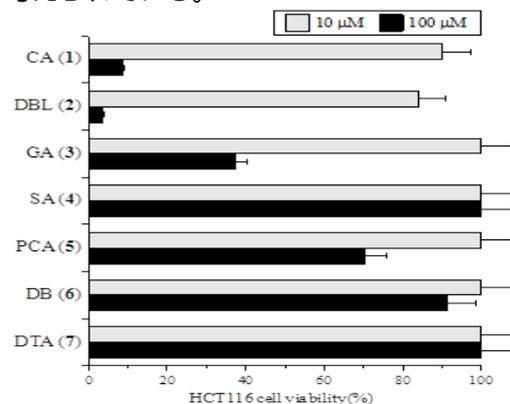
本研究において学術論文として報告した内容を主な研究成果として以下に報告する。

【成果 1: 文献 1】フォスファチジルコリン・ヒドロペルオキシドの肝臓癌細胞致死作用

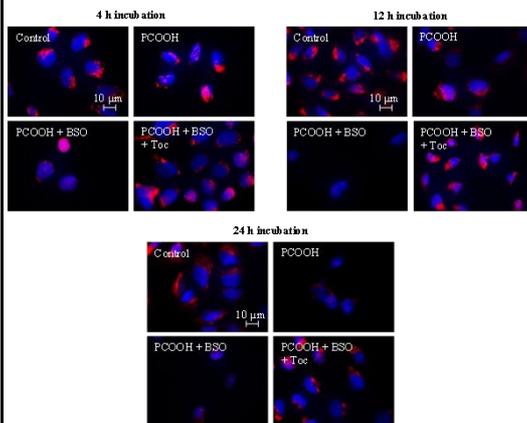
低密度リポタンパク質 (LDL) は生体内反応で酸化されることにより、生体攻撃性のある酸化 LDL (Ox-LDL) になることが知られており、ヒトの血中からも生活習慣および食習慣の乱れから多く検出されるようになった。様々な病因と深く関与していることから、食品中の抗酸化物でこの過程を阻害して健康増進に結び付けようとする試みは多くなされている。酸化フォスファチジルコリン (PC) は酸化 LDL に多く含まれていることが既に報告されており、PC ヒドロペルオキシド (PCOOH)



はその中でも最も毒性の強い分子であると同時に臨床での動脈硬化の主要因であるとも考えられている。



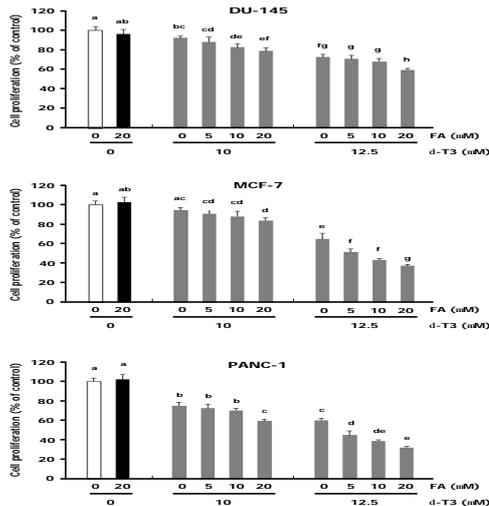
精製した PC、PCOOH、PC ヒドロキシド (PCOH)、グルタチオン阻害剤 (BSO)、抗酸化剤としてトコフェロール (-toc) を加え、HepG2 肝臓癌細胞の生存率を測定した (上図)。PCOOH は極めて高い細胞毒性を示した。BSO を添加するとその毒性は増強されたが、-toc の添加により抗酸化作用が示されたためか、その毒性は認められなかった。



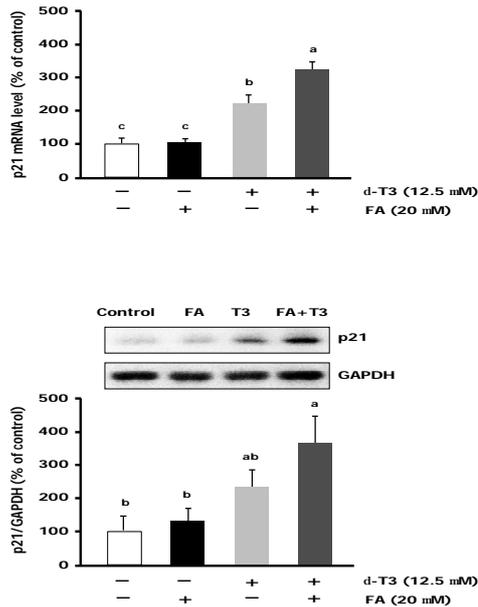
ミトコンドリアの膜電位について調べた (上図)。Control (左上)、PCOOH (右上)、PCOOH + BSO (左下)、PCOOH + BSO + -toc (右下) の順番で 4 時間、12 時間、24 時間の培養後の Mito-Tracker によるミトコンドリア膜電位を調べた図である。青が DAPI による核染色、赤が膜電位の認められるミトコンドリアを示している。生存率試験同様に PCOOH では膜電位の消失が認められ、PCOOH + BSO では時間依存的にミトコンドリア膜電位が顕著に消失している様子が分かった。加えて、アポトーシスマーカーである MAP キナーゼのひとつ JNK が活性化されていることも示された。この結果から、酸化 LDL の毒性が発現するメカニズムについて一定の証明がなされたと考えている。

【成果 2: 文献 2】癌細胞の増殖に対するフェルラ酸と トコトリエノールの相乗作用

米糠はビタミンやミネラルおよびその他の微量活性成分を多く含み、機能性成分が多いことで健康食品素材として注目されている。本研究ではその成分の中でもフェルラ酸とトコトリエノールの相乗的な癌細胞増殖抑制作用を発見したので報告した。



前立腺癌 (DU-145)、乳癌 (MCF-7)、膵臓癌 (PANC-1) の各種癌細胞を用いてフェルラ酸とトコトリエノールの作用を単独もしくは複合的に調べたところ、MCF-7 と PANC-1 細胞で相乗的な癌細胞増殖抑制作用が見られた。とくに PANC-1 細胞において顕著であった(上図)。

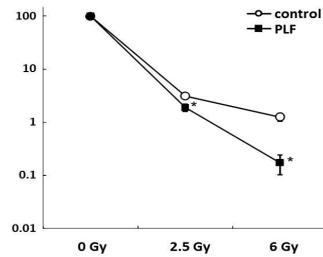


フェルラ酸とトコトリエノールの相乗効果は、細胞周期を G1 で停止する際、およびアポトーシスによる細胞死が起こる際に顕著に発現する p21 タンパク質の発現によるものであることが転写レベルとタンパク質発現レベルで示された(上図)。フェルラ酸と

トコトリエノールは米糠の主要機能性成分でもあるが、これまで報告されていた米糠の抗癌作用の一端を本研究が明らかにしたものと考えている。

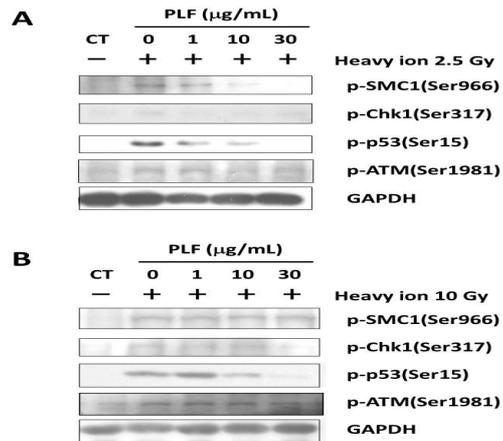
【成果3：文献3】柿葉フラボノールによる重粒子線照射マウスのDNA損傷チェックポイントシグナル活性阻害活性

柿の葉には様々な機能性があることが知られているが、本研究では柿の葉に含まれるフラボノール成分が ATM の活性を抑制して重粒子線による細胞致死作用および腫瘍組織の縮小作用を増強することを突き止めることができたので報告した。

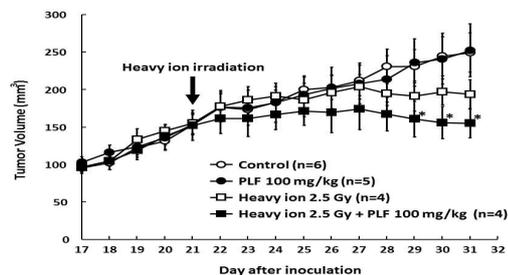


コロニーフォーメーションアッセイにおいて、重粒子線は A549 癌細胞の生存率を低下させたが、柿葉フラボノイド (PLF) は

有意にその生存率を下げる働きを示し、癌細胞の重粒子線感受性を顕著に高めた(上図)。これらの細胞のチェックポイントシグナルをそれぞれ p53、SMC1、Chk1 にて ATM または ATR の特異的リン酸化サイトを調べたところ、PLF によってチェックポイントシグナル(リン酸化活性)はいずれも低下していた(下図)。

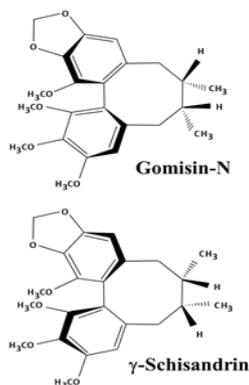


インビトロにおいて ATM と ATR の活性阻害試験を行ったところ、PLF は ATM のみを阻害したことから、重粒子線によるチェックポイント活性を PLF が抑制したことは、ATM の活性化を阻害したことによると考察された。



さらに、マウスの異種移植モデルにおいては、SCID マウスにヒトの肺癌細胞である A549 細胞を移植して腫瘍組織を大きくした時点で、重粒子線を照射した。同時に PLF を経口投与で与え、その後の腫瘍の成長を比較した。その結果、PLF を投与して重粒子線を照射した群では腫瘍の成長が有意に抑えられることが分かった(上図)。この結果がヒトの癌細胞を用いた動物実験系で認められたことは、今後の臨床への応用が期待される。

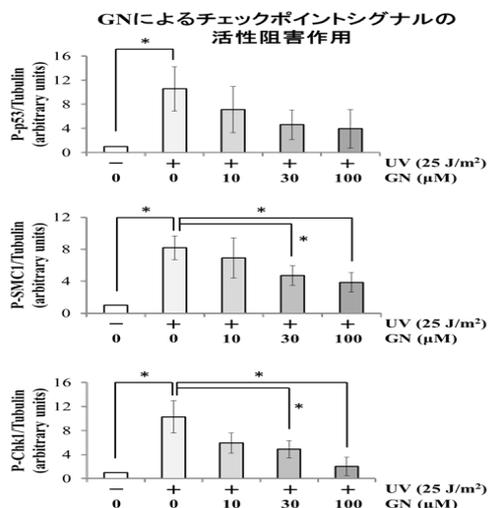
【成果4：文献4】Schisandrin-B のステレオアイソマーによる ATR 依存性 DNA 損傷チェックポイントシグナルの阻害活性



これまで我々は DNA 損傷チェックポイントの阻害活性因子として生薬の五味子に含まれる Schisandrin-B (SchB) が紫外線や特定の抗癌剤による DNA 損傷にตอบสนองしてチェックポイントシグナルを活性化させる ATR を特異的に阻害す

ることを報告した (Nishida et al, Nucleic Acid Research, 2009)。その後の有機化学的分析により、SchB には γ -Schisandrin および Gomisin-N (GN) の 2 つの異性体が存在することが分かった(上の化合物図)。SchB による ATR の阻害はこの 2 つの化合物のいずれによって阻害されるかを培養細胞系を用いて詳細に調べた。その結果、これまでの ATR 阻害活性は GN による阻害作用が大きかったことが分かった(上図)。

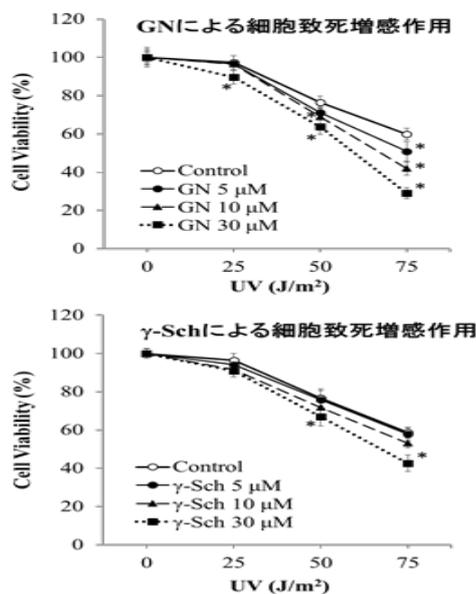
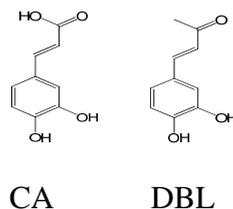
さらに、細胞の UV 照射により ATR を活性化させ、複数のチェックポイントシグナルを活性化させる手法で、GN による ATR 依存シグナルの阻害作用を調べたところ、G1/S 期のチェックポイント分子 p53、S 期チェックポイン



ト分子 SMC1、G2/M 期チェックポイント分子 Chk1 における ATR 特異的リン酸化部位のリン酸化活性は GN の濃度依存的に阻害された(下図)。したがって、GN は UV 照射による細胞の ATR 活性化を特異的に阻害することで、UV の細胞致死効果を増強する作用(増感作用)があることが分かった。ATR の mutation や欠損は胎生致死に至るため、同様の作用を持つ ATM よりも細胞の生存に極めて critical であることが知られている。本研究では、日本でも主要生薬のひとつに数えられる五味子の成分として GN が ATR 阻害活性を示したことは、今後の癌治療戦略にとって大きな前進であったと考えている。引き続き、GN と ATR の結合様式などの分子メカニズムを詳細に検討していきたい。

【成果5：文献5】癌細胞の増殖と DNA 合成酵素阻害活性に及ぼす Inonotus obliquus (Chaga) 由来低分子ポリフェノールの作用

Inonotus obliquus (Chaga) には古くから抗癌作用があるとされており、現在もロシアでは医薬品として用いられている。本研究ではこの Chaga の成分に含まれる抗腫瘍作用因子を同定することを目的として研究を行った。特に腫瘍細胞が増殖する際には極めて高い DNA ポリメラーゼ活性が認められている。Chaga から 7 種類の小分子フェノールを分画して実験に供した。



結果として、caffeic acid (CA) と 3,4-dihydroxybenzalacetone (DBL) が癌細胞の増殖を顕著に抑制することが分かった(下

図)。これらの作用は DNA トポイソメラーゼ II の阻害作用に起因することが示唆された。チェックポイントシグナルに関してはいずれの化合物についても増感作用を確認することはできなかったが、Chaga に含まれる成分（化合物）が癌治療に用いられてきたのはこれらの2つの成分が抗腫瘍作用を示していることを示唆している。

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 5 件）

1. Suzuki Y, Nakagawa K, Kato S, Tatewaki N, Mizuochi S, Ito J, Eitsuka T, Nishida H, Miyazawa T. Metabolism and cytotoxic effects of phosphatidylcholine hydroperoxide in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 458, 920-927, 2015

2. Eitsuka T, Tatewaki N, Nishida H, Kurata T, Nakagawa K, Miyazawa T. Synergistic inhibition of cancer cell proliferation with a combination of δ -tocotrienol and ferulic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 453, 606-611, 2014

3. Kawakami K, Nishida H, Tatewaki N, Eguchi-Kasai K, Anzai K, Eitsuka T, Konishi T, Hirayama M. Persimmon leaf flavonols enhanced anti-cancer effect of heavy ion radiotherapy on murine xenograft tumors. *J. Cancer Ther.*, 4, 1150-1157, 2013

4. Tatewaki N, Nishida H, Yoshida M, Ando H, Kondo S, Sakamaki T, Konishi T. Differential effect of Schisandrin B stereoisomers on ATR-mediated DNA damage checkpoint signaling. *J. Pharmacol Sci*, 122, 138-148, 2013

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

〔学会発表〕（計 4 件）

1. N. Tatewaki, T. Eitsuka, H. Nishida Squalene inhibits inflammation in tumor transplanted mice through the suppression of PGE₂ production.

Society for Free Radical Biology and Medicine, 21st Annual Meeting, Seattle, USA, 2014

2. N. Tatewaki, M. Tamiya, M. Ishiguro, Eitsuka, T. Konishi, H. Nishida, Elucidation of ATR kinase inhibition mechanism by Gomisin N. International Conference on Food for Health in Niigata 2014, Niigata, Japan, 2014

3. N. Tatewaki, T. Eitsuka, T. Konishi, H. Nishida, The effect of Schisandrin on DNA damage checkpoint induced by heavy ion. American Society for Cell Biology, Annual Meeting, New Orleans, 2013

4. H. Nishida The effect of Schisandrin on DNA damage checkpoint induced by heavy ion. Annual Conference of Environmental Mutagen Society Of India Mumbai, 2013

〔産業財産権〕
出願状況（計 1 件）

名称：ヒストンデアセチラーゼ阻害剤
発明者：赤井昭二、西田浩志、小島勝、永塚貴弘、佐藤真治、佐藤憲一、青島啓太
権利者：赤井昭二、西田浩志、小島勝、永塚貴弘、佐藤真治、佐藤憲一、青島啓太
種類：
番号：2014-142432
出願年月日：2014年7月
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者
西田浩志 (NISHIDA, HIROSHI)
新潟薬科大学 応用生命科学部 教授
研究者番号：60322541