

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450185

研究課題名(和文)糖化脂質によるテロメラーゼ活性化の基盤的研究：糖尿病と癌の関わり

研究課題名(英文)Up-regulation of cellular telomerase activity by Amadori-glycated phosphatidylethanolamine: a link between diabetes and cancer

研究代表者

永塚 貴弘 (Eitsuka, Takahiro)

新潟薬科大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：30445895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖化脂質は糖尿病患者に高蓄積し、これが糖尿病合併症を誘発する。疫学研究によって糖尿病患者は健常者よりも癌に罹りやすいことが示されている。本研究では、糖化脂質が癌の無限増殖に關与する酵素テロメラーゼを活性化させるメカニズムを調べることで、糖尿病と癌の関わりを解明することを目的とした。糖化脂質は酸化ストレスの誘発を介してMAPK経路を活性化し、これがc-MycとhTERTの発現を誘導してテロメラーゼを活性化することを明らかにした。糖化脂質によるテロメラーゼの活性化は、抗酸化物質である α -トコフェロールを処理することで打ち消された。以上より、糖尿病と癌の関わりの一端に糖化脂質の關与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Numerous epidemiologic studies suggest that type 2 diabetes significantly increases cancer risk. Amadori-glycated phosphatidylethanolamine (Amadori-PE) plays a key role in the development of diabetic complications. We hypothesized that Amadori-PE may participate not only in the pathogenesis of diabetic complications but also in tumor progression. In the present study, this hypothesis was investigated in cell-culture study, with particular emphasis on the effect of Amadori-PE on telomerase activity which contributes to the infinite replicative potential of cancer cells. Amadori-PE activated MAPK pathway by inducing oxidative stress, leading to up-regulation of c-Myc and hTERT expressions, thereby increasing cellular telomerase activity. Telomerase activity was decreased by a combination treatment of Amadori-PE and α -tocopherol, an antioxidant vitamin. These results provide experimental evidence for a novel role of lipid glycation in linking diabetes and cancer.

研究分野：食品科学

キーワード：糖尿病 癌 テロメラーゼ 糖化脂質

1. 研究開始当初の背景

糖尿病人口は世界的に増え続けている。日本における患者数は1000万人を超え、国民医療費のうち糖尿病の年間医療費は1兆2076億円(2013年)と見積もられている。近年の疫学研究で糖尿病患者は健常者よりも癌に罹りやすいことが明らかになり、糖尿病と癌の関わりが注目されつつある。“糖尿病は合併症との闘い”と言われ、古くから糖尿病性血管障害の発症機構とその治療法が研究対象とされてきた。1980年代までは日本人糖尿病患者の死因の第1位は血管合併症、第2位が癌であったが、1990年代になると順位が入れ替わって癌による死亡が最も高い割合を占めるようになった。このことから、糖尿病と癌の関わりを正しく理解し、早急に対策を講じることが重要な課題と言えるが、これを解決するための研究が今まで十分に行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

著者らの所属する研究グループでは、グルコースとアミノリン脂質(ホスファチジルエタノールアミン)とのメイラード反応により糖化脂質(図1)が生じることを明

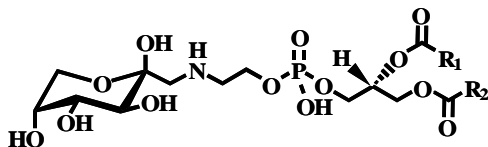


図1 糖化脂質の化学構造

らかにし、糖尿病患者における糖化脂質の高蓄積を証明した。また、それが糖尿病合併症に深く関与する酸化ストレスや血管新生を誘導することを見出した。これらの結果から、糖化脂質が糖尿病合併症の発症・進展に関与するという従来全く知られていない仮説を提示した。糖化脂質のさらなる生理作用を探索するために糖尿病と癌の関わりに着目した結果、癌細胞のテロメラーゼを生理的な濃度(糖尿病患者の血中に存在し得る濃度)で活性化する働きを新たに発見した。そこで本研究では、“糖化脂質によるテロメラーゼ活性化の分子機構解明”と、“糖化脂質によるテロメラーゼ活性化を抑制する食品成分の探索”に取り組むことで、糖尿病患者の癌予防に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

糖化脂質(Amadori-PE)を培地(10%FBSを含むRPMI-1640培地)に添加して、ヒト膵臓癌細胞PANC-1を培養した。培養後、細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロット法によりタンパク質の発現レベルを強化した。細胞からtotal RNAを抽出し、

real-time RT-PCRで遺伝子発現の変動を解析した。テロメラーゼ活性をStretch-PCR法で測定した。細胞内の活性酸素種レベルをDCFH(2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate)法により評価した。

4. 研究成果

Amadori-PEによるテロメラーゼ活性化の分子機構を調べるために、ウエスタンブロットとreal-time RT-PCRを行った。テロメラーゼの触媒サブユニットであるhTERT(human telomerase reverse transcriptase)の発現を調べた結果、Amadori-PE処理によってhTERTタンパク質、hTERT mRNAともに濃度依存的に増大していた(図2)。

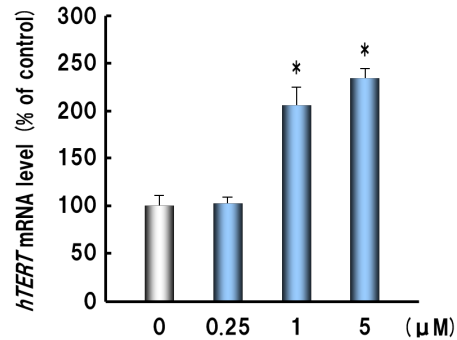
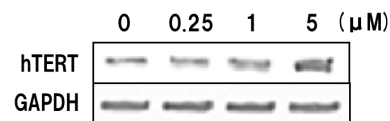


図2 Amadori-PEによるhTERT発現誘導

癌遺伝子c-MycはhTERTのプロモーターに作用してhTERTの遺伝子発現を誘導することが知られている。c-Mycに対するAmadori-PEの影響を調べた結果、Amadori-PEの処理濃度に依存してc-Mycの発現が増大していた(図3)。

この結果から、Amadori-PEによるテロメラーゼの活性化にはc-Mycの関与が示唆され、この効果を確認するためにc-Mycの阻害剤(10058-F4)を使った実験を行った。Amadori-PEとc-Myc阻害剤を同時添加することでAmadori-PEによるテロメラーゼの活性化が起こらなくなった(図4)。したがって、Amadori-PEはc-Mycを介してテロメラーゼを活性化していることが明らかになった。

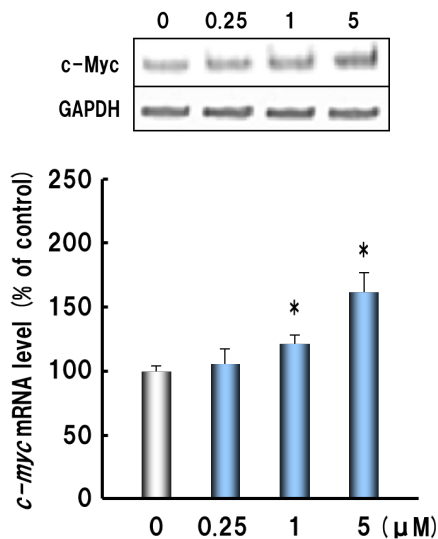


図3 Amadori-PEによるc-Mycの活性化

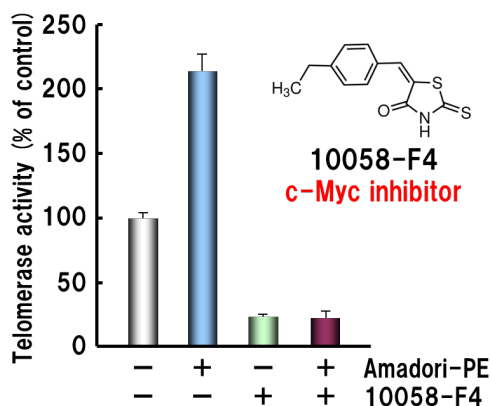


図4 c-Myc阻害剤のテロメラーゼ活性に与える影響

Amadori-PEは金属イオンの存在下で活性酸素種を生じることが報告されているが、Amadori-PEを処理した細胞における影響は評価されていない。そこで、Amadori-PEがPANC-1細胞内で活性酸素種を誘導するかをDCFH法によって調べた。

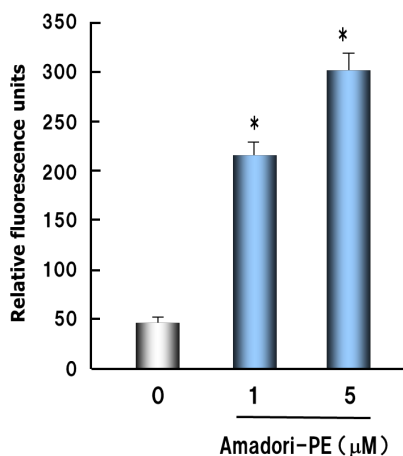


図5 Amadori-PEによる活性酸素種の誘導

Amadori-PEはPANC-1細胞内で濃度依存的に活性酸素種を誘導することが明らかになった(図5)。この結果から、Amadori-PEによるテロメラーゼの活性化には酸化ストレスの関与が考えられたため、酸化ストレスシグナルとして知られているMAPK経路を検討した。この経路の活性化を調べるために、ERKタンパク質のリン酸化状態をウエスタンブロットにより解析した結果、Amadori-PEによって有意にERKのリン酸化レベルが増大していた(図6)。

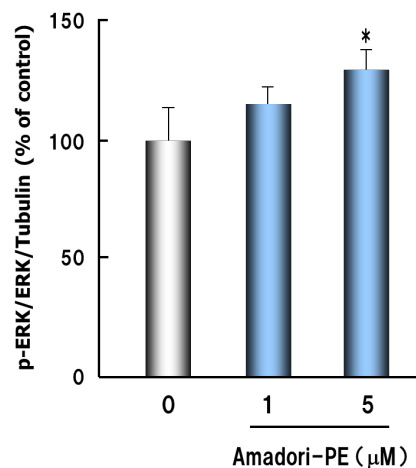


図6 Amadori-PEによるERKの活性化

MAPK経路の一つであるERKにはc-Mycを活性化する作用のあることが知られている。このことからAmadori-PEによるテロメラーゼ活性化機構を以下のように推定した。Amadori-PEが酸化ストレスを誘発し、これによりMAPK経路の活性化、c-Myc、hTERTの遺伝子発現の増大が起こり、テロメラーゼの活性が高まると考えられた(図7)。

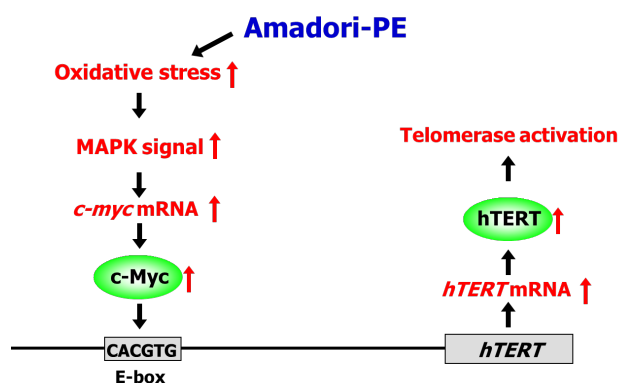


図7 Amadori-PEによるテロメラーゼ誘導の分子機構

以上の結果から、Amadori-PEは酸化ストレスを介してテロメラーゼを誘導することが明らかになったため、この酸化ストレスを軽減することでテロメラーゼの活性化が抑制されると予想した。そこで、Amadori-PEの効果打ち消す食品成分を

種々の抗酸化物質から探索した。特に効果の高い食品成分は α -トコフェロールであった(図8)。また、アスコルビン酸にも効果が認められた。

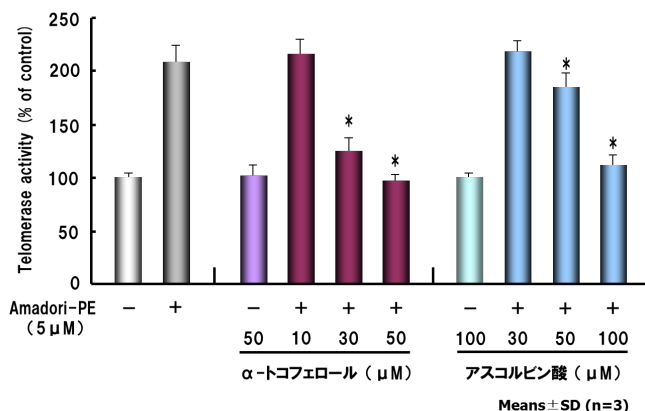


図8 Amadori-PEによるテロメラーゼ活性化に対する抗酸化成分の影響

糖尿病と癌の関わりを検証する研究、特に「脂質と糖」の反応産物である糖化脂質がテロメラーゼに与える影響を評価して、糖化脂質によるその作用を抑制する物質を食品から探索する試みは過去に無いため、本研究の新規性は極めて高い。この成果を基にして、糖尿病に特徴的な癌に特化した従来にない革新的な予防法の開発が見込まれる。近年、糖尿病患者の数は世界的に増加しており、特に日本では癌による死因が1位を占めているが、この対策が積極的に取られていないことから、今後このような研究が各所で展開されることが容易に想像できる。また、糖尿病患者の癌のリスク増大に関する分子機構が推測されつつあるが、テロメラーゼに着目したのは本研究が世界で初めてであることから、独創的な発想と言える。本研究の成果により、糖尿病の病態に関する新しいエビデンスが蓄積され、より良い糖尿病病態の管理に繋がる。これにより、糖尿病患者の生活の質(quality of life: QOL)の向上と、糖尿病に要する国民医療費の高騰抑制に結びつく可能性があるため、社会的意義と波及性が大きい。したがってこの成果は、食品学、栄養学、生化学にとどまらず、薬学や医学の分野にも大きく展開できると考えられる。

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 7 件)

1. T. Eitsuka, N. Tatewaki, H. Nishida, K. Nakagawa, T. Miyazawa. A combination of α -tocotrienol and ferulic acid

synergistically inhibits telomerase activity in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, in press (2016)

2. N. Tatewaki, T. Konishi T, Y. Nakajima, M. Nishida, M. Saito, T. Eitsuka, T. Sakamaki, N. Ikekawa, H. Nishida. Squalene inhibits ATM-dependent signaling in IR-induced DNA damage response through induction of Wip1 phosphatase. *PLoS One* 11, e0147570 (2016) doi: 10.1371/journal.pone.0147570
3. Y. Suzuki, K. Nakagawa, S. Kato, N. Tatewaki, S. Mizuochi, J. Ito, T. Eitsuka, H. Nishida, T. Miyazawa. Metabolism and cytotoxic effects of phosphatidylcholine hydroperoxide in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458, 920-927 (2015) doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.063.
4. M. Katayama, T. Kiyono, K. Horie, T. Hirayama, T. Eitsuka, K. Kuroda, K. Donai, S. Hidema, K. Nishimori, T. Fukuda. Establishment of an immortalized cell line derived from the prairie vole via lentivirus-mediated transduction of mutant cyclin-dependent kinase 4, cyclin D, and telomerase reverse transcriptase. *Exp. Anim.* 65, 87-96 (2015) doi: 10.1538/expanim.15-0061.
5. K. Kuroda, T. Kiyono, T. Eitsuka, H. Isogai, K. Takahashi, K. Donai, E. Isogai, T. Fukuda. Establishment of cell lines derived from the genus *Macaca* through controlled expression of cell cycle regulators. *J. Cell Biochem.* 116, 205-211 (2015) doi: 10.1002/jcb.24963.
6. T. Eitsuka, N. Tatewaki, H. Nishida, T. Kurata, K. Nakagawa, T. Miyazawa. Synergistic inhibition of cancer cell proliferation with a combination of α -tocotrienol and ferulic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 606-611 (2014) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.126.
7. K. Donai, T. Kiyono, T. Eitsuka, Y. Guo, K. Kuroda, H. Sone, E. Isogai, T. Fukuda. Bovine and porcine fibroblasts can be immortalized with intact karyotype by the expression of mutant cyclin dependent kinase 4, cyclin D, and telomerase. *J. Biotechnol.* 176, 50-57 (2014) doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.02.017.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. T. Eitsuka, K. Nakagawa, N. Tatewaki, H. Nishida, T. Miyazawa, Amadori-glycated phosphatidylethanolamine induces cellular telomerase activity. 12th International Symposium on the Maillard Reaction, Tokyo, Japan (Sep 1-4, 2015)
2. T. Eitsuka, N. Tatewaki, H. Nishida, K. Nakagawa, T. Miyazawa, Synergistic inhibition of cancer cell growth by a combination of delta-tocotrienol and ferulic acid. 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan (May 14-18, 2015)
3. 永塚貴弘、館脇直人、西田浩志、仲川清隆、宮澤陽夫「トコトリエノールの抗癌作用に対するフェルラ酸の相乗効果」農芸化学会、岡山、2015年3月27-29日
4. 永塚貴弘、館脇直人、西田浩志、仲川清隆、宮澤陽夫「ビタミンEによるテロメア短縮抑制作用」ビタミンE研究会、東京、2015年1月9-10日
5. T. Eitsuka, N. Tatewaki, H. Nishida, K. Nakagawa, T. Miyazawa, Synergistic inhibition of cancer cell growth by combination treatment of -tocotrienol and ferulic acid. International Conference on Food for Health in Niigata 2014, Niigata, Japan, (Oct 30-31, 2014)
6. 永塚貴弘、仲川清隆、西田浩志、倉田忠男、宮澤陽夫「糖化リン脂質による癌細胞テロメラーゼの活性化」日本メイラード学会、東京、2013年11月29日
7. T. Eitsuka, K. Nakagawa, H. Nishida, T. Miyazawa, Up-regulation of cellular telomerase activity by Amadori-glycated phosphatidylethanolamine: a link between diabetes and cancer. Diet and Optimum Health, Corvallis, USA (May 15-18, 2013)

〔図書〕(計 1 件)

1. 永塚貴弘, 第5章 ビタミン様物質 2.ピロロキノリンキノン, ビタミンK2(メナキノン-4), トコトリエノール, 食品機能性成分の吸収・代謝機構(監修 宮澤陽夫), シーエムシー出版, pp. 192-199 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

永塚 貴弘 (TAKAHIRO EITSUKA)
新潟薬科大学・応用生命科学部・助教
研究者番号: 30445895

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: