

令和元年6月26日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07434

研究課題名(和文) 抗炎症性ニトロ化脂肪酸の抗がん作用

研究課題名(英文) Anti-cancer effect of nitro-fatty acid

研究代表者

西山 和夫 (Nishiyama, Kazuo)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：40164610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ニトロオレイン酸の抗がん作用をがん細胞の増殖とがん細胞の遊走に対する作用を指標として検討した。9-ニトロオレイン酸は濃度依存的にヒト膀胱がん細胞T-24の生細胞数を低下させ、10 $\mu$ M以上では有意に低下させた。50 $\mu$ M以上では細胞死の誘導が認められた。これは抗ガン作用が知られているスルフォラファンと同程度の活性であった。一方、9-ニトロオレイン酸は10 $\mu$ M以下の濃度では濃度依存的にT-24細胞の遊走を促進し、10 $\mu$ Mでは有意な促進作用が認められた。スルフォラファンもT-24細胞の遊走に対し、同様の作用を示した。親電子性物質のがん細胞に対する作用については、今後より詳細な検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの発生や転移には慢性的な炎症が関与している。不飽和脂肪酸と酸化窒素化合物の反応で生成するニトロ化脂肪酸が抗炎症作用を示すことが報告されており、その作用に親電子性が関与していることが示唆されている。親電子性物質には抗炎症作用のみならず抗がん作用を示すものが多いが、ニトロ化脂肪酸のがん細胞に対する作用に関する研究は行われていなかった。本研究では、9-ニトロオレイン酸が、がん細胞の増殖を抑制するが、条件によっては、がんの転移に関係する細胞の遊走を促進することを明らかにすることにより、ニトロ化脂肪酸を含めた親電子性物質のがん細胞に対する作用については、さらに詳細な検討が必要であることを提示した。

研究成果の概要(英文)：The effects of chemically synthesized 9-nitrooleate on cancer cell growth and migration were evaluated by using human bladder cancer cell line T24. 9-Nitrooleate inhibited cell growth in a concentration dependent manner at  $\mu$ M level and induced cell death at concentrations higher than 50  $\mu$ M. On the other hand, 9-nitrooleate promoted cancer cell migration at concentrations lower than 10  $\mu$ M. Sulforaphane, a typical anti-cancer isothiocyanate, showed almost the same effect as 9-nitrooleate. It is suggested that further studies are necessary to clarify the effects of electrophiles such as nitro-fatty acids and isothiocyanates on cancer cells.

研究分野：食品機能化学

キーワード：ニトロオレイン酸 抗がん作用 細胞増殖 細胞遊走 親電子性物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

がんの発生や転移には慢性的な炎症が関与している。近年、不飽和脂肪酸と酸化窒素化合物 (NOx) の反応で生成するニトロ化脂肪酸が抗炎症作用を示すことが報告されており、その作用にタンパク質チオールとの反応性 (親電子性) が関与していることが示唆されている。親電子性物質には抗炎症作用のみならず抗がん作用を示すものが多いが、ニトロ化脂肪酸によるがん予防に関する研究は行われていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ニトロオレイン酸の抗がん作用について、がん細胞の増殖およびがん転移に関係するがん細胞の運動 (細胞遊走) に対する作用を指標として検討し、その効果を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ニトロオレイン酸の合成と分離精製

Woodcock らの方法を改変して行った。まず、オレイン酸を原料としてニトロ化反応を行うことによりニトロオレイン酸を合成し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製を行った。

### (2) ニトロオレイン酸のがん細胞増殖への影響

ヒト膀胱がん細胞 T-24 を 24-well plate に播種し、24 h 前培養を行った。前培養後、培地を取り除いて PBS で洗浄し、9-ニトロオレイン酸を終濃度 1、5、10、25、50、100  $\mu\text{M}$  になるように培地 (10%血清) に添加し、さらに 24 h 培養した。9-NO<sub>2</sub>-OA は水溶液中で分解が進むため 9-ニトロオレイン酸処理する時にはその都度培地と混合して調製した。Control 区は DMSO を 300 倍希釈し、培地 (10%血清) と混合し添加した。24-well plate から培地を除去し、0.25% トリプシン - EDTA 溶液を 100  $\mu\text{l}$  加え全体に行き渡らせ、インキュベーターで 3~5 分間静置し、顕微鏡を用いて細胞が plate からはがれたのを確認したら同量 (100  $\mu\text{l}$ ) の培地 (10%血清) を加えピペティングして細胞を懸濁させた。細胞懸濁液から 90  $\mu\text{l}$  取り、生細胞数および死細胞数をカウントするために 0.5% トリパンブルー溶液 10  $\mu\text{l}$  と混合した。その混合液から 10  $\mu\text{l}$  取り、血球計算盤で計測した。

### (3) ニトロオレイン酸のがん細胞増殖遊走への影響

T-24 細胞を 6 well plate に播種し、plate 底面に隙間が無くなる (confluence) まで培養した。細胞が confluence になったら、培地を取り除いて PBS 洗浄後、サンプルを加えた無血清培地を添加し、チップの先端で底面をまっすぐ引っ掻くようにして接着している細胞の一部を剥がした。インキュベーターで 6 h 培養した。細胞撮影用のデジタルカメラを用いて細胞の写真を撮影した。本実験では、サンプル添加後 0, 6h 後にそれぞれ撮影した。倍率は  $\times 400$  倍に設定した。遊走面積の測定には、PC ソフトウェアの ImageJ を使用した。チップで剥がした部位に移動してくる細胞の面積を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) ニトロオレイン酸の合成と分離精製

オレイン酸を原料としてニトロ化反応を行い、ニトロオレイン酸を合成し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離精製を行った。200 ml ナスフラスコにオレイン酸 2.0 g (7 mmol)、テトラヒドロフラン 24 ml、アセトニトリル 18 ml を加え氷冷し、フラスコ内を窒素で満たし窒素置換を行った。10 分間、氷冷下で攪拌した後、Mercury (II) Chloride 2.3 g (8.4 mmol) を加え、さらに氷冷下で 10 分間攪拌した。次いで臭化フェニルセレネニル 1.86 g (7.8 mmol) を加え、氷冷下で 10 分間攪拌した。さらに Sodium Nitrite 0.98 g (14.2 mmol) を加え、氷冷下で 4 時間攪拌した。その後、生成した中間体を適量のシリカゲルと適量のセライトを敷いたキリヤマ漏斗を用いて吸引濾過した。濾液はロータリーエバポレーターを用いて濃縮した。濃縮物にテトラヒドロフラン 24 ml を加え 10 分間氷冷した後、30% 過酸化水素水溶液 8 ml (7 mmol) を滴下漏斗を用いて 7 分かけて滴下した。その後、氷冷下で 1 時間攪拌した。1 時間後、脱イオン水 10 ml と酢酸エチル 10 ml を加え、氷冷下で 5 分間攪拌した。その後、分液漏斗に移し上部の有機層を分液した。下層の水層はさらに酢酸エチル 20 ml を加えて分離する作業を 3 回繰り返す、有機層を抽出した。2 M の K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を 20 ml 加え静置後下層の水層を除去した。0.1 M の塩酸を 20 ml 加えて混ぜて静置後下層の水層を除去した。適量の飽和食塩水を加えて静置後、下層の水層を除去した。無水硫酸ナトリウムを加え、乾燥させた。次にシリカゲル 25 g、直径 1.5 cm のクロマト管を用いて、サンプルをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (高さ 33.5 cm) で分離し、フラスコに約 25 ml ずつ回収した。展開溶媒はヘキサン : 酢酸エチル = 10 : 1、次いでヘキサン : 酢酸エチル : 酢酸 = 92 : 8 : 0.5 を用いた。分離した 28 個のフラクション

ンを TLC(展開溶媒/ヘキサン:酢酸エチル=4:1)で確認した。エバポレーターを用いて濃縮後、各フラクションにニトロオレイン酸が存在していることを確認し、NMR を用いて測定した。組成を確認後、溶媒を揮発除去し、-80 で保存した。NMR で測定した結果、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおけるフラクション 19~24 は 9-ニトロオレイン酸であり、フラクション 25~28 は 9-ニトロオレイン酸と 10-ニトロオレイン酸の混合物であることが分かった。本実験では、ほぼ純粋な 9-ニトロオレイン酸であるフラクション 19~24 を合わせたものを使用した。NMR 解析による混合比は 9-ニトロオレイン酸:10-ニトロオレイン酸 = 98:2 であった。市販されている 9-ニトロオレイン酸は、大変高価であり、細胞実験に使用するにも多額の研究費がかかることが懸念されたが、今回、合成とシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を比較的容易に実施することが可能であることを示すことができた。これにより、以降の研究を低コストで実施することができた。さらに今後のニトロオレイン酸の研究の進展にも大きく貢献するものと考えられる。

### (2) ニトロオレイン酸のがん細胞増殖への影響

まず、ニトロ化の有無による細胞増殖抑制活性を比較するためにニトロ化されていないオレイン酸の T-24 細胞の増殖への影響を調べた。その結果、ニトロ化されていないオレイン酸は 300  $\mu\text{M}$  の濃度においても T-24 細胞の生細胞数に全く影響を及ぼさなかった。一方、今回合成した 9-ニトロオレイン酸処理により濃度依存的に T-24 細胞の生細胞数が減少し、10  $\mu\text{M}$  以上の濃度では有意な生細胞数の減少が認められた。また、50  $\mu\text{M}$  以上の濃度では細胞死の誘導が認められた。次に 9-ニトロオレイン酸の細胞増殖抑制活性の程度を明らかにするために代表的なイソチオシアネート類であるスルフォラファンの T-24 細胞の増殖への影響を調べた。その結果、スルフォラファンは 9-ニトロオレイン酸と同様に濃度依存的に生細胞数を減少させ、10  $\mu\text{M}$  以上では有意な減少が認められ、50  $\mu\text{M}$  で細胞死の誘導が認められた。以上の結果より、9-ニトロオレイン酸はマイクロモルオーダーの濃度で濃度依存的に T-24 細胞の増殖を抑制し、処理濃度が高くなると細胞死を誘導すること、さらにその活性は代表的なイソチオシアネート類であるスルフォラファンと同程度の強さであることが明らかとなった。さらに 9-ニトロオレイン酸の細胞増殖抑制作用におけるタンパク質チオールとの反応性(親電子性)の関与を明らかにするために 9-ニトロオレイン酸の T-24 細胞の増殖抑制作用に対する N-アセチルシステインの影響を調べた。その結果、9-ニトロオレイン酸の細胞増殖抑制作用が N-アセチルシステインによってキャンセルされることを確認し、9-ニトロオレイン酸の細胞増殖抑制作用には 9-ニトロオレイン酸の親電子性が関与していることを明らかにした。

### (3) ニトロオレイン酸のがん細胞遊走への影響

まず、ニトロ化の有無による細胞遊走への影響を比較するためにニトロ化されていないオレイン酸の T-24 細胞の遊走への影響を調べた。その結果、ニトロ化されていないオレイン酸は今回調べた濃度において T-24 細胞の生細胞の遊走に全く影響を及ぼさなかった。一方、9-ニトロオレイン酸は 10  $\mu\text{M}$  以下の 9-NO<sub>2</sub>-OA は濃度依存的に遊走を促進し、10  $\mu\text{M}$  では有意な促進作用が認められた。さらにスルフォラファンは 1  $\mu\text{M}$  で細胞遊走を促進する傾向を示し、5  $\mu\text{M}$  では有意に促進することが明らかとなった。ニトロオレイン酸やスルフォラファンのような親電子性物質の標的として Keap1-Nrf2 系がある。Nrf2 は抗酸化酵素や薬物代謝酵素の遺伝子発現に関与する転写因子であり、抗炎症作用に重要な働きをしているが、近年 Nrf2 が、がん細胞の遊走に関与する可能性を示す論文が報告されている。今後、ニトロ化脂肪酸を含めた親電子性物質のがん細胞に対する作用については、より詳細な検討が必要であると思われる。

#### <引用文献>

Woodcock SR, Bonacci G, Gelhaus SL, Schopfer FJ, Nitrated fatty acids: synthesis and measurement. *Free Radical Biology and Medicine* 59, 14-26 (2013)

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

K. Yamasaki, K. Sugamoto, T. Arakawa, K. Nishiyama, M. Yamasaki, Chronic intake of high-dose of blueberry leaf extract does not augment the harmful effects of ethanol in rats. *PeerJ* 7:e6989 (2019) 査読有

DOI:[10.7717/peerj.6989](https://doi.org/10.7717/peerj.6989)

T. Kosakai, R. Nobetsu, C. Sho, K. Kawano, K. Iwai, Y. Takase, K. Nishiyama, M. Yamasaki, Novel fermented products made from sweet potato-shochu distillery by-products reduces body fat and serum cholesterol in mice. *Journal of The Brewing Society of Japan* 114(5), 294-301 (2019) 査読有

<http://www.jozo.or.jp/newstoppers/%e6%97%a5%e6%9c%ac%e9%86%b8%e9%80%a0%e5%8>

[d%94%e4%bc%9a%e8%aa%8c%e7%ac%ac114%e5%b7%bb5%e5%8f%b7%e3%81%8c%e7%99%ba%e5%88%8a%e3%81%95%e3%82%8c%e3%81%be%e3%81%97%e3%81%9f](https://doi.org/10.5650/jos.ess18226)

K. Fujii, Y. Ota, K. Nishiyama, H. Kunitake, Y. Yamasaki, H. Tari, K. Araki, T. Arakawa, M. Yamasaki, Blueberry leaf polyphenols prevent body fat accumulation in mice fed high-fat, high-sucrose diet. Journal of Oleo Science 68(5), 471-479 (2019) 査読有  
DOI:[10.5650/jos.ess18226](https://doi.org/10.5650/jos.ess18226)

M. Yamasaki, K. Hamada, K. Fujii, K. Nishiyama, H. Tari, K. Araki, T. Arakawa, Vaccinium ashei leaves extract alleviates insulin resistance via AMPK independent pathway in C2C12 myotube model. Biochemistry and Biophysics Reports 14, 182-187 (2018) 査読有  
DOI:[10.1016/j.bbrep.2018.05.003](https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.05.003)

R. Fujioka, K. Nishiyama, M. Yamasaki, Dietary borage oil promotes gamma-linoleic acid accumulation in dextran sulfate sodium-treated mice but does not manipulate the severity of colitis. Journal of Food and Nutrition Research 5(3), 151-155 (2017) 査読有  
<http://pubs.sciepub.com/jfnr/5/3/2/index.html>

K. Yamasaki, H. Nagatomo, Y. Kawamura, K. Sugamoto, T. Kai, K. Kamenaga, M. Takeshita, Y. Kikuchi, Y. Matsuura, C. Yukizaki, K. Nishiyama, M. Yamasaki, A single dose of blueberry leaf extract suppresses serum ethanol levels after oral ethanol administration in rats. European Journal of Scientific Research 140 (4), 352-365 (2016) 査読有  
[https://www.europeanjournalofscientificresearch.com/issues/EJSR\\_140\\_4.html](https://www.europeanjournalofscientificresearch.com/issues/EJSR_140_4.html)

K. Kishita, K. Ibaraki, S. Itakura, Y. Yamasaki, N. Nishikata, K. Yamamoto, M. Shimizu, K. Nishiyama, M. Yamasaki, Preparation of conjugated linoleic acid nanoemulsions and their biodistribution. Journal of Oleo Science 65(11), 949-954 (2016) 査読有  
DOI:[10.5650/jos.ess16099](https://doi.org/10.5650/jos.ess16099)

〔学会発表〕(計3件)

9-ニトロオレイン酸とスルフォラファンはヒト膀胱がん細胞の増殖を抑制するが遊走を促進する、児玉大輔、一万田晃、松木美佐、野見山将太、菅本和寛、山崎正夫、西山和夫、日本食品科学工学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会(長崎)2017年10月

9-ニトロオレイン酸はヒト膀胱がん細胞の増殖を抑制するが遊走を促進する、一万田晃、松木美佐、児玉大輔、野見山将太、菅本和寛、山崎正夫、西山和夫、フードサイエンスフォーラム第23回学術集会(宮崎)2017年9月

ヒト膀胱がん細胞に対するニトロオレイン酸の作用、一万田晃、松木美佐、野見山将太、菅本和寛、山崎正夫、西山和夫、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会(大分)2016年10月

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：菅本 和寛

ローマ字氏名：(SUGAMOTO, kazuhiro)

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：工学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10274771

研究協力者氏名：山崎 正夫

ローマ字氏名：(YAMASAKI, masao)

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：80381060

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。