

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580190

研究課題名(和文) 腸管機能制御を通じて加齢性疾患を抑制する抗老化食品の探索とその機能性の分子基盤

研究課題名(英文) Screening for anti-aging food that regulates intestinal function and clarification of its molecular basis

研究代表者

片倉 喜範 (Yoshinori, Katakura)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50264106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：Caco-2細胞をヒト腸管モデル細胞株として用い、SIRT1プロモーター制御下でEGFPを発現するベクターを安定導入した組換えCaco-2細胞を樹立した。フローサイトメーターを用いてEGFPの蛍光強度の変化を追跡した結果、乳酸菌T2102株を陽性菌として選定した。T2102株は、SIRT1の活性化の結果、 $\beta$ -カテニンの脱アセチル化を誘導するとともに、その発現を消失させることが明らかとなった。また、T2102株はDLD-1細胞におけるテロメラーゼ発現も抑制するとともに、細胞老化を誘導することが明らかとなった。またがん細胞抑制能が足場非依存性増殖能及び造腫瘍能の結果より明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We used human colon cancer cell line, Caco-2 cells, and established recombinant Caco-2 cells expressing EGFP under the control of human SIRT1 promoter. We monitored the changes in EGFP fluorescence after adding lactic acid bacteria by using flow cytometer, and identified T2102 strain as positive lactic acid bacteria. T2102 activated SIRT1, deacetylated and destabilized  $\beta$ -catenin. T2102 repressed hTERT expression and induced cellular senescence in Caco-2 cells. Furthermore, tumor suppressing activity of T2102 was evidenced by anchorage-independent growth and tumorigenicity.

研究分野：食品機能学

キーワード：アンチエイジング 乳酸菌 SIRT1 がん抑制

### 1. 研究開始当初の背景

カロリー制限は数多くのモデル生物の寿命を延長し、哺乳類における加齢性疾患発症リスクを軽減することが知られている、唯一確実な方法である。NAD<sup>+</sup>依存的な脱アセチル化酵素 SIRT1 は、カロリー制限効果を仲介し、ホメオスタシスの維持や細胞生存に機能しうることが知られている。SIRT1 の制御メカニズムは、これまで精力的に研究されてきている。ポリフェノールを含む植物の代謝産物が SIRT1 を活性化しうる小分子として同定されているとともに、それら SIRT1 活性化因子が健康改善効果を有することも知られるようになってきている。これらの活性化因子は、SIRT1 に対するアロステリックな結合とともに、アセチル化された基質に対する Km 値を低下させることで SIRT1 活性を制御している。SIRT1 遺伝子の転写制御機構に関する研究も行われており、PPAR / やインターフェロン が関わるメカニズムが報告されている。しかしながら、食品や食品由来因子が SIRT1 転写を増強する例はこれまで報告されていない。そこで本研究では、SIRT1 転写を増強する因子を探索することのできる新たなスクリーニングシステムを構築した。本システムは、健康増進機能を有する有用な機能性食品の探索に非常に有用なシステムであると考えられる。

腸管は、食品と生体との接点であり、消化、吸収、バリア機能、毒素代謝、腸管免疫、腸管微生物との相互作用など様々な機能を有する。腸管 SIRT1 は、腸管のがんを抑制する機能や腸管ホメオスタシスを制御する機能がこれまで報告されている。しかしながら、これまで腸管 SIRT1 発現を増強する食品・食品成分は報告されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、腸管由来細胞において SIRT1 転写を増強する食品、食品由来因子、化合物を探索するためのシステムを構築するとともに、それら因子の腸管における機能性とその機能性発現の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

細胞株：細胞株としては、ヒト結腸ガン由来細胞株 Caco-2 細胞及び DLD-1 細胞を用いた。これらの細胞は、10 ユニット胎児血清を含む DMEM 培地にて培養を行った。

乳酸菌：本研究には 60 種の乳酸菌株を用いた。乳酸菌は、100 30 分熱処理後、凍結乾燥し、PBS に懸濁後実験に用いた。

SIRT1 発現増強食品スクリーニングシステム：まずヒト SIRT1 プロモーターを、ヒトゲノム DNA を鋳型に増幅した。増幅フラグメントを CMV プロモーターを除去した pEGFP-C3 ベクターに挿入した。構築したプラスミドは、

SIRT1p-EGFP とした。SIRT1p-EGFP を Caco-2 細胞に導入し、安定株を樹立した (Caco-2 (SIRT1p-EGFP))。EGFP の蛍光強度の変化は、フローサイトメーターを用いて追跡した。

定量 RT-PCR：RNA は High Pure RNA Isolation kit を用いて調製した。cDNA は ReverTra Ace kit により合成した。qRT-PCR は、KAPA SYBR Fast qPCR kit を用いて行った。プライマーは次のものを用いた。SIRT1 forward primer, 5'-GCCTCACATGCAAGCTCTAGTGAC-3', reverse primer, 5'-TTCGAGGATCTGTGCCAATCATAA-3'; hTERT forward primer, 5'-CGTACAGGTTTCACGCATGTG-3', reverse primer, 5'-ATGACGCGCAGGAAAAATG-3'; human  $\beta$ -actin forward primer, 5'-TGGCAGCCAGACAATGAA-3', reverse primer, 5'-CTAAGTCATAGTCCGCTAGAAGCA-3'.

ルシフェラーゼアッセイ：リポーターベクターとしては、TCF/LEF エレメントを含む M50 Super 8xTopFlash、hTERT コアプロモーターを含むベクター、変異型 hTERT コアプロモーターを含むベクターを用いた。ルシフェラーゼアッセイは、Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いた。

イムノブロットング：細胞溶解液は NP-40 lysis buffer を用いて調製した。タンパク質は、10% SDS-PAGE により分離を行い、PVDF 膜に転写した。タンパク質の検出は、抗  $\alpha$ -カテニン抗体、西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体、抗マウス IgG 抗体を用いた。タンパク質の検出は、ImmunoStar LD を用いて行った。

免疫沈降：細胞溶解液は TritonX-100 lysis buffer を用いて調製した。抗アセチル化リジン抗体をまず加え、免疫沈降物を  $\mu$  MACS Protein A Microbeads を用いて調製した。

Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) アッセイ：蛍光 SA- $\beta$ -Gal アッセイは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの蛍光基質 (C<sub>12</sub>FDG) を用いて行った。それぞれのウェルのイメージは IN Cell Analyzer 1000 を用いて取得した。Hoechst33342 由来のシグナルで核染色を行った。この染色をもとに、細胞数と SA- $\beta$ -Gal 活性の測定を行った。

レトロウイルスによる遺伝子導入：ウイルスを含む培養上清は、293 T 細胞に、pGag-Pol, pVSV-g 及びそれぞれの発現ベクターを導入することにより作製した。ウイルス培養上清に 10% FBS と 10  $\mu$ g/mL のポリブレンを添加し、ターゲット細胞を感染させた。感染後、3  $\mu$ g/mL のピューロマイシンで導入細胞の選択を行った。

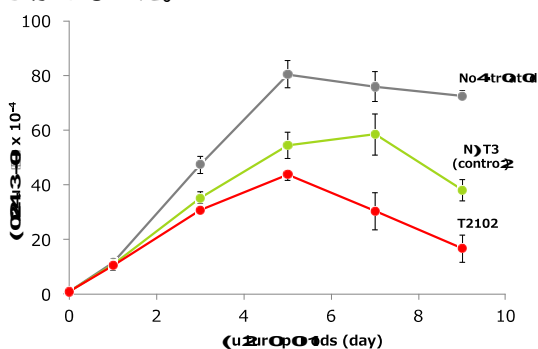
shRNA: siRNA を発現する配列を含むオリゴヌクレオチドを pSUPER.retro ベクターに挿入し、上記方法により細胞に導入した。

統計解析：全ての実験は少なくとも3回行った。統計的有意差は、Student's t-test により検証し、 $P < 0.05$  を有意とした。

#### 4. 研究成果

SIRT1 増強乳酸菌の同定：上記構築したシステムを用いて SIRT1 発現を増強する乳酸菌株 T2102 を同定した。

T2102 は  $\beta$ -カテニンを標的とした：T2102 株は、SIRT1 の標的タンパク質の一つ  $\beta$ -カテニンをターゲットにしていることが明らかとなった。T2102 は、 $\beta$ -カテニンの脱アセチル化を通じて分解を誘導し、その結果として結腸ガン細胞 DLD-1 細胞の増殖を強く抑制することが明らかとなった。この効果は、SIRT1 のドミナントネガティブ体の導入により消失するとともに、SIRT1 の導入により DLD-1 細胞の増殖が抑制されることから明らかとなった。



結論：以上の結果から、SIRT1 増強を指標にしてスクリーニングして得られた乳酸菌株 T2102 が、SIRT1 の増強とともに、その下流因子  $\beta$ -カテニンの不活化を誘導し、結腸ガン細胞の増殖を強く抑制していることが明らかとなった。つまり、本研究により構築したアンチエイジング食品スクリーニング系が機能性食品成分の探索に利用可能であることが明らかとなった。今後は、T2102 以外の食品成分の機能性、さらには T2102 のがん抑制以外の機能性について検証する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Gakuro Harada, Pawat Pattarawat, Kenji Ito, Takashi Matsumoto, Takanori Hasegawa, Yoshinori Katakura, *Lactobacillus brevis* T2102 suppresses the growth of colorectal cancer cells by activating SIRT1, *Journal of Functional Foods*, 査読有, 23, 2016, 444-452

doi:10.1016/j.jff.2016.01.016

Tatsuhiro Hisatsune, Jun Kaneko, Hiroki Kurashige, Yuan Cao, Hideo Satsu, Mamoru Totsuka, Yoshinori Katakura, Etsuko Imabayashi, Hiroshi Matsuda, Effect of Anserine/Carnosine Supplementation on Verbal Episodic Memory in Elderly People, *Journal of Alzheimer's Disease*, 査読有, 22, 149-159 (2015) doi: 10.3233/JAD-150767

Chisato Inoue, Tomomi Kozaki, Yukiko Morita, Bungo Shirouchi, Katsuya Fukami, Kuniyoshi Shimizu, Masao Sato, Yoshinori Katakura, Kibizu concentrated liquid suppresses the accumulation of lipid droplets in 3T3-L1 cells, *Cytotechnology*, 査読有, 67, 721-725 (2015)

doi: 10.1007/s10616-015-9849-x

Keishi Kadooka, Kaoru Fujii, Takashi Matsumoto, Mikako Sato, Fumiki Morimatsu, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, Yoshinori Katakura, Mechanisms and consequences of carnosine-induced activation of intestinal epithelial cells, *Journal of Functional Foods*, 査読有, 13, 32-37 (2015)

doi: 10.1016/j.jff.2014.12.024

Miyako Udono, Kaoru Fujii, Gakuro Harada, Yumi Tsuzuki, Keishi Kadooka, Pingbo Zhang, Hiroshi Fujii, Maho Amano, Shin-ichiro Nishimura, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, Yoshinori Katakura, Impaired ATP6V0A2 expression contributes to Golgi dispersion and glycosylation changes in senescent cells, *Scientific Reports*, 査読有, 5, 17342 (2015)

doi: 10.1038/srep17342

Shuntaro Yamashita, Kaori Ogawa, Tsukasa Fujiki, Yoshinori Katakura, FOXO3a potentiates hTERT gene expression by activating c-MYC and extends the replicative life-span of human fibroblast, *PLoS ONE*, 査読有, 9, e101864 (2014)

doi: 10.1371/journal.pone.0101864

〔学会発表〕(計13件)

SIRT1 を増強するアンチエイジング乳酸菌の同定とその機能性検証 山口大貴、味志美穂、高田洋樹、片倉喜範 日本農芸化学会 北海道 2016.3.29  
カルノシンによるアンチエイジンググナル活性化効果 久保智里、藤井薫、松本貴之、片倉喜範 日本農芸化学会 北海道 2016.3.29

SIRT6 活性化食品の探索とその機能性  
解明 松岡沙季、藤田幸佑、西田典永、  
長友暁史、田中幸雅、伊藤秀之、片倉喜  
範 日本農芸化学会 北海道  
2016.3.29

オートファジー誘導食品の探索とその  
機能性 小野友愛、西田典永、長友暁史、  
田中幸雅、伊藤秀之、片倉喜範 日本農  
芸化学会 北海道 2016.3.29

アンチエイジング食品の可能性 片倉  
喜範 第6回豊かな長寿社会を目指す  
講演会 糸島市健康福祉センター

ザクロ由来ポリフェノールによる大腸  
ガン抑制効果とその分子基盤 花田栄、  
堀美久、伊東秀之、西田典永、長友暁史、  
松浦洋一、片倉喜範 日本分子生物学会  
神戸 2015.12.2

SIRT1 増強乳酸菌 T2102 株による大腸が  
ん抑制効果とその分子基盤解明 原田  
額郎、松本貴之、長谷川隆則、片倉喜範  
日本分子生物学会 神戸 2015.12.3

アンチエイジング食品による腸管機能  
制御 片倉喜範 日本食品免疫学会  
2015 年度大会 東京大学伊藤謝恩ホー  
ル 2015.10.16

加齢性炎症と食品による抑制 八村敏  
志、宮川拓也、片倉喜範、田之倉優 日  
本食品免疫学会 2015 年度大会 東京大  
学伊藤謝恩ホール 2015.10.15

BDNF をターゲットとした脳腸関連活性  
化食品とその機能性 久保智里、玉井郁  
人、松本貴之、片倉喜範、2015/7/9 東  
北大学

SIRT3 活性化食品の探索・同定とその機  
能性解析 松岡沙季、坂口武則、藤田幸  
佑、伊東秀之、西田典永、長友暁史、松  
浦洋一、片倉喜範、2015/7/9 東北大学  
アンチエイジング食品の探索とその機  
能性の分子メカニズム 片倉喜範 日  
本農芸化学会 2014 年度中四国支部大  
会・第33回動物細胞工学シンポジウム  
共催シンポジウム「食と健康」 徳島大  
学 2014/9/26

マイクロアレイ解析による鶏肉由来高  
機能ジペプチドの機能性検証 片倉喜  
範 日本農芸化学会 明治大学  
2014.3.30

〔図書〕(計2件)

片倉喜範, ザクロポリフェノールの長  
寿遺伝子活性化, *Medical Science  
Digest*, **41**(6) 36-39 (2015)

片倉喜範, ザクロエキスのアンチエイ  
ジング効果  
*最新精神医学*, **20**(6) 511-515 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/crt/katakura/Site2/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片倉 喜範 (KATAKURA, Yoshinori)  
九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号: 50264106

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

藤井 薫 (FUJII, Kaoru)  
原田 額郎 (HARADA, Gakuro)  
山下 俊太郎 (YAMASHITA, Shuntaro)  
門岡 桂史 (KADOOKA, Keishi)