

令和元年6月18日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02529

研究課題名(和文) がんの「分子標的予防法」のヒト予防介入試験への応用

研究課題名(英文) Application of molecular-targeting cancer prevention to human intervention study.

研究代表者

酒井 敏行 (SAKAI, Toshiyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：20186993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,200,000円

研究成果の概要(和文)： 強力なRB再活性化能及び抗炎症作用を持つ果汁飲料A及びBの併用効果について、培養大腸がん細胞を用いた評価系及びマウス大腸がんモデルで検討した。培養大腸がん細胞に対する作用では、果汁飲料AB併用による相加効果は認められるが、相乗効果は認められないことが判明した。また、マウス大腸がんに対して、果汁飲料AB併用の経口摂取で発がん抑制を認めたが、果汁飲料AB併用への乳酸菌混餌摂取の相加相乗効果は認められなかった。

その他、果汁飲料AおよびBにおいて、RBタンパク質の活性化を指標として、複数の活性成分を同定し、更に未同定の成分について単離同定中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん代表される悪性腫瘍は、依然、死因の第一位である。また、昨今の治療の主流である分子標的薬は高額であり、がん患者やその家族は精神的な不安のみならず経済的な負担を抱えている。それは、同時に医療政策における国家レベルの大問題でもある。そのため、これに対する対策は社会的な急務であり、がん罹患しないことを目指した予防研究の社会的意義は非常に大きい。

本研究成果は、安全性や供給量から早期に実用化が期待できる天然物を用いて、多くのがん細胞で不活性化している生体分子であるRBを再活性化するという発がん原因に理論的にアプローチした予防法の開発であることから、極めて学術的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)： We have examined the combined effects of fruit juices A and B on RB reactivating ability and anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. In vitro assay, we found that an additive effect of A and B but not synergistic effect was observed. We found the inhibitory effect on in vivo animal colon carcinogenesis models by oral administration of the combination of A and B. However, there was neither additive nor synergistic effects by the combination of A and B with the supplementation of lactic acid bacteria.

In addition, we have identified a several active components from A and B by using the activation of RB protein as an index. Furthermore, we also try to isolate and identify several unidentified components.

研究分野：がん化学予防

キーワード：がん予防 分子標的予防法 RB再活性化 天然物 抗酸化 抗炎症 飲料

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) がんに代表される悪性腫瘍は、依然、死因の第一位である。また、従来の抗癌剤よりも特異的にがん細胞に作用する分子標的薬は高額であり、がん患者やその家族は精神的な不安、更に経済的な負担を抱えている。同時に医療経済的にも医療政策における国家レベルの大きな問題でもある。

そのため、安全性の面からも供給量の面からも早期に実用化が期待できる天然物や承認済みの薬物を用いた、がん罹患しないことを目指したがん予防研究、それによるがん予防法の確立は喫緊の課題である。

(2) 大腸がん細胞に対するコロニー形成抑制を指標とした一次スクリーニングにより、既に、強力なコロニー形成抑制能、即ち、細胞増殖抑制能を有する果汁飲料 A 及び B を見出していた。

(3) 細胞増殖の直接的な調節以外にも、DNA 損傷をもたらす炎症作用、DNA 等生体分子の損傷保護としての抗酸化作用、がん細胞自身が死滅する機能（アポトーシス）、更には正常ではない細胞を排除するための個体レベルでの免疫機能などが重要な要因として知られている。

2. 研究の目的

安全、安価に調達できる食品や食品因子などの天然物を用いてヒトでのがん予防介入試験を行うために、細胞レベルでの検討で既に見出していた果汁飲料 A 及び B について、更に、細胞レベル及び動物レベルで、併用効果を中心に検証する。また、その他、含有される成分について、単離同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 培養がん細胞に対するがん予防効果の評価：

①大腸がん細胞（APC 遺伝子変異株）に、果汁飲料 A、B もしくは AB 混合を添加し、一定期間培養後、形成されたコロニーを染色し、コロニー数をカウントし、果汁飲料無添加のコントロール群のコロニー数と比較することで、相加相乗効果の有無を検討した。また、果汁飲料添加もしくは無添加で培養した細胞から総タンパク質を抽出し、がん抑制遺伝子 RB がコードする RB タンパク質のリン酸化状態を Western blot 法で比較することで、果汁飲料の RB タンパク質活性化能を検討した。

②①のがん細胞に、果汁飲料 A、B もしくは AB 混合を添加し、その 1 時間後に TNF- α を添加して炎症反応を惹起し、更に 1 時間後に細胞から total RNA を抽出した。この total RNA を用いて、炎症マーカーとして IL-6 の mRNA 誘導量を qRT-PCR 法により定量し、恒常的に発現している GAPDH の mRNA 量により補正した値を対照群と比較することで、果汁飲料の抗炎症能を評価した。

③①のがん細胞に、果汁飲料 A、B もしくは AB 混合を添加し、その 24 時間後に過酸化水素を添加して活性酸素産生を惹起し、更に 1 時間後に活性酸素の指示薬である CM-H2DCFDA にて細胞内の活性酸素種量の測定を行い、活性酸素除去能をもって抗酸化能として評価した。

(2) 細胞周期停止作用を有する有効成分の同定：

有機溶媒と分離カラムによる成分の分画を行い、Western blot 法による RB タンパク質のリン酸化状態の変化を指標として、有効成分の単離同定を試みた。

(3) 動物発がんモデルを用いた、果汁飲料の発がん抑制効果の検証：

混合果汁飲料 AB の発がん予防効果を、AOM 惹起大腸前がん病変モデル、及び AOM-DSS 惹起大腸発がんモデルを用いて検討した。果汁飲料は発がん剤もしくは発がん剤と炎症惹起剤の投与前から、自由飲水で摂取させた。動物は実験終了時に安楽死させ、直ちに摘出した大腸を長軸方向に切開し、ホルマリン固定した。大腸のポリープは肉眼観察下で、前癌病変（aberrant crypt）は顕微鏡観察下で、それぞれ、その個数をカウントした。また、果汁飲料と、大腸がん予防効果が報告されている乳酸菌（混餌）の併用効果を同モデルで合わせて検討した。全ての動物試験は、京都府立医科大学動物実験委員会の承認を受けて実施した。

4. 研究成果

(1) 培養がん細胞に対するがん予防効果の検討：

①果汁飲料によるコロニー形成抑制と RB 活性化能：

果汁飲料 A と B を 25% ずつ比率を変えて混合し、培養液に添加して 10 日間培養した後、生育したコロニー数をカウントした。その結果、混合率にかかわらず、培地への添加量に比例してコロニー形成の抑制率が高まったが、再現性を持って果汁飲料 A の含有率の高い方がよりコロニー形成抑制効果が高かった。また、果汁飲料による RB タンパク質の活性化に関しても、コロニー形成抑制効果と同様に、果汁飲料 A が多く含有されている方が、より RB タンパク質が活性化されていた。

②混合果汁飲料による抗炎症能：

抗炎症能に関しては、コロニー形成抑制及び RB 活性化能とは逆に、再現性を持って、果汁飲料 B の含有比率が高いほど、その効果が高かった。

③混合果汁飲料による抗酸化能：

抗酸化能に関しては、果汁飲料 A、B 共に有意差を持って活性酸素を除去しており、その効果は A>AB> B の順で強く、抗酸化能のポジティブコントロールとしてもちいたセサミン 50 μM と同程度であった。

(2) 活性成分の同定

現在までに、果汁飲料 A において化合物 X 及び化合物 Y、果汁飲料 B において化合物 Z が活性成分として同定できた。その他、活性を有する未同定の化合物が存在しており、単離、同定中である。

(3) 動物発がんモデルでの果実飲料のがん予防効果の検証：

(3-1) ラット AOM-ACF モデルによる評価：

代表的な aberrant crypt foci (ACF) の顕微鏡写真を図 1 に示す。顕微鏡観察下で、aberrant crypt (AC) 個数毎に解析した ACF 数をカウントし、その個数を、水を与えたコントロール群のそれと比較した。その結果、混合果汁飲料 AB は、ラット大腸前癌病変 (ACF および AC) の個数を減らしていた。また、混合果汁飲料 AB を乳酸菌と併用することで、混合果汁飲料 AB のみよりも強く前癌病変の数を減らしていた。しかし、どちらもコントロール群に対して、有意な差ではなかった。

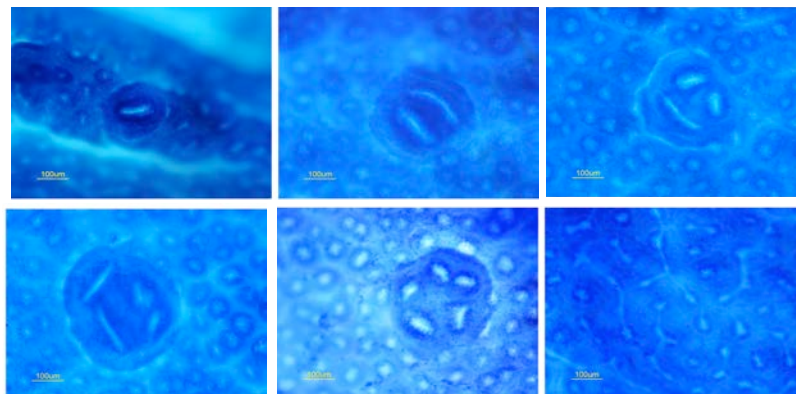


図 1 代表的な ACF

上段左：AC 1 の ACF、上段中央：AC 2 の ACF、上段右：AC 3 の ACF、
下段左：AC 4 の ACF、下段中央：AC 5 の ACF、下段右：正常粘膜

(3-2) マウス AOM-DSS モデルによる評価：

A:50%/B:50%の混合果汁飲料、もしくは乳酸菌の単独投与は、個体当たりのポリープ発生個数を減らしていたが、有意な差は認められなかった。また、混合果汁飲料 AB と乳酸菌サンプルの併用投与は、ポリープ形成抑制に対して相加相乗効果を認めなかった。

その他、20 週間サンプルを投与したが、いずれのサンプル投与群においても、コントロール群と比較して、体重、主要臓器重量などに対して明らかな影響はなかった。

以上の検討結果から、安価で安全な果汁飲料 A および B の混合飲料は、ヒト大腸がん予防のための有力な候補素材として提案することができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) S Yasuda, Y Sowa, H Hashimoto, T Nakagami, T Tsuno, T Sakai, Cycloartenyl ferulate and β -sitosteryl ferulate - steryl ferulates of γ -oryzanol - suppressed intracellular reactive oxygen species in cell-based system, Journal of Oleo Science, 査読有, *in press*.

(2) Y Aono, M Horinaka, Y Iizumi, M Watanabe, T Taniguchi, S Yasuda, T Sakai, Sulindac sulfone inhibits the mTORC1 pathway in colon cancer cells by directly targeting voltage-dependent anion channel 1 and 2, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 505, 1203-10. doi:10.1016/j.bbrc.2018.10.050.

(3) M Watanabe, Y Iizumi, M Sukeno, M Iizuka-Ohashi, Y Sowa, T Sakai, The pleiotropic regulation of cyclin D1 by newly identified sesaminol-binding protein ANT2, Oncogenesis, 査読有, 6, 2017, e311.

doi:10.1038/oncsis.2017.10

〔学会発表〕（計 10 件）

- ①スリンダク代謝体の大腸腺腫形成抑制作用における新規標的分子の探索と作用機序の解析、青野裕一、堀中真野、飯泉陽介、渡邊元樹、谷口知行、安田周祐、酒井敏行、第 89 回日本衛生学会学術総会 2019 年 2 月 一般口演
- ②新規スリンダクスルホン結合タンパク質 VDAC による細胞周期制御のメカニズムの解析、青野裕一、堀中真野、飯泉陽介、渡邊元樹、谷口知行、安田周祐、酒井敏行、第 18 回分子予防環境医学研究会 2019 年 1 月 一般口演
- ③新規エピゲノム併用療法の開発、曾和義広、酒井敏行、第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月、シンポジウム
- ④食べて防ごう！ がん化学予防への挑戦！、堀中真野、おかやまバイオアクティブ研究会第 53 回シンポジウム 2018 年 6 月 招聘講演
- ⑤新規セサミノール結合蛋白質 ANT2 による cyclin D1 の多面的制御機構の解明、渡邊元樹、飯泉陽介、曾和義広、酒井敏行、第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会 2018 年 5 月 一般口演
- ⑥がんの分子標的予防の実現に向けて、曾和義広、第 88 回日本衛生学会学術総会 2018 年 3 月 シンポジウム講演
- ⑦セサミノール結合タンパク質 ANT2 の発見がもたらす新たな細胞周期調節機構の解明、渡邊元樹、第 88 回日本衛生学会学術総会 2018 年 3 月 一般口演
- ⑧セサミノール結合タンパク質 ANT2 の発見がもたらす cyclin D1 の多面的制御機構の解明、渡邊元樹、第 17 回分子予防環境医学研究会 2018 年 2 月 一般口演
- ⑨プロテオーム解析により新規に同定されたセサミノール結合蛋白質 ANT2 は cyclin D1 を多面的に制御する、渡邊元樹、第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 ポスター発表
- ⑩プロテオーム解析により新規に同定されたセサミノール結合蛋白質 ANT2 による cyclin D1 の多面的制御、渡邊元樹、がん予防学術大会 2017 2017 年 6 月 一般口演（優秀演題賞受賞）

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：増田 光治
ローマ字氏名：(MASUDA, mitsuharu)
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：医学研究科
職名：助教
研究者番号 (8 桁)：10305568

研究分担者氏名：友杉 真野 (堀中 真野)
ローマ字氏名：(TOMOSUGI (HORINAKA), mano)
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：医学研究科
職名：講師
研究者番号 (8 桁)：80512037

研究分担者氏名：曾和 義広
ローマ字氏名：(SOWA, yoshihiro)
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：医学研究科
職名：准教授
研究者番号 (8 桁)：70315935

研究分担者氏名：渡邊 元樹
ローマ字氏名：(WATANABE, motoki)
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：医学研究科
職名：講師
研究者番号 (8 桁)：40723581

研究分担者氏名：飯泉 陽介
ローマ字氏名：(IIZUMI, yosuke)
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：医学研究科
職名：助教
研究者番号 (8 桁)：20533178

研究分担者氏名：石川 秀樹
ローマ字氏名：(ISHIKAWA, hideki)
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：医学研究科
職名：特任教授
研究者番号 (8 桁)：30351795

※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。