

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07803

研究課題名(和文)米ぬか成分を活用したトコトリエノールの相乗的癌抑制とその機構解明に関する研究

研究課題名(英文) Synergistic anti-cancer effects of rice bran components and their mechanisms of action

研究代表者

永塚 貴弘 (Eitsuka, Takahiro)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：30445895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：米ぬかは、植物ステロール、ビタミンE(トコフェロール、トコトリエノール)、フェルラ酸、 γ -オリザノール、などの多様な機能性成分を特徴的に含んでいる。我々は米ぬか成分に着目し、トコトリエノールとフェルラ酸が相乗的な癌抑制効果(細胞増殖抑制、テロメラーゼ阻害)を有することを見出した。この相乗効果の機構として、フェルラ酸がトコトリエノールの代謝を阻害し、細胞内トコトリエノール濃度を上昇させることが考えられた。フェニルプロパノイド骨格を有するフェルラ酸の類縁体がトコトリエノールと相乗作用を示すことを明らかにした。以上の成果から、米ぬか成分を活用した癌抑制への応用に新たな道を拓いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、米ぬか成分の潜在的可能性を究明し、“米成分による癌予防”の道を拓くものである。米ぬかに含まれる成分同士の相乗効果とその機構を解明しようとする研究は国内外で皆無であり、本研究の新規性は極めて高い。トコトリエノールの癌抑制に相乗効果をもたらす食品機能分子をフェルラ酸の類縁体から見出したことで、トコトリエノールとの食べ合わせに理想的な食品を提案することができるため、栄養指導の観点から癌を予防することが可能になる。また、米ぬかを高付加価値化できるため、米の消費拡大と食品産業の活性化が図られるとともに、高齢化が進む日本人の健康維持への貢献、さらには増大する国民医療費の抑制にもつながる。

研究成果の概要(英文)：Rice bran consists of many functional compounds, including phytosterols, vitamin E (tocopherol and tocotrienol), ferulic acid, and gamma-oryzanol. We clarified the synergistic anti-cancer action (cell growth suppression and telomerase inhibition) of tocotrienol and ferulic acid. This synergistic effect is attributed to an increase in the cellular concentration of tocotrienol through inhibition of its metabolism by ferulic acid. Ferulic acid analogs containing a phenylpropanoid backbone can also synergize with tocotrienol. Our findings suggest the application of rice bran components to cancer prevention and therapy.

研究分野：食品科学

キーワード：米ぬか トコトリエノール フェルラ酸 癌抑制 テロメラーゼ 相乗効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

米ぬかには優れた健康機能性を有することが古くから知られており、植物ステロール、ビタミン E (トコフェロール、トコトリエノール)、フェルラ酸、 γ -オリザノール、スフィンゴ糖脂質などの多様な成分を特徴的に含んでいる。ビタミン E はクロマン環に側鎖が結合した構造をしており、飽和側鎖をもつトコフェロールと不飽和側鎖を有するトコトリエノールに大別される (図 1)。クロマン環に結合するメチル基の数と位置の違いによって、 α 、 β 、 γ 、 δ の 4 種の異性体があるため、天然には 8 種のビタミン E が存在する。トコフェロールは植物に広く分布するが、トコトリエノールは米ぬかやパームなどの限られた天然物に特徴的に含まれる。トコトリエノールは 1964 年にゴムの樹液から発見され、長い間その生理作用は不明であったが、1986 年にコレステロール低下作用が報告されたのをきっかけに世界的に注目を集め、抗酸化、抗がん、抗炎症、抗動脈硬化、神経細胞保護などの多様な効果が見出されている。これらの生理活性はトコフェロールよりもトコトリエノールの方が高く、その理由として、トコトリエノールは細胞内に容易に取り込まれるためと考えられる。上記のトコトリエノールの効果の中でも抗がん作用は多くの研究者によって検証され、その作用機序として G1 期停止を介した細胞増殖抑制、アポトーシス誘導、抗血管新生などが報告されている。我々は、トコトリエノールによるテロメラーゼ阻害作用を初めて見出した。また、その活性の強さは異性体間で異なり、 α -トコトリエノールが最も高い阻害効果を示すことを明らかにした。

小腸で吸収されたビタミン E が肝臓に到達すると、 α -トコフェロール輸送タンパク質 (α -TTP) と結合してリポタンパク質に渡されて再び血液循環に入り、各組織へとビタミン E が運ばれる。ビタミン E 同族体の中では α -トコフェロールが最も α -TTP と結合能が高く、 α -トコトリエノールの親和性は α -トコフェロールと比較して 12% 程度である。したがって、トコトリエノールの血中濃度はトコフェロールよりも低いことが知られている。こうしたトコトリエノールの低バイオアベイラビリティを補う目的で、トコトリエノールの生物活性を相乗的に高める化合物が探索されている。3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-Coエンザイム A (HMG-CoA) 還元酵素の阻害剤 (スタチン)、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (ゲフィチニブ、エルロチニブ)、シクロオキシゲナーゼ-2 阻害剤 (セレコキシブ) などの薬剤は、トコトリエノールの抗がん作用に対して相乗効果を発揮する。しかし、これらの薬品の使用は副作用を伴う可能性が考えられる。我々は米ぬか成分からトコトリエノールの抗がん活性を高める化合物を探索した結果、トコトリエノールとフェルラ酸 (図 1) の組み合わせが有効であることを見出した。

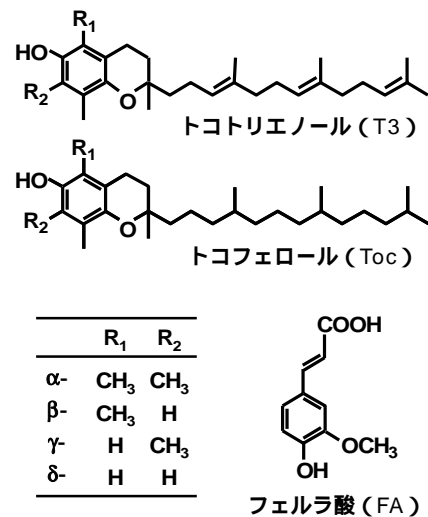


図 1 ビタミン E とフェルラ酸の化学構造

2. 研究の目的

我々は、食品脂質による癌予防の実現に挑む基盤的研究を展開してきた。細胞に無限の分裂能を付与する酵素テロメラーゼの活性を調節する食品由来の機能性脂質を探索した結果、米ぬかに特徴的に含まれるトコトリエノールが有効であることを証明した。米ぬか成分の生物化学的特性を解析する過程で、トコトリエノールの癌細胞増殖抑制作用をフェルラ酸が増強することを世界に先駆けて報告したため、本研究では以下の課題の基盤的解明を図ることを目的とした。

- (1) フェルラ酸による相乗効果発揮の機構解明
- (2) トコトリエノールの機能を向上させるフェルラ酸類縁体の探索
- (3) トコトリエノールとフェルラ酸による相乗的なテロメラーゼ抑制作用の解析
- (4) 新規モデルによるトコトリエノールとフェルラ酸の有効性評価

3. 研究の方法

ヒト膵臓癌由来の PANC-1 細胞の CYP4F2 を CRISPR-Cas9 システムでノックダウンし、ピューロマイシンで目的の細胞を選択した。細胞増殖に与える影響を MTT 法により評価した。テロメラーゼ活性は、stretch-PCR 法により測定した。テロメラーゼ触媒サブユニット hTERT の発現をウエスタンブロット法により調べた。

4. 研究成果

(1) フェルラ酸による相乗効果発揮の機構解明

トコトリエノールの細胞増殖抑制作用をフェルラ酸が増強する機構として、フェルラ酸処理による癌細胞内トコトリエノール濃度の増大が挙げられる。体内に取り込まれたビタミン E は代謝され、水溶性を増した CEHC (2,7,8-trimethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman) へと変換されて尿中に排泄される。このビタミン E 代謝を仲介する初発的な酵素として、薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP) 4F2 が知られている。ゴマに含まれるセサミンは、CYP4F2 の阻害によってビタミン E の生体内濃度を上昇させることが報告されている。フェルラ酸も同様にトコ

トリエノールの細胞内濃度を上昇させるため、セサミンと同様の機構が介在すると推定される。特に、両物質はフェニルプロパノイド骨格を共通して有していることから、その可能性が高い。そこで、相乗効果に CYP4F2 の阻害が関与しているのであれば、細胞内の CYP4F2 をノックダウンするとその相乗効果が消失すると考えた。ヒト膵臓癌由来細胞 PANC-1 の CYP4F2 を CRISPR-Cas9 システムでノックダウンした細胞株を構築し、 δ -トコトリエノールとフェルラ酸の細胞増殖抑制を調べた結果、フェルラ酸による有意な相乗効果が認められなかった。したがって、 δ -トコトリエノールとフェルラ酸による細胞増殖抑制の相乗作用には、フェルラ酸による CYP4F2 阻害が関与すると考えられた。

(2) トコトリエノールの機能を向上させるフェルラ酸類縁体の探索

植物では、シキミ酸経路によって生合成されたアミノ酸(フェニルアラニンとチロシン)をもとにフェルラ酸をはじめとしたフェニルプロパノイド類縁体(クマル酸、ケイ皮酸、コーヒー酸など)が合成される。これらのフェニルプロパノイドは多種多様なポリフェノールの生合成の出発材料となる。そこで、フェルラ酸とその類縁体 8 種類を用いて、PANC-1 細胞の増殖に対する影響を評価した。フェニルアラニンは δ -トコトリエノールの増殖阻害作用に何ら影響を与えなかったが、一方で、コニフェリルアルコールとカフェ酸はフェルラ酸よりも強い相乗効果を有していた(図 2)。

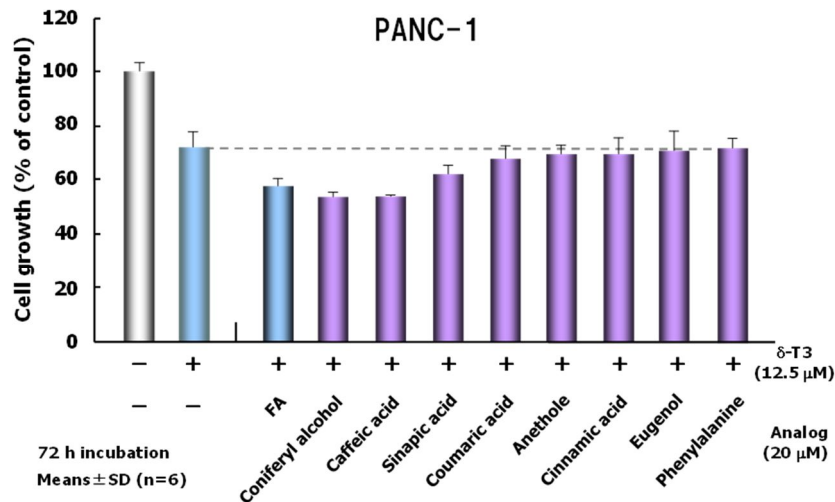


図 2 トコトリエノールとフェニルプロパノイド類縁体の増殖抑制効果

(3) トコトリエノールとフェルラ酸による相乗的なテロメラーゼ抑制作用の解析

我々が過去に報告したトコトリエノールのテロメラーゼ阻害作用に対してフェルラ酸が相乗効果を発揮するかを検証した。テロメラーゼは、細胞分裂の度に短縮するテロメアにテロメア DNA (5'-TTAGGG-3'の繰り返し配列) を付加する逆転写酵素の一種である。テロメラーゼはがん細胞に特に高く発現しており、がん細胞に無限の増殖能を付与することから、テロメラーゼ活性阻害によるがん治療が近年期待されている。フェルラ酸はテロメラーゼ活性に影響しなかったが、 δ -トコトリエノールとフェルラ酸の同時処理により相乗的にテロメラーゼ活性が抑制された(図 3A)。

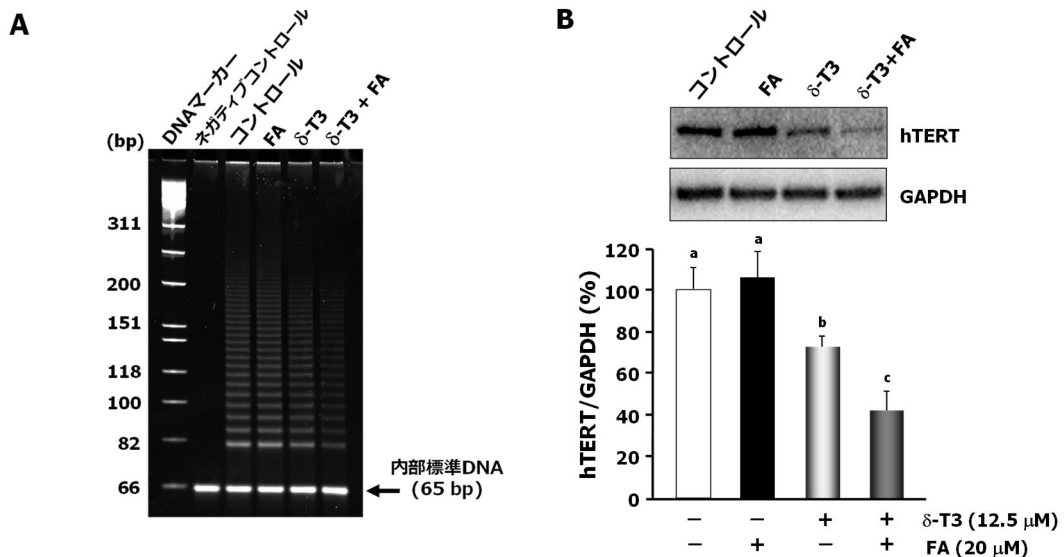


図 3 トコトリエノールとフェルラ酸の相乗的なテロメラーゼ阻害作用

テロメラーゼの活性化には触媒サブユニットである human telomerase reverse transcriptase (hTERT) の発現が深く関与しており、細胞のテロメラーゼ活性と hTERT の発現レベルは高く相関する。 δ -トコトリエノールとフェルラ酸の hTERT に対する影響をウエスタンブロット法で調べた結果、 δ -トコトリエノールとフェルラ酸は δ -トコトリエノールの単独処理よりも顕著に hTERT 発現を抑制した (図 3B)。したがって、 δ -トコトリエノールとフェルラ酸は hTERT の発現抑制を介してテロメラーゼ活性を転写レベルで阻害することが示された。以上より、 δ -トコトリエノールとフェルラ酸による相乗効果は細胞増殖抑制のみならずテロメラーゼ阻害にも有効であり、これらの組み合わせはがん細胞に対して高い効果を発揮する可能性が考えられた。

(4) 新規モデルによるトコトリエノールとフェルラ酸の有効性評価

近年、癌の薬効評価への応用に注目を集めているスフェロイド(組織様構造体)に着目し、これを活用してトコトリエノールとフェルラ酸の相乗効果を検証した。PANC-1 からスフェロイドを作製し、培地に δ -トコトリエノールを処理することで PANC-1 の細胞増殖が抑制されることが確認できた。PANC-1 のスフェロイドに δ -トコトリエノールとフェルラ酸を同時処理すると、PANC-1 の増殖が相乗的に阻害された。また、フェニルプロパノイド類縁体であるコニフェリルアルコールやカフェ酸も(2)の試験と同様に、トコトリエノールの癌抑制効果を強力に高めることがわかり、フェニルプロパノイド類縁体がトコトリエノールの癌抑制作用に高い効果を発揮することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukuda T, Eitsuka T, Donai K, Kurita M, Saito T, Okamoto H, Kinoshita K, Katayama M, Nitto H, Uchida T, Onuma M, Sone H, Inoue-Murayama M, Kiyono T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Expression of human mutant cyclin dependent kinase 4, Cyclin D and telomerase extends the life span but does not immortalize fibroblasts derived from loggerhead sea turtle (<i>Caretta caretta</i>).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 9229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-27271-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Gouko R, Onuma M, Eitsuka T, Katayama M, Takahashi K, Nakagawa K, Inoue-Murayama M, Kiyono T, Fukuda T.	4. 巻 70
2. 論文標題 Efficient immortalization of cells derived from critically endangered Tsushima leopard cat (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>) with expression of mutant CDK4, Cyclin D1, and telomerase reverse transcriptase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 1619-1630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10616-018-0254-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Eitsuka, T., Nakagawa, K., Kato, S., Ito, J., Otoki, Y., Takasu, S., Shimizu, N., Takahashi, T., Miyazawa, T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Modulation of Telomerase Activity in Cancer Cells by Dietary Compounds: A Review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19020478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 永塚貴弘	4. 巻 70
2. 論文標題 脂溶性栄養成分によるがん抑制に関する食品学的研究	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本栄養食糧学会誌	6. 最初と最後の頁 263-269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 永塚 貴弘, 西田 浩志, 仲川 清隆, 宮澤 陽夫	4. 巻 17
2. 論文標題 こめ油成分を活用した相乗的ながん抑制効果	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 オレオサイエンス	6. 最初と最後の頁 261-268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 永塚 貴弘, 仲川 清隆, 宮澤 陽夫
2. 発表標題 こめ油成分による相乗的な癌細胞増殖阻害
3. 学会等名 日本油化学会第57回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永塚貴弘、仲川清隆、宮澤陽夫
2. 発表標題 トコトリエンールとフェルラ酸による相乗的な癌抑制作用
3. 学会等名 第29回ビタミンE研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 永塚 貴弘	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 331-336
3. 書名 食品機能性成分の吸収・代謝・作用機序	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----