

機関番号：24701

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007~2009

課題番号：19390165

研究課題名 (和文) 食品由来物質による発がん抑制機構の総合的解明と発がん予防への応用

研究課題名 (英文) Preventive effects of dietary compounds for cancer development

研究代表者

牟礼 佳苗 (MURE KANAE)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90268491

研究成果の概要 (和文)：本研究は、疫学調査によりがんの発症リスクを抑制することが報告されている食品由来物質について、発がんの過程に沿って作用機構を総合的に解明することを目的として行った。ヒト大腸がん由来および皮膚由来細胞用い、トマト由来リコピンやビタミン E 等の食品由来物質の影響について、発がんの初期過程に重要な意味を持つ DNA 修復関連遺伝子系に着目して、突然変異や細胞死 (アポトーシス) を中心として解析した。

研究成果の概要 (英文)：We have investigated the effects of dietary compounds for cancer prevention in the cell culture system. Tomato-derived lycopene, vitamin E and tea-catechin showed significant effects on reducing spontaneous and carcinogen-induced mutagenesis in human colorectal and skin cells by up-regulating DNA repair related genes. Those compounds also showed effects on apoptosis mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：がん予防、食品由来物質

1. 研究開始当初の背景

疫学調査により、発がんリスクを抑制する野菜や果物等特定の食品が次々と明らかになり、これらの食品由来物質の発がん抑制効果に関する研究が、国内外において盛んに行われている。しかしながら、多種多様な食品由来物質の個々の作用機構は未だ不明な点が多い。また、遺伝的にがんのハイリスク群に属する個人へは、生活習慣の改善以上により積極的な発がん予防法の開発が重要かつ必須である。そのためには、ヒト由来細胞用い、発がんの過程に沿って、食品由来物質

の作用機構を詳細に明らかにすることが必要であると考えた。

2. 研究の目的

がんは遺伝子の質的・量的な異常による遺伝子修復・細胞増殖・細胞死 (アポトーシス) 等の調節機構の異常により起きる疾患であり、食品由来物質による効果的な発がん予防法の開発には、各段階への影響を総合的に調べる必要がある。本研究は、これまで申請者が明らかにしてきた食品由来物質による突然変異抑制効果を基に、発がん過程の段階ごとにエ

ンドポイントを設置して総合的に解析することを目的として、DNA修復系への影響に重点をおいて行った。

3. 研究の方法

(1)細胞

①ヒト遺伝子性大腸がん由来細胞

ヒト遺伝性大腸がん由来細胞として、下記に示すように発がんの初期過程において重要な意味を持つDNAのミスマッチ修復関連遺伝子に異常のある細胞群を用いた。

ミスマッチ修復遺伝子					
細胞名	MSH2	MSH6	MSH3	MLH1	PMS2
SW480					
HCT116			+	+	+
LOVO	+	+	+		
DLD1		+			

+：突然変異等の異常がある。

②ヒト皮膚由来細胞

ヒト皮膚由来細胞として、CS2AW 細胞および HaCaT 細胞等を用いた。

(2)食品由来物質

トマト由来リコピン、ビタミンE、緑茶由来カテキンである epigallocatechin-gallate (EGCG) 等を用いた。実験に先立って毒性試験を行い、細胞毒性のない濃度を以下の実験に用いた。

(3)実験方法

下記のとおりの実験について、発がん物質への曝露を行わない状態、紫外線 (UV-B) を照射した状態の2条件を設定し、食品由来物質の影響評価を行った。

①突然変異抑制試験

突然変異抑制試験は、HPRT法を用いた。突然変異検出マーカーである6-チオグアニン培地により突然変異発生頻度を測定すると同時に、単一変異細胞を分離した。Total RNA を抽出後、HPRTに対応したプライマーを用いてRT-PCR法によりcDNAを作成した。HPRT遺伝子について、遺伝子配列 (シーケンス) 解析を行い、突然変異のタイプ、場所を特定した。

②ゲノムの不安定化への影響評価

ダメージを受けたDNAは、通常DNA修復系によって修復されるが、修復系に異常があるとダメージは蓄積し、ゲノムは不安定化する。その結果細胞増殖機構に異常を来し、がん化することが明らかにされている。そこで、ゲノムDNAをDNAzol (Invitrogen 社、

東京)により抽出し、ゲノムの不安定性のマーカーである D2S123、D3S1611、D5S107 等について、PCR法によりゲノム不安定化 (Microsatellite Instability: MSI) を検出した。

③細胞死 (アポトーシス) への影響評価

本研究で着目したミスマッチ修復タンパク質は、ミスマッチやミスペア等を認識して修復するほか、P53を誘導してダメージを持った細胞をアポトーシスへと導くことがわかっている。そこで、細胞レベルでアポトーシスが観察できる APOPercentage 法 (Biocolor 社、Northern Ireland)、およびDNAレベルで測定できる Apoptotic DNA Ladder Assay 法を用いて解析した。

④細胞内シグナル伝達への影響評価

細胞内シグナル伝達においては、DNA修復関連遺伝子群を重点的に解析した。遺伝子全体の発現状態を網羅的に把握できるマイクロアレイ法を用いて影響を受けている遺伝子を調べ、さらにミスマッチ修復関連遺伝子群 (MSH3、MLH1、MSH6 等)、酸化ストレスによるDNAダメージの修復に関与している OGG1、アポトーシスや細胞周期の調節に関与している P53 について、リアルタイムPCR法を用いて、遺伝子発現を定量測定した。

4. 研究成果

(1)突然変異抑制試験

遺伝性大腸がん由来細胞を用いた実験では、ミスマッチ修復に異常のないSW480細胞は、細胞10⁶個あたり0.1個以下の自然発生突然変異率を示した。1塩基のミスペアの認識に関与する hMSH6、deletion や insertion の認識に関与している hMSH3、さらにそのどちらにも関与している hMSH2 のすべてに異常のある LOVO 細胞が、最も高い自然発生突然変異率を示した。つぎに、hMSH3 およびエラーの認識後の修復に関与している hMLH1 に異常があり、そのため hMLH1 と複合体を形成する hPMS2 もタンパクレベルで発現できない HCT116 細胞が高い自然発生突然変異率を示した。また、hMSH6 のみに異常がある DLD-1 細胞は、LOVO 細胞や HCT116 細胞ほどは高くないが、SW480 細胞よりは高い自然発生突然変異率を示した。各細胞をトマト由来リコピンで処理した結果、リコピンは LOVO、HCT116、DLD-1 細胞の順に、各細胞内の自然発生突然変異率を抑制した。

一方、ヒト皮膚由来細胞を用いた実験において、UV-B の照射量に応じて、誘発される突然変異頻度は増加した。また、リコピンによる抑制率は、UV-B 50 J/m² では 21.5%、100 J/m² では 35.1%、200 J/m² では 33.8%

であった。

(2) ゲノムの不安定化への影響評価

ヒト大腸がん由来細胞を用いた実験では、D13S153 マーカーにおいて、顕著に MSI 誘発が観察され、またリコピン処理により抑制されていた。ヒト皮膚由来細胞を用いた実験では、UV-B 照射により顕著な MSI 誘発が観察された。

(3) アポトーシスへの影響評価

ヒト皮膚由来細胞を UV-B 照射し、アポトーシス誘発を観察した結果、細胞レベル、DNA レベルの両法において、UV-B 100 J/m² 照射において最も強く、アポトーシスが誘発されていることがわかった。一方リコピンやビタミン E 等により、アポトーシスが抑制されている結果を得た。

(4) 細胞内シグナル伝達への影響評価

マイクロアレイ法では、ミスマッチ修復関連遺伝子 *hMSH3* を up-regulate していることが明らかとなった。そこで、リアルタイム PCR 法を用いて 6 つのミスマッチ修復関連遺伝子の発現を定量測定したところ、リコピンにより *MSH2*、*MSH3*、*MSH6* が up-regulate されていることが確認された。

また、UV-B 照射 (100 J/m²) により各 DNA 修復関連遺伝子発現量が up-regulate されていた。これらの遺伝子群は、リコピン、ビタミン E、EGCG 等によっても up-regulate されていた。

以上の結果により、食品由来物質は DNA 修復系に影響を及ぼすことで、細胞ダメージを抑制する可能性が示唆された。

今後さらにデータを蓄積し、総合的に解析することで、安全で効果的な発がん予防法へ応用できることが可能になると考えられる。

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 19 件)

1. 牟礼佳苗、竹下達也、植物由来物質による紫外線誘発細胞障害抑制効果について、*EICA*、2-3 巻、2010、9-12.
2. Ikeda W, Inaba Y, Takeshita T, Yoshida K, Ogoshi K, Okamoto K. Does the Japanese Society for Hygiene need its own Code of Conduct? —A comparison of questionnaire between councilors and junior members—, *Environ Health Prev Med* (in press)、査読有.
3. Sato K, Umemura T, Tamura T, Kusaka Y, Ido T, Aoyama K, Ueda A, Harada K, Minamoto K, Otsuki T, Yamashita K,

Takeshita T, Shibata E, Dobashi K, Kameo S, Miyagawa M, Kaniwa M, Yoshida T, Fukushima T, Yuta K. A respiratory sensitization study by a new quantitative structure-activity relationships (QSAR). *AATEX* (in press)、査読有.

4. 前田正信、向坂 彰、岸岡史郎、岩橋秀夫、池田裕明、竹下達也、宮下和久、有田幹雄、富田耕太郎、和気秀文. 柿による悪酔い防止の生理学的研究、自律神経、査読有、47 巻、2010、32-38.

5. 池田若葉、稲葉 裕、吉田勝美、竹下達也、御輿久美子、岡本和士、日本衛生学会評議員を対象とした科学者の行動規範に関する意識調査、日本衛生学雑誌、査読有、65 巻、2010、60-74.

6. Nishida N, Tanaka M, Sekine S, Takeshita T, Nakayama K, Morimoto K, Shizukuishi S, Association of ALDH2 Genotypes with Periodontitis Progression, *J Dental Res*、査読有、89 巻、2010、138-142.

7. Ikejima H, Imanishi T, Tsujioka H, Kashiwagi M, Kuroi A, Tanimoto T, Kitabata H, Ishibashi K, Komukai K, Takeshita T, Akasaka T. Upregulation of fractalkine and its receptor, CX3CR1, is associated with coronary plaque rupture in patients with unstable angina pectoris, *Circ J*、査読有、74 巻、2010、337-345.

8. Nishio N, Kouda K, Nishio J, Nakamura H, Sonoda Y, Takeshita T, Smoking prevalence among dentists in Hyogo, Japan 2003, *Ind Health*、査読有、47 巻、2009、431-435.

9. Yanaoka K, Oka M, Ohata H, Yoshimura N, Deguchi H, Mukoubayashi C, Enomoto S, Inoue I, Iguchi M, Maekita T, Ueda K, Utsunomiya H, Tamai H, Fujishiro M, Iwane M, Takeshita T, Mohara O, Ichinose M, Eradication of *Helicobacter pylori* prevents cancer development in subjects with mild gastric atrophy identified by serum pepsinogen levels, *Int J Cancer*、査読有、125 巻、2009、2697-2703.

10. Yanaoka K, Oka M, Yoshimura N, Deguchi H, Mukoubayashi C, Enomoto S, Maekita T, Inoue I, Ueda K, Utsunomiya H, Iguchi M, Tamai H, Fujishiro M, Nakamura Y, Tsukamoto T, Inada K, Takeshita T, Ichinose M, Preventive effects of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on cancer development in extensive metaplastic gastritis, a *Helicobacter pylori*-negative precancerous lesion, *Int J Cancer*、査読有、126 巻、2009、1467-1473.

11. Koizumi A, Harada KH, Eslami B, Fujimine Y, Hachiya N, Hirose I, Inoue K, Inoue S, Koda S, Kusaka Y, Murata K, Omae K, Saito N, Shimbo S, Takenaka K, Takeshita T, Todoriki H, Wada Y, Watanabe T, Ikeda M, Paradoxical increases in serum levels of highly chlorinated PCBs in aged women in clear contrast to robust decreases in dietary intakes from 1980 to 2003 in Japan, *Environ Health Prev Med*, 査読有, 14 巻, 2009, 235-246.

12. Sato K, Umemura T, Tamura T, Kusaka Y, Aoyama K, Ueda A, Harada K, Minamoto K, Otsuki T, Yamashita K, Takeshita T, Shibata E, Dobashi K, Kameo S, Miyagawa M, Kaniwa M, Endo Y, Yuta K, Skin sensitization study by quantitative structure-activity relationships (QSAR), AATEX, 査読有, 14 巻, 2009, 940-946.

13. Takahashi Y, Takano K, Suzuki M, Nagai S, Yokosuka M, Takeshita T, Saito A, Yasueda H, Enomoto T, Two Routes for Pollen Entering Indoors; Ventilation and Clothes, *J Invest Allergol Clin Immunol*, 査読有, 18 巻, 2008, 382-388.

14. Yanaoka K, Oka M, Mukoubayashi C, Yoshimura N, Enomoto S, Iguchi M, Magari H, Utsunomiya H, Tamai H, Aarii K, Ohata H, Fujishiro M, Takeshita T, Mohara O, Ichinose M, Cancer high-risk subjects identified by serum pepsinogen tests: outcomes after 10-year follow-up in asymptomatic middle-aged males, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 査読有, 17 巻, 2008, 838-845.

15. Yanaoka K, Oka M, Yoshimura N, Mukoubayashi C, Enomoto S, Iguchi M, Magari H, Utsunomiya H, Tamai H, Aarii K, Yamamichi N, Fujishiro M, Takeshita T, Mohara O, Ichinose M, Risk of gastric cancer in asymptomatic, middle-aged Japanese subjects based on serum pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody levels, *Int J Cancer*, 査読有, 123 巻, 2008, 917-926.

16. 湯原弘喜, 一田 綾, 大谷里奈, 前田美季, 淡路水須, 高橋直子, 内海みよ子, 有田幹雄, 牟礼佳苗. 血圧と血中抗酸化能に及ぼす運動の影響. *関西臨床スポーツ医・科学研究会誌*, 18 巻, 2008, 45-46.

17. Harada K, Koizumi A, Saito N, Inoue K, Yoshinaga T, Date C, Fujii S, Hachiya N, Hirose I, Koda S, Kusaka Y, Murata K, Omae K, Shimbo S, Takenaka K, Takeshita T, Todoriki H, Wada Y, Watanabe T, Ikeda M, Historical and

geographical aspects of the increasing perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate contamination in human serum in Japan, *Chemosphere*, 査読有, 66 巻, 2007, 293-301.

18. Yamada K, Takeshita T, Hirano K, Sakata K, Status of suicidal thoughts and related factors in workers, *Wakayama Med Rep*, 査読有, 47 巻, 2007, 7-14.

19. 牟礼佳苗, 竹下達也, 森岡郁晴, 有田幹雄, 柿酢飲用による血中抗酸化能および尿中イソプロスタンレベルの変化, *日本衛生学雑誌*, 査読有, 62 巻, 2007, 32-38.

[学会発表] (計 10 件)

1. 牟礼佳苗, 前田真也, 麦谷耕一, 岩根幹能, 木下藤寿, 茂原 治, 竹下達也, 肥満関連遺伝子多型とメタボリックシンドロームとの関連性, 分子環境予防医学研究会大会, 2011 年 1 月 22 日, 京都市.

2. 牟礼佳苗, 竹下達也, 植物由来物質による紫外線誘発細胞障害抑制効果について, 第 22 回環境システム計測制御学会, 2010 年 10 月 29 日, 草津市.

3. 前田真也, 牟礼佳苗, 竹下達也, 渡辺美香, 向林知津, 麦谷耕一, 渡辺豊, 岩根幹能, 木下藤寿, 湯川修也, 茂原治. 職域男性における飲酒量と血清総アディポネクチン値との関連性の解析, 第 83 回日本産業衛生学会, 2010 年 5 月 27 日, 福井市.

4. 牟礼佳苗, 前田真也, 麦谷耕一, 岩根幹能, 木下藤寿, 茂原 治, 竹下達也, コーヒー摂取とメタボリックシンドロームの関連性について, 第 80 回日本衛生学会総会, 2010 年 5 月 11 日, 仙台市.

5. 前田真也, 牟礼佳苗, 竹下達也, 麦谷耕一, 岩根幹能, 木下藤寿, 茂原治. 職域集団における $\beta 3$ アドレナリン受容体遺伝子多型別の内臓脂肪面積, 運動習慣と肝機能検査値との関連性についての解析, 第 82 回日本産業衛生学会, 2009 年 5 月 21 日, 福岡市.

6. 牟礼佳苗, 竹下達也, トマト由来リコピンの紫外線誘発ダメージ抑制効果, 第 79 回日本衛生学会, 2009 年 3 月 31 日, 東京都.

7. 前田真也, 牟礼佳苗, 竹下達也, 麦谷耕一, 大畑博, 岩根幹能, 木下藤寿, 茂原治, 職域男性における ALDH2 遺伝子多型別の飲酒量と血清脂質との関連性についての解析, 第 81 回日本産業衛生学会, 2008 年 6 月 27 日, 札幌市.

8. 牟礼佳苗, 竹下達也, リコペンによるミスマッチ修復異常大腸癌由来細胞内の自然発生突然変異抑制効果について, 第 78 回日本衛生学会総会, 2008 年 3 月 31 日, 熊本市.

9. 有田幹雄, 高橋直子, 淡路水須, 岩田麻衣子, 古家彩美, 牟礼佳苗, 中村千種, 運動の血中抗酸化能および循環機能に及ぼす影

響、第 18 回日本臨床スポーツ医学会学術集会、2007 年 11 月 3 日、別府市。

10. 牟礼佳苗、竹下達也、トマト由来リコペンがミスマッチ修復関連遺伝子発現に与える影響について、第 14 回日本がん予防学会・第 8 回日本がん分子疫学研究会・第 30 回日本がん疫学研究会合同大会、2007 年 7 月 12 日、東京都。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牟礼 佳苗 (MURE KANAE)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：90268491

(2) 研究分担者

竹下 達也 (TAKESHITA TATSUYA)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20150310

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号：