

平成 21 年 6 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19780105  
 研究課題名（和文） 食品機能成分によるテロメラーゼ阻害を介した癌の発症・進展予防  
 研究課題名（英文） Anti-tumor effect of functional foods via telomerase inhibition.  
 研究代表者  
 永塚 貴弘（EITSUKA TAKAHIRO）  
 新潟薬科大学・応用生命科学部・助教  
 研究者番号：30445895

研究成果の概要：細胞に無限増殖能を与える酵素“テロメラーゼ”は、その酵素活性の阻害による癌治療への応用が近年世界的に注目を集めている。既に我々は、長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノールのテロメラーゼ阻害作用を見出している。2007年度は阻害の分子機構を解析し、長鎖不飽和脂肪酸は核内受容体 PPAR $\gamma$ を介して、トコトリエノールは TGF- $\beta$ シグナルを介してテロメラーゼ活性を抑制することを明らかにした。2008年度は担癌マウスを用いた動物試験により長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノールの有効性を評価し、テロメラーゼ阻害により腫瘍を退縮させることを確認した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：テロメラーゼ、テロメア、トコトリエノール、長鎖不飽和脂肪酸、シグナル伝達、抗癌

## 1. 研究開始当初の背景

80%以上のヒト癌組織に検出され、細胞に無限増殖能を与える酵素“テロメラーゼ”は、癌診断の新たなマーカーとしての利用が期待される一方で、その酵素活性の阻害による癌治療への応用が近年世界的に注目を集めている。

我々は、長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノールがテロメラーゼ触媒サブユニット hTERT やテロメラーゼ制御因子 c-myc の発現抑制を介して酵素活性を阻害することを培養細胞

試験により世界に先駆けて明らかにした。過去に、テロメラーゼ活性を転写レベルで抑制する物質がいくつか見出され、それらの分子機構の解明のために hTERT と c-myc の遺伝子発現が調べられているが、さらに上流の分子メカニズムを詳細に検証することで、阻害物質の与える影響を包括的に解析した例は未だない。一方、これまでに極めて多くのテロメラーゼ阻害剤（薬剤を含む）が *in vitro* で見出されてきたが、有効性を動物試験で確認した論文は数報のみであり、その試験方法

も確立されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、

(1) 長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノールによるテロメラーゼ活性の阻害メカニズムをそれぞれ包括的に解明する。

(2) テロメラーゼ阻害物質の *in vivo* での試験方法を新たに確立し、それを活用して長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノールの有効性をそれぞれ検証する。

これら(1)(2)を研究目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノールによるテロメラーゼ活性阻害の機構解析

長鎖不飽和脂肪酸(エイコサペンタエン酸(EPA)とドコサヘキサエン酸(DHA))またはトコトリエノールを培地(10%FBSを含むRPMI-1640培地)に添加して、ヒト大腸癌細胞DLD-1を培養した。培養後、total RNAを抽出し、real-time RT-PCRで遺伝子発現の変動を解析した。さらに、培養後の細胞から細胞抽出液を調製し、リン酸化部位認識抗体を用いたウエスタンブロット法によりタンパク質のリン酸化レベルを評価した。

一方、テロメラーゼ活性の阻害により、細胞分裂に伴ってテロメアDNAが短縮し、最終的にDLD-1細胞の老化(分裂停止)が観察されると予想できる。したがって、テロメアDNAの長さをサザンブロット法で調べ、細胞老化を老化マーカーであるSA-β-Gal(senescence-associated β-galactosidase)によって評価した。

### (2) 担癌マウスによる長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノールの有効性の検討

ヒト大腸癌細胞DLD-1をヌードマウス(BALB/cA Jcl-nu, nu/nu)背部皮下に移植し、DHAまたはトコトリエノールを胃内ゾンデにより経口摂取させて腫瘍の大きさを観察した。その後、腫瘍からtotal RNAを抽出してテロメラーゼ触媒サブユニットhTERT(human telomerase reverse transcriptase) mRNAの発現レベルをreal-time RT-PCRにより解析した。同時に、癌組織から細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロット法によりhTERTのタンパク質発現も評価した。また、腫瘍からDNAを抽出し、テロメアの長さをサザンブロット法で調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノール

### によるテロメラーゼ活性阻害の機構解析

長鎖不飽和脂肪酸であるEPAやDHAは核内受容体PPAR $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ )のリガンドになることがわかっている。転写調節因子である $\beta$ -cateninはテロメラーゼ制御因子c-mycのプロモーターに作用してc-myc遺伝子発現を誘導することが報告されている。また、PPAR $\gamma$ は $\beta$ -cateninと複合体を形成して $\beta$ -cateninシグナルを抑制することが知られている。これらの遺伝子に着目した結果、EPAやDHAはPPAR $\gamma$ の活性化により $\beta$ -cateninシグナルを阻害し、c-mycとhTERTのmRNA発現をダウンレギュレートすることでテロメラーゼ活性を抑制することがわかった(図1)。

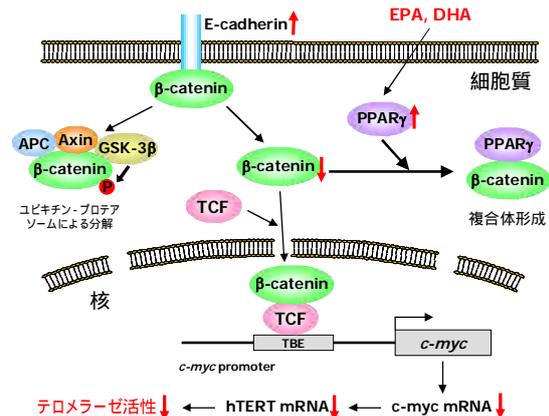


図1. EPAとDHAのテロメラーゼ活性阻害機構

一方、c-myc遺伝子はTGF- $\beta$ シグナルに制御されることがわかっている。TGF- $\beta$ は細胞膜に存在する受容体に結合すると、そのシグナルの伝達役であるSmadをリン酸化する。リン酸化されたSmadは核内へと移行し、転写共役因子E2Fと共にc-mycプロモーターに作用して遺伝子発現をダウンレギュレートする。TGF- $\beta$ シグナルに着目した結果、トコトリエノールは本シグナル(TGF- $\beta$ 1 TGF- $\beta$ 受容体IIリン酸化Smad、E2F)の活性化を介してc-mycとhTERTの遺伝子発現をダウンレギュレートし、テロメラーゼ活性を阻害することを明らかにした(図2)。

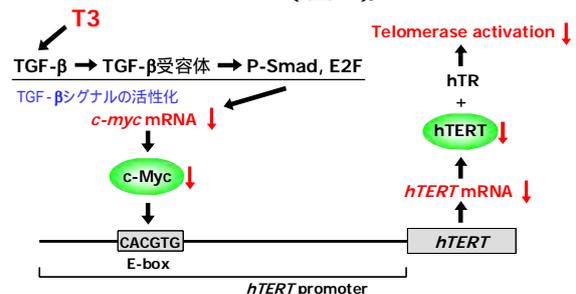


図2. トコトリエノールのテロメラーゼ活性阻害機構

DHA またはトコトリエノールを処理した DLD-1 細胞のテロメア長をサザンブロット法で測定した結果、PDL (population doubling level; 細胞分裂回数の指標) の増加に伴ってテロメア DNA 由来のシグナルが低分子側にシフトしていた (図 3; DHA 処理の結果のみを示した)。この結果から、DHA やトコトリエノールはテロメラーゼ阻害を介してテロメア長を短縮させることが明らかになった。

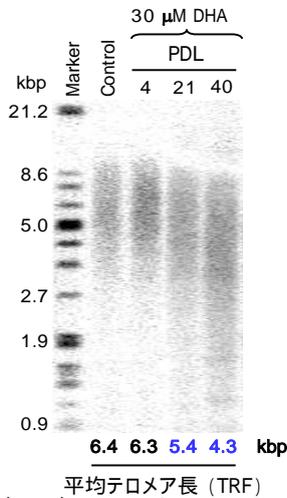


図 3. サザンブロット法によるテロメア DNA の検出

DHA またはトコトリエノールを DLD-1 に長期処理することで SA-β-Gal 活性が検出され (図の矢印部分) 細胞老化の誘導を確認した (図 4; DHA 処理の結果のみを示した)。細胞の肥大化・偏平化、細胞の輪郭が不明瞭になるなどの老化細胞に特徴的な表現型も顕微鏡下で観察できた (図 4)。

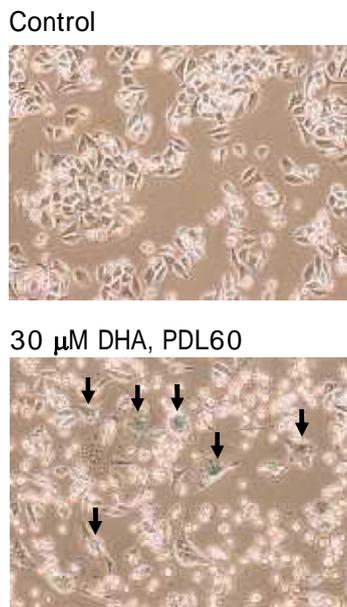


図 4. SA-β-Gal 染色による細胞老化の評価

以上 (図 3, 4) より、テロメラーゼ活性阻害によるテロメア長の短縮と細胞老化の誘導が明らかになり、長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノールの有効性が培養細胞試験により確認できた。

## (2) 担癌マウスによる長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノールの有効性の検討

ヌードマウス背部に移植した腫瘍組織のサイズは、DHA またはトコトリエノールを胃内ゾンデにより経口摂取させることで退縮した (図 5; DHA 処理の結果のみを示した)。

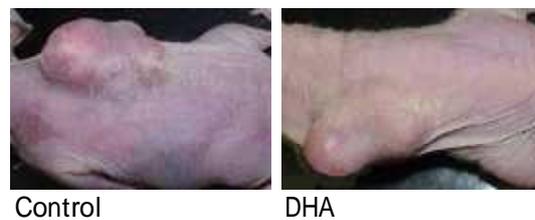
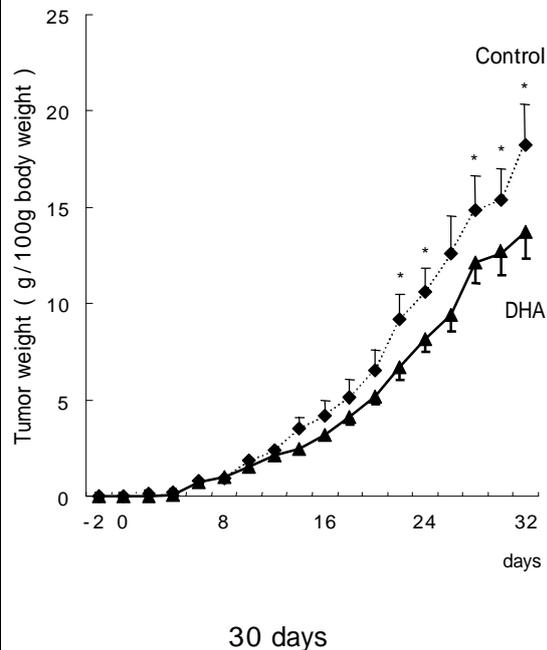


図 5. ヌードマウス背部の腫瘍サイズ

次に、real-time RT-PCR とウエスタンブロット法により腫瘍の hTERT 発現を評価した結果、DHA とトコトリエノール投与のいずれにおいても hTERT の mRNA・タンパク質発現レベルが減少していた。また、DHA とトコトリエノールの摂取により、腫瘍組織のテロメア長が短縮していることをサザンブロット法で確認した。

以上より、DHA とトコトリエノールはテロメラーゼ阻害を介して腫瘍の増殖を抑制することを動物試験により明らかにした。

長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノールの

テロメラーゼ阻害作用は我々が世界に先駆けて報告しており、本研究で解明した阻害の分子メカニズムと動物試験による有効性確認のような研究は国内外で皆無であるため、本研究の新規性は極めて高い。こうした研究の推進は、長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノールによる“テロメラーゼ阻害を介した癌の発症・進展予防”へ結びつくと期待される。すなわち本成果は、長鎖不飽和脂肪酸とトコトリエノールの生物化学的特性を理解し、食品の新しい機能発見や疾病予防に役立つため、社会的意義と波及性は極めて大きいと言える。

今後の展望として、本研究の推進過程でトコトリエノールの生理活性（癌細胞増殖抑制、テロメラーゼ阻害など）を増強できる食品成分を培養細胞試験により新たに見出しており、その機構解析と動物試験への展開を予定している。

#### 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 1 件)

T. Miyazawa, A. Shibata, P. Sookwong, Y. Kawakami, T. Eitsuka, A. Asai, S. Oikawa and K. Nakagawa. Antiangiogenic and anticancer potential of unsaturated vitamin E (tocotrienol). J. Nutr. Biochem. (2009) 20, 79-86. [Review]

〔学会発表〕(計 5 件)

永塚貴弘、仲川清隆、三宅紀子、倉田忠男、宮澤陽夫 “長鎖不飽和脂肪酸による PPAR を介したテロメラーゼ阻害作用” 日本農芸化学会、2009 年 3 月 29 日、福岡（マリンメッセ福岡）

T. Eitsuka, K. Nakagawa, N. Miyake, T. Kurata and T. Miyazawa “Tocotrienol down regulates cellular telomerase activity in DLD-1 human adenocarcinoma cells” 4th International Niigata Symposium on Diet and Health, 29 Nov 2008, Niigata (Toki Messe)

永塚貴弘、仲川清隆、三宅紀子、倉田忠男、宮澤陽夫 “トコトリエノールによるテロメラーゼ活性の抑制機構” 日本ビタミン学会、2008 年 6 月 14 日、仙台（仙台国際センター）

永塚貴弘、仲川清隆、三宅紀子、倉田忠男、宮澤陽夫 “トコトリエノールによるテロメラーゼ阻害とその作用機序” 日本農芸化学会、2008 年 3 月 27 日、名古屋（名城大学天白キャンパス）

永塚貴弘、仲川清隆、三宅紀子、倉田忠男、

宮澤陽夫 “トコトリエノールによるテロメラーゼ活性の阻害機構” 日本ビタミン学会、2007 年 5 月 25 日、長崎（ハウステンボス）

〔図書〕(計 1 件)

T. Eitsuka, K. Nakagawa and T. Miyazawa “Telomerase inhibition” R.R. Watson and V.R. Preedy ed. Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols, pp. 209-216, Taylor & Francis Group (2009)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

永塚 貴弘 (EITSUKA TAKAHIRO)

新潟薬科大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：30445895