

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21700773

研究課題名（和文） 腫瘍血管新生を標的とした高濃度レスベラトロールオリゴマー含有食品の癌予防効果

研究課題名（英文） Cancer Preventive Effects of Resveratrol Oligomer-Rich Food Factors with an Antiangiogenic Activity

研究代表者

國政 和宏（KUNIMASA KAZUHIRO）

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センターゲノム研究部・研究員

研究者番号：50534020

研究成果の概要（和文）：*In vitro* 血管新生モデルを用いて、東南アジア原産のメリンジョ（*Gnetum gnemon* L.）種子抽出物とその主要構成成分であるレスベラトロール二量体、グネチンCが血管内皮細胞の増殖、遊走及び管腔形成を顕著に阻害することを見出した。さらに、メリンジョ種子抽出物は腫瘍血管新生、腫瘍の増大、及び転移も抑制した。また、遺伝子発現情報解析によって、メリンジョ種子抽出物とグネチンCの作用機序が、topoisomeraseやCDK阻害剤等と類似していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In *in vitro* angiogenesis models, the melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract and its major component gnetin C, a resveratrol dimer, inhibited multiple angiogenic functions, such as endothelial cell proliferation, migration, and tube formation. The melinjo extract also suppressed tumor angiogenesis, growth, and metastasis *in vivo*. Furthermore, using a gene expression signature-based approach, the modes of action of the melinjo extract and gnetin C were found to be similar to those of topoisomerase and cyclin-dependent kinase inhibitors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：血管新生、血管内皮細胞、がん、レスベラトロール、食品機能、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

がん死の主因である無秩序な増殖と遠隔転移は、がんが誘導する血管網の形成（腫瘍血管新生）に極めて依存した現象である。そ

れ故、腫瘍血管新生の抑制はがん予防に非常に有効であると考えられている。事実、疫学調査により、ワイン等に含まれるレスベラトロールや大豆イソフラボン等のがんの罹患リスクを低減させる食品成分の多くが、血管

新生抑制作用を有している。こうした知見から、研究代表者は、「経口摂取で腫瘍血管新生抑制作用を発揮する食品（成分）は、がん予防に貢献する」というコンセプトを掲げ、様々な食品素材から血管新生抑制成分を新たに同定し、報告してきた。

最近の成分分析の進展に伴って、レスベラトロールが重合したレスベラトロールオリゴマー（2 から 8 量体）が、グネツム科、マメ科、及びフタバガキ科等の植物に含まれていることが報告されている。さらに、そうしたレスベラトロールオリゴマーの一部は、レスベラトロールよりも顕著な抗がん作用等の生理活性を有していることが明らかにされつつある。しかしながら、血管新生に対するレスベラトロールオリゴマーの効果や詳細な作用機序は不明のままであった。

2. 研究の目的

最近、グネツム科に属し、インドネシア等の東南アジアで伝統食として食文化のあるメリンジョ（*Gnetum Gnetum* L.）種子に、レスベラトロール 2 量体であるグネチン C (gnetin C: GC)、その配糖体であるグネモノシド A, C 及び D (gnemonoside A, B and C: GMA, GMC, and GMD)、及びレスベラトロール類縁体グネチン L (gnetin L: GL) が豊富に含まれていることが明らかにされた (Kato E, et al. J Agric Food Chem 2009)。

そこで本研究では、メリンジョ種子エタノール抽出物 (ethanol extract of melinjo seeds: EEMS) とその主要構成成分であるレスベラトロールダイマーの血管新生抑制作用及び抗がん作用を検証することを目的とした。さらに、マイクロアレイを用いた遺伝子発現情報解析により、EEMS とグネチン C の標的分子（または経路）の同定を試みた。

3. 研究の方法

① *In vitro* 血管新生モデル

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVECs) を血管新生促進因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) 及び basic fibroblast growth factor (bFGF) で刺激し、細胞増殖、遊走、及びコラーゲンゲル中での管腔形成を誘導した。さらに、コラーゲンゲル内で三次元培養した HUVECs からタンパク質を回収し、血管新生シグナルに対する EEMS やグネチン C の作用を Western blotting を用いて解析した。

② 腫瘍血管新生、腫瘍増大及び転移モデル

EEMS の腫瘍血管新生に対する作用は、マウス肉腫 S180 細胞を用いて、マウス背部皮下

法により解析した。その際、EEMS は 5% 混餌食として投与した。

抗がん作用はマウス大腸がん細胞株 colon-26 の皮下移植モデルを用いて検証した。また、腫瘍組織を血管マーカーである CD31 抗体で免疫染色し、微小血管密度を定量化することで、腫瘍増殖の抑制時の血管新生抑制効果を確認した。

がん転移に関する効果は、脾臓内に移植した colon-26 の肝転移モデルを用いて評価した。

③ 遺伝子発現情報解析

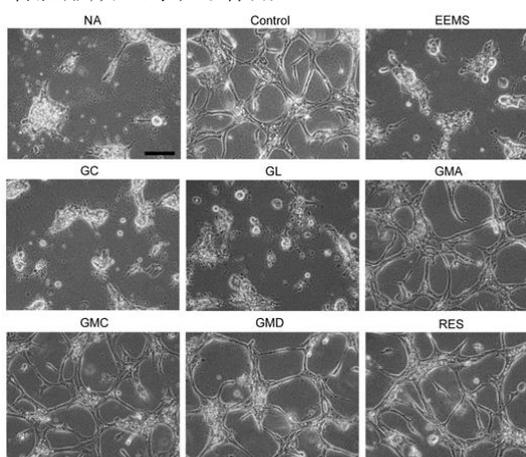
マイクロアレイ解析によって得られた遺伝子発現変動パターンを機能 (標的) 既知の化合物のパターンと比較することで、標的未知の化合物の標的候補を特定することができる。そこで本研究でも、EEMS とグネチン C の標的分子または経路を同定するために、ヒト大腸がん細胞株 HT-29 とヒト乳がん細胞株 MCF-7 を EEMS、グネチン C 及びレスベラトロールで処理し、遺伝子発現変動パターンを取得した。これらのデータを Connectivity Map 等の解析ツールを用いて、標的候補の絞り込みを行った。

4. 研究成果

① *In vitro* における血管新生抑制作用

HUVECs の細胞増殖に対する EEMS とレスベラトロールオリゴマーの作用を検討した結果、EEMS、グネチン C、グネチン L 及びグネモノシド D に顕著な増殖抑制活性が認められた。また、EEMS、グネチン C 及びグネチン L は管腔形成を強力に阻害し (図 1)、EEMS 及びグネチン C は細胞遊走も抑制した。さらに、EEMS やグネチン C は、VEGF や bFGF が誘導する血管新生シグナル (Raf-1-MEK1/2-ERK1/2 経路) を抑制することを見出した。以上のことから、EEMS は *in vitro* で血管内皮細胞の

図 1 EEMS とレスベラトロールオリゴマーの管腔形成に対する作用

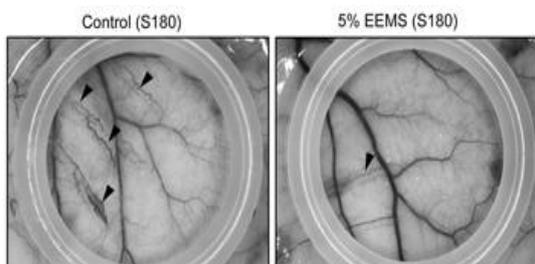


血管新生過程を阻害することが確認された。さらに、主要構成成分の中でも、グネチン C が一番強い血管新生阻害活性を有することを見出した。

② *In vivo*における血管新生抑制及び抗がん作用

EEMS の腫瘍血管新生抑制作用を S180 マウス肉腫を封入したチャンバーを背部皮下に移植するモデルで検証した結果、EEMS の 5% 混餌食の摂取により、有意に腫瘍血管新生の本数が減少することを確認した(図 2)。また、マウス colon-26 細胞を皮下移植した腫瘍増殖モデルにおいて、EEMS の経口投与 (50 及び 100 mg/kg/day)により、腫瘍体積及び重量の有意な減少が認められた。さらに、腫瘍組織を CD31 抗体で免疫染色した結果、EEMS が腫瘍内の微小血管密度を低下させることを確認した。また、その際、体重減少等の明らかな副作用は認められなかった。脾臓に移植した colon-26 の肝転移モデルにおいても、EEMS の経口投与により、転移巣の増大に伴う肝重量の増加が抑制され、転移巣の形成率も大幅に減少していた。以上の結果は、EEMS が腫瘍血管新生を抑制するのみならず、腫瘍の増大や遠隔転移も抑制し得ることを示している。

(図 2) マウス背部皮下法 (矢頭は腫瘍血管を示している)



③ 遺伝子発現情報解析

Connectivity Map 解析の結果、EEMS、グネチン C、及びレスベラトロールによって引き起こされる遺伝子発現変動パターンは、topoisomerase I 及び II, cyclin-dependent kinase1/2, GSK-3beta 等の阻害剤の変動パターンと類似していることが確認された。また、パスウェイ解析の一つである DAVID においても、腫瘍形成や cell cycle 等に関わる遺伝子群が変化していることが確認された。以上の結果は、EEMS やグネチン C の作用機序が、topoisomerase や細胞周期等の阻害であることを示唆している。

以上の結果をまとめ、本研究において、東南アジア原産のメリンジョ種子抽出物と

その主要構成成分であるレスベラトロール 2 量体グネチン C が血管新生抑制作用を有していることを見出した。さらに、メリンジョ種子抽出物に関しては、*in vivo* において腫瘍の増大や転移を抑制することを明らかにした。メリンジョ種子がインドネシアの一部の地域で食生活に取り入れられていることを考慮すると、メリンジョ種子はがん予防に有用な食品素材であることが示唆された。今後、標的分子の同定や自然発症がん等へ効果を解析していくことで、がん予防に効果的か否かを慎重に検証していく必要がある。

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 7 件)

- ① Tsuchiya I, Hosoya T, Ushida M, Kunimasa K, Ohta T, Kumazawa S. Nymphaeol-A Isolated from Okinawan Propolis Suppresses Angiogenesis and Induces Caspase-Dependent Apoptosis via Inactivation of Survival Signals. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:826245. doi: 10.1155/2013/826245. 査読有
- ② Kunimasa K, Ohta T, Tani H, Kato E, Eguchi R, Kaji K, Ikeda K, Mori H, Mori M, Tatefuji T, Yamori Y. Resveratrol derivative-rich melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and tumor angiogenesis. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55(11):1730-4. doi: 10.1002/mnfr.201100098. 査読有
- ③ Kunimasa K, Ahn MR, Kobayashi T, Eguchi R, Kumazawa S, Fujimori Y, Nakano T, Nakayama T, Kaji K, Ohta T. Brazilian Propolis Suppresses Angiogenesis by Inducing Apoptosis in Tube-Forming Endothelial Cells through Inactivation of Survival Signal ERK1/2. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:870753. doi: 10.1093/ecam/nep024. 査読有
- ④ Kunimasa K, Ikekita M, Sato M, Ohta T, Yamori Y, Ikeda M, Kuranuki S, Oikawa T. Nobiletin, a citrus polymethoxy-flavonoid, suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and angiogenesis *in vivo*. *Cancer Sci.* 2010;101(11):2462-9. doi:

10.1111/j.1349-7006.2010.01668.x. 査読有

- ⑤ Kunimasa K, Yoshitomi H, Miura C, Mori H, Tsuchikura S, Ikeda K, Gao M, Yamori Y, Mori M. High susceptibility of obese hypertensive SHRSP. Z-Lepr(fa) /IzmDmcr rats to lipid deposition in the mesenteric artery. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2010;37(11):1102-4. doi: 10.1111/j.1440-1681.2010.05440.x. 査読有
- ⑥ Eguchi R, Fujimori Y, Ohta T, Kunimasa K, Nakano T. Calpain is involved in cisplatin-induced endothelial injury in an in vitro three-dimensional blood vessel model. Int J Oncol. 2010;37(5):1289-96. 査読有
- ⑦ Kunimasa K, Kobayashi T, Kaji K, Ohta T. Antiangiogenic effects of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane are associated with their differential regulation of ERK1/2 and Akt in tube-forming HUVEC. J Nutr. 2010;140(1):1-6. doi: 10.3945/jn.109.112359. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 池田恵、元島敦子、倉貫早智、佐藤眞友美、国政和宏、松浦信康、小倉弘、五十嵐康弘、及川勉：放線菌由来 nocapyrone E によるアディポネクチン分泌促進、日本薬学会 第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 30 日
- ② 国政和宏、太田敏郎、谷央子、加藤榮信、江口良二、加治和彦、池田克己、森英樹、森真理、立藤智基、家森幸男：レスベトロール類縁体を豊富に含むメリンジョ種子抽出物は血管新生に関連した内皮細胞機能及び腫瘍血管新生を抑制する、日本農芸化学会 2012 年度大会、京都、2012 年 3 月 24 日
- ③ 土屋育未、太田敏郎、牛田素子、国政和宏、吉田真奈美、熊澤茂則：沖縄産プロポリス中のプレニルフラボノイドの血管新生抑制活性に関する研究、日本農芸化学会 2012 年度大会、京都、2012 年 3 月 24 日
- ④ 土屋育未、太田敏郎、牛田素子、国政和宏、吉田真奈美、熊澤茂則：沖縄産プロポリスの血管新生抑制活性成分に関する研究、第 2 回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会、岐阜、2011 年 11 月 26 日
- ⑤ 国政和宏、池北雅彦、佐藤眞友美、太田敏郎、池田恵、及川勉：柑橘ポリメトキシ

フラボノイド、ノビレチンは血管新生に連結した内皮細胞機能および *in vivo* 血管新生を抑制する、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 3 日

- ⑥ 国政和宏：細胞分化調節活性を指標とした糖尿病改善・血管新生抑制化合物の探索：ポリメトキシフラボノイドであるノビレチンに関して、第 2 回生命機能研究会、神戸、2011 年 8 月 31 日
- ⑦ Kunimasa K, Eguchi R, Ohta T. Antiangiogenic properties of resveratrol dimers isolated from ethanol extract of melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
- ⑧ 国政和宏、太田敏郎、家森幸男、池田恵、倉貫早智、及川勉：ポリメトキシフラボノイドであるノビレチンの細胞分化調節作用を介したアディポネクチン産生促進および血管新生抑制効果、第 15 回日本フードファクター学会、仙台、2010 年 10 月 4-5 日
- ⑨ Eguchi R, Fujimori Y, Ohta T, Kunimasa K, Nakano T. Calpain is involved in cisplatin-induced endothelial injury in an *in vitro* three-dimensional blood vessel model. 第 18 回日本血管生物医学会、大阪、2010 年 12 月 1-3 日
- ⑩ 国政和宏、太田敏郎、谷央子、加藤榮信、江口良二、池田克己、森英樹、森真理、立藤智基、家森幸男：メリンジョ (*Gnetum gnemon* L.) 種子由来レスベラトロール 2 量体の血管新生抑制作用、第 131 回日本薬学会、静岡、2011 年 3 月 28-31 日
- ⑪ 吉田真奈美、国政和宏、太田敏郎：レスベラトロールによる血管新生抑制作用とそのメカニズム解析、第 14 回日本フードファクター学会、神戸、2009 年 11 月 15-17 日
- ⑫ 国政和宏、江口良二、太田敏郎、加治和彦、森英樹、森真理、立藤智基、家森幸男：インドネシア果実メリンジョから単離されたレスベラトロール 2 量体グネチン C の血管新生抑制作用、第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21-24 日
- ⑬ 太田敏郎、牛田素子、国政和宏、百瀬昇、吉田真奈美、福本修一、熊澤茂則、加治和彦：沖縄産プロポリスとその起源植物オオバキによる血管内皮細胞の管腔形成抑制とアポトーシス誘導、第 3 回岐阜薬科大学高次機能性食品（蜂産品）研究会、岐阜、2009 年 7 月 25 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.jfer.or.jp/chemotherapy/department/genome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國政 和宏 (KUNIMASA KAZUHIRO)

公益財団法人 がん研究会

がん化学療法センター

ゲノム研究部・特任研究員

研究者番号：50534020