

## 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 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22780126

研究課題名（和文）カロテノイドによるテロメラーゼ阻害と食品成分間相乗効果の解明

研究課題名（英文）Telomerase inhibition by carotenoid and its synergistic effect of other constituents in food stuffs.

研究代表者

永塚 貴弘 (TAKAHIRO EITSUKA)

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（和文）：癌の無限増殖に関わる酵素テロメラーゼの阻害物質を食品成分から探索した結果、カロテノイドの一種であるβ-カロテンを新たに発見した。β-カロテンを単独で癌細胞に処理すると、生理的な条件よりも比較的高濃度でテロメラーゼ活性を阻害するが、ビタミンE（α-トコフェロール）をβ-カロテンと同時に処理すると、生理的なβ-カロテン濃度（5 μM）でもテロメラーゼの有意な阻害効果が認められた。この効果を動物実験でも確認した。

研究成果の概要（英文）：We screened potential telomerase inhibitors in food stuffs, and found that β-carotene, the most common carotenoid, significantly inhibited telomerase in cell-culture study. After treatment of the cells with β-carotene and vitamin E (α-tocopherol), telomerase activity was synergistically reduced. Furthermore, we ascertained the anti-telomerase action of β-carotene using in vivo tumor models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：食品機能科学

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、カロテノイド、相乗効果

## 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。申請者らは、糖脂質、長鎖不飽和脂肪酸、トコトリエノールがヒト大腸癌細胞のテロメラーゼ活性を阻害することを世界で初めて発見し、その分子メカニズムを明らかにしている。テロメラーゼ阻害物質を食品成

分からさらに探索した結果、カロテノイドの一種であるβ-カロテンを申請者は新たに発見した。β-カロテンを単独で癌細胞に処理すると、生理的な条件よりも比較的高濃度でテロメラーゼ活性を阻害するが、ビタミンE（α-トコフェロール）をβ-カロテンと同時に処理すると、生理的なβ-カロテン濃度でもテロメラーゼの阻害効果があることを認めつつある。

一方、これまでに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。したがって、 $\beta$ -カロテンによるテロメラーゼ阻害を *in vivo* で評価する方法を確立し、その効果を検証することは極めて重要である。

## 2. 研究の目的

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) カロテノイドによるテロメラーゼ抑制と相乗効果を与える食品成分の解析

(2) カロテノイドによるテロメラーゼ阻害の動物試験での有効性評価

本研究は、カロテノイドによるテロメラーゼ抑制を明らかにしてその効果を相乗的に高める食品機能成分をスクリーニングし、動物試験によりそれらの有効性を確認することで、“カロテノイドによる癌予防”の実現に挑むものである。

## 3. 研究の方法

(1) カロテノイドによるテロメラーゼ抑制と相乗効果を与える食品成分の解析

$\beta$ -カロテン (BC) または  $\alpha$ -トコフェロール ( $\alpha$ -Toc) を培地 (10%FBS を含む RPMI-1640 培地) に添加して、ヒト前立腺癌細胞 DU-145 を培養した。培養後、stretch PCR 法によってテロメラーゼ活性を測定した。また、細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロット法によりタンパク質の発現レベルを強化した。細胞から total RNA を抽出し、real-time RT-PCR で遺伝子発現の変動を解析した。

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 DU-145 細胞の老化 (分裂停止) が観察されると予想できる。そこで、細胞老化を老化マーカーである SA- $\beta$ -Gal (senescence-associated  $\beta$ -galactosidase) によって評価した。

(2) カロテノイドによるテロメラーゼ阻害の動物試験での有効性評価

ヒト前立腺癌細胞 DU-145 をヌードマウス (BALB/cA Jcl-nu, nu/nu) 背部皮下に移植し、BC または  $\alpha$ -Toc 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。

## 4. 研究成果

(1) カロテノイドによるテロメラーゼ抑制と相乗効果を与える食品成分の解析

BC を生理的な条件よりも比較的高濃度 (50  $\mu$ M) で DU-145 に与えると、有意にテロメラーゼ活性が阻害された (データ不掲載)。一方、低濃度の BC (5-20  $\mu$ M) を単独で DU-145 細胞に処理しても、テロメラーゼ活性に何ら影響を与えなかった (図 1)。この BC 濃度と同時処理することでテロメラーゼを阻害する食品成分を探索した結果、 $\alpha$ -Toc に顕著な作用のあることを見出した。生理的な  $\alpha$ -Toc 濃度 (20  $\mu$ M) を添加しても酵素活性に影響はないが、BC と  $\alpha$ -Toc を同時に培地に添加することで、効果的にテロメラーゼ活性を抑制することがわかった (図 1)。

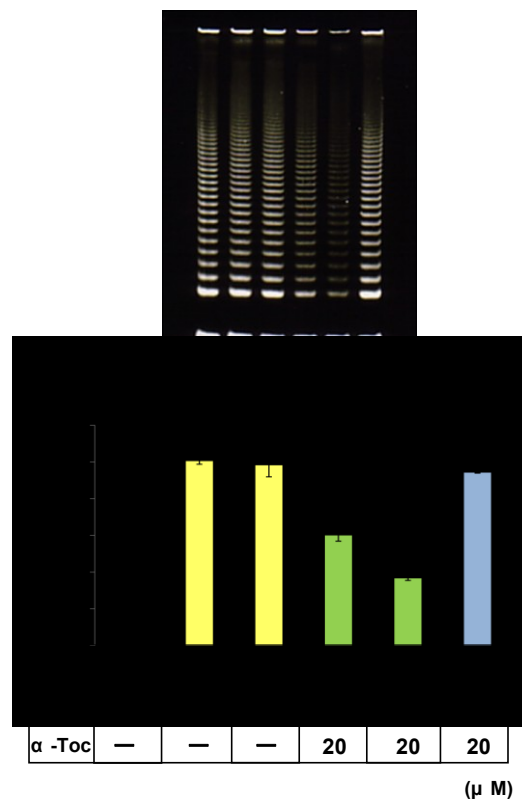


図 1. BC と  $\alpha$ -Toc の同時添加によるテロメラーゼ活性に与える影響

次に、テロメラーゼ阻害のメカニズムを検証するため、ウエスタンブロット法を行った。hTERT (human telomerase reverse transcriptase) はテロメラーゼ活性を司る触媒サブユニットとして知られている。また、c-Myc は hTERT のプロモーターに作用して hTERT の遺伝子発現を誘導することが明らかになっている。BC や  $\alpha$ -Toc をそれぞれ単独で DU-145 に処理しても hTERT と c-Myc の発現には影響がなかったが、BC と  $\alpha$ -Toc を同時に添加することで、相乗的に hTERT と c-Myc

の発現を抑制することがわかった (図 2)。real-time RT-PCR によって hTERT と c-myc の mRNA の発現レベルを解析した結果、ウエスタンブロットと同様に、BC と  $\alpha$ -Toc の同時添加で遺伝子発現が有意に抑えられていた (データ不掲載)。

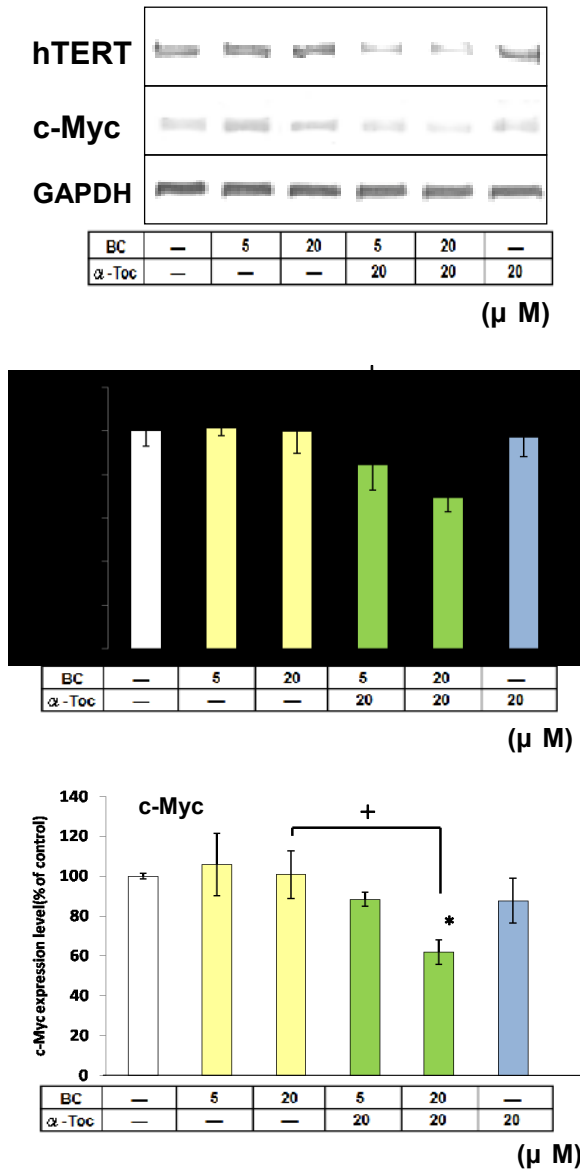


図 2. hTERT と c-Myc の発現抑制

以上のことから、BC と  $\alpha$ -Toc の同時処理によって、c-myc の発現抑制を介して hTERT がダウンレギュレートされ、テロメラーゼ活性が阻害されることが考えられた。

また、BC と  $\alpha$ -Toc を DU-145 に長期的に同時処理することで SA- $\beta$ -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)。細胞の肥大化・扁平化、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)。

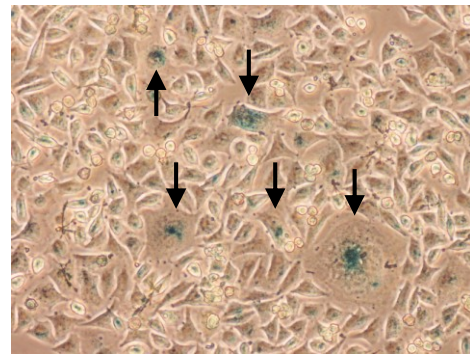


図 4. SA- $\beta$ -Gal 染色による細胞老化の評価

この結果から、テロメラーゼ活性阻害による細胞老化の誘導が明らかになり、BC と  $\alpha$ -Toc の有効性が培養細胞試験により確認できた。

## (2) カロテノイドによるテロメラーゼ阻害の動物試験での有効性評価

ヌードマウス背部に移植した腫瘍組織のサイズは、BC と  $\alpha$ -Toc 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)。

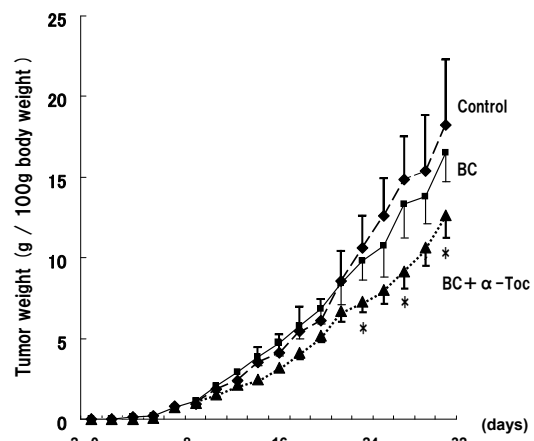


図 5. ヌードマウス背部の腫瘍サイズ

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、BC と  $\alpha$ -Toc 投与で hTERT の mRNA・タンパク質発現レベルが減少していた。

以上より、BC と  $\alpha$ -Toc の同時投与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。

テロメラーゼ阻害を介した癌の発症・進展予防にカロテノイドを応用する試みは未だないため、本研究の新規性は極めて高い。カロテノイドのテロメラーゼ阻害に相乗効果

をもたらす食品機能分子を見出すことにより、カロテノイドとの食べ合わせに理想的な食品を提案することができ、栄養指導の観点から癌を予防することが可能となる。カロテノイドによるテロメラーゼ阻害機構を分子レベルで明らかにし、また、*in vivo* の試験方法を確立してそれらの有効性を検証する試みは独創的であり、研究企画も明確である特徴がある。本研究の推進は食品の新しい機能性の発見につながると同時に、食品成分による癌予防に結びつくこと期待されるため、この成果は食品学、栄養学、生化学にとどまらず、薬学や医学の分野に大きく展開できると考えられる。また、食品成分を高付加価値化するために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や増大する国民医療費の抑制にもつながる可能性があるため、社会的意義と波及性が大きい。

#### 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 2 件)

- ① T. Eitsuka, K. Nakagawa, Y. Ono, N. Tatewaki, H. Nishida, T. Kurata, N. Shoji, T. Miyazawa, Amadori-glycated phosphatidylethanolamine up-regulates telomerase activity in PANC-1 human pancreatic carcinoma cells. *FEBS Letters* (2012) in press. 査読有り
- ② T. Fukuda, M. Katayama, T. Yoshizawa, T. Eitsuka, H. Mizukami, K. Nakagawa, H. Ito, H. Komagata, S. Song, S. Roh, Y. Hoshino, E. Sato, H. Hanada, K. Nishimori, T. Miyazawa, T. Uchida, Efficient establishment of pig embryonic fibroblast cell lines with conditional expression of simian vacuolating virus 40 large T fragment. *Biosci. Biotech. Biochem.* (2012) in press. 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- ① 永塚貴弘, トコトリエノールによる細胞分裂寿命の延長, 日本農芸化学会, 2012年3月23日, 京都女子大学 (京都)
- ② 永塚貴弘, トコトリエノールによる細胞分裂寿命の延長~酸化ストレスとテロメアの関わり~, 東北大学 先端農学シンポジウム(招待講演), 2011年11月24日, 東北大学 (仙台)
- ③ 永塚貴弘, トコトリエノールによるテロメア短縮抑制と分裂寿命の延長, 日本ビタミン学会, 2011年6月4日, 安田女子大

学 (広島)

- ④ 永塚貴弘, トコトリエノールによるテロメア短縮抑制, 日本農芸化学会, 2011年3月27日, 京都女子大学 (京都)
- ⑤ 小野祐一, アマドリ型糖化リン脂質によるテロメラーゼの活性化, 日本メイラード学会, 2010年9月17日, お茶の水女子大学 (東京)
- ⑥ 小野祐一, アマドリ型糖化リン脂質の癌テロメラーゼ活性に与える影響, 日本栄養・食糧学会, 2010年5月23日, アステイトくしま (徳島)
- ⑦ 永塚貴弘, トコトリエノールによるテロメア短縮の抑制効果, 日本栄養・食糧学会, 2010年5月22日, アステイトくしま (徳島)

[図書] (計 2 件)

- ① T. Eitsuka, K. Nakagawa, T. Miyazawa, CRC Press, *Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols, Second Edition*, Antiangiogenic effects of tocotrienol. (2012) 79-88 (共著)
- ② 永塚 貴弘, 丸善出版, 機能性食品の作用と安全性百科, ビタミン E 循環系に作用する成分-血中、血中脂質、血流などとの関係 (2012) 印刷中

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

永塚 貴弘 (TAKAHIRO EITSUKA)  
新潟薬科大学・応用生命科学部・助教  
研究者番号: 30445895