

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700832

研究課題名(和文) ストレスによる癌進行に対するローズマリー由来成分の効果

研究課題名(英文) The effect of carnosic acid on cancer induced by psychological stress

研究代表者

萱島 知子 (Kayashima, Tomoko)

佐賀大学・文化教育学部・准教授

研究者番号：90452599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ローズマリー成分のカルノシン酸が精神的ストレスによるガン進行に与える影響を明らかにすることである。その結果、卵巣腫瘍細胞においてストレスホルモンにより増大した細胞増殖や血管新生促進因子の発現を、カルノシン酸が抑制することが明らかになった。カルノシン酸が、精神的ストレスによるガン進行の重要なターゲットとされている血管新生の抑制を介して、ガン進行を抑えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the effect of carnosic acid from rosemary leaves on cancer induced by psychological stress was examined using ovarian cancer cells. Carnosic acid suppressed cell growth and VEGF mRNA and protein expressions induced by norepinephrin. These results suggest that carnosic acid may be useful for cancer treatment through inhibition of angiogenesis that is important target of cancer induced by psychological stress.

研究分野：食物学

キーワード：カルノシン酸 精神的ストレス 血管新生 ガン ローズマリー 卵巣腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

ローズマリーに含まれているカルノシン酸は強力な抗酸化効果を示し、有効な機能性成分として近年注目されている。研究代表者らはこれまで、カルノシン酸が血管新生抑制作用を示すことを明らかにした<sup>1)</sup>。血管新生は既存の血管から新しい血管を生じる現象であり、がん細胞がこの新しい血管から血液中に含まれる栄養や酸素取り込み増大することや、他の臓器に転移することが知られている。したがって、血管新生抑制作用を示す成分は、ガンの進行を遅らせることが期待できる。

精神的なストレスがガンの発症・進行に関与していることが、疫学調査や動物実験により明らかになっている。そのメカニズムは不明な点が多いが、近年、ストレスホルモンであるノルエピネフリンによる血管新生の促進が影響していることが明らかになった<sup>2)</sup>。卵巣腫瘍細胞といったがん細胞において、ノルエピネフリンが血管内皮細胞増殖因子 VEGF (vascular endothelial growth factor) の産出を増大させることが報告されている<sup>3)</sup>。しかし、このような、精神的ストレスによるがん進行において重要なターゲットと考えられる血管新生亢進に対して、食品成分が与える影響は十分には明らかになっていない。

そこで、本研究では、ローズマリー成分で血管新生抑制効果を示すカルノシン酸が、精神的ストレスによるがん進行に対しても抑制効果を示すのではないかと考え、検討することにした。

## 2. 研究の目的

本研究では次の3項目を明らかにすることで、カルノシン酸が精神的ストレスによるがん進行に与える影響を検討することを目的とした。

(1) ローズマリー成分が卵巣腫瘍細胞の増大に与える影響

(2) カルノシン酸がストレスホルモン刺激による卵巣腫瘍細胞の増大に与える影響

(3) カルノシン酸がストレスホルモン刺激による卵巣腫瘍細胞の血管新生関連因子発現に与える影響

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

がん細胞はノルエピネフリン添加により VEGF 量が増大することが報告されているヒト卵巣腫瘍細胞 SKOV3 を用い、5%CO<sub>2</sub>、37℃条件下で培養した。培地は RPMI1640 培地(Gibco)に 15%FBS(Gibco)と 0.1%gentamicinsulfate(SIGMA Aldrich)を添加したものをを用いた。ノルエピネフリン、カルノシン酸、その他のローズマリー成分は SIGMA Aldrich Japan より購入した。

### (2) 細胞増殖

細胞増殖は、SKOV3 を 96 well プレートに  $2.5 \times 10^3$  cells/well 播種し、15%FBS 添加培地で一晚培養後、ストレスホルモン刺激としてノルエピネフリンを添加した。さらにローズマリー成分のカルノシン酸、カルノソール、ロスマリニン酸、ミルセンをそれぞれ培地添加し、48 時間培養後、Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所)を用い 450 nm 吸光度を測定した。

### (3) タンパク質及び遺伝子発現

VEGF 発現量は、Susan K.らの報告<sup>3)</sup>に基づき検討した。すなわち SKOV3 を 12 well プレートに  $2.5 \times 10^5$  cells/well 播種し、FBS 無添加培地で 1 日培養後、カルノシン酸または溶媒を添加し、1 時間培養した。その後、ノルエピネフリンを添加し所定の時間培養した。培養培地を回収・ろ過し、Human VEGF Assay Kit (R&D Systems 社)を用いて、ELISA 法にて 450 nm 吸光度を測定することで求めた。

mRNA 発現量は、 $1.0 \times 10^5$  cells/well 播種したものを同様に培養し、細胞を回収後、トータル RNA の抽出と逆転写を行い、定量リアルタイム PCR 解析を行った。GAPDH を内部標準とし、Comparative Ct 法にて発現量の比を求めた。

### (4) 統計処理

実験結果は各群間の平均±標準誤差で表し、Dunnett's test により有意差検定を行い、 $p < 0.05$  を有意水準とした。

## 4. 研究成果

(1) ローズマリー成分が卵巣腫瘍細胞の増大に与える影響

はじめに、ストレスホルモン刺激を与えない状態において、SKOV3 の増殖増大に対するカルノシン酸の効果他のローズマリー成分と比較した。その結果、図1のように、カルノシン酸は SKOV3 に対して増殖抑制効果を示した。同じジテルペンで血管新生抑制効果を示すカルノソール<sup>1)</sup>も同様の抑制効果を示した。一方、フェノールカルボン酸で血管新生抑制効果が報告されているロスマリニン酸や、モノテルペンのミルセンの抑制効果はカルノシン酸と比べ弱かった。

以上より、今回比較したローズマリー成分の中では、カルノシン酸は卵巣腫瘍細胞の増大を強力に抑制し、カルノソールの効果と同程度であることが明らかとなった。本研究ではストレスホルモン刺激に対する効果をカルノシン酸に限定し検討したが、効果に寄与する構造の特徴を明らかにするためには同じジテルペンであるカルノソールと比較する必要がある。

(2) カルノシン酸がストレスホルモン刺激による卵巣腫瘍細胞の増大に与える影響

次に、ストレスホルモン刺激を与えた場合

の SKOV3 増大に対するカルノシン酸の効果を検討した。その結果、図 2 のように、ノルエピネフリン刺激により SKOV3 の増殖は増大した。この増大は、カルノシン酸添加により消失した。これより、カルノシン酸がストレス

ホルモン刺激によるガン細胞の増殖増大を抑えることが示された。

(3) カルノシン酸がストレスホルモン刺激による卵巣腫瘍細胞の血管新生促進因子発現に与える影響

さらに、ノルエピネフリンにより増大した血管新生促進因子に対して、カルノシン酸が与える影響を分子レベルで検討した。その結果、図 3・4 のように、ノルエピネフリン刺激による VEGF のタンパク質及び遺伝子発現の増大は、カルノシン酸の添加により消失した。また、MMP2 (matrix metalloproteinase-2) の遺伝子発現についても、ノルエピネフリン刺激による増大はカルノシン酸添加で消失した。

ノルエピネフリンはガン細胞中の  $\beta$  受容体に結合し、VEGF の発現を増大させる<sup>2)</sup>。今回、ノルエピネフリンの受容体への結合遮断剤<sup>3)</sup>を添加した場合、カルノシン酸による遺伝子発現の増大抑制はみられなかった。このため、カルノシン酸はこの受容体に作用している可能性が考えられ、現在検討中である。

以上より、カルノシン酸はストレスホルモン刺激による VEGF 等の血管新生関連因子の発現増大を遺伝子・タンパク質レベルで抑制することにより、精神的ストレスによるガン進行を抑える可能性が示された。カルノシン酸が、精神的ストレスによるガン進行の重要なターゲットとされている血管新生の抑制を介して、ガンの進行を抑えることが示唆された。

ローズマリーは香辛料や飲料として利用され、一般的にリラックス効果によるストレス軽減が期待されており、ガンの民間療法で用いられる場合もある。しかし、その効果の有用性は、経験的実例に基づくものが多く、科学的根拠が十分に示されているとは言い難いものもある。本成果より、ローズマリーの抗がん作用の一つとして、カルノシン酸による精神的ストレスでのガン進行抑制が考えられる。しかし、実験が計画通り進まず、生体内への影響を検討することができなかった。今後は精神的ストレスを負荷した実験動物モデルでのカルノシン酸の影響を検討する予定である。

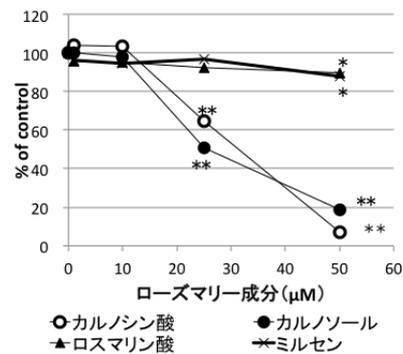


図 1. ローズマリー成分の細胞増殖への影響 (n=4)

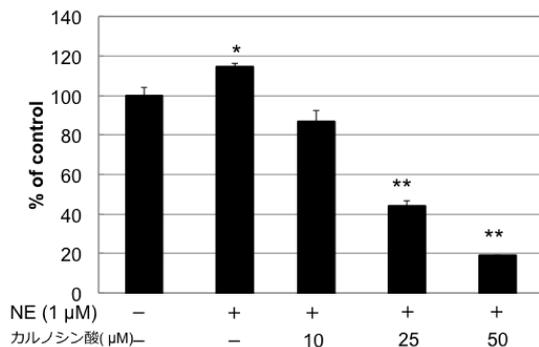


図 2 カルノシン酸のノルエピネフリン刺激による細胞増殖増大への影響 (n=4)

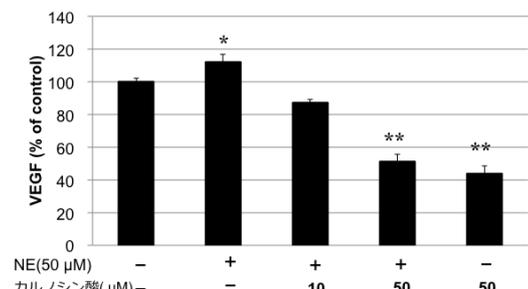


図 3 カルノシン酸のノルエピネフリン刺激による VEGF 発現量への影響 (n=3)

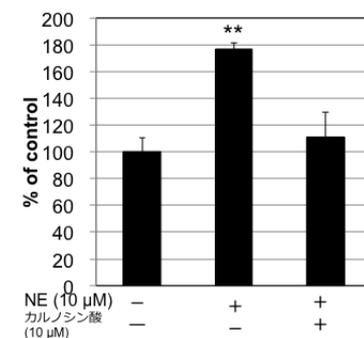


図 4 カルノシン酸のノルエピネフリン刺激による VEGF の mRNA 発現量への影響 (n=3)

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Dunnett's test  
NE: ノルエピネフリン

(参考文献)

- 1) Kayashima T and Matsubara K, BBB, 76(1), 115-119 (2012)
- 2) Premal H T *et al.* Nature Med., 12(8), 939-944 (2006)
- 3) Susan K.*et.al.*, Clinical Cancer Research, 45(14), 4514-4521 (2003)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

河原咲子、萱島知子、松原主典「ローズマリー成分の卵巣腫瘍細胞に対する抑制効果」日本家政学会第66回大会(北九州国際会議場) 2014年5月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

萱島 知子 (Tomoko Kayashima)

佐賀大学 文化教育学部 准教授

研究者番号：90452599