

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670321

研究課題名(和文) 分子標的癌予防の実用化に向けて；安全かつ効果的な癌予防ジュースの創製の試み

研究課題名(英文) Towards realization of molecular-targeting cancer prevention; an attempt to develop safe and effective juice for cancer chemoprevention

研究代表者

増田 光治 (MASUDA, Mitsuharu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：10305568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：提供された種々の天然果汁ジュースを、大腸癌予防を目的として、“分子標的癌予防”の概念に基づいたRBタンパク質再活性化による癌細胞増殖抑制能及び、発癌リスク因子である炎症を抑える抗炎症能について評価した。

その結果、既に含有する成分で癌予防効果が報告されているジュースを含む複数のジュースが、大腸癌細胞に対する細胞周期G1期停止とRBタンパク質活性化による細胞増殖抑制効果や抗炎症能を有することを見いだしたが、他の多くのジュースはこのような性質を持ち合わせていなかった。今後はスクリーニングを広げることにより、さらに理想的なジュースの創製に近づきたい

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effects of a variety of natural fruit juices on inhibitory activity of cellular proliferation by reactivating RB function and anti-inflammatory ability based on the concept of “molecular-targeting cancer prevention” to prevent colon cancer.

As the results, a part of fruit juices showed growth-inhibitory activity by G1-phase arrest with reactivation of RB protein. Moreover, several juices also showed anti-inflammatory effects. However, most of juices did not show these effects. We would like to find the more ideal juices for “molecular-targeting cancer prevention”.

研究分野：がん予防

キーワード：癌予防 大腸癌 天然物

1. 研究開始当初の背景

RB 遺伝子は最初の癌抑制遺伝子として遺伝性網膜芽細胞腫家系の解析から同定された。その後の研究で、多くの悪性腫瘍においても、種々の癌遺伝子の活性化や種々の癌抑制遺伝子の失活の結果、いくつかのサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の活性化により RB タンパク質がリン酸化型になることにより失活することが明らかとなった。その RB タンパク質の失活により、転写因子の E2F が活性化され、細胞周期の G1 後期で促進的に働くことにより発癌に至ることが知られている。研究代表者の教室では、シスメックス社に依頼し、CDK 活性を定量する装置の開発を行った。それを用いて、食道癌、胃癌、大腸癌で、隣接する正常組織と CDK2 活性を比較したところ、約 8 割の癌組織において、CDK2 の活性化が見られ、実際に RB タンパク質が失活することにより発癌に至っていることが明らかとなった。

例えば、RB 遺伝子と共に代表的な癌抑制遺伝子である p53 においても、その失活が CDK 阻害因子である p21 を転写レベルで減少させ、その結果 RB タンパク質が不活性化型になり発癌に至る経路が証明されている。このように、現在知られている多くの癌抑制遺伝子の失活や癌遺伝子の活性化は、最終的に RB タンパク質を不活性化型にすることで発癌に至ると考えても過言ではない(図 1)。

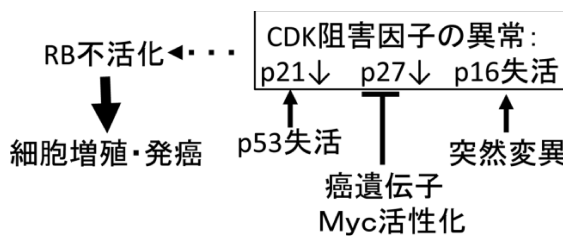


図1 RBタンパク質の質的異常と発癌

研究代表者の研究室では、上述のように RB が発癌抑制に最も重要な分子であることを示し、ビタミン D3、フラボノイドやカロテノイドなどの研究から種々の機序を介して RB

を再活性化させる癌予防食品成分を数多く見出して報告してきた (日衛誌 2011; 66, 3-12)。また、非常に少ないが、搾汁した果汁ジュース(以下ジュース)が癌細胞増殖抑制効果や細胞増殖に係る遺伝子発現変動効果を有するという報告があり (Anticancer Res. 2007; 27, 937-48) 研究代表者も、共同研究先の食品企業から提供された種々のジュースを用いて、同様の結果を得つつある。

疫学研究においては、緑茶、大豆や大豆製品に代表されるような野菜や果物など特定の食材・食品群の摂取と発癌率の低下の相関関係を示す重要かつ有用なデータが多く存在する。しかし、それらを受けて行われた多くの基礎研究は研究が比較的容易な単一成分を用いることが多かった。また、それらの研究で明確な有効性、作用機序が報告されている単一成分の濃度は非常に高く、疫学データを元に食材から単離された成分であるにも関わらず、それだけの量を元の食材から摂取しようとする毎回は非現実的な量を摂取しなければならないという矛盾を生じている。

その他に、癌予防物質による介入試験の報告は世界的にもまだ少ない。これは、抗酸化能を有する β -カロテンの失敗に代表されるように、単一癌予防成分の大量投与はむしろ危険であることが明らかとなったことも大きく影響しているが (J. Natl. Cancer Inst. 1996; 88, 1560-70) 今後も単一成分の大量投与による予防は副作用のリスクから現実的でないように思われる。また、同様の観点から、癌予防物質も今後は薬剤と同等の安全性試験の必要性が求められ、膨大なコストが掛かることが予測できる。この点に関して、申請者の所属する研究室では“分子標的併用予防”という概念を提唱し、複数の癌予防成分をそれぞれ低濃度で併用することで副作用のリスクを軽減し、相加相乗的な効果を期

待する方法を提案・研究している。

すなわち、日常的に摂取しているジュースであれば安全性が保証されることに加えて、ジュースに少量ずつ多種類含まれる分子標的癌予防成分の併用効果が期待できる。更に、単独でも摂取しやすいジュースという形態や化学合成物質を含まないことは、癌予防という長期にわたる摂取でも摂取者の心理的抵抗感を減らすなど、安心して摂取し続けられるというメリットがある。食という日常生活を介して、科学的に、かつ廉価に、疾病を予防しうることは大きな利点である。

2. 研究の目的

(1) 上記を踏まえて、RB を活性化させる種々の癌予防食品成分を含む果実・野菜から搾汁したジュースにより、細胞レベル、動物レベルで RB が活性化され癌予防効果を示すことを実証する。それにより、癌予防ジュースという多くの成分が混合した食材を総合的に評価し、安全な分子標的予防の実効性を証明し、従来には無かった安全な分子標的ヒト大腸癌予防介入研究を行うための根拠を示す(図2)。

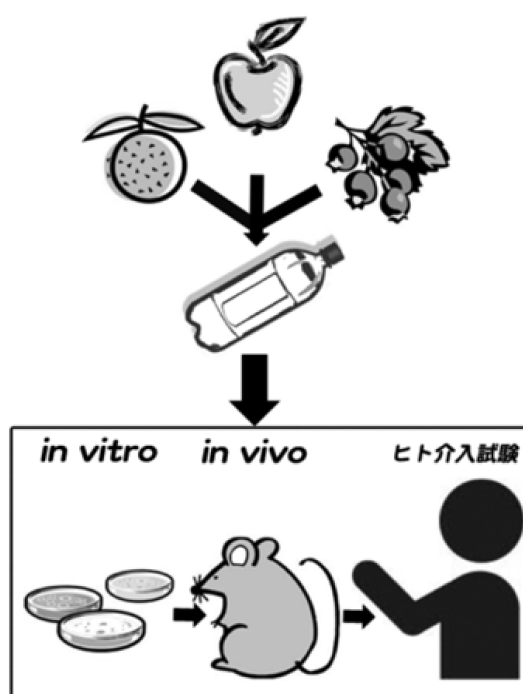


図2 ジュースによる癌予防:
in vitroからヒト疫学研究まで

(2) 更に、明確な根拠に基づく癌予防物質の併用など実際にヒトへ用いる根拠有る癌予防法の先駆けとなり、他臓器の癌における予防介入試験にも応用できる癌予防のモデル研究を目指す。この研究を完成させることにより、その後の癌予防介入研究に入る根拠を示し、最も安全かつ合理的な癌予防ジュースの創製を目指す。

3. 研究の方法

日本でも罹患率が高い大腸癌の予防を最初の目標に設定し、*in vitro*でヒト大腸癌細胞株によるコロニー形成抑制試験を用いてRB を活性化させる遺伝子群の発現増強とコロニー形成抑制効果の有無を検証する(図3)。



図3 *in vitro*、*in vivo*とヒト介入試験を繋ぐ遺伝的要因

また、大腸癌では炎症が発癌プロモーションに強く関与していることから、このジュースが抗炎症能を合わせ持つかどうかについても検討する。

使用する大腸癌細胞株は、大腸癌で変異が多いことが知られている Wnt- カテニン経路の異常を踏まえて、同経路の関連遺伝子変異を持つ細胞株を優先的に用いた。

(1) コロニー形成抑制試験:

フィルター処理した各ジュースを、それぞれ細胞培養培地へ添加(コントロールは PBS を添加)し、一定期間培養した後、形成されたコロニーを固定・染色後、コロニー数をカ

ウントしてコロニー形成抑制能を比較した。

(2)細胞周期解析：

各ジュースについて、フローサイトメーターを用いて細胞周期への影響を検討した。フィルター処理した各ジュースを、それぞれ細胞培養培地へ添加（コントロールはPBSを添加）培養した後、フローサイトメーターで細胞周期を測定し、G1期停止作用を持つジュースを選別した。

(3)RBタンパク質のリン酸化状態の検証：

細胞周期解析でG1期停止作用を認めたジュースについて、Western blottingによりRBタンパク質のリン酸化状態を検証した。フィルター処理した各ジュースを、それぞれ細胞培養培地へ添加（コントロールはPBSを添加）し、72時間まで培養した細胞を溶解させタンパク質を回収し、Western blottingを行った。

(4)抗炎症能評価：

各ジュースについて、TNF 添加によるIL-6誘導を抑制する濃度を指標として抗炎症能を評価した。

プレ培養後、無血清培地に交換し、フィルター処理したジュースを添加（コントロールはPBSを添加）して1時間培養した。その後、TNF を添加して更に1時間培養した細胞を溶解してtotal RNAを回収し、real time RT-PCRでIL-6を測定した。

4. 研究成果

今回企業より提供された20数種類のジュースを評価した。

(1)コロニー形成抑制試験：

コロニー形成抑制試験を行った結果、コロニー形成を抑制したジュースもあれば、抑制しないジュースもあることを見いだした。

コロニー形成抑制能は、大きく3つのグループ、すなわち全く作用を示さないか非常に

弱い作用しか示さないグループ1、強い抑制作用を示すグループ3と、グループ1と3の中間の作用を示すグループ2に分けることが出来た。

特定成分を抽出せずとも一般的なジュースの一部が癌細胞増殖抑制を示すことを見いだした。

(2)細胞周期解析：

細胞周期への影響を判定しやすくするため血清除去により同調培養し、血清を再添加する時にジュースを添加し、細胞周期解析を行った。その結果、比較的高い添加量で3種類のジュースによりG1期停止が観察されたが、コロニー形成抑制試験でグループ2と3に分類した多くのジュースでG1期停止が認められなかった。これは、ジュースは種々成分の混合物であることから、細胞増殖抑制に係わる成分も種々存在し、その結果、G1期停止作用が強いジュースとそれ以外の作用が強いジュースの両方が存在するためと考えている。

(3)RBタンパク質のリン酸化状態の検証：

ジュースを添加し培養した細胞から抽出したタンパク質を用いてWestern blottingによりRBタンパク質のリン酸化状態を検証した。その結果、一部のジュース添加によるRB脱リン酸化を確認できたが、他のジュースでは確認できなかった。

(4)抗炎症能評価：

一部のジュースは炎症性サイトカインIL-6の誘導を抑制した。一方、抗炎症能を持たないジュースも数多く存在した。

このように、大腸癌予防の可能性をもつ癌予防効果を持つジュースの候補をある程度は選別することができた。同時に、癌予防成分を抽出したり、また強化すること無く、ジ

ユースのままでも癌予防効果を評価できる可能性を示した。

今後も評価系の改良は必要であるが、更にスクリーニングを重ね、最終的に選択されたジュースが *in vivo* 化学発癌モデルを用いた前臨床試験でも有効性を示せば、ヒト大腸癌への疫学介入に提供できる安全で作用機序の明確なツールを供給するモデル研究となり、実際に医療福祉に貢献することが出来ると期待している。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

増田 光治 (MASUDA Mitsuharu)

京都府立医科大学・医学研究科・博士研究員

研究者番号：10305568

(3)連携研究者

石川 秀樹 (ISHIKAWA Hideki)

京都府立医科大学・医学研究科・特任教授

研究者番号：30351795