

## サブテーマ1: ウイルス発がんの機序解明と予防・治療法の創出

## 小テーマ1-3: ウイルス発がん予防のための高機能性食品の探索及び有用性の解明

## c) ATLの発症・進展予防効果を有する機能性食品の探索

サブテーマリーダー 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科：教授 坪内博仁

研究従事者 宮崎大学医学部：教授 片岡寛章、教授 岡山昭彦、教授 森下和広、主任臨床検査技師 山本成郎

宮崎県食品開発センター：主任技師 酒井美穂、主任研究員 柚木崎千鶴子

宮崎県産業支援財団：研究員 赤松絵奈、甲斐博久

宮崎大学農学部：助教 山崎正夫

京都薬科大学：教授 吉川雅之、松田久司、森川敏生

## 研究の概要、新規性及び目標

## ①研究の概要

ATL発症・進展予防に効果のある高機能性食品の開発を目的として、宮崎県産農作物が有するHTLV-1感染細胞増殖抑制活性、ATL細胞増殖抑制活性、HTLV-1産生・感染抑制活性を評価し、その作用機序の解明や機能性成分の同定を進める。さらに、生体内でATL並びにHTLV-1ウイルスに対する抗腫瘍効果、抗ウイルス効果を評価するための*in vivo*モデル系を構築し、*in vitro*で有用であった食品成分の*in vivo*における効果を評価する。

## ②研究の独自性・新規性

ATLを対象に各種農作物が有する抗腫瘍効果や抗ウイルス効果について網羅的な検討をした例は他にない。宮崎県産の農作物について、ATL細胞、HTLV-1感染細胞の増殖抑制活性を網羅的に評価し、スクリーニングすることで、ATL予防効果を有する新規機能性素材の発見や県独自の素材を用いた高機能性食品の開発が期待される。また、*in vitro*系で高い機能性が見出された食品について実際の機能を確認するために*in vivo*モデル系を構築している。使用するマウスは免疫不全NOGマウスを用いている。本実験動物モデルを用いたATLやHTLV-1ウイルス感染に対する食品機能の解析は、わが国では初めての試みである。

## ③研究の目標

- ・フェーズⅠ：県内農作物のATL細胞増殖抑制活性を評価し、活性の高い農作物を見出す。また、*in vitro*でのHTLV-1産生・感染抑制活性測定系および*in vivo*での抗腫瘍効果測定系の構築を目指す。
- ・フェーズⅡ：ATL細胞増殖抑制活性、HTLV-1産生・感染抑制活性が強い農作物について、その有効成分の同定を行うと同時に細胞増殖抑制への作用機序を解明する。具体的には、その作用機構として、アポトーシス及び細胞周期停止関連蛋白質の発現解析を行い、さらには*in vivo*動物実験で検証し、ヒトへの応用の可能性を検討するための基礎データを集積する。
- ・フェーズⅢ：ATL及び肝がん発症・進展予防に効果のある高機能性食品の開発を目指す。

## 研究の進め方及び進捗状況

60作物283品種の農作物を可食部、皮、種などの部位ごとに分類した約2000試料にもおよび宮崎県産農作物サンプルライブラリーについて、DPPHラジカル消去活性法により抗酸化活性を測定した。活性の高い農作物について、ATL細胞株を用いて、がん細胞増殖抑制活性を評価し、ATL予防に貢献する可能性のある高機能性農作物をスクリーニングした。この結果、ブルーベリー葉、ニガウリ種子、5種のハーブ類、大豆イソフラボンが選抜された。

ブルーベリー葉については、がん細胞の増殖抑制活性と共に正常細胞への影響についても検討した。また、高度免疫不全マウス（NOGマウス）にHTLV-1キャリア由来の感染細胞を腹腔内投与することにより、HTLV-1感染モデルマウスの作出に成功し、このモデルマウスにブルーベリー葉を摂食させ、ATL発症抑制効果についても検討した。

ニガウリ種子については、活性成分の単離・同定を行った。溶媒抽出、カラム分画を行い、各フラクションの細胞増殖抑制活性を評価した。また、ニガウリ種子に含まれる高極性物質として、糖タンパクであるレクチン（momordin など）が多数単離報告されており、細胞増殖抑制活性との関係を検討し、水抽出物の活性本体がレクチンであるかをTLCおよびSDS-PAGEで見極める。実験がほぼ終了し、解析した結果、目標どおりの進行状況にある。

ハーブ類については、5種のハーブ（ペパーミント、ローズマリー、スペアミント、バジル、及びレモンバーム）より、細胞増殖抑制活性を評価した。さらに、蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析や細胞内抗酸化物質であるグルタチオンの分析により、細胞増殖抑制効果に関する作用機序解析を行った。

大豆イソフラボンについては、作用機序解明と共に、NOGマウスにATL細胞株を生着させたATLモデルマウスを用いて、腹腔内投与による効果を検証した。

## 主な成果

## 具体的な成果内容：

【ブルーベリー葉】非常に高いATL細胞増殖抑制効果を見出した。またATL細胞と比較して、正常細胞への影響は小さいことを確認した。さらに、HTLV-1感染モデルマウスにブルーベリー葉を摂食させたところ、非摂食群と比較してプロウイルスコピー数が減少する傾向があり、ATL発症には、ウイルス量が大きく関与することから、ATL発症への予防効果が示唆された。

【ニガウリ種子】有機溶媒により抽出分画を行い、ニガウリ種子油中には大腸がん予防に有用である報告がある $\alpha$ -エリオステアリン酸が多量に含まれることが分かった。ATL細胞増殖試験を行ったところ、 $IC_{50}$ が8.86 mM (=2.46  $\mu$ g/ml) と強い活性が認められた。そのほかにもメタノールエキスを順相HPLCで分画し、複数の精製物を得ているが、これらについても脂肪酸である可能性が示唆されている。

水抽出物については、熱処理により失活したため、活性成分は蛋白質であることが示唆された。SDS-PAGE、MALDI-TOF-MSにより解析したところ、活性成分はmomordin-Iと同定した（ $IC_{50}=3.23 \mu$ g・protein/ml）。これらの結果から、ニガウリ種子のATL細胞増殖抑制活性はmomordin-Iが、寄与していると思われる。さらに、正常細胞(PBMC)には、強い細胞障害性は認められなかった。

[ハーブ類] ローズマリーアルコール抽出物において、ローズマリー抽出物が ATL 細胞にアポトーシスを誘導することを見出した。更にその有効成分として、ポリフェノールの 1 種であるカルノソールを同定した。カルノソールの作用機序解析を行ったところ、カルノソールは細胞内グルタチオンを減少させることによって、アポトーシスを誘導することを明らかにした。

[大豆イソフラボン] 大豆イソフラボンの 1 種であるゲニステインが細胞周期を G2/M 期で停止させることによって、ATL 細胞の増殖を抑制することを明らかにし、その作用機構として、p53 タンパクの発現誘導の関与が示唆されていることを初めて見出した。ATL モデルマウスにゲニステインを腹腔内投与したところ、コントロールに比べ約 6 分の 1 に縮小し臓器浸潤性も低下した。病理組織像においても細胞増殖能を示す MIB-1 の発現が弱くなりかつ細胞死が多く見られたことから、ゲニステインは ATL 細胞に対して抗腫瘍効果を有することが示唆された。

特許件数: 4件

論文数: 6件

口頭発表件数: 10件

## 研究成果に関する評価

### 1 国内外における水準との対比

食品成分とその抗がん作用についての研究は盛んに行われているが、ATL に及ぼす農作物・食品成分の検討はほとんど見られない。特に、地域農産物の ATL 細胞増殖抑制活性を、可食部・非可食部にわたるまで網羅的に評価している例は少なく、その結果、新規に高機能性素材を発見するに至っている。

また、ブルーベリー葉、ニガウリ種子、ハーブ類及び大豆イソフラボンについて、ATL 発症予防・治療などに有効である可能性が示されたのは本報告が初めてであり、極めて新規性が高い。ローズマリー、ゲニステインについては、アポトーシス誘導や細胞周期など、細胞増殖抑制効果に係る作用機序解明にも至っており、学術的にも高い水準の成果と言える。

NOG マウスを用いた HTLV-1 感染モデルマウスや ATL モデルマウスの作出は、これまでに世界的にも例がなく、ATL 発症予防・治療効果を検証するモデルとして非常に有用である。これらのモデルを用いて検証した農作物についても、ATL 発症予防に貢献する食品としての期待度も高い。

### 2 実用化に向けた波及効果

県内農作物からATL予防候補食品を見出しており、これらの農作物についてはその付加価値の向上とともに高機能性食品としての展開が期待される。がん予防効果を有する高機能性食品の開発が期待される。特にブルーベリー葉については、ウイルス抑制効果が期待される結果が得られており、HTLV-1ウイルス量がATL発症の大きな要因とされることから、日常より食品として摂取することによりウイルス量を低減させ、ATL発症リスクを低減することができれば、HTLV-1キャリアへの福音となる。作用メカニズムの解明も進んでおり、エビデンスに基づいた高機能性食品の提案が期待される。

### 残された課題と対応方針について

培養細胞系を用いた *in vitro* 試験での効果の部分もあり、今後 HTLV-1 キャリアモデル動物を用いた *in vivo* 試験やヒト臨床試験を行い、効果を実証しなければならない。ブルーベリー葉の抗ウイルス効果については、平成20年10月からスタートした「研究開発資源活用型」(JST:平成23年3月まで)により、*in vivo*系による効果の検証を行った上で、ヒト臨床試験を実施する方針である。

有効成分の同定が充分でない部分もある。創薬シーズとなりえる可能性の高い骨格をもつ化合物を単離すべく、活性成分の単離・同定を進める。

がん予防を効果として謳う食品は、販売することができない。これまでの研究成果を広く積極的に公開していくことも、これらの研究成果を実用化研究へと結びつけていくための課題と考える。

	JST負担分(千円)							地域負担分(千円)							合計
	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	
人件費	0	2,853	3,624	6,197	5,321	2,426	20,421	0	10,647	0	0	0	0	10,647	31,068
設備費	0	0	0	231	0	0	231	0	0	0	0	0	0	0	231
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	300	2,190	3,800	11,263	11,894	2,708	32,155	0	1,447	0	0	0	0	1,447	33,602
旅費	0	40	108	275	250	114	787	0	0	0	0	0	0	0	787
その他	27	46	32	433	362	190	1,090	0	0	0	0	0	0	0	1,090
小計	327	5,129	7,564	18,399	17,827	5,438	54,684	0	12,094	0	0	0	0	12,094	66,778

代表的な設備名と仕様 [既存(事業開始前)の設備含む]

JST負担による設備: LC/MS/MS、MALDI型TOF-MS、マイクロプレートリーダー、HPLC、ラック

トケース

地域負担による設備: NMR