

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26420801

研究課題名 (和文) 燃料作物ジャトロファの安全性評価に基づく抗発がんプロモーション活性物質の取得

研究課題名 (英文) Development of anti-tumor-promoting reagent based on the safety assessment of fuel crop *Jatropha curcas*

研究代表者

梶山 慎一郎 (KAJIYAMA, Shinichiro)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20243496

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要 (和文) : ナンヨウアブラギリ (*Jatropha curcas*) はその種子中にバイオディーゼルの生産に適した流動性の高い中性脂質を 50%以上含み、次世代のバイオ燃料の原料作物として期待されている熱帯性灌木である。一方本植物は油脂以外に二次代謝産物として発がんプロモーション活性を持つホルボールエステル類を生産する。我々は、本植物の安全性を評価する過程でジャトロファの代謝産物中に、既存の強力な発癌プロモーション活性物質であるPMAの作用を逆に抑制する作用を持つ代謝産物が存在することを示唆する結果を得た。本研究では、この抗発がんプロモーション活性物質の化学的性状および生理活性について知見を得た。

研究成果の概要 (英文) : *Jatropha curcas* is a tropical shrub which contains more than 50% (w/w) liquid neutral lipid suitable for biodiesel production in its seeds and is expected as a raw crop for next generation biofuels. On the other hand, this plant produces phorbol esters having tumor promoting activity as a secondary metabolite other than lipids. In the process of evaluating the safety of this plant, we found that this plant also contains metabolites that act as the counteractant of PMA, which is known as a potent tumor promoter. In this study, we gained insights on the chemical properties and physiological activities of this anti-tumor promoting metabolite of this plant.

研究分野：生物有機化学

キーワード： *Jatropha curcas* phorbol ester anti-tumor promoter

1. 研究開始当初の背景

中南米原産落葉低木であるジャトロファ (ナンヨウアブラギリ *Jatropha curcas*) は、その種子中にバイオディーゼルの生産に適した流動性の高い中性脂質を50%以上含み、病害虫に強く、半乾燥地や貧栄養土壌でも栽培可能であることから、次世代のバイオ燃料としてすでにEUや東南アジア・アフリカなどで、その試験栽培と生産性や経済性の実証研究が開始されている¹⁾。しかし、本植物は、多くの利点を有する一方、実用化するにあたっては留意すべき問題点も併せ持っている。すなわち、本植物の種子には油脂以外に、発がんプロモーション活性を有するホルボールエステル類を含み、生産者や消費者の健康に与える影響が懸念される点である²⁾。

発がんプロモーターとは、現在、化学発がんの発生機構として広く受け入れられている化学発がん多段階説 (multi-stage theory of carcinogenesis) において、事前にUVや化学物質などによってDNAレベルでの損傷を受けた細胞 (イニシエーションを受けた細胞) に対して癌化を促進する物質のことであり、それ単独では発がん活性を示さないが、遺伝子損傷を受けた細胞が複数回繰り返し暴露することによって確実に癌化を引き起こす物質である。したがって、ホルボールエステル類を含有するジャトロファの大規模栽培は、後に栽培地域の新たな環境問題や健康問題となる可能性を有している。報告者らはこのような観点からこれまでに、実際にジャトロファ栽培者や、バイオディーゼル生産者が触れる機会の多い粗油や搾油滓、および種子、根、茎、葉などの様々な器官に存在するホルボールエステルの機器分析を用いた定性・定量分析と、マウス皮膚発がん試験を用いた発がんプロモーション活性について評価し報告してきた。そしてこの過程で以下に示す大変興味深い現象を見いだした。すなわち、①ジャトロファ種子粗抽出物の発がんプロモーション活性は、ホルボールエステルの定量結果から推察されるものよりも格段に低いこと。②ジャトロファ種子粗抽出物は、既知の強力な発がんプロモーターであるPMA (phorbol-12-myristate-13acetate) の作用を打ち消す効果があること。③ジャトロファ種子粗抽出物中には、6種のホルボールエステル分子種が同定されているが、これ以外にも代謝産物を複数種類含有することの3点である。これらの実験結果は、ジャトロファ種子粗抽出物に、PMAによる化学発がんを抑制する作用を持つ代謝産物が存在することを示唆するものであった。

2. 研究の目的

上記のような研究背景から本研究では、ジャトロファ種子粗抽出物に含まれる発がんプロモーション抑制物質の化学的性状を明らかにすると同時に、各種 *in vitro* アッセイ系に供することにより、その抑制様式を明

らかとすることを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) ホルボールエステル非生産株の活性の検討

PMAの発癌プロモーション作用を抑制する活性が、ジャトロファのどのような代謝産物に由来するのかについて知見を得る目的で、ホルボールエステルを生産するジャトロファ通常株と生産しない非生産株の活性を比較した。方法としては、ジャトロファの種子を破碎後、まずヘキサンで抽出することにより中性脂質を取り除き、さらにアセトン抽出することにより抽出物を得た。これを各種クロマトグラフィーにより分離を行い、得られた各画分に関してマウス発がん2段階試験を用いて、画分単独投与群および、PMAとの共投与群の活性の評価を行った。また、ジャトロファのホルボールエステルが競争的にPMAの活性を阻害している可能性を検討した。

(2) EBV-EA 関連遺伝子の発現解析

(1)の結果(後述)から、ジャトロファ抽出物によるPMAの活性阻害は、ジャトロファの生産するホルボールエステルによる競争的な阻害である可能性が強く示唆されたため、次にマウス二段階発がん試験と高い相関を示すことが判っているRaji細胞のEBV-EA (Epstein-Barr virus 早期抗原) 誘導試験により、ジャトロファのホルボールエステルとPMAとのEA誘導における相違を確認した。具体的には、EBVに潜伏感染しているRaji細胞に、被験試料を添加後、24時間培養して、細胞を回収し、RNAを抽出し、cDNA化してRT-PCRを行うことによりコンパレイティブCT法によりEA関連遺伝子(BRLF1)のGAPDHとの相対発現量の解析を行った。

(3) 細胞増殖作用の検討

発がんプロモーターは、DNAに不可逆な損傷を受けた細胞を、がん細胞へと導くが、がんは進行に伴い、発生したがん細胞が無秩序に増殖する腫瘍形成の過程と、がん細胞が形態変化を起こし、組織の境目に接着することにより、浸潤し血管に入ったがん細胞がさらに広範囲の組織に転移する過程に大別される。そこでジャトロファのホルボールエステル類がこのがんの進行過程にどのように作用しているかについて検討するため、細胞増殖活性について検討を行った。具体的には、細胞濃度 5×10^3 乗 cells/well に調整したRaji細胞に、ジャトロファのホルボールエステル、PMAおよび、これらの混合物試料を添加した後、37°C、5%CO₂存在下で静置培養し、24時間後、細胞の還元活性を発色法で検出し、コントロールと比較することにより増殖活性を算出した。

(4) 細胞形態変化誘導活性及び細胞接着・コロニー形成能の検討

(2) および (3) の実験の過程で、PMA および、ジャトロファのホルボールエステルを添加した実験区において浮遊細胞である Raji 細胞に形態変化が生じ、さらに形態変化したものには接着性を示すものが存在することを見出した。細胞の接着性は、がんの浸潤過程に関与すると考えられるためこれらについて PMA および、ジャトロファのホルボールエステルの活性の比較を行った。具体的には、ガラスボトムプレートに細胞濃度 1×10^5 乗個 cells/well に調整し、試料を添加した後、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で静置培養し、24 時間後、Alexa 488 ファロイジンおよび DAPI を用いて細胞骨格の可視化を行い、倒立蛍光顕微鏡で観察し接着細胞と形態変化細胞の数をカウントした。さらに、培養時間を 2 週間まで延長し、コロニーの様態を観察した。

4. 研究成果

ホルボールエステルを生産するジャトロファ通常株 (通常株) とホルボールエステル類を生産しないジャトロファホルボールエステル非生産株 (無毒株) の活性を比較では、PMA とホルボールエステル非生産株抽出物の混合物において初めて腫瘍形成が確認された時期は 5 週目であり、これは、PMA のみ供与した場合とほぼ同時期であった。また、最終腫瘍形成率も PMA 塗布群に近い結果であった。これはジャトロファ無毒系統抽出物が PMA の作用を抑制していないことを示すものであり、有毒株抽出物が PMA の作用を有意に抑制することを合わせて考えると、抑制効果がジャトロファのホルボールエステル類に起因していることを示唆するものである。また、精製したジャトロファのホルボールエステルにおいても拮抗作用が観察された。これらのことから、ジャトロファのホルボールエステルは PMA の作用に対して拮抗的に働くことが示唆された。

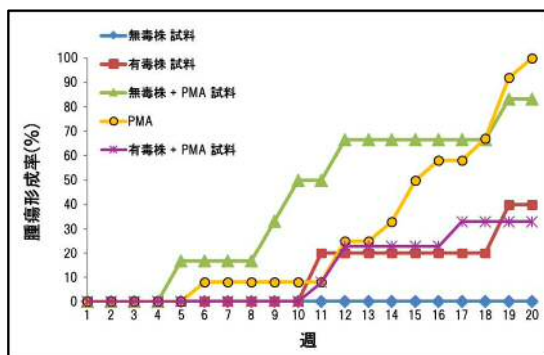


図 1 : マウスの腫瘍形成率の変化

縦軸は各試験区でのマウスの総数に対する腫瘍形成が確認されたマウスの割合、横軸は週を示している。プロモーション開始から実験終了までの期間における試験区ごとのマウスの腫瘍形成率の推移を示した。

次に EBV-EA 関連遺伝子の発現解析では、PMA および、ジャトロファのホルボールエステルともに EA-D の発現を誘導することが示され、ジャトロファホルボールエステルは本試験では PMA の約 1/5 の誘導活性を持つことが示された。

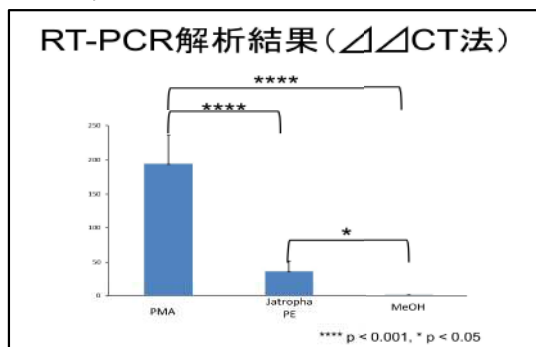


図 2 : ジャトロファホルボールエステルの EBV-EA 関連遺伝子の発現誘導

参照遺伝子に GAPDH を用いたコンパレイティブ CT 法 (ΔΔCT 法) により相対発現量を表記した。

また、先述のごとく本試験の過程でホルボールエステルを添加した実験区において浮遊細胞である Raji 細胞に形態変化が生じることが判明した。

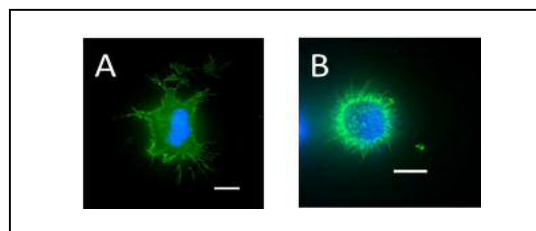


図 3 : ホルボールエステルによる Raji 細胞の形態変化

A: ジャトロファホルボールエステル 1ppm 添加 B: コントロール
緑色: アクチン染色 (Alexa488 Phalloidin)、青色: 核染色 (DAPI)
スケールバー: $10 \mu\text{m}$

そこで、がん化に関与すると考えられる細胞増殖能、形態変化誘導能および、コロニー形成能について調査した。その結果、細胞増殖活性においてはジャトロファのホルボールエステルは、供試した濃度範囲でほとんど活性は見られず、かつ 1ppm のジャトロファホルボールエステルを PMA と同時投与することにより PMA の細胞増殖活性を約 1/5 にまで低下させることが明らかとなった。このことは、先の EBV-EA 関連遺伝子の発現解析の結果と一致した。(図 4)

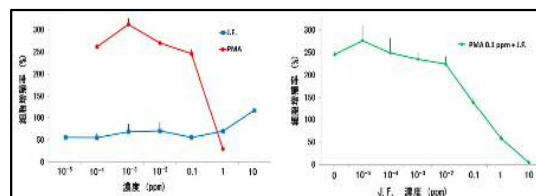


図 4 : ホルボールエステルの細胞増殖効果

左: ジャトロファホルボールエステル (J.F) および、PMA を添加した際の細胞増殖を無添加 (コントロール) の場合を 100% として表記。右: PMA 0.1ppm に J.F の濃度を変えて添加した場合の細胞増殖。

細胞の形態変化に関しては、PMA もジャトロファのホルボールエステルも接着細胞数、形態変化している細胞数が濃度依存的に増加した。このことから、JF はがん細胞の形態変化を誘導する活性はPMA と同等であることが判った。(図5)

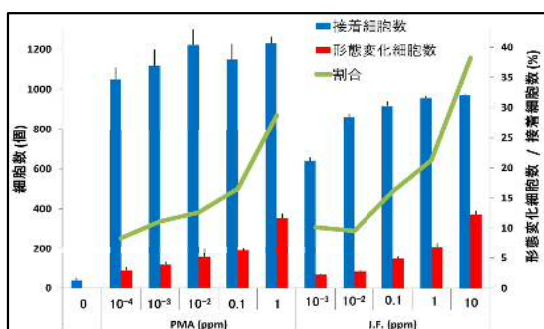


図5：ホルボールエステルの細胞形態変化誘導

次に細胞集合体形成を観察では、PMA 終濃度 0.1 ppm、ジャトロファのホルボールエステル終濃度 1 ppm、双方同時処理および試薬処理なし(それぞれ n=4) の条件で Raji 細胞に試薬処理し、2 週間後の細胞集合体形成を観察した(図6)。その結果、ジャトロファのホルボールエステルは試薬処理なしのネガティブコントロールの結果と同等であり、細胞集合体形成に影響を与えなかった。また、PMA は 1/10 の濃度でも有意に細胞集合体の形成を促進しており、この活性は PMA にジャトロファのホルボールエステルを同時処理しても抑制されなかった。

以上のことから、ジャトロファのホルボールエステルは PMA と比較して、がん化における細胞増殖に対する関与が低いこと、形態変化に関しては、PMA と同等の活性を有していること、細胞集合体の誘導においては、ほとんど活性が見られないこと、さらに、PMA による細胞集合体形成を抑制しないこと(図6) から、形態変化およびその後の集合体形成に関しては別の作用様式を有していることが示唆され、同じホルボールエステルでも作用点および、その強度に違いがあることが判った。このことは、ジャトロファのホルボールエステルが、化学発癌機構の研究に用い得る新しい分子プローブのリード化合物となりうることを示すものである。

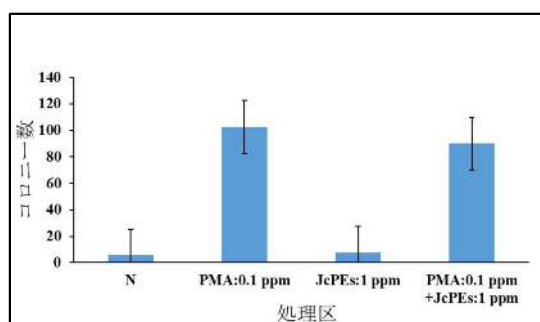


図6：細胞集合体形成の誘導活性

<引用文献>

- 1) Makkar et al. 2009 Eur. J. Lipid Sci. Technol., 111, 773-787.
- 2) Li et al. 2010, Food and Chem. Toxicol., 48, 620-625.

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3件)

① Shin' ichiro KAJIYAMA, Application of CRISPR/Cas9 genome editing system to modulate *Jatropha curcas* biosynthesis., 11th International Symposium Exploring the Global Sustainability. Mar. 21, 2018 Kobe Japan.

② 柳内知哉, 小田垣瑞穂, 高田果歩, 松川哲也, 西海史子, 名倉由起子, 柳原格, 梶山慎一郎, *Jatropha curcas* の産生するホルボールエステル類の生理活性評価., 69th 日本生物工学会大会 2017 年 9 月 東京

③ Shin' ichiro KAJIYAMA, Biological Activities of Seeds Extracts from Two Oil-Producing Plants, *Jatropha* and *Joboba*. International Symposium on Effective Use of Bioresources in Arid Land., Mar. 8, 2016 Osaka Japan.

[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

<http://www.waka.kindai.ac.jp/tea/biotech/labs/mat/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶山 慎一郎 (KAJIYAMA, Shinichiro)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20243496

(2) 研究分担者

柳原 格 (YANAGIHARA, Itaru)

大阪母子医療センター研究所・免疫部門・部長

研究者番号：60314415