

## こめトコトリエノールの癌抑制作用

宮澤 陽夫

(東北大学大学院農学研究科 機能分子解析学分野)\*

## Anti-cancer effect of tocotrienol and its mechanism

Teruo MIYAZAWA

Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

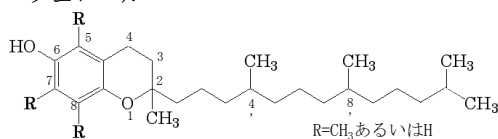
## Summary

Angiogenesis is a complex process of sprouting new capillaries from the pre-existing blood vessels. It happens in normal physiological processes, such as embryonic development, the female menstrual cycle, bone remodeling and wound healing. On the other hand, angiogenesis also plays a crucial role in many pathological conditions, including tumor growth, diabetic retinopathy, psoriasis, rheumatoid arthritis and atherosclerosis. Here the antiangiogenic effect of rice bran tocotrienol (T3) and its mechanism from the fundamental data of in vitro cell studies, DNA chip analysis, and in vivo egg and animal models are described.

血管系の異常は、血管特有の動脈硬化や糖尿病血管障害、あるいは種々の臓器の病変に密接に関係する。とくに老化性の異常な血管新生は、固形腫瘍や糖尿病性網膜症、関節リウマチと深く関わる<sup>1)</sup>。本稿では癌抑制に重要な“血管新生とその抑制”を取り上げ、“こめの不飽和ビタミンEであるトコトリエノール (tocotrienol, T3, Fig. 1) による抗血管新生作用”について、著者らの知見をまじえて紹介する。

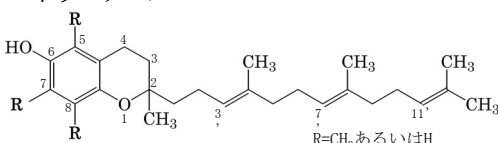
血管新生 (angiogenesis) は、既存の血管から新しい血管が形成される現象である。通常、血管新生の促進と抑制の両因子のバランスは保たれ、正常な血管は静的な状態にある。しかし、バランスが促進側に傾くと、異常な病的な血管新生が惹起される。古くは、血管新生は創傷治癒部位や子宮内膜などの限られた部位に認められるとされた。1970年代に Judah Folkman らは、血管新生と腫瘍の関わりとして“腫瘍がある一定以上の大きさ (1~2 mm<sup>3</sup>) になるには、腫瘍に栄養成分や酸素を供給するため血管新生が必要”であることの説を提言し<sup>2)</sup>、血管新生の抑制による制癌の可能性がはじめて示唆された。1980年代以降、血管内皮細胞の培養系確立に伴い、血管新生研究が本格化し、種々の血管新生促進因子 (血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 血小板由来内皮細胞増殖因子 (platelet derived endothelial cell growth factor, PDECGF), 繊維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor, FGF), 腫瘍壊死因子 (tumor necrotic factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), インターロイキン (interleukin 8, IL8)) が次々と同定された。現在、欧米を中心に、血管新生をターゲットとする幾つかの薬剤の開発が第II相や第III相臨床試験まで進み、血管新生病の予防と治療の手段に血管新生抑制がいかに重要かが伺える。

## トコフェロール



略称名	化学名	分子式	分子量
$\alpha$ -トコフェロール	5,7,8-トリメチルトコール	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	430.7
$\beta$ -トコフェロール	5,8-ジメチルトコール	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	416.7
$\gamma$ -トコフェロール	7,8-ジメチルトコール	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	416.7
$\delta$ -トコフェロール	8-メチルトコール	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	402.7

## トコトリエノール



略称名	化学名	分子式	分子量
$\alpha$ -トコトリエノール	5,7,8-トリメチルトコトリエノール	C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	424.74
$\beta$ -トコトリエノール	5,8-ジメチルトコトリエノール	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	410.6
$\gamma$ -トコトリエノール	7,8-ジメチルトコトリエノール	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	410.6
$\delta$ -トコトリエノール	8-メチルトコトリエノール	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	396.6

Fig. 1 ビタミンE同族体の化学構造

\*所在地：仙台市青葉区堤通雨宮町1-1 (〒981-8555)

よる管腔形成、ペリサイトの接着と血管の成熟化などの一連のプロセスで進む。一方、腫瘍の血管は、ペリサイトの欠如（あるいは減少）により、血管新生因子（とくに VEGF）の影響を常に受けやすい状態にある。このため、未成熟な新生血管の形成が、繰り返し行われていると考えられている。腫瘍血管新生のメカニズムは、腫瘍などから分泌された VEGF が内皮細胞（とくにペリサイトが失われている内皮細胞）膜上の VEGF 受容体（VEGFR）に結合し、VEGFR のチロシンキナーゼドメインの活性化、自己リン酸化、細胞内シグナル伝達を経て、内皮細胞の増殖・遊走・管腔形成につながると考えられている<sup>3)</sup>。したがって、血管新生抑制の観点からは、VEGF は最も有望な治療標的である<sup>4)</sup>。

VEGF をターゲットとする阻害剤は、VEGF や VEGFR に対する中和抗体と、VEGFR のチロシンキナーゼのリン酸化阻害剤に分けられる。良く知られる阻害剤のひとつに、VEGF 中和活性を示すアバスタチン（VEGF モノクローナル抗体）があり、これは他の抗癌剤との併用で大腸癌の改善作用（生存期間延長効果）が示され<sup>5)</sup>、2004 年 2 月に米国食品医薬品局（FDA）に承認された。最近では、低コストや経口投与可能、安全性などの観点から、VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤への期待が高まり、薬剤開発とともに、天然成分（クルクミン<sup>6)</sup>、エピガロカテキンガレート<sup>7)</sup>、ビタミン D<sup>8)</sup>）を活用する試みがなされている。著者らは米糠などに含まれる T3 の抗血管新生活性を見出し<sup>9-11)</sup>、その機構解析や有用性を評価してきた。

T3 と通常のビタミン E であるトコフェロール（tocopherol, toc）の違いを最初に述べる。ビタミン E は、クロマン環に側鎖が結合した両親媒性化合物であり、不飽和側鎖（イソプレノイド側鎖）を持つ T3 と、飽和側鎖（フィチル側鎖）を有する Toc に分けられる。クロマン環に結合するメチル基の数や位置の違いにより、T3 や Toc にはそれぞれ 4 種類の異性体（ $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -T3 および Toc）がある（Fig. 1）。ビタミン E の生理機能としては、一般に広く知られる抗酸化の他に、細胞内シグナル伝達への影響など抗酸化のみでは十分に説明できない作用が知られるようになった。こうした作用では、Toc よりも T3 のほうが高活性である場合が多く、T3 の bioavailability への注目が高まってきている<sup>12)</sup>。近年の T3 研究として、例えば動脈硬化予防の分野では、T3 が酸化 LDL や TNF- $\alpha$  により誘導される細胞接着因子（VCAM1, ICAM1 など）の発現を抑制すること<sup>13)</sup>、protein phosphatase 2A（PP2A）を活性化することで protein kinase C（PKC）活性を抑制し、PKC に依存する血管平滑筋細胞の増殖を阻害すること<sup>14)</sup>、nuclear factor- $\kappa$ B（NF- $\kappa$ B）を阻害することでプロスタグランジン産生の主要な酵素であるシクロオキシゲナーゼの活性と発現を抑制すること<sup>15)</sup>などが報告されている。神経細胞障害の関係では、T3 が JNK を阻害して、グルタミ

ン酸による神経細胞のアポトーシス誘導を抑制すること<sup>16)</sup>が見出されている。また、T3 と Toc の比較例として、癌細胞の増殖抑制能の強さの順は  $\delta$ -T3 >  $\gamma$ -T3 >  $\alpha$ -T3 >>  $\alpha$ -Toc とされる<sup>17)</sup>。T3 と Toc の抗酸化能（ラジカル捕捉能）に大差はないものの活性に違いが見られる理由として、T3 の細胞内への移行のし易さや、細胞内シグナル伝達の調節能の高さが挙げられている。こうした T3 の多岐にわたる細胞機能への影響を考慮しつつ、著者らは T3 の抗血管新生能を評価していくこととした。

血管新生阻害活性を評価するため、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）を T3 とともに培養すると、VEGF や FGF などの血管新生促進因子で誘導される HUVEC の増殖や遊走、管腔形成が T3 により抑制された<sup>9, 10)</sup>。活性の強さは  $\delta$ -T3 >  $\beta$ -T3 >  $\gamma$ -T3 >  $\alpha$ -T3 であり、これらの順と HUVEC への各 T3 異性体の移行量には相関があった。また、T3 の抗血管新生作用を支持する他の知見として、細胞外基質（コラーゲン I やフィブロネクチン、ラミニン）により誘導される HUVEC の浸潤も、T3 により抑制されることがわかった<sup>11)</sup>。

管腔形成阻害を評価した時、管腔形成が進んでいる HUVEC には T3 の効果が現われたが、既に管腔様構造が形成済みの HUVEC には影響しなかった<sup>11)</sup>。このことから、既存の血管の静的な内皮細胞よりも、未成熟な血管の活発な内皮細胞に対して T3 はより効果的に作用するように感じられ、その応用に期待が持たれた。また、こうした細胞試験では、ある濃度以上の T3 を HUVEC に処理すると、活性酸素産生を介した HUVEC のアポトーシスが認められた<sup>10, 11)</sup>。Toc のコハク酸エステル誘導体でも同様の現象が最近報告<sup>18)</sup>されているので、T3（および Toc のコハク酸エステル誘導体）の血管新生阻害にはアポトーシス誘発が一役を担っていると考えられた。さらに T3 は内皮細胞のみならず、癌細胞にも直接的に作用（大腸癌細胞 DLD-1 やヒト肝癌細胞 HepG2 からの VEGF 分泌を抑制）し<sup>19)</sup>、このことも T3 の血管新生阻害に深く関わると考えられた。すなわち、T3 は内皮細胞に作用し、血管新生促進因子由来のシグナル伝達への影響やアポトーシスの誘発を介して、内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を抑制し、加えて癌細胞からの血管新生促進因子の分泌も抑制するなどして、こうした一連の現象により癌に由来する悪性の血管新生を阻害すると推定した。

T3 による血管新生阻害について、そのメカニズム解析の手始めに血管新生促進因子由来のシグナル伝達への影響を調べた。その結果、HUVEC への T3 処理により、PI3 キナーゼ/Akt シグナルタンパク質の活性化（リン酸化）の抑制が見られた<sup>10, 11)</sup>。この PI3 キナーゼ/Akt は、上述した VEGFR のチロシンキナーゼドメインの活性化を経て、リン酸化される。この経路は血管新生（内皮細胞の増殖・遊走・管腔形成、および抗アポトーシス）に中心的な役割

を担うため<sup>3)</sup>, この抑制が T3 の抗血管新生作用の主因と思われた。予想通り, Akt のターゲットタンパク質 (ERK や eNOS, GSK) のリン酸化も T3 は制御し<sup>10)</sup>, 著者らの考えを支持する知見が得られた。また, ある濃度以上の T3 を HUVEC に処理すると, ストレス応答性タンパク質 (apoptosis regulated kinase (ASK-1) や p38) のリン酸化を介したアポトーシス実行因子 (カスパーゼ 3 と 9) の活性化が見られ<sup>10)</sup>, このことから T3 の血管新生阻害におけるアポトーシスの重要性が伺えた。続いて, T3 の作用点を知るために, PI3 キナーゼ / Akt の上流にある VEGFR タンパク質の活性を調べ, VEGFR2 のリン酸化の T3 による抑制を認めた<sup>11)</sup>。Neoplastic + SA mouse mammary epithelial cell を用いた最近の研究<sup>20)</sup> では, 上皮系細胞増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) 受容体のリン酸化, および EGF 由来 PI3 キナーゼ / Akt シグナルの活性化を  $\gamma$ -T3 が抑制することが報告されている。した

がって, T3 は VEGFR をはじめとする種々の増殖因子受容体に作用する可能性があり, このことと抗血管新生能の関係が興味深いと思われた。まだ仮説であるが, 内皮細胞の細胞膜へ T3 が取り込まれる際に, T3 が膜脂質二重層に揺らぎを与える, あるいは脂質ラフトに変化をもたらすなどして, 細胞膜上の種々の増殖因子受容体に影響するのかもしれない。こうした点の解明を今後に進めていきたいと考えている (Fig. 2, Fig. 3)。

本稿ではトピックスとして血管新生阻害を取り上げ, T3 の抗血管新生能とそのメカニズムについて著者らの細胞実験の結果を概説した。in vivo での T3 の評価については, Toc や Toc 誘導体に比べ報告例は少ないものの, 腫瘍細胞移植マウスへの T3 経口投与による腫瘍抑制の報告<sup>21)</sup> があり, この効果には T3 の血管新生抑制の寄与があると期待している。著者らは, 癌細胞移植ヌードマウスへ

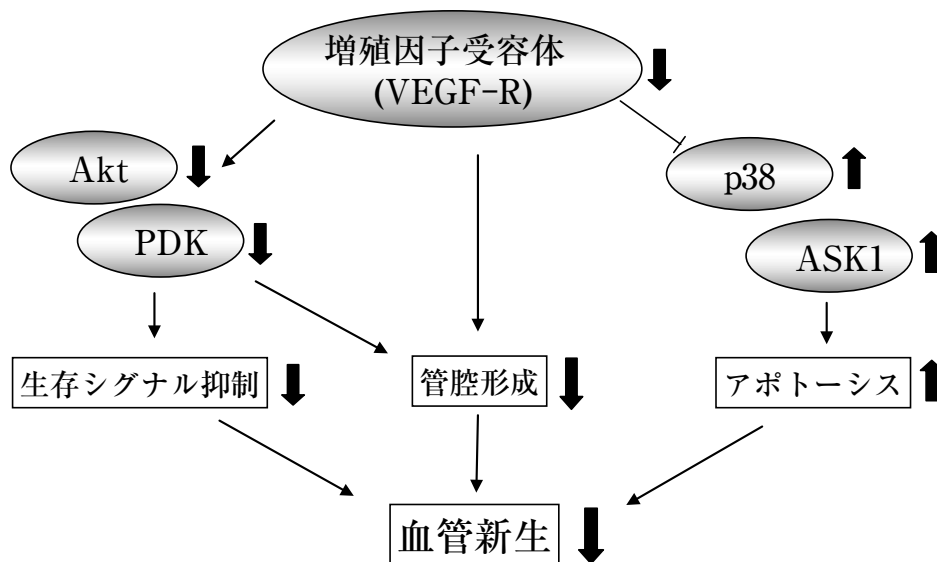


Fig. 2 内皮細胞におけるトコトリエノールの血管新生抑制機構

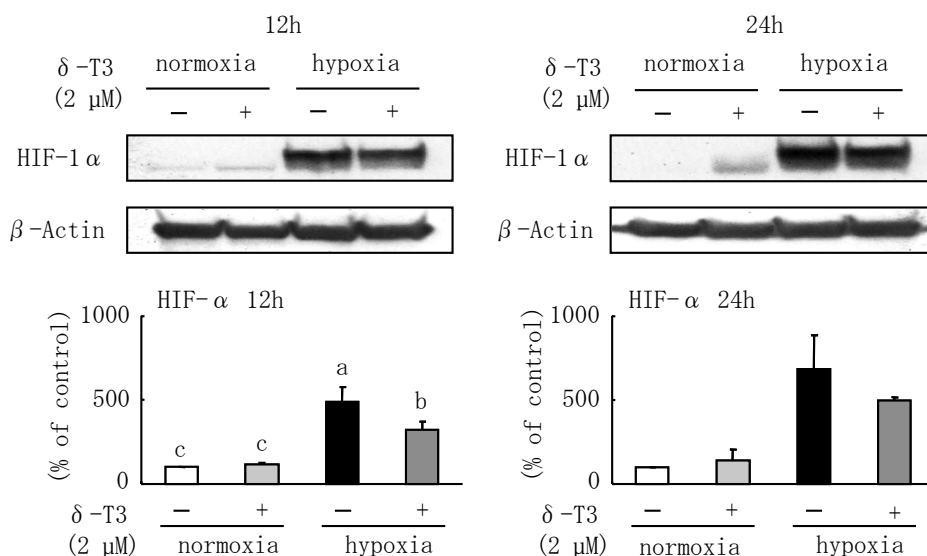


Fig. 3 トコトリエノール (T3) の HIF-1 $\alpha$  抑制作用

T3を経口的に与え、血管新生抑制やアポトーシス惹起を機序とする腫瘍抑制を認めており、この詳細な評価とともに、T3の代謝を踏まえた最適投与量の検討を進めていく予定である。T3に限った話ではないが、相加的・相乗的作用を期待して、複数の血管新生阻害成分の同時活用の検討も必要と考えている。

T3のような食品成分を活用していくことの大きな利点は、その長い食経験から裏付けられた高い安全性にあると思われる<sup>22, 23)</sup>。このことは、血管新生病の予防のように継続的な長期間の摂取が想定される場合には、ことさら重要であろう。今後も細胞や疾患モデル動物を用いた実験を続けニュートリゲノミクスの手法などで解析を進めるが、こうした基礎研究の成果が、ヒト臨床試験を経て、食品成分による血管新生病の予防や治療に少しでも貢献できれば幸甚である。

### 参考文献

- 1) Folkman J, Klagsbrun M (1987) Angiogenic factors. *Science* **235**, 442-447
- 2) Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**, 1182-1186
- 3) Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L (2003) VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* **28**, 488-494
- 4) Schlaeppli JM, Wood JM (1999) Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) for anticancer therapy, by anti-VEGF neutralizing monoclonal antibodies and VEGF receptor tyrosine-kinase inhibitors. *Cancer Metastasis Rev* **18**, 473-481
- 5) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **350**, 2335-2342
- 6) Thaloor D, Singh AK, Sidhu GS, Prasad PV, Kleinman HK, Maheshwari RK (1998) Inhibition of angiogenic differentiation of human umbilical vein endothelial cells by curcumin. *Cell Growth Differ* **9**, 305-312
- 7) Cao Y, Cao R (1999) Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* **398**, 38
- 8) Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE (2000)  $1\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res* **87**, 214-220
- 9) Inokuchi H, Hirokane H, Tsuzuki T, Nakagawa K, Igarashi M, Miyazawa T (2003) Anti-angiogenic activity of tocotrienol. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 1623-1627
- 10) Nakagawa K, Shibata A, Yamashita S, Tsuzuki T, Kariya J, Oikawa S, Miyazawa T (2007) In vivo angiogenesis is suppressed by unsaturated vitamin E, tocotrienol. *J Nutr* **137**, 1938-1943
- 11) Shibata A, Nakagawa K, Sookwong P, Tsuzuki T, Oikawa S, Miyazawa T (2008) Tumor anti-angiogenic effect and mechanism of action of  $\delta$ -tocotrienol. *Biochem Pharmacol* **76**, 330-339
- 12) Miyazawa T, Shibata A, Sookwong P, Kawakami Y, Eitsuka T, Asai A, Oikawa S, Nakagawa K (2009) Anti-angiogenic and anti-cancer potential of unsaturated vitamin E, tocotrienol (Review). *J Nutr Biochem* **20**, 79-86
- 13) Noguchi N, Hanyu R, Nonaka A, Okimoto Y, Kodama T (2003) Inhibition of THP-1 cell adhesion to endothelial cells by  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol is dependent on intracellular concentration of the antioxidants. *Free Radic Biol Med* **34**, 1614-1620
- 14) Chatelain E, Boscoboinik DO, Bartoli GM, Kagan VE, Gey FK, Packer L, Azzi A (1993) Inhibition of smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity by tocopherols and tocotrienols. *Biochim Biophys Acta* **1176**, 83-89
- 15) Wu SJ, Liu PL, Ng LT (2008) Tocotrienol-rich fraction of palm oil exhibits anti-inflammatory property by suppressing the expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *Mol Nutr Food Res* **52**, 921-929
- 16) Khanna S, Roy S, Ryu H, Bahadduri P, Swaan PW, Ratan RR, Sen CK (2003) Molecular basis of vitamin E action: tocotrienol modulates 12-lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration. *J Biol Chem* **278**, 43508-43515
- 17) Yu W, Simmons-Menchaca M, Gapor A, Sanders BG, Kline K (1999) Induction of apoptosis in human breast cancer cells by tocopherols and tocotrienols. *Nutr Cancer* **33**, 26-32
- 18) Dong LF, Swettenham E, Eliasson J, Wang XF, Gold M, Medunic Y, Stantic M, Low P, Prochazka L, Witting PK, Turanek J, Akporiaye ET, Ralph SJ, Neuzil J (2007) Vitamin E analogues inhibit angiogenesis by selective induction of apoptosis in proliferating endothelial cells: the role of oxidative stress. *Cancer Res* **67**, 11906-11913
- 19) Shibata A, Nakagawa K, Sookwong P, Tsuzuki T, Tomita S, Shirakawa H, Komai M, Miyazawa T (2008) Tocotrienol inhibits angiogenic factors secretion from human colorectal adenocarcinoma cells via suppressing hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ . *J Nutr* **138**, 1623-1627

2136-2142

- 20) Samant GV, Sylvester PW (2006)  $\gamma$ -Tocotrienol inhibits ErbB3-dependent PI3K/Akt mitogenic signalling in neoplastic mammary epithelial cells. *Cell Prolif* **39**, 563-574
- 21) Nesaretnam K, Ambra R, Selvaduray KR, Radhakrishnan A, Reimann K, Razak G, Virgili F (2004) Tocotrienol-rich fraction from palm oil affects gene expression in tumors resulting from MCF-7 cell inoculation in athymic mice. *Lipids* **39**, 459-467
- 22) Miyazawa T, Tsuzuki T, Nakagawa K, Igarashi M (2004) Antiangiogenic potency of vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* **1031**, 401-404
- 23) Sookwong P, Nakagawa K, Yamaguchi Y, Miyazawa T, Kato S, Kimura F, Miyazawa T (2010) Tocotrienol distribution in foods: estimation of daily tocotrienol intake of Japanese population. *J Agric Food Chem* **58**, 3350-3355