

13-15 食品中の発がん抑制要因に関する研究

主任研究者 金沢医科大学医学部 田 中 卓 二

研究成果の要旨

共役リノレン酸 CLN (9*c*,11*t*,13*t*-18:3) を豊富に含有するニガウリ種子油(BG0)、柑橘由来化合物 auraptene、nobiletin、collinin の大腸発がん抑制効果をラット大腸発がんモデルないし新規に確立した炎症関連マウス大腸発がんモデルで明らかにした。また、nobiletin のラット肝発がん抑制作用が明らかとなった。Nobiletin、auraptene はヒト・ラット肝細胞がん細胞の増殖を抑制し、G2/M arrest とアポトーシスを誘導するとともに、caspase 2 発現を増強することが判明した。沖縄県自生植物の中にヒト大腸がん細胞株に対する増殖抑制効果や G1 cell cycle arrest と apoptosis 誘導を惹起するものが存在することを明らかにした。ブドウの種子中プロシアニジンのうち、5-10 量体混合物 (PA5/10) には強力な増殖抑制作用やアポトーシス誘導能を有することをヒト大腸がん細胞で明らかにした。青梅中の *H. Pylori* 運動能抑制物質として(+)-シリンガレシノールを単離、同定した。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
田 中 卓 二	金沢医科大学医学部 教授	食品素材中の発がん抑制要因の広範囲探索とその作用機構の解析
朝 元 誠 人 * ¹	名古屋市立大学大学院医学研究科 助教授	発がん抑制物質による遺伝子変化
小川久美子* ²	名古屋市立東市民病院 部長	発がん抑制物質による遺伝子変化
原 明	岐阜大学大学院医学研究科 助教授	肝がん発生に対する食品中抑制要因に関する研究
酒々井真澄	琉球大学医学部 助教授	大腸がん発生に対する食品中の抑制要因とその作用機序に関する研究
飯 飯 正 明	国立がんセンター研究所 室長	食道がん及び大腸がん発生に対する食品中の抑制因子に関する研究
宇都宮洋才	和歌山県立医科大学 講師	消化器がん発生に対する食品中の抑制要因の検索

*1：平成15年4月1日～平成16年3月31日

*2：平成16年4月1日～平成17年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

本研究班の目的は、後半な食品素材から有望な発がん抑制候補物質を見出し、その抑制機構を解明することにより、臨床試験に有用な情報を提供することにある。具体的には、共役リノレン酸 CLN (9*c*, 11*t*, 13*t*-18:3) 含有ニガウリ種子油(BGO)、柑橘由来化合物 auraptene、nobiletin、collinin、ショウガに含有される zerumbone、について大腸、前立腺、ないし肝発がんへの影響を検討し、nobiletin、auraptene、アブラナ科含硫黄化合物 indole-3-carbinol (I3C)、ブドウ種子中プロシアニジン、沖縄県自生植物のクロロホルム抽出物の培養がん細胞増殖や apoptosis への影響を検討した。さらに、青梅中の HP 運動能抑制物質の同定と梅エキス、auraptene の *H. pylori* (HP) 運動能への影響や抗炎症作用について検討した。

2 研究成果

食品中の新規発がん抑制因子を見いだす目的で、BGO、auraptene、nobiletin および collinin の大腸発がんへの影響を検討し、COX-2 阻害剤 nimesulide と比較した。AOM 誘発ラット大腸発がんモデルでの検討では、BGO の混餌投与により大腸腺がんの発生が抑制された（抑制率—0.01% BGO:47%、0.1% BGO:40%、1% BGO:17%）が、用量相関はなかった。その抑制機構として CLN の代謝物とされる CLA とその中間体の関与、PPAR γ の関与が示唆された。短期マウス大腸発がん系の作出を試みた結果、雄性 ICR マウスに AOM (10 mg/kg 体重、単回 i.p.)ないし PhIP (200 mg/kg 体重、単回 i.g.)の投与 1 週後から 1~2% dextran sodium sulfate (DSS)を 1 週間飲水投与するプロトコルで、 β -catenin 変異大腸腺がんを誘発できた。そこで、この AOM/DSS 誘発マウス大腸発がんモデルで BGO、auraptene、nobiletin、collinin の大腸発がんへの影響を検討した結果、いずれも nimesulide (56%抑制率)に匹敵する大腸腺がんの発生を抑制した（抑制率—1% BGO:56%、0.01% auraptene:50%、0.05% auraptene:60%、0.01% collinin:60%、0.05% collinin:60%）が、用量相関は見出せなかった。さらに、PhIP/DSS 誘発マウス大腸発がんモデルで、auraptene、nobiletin、nimesulide の大腸発がん抑制効果を検証した結果、抑制率の程度は、0.04% nimesulide (67%)> 0.05% auraptene (44%)> 0.05% nobiletin (33%)の順であった。これらの系による被験化合物の抑制機構としては、炎症関連酵素の抑制が示唆され、auraptene、nobiletin は、炎症を背景とする大腸発がんをも抑制することが判明した（田中）。

がん予防候補物質の nobiletin と auraptene の *in vitro*での細胞増殖および apoptosis に対する影響と遺伝子発現変化を検討し、がん抑制作用のメカニズムの解明やがん抑制作用のマーカー遺伝子の同定を試みると共に、これらの物質の SV40Tag Tg ラット前立腺発がんの抑制作用を検討した。Nobiletin と auraptene を、EC₂₀ でヒト (HepG2)およびラット (MH1C1)肝細胞がん細胞株に 3 日間暴露した結果、増殖抑制および G2/M arrest、apoptosis が誘導されたが、大腸がん細胞株では、有意な変化をみなかった。その MH1C1 遺伝子発現変化を microarray 解析すると、caspase 2 発現の 2.1 倍の増加や複数の遺伝子発現変化を認めた。SV40Tag Tg ラット前立腺発癌では、これらの物質は前立腺重量や発がん頻度には影響を及ぼさないものの、画像解析により腹葉でがん組織の占める面積比が対照群 (77.3 $\pm$ 4.3%) に比べ、nobiletin (67.3 $\pm$ 10.3) および uraptene (71.0 $\pm$ 8.7%) 投与群では低下傾向が見られ、前立腺がん増殖抑制作用が示唆された（朝元・小川）。

柑橘類由来の nobiletin の DEN 誘発ラット肝発がんへの影響を検索した。その結果、nobiletin の混餌投与により肝細胞がんの平均発生個数/匹は DEN 群(8.64 $\pm$ 3.50)に比べて 0.01%、0.05% nobiletin の initiation 相投与では、5.18 $\pm$ 1.72 (P<0.02)、3.58 $\pm$ 2.47 (P<0.001)、0.01%、0.05% nobiletin の promotion 相投与では、4.92 $\pm$ 1.24 (P<0.01)、4.17 $\pm$ 1.85 (P<0.002)といずれも有意に減少していた。次いで、ショウガ含有 zerumbone の EN 誘発ラット肝発がんへの影響を検索したところ zerumbone 混餌投与により、肝腫瘍数は、initiation 相、promotion 相投与ともに、濃度依存性に減少傾向を示したが、DEN 投与群に比べ有意な差をみなかった（原）。

沖縄県自生植物のクロロホルム抽出物と I3C についてヒト大腸がん細胞株に対する増殖抑制効果とその作用機序を解析した。その結果、沖縄県自生植物 51 サンプル中 8 サンプル(アキノワスレ草・ベニイモ・秋ウコン・クレソン・ヘチマ・ヨウサイ・サラダナ・クールミント)に増殖抑制作用を認めた。HCT116 細胞株における DMEM+10%FBS, 48h 培養の条件下で IC₅₀ 値(50%増殖抑制率)は 40-80 μ g/ml であった。そのうち 4 サンプル(アキノワスレ草・ベニイモ・秋ウコン)について作用機序を解析した結果、増殖抑制作用は G1 cell cycle arrest と apoptosis 誘導が重要であることが明らかになった。I3C は同細胞株に対して細胞増殖を抑制し、機序として p21^{CIP1}mRNA 誘導が考えられた（酒々井）。

ブドウの種子の procyanidine は、flavan-3-ol が縮合

した重合度の異なる混合物として存在し、重合度が高いほど強力な抗酸化能を有する。Procyanidine は AOM 誘発大腸前がん病変 ACF の発生を有意 ($p < 0.05$) に抑制することを見出し、その機構として腸管粘膜の interferon- γ の増加などによる免疫細胞 (NK 細胞や macrophage) の活性化と AOM 処置大腸上皮細胞の apoptosis の増加が重要と考えられた。また、ラット大腸がん細胞 RCN-9 に対する殺細胞効果を検討したところ、procyanidine 5 量体から 10 量体の混合物 (PA5/10) が、EGCG, procyanidine 1 量体 (PA1) や 2 量体から 4 量体の混合物 (PA2/4) より強い細胞増殖抑制を示し、核断片化およびクロマチンを惹起した。さらに、FACS 解析にて PA5/10 は sub G_1 期細胞を濃度依存性に増加させ、EGCG よりも強い apoptosis 誘導能を有することが判明した。その apoptosis 誘導機構として、caspase-9 および -3 活性亢進や caspase 活性体増加作用を見出した (飯郷)。

青梅中の HP 運動能抑制物質の特定を試み、最も強力な HP 運動能抑制を示す青梅ジクロロメタン分画中から活性成分 (+)-シリングレシノールを同定した。その含量は、梅エキス、梅干で各々 24 $\mu\text{g/g}$, 11 $\mu\text{g/g}$ と判明した。この化合物の HP 運動能抑制効果は濃度依存性であり、 IC_{50} 値は 50 $\mu\text{g/mL}$ であった。梅エキスを DSS 誘発ラット大腸炎での抗炎症作用はなく、auraptene は HP 運動能を対照群の 25% 以下に抑制したが、その混餌投与では、スナネズミの HP 菌量や胃炎に影響しなかった (宇都宮)。

3 倫理面への配慮

動物実験にあたっては各研究者所属施設の動物実験指針に従い実験動物委員会の承認に基づき行った。動物への発がん物質の投与や屠殺時には苦痛を軽減し、動物愛護を充分考慮した。