

共役トリエン酸の抗腫瘍効果と作用機構の解明

学位論文内容の要旨

脂質はエネルギー源としての役割のみならず、脂質を構成する脂肪酸の中には優れた生理機能を持ち、各種の疾病の発症や予防に深く関わっているものがある。代表的な脂肪酸としてn-3系高度不飽和脂肪酸のEPAやDHAが上げられるが、近年、共役脂肪酸の特異的な生理作用が注目を集めている。共役脂肪酸は分子内に共役二重結合を有する型脂肪酸であり、共役二重結合が2つ存在する脂肪酸を共役ジエン酸、3つ存在するものを共役トリエン酸と呼んでいる。代表的なものにリノール酸(18:2n-6)の位置および幾何異性体である共役リノール酸が挙げられる。これまで多くの生理作用が報告されているCLA以外にも、天然界には他の共役型脂肪酸が存在する。例えば、ニガウリやザクロなどいくつかの植物種子油中には、分子内に共役トリエン構造を有する共役リノレン酸(CLN)が高濃度存在することが報告されている。また、海藻中にはEPA由来の共役トリエン酸の存在が報告されており、それら共役脂肪酸の構造と機能性との関係に興味を持たれた。そこで本研究では、優れた生体機能が期待される共役型脂肪酸として、特に植物種子油中のCLNや水産脂質より調製した共役トリエン酸の機能性に着目し、近年日本において増加の一途をたどる大腸癌に対する抗腫瘍効果を中心に、モデル動物や培養癌細胞を用いた検討を行った。

第1章では、CLNを高濃度含有する植物種子油を用いて、大腸癌を誘発させたラットに及ぼす発癌抑制効果について検討した。9*c*,11*t*,13*t*-CLNを約60%含有するニガウリ種子油(BGO)、9*t*,11*t*,13*c*-CLNを約40%含有するキササゲ種子油(CPO)および9*c*,11*t*,13*c*-CLNを約80%含有するザクロ種子油(PGO)を用いて4週間と32週間の短期および長期発癌動物実験を行なった。その結果、いずれのCLN高含有種子油を経口投与した場合においても、脂肪肝や体重減少などの毒性的な症状を引き起こすことなく、大腸前癌病変部(ACF)や大腸腺癌の形成を顕著に抑制することを見い出した。その有効濃度は0.01%、0.1%、1%と非常に低濃度であり、これまで抗腫瘍効果が報告されている他の高度不飽和脂肪酸と比較して1/10~1/100の濃度であったことから、CLN高含有種子油の強い大腸癌抑制能が明らかとなった。また、大腸粘膜において癌予防のターゲット分子として注目されている

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 γ (PPAR γ)の発現亢進とシクロオキシゲナーゼ2 (COX-2)の発現抑制が観察された。更に注目されることとして、大腸前癌病変部にのみアポトーシスが誘導されていた。これらの結果は、CLNが発癌過程における遺伝子の変化を制御することで顕著な大腸癌抑制効果を発揮していることを示すものである。

第2章では、各CLN異性体がヒト結腸癌細胞に及ぼす影響について検討した。各植物種子油から単離した9*c*,11*t*,13*t*-CLN(ニガウリ)、9*c*,11*t*,13*c*-CLN(ザクロ)、9*t*,11*t*,13*c*-CLN(キササゲ)そして8*t*,10*t*,12*c*-CLN(キンセンカ)を用い、ヒト結腸癌細胞に及ぼす影響について比較検討した。その結果、9,11,13-CLNが8,10,12-CLNと比較して強い増殖抑制能およびアポトーシス誘導能を有することが明らかとなった。更にCLNの共役二重結合の立体構造の影響についても検討を行なった結果、*all-trans*型の9*t*,11*t*,13*t*-CLNと8*t*,10*t*,12*t*-CLNは*cis*型を含むCLN異性体よりも強いアポトーシス誘導能を有することが明らかとなった。以上のことからCLNの共役二重結合の位置および立体構造がその抗腫瘍効果に大きく影響することが示された。

ところで、近年癌研究において発癌や抗腫瘍の分子メカニズムの解明が盛んに行なわれている。そこで第3章では、ヒト結腸癌細胞Caco-2を用いて、CLNを高濃度含有するBGOより調製した脂肪酸(BGO-FFA)の癌関連遺伝子の発現に及ぼす影響について、DNAマイクロアレイによる網羅的な解析を行なった。その結果、BGO-FFAは比較対照として用いた9*c*,11*t*-CLAやリノレン酸と比べ非常に多くの遺伝子の発現を変化させることが明らかとなった。発現が増加した遺伝子の中には細胞周期やアポトーシス誘導に関与するGadd45や癌抑制遺伝子p53などが含まれていた。一方、発現が抑制された遺伝子の中には、癌細胞の無秩序な増殖を引き起こすPCNAや細胞周期を調節するcyclin G1などが含まれていた。そこでこれらの遺伝子の中から、癌細胞に対する増殖抑制やアポトーシス誘導に関わるものが推察されるGadd45とp53の2つの遺伝子に注目し、定量PCR法により詳細な発現解析を行なった。その結果、両遺伝子においてBGO-FFAの添加濃度と時間に依存した著しい増加が観察されたことから、この2つの遺伝子の発現亢進による作用機構が推察された。

以上のようにCLNが優れた抗腫瘍効果を有することが明らかとなったことから、水産脂質由来の共役脂肪酸にも高い抗腫瘍効果が期待された。いくつかの海藻中には共役トリエン構造を有する様々な共役EPA(CEPA)の異性体が報告されている。更に、最近、紅藻(*Ptilota pectinate*)から単離した共役化酵素によりEPAから特定の共役トリエン構造を有するCEPAの合成が可能となった。そこで、この紅藻由来の酵素から調製したCEPA (35% 5*c*,7*t*,9*t*,14*c*,17*c*-CEPA、8.18% 5*t*,7*t*,9*t*,14*c*,17*c*-CEPA)の有する抗腫瘍効果について、いくつかの培養系ヒト癌細胞を用いた検討を行なった。その結果、CEPAは強い細胞毒性能

を示したが、その効果は細胞の種類によって大きく異なり、特にヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60) やヒト肝癌細胞 (HepG2) に対して細胞選択性があることが示された。一方、最近、本研究室において精製イワシ油から共役トリエン構造を有する新規の共役脂肪酸を発見した。その構造は炭素数16で、6,8,10位に共役二重結合とシクロプロパン環を有する(6*Z*,8*E*,10*Z*)-12-(2-methylcyclopropan-1-yl)-dodecatrienoic acid (CCP-16:3)であった。この新規CCP-16:3の培養癌細胞に対する抗腫瘍効果について検討を行なった結果、CCP-16:3もまた上述のCEPAと同様に強い抗腫瘍効果を示したが、その増殖抑制能やアポトーシス誘導能に細胞選択性があることが明らかとなった。本実験に使用したCCP-16:3はイワシ油中に特徴的に含まれる16:4n-1に起因する新規共役脂肪酸であり、低酸素条件下での加熱により生成した。CCP-16:3の抗腫瘍効果を示した本研究成果は魚油由来の新規な共役トリエン脂肪酸の機能性を示す初めての結果であると共に、これまで注目されてこなかった16:4n-1の新たな利用につながる有意義な知見であると考ええる。

以上、本研究では植物種子油ならびに水産脂質由来の共役トリエン酸の優れた抗腫瘍性を明らかにした。今後は水産物由来のCEPAやCCP-16:3の大量調製法の確立が望まれるところである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 下 和 夫

副 査 教 授 高 橋 是 太 郎

副 査 助 教 授 細 川 雅 史

学 位 論 文 題 名

共役トリエン酸の抗腫瘍効果と作用機構の解明

共役脂肪酸は分子内に共役二重結合を有する型脂肪酸であり、代表的なものにリノール酸(18:2n-6)の位置および幾何異性体である共役リノール酸(CLA)がある。CLAは分子内に共役ジエン構造を有する共役脂肪酸であり、抗がん作用、脂肪蓄積抑制作用、動脈硬化抑制作用、抗アレルギー作用などの生理作用を示すことが明らかになっている。一方、天然物中にはCLA以外の共役脂肪酸の存在も報告されている。

例えば、ニガウリやザクロなどいくつかの植物種子油中には、分子内に共役トリエン構造を有する共役リノレン酸(CLN)が高濃度存在することが報告されている。また、海藻中にはEPA由来の共役トリエン酸の存在が報告されており、それら共役脂肪酸の機能性については興味を持たれる。そこで本研究では、優れた生体機能が期待される共役型脂肪酸として、特に植物種子油中のCLNや水産脂質より調製した共役トリエン酸に着目し、近年日本において増加の一途をたどる大腸癌に対する抗腫瘍効果を中心に、モデル動物や培養癌細胞を用いた検討を行い、以下のような成果を得た。

1. 9*c*, 11*t*, 13*t*-CLNを約60%含有するニガウリ種子油、9*t*, 11*t*, 13*c*-CLNを約40%含有するキササゲ種子油および9*c*, 11*t*, 13*c*-CLNを約80%含有するザクロ種子油を用いて短期(4週間)および長期(32週間)発癌動物実験を行い、いずれのCLN高含有種子油を経口投与した場合においても、低濃度(0.01%)のCLNで大腸前癌病変部(ACF)や大腸腺癌の形成を顕著に抑制することを明らかにした。

2. 上記動物実験において、大腸粘膜の癌予防のターゲット分子として注目されているペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 γ (PPAR γ)の発現亢進とシクロオキシゲナーゼ2(COX-2)の発現抑制および大腸前癌病変部に特異的なアポトーシス誘導の起こることを明らかにした。

3. 各植物種子油から単離した各種CLN異性体のヒト結腸癌細胞に及ぼす影響について比較検討し、9, 11, 13-CLNが8, 10, 12-CLNと比較して強い増殖抑制

能およびアポトーシス誘導能を有することおよびall-*trans*型のCLNは*cis*型を含むCLNよりも強いアポトーシス誘導能を有することを示した。

4. ヒト結腸癌細胞Caco-2に対する9*c*, 11*t*, 13*t*-CLNの増殖抑制作用について、DNAマイクロアレイによる網羅的な遺伝子解析を行い、9*c*, 11*t*, 13*t*-CLN添加により、細胞周期やアポトーシス誘導に関与するGadd45や癌抑制遺伝子p53などの発現亢進と、癌細胞の無秩序な増殖を引き起こすPCNAや細胞周期を調節するcyclin G1などの発現抑制の起こることを明らかにした。Gadd45とp53の2つの遺伝子については定量PCR法によりその著しい発現亢進を確認した。

5. 紅藻 (*Ptilota pectinate*) から単離した共役化酵素によりEPAから調製した共役EPA (5*c*, 7*t*, 9*t*, 14*c*, 17*c*-CEPAと 5*t*, 7*t*, 9*t*, 14*c*, 17*c*-CEPA) の培養系ヒト癌細胞に対する作用を検討し、CEPAが癌細胞に対する強い増殖抑制能を示すこと、また、その効果は細胞の種類によって大きく異なり、特にヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60) やヒト肝癌細胞 (HepG2) に対して細胞選択性があることを示した。

6. イワシ油に特異的に多く存在する高度不飽和脂肪酸 (16:4n-1) から熱処理精製工程で生ずる共役トリエン脂肪酸 ((6*Z*, 8*E*, 10*Z*)-12-(2-methylcyclopropan-1-yl)-dodecatrienoic acid (CCP-16:3)) の培養癌細胞に対する抗腫瘍効果について検討し、CCP-16:3もCEPAと同様に強い抗腫瘍効果を示すが、その増殖抑制能やアポトーシス誘導能に細胞選択性があることを明らかにした。

このように、本研究では、動物実験と培養細胞実験により植物油および水産物油由来の共役トリエン脂肪酸の抗腫瘍機能について検討を行い、これらの共役脂肪酸が強い抗腫瘍活性を示すことや構造と活性との相関について示した。また、海藻や魚油に含まれる共役トリエン脂肪酸の癌細胞に対する増殖抑制作用が細胞によって大きく異なることを初めて明らかにした。さらに、本研究では、マイクロアレイや定量PCR法を活用し、植物油や水産物などに含まれる共役トリエン脂肪酸の抗腫瘍活性を遺伝子レベルで詳細に解析している。これらの成果は、天然物由来の機能性成分を活用する上で有益な知見を与えるものと高く評価される。よって審査員一同は本研究の申請者が博士 (水産科学) の学位を授与される資格のあるものと判定した。