

学位論文題名

Marine complex lipid as a bioavailable material for
colon carcinoma and myeloma suppression

（高生体適合性大腸ガン及び骨髄腫抑制物質としての
水産複合脂質に関する研究）

学位論文内容の要旨

水産リン脂質は水産動物の生殖巣、イカミール、イカ皮、ホタテガイ中腸腺等に広く分布し、含有量も比較的多い。その特徴はドコサヘキサエン酸(DHA)やイコサペンタエン酸(EPA)を分子骨格の *sn*-2 位に豊富に結合していることにあり、生体親和性及び生体利用率が高い状態で DHA や EPA の有用生理機能を発揮できる点にある。また、DHA、EPA がリン脂質の分子形態をとることによって、初めて発揮される新規機能も報告されている。さらに、リン脂質は両親媒性であることから、水中でリポソームと呼ばれる小胞を形成し、この小胞に機能性物質を内包させることによって、効率的に小腸に送達させることも期待されている。以上のような背景から、本研究では水産リン脂質の生体親和性及び生体利用率が高い点に注目し、多くの有用機能のうち特に抗腫瘍性に着目した研究を行った。先ず第 1 章では水産リン脂質リポソームの消化管における安定化と取り込み性について調べた。すなわち、消化管においては、水産リン脂質リポソームが胃での低 pH、十二指腸及び小腸での胆汁酸、消化酵素の曝露に対して崩壊せずに形状を保つこと求められるが、コレステロール及びホスファチジルセリン(PS)の添加が内包物質の漏出防止と安定化に有効であることを証明した。次いで Caco-2 細胞を用いて単層膜をウェルプレート形成し、小腸上皮細胞モデルを構築して DHA 結合型リン脂質を主成分とするイカミールリン脂質 SUV (Small uni-lamella vesicle)、EPA 結合型リン脂質を主成分とするヒトデリン脂質 SUV、リノール酸結合型リン脂質を主成分とする大豆リン脂質 SUV の単層膜透過性を脂肪酸残基の蛍光ラベル化によって調べたところ、水産リン脂質 SUV は DHA 結合型及び EPA 結合型の何れも大豆リン脂質 SUV より透過性に優れることを認めた。

第 2 章では各種培養細胞を用いて水産リン脂質の *in vitro* における抗腫瘍性について調べた。抗腫瘍性の指標にはアルカリホスファターゼ活性を目安にした細胞分化誘

導, 生細胞数変化, アポトーシスの実行段階に関わる代表的な分解酵素であるカスパーゼ3の活性化, ELISA法を応用したアポトーシスの指標であるエンリッチメントファクター, アポトーシス回避ガン遺伝子誘導タンパク質 Bcl-2の電気泳動によるDNAの断片化の観察を適用した。大腸ガンの細胞株には HT-29, DLD-1, Caco-2を用いた。一方, DHA, EPA, アラキドン酸(AA)の如き高度不飽和脂肪酸は容易に酸化されて酸化物が生成されることから, 酸化生成物によるストレスがDHAやEPAのガン細胞に対する抑制機序であるとする説がある。このことから, 本研究ではチオバルビツール酸価(TBARS)による酸化度についても併せて調べた。その結果, 酪酸ナトリウムとの併用が前提になるが, HT-29細胞においては終濃度100 μ Mのイカミールホスファチジルコリン(PC)の培地への添加で, 添加48時間後に約60%の生細胞数減少率, 同濃度ヒトデPCの培地への添加で約50%の生細胞数減少率, また同濃度AA結合型PCの培地への添加では約8%の生細胞数減少率を認めた。DLD-1細胞に対しては終濃度100 μ MのイカミールPCの培地への添加で, 添加48時間後に20%の生細胞数減少率, 同濃度ヒトデPCの培地への添加で, 18%の生細胞数減少率を認めた。一方, Caco-2細胞においては終濃度100 μ MのイカミールPCの培地への添加で48時間後に約35%の生細胞数減少率, 同濃度ヒトデPCの培地への添加で, 約28%の生細胞数減少率を認めた。このとき, 終濃度100 μ Mの高濃度添加において水産リン脂質は何れも細胞のTBARSを上昇させていた。イカミールPC及びそれから誘導したPSは酪酸ナトリウムと併用することにより, Caco-2細胞に対しては, 添加48時間後にアポトーシスを誘導していることが示唆された。因みにCaco-2細胞及びHT-29細胞において, 水産リン脂質と酪酸ナトリウムとの併用は, Bcl-2がダウンレギュレーションに寄与している可能性もされた。また同時に, 両者の併用により細胞分化を誘導していることが72時間後のアルカリホスファターゼ活性の上昇により示された。酪酸ナトリウム併用による水産リン脂質の抗ガン性有効性はHT-29>Caco-2>DLD-1の順になった。

第3章では海藻に豊富なジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)とスルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)のCaco-2細胞に対する抗腫瘍性, 及びそれらと上記の水産リン脂質との併用による抗腫瘍性について, 第2章と全く同様の方法によって検討した。その結果, 酪酸ナトリウムとの併用で, SQDGはDGDGよりもCaco-2細胞に対して優れた抗腫瘍性を示すものの, その効果は水産リン脂質よりも低いことが明らかになった。また水産糖脂質を組み入れた水産リン脂質リポソームを構築し, 酪酸ナトリウムを併用した場合の抗腫瘍性をみたところ, 両者の合計量と同量の水産リン脂質と酪酸ナトリウムを併用した場合の効果には及ばないことも明らかになった。

第4章では水産リン脂質を膜材としたリポソームに, アガリクス(*Agaricus blazei* Murill)の水抽出物(β -グルカンを主成分とする)を内包させることにより送達の効率が

改善され、抗腫瘍機能が一層高まるか否かについて検討した。リポソーム膜材にはイカミール由来 PC:PS: コレステロール=1:1:2 の組成のものを用いた。sp2 骨髄腫を BALB/c マウスの皮下に移植して坦ガンモデルとし、5 群に分けてそれぞれ蒸留水、0.5mg/ml アガリクス水抽出物、1.0mg/ml リポソーム、0.5mg/ml アガリクス水抽出物+1.0mg/ml リポソーム(非内包型)、0.5mg/ml アガリクス水抽出物内包型 1.0mg/ml リポソームを 21 日間経口投与した。抗腫瘍性の評価は腫瘍サイズ及び体重減少緩和効果の計測によって行った。また、回腸パイエル板 M 細胞様モデルによって取り込み性についても評価した。その結果腫瘍の増殖に対しては、コントロールを除く全ての群で抑制が認められたが、特にアガリクス水抽出物とリポソームを併用した群で明確であった。血清中のサイトカイン量はバラツキが多くて解析できず、またリポソーム化による明確な β -グルカンの取り込み性向上の立証にも至らなかった。しかし、 β -グルカンと水産リン脂質との単純混合系よりは β -グルカンを内包した水産リン脂質リポソーム形態の方が腫瘍が小さい傾向が見られ、さらに完全治癒を誘導出来た個体も一部に認められた。

次いで小腸壁など粘膜附着性の素材(キトサンなど)で被覆した水産リン脂質リポソームにより、腸内滞留時間を高めて水産リン脂質及び内包させた機能性素材の生理機能を向上させることができるか否かについても検討した。イカミール由来リン脂質溶液(イカミール由来 PC:PS: コレステロール=9:1:10 のクロロホルム溶液)を円錐形内壁のガラス容器に入れ、溶媒を留去することによって先ず同リン脂質の薄膜を内壁に形成した。これにリン脂質濃度が 1mg/ml になるように水を入れ、円錐形内壁の形状に合う三角形攪拌子を入れて 20~50rpm で 30 分間、次いで 800~1200rpm で 30 分間攪拌してリポソームを形成した。このリポソーム分散液を 5mg/ml のキトサン溶液に滴下することによってキトサンコート水産リン脂質リポソームを調製した。キトサンコート水産リン脂質リポソーム分散液、水産リン脂質リポソームのみの分散液、キトサンのみの分散液、水産リン脂質リポソームのみの分散液とキトサンの分散液を単純に混ぜた混液をそれぞれあらかじめ sp2 骨髄腫の腫瘍細胞を注射した BALB/c ヌードマウスに 28 日間経口投与した。その結果、キトサンコート水産リン脂質リポソーム分散液投与群で最も顕著な腫瘍増大抑制効果を認め、キトサンと水産リン脂質リポソームの併用群で体重減少(悪疫質)に対する明確な緩和効果を認めた。

以上の研究により、水産リン脂質は大腸ガン及び骨髄腫に対して安全に腫瘍抑制効果を発揮できる素材として非常に有望であることが強く示唆された。また、これらのガンの進行に伴う悪疫質の緩和にも有用であり、Quality of life の維持にも役立つ可能性が高いと判断された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 是 太 郎
副 査 教 授 宮 下 和 夫
副 査 助 教 授 栗 原 秀 幸
副 査 助 教 授 細 川 雅 史

学 位 論 文 題 名

Marine complex lipid as a bioavailable material for colon carcinoma and myeloma suppression

(高生体適合性大腸ガン及び骨髄腫抑制物質としての
水産複合脂質に関する研究)

水産リン脂質は水産動物の生殖巣、イカミール、イカ皮、ホタテガイ中腸腺等に広く分布し、含有量も比較的多い。その特徴はドコサヘキサエン酸(DHA)やイコサペンタエン酸(EPA)を分子骨格の *sn*-2 位に豊富に結合していることにあり、生体親和性及び生体利用率が高い状態で DHA や EPA の有用生理機能を発揮できることが期待されている。また、DHA, EPA がリン脂質に組み入れられることによってのみ発揮される新規機能も報告されている。さらに、リン脂質は両親媒性であることから、水中でリポソームと呼ばれる小胞を形成し、この小胞に機能性物質を内包させることによって、効率的に小腸に送達させることも期待されている。以上のような背景から、本研究は水産リン脂質の生体親和性及び生体利用率が高い点に注目し、多くの有用機能のうち特に抗腫瘍性に着目した研究を行ったものである。

申請者は初めに水産リン脂質リポソームの消化管における安定化と取り込み性について調べた。すなわち、消化管においては、水産リン脂質リポソームが胃での低 pH, 十二指腸及び小腸での胆汁酸、消化酵素の曝露に対して崩壊せずに形状を保つこと求められるが、コレステロール及びホスファチジルセリン(PS)の添加が内包物質の漏出防止と安定化に有効であることを証明した。次いで Caco-2 細胞を用いて単層膜をウェルプレート上に形成し、小腸上皮細胞モデルを構築して DHA 結合型リン脂質を主成分とするイカミールリン脂質 SUV(Small uni-lamella vesicle), EPA 結合型リン脂質を主成分とするヒトデリン脂質 SUV, リノール酸結合型リン脂質を主成分とする大豆リン脂質 SUV の単層膜透過性を脂肪酸残基の蛍光ラベル化によって調

べたところ、水産リン脂質 SUV は DHA 結合型及び EPA 結合型の何れも大豆リン脂質 SUV より透過性に優れることを認めた。これらの知見は“不飽和度の高いリポソームは極めて不安定で利用することができない”とする従来の先入観を払拭するものであり、高度不飽和リン脂質の利用拡大に大きく貢献するものである。

次いで、各種培養細胞を用いて水産リン脂質の *in vitro* における抗腫瘍性について調べ、酪酸ナトリウムとの併用が前提にはなるが、HT-29 細胞においては終濃度 100 μ M のイカミールホスファチジルコリン(PC)の培地への添加で、添加 48 時間後に約 60%の生細胞数減少率、同濃度キヒトデ PC の培地への添加で約 50%の生細胞数減少率、また同濃度 AA 結合型 PC の培地への添加では約 8%の生細胞数減少率を認めた。DLD-1 細胞に対しては終濃度 100 μ M のイカミール PC の培地への添加で、添加 48 時間後に 20%の生細胞数減少率、同濃度キヒトデ PC の培地への添加で、18%の生細胞数減少率を認めた。一方、Caco-2 細胞においては終濃度 100 μ M のイカミール PC の培地への添加で 48 時間後に約 35%の生細胞数減少率、同濃度キヒトデ PC の培地への添加で、約 28%の生細胞数減少率を認めた。このとき、終濃度 100 μ M の高濃度添加において水産リン脂質は何れも細胞の TBARS を上昇させていることを示し、抗腫瘍作用の一端が活性酸素種の発生にもあることを示唆した。またイカミール PC 及びそれから誘導した PS は酪酸ナトリウムと併用することにより、Caco-2 細胞に対しては、添加 48 時間後にアポトーシスを誘導していることも示唆した。すなわち Caco-2 細胞及び HT-29 細胞において、水産リン脂質と酪酸ナトリウムとの併用が、Bcl-2 がダウンレギュレーションに寄与している可能性を認めた。これに加え、両者の併用により細胞分化を誘導していることをアルカリホスファターゼ活性の上昇により示唆した。そして酪酸ナトリウム併用による水産リン脂質の抗ガン有効性は HT-29 > Caco-2 > DLD-1 の順になることも示し、水産リン脂質の抗腫瘍性について多様な側面から新知見を見出した。

さらに申請者は動物実験を行い、水産リン脂質を膜材としたリポソームに、アガリクス (*Agaricus blazei* Murill) の水抽出物 (β -グルカンを主成分とする) を内包させることにより送達の効率が改善され、抗腫瘍機能が一層高まることも証明した。すなわち、リポソーム膜材にイカミール由来 PC : PS : コレステロール = 1 : 1 : 2 の組成のものを用い、sp2 骨髄腫を BALB/c マウスの皮下に移植して坦ガンモデルとして 5 群に分け、それぞれ蒸留水、アガリクス水抽出物 (0.5mg/ml)、リポソーム (1.0mg/ml)、アガリクス水抽出物 (0.5mg/ml) + リポソーム (1.0mg/ml, 非内包型)、アガリクス水抽出物 (0.5mg/ml) 物内包型リポソーム (1.0mg/ml) を 21 日間経口投与し、特にアガリクス水抽出物とリポソームを併用した群で抗腫瘍性が明確に表れることを示した。血清中のサイトカイン量はバラツキが多くて解析できず、またリポソーム化による明確な β -

グルカンの取り込み性向上の立証には至らなかったが、 β -グルカンと水産リン脂質との単純混合系よりは β -グルカンを内包した水産リン脂質リポソーム形態の方が腫瘍をより小さくさせる傾向が見られ、さらに完全治癒を誘導出来た個体も一部に認めるに至った。この知見は先の *in vitro* 実験とともに、水産リン脂質の抗ガン性機能の有用性を示すものである。

次いで申請者は小腸壁などに対する粘膜付着性の素材（キトサンなど）で被覆した水産リン脂質リポソームにより、腸内滞留時間を高めて水産リン脂質及び内包させた機能性素材の生理機能を向上させることができるか否かについても検討した。すなわち、キトサンコート水産リン脂質リポソーム分散液、水産リン脂質リポソームのみの分散液、キトサンのみの分散液、水産リン脂質リポソームのみの分散液とキトサンの分散液を単純に混ぜた混液をそれぞれあらかじめsp2骨髄腫の腫瘍細胞を注射したBALB/cヌードマウスに28日間経口投与した結果、キトサンコート水産リン脂質リポソーム分散液投与群で最も顕著な腫瘍増大抑制効果を認めた。また、キトサンコート水産リン脂質リポソームのみならず、キトサンと水産リン脂質リポソームの併用群でも体重減少(悪疫質)に対する明確な緩和効果を認めた。この知見は水産リン脂質をリポソーム化し、さらにコーティング等工夫を重ねることによって、生体利用率や持続性をさらに高められる可能性を示している。

以上の知見は水産物の利用方途に新たな可能性を切り開くものであり、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十分な資格を有すると判定した。