

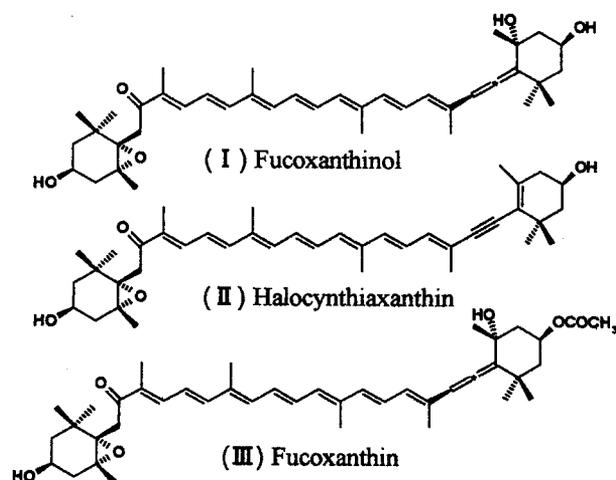
ホヤ由来カロテノイドの抗癌及び抗炎症作用の解明

学位論文内容の要旨

近年、わが国では食生活の乱れに起因する生活習慣病が増加の一途を辿っている。中でも、癌は日本人の死亡原因の第1位を占め、その予防、治療法の開発が大きな課題となっている。カロテノイドは、抗酸化作用、免疫賦活作用等を示すことが報告されているが、癌の予防効果も有する。本研究では、ユニークな構造をもつカロテノイドを複数含み資源量も豊富なホヤを試料とし、癌の予防や治療の研究で注目されているアポトーシス誘導効果を示すホヤカロテノイドについて検討した。また、癌をはじめ様々な生活習慣病の予防につながる抗炎症効果を有するカロテノイドの探索とその機能性の解明も行った。

第一章では、ヒト白血病細胞株 HL-60 細胞に対する増殖抑制を示すカロテノイドをホヤ中に探索した。ホヤに含まれるカロテノイドをアセトンを用いて抽出し、シリカゲル薄層クロマトグラフィーにより分画した。得られた Fraction1~Fraction5 の増殖抑制効果を調べた結果、いずれの画分にも抑制効果がみられた。特に顕著な増殖抑制効果を示した Fraction3、Fraction4 を精製し各種機器分析により構造解析した結果、Fraction4 が fucoxanthinol (I)、Fraction3 が halocynthiaxanthin (II)であることを明らかにした。次いで、fucoxanthinol 及び halocynthiaxanthin と、これまでに報告例のある fucoxanthin (III)の増殖抑制効果を比較した結果、fucoxanthinol が特に強い増殖抑制作用を有することを見出した。その後、fucoxanthinol や halocynthiaxanthin で処理した HL-60 細胞の形態を観察したところ、アポトーシス細胞に特徴的な、アポトーシス小体に加えクロマチンの凝集と細胞内 DNA の断片化がみられた。更に fucoxanthinol と halocynthiaxanthin によるアポトーシス誘導機構を明らかにするためアポトーシスの制御因子である Bcl-2 タンパク質をウエスタンブロット法により解析した。Fucoxanthinol、halocynthiaxanthin、fucoxanthin のいずれにおいてもその発現量が低下し、特に、fucoxanthinol で顕著であった。以上より、これらのカロテノイドは Bcl-2 の発現量の低下を引き起こし、その結果、癌細胞でみられるアポトーシスの抑制を解除することで細胞死を誘導することが推察された。

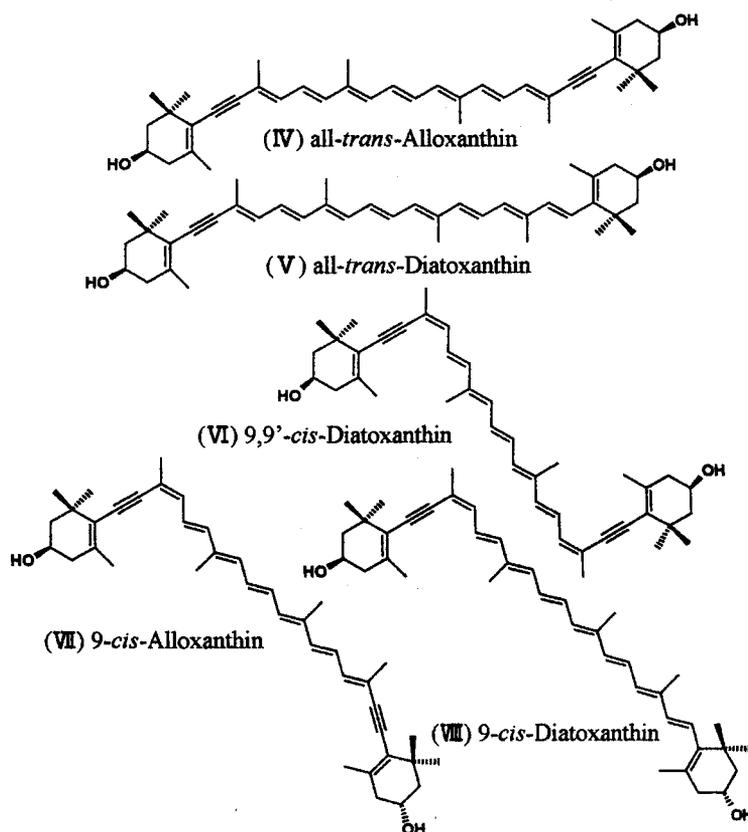
第2章では、結腸癌 Caco-2、乳癌 MCF-7、前立腺癌 LNCap 細胞に対する各種カロテノイドの増殖抑制能およびアポトーシス誘導能を評価した。その結果、どの癌細胞に対しても、fucoxanthinol > halocynthiaxanthin > fucoxanthin の順で強いアポトーシス誘導能を示した。ま



た、カロテノイドの細胞内への取り込みについて分析した結果、**fucoxanthinol** が最も多く蓄積していることが分かった。**Fucoxanthinol** は、**fucoxanthin** の末端のアセチル基が脱離し、アルコールが1個多い構造をとる。したがって **fucoxanthin** よりも親水性が高い。こうした点が **fucoxanthinol** や **halocynthiaxanthin** の強いアポトーシス誘導能に関わっているものと推察された。

一方、近年の研究により炎症と癌をはじめとした多くの生活習慣病の発症間に深い関わりがあることが明らかになってきた。炎症は、急性炎症と慢性炎症に大別され、急性炎症を引き起こす細胞外の刺激因子である LPS の刺激によって、細胞から TNF- α 、IL- β 、IL-6、IFN- γ などのサイトカインが誘導される。

第3章では、マクロファージ様 RAW264.7 細胞を用いて、炎症性サイトカイン及び炎症関連酵素の iNOS や COX-2 の遺伝子発現に対して抑制効果を示すホヤカロテノイドの探索を行った。最初に、**halocynthiaxanthin** 及び **fucoxanthinol** について炎症性サイトカイン及び iNOS、COX-2 の mRNA 発現への影響を調べたが、両カロテノイドとも RAW264.7 細胞に対して、強い増殖抑制を示したが、炎症関連遺伝子への発現抑制効果は認められなかった。次に、**Fraction2** より抗炎症作用を有するカロテノイドの探索を行った。HPLC により検出された **Fraction2** 中の5つのピークを精製し構造を解析し、**Fraction2-1** は **all-trans-alloxanthin**(IV)、**Fraction2-2** は **all-trans-diatoxanthin**(V)、**Fraction2-3** は **9,9'-cis-alloxanthin**(VI)、**Fraction2-4** は **9-cis-alloxanthin**(VII)、**Fraction2-5** は **9-cis-diatoxanthin**(VIII) と同定した。



Fraction2-1 は **all-trans-alloxanthin**(IV)、**Fraction2-2** は **all-trans-diatoxanthin**(V)、**Fraction2-3** は **9,9'-cis-alloxanthin**(VI)、**Fraction2-4** は **9-cis-alloxanthin**(VII)、**Fraction2-5** は **9-cis-diatoxanthin**(VIII) と同定した。このうち **all-trans-alloxanthin**、**all-trans-diatoxanthin**、**9-cis-alloxanthin**、**9-cis-diatoxanthin** は、LPS によって誘導される IL-1 β 、IL-6、COX-2 および iNOS の mRNA 発現を、コントロールと比較して有意に抑制した。

一方、炎症反応は、急性炎症が引き続いて慢性化することが多い。炎症の慢性化を促進する因子として炎症にともなって過剰に発生する活性酸素(O₂⁻、H₂O₂、 \cdot OH、O₂¹)および TNF- α などの炎症性のサイトカインなどがある。第4章では、ヒト結腸癌細胞株 HT-29 を H₂O₂ や TNF- α で刺激すると炎症性サイトカインの分泌が高まることから、誘導される IL-8、IL-1 β 、COX-2 の mRNA 発現に及ぼす **all-trans-alloxanthin** 及び **all-trans-diatoxanthin** の抑制効果を検討した。その結果、H₂O₂ により誘導される IL-1 β の mRNA 発現量が **all-trans-alloxanthin** 及び **all-trans-diatoxanthin** 処理により顕著に低下した。更に、TNF- α により誘導された、IL-1 β 及び IL-8 の mRNA 発現量についても **all-trans-alloxanthin** 及び **all-trans-diatoxanthin** は抑制効果を示した。これらの結果は、ホヤ中に含まれるカロテノイドが慢性炎症に関わる癌やその他の生活習慣病に対しても予防効果を期待させる物質であることを示すものであった。

第5章では、カロテノイドに共通するイソプレノイド構造を有した14種類の類縁化合物の癌細胞に対する増殖抑制効果を調べた結果、**phytol**と**zeaxanthin**がHL-60細胞に対して顕著な増殖抑制を示し、更に**phytol**はアポトーシス誘導能を示した。また、**phytol**及び**phytanic acid**がRAW264.7細胞に対し炎症性サイトカイン及びiNOS、COX-2のmRNA発現を顕著に抑制することも明らかになった。本研究ではカロテノイドに加え、その類縁化合物においても癌細胞に対する強いアポトーシス誘導能と抗炎症作用を明らかにした。

本研究では、ホヤに含まれる**fucoxanthinol**及び**halocynthiaxanthin**の新たな機能性として癌細胞に対するアポトーシス誘導能を明らかにした。更に、**all-trans-alloxanthin**、**all-trans-diatoxanthin**及びその9-cis-異性体が広く生活習慣病の予防効果が期待できる抗炎症作用を示し、これが炎症性サイトカインや炎症誘導酵素の遺伝子発現に対する抑制効果に起因することをはじめて明らかにした。これらの成果は、癌や炎症予防の研究分野において重要な知見になるとともに、機能性食品への高度利用や水産資源の有効利用の分野に新たな視点を与える意義深いものである。

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 准 教 授 細 川 雅 史

学 位 論 文 題 名

ホヤ由来カロテノイドの抗癌及び抗炎症作用の解明

癌は日本人の死亡原因の第1位を占め、その予防、治療法の開発が大きな課題となっている。カロテノイドは、抗酸化作用、免疫賦活作用等を示すことが報告されているが、癌の予防効果についても多くの疫学的研究がある。本研究では、ユニークな構造をもつカロテノイドを複数含み資源量も豊富なホヤを試料とし、癌の予防や治療の研究で注目されているアポトーシス誘導効果を示すホヤカロテノイドについて検討した。また、癌をはじめ様々な生活習慣病の予防につながる抗炎症効果を有するカロテノイドの探索とその機能性の解明も行い、以下のような成果を得た。

1. ホヤカロテノイドのヒト白血病細胞に対する増殖抑制効果

ヒト白血病細胞株HL-60細胞に対する増殖抑制を示すホヤカロテノイドとして、フコキサンチノールとハロシンチアキサンチンを見出した。これまでに海藻に含まれるカロテノイド、フコキサンチンが、ヒト白血病細胞に対して非常に強い増殖抑制効果のあることが報告されている。フコキサンチンの活性は、自然界に存在するカロテノイドの中でも最も強いとされていたが、フコキサンチノールとハロシンチアキサンチンの増殖抑制作用はフコキサンチンのそれよりも強いことを初めて明らかにした。

2. ホヤカロテノイドのアポトーシス誘導作用

フコキサンチノールとハロシンチアキサンチンで処理したHL-60細胞の形態を観察したところ、アポトーシス細胞に特徴的にみられるアポトーシス小体に加え、クロマチンの凝集と細胞内DNAの断片化がみられた。さらに、フコキサンチノールとハロシンチアキサンチンによるアポトーシス誘導機構を明らかにするため、アポトーシスの制御因子であるBcl-2タンパク質をウェスタンブロット法により解析した。その結果、フコキサンチノールとハロシンチアキサンチンのいずれにおいてもその発現量が低下し、特に、フコキサンチノールで顕著な低下が見られた。このように、ホヤカロテノイドはBcl-2の発現量の低下を引き起こし、その結果、癌細胞でみられるアポトーシスの抑制を解除することで細胞死を誘導することを明らかにした。

3. ホヤカロテノイドの各種癌細胞に対する増殖抑制効果

結腸癌Caco-2、乳癌MCF-7、前立腺癌LNCap細胞に対するフコキサンチノールとハロシンチアキサンチン並びにフコキサンチンの増殖抑制能およびアポトーシス誘導能を評価した。その結果、どの癌細胞に対しても、

フコキサンチノール>ハロシンチアキサンチン>フコキサンチンの順で強いアポトーシス誘導能を示すことがわかった。また、カロテノイドの細胞内への取り込みについて分析した結果、フコキサンチノールが最も取り込まれやすいことがわかり、こうした特長がフコキサンチノールの強い増殖抑制作用と関係していることを明らかにした。

4. ホヤカロテノイドの抗炎症作用（急性炎症抑制）

急性炎症は、刺激因子による炎症細胞からの炎症性サイトカイン（TNF- α 、IL- β 、IL-6、IFN- γ ）の分泌により誘導される。マクロファージ様RAW264.7細胞を用いて、炎症性サイトカイン及び炎症関連酵素のiNOSやCOX-2の遺伝子発現にするホヤカロテノイドの作用を検討したところ、アロキサンチンとディアトキサンチンに、IL-1 β やIL-6といった炎症性サイトカインや、COX-2およびiNOSなどの炎症関連酵素のmRNA発現の抑制効果のあることを見出した。

5. ホヤカロテノイドの抗炎症作用（慢性炎症抑制）

急性炎症が引き続くと慢性炎症となる場合がある。炎症の慢性化を促進する因子として、炎症にもなって過剰に発生する活性酸素およびTNF- α などの炎症性のサイトカインの関与が考えられる。そこで、ヒト結腸癌細胞株HT-29を過酸化水素やTNF- α で刺激し、炎症性サイトカインの分泌を亢進させた状態で、アロキサンチンとディアトキサンチンの効果を検討した。その結果、両カロテノイド共、活性酸素（過酸化水素）やTNF- α により誘導される炎症性サイトカイン遺伝子の発現量を抑制できることを明らかにした。

6. イソプレノイドの癌細胞に対する増殖抑制効果

カロテノイドに共通するイソプレノイド構造を有した14種類の類縁化合物の癌細胞に対する増殖抑制効果を調べた結果、フィトールとゼアキサンチンがHL-60細胞に対して顕著な増殖抑制を示し、更にフィトールはアポトーシス誘導能を示すことを明らかにした。また、フィトールとフィタン酸がRAW264.7細胞に対し炎症性サイトカイン及びiNOS、COX-2のmRNA発現を顕著に抑制することも明らかにした。

このように、本研究では、ホヤに含まれるフコキサンチノールとハロシンチアキサンチンの新たな機能性として癌細胞に対するアポトーシス誘導能を明らかにした。また、両カロテノイドの癌細胞に対する増殖抑制効果が、これまで知られているカロテノイドの中では最も強いことを明らかにした。さらに、ホヤに含まれるその他の主要カロテノイドであるアロキサンチンとディアトキサンチンが、抗炎症作用を示し、これが炎症性サイトカインや炎症誘導酵素の遺伝子発現に対する抑制効果に起因することを初めて明らかにした。これらの成果は、癌や炎症予防の研究分野において重要な知見になるとともに、機能性食品への高度利用や水産資源の有効利用の分野に新たな視点を与える意義深いものである。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。