

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580121

研究課題名(和文) ポリフェノールによるアディポカイン産生調節と乳癌抑制効果

研究課題名(英文) Adipokine regulation and antitumor effect by apple procyanidins

研究代表者 葛西 宏介

(KASAI KOSUKE)

弘前大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：50400148

研究成果の概要(和文)：肥満マウスにACTを摂取させることにより、脾臓における抗腫瘍免疫機能を活性化させること、およびB16 melanoma細胞に対して細胞増殖促進作用を示すアディポネクチンのレセプター(*Adipor1*)遺伝子の発現量をACTが低下させることにより、アディポネクチンによる細胞増殖シグナルを抑制し、肥満により促進される腫瘍の増殖を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

In this study, anti-tumor action of the apple procyanidins (ACT) in obesity mouse model, in which high-fat diet (HFD) was fed with C57BL/6J mouse, was investigated. The expression of adipokine, cytokine and apoptosis-related genes in adipose, spleen and tumor tissue were analyzed by real-time RT-PCR after transplantation with B16 melanoma cells. Obesity mice fed with ACT (HFD-ACT) showed 65.4 % of tumor volume decrease. It is indicated that the ACT suppressed the obesity-related acceleration of tumor growth by activation of the anti-tumor immunity and suppression of growth signal in tumor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：リンゴプロシアニジン、肥満、抗腫瘍効果、アディポネクチン

1. 研究開始当初の背景

(1)アディポカインと癌の増殖

アディポネクチンとがんには互いに関係性があり、血中アディポネクチン濃度が低いと発がん率が上昇する報告がある。また、アディポネクチンは肥満状態にあるマウスの大腸がんを抑制する効果を表すなど、癌の増殖を有意に抑制することが

報告されている。しかし、アディポネクチンの分泌量は内臓脂肪と負の相関を示しており、内臓脂肪が増えれば血液中のアディポネクチンは減少することが報告されている。

(2)食品による生活習慣病の予防

がんを始めとする生活習慣病の多くは活性酸素やそれに由来するフリーラジカル、過酸化脂質な

どによる酸化ストレスが発症や進行の一つの要因となることが明らかになっている。ポリフェノールやカロテノイド、ビタミンCは代表的な抗酸化性食品成分であり、*in vitro* や *in vivo*における抗酸化能が明らかにされている他、免疫調査における疾病予防・改善に関する報告も多くなされている。特に、ポリフェノールは、抗酸化作用を始めとする様々な機能性を有することから生活習慣病の予防・改善に寄与することが期待され、現在までに多くの研究報告がなされてきた。

(3) リンゴポリフェノール

リンゴの摂取により、がん、心血管疾患、糖尿病など多くの疾病罹患リスクを減らすことが報告されており、リンゴに多く含まれるポリフェノール類の関与が報告されている。リンゴポリフェノールに含まれているリンゴプロシアニジンは、腫瘍細胞をアポトーシスへと誘導させる作用があることが示唆されている。ポリフェノールには体重増加を抑制する傾向が示されており、緑茶に含まれるカテキン類のEGCGを摂取することにより体重および低比重リポタンパク-コレステロール

(LDC-c)の低下が認められる報告がある。また、リンゴポリフェノールに含まれるリンゴプロシアニジンも高脂肪飼料とともに摂取させたラットの内臓脂肪の蓄積量を測定した結果、リンゴプロシアニジンの摂取により脂肪の蓄積が有意に抑制されることが報告されている。しかしながら、リンゴプロシアニジンの抗腫瘍効果と肥満の関係を明らかにした報告はない。

2. 研究の目的

リンゴプロシアニジン (ACT) とアディポネクチンは、腫瘍細胞へアポトーシスを誘導することが報告されている。また、アディポネクチンの分泌は内臓脂肪と負の相関を示し、近年、肥満によるアディポネクチン産生減少と腫瘍の増殖との関係が注目されている。しかしながら、ACTによる抗腫瘍効果と肥満の関係は不明である。本研究ではマウス肥満モデルを用い、ACTの抗腫瘍効果に及ぼす肥満の影響を解析した。

3. 研究の方法

(1) リンゴプロシアニジン

リンゴの未熟果から抽出・精製したリンゴポリフェノール (apple polyphenol : AP, アサヒビール株式会社) のプロシアニジン濃度を約 85%まで精製したリンゴプロシアニジン類 (apple condensed tannin : ACT, アサヒビール株式会社) を用いた。

(2) 実験動物

4 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールス・リバー株式会社) を 1 週間の予備飼育期間を経て実験に供した。飼育環境は室温を $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度を $55 \pm 5\%$ とし、照明時間を 8 時~20 時とした。尚、全ての動物実験は「弘前大学動物実験マニュアル」に従い弘前大学医学部動物実験倫理委員会の認証を経て実施した。

(3) 飼料調整

通常飼料として、MF (脂肪分 5%カロリー比, オリエンタル酵母工業株式会社) を用いた。高脂肪飼料には、脂肪分 60%カロリー比高脂肪飼料 (high fat diet-60 : HFD, オリエンタル酵母工業株式会社) を用いた。

(4) 培養細胞株

ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲されたマウス由来 B16 melanoma 細胞株を用いた。

(5) 肥満マウスモデル

予備飼育後のマウス (5 週齢) を通常食 (Normal diet, ND) 群と、高脂肪食 (HFD) 群に分け、さらに、それぞれ蒸留水 (DW) 投与群 (ND-DW および HFD-DW) と 1% ACT リンゴプロシアニジン (ACT) 投与群 (ND-ACT および HFD-ACT) の 4 群に分け実験を行った。マウスには、自由摂餌および自由飲水にて飼育した。投与開始 13 週間後、B16 melanoma 細胞 (1×10^6 cells/mouse) をマウスに皮下移植した。

(6) 血清アディポネクチン濃度の測定

血清中のアディポネクチン濃度はマウス/ラットアディポネクチン ELISA キット (大塚製薬株式会社) を用いて測定した。

(7) 生化学検査

血中のグルコース濃度は Accu-Chek[®] (Roche) を用いて測定した。血中脂質濃度 (総コレステロール (T-cho)、TG、HDL-c) および肝機能 (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ値 (AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ値 (ALT)) は Spotchem[™] II 肝機能-2 (Arkray) を用いて測定した。

(8) 遺伝子発現解析

細胞を終濃度 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した ACT 含有培地中で 48 時間培養を行った。また、腫瘍移植後にマウスより摘出した各臓器 (脾臓、腫瘍および WAT) 並びに腫瘍組織は RNA *later* に浸漬保存した。細胞浮遊液および摘出組織より総 RNA を抽出し、TaqMan[®] Assays による qRT-PCR を行った。定量解析には $\Delta\Delta\text{CT}$ 法 ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) を用いた。

(9) 細胞増殖試験

B16 melanoma 細胞を 2×10^4 cells/well に調整

後、96-well プレート (Iwaki) で 24 時間前培養した。前培養後、PBS を用いて各種濃度 (0, 0.03, 0.3, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に希釈したリコンビナントアディポネクチン (ACRP30, BioVendor) を各ウェルに添加し、さらに 24 時間培養した。細胞増殖試験には、Alamar Blue® Assay を用いた (40)。

(10) 統計解析

実験にて得られた数値は平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した。肥満マウスに及ぼす ACT の抗腫瘍効果および B16 melanoma 細胞に及ぼすアディポネクチンの影響解析を行ったデータの統計解析は Kruskal-Wallis test を行った後、Scheffe' s F test を実施した。有意水準 $p < 0.05$ を有意差有とした。また、B16 細胞の遺伝子発現に及ぼす ACT の直接的影響を解析する実験データの統計解析は Mann-Whitney' s U test を実施し、有意水準 $p < 0.05$ を有意差有とした。データの統計解析は Statcel2 (オーエムエス) を使って実施した。

4. 研究成果

(1) 肥満マウスモデルにおける血糖および血中タンパク質に及ぼすリングプロシアニジンの影響

HFD による肥満モデルの確認、および ACT 摂取による体重増加の抑制効果を検討するため ND および HFD 開始後から 15 週間後まで各マウスの体重を 1 週間毎に測定した (Fig. 1)。ND-DW マウスおよび ND-ACT マウスでは、それぞれ実験開始時の (16.1 \pm 0.92 g, 17.0 \pm 0.85 g) から 15 週間後には (30.4 \pm 2.1 g, 29.9 \pm 2.4 g) まで体重が増加したが、両群間で体重の増加に有意な差は認められなかった ($p=0.50$)。HFD 摂取マウスでは摂取開始時 (17.1 \pm 1.0 g) から体重が増加し、6 週間後には HFD-DW マウスでは 31.7 \pm 1.5 g、HFD-ACT マウスでは 29.5 \pm 1.9 g で、ND-DW に対して有意に増加した ($p=0.0014$, $p=0.0028$)。6 週目以降もさらに体重は有意に増加した ($p=0.00078$, $p=0.0091$)。また、HFD-DW マウスに比べ HFD-ACT マウス間では、ACT 摂取による体重の減少傾向が認められた ($p=0.13$)。

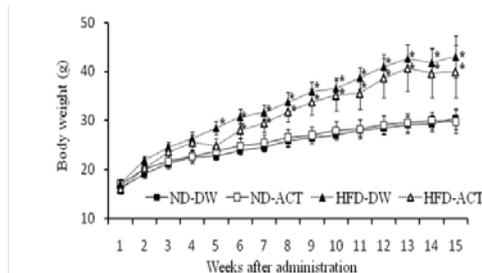


Fig. 1. ACT および HFD 摂取後のマウスの体重変化。

次に、各群のマウスを 15 週間飼育した後、血中グルコース、T-Cho, TG, HDL-c, LDL-c, AST, ALT, 血清 adiponectin を測定した (Table 2)。ND 群、HFD 群ともに ACT 投与による顕著な影響は認められなかった。HFD マウスは ND マウスと比較して T-Cho の有意な上昇 ($p=0.017$) が示され、他にも TG および LDL-c の上昇傾向が認められた。さらに、AST および ALT の上昇傾向により肝機能の低下も認められた。また、血中アディポネクチン濃度は全ての群間で有意な差は認められなかった。これまで、肥満と血中アディポネクチンの間には負の相関があるとの報告が多く認められたが、我々の結果はこれを支持しない。従って、アディポネクチンの腫瘍に対する直接的な作用については再検討が必要となるであろう。

(2) リングプロシアニジンの内臓脂肪蓄積抑制効果

ACT 摂取による内臓脂肪の蓄積抑制効果を検討するため、各群のマウスを 15 週間飼育後、WAT を採取して重量を測定した (Fig. 2)。ND マウス群間において、ACT 摂取による WAT 重量の有意な抑制効果は認められなかった ($p=0.83$)。一方、HFD-DW マウスおよび HFD-ACT マウスでは ND-DW 群と比較してそれぞれ 4.6 \pm 0.49 倍 ($p=0.00078$) および 3.6 \pm 0.92 倍 ($p=0.013$) に WAT 重量が有意に増加した。さらに HFD-ACT マウスでは HFD-DW に比べ、WAT 重量の減少傾向が認められた ($p=0.35$)。

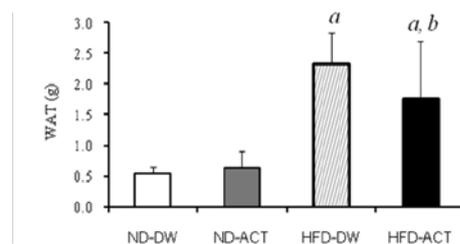


Fig. 2. ACT および HFD 摂取 15 週間後における内臓脂肪量の比較

(3) 肥満モデルマウスにおけるリングプロシアニジンの抗腫瘍効果

各群のマウスを 13 週間飼育した後、B16 melanoma 細胞をマウスに皮下移植し、さらに 2 週間飼育後の腫瘍体積を測定した (Fig. 3)。腫瘍移植 2 週間後における腫瘍体積は、ND-DW マウスと ND-ACT マウスの間で有意な差は認められなかった ($p=0.75$)。一方、HFD-DW マウスは ND-DW 摂取群に対して 3.9 \pm 1.4 倍 ($p=0.0011$) に有意に腫瘍

体積が増加した。また、HFD 摂取マウス群間において ACT を摂取することにより $65.4 \pm 11.7\%$ の腫瘍体積の減少が示され、腫瘍の増加を有意に抑制する効果が認められた ($p=0.0018$)。肥満マウスモデルにおけるリンゴプロシアニジンの抗腫瘍作用は本研究が初めての報告であり、今後の脂質代謝と抗腫瘍との関連において重要な意味を持つ。

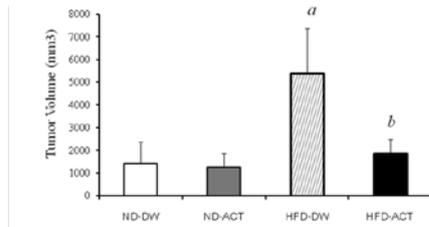


Fig. 3. 腫瘍移植 2 週間後における腫瘍体積の比較.

(4) 脂肪組織における遺伝子発現に及ぼすリンゴプロシアニジンの影響

ACT および HFD が脂肪細胞から分泌されるアディポネクチン (*Adipoq*)、*I16* および *Tnf* の発現量変化に及ぼす影響を検討するため、real-time RT-PCR を用い WAT における遺伝子発現量の変化を解析した (Fig. 4)。ND マウス間においては ACT 摂取による *Adipoq* 発現量アディポネクチンの発現量に有意な差は認められなかった ($p=0.38$)。一方、HFD-DW および HFD-ACT マウスの *Adipoq* 発現量は ND-DW マウスと比較してそれぞれ $77.7 \pm 27.7\%$ ($p=0.0078$) および $64.1 \pm 23.6\%$ ($p=0.0091$) に減少した。また、HFD 群間では ACT を摂取させることにより発現量が増加する傾向が示された (Fig. 4A)。*I16* の発現は、いずれの群も ND-DW 摂取マウス群に対して有意な発現量の減少が認められ (Fig. 4B)、また、*Tnf* の発現に関しては全群間において有意な差は認められないものの、ACT 摂取により発現量を抑制する傾向が示された ($p=0.057$) (Fig. 4. C)。

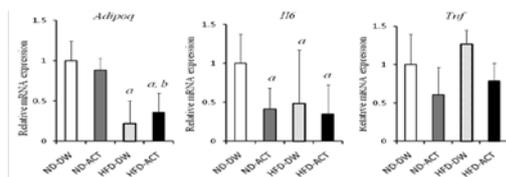


Fig. 4. 脂肪組織におけるアディポサイトカイン遺伝子の発現.

(5) 脾臓における遺伝子発現に及ぼすリンゴプロシアニジンの影響

ACT の抗腫瘍効果と肥満の影響をサイトカイン活性に着目して検討するため脾臓における各遺伝

子 (*Tnf*, *I14*, *I16*, *Ifng*, *Fas1*, *Tnfsf10*) の発現量を測定した (Fig. 5)。炎症反応を引き起こすとされている $\text{TNF-}\alpha$ だが、ACT を摂取することにより両群ともに ND-DW マウスに比べ *Tnf* の発現において上昇傾向が示された (ND-ACT : $p=0.056$ 、HFD-ACT : $p=0.063$)。また *I14* の発現量に有意な差

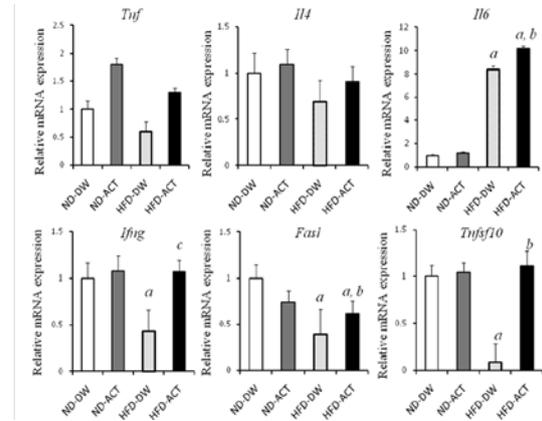


Fig. 5. 脾臓におけるサイトカイン遺伝子の発現.

はなく、*I16* の発現量は ND 群と比較して HFD マウス群では 8.3 ± 0.22 倍の発現増加を示し、有意な差が認められた ($p=0.0091$)。また、*Ifng*, *Fas1* および *Tnfsf10* の発現変化はいずれも類似した傾向を示した。HFD-DW 群は他の 3 群と比較して各遺伝子の発現量が有意に減少していることが認められ、ND-DW との発現量を比較すると、*Ifng* は $56.3 \pm 22.0\%$ ($p=0.0016$)、*Fas1* は $60.5 \pm 26.5\%$ ($p=0.00078$) および *Tnfsf10* は $90.9 \pm 19.3\%$ ($p=0.0026$) の減少が認められ、また ACT を摂取することにより HFD-DW 群で生じた肥満の影響による発現量の減少を有意に抑える効果が認められた (*Ifng* : 2.4 ± 0.30 倍 ($p=0.012$)、*Fas1* : 1.6 ± 0.35 倍 ($p=0.0063$)、*Tnfsf10* : 12.2 ± 1.6 倍 ($p=0.0026$))。

(6) 腫瘍組織における遺伝子発現に及ぼすリンゴプロシアニジンの影響

ACT の抗腫瘍効果に及ぼす肥満の影響を検討するため腫瘍組織において、アディポネクチンレセプター (*Adipor1*, *Adipor2*)、アポトーシスの誘導に関与するデスレセプター (death receptor : DR)、およびアポトーシス関連因子 (*Trp53*, *Bcl2*, *Bcl2l1*) の遺伝子発現量変化を測定した。各 DR 遺伝子 (*Tnfrsf1a*, *Tnfrsf1b*, *Tnfrsf10b*, *Fas*) は、ACT の摂取による発現量の変化は認められず、また肥満マウスにおいても有意な差は認められなかった。HFD-DW マウスは ND-DW マウスと比較して *Adipor1* の発現量が 1.6 ± 0.15 倍に有意に増加

していることが認められ ($p=0.0040$)、さらに ACT を摂取することにより $22.3 \pm 6.88\%$ の発現減少が認められた ($p=0.0032$) (Fig. 6)。一方、*Adipor2* の発現量は 4 群間において有意な差は認められなかった (Fig. 6)。アポトーシスの制御に関与す

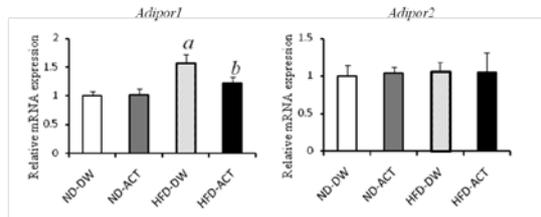


Fig. 6. 腫瘍組織におけるアディポネクチンレセプター遺伝子の発現。

る *Trp53* および *Bcl2* の発現量は 4 群間に有意な差は認められなかった。一方、*Bcl2l1* 発現量において HFD-DW 摂取マウス群は ND-DW 群と比較して 2.2 ± 0.14 倍に発現量が有意に増加していることが認められ ($p=0.0016$)、ACT を摂取することにより $19.9 \pm 6.37\%$ に減少した ($p=0.17$)。

(7) B16 melanoma 細胞の増殖におけるアディポネクチンの直接的影響

アディポネクチンの B16 melanoma 細胞に及ぼす直接的な影響を検討するために、*in vitro* において B16 melanoma 細胞へリコンビナントアディポネクチンを直接作用させ、細胞増殖への影響を解析した。アディポネクチン ($0.03 \sim 30 \mu\text{g/mL}$) を B16 melanoma 細胞に添加させるところ、 0.3 および $3.0 \mu\text{g/mL}$ のリコンビナントアディポネクチンを添加した B16 melanoma 細胞においてそれぞれ 1.37 ± 0.07 倍 ($p=0.034$)、 1.35 ± 0.05 倍 ($p=0.034$) 倍に細胞が有意に増殖した。また、アディポネクチンによる B16 melanoma 細胞の増殖促進効果において濃度依存性は認められなかった (Fig. 7)。アディポネクチンは腫瘍の増殖を必ずしも抑制するわけではなく、アディポネクチンの生理作用（特に細胞内シグナリングに対する影響）について詳細な解析が必要となる。

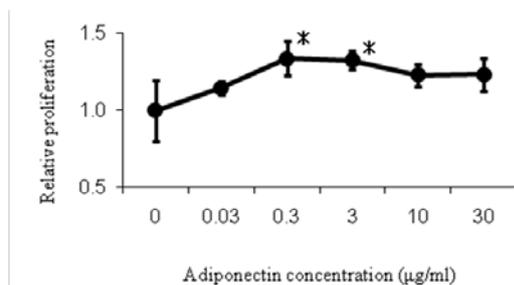


Fig. 7. *In vitro* における B16 melanoma 細胞の

増殖に及ぼすアディポネクチンの影響。

(8) B16 細胞の遺伝子発現に及ぼす ACT の直接的影響

ACT の抗腫瘍機序が直接 B16 細胞に及ぼしているのかを検討するため B16 細胞に ACT を直接添加し、DR、アディポネクチンレセプターおよびアポトーシス関連因子の遺伝子発現量変化を測定した。4 種の DR (*Tnfrsf1a*, *Tnfrsf1b*, *Tnfrsf10b*, *Fas*) 遺伝子の発現において、ACT による影響は認められなかった。ACT を添加した B16 melanoma 細胞の ACT 添加群では、非添加群と比較して *Adipor1* 発現が $31.5 \pm 3.7\%$ 減少した ($p=0.021$) (Fig. 8)。一方、アディポネクチン *Adipor2* の発現量には両群間で有意な差は認められなかった (Fig. 8)。さらに、アポトーシス関連遺伝子のうち *Trp53* の発現量に有意な差は認められなかったが (Fig. 9)、アポトーシスを抑制する働きを持つ *Bcl2* の発現量は ACT 添加群において $54.3 \pm 9.1\%$ に減少しており有意な差が認められた ($p=0.021$) (Fig. 9)。ポリフェノールがアディポネクチンレセプターの発現に影響を及ぼすという報告はこれまでなく、レセプター発現調節による腫瘍増殖の調節経路を詳細に解析する必要があるだろう。

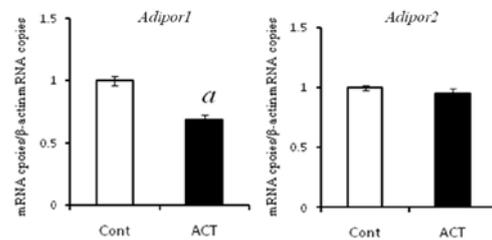


Fig. 8. B16 melanoma 細胞におけるアディポネクチンレセプター遺伝子発現に及ぼす ACT の影響。

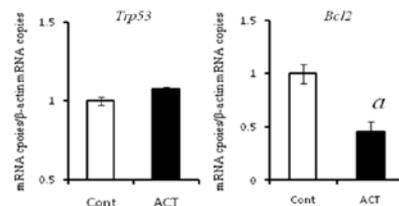


Fig. 9. B16 melanoma 細胞におけるアポトーシスシグナル遺伝子発現に及ぼす ACT の影響。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Kuwabara H, Nakamura T (4 番目) et al. A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits the tumor invasion associated with N-cadherin decrease. *Pathol Int.* (2010), 61:262-263 査読有り
- ② Kasai K, et al. Novel L-amino acid oxidase with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from epidermal mucus of the flounder *Platichthys stellatus*. *FEBS J* (2010), 277:453-465 査読有り
- ③ 中野京子, 三浦富智 等. ラット膵腺房細胞に及ぼすアディポネクチンの作用. 弘前大学大学院保健学研究科紀要(2010), 9:143-149 査読有り
- ④ Honma M, Miura T (5 番目) et al. Novel neofusapyrones isolated from *Verticillium dahliae* as potent antifungal substances. *Bioorg Med Chem Lett* (2010), 20(2):709-712 査読有り
- ⑤ Murakami T, Miura T (6 番目) et al. Four analogues of spiroleptosphol isolated from *Leptosphaeria doliolum*. *Bioorg Med Chem* (2009), 17:492-495 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- ① 三浦富智、リンゴポリフェノールに含まれるプロシアニジン類の抗腫瘍作用、弘前大学プロジェクト研究京都シンポジウム、2009年11月20日、京都リサーチパーク・サイエンスホール
- ② 三浦富智、リンゴプロシアニジンによるDR5発現誘導とTRAILとの併用効果、日本薬学会第129年会、2009年3月27日、国立京都国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/~kensa/biology/page002.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛西 宏介 (KASAI KOSUKE)

弘前大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号：50400148

(H20-H21 研究代表者)

三浦 富智 (MIURA TOMISATO)

弘前大学・大学院保健学研究科・講師
研究者番号：20261456

(2) 研究分担者

中村 敏也 (NAKAMURA TOSHIYA)

弘前大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：00155847

佐藤 達資 (SATO TATSUSUKE)

弘前大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：00091611

(H20-21)