

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580129

研究課題名（和文）大腸発がんにおけるアディポサイトカインの役割と予防食品因子の解明

研究課題名（英文）Roles of adipocytokines in colorectal carcinogenesis and identification of preventive food factors

研究代表者

村上 明（MURAKAMI AKIRA）

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：10271412

研究成果の概要（和文）：現在、先進諸国を中心として肥満者数は急増しており、大腸発がんの要因として注目されている。本研究では、発がん動物モデルにおける肥満関連因子を究明し、さらにこれを制御する食品成分を検索した。その結果、摂食ホルモンであるレプチンの重要性が初めて指摘できた。さらに、柑橘類に特有なフラボノイドであるノビレチンがレプチンの産生を低下させ、またマウス大腸発がんも抑制することも見出した。

研究成果の概要（英文）：At present, obesity is trending in many developed countries, and there is increasing evidence that obesity is associated with colorectal carcinogenesis. In the present study, I attempted to identify endogenous factors which are concomitantly regulated in the processes of obesity and colorectal cancer. Leptin was suggested to be important hormone that increased during chemical carcinogenesis in the colon. In addition, citrus nobiletin was identified to be a promising phytochemical that is capable of regulating leptin levels appropriately and preventing colon tumorigenesis in mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	2,800,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：メタボリックシンドローム、肥満、レプチン、インスリン、大腸発がん、ノビレチン、脂肪細胞、柑橘類

1. 研究開始当初の背景

現在、先進諸国を中心として肥満者数は急増している。WHO（世界保健機関）による2000年の調査では、その数は約11億人であると報告されている。

肥満状態では、高脂血症、心筋梗塞、動脈硬化、高血圧および糖尿病などの様々な生活習慣病の発症リスクが上昇する。

さらに近年の疫学調査では、大腸をはじめとする多くの組織における発がんリスクの上昇も肥満と関連していることが報告されている。実際に、遺伝的に肥満を誘発するモデルマウスを用いた研究によっていくつかの肥満関連因子の関与が示唆されている。

その一方で、非肥満状態における大腸発がん過程に寄与する肥満関連因子を解析した例はこれまでになかった。

従って、化学発がんモデルマウスを用いて発がんに関与する肥満因子を究明することは意義深いと考えられる。

2. 研究の目的

以上を踏まえ、主に次の3課題取り組むことを研究目的とした。

- (1) 大腸化学発がんモデルにおける大腸発がん促進因子の探索
- (2) 大腸腺がん形成および血中レプチンに対する食品成分の作用
- (3) 食品因子の作用機構解明

3. 研究の方法

(1) 主な実験材料

- ・マウス：ICRマウス（雄性、5週齢）
- ・Azoxymethane (AOM)：Sigma社
- ・Dextran sulfate sodium (DSS)：分子量36,000-50,000 (MP Biochemical社)
- ・フラボノイド試料：和光純薬社
- ・3T3L1細胞、HT29細胞：ATCC

(2) 主な試験方法

- ・大腸発がん試験：AOMは10 mg/kg体重の用量で腹腔内単回投与した。またDSSは1%の濃度で飲料水中に添加し1週間投与した。
- ・タンパク質発現量解析：Western blot法
- ・mRNA発現解析：RT-PCR法
- ・アディポサイトカイン定量：ELISA法

4. 研究成果

(1) 大腸化学発がんモデルにおける大腸発がん促進因子の探索

野生型ICRマウスを用いた大腸化学発がんモデルにおける血中アディポサイトカイン濃度の推移を検討した。

本実験では、発がんイニシエーターであるAOMおよび発がんプロモーターであるDSSを

投与することで、20週という短期間で大腸腺がんが形成される動物モデルを用いた。

20週後の血中レプチン濃度を測定したところ、AOMおよびDSS処理群では無処理群に比べ約3倍に上昇していた。

一方、その他のアディポサイトカインであるTNF- α 、IL-6およびアディポネクチンに有意な変化はなかった。レプチンは、主に白色脂肪組織で産生されることが知られている。

そこで、内臓脂肪に注目したところ、腸間膜脂肪および精巣上体周囲脂肪量の増加が観察された。特に顕著な増加が見られた精巣上体周囲脂肪ではレプチン mRNA およびタンパクの発現が上昇していた（図1）。

さらに、レプチン産生の主要な制御機構の1つであるインスリンシグナル経路の活性化および血中インスリンとIGF-1濃度の上昇が認められた。

以上のことから、本モデルにおける血中レプチン濃度の上昇は、内臓脂肪重量の増加および同組織におけるインスリンシグナル経路の活性化に起因していると推察された。

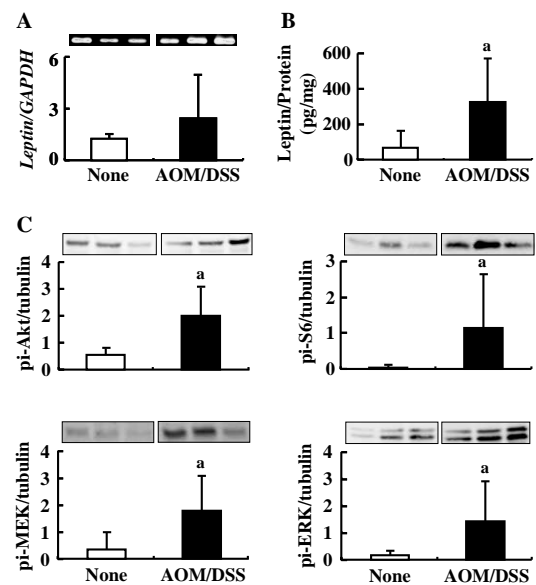


図1. 精巣上体周囲脂肪における (A) レプチン mRNA、(B) レプチンタンパク質発現量の変化および (C) インスリンシグナル経路の活性化 $^aP < 0.05$ vs None

(2) 大腸腺がん形成および血中レプチンに対する食品成分の作用

次に、*in vitro*においてレプチン分泌抑制物質が、大腸化学発がんモデルにおける血中レプチン濃度および腺がん形成に対してどのように作用するかを検討した。

まず、quercetin (QER)、luteolin、apigenin、flavone、chrysin (CHR) および nobiletin

(NOB) の 6 種のフラボノイドについて、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 のレプチン分泌に及ぼす影響を ELISA 法で解析した。

3T3-L1 細胞に分化誘導を行い、その後 12 日間フラボノイド (10 μ M) を添加したところ、NOB が最も強いレプチン分泌抑制作用を示した (図 2)。

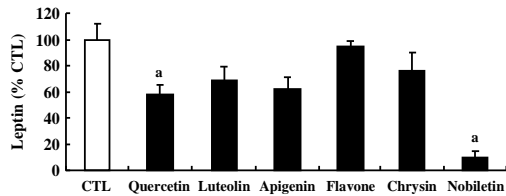


図 2. レプチン分泌に対する各フラボノイドの作用 (^a $P < 0.01$ vs CTL)

そこで、体内への吸収効率を考慮し、NOB と同程度の分子疎水性を有するにも関わらず活性の低かった CHR と NOB を大腸化学発がん試験に供した。

20 週間における発がん処理群の血中レプチン濃度は、無処理群に比べ有意に上昇していた (図 3)。一方、大腸腺がん数の減少および発生率の低下が認められた NOB 混餌投与群 (100 ppm) では、血中レプチン濃度も無処理群とほぼ同程度にまで低下していた。

また、レプチンがヒト大腸がん細胞 HT-29 の増殖を有意に促進させたことから、血中の過剰なレプチンは、非肥満状態における大腸発がんのプロモーションあるいはプログレッション段階に関与しており、NOB はその上昇を抑制することで、腺がんの形成を抑制している可能性が示唆された。

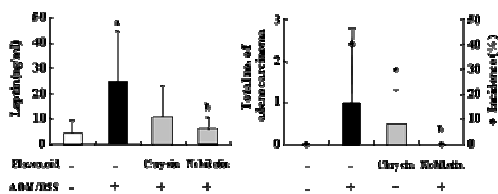


図 3. マウス大腸腺がん数および発生率
^a $P < 0.05$ vs None, ^b $P < 0.05$ vs AOM/DSS

(3) 食品因子の作用機構解明

次に、*in vitro* で活性の強かった NOB のレプチン分泌抑制作用およびその分子機序について解析した。

3T3-L1 細胞を脂肪細胞へと分化誘導した後、QER および NOB を 12 日間添加したところ、培地中へのレプチン分泌量が濃度依存的に抑制された。

脂肪細胞のレプチン産生経路には、翻訳調

節因子である mammalian target of rapamycin (mTOR) やその下流因子である p70 S6 kinase (S6K1) および、その基質である S6 と eukaryotic initiation factor (eIF) 4B が存在する。

mTOR の阻害剤である rapamycin (RAP) は脂肪細胞の分化およびレプチン分泌を抑制することから、これらのシグナル分子に対する NOB の影響を Western blot 法により RAP と比較した。

その結果、RAP は S6 と eIF4B の活性化を抑制し、NOB は MEK1/2 の活性化の抑制を介して eIF4B のリン酸化を抑制することが強く示唆された (図 4・5)。

また、レプチン mRNA 発現に対する作用を RT-PCR 法を用いて検討したところ、NOB は濃度依存的にその発現を抑制することが明らかとなった。

以上の結果から、NOB は転写および翻訳段階の両方に作用することで強いレプチン分泌抑制作用を示すと考えられた。

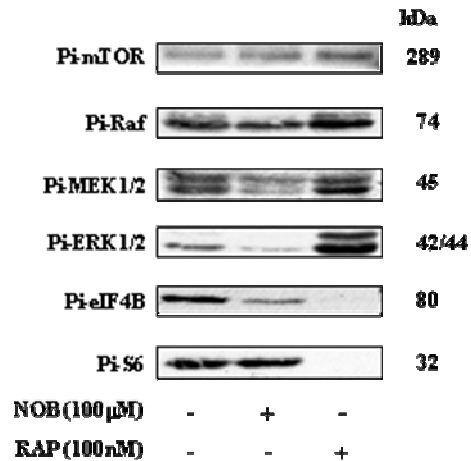


図 4. MEK/ERK/eIF4B 経路のリン酸化に対する NOB の抑制作用

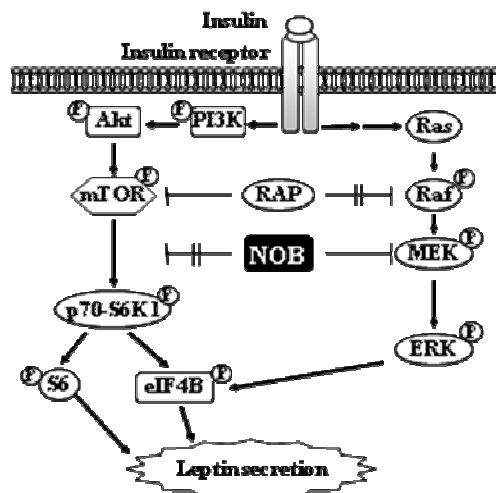


図5. NOB と RAP のレプチン分泌抑制推定分子機構

(4) 結語

本研究は、非肥満マウスを用いた大腸化学発がんモデルにおいて血中レプチン濃度が上昇することを初めて明らかにした。

また、その機構として精巣上体周囲脂肪量の増加と同組織におけるインスリンシグナル経路の活性化を提示できた。

カンキツ類特有のフラボノイドである NOB は、*in vitro* と *in vivo* で特に強いレプチン分泌抑制作用を示したことから、血中レプチン濃度を適切に維持することで、大腸発がんを抑制している可能性が示唆された。

レプチンは、生体の恒常性維持に必須なホルモンであるが、エストロゲンやインスリンと同様に、その血中濃度が過剰になると大腸発がんの促進因子となると考えられる。

従って、内臓脂肪の過剰な生成はメタボリックシンドロームのみならず、大腸発がんにおいても病態の発症基盤として重要であると思われる。

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7件)

■原著論文

(1) Dietary flavonoids suppress azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. Miyamoto S, Yasui Y, Ohigashi H, Tanaka T, Murakami A., Chem Biol Interact, 2010;183(2):276-83. 査読有

(2) Increased visceral fat mass and insulin signaling in colitis-related colon carcinogenesis model mice. Miyamoto S, Tanaka T, Murakami A., Chem Biol Interact, 2010;183(2):271-5. 査読有

(3) Suppressive effects of nobiletin on hyperleptinemia and colitis-related colon carcinogenesis in male ICR mice. Miyamoto S, Yasui Y, Tanaka T, Ohigashi H, Murakami A. Carcinogenesis. 2008;29(5):1057-63. 査読有

■総説

(4) Dietary flavonoids as cancer-preventive biofactors. Nishiumi S, Miyamoto S, Kawabata K, Ohnishi K, Mukai R, Murakami A., Ashida H, Terao J. Front Biosci, in press. 査読有

(5) Reply to letter to the editor "Comment on: Dietary flavonoids suppress azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice" Miyamoto S, Yasui Y, Ohigashi H, Tanaka T, Murakami A., Chem Biol Interact, 2010;183(2):271-5. 査読有

(6) Multitargeted cancer prevention by quercetin. Murakami A., Ashida H, Terao J. Cancer Lett. 2008;269(2):315-25. 査読有

(7) 宮本真吾、村上 明、肥満と大腸がんをつなぐ因子:レプチン ~柑橘類フラボノイドの新たな大腸発がん抑制メカニズム?~, vol. 642, pp. 34-38, フードリサーチ、食品研究社、2008. 査読無

[学会発表] (計5件)

■一般口演

(1) 宮本真吾、安井由美子、村上 明、大東 肇、田中卓二、遺伝性肥満 db/db マウスにおける大腸前がん病変の生成に対する quercetin の抑制作用、日本フードファクター学会、2008年11月17日~18日 タワーホール船堀 (東京)

(2) 宮本真吾、村上 明、田中卓二、脂肪細胞のレプチン分泌に対するノビレチンの抑制メカニズム、第15回 日本がん予防学会、2008年5月22日~23日 九州大学医学部百年講堂 (福岡)

■招待講演

(3) Akira Murakami and Shingo Miyamoto, Preventive effects of flavonoids on hyperleptinemia and colitis-related colon carcinogenesis in ICR mice. The 4th International Gastrointestinal Consensus Symposium. February 19, 2011, Kyoto, Japan

(4) 村上 明、食品因子の機能性と安全性: 諸刃の剣が語ること、日本環境変異原学会、2009年11月27日 清水テルサ (静岡)

(5) 村上 明、ポリフェノールの抗炎症作用について第14回チョコレート・ココア国際栄養シンポジウム、2009年9月18日 国際会議場 (東京)

[図書] (計1件)

(1) Murakami A. and Ohigashi H., Anti-inflammatory and Anti-carcinogenesis Potentials of Citrus Coumarins and Polymethoxyflavonoids. In Nutrigenomics and Proteomics in Health and Disease, Wiley-Blackwell, 412, pp. 311-324 (2009).

〔その他〕

ホームページ等

<http://foodscience.rakurakuhp.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 明 (MURAKAMI AKIRA)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：10271412

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：