

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(c)

研究期間：2010～2012 年度

課題番号：22500780

研究課題名（和文）マウス大腸炎および発がんモデルに対する低用量アロエエモジンの修飾作用

研究課題名（英文）Effect of low-dose aloe emodin on the development of colorectal tumors in Min mice

研究代表者 新保 寛 (SHIMPO HIROSHI (KAN))

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・教授

研究者番号：10142580

研究成果の概要（和文）：

アロエエモジン(AE)は抗がん活性や抗炎症効果を有することが報告されている。我々は ApcMin/+マウスの大腸腫瘍発症のデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)処置の有無に対する低用量 AE の修飾作用を調べた。その結果、低用量 AE の混餌投与は、DSS 未処置・処置の双方で Min マウスの大腸腫瘍の発生を低下させた。さらに、低用量 AE 投与は Min マウスの大腸粘膜の細胞増殖能を抑制した。

研究成果の概要（英文）：

Aloe emodin (AE) is a hydroxyanthraquinone compound that is present in some medicinal plants such as Cassia, Rheum, and Aloe. AE has been reported to have anticancer activity in various cancer cell lines and anti-inflammatory effects in murine macrophages. We investigated the cancer chemopreventive effects of low-dose AE on the development of colorectal tumors in ApcMin/+ mice without or with dextran sodium sulfate (DSS). As a result, feeding with low-dose (5, 10 or 50 ppm) AE reduced the development of colorectal tumors in ApcMin/+ mice without or with DSS, although this was not dose-dependent. These results suggest that dietary administration of low-dose (somewhere between 5 and 50 ppm) AE may have chemopreventive effects especially against colitis-related colorectal tumor development in ApcMin/+ mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：特殊栄養食品、アロエエモジン、デキストラン硫酸ナトリウム、潰瘍性大腸炎、Apc 遺伝子変異 Min マウス、大腸腫瘍

1. 研究開始当初の背景

本邦で健康食品として広く普及している

キダチアロエ(*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger)を摂食すると、大腸で微

量のアロエエモジン(AE)が産生される可能性がある。このAEは生理活性が強く *in vitro* では抗がん作用などが多数報告されているが、*in vivo* 実験での報告はほとんど見られない。申請者は最近、簡便にAEを精製する方法を確立し、マウスへの投与実験を試みた。その結果、500 ppm 投与群で大腸粘膜の細胞増殖能が亢進した。一方 *in vitro* 実験でAEが抗炎症作用を有することが報告された。

2. 研究の目的

本研究では低用量AE投与がマウス大腸炎及び大腸発がんの *in vivo* モデルにおいても抗炎症・発がん抑制作用を發揮するか否かを検討した。特に大腸発がんに対する抑制効果の有無は動物発がんモデルとして、*Apc* 遺伝子変異 Min マウスを用いて検討した。Min マウスは家族性大腸腺腫症(FAP)のモデルだけでなく、ヒトの大腸がん発生モデルとしても有用なことが知られている。しかしながら、Min マウスの腸管でのポリープの好発部位は主に小腸であり、大腸ではポリープの発生は少ない。そこで大腸炎モデル実験で用いたデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を処理したモデルでの発がん実験も検討した。

3. 研究の方法

(1)DSS 誘発マウス潰瘍性大腸炎モデルに対する低用量AEの修飾作用

実験1は雄C57BL/6マウスにAE混餌(2.5/5 ppm)を与え、14日後飲水として2% DSS溶液を投与した。DSS投与7日後に全てのマウスを解剖し、大腸長を測定した。実験2では同マウスにDSS溶液を投与すると同時にAE混餌(0.02%)を12日間投与した。実験3では同マウスにDSS溶液7日間投与後、飲水を水として0.02% AE混餌を与える回復効果を検討した。

(2)*Apc* 遺伝子変異Minマウスを用いた腸管ポリープ形成に対するAEの修飾作用

実験はPerkinsら(2002)の報告に準じて行った。雄MinマウスにAE混餌(5/10 ppm)を12週間投与した。実験終了後マウスを解剖し、腸管(小腸と大腸)を摘出し、0.5 mm以上のポリープ(腫瘍)数を測定した。実験終了後マウスを解剖し、腸管(小腸と大腸)を摘出し、0.5 mm以上のポリープ(腫瘍)数を測定した。

(3)DSS誘発炎症刺激によるMinマウス大腸発がんには及ぼす影響

実験はKohnoら(2007)の報告に従って行った。雌Minマウスに、最初の1週間1% DSS混水を与え、同時に対照群に基礎飼料、実験群にはAE混餌(5/50 ppm)を5週間与えた。実験終了後マウスを解剖し、腸管(小腸と大腸)を摘出し、0.5 mm以上のポリープ(腫瘍)

数を測定した。

(4)Min マウスを用いた腸管ポリープ形成に対するエモジン(AE類似物質)の修飾作用

実験は(2)と同様、Perkinsら(2002)の報告に準じて行った。実験群は基礎飼料群、75 ppmエモジン混餌投与群、150 ppmエモジン混餌投与群を作成し12週間実施した。実験終了後マウスを解剖し、腸管(小腸と大腸)を摘出し、0.5 mm以上のポリープ(腫瘍)数を測定した。

4. 研究成果

(1)DSS誘発マウス潰瘍性大腸炎モデルに対する低用量AEの修飾作用

実験1~3のいずれにおいてもAEによる抑制効果は見られなかった。一方、AE投与による大腸炎の促進作用も認めることができなかった(詳細データは省く)。

(2)*Apc* 遺伝子変異Minマウスを用いた腸管ポリープ形成に対するAEの抑制効果

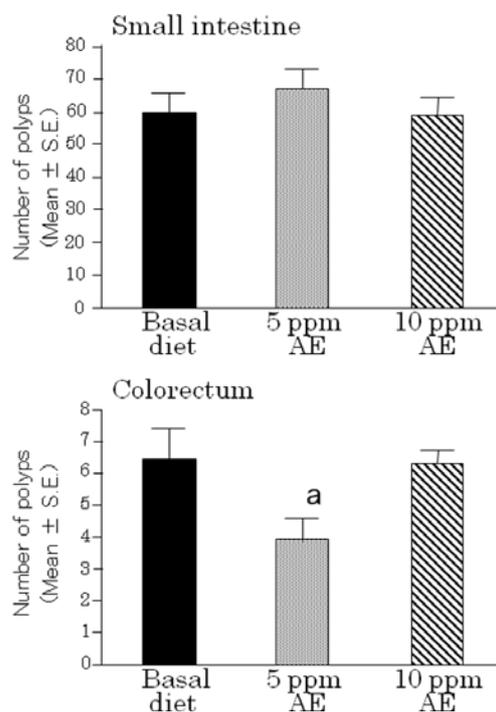


図1. 腸管ポリープ数の比較

小腸腫瘍数はAE混餌投与で有意な変化は見られなかったが、大腸腫瘍数では5 ppm AE群で有意な抑制効果が見られた(図1)。また、大腸粘膜の細胞増殖性マーカー(MIB-5 標識率)が5 ppm AE群と10 ppm AE群でともに有意に抑制した(次ページ、図2)。

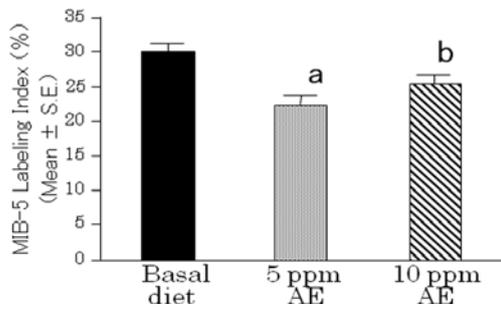


図 2. MIB-5 標識率の比較

(3) DSS 誘発炎症刺激による Min マウス大腸癌に対する AE の抑制効果

図 3 に示すように、小腸腫瘍数は DSS 処置の有無と AE 混餌投与で有意な変化は見られなかった。一方、大腸腫瘍数は DSS 処置で有意に増加し、それに対して 50 ppm AE 群で有意に抑制し、5 ppm AE 群でも抑制傾向を示した。また、MIB-5 標識率は DSS 処置で有意に増加し、それに対して 5 ppm AE 群で有意に抑制した (図 4)。

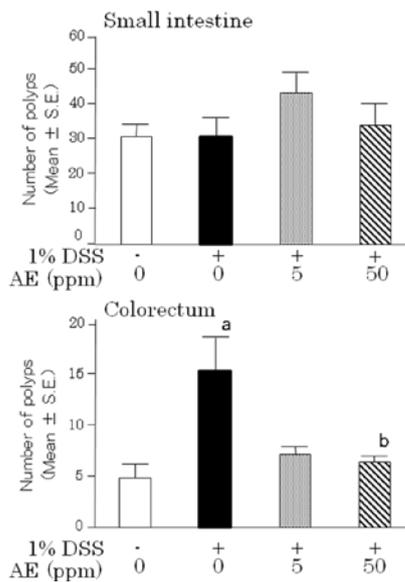


図 3. 腸管ポリープ数の比較

本実験における血漿脂質レベルを測定した結果、トリグリセリドも総コレステロール値も有意な変化は見られなかった (詳細データは省く)。また、定量的 RT-PCR 法を用いて、大腸粘膜の iNOS mRNA 発現を測定した結果、5 ppm AE 群と 50 ppm AE 群で抑制傾向が見られた (詳細データは省く)。

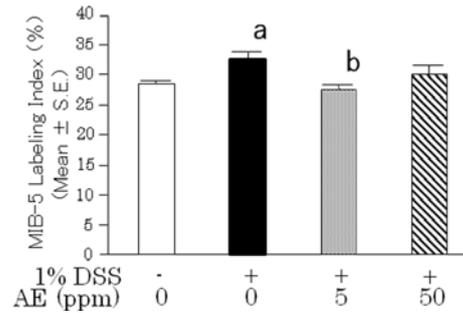


図 4. MIB-5 標識率の比較

(4) Min マウスを用いた腸管ポリープ形成に対するエモジンの影響

小腸腫瘍数はエモジン混餌投与で有意な変化は見られなかったが、大腸腫瘍数では 75 ppm エモジン群で 31%、150 ppm エモジン群で 29% ($p < 0.05$) の抑制効果が見られた (詳細データは省く)。この抑制メカニズムは現在検討中である。

(5) 考察

アントラキノン系緩下剤の長期服用が大腸癌の危険因子になる可能性が指摘されてから約 20 年が過ぎたが、当初ラット・マウスへの AE 混餌投与の報告は見られなかった。我々は 2009 年、AE をマウスへ 5 週間混餌投与してその影響を調べた。その結果、500 ppm AE 混餌投与で大腸粘膜の肥厚が観察されたので、細胞増殖性マーカーである Ki-67 標識率を調べたところ、500 AE 群で上昇傾向を示した。

一方、AE と同様のアントラキノン骨格を有し、既にラットやマウスで大腸癌が認められている 1,8-ジヒドロキシアントラキノン (DHAQ) はラットの近位結腸で 0.0125% (=125 ppm) 混餌投与でも同じく細胞増殖能をみる BrdU 標識率が有意に増加することが報告されており、AE は DHAQ をやや下回る大腸粘膜の細胞増殖能を有する可能性が示唆された。また、もう一つの AE 類似化合物であるエモジンは、米国国家毒性プログラムによって詳しい毒性試験成績が報告されている。その詳細は省くが、エモジンの毒性は DHAQ や AE より低い所見であった。

なお、我々はキダチアロエ全葉凍結乾燥粉末を下痢しない程度 (0.1~1%) で混餌投与すると、マウス大腸腫瘍性病変発生を軽減させること、さらにラット腸管腫瘍発生率を低下させることを報告してきた。一方、著者らと異なる製法でのキダチアロエ粉末を用いたラット 1 年間毒性試験および 2 年間毒性・発がん性試験結果が 2008~2009 年に報

告された。特に後者では、高用量投与群で一部に大腸腫瘍発生の曖昧な証拠が見出され、それは継続的な下痢に起因することが示唆された。一方で我々の以前行った AE 投与実験では、大腸粘膜の細胞増殖性が亢進する傾向にあった 500 ppm AE 投与群でもまったく下痢症状は見られなかった。

ごく最近(2013年)、Boudreauらは、ラットとマウスを用いてアロエベラ (*Aloe barbadensis* Miller = *Aloe vera*) 全葉抽出物(以下、AVWLE)の2年間毒性試験結果を報告し、この抽出物はラットとマウスで腸内刺激剤であり、またラットで明確な大腸発がん性を有することが示された。この報告では、マウスとラットの AVWLE の1日摂取量から、AVWLE 抽出物のリンゴ酸、アロイン A、AE の1日摂取量が算出されている。

そこで、著者らが行った本研究における AE の Min マウスでの1日摂取量と比較してみたい(単位は mg/kg bw/day)。著者らは 5 ppm AE 群 0.7、10 ppm AE 群 1.64、50 ppm AE 群 7.4 であった。一方、Boudreauらは雄マウスで 0.5% AVWLE 群 0.21、1.0% AVWLE 群 0.49、1.5% AVWLE 群 0.84、雄ラットで 0.5% AVWLE 群 0.02、1.0% AVWLE 群 0.04、1.5% AVWLE 群 0.08 (雌のマウス・ラット数値は略す)であった。これらを単純に比較すると、著者らが低用量として設定して、Min マウスの大腸腫瘍形成を抑制した 5~50 ppm AE 群に対して、Boudreauらの特に大腸発がん性を示したラットの 1.0% AVWLE 群や 1.5% AVWLE 群では、AE の1日摂取量が随分と低値となる矛盾した数値となっている。

しかし、AVWLE はアロエベラの外側の葉皮を除く全成分が濃縮された粉末であり、より高濃度に含まれているアロインがラットでは大腸内で腸内細菌によって代謝変換されて最終的に一部が AE になることも考慮されなければならない。また Boudreau は AVWLE がラットで大腸発がん性を示したことについて、従来から懸念されているアロエラテックスのアントラキノン系成分(アロインや AE)のほかに、ゲル成分の関与も推察しているがそれを明らかにするにはさらなる研究が必要としている。

結論として、本研究で著者らは、マウス大腸炎モデルにおいて、AE の抑制効果を見出すことはできなかった。しかし、Min マウス大腸発がんモデルでは、AE の低用量食餌性投与(5, 10, 50 ppm)で大腸腫瘍の発生を、DSS 処置の有無にかかわらず、抑制することを見出した。さらに、AE 類似化合物のエモジンにおいても Min マウスの大腸発がんを抑制することを明らかにした。

これらの成果を踏まえて、今年度から「炎症を背景としたマウス大腸発がんモデルに対するキダチアロエ低分子成分の修飾作

用」(平成25年度科研費・基盤(C)採択)の研究に取り組みは始めている。

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)

[学会発表] (計1件)

1. Kan Shimpō, Takeshi Chihara, Takaaki Kaneko, Hidehiko Beppu, Kazumasa Wakamatsu, Masanori Shinzato, Shigeru Sonoda. Effect of low-dose aloe emodin on the development of colorectal tumors in Min mice. (新保 寛、千原 猛、金児孝晃、別府秀彦、若松一雅、新里昌功、園田 茂. Minマウスの大腸腫瘍発生に対する低用量アロエエモジンの影響) The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association(第71回日本癌学会学術総会) September 19-21, 2012 (Proceedings P-3367, p. 552).

[その他]

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/FMIP/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新保 寛 (SHIMPO HIROSHI (KAN))

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所
所・生化学研究部門・教授

研究者番号：10142580

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

千原 猛 (CHIHARA TAKESHI)

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所
・講師

研究者番号：00217241

金児孝晃 (KANEKO TAKAAKI)

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所
・助手

研究者番号：90267956

戸松亜希子 (TOMATSU AKIKO)

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所
・技術員

研究者番号：20440696

若松一雅 (WAKAMATSU KAZUMASA)

藤田保健衛生大学・医療科学部・教授

研究者番号：80131259

新里昌功 (SHINZATO MASANORI)

藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授

研究者番号：80148288