

令和元年9月2日現在

機関番号：34505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00859

研究課題名(和文) 乳癌制御に効果的な海洋性キサントフィルの探索研究

研究課題名(英文) Research of dietary marine xanthophylls with anti-mammary carcinogenic effects

研究代表者

坂 貴司 (Yuri, Takashi)

甲子園大学・栄養学部・教授

研究者番号：50330212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラットに2種の海洋性キサントフィル(アスタキサンチン・カンタキサンチン)を摂取させ、その後の乳がんの発生率を検証した。アスタキサンチンを豊富に摂取すると、乳がんの発生が抑制されるが、カンタキサンチンには乳がん抑制効果をみなかった。その抑制のメカニズムには、乳腺の周囲にある脂肪細胞が分泌する善玉サイトカインである、アディポネクチンの分泌亢進が関わっていることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海藻やサーモンや甲殻類に含まれるアスタキサンチンは、本邦では美白効果など美容に効果のある天然食材として知られているが、乳がんの抑制にも効果があることを病理組織学的に証明した。アスタキサンチンなどの海洋性キサントフィルは、古来から日常的に摂取されてきた食品成分であるが、本邦で増加している乳がんの抑制効果も有していることを証明したことは、国民の健康増進に寄与しうる成果と考える。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether short-term dietary xanthophyll administration (canthaxanthin and astaxanthin) inhibits N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced rat mammary carcinogenesis during initiation until early promotional stages of cancer development. Dietary administration of astaxanthin during the initiation and early promotion stages significantly suppressed MNU-induced rat mammary carcinogenesis. In contrast, inhibitory effects of dietary canthaxanthin were not observed. The immunoblotting and immunohistochemical results indicated that a possible mechanism explaining the effects of astaxanthin might be related to the secretion of adiponectin from mammary adipocytes.

研究分野：実験病理学

キーワード：アスタキサンチン カンタキサンチン 乳癌 アディポネクチン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

東南アジア諸国の中でもタイにおける乳癌の年齢調整罹患率は、米国白人のおよそ 1/4 と特に低いが、欧米と比較し、タイでは日常的に牛肉などに多く含まれる動物性脂質の摂取が少なく、エビやカニといった甲殻類に代表される海産資源やレモングラスなどの香草類を豊富に摂取しており、これらの食物に含まれる機能性食品成分が、乳癌罹患率・死亡率の低下に大きく関わっていると推察される。古代より過酷な環境下で生き残ってきた甲殻類や魚類、海藻類に代表される海産資源にはカンタキサンチン、アスタキサンチンやゼアキサンチンといった海洋性キサントフィルが豊富に含まれており、香草類に多く含まれるカロテノイドとともに、これらの海洋性カロテノイド由来のキサントフィルが、乳癌の発生ならびに進行に予防的に作用していると注目されている。今回、タイで豊富に摂取されている海産資源由来キサントフィルの乳癌抑制への関わりを証明するために、本課題を申請した。また、キサントフィルのなかでもプロビタミン A 活性を有する  $\beta$ -カロテンや褐藻類に含まれるフコキサンチンの癌抑制効果は報告されているものの、カンタキサンチンをはじめとする海洋性キサントフィルのヒト乳癌に及ぼす影響は未だ明らかではない。本申請課題では代表的な海洋性キサントフィル 3 種を対象として、ヒト乳癌制御への有用性を検証する。

### 2. 研究の目的

海産資源に豊富に含まれるカンタキサンチン(canthaxanthin, Cx)やアスタキサンチン(astaxanthin, Ax)といった天然キサントフィルは、ヒトの耐糖能障害や高脂血症を改善する作用を有するが、各種の癌に対して抗腫瘍効果を発揮することも報告されている。本課題では *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)誘発ラット乳癌モデルを用いて、発癌のイニシエーション期/早期プロモーション期における Cx や Ax の摂取が乳癌の発生に影響を及ぼすか否かを実験病理学的に評価するとともに、その作用機序についても検証する。Cx や Ax が乳癌抑制効果を有することを動物モデルを用いて証明し、その抑制機序も解明されれば、古来より日常的に摂取されてきた海洋性キサントフィルの摂取が、国民の健康増進に有用であることを伝えることができる。

### 3. 研究の方法

実験に用いたキサントフィル(Cx・Ax)は LKT laboratories ならびに Sequoia Research より購入した。3 週齢雌 Sprague-Dawley ラット 90 匹を各群 18 匹ずつ、基礎食群(AIN-76A)、低・高用量 Cx・Ax 食群の 5 群に分け、低用量食群には 0.04%、高用量食群には 0.4%の Cx あるいは Ax を混合した AIN-76A 食を 3 週齢時から 5 週間摂取させた。試験食期間が終了した 8 週齢以降は、すべてのラットに基礎食を摂取させた。全実験期間を通じてラットは一定の環境のもとで飼育し、試験食摂取期間中は、7 日おきにすべてのラットの体重を測定するとともに、1 日あたりの試験食摂取量を記録した。6 週齢時に各群 15 匹ずつのラットに対して、60mg/kg MNU を単回腹腔内投与することにより乳腺発癌を促した。MNU 投与後は触診により乳腺腫瘍の発生を同定し、最大径が 1cm 以上の乳腺腫瘍が発生するまでに要した期間を記録した。なお、実験期間中に腫瘍死したラットは評価の対象から除外した。MNU 投与 14 週後(20 週齢時)に実験を終了し、生存しているラットを麻酔薬過吸入法により屠殺し、すべての触知可能な大きさの乳腺腫瘍を摘出し、腫瘍湿重量を測定した後、組織診断ならびに抗アディポネクチン受容体抗体 -1, -2(ADIPO R-1・R-2 antibodies, いずれも Santa Cruz Biotechnology)の免疫組織学を行った(図 1A)。

MNU を投与しなかった各群 3 匹ずつのラットは試験食摂取中の 7 週齢時に屠殺し、全身臓器の肉眼観察を行うことにより試験食摂取の毒性を評価するとともに、腹部乳腺組織を摘出し凍結保存した。摘出したラットの乳腺脂肪組織からタンパクを抽出し、タンパク量を測定した後、アディポネクチン (anti-adiponectin C-terminal antibody, ab181699, Abcam)の発現を SDS-PAGE・Western-blotting 法により同定し、キサントフィル摂取中の乳腺組織におけるアディポネクチンの発現強度を測定した(図 1B)。

実験で得られた結果は t 検定(対応なし)あるいは Mann-Whitney の U 検定を用いて統計解析を行い、p 値が 0.05 以下で有意差ありとした。

### 4. 研究成果

#### 1) ラットの試験食摂取量と体重変化

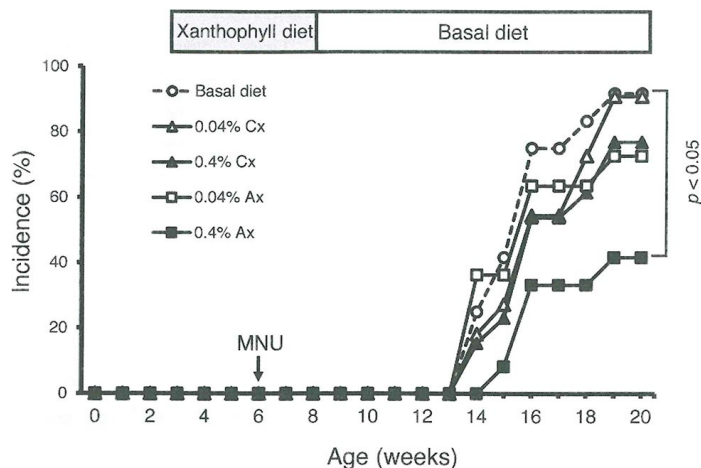
1 日あたりの食餌摂取量は、基礎食群と Cx あるいは Ax 食群で差をみなかった。1 日あたりのキサントフィル摂取量は低用量 Cx と Ax 食群でそれぞれ  $3.9 \pm 0.3$  と  $4.2 \pm 0.5$ mg であったのに対して、高用量の Cx と Ax 食群では各の  $41.8 \pm 0.7$  と  $45.5 \pm 0.6$ mg であり、高用量食群のラットは低用量食群のおよそ 10 倍のキサントフィルを摂取していた。試験食終了時のラットの体重は各群で差を認めず、試験食摂取期間中(7 週齢時)に行った解剖では、キサントフィル摂取群のラットの諸臓器に明らかな変化はみなかった。

#### 2) MNU 誘発ラット乳癌に及ぼすキサントフィルの効果

試験食が終了した 8 週齢以降も、各群のラットの体重増加に差をみなかった。MNU 投与により発生した触知可能な大きさの乳腺腫瘍は、いずれも乳頭状・篩状腺癌であり、線維腺腫など

他の組織型の腫瘍は発生しなかった。MNU 投与から触知可能な大きさの乳癌が同定されるまでに用いた日数(潜伏期間)は、基礎食群が  $68 \pm 3$  日であったのに対して、高用量 Ax 食群では  $73 \pm 5$  日と多少延長傾向をみた。実験終了時(20 週齢時・MNU 投与 14 週後)、触知可能な大きさの乳癌の発生率は基礎食群が 92%であったのに対して、高用量 Cx 食群は 77%と低下傾向を認めしたが、高用量 Ax 食群では 42%であり、基礎食群と比較して発生率の有意な低下をみた ( $p$  値 = 0.02)。発生した乳癌1個あたりの湿重量は、基礎食群が  $3.9 \pm 0.6$ g であったのに対して、0.4%Ax 食群では  $2.8 \pm 0.8$ g と低下傾向にあったが、両群間の測定値に有意差はみなかった (図 1)。

図 1  
アスタキサンチン・カンタキサン  
摂取による MNU 誘発ラット乳癌  
発癌抑制効果



### 3) アディポネクチンの産生変動と乳癌におけるアディポネクチン受容体の発現

7 週齢時、試験食摂取期間中に MNU を投与していないラットの乳腺組織からタンパクを抽出し、Western-blotting 法でアディポネクチンの発現を同定したところ、基礎食群の発現 (loading control として用いたアクチンと比較した発現強度:  $0.32 \pm 0.02$ ) に対して、高用量 Ax 食群では有意な発現の上昇をみた ( $0.51 \pm 0.01$ ,  $p$  値 = 0.01) (図 2 A,B)。

また、発生した乳癌のアディポネクチン受容体-1 と-2 の免疫組織化学では、Jeong らが報告したアディポネクチン抗体の免疫染色に対する評価法 1) を用いて染色強度を比較したところ、高用量 Ax 食群に発生した乳癌では基礎食群の乳癌と比較して、アディポネクチン受容体-1, -2 とともに、強く発現する傾向がみられた (図 3)。したがって、高用量の Ax 摂取はラットの乳腺脂肪織で産生・分泌されるアディポネクチンを増加させることにより、アディポネクチン受容体陽性の乳癌の発生を抑制したと推察された。

図 2 乳腺脂肪織におけるアディポネクチンの発現変動

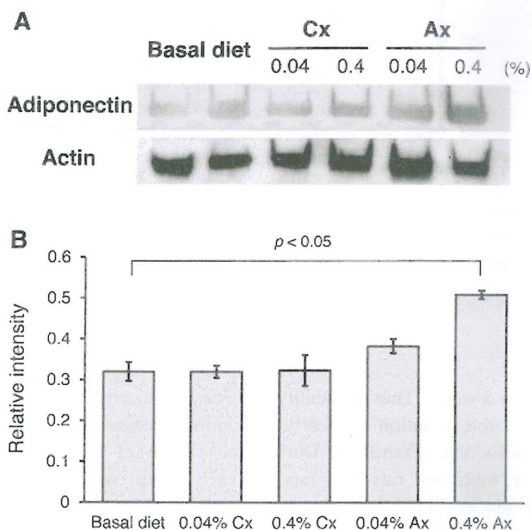
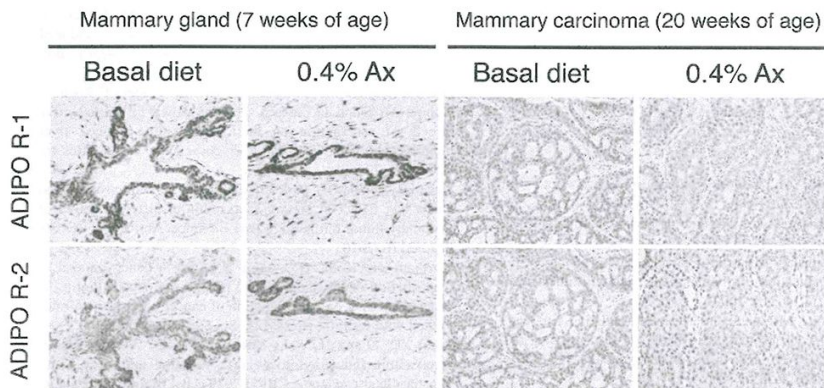


図 3  
ラット乳管と乳癌における  
アディポネクチン受容体-1,  
-2 の発現



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Yuri T, Yoshizawa K, Emoto Y, Kinoshita Y, Yuki M, Tsubura A  
Effects of dietary xanthophylls, canthaxanthin and astaxanthin on *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced rat mammary carcinogenesis.  
In Vivo 30 795-800, 2016

2. 坎貴司、義澤克彦

カンタキサンチン・アスタキサンチン摂取による MNU 誘発ラット乳腺発癌予防効果の検証  
乳癌基礎研究 25 27-31, 2016.

〔学会発表〕(計 1 件)

坎貴司、義澤克彦

カンタキサンチン・アスタキサンチン摂取による MNU 誘発ラット乳腺発癌予防効果の検証  
乳癌基礎研究会 2016 年 7 月 奈良

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：義澤克彦

ローマ字氏名：Katsuhiko Yoshizawa

所属研究機関名：武庫川女子大学

部局名：生活環境学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 70548396

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。