

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350152

研究課題名(和文)炎症を背景としたマウス大腸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

研究課題名(英文) Modifying effects of the low-molecular-weight compounds of Kidachi aloe on inflammation-associated colorectal carcinogenesis in 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：キダチアロエ抽出物(アロエ)やその主薬成分であるアロインは、抗炎症作用や抗腫瘍効果を有することが報告されている。

我々はApc遺伝子欠損Minマウスにおけるアロエとアロインのがん予防効果を検討した。最初に、Minマウスに基礎食と低用量アロエ含有食を与えると、アロエは腸管腫瘍数を有意に低下させた。次に、高脂肪食摂取条件下で低用量アロエやアロインの影響を調べた結果、アロインは腸管腫瘍数を有意に減少させ、血漿アディポネクチンを上昇させた。これらの結果は、低用量アロインは高脂肪食摂取Minマウスの腸管腫瘍発症に対して予防効果を有し、血中アディポネクチン上昇と部分的に関連することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Whole-leaf extract of "Kidachi aloe"(Aloe arborescens; Aloe) and its main ingredient aloin have been reported to exhibit anti-inflammatory and anti-tumor effects in some experimental models.

In the present study, we examined the cancer preventive effects of Aloe and aloin in an Apc-deficient Min mouse model. In the first experiment, Min mice were fed a basal diet or a diet containing low-dose Aloe for 12 weeks. Aloe significantly reduced the number of intestinal tumors. In a second experiment, we examined the effects of low-dose Aloe and aloin on intestinal tumor development in Min mice fed a high-fat diet for 11 weeks. Aloin, but not Aloe, significantly reduced the number of intestinal tumors. We also found that feeding with aloin increased plasma adiponectin levels in Min mice.

These results suggest that low-dose aloin has preventive effects against intestinal tumor development in Min mice fed high-fat diet, possibly, in part, by increasing adiponectin in blood.

研究分野：生化学、食品機能学

キーワード：キダチアロエ アロイン ApcMinマウス 腸管腫瘍(ポリープ) 高脂肪食 アディポネクチン

1. 研究開始当初の背景

Aloe Emodin (AE) はアロエやダイオウに含まれるアントラキノン誘導体である。本邦で健康食品として広く普及しているキダチアロエの新鮮生葉乾燥粉末には、配糖体としての Aloin (barbaloin + isobarbaloin) が約 10 ~ 15 mg/kg (粉末) 量検出されるが、そのアグリコンである AE は微量 (0.012 mg/g) しか検出されない。

近年、この AE が各種の株化がん細胞に対して増殖抑制効果を示すことが多数報告されてきた。しかし、動物モデルでの効果の報告は少ない。そこで、申請者らは平成 22 ~ 24 年度の科研費交付を受けて、AE の低用量食餌性投与 (5 ~ 50 ppm) は、Apc 遺伝子変異 Min マウスの大腸腫瘍の発症を、大腸起炎物質であるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 処理の有無にかかわらず、抑制することを見いだした。また、申請者らは AE の類似化合物であるエモジンの低用量混餌投与が Min マウスの大腸腫瘍 (特に大腸腫瘍) の発症に対して抑制作用を示す予備実験的成績も得た。

2. 研究の目的

今回申請者らが取り組みたい課題は、いくつかの試行錯誤を経て、次の 2 点に絞られる。すなわち、(1) キダチアロエ抽出物および Aloin (アロエ・フェノールの緩下作用成分) が、Min マウスの腸管腫瘍形成に対して、普通食条件下および高脂肪食条件下で如何なる影響を及ぼすか、抑制作用が見いだされた場合抑制機序は何かであり、そのほか、(2) 前回の科研費研究で腸管腫瘍形成に対して抑制作用が見いだされた Emodin について、その抑制作用を確認し、抑制機序は何かを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) Min マウスの腸管腫瘍形成に対するキダチアロエ抽出物および Aloin の修飾作用

Min マウスの繁殖と遺伝子型解析: 雄性 C57/6J-Min/+ マウスを米国ジャクソン研究所より購入し、野生型雌性 C57BL/6J-+/+ と交配・繁殖させる。実験はその新生マウスの遺伝子型を PCR により検出し、ヘテロ接合体のみを実験に使用する。

試験物質: キダチアロエ抽出物 (Aloe) は、キダチアロエエキス末 (製造: 小城製薬; 発売: ササキアロエ) を購入し使用した。Aloin は Sigma Aloin (B6906; 純度、>97%) を購入して用いた。

Min マウス実験: **普通食実験** - 雄性 6 週齢 Min マウスを用いて、実験群は普通食 (ND) 群と低濃度 Aloe 含有 ND (Aloe) 群とで構成し、それぞれを 12 週間与えた (飲水は水道水)。実験終了後、麻酔下でヘパリン血を採取し、小腸、大腸を摘出し、腸管腫瘍 (ポリープ) とそのサイズを計測した。**高脂肪食 (HFD) 負荷実験** - HFD は脂肪分 60% カロリー比高脂肪飼料 (オリエンタル酵母工業) を

用いた。低濃度 Aloe 含有 HFD はオリエンタル酵母工業で調製したものを購入し用いた。Aloin は低濃度水溶液を調製し、混水投与した。実験は雄性 6 週齢 Min マウスを用いて、HFD (Con) 群、HFD+Aloe (Aloe) 群、HFD+Aloin (Aloin) 群の 3 群で構成し、それぞれを 11 週間与えた。実験終了後の処置は前述の通りとした。

なお、基礎食実験と HFD 負荷実験で、実験終了時に採取した血漿を用いて、総コレステロール、トリグリセリド、HMW アディポネクチンを測定した。

(2) 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修飾作用

Min マウスは雌性 5-6 週齢マウスを用いた。Emodin は東京化成工業製 (>96%) を用いた。実験群は普通飼料 (ND) 群、50 ppm エモジン混餌 (EM) 群で構成し、12 週間投与した。実験終了後の処置は前述の通りとした。

抑制機序の解明のため、血漿トリグリセリド、総コレステロール量測定、mRNA 発現量測定 (肝アディポネクチンレセプター (AdipoR)1・2 発現量) などを実施した。

4. 研究成果

(1) Min マウスの腸管腫瘍形成に対するキダチアロエ抽出物 (Aloe) と Aloin の修飾作用

普通食実験 - 図 1 に示すように、小腸部位の総ポリープ数は、Aloe 投与群で ND 群に比して有意に ($p < 0.05$) 減少した。また 2 mm 以上の大型ポリープ数は Aloe 投与群でさらに強く有意に ($p < 0.01$) 減少した。しかし、大腸部位では有意差は見られなかった。

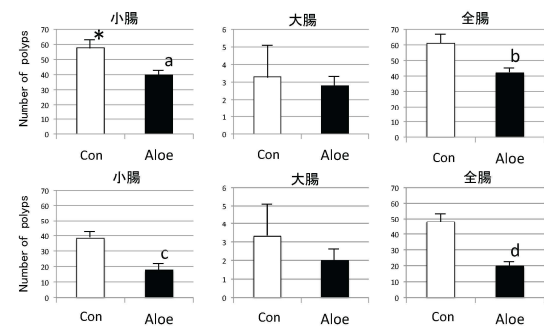


図 1. Min マウスの腸管ポリープ形成に及ぼすアロエの影響. 上: ポリープ総数, 下: 大型 (≥ 2 mm) ポリープ数. ^a $p < 0.05$, ^b $p = 0.05$, ^c $p < 0.01$, ^d $p < 0.005$.

HFD 負荷実験 - 図 2 に示すように、小腸総ポリープ数および大型ポリープ数は対照群に対して、Aloin 投与群でそれぞれ有意に低下した ($p < 0.05$)。しかし、Aloe 群ではそれぞれ有意な変化は認められなかった。

実験終了時に採取した血漿を用いて、総コレステロールレベルとトリグリセリドレベルを測定した。しかし、それらは、各群間で有意な変化が認められなかった。その一因として、動物実験実施数が少数例でばらついたことが考えられる。

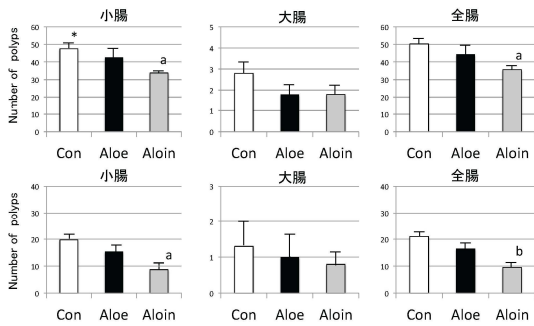


図 2 . 高脂肪食負荷 Min マウスの腸管ポリープ形成に及ぼす Aloe と Aloin の影響 . 上 : ポリープ総数, 下 : 大型 (≥2 mm) ポリープ数 . *平均±SE, ^ap<0.05, ^bp<0.01.

一方、血漿 HMW アディポネクチンレベルでは、基礎食実験の 2 群間では有意な変化が認められなかった。しかし、HFD 負荷実験では、HFD(Con)群に対して、HFD+Aloe(Aloe)群では有意な変化は見いだされなかったが、HFD+Aloin(Aloin)群で有意に高値を示した(図 3A)。また、Con 群と Aloin 群における腸管の大型ポリープ数と血漿アディポネクチンレベルの間には、有意な負の相関性がみいだされた($r = -0.614, p < 0.05$; 図 3B)。

これらの成績より、HFD 負荷条件下での Min マウスの腸管ポリープの腫大化は低用量 Aloin の混水投与で有意に抑制し、その抑制機序として血漿 HMW アディポネクチンレベルの上昇が一部に参与している可能性が示唆された。

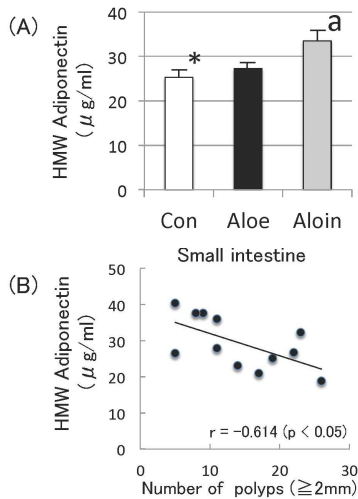


図 3 . (A) 血漿アディポネクチンレベル、(B) 腸管ポリープ (≥2 mm) 数と血漿アディポネクチンレベルとの相関性 . *平均±SE, ^ap<0.05.

(2) Min マウスを用いた腸管ポリープ形成に対する Emodin (EM) の修飾作用

小腸総ポリープ形成で、EM 群は対照群と比べ抑制傾向を示した(有意差なし)。一方、小腸の 2.5 mm 以上の大型ポリープ数は、EM 群で有意な抑制効果を示した(図 4)。大腸では有意な抑制効果はなかった。

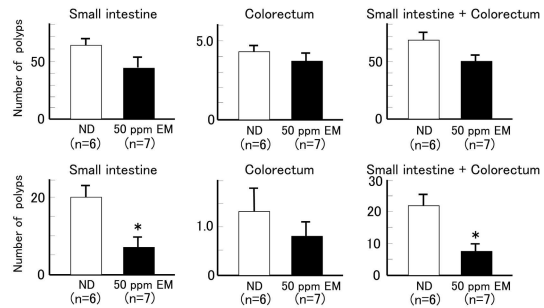


図 4 . Min マウスの腸管ポリープ形成に及ぼすエモジンの影響 . 上 : ポリープ総数, 下 : 大型 (≥2.5 mm) ポリープ数 . *p<0.05.

EM 群では、対照群と比べて、血漿総コレステロール低下、肝 AdipoR2 mRNA 発現量増強が見いだされた(図 5、6)。さらに大型ポリープ数は血漿総コレステロール値とで有意な正の相関性、肝 AdipoR2 mRNA 発現量とで有意な負の相関性が示された(図 5、6)。

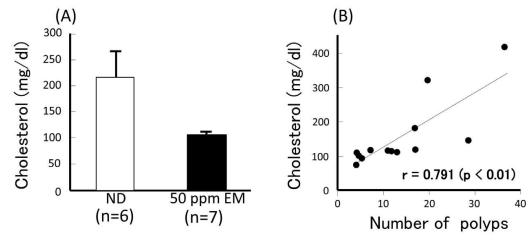


図 5 . (A) 血漿コレステロールレベル、(B) 腸管大型 (≥2.5 mm) ポリープ数と血漿コレステロールレベルとの正の相関性 .

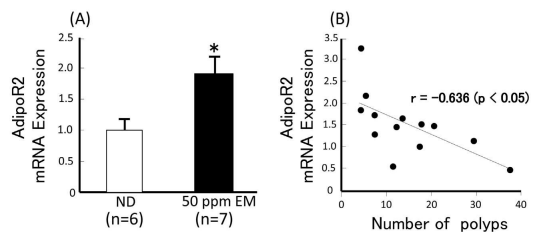


図 6 . (A) 肝 AdipoR2 mRNA 発現レベル、(B) 腸管大型 (≥2.5 mm) ポリープ数と肝 AdipoR2 mRNA 発現レベルとの負の相関性 .

(3) 追記および考察

申請者らは平成 25 年度、アゾキシメタン(AOM) / デキストラン硫酸ナトリウム(DSS) 誘発マウス前がん病変(MDF)形成に対する Aloe Emodin (AE) と Emodin (EM) の修飾作用を検討した。しかし、AE と EM の抑制効果は見られなかった(詳細省く)。先行研究(Shimpo et al., 2014)では、低用量 AE 投与は Min マウスの大腸腫瘍形成を抑制することを報告したが、それと一致しなかった。一方、低用量 EM 投与が Min マウスの腸管ポリープ形成に対して有意な抑制効果を示すことが確認されたので、その詳細を上述した。

次に、申請者らはマウス大腸発がんに対す

るキダチアロエ抽出物 (Aloe) や同活性成分の修飾作用を検討するため、まず同活性成分の分画と精製を試みた。Aloe は、キダチアロエエキス末 (製造: 小城製薬; 発売: ササキアロエ) を購入し、フェノール性化合物含有量 (mg/g 粉末) を申請者らが確立した HPLC 法で分析した。その結果、Aloenin 14.28、Aloesin 関連化合物 (*p*-coumaroyl-aloesin + feruloyl-aloesin) 2.18、Aloin B 6.68、Aloin A 4.65 (Aloin として 11.33)、Aloe emodin (AE) 0.062 であった。

これら 2 種の Aloesin 関連化合物は八木らによって単離され、抗酸化・抗炎症活性やメラニン形成阻害活性を有し、本研究テーマ、すなわち、炎症を背景としたマウス大腸がんモデルに対する試験物質として相応しいと思われた。しかし、上記に示すように、Aloe フェノール性化合物の中で、これらの Aloesin 化合物を分画・精製し、動物実験に供するための十分量を期間内に確保することは難しいことが予想された。

そこで Aloesin 化合物は次の機会に検討することで、今回は単一成分としては Aloin を用いて、Aloe とともに Min マウスの腸管ポリープ形成に及ぼす影響をまず検討した。

Aloin は多量に経口投与すると緩下作用を示すことが知られているが、下痢を生じさせない低用量では、むしろ抗酸化・抗炎症作用を有することが最近報告されている。そしてラット大腸がんモデルでの抑制効果が見いだされた。しかも、Aloin は脂肪代謝においても有益な作用を示すことも報告された。

これらの試料における実験系では、上述のように、普通食条件と高脂肪食条件での 2 つの条件下での Min マウスの腸管ポリープ形成に及ぼす修飾作用を検討した。炎症を背景とした大腸がんモデルでは、大腸起炎物質のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) による大炎モデルが多用されている。しかし、申請者らは別の炎症関連腸がんモデルとして、高脂肪食負荷 Min マウスの腸管ポリープ形成に対して、アロエベラゲル抽出エキス (AVGE) の抑制効果を報告し、その抑制機序の一部を明らかにした (Chihara et al., 2013, 2015)。

その結果は上述の通りにて、普通食条件下で低用量のキダチアロエ抽出物 (Aloe) が、また高脂肪食負荷条件下で低用量 Aloin が、Min マウスの腸管ポリープ形成を有意に抑制することを我々は明らかにした。

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] Shimpo K, Chihara T, Beppu H, Kaneko T, Shinzato M, Wakamatsu K,

Higashiguchi T, Sonoda S. Inhibitory effects of emodin on intestinal tumor development in Min mice. *Clinical Pharmacology and Therapy* (薬理と臨床) 26/2, 7(45)-16(54), 2016.(査読なし)(計 1 件)

[学会発表] Shimpo K, Chihara T, Kaneko T, Beppu H, Shinzato M, Wakamatsu K, Sonoda S. Effect of emodin on intestinal polyp formation in ApcMin/+ mice. (ApcMin/+マウスの腸管ポリープ形成に対するエモジンの影響) 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 横浜. (計 1 件)

[その他]
ホームページ等
http://www.fujita-hu.ac.jp/FMIP/Biochem_intro.html

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・
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

別府 英博 (秀彦) (BEPPU, Hidehiro
(Hidehiko))
藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・
生化学研究部門・准教授
研究者番号: 30142582

千原 猛 (CHIHARA, Takeshi)
藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・
生化学研究部門・准教授
研究者番号: 00217241

金児 孝晃 (KANEKO, Takaaki)
藤田学園・本部施設管理課環境管理・技術
員 (元藤田保健衛生大学・助手)
研究者番号: 90267956

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

酒井 一由 (SAKAI, Kazuyoshi)
藤田保健衛生大学医療科学部・准教授
研究者番号: 90215583