

氏名・本籍	直原 寛 (岡山県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第26号
学位授与の日付	平成27年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	熟成ニンニク抽出液による大腸腫瘍の抑制効果に関する研究
学位論文審査委員	主査 教授 嶋本 文雄 副査 教授 達家 雅明 教授 小西 博昭 教授 肖 業貴

## 学位論文の要旨

第1章では緒言として背景と目的を記載する。がんは本邦における死因の第1位であり、中でも大腸癌は食生活の欧米化などにより増加傾向にあるため、日常生活で発生・発育リスクを抑えることが重要となっている。一般的に癌は正常細胞の遺伝子異常またはエピジェネティックな変化に端を発し、その結果として細胞増殖が異常亢進することで、発育、増殖、進展する。古くから薬用食品として食されてきたニンニクは、近年の疫学研究およびモデル動物を用いた研究などから抗癌作用が明らかとなっており、中でも生ニンニクをエタノール溶液で10ヶ月以上熟成・濃縮させた熟成ニンニク抽出液 (Aged Garlic Extract: AGE) は、生ニンニクが持つ胃腸粘膜などへの刺激を軽減した長期間の継続服用に適した素材として注目されている。過去の研究において AGE は大腸癌モデル動物に対する発癌予防効果が確認されているが、腫瘍の発育過程における効果やその作用機序については不明な点が多い。本研究では、大腸化学発癌モデルラットを用いた腫瘍発育過程における AGE の抗腫瘍効果を検証し、そのメカニズムを解明することを目的としている。

第2章では 1,2 ジメチルヒドラジン (NN'-dimethylhydrazine dihydrochloride: DMH) による大腸化学発癌モデルラットを用いた AGE の抗腫瘍効果について述べる。腫瘍発育期での作用を検証するため、DMH による8週間の発癌処置を施したラットに対して AGE 混餌基礎飼料を23週間摂餌させた。摘出した大腸をホルマリンで固定し、大腸全領域を病理組織学的に評価した結果、AGE 摂餌により、前癌性病変を多く含む異常腺窩叢 (ACF)、良性腫瘍の腺腫そして悪性腫瘍の腺癌の発生数が、有意に減少したことを確認した。また腫瘍組織の細胞増殖能について免疫組織化学的手法で評価した結果、AGE は同一の組織型に分類された腫瘍組織においてその増殖能を抑制することが確認された。その一方で、大腸の正常組織では増殖能に影響を与えなかった。つまり、本研究において、AGE による腫瘍の発育抑制効果は、DMH 暴露により細胞増殖能が亢進した大腸粘膜腫瘍病変細胞の増殖抑制に起因すること

を明らかにした。

第3章ではヒト大腸癌細胞株およびDMH誘発ラット大腸腺癌細胞株を用いて、第2章で示されたAGEの細胞増殖抑制効果のメカニズムを明らかにする。AGEのヒト大腸癌細胞株(DLD-1)に対する増殖抑制効果を検証した結果、AGEはDLD-1細胞の増殖を抑制し、一方で正常線維芽細胞株(MRC-5)の増殖は抑制しないことを確認した。ただし、DLD-1細胞に対するAGEの増殖抑制効果は緩やかであり、3日目以降で濃度依存的な増殖抑制効果を示した。これはAGEが、DLD-1細胞に対して強い増殖抑制作用を持っているわけではないことを示唆している。先行研究ではニンニク由来成分が、ヒト大腸癌細胞株の増殖を抑制することが示されており、機序として、G2/M期での細胞周期の停止とアポトーシスの誘導促進作用に起因すると報告されている。しかしながら、AGEはDLD-1細胞に対して細胞周期停止作用を示さなかった。さらに、AGEはDLD-1細胞を含む3種類のヒト大腸癌細胞株およびDMH誘発ラット大腸腺癌細胞株(RCN-9)に対して、アポトーシス誘導能も示さなかった。一方で、細胞周期同調細胞を用いた細胞周期速度評価により、AGEはDLD-1細胞に対して、G2/M期で細胞周期の進行を2-3時間遅延させる、細胞増殖倍加時間遅延効果を持つことが明らかとなった。そしてその機序として、AGEはG2/M期の制御タンパク質であるcyclin B1とcdk1の発現量を低下させることが確認された。さらにcyclin B1の発現量を制御している転写因子NF- $\kappa$ Bの核内移行が抑制されていることが確認された。つまり本研究より、AGEは腫瘍細胞に対して、細胞増殖シグナルの減弱による増殖速度遅延作用により増殖抑制効果を示したと考えることができる。これは、AGEによる細胞増殖抑制効果が、緩やかであり、3日目以降で確認できたこと、AGEの作用が細胞周期の停止やアポトーシス誘導など強い増殖阻害ではない結果と相関している。そして、G2/M期で細胞周期が遅延することは、結果としてS期の細胞の存在比を低下させることに繋がり、AGE摂取ラットの大腸腫瘍でPCNA陽性細胞の比率が低下した点とも結び付けて考えることができる。

第4章では本研究の総括を述べる。本研究では大腸癌モデルラットによる腫瘍の発育・増殖を病理学的に評価し、さらに培養細胞による作用機序検討を行うことで、熟成ニンニク抽出液(AGE)が、腫瘍の発育抑制効果を示すことを明らかにした。これまでAGE研究で腫瘍発育抑制に焦点を充てた研究はなく、腫瘍細胞の増殖速度に影響を与える事実は新知見であり、今後のAGE研究にとって有用な情報になると思われる。本研究は食習慣による大腸癌の予防効果を示唆しており、AGEによって大腸癌の発症や発育の予防に貢献できるものと期待される。

## 審査の結果の要旨

本研究は、熟成ニンニク抽出液による大腸腫瘍の抑制効果を確立することを目的として、DMH 発癌動物実験と培養細胞における腫瘍細胞の抗腫瘍効果実験系を考案して、以下に記す新しい知見を明らかにした。

本論文は4章で構成されている。第1章では緒言として背景と目的が記載されている。食生活の欧米化により増加傾向にある大腸癌は、その死因も著しく増加し、その予防は重要な課題になっている。一方熟成ニンニク抽出液 (AGE) は、大腸発癌予防効果が確認されているが、その作用機序については不明な点が多い。本研究では、AGE のメカニズムを解明することを目的としている。

第2章では、DMH 誘発大腸発癌処置を施したラットに AGE を 23 週間摂餌させ、その効果を検討している。その結果では AGE 摂餌により、前癌性病変を多く含む ACF、腺腫そして悪性腫瘍の腺癌の発生数が、有意に減少したことを認めている。免疫組織学的に AGE は同一の組織型に分類された腫瘍組織においてその増殖能を抑制していることから、AGE の腫瘍発育抑制効果は、大腸腫瘍の増殖抑制に起因することを明らかにしている。

第3章ではヒト大腸癌細胞株 (DLD-1) および DMH 誘発ラット大腸腺癌細胞株を用いて、AGE の細胞増殖抑制効果のメカニズムを明らかにしている。DLD-1 細胞に対する AGE の増殖抑制効果は、3 日目以降で濃度依存的な増殖抑制効果を示している。しかし AGE は種々の培養細胞株にたいして、アポトーシス誘導能も示さず、DLD-1 細胞に対して、細胞増殖倍加時間遅延効果を持つことが明らかとなった。その機序として、G2/M 期の制御タンパク質である cyclin B1 と cdk1 の発現量を低下、さらに転写因子 NF- $\kappa$ B の核内移行が抑制されていることを証明した。細胞増殖シグナルの減弱による増殖速度遅延作用により増殖抑制効果を示した。第4章では本研究の総括がのべられている。

論文は、DMH 動物実験並びに培養細胞における大腸腫瘍の増殖能に関する実験系を考案し、AGE が、大腸腫瘍細胞の増殖速度に影響を与える事実は新発見であり、今後の AGE 研究さらにヒト大腸癌予防にとって寄与するところが大きいと判断した。よって本論文は博士 (生命システム科学) の学位に値するものと認められる。