

1

10t,12c-CLAのがん細胞増殖抑制作用を担う遺伝子p38IP の機能解析

○阿比留晶子¹、園田知代¹、山田耕路¹、立花宏文^{1,2,3}

¹九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門、²九州大学・バイオアーキテクチャセンター、
³九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点

【目的】

我々はこれまでに、10t,12c-CLAのがん細胞増殖抑制作用を担う遺伝子（CLA 感知関連遺伝子）としてp38 interacting protein (p38IP) を同定し、その発現を低下させたマウスメラノーマ細胞株B16に対し10t,12c-CLAの細胞増殖抑制作用が発現しないことを明らかにした。しかしながら、p38IP の機能についてはほとんど不明である。そこで本研究では、CLAの感知関連遺伝子としてのp38IPの機能解析を行った。

【方法・結果】

マウスメラノーマ細胞株B16に対して、10t,12c-CLAは細胞増殖抑制作用を示すのに対し、9c,11t-CLA はその細胞増殖を抑制しなかった。そこで、p38IP の発現量に対するCLA の影響を検討したところ、10t,12c-CLAは時間依存的にp38IP の発現量を増加させたが、9c,11t-CLAにはそうした作用は観察されなかった。一方、p38IP はMAP キナーゼの一種p38と相互作用することが知られており、p38IPを低発現させた細胞においてp38 の活性化に関与するリン酸化レベルが増大することを見出している。さらに、p38は細胞核において活性化されることが知られていることから、p38IPの細胞内局在に対するCLA の影響を検討したところ、9c,11t-CLAは局在に対して影響を及ぼさないのに対し、10t,12c-CLAはp38IPの核への局在を促進することを見出した。

【考察】 p38IPはp38 結合因子であること、また、p38IPの発現を低下させるとp38 のリン酸化レベルが増大することから、p38IP はp38 の活性に対して阻害的に作用することが示唆されていた。今回の結果から、10t,12c-CLAはp38IPの発現を増加させるとともに、その核内局在を増加させることでp38 との相互作用を促進し、その結果としてp38 の活性化（リン酸化）を阻害し、がん細胞増殖抑制作用を発揮している可能性が示された。

2

肝ガン細胞における共役リノール酸の致死作用

○野見山将太¹, 山崎正夫¹, 岡本威明², 須田泰司³, 榊原陽一¹, 水光正仁¹, 西山和夫¹
¹宮崎大院・農・応生科, ²川崎医大・自然科学, ³川崎医大・組織・電子顕微鏡センター

【目的】

共役リノール酸(CLA)はリノール酸の位置および構造異性体の総称である。代表的な CLA に反芻動物の胃内に存在する微生物によって生合成され、それらの食肉や乳製品が含有する *cis9,trans11-CLA* (*c9,t11-CLA*) やリノール酸をアルカリ下で熱処理することで *c9,t11-CLA* と 1:1 で合成される *trans10,cis12-CLA* (*t10,c12-CLA*) があり、これらの CLA は抗肥満、抗動脈硬化、抗糖尿病、抗ガンといった様々な生理機能を有することが報告されている。しかし種々のガン細胞における増殖抑制や致死効果の作用機構については解明されていない。本研究では CLA の肝ガン細胞における致死作用について検討した。

【方法】

肝ガン細胞である HepG2 細胞を 2.0×10^3 cells/cm² で播種し 24 時間前培養後、1%牛胎児血清含有 DMEM 培地に *c9,t11-CLA*、*t10,c12-CLA* を添加し 24-72 時間培養した。その後ヨウ化プロピジウムによる染色後にフローサイトメトリーで細胞周期解析を行い、透過型電子顕微鏡による細胞の形態観察を行った。また HepG2 細胞を 1.0×10^5 cells/cm² で播種し培養後、Oil Red O 染色を行いイソプロパノールで色素を再溶出の後、細胞内脂質含量を比色法により測定した。

【結果・考察】

HepG2 細胞を *t10,c12-CLA* で 48-72 時間処理すると 48 時間から G1 期遅延がみられ、sub G1 期細胞集団の増加を伴う致死効果があらわれた。また *c9,t11-CLA* において致死作用はみられなかった。さらに透過型電子顕微鏡による形態観察から *c9,t11-CLA*、*t10,c12-CLA* 処理により油滴の蓄積が認められ、*t10,c12-CLA* 処理した細胞では細胞核の形態や色調の変化が確認された。また Oil Red O 染色を行ったところ CLA 処理した細胞内では油滴の蓄積が確認された。今後、細胞核の形態や色調の変化および油滴の蓄積と CLA の肝ガン細胞における致死作用の関係について検討する予定である。

3

ナノエマルジョン化共役リノール酸の体内動態と培養肝臓ガン細胞の増殖に及ぼす影響

○ 木下和昭¹、茨木佳代¹、板倉祥子¹、西片奈保子²、清水正高³、
窄野昌信¹、山崎正夫¹、西山和夫¹

¹宮崎大農・応生科、²宮崎県産業支援財団、³宮崎県工業技術センター

【目的】

共役リノール酸 (CLA) の 1 つである *trans10,cis12*-CLA (*t10,c12*-CLA) は、*in vitro* において肝臓ガン細胞に対して低濃度で致死効果を示すことが知られている。しかしながら、*in vivo* においては肝臓ガンへの蓄積効率が著しく低く、ガンの増殖に対する抑制効果が認められない。そこで本研究では、『薬物を病巣に選択的に送達する』というドラッグデリバリーシステムの概念を利用することで *t10,c12*-CLA の肝臓ガンへの効率的な輸送法を構築することを目的とし、CLA ナノエマルジョンの作製を試みた。

【方法】

シラス多孔質ガラス膜、polycarbonate 膜を使用した膜透過により、トリグリセリド型 CLA を原料として平均粒径 100 nm と 200 nm の CLA ナノエマルジョンを調製した。まず *in vitro* において培養肝臓ガン細胞に CLA ナノエマルジョンを添加し、致死効果を検討した。また、CLA ナノエマルジョンの体内動態を検討するために、尾静脈注射により BALB/c マウスへ投与した。1 匹あたり約 4.2 mg の CLA 量に相当する CLA ナノエマルジョンを投与後 1、3、6 および 24 時間で屠殺を行い、血液、肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓および脂肪組織を摘出し、分析に供した。各組織の CLA 量はガスクロマトグラフィーにより測定した。

【結果】

膜透過により平均粒径 105.9 nm と 190.0 nm の CLA ナノエマルジョンが得られた。*In vitro* において CLA ナノエマルジョンは濃度依存的に肝臓ガン細胞の致死効果を示し、その効果は 100 nm の方がより強かった。*In vivo* においては、投与した CLA の大部分が血中に存在しており、投与後 6 時間の血中での CLA 残存量は 200 nm よりも 100 nm の方が多かった。

【考察】

100 nm の CLA ナノエマルジョンの方が肝臓ガン細胞に対する致死効果が強かったことから、ナノエマルジョンの粒径の違いにより細胞への作用や取り込み量が異なることが考えられた。また、体内動態においては投与後 6 時間で血中での CLA 残存量に差が見られたことから、100 nm の方がより長い血中滞留性を有する可能性が示された。以上のことから、肝臓ガンへの CLA 送達において、粒径 100 nm 程度の CLA ナノエマルジョンが有用であることが示唆された。今後、担ガンマウスへの CLA ナノエマルジョンの投与を行い、肝臓ガンの増殖に及ぼす影響を検討する予定である。

4

嫌気性微生物による新規な非メチレン型不飽和脂肪酸生産法の開発

○朴 時範¹、岸野 重信^{1,2}、横関 健三¹、清水 昌^{2,3}、小川 順²

¹京大院農・産業微生物、²京大院農・応用生命、³京都学園大・バイオ環境

【目的】

非メチレン型不飽和脂肪酸は、脂質代謝改善作用や高度不飽和脂肪酸の代替機能、抗癌剤の標的酵素であるDNAトポイソポリメラーゼの阻害活性など様々な生理活性が報告されている機能性脂質であり、脂質栄養学・生理学分野において関心を集めている。しかし、これら非メチレン型不飽和脂肪酸の天然物素材における含有量は、極めて少ない。本研究では、嫌気性微生物による機能性脂質生産研究の一環として、新規な非メチレン型不飽和脂肪酸生産法の構築を試みた。

【方法】

スクリーニングにより選抜した *Clostridium bifermentans* JCM 1386 を GAM 培地にて培養・集菌し、無細胞抽出液を調製した。本無細胞抽出液を触媒として、エイコサペンタエン酸 (EPA) やアラキドン酸など高度不飽和脂肪酸を基質とする反応を行い、GC 分析により反応生成物をモニターした。さらに反応生成物を HPLC により精製し、GC-MS や NMR 分析により反応生成物の構造解析を行った。また、反応液の脂肪酸組成を経時的にモニターすることにより本菌の反応経路について考察した。

【結果及び考察】

様々な基質を用いて反応を行い、得られた反応生成物の構造解析を行ったところ、反応生成物は基質の $\omega 6$, $\omega 9$ 位のシス型二重結合が $\omega 7$, $\omega 9$ 位へと異性化した共役脂肪酸、ならびに、 $\omega 7$ 位のトランス型二重結合へと飽和化された非メチレン構造を有する部分飽和脂肪酸であることを明らかにした。本反応における反応経路を考察したところ、本菌は $\omega 6$, $\omega 9$ 位シス型二重結合を有する不飽和脂肪酸を基質として認識し、 $\omega 6$ 位のシス型二重結合を $\omega 7$ 位へ異性化して共役型脂肪酸へと変換したのち、この共役型脂肪酸の $\omega 9$ 位二重結合が飽和化され、非メチレン型不飽和脂肪酸へと変換されることが分かった。以上のことより、非メチレン型不飽和脂肪酸は嫌気性微生物の不飽和脂肪酸飽和化代謝の最終産物であることを明らかにした。以上により嫌気性微生物による高度不飽和脂肪酸変換反応を利用し、天然には希少な共役型高度不飽和脂肪酸と非メチレン型不飽和脂肪酸の供給が可能となった。

5

肥満ラットの病態発症に及ぼすオゾン化脂質摂取の影響

○永尾晃治¹、迫尾昌美¹、甲斐俊一¹、小島浩一²、永井利治²、柳田晃良¹

¹ 佐賀大農・生機科、² 月島食品工業（株）

【目的】近年、生活習慣の多様化によって引き起こされる慢性炎症が、不可逆的な臓器の機能不全を生じ、メタボリックシンドローム、動脈硬化性疾患、癌などの発症・進展の原因として注目されている。中でも肥満における脂肪組織自体の炎症性変化が、アディポサイトカイン産生調節の破綻をもたらし、メタボリックシンドロームの病態形成に中心的な役割を果たすと考えられている。ところで、食事脂肪酸の炭素数や二重結合の有無が生理活性に大きく影響することは周知の事実であるが、脂肪酸の二重結合をオゾニド化したオゾン化脂質が抗菌作用・抗酸化作用・抗腫瘍作用・抗炎症作用など様々な生理活性を発揮することが最近報告されている。そこで本研究では、肥満モデル動物の病態発症に及ぼすオゾン化脂質摂取の影響について検討を行った。

【方法】食餌組成は AIN-76 組成に準じ、コーン油 6.5%+オリーブ油 0.5%を添加した対照食およびコーン油 6.5%+オゾニド化したオリーブ油 0.5%を添加した実験食を調製した。これらの食餌を 6 週齢オスの肥満（Zucker *fa/fa*）ラットに与え、4 週間飼育した。飼育終了後、エーテル麻酔下で大動脈採血により屠殺を行い、血液、肝臓および脂肪組織を摘出し、分析に供した。また肥満を呈しない普通（Zucker lean）ラットも同時に飼育して比較検討。

【結果・考察】肥満ラットは、普通ラットに比べ摂食量、終体重、白色脂肪組織重量および肝臓重量の増加が認められ、肥満および肝肥大を発症していた。さらに肥満ラットでは、肝臓脂質濃度、血中肝障害マーカーレベルおよび血中炎症性因子 Plasminogen activator inhibitor-1（PAI-1）濃度が顕著に上昇していたことから、肥満に伴う炎症状態の悪化や肝臓障害発症が示唆された。その際、肥満ラットにおいてオゾン化脂質摂取は、摂食量および白色脂肪組織重量に影響を及ぼさなかったが、肝臓重量および肝臓トリグリセリド濃度を有意に低下させた。さらにオゾン化脂質摂取は、肥満ラットの血中肝障害マーカーレベルを顕著に低下させ、肝臓障害を改善することが示された。その作用機序としては、オゾン化脂質摂取による血中 PAI-1 濃度の低下が関与していることが示された。

以上の結果から、肥満モデル Zucker *fa/fa* ラットにおいて、オゾン化脂質摂取は炎症状態の悪化や脂肪肝発症を抑制することが示され、肥満誘発性の炎症性代謝異常を改善する成分として期待できることが示された。