



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	フコキサンチノールの臨床大腸癌および大腸癌細胞株に対する抗腫瘍効果に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	高橋, 一人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第11781号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58635
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuto_Takahashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：高 橋 一 人

学 位 論 文 題 目

フコキサンチノールの臨床大腸癌および

大腸癌細胞株に対する抗腫瘍効果に関する研究

我が国は環境や食生活の改善、医療技術の進歩により、世界有数の保健衛生大国に成長した。一方で、1981 年以降、癌は死因の 第 1 位となり、近年では食生活の欧米化や生活環境の変化を要因とする大腸癌や肺癌の増加が大きな問題となっている。

このような社会背景の中、農作物や水産物を中心とした日本の伝統的な食生活が、癌をはじめとする生活習慣病の予防に有効であるとの認識がなされ、国内外で注目されている。中でもワカメやコンブなどの褐藻類に多く含まれるフコキサンチンは生体内でフコキサンチノールに変換され、抗肥満・抗糖尿病作用、抗癌作用、抗酸化作用および抗炎症作用などを発現することが報告されている。しかしながら、これらの機能性評価のほとんどが実験動物によるものであることから、ヒトでの有効性をより明らかにするための評価系の構築が今後益々重要になると考える。更に、日常の食生活による疾病の予防に加え、有効成分の治療への応用も期待される。

最近の癌治療における実臨床では、抗癌剤の効果を事前に予測する CD-DST (Collagen gel Droplet embedded culture Drug Sensitivity Test) を用いた抗癌剤感受性試験が保険診療として認可されている。先に述べたフコキサンチンの抗腫瘍効果の報告は細胞株や動物実験によるものであり、実際の臨床癌に対する効果の検証は未だ行われていない。本研究では、CD-DST を用い、患者から摘出された臨床大腸癌に対するフコキサンチノールの抗腫瘍効果を明らかにすることを目的とした。さらにフコキサンチノールの抗腫瘍効果の個体差について、形態学的所見、細胞増殖に関する細胞機能および遺伝子発現の観点から細胞株を用いて詳細な検討を行った。

最初に、臨床大腸癌を対象とした CD-DST の技術的な改善をはかり判定効率を高めるため、様々な細胞成分から構成される臨床大腸癌組織から癌細胞を分散させる工程の検討を行った。従来用いられてきたメスではなく、金属メッシュを用いた採取法を開発することにより、癌細胞の比率が高い細胞培養が可能になることを見いだした。さらに、大腸組織内の常在菌対策としてバンコマイシンを利用することで、雑菌増殖を抑えることが可能となり、CD-DST 開始当初、30% だった判定可能率を 90% 程度まで大きく上昇させることに成功した。また、CD-DST の評価結果と実際の抗癌剤治療成績を比較した 24 例では、感度 85.7%、特異度 76.5%、正診率 79.2% となり、CD-DST が臨床大腸癌の抗腫瘍効果の事前評価に優れ、フコキサンチノールの抗腫瘍効果を検証することが可能と考えた。

CD-DST を用いて、6 種類のヒト大腸癌細胞株 (Caco-2、DLD-1、Colo205、HCT116、SW620、WiDr) および 20 例の臨床大腸癌に対して、フコキサンチノールおよびフコキサンチンの抗腫瘍効果を検討したところ、大腸癌細胞株および臨床大腸癌に対し、ともにフコキサンチノールの方が高い抗腫瘍効果を示し、特に Caco-2 と WiDr ではその効果が顕著であった。フコキサンチンは生体内においてフコキサンチノールに代謝されることから、高い活性を示す構造に変換されるといえる。また、大腸癌細胞株におけるフコキサンチノールと 4 種類の抗癌剤 (5FU、CPT-11、CDDP、PTX) の併用効果の

検討では、細胞株によって有意な効果を示す抗癌剤は異なっていたが、それぞれの単独処理と比較して高い抗腫瘍効果を発揮することがわかった。臨床大腸癌においては、5FU とフコキサンチノールによる併用効果を認めなかったが、CPT-11 との併用では 15 例中 3 例、CDDP とは 15 例中 2 例、PTX との併用では 13 例中 1 例に有意な併用効果が見られた。さらに興味深いことに、臨床大腸癌の中には 4 種類の抗癌剤全てに抗腫瘍効果を示さないものの、フコキサンチノールに強い抗腫瘍効果を示す症例が 20 例中 4 例認められ、抗癌剤との併用により、新しい癌治療の選択肢となり得る可能性が示された。

そのようなフコキサンチノールの抗腫瘍活性の発現要因として、大腸癌細胞株に取り込まれ蓄積するフコキサンチノール量の定量を行った。癌細胞へのフコキサンチノールの取り込みは、10 μ M より 20 μ M 処理で濃度依存的に増加し、それに伴い抗腫瘍効果も増強した。また、フコキサンチノールにより強い抗腫瘍効果のみられた Caco-2 では、効果の弱かった DLD-1 や Colo205 と比較して、フコキサンチノールの蓄積量が 2 倍近く多かった。一方、Caco-2 ではフコキサンチノールと 微小管合成阻害作用を有する PTX との併用で、フコキサンチノールの蓄積量が有意に減少することがわかった。よって、フコキサンチノールの抗腫瘍効果の発現には、細胞内への取り込みまたは蓄積が重要であり、微小管阻害を標的とする抗癌剤以外との併用効果が期待できると考える。

フコキサンチノールの抗腫瘍効果の機序を解明するため、大腸癌細胞株を用いて形態学的所見、アポトーシス誘導能、細胞周期解析および細胞増殖関連遺伝子の解析を行った。形態学的には 20 μ M のフコキサンチノール処理で生じる細胞質内空胞が特徴的であり、Caco-2 では細胞の膨化も認められた。DNA ラダー法、TUNEL 法 および Annexin V 法によるアポトーシス誘導能の検証では、Caco-2 や Colo205 において TUNEL 法による核の断片化が観察されたのに対し、DLD-1 では Annexin V 法による細胞膜構造の変化を検出した。一方、Caco-2 では、明瞭な DNA ラダーや Annexin V 法によるアポトーシス細胞は検出されなかった。細胞周期解析では抗腫瘍効果が乏しかった HCT116 を除き、SubG1 領域の増加がみられ、相対的な G0/G1 期の細胞比率増加を認めた。さらに 10 μ M および 20 μ M フコキサンチノール処理時の 19 種類の細胞増殖関連遺伝子の発現量を検討したところ、20 μ M フコキサンチノール処理の Caco-2 において、カスパーゼ 3 と p53 の発現量の有意な増加を認めた。これら結果より、フコキサンチノールの抗腫瘍効果は、アポトーシスや細胞周期停止をはじめとする細胞死の機序が複合的に影響していると考えられた。また、フコキサンチノールは、薬剤の細胞外排出に関わる MDR1 活性が高値を示す HCT116 および SW620 に対して有意な活性低下を誘導したことから、薬剤耐性を示す癌細胞に対し、抗癌剤の効果を増強させる作用も期待されるカロテノイドであることがわかった。

今日の癌診療では、手術や抗癌剤による直接的な治療に加え、栄養管理による補助療法が普及している。フコキサンチノールが示すユニークな抗腫瘍作用は、癌細胞への直接的な効果だけではなく、治療補助としても効果を発揮することが期待でき、有病者に対する副作用軽減や症状緩和にも有効と考えられる。本研究では、フコキサンチノールが臨床大腸癌に対しても抗腫瘍効果を示し、複数の機序が関与することを明らかにした。これらは癌診療の新しい選択肢をもたらす基礎研究であり、水産資源に含まれる機能性を新しい視点で掘り下げ、より幅の広い医療の提案に寄与すると思われる。