



Studies on Anticarcinogenesis of Fucoxanthin in Japanese Kelp

Das, Swadesh Kumar

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2006-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3561

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003561>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 2 1 2 】

氏 名・（本 籍）	Swadesh Kumar (バングラデシュ) Das
博士の専攻分野の名称	博士（学術）
学 位 記 番 号	博い第585号
学位授与の 要 件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付	平成18年3月25日

【 学位論文題目 】

Studies on Anticarcinogenesis of Fucoxanthin in Japanese Kelp
(昆布に含まれるフコキサンチンの抗がん作用機構に関する研究)

審 査 委 員

主 査	教 授	金 沢	和 樹
	教 授	坂 本	博
	教 授	芦 田	均

Cancer incidence is closely associated with the life style. Various factors in plant food, as antioxidative vitamin, carotenoids, phenolic, terpenoids, indoles and fibers, have been considered as responsible for reducing the life style related diseases including cancers. Among the carotenoids, 600 different types are found in nature, 40 are regularly in our diets. Chemically, carotenoids are divided into the hydrocarbon carotenoids, and oxygenated carotenoids xanthophylls. The relative bioavailability of carotenes compared with the xanthophylls was studied and indicates some of the xanthophyll showed higher bioavailability than carotenes. A strategy for cancer prevention with food factors is to find out the bioavailable compounds that are refractory to be conjugated with glucuronide/sulfate during absorption. Xanthophylls are known to be incorporated into body without conjugation. In the present study, the author is interested in fucoxanthin, a major xanthophyll in brown seaweeds which receives a minor change at the side chain of ionone ring in the intestinal absorption process. Thus, fucoxanthin is considered as one of the promising candidate for cancer prevention.

In this study, the author first explored the cancer chemopreventive factors in foods, focusing the target on a traditional diet, Japanese kelp. The evidence has been provided that a diet containing kelp powder can significantly increases the longevity of mouse under growing benzo[*a*]pyrene (BaP) diet, an environmental carcinogen. Animals fed 4-ppm BaP diets significantly reduced life span whereas addition of kelp powder remarkably recovered the life span to the similar level of carcinogen free animals. The increasing life span was associated with the reduction of cancer risk because cancer shortening the longevity. Thus, the Japanese kelp seems to be a treasure resource for cancer preventing factors. Analysis of ingredients and the evaluation of *in vitro* bioactivity showed that it includes several beneficial compounds in respect to cancer prevention and xanthophyll fucoxanthin was one of them.

To make more stringent evidence then the author employed a short term animal study to investigate the inhibitory effects of fucoxanthin and kelp extract on the development of azoxymethane (AOM)-induced colonic aberrant crypt foci (ACF). Carcinogen treated rodent colon revealed the presence of a single or cluster of

morphologically altered crypts. These crypts termed as aberrant crypts and it was hypothesized that aberrant crypt represented as preneoplastic markers. Thus, their number and growth features could be used to identify the modulator and/or suppressor of colon carcinogenesis. The number of ACF per mouse was significantly lower in fucoxanthin given mice compared to AOM alone mice, about 31%, 35% inhibition by fucoxanthin at 0.05 and 0.1 mg/ml dose, respectively. These findings suggest that fucoxanthin suppress early phase of colon carcinogenesis. Kelp extract, containing 0.075 mg/ml fucoxanthin also showed inhibition of ACF development by 36% compared to the AOM alone mice. The results that kelp extract and fucoxanthin similarly reduced the number of ACF indicate that fucoxanthin is one of the active ingredients of kelp. Several mechanisms are behind the prevention of ACF development, e.g. elevation of phase II enzyme activity, an inhibition of tumor proliferation and/or induction of the apoptosis of tumor cells. It was also examined the changes in activity of two phase II enzymes, glutathione S-transferase (GST) and quionone reductase (QR), in the liver of mice given fucoxanthin. Fucoxanthin showed a minor induction of GST activity at a dose of 0.1 mg/ml indicating the ACF suppression was possibly due to other mechanisms rather than phase II enzyme activation.

ACF demonstrate a greater cellular proliferation than generalized hyperproliferative mucosa. It was reported that proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive index, a biochemical biomarker for cell proliferation was greater in ACF than normal appearing crypts and over-expression of cyclin D1 in ACF induced by AOM was higher than normal crypts. Thus, development of ACF might be suppressed by inhibition of cellular proliferation. Then, the effects of fucoxanthin on the growth of colon cancer cells (WiDr) were examined. Fucoxanthin reduced the viability of cells through the induction of cell cycle arrest at G₀/G₁ phase followed by apoptosis. Fucoxanthin induced the up-regulation of p21^{WAF/Cip1}, a negative regulator for cell cycle at both transcriptional and protein level. In further investigations by using isogenic human colon adenocarcinoma cell lines, fucoxanthin failed to induce G₀/G₁ arrest in p21-deficient

氏名 : Swadesh Kumar Das NO. 3

HCT116 cells, but not in HCT116 wild-type cells revealed the critical role of p21 in fucoxanthin mediated growth arrest. Thus, fucoxanthin regulates cell proliferation by induction of growth inhibitory signals and similar type mechanisms are supposed to be involved in fucoxanthin mediated ACF suppression.

To elucidate the effects of fucoxanthin against other carcinoma, the present study was further extended to investigate the effect of fucoxanthin against hepatic cancer by using HepG2 cells. In hepatic carcinoma cell line fucoxanthin also caused inhibition of cell proliferation by causing cell cycle arrest at G₀/G₁ phase. Fucoxanthin caused down-regulation of cyclin D type protein through the ubiquitin- proteasome pathway and thus inhibiting the cyclin D/ cdk 4 kinase activity and as a result cell cycle has been arrested.

Fucoxanthin caused cell cycle arrest in both colon and hepatic carcinoma cell line and the growth inhibitory signals have been elucidated. In colon cancer cell line fucoxanthin (25 μM) up-regulates p21^{WAF/Cip1} and have no effect on the Cyclin Ds protein at least at 24 h. Whereas, in hepatic carcinoma cell line same concentration of fucoxanthin showed rapid down regulation of Cyclin Ds type protein. The signal pathway responsible for inducing growth arrest may be variable depending on tissue types. This may be due to variations in the endogenous growth factors produced in the different cell types or to variations in the growth-regulating signaling pathways altered in the different cell types during the process of immortalization and/or transformation.

In conclusion, fucoxanthin in Japanese kelp contributes to the prevention from hepatic and colon carcinogenesis. Cancer cells are proliferating more actively than the non-cancer cells in the body and are incorporating various endogenous chemicals including non-nutrient. Dietary fucoxanthin may specifically incorporate to the cancer cells without making conjugation and exhibit the suppressing activity on the proliferation and thus act as a cancer preventing agents.

氏名	Swadesh Kumar Das		
論文 題目	Studies on anticarcinogenesis of fucoxanthin in Japanese kelp 昆布に含まれるフコキサンチンの抗がん作用機構に関する研究		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	金沢 和樹
	副査	教授	坂本 博
	副査	教授	芦田 均
	副査		
			印
要 旨			
<p>大腸がんによる死亡率が急増しており、それを予防する食品成分の発見が強く望まれている。日本には伝統食品として昆布などの褐色の海藻があるが、疫学研究では褐藻類の消費量と大腸がんの発症率が逆相関している。また、沖縄県の男女の平均寿命は、昆布の消費量が高かった1995年までは日本でもっとも長かった。これらの情報に基づいて、本博士論文は、昆布にがん予防成分が含まれている可能性に着目した。そして、そのがん予防成分がキサントフィルの一つであるフコキサンチンであることを見出し、フコキサンチンの大腸がん予防機構を分子生化学的に解明したものである。</p> <p>第一章は序論で、キサントフィル類ががん予防成分の有効な候補であることを論理的に解説している。キサントフィル類はカロテノイドの仲間であり、その化学構造に酸素を含む。β-カロテンなどの炭化水素カロテノイドは体内でビタミンAに変換され、細胞分化に影響を与える。β-カロテンを用いた疫学介入試験が、1980年代から約20年かけて世界的規模で行われたが、肺がんと胃がんのリスクが約30%上がり、β-カロテンを用いるヒト試験は禁止された。一方、キサントフィル類は水酸基やエポキシ基を有するので、体内でビタミンAに変換されない。したがって、発がんリスクを上げることなく、がんを予防する可能性が高い。そして、海藻類は多様なキサントフィル類を含んでいる。この論理に基づいて研究を進めている。</p> <p>第二章では、まず実験動物に昆布を与えて生涯試験をしている。強い発がん物質であるベンズピレン4 ppmを餌に混ぜてマウスに与え、同時に餌に2%あるいは5%の昆布粉末を加えて寿命を比較している。ベンズピレンだけの場合には、対照群の寿命約900日と比較して寿命が有意に短く約600日になったが、2%あるいは5%の昆布粉末は対照群と同等の約850日まで寿命を回復した。その作用の一つは、昆布に含まれる食物繊維がベンズピレンを消化管内で吸着し糞便に排泄することであった。しかし、寿命の顕著な回復はこれだけでは説明できないと考えた。そこで、昆布の微量成分を分析し、フコキサンチンというキサントフィルが20 μg/g含まれることを見出した。</p> <p>第三章では、昆布からフコキサンチンを精製して、大腸がんモデル動物に与えている。マウスにアゾキシメタンを、1日目と8日目に皮下注射し、28日目に結腸の前がんに病変であるアベラントクリプトフォーサイ (ACF) を染色して同定・計数した。この試験期間中、昆布のアルコール抽出物75 mg/Lあるいは精製フコキサンチンを50 mgと100 mg/L濃度で飲用水に混ぜて与えている。昆布抽出物もフコキサンチンも有意にACFの形成数を35%抑えた。その作用機構を解明するために、まず、肝臓の薬物代謝系第二相酵素のグルタチオンS転移酵素とキノン還元酵素の活性を測定している。いずれの活性も有意に上昇していた。しかし、これらの酵素の誘導に関わるDNAの抗酸化応答部位 (ARE) の活性化は昆布抽出物を与えたマウスでしか検出されなかった。これらの結果から、フコキサンチンは顕著に大腸の前がん病変形成性を抑えるが、その作用は発がん物質の解毒系を誘導するものではないと結論している。そして、次章以降では、フコキサンチンの作用機構を解明するために、ヒト結腸がん細胞 WiDr と肝がん細胞 HepG2 を用いている。</p> <p>第四章は WiDr でのがん予防機構の解明である。フコキサンチンを WiDr に与えると、そ</p>			

氏名	Swadesh Kumar Das
<p>の増殖を濃度依存的に抑制した。そこで、細胞毒性を示さない低濃度の 25 あるいは 50 μM を用いて増殖抑制機構を解析している。フローサイトメトリーで細胞周期を測定すると、培養 24 時間で G_0/G_1 期停止が観察され、48 時間後にはアポトーシスが認められた。細胞周期の G_0/G_1 から S 期へのチェックポイントは転写因子 E2F で制御されている。E2F はレチノブラストーマタンパク質 (Rb) のリン酸化で遊離される。Rb のリン酸化はその上流のタンパク質によって調節されている。これらをウエスタンブロッティングで測定して、Rb のリン酸化がフコキサンチンに濃度依存的に抑えられており、リン酸化を触媒する複合タンパク質であるサイクリン D 類とその依存キナーゼ類のうち、サイクリン D_1 が特異的にダウンレグレートされていた。そして、サイクリン D と依存キナーゼ複合体の活性を調節する上流タンパク質の p21 と p27 が顕著に発現誘導されていた。これらはフコキサンチンを与えて 48 時間後のイベントであった。そこで、初期応答遺伝子を知るためにノーザンブロッティングを行い、p21 が 24 時間で特異的に発現誘導されることを見出している。さらに、この結果を確認するために、p21 遺伝子の欠損株である HCT116 を使い、HCT116 では G_0/G_1 期停止誘導は認められないことを示している。これらの結果から、フコキサンチンは p21 の発現を促し、その下流のサイクリン D_1 をダウンレグレートすることで Rb のリン酸化を阻害し、結果として腫瘍細胞の細胞周期を G_0/G_1 期停止させ、停止した細胞をアポトーシスで分解させると結論している。</p>	
<p>第五章では、フコキサンチンのがん予防作用が他のがん細胞にも有効であることを明らかにするために、HepG2 細胞を用いている。フコキサンチンは HepG2 細胞にも濃度依存的に G_0/G_1 期停止を誘導した。しかし、その作用標的は WiDr の場合と異なった。フコキサンチンはサイクリン D_1 のタンパク量を減少させたが、その上流のタンパク質量には全く影響を与えなかった。そこで RT-PCR でサイクリン D_1 の mRNA の発現を追跡すると、フコキサンチンは与えた後の初期段階の 12 時間後に mRNA 発現を抑えた。レポーターアッセイでサイクリン D_1 のプロモーターの転写活性を測定すると、フコキサンチンはいずれのプロモーターにも作用しなかった。真核細胞のサイクリン D 類はユビキチン系で厳密に調節されている。そこで、ユビキチンプロテアソーム阻害剤の MG132 をフコキサンチンと同時に HepG2 に与えた。MG132 は、フコキサンチンによるサイクリン D_1 量の減少を回復させた。したがって、フコキサンチンはサイクリン D_1 のユビキチンプロテアソームによる分解を促進することでサイクリン D_1 量を減少させ、結果として、サイクリン D_1 とサイクリン依存キナーゼの活性を抑え、Rb のリン酸化を抑制すると結論している。</p>	
<p>第六章では、以上の結果をまとめて、フコキサンチンががん細胞の由来臓器の違いによって異なる機構で作用する、大腸がん細胞では p21^{WAF/Cip1} を標的とし、肝がん細胞ではユビキチンプロテアソーム系を標的とすることを議論している。また、日本人が古代から伝統食品としてきた褐藻類にフコキサンチンが特異的に含まれることの意義を指摘している。</p>	
<p>以上のように、本研究は、治療が困難ながんを予防できる食品成分が強く求められている現状に対して、日本の伝統食品の昆布が顕著ながん予防作用を示すフコキサンチンを含んでいることを明らかにしている。そのがん予防効果を実験動物を用いて延命効果と大腸がん予防効果で証明し、さらに作用機構を結腸がん細胞と肝がん細胞を用いて分子レベルで詳細に解明している。がん予防成分としてフコキサンチンを発見したことは大きな成果である。そして、本研究成果で、日本がん予防学会から Young Award を受賞している。さらに、そのフコキサンチンが、日本の伝統食品の昆布やワカメなどの褐藻類に含まれていることを示し、日本の伝統的食生活が長寿のために理にかなったものであったことを科学的に指摘した点は、日本の食文化の見直しに刺激を与え、日本人の健康維持に大きく貢献するものと考えられる。</p>	
<p>よって、学位申請者の Swadesh Kumar Das は、博士 (学術) の学位を得る資格があると認める。</p>	