

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

県立広島大学大学院

総合学術研究科

生命システム科学専攻

博士論文

平成 27 年 3 月

(2015 年)

直原 寛

目次

第一章	緒言	1
第一節	研究の背景について	1
第一項	発癌と予防に関する取り組み	1
第二項	1,2 Dimethylhydrazine によるラット大腸発癌モデル	4
第二節	熟成ニンニク抽出液 (AGE) について	7
第一項	ニンニクについて	7
第二項	熟成ニンニク抽出液 (AGE) について	15
第三節	本研究の目的	18
第二章	大腸化学発癌モデルラットを用いた AGE の抗腫瘍効果	20
第一節	はじめに	20
第二節	材料および方法	21
第一項	供試動物	21
第二項	飼料	21
第三項	動物実験スケジュール	21
第四項	大腸組織の組織学的評価	24
第五項	大腸組織の免疫染色 (PCNA)	25
第六項	統計処理	26
第三節	結果	27
第一項	DMH による発癌処理の妥当性検証	27
第二項	体重、摂餌量、飲水量推移	29
第三項	臓器重量	31
第四項	肉眼的所見結果 (大きさ、部位、腫瘍数)	32
第五項	ACF の測定結果	35
第六項	病理組織学的結果	39
第七項	PCNA 免疫染色による評価	52
第四節	小括	58
第三章	ヒト大腸癌細胞株 (DLD-1) を用いた AGE による増殖抑制作用メカニズム検証	62
第一節	はじめに	62
第二節	材料および方法	63
第一項	材料	63
第二項	細胞増殖率の測定 (Sulforhodamine B assay)	63
第三項	G1/S 期への細胞周期同調	64
第四項	細胞周期解析	67

第五項	培養細胞での細胞周期関連タンパク質発現評価	68
第六項	カスパーゼ3 活性評価.....	72
第七項	統計処理.....	73
第三節	結果	74
第一項	AGE の大腸癌細胞株に対する増殖抑制効果	74
第二項	AGE の大腸癌細胞株に対するアポトーシス誘導性評価.....	79
第三項	AGE の大腸癌細胞株に対する細胞増殖速度遅延に与える効果.....	88
第四項	AGE が大腸癌細胞株の細胞周期関連タンパク質の発現に与える影響.....	94
第四節	小括	98
第四章	総括	102
謝辞	108
参考文献	109

第一章 緒言

第一節 研究の背景について

第一項 発癌と予防に関する取り組み

2013 年のがんの統計によると、がんは本邦における死亡原因の第 1 位である。なかでも大腸癌は食生活の欧米化などにより 1980 年代以降その罹患率は増加傾向にあり、部位別の死亡数は男性では肺癌、胃癌に続いて第 3 位、女性では第 1 位である (1)。そしてがんの発症は、年齢との相関性が高いことも統計データで示されており、高齢化社会の到来により今後がん罹患者が増加することが予想される。

がんは、ウイルスや放射線、化学物質などの外的環境因子や細胞内に発生した過剰な活性酸素などが染色体 DNA を損傷することに端を発し、一般的には変異遺伝子の蓄積やメチル化異常などのエピジェネティックな異常が、正常細胞に異常増殖を引き起こすことで正常組織から前癌性病変、早期癌そして進行性の癌へと進展していく疾病である(2)。

一方、がんの発症は、食生活などの生活習慣も大きな危険因子になることが易学研究で示され、1980 年代の米国では、発がん危険因子の摂取を避け、予防効果のある食品を積極的に摂取することで、がん罹患リスクを低減しようとするがん化学予防 (cancer chemoprevention) の考えが生まれた(3)。そして、がんの発生を抑制したり、発症や発育を遅らせたりすることができる食品について多数報告されるようになり、1992 年にはアメリカ国立がん研究所 (NCI) で、野菜や果物が、がん予防にどのような効果を示すかを科学的に検証するデザイナーフーズプログラムが実施された(4)。その結果、発癌予防効果が期待される

多くの食品が示され、そのなかでニンニクは、がん予防が最も期待される食材として示されており、デザイナーフーズとして注目されている素材でもある (Figure 1-1) (4)。

そして本邦においても、1984年より「対がん10ヵ年総合戦略」を策定するなど国策としてがん対策に取り組んでいる。また、平成24年に閣議決定されたがん対策推進基本計画(5)では、がんによる死亡者の減少などが目標として掲げられ、さらに個別目標としてがん医療の充実と共にがんの予防も含まれている。がんの予防に関する取り組みとして、肺癌と相関の高い喫煙率を低下させるための啓蒙活動や、野菜や果物の摂取量を増加させるための啓蒙活動が行われている。さらに、国立がん研究センターでも科学的根拠に基づいたがん予防効果の研究を推進している(6)。このように国民の2人に1人が、がんを発症する現在では、日常生活において、がんの発症や発育を予防・抑制することが、これからの社会に求められていることの一つであると言える。

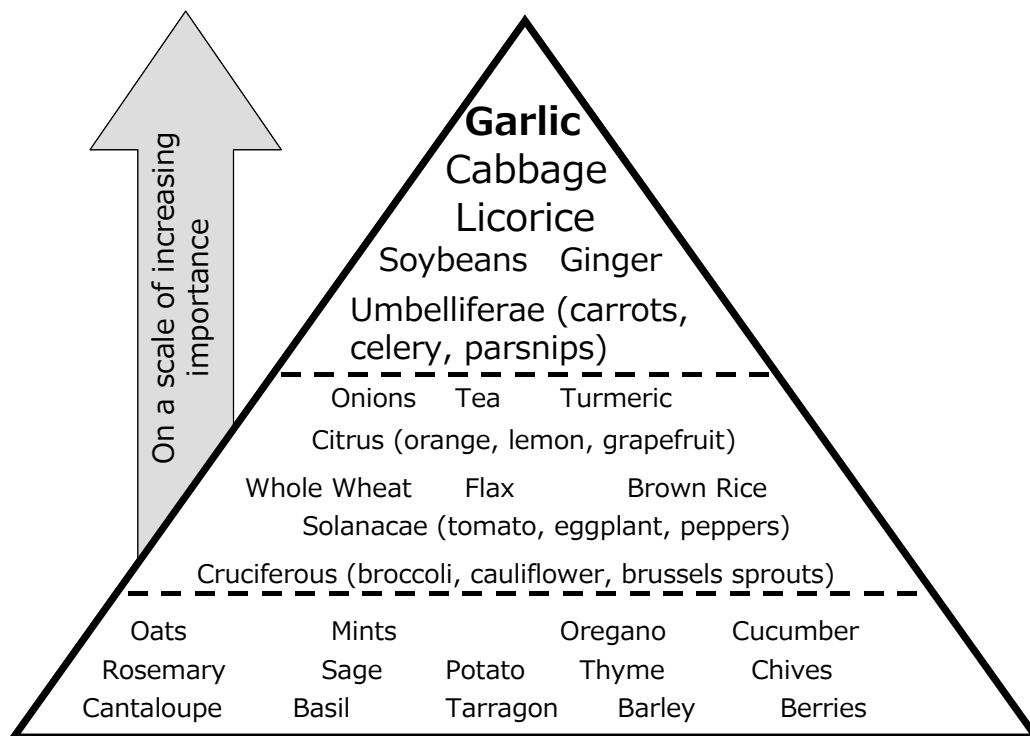


Figure 1-1 デザイナーフーズピラミッド

Caragay A. B.: Cancer-preventive foods and ingredients. Food Technol., 4, 65-68, 1992 より

一部データ引用

第二項 1,2 Dimethylhydrazine によるラット大腸発癌モデル

がんの化学予防効果を検証するには、疾患モデル動物を用いることが多い。例えば、1,2 Dimethylhydrazine (DMH) は、げっ歯類の大腸発癌剤として広く利用されており、その発癌メカニズムについても解明されている(7,8,9)。例えば、皮下注射された DMH は肝臓で酸化還元酵素であるシトクロム P450 (CYP450) 1A1 によって Azoxymethane (AOM) に代謝され、さらに CYP450 2E1 によって中間体である methylazoxymethanol (MAM) に変換される。そして、最終的に高反応性の代謝産物である methyldiazonium イオンに代謝される (Figure 1-2)。MAM は胆汁に排出され大腸に移送されるか、血流から直接大腸上皮に到達する。また、別の報告では *in vitro* の実験で大腸粘膜細胞もしくは大腸バクテリアが直接、DMH を MAM に代謝することも確認されている(10,11)。そして、MAM は大腸上皮細胞 DNA のグアニン塩基 (G) をメチル化して O⁶-メチルグアニンに変化させる。通常、グアニン塩基はシトシン (C) 塩基と 3 箇所の水素結合で会合するが、O⁶-メチルグアニンでは水素結合部位が 2 箇所となり、チミン (T) 塩基とミスペアリングする。そしてミスペアリングしたチミン塩基は DNA 複製時にアデニン (A) 塩基と会合する (Figure 1-3)。つまり、DMH は、その代謝産物が染色体 DNA に付加体を形成させ、DNA 複製過程で G:C 塩基対を A:T 塩基対に変異させることで遺伝子変異を引き起こし、癌化に関与している。

事実、DMH による大腸発癌誘導ラットの腫瘍では腺腫組織の 16%、そして腺癌組織の 53% で KRAS 遺伝子 (コドン 12 や、コドン 13、59) の G は A に変異している (12,13)。そしてラット APC 遺伝子についても 33% の腫瘍で G から A に変異している(14,15,16)。さらに β -catenin 遺伝子についても DMH

誘発腫瘍の 77 %で G から A への変異が確認されている(17,18,19)。このように DMH による発癌誘導は K-ras や APC、 β -catenin といった細胞増殖に関わる遺伝子に変異を生じさせた結果、細胞の異常増殖を引き起こし、腺腫や腺癌へ進行させる。

一方、フォーゲルシュタインらはヒト大腸癌の研究から多段階発癌モデルを提唱している(2)。これは異なる遺伝子が連続的な変異によって、本来制御された細胞増殖機構を破綻させ、細胞の異常増殖を引き起こすことで、正常粘膜が腺腫、早期癌そして進行性の癌へと進展していくというモデルである。大腸癌以外でも乳癌など複数の癌種で確認された現在広く支持されているがんの進行モデルである。例えば、1 cm 以上のヒト大腸腫瘍性病変では、50 %の病変で KRAS 遺伝子に G から A 変異が確認されている(20)。

このように DMH によるげっ歯類の大腸化学発癌モデルは、ヒト大腸癌と類似した遺伝的および組織的变化を示すため、DMH による大腸発癌を、多段階発癌モデルに当てはめたと考えることができる。DMH 代謝物である MAM によって DNA が損傷(変異)されるイニシエーション過程と、自律的な細胞増殖能を獲得したプロモーション過程、そして遺伝子異常が増加し悪性化したプログレッション過程として捉えることができ、環境因子や食品、薬剤が大腸癌の発症・発育にどのように影響するかを研究する際、広く用いられている発癌モデルである。

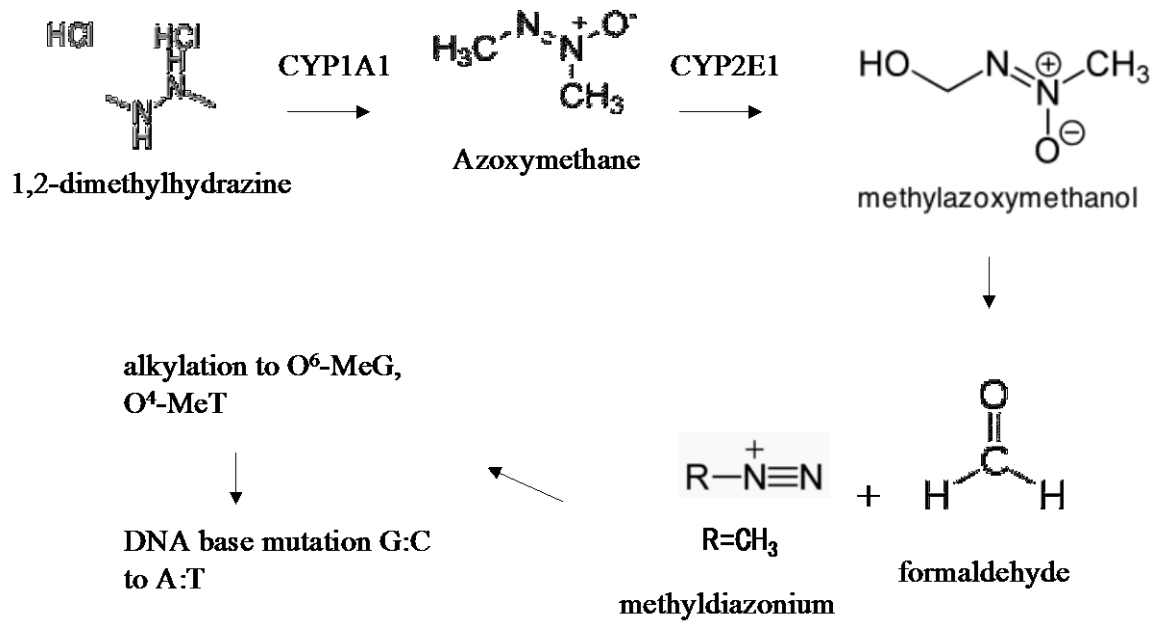


Figure 1-2 Scheme of DMH metabolism.

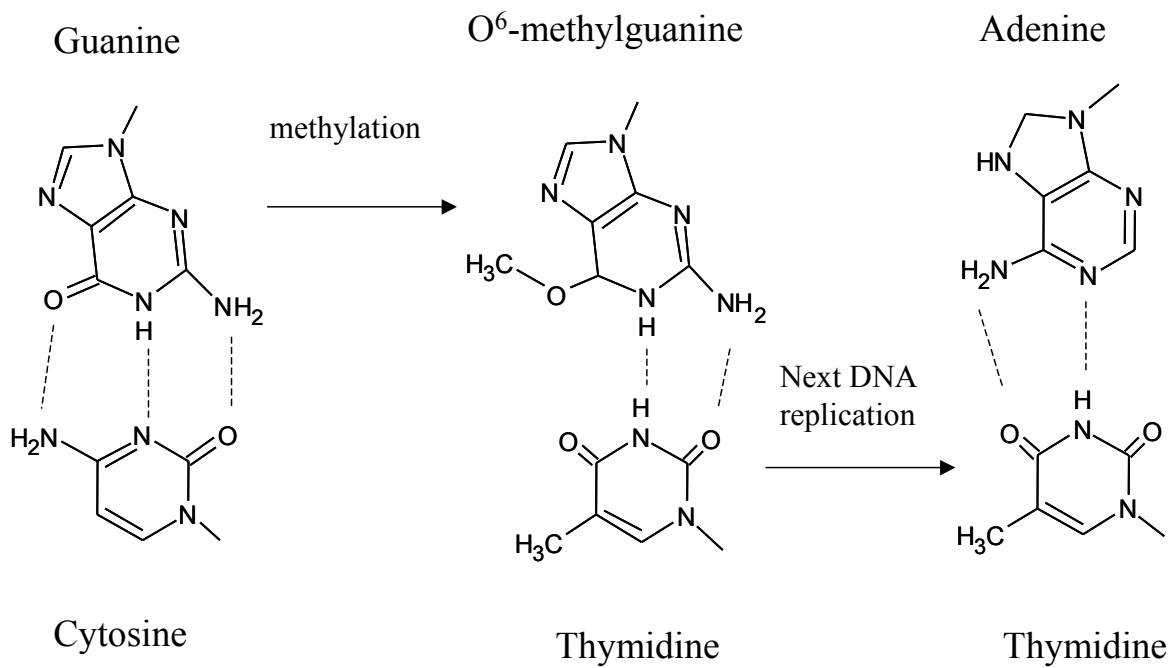


Figure 1-3 Scheme of DMH-induced DNA mutation.

第二節 熟成ニンニク抽出液 (AGE) について

第一項 ニンニクについて

ニンニクはアスパラガス目のネギ科、アリウム属 (*Allium*) に分類され、滋養強壮や様々な疾患に対して効果があるとされる古くからアジアを中心に世界中で栽培されている機能性の食品である。1999年の統計データでは全世界で約900万トンが生産され、国別では中国が599万トン(70%)、韓国が48万トン(5%)、インドが45万トン(5%)、アメリカが22万トン(2%)の順で、日本の生産量は約4万トンである。

Table 1-1 にニンニク鱗茎の栄養学的な組成を示す(21)。水溶性多糖類のフルクタンが乾燥重量比で8割を占めるが、他の食品にないニンニクの特徴としてアルギニン含量が特に高い点が挙げられ、総イオウ含量は0.3%に相当する。

生ニンニクの主要な特徴成分は、アリイン (alliin : (+)-S-allyl-L-cysteine sulfoxide) であるが (Table 1-2) (22)、ニンニクの細胞が破砕されると無臭のアリインはアリイナーゼによる酵素反応で強い抗菌性を有するアリシンへ変換される。アリシンは血液中ではヘモグロビン中の2価鉄を3価鉄に酸化しメトヘモグロビンを生じ、生体に対して貧血などを引き起こし(23)、また胃粘膜傷害を引き起こすことが報告されているため(24)、生ニンニクの過剰な摂取は健康障害につながる恐れがある。ただ、アリシンは不安定な化合物であり、20℃、20時間でほぼ完全にニンニク特有の臭いを発するジアリルスルフィド類に分解され(25)、さらに温度や溶媒などの諸条件でジアリルスルフィド類、ビニルジチン類、アホエン、S-アリルシステイン、S-アリルメルカプトシステインなどの多様な化合物に変化する(Figure 1-4)。Table 1-3 に、生ニンニクを乾燥して粉末化したガーリックパウダー、生ニンニク破砕物を水蒸気蒸留したガー

リックオイル、生ニンニク破砕物を植物オイルで抽出したオイルマセレート、そして熟成ニンニク抽出液に含まれる主要な化学成分の含量をまとめた(22)。

ニンニクは古くから滋養強壮のための食材だけでなく、様々な疾患に効果があるとされているが、その主な薬理的作用として、抗菌活性による感染症予防効果、コレステロール低下作用による循環器疾患の予防効果、抗酸化作用による発癌予防効果などが科学的に示されている。

ニンニクの感染症予防効果として、Jezpwa らは生ニンニクと乾燥粉末ニンニク調製品が、黄色ブドウ球菌、ブドウ球菌属細菌、肺炎桿菌、プロテウス属細菌、大腸菌、腸炎菌、真菌の鷲口瘡カンジダに対して効果的であると報告している(26)。

また、ニンニクの循環器疾患予防効果として、ニンニクやニンニク由来のイオウ化合物であるアホエン、ジチイン類、S-アリルシステインはコレステロール合成の主要酵素である β -ヒドロキシ- β -メチルグルタリル CoA (HMG-CoA) 合成酵素と還元酵素を阻害することで、肝臓におけるコレステロール合成と脂肪酸合成を抑制し、コレステロール低下作用による循環器疾患の予防効果を示すことが報告されている (27, 28, 29)。

そして、ニンニクの抗酸化作用による発癌予防効果として、ニンニク中に豊富に含まれるスルフィド類やシステイン誘導体といったイオウ化合物が持つペルオキシラジカルの消去能により (30,31)、細胞内で過剰に発生した活性酸素が除去され、酸化的 DNA 損傷を軽減させることで、発癌抑制に寄与すると報告されている(32)。つまり、ニンニクの抗酸化作用による発癌予防効果は、発癌のイニシエーション過程に作用し、発癌物質による DNA の酸化的遺伝子変異を軽減する効果に起因すると考えられている。例えば、疫学的な研究では、日常的なニンニクの摂取は大腸癌や胃癌、食道癌の発症リスクを低下させるこ

とが明らかとなっている(33,34)。そしてニンニクおよびそのイオウ化合物は、動物実験において大腸発癌を抑制すると報告され(35,36,37)、培養細胞株を使った実験において癌細胞の増殖を抑制したと報告されている(38,39,40,41,42,43,44,45)。また、Sumiyoshi らは、S-アリルシステインが DMH 誘発性のマウス大腸腺管細胞の核異常を濃度依存的に抑制することを示し、このとき抗酸化作用の指標の一つであるグルタチオン S 転移酵素の活性が、肝臓および大腸組織で亢進していたことから、S-アリルシステインは抗酸化作用により DMH の最終代謝物 (メチルアゾニウムイオン) の活性化を抑制することで、大腸組織細胞の核障害性を抑制したと考察している(35)。さらに、Hosono らは、ジアリルトリスルフィド(DATS)がヒト大腸癌細胞株に対して、細胞周期の G2/M 期での停止させ、アポトーシスを誘導させることで、細胞増殖抑制作用を示すことを報告している(41)。

このようにニンニクおよびそのイオウ化合物は、デザイナープログラム(4)で示されたとおり、癌の発生予防や発育抑制効果を持つ素材であることが動物実験や培養細胞実験で報告されている。

Table 1-1 ニンニク中の主な栄養成分組成 (可食部 100 g あたり)

水分 (g)	蛋白質 (g)	脂質 (g)	炭水化物 (g)		灰分 (g)	食物繊維 (g)		ビタミン (mg)		アミノ酸組成(mg)			
			糖質	繊維		水溶性	不溶性	B1	C	リジン	アルギニン	アスパラギン酸	グルタミン酸
60.3	8.4	0.1	28.7	0.9	1.6	5.8	2.6	0.21	19	290	1300	630	960

出典 ; 化学技術庁資源調査会編 : 四訂日本食品成分表, p.166, 250, 395, 420, 1993.

Table 1-2 生ニンニクに含有される主なイオウ化合物の種類と含量*

化合物名	生ニンニク中含量 (mg/g)
(+)-S-アリル-L-システインスルホキシド (アリイン)	5.4~14.5
(+)-S-メチル-L-システインスルホキシド (メチイン)	0.2~2
(+)-S-(trans-1-プロペニル)-L-システインスルホキシド (イソアリイン)	0.1~2
γ -グルタミル-S-アリル-L-システイン	1.9~8.2
γ -グルタミル-S-(trans-1-プロペニル)-L-システイン	3~9
γ -グルタミル-S-メチル-L-システイン	0.1~0.4
アリシン	2.5~5.0**

* Koch, H. P., and Lawson, L. D. (eds.): Garlic; The science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species, p. 42, Williams & Wikins, Baltimore, 1996 より一部データ引用, **生ニンニクを同量の水とともに破碎し、生じたアリシンを HPLC にて測定した

出典 ; 齋藤洋: 4.ニンニクの化学、ニンニクの科学 (朝倉書店) , p96, 2000

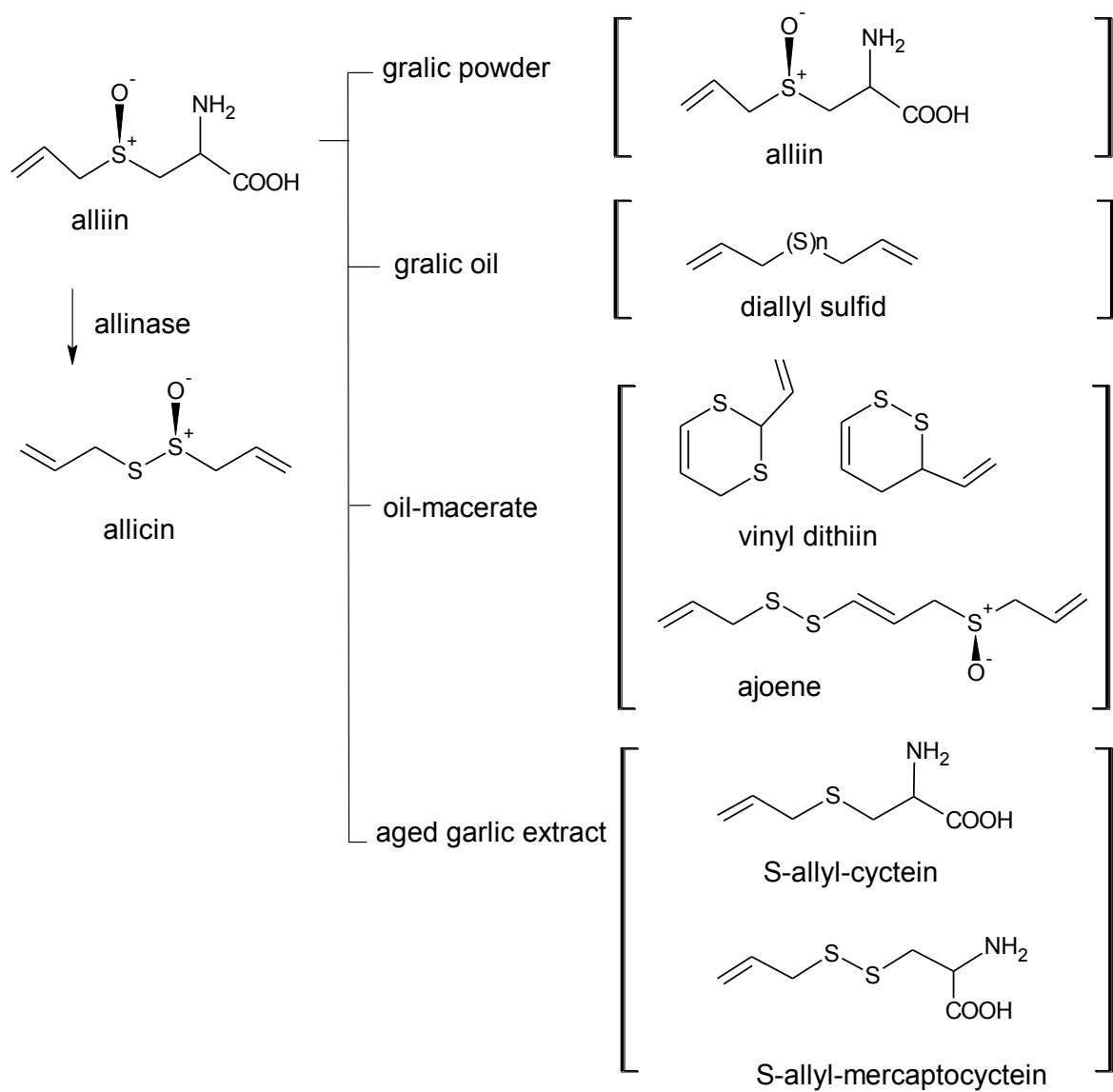


Figure 1-4 Organosulfur compounds derived from garlic.

出典 ; 齋藤洋: ニンニクの科学 (朝倉書店) 4.ニンニクの化学, p106, 2000

Table 1-3 加工ニンニク中の主要な含有成分

	ガーリック パウダー	ガーリック オイル	オイルマ セレート	熟成ニン ニク抽出 液 (AGE)	加熱処理 ニンニク
アリイン	+++	N.D.	N.D.	±	+++
アリシン生成能	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
アリシン	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ビニルジチイン類	N.D.	N.D.	+++	N.D.	N.D.
アホエン	N.D.	N.D.	++	±	N.D.
アリルスルフィド類	N.D.	+++	+++	+	±
γ-グルタミル-S-アシル システイン	+++	N.D.	++	++	+++
S-アシルシステイン	N.D.	N.D.	+++	+++	±
S-アシルメルカプトシス 테인	N.D.	N.D.	N.D.	+	N.D.
フルクタン	+++	N.D.	+++	+++	+++
スピロスタノールサポニ ン類	N.D.	N.D.	U	+++	N.D.
フルクトシル-アルギニン	N.D.	N.D.	U	+++	N.D.
F-4	U	N.D.	U	+++	U

+++、++、+、±、N.D.: 生ニンニク 1g に換算した成分含量。それぞれ 1 mg 以上, 0.2 mg~1 mg, 0.05 mg~0.2 mg, 0.01 mg~0.05 mg, 0.01 mg 以下. U: 未実施。

ガーリックパウダー: 生ニンニクの凍結乾燥粉末、ガーリックオイル: 生ニンニクをスラ

イスし水蒸気蒸留後分離されたオイル、オイルマセレート：生ニンニクを大豆油中で粉碎し4週間室温に放置、熟成ニンニク抽出液：湧永製薬（株）製造品、加熱加工処理ニンニク：生ニンニクを沸騰水中で1時間加熱。

出典：齋藤洋：ニンニクの科学（朝倉書店） 4. ニンニクの化学, p.107, 2000

第二項 熟成ニンニク抽出液 (AGE) について

熟成ニンニク抽出液 (aged garlic extract; AGE) はスライスした生ニンニクをエタノール中で 10 ヶ月以上熟成させ、濃縮した褐色の抽出液であり、生ニンニクとは含まれる成分にも違いがある。AGE に特徴的に含まれる成分として、S-アリルシステイン (SAC)、S-アリルメルカプトシステイン (SAMC)、 γ -グルタミル-S-アリルシステイン (G-SAC) などの水溶性イオウ化合物の存在が挙げられる (Table 1-3)。AGE 中のイオウ化合物の存在量は S-アリルシステインが最も多く、主な活性成分であると考えられる。一方、アリシン、ビニルジチン類、アホエンなどの脂溶性イオウ化合物は含んでいない。また揮発性のイオウ化合物として知られるジアリルスルフィド (DAS)、ジアリルジスルフィド (DADS)、ジメチルジスルフィドなどのアリルスルフィド類はごく僅しか存在しないため、ニンニクに特異的な臭いがほとんどない点が特徴として挙げられる (Figure 1-4)。

これまでの先行研究で、AGE には抗腫瘍効果、免疫賦活効果、抗酸化効果、抗疲労効果など多くの生理機能が報告されている。

例えば AGE の抗腫瘍効果としては、大腸腺腫保有者を対象とした臨床試験において、新規腺腫の発生抑制効果が確認されている (46)。また、ヒト大腸腺癌細胞株の増殖抑制効果 (47) や、大腸腫瘍化学誘発ラットに対する腫瘍発生抑制効果 (48) が報告されている。

そして、AGE の腫瘍免疫賦活効果として、肝癌患者での血中 natural-killer (NK) 細胞の活性亢進作用 (49)、Sarcoma-180 細胞移植マウスでの NK 活性増強作用 (50, 51) が報告されている。さらに、抗酸化効果として AGE を経口投与したマウスで nitric oxide (NO) の血中濃度上昇が報告されている (52)。一方で、

NO は腫瘍に対して抑制と促進の両面の作用が報告されている。例えば、Reynaert らは、NO が腫瘍の発育段階で活性化し、アポトーシスを抑制する転写因子 NF- κ B を抑制することで、腫瘍形成を抑制することを示している(53)。またその一方で、Mannick らは、NO がアポトーシスを誘導するカスパーゼのシステイン活性基をニトロシル化 (S-nitrosylation) で不活化させることでアポトーシスを抑制することを示している(54)。しかしながらこれまでのところ、AGE による NO 上昇作用と腫瘍の発育との関係は不明である。

また、AGE の抗疲労効果として、AGE を投与した運動負荷マウスでは糖代謝活性が亢進することが示されている(55)。

一般的に抗腫瘍効果は、抗発癌効果と抗腫瘍発育効果に分けることができる。抗発癌効果に寄与する機序として、抗酸化作用による過剰な活性酸素の除去作用、肝臓の代謝酵素シトクロム P450 に代表される化合物の分解に関与するフェーズ I 代謝酵素の活性を調整することによる発癌物質の不活化、そして、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) に代表される活性化代謝物や変異原性物質の抱合による中和と体外排出に関与するフェーズ II 代謝酵素の亢進が挙げられる。そして、抗腫瘍発育効果に寄与する機序として、発生した腫瘍細胞に対する免疫担当細胞による細胞傷害活性、腫瘍細胞へ直接的に働きかける増殖抑制やアポトーシスの誘導に大別することができる。

がんは遺伝子変異や DNA のメチル化異常などのエピジェネティック異常が起因となり発症する疾病であるが、その原因の一つに細胞の代謝反応過程で生じた活性酸素やフリーラジカルによる酸化的 DNA 損傷 (32) や環境中の化学発癌性代謝産物による DNA 付加体形成が引き起こす DNA 変異が報告されている(9)。先行研究では AGE による活性酸素除去作用や、脂質の過酸化抑制作用が示されている(31)。また、ニンニク由来成分であるジアリルスルフィド

(DAS) は、DMH をメチルアゾキシメタノール (MAM) に代謝する酵素であるシトクロム P450 2E1 の代謝活性を低下させ (56)、また肺癌を誘発するタバコ特異的なニトロソアミン化合物である 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane (NNK) のケトアルデヒド体への代謝を抑制することが報告されている(57)。

そして GST や UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼは、MAM などの外来性電子親和性生理活性物に対する抱合反応を促進するため、発癌物質の中和作用において重要な役割を果たすと考えられており (58)、Liu らは AGE の混餌投与によって、7,12-ジメチルベンズアントラセン(dimethylbenz[a]anthracene ; DMBA) で発癌誘導したラット乳腺中の発生腫瘍数の減少、およびラット乳腺組織内の GST 活性の上昇とグルタチオン量の増加を報告している (59)。

また、ニンニクによる腫瘍免疫の増強については 1957 年の Weisberger と Pensky による報告(60)に始まり多くの研究報告がある。AGE では、マウスに移植した Sarcoma-180 (マウス肉腫由来細胞株) の増殖抑制効果が確認され、同時に Sarcoma-180 細胞を標的とした NK 活性の上昇が確認されている(61)。

これらの先行研究をまとめると、ニンニク由来の AGE は化学発癌剤の代謝活性化酵素 (CYP450 2E1) の活性低下作用と、GST の抱合反応活性化による中和・排出作用の亢進により、発癌予防効果を発揮すると考えることができる。そして免疫細胞の活性化により癌細胞の増殖を抑制している可能性も考えられる。しかしながら、AGE が腫瘍の発育・進行に与える効果は不明であり、AGE の薬理作用についての作用機序は十分に検証されておらず、不明な点が多い。

第三節 本研究の目的

これまでの先行研究から、AGE には化学発癌剤を活性化する代謝酵素 (CYP450 2E1) を減弱させる作用と、GST による抱合反応亢進による発癌物質の中和・排泄を増強させる作用が示されている。さらに AGE は免疫細胞を活性化することも示されている。

AGE の抗腫瘍効果に関する先行研究としては、Tanaka らによる大腸腺腫保有者を対象とした臨床試験において新規腺腫の発生抑制効果が示されている(46)が、その機序は明らかとなっていない。また、Katsuki らは化学発癌剤 (DMH) による大腸癌モデルラットを用いた研究で、AGE が ACF や腫瘍の発生数を低下させた重要な報告をしている(48)。しかしその一方で、Perše らは「DMH 誘導性発癌はその代謝産物が発癌作用を示すため、肝臓での代謝酵素 (CYP450 2E1 など) に影響を与える素材は発癌とその作用結果に影響を与える。」と言及している(7)。Katsuki らの研究は、AGE という素材の発癌予防効果を主眼に置いた研究であるため、AGE にて抗酸化作用を高めたラットに発癌剤を投与し、AGE の発癌予防効果を示した重要な研究であるが、AGE が発癌物質の作用を減弱化させていることで発癌抑制した可能性が考えられ、つまり、AGE が腫瘍の発育に対して抑制効果を示すかどうかは不明である。

AGE による抗腫瘍効果について検討する上で、発癌の予防効果と共に、腫瘍の発育抑制効果についての研究が重要であると考えるが、これまでの研究では AGE が腫瘍の発育を抑制した報告はなく、また腫瘍細胞へ対するメカニズムについての研究も十分ではない。

そこで本論文では、大腸化学発癌モデルラットを用いて腫瘍発育過程における AGE の腫瘍形成の抑制効果を検証し、そのメカニズムを解明することを目

的としている。

第二章 大腸化学発癌モデルラットを用いた AGE の抗腫瘍効果

第一節 はじめに

大腸化学発癌実験では、マウスやラットに、azoxymethane (AOM)、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo pyridine (PhIP)、1,2-dimethylhydrazine-2HCl (DMH)などを投与する実験系がある(62)。なかでも DMH や AOM を用いたラット発癌実験は、ヒトでの散発性大腸癌と類似した組織像を示すため、広く用いられている実験である。これらの発癌剤を用いた実験では、マウスやラットの大腸に発生する前癌性病変や腫瘍を指標とした発癌研究が展開されており、被検物質の投与のタイミングにより、発癌予防効果や抗腫瘍進展効果について検証することができる。例えば、被検物質を発癌処理前から投与することによって、発癌から発育までの全過程についての化学予防効果を言及することができる。一方、発癌処理後から被検物質の投与を開始することで発癌のプロモーションやプログレッション段階での腫瘍の発育抑制効果を検証することができる(63)。

本章では、AGE の腫瘍発育過程における抗腫瘍効果を検証することを目的とし、DMH により発癌処理を施したラットに AGE を摂餌させた。そしてラット大腸粘膜に発生した前癌性病変を含む異常腺窩巢(aberrant crypt foci :ACF)、腺腫、腺癌を病理組織学的に検討した。また、AGE が腫瘍組織の増殖能に与える影響を免疫組織化学的手法で評価した。

第二節 材料および方法

第一項 供試動物

本実験には、日本チャールズリバー株式会社から購入した 4 週齢オス SPF/VAF ラット（系統名 ; F344/DuCrI CrIj (Fischer)) 26 匹を 1 週間の予備飼育期間を経て実験に用いた。なお本実験は、県立広島大学研究倫理委員会の承認(通知番号第 11HA004 号)を得たものであり、本学の実験動物舎において $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12 時間明暗の飼育環境で行い、県立広島大学人間及び動物を対象とする研究に関する倫理規定（平成 17 年 7 月 8 日施行）に従い、実施した。

第二項 飼料

熟成ニンニク抽出液 (Aged garlic extract : AGE) は、スライスした生ニンニクをアルコールに 10 ヶ月以上浸漬し、ろ過抽出・濃縮した液体であり、湧永製薬株式会社（広島）から供与され、実験に用いた飼料はオリエンタル酵母工業株式会社（東京）で依頼製造した。AGE 混餌飼料は実験動物用固形基礎飼料 MF（オリエンタル酵母）に AGE の乾燥重量比として 3 % (w/w) になるように調製した。コントロール飼料は、AGE 乾燥重量と同量のスクロース : セルロースが 2 : 3 のコントロールパウダーを MF に添加して調製した。

第三項 動物実験スケジュール

ラットは実験開始時に体重に偏りがないように 4 群（第 1 群 : 10 匹、第 2 群 : 10 匹、第 3 群 : 5 匹、第 4 群 : 1 匹）に分けた。塩酸 NN'-ジメチルヒドラジン [NN'-dimethylhydrazine dihydrochloride: $\text{CH}_3\text{NHNHCH}_3 \cdot 2\text{HCl}$] (D0741 : 東京化成工業株式会社、東京、以下 DMH と略す) を生理食塩水（大塚生食注）（大塚製薬株式会社、徳島）に溶解し、炭酸水素ナトリウムで

pH6.5-7.0 に調整した。第 1、第 2、第 3 群のラットに対して DMH 溶液を 1 匹あたり 0.3 mL 程度、20 mg/kg ずつ毎週 1 回計 8 回、背部皮下に投与した。

1 群および 3 群は全実験期間を通じてコントロール飼料を自由摂餌させた。2 群は DMH の投与期間である実験開始から 8 週間はコントロール飼料を摂餌し、9 週目以降実験終了まで 3 %AGE 混餌飼料を自由摂餌した。

1 群、2 群は実験開始 8 週間までは各群 1 ケージで飼育し、9 週目以降は 3 ケージ (4 匹、3 匹、3 匹) で飼育した。そして 1 群、2 群、4 群は実験 31 週目にジエチルエーテル (15401-45 : ナカライテスク、京都) 麻酔下で開腹し、屠殺後、主要臓器 (心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、睾丸、睾丸上体脂肪) の重量を測定し、肉眼所見とともに記録した。3 群は DMH 処理が完了する 8 週目終了時に上記手法により解剖した。(Figure 2-1)

全ての群で実験中は水道水を自由摂取とし、各ラットの体重、各ケージでの摂餌量、飲水量は毎週測定し、記録した。

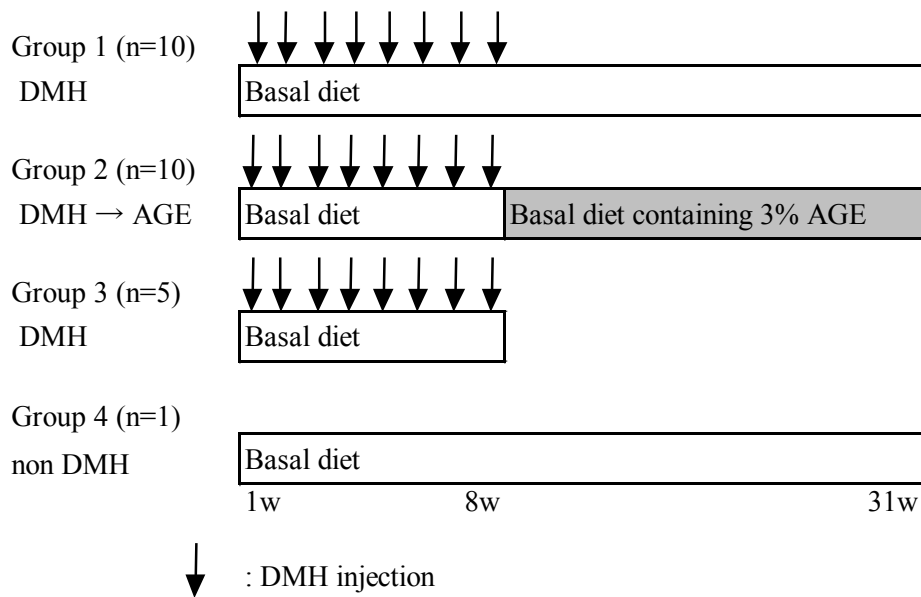


Figure 2-1. Experimental design. Group 1 rats were administered with subcutaneous injections of 20 mg/kg body weight DMH once a week for 8 weeks and fed a basal diet throughout the experimental period. Group 2 rats were administered with DMH similarly to group 1, and were fed a diet containing 3% AGE from one week after the last injection of DMH for the remaining experimental period. Group 1 and 2 rats were killed after 31 weeks. Group 3 rats were administered with DMH as in group 1 and were killed after 8 weeks. Group 4 rat was fed a basal diet throughout the experimental period without DMH treatment.

第四項 大腸組織の組織学的評価

ラット解剖時に速やかに摘出した盲腸、結腸を縦軸方向に切開し、大腸粘膜に発生した肉眼的に判別できる腫瘍についてその最大径、形状、発生部位を記録した。大腸は10%中性緩衝ホルマリン液(060-01667:和光純薬工業、大阪)で24時間程度固定した。

異常腺窩巢(aberrant crypt foci:ACF)測定:24時間程度ホルマリン固定した大腸を水道水で洗浄後、0.2%メチレンブルー液で5分間染色し、水に浸漬した状態で実体顕微鏡(Nikon:10倍率)を用いて、盲腸を除いた大腸全表面に発生したACF数および、集合した異常腺窩(aberrant crypt:AC)数を計測した。

組織学的観察:ACF測定後の盲腸を除いた大腸全長を8等分し、さらに縦軸方向に3等分に分割、盲腸は全割し、そしてそれぞれをカセットに入れて、パラフィン包埋標本ブロックを作製した。その後、マイクロームで4 μ mに薄切した組織切片でヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本を作製した。病理組織学的観察は、大腸癌取扱い規約(第8版;金原出版株式会社)(64)に則り、腺腫・腺癌に分類した。腺腫の異型度として、軽度異型腺腫、中等度異型腺腫、高度異型腺腫に分類し、腺癌の分化度として、高分化型管状腺癌、中分化型管状腺癌、低分化型管状腺癌、粘液癌、印環細胞癌に分類した。さらに腺癌の進達度として、粘膜内(M)、粘膜下層(SM)、固有筋層内(MP)、漿膜表面には露出していない(SS)、漿膜を超えて腫瘍が露出している(SE)に分類した(64)。また、大腸はRosengrenら(1977)の報告(65)に準じ、盲腸、近位結腸(proximal)、結腸屈曲部(flexure)、遠位結腸(distal)に分けた。近位結腸は斜走襞を有する部分

とし、結腸屈曲部やラットにより異なるが、斜走襞の終わりから肛門側にかけて約 3cm とし、それ以下縦走襞を遠位結腸とした。

HE 染色による大腸腫瘍の評価：大腸のパラフィン包埋切片 (4 μ m) をキシレンにて脱パラフィン処理後、100、90、70 % エタノール (EtOH) に各 5 分間浸漬することで再水和し、水道水に 5 分間浸漬、マイヤーヘマトキシリン液 (サクラファインテックジャパン株式会社、東京) に 2 分間核染色した。流水下の水道水で 5 分間洗浄し、エオジン (サクラファインテックジャパン株式会社) で 5 分間、細胞質・間質を染色した。水道水で 1 秒間洗浄し、3 分間ずつ 70、90、100、100 % EtOH で脱水処理し、キシレンで 3 回透徹処理したスライドをエンテランニュー (メルク) で封入した。

第五項 大腸組織の免疫染色 (PCNA)

大腸の腫瘍病変組織の増殖活性を anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen ; PCNA) 抗体 (Clone PC10, Dako, Denmark) で評価した。パラフィン包埋切片 (4 μ m) をキシレンで脱パラフィン後、3 % 過酸化水素/メタノール (MeOH) で 30 分浸漬にて内在性ペルオキシダーゼを失活させた。100、90、70 % エタノール (EtOH)、水道水、PBS に浸漬 (各 5 分) し、再水和させた。Dako target retrieval (Dako) に浸漬した組織スライドを電子レンジで沸騰直前まで加熱、徐冷することで抗原賦活した。PBS に 5 分間浸漬後、200 倍希釈した抗 PCNA 抗体を組織切片にのせ、湿潤箱内で 4°C、一晩反応させた。PBS で 5 分 3 回洗浄し、ビオチン標識抗マウス/ラビット抗体 (biotinylated link, LSAB2, Dako) を組織スライドに数滴添加、室温で 1 時間反応させた。PBS で 5 分 3 回洗浄し、Streptavidin-HRP (LSAB2, Dako) を組織スライドに数滴添加、室温で 1 時間

反応させた。PBS で 5 分 3 回洗浄し、過酸化水素を添加した DAB (3,3' - ジアミノベンジジン四塩酸塩 ; メルク) 溶液に浸漬し、染色した。対比染色のためヘマトキシリンで 10 秒程度核染色した。そして、3 分間ずつ 70、90、100、100 %EtOH で脱水処理し、さらにキシレンで 3 回透徹処理したスライドをエンテランニューで封入し、光学顕微鏡 (オリンパス) で観察した。HE 染色で軽度異型腺腫、中等度異型腺腫、腺癌に分類された組織の連続切片を PCNA で染色した。褐色に染色された核を PCNA 陽性細胞とし、濃紺色に染色された核を PCNA 陰性細胞とした。腺腫については、それぞれ 5 症例程度の組織を評価し、腺癌については、肉眼所見で確認された各群 3 症例の高分化型管状腺癌を評価した。病変組織における PCNA 陽性率は、(陽性細胞 / 陽性細胞 + 陰性細胞) × 100 で計数し、算出した。計数には目視確認および Image J ソフトウェア (NIH) を用いた。

第六項 統計処理

動物実験で得られた全ての数値は平均値 ± 標準誤差で示した。有意差検定には unpaired two-tailed Student's t-tests を使用した。P 値が 0.05 未満のとき有意差ありと判定した。

第三節 結果

第一項 DMHによる発癌処理の妥当性検証

本研究は、腫瘍発育過程における AGE の抗腫瘍効果について研究するものであり、AGE 摂餌開始時点で DMH による発癌誘導が確実に起こっていることが重要である。そこで本検討では AGE 摂餌開始時に DMH による発癌誘導が起こっているかどうかを検証した。検証の方法として、8 週間の DMH 処理を終えたラット (Group 3) を解剖し、大腸表面に発生した異常腺窩巢(aberrant crypt foci: ACF)数を計測した。

ACFは大腸腫瘍発生の初期段階に観察される過形成病変である。全ての ACF が腫瘍化に関連するわけではないが、4 個を超える腺管が集合した ACF は発癌評価に有効なバイオマーカーであると言われているため、現在でも広く用いられるバイオマーカーである (66)。

Table 2-1 に Group 3 ラットの DMH 処理終了時 ACF 数の結果を示す。8 週間の DMH 処理を施した全てのラットで ACF の発生を確認し、ACF 数は 114.2 ± 20 個/rat であった。また、将来的な癌化に関与する可能性が高い 4 個を超える腺管が集合した ACF も 2.0 ± 1.0 個/rat 発生していた。一方、DMH 処理を施さなかったラット (Group 4) は 31 週時点でも ACF の発生は確認されなかった。つまり、本実験で用いた DMH 発癌プロトコールはラットに対して確実に発癌誘導を起こすことが確認され、9 週目以降に AGE 摂餌を開始した Group 2 は、発癌誘導後が起こっているラットについて抗腫瘍効果が検証できる系であることが確認できた。

Table 2-1. Total number and multiplicity of ACF in the colon tissue.

Group	Treatment	n	Weeks	Incidence (%)	Total ACF ^b	ACF with more than 4 AC
3	DMH	5	8	100	114.2±20.8	2.0±1.0
4	Non DMH	1	31	0	0.0±0.0	0.0±0.0

N: number of rats per group, weeks: experimental duration.

^b, number of ACF per rat, means ± S.E.

第二項 体重、摂餌量、飲水量推移

動物の体重、摂餌量、飲水量は動物の健康状態を把握する上で重要な指標となる。Table 2-2 に解剖時の平均体重、平均摂餌量、平均飲水量をまとめた。そして、Figure 2-2 に実験期間中の体重推移 (A)、摂餌量推移 (B)、飲水量推移 (C) を示した。

その結果、AGE を摂餌させた Group 2 群はコントロール群 (Group 1) と比較して体重に大きな違いはなかった。そして全実験期間を通して摂餌量、飲水量に大きな違いはなかった。

Table 2-2 平均体重、平均摂餌量、平均飲水量

Group	Treatment	n	Body weight at 31 week (g)	Food intake (g/day/rat)	Drink water (ml/day/rat)
1	DMH	10	401.0±8.6	14.6±0.1	20.0±0.4
2	DMH→AGE ^a	10	381.0±7.4	14.5±0.1	20.6±0.4

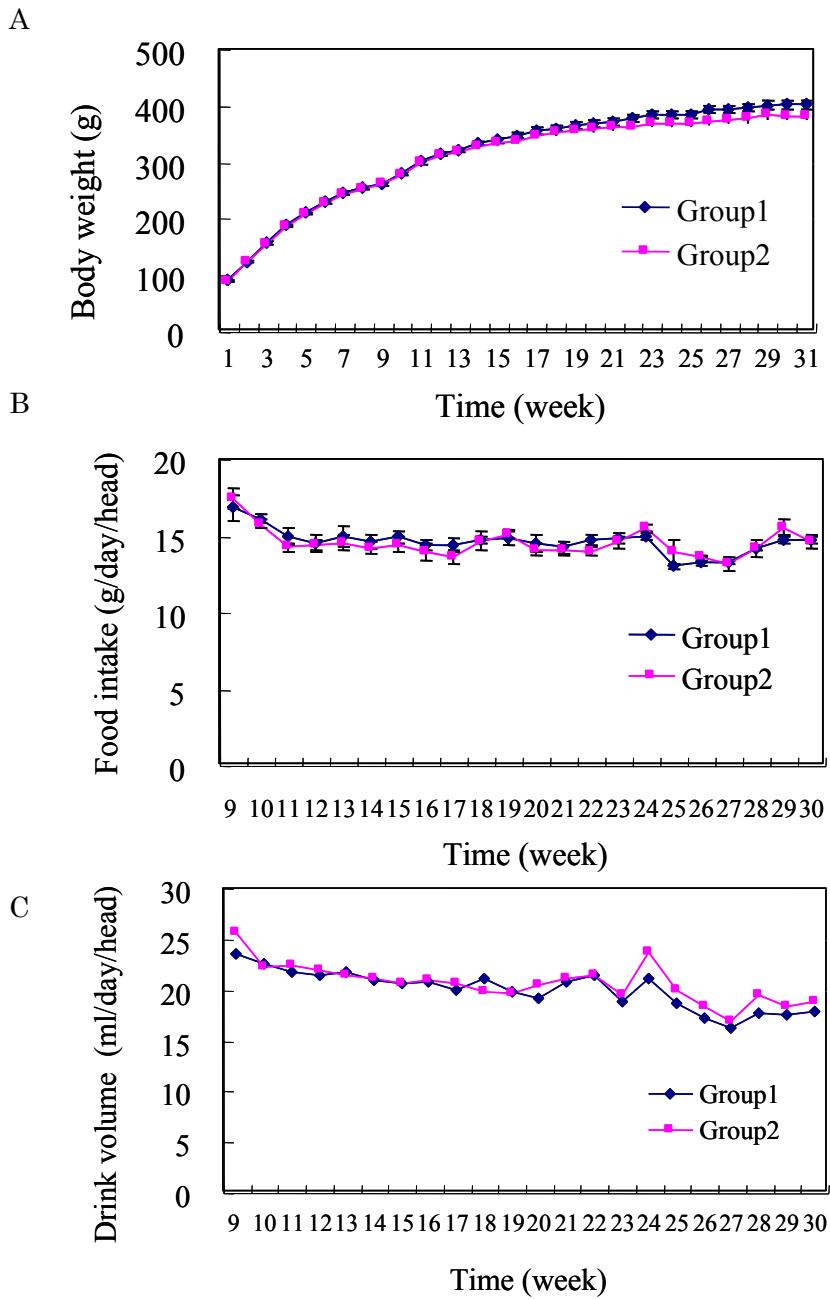


Figure 2-2. 体重(A)、摂餌量 (B)、飲水量推移(C)

第三項 臓器重量

解剖時に Group 1 と Group 2 の全ラットの心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、睾丸、精巣上体脂肪組織の重量を計測した (Table 2-3)。AGE 摂餌群とコントロール群で臓器重量に違いはなかった。

Table 2-3 解剖時臓器重量

Group	n	Organ weight (g)							
		Heart	Lung	Liver	Spleen	Pancreas	Kidney	Testicle	Epididymal adipose tissue
1	10	1.04±0.01	1.56±0.05	7.87±0.21	0.72±0.01	0.75±0.05	1.01±0.03	1.64±0.02	11.6±0.51
2	10	1.03±0.02	1.55±0.04	7.62±0.22	0.71±0.03	0.77±0.07	1.00±0.02	1.64±0.03	10.0±0.56

第四項 肉眼的所見結果（大きさ、部位、腫瘍数）

DMH によるラット大腸化学発癌モデルは、ヒトの散発性結腸癌と類似した段階的な形態変化や組織学的特徴を示すため、広く用いられている(66)。そして、大腸粘膜表面に発生した腫瘍を観察することは抗腫瘍効果を検証するものとも信頼性の高い方法であるといわれている。

DMH で誘発される腫瘍の形態は、大腸癌の取扱い規約により、隆起型 (I)、表面型 (II) に分類することができる(64)。そして、隆起型 (I) はさらに、有茎性 : Ip (明らかな茎を持つ)、亜有茎性 : Isp (茎がはっきりしない)、無茎性 : Is (茎がない) に分類される。また、隆起がはっきりしない腫瘍を表面型 (II) と呼び、表面隆起型 : IIa (表面が僅かにもりあがった)、表面平坦型 : IIb (表面が平たく、表面の色が変化)、表面陥凹型 : IIc (表面がわずかに陥凹) に分類される。

一般的には隆起型は良性腺腫から癌に進行する adenoma-carcinoma sequence をたどる腫瘍であり、表面型には、発生早期から粘膜下層へ浸潤する de novo 腫瘍がある (67, 68)。

本検討では、解剖時に摘出したラット大腸を縦軸方向に切開し、肉眼的に確認可能な腫瘍の発生頻度、個数、大きさ、さらに形態分類と発生部位を観察した。Table 2-4 に腫瘍の発生頻度、発生数、腫瘍の大きさをまとめた。Figure2-3 に肛門側 8.5cm に腫瘍径 8mm の亜有茎性腫瘍(Isp)を発生した代表的な大腸写真を示す。左が肛門側であり、右が上行結腸である。肉眼的腫瘍の発生総数は Group 1 (10 匹)、Group 2 (10 匹) 共に 3 個であり、複数の腫瘍が発生したラットはなかった。そして肉眼所見にて確認された全ての腫瘍は隆起型の亜有茎性腫瘍であり、いずれも結腸屈曲部、遠位結腸に発生していた。AGE 摂餌群

ではコントロール群と比較して肉眼的腫瘍数に違いは無かったが、統計的有意差はないものの、肉眼的腫瘍の平均腫瘍径が減少した (5.0 ± 1.5 vs 7.3 ± 1.4 mm)。

Table 2-4. Incidence, multiplicity and size of gross colon tumors.

Group	Treatment	N	Weeks	Gross lesions		
				Adenocarcinoma		Tumor diameter (mm)
				Incidence (%)	Multiplicity ^a	
1	DMH	10	31	30	0.3±0.2	7.3±1.4
2	DMH→AGE	10	31	30	0.3±0.2	5.0±1.5
3	DMH	5	8	0	0	0

N, number of rats per group

^a number of tumors per rat; means ± S.E.



Figure 2-3. Macroscopic feature of DMH-treated rat colon. Gross feature indicated with an arrow is diagnosed as semi-pedunculated, Isp. The tumor histologically shows adenocarcinoma.

第五項 ACF の測定結果

異常腺窩巢 (Aberrant crypt foci : ACF) は、大腸粘膜表面をメチレンブルーで濃染することで観察される大腸癌進展の最初段階の病変であり、1987年に Bird がアゾキシメタン処理したマウス大腸で観察した(69)。Bird は ACF の定義として、肉眼的には正常に見えるが、メチレンブルーに濃染する腺管の集まりで、正常腺管より大きい腺管から成る、としている。その後、ACF は発癌処理を施したげっ歯類 (66, 69) だけでなく、家族性大腸癌の高リスク群のヒト (70, 71)でも確認されるようになり、大腸癌の前癌性病変として位置づけられるようになった。しかしながら、最近の研究では、 β カテニンタンパク質が核や細胞質に蓄積した ACF の腺管(β -catenin accumulated crypts: BCAC)が、癌化と関連すると言われている (72, 73)。また、ACF の一部は APC や KRAS 遺伝子の変異を伴う機能喪失を伴った微小腺腫などの上皮内腫瘍を示し(74, 75)、ラットでは 4 個を超える異常腺窩 (Aberrant crypts: AC) が集合して形成した ACF は、発癌評価に有効なバイオマーカーであると言われているため (66)、現在でも広く用いられるバイオマーカーである。

Figure2-4 に大腸粘膜表面をメチレンブルーで染色した代表的な ACF 像を示す。大腸の正常部分では規則正しい腺窩構造が確認されるが、過形成や異形成病変は肥大化した複数の腺管が融合し、濃染される。

本検討では、AGE による腫瘍の発育抑制効果について検証するため、ACF 数について評価した(Table 2-5)。そして、それぞれのラットで発生した ACF 数及び集合した腺窩数を Table 2-6 にまとめた。DMH 処理群 (Group 1) では全てのラットで ACF が発生しており、その発生個数は 245.6 ± 29.3 個/rat であった。また、DMH 処理後に AGE を摂餌した群 (Group 2) においても全てのラ

ットで ACF が発生しており、その発生数は 178.4 ± 25.7 個/rat と Group 1 と比較して減少していた。さらに腫瘍化に関連性がある 4 つを超える腺管が融合した ACF については AGE 群 (24.8 ± 4 個/rat) はコントロール群 (50.6 ± 10 個/rat) に比べて有意に減少していた。

A

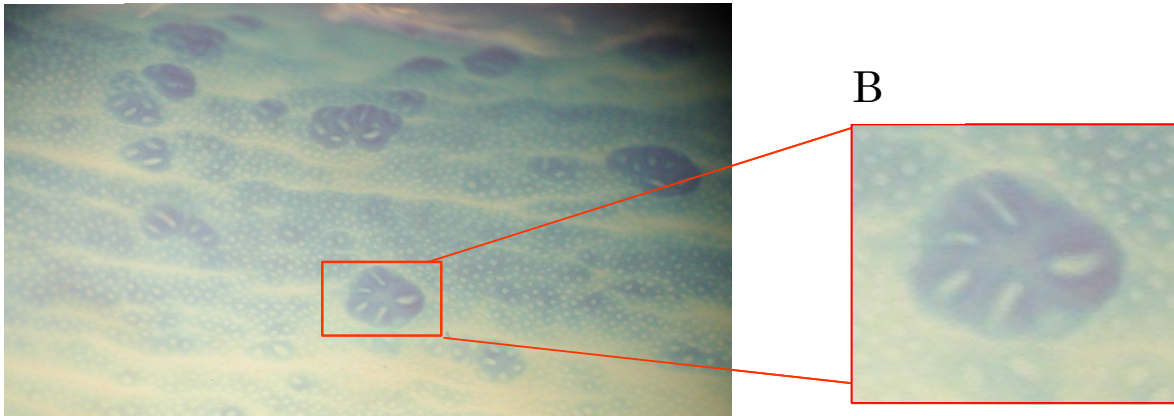


Figure 2-4. Microscopic feature of multiple ACFs of the DMH-induced colon (A). Colon tissue was fixed with formalin and stained with 0.5% methylene blue; aberrant crypt foci (ACF) composed of 5 aberrant crypts (B). Original magnification, $\times 10$.

Table 2-5. Total number and multiplicity of ACF in the colon tissue.

Group	Treatment	N	Weeks	Incidence (%)	Total ACF ^b	ACF with more than 4 AC ^c
1	DMH	10	31	100	245.6 \pm 29.3	50.6 \pm 10.5
2	DMH \rightarrow AGE	10	31	100	178.4 \pm 25.7	24.8 \pm 4.4*

N, number of rats per group; weeks, experimental duration.

^bnumber of ACF per rat; means \pm S.E.

^c number of Aberrant crypts (AC)

* $P < 0.05$ vs. group 1

Table 2-6. Number of ACF with aberrant crypts in each rat.

Rat ID	Number of aberrant crypts in ACF											total ACF
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	>=12	
Group 1-1	67	73	43	29	15	4	2	2	0	0	0	235
Group 1-2	43	51	46	21	12	6	7	3	1	0	1	191
Group 1-3	95	92	50	27	7	8	3	0	0	0	0	282
Group 1-4	64	73	43	15	7	4	0	0	1	0	1	208
Group 1-5	82	61	37	12	1	1	1	0	0	0	0	195
Group 1-6	76	102	78	36	29	10	5	5	2	1	0	344
Group 1-7	28	25	20	2	3	2	0	0	0	0	0	80
Group 1-8	78	61	40	17	10	2	2	0	1	0	0	211
Group 1-9	69	88	66	27	24	10	5	4	1	2	0	296
Group 1-10	94	128	77	46	39	14	10	3	1	1	1	414
Group 2-1	51	52	39	19	4	1	2	0	0	0	0	168
Group 2-2	13	10	6	0	0	0	0	0	0	0	0	29
Group 2-3	84	76	51	21	12	2	1	0	0	0	0	247
Group 2-4	86	64	45	16	9	2	0	2	0	0	0	224
Group 2-5	55	74	44	17	9	3	3	1	0	0	0	206
Group 2-6	89	103	72	22	10	6	3	0	1	1	0	307
Group 2-7	33	25	10	2	1	0	0	0	0	0	0	71
Group 2-8	50	50	27	10	3	3	0	0	0	0	0	143
Group 2-9	55	69	48	14	9	5	1	0	0	0	0	201
Group 2-10	51	69	35	17	9	5	2	0	0	0	0	188
Group 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

第六項 病理組織学的結果

一般的に腫瘍は初期病変の ACF から腺腫 (Adenoma) に進行し最終的に腺癌 (Adenocarcinoma) に進展する Adenoma-Adenocarcinoma 多段階発癌モデルが提唱されている(2)。

本検討では HE 染色した大腸組織切片を用いて腫瘍を病理組織学的に腺腫と腺癌に分類し、それぞれの異型度・分化度・深達度を観察することで AGE の抗腫瘍効果について検証した。

腺腫は良性の腫瘍であり、その異型度の違いにより、軽度異型腺腫 (mild atypia)、中等度異型腺腫 (moderate atypia)、高度異型腺腫 (severe atypia) に分類される(64)。Figure2-5 に代表的な組織像を示す。軽度異型腺腫 (Figure2-5 A)は、正常な腺管構造よりも核の密在性が高まっているが、大小不同は無く、核は腺管基底側に位置し、軽度の核異型を示す、粘液分泌細胞が正常密度で分布する病変である。中等度異型腺腫(Figure2-5 B)は、核が胞体の半分程度まで細長く変形し、大小不同が見られ重畳化した病変である。高度異型腺腫(Figure2-5 C)は、細長く変形した核が大小不同に重畳し、核/細胞質比率も高まり、胞体の表面にまで伸びているため癌と近似性が強いが、核の極性は保存されているため、腺腫の範囲内とみなすことができる病変である。

Table 2-7 および Figure 2-6 B に示すように、Group 1 では全てのラットで腺腫の発生を確認し、1 匹あたりの腺腫数は 32.4 ± 5.0 個であった。一方、Group 2 では腺腫発生率は 90 %、1 匹あたりの腺腫数は 12.5 ± 2.7 個であり、AGE 摂餌群で腺腫数が有意に低下した (Figure2-6A)。また、腺腫の発生部位評価のため、

盲腸を除いた結腸を盲腸側から肛門側に向かい3つの部位(近位結腸: proximal, 結腸屈曲部: flexure, 遠位結腸: distal)に分け、各部位での腺腫数について検証を行った(Figure 2-7, Table 2-8)。近位結腸には腺腫の発生はほとんど観察されず、結腸屈曲部、遠位結腸での腺腫発生数は、AGE群で有意に抑制されていた。さらに、Group 1とGroup 2の各ラットで軽度、中等度、高度異型腺腫が分布する割合は、軽度; 62.0 ± 4.1 vs 76.6 ± 6.4 (%), 中等度; 32.4 ± 3.5 vs 30.8 ± 5.7 (%), 高度; 5.6 ± 1.4 vs 1.6 ± 1.1 (%)となり、高度異型腺腫の存在比が、AGE摂餌群で有意に低下する結果が得られた(Figure 2-6 B, Table 2-7)。

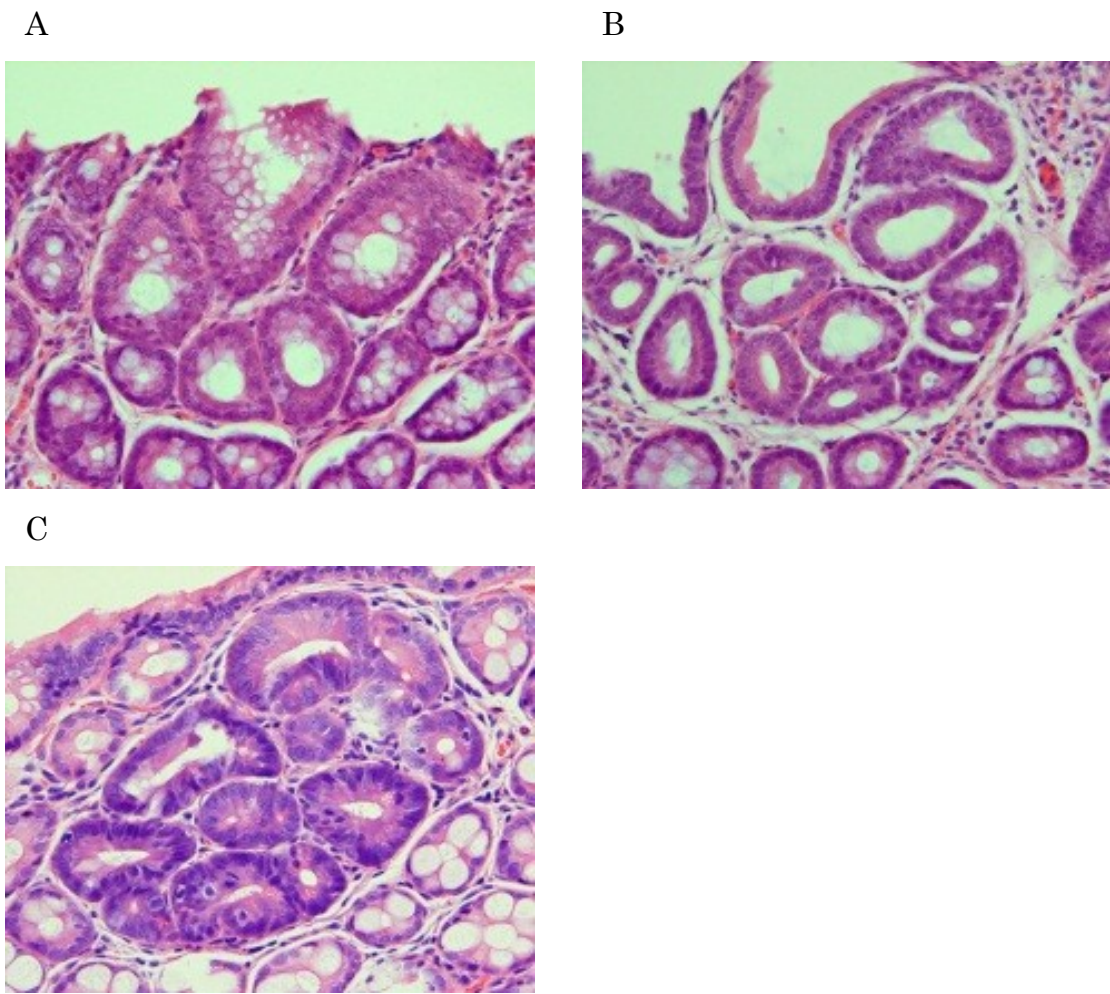


Figure 2-5. Histological features of DMH-treated rat colon. (A) Histology of adenoma with mild atypia. HE, $\times 200$. (B) Histology of adenoma with moderate atypia. HE, $\times 200$. (C) Histology of adenoma with severe atypia. HE, $\times 200$.

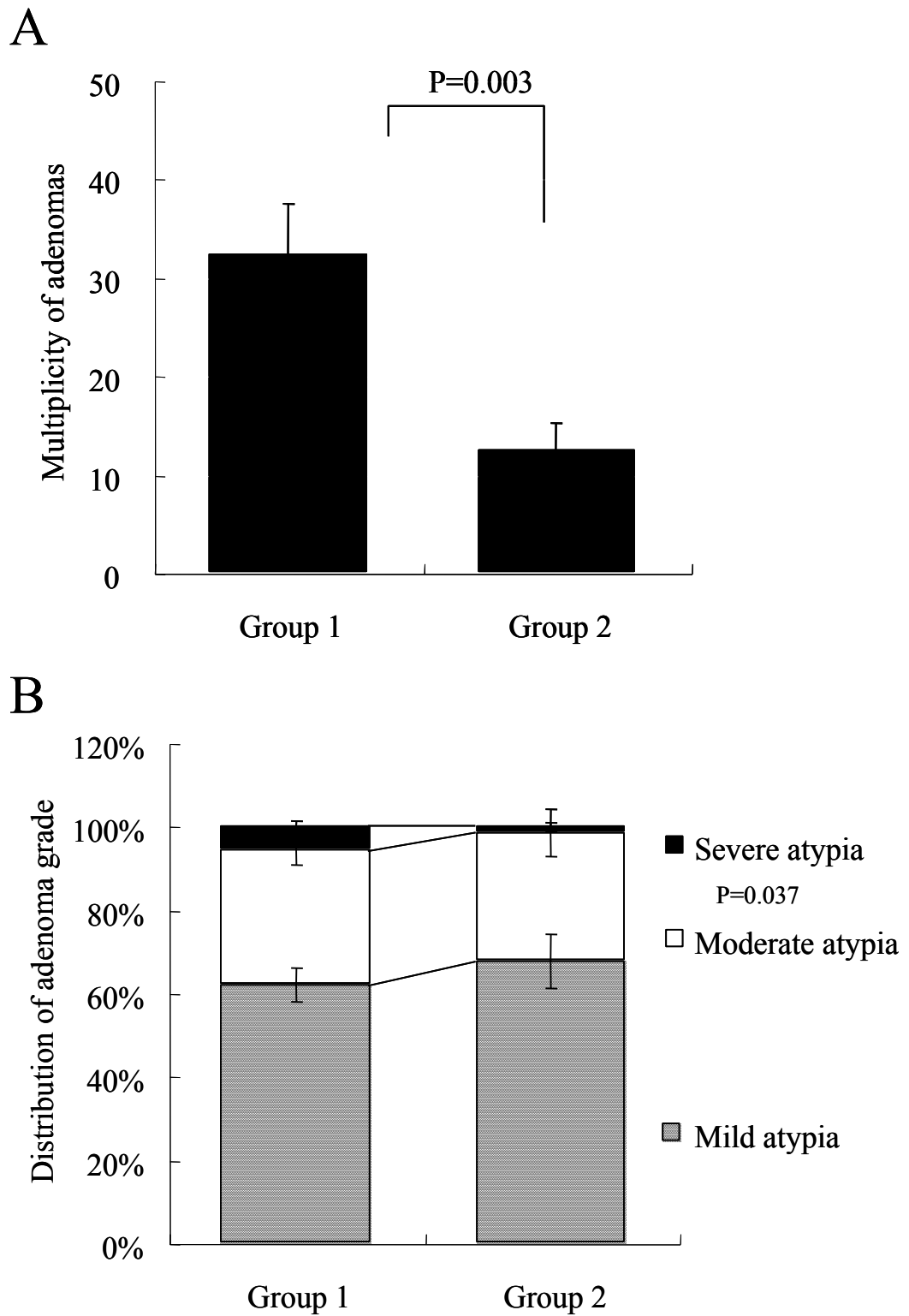


Figure 2-6. Multiplicity and distribution of microscopic colon adenomas. Multiplicity of DMH-induced colon adenoma (A). The percentage of adenomas with mild, moderate or severe atypia (B). *P* corresponding value of group 1.

Table 2-7. Incidence, multiplicity and distribution of microscopic colon adenomas.

Group	n	Incidence (%)	Multiplicity	Distribution of adenomas (%)		
				Mild atypia	Moderate atypia	Severe atypia
1	10	100	32.4±5.0	62.0±4.1	32.4±3.5	5.6±1.4
2	10	90	12.5±2.7**	76.6±6.4	30.8±5.7	1.6±1.1*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. group 1

+

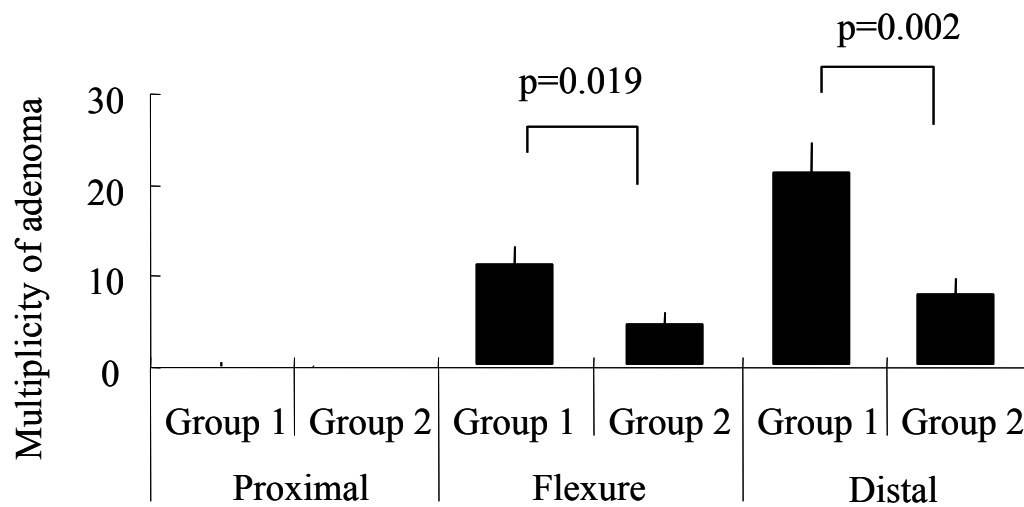


Figure 2-7. Localization of colonic adenoma. The colons were sectioned into three parts, proximal, flexure and distal colon. Number of adenomas on each sections were counted. P corresponding value of group 1.

Table 2-8. 大腸腺腫発生数の部位別評価

Group	N	Multiplicity		
		Proximal	Flexure	Distal
1	10	0.20±0.20	11.10±2.14	21.20±3.24
2	10	0.00±0.00	4.70±1.30*	7.80±1.83**

N, number of rats

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. group1

腺癌は悪性の腫瘍であり、分化度の違いにより分類され、分化型腺癌は、高分化型管状腺癌(Well differentiated tubular adenocarcinoma; wel)と中分化型管状腺癌(Moderately differentiated tubular adenocarcinoma; mod)に分類される(64)。そして、未分化型腺癌は、低分化型管状腺癌(Poorly differentiated adenocarcinoma; por)、粘液癌(Mucinous carcinoma; muc)、印環細胞癌(Signet-ring cell carcinoma; sig)に分類される。

正常な大腸の上皮細胞は円柱型の円柱上皮細胞であるが、高分化型管状腺癌の特徴として、癌を形成する腺管が明瞭で大きく、正常な円柱上皮よりも丈が伸びた高円柱上皮性を示す。一方、低分化型管状腺癌は、腺管形成が不明瞭で管腔が小さいかほとんど認められず、癌細胞の多くが立方上皮性であるものである。そして、中分化型管状腺癌は、両者の中間型である。また、粘液癌は細胞外に多量の粘液を産出し、粘液の結節を形成する癌であり、印環細胞癌は細胞内に粘液が貯留し、癌細胞は印環状を呈するが腺管形成は認められない癌である (Figure 2-8)。

また、組織学的深達度は、早期癌と進行癌に分類され、早期癌として、腫瘍が粘膜内に留まっているものが **M**、粘膜下層に留まるものが **SM** に分類される。そして、進行癌として腫瘍が固有筋層内に留まるものを **MP**、筋層を超えるが漿膜表面には露出していないものを **SS**、漿膜を超えて腫瘍が露出しているものが **SE** に分類される(64)。

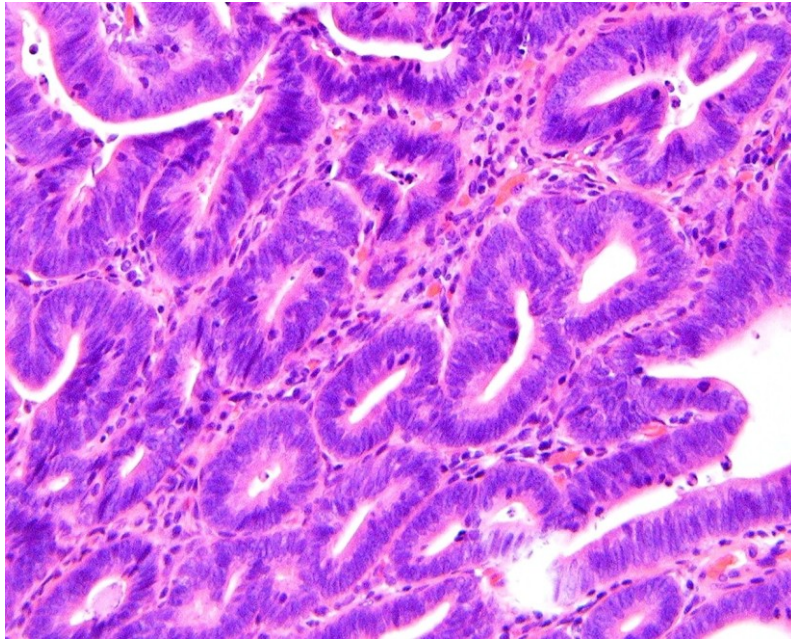
Table 2-9 に示すように、病理組織学的な検証の結果、腺癌の発生率は Group 1 が 70 %、Group 2 が 40 % と AGE 摂餌群で低下傾向にあった。また、腺癌の発生数は 1.3 ± 0.3 、 0.5 ± 0.2 個/ラット (有意差は $p=0.078$) であり、実質的な抑制効果を示した (Figure 2-9)。さらに、腺癌発生数について大腸の部位別に

評価するため、盲腸を除いた結腸について盲腸側から肛門側に向かい3つの部位（近位結腸：proximal, 結腸屈曲部：flexure, 遠位結腸：distal）に分け、各部位での腺癌数について検証を行った（Table 2-10、Figure 2-10）。その結果、近位結腸と結腸屈曲部では腺癌発生数に統計上の違いはなかったが、AGEは遠位結腸の腺癌発生数を有意($p=0.02$)に減少させたことを確認した。

また、Table 2-11 に示すように、Group 1 と Group 2 で高分化型環状腺癌の発生数は 0.8 ± 0.2 、 0.2 ± 0.1 個/ラット、中分化型環状腺癌の発生数は 0.3 ± 0.1 、 0.2 ± 0.1 個/ラットであり、AGE 摂餌群で分化型管状腺癌の発生数の減少傾向 ($p=0.085$) を確認した。低分化癌の発生数は 0.2 ± 0.1 、 0.1 ± 0.1 個/ラットと両者に違いは無かった。さらに、深達度に関する検討では、Group 1 では固有筋層内の進行癌が確認されたが、AGE 群では進行癌は確認されなかった。

そして Table 2-12 に示すように、悪性度の高い低分化癌は近位結腸にのみ発生しており、遠位結腸には高分化癌が発生していることが確認された。つまり、Table 2-10 の結果と合わせると、AGE は高分化型管状腺癌の発生を有意に抑制したことが確認できた。

A



B

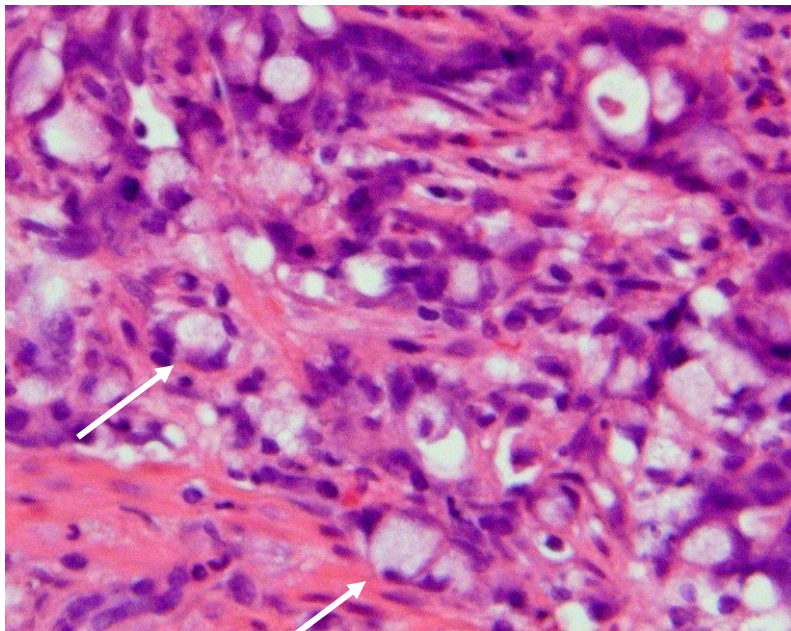


Figure 2-8. Histological features of DMH-treated rat colon. (A) Histology of well-differentiated tubular adenocarcinoma. HE, $\times 200$. (B) Histology of signet-ring cell carcinoma indicated with arrows. HE, $\times 400$.

Table 2-9. Incidence, multiplicity of microscopic colon adenocarcinomas.

Group	n	Incidence (%)	Multiplicity
1	10	70	1.3±0.3
2	10	40	0.5±0.2 ^c

n, number of rats per group

^c $P=0.078$

Table 2-10. 大腸腺癌発生数の部位別評価

Group	N	Multiplicity		
		Proximal	Middle	Distal
1	10	0.30±0.15	0.10±0.10	0.90±0.28
2	10	0.20±0.13	0.20±0.13	0.10±0.10*

N, number of rats

* $P<0.05$ vs. group1

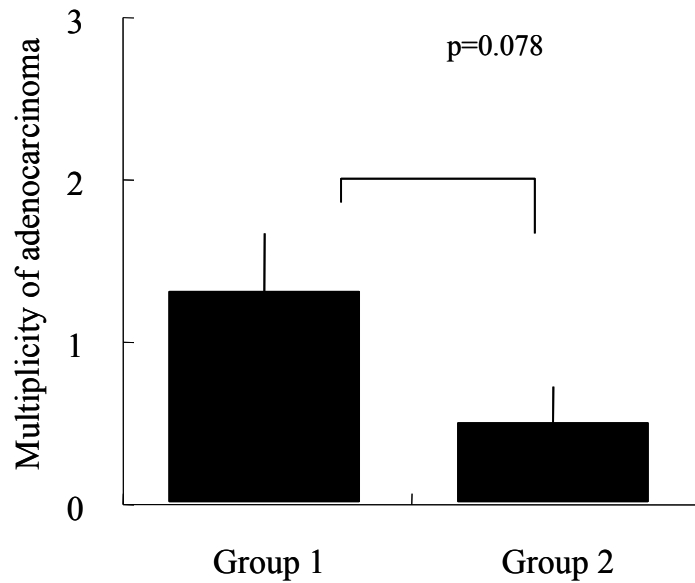


Figure 2-9. Multiplicity of DMH-induced microscopic colon adenocarcinomas.

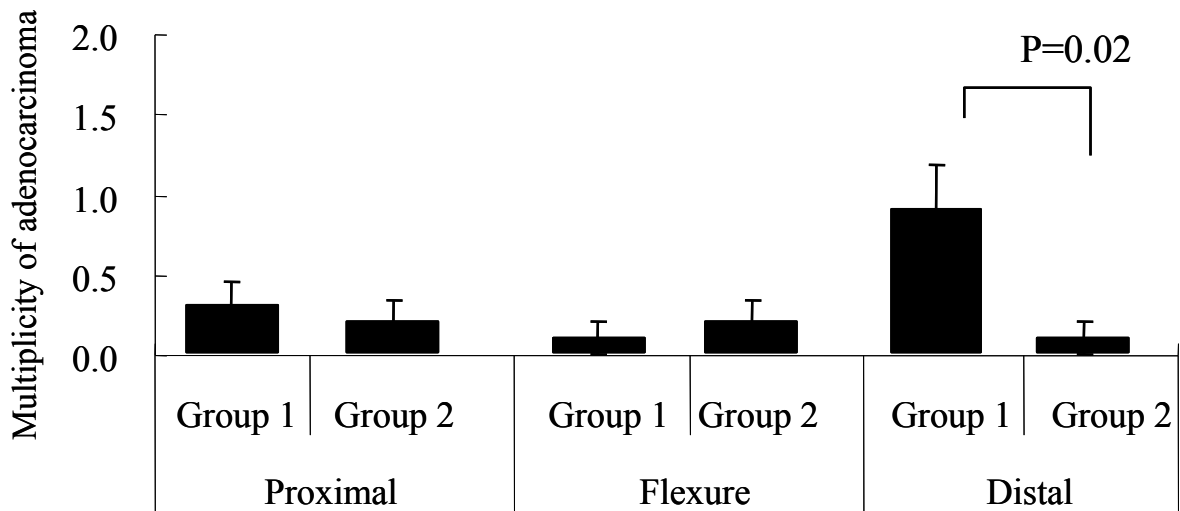


Figure 2-10. Localization of adenocarcinoma on colon. The colons were sectioned into three parts, proximal, flexure and distal colon. Number of adenocarcinomas of each sections were counted. P corresponding value of group 1.

Table 2-11. Pathological characteristics of microscopic colon adenocarcinomas.

Histology

Group	n	Differentiated type			Undifferentiated type				Total/ rat
		Wel	Mod	Total	Por	Muc	Sig	Total	
1	10	0.8±0.2	0.3±0.1	1.1±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.1	0.2±0.1	1.3±0.3
2	10	0.2±0.1	0.2±0.1	0.4±0.2 ^a	0.1±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.1 ^b	0.5±0.2 ^c

n, number of rats per group

Wel, well differentiated tubular adenocarcinoma: Mod, moderately differentiated tubular adenocarcinoma: Por, poorly differentiated adenocarcinoma: Muc, mucinous adenocarcinoma: Sig, signet-ring cell carcinoma

^a $P=0.085$, ^b $P=0.556$, ^c $P=0.078$

Depth of invasion

Group	n	Early colorectal cancer			Advanced colorectal carcinomas				Total/ rat
		m	sm	Total	mp	ss	se	Total	
1	10	0.9±0.3	0.3±0.1	1.2±0.3	0.1±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.1	1.3±0.3
2	10	0.2±0.1	0.3±0.1	0.5±0.2 ^d	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.5±0.2 ^c

m, mucosa; sm, submucosa; mp, muscularis propria; ss, subserosa; se, serosa

^d $P=0.093$

Table 2-12 Onset site-specific histological evaluation.

Group	Location	Differentiated type		Undifferentiated type			Total/ rat
		Wel	Mod	Por	Muc	Sig	
1	Proximal	0.10±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.20±0.13	0.30±0.15
	Flexure	0.00±0.00	0.10±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.10±0.10
	Distal	0.70±0.26	0.20±0.13	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.90±0.27
2	Proximal	0.10±0.10	0.00±0.00	0.10±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.20±0.13
	Flexure	0.10±0.10	0.10±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.20±0.13
	Distal	0.00±0.00	0.10±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.10±0.10

Wel, well differentiated tubular adenocarcinoma: Mod, moderately differentiated tubular adenocarcinoma: Por, poorly differentiated adenocarcinoma: Muc, mucinous adenocarcinoma: Sig, signet-ring cell carcinoma

第七項 PCNA 免疫染色による評価

これまでの検討において、AGE は DMH による大腸発癌処理を施したラットに対して ACF や腺腫、腺癌の発生数を低下させることが確認できており、これは AGE に腫瘍の発育・進行を抑制する効果があることを示す結果である。

腫瘍組織は細胞増殖が活性化している細胞集団であり、細胞増殖に関与する proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は、様々な腫瘍組織において発現亢進が確認されている (76, 77)。PCNA とは DNA 複製時に中心的な働きを持つ 3.3 万 kDa のタンパク質であり、3 量体を形成して DNA を取り囲むように結合し、DNA ポリメラーゼ δ によるリーディング鎖の合成を補佐する働きをもつ。その発現は細胞周期の S 期で最大となるが、G1 期、G2 期においても発現することが確認され(78)、大腸の正常組織から腺腫組織、腺癌組織へ移行するに従い、陽性率も高くなることが知られているため、腫瘍の増殖能マーカーとして用いられているタンパク質である(76, 77, 79)。

本検討では、AGE が DMH 誘導性の大腸腫瘍組織の増殖活性に影響を与えているかどうかを検証するために、腫瘍細胞の PCNA 発現量を免疫組織化学的手法で検出した。そして、PCNA 陽性細胞数の割合から大腸組織における細胞増殖を評価することとした。

はじめに、DMH 未処置および処置したラットの大腸正常腺管組織における PCNA 陽性率を評価した (Figure 2-11)。正常腺管組織における PCNA 陽性率は Group 4(DMH 未処理: Figure 2-11 A)、Group 1 (DMH 処理: Figure 2-11 B)、Group 2(DMH 処理後に AGE 摂餌: Figure 2-11 C) でそれぞれ $42 \pm 2\%$ 、 $46 \pm 4\%$ 、 $42 \pm 3\%$ であり、群間で正常組織での PCNA 陽性率に違いはなかった(Figure

2-11 D)。

続いて、大腸の腺腫組織における PCNA 陽性率を評価した。4 μm に薄切した大腸組織の連続切片を調製し、HE 染色にて腫瘍を組織学的に観察し、軽度異型腺腫(Figure 2-12 A,C)、中等度異型腺腫(Figure 2-13 A,C)と判断した標本について抗 PCNA 抗体で免疫染色を行った。

軽度異型腺腫組織の PCNA 陽性率は Group 1 (Figure 2-12 B)と Group 2 (Figure 2-12 D)で $65\pm 4\%$ と $59\pm 2\%$ であり、陽性率に統計学上の違いは無かった(Figure 2-12 E)。一方、中等度異型腺腫組織の PCNA 陽性率は、Group 1 (Figure 2-13 B)と Group 2 (Figure 2-13 D)で $69\pm 4\%$ と $53\pm 4\%$ であり、AGE は PCNA 活性を有意($P=0.009$)に低下させていた (Figure 2-13 E)。

さらに、高分化型管状腺癌と診断した肉眼的に観察可能な腫瘍組織について PCNA 陽性率を評価した結果、PCNA 陽性率は Group 1 (Figure 2-14 A)と Group 2 (Figure 2-14 B)で $47\pm 3\%$ と $34\pm 5\%$ であり、AGE 摂餌は有意差 $P=0.054$ で抑制傾向を示した(Figure 2-14 C)。

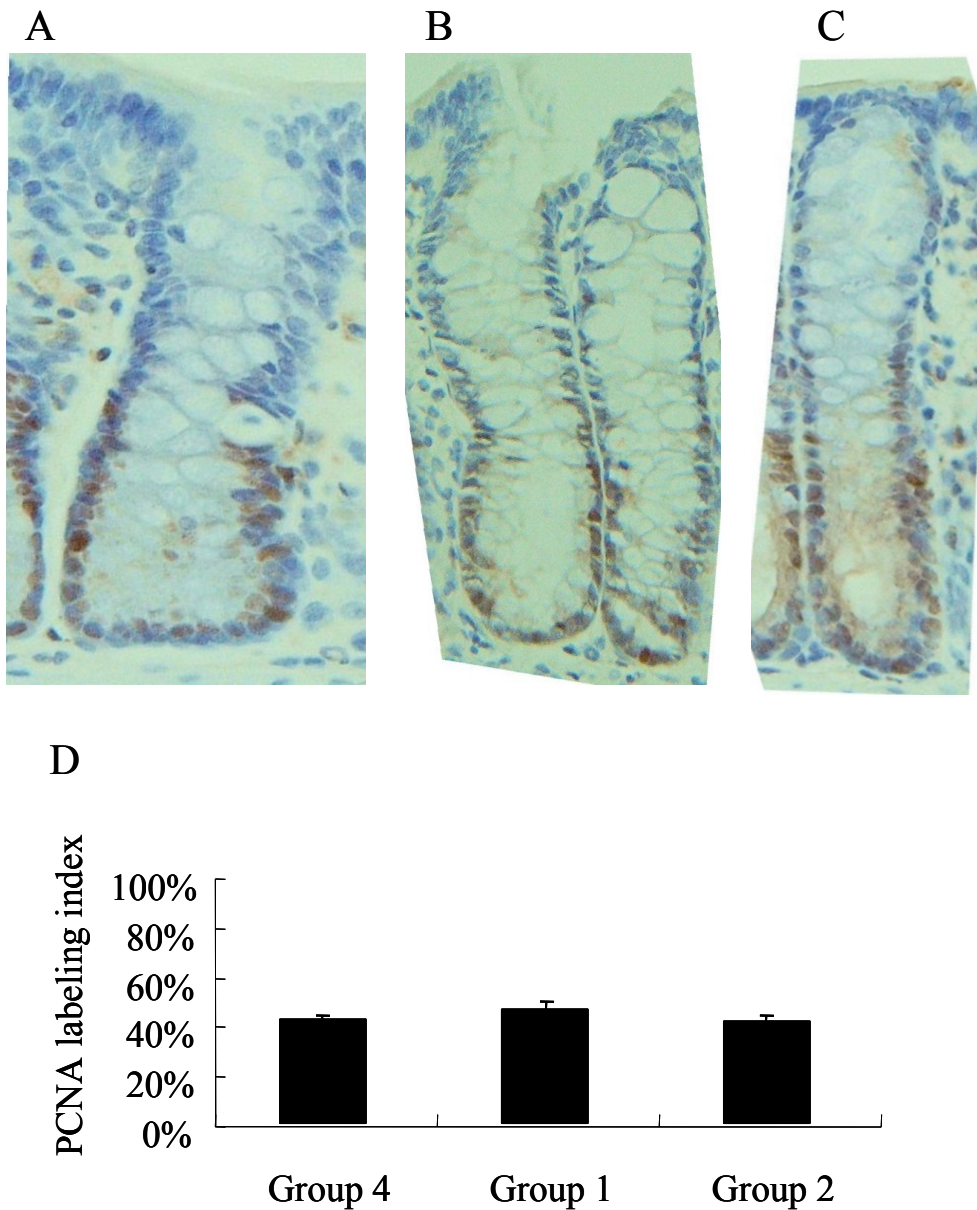


Figure 2-11. Photomicrographs depicting IHC staining of PCNA. Normal colorectal tissue of without DMH treatment; group 4 (A), with DMH treatment; group 1 (B) or with DMH treatment followed by AGE fed; group 2 (C) rats were stained by anti-PCNA antibody. Brown color indicates immunostaining of PCNA and light blue color indicates nuclear hematoxylin staining. Original magnification, $\times 200$. (D) PCNA positive cells were counted and results are expressed as number of positively-stained cells / total number of cells $\times 100$ in each group; more than 500 cells were counted for evaluation. Data are shown as means with standard error.

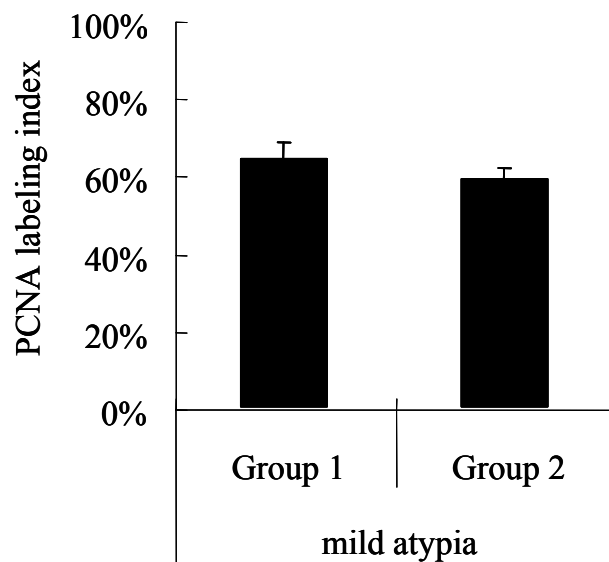
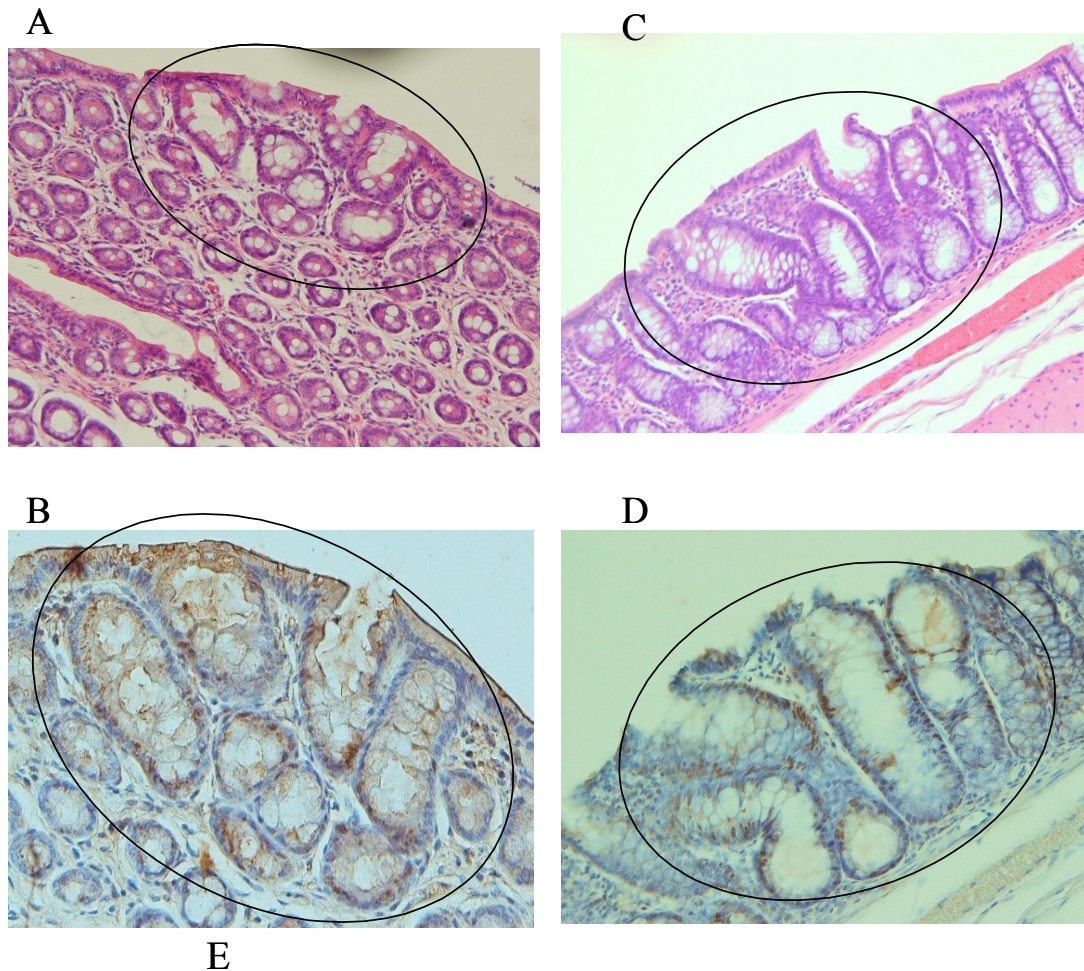


Figure 2-12. Photomicrographs depicting IHC staining of PCNA. Adenoma with mild atypia sections of colorectal tissue were subjected to IHC analysis using an anti-PCNA antibody. HE staining in group 1 (A) and group 2 (C), and PCNA staining in group 1 (B) and group 2 (D) were shown. Original magnification, $\times 200$. (E) PCNA positive cells were counted and results are expressed as number of positively-stained cells / total number of cells $\times 100$ in each group; more than 500 cells were counted for evaluation. Data are shown as means with standard error.

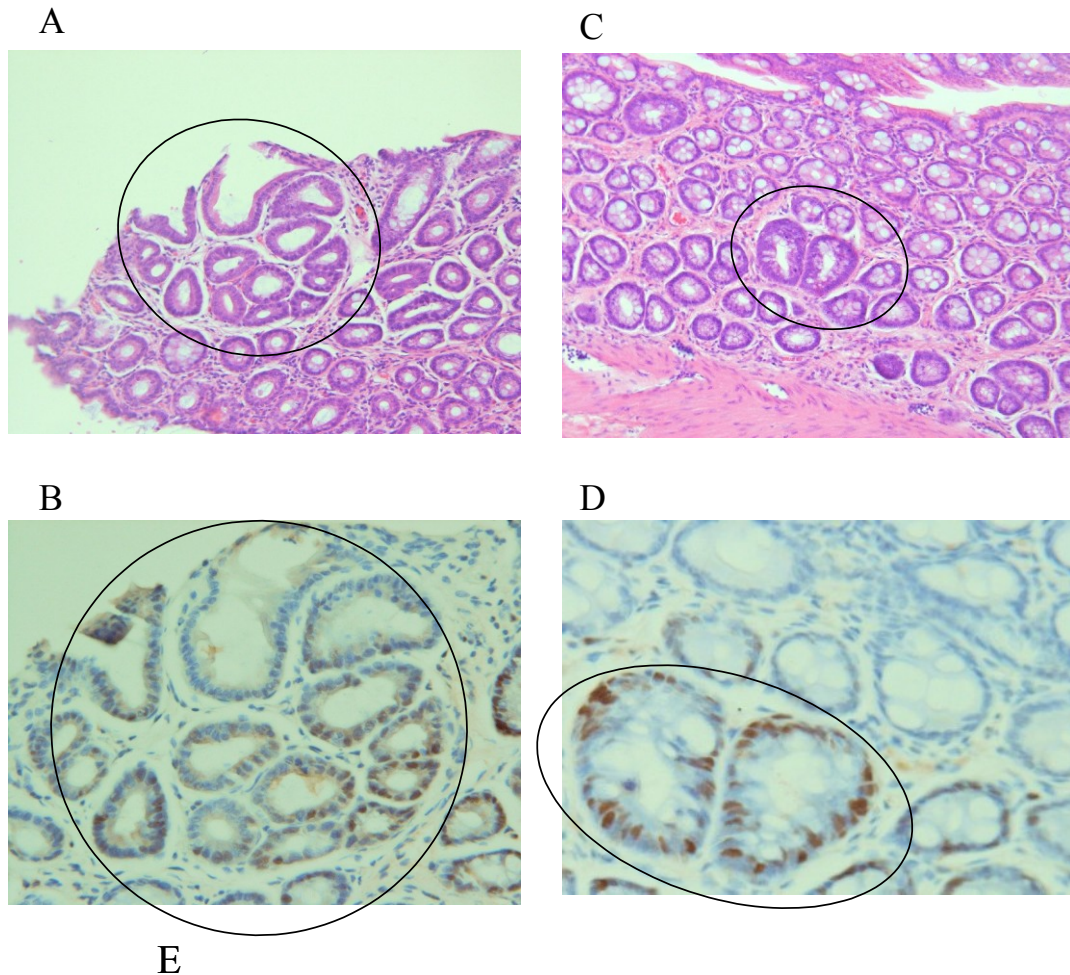


Figure 2-13. Photomicrographs depicting IHC staining of PCNA. Adenoma with moderate atypia sections of colorectal tissue were subjected to IHC analysis using an anti-PCNA antibody. HE staining in group 1 (A) and group 2 (C), and PCNA staining in group 1 (B) and group 2 (D) were shown. Original magnification, $\times 200$. (E) PCNA positive cells were counted and results are expressed as number of positively-stained cells / total number of cells $\times 100$ in each group; more than 500 cells were counted for evaluation. Data are shown as means with standard error. $**P < 0.01$ corresponding value of group 1.

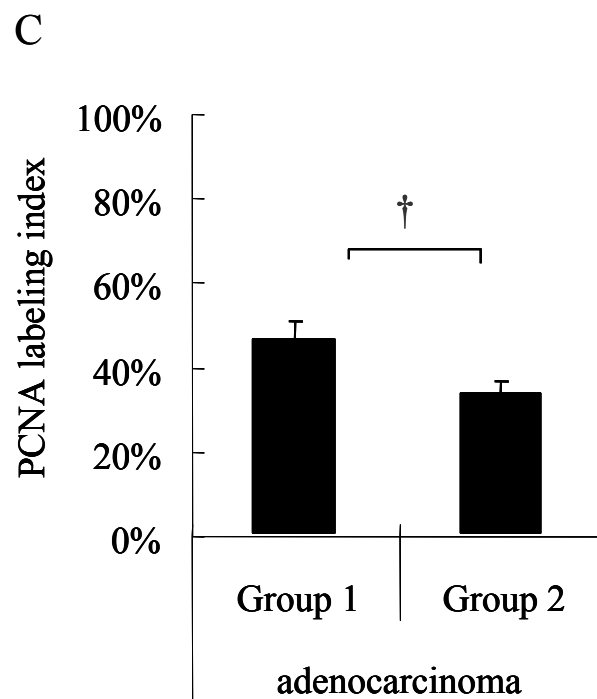
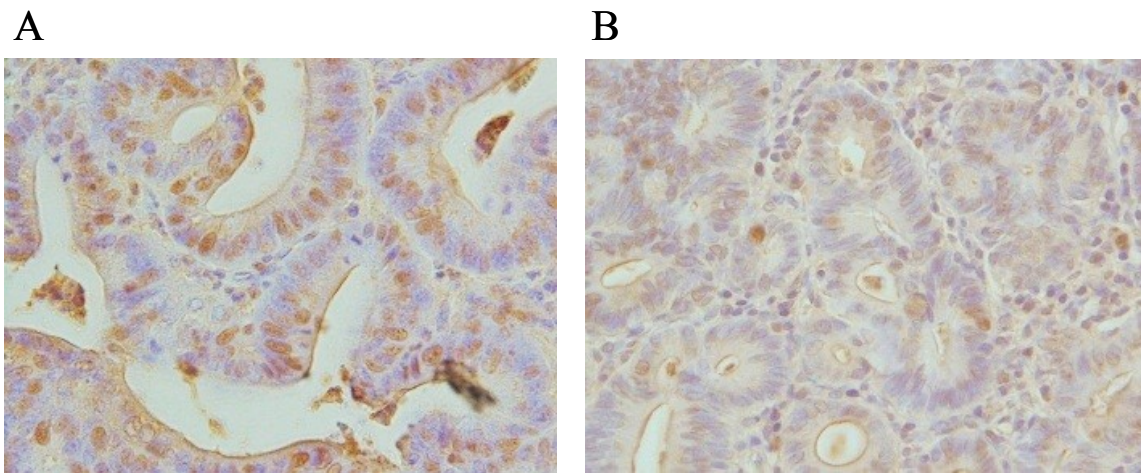


Figure 2-14. Photomicrographs depicting IHC staining of PCNA. Gross tumor-containing sections of colon were subjected to IHC analysis using an anti-PCNA antibody. PCNA staining in group1 (A) and group2 (B) were shown. Original magnification, $\times 400$. (C) PCNA positive cells were evaluated using ImageJ software and results are expressed as number of positively-stained cells / total number of cells $\times 100$ in each group; more than 5,000 cells were counted for evaluation. Data are shown as means with standard error. $\dagger P=0.054$ corresponding value of group 1.

第四節 小括

ニンニクおよびその成分について抗腫瘍効果を言及する報告は多数存在している。最近の研究ではモデル動物や培養細胞を用いた実験で、抗発癌効果とその分子的なメカニズムが示されており、直接的な作用として癌細胞の増殖抑制効果や、間接的な作用として抗酸化酵素の誘導や代謝酵素の調節による解毒の促進作用が報告されている。AGE についても大腸化学発癌モデルにおいて、抗酸化作用による発癌予防効果が示されている(46)。

今回の検討では、AGE による腫瘍発育段階における抑制効果を検証するため、AGE による発癌物質の解毒・排出効果の影響を排除した動物実験系で評価した。つまり、DMH 処理が完了し、異形成の ACF 病変を発症したラットに対して AGE の摂餌を開始させた。Table 2-1 (Group 3) に示したように、8 週間の DMH 処理を行った全てのラットで ACF の発生が確認され、一方、DMH 処理を行っていないラットでは ACF の発生が確認されなかったことから、本実験での DMH プロトコールによってラットは確実に発癌誘導が起こっていることが確認できた。発癌誘導を施したラットに 3%(w/w)AGE 含有飼料を 23 週間摂餌させたが、全実験期間を通じて体重、摂餌量、飲水量、臓器重量で AGE 群とコントロール群で違いはなかった。

AGE による腫瘍発育段階での抑制効果について、病理組織学的に観察された ACF や腺腫、腺癌の発生数は AGE 群で有意な減少効果を確認し、AGE による腫瘍発育の抑制効果を確認した (Table 2-5、Table 2-7、Table 2-9、Table 2-10)。

しかしその一方で、肉眼的に観察可能であった腫瘍の発生数に違いはなかった (Table 2-4)。このことは、これらの腫瘍については 2 ヶ月間の DMH 処理

期間の初期段階から腫瘍化し、AGE 摂餌開始時点で腫瘍化が進行していた可能性がある。Pretlow らは、4 つを超える腺管が集合した ACF は異型度が高く、腫瘍化病変と相関すると報告している(71)。本検討においても、8 週間の DMH 処理完了時点で 4 つ以上の腺窩が集合した ACF が確認されており、これらは遺伝子変異が進み、細胞増殖が亢進した病変である可能性がある。このように腫瘍化が進行した病変については、AGE で腫瘍の発育・進行を十分に抑制することができなかつたと推測する。ただ、これらの肉眼的な腫瘍の平均最大径は AGE 群で縮小しており、この点については AGE による抗腫瘍効果があったと推測する。

また、Table 2-12 に示したとおり、腺癌の発生部位は高分化型管状腺癌は遠位結腸に発生し、低分化癌は近位結腸に発生していたが、この傾向は、Park らの報告(68)と一致していた。そして、AGE は遠位結腸に発生した高分化型腺癌の発生数を有意($p=0.02$)に減少させたが、近位結腸に発生した低分化型腺癌は絶対数が少ないものの、その効果は弱かつた(Table 2-11)。このことは、AGE の抗腫瘍効果は、悪性度の高い低分化型腺癌に対しては低い可能性を示唆している。

発育中の腫瘍で共通して起こるイベントの一つは細胞の自律的な増殖能の亢進である(77)。細胞増殖マーカーである PCNA は腫瘍で発現量が増加し、そして腫瘍の進行度と PCNA の発現量は相関する(76, 77)。また、先行研究では、ニンニク由来の成分であるジアリルジスルフィド (DADS) による乳癌細胞の増殖抑制は PCNA 活性の減弱化と相関すること(80)、S-アリルシステイン (SAC) は口腔癌細胞のマウス xenograft モデルで移植腫瘍の PCNA 活性を抑制することが報告されている(81)。

腫瘍組織では、腫瘍の組織型において細胞増殖能が異なることが明らかであ

るため、異なる組織型の増殖能は比較に値しない。そこで本検討では、同一組織型に分類された腫瘍同士で PCNA の発現量を免疫染色法にて解析した。その結果、中等度異型腺腫と腺癌の組織において、AGE 群で PCNA の発現量が低下する結果であった。一方、軽度異型腺腫組織や正常腺管組織では PCNA 発現量に違いはなかった。つまり、AGE は異形度が増した腫瘍組織において細胞増殖活性を抑制したと考えることができる。

一方、AGE を用いた先行研究では、AGE 投与マウスで NK 細胞の増加が確認されており、AGE の NK 活性亢進による免疫賦活作用が報告されている(49, 50, 51)。NK 細胞はウイルスに感染した細胞や癌細胞など自己 MHC クラス I 分子の発現量が低下した正常ではない細胞を認識し、孔形成タンパク質のパーフォリンやセリンプロテアーゼであるグランザイムを放出することで標的細胞のアポトーシスを誘導する免疫細胞である。今回の検討結果である、AGE による DMH 誘発性腫瘍の細胞増殖活性抑制効果が、NK 活性化などによる免疫賦活作用に起因した可能性も考えられる。しかしながら、免疫賦活作用によって DMH 誘発大腸癌ラットの腺癌発生数の減少を報告した先行研究(82)では、腫瘍での細胞増殖マーカーはコントロールと同様に上昇したことを報告している。つまり、免疫賦活作用はアポトーシスの誘導などにより腫瘍形成を抑制するが、腫瘍の細胞増殖能には影響を与えないことを示している。

このことは、本研究では、AGE 摂取によって、免疫担当細胞が活性化されたことによる抗腫瘍効果の可能性を否定することはできないものの、PCNA 活性比較の検討から、中等度異型腺腫同士、高分化型管状腺癌同士といった、同一組織型の異形病変での比較検討において、AGE は細胞増殖活性を抑制することを示した。

つまり本章の検討において、AGE が腫瘍発育抑制効果を示すことを明らかと

し、その少なくとも一つの機序として、腫瘍病変の細胞増殖活性の抑制に起因することを明らかとした。

第三章 ヒト大腸癌細胞株 (DLD-1) を用いた AGE による増殖抑制作用

用メカニズム検証

第一節 はじめに

これまでの先行研究で、ニンニクおよびニンニクから単離された成分には、癌細胞株に対する増殖抑制効果が確認されており、その抑制メカニズムについても解明されつつある。例えば、Knowles らはニンニク成分であるジアリルジスルフィド (DADS) が、ヒト大腸癌細胞株 HCT-15 を G2/M 期で細胞停止させることを示し、その機序として Cyclin B1/ Cdk1 複合体の減少が関連する報告している (39)。一方で、AGE の大腸癌細胞に対する作用について、Matsuura らは AGE による大腸癌細胞株 HT29、SW480、SW620 細胞の増殖抑制効果を確認している (47)。しかしながら、AGE の癌細胞に対する作用機序についての報告は少なく、不明な点が多い。

第二章の動物実験において、AGE はラット大腸腫瘍の増殖能を抑制することが確認された。そこで、本第三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、AGE が大腸癌細胞の増殖活性に与える影響と、その機序を明らかにすることを目的とした。

はじめに AGE によるヒト大腸癌細胞株 (DLD-1) の増殖抑制効果について検討し、続いて DLD-1 細胞を用いた細胞周期解析と、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) を用いた AGE によるアポトーシスの誘導能について検討した。そして得られた知見を基に、AGE が細胞周期速度に与える影響と、その機序として細胞周期の調節に関係するタンパク質の発現量変化について検証した。

第二節 材料および方法

第一項 材料

Aged garlic extract (AGE)は固形成分 50 %(w/w)の液体として湧永製薬株式会社より供与された。DLD-1 ヒト大腸腺癌細胞株 (ATCC CCL-221)、MRC-5 ヒト正常繊維芽細胞 (ATCC CCL-171)、LoVo ヒト大腸腺癌細胞株 (ATCC CCL-229)、HCT-8 (ATCC CCL-244) は American Type Culture Collection (ATCC, USA)より購入した。RCN-9 ラット大腸癌細胞 (JCRB0167) は独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクから購入した。各細胞株は RPMI-1640 培地 (ナカライテスク、京都) に 10 %(v/v)の非働化牛胎児血清 (FBS; HyClone, USA) と 100 U/ml のペニシリン(Invitrogen, USA)、100 μ g/ml のストレプトマイシン (Invitrogen) を添加した通常培地を用い、100 % 湿度、5 %二酸化炭素、37 °C環境で培養した。

第二項 細胞増殖率の測定 (Sulforhodamine B assay)

AGE が細胞増殖へ与える影響はスルフォローダミン B アッセイ(83)で評価した。DLD-1 細胞または MRC-5 細胞を 4×10^3 cells/well で 96-well プレートに播種し、一晚 CO₂ インキュベータ内で培養し、0、1、5 もしくは 10 mg/ml になるように AGE を添加した 10 % FBS 含有 RPMI1640 培地に培地交換した (各ウェル 100 μ L)。1、2、3 もしくは 4 日間培養した細胞に冷 50 % (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA) を 25 μ L 添加し、4 °C で 1 時間インキュベートすることで細胞タンパク質をウェルに固定した。培地をアスピレータで除去後、200 μ L の milliQ 水で 3 回洗浄し、TCA や血清タンパク質を除去した。各ウェルに 1 % 酢酸で溶解した 0.4 %スルフォローダミン B (Sigma, USA) を 40 μ L 添加し、室温で 20 分間インキュベートした。上清を除去後、200 μ L の 1 %酢酸溶液で

5回洗浄し、続いて、100 μ L の 10 mM Tris を添加し 5 分間の振とうで細胞タンパク質に結合していたスルフォローダミン B を溶解させた。そして、スルフォローダミン B の吸収波長である Abs. 565 nm を測定した。各測定データは N=3 実験から取得した。

第三項 G1/S 期への細胞周期同調

AGE による細胞周期速度への影響はダブルチミジンブロック法による G1/S 期同調細胞を用いて評価した。ダブルチミジンブロック法とは、過剰チミジン存在下でリボヌクレオチドレダクターゼのフィードバック阻害によるデオキシリボースへの還元反応が停止することで、結果として DNA 複製が停止することを原理としている(84,85)。培養中の細胞に過剰チミジンを添加することで、S 期にあった細胞は S 期のまま停止し、それ以外の細胞周期にあった細胞は S 期の境界の G1 期に収束される。そして、過剰チミジンを除去した通常培地条件で 9 時間程度培養することで、S 期の直前および S 期にあった細胞を G2 期以降に進めた後、再び、過剰チミジン環境で DNA 合成を停止させることで、全ての細胞を S 期の直前に同調させることができる (Figure 3-1)。そして培地からチミジンを除去することで速やかに S 期への進行が開始する。このように操作が簡便なダブルチミジンブロック法は G1/S 期での細胞同調法として広く用いられている手法である。

DLD-1 細胞を 1×10^5 cells/well で 6-well プレートに播種し 70%コンフルエントになった時点で 2 mM チミジンを添加した通常培地 (10%FBS 含有 RPMI-1640) に培地交換し、16 時間培養した。この時点で細胞は S 期または S 期の境界の G1 期に収束している。過剰チミジンを除去するために、1 mL の

PBS(-)で細胞を3回洗浄し、温めた通常培地で9時間培養した。この培養中にほとんどの細胞はS期を通過する。そして再び2 mM チミジンを添加した通常培地で16時間培養し、ほとんどの細胞をS期の直前に同調させた。

G1/S期同調細胞をPBS(-)で3回洗浄し、0、10 mg/ml AGE を添加した通常培地に交換し、24時間まで経時的に細胞周期を観察した。

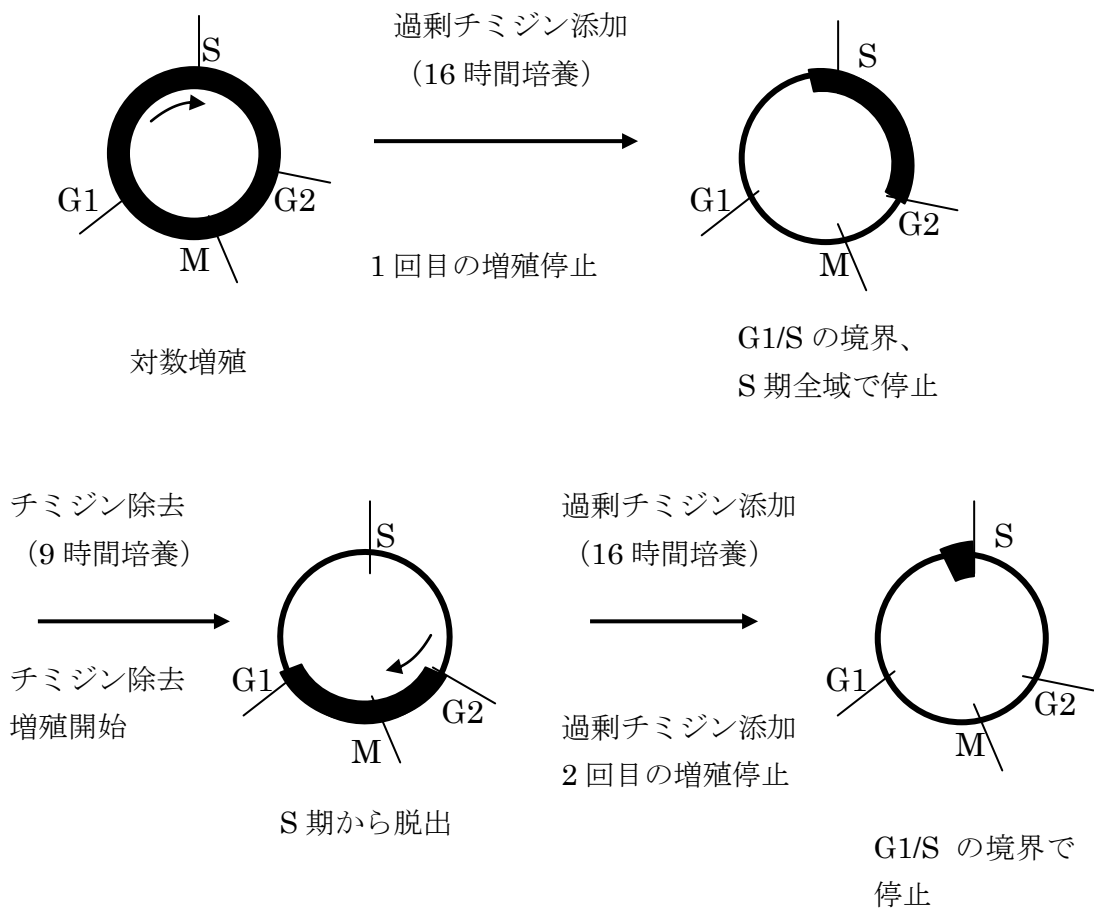


Figure 3-1. ダブルチミジンブロック原理

第四項 細胞周期解析

真核細胞の増殖は一連の細胞周期を規則正しく繰り返すことで成り立っている。これらは細胞増殖と染色体複製の準備期である G1 期から DNA 合成期の S 期を経て、細胞が分裂するための準備を行う G2 期、有糸分裂により娘細胞へ引き継ぐ M 期へと移行していく。それぞれの細胞がどの細胞周期に位置しているかは細胞内の DNA 量をヨウ化プロピジウム (P.I.) などの核染色蛍光色素で染色することで測定することができる。

DLD-1 細胞を 2×10^5 cells/well で 6-well プレートに播種し、2 日培養した。0、1、5 もしくは 10 mg/ml になるように AGE を添加した通常培地に交換し、2 日間培養した。G2/M 期停止の陽性コントロール試薬として $0.025 \mu\text{M}$ のコルヒチン (和光純薬工業 039-03851) を用いた。浮遊細胞と接着細胞を回収し、1 mL の冷 0.5 % EDTA-PBS で洗浄、遠心力 $2,000 \times g$ で 3 分間遠心し、上清除去した。500 μL の氷冷 70 % EtOH で細胞を懸濁し、氷上で 1 時間、細胞を固定した。遠心力 $5,000 \times g$ で 3 分間遠心し、上清除去、冷 PBS で 1 回洗浄した後、100 $\mu\text{g/ml}$ の RNase A (和光純薬工業 318-06391、大阪) を 150 μL 添加し、37 °C で 30 分間処理した。遠心、上清除去後、25 $\mu\text{g/ml}$ のヨウ化プロピジウム (P.I., Sigma) を 150 μL 添加し、氷上 20 分反応した。350 μL の冷 0.5 % EDTA-PBS を添加し、フローサイトメータ (FACSCalibur; Becton Dickinson, USA) で細胞内の DNA 量を計測した。

第五項 培養細胞での細胞周期関連タンパク質発現評価

細胞処理（全細胞）：

DLD-1 細胞を 2×10^5 cells/well で 6-well プレートに播種し、2 日培養した。0、1、5 もしくは 10 mg/ml になるように AGE を添加した通常培地に培地交換し、2 日間培養した。浮遊細胞と接着細胞を 1.5 mL マイクロチューブにセルスクレイパーで回収し、遠心力 $2,000 \times g$ で 3 分間遠心し、上清除去した。培地中の血清タンパク質を除去するために、1 mL の冷 0.5 % EDTA-PBS で、合計 3 回洗浄処理を行った。100 μ L の Cell-LyEX1（東洋ビーネット）（1/200 量の Protease Phosphatase cocktail (Thermo #1861281) を添加したもの）を添加、混合後、氷上 1 時間静置し、細胞を可溶化した。さらに超音波処理することでゲノム DNA を切断した。遠心力 $20,600 \times g$ で 4 $^{\circ}$ C、20 分間遠心し、上清を全細胞の細胞抽出液として用いた。

細胞処理（核抽出液）

細胞の核タンパク質は、Schreiber らの方法(86)に準じて行い、低張液で細胞を破碎後、高張液を加えることで抽出した。2 日間、0、1、5 もしくは 10 mg/ml になるように AGE を添加した通常培地で培養した DLD-1 細胞を、セルスクレイパーで回収し、1 mL の PBS を加え、遠心力 $2,000 \times g$ で 3 分間遠心し、上清除去した。同様の PBS による洗浄をさらに 2 回繰り返した。細胞ペレットに 200 μ L の低張液 A（10 mM HEPES (pH7.5)、10 mM KCl、0.1 mM EGTA、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.5 mM PMSF、proteinase inhibitor、0.5 % Nonidet P-40）を添加し、氷上 15 分間置いた。遠心力 $500 \times g$ で 1 分間遠心し、上清を細胞質画分として回収した。細胞ペレットを 200 μ L の低張液 A で 2 回洗浄し、各上清

は細胞質画分に合わせた。細胞ペレットに 150 μL の高張液 B (20 mM HEPES (pH7.5)、400 mM NaCl、1 mM EGTA、1 mM EDTA、1 mM DTT、1 mM PMSF、proteinase inhibitor)を添加、ボルテックスし、氷上に 15 分間静置した。遠心力 20,600 $\times g$ で 4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分間遠心し、上清を核タンパク質抽出液として回収した。

タンパク質の定量

回収したタンパク質濃度の定量は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo; #23225, USA)を用いて行った。タンパク質の定量方法としては、Bradford 法などもあるが、界面活性剤の影響が懸念されたため、界面活性剤の影響を受けにくい BCA (ビスニコニン酸) 法を選択した。BCA 法の原理は、アルカリ条件下でタンパク質のペプチド結合が Cu(II)イオンを Cu(I)イオンに還元し、この還元 Cu(I)イオンがビスニコニン酸と錯体を形成する。この錯体の吸収極大波長 (562nm) を測定することで、タンパク質濃度を算出するものである。

上記手法で調製した細胞タンパク質抽出液を PBS にて 30、60、120 倍に希釈した。BCA 試薬の溶液 A と溶液 B を 50:1 で混合した基質溶液 200 μL と希釈サンプル 25 μL を 96-well プレートで混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベート後、マイクロプレートリーダー (Multiskan GO、Thermo) で 562 nm の吸光度を測定した。タンパク質濃度は濃度既知のイムノグロブリン G (IgG) で換算した。

ウェスタンブロッティングによる細胞周期関連タンパク質の検出

AGE が DLD-1 細胞の細胞周期関連タンパク質の発現量に与える影響は Sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタンブロッティングにて評価した。

20 μ g の各細胞抽出液に 4 倍濃度のサンプルバッファー (0.5 M Tris-HCl (pH6.8)、16 % (w/v) SDS、20 % sucrose、0.04 % BPB、0.4 M DTT) を 3 μ L 添加し、さらに泳動サンプル量が 12 μ L になるように milliQ 水でメスアップした。泳動サンプルを沸騰水中で 5 分間熱変性処理した後、10-20 % グラジエント SDS-PAGE ゲル (アプロサイエンス、徳島) にアプライし、25 mM Tris、192 mM Glycin、0.1 % SDS (pH8.3) のバッファー条件下、定電圧 300 V (ATTO myPower300) で 20 分間、電気泳動した。電気泳動後、ゲルを定電流 100 mA で 40 分間、PVDF 膜 (Millipore, USA) に転写した。転写した PVDF はブロッキングするため 2 % BSA を含んだ TBST (10 mM Tris、150 mM NaCl、0.05 % (w/v) Tween-20 pH7.6) で室温下 1 時間振とうした。細胞周期関連タンパク質の発現評価のために抗 Cyclin B1 抗体 (clone 12231)、抗 Cdk1 抗体 (clone 9112)、抗 Cyclin D1 抗体 (clone 2926)、抗 NF- κ B p65 抗体 (clone 8242) (いずれも Cell Signaling Technology, USA) を 1 次抗体として用いた。アポトーシス関連タンパク質評価のために抗 caspase-3 (clone 9662) (Cell Signaling Technology)、内部コントロールとして β -actin (MBL, Japan)、lamin B1 (clone 133741, Abcam, USA) を 1 次抗体として用いた。いずれの 1 次抗体も 2 % BSA/TBST で 1,000 倍希釈し、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。反応後、TBST で 5 分間 3 回洗浄を行い、2 % BSA/TBST で 2,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で室温、1 時間反応させた。反応後、TBST で 5 分間 3 回洗浄を行い、PVDF

を ECL 試薬 (Luminate Forte Western HRP Substrate, Millipore) で化学発光させ、CCD カメラシステム (ImageQuant LAS 4000, GE) で撮影した。得られた発光バンドは画像解析ソフトウェア (ImageQuant TL software (GE Healthcare, USA)) でバンド強度を計算した。

第六項 カスパーゼ 3 活性評価

カスパーゼ経路の活性化はアポトーシス経路で必須のイベントであり、中でもカスパーゼ 3 の活性化はアポトーシスを実行させる引き金としての役割を果たしている(87)。

本検討では AGE によるアポトーシスの誘導性を検証するため、ヒト大腸癌細胞株 (DLD-1、HCT-8、LoVo) および、DMH 誘発ラット大腸腺癌細胞株 (RCN-9) のカスパーゼ 3 活性を、カスパーゼ 3 測定キット Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega, G8091)で測定した。本アッセイシステムではカスパーゼ 3/7 で認識される DEVD アミノ酸配列を付加した前駆基質を使用しており、キットの細胞溶解バッファーで遊離された細胞内の活性化カスパーゼ 3 が、前駆基質を切断すると、アミノルシフェリンを生じる。生じたアミノルシフェリンは ATP 存在下でルシフェラーゼ、マグネシウム、酸素に触媒され発光するという原理を利用している (Figure 3-2)。

ヒト大腸癌細胞 (DLD-1、HCT-8、LoVo) および、DMH 誘発ラット大腸腺癌細胞 (RCN-9) を 4.5×10^3 cells/well で 96-well half well プレート (CORNING 3882) に播種し、2 日培養した。0、1、5 もしくは 10 mg/ml になるように AGE を添加した通常培地に培地交換 (50 μ L) し、2 日間培養した。また、カスパーゼ 3 活性化の陽性コントロールとして 0.05 μ M スタウロスポリン (Sigma) を用いた。40 μ L の Caspase-Glo 3/7 (Promega, G8091)を添加し、室温で 30 分間反応後、各ウェルの化学発光量を測定した (2104 EnVision, PerkinElmer)。

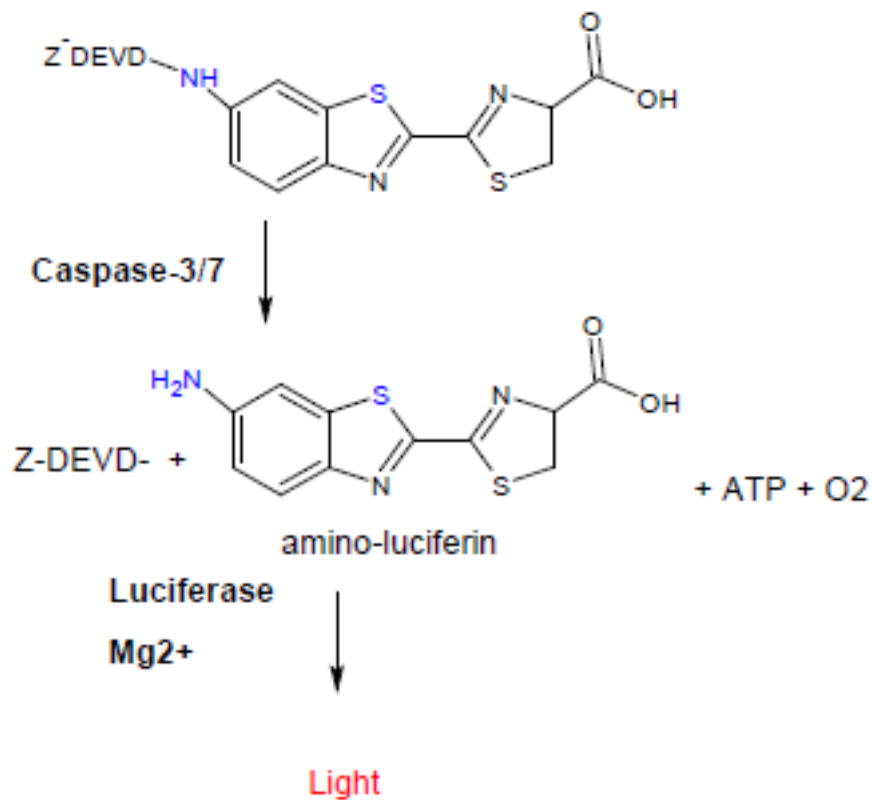


Figure 3-2. カスパーゼ 3 活性測定原理

第七項 統計処理

全ての数値は平均値±標準誤差で示した。有意差検定には、2 群間の検定には unpaired two-tailed Student's t-tests を使用した。3 群間以上の検定では一元配置分散分析 (one-way ANOVA) と多重比較検定 (Tukey-Kramaer's tests) を用いた。P 値が 0.05 未満のとき有意差ありと判定した。

第三節 結果

第一項 AGE の大腸癌細胞株に対する増殖抑制効果

披検物質の細胞に対する毒性や増殖活性の評価は、一定期間培養した生細胞の数を計数する方法が一般的であり、その手法としては、血球計算盤で計測する方法、標識したDNAアナログを用いてDNA取り込み量を測定する方法、自動計測器を用いる方法や、細胞活性を発色に変換する方法がある(88)。なかでもスルフォローダミンBアッセイは接着細胞のtotal biomassをスルフォローダミンBで染色する再現性の高い方法である(89)。

はじめに、スルフォローダミン B アッセイで培養細胞数を正しく評価することが可能かどうかを検証した。DLD-1 細胞を 96-well プレートに 0, 100, 500, 1000, 2000, 5000, 10000 cells/well で播種し、増殖による細胞数変動の影響を最低限に止めるために一晩だけインキュベートした細胞について、スルフォローダミン B アッセイを行った。細胞数と吸光度 (Abs.565 nm) のプロットから算出したピアソンの相関係数は 0.9944、 $P=4.35 \times 10^{-6}$ であった (Figure 3-3)。この結果より、スルフォローダミン B アッセイは培養中の接着細胞数を精度良く反映する測定系であることが確認できた。

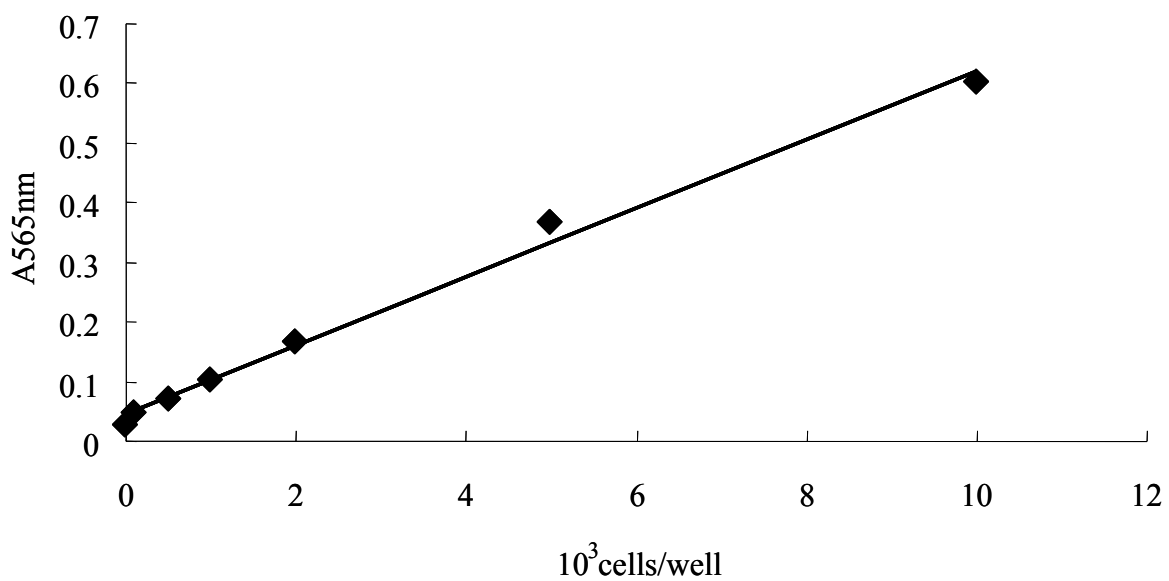


Figure 3-3. Preparation of the standard curve in sulforhodamine B assay. Sulforhodamine B assays were performed to evaluate the straightness of the standard curve. Cells seeded at several density were incubated for over night, and were performed by sulforhodamine B assay.

続いて、AGE が DLD-1 細胞の増殖へ与える影響を評価した。96-well プレートに播種した DLD-1 細胞に AGE を 0, 1, 5, 10 mg/ml となるように添加し、4 日間培養し、経時的にスルフォローダミン B アッセイで増殖細胞数を評価した (Figure 3-4)。

2 日間の測定では AGE 処理による DLD-1 細胞数の変化を確認することはできず、3 日間および 4 日間培養した際に、AGE 濃度依存的な DLD-1 細胞の増殖抑制が確認された。

一方、AGE の正常細胞に対する影響を確認する目的で、ヒト正常繊維芽細胞株 (MRC-5) に同濃度の AGE を添加し、増殖細胞数を評価した (Figure 3-5)。その結果、AGE は 10 mg/ml 条件でも MRC-5 細胞に対して増殖抑制効果を示さず、むしろ増殖を促進させる傾向を示した。

この結果より、AGE は DLD-1 細胞に対して緩やかな増殖抑制効果を示すことが確認された。

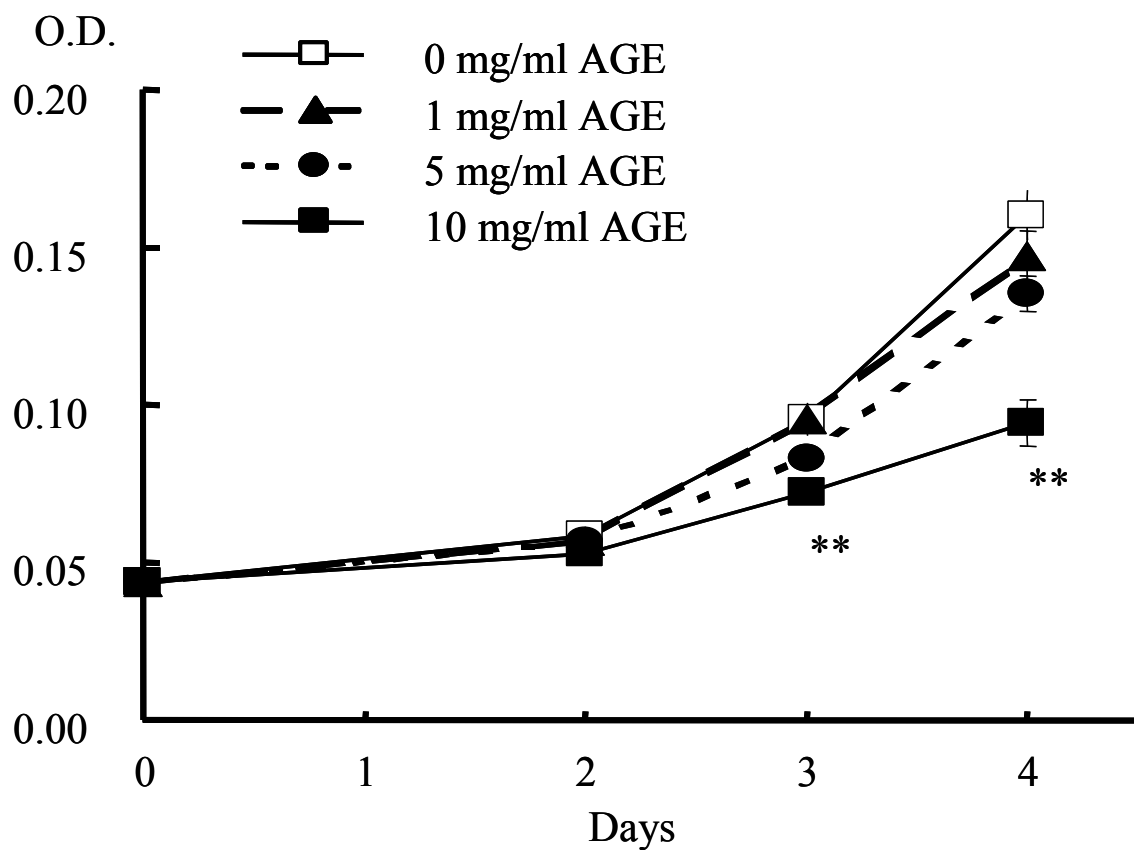


Figure 3-4. Effect of AGE on proliferation of human colon cancer cells. Sulforhodamine B assays were performed to study the effect of AGE on DLD-1 human colon cancer cells. Cells were treated with AGE at 0, 1, 5 or 10 mg/ml for different times. The cell proliferation ratio was calculated from the values obtained in the absence of AGE treatment. Data are presented as the mean \pm SE of triplicate experiments. The proliferation of DLD-1 cells was significantly reduced by AGE in a dose-dependent manner over a culture period of more than 2 days.

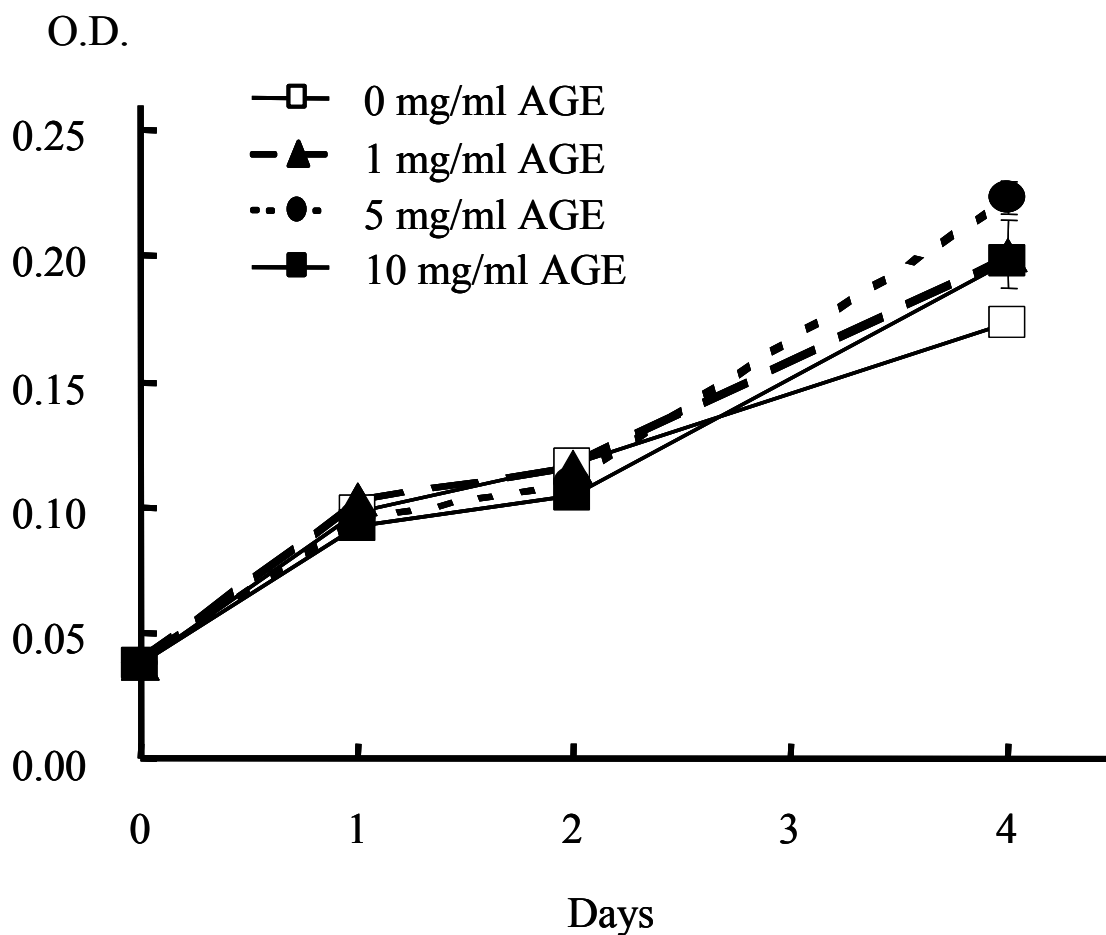


Figure 3-5. Effect of AGE on proliferation of human fibroblast cells. Sulforhodamine B assays were performed to study the effect of AGE on MRC-5 fibroblast cells as the normal control. Cells were treated with AGE at 0, 1, 5 or 10 mg/ml for different times. The cell proliferation ratio was calculated from the values obtained in the absence of AGE treatment. Data are presented as the mean \pm SE of triplicate experiments. AGE showed no suppressive effect in normal fibroblast MRC-5 cells.

第二項 AGE の大腸癌細胞株に対するアポトーシス誘導性評価

一般的に癌細胞の増殖抑制作用の機序として、細胞周期停止やアポトーシスの誘導が知られている(90)。さらにニンニク由来成分を用いた先行研究においても、抗腫瘍効果の機序として細胞周期の停止やアポトーシスの誘導作用が示されている(91)。

本検討では AGE による DLD-1 細胞の増殖抑制効果が、細胞周期の停止作用やアポトーシスの誘導作用に関連するものかどうかを検証した。

はじめに、AGE が DLD-1 細胞に対して細胞周期の停止作用を示すかどうかを、細胞周期解析の一般的な手法であるヨウ化プロピジウム (P.I.) による細胞核 DNA 量分析法にて検証した。

真核細胞は増殖の過程で規則正しい細胞周期を繰り返すことで成り立っている。増殖が休止状態の G0 期と染色体複製のための準備状態の G1 期細胞では 2 倍体の DNA 量であるが、DNA の合成期である S 期を経た、細胞分裂の準備期である G2 期や有糸分裂を行う M 期細胞では 4 倍体となり、DNA 含量は G0/G1 期の 2 倍になる。また、アポトーシスを起こした細胞は DNA の断片化が発生しており、DNA 量の少ない細胞集団 (sub-G1 期) として検出される。P.I.などの核染色蛍光色素を用いることで細胞内の DNA 量を定量的に測定することが可能であり、細胞周期の分布として検出することが可能である。

P.I.を用いた細胞周期解析方法を、G2/M 期で細胞周期を停止させる薬剤であるコルヒチンを用いて検証した。コルヒチンはチューブリン重合を阻害することで細胞分裂の停止を引き起こし、細胞周期を M 期で停止させる薬剤である

(92)。

0.025 μM のコルヒチンで 2 日間処理した DLD-1 細胞を P.I. で染色し、フローサイトメータで測定した (Figure 3-6)。通常培養の DLD-1 細胞 (Figure 3-6 A) は 4 倍体の DNA 量を示す G2/M 期の細胞が全体の 20 %程度であるのに対し、0.025 μM コルヒチンで処理すると G2/M 期の細胞の割合が 40 %まで増加している様子が確認できる。さらに低 DNA 量を示す sub-G1 期の比率も高まっており、アポトーシスの誘導も進んでいることが確認できた (Figure 3-6 B)。本手法にて細胞周期の解析が可能であることが確認できた。

続いて、AGE が DLD-1 細胞周期に与える影響について検証した。0、1、5、10 mg/ml の AGE で 2 日間処理した DLD-1 細胞を P.I. で染色し、フローサイトメータで測定した。Figure 3-7 にヒストグラムを、Figure 3-8 に各細胞周期の存在比を示した。

いずれの AGE 濃度においてもヒストグラムパターンに違いは無く、特定の細胞周期への収束は無いことが確認された。また、アポトーシスの指標でもある低 DNA 量を示す sub-G1 期の分布についてもいずれの AGE 濃度においても未処理と比較して違いは無かった。これらの結果から、AGE は DLD-1 細胞に対して特定の細胞周期で停止させる作用は持たないことが確認された。さらに、sub-G1 期での存在比にも違いが無いことから、AGE は DLD-1 細胞に対してアポトーシスを誘導しないことが示唆された。

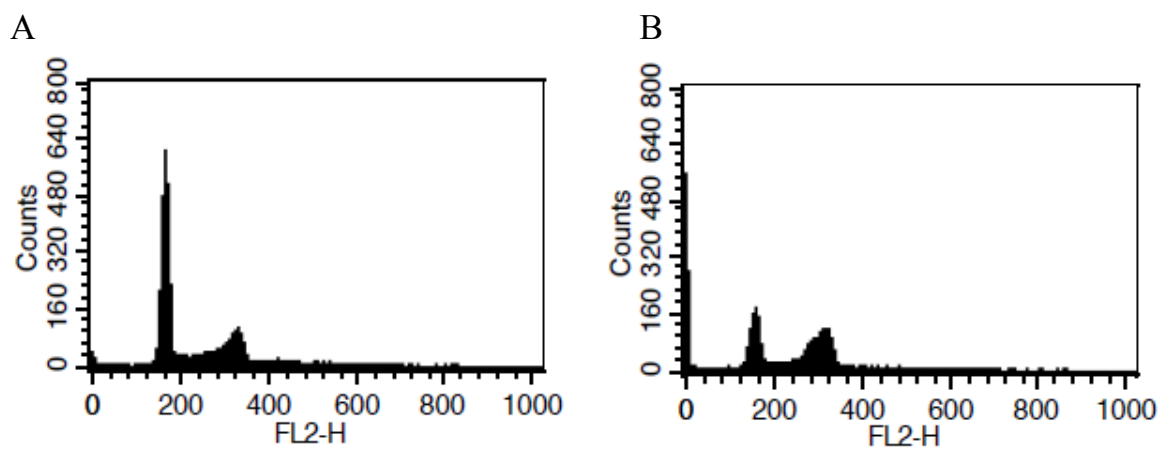


Figure 3-6. DLD-1 cells (A) or DLD-1 cells were treated with 0.025uM of colchicine for 2 days (B) were stained with PI and subjected to cell cycle analysis using a FACSCalibur. Representative histograms of the cell cycle distribution of DLD-1 cells are shown.

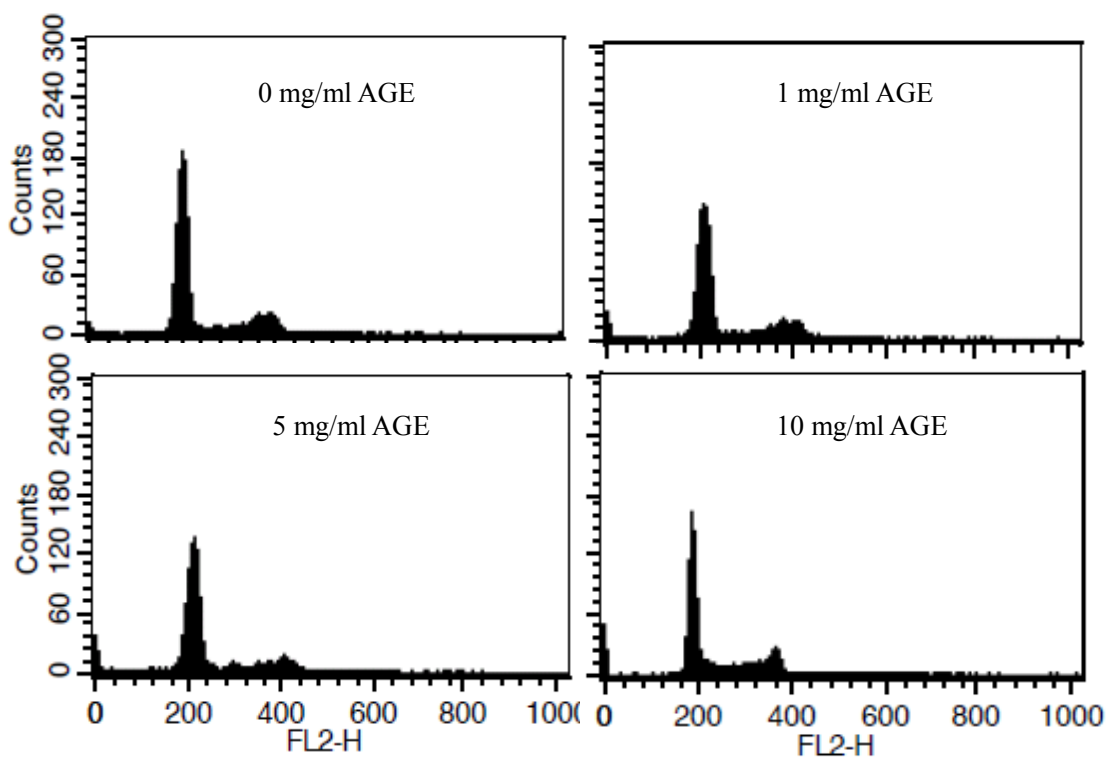


Figure 3-7. DLD-1 cells were treated with indicated concentrations of AGE for 2 days. Harvested cells were stained with PI and subjected to cell cycle analysis using a FACSCalibur. Representative histograms of the cell cycle distribution of DLD-1 cells are shown.

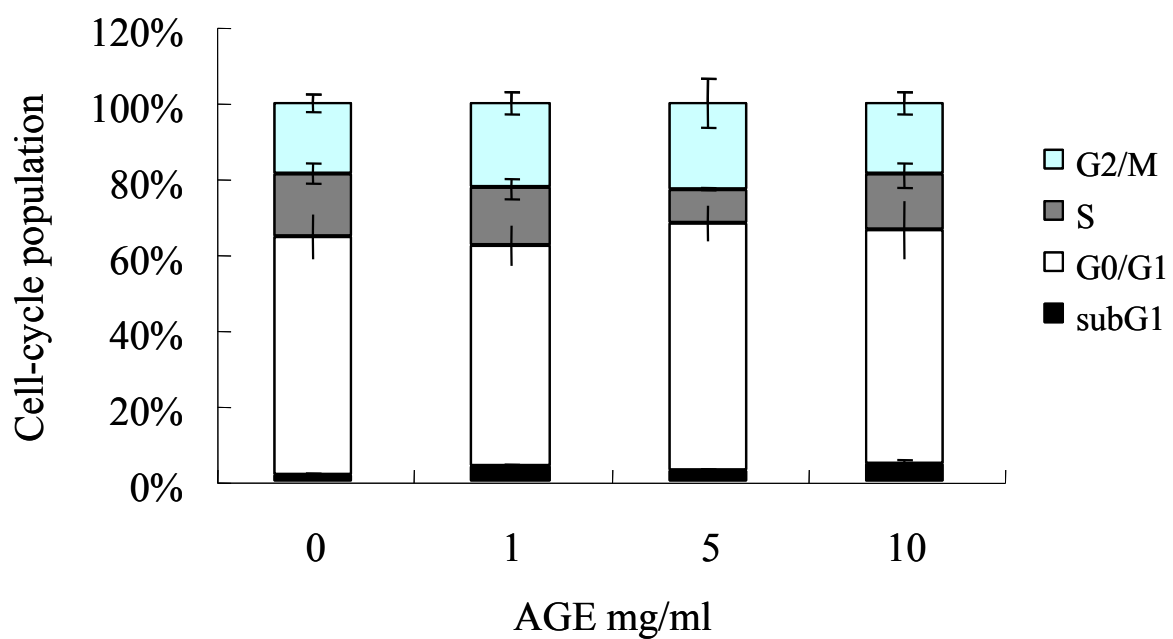


Figure 3-8. DLD-1 cells were treated with different concentrations of AGE for 2 days. Harvested cells were stained with PI. The percentages of cells in G0/G1, S, G2/M and sub-G1 phases are shown. Data are shown as means \pm SE (n=3)

次に、AGEが大腸癌細胞に対してアポトーシス誘導能を有するかどうかを、カスパーゼ 3 を指標として検証した。アポトーシスは核凝縮や DNA の断片化によって特徴付けられる細胞の自殺メカニズムであり、細胞増殖阻害活性を示す化合物はアポトーシス誘導を機序とする場合がある(90)。システインプロテアーゼファミリーであるカスパーゼは、アポトーシスの中心的な制御因子として機能するため、アポトーシスの指標として用いられる。

カスパーゼを活性化する因子として、TNF や FasL などによるデスシグナルはカスパーゼ 8 と 10 を活性化し、DNA 損傷シグナルはカスパーゼ 2 を活性化する。また、ダメージを受けたミトコンドリアから放出されるシトクロム c は、カスパーゼ 9 を活性化する。そしてこれらのカスパーゼは下流のエフェクターカスパーゼとしてのカスパーゼ 3、6、7 を消化・活性化し、特異的な Asp 残基にしたがって細胞タンパク質を消化し、アポトーシスを実行する(87)。

本検討では、AGE によるアポトーシスの誘導性を確認する手法として、エフェクターカスパーゼであるカスパーゼ 3 の活性化状態を、酵素活性または分子サイズの面から評価した。

AGE によるカスパーゼ 3 の活性化を酵素活性の面から評価するため、本検討では DLD-1 細胞に加えて、別のヒト大腸癌細胞株である HCT-8 および、LoVo 細胞、そして F344 ラットの DMH 誘発大腸癌細胞株である RCN-9 細胞について、AGE がカスパーゼ 3 の活性化を誘導するかどうか検証した。

0、1、5、10 mg/ml の AGE および、カスパーゼ 3 活性化の陽性コントロールとしての 0.05 μ M スタウロスポリン(STS)で 2 日間処理した各種細胞のカスパーゼ 3 活性を Caspase-Glo 3/7 Assay (promega)で測定した (Figure 3-9)。

DLD-1 細胞 (Figure 3-9 A)、HCT-8 細胞 (Figure 3-9 B)、LoVo 細胞 (Figure

3-9 C)、RCN-9 細胞 (Figure 3-9 D) のいずれの細胞に対しても、AGE は全ての濃度において未処理群と同程度のカスパーゼ 3 の活性化値を示した。一方、各細胞に対して陽性対照群 (0.05 μ M STS) は有意な活性上昇を確認した。これらの結果から、AGE は DLD-1 細胞、HCT-8 細胞、LoVo 細胞、RCN-9 細胞に対してカスパーゼ 3 の活性化を誘導しないことが確認された。つまり、アポトーシスの誘導を惹起しないことが示唆された。

次に、AGE によるアポトーシス誘発能について、切断型カスパーゼ 3 の存在を指標に検討した。カスパーゼ 3 は 35kDa のタンパク質であるが、19kDa と 17kDa の切断型に消化されることで活性化する。そこで、0、1、5、10 mg/ml の AGE で 2 日間処理した DLD-1 細胞の抽出液を SDS-PAGE し、抗カスパーゼ 3 抗体によるウェスタンブロットで検証した (Figure 3-10)。このとき、 β -アクチンを内部コントロールとして用いた。

非活性型の完全長カスパーゼ(35kDa)のバンドは確認されたが、AGE 処理により切断型のカスパーゼ (19kDa、17kDa) を確認することはできず、この結果からも、AGE は DLD-1 細胞に対してカスパーゼ 3 の活性化を誘導しないことが確認された。

これらの結果から、AGE は DLD-1 細胞および、HCT-8 細胞、LoVo 細胞、RCN-9 細胞に対して、アポトーシスを誘導しないと結論付けることができる。

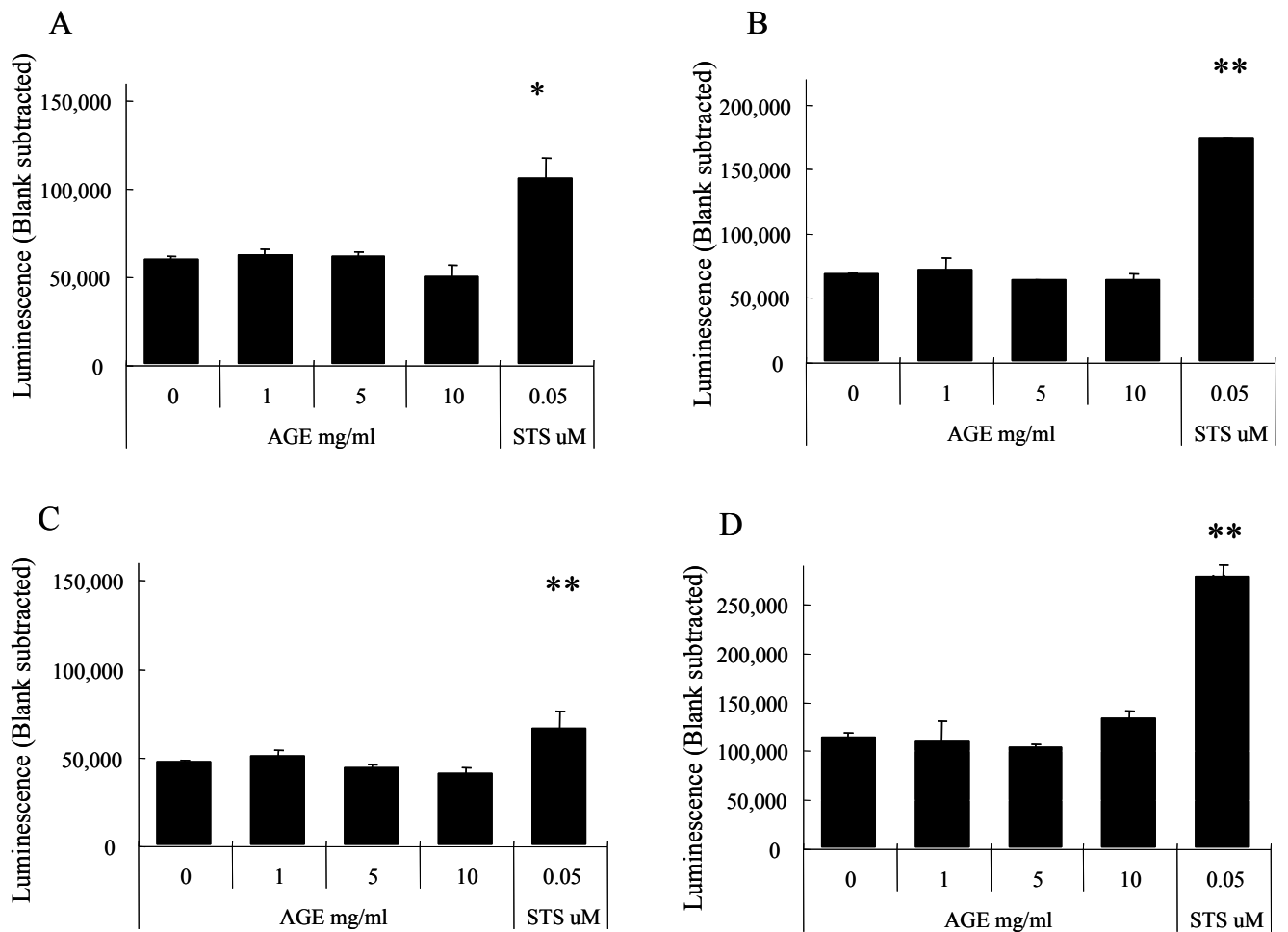


Figure 3-9. Effect of AGE on apoptosis of colorectal adenocarcinoma cells. DLD-1 cells (A), HCT-8 cells (B), LoVo cells (C) and RCN-9 cells (D) were treated with different concentrations of AGE or staurosporine (STS) (0.05 μ M) as a positive control for 2 days. Caspase-3 activity was assayed with the Caspase-Glo 3/7 Assay kit (Promega, USA).

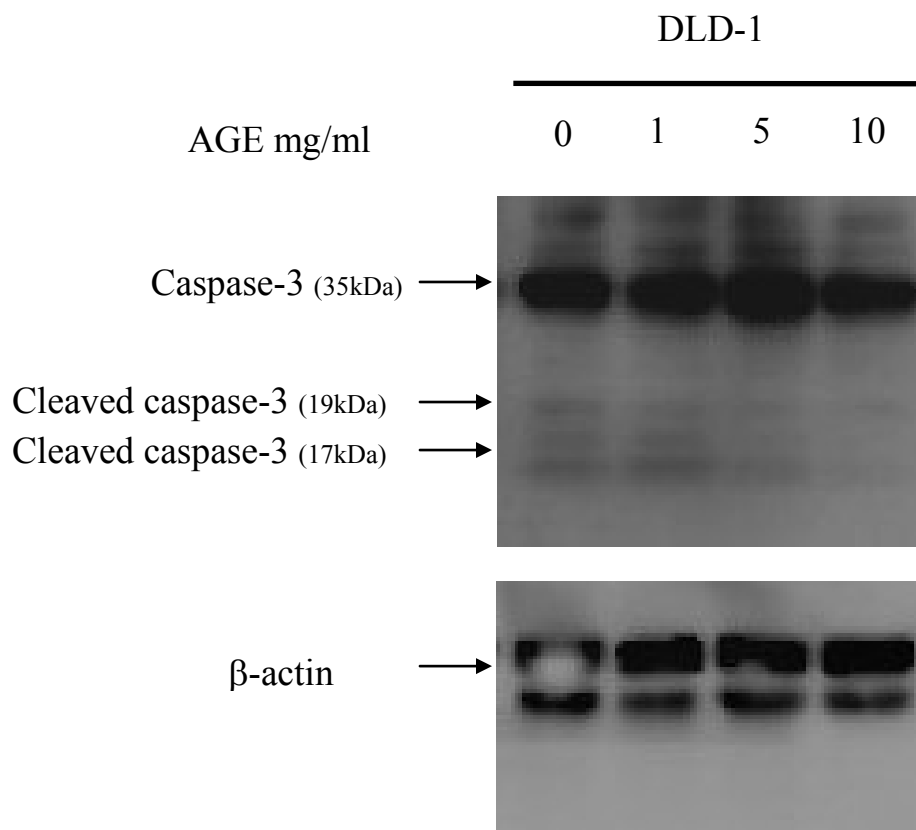


Figure 3-10. Effect of AGE on apoptosis of DLD-1 cells. Whole cell lysates of DLD-1 cells treated with AGE for 2 days were analyzed by western blotting for caspase-3 (upper panel) and β -actin (lower panel) as a loading control. The immunoactive bands are indicated with an arrow.

第三項 AGE の大腸癌細胞株に対する細胞増殖速度遅延に与える効果

これまでの検討において、AGE はヒト大腸腺癌細胞 (DLD-1) に対して、増殖抑制作用を示すが、細胞周期停止作用やアポトーシス誘導能は示さないことが確認された。そこで、AGE による大腸癌細胞の増殖抑制作用が細胞増殖速度に影響を与えている可能性を検証することとした。細胞増殖速度を評価するためには特定の細胞周期に同調した細胞を用いて、同調解除後の細胞周期の推移を評価する方法が一般的である。例えば、G1/S 期の境界で同調させる方法としてダブルチミジン法(84, 85)や、M 期で同調させるノコタゾール法(93)などがある。過去の報告では、ニンニク成分は G2/M 期での細胞周期停止作用が報告されている(91)。AGE には細胞周期停止作用は無いものの、G2/M 期に作用する可能性が考えられたため、G1/S 期で同調させるダブルチミジンブロック法で検討することとした。

DLD-1 細胞を 2 回の過剰チミジン添加条件で培養することで G1/S 期の境界に細胞を同調させた後、0、10 mg/ml の AGE を含んだ培地に交換し、24 時間まで経時的に培養した。細胞周期の進行を経時的に確認するため、1、3、5、7、9、13、15、17、21、24 時間後の細胞を PI 染色し、フローサイトメータで細胞周期を評価した (Figure 3-11、Figure 3-12)。

通常培地条件では、同調解除後 3 時間で G2/M 期への進行が確認され、5 時間後には G2/M 期から次の G1 期への進行も開始していた。そして解除 7 時間後にはほとんどの細胞が次の G1 期に移行していた。また、21 時間後には次の S 期への進行が始まり、解除 24 時間後には次の G2/M 期へ進行する細胞も確

認された。一方、10 mg/ml の AGE を添加した培地条件では、解除 5 時間後でも多くの細胞が G2/M に留まっており、9 時間後でも通常培地条件と比較すると G2/M 期細胞の割合が有意に多い結果であった。さらに、次の S 期への移行は同調解除から 24 時間後に確認された (Figure 3-11、Figure 3-12、Table 3-1)。この結果から、AGE は DLD-1 細胞の細胞周期を 2-3 時間遅延させることが確認された。

この結果を受けて、細胞倍加時間の遅延が及ぼす細胞数の経時的変化について試算した (Table 3-2)。24 時間後の細胞数は $2^{(24 \text{ 時間} / \text{倍加時間})}$ で計算することができ、細胞倍加時間が 21 時間と 24 時間で比較した場合、48 時間後では 1.21 倍に、72 時間後では 1.34 倍の違いが生じる試算結果となった。さらに、4,000 個の細胞を播種したと想定すると、倍加時間が 21 時間と 24 時間では、48 時間後に 19,504 個、16,000 個に増殖し、72 時間後には 43,069 個、32,000 個に増殖する試算となる。これは、48 時間後で両者の増殖細胞数の違いは 18 %であったが、72 時間後では 26 %に拡大することを示している。

つまりこの試算結果は、長期間培養することで増殖抑制効果が顕著に確認されることを示しており、Figure 3-4 で示した細胞増殖結果を反映する結果である。

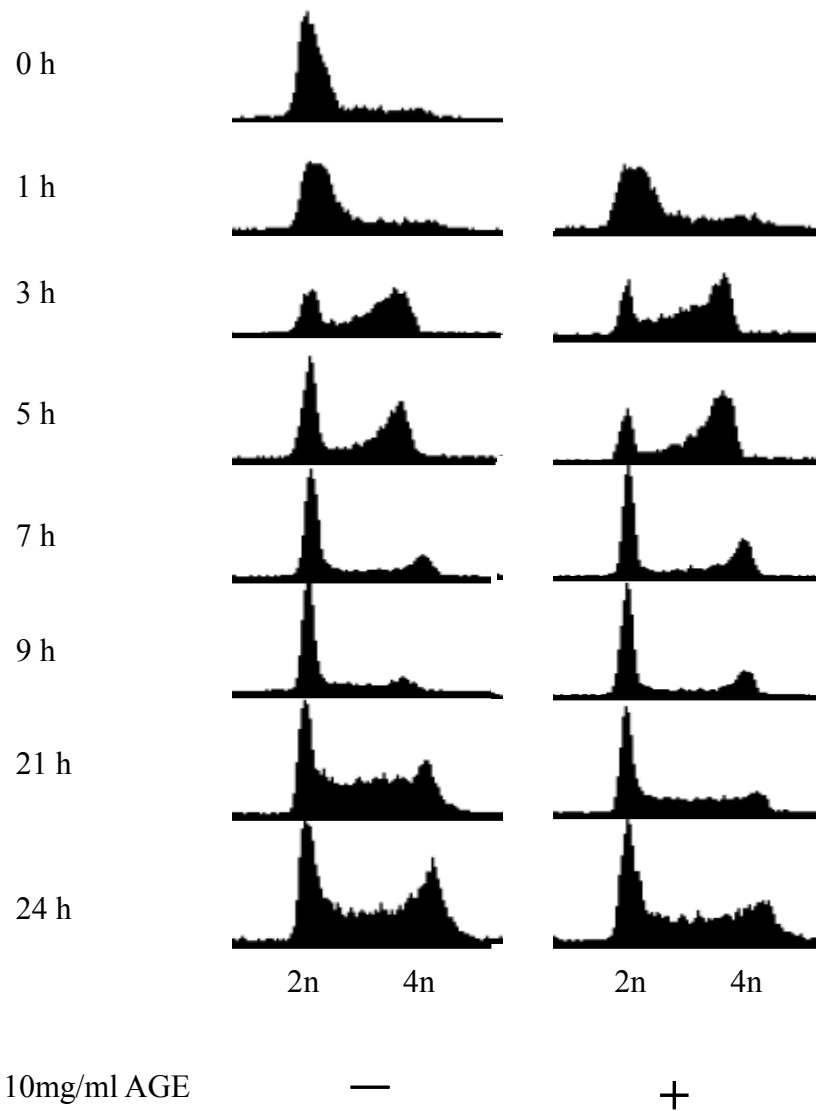


Figure 3-11. Effect of AGE on cell cycle progression of DLD-1 cells.

DLD-1 cells were synchronized at the G1/S boundary by double thymidine block. The synchronized cells were released by changing the medium to thymidine-free medium or 10 mg/ml AGE-supplemented medium for indicated times. Changes in cell cycle distribution were monitored by flow cytometry. Representative histogram pattern of DLD-1 cells.

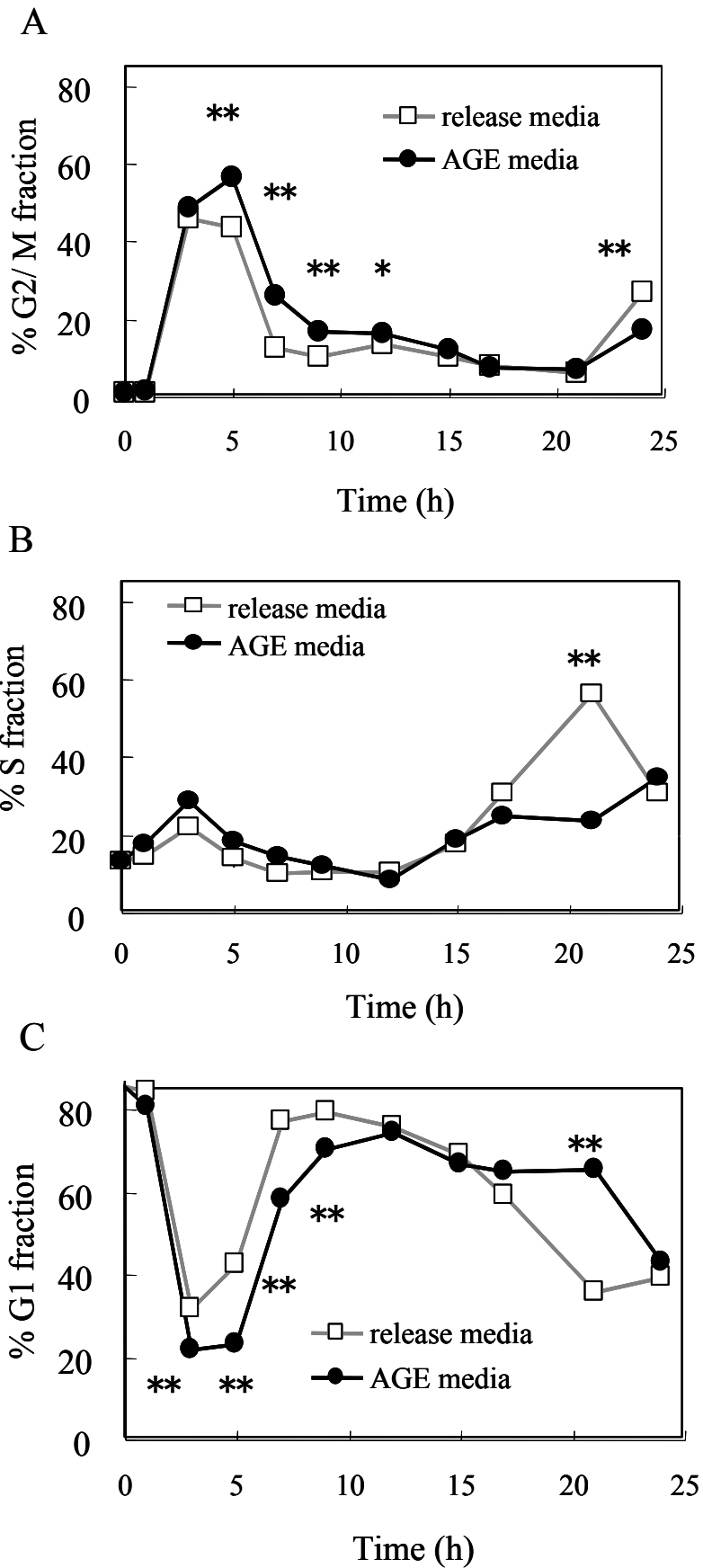


Figure 3-12. Effect of AGE on cell cycle progression of DLD-1 cells. Percentage of cells at the G2/M phase (A), S phase (B) and G1 phase (C) are presented. Data are shown as means±SE (n=3); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with released media condition.

Table 3-1. AGE delays cell cycle progression of DLD-1 cells.

		Distribution (%)		
	10 mg/ml AGE	G0/G1	S	G2/M
0 h	-	85.4±0.2	13.2±0.1	0.8±0.2
1 h	-	84.1±0.7	14.2±0.7	1.1±0.1
	+	80.6±1	17.6±1.1	1.1±0.1
3 h	-	31.4±1.1	21.8±1.1	45.9±1.5
	+	21.6±0.7**	28.4±0.7	48.5±1.4
5 h	-	42.3±2.1	13.7±0.5	43.3±2
	+	22.7±1.4**	18.3±0.2	56.1±1.1**
7 h	-	77±0.8	9.8±0.3	12.2±0.5
	+	57.9±0.8**	14.4±0.3	25.8±0.8**
9 h	-	79.1±0.2	10.3±0.4	9.9±0.3
	+	70.1±0.8**	12±0.2	16.4±0.7**
21 h	-	35.7±0.4	55.9±0.3	5.8±0.8
	+	65.3±1**	23.4±0.4**	6.7±0.7
24 h	-	39.1±0.4	30.6±0.8	26.9±0.9
	+	42.8±0.6	34.6±1.6	17.3±1.9**

Data are shown as means ± S.E.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with released media condition

Table3-2 The cell number estimation by differences of doubling time

Doubling time(h)	0	24	48	72	96
21	×1.00	×2.20	×4.87	×10.76	×23.77
24	×1.00	×2.00	×4.00	×8.00	×16.00

in case of 4,000 cells/well seeding

Doubling time(h)					
21	4,000	8,833	19,504	43,069	95,104
24	4,000	8,000	16,000	32,000	64,000
Fold-cange	0%	9%	18%	26%	33%

第四項 AGE が大腸癌細胞株の細胞周期関連タンパク質の発現に与える影響

これまでの検討で、AGE の大腸癌細胞株増殖抑制効果が、細胞周期速度遅延作用に関連があることを示してきた。本検討では、AGE が細胞周期速度を遅延させる機序を明らかにするため、細胞周期調節因子タンパク質の発現量変化を検討した。

サイクリン B1/Cdk1 (Cyclin-dependent kinase 1) 複合体は細胞が G2 期から M 期へ移行する際に必要な細胞周期調節因子であり(94, 95, 96, 97, 98)、Ryu らは G2/M 期停止に、サイクリン B1/Cdk1 発現量の減少が関連することを示している(39, 99, 100)。

0、1、5、10 mg/ml の AGE で 2 日間処理した DLD-1 細胞の細胞抽出液を SDS-PAGE し、細胞周期調節タンパク質の発現量をウェスタンブロットで評価した。その結果、AGE は DLD-1 細胞のサイクリン B1 と Cdk1 の発現量を濃度依存的に抑制することが確認された (Figure 3-13 A,B)。その抑制効果は 10 mg/ml AGE 処理のとき、未処理条件と比較して、サイクリン B1 で 50 %、Cdk1 で 30 %発現量が抑制されていた。このとき、泳動タンパク質量の内部指標として β アクチンの発現量を評価し、群間で違いがないことを確認した。

一方、AGE は G1 期から S 期への移行に必要な細胞調節因子であるサイクリン D1 の発現量に影響を与えることはなかった (Figure 3-13 C)。

つまり、この結果から AGE による DLD-1 の細胞周期遅延作用は、G2/M 期制御タンパク質の発現量調整に起因すると考えることができる。

Nuclear factor- κ B (NF- κ B)は、細胞増殖や細胞周期の進行など、多くの遺伝

子発現に関与する転写因子であるが、NF- κ B の一つの作用として、サイクリン B1 の発現量を調整することで腫瘍の発育を促進するという報告がある(101, 102)。このことから、AGE によるサイクリン B1 の発現抑制作用は、NF- κ B の作用に関連する可能性が考えられる。

そこで本検討では、AGE が NF- κ B の活性化を阻害するかどうかを検証した。

NF- κ B は細胞質内では Inhibitor κ B: I κ B と結合することで不活性型として存在しているが、細胞外などの刺激によって I κ B がリン酸化を受けると I κ B から遊離し、活性体として核内へ移行し、目的遺伝子の転写活性化を行うことが知られている(101)。つまり、核内に移行した NF- κ B 量を評価することで、NF- κ B の活性化状態を評価することができる。

AGE で 2 日間処理した DLD-1 細胞から核タンパク質と細胞質タンパク質をそれぞれ抽出し、NF- κ B の構成ユニットである p65 タンパク質の発現量を評価した。その結果、AGE は核へ移行した p65 タンパク質の量を濃度依存的に抑制することが確認された。一方、細胞質中の p65 タンパク質量に変化は無かった (Figure 3-14)。

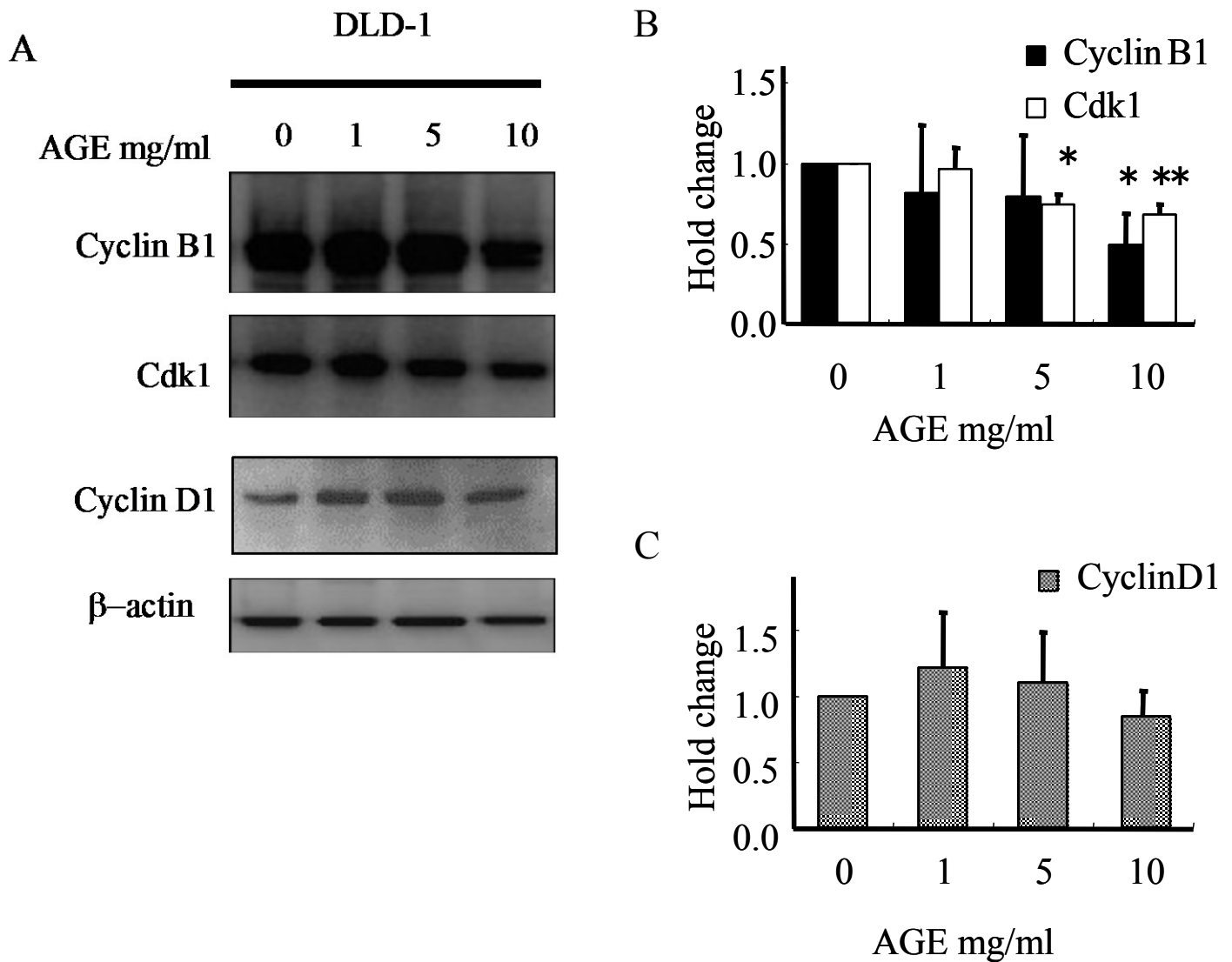


Figure 3-13. Effect of AGE on expression of cell cycle regulatory proteins.

DLD-1 cells were treated with different concentrations (0, 1, 5 or 10 mg/ml) of AGE for 2 days. (A) Equal amounts of whole cell lysates (20 μ g/ lane) were subjected to 10–20% SDS-PAGE. Expression of Cyclin B1, Cdk1 and Cyclin D1 were analyzed by western blotting. β -actin served as a positive loading control. Protein expression levels of Cyclin B1, Cdk1 (B) and Cyclin D1 (C) were normalized to that of β -actin and presented as the fold-change compared with the control.

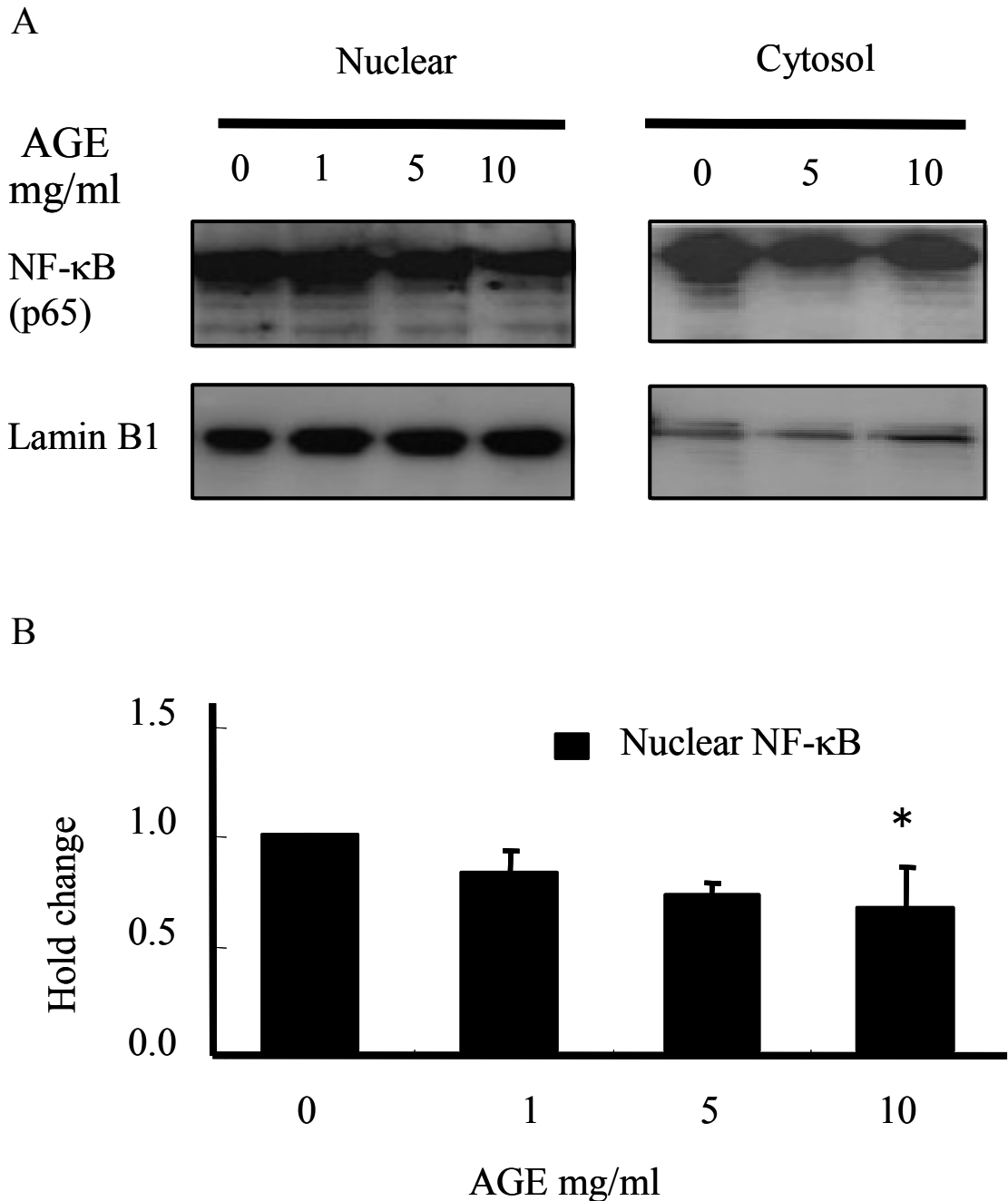


Figure 3-14. Effect of AGE on expression of cell cycle regulatory proteins. DLD-1 cells were treated with different concentrations (0, 1, 5 or 10 mg/ml) of AGE for 2 days. Equal amounts of nuclear or cytosol proteins (10 μ g/ lane) were subjected to 10–20 % SDS-PAGE. Expression of NF- κ B (p65) was analyzed by western blotting. Lamin B1 served as a positive loading control. Each band is representative of three experiments (A). Protein levels of nuclear NF- κ B were normalized to that of lamin B1 and presented as the fold-change compared with the control (B). Data are shown as means \pm SE (n=3); * P <0.05, ** P <0.01 compared with the control.

第四節 小括

本章では、AGE がヒト大腸癌細胞に与える細胞増殖への影響と、その機序について検証した。

AGE をヒト大腸癌細胞株 DLD-1 細胞に添加し、4 日間培養した結果、AGE は DLD-1 細胞に対して緩やかな増殖抑制効果を示し、3 日間以上の培養で、統計上有意差のある増殖抑制効果を示した。しかし 4 日間の培養でも細胞は増殖傾向にあり、AGE が DLD-1 細胞の増殖を停止させるほどの作用は持っていないことが確認された。また AGE が正常細胞に及ぼす影響についてヒト正常繊維芽細胞 MRC-5 を用いて評価した結果、DLD-1 細胞とは異なり、増殖の抑制作用は確認されなかった。Matsuura からも同程度濃度の AGE は、ヒト大腸癌細胞株 HT29、SW480、SW620 細胞の増殖を抑制することを示しており (47)、本検討と一致する結果であった。AGE は複数のヒト大腸癌細胞に対する増殖抑制作用が確認された。

先行研究において、ニンニク由来の成分であるイオウ化合物 (DADS、DATS など) は化学発癌動物モデルや、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌細胞株に対して抗腫瘍効果を示し、アポトーシスの誘導や細胞周期の停止作用との関連が報告されている(91)。本検討においても、AGE の増殖抑制効果がアポトーシスの誘導と細胞周期の停止作用に関係があるかどうかを検証したが(Figure 3-7、Figure 3-8、Figure 3-9、Figure 3-10)、AGE は増殖抑制効果を示す濃度においても DLD-1 細胞に対して特定の周期で細胞を停止させることはなかった。さらに、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ 3 の活性化も誘導しなかった。これらの結果は AGE が細胞に対して細胞周期の停止能やアポトーシスの誘導能を持たないことを示している。

Table 1-3 に示したとおり、AGE 中に存在するイオウ化合物 S-アリルシステイン (SAC) は、先行研究において *in vivo*、*in vitro* 実験で癌細胞の増殖抑制効果が確認されている(81, 103)。一方で、Shipin らは、SAC (250 μ M)が大腸癌細胞株 (SW480、HT29) に対して 2 日間の処理で増殖抑制効果および、カスパーゼ 3 活性化誘導作用を示さないことを報告している(40)。Moriyama らによると、AGE 中には SAC が 1.6-2.4 mg/g (dry weight)含まれている(104)ため、本検討の 10 mg/ml AGE 中には SAC が 16-24 μ g/ml 含まれていることになる。そして SAC の分子量は 161.22 であるため、Shipin らが用いた 250 μ M SAC は 40 μ g/ml となり、両実験系での SAC 濃度は同程度であることが確認できる。両実験で大腸癌細胞に対する作用も、類似する結果であった。

一方本章では、細胞周期の同調細胞を用いた実験において、AGE が細胞周期の速度を遅延させていることを明らかとした (Figure 3-11)。細胞周期同調実験から DLD-1 細胞は倍加時間が 21 時間であることが確認され、AGE 添加によって 24 時間に遅延していた。つまり、AGE は DLD-1 細胞に対して 3 時間細胞周期を遅延させることを明らかとした。この細胞倍加時間で増殖する細胞数をシミュレートした結果(Table 3-2)、48 時間後では増殖細胞数の違いは 18 %であったが、72 時間後では 26 %に拡大していた。つまりこの試算結果は、長期間培養することで増殖抑制効果を顕著に確認することが可能であることを示しており、Figure 3-4 で示した細胞増殖結果を反映する結果である。AGE は癌細胞の増殖を停止するのではなく、遅延させる作用を示すため、増殖細胞数の違いが確認するには 3 日間以上を要する必要があると考察することができる。Shipin らは、SAC が大腸がん細胞株 (SW480、HT29) に対して 2 日間の処理では増殖抑制効果を示さないと結論している(40)が、より長期で観察するこ

とで SAC の増殖抑制作用を確認できたかも知れない。

次に、AGE による細胞周期遅延効果の機序を明らかにするため、細胞周期調節因子の発現量を評価した。AGE は G2/M 期で遅延効果を示したため、G2/M 期で作用する細胞周期関連タンパク質として、サイクリン B1 と Cdk1 の発現量を評価した。その結果、AGE は DLD-1 細胞のサイクリン B1 と Cdk1 の発現量を濃度依存的に抑制することを明らかとした (Figure 3-13)。この結果は Ryu らが示した G2/M での細胞周期停止にサイクリン B1/Cdk1 タンパク質の発現量減少が関連するという報告 (39,99,100) と関連しており、AGE による G2/M 期での細胞周期遅延効果との関連を示唆する結果である。その一方で、G1 期から S 期移行に関連するサイクリン D1 の発現量に変化は無かった。つまり AGE が G1 期から S 期への進行には影響を与えない可能性を示唆している。

さらに、AGE によるサイクリン B1 発現抑制についてさらに検討するため、NF- κ B の活性化について評価した。NF- κ B は大腸癌を含め、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、肺癌で活性化しており、癌細胞の増殖に関与している (42, 105, 106, 107, 108)。そして、ヒト大腸の腫瘍組織においても活性化している報告がある (109)。一方で、NF- κ B の活性化を抑制することでサイクリン B1 の発現量が低下したという報告 (101, 102) があることから、サイクリン B1 の発現量を調整する因子として NF- κ B の活性化が想定されている。Pai らは xenograft モデル実験で、SAC が腫瘍組織の NF- κ B の核内移行を抑制することを示しており (81)、本研究においても、AGE が DLD-1 細胞に対して NF- κ B の核移行を抑制することが確認された (Figure 3-14)。つまり、AGE は NF- κ B の活性化を抑制する作用を持つことが確認された。

これらの結果より、AGE の作用機序として、AGE は腫瘍細胞で亢進した NF- κ B の活性化を抑制することで、サイクリン B1 の発現量を減少させ、そして、細胞周期の遅延を引き起こすことで、腫瘍細胞の増殖を緩やかに抑制させると考察することができる。

第四章 総括

第一章では緒言をまとめた。がんは本邦における最も高い死因であり、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。加齢と共に罹患リスクが高まるがんは、わが国の人口構成を考えると今後も増加することが容易想像される。このため国策として、治療の充実と共に予防への取り組みが強化されている(1)。米国は特に先進的であるが、本邦においても日常生活でがんの発生や発育のリスクを抑えることがますます重要となっている。

抗発癌効果のある食品はこれまでの研究で多く確認されているが、中でもニンニクはその期待が大きい(4)。そして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) はその安全性の高さから長期間の継続服用に適した素材であり、過去の研究において発癌予防効果が報告されている(48)。ただし、AGE が腫瘍の発育・進行に対する抑制効果についてはまだ不明な点が多く、その作用機序についての情報は少ない。そこで、本研究では AGE の抗腫瘍効果について、特に腫瘍の発育過程における効果や、その作用機序について解明することを目的として研究を行った。

第二章では、大腸化学発癌モデルラットを用いて AGE の抗腫瘍効果を検証した。ニンニクの作用の一つとして発癌物質の解毒・排出効果が知られているため(58, 59)、本検討では AGE による発癌剤の解毒効果の影響を排除した実験系にて検証を行った。DMH 処理による発癌誘導が起こっているラットに 3%(w/w) AGE 含有飼料を 23 週間摂餌させた。全実験期間を通じての体重、摂

餌量、飲水量および、解剖時の各臓器重量について、AGE 群とコントロール群で違いはなことから、長期間の AGE 摂餌がラットに対して悪影響は与えていないことが分かる。

AGE による腫瘍発育段階での抑制効果について、病理組織学的に検証した結果、観察された ACF や腺腫、腺癌の発生数は AGE 群で有意な減少効果が確認され、AGE による腫瘍発育の抑制効果が確認された (Table 2-5、Table 2-7、Table 2-9、Table 2-10)。

発育中の腫瘍で共通して起こるイベントの一つは、細胞の自律的な増殖である。PCNA は細胞増殖マーカーとして知られており、異形成病変や腫瘍の進行により発現量が亢進する(76, 77)。そして先行研究で、癌細胞の増殖抑制効果と PCNA 活性抑制効果が示されている。例えば、ニンニク由来の成分であるジアリルジスルフィド (DADS) によって増殖が抑制された乳癌細胞では PCNA の発現量も低下する (80)。また、AGE にも含まれる S-アリルシステイン (SAC) はマウスに移植した口腔癌細胞の PCNA 発現量を抑制した (81)。

本研究では、腫瘍組織の細胞について特に、同一組織型の病変同士で PCNA の発現量を免疫染色法にて解析したところ、中等度異型腺腫と腺癌の組織において、AGE が PCNA の発現量が低下させる結果を示した。一方、軽度異型腺腫組織では PCNA 発現量に違いはなく、正常腺管組織の増殖活性も群間で違いはなかった。本研究においても、先行の類似研究と同様の結果が得られ、AGE の抗腫瘍発育効果が腫瘍病変の細胞増殖活性の抑制に起因することを明らかにした。

第三章では、第二章で得られた AGE の腫瘍細胞への増殖活性抑制効果についてその機序を明らかにするため、AGE がヒト大腸癌細胞に与える影響とその

機序について検証した。

AGE はヒト大腸癌細胞株 DLD-1 細胞に対しても、濃度依存的にその増殖を抑制することが確認されたが、その抑制効率は緩やかであり、3 日間以上の培養で統計上有意差のある増殖抑制効果を確認した。また 4 日間の培養でも細胞は増殖傾向にあり、AGE の増殖抑制効果は強いものではないことが示された。一般的に癌細胞の細胞倍加時間は 1 日程度とされているため、細胞増殖を顕著に抑制する薬剤を使用すると、培養 1 日時点でも細胞数の違いを確認することができる。また、AGE の正常細胞に対する影響についてヒト正常繊維芽細胞 MRC-5 を用いて評価した結果、4 日間の培養でも増殖の抑制作用は確認されず、むしろ増殖を促進する傾向にあった。Table 1-1 にも示したが、ニンニクには 28 %の糖質が含まれており、水溶性の AGE にも糖質が含まれていることは十分考えられ、増殖活性が高くない正常細胞に対しては増殖エネルギーとして作用した可能性も考えられる。AGE は増殖活性が高い腫瘍細胞に対して特異的に増殖抑制作用を示すことが確認された。また Matsuura らも同程度の AGE 濃度でヒト大腸癌細胞株 HT29, SW480, SW620 細胞の増殖を抑制することを示しており (47)、本検討と一致する結果であった。

ニンニク由来のイオウ化合物 (DADS、DATS) は化学発癌動物モデルや、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌細胞株に対して抗腫瘍効果を示し、アポトーシスや細胞周期の停止作用との関連が報告されている(91)。AGE の増殖抑制効果がアポトーシスの誘導と細胞周期の停止作用に関係があるかどうかを検証したが(Figure 3-7、Figure 3-8、Figure 3-9、Figure 3-10)、AGE は DLD-1 細胞に対して特定の周期で細胞を停止させることはなく、さらに、アポトーシスの指標であるカスパーゼ 3 の活性化も誘導しなかった。これらの結果は AGE が細

胞に対して細胞周期の停止能やアポトーシスの誘導能を持たないことを示している。ニンニクから単離されたジアリルトリスルフィド (DATS) は癌細胞に対して G2/M 期で細胞周期を停止させ、BCL-2 ファミリータンパク質の発現量を調節してアポトーシスを誘導するとされている (91)。AGE がアポトーシスを誘導しなかった原因についてはまだ不明な点が多い。ただ、興味深いことに細胞周期を同調させた細胞を用いた実験において、AGE は細胞周期の速度を遅延させていることが確認された (Figure 3-11)。G1/S 期の境界で同調させた細胞は、通常培地に交換することで細胞周期が再開し、21 時間後には次のサイクルの S 期に移行していることから、DLD-1 細胞の増殖倍加速度は 21 時間程度であることが分かる。一方、10 mg/ml の AGE を添加した培地条件では G2/M 期での遅延が確認され、次の S 期への移行が 24 時間後に遅延していた。つまり、AGE は DLD-1 細胞の増殖倍加時間を 2-3 時間程度遅延させていることを示す結果が得られた。この結果を踏まえ、倍加時間の違いによる細胞増殖数の変化を試算したところ (Table 3-2)、細胞倍加時間が 21 時間から 24 時間程度に遅延した場合、2 日後で 19,504 個、16,000 個の違いしかなく、3 日後で 43,069 個、32,000 と識別可能な細胞差に増殖することが確認できた。この試算は Figure 3-4 で示した細胞増殖検討とほぼ同様の結果を示している。また、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 摂餌ラットの大腸腫瘍では PCNA 陽性細胞の比率が低下した結果 (Figure 2-13、Figure 2-14) と結び付けて考えることができる。

これら遅延効果の原因を検討するため、細胞周期調節因子のタンパク質発現量を検討した。AGE は G2/M 期での遅延効果を示したため、G2/M 期で作用する細胞周期関連タンパク質として、サイクリン B1 と Cdk1 の発現量を評価し

た。サイクリン B1 と Cdk1 複合体は細胞周期の G2 期から M 期へ移行する際の調節因子として重要な役割を担っており、G2/M 期で細胞停止させアポトーシスを誘導するベンジルイソチアシアネート (BITC) はサイクリン B1、Cdk1 の発現量を低下させることが報告されている(94)。本研究によって AGE は DLD-1 細胞のサイクリン B1 と Cdk1 の発現量を濃度依存的に抑制することが確認された。一方で、G1 期から S 期移行に関連するサイクリン D1 の発現量に変化は無く、G1 期から S 期への進行には影響を与えない可能性を示唆した。

さらに、AGE によるサイクリン B1 発現抑制効果について検討するため、NF- κ B 活性化との相関について評価した。NF- κ B は癌細胞の増殖に関与しており(108)、さらに、サイクリン B1 の発現量を調整する因子としても報告がある(101)。活性化 NF- κ B を評価する方法として核内移行した NF- κ B の量を検討した。その結果、AGE は濃度依存的に DLD-1 細胞の核内移行した NF- κ B 量を抑制することが確認された。

本研究によって、AGE は腫瘍細胞の発育抑制効果を有することが確認された。その AGE の作用機序として、AGE は腫瘍細胞で亢進した NF- κ B の活性化を抑制することで、細胞増殖調整タンパク質であるサイクリン B1 の発現量を低下させ、その結果、G2/M 期での細胞周期の遅延を引き起こさせ、最終的に、腫瘍の増殖活性を抑制させたと考察する。

本研究では大腸癌モデルラットを用いた病理学的な腫瘍形成評価および培養細胞を用いた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発見であり、AGE の新たな有効性を示した研究成果である。

現在そして将来、癌による死亡者は増加することが予想されており、日常生活において、発癌・発育を予防することが重要である。2012年に閣議決定されたがん対策推進基本計画(5)では、がんによる死亡者数減少を目指しており、がん医療の充実とともに、野菜摂取量の増加など、予防につながる生活習慣の啓蒙の重要性が記されている。また、2014年には消費者庁、厚生労働省、農林水産省から食品の新たな機能性表示制度に関する検討会報告書(110)が公表され、2015年4月からの運用開始に向けて準備が進められている。このように、科学的根拠の基で食品の新しい機能を見出すことにより、国民の健康が維持・増進することが期待されている。

本研究では、動物実験において、AGEの腫瘍発育抑制効果を示し、ヒト大腸癌細胞を用いて作用機序の一端を明らかにした。本研究成果は食習慣による大腸癌の予防効果を科学的に示したものであり、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。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました県立広島大学人間文化学部健康科学科 嶋本 文雄 教授に深甚なる謝意を表します。

また、折に触れて数々のご指導とご助言を頂戴しました県立広島大学生命環境学部生命科学科 達家雅明教授、県立広島大学生命環境学部生命科学科 小西博昭教授、県立広島大学経営情報学部経営情報学科 肖業貴教授に感謝申し上げます。

本研究を進めるに動物実験をサポートしていただいた県立広島大学人間文化学部健康科学科 病態病理学研究室 斉公営 博士、野添浩一郎、佐藤裕美、広川真由実の諸氏に感謝いたします。そして、標本作製にご協力いただきました土谷総合病院病理検査室 森脇奈美氏並びに同病理検査室の皆様感謝いたします。

本研究の機会を与えてくださった湧永製薬株式会社 湧永寛仁 社長、湧永寛信 副社長、ならびに前川尻真司 試薬・診断薬事業部部長に厚く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたりご指導、ご助言をいただいた岡孝巳 研究顧問、板倉啓壺 研究顧問に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり貴重なご意見、アドバイスをいただいた森原直明博士、創薬研究所 第一研究室の皆様へ深謝いたします。そして実験飼料作製にご協力いただいた小寺幸広 博士、今村和彦 博士に感謝いたします。

本研究を進めるにあたり多大なご協力をいただいた試薬・診断薬事業部の皆様へ感謝いたします。

最後に、本研究を行うにあたり常に励まし、協力し続けてくれた家族に心から感謝します。

参考文献

1. がんの統計'13_公益財団法人 がん研究振興財団、2013
2. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*; 87:159–170.1996.
3. Surh Y. J.: Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 768-780, 2003
4. Caragay A. B.: Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technol.*, 4, 65-68, 1992
5. がん対策推進基本計画, 厚生労働省, 2012年6月
6. Shimazu T., Wakai K., Tamakoshi A. et al.: Association of vegetable and fruit intake with gastric cancer risk among Japanese: a pooled analysis of four cohort studies. *Ann Oncol*: 1228-1233, 2014.
7. Perše M and Cerar A: Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol*: 1-14, 2011.
8. Tammariello AE and Milner JA: Mouse models for unraveling the importance of diet in colon cancer prevention. *J Nutr Biochem* 21: 77-88, 2010.
9. Chen J and Huang XF: The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biol Ther* 8: 1313-1317, 2009.
10. H. P. Glauert and M. R. Bennink: Metabolism of 1,2-dimethylhydrazine by cultured rat colon epithelial cells. *Nutrition and Cancer*, vol. 5, no. 2. 78–86, 1983.
11. C. T. Oravec, C. A. Jones, and E. Huberman: Activation of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine in a rat colon cell-mediated mutagenesis assay. *Cancer Research*, 46, 10, 5068–5071, 1986.
12. M. Takahashi, M. Mutoh, T. Kawamori, T. Sugimura, and K. Wakabayashi: Altered expression of β -catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat

- colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 7, 1319–1327, 2000.
13. R. F. Jacoby, X. Llor, B. B. Teng, N. O. Davidson, and T. A. Brasitus: Mutations in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 87, no.2, pp. 624–630, 1991.
 14. C. De Filippo, G. Caderni, M. Bazzicalupo et al.: Mutations of the Apc gene in experimental colorectal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats. *British Journal of Cancer*, vol. 77, no. 12, pp. 2148–2151, 1998.
 15. K. J. Sohn, M. Puchyr, R. N. Salomon et al.: The effect of dietary folate on Apc and p53 mutations in the dimethylhydrazine rat model of colorectal cancer. *Carcinogenesis*, vol 20, no. 12, pp. 2345–2350, 1999.
 16. C. A. Blum, T. Tanaka, X. Zhong et al.: Mutational analysis of Ctnnb1 and Apc in tumors from rats given 1,2-dimethylhydrazine or 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline: mutational 'hotspots' and the relative expression of β -catenin and c-jun. *Molecular Carcinogenesis*, vol. 36, no.4, pp. 195–203, 2003.
 17. K. Wakabayashi. Altered expression of β -catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethaneinduced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, vol. 21, no.7, pp. 1319–1327, 2000.
 18. Y. Yamada, N. Yoshimi, Y. Hirose et al.: Frequent β -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Research*, vol. 60, no. 13, pp. 3323–3327, 2000.
 19. A. P. Femia, P. Dolara, A. Giannini, M. Salvadori, A. Biggeri, and G. Caderni: Frequent mutation of Apc gene in rat colon tumors and mucin-depleted foci, preneoplastic lesions in experimental colon carcinogenesis. *Cancer Research*, vol. 67, no. 2, pp. 445–449, 2007.
 20. C. Liu and J. Crawford: The gastrointestinal tract. In *Robbins and Cotran Patologic Basis of*

- Disease, V. Kumar, A. Abbas, and N. Fausto, Eds., pp. 797–875, Elsevier Saunders, 2004.
21. 化学技術庁資源調査会編：四訂日本食品成分表, p.166, 250, 395, 420, 1993.
 22. 齋藤洋監修、湧永製薬株式会社：ニンニクの科学, 朝倉書店, 2000, p96, 106, 107
 23. Freeman F., Koderia Y. Garlic chemistry; stability of S-(2-propenyl)-2-propene-1-sulfinothioate (allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. *J. Agric. Food. Chem.*, 43, 2332-2338, 1995.
 24. Imada O.. Toxicity wild aspects of garlic. *Proceeding of First World Congress on the Health Significance of Garlic and Garlic Constituents*, 47, 1990.
 25. Brodnitz M. H., Pascale J. V., van Derslice L. J.. Flavor components of garlic extract. *J. Agric. Food Chem.*, 19, 273-275, 1971.
 26. Jezpwa L., Rafinski T., Wrocinski T.. Investigations on the antibiotic activity of *Allium sativum* L. *Herba. Pol.*, 12, 3, 1966
 27. Abuirmeileh N., Yu S. G., Qureshi H. Lin R. I-S. and Qureshi A. A.: Suppression of cholesterologenesis by Kyolic and S-allylcysteine. *FASEB J.*, 5, A 1756, 1991.
 28. Lawson L. D.: Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products. *Human medicinal agents from plants*, ACS Symp. Ser 534, Washington D. C., pp306-330, 1993.
 29. Vorberg G. and Schneider B.: Therapy with garlic: Results of placebo-controlled, double-blind study. *Br. J. Clin. Pract. Symp. Suppl.*, 69, 7-11, 1990
 30. Cao G., Sofic E. and Prior R. L.: Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3426-3431, 1996
 31. Horie T., Awazu S., Itakura Y., and Fuwa T: Identified diallyl polysulfides from an aged garlic extract which protects the membranes from lipid peroxidation. *Planta Med.*, 58, 468-469, 1992.
 32. Hirano T., Kasai H.: Oxidative stress and cancer. *Bio Clinica*, 13, 51-54, 1998
 33. Fleischauer AT, Poole C and Arab L: Garlic consumption and cancer prevention: meta-analyses of

- colorectal and stomach cancers. *Am J Clin Nutr* 72: 1047-1052, 2000.
34. Gao CM, Takezaki T, Ding JH, Li MS and Tajima K: Protective effect of allium vegetables against both esophageal and stomach cancer: a simultaneous case-referent study of a high-epidemic area in Jiangsu Province, China. *Jpn J Cancer Res* 90: 614-621, 1999.
 35. Sumiyoshi H and Wargovich MJ: Chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice by naturally occurring organosulfur compounds. *Cancer Res* 15: 5084-5087, 1990.
 36. Hatono S, Jimenez A and Wargovich MJ: Chemopreventive effect of S-allylcysteine and its relationship to the detoxification enzyme glutathione S-transferase. *Carcinogenesis* 17: 1041-1044, 1996.
 37. Wang X, Jiao F, Wang QW, et al: Aged black garlic extract induces inhibition of gastric cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Med Rep.* 5: 66-72, 2012.
 38. Xiao D, Pinto JT, Soh JW, Deguchi A, et al: Induction of apoptosis by the garlic-derived compound S-allylmercaptocysteine (SAMC) is associated with microtubule depolymerization and c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 activation. *Cancer Res* 63: 6825-6837, 2003.
 39. Knowles LM and Milner JA: Depressed p34 cdc2 kinase activity and G2/M phase arrest induced by diallyl disulfide in HCT-15 cells. *Nutr Cancer* 30:169-174, 1998.
 40. Shirin H, Pinto JT, Kawabata Y, et al: Antiproliferative effects of S-allylmercaptocysteine on colon cancer cells when tested alone or in combination with sulindac sulfide. *Cancer Res* 61: 725-731, 2001.
 41. Hosono T, Fukao T, Ogihara J, Ito Y, Shiba H, Seki T and Ariga T: Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of beta-tubulin. *J Biol Chem* 280: 41487-41493, 2005.
 42. Ban JO, Yuk DY, Woo KS, et al: Inhibition of cell growth and induction of apoptosis via inactivation of NF-kappaB by a sulfurcompound isolated from garlic in human colon cancer cells.

- J Pharmacol Sci 104: 374-383, 2007.
43. Sriram N, Kalayarasan S, Ashokkumar P, Sureshkumar A and Sudhandiran G: Diallyl sulfide induces apoptosis in Colo 320 DM human colon cancer cells: involvement of caspase-3, NF-kappaB, and ERK-2. *Mol Cell Biochem* 311: 157-165, 2008.
 44. Liang D, Qin Y, Zhao W, et al: S-allylmercaptocysteine effectively inhibits the proliferation of colorectal cancer cells under in vitro and in vivo conditions. *Cancer Lett* 310: 69-76, 2011.
 45. Dong M, Yang G, Liu H, Liu X, Lin S, Sun D and Wang Y: Aged black garlic extract inhibits HT29 colon cancer cell growth via the PI3K/Akt signaling pathway. *Biomed Rep.* 2: 250-254, 2014.
 46. Tanaka S, Haruma K, Kunihiro M, et al: Effects of aged garlic extract (AGE) on colorectal adenomas: a double-blinded study. *Hiroshima J Med Sci* 53: 39-45, 2004.
 47. Matsuura N, Miyamae Y, Yamane K, et al: Aged garlic extract inhibits angiogenesis and proliferation of colorectal carcinoma cells. *J Nutr* 136: 842S-846S, 2006.
 48. Katsuki T, Hirata K, Ishikawa H, Matsuura N, Sumi S and Itoh H: Aged garlic extract has chemopreventative effects on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *J Nutr* 136: 847S-851S, 2006.
 49. Hideki Ishikawa, Kanehisa Morimoto, et.al. Aged Garlic Extract Prevents a Decline of NK Cell Number and Activity in Patients with Advanced Cancer. *J Nutr.* 136 816S-820S 2006
 50. Kyo E, Uda N, Kasuga S and Itakura Y: Immunomodulatory effects of aged garlic extract. *J Nutr* 131: 1075S-10759S, 2006.
 51. Eikai Kyo, Yoichi Itakura, et.al. Immunomodulatory Effects of Aged Garlic Extract. *J. Nutr.* 131 1075S-1079S 2001
 52. Naoaki Morihara, Eikai Kyo et.al. Aged garlic extract enhanced production of nitric oxide. *Life Science* 71 509-517 2002
 53. Reynaert NL, Ckless K, Korn S.H. et al: Nitric Oxide represses inhibitory kappaB Kinase

- through S-nitrosylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*; 101(24): 8945–8950. 2004
54. Mannick JB, Schonhoff C, Papeta N et al.: Nitrosylation of mitochondrial caspases. *J. Cell Biol.*: 20(3):245–248. 2001.
 55. Naoaki Morihara, Hidekatsu Takeda, et.al. Aged Garlic Extract Ameliorates Physical Fatigue. *Biol. Pharm. Bull.* 29 (5) 962-966 2006
 56. Brady JF, Ishizaki H, Fukuto JM, Lin MC, Fadel A, Gapac JM, et al. Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chem Res Toxicol* ; 4: 642–647, 1991.
 57. Hong J. Y., Wang Z. Y., Smith T. J., and Zhou S.: Inhibitory effects of diallyl sulfide on the metabolism and tumorigenicity of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in A/J mouse lung. *Carcinogenesis*, 13, 901-904, 1992.
 58. Gudi V. A and Singh S. V.: Effect of diallyl sulfide, a naturally occurring anti-carcinogen, on glutathione-dependent detoxification enzymes of female CD-1 mouse tissues. *Biochem. Pharmacol.*, 42, 1261-1265, 1991.
 59. Liu J., Lin R. I. and Milner J. A.: Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumors and DNA adducts by garlic powder. *Carcinogenesis*, 13 (10), 1847-1851, 1992.
 60. Weisberger A. S. and Pensky J.: Tumor-inhibiting effects derived from an active principle of garlic (*Allium sativum*). *Science*, 126, 1112-1114, 1957.
 61. Kyo E., Uda N., Suzuki A., Kakimoto M., Ushijima M., Kasuga S., and Itakura Y.: Immunomodulation and anti-tumor activities of aged garlic extract. *Phytomedicine*, 5 (4), 259-267, 1998.
 62. Reddy BS: Colon carcinogenesis models for chemoprevention studies. *Hematol Oncol Clin North Am.* 12 (5), 963-973, 1998.
 63. M. J. Wargovich, A. Jimenez, K. McKee et al.: Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis*, 21, 6, pp. 1149–1155, 2000.

64. 大腸癌取扱い規約 第8版 大腸癌研究会／編 金原出版株式会社 2013年
65. Nelson KA, Sjögren HO, Rosengren JE.: Detection of antibodies to embryonic antigens in sera of multiparous or colon tumor-bearing rats by a new indirect immunofluorescence assay. *Int J Cancer*. 1977 Aug 15;20(2):227-233.
66. R. P. Bird: Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Letters*, 93, 1, 55–71, 1995.
67. M. Perčič and A. Cerar: The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat—experimental colorectal carcinogenesis. *Radiology and Oncology*, 39, no. 1, 61–87, 2005.
68. H. S. Park, R. A. Goodlad, and N. A. Wright: The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. *Cancer Research*. 57, 20, 4507–4510, 1997.
69. R. P. Bird. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Letters*, 37, 2, 147–151, 1987.
70. T. P. Pretlow, B. J. Barrow, W. S. Ashton et al.: Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Research*, 51, 5, 1564–1567, 1991.
71. T. P. Pretlow and T. G. Pretlow: Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1756, 2, 83–96, 2005.
72. H. Mori, Y. Yamada, T. Kuno, and Y. Hirose: Aberrant crypt foci and β -catenin accumulated crypts: significance and roles for colorectal carcinogenesis. *Mutation Research*, 566, 3, 191–208, 2004.
73. H. Mori, K. Hata, Y. Yamada, T. Kuno, and A. Hara: Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions*, 155, 1-2, 1–9, 2005.
74. K. Otori, K. Sugiyama, T. Hasebe, S. Fukushima, and H. Esumi: Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation.

- Cancer Research, 55, 21, 4743–4746, 1995.
75. E. A. McLellan, A. Medline, and R. P. Bird: Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. *Cancer Research*, 51, 19, 5270–5274, 1991.
 76. Hur K, Kim JR, Yoon BI, Lee JK, Choi JH, Oh GT and Kim DY: Overexpression of cyclin D1 and cyclin E in 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced rat colon carcinogenesis. *J Vet Sci* 1: 121-126, 2000.
 77. Janakiram NB, Mohammed A, Qian L, Choi CI, Steele VE and Rao CV: Chemopreventive effects of RXR-selective rexinoid bexarotene on intestinal neoplasia of Apc(Min/+) mice. *Neoplasia* 14: 159-168, 2012.
 78. Salim EI, Abou-Shafey AE, Masoud AA and Elgendy SA: Cancer Chemopreventive Potential of the Egyptian Flaxseed Oil in a Rat Colon Carcinogenesis Bioassay. Implications for its Mechanism of Action, *Asian Pacific J Cancer Prev*, 12, 2385-2392, 2011
 79. 西村和彦, 細川洋平, 藤本荘太郎, 土橋康成, 服部隆則, 川井啓市: PCNA 免疫組織化学によるヒト大腸腺腫の進展に伴う細胞増殖と増殖の場の変化の検討, *日本消化器病学会雑誌* 90(3), 647-654, 1993.
 80. Powolny AA and Singh SV: Multitargeted prevention and therapy of cancer by diallyl trisulfide and related Allium vegetable-derived organosulfur compounds. *Cancer Lett.* 269 305–314, 2008
 81. Pai MH, Kuo YH, Chiang EP and Tang FY: S-Allylcysteine inhibits tumour progression and the epithelial-mesenchymal transition in a mouse xenograft model of oral cancer. *Br J Nutr.* 14: 28-38, 2012.
 82. Kossoy G, Ben-Hur H, Stark A, Zusman I and Madar Z: Effects of a 15% orange-pulp diet on tumorigenesis and immune response in rats with colon tumors. *Oncol Rep.* 8(6), 1387-1391. 2001.
 83. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, et. Al: Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer.* 29; 91(11): 1931-1946. 2004.

84. Gong J, Traganos F and Darzynkiewicz Z: Growth imbalance and altered expression of cyclins B1, A, E, and D3 in MOLT-4 cells synchronized in the cell cycle by inhibitors of DNA replication. *Cell Growth Differ.* 6:1485–1493. 1995.
85. Jackman J and O'Connor PM: Synchronizing cells at the onset of Sphase by double thymidine block. *Curr Protoc Cell Biol* ; 8.3.11–12. 1998.
86. Schreiber E, Matthias P, Müller MM and Schaffner W.: Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* Aug 11, 17(15): 6419. 1989.
87. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, and Yuan J: Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171, 1996.
88. Watanabe W, Konno K, Ijichi K, Inoue H, Yokota T and Shigeta S.: MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo- and anti-paramyxoviral agents, *J Virol Methods.* 48,257-65 1994.
89. Skehan, P. et al.: Evaluation of Colorimetric Protein and Biomass Stains for Assaying Drug Effects Upon Human Tumor Cell Lines. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 30, 2436 , 1989.
90. Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA and Giaccone G: Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2002 8: 2024-2034, 2002.
91. Herman-Antosiewicz A, Powolny AA and Singh SV: Molecular targets of cancer chemoprevention by garlic-derived organosulfides. *Acta Pharmacol Sin* 28: 1355-1364, 2007.
92. Chang C.H., Yu F. Y., Wu T. S., Wang L. T. and Liu B. H.: Mycotoxin Citrinin Induced Cell Cycle G2/M Arrest and Numerical Chromosomal Aberration Associated with Disruption of Microtubule Formation in Human Cells. *Toxicol Sci.* Jan; 119 (1):84-92. 2011.
93. Lee J. Y., Leonhardt L. G. and Obeid L. M.: Cell-cycle-dependent changes in ceramide levels preceding retinoblastoma protein dephosphorylation in G2/M. *Biochem. J.* 334, 457-461 1998.

94. Xiao D, Vogel V and Singh SV: Benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells is initiated by reactive oxygen species and regulated by Bax and Bak. *Mol Cancer Ther* 5: 2931-2945, 2006.
95. Muschel RJ, Zhang HB, Iliakis G and McKenna WG: Cyclin B expression in HeLa cells during the G2 block induced by ionizing radiation. *Cancer Res* 51: 5113-5117, 1991.
96. Metting NF and Little JB: Transient failure to dephosphorylate the cdc2-cyclin B1 complex accompanies radiation-induced G2-phase arrest in HeLa cells. *Radiat Res* 143: 286-292, 1995.
97. Kao GD, McKenna WG, Maity A, Blank K and Muschel RJ: Cyclin B1 availability is a rate-limiting component of the radiation-induced G2 delay in HeLa cells. *Cancer Res* 57: 753-758, 1997.
98. Azzam EI, de Toledo SM, Gooding T and Little JB: Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat Res* 150: 497-504, 1998.
99. Ryu DS, Kim SH and Lee DS: Anti-proliferative effect of polysaccharides from *Salicornia herbacea* on induction of G2/M arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *J Microbiol Biotechnol.* 19: 1482-1489, 2009.
100. Knowles LM, Milner JA. Diallyl disulfide inhibits p34(cdc2) kinase activity through changes in complex formation and phosphorylation. *Carcinogenesis* ; 21: 1129-1134, 2000.
101. Guo G, Yan-Sanders Y, Lyn-Cook BD, et al: Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol Cell Biol* 23: 2362-2378, 2003.
102. Ozeki M, Tamae D, Hou DX, Wang T, Lebon T, Spitz DR and Li JJ: Response of cyclin B1 to ionizing radiation: regulation by NF-kappaB and mitochondrial antioxidant enzyme MnSOD. *Anticancer Res* 24: 2657-2663, 2004.
103. Lea MA, Rasheed M, Randolph VM, Khan F, Shareef A, and desBordes C.: Induction of histone

- acetylation and inhibition of growth of mouse erythroleukemia cells by S-allylmercaptocysteine. *Nutr Cancer*; 43: 90–102. 2002.
104. Morihara N, Ide N and Weiss N.: Aged garlic extract inhibits homocysteine-induced scavenger receptor CD36 expression and oxidized low-density lipoprotein cholesterol uptake in human macrophages in vitro. *J. Ethnopharmacol.* 134, 711–716, 2011.
105. Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD and Fidler IJ: Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 20: 4188-4197, 2001.
106. Lee SH, Lee CW, Lee JW, et al: Induction of apoptotic cell death by 2'-hydroxycinnamaldehyde is involved with ERK-dependent inactivation of NF-kappaB in TNF-alpha-treated SW620 colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 70: 1147-1157, 2005.
107. Saccani A, Schioppa T, Porta C, et al: p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res* 66: 11432-11440, 2006.
108. Tang X, Liu D, Shishodia S, et al: Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. *Cancer* 107: 2637-2646, 2006.
109. Hardwick JC, van den Brink GR, Offerhaus GJ, van Deventer SJ and Peppelenbosch MP: NF-kappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps. *Oncogene* 20: 819-827, 2001.
110. 食品の新たな機能性表示制度に関する検討会報告書_消費者庁、2014年7月30日