


論 文 要 旨

論 文 題 目

Inhibitory effect of rice bran-derived crude glycosphingolipid on colon  
preneoplastic biomarker lesions induced by azoxymethane in male  
F344 rats

(Azoxymethane 誘発 F344 雄ラット大腸前癌病変バイオマーカーにおけ  
る、米ぬか由来 glycosphingolipid の抑制効果について)

氏名 石川 希純 

## 論 文 要 旨

【背景】近年スフィンゴ脂質は細胞の分化や増殖、そしてアポトーシスの過程において分子的な関与をしていると報告されており、癌化学予防または治療の分野において注目されている。一方齧歯類を用いた大腸発癌研究では、変異陰窩巣 (aberrant crypt foci; ACF) 及び粘液枯渴巣 (mucin depleted foci; MDF) が短期間の腫瘍発生研究において有用なバイオマーカーとして知られている。

【目的】Crude glycosphingolipid (cGSL) を Azoxymethane (AOM) 誘発大腸腫瘍モデルに投与し、誘発される病変において cGSL の抑制効果を肉眼的に観察する。さらに cGSL の細胞増殖およびアポトーシスに及ぼす影響を免疫粗組織学的に探索する事を目的とした。

【方法】5週目の雄 F344 ラットを6グループに分け、1から4のグループには AOM を体重あたり 20 mg/kg 投与し、残りの2グループは非投与のコントロール群とした。AOM の投

与後グループ2, 3, 4にはそれぞれ250、1,000、3,000ppmのcGSLを5週間摂取させ、摂取開始から5週間後に屠殺し大腸を摘出した。摘出大腸にてAlcian blue染色を行い、ACF及びMDFを同定した。それぞれの個数ならびに各病変を構成する腺管数を計測した。計測の後病変を含む大腸組織の細胞増殖因子PCNA、アポトーシス因子caspase-3の免疫組織染色を行った。

【結果】cGSLの摂取によりACFはAOM単独のグループ1に比べ有意に抑制され(グループ3及び4;  $P < 0.05$ )、更にMDFにおいても同様に有意に抑制された(グループ2、3及び4;  $P < 0.05$ )。グループ3と4はグループ1に比較すると上皮におけるPCNA指標が弱かった( $P < 0.05$ )。また、両グループのCaspase-3陽性指標はグループ1に比し高い値を示した( $P < 0.05$ )




【考察】本研究において、cGSLの経口摂取がAOM誘発ACFとMDFの発生を有意に抑制す

ることがわかった。また、cGSL投与したラットにおいては濃度依存的に細胞増殖活性が抑制されていた。更に、cGSLの摂取はAOM投与した大腸上皮細胞のcaspase-3の指標を濃度依存的に増加させている。これらの結果より、cGSLは細胞増殖を抑制し同時にアポトーシスを活性化することで大腸の前癌病変を抑制するということが明らかとなった。

【結語】cGSLは本実験の短期大腸発癌システムにおいて、その細胞増殖とアポトーシスを制御することで有用な化学予防効果を発揮した。今後この抑制効果の更なる分子学的レベルの検索と、cGSLの長期の大腸発癌システムにおける化学予防効果の検討が必要である。

(別紙様式第7号)

## 論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第326号 論文博	氏名	砂川 奈穂
論文審査委員	審査日	平成 21年 1 月 6 日	
	主査教授	加藤 誠也 	
	副査教授	西巻 正 	
	副査教授	斎藤 誠一 	
(論文題目)			
<p>Inhibitory effect of rice bran-derived crude glycosphingolipid on colon preneoplastic biomarker lesions induced by azoxymethane in male F344 rats</p>			
(論文審査結果の要旨)			
<p>上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、 学術的水準等につき慎重かつ公正に検討し、以下のような審査結果を得た。</p>			
<p>1. 研究の背景と目的</p> <p>がん化学予防の研究は、medical herb, fruit, vegetableなどの植物性成分を in vitro および in vivo system を用いて検討するものである。今回、米糠から抽出 された粗スフィンゴ糖脂質(crude glycosphingolipid ; cGSL)は、セラミドに 糖が付加したスフィンゴ脂質であり、生体内ではその代謝物が腫瘍細胞の増殖 抑制に関与していると報告されているが、未だ不明な点が多い。本研究では、 すでにラットにおいて大腸癌前癌病変バイオマーカーとして確立されている異 常陰窩巢(Aberrant crypt foci; ACF)および粘液枯渴巢(mucin depleted foci ; MDF)を用い、cGSL の前癌病変形成に及ぼす抑制効果と、その作用機序を増 殖・アポトーシスの細胞機能面で評価することを目的とした。</p>			
<p>2. 研究内容</p> <p>5週齢の F344 雄ラットを 6 グループに分け、グループ 1 は陽性対照群とし て基礎食(CE-2)を、グループ 2、3、4 には cGSL を 250、1,000、3,000ppm の 濃度で混餌投与した。グループ 5 は副作用検討の為に 3,000ppm の cGSL を、 グループ 6 は陰性対照群として基礎食のみを与えた。グループ 1 から 4 には大 腸癌発癌物質である Azoxymethane (AOM)を 20mg/kg 体重で投与した。開始</p>			

から5週目で全てのラットを屠殺し大腸を摘出、アルシアンブルー染色(pH2.5)を施し、MDFの個数並びにその腺管数を計測した。その後、摘出腸管を0.5%メチレンブルーで染色し同様にACF数の計測を行った。更にこれら大腸組織から薄切切片を作り、細胞増殖能マーカーとして proliferating nuclear cell antigen (PCNA) およびアポトーシスマーカーとして cleaved Caspae-3 の免疫染色を行った。結果として、ACF 総数は、cGSL 投与群ではコントロール群に比べ、低濃度の 250ppm 投与群以外で有意に減少を示した。また、MDF 総数は、全ての cGSL 投与群はコントロール群に比べて有意に減少を示した。一方、免疫染色では、PCNA 標識率は cGSL 投与群では、コントロール群に比べ 250ppm 投与群以外で有意に減少していた。また cleaved Caspase-3 陽性率は 250ppm 投与群以外で有意に増加していた。以上の結果から、F344 雄ラットを用いた AOM 誘発大腸癌前癌病変モデルにおいて、cGSL の混餌投与は二つの異なる大腸癌前癌病変、すなわち ACF と MDF の形成を抑制し、さらに背景の大腸粘膜組織において、上皮細胞の細胞増殖を抑制し、かつアポトーシスを誘導させることが示唆された。

### 3. 研究成果の意義と学術的水準

スフィンゴ脂質の腫瘍抑制効果を *in vivo* 及び *in vitro* で検討している報告は近年増加してきているが、本研究のように大腸癌前癌病変バイオマーカーを用いての検討ならびに組織レベルでの細胞増殖の抑制、アポトーシス活性の促進を明らかにしたものは過去にはない。また、一般的に他の研究においては、スフィンゴ脂質は多くの動物材料を基に抽出されており、狂牛病等の危険性は見過ごせず、本研究で使用した米糠等の植物由来のものでの研究は未だ少ない。スフィンゴ脂質及びその代謝産物であるセラミドの腫瘍についての抑制メカニズムは、さらに解明されていく必要があるが、今回の研究がその基盤となり今後の大腸癌化学予防の分野の発展に大きく寄与すると考えられる。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものと判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
  - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。