

<平成 22 年度助成>

## 自然免疫関連ペプチドを指標とした食品成分の 安全性評価法の構築

高橋 夏子

(北海道大学大学院医学研究科)

### 緒 言

がんは日本の死亡原因の第一位を占めており<sup>1)</sup>、分子標的薬を中心としたがん治療法が急速に発展している現在においても完治は難しく、がん患者の数は今後も増加の一途を辿ることが予想される。

一方、がん患者の多くに、手術および抗がん薬の副作用による侵襲から腸粘膜の萎縮、さらには腸管免疫の機能低下が惹起されることが指摘されている。このような問題を背景に、がん患者の免疫賦活を目的としたサプリメントの市場が拡大しているが、エビデンスに乏しいものが存在するため使用に際しては注意が必要とされる。さらに、近年の医療費の増大や患者の QOL (Quality of life) 向上に対する意識の変化からも機能性食品の使用が増加し、健康被害が報告されるようになった。がん患者の安全の担保および QOL 向上の観点から、経口摂取された機能性食品および薬物が最初に接触する防御機構、すなわち腸管免疫の食-薬間相互作用の科学的検証が極めて重要な因子となる。

近年、小腸パネート細胞から分泌される抗菌ペプチド、 $\alpha$ -defensin が腸管免疫の分野で注目されている。このペプチドは、微生物に対する生体防御機構としてだけでなく、クローン病のような腸管疾患との関連<sup>2)</sup>や腸管免疫との関連<sup>3)</sup>等、生体における重要性が報告されている。

本研究では、がん患者における機能性食品と経口抗がん剤併用による影響を  $\alpha$ -defensin を指標とした免疫能の観点から科学的根拠に基づいて提示

するとともに、がん治療における食品機能性成分の有用性を明らかにすることを目的とする。

### 実験方法

#### 1. 使用細胞

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を使用した。理化学研究所バイオリソースセンターより購入した Caco-2 細胞を継代数 45-60 で使用した。Caco-2 細胞の培養には、DMEM に 10% (v/v) FBS, 0.1 mM NEAA, 2 mM L-グルタミン、100 IU/mL ペニシリン-100 ng/mL ストレプトマイシンを添加した培養液を用いた。培養は 75 cm<sup>2</sup> フラスコに培養液 15 mL を加え、37°C-5% CO<sub>2</sub> 下で行った。

#### 2. 細胞生存率の評価法

細胞生存率の評価は、3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay<sup>4)</sup>にて行った。細胞懸濁液を  $5 \times 10^4$  cells/mL に調製し、96 穴平底マイクロプレート (FALCON<sup>®</sup>, Becton Dickinson) に 50  $\mu$ L/well ずつ播種した。37°C-5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した後、終濃度に合わせて調製した薬液を 50  $\mu$ L/well ずつ添加した。CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて一定時間薬液を培養細胞と接触させた。反応終了前に培養液 100  $\mu$ L に対し 0.5% MTT-PBS ストック溶液 (滅菌 PBS に MTT を溶解して調製) を 10  $\mu$ L/well ずつ添加しインキュベーター内で発色させた。反応後、培養液を吸引除去し、DMSO を 200  $\mu$ L/well ずつ添加して細胞を溶解し、マイクロプレートリーダー (Wallac 1420 ARVOsx, Perkin Elmer) にて 590 nm にお

ける吸光度を測定し、生成した MTT formazan の吸光度を求めた。細胞生存率は薬物未処理群 (control) の吸光度に対する薬物処理群の吸光度の比 (% of control) を示した。また、inhibitory concentration 50% (IC<sub>50</sub> 値) の算出には解析ソフト Origin 8.1J<sup>®</sup> を用いた。

### 3. $\alpha$ -defensin mRNA の測定

#### 1) Caco-2 細胞からの total RNA の抽出

Caco-2 細胞  $1 \times 10^5$  cells/mL 懸濁液を調製後、6 well プレート (coster) に 2 mL/well ずつ播種し、37°C-5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内でコンフルエントとなるまで培養を行った。その後、抗がん薬としてテガフルおよび機能性食品として Epigallocatechin gallate (EGCg) を添加し、規定の時間細胞に接触させた。テガフルおよび EGCg 処理後、培養液を吸引し氷冷した PBS を加えた。セルスクレーパーにより細胞をかきとり、遠心分離 (1,500  $\times$  g, 5 min, 4°C) により細胞を回収した。回収した細胞を氷冷した PBS で洗浄後、ISOGEN<sup>®</sup> 0.5 mL に溶解させた。ISOGEN 溶液に chloroform 0.2 mL を加え、15 秒間激しく転倒混和し、室温で 3 分間静置した。遠心分離 (12,000  $\times$  g, 15 min, 4°C) により得られた上清に 2-propanol 0.5 mL を加え、室温で約 5 分間静置した。その後、遠心分離 (12,000  $\times$  g, 10 min, 4°C) により沈殿を回収し、70% ethanol 1 mL を加えた。遠心分離 (7,500  $\times$  g, 10 min, 4°C) を行い、沈殿した total RNA を乾燥後、RNase free water (DEPC-treated water) に溶解させた。

#### 2) 逆転写反応

逆転写反応は、ReverTra Ace を用い、得られた total RNA 5  $\mu$ g について逆転写反応を行い cDNA を合成し、Real-time PCR のテンプレート DNA として用いた。なお、逆転写反応には iCycler<sup>™</sup> (BIO-RAD) を使用した。

#### 3) Real-time PCR

Real-time PCR は、Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green

qPCR SuperMix UDG を用い、95°C で 15 分間変性させた後、さらに 94°C で 30 秒間変性、60°C で 30 秒間アニーリング、72°C で 10 分間伸長の条件で 40 サイクル増幅させた。Human defensin 5 (HD-5)、Human defensin 6 (HD-6)、GAPDH のプライマーは以下のものを用いた。

HD-5 forward: 5'-cgccatccttgctgccattct-3',

HD-5 reverse: 5'-aacggccggttcggcaatagc-3',

HD-6 forward: 5'-gtggggcaaatgaccaggact-3',

HD-6 reverse: 5'-tcctcagaggcagcagaatc-3',

GAPDH forward: 5'-atgggaagctggtcatcaac-3',

GAPDH reverse: 5'-gtggttcacacccatcaca-3'。

また、反応および検出には、Mx3000<sup>™</sup> Real-Time PCR System (STRATAGENE) を使用した。実験の結果は HD-5 および HD-6 の結果を GAPDH で割り、コントロールの値を 100% に換算したときの相対値を示した。

#### 4) 統計処理

データは平均  $\pm$  標準偏差で表示した。多群間の比較には one way ANOVA および Duncan test を行い解析した。危険率 5% 未満を統計学的有意とした。

## 結果と考察

### 1. Caco-2 細胞における $\alpha$ -defensin mRNA 量に対するテガフルおよび Epigallocatechin gallate (EGCg) の影響

機能性食品の安全性評価法の構築に必要な基礎的知見を得るため、テガフルおよび EGCg の曝露時間を変動させ  $\alpha$ -defensin mRNA 量を評価した。

予備培養後、テガフルおよび EGCg を 3、6、12、24、48 時間曝露し Caco-2 細胞を培養した。各設定時間曝露後、Caco-2 細胞より RNA を抽出し cDNA を合成、Real-time PCR に用いた。その結果、HD-5 mRNA 量は 3 時間で顕著な減少を示し、12 時間まで時間依存的に回復し、48 時間にかけて再び減少した (図 1-a)。また、HD-6 で

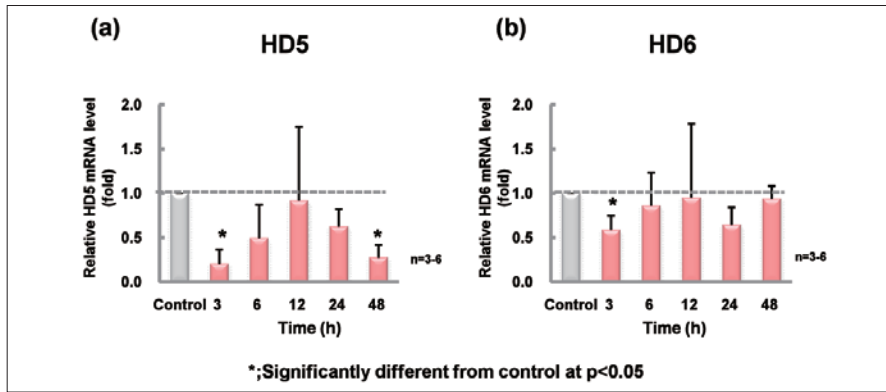


図1 テガフルール曝露がHD-5/6 mRNA量に及ぼす影響

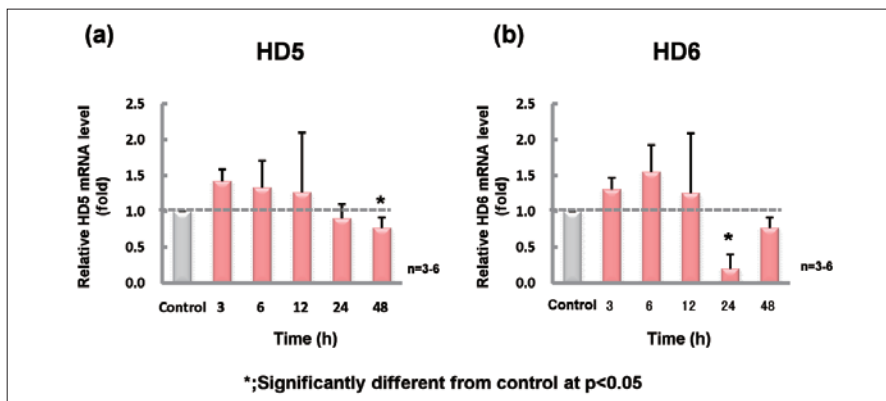


図2 EGCg曝露がHD-5/6 mRNA量に及ぼす影響

は3時間曝露において有意な減少が確認され、12時間にかけて回復後は大きな変動を示さなかった(図1-b)。一方、EGCg曝露においては、HD-5およびHD-6 mRNA量共に早い段階での増加が見られ、12時間後減少傾向を示した(図2-a, b)。この理由については、EGCgの分解物による影響が考えられるが、現在のところ不明である。また、テガフルールおよびEGCgの曝露濃度の違いが $\alpha$ -defensinに与える影響については、実際の投与を想定し、腸管に曝露されうる1から100 $\mu$ Mの濃度範囲で検討を行った。設定時間は、自然免疫系の発動が早期であること、またテガフルール曝露によるHD-5およびHD-6 mRNA量減少が顕著であった3時間とした。テガフルール曝露においては、1、10 $\mu$ M曝露でHD-5およびHD-6 mRNA量に変化は見られなかったが、100 $\mu$ Mにおいて、両 mRNA量の低下が確認された(data not shown)。また、EGCg曝露においては、濃度の違いによるHD-5およびHD-6 mRNA量の変動は観察されな

かった。

## 2. テガフルールおよび Epigallocatechin gallate (EGCg) 曝露による Caco-2 細胞に対する障害性

1の検討で得られた $\alpha$ -defensinの変動が細胞障害性に起因するものであるか確認するため、テガフルールおよびEGCgの曝露濃度、時間を変動させMTT assayにて評価した。

テガフルールの曝露濃度の違いによる細胞障害性の検討では、1、10、100 $\mu$ Mにおいて細胞障害性は確認されなかった(図3-a)。また、EGCg曝露においても、1から100 $\mu$ Mにおいて細胞障害性は確認されなかった(図3-b)。テガフルールの曝露時間の違いが細胞生存率に与える影響では、24時間目まで顕著な変動は確認されなかったが、48時間曝露において細胞生存率の低下が見られた(図4-a)。また、EGCg曝露においては、3時間から48時間まで細胞障害性は確認されなかった(図4-b)。以上の結果より、各条件における検討

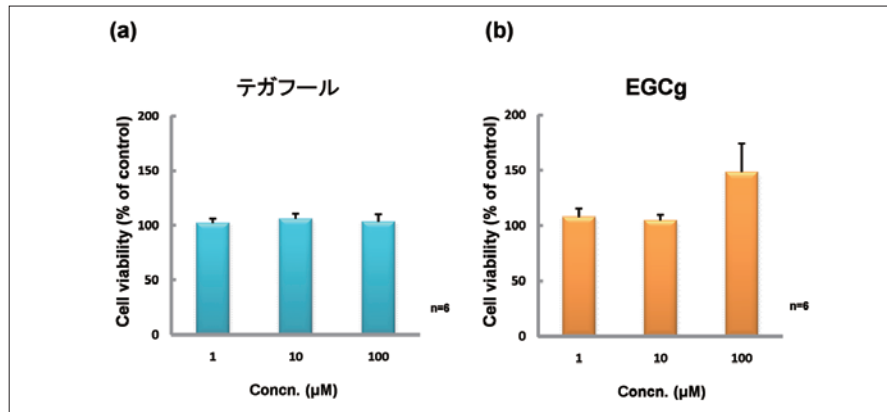


図3 テガフルおよびEGCgの曝露による細胞障害性(濃度)

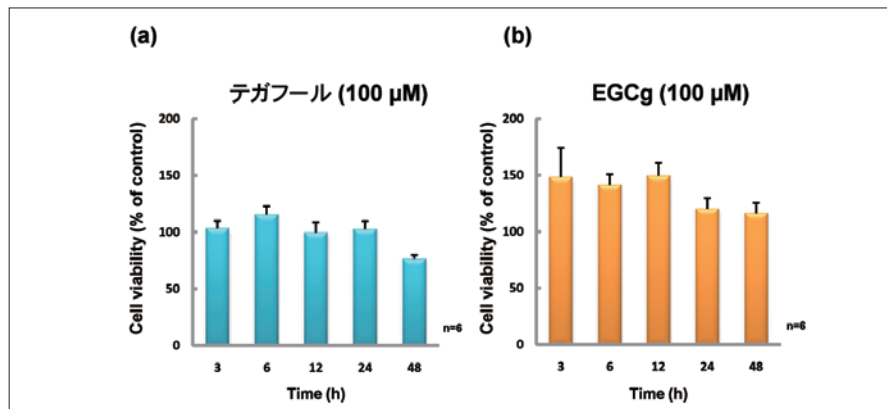


図4 テガフルおよびEGCgの曝露による細胞障害性(時間)

は適切であると判断し、以下の検討を行った。

### 3. テガフルによる $\alpha$ -defensin mRNA量の減少に対するEGCgの影響

EGCg併用がテガフルのHD-5およびHD-6 mRNA量低下に及ぼす影響を評価した。

テガフルおよびEGCgの曝露時間は、自然免疫系の働きが早期であることを考慮し3時間に設定した。また、テガフルの濃度は、1の検討より変動が見られた100 $\mu$ Mとし、1、10、100 $\mu$ Mの各濃度のEGCgを同時に曝露した時の影響を

評価した。

EGCg曝露濃度依存的に、テガフルによるHD-5およびHD-6 mRNA量減少を抑制する傾向が見られた。特に、HD-5における抑制効果は、HD-6と比較しより低濃度で効果があることが明らかとなった(表1)。

以上の結果より、EGCgは腸管において、テガフルによる $\alpha$ -defensin mRNA量減少を抑制することが示され、抗がん薬治療による免疫低下を改善できる食品素材となり得る可能性が示唆された。

表1 FTによるHD-5およびHD-6 mRNA量低下にEGCgが及ぼす影響

	Relative mRNA level (fold)	
	HD5	HD6
FT	0.21 $\pm$ 0.16 *	0.59 $\pm$ 0.17 *
FT+ EGCg 1	0.81 $\pm$ 0.24 ns	0.63 $\pm$ 0.29 ns
FT+ EGCg 10	1.11 $\pm$ 0.39 ns	0.98 $\pm$ 0.34 ns
FT+ EGCg 100	1.06 $\pm$ 0.34 ns	1.29 $\pm$ 1.21 ns

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of 6-8 determinations.  
\*:Significantly different from control at  $p < 0.05$ ; ns; not significant

## まとめ

がん治療においては、治療費が高額になることや奏効率の低さから、がん患者が補完代替医療としてサプリメントを併用するケースが増えている。しかしながら、サプリメントの使用は恩恵をもたらすばかりではなく、それ自体もしくは薬剤との併用による健康被害を被る可能性があり、利用するには注意が必要とされる。本研究では、がん患者に汎用され、且つ日常的にも摂取される機能性食品成分の一つである茶ポリフェノールに着目し、腸管免疫への影響から安全性評価を試みた。

腸管上皮細胞が産生する抗菌性ペプチドである $\alpha$ -defensinの発現に対する経口抗がん薬と機能性食品成分の影響を検討した。腸管モデル細胞であるCaco-2を用い、テガフル曝露によるHD-5 mRNA量への影響を確認したところ、HD-5 mRNA発現量は減少し、短時間の曝露で最も減少することが明かとなった。さらに、機能性食品成分であるEGCgを同時添加したところ、テガフルによるHD-5およびHD-6 mRNAの減少を抑制する効果が認められた。

近年、健康の保持、病気の予防・治療などを目的とした多くの機能性食品が市場に出回り、国民の8割以上が利用経験を有し、日常生活に欠くことのできないものとなりつつある。一方で、わが国で販売されている機能性食品は科学的に機能が

実証されていないものも数多く存在し、機能性食品と医薬品の併用による健康被害が問題となっている。

本研究において確立された評価法は、機能性食品の安全性評価における新たな基準となり、がん患者のみならず、生活習慣病を予防する食品の探索等、健常人の健康維持・増進にも役立つことを大いに期待する。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大な研究助成を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者各位に心より感謝を申し上げますとともに、貴財団の将来にわたる益々のご発展をお祈り申し上げます。

本研究助成による成果は、第21回日本医療薬学会年会(神戸)において演題名:「Epigallocatechin gallateが経口抗がん薬由来の腸管免疫低下に与える影響」で発表した。

## 文献

- 1) 「平成22年人口動態統計の概況」厚生労働省 大臣官房統計情報部, 2010.
- 2) Tanabe H. *et al.* *BBRC*, 2007.
- 3) Masuda K. *et al.* *Adv Otorhinolaryngol*, 2011.
- 4) Mosmann T., *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55-63 1983.

## Establishment of a safety evaluation system for functional food by innate immune peptide $\alpha$ -defensin

Natsuko Takahashi

*Graduate School of Medicine, Hokkaido University*

Supplements are being used by many cancer patients to alleviate side effects of chemotherapy and therapy-related symptoms such as immune compromise. Some nutraceuticals have been approved as dietary foods for special medical purposes for cancer patients. However, the most pressing problems associated with these products are presence of incorrect assumption and absence of regulatory oversight. In addition, interactions between supplements and anticancer drugs may increase or decrease the pharmacological or toxicological actions.

The effect of epigallocatechin gallate (EGCg) on suppression of the immune system by tegafur, an oral 5-FU prodrug, was investigated. We focused on  $\alpha$ -defensins and examined the effect of EGCg on the expression of  $\alpha$ -defensins in intestinal epithelial Caco-2 cells in this study.  $\alpha$ -Defensins (HD-5: human defensin 5, HD-6: human defensin 6) are abundant constituents of mouse and human paneth cells and play a role in the innate immune system in the intestine. We detected HD-5 and HD-6 mRNA in Caco-2 cells by real-time PCR analysis and evaluated the effects of an anticancer drugs and functional foods on HD-5 and HD-6 mRNA levels. HD-5 and HD-6 mRNA levels were decreased by exposure of tegafur. On the other hand, EGCg increased HD-5 and HD-6 mRNA levels. The tegafur-induced decrease in HD-5 and HD-6 mRNA levels was almost completely suppressed by EGCg. These results indicate that EGCg suppressed the expression of  $\alpha$ -defensins induced by FT at the transcriptional level in Caco-2 cells, suggesting that EGCg can be used an adjunctive therapy in chemotherapy.