

博士論文の内容の要旨

氏名	河原誠一
学位名	博士（農学）
学位授与年月日	2020年3月20日
論文題目	抗腫瘍活性を有するプロアントシアニジンオリゴマーに関する研究

(博士論文の内容の要旨)

1. ブドウ梗由来抗腫瘍性プロアントシアニジンオリゴマーの構造と性状

ワイン用のブドウは今や世界中で栽培されるようになったが、ジュースと異なり搾汁率は70%程度であるため残りが残渣として廃棄されている。これまで、この残渣（産業廃棄物）の有効活用法の開発はワイン企業にとって重要な課題となっていた。また、廃棄資源の有効活用法の開発は、持続可能な社会を実現するために社会的にも求められている。信州大学の藤井らは、ブドウ果柄残渣成分にがん細胞増殖抑制活性だけではなく、ヒト前立腺がん細胞株 (PC-3) において、浸潤や転移促進遺伝子 FABP5 (Fatty acid-binding protein 5) の発現を顕著に抑制する活性を見出した。本研究では、活性成分を同定するために、シャルドネ (*Vitis vinifera*) の梗からポリスチレン系多孔性合成吸着剤 Amberlite XAD を用いることによって抗腫瘍活性を有するプロアントシアニジンオリゴマーを効率よく濃縮することに世界に先駆けて成功した。また、FABP5 遺伝子の発現を抑制する化合物が (Epi) catechin の5量体以上であることを明らかにした。精製した活性画分を LC-TOFMS (Liquid chromatography- time-of-flight mass spectrometry) により詳細に分析し、重合度の異なるプロアントシアニジンオリゴマーを検出したが、主要活性分子は、(Epi) gallocatechin, gallate 基を1つずつ含んだ8量体と10量体であることが推定された。MS分析法は、MS/MS、MS クロマトグラフィーおよびコリジョンエネルギーの段階的な付加エネルギーの変更を行い、推定質量を裏付けるデータを得た。観測した $[M+H]^+$: 2475.5425 (実測値)、 $[M+H]^+$: 3051.6587 (実測値) が理論値および同じ分子式と比較し間違いのないことを確認した。10量体については精製量が少なかったため他の分析に供することができなかった。また、マスカットベリーA (ラブラスカ系品種) の梗においても同様の分画に顕著な FABP5 遺伝子の発現抑制活性があったことから、シャルドネ (ビニフェラ系品種) だけでなく、種々のブドウの梗抽出物には抗腫瘍活性成分が含まれていることが確認できた。

次に、上記抗腫瘍活性を有するプロアントシアニジンオリゴマーの生体に対する安全性を、細菌 *Salmonella typhimurium* 及び *Escherichia coli* を用いる復帰突然変異試験、ラットの単回経口投与による急性毒性試験 (2000 mg/kg) で評価した。その結果、プロアントシアニジンオリゴマーには有意な細胞毒性は検出されなかった。次に、in vivo におけるプロアントシアニジンオリゴマーの抗腫瘍活性を評価するために、担がんマウスへの混餌 (5% w/w) 反復投与試験を行った。その結果、担がんマウスは見かけ上正常であったが、コントロール群に比べて体重の減少が見られたため、混餌含量を2.5% w/w へ変更した。その結果、体重減少は回復し、がん細胞は縮小したが、肝重量の減少がみられた。

2. 小豆由来抗腫瘍性プロアントシアニジンオリゴマーの構造と性状

小豆は古くから日本人に親しまれてきた食品である。これまでの研究で、小豆種皮の赤色はアントシアニンに由来するもので、餡の紫色はカテキノピラノシアニンとシアニジンの縮合物であることが報告されている。本研究では、小豆抽出物由来抗腫瘍性新規プロアントシアニジンオリゴマーを同定するために、活性分子の精製に取り組んだ。

小豆粗抽出物を種々のクロマトグラフィー (Amberlite XAD など) で精製し、抗腫瘍活性を有するプロアントシアニジンオリゴマーを効率よく濃縮した。各精製画分を抗腫瘍活性試験に供したところ、ブドウの場合と同様に、プロアントシアニジンオリゴマーに富む分画に顕著な FABP5 遺伝子の発現抑制活性が認められた。上記の活性画分を LC-TOFMS で分析したところ、ブドウの場合と同様に5量体以上のオリゴマー (<7量体) の存在が示唆された。

次に、蛍光標識 (Green fluorescent protein: GFP 化) した PC-3 担がんマウスを用いて、小豆由来プロアントシアニジンオリゴマー含有飲料水 (0.2% w/v) を4週間経口投与したところ、有意な体重変化もなく、がん細胞の大きさがコントロール群に比べて面積で35.5%、重量で50%の縮

小がみられた。ブドウ抽出物を用いた実験結果とは異なり、小豆由来プロアントシアニジンオリゴマーでは顕著な抗腫瘍作用が確認できた。今後両者の実験結果の相違について検討する必要がある。

ブドウ以外の植物や部位から同様の抗腫瘍活性分子を得たことは、プロアントシアニジンオリゴマーがブドウだけに含まれているのではなく、シキミ酸経路から芳香族アミノ酸、フェニルプロパノイド、シンナモイル-CoA からさらにフラボノイド類生成、重合に至る2次代謝産物の生合成経路を有する植物には普遍的に含まれていることがわかった。したがって、植物由来成分には疾患の予防や発症・進展抑制作用など、ヒトの健康維持増進において重要な役割を果たす新規生理活性物質が含まれている可能性が期待される。このように、本研究では新たに開発した精製法を駆使することによって、種々の植物成分から抗腫瘍活性を有するプロアントシアニジンオリゴマーを効率的に濃縮する方法を開発することができた。今後、プロアントシアニジンオリゴマーの細胞内及び体内動態を詳細に解析し、この化合物による抗腫瘍活性発現機構を明らかにする計画である。