



講師  
寺崎 将

- 2003年 北海道大学大学院水産科学研究院  
博士課程修了 博士(水産科学)
- 2003年 食品総合研究所食品素材部  
脂質素材研究室 postdoc
- 2005年 国立がんセンター研究所がん予防  
基礎研究プロジェクト  
リサーチレジデント
- 2007年 共和コンクリート工業 海藻技術  
研究所 主任研究員
- 2009年 北海道医療大学薬学部衛生薬学  
講座 講師
- 2016年 同大学 がん予防研究所 (兼任)

## フコキサンチンによるマウス大腸がん予防へ寄与する

### 腸内細菌の解明

#### 背景・目的

我が国では、がん粗死亡率増加に伴う医療費は著増しており、国の財政を圧迫している。従って、がんの予防及び治療法の開発は喫緊の課題となっている。これまで、がん予防が期待できる食品や天然化合物は数千種類報告されている。しかし、日本人の生涯を通じて美味しく食べられ、家計に占める食費負担が少なく、かつ、がんの1次予防効果が期待される成分を豊富に含む食品はほとんどないと言える。フコキサンチン(Fx)は、高極性カロテノイドの一つであり、日本人や他のアジア人が日常的に摂取しているワカメ等に豊富に含まれている。我々は Fx によるマウス大腸がん化学予防に関する知見を数報発表してきた (Terasaki *et al.*, 2019a and 2019b)。しかし、Fx またはワカメによるがん予防作用分子機序について、まだ未解明な点が多い。近年、腸内細菌叢の変質とそれによってもたらされる特定の細菌の増殖が、大腸がんの発症や予防へ寄与することが明らかとなってきた (Ray and Kidane, 2016; Tomasello *et al.*, 2014)。腸内細菌叢の解析には、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析は必須となっている。これまでカロテノイドを豊富に含む食品の摂取により腸内細菌叢が変質する報告は散見されるが (Lyu *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018)、Fx 摂取による腸内細菌の変質や、腸内細菌と大腸組織の分子レベルでの関連性を明らかにした知見はほとんどない。

そこで本研究では、病理解析及び次世代シーケンサー (NGS)によるメタゲノム解析等の手法を用いて、Fx による大腸内の細菌群の変質作用とマウス大腸がん予防作用の相関性について検討した。また、Fx によるマウス大腸がん予防予測腸内細菌群の同定を試みた。

## 方法

ICR マウス(5 週齢、雄)へ発がん剤 AOM と炎症誘発剤 DSS を投与して 14 週間飼育し、発がんさせた(AOM/DSS 大腸発がんモデルマウス)。実験群は 4 群とした。AOM/DSS – Fx oil 投与群 (30 mg/kg bw、グループ 1)、対照として、AOM/DSS – control oil 投与群(グループ 2)、AOM と DSS 未投与の Fx oil 投与群 (30 mg/kg bw、グループ 3)、及び control oil 投与群 (グループ 4)を準備した。全てのマウスについて、DSS 投与直後 (0 週後)、4、9、14 週後の糞便を回収した (図 1)。と殺後、マウスの大腸を採取して開腸し、粘膜上皮腫瘍を計数後、ホルマリン固定した。固定組織をパラフィン包埋し、Hematoxylin and eosin-stained (HE)切片を作製した。動物実験は、”Guidelines for Animal Experiments in the Health Sciences University of Hokkaido”へ従って行った。

マウス 1 匹あたり糞便 3 個をまとめて DNA を抽出した。精製した DNA を 16s rRNA の V3-4 領域(F341-R805)を PCR で増幅し、得られたアンプリコンに個体識別用の塩基配列を含むインデックスプライマーを付けて PCR 増幅を行った。NGS (MiSeq, Illumina 社製)解析で得られたデータの品質を調べ、データベースに含まれる既知の細菌の配列と比較し、97% 以上の相同配列を持つリードをまとめた Operational Taxonomic Unit (OTU)を取得した。得られた OTU の系統情報をソフトウェア(QIIME)を用いて解析し、階層毎の菌群組成 (Taxonomy plot)、 $\alpha$  多様性 (群内多様性)、及び  $\beta$  多様性 (群間多様性、主座標解析 PCoA)解析を行った。

上記により得られた病理及び細菌叢解析結果の有意差検定を行い、Fx によるマウス大腸がん予防へ相関する腸内細菌群を検索した。

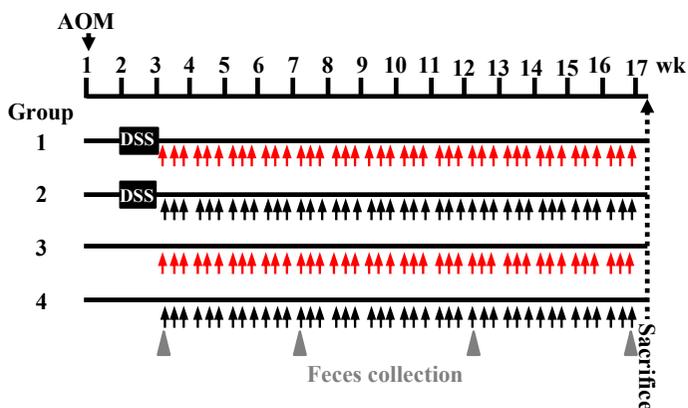


図 1 AOM/DSS マウスにおける Fx 投与及び糞便採取スキーム

赤矢印, Fx オイル投与; 黒矢印, コントロールオイル投与; 灰色印, 糞便回収.

## 成果及び考察

### 組織病理学的所見

全4群間の体重推移には、有意差は認められなかった (図 2A)。グループ 1-2 間の大腸粘膜上皮における腫瘍数に有意差は観察されなかったが (図 2B)、グループ 1 の腫瘍サイズは、グループ 2 と比べ、約 0.4 倍へ低下した ( $*P<0.05$ , 図 2C)。グループ 3 及び 4 の大腸には腫瘍は認められなかった。大腸粘膜上皮の病変の発症率を調べた結果、グループ 1 の腺がん、良性腫瘍、異形成、及び粘膜潰瘍はすべて、グループ 2 と比べ、抑制傾向が認められた。また、グループ 1 の各病変の多重度を調べたところ、グループ 2 と比べ、総腫瘍数、良性腫瘍、及び異形成は有意に減少した。これらの組織病理学的所見から、Fx 投与により AOM/DSS マウスにおいて明瞭な大腸がん化学予防効果が認められた ( $*P<0.05$ , 図 3)。

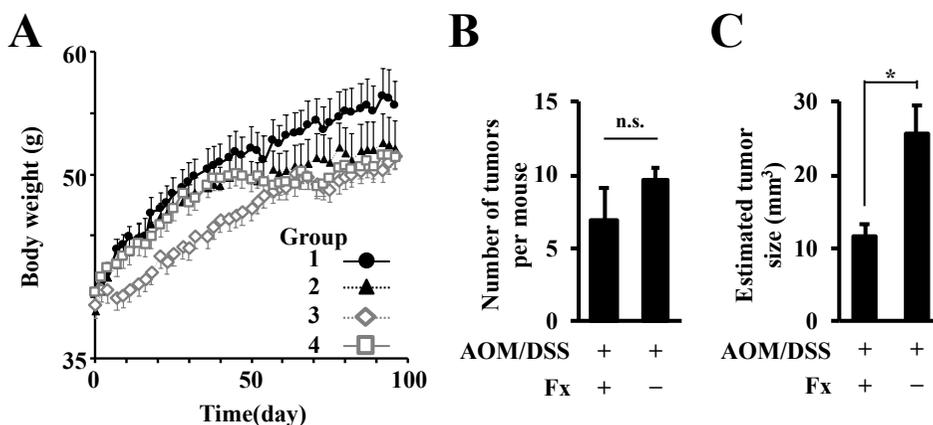


図 2 Fx を投与した AOM/DSS マウスにおける体重、腫瘍数及び腫瘍サイズへの効果

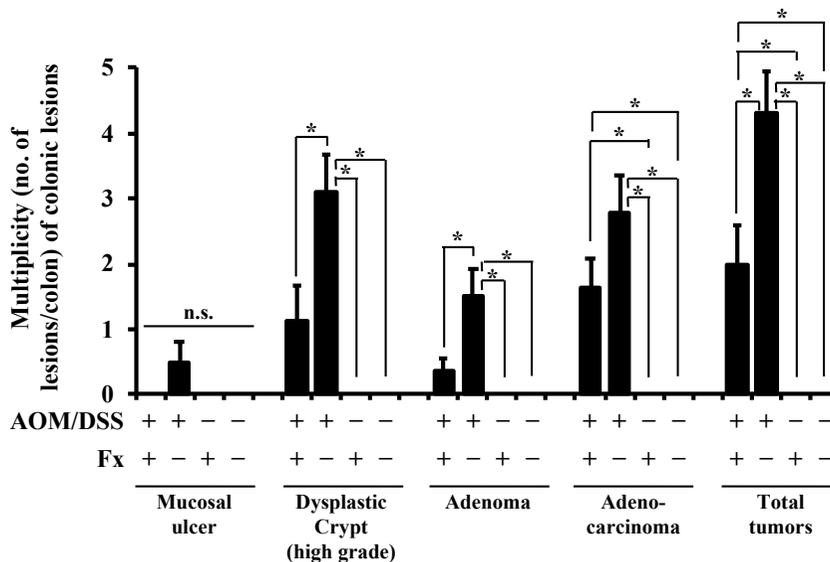


図 3 Fx を投与した AOM/DSS マウスの大腸における病変多重度予防効果

## Fx 投与によるマウス糞便中の腸内細菌変質

DSS 投与終了直後(0 週間)及び 14 週間後のマウス糞便における、階層毎の菌種組成 (Taxonomy prot)、 $\alpha$  多様性、及び  $\beta$  多様性解析を行った。その結果、マウスによっては最大 128 種の菌群が同定された。DSS 投与終了直後のマウス群の腸内細菌(グループ 1 及び 2)は、DSS 未投与群 (グループ 3 及び 4)と比べ、異なる属組成割合が認められた (図 4A)。 $\alpha$  多様性 (群内多様性)を調べた結果、DSS 投与 - 未投与間では、菌種数の期待値 (図 4B)、菌種数 (図 4C)、及び菌構成割合(図 4D)には有意差は認められなかった。一方、 $\beta$  多様性 (群間多様性)を調べた結果、DSS 投与終了直後の腸内細菌(グループ 1 及び 2) は、DSS 未投与(グループ 3 及び 4)と比べ、有意に異なるクラスターを形成した (図 4E)。これらの結果から、DSS 投与により、大腸腸内細菌叢は著しく変質したことが分かった。それ故、群間の腸内細菌叢の有意差検定については、全 4 群間の多重検定を行う一方、DSS 投与・未投与へ分け、Fx 投与の有無の 2 群間でも行うこととした。

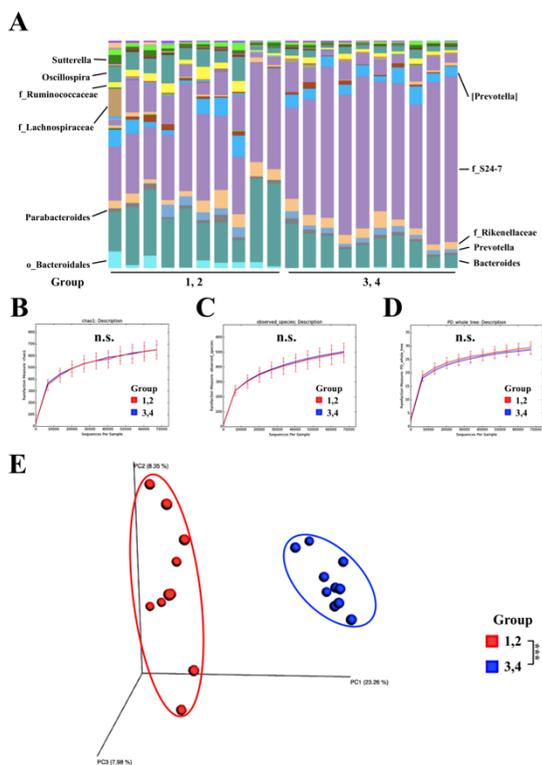


図 4 AOM/DSS マウスの大腸における DSS による腸内細菌変質効果

次に、DSS 投与 14 週間後のマウス糞便における、階層毎の菌種組成(Taxonomy prot)、 $\alpha$  多様性、及び  $\beta$  多様性解析を行った。その結果、DSS 投与直後のマウス糞便と同様、最大 128 種の菌群が同定され、それぞれ異なる属組成割合が認められた (図 5A)。 $\alpha$  多様性(群内多様性)を調べた結果、4 グループ全てにおいて、菌種数の期待値(図 5B)、及び菌種数(図 5C)に有意差が認められた(\* $P<0.05$ )。4 グループの菌構成割合には有意差は認められなかった(図 5D)。 $\beta$  多様性(群間多様性)を調べた結果、グループ 1 とグループ 2 の間には有意に異なるクラスターが形成された(\* $P<0.05$ , 図 5E)。細菌組成割合において 1%以上を占める細菌を検索した結果、14 群が同定された。これらの群のうち、Fx を投与したグループ 1 のマウスの Bacteroidiales 目の細菌群、Rilenellaceae 科の細菌群、及び Lachnospiraceae 科の細菌群の割合は、グループ 2 のそれらの細菌群と比べ、著しく減少または増加した (\* $P<0.05$ , DSS 投与 9 週後の細菌群解析データを含む) (図 6)。

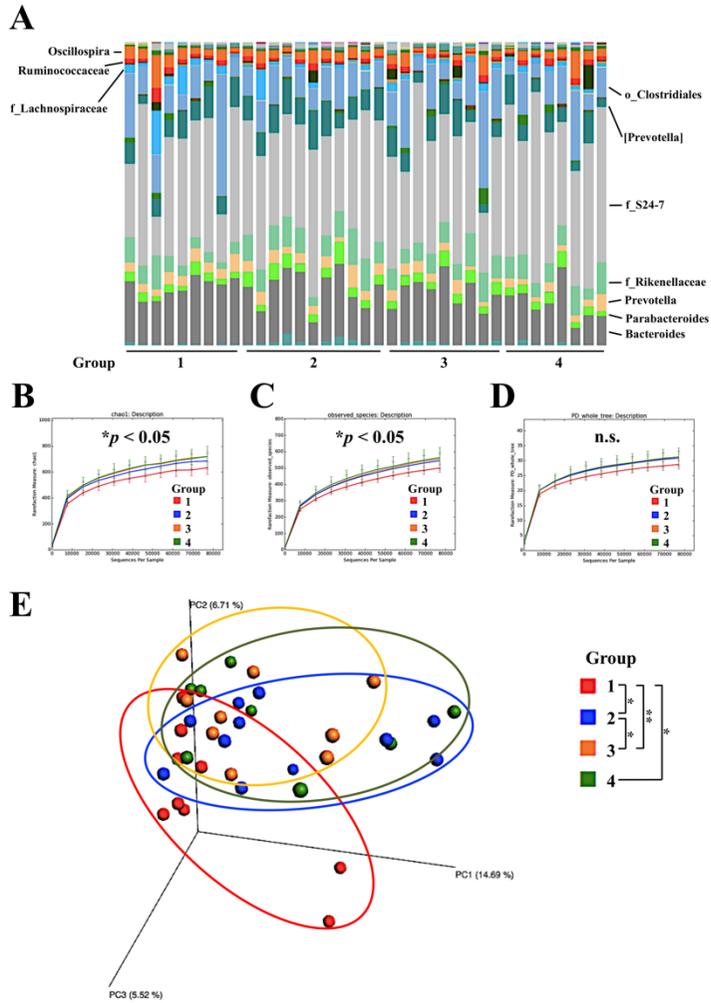


図5 DSS投与14週後のマウス大腸におけるFxによる腸内細菌変質効果

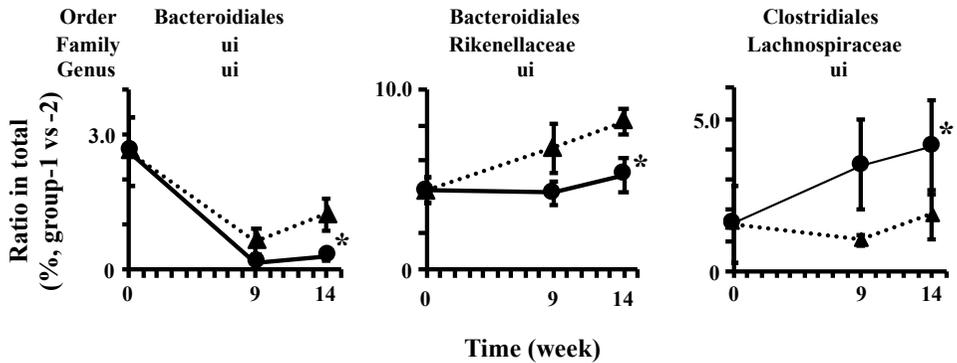


図6 Fxを投与したAOM/DSSマウスの大腸における3菌群割合の経時変化

本研究の結果、Fx 投与により AOM/DSS 大腸発がんモデルマウスに対して明瞭ながん予防効果が認められた。経時的に採取した糞便における腸内細菌叢の組成変質程度を調べた結果、Bacteroidiales 目の細菌群、Rilenellaceae 科の細菌群、及び Lachnospiraceae 科の細菌群の 3 群の細菌群が、Fx によるマウス大腸がん予防効果と相関するがん予防予測腸内細菌群となり得る可能性が強く示唆された。NGS による腸内細菌叢解析では、属レベルまでの細菌群を明らかにできるが、種レベルまでは解析できない。今後、がん予防へ貢献する責任細菌を同定するため、上記の 3 群の細菌群に属する細菌について、各細菌のプライマーを用いて real time-PCR 等で量的変動を明らかにする。その後、得られた結果から、幾つかの細菌を培養して懸濁液を調製し、AOM/DSS マウスへ投与することで、がん予防責任細菌による大腸粘膜組織へのがん予防作用分子機序の解明を試みたい。

## 謝辞

本研究は、公益財団法人 サッポロ生物科学振興財団の研究助成により、著しく進展致しました。御財団のご支援に厚く御礼を申し上げます。

## 参考文献

1. Terasaki, M., Iida, T., Kikuchi, F., Tamura, K., Endo, T., Kuramitsu, Y., Tanaka, T., Maeda, H., Miyashita, K., Mutoh, M. Fucoxanthin potentiates anoikis in colon mucosa and prevents carcinogenesis in AOM/DSS model mice. *J Nutr Biochem*, 64, 198-205, 2019a.
2. Terasaki, M., Masaka, S., Fukada, C., Houzaki, M., Endo, T., Tanaka, T., Maeda, H., Miyashita, K., Mutoh, M. Salivary glycine is a significant predictor for the attenuation of polyp and tumor microenvironment formation by fucoxanthin in AOM/DSS mice. *IN VIVO*, 33, 365-374, 2019b.
3. Ray, D., Kidane, D. Gut microbiota imbalance and base excision repair dynamics in colon cancer. *J Cancer*, 7, 1421-1430, 2016.
4. Tomasello, G., Tralongo, P., Damiani, P., Sinagre, E., Di Trapani, B., Zeenny M.N., Hussein, I.H., Jurjus, A., Leone, A. Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: Changes in response of colocytes. *World J Gastroenterol*, 20, 18121-18130, 2014.
5. Lyu, Y., Wu, L., Wang, F., Shen, X., Lin, D. Carotenoid supplementation and retinoic acid in immunoglobulin A regulation of the gut microbiota dysbiosis. *Exp Biol Med*, 243, 613-620, 2018.
6. Liu, H., Liu, M., Fu, X., Zhang, Z., Zhu, L., Zheng, X., Liu, J. Astaxanthin prevents alcoholic fatty liver disease by modulating mouse gut microbiota. *Nutrients*, 10, 1298-1314, 2018.