

<平成 25 年度助成>

クルクミンによる腸内細菌プロファイルの変化を介する 肝がん抑制効果の検討

大谷直子

(東京理科大学理工学部応用生物科学科)

要 旨

近年、肥満は糖尿病や心筋梗塞だけでなく、大腸がん、肝がん等、様々ながんのリスクファクターであることが指摘されている。しかし、その分子メカニズムの詳細は十分には明らかになっていない。我々は先行研究において、全身性の発癌モデルマウスを用いて、高脂肪食摂取に伴う肥満により肝がんの発症が著しく増加することを見出した。興味深いことに、肥満すると、2次胆汁酸を産生するグラム陽性腸内細菌が増加し、体内の2次胆汁酸であるデオキシコール酸の量が増え、これにより腸肝循環を介して肝臓の間質に存在する肝星細胞が細胞老化と細胞老化随伴分泌現象を起こし、肝がん促進的ながん微小環境を形成することが肝がん進展の原因のひとつであることを明らかにした。しかし食餌性に増加する腸内細菌に起因するがんであれば、その腸内細菌を増やさないような食品成分を探索し用いることで、がんの予防が可能になるかもしれない。そのような食品成分の候補として私はクルクミンに着目した。クルクミンは肝星細胞や腸管上皮に対し抗炎症作用を示すことが知られている。そこで、本研究では、肥満誘導性肝癌誘発実験においてクルクミン投与により肝癌の形成や腸内細菌の構成が変化するかどうかについて検討した。その結果、クルクミン投与により肝癌の形成率には変化はなかったが、腸内細菌の構成が発がん予防的な腸内細菌の構成に変化する傾向があることが示された。今後さらに詳細を検討し、肥満誘導性肝癌を予防するプロ

バイオティックス研究やプレバイオティックス研究につなげていきたいと考えている。

1. はじめに

肥満は糖尿病や心血管性疾患を増悪させるだけでなく、大腸がん、前立腺がんなど、様々ながんのリスクファクターであることが疫学的に示されている。特に脂肪肝肝炎を素地として発症する肝がんは肥満が重要なリスクファクターであることが示されている。しかしなぜ肥満が肝がんを促進するのかそのメカニズムは十分に明らかになっていなかった。私たちはマウスを用いて全身でがん遺伝子産物のRasシグナルを活性化処理をし、高脂肪食を与え肥満させると、肝臓がんの発症が著しく促進されることを見出した。そして、その発症機構のひとつとして、肥満で増加したグラム陽性腸内細菌の代謝物、デオキシコール酸が腸肝循環を介して肝臓に到達し、肝臓の間質に存在する線維芽細胞の肝星細胞の細胞老化を誘導し、細胞老化を起こした肝星細胞から様々な炎症性サイトカインやプロテアーゼなどが分泌され、肝がんを促進的ながん微小環境を形成することが、肝がん進展の原因のひとつであることを明らかにした¹⁾。細胞老化を起こした細胞に生じるこの現象を「細胞老化随伴分泌現象」Senescence-associated secretory phenotype, SASPという。この肝星細胞におけるSASP現象は、ヒトの非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)にともない発症する肝がん組織においても認められ、ヒトにおいても、SASPが肥満誘導

性肝がんの発症に関与すると考えられた。

このように我々の先行研究の結果から、高脂肪食摂取に伴う腸内細菌の変化が結果的に肝がんを促進することが明らかになった。しかし、逆に食餌性に増加する腸内細菌に起因するがんであれば、その腸内細菌を増やさないような食品成分を探索し用いることで、がんの予防が可能になるかもしれない。そのような食品成分の候補として私はクルクミンに着目した。クルクミンは様々な炎症作用を抑制することが知られており、肝星細胞に対しても、増殖シグナルや炎症シグナルを抑制させるという複数の報告がある^{2,3)}。また、腸内細菌を介して腸内の炎症を抑制するとの報告もあることから⁴⁾、前述した肥満誘導性肝がんの発症の予防に、クルクミンが有効ではないかと考えた。そこで本研究では、マウスにおいてクルクミンを投与した場合に、肥満誘導性肝がんの形成が抑制されるかどうかについて検討した。また、前述したようにクルクミンの腸内細菌への影響も報告されていることから、クルクミン投与により腸内細菌のプロファイルに変化が認められるかどうかについて検討した。

2. 方 法

2-1 マウス

日本クレアから成熟齢の C57BL/6 マウス♂♀を購入して高配し、出産させ仔マウスを実験に使用した。

2-2 肥満誘導性肝がん誘発実験

生後 4～5 日の新生仔マウスの背中皮膚に 0.5% DMBA (7,12- dimethylbenz[a]anthracene) (アセトンに溶解) 50 μ l を 1 回塗布し、その後、離乳前は母親マウスに、離乳後は薬剤を塗布したマウスに直接、合計 30 週間高脂肪食 (D12492, Research Diets Inc) または普通食 (CE-2, CLEA Japan Inc) を摂取させ、マウスが 30 週齢に達した時点でマウスを解剖し肝がんの形成を確認した。

2-3 クルクミンの調整法と投与法

クルクミン (ナカライテスク) を 50 度に温めながら溶媒のプロピレングリコールに溶解し、7 mg/ml のクルクミン溶液を作成した。このクルクミン溶液を体重当たり 40 μ g/g の量になるように、週 3 回ゾンデを用いてマウスに経口投与した。上記の肥満誘導性肝がん誘発実験の過程で、20 週齢から 30 週齢の間の 10 週間、クルクミン溶液または溶媒のプロピレングリコールを投与した。

2-4 腸内細菌 DNA の調整

クルクミン投与前と解剖時のマウスの糞便を約 50 mg 採取し、QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) を用いて糞便中の腸内細菌 DNA を抽出・精製した。

2-5 腸内細菌プロファイル解析

腸内細菌の 16SrRNA 遺伝子の V1～V3 領域を含む領域を PCR で増幅し、次世代シーケンサー Miseq (イルミナ社) にて、その領域の塩基配列を決定しその配列から、クルクミン投与前後の腸内細菌の種類を、Qiime ソフトウェアを用いて解析・分類した (受託会社に依頼)。PCR 増幅用プライマーは以下の配列のものを使用した。16S 27f: 5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3' 16S 518r: 5'-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'

3. 結 果

3-1 肝腫瘍数の解析

クルクミン投与群 6 匹の平均腫瘍形成数は 4.5 個、コントロール群 4 匹 (溶媒投与群) の平均腫瘍形成数は 5 個であり、両群で有意差はなかった (図 1)。

3-2 腸内細菌プロファイルの解析

哺乳動物の多くは腸内細菌と共生状態にあり、500 種類以上もの腸内細菌が存在しているといわれている。近年、次世代シーケンサーの開発により、膨大な量の塩基配列情報を短期間に網羅的に明らかにすることが可能になった。腸内細菌も 16SrRNA 遺伝子の可変領域の塩基配列から、単

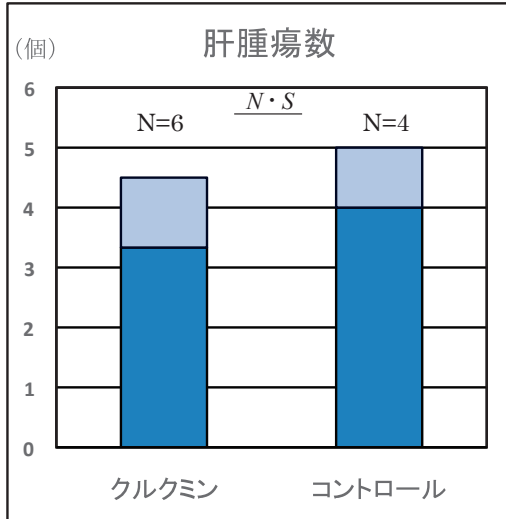


図1 クルクミン投与群とコントロール群における肥満誘導性肝腫瘍数
腫瘍の直径：水色2mm～5mm、青2mm未満

離できていない菌も分類することが可能になっている。今回、クルクミンまたは溶媒を投与したマウスの糞便から腸内細菌 DNA を抽出・精製し、次世代シーケンサー Miseq (イルミナ社) にて 16SrRNA 遺伝子の可変領域 V1～V3 を含む領域

を PCR にて増幅し、塩基配列を決定した。その配列から Qiime 解析法にて菌を分類し、クルクミン投与前後の腸内細菌プロファイルと比較しその変化を検討した。

図2はクルクミン投与前後のマウス2個体における科レベルの腸内細菌のプロファイルを示す。Qiime 解析の結果、興味深いことに、クルクミン投与により、Bacteroidaceae 科 (図2③、A:14.8%→19.7%、B:14.7%→17.9%)、Ruminococcaceae 科 (図2⑬、A:7.3%→9.3%、B:6.1%→8.5%)、Lachnospiraceae 科 (図2⑥、A:2.0%→4.8%、B:1.7%→6.7%) の菌種が A、B 2個体とも明らかに腸内で占める割合が増加していた。一方、Rikenellaceae 科 (図2④) 13.1%→8.8%、B:16.1%→8.6%)、Clostridiales 門に属するが科レベルまで分類できなかった菌種 (図2⑤、A:22.1%→18.7%、B:23.8%→19.2%) が明らかに減少していた。今後、明らかに増減があった菌種

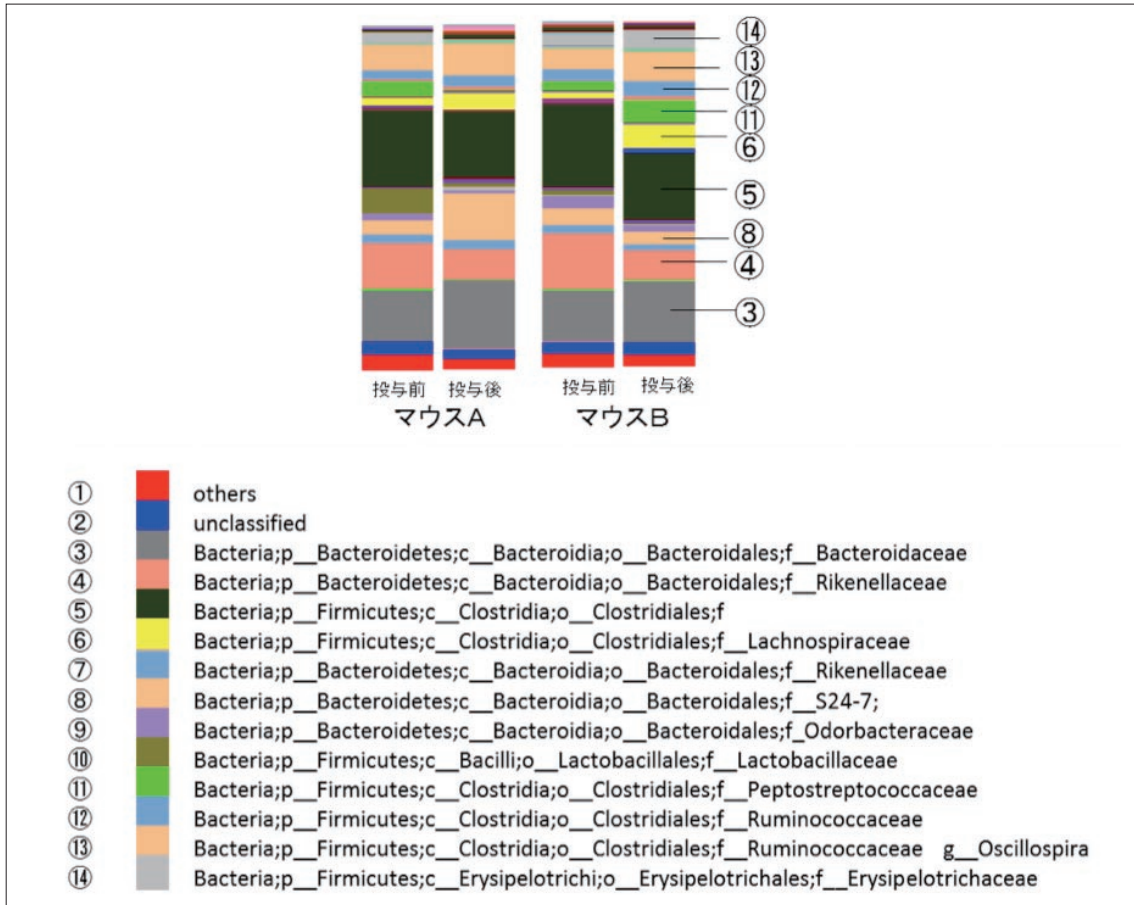


図2 クルクミン投与前後における腸内細菌のプロファイル (科レベル)
腸内細菌の占める割合が1%程度以上のものを①～⑭に示す。

に関しては、塩基配列から詳細を検討し、種レベルまで同定したいと考えている。

4. 考 察

今回、抗炎症作用が知られるクルクミンの投与により、肥満誘導性肝癌の発症数やその発症に関与する腸内細菌のプロファイル変化を検討した。その結果、30週間のプロトコールの中で最後の10週間クルクミンを投与した今回のプロトコールでは、腫瘍形成数に有意な差は認めなかった。しかし、腸内細菌プロファイル調べたところ Bacteroidaceae 科の菌種がクルクミン投与群で共通して増加していた(図2③)。Bacteroidaceae 科はグラム陰性菌であり、我々の先行研究¹⁾の結果から、高脂肪食摂取により肥満させたマウスでは普通食摂取マウスに比べて著しく減少している菌である。クルクミン摂取により、Bacteroidaceae 科のグラム陰性菌が増加するという、高脂肪食摂取と逆の傾向を誘導したことは、肥満誘導性の癌の予防につながる可能性があり興味深い知見である。また今回クルクミン投与により、Ruminococcaceae 科の菌の増加も検出された(図2⑬)。Ruminococcaceae 科の菌は、肥満で増加し発がん作用のある腸内細菌代謝物、デオキシコール酸を減少させる作用のある菌として知られている菌である^{1, 5)}。そのような作用のある Ruminococcaceae 科がクルクミン投与により増加したことも興味深い。

以上の結果から、高脂肪食摂取とクルクミンの同時摂取は腸内細菌プロファイルを発がん抑制的なプロファイルに改善させる傾向に導くことが明らかになった。今後さらにクルクミンを長期投与するプロトコールを試み、肝星細胞を含む詳細な組織解析やマウス血中胆汁酸に対する影響も調べていく必要があると思われる。腸内細菌解析に関

しても、クルクミン投与により変化する腸内細菌を種レベルまで同定し、肥満誘導性肝癌を予防するプロバイオティクスやプレバイオティクスにつなげる研究を目指したいと考えている。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に心より感謝申し上げます。東京理科大学・理工学部・応用生物科学科に着任したばかりの研究室立ち上げの時期に貴財団から研究費を賜り、非常にありがたく有効に使わせていただきました。今後も貴財団のますますの発展をお祈り申し上げますとともに、ご指導ご鞭撻を賜りますよう何卒よろしくお願い申し上げます。

文 献

- 1) Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*. 2013; **499**(7456):97-101.
- 2) Wang ME, Chen YC, Chen IS, Hsieh SC, Chen SS, Chiu CH. Curcumin protects against thioacetamide-induced hepatic fibrosis by attenuating the inflammatory response and inducing apoptosis of damaged hepatocytes. *J Nutr Biochem*. 2012; **23**(10):1352-66.
- 3) Lin J, Tang Y, Kang Q, Feng Y, Chen A. Curcumin inhibits gene expression of receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in hepatic stellate cells *in vitro* by elevating PPAR γ activity and attenuating oxidative stress. *Br J Pharmacol*. 2012; **166**(8):2212-27.
- 4) Bengmark S. Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacol Res*. 2013; **69**(1):87-113.2012.
- 5) Minamida K, Kaneko M, Ohashi M, Sujaya IN, Sone T, Wada M, Yokota A, Hara H, Asano K, Tomita F. Effects of difructose anhydride III (DFA III) administration on bile acids and growth of DFA III-assimilating bacterium *Ruminococcus productus* on rat intestine. *J Biosci Bioeng*. 2005; **99**(6):548-54.

The effect of Curcumin on the profile of gut microbiota associated with obesity-induced liver cancer development

Naoko Ohtani

*Department of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology
Tokyo University of Science*

Obesity has recently become more prevalent in most developed countries and is increasingly recognized as a major risk factor for several common types of cancers. As the worldwide obesity epidemic has shown no signs of abating, better understanding of the mechanisms underlying obesity-associated cancer is urgently needed. Although several events were proposed to be involved in obesity-associated cancer, the exact molecular mechanisms that integrate these events have remained largely unclear. We previously showed that the long-term high-fat diet (HFD) accelerated development of cancers in mice treated with DMBA, a chemical carcinogen, at neonatal stage. In particular, all mice with HFD for 30 weeks developed hepatocellular carcinomas (HCCs), whereas no tumors were found in mice fed with normal diet (ND) at 30 weeks' time point. Dietary obesity induces alterations of gut microbiota, thereby increasing the levels of a bacterial metabolite, deoxycholic acid, that cause DNA damage. The enterohepatic circulation of the bacterial metabolites provokes tumor-promoting microenvironment in the liver, particularly inducing the senescence-associated secretory phenotype (SASP) of hepatic stellate cells, thus facilitating HCC development. Importantly, intestinal bacterial profile revealed that Phylum Firmicutes (Gram positive bacteria) was significantly increased, whereas Phylum Bacteroidetes showed great reduction in the HFD fed mice. Reducing the gram positive intestinal bacteria by vancomycin treatment efficiently prevented HCC development in obese mice, indicating that increased Gram positive gut bacteria by HFD play a cancer-promoting role.

As a next step, we aimed to search for food materials that prevent obesity-associated HCC development by changing the profile of gut microbiota. Since curcumin is known to have an anti-inflammatory effects on intestinal epithelial cells and hepatic stellate cells, in this study we focused on curcumin to investigate whether curcumin has a role on preventing obesity-associated HCC development by altering the profile of gut microbiota. We found that ten weeks' feeding of curcumin during the period of thirty weeks' high fat diet can alter the profile of gut microbiota profile, although the frequency of HCC development was unchanged. Interestingly, curcumin treatment induced Bacteroidaceae Family which is known to be reduced in the condition of HFD. Moreover, Ruminococcaceae family, which is known to reduce the production of secondary bile acid, such as deoxycholic acid, was found to be increased by curcumin intake. These findings suggest that curcumin could have a potential to alter the gut microbiota profile to cancer-preventable profile.