

チョコレートに含まれるカカオマス ポリフェノールの抗腫瘍免疫効果

鈴木 登 (聖マリアンナ医科大学助教授)

食品と健康の関連について、ことにチョコレートの悪性腫瘍（ガン）の予防効果について、最近の知見を概観してみたいと思う。

酸素は生物が生命活動を営むうえで、必要不可欠であるが、生体内では酸素の一部は活性酸素と呼ばれる、化学的な反応性の高い状態で存在する。活性酸素としては、スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素、一重項酸素、一酸化窒素 NO がよく知られている。活性酸素は、生体内では殺菌作用が重要である。さらにリンパ球などでは刺激を受けると、活性酸素が産生され、細胞内刺激伝達系に関わる。しかし、活性酸素の産生が過剰になると、脂質の酸化、蛋白変性、DNA 損傷などむしろ細胞や組織の障害を引き起こす。言い換えると、活性酸素は我々の体にとって両刃の剣といえる。実際、ガンや老化、動脈硬化をはじめ数多くの疾患や病態に、活性酸素が関与している。正常者では抗酸化防御系が活性酸素による組織障害を防ぐように働く。すなわち生体内に存在する抗酸化酵素である superoxide dismutase (SOD) や catalase、低分子の抗酸化物質であるビタミン C、ビタミン E が活性酸素による組織障害を防ぐ。しかし、活性酸素が過剰に産生されるような状況に陥ったとき、すなわち病的な状態では、これらの防御系だけでは不十分と考えられる。

いっぽう食品由来の抗酸化物質は、生体内での抗酸化防御系の重要な一部分をつかさどっており、チョコレートやココアの原料であるカカオマスに含まれるポリフェノール CMP は、抗酸化作用を基本にして多彩な機能を生体内で示す。我々はこれまでカカオマスポリフェノール CMP が抗酸化作用、抗炎症、さらに免疫調節作用をもつことを報告してきた。今回 CMP が NK 細胞活性、腫瘍細胞自身の増殖、さらにヒトガン細胞を移入した動物モデルにおける効果、最後にチョコレート摂取したときのヒトの Natural killer (NK) 細胞に対する効果を紹介する。

悪性腫瘍即ちガン細胞が生体内に出現すると、NK 細胞や活性化マクロファージなどが腫瘍細胞に対処する。NK 細胞は正常者末梢血リンパ球の約 10% を占める、やや大型の顆粒を持ったリンパ球で、抗腫瘍免疫に重要な細胞である。CMP はチョコレート・ココアの原料であるカカオマスからエタノール抽出と高速液体クロマトグラフィーにより精製して得られるチョコレート色をした粉末で、これを実験に用いる。NK 細胞活性の測定法を示す(図 1)。各種のガン細胞を Cal-AM という蛍光色素で標識し、これに NK 細胞を加えて 4 時間培養する。腫瘍細胞が殺されると、培養液中に蛍光色素が放出されるので、たくさんのガン細胞が殺されれば、より大量の蛍光色素が放出されることになる。培養終了後、培養上清中の蛍光強度を測定することで NK 細胞活性が評価できる。表 1 に用いたヒトガン細胞株を示す。ガン細胞はそれぞれが発生した組織の特徴を持っているため、

図1 NK細胞活性測定法

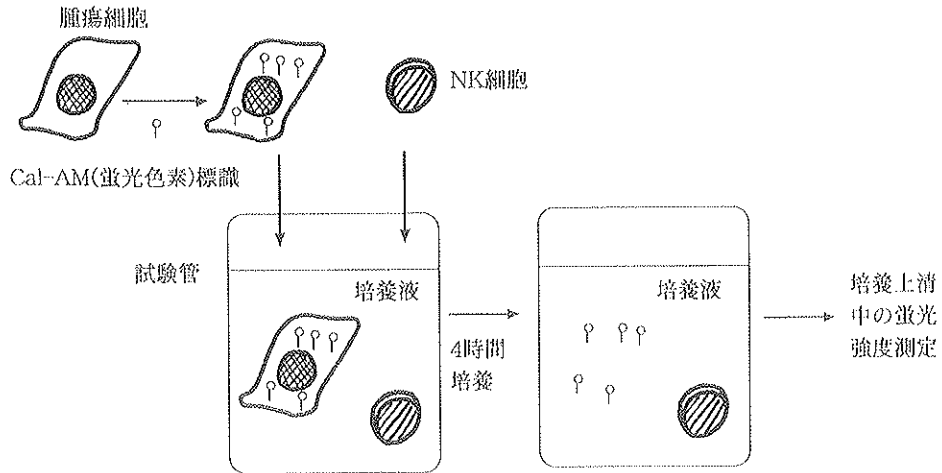


表1 今回の検討に用いた腫瘍細胞

K562細胞	白血病患者由来腫瘍細胞
Raji細胞	悪性リンパ腫患者由来腫瘍細胞
Jurkat細胞	リンパ性白血病患者由来腫瘍細胞
MCF7	乳ガン患者由来腫瘍細胞
KATO	胃ガン患者由来腫瘍細胞

チョコレートがどのガン細胞に作用するのかを明らかにする目的で血液のガンである白血病、悪性リンパ腫細胞、さらに乳ガン・胃ガン細胞を用いた。代表的なNK細胞活性の成績を示す(図2)。標的細胞は白血病由来のK562細胞だが、ガン細胞の40倍という十分なNK細胞を加えると4時間の培養で70%弱の細胞が、ガン細胞の5倍という少数のNK細胞では約20%が殺されることが分かる。この実験系を用いてCMPのNK細胞活性を評価した。NK細胞にCMPを加え1時間作用させた後、

NK細胞活性を測定したところ、CMP100, 50 および 25 マイクログラムで処理すると濃度依存的に *in vitro* でのNK細胞活性が増強する(図3)。すなわちCMPによりNK細胞活性が増強することが分かる。同様にCMPの、胃ガン細胞株KATO IIIに対するNK細胞活性を調べた。

図2 NK細胞活性(標的細胞 K562細胞)

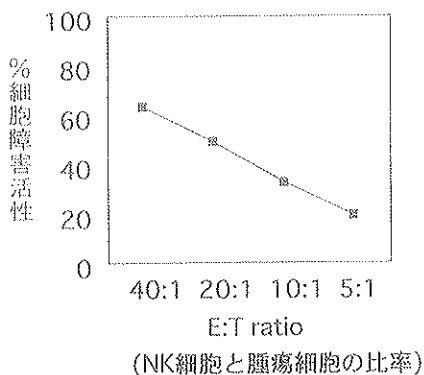
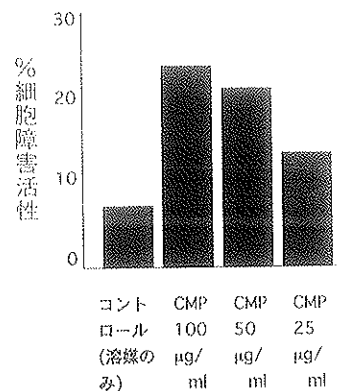


図3 CMPによるNK細胞活性の増強(*in vitro*) (標的細胞 K562)



一般的に胃ガン細胞に対するNK細胞活性は微弱で、胃ガン細胞の20倍のNK細胞を加えても10%弱のKATO III細胞しか殺さない。この培養系にCMPを加え1時間作用させると、胃ガン細胞株KATO IIIが効率よく殺される。一般的にNK細胞に抵抗性をもつ胃ガン細胞に対してもCMPはNK細胞活性を増強することが分かる(図4)。正常者末梢血リンパ球を、増殖因子であるIL-2とともに培養すると、より強い抗腫瘍免疫能を持つ lymphokine activated killer cell (LAK) 細胞

が誘導される。このLAK細胞にCMPを添加して、抗腫瘍免疫能に対するCMPの作用を検討した。悪性リンパ腫由来Raji細胞を用いたところ、CMPの添加はRaji細胞に対する細胞障害活性を強く増強する(図5)。*In vitro*でIL-2活性化リンパ球をCMP処理することで正常者のIL-2活性化リンパ球活性は増強し、抗腫瘍免疫作用を増強することが分かる。EpicatechinはCMPに含まれる主要な抗酸化物質であるが、EpicatechinもNK細胞活性を増強する(図6)。即ちCMPの持つ抗酸化活性がNK細胞活性の増強に重要である。以上の成績からCMPは*in vitro*で様々な腫瘍細胞に対する末梢血リンパ球の抗腫瘍免疫能を増強させることが分かる。ガン細胞は一般に過剰な細

図4 NK細胞活性(胃ガン細胞株, KATO IIIに対するCMPの効果(*in vitro*))

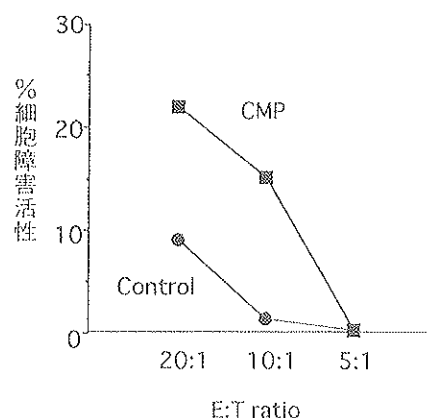


図5 CMPによるIL-2活性化キラー細胞活性の増強(*in vitro*)(標的細胞Raji)

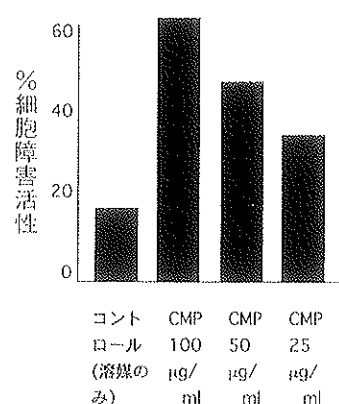
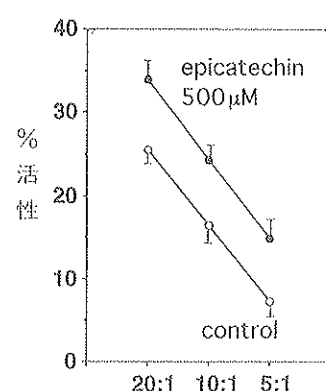


図6 ヒトNK細胞活性に対するエピカテキンの影響



胞増殖を示す。そこで腫瘍細胞自体の増殖に対するCMPの効果を検討した。CMP存在下に腫瘍細胞を培養し、トリチウムサイミジンの取り込みからDNA合成を、トリパンプルを用いて、実際の細胞数を評価した。悪性リンパ腫細胞由来のRaji細胞での成績を示す(図7)。CMPと共に腫瘍細胞を培養すると、腫瘍細胞の増殖は明らかに抑制される。実際の、腫瘍細胞数もCMPにより明らかに減少する(図8)。ここには示さないが、CMPは調べたすべてのガン細胞の増殖を抑制する。

ではCMPはガン細胞を殺すことが出来るのだろうか。細胞死には、細胞が活性化されて起きるア

図7 Raji細胞増殖に対するCMPの効果(*in vitro*)

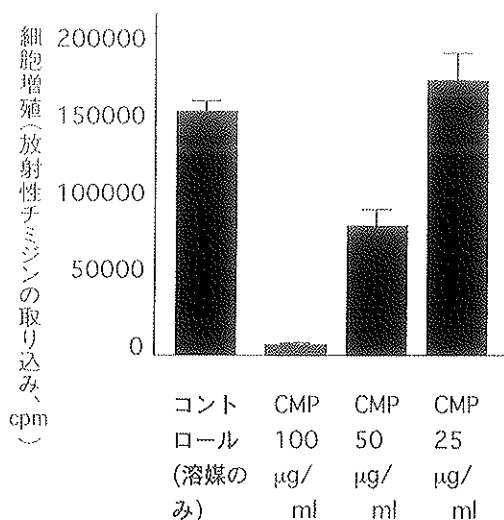
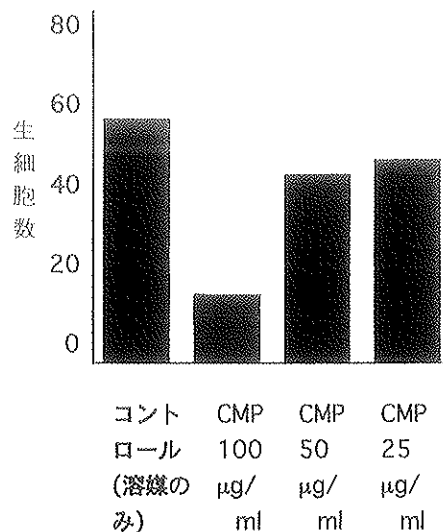
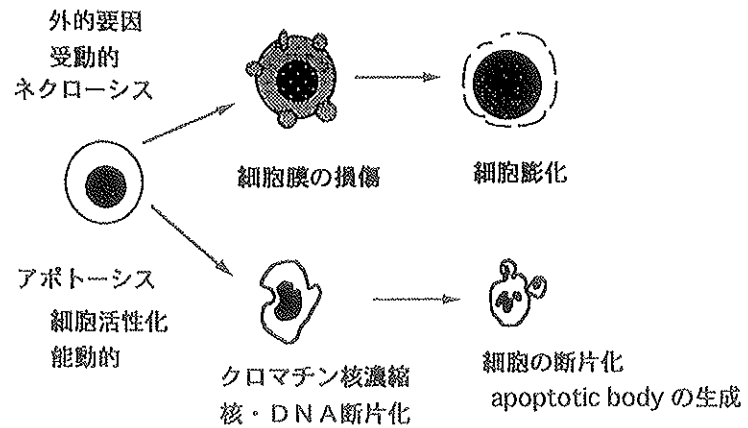


図8 Raji細胞数に対するCMPの効果(*in vitro*)



ポトーシスと呼ばれる細胞死と、外からの原因によって受動的に起きるネクローシスと呼ばれる細胞死の2種類がある。アポトーシスでは細胞が縮小、断片化するが、ネクローシスでは細胞は水泡化、膨潤する。多くの抗ガン剤はガン細胞にアポトーシスを誘導する(図9)。ガンの悪性化にはアポトーシスの異常が重要である。染色体DNAが損傷を受ける、ガン遺伝子の過剰活性化が起こる、

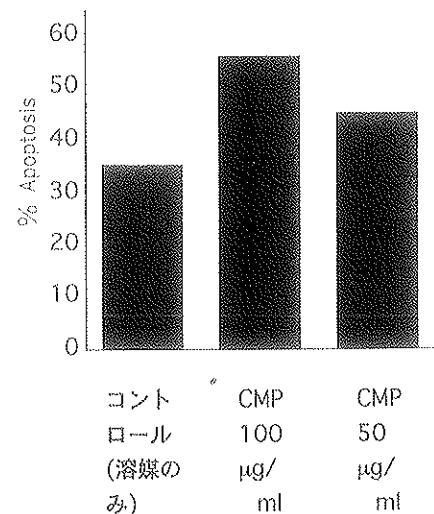
図9 細胞死の形態的特徴



あるいは細胞増殖が異常に亢進した細胞、あるいはガンの一歩手前の異常細胞が生体内に出現した場合を考えてみる。この細胞にアポトーシス・あるいは細胞死がうまく誘導できれば、ガン化に至らず、生体はまたもとの恒常性を維持できるが、この異常細胞にアポトーシスが誘導できないと細胞は悪性化・ガン化することになる。すなわちガンの悪性化は細胞のアポトーシスのメカニズムに異常をきたすことが原因の一つである。したがって、ガン細胞あるいはその一歩手前の異常細胞にアポトーシスを誘導できれば細胞の悪性化・ガン化を防ぐことも可能である。そこでCMPがガン細胞の細胞死、あるいはアポトーシスを誘導できるかを検討した。方法は、細胞のDNAをヨードで染色し、アポトーシスの特徴である断片化した染色体DNAを検出し、これを用いてアポトーシス細胞を定量化することができるというものである。

胃ガン由来のKATO細胞は、CMPと共培養することでアポトーシスが誘導される(図10)。CMPと共培養した細胞を観察すると、アポトーシスに特徴的な縮小した細胞を認め、共培養した細胞のDNAを観察すると、アポトーシスに特徴的なDNAのラダー形成が認められた。ここには示さないが、CMPは調べたすべてのガン細胞に細胞死を誘導できた。様々な刺激がアポトーシスの誘導に働く。いずれの刺激もミトコンドリアに収束して、アポトーシスに共通のミトコンドリア膜電位の低下を起こす。アポトーシスに抵抗性をもたらすアポトーシス抵抗性蛋白であるBcl-2はこのミトコンドリア膜電位の低下を抑制することが知られているが、ミトコンドリア膜電位の低下に伴い、アポトーシスの実行蛋白である各種カスパーゼ、すなわち蛋白分解酵素が活性化される。その結果、核の断片化、細胞膜の変化などアポトーシスに特徴的な変化が認められるようになる。そこでCMPのミトコンドリア膜電位に対する作用を検討した。方法はミトコンドリア膜電位に対応して蛍光強度の変化するDIOC6という蛍光色素を各種ガン細胞に取り込ませ、その蛍光強度をフローサイトメーターで測定するというものである。その結果、CMPは乳ガン細胞のミトコンドリア膜電位を低下させることが確認された。CMPは調べたすべてのガン細胞のミトコンドリア膜電位を低下させ、アポトーシス誘

図10 KATO細胞に対するCMPのアポトーシス誘導効果 (in vitro)

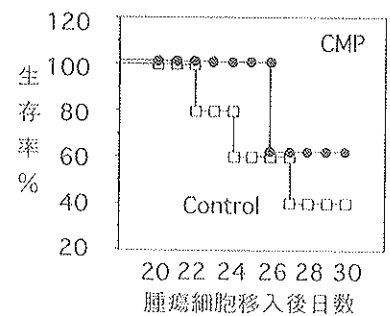


導することが分かった。ミトコンドリア膜電位の低下により、アポトーシス実行蛋白である cyp32 や ICH-1L と呼ばれる蛋白分解酵素の活性化が起こる。一方、アポトーシス誘導のステップをアポトーシス抑制蛋白である Bcl-2 や Bcl-XL は抑制する。代表的なアポトーシス実行蛋白である cyp32 の発現に対する CMP の効果を検討したところ、CMP は Raji 細胞のアポトーシス実行蛋白発現を増強させ、代表的なアポトーシス抑制蛋白である Bcl-2 発現を抑制する。すなわち、CMP は腫瘍細胞のミトコンドリア膜電位の低下を引き起こし、アポトーシス実行蛋白発現を誘導し、一方アポトーシス抑制蛋白発現を抑制することで腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することが分かる。

次にモデル動物を用いた検討結果を報告する。方法はヒト悪性リンパ腫細胞 Raji 細胞 600 万個を SCID マウスの腹腔内に移入する。SCID マウスでは T リンパ球、B リンパ球が先天的に欠損しているが、NK 細胞は存在している。通常食あるいは 1% CMP を混ぜた餌を与え、30 日間飼育し、全身の状況を評価した。実験の結果を示す (図11)。

腫瘍細胞移入 22 日後あたりから、通常食マウスに死亡するものが出始め、CMP 食マウスでも 26 日後に死亡するものを認めたが、30 日目に生存しているマウスも観察された。外見的には腫瘍細胞を移入していないマウスに比べ、腫瘍細胞を移入した通常食マウス、CMP 食マウスとも毛づやは悪化している。腹部の様子を見ると、腫瘍細胞を移入した通常食マウスにくらべ CMP 食マウスのほうが腹部膨満は軽度である。腫瘍細胞の肝臓への転移を見ると、通常食マウスでは非常に巨大な腫瘍の固まりが認められる。CMP 食マウスでも腫瘍細胞の肝臓への転移は明らかであるが、その程度は軽いと思われる。肝臓への転移を顕微鏡で観察した。通常食では濃い青色に染まる腫瘍細胞が瀰漫性に浸潤し、周囲の肝細胞の壊死が認められる。CMP 食グループでは腫瘍細胞の浸潤に対し、単核細胞が集簇している。アポトーシス細胞を染色する TUNEL 染色を行ったところ、通常食では腫瘍細胞にはアポトーシスは明らかではなく、周囲の肝細胞のアポトーシスが明らかである。CMP 食では、腫瘍細胞の集簇部位に TUNEL 染色陽性のアポトーシス細胞を多数認めた。マウスの NK 細胞を特異的に染色する抗 asialoGM1 抗体で染色したところ、通常食グループに比べ、CMP 食グループでは asialoGM1 陽性の NK 細胞が腫瘍細胞活性を増強させることが示唆された。

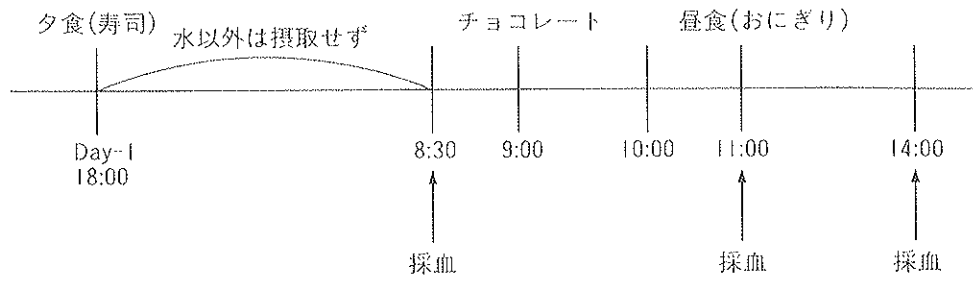
図11 腫瘍細胞移入 SCID マウスの生存に対する CMP の影響



それではヒトでもチョコレート摂取がほんとうに抗腫瘍免疫能を増強するように働くのかを検討した。正常人ボランティアにチョコレートを食べてもらい、NK 細胞数と機能を調べた。試験前日、夕食に抗酸化物質の少ない寿司を食べてもらった。試験当日朝まで水以外は何も摂取せず、朝 9 時にチョコレート 4 枚、200g を食べてもらい、チョコレート摂取前、摂取 2 時間後、5 時間後に採血した(図12)。末梢血中の NK 細胞をフローサイトメーターを用いて測定したところ、個人差はあるが、チョコレートの摂取 2 時間後、5 時間後では末梢血中の NK 細胞は増加する。

次にチョコレート摂取による NK 細胞の機能について検討した。チョコレートの摂取後、2 時間、5 時間では末梢血中の NK 細胞機能は増強し強い細胞障害活性を示す(図12)。すなわち、チョコレートの摂取は正常者末梢血 NK 細胞の機能を増強させることが分かる。

図12



以上の成績から、チョコレートは経口摂取することで *in vivo* で抗腫瘍免疫の増強に働く可能性を持つことが分かった。今後、食品のもつ健康増進の働きを科学的に解明することはますます重要になると考え、さらに研究を続ける予定である。