

カカオ豆由来リグニン配糖体の 新たな活性を求めて

坂上 宏

(明海大学 歯学部 病態診断治療学講座 薬理学分野 教授)

1. 研究目的

我々は、カカオ成分の新規機能性の解明を目的として、カカオマスおよびカカオハスクよりリグニン配糖体(以下LCC)を調製し検討した結果、カカオハスクLCCの生理活性が明らかになった^{1,2,3)}。しかし、試料の溶解性、滅菌性については検討していなかった。そのためLCCを1.39% NaHCO₃に溶解し、更にオートクレーブ滅菌を行い、溶解性と滅菌性を確保した。そして、このように調製されたLCCの活性を再検討した。その結果、カカオマスLCCは、新しい生物作用を示すことが判明した。

2. リグニン画分の調製と収率

カカオマスあるいはハスクに対し、10倍量のヘキサンによる脱脂を3回繰り返した。その後、試料を室温にて2時間、1%NaOHで攪拌抽出を行い、不溶物を遠心により除去した。酢酸を添加して、pH5.0でLCC画分(酸沈殿1回)を沈殿させた。一部を1%NaHCO₃に溶解後、不溶物を遠心で除去後、同様に酢酸を添加して、精製LCCを得た(酸沈殿2回)。これらを水に対して透析後、凍結乾燥した(図1)。カカオマスLCC、ハスクLCCの収率は、表1に示した。LCCは、1.39%NaHCO₃に溶かし、オートクレーブ(121℃、2気圧)により滅菌した。その後、ゲル濾過で求めた分子量は、10万以上であり、高分子状態が維持できていることが確認された。

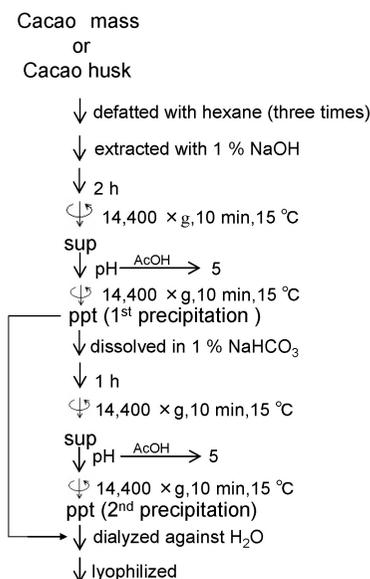


図1 カカオLCCの調製法

3. 抗HIV活性

ヒトT-細胞白血病細胞MT-4を、HIV-1_{MB}で感染させ細胞を死滅させる条件を設定し、HIV-感染、非感染MT-4細胞を5日間、試料とともに培養して相対的生細胞数をMTT法で測定した。非感染あるいは感染細胞から、それぞれ50%の細胞を生存させる濃度(CC₅₀、EC₅₀)を測定した。抗HIV活性は、選択係数SI (SI=CC₅₀/EC₅₀)により数値化した(図2)。

カカオマスLCC(酸沈殿1回)(図2)は、ハスクLCC(酸沈殿1回)(図3)よりも高い抗HIV活性を示した(表1)。アルカリ可溶化と酸沈殿を再度行っても、カカオマスLCCの抗HIV活性は(図2)は、ハスクLCC(図3)よりも高かった。

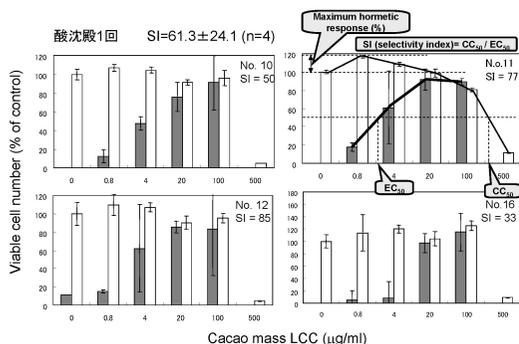


図2 カカオマスLCCの抗HIV活性
各点は、3回の実験値の平均値を示す。

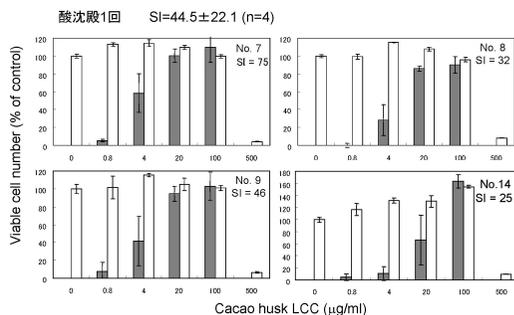


図3 カカオハスクLCCの抗HIV活性
各点は、3回の実験値の平均値を示す。

表1 カカオマスおよびカカオハスクLCCの収率、ホルメシス誘導活性および抗HIV活性

	収率 (%)	最大 ホルメシス 誘導活性 (%)	抗HIV 活性 (SI)
カカオマス LCC			
酸沈殿 1 回	9.6±1.1	11.3±5.1	61.3±24.1
酸沈殿 2 回	8.2±2.0	7.2±4.8	39.0±23.6
カカオハスク LCC			
酸沈殿 1 回	4.8±1.8	15.1±0.6	44.5±22.1
酸沈殿 2 回	0.57±0.57	2.7±4.7	28.0±16.4
デキストラン硫酸			1196
カードラン硫酸			3292
AZT			10120
ddC			1536
LPS			><1.0

4 回の実験の平均値±S.D.を示す。

4. ホルメシス効果

低濃度のカカオマス及びハスクLCCは、MT-4細胞の増殖を若干（15%程度）促進した（図2、3、表1）。低濃度における増殖促進効果は、ホルメシスとして知られており、種々の薬物、放射線照射により誘導されることが報告されている^{4,5)}。カカオマスおよびハスクLCCに対して、ホルメシス効果を示す細胞は、その細胞の膜表面に受容体を発現している可能性が示唆される。

5. マウスマクロファージ様細胞におけるNO産生に及ぼす影響

RAW264.7細胞あるいはJ774.1細胞を、24時間、LCCとインキュベーションし、放出されたNOおよび生細胞数を測定した。培養液中のNO濃度は棒グラフ、生細胞数は丸印で示した。白あるいは灰色は、それぞれ、酸沈殿1回、あるいは2回により調製されたサンプルを示した。各点は、2回の平均値を示し、NO定量には、LCCの着色によるバックグラウンド値を差し引いた。

カカオマスLCCは、酸沈殿1回あるいは2回のいずれでも、RAW264.7細胞あるいはJ774.1細胞によるNO産生を、125 $\mu\text{g/ml}$ までの濃度では促進しなかった (図4)。

また、RAW264.7細胞を、LPS (100ng/ml) 存在あるいは非存在下において、カカオマスLCCと24時間インキュベーションし、誘導型NO合成酵素 (iNOS) の発現をウェスタンブロット解析により調べた。カカオマスLCCは、50 $\mu\text{g/ml}$ まで、単独では、RAW264.7細胞におけるiNOSの発現を誘導しなかった。しかし、カカオマスLCCは、LPSにより促進されるiNOSの発現を濃度依存的に促進することが判明した (図5)。

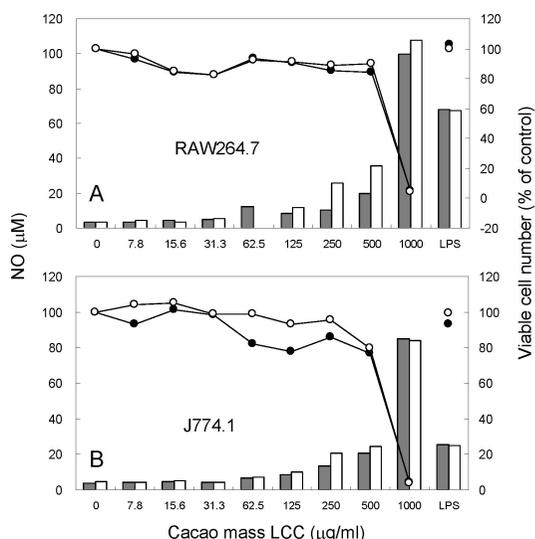


図4 カカオマスLCCによるマウスマクロファージ様細胞のNO産生に及ぼす効果

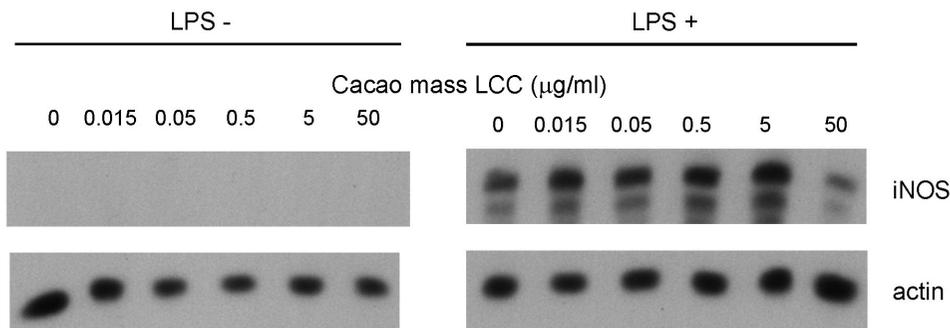


図5 LPSのiNOSタンパク質発現に対するカカオマスLCCの影響

一方、培養液中のNO濃度は、NOの産生と分解により規定される。そこで、カカオマスLCCおよびcarboxy-PTI存在下において、NOC-7から発生するNO産生量をESRにより測定した。NOラジカル強度は、矢印で示したcarboxy-PTIのピークの高さと、外部標準のMnOのピークの高さの比を求め、controlに対する%に換算して表した。各点は、平均値 \pm S.D. (n=3)を示した。

カカオマスLCCは、NOC-7から発生するNOを濃度依存的に消去した。50%抑制濃度は、53 $\mu\text{g/ml}$ であった (図6)。これに対して、LPSは、顕著なNO消去活性を示さなかった (data not shown)。以上の結果は、カカオマスLCCとLPSは作用点が異なることを示唆する。

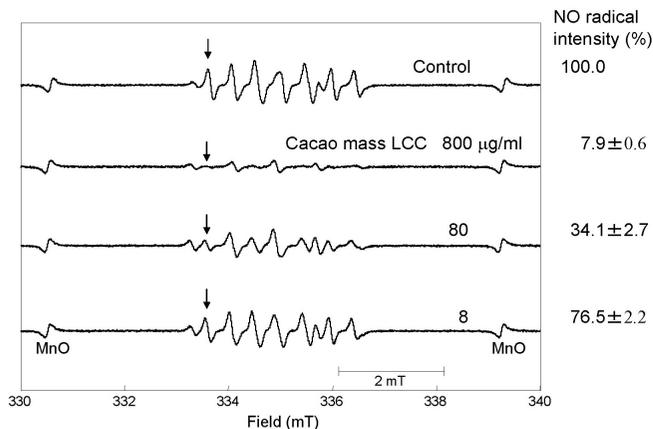


図6 カカオマスLCCのNOラジカル消去活性

6. サイトカイン産生に及ぼす影響

RAW264.7(A)およびJ774.1細胞(B)を種々の濃度のカカオマスLCCと24時間インキュベーションし、培養液中のTNF- α の濃度を、ELISAにより測定した。白あるいは灰色は、それぞれ酸沈殿1回、あるいは2回により調製されたサンプルで、2点の平均値を示した。RAW264.7細胞(A)と比較して、J774.1細胞(B)は高濃度のTNF- α を自発的に培養液中に産生・放出していた(図7)。この結果は、J774.1細胞は培養上清に、TNFのマウスホモログであるtumor killing factorを産生・放出するという報告⁶⁾を支持する。ただし、カカオマスLCCによるTNF- α 産生促進はLPSに比べればかなり弱いものであった。

また同様に、RAW264.7細胞の培養上清中のIL-1 β (A)、IFN- α (B)、IFN- γ (C)の濃度を、ELISAにより測定した。白あるいは灰色は、それぞれ、酸沈殿1回、あるいは2回により調製されたサンプルを示した。各点は、平均値 \pm S.D.(n=3)を示した。カカオマスLCC(0.005~500 μ g/ml)は、RAW264.7細胞によるインターロイキン- β (IL-1 β)、インターフェロン- α (IFN- α)、IFN- γ の産生を促進しなかった(図8)。

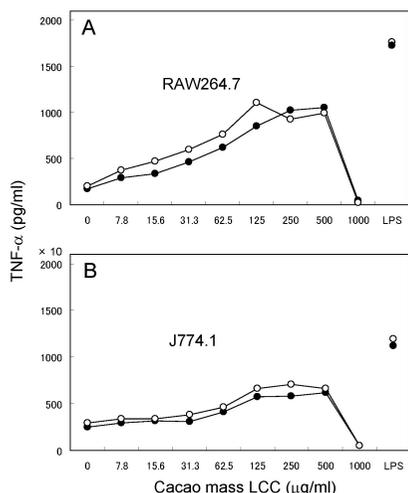


図7 カカオマスLCCのマウスマクロファージ様細胞のTNF- α 産生に及ぼす効果

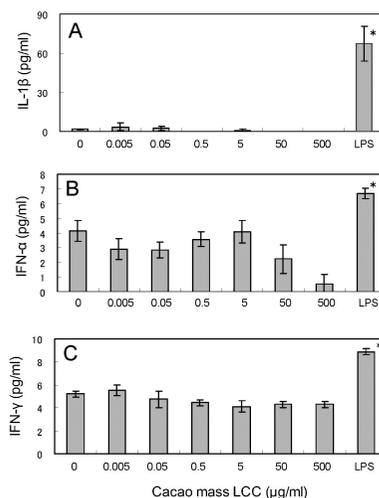


図8 カカオマスLCCのマウスマクロファージ様細胞の種々のサイトカイン産生に及ぼす効果 * <0.05.

7. 考察

我々の研究により、緩和なアルカリ条件で、オートクレーブ滅菌することにより、高分子構造を維持したLCCを完全に可溶化されたことが初めて明らかになった。この様にして調製されたカカオマスLCCの抗HIV活性は、カカオハスクLCC、他のLCC、タンニン類、フラボノイド類^{7, 8)}を凌ぐものであった。可溶化されたLCCはシグナル伝達経路の解明に貢献すると思われる。

最近、我々はシイタケ菌糸体培養液 (LEM) 由来LCCが、種々の免疫応答遺伝子の発現を誘導すること、大半はLPSで誘導される遺伝子と重複することを明らかにした⁹⁾。また、免疫応答遺伝子の発現は、LPSの方が強く誘導することを見出した⁹⁾。カカオマスLCCも同様な活性を示すか、また、濃度が異なる際に同様の活性を示すか否か、今後の検討課題である。

今回の研究は、LCC自身には、iNOSタンパク質の発現を促進する活性はないが、LPSのiNOSタンパク質の発現を相乗的に増強することを明らかにした。これは、LCCの作用点がLPSとは異なること、また、それ自身では、サイトカインの産生能は低いが、宿主細胞を活性化してサイトカインの産生、あるいは発現を促進する可能性を示唆する。LCCの糖組成の検討が、カカオマスLCCの免疫増強効果発現のメカニズムの解明に必要である。

カカオマスおよびカカオハスクLCCは、今回、MT-4細胞の増殖を若干促進することが見いだされた。我々は、カカオLCCが、歯肉線維芽細胞の増殖を促進すること¹⁾、五葉松の松かさLCCは、マウス脾臓リンパ球の幼若化 (³H-チミジンのDNAへの取り込み) を促進することを報告している^{10, 11)}。LCCが、選択的な受容体を介して、正常細胞の増殖を選択的に促進するのか否かは、今後の重要な研究課題である。

文献

- 1 坂上 宏、前田裕一、大澤謙二：カカオハスクの多様な生物作用と代替医療における機能性、*New Food Industry* 50 (4) : 1-9, 2008
- 2 Sakagami H, Kushida T, Oizumi T and Makino T: Distribution of lignin carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine. *Pharmacology & Therapeutics* 128: 91-105, 2010.
- 3 Sakagami H, Satoh K, Fukamachi H, Ikarashi T, Simizu A, Yano K, Kanamoto T, Terakubo S, Nakashima H, Hasegawa H, Nomura A, Utsumi K, Yamamoto M, Maeda Y and Osawa K: Anti-HIV and vitamin C-synergized radical scavenging activity of cacao husk lignin fractions. *In Vivo* 22: 327-332, 2008.
- 4 Calabrese EJ: Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution* 138: 379-412, 2005.
- 5 Calabrese EJ, Staudenmayer JW, Stanek III EJ and Hoffmann GR: Hormesis outperforms threshold model in national cancer institute drug screening database. *Toxicol Sci* 94: 368-378, 2006.
- 6 Ito A, Ohsawa F and Natori S: Purification of a cytotoxic protein produced by the murine macrophage-like cell line J774.1 in response to Sarcophaga lectin. *J Biochem* 99: 9-15, 1986.
- 7 Fukai T, Sakagami H, Toguchi M, Takayama F, Iwakura I, Atsumi T, Ueha T, Nakashima H

- and Nomura T: Cytotoxic activity of low molecular weight polyphenols against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* 20: 2525-2536, 2000.
- 8 Shirataki Y, Motohashi N, Tani S, Sakagami H, Satoh K, Nakashima H, Mahapatra SK, Ganguly K, Dastidar SG and Chakrabarty AN: In vitro biological activity of prenylflavanone. *Anticancer Res* 21: 275-280, 2001.
 - 9 Kawano M, Thet MM, Makino T, Kushida T and Sakagami H: DNA microarray analysis of signaling pathway in macrophages stimulated by lignin-carbohydrate complex from *Lentinus edodes* mycelia extract (L·E·M) *Anticancer Res* 30: 2567-2576, 2010.
 - 10 Kurakata Y, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Kitajima K, Ichikawa S, Hata N and Sato T: Mitogenic activity of pine cone extracts against cultured splenocytes from normal and tumor-bearing animals. *Anticancer Res* 9: 961-966, 1989.
 - 11 Kurakata Y, Sakagami H, Oh-hara T, Kawazoe Y, Asano K, Fujinaga S, Takeda M and Sato T: Mitogenic activity of natural and synthetic lignins against cultured splenocytes. *In vivo* 4: 377-380, 1990.