

2016年2月7日

第9回 LMF研究会

基礎研究 最新報告

九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門
システム生物工学講座 細胞制御工学分野
照屋 輝一郎、白畑 實隆



KYUSHU UNIVERSITY



本日のトピックス

- ナタマメエキス添加LMF (LMF-CG) のガン抑制効果
- ケトン体存在下でのLMFによるガン細胞増殖抑制効果の検討
- マウスにおけるPFクリームの効果判定



ナタマメエキス添加LMF (LMF-CG) のガン抑制効果

ナタマメエキス調製法

焙煎ナタマメ(約5 mm刻み) 1 kg
水(常温) 14 kg(対原料14倍)



抽出90~95°C(2時間攪拌)
Brix 2.6%、pH 5.18



30メッシュパス
液量 9.6 kg、残渣4.94 kg
Brix 2.8%、pH 5.11



pH 4.5調整、50°C
クエン酸 12 g添加(対原料1.2%)
pH 5.11→pH 4.51



酵素処理50°C、4時間攪拌(×2)
セルラーゼ・ペクチナーゼ添加
液量 9.42 kg、Brix 3.0%、pH 4.12



↓
#2濾紙濾過



酵素失活90~95°C(30分)
液量 9.36 kg、Brix 3.0%、pH 4.09



濾過助剤添加、1 μm(ハウジング)濾過
液量 10.36 kg、Brix 2.4%、pH 4.10、
固形分2.5%



減圧濃縮60°C、55分
液量 3.0kg、Brix 8.4%、pH 4.12、
固形分8.1%

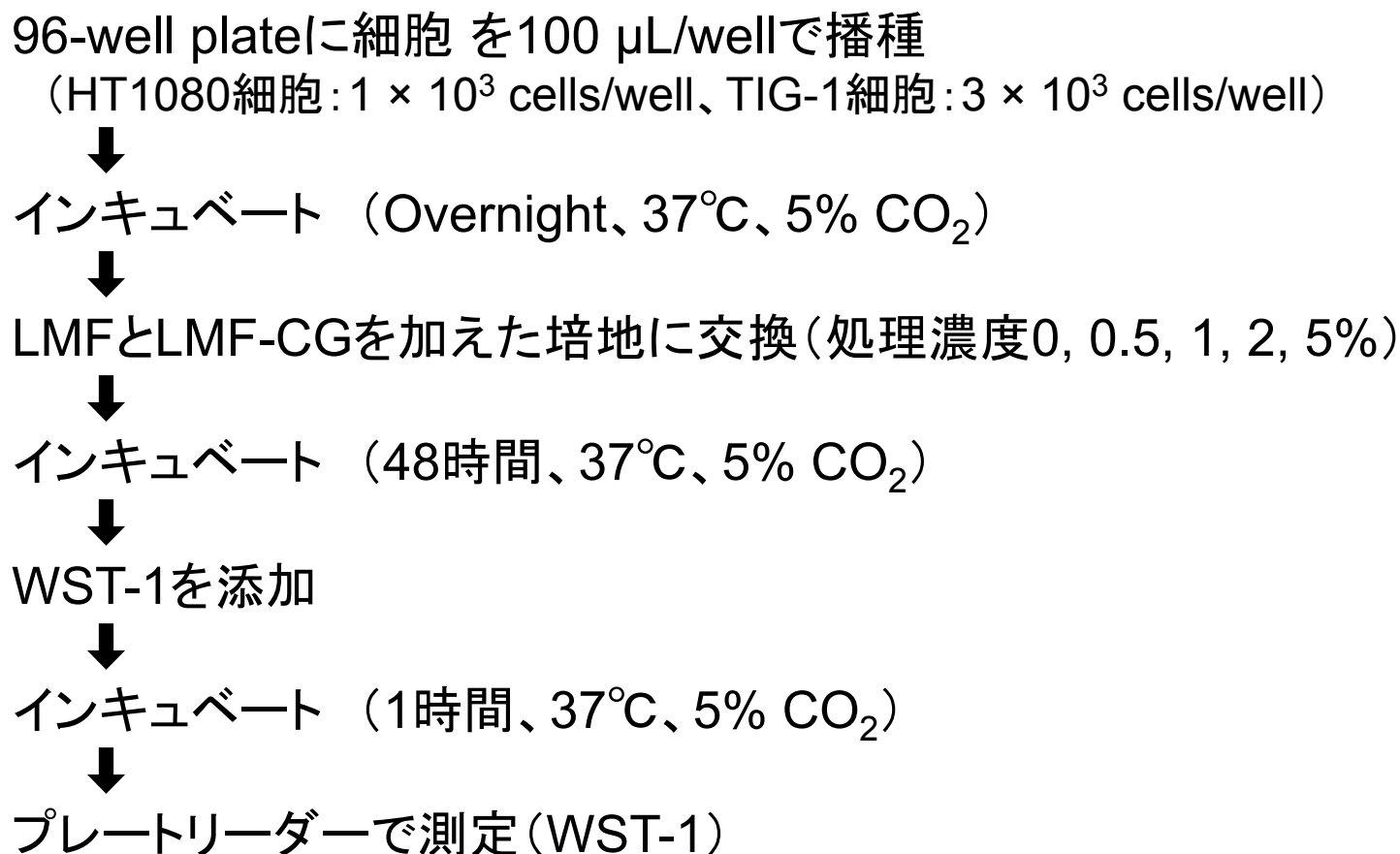
・ナタマメエキス乾燥物収率24.3%



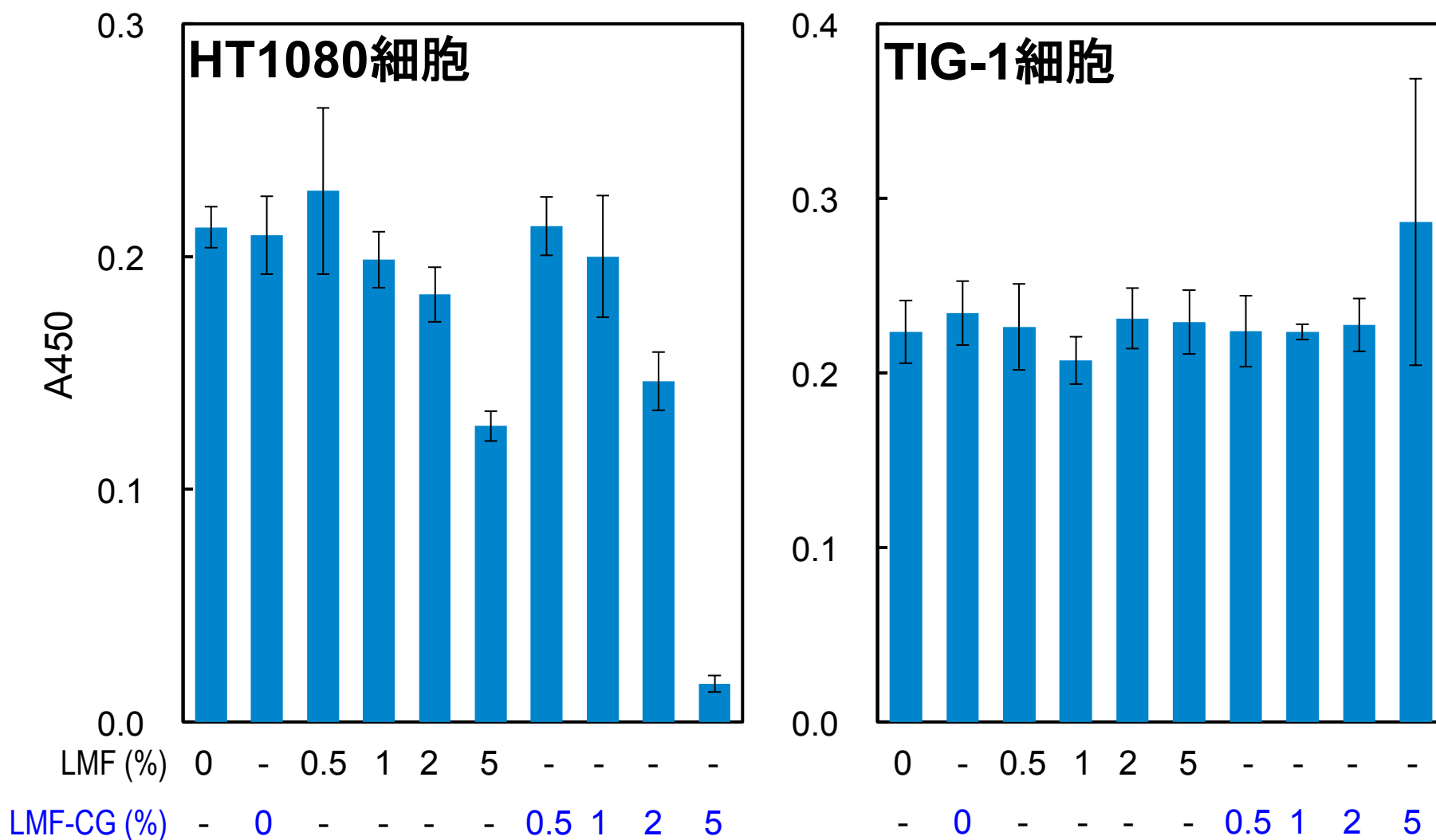
ナタマメ (*Canavalia gladiata*)

LMF-CG(ナタマメエキス5%添加LMF)

LMF-CGのガン細胞死誘導効果に関する試験方法1

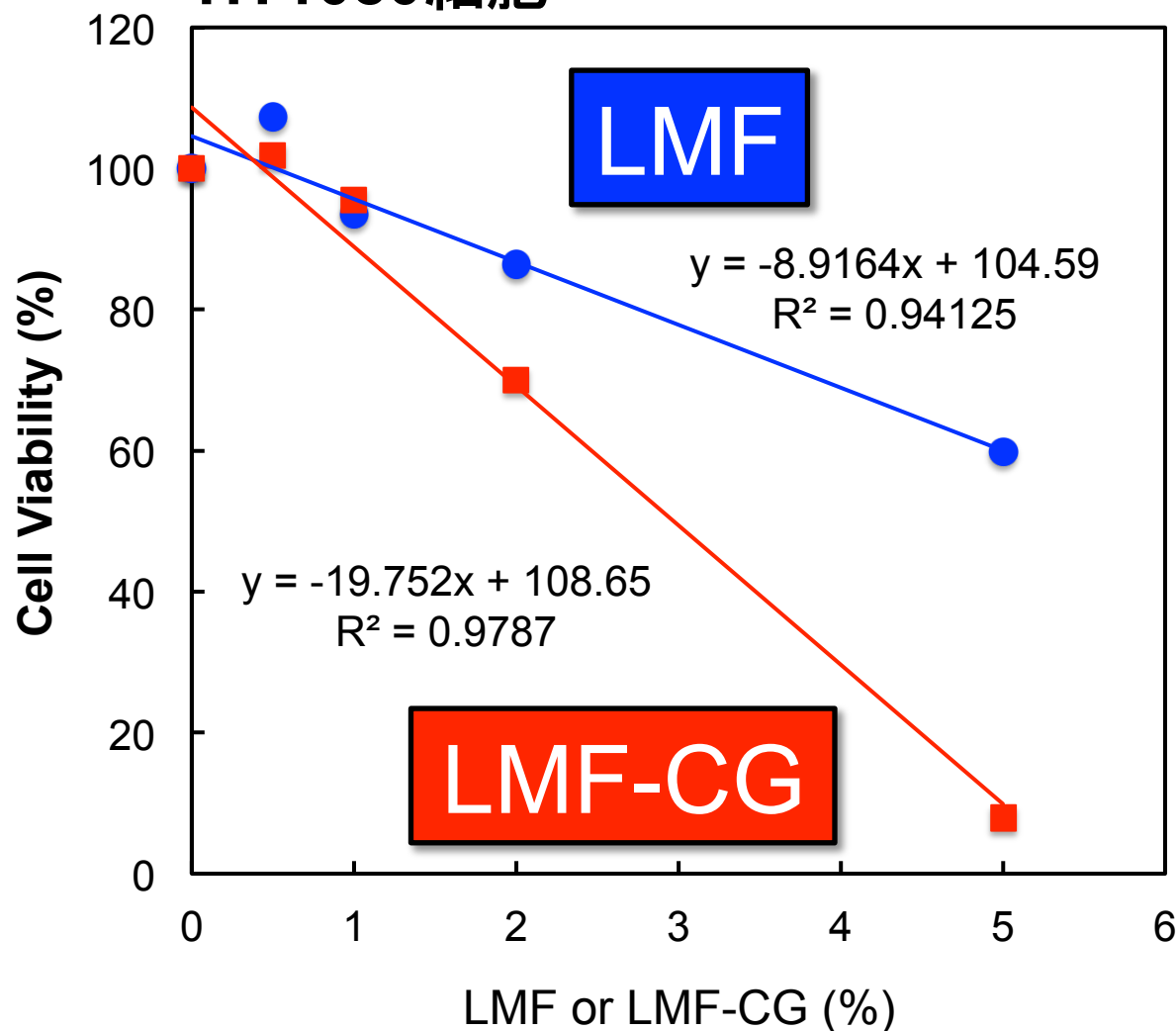


LMF-CGによる細胞死誘導効果



LMF-CGによる細胞死誘導効果

HT1080細胞



$IC_{50} : 6.12\%$

2.1倍活性が高い

$IC_{50} : 2.97\%$

LMF-CGのガン細胞死誘導効果に関する試験方法2

96-well plateに細胞を100 μ L/wellで播種

(TIG-1細胞: 3×10^3 cells/well、HepG2細胞: 5×10^3 cells/well、
HuH-7細胞: 4×10^3 cells/well)



インキュベート (Overnight、37°C、5% CO₂)



LMFとLMF-CGを加えた培地に交換(処理濃度0, 2, 5, 10, 15%)



インキュベート (48時間、37°C、5% CO₂)



WST-1を添加

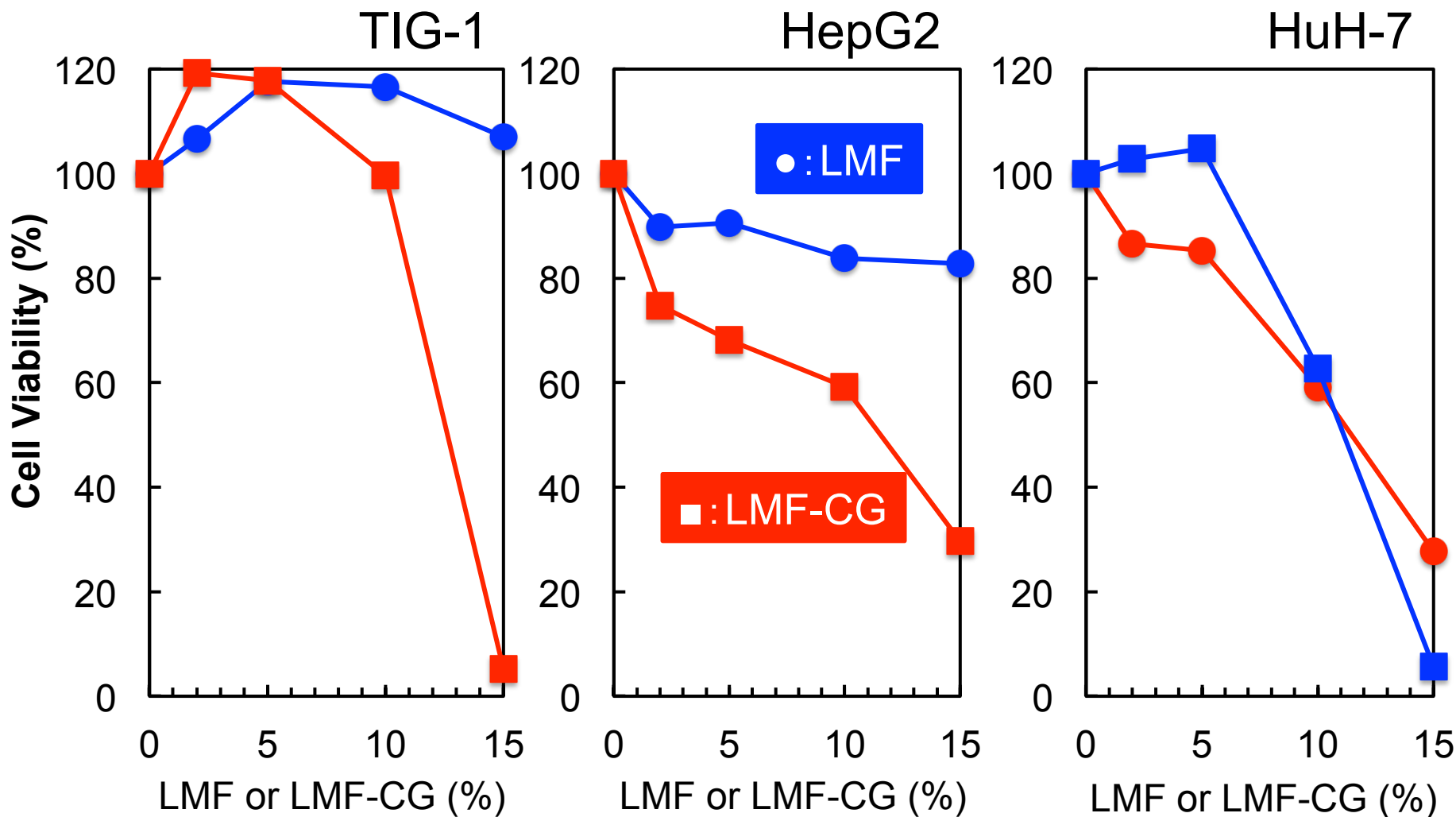


インキュベート (1時間、37°C、5% CO₂)



プレートリーダーで測定(WST-1)

LMF-CGによる細胞死誘導効果

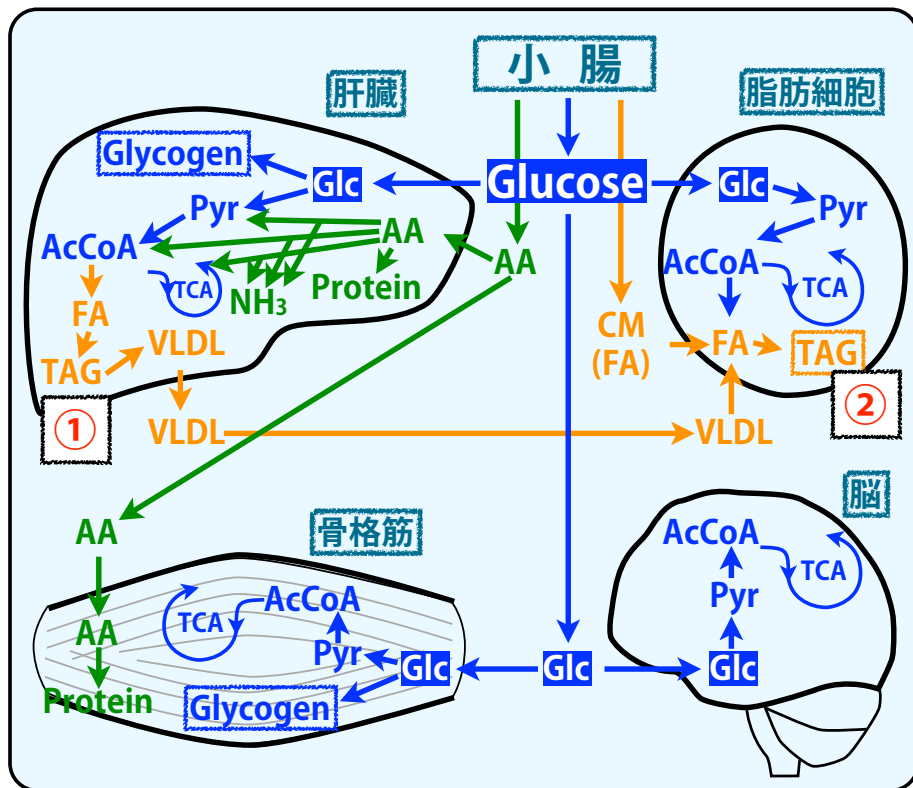




ケトン体存在下でのLMFによるガン 細胞増殖抑制効果の検討

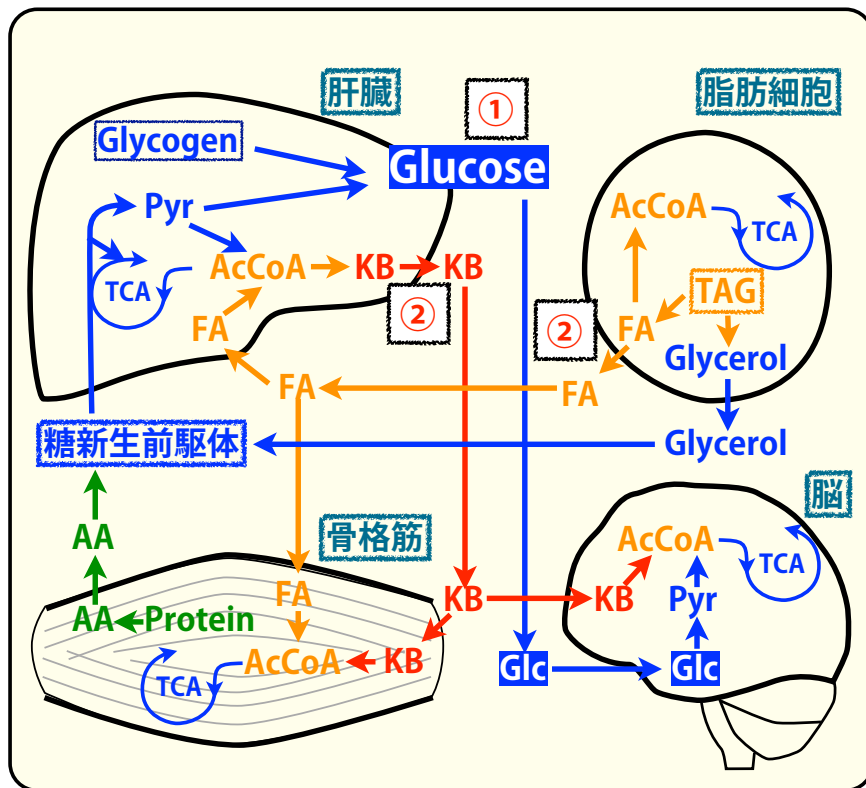
摂食時と空腹時の組織間の相互関係

摂食時

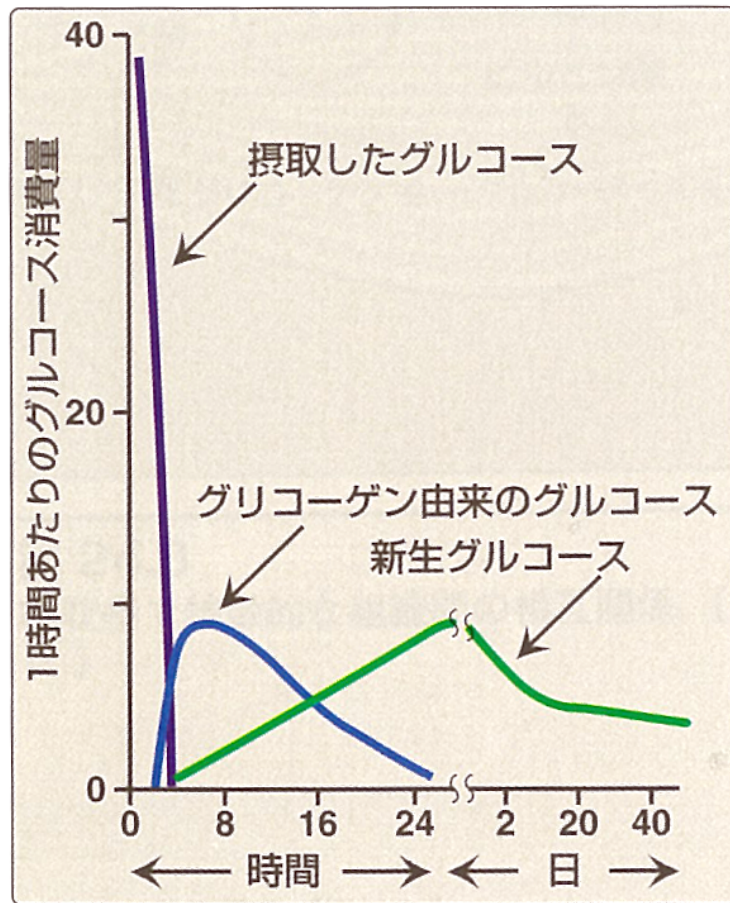


- ① 食事の糖質とタンパク質は体脂肪に変換されうる
- ② 食事の脂肪は体脂肪に変換されうる

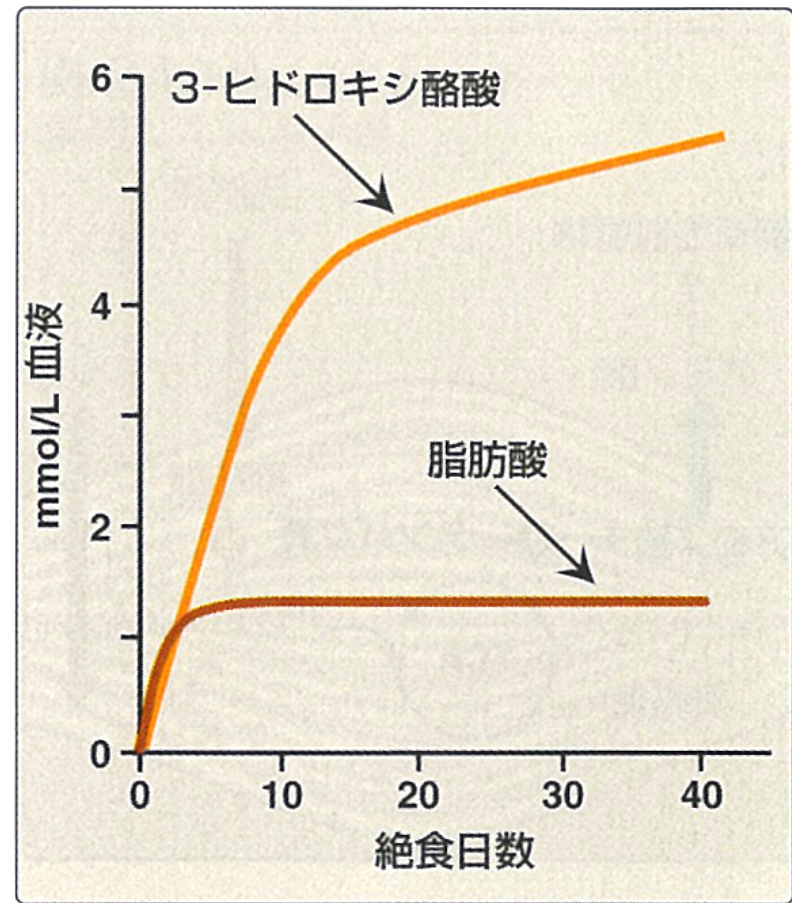
空腹時



- ① グルコース必須組織への供給 (グリコーゲン→糖新生)
- ② グルコース非必須組織への供給 (TAG→FA, KB)



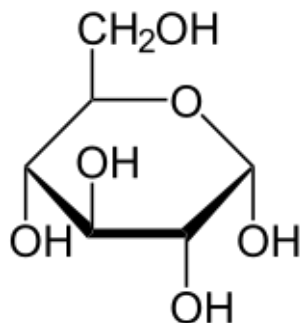
100 gのグルコースを摂取後の
血糖の由来



絶食時の脂肪酸と3-ヒドロキシ
酪酸の血中濃度の変化



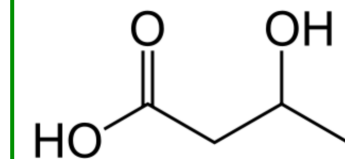
ケトン体のガン抑制



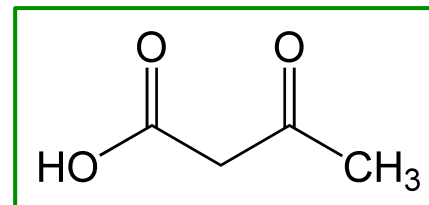
グルコース

グルコース

ケトン体



3-ヒドロキシ酪酸

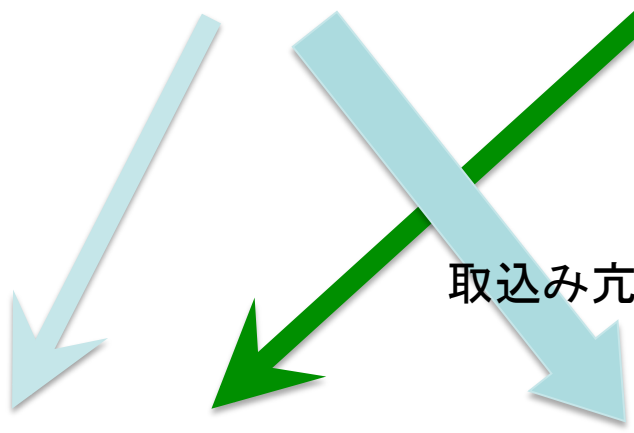


アセト酢酸

正常細胞

ガン細胞

LMF

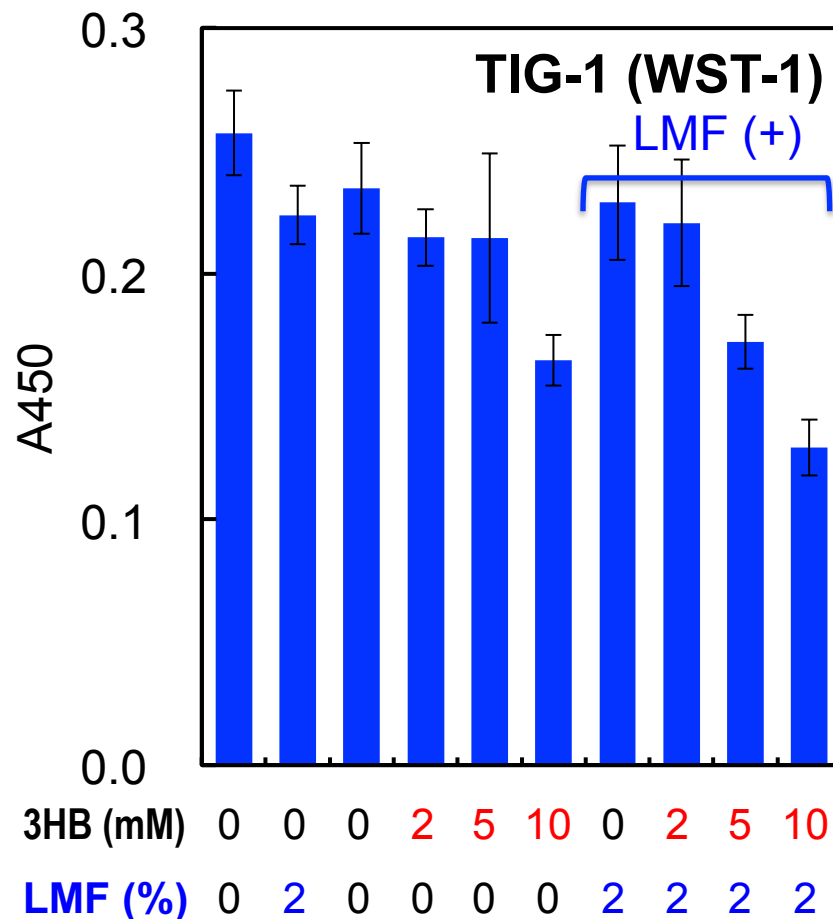
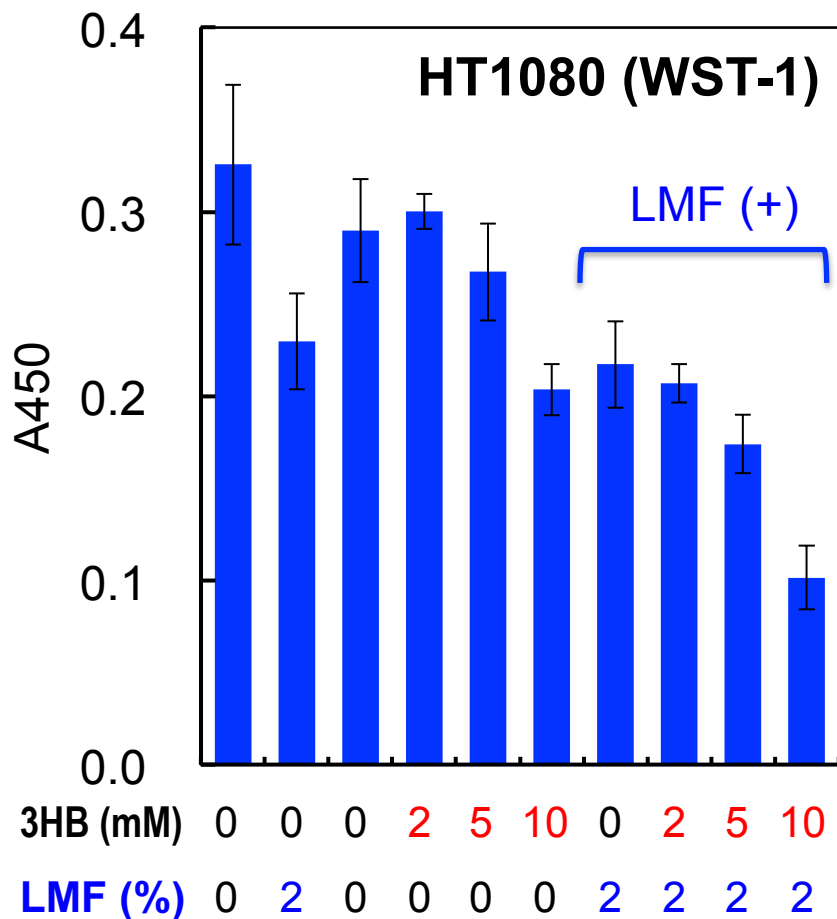


取込み亢進

増殖阻害

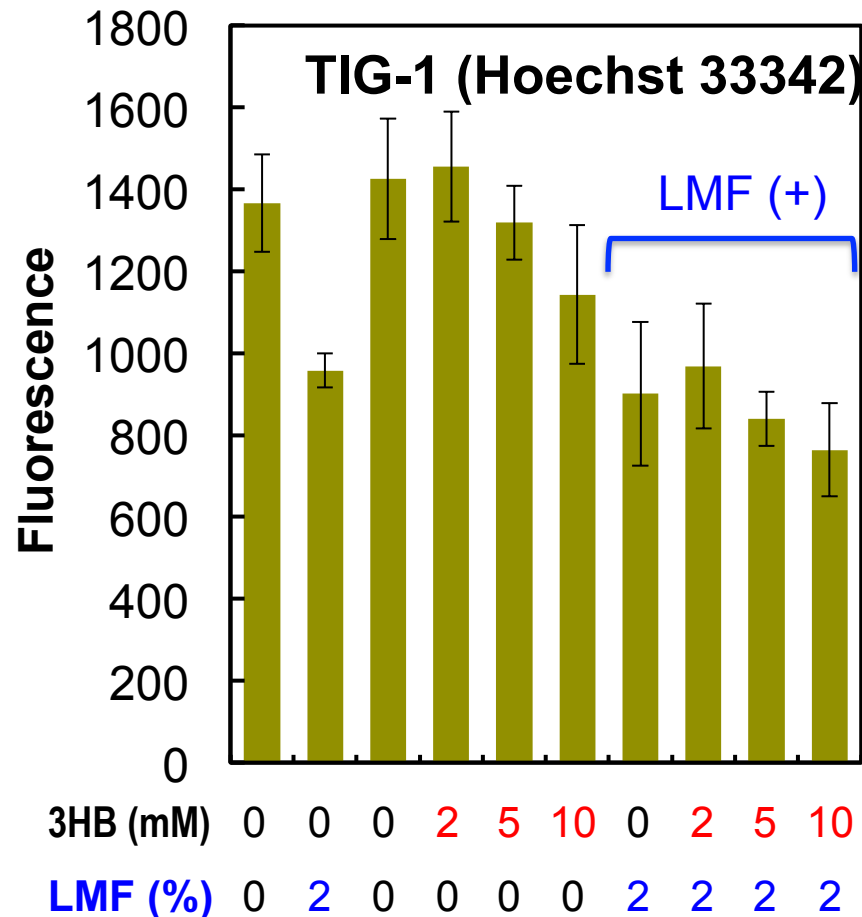
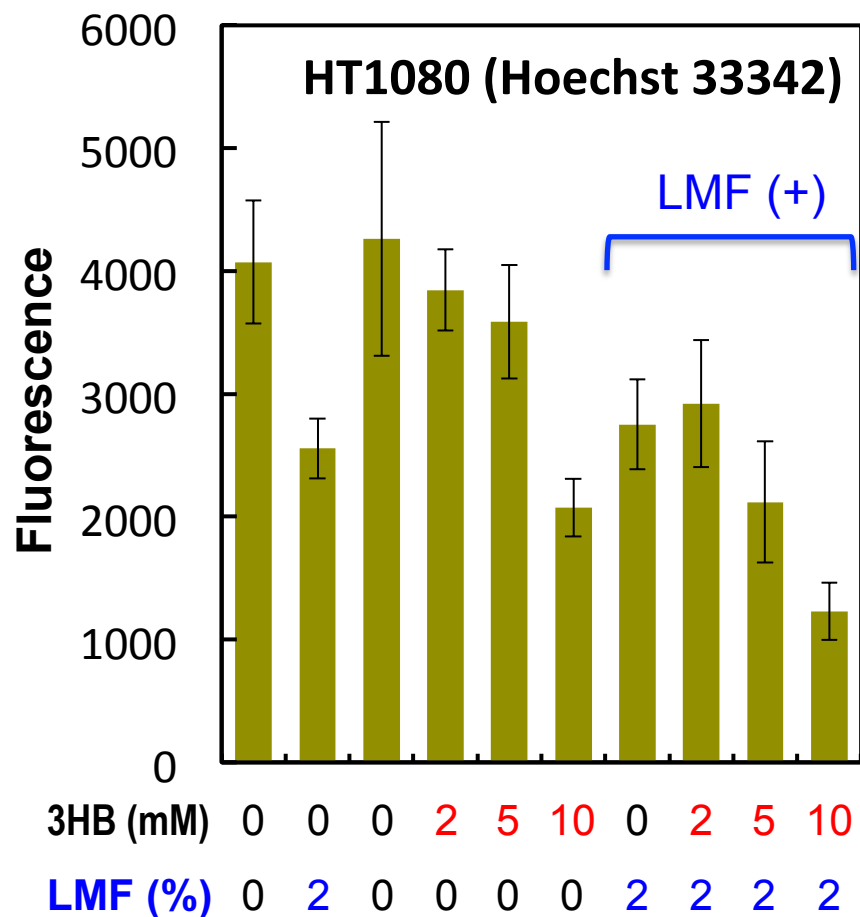


3HBとLMFの併用によるガン細胞増殖抑制効果 (WST-1)



(3HB:3-ヒドロキシ酪酸)

3HBとLMFの併用によるガン細胞増殖抑制効果 (Hoechst 33342)



(3HB:3-ヒドロキシ酪酸)



マウスにおけるPFクリームの効果 判定

PFクリーム of 皮膚創傷治癒への効果

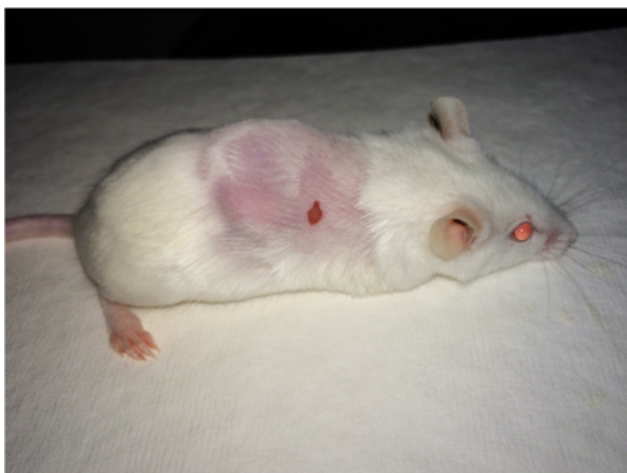
麻酔下でICRマウス背部を剃毛



直径 4 mm の皮膚トレパンにて皮筋を含む皮膚全層欠損創を作製
(1匹あたり脊柱を挟んだ左右対称に2 個作製)



クリーム、デルモゾールG軟膏、PFクリームを右側の創傷に塗布、
左側の創傷は未処置



PFクリーム of 皮膚創傷治癒への効果

クリーム (PF-)

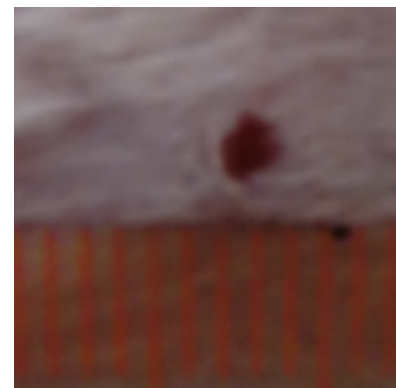
デルモゾールG軟膏

PFクリーム

0日



7日



まとめ

- HT1080細胞における IC_{50} を算出したところ、LMF-CGはLMFの約2倍の効果を有すると考えられた。HepG2細胞とHuH-7細胞においてLMF-GC処理に対する反応が異なっていた。
- 3HBとLMFの併用処理において、HT1080細胞において単独処理時と比較して強いガン細胞増殖抑制が確認されたが、TIG-1細胞においても若干の増殖抑制の傾向が認められた。
- PFクリームの皮膚創傷治癒への効果を検討したところ、「デルモゾールG軟膏」>「PFクリーム」>「クリーム」の順で良好な傾向が認められた。