

きのこ子実体抽出成分によるホルモン依存性乳癌細胞株の増殖阻害（第1報）

バイオスタッフ 岩原健二* 勝山 聡*

Inhibition of proliferation of hormone-dependent breast cancer cell line by the extracts of fruit body of basidiomycetes (1st report)

Kenji Iwahara and Satoshi Katsuyama

1. 緒言

がんは日本人の死亡原因のトップであり、毎年数十万人（2008年342,849人：男性206,287人・女性136,562人）が死亡している。女性では乳癌が明らかに増加してきている。乳癌の罹患は、働き盛りの40～60歳で多くなっており、さらに最近では閉経後での乳癌が増加している。乳癌の多くは（約7割）、ホルモン依存性である。女性ホルモンであるエストロゲンは細胞内のエストロゲンレセプター（ER）に結合してDNAに作用して乳癌が増殖する。このエストロゲン生成に関与しているいくつかの酵素やERへの結合を阻害する物質がホルモン依存性乳癌の治療薬として開発されている¹⁾。治療に非常に有効な反面、骨密度の低下、耐性の獲得、他器官での癌誘発などの副作用も懸念されている。それゆえ、効果的な治療薬の開発は常に求められている。

これまでに、日常摂取する食品（野菜、果物、水産品、きのこ）のエタノール抽出区分がホルモン依存性乳癌細胞の増殖を阻害する成分が広く認められることを見出してきた^{2,3)}。中でも、きのこ類は2次代謝においてアルカロイド、テルペノイド、フェノール類等を生産し、抗腫瘍効果があるものも見出されているが、いまだ未同定な物質も多く存在していると考えられる。そこで、きのこ中に含まれるホルモン依存性乳癌細胞の増殖を阻害する成分についての検討を行った。

2. 実験方法

2. 1 きのこと抽出成分による乳癌細胞の増殖阻害試験

ヒト乳癌細胞は凍結保存してあるホルモン依存性乳癌細胞株、T47Dおよびホルモン非依存性細胞株、MDA-MB-231を用いた。培地は、非働化したFBS

を10%含むDulbecco's modified Eagle's medium、DMEM（+）および増殖因子である性ステロイドやステロイド様作用物質をチャコール・デキストラ処理して取り除いたDMEM（-）を用いた。

継代5日目のT47DあるいはMDA-MB-231を回収し、遠心分離しDMEM（+）を捨ててDMEM（-）に懸濁させ、96ウェルプレートに 1×10^4 cell/cm²になるように播種し、37°C、5%CO₂インキュベーターに入れた。

細胞接着後、培地を吸い取り、各種きのこのエタノールおよび水抽出液（きのこ子実体の乾燥重量3gに対して100mlのエタノールあるいは水で抽出）の100 μ lを凍結乾燥し、20 μ lのDMSO溶液とした。このDMSO溶液1.0 μ lを生育因子であるE1Sを100nMあるいはE2を1nM含むDMEM（-）培地1,000 μ lに添加した。これらを96ウェルプレートに各抽出物につき5ウェルに100 μ l加えた。2日後同培地にて培地交換し、3日後Cell Counting Kit-8（株式会社同仁化学研究所、水溶性テトラゾリウム塩WST-8が生細胞数に比例する細胞内脱水素酵素活性により還元され生じた極大吸収を460nm付近に持つ桃色生成物であるホルマザンを450nmにて測定し生細胞数を測定）にて評価した。細胞増殖の阻害は、次のようにして評価した。増殖阻害（%）= $100 - (\text{Abs } 450\text{nm、きのこ抽出液成分有培地} / \text{Abs } 450\text{nm、きのこ中抽出液成分無培地}) \times 100$

2. 2 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によるきのこ抽出成分の分離

きのこ抽出液成分の分離は、逆相カラムクロマトグラフィー（C8カラム、ZORBAX XDB C-8、250 mm×9.4 mmID、Agilent社製）により分画を行った。サンプルは40 μ lアプライした。溶出は、水-

*) 現 バイオ科

エタノール濃度勾配にて行った。検出は、272nmにて行った。

3. 結果と考察

阻害試験を行ったほとんどのきのこのエタノール抽出物および水抽出物についてT47D阻害についての増殖阻害効果が認められた(表1)。水抽出物の阻害成分は、水溶性の高い高分子であるβ-グルカンなどの多糖類、糖タンパク質、ペプチド、レクチンであると考えられる。一方、エタノール抽出物中の阻害成分は、エタノールにより抽出されていることから低分子物質であり、ステロイド、脂肪酸、テルペノイド等であると考えられた⁴⁾。これら成分の中で、低分子化合物について検討を行った。試験したもののうちで阻害効果が高かったブナシメジのエタノール抽出区分を逆相クロマトグラフィー(HPLC)により水溶性から脂溶性のフラクションに分離し、各フラクションについてT47D、ホルモン非依存性乳癌細胞(MDA-MB-231)の増殖阻害効果を検討した。その結果、T47DをMDA-MB-231よりも特異的に阻害する脂溶性区分(F6)を見出した。また、これとは逆に、水溶性の高い画分(F2, 3)において、MDA-MB-231に対してより強く作用する成分も確認された(図1)。脂溶性の高い区分は、ステロイド、脂肪酸、テルペノイド、また、水溶性の高い区分はそれら物質の配糖体類ではないかと考えられる。これら区分中の阻害に有効な成分について、さらに分離精製を進めて行く予定である。

4. まとめ

主に食用とされている数十種類のきのこの抽出成分についてホルモン依存性乳癌細胞であるT47D株の増殖阻害作用の検討を行った。いくつかのきのこのにおいて高い増殖阻害作用が認められた。その中でシメジのエタノール抽出液中には、T47D株の増殖を特異的に阻害する効果のある成分が認められた。

謝辞

本研究を進めるにあたり、貴重なきのこ子実体の試料をご提供いただきましたSEIRYU Bio株式会

表1 きのこエタノール抽出物によるT47Dの増殖阻害

	増殖阻害(%)	
	エタノール抽出	水抽出
ブナシメジ	50	61
ボトベラ	43	27
ヤマブシタケ	40	36
シロハツ	33	14
チャジユタケ	29	51
マイタケ	27	17
スギタケ	24	16
エノキ	24	-1
シロキクラゲ	22	22
イワタケ	20	26
エリンギ	20	17
シイタケ	20	26
ナメコ	18	30
アワビタケ	15	7
クログチ	14	21
ツエタケ	11	12
ユキレイタケ	6	5

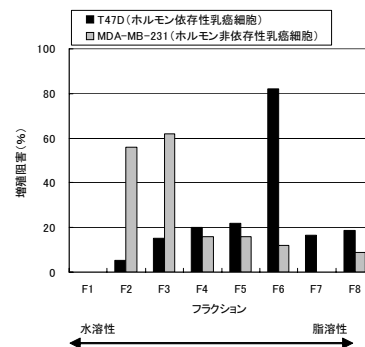


図1 シメジーエタノール抽出液分画物によるT47D及びMDA-MB-231の増殖阻害

社に感謝いたします。実験方法などご指導いただきました静岡県立大学環境科学研究所 大学院生活健康科学研究科 生体機能学研究室 下位香代子教授に感謝いたします。

参考文献

- 1) M. J. Reed, A. Purohit, L.W.L Woo, S.P. Newman and B.V.L. Potter : Steroid Sulfatase: Molecular Biology, Regulation and Inhibition, Endocrine Reviews, 26(2), 171-202 (2005).
- 2) 岩原健二、室伏敬太：食品中のステロイドスルファターゼ阻害物質による乳癌抑制に関する研究(第1報), 静岡県工業技術研究所研究報告, 第1号, 55-56 (2008).
- 3) 岩原健二、室伏敬太：食品中のステロイドスルファターゼ阻害物質による乳癌抑制に関する研究(第2報), 静岡県工業技術研究所研究報告, 第2号, 101-102 (2009).
- 4) 衣川堅二郎、小川真：きのこハンドブック, 朝倉書店 (2000).