【報告】

ブナシメジ抽出成分によるホルモン依存性乳癌細胞株の増殖阻害

― 増殖阻害成分の分離精製 ―

バイオ科　　岩原健二　天野祥吾　勝山　聡

Inhibition of proliferation of hormone-dependent breast cancer cell line by the extract from edible mushroom, *Hypsizygus marmoreus*

－Purification of cell growth inhibitors－

Kenji Iwahara, Shogo Amano and Satoshi Katsuyama

It has been well known that many kinds of ingredients in the mushrooms have inhibitory effects on proliferation of cancer cell line. In our recent research, it was found that the ethanol or water extracts from freeze-dried fruit body of *Hypsizygus marmoreus* (Buna-shimeji) had an inhibitory effect on cell proliferation for estrogen-dependent human breast cancer cell line, T47D.The proliferation inhibitors were separated by stepwise extraction with hexane, ethyl-acetate, ethanol, water, and hot water. Most effective inhibitors were in the ethyl-acetate extracts. The inhibitors in ethyl-acetate were separated into two major peaks by reversed phase chromatography on high performance liquid chromatography (HPLC). These inhibitors inhibited cell proliferation of T47D from 0.1 mg / ℓ to 15 mg / ℓ in a dose dependent manner. It appeared that the inhibitors irreversibly inhibited T47D cell growth by apoptosis or other systems at 15 mg / ℓ but, below the concentration (1.5 mg / ℓ), inhibited reversibly cell growth by stopping cell cycle.

１．緒言

毎年がんにより数十万人（2008年342,849人：男性206,287人・女性136,562人）が死亡しており、日本人の死亡原因の第一位となっている。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す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、食用きのこであるブナシメジ（学名：*Hypsizygus marmoreus*）の子実体のエタノール抽出区分中にホルモン依存性乳癌細胞の増殖を低濃度で阻害する成分が認められることを見出した[2、3]。これら成分についての作用機構、構造等の詳細は、まだ不明である。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、ブナシメジ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新規性の高い成分の分離精製、構造について知見を得るための検討を行った。

２．実験方法

２．１　ブナシメジ子実体凍結乾燥粉末の各種溶媒による抽出

市販の生のブナシメジ子実体を凍結乾燥し粉末状にした。これにヘキサンを加え撹拌しながら、遮光下にて24時間抽出した。抽出後、濾過して上澄みを回収し、さらに沈殿を同溶媒で洗浄し、上澄みと合わせてヘキサン抽出液とした。ついで、この残渣を酢酸エチル、エタノール、水、熱水により極性の低いほうから同様の操作を行い、それぞれの抽出液を得た。

【報告】

２．２ ブナシメジ子実体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・デキストラン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/㎠になるように播種し、37℃、５%CO_2インキュベーターに入れた。

細胞接着後、培地を吸い取り、各種抽出液のDMSO1.0$\mu\ell$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$\mu\ell$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$\mu\ell$加えた。５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－（Abs 450nm、きのこ抽出液成分有培地/Abs 450nm、きのこ中抽出液成分無培地）×100。

２．３ 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

ブナシメジ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、250mm×9.4 mmID、Agilent社製）により分離を行った。溶出は、水－アセトニトリル濃度勾配にて行った。検出は、220nm、254nm、および272nmにて行った。

３．結果と考察

市販の生のブナシメジ900ｇを凍結乾燥後、粉末状物を78.6ｇ得た。これにヘキサンから順番に抽出した各溶媒における抽出物の量（ｇ）と収率（%）性状を表１に示した。性状からヘキサンでは、脂肪分、酢酸エチル、エタノールにおいては、低分子芳香族、ステロイド、カロテノイド、あるいはそれらの配糖体、水、熱水においては、糖類、多糖類（キチン、キトサン、グルカンなど）、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質が抽出されたものと考えられた[4)]。

表１　各抽出溶媒における抽出量、収率、および性状

抽出溶媒	抽出量　収率	性状
ヘキサン	1.3 ｇ （1.7%）	白色ワックス状
酢酸エチル	1.5 ｇ （1.5%）	橙色半固形
エタノール	4.2 ｇ （5.4%）	黄色油状
水	42.6 ｇ （54.2%）	白色固形物
熱水	5.4 ｇ （6.9%）	白色繊維状

次に、得られた抽出液の阻害効果について検討を行った。各抽出物を細胞培地中にて50μｇ/ℓになるように添加して阻害効果を見た。いずれの画分においてもT47D、およびMDA-MB-231において阻害効果が認められた。酢酸エチル抽出液においてもっとも高い阻害効果が認められた（図１）。

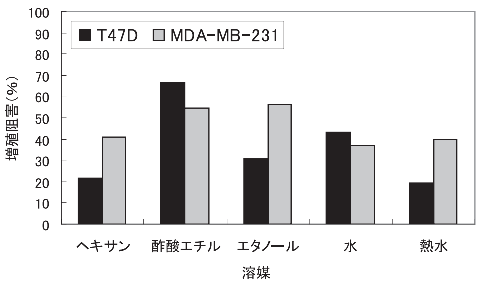

図１　各抽出段階におけるT47DおよびMDA-MB-231の増殖阻害

また、５日培養後の細胞の状態を観察したところ、酢酸エチルにおいてのみ細胞が萎縮した形態のものが観察された。他の区分においては、阻害物質を加えていないものと形態的には同じであった。萎縮しているものは、細胞が死んでいると考えられた。また、萎縮していないものは、細胞の増殖が停止しているだけであることも考えられた。これより、以後の実験においては、酢酸エチルの抽出液中の成分の

分析を行った。

まず、酢酸エチル区分を逆相クロマトグラフィーにより分離を行い５分毎に分画した（Ｆ１〜Ｆ９）。各区分のT47Dの増殖阻害効果を見た結果、アセトニトリルが90％以上で溶出されており、かなり極性の低いと考えられる区分（Ｆ５〜７）に強い阻害が認められた（図２）。Ｆ５、６はT47D、MDA-MB-231ともに阻害効果が認められたが、Ｆ７はT47Dに対しては阻害効果があったが、MDA-MB-231に対しては逆に生育を促進する効果が認められた。そこで、もっとも高い阻害効果のあったＦ６についてさらに検討を行うこととした。Ｆ６を分取し、さらに分離をし（Ｆ６−１〜Ｆ６−５に分画）阻害効果を検討した。その結果、Ｆ６−１とＦ６−５に強い阻害効果が認められた（図３）。これら２つのフラクションの中で阻害活性の強い成分をさらに精製を行い、Ｆ６−１Ｐ、及びＦ６−５Ｐを得た。いずれの成分も濃度依存的にT47D, およびMDA-MB-231の増殖を阻害した。Ｆ６−１Ｐは、T47Dでは、0.25mg/ℓ（Ｆ６−１Ｐ)、0.7mg/ℓ（Ｆ６−５Ｐ)、MDA-MB-231では、９mg/ℓ（Ｆ６−１Ｐ)、4.5mg/ℓ（Ｆ６−５Ｐ）において約50％の阻害を示した（図４、５）。いずれも低濃度では、T47Dに強い増殖阻害効果が認められたが、MDA-MB-231では認められなかった。MDA-MB231はER（−）であるので、阻害剤はT47DのERに競合的に結合してＥ２の結合を阻害することにより増殖が阻害されていることが考えられた。また濃度が高くなると（15mg/ℓ）ではいずれの細胞株においても形態的に細胞が死んでいる様子が観察されたことから、高濃度では、細胞が何らかの作用により細胞死が誘導されていると考えられた。

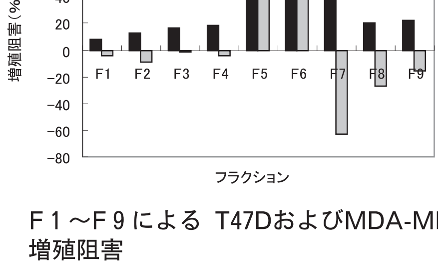

図２　Ｆ１〜Ｆ９による T47DおよびMDA-MB-231の増殖阻害

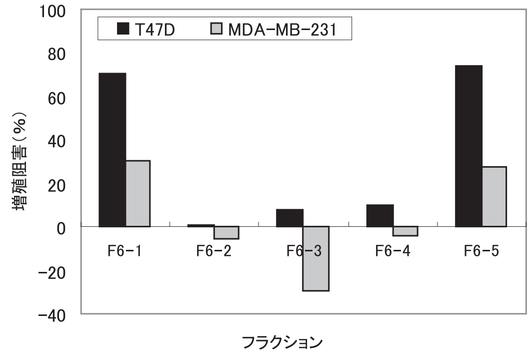

図３　Ｆ６−１〜Ｆ６−５によるT47DおよびMDA-MB-231の増殖阻害

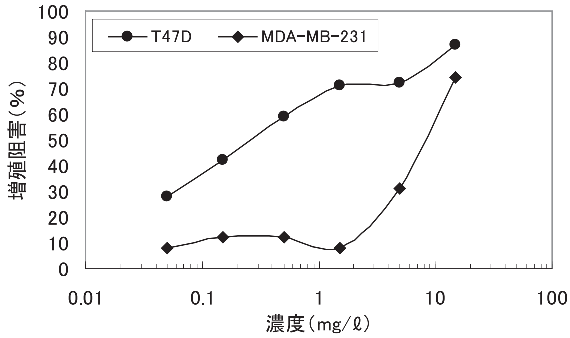

図４　Ｆ６−１ＰによるT47DおよびMDA-MB-231の増殖阻害

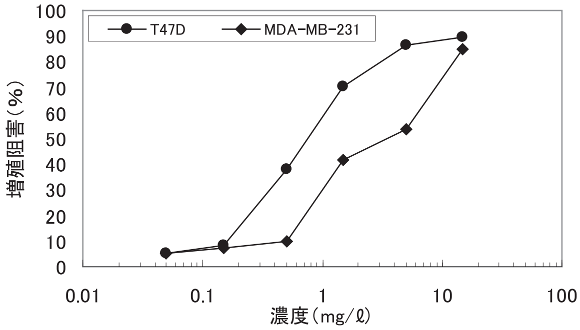

図５　Ｆ６−５Ｐによる T47DおよびMDA-MB-231の増殖阻害

そこで、培養２日後の細胞に阻害剤（1.5mg/ℓ、および15mg/ℓ）を含むあるいは含まない培地に交換し、５日後の細胞の増殖を確認した。その結果、1.5mg/ℓでは、増殖が阻害剤を含まない場合の約半分が認められた。しかし、15mg/ℓでは細胞数が減少しており、細胞が増殖することなく死滅していると考えられた。これら作用機構については更なる検討が必要である。

【報告】

４．まとめ

ブナシメジ子実体の酢酸エチル抽出区分にホルモン依存性乳癌細胞を強く阻害する主要な２成分を分離した。いずれのピークも低濃度においてはホルモン依存性乳癌の増殖のみを阻害したが、濃度が上がるにつれてホルモン非依存性乳癌乳細胞の増殖も阻害した。また、低濃度においては、増殖を停止している作用であるが、濃度が高くなると細胞を殺す作用となっていることが推察された。

謝辞

本研究を進めるにあたり、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、静岡大学創造科学技術大学院（兼）静岡大学農学部応用生物化学科　河岸洋和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 (2005) Steroid Sulfatase: Molecular Biology, Regulation and Inhibition, Endorcine Reviews. 26(2):171-2

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２報）：静岡県沼津工業技術研究所研究報告，第２号，p 101-102 （2009）

３）岩原　健二、勝山　聡、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）：静岡県沼津工業技術研究所研究報告，第３号，p65-66 （2010）

４）衣川堅二郎、小川眞、きのこハンドブック（朝倉書店、2000）