【ノート】

シメジ由来のホルモン依存性乳癌細胞の増殖阻害物質に関する研究
― 菌糸体培養による物質生産の検討 ―

バイオ科　勝山　聡　天野祥吾　岩原健二

Study on inhibitors of hormone-dependent breast cancer cell growth by *Hypsizygus marmoreus.*
－Production of inhibitors by the cultivation of mycelium.－

Satoshi Katsuyama, Shogo Amano and Kenji Iwahara

1．緒論

癌は日本人の死亡原因のトップであり、特に近年、女性において乳癌の罹患率および死亡率が増加している。そのため、効果的な治療薬の開発が求められている。我々はこれまでの研究により、日常摂取する食品のエタノール（以下、EtOH）抽出画分に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[1,2]。また、その中でも特にブナシメジ子実体からのEtOH抽出画分中に非常に強い阻害成分が認められた[3]。しかし、きのこ子実体は形成に長期間を要することや栽培菌床成分などの外部環境から影響を受けやすく均一な素材を得にくいこと等から、阻害物質の安定的な生産には向かない。そこで本研究では、子実体よりも培養が容易で均一な素材を大量に得られる菌糸体を用い、阻害物質の生産について検討を行った。

2．実験方法

2．1　ブナシメジ菌糸体培養およびEtOH抽出

ATCC（American Type Culture Collection）より分譲されたブナシメジHypsizygus marmoreus（Peck）Bigelow を供試菌株とし、これをPDA培地（Difco）にて25℃、7日間前培養した。培養後、これの密生成長部を内径7.0mmのコルクボーラーで打ち抜き、接種源とした。本培養には、この接種源2片をGP液体培地（2.0% グルコース、0.2%酵母エキス、0.5%ペプトン、0.1% KH_2PO_4、0.05% Mg_2SO_4、pH 5.0）5㎖にて懸濁液とし、GP液体培地200㎖に接種し25℃にて振とう培養した。培養後、吸引ろ過により得たろ液を菌糸体培養液、超純水にて洗浄した残渣を菌糸体として回収した。また、それぞれについて凍結乾燥処理し、重量を測定した。

EtOH抽出は以下のように行った。菌糸体については、凍結乾燥し粉末化したものを0.03g/㎖の割合でEtOHにて約24時間暗所抽出した。培養液については、得た培養液のうち50㎖を凍結乾燥させ、これにEtOH10㎖を加え約24時間暗所抽出した。その後、菌糸体および培養液ともにデカンテーションにより上清と残渣に分け、さらに上清を0.45μmフィルターろ過しEtOH抽出液とした。

2．2　乳癌細胞の増殖阻害試験

ヒト乳癌細胞は、ECACC（European Collection of Cell Cultures）より購入したホルモン依存性ヒト乳癌細胞T47-D株およびホルモン非依存性ヒト乳癌細胞MDA-MB-231株を用いた。培地は非働化した牛胎児血清（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様作用をする物質をチャコール・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T47-DおよびMDA-MB-231を回収し、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にて細胞接着させた。

増殖阻害試験には、各種EtOH抽出液100μℓを凍結乾燥させ、DMSO20μℓにて溶解させたものを阻害溶液として用いた。試験培地には、T47-Dは増殖因子のエストロン3硫酸（E1S）を100nM含むDMEM(－)を、MDA-MB-231は増殖因子を含まな

【ノート】

いDMEM(－)を用い、これに阻害溶液をDMSO最終濃度が0.1%になるように添加したものを用いた。増殖阻害効果は細胞接着後、試験培地へ転換し、37℃、5 %CO_2にて５日間培養後の生細胞数をCell Counting Kit-8（㈱同仁化学研究所、生細胞数に比例して生成されるホルマザン色素を波長450nmにて吸光度測定）にて解析し、次式により評価した。阻害効果（%）＝100－試験区平均吸光度 / 対照区平均吸光度×100。

２．３　高速液体クロマトグラフィーによる抽出成分の分画

高速液体クロマトグラフ（HPLC, Agilent 1100）を用い、逆相カラムクロマトグラフィーにより分画を行った。分析カラムはZORBAX Eclipse XDB-C8 semi-preparative 9.4 × 250mm 5-micron (Agilent) を用い、カラム温度25.0℃で、溶離液は濃度勾配H_2O/CH_3CN、流速2.0㎖/min、試料アプライ量25.0μℓで、紫外吸収検出器（UV:220nm、254nm、272nm）により分析を実施した。

３．結果と考察

培養の結果、菌糸体は培養13日目で重量最大となった（図１）。きのこ類において多くの機能性が見出されている二次代謝産物は主に定常期にて生産される。よって、乳癌細胞の増殖阻害物質も培養13日目以降の抽出液中に含まれると考えられた。そのため、次に、種々の培養日数における菌糸体および培養液のEtOH抽出液による乳癌細胞の増殖阻害効果を調べた。その結果、培養20日目の菌糸体EtOH抽出液においてMDA-MB-231に対して他の抽出液よりも高い阻害効果が認められた（図２）。さらに、この培養20日目の菌糸体EtOH抽出液についてHPLCにて分画を行ったところ、脂溶性の高い区分（保持時間25分、溶離液２%H_2O/98% CH_3CN）に顕著なピークが確認された（図は不掲載）。これは子実体からのEtOH抽出液においては確認されなかったピークであり、また培養６日目および13日目の菌糸体EtOH抽出液においても確認されなかったため、菌糸体特異的に生成される二次代謝産物であると考えられる。

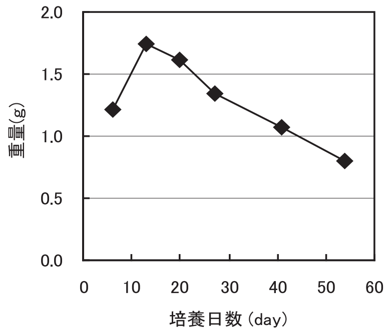

図１　菌糸体の重量変化

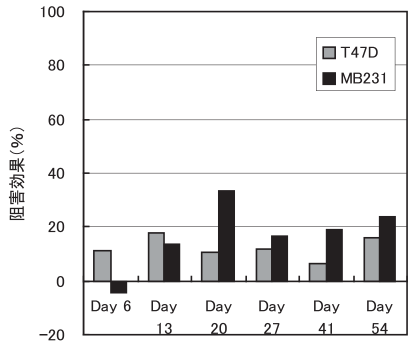

図２　菌糸体EtOH抽出物による乳癌細胞増殖阻害効果

４．まとめ

ブナシメジ菌糸体培養20日目に得た菌糸体によるEtOH抽出液においてホルモン非依存性乳癌細胞MDA-MB-231に対する増殖阻害効果が認められた。またHPLC分析により、この阻害成分は菌糸体特異的な物質であることが示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり、実験方法などご指導いただきました静岡大学創造科学技術大学院　バイオサイエンス専攻　河岸洋和教授に感謝いたします。

参考文献

１）岩原、室伏：静岡県工業技術研究所研究報告，第１号、55-56（2008）.

２）岩原、室伏：静岡県工業技術研究所研究報告，第２号、101-102（2009）.

３）岩原、勝山：静岡県工業技術研究所研究報告，第３号、65-66（2010）