

〈報告〉

ヒト乳がん細胞の増殖と遺伝子発現に対する 新規オリゴ糖 MeINH₂ の効果

中里隆之佑*・飯泉 恭一*・佐々木 啓*・重永 綾子**・
尾形 慎***・青木 大地***・三澤 義知****・細見 修*・
久保原 禅*

Effects of a novel oligosaccharide, MeINH₂, on human breast cancer cells

Ryunosuke NAKAZATO*, Kyo-ichi IIZUMI*, Hiraku SASAKI*, Ayako SHIGENAGA**,
Makoto OGATA***, Daichi AOKI***, Yoshinori MISAWA****, Osamu HOSOMI*,
and Yuzuru KUBOHARA*

Abstract

AIMS: It has been shown that GlcNH₂ exhibits anti-tumor activities in various tumor cell lines in vitro. Recently, a novel disaccharide, Gal α 1-6GlcNH₂ (designated MeINH₂), was shown to suppress cell growth in some tumor cells in vitro. In this study, we have examined the effects of MeINH₂ (and GlcNH₂ as a reference) on the human triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231.

METHODS: Cell growth was assessed by XTT assay. The mRNA expressions in control and MeINH₂-treated cells were compared by the use of DNA microarrays. To identify the proteins that were affected by MeINH₂ treatment, we performed 2-dimensional electrophoresis (2-DE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

RESULTS: At a range of 2.5–10 mM, MeINH₂ as well as GlcNH₂ significantly suppressed cell growth of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner. DNA microarray and 2-DE-LC-MS/MS analyses revealed that treatment of the cells with 5 mM MeINH₂ could alter the expression of various genes and proteins that are involved in regulation of cell growth and survival.

CONCLUSION: The present results suggest that MeINH₂ may have a therapeutic potential in the treatment of malignant breast cancer.

1. 緒 言

日本人のがんによる死亡数は1950年代から増加し、1980年には死因のトップとなった⁴⁾。それ以降もがんの罹患数・死亡数は増加し続けており、より有効で副作用の(少)ない抗がん剤の開発等を含めた治療法の確立が求められている。がんの中でも乳がんは罹患数・死亡数共に年々増加傾向にあり、女性のがん罹患数全体の約20%を占めるまでになってい

* 順天堂大学スポーツ健康科学部健康学科
Department of Health Sciences, Faculty of Health
and Sports Science, Juntendo University

** 順天堂大学スポーツ健康医科学研究所
Institute for Health and Sports Science, Juntendo
University

*** 福島工業高等専門学校物質工学科
Department of Chemistry and Biochemistry, National
Institute of Technology, Fukushima College

**** 株式会社インフィンコ
INFINCON Co., Ltd.

る⁴⁾。

乳がんの危険因子としてエストロゲンの関与が指摘されており、乳腺が高濃度のエストロゲンに長期間暴露されると乳がん発症のリスクが高まるとされる³⁾¹⁷⁾²³⁾。我が国においては、近年の食の欧米化や女性の社会進出によりエストロゲン暴露期間が増加していると考えられている。通常、全身の脂肪組織(脂肪細胞)ではエストロゲンが産生されているのだが、食の欧米化は脂肪を蓄積しやすいため(脂肪組織が発達し)体内のエストロゲン濃度を高めることに繋がる。また、妊娠中の女性の体内ではプロゲステロンが分泌され、その分、エストロゲンの作用を抑制するのだが、女性の社会進出等による出産経験の遅れや出産回数の減少も結果的に(エストロゲンへの暴露機会を増すことになり)乳がん発症のリスクを高める要因となっている¹⁾³⁾⁹⁾¹⁰⁾¹⁴⁾¹⁷⁾²³⁾。

以上のような理由から、エストロゲン受容体、およびその関連分子を標的とした発がん予防や、抗がん剤の開発、乳がん治療法の確立が試みられている。また、乳がんのタイプによっては、ヒト上皮成長因子受容体2(human epidermal growth factor receptor type2:HER2)という細胞増殖に関わる受容体を阻害することで高い治療効果を得ている。しかしながら、乳がんの中にはホルモン受容体やHER2を標的とした対処が不可能なタイプの乳がんが存在する。それは「トリプルネガティブ乳がん」と呼ばれるタイプのもので、乳がん患者全体の15~20%を占める。このタイプの乳がん細胞は、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、そしてHER2を発現していない⁴⁾⁷⁾¹⁶⁾。そのため、このトリプルネガティブ乳がんに対しては、他の乳がんに対して有効な薬剤、即ち、抗エストロゲン製剤、抗HER2薬剤ラパチニブ、トラスツズマブ(HER2を特異的に阻害する薬剤)等の治療薬が無効なうえ、アドリアマイシンやタキソール等の(乳がん以外の治療にも用いられる)抗がん剤もあまり有効ではないため、一般にトリプルネガティブ乳がん患者の予後は悪い¹⁶⁾。

機能性単糖類の1つであるD-Glucosamine

(GlcNH₂)は様々な薬理活性を有するとされており、近年、GlcNH₂の有する抗腫瘍活性に関する多くの報告がなされている。GlcNH₂は各種腫瘍細胞において、細胞周期の移行阻害、細胞増殖に関わるシグナル系への影響、グルコース解糖系の阻害、小胞体ストレスによる細胞死の誘導等を引き起こすことが示されており⁵⁾¹⁵⁾²¹⁾²³⁾²⁷⁾、GlcNH₂を含む機能性糖類の抗がん剤としての臨床応用が期待されている。

一方、当研究室において合成された新規オリゴ糖Gal α 1-6GlcNH₂(MelNH₂)も強力な抗腫瘍活性を有することが報告されている。MelNH₂はGlcNH₂よりも強くK562細胞(ヒト白血病細胞)の細胞増殖を阻害する一方で、正常細胞のモデルであるHUC-F2細胞(ヒト瞬帯繊維芽細胞)に対する増殖阻害作用は認められなかったことから¹¹⁾このオリゴ糖についても抗がん剤としての臨床応用が期待されている。しかしながら、MelNH₂の作用スペクトルや作用機序についてはほとんど解明されていない。

本研究では、ヒトトリプルネガティブ乳がんモデル細胞であるMDA-MB-231細胞を用いて、MelNH₂の増殖阻害効果の検討と、その作用機序の解析を試みた。その結果、2.5-10 mMのMelNH₂は濃度依存的にMDA-MB-231細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。また、MelNH₂の作用機序解析を目的としたDNAマイクロアレイ法によるmRNA発現の比較検討、並びに、二次元電気泳動法とLC-MS/MS法によるタンパク質発現の比較検討を行い、MelNH₂によって発現調節を受けるいくつかの遺伝子・タンパク質を同定した。これらのデータを基にMelNH₂の作用機序について考察する。

2. 方 法

2.1 ヒト乳がん細胞の培養と糖の調整

ヒトMDA-MB-231トリプルネガティブ乳がん細胞は、ATCC(American Type Culture Collection)より購入した。細胞は、Fetal Bovine Serum(10% [v/v])、Penicillin(100 U/ml)、Streptomycin(100 μ g

/ml) を添加した Leibovitz's L-15 (和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan) 培地を用い, 37°Cで培養した。

MelNH₂ の合成は, 先行論文に記載の方法に従って行った¹¹⁾。GlcNH₂ (Sigma-Aldrich Japan 社) と MelNH₂ は pH7.4 のリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) で溶解し, 100 mM に調整した。これらの糖溶液は, 0.20 μm のシリンジフィルター (Minisart RC 15; Sartorius 社, Göttingen, Germany) で滅菌し, 使用するまで -20°C で保管した。糖溶液は PBS で希釈して, 25 mM と 50 mM 溶液も調整した。

2.2 細胞増殖の検討

細胞 (3 × 10³ cells/well) を 96 ウェルプレート (Corning 社, Corning, NY, USA) に播種後, 6 時間培養し, ウェルの底面に接着させた。その後, 培地を除去し, 新しい培地 90 μl と 10 μl の PBS あるいは 25-100 mM 糖溶液 (糖の最終濃度はそれぞれ, 0, 2.5, 5, 10 mM) をそれぞれのウェルに加え, 72 時間培養した。

培養後の細胞数は Cell Proliferation Kit II (XTT assay; Roche 社, Mannheim, Germany) を用いて評価した。培地を除去後, 各ウェルに新たな培地 100 μl と XTT 試薬 (XTT 標識試薬と電子カップリング試薬を 37°C の恒温槽にて融解し, 50 : 1 の割合で混合したもの) 50 μl を順に添加した。その際, ブランクとして培地のみのウェルも用意した。このプレートを 37°C で 4 時間発色後, iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad 社, Hercules, CA, USA) を用いて吸光度 (450 nm) を測定し, 得られた吸光度から, コントロールを 100 とした相対細胞数を求めた。

2.3 二次元電気泳動

細胞 (6 × 10⁵ cells/well) を 6 ウェルプレート (Corning 社) に播種し一晩培養を行った。翌日, 培地を除去し, 細胞を 5 mM MelNH₂ を含む培地あるいは含まない培地で 12 時間培養後, PBS で洗浄し, 糖処理細胞とコントロール細胞をそれぞれプロテアーゼ阻害剤 (Complete Protease Inhibitor;

Roche 社) 入りの SDS (Sodium dodecyl sulphate) 溶液 (80 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% [w/v] Glycerol, 2% [w/v] SDS) で溶解した (これらのサンプルは通常の SDS-PAGE/Western blot にも利用できるように, 一旦 SDS 溶液で溶解して回収した。ただし, 本稿では SDS-PAGE/Western blot のデータは採用していない)。超音波処理で細胞を加熱破碎後, 等電点電気泳動に影響を与える SDS と塩を除去するために, Acetone 溶液 (90% [v/v] acetone, 5% [v/v] acetic acid, 5% [v/v] methanol 混合液: 予め -4°C で冷却) をサンプルの 5 倍量を加え, タンパク質を沈殿させた。4°C で 15,000 rpm の条件下で遠心を行い, 沈殿したタンパク質を回収した。

回収したタンパク質を膨潤用ストック溶液 (9 M Urea, 4% [w/v] CHAPS (3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate), 0.5% [v/v] IPG (Immobilized pH gradient) buffer, 0.002% [w/v] Bromophenol blue) に溶解し, Immobiline Dry Strip ゲル (pH 3-10 NL, 7 cm; GE Healthcare 社, Waukesha, WI, USA) を用いて一次元目の等電点電気泳動 (Isoelectric focusing: IEF) を行った。泳動には Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare 社) を用いた [膨潤時間: 12 時間, 電圧条件: (1) 300 V, 4 時間 (Step and Hold), (2) 1,000 V, 1 時間 (Gradient), (3) 5,000 V, 1 時間 30 分 (Gradient), (4) 5,000 V, 30 分 (Step and Hold)]。IEF 後の 2 本の Strip ゲル (コントロール細胞と糖処理細胞のタンパク質をそれぞれ IEF 展開したゲル) を SDS 平衡化バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Urea, 30% [w/v] Glycerol, 0.1% [w/v] DTT (dithiothreitol)) で 30 分間平衡化した。その後, 2 つの Strip ゲルを幅広の 10% アクリルアミドゲル (10% [w/v] アクリルアミド, 0.375 M Tris pH 8.8, 0.1% [w/v] SDS, 0.033% [w/v] 過硫酸アンモニウム, 0.05% [v/v] テトラメチルエチレンジアミン) 上にセットし, ナイアガラ電気泳動装置を用いて二次元目の泳動を行った。このナイアガラ電気泳動システムを用いることで, IEF 後の 2 つのサンプルタンパク質を同一幅広ゲル中で展開することが可能となる。

電気泳動後のゲルは、以下の2つの方法で染色した。タンパク質のリン酸化量の変化は、リン酸化タンパク質の特異的蛍光染色薬 Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen 社, Carlsbad, CA, USA) を用いて検討した。さらに、トータルタンパク質の発現量は、SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Lonza Japan 社, Tokyo, Japan) を用いて蛍光染色した。蛍光染色したゲルは、蛍光染色ゲル撮影・切り出し装置「フルオロホレスター3000 (Anatech 社, Tokyo, Japan)」を用いて撮影し、「サンプル間(±MeI_{NH}₂)で発現量に差があり、かつ、切り出しやすいタンパク質スポットを任意に選定して」切り出した(→LC-MS/MS解析に使用)。

撮影したゲル中のタンパク質スポットは、ImageQuant software (Amersham 社, Little Chalfont, UK) を用いて定量した。

2.4 液体クロマトグラフィー質量分析法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS 法) によるタンパク質の同定

2次元電気泳動ゲルから切り出したスポットは、還元アルキル化処理後に、トリプシン (Promega 社) でゲル内 (in-gel) 消化を行った。回収したペプチドは濃縮後、LC-MS/MS 分離分析装置 (LC: Paradigm MS2; Michrom BioResources 社, Auburn, CA, USA, MS: Thermo Fisher Science LXQ mass spectrometer; Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, MA, USA) により測定を行った。分析用カラムには、Zaplous α Pep-C18 column (0.1 mm ID×150 mm; AMR 社, Tokyo, Japan) を用いた。移動相には、0.1% [v/v] ギ酸水溶液とアセトニトリルを用いたグラジエント溶出法を適用し、流速は500 nl/分で行った。LXQ mass spectrometer は、イオン化法としてエレクトロスプレーイオン化法を、分析法としてイオントラップ法を採用した質量分析器である。LC および MS/MS の詳細な測定条件は、先行論文²⁶⁾に従った。測定により得られたペプチド (ペリカーサーイオン)、及びペプチドのフラグメント (フラグメントイオン) 質量値の解析には、タンパ

ク質同定関連ソフトウェアである Mascot (MATRIX SCIENCE 社, London, UK) を用い、データベースには Swiss-Prot を使用した。

2.5 Total RNA の調整とマイクロアレイ法による mRNA 発現の解析

細胞 (8×10^5 cells/well) を12ウェルプレート (Corning 社) に播種し、1晩培養を行った。翌朝、培地を除去し、MeI_{NH}₂ (5 mM) 存在下と非存在下で6時間培養した。培養後、上清を除去し、細胞をPBSで洗浄後、1 ml の Trizol reagent (Life Technologies 社, Gaithersburg, MD, USA) を加え、Eppendorf tube に回収した。サンプルは十分に懸濁した後、室温で5分間静置し、200 μ l のクロロホルムを加えた。これらを遠心し、RNA を含む上清を別のチューブに回収した。その後、RNeasy Mini Kit (Qiagen 社, Valencia, CA, USA) を利用してRNAを精製し、-20°Cで保管した。RNAの濃度はNanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, MA, USA) を用いて測定した。回収した2つのサンプル(コントロール細胞由来RNAと糖処理細胞由来RNA)は、タカラバイオ株式会社に発送し、一色法による蛍光プローブ付加後、2つのマイクロアレイ (SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60,000 Arrays: AMADID 028004; Agilent Technologies 社, Santa Clara, CA, USA) を用いて、26,083遺伝子発現について検討した。その際、GeneSpring GX 11.5.1 software program (Agilent Technologies 社) を用いて、遺伝子発現量をノーマライズすることで2つのアレイ間の比較検討を行った。加えて、発現量が大きく変化した上位1,000遺伝子のヒートマップ図を作成した。

2.6 統計処理

統計処理には GraphPad Prism 6 (GraphPad Software 社, San Diego, CA, USA) を用い、二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) および Post-hoc test (Tukey の多重比較検定) を行った。検定の有意水準は $p < 0.05$ とした。

3. 結 果

3.1 MDA-MB-231細胞における MelNH₂ と GlcNH₂ の増殖抑制効果

我々はまず、ヒト乳がん MDA-MB-231細胞の増殖に対する MelNH₂ と GlcNH₂ の効果を比較検討した(図1)。その結果、2.5-10 mM の MelNH₂ と GlcNH₂ は濃度依存的に有意にこの細胞の増殖を阻害した。また、作用濃度で比較した場合、MelNH₂ と比べて GlcNH₂ の増殖阻害効果の方が総じて有意に高かった。

3.2 MDA-MB-231細胞の mRNA 発現に対する MelNH₂ 効果

さらに、MelNH₂ の作用機序を明らかにすることを目的として、Control 細胞と MelNH₂ (5 mM) 処

理細胞中の mRNA 発現の差異をマイクロアレイ法により網羅的に解析した(図2, 表1)。ヒートマップからも明らかなように、糖処理の有無によって遺伝子発現は大きく変化した。MelNH₂ 処理した細胞では、細胞増殖やがん関連遺伝子などで大きな差が見られたが、とりわけ、Thioredoxin interacting protein (TXNIP) の発現は Control と比較して5倍以上高く、Gap junction protein-delta 2は170倍、Toll-like receptor 8は10倍ほど高かった。また、MelNH₂ 処理細胞では、Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) の発現が Control と比較して1/70に、NADPH oxidase 1の発現は1/40に、Glutathione peroxidase 6の発現は1/15に、BCL2-like 10 (BCL2L10) の発現は1/30ほどにそれぞれ減少していた。

3.3 MDA-MB-231細胞におけるタンパク質発現とタンパク質リン酸化に対する MelNH₂ の効果

同じく、MelNH₂ の作用機序を明らかにすることを目的として、以下の検討を行った。細胞の増殖はタンパク質のリン酸化により調節を受けることが多い。そこで Control 細胞と MelNH₂ (5 mM) 処理した細胞におけるタンパク質のリン酸化状態を網羅的に調べた。まず、細胞からタンパク質を抽出して二次元電気泳動を行い、リン酸化タンパク質の蛍光染色を実施した(図3A)。シグナル変化の大きなスポットは確認できなかったが、Control と比較してリン酸化シグナルに違いがあると思われた4つのスポット(図3A 破線円)を切り出し、LC-MS/MS法によるタンパク質同定を行った(Data not shown)。しかしながら、今回の MelNH₂ によるリン酸化タンパク質の変化については差異が小さく、2回の実験結果にバラツキがあったため、これらのタンパク質のリン酸化動態については、さらなる検証が必要と思われた。

さらに、Control 細胞と MelNH₂ (5 mM) 処理細胞のタンパク質を二次元電気泳動で展開し、タンパク質発現量の変化を網羅的に解析した(図3B)。MelNH₂ 処理によって発現量の変化したスポットを

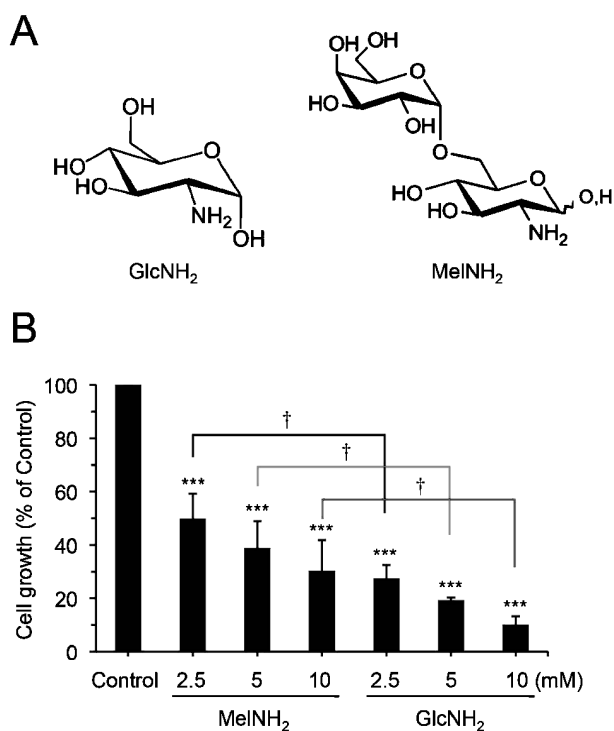


図1 MelNH₂ と GlcNH₂ の構造式と、ヒト MDA-MB-231細胞の増殖に対する効果。
A. GlcNH₂ と MelNH₂ の構造式。 B. MDA-MB-231細胞を2.5-10 mM の MelNH₂ あるいは GlcNH₂ 存在下で3日間培養後、XTT法により相対細胞数(Control細胞数を100とした相対値)を算出した。グラフは3回の実験結果の平均値と標準偏差(Error bars)で表した。***, $p < 0.001$ vs. Control. †, $p < 0.05$.

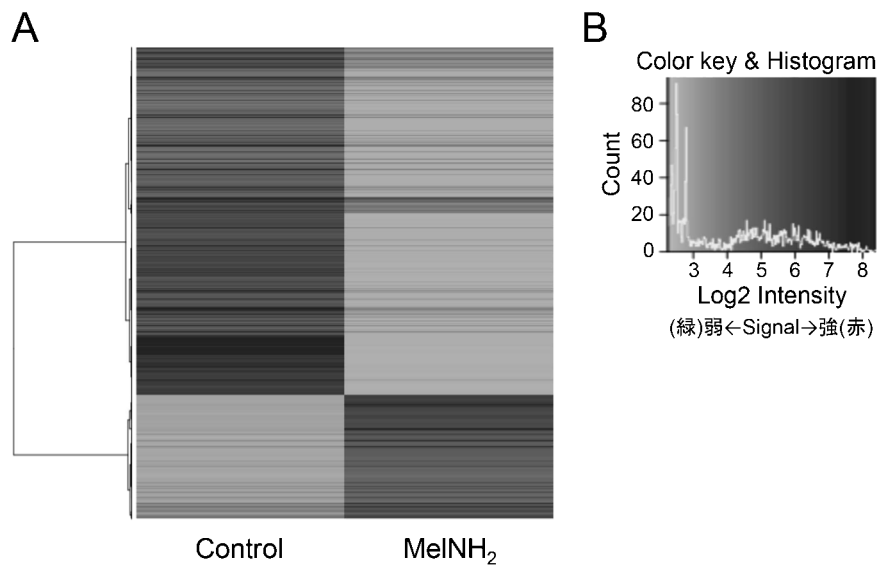


図2 Control細胞と糖処理細胞の遺伝子発現量を比較したヒートマップ。

A. MDA-MB-231細胞を5 mMのMelNH₂存在下および非存在下(Control)で6時間培養後、それぞれRNAを抽出し、Agilent Expression Array(ヒト遺伝子発現用マイクロアレイ)を用いて遺伝子発現の比較解析を行った。解析したデータからControl細胞と糖処理細胞の間の変動差の大きかった上位1,000遺伝子を抽出し、ヒートマップを作成した。シグナル値の低い遺伝子を緑、高い遺伝子を赤で表示し(ただし、本稿はモノクロ印刷のため、モノクロの濃淡が発現量の高低にほぼ対応している)、1,000遺伝子のクラスタリング解析によって得られた「系統樹」をヒートマップ左に記している。B. カラーとシグナル強度の関係、並びにシグナル強度ごとの遺伝子数(Count)を表したヒストグラム(Aのグラフ同様、本来はカラーデータであったものをモノクロに変換している)。DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現の比較解析は1回の実施だが、このヒートマップから、糖処理によって遺伝子発現が大きく変化することがわかる。

表1 MelNH₂処理によって発現が変化した主な遺伝子

遺伝子名(シンボル表記)	MelNH ₂ 処理後の発現比率
Gap junction protein-delta 2 (<i>GJD2</i>)	170.9
Toll-like receptor 8 (<i>TLR8</i>)	9.8
Thioredoxin interacting protein (<i>TXNIP</i>)	5.4
Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3 (<i>NFATC3</i>)	0.154
Glutathione peroxidase 6 (<i>GPX6</i>)	0.067
BCL2-like 10 (<i>BCL2L10</i>)	0.033
NADPH oxidase 1 (<i>NOX1</i>)	0.027
Lipopolysaccharide-binding protein (<i>LBP</i>)	0.015

切り出し、LC-MS/MSによりタンパク質を同定した(表2)。Tubulin, Peroxiredoxine1, GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), 14-3-3 protein Epsilonなどの発現やリン酸化が糖処理によって変化していた。

4. 考察

4.1 MDA-MB-231細胞におけるMelNH₂の増殖阻害活性

前述のように、MelNH₂(5 mM)はK562ヒト白血病細胞の細胞増殖を強力に阻害する一方で、HUC-F2ヒト瞬帯繊維芽細胞(正常細胞のモデル)の増殖阻害作用は認められなかったことから、MelNH₂の臨床応用(白血病治療)が期待されている¹¹⁾。さらに、Melibiose(Galα1-6Glc)やMelNAc(Galα1-6GlcNAc)等のオリゴ糖(それぞれ5 mM)には増殖阻害活性がないことから、MelNH₂の増殖阻害作用はその構造に特異的なものであると考えられている¹¹⁾。しかし、数ある腫瘍細胞に対するMelNH₂の作用スペクトルは十分に検討されていない。今回我々は、ヒト乳がん由来MDA-MB-231細胞に対するMelNH₂増殖抑制効果を検討し、2.5-10 mMのMelNH₂が濃度依存的に当該細胞の増殖

を阻害することを示した(図1)。また、既知の機能性糖類の1つであるGlcNH₂の効果についても比較検討し、GlcNH₂の増殖阻害活性の方がMeINH₂よりも僅かではあるが有意に高いことも示した(図1)。ただし、K562ヒト白血病細胞においては、MeINH₂(5 mM)の方がGlcNH₂(5 mM)よりも増殖阻害活性が高いことから¹¹⁾、これら2つの糖の抗腫瘍作用並びにそれらの作用機序については、今後も様々な腫瘍細胞を用いた比較検討が必要と思われる。

いずれにしても、MeINH₂(5 mM)がHUC-F2ヒト瞬帯繊維芽細胞(正常細胞のモデル)の増殖を阻害しないこと、対して同濃度のGlcNH₂はHUC-F2細胞の増殖を有意に阻害したことに鑑みれば¹¹⁾、今回の結果は、MeINH₂がトリプルネガティブ乳がんの治療に(副作用の少ない抗がん剤として)臨床応用できる可能性を示唆している。

4.2 MDA-MB-231細胞における遺伝子発現に対するMeINH₂の効果

DNAマイクロアレイによる解析結果から、Control細胞とMeINH₂処理細胞における遺伝子発現が大きく異なることが明らかとなった(図2, 表1)。中でもいくつかの遺伝子発現の差異は注目に値する。MeINH₂処理細胞において顕著に発現レベルが上がっていたTXNIPは、がん抑制因子としての性格を持ち、多くのがん細胞でTXNIP発現は減少しており、TXNIPの発現量を増加させることで細胞増殖を阻害できることが報告されている²⁰⁾²⁵⁾³⁰⁾。

また、BCL2L10は、ミトコンドリアからのシトクロムcの放出を防止し、カスパーゼ3を活性化させることで細胞のアポトーシスを抑制することで知られているが³⁾²⁸⁾²⁹⁾、MeINH₂処理細胞ではBCL2L10の発現が顕著に減少していた。

さらに、種々の酸化ストレス反応に関与しているNADPH oxidase 1(NOX1)の発現もMeINH₂処理細胞で低下した。酸化ストレスとは「体内で生まれた活性酸素が生体に及ぼす影響」と「抗酸化物質などによる活性酸素の解毒作用」のバランスが崩れた状態を指す。酸化ストレスの上昇は多くの細胞内器

官に障害を生じ、がんを始めとする様々な疾患や老化に関与している²⁾⁸⁾¹⁸⁾。その酸化ストレスを高める活性酸素産生酵素であるNOX1は、がん細胞の増殖を亢進させること、さらには、発がん遺伝子であるRasの活性化はNOX1の発現を促進することが報告されている⁶⁾⁸⁾。このような背景から、MeINH₂は何等かの機序でNOX1発現を抑制することによって、がん細胞の増殖を阻害している可能性も推察される。

Lipopolysaccharide(LPS)と呼ばれるバクテリア由来成分の受容体であるLipopolysaccharide-binding protein(LBP)の発現もMeINH₂処理細胞において顕著に減少していた。これらの因子は通常、免疫反応に関与しており、LPSは免疫細胞上のLBPと結合することによって炎症反応(免疫反応)を引き起こす¹⁶⁾¹⁸⁾。ところが、興味深いことに、LPSはLBPを介して乳がんの悪性を促進する可能性が示されており¹²⁾、今回の結果は、MeINH₂がLBP発現を減少させることによって乳がんの悪性を阻害できる可能性を示唆している。

4.3 MDA-MB-231細胞におけるタンパク質発現とタンパク質リン酸化に対するMeINH₂の効果

今回、二次元電気泳動とLS-MS/MSの解析結果からもMeINH₂処理によって様々なタンパク質発現が変化することが明らかとなった(図3, 表2)。ただし、今回は試験的な試みと位置づけ、2回の実験を行い「サンプル間(±MeINH₂)でスポットの対応・比較が可能で、発現量に差があり、かつ、切り出しやすいタンパク質スポットを選定して」解析したため、実際の変化量は大きくはなかった(表2)。しかしながら、今回の方法によって発現が変化するタンパク質を多数同定できることが示された。今後は画像解析ソフトを利用することによって、より発現変化率の大きなスポットの解析が可能と思われる。

表2中のPeroxioredoxin-1は、抗酸化活性を有し、成長因子やTNF- α のシグナル伝達系に関与する²²⁾。GAPDHはいわゆる「House-keepingタンパ

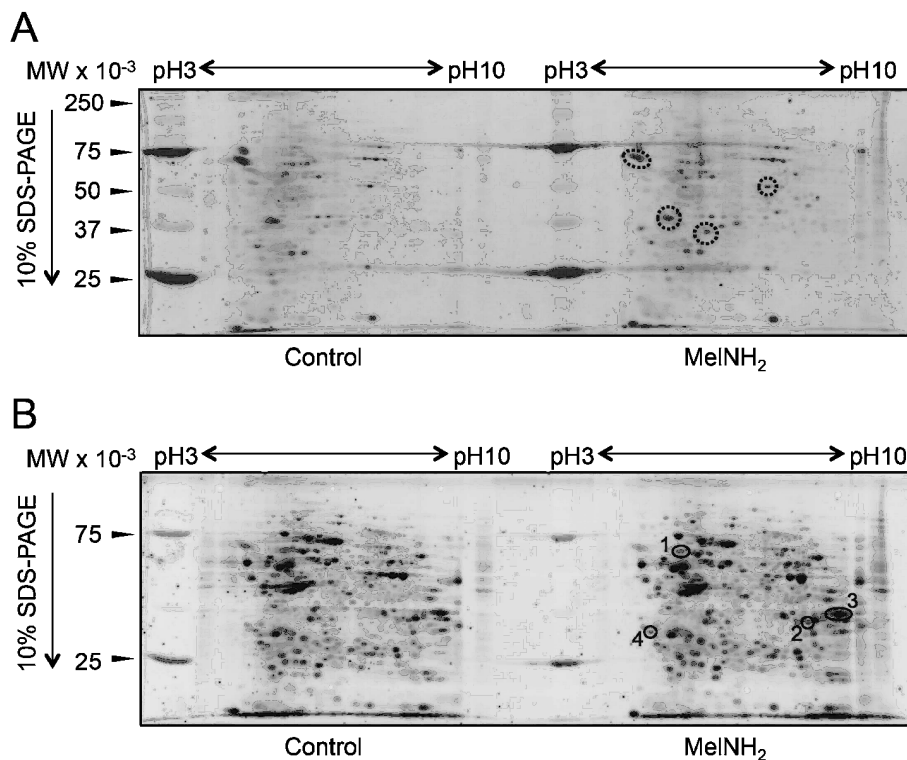


図3 二次元電気泳動によるタンパク質の発現とリン酸化状態の解析.

Control 細胞と6時間糖処理した細胞からタンパク質を抽出して二次元電気泳動を行った. リン酸化タンパク質を蛍光染色し, リン酸化の程度に違いがあるスポットを切り出した (A). また, 全タンパク質染色も行い, 発現量に違いのあるスポットを切り出した (B). 切り出したスポットを用いて LC-MS/MS 分析を行い, タンパク質を同定した. 同定した主なタンパク質は表2に記した. 写真は, 2回の電気泳動実験の中の代表的泳動結果.

表2 LC-MS/MS 分析によって同定したタンパク質

番号	タンパク質名	機能	MelNH ₂ /Control
1	Tubulin beta chain	細胞骨格	0.71
2	Peroxiredoxin-1	抗酸化作用	1.24
3	GAPDH	多機能タンパク質	1.41
4	14-3-3 protein epsilon	多機能タンパク質	0.86

ク質 (様々な生理条件下で発現量が変化しないと考
えられているタンパク質)」としてタンパク質発現
の Normalization に利用されるが, 今回 MelNH₂ 処
理によって GAPDH 量が増加したことは興味深い.
GAPDH は, 解糖系のキーとなる酵素の1つだが,
近年, 新たな機能を有することが報告されてい
る²⁴⁾. 即ち, GAPDH は「細胞ストレスのセンサー」
として, ストレス耐性の獲得, 細胞死の誘導,

DNA 修復等に関与することが明らかとなっている.
これらタンパク質の発現制御に関わるシグナル
伝達系の解明, MelNH₂ の作用機序の解析は今後の
課題となる.

ところで, 我々は DNA マイクロアレイを用いた
mRNA 発現の網羅的解析, 並びに二次元電気泳動
と LC-MS/MS 法を用いたタンパク質発現の網羅的
解析を試みたが, 本研究において着目した遺伝子産
物には両解析における共通するものが見出せなかつ
た. その理由の1つは, コントロール細胞と糖処理
細胞の mRNA 発現量の差異については極めて微量
な mRNA 量の比較解析が可能であった一方で, 二
次元電気泳動によるタンパク質の発現量の解析は,
発現変化の小さいタンパク質4つであった. 発現変
化量の大きい, より多くの二次元電気泳動のスポッ
トを分析すれば, DNA マイクロアレイで検出した

mRNA と一致してくるはずである。

近年、希少糖類の抗酸化活性に関する報告や¹⁹⁾、虚血が引き起こす神経細胞死からの保護作用¹³⁾など、糖類が有する様々な薬理効果が明らかになりつつあり、サプリメントあるいは薬剤としての応用が期待されている。MeINH₂についても、抗腫瘍活性以外の有用な生物活性を有することが期待されており、様々な研究分野における MeINH₂ の機能解析が必要となるだろう。今後は、今回得られた結果の再現性を確認すると同時に、これらの成果を基にした MeINH₂ の作用機序の解析を進めていきたい。

5. 結 論

本研究では、ヒトトリプルネガティブ乳がんのモデルである MDA-MB-231 細胞を用いて、MeINH₂ と GlcNH₂ の増殖抑制効果を比較検討した。その結果、MeINH₂ と GlcNH₂ は濃度依存的に MDA-MB-231 細胞の増殖を阻害することが明らかとなった。また、MeINH₂ 処理した細胞では細胞の増殖や生存に関与する多くのタンパク質発現やリン酸化状態が変化することが示された。

文 献

- Bernstein, L. (2002) Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 3-15.
- Boveris, A., Oshino, N. & Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617-630.
- Britt, K., Ashworth, A. & Smalley, M. (2007) Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 14, 907-933.
- Cancer Registry and Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan. (http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/dl/)
- Caramés, B., Kiosses, W. B., Akasaki, Y., Brinson, D. C., Eap, W., Koziol, J., et al. (2013) Glucosamine activates autophagy in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 65, 1843-52.
- Carnero, A., Blanco, A. C., Renner, O., Link, W. & Leal, J. F. M. (2008) The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 8, 187-198.
- Chavez, K. J., Garimella, S. V. & Lipkowitz, S. (2010) Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis* 32, 35-48.
- Eguchi, H., Fujiwara, N., Ookawara, T., Suzuki, K. & Taniguchi, N. (2009) Oxidative stress and health. *Journal of analytical bio-science* 32, 247-256.
- Falandry, C., Canney, P. A., Freyer, G. & Dirix, L. Y. (2009) Role of combination therapy with aromatase and cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 20, 615-620.
- Hoover, R., Gray, L. A., Cole, P. & MacMahon, B. (1976) Menopausal Estrogens and Breast Cancer. *N Engl J Med* 295, 401-405.
- Hosomi, O., Misawa, Y., Takeya, A., Matahira, Y., Sugahara, K., Kubohara, Y., et al. (2009) Novel oligosaccharide has suppressive activity against human leukemia cell proliferation. *Glycoconj J* 26, 189-198.
- Huang, T., Chen, Z. & Fang, L. (2013) Curcumin inhibits LPS-induced EMT through downregulation of NF- κ B-Snail signaling in breast cancer cells. *Oncol Rep* 29, 117-124.
- Hui, L., Zheng, Y., Yan, Y., Bargonetti, J. & Foster, D. A. (2006) Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene* 25, 7305-7310.
- Iwasaki, M., Otani, T., Inoue, M., Sasazuki, S. & Tsugane, S. (2007) Role and impact of menstrual and reproductive factors on breast cancer risk in Japan. *Eur J Cancer Prev* 16, 116-123.
- Ju, Y., Yu, A., Sun, X., Wu, D. & Zhang, H. (2013) Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide, inhibits A549 and H446 cell proliferation by blocking G1/S transition. *Mol Med Rep* 8, 794-798.
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., et al. (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121, 2750-2767.
- Ma, H., Bernstein, L., Pike, M. C. & Ursin, G. (2006) Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor sta-

- tus: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Res* 8, R43.
- 18) Miyano, K. & Sumimoto, H. (2009) Oxidative stress and the Nox family. *Journal of analytical bio-science* 32, 289–296.
- 19) Murata, A., Sekiya, K., Watanabe, Y., Yamaguchi, F., Hatano, N., Izumori, K., et al. (2003) A novel inhibitory effect of d-allose on production of reactive oxygen species from neutrophils. *J Biosci Bioeng* 96, 89–91.
- 20) Nishinaka, Y., Nishiyama, A., Masutani, H., Oka, S., Ahsan, K. M., Nakayama, Y., et al. (2004) Loss of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D3 up-regulated protein 1 in human T-cell leukemia virus type I-dependent T-cell transformation: implications for adult T-cell leukemia leukemogenesis. *Cancer Res* 64, 1287–1292.
- 21) Quastel, J. H. & Cantero, A. (1953) Inhibition of tumour growth by D-glucosamine. *Nature* 171, 252–254.
- 22) Riddell, J. R., Wang, X. Y., Minderman, H. & Gollnick, S. O. (2010) Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4. *J Immunol* 184, 1022–1030.
- 23) Russo, J., Moral, R., Balogh, G. A., Mailo, D. & Russo, I. H. (2005) The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 7, 131–142.
- 24) Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W. & Sawa A. (2011) The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal* 23, 317–323.
- 25) Turturro, F., Von, B. G. & Friday, E. (2007) Hyperglycemia-induced thioredoxin-interacting protein expression differs in breast cancer-derived cells and regulates paclitaxel IC50. *Clin Cancer Res* 13, 3724–3730.
- 26) Uda, M., Kawasaki, H., Iizumi, K., Shigenaga, A., Baba, T., Naito, H., Yoshida, T. & Yamakura, F. (2015) Sumoylated α -skeletal muscle actin in the skeletal muscle of adult rats. *Mol Cell Biochem* 409, 59–66.
- 27) Weimer, S., Prieb, J., Kuhlow, D., Groth, M., Prieb, S., Mansfeld, J., et al. (2014) D-Glucosamine supplementation extends life span of nematodes and of ageing mice. *Nat Commun* 5, 3563.
- 28) Wong, R. S. Y. (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 30, 87.
- 29) Xu, J. D., Cao, X. X., Long, Z. W., Liu, X. P., Furuya, T., Xu, J. W., et al. (2011) BCL2L10 protein regulates apoptosis/proliferation through differential pathways in gastric cancer cells. *J Pathol* 223, 400–409.
- 30) Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I. & Tschopp, J. (2010) Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11, 136–140.

(平成29年11月13日 受付)
(平成29年12月18日 受理)