

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 6 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591683

研究課題名(和文) スルフォラファンのオートファジーを介する乳癌細胞死滅機構の同定と癌治療への応用

研究課題名(英文) Mechanisms of sulforaphane-induced breast cancer cell death via autophagy and its application in cancer treatment

研究代表者

螺良 愛郎 (TSUBURA AIRO)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：90098137

研究成果の概要(和文)：スルフォラファン(SFN)は目立った副作用なくヌードマウス移植 KPL-1 ヒト乳癌細胞株の増大を有意に抑制し、腋窩リンパ節転移を軽減する傾向を示した。SFN の MCF-7 と MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞培養株に対する細胞死機構におけるオートファジーの関与を検討したところ、SFN により誘発される乳癌細胞のアポトーシスに対してオートファジーは細胞保護的に働いていることが判明した。よって、SFN に毒性は認めず、乳癌抑制には、SFN とオートファジー阻害剤の併用が有効であると結論できた。

研究成果の概要(英文)：Sulforaphane (SFN) significantly inhibited primary tumor growth and tended to reduce axillary lymph node metastasis of KPL-1 human breast cancer cell xenografts in female athymic mice with no side effects. The involvement of autophagy in the SFN-induced apoptotic cell death of MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells was cytoprotective. Therefore, SFN is safe and the combination of SFN with autophagy inhibitor may be a promising strategy for breast cancer control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：スルフォラファン、乳癌、アポトーシス、オートファジー、細胞死、バフィロマイシン、3-メチルアデニン

## 1. 研究開始当初の背景

乳癌は米国人女性においては最も頻度の高い癌であり、日本においても増加傾向にあり、その制圧は緊急の課題である。乳癌の原因は明らかではないが、ホルモン、食餌因子や遺伝素因などが挙げられる。遺伝素因としては家族性乳癌が知られているが、その頻度

はそう高くない。乳癌リスクはホルモンと関連し、体内エストロゲン環境が影響する。我々も若年満期妊娠が乳癌リスクを減ることにより、若年期での妊娠期を模倣する短期エストロゲン暴露による動物実験でその有効性を確認している (Tsubura A et al., *In vivo* 22: 191-201, 2008. Review)。一方、癌

の 80%以上は環境要因が関与し、そのうち 1/3 は食餌因子と関連をみる。脂肪や植物由来の化学物質と乳癌との関係が論じられているが、我々は脂肪酸に着目し、n-3 系多価不飽和脂肪酸や、共役脂肪酸の効果を提示するとともに、果物や野菜に含まれる植物由来の天然化学物質のなかでは、genistein, resveratrol, diallyl disulfide, perillyl alcohol, enterolactone 等の有効性の証明とその機序解明を行ってきた (Tsubura A et al., *Histol Histopathol* (in press). Review; *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10: 87-100, 2005. Review)。一般にこれら化学物質は、ヒト乳癌細胞株に対し、細胞周期を停止させ、アポトーシスによる細胞死を引き起こすことにより、細胞増殖を抑制する。アブラナ科植物の摂取は乳癌も含めた多臓器の癌予防に有効とされている。アブラナ科に属するブロッコリーの新芽には、Sulforaphane (SFN; l-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)-butane) が多く含まれている (Zhang Y et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3147-3150, 1994)。SFN はラットの化学発癌剤で誘発される乳癌、腸癌や前胃癌に対して有効で、ヌードマウス移植ヒト大腸癌細胞株の増殖を抑制する。我々は、SFN のヒト乳癌細胞株に対する抗腫瘍効果を調べたところ、濃度依存的に細胞増殖抑制能をみとめ、細胞周期停止と細胞死の出現をみた。そして、電顕的には細胞質にはオートファゴゾームおよび多数のオートライソゾームの出現をみた。様々な化学物質によって癌細胞株に細胞死が誘導されるが、カスパーゼに依存するアポトーシスとは異なり、カスパーゼ非依存的な細胞死をオートファジー性細胞死 (autophagic cell death, autophagic degeneration, type 2 programmed cell death) と呼称する (Clarke PG. *Anat Embryol* 181: 195-213, 1990)。オートファジーは全ての真核細胞に普遍的に備わる細胞内の大規模分解系のひとつであり、細胞質内の不要になった小器官や細胞構造物をライソゾームにより分解・消化して細胞の恒常性を保ったり (細胞内浄化)、飢餓状態になったときには、生存のために自身の成分を分解して再利用 (飢餓適応) する生理的な機構である。一方、オートファジーと癌との関係は複雑である。そもそも、オートファジー性細胞死がオートファジーにより誘導される細胞死の原因なのか、アポトーシスを回避する癌細胞側の生体防御機構なのか判然としないのが現状である。オートファジーが癌細胞の細胞死を亢進しているのであれば、さらにオートファジーを誘導する癌治療が理に適っており、逆に生存シグナルとして細胞死を抑制しているのであれば、オートファジーを回避する手立てが必要である。今回 SFN をモデルとして、オートファジーを

介する乳癌細胞の死滅機構を同定し、オートファジーを制御することにより、より有効な乳癌の治療法の確立を目指す。

## 2. 研究の目的

SFN をはじめとした化学物質の乳癌細胞への有効性の評価とすれば、まず、i) 抗腫瘍能の確認に始まり、次いで ii) 細胞死の様式同定、さらに iii) 細胞死滅機構の解明が必要である。乳癌の場合、被験細胞株としてはエストロゲン受容体陽性 (MCF-7) と受容体陰性 (MDA-MB-231) のヒト乳癌細胞株を用い、まず、MTT アッセイにより被験化学物質の増殖抑制能を確認し、IC<sub>50</sub> 値を算出する。次に、トリパンブルー色素排除法により細胞死の発現の有無をみる。また、アポトーシスの存在は、FCM により subG1 分画の有無を見るときともに Nucleosome ELISA キットを用いて DNA の断片化の有無をみる。さらに、エフェクターキャスパーゼとして Caspase-3 の活性化の有無をみる。次いで、オートファジーの存在は、Acridine Orange 染色により酸性オルガネラ形成の比率を FCM にて測定する。加うるに、オートファゴゾームのマーカーである microtubule associated protein 1 light chain 3B (LC3) の mRNA レベルでの発現変化を RT-PCR 法によりみるとともに、Western blot 法により蛋白レベルで細胞質型 (LC-I) と膜型 (LC-II) の発現をみる。同時に LC3 の細胞内局在は蛍光免疫染色により可視化する。これらとともに超微形態観察を行う。以上により細胞死の様式を確定したい。これらをふまえて細胞死滅機構の解明として、オートファジー阻害剤 (3-methyladenine や bafilomycin A1) を駆使することにより、*in vitro* で SFN の細胞死誘導におけるオートファジーの役割を検討する。なお、癌は生体の局所より生じ、転移により全身病となる。よって、上述した *in vitro* の結果の *in vivo* への外挿は必須である。KPL-1 ヒト乳癌細胞株はヌードマウスの乳腺内に正所性移植をすると高率に領域リンパ節に転移をきたすことによりヒト乳癌の進展を再現する極めてよいモデルである (Senzaki H, Tsubura A et al., *World Rev Nutr Diet* 88 117-125, 2001)。*in vitro* の結果をふまえ、SFN の *in vivo* での乳癌増殖抑制効果をみるとともに、毒性の有無についても評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト乳癌細胞株のスルフォラファン

(SFN) による *in vitro* 増殖抑制実験  
乳癌細胞株として MCF-7 (ER 陽性) MDA-MB-231 (ER 陰性) を用いて D, L-Sulforaphane (純度 99%) は LKT Laboratory, St. Paul, MN, USA のものを使用する。MTT アッセイは SFN の濃度を 0-100  $\mu$ M の範囲に設定して 0, 24, 48, 72

時間培養し、72 時間培養時の IC50 値を算出する。

(2) ヒト乳癌細胞株の SFN による細胞周期の変動の検定

①Flow cytometry

SFN の IC50 値に対して上記 2 つの細胞株に対して FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)にて細胞周期を解析。

②Western blot 法

SFN の IC50 値を用いて細胞周期関連蛋白 (Cyclin A, Cyclin B, Cdc2, p21, p27)の変動を検出。

(3)ヒト乳癌細胞株における SFN によるアポトーシスの検出

Bcl-2, Bax, Bcl-xL と Caspase-3 抗体を用いて SFN の IC50 値を添加して 72 時間後の各分子の活性を Western blot 法にて判定。

(4)ヒト乳癌細胞における SFN によるオートファジーの検出

①酸性オルガネラ形成の比較

IC50 値の SFN ならびに対照として等量の DMSO を添加し、各の 72 時間培養後に Acridine Orange 染色を施し、FCM にて酸性オルガネラの比率を比較する。

②microtubule associated protein 1 light chain 3B(LC3)の発現変化

a. LC3 の細胞内局在

SFN の IC50 値を添加後 0, 24, 48, 72 時間での LC3 の細胞内局在を蛍光免疫染色法により検出。

b. LC3 mRNA 発現

SFN の IC50 値を添付後 0, 24, 48, 72 時間における LC3 mRNA の発現変化を RT-PCR 法により検出。

c. LC3-I, LC3-II 蛋白発現

SFN の IC50 値を添加後 0, 24, 48, 72 時間における LC3 蛋白発現変化を Western blot 法にて検出。

(5)超微形態学的観察

SFN の IC50 値を添加後 0, 72 時間にて培養細胞を回収し、遠沈により細胞を集めて Karonvsky 固定、オスミウム後固定したものをエポン樹脂包埋。電子顕微鏡(JEM-10 11, 日本電子, 東京)にて観察。

(6)オートファジー阻害剤による in vitro 増感効果の検討

3-methyladenine (Sigma, St. Louis, MO, USA) と Bafilomycin A1(Wako Pure Chemical, Osaka)を用いて、IC50 値の SFN、それに 5  $\mu$  M の 3-methyladenine, 1mM の Bafilomycin A1 をそれぞれ加えたもの、ならびに対照として

等量の DMSO を添加し、各の MTT アッセイを行い細胞増殖の動態を比較する。

(7)ヒト乳癌細胞ヌードマウス移植系による増殖抑制実験

可移植性高転移性 KPL-1 ヒト乳癌細胞株を我々の既報(Singh Y, Tsubura A et al., Breast Cancer Res Treat 45: 15-27, 1997)に則り、その  $1 \times 10^7$  個を雌 BALB/C-nu/nu マウスの胸部乳腺脂肪織内に正所性移植。

実験群として

1 群:SFN  $\cdot$  25mg/kg/day を腹腔内注射

2 群:SFN  $\cdot$  50mg/kg/day を腹腔内注射

3 群:無処置対照群、を作製

SFN 投与は腫瘍移植の翌日に開始し、週 5 回投与し(計 20 回)、移植 26 回目に実験を終了する。

(8)ヌードマウスの毒性評価

屠殺動物における毒性発現を剖検標本にて検索。

#### 4. 研究成果

SFN 存在下で培養した MDA-MB-231 と MCF-7 細胞において、時間ならびに濃度依存的細胞増殖抑制および細胞死が確認された(72 時間 IC50 値: MCF-7,  $33.8 \pm 0.1 \mu$  M; MDA-MB-231,  $31.5 \pm 0.1 \mu$  M)。MDA-MB-231 細胞に対しては 30  $\mu$  M の SFN は P21<sup>WAF1</sup> と P27<sup>KIP1</sup> 値の上昇と cyclin A, cyclin B と CDC 値の減少に伴い、S 期と G2/M 期での細胞周期の停止を来すとともに、caspase-3 の上昇と Bcl-2 値の減少に伴い、アポトーシスを発来した。加うるに、電顕的に観察されるオートリソゾーム・オートファゴゾームの存在、フローサイトメトリーによるオートファジーのマーカーである酸性オルガネラ形成と蛍光顕微鏡によるオートファゴリーム結合蛋白質である LC3 の出現により、オートファジーの誘導を検出した。さらに、MDA-MB-231 細胞を SFN およびオートファジー阻害剤である 3-methyladenine または bafilomycin A1 存在下で培養し、酸性オルガネラ形成および Propidium iodide 染色による生存率を測定したところ、Bafilomycin A1 処置により顕著なオートファジーの抑制をみると同時に、アポトーシスの亢進が認められた。なお、Bafilomycin A1 による生存率低下は、Bax 値の上昇と Caspase-3 の活性化を伴うアポトーシス誘導によるものであった。以上、MDA-MB-231 細胞において、SFN により誘導されるオートファジーは、細胞生存(細胞保護的)に作用する可能性が示唆された。よって、SFN と Bafilomycin A1 の併用は乳癌の制御に有効であると結論できる。但し、3-methyladenine ではアポトーシスの亢進はみなかった。

以上の結果より、SFN により誘導されるオー

トファジーは、細胞生存へ寄与していることが示唆された。また、50mg/kg・SFNは目立った副作用なしに、ヌードマウス移植 KPL-1 細胞に対して有意な原発巣の増殖抑制をみるとともに転移に対しても抑制傾向を示した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kanematsu S, Yoshizawa K, Uehara N, Miki H, Sasaki T, Kuro M, Lai Y-C, Kimura A, Yuri T, Tsubura A. Sulforaphane inhibits the growth of KPL-1 human breast cancer cells *in vitro* and suppresses the growth and metastasis of orthotopically transplanted KPL-1 cells in female athymic mice. *Oncol Rep* 26(3): 603-608, 2011.
- ② Kanematsu S, Uehara N, Miki H, Yoshizawa K, Kawanaka A, Yuri T, Tsubura A. Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Anticancer Res* 30(9): 3381-3390, 2010.

査読全てあり

[学会発表] (計 7 件)

- ① 兼松清果, 義澤克彦, 佐々木朋, 三城弥範, 畔 満喜, 頼 彦長, 木村彩子, 上原範久, 塚 貴司, 螺良愛郎. Sulforaphane によるヌードマウス可移植性 KPL-1 ヒト乳癌細胞株の増殖抑制. (日病会誌 100: 461, 2011) 第 100 回日本病理学会 横浜 4 月 30 日, 2011.
- ② 兼松清果, 義澤克彦, 佐々木朋, 三城弥範, 畔 満喜, 頼 彦長, 木村彩子, 上原範久, 塚 貴司, 螺良愛郎. Sulforaphane によるヌードマウス可移植性 KPL-1 ヒト乳癌細胞株への効果. (抄録集: 388, 2011) 第 19 回日本乳癌学会 仙台 9 月 3 日, 2011.
- ③ 兼松清果, 上原範久, 三城弥範, 桑田満喜, 頼 彦長, 川中彩子, 義澤克彦, 塚 貴司, 螺良愛郎. MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞株における Sulforaphane によるオートファジー誘導とオートファジー阻害剤の効果. (日病会誌 99: 336, 2010) 第 99 回日本病理学会 東京 4 月 28 日, 2010.
- ④ 兼松清果, 上原範久, 三城弥範, 桑田満喜, 頼 彦長, 川中彩子, 義澤克彦, 塚 貴司, 螺良愛郎. Sulforaphane の MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞株におけるオートファジー誘導. (抄録集: 378, 2010)

第 18 回日本乳癌学会 札幌 6 月 24 日, 2010.

- ⑤ 兼松清果, 上原範久, 松岡洋一郎, 螺良愛郎. Sulforaphane による乳癌細胞増殖抑制におけるオートファジー誘導の役割. (日病会誌 98: 306, 2009) 第 98 回日本病理学会 京都 5 月 1 日, 2009.
- ⑥ 兼松清果, 上原範久, 松岡洋一郎, 螺良愛郎. Sulforaphane の乳癌細胞増殖抑制とオートファジー. (抄録集: 550, 2009) 第 17 回日本乳癌学会 東京 7 月 4 日, 2009.
- ⑦ 兼松清果, 上原範久, 三城弥範, 桑田満喜, 義澤克彦, 川中彩子, 義澤克彦, 塚 貴司, 螺良愛郎. Sulforaphane による乳癌細胞増殖抑制におけるアポトーシスとオートファジー誘導. (要旨集: 142, 2009) 第 41 回日本臨床分子形態学会 神戸 9 月 4 日, 2009.

[図書] (計 1 件)

- ① 塚 貴司, 螺良愛郎. 天然産物による乳がんの化学予防と治療への応用. 病気の分子形態学. 日本臨床分子形態学会 (編集) 学祭企画, 東京, p. 293-295, 2011.

[その他]

ホームページ

<http://www3.kmu.ac.jp/patho12/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

螺良 愛郎 (TSUBURA AIRO)  
関西医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 90098137

##### (2) 研究分担者

上原 範久 (UEHARA NORIHISA)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 30368211

塚 貴司 (YURI TAKASHI)

関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 50330212

##### (3) 連携研究者

なし