

氏名	脇本 麗
学位の種類	博士 (栄養科学)
学位記番号	博栄甲第 0021 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (課程博士)
研究科専攻	栄養科学研究科 栄養科学専攻
学位論文題目	Differential Anticancer Activity of Pterostilbene Against Three Subtypes of Human Breast Cancer Cells (サブタイプ別乳癌細胞に対するプテロスチルベンの 抗腫瘍効果の検討)
主論文公表雑誌	Anticancer Research
論文審査委員	(主査) 津田 博子 (副査) 中野 修治 (副査) 太田 英明 (外部審査委員) 安永 晋一郎 (福岡大学 医学部) (外部審査委員) 岡部 幸司 (福岡歯科大学 口腔歯学部)

論文内容の要旨

【緒言】 Pterostilbene は主にブルーベリーやブドウの皮に含まれるフィトケミカル的一种であり、乳癌をはじめ大腸癌、前立腺癌などで細胞増殖抑制効果が報告されている。しかし、サブタイプ別乳癌細胞に対する pterostilbene の増殖抑制効果の詳細な機序については不明である。そこで本研究では、サブタイプ別乳癌細胞に対する pterostilbene の増殖抑制効果について検討を行った。さらに臨床応用が可能かどうか調べるため、細胞実験において pterostilbene により最も顕著な増殖抑制効果を示した triple-negative 乳癌細胞をヌードマウスに移植し、pterostilbene の腫瘍形成抑制効果について検討を行った。

【方法】 乳癌細胞は MCF-7 (ER/PR 陽性、HER2 陰性)、SK-BR-3 (ER/PR 陰性、HER2 陽性)、MDA-MB-468 (ER/PR/HER2 陰性) のホルモンステータスの異なる 3 種を使用し、pterostilbene の IC₅₀ を決定した。細胞周期およびアポトーシスへの影響はフローサイトメトリーにより解析し、細胞内シグナル伝達タンパク質への影響は Western Blot により解析した。in vivo 実験では、雌ヌードマウスに triple-negative 乳癌細胞を移植し、エストロゲン様物

質を含む大豆成分を除いた NIH-07PLD 飼料と NIH-07PLD + pterostilbene 添加飼料でそれぞれ飼育した。体重、飼料重量および腫瘍体積を経過観察し、pterostilbene の腫瘍形成抑制効果について検討した。

【結果・考察】 Pterostilbene はすべての乳癌細胞で濃度依存的に増殖を抑制し、とくに triple-negative 乳癌細胞で最も顕著に抑制された。細胞周期解析では、すべての細胞で G₀/G₁ ブロックによる細胞周期の停止がみられた。細胞内シグナル伝達タンパク質の解析では、cyclinD1 発現抑制と p21 発現増加に伴う持続的な ERK の活性化、AKT と mTOR の活性化抑制による PI3K-AKT-mTOR 経路の抑制が示唆された。また、pterostilbene によりアポトーシス誘導タンパク質 BAX の発現が triple-negative 乳癌細胞において最も顕著に増加し、さらに *in vivo* 実験においても triple-negative 乳癌細胞移植ヌードマウスの腫瘍形成を有意に抑制したことから、pterostilbene はとくに triple-negative 乳癌に対する治療や予防に効果的であることが示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究は、ブルーベリーやブドウの皮に含まれるスチルベン系化合物の pterostilbene について、サブタイプ別乳癌細胞に対する増殖抑制効果、ヌードマウスを用いた腫瘍形成抑制効果を検証することを目的としている。

Pterostilbene は、MCF-7 (ER/PR 陽性、HER2 陰性)、SK-BR-3 (ER/PR 陰性、HER2 陽性)、MDA-MB-468 (ER/PR/HER2 陰性) の 3 種の乳癌細胞株の増殖を濃度依存的に抑制したが、MDA-MB-468 の抑制が最も顕著であった (IC₅₀=45.7 μM)。Flow cytometer による細胞周期解析では、100 μM pterostilbene によりすべての細胞で G₀/G₁ ブロックによる細胞周期の停止がみられた。Western blotting による細胞内シグナル伝達タンパク質の解析では、cyclinD1 発現抑制と p21 発現増加に伴う持続的な ERK の活性化、AKT と mTOR の活性化抑制による PI3K-AKT-mTOR 経路の抑制が示唆された。また、アポトーシス誘導タンパク質 BAX の発現抑制は MDA-MB-468 で最も強かったが、アポトーシス抑制タンパク質 BCL-xL の発現は殆ど変化しなかった。*In vivo* 実験では、雌ヌードマウスに MDA-MB-468 を移植し、0.1% pterostilbene を含む飼料で 8 週間飼育した結果、コントロール群に比べて体重増加、食餌摂取量には差がなかったが、腫瘍形成を有意に抑制した。

本論文は、pterostilbene がアポトーシスを誘導することにより乳癌細胞株の増殖を抑制し、その細胞内シグナル伝達が ERK 活性化や AKT-mTOR 抑制を介することを示唆している。また、pterostilbene のヌードマウスへの経口投与による腫瘍形成抑制効果から、triple-negative 乳癌の予防や治療に効果的である可能性を示唆している。

公開審査会では、論文の内容を適切に呈示し、質疑応答においても的確に回答した。

審査員合議のうえ、博士論文として適格であると判定した。

最終試験結果の要旨

申請者に対して以下の質問および意見が述べられた。

- 1) 細胞増殖抑制実験では 72 時間培養しているが **confluency** はどうだったのか。正常細胞への細胞毒性はないのか。増殖抑制曲線を **log plot** とした方が **IC₅₀** の差が明確になったのではないか。
- 2) **Flow cytometry** 実験で、細胞周期解析では **BrdU** 法、アポトーシス検出では **Annexin V** を用いる方が高感度だが何故用いなかったか。また、**G₀/G₁** ブロックが起こっているのに **S** 期の細胞が減少しないのをどう考えるか。
- 3) **Western blotting** 実験で、いずれの細胞株でも 24 時間後に **pERK** が一過性に減少しているがどう解釈するのか。**MCF-7** では **cyclin D1** の発現が低下しているのに **p21** の発現に変化がない点、72 時間後に **BCL-xL** の発現が上昇している点についてどう解釈するのか。検討した乳癌細胞には **p53** 遺伝子変異は報告されていないのか。
- 4) *In vivo* 実験の結果は素晴らしいが、**0.1% pterostilbene** の摂餌量はヒトの摂取量にするほどの程度か。実験のプロトコールが論文に正確に記載されていないので分かりにくい。**Pterostilbene** は **resveratrol** に比べて **bioavailability** が良いということだが、**resveratrol** を摂餌したらどのような効果が予想されるか。**Pterostilbene** と **resveratrol** で、吸収後の血中内代謝産物に違いはあるか。
- 5) **Pterostilbene** の標的分子は同定されているか。**ROS scavenger** としての機能は関与しないか。
- 6) **Lycopene**、**nobiletin**、**isoflavone**、**pterostilbene** の乳癌細胞増殖抑制のメカニズムの違いは。
- 7) **Pterostilbene** は **resveratrol** と同様に **sirtuin** を活性化するのか。**ER α** 、 **β** との解離定数に違いはあるのか。

最終試験は口頭試問により、専門的な見地より、研究の目的、方法、結果の解釈などについて上記の質疑を行った結果、的確な回答が得られたので、最終試験に合格と判定した。