

氏名	竹嶋 美夏子
学位の種類	博士 (栄養科学)
学位記番号	博栄甲第 0019 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 14 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	Anti-proliferative and apoptosis-inducing activity of lycopene against three subtypes of human breast cancer cell lines (リコペンによる乳癌細胞のサブタイプ別増殖抑制およびアポトーシス誘導作用の機序解析)
主論文公表雑誌	Cancer Science
論文審査委員	(主査) 津田 博子 (副査) 中野 修治 (副査) 太田 英明 (副査) 市川 純 (福岡大学 医学部) (副査) 池邊 哲郎 (福岡歯科大学 口腔歯学部)

論文内容の要旨

【目的】女性の癌の中で最も発症率の高い乳癌は、年々増加しており、日本人女性の約 14 人に 1 人が経験するといわれている。カロテノイドを多く含む野菜や果物を多く摂取することは、乳癌のリスクを減らす、また、カロテノイドの一種であるリコペンは、エストロゲンレセプター (ER) 陰性の乳癌に抑制的に働くことなどが報告されている。しかし、その作用機序について様々なサブタイプの乳癌細胞での違いは明らかにされていない。そこで、ホルモン受容体、HER-2 ステータスの異なる 3 種類の乳癌細胞に対するリコペンの増殖抑制作用機序について検討した。

【方法】細胞は、MCF-7 (ER/PR 陽性、HER-2 陰性)、SK-BR-3 (ER/PR 陰性、HER-2 陽性)、MDA-MB-468 (ER/PR/HER-2 陰性) を使用した。リコペンはテトラヒドロフランに溶解し、使用直前に 0~100 μ M に調製した。細胞周期とアポトーシスは FACS で解析を行った。リコペンの作用機序については、増殖およびアポトーシス関連タンパクをウエスタンブロットにより解析した。

【結果】リコペンは各乳癌細胞に対して時間、濃度依存的に増殖を抑制し、MDA-MB468

で最も強い抑制効果を示した。168 時間培養後の IC₅₀ は、MCF-7 : 29.9 μ M、SK-BR-3 : 22.8 μ M、MDA-MB-468 : 10.3 μ M となった。FACS 解析では、3 つの乳癌細胞ともにリコペンは G1/S 境界で細胞周期を停止させ、アポトーシスを示す sub G0/G1 分画は MDA-MB-468 で最も多く検出された。ウエスタンブロットでも Cleaved-PARP は MDA-MB468 に認められたが、他の細胞ではほとんど認められなかった。Bax は MDA-MB-468 で経時的に増加したが、他の細胞では変化が認められなかった。Akt は MDA-MB-468 のみで活性が抑制され、その下流の mTOR の抑制を認めた。すべての細胞において G1/S チェックポイントに関連する Cyclin D1 は抑制され、p21 は上昇がみられた。

【考察】リコペンは MDA-MB-468 に対して強く増殖を抑制し、Akt とその下流の mTOR のリン酸化の抑制により Bax が増加し、アポトーシスが誘導されることから、特にトリプルネガティブ乳癌の予防に有効な可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究は、トマトに含まれるカロテノイドの一種であるリコペンの乳癌細胞増殖抑制作用の作用機序を検証することを目的としている。

Estrogen/progesterone receptor および human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) の発現レベルの異なる 3 種類の乳癌細胞株、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) について、リコペンによる細胞増殖、細胞周期、アポトーシス、シグナル伝達機構への影響を検討した。

リコペンはいずれの乳癌細胞に対しても時間、濃度依存的に増殖を抑制した。MDA-MB468 で最も強い抑制効果を示したが、168 時間後の IC₅₀ は約 10 μ M であった。いずれの乳癌細胞も 50 μ M リコペン 72 時間処理により G1/S 境界で細胞周期を停止したが、SK-BR-3、MDA-MB-468 では sub G0/G1 分画が増加していた。アポトーシス指標の PARP 切断、アポトーシス促進因子 Bax 発現上昇、生存シグナル因子の Akt および mTOR の活性化抑制は MDA-MB-468 のみで認めたが、すべての細胞において ERK1/2 の活性化増強、G1/S 移行促進因子の Cyclin D1 の発現抑制、移行阻止因子の p21 発現増強がみられた。

本論文は、リコペンによる乳癌細胞増殖抑制作用が受容体の有無によって異なることを明らかにしている。ER/PR/HER2 がすべて陰性の乳癌細胞に対しては、細胞周期停止だけでなくアポトーシスを誘導したが、それには Akt/mTOR シグナル経路が関与することを示唆した。

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) Lycopene は疎水性が強く溶媒として THF しか使えないようだが、THF には細胞毒性はないのか。コントロール実験には THF を添加しているか。
- 2) WST assay で lycopene 存在下に 7 日間も培養したのは何故か。先行研究でも同様か。MDA-MB-468 は増殖が遅いように見えるがそうなのか。
- 3) ER/PR 陽性、HER2 陽性乳癌細胞の増殖のメカニズムは分かっているようだが、ER/PR/HER2 陰性乳癌細胞の増殖メカニズムについて説明せよ。
- 4) Lycopene は疎水性が強いので細胞膜を通過すると思うが、細胞内での作用メカニズムについてはどう考えるか。Akt や Bax に直接作用するのか、lycopene 受容体が存在するのか。
- 5) Flow cytometry と western blotting で用いた lycopene の濃度が異なるのは何故か。
- 6) Lycopene 処理により G₀/G₁ 分画が増加しているが、G₀ と G₁ 期のどちらが増加するのか。
- 7) Lycopene は ER/PR/HER2 陰性乳癌細胞に対してアポトーシスを誘導する点では非常に有望だが、その作用機序からは治療と予防のどちらに有効と思われるか。In vivo での効果確認に必要な ER/PR/HER2 陰性乳癌のモデル動物はあるのか。
- 8) Lycopene は Akt リン酸化の抑制を介して Bax 発現を増加させているのか。Bax への影響は発現量の増加なのか、または Bax のミトコンドリアへの移行なのか。
- 9) Lycopene は正常乳腺細胞に対して増殖抑制などの影響はないか。
- 10) Lycopene の消化管からの吸収機序は？日本人の血中 lycopene 濃度は分かっているのか。
- 11) β -Carotene や β -cryptoxanthin について抗乳癌作用は報告されているのか。
- 12) Lycopene は前立腺に集積するが、乳腺にも集積するのか。
- 13) β -Carotene は疫学研究や *in vitro* では肺癌抑制効果を示したが、介入研究では逆に肺癌促進作用を示したことが報告されている。Lycopene についてはどのように考えるか。

最終試験は口頭試問により、専門的な見地から、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。