

平成 27 年度

順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科 修士論文

糖を用いたヒト乳がん細胞に対する抗腫瘍効果

氏 名 中里 隆之佑

論文指導教員 久保原 禪

合格年月日 平成 28 年 2 月 22 日

論文審査員

主査

鈴木 良雄

副査

和氣 秀文

副査

久保原 禪

目次

第1章 緒言	1
第2章 関連文献の考証	3
第1節 トリプルネガティブ乳がん	3
第2節 ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231	3
第3節 糖の抗がん作用	4
第3章 実験方法	5
第1節 ヒト乳がん細胞の培養と糖の調整	5
第2節 細胞増殖アッセイ	5
第3節 ウェスタンブロッティング	5
第4節 糖を添加した MDA-MB-231 細胞内のタンパク質の二次元電気泳動	6
第5節 液体クロマトグラフィー質量分析法 (liquid chromatography–mass–mass spectrometry (liquid chromatography–tandem mass spectrometry): LC/MS/MS 法) によるタンパク質の同定	7
第6節 total-RNA の精製とマイクロアレイ法による mRNA 発現の解析	8
第7節 統計処理	8
第4章 結果	9
第1節 MDA-MB-231 細胞における MeINH ₂ と GlcNH ₂ の増殖抑制効果	9
第2節 細胞内シグナル伝達系に対する MeINH ₂ と GlcNH ₂ の効果	9
第3節 MDA-MB-231 細胞の mRNA 発現に対する MeINH ₂ 効果	9
第4節 MDA-MB-231 細胞におけるタンパク質発現とリン酸化に対する MeINH ₂ の効果	9
第5章 考察	11
第1節 MDA-MB-231 細胞における MeINH ₂ と GlcNH ₂ の増殖阻害活性	11
第2節 MDA-MB-231 細胞における MeINH ₂ の作用機序の解析 (DNA マイクロアレイ)	11
第3節 MDA-MB-231 細胞における MeINH ₂ の作用機序の解析 (二次元電気泳動と LC/MS/MS)	12
第6章 結論	14
第7章 要約	15

第 8 章 謝辭.....	16
引用文献.....	17
英文要約.....	21

第1章 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⁸⁾。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る⁸⁾。

乳がんの危険因子として「エストロゲン(女性ホルモンの1つ)」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³¹⁾³³⁾⁴¹⁾。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(女性ホルモンの1つ)」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¹⁵⁾²⁴⁾³¹⁾³³⁾³⁴⁾³⁵⁾⁴¹⁾。

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)を標的とした乳がん予防や、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、がん細胞の増殖を調節する因子の1つである「ヒト上皮成長因子受容体2(human epidermal growth factor receptor type2: HER2)」というタンパク質の働きを阻害する治療法も有効とされている。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⁸⁾²⁰⁾⁴⁶⁾。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は効果を発揮する「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(乳がん以外の治療にも用いられる)抗がん剤治療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²⁰⁾。

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

れているが、近年、GlcNH₂の有する抗腫瘍活性に関する報告が多々為されている。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¹²⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²²⁾⁴⁰⁾、GlcNH₂等の機能性糖質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 Galα1-6GlcNH₂ (MeINH₂) も強力な抗腫瘍活性を有することが報告されている。MeINH₂は GlcNH₂よりも強力に 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²⁰⁾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、MeINH₂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細胞である MDA-MB-231 細胞を用いて、MeINH₂の増殖阻害効果の検討と、その作用機序の解析を行った。その結果、2.5–10 mM の MeINH₂は濃度依存性に 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、MeINH₂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、MeINH₂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 MeINH₂の作用機序について議論する。

第2章 関連論文の考証

第1節 トリプルネガティブ乳がん

乳がんは薬物療法を行う際、患者の乳がんのタイプにより治療方法が異なる。大きく分けて3種類の治療法があり、それらは、1) 複数の抗がん剤を組み合わせる化学療法、2) エストロゲン産生を抑制する薬剤やエストロゲンが乳がん細胞に作用することを抑制する薬剤などを投与するホルモン療法、そして、3) 過剰発現や活性化することでがん細胞の増殖促進や悪性度を高める HER2 と呼ばれるタンパク質の働きを阻害する抗 HER2 治療である。

また、乳がんには、ホルモン受容体（エストロゲンとプロゲステロンの2つの受容体）と HER2 の発現パターンによって6つのサブタイプが存在するが、中でも2つのホルモン受容体が陰性かつ HER2 陰性のタイプの乳がんは「トリプルネガティブ乳がん」と呼ばれ、乳がん患者全体の15~20%がこのタイプに分類される²⁰⁾³⁵⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾。トリプルネガティブ乳がんに対してはホルモン療法と抗 HER2 療法を行えないため、通常の抗がん剤による化学療法のみ薬物治療となる。トリプルネガティブ乳がんは特異的な薬物療法のターゲットが存在しない（ため治療法も限定的になる）上に、早期に再発する傾向にあり、治療が難しい²⁰⁾³⁵⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾。ちなみに、トリプルネガティブ乳がんは、さらに細かなサブタイプに分類されており、それぞれの特徴に対応した的確な治療法を確立することが重要とされている²⁰⁾³⁵⁾⁴⁵⁾⁴⁷⁾。

第2節 ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231

ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞は、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、及び HER2 の発現陰性を示すトリプルネガティブ乳がん細胞である⁴²⁾⁴³⁾。そのため効果的な治療法の確立されていないトリプルネガティブ乳がんのモデル細胞として、乳がんの性状解析や抗がん剤の開発研究などに頻りに利用されている⁴⁾¹³⁾²⁰⁾²⁵⁾⁴⁷⁾。

実際にこのモデル細胞を利用して、トリプルネガティブ乳がん細胞においては「Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)→ Akt→ Mammalian target of rapamycin 1 (mTORC1)」シグナル伝達系が活性化状態にあることが見出されている¹³⁾³⁹⁾。また、MDA-MB-231 細胞では、細胞分裂促進に関与する Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) が恒常的に活性化していることや、v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) が変異している等も示されており、それらを

ターゲットした薬剤開発の報告もされている (420)96)3746)。

第3節 糖の抗がん作用

1953年にアミノ糖である GlcNH₂の抗腫瘍作用について初めて報告があり²²⁾、それ以降、様々ながん細胞に対する GlcNH₂の抗腫瘍作用や、その作用機序に関する研究が為されている。最近の研究では、GlcNH₂が Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 受容体を介した PI3K/Akt/mTORC1 シグナルの活性化を阻害することで細胞増殖を阻害することが示された⁴⁰⁾。すなわち、GlcNH₂は IGF-1 受容体の異常なグリコシル化を増加させることで、IGF-1 受容体のプロテアソーム分解を促す一方、異常なグリコシル化を起こしたタンパク質が小胞体に蓄積することで (小胞体ストレスが高まり)、アポトーシスを誘導することが報告されている¹⁸⁾⁴⁰⁾。他にも、GlcNH₂が AMP-activated protein kinase (AMPK) を活性化し、ミトコンドリアの生成を促進させることで線虫の寿命を延ばすとの報告¹²⁾もあり、GlcNH₂の有する多様な生物活性が注目されている。

第3章 実験方法

第1節 ヒト乳がん細胞の培養と糖の調整

ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 は、ATCC (American Type Culture Collection) より購入した。細胞は、Leibovitz's L-15 (和光純薬工業株式会社) に Fetal Bovine Serum (10%)、penicillin (100 U/ml)、streptomycin (100 µg/ml) を添加した培地を用い、37 °C (CO₂ 非添加) で培養した。

GlcNH₂ (Sigma-Aldrich Japan) と MeINH₂ は pH 7.4 のリン酸緩衝生理食塩水 (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, Göttingen, Germany) で滅菌し、使用するまで -20 °C で保管した。

第2節 細胞増殖アッセイ

細胞 (3×10³ cells/well) を 96 ウェルプレート (Corning, 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 の糖溶液 (最終濃度が 2.5 mM、5 mM、10 mM となるよう PBS で調整した GlcNH₂ および MeINH₂) をそれぞれのウェルに加え、72 時間培養した。

細胞増殖及び細胞の生存率は Cell Proliferation Kit II (XTT assay) (Roche, 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 時間インキュベートし、iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて吸光度 (450 nm) を測定した。得られた吸光度から細胞の増殖率を測定した。

第3節 ウェスタンブロッティング

細胞 (6×10⁵ cells/well) を 6 ウェルプレート (Corning) に播種し、1 晩培養を行った。翌朝、培地を除去し、最終濃度 5 mM となるように糖 (GlcNH₂ または MeINH₂) と培地を加えた。培養時間は 30 分、1 時間、3 時間とした。各時間経過後、PBS でそれぞれのウェルを洗浄し、SDS sample buffer を加え、タンパク質を回収した。

SDS-PAGE に用いたゲルは NuPAGE® Novex 10% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 12 Well

(Thermo Fisher Scientific) を用いた。泳動バッファーは NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

ゲルは泳動後、タンク式転写機を用いてオーバーナイトで PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) 膜 (Immun-Blot PVDF メンブレン、0.2 μm 、Bio-Rad) に転写を行った。転写後の PVDF 膜を Western BLoT Blocking Buffer (Protein Free) (タカラバイオ株式会社) に 1 時間浸し、TBS-T (Tris-Buffered Saline and Tween 20) で洗浄後、TBS-T 中で抗体反応を行った。一次抗体は Anti-ERK 1/2 pAb,Rabbit (Promega、1:5000 希釈)、Anti-ACTIVE MAPK pAb,Rabbit,pTEpY (Promega、1:5000 希釈)、Akt Antibody (New England Biolabs,inc.、1:1000 希釈)、Phospho-Akt (Ser473) Antibody (New England Biolabs,inc.、1:1000 希釈)、NF κ B p65 (L8F6) Mouse mAb (Cell Signaling Technology、1:1000 希釈)、Phospho-NF κ B p65 (Ser536) (93H1) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology、1:1000 希釈)、p38 MAPK Antibody (New England Biolabs,inc.、1:1000 希釈)、Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Antibody (New England Biolabs,inc.、1:1000 希釈)、SAPK/JNK Antibody (Cell Signaling Technology、1:1000 希釈)、Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody (Cell Signaling Technology、1:1000 希釈)、Jun (Transduction Laboratories、1:1000 希釈) Phospho-c-Jun (Ser73) Antibody (Cell Signaling Technology、1:1000 希釈)、Bad Antibody (New England Biolabs,inc.、1:1000 希釈)、Phospho-Bad (Ser136) Antibody (New England Biolabs,inc.、1:1000 希釈) を用いて、二次抗体は Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology、1:3000 希釈) と Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology、1:3000 希釈) を用いた。HRP 標識された二次抗体の検出には Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo Fisher Scientific) を用いた。化学発光の検出には ChemiDoc MP (Bio-Rad) を用いた。撮影後の画像解析は Image Lab (Bio-Rad) を用いた。

第 4 節 糖を添加した MDA-MB-231 細胞内のタンパク質の二次元電気泳動

細胞 (6×10^5 cells/well) を 6 ウェルプレート (Corning) に播種し一晩培養を行った。翌日、培地を除去し、糖 (GlcNH₂ または MelNH₂) の終濃度が 5 mM となるように糖溶液と培地を加えた。12 時間後、PBS で洗浄し、プロテアーゼ阻害剤 (cOmplete Protease inhibitor, Roche) 入りの SDS sample buffer (80 mM Tris-HCl pH 6.8、20 % Glycerol、

2% SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) で細胞を回収した。タンパク質を完全に可溶化するため、回収した溶液は超音波処理を行った。その後、二次元電気泳動に影響を与える SDS と塩を除去するために、-4℃で冷却していた沈殿用溶液 (90 % acetone、5 % acetic acid、5% methanol) を細胞の回収時に加えた SDS sample buffer の 5 倍量を加え、4℃で 15000rpm の条件下で遠心を行い、タンパク質を濃縮した。

その後、膨潤用ストック溶液 (9 M Urea、4% CHAPS、0.5% IPG Buffer、0.002% Bromophenol blue) に溶解し、Immobiline Dry Strip ゲル (pH 3-10 NL、7 cm、GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) を用いて一次元目の等電点電気泳動を行った。泳動には Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) 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) 1000 V 1 時間 (Gradient)、(3) 5000 V 1 時間 30 分 (Gradient)、(4) 5000 V 30 分 (Step and Hold))。泳動後、SDS 平衡化バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.8、6 M Urea、30% Glycerol、0.1% DTT) で 30 分間平衡化を行い、その後 10% アクリルアミドゲル (10% アクリルアミド、0.375 M Tris pH 8.8、0.1% SDS、0.033% 過硫酸アンモニウム、0.05% テトラメチルエチレンジアミン) により二次元目 SDS-PAGE を行った。

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である Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて確認した。タンパク質の発現量は、SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Lonza Japan, Tokyo, Japan) により確認した。蛍光染色したゲルは蛍光イメージャーであるフルオロホレスター 3000 (anatech, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。サンプル間で差のあるスポットは同機を用いて切り出しを行った。

第 5 節 液体クロマトグラフィー質量分析法 (liquid chromatography-mass-mass spectrometry (liquid chromatography-tandem mass spectrometry): LC/MS/MS 法) によるタンパク質の同定

切り出したゲル片は、100 μ l の還元処理液 (10 mM DTT、100 mM 炭酸水素アンモニウム) と 100 μ l のアルキル化試薬液 (54 mM ヨードアセトアミド、100 mM 炭酸水素アンモニウム) で順番に 30 分処理し、システイン残基の還元アルキル化を行った。その後、脱色液 A (50%メタノール、50 mM 炭酸水素アンモニウム) と、脱色液 B (50%アセトニトリル、50 mM 炭酸水素アンモニウム) を用いて脱色し、100%アセトニトリルに 5 分

間浸漬して脱水した。これに 100 mg/μl のトリプシン溶液を加え氷上で 45 分間静置した。残液を除去後、1 サンプルあたり 15 μl の 100 mM 炭酸水素アンモニウムを加え、37 °C で 1 晩インキュベートし、ゲル内消化した。ゲル内消化により生成したペプチドは抽出用液 A (50% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸)、抽出用液 B (5% ギ酸、15% イソプロパノール、25% アセトニトリル)、抽出用液 C (80%アセトニトリル) を用いて段階的に回収した。回収したペプチドは Thermo Fisher Scientific LXQ mass spectrometer (AMR, Inc., Tokyo, Japan) を用いて分析を行った。タンパク質の同定は MASCOT search (Matrix Science, UK) を用いた。

第 6 節 total-RNA の精製とマイクロアレイ法による mRNA 発現の解析

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を利用して精製した。細胞 (8×10^6 cells/well) を 12 ウェルプレート (Corning) に播種し、1 晩培養を行った。翌朝、培地を除去し、最終濃度 5 mM となるように MeI_{NH}₂ 溶液と培地を加えた。6 時間後、PBS でそれぞれのウェルを洗浄し、Trizol reagent (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) 1 ml 加え、セルスクレーパーを用いて 1.5 ml エッペンチューブに回収した。懸濁後、-80°C で 5 分凍結させ、室温で 5 分間静置し、200 μl のクロロホルムを加え、遠心した後、上清を別のチューブに移し、等量の 70%エタノールを加えた。スピнкаラムを用いて洗浄と遠心を繰り返し、最後に RNA を溶出させ-20°C で保管した。RNA の濃度は NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定した。回収した RNA サンプルは、タカラバイオ株式会社に発送し、Agilent Expression Array 解析 (SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K Ver. 3.0) を依頼した。

第 7 節 統計処理

細胞増殖アッセイは独立した 3 回の実験の平均値±標準偏差で示した。各データの比較には student の対応のない t 検定で行った。有意差水準は *p<0.05、**p<0.01 とした。

第4章 結果

第1節 MDA-MB-231細胞に対する MeINH₂と GlcNH₂の増殖抑制効果

私は先ず、ヒト乳がん MDA-MB-231 細胞の増殖に対する MeINH₂と GlcNH₂の効果を比較検討した (図1)。その結果、2.5–10 mM の MeINH₂と GlcNH₂は濃度依存性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、MeINH₂と比べて GlcNH₂の増殖阻害効果の方がやや高かった。

第2節 細胞内シグナル伝達系に対する MeINH₂と GlcNH₂の効果

次に、MeINH₂と GlcNH₂の作用機序を解明する第一段階として、細胞増殖や生存に関与するとされるシグナル伝達系 (ERK、JNK、p38 MAPK、c-Jun、NFκB、Akt) に対する MeINH₂と GlcNH₂の短時間の効果を比較検討した (図2–7)。その結果、MeINH₂は今回調べたタンパク質の発現やリン酸化状態に大きな影響を与えなかった。一方、GlcNH₂は比較的早い時間で ERK (糖処理後 0.5 時間) や JNK (0.5 時間)、c-Jun (1 時間) のリン酸化を抑制すること、逆に、p38 MAPK (糖処理後 3 時間) や NFκB (1–3 時間)、Akt (1 時間) のリン酸化を促進することが示唆された。これらの結果は、MeINH₂と GlcNH₂の作用機序が少なくとも一部異なることを示唆している。

第3節 MDA-MB-231細胞の mRNA 発現に対する MeINH₂効果

さらに、MeINH₂の作用機序を明らかにすることを目的として、Control 細胞と MeINH₂ (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8、表1)。ヒートマップからも明らかのように、糖処理の有無によって遺伝子発現は大きく変化した。MeINH₂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。しかし、MeINH₂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 (BCL2L0)の発現は1/30ほどにそれぞれ減少していた。

第4節 MDA-MB-231細胞におけるタンパク質発現とリン酸化に対する MeINH₂の効果

同じく、MeINH₂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 MeINH₂ (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 9 A)。Control と比較してリン酸化の程度に違いがあるスポットを切り出して、LC/MS/MS 分析を行い、タンパク質の同定を行った (表 2 No. 1 - No. 4)。この中の Nucleophosmin (NPM) は、リン酸化を受けることにより細胞の複製を促進することが報告されており、MeINH₂による NPM のリン酸化の減少は細胞の増殖抑制に関わっている可能性が示唆された。

さらに、Control 細胞と MeINH₂ (5 mM) 処理細胞のタンパク質を二次元電気泳動で展開し、発現量に差のあるタンパク質を網羅的に解析した (図 9 B)。泳動後のゲルをタンパク質に対する蛍光試薬で染色し、Control とシグナル強度に違いのあるスポットを明らかにした。これらのスポットを切り出し、LC/MS/MS によりタンパク質を同定した (表 2 No. 5 - No. 17)。興味深いことに、Tubulin、Vimentin、Actin (以上、細胞骨格系タンパク質)、Heat shock cognate 71 kDa protein、78 kDa glucose-regulated protein、Mitochondrial Stress-70 protein、Endoplasmin (以上、熱ショックタンパク質)、14-3-3 protein Epsilon、calreticulin、Mitochondrial Enoyl-CoA hydratase、Nucleophosmin、Annexin ファミリータンパク質 (以上、がん関連タンパク質) などの発現や修飾が糖処理によって大きく変化していた。

第5章 考察

第1節 MDA-MB-231細胞における MelNH₂と GlcNH₂の増殖阻害活性

前述のように、これまでの研究で、Galα1-6GlcNH₂構造の新規オリゴ糖 MelNH₂がヒト K562 白血病細胞の増殖を阻害することが示されていたが、この糖の作用スペクトルは十分に検討されていない。今回の研究では、ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞に対する MelNH₂増殖抑制効果や遺伝子発現への影響、さらにシグナル伝達系への作用を検討した。MDA-MB-231 細胞は 2.5–10 mM の MelNH₂が濃度依存性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 GlcNH₂の効果を比較検討し、GlcNH₂の増殖阻害活性の方が MelNH₂よりもやや強力であることも判明した(図1)。

しかしながら、MDA-MB-231の細胞内シグナル伝達系に対する MelNH₂と GlcNH₂の短時間の効果をウェスタンブロット法により解析した結果、細胞の増殖や生存に関与する主要なタンパク質の活性化(リン酸化)に対する2つの糖の作用は一部異なっていた(図2-7)。GlcNH₂(5 mM)存在下では、ERK、JNK、c-Junのリン酸化が抑制され、逆に、p38 MAPKやNFκB、Aktのリン酸化が促進されることが示唆された。一方、MelNH₂(5 mM)存在下では、これらのタンパク質のリン酸化状態に(GlcNH₂ほどの)大きな変化は認められなかったが、Akt(糖処理後3時間)のリン酸化を20%ほど阻害した(図7)。一般に、MAPKファミリー酵素群(ERK、JNK、p38 MAPK)やNFκBは細胞増殖や細胞分化等を制御し、Aktは細胞の生存に関与すると考えられている²⁴²⁾。とりわけ、ERKはその活性亢進によりがん細胞の増殖を促進することが報告されており²¹⁶⁾、GlcNH₂は少なくとも一部 ERK 活性を阻害することで MDA-MB-231 細胞の増殖を抑制しているのかもしれない。一方、MelNH₂は、少なくとも一部 Akt 活性を阻害することで細胞の増殖を阻害しアポトーシスを誘導するのかもしれない。今後、これらの結果を参考に MelNH₂と GlcNH₂の作用機序の解明を進めていく必要があるが、今回の結果は、2つの糖の作用機序が少なくとも一部異なることを示唆している。

いずれにしても、MDA-MB-231細胞は「トリプルネガティブ乳がん」のモデルであることから、今回の結果は、MelNH₂と GlcNH₂が難治性乳がんの治療に臨床応用できる可能性を示唆している。

第2節 MDA-MB-231細胞における MelNH₂の作用機序の解析(DNA マイクロアレイ)

DNA マイクロアレイによる解析結果から、Control 細胞と MelNH₂ 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8、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¹⁹⁾²³⁾⁴⁴⁾。

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⁵⁾⁶⁾³¹⁾、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⁹⁾²⁸⁾²⁹⁾³⁹⁾。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²⁰⁾⁴²⁾。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に対する受容体である 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 LPS 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²⁰⁾²⁹⁾。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¹⁰⁾、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が示唆している。

第 3 節 MDA-MB-231 細胞における MeINH₂ の作用機序の解析 (二次元電気泳動と LC/MS/MS)

今回、二次元電気泳動と LC/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(表1)。主なタンパク質を以下に列記する。STAT3 のリン酸化を抑制する Mitochondrial Enoyl-CoA hydratase は、多くのがん細胞

で発現している¹⁴⁾。Annexin A2 は細胞増殖を促進し、アポトーシスを抑制する³¹⁰⁾。Calreticulin は、がん化した細胞のオートファジーの促進する⁷⁾。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³⁰⁾。この他にも多くのがん関連タンパク質や細胞増殖、細胞骨格に関わっているタンパク質の発現が糖処理によって変化することが明らかとなったが、それらの発現制御に関わるシグナル伝達系の解明、MeI-NH₂ の作用機序の解析は今後の課題となる。

近年、希少糖類の抗酸化活性に関する報告や⁷⁾、虚血が引き起こす神経細胞死からの保護作用²⁹⁾など、糖類がもつ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。MeI-NH₂ 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、今回の成果と先行研究との関連を精査する必要があるだろう。

第6章 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、MeI_{NH}₂ と GlcNH₂ の増殖抑制効果を比較検討した。その結果、MeI_{NH}₂ と GlcNH₂ は濃度依存性に MDA-MB-231 細胞の増殖を阻害すること、2つの糖の作用機序は少なくとも一部異なることが明らかとなった。また、MeI_{NH}₂ 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。これらの成果を基にした MeI_{NH}₂ の作用機序の解明が期待される。

第7章 要約

既知の機能性単糖類の1つ GlcNH₂は抗腫瘍活性を有することが報告されており、臨床応用が期待されている。近年、本研究室で合成した新規オリゴ糖 MelNH₂もいくつかのがん細胞に対する増殖抑制活性を有することが報告されているが、乳がん細胞に対する効果は確認されていない。本研究では、トリプルネガティブ乳がんのモデル細胞である MDA-MB-231 を用いて、MelNH₂と GlcNH₂の増殖抑制効果の比較検討と、MelNH₂の作用機序の解析を試みた。その結果、2.5–10 mM の MelNH₂と GlcNH₂は、濃度依存性に MDA-MB-231 細胞の増殖を抑制したが、2つの糖の作用機序は少なくとも一部異なることが示唆された。MelNH₂の作用機序を解明すべく、Control 細胞と糖 (5 mM) 処理後の細胞内の遺伝子発現の差異を DNA マイクロアレイ法によって比較解析した。さらに、Control 細胞と糖処理後の細胞内のタンパク質を2次元電気泳動で展開し、発現量やリン酸化状態の変化したタンパク質スポットを切り出し、LC/MS/MS 法によりタンパク質を同定した。その結果、MelNH₂ (5 mM) 処理後の細胞では、細胞の増殖や生存、アポトーシス、抗酸化作用などに関与するいくつかのタンパク質の発現に顕著な変化が生じることが明らかとなった。今回の結果は、MelNH₂が難治性乳がんの治療に臨床応用できる可能性を示唆している。

第8章 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究をご指導頂いた健康生命科学研究室の久保原禪教授、並びに飯泉恭一先生に心より御礼申し上げます。また、糖サンプルの提供とご指導を頂いた細見修特任教授、貴重なご助言を頂いた佐々木啓先生、タンパク質を同定する際に大変お世話になりましたスポーツ健康医科学研究所の松本綾子先生に深謝致します。

引用文献

- 1) Murata A. et al. (2003). A novel inhibitory effect of d-allose on production of reactive oxygen species from neutrophils. *J Biosci Bioeng* 96, 89–91.
- 2) Worster DT. et al. (2012) Akt and ERK control the proliferative response of mammary epithelial cells to the growth factors IGF-1 and EGF through the cell cycle inhibitor p57Kip2. *Sci Signal* 5, ra19.
- 3) Sharma MR, Koltowski L, Ownbey RT, Tuszynski GP, Sharma MC. (2006). Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Exp Mol Pathol* 81, 146–56.
- 4) Kim NH, Park HJ, Oh MK, Kim IS. (2013). Antiproliferative effect of gold(I) compound auranofin through inhibition of STAT3 and telomerase activity in MDA-MB 231 human breast cancer cells. *BMB Rep* 46, 59–64.
- 5) Wong RSY. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 30, 87.
- 6) Xu JD. et al. (2011). BCL2L10 protein regulates apoptosis/proliferation through differential pathways in gastric cancer cells. *J Pathol* 223, 400–9.
- 7) Obeid M. et al. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13, 54–61.
- 8) Cancer Registry and Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan.
- 9) Boveris A, Chance B, Oshino N. (1972). Cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617-30.
- 10) Seckinger A. et al. (2012). Clinical and prognostic role of annexin A2 in multiple myeloma. *Blood* 120 1087–94.
- 11) 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.
- 12) Weimer S. et al. (2014). D-Glucosamine supplementation extends life span of nematodes and of ageing mice. *Nat Commun* 5, 3563.

- 13) Gang S. et al. (2015). Effect of PI3K inhibitor LY294002 combined with RAD001, a mTOR specificity inhibitor, on proliferation and apoptosis of triple-negative breast cancer cell lines MDA-MB-231 through PI3K/AKT/mTOR pathway in vitro. ASCO Meet Abstr 33, e12088.
- 14) Agnihotri G, Liu H. (2003). Enoyl-CoA hydratase. reaction, mechanism, and inhibition. *Bioorg Med Chem* 11, 9–20.
- 15) Bernstein L. (2002). Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 3–15.
- 16) Cagnol S, Chambard JC. (2010). ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* 277, 2–21.
- 17) Caramés B. et al. (2013). Glucosamine activates autophagy in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 65, 1843–52.
- 18) 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, 794–8.
- 19) Turturro F, Von BG, Friday E. (2007). Hyperglycemia-induced thioredoxin-interacting protein expression differs in breast cancer-derived cells and regulates paclitaxel IC50. *Clin Cancer Res* 13, 3724–30.
- 20) Lehmann BD. et al. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121, 2750–67.
- 21) Mochizuki T. et al. (2006). Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells. *Oncogene* 25, 3699–707.
- 22) Quastel JH, Cantero A. (1953). Inhibition of tumour growth by D-glucosamine. *Nature* 171, 252–4.
- 23) Nishinaka 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, 1287–92.

- 24) Hoover R, Gray LA, Cole P, MacMahon B. (1976). Menopausal Estrogens and Breast Cancer. *N Engl J Med* 295, 401–405.
- 25) Hui L, Zheng Y, Yan Y, Bargonetti J, Foster DA. (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, 7305–10.
- 26) Hirooka K. et al. (2006). Neuroprotective effects of D-allose against retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 47, 1653–7.
- 27) Hosomi O. et al. (2009). Novel oligosaccharide has suppressive activity against human leukemia cell proliferation. *Glycoconj J* 26, 189–98.
- 28) Eguchi H, Fujiwara N, Ookawara T, Suzuki K, Taniguchi N. (2009). Oxidative stress and health. *Journal of analytical bio-science* 32(4),247–256.
- 29) Miyano K, Sumimoto H. (2009). Oxidative stress and the Nox family. *Journal of analytical bio-science* 32(4),289–296.
- 30) Riddell JR, Wang XY, Minderman H, Gollnick SO. (2010). Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4. *J Immunol* 184, 1022–30.
- 31) Britt K, Ashworth A, Smalley M. (2007). Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 14, 907–33.
- 32) Katayose Y. et al. (1997). Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 57, 5441–5.
- 33) Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G. (2006). Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Res* 8, R43.
- 34) 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, 116–23.
- 35) Falandry C, Canney PA, Freyer G, Dirix LY. (2009). Role of combination therapy with aromatase and cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 20, 615–20.

- 36) Camporeale A. et al. (2014). STAT3 Activities and Energy Metabolism: Dangerous Liaisons. *Cancers Basel* 6, 1579–96.
- 37) Segatto I. et al. (2014). Surgery-induced wound response promotes stem-like and tumor-initiating features of breast cancer cells, via STAT3 signaling. *Oncotarget* 5, 6267–79.
- 38) Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8, 627–44.
- 39) Boveris A, Oshino N, Chance B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617–30.
- 40) Song KH. et al. (2014). The novel IGF-1R/Akt-dependent anticancer activities of glucosamine. *BMC Cancer* 14, 31.
- 41) Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH. (2005). The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 7, 131–42.
- 42) Carnero A, Blanco AC, Renner O, Link W, Leal JFM. (2008). The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 8, 187–98.
- 43) Mitsushita J, Lambeth JD, Kamata T. (2004). The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation. *Cancer Res* 64, 3580–5.
- 44) Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11, 136–40.
- 45) Rahman M. et al. (2009). TRAIL induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells with a mesenchymal phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 113, 217–30.
- 46) Chavez KJ, Garimella SV, 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.
- 47) Giuliano M. et al. (2015). Upregulation of ER Signaling as an Adaptive Mechanism of Cell Survival in HER2-Positive Breast Tumors Treated with Anti-HER2 Therapy. *Clin Cancer Res* 21, 3995–4003.

英文要約

Abstract

Effects of an amino sugar, MelNH₂, on human breast cancer cells

Ryunosuke Nakazato

BACKGROUND: It has been shown that GlcNH₂ exhibits anti-tumor activities in various tumor cell lines in vitro. Recently, a novel amino sugar, MelNH₂, was shown to suppress cell growth in some tumor cells in vitro. However, it has not been conducted to assess whether MelNH₂ exhibits anti-tumor effects on breast cancer cells.

PURPOSE: The aim of this study was to assess the anti-tumor effects of MelNH₂ (and GlcNH₂ as a reference) in the human breast cancer cell line, MDA-MB-231, which is a model of triple-negative breast cancer. We also tried to elucidate the mechanism underlying the action of MelNH₂ in the breast cancer cells.

METHOD: Cell growth was assessed by XTT assay. The effects of MelNH₂ and GlcNH₂ on some signal transduction pathways such as MAPK signaling were investigated by the use of western blotting. The mRNA expressions in control and MelNH₂-treated cells were compared by the use of DNA microarrays. To identify the proteins that were affected (induced or reduced, or phosphorylated) by MelNH₂ treatment, we performed 2-dimensional electrophoresis (2DE) and liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

RESULT and DISCUSSION: At a range of 2.5–10 mM, MelNH₂ as well as GlcNH₂ significantly suppressed cell growth of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner. Western blot analysis showed that the mechanisms of the sugars might be different from each other, at least in part. Furthermore, DNA microarray and 2DE–LC/MS/MS analyses revealed that treatment with 5 mM MelNH₂ could alter the expression of various proteins that are involved in regulation of cell growth and survival. The present results suggest that MelNH₂ may have a therapeutic potential in the treatment of malignant breast cancer.

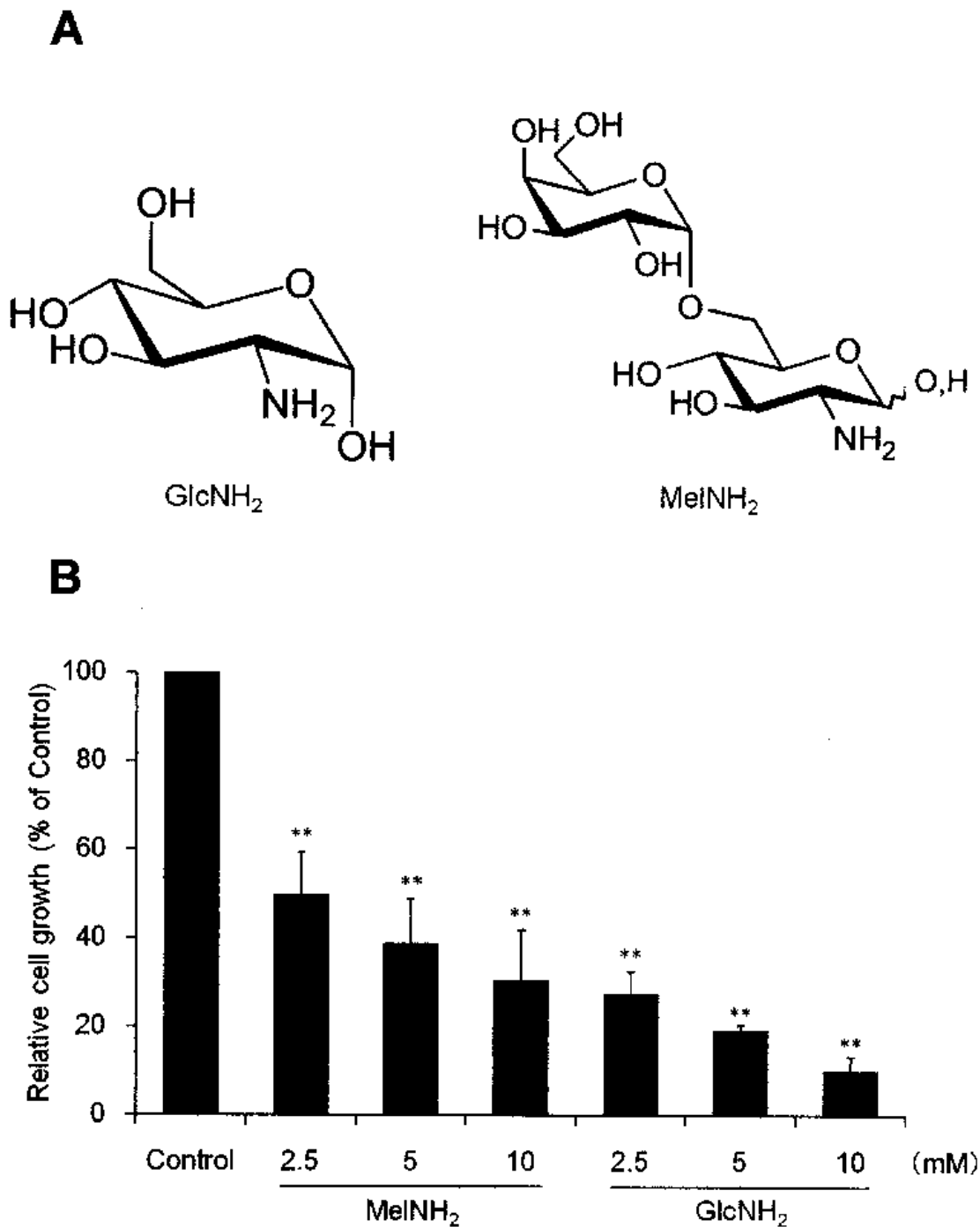


図1. MeINH₂ と GlcNH₂ の構造式と、ヒト MDA-MB-231 細胞の増殖に対する効果。A. GlcNH₂ と MeINH₂ の構造式。B. MDA-MB-231 細胞を 2.5–10 mM の MeINH₂ あるいは GlcNH₂ 存在化で 3 日間培養後、XTT 法により相対細胞数 (Control 細胞数を 100 とした相対値) を算出した。グラフは 3 回の実験結果の平均値と標準偏差 (Error bars) で表した。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs. Control.

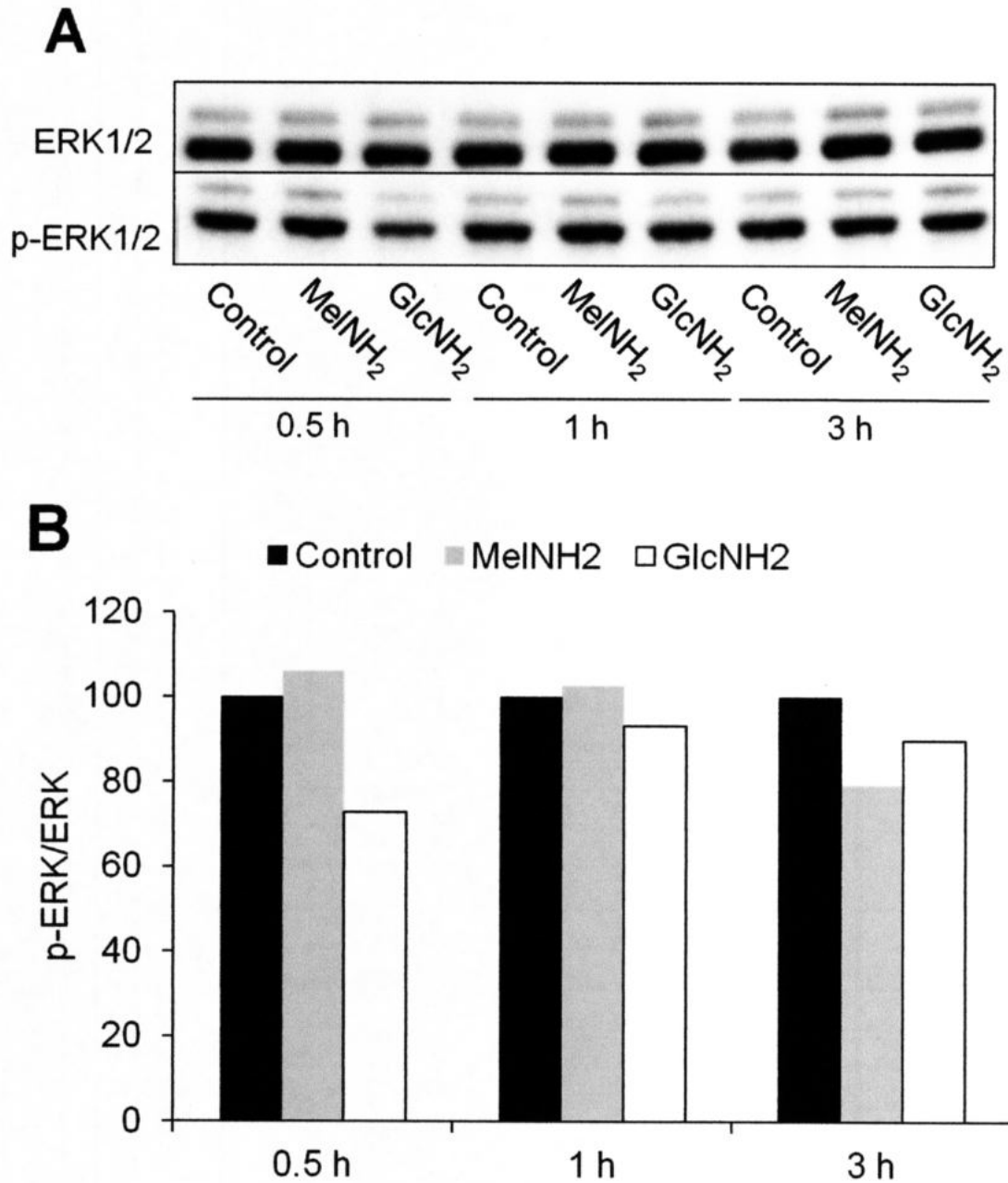


図2. ERKのリン酸化(活性化)に対する糖の効果

細胞を5 mMの糖存在下と非存在下(Control)で0.5-3時間処理し、細胞を回収後ウェスタンブロット法でERKとp-ERKを検出した(A)。それぞれのバンドを定量化し、ERKのリン酸化率を算定した。グラフは、Control細胞のERKリン酸化率を100とした相対値を示している(B)。GlcNH₂処理後0.5時間でリン酸化を抑制傾向にあることが示唆された。

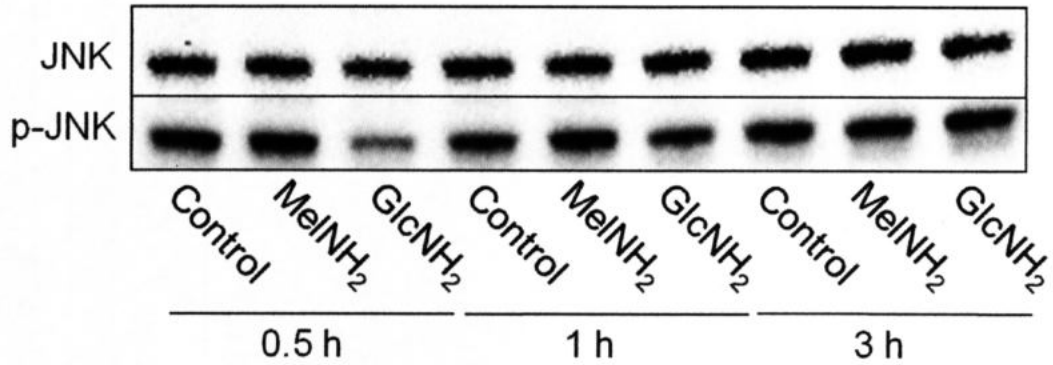
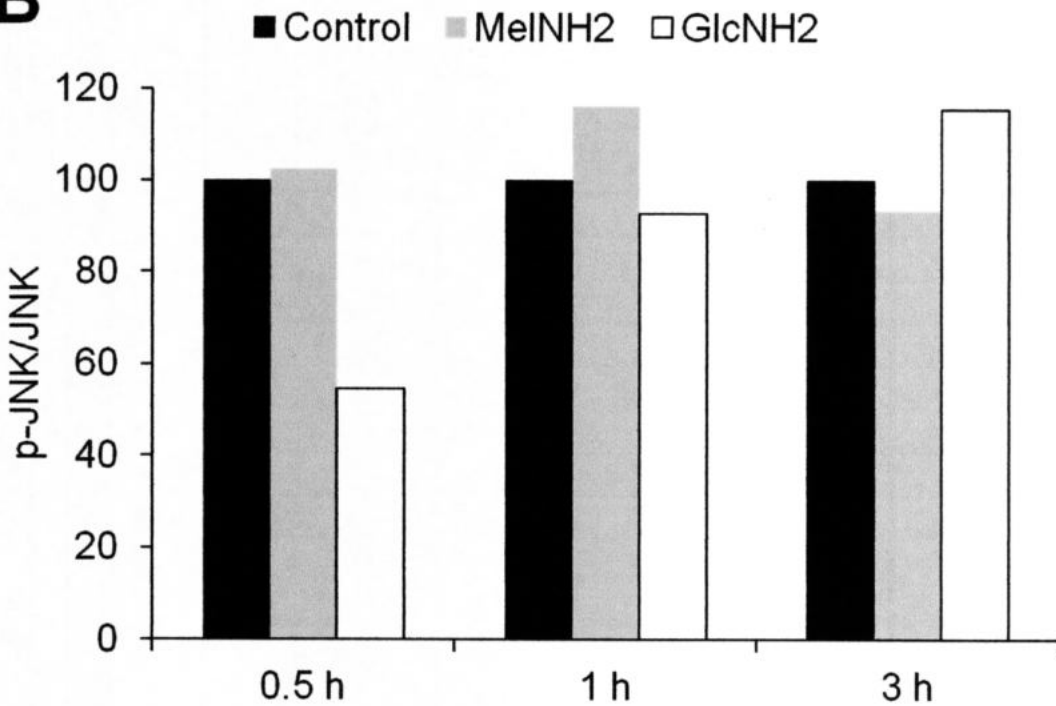
A**B**

図3. JNKのリン酸化率

細胞を5 mMの糖存在下と非存在下 (Control) で0.5-3時間処理し、細胞を回収後ウェスタンブロット法でJNKとp-JNKを検出した (A)。それぞれのバンドを定量化し、JNKのリン酸化率を算定した。グラフは、Control細胞のJNKリン酸化率を100とした相対値を示している (B)。GlcNH₂処理後0.5時間でリン酸化を抑制している可能性が示唆された。

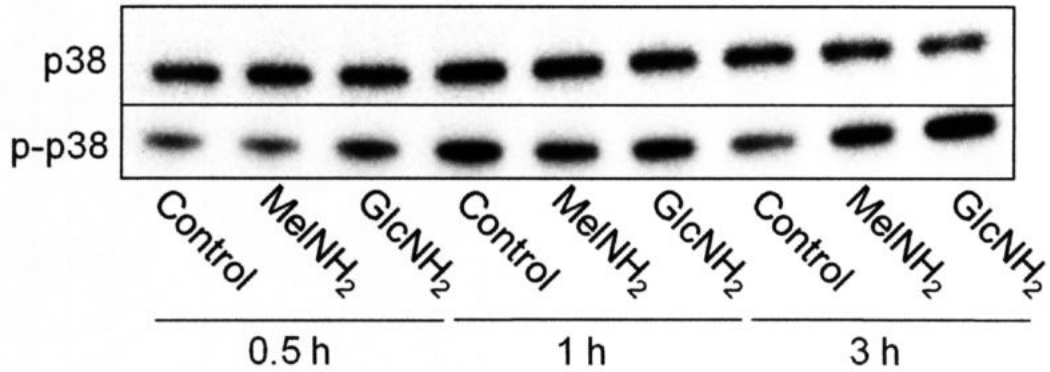
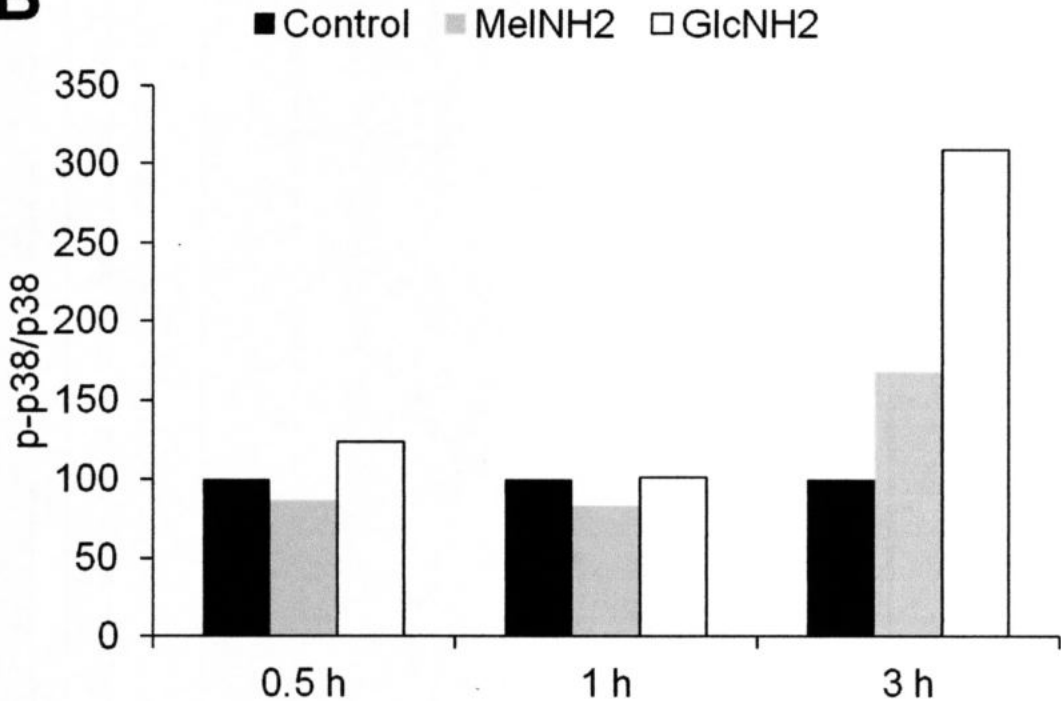
A**B**

図4. p-38 MAPK のリン酸化 (活性化) に対する糖の効果

細胞を 5 mM の糖存在下と非存在下 (Control) で 0.5-3 時間処理し、細胞を回収後ウェスタンブロット法で p38 MAPK (p38) と p-p38 MAPK (p-p38) を検出した (A)。それぞれのバンドを定量化し、p38 MAPK のリン酸化率を算定した。グラフは、Control 細胞の p38 MAPK リン酸化率を 100 とした相対値を示している (B)。GlcNH₂ 処理後 3 時間でリン酸化が促進されることが示唆された。

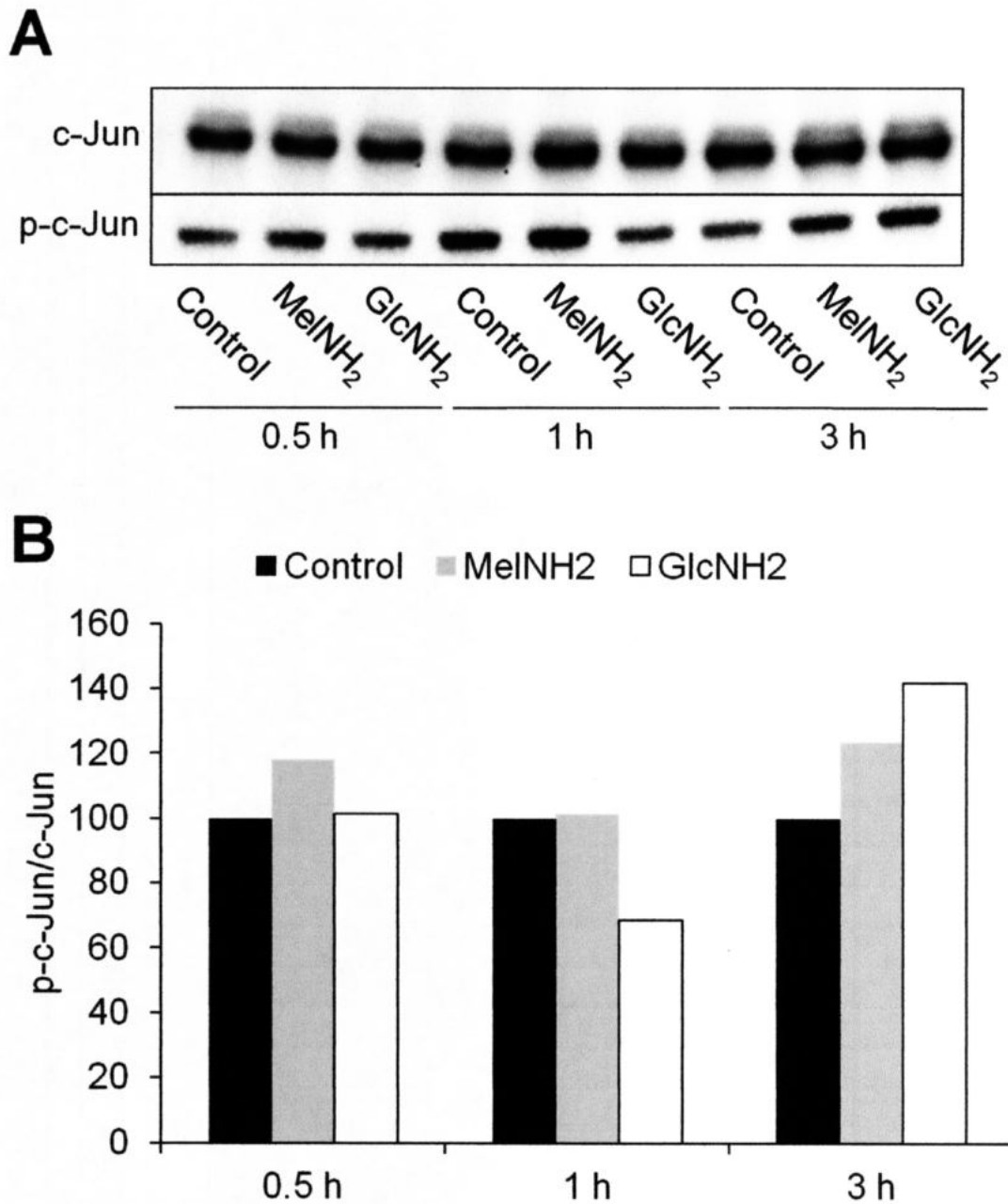


図5. c-Jun のリン酸化 (活性化) に対する糖の効果

細胞を 5 mM の糖存在下と非存在下 (Control) で 0.5-3 時間処理し、細胞を回収後ウェスタンプロット法で c-Jun と p-c-Jun を検出した (A)。それぞれのバンドを定量化し、c-Jun のリン酸化率を算定した。グラフは、Control 細胞の c-Jun リン酸化率を 100 とした相対値を示している (B)。GlcNH₂ 処理後 1 時間で c-Jun のリン酸化を抑制している傾向が示唆された。

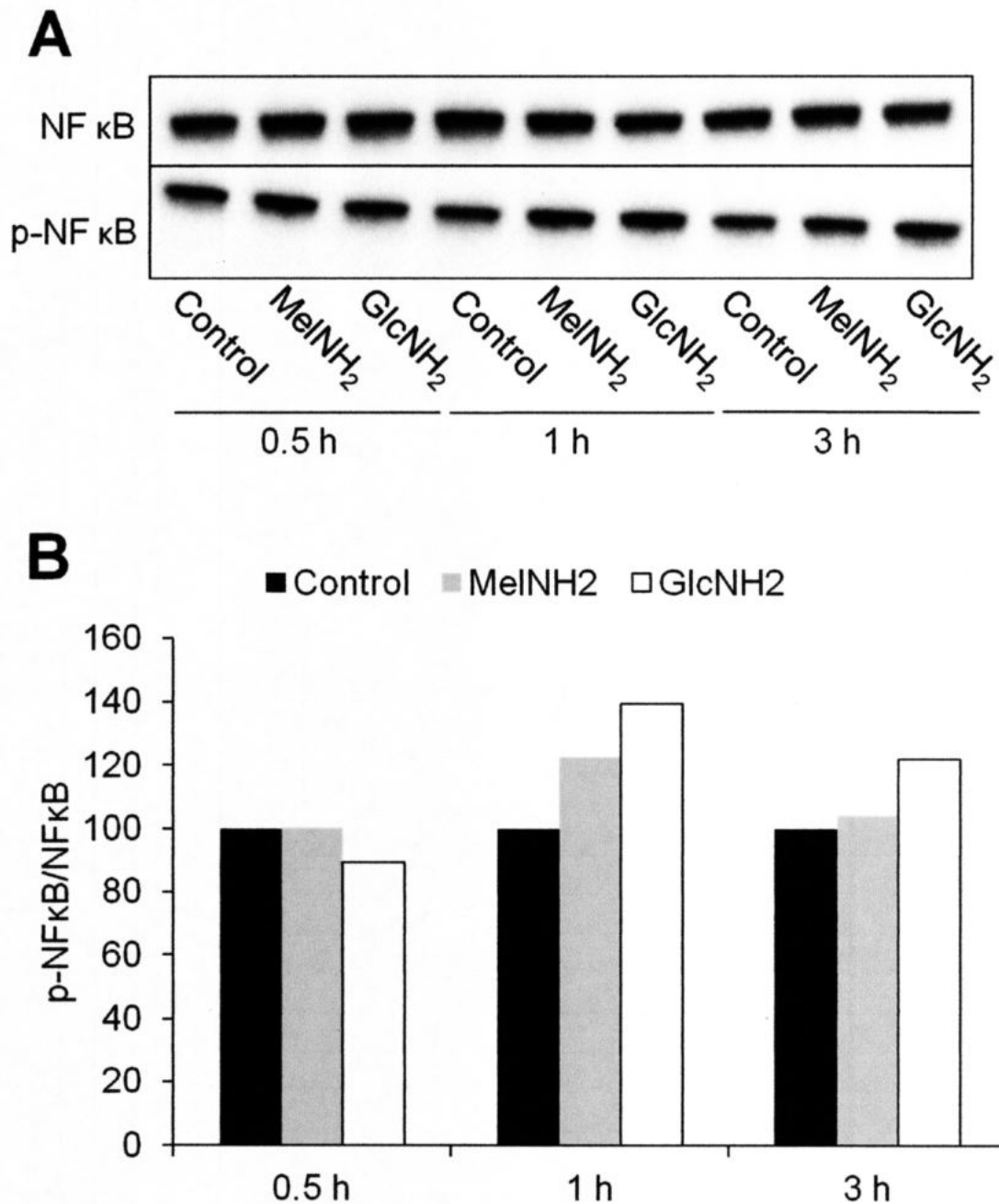


図6. NFκB のリン酸化 (活性化) に対する糖の効果

細胞を 5 mM の糖存在下と非存在下 (Control) で 0.5-3 時間処理し、細胞を回収後ウェスタンブロット法で NFκB と p-NFκB を検出した (A)。それぞれのバンドを定量化し、NFκB のリン酸化率を算定した。グラフは、Control 細胞の NFκB リン酸化率を 100 とした相対値を示している (B)。糖処理後 1 時間でリン酸化をやや促進しているかもしれないが顕著な変化は認められなかった。尚、NFκB は多様な刺激により活性化され、細胞増殖やアポトーシスなど多くの生理活性活性に関与している転写調節因子である。

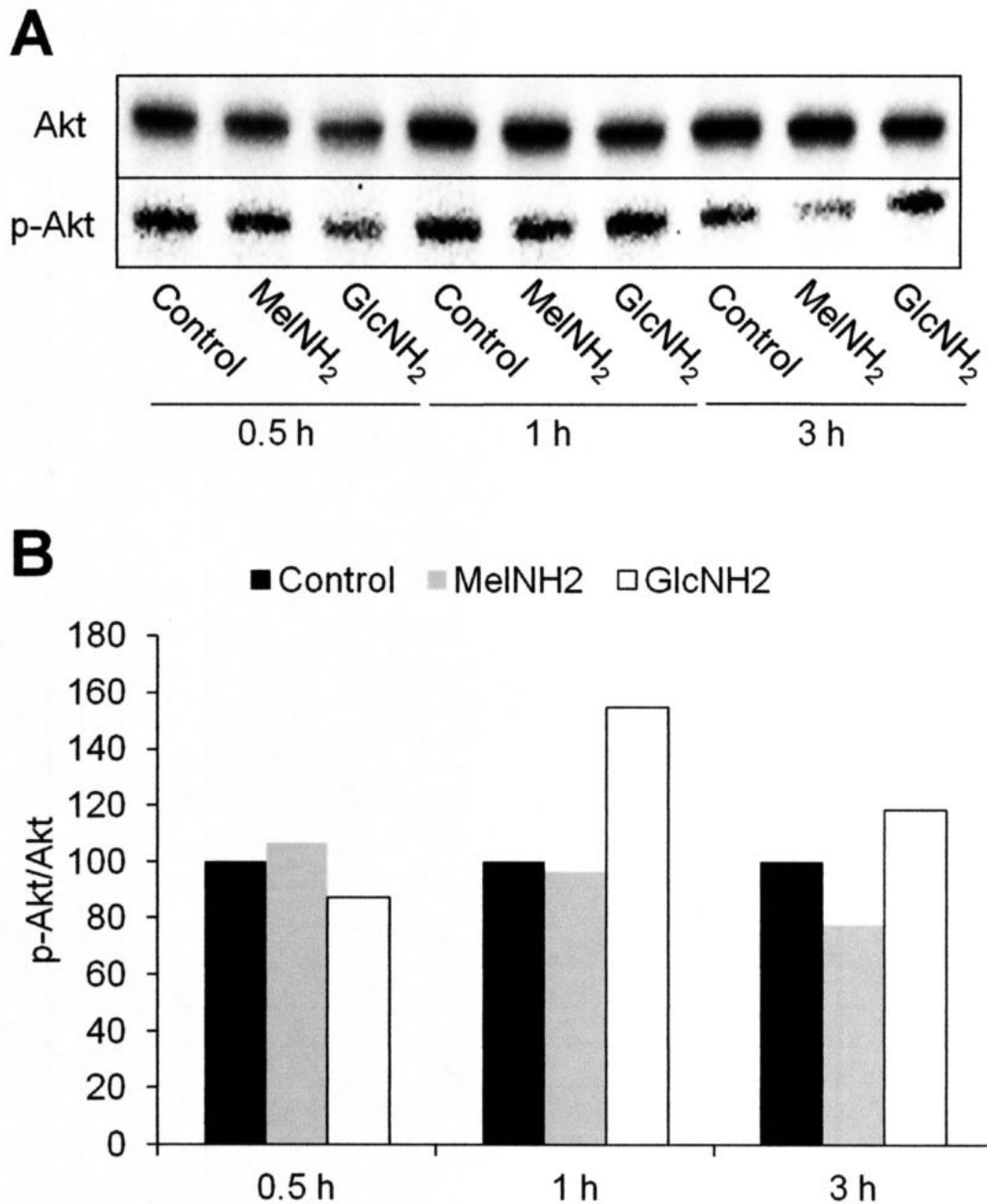


図7. Aktのリン酸化（活性化）に対する糖の効果

細胞を5 mMの糖存在下と非存在下（Control）で0.5-3時間処理し、細胞を回収後ウェスタンブロット法でAktとp-Aktを検出した（A）。それぞれのバンドを定量化し、Aktのリン酸化率を算定した。グラフは、Control細胞のAktリン酸化率を100とした相対値を示している（B）。GlcNH₂処理後1時間でAktのリン酸化を促進している可能性が示唆された。

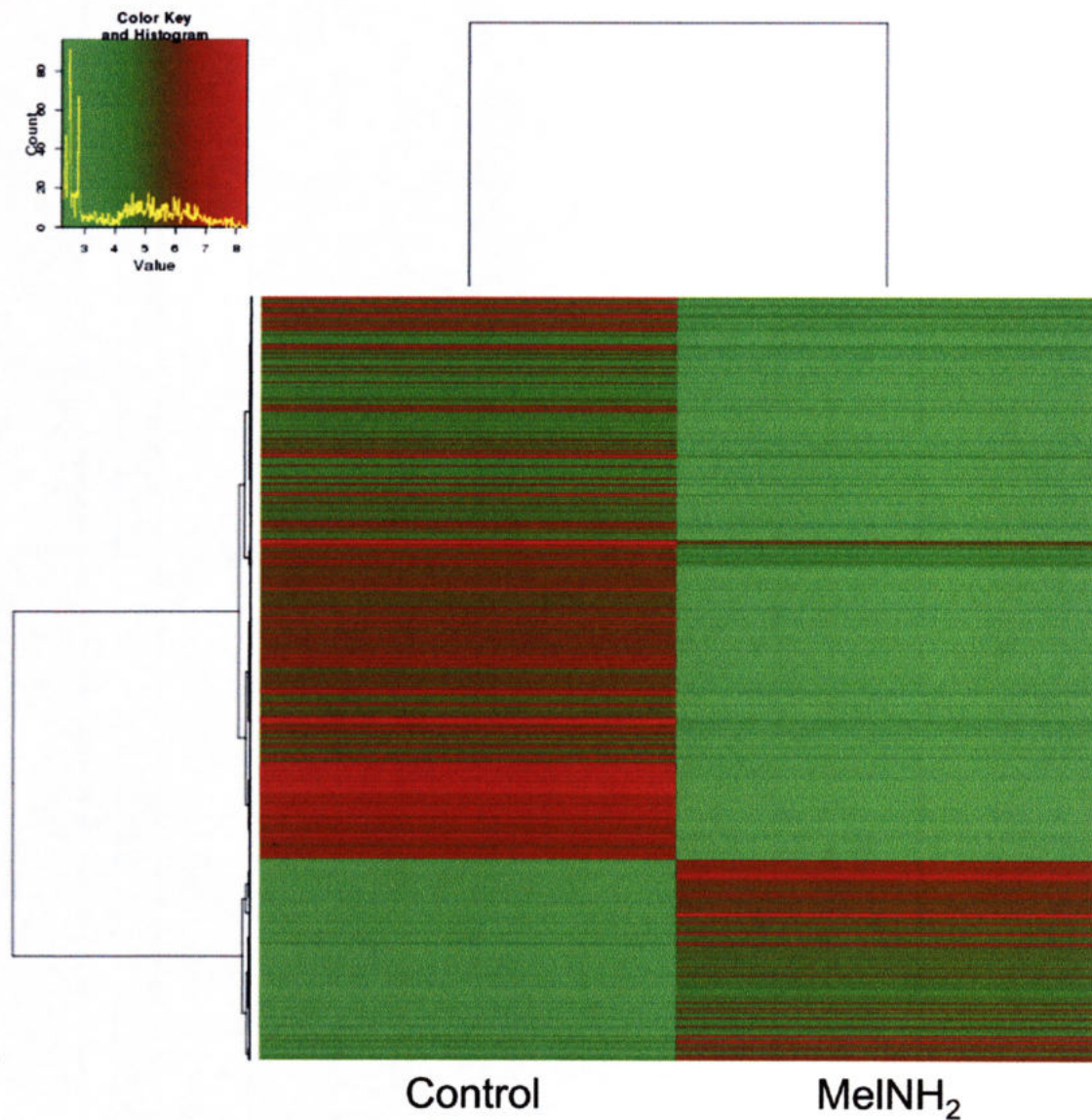


図 8. Control 細胞と糖処理細胞の遺伝子発現量を比較したヒートマップ

MDA-MB-231 細胞を 5 mM の MelNH₂ 存在化と非存在下 (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 1000 遺伝子を抽出し、ヒートマップを作成した (ヒートマップ: 多くの比較標本から遺伝子発現レベルを色で区分した図。シグナル値の低い遺伝子を緑、高い遺伝子を赤で表示)。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。

遺伝子名	糖処理後の発現比率
thioredoxin interacting protein(TXNIP)	5.4
lipopolysaccharide binding protein(LBP)	0.015
NADPH oxidase 1(NOX1)	0.027
BCL2-like 10(BCL2L10)	0.033
nuclear factor of activated T-cells,cytoplasmic,calcineurin-dependent3 (NFATC3)	0.154
gap junction protein-delta 2(GJD2)	170.9
toll-like receptor 8(TLR8)	9.8
glutathione peroxidase 6(GPX6)	0.067

表 1. 糖処理によって発現が変化した主な遺伝子

図 8 に示すように、糖処理の有無により多くの遺伝子発現が変化した。細胞増殖やがん関連遺伝子などに関与する主な遺伝子を表にまとめた。表の値は Control 細胞での発現を 1 とした時の糖処理後の発現比率。

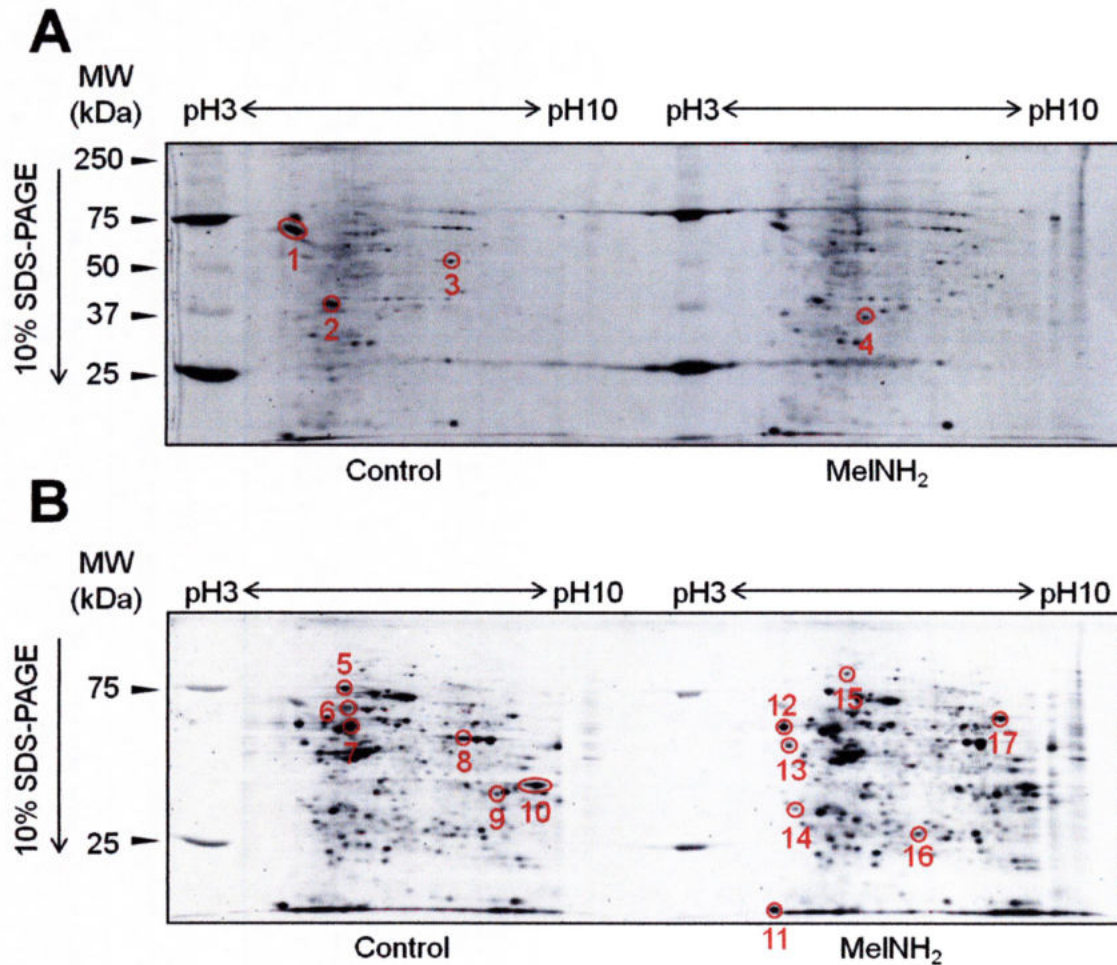


図9. 二次元電気泳動によるタンパク質の発現とリン酸化状態の解析

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 (図9中のスポットに記した番号と対応)。

番号	タンパク質名	機能	糖処理による変化
1	Nuclear Autoantigenic Sperm Protein	細胞増殖	↓
2	Nucleophosmin	がん遺伝子	↓
3	Alpha-Enolase	腫瘍抑制	↓
4	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K	アポトーシス誘導	↑
5	78 kDa glucose-regulated protein	HSP、シャペロン	↓
6	Tubulin beta chain	細胞骨格	↓
7	Vimentin	細胞骨格	↑
8	Eukaryotic Elongation Factor 1 A-1	サイトカイン産生	↓
9	Peroxiredoxin1	抗酸化作用	↑
10	GAPDH	多機能タンパク質	↑
11	Calmodulin	多機能タンパク質	↑
12	Calreticulin	多機能タンパク質	↑
13	Nucleosome Assembly Protein 1-Like 1	細胞増殖	↓
14	14-3-3 protein epsilon	多機能タンパク質	↓
15	Endoplasmin	シャペロン	↑
16	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	アポトーシス誘導	↑
17	Pyruvate Kinase	代謝	↑

表2. LC/MS/MS 分析によって同定したタンパク質

図9の二次元電気泳動ゲルから切り出したスポットを LC/MS/MS 法で分析し、タンパク質を同定した。糖処理によってリン酸化状態や発現が上昇した場合「↑」、減少した場合「↓」で表記している (No.1-4 はリン酸化状態の変化、No.5-17 は発現の変化)。細胞骨格や熱ショックタンパク質、がん関連タンパク質など多くのタンパク質の発現や修飾が糖処理によって変化していることがわかる。