

# 論文要約

平成 21 年入学

医歯学総合研究科

先進治療科学専攻

研究分野 皮膚科

氏名 馬場 直子

## 【タイトル】 Japanese black vinegar “Izumi” inhibits the proliferation of human squamous cell carcinoma cells via necroptosis

日本の黒酢「栴志田泉®」はネクロトーシスを介してヒト扁平上皮癌細胞の増殖を阻害する

### 【序論および目的】

黒酢は調味料や健康食品として広く利用されている。鹿児島県は黒酢の産地である。「栴志田泉®」は霧島市福山町で作られている黒酢であり、有機玄米、有機大豆、麴、軟水をカメ壺に仕込み、1年間かけて発酵させ、その後3年間熟成させた酢である。「栴志田泉®」は、原料に玄米と大豆を使用することにより、アミノ酸総量が米酢の約5.6倍、通常の黒酢の約1.6倍含有されている。

黒酢は抗酸化作用を有することが報告されており抗腫瘍効果も期待される。本論文ではヒト皮膚扁平上皮癌細胞株であるHSC-5に対する、玄米黒酢「栴志田泉®」の癌細胞増殖抑制効果について検討した。

### 【材料および方法】

ヒト皮膚扁平上皮癌細胞株であるHSC-5を使用した。酸度4.2%に調製した「栴志田泉®」と一般的な酢である穀物酢を各々最終濃度 $10\mu\text{l/ml}$ で培養HSC-5を刺激した。同量のPBSをcontrolとした。すべての条件で20mM HEPES bufferを添加した。

#### 1) MTT assay

HSC-5を96 well plateに細胞数 $4\times 10^4$ 個/wellで播種し、酢で刺激した。経時的にMTT液を添加し、3時間インキュベート後、acid-SDSを加え遮光し一晩室温で静置した。吸光度計で570nm, reference 630nmの波長を計測し細胞増殖率を定量化した。

#### 2) Trypan blue 染色

6 well plateに細胞数 $4\times 10^4$ 個/wellで播種し、 $10\mu\text{l/ml}$ 濃度の「栴志田泉®」、穀物酢、PBSで刺激した。一定時間経過した後に0.5% trypan blue液を加え、血球計算板を用いて死細胞をカウントし、死細胞数の割合を示した。

#### 3) Annexin V 染色

HSC-5を8-well chamber slidesに $1\times 10^4$ /wellで播種し $10\mu\text{l/ml}$ 濃度の「栴志田泉®」、穀物酢、PBSで刺激し24時間後にannexin V reagentとDAPI solutionで染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。100 $\mu\text{m}$ のetoposideをpositive controlとして用いた。

#### 4) Flow cytometry

HSC-5を「栴志田泉®」、穀物酢、PBS酢で72時間刺激した後トリプシン処理し、4°Cの70%エタノールで4時間固定した。次に氷冷したPBSで洗浄し50 $\mu\text{g/ml}$ のヨウ化プロピジウムを加え4°Cで30分インキュベートし、flow cytometryによりapoptosisを解析した。

#### 5) Western blotting

40  $\mu$ g の HSC-5 蛋白もしくは 40  $\mu$ l の HMGB1 サンプルを 12%SDS-PAGE に展開し、メンブレンに転写した。5%スキムミルクで1時間ブロッキングしたのち抗 RIPK3、HMGB1、GAPDH 抗体に反応させ、さらにそれぞれに対応する HRP 標識 IgG 2次抗体を反応させペルオキシダーゼ酵素活性による化学発光を検出した。

## 【結果】

### 1) MTT assay

MTT assay で HSC-5 細胞の細胞増殖を day7 まで観察したところ、day3 以降で穀物酢、「桷志田泉®」のいずれも細胞増殖を阻害し、特に「桷志田泉®」は穀物酢より有意に強く阻害効果を示すことを確認した。

### 2) Trypan blue 染色

Trypan blue 染色で死細胞数を確認してところ、「桷志田泉®」はコントロール、穀物酢と比較し死細胞の割合が著明に高く、とくに day 7 で高い死細胞の割合を示した。これらの結果から「桷志田泉®」は HSC-5 細胞の増殖を抑制することが確認できた。

### 3) Annexin V 染色

Apoptosis が誘導されるかみるために穀物酢、「桷志田泉®」で刺激した細胞を annexin V /ヨウ化プロピジウムで染色した。Apoptosis 細胞の割合は、control、穀物酢、「桷志田泉®」において差はなく、「桷志田泉®」、穀物酢のいずれも apoptosis 細胞の増加はみられなかった。

### 4) Flow cytometry

Flow cytometry でも「桷志田泉®」、穀物酢、PBS の3群間で有意な差はみられず、apoptosis は確認できなかった。

### 5) Western blotting

「桷志田泉®」の癌細胞増殖抑制効果は apoptosis によるものではなかったため、necroptosis による作用ではないかと考え necroptosis の key signaling 分子である RIPK3 の発現をウエスタンブロット法で確認したところ、「桷志田泉®」で刺激した HSC-5 細胞の RIPK3 の発現が増強していた。

「桷志田泉®」、穀物酢で刺激した HSC-5 細胞培地上清を用い、necroptosis の際に細胞外に放出される DAMPs の1つである HMGB1 の発現を確認したところ培養5日目以後に HMGB1 蛋白が検出された。「桷志田泉®」で7日間培養したもので特に多く放出されていた。

## 【結論及び考察】

これまでの研究で黒酢抽出物で肺癌 (A549)、膀胱癌 (5637)、前立腺癌 (LNCaP)と大腸癌 (Caco-2)、乳癌 (MCF-7)の癌細胞増殖抑制作用が報告されており、in vivo で大腸癌マウスモデルの癌発育抑制も報告されている。黒酢は他の酢に比べアミノ酸含有量が多く、我々も HPLC で「桷志田泉®」のアミノ酸含有量が穀物酢に比べ高いことを確認した。

「桷志田泉®」は HSC-5 細胞の増殖を抑制したが、その作用は apoptosis によるものではなかった。福山らも黒酢抽出物のマウス大腸癌の進行阻害効果を認めたが、それは apoptosis によるものではないと結論づけている。

近年、apoptosis と同様に制御されている necrosis が報告され、necroptosis とも言われている。Necroptosis の key signaling 分子である RIPK3 を観察したところ、「桷志田泉®」により HSC-5 細胞の RIPK3 発現が誘導された。necroptosis などの細胞死や細胞の損傷が生じるとその細胞から DAMPs が放出される。我々の実験でも「桷志田泉®」により HSC-5 細胞から HMGB1 が放出されるのを確認した。以上の結果から「桷志田泉®」は necroptosis を介して癌細胞増殖抑制効果を発揮すると考えられた。抗癌剤と併用することで治療効果を増強することが期待される。(NUTRITION AND CANCER 2013; 65: 7, 1093-1097 掲載)

