

博士論文

アドレナリン受容体を介した乳がん進展に対する
食品成分の抑制効果に関する研究

Studies of inhibitory effects of food factors
on adrenergic receptor-mediated development of breast cancer

2014年 2月

静岡県立大学大学院 生活健康科学研究科
環境物質科学専攻 博士後期課程
生体機能学研究室

山崎 隼輔

目次

略語一覧	1
緒言	3
第 1 章 ヒト乳腺細胞におけるノルアドレナリンと 4-OHE ₂ 誘発 DNA 損傷に対するケルセチンおよびその代謝物の影響	10
序論	10
第 1 節 4-OHE ₂ による DNA 損傷誘発	13
1-1-1 実験方法	13
1-1-1-1 ヒストン H2AX のリン酸化の検出	14
1-1-1-2 AP sites の生成	21
1-1-2 実験結果	23
1-1-2-1 4-OHE ₂ によるヒストン H2AX のリン酸化	23
1-1-2-2 4-OHE ₂ による AP sites の生成	26
第 2 節 ノルアドレナリンと 4-OHE ₂ による DNA 損傷誘発	28
1-2-1 実験方法	28
1-2-1-1 α_2 -アドレナリン受容体の発現	30
1-2-1-2 ヒストン H2AX のリン酸化の検出	35
1-2-1-3 AP sites の生成	36
1-2-1-4 フローサイトメトリーを用いた活性酸素の測定	36
1-2-2 実験結果	38
1-2-2-1 MCF-10A 細胞における α_2 -アドレナリン受容体の発現	38
1-2-2-2 ノルアドレナリンと 4-OHE ₂ によるヒストン H2AX のリン酸化	40
1-2-2-3 ノルアドレナリンと 4-OHE ₂ による AP sites の生成	42
1-2-2-4 ノルアドレナリンと 4-OHE ₂ による活性酸素の生成	44
第 3 節 ノルアドレナリンと 4-OHE ₂ による DNA 損傷誘発に対するケルセチンおよびその代謝物の影響	46
1-3-1 実験方法	46
1-3-1-1 ヒストン H2AX のリン酸化の検出	46
1-3-1-2 AP sites の生成	47
1-3-1-3 HPLC の分析	47

1-3-1-4	α_2 -アドレナリン受容体結合試験	49
1-3-2	実験結果	52
1-3-2-1	ヒストン H2AX のリン酸化に対するケルセチンおよびその代謝物の影響	52
1-3-2-2	AP sites 生成に対するケルセチンおよびその代謝物の影響	54
1-3-2-3	ケルセチンおよびその代謝物の細胞内への取り込み	56
1-3-2-4	ノルアドレナリンの α_2 -アドレナリン受容体への結合に対するケルセチンおよびその代謝物の阻害作用	58
1-4	考察	60
第2章	ヒト乳がん細胞の浸潤に対するノルアドレナリンの影響と quercetin-3-O-glucronide の抑制効果	65
	序論	65
2-1-1	実験方法	68
2-1-1-1	β_2 -アドレナリン受容体の発現	69
2-1-1-2	フローサイトメトリーを用いた活性酸素の測定	69
2-1-1-3	<i>HMOX1</i> 、 <i>MMP2</i> 、 <i>MMP9</i> の遺伝子発現	69
2-1-1-4	cAMP の測定	71
2-1-1-5	Ras の測定	71
2-1-1-6	ERK1/2、p38 のリン酸化の検出	74
2-1-1-7	浸潤の測定	75
2-1-1-8	pro-MMP-2、pro-MMP-9 の Gelatin zymography による検出	76
2-1-1-9	β_2 -アドレナリン受容体結合試験	81
2-1-2	実験結果	83
2-1-2-1	MDA-MB-231 細胞における β_2 -アドレナリン受容体の発現	83
2-1-2-2	ノルアドレナリンによる β_2 -AR を介した活性酸素の生成	85
2-1-2-3	ノルアドレナリンによる活性酸素の生成に対する quercetin-3-O-glucronide の抑制効果	87
2-1-2-4	ノルアドレナリンによる β_2 -アドレナリン受容体を介した <i>HMOX1</i> 、 <i>MMP2</i> および <i>MMP9</i> の遺伝子発現量に対する quercetin-3-O-glucronide の抑制効果	89
2-1-2-5	ノルアドレナリンによる <i>MMP2</i> および <i>MMP9</i> の遺伝子発現量増加機序の解明	92
2-1-2-6	β_2 -アドレナリンシグナリングに対する quercetin-3-O-glucronide の抑制効果	95
2-1-2-7	ノルアドレナリンによる浸潤促進と quercetin-3-O-glucronide の	98

抑制効果	100
2-1-2-5 ノルアドレナリンの β_2 -アドレナリン受容体への結合に対する quercetin-3- <i>O</i> -glucronide の阻害作用	100
2-2 考察	102
総括	107
謝辞	109
参考文献	110

略語一覽

A	: adrenaline
AR	: adrenergic receptor
AC	: adenylyl cyclase
ACTH	: adrenocorticotrophic hormone
AP sites	: apurinic sites
ATM	: ataxia telangiectasia mutated
ATR	: atm and rad3-related
APS	: ammonium persulfate for electrophoresis
AP-1	: activator protein-1
BRCA1	: breast cancer 1
CYP	: cytochrome P450
COMT	: catechol- <i>O</i> -methyl transferase
CNS	: central nervous system
Clo	: clonidine
cAMP	: cyclic adenosine monophosphate
DMEM	: dulbecco's modified eagles medium
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DNA-PK	: DNA-dependent serine/threonine protein kinase
DPM	: disintegration per minute
DCHH-DA	: 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate
ER	: estrogen receptor
ERK	: extracellular signal-regulated kinase
E _{2-3,4,Q}	: E _{2-3,4} ,quinone
ECD	: HPLC-electrochemical detection
E ₁	: estrone
E ₂	: 17 β -estradiol
E ₃	: estriol
FBS	: fetal bovine serum
HO-1	: heme oxygenase-1
HPA	: hypothalamo-pituitary-adrenal axis
H2AX	: variant of histone H2A
Iso	: isoproterenol
KU	: KU-55933

NAT	: noradrenaline transporter
NA	: noradrenaline
NF- κ B	: nuclear factor-kappa B
MMPS	: matrix metalloproteinases
MEK	: MEK kinase
OA	: oxalic Acid
PKA	: cAMP-dependent protein kinase A
PI3K	: phosphatidylinositol-3 kinase-related kinases
Pro	: propranolol
PMSF	: pohenylmethylsulfony fluoride
Q3G	: quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide
-OH	: hydroxyl radical
Rau	: rauwolscine
SAM	: sympathetic nervous adrenal medullary system
SDS	: sodium dodecyl sulfat
TFA-MeOH	: trifluoroacetic acid-metanol
TBS	: tris buffered saline
Tris-HCl	: tris hydrochloride acid
8-OHdG	: 8-hydroxydeoxyguanosine
2-OHE ₂	: 2-hydroxyestradiol
4-OHE ₂	: 4-hydroxyestradiol
γ -H2AX	: phosphorylated form of histone H2AX

緒言

現代はストレス社会と呼ばれ、我々は、温度や光などの環境ストレスや心理・社会的ストレスなど様々なストレスに常に曝されている。ストレスによる刺激は脳の脳皮質で認識され、脳内の視床下部-脳下垂体-副腎皮質系 (hypothalamo-pituitary-adrenal axis: HPA) および視床下部-交感神経-副腎髄質系 (sympathetic nervous adrenal medullary system: SAM) の活動を亢進する。HPA 系の応答では、視床下部からコルチコトロピン放出ホルモン (corticotropin-releasing hormone: CRH) が分泌され、それが脳下垂体から副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone: CTH) を分泌させ、副腎皮質から、コルチゾールが分泌される。SAM 系の応答では、交感神経系が活性化され、交感神経ニューロン末端から、ノルアドレナリン (noradrenaline: NA) (Fig. 1) が、副腎髄質からアドレナリン (adrenaline: A) (Fig. 1) が主に分泌される。ノルアドレナリンやアドレナリンは、脳内の神経経路網において重要な役割を果たしており、また、重要な臓器の血液を保持する生体の恒常性維持に大きな役割を果たしているが、ストレスの刺激により分泌が増加すると、汗線からは、汗が分泌され、体毛が逆立ち、より多くの光を集めるために瞳孔が散大し、酸素供給をよくするために気管支が拡張し、心拍数が増加し、心臓の収縮力が増大するなど、心臓、呼吸器、血管など多くの器官に影響を与える。A の通常での血中濃度は、10 pmol/L とされておりストレス負荷時では 10 nmol/L まで上昇することが知られている [1]。また、NA の通常での血中濃度は、10 pmol/L とされており、ストレス負荷時では 100 nmol/L まで上昇することが知られている [1]。また、ほとんどの末梢組織において、NA の組織含量が交感神経の分布密度に相関しており、副腎髄質を除いては、末梢組織中の NA は交感神経終末に存在している。心臓、脾臓、精管、および血管組織などでは、特に NA が多く存在し、5-50 nmol/g と報告されている [2]。

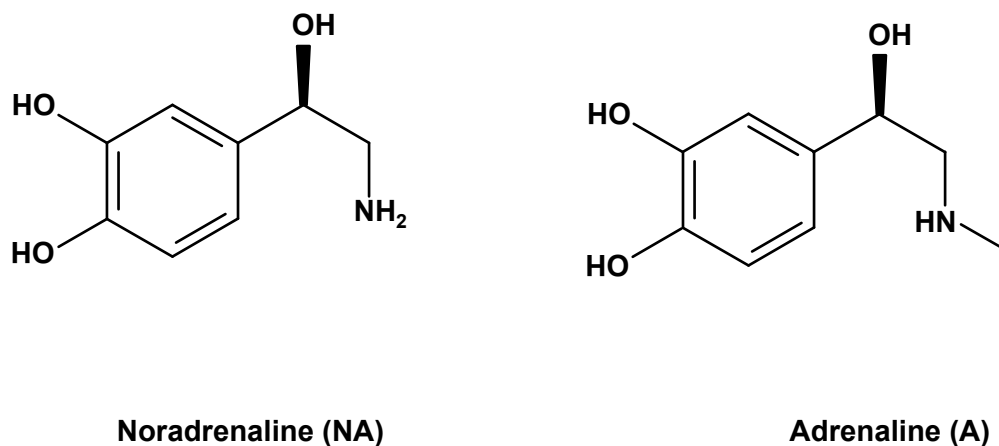


Fig. 1. Chemical structure of catecholamine used in this study.

NA、A に応答する受容体は、アドレナリン受容体 (adrenergic receptor: AR) と呼ばれ、内在性膜タンパク質であり広範な組織に存在している。これらは、大きく分けて3種類、すなわち α_1 、 α_2 、 β -AR に分類される。さらに、AR は、 α_1 (α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{1C})、 α_2 (α_{2A} 、 α_{2B} 、 α_{2C})、 β (β_1 、 β_2 、 β_3) の9種類に分類される。AR は α 、 β 、 γ の3量体 G タンパク質を介して標的細胞を活性化し、生理応答を引き起こす情報伝達の代表的な受容体である。 α_2 -AR (α_{2A} 、 α_{2B} 、 α_{2C}) の中で α_{2B} 、 α_{2C} は、正常乳腺細胞で発現している [3]。代表的な応答として、NA は α_2 -AR を介すと、抑制性 G タンパク質 (Gi) と共役し、アデニル酸シクラーゼ (adenylyl cyclase: AC) を抑制し、カルシウムチャンネルを抑制するとともに、cyclic AMP (cyclic adenosine monophosphate: cAMP) を減少させる [4, 5]。一方、 β -AR は、促進性 G タンパク質 GS と共役し、生じた Gas-GTP 複合体が AC を活性化し、増加した cAMP により活性化されたプロテイン A キナーゼ (protein kinase A: PKA) が種々のタンパク質をリン酸化して生理作用を引き起こす [4, 5]。

ストレスに過度にあるいは慢性的に曝露され続けると、自律神経系および内分泌系を介して生体機能に異常をきたし、様々な疾患が誘発される [6-9]。近年、日常生活で暴露されるストレス、例えば夫の死などのストレス負荷が乳がんのリスクを増加させる可能性が、フィンランド人、約1万人のアンケート調査にもとづく疫学調査から指摘されている [8]。また、動物試験においてもマウスに拘束ストレスを定期的に負荷すると、ストレスを負荷していないマウスに比べ、移植した乳がん細胞が種々の臓器に多く転移することが報告されている [10, 11]。さらに、興味深いことに、高血圧の治療を目的として β_2 -AR 拮抗薬の投与を受けていた患者に乳がんの遠隔転移や局所再発が低く、乳がん死亡のリスクが71%も低下していたことが報告されている [12]。これらの知見より、AR を介するカテコールアミンの作用は、乳がん進展プロセスに深く関与していることが考えられる (Fig. 4)。このようにストレスは、乳がんのリスク因子として考えられるが、その他のリスク因子として、BRCA1 (breast cancer 1) などの遺伝子変異に代表される遺伝的要因、高カロリー・高脂肪の食生活、交代勤務 (シフトワーク) などがある [13]。さらに、乳がんの多くは、ホルモン依存性腫瘍であることから、初経年齢、閉経年齢、出産歴や初産年齢、ホルモン補充療法などによる女性ホルモンであるエストロゲンへの長期暴露、環境中の発がん性物質やエストロゲン様化学物質への長期暴露が乳がんの重要なリスク因子であると報告されている [14]。エストロゲンは卵巣で合成されて、主に卵胞や黄体から分泌され、子宮の発育や子宮内膜の増殖、乳腺の発達などさまざまな生理作用があり、女性にとって特に重要なホルモンである。エストロゲンの血中濃度は、卵胞期 10~200 pg/ml、排卵前日 120~375 pg/ml、黄体期 15-260 pg/ml である (ただし採血時期、食事内容、採血時の体位などで異なる) [15]。エストロゲン

には 17 β -estradiol (E₂) の他に estrone (E₁)、estriol (E₃) などがある。乳がんの進展プロセスにこれらのエストロゲンは深く関わっており、estrogen receptor (ER) を介して細胞増殖作用を示す。後述するエストロゲン代謝物が、乳腺細胞の DNA を損傷し、乳腺細胞に突然変異を誘発し、染色体に不安定性をもたらす。このようにエストロゲンは、細胞をがん化させ、さらに悪性度の高いがん細胞へと進展させる [14, 16]。

E₂ の A 環は芳香環になっており、3-ヒドロキシル基はフェノール性水酸基の性質を有する。これは他のステロイドホルモンには見られないエストロゲン特有の構造である。そのため乳腺組織内などで薬物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) により代謝される。E₂ を代謝する CYP 類は、CYP1A1、CYP1B1、CYP1A2、CYP3A4 が知られているが、CYP1A1 と CYP1B1 が乳腺組織での発現が高く [17, 18]、CYP1A1 は主に 2 位の水酸化に、CYP1B1 は 4 位の水酸化に関与し [19]、それぞれ 2 位及び 4 位のカテコール体 (2-hydroxyestradiol: 2-OHE₂、4-hydroxyestradiol: 4-OHE₂) が生成される (Fig. 2)。正常乳腺組織では、catechol-O-methyl transferase (COMT) によって、メチル化され、安定なメトキシ体となり、さらに抱合化され、解毒される。しかし、乳がん組織では、COMT の発現が低下しており、COMT による解毒効果が弱い [20]。事実、悪性の乳がん組織中では、4-OHE₂ が多く検出されており [21]、正常な乳腺組織での 4-OHE₂ の濃度は、78.7 \pm 49.5 fmol/mg、悪性の乳がん組織中では、1608.7 \pm 466.8 fmol/mg と報告されている [22]。4-OHE₂ は実験小動物に発がんを誘発することが報告されている [23, 24]。また、乳がん患者の尿中に、4-OHE₁ (E₂)-1-N3Ade (4-hydroxy-estrone (estradiol) -1-N3Adenine) が検出されるが、健常者の尿中では検出限界以下とされている [16]。これらのことは、4-OHE₂ が乳がん発生に重要なリスク因子であることを示している。

2-OHE₂ や 4-OHE₂ などのカテコールエストロゲンは、金属イオンや種々の酸化酵素により酸化反応をうけ、セミキノンを経て不安定なキノン体となる。また、キノン体生成過程においてスーパーオキシドアニオン ($\cdot\text{O}_2^-$) やヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) など種々の活性酸素が生じる [25] (Fig. 2)。2-OHE₂ と 4-OHE₂ により細胞中に生成する活性酸素量を比較すると、4-OHE₂ による生成量が多いことが報告されている [26, 27]。これらの ROS により、グアニンの 8 位が水酸化され、8-ヒドロキシグアニンなどの酸化的 DNA 損傷が生じる [28]。さらに、化学的に不安定なキノン体は、タンパク質や DNA への付加体を形成することが報告されている [29]。アデニンとグアニンと反応し生成した付加体は不安定なため、脱塩基部位 (apurinic sites: AP sites) を生じるが、修復ミスにより突然変異を誘発する。

一方、最近 DNA 損傷の高感度なマーカーとして、ヒストンがリン酸化された γ -H2AX が注目されている。DNA は H2A、H2B、H3、H4 各 2 分子から構成される

ヒストン八量体に巻き付き、ヌクレオソームと呼ばれる構造を形成してその高次構造を維持している。さらにヌクレオソームが数珠状につながりヒストン H1 などが結合してクロマチン構造が形成されている。ヒストン H2AX は、ヒストン H2A のバリエーションで、DNA 損傷が生じると、損傷部位周辺の H2AX がリン酸化される。セリンの 139 番目がリン酸化されたヒストン H2AX は、 γ -H2AX と呼ばれている。近年、電離放射線を始め、多環芳香族炭化水素のベンツ[a]ピレンなどの変異原物質などによって H2AX のリン酸化が誘導されることが報告されている [30-32]。

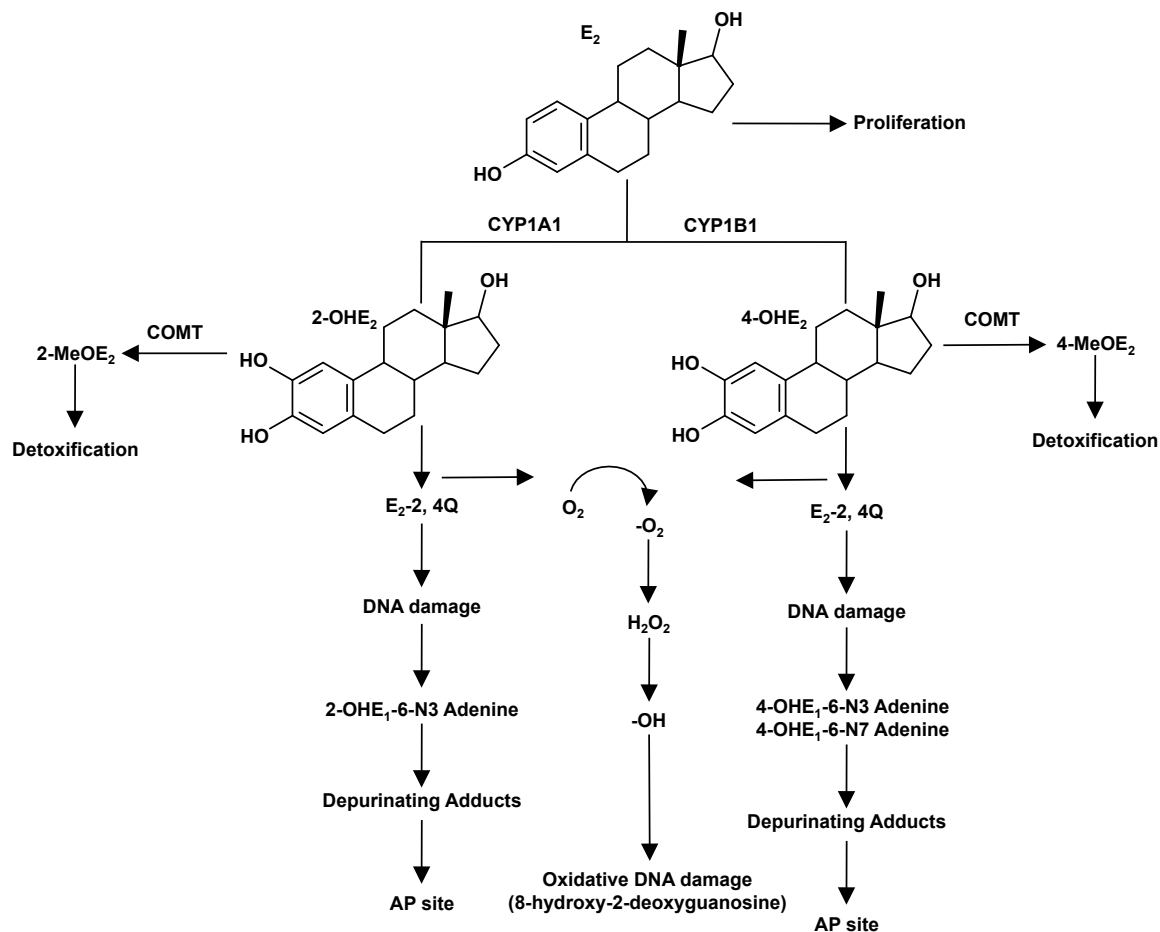


Fig. 2. Estrogen metabolism and catechol estrogen induced DNA damage. E₂: 17β-estradiol; COMT: catechol-*O*-methyltransferase; 2-OHE₂: 2-hydroxyestradiol; 4-OHE₂: 4-hydroxyestradiol; 2-MeOE₂: 2-methoxyestradiol; 4-MeOE₂: 4-methoxyestradiol; E₂-2, 4Q: estradiol-2, 4quinone; E₂-3, 4Q: estradiol-3, 4quinone

ところで、疫学研究から、植物界に広く分布しているフラボノイドの摂取量と乳がんリスクとの間に逆相関性があることが示唆されており、フラボノイドは、エストロゲン依存性又は非依存性乳がんにおける化学的予防効果を発揮することができる食品成分として報告されている [33, 34]。日常生活で、我々が摂取しているフラボノイド類は、植物界に広く分布しているポリフェノール化合物であり、現在まで

におおよそ 4000 種類が分類同定されている。植物の種類により、また、同じ植物でも、葉、花、果実など組織によって分布するフラボノイドの種類や含有量が異なっている。主に、配糖体として存在しているが、表皮、樹脂、種子にはアグリコンが多く含まれている。また、フラボノイド類は、フラボン類、フラボンの 3 位に水酸基が置換したフラボノール類、通常は配糖体として存在しているアントシアニン類、B 環が 3 位に結合した、イソフラボン類、C 環が飽和結合のフラバノン類、そして、カルコン等に分類される。

フラボノイド類は、発がん抑制作用 [35, 36]、その他にも抗酸化作用 [36]をはじめ、抗菌性、抗アレルギー [37]、抗変異原性 [38]、細胞周期の抑制制御 [39]等の機能性を有している。しかしながら、高濃度で作用させると逆に変異原性を示すことが報告されている [40]。ケルセチン (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone: Quercetin) (Fig. 3) は、代表的なフラボノイドであるが、たまねぎなどの野菜や果物類に配糖体として含まれており、我々は日常的に摂取している。たまねぎには 0.3 mg/g、お茶には、10-25 mg/L、配糖体として存在している [41-43]。ケルセチン配糖体は、腸内細菌によって加水分解を受けアグリコンとなり、アグリコンが腸管により吸収される。その後、UDP-グルクロン酸転移酵素によって抱合体 (Quercetin-3-O-glucuronide: Q3G) (Fig. 3) へと代謝され、肝臓で COMT によりメチル化される。従って、ケルセチン抱合体、Q3G、quercetin-3'-O-sulfate、メチル化体であるイソラムネチン (isorhamnetin-3-O-glucuronide: Iso) の抱合体 (Fig. 3) が、血流を介して体全体を循環する [44, 45]。ヒトがたまねぎ (500 g : 配糖体としてケルセチンを含有するが、150 mg のケルセチンアグリコンに相当) を摂取した場合の血中の濃度は、ケルセチンとして 0.1-1 μM と報告されている [46, 47]。

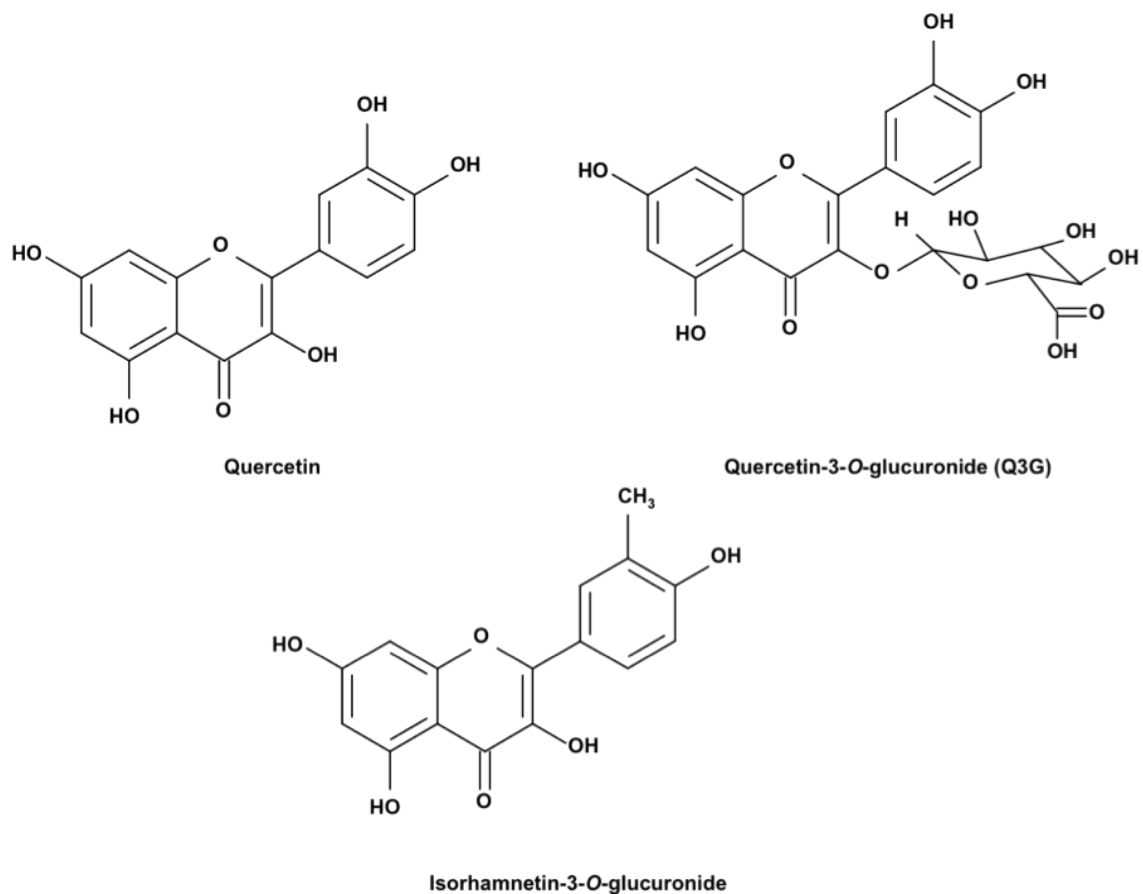


Fig. 3. Chemical structure of quercetin metabolites used in this study.

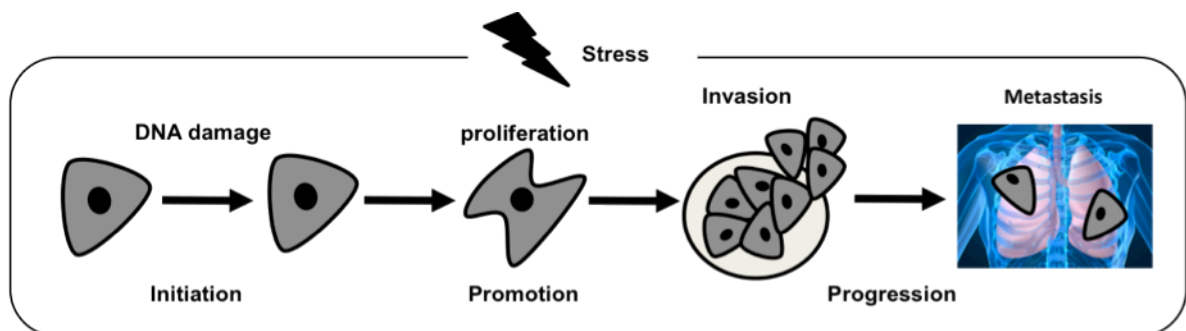


Fig. 4. Stress and breast cancer development.

我が国では、近年、乳がんの罹患率および死亡率が増加の一途をたどっており [48, 49]、それ故に、乳がんを未然に防ぐことは社会的な重要課題とされている。本研究では、Fig. 4 に示すように、乳がんの進展プロセスすなわち、イニシエーション、プロモーション、プログレッションの各段階を考慮して、ヒト乳腺細胞 MCF-10A およびヒト乳がん細胞 MCF-7、MDA-MB-231 を用いて、培養細胞系により、ストレス刺激がイニシエーションやプログレッションの段階にどのような影響を及ぼすの

か、また、食品成分であるケルセチンなどのフラボノイド類が予防的に作用するの
かどうかが明らかにすることを目的とした。第1章では、DNA 損傷に注目し、ノルア
ドレナリンと 4-OHE₂による DNA 損傷誘発に対するフラボノイド類の抑制効果とそ
の作用機序について検討した。第2章では、浸潤に着目し、ヒト乳がん細胞である
MDA-MB-231 を用いて、NA による浸潤促進への影響とそれに対する Q3G の抑制効
果について検討し、その作用機序を明らかにした。

第 1 章

ヒト乳腺細胞におけるノルアドレナリンと 4-OHE₂ 誘発 DNA 損傷に対するケルセチンおよびその代謝物の影響

本章は以下の論文に基づいています。

1. [Yamazaki, S., Sakakibara, H., Takemura, H. and Shimoi, K.:](#) 4-Hydroestradiol induces γ -H2AX in the presence of an inhibitor of catechol-*O*-methyltransferase in human breast cancer MCF-7 cells. *Genes Environ.*, **34**, 129-135, (2012).
2. [Yamazaki, S., Sakakibara, H., Yasuda, M. and Shimoi, K.:](#) Quercetin-3-*O*-glucuronide inhibits noradrenaline binding to α_2 -adrenergic receptor, thus suppressing DNA damage induced by treatment with 4-hydroxyestradiol and noradrenaline in MCF-10A cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **143**, 122-129, (2014).

序論

緒言でも述べたように、 E_2 は、子宮、乳腺の発達促進作用など様々な生理作用を有しているが、その長期暴露は乳がんのリスク因子となる [23, 24]。 E_2 の代謝物質である 4-OHE₂ は不安定なキノン体へと酸化される [25] (Fig. 2)。この不安定なキノン体が、DNA のプリン塩基である、グアニンの 7 位やアデニンの 3 位に付加体 (4-OHE₂-1-N3Adenine、4-OHE₂-1-N7Guanine) を生成するが、これらは、化学的に不安定なため、容易に depurination (脱塩基) がおこる [25, 50] (Fig. 2, 5)。また、キノン生成過程でヒドロキシラジカルやスーパーオキシドアニオン ($\cdot O_2^-$) などの ROS が発生することにより、8 位が水酸化され、8-ヒドロキシグアニン (8-hydroxyguanine) が生成すると言われている。この場合の脱塩基は、DNA-glycosylase によりデオキシリボースとプリンヌクレオチドを繋いでいる N-グリコシド結合が開裂することによって発生し、塩基が失われた部位である apurinic sites (AP sites) が発生する [25, 50] (Fig. 2, 5)。これらの DNA 損傷は、塩基除去修復によって修復されていくが、AP sites が修復されないうちに DNA ポリメラーゼが作用すると、AP sites の反対側にアデニン残基を入れ先へ進むことが知られている [50]。また、不安定な E_2 キノン体によって脱塩基により生じた AP sites の修復ミスにより AT から GC への突然変異が生成し、乳がんのイニシエーションに関与していると考えられている [50]。

一方、生物の遺伝情報を保持している DNA は、複製時の DNA ポリメラーゼのエラーに加え、環境中の放射線や紫外線、またはアルキル化剤等の化学物質、生体内における活性酸素等の代謝物により損傷を受けることが知られている。DNA が突然変異誘発物質にさらされると、ゲノムの不安定性や有害な形質転換に至ってしまう突然変異から細胞を防御するために動物細胞は複雑に、また高度に分岐したシグナルネットワークによる DNA 損傷応答を促進させる。また、DNA 損傷を感知すると、DNA 修復、細胞死、細胞周期停止といった転写プログラムを活性化させるよう細胞内シグナル伝達を行う。DNA 合成の停止や遅延を起こすために 3 つの細胞周期チェックポイント経路が存在するが、G1、S、G2 期は ATM (ataxia telangiectasia mutated) や ATR (ATM and Rad3-related) プロテインキナーゼにより制御される。ATM と ATR はセリン-スレオニンキナーゼの PI3 (phosphatidylinositol-3 kinase-related kinases) ファミリーのメンバーで、DNA 損傷応答に関与している [51]。

近年、細胞内に DNA 損傷が生じると、その切断部位を中心に近傍のヒストン H2AX (H2A のバリエーションの一種) の 139 番目のセリン残基がリン酸化 (γ -H2AX) されることが知られており、 γ -H2AX は、一般的に DNA 損傷の高感度なマーカーとされている (Fig. 6)。 γ -H2AX は、電離放射線や活性酸素などにより直接的に生成す

るが、最近、放射線、紫外線などの DNA 損傷やトポイソメラーゼ阻害剤による DNA 複製や転写時の障害、DNA 修復の障害などで間接的に誘導されることも報告されている [51]。

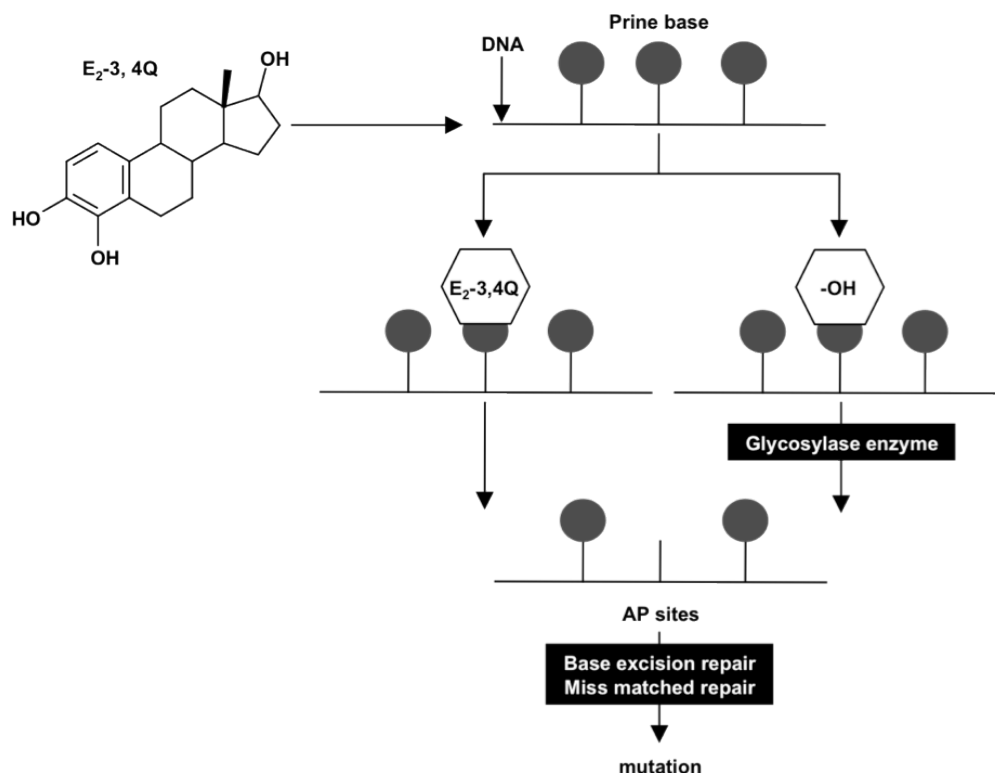


Fig. 5. Putative pathway for biological consequence of AP sites induced by catechol estrogen. Catechol estrogen, 4-OHE₂, is oxidized and partially formed to quinone moiety, estradiol 3,4-quinon (E₂-3,4Q). E₂-3,4Q can directly make DNA-adduct with purine bases, or induce hydrolysis of purine bases by generations of hydroxyl radical (\cdot OH). Apurinic/apyrimidinic (AP) sites are common intermediates in the course of the base excision repair of the majority of such endogenous DNA damage. Hence, generations of AP sites are thought to be one of useful biomarker for DNA damage.

ストレスが生体に負荷されると、視床下部-交感神経-副腎髄質系が亢進し、NA も血中濃度や組織内濃度が上昇する [1, 52]。単独隔離ストレスをマウスに負荷すると、コメットアッセイにより末梢血細胞の酸化的 DNA 損傷が増加することが報告されている [53]。また、最近、野生型マウスに β_2 アドレナリン受容体のアゴニストであるイソプロテレノールを 4 週間にわたり投与すると、胸腺組織において γ -H2AX が増加し蓄積すること、その機序として Gs タンパク質-プロテインキナーゼ A 経路、および、 β アレスチン 1 による p53 の低下という 2 つのシグナル伝達の同調が引き起こされて DNA 損傷が蓄積することが報告された [54]。

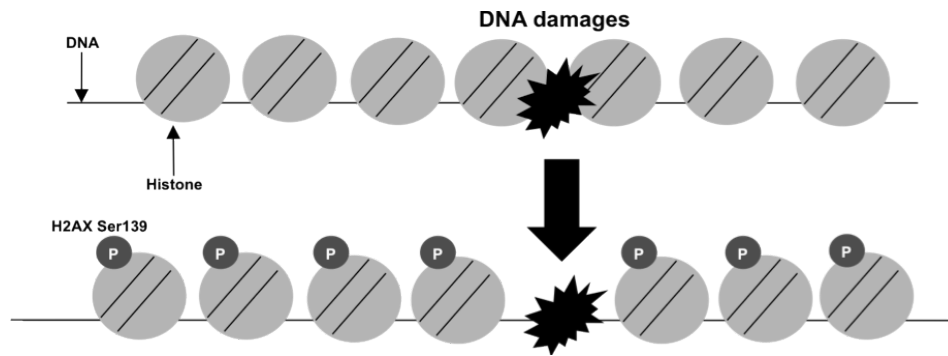


Fig. 6. Phosphorylation of histone H2AX-induced by radiation and chemical compounds.

そこで本章では、乳がん進展プロセスにおけるイニシエーションに関わる DNA 損傷に着目し、第1節では、4-OHE₂により γ -H2AX が誘導されるのかどうか検討し、第2節では4-OHE₂による DNA 損傷に対する NA の影響、第3節では、NA と 4-OHE₂による DNA 損傷に対するフラボノイド類のケルセチンおよびその代謝物の抑制効果について検討した。

第1節 4-OHE₂によるDNA損傷誘発

1-1-1 実験方法

(1) 使用した細胞

- MCF-7 (mammary gland/breast; derived from metastatic site: pleural effusion)
HTB-22 (69 歳)
久留戸涼子博士 (元: 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科、現: 常葉大学、教育学部) から分与頂いた。

(2) 培地用試薬

- Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM) (通常の培養で使用) 429 mL
DMEM [日本製薬株式会社、東京、日本] # 5792
(DMEM4.75g を超純水 500 ml に溶解し高压滅菌)
- 炭酸水素ナトリウム [特級/和光純薬工業株式会社、大阪、日本] 5.6 mL
191-01305
- l-glutamine 200 mM [Invitrogen, Carlsbad, CA, USA] # 25030-081 10 mL
- 100×penicillin/streptomycin [Invitrogen] # 15140 5 mL
- FBS (非働化 牛児血清) [Invitrogen] # 2916754 50 mL
DMEM 429 ml に対し他の試薬を加えて調製した。

- フェノールレッドフリー培地 (E₂ 存在下)

DMEM (without phenoled free) [Invitrogen] # 11054	500 mL
200 mM L-gutamine [Invitrogen] # 25030-081	10 mL
100×penicillin/streptomycin [Invitrogen] # 15140	5 mL
HyClone Charcol/Dextran treated FBS [Invitrogen] # AML17637	55 mL

上記の試薬を混合し 4°C で保存した。

(3) 試薬調製

- 10×PBS (-) pH7.4

塩化ナトリウム [特級/和光純薬工業株式会社] # 191-01665	80 g
KCl [特級/和光純薬工業株式会社] # 163-03545	2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O [特級/和光純薬工業株式会社] # 196-02835	6.3 g
KH ₂ PO ₄ [特級/和光純薬工業株式会社] # 169-04245	2.4 g

上記の試薬を超純水に溶解し pH7.4 に調製し、超純水で 1 L にメスアップ後、高

圧滅菌して保存した。使用時には滅菌済みの超純水で 10 倍希釈した。

- 1×Trypsin/EDTA

10×Trypsin/EDTA [Invitrogen] # 15400-054 を PBS (-) で 10 倍希釈し、10 mL ずつ分注したものを使用まで -20°C で保存した。

- Ro 41-0960 (COMT の阻害剤) [Sigma-aldrich, ST Louis, MO, USA] # 034K4611

使用直前に 3 μM となるように、100%のエタノールに溶解した。

- 2-OHE₂ [Sigma-aldrich] # 038K1246 および 4-OHE₂ [Sigma-aldrich] # 128K1021

各試料ともに Dimethyl sulfoxide (DMSO) で 10 mM に溶解し、使用まで冷凍保存した。

- KU-55933 (ATM 阻害剤) [コスモ・バイオ株式会社、東京、日本] # CD0191

Dimethyl sulfoxide (DMSO) で 10 mM に溶解し、使用まで冷凍保存した。

(4) 継代培養条件

クリーンベンチ内で使用する器具類は、すべて使用前に滅菌した。細胞を継代する時は、培地を吸引除去後、37°C に温めた PBS (-) で 5 mL で一度洗浄した。2 mL/cm² の 1×trypsin/EDTA を添加し、CO₂ インキュベーター内で 2 分静置した。その後、剥離した細胞を回収し、速やかに遠心分離 (1000 rpm×10 分) することで、trypsin を除去した。新しい培地に再懸濁後、トリパンブルー (細胞懸濁液 50 μL とトリパンブルー 50 μL) で染色した細胞を血球計算版 [株式会社エルマ、東京、日本] # 第 118 号でカウントし、あらかじめ培地を入れておいたシャーレ内に 1×10⁴ cells/cm² で細胞を播種した。3 日後に新しい培地に交換し、その 2 日後に細胞はサブコンフルエントに達した。CO₂ インキュベーター [Napco、日成部品製作所、大阪、日本] 内の条件は CO₂ 濃度 5% 温度 37°C とした。

1-1-1-1 ヒストン H2AX のリン酸化の検出

(1) 細胞培養条件

60 mm dish [株式会社三商、東京、日本] にヒト乳がん細胞 MCF-7 を 1×10⁴ cell/cm² で播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、2 日間培養した。サブコンフルエントに到達したことを顕微鏡下で確認後、Ro 41-0960 (3 μM) を含むフェノールレッドフリーの DMEM 培地に交換し、1 時間前培養したその後、2-OHE₂ (30 μM) もしくは

4-OHE₂ (30 μM) およびRo 41-0960 (3 μM) を含むフェノールレッドフリーのDMEM培地に交換し、それぞれ0-12時間培養した。

(2) 使用した試薬

• 1×Cell Lysis Buffer

10×Cell Lysis Buffer [Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA] # 9803 500 μL

(1 度融解し、500 μL ずつ分注し-20℃で保存)

Pohenylmethylsulfony fluoride (PMSF) [和光製薬工業株式会社、大阪、日本] # 160-1218 (PMSF を 100 mM になるようにメタノールで溶解した) 50 μL

上記の試薬を 4450 μL の純水に溶解し 1×Cell Lysis Buffer とした。なお、Cell Lysis Buffer は実験の直前に調製し、凍結溶解を繰り返してはいけない。調製した溶液は氷冷しておいた。

• BCA Protein Assay Kit [Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA] # 23225

下記に詳しい内容が記載されている ((3) タンパク質の抽出)。

• 250 mM Tris-HCl (pH 6.8)

Trizma base [Sigma-aldrich] # T6066-1KG 6.1 g

上記の試薬を超純水に溶解し、pH 6.8 に調製した後 1 L にメスアップした。

• 4×SDS sample buffer

250 mM Tris-HCl (pH 6.8) 7 mL

300 mM DTT ((±)-Dithiothreitol) [分子生物学用/和光純薬工業株式会社] # 040-29223 46 mg

6% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) [生化学用/和光純薬工業株式会社] # 191-07145 600 mg

Glycerol [特級/和光純薬工業株式会社] # R14462 3 mL

Bromophenol blue [特級/和光純薬工業株式会社] # 021-02911 2 mg

上記の試薬を混合し 20 mL にメスアップし、500 μL に分注して-20℃で保存した。

• 電気泳動用バッファー

Trizma base [Sigma-aldrich] # T6066-1KG 3 g

Glycine [特級/和光純薬工業株式会社] # 077-00735 14.4 g

Sodium Dodecyl Sulfate [生化学用/和光純薬工業株式会社] # 191-07145 1 g

- Transfer Buffer

Trizma base [Sigma-aldrich] # T6066-1KG 6 g

上記の試薬を超純水に溶解し、最終容量を 500 mL とした。転写直前にメタノール 20% (v/v)になるように調製した。

- Blocking Buffer

ブロックエース粉末 [大日本住友製薬株式会社、東京、日本] # UK-B80 4 g

上記の試薬を 100 mL の超純水に溶解した。

- Dilution Buffer

Blocking Buffer を超純水で 10 倍希釈した。

- 10×TBS pH 7.6

Trizma base [Sigma-aldrich] # T6066-1KG 42.2 g

塩化ナトリウム [特級/和光純薬工業株式会社] # 191-01665 87.6 g

上記の試薬を超純水に溶解し、pH 7.6 に調製し、最終容量を 1 L とした。

- 1×TBS-T

10×TBS を超純水で 10 倍希釈した 1×TBS-T 500 mL に Tween 20 [和光純薬工業株式会社] # 103168 を 500 μ L 加えた。

- ニトロセルロースメンブレン [GE Healthcare, Little chelfort, United kingdom, USA] # RPN303D

- ろ紙 (Hybond blotting paper) [GE Healthcare] # RPN6101M

- ECL-Plus Western Blotting Detection System GE [BD Healthcare Princeton, Franklin Lakers, NJ, USA] # RPN2132

- ECL-Prime Western Blotting Detection System GE [BD Healthcare Princeton] # RPN2232

- 一次抗体

Anti-phospho-H2A (Ser139) [Millpore, Billerica, MA, USA] # DAM1546024

Actin (1-19) [Santa Cruz, Texas, Dallas, USA] # SC-1616

- 二次抗体

Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody [Cell Signaling, Boston, MA, USA] # 7074

Bovine anti-goat IgG-HRP [Santa Cruz] # sc-2350

(3) 使用した機器

- ・ セルスクレーパー [株式会社三商、愛知、日本] # 9000-220
- ・ Centrifuge (遠心機) [Eppendorf、東京、日本] # 5417R
- ・ Recipro Shaker (シェイカー) [日信工業株式会社、長野、日本] # NA-20
- ・ Handy Sonic (超音波発生機) [株式会社トミー精工 (TOMY)、札幌、日本] # UR-20P
- ・ MG-2300 (マイクロチューブ恒温器) [EYELA 東京理科機械株式会社、東京、日本] # MG-2300
- ・ ブロッキング装置ホライズブロット [アトー株式会社、東京、日本] # AE-6677
- ・ スラブ型 EP ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 [アトー株式会社] # AE-6500
- ・ Light-Capture II (蛍光撮影出力装置) [Type AE-6981/2FC (Zoom Lens), Cooled CCD Camera System (-30°C)] [アトー株式会社]
- ・ Printgraph (9 インチモノクロモニター) [アトー株式会社] # K80235564A
- ・ VIDEO GRAPHIC PRINTER (モノクロビデオプリンタ) [アトー株式会社] # SONY CUP-897MD
- ・ マイクロプレートリーダー (Varioskan) [Thermo Fisher Scientific Inc] # 525-0040

(5) タンパク質の抽出

60 mm dish から培地を吸引除去後、氷冷した PBS (-) で 1 回洗浄し、培地を完全に取り除き、1×Cell Lysis Buffer 160 μ L (60 mm dish に対して) を添加し、氷上に静置した。その 5 分後、セルスクレーパーで細胞を剥離し、マイクロチューブに回収した。細胞膜を破壊するために Handy Sonic (超音波破碎機) を用いて行った (3 秒間×3 回)。破碎したサンプルを遠心分離 (4°C、14000×rpm、15 分間) し、上清を新しいマイクロチューブに回収した。回収した抽出液より一部分をタンパク質定量用にとりわけ、残りは速やかに小分けにし-80°Cに保存した。

(6) タンパク質定量

タンパク質定量は BCA Protein Assay Kit [Thermo Fisher Scientific Inc] # 23225 を用い、プロトコールに従って行った。具体的には、超純水で 10 倍希釈したタンパク質抽出溶液と 9 段階の濃度のタンパク質標準液 (スタンダード) (0、25、125、250、500、750、1000、1500、2000 μ g/mL) を用意した。各試料溶液 25 μ L を 96 穴平底プレートに添加し、37°C で 30 分間、恒温槽にてインキュベートした。30 分間後、室温に戻し、マイクロプレートリーダーで 562 nm における吸光度を測定した。測定したタンパク質標準液の吸光度から検量線を作成し、各試料中のタンパク質量を求

めた。

(7) SDS サンプルの作成

算出したデータを元に、各試料中のタンパク質濃度が 10 µg/mL となるように Cell Lysis Buffer を用いて調製した後、サンプルと SDS サンプル Buffer を 1:3 の割合になるように混合した。このとき、泳動用ゲルへの添加量が 10 µL 前後となるように Cell Lysis buffer で調製した。その後、アルミブロック恒温槽 (EYELA MG-2300) を用いて 95°C で 5 分間加熱することで還元処理した。

(8) 電気泳動用ゲル作製試薬と作製方法

Acrylamide [電気泳動用/和光純薬工業株式会社] # 011-08015

Ammonium persulfate (APS) [Sigma-aldrich] # A3678-100G

N, N-Methylene-bis (BIS) (acrylamide) [電気泳動用/和光純薬工業株式会社]
138-06032

Tetramethyl ethylenediamine (TEMED) [鹿特級/関東化学株式会社、東京、日本]
A3678-100G

・ 30%アクリルアミド (A 液)

Acrylamide [電気泳動用/和光純薬工業株式会社] # 011-08015	14.6 g
N, N-Methylene-bis (BIS) (acrylamide) [電気泳動用/和光純薬工業株式会社] # 138-06032	0.4 g

上記の試薬を超純水 40 mL に溶解し、超純水で 50 mL にメスアップした。

・ 1.5M Tris HCl pH 8.8 (B 液)

Trizma base [Sigma-aldrich] # T6066-1KG	9.09 g
---	--------

上記の試薬を純水 40 mL に溶解し、pH 8.8 に調製し、超純水で 50 mL にメスアップした。

・ 0.5M Tris HCl pH 6.8 (C 液)

Sodium Dodecyl Sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム) [生化学用/和光純薬工業株式会社] # 191-07145	3.03 g
--	--------

上記の試薬を超純水 40 mL に溶解し、6N HCl を用いて pH 8.8 に調製した後、超純水で 50 mL にメスアップした。

- 10% SDS

Sodium Dodecyl Sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム) [生化学用/和光純薬工業株式会社] # 191-07145 5 g

上記の試薬を超純水 40 mL に溶解し、超純水で 50 mL にメスアップした。

- 10% APS

Ammonium persulfate for electrophoresis (APS) [Sigma-aldrich] 0.1 g
A3678-100G

上記の試薬を超純水 900 μ L に溶解し、超純水で 1 mL にメスアップした

- 分離ゲル (Separating gel)、濃縮ゲル (Stacking gel) を以下の通りに混合し、ゲルを作製し使用した。以下の組成は共にゲル 2 枚分の分量である。

(分離ゲル)

	12.5%
超純水	5.8 mL
A 液	7.5 mL
B 液	4.5 mL
10% SDS	180 μ L
TEMED	10 μ L
APS	70 μ L

(濃縮ゲル)

超純水	3.5 mL
A 液	0.9 mL
C 液	1.5 mL
10%SDS	60 μ L
TEMED	10 μ L
APS	18 μ L

A 液: 30%アクリルアミド
B 液: 1.5M Tris HCl pH 8.8
C 液: 0.5M Tris HCl pH 6.8

(9) 電気泳動

電気泳動用 Buffer を、電気泳動槽 [アトー株式会社]の線の部分まで満たし、作成した 12.5%のゲルを電気泳動槽にセットした後、電気泳動用 Buffer で完全に満たした。その後、還元処理をしたサンプルすべてをゲルにアプライし、ゲル 1 枚あたり 20 mA の低電流で約 60 分間電気泳動を行った。

(10) メンブレンへの転写

10 cm×10 cm にニトロセルロースメンブレン、ろ紙 (メンブレン 1 枚あたり 4 枚のろ紙) を裁断した。転写の準備として、Transfer Buffer にメタノールを 20% (v/v)

になるように加え、ろ紙（2枚）、メンブレン、ろ紙（2枚）の順番で、約15分間浸透した。ブロッキング装置（ホライズプロット AE-6677）にろ紙（2枚）とメンブレンをこの順番で置き、Transfer Buffer を適当量加え、メンブレンが乾かないようにした。電気泳動が終了したゲルをゲル板から外し、不要な部分をヘラで切り取った。そして、あらかじめブロッキング装置に準備したメンブレンの上に気泡が入らないようにゲルをおいた。その上に残りのろ紙（2枚）を置きブロッキング装置をセットし、144 mA で2時間転写を行った。

(11) メンブレンのブロッキング

転写終了後、必要な分子量の部分のメンブレンをカットし、Blocking Buffer に浸し、室温で最低3時間振とうさせた（もしくは4°Cで一晩振とう）。

(12) 一次抗体

ブロッキング終了後、TBS-T 中で15、10、5分間を3回振とうさせながら洗浄した。その間に、一次抗体をDilution Buffer で下記の倍率で希釈した。

抗体希釈液（約1.5 mL）をメンブレンに添加し、4°Cで一晩（あるいは室温で3時間）インキュベートした。

(13) 二次抗体

一次抗体反応後、TBS-T 中で15、10、5分間を3回振とうさせながら洗浄し、一次抗体液を除いた。二次抗体は下記の通り一次抗体を作成した動物の免疫グロブリンに対する二次抗体を用いた。

一次抗体	抗体希釈率	二次抗体免疫動物	抗体希釈率
γ -H2AX	1:500	Rabbit	1:2000
β -actin	1:500	Goat	1:2000

(14) メンブレンの化学発光（ECL Plus）

二次抗体反応終了後、TBS-T 中で15、10、5分間と3回振とう洗浄し、二次抗体を除いた。1 mL のA液に対し25 μ L のB液で混ぜ合わせ、二次抗体洗浄後のメンブレンに添加し5分間反応させた。反応後、化学発光撮影出力装置（Light-Capture II、Zoom Lens）Cooled CCD Camera System (-30°C) [アトー株式会社] # Type AE-6981 を使用し適当な時間で撮影を行った。

(15) 数値化と統計処理

CS Analyzer ver 3.0 [アトー株式会社] により Western blot の結果を数値化した。 β -actin で補正したそれぞれの試料中の γ -H2AX の誘導は、コントロール（溶媒対象群）を 1 としたときの比率で表記した（平均値 \pm 標準偏差、n=5）。Pharmaco Analyst II（ヒューマンライフ社）を用いて多重検定（*Tukey test*）を行った。

1-1-1-2 AP sitesの生成

(1) 細胞培養条件

100 mm dishにヒト乳がん細胞MCF-7を 1×10^4 cell/cm² で播種した。3日後に新しいDMEM培地に交換し、2日間培養した。サブコンフルエントに到達したことを顕微鏡下で確認後、Ro 41-0960（COMTの阻害剤）（3 μ M）を含むフェノールレッドフリーのDMEM培地に交換し、1時間前培養した。続いて、2-OHE₂もしくは4-OHE₂（30 μ M）、Ro 41-0960（3 μ M）を含むフェノールレッドフリーのDMEM培地に交換し、それぞれ0-2時間培養した。

(2) AP sites の測定

抽出した DNA 中の AP sites 生成量を DNA Damage Quantification Kit - AP Site Counting -（株式会社同仁化学研究所、熊本、日本）を用いて、マニュアルに従って測定した。AP sites の測定原理は以下のとおりである。

DNA 損傷部位には修復機構が働き、その一つとして塩基除去修復がある。この時 AP site (apurinic / apyrimidinic site) と呼ばれる塩基除去部位が出現する。つまり AP site の検出は DNA 損傷部位を測定し得る有効な方法となる。

ARP (*N*-Aminooxymethylcarbonylhydrazino-D-biotin) は、この AP site と特異的に結合しビオチン化できる試薬として知られており、本キットは、ARP を用いて DNA をビオチン化し 96 穴マイクロプレートに固定化して検体 DNA 中の AP site を簡便に定量するものである。このキットには、AP site 数が既定された標準 DNA が含まれており、HRP 標識ストレプトアビジンによるビオチン検出法を用いることによって AP site の定量ができる。

(4) DNA の抽出方法

回収した細胞懸濁液を 200 \times g で 5 分間遠心分離後、上澄みを除去した。さらに、PBS (-) 500 μ l で細胞を懸濁して洗い、200 \times g で 5 分間遠心分離し、上澄みを除去した。その後、DNA Damage Quantification Kit - AP Site Counting -（株式会社 同仁化学研究所）を用いて、マニュアルに従い、70%エタノールによって DNA を沈殿させ抽

出した。

(5) 吸光度測定

プロトコールに従って、96 well プレート を 37°C で各時間 (0-12 時間) インキュベートした後、マイクロプレートリーダー (Varcioskan) [Thermo Fisher Scientific Inc]にて、波長 650 nm における吸光度を測定した。

(6) 統計処理

DNA中のAP sites数 (100,000塩基あたりの数) を検量線から算出し、平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した (n=5)。Pharmaco Analyst II (ヒューマンライフ社) を用いて多重検定 (*Tukey test*) を行って比較した。

1-1-2 実験結果

1-1-2-1 4-OHE₂によるヒストン H2AX のリン酸化

Fig. 7 に 2-OHE₂ および 4-OHE₂ による γ -H2AX の誘導の結果を示した。なお、数値に関しては、コントロールを 1 として算出している。

ヒト乳がん細胞 MCF-7 において、2-OHE₂ は COMT の阻害剤である Ro 41-0960 非存在下では、DNA 損傷の指標であるヒストン H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) を誘導しなかった (Fig. 7-A) が、COMT 阻害剤が共存すると、2-OHE₂ の添加 12 時間後、コントロール (1.0 ± 0.1) に対して有意に γ -H2AX を誘導した (2.2 ± 0.3 (2 倍)、 2.7 ± 1.0 (2.7 倍)) (Fig. 7-B)。一方、4-OHE₂ は COMT 阻害剤非存在下であっても、4-OHE₂ 添加 12 時間後に、コントロール値 (1.0 ± 0.3) に対して γ -H2AX の有意な上昇が見られた (3.2 ± 0.2 (3 倍)) (Fig. 7-C)。さらに、COMT 阻害剤が共存すると、4-OHE₂ 添加後 1 時間で γ -H2AX の誘導が顕著に上昇し (3.3 ± 0.1 (3.3 倍))、その後、経時的に減少した。4 時間後にはコントロールレベルに戻った (1.8 ± 0.5 (1.8 倍)) (Fig. 7-D)。ところが、12 時間後には再び、 γ -H2AX の誘導が著しく上昇した (4.2 ± 1.2 (4.2 倍)) (Fig. 7-D)。また、1 時間後の 4-OHE₂ と COMT の阻害剤である Ro 41-0960 存在下で有意に γ -H2AX を誘導した (3.5 ± 0.1 (3.5 倍))。また、DMSO 添加群でも 12 時間後に、コントロール値 (1.0 ± 0.1) と比較して、有意に γ -H2AX が誘導した (2.8 ± 0.5 (2.8 倍)) (Fig. 7-E)。この結果に対して、ATM の阻害剤 KU-55933 (10 μ M) を添加すると、顕著に γ -H2AX の誘導が減少した (0.98 ± 0.1 (3.5 倍)) (Fig. 8)。

これらの結果から、4-OHE₂ と COMT の阻害剤である Ro 41-0960 存在下における γ -H2AX の誘導は、ATM を介していることが分かった。

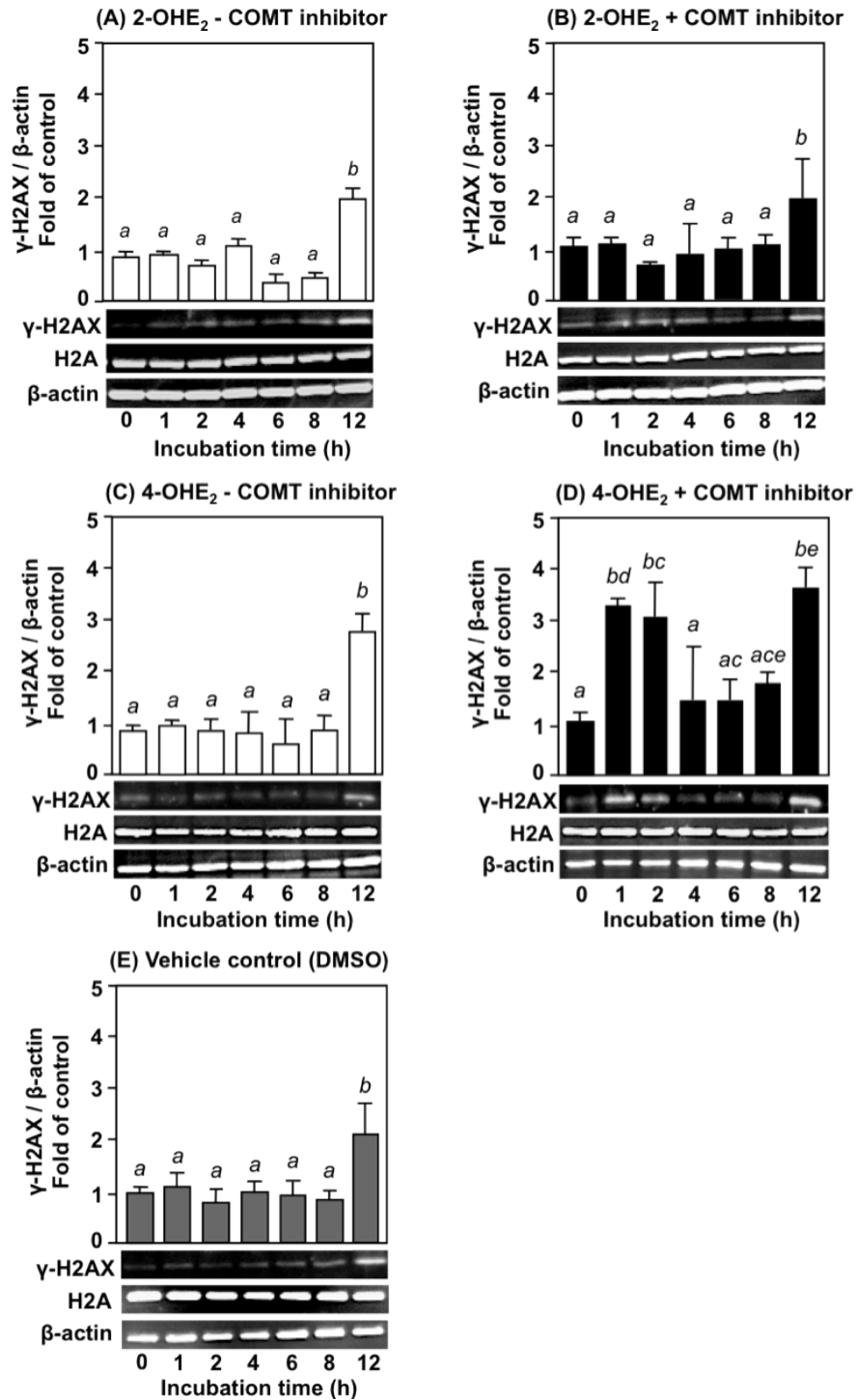


Fig. 7. Induction of γ -H2AX in MCF-7 cells treated with or without a COMT inhibitor, 2-OHE₂ and 4-OHE₂. MCF-7 human breast cancer cells were pretreated with (B and D) or without (A, C and E) Ro 41-0960 (COMT inhibitor, 3 μ M) for 1 h, and then exposed to 30 μ M of 2-OHE₂ (A and B), 4-OHE₂ (C and D) or DMSO (vehicle control (E)) for 0-12 h. Values indicate the mean \pm SD (n=5). Different alphabetical superscripts on the top of each column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ as evaluated by the *Tukey test*.

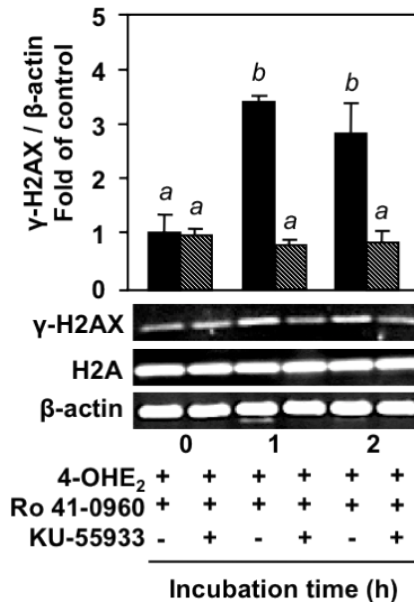


Fig. 8. Effect of ATM inhibitor on γ -H2AX induction in MCF-7 cells treated with 4-OHE₂ and a COMT inhibitor. MCF-7 human breast cancer cells were pretreated with Ro 41-0960 (COMT inhibitor, 3 μ M) and KU-55933 (ATM inhibitor, 10 μ M) for 1 h, and then exposed to 30 μ M of 4-OHE₂ in the presence or absence of KU-55933 (10 μ M) for 0-2 h. Values indicate the mean \pm SD (n=5). Different alphabetical superscripts on the top of each column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ as evaluated by the *Tukey test*.

1-1-2-2 4-OHE₂によるAP sitesの生成

Fig. 9 に 2-OHE₂ および 4-OHE₂ が AP sites の生成に及ぼす効果について検討した結果を示した。コントロール値を示す 0 時間の AP sites の存在量は、10 万塩基対あたり 2.2 ± 0.16 であった。COMT の阻害剤である Ro 41-0960 共存下の有無に関わらず、2-OHE₂ 添加後どの処理時間においても、AP sites の生成は見られなかった (Fig. 9-A and B)。一方、4-OHE₂ は COMT 阻害剤非共存下では、AP sites の生成は見られなかった (Fig. 9-C) が、COMT 阻害剤共存下において、添加後 1 時間で AP sites の生成量は、コントロール値 (2.5 ± 0.09) と比較して、有意に上昇し (13.1 ± 0.16 (5.2 倍))、その後、2 時間後には、有意に AP sites が減少した (7.5 ± 0.1 (1.74 倍)) に戻った (Fig. 9-D)。

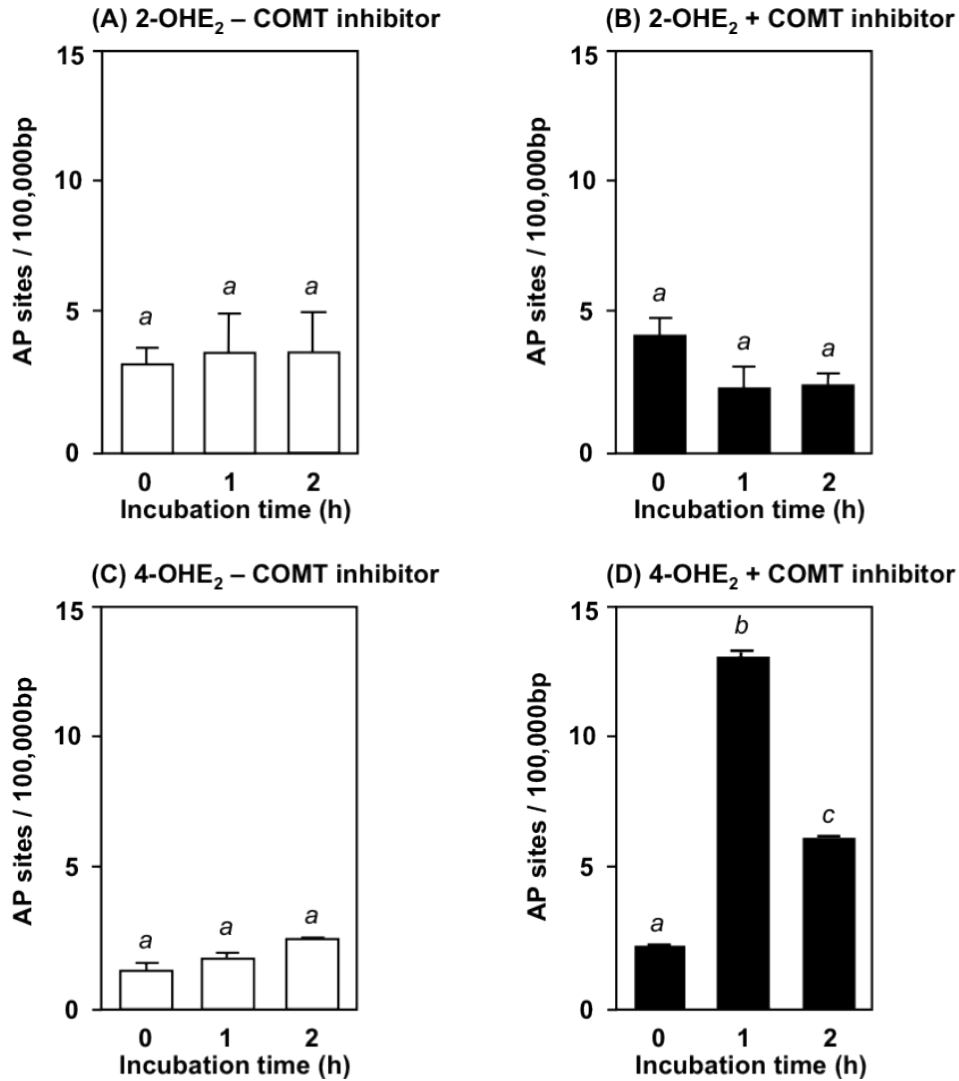


Fig. 9. AP site formation in MCF-7 cells treated with or without a COMT inhibitor, 2-OHE₂ and 4-OHE₂. MCF-7 cells were pretreated with (B and D) or without (A and C) Ro 41-0960 (COMT inhibitor, 3 μ M) for 1 h, and then exposed to 30 μ M of 2-OHE₂ (A and B) or 4-OHE₂ (C and D) for 0-2 h. Values indicate mean \pm SD (n=4). Different alphabetical superscripts on the top of each column indicate statistically significant differences at p < 0.05 as evaluated by the *Tukey test*.

第2節 ノルアドレナリンと4-OHE₂によるDNA損傷誘発

1-2-1 実験方法

(1) 使用した細胞

- MCF-10A (mammary gland; breast, epithelial, fibrocystic diseases) # CRL-10317 (36 歳) ATCC (American Type Culture Collection) [Manassas, VA, USA] にて購入した。

(2) 培地用試薬

- DMEM/F12 (DMEM) [Invitrogen] # 11330-032 500 mL
- 5% (vol/vol) fetal bovine serum FBS [Invitrogen] # 172012 25 mL
- 100 ng/mL Cholera toxin solution [和光純薬工業株式会社] # 036-2060 100 μL
100 ng/mLになるように超純水で調製し、100 μLずつ分注したものを使用
まで-80°Cで保存した。
- 10 μg/mL Insulin [Sigma-aldrich] # 120M8702V 500 μL
10 μg/mLになるように超純水で調製し、500 μL ずつガンマ線滅菌エッ
ペンチューブに分注したものを使用まで-20°Cで保存した。
- 0.5 mg/mL Hydrocortisone [和光純薬工業株式会社] # 098K5308 250 μL
0.5 mg/mLになるようにメタノールで調製し、250 μL ずつガンマ線滅菌
エッペンチューブに分注したものを使用まで-20°Cで保存した。
- 20 ng/mL Epidermal growth factor [Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA] 100 μL
0712AFC05
20 ng/mLになるように超純水で調製し、100 μL ずつガンマ線滅菌エッ
ペンチューブに分注したものを使用まで-20°Cで保存した。
- 100×penicillin/streptomycin [Invitrogen] # 15140 5 mL
(2)の培地の組成は、ATCC の培養方法に従った。

(3) 継代培養条件

1-1-1 の MCF-7 細胞と同様の方法で行った。

(4) 試薬調製

- リン酸緩衝生理食塩水粉末 (PBS-, 0.01mol/L PH 7.2-7.4) [和光純薬工業株式会社]

162-19321

100 g の粉末 (1 袋) に対して 1L の超純水液で溶解し、オートクレーブで滅菌処理後、実験に用いた。

• 1×Trypsin/EDTA

1-1-1と同様の方法で調製した。

• 4-hydroxyestradiol [Sigma-aldrich] # 128K1021

1-1-1と同様の方法で調製した。

• ノルアドレナリン (Noradrenaline: NA) [Sigma-aldrich] # 056K1167

0.12M perclonic acid で 10 mM に溶解し、使用まで冷凍保存した。

• 0.12M perclonic acid

60%過塩素酸 [和光純薬工業株式会社] # 166-00713

上記の試薬 1.2 mL に 100 mL の超純水と混ぜ、100 ng の L-システイン (l-cysteine) [和光純薬工業株式会社] # 039-20652 と混合した。

• Clonidine hydrochloride (α_2 -adrenergic receptor agonist) [和光純薬工業株式会社] # 038-14291 (Fig. 10)

• Rauwolscine hydrochloride (α_2 -adrenergic receptor antagonist) [Tocris Bioscience, Boston, ST, Louis, MO, USA] # 0391 (Fig. 10)

• L-(-)-isoproterenol hydrochloride (β_2 -adrenergic receptor agonist) [MP Biomedicals, LLC, Carlsbad, CA, USA] # 6536B (Fig. 10)

• Propranolol hydrochloride (β_2 -adrenergic receptor antagonist) [Tocris Bioscience] # 0624 (Fig. 10)

上記の4つの試薬は、それぞれ超純水で 10 mM に溶解し、使用まで冷凍保存した。

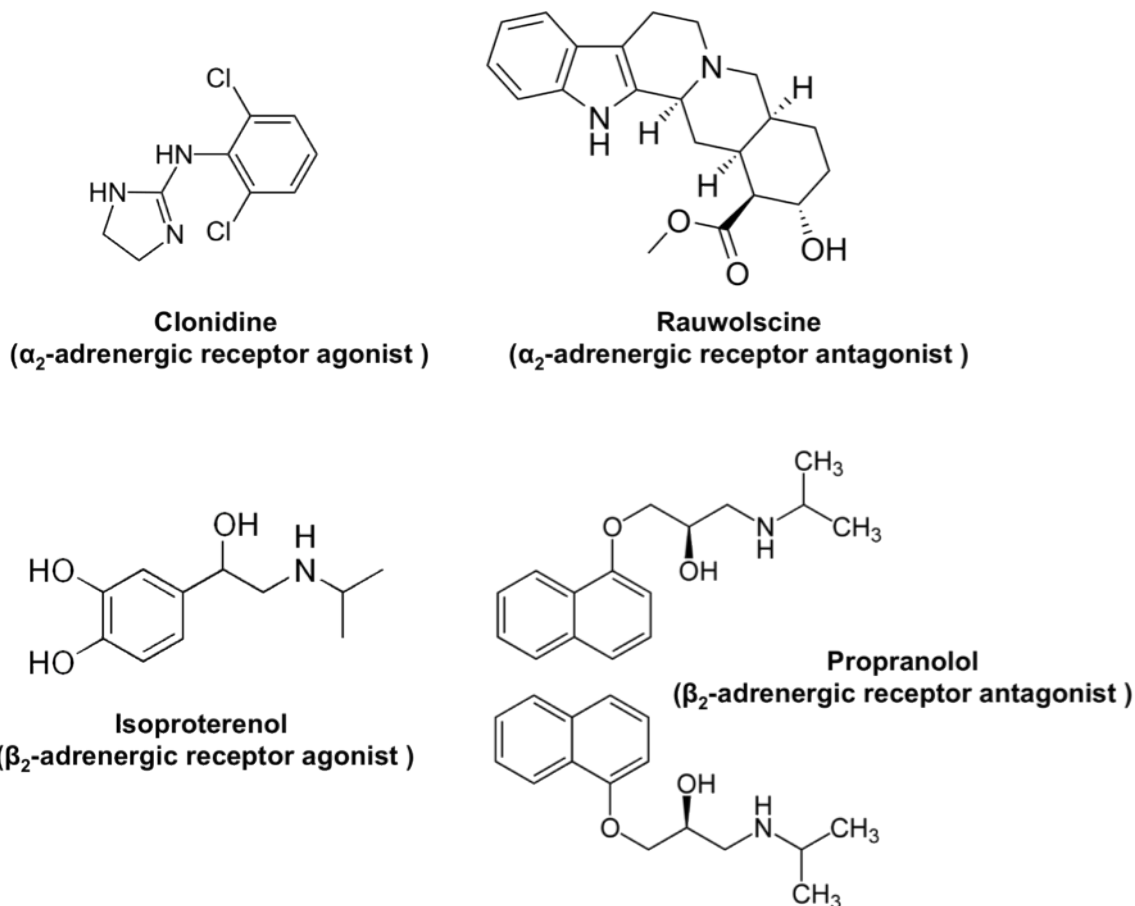


Fig. 10. Chemical structures of α_2 , β_2 -adrenergic receptor (AR) agonist of clonidine, isoproterenol and α_2 , β_2 -AR antagonist of rauwolscine, propranolol used in this study.

1-2-1-1 α_2 -アドレナリン受容体の発現

(1) 使用した抗体

・一次抗体

α_{2B} -AR (C-4) [Santa Cruz] # sc-390429

α_{2C} -AR (T-15) [Santa Cruz] # sc-30437

β_2 -AR (H-73) [Santa Cruz] # sc-9042

Actin (1-19) [Santa Cruz] # sc-1616

・二次抗体

Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody [Cell Signaling] # 7074

Bovine anti-goat IgG-HRP [Santa Cruz] # sc-2350

(2) 一次抗体

ブロッキング終了後、TBS-T 中で 15、10、5 分間と 3 回振とうさせながら洗浄した。その間に、一次抗体を Dilution Buffer で下記の倍率で希釈した。

抗体希釈液（約 1.5 mL）をメンブレンに添加し、4°Cで一晩（あるいは室温で 3 時間）インキュベートした。

(3) 二次抗体

一次抗体反応後、TBS-T 中で 15、10、5 分間と 3 回振とうさせながら洗浄し、一次抗体液を除いた。二次抗体は下記の通り一次抗体を作成した動物の免疫グロブリンに対する二次抗体を用いた。

一次抗体	抗体希釈率	二次抗体免疫動物	抗体希釈率
α_{2B} -AR	1:500	Goat	1:2000
α_{2B} -AR	1:500	Goat	1:2000
β_2 -AR	1:500	Rabbit	1:2000
β_2 -AR	1:500	Goat	1:2000

遺伝子発現の測定は、Motoyama, Tsurusakiらの方法に従い、7500 Real-time PCR System [Applied Biosystems]を用いてPCRを行い、解析を行った [55, 56]。

(1) 使用した試薬

- Distilled Water RNase DNase-Free [Life Technologies, Carlsbad, California, USA] # 100977-023
- Prime Script RT reagent kit [タカラバイオ株式会社、滋賀、日本] # RR037A
- QuickGene RNA cultured cell kit S [富士フイルム、東京、日本] # RC-S
- TaqMan Gene Expression Master Mix [Applied Biosystems] # 4369016
- Ethanol (99.5%) [特級/和光純薬工業株式会社] # 052-07221
- 2-mercaptoethanol [生化学用/和光純薬工業株式会社] # 137-06862
- Rnase AWAY [Molecular Bio Products] # 7002

(2) 使用した機器

- Gene Quant pro''S'' [GE Healthcare] # 16-8-04
- ウルトラマイクロボリュームセル [GE Healthcare] # 80-2103-69
- ビーズ式細胞破碎装置 (Bead Smash 12) [和研薬株式会社] # BS-12R

- ・ ビーズ式細胞破碎装置サンプルチューブ [株式会社トミー精工 (TOMY)] # TM-625S
- ・ ビーズ (ジルコニア、サイズ : 5.0 φ) [株式会社トミー精工 (TOMY)] # ZB-50
- ・ QuickGene Mini 80 [富士フィルム] # 76221370
- ・ TakaRa PCR Thermal Cycler Dice mini [タカラバイオ株式会社] # TP-100
- ・ CUTE MIXER [EYELA 東京理科機械株式会社、東京、日本] # CM-100
- ・ THERMAL PRINTER [セイコーインスツル株式会社、千葉、日本] # DPU-414

(2) 細胞からのtotal RNAの抽出

QuickGene RNA cultured cell kit Sを用いて、添付のプロトコールに従い、細胞中のtotal RNAの抽出を行った。細胞は60 mm dishで培養したものをを用いた。

(4) RNA濃度測定

使用器具

- ・ Gene Quant pro”S” [GE Healthcare] # 16-8-04
- ・ ウルトラマイクロボリュームセル [GE Healthcare] # 80-2103-69
- ・ THERMAL PRINTER [セイコーインスツル株式会社] # DPU-414

・ 方法

抽出したtotal RNAを超純水で10倍希釈し、上記の条件で吸光度を測定し、濃度を求めた。260 nm/280 nmの比 (純度) が1.9-2.2に収まらなかった場合は、再度、抽出を行った。下記に詳しい条件プログラムを示した。

Factor	40.0
Units	ng/μL
Pathlength	5 mm
Dilution Factor	10
Use 320 nm	Yes

(5) Reverse Transcription (RNAの逆転写反応)

Prime Script RT reagent kitを用いて、添付のプロトコールに従い、RNAの逆転写を行った。具体的には下記に記載した。

1 サンプルあたりの必要量

5×PrimeScript Buffer	2 μ L
PrimeScript RT Enzyme Mix1	0.5 μ L
Oligo dt Primer	0.5 μ L
Random 6 mers	2 μ L
Distilled Water DNase RNase Free	0-4.9 μ L

上記の試薬を必要サンプル分の量で良く混合させた。Total RNA量は、全量として400 ng アプライする（容量としては、0.1-5 μ L）。アプライするRNAの容量を基準として逆転写反応液の最終全量を10 μ LになるようにDistilled Water DNase Freeの量を0-4.9 μ Lとした。

- ・ 逆転写反応

調製したサンプルをTaKaRa PCR Thermal Cycler Dice miniにセットし、下記のプログラムで逆転写反応を行う。逆転写プログラムは下記に記載した。

Temperature	Time
37°C	15 min
85°C	5 sec
4°C	hold

合成されたcDNAは、-20°Cで保存した。cDNAは、RNAより安定であり、長期保存が可能である。

(6) リアルタイムRT-PCRによる遺伝子発現量の測定（試薬、使用機器）

- ・ Taq Man Gene Expression Master Mix (Cat. No. 4369016) [Applied Biosystems] # 4369016
- ・ Taq Man 内在性コントロール (Reporter: VIC Dye, Quencher: MGB); human GAPGH # 4326317E
- ・ ターゲット遺伝子Taq Manプライマー・プローブ
上記の試薬は、全て[Applied Biosystems]より購入した。

- ・ 合成したcDNAサンプル

- Distilled Water DNase RNase Free [Life Technologies] # 100977-023
- Applied Biosystems Real Time PCR 7500 system [Applied Biosystems]
- STAR 8-strip Tube (Flat Type) (Item No: RS-PCR-8F) [理科研株式会社、東京]
RS-PCR-8F

今回使用したターゲット遺伝子Taq Manプライマー・プローブをTable.1に示した。プライマー・プローブは、Applied Biosystems社のTaq Man Gene expression Assayを利用してターゲット遺伝子別のプライマー・プローブセットを購入した。

Assay ID	Gene name	Amplicon Length
Hs00265090_s1	α_{2B} -adrenergic receptor	117
Hs01896125_s1	α_{2C} -adrenergic receptor	95
Hs00240532_s1	β_2 -adrenergic receptors	65

Table. 1. Primer probe of target genes assayed by quantitative RT-PCR.

(7) PCR反応試薬の調製

1 サンプルあたりの必要量

TaqMan Gene Expression Master Mix	10 μ L
Distilled water DNase, RNase free	7.5 μ L
TaqMan ヒト内在性コントロール (GAPDH)	1 μ L
ターゲット遺伝子 TaqMan プライマー・プローブ	1 μ L

上記の試薬を必要サンプル分+1-2 μ Lの量で良く混合し、スピンドウンし、チューブの壁面に付着している液を落とした。その後、STAR 8-strip Tubeに19.5 μ Lずつ分注（なるべく気泡が入らないようにする）し、cDNAを0.5 μ Lずつアプライし、全量20 μ Lとした。

(8) PCR反応

調製したサンプルを7500 Real-Time PCR systemにセットし、Relative Quantification plate (RQ Plate) ドキュメントを選択した。設定したwellにサンプルを設置し、反応を開始した。反応プログラムは下記に記載した。

Temperature	Times	Cycle number
50°C	2 min	1 cycle
95°C	10 min	1 cycle
95°C	15 sec	50 sec
60°C	1 min	50 sec

(9) データの解析

測定した各サンプルのターゲット遺伝子のCt値と内在性コントロール（GAPDH）のCt値の平均値と標準偏差を算出する。ターゲット遺伝子Ct値-内在性コントロールCt値を ΔC_T 値（ dC_T ）とする。次に、基準とするサンプル群の ΔC_T 値から引き、その値を $\Delta \Delta C_T$ 値（ ddC_T ）とする。（基準としたサンプル群の $\Delta \Delta C_T$ 値は0になる）。 $\Delta \Delta C_T$ 値は、サイクル数の差となるので、そこからさらに $2^{\Delta \Delta C_T}$ （ $\Delta \Delta C_T$ ）を算出するので、相対値を求めることができる（基準としたサンプル群の相対値は1となる）。

(10) 統計処理

遺伝子発現量の変化は、各サンプルのターゲット遺伝子のCt値-内在性コントロール（GAPDH）Ct値（ dCt ）の値で補正し、それぞれを平均値で示した。GAPDHを1として、それぞれのターゲット遺伝子の発現量を求めグラフ化した。数値は、平均値 ± 標準偏差（SD）で示した（ $n=5$ ）。Pharmaco Analyst II（ヒューマンライフ社）を用いて多重検定（*Tukey test*）を行って比較した。

1-2-1-2 ヒストンH2AXのリン酸化の検出

1-1-1-1に準じて検出した。

(1) 細胞培養条件

60 mm dishにMCF-10A細胞を 1×10^4 cells/dishで播種した。3日後に新しいDMEM培地を交換し、2日間培養した。5日目に、終濃度3-100 nMのNA、clonidine（0.5、2.5、5 μ M）、rauwolscine（5、50、500 nM）、isoproterenol（1、5、10 μ M）、propranolol（1、5、10 μ M）を含むDMEM培地に交換し、1時間前培養した。その後、NAを含む3 μ Mの4-OHE₂存在下、非存在下におけるDMEM培地に交換し、1時間培養した。

1-2-1-3 AP sitesの生成

1-1-1-2に準じて行った。

(1) 細胞培養条件

100 mm dishにMCF-10A細胞を 1×10^4 cells/dishで播種した。3日後に新しいDMEM培地に交換し、2日間培養した。5日目に、終濃度3-100 nMのNA、clonidine (0.5、2.5、5 μ M)、rauwolscine (5、50、500 nM)、isoproterenol (1、5、10 μ M)、propranolol (1、5、10 μ M)を含む培地に交換し、1時間前培養した。その後、NAを含む3 μ Mの4-OHE₂存在下、非存在下におけるDMEM培地に交換し1時間培養した。

1-2-1-4 フローサイトメトリーを用いた活性酸素の測定

活性酸素の測定は、薬学部棟4階にあるFlow cytometry (FACS CANTTM II)を用いて測定した。フローサイトメトリーの使用方法は、静岡県立大学、食品栄養科学部、長寿生化学研究室の三好規之先生に指導を受け習得した。

フローサイトメトリーを用いたDCFHによる活性酸素の測定は、2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)を細胞内に作用させると、細胞内エステラーゼにより脱アセチル化し、非蛍光型2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH)となる。更に、活性酸素により酸化され強く蛍光を有する2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF)に変化する。この反応を用いることによって、フローサイトメトリーで活性酸素の定量ができる。本実験では、励起波長を488、最大蛍光波長を530 nmに設定し、細胞内の活性酸素の生成を測定した。

(1) 使用した機器

- ・ Flow cytometry (FACS CANTTM II) [Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ]
V96100053

(2) 細胞培養条件

6 well plateにMCF-10A細胞を 1×10^4 cells/cm²で播種した。3日後、新しいDMEM培地に交換し、さらに2日間培養した。5日目に、3 μ MのNAの培地に交換し、1時間、前培養をした。その後、NA (3 μ M)と4-OHE₂ (10 μ M)を含むDMEM培地に交換し、1時間培養した。さらに、PBS (-) 5 mLで2回洗浄した後、20 μ MのDCFHを含むDMEM培地に交換し、1時間培養した。clonidine (α_2 -AR アゴニスト)、rauwolscine (α_2 -AR アンタゴニスト)、isoproterenol (β_2 -AR アゴニスト)、propranolol (β_2 -AR アンタゴニスト)についてもNAと同様の処理を行った。

(3) 細胞の回収方法

Trypsin 250 μL を添加し、早急にセルスクレーパーで細胞を回収し、サンプルを遠心チューブに移した。その後、4°C、2000 rpm で2分間遠心後、上清を捨て、500 μL の PBS (-) でピペッティングし、細胞を洗浄した (2回)。遠心後、上清を捨て、ペレットの状態に 1 mL の PBS (-) を加え、ピペッティングした後、フローサイトメトリー用のサンプルとした。これらの作業は、蛍光物質 (DCFH) を扱うために、フタリンランプ下 (暗室) で行った。

(4) 統計処理

コントロール (溶媒対象群) の活性酸素の生成量を 1 としたときの比率で表記した (平均値 \pm 標準偏差 (SD)、 $n=5$)。Pharmaco Analyst II (ヒューマンライフ社) を用いて多重検定 (*Tukey test*) を行った。

1-2-2 実験結果

1-2-2-1 MCF-10A細胞における α_2 -アドレナリン受容体の発現

本研究で用いる、ヒト乳腺細胞であるMCF-10AにARが発現しているのか否かを、タンパク質発現をWestern blot法、mRNAをRT-PCR法を用いて検討した。

Fig.11にヒト乳腺細胞MCF-10AのARの発現について示した。なお、数値は、内在性コントロールであるGAPDHを1として算出している。

Western blot法を用いてタンパク質レベルで検討を行った結果、 α_{2C} および β_2 -ARが発現していることを確認できた。しかしながら、 α_{2B} に関しては発現していないことが分かった (Fig. 11-A)。さらに、リアルタイムPCRを用いてmRNAについての発現量も調べた結果、 α_{2B} (0.00000891 ± 0.0000012)、 α_{2C} (0.000373 ± 0.00013)、 β_2 -AR (0.1 ± 0.02) であり (GAPDHに対して (1.0 ± 0.003))、Western blot法と同様の結果であった (Fig. 11-B)。

これらの結果より、本研究で用いたヒト乳腺細胞MCF-10Aには、 α_{2C} および β_2 -ARが発現していることが分かった。

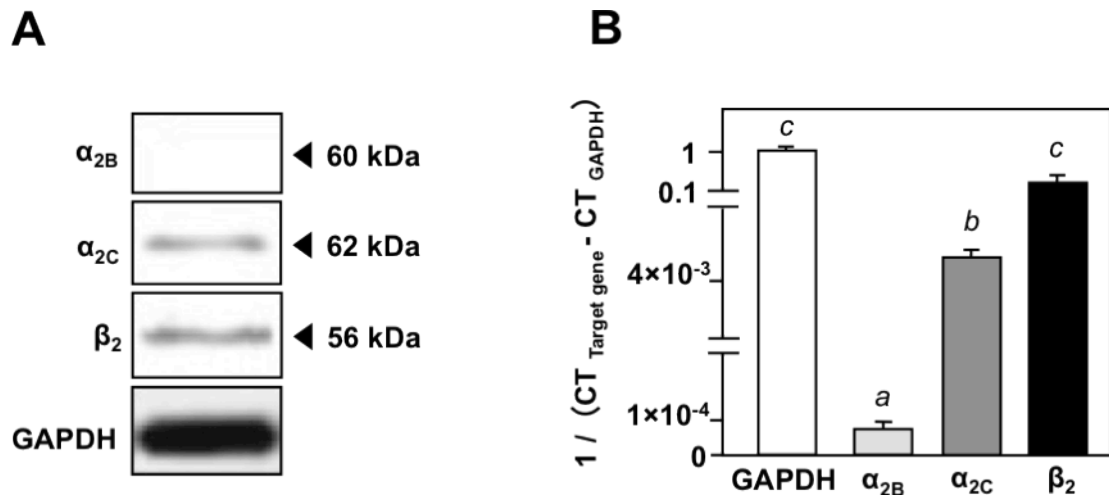


Fig. 11. Western blot and RT-PCR analysis of α_{2B} , α_{2C} , and β_2 -AR in MCF-10A cells. (A) The expression of α_{2B} , α_{2C} , and β_2 -AR proteins was assayed by western blot. (B) The expression of α_{2B} and α_{2C} mRNA was analyzed by RT-PCR. Values indicate mean \pm SD (n = 5). Different alphabetical superscripts on the top of each column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ as evaluated by the *Tukey test*.

1-2-2-2 ノルアドレナリンと4-OHE₂によるヒストンH2AXのリン酸化

本節では γ -H2AXの誘導をDNA損傷の指標にし、NAと4-OHE₂存在下、非存在下におけるDNA損傷増加について検討を行った。さらに、その作用機序の一旦の解明を目指すために、一般的に γ -H2AXの誘導作用機序の上流に位置すると考えられているATM (ataxia telangiectasia mutated) と、NAの結合受容体であるARに着目し検討を行った。

Fig. 12 に NA と 4-OHE₂ 存在下、非存在下による γ -H2AX の誘導に及ぼす影響について結果を示した。何れの結果も、NA、4-OHE₂ あるいは溶媒 (DMSO) 添加 1 時間後の結果である。数値に関しては、コントロールを 1 として算出した。

ヒト乳腺細胞 MCF-10A において、NA (3 nM) と 4-OHE₂ (0.03、0.3、3、30 μ M) 存在下で、一般的に DNA 損傷の指標であるヒストン H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) の誘導が、コントロール値に対して (1.3 ± 0.6)、濃度依存的に増加した (1.2 ± 0.2 、 2.4 ± 0.3 (2.4 倍)、 3.6 ± 0.3 (3.6 倍)、 3.2 ± 0.2 (3.2 倍)) (Fig. 12-A)。NA (3、30、100 nM) と 4-OHE₂ (0.1 μ M) 存在下で濃度依存的に γ -H2AX が増加した (1.3 ± 0.4 (1.3 倍)、 2.2 ± 0.2 (2.2 倍)、 3.3 ± 0.4 (3.3 倍)) (Fig. 12-B)。NA (3、3、10、30、100 μ M) と 4-OHE₂ (3 μ M) 存在下では、NA (100 nM) 単独で、コントロール値に対して (1.0 ± 0.3)、有意な上昇が見られ (2.7 ± 0.1 (2.7 倍))、4-OHE₂ 存在下でも、濃度依存的に γ -H2AX の誘導が増加した (3.2 ± 0.1 (3.2 倍)、 5.3 ± 0.2 (5.3 倍)、 5.5 ± 0.1 (5.5 倍)、 5.0 ± 0.3 (5.0 倍)) (Fig. 12-C)。これらの結果から、NA を 3 nM、4-OHE₂ を 3 μ M に設定し、次節から実験を行うこととした。

次に、NA (3 nM) と 4-OHE₂ (3 μ M) 存在下による γ -H2AX の誘導 (3.7 ± 0.7) に対して、ATM の阻害剤である KU-55933 (10 μ M) を作用させると顕著に γ -H2AX の誘導が抑制された (1.2 ± 0.2 (3.0 倍)) (Fig. 12-D)。さらに、NA と 4-OHE₂ 存在下における γ -H2AX の誘導が AR を介しているのか確かめるために、 α_2 -AR アゴニストである clonidine (0.5、2.5、5 μ M) と 4-OHE₂ (3 μ M) を作用させると、濃度依存的に γ -H2AX の誘導が、コントロールに対して有意に増加した (3.2 ± 0.6 (3.2 倍)、 4.6 ± 1.5 (4.6 倍)、 5.3 ± 1.1 (5.3 倍)) (Fig. 12-E)、さらに α_2 -AR アンタゴニストである rauwolscine (5、50、500 nM) を作用させると、NA と 4-OHE₂ 存在下における γ -H2AX の誘導に対して (4.7 ± 0.2)、濃度依存的に有意に抑制された (2.7 ± 1.1 (1.7 倍)、 1.3 ± 0.6 (3.6 倍)、 1.2 ± 1.0 (3.9 倍)) (Fig. 12-F)。しかしながら、isoproterenol (β_2 -AR アゴニスト) および propranolol (β_2 -AR アンタゴニスト) 共に、NA と 4-OHE₂ 存在下における γ -H2AX の誘導に対して影響はなかった (Fig. 12-G, H)。

これらの結果より、NA と 4-OHE₂ 存在下における γ -H2AX の誘導は、 α_2 -AR、ATM を介していることが分かった。

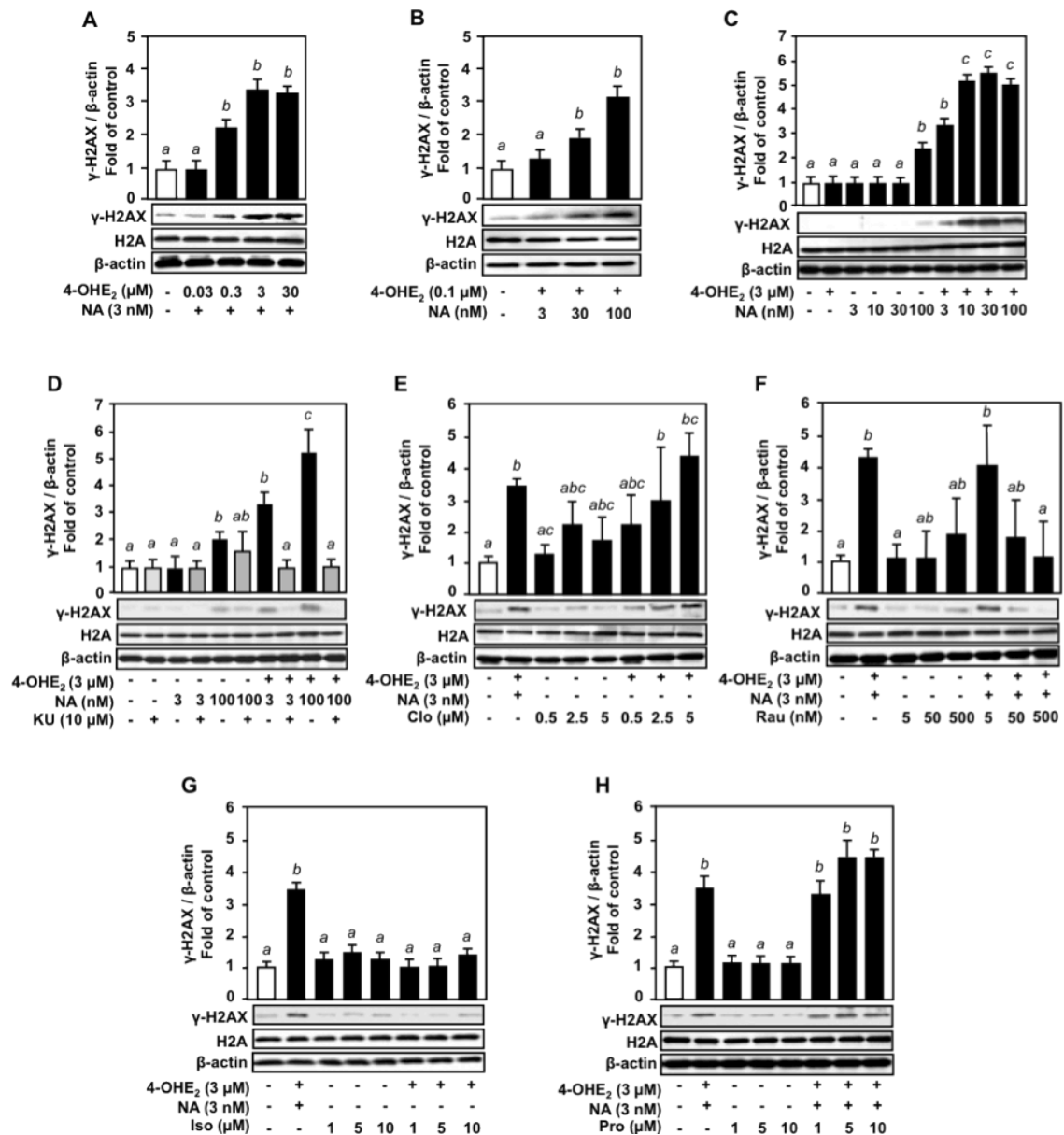


Fig. 12. Effect of ATM inhibitor or α_2 and β_2 -AR agonist or antagonist on γ -H2AX induction in MCF-10A cells treated with 4-OHE₂ and NA. MCF-10A cells were pretreated with NA for 1 h, then exposed to 4-OHE₂ or DMSO together with NA for 1 h. Induction of γ -H2AX was detected by western blot analysis at the indicated time, (A) 4-OHE₂: 0.03, 0.3, 3, 30 μ M; NA: 3 nM, (B) 4-OHE₂: 0.1 μ M; NA: 3, 30, 100 nM, (C) 4-OHE₂: 3 μ M; NA: 3, 10, 30, 100 nM. Cells were pretreated with or without NA (3 nM) and KU-55933 (KU) (10 μ M) (D), clonidine (Clo): 0.5, 2.5, 5 μ M (E), rauwolscine (Rau): 5, 50, 500 nM (F), isoproterenol (Iso): 1, 5, 10 μ M (G), or propranolol (Pro): 1, 5, 10 μ M (H) for 1 h, then exposed to 3 μ M 4-OHE₂ or DMSO together with each compound for 1 h. Values indicate mean \pm SD (n = 5). Different alphabetical superscripts on the top of each column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ as evaluated by the *Tukey test*.

1-2-2-3 ノルアドレナリンと4-OHE₂によるAP sitesの生成

AP sites は、酸化的 DNA 損傷である 8-hydroxyguanine (8-oxdG) などの塩基除去修復過程やカテコールエストロゲンによって生成する不安定な DNA 付加体の脱塩基などにより生成する。AP sites の検出は、DNA 損傷部位を測定できる有効な手段と考えられている。本節では、NA と 4-OHE₂ 存在下、非共存下における、DNA 損傷を増加させるかを、AP sites の生成の検出から検証し、その作用機序の一端の解明を目指し、NA の結合受容体である AR に着目し検討を行った。

Fig. 13 に NA と 4-OHE₂ 存在下における AP sites の生成に及ぼす影響について結果を示した。何れの結果も、NA、4-OHE₂ あるいは溶媒 (DMSO) 添加 1 時間後の結果である。コントロール値の AP sites の存在量は、10 万塩基あたり 2.25 ± 0.16 であった。NA (100 μ M) 単独で AP sites の生成が有意に増加した (25 ± 2.1 (11 倍))。また、NA (3、100 nM) と 4-OHE₂ 存在下では、NA 単独よりも AP sites の生成が増加することが分かった (28 ± 1.3 (12 倍)、 44 ± 2.5 (19.5 倍)) (Fig. 13-A)。さらに、NA と 4-OHE₂ 存在下における AP sites の生成が AR を介しているのかを調べるために、 α_2 -AR アゴニストである clonidine を用いて検討した結果、4-OHE₂ と clonidine (2.5、5 μ M) 存在下でコントロール値 (3.1 ± 0.4) と比較すると AP sites の生成が著しく増加した (10 ± 0.2 (3.2 倍)、 13 ± 0.2 (4.9 倍)) (Fig. 13-B)。しかしながら、clonidine 単独処理においては、影響を及ぼさなかった。さらに、 α_2 -AR アンタゴニストである rauwolscine (50、500 nM) を作用させた結果、NA と 4-OHE₂ 存在下における AP sites の生成の増加に対して (18 ± 0.3)、濃度依存的に AP sites の生成がコントロール値 (3.6 ± 0.5) まで抑制された (13 ± 0.2 (1.4 倍)、 3.4 ± 0.2 (5.2 倍))。 (Fig. 13-C)。

これらの結果より、NA と 4-OHE₂ 存在下における Ap sites の生成の増加は、 α_2 -AR を介していることが分かった。

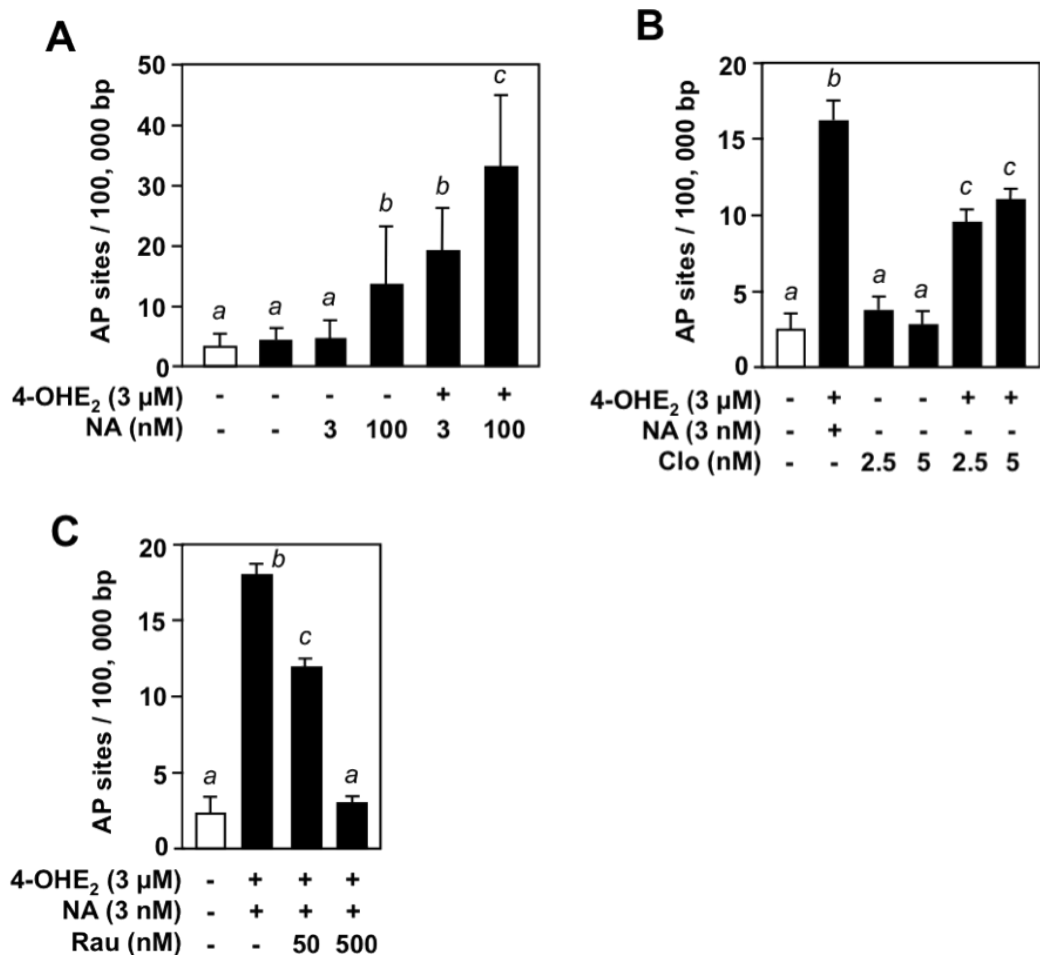


Fig. 13. AP site formation in MCF-10A cells treated with 4-OHE₂ and NA. MCF-10A cells were pretreated with or without NA (3, 100 nM) for 1 h, then exposed to 3 μM 4-OHE₂ or DMSO together with NA for 1 h (A). Cells were pretreated with or without NA (3 nM), clonidine (Clo) (2.5, 5 μM) (B), rauwolscine (Rau) (50, 500 nM) (C) for 1 h, then exposed to 3 μM 4-OHE₂ or DMSO together with each compound for 1 h. Values indicate mean ± SD (n = 4). Different alphabetical superscripts on the top of each column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ as evaluated by the *Tukey test*.

1-2-2-4 ノルアドレナリンと4-OHE₂による活性酸素の生成

これまでの結果より、NA と 4-OHE₂ 存在下における DNA 損傷 (γ -H2AX、 γ -H2AX) の増加は、 α_2 -AR と ATM を介していることが分かった。そこで、本節では、その作用機序の一端の解明を目指すために、活性酸素の生成に着目し検討を行った。さらに、NA 単独処理でも γ -H2AX および AP sites の生成が増加したことから、NA 単独処理による活性酸素の増加に関しても検証することにした。

Fig. 14 に NA と 4-OHE₂ 存在下、非存在下における活性酸素の生成と Fig. 15 に NA 単独処理による活性酸素の生成に及ぼす影響について結果を示した。何れの結果も、NA、4-OHE₂ あるいは溶媒 (DMSO) 添加 1 時間後の結果である。数値は、コントロールを 1 として算出した。

Fig. 14 に示したように、NA (3 μ M) と 4-OHE₂ (10 μ M) 存在下において、コントロール値 (1.0 ± 0.2) と比較すると活性酸素の生成が有意に増加した (1.9 ± 0.3 (1.9 倍))。さらに、NA と 4-OHE₂ 存在下で活性酸素の生成が AR を介しているのかを調べるために、 α_2 -AR アゴニストである clonidine を用いて検討した結果、活性酸素の生成に影響を及ぼすことはなかった (Fig. 14-A)。しかしながら、 β_2 -AR アゴニストである Isoproterenol (5、10 μ M) を作用させると、NA と 4-OHE₂ 存在下における活性酸素の生成の増加と同等レベルの増加が観察された (1.7 ± 0.2 (1.7 倍)、 2.3 ± 0.2 (2.3 倍)) (Fig. 14-A)。さらに、 α_2 -AR アンタゴニストである rauwolscine を作用させると、NA と 4-OHE₂ 存在下における活性酸素の生成の増加 (1.8 ± 0.1) に対する効果は、予想通り見られなかったが、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol (5、10 μ M) を作用させるとコントロールレベルまで活性酸素の生成の増加が有意に抑制されることが分かった (1.3 ± 0.2 (1.4 倍)、 1.2 ± 0.1 (1.5 倍)) (Fig. 14-B)。

これらの結果から、NA と 4-OHE₂ 存在下における活性酸素の生成の増加は、 α_2 ではなく、 β_2 -AR を介していることが分かった。

また興味深いことに、NA (0.1-10 μ M) の単独処理の場合、無処理群である α_2 (+)、 β_2 -AR (+) (Fig. 15-A)、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol を作用させた群 α_2 -AR (+)、 β_2 -AR (-) (Fig. 15-B)、 α_2 -AR アンタゴニストである rauwolscine を作用させた群 α_2 -AR (-)、 β_2 -AR (+) (Fig. 4-C) のどの処理群においても α_2 および β_2 -AR を介する NA による活性酸素生成増加は見られなかった (Fig. 15)。

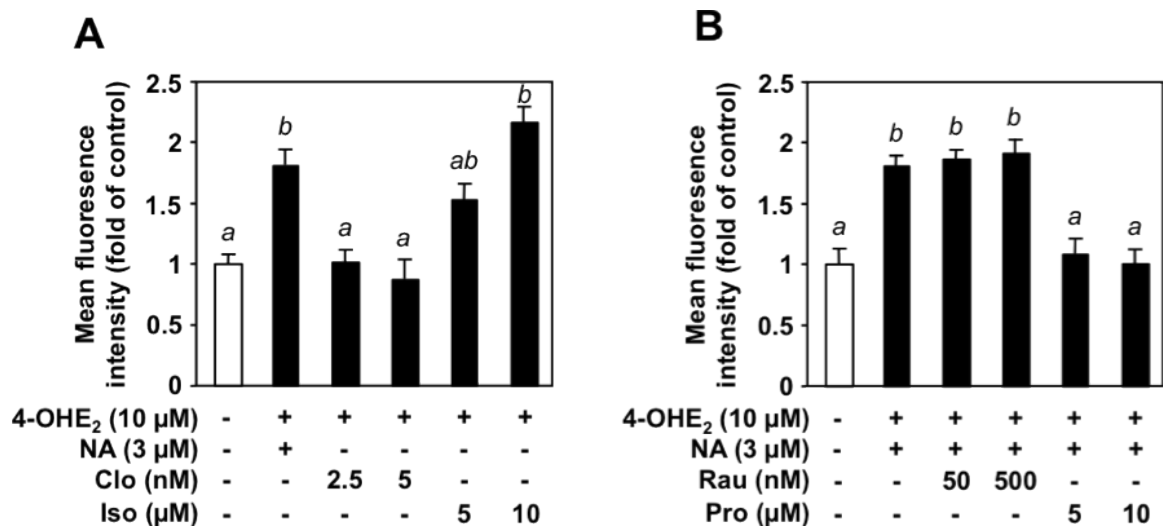


Fig. 14. Generation of ROS in MCF-10A cells treated with 4-OHE₂ and NA. MCF-10A cells were pretreated with NA (3 μM), clonidine (Clo) (2.5, 5 μM), or isoproterenol (Iso) (5, 10 μM) (A), rauwolscine (Rau) (50, 500 nM) or propranolol (Pro) (5, 10 μM) (B) for 1 h, then exposed to 10 μM 4-OHE₂ for 1 h. Values indicate mean ± SD (n = 5). Different alphabetical superscripts on the top of each column indicate statistically significant differences at p < 0.05 as evaluated by the *Tukey test*.

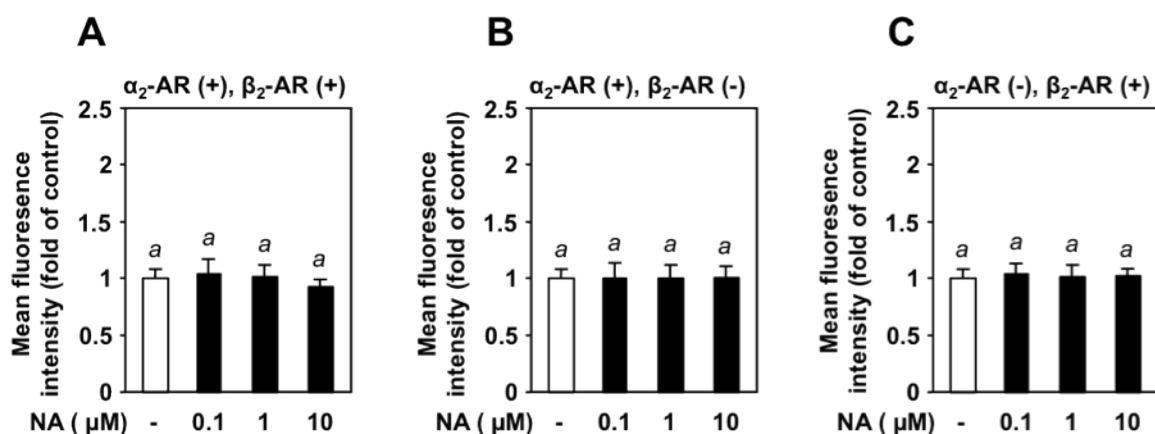


Fig. 15. Generation of ROS in MCF-10A cells treated with NA. MCF-10A cells were pretreated with NA (0.1, 1, 10 μM) (A) and rauwolscine (Rau) (500 nM) (B) or propranolol (Pro) (10 μM) (C) for 1 h. Values indicate mean ± SD (n = 5). Different alphabetical superscripts on the top of each column indicate statistically significant differences at p < 0.05 as evaluated by the *Tukey test*.

第3節 ノルアドレナリンと4-OHE₂によるDNA損傷誘発に対する ケルセチンおよびその代謝物の影響

1-3-1 実験方法

(1) 使用した細胞

1-2-1 と同様の細胞を用いた。

(2) 使用した試薬

- ・ 4-hydroxyestradiol (4-OHE₂) [Sigma-aldrich] # 128K1021

1-1-1 に準じて調製した。

- ・ ノルアドレナリン (Noradrenaline) [Sigma-aldrich] # 056K1167

1-2-1 に準じて調製した。

- ・ 0.12M percronic acid

60%過塩素酸 [和光純薬工業株式会社] # 166-00713

1-2-1 に準じて調製した。

- ・ Quercetin dihydrate (HPLC) [Extrasynthese, Genay, France] # 1135S

- ・ Quercetin-3-*O*-glucuronide (HPLC) [Extrasynthese] # 1127S

- ・ Isorhamnetin (HPLC) [Extrasynthese] # 1120S

上記の試薬は、Dimethyl sulfoxide (DMSO)で 10 mM に溶解し、使用まで冷凍保存した。

1-3-1-1 ヒストンH2AXのリン酸化の検出

1-1-1-1に準じて検出した。

(1) 細胞培養条件

60 mm dish に MCF-10A 細胞を 1×10^4 cells/dish で播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、2 日間培養した。5 日目に、終濃度 3、100 μ M の NA、ケルセチン、Q3G、イソラムネチン (0.1、1、10 μ M) を含む DMEM 培地に交換し、1 時間、前培養した。その後、NA を含む 3 μ M の 4-OHE₂ 存在下、非存在下における DMEM 培地に交換し 1 時間培養した。

1-3-1-2 AP sitesの生成

1-1-1-2に準じて測定した。

(1) 細胞培養条件

100 mm dishにMCF-10A細胞を 1×10^4 cells/dishで播種した。3日後に新しいDMEM培地に交換し、2日間培養した。5日目に、終濃度3-100 nMのNA、clonidine (0.5、2.5、5 μ M)、rauwolscine (5、50、500 nM)、isoproterenol (1、5、10 μ M)、propranolol (1、5、10 μ M)を含むDMEM培地に交換し、1時間、前培養した。その後、NAを含む3 μ Mの4-OHE₂存在下、非存在下におけるDMEM培地に交換し1時間培養した。

1-3-1-3 HPLC の分析

(1) 使用した試薬および機器

- ・ メタノール [液クロマトグラフィー用/和光純薬工業株式会社] # 132-06471
- ・ アセトニトリル [液クロマトグラフィー用和光純薬工業株式会社] # 015-08633
- ・ β -glucuronidase (13800 units) [和光純薬工業株式会社] # 070-04001
- ・ 0.5%トリフルオロ酢酸-メタノール (TFA-MeOH: Trifluoroacetic Acid-Metanol) [関東化学株式会社] # 40578-30
メタノールを用いて0.5%になるように調製した。
- ・ 0.01 M シュウ酸 (Oxalic Acid: OA) [和光純薬工業株式会社] # 155-0042
0.6 g 計りとり、超純水 500 mL に溶解した。
- ・ 50 mM リン酸バッファー (pH 5.0)
 - ・ リン酸二水素ナトリウム [和光純薬工業株式会社] # 192-02815
 - ・ リン酸水素二ナトリウム [和光純薬工業株式会社] # 196-02835上記の試薬調製は、バイオ試薬調製ポケットマニュアル (p.37) を参考にした。

(3) 使用した機器

- ・ HPLC-electrochemical detection (ECD) system [ESA Biosciences, Inc., Chelmsford, MA, USA] # Model 5600A Coul-Array System
- ・ デガッサー (GASTORR) [株式会社 Flom (フロム)] # Model No 153
- ・ ポンプ [ESA Biosciences, Inc] # Model No 582
- ・ カラムオーブン [ESA Biosciences, Inc] # Model No 70-4470T, CTO-0134

- ・ 検出器 [ESA Biosciences, Inc] # Model No 5600A, CA-767
- ・ C-18 OASIS HLB (10 mg) (抽出) [Waters Co., Milford, MA, USA]
- ・ ODS-C-18 (4.6 mm, D×250 mm; F/NE Chemicals) (カラム) [資生堂、東京]
- ・ エバポレーター (dry up 装置) [Taitec Co.] # VC-96N
- ・ ビーズ式細胞破碎装置 (Bead Smash 12) [和研薬株式会社] # BS-12R
- ・ ビーズ式細胞破碎装置サンプルチューブ [株式会社トミー精工 (TOMY)] # TM-625S
- ・ ビーズ (ジルコニア、サイズ: 5.0 φ) [株式会社トミー精工 (TOMY)] # ZB-50

(3) HPLC 分析条件

流速 0.1 mL/min、カラム温度 50°C、サンプル注入量 10 μL に設定し、溶媒 35% アセトニトリル、0.5% リン酸 (超純水 645 mL : アセトニトリル 350 mL : リン酸 5 mL)、電気化学的検出の電極を 150 mV (チャンネル 1)、200 mV (チャンネル 2) で実地分析を行った。

(4) 細胞培養条件

60 mm dish に MCF-10A 細胞を 1×10^4 cells/dish で播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、2 日間培養した。5 日目に、ケルセチン、Q3G (1 μM) を含む DMEM 培地に交換し、1 時間作用させた。その後、細胞を回収し HPLC を用いて分析を行った。

(5) サンプル抽出法

細胞を PBS (-) で 2 回洗浄後、セルスレーパーを用いて細胞を回収し、ビーズ式細胞破碎装置用サンプルチューブに入れた。その後、ビーズ式細胞破碎装置を用いて、細胞の破碎処理を行った (ビーズ式細胞破碎装置サンプルチューブにビーズ 2 個 : 4°C、3800 rpm 30 秒)。3000 rpm で 10 分間遠心し、上清を全回収した。

(6) 酵素反応処理

(5) で抽出した全量のサンプルに、50 mM リン酸バッファーを 500 μL と β-glucuronidase (13800 units) を 25 μL をエッペンチューブに入れ、良く混合し、37°C で 90 分間、インキュベートした。

(7) 固相抽出方法

(6) の酵素反応処理サンプルを、C-18 OASIS HLB を用いて固相抽出を行った。まず、C-18 カラムを平衡化させるために、0.5% トリフルオロ酢酸-メタノール (2 mL)

をカラムに通した。その後、カラムを慣らすため、0.01 M シュウ酸 (1-2 mL) を通す (※全量通さないように気を付ける)。まず、サンプル (1 mL) 通し→0.01 M シュウ酸 (1 mL) →0.5%トリフルオロ酢酸-メタノール (1 mL) →エバポレーターで dry up を行い、HPLC にて検出した (Fig. 16)。 (※同様のサンプルであれば、0.5%トリフルオロ酢酸-メタノール以降の手順の 0.01 M シュウ酸から行った)。尚、この方法は、Sakakibara らの方法を参考にした [57, 58]。

(8) 統計処理

平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した (n=5)。

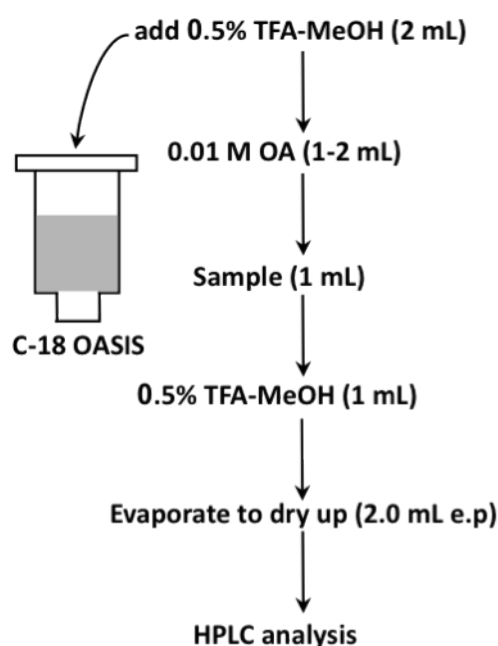


Fig. 16. Solid-phase extraction assay.

1-3-1-4 α_2 -アドレナリン受容体結合試験

(1) 使用した試薬

- [^3H]-noradrenaline hydrochloride (5-15 Ci mmol) [公益財団法人日本アイソトープ協会、東京、日本] # NET 048
- Ultima Gold XR (液体シンチレーター) [Perkin Elmer Inc., Melville, NY, USA] # PE-601311

(2) 使用した機器

- ・ バイアル (100 mL) [ESA Biosciences, Inc., USA] # 99-90161801
- ・ 液体シンチレーションカウンター検出器 [Beckman Coulter、東京、日本]
LS6500SE
- ・ 液体シンチレーションカウンター検出器 [日立アロカメディカル株式会社、水戸、日本] # LSC-5100
- ・ 細胞用インキュベーター [株式会社太陽パーソナル、三重、日本] # DX
- ・ 製氷機 [ホシザキ関東株式会社、東京、日本] # FM-120F-50
- ・ 乾燥機 [東京理科機械株式会社] # NDO-450D
- ・ 超音波発生装置 [株式会社トミー精工 (TOMY)] # CC-100
- ・ Kypplot [株式会社カイエンス、東京、日本] # version 5.00

(3) 細胞培養条件

10 mm dish に MCF-10A 細胞を 1×10^4 cells/dish で播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、2 日間培養した。その後、0.5%の DMEM 培地に交換し、48-72 時間培養後、 β_2 -AR をあらかじめ阻害するために propranolol (β_2 -AR アンタゴニスト) (10 μ M) を含む DMEM 培地中で 1 時間培養した。その後、ケルセチン、Q3G、NA (non labeled) をそれぞれ (10^{-10} - 10^{-4}) の終濃度で 1 時間前培養し、PBS (-) で細胞を洗浄後、 $[^3\text{H}]$ -NA (6 μ M) を含んだ DMEM 培地に交換し、30 分間培養させた。その後、cold PBS (-) で細胞を洗浄し、1×trypsin 250 μ L 添加後、氷上で細胞を回収し、液体シンチレーション用測定サンプルとした。

(4) 液体シンチレーションカウンター用測定サンプル

(1) で回収したサンプルをあらかじめ、液体シンチレーターを 2 mL 入れておいたバイアルに入れ混合した。その後、液体シンチレーションカウンターで 15 分間カウントし、測定した。

(5) 液体シンチレーションカウンター原理

トルエン、キシレンなどの溶媒にターフェニール、ポリフェニレン-オキシド等の発光物質の溶質を溶かし込んだシンチレーターに混合した試料からの放射線作用で、シンチレーターが発光し、放射線濃度を測定できる。

(6) データ処理

データシートの壊変率 (真の放射能) DPM (disintegration per minute) 値を用いて、コントロール値を 100% とし、受容体に対する結合度合いを Kypplot version 5.00

(Windows)を用いて、hill の計算式によりグラフ化した(下記に詳細な情報を示す)。
平均値 ±標準偏差 (SD) で示した (n=5)。

Problem	: Least Squares for $Y=F [X \cdot A]$
Model	: Drc_hill.fun
Formula	: $100-A1 / (1+A2x)^{A3}$

1-3-2 実験結果

1-3-2-1 ヒストン H2AX のリン酸化に対するケルセチンおよびその代謝物の影響

1-2-2-2で明らかにした、NAと4-OHE₂存在下、非存在下における γ -H2AXの誘導の増加に対する抑制効果を、たまねぎに多く含まれている食品成分のケルセチン、その代謝物であるQ3G、およびそのメチル化体であるイソラムネチンを用いて検討した。

Fig. 17にNAと4-OHE₂存在下における γ -H2AXの誘導の増加に対するケルセチンとその代謝物であるQ3G、メチル化体であるイソラムネチンによる抑制効果への影響について示した。何れの結果も、NA、4-OHE₂あるいは溶媒(DMSO)、quercetin、Q3G、イソラムネチン添加1時間後の結果である。なお、数値は、コントロールを1として算出した。

NA (3 nM) と 4-OHE₂ (3 μ M) をヒト乳腺細胞 MCF-10A に作用させると、コントロール値 (1.0 ± 0.2) と比較すると、有意に γ -H2AXの誘導が増加した (3.7 ± 0.4 (3.7倍))。この現象に対して、ケルセチン (0.1、1、10 μ M) を作用させると、NAと4-OHE₂存在下における γ -H2AXの誘導の増加に対して、濃度依存的に γ -H2AXの誘導を有意に抑制した (4.0 ± 1.8 , 2.1 ± 0.7 (1.76倍)、 2.0 ± 1.0 (1.85倍)) (Fig. 17-A)。同様に、Q3G (0.1、1、10 μ M) 作用させることによって、ケルセチンと同様にNAと4-OHE₂存在下における γ -H2AXの誘導の増加に対して (3.8 ± 0.4)、濃度依存的に γ -H2AXの誘導の増加を有意に抑制した (4.0 ± 0.7 , 2.4 ± 1.5 (1.58倍)、 2.3 ± 2.0 (1.65倍)) (Fig. 17-B)。しかしながら、イソラムネチン (0.1、1、10 μ M) 添加群では、NAと4-OHE₂存在下における γ -H2AXの誘導の増加 (3.8 ± 0.4) に対して、どの処理群においても影響を及ぼすことはなかった (Fig. 17-C)。

また、NA (100 μ M) 単独処理における γ -H2AXの誘導の増加に対するQ3Gの影響も検証したところ、Q3G (0.1、1、10 μ M) を作用させると、NA (100 nM) による γ -H2AXの誘導増加に対して (3.4 ± 0.3)、著しく抑制効果を示した (1.2 ± 0.2 (2.8倍)、 1.5 ± 0.2 (2.2倍)、 1.2 ± 0.3 (2.8倍)) (Fig. 17-D)。

これらの結果より、NAと4-OHE₂存在下、非存在下における γ -H2AXの誘導の増加に対して、ケルセチンおよびQ3Gが有意に抑制効果を示した。しかし、イソラムネチンは抑制効果を示さなかったことから、フラボノイド類の中でも、カテコール構造が重要であることが示唆された。

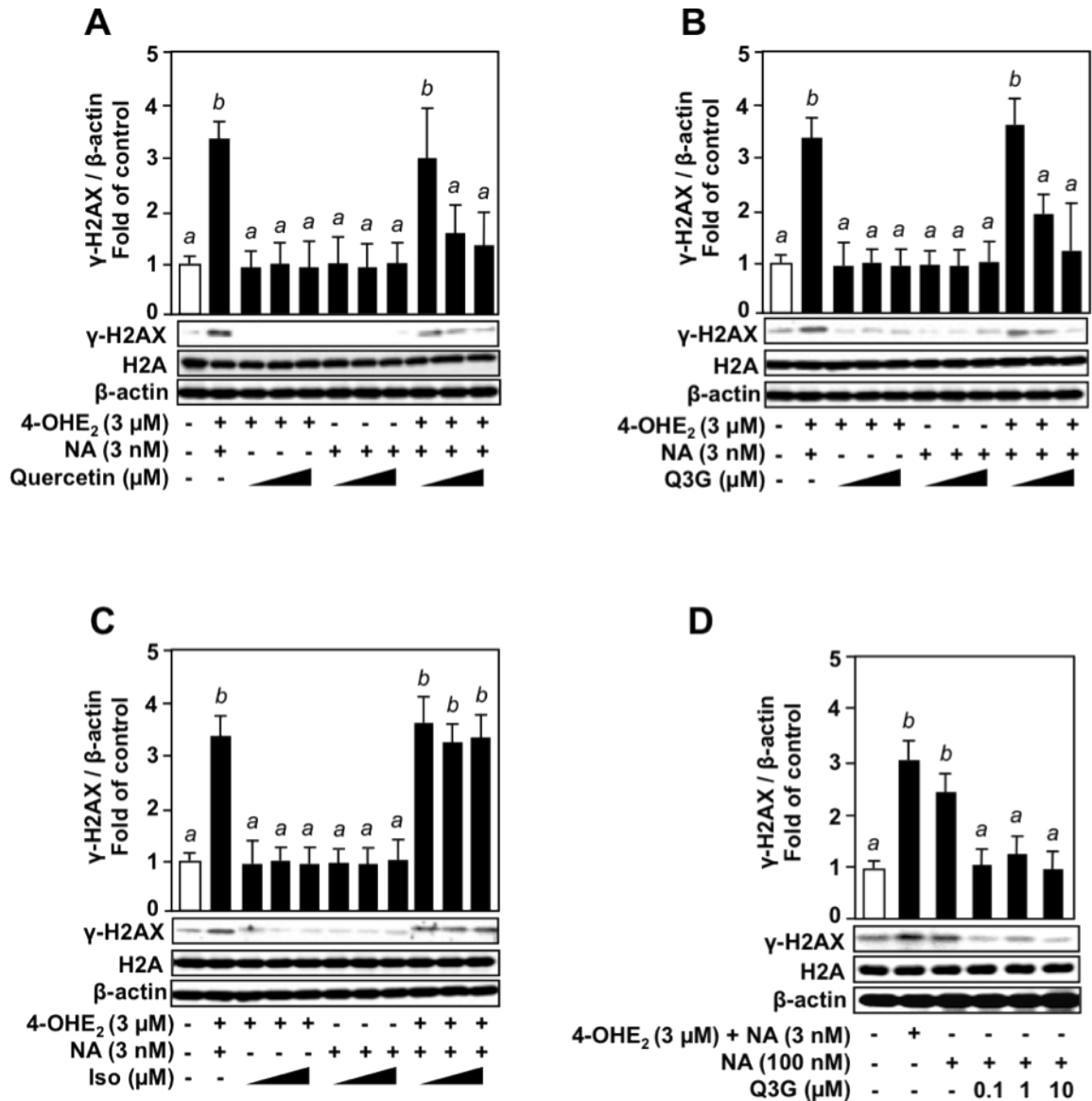


Fig. 17. Effects of quercetin and its metabolite, quercetin-3-*O*-glucuronide, on 4-OHE₂- and NA-induced γ -H2AX in MCF-10A cells. MCF-10A cells were pretreated with noradrenaline (NA; 3, 100 nM), quercetin (0.05, 0.1, 1 μ M) or quercetin-3-*O*-glucuronide (Q3G; 0.05, 0.1, 1 μ M), isorhamnetin (Iso; 0.05, 0.1, 1 μ M) for 1 h, and were then exposed to 3 μ M 4-OHE₂ or DMSO together with each compound for 1 h. Effects of quercetin or Q3G on 4-OHE₂- and NA-induced γ -H2AX (A, B, D) in MCF-10A cells. Values indicate mean \pm SD (n = 5). Closed triangle: 0.05, 0.1, 1 μ M. Different alphabetical superscripts on the top of each column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ as evaluated by the *Tukey test*.

1-3-2-2 AP sites生成に対するケルセチンおよびその代謝物の影響

1-2-2に、NAと4-OHE₂存在下、非存在下における γ -H2AXの誘導やAP sitesの生成増加を示した。そこで、本節では、NAと4-OHE₂存在下におけるAP sitesの生成の増加に対する、フラボノイド類であるケルセチンおよびQ3Gの抑制効果について検討を行った。

Fig. 18にNAと4-OHE₂存在下におけるAp sitesの生成増加に対するケルセチンとその代謝物であるQ3Gによる抑制効果について示した。何れの結果も、NA、4-OHE₂あるいは溶媒(DMSO)添加1時間後の結果である。NA(3 nM)と4-OHE₂(3 μ M)をヒト乳腺細胞MCF-10Aに作用させると、コントロール値(6.2 ± 0.5)と比較すると有意にAp sitesの生成が増加した(24 ± 1.3 (3.8倍))。さらに、NAと4-OHE₂存在下におけるAp sitesの生成の増加に対して、ケルセチン(0.05、0.1、1 μ M)を作用させると、濃度依存的にAP sitesの生成の増加が抑制された(22 ± 0.5 、 14 ± 0.4 (1.7倍)、 10 ± 0.4 (2.4倍))。Q3G(0.05、0.1、1 μ M)を作用させると、NAと4-OHE₂存在下におけるAp sitesの生成の増加に対して、濃度依存的に抑制が見られた(20 ± 0.3 (1.2倍)、 14 ± 0.3 (1.7倍)、 13 ± 0.3 (1.8倍))。

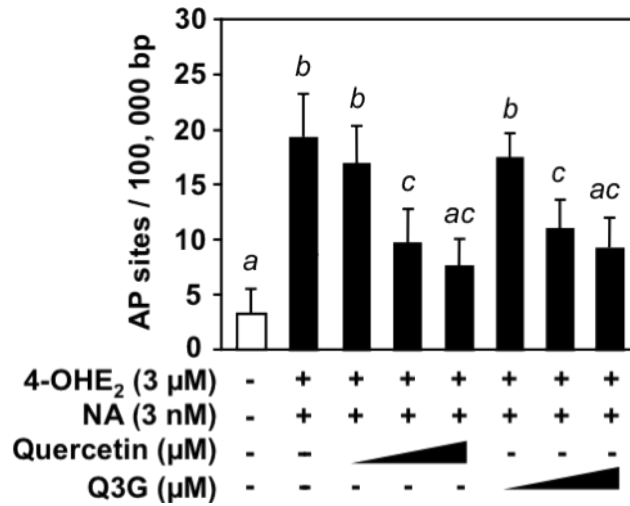


Fig. 18. Effects of quercetin and its metabolite, quercetin-3-*O*-glucuronide, on 4-OHE₂- and NA-induced AP sites in MCF-10A cells. MCF-10A cells were pretreated with noradrenaline (NA; 3 nM), quercetin (0.05, 0.1, 1 μM) or quercetin-3-*O*-glucuronide (Q3G; 0.05, 0.1, 1 μM) for 1 h, and then exposed to 3 μM 4-OHE₂ for 1 h. Values indicate mean ± SD (n = 5). Closed triangle: 0.05, 0.1, 1 μM. Different alphabetical superscripts on the top of each column indicate statistically significant differences at p < 0.05 as evaluated by the *Tukey test*.

1-3-2-3 ケルセチンおよびその代謝物の細胞内への取り込み

これまで、NA と 4-OHE₂ 存在下、非存在下における γ -H2AX の誘導や AP sites の生成の増加に対して、フラボノイド類である quercetin や Q3G によって効果を示した。これらの結果から、ケルセチンや Q3G は、細胞内あるいは細胞膜上で効果を発揮してしていることが考えられる。そこで、本節では、まず MCF-10A 細胞におけるケルセチンや Q3G の取り込み実験を HPLC(クーロアレイ)により分析を行った。

Fig. 20 にヒト乳腺細胞である MCF-10A におけるケルセチンと Q3G の細胞内取り込みへの影響について結果を示した。何れの結果も、ケルセチンと Q3G は、添加 1 時間後の結果である。

ケルセチンは、酵素 (β -glucuronidase) 処理 (-) (3.2 ± 0.6)、酵素処理 (+) (12 ± 2.1 (3.8 倍)) と酵素処理 (+, -) 関わらず細胞内に取り込まれていた。しかしながら、Q3G は、酵素処理 (+, -) どちらの処理群でも検出限界以下であった。これらの結果より、Fig. 17, 18 で示した NA と 4-OHE₂ による γ -H2AX のリン酸化と AP sites の生成増加に対するケルセチンおよび Q3G の抑制効果は、ケルセチンの場合は、細胞内および細胞膜上で効果を示している可能性が考えられ、Q3G については、細胞内ではなく細胞膜上で効果を示している可能性が示唆された。

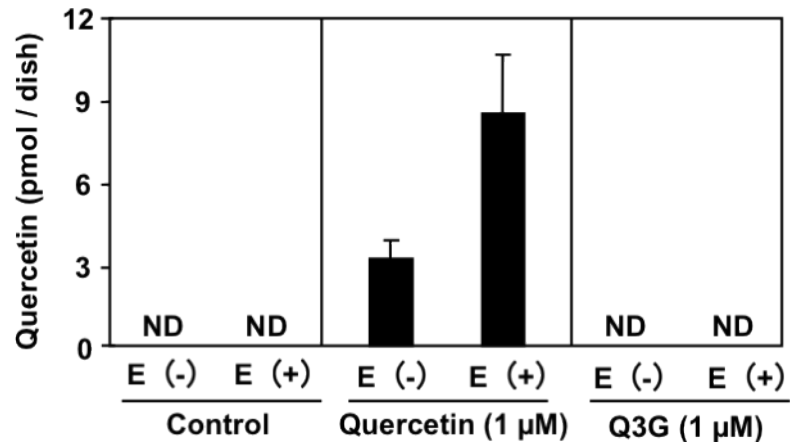


Fig. 19. Concentration of quercetin in the extract of MCF-10A cells treated with quercetin or Q3G. Cells were treated with 1μM quercetin or Q3G for 1 h. Values indicate means \pm SD (n = 5). Enzyme treatment (E): β -glucuronidase (+, -).

1-3-2-4 ノルアドレナリンの α_2 -アドレナリン受容体への結合に対する ケルセチンおよびその代謝物の阻害作用

1-3-2-3 の結果から、ヒト乳腺細胞である MCF-10A において、ケルセチンは細胞内に取り込まれていたが、Q3G は細胞内の濃度が検出限界以下であったことから細胞内に取り込まれていないことが示唆された。これらの結果から、ケルセチンは細胞内および細胞膜上どちらでも効果を示していることが予想される。しかしながら、Q3G は細胞内に取り込まれていないことから、細胞膜上で効果を示している可能性が考えられる。そこで、本節では、ヒト乳腺細胞 MCF-10A における、 α_2 -AR への NA の結合に対するケルセチンおよび Q3G の阻害効果を [3 H]-NA を用いて、結合試験を行った。

Fig. 20 に α_2 -AR への NA の結合に対するケルセチンおよび Q3G の阻害効果への影響について示した。尚、ヒト乳腺細胞である MCF-10A に発現していた β_2 -AR を、 β_2 -AR のアンタゴニストである propranolol で前処理を行ってあらかじめ阻害し、 α_2 -AR のみの発現で実験を行っている。

ポジティブコントロールである、non labeled の NA (10^{-10} - 10^{-4}) を作用させると、 α_2 -AR への [3 H]-NA の結合を濃度依存的に阻害することが分かった (100 ± 3.3 , 96.8 ± 3.3 , 99.8 ± 2.6 , 90.7 ± 5.8 , 74.0 ± 7.9 , 54.5 ± 3.5 , 42.9 ± 3.5 , 47.5 ± 2.6)。さらに、 α_2 -AR アンタゴニストである rauwolscine (10^{-10} - 10^{-4}) を作用させると、ポジティブコントロールである、non labeled の NA 処理群と比較すると、低濃度で、 α_2 -AR への [3 H]-NA の結合を阻害することが分かった (102 ± 6.9 , 103 ± 6.0 , 77.6 ± 4.2 , 69.1 ± 4.9 , 51.5 ± 0.5 , 57.3 ± 1.4 , 50.2 ± 3.7 , 45.9 ± 3.5)。

一方、フラボノイド類であるケルセチン (10^{-10} - 10^{-4}) を作用させると、 α_2 -AR アンタゴニストである rauwolscine ほどの阻害効果は見られなかったが、 α_2 -AR への [3 H]-NA の結合を濃度依存的に阻害することが分かった (96.7 ± 3.3 , 94.4 ± 3.3 , 95.3 ± 2.6 , 102.3 ± 4.9 , 97.5 ± 5.7 , 87.5 ± 4.3 , 74.9 ± 4.1 , 53.6 ± 2.2)。また、Q3G (10^{-10} - 10^{-4}) を作用させることで、こちらも、 α_2 -AR アンタゴニストである rauwolscine ほどの阻害効果は見られないものの、ケルセチンによる α_2 -AR への [3 H]-NA の結合阻害効果の度合いよりも、若干強い阻害効果を示すことが分かった (97.7 ± 3.3 , 100 ± 3.3 , 97.3 ± 2.6 , 99.3 ± 4.9 , 89.6 ± 5.7 , 70.5 ± 4.3 , 58.3 ± 4.1 , 51.6 ± 2.2)。

これらの結果より、フラボノイド類であるケルセチンおよび Q3G は、 α_2 -AR への NA の結合を阻害することが分かった。

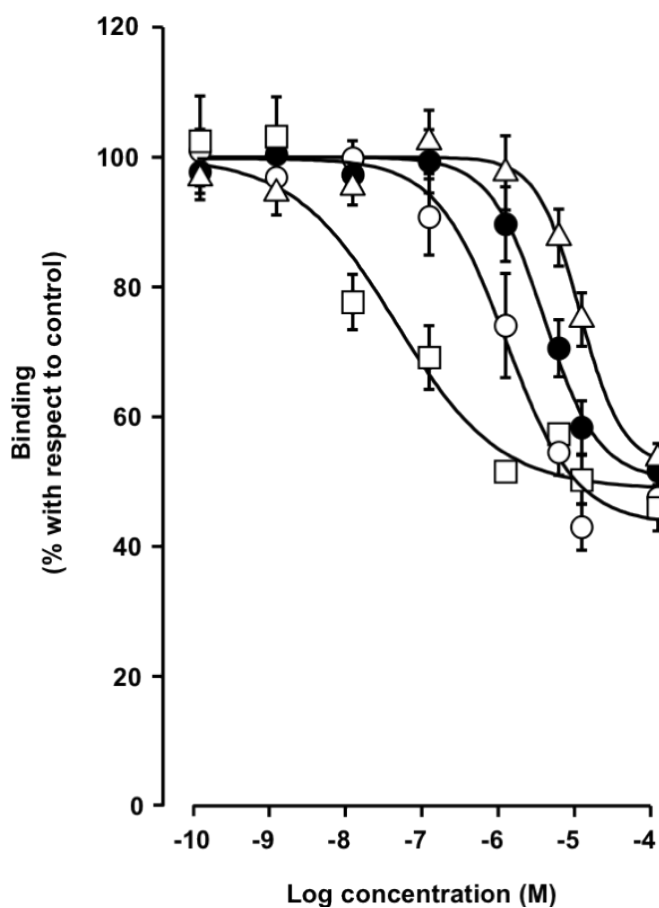


Fig. 20. Competition assay of the binding of [³H]-noradrenaline to α_2 -AR in MCF-10A cells. Competition analysis was performed in whole cells, as described in Material and methods, with a constant [³H]-noradrenaline concentration of 6 μ M in the presence of increasing concentrations of different compounds. MCF-10A cells were pre-treated with propranolol for 1 h and rauwolscine (□), unlabeled NA (○), quercetin (△) or Q3G (●) for next 1 h. Values indicate mean \pm SD (n = 5).

1-4 考察

本章では、乳がん進展プロセスで生成する DNA 損傷にまず注目し、DNA 損傷の高感度な指標とされているヒストン H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) の誘導および脱プリン反応や塩基除去修復時に生成する apurinic sites (Ap sites) について、ストレス負荷時に分泌が増加する NA が乳がんの重要なリスク因子である 4-OHE₂ 存在下、非存在下において DNA 損傷を誘発するかどうかその機序も含め検討した。さらに、フラボノイド類がその DNA 損傷に対して抑制効果を示すかどうか検討を行った。

第 1 節では、ヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いて、E₂ が CYP1A1 によって代謝されと生成するカテコールエストロゲンである 2-OHE₂ と 4-OHE₂ を用いて、 γ -H2AX の誘導および AP sites の生成について検討した。2-OHE₂ は COMT 存在下、非存在下に関わらず 12 時間後に γ -H2AX の誘導が増加することが分かった (Fig. 7-A, B)。しかしながら、4-OHE₂ は COMT 非存在下で 12 時間後に γ -H2AX の誘導が増加し (Fig. 7-C)、COMT 存在下では、1 時間後に γ -H2AX の誘導が増加した (Fig. 7-D)。12 時間後の 2-OHE₂ (COMT 阻害剤存在下、非存在下) および 4-OHE₂ (COMT 阻害剤非存在下) の γ -H2AX の誘導は、Fig. 7-E の DMSO でも同様に 12 時間後に γ -H2AX の誘導が増加した。おそらく細胞周期による影響ではないかと予想される。さらに、E₂ が、DNA 複製に応答し、 γ -H2AX を誘導することが示唆されている [59]。これらのことから、12 時間後の γ -H2AX の誘導は細胞周期に伴う反応であることが考えられる。この結果より、4-OHE₂ と COMT 阻害剤による 1 時間後の γ -H2AX の誘導に注目し、その作用機序について検討した。

一般的に γ -H2AX の誘導は、ATM、ATM および RAD3 関連 (ATR) を含む、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼファミリー (PI3K) のメンバー、および DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) が関与していることが報告されている [51]。そこで、ATM を介しているのかを ATM の阻害である KU-55933 を用いて検討したところ、4-OHE₂ と COMT 阻害剤存在下による γ -H2AX の誘導を有意に抑制したことから、ATM を介していることが分かった (Fig. 8)。また、活性酸素により生成する 8-OHdG などの DNA 損傷の塩基除去修復の過程で、また、E₂ のキノン体 (E₂-3,4Q) が DNA と反応し脱プリン反応により生成される AP sites について検討したところ、2-OHE₂ (COMT 阻害剤存在下、非存在下) および 4-OHE₂ (COMT 阻害剤非存在下) では、AP sites の生成は見られなかったが (Fig. 9-A, B, C)、4-OHE₂ と COMT 阻害剤存在下で、1 時間後に γ -H2AX の誘導同様、AP sites の生成が増加することが分かった (Fig. 7-D, 8-D) [60]。

以上の結果より、第 2 節以降からは、 γ -H2AX の誘導、AP sites の生成を DNA 損傷の指標として用いて、1 時間後の 4-OHE₂ による DNA 損傷に対する NA の影響に

ついて検討することにした。

第2節では、ヒト乳腺細胞 MCF-10A を用いて、NA と 4-OHE₂ による γ -H2AX の誘導を調べたところ、ストレス負荷時に血中で存在しうる NA (100 nM) 単独で有意に γ -H2AX の誘導が増加することが分かった (Fig. 12-C)。本結果より過度なストレスが負荷されると DNA 損傷が増加する可能性が考えられた。さらに、NA (3 nM) と 4-OHE₂ (3 μ M) の単独処理では、 γ -H2AX は誘導されなかったが、両者が同時に作用することで、 γ -H2AX が誘導されることが分かった (Fig. 12-C)。次に、NA と 4-OHE₂ による γ -H2AX の誘導が ATM を介しているかどうか確かめるために、ATM の阻害剤である KU-55933 を作用させたところ、NA と 4-OHE₂ による γ -H2AX の誘導が有意に阻害されたことから、NA と 4-OHE₂ による γ -H2AX の誘導は、ATM を介していることが分かった (Fig. 12-D)。NA の通常での血中濃度は、10 pmol/L とされており、ストレス負荷時では 100 nmol/L まで上昇することが知られている [1]。また、正常な乳腺組織での 4-OHE₂ の濃度は、 78.7 ± 49.5 fmol/mg とされており、悪性の乳がん組織中では、 1608.7 ± 466.8 fmol/mg と報告されている [22]。この報告から、4-OHE₂ の組織中の濃度は 0.1 μ M 程度と考えられる。Fig. 12-B の結果より、組織内濃度を考慮した 4-OHE₂ (0.1 μ M) と NA (3, 30, 100 nM) により濃度依存的に γ -H2AX が誘導されることが分かった。しかしながら、NA が 3 nM では、増加傾向はあったものの有意な増加ではなかったため、NA と 4-OHE₂ による γ -H2AX の誘導機序を明らかにするために、4-OHE₂ を 3 μ M に設定し以降実験を行うことにした。

一般的に、AR は、 $\alpha\beta\gamma$ の 3 量体 G タンパク質を介して、標的細胞を活性化し、生理応答を誘発させる情報伝達系の代表的な受容体である [4, 5]。NA が結合する AR は、 α_1 、 α_2 、 β_2 の 3 種類とされており、Vazquez らの報告では、ヒト乳腺細胞 MCF-10A では、 α_2 のサブタイプである、 α_{2B} 、 α_{2C} が発現していることが報告されている [61]。また、ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 では、 β_2 が発現していることが知られており [62]、乳がん患者からの組織マイクロアレイの免疫組織化学的分析結果から、 α および β_2 -AR が過剰に発現していることが報告されている [3]。従って、本研究で用いたヒト乳腺細胞 MCF-10A に、 α_{2B} 、 α_{2C} 、 β_2 -AR が発現しているのかを、リアルタイム PCR 法と Western blot 法を用いて検討したところ、我々が使用した MCF-10A では、 α_{2C} 、 β_2 -AR が有意に発現していることが分かった (Fig. 11)。なお、ヒト乳腺細胞 MCF-10A で、 β_2 -AR が発現している例はこれまでに報告例はない。MCF-10A に発現している AR を確認できたので、NA と 4-OHE₂ による γ -H2AX の誘導が、 α_2 および β_2 -AR のどちらを介している反応なのか確かめるために、 α_2 、 β_2 -AR アゴニスト (clonidine、isoproterenol) アンタゴニスト (rauwolscine、propranolol) を用いて検討したところ、clonidine 添加で有意に γ -H2AX の誘導が増加 (Fig. 12-G)

し、rauwolscine 添加で NA と 4-OHE₂ による γ -H2AX の誘導が抑制された (Fig. 12-H)。しかしながら、isoproterenol および propranolol は、影響を及ぼすことはなかった (Fig. 12-G, H)。これらの結果より、NA と 4-OHE₂ による γ -H2AX の誘導は、 α_2 -AR を介していることが分かった。さらに、AP sites について検討したところ、やはり、NA (100 nM) 単独で AP sites の生成が有意に増加することが分かった (Fig. 13-A)。さらに、NA (3 nM) と 4-OHE₂ (3 μ M) 共存下で NA 単独よりも AP sites が著しく増加し、この反応は、 α_2 -AR を介していることが分かった (Fig. 13-A, B)。Luthy らの報告から、4-OHE₂ は、 α_2 -AR に結合しないことが報告されている [63]。以上の結果より、NA は、 α_2 -AR を介して 4-OHE₂ 存在下で DNA 損傷を増加させることが分かった。

近年、活性酸素は、GPCR のトランスデューサーであると報告されている [64-67]。また、 β_2 -AR、アンジオテンシン II、エンドセリン-1 受容体を含む、GPCR スーパーファミリー等のアゴニスト作用は、細胞内活性酸素の増加につながることを示されている [64-67]。Moniri らの報告から、細胞内活性酸素がフラビンオキシダーゼによって生成され、G タンパク質依存カスケード (PKA、cAMP、プロテインキナーゼ A) を介した β_2 -AR シグナルリングが存在していることが示唆されている [66]。また、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol によって、ヒト胚性腎細胞における細胞内の活性酸素の生成が促進されることも報告されている [66]。しかしながら、 α_2 -AR を介して活性酸素が生成されるかどうか明らかではない。また、4-OHE₂ は CYP1B1 によりキノン体に代謝されるが、その際活性酸素を生成することが知られている [25]。そこで、NA と 4-OHE₂ による DNA 損傷増機序解明のため、活性酸素の生成に着目し検討を行った。Fig. 14 から、NA と 4-OHE₂ 共存下で有意に活性酸素の生成が増加した。この反応が、AR を介しているのか検討したところ、 α_2 -AR アゴニストおよびアンタゴニストでは影響は見られなかったが (Fig. 14-A, B)、興味深いことに、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol の添加で有意に活性酸素が増加し、アンタゴニストである propranolol 添加により、NA と 4-OHE₂ 共存下で活性酸素が顕著に減少したことから、NA と 4-OHE₂ による活性酸素の生成は、 β_2 -AR を介していることが分かり、 α_2 -AR を介する DNA 損傷の誘発機序は活性酸素ではない別のシグナルによることが推察された (Fig. 14-A, B)。

また、Vazquezらは、NA、Aによって、ヒト乳がん細胞であるMCF-7へのチミジンの取り込みを増加させることを報告し、 α_2 -ARアゴニストのclonidineは、細胞増殖に対する効果を有していることを明らかにした [61]。さらに、 α_2 -ARは、抑制性タンパク質Giと共役し、アデニル酸シクラーゼを抑制して細胞内cyclic AMP (cAMP) 濃度を低下させることが知られている [4, 5]。一方、CYCLIN B1は、G2期の有糸分裂の調整に関与しているタンパク質である。CYCLIN B1の役割は、G2からM期へ細胞を移

行することであり、CYCLIN B1の過剰発現は、cyclin依存性キナーゼに結合することにより、がん細胞の細胞増殖につながる可能性があることが報告されている [68]。さらに、マウスマクロファージ細胞において、cAMPの上昇は、G2期の進行を遅延させCYCLIN B1の発現が抑制されることが報告されている [67]。これらのことから、 α_2 -ARを介したcAMPの低下は、CYCLIN B1を増加させ、G2/M期に向かって細胞周期を進行させることが考えられる。以上のことから、MCF-10A細胞にNAと4-OHE₂を作用させると、NAが α_2 -ARを介して細胞増殖シグナルが刺激されることにより、MAPキナーゼおよびATMのリン酸化が活性化され、その結果、 γ -H2AXが誘導されるのではないかと考えられた。さらに、NAと4-OHE₂によりAP sitesが生成することから、NAによる α_2 -ARを介した細胞増殖シグナルは、DNA損傷時のミスマッチ修復の原因となる可能性が考えられるが、この機序の解明には、エピジェネティックス解析も含め、さらなる検討が必要である。

一方、日常生活で摂取しているフラボノイド類は、抗酸化作用など様々な機能性を有している [43]。特に、乳がんのリスクを減少させることが動物試験および疫学調査から示されている [33, 34]。また、Takemuraらの報告では、フラボノイド類が、エストロゲンによる発がんの化学的な防御に関与し得ることを示しており、メトキシフラボノイドはCYP1B1酵素の選択的な阻害剤であるとしている [34]。そこで、第3節では、NAと4-OHE₂共存下における α_2 -ARを介したDNA損傷の増加機序に対して、ケルセチン (Quercetin) と血中に検出される代謝物であるケルセチンの抱合体 (Quercetin-3-O-glucuronide: Q3G) による抑制効果について検討を行った。まず、NAと4-OHE₂による γ -H2AXの誘導に対するケルセチン、Q3Gおよびメチル化体であるイソラムネチン (Isorhamnetin) の影響を検討したところ、ケルセチン (Fig. 17-A) およびQ3G (Fig. 17-B) は0.1 μ Mで有意にNAと4-OHE₂による、 γ -H2AXの誘導を抑制した。さらに、NA単独による γ -H2AXの誘導もQ3G (0.1 μ M) が有意に抑制することが分かった (Fig. 17-D)。しかしながら、メチル化体であるイソラムネチンは、NAと4-OHE₂存在下による γ -H2AXの誘導に対して抑制効果を示さなかった (Fig. 17-C)。おそらく、NA単独による γ -H2AXの誘導に対しても効果を示さないと考えられ、これらの結果より、フラボノイド類の中でもカテコール構造が重要ではないかと予想される。

次に、NAと4-OHE₂によるAP sitesの生成に対するケルセチンおよびQ3Gの抑制効果について検討したところ、 γ -H2AXと同様、AP sitesもケルセチンおよびQ3G (0.1 μ M) により有意に抑制されることが分かった (Fig. 18)。フラボノイドの血中濃度は0.1-1 μ Mと報告されており [1]、本研究で効果を示した濃度は、血中で検出される濃度であることが分かる。次に、HPLC-ECDを用いて、ケルセチンおよびQ3GのMCF-10A細胞への取り込み実験を行ったところ、ケルセチンは取り込まれ

ていたが、Q3Gの細胞内濃度は検出限界以下であった (Fig. 19)。故に、Q3Gは、細胞膜上で効果を示している可能性が考えられるため、 $[^3\text{H}]\text{-NA}$ を用いて、Q3Gの $\alpha_2\text{-AR}$ に対する結合試験を行った。その結果、Q3Gは、 $[^3\text{H}]\text{-NA}$ の結合を阻害することがわかった (Fig. 20)。これらの結果から、Q3Gは $\alpha_2\text{-AR}$ へのNAの結合を阻害することによりDNA損傷を抑制することが分かった (Fig. 21)。

結論として、これらの結果は、我々の知る限りでは、フラボノイドの新しい機能性を示す最初の報告である。今までに、疫学調査や動物試験の結果から乳がんの予防因子としてイソフラボン類が報告されており、その作用機序として、エストロゲン受容体に作用してエストロゲンの作用を抑制することが明らかにされているが [34]、本章で示した結果は、ケルセチンやQ3Gが $\alpha_2\text{-AR}$ アンタゴニストとして作用することを示しており、ストレスにより促進する乳がんに対する化学予防因子として作用する可能性を示唆している。今後、Q3Gが *in vivo* においてもDNA損傷を阻害し、突然変異を抑制するか動物実験を用いたさらなる研究が必要であると考えられる。

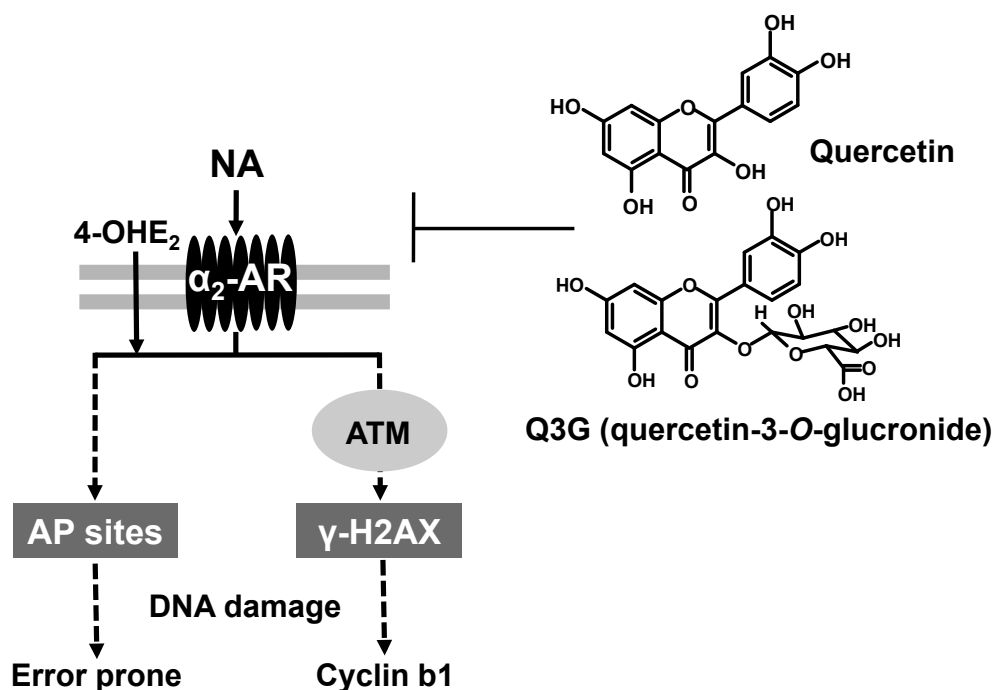


Fig. 21. Quercetin and Q3G may acts as an $\alpha_2\text{-AR}$ antagonist.

第 2 章

ヒト乳がん細胞の浸潤に対するノルアドレナリンの影響と **quercetin-3-O-glucronide** の抑制効果

本章は以下の論文に基づいています。

3. Yamazaki, S., Miyoshi, N., Kyuichi, K., Yasuda, M. and Shimoi, K.: Quercetin-3-O-glucronide inhibits noradrenaline-promoted invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells by blocking β_2 -adrenergic signaling. *Arch. Biochem. Biophys.*, **557**, 18-27, (2014).

序論

第1章で、がんの進展プロセス（イニシエーション、プロモーション、プログレッション）のイニシエーションの段階において誘導される DNA 損傷について検討を行った。

がんは、正常な細胞増殖の制御機構から逸脱し、もともとの性質をある程度残しながら、自律的な過剰増殖をする組織であり、この新生物が原発巣から連続的に周囲の正常組織に侵入して増殖する場合を浸潤（invasion）と呼び、原発巣から離れた部位に非連続的に同一の病変を発生させることを転移（metastasis）と呼ぶ [69] (Fig. 23)。多くのがんは、発生部位の上皮内に限局した増殖から始まり、この状態のがんは上皮内がんと呼ばれる。この上皮内がんが浸潤を獲得すると、隣接組織を侵し、転移する状態となる。がん細胞が浸潤をはじめる仕組みは、3段階（1. 細胞外基質との接触、2. 細胞外基質の分解、3. がん細胞移動）の順番で起こる [69]。これらには、がん細胞の形質変化と周囲の間質（がん微小環境）が深く関与していることが考えられている。

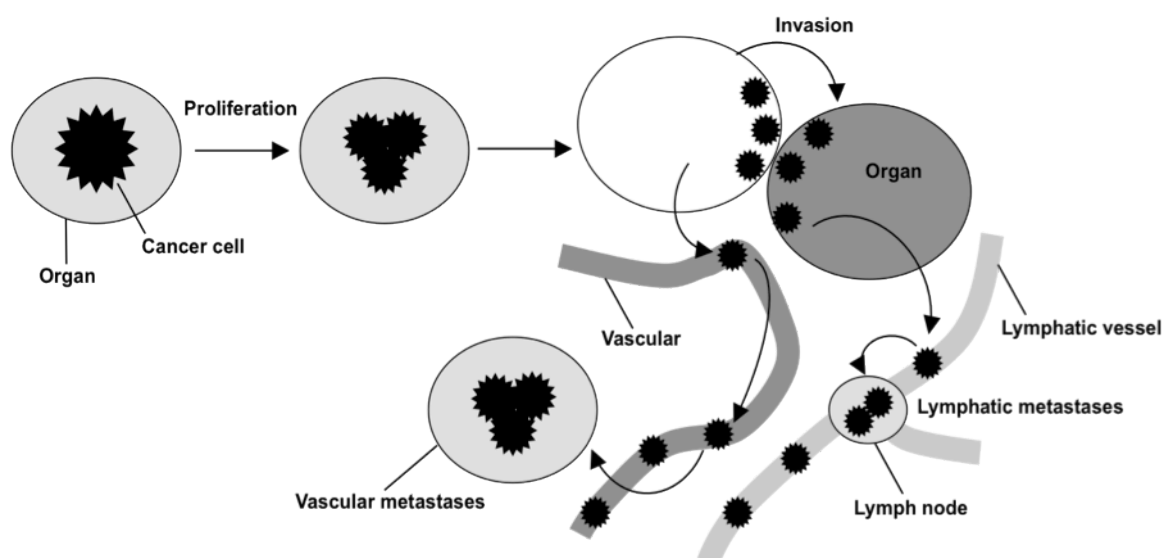


Fig. 22 Invasion and metastases.

がん細胞は、基底膜を溶解するタンパク質分解酵素を産生する。このような酵素には、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子やコラゲナーゼなどを含むマトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase: MMP）などがある。MMPは、活性中心に亜鉛を結合する金属要求性エンドペプチダーゼで、ヒトでは23種同定されており、細胞外に分泌される可溶型と細胞膜上に結合している膜型に分類さ

れる (Table. 1)。

Table. 2. MMP 種類

可溶型 MMP	ストロメリシン (Stromelysins) …MMP3, MMP10, MMP11, MMP18 コラゲナーゼ (Collagenases) …MMP1, MMP8, MMP13 ゼラチナーゼ (Gelatinases) …MMP2, MMP9 エナメリシン (Enamelysins) MMP20, MMP23, MMP28
膜型 MMP	MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24, MMP25

がんの浸潤を促進する MMP1 と MMP13、ゼラチナーゼ活性 (基底成分の 5 型コラーゲンやラミンの分解活性) をもつ MMP2 および MMP9、両方の活性を持つ MMP14 (膜型 MMP: MT-1MMP) が知られている。これらのタンパク質分解酵素は、がん細胞自身から分泌される一方、がん細胞周囲の間質細胞中のマクロファージ、肥満細胞や繊維芽細胞からも分泌される [69]。実際、MMP9 の発現は、原発腫瘍の転移能と正の相関があるばかりでなく、浸潤のマクロファージや繊維芽細胞でも発現している [70]。基底膜を破壊した細胞は、結合組織内を移動する。細胞の運動を誘導する運動促進性シグナルに反応して、細胞が動く分子機構は非常に複雑であり、アクチン骨格の再構築や細胞外基質の分解・接着の協調作用によるものと考えられている。細胞は運動しようとする方向に細胞質を伸ばし、プロテアーゼを利用し、細胞外基質を分解し、細胞外基質と新たな細胞接着斑を構築しながら細胞を移動させる [71]。がん細胞は基底膜を破壊する前、多孔性の基底膜を透過する血管新生因子などを分泌し、血管やリンパ管の新生を促進させている [72]。この結果、間質内に浸潤したがん細胞は容易に毛細血管と接触でき、栄養源と酸素を入手することができる。がん細胞自身の浸潤能で、これら脈管の内腔へ移動する。このような脈管侵入により、血行性転移やリンパ行性転移が可能であり、遠隔臓器の転移には、これらのほかに、播種性転移、経管性転移や接触性転移などの経路もある [73]。

近年、興味深いことに、 β -AR 拮抗薬の投与を受けていた患者に乳がんの死亡リスクが減少することが報告されている [12]。 β -AR は、促進性 G タンパク質 GS と共役し、生じた GSa-GTP 複合体がアデニル酸シクラーゼを活性化し、増加した cAMP により活性化された A キナーゼ (PKA) が種々のタンパク質をリン酸化して生理作用を引き起こす [5]。卵巣由来がん細胞において、NA は、 β_2 -AR を介し MMP を分泌してがん細胞の浸潤を促進することが報告されている [74]。しかしながら、現在までに、乳がん細胞を用いて NA による影響を検討した報告例はない。

そこで、本章では、ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞を用いて、NA の浸潤に対する影響とその作用機序を調べ、それに対する Q3G の抑制効果について検討した。

なお、第 1 章の結果から、ケルセチンは細胞内もしくは細胞膜上、Q3G は細胞膜上で効果を示している可能性が考えられた。従って、本章ではケルセチンの抱合体である Q3G に着目して実験を行った。

2-1-1 実験方法

(1) 使用した細胞

- ・ MDA-MB-231 (mammary gland, epithelial breast adenocarcinoma) # HTB-26 (51 歳) ATCC (American Type Culture Collection) にて購入した。

(2) 培地用試薬

- ・ Leibovitz/L-15 (DMEM) (Invitrogen) # 11415-064 500 mL
- ・ 10% (vol/vol) fetal bovine serum FBS [Invitrogen] # 172012 50 mL
- 100 × penicillin/streptomycin [Invitrogen] # 15140 5 mL

(2)の培地の組成は、ATCC の培養方法に従った。

(3) 継代培養条件

クリーンベンチ内で使用する器具類は、すべて使用前に滅菌した。細胞を継代する時は、DMEM 培地を吸引除去後、37°Cに温めた PBS (-) 5 mL で一度洗浄した。2 mL/cm² の 1×trypsin/EDTA を添加し、インキュベーター内で 2 分静置した。その後、剥離した細胞を回収し、速やかに遠心分離 (1000 rpm×10 分) することで、trypsin を除去した。新しい DMEM 培地に再懸濁後、トリパンブルーで染色した細胞を血球計算版 [株式会社エルマ] でカウントし、あらかじめ培地を入れておいた dish 内に 1×10⁴ cells/cm² で細胞を播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、その 2 日後に細胞はサブコンフルエントに達した。インキュベーター [フナコシ株式会社] 内の条件は、温度 37°C、湿度 100%、100% Air (※MCF-7、MCF-10A 細胞と異なるので注意)。

(4) 試薬調製

- ・ リン酸緩衝生理食塩水粉末 (PBS (-): 0.01mol/L PH 7.2-7.4) [和光純薬工業株式会社] # 162-19321
100g の粉末 (1 袋) に対して 1L の超純水液で溶解し、オートクレーブで滅菌処理後、実験に用いた。

- ・ 1×Trypsin/EDTA

1-1-1に準じて調製した。

- ・ ノルアドレナリン (Noradrenaline) [Sigma, USA] # 056K1167

1-2-1に準じて調製した。

- 0.12M peracetic acid
1-2-1に準じて調製した。
- Quercetin-3-*O*-glucuronide (HPLC) [Extrasynthese, Genay, France] # 1127S
1-3-1に準じて調製した。
- L-(-)-isoproterenol hydrochloride (β_2 -adrenergic receptor agonist) [MP Biomedicals, LLC, Japan] # 6536B
- Propranolol hydrochloride (β_2 -adrenergic receptor antagonist) [Tocris Bioscience] # 0624
1-2-1 に準じて調製した。

2-1-1-1 β_2 -アドレナリン受容体の発現

1-2-1-1 に準じて検出した。

(1) 細胞培養条件

60 mm dish に MDA-MB-231 細胞を 1×10^4 cells/dish で播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、2 日間培養した。その後、細胞を回収した。

(2) 統計処理

遺伝子発現量の変化は、各サンプルのターゲット遺伝子 Ct 値-内在性コントロール (GAPDH) Ct 値 (dCt) の値で補正し、それぞれを平均値で示した。GAPDH を 1 として、それぞれのターゲット遺伝子の発現量を求めグラフ化した。数値は、平均値±標準偏差 (SD) で示した (n=5)。Pharmaco Analyst II (ヒューマンライフ社) を用いて多重検定 (*Tukey test*) を行って比較した。

2-1-1-2 フローサイトメトリーを用いた活性酸素の測定

1-2-1-4 準じて行った。

2-1-1-3 *HMOX1*、*MMP2*、*MMP9*の遺伝子発現

1-2-1-1に準じて行った。

(1) 使用した試薬

- H-89 (PKAの阻害剤) [Tocris Bioscience, Boston, MA] # 130964-39-5
- SR11302 (AP-1 (DNA binding)の阻害剤) [Tocris Bioscience, Boston, MA]

160162-42-5

- Tanshinone IIA (NF-kB阻害剤) [Tocris Bioscience, Boston, MA] # 568-72-9
- SB203580 (p38 α , p38-MAPK阻害剤) [和光順薬工業株式会社] # 199-16551

(2) 細胞培養条件

60 mm dish に MDA-MB-231 細胞を 1×10^4 cells/dish で播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、2 日間培養した。その後、阻害剤 (H-89 (0.1、1、10 μ M)、SR11302 (0.01、0.1、1 μ M)、Tanshinone IIA (10、30、50 μ M)、SB203580 (1、5、10 μ M) を含む DMEM 培地に交換し、1 時間作用させた後、NA (1 μ M)、Q3G (0.1 μ M) を含む DMEM 培地に交換し 12 時間培養した。

(3) 使用したプライマー

今回使用したターゲット遺伝子 Taq Man プライマー・プローブを Table.1 に示した。プライマー・プローブは、Applied Biosystems 社の Taq Man Gene expression Assay を利用してターゲット遺伝子別のプライマー・プローブセットを購入した。

Assay ID	Gene name	Amplicon Length
Hs01110251_m1	<i>HMOX1</i>	130
Hs01548727_m1	<i>MMP2</i>	65
Hs00234579_m1	<i>MMP9</i>	54

Table. 3. Primer probe of target genes assayed by quantitative RT-PCR.

(4) データの解析

測定した各サンプルのターゲット遺伝子の Ct 値と内在性コントロール (GAPDH) の Ct 値の平均値と標準偏差を算出する。ターゲット遺伝子 Ct 値-内在性コントロール Ct 値を ΔC_T 値 (dC_T) とする。次に、基準とするサンプル群の ΔC_T 値から引き、その値を $\Delta \Delta C_T$ 値 (ddC_T) とする。(基準としたサンプル群の $\Delta \Delta C_T$ 値は 0 になる)。 $\Delta \Delta C_T$ 値は、サイクル数の差となるので、そこからさらに $2^{\Delta \Delta C_T}$ ($\Delta \Delta C_T$) を算出するので、相対値を求めることができる (基準としたサンプル群の相対値は 1 となる)。

(5) 統計処理

遺伝子発現量の変化は、各サンプルのターゲット遺伝子 Ct 値-内在性コントロール (GAPDH) Ct 値 (dCt) の値で補正し、それぞれを平均値で示した。そして、コントロールとの相対値でグラフ化した。数値は、平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した ($n=5$)。Pharmaco Analyst II (ヒューマンライフ社) を用いて多重検定 (*Tukey test*) を行って

比較した。

2-1-1-4 cAMP の測定

cAMP の測定は、Cyclic AMP EIA kit [Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA] # 581001 を用いて、添付のプロトコールに従って、サンプルを調製した。その後、マイクロプレート (Varioskan) [Thermo Fisher Scientific Inc] を用いて、波長 405 nm-420 nm における吸光度で細胞中の cAMP を測定した。

(1) cAMP の測定原理

使用したキットでは、アセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase: AChE) で標識した cAMP との競合 ELA により比色法 (412 nm) で cAMP を定量する。

(2) 細胞培養条件

10 mm dish に MDA-MB-231 細胞を 1×10^4 cells/dish で播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、2 日間培養した。その後、NA (1 μ M)、isoproterenol (β_2 -AR アゴニスト) (5、10 μ M)、propranolol (β_2 -AR アンタゴニスト) (5 μ M)、Q3G (0.1 μ M) を含む DMEM 培地に交換し、24 時間培養した。その後、サンプルの調製は、kit のプロトコールに従った。

(3) 統計処理

グラフは、平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した (n=5)。Pharmaco Analyst II (ヒューマンライフ社) を用いて多重検定 (Tukey test) を行って比較した。

2-1-1-5 Ras の測定

Ras の測定は、Ras Activation Assay Biochem Kit™ [Cytoskeleton, Inc] # BK008-S を用いて、添付のプロトコールに従って、サンプルを調製した。その後、western blot 法を用いて、活性化 Ras を検出した。

(1) Ras の測定原理

使用したキットでは、各低分子量 G タンパク質 (Ras) に対するエフェクター分子 (Raf1) の相互作用ドメイン (Raf1-RBD) がビーズ上にコートされており、試料中の活性型低分子量 (Ras) をプルダウン法 (ビーズを遠心し活性型低分子量を沈殿させる) により回収し、ビーズに結合した活性型低分子量を SDS で溶出し Western

blot 法にて検出する。

(2) 細胞培養条件

60 mm dish に MDA-MB-231 細胞を 1×10^4 cells/dish で播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、2 日間培養した。その後、NA ($1 \mu\text{M}$)、Q3G ($0.1 \mu\text{M}$) を含む DMEM 培地に交換し、1 時間培養した。その後、サンプルの調製および測定方法は、kit のプロトコールに従った。

(3) 使用した試薬

・ 一次抗体

anti-Pan Ras antibody (kit 中の抗体) # AESA02

Actin (1-19) [Santa Cruz] # sc-1616

・ 二次抗体

Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody [Cell Signaling] # 7076

Bovine anti-goat IgG-HRP [Santa Cruz] # sc-2350

(4) 使用した機器

- ・ PVDF メンブレン [GE healthcare] # RPN2020F

(5) SDS サンプルの作成

計算したデータを元に、各試料中のタンパク質濃度を $100 \mu\text{g/mL}$ となるように Cell Lysis Buffer (kit 中のものを使用した) を用いて調製した後、サンプルと SDS sample Buffer を 1:3 の割合になるように混合した。このとき、泳動用ゲルへの添加量が $10 \mu\text{L}$ 前後となるように Cell Lysis buffer で調製した。その後、アルミブロック恒温槽 (EYELA MG-2300) を用いて 95°C で 5 分間加熱することで還元処理した。

(6) 電気泳動

作成した 12% (kit のプロトコールに従って行った) のゲルを電気泳動槽 [アトー株式会社] にセットし、電気泳動用 Buffer (kit のプロトコールに従い調製) で満たした。還元処理をしたサンプルすべてをゲルにアプライし、ゲル 1 枚あたり 20 mA の低電流で約 60 分間電気泳動を行った。

- ・ 分離ゲル (Separating gel)、濃縮ゲル (Stacking gel) を以下の通りに混合し、ゲルを作製し使用した。以下の組成は共にゲル 2 枚分の量である。

(分離ゲル)

	12%
超純水	7.0 mL
A 液	7.2 mL
B 液	4.3 mL
10% SDS	173 μ L
TEMED	9.6 μ L
APS	67 μ L

(濃縮ゲル)

超純水	3.5 mL
A 液	0.9 mL
C 液	1.5 mL
10%SDS	60 μ L
TEMED	10 μ L
APS	18 μ L

A 液: 30%アクリルアミド
B 液: 1.5M Tris HCl pH 8.8
C 液: 0.5M Tris HCl pH 6.8

(7) 一次抗体

ブロッキング終了後、TBS-T (kit のプロトコールに従い調製したもの) で 15、10、5 分間と 3 回振とうさせながら洗浄した。その間に、一次抗体を Dilution Buffer で下記の倍率で希釈した。

抗体希釈液 (約 1.5 mL) をメンブレンに添加し、4°Cで一晩 (あるいは室温で 3 時間) インキュベートした。

(8) 二次抗体

一次抗体反応後、TBS-T (kit のプロトコールに従い調製したもの) で 15、10、5 分間と 3 回振とうさせながら洗浄し、一次抗体液を除いた。二次抗体は下記の通り一次抗体を作成した動物の免疫グロブリンに対する二次抗体を用いた。尚、Ras の抗体希釈率は、kit のプロトコールに従って行った。

一次抗体	抗体希釈率	二次抗体免疫動物	抗体希釈率
Ras	1:250	mouse	1:20000
β -actin	1:500	Goat	1:2000

(9) メンブレンの化学発光 (ECL Plus)

二次抗体反応終了後、TBS-T (kit 中のプロトコールに従い調製したもの) で 15、10、5 分間、3 回振とう洗浄し、二次抗体を除いた。1 mL の A 液に対し 25 μ L の B

液で混ぜ合わせ、二次抗体洗浄後のメンブレンに添加し 5 分間反応させた。反応後、化学発光撮影出力装置 (Light-Capture II、Zoom Lens)、Cooled CCD Camera System (-30°C) [アトー株式会社] # Type AE-6981 を使用し適当な時間で撮影を行った。

(10) 数値化と統計処理

CS Analyzer ver 3.0 [アトー株式会社] により Western blot の結果を数値化した。 β -actin で補正したそれぞれの試料中の Ras の発現量は、コントロール (溶媒対象群) の発現量を 1 としたときの比率で表記した (平均値 \pm 標準偏差、n=5)。Pharmaco Analyst II (ヒューマンライフ社) を用いて多重検定 (*Tukey test*) を行った。

2-1-1-6 ERK1/2、p38 のリン酸化の検出

(1) 細胞培養条件

60 mm dish に MDA-MB-231 細胞を 1×10^4 cells/dish で播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、2 日間培養した。その後、NA (1、10 μ M)、isoproterenol (β_2 -AR アゴニスト) (10 μ M)、propranolol (β_2 -AR アンタゴニスト) (5 μ M)、Q3G (0.1 μ M) を含む DMEM 培地に交換し、10 分 (p38)、1 時間 (ERK1/2) 培養した。

(2) 使用した試薬

・一次抗体

p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) [Cell Signaling] # 9101S

p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody [Cell Signaling] # 9102

phosphor-p38 (Thr180/Tyr182) [Cell Signaling] # 4511

p38 Antibody [Cell Signaling] # 9212

Actin (1-19) [Santa Cruz] # sc-1616

・二次抗体

Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody [Cell Signaling] # 7074

Bovine anti-goat IgG-HRP [Santa Cruz] # sc-2350

(3) 一次抗体

ブロッキング終了後、TBS-T 中で 15、10、5 分間と 3 回振とうさせながら洗浄した。その間に、一次抗体を Dilution Buffer で下記の倍率で希釈した。

抗体希釈液 (約 1.5 mL) をメンブレンに添加し、4°C で一晩 (あるいは室温で 3

時間) インキュベートした。

(4) 二次抗体

一次抗体反応後、TBS-T 中で 15、10、5 分間と 3 回振とうさせながら洗浄し一次抗体液を除いた。二次抗体は下記の通り一次抗体を作成した動物の免疫グロブリンに対する二次抗体を用いた。

一次抗体	抗体希釈率	二次抗体免疫動物	抗体希釈率
p44/42 MAPK	1:500	Rabbit	1:2000
p44/42 MAPK Antibody	1:500	Rabbit	1:2000
Phosphor-p38	1:500	Rabbit	1:2000
p38 Antibody	1:500	Rabbit	1:2000
β -actin	1:500	Goat	1:2000

(5) 数値化と統計処理

CS Analyzer ver 3.0 [アトー株式会社] により Western blot の結果を数値化した。 β -actin で補正したそれぞれの試料中の ERK1/2 のリン酸化は、コントロール (溶媒対象群) の発現量を 1 としたときの比率で表記した (平均値 \pm 標準偏差、n=5)。Pharmaco Analyst II (ヒューマンライフ社) を用いて多重検定 (Tukey test) を行った。

2-1-1-7 浸潤の測定

(1) 細胞培養条件

100 mm dish に MDA-MB-231 細胞を 1×10^4 cells/dish で播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、5 日間培養した。

(2) 浸潤の測定

Kit 専用の 96 well plate を 10 分間室温にあらかじめ置いた。さらに、温めておいた無血清 DMEM 培地を、内部のコンパートメント (専用 plate) に加え、細胞培地の基底膜層を再水和させ、室温で 1 時間置いた。(1) でサブコンフルエント状態になった細胞を、trypsin 処理を行い、 2.0×10^6 cells/mL の細胞懸濁液 (無血清培地) に調製した。320 μ L の細胞懸濁液に直接、NA (0.003、0.1、1、10 nM)、isoproterenol (5、10 μ M)、propranolol (5、10 μ M)、Q3G (0.1、1、10 μ M) をそれぞれの濃度になるように 1.6 μ L (懸濁液 320 μ L に対して 200 \times の 1.6 μ L) 加え、24 時間培養した。そ

の後は、CytoSelect™ 96-Well Cell Invasion assay Kit [Cell Biolabs, Inc] # CBA-112 のプロトコールに従った。

(3) Invasion assay Kit の原理

CytoSelect™ 96-Well Cell Invasion assay Kit は、96-well plate に、ポリカーボネート膜インサート (8 mm) が付属している。インサート膜の上層には、乾燥した基底膜マトリックス溶液が、均一にコートされている。この基底膜層は、非浸潤細胞から、浸潤細胞を分けて隔てる役割をしている。浸潤細胞は、層のマトリックスタンパク質を分解し、最終的には、ポリカーボネート層膜を通過する。その後、浸潤細胞を膜から分離し、蛍光色素である CyQuant GR Dye で検出する。

(4) 吸光度測定

マイクロプレートリーダー (Varcioskan) [Thermo Fisher Scientific, Inc] にて、波長 480 nm における吸光度を測定した (参照波長: 520 nm)。

(5) 統計処理

平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した (n=5)。Pharmaco Analyst II (ヒューマンライフ社) を用いて多重検定 (*Tukey test*) を行って比較した。

2-1-1-8 pro-MMP-2、pro-MMP-9 の Gelatin zymography による検出

本法は、培地上清を SDS-PAGE で分離した後、ゲル内に共存する MMP の基質 (gelatin) と反応させることで、MMP の存在する部位が青色の背景に白く抜けたバンドとして観察される。MMP の基質特異性を考慮し、ゲルに混入させる基質を変えることで、検討したい MMP も変更することが可能である。すなわち、MMP-1 や 2、9 などは gelatin を、MMP-3 や 7 などは casein を用いる。

本法は感度が高く、Western blot と異なり培地上清をそのまま用いれば活性測定が可能であるが、定量性には乏しい。また、活性型だけでなく pro 型もバンドとして観察される。これは、MMP の endogenous inhibitor である TIMP が SDS により pro 型 MMP-9 から解離するためである。しかし、本法は western blot で得られた結果と比較し、考察する上で重要である。

通常の SDS-PAGE と異なる点は、1.) 泳動は低温室で行う、2.) サンプル buffer にはβ-メルカプトエタノールは添加しない、3.) サンプルは加熱しない、の 3 点である。いずれも酵素活性を保持させるために重要である。本法は、福井県立大学、生物資源部機能食品学分野、川畑球一先生のプロトコールに従って行った。

(1) 細胞培養条件

60 mm dish に MDA-MB-231 細胞を 1×10^4 cells/dish で播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、2 日間培養した。その後、NA (1, 10 μ M)、propranolol (β_2 -アドレナリン受容体アンタゴニスト) (5, 10 μ M)、Q3G (0.1 μ M) を含む DMEM 培地に交換し、1 時間培養した。

(2) サンプルの回収

培地 (1 mL 前後) をエッペンチューブに回収し、6000 rpm、3 分遠心した。上清を別のエッペンチューブに移し、サンプルとした。

(3) タンパク定量

1-1-1 に準じて行った。

(4) SDS サンプルの作成

計算したデータを元に、各試料中のタンパク質濃度を 45 μ g/mL となるように Cell Lysis Buffer を用いて調製した後、サンプルと SDS sample Buffer を 1:3 の割合になるように混合した。このとき、泳動用ゲルへの添加量が 10 μ L 前後となるように Cell Lysis buffer あるいは超純水で調製した。

(3) 使用した試薬

- ・ 分子量マーカー (Precision Plus, ProteinTM Dual Color Standards) [Bio RAD, USA] # 161-0374
- ・ MMP マーカー [コスモ・バイオ株式会社、東京] # AK38
- ・ 50 mg/mL ヘパリン (Heparin) [試薬特級/和光純薬株式会社] # 085-00134
上記の試薬ヘパリン 5 mg を超純水に 1 mL に溶解した (使用前に調製)。
- ・ アジ化ナトリウム (Sodium Azide) [試薬特級/和光純薬株式会社] # 195-11092
- ・ 塩化亜鉛 (Zinc Chloride) [試薬特級/和光純薬株式会社] # 263-00271]
- ・ Trizma base [Sigma-aldrich] # T6066-1KG
- ・ TRITON -X100 (t-Octylphencxypoly-ethooxyethaol) [Sigma-aldrich] # T-9284 500 m
- ・ 塩化カルシウム [試薬特級/和光純薬株式会社] # 039-00475
- ・ Incubation buffer (酵素反応用試薬) およびゲル洗浄用 buffer の調製方法
 1. Trizma base (6.057 g)、塩化カルシウム (555 mg)、アジ化ナトリウム (20 mM)、を超純水に 400 mL で溶解し、pH 7.5 に調製後、500 mL にメスアップした。

2. 半分に分け、一方は 500 mL にメスアップし、incubation buffer として室温で保管 (50 mM Trizma base/5 mM 塩化ナトリウム/1 μ M 塩化亜鉛/0.02%アジカナトリウム)
3. もう一方には、TRITON -X100 (12.5 mL) /超純水 (237.5 mL) を添加し良く攪拌し、ゲル洗浄用 buffer として室温で保管 (50 mM Trizma base/5 mM 塩化ナトリウム/1 μ M 塩化亜鉛/0.02%アジカナトリウム/2.5% TRITON -X100)

- Comassie Brilliant Blue (CBB) (クーマシーブリリアントブルー) 染色液
メタノール [高速液体クロマトグラフィー用/特級/和光純薬工業株式会社]
132-06471

酢酸 (Acetic Casis) [関東化学株式会社] # 01021-03

コマジーブリリアントブルー-R-250 (Coomassie Brilliant Blue: CBB) [電気泳動用特製試薬/ナカライ株式会社、京都] # 09408-52

上記の試薬、メタノール 100 mL、酢酸 20 mL、超純水 100 mL およびブリリアントブルー-550 mg を混合し、4°Cで保存した。

- 脱色液

メタノール [高速液体クロマトグラフィー用/特級/和光純薬工業株式会社]

132-06471

ギ酸 (Formic acid) [特級/関東化学株式会社] # 16064-00

上記の試薬、メタノール 150 mL、超純水 345 mL およびギ酸 5 mL を混合し、室温で保管した。

- 2×sample buffer の作製

125 mM Tris-HCl (pH 6.8) 25 mL

10% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) [生化学用/和光純薬工業株式会社] 40 mL

191-07145

0.2% Glycerol [特級/和光純薬工業株式会社] # 56-81-5 20 mL

ブロモフェノールブルー (Bromophenol blue) [特級/和光純薬工業株式会社] # 021-02911 10 mg

(6) 使用した機器

- 遠心機 [Eppendorf、東京] # Centrifuge 5417R
- Recipro Shaker (シェイカー) [日信工業株式会社、長野、日本] # NA-20
- スラブ型 EP ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 [アトー株式会社] # AE-6500

- ・ マイクロプレートリーダー (Varioskan) [Thermo Fisher Scientific Inc] # 525-0040
- ・ ホットスターラー (strirrer/Hot plate) [東レ・ダウコーニング、東京] # PC-420
- ・ スキャナー [EPSON、東京、日本] # GT-9700F

(7) 電気泳動用ゲル作製試薬と作製方法

Acrylamide [電気泳動用/和光純薬工業株式会社] # 011-08015

Ammonium persulfate (APS) [Sigma-aldrich] # A3678-100G

N, N-Methylene-bis (BIS) (acrylamide) [電気泳動用/和光純薬工業株式会社]
138-06032

Tetramethyl ethylenediamine (TEMED) [鹿特級/関東化学株式会社] # A3678-100G
3 mg/mL ゼラチン (Gelatin from porcine skin) [Sigma-aldrich] # G1890-100G

- ・ 30%アクリルアミド (A 液)

Acrylamide [電気泳動用/和光純薬工業株式会社] # 011-08015 14.6 g

N, N-Methylene-bis (BIS) (acrylamide) [電気泳動用/和光純薬工業株式会社] 0.4 g

138-06032

1-1-1-1 に準じて調製した。

- ・ 1.5M Tris HCl pH 8.8 (B 液)

Trizma base [Sigma-aldrich] # T6066-1KG 9.09g

1-1-1-1 に準じて調製した。

- ・ 0.5M Tris HCl pH 6.8 (C 液)

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (ドデシル硫酸ナトリウム) [生化学用
和光純薬工業株式会社] # 191-07145 3.03g

1-1-1-1 に準じて調製した。

- ・ 3 mg/mL ゼラチン

上記の試薬ゼラチン 600 mg を 0.02%アジ化ナトリウム/超純水 200 mL に加温 (ホットプレートスターラー使用) しながら溶解した。4°Cで保管した。

- ・ 10% APS

Ammonium persulfate for electrophoresis (APS) [Sigma-aldrich] 0.1g

A3678-100G

1-1-1-1 に準じて調製した。

- 分離ゲル (Separating gel)、濃縮ゲル (Stacking gel) を以下の通りに混合し、ゲルを作製した。以下の組成は共にゲル 2 枚分の分量である。

(分離ゲル)

	10%
超純水	1.34 mL
A 液	6.66 mL
B 液	5.0 mL
gelatin 溶液	4 mL
0.5 % TEMED	3 mL
10% APS	150 μ L

(濃縮ゲル)

超純水	4.5 mL
A 液	1.5 mL
C 液	2.5 mL
0.5 % TEMED	1.5 mL
10% APS	75 μ L

A 液: 30%アクリルアミド

B 液: 1.5M Tris HCl pH 8.8

C 液: 0.5M Tris HCl pH 6.8

- 電気泳動用バッファー

Trizma base [Sigma-aldrich] # T6066-1KG 3 g

Glycine [特級/和光純薬工業株式会社] # 077-00735 14.4 g

Sodium Dodecyl Sulfate [生化学用/和光純薬工業株式会社] # 191-07145 1 g

1-1-1-1 に準じて調製した。

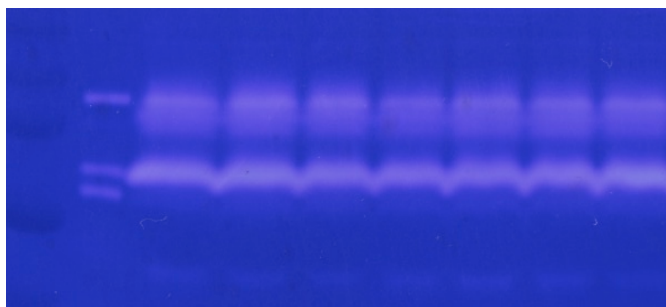
(8) 電気泳動 (低温室で行った)

- 泳動槽 buffer (1x conc.) を 300 mL 作製し、低温室にて冷却しておいた。
- 基質溶液を 37°C 水浴中にて、溶液が透明になるまで保温した (5-10 分間)。
- 0.6 mg/mL gelatin (1 mg/mL casein) /10% acrylamide gel を作製。以下の割合で 0.5%TEMED まで混合した。
- 分離ゲルに 10%APS を加え、ゲル板に流しこみ (6 cm)、50%EtOH 400 μ L を重層した。
- 分子量マーカー (Precion Plus, ProteinTM Dual Color Standards) [Bio RAD] # 161-0374、MMP マーカー [コスモ・バイオ株式会社] # AK38 をそれぞれ 10 μ L アプライした。

6. 分離ゲルが固まったら 100%エタノールを丁寧に洗い流した。
7. 濃縮ゲルに 10%APS を加えてゲル板に流しこみ、コームを差し込んだ。
8. ゲル板を泳動装置にセッティングし、サンプルとともに低温室に運んだ。
9. サンプルをアプライし（細胞培養液は、最高 18 μ L）泳動した。
10. 青いラインがゲル下端直前まできたところで泳動を止め、ゲルを切った。

(9) 酵素反応と検出

1. ゲルを洗浄用 buffer 30 mL (+ 120 μ L Heparin (50 mg/mL)) に浸し、室温で 1 時間浸透させ、ゲル中の SDS を除去した。
2. Incubation buffer 5 mL で 2 回洗浄した（捨てる・入れる \times 2）。
3. Incubation buffer 30 mL に交換し、37°C 水浴中にて 24 時間インキュベートした（酵素反応）。
4. CBB 染色液に浸し、30 分間染色した後、オーバーナイトで脱色した（様子を見ながら）。下記に CBB 染色後の結果を示した。
5. スキャナーで取り込み、解析した。



CBB 染色後の結果 (Fig. 29)

(10) データ解析

CS Analyzer ver 3.0 [アトー株式会社] により Gelatin zymography の結果のバンドを白、バックを黒色に変換した。

2-1-1-9 β_2 -アドレナリン受容体結合試験

1-3-1-4 に準じて行った。

(1) 細胞培養条件

10 mm dish に MDA-MB-231 細胞を 1×10^4 cells/dish で播種した。3 日後に新しい DMEM 培地に交換し、2 日間培養した。その後、0.5% FBS の DMEM 培地に交換し、48-72 時間培養後、 $[^3\text{H}]\text{-NA}$ (6 μ M) を含んだ DMEM 培地に、propranolol (β_2 -AR ア

ンタゴニスト)、Q3G、NA (non labeled) をそれぞれ (10^{-10} - 10^{-4}) の濃度で、30 分間培養した。その後、cold PBS (-) 5 mL にて洗浄後、1×trypsin 250 μ L 添加後、氷上で細胞を回収し、液体シンチレーションサンプルとした。

2-1-2 実験結果

2-1-2-1 MDA-MB-231 細胞における β_2 -アドレナリン受容体の発現

本章で用いたヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 に β_2 -AR の発現について検討した。

Fig. 24 にヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 の AR の発現への影響について示した。なお、リアルタイム PCR 法の結果の数値は、内在性コントロールである GAPDH を 1 として算出している。

Fig. 23-Aでは、リアルタイムPCRを用いてmRNAレベルで検討を行った結果、 β_2 -AR が発現していることを確認した (0.6 ± 0.2) (GAPDHに対して (0.98 ± 0.045))。さらに、Western blot法を用いてタンパク質レベルでも調べた結果、リアルタイムPCRと同様の結果で、 β_2 -ARが発現していることを再確認できた (Fig. 23-B)。しかしながら、第1章の1-3、4節で行った、 α_{2B} 、 α_{2C} -ARは、発現していないことが分かった (data not shown)。

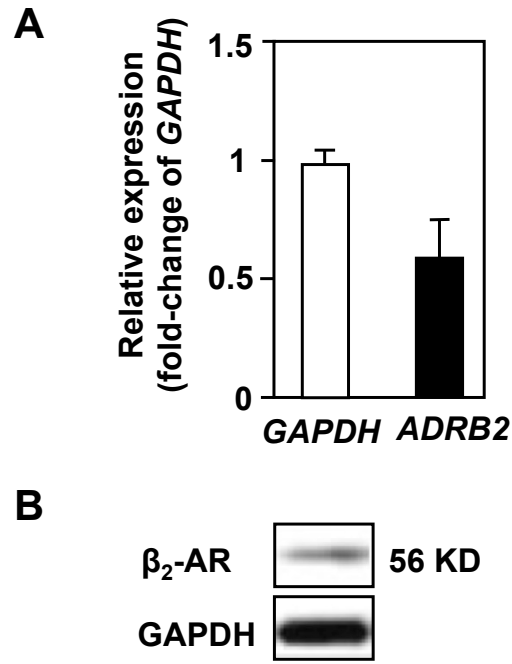


Fig. 23. Analysis of β_2 -AR expression in MDA-MB-231 human breast cancer cells. (A) qRT-PCR analysis of *ADRB2* (β_2 -AR) mRNA expression. **(B)** Western blotting analysis of β_2 -AR protein expression. Values indicate mean \pm SD (n = 5).

2-1-2-2 ノルアドレナリンによる β_2 -AR を介した活性酸素の生成

第1章では、乳がんの進展プロセスである、DNA 損傷に着目して検討を行ってきた。本節からは、がんの転移に重要なプロセスの1つである浸潤に注目し、NA による浸潤への影響と Q3G による抑制効果について、ヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 を用いて検討を行った。そこで、本節では NA による浸潤促進作用機序の一端を解明するために、まず浸潤に深く関与している活性酸素の生成をフローサイトメトリー法により検討した。さらに、本節では A による活性酸素の生成への影響についても検討した。

Fig. 24 に NA および A による活性酸素の生成の増加への影響について示した。

まず、Fig. 24-A の結果からは、NA (0.1、1、10 μM) をヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 に作用させると、コントロール値 (1.0 ± 0.1) と比較して濃度依存的に活性酸素が有意に増加した (1.1 ± 0.2 (0.9 倍)、 1.8 ± 0.6 (1.8 倍)、 1.8 ± 0.1 (1.8 倍))。

次に、NA による活性酸素の増加が β_2 -AR を介しているのか確かめるために、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol (5、10 μM) を作用させたところ、NA と同様に活性酸素の生成が有意に増加した (1.7 ± 0.3 (1.7 倍)、 2.0 ± 0.1 (2.0 倍))。さらに、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol (5、10 μM) を作用させると、NA (1 μM) による活性酸素の増加に対して、顕著に抑制された (1.4 ± 0.3 (1.3 倍)、 1.1 ± 0.4 (1.6 倍))。また、propranolol (5、10 μM) 単独処理においては活性酸素の生成に影響は見られなかった。

これらの結果より、NA は β_2 -AR を介して、活性酸素の生成を増加させることが分かった (Fig. 28-A)。

A (0.001、0.1、1 μM) を作用させると、コントロール値 (1.0 ± 0.2) と比較して 1 μM の A で活性酸素が著しく増加した (1.6 ± 0.2 (1.6 倍)) (Fig. 24-B)。さらに、propranolol (β_2 -AR アンタゴニスト) (5 μM) を作用させると、A (1 μM) による活性酸素の生成は顕著に抑制された (1.1 ± 0.2 (1.5 倍))。これらの結果より A も β_2 -AR 介して、活性酸素の生成を増加させることが分かった。また、propranolol (5 μM) 単独処理においては活性酸素の生成に影響は見られなかった。

以上の結果より、NA および A は β_2 -AR を介して活性酸素の生成を増加させることが分かった。

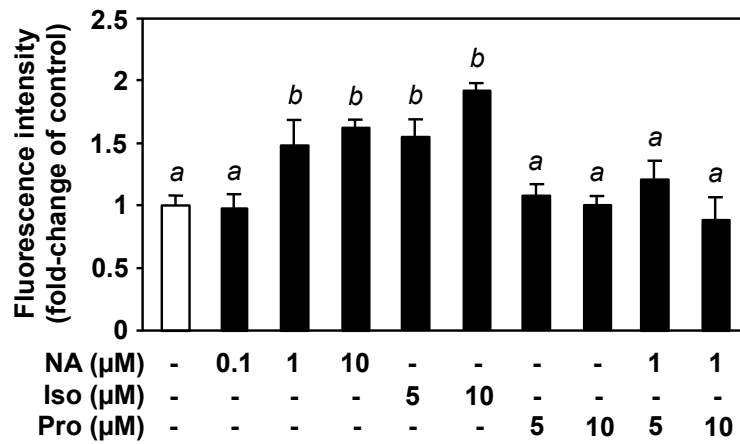
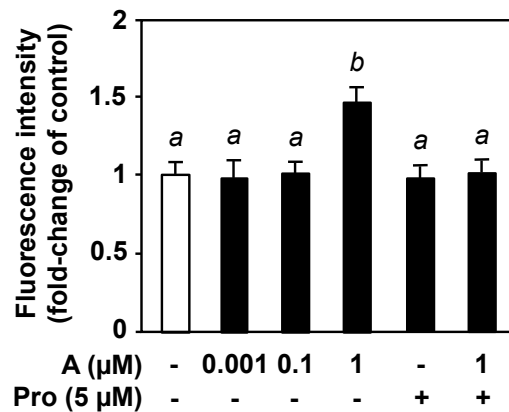
A**B**

Fig. 24. Generation of ROS in MDA-MB-231 cells treated with catecholamines, isoproterenol and propranolol. Cells were treated with isoproterenol (Iso; 0, 5, 10 μM), or propranolol (Pro; 0, 5, 10 μM) in the absence or presence of NA (0, 0.1, 1, 10 μM) (A), or A (0, 0.001, 0.1, 1 μM) (B) for 1 h. The fluorescence intensity of intracellular DCF was determined by flow cytometry. Values indicate mean ± SD (n=5) as fold-changes of the control. Superscripts at the top of each column indicate statistically significant differences at p<0.05 as evaluated by the *Tukey test*.

2-1-2-3 ノルアドレナリンによる活性酸素の生成に対する quercetin-3-O-glucronide の抑制効果

2-1-2-2の結果から、NAおよびAは β_2 -ARを介して、ヒト乳がん細胞MDA-MB-231細胞の活性酸素の生成を増加させた。そこで、本節ではフラボノイド類であるQ3Gによる抑制効果についてヒト乳がん細胞であるMDA-MB-231を用いて検討を行った。尚、数値は、コントロールを1として算出した。

Fig. 25にNAおよびAによる β_2 -ARを介した活性酸素の生成の増加に対するQ3Gの抑制効果について示した。まず、Fig. 25-AからNA (1 μ M)をヒト乳がん細胞であるMDA-MB-231に作用させると、コントロール値 (1.0 \pm 0.1)と比較して活性酸素が有意に増加した1.7 \pm 0.4 (1.7倍)。また、A (1 μ M)をヒト乳がん細胞であるMDA-MB-231に作用させると、コントロール値 (1.0 \pm 0.1)と比較して活性酸素が有意に増加した1.7 \pm 0.3 (1.7倍) (Fig. 25-B)。

次に、NAおよびAによる活性酸素の生成の増加に対するQ3Gの効果を検討した結果、NA (1 μ M)による活性酸素の生成の増加 (1.7 \pm 0.4)に対して、Q3G (0.01、0.05、0.1、1 μ M)を作用させると濃度依存的に有意に抑制された ((1.7 \pm 0.3 (1.0倍))、(1.5 \pm 0.2 (1.1倍))、(1.0 \pm 0.2 (1.7倍))、(1.0 \pm 0.2 (1.7倍)) (Fig. 29-A)。さらに、A (1 μ M)による活性酸素の増加 (1.7 \pm 0.3)に対しても、Q3G (0.1 μ M)を作用することにより濃度依存的に顕著に抑制された ((1.5 \pm 0.2 (1.1倍))、(1.4 \pm 0.2 (1.2倍))、(1.2 \pm 0.2 (1.4倍))、(1.0 \pm 0.2) (1.7倍) (Fig. 25-B)。

一方、Q3G (0.01、0.05、0.1、1 μ M)単独処理群では活性酸素の生成増加は見られなかった (Fig. 25-A and B)。

以上の結果より、NAは β_2 -ARを介して活性酸素の生成を増加させ、それがQ3Gにより抑制されることが分かった。さらに、NAによる β_2 -ARを介した浸潤促進作用には、活性酸素の増加が関与している可能性が考えられた。

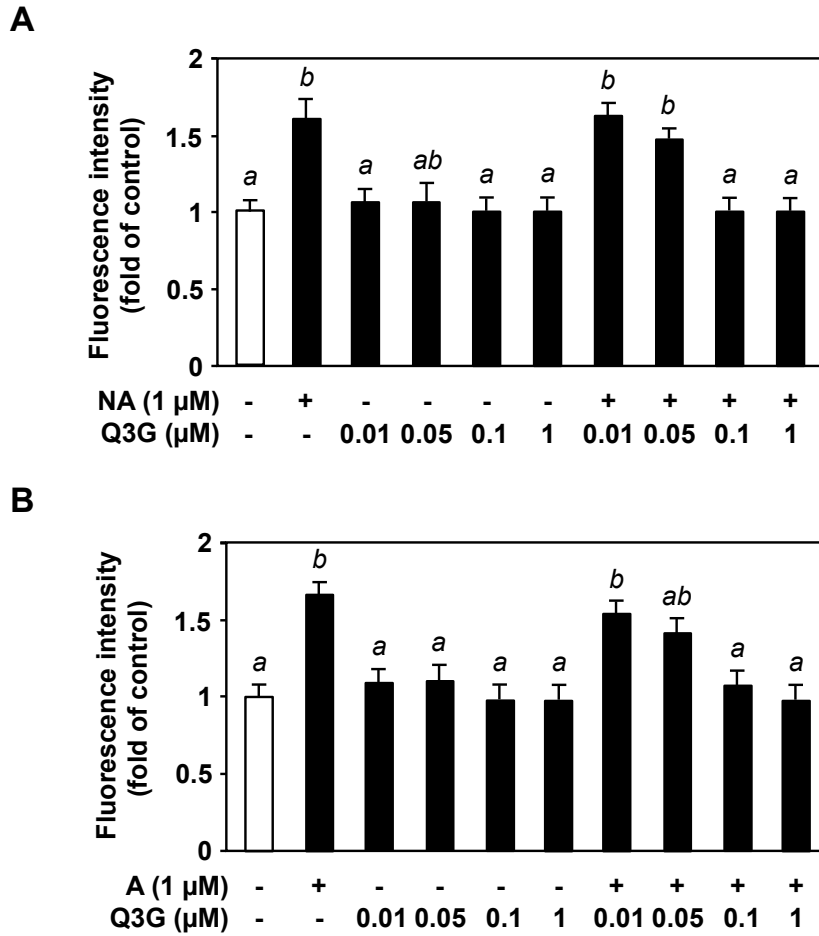


Fig. 25. Downregulation of catecholamine-induced intracellular ROS generation by Q3G treatment in MDA-MB-231 cells. Cells were treated with Q3G (0, 0.01, 0.05, 0.1, 1 μM), NA (0, 1 μM) (A), or A (0, 1 μM) (B) for 1 h. The fluorescence intensity of intracellular DCF was determined by flow cytometry. Values indicate mean \pm SD ($n = 5$) as fold-changes of the control. Superscripts at the top of each column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ as evaluated by the *Tukey test*.

2-1-2-4 ノルアドレナリンによる β_2 -アドレナリン受容体を介した *HMOX1*、*MMP2* および *MMP9* の遺伝子発現量に対する quercetin-3-*O*-glucuronide の抑制効果

本節では、NA による mRNA レベルでの活性酸素の生成により発現してくる *heme oxygenase-1* (*HMOX1*) および浸潤・転移に関与している matrix metalloproteinase (*MMP*) 2、9 の発現量への影響と Q3G による抑制効果について、ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 を用いて、リアルタイム PCR 法により検討した。なお、本節以降の NA の濃度は 1、10 μM に設定して実験を行った。尚、数値は、コントロールを 1 として算出した。

Fig. 26-A では、NA (1 μM) による *HMOX1* の遺伝子発現量について検討した結果、NA (1 μM) を作用させると、コントロール値 (1.0 ± 0.1) と比較して有意に *HMOX1* の遺伝子発現量が増加した (2.3 ± 0.5 (2.3 倍))。この結果は、NA による活性酸素の生成の増加と一致した (Fig. 24, 25-A)。次に、NA による *HMOX1* の遺伝子発現量の増加が、 β_2 -AR を介しているのか確かめるために、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol (5 μM) を作用させるとコントロール値 (1.0 ± 0.1) と比較して、NA による *HMOX1* の遺伝子発現量の増加と同等に有意に増加した (2.0 ± 0.2 (2.0 倍))。

また、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol (5 μM) を作用させると、NA (1 μM) による *HMOX1* の遺伝子発現量の増加に対して、顕著に抑制された (1.2 ± 0.2 (1.9 倍))。これらの結果より、NA は β_2 -AR を介して *HMOX1* の遺伝子発現量を増加させることが分かった。さらに、Q3G (0.1 μM) を作用させると、NA による *HMOX1* の遺伝子発現量の増加に対して、顕著に抑制された (1.2 ± 0.2 (1.9 倍))。Q3G (0.1 μM) 単独処理群では *HMOX1* の遺伝子発現量に影響をおよぼさなかった。

Fig. 26-B では、NA (1 μM) による *MMP2* の遺伝子発現量について検討した結果、NA (1 μM) を作用させると、コントロール値 (1.0 ± 0.1) と比較して有意に *MMP2* の遺伝子発現量が増加した (3.2 ± 0.1 (3.2 倍))。次に、NA による *MMP2* の遺伝子発現量の増加が、 β_2 -AR を介しているのか確かめるために、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol (5 μM) を作用させるとコントロール値 (1.0 ± 0.1) と比較して、NA による *MMP2* の遺伝子発現量の増加と同等に著しく増加した (2.8 ± 0.3 (2.0 倍))。

また、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol (5 μM) を作用させると、NA (1 μM) による *MMP2* の遺伝子発現量の増加に対して、顕著に抑制された (1.1 ± 0.3 (3.0 倍))。

これらの結果より、NA は β_2 -AR を介して *MMP2* の遺伝子発現量を増加させることが分かった。さらに、Q3G (0.1 μM) を作用させると、NA による *MMP2* の遺伝子発現量の増加に対して、顕著に抑制された (1.1 ± 0.2 (3.0 倍))。一方、Q3G (0.1 μM) 単独処理群では *MMP2* の遺伝子発現量に影響をおよぼさなかった。

Fig. 26-C では、NA (1 μM) による *MMP9* の遺伝子発現量について検討した結果、

NA (1 μ M) を作用させると、コントロール値 (1.0 ± 0.1) と比較して有意に *MMP2* の遺伝子発現量が増加した (1.5 ± 0.4 (1.5 倍))。次に、NA による *MMP9* の遺伝子発現量の増加が、 β_2 -AR を介しているのか確かめるために、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol (5 μ M) を作用させるとコントロール値 (1.0 ± 0.1) と比較して、NA による *MMP9* の遺伝子発現量の増加と同等に著しく増加した (1.7 ± 0.3 (1.7 倍))。また、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol (5 μ M) を作用させると、NA (1 μ M) による *MMP2* の遺伝子発現量の増加に対して、顕著に抑制された (0.7 ± 0.2 (2.1 倍))。これらの結果より、NA は β_2 -AR を介して *MMP9* の遺伝子発現量を増加させることが分かった。さらに、Q3G (0.1 μ M) を作用させると、NA による *MMP9* の遺伝子発現量の増加に対して、顕著に抑制された (0.9 ± 0.2 (1.7 倍))。一方、Q3G (0.1 μ M) 単独処理群では *MMP9* の遺伝子発現量に影響をおよぼさなかった。

以上の結果より、NA により β_2 -AR を介して *HMOX1*、*MMP2* および *MMP9* の遺伝子発現量が増加し、Q3G によって抑制されることが分かった。

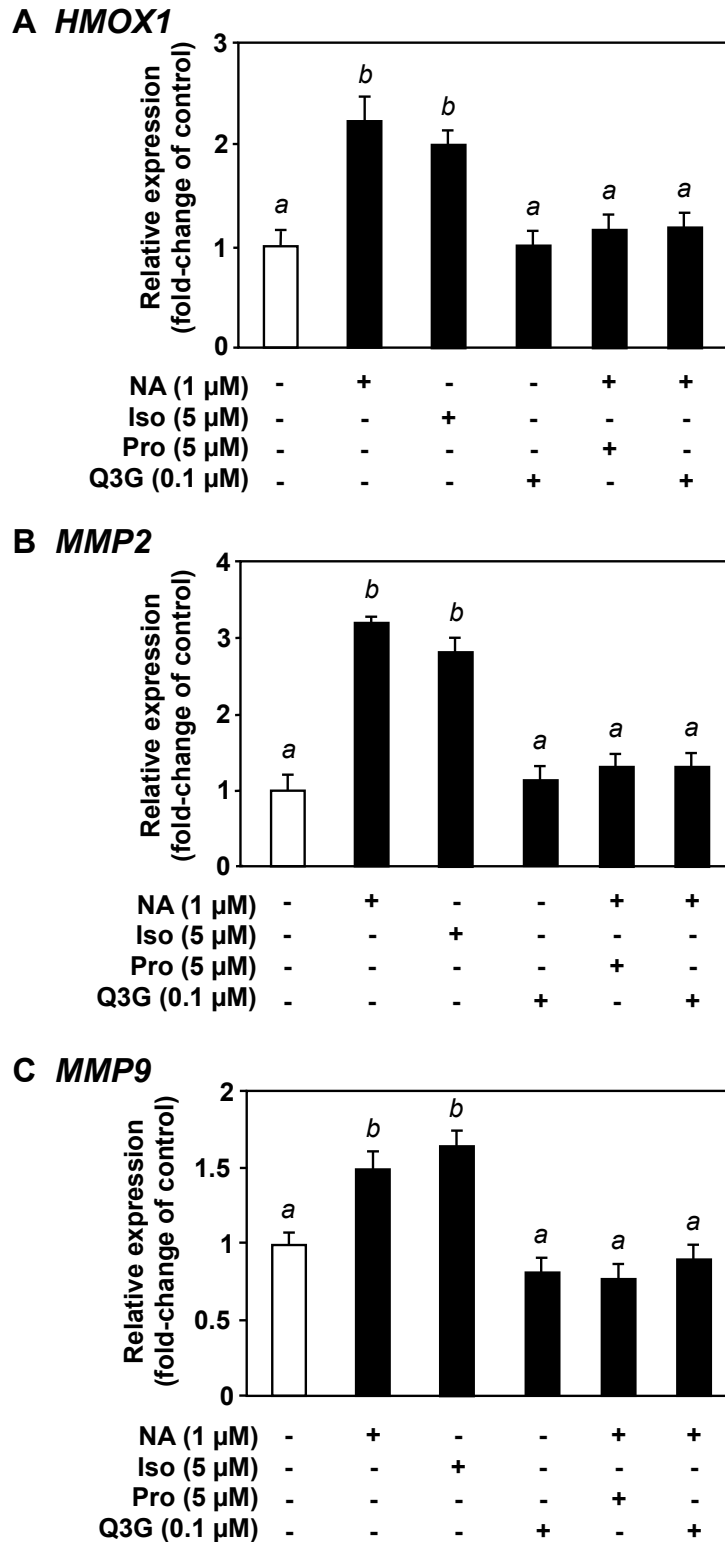


Fig. 26. Downregulation of NA-induced *HMOX1*, *MMP2* and *MMP9* gene expression by Q3G treatment in MDA-MB-231 cells. Cells were treated with combinations of isoproterenol (Iso; 0, 5 μ M), propranolol (Pro; 0, 5 μ M), Q3G (0, 0.1 μ M) and NA (0, 1 μ M) for 8 h (for *HMOX1*) or 12 h (for *MMP2* and *MMP9*). The expression of *HMOX1*, *MMP2*, and *MMP9* mRNA was analyzed by qRT-PCR. Values indicate mean \pm SD (n = 5) as fold-changes of the control. Superscripts at the top of each column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ as evaluated by the *Tukey test*.

2-1-2-5 ノルアドレナリンによる *MMP2* および *MMP9* の遺伝子発現量増加 機序の解明

2-1-2-4 の結果から、NA をヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 に作用させると β_2 -AR を介して *MMP2* および *MMP9* の遺伝子発現量が増加し、Q3G によって抑制されることが分かった。そこで本節では、NA による *MMP2* および *MMP9* の遺伝子発現量の増加機序を解明するために PKA (cAMP-dependent protein kinase A: PKA)、AP-1 (activator protein-1: AP-1)、NF- κ B (nuclear factor-kappa B: NF- κ B) および p38 のシグナル伝達経路に着目し、個々の阻害剤を用いて *MMP2* および *MMP9* の遺伝子発現量への影響をリアルタイム PCR 法により検討した。尚、数値は、コントロールを 1 として算出した。

Fig. 27-A では、NA による *MMP9* の遺伝子発現量の増加に対する PKA (H-89)、AP-1 (SR11302) および NF- κ B (Tanshinone IIA) の阻害剤の影響について検討した。

まず、NA をヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 に作用させると、コントロール値 (1.0 ± 0.1) と比較して有意に *MMP9* の遺伝子発現量が増加した (1.5 ± 0.7 (1.5 倍))。この結果は、Fig. 26-C と同様の結果が得られた。

次に、PKA 阻害剤である H-89 (0.1、1、10 μ M) を作用させると、NA による *MMP9* の遺伝子発現量の増加に対して濃度依存的に有意に減少した ((1.5 ± 0.5 (1.0 倍)、(1.3 ± 0.3 (1.1 倍)、(0.7 ± 0.3) (2.1 倍) (Fig. 27-A)。

一方、AP-1 阻害剤である SR11302 (0.1、1、10 μ M) を作用させると、NA による *MMP9* の遺伝子発現量の増加に対して濃度依存的に著しく減少した ((1.5 ± 0.2 (1.0 倍)、(1.2 ± 0.2 (1.3 倍)、(0.8 ± 0.3) (1.9 倍) (Fig. 27-A)。さらに、NF- κ B の阻害剤である Tanshinone IIA (10、30、50 μ M) を作用させると、NA による *MMP9* の遺伝子発現量の増加に対して濃度依存的に顕著に減少した ((1.5 ± 0.2 (1.0 倍)、(0.8 ± 0.2 (1.9 倍)、(0.6 ± 0.2) (2.5 倍) (Fig. 27-A)。

これらの結果より、NA により PKA、AP-1、NF- κ B が活性化し *MMP9* の遺伝子発現量が増加することが分かった。

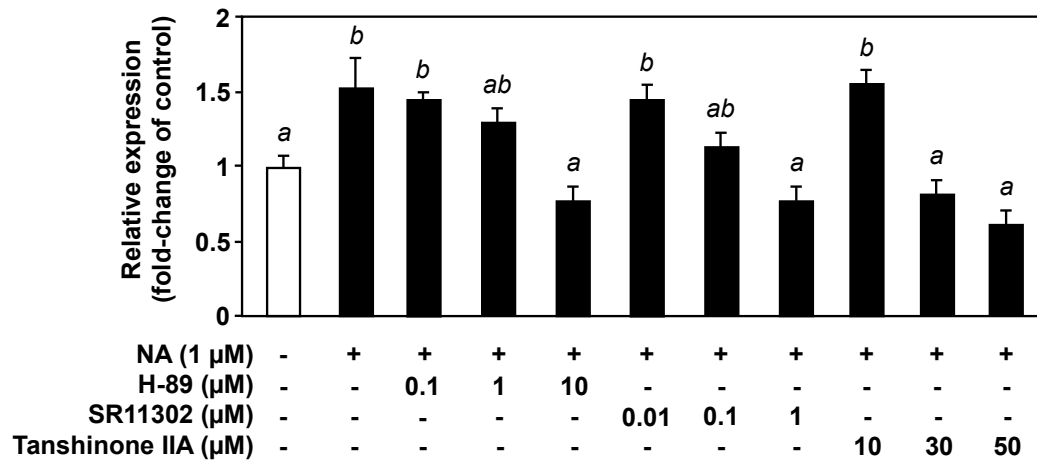
Fig. 27-B では、NA による *MMP9* の遺伝子発現量の増加に対する p38 (SB203580) の阻害剤の影響について検討した。

一方、NA をヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 に作用させると、コントロール値 (1.0 ± 0.1) と比較して有意に *MMP2* の遺伝子発現量が増加した (3.2 ± 0.1 (3.2 倍))。この結果は、Fig. 27-B と同様の結果が得られた。

p38 の阻害剤である SB203580 (1、5、10 μ M) を作用させると、NA による *MMP2* の遺伝子発現量の増加に対して濃度依存的に有意に減少した ((2.8 ± 0.3 (1.1 倍)、(1.7 ± 0.2 (1.9 倍)、(1.2 ± 0.2) (2.7 倍) (Fig. 27-A)。

これらの結果より、NAにより p38 のリン酸化が活性化し *MMP2* の遺伝子発現量が増加することが分かった。

A MMP9



B MMP2

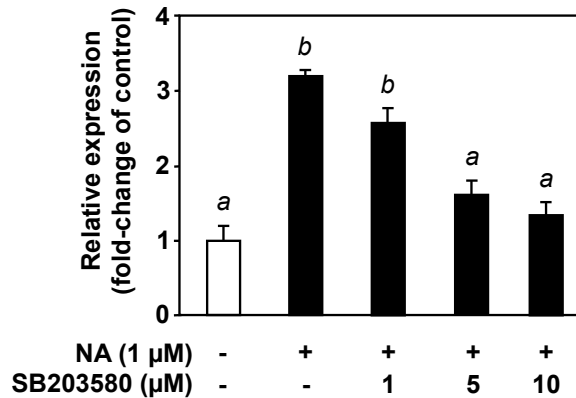


Fig. 27. Effects of inhibitors of PKA, AP-1, NF- κ B and p38 inhibitors on NA-induced *MMP2* and *MMP9* gene expression in MDA-MB-231 cells. Cells were pretreated with H-89 (0.1, 1, 10 μ M), SR11302, (0.01, 0.1, 1 μ M) Tanshinone IIA, (10, 30, 50 μ M) or SB203580 (1, 5, 10 μ M) for 1 h, and then exposed to 1 μ M NA for 12 h. *MMP9* (A) and *MMP2* (B) mRNA expression was analyzed by qRT-PCR. Values indicate mean \pm SD (n = 5) as fold-changes of the control. Superscripts at the top of each column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ as evaluated by the *Tukey test*.

2-1-2-6 β_2 -アドレナリンシグナリングに対する quercetin-3-O-glucuronide の抑制効果

2-1-2-5 の結果より、NA により β_2 -AR を介して、ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 の MMP9 および MMP2 の遺伝子発現量の増加機序の一端として、PKA、AP-1、NF- κ B、p38 のリン酸化の増強が関与している可能性が示唆された。さらに、Q3G がそれらのシグナル伝達経路を抑制する可能性が示唆された。そこで本節では、さらなる作用機序を明らかにするために、 β_2 -AR の下流に存在することが知られている cyclic AMP (cAMP) の生成、NF- κ B のリン酸化、Ras の活性および p38 のリン酸化をタンパク質レベルで調べ、NA による影響と Q3G の抑制効果について検討を行った。

Fig. 28-A に NA による cAMP の生成に対する Q3G の抑制効果への影響について示した。NA (0.1、1、10 μ M) をヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 に作用させると、コントロール値 (5.8 ± 0.3) と比較して、濃度依存的に cAMP の量が増加した (6.1 ± 0.2 (1.0)、 8.4 ± 0.3 (1.5 倍)、 11 ± 0.2 (1.9 倍))。NA による cAMP の増加が、 β_2 -AR を介しているのか確かめるために、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol (5、10 μ M) で作用させると、NA による cAMP の生成増加と同等の増加が見られた (7.5 ± 0.5 (1.3 倍)、 8.8 ± 0.1 (1.5 倍))。さらに、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol (5 μ M) を作用させると、NA (0.1、1、10 μ M) による cAMP の産生増加に対して、どの処理群でも有意に抑制された (5.0 ± 0.1 (1.2 倍)、 5.7 ± 0.2 (1.5 倍)、 4.9 ± 0.4 (2.2 倍))。これらの結果より、NA は β_2 -AR を介して、cAMP の産生を増加させることが分かった。この現象に対して、Q3G (0.1 μ M) を作用させると、NA による cAMP の産生増加に対して、顕著に抑制された (5.0 ± 0.2 (1.2 倍)、 5.8 ± 0.2 (1.5 倍)、 6.0 ± 0.2 (1.8 倍))。これらの結果より、NA は β_2 -AR を介して cAMP の産生を増加させ、Q3G により抑制されることが分かった。

さらに、Fig. 28-B に NA による ERK1/2 のリン酸化の増加に対する Q3G の抑制効果を示した。なお、数値はコントロールを 1 として算出した。NA (1、10 μ M) をヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 に作用させると、コントロール値 (1.0 ± 0.2) と比較して、有意に ERK1/2 のリン酸化が増加することが分かった (2.6 ± 0.5 (2.6 倍)、 2.3 ± 0.5 (2.3 倍))。NA による ERK1/2 のリン酸化が β_2 -AR を介しているのか確かめるために、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol (10 μ M) を作用させると、NA による ERK1/2 のリン酸化の増加と同等の増加がみられた (2.3 ± 0.3 (2.3 倍))。さらに、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol (5 μ M) を作用させると、NA (1、10 μ M) による ERK1/2 のリン酸化の増加に対して、有意に抑制された (1.2 ± 0.3 (2.2 倍)、 1.2 ± 0.2 (1.9 倍))。これらの結果から、NA は、 β_2 -AR を介して、ERK1/2 のリン酸化を増加することが分かった。一方、Q3G (0.1 μ M) を作用させると、NA (1、10 μ M) による ERK1/2 のリン酸化の増加に対して、顕著に抑制された (1.2 ± 0.2 (2.2

倍)、 1.3 ± 0.4 (1.8 倍))。これらの結果より、NA は β_2 -AR を介して ERK1/2 のリン酸化を増加させ、Q3G によりそれが抑制されることが分かった。

Fig. 28-C に NA による Ras の活性と Q3G による抑制効果への影響について示した。なお、数値は、コントロールを 1 として算出している。NA ($0.1 \mu\text{M}$) をヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 に作用させると、コントロール値 (1.0 ± 0.2) に対して、有意に Ras の活性が増強した (2.3 ± 0.2 (2.3 倍))。さらに、Q3G ($0.1 \mu\text{M}$) を作用させると、NA による Ras の活性増強に対して、顕著に抑制された (1.5 ± 0.8 (1.5 倍))。

Fig. 28-D に NA による p38 のリン酸化の増加に対する Q3G の抑制効果の結果を示した。なお、数値はコントロールを 1 として算出した。NA (1、 $10 \mu\text{M}$) をヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 に作用させると、コントロール値 (1.0 ± 0.2) と比較して、有意に ERK1/2 のリン酸化が増加することが分かった (2.6 ± 0.5 (2.6 倍)、 2.3 ± 0.5 (2.3 倍))。NA による ERK1/2 のリン酸化が β_2 -AR を介しているのか確かめるために、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol ($10 \mu\text{M}$) を作用させると、NA による ERK1/2 のリン酸化の増加と同等の増加がみられた (2.3 ± 0.3 (2.3 倍))。さらに、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol ($5 \mu\text{M}$) を作用させると、NA (1、 $10 \mu\text{M}$) による ERK1/2 のリン酸化の増加に対して、有意に抑制された (1.2 ± 0.3 (2.2 倍)、 1.2 ± 0.2 (1.9 倍))。これらの結果から、NA は、 β_2 -AR を介して、ERK1/2 のリン酸化を増加することが分かった。一方、Q3G ($0.1 \mu\text{M}$) を作用させると、NA (1、 $10 \mu\text{M}$) による ERK1/2 のリン酸化の増加に対して、顕著に抑制された (1.2 ± 0.2 (2.2 倍)、 1.3 ± 0.4 (1.8 倍))。

以上の結果より、NA は β_2 -AR を介して cAMP の生成、ERK1/2 のリン酸化、Ras の活性増強、p38 のリン酸化を増加させ、Q3G によりそれが抑制されることにより NA による浸潤促進が抑制される可能性が考えられた。

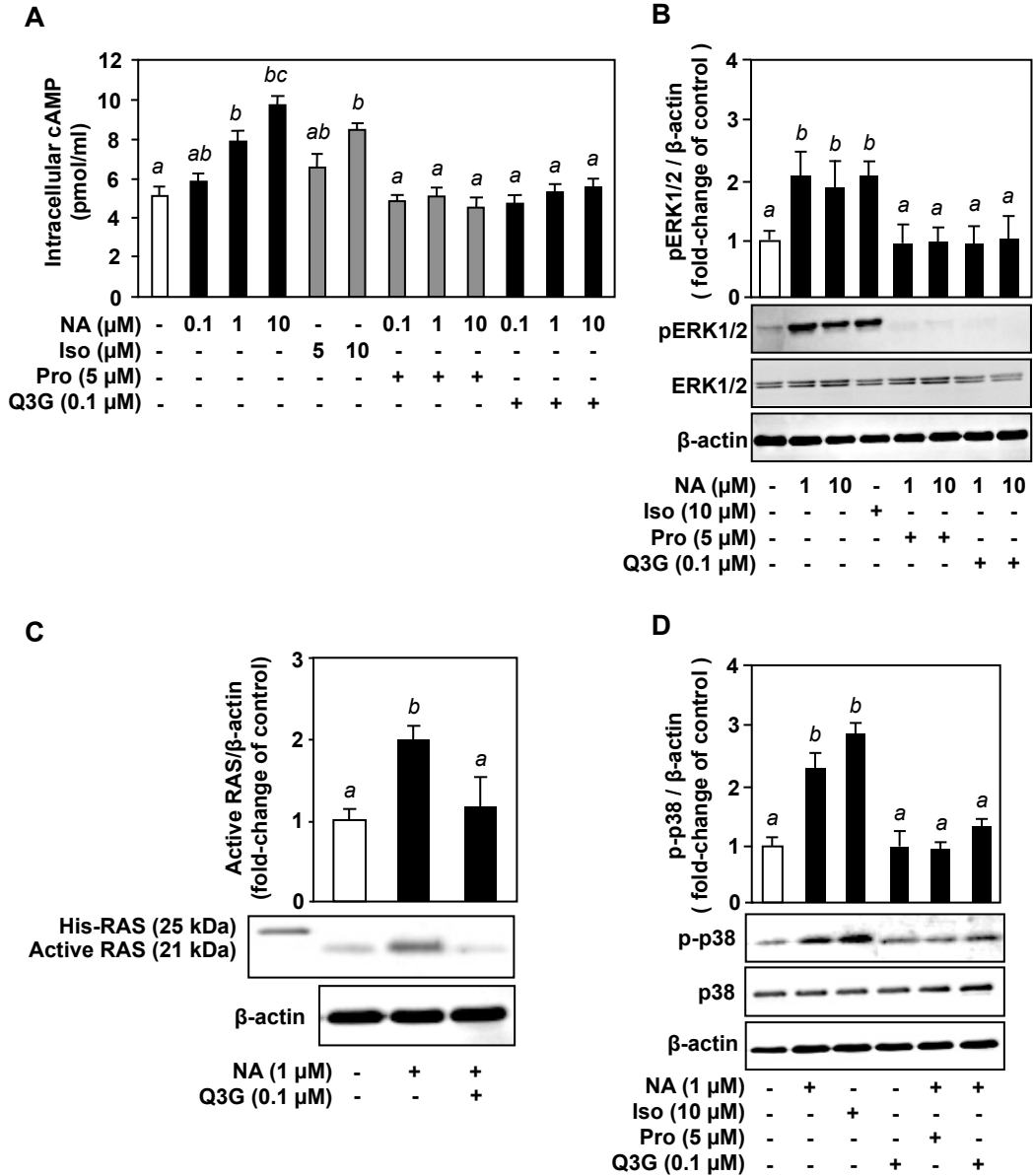


Fig. 28. Effect of Q3G on NA-mediated β_2 -adrenergic signaling in MDA-MB-231 cells. Cells were treated with combinations of NA (0, 0.1, 1, 10 μ M), Q3G (0, 0.1 μ M), isoproterenol (Iso; 0, 5, 10 μ M) and propranolol (Pro; 0, 5 μ M) for 10 min (for p-p38), 1 h (for active RAS and pERK1/2) or 24 h (for cAMP). cAMP (A), phosphorylated ERK1/2 (B), RAS activation (C) and phosphorylated p38 (D) were assayed using a Cyclic AMP EIA Kit or by Western blotting. Values indicate mean \pm SD (n = 5) (A and C). Results are representatives of at least three independent experiments (B and D). Superscripts at the top of each column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ as evaluated by the *Tukey test*.

2-1-2-7 ノルアドレナリンによる浸潤促進と quercetin-3-O-glucuronide の抑制効果

これまでの結果から、NA をヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 に作用させると、浸潤および転移に関与している *MMP2* および *MMP9* の遺伝子発現量が増加することが分かった。さらに Q3G によって抑制されることが分かった。その機序として cAMP、ERK1/2 のリン酸化、Ras の活性増加、p38 のリン酸化が関与していることが分かった。そこで本節では、実際に NA により浸潤が促進されるのかを Invasion assay kit を用いて調べた。また、タンパク質レベルの活性化 *MMP9* を Glatin zymography 法を用いて評価した。さらに、NA による浸潤促進と *MMP9* 活性に対する Q3G の抑制効果への影響についても検討を行った。

Fig. 29-A に NA による浸潤促進と Q3G の抑制効果への影響について示した。NA (0.003、0.1、1、10 μM) をヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 に作用させると、コントロール値 (38 ± 0.2) と比較すると、濃度依存的に浸潤が促進した (39 ± 0.2 (1.0 倍)、 47 ± 0.2 (1.2 倍)、 57 ± 0.09 (1.5 倍)、 62 ± 0.3 (1.6 倍))。NA による浸潤促進が、 β_2 -AR を介しているか確認するために、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol (5、10 μM) を作用させたところ、コントロールと比較し、有意に浸潤が促進した (45 ± 0.5 (1.2 倍)、 60 ± 0.6 (1.6 倍))。さらに、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol (5、10 μM) を作用させると、NA による浸潤促進に対してどの処理群でも有意に抑制された (28 ± 0.2 (1.4 倍)、 25 ± 0.2 (1.9 倍)、 28 ± 0.1 (2.0 倍)、 27 ± 0.2 (2.2 倍))。これらの結果から、NA は、 β_2 -AR を介して、ヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 の浸潤を促進させることが分かった。この現象に対して、Q3G (0.1 μM) を作用させると、NA (1、10 μM) による浸潤促進に対して、顕著に抑制させることが分かった (28 ± 0.4 (2.0 倍)、 25 ± 0.08 (2.5 倍))。

Fig. 29-B は、乳がん細胞 MDA-MB-231 における NA による、*MMP-2* および *MMP-9* の活性に対する Q3G の抑制効果への影響について示した。NA (1、10 μM) によって *MMP-9* の活性が顕著に増加した。NA による *MMP-9* の活性が β_2 -AR を介しているのか確かめるために、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol (5、10 μM) を作用させると、NA による *MM-9* の活性が顕著に抑制された。この結果から、NA は β_2 -AR を介して、*MMP-9* の活性を増加することが分かった。この現象に対して、Q3G (0.1 μM) を作用させると、NA による *MMP-9* の活性の増加に対して、有意に抑制された。しかしながら、*MMP-2* に関しては、活性は観察されるが、どの処理群でも影響は見られなかった。

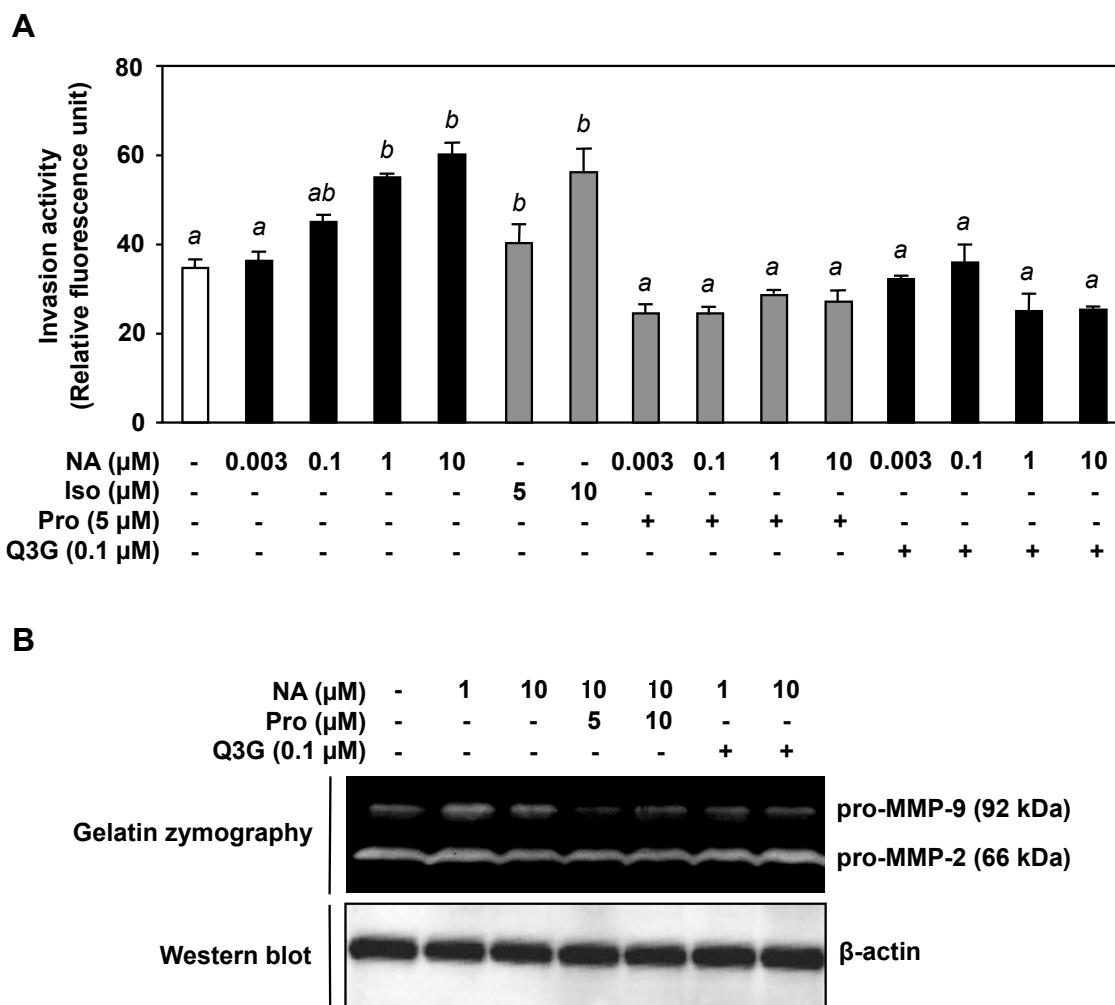


Fig. 29. Suppression of NA-promoted invasion and pro-MMP-2 and pro-MMP-9 activity by Q3G treatment in MDA-MB-231 cells. Cells were treated with combinations of NA (0, 0.003, 0.1, 1, 10 μM), Q3G (0, 0.1 μM), isoproterenol (Iso; 0, 5, 10 μM) and propranolol (Pro; 0, 5, 10 μM) for 24 h (A). Values indicate mean \pm SD ($n = 5$). The zymography of gelatinases was performed in cell lysates of control NA (0, 1, 10 μM), Q3G (0, 0.1 μM) and propranolol (Pro; 0, 5, 10 μM)-treated cells as described in the experimental section (B). Data shown is representative of three independent experiments carried out in duplicate, each of which demonstrated similar results. Superscripts at the top of each column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ as evaluated by the *Tukey test*.

2-1-2-4 ノルアドレナリンの β_2 -アドレナリン受容体への結合に対する quercetin-3-O-glucuronide の阻害作用

これまでに、NA をヒト乳がん細胞MDA-MB-231に作用させると、活性酸素、cAMP の生成、ERK1/2 のリン酸化、Ras の活性化を増加させることによって、浸潤が促進されることが分かった。この機序に対して、フラボノイド類である Q3G を作用させると、上記の機序を全て抑制することにより、浸潤が抑制されることが分かった。そこで、MDA-MB-231 細胞内に Q3G が取り込まれるのか HPLC (クーロアレイ) によって測定したところ、検出限界以下だった (data not shown)。この結果より、Q3G は MDA-MB-231 細胞の細胞膜上で効果を発揮している可能性が考えられた。そこで、本節では、ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 における、 β_2 -AR への NA の結合に対する Q3G の阻害効果を ^3H -NA を用いた結合試験にて評価した。

Fig. 31 に β_2 -AR への NA の結合に対する Q3G の阻害効果について示した。まず、ポジティブコントロールである、non labeled の NA (10^{-10} - 10^{-4}) を作用させると、 β_2 -AR への ^3H -NA の結合を濃度依存的に阻害することが分かった (100 ± 6.3 、 100 ± 7.2 、 96 ± 8.5 、 95 ± 8.1 、 71 ± 6.8 、 50 ± 6.3 、 59 ± 3.9 、 49 ± 8.4)。 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol (10^{-10} - 10^{-4}) を作用させると、ポジティブコントロールである、non labeled の NA の β_2 -AR への ^3H -NA の結合の阻害よりも、強い阻害効果が観察された (97 ± 2.3 、 100 ± 5.2 、 87 ± 2.5 、 73 ± 2.5 、 55 ± 6.8 、 35 ± 4.4 、 32 ± 5.5)。次に、Q3G (10^{-10} - 10^{-4}) を作用させると、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol の β_2 -AR への ^3H -NA の結合の阻害効果ほどではなかったものの、濃度依存的に β_2 -AR への ^3H -NA の結合を阻害することが分かった (103 ± 7.9 、 100 ± 5.6 、 102 ± 3.5 、 99 ± 5.8 、 77 ± 5.4 、 79 ± 4.2 、 60 ± 3.8 、 48 ± 7.2)。これらの結果より、Q3G は、 β_2 -AR への NA の結合を阻害していることが分かった。

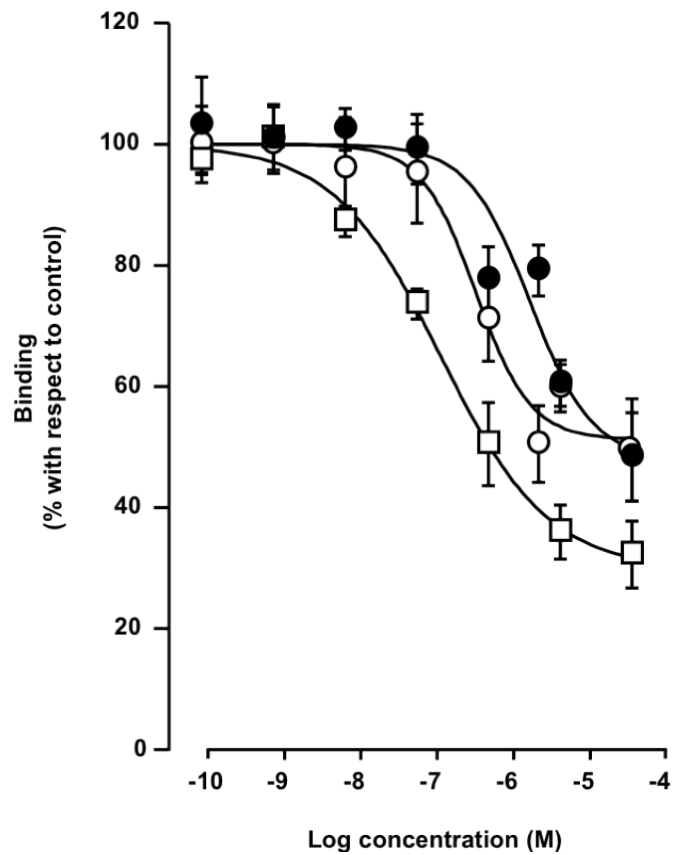


Fig. 30. Competition assay of [³H]-NA binding to β_2 -AR in MDA-MB-231 cells. Competitive binding analysis was performed in whole cells with a constant [³H]-NA concentration of 6 μ M in the presence of increasing concentrations (10^{-10} to 10^{-4}) of different compounds. MDA-MB-231 cells were treated with propranolol (\square), unlabeled NA (\circ), Q3G (\bullet) for 1 h. Values indicate mean \pm SD (n = 5).

2-2 考察

第1章で、乳がん進展プロセスである DNA 損傷に注目し検討を行った結果、NA と 4-OHE₂ により、 α_2 -AR を介して DNA 損傷が増加することが分かった。さらに、ケルセチンおよびその抱合体である Q3G が血中で検出される濃度で NA と 4-OHE₂ による DNA 損傷増加を抑制することが分かった。その抑制機序としては、Q3G が α_2 -AR のアンタゴニストとして作用することが示唆された。そこで、第2章では、乳がん進展プロセスの転移などに重要な経路とされている浸潤に着目した。Sood らは、NA、A (0.1、1、10 μ M) を卵巣がんの EG 細胞に作用させると、A と比べて NA の方がより濃度依存的に浸潤を促進することを報告した [74]。さらに、作用機序としては、NA が β_2 -AR を介して、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase: MMP) 2、9 の細胞内の分泌を増加させることで浸潤が促進されることを示した [74]。

Perez らの報告は、ヒト乳がん細胞である IBH および MDA-MB-231 では、有意に β_2 -AR が発現していることが報告され [62]、組織中でも β_2 -AR が発現していることが報告されている [62]。さらに、乳がん患者の試料の組織マイクロアレイの免疫組織化学的分析結果から、 α および β_2 -AR が過剰に発現していることを示し、ヒト乳がん細胞である IBH と MDA-MB-231 に β_2 -AR が発現していることを報告した [3]。

本研究では、ヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 に β_2 -AR が発現しているかどうかリアルタイム PCR 法および Western blot 法を用いて検討したところ、MDA-MB-231 細胞には、 β_2 -AR が有意に発現していることを確認した (Fig. 23)。しかしながら、 α -AR に関しては発現していないと思われた (data not shown)。

近年、活性酸素は GPCR のトランスデューサーであると報告されている [64-67]。また、 β_2 -AR、アンジオテンシン II、エンドセリン-1 受容体を含む、GPCR スーパーファミリー等のアゴニスト作用は、細胞内活性酸素の増加につながることを示されている [64-67]。Moniri らは、G タンパク質依存カスケード (PKA、cAMP、プロテインキナーゼ A) を介した β_2 -AR のシグナリングは、フラビンオキシダーゼによって生成される細胞内活性酸素に依存していることを報告している [66]。また、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol によって、ヒト胚性腎細胞における細胞内の活性酸素の産生が促進されることも報告されている [66]。そこで、活性酸素に注目し検討を行った。NA (0.1、1、10 μ M) を MDA-MB-231 に作用させると濃度依存的に顕著に活性酸素の生成が増加することが分かった (Fig. 24-A)。さらに、NA による活性酸素の生成増加が β_2 -AR を介している確かめるために、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol、アンタゴニストである propranolol を用いて検討したところ、isoproterenol (5、10 μ M) を作用させると活性酸素の増加が見られ、propranolol (5、10 μ M) に

よって NA による活性酸素の増加を有意に抑制することが分かった (Fig. 24-A)。これらの結果は、NA は β_2 -AR を介して活性酸素の生成を誘導することを示唆している。同様に A (1 μ M) を作用させると、活性酸素の生成が増加したことから、NA と同様の機序が考えられた (Fig. 24-B)。しかしながら、興味深いことに、第 1 章の Fig. 14 に示したように、ヒト乳腺細胞 MCF-10A では β_2 -AR が発現しているにもかかわらず、NA を単独で作用させても活性酸素の生成を増加することはなかった。ヒト乳腺細胞 MCF-10A (Fig. 14-A) と乳がん細胞 MDA-MB-231 (Fig. 23-A) とで、 β_2 -AR の遺伝子発現量の差をみると、若干乳がん細胞の発現のほうが高い。両細胞における β_2 -AR を介する応答の違いは、 β_2 -AR の量的な違いによるものか、あるいは β_2 -AR の構造等の違いによるものか、今後詳細な研究を行う必要があり、興味深いところである。

一方、活性酸素は、I κ B α の分解を介して NF- κ B、レドックス感受性転写因子を活性化することができる。さらに、活性化 NF- κ B は、*HMOX1* のようなストレス誘発性応答に関連する複数の遺伝子の発現を制御することが知られている [75, 76]。そこで、*HMOX1* の遺伝子発現量について検討したところ、生理的な濃度である NA (1 μ M) によって顕著に *HMOX1* の遺伝子発現量が増加し (Fig. 26-A)、NA による活性酸素の生成と同様な結果が得られた (Fig. 24-A)。さらに、NA による *HMOX1* の遺伝子発現量の増加が β_2 -AR を介しているか確かめるために、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol (5 μ M)、アンタゴニストである propranolol (5 μ M) を用いて検討したところ、isoproterenol を作用させると *HMOX1* の遺伝子発現量の増加が見られ、propranolol によって NA による *HMOX1* の遺伝子発現量が著しく抑制することが分かった (Fig. 26-A)。これらの結果は、NA は β_2 -AR を媒介し、活性酸素の生成に伴い、*HMOX1* の遺伝子発現量が増加したことを示唆している。

主要な β_2 -AR シグナリングのカスケードは、活性化アデニルシクラーゼ/cAMP の産生/ PKA 経路およびアデニルシクラーゼ/cAMP/アデニルシクラーゼ経路により活性化される交換タンパクである。 β_2 -AR はヘテロ三量体 G タンパク質に優先的に結合し、アデニル酸シクラーゼを活性化し、また、ふたつの主な下流のエフェクター、PKA と cAMP により活性化されるグアニヌクレオチド交換タンパク質の直接的な活性化を通してシグナルを伝達する一過性の細胞内セカンドメッセンジャー cAMP が産生される [77]。また、cAMP 産生は、卵巣癌の進行に関与していることが報告されている [78]。最近の研究では、内皮細胞および様々な癌細胞において、NA、A および β_2 -AR アゴニストである isoprenaline などの β -AR アゴニスト類が、増殖と ERK による MAPK 経路の活性化を誘導することが示されている [78, 79-81]。

MAPK は、核転写因子をリン酸化し、細胞増殖に関与する複数の遺伝子の発現を調節するセリン/スレオニンキナーゼである。また、MAPK は、核内転写因子をリン

酸化し、細胞増殖に関与する複数の遺伝子の発現を調節するセリン/スレオニンキナーゼである。また、 β -AR のシグナル伝達は、炎症、血管新生に関わる転移関連遺伝子発現における転写活性の促進、および組織浸潤、抗腫瘍免疫応答を促進する遺伝子の発現抑制をもたらす [78]。

浸潤や転移に関与している *MMP9* の遺伝子発現は、cAMP / EPAC / RAP1A / AP-1 経路を介して促進される [74, 77]。さらに、H-Ras を導入した MCF-10A 細胞では、Rac-MKK3 / 6-p38 経路を介した *MMP2* 遺伝子発現増加が H-Ras による誘導性の浸潤および遊走に重要であること [82]、また、WB-F344 ラット肝上皮細胞において、ERK1/2 および NF- κ B の活性化を介して H-RAS によって *MMP9* の遺伝子発現が促進されること [83] が報告されている。さらに、*MMP-9* のプロモーター領域は、NF- κ B の結合部位を含むことが報告されている [84]。

Schmitt and Stork は以前、ヒト胎児腎臓 HEK293 細胞において β_2 -AR アゴニストである isoproterenol が RAS を活性化したことを報告した [86]。RAS タンパク質は、GTPase であり、活性化 RAS タンパク質は、腫瘍による浸潤と血管新生という悪性の表現型に寄与している [85]。一方、*MMP-2* および *MMP-9* は、腫瘍細胞の浸潤および遊走に関与していることが報告されている [87]。

本研究は、NA (1 μ M) および β_2 -AR アゴニストである isoproterenol (5 μ M) は、MDA-MB-231 細胞において、 β_2 -AR を介して *MMP2* および *MMP9* の遺伝子発現量を増強させることを見いだした (Fig. 26-B, C)。対照的に、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol (5 μ M) は、NA による *MMP2* および *MMP9* の遺伝子発現量を減少させた (Fig. 26-B, C)。これらの結果より、NA を MDA-MB-231 細胞に作用させると β_2 -AR を介して *MMP2* および *MMP9* の遺伝子発現量が増加することが分かった。上記のように、*MMP2* および *MMP9* の遺伝子発現量の増加機序を調べるために、 β_2 -AR シグナル伝達経路のいくつかの阻害剤の効果を検討した。H-89 (cAMP 依存性プロテインキナーゼの阻害剤)、SR11302 (AP-1 転写因子の阻害剤) および Tanshinone IIA (NF- κ B および AP-1 の DNA 結合を阻害) を MDA-MB-231 細胞に作用させると、NA による *MMP9* 遺伝子発現の誘導が阻害された (Fig. 27-A)。また、Fig. 28-D に示したように、NA (1 μ M) および β_2 -AR アゴニストである isoproterenol (10 μ M) による p38 のリン酸化の増強に対して、SB203580 (p38 MAP キナーゼ阻害剤) を作用させると、NA による *MMP2* 遺伝子発現量の増加が抑制された (Fig. 27-B)。一方、Fig. 28 に示したように、NA (1, 10 μ M) を MDA-MB-231 細胞に作用させると、cAMP の産生 (Fig. 28-A)、ERK1/2 のリン酸化 (Fig. 28-B) および RAS の活性化 (Fig. 28-C) が有意に増強した。さらに、 β_2 -AR アゴニストである isoproterenol (10 μ M) を作用させると、cAMP の産生増加 (Fig. 28-A)、ERK1/2 のリン酸化 (Fig. 28-B) が増強し、 β_2 -AR アンタゴニストである propranolol (5 μ M) を作用させると、NA による cAMP の産生 (Fig. 28-A)、ERK1/2 のリン酸化 (Fig.

28-B) が阻害された。これらの結果は、cAMP-PKAおよびMAPK経路が、 β_2 -ARシグナル伝達に関与していること、さらに、NAが、活性酸素の生成、cAMPの産生、AP-1およびpERK1/2の活性化、Rasの活性化、p38のリン酸化を増強させ、*HMOX1*、*MMP2*および*MMP9*の遺伝子発現量を増加させることを示している (Fig. 31)。

MMP は、がん浸潤及び転移 [88-90]に至る過程に関与しており、また、腫瘍の血管新生 [89]において主要な役割を果たしている。MMP-2 および MMP-9 は、前立腺癌 [91]を含む様々な腫瘍 [90]における浸潤性転移および血管新生のプロセスに重要な酵素である。本研究では、NA (1、10 μ M) が 24 時間で浸潤および pro-MMP-9 の活性化を有意に増加させることを示した (Fig. 29)。Fig. 28-A に示すように、NA は細胞内 cAMP のレベルを増加させたことから、これらの結果は、NA が cAMP 産生を介して MMP-9 活性を増加させることを示唆している。

第 1 章で用いた、ケルセチンの抱合体である Q3G を用いて、NA による β_2 -AR を介した浸潤促進機序に対する抑制効果について検討を行った。これまでフラボノイド類による浸潤抑制の研究は数多く報告されている。例えば、本研究で用いたケルセチンが、U87 細胞の細胞増殖を抑制することによって浸潤を抑制すること [92]、また、ポリフェノール類が MAP kinase を抑制して浸潤を抑制することが報告されている [93, 94]。しかしながら、ケルセチンの代謝物である抱合体が血中で検出される濃度で抑制効果を示している報告や細胞膜上で効果を発揮している報告はない。

本研究では、Q3G の新しい機能性を提供した。ヒト血漿中の検出濃度 (0.1 μ M) の Q3G を MDA-MB-231 細胞に作用させると、NA と A (1 μ M) による活性酸素の生成が著しく抑制された (Fig. 25)。さらに、Q3G (0.1 μ M) は、NA (1 μ M) による *HMOX1*、*MMP2* および *MMP9* 遺伝子発現量の増加に対しても顕著に抑制し (Fig. 26)、また、NA による cAMP の産生、ERK1 / 2、Ras の活性化および p38 のリン酸化の増強も有意に阻害した (Fig. 28)。一方、NA (1 μ M) 誘発性浸潤および pro-MMP-9 の活性化の促進に対して、Q3G (0.1 μ M) を作用させると有意に抑制されることが分かった (Fig. 29)。これらの結果から、Q3G は、 β_2 -AR に結合することで NA の作用を阻害している可能性が示唆された。そこで、HPLC-クーロアレイを用いて Q3G の MDA-MB-231 細胞内への取り込み実験を行ったところ、Q3G は検出限界以下だった (data not shown)。そこで、 $[^3\text{H}]$ -NA を用いて Q3G の β_2 -AR への競合結合試験を行ったところ、Q3G が β_2 -AR への $[^3\text{H}]$ -NA の結合を阻害していることが分かった (Fig. 30)。

以上の結果は、血中で検出される濃度で Q3G が、 β_2 -AR アンタゴニストとして作用し、 β_2 -AR 作動性シグナル経路を阻害し、その結果、MDA-MB-231 細胞において、NA による *MMP9* の遺伝子発現の誘導、pro-MMP9 の活性化を阻害して MDA-MB-231 細胞の浸潤を抑制したことを示唆している。本研究により、 β_2 -AR シグナル伝達に

ヒト血漿中で検出される濃度の Q3G が阻害作用を示すことを初めて報告した。

第 1 章で説明したように、NA による DNA 損傷の最も初期の指標である γ -H2AX の誘導増加が Q3G (0.1 μ M) により有意に抑制されることが分かった (Fig. 18-D)。その作用機序として、Q3G が α_2 -AR への NA の結合を阻害することを明らかにした。これらの結果や本章の結果から、Q3G が α_2 および β_2 -AR への結合を阻害する条件として、カテコール構造が重要であると思われる。また、NA の過剰分泌によって活性化される β_2 -AR のシグナル伝達経路は、がんだけではなく、高血圧症、血栓症、動脈硬化または他のストレス関連疾患も考えられており、Q3G がこれらの疾患のリスクを低減するかどうか、今後さらに詳細な研究が必要である。

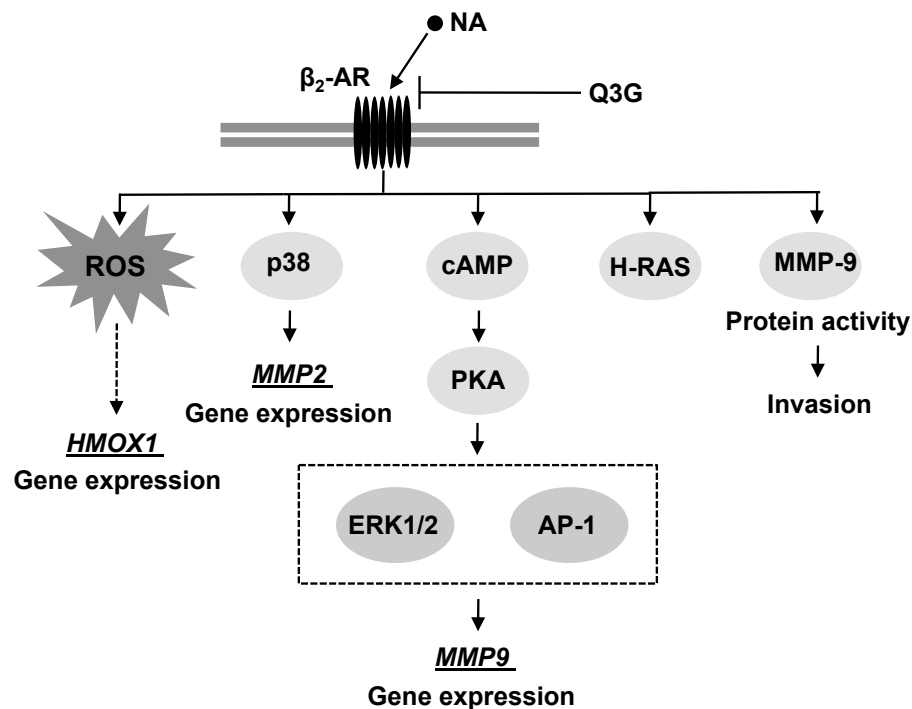


Fig. 31. Proposed scheme of Q3G action on NA mediated β_2 -adrenergic signaling in MDA-MB-231 human breast cancer cells.

総括

現代はストレス社会と言われているが、ストレスに過度にあるいは慢性的に曝露され続けると、生体機能に異常をきたし、その結果様々な疾患が誘発される。ストレスを受けると、視床下部-交感神経-副腎髄質系が活性化され、副腎髄質および神経末端からの NA や A の分泌が増加する [1]。これらのカテコールアミンは、AR に結合することでシグナルが伝達され、様々なストレス反応を起こす。NA の通常での生体内血漿中濃度は、10 pmol/L とされておりストレス負荷時では 100 nmol/L まで上昇することが知られている [1]。また、乳腺組織中の濃度は、5-50 nmol/g と報告されている [2]。近年、疫学調査および動物試験から、ストレスが乳がんのリスクを増加することが示唆され [6-9]、興味深い事に、 β -AR 拮抗薬の投与を受けていた患者では、乳がんの死亡リスクが低いことが報告された [12]。これらの知見により、AR を介するカテコールアミンの作用は、乳がんの進展に深く関与していることが考えられた。

一方、乳がんのリスク因子である E_2 は、乳腺組織内などで CYP1B1 により 4 位の カテコール体 (4-OHE₂) へ代謝され [20]、4-OHE₂ がさらに酸化されたキノン体が DNA のプリン塩基と反応し、脱塩基部位 (AP sites) を生じる [25, 50]。この DNA 損傷の修復ミスが突然変異を誘発し、がん化へと進展すると考えられている。

疫学研究から、野菜や果物に広く分布しているフラボノイドの摂取量と乳がんリスクとの間に逆相関性があることが示唆されている。たまねぎにはケルセチンの配糖体が多く含まれているが、ヒトがたまねぎを摂取すると、ケルセチンの配糖体は腸内細菌によりケルセチンアグリコンに加水分解され、腸管から吸収されケルセチンの抱合体 (Quercetin-3-O-glucuronide: Q3G など) に代謝される [44, 45]。ケルセチン抱合体は、血流を循環するが、ヒト血中濃度はケルセチンとして 0.1-1 μ M と報告されている [46, 47]。

本研究では、乳がんの進展プロセスすなわち、イニシエーション、プログレッションの各段階を考慮して、ヒト乳腺細胞 MCF-10A、ヒト乳がん細胞 MCF-7 および MDA-MB-231 を用いて、NA と 4-OHE₂ による DNA 損傷誘発作用と NA による浸潤促進作用について検討し、さらに、それらの作用に対するフラボノイド類の抑制効果について検討し、以下のことを明らかにした。

1. 4-OHE₂ は COMT 存在下で、近年、DNA 損傷の高感度な指標として用いられている γ -H2AX は、ATM を介して誘導し、また、AP sites の生成も増加した。
2. NA (100 nM) をヒト乳腺細胞 MCF-10A に作用させると、 γ -H2AX および AP sites が有意に増加した。また、NA (3 nM) と 4-OHE₂ (3 μ M) は、それぞれ単独よ

りも共存下で γ -H2AX および AP sites をより増加することが分かった。これらの増加は、 α_2 -AR と ATM を介していることを明らかにした。MCF-10A 細胞では、 α_{2c} -AR と β_2 -AR が発現していた。

3. ケルセチンと Q3G は、NA と 4-OHE₂ による γ -H2AX および AP sites の増加を、血中で検出される 0.1 μ M の濃度で有意に抑制した。さらに、この抑制機序は、Q3G やケルセチンが α_2 -AR への NA の結合を阻害し、 α_2 -AR のアンタゴニストとして作用することを明らかにした。
4. ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞では、 β_2 -AR のみが発現していた。
5. NA による MDA-MB-231 細胞の *MMP2* および *MMP9* 遺伝子発現量の増加は β_2 -AR のシグナル経路、すなわち、活性酸素の生成、cAMP の産生、ERK1/2 のリン酸化、Ras の活性化等を介していることが分かった。
6. NA (1, 10 μ M) を MDA-MB-231 に作用させると、 β_2 -AR を介して浸潤が促進された。さらに、*MMP-2*、*9* の分泌について Gelatin zymography 法を用いて検出した結果、NA によって有意に *MMP-9* の活性が増加することが分かった。
7. Q3G (0.1 μ M) は、NA による MDA-MB-231 の浸潤および *MMP-9* の活性の増加を抑制した。また、NA による活性酸素の生成、cAMP の産生、ERK1/2 のリン酸化、Ras の活性化、p38 のリン酸化も Q3G により抑制された。これらの結果から、Q3G は β_2 -AR への NA の結合を阻害することで、 β_2 -AR の下流のシグナルを阻害し、それに伴って、NA による MDA-MB-231 の浸潤促進を抑制したものである。

本研究により、代謝物である Q3G が、血中で検出される濃度で α_2 および β_2 -AR への NA の結合を阻害するというアンタゴニストとしての新しい機能性を示すことができた。また、乳がんの進展を阻害する予防因子として Q3G が作用する可能性が示唆され、フラボノイド類の新しい機能性を報告することができた。

謝辞

本研究の遂行や本論文の作成のために終始ご指導、ご鞭撻を賜りました静岡県立大学大学院、生活健康科学研究科、環境物質科学専攻、生体機能学研究室、下位香代子先生、保田倫子先生に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、熱心なご指導および実験に協力してくださいました、宮崎大学、農学部の中原啓之先生、静岡県立大学大学院、薬食生命科学総合学府、長寿生化学研究室内の三好規之先生、愛知学泉大学、家政学部の竹村ひとみ先生、福井県立大学、生物資源部、機能食品学分野の川畑球一先生、静岡県立大学大学院、薬食生命科学総合学府、生理学研究室、唐木晋一先生、常葉大学、教育学部、久留戸涼子先生に深くお礼申し上げます。

さらに、本論文の審査にあたり、副査として、ご助言、ご鞭撻を賜りました静岡県立大学大学院、薬食生命科学総合学府、化学環境研究室の若林先生、生態発生遺伝学研究室の小林亨先生、人類遺伝学研究室の小林公子先生に深く感謝御礼申し上げます。

また、これまでの研究生活において、私達の研究生活を円満に進めるために多大なご協力を頂いた、生体機能学研究室の秘書の熊沢美智子様、共に励みあい、研究室を盛り上げた、同研究室 OB の小柳顯陽さん、青島良輝さん、現研究室の博士後期課程 2 年の伊藤圭一様、博士前期課程 2 年の大塚好美さん、鈴木麻衣子さん、長澤達弘さん、藤田琴子さんに大変お世話になりました。深く感謝します。

最後に、博士前期課程からの 5 年間、生活を支えてくれた家族、そして、癒しをくれた愛犬チョコに感謝します。

参考文献

- [1] Bierhaus, A. Wolf, J., Andrassy, M., Rohleder, N., Humpert, P.M., Petrov, D., Ferstl, R., Von Eynatten, M., Wendt, T., Rudofsky, G., Joswig, M., Morcos, M., Schwaninger, M., Ewen, B.M., Kirschbaum, C., Nawroth, P.P.: A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **100**, 1920-1925 (2003).
- [2] H.L. Hsieh, H.H. Wang, W.B. Wu, P.J. Chu, C.M. Yang, J. Neuroinflammation **7**, 88 (2010).
- [3] Powe, D.G., Voss, M.J., Habashy, H.O., Zanker, K.S., Green, A.R., Ellis, I.O., Fentschladen, F.: Alpha-and beta-adrenergic receptor (AR) protein expression is associated with poor clinical outcome in breast cancer: an immunohistochemical study. *Breast Cancer Res.*, **130**, 457-463, (2011).
- [4] Lüthy, I.A., Bruzzone, A., Pérez Piñero, C., Castillo, L.F., Chiesa, I.J., Vázquez S.M., and Sarappa M.G.: Adrenoceptors: Non Conventional Target for Breast Cancer?. *Curr. Med. Chem.*, **16**, 1850-1862 (2009).
- [5] Cole, S.W., and Sood, A.K.: Molecular Pathways: Beta-Adrenergic Signaling in Cancer. *Clin. Cancer Res.*, **18**, 1201-1206, (2012).
- [6] Parkin, D.M.: International variation, *Oncogene*, **23**, 6329-6340 (2004).
- [7] James, C.D., Berge-Landry, H.V., Valdimardottir, H.B, Montgomery, G.H., Bovbjerg, D.H.: Urinary catecholamine levels in daily life are elevated in women at familial risk of breast cancer. *Psychoneuroendocrinology.*, **29**, 831-838 (2004).
- [8] Lillberg, K., Verkasalo, P.K., Kaprio, J., Teppo, L., Helenius, H., Koskenvuo, M., Stressful Life Events and Risk of Breast Cancer in 10,808 Women: A Cohort Study.

- Am. J. Epidemiol.*, **157**, 415-423 (2003).
- [9] Sloan, E.K., Priceman, S.J., Cox, B.F., Yu, S., Primentel, M.A., Tangkanangkai, V., Arevalo, J.M., Morizono, K., Karanikolas, B.D., Wu, L., Sood, A.K., Cole, S.W.: The Sympathetic Nervous System Induces a Metastatic Switch in Primary Breast Cancer. *Cancer Res.*, **70**, 7042-7052 (2010).
- [10] Shakhar, G., Eliyahu, S.B.: In vivo β -adrenagic stimulation suppresses natural killer activity and compromises resistance to tumor metastasis in rats. *J. Immunol.*, **160**, 3251-3258 (1998).
- [11] Thaker, P.H., Han, L.Y., Kamat, A.A., Arevalo, J.M.: Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat. Med.*, **12**, 939-944 (2006).
- [12] Powel, D.J., Voss, M.J., Zanker, K.S., Habashy, H.O., Green, A.R., Ellis, I.O., & Entschladen, F.: Beta-Blocker Drug Therapy Reduces Secondary Cancer Formation. *Oncotarget.*, **1**, 628-638 (2010).
- [13] Nelson, H.D, Huffman, L.H., Fu, R, Harris, E.L.: Genetic risk assessment and brca mutation testing for breast and ovarian cancer susceptibility: systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern.*, **143**, 362-79 (2005).
- [14] Zahid, M., Saeed, M., Lu, F., Gaikwad, N., Rogan, E., Cavalieri, E.: Inhibition of catechol-*O*-methyltransferase increases estrogen-DNA adduct formation. *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 1534-1540 (2007).
- [15] 鈴木紘一, 石浦章一, 榎森康文, 大隅萬里子, 大隅良典, 大野茂男, 木南英紀. 日本生化学会 (編), 新生化学実験講座 9 ホルモン II-非ペプチドホルモン-東京化学同人 (株), pp. 101 (1992).
- [16] Yang, L, Gaikwad, N.W., Meza, J., Cavalieri, E.L., Muti, P., Trock, B., Rogan E.G.:

- Novel biomarkers for risk of prostate cancer: results from a case-control study. *Prostate Jan.*, **69**, 41-48 (2009).
- [17] Hung, Z., Fasco, M.J., Figge, H.L., Keyomarsi, K., Kaminsky, L.S.: Expression of cytochromes: p450 in human breast tissue and tumors. *Drug Metab Dispos.*, **24**, 899-905 (1996).
- [18] Shimada, T., Hayes C.L., Yamazaki H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P., Stutter, T.R.: Activation of cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.*, **56**, 2979-2984 (1996).
- [19] Alexanda, R., David, L., Sheila, D., Dawling, S., Roodi, N., Parl, F.F.: Cytochrome P-450 1B1-mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation. *Cancer Res.*, **67**, 812-817 (2007).
- [20] Sigh, S., Chakravarti, D., Edney, J.A., Hollins, R.R., Johnson, P.J., West, W.W., Higginbotham, S.M., Cavalieri, E.L., Rogan E.G.: Relative imbalances in the expression of estrogen-metabolizing enzymes in the breast tissue with breast carcinoma. *Oncol. Rep.*, **14**, 1091-1096 (2005).
- [21] Fernandez, S.V., Russo, I.H., Russo, J.: Estradiol and its metabolites 4-hydroxyestradiol and 2-hydroxyestradiol induce mutations in human breast epithelial cells. *Int J Cancer*, **118**, 1862-1868 (2006).
- [22] Castagnetta, L.A.M., Granata, O.M., Traina, A., Ravazzolo, B., Amoroso, M., Miele, M., Bellavia, V., Agostara, B., and Carruba, G.: Tissue Content of Hydroxyestrogens in Relation to Survival of Breast Cancer Patients, *Clin. Cancer Res.*, **8**, 3146-3155 (2002).
- [23] Liehr, J.G., Fang, W.F., Sirbasku, D.A., Ari-Ulubelen, A.: Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters. *J Steroid Biochem.*, **24**, 353-356 (1986).
- [24] Newbold, R.R., Liehr, J.G.: Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by

- catechol estrogens. *Cancer Res.*, **60**, 235-237 (2000).
- [25] Gaikwad, N.W., Yang, L., Muti, P., Meza, J.L., Pruthi, S., Ingle, J.N., Rogan, E.G., Cavalieri E.L.: The molecular etiology of breast cancer: evidence from biomarkers of risk. *Int. J., Cancer.*, **122**, 1949-1957 (2008).
- [26] Chen, Z.H., Na, H.K., Hurh, Y.J., Surh, Y.J.: 4-Hydroxyestradiol induces oxidative stress and apoptosis in human mammary epithelial cells: possible protection by NF-kappaB and ERK/MAPK. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **208**, 46-56 (2005).
- [27] Lee, E.J., Oh, S.Y., Kim, M.K., Ahn, S.H., Son, B.H., Sung, M.K.: Modulatory effects of alpha- and gamma-tocopherols on 4-hydroxyestradiol induced oxidative stresses in MCF-10A breast epithelial cells. *Nutr Res Pract.*, **3**, 185-191 (2009).
- [28] Saeed, M., Rogan, E.G., Fernandez, S.V., Sheriff, F., Russo, J., Cavalieri, E.: Formation of depurinating N3Adenine and N7Guanine adducts by MCF-10F cells cultured in the presence of 4-hydroxyestradiol. *Int. J. Cancer.*, **120**, 821-4 (2007).
- [29] Devanesan, P., Todorovic, R., Zhao, J., Gross, M.L., Rogan, E.G., Cavalieri, E.L.: Catechol estrogen conjugates and DNA adducts in the kidney of male Syrian golden hamsters treated with 4-hydroxyestradiol: potential biomarkers for estrogen-initiated cancer. *Carcinogenesis.*, **22**, 489-497 (2001).
- [30] Yan, C., Lu, J., Zhang, G., Gan, T., Zeng, Q., Shao, Z., Duerksen-Hughes, P.J., Yang, J.: Benzo[a]pyrene induces complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM, ATR, and DNA-PK. *Toxicol In Vitro.*, **25**, 91-99 (2011).
- [31] Sokolov, M.V., Dickey, J.S., Bonner, W.M., Sedelnikova, O.A.: γ -H2AX in bystander cells: not just a radiation-triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication. *Cell Cycle.*, **6**, 210-212 (2007).
- [32] Ohnuki, G., Toyooka, T., Ibuki, Y.: UVB in solar-simulated light causes formation of

- BaP-photoproducts capable of generating phosphorylated histone H2AX. *Mutat. Res.*, **702**, 70-77 (2010).
- [33] Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomá's-Barberá'n, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S.: Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **59**, 113-122 (2004).
- [34] Takemura, H., Sakakibara, H., Yamazaki, S., Shimoi, K., Breast cancer and flavonoids - a role in prevention. *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 6125-6132 (2013).
- [35] Kuo, S.M.: Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett.*, **110**, 41-48 (1996).
- [36] Nishino, H., Inoue, J., and Kawanishi, S.: Anti-tumor-promoter activity and oxygen radical scavenging activity of flavonoid compounds. *Environ. Mutagen Res.*, **18**, 63-66 (1996).
- [37] 山本浩代.: シソ種子ポリフェノールの抗アレルギー作用, 食品と開発, **32**, 41-43 (1997).
- [38] Samejima, K., Kanazawa, K., Ashida, K., Danno, G.: Luteolin: A strong antimutagen against dietary carcinogen, Trp-p-2, in peppermint, sage, and thyme. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 410-414 (1995).
- [39] Yoshida, M., Sakai, T., Hosakawa, N., Mrui, K., Matumoto, K., Fujioka, A., Nishino, H., and Aoike, A.: The effects of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett.*, **260**, 10-13 (1990).
- [40] Nagao, M., Morita, N., Yahagi, T., Shimizu, M., Kuroyanagi, M., Fukuoka, M., Yoshihira, K., Natori, S., Fujino, T., and Sugimura, T.: Mutagenities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ. Mutagen.*, **3**, 401-419 (1981).
- [41] Williamson, G., Barron, D., Shimoi, K., Terao, J.: In vitro biological properties of

- flavonoid conjugates found in vivo. *Free. Radic. Res.*, **39**, 457-469 (2005).
- [42] Hertog, M.G., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D.: Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer.*, **20**, 21-29 (1993).
- [43] Scalbert, A., Williamson, G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, **130**, 2073S-2085S (2000).
- [44] Day, A.J., DuPont, M.S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.J., Williamson, G.: Deglycosylation of flavonoid and isoavonoid glycosides by human small intestine and liver α -glucosidase activity. *FEBS. Lett.*, **436**, 71-75 (1998).
- [45] Day, A.J., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G., Morgan, M.R., Williamson, G.: Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free. Radic. Res.*, **35**, 941-952 (2001).
- [46] Mullen, W., Edwards, C.A., Crozier, A.: Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br. J. Nutr.*, **96**, 107-116 (2006).
- [47] Murota, K., Hotta, A., Ido, H., Kawai, Y., Moon, J.H., Sekido, K., Hayashi, H., Inakuma, T., and Terao, J., Antioxidant capacity of albumin-bound quercetin metabolites after onion consumption in humans. *J. Med. Invest.*, **54**, 370-374 (2007).
- [48] 厚生労働省. 人口動態統計月報年計 (概数).
- [49] 「がんの統計 10」 (財団法人がん研究振興財団).
- [50] Lu, F., Zaid, M., Saeed, M., Cavalieri, E., Rogan, E.G.: Estrogen metabolism and formation of estrogen-DNA adducts in estradiol-treated MCF-10F cells The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induction and catechol-*O*-methyltransferase inhibition. *J. Steroid Biochem Mol Biol*, **105**, 150-10158 (2007).

- [51] Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., Pommier, Y.: γ -H2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, **8**, 957-967 (2012).
- [52] Antoni, M.H., Lutgendorf, S.K., Cole, S.W., Dhabhar, F.S., Sephton, S.E., McDonald, P.J., Stefanek, M., Sood, A.K.: The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat. Rev. Cancer.*, **6**, 240-248 (2006).
- [53] Nishio, Y., Nakano, Y., Deguchi, Y., Terato, H., Ide, H., Ito, C., Ishida, H., Takagi, K., Tsuboi, H., Kinae, N., Shimoi K.: *Genes. Environ.*, **29**, 17-22 (2007).
- [54] Hara, M.R., Kovacs, J.J., Whalen, E.J., Rajagopal, S., Strachan, R.T., Grant, W., Towers, A.J., Willams, B., Lam, C.M., Xiao, K., Shenoy, S.K., Gregory S.G., Ahn, S., Duckett, D.R., Lefkowitz, R.J., A stress response pathway regulates DNA damage through β 2-adrenoreceptors and β -arrestin-1. *Nature.*, **477**, 349-353 (2011).
- [55] Motoyama, K., Nakai, Y., Miyashita, T., Fukui, Y., Morita, M., Sanmiya, K., Sakakibara, H., Matsumoto, I., Abe, K., Yakabe, T., Yajima, N., Shimoi, K.: Isolation stress for 30 days alters hepatic gene expression profiles, especially with reference to lipid metabolism in mice. *Physiol Genomics.*, **10**, 79-87 (2009).
- [56] Tsurusaki, T., Sakakibara, H., Aoshima, Y., Yamazaki, S., Sakono, M. and Shimoi, K.: Diurnal rhythmicity in biological processes involved in bioavailability of functional food factors. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **52**, 208-214 (2013).
- [57] Sakakibara, H., Ogawa, T., Koyanagi, A., Kobayashi, S., Goda, T., Kumazawa, S., Kobayashi, H., Shimoi, K.: Distribution and excretion of bilberry anthocyanins [corrected] in mice. *J. Agric Food Chem.*, **57**, 1-6 (2009).
- [58] Ishisaka, A., Ichikawa, S., Sakakibara, H., Mariusz, K.P., Nakamura, T., Kato, Y., Ito, M., Miyamoto, K., Tsuji, A., Terao, J.: Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radic. Biol. Med.*, **51**,

- 1329-1336 (2011).
- [59] Laura, M., Williamson and Susan, P., Lees, M.: Estrogen receptor α -mediated transcription induces cell cycle-dependent DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, **32**, 279-285 (2011).
- [60] Yamazaki, S., Sakakibara, H., Takemura, H. and Shimoi, K.: 4-Hydroestradiol induces γ -H2AX in the presence of an inhibitor of catechol-O-methyltransferase in human breast cancer MCF-7 cells. *Genes Environ.*, **34**, 129-135 (2012).
- [61] Vazquez, S.M., Pignataro, O., Luthy, I.A.: Alpha2-adrenergic effect on human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, **55**, 41-49 (1999).
- [62] Pérez Piñero, C., Bruzzone, A., Sarappa, M.J., Castillo, L.F., Lüthy, I.A.: Involvement of α 2- and β 2-adrenoceptors on breast cancer cell proliferation and tumour growth regulation. *Br. J. Pharmacol.*, **166**, 721-736 (2012).
- [63] Lüthy, I.A., Bruzzone, A., Pérez Piñero, C., Castillo, L.F., Chiesa, I.J., Vázquez, S.M and Sarappa, M.G.: Adrenoceptors: Non Conventional Target for Breast Cancer?, *Curr. Med. Chem.*, **16**, 1850-1862 (2009).
- [64] Li, J., Yan, B., Huo, Z., Liu, Xu, J., Sun, Y, Liu, Y., Liang, D., Peng, L., Zhang, Y., Zhou, Z.N., Shin, J., Cui, J., Chen, Y.H.: beta2- but not beta1-adrenoceptor activation modulates intracellular oxygen availability. *J. Physiol.*, **588**, 2987-2998 (2010).
- [65] Gong, K., Li, Z., Xu, M., Du, J., Lv, Z., Zhang, Y.: A novel protein kinase A-independent, beta-arrestin-1-dependent signaling pathway for p38 mitogen-activated protein kinase activation by beta2-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.*, **283**, 29028-29036 (2008).
- [66] Brouard, S., Berberat, P.O., Tobiasch, E., Seldon, M.P., Bach, F.H., Soares, M.P.: Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription

- factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **277**, 17950-17961 (2002).
- [67] Shin, I., Kim, S., Song, H., Kim, H.R., Moon, A.: H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **280**, 14675-14683 (2005).
- [68] Nakayama, Y., Yamaguchi, N., Role of CYCLIN B1 levels in DNA damage and DNA damage-induced senescence. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **305**, 303-337 (2013).
- [69] 宮澤恵二, 伊藤進: がん増殖と悪性化の分子機構, 化学同人, pp. 78-81 (2012).
- [70] Vandooren, J., Van den Steen, P.E., Opdenakker, G.: Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **48**, 222-272 (2013).
- [71] Ridley AJ.: Life at the leading edge. *Cell.*, **145**, 1012-1022 (2011).
- [72] Coussens, L.M., Raymond, W.W., Bergers, G., Laig-Webster, M., Behrendsen, O., Werb, Z., Caughey, G.H., Hanahan, D.: Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes. Dev.*, **1**, 1382-1397 (1999).
- [73] Rubin, E.: Rubin's Pathology 4TH edition, Lippincott Williams and Wilkins/Wolterskluwer Health (2005).
- [74] Sood, A.K., Bhatti, R., Kamat, A.A., Charles N. Landen, Han, L., Thaker, P.H., Li, Y., Gershenson, D.M., Lutgendorf, S., and Cole, S.W.: Stress Hormone Mediated Invasion of Ovarian Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.*, **12**, 369-375 (2006).
- [75] Huang, S., Van, Arsdall M, Tedjarati S.: Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **94**, 1134-1142 (2002).

- [76] Yuan, Z., Hu, Z., Zhang, L., Yan, X., Wang, H., Wu, B.: Effects of quercetin on invasion, migration, proliferation and cell cycle of glioma U87 cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.*, **33**, 207-211 (2013).
- [77] Cole, S.W., Sood, A.K.: Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1201-1206 (2012).
- [78] Sood, A.K., Bhatt, R., Kamat, A.A., Landen, C.N., Han, L., Thaker, P.H, Li, Y., Gershenson, D.M., Lutgendorf, S., Cole, S.W.: Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, **12**, 369-375 (2006).
- [79] Iaccarino, G., Ciccarelli, M., Sorriento, D., Galasso, G., Campanile, A., Santulli, G., Cipolletta, E., Cerullo, V., Cimini, V., Altobelli, C.G., Piscione, F., Priante, O., Pastore, L., Chiariello, M., Salvatore, F., Koch, W.J., Trimarco, B.: Ischemic neoangiogenesis enhanced by beta2-adrenergic receptor overexpression: a novel role for the endothelial adrenergic system. *Circ. Res.*, **97**, 1182-1189 (2005).
- [80] Lai, K.B., Sanderson, J.E., Yu, C.M.: The regulatory effect of norepinephrine on connective tissue growth factor (CTGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in cultured cardiac fibroblasts. *Int. J. Cardiol.*, **163**, 183-189 (2013).
- [81] Schuller, H.M.: Beta-adrenergic signaling, a novel target for cancer therapy? *Oncotarget.*, **1**, 466-469, (2010).
- [82] Shin, I., Kim, S., Song, H., Kim, R.C., Moon, A.: H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **280**, 14675-14683 (2005).
- [83] Lee, K.W., Kim, M.S., Kang, N.J., Kim, D.H., Surh, Y.J., Lee, H.J., Moon. A.: H-Ras selectively up-regulates MMP-9 and COX-2 through activation of ERK1/2 and

- NF-kappaB: an implication for invasive phenotype in rat liver epithelial cells. *Int. J. Cancer.*, **119**, 1767-1775 (2006).
- [84] Kim, J.H., Lee, K.W., Lee, M.W., Lee, H.J., Kim, S.H., Surh, Y.J.: Hirsutenone inhibits phorbol ester-induced upregulation of COX-2 and MMP-9 in cultured human mammary epithelial cells: NF-kappaB as a potential molecular target. *FEBS Lett.*, **580**, 385-392 (2006).
- [85] Bos, J.L.: ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.*, **49**, 4682-4689 (1989).
- [86] Schmitt, J.M., Stork, P.J.: beta 2-adrenergic receptor activates extracellular signal-regulated kinases (ERKs) via the small G protein rap1 and the serine/threonine kinase B-Raf. *J. Biol. Chem.*, **275**, 25342-25350 (2000).
- [87] Vijayababu, M.R., Arunkumar, A., Kanagaraj, P., Venkataraman, P., Krishnamoorthy, G., Arunakaran, J.: Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). *Mol. Cell. Biochem.*, **287**, 109-116 (2006).
- [88] Liotta, L.A., Steeg, P.S., Stetler-Stevenson, W.G.: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.*, **64**, 327-336 (1991).
- [89] Liotta, L.A.: Cancer cell invasion and metastasis. *Sci. Am.*, **266**, 54-59 (1992).
- [90] Stetler-Stevenson, W.G, Surg.: The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis. *Oncol. Clin. N. Am.*, **10**, 383-392 (2001).
- [91] Sauer, C.G., Kappeler, A., Spath, M., Kaden, J.J., Michel, M.S., Mayer, D., Bleyl, U., Grobholz, R.: *Virchows Arch.* **444**, 518-526 (2004).
- [92] Yuan, Z., Hu, Z., Zhang, L., Yan., X., Wang, H., Wu, B.: Effects of quercetin on invasion, migration, proliferation and cell cycle of glioma U87 cells. *Nan Fang Yi Ke*

Da Xue Xue Bao., **33**, 207-211 (2013).

- [93] Lai, W.W., Hsu, S.C., Chueh, F.S., Chen, Y.Y., Yang, J.S., Lin, J.P., Lien, J.C., Tsai, C.H., Chung, J.G.: Quercetin inhibits migration and invasion of SAS human oral cancer cells through inhibition of NF- κ B and matrix metalloproteinase-2/-9 signaling pathways. *Anticancer Res.*, **33**, 1941-1950 (2013).
- [94] Im, I., Park, K.R., Kim, S.M., Kim, C., Park, J.H., Nam, D., Jang, H.J., Shim, B.S., Ahn, K.S., Mosaddik, A., Sethi, G., Cho, S.K., Ahn, K.S.: The butanol fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract suppresses MMP-2 and MMP-9 expression and activity through the suppression of the ERK1/2 MAPK signaling pathway. *Nutr. Cancer.*, **64**, 255-266 (2012).