

培養NK細胞の抗大腸癌活性に及ぼす スルフォラファンの効果

Effect of sulforaphane on cultured NK cell activity against colon cancer cells.

吉浦健太 鳥居奈央

Kenta YOSHIURA and Nao TORII

1. はじめに

近年、健康寿命の延長を目指すなかで、食品の健康効果に対する関心がますます高まっている。糖質、たんぱく質、脂質など主要栄養素の摂取量およびその適正バランスに配慮することをはじめ、野菜、発酵食品、食物繊維など腸内環境の改善を意識した食材を取り入れることなど、食生活全体を考慮した包括的な視点が重要である。また一方では、スーパーフードに代表されるような、特定の栄養素に富み、特別な健康効果が期待される多様な食材が見出されており、健康的な食生活の選択の範囲は拡大の一途である。

癌は、健康長寿を妨げる主要な疾患であることは論を待たない。ただし、癌の種類によっては、食生活による一定の予防効果が期待されている。癌予防の食生活を考える上で、食生活全体をみる視点は重要であるが、それに加え、癌細胞に特異的に作用する食品成分の探索も有効な戦略である。

癌予防効果が期待される食品成分は多数挙げられるが、本研究では、ブロッコリーに含まれるスルフォラファンに着目し、癌細胞を攻撃するナチュラルキラー（NK）細胞の活性を高める可能性について検討した。

ヒトの抗癌免疫システムは、自然免疫系と獲得免疫系に区別されるが、抗原特異的な獲得免疫系が癌治療法としての活用が期待される一

方、自然免疫系のNK細胞は抗原非特異的で機動力が高いという特質があるため、癌治療のみならず予防において力を発揮することが期待される。生体は日夜、種々のストレスを受けており、紫外線や放射線など変異原性を示す傷害因子によりDNAが損傷し、その結果、癌細胞が生まれると想定されている。NK細胞は体内を循環、監視し、異常な細胞を検知し即座に破壊することで、臨床的ながんの発症を抑えていると考えられる。よって、このNK細胞の機能を増強する食品成分を特定する研究は、がん予防対策として画期的である。

われわれはこれまで、NK細胞株やヒト分離NK細胞と、大腸癌や膵癌細胞株との共培養モデルを作製し、食物成分の効果を検討してきた^{1) 2) 3) 4)}。本研究では、NK細胞株KHYG-1と大腸癌細胞株DLD-1の共培養モデルを用い、スルフォラファンのNK細胞抗癌活性に与える影響を、培養時間や投与のタイミングなどの条件をかえた3つのパターンを作成し評価した。

2. 材料と方法

細胞株および培養法

NK細胞株はKHYG-1（独立行政法人医薬基盤研究所JCRB細胞バンク）、標的となる癌細胞株は大腸癌細胞DLD-1（東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター）を用いた。基本培養液は、RPMI-1640（シグマ）に、10%牛胎児血清（FBS）、ペニシリン（100U/mL）／ストレ

プトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (ライフテクノロジー) を添加したものとした。KHYG-1 細胞の培養には、基本培養液に50ng/mLヒトリコンビナントインターロイキン2 (hrIL-2; ORF Genetics) を添加した。培養細胞は、二酸化炭素 (5%) を加えた大気をみだした37°C恒温槽で培養した。

培養細胞は、96穴プレートに播種した。播種細胞数の計数は、EVE Automatic cell counter (NanoEnTek, Korea) を使用した。

食品成分

スルフォラファン (Cayman chemical, MI, USA) を使用した。

生存細胞数の評価

96穴プレートの底面に付着したDLD-1の生存細胞数を、Cell Counting Kit-8 (CCK-8; 同仁化学研究所) で測定した。具体的には、まずリン酸塩緩衝液 (PBS) で2回洗浄し、共培養のKHYG-1細胞を除去した。その後、キット中のWST-8試薬を含む培地を加え3時間培養し、生細胞が産生するNADHの還元活性により生じたホルマザンの吸光度 (450nm; 対照630nm) を測定した。

統計処理

平均値の差の検定には、t-検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

NK細胞株KHYG-1による大腸癌細胞株DLD-1の生存数低下に及ぼすスルフォラファンの効果パターン1

パターン1の培養方法を、図1 (下) に示す。

- ① DLD-1細胞を96穴プレートのウェルあたり 10^4 個播種し、培養を開始した。
- ② 1日後、5あるいは10 μM のスルフォラファンを添加した。
- ③ 2日後、ウェルあたり500、1000、あるいは

は2000個のKHYG-1細胞を加えた。

- ④ 3日後、生存するDLD-1細胞数を測定した。

結果は、図1 (上) に示すように、KHYG-1を加えないとき、10 μM のスルフォラファンの添加により、細胞数は34%に減少した。

KHYG-1を500個加えたとき、単独では、DLD-1細胞数は減少しなかったが、5 μM 以上のスルフォラファンの添加により、細胞数は有意に減少した。

KHYG-1を1000、あるいは2000個加えたとき、DLD-1細胞数は有意に減少した。その上に5 μM 以上のスルフォラファンを加えると、DLD-1細胞数はさらに有意に減少した。

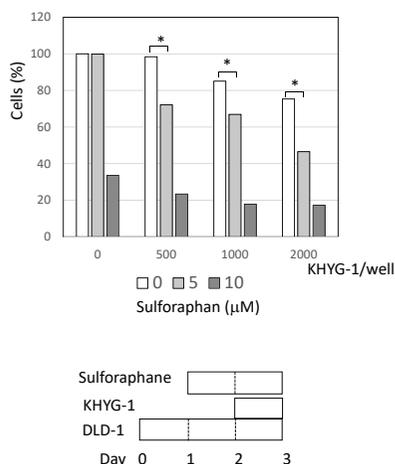


図1 KHYG-1細胞のDLD-1細胞殺傷活性に及ぼすスルフォラファンの効果 (パターン1)

(上) ウェルあたりDLD-1細胞10000個に対し、KHYG-1細胞を0、500、1000、2000個加え、共培養した。さらに、スルフォラファンを、0、5、10 μM 添加した。実験終了時の、DLD-1細胞の生存率を示した。*: $P < 0.05$ 。

(下) DLD-1細胞を播種し、1日後にスルフォラファンを添加し、2日後にKHYG-1細胞を共培養し、3日後にDLD-1生存細胞数を計測した。

パターン2

パターン2の培養方法を、図2 (下) に示す。

- ① DLD-1細胞を96穴プレートのウェルあたり 10^4 個播種し、培養を開始した。
- ② 1日後、ウェルあたり500、1000、あるいは2000個のKHYG-1細胞を加えた。同時に、

培養NK細胞の抗大腸癌活性に及ぼすスルフォラファンの効果

10 μ Mのスルフォラファンを添加した。

③ 3日後、生存するDLD-1細胞数を測定した。

結果は、図2（上）に示すように、KHYG-1を加えないとき、5 μ M以上のスルフォラファンの添加で、細胞数は有意に減少した。

KHYG-1を500、1000あるいは2000個加えたとき、それぞれ単独で、DLD-1細胞数は有意に減少した。その上に5 μ M以上のスルフォラファンを加えると、細胞数はさらに有意に減少した。

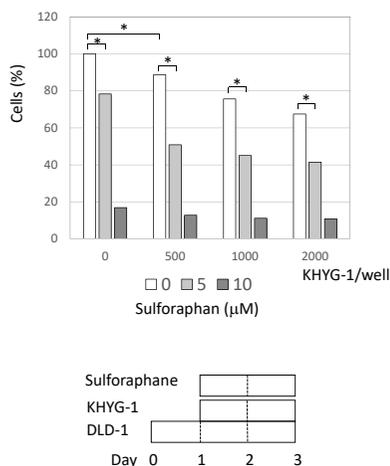


図2 KHYG-1細胞のDLD-1細胞殺傷活性に及ぼすスルフォラファンの効果（パターン2）

（上）ウェルあたりDLD-1細胞10000個に対し、KHYG-1細胞を0、500、1000、2000個加え、共培養した。さらに、スルフォラファンを、0、5、10 μ M添加した。実験終了時の、DLD-1細胞の生存率を示した。*：P<0.05。

（下）DLD-1細胞を播種し、1日後にスルフォラファンを添加するとともにKHYG-1細胞を共培養し、3日後にDLD-1生存細胞数を計測した。

パターン3

パターン3の培養方法を、図3（下）に示す。

① DLD-1細胞を96穴プレートウェルのウェルあたり10⁴個播種し、培養を開始した。

② 1日後、ウェルあたり500、あるいは2000個のKHYG-1細胞を加えた。同時に、10 μ Mのスルフォラファンを添加した。

③ 5日後、生存するDLD-1細胞数を測定した。

結果は、図3（上）に示すように、KHYG-1を加えないとき、10 μ Mのスルフォラファンの

添加により、細胞数は40%に減少した。

KHYG-1を500個加えたとき、単独では、DLD-1細胞数は減少しなかったが、その上に10 μ Mのスルフォラファンを添加すると、細胞数は有意に減少した。

KHYG-1を2000個加えたとき、単独でDLD-1細胞数は15%に減少した。その上に10 μ Mのスルフォラファンを加えると、細胞数はさらに有意に減少した。

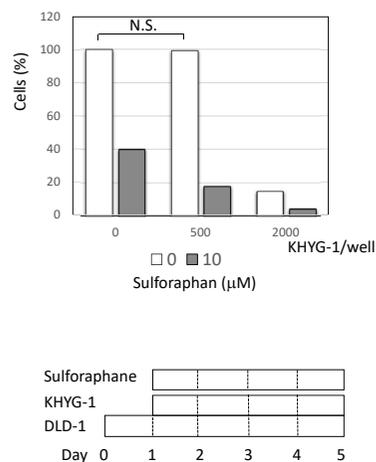


図3 KHYG-1細胞のDLD-1細胞殺傷活性に及ぼすスルフォラファンの効果（パターン3）

（上）ウェルあたりDLD-1細胞10000個に対し、KHYG-1細胞を0、500、2000個加え、共培養した。さらに、スルフォラファンを、0、10 μ M添加した。実験終了時の、DLD-1細胞の生存率を示した。N.S.：有意差なし。

（下）DLD-1細胞を播種し、1日後にスルフォラファンを添加するとともにKHYG-1細胞を共培養し、5日後にDLD-1生存細胞数を計測した。

4. 考察

スルフォラファンはブロッコリーなどアブラナ科に属する野菜が含有するイソチオシアネートの1種である。ブロッコリーの中で、スルフォラファンは前駆体であるグルコラファニンとして存在する。グルコラファニンは、ミロシナーゼにより加水分解され、スルフォラファンが生成される。ブロッコリーは、グルコラファニンおよびミロシナーゼの両方を含有しているが、

それぞれを持つ細胞が異なる^{5) 6)}。よって、細かく刻んだときや、口腔内で咀嚼したときなど、両方の細胞が破碎されるとグルコラファニンとミロシナーゼが遊出し、酵素反応が起こり、スルフォラファンが生成される。ただしブロッコリーを加熱調理した場合、グルコラファニンは熱に安定であるが、ミロシナーゼは熱で不活化するため、スルフォラファンの生成が低下する。その対策として、ブロッコリーを加熱した場合は、辛子調味料を加えることが有効である。辛子に含まれるミロシナーゼによってスルフォラファンが生成され生体に利用されることが、ヒトの実験で報告されている⁷⁾。またミロシナーゼは、ある種の腸内細菌によって分泌されるため、腸内で生成されたスルフォラファンが腸管から吸収され、ヒトに健康効果をもたらしている可能性が指摘されている⁸⁾。

スルフォラファンの抗癌作用には、複数のメカニズムが知られている⁹⁾。まず、第2相解毒酵素の誘導により、発がん物質の無毒化に寄与する。グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) などの解毒酵素は、bZip型転写因子であるNrf2の発現調節を受けている。Nrf2は、通常Keap1と細胞質で複合体を形成しているが、スルフォラファンがKeap1のCys残基に共有結合すると、Nrf2がKeap1から離れて核内に移行し、転写因子として働く。また、Raf1-MEK-ERK2 経路を介し、Nrf2を活性化することも報告されている。ただし、解毒酵素の誘導によって、抗癌剤の効果を損なうおそれがあることに注意が必要である。

次に、スルフォラファンは、NFkB経路を阻害して癌の進行を抑制する可能性がある。スルフォラファンは、NFkB経路の上流にあるトル様受容体-4 (TLR-4) の細胞外ドメインのシステイン残基と複合体を形成しリガンドとの結合を阻害することでNFkB経路を抑制することや、NFkB自体の発現抑制、およびNFkBのDNAとの結合を阻害することなどが報告されている。

また、スルフォラファンは、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害作用を有することで、エピジェネティック機序に介入する。HDACは、ヒストンを脱アセチル化し、DNAとの結びつきを強固にし、遺伝子の転写を抑制する作用がある。よって、HDACを抑制することは遺伝子の転写を促進することにつながる。この機序により、スルフォラファンが、Bax、Bad、p21などアポトーシス促進遺伝子の発現を促進し、癌細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。

また、スルフォラファンが、マイクロRNAの発現を修飾し、発癌を予防する可能性も示唆されている¹⁰⁾。

スルフォラファンがNK細胞活性を増強することを示唆する実験結果も数件報告されている。スルフォラファンがIL-2およびIFN- γ の産生を促進し、NK細胞活性を亢進することが認められることが、エールリッヒ腹水癌マウス¹¹⁾や、B16F-10メラノーマ担癌マウス¹²⁾で報告されている。マウス前立腺癌のモデルでは、スルフォラファンが樹状細胞のIL-12の分泌を促進し、NK細胞を活性化することが報告されている¹³⁾。WEHI白血病細胞負荷マウスにおいても、スルフォラファンがNK細胞を活性化していることが認められている¹⁴⁾。またA549 肺癌細胞株およびMDA-MB-231乳癌細胞株においては、スルフォラファンが、NKG2DリガンドであるMICA/Bの発現を増強し、NK細胞に対する感受性を高めていることが報告されている¹⁵⁾。

これらの報告は、スルフォラファンが、NK細胞に作用し抗癌活性を亢進するだけではなく、癌細胞に作用し、NK細胞の攻撃を受けやすくしていることを示唆する。今回の実験におけるパターン1では、スルフォラファンで1日処理した後に、KHYG-1細胞を1日作用させることによって、KHYG-1による良好な抗癌効果がみられた。この結果より、前投与のスルフォラファンが、癌のNK細胞に対する感受性を高めた可能性も考えられる。

今回の実験のパターン2では、スルフォラファンの添加とKHYG-1の共培養を同時に2日間おこなった。スルフォラファンの細胞傷害作用が、KHYG-1細胞に及んだ場合、KHYG-1細胞が傷害されるため、結果的にDLD-1細胞の生存率が上がることもある。しかし、図2に示すように、スルフォラファンの存在下で、濃度依存的にDLD-1細胞の生存率が低下しているため、スルフォラファンがKHYG-1細胞を傷害している影響は低い。また、500個のKHYG-1共培養時における、スルフォラファン5 μm の添加による殺傷率は、それぞれ単独での殺傷率を乗じたものより大きいので、スルフォラファンが、KHYG-1細胞の抗癌活性を増強していることが示唆される。

今回の実験のパターン3では、スルフォラファンの添加とKHYG-1の共培養を同時に4日間おこなった。96穴プレートのように狭い培養空間で、増殖能の高い癌細胞の長期培養による評価は困難であるが、この実験でも、スルフォラファンがKHYG-1の抗癌効果を強めていることが示唆された。

以上、文献的考察を含め、スルフォラファンの作用が、直接癌細胞を攻撃できること、NK細胞に作用してその抗癌作用を増強すること、癌細胞に作用して、NK細胞に対する感受性を高めることなど、複数のモードがあることが示唆された。日常的に食事で野菜を摂取する場合、例えばスルフォラファンのような特定の成分の血中濃度は、それを含む野菜の摂取量や頻度に応じた増減があり、薬物のようにコントロールすることは困難である。しかし、複数の作用モードがあれば、血中濃度の増減にかかわらず効果が発揮されやすい可能性がある。このように、NK細胞の抗癌活性を増強できる作用を持つことにより、スルフォラファンは癌予防効果に大変優れた食品成分であると考えられる。

5. 結び

ヒトNK細胞株KHYG-1と、大腸癌細胞株

DLD-1を用いたNK細胞抗癌モデルにおいて、スルフォラファンの効果を検討した。培養日数や、スルフォラファンの作用時間などを変えた3つのパターンで検討した結果、スルフォラファンが、直接的な抗癌効果を有するのみならず、KHYG-1細胞の抗癌効果を増強することが示唆された。

文献

- 1) 吉浦健太: 共立女子大学家政学部紀要, 61. 109-114 (2015)
- 2) 吉浦健太: 共立女子大学家政学部紀要, 62. 135-143 (2016)
- 3) 鳥居奈央, 吉浦健太: 共立女子大学家政学部紀要, 63. 107-112 (2017)
- 4) 吉浦健太, 鳥居奈央: 共立女子大学家政学部紀要, 64. 79-84 (2018)
- 5) Koroleva, O.A., et al.: *Plant Physiol*, 124. 599-608 (2000)
- 6) Andreasson, E., et al.: *Plant Physiol*, 127. 1750-63 (2001)
- 7) Okunade, O., et al.: *Mol Nutr Food Res*, 62. e1700980 (2018)
- 8) Tian, S., et al.: *J Sci Food Agric*, 98. 1255-1260 (2018)
- 9) Bayat Mokhtari, R., et al.: *J Cell Commun Signal*, 12. 91-101 (2018)
- 10) Dacosta, C. and Y. Bao: *Nutrients*, 9. (2017)
- 11) Thejass, P. and G. Kuttan: *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 28. 443-57 (2006)
- 12) Thejass, P. and G. Kuttan: *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 29. 173-86 (2007)
- 13) Singh, S.V., et al.: *Cancer Res*, 69. 2117-25 (2009)
- 14) Shih, Y.L., et al.: *Mol Med Rep*, 13. 4023-9 (2016)
- 15) Amin, P.J. and B.S. Shankar: *Life Sci*, 126. 19-27 (2015)