



Growth inhibition of estrogen receptor positive human breast cancer cells by Taheebo from the inner bark of *Tabebuia avellanedae* tree

George Y.C. Wong

Strang Cancer Prevention Center

B.MUKHERJEE¹, N.TELANG² and G.Y.C. WONG¹

¹Strang Cancer Prevention Center, New York, NY; ²Palindrome Liaisons, Montvale, NJ, USA

Abstract:

Selective estrogen receptor(ER)modulators are used as a therapy for ER⁺ clinical breast cancer, but they exhibit adverse effects. Herbal medicines may provide an alternative or complementary approach. Taheebo, extracted from the inner bark of the *Tabebuia avellanedae* tree found in the Brazilian Amazon, exhibits selective anti-proliferative effects in carcinoma cell lines. The present study identifies the mechanistic leads for the inhibitory effects of Taheebo.

Human breast carcinoma derived ER⁺ MCF-7 cells were used as the model. Aqueous extract of Taheebo was the test compound. Cell cycle analysis, clonogenic assay, and global gene expression profiles were the quantitative parameters. Taheebo treatment resulted in a dose/time-dependent growth inhibition(S phase arrest, reduced clonogenicity)and initiation of apoptosis (chromatin condensation). A 6-h treatment with 1.5 mg/ml Taheebo modulated the gene expression of G2 specific cyclin B 1 (-2.0-fold); S phase specific PCNA(-2.0-fold) and OKL38(+11.0-fold); apoptosis specific GADD-45 family(+1.9-5.4-fold), Caspases(+1.6-1.7-fold), BCL-2 family(-1.5-2.5-fold), estrogen responsive ESRI(-1.5-fold), and xeno-biotic meta-bolism specific CYP 1A1(+19.8 fold) and CYP 1B1(+7.9-fold). The anti-proliferative effects of Taheebo correlate with down-regulated cell cycle regulatory and estrogen responsive genes, and up-regulated apoptosis specific and xeno-biotic metabolism specific genes. These data validate a rapid mechanistic approach to prioritize efficacious herbal medicines, thereby complementing the existing endocrine therapy for breast cancer.

Keywords: human breast carcinoma cells, growth inhibition, global gene expression profile

Introduction

It is well recognized that ~80% of sporadic clinical breast cancers express estrogen receptor (ER) and that endocrine therapy with or without chemotherapy is a common treatment option (1,2). However, long-term treatment with chemo-endocrine therapy is frequently associated with adverse toxicity that compromises patient compliance (3,4).

In recent years complementary and alternative approaches utilizing herbal medicines are being extensively used independently, or as adjuvants to chemo-endocrine therapy in an effort to reduce therapy related toxicity and enhance efficacy (3,5-8). However, long-term safety, efficacy and toxicity of herbal medicines and their interactions with conventional therapeutic regimen remain to be established.

Taheebo, a naturally occurring constituent of the inner bark of the *Tabebuia avellanedae* tree found in the Brazilian Amazon, has been used for over 1,500 years in South America to treat a variety of health conditions(9-11). In the USA, Taheebo is available as a nutritional supplement under the name Pau d' f Arco tea. However, the mechanism(s) of action, molecular targets of efficacy and long-term toxicity profile of Taheebo remain to be identified.

The human breast carcinoma derived MCF-7 cell line represents a widely used preclinical cell culture model for hormone responsive ER⁺ clinical breast cancer. This model has been extensively utilized in *in vitro* (cell culture) as well as *in vivo* (xeno-transplant) approaches to evaluate the efficacy of selective estrogen receptor modulators and aromatase inhibitors for preventive/therapeutic intervention of hormone responsive ER⁺ clinical breast cancer(12,13).

The experiments in the present study utilized the MCF-7 cell culture model to examine the growth inhibitory effects of Taheebo and identify possible mechanistic leads for its efficacy. The phenomenological and mechanistic data generated from this study provide evidence that the growth inhibitory effects of Taheebo are associated with down-regulated expression of several cell cycle regulatory and estrogen responsive genes, and with up-regulated expression of apoptosis specific genes and of xeno-biotic metabolism specific genes. Taken together, the outcome of this study validates the present experimental approach for a mechanism based evaluation of the efficacy of plant derived medicinal products for therapy of hormone responsive ER⁺ breast cancer.

Material and methods

ER⁺ human mammary carcinoma MCF-7 cell line.

The ER⁺ human mammary carcinoma derived MCF-7 cell line was obtained from ATCC, Manassas, VA. The cell line was maintained and propagated in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM l-glutamine, 10 µg/ml bovine insulin and 1% penicillin-streptomycin mixture as recommended by the supplier. Routinely, cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air, and were subcultured at about 70% confluency.

Dose response of Taheebo.

Lyophilized powder of non-fractionated Taheebo was provided by Taheebo Japan Co.Ltd. (Osaka, Japan). This powder was dissolved in double distilled water at a concentration of 500 mg/ml to make the stock solution. This stock solution was serially diluted in the MEM culture medium to obtain various concentrations of Taheebo ranging from 1.5, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 and 0.05 mg/ml for dose response experiments. The initial dose response of a 6-day duration was conducted at the concentration range of 0.05-0.5 mg/ml. The viable cell counts were obtained using a hemocytometer after trypan blue staining and were confirmed using a coulter counter. For the experiments on cell cycle analysis, induction of apoptosis/necrosis and clonogenicity Taheebo was evaluated at the concentration of 0.75 mg/ml. For micro-array based gene expression profiles and electron microscopy Taheebo was evaluated at a concentration of 1.5 mg/ml for durations of 6 and 24 h, respectively.

Cell cycle progression.

For cell cycle analysis, controls and Taheebo treated cultures were trypsinized and washed with PBS. The cell suspensions were fixed in 75% ethanol and stained with propidium iodide (PI). The fluorescence assisted cell sorting was performed using a flow cytometer (BD FACS Canto, Becton Dickenson), and percent distribution of cell population in G₀/G₁, S, and G₂/M phases of cell cycle were calculated using the multicycle software. The data were expressed as G₁:S+G₂/M ratio.

Electron microscopy for apoptosis and necrosis.

MCF-7 cells treated with 1.5 mg/ml of Taheebo for 24 h and parallel non-treated controls were fixed with 2.5% Glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 1 h at room temperature, rinsed in the same buffer several times, post-fixed in 1% osmium tetroxide solution, dehydrated in serial ethanol dilutions and embedded in Poly-Bed araldite media. Ultra-thin sections (65-70 nm) were then counterstained with uranyl acetate and lead citrate and viewed under a Philips-410 transmission electron microscope (Phillips, Eindhoven, Holland).

Clonogenic assay.

This assay was performed using a protocol similar to the one previously published (14). Briefly, MCF-7 cells were pre-treated with Taheebo at a concentration of 0.75 mg/ml for 72 h. The treated cells were trypsinized, washed and re-plated at a seeding density of 1,000 cells per flask.

The untreated control cells were also re-plated at an identical seeding density. Both sets of cultures were maintained without any further treatment for 8 days. Percentage of survival was calculated as (colony number in treated group / colony number in control group) x 100.

Micro-array analysis for global gene expression profile.

Cells (1.0x10⁶ cells per flask) were plated in T25 flasks 24 h prior to treatment. Treatment with Taheebo was performed for 6 h at a dose of 1.5 mg/ml. RNA was isolated following the protocol for RNeasy kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA).

The RNA was quantified using a spectrophotometric assay by absorbance at 260 nM. The integrity of RNA was evaluated by, i) 260:280 absorbance ratio, ii) 28S:18S intensity ratio, and iii) RNA integration number (RIN) using the Bioanalyzer (Agilent Technologies). RNA was amplified using a low input linear amplification kit according to the process outlined by the manufacturer (Agilent Technologies). Amplified target cRNA (1-5 µg) was labeled with either cyanine-5 or cyanine-3 using ULS RNA Fluorescent Labeling Kit (Kreatech Biotechnology, Amsterdam, The Netherlands), according to the manufacturer's protocol. Concentration of labeled cRNA and the label incorporation was determined with a Nanodrop-1000 spectrophotometer. All labeling and post-labeling procedures were conducted in an ozone-free enclosure to ensure the integrity of the label. Labeled materials were setup for fragmentation reaction as described by the Agilent Technology Protocol processing manual and hybridized overnight in a rotating oven at 65°C in an ozone-free room. Whole Human Genome slide 4x44K format (Agilent Technologies) was used. From each labeled sample, 825 ng were co-hybridized using Sure-Hyb chambers (Agilent Technologies). Wash conditions used were as outlined in the Agilent Technologies processing manual, and the arrays were scanned using Agilent scanner 2505B. Feature Extraction from Agilent Technologies was used to extract the micro-array data. Further analysis was performed using Rosetta luminator software by MOgene, LC, St. Louis, MO.

Real-time PCR for micro-array data validation.

The RNA was used to synthesize complementary DNA using TaqMan one-step RT-PCR master Mix Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) with TaqMan probe-primers set (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Real-time PCR was used to verify the micro-array data for six modulated genes using the following Taq Man probes and primers for individual genes (Applied Biosystems, Foster City, CA). DUSP 4 (NM_001394, Assay ID Hs 00154826_ml), DUSP 10 (NM_007207, Assay ID Hs 00200527_ml), GTSE 1 (NM_016426_ml, Assay ID Hs 00212681_ml), Cyclin B1 (NM_031966, Assay ID Hs 00259126_ml), CYP 1A1 (NM_000499, Assay ID Hs 00153120_ml) and OKL 38 (NM_013370, Assay ID Hs 00203539_ml). Briefly, the reverse transcription protocol used 1 μ g of total RNA and random hexamer method. The fold change in expression of each gene was calculated using the $\Delta\Delta$ CT method with GAPDH mRNA as the internal control(15).

Statistical analysis.

Mean data with their deviations (\pm SEM) are presented from independent triplicate sets of experiments. P-values were calculated using two sample t-test and $p < 0.05$ was considered significant.

The statistical analysis of the data from micro-array was performed on three independent sets of experiments using Agilent and Rosetta software (MOgene, LC). Differentially expressed genes were considered as average of three sets of experiments. Modulations of ≥ 1.5 -fold change (\log ratio $\geq + 0.176$ or ≤ -0.176) in the Taheebo treated group compared to the untreated control group were considered statistically significant ($p < 0.01$).

Results

Dose response of Taheebo on ER⁺ MCF-7 cells.

The data presented in Fig. 1A exhibits dose-dependent growth inhibition of MCF-7 cells in response to treatment with Taheebo. The IC₅₀ concentration extrapolated from growth curves after a 6-day treatment schedule was ~ 0.25 mg/ml.

The short-term dose response of high dose (0.75 mg/ml) Taheebo at 24, 48 and 72 h post-seeding demonstrated 20,35 and 72% growth inhibition relative to that of controls (Fig. 1B). These data identified the optimal concentration of Taheebo for subsequent experiments.

To identify minimum effective, maximum cytostatic and toxic concentrations of Taheebo, a time-dependent kinetics of viable cell number was performed. This experiment revealed that a 24-h treatment with 1.5 mg/ml of Taheebo resulted in a statistically non-significant 15% increase in the viable cell number relative to the initial seeding density of 1.0×10^5 cells.

In contrast, a 48-h treatment with 1.5 mg/ml Taheebo resulted in a 94% decrease in the viable cell number relative to the initial seeding density. Thus, the 24-h treatment was defined as non-effective, while the 48-h treatment was defined as toxic.

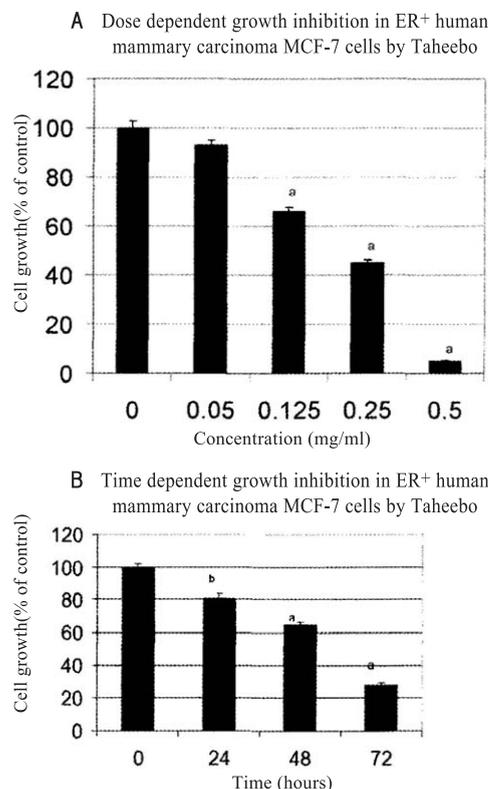


Figure 1. Dose-dependent growth inhibition of ER⁺ MCF-7 cells by Taheebo. (A) Inhibition of growth in response to treatment with 0.05-0.5 mg/ml of Taheebo. Data expressed as inhibition of cell growth(% control). Mean \pm SEM, n=3 per treatment group. $P < 0.001$ compared to control. (B) Short term dose response to growth inhibition by 0.75 mg/ml Taheebo at 24, 48, and 72 h post-seeding. Data expressed as inhibition of cell growth(% control). Mean \pm SEM, n=3 per treatment group. $P < 0.01$ compared to control.

Cell cycle regulation of ER⁺ MCF-7 cells by Taheebo.

The time-dependent alteration in cell cycle regulation of MCF-7 cells in response to treatment with 0.75 mg/ml Taheebo is presented in Table I. The data expressed as the G₁S+G₂/M ratio demonstrate a time-dependent progressive decrease associated with the S phase arrest of cells.

Induction of apoptosis/necrosis in ER⁺ MCF-7 cells by Taheebo.

The effect of Taheebo on cell viability was also evaluated by transmission electron microscopy based cellular morphology (Fig.2A and B), and by the incidence of non-viable floating cells at 6, 12, 18, and 24 h of duration (Fig.3). The electron microscopy data show the ultra-structural characteristics of the Taheebo treated cultures revealing the presence of apoptotic cells characterized by the presence of peripheral condensation of the chromatin and membrane 'blebbing' (Fig.2B), and of necrotic cells characterized by the presence of numerous lysosomes in the cytoplasm (Fig.2B). Furthermore, the data presented in Fig.3 reveal a time-dependent increase in the incidence of a non-adherent (floating) cell population.

(Table I.) Cell cycle regulation in ER⁺ human mammary carcinoma MCF-7 cells by Taheebo.^a

Treatment	Dose (mg/ml)	Duration (時)	G1 (%)	S+G2/M (%)	Ratio	Modulation (% control)
None		24	53.2	46.5	1.1	-
Taheebo	0.75	24	59.9	39.9	1.5	+36.4
None		48	63.1	36.7	1.7	-
Taheebo	0.75	48	64.9	35.0	1.8	+5.9
None		72	67.5	32.3	2.1	-
Taheebo	0.75	72	60.9	39.1	1.5	-28.6

^aData expressed as arithmetic means from independent determinations in triplicate.

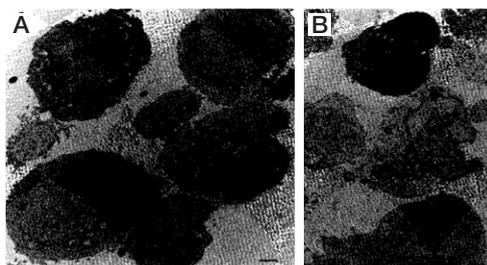


Figure 2. Transmission electron microscopy based cellular morphology of apoptotic and necrotic cells. (A) Untreated control, (B) treated with 1.5 mg/ml of Taheebo for 24 h. Note the presence of peripheral condensation and central fragmentation of nuclear chromatin in the apoptotic cell, and the presence of membrane blebbing and cytoplasmic lysosomes in the necrotic cells.

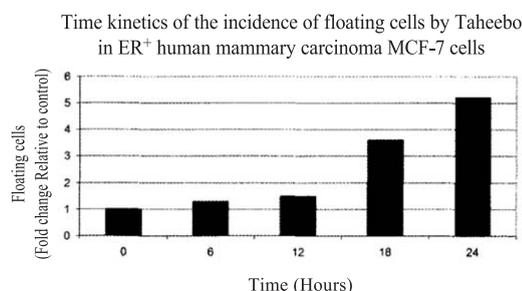


Figure 3. Time-dependent increase in non-adherent(floating)cells in response with the treatment of 1.5mg/ml of Taheebo.

Long-term growth inhibition of ER⁺ MCF-7 cells by Taheebo.

The persistence of long-term growth inhibition in response to treatment with Taheebo was examined in the experiment presented in Fig. 4A and B. The colony counts obtained at the end of 11 days(3 day pre-treatment and 8 day clonogenic assay) revealed that relative to control cultures, mean colony number 419.0 ± 6.4 (Fig. 4A), the Taheebo treated cultures exhibited 88% inhibition mean colony number 50.3 ± 2.9 , $p < 0.001$ (Fig.4B), in the number of colonies formed.

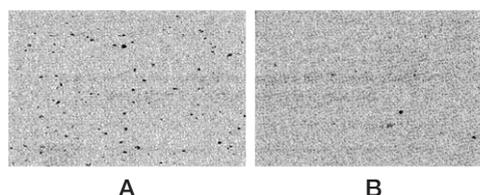


Figure 4. Inhibition of clonogenic growth of ER⁺ MCF-7 cells in response to 72 h of pre-treatment with 0.75 mg/ml of Taheebo. (A) Colonies in the untreated control. (B) Colonies in the Taheebo treated cultures at day 8 post-seeding.

Modulation of global gene expression profile of ER⁺ MCF-7 cellos by Taheebo.

The data presented in Table II examine the modulatory effect of Taheebo on global gene expression profiles in ER⁺ MCF-7 cells. In Taheebo treated cells from among multiple genes functioning in the regulation of cell cycle progression, down-regulation of S phase specific PCNA, GSTE1 and OKL38, and G2 specific cyclin B and cdc2 resulted in a >1.5-fold reduction relative to that in untreated controls. In contrast, among multiple genes functionally involved in cellular apoptosis, the GADD45 gene family members and inactivators of the anti-apoptotic Bcl-2, such as BIM, HRK/BH3 and BBC3 were notably up-regulated to >1.5-fold, relative to those in untreated controls.

Furthermore, tumor necrosis factor receptor super family(TNFRSF)genes responsible for apoptosis, and Calpain family genes responsible for necrosis were also up-regulated.

Genes responsible for estrogen responsiveness such as ESRI for ER- α were down-regulated, while genes such as CYP 1A1 and CYP 1B1, responsible for xenobiotic metabolism, including that of estradiol were significantly up-regulated.

The extent of modulation in the expression of selected genes was also confirmed using real-time PCR assay(Fig.5).

Comparison of the data on gene expression by microarray and real time PCR

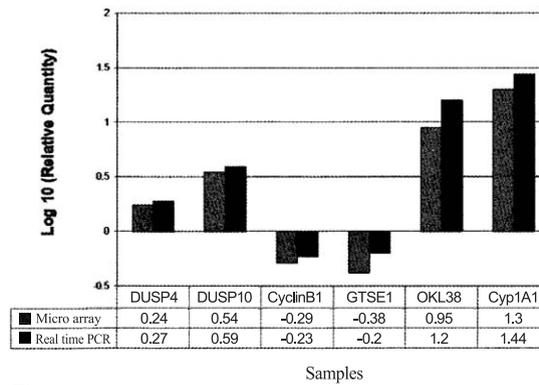


Figure 5.
A comparison in modulation of gene expression using the microarray and real-time PCR assays.

(Table II.) Modulation of gene expression profiles in ER⁺ human mammary carcinoma MCF-7 cells by Taheebo.³

Gene	Gene bank no.	Fold Change		Log Ratio		Function
		up	down	Log Ratio		
Cell cycle regulatory genes						
GTSE1	NM_016426		2.38	-0.376		<i>Homo sapiens</i> G2 and S phase expressed l(GTSE1). DNA damage response. Signal transduction by p53 class mediator resulting in cell cycle arrest.
PCNA	NM_002592		1.96	-0.29		<i>Homo sapiens</i> proliferating cell nuclear antigen(PCNA), regulation of cell cycle; DNA replication
Cyclin B1	NM_031966		1.96	-0.29		Regulation of cell cycle at G2/M
Cyclin E1	NM_001238		1.6	-0.2		Regulation of cell cycle at G1/S transition.
Cyclin E2	NM_057749		3.22	-0.5		Regulation of cell cycle at G1/S transition.
cdc2	NM_001786		2.56	-0.4		Cell division cycle 2.
Cyclin A2	NM_001237		2.77	-0.44		Mitotic G2 arrest Regulators of CDK kinases. This cyclin binds and activates CDC2 and cdk2 at G1/S and G2/M transitions.
RFC4	NM_002916		1.56	-0.19		Replication factor C4
cdc20	NM_001255		1.85	-0.27		Cell division cycle homolog 20.
Chk1	NM_005197	1.61		0.2		Checkpoint suppressor 1.
CCRK	NM_178432	1.84		0.26		Cell cycle related kinase(CCRK); p42.
cdk6	NM_001259		2.0	-0.296		Cyclin dependent kinase 6.
cdk2	NM_001798		1.50	-0.18		Cyclin dependent kinase 2.
p18	NM_001262		1.88	-0.275		Cdk-4 inhibitor, p18.
POLE2p59	NM_002692		1.81	-0.26		ϵ DNA polymerase activity DNA replication etc.
EXO1	NM_003686		1.51	-0.182		DNA binding exonuclease(5' to 3') activity, interacts with Msh2 which is involved in Mismatch repair.
OKL38	NM_013370	11.03		1.04		<i>Homo sapiens</i> pregnancy-induced growth inhibitor, negative regulation of cell growth (akaBDG1)
MCM6	NM_005915		1.639	-0.21		Minichromosome maintenance deficient 6 DNA replication related function.
cdc25A	NM_001789		1.75	-0.24		Regulate cyclin dependent protein kinase act. cdc25A DUSP control entry into and progression through S phase by dephosphorylating sites on cyclinE-cdk2 (Thr14, Tyr15).
AURKA	NM_198433		1.85	-0.27		Cell cycle regulated kinase that appears to be involved in microtubule formation/chromosome segregation and stabilizes spindle pole etc.
cdc20	NM_001255		1.85	-0.27		It interacts with multiple checkpoints in cell cycle. It is involved for nuclear movement prior to anaphase and chromosome segregation.
SKP2	NM_032637		1.96	-0.29		S phase kinase associated protein 2; It is an element for cycA-cdk2 S phase kinase
POLA2	NM_002689		1.89	-0.276		DNA directed polymerase- α ; DNA replication.
HCAP-G	NM_022346		1.69	-0.226		<i>Homo sapiens</i> chromosome condensation protein G. Mitotic cell cycle, chromosome condensation
cdc7	NM_003503		1.85	-0.267		Negative regulation of cell proliferation. G1/S transition. cdc7 activity is essential for initiation of DNA replication.

(Table II.) Continued

Gene	Gene bank no.	Fold Change		Log Ratio	
		up	down	Log Ratio	Function
AMID	NM_032797	2.62		0.42	<i>Homo sapiens</i> apoptosis inducing factor (AIF) like mitochondrion-associated inducer of death (AMID)
Caspase4	NM_033306	1.62		0.21	
caspase7	NM_033339	1.652		0.22	
caspase8	NM_033356	1.643		0.21	Transcript variant C, caspase 8.
AATK	AK131529	1.8		0.25	Apoptosis associated tyrosine kinase.
PAWR	NM_002583	1.47		0.17	PRKC, apoptosis WT 1 regulator.
GADD45G	NM_006705	3.47		0.54	GADD 45 family A,B,G are responsible for growth suppression, induction of apoptosis through inhibition of NF-κB, up-regulation of c jun N terminal kinase (JNK).
GADD45B	NM_015675	1.92		0.28	
GADD45A	NM_001924	5.41		0.73	
TP53INP1	NM_033285		1.47	-0.17	Its transcription is activated by p53. It is responsible for G1 arrest and p53 mediated apoptosis.
CCAR1	NM_018237		1.55	-0.19	
BCL-2 Family					
BCL-2	NM_000633		1.53	-0.19	
HRK/BH3	NM_003800	3.75		0.57	Activator of apoptosis. HRK regulates apoptosis through inactivating BCL2 and BCLXL but not with the death promoting Bcl2 related protein BAX, BAK or BCLXs. HRK interacts with (BH3) domain with BCL2/BCL-XL.
Bcl2like1 (BIM)	NM_138622	2.156		0.33	<i>Homo sapiens</i> apoptotic like facilitator. BCL-2 like 11.
BBC3	NM_014417	3.08		0.49	<i>Homo sapiens</i> BCL-2 binding component 3 also known as PUMA.
Athanogene 1	NM_004323	1.758		0.245	BCL2 associated athanogene 1. It binds and enhances anti-apoptotic effects of BCL2 and represents a link between growth factor receptors and apoptotic mechanism.
Athanogene 3	NM_004281	1.6			
Turnor necrosis factor receptor super family genes					
TNRSF1A	NM_001065	2.44		0.387	TNFRSF family leads to apoptosis through MAPK/JNK and/or through Fas-associated death domain (FADD).
TNFR SF6	NM_000043	1.67		0.22	
TNFR SF21	NM_014452	1.677		0.22	
Calpain family					
CAPN12	NM_144691	1.6		0.2	Calpains, together with the lysosomal aspartyl proteases mediate necrotic cell death.
CAPN10	NM_023083	1.5		0.176	
CAPN2 (m/II)	NM_001748	1.46		0.17	
Dual specific phosphatase (DUSP) family genes					
MAP2K6	NM_002758		-4.786	-0.68	Extracellular signal regulated (ERK) kinase.
MAP3K1/MEKK1	ENST0000026477		-1.5	-0.18	Activates other MAP kinase signalling pathway.
MAP3K2/MEKK2	NM_006609		-1.47	-0.18	Phosphorylates and activates I κ β kinase.
MAP3K10	NM_002446	1.64		0.21	Induction of apoptosis via JUN pathway.
MAP3K14	NM_003954	1.8		0.25	NF-κB inducing kinase.
DUSP2	NM_004418		2.63	-0.42	Dual specific phosphatase 2.
DUSP8	NM_004420	2.2		0.34	Dual specific phosphatase 8.
DUSP4	NM_001394	1.75		0.24	Dual specific phosphatase 4.
DUSP10	NM_007207	3.53		0.547	Dual specific phosphatase 10.
DUSP5	NM_004419	2.02		0.3	Dual specific phosphatase 5.
DUSP13	NM_001007271	2.0		0.3	Dual specific phosphatase 13.
DUSP1	NM_004417	1.8		0.25	Dual specific phosphatase 1.
DUSP16	NM_0030640	2.62		0.41	Dual specific phosphatase 16.
Estrogen responsive genes					
ESR1	NM_000125		1.6	-0.2	Estrogen receptor-α.
CYP1A1	NM_000499	19.77		1.3	
CYP1B1	NM_000104	7.95		0.9	
^a Modulation in gene expression. Fold change represents comparison between Taheebo treated and untreated control group. Values for fold change represent means from independent triplicate sets of experiments. Genes in bold have been verified by real-time PCR.					

Discussion

It is generally recognized that hormone responsive ER⁺ clinical breast cancers represent ~80% of all sporadic cancer and exhibit a positive response to endocrine based therapeutic interventions (1,2). However, long-term endocrine therapy with selective estrogen receptor modulators is frequently associated with reduced patient compliance, in part due to acquired drug resistance, or adverse systemic toxicity. These limitations emphasize a need to identify efficacious novel agents with minimal long-term toxicity.

The present study utilized the well-established human breast carcinoma derived ER⁺ MCF-7 cell culture model to examine the therapeutic efficacy of a natural plant extract, Taheebo, and to identify potential mechanistic leads for its efficacy on ER⁺ clinical breast cancer.

The phenomenological evidence for the growth inhibitory effect of Taheebo on ER⁺ MCF-7 cells is supported by the data that demonstrate a dose- and time-dependent inhibition of growth in response to treatment with Taheebo. These growth curves also identified optimum maximally cytostatic treatment for Taheebo in the present model system.

The experiments designed to identify possible phenomenological leads for growth inhibition revealed that a short-term treatment of up to 72 h is associated with a progressive time-dependent decrease in G1S+G2/M ratio due to a modest S phase arrest. This is consistent with a progressive time-dependent increase in the incidence of non-adherent (floating) cells. These data suggest that regulation of cell cycle progression and induction of cellular apoptosis/necrosis represent susceptible mechanistic pathways that are responsible for the observed effects of Taheebo.

The experiment was designed to examine the long-term effects of Taheebo using the clonogenic assay revealed that withdrawal of Taheebo retained its inhibitory effects for at least 8 days. These data identify possible leads that dose fractionation achieved by discontinuous treatment reduces long-term toxicity without compromising the efficacy.

The experiment utilizing micro-array based global gene expression profiling identified important leads for possible molecular targets and mechanistic pathways critical for the efficacy of Taheebo. Overall, the micro-array assay examined the gene expression profiles of 43,376 genes, using the 44K gene chip. About 1,600 genes (3.7%) exhibited down-regulated expression, 1,900 genes (4.4%) exhibited up-regulated expression, and 40,000 genes (92.2%) remained essentially unchanged. It is clear from the data obtained from selected genes relevant to growth, proliferation, apoptosis and metabolism of ER⁺ MCF-7 cells in the culture that Taheebo modulates the expression of multiple genes that are involved in these biological processes. The modulation in gene expression profiles essentially correlated with the cell cycle regulation and induction of initial stages of cellular apoptosis. Thus, with regard to S phase arrest, it is noteworthy that genes such as PCNA and GTSE1 were down-regulated. These genes play a role in DNA

synthesis and replication at the S phase of the cell cycle (16). In addition, the GADD 45 family of genes was also substantially up-regulated in response to the treatment with Taheebo. This gene family is involved in the regulation of growth, DNA repair, and induction of apoptosis (17). Interestingly, OKL38 gene, also known as the human bone marrow stromal cell derived growth inhibitor (BDGI), exhibited a robust 12-fold up-regulation. This gene is known to induce S phase arrest with subsequent initiation of apoptosis (18,19). The genes responsible to inactivate anti-apoptotic BCL-2, such as BIM, HRK/BH3 and BBC3 exhibited 2.16-, 3.75-, and 3.08-fold up-regulation, respectively. These genes are also known to arrest the cells in the S phase and initiate apoptosis (19,20). These data on the modulated expression of OKL38, BIM, HRK/BH3 and BBC3 genes taken together, suggest that initiation of the apoptotic process by Taheebo is in part due to reduced function of the anti-apoptotic BCL-2 gene. In this context it is also noteworthy that consistent with the presence of necrotic cells in Taheebo treated cultures, the Calpain family genes (21) were up-regulated to > 1.5-fold, relative to those in untreated controls.

Regarding the effect of Taheebo on ER signaling, it was observed that Taheebo treatment up-regulated the dual specific phosphatase (DUSP) gene family is responsible for negative regulation of MAPK signaling (22-24). These data indicate that Taheebo suppresses the proliferation of ER⁺ MCF-7 cells via its effect on the ligand independent AF-1 domain that is critical for the ER signaling pathway. Consistent with the possible efficacy of Taheebo via ER signaling, observed down-regulation of cyclin A and cdk2 is suggestive of an inhibition of phosphorylation of ER N-terminal AF-1 domain (25,26).

This interpretation provides proof of a principle mechanistic lead for the possible anti-estrogenic effects of Taheebo components at high cytostatic doses via the ER signaling pathway.

With regard to estrogen responsive genes, it is noteworthy that Taheebo treatment resulted in 1.6-fold down-regulation of ESR1, the gene for ER- α , while ESR2, the gene for ER- β , remained essentially unaltered. Although, CYP 1A1 and CYP 1B 1 genes are primarily involved in xeno-biotic metabolism, they are also responsible for cellular metabolism of estradiol leading to the generation of C2-, C4-, and C16 α -hydroxylated metabolites capable of modulating the growth of MCF-7 cells (27-29). Similar to the MCF-7 cells, modulation of cellular metabolism of estradiol was noted in the 184-B5/HER cell culture model for ER⁻/HER-2⁺ pre-invasive comedo ductal carcinoma *in situ* (30).

All the targets and pathways discussed above are well recognized in the growth, cellular proliferation and tumorigenicity of ER⁺ MCF-7 cells (12,13). Furthermore, experimental modulation in these pathways in response to treatment with selective estrogen receptor modulators is associated with growth inhibition of MCF-7 cells both in *in vitro* cell cultures as well as in *in vivo* xeno-transplant models for tumorigenicity via multiple mechanisms (12, 13, 22, 23, 25, 26). These data taken together, suggest that the mode of action of Taheebo is

similar to that of a selective estrogen receptor modulator. In this context it is noteworthy that published studies with Tamoxifen on ER⁺ MCF-7 cells demonstrated that in addition to the ER-dependent mechanism, the selective estrogen receptor modulator Tamoxifen alters cellular metabolism of estradiol to favor the generation of anti-proliferative metabolites (31-33), and influence cell cycle progression in MCF-7 cells via cdk-4/6 and p53-dependent pathways (12, 13, 34).

With regard to the identification of molecular target(s) and mechanistic pathway(s) for the efficacy of Taheebo, it needs to be recognized that non-fractionated aqueous extract of Taheebo used in the present study contains a mixture of several mechanistically distinct constituents including furano-naphthoquinones, quinines, naphthoquinones and flavonoids (35-37). Naphthofurandione, a major component of Taheebo, has selective anti-tumor effects on a variety of human carcinoma derived cell lines (35-38). It is therefore, conceivable that the efficacy for growth inhibition by Taheebo, as evidenced by the present data, is due to interactive effects of multiple water soluble components from Taheebo.

In conclusion, the outcome of the present study validates a human tissue derived cell culture approach to evaluate the efficacy of non-fractionated herbal medicinal extracts and to identify clinically translatable mechanistic leads for alternative therapy of ER⁺ clinical breast cancer.

Acknowledgements

Major funding for this research was provided by philanthropic contributions to American Foundation for Chinese Medicine from the family of Daniel and Kathleen Mezzalingua, the family of Haken and Marie Ledin and Issac and Laura Perlmutter Fund.

References

- 1) Lippman ME: Efforts to combine endocrine and chemotherapy in the management of breast cancer: do two and two equal three? *Breast Cancer Res Treat* 3: 117-127, 1983.
- 2) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTG): Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15 years survival: An overview of the randomized trials. *Lancet* 365: 1687-1717, 2005.
- 3) Rock E and DeMichele A: Nutritional approaches to late toxicities of adjuvant chemotherapy in breast cancer survivors. *J Nutr* 133: 3785s-3793s, 2003.
- 4) Oudin C, Bonnetain F, Boidot R, *et al* : Patterns of loss of heterozygosity in breast carcinoma during neo-adjuvant chemotherapy. *Int J Oncol* 30: 1145-1155, 2007.
- 5) Molassiotis A, Scott JA, Kearney N, *et al* : Complementary and alternative medicine use in breast cancer patients in Europe. *Support Care Cancer* 14: 260-267, 2006.
- 6) Tindle HA, Davis RB, Phillips RS, *et al* : Trends in the use of complementary and alternative medicine by US adults: 1997-2002. *Altern Ther Health Med* 11: 42-49, 2005.
- 7) Helyer LK, Chin S, Chui BK, *et al* : The use of complementary and alternative medicines among patients with locally advanced breast cancer—a descriptive study. *BMC Cancer* 6: 39-46, 2006.
- 8) Matthews AK, Sellergren SA, Huo D, *et al* : Complementary and alternative medicine use among breast cancer survivors. *J Altern Complement Med* 13: 555-562, 2007.
- 9) Park BS, Lee HK, Lee SE, *et al* : Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter Pylori*. *J Ethnopharmacol* 105: 255-262, 2006.
- 10) Park BS, Kim JR, Lee SE, *et al* : Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. *J Agri Food Chem* 53: 1152-1157, 2005.
- 11) Son DJ, Lim Y, Park YH, *et al* : Inhibitory effects of *Tabebuia impetiginosa* inner bark extract on platelet aggregation and vascular smooth muscle cell proliferation through suppressions of arachidonic acid liberation and ERK 1/2 MAPK activation. *J Ethnopharmacol* 108: 148-151, 2006.
- 12) Lippman ME, Osborne CK, Knazek R and Young N: In vitro model systems for the study of hormone dependent breast cancer. *N Engl J Med* 296: 154-159, 1977.
- 13) Jordan VC: Historical perspective on hormonal therapy of advanced breast cancer. *Clin Ther* 24: A3-A16, 2002.
- 14) Hsieh TC, Lu X, Guo J, *et al* : Effects of herbal preparation Equigard on hormone responsive and hormone refractory prostate carcinoma cells. *Int J Oncol* 20: 681-689, 2002.

- 15) Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
- 16) Monte MR, Benetti R, Buscemi G, *et al* : The cell cycle-regulated protein human GTSE-1 controls DNA damage-induced apoptosis by affecting p53 function. *J Biol Chem* 278: 30356-30364, 2003.
- 17) Yin F, Bruemmer D, Blaschke F, *et al* : Signaling pathways involved in induction of GADD45 gene expression and apoptosis by troglitazone in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Oncogene* 23: 4614-4623, 2004.
- 18) Huynh H, Ng CY, Ong CK, *et al* : Cloning and characterization of a novel pregnancy-induced growth inhibitor in mammary gland. *Endocrinology* 142: 3607-3615, 2001.
- 19) Wang T, Xia D, Li N, *et al* : Bone marrow stromal cell-derived growth inhibitor inhibits growth and migration of breast cancer cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Biol Chem* 280: 4374-4382, 2005.
- 20) Concannon CG, Koehler BF, Reimertz C, *et al* : Apoptosis induced by proteasome inhibition in cancer cells: predominant role of the p53/PUMA pathway. *Oncogene* 26: 1681-1692, 2007.
- 21) Artal-Sanz M and Tavernarakis N: Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett* 579: 3287-3296, 2005.
- 22) Frigo DE, Basu A, Nierth-Simpson EN *et al* : p38 Mitogen-activated protein kinase stimulates estrogen mediated transcription and cell proliferation through the phosphorylation and potentiation of the p160 co-activator glucocorticoid receptor interacting protein 1. *Mol Endocrinol* 20: 971-983, 2006.
- 23) Creighton CJ, Hilger AM, Murthy S, *et al* : Activation of mitogen-activated protein kinase in estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells in vitro induces an in vivo molecular phenotype of estrogen receptor alpha-negative human breast tumors. *Cancer Res* 66: 3903-3911, 2006.
- 24) Jeffrey KL, Camps M, Rommel C and Mackay CR: Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signaling and immune responses. *Nature Rev Drug Disc* 6: 391-403, 2007.
- 25) Rogatsky I, Trowbridge JM and Garabedian MJ: Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclinA-cdk2 complex. *J Biol Chem* 274: 22296-22302, 1999.
- 26) Trowbridge JM, Rogasky IO and Garabedian MJ: Regulation of estrogen receptor transcriptional enhancement by the cyclin A/Cdk2 complex. *Proc Natl Acad Sci* 94: 10132-10137, 1997.
- 27) Yager JD and Davidson NE: Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 354: 270-282, 2006.
- 28) Schneider J, Huh MM, Bradlow HL and Fishman J: Anti-estrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 259: 4840-4845, 1984.
- 29) Lottering ML, Haag M and Seegers JC: Effects of 17 β -estradiol metabolites on cell cycle events in MCF-7 cells. *Cancer Res* 52: 5926-5932, 1992.
- 30) Telang NT, Katdare M, Bradlow HL and Osborne MP: Cell cycle regulation, apoptosis and estradiol metabolism: Novel end point biomarkers for human breast cancer prevention. *J Clin Ligand Assays* 23: 130-137, 2000.
- 31) Suto A, Bradlow HL, Kubota T *et al* : Alteration in proliferative and endocrine responsiveness of human mammary carcinoma cells by prototypic tumor suppressing agents. *Steroids* 58: 215-219, 1993.
- 32) Telang NT, Bradlow HL and Osborn MP: Effect of Tamoxifen on mammary preneoplasia: relevance to chemopreventive intervention. *Cancer Detect Prev* 18: 313-321, 1994.
- 33) Osborne MP: Chemoprevention of breast cancer. *Surg Clin North Am* 79: 1207-1221, 1999.
- 34) Cover CM, Hsieh SJ, Cram EJ, *et al* : Indole-3-carbinol and tamoxifen co-operate to arrest cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 59: 1244-1251, 1999.
- 35) Queiroz ML, Valadares MC, Torello CO, *et al* : Comparative studies of the effects of *Tabebuia avellanedae* bark extract and β -lapachone on the hematopoietic response of tumor-bearing mice. *J Ethnopharmacol* 117:228-235, 2008.
- 36) Ueda S, Umemura T, Dohguchi K, *et al* : Production of anti-tumor-promoting furano-naphthoquinones from *Tabebuia avellanedae* in cell cultures. *Phytochemistry* 36: 323-325, 1994.
- 37) Park BS, Lee KG, Shibamoto T, *et al* : Antioxidant activity and characterization of volatile constituents of Tallebo(*Tabebuia impetiginosa Martius ex DC*). *J Agri Food Chem* 51: 295-300, 2003.
- 38) Ueda S, Tokuda H, Hirai K, *et al* : A novel antitumor compound 2-(1-hydroxyethyl)-5-hydroxynaphtho[2, 3-b]furan-4, 9-dione and anti-tumor agents comprising this compound. United States of America, Patent # 5,663,197, 1997.



タバペイア・アベラネダエ樹木の内部樹皮由来タヒボによる エストロゲン受容体陽性ヒト乳癌細胞の増殖阻害

ジョージ Y.C. ウォン

ベスイスラエル (メディカルセンター)

B.MUKHERJEE¹, N.TELANG² and G.Y.C. WONG¹

¹Strang Cancer Prevention Center, New York, NY; ²Palindrome Liaisons, Montvale, NJ, USA

(抄録)

選択的エストロゲン受容体 (ER) モジュレーターは、ER⁺臨床的乳癌の治療に用いられているが、副作用をもたらす。漢方薬は、代替または補足的なアプローチとなることがある。ブラジリアマゾンに生育するタバペイア・アベラネダエ樹木の内部樹皮から抽出される有効成分は、癌細胞株において選択的抗増殖作用を発揮する。本試験では、アベラネダエ樹皮有効成分の阻害作用を導く機序を同定する。ヒト乳癌由来ER⁺ MCF-7細胞をモデルとして用いた。アベラネダエ樹皮有効成分の水抽出物を被験化合物とした。細胞周期解析、クローン形成法、および全体的遺伝子発現プロファイルを定量的パラメータとした。被験化処理により、用量/時間依存性増殖阻害 (S期停止、クローン形成能低下) およびアポトーシス開始 (クロマチン凝縮) に至った。1.5 mg/mlのアベラネダエ樹皮有効成分で6時間処理することにより、G2特異的サイクリンB1 (-2.0倍) ; S期特異的PCNA (-2.0倍) およびOKL38 (+11.0倍) ; アポトーシス特異的GADD-45群 (+1.9 -5.4倍) 、カスパーゼ (+1.6 -1.7倍) 、BCL-2群 (-1.5 -2.5倍) 、エストロゲン応答性ESR1 (-1.5倍) 、ならびに生体異物代謝特異的CYP 1A1 (+19.8倍) およびCYP 1B1 (+7.9倍) の遺伝子発現が修飾された。アベラネダエ樹皮有効成分の抗増殖作用には、ダウンレギュレートした細胞周期調節およびエストロゲン応答性遺伝子、ならびにアップレギュレートしたアポトーシス特異的および生体異物代謝特異的遺伝子との相関性が認められた。これらのデータから、有効な漢方薬に優先順位を付けることにより、乳癌に対する既存の内分泌療法を補足するための速やかな機構的アプローチが立証されている。

キーワード: ヒト乳癌細胞、増殖阻害、全体的遺伝子発現プロファイル

緒 言

散発性臨床的乳癌の約80%はエストロゲン受容体 (ER) を発現し、化学療法の併用または非併用による内分泌療法が一般的な治療選択肢になることは十分に認識されている (1,2)。しかし、長期にわたる化学-内分泌療法による治療は、患者の遵守を損なう有害毒性をもたらす頻度が高い (3,4)。

近年、漢方薬を利用した補足的および代替のアプローチがそれぞれ広範囲に用いられており、療法関連毒性を低減するとともに有効性を高めるため、化学-内分泌療法の補助として用いられることもある (3,5-8)。しかし、漢方薬の長期安全性、有効性、および毒性、ならびに漢方薬と従来の治療レジメンとの相互作用については、未だ確立されていない。

ブラジリアマゾンに生育するタバペイア・アベラネダエ樹木の内部樹皮から自然に生じる有効成分は、南米では様々な健康状態の治療において1,500年間にわたり用いられてきた (9-11)。米国では、その樹皮のお茶がパウダルコ茶という名称で栄養補助食品として販売されている。しかし、その作用機序、有効性の分子標的、および長期毒性プロファイルは、いまだ同定されていない。

ヒト乳癌細胞由来MCF-7細胞株は、ホルモン応答性ER⁺臨床的乳癌の前臨床細胞培養モデルとして広く用いられている。本モデルは、ホルモン応答性ER⁺臨床的乳癌の予防的/治療的介入における選択的エストロゲン受容体モジュレーターおよびアロマトラーゼ阻害薬の有効性を解明するため、*in vitro* (細胞培養) ならびに *in vivo* (異種移植) アプローチで広く用いられている (12,13)。

本試験における実験ではMCF-7細胞培養モデルを用い、アベラネダエ樹皮有効成分の増殖阻害作用について調査するとともに、その有効性を導くと考えられる機序を抽出した。本試験で得られた現象論的データおよび機構的データから、アベラネダエ樹皮有効成分の増殖阻害作用にはダウンレギュレートした数種類の細胞周期調節およびエストロゲン応答性遺伝子発現、ならびにアップレギュレートしたアポトーシス特異的および生体異物代謝特異的遺伝子発現との相関性があるとのエビデンスが得られている。総合すると、ホルモン応答性ER⁺乳癌の治療に用いる植物由来医薬品の機序に基づき、既存の実験的アプローチを有効性評価に使用可能であることが、本試験の結果から立証されている。

材料および方法

ER⁺ヒト乳癌MCF-7細胞株

ER⁺ヒト乳癌由来MCF-7細胞株は、ATCC, Manassas, VAから入手した。細胞株は、供給業者の勧告に従い、10%ウシ胎児血清、2mM L-グルタミン、10 μ g/mlウシインスリン、および1%ペニシリン-ストレプトマイシン合剤で補足したMEM中で維持・増殖させた。通常では、5%CO₂および95%大気の高湿環境中、37°Cで細胞を維持し、約70%の集密度で継代培養した。

タヒボの用量反応

アベラネダエ樹皮水抽出物のスプレッドライエクス末は、タヒボジャパン株式会社（大阪）から提供された。このエキス末を2倍量の蒸留水で500mg/ml濃度に溶解し、原液を作製した。この原液をMEM培地で連続希釈し、1.5、0.75、0.5、0.25、0.125、および0.05mg/mlという様々な濃度のアベラネダエエキス希釈液を調整して用量反応実験に用いた。6日間の初期用量反応を0.05～0.5mg/mlの濃度範囲で実施した。トリパンブルー染色後に血球計数器を用いて生存細胞数を求め、コールターカウンターで確認した。細胞周期解析、アポトーシス/壊死誘導、およびクローン形成能の実験では、濃度0.75mg/mlのタヒボを評価した。マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルおよび電子顕微鏡法では、それぞれ6時間および24時間で濃度1.5mg/mlのアベラネダエエキス希釈液を評価した。

細胞周期進行

細胞周期解析では、対照およびアベラネダエエキス希釈液で処理した培養液をトリプシン処理し、PBSで洗浄した。細胞懸濁液を75%エタノールで固定し、ヨウ化プロピジウム (PI) で染色した。フローサイトメトリー (BD FACS Canto, Becton Dickinson) を用いて蛍光補助細胞分類を実施し、マルチサイクルソフトウェアを用いて細胞周期のG₀/G₁、S、およびG₂/M期における細胞集団の分布率を算出した。データは、G₁:S+G₂/M比で表わした。

アポトーシスおよび壊死の電子顕微鏡法

1.5mg/mlのアベラネダエエキス希釈液で24時間処理したMCF-7細胞および並行する非処理対照を2.5%グルタルアルデヒド加0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) により室温で1時間固定し、同じ緩衝液で数回すすぎ、

1%四酸化オスミウム溶液で後固定し、エタノール系列で脱水した後にPoly-Bedアララルダイトメディアで包埋した。次に、極薄切片 (65～70nm) を酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で対比染色し、Philips-410透過電子顕微鏡 (Philips, Eindhoven, Holland) を用いて観察した。

クローン形成法

クローン形成法は、既報と同様のプロトコルを用いて実施した (14)。簡潔に述べると、MCF-7細胞を濃度0.75mg/mlのアベラネダエエキス希釈液で72時間前処理した。処理後の細胞をトリプシン処理し、洗浄した後に、フラスコ当たり1,000細胞の播種密度で再度平板培養した。非処理対照細胞も同じ播種密度で再度平板培養した。いずれの培養も、その後の処理を行わず8日間維持した。生存率は、(処理群のコロニー数/対照群のコロニー数) × 100で算出した。

全体的遺伝子発現プロファイルのマイクロアレイ解析

細胞 (1.0 × 10⁶細胞/フラスコ) をT25フラスコで24時間平板培養した後に処理した。アベラネダエエキス希釈液での処理は、1.5mg/ml用量で6時間実施した。RNeasyキット (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) のプロトコルに従ってRNAを分離した。RNAの定量は、吸光度260nmの分光光度測定法を用いて実施した。RNAの完全性は、(i) 260:280吸光度比、(ii) 28S:18S強度比、および (iii) Bioanalyzer (Agilent Technologies) を用いたRNA積算数 (RIN) により評価した。低投入線形増幅キットを製造業者 (Agilent Technologies) が略述したプロセスに従って用い、RNAを増幅した。ULS RNA Fluorescent Labeling Kit (Kreatech Biotechnology, Amsterdam, The Netherlands) を製造業者のプロトコルに従って用い、増幅後の標的cRNA (1～5 μ g) をシアニン-5またはシアニン-3のいずれかで標識した。Nanodrop-1000分光光度計を用いて、標識cRNA濃度および標識取り込みを測定した。標識の完全性を確保するため、すべての標識手順および標識後手順をオゾン非存在雰囲気中で実施した。標識後の材料をAgilent Technology Protocol処理手順書に示されたとおりフラグメンテーション反応のために準備し、無オゾン室で65°Cの回転式オープン中にて一晩ハイブリダイズした。Whole Human Genomeスライド4 × 44 Kフォーマット (Agilent Technologies) を用いた。Sure-Hybチャンバー (Agilent Technologies) を用い、

各標識試料から825 ngをコハイブリダイズした。使用した洗浄条件はAgilent Technology Protocol処理手順書に略述されたとおりであり、Agilentスキャナー2505Bを用いてアレイをスキャンした。Agilent TechnologiesのFeature Extractionを用いてマイクロアレイデータを抽出した。その後の解析は、MOgene, LC, St. Louis, MOのRosetta Luminatorソフトウェアを用いて実施した。

マイクロアレイデータのバリデーション用リアルタイムPCR

RNAを用い、Taq Manプローブプライマーセット (Applied Biosystems, Foster City, CA)を備えたTaq ManワンステップRT-PCRマスターMix Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA)により補足DNAを合成した。

リアルタイムPCRを用い、遺伝子ごとに下記のTaq Manプローブおよびプライマーを用いて6種類の修飾遺伝子に関するマイクロアレイデータを検証した (Applied Biosystems, Foster City, CA)。DUSP 4 (NM_001394, Assay ID Hs 00154826_ml)、DUSP 10 (NM_007207, Assay ID Hs 00200527_ml)、GTSE 1 (NM_016426_ml, Assay ID Hs 00212681_ml)、Cyclin B1 (NM_031966, Assay ID Hs 00259126_ml)、CYP 1A1 (NM_000499, Assay ID Hs 00153120_ml)、およびOKL 38 (NM_013370, Assay ID Hs 00203539_ml)。簡潔に述べると、逆転写プロトコルで1 μ gの総RNAおよびランダムヘキサマー法を用いた。各遺伝子発現における折り畳み変化は、GAPDH mRNAを内部対照とした $\Delta\Delta$ CT法を用いて算出した(15)。

統計解析

個別に実施する3連の実験から、平均値およびその偏差(± SEM)を提示した。2サンプル検定を用いてP値を算出し、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

マイクロアレイから得られたデータの統計解析は、個別に実施する3連の実験についてAgilentおよびRosettaソフトウェア(MOgene, LC)を用いて実施した。異なった形で発現した遺伝子は、3連の実験の平均とみなした。アベラネダエ樹皮エキス処理群に、非処理対照群と比較して15倍以上の変化の修飾(対数比 ≥ 0.176 または ≤ -0.176)が認められた場合は、統計的に有意とみなした($p < 0.01$)。

結 果

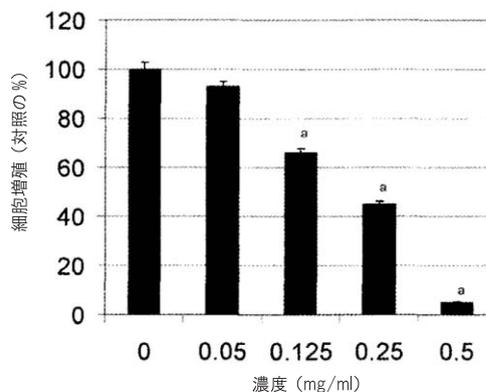
ER+ MCF-7細胞に対するアベラネダエ樹皮エキスの用量反応

図1Aに提示したデータから、アベラネダエ樹皮エキス処理に伴うMCF-7細胞の用量依存性増殖阻害が示されている。6日間処理スケジュール後の増殖曲線から推定したIC₅₀濃度は、約0.25 mg/mlであった。高用量(0.75 mg/ml)アベラネダエ樹皮エキスの播種後24、48、および72時間目における短期用量反応は、対照と比較して20、35、および72%と示された(図1B)。これらのデータから、続く実験で用いるアベラネダエ樹皮エキスの至適濃度を抽出した。

アベラネダエ樹皮エキスの最小有効濃度、最大細胞増殖抑制濃度、および毒性濃度を抽出するため、生存細胞数の時間依存性動態の実験を実施した。本実験から、アベラネダエ樹皮エキス1.5 mg/mlの24時間処理により、生存細胞数に初期播種密度 1.0×10^5 細胞と比較して15%という統計的に非有意な増加がもたらされることが判明した。アベラネダエ樹皮エキス1.5 mg/mlの48時間処理は対照的であり、生存細胞数が初期播種密度と比較して94%減少した。したがって、24時間処理を非有効、48時間処理を毒性と定義した。

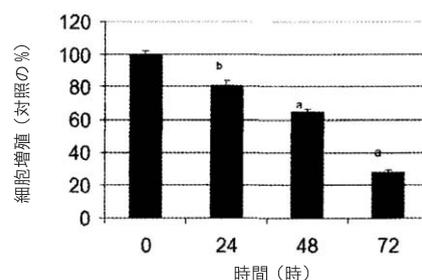
(図1)
アベラネダエ樹皮エキスによるER+ MCF-7細胞の用量依存性増殖阻害

A アベラネダエ樹皮エキスによるER+ ヒト乳癌 MCF-7 細胞の用量依存性増殖阻害



(A) 0.05~0.5 mg/mlのアベラネダエ樹皮エキス処理に伴う増殖阻害。データは細胞増殖阻害(対照%)として表わす。平均値 ± SEM、処理群当たりn = 3。対照と比較して $P < 0.001$ 。

B アベラネダエ樹皮エキスによるER+ ヒト乳癌 MCF-7 細胞の時間依存性増殖阻害



(B) 播種後24、48、および72時間目のアベラネダエ樹皮エキス0.75 mg/mlによる増殖阻害に対する短期用量反応。データは細胞増殖阻害(対照%)として表わす。平均値 ± SEM、処理群当たりn = 3。対照と比較して $P < 0.01$ 。

(表 I.) アベラネダエ樹皮エキスによるER⁺ヒト乳癌MCF-7細胞における細胞周期調節^a

処理	用量 (mg/ml)	時間 (時)	G1 (%)	S+G2/M (%)	比率	修飾 (対照の%)
なし		24	53.2	46.5	1.1	-
タヒボ	0.75	24	59.9	39.9	1.5	+36.4
なし		48	63.1	36.7	1.7	-
タヒボ	0.75	48	64.9	35.0	1.8	+5.9
なし		72	67.5	32.3	2.1	-
タヒボ	0.75	72	60.9	39.1	1.5	-28.6

^a3連で実施した個別測定の数値平均値として表わすデータ

アベラネダエ樹皮エキスによるER⁺ MCF-7細胞の細胞周期調節

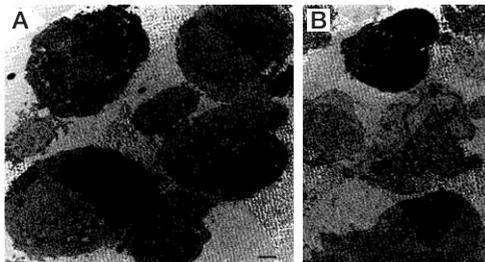
アベラネダエ樹皮エキス0.75mg/ml処理に伴うMCF-7細胞の細胞周期調節における時間依存性変化を表Iに示す。G1:S+G2/M比として表わしたデータは、S期細胞停止に伴う時間依存性進行性低下を示している。

アベラネダエ樹皮エキスによるER⁺ MCF-7細胞のアポトーシス/壊死誘導

透過電子顕微鏡による細胞形態(図2AおよびB)ならびに6、12、18、および24時間目における非生存浮遊細胞の発生率(図3)から、細胞生存に対するアベラネダエ樹皮エキスの作用についても評価した。透過電子顕微鏡データから、アベラネダエ樹皮エキス処理培養の微細構造的特性が示されており、染色体の周辺部濃縮および膜「床形成」(図2B)があることを特徴とするアポトーシス細胞が存在し、細胞質内に多数のリソソームが存在することを特徴とする壊死細胞(図2B)が判明した。さらに、図3に提示したデータから、非接着性(浮遊)細胞集団の発生率が時間依存性に上昇することが判明した。

(図2)

アポトーシス細胞および壊死細胞の透過電子顕微鏡による細胞形態



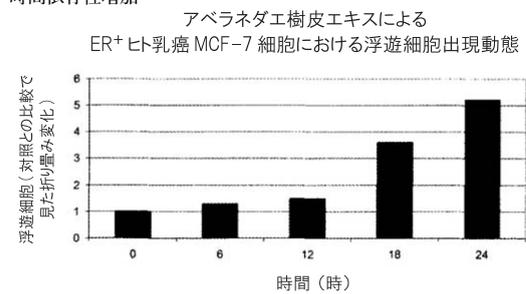
(A) 非処理対照

(B) アベラネダエ樹皮エキス処理

1.5 mg/mlで24時間処理。アポトーシス細胞に核クロマチンの周辺部濃縮および中心フラグメンテーション、壊死細胞に膜床形成および細胞質リソソームが存在することに注意。

(図3)

アベラネダエ樹皮エキス1.5 mg/ml処理に伴う非接着性(浮遊)細胞の時間依存性増加

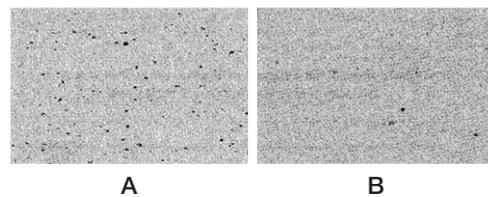


アベラネダエ樹皮エキスによるER⁺ MCF-7細胞の長期増殖阻害

図4AおよびBに提示した実験では、アベラネダエ樹皮エキス処理に伴う長期増殖阻害の継続について調査した。形成されたコロニー数を11日間の終了時(3日間の前処理および8日間のクローン形成法)に測定したコロニー数から見ると、対照培養の平均コロニー数419.0 ± 6.4(図4A)と比較して、アベラネダエ樹皮エキス処理培養では88%阻害が判明し、平均コロニー数50.3 ± 2.9、 $p < 0.001$ (図4B)であった。

(図4)

アベラネダエ樹皮エキス処理0.75mg/mlの72時間前処理に伴うER⁺ MCF-7細胞のクローン性増殖阻害。



(A) 非処理対照におけるコロニー

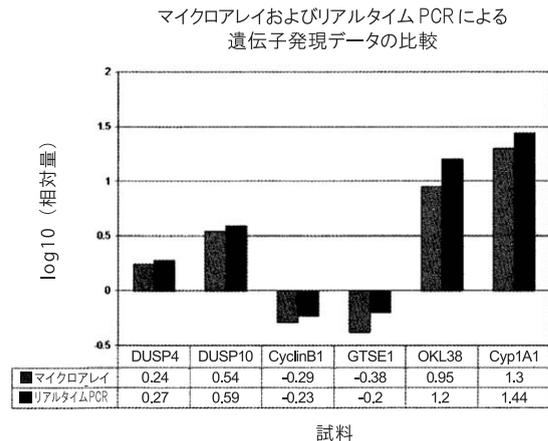
(B) アベラネダエ樹皮エキス処理培養の播種後8日目におけるコロニー

アベラネダエ樹皮エキスによるER⁺ MCF-7細胞の全体的遺伝子発現プロファイルの修飾

表IIに提示したデータでは、ER⁺ MCF-7細胞の全体的遺伝子発現プロファイルに対するアベラネダエ樹皮エキスの修飾作用について調査した。細胞周期進行の調節において機能する同義遺伝子からのアベラネダエ樹皮エキス処理細胞では、S期特異的なPCNA、GSTE1、およびOKL38、ならびにG2特異的なサイクリンBおよびcdc2のダウンレギュレーションに、非処理対照と比較して1.5倍を超える減少が認められた。一方、細胞アポトーシスに対して機能的に関与する同義遺伝子では、GADD45遺伝子群のメンバーおよびBIM、HRK/BH3、およびBBC3などの抗アポトーシスBCI-2の不活性化因子に、非処理対照と比較して1.5倍を超える顕著なアップレギュレートが認められた。さらに、アポトーシスの原因となる腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー (TNFRSF) 遺伝子および壊死の原因となるカルパイン群遺伝子もアップレギュレートした。エストロゲン応答性を担うER- α のESR1などの遺伝子はダウンレギュレートしたのに対し、生

体異物代謝を担うCYP 1A1およびCYP 1B1などの遺伝子は有意にアップレギュレートしており、一例としてエストラジオールが挙げられた。選択された遺伝子の発現における修飾の範囲も、リアルタイムPCRを用いて確認された(図5)。

(図5) マイクロアレイおよびリアルタイムPCR法を用いた遺伝子発現修飾の比較



(表II) アベラネダエ樹皮エキスによるER⁺ヒト乳癌MCF-7細胞における遺伝子発現プロファイル修飾^{a)}

遺伝子	遺伝子バンク番号	折り畳み変化		対数比		機能
		アップ	ダウン	対数比		
細胞周期調節遺伝子						
GTSE1	NM_016426		2.38	-0.376		<i>Homo sapiens</i> の G2 期および S 期発現 1 (GTSE1) DNA 損傷反応。細胞周期停止に至る p53 クラスメチエータによるシグナル伝達
PCNA	NM_002592		1.96	-0.29		<i>Homo sapiens</i> の増殖細胞核抗原 (PCNA)、細胞周期調節; DNA 複製
Cyclin B1	NM_031966		1.96	-0.29		G2/M における細胞周期調節
Cyclin E1	NM_001238		1.6	-0.2		G1/S 移行における細胞周期調節
Cyclin E2	NM_057749		3.22	-0.5		G1/S 移行における細胞周期調節
cdc2	NM_001786		2.56	-0.4		細胞分裂周期 2
Cyclin A2	NM_001237		2.77	-0.44		有糸分裂 G2 停止。CDK 動態のレギュレーター。このサイクリンは、G1/S および G2/M 移行において CDC2 および cdk2 と結合して活性化する。
RFC4	NM_002916		1.56	-0.19		調節因子 C4
cdc20	NM_001255		1.85	-0.27		細胞分裂周期ホモログ 20
Chk1	NM_005197	1.61		0.2		チェックポイントサブプレッサー 1
CCRK	NM_178432	1.84		0.26		細胞周期関連キナーゼ (CCRK); p42
cdk6	NM_001259		2.0	-0.296		サイクリン依存性キナーゼ 6
cdk2	NM_001798		1.50	-0.18		サイクリン依存性キナーゼ 2
p18	NM_001262		1.88	-0.275		Cdk-4 インヒビター、p18
POLE2p59	NM_002692		1.81	-0.26		ϵ DNA ポリメラーゼ活性、DNA 複製など
EXO1	NM_003686		1.51	-0.182		DNA 結合エキソヌクレアーゼ (5' - 3') 活性は、ミスマッチ修復に関与する Mch2 と相互作用する。
OKL38	NM_013370	11.03		1.04		<i>Homo sapiens</i> の妊娠誘導性増殖阻害物質、負の細胞増殖調節 (akaBDG1)
MCM6	NM_005915		1.639	-0.21		ミニ染色体保持欠損 6 DNA。複製関連機能
cdc25A	NM_001789		1.75	-0.24		サイクリン依存性プロテインキナーゼの作用を調節。cdc25A DUSP がサイクリン E-cdk2 (Thr14、Tyr15) の脱リン酸化部位による S 期への導入および S 期を通じた進行を制御する。
AURKA	NM_198433		1.85	-0.27		微小管形成 / 染色体分離に関与し、紡錘体極などを安定化すると考えられる細胞周期調節キナーゼ
cdc20	NM_001255		1.85	-0.27		細胞周期における複数のチェックポイントと相互作用する。後期に先立つ核運動および染色体分離に関与する。
SKP2	NM_032637		1.96	-0.29		S 期キナーゼ関連蛋白質 2; eyeA-cdk2 S 期キナーゼの要素である。

(表 II) 続き

遺伝子	遺伝子バンク 番号	折り畳み変化		対数比	
		アップ	ダウン	対数比	機能
POLA2	NM_002689		1.89	-0.276	DNA 依存性ポリメラーゼ- α ; DNA 複製
HCAP-G	NM_022346		1.69	-0.226	<i>Homo sapiens</i> の染色体凝縮 G 蛋白質。有糸分裂細胞周期、染色体凝縮
cdc7	NM_003503		1.85	-0.267	負の細胞増殖調節。G1/S 移行。cdc7 活性は DNA 複製の開始に不可欠である
AMID	NM_032797	2.62		0.42	<i>Homo sapiens</i> のアポトーシス誘導因子 (AIF) 様ミトコンドリア - 死関連誘導物質 (AMID)
Caspase4	NM_033306	1.62		0.21	
caspase7	NM_033339	1.652		0.22	
caspase8	NM_033356	1.643		0.21	転写変異体 C、カスパーゼ 8
AATK	AK131529	1.8		0.25	アポトーシス関連チロシンキナーゼ
PAWR	NM_002583	1.47		0.17	PRKC、アポトーシス WT1 レギュレータ
GADD45G	NM_006705	3.47		0.54	GADD45 群の A、B、および G は、増殖抑制、NF- κ B の阻害を介したアポトーシスの誘導、c jun N 末端キナーゼ (JNK) のアップレギュレーションを担う。
GADD45B	NM_015675	1.92		0.28	
GADD45A	NM_001924	5.41		0.73	
TP53INP1	NM_033285		1.47	-0.17	転写は p53 により活性化される。G1 停止および p53 介在性アポトーシスを担う。
CCAR1	NM_018237		1.55	-0.19	
BCL-2 群					
BCL-2	NM_000633		1.53	-0.19	
HRK/BH3	NM_003800	3.75		0.57	アポトーシスのアクチベータ。HRK は BCL2 および BCLXL の不活化を介してアポトーシスを調節するが、死促進 Bcl2 関連蛋白の BAX、BAK、または BCLX との相互作用は伴わない。HRK は BCL2/BCL-XL を伴う (BH3) ドメインと相互作用する。
Bcl2like1 (BIM)	NM_138622	2.156		0.33	<i>Homo sapiens</i> のアポトーシス様促進物質。BCL-2 様 11
BBC3	NM_014417	3.08		0.49	<i>Homo sapiens</i> の BCL-2 結合要素 3 は PUMA と呼ばれている。
Athanogene 1	NM_004323	1.758		0.245	BCL2 関連 athanogene 1。BCL2 と結合してその抗アポトーシス作用を増強し、増殖因子受容体とアポトーシス機序を結び付ける。
Athanogene 3	NM_004281	1.6			
腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー遺伝子					
TNRSF1A	NM_001065	2.44		0.387	TNFRSF 群は、MAPK/JNK および / または Fas 関連死ドメイン (FADD) を介してアポトーシスを導く。
TNFR SF6	NM_000043	1.67		0.22	
TNFR SF21	NM_014452	1.677		0.22	
カルパイン群					
CAPN12	NM_144691	1.6		0.2	カルパインは、リソソームアスパルチルプロテアーゼとともに壊死細胞死を仲介する。
CAPN10	NM_023083	1.5		0.176	
CAPN2 (m/II)	NM_001748	1.46		0.17	
二重特異性ホスファターゼ (DUSP) 群遺伝子					
MAP2K6	NM_002758		-4.786	-0.68	細胞外シグナル制御 (ERK) キナーゼ
MAP3K1/MEKK1	ENST0000026477		-1.5	-0.18	その他の MAP キナーゼシグナル伝達経路を活性化する。
MAP3K2/MEKK2	NM_006609		-1.47	-0.18	I κ B キナーゼをリン酸化・活性化する。
MAP3K10	NM_002446	1.64		0.21	JUN 経路を介したアポトーシスの誘導
MAP3K14	NM_003954	1.8		0.25	NF- κ B 誘導キナーゼ
DUSP2	NM_004418		2.63	-0.42	二重特異性ホスファターゼ 2
DUSP8	NM_004420	2.2		0.34	二重特異性ホスファターゼ 8
DUSP4	NM_001394	1.75		0.24	二重特異性ホスファターゼ 4
DUSP10	NM_007207	3.53		0.547	二重特異性ホスファターゼ 10
DUSP5	NM_004419	2.02		0.3	二重特異性ホスファターゼ 5
DUSP13	NM_001007271	2.0		0.3	二重特異性ホスファターゼ 13
DUSP1	NM_004417	1.8		0.25	二重特異性ホスファターゼ 1
DUSP16	NM_0030640	2.62		0.41	二重特異性ホスファターゼ 16
エストロゲン応答性遺伝子					
ESR1	NM_000125		1.6	-0.2	エストロゲン受容体アルファ
CYP1A1	NM_000499	19.77		1.3	
CYP1B1	NM_000104	7.95		0.9	
^a 遺伝子発現における修飾。アペラネダエ樹皮エキス処理と非処理対照群で折り畳み変化を比較している。折り畳み変化値は、個別に実施する 3 連の実験からの平均値である。ボールド体で記載した遺伝子は、リアルタイム PCR により検証された。					

考 察

ホルモン応答性ER⁺臨床的乳癌は散発性癌全体の約80%を占め、内分泌に基づく治療的介入が有効であることは一般的に認識されている(1,2)。しかし、選択的エストロゲン受容体モジュレータを用いた長期内分泌療法は患者の遵守が低下することが多く、その理由として、後天的薬剤耐性または有害な全身毒性も挙げられている。このような限界があるため、長期毒性を最小限に抑えた有効な新規薬剤を抽出する必要性が強調されている。

本試験では、十分に確立されたヒト乳癌由来ER⁺MCF-7細胞培養モデルを用い、天然の植物抽出物アベラネダエ樹皮エキスの治療効果を調査し、ER⁺臨床的乳癌に対する有効性を導くと考えられる機構的手掛かりを抽出することとした。

ER⁺MCF-7細胞に対するアベラネダエ樹皮エキスの増殖阻害作用の現象論的エビデンスは、アベラネダエ樹皮エキス処理に伴う用量および時間依存性増殖阻害が示されたデータから裏付けられている。また、これらの増殖曲線から、本モデル系におけるアベラネダエ樹皮エキスの至適最大細胞増殖抑制処理も抽出された。

増殖阻害を導くと考えられる機構的手掛かりを抽出するようにデザインした実験から、最長72時間の短期処理では、軽微なS期停止に起因してG1:S+G2/M比が進行性時間依存性に低下することが判明した。この点は、非接着性(浮遊)細胞の発生率の進行性時間依存性上昇に合致している。これらのデータから、細胞周期進行の調節および細胞アポトーシス/壊死の導入は、アベラネダエ樹皮エキスに観察された効果に起因する感受性機構的経路であることが示唆されている。

本実験は、クローン形成法を用いてアベラネダエ樹皮エキスの長期効果を調査するようにデザインしており、アベラネダエ樹皮エキスを中止した場合は、その阻害作用が8日間以上にわたって保持されることが判明した。これらのデータから、不連続の処理によって到達した用量分割により、有効性を損なうことなく長期毒性を低減するための手掛かりが抽出されたといえよう。

マイクロアレイに基づく全体的遺伝子発現プロファイルを用いた実験から、分子標的の可能性およびアベラネダエ樹皮エキスの効果を得るために重要な機構的経路に関する重要な手掛かりが抽出された。全体的に、マイクロアレイ法では44Kの遺伝子チップを用いて43,376遺伝子

の遺伝子発現プロファイルを調査した。約1,600遺伝子(3.7%)はダウンレギュレートした発現、1,900遺伝子(4.4%)はアップレギュレートした発現を呈し、40,000遺伝子(92.2%)は本質的に変化なく推移した。培養中ER⁺MCF-7細胞の発育、増殖、アポトーシス、および代謝に関連する選択された遺伝子で得られたデータから、アベラネダエ樹皮エキスは生物学的プロセスに関与する同義遺伝子の発現を修飾することが明らかとなっている。遺伝子発現プロファイルの修飾には、本質的に細胞周期調節および細胞アポトーシスの初期段階導入との相関性が認められた。したがって、PCNAおよびGTSE1などの遺伝子がダウンレギュレートしたことは、S期停止の観点から注目に値する。これらの遺伝子は、細胞周期のS期におけるDNAの合成および複製で役割を担う(16)。また、GADD 45群の遺伝子は、アベラネダエ樹皮エキス処理に伴って実質的にアップレギュレートした。この遺伝子群は、増殖の調節、DNA修復、およびアポトーシス誘導に関与する(17)。興味深いことに、ヒト骨髄間質細胞由来増殖阻害因子(BDGI)とも呼ばれているOKL38遺伝子は、堅固な12倍のアップレギュレーションを呈した。この遺伝子はS期停止を誘導し、その後アポトーシスが開始することが知られている(18,19)。BIM、HRK/BH3、およびBBC3などの抗アポトーシスBCL-2の不活化を担う遺伝子は、それぞれ2.16倍、3.75倍、および3.08倍のアップレギュレーションを呈した。これらの遺伝子は、S期に細胞停止を導き、アポトーシスを開始させることも知られている(19,20)。OKL38、BIM、HRK/BH3、およびBBC3遺伝子の発現修飾について得られたデータから、アベラネダエ樹皮エキスによりアポトーシスプロセスが開始される理由の一部として、抗アポトーシスBCL-2遺伝子の機能低下が示唆されている。このコンテキストでは、アベラネダエ樹皮エキス処理培養中に壊死細胞が存在したことと一致し、カルパイン群遺伝子(21)が非処理対照と比較して1.5倍超にアップレギュレートしたことも注目に値する。

ERシグナル伝達に対するアベラネダエ樹皮エキスの効果について述べると、アベラネダエ樹皮エキス処理によってアップレギュレートした二重特異性ホスファターゼ(DUSP)群遺伝子は、MAPKシグナル伝達における負の調節を担うことが観察されている(22-24)。これらのデータから、アベラネダエ樹皮エキスはERシグナル伝達経路において重要なリガンド非依存性AF-1ドメインに対す

る作用を介してER⁺ MCF-7細胞の増殖を抑制することが示唆されている。ERシグナル伝達を介したアベラネダエ樹皮エキスの潜在的効果に合致して、観察されたサイクリンAおよびcdk2のダウンレギュレーションから、ERのN末端AF-1ドメインのリン酸化が阻害されることが示唆されている(25,26)。このように解釈すると、アベラネダエ樹皮に含有される有効成分は細胞増殖抑制作用を発揮する高用量により、ERシグナル伝達経路を介して潜在的な抗エストロゲン作用をもたらすことを示す主な機構の手掛かりが立証される。エストロゲン応答性遺伝子について述べると、アベラネダエ樹皮エキス処理はER- α に対する遺伝子のESR1に1.6倍のダウンレギュレーションをもたらしたが、ER- β に対する遺伝子のESR2は本質的に変化なく推移した点が注目に値する。CYP 1A1およびCYP 1B1遺伝子は主として生体異物代謝に関与するが、エストラジオールの細胞代謝も担い、MCF-7細胞の増殖に対する修飾能を有したC2-、C4-、およびC16 α -ヒドロキシル化代謝産物の産生を導く(27-29)。MCF-7細胞と同様、エストラジオールの細胞代謝修飾は、ER-/HER-2⁺浸潤前コメド腺管上皮内癌の184-B5/HER細胞培養モデルに認められた(30)。

上述した標的および経路のいずれも、ER⁺ MCF-7細胞の発育、細胞増殖、および腫瘍原性において十分に認識されている(12,13)。さらに、選択的エストロゲン受容体モジュレータ処理に伴うこれら経路の実験的修飾には、*in vitro*細胞培養ならびに複数の機序を介した腫瘍原性の*in vivo*異種移植モデルにおけるMCF-7細胞の増殖阻害との関連性が認められている(12,13,22,23,25,26)。これらのデータを総合すると、アベラネダエ樹皮に含有される有効成分の作用機序は選択的エストロゲン受容体モジュレータと同様であることが示唆されている。このコンテキストでは、ER⁺ MCF-7細胞に対する既報のタモキシフェン試験から、選択的エストロゲン受容体モジュレータのタモキシフェンはER依存性機序とともにエストラジオールの細胞代謝を変化させ、抗増殖代謝物の産生に有利となり(31-33)、cdk-4/6およびp-53依存性経路を介してMCF-7細胞の細胞周期進行に影響をもたらすことが示されている点が注目に値する(12,13,34)。

アベラネダエ樹皮エキスの有効性に対する分子標的および機構的経路が同定されたことに関連し、本試験で用いたアベラネダエ樹皮の非分画水抽出物には、フ

ラノフトキノ、キニン、ナフトキノ、およびフラボノイドなど、機構的に異なる数種類の成分の混合物が含まれている点を認識する必要がある(35-37)。アベラネダエ樹皮の主成分であるナフトフランジオンは、様々なヒト癌由来細胞株に対して選択的抗腫瘍作用を発揮する(35-38)。したがって、今回提示したデータから証明された増殖阻害におけるアベラネダエ樹皮含有成分の有効性は、アベラネダエに由来する複数の水溶性成分複合作用をもたらすものと考えられる。

結論として、非分画漢方薬抽出物の有効性を評価し、ER⁺臨床的乳癌の代替療法を導くため、臨床的に置き換え可能な機構的手掛かりを抽出することを目的としたヒト組織由来細胞培養アプローチが、本試験の結果から立証されている。

謝 辞

本研究の主な資金は、DanielとKathleen Mezzalinguaのご一家、HakenとMarie Ledinのご一家、およびIssac and Laura Perlmutter FundからAmerican Foundation for Chinese Medicineにお寄せいただいたご寄付により提供された。

■文献

- 1) Lippman ME:乳癌の管理における内分泌療法・化学療法併用の試み:2 + 2 = 4となるのか?Breast Cancer Res Treat 3:117-127, 1983.
- 2) Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group (EBCTG):早期乳癌の化学療法およびホルモン療法が再発ならびに15年間生存にもたらす効果:無作為化試験の概観.Lancet 365:1687-1717, 2005.
- 3) Rock E and DeMichele A:乳癌生存者におけるアジュバント化学療法の遅発性毒性に対する栄養的アプローチ.J Nutr 133:3785s-3793s, 2003.
- 4) Oudin C, Bonnetain F, Boidot R, et al:ネオアジュバント化学療法中の乳癌におけるヘテロ接合性喪失パターン.Int J Oncol 30:1145-1155, 2007.
- 5) Molassiotis A, Scott JA, Kearney N, et al:欧州の乳癌患者における補足および代替治療の使用.Support Care Cancer 14:260-267, 2006.
- 6) Tindle HA, Davis RB, Phillips RS, et al:米国の成人における補足および代替治療の使用傾向:1997-2002年.Altern Ther Health Med 11:42-49, 2005.
- 7) Helyer LK, Chin S, Chui BK, et al:局所進行乳癌患者における補足および代替治療の使用-記述的研究.BMC Cancer 6:39-46, 2006.
- 8) Matthews AK, Sellergren SA, Huo D, et al:乳癌生存者における補足および代替治療の使用.J Altern Complement Med 13:555-562, 2007.

- 9) Park BS, Lee HK, Lee SE, *et al*: *Helicobacter Pylori*に対する *Tabebuia impetiginosa Martius ex DC* (タヒボ) の抗菌作用。 *J Ethnopharmacol* 105: 255-262, 2006.
- 10) Park BS, Kim JR, Lee SE, *et al*: *Tabebuia impetiginosa* 内部樹皮において同定された化合物のヒト腸内細菌に対する選択的増殖阻害作用。 *J Agri Food Chem* 53:1152-1157, 2005.
- 11) Son DJ, Lim Y, Park YH, *et al*: *Tabebuia impetiginosa* 内部樹皮抽出物のアラキドン酸放出抑制ならびに ERK1/2 MAPK 活性化を介した血小板凝集および血管平滑筋細胞増殖に対する阻害作用。 *J Ethnopharmacol* 108:148-151, 2006.
- 12) Lippman ME, Osborne CK, Knazek R and Young N: ホルモン依存性乳癌の試験における *in vitro* モデル系。 *N Engl J Med* 296:154-159, 1977.
- 13) Jordan VC: 進行乳癌のホルモン療法に関する歴史的見解。 *Clin Ther* 24:A3-A16, 2002.
- 14) Hsieh TC, Lu X, Guo, J, *et al*: ホルモン応答性およびホルモン抵抗性前立腺癌細胞に対する漢方薬 Equigard の効果。 *Int J Oncol* 20:681-689, 2002.
- 15) Livak KJ and Schmittgen TD: リアルタイム定量 PCR および $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ 法を用いた相対的遺伝子発現データの解析。 *Methods* 25:402-408, 2001.
- 16) Monte MR, Benetti R, Buscemi G, *et al*: 細胞周期調節蛋白質ヒト GTSE-1 は p53 機能への影響を介して DNA 損傷誘導性アポトーシスを抑制する。 *J Biol Chem* 278:30356-30364, 2003.
- 17) Yin F, Bruemmer D, Blaschke F, *et al*: ヒト MCF-7 乳癌細胞における トログリタゾン による GADD45 遺伝子発現およびアポトーシスの誘導に関するシグナル伝達経路。 *Oncogene* 23:4614-4623, 2004.
- 18) Huynh H, Ng CY, Ong CK, *et al*: 乳腺における新規妊娠誘導性増殖阻害のクローニングおよび特徴付け。 *Endocrinology* 142:3607-3615, 2001.
- 19) Wang T, Xia D, Li N, *et al*: 骨髄間質細胞由来増殖阻害因子は細胞周期停止およびアポトーシスの誘導を介して乳癌細胞の増殖ならびに移動を阻害する。 *J Biol Chem* 280:4374-4382, 2005.
- 20) Concannon CG, Koehler BF, Reimertz C, *et al*: 癌細胞のプロテアソーム阻害が誘導するアポトーシス: p53/PUMA 経路の主な役割。 *Oncogene* 26:1681-1692, 2007.
- 21) Artal-Sanz M and Tavernarakis N: 壊死細胞死および神経変性における蛋白分解機序。 *FEBS Lett* 579:3287-3296, 2005.
- 22) Frigo DE, Basu A, Nierth-Simpson EN, *et al*: p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼは p160 コアクチベータグルココルチコイド受容体相互作用蛋白質 1 のリン酸化と増強を通してエストロゲン介在性転写および細胞増殖を刺激する。 *Mol Endocrinol* 20: 971-983, 2006.
- 23) Creighton CJ, Hilger AM, Murthy S, *et al*: エストロゲン受容体アルファ陽性乳癌細胞における *in vitro* マイトジェン活性化プロテインキナーゼの活性化はエストロゲン受容体アルファ陰性ヒト乳房腫瘍の *in vivo* 分子表現型を誘導する。 *Cancer Res* 66: 3903-3911, 2006.
- 24) Jeffrey KL, Camps M, Rommel C and Mackay CR: 二重特異性ホスファターゼを標的に: MAPキナーゼシグナル伝達および免疫応答の操作。 *Nature Rev Drug Disc* 6:391-403, 2007.
- 25) Rogatsky I, Trowbridge JM and Garabedian MJ: サイクリンA-cdk2複合体によるセリン104および106のリン酸化を介したヒトエストロゲン受容体アルファ転写活性化の増強。 *J Biol Chem* 274:22296-22302, 1999.
- 26) Trowbridge JM, Rogasky IO and Garabedian MJ: サイクリンA/Cdk2複合体によるエストロゲン受容体転写増強の調節。 *Proc Natl Acad Sci* 94: 10132-10137, 1997.
- 27) Yager JD and Davidson NE: 乳癌におけるエストロゲンの発癌作用。 *N Engl J Med* 354:270-282, 2006.
- 28) Schneider J, Huh MM, Bradlow HL, and Fishman J: MCF-7 ヒト乳癌細胞に対する 2-ヒドロキシエストロンの抗エストロゲン作用。 *J Biol Chem* 259: 4840-4845, 1984.
- 29) Lottering ML, Haag M and Seegers JC: MCF-7 細胞での細胞周期事象に対する 17β エストラジオール代謝物の影響。 *Cancer Res* 52:5926-5932, 1992.
- 30) Telang NT, Katdare M, Bradlow HL and Osborne MP: 細胞周期調節、アポトーシス、およびエストラジオール代謝: ヒト乳癌予防における新規エンドポイントバイオマーカー。 *J Clin Ligand Assays* 23:130-137, 2000.
- 31) Suto A, Bradlow HL, Kubota T, *et al*: 原型腫瘍抑制物質によるヒト乳癌細胞の増殖および内分泌応答性の変化。 *Steroid* 58:215-219, 1993.
- 32) Telang NT, Bradlow HL and Osborne MP: 乳房前癌状態に対するタモキシフェンの効果: 化学予防療法との比較。 *Cancer Detect Prev* 18:313-321, 1994.
- 33) Osborne MP: 乳癌の化学予防。 *Surg Clin North Am* 79:1207-1221, 1999.
- 34) Cover CM, Hsieh SJ, Cram EJ, *et al*: インドール-3-カルビノールおよびタモキシフェンは MCF-7 ヒト乳癌細胞の細胞周期停止と連動する。 *Cancer Res* 59: 1244-1251, 1999.
- 35) Queiroz ML, Valadares MC, Torello CO, *et al*: 担癌マウスの造血反応に対する *Tabebuia avellanedae* 樹皮抽出物および β -ラパコンの作用に関する比較試験。 *J Ethnopharmacol* 117:228-235, 2008.
- 36) Ueda S, Umemura T, Dohguchi K, *et al*: 細胞培養中 *Tabebuia avellanedae* 由来抗腫瘍促進性フラノナフトキノンの産生。 *Phytochemistry* 36:323-325, 1994.
- 37) Park BS, Lee KG, Shibamoto T, *et al*: タヒボ (*Tabebuia impetiginosa Martius ex DC*) の揮発性成分の抗酸化作用および特徴付け。 *J Agri Food Chem* 51:295-300, 2003.
- 38) Ueda S, Tokuda H, Hirai K, *et al*: 新規抗腫瘍化合物 2-(1-ヒドロキシエチル-5-ヒドロキシナフト [2,3-b] フラン-4,9-ジオン) および本化合物から構成された抗腫瘍薬。 米国特許 #5,663,197, 1997.