

乳がん細胞への細胞毒性に及ぼす脂肪酸の炭素鎖構造の影響

Sawitree Wongtangtintharn¹, 屋 宏 典^{*、2}
稲 福 征 志¹, 岩 崎 公 典², 戸 田 隆 義³

(2005年4月15日受付; 2005年11月14日受理)

要旨: 分枝鎖脂肪酸の抗がん活性の発現メカニズムを探るため、特殊な炭素鎖構造をもつ脂肪酸の乳がん細胞脂質への取り込みを調べ、脂肪酸炭素鎖の化学構造と細胞毒性との関連性について検討した。培地に添加されたすべての脂肪酸はリン脂質よりもトリグリセリドに優先的に取り込まれ、分枝鎖脂肪酸については主鎖の炭素数が14の脂肪酸が13のものよりも取り込み率が高い傾向にあった。シクロアルキル基をもつ脂肪酸の取り込みは分枝鎖脂肪酸よりも低い傾向にあった。ヒドロキシ脂肪酸の取り込みは分枝鎖脂肪酸とほぼ同程度と見積もられた。分枝鎖脂肪酸のD₅₀は他の脂肪酸よりも低い傾向にあり、シクロアルキル基をもつ脂肪酸およびヒドロキシ脂肪酸のD₅₀は直鎖脂肪酸と同程度か高い傾向にあった。主鎖の炭素数は同一で化学構造が異なる脂肪酸の細胞毒性を比較すると、分枝鎖脂肪酸についてのみ乳がん細胞に対する細胞毒性が認められ、分枝鎖の化学構造が細胞毒性と関連していることが示唆された。

キーワード: 分枝鎖脂肪酸, 化学構造, 炭素鎖, 乳がん細胞, 細胞毒性

メチル分枝をもつ分枝鎖脂肪酸や分枝鎖脂肪アルコールは乳製品あるいは発酵食品に含まれており、直鎖脂肪酸と異なる生理機能をもつことが報告されている¹⁾²⁾。その一つに抗腫瘍活性があげられ、羊の皮脂に含まれるイソ型あるいはアンテイソ型の分枝鎖脂肪酸あるいは分枝鎖脂肪アルコールは Ehrlich 腹水腫がん細胞の増殖を抑制した¹⁾²⁾。またがん治療に有効とされている大豆発酵食品から抗腫瘍活性成分として 13-methyltetradecanoic acid (MTD) が単離され、各種がん細胞に対する増殖抑制効果が明らかにされている³⁾。MTD は前立腺がん細胞においてはリポキシゲナーゼを抑制することによりアポトーシスを誘導する⁴⁾。さらに乳がん細胞においては脂肪酸合成酵素を阻害することにより細胞毒性を発揮することが示唆されている⁵⁾。

細胞に取り込まれた脂肪酸は細胞膜成分であるリン脂質あるいは貯蔵脂質であるトリグリセリド合成へと代謝利用される。このような代謝過程で分枝鎖脂肪酸はメチル分枝に起因する“かさの増大”により、通常の脂肪酸とは異なる代謝を受けることが想定される⁶⁾⁷⁾。すなわち、通常の脂肪酸代謝過程が攪乱された結果として細胞内に蓄積し、細胞機能に悪影響を及ぼすことが考えられる。一方において分枝鎖脂肪酸が細胞膜脂質に取り込ま

れた場合には“かさの増大効果”により膜の流動性ひいては細胞機能に影響を及ぼすことも考えられる。

脂肪酸の化学構造はこのように細胞内代謝を決定する因子であるが、脂肪酸の炭素鎖の構造と細胞内蓄積および細胞毒性について検討した報告はない。そこで本研究においては炭素鎖構造が特殊な脂肪酸を合成し、リン脂質およびトリグリセリドへの取り込みと細胞毒性について検討した。

方 法

1. 脂肪酸の化学合成

各種分枝鎖あるいはシクロアルキル短鎖脂肪酸とセバシン酸モノメチルエステルをコルベ電解により連結し、図1に示すような鎖長がC14-C17の特殊な炭素鎖構造の脂肪酸を合成した。電気分解により陽極側でカルボキシル基同士が会合し、カルボキシル基の離脱に伴い炭素鎖の連結が起こると考えられている⁸⁾。すなわち0.5 mmolのセバシン酸モノメチルエステルと1 mmolの分枝鎖あるいはシクロアルキル短鎖脂肪酸を15 mLのメタノールに溶解し、200 Vおよび400 Vでそれぞれ90分間および60分間電気分解を行った。電気分解物に酢酸30 μLを加えたのち、脂肪酸メチルエステルを20 mL

* 連絡者・別刷請求先

¹ 鹿児島大学大学院連合農学研究科 (890-0065 鹿児島市郡元町1-21-24)

² 琉球大学遺伝子実験センター (903-0213 沖縄県西原町千原1番地)

³ 琉球大学附属病院臨床検査医学講座 (903-0125 沖縄県西原町上原207)

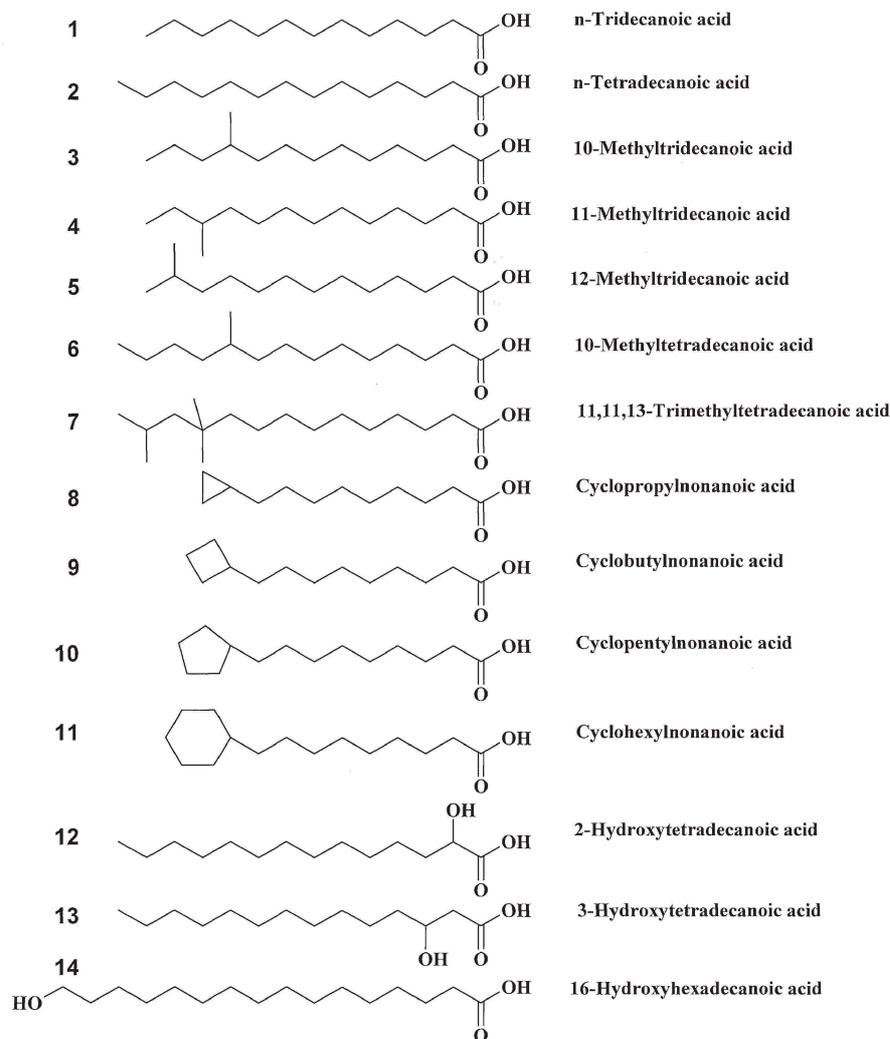


図1 本実験に用いた脂肪酸の化学構造

のクロロホルムで抽出した。抽出物を 20 mL の 0.2 N 水酸化ナトリウム溶液および蒸留水にて洗浄し、未反応の短鎖脂肪酸を除去した。次いで、クロロホルム溶液を蒸発乾固し、5 mL の 3% 水酸化カリウム溶液 (96% エタノールに溶解) 中にて 50°C で 60 分間ケン化した。ケン化溶液に 0.5 mL の 6 N 塩酸を加えて酸性とした後、脂肪酸を 20 mL のヘキサンにて抽出した。合成した脂肪酸の純度はガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー (GC-MS) およびガスクロマトグラフィー (GC) により検定した。ヒドロキシ脂肪酸 (DL-2-hydroxytetradecanoic acid, DL-3-hydroxytetradecanoic acid, 16-hydroxyhexadecanoic acid) は Sigma 社から購入した。用いた脂肪酸の純度は 85% 以上であった。

2. 細胞毒性試験

乳がん細胞 SKBR-3 は大日本製薬より購入し、10% 牛胎児血清を含む McCoy's 5A 培地で培養した。脂肪酸は中和した後、0.8% Tween 80 を含むリン酸緩衝溶液 (PBS) に溶解し、培地へと添加した。96 穴マイクロプレートにウェルあたり 700 個の細胞を播種し、脂肪酸サンプルを添加 24 時間後の細胞生存率を MTS 試薬

(Cell Titer® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega Co.) を用いて測定した。本実験においては細胞の 50% を死滅させる脂肪酸濃度を D_{50} と定義した⁵⁾。

3. 脂肪酸組成

SKBR-3 細胞を 0.25 mM の各種脂肪酸で 24 時間処理した後、培養層表面を PBS にて 2 回洗浄した。細胞をポリスマンにて剥離し、低速遠沈 (700×g, 10 分間) 後に Folch *et al.* の方法⁹⁾ により脂質を抽出した。抽出した脂質は薄層クロマトグラフィーによりトリグリセリドおよびリン脂質画分に分離し、脂肪酸組成を GC により分析した¹⁰⁾。

4. 有意差検定

平均値の差は Tukey-Kramer の方法¹¹⁾ により有意性を検定した。

結 果

培地に添加されたすべての脂肪酸はリン脂質よりもトリグリセリドに優先的に取り込まれた (図 2)。メチル分枝をもつ脂肪酸については主鎖の炭素数が 14 の脂肪

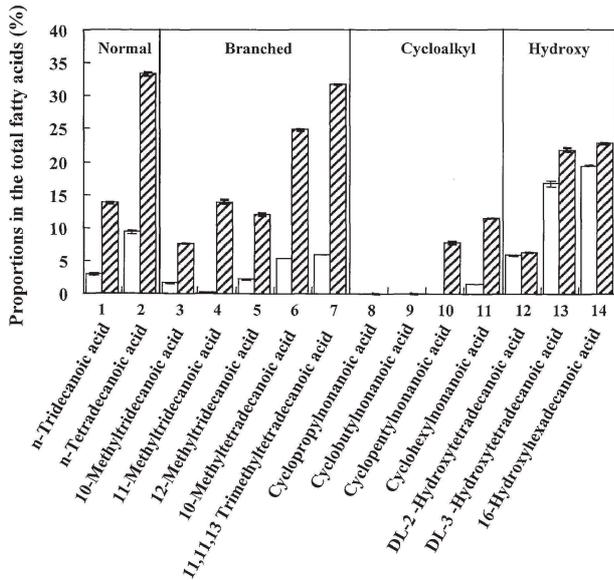


図2 乳がん細胞のリン脂質およびトリグリセリド画分における総脂肪酸に対する添加脂肪酸の比率。白抜きのカラムはリン脂質画分、斜線のカラムはトリグリセリド画分を示す。3回の分析値の平均±標準誤差を示す。

酸が13のものよりもリン脂質およびトリグリセリド画分への取り込み率が高い傾向にあった。主鎖の炭素数が13の脂肪酸(3-5)においてはメチル分枝の位置は取り込み率に大きな影響は及ぼさなかった。シクロアルキル基をもつ脂肪酸のリン脂質およびトリグリセリド画分への取り込みは直鎖脂肪酸や分枝鎖脂肪酸よりも低い傾向にあった。ヒドロキシ脂肪酸のリン脂質およびトリグリセリド画分への取り込みは直鎖脂肪酸や分枝鎖脂肪酸とほぼ同程度であった。

分枝鎖脂肪酸のD₅₀は他の脂肪酸よりも低い傾向にあった(図3)。シクロアルキル基をもつ脂肪酸のD₅₀は直鎖脂肪酸とほぼ同程度であり、ヒドロキシ脂肪酸はこれより高い傾向があった。なお、主鎖の炭素数が14の脂肪酸(2, 6, 7, 10, 12, 13)を比べた場合、分枝鎖脂肪酸(6, 7)のD₅₀は直鎖脂肪酸よりも有意に低く($p < 0.05$)、シクロアルキル基をもつ脂肪酸とヒドロキシ脂肪酸のD₅₀は直鎖脂肪酸よりも高い傾向がみられた。

考 察

主鎖の炭素数が14で化学構造の異なる脂肪酸の細胞毒性を比較すると分枝鎖脂肪酸についてのみ乳がん細胞に対する細胞毒性が認められた。このことは分枝鎖の化学構造が細胞毒性と関連していることを示唆しているものと考えられた。

一方、ヒドロキシ脂肪酸およびシクロアルキル基をもつ脂肪酸のD₅₀は直鎖とほぼ同等か大きいことから、脂肪酸の化学構造が直鎖でないことは必ずしも細胞毒性とは関連していないことが示された。これらの脂肪酸がリ

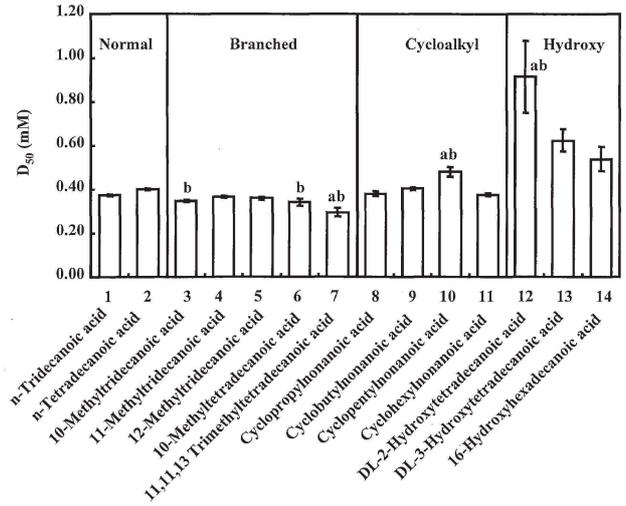


図3 乳がん細胞に対する添加脂肪酸のD₅₀。4-8回の分析値の平均±標準誤差を示す。^aはn-tridecanoic acid, ^bはn-tetradecanoic acidに対してそれぞれ有意差があることを示す($p < 0.05$)。

ン脂質に取り込まれた場合には膜構造には変化が予想されるが、細胞毒性は必ずしも直鎖脂肪酸よりも強いとはいえなかった。このことから、分枝鎖脂肪酸の細胞毒性は細胞膜構造の変化が原因ではない可能性も考えられる。分枝鎖脂肪酸は各種酵素反応に影響を及ぼすことがすでに報告されている⁴⁻⁶⁾。したがって、分枝鎖脂肪酸の毒性はおもに細胞内蓄積に伴う代謝障害により発揮されているものと考えられる。

文 献

- 1) Nakamura S, Nishimura Y, Inagaki K, Miwa N (1994) Inhibition of tumor cell growth by low-boiling-point-saturated fatty acids isolated by molecular distribution and reversed phase liquid chromatography of hydrolysates of uncytotoxic wool grease secreted from sheep sebaceous gland. *Cancer Biochem Biophys* **14** : 113-21.
- 2) Miwa N, Nakamura S, Nagao N, Naruse S, Ito H, Takada Y, Kageyama K (1996) Wool grease-derived α -monohydric fatty alcohols are carcinostatic depending on their branched alkyl moiety bulkiness. *Anticancer Res* **16** : 2479-84.
- 3) Yang Z, Liu S, Chen S, Chen H, Haung M, Zheng J (2000) Induction of apoptotic cell death and *in vivo* growth inhibition of human cancer cells by a saturated branched-chain fatty acid, 13-methyltetradecanoic acid. *Cancer Res* **60** : 505-9.
- 4) Yang P, Colin P, Madden T, Chan D, Sweeney-Gotsch B, McConkey D, Newman RA (2003) Inhibition of proliferation of PC3 cells by the branched-chain fatty acid, 12-methyltetradecanoic acid, is associated with inhibition of 5-lipoxygenase. *The Prostate* **55** : 281-91.
- 5) Wongtangtharn S, Oku H, Iwasaki H, Toda T

- (2004) Effect of branched-chain fatty acids on fatty acid biosynthesis of human breast cancer cells. *J Nutr Sci Vitaminol* **50** : 137-43.
- 6) Tagiri M, Endo Y, Fujimoto K, Suzuki T (1992) Hydrolysis of triglycerides of branched-chain fatty acids and castor oil derivatives by pancreatic lipase. *Biosci Biotechnol Biochem* **56** : 1490-1.
- 7) Tagiri M, Endo Y, Fujimoto K, Suzuki T (1994) The digestibility of branched-chain triacylglycerols and their effects on plasma and hepatic lipid levels in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* **58** : 1093-6.
- 8) Greaves WS, Linstead BR, Shephard BR, Thomas SLS, Weedon BCL (1956) Anodic syntheses. Part I. New synthesis of stearic, myristic, and other acid. *J Chem Soc* **34** : 3326-35.
- 9) Folch JLM, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* **266** : 497-506.
- 10) Yamashiro H, Oku H, Higa H, Chinen I, Sakai K (1999) Composition of lipids, fatty acids and sterols in Okinawan corals. *Comp Biochem Physiol, Part B* **122** : 397-407.
- 11) 永田 靖, 吉田道弘 (2001) 統計的多重比較法の基礎, p. 19-40. サイエンス出版社, 東京.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **59** : 115-118 (2006)

Research Note

Effects of Carbon Chain Structures of Fatty Acids on Their Cytotoxicity to Breast Cancer Cells

Sawitree Wongtangintharn,¹ Hirosuke Oku,^{*,2}

Masashi Inafuku,¹ Hironori Iwasaki,² and Takayoshi Toda³

(Received April 15, 2005; Accepted November 14, 2005)

Summary : This study investigated the incorporation of unusual fatty acids into cellular lipids of breast cancer cells and its relevance to cell cytotoxicity. Fatty acids added to the culture medium were preferentially incorporated into triacylglycerols rather than into phospholipids. The length of the main carbon chain appeared to be the critical factor for incorporation into cellular lipids. Incorporation of branched-chain fatty acids was higher than that of cycloalkyl fatty acids, and similar to that of hydroxy fatty acids. The cytotoxicities of branched-chain fatty acids were stronger than those of cycloalkyl or hydroxy fatty acids. Thus, of the fatty acids studied, only branched-chain fatty acids exhibited cytotoxicity against breast cancer cells. These observations suggest that the branched carbon chain structure has some relevance to its cytotoxicity.

Key words : branched chain fatty acid, chemical structure, carbon chain, breast cancer cell, cytotoxicity

* Corresponding author

¹ United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima University, 1-21-24, Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

² Center of Molecular Bioscience, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan

³ Department of Clinical Laboratory Medicine, University of the Ryukyus Hospital, School of Medicine, 207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-0125, Japan