

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：34449

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591924

研究課題名(和文) テネイシンC抗体と マンゴスチンとの複合による乳癌転移阻止の試み

研究課題名(英文) Treatment with tenascin C antibody and/or alpha-mangostin reduces tumor growth and lymph node metastasis in a model of metastatic mammary cancer

研究代表者

柴田 雅朗 (SHIBATA, Masaaki)

大阪保健医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：10319543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌細胞株をマウス皮下に移植し、2週間後にテネイシンC(TNC)抗体(125 μ g、週2回、腹腔内投与)、 α -マンゴスチン(4000 ppm、混餌投与)並びに両者の組み合わせ投与を実施し、6週経過後に実験を終了した。腫瘍体積では、対照群と比較して、全ての治療群で1週より実験終了まで抑制をみた。病理組織学的には、リンパ節および肺転移を含む総て臓器の転移において、対照群と比較して、全ての治療群で有意な低下をみた。以上、本乳癌モデルに対して、TNC抗体あるいは α -マンゴスチンは腫瘍増殖および転移に対する抑制作用を発揮したが、両者を複合することによる明らかな抗腫瘍作用の増強効果は示されなかった。

研究成果の概要(英文)：Metastatic mammary tumors in BALB/c mice were induced by inoculation of syngeneic mammary carcinoma cells into subcutis. These mice were subsequently exposed to 125 microgram tenascin C antibody (TNC Ab) i.p twice weekly, to continuous dietary 4000 ppm alpha-mangostin (MG), or to a combined TNC Ab + MG treatment. Control mice received saline twice weekly i.p. The study was terminated after 6 weeks of agent administration. Tumor volumes were significantly decreased in all treated groups, as were the multiplicities of lymph node and lung metastases. Both TNC Ab and MG also significantly decreased the multiplicity of metastatic foci in any other organ. In conclusion, since lymph node involvement is the most important prognostic factor in breast cancer patients, the anti-metastatic activity of both TNC Ab and MG may be of clinical significance. Unfortunately, the therapeutic effects of TNC Ab and MG were not enhanced by combination in this model.

研究分野：乳癌転移抑制

キーワード：テネイシンC抗体 マンゴスチン 乳癌 転移 治療 マウス 抗体医薬 複合治療

1. 研究開始当初の背景

ヒト乳癌はリンパ節、肺、肝、骨などに転移し、腫瘍サイズとの間には強い正の相関があり、生存率とは負の相関がある。その中でもリンパ節転移は最も予後の悪い因子である。この意味では転移を阻止する治療法の開発は急務である。

最近の癌治療の流れは癌細胞に発現した特定分子を標的とする分子標的治療に向かっている。その中でも抗体治療は特定の標的分子に結合することにより抗腫瘍効果を示す。しかし、抗体医薬が効果を示す癌腫は白血病やリンパ腫と限定的で、固形癌に対する抗腫瘍効果は決して十分ではない。その理由としては、固形癌に対して有効である標的分子が少ないこと、癌細胞の異常シグナル経路が複数あること、また上流のシグナルが遮断されても迂回路によって癌細胞の増殖活性を補填する(引用文献)などが考えられる。

2. 研究の目的

抗体医薬が効果を示す癌腫は限定的で、固形癌に対しての抗腫瘍効果は必ずしも十分とは言えない(引用文献)。そこで抗体医薬と低分子との複合治療を行い、2つの薬剤の複合により異なった癌の増殖・転移を担うシグナル伝達経路網を標的とする。テネイシンC(TNC)抗体を用いて、癌細胞の微小環境・間質を標的とし(引用文献)、低分子剤としてPI3K/Aktのリン酸化抑制作用のある -マンゴスチンで癌細胞自身を殺傷する(引用文献)。 -マンゴスチンは天然資源由来で毒性がなく、単独投与でも乳癌の転移抑制(引用文献)があるこの両者の複合治療で転移抑制の増強を試みた。

3. 研究の方法

(1) 乳癌細胞株

本実験で用いた乳癌細胞株 BJMC3879Luc2 は、

BALB/c 系マウスにマウス乳癌ウイルス(MMTV)を接種することにより誘発された乳癌より樹立された BJMC3879 細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を安定的に組み込んだものである。BJMC3879 細胞株を同系マウスに移植するとリンパ節や肺に高率に転移を起こす。

(2) 投与物質

TNC 抗体：ヒトメラノーマ細胞株(GIT 培地で培養)の培養上清から精製した TNC を抗原として、ラットに接種し、マウスのミエローマ NS-1 細胞と融合させたハイブリドーマから作成したラットのモノクローナル抗体である。抗体はプロテイン G カラムで精製して使用した。

-マンゴスチン：タイ産の成熟マンゴスチン果皮を乾燥した後、粉碎し、精製水とエタノール抽出、凍結乾燥、エチルアセテート抽出、クロマトグラフィーを用いた精製を経て -マンゴスチン結晶を得た。純度は>98%であった。

(3) マウス乳癌モデルを用いた実験

6週齢の50匹のBALB/c系雌マウス(日本SLC)の鼠径部皮下乳腺部にBJMC3879Luc2細胞を移植し、2週後に腫瘍径が0.5~0.7cm大の40匹の動物を無作為に選び、群分けした。1群は対照群で、5%コーンオイルを含むクレアCE-2粉末飼料を自由摂取させると共に、生理食塩水を週に2回、腹腔内投与した。2群は前述と同様にCE-2粉末飼料を与え、TNC抗体125μg(溶媒:生理食塩水)を週に2回、腹腔内投与した。3群には -マンゴスチンを4000ppm濃度に混じたクレアCE-2粉末飼料(5%コーンオイル含有)を自由摂取させると共に、生理食塩水を週に2回、腹腔内投与

した。4群には、4000ppmの α -マンゴスチン含有飼料を自由摂取させると共に、TNC抗体125 μ gを週に2回、腹腔内投与した。毎週、体重と乳腺腫瘍のサイズを個体別に測定した。乳腺腫瘍はデジタル式キャリパスで短径と長径を計測し、その体積を長径 \times (短径)² \times 0.4の算出式で求めた。実験開始の6週経過後には、全生存動物を屠殺剖検し、乳腺腫瘍を摘出し、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定した。肺およびリンパ節(腋窩部、鼠径大腿部)を採取し、更に肉眼病変部と異常の見られたリンパ節についても採取し、病理組織学的に検索した。

(4) 癌転移の生体イメージング

実験終了の6週時に、マウス1匹当たり3mgのD-ルシフェリンカリウム塩を腹腔内に投与し、イソフルレン吸入麻酔下にて、フォトンイメージャー(Biospace社)を用いて、生体発光イメージングを行い、転移の拡がりを群間で比較した。

(5) 腫瘍細胞の細胞増殖とアポトーシス

乳腺腫瘍の未染色標本について、細胞増殖の指標のPCNAを抗PCNA抗体(Santa Cruz社)を用いて免疫組織学的に染色し、またアポトーシス細胞を認識するTUNLE染色(和光純薬工業)を施した。それらの陽性細胞をカウントし、腫瘍1cm²当たりの数として算出した。

(6) 腫瘍内微小血管の定量と腫瘍内のリンパ管侵襲の数

乳腺腫瘍の未染色標本について、血管内皮のマーカであるCD31を抗CD31抗体(LabVision社)を用いて、免疫組織学的染色を施し、陽性を示した腫瘍内の毛細血管を定量した。リンパ管内皮のマーカであるポドプラニンを抗ポドプラニン抗体(AngioBio

社)を用いて免疫組織学的染色を施し、拡張した毛細リンパ管内腔に癌細胞浸潤を認め、そのリンパ管の数をカウントした(リンパ管侵襲)。

(7) 統計学的解析

対照群と投与群との間の定量的データではスチューデントの*t*検定を行った。発生頻度の解析にはフィッシャーの正確確率検定を用いた。

4. 研究成果

(1) 体重および腫瘍体積

体重では、群間に統計学的な有意差は認められなかった。なお、各群とも一般状態は良好であった。なお、実験開始の3および4週に投与に起因しない死亡例が散見され、死因も不明であったため、解析から除外した。

実験開始の1週より実験終了の6週まで、全ての投与群において、対照群と比較して、一貫して腫瘍体積は有意に低値を示した。

(2) 癌転移の生体発光イメージング

実験終了時の生体発光イメージングでは、対照群と比較して、投与群では転移の拡がりは小さい傾向にあった(図1)。

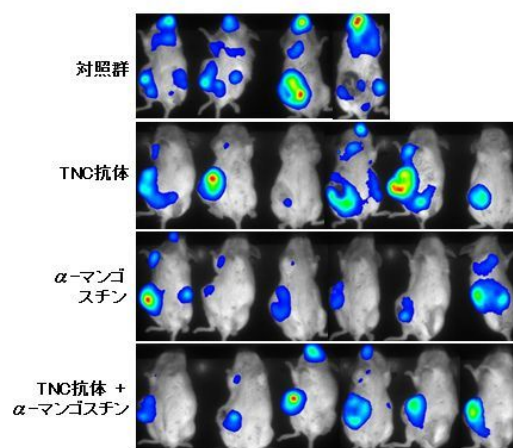


図1 生体発光イメージング

(3) 病理組織学的検索

マウス1匹当たりのリンパ節の転移個数は、

全ての投与群で、対照群と比較して、有意な低下が示された。肺転移では、転移巣の大きさが1mm以上のものについて、マウス1匹当たりの数を算出した結果、全ての投与群で、対照群と比較して、有意な低下が示された。転移をみた全ての臓器のマウス1匹当たりの数についても、全ての投与群で有意な低下が観察された(図2、** $P < 0.01$; 危険率が1%以下の確率で統計的に有意)。

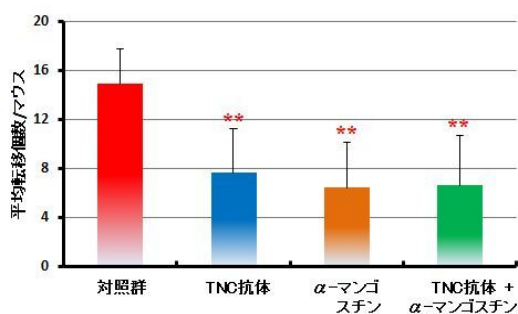


図2 マウス1匹当たりの平均転移個数

(4) 腫瘍細胞の細胞増殖とアポトーシス

腫瘍細胞の細胞増殖は全ての投与群で有意な低下を示し、アポトーシスでは α -マンゴスチン投与群と複合投与群で有意な増加を示した。

(5) 腫瘍内の微小血管密度およびリンパ管侵襲の数

免疫組織学的染色にて CD31 陽性を示した腫瘍内の微小血管を算定した。微小血管密度は α -マンゴスチン単独投与群および複合投与群で有意な減少が示された。TNC 抗体単独の投与群では減少傾向のみが示され、統計学的な差異は示されなかった。

同様にリンパ管内皮のマーカーであるポドプラニンを免疫組織学的に染色し、リンパ管を鑑別したところ、拡張した毛細リンパ管内腔に浸潤した癌細胞が観察された。その癌細胞の侵襲を受けたリンパ管をリンパ管侵襲の数として算定した結果、全ての投与群で

有意な低下が観察された。

以上、高転移性マウス乳癌モデルにおいて、TNC 抗体および α -マンゴスチンは抗腫瘍効果を発揮し、特にリンパ節をはじめとする転移の抑制は臨床的意義が極めて高い所見と考えられた。今後、より複数の分子標的性を示すその他の組み合わせ投与を実施して、転移阻止に向けた研究が必要と考える。

<引用文献>

設楽研也、がんの抗体医薬の現状と将来、実験医学増刊、27巻、2009年、49-55

Hancox, R. A. et al., Tumour-associated tenascin-C isoforms promote breast cancer cell invasion and growth by matrix metalloproteinase-dependent and independent mechanisms, Breast Cancer Res, 11, 2009, R24

Shibata, M. A. et al., α -Mangostin extracted from the pericarp of the mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn) reduces tumor growth and lymph node metastasis in an immunocompetent xenograft model of metastatic mammary cancer carrying a p53 mutation, BMC Med 9:69, 2011

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

Shibata MA, Matoba Y, Tosa H and Iinuma M, Effects of mangosteen pericarp extracts against mammary cancer. Altern. Integ. Med., 査読有、2:8、2013

(doi.10.4172/2327-5162.1000e139)

Shibata MA, Shibata E, Fujioka S and Harada-Shiba M, Experimental translational research using siRNA to target vascular genesis in inhibition of mammary cancer metastasis. Altern. Integ. Med., 査読有、2:9、2013 (doi.10.4172/2327-5162.1000e109)

柴田雅朗、日下部守昭、森本純司、柴田映子、斯波真理子、的場信吉、土佐秀樹、飯沼宗和、テネイシン抗体と α -マンゴスチンとの複合投与による乳癌転移抑制の試み、乳癌基礎研究、22巻、9-14、2013

Shibata MA, Akao Y and Iinuma M, A novel resveratrol tetramer vaticanol C from stem bark acts as an anti-metastatic

action in a mouse mammary cancer model、
Altern. Integ. Med.、査読有、4:2、2015
(doi.10.4172/2327-5162.1000e118)

〔学会発表〕(計 3件)

柴田雅朗, 日下部守昭, 森本純司, 柴田
映子, 斯波真理子, 的場吉信, 土佐秀樹,
飯沼宗和: テネインC抗体と α -マンゴス
チンとの複合投与による乳癌転移抑制の
試み. 第 118 回日本解剖学会総会・全国
学術集会, 自治医科大学(栃木県・下野
市), 2013. 3.39.

柴田雅朗, 森本純司, 日下部守昭: テネ
インC抗体および α -マンゴスチンに
よるマウス乳癌の転移抑制. 第 72 回日
本癌学会学術総会, パシフィコ横浜(神
奈川県・横浜市), 2013.10.5.

柴田雅朗, 日下部守昭, 柴田映子, 森
本純司, 斯波真理子, 飯沼宗和: テネ
インC抗体または α -マンゴスチンの単
独投与ならびにそれらの複合投与によ
るマウス乳癌転移抑制. 第 30 回日本毒
性病理解学会総会・学術集会, あわぎんホ
ール(徳島県・徳島市), 2013.1.30.

〔その他〕

ホームページ等

<http://shibata.ohsu.ac.jp/research.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴田雅朗 (SHIBATA, Masaaki)

研究者番号:

1 0 3 1 9 5 4 3

(2)研究分担者

日下部守昭 (KUSAKABE Moriaki)

研究者番号:

6 0 1 5 3 2 7 7

森本純司 (MORIMOTO Junji)

研究者番号:

9 0 1 4 5 8 8 9

(平成 25 年度より退職にて離脱)