

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659216

研究課題名(和文) 吸血動物の唾液および蛇毒に含まれるガン細胞転移抑制物質のスクリーニング

研究課題名(英文) Screening of anti-tumor metastatic substances using salivary gland of blood feed animals and snake venom

研究代表者

松岡 裕之 (Matsuoka, Hiroyuki)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10173816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの結腸がん細胞(Colon26)を用いて、このがん細胞のマウスへの定着を抑制する物質を探した。マウス結腸がん細胞にはLuciferase 遺伝子を組込んでおり、マウス体内においてがん細胞が生存・増殖した場合、外部から基質(Luciferin)を注入すると、専用のカメラにより捉えることができる。抑制物質の候補として、蚊の唾液腺、ヒルの唾液成分、ヒルのもつ抗凝固物質ヒルジン、ヘパリン、アスピリンなどを用いた。実験によっては腫瘍抑制傾向を認めたこともあったが、繰り返し実験を行なうと再現性がなかった。すなわち研究期間中に腫瘍抑制効果のある物質を見つけ出すことはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse colon cancer cell line (Colon26) I made screening for anti-tumor metastatic substances. Since Colon26 contains luciferase in the genome, you can monitor the cell grow by in vivo imaging system if the cancer cells grow in mouse body. The tested materials were mosquito salivary gland, salivary part of leech, hirudin (purified leech saliva), heparin and aspirin. Indeed I repeated the screening tests for several times, I failed to find anti-tumor metastatic substance.

研究分野：6910

科研費の分科・細目：6910

キーワード：がん細胞 転移抑制 唾液腺 凝固阻害 ルシフェリン ルシフェラーゼ ヒルジン アスピリン

1. 研究開始当初の背景

自治医科大学ではホタル由来ルシフェラーゼを安定的に発現するがん細胞株 (Colon26Luci) を作製し保有している。このがん細胞をマウス左心室から注入すると、がん細胞の性質にしたがって親和性のある臓器に転移する。定着・増殖した腫瘍は、マウスにルシフェラーゼの基質である D-ルシフェリンを投与すると In Vivo Imaging System によって経時的に追跡することができる。

2. 研究の目的

寄生虫・医動物学分野の生物から各種エキスを調整し、ルシフェラーゼ発現腫瘍細胞の転移・増殖阻止を指標として、転移抑制物質を発見したい。

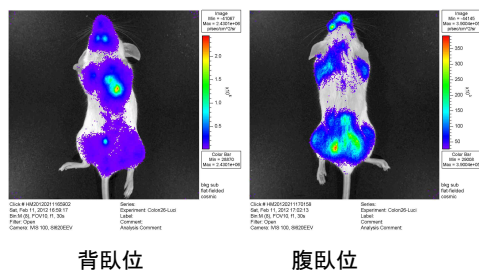
3. 研究の方法

がん細胞は 2.5×10^6 /ml に調整しマウス 1 匹あたり 0.2ml (50 万細胞) を、超音波画像解析装置のガイド下で左心室を確認しつつ注射した。心臓注射 30 分後に生物粗エキスを腹腔注射した。24 時間後および 48 時間後に再度生物粗エキスを注射した (計 3 回注射)。がん細胞注射後 3 日、9 日、12 日にマウスを麻酔してルシフェリンを注射し、In Vivo Imaging System により腫瘍が定着・増殖している様子を画像観察した。また発光強度を積算して腫瘍細胞数を推算した。

4. 研究成果

Colon26Luci は左心室から注射されると全身に播種される。図 1 に一例を示した。この図によるとがん細胞は肺、脳、腸管、腰骨に定着し増殖していることが窺われた。

図 1 Colon26-Luci 50万/左心室 (Day9)



しかし心臓注射はマウスの死亡率が高く、スクリーニングの方法としては適切でないと思われ、この方法は棄却することにした。

新たな方法として腹腔内へ直接がん細胞を注射する方法を取った。注射細胞数は 1 万とした。そのうえでがん細胞の定着・増殖を抑制する物質の検索をおこなった。

蚊の唾液腺、ヒルの唾液粗成分、ヒルのもつ抗凝固物質ヒルジン、ヘパリンなどを注射して対照群と比較した。またアスピリンを溶かした水を飲料水として与え、普通水を飲料水としたマウス群と比較した。

蚊の唾液腺 (図 2)、ヒルの唾液成分注射 (図 3)、アスピリンの飲用 (図 4) に腫瘍抑制傾向を認めた実験があったが、繰り返し実験を行なうと再現性がなかった。そこで研究期間中に腫瘍抑制効果のある物質を見つけ出すことはできなかつたと結論した。

図 2 Colon26-Luci 1万/ip (Day12)

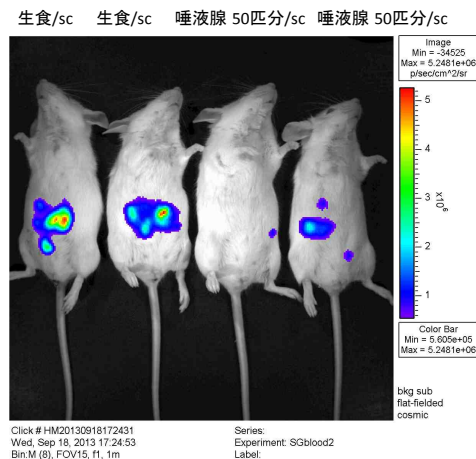


図 3 Colon26-Luci 1万/ip (Day3)

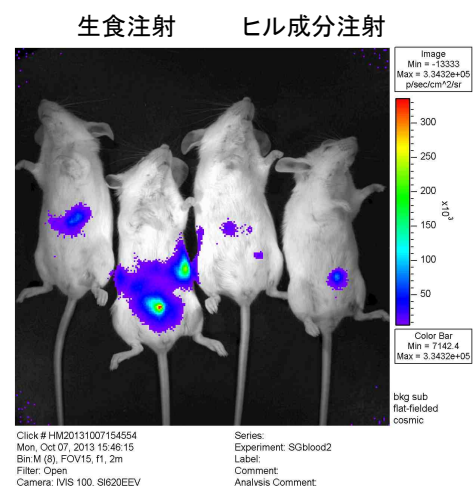
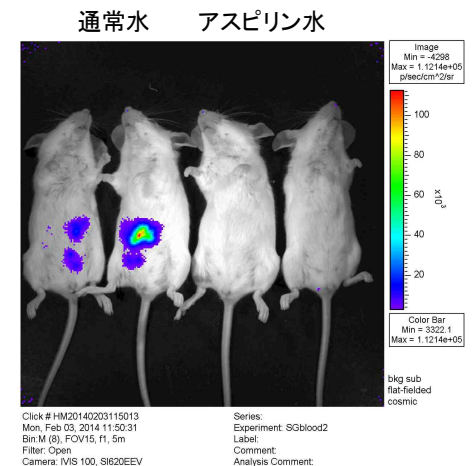


図 4 Colon26-Luci 1万/ip (Day3)



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 9 件)

- Hayashi H, Kyushiki H, Nagano K, Sudo T, Matsuoka H, Yoshida S. Effects of recombinant anopheline anti-platelet protein from a malaria vector mosquito has anti-thrombotic effects *in vivo* without compromising hemostasis. *Thrombosis Res* 129(1): 169-175, 2012
- Yamamoto DS, Sumitani M, Nagumo H, Yoshida S, Matsuoka H. Induction of anti-sporozoite antibodies by biting of transgenic *Anopheles stephensi* delivering malarial antigen via blood feeding. *Insect Mol Biol* 21(2): 223-233, 2012
- Matsuoka H, Sano G, Hattori R, Tomita H, Yamamoto DS, Hirai M. One injection of DsRed followed by bites from transgenic mosquitoes producing DsRed in the saliva elicits a high titer of antibody in mice. *Trop Med Health* 40(2): 47-53, 2012
- Reza M, Yamamoto DS, Matsuoka H. Low-concentration copper solution jeopardizes larval movement and ability to survive predation: new insight into malaria eradication via vector control. *Med Entomol Zool* 63(3): 217-222, 2012
- Hayash H, Kyushiki H, Nagano K, Sudo T, Iyori M, Matsuoka H, Yoshida S. Identification of the active region responsible for the anti-thrombotic activity of anopheline anti-platelet protein from a malaria vector mosquito. *Platelets* 24(4): 324-332, 2013
- Reza M, Yamamoto DS, Matsuoka H. Laboratory testing of larvivoracious fish Japanese medaka (*Orizias latipes*) predation ability to copper-treated *Anopheles stephensi* larvae: An alternative method for vector control under low concentration of copper. *Med Entomol Zool* 64(2): 67-71, 2013
- Yamamoto DS, Hatakeyama M, Matsuoka H. Artificial activation of mature unfertilized eggs in the malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi* (Diptera, Culicidae). *J Exp Biol* 216: 2960-2966, 2013
- Matsuoka H, Ogata N. Inhibition of malaria infection and repellent effect against mosquitoes by chlorine dioxide. *Med Entomol Zool* 64(4): 203-207, 2013
- Yamamoto DS, Yokomine T, Sumitani M, Yagi K, Matsuoka H, Yoshida S. Visualization and live imaging analysis of a mosquito saliva protein in host animal skin using a transgenic mosquito with a secreted luciferase reporter system. *Insect Mol Biol* 22(6): 685-693, 2013

[学会発表] (計 12 件)

- Matsuoka H, Ikezawa T, Hattori R, Tomita H, Yamamoto D, Hirai M: Secretion and discharge of an alien protein in the saliva produced in a transgenic mosquito, *Anopheles stephensi*. 45th Annual U.S.-Japan Joint Conference on Parasitic Diseases. January 10-11, 2011, Tokyo
- 山本大介, 炭谷めぐみ, 吉田栄人, 松岡裕之: 唾液腺に DsRed-CSP 融合タンパク質を発現するトランスジェニックハマダラカの解析 第 54 回日本衛生動物学会大会 2011 年 4 月 14-16 日 東京都
- 山本大介, 畠山正統, 松岡裕之: ステフェンスハマダラカにおける成熟未受精卵の人為的賦活 第 47 回日本節足動物発生学会大会 2011 年 6 月 10-11 日 守山市
- Matsuoka H: Cutting malaria transmission by primaquine. Sam Ratulangi University 開学 50 周年記念シンポジウム "Symposium on Clinical Biomolecular Epidemiology" October 4, 2011, Manado, Indonesia
- 吉田栄人, 伊従光洋, 石井 明, 松岡裕之: ハマダラカ唾液タンパクに対する抗体価とマラリア感染 - マラリア疫学調査の新手法 - 第 64 回日本衛生動物学会大会 2012 年 3 月 29 - 30 日 上田市
- Reza M, Yamamoto D, Matsuoka H: Low concentration of copper jeopardizes larval movement and survival ability to predator: new insight in malaria eradication via vector control. 15th Japan-Korea Parasitologists' Seminar May 23-25, 2012 Miyazaki
- Yoshida S, Yamamoto D, Matsuoka H: "Flying Vaccinator" A transgenic anopheline mosquito delivers the leishmania vaccine antigen SP15 via blood feeding. XXIV International Congress of Entomology, August 19-25, 2012 Daegu, Korea
- 松岡裕之: 有害生物を有用生物にできないか 第 20 回有害生物研究会 2012 年 12 月 15 日 川崎市
- Matsuoka H, Reza M: Mosquito's salivary gland, a small treasure island. British Society for Parasitology Spring Meeting, April 9-11, 2013, Bristol, United Kingdom
- Reza M, Yamamoto DS, Matsuoka H: Utilizing copper at a relatively low concentration in ovitraps: a simple low-cost alternative to Integrated Vector Management. British Society for Parasitology Spring Meeting, April 9-11, 2013, Bristol, United Kingdom
- 松岡裕之, 島田瑞穂, 山本大介, Reza Mohamad: Control of wild mosquito larvae using low concentration copper. 第 54 回日本

熱帯医学会大会 2013年10月4-5日 長崎市

松岡裕之, 島田瑞穂, 山本大介, Reza Mohamad : 銅溶液を用いた野生蚊幼虫の防除 第65回日本衛生動物学会東日本支部大会 2013年10月25日 川口市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ: 自治医科大学医動物学部門
<http://www.jichi.ac.jp/idoubutsu/MedZoo1-home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡裕之 (自治医科大学医動物学部門)
研究者番号: 10173816

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし