

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 10日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791506

研究課題名（和文）乳癌細胞株に対するヒト絨毛性ゴナドトロピンを用いた革新的な乳癌治療法の開発

研究課題名（英文） Development of new strategy of breast cancer treatment using human chorionic gonadotropin

研究代表者

坂 貴司（YURI TAKASHI）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50330212

研究成果の概要（和文）：ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)は、妊娠胎盤の絨毛細胞より産生される性ホルモンであるが、各種悪性腫瘍に対し抗腫瘍効果を発揮する。本研究では雌ヌードマウスにヒト乳癌細胞株を移植しhCGを投与したところ、対照群と比較して移植腫瘍の増殖は有意に抑制された。血清ホルモン値測定およびhCG標的臓器の形態学的変化から、hCGの移植乳癌細胞増殖抑制には卵巣からの妊娠期を模倣したエストロゲン分泌亢進が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Human chorionic gonadotropin (hCG) is one of a sex-steroid hormone produced in placental trophoblastic cells. hCG possess anti-tumor properties, and we examined the anti-cancer effects of hCG in female BALB/c transplantation assay. Daily hCG treatment significantly inhibited the growth of transplanted human breast cancer cells. In serum hormone analysis and histological analysis of target organs, elevated secretion of estradiol mimicking pregnancy may be related with the anti-cancer properties of hCG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・外科学一般

キーワード： 性ホルモン・乳癌・治療・ヒト絨毛性ゴナドトロピン

1. 研究開始当初の背景

乳癌の発生には、食餌因子や生活習慣、遺伝などの多様な要因が複雑に関与している。代表的なホルモン依存性癌である乳癌の発生ならびに進展には、性ホルモンが深く関係

しているが、若年期に満期産を経験した女性はその後の乳癌発生率が低いという疫学的事実をみると、妊娠期に一過性に分泌亢進するホルモンには、発癌抵抗性の獲得や癌化した乳腺上皮の増殖抑制作用を有すると推察

される。申請者は、短期高用量のエストロゲンの曝露が、乳腺前癌病変から癌への進展を抑制することを見出したが、妊娠に関連した性ホルモンのなかでも、hCG の抗腫瘍効果について、化学発癌誘発ラット乳癌モデルで有効性を見出したので、ヒト乳癌細胞株に対する効果も本課題で実証したい。

2. 研究の目的

hCG は妊娠初期から中期の妊娠安定化に寄与する性ホルモンであるが、HIV 患者に生じた Kaposi 肉腫より樹立した細胞株 KS Y-1 にアポトーシスを誘導し、腫瘍縮小効果をあらわすことが報告されている (*Nature*, 1995)。HIV 関連 Kaposi 肉腫に対する hCG の抗腫瘍効果は臨床試験が実施され、1 日あたり 5,000 ~10,000IU の hCG の投与は、患者に強い毒性をあらわさず、腫瘍の進行が抑制されるとの報告もみる (*J Natl Cancer Inst*, 1997)。 *in vivo* における実験系では、7,12-dimethylbenz[α]anthracene 誘発ラット乳癌発癌モデルにおいて、100IU の hCG を連日腹腔内投与すると、非投与群のラットと比較し乳癌の発生が有意に抑制され、hCG 投与群の乳腺では、p53 をはじめとしたアポトーシス関連遺伝子の発現亢進がみられる (*Carcinogenesis*, 1997)。hCG は乳腺の癌化予防効果を有するのみならず、アポトーシスを機序とした乳癌縮小作用も有していると推察されるが、臨床応用へ向けた基盤となる証拠を提供しうる動物実験系、なかでもヒト乳癌細胞株ヌードマウス移植モデルを用い、乳癌の増殖抑制効果を病理組織学的に検討し、hCG 標的臓器への毒性の有無を評価しようとする試みは、これまで国内外を通じて報告がみられない。ヒト乳癌細胞株に対する増殖抑制効果を BALB/c ヌードマウス移植モデルを用いて証明し、その毒性も実験病理学的手法を用いて明らかにする。hCG の抗腫瘍効

果を *in vitro*・*in vivo* の両者から実験病理学的手法を用いて実証することにより、動物モデルから得られた証拠をもとに、革新的な乳癌補助療法を *bed side* に提唱することが、本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

(1) ヒト乳癌細胞株に対する hCG の *in vitro* における増殖抑制効果に関する検証

Luminal A subtype のヒト乳癌細胞株 KPL-1 を、0-200 IU/ml hCG を添加した培地で培養し、24・48・72 時間後の生細胞数を 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 法を用いて計測した。また、KPL-1 細胞を chamber glass 上で培養し、100 IU/ml hCG 添加 48 時間培養後の細胞形態変化を観察した。

(2) BALB/c ヌードマウス移植 KPL-1 の増殖およびリンパ節転移に及ぼす hCG の作用

5 週齢雌 BALB/c nu-nu マウスの右腋下脂肪織内に 1×10^7 個の KPL-1 細胞を同所移植し、対照群および hCG 治療群に分けた。hCG 治療群には生理食塩水に溶解した 100 IU hCG を連日腹腔内投与し、対照群には同量の生理食塩水のみを投与した。実験期間中は腫瘍の発育を計測するとともに、体重変化を含めた全身状態を観察した。乳癌細胞移植後 5 週で実験終了とし、マウスの血清を採取するとともに、移植腫瘍を摘出した。腫瘍湿重量を計測し、腫瘍の組織切片を病理組織学的に評価することにより、hCG のヒト乳癌細胞に及ぼす治療効果を評価した。

(3) *in vitro* hCG 処置 KPL-1 細胞の増殖に関する検討

5 週齢雌 BALB/c ヌードマウスに、100 IU/ml hCG を添加した培地で 48 時間培養を行った KPL-1 細胞を同数 (1×10^7 個) 移植し、移植後は生理食塩水のみを腹腔内に投与する群を作製することにより、*in vitro* hCG 処置後の

乳癌細胞の腫瘍発育を観察した。乳癌細胞移植 5 週後を実験終了とし、移植腫瘍を摘出した。

(4) hCG 標的臓器の病理形態学的変化

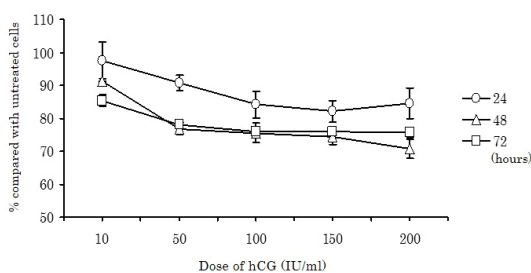
乳癌細胞移植 5 週後の各群ヌードマウスの乳腺、子宮、卵巣の各臓器の組織標本を作製し、hCG の hCG 標的臓器に及ぼす影響を病理形態学的に評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) のヒト乳癌細胞株 KPL-1 の増殖に及ぼす影響

hCG の *in vitro* における細胞増殖抑制効果について、luminal A subtype であるヒト乳癌細胞株 KPL-1 を用いた MTT-assay 法で検討を行った。100 IU hCG を添加した培地を用いて培養した KPL-1 の生細胞数は、生食のみ添加した対照群と比較し、24 時間後では 86%、48 時間および 72 時間後では 75% に減少した。150 IU および 200 IU hCG を添加した培地を用いて同時間の培養を行ったところ、86% 以下の KPL-1 生細胞数の減少が認められず、100 IU の hCG 濃度がヒト乳癌細胞株 KPL-1 に対して、最も増殖抑制作用が強いことが判明した (図 1)。

(図 1. MTT-assay)

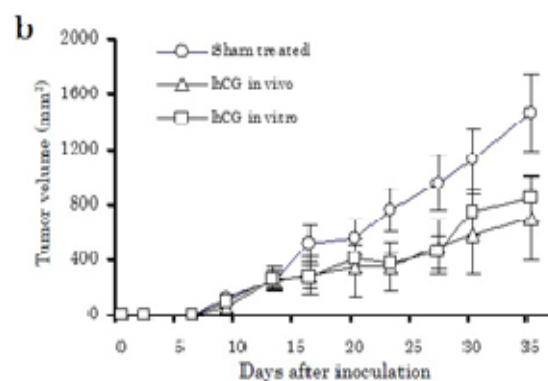
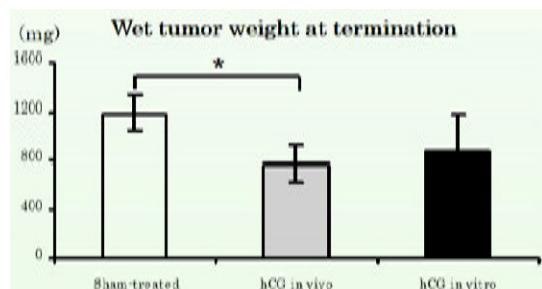


(2) ニードマウス移植 KPL-1 細胞の増殖に及ぼす hCG の効果

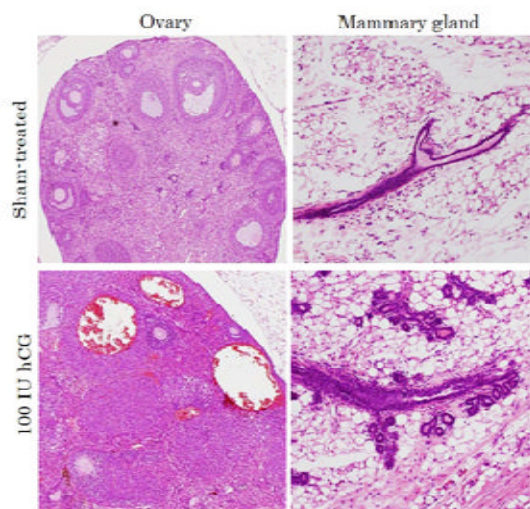
4 週齢雌 BALB/c ニードマウスにを A: 対照群、B: 100 IU hCG 投与群、C: hCG 前処置細胞移植群 3 群にわけ、各群のニードマウスに 1×10^7

の KPL-1 細胞を乳腺脂肪織内に移植した。B 群には KPL-1 細胞移植後、100 IU hCG を連日腹腔内投与し、A 群には同量の生理食塩水のみを投与した。C 群には 100 IU hCG を添加した培地を用いて 48 時間培養後の同数の KPL-1 細胞を移植した。KPL-1 細胞移植後 5 週間後に移植した腫瘍および生殖器を摘出し、腫瘍の湿重量を各群で比較したところ、A 群は $1185 \pm 13 \text{mg}$ であったのに対し、B 群は $774 \pm 151 \text{mg}$ と有意に減少した。5 週後の C 群の移植腫瘍の湿重量は $861 \pm 323 \text{mg}$ と A 群と比較して減少傾向であったが、各群と有意な差をみなかった (図 2)。卵巣の病理学的検索では、B 群の卵巣では他の群と比較し、黄体が多く形成されていた (図 3)。

(図 2. 実験終了時の腫瘍湿重量の比較と移植乳癌細胞の発育曲線)



(図 3. 治療 5 週後の卵巣・乳腺の形態学的変化)



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 1 件)

Yuri T, Lai YC, Yoshizawa K, Tsubura A. Human chorionic gonadotropin inhibits *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary carcinoma growth in female Lewis rats. *In Vivo* (ISSN:0258851X) 26(3):361-367

[学会発表] (計 3 件)

1. 坂 貴司, 榎本祐子, 木村彩子, 木下勇一, 義澤克彦, 螺良愛郎

妊娠に関連するホルモンによる乳癌治療の可能性: hCG によるヒト乳癌細胞株増殖抑制効果

第 102 回 日本病理学会総会, 2013 年 6 月 6 日, (札幌)

2. 坂 貴司, 頼 彦長, 木村彩子, 佐々木朋, 木下勇一, 義澤克彦, 螺良愛郎

Growth inhibitory mechanisms of human chorionic gonadotropin on MNU-induced female rat mammary carcinoma.

第 101 回 日本病理学会総会, 2012 年 4 月 27 日, (東京)

3. 坂 貴司, 頼 彦長, 木村彩子, 佐々木朋, 義澤克彦, 螺良愛郎

ヒト絨毛性ゴナドトロピンによる MNU 誘発ラット乳癌の増殖抑制効果に関する検討

第 100 回 日本病理学会総会, 2011 年 4 月 28 日, (横浜)

[図書] (計 1 件)

坂 貴司, 螺良愛郎

天然産物による乳がんの化学予防と治療への応用

病気の分子形態学 293-295, 2011

日本臨床分子形態学会 編

学際企画

[その他]

ホームページ等

(1) 関西医科大学 病理学第二講座 ホームページ

<http://www3.kmu.ac.jp/pathol2/>

(2) 関西医科大学 教員情報

<http://research.kmu.ac.jp/kmuhp/Koza?kyoinId=ygodgo>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂 貴司 (YURI TAKASHI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50330212

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし