

学位論文内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 論文審査担当者 |
|--|--|
| 土井仁志 | 主査 教授 大道 正 英 副査 教授 瀧内 比呂也 副査 教授 芝山 雄老 副査 教授 樋口 和秀 |
| 主論文題名 Panaxanthone isolated from pericarp of <i>Garcinia mangostana</i> L. suppresses tumor growth and metastasis of a mouse model of mammary cancer (<i>Garcinia mangostana</i> L.の果皮より抽出されたパナキサントンはマウス乳癌細胞の腫瘍増殖と転移を抑制する) | |
| 学位論文内容の要旨 | |
| 《研究目的》 我が国では年間、約4万人が乳癌に罹患して約1万人が死亡している。2020年までの我が国の女性乳癌患者の罹患数は、2010年4万5千人、2020年5万人と増加傾向が見込まれている。更に、乳癌患者の約3割が再発・死亡する。一般的に術後2~3年以内に多くは再発して、大部分は5年までに再発する。遠隔再発例における初発部位は骨、肺、肝臓の順に多く見られる。最近の新規化学療法、放射線療法の進歩により延命を期待できるが、再発乳癌の予後は極めて不良であり、治癒率は数%に過ぎない。このことより乳癌細胞の増殖抑制と転移制御は癌治療の最大の課題である。 近年、様々な天然由来の薬物が抗腫瘍効果を発揮することが報告されている。その中でも、マンゴスチン果皮に含まれているキサントン誘導体が様々な癌細胞株に対して、アポトーシスを誘導することが注目されている。本研究では高率にリンパ節、肺に転移するマウス乳癌モデルを用いて、マンゴスチン果皮より抽出されたキサントン誘導体であるパナキサントン(α -Mangostin 80%、 γ -Mangostin 20%含有)を投与し、腫瘍増殖や転 | |

移抑制に対する効果を検討した。更に、パナキサントンの主成分である α -Mangostin によるアポトーシスのシグナル経路への影響についても検討した。

《方 法》

〈*In vivo*〉BALB/c 系マウスから樹立した乳癌細胞株の BJMC3879 を同系の雌マウスの単径部皮下に移植し、腫瘍径が 0.2~0.4cm になった時点より、パナキサントンを 0、2500 および 5000 ppm の濃度で飼料中に混じて経口的に摂取させた。毎週一回、体重および腫瘍体積を測定した。実験開始の8週経過後に、動物を屠殺・剖検し、移植乳腺腫瘍、リンパ節(腋窩、単径部および肉眼的異常を認めたもの)および肺を摘出し、病理組織標本作製し、転移の有無を病理組織学的に検索するとともに、腫瘍細胞のアポトーシスおよび DNA 合成、腫瘍内の微小血管密度を免疫組織学的染色を施し、定量的に解析した。

〈*In vitro*〉BJMC3879 乳癌細胞にパナキサントンの主成分である α -Mangostin を24時間投与し、細胞周期、TUNEL 染色、Caspase 活性と阻害実験およびミトコンドリア膜電位について検討した。

《結 果》

〈*In vivo*〉

1) パナキサントン処置群の体重推移は、対照群との間に有意な差異は認められなかった。一方、腫瘍体積では 2500 および 5000ppm 群で有意な増加抑制($p<0.01$)が示された。

2) 肺転移では、パナキサントン投与群において、肺転移巣の大きさが小さい傾向を示し、マウス1匹当たりの肺転移巣の個数で 2500 および 5000ppm 群で有意な減少を示した($p<0.05$)。

3) リンパ節転移では、パナキサントン投与群において、マウス1匹当たりの転移個数は減少傾向を示したが、統計学的な有意差は観察されなかった。

4) TUNEL 陽性率を指標とした細胞死の数は、5000ppm 群で有意に増加した(p<0.05)。

5) PCNA 陽性率は 2500 および 5000ppm 群で有意に減少した(p<0.01)。

6) 腫瘍内の微小血管密度は、5000ppm 群で有意な減少を示した(p<0.05)。

〈*In vitro*〉

1) 細胞増殖は、8 μ M以上の濃度の α -Mangostin を 24 時間処置した際に有意に抑制された(p<0.01)。また、細胞周期に対する影響では、G_{0/1} 期の細胞の増加と S 期および G₂/M 期の細胞の減少が示された(p<0.01)。

2) TUNEL 陽性細胞は、 α -Mangostin 処置群で有意な増加を示した(p<0.01)。また、Caspase-3,8 および 9 活性の上昇も認められた。Caspase-3 および 9 の阻害剤では、生存率の改善を認めたが、Caspase-8 阻害剤では改善が認められなかった。また、 α -Mangostin 処置によりミトコンドリア膜電位の低下がもたらされた。

《考察および結論》

高転移性マウス乳癌モデルに対して、パナキサントンを経口的に投与した結果、乳腺腫瘍体積の有意な抑制、肺転移やリンパ節転移の有意な抑制ないしはその傾向、TUNEL 陽性細胞(アポトーシス)の有意な増加、PCNA 陽性細胞(増殖細胞)の有意な減少、腫瘍内微小血管密度の有意な減少がもたらされた。

血管新生は固形癌の増殖に極めて重要なプロセスであり、新生血管のネットワーク無しには腫瘍は 1mm³ を越える大きさには成長出来ない。原発巣の増殖も転移も血管新生に依存している事が報告されており、腫瘍内微小血管は癌治療の新たな標的として重要視されるようになってきた。 γ -Mangostin が COX-2発現を抑制し、また COX-2 が血管

新生因子の VEGF-A の発現を亢進させる事が報告されていることから、パナキサントンの作用機序の 1 つとして腫瘍内血管新生の抑制があげられる。

In vitro においては、 α -Mangostin は 8 μ M といった低濃度で乳癌細胞に強い殺傷効果を示し、TUNEL 陽性細胞の増加、Caspase-3、8 および 9 活性の上昇とミトコンドリア膜電位の低下が認められたことより、その細胞死はミトコンドリア経路を介したアポトーシスであると考えられた。Caspase-3 および 9 の阻害実験では生存率の改善を認めたが、Caspase-8 阻害剤では改善が認められなかったことより、 α -Mangostin 誘導のアポトーシスには Caspase-8 は関与しないことが示唆された。細胞周期に対する効果では、G₁ 期停止と S 期および G₂/M 期への移行を阻害することが明らかとなった。このようにパナキサントンによる腫瘍増殖の抑制や転移の抑制には、アポトーシスや細胞周期の停止、さらには血管新生の抑制などが複雑に関わっていることが示唆された。

乳癌は外科的に切除可能な症例は予後が比較的良好であるが、リンパ節、肺、骨、肝などへの転移を伴う症例に関しては、生存期間が短く、化学療法の奏効率が 50%以下であり、日本だけでなく世界的に死因の上位を占める疾患である。天然由来の薬物であるマンゴスチン果皮からの抽出物であるパナキサントンは、乳癌において癌の進展や転移を抑制あるいは遅延させる効果のあることを示唆しており、癌の化学予防や治療薬として期待される。

審査結果の要旨および担当者

| 報告番号 | 甲第 | 号 | 氏名 | 土井仁志 |
|--|----|---|-------------|------|
| 論文審査担当者 | | | 主査教授 大道 正英 | |
| | | | 副査教授 瀧内 比呂也 | |
| | | | 副査教授 芝山 雄老 | |
| | | | 副査教授 樋口 和秀 | |
| 主論文題名 | | | | |
| Panaxanthone isolated from the pericarp of <i>Garcinia mangostana</i> L. suppresses tumor growth and metastasis of a mouse model of mammary cancer (<i>Garcinia mangostana</i> L.の果皮より抽出されたパナキサントンはマウス乳癌細胞の腫瘍増殖と転移を抑制する) | | | | |
| 論文審査結果の要旨 | | | | |
| <p>近年、様々な天然由来の薬物が抗腫瘍効果を発揮することが報告されている。その中でも、マンゴスチン果皮に含まれているキサントン誘導体が様々な癌細胞株に対して、アポトーシスを誘導することが注目されている。そこで申請者は、マンゴスチン果皮からの抽出物であるキサントン誘導体のパナキサントンをを用いて、高転移性マウス乳癌モデルに対する腫瘍増殖や転移の抑制効果を検討した。さらに、パナキサントンの主成分である α-Mangostin によるアポトーシスのシグナル経路への影響についても詳細に検討した。</p> <p>申請者は、転移性のマウス乳癌 BJMC3879 モデルを用いて、パナキサントンを 0, 2500 および 5000ppm の濃度で飼料中に混じて 8 週間投与した。その結果、腫瘍体積はパナキサントン投与群で 2 週目より有意な抑制効果を認めた。肺転移については、パナキサントン投与群で有意な抑制が示された。リンパ節転移については、有意差は認められなかったが、抑制傾向が示された。また、パナキサントンの 5000ppm 群では、TUNEL 陽性細胞の増加とともに PCNA 陽性細胞数の減少と腫瘍血管新生の抑制を認めた。</p> | | | | |

次に申請者は *in vitro* において BJMC3879 細胞を用いてマンゴスチンの細胞死誘導能を詳細に検討するために、 α -Mangostin を用いて培養実験を行った。 α -Mangostin 添加の 24 時間後では 8 μ M の濃度より乳癌細胞の生存率は有意に低下した。種々のアポトーシスのパラメーターについて解析した結果、細胞周期の G1 期停止、TUNEL 陽性細胞の増加、Caspase-3,8 および 9 の活性上昇、ミトコンドリア膜電位の低下が示され、 α -Mangostin 誘導による細胞死はミトコンドリア経路を介したアポトーシス誘導であると考えられた。なお、Caspase-8 阻害剤を用いてもアポトーシスが抑制出来なかったことより、本薬剤により誘導されるアポトーシスには直接 Caspase-8 の活性は重要でないと考えられた。

パナキサントンがマウス乳癌モデルに対して、抗腫瘍効果、とりわけ転移抑制作用を誘導することが本研究で初めて明らかになった。また、それには細胞周期の G1 期停止やミトコンドリア経路を介したアポトーシス誘導が関与していることが示された。このように、マンゴスチン果皮からの抽出物であるパナキサントンには乳癌の進展や転移を抑制あるいは遅延させる効果のあることを示唆され、予防医学の上からも極めて興味深い研究成果と考えられた。

以上により、本論文は本学大学院学則第11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Anticancer Research 29 (7): 2485-2495, 2009