

2016年9月11日

# 第10回 LMF研究会

基礎研究 最新報告

九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門  
システム生物工学講座 細胞制御工学分野  
照屋 輝一郎、白畑 實隆



KYUSHU UNIVERSITY



# 本日のトピックス

- 担がんマウスを用いたLMF投与試験
- ナタマメエキス添加LMF (LMF-CG)とカルボプラチン (CBDCA) の併用によるがん抑制効果



# 担がんマウスを用いたLMF投与試験

本実験は「九州大学大学院農学研究院、大学院生物資源環境科学府及び農学部における動物実験方針」、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号)、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第六号)の規則に基づいて行った。

# 実験方法(マウス飼育)

BALB/cN Seaマウス ♀ 3週齢 52匹(九動株式会社より購入)

飼育条件: 12 h light on / 12 h light off、22~25°C、  
湿度 35~60%、餌: CE-2 (日本クレア株式会社)  
食餌ならびに水の摂取は自由とした。  
1週間に2度水と床敷きの交換を行った。  
10日間の予備飼育の後本実験を行った。  
人道的エンドポイントを腫瘍径20 mm以上とし、  
これを超過したマウスは安楽死の処置をとった。

# 実験方法(がん移植)

移植がん細胞はBalb/cマウス由来Colon26細胞を使用した。細胞は10%FBS RPMI1640で培養し、回収した細胞を、 $5 \times 10^5$  cells/mLにてPBS (-) に懸濁し、麻酔下で剃毛後のマウス背部に0.2 mLずつ皮下注射した。

腫瘍形成の確認後、サンプル投与を開始し、マウス体重、飲水量、摂餌量、腫瘍サイズ(腫瘍短径および長径)を測定した。

# 実験方法（サンプル投与）

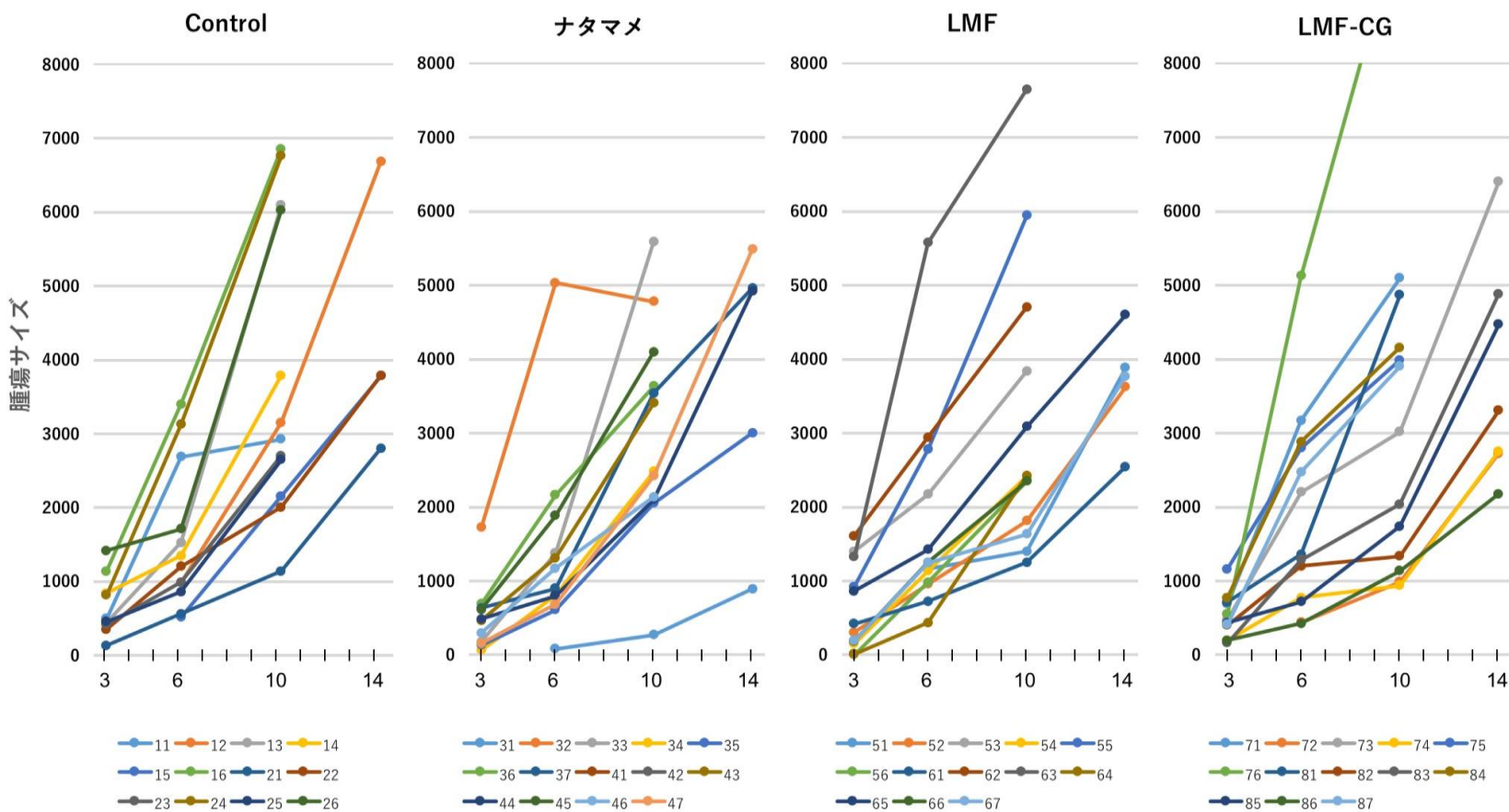
なお実験試験区は、以下の4群とし、サンプル投与量は1匹あたり0.2 mLとしゾンデを使用し経口投与した。

- 1: 生理食塩水投与群 (Control)
- 2: ナタマメ (5% ナタマメエキス / 生理食塩水) 投与群
- 3: LMF (5% 生理食塩水 / LMF) 投与群
- 4: LMF-CG (5% ナタマメエキス / LMF) 投与群

腫瘍の長径及び短径部の距離はノギスで測定し、以下の式にて腫瘍サイズを算出した。

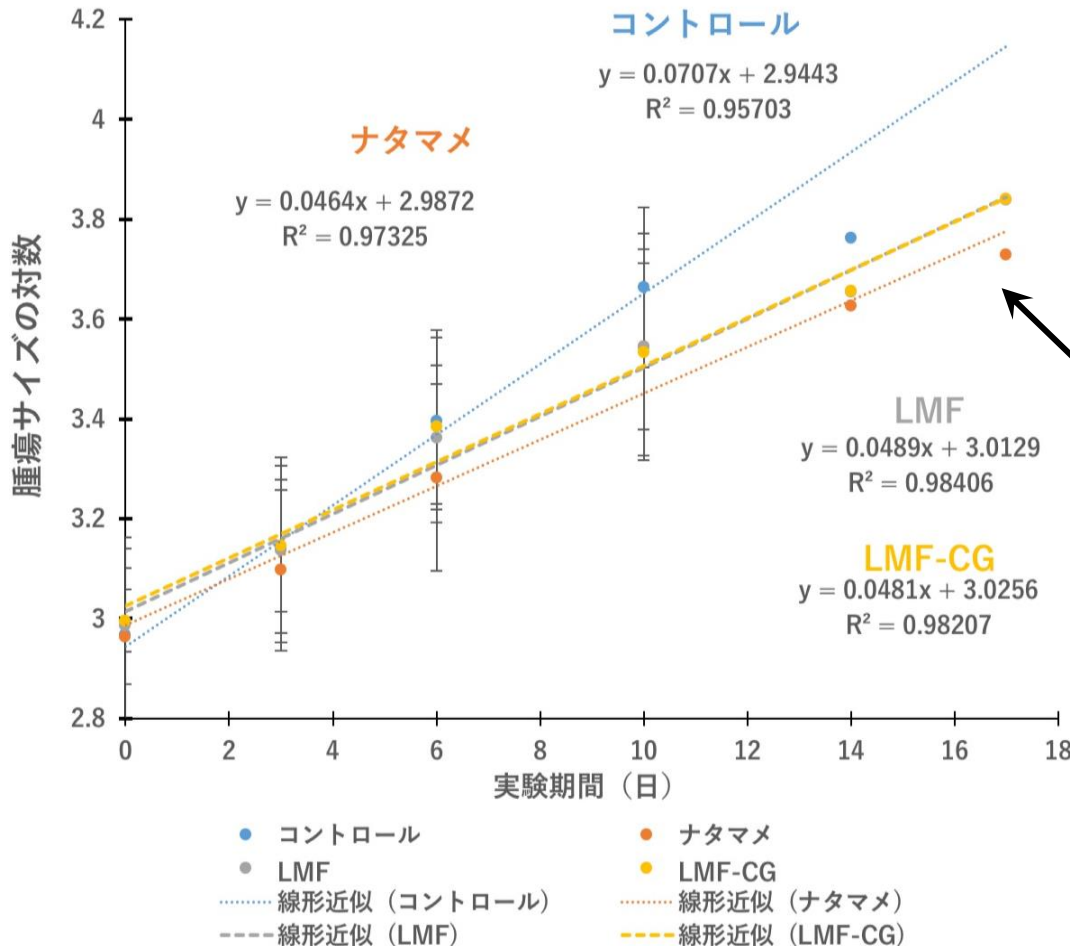
$$\text{腫瘍体積} = (\text{短径}^2 \times \text{長径}) / 2$$

# 個々のColon26担がんマウスの背部腫瘍サイズの経過



マウス体重、飲水量、摂餌量に顕著な差は見られなかった。  
 各実験区の初発腫瘍サイズの平均値を基準とし、腫瘍サイズ増加の値の標準化を行った。

# 個々のColon26担がんマウスの背部腫瘍サイズの経過



グラフの傾き：  
腫瘍サイズの増加速度に対応

腫瘍サイズ増加の鈍化傾向

各マウスの標準化後の腫瘍サイズを対数に変換した後、各実験区の平均を求め各実験区の平均値の推移を示した。





# ナタマメエキス添加LMF (LMF-CG) と カルボプラチン(CBDCA)の併用による がん抑制効果

# ナタマメエキス調製法

焙煎ナタマメ(約5 mm刻み) 1 kg  
水(常温) 14 kg(対原料14倍)



抽出90~95°C(2時間攪拌)  
Brix 2.6%、pH 5.18



30メッシュパス  
液量 9.6 kg、残渣4.94 kg  
Brix 2.8%、pH 5.11



pH 4.5調整、50°C  
クエン酸 12 g添加(対原料1.2%)  
pH 5.11→pH 4.51



酵素処理50°C、4時間攪拌(×2)  
セルラーゼ・ペクチナーゼ添加  
液量 9.42 kg、Brix 3.0%、pH 4.12



ナタマメ (*Canavalia gladiata*)



#2濾紙濾過



酵素失活90~95°C(30分)  
液量 9.36 kg、Brix 3.0%、pH 4.09



濾過助剤添加、1 μm(ハウジング)濾過  
液量 10.36 kg、Brix 2.4%、pH 4.10、  
固形分2.5%

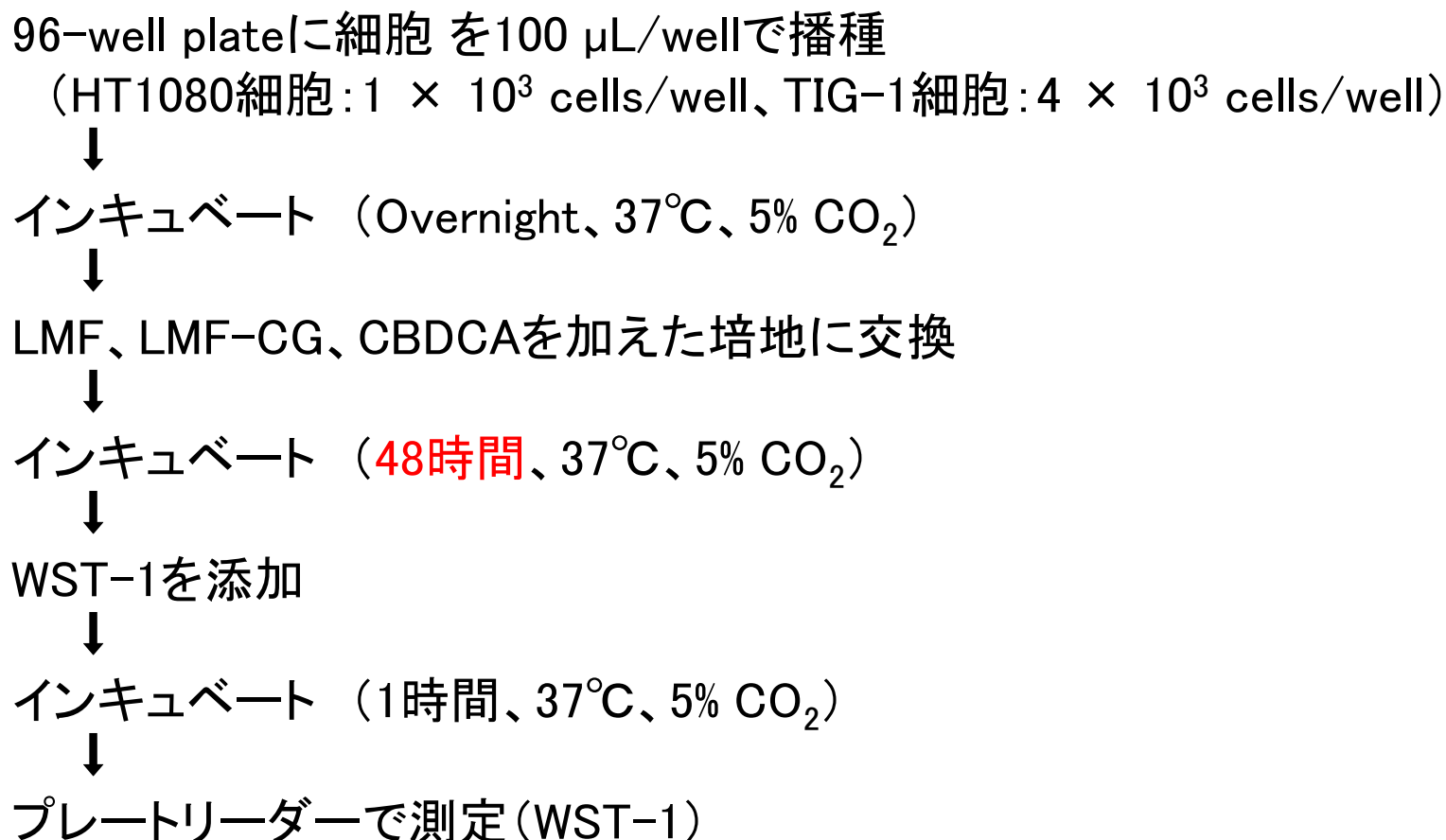


減圧濃縮60°C、55分  
液量 3.0kg、Brix 8.4%、pH 4.12、  
固形分8.1%

・ナタマメエキス乾燥物収率24.3%

LMF-CG(ナタマメエキス5%添加LMF)

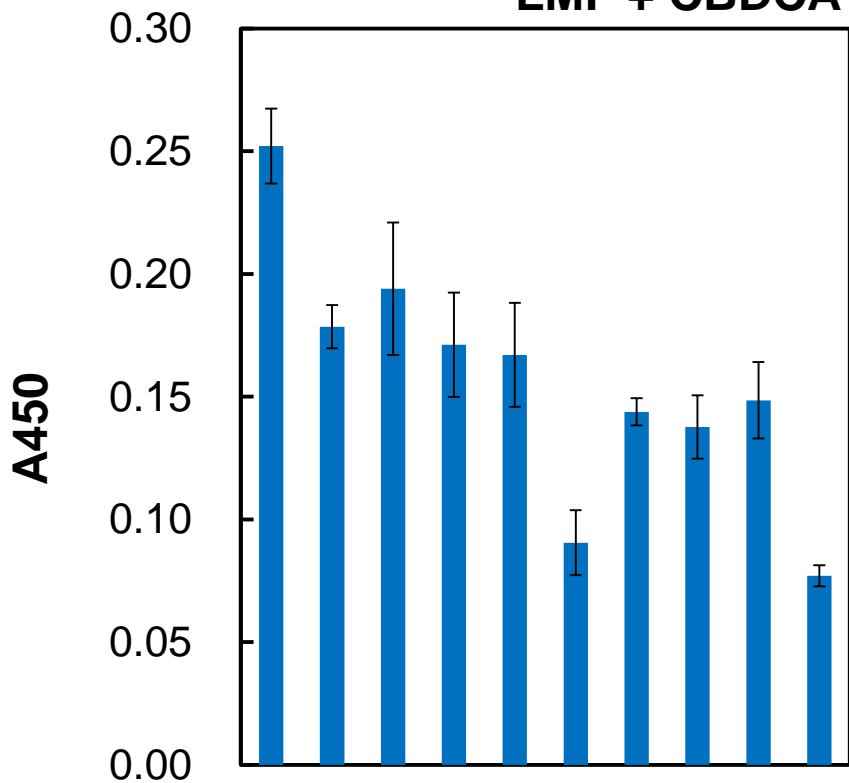
# LMF-CGとCBDCA併用によるがん細胞死誘導効果1: 試験方法



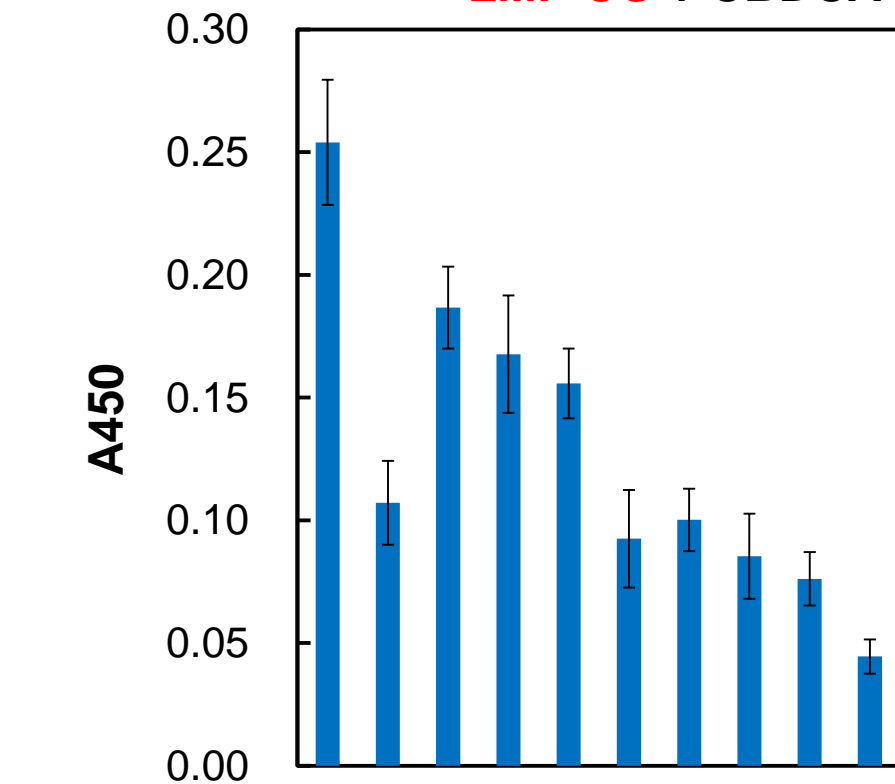
# LMF-CGとCBDCA併用によるがん細胞死誘導効果

HT1080細胞(線維肉腫由来)

LMF + CBDCA



LMF-CG + CBDCA



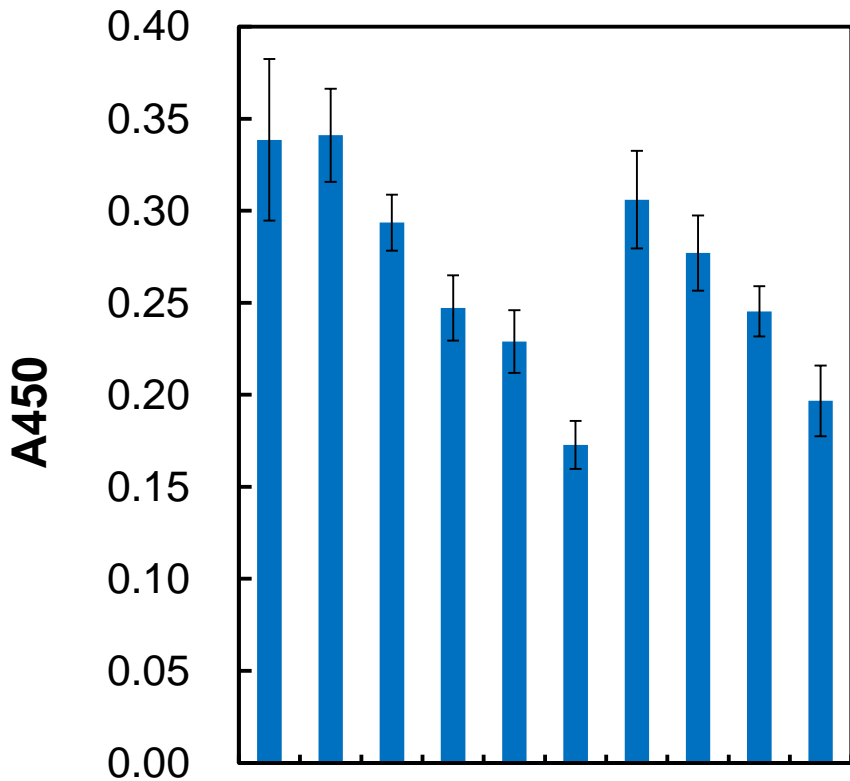
LMF (%)            -    5    -    -    -    -    5    5    5    5  
 CBDCA (µg/mL)   -    -    5    10    20    40    5    10    20    40

LMF-CG (%)       -    5    -    -    -    -    5    5    5    5  
 CBDCA (µg/mL)   -    -    5    10    20    40    5    10    20    40

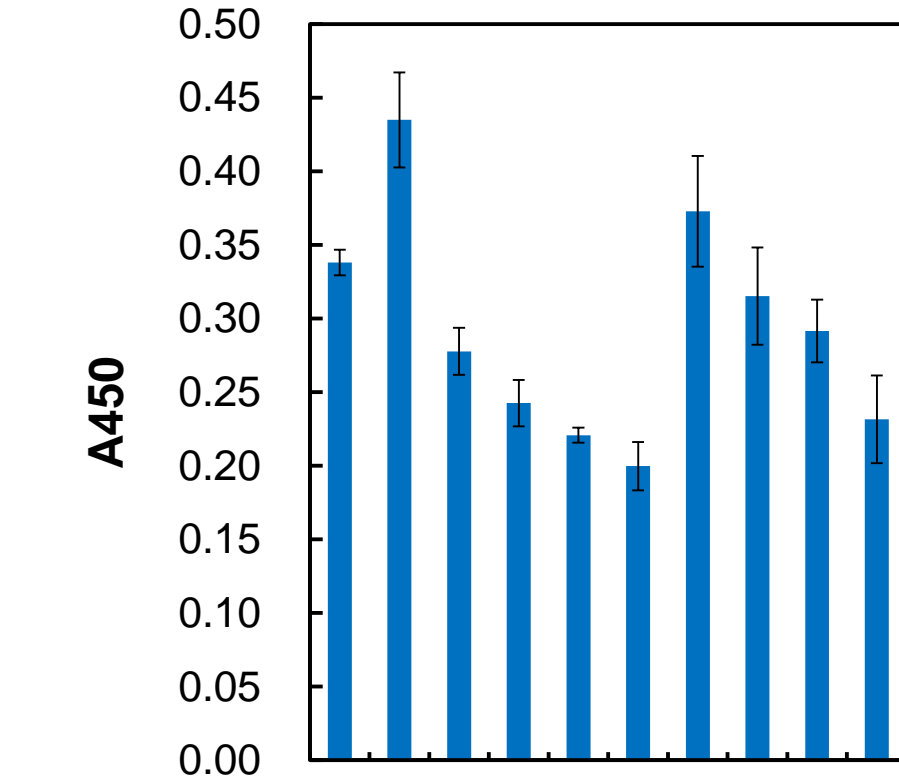
# LMF-CGとCBDCA併用によるがん細胞死誘導効果

TIG-1細胞(正常線維芽細胞)

LMF + CBDCA



LMF-CG + CBDCA



LMF (%)            -    5    -    -    -    -    5    5    5    5  
 CBDCA (μg/mL)   -    -    5    10    20    40    5    10    20    40

LMF-CG (%)        -    5    -    -    -    -    5    5    5    5  
 CBDCA (μg/mL)   -    -    5    10    20    40    5    10    20    40

# LMF-CGとCBDCA併用によるがん細胞死誘導効果2: 試験方法

96-well plateに細胞を100  $\mu$ L/wellで播種

(A549細胞(肺がん):  $7 \times 10^2$  cells/well、PANC-1細胞(膵がん):  $3 \times 10^3$  cells/well、MDA-MB-231細胞(乳がん):  $3 \times 10^3$  cells/well)



インキュベート (Overnight、37°C、5% CO<sub>2</sub>)



LMF、LMF-CG、CBDCAを加えた培地に交換



インキュベート (72時間、37°C、5% CO<sub>2</sub>)



WST-1を添加



インキュベート (1時間、37°C、5% CO<sub>2</sub>)

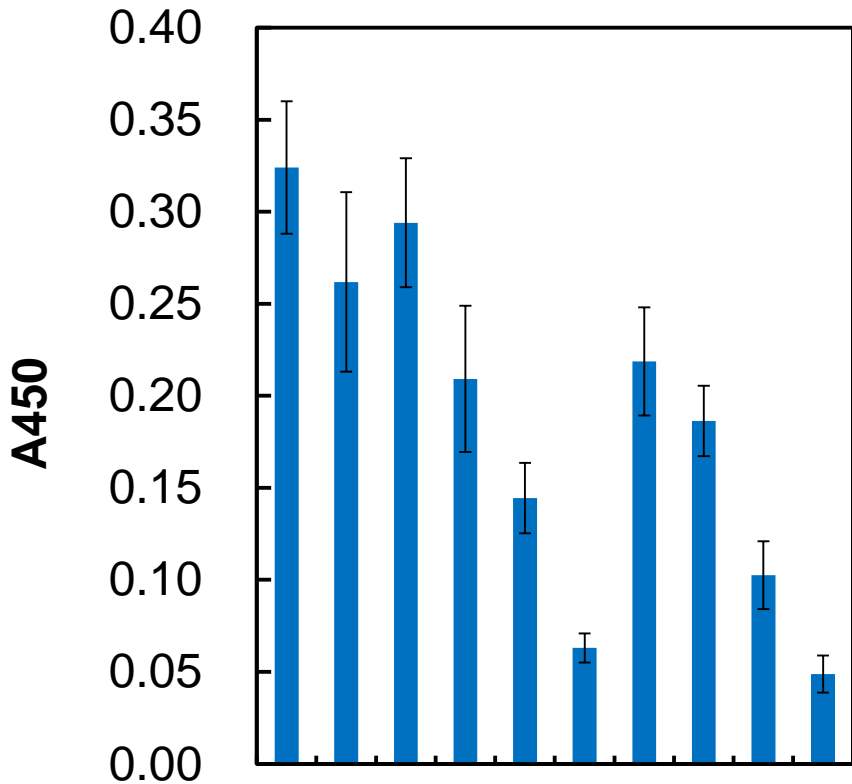


プレートリーダーで測定 (WST-1)

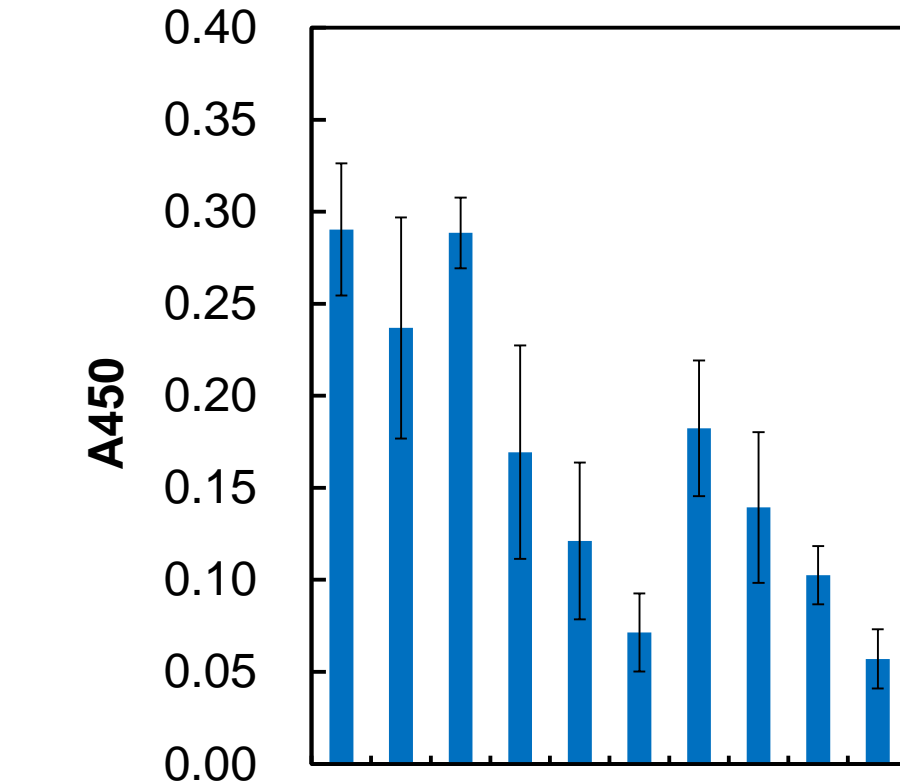
# LMF-CGとCBDCA併用によるがん細胞死誘導効果

A549細胞(肺がん由来)

LMF + CBDCA



LMF-CG + CBDCA



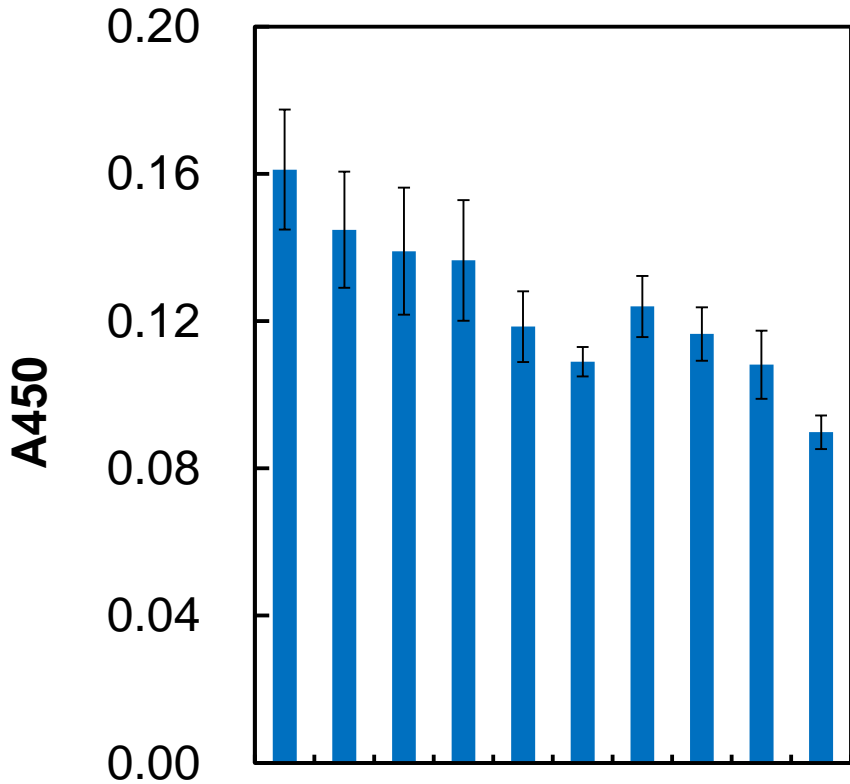
LMF (%)            -    5            -    -    -    -    -    5    5    5    5  
 CBDCA (µg/mL)   -   -            2    5    10   20    2    5    10   20

LMF-CG (%)       -    5            -    -    -    -    -    5    5    5    5  
 CBDCA (µg/mL)   -   -            2    5    10   20    2    5    10   20

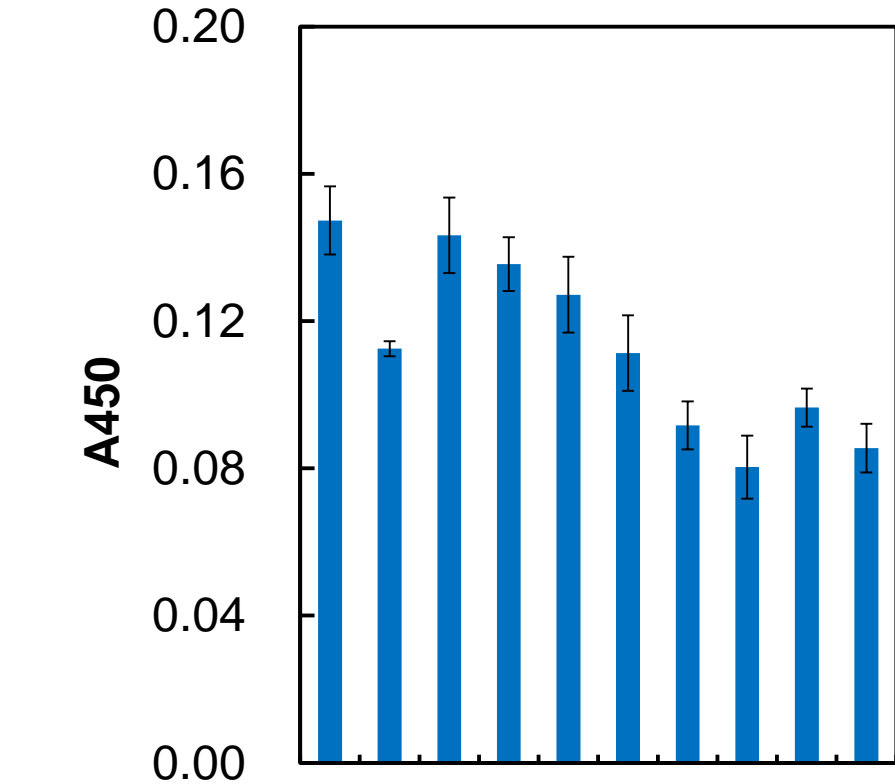
# LMF-CGとCBDCA併用によるがん細胞死誘導効果

MDA-MB-231細胞(乳がん由来)

LMF + CBDCA



LMF-CG + CBDCA



LMF (%)            -    5    -    -    -    -    5    5    5    5  
 CBDCA (μg/mL)   -    -    2    5    10    20    2    5    10    20

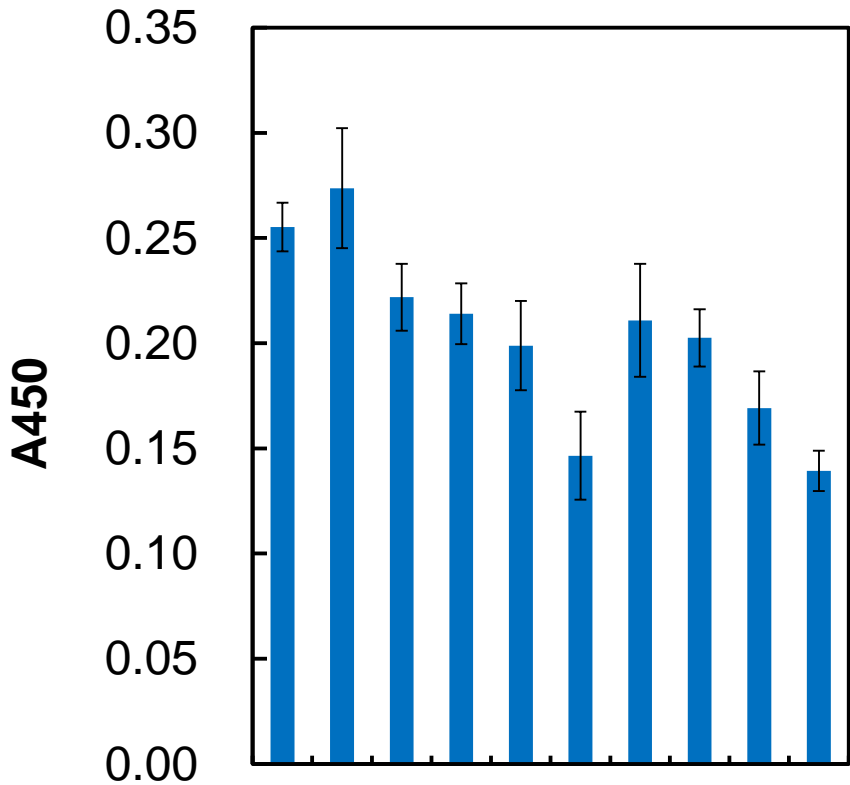
LMF-CG (%)        -    5    -    -    -    -    5    5    5    5  
 CBDCA (μg/mL)   -    -    2    5    10    20    2    5    10    20



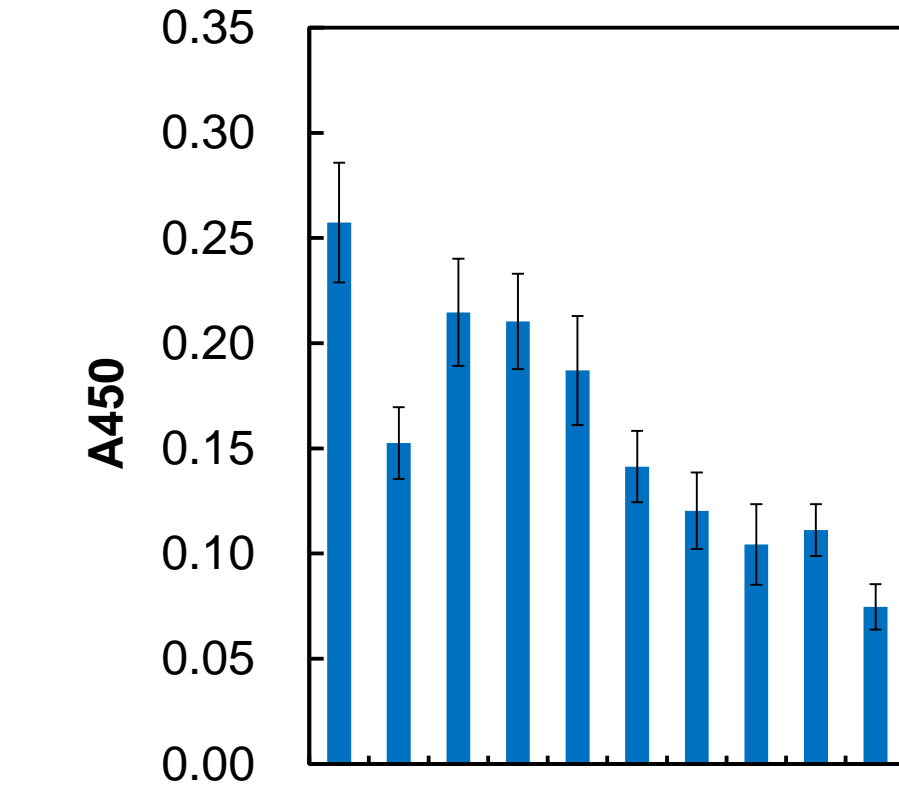
# LMF-CGとCBDCA併用によるがん細胞死誘導効果

PANC-1細胞(膵がん由来)

LMF + CBDCA



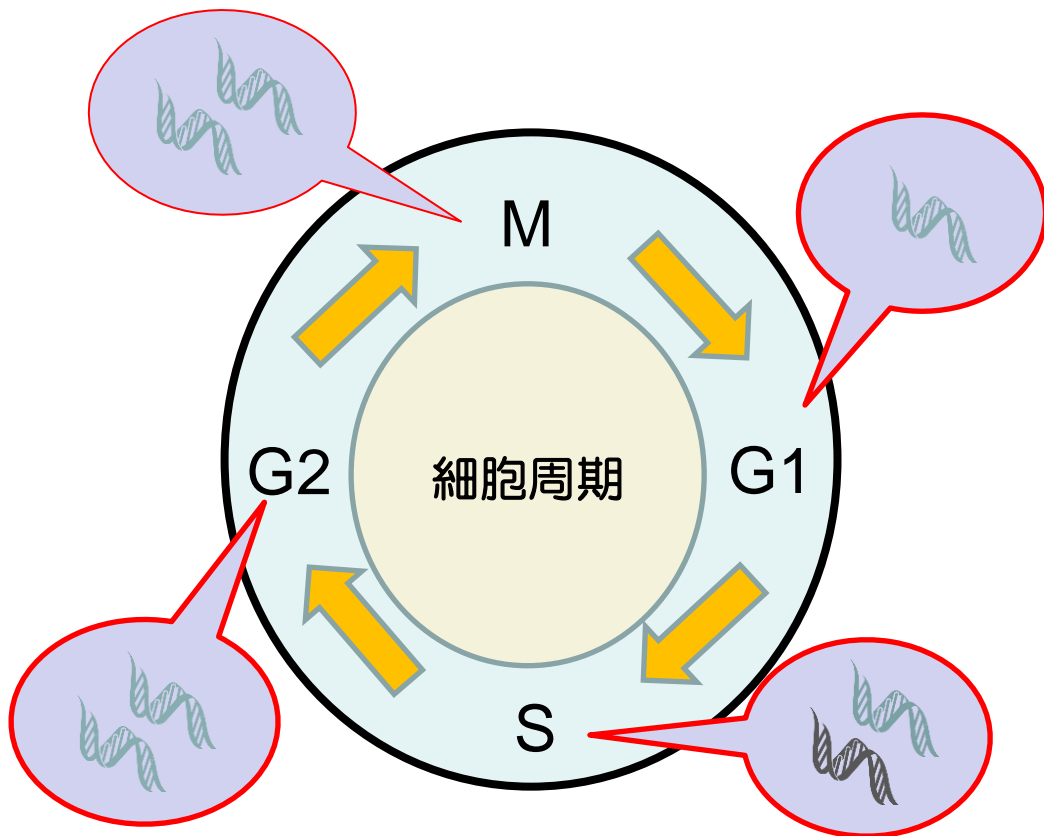
LMF-CG + CBDCA



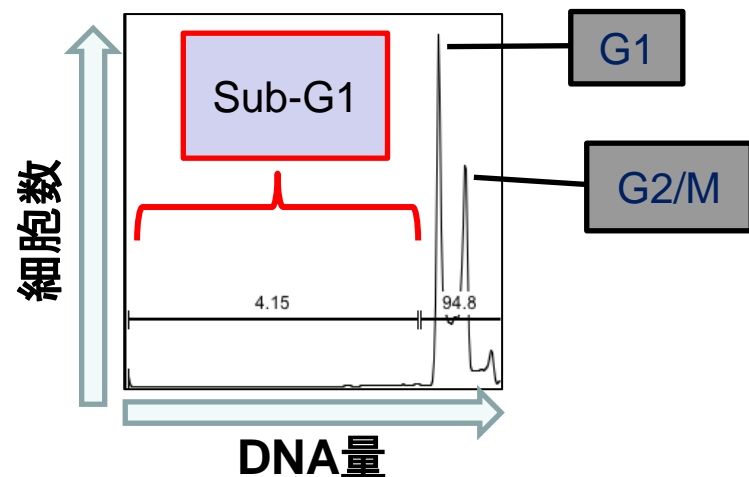
LMF (%)            -    5    -    -    -    -    5    5    5    5  
 CBDCA (µg/mL)   -    -    2    5    10   20   2    5    10   20

LMF-CG (%)       -    5    -    -    -    -    5    5    5    5  
 CBDCA (µg/mL)   -    -    2    5    10   20   2    5    10   20

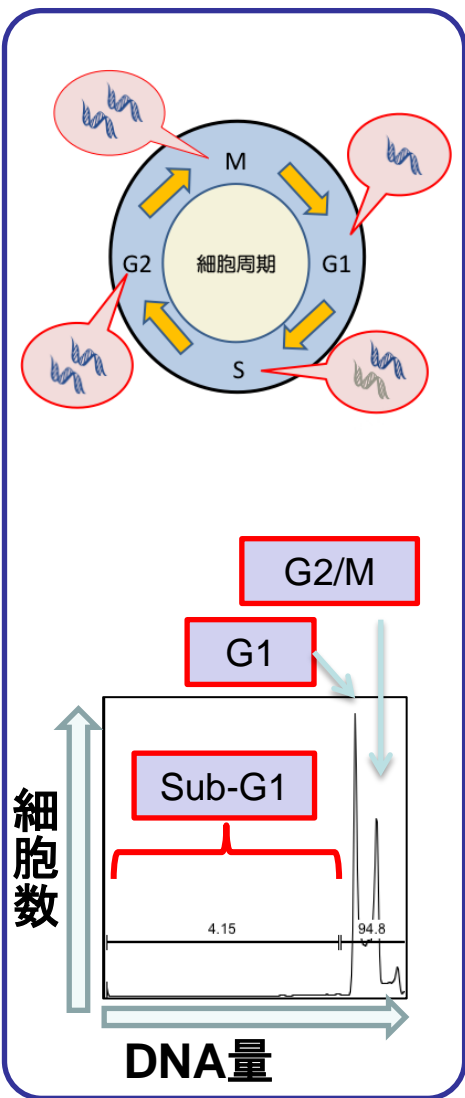
# 細胞周期解析によるLMFとナタマメエキスの併用効果の検討



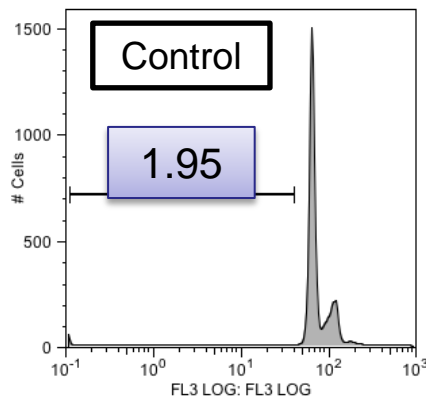
◆方法  
 細胞播種(前培養24時間)  
 ↓  
 サンプル処理(48時間)  
 ↓  
 エタノール固定、RNA分解、PI染色  
 ↓  
 フローサイトメトリーによる細胞周期解析



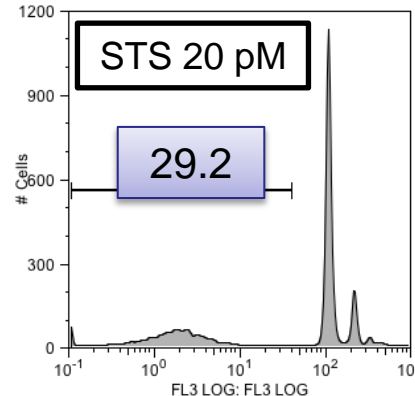
# LMFとナタマメエキスの併用による細胞周期への影響



Z0082063.LMD

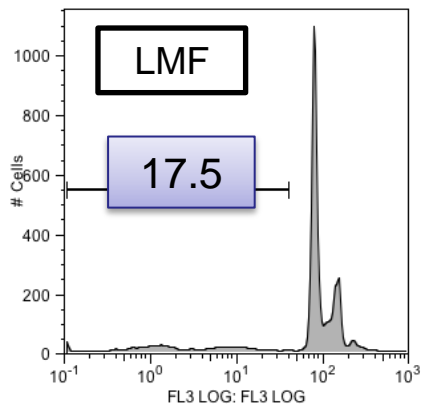


Z0082064.LMD

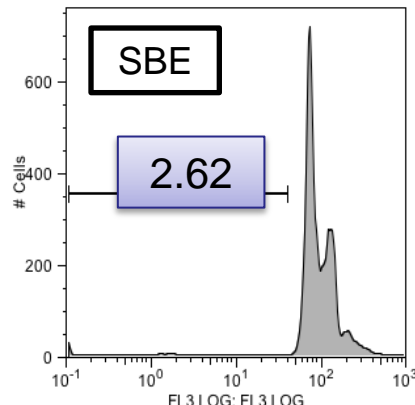


HT1080細胞

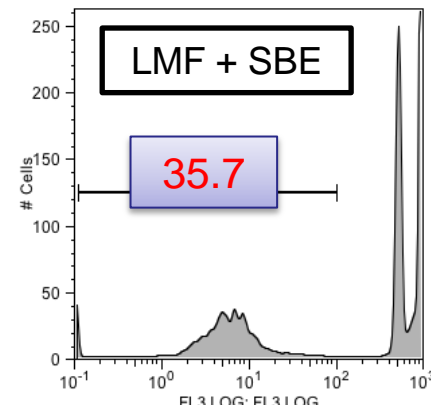
Z0082065.LMD



Z0082049.LMD



Z0081949.LMD



LMF 0.5 mg/mL、ナタマメエキス(SBE) 200 µg/mL

# まとめ

- 担がんマウスにおいて、ナタマメエキス投与群、LMF投与群、LMF-CG投与群において腫瘍成長速度の鈍化傾向が見られた。
- LMF-CGとCBDCA併用によるがん細胞死誘導増強効果が確認された。感受性はがん細胞の種類により異なることが確認された。
- HT1080細胞において、細胞周期解析を行ったところ、ナタマメエキス単独処理ではSub-G1期の細胞数は増加せず、LMFとナタマメエキスの併用処理時にSub-G1期の細胞数増加(細胞死の増加)が確認された。

# 今後の予定

- 担がんマウスにおけるLMF、およびLMF-CGの効果
- LMF、およびLMF-CGと抗がん剤の併用効果

抗がん剤種類:

Carboplatin, Paclitaxel, 5-Fluorouracil, Tamoxifen,  
Gemcitabine, Doxorubicin

細胞種類:

肺がん、乳がん、卵巣がん、膵がん、大腸がん、肝がん、胃がん、白血病

- がん幹細胞に対するLMF、およびLMF-CGの効果

がん幹細胞の調製

(スフェロイド形成、CD44vによるソーティング)