

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、白畠 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)とカルボプラチニ(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 (日本クリア株式会社)

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、 5×10^5 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)

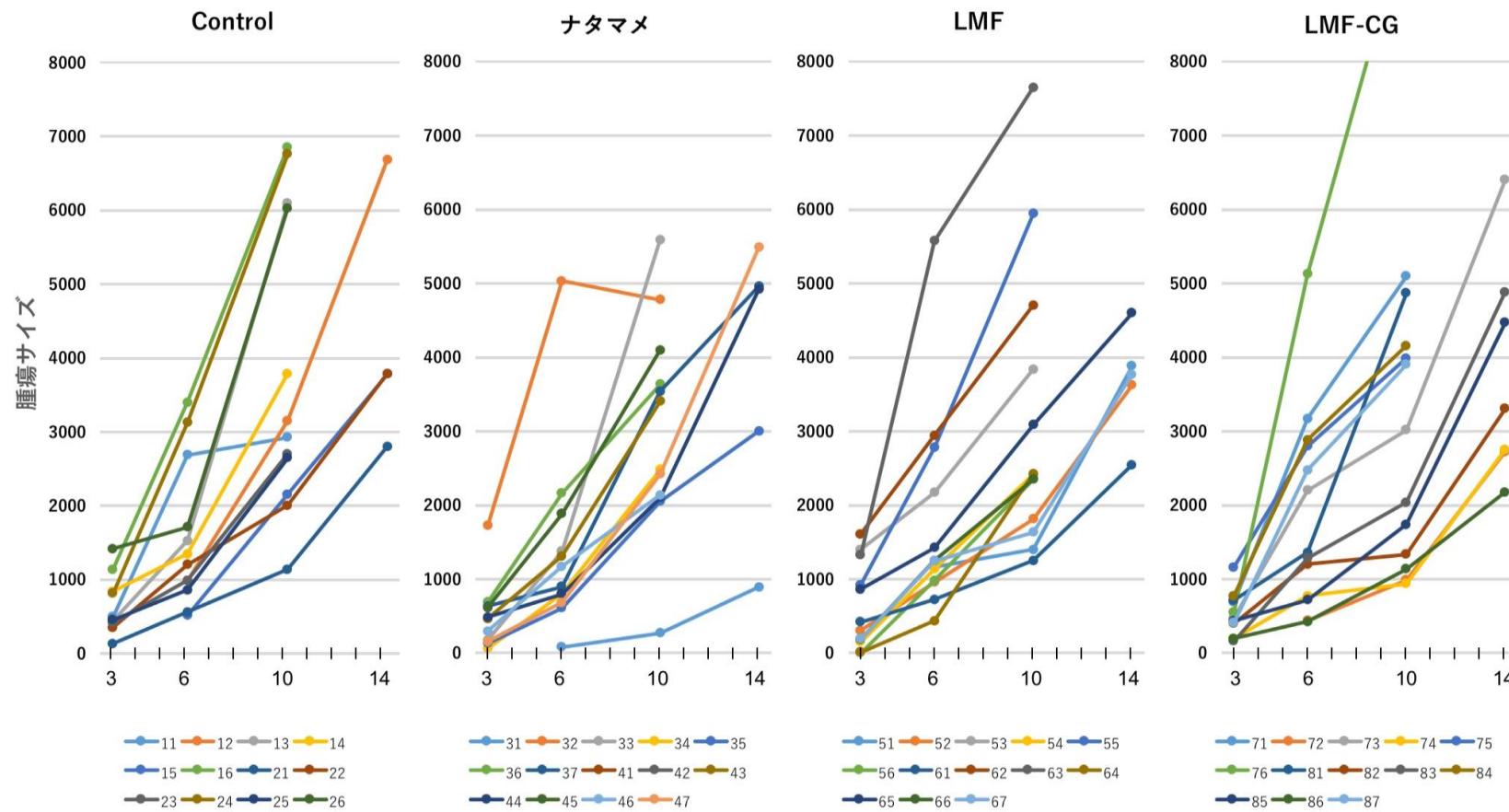
なお実験試験区は、以下の4群とし、サンプル投与量は1匹あたり0.2 mLとしゾンデを使用し経口投与した。

- 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。

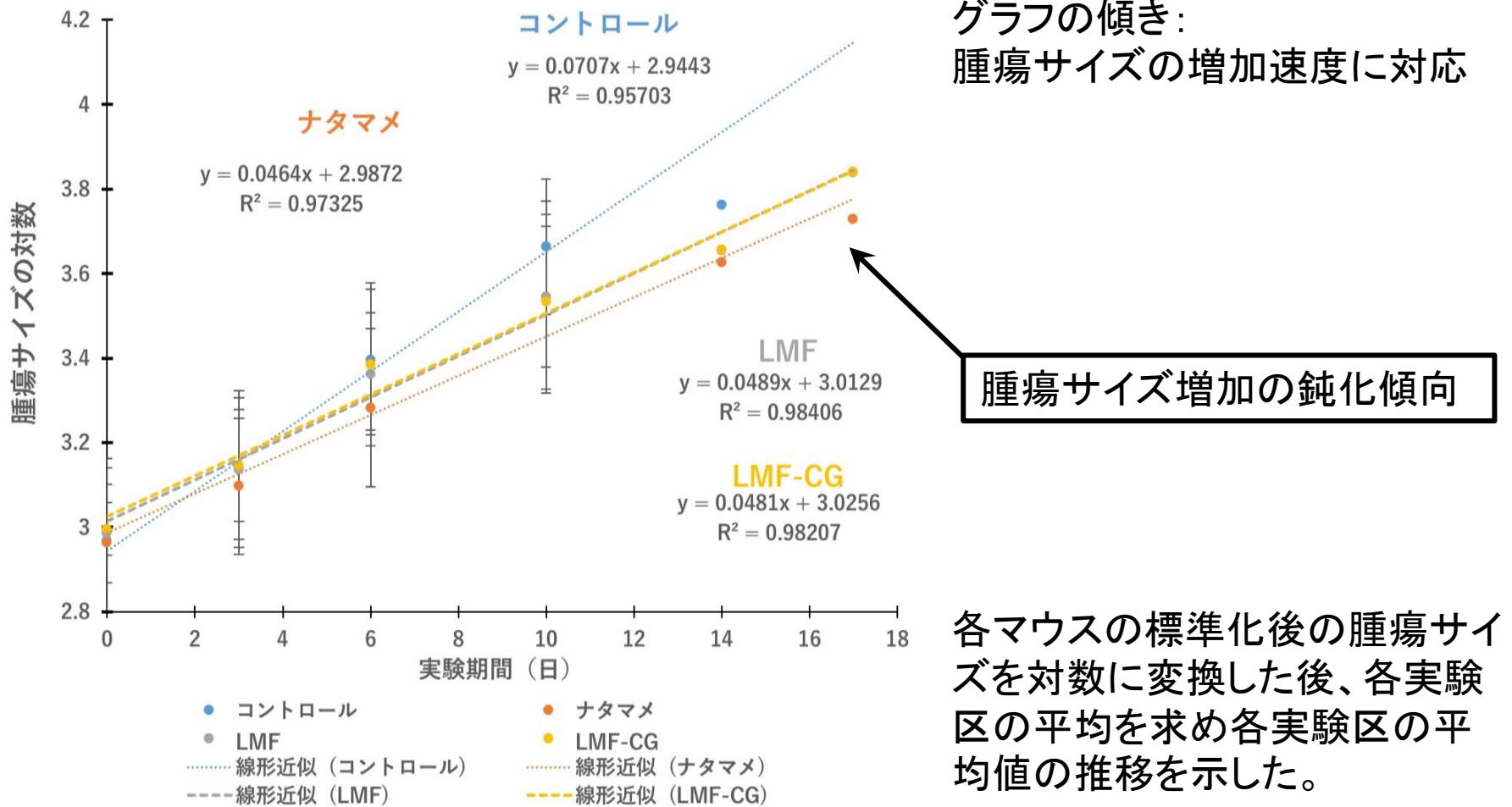
$$\text{腫瘍体積} = (\text{短径}^2 \times \text{長径}) / 2$$

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





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

↓
#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%



ナタマメ (*Canavalia gladiata*)

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

96-well plateに細胞を $100 \mu\text{L}/\text{well}$ で播種

(HT1080細胞： $1 \times 10^3 \text{ cells/well}$ 、TIG-1細胞： $4 \times 10^3 \text{ cells/well}$)



インキュベート (Overnight、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$)



LMF、LMF-CG、CBDCAを加えた培地に交換



インキュベート (**48時間**、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$)



WST-1を添加



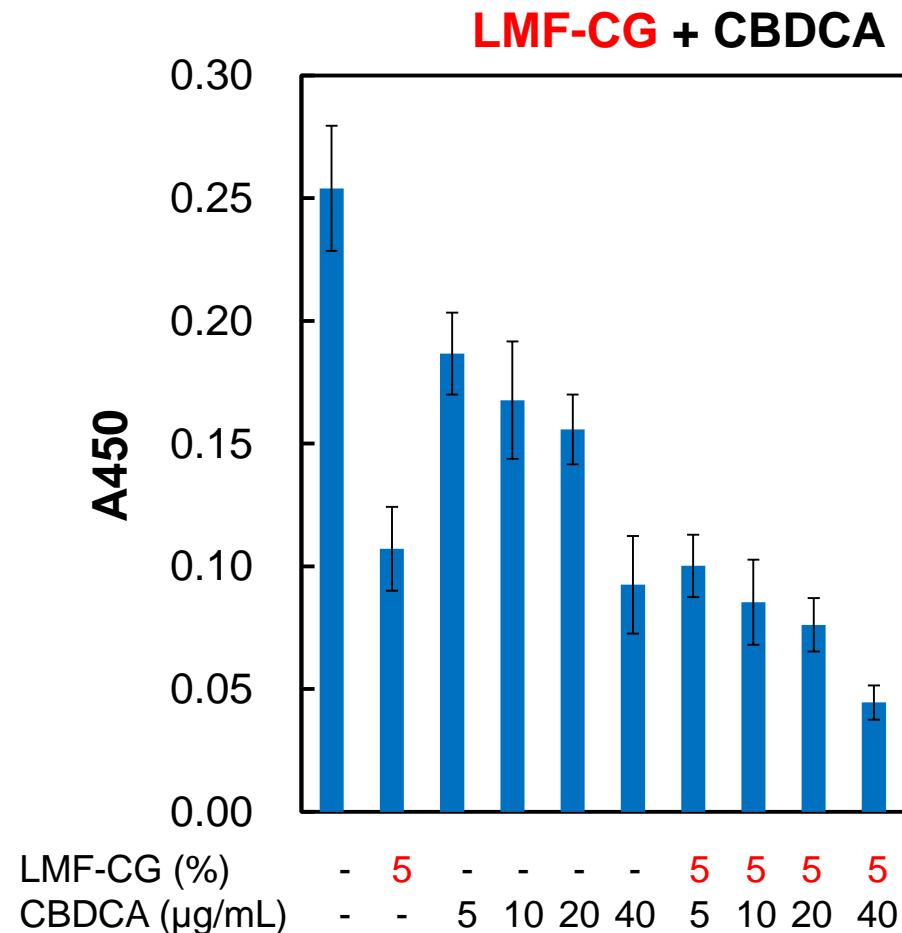
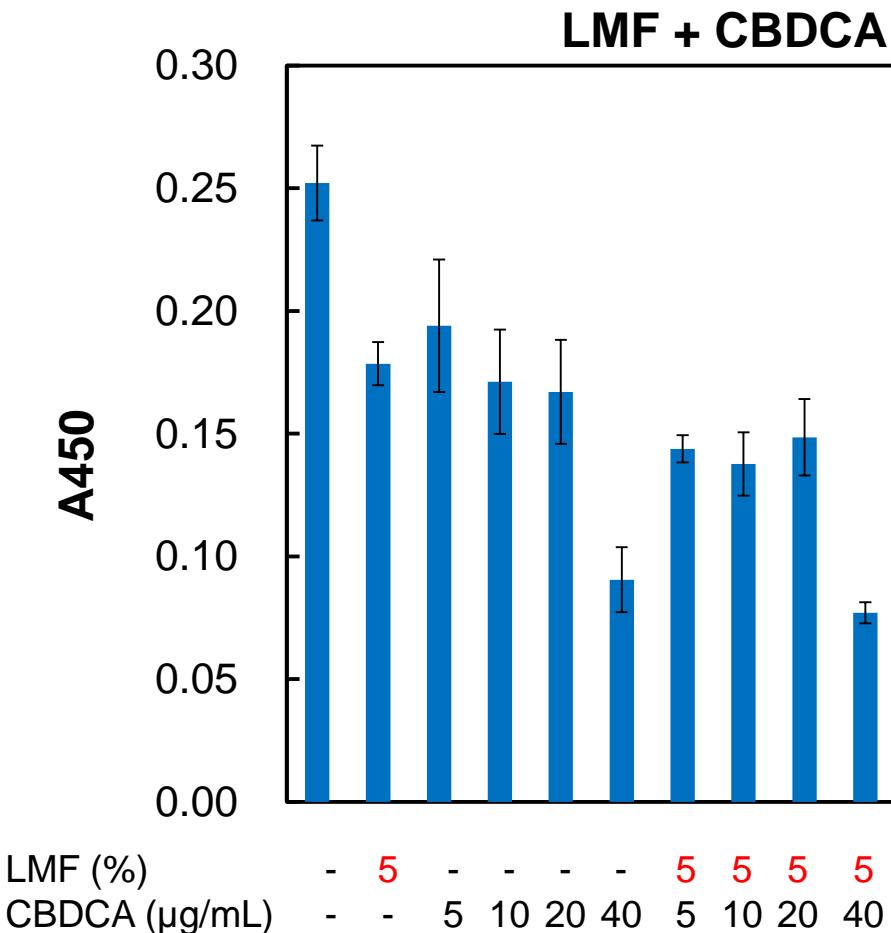
インキュベート (1時間、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$)



プレートリーダーで測定(WST-1)

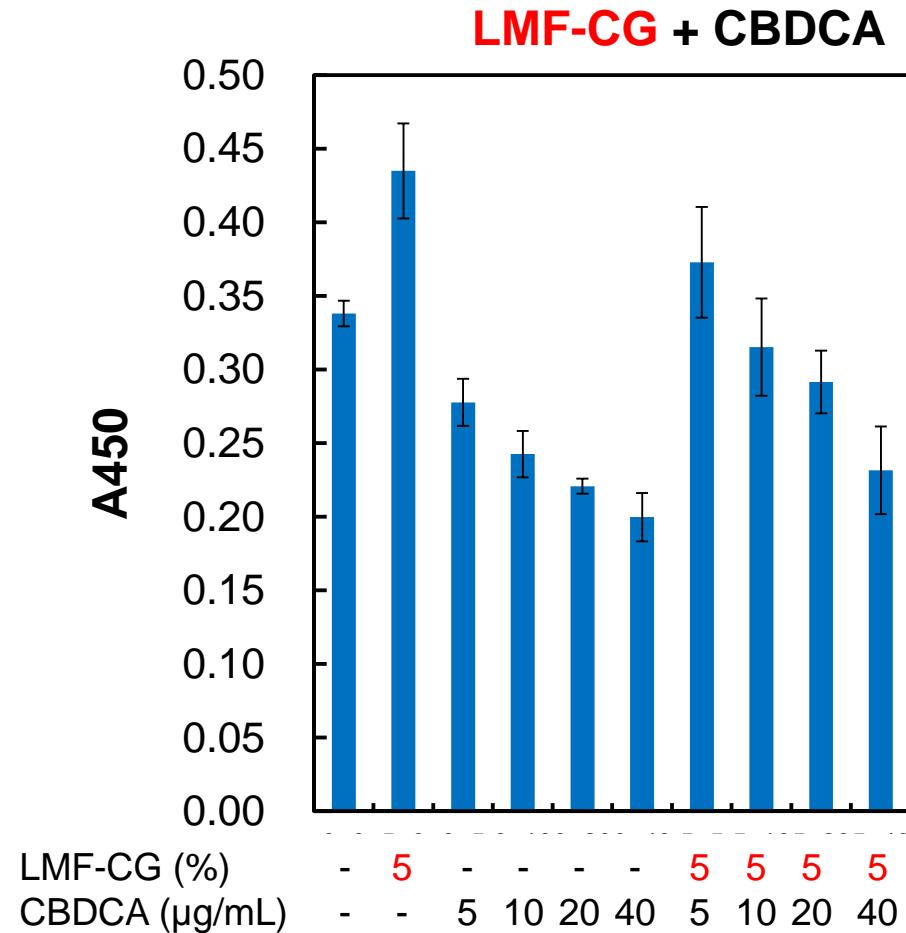
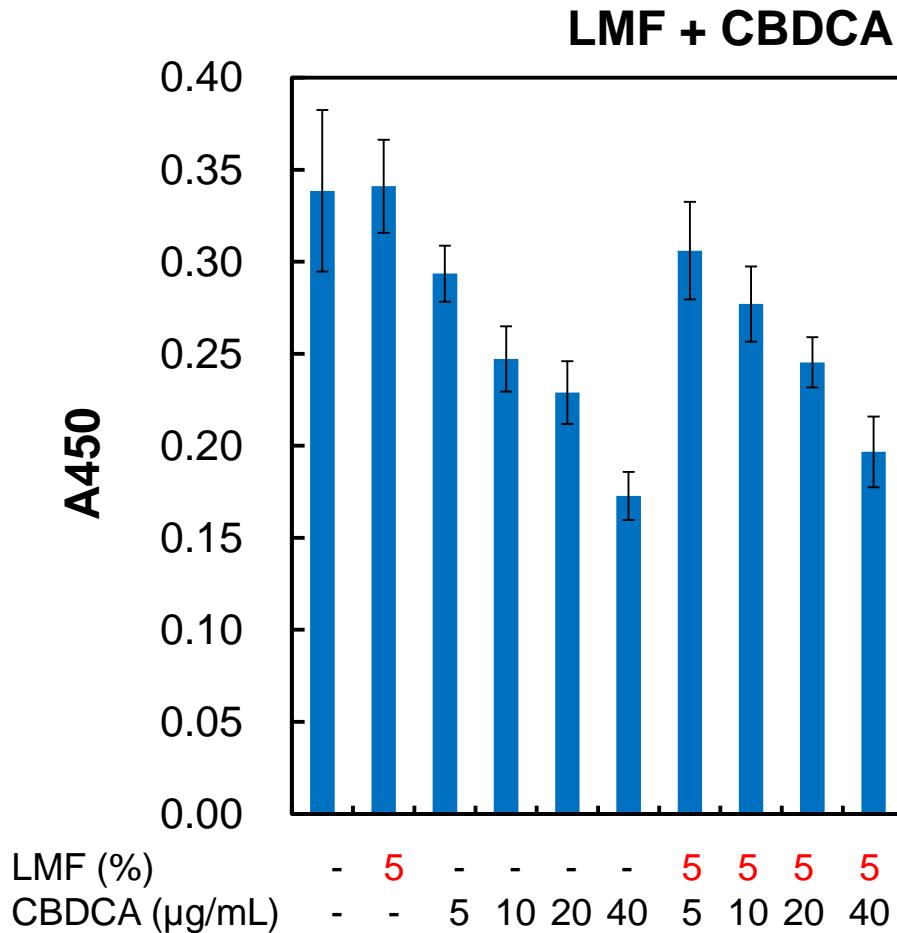
LMF-CGとCBDCA併用によるがん細胞死誘導効果

HT1080細胞(線維肉腫由来)



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-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 $100 \mu\text{L}/\text{well}$ で播種

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



インキュベート (Overnight, 37°C , 5% CO_2)



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_2)



WST-1を添加



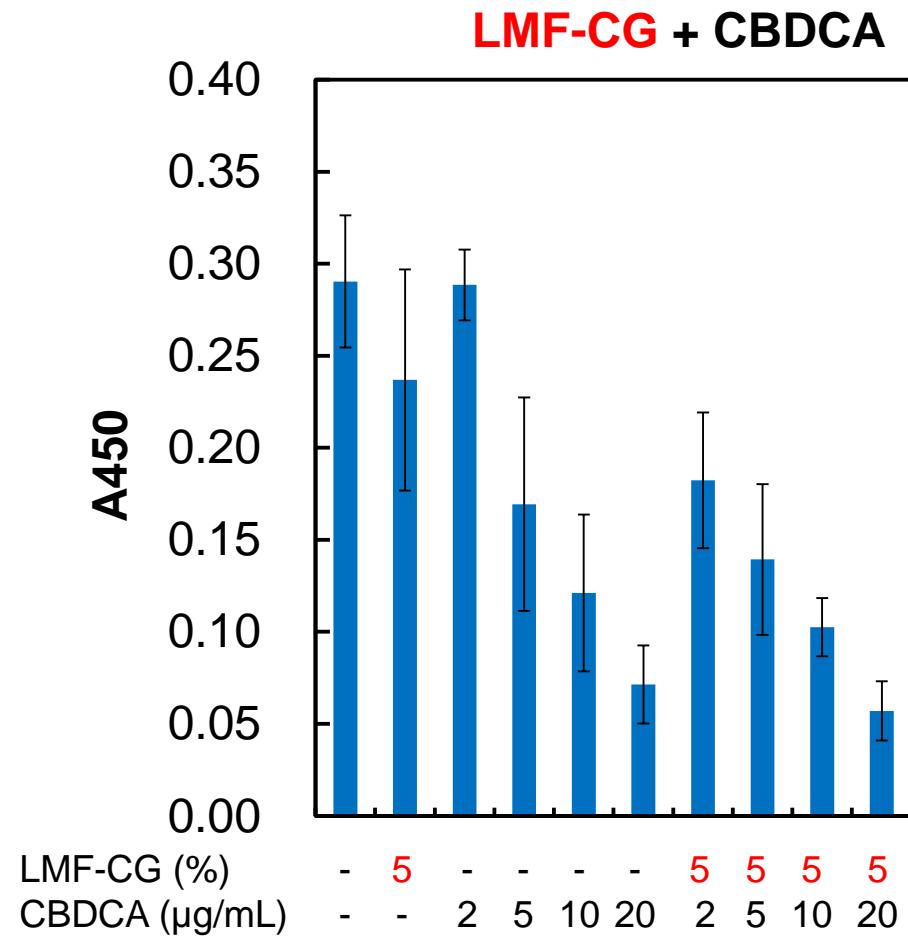
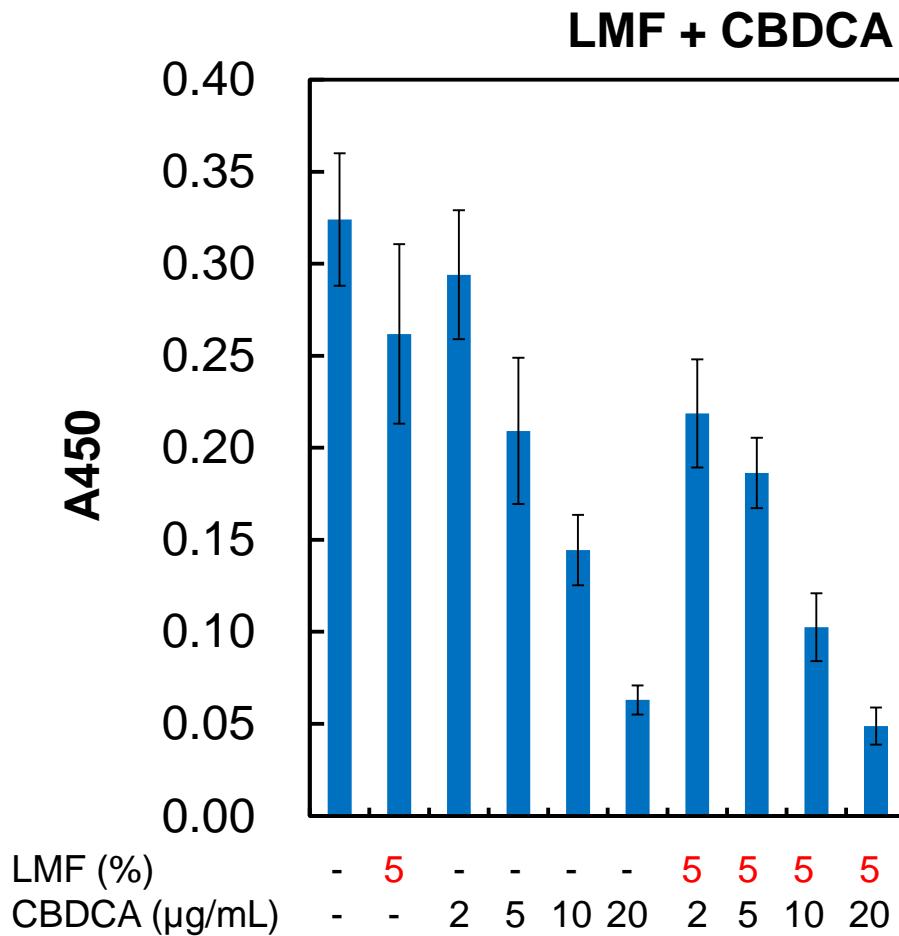
インキュベート (1時間, 37°C , 5% CO_2)



プレートリーダーで測定(WST-1)

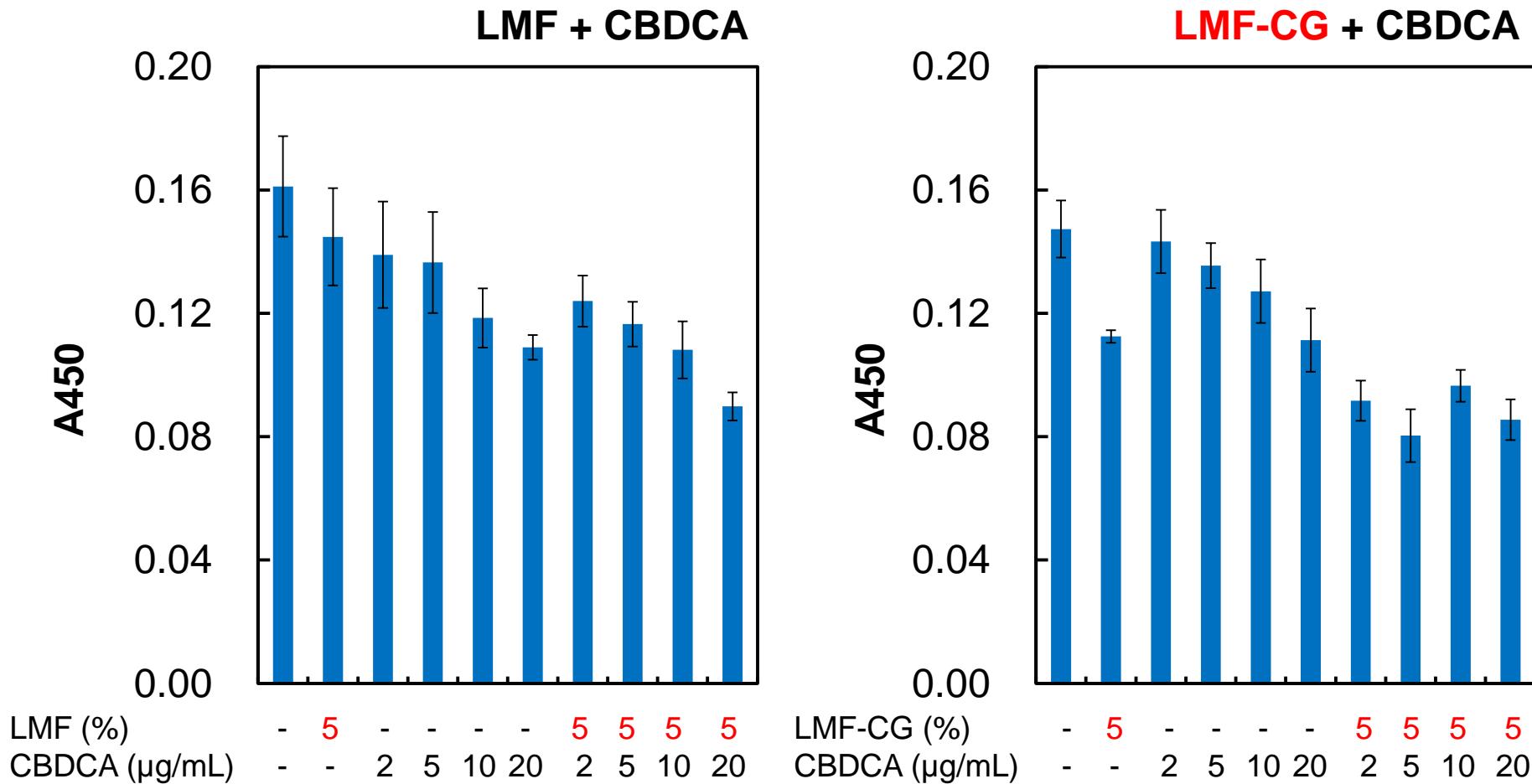
LMF-CGとCBDCA併用によるがん細胞死誘導効果

A549細胞(肺がん由来)



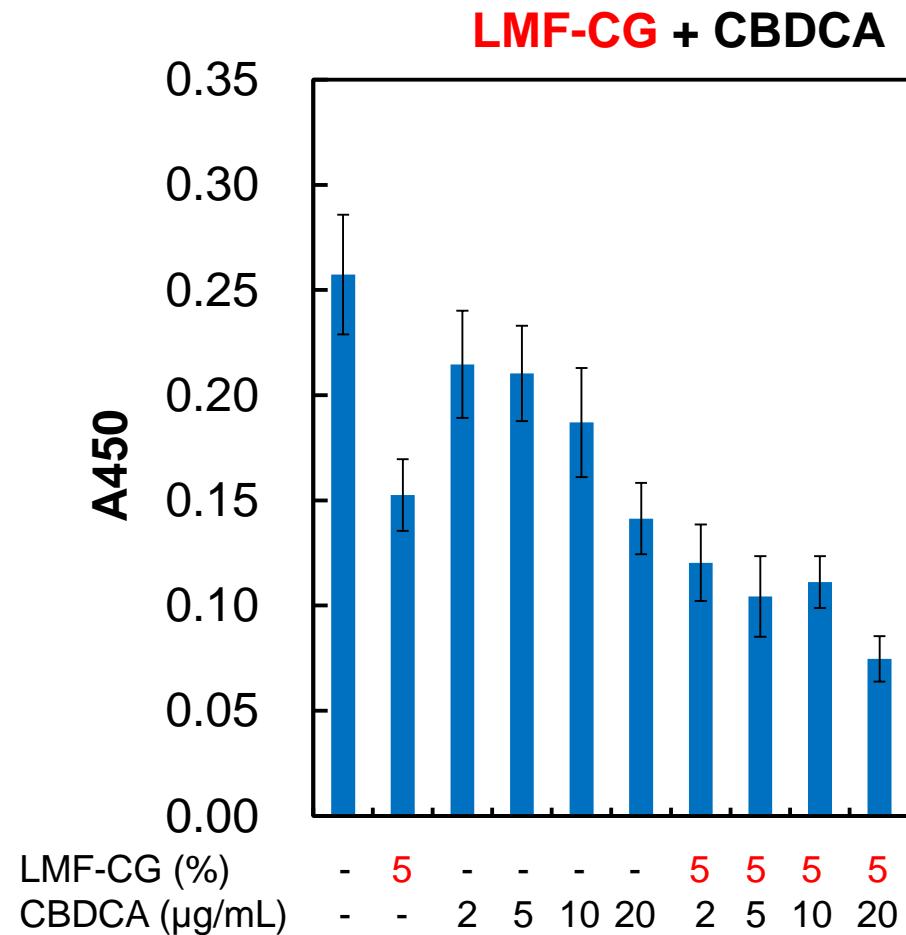
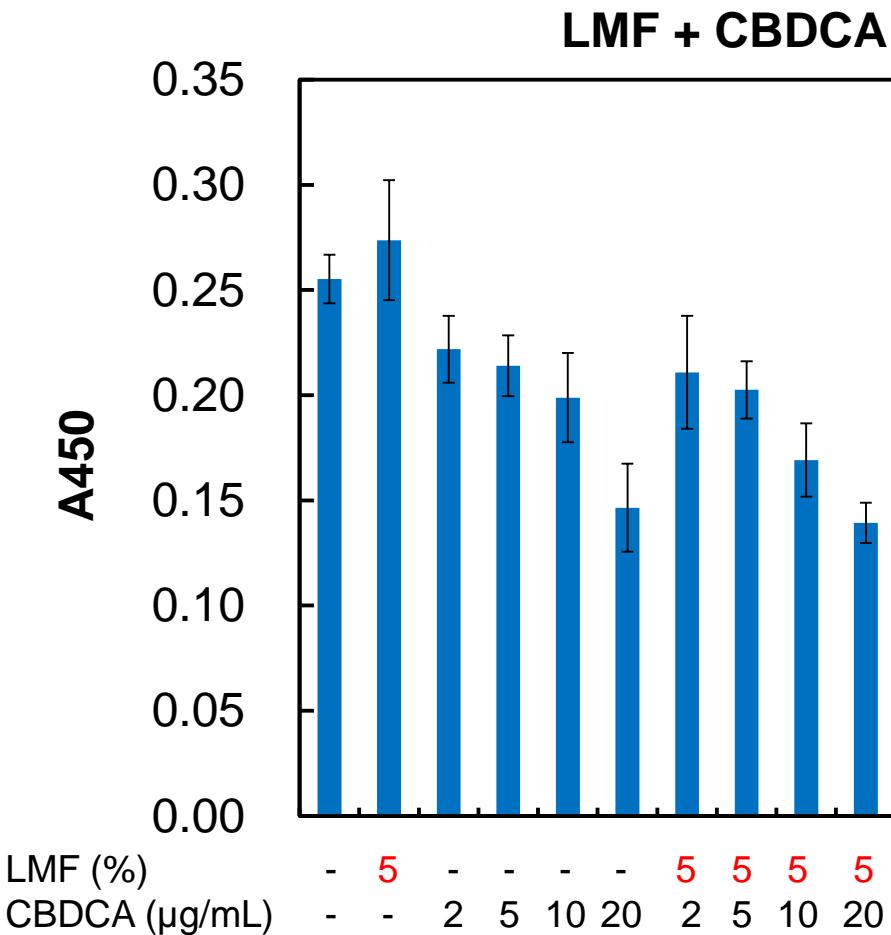
LMF-CGとCBDCA併用によるがん細胞死誘導効果

MDA-MB-231細胞(乳がん由来)

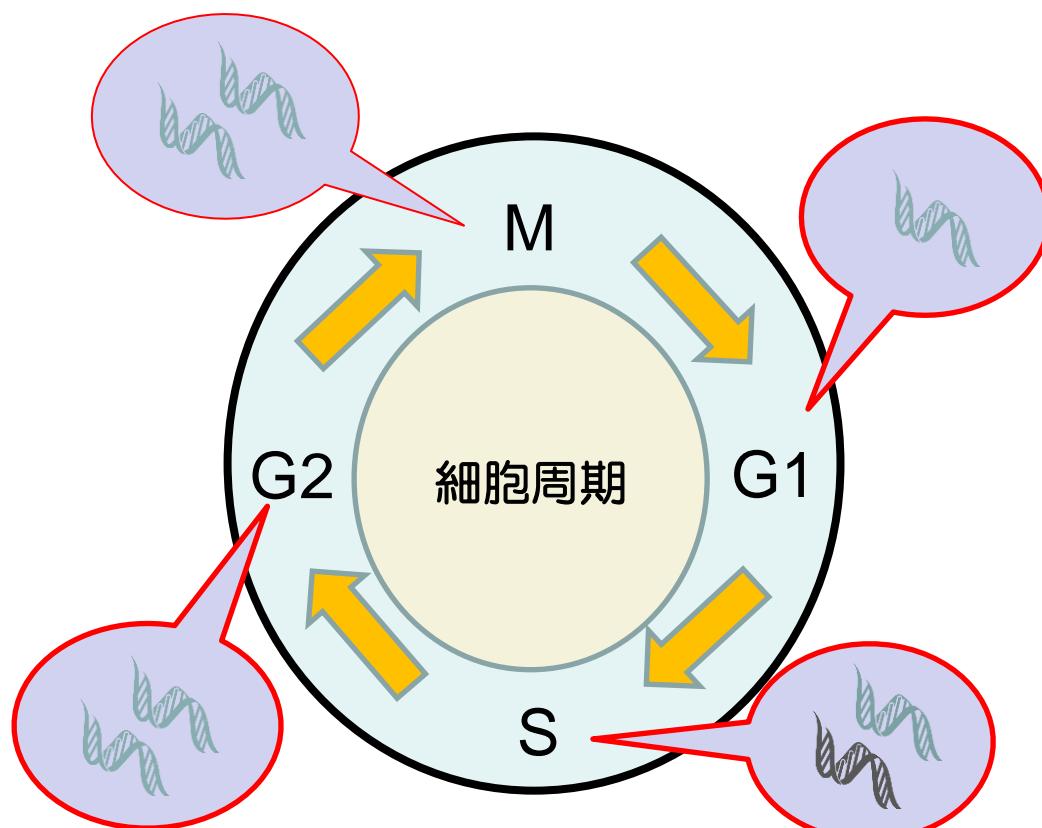


LMF-CGとCBDCA併用によるがん細胞死誘導効果

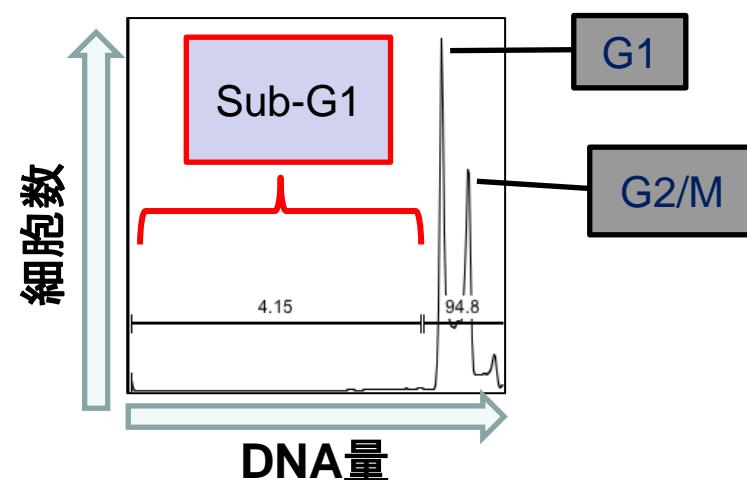
PANC-1細胞(膵がん由来)



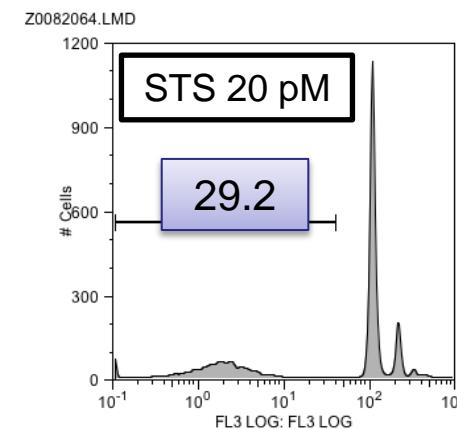
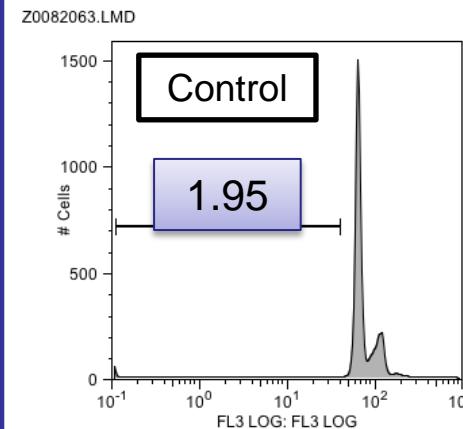
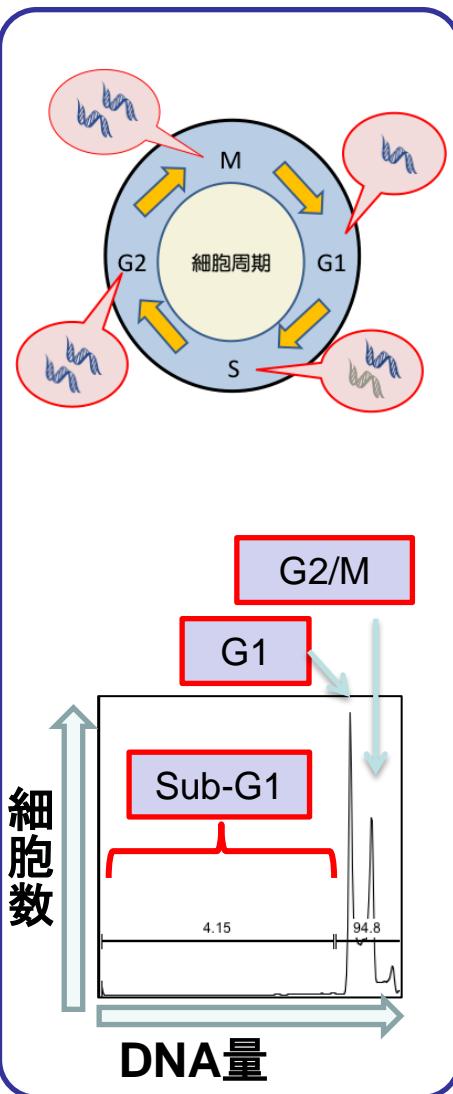
細胞周期解析によるLMFとナタマメエキスの併用効果の検討



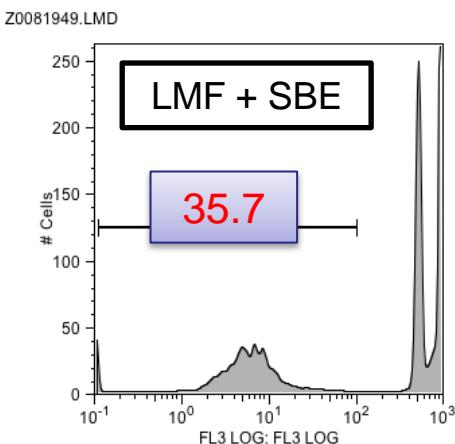
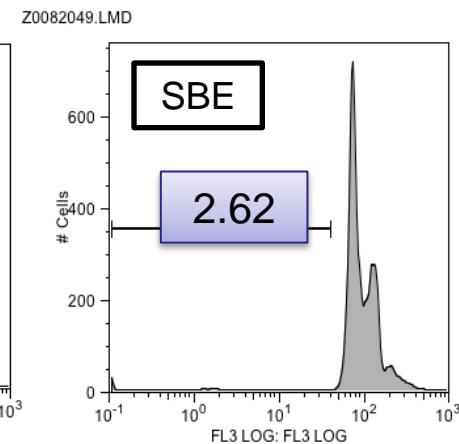
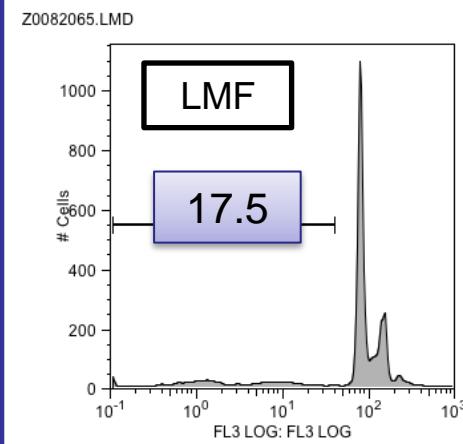
◆方法
細胞播種(前培養24時間)
↓
サンプル処理(48時間)
↓
エタノール固定、RNA分解、
PI染色
↓
フローサイトメトリーによる
細胞周期解析



LMFとナタマメエキスの併用による細胞周期への影響



HT1080細胞



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)