

マンゴスチン果皮成分の α -Mangostinに中鎖脂肪酸を付加した α -Mangostinドデカン酸ジエステルのマウス乳癌転移抑制の増強効果

柴田雅朗¹⁾・濱岡仁美¹⁾・伊藤裕子¹⁾
土佐秀樹²⁾・的場吉信³⁾・飯沼宗和⁴⁾・近藤洋一¹⁾

¹⁾ 大阪医科大学医学部・生命科学講座解剖学教室

³⁾ 株式会社エコリソース研究所

²⁾ 株式会社フィールドアンドデバイス

⁴⁾ 岐阜薬科大学大学院 生薬学研究室

要 旨

東南アジアでは、マンゴスチン果皮は民族伝承薬物として古くから用いられてきた。以前、私達はマンゴスチン果皮抽出物の α -Mangostinが、高転移性マウス乳癌モデルに対して、転移抑制効果を有することを見い出した¹⁾³⁾。そこで、 α -Mangostinの生体内への吸収率を高めることにより、抗腫瘍効果の増強を狙い、 α -Mangostinに中鎖脂肪酸を付加した α -Mangostinドデカン酸ジエステル(MGD)を合成し、マウス乳癌に対する抗腫瘍効果の増強作用について検討した。

BJMC3879Luc2乳癌細胞をBALB/cマウス雌に移植し、その2週後にMGDを0、2000および4000ppm濃度で飼料中に混じ、実験終了の7週まで自由摂取させた。その結果、生存率では4000ppm群で、対照群と比較し、有意な延長が示された。腫瘍体積では、投与開始後の1週より実験終了時まで、2000および4000ppm群で有意な抑制ないしはその傾向が観察された。病理組織学的解析では、リンパ節転移、肺転移ともに、MGD投与両群で有意な抑制が観察された。また、腫瘍内の微小血管密度はMGD投与両群で有意な低下が観察され、さらにリンパ管侵襲の数においても、MGD投与両群で有意な低下が示された。以前行った実験での4000ppm α -Mangostin投与群の抗腫瘍効果と比較すると、MGD投与群ではその作用は著しく増強されていた。

高転移性マウス乳癌モデルにおいて、中鎖脂肪酸を付加したMGDは強い抗腫瘍効果を発揮

し、とりわけ延命効果やリンパ節転移の抑制は臨床的意義が高いと考えられた。

はじめに

東南アジア原産の果実であるマンゴスチン(学名*Garcinia mangostana* L)は、原産地に暮らす人々の間では、その果皮は古くから、鎮痛、皮膚病、創傷、赤痢、伝染性の下痢などの治療薬として用いられてきており、天然薬として代々受け継がれ、重宝されてきた^{4),5)}。

マンゴスチン果皮に含まれる約40種類のキサントンのうち、 α -および γ -Mangostinには抗菌作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用、癌細胞に対する殺作用を有していることが科学的に証明され、その生理活性が注目されるようになった⁶⁾⁻⁸⁾。2009年、私達はパナキサントン(75-85% α -Mangostinおよび5-15% γ -Mangostin)がマウス乳癌に対して抗腫瘍効果を有することを報告した¹⁾。次いで、2011年、先の乳癌モデルに対して、 α -Mangostin単体でも抗腫瘍効果を発揮することを報告し、その作用機序の一端も明らかにした^{2),8)}。そこで今回は、天然の α -Mangostinに中鎖脂肪酸であるドデカン酸(別名ラウリン酸)を付加した α -Mangostinドデカン酸ジエステル(α -Mangostin dilauriate; MGD)を合成し、生体への吸収効率を高め、抗腫瘍効果の増強を狙った。

連絡先：大阪医科大学医学部・生命科学講座解剖学教室
〒569-8686 高槻市大学町2-7
Tel. 072-684-7197 Fax. 072-684-6511
E-mail: an1031@osaka-med.ac.jp

キーワード： α -マンゴスチン、中鎖脂肪酸修飾、乳癌、転移抑制、マウス

材料と方法

乳癌細胞株

本実験で用いた乳癌細胞株BJMC3879Luc2は、BALB/c系マウスにMMTVを接種することにより誘発された乳癌より樹立されたBJMC3879細胞株⁹⁾にLuciferase遺伝子を安定的に組み込んだものである¹⁰⁾。BJMC3879Luc2細胞株を同系マウスに移植するとリンパ節や肺に高率に転移を起こす¹⁰⁾⁻¹³⁾。

投与物質

α -Mangostin ドデカン酸ジエステル (MGD): タイ産の成熟マンゴスチン果皮を乾燥の後、粉碎し、精製水とエタノール抽出、凍結乾燥、エチルアセテート抽出、クロマトグラフィーを用いた精製を経て α -Mangostin 結晶を得た。次いで、 α -Mangostin (0.01M) をピリジンおよびテトラヒドロフランに溶解し、ドデカン酸クロリド中に滴下した。その反応液を水浴上で加温・冷却の後、1N塩酸に加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム) にて精製を行い、 α -Mangostin ドデカン酸ジエステルを淡黄色油状物質として得た。

In vivo 乳癌モデル実験

6週齢の42匹のBALB/c系雌マウス(日本SLC)の鼠径部皮下乳腺部にBJMC3879Luc2細胞を移植し、2週後に腫瘍径が0.3~0.4cm大となった30匹の動物を無作為に選び、群分けをした。対照群には、5%コーンオイルを含む基礎食(CE-2粉末飼料、クレア)を、投与群にはMGDを2000ppm、または4000ppm濃度に混じた基礎食を、それぞれ自由摂取させた。毎週、体重と乳腺腫瘍のサイズを個体別に計測し、ケージ毎に摂餌量の測定を行った。乳腺腫瘍はデジタル式キャリパスで短径と長径を計測し、その体積を長径×(短径)²×0.4の算出式で求めた¹⁴⁾。実験開始の7週時に全生存動物を屠殺剖検し、乳腺腫瘍を摘出し、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定した。肺およびリンパ節(腋窩部、鼠径大腿部)を採取し、更に肉眼病変部と異常の見ら

れたリンパ節についても採取し、病理組織学的に検索した。

乳癌転移の生体イメージング

実験終了の7週時に、マウス1匹当たり3mgのD-luciferin potassium salts (和光純薬工業)を腹腔内に投与し、イソフルレン吸入麻酔下にて、Photon Imager (Biospace)を用いて、生体発光イメージングを行い、転移の拡がりを群間で比較した。

腫瘍細胞のアポトーシスの解析

乳腺腫瘍のパラフィン包埋薄切切片を用いて、3'-OH末端のDNA切断を証明するTUNEL染色(Apoptosis *in situ* Detection Kit, 和光純薬工業)を施し、TUNEL陽性細胞数を算定し、腫瘍の単位面積当たりのアポトーシス細胞として算出した。

腫瘍細胞の細胞増殖の解析

屠殺1時間前に50mg/kgの用量で5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; Sigma)を腹腔内に投与した。乳腺腫瘍のパラフィン包埋薄切切片について、抗BrdU抗体(Dako)を用いて免疫組織染色を施し、BrdUの取り込みの観察されたS期細胞数を算定し、BrdU標識率を腫瘍の単位面積当たりの数として算出した。

腫瘍内微小血管密度の定量と腫瘍内のリンパ管侵襲の数

血管内皮のマーカーであるCD31を抗CD31抗体(LabVision)を用いて、免疫組織学的染色を施し、陽性を示した毛細血管を定量した¹⁵⁾。リンパ管内皮のマーカーであるPodoplaninを抗Podoplanin抗体(AngioBio)を用いて免疫組織学的染色を施し、拡張した毛細リンパ管内腔に癌細胞浸潤を認めたそのリンパ管(リンパ管侵襲)の数をカウントした¹⁶⁾。

統計学的解析

対照群と各投与群との間の定量的データでは独立多群間のTukey検定や独立2群間のt検定を行った。生存率はHolm-Sidak法で解析した。

結 果

生存率：対照群の動物では実験開始の6週時に2例、7週時に3例の死亡例が、2000ppm群では7週時に1例の死亡例が観察され、4000ppm群では死亡例は認められなかった。なお、実験終了時の生存率は対照群で50%、2000ppm群で90%、4000ppm群で100%であり、4000ppm群では有意差が示された(図1)。

体重：4000ppm群の体重では、対照群と比較して、一貫して低い傾向にあったが、群間に統計学的な有意差は認められなかった。なお、各群とも一般状態は良好であった。

腫瘍体積：4000ppm群では、対照群と比較して、実験開始の1週より実験終了時まで有意な腫瘍増殖の抑制が観察された。2000ppm群では、実験期間を通して、腫瘍増殖は抑制されており、散発的に有意差が示された。なお、実験開始6週時の各群の腫瘍体積では(図2)、対照群と比較して、いずれのMGD投与群においても有意な低下が観察された。

癌転移の生体発光イメージング：実験終了の7週時の生体発光イメージングでは、対照群と比較して、明らかに投与群で転移の拡がりはいずれも小さい傾向にあった。

転移の病理組織学的検索：マウス1匹当たりのリンパ節の転移個数は、全てのMGD投与群で、対照群と比較して、有意な低下が示された。肺転移では、転移巣の大きさが1mm以上のものに

ついて、マウス1匹当たりの数を算出した結果、全てのMGD投与群で、対照群と比較して、有意な低下が観察された。

腫瘍細胞のアポトーシスおよび細胞増殖：腫瘍組織において、TUNEL陽性(アポトーシス細胞)を示した腫瘍細胞の数を定量的に解析した結果、全てのMGD投与群で有意な増加が示された。また、BrdU標識率を指標とした腫瘍細胞の増殖では、全てのMGD投与群で有意な低下が示された。

腫瘍内の微小血管密度およびリンパ管侵襲の数：CD31をマーカーとした微小血管密度は全てのMGD投与群で有意な減少が示された。また、Podoplaninをマーカーとしてリンパ管侵襲の数を算定した結果、全てのMGD投与群で有意な低下が観察された。

考 察

ヒトと類似の転移スペクトラムを有する高転移性マウス乳癌モデルに対して、*a*-Mangostinに中鎖脂肪酸であるドデカン酸を付加した*a*-Mangostinドデカン酸ジエステル(MGD)は腫瘍増殖を抑制し、リンパ節転移ならびに肺転移を抑制した。また、MGD投与群では、腫瘍細胞のアポトーシスの増加とBrdU標識率を指標とした細胞増殖の抑制が観察された。さらに、MGD投与群においては、腫瘍内血管密度およびリンパ管侵襲の数の有意な低下をもたらした。

以前行った天然の*a*-Mangostin³⁾と今回の実験

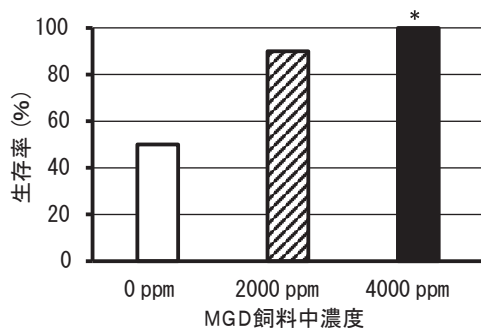


図1 生存率

実験終了時の生存率は、4000ppm群では、対照群と比較して、有意な延長を示した(* $P < 0.05$)。

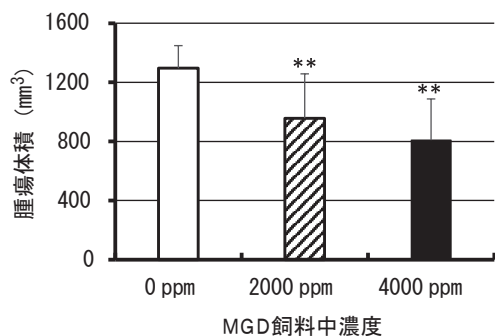


図2 腫瘍体積

実験終了時の腫瘍体積は、2000ppmおよび4000ppm群ともに、対照群と比較して有意に低値を示した(** $P < 0.01$)。

の α -Mangostin 中鎖脂肪酸付加体である MGD との抗腫瘍効果を比較した (図3)。各実験群のそれぞれの対照群のリンパ節転移を100とした時、 α -Mangostin の4000ppm 群では42%のリンパ節転移抑制率であったが、40000ppm MGD 群では23%で、その効果は約2倍増強されており、中鎖脂肪酸修飾による効果と考えられた。

マンゴスチンは東南アジアを代表する果実で、その果皮は古くから、様々な疾患の治療薬として代々受け継がれ、民族伝承薬物として重宝されてきた^{4),5)}。マンゴスチン果皮に含まれる α -ならびに γ -mangostin は様々な生理活性をもたらすことが報告されている。特に、 α -Mangostin がミトコンドリア経路によるアポトーシス誘導、細胞周期のG1期停止やS期抑制、血管新生の抑制、Akt 脱リン酸化を惹起し、これらの作用の総和として抗腫瘍効果 (腫瘍増殖ならびに転移抑制) が発揮されたと考えられる^{2),4),8)}。私達のマウス乳癌モデル以外の実験動物腫瘍モデルでもマンゴスチン抽出物の抗腫瘍効果は報告されており、例えばDMBA 誘発のマウス乳癌モデル¹⁷⁾、ラット大腸癌モデル¹⁸⁾、ヒト結腸癌細胞株HCT116のヌードマウス移植モデル¹⁹⁾でその抗腫瘍効果が示されている。

Akt はセリン/スレオニンキナーゼで、Akt が

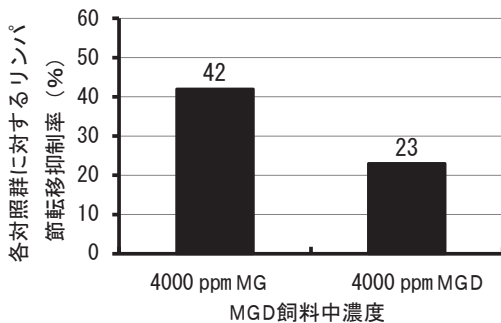


図3 天然の α -マンゴスチン (MG) とその中鎖脂肪酸付加体 (MGD) との抗腫瘍効果の比較
以前、行った α -Mangostin (MG) とその中鎖脂肪酸付加体である MGD との抗腫瘍効果を比較した。それぞれの実験の対照群のリンパ節転移を100とした時、MGの4000ppm 群では42%のリンパ節転移抑制率であったが、40000ppm MGD 群では23%で、その効果は増強されていた。

活性化するためには Thr308 部位と Ser473 部位の両者がリン酸化されることが必要であり、PI3 キナーゼの下流で制御されている²⁰⁾。Akt が活性化すると、細胞増殖、細胞生存 (抗アポトーシス)、脈管新生、細胞周期などの癌の進展に関わる変化を惹起する²¹⁾。 α -Mangostin の抗腫瘍効果には Akt の脱リン酸化作用が大いに関わっているものと考えられる^{2),4),8)}。しかし、それに留まらず、 α -Mangostin には免疫活性化作用 (NK 活性化)、抗酸化作用、アロマトマーゼ抑制作用など極めて多様な効果をもたらすことから、本実験において観察された α -Mangostin 中鎖脂肪酸付加体の抗腫瘍効果にもこれら作用機序が関わっているものと推察される。

ヒトの乳癌は主にリンパ節、肺、肝臓および骨に転移し、殆どの場合、転移により死に至る。癌転移を克服することこそが延命効果につながると考えられ、癌治療の最大の課題と言える。本実験において、MGD が乳癌転移を抑制した事実は極めて臨床的に意義があると考えられる。しかも、その転移抑制効果は天然の α -Mangostin の抗腫瘍効果を上回るものであった。ヒト乳癌ではサイズが4 cmを超えると再発や転移のリスクが著しく高まることが報告されていることから²²⁾、MGD 投与群においての腫瘍サイズが、対照群のそれより小さいことは意義ある所見と考えられる。

以上、高転移性マウス乳癌モデルにおいて、中鎖脂肪酸付加体である α -Mangostin ドデカン酸ジエステルは、天然の α -Mangostin の抗腫瘍効果と比較して、さらに強い抗腫瘍効果を発揮し、特に生存率の延長や転移抑制作用は臨床的意義が極めて高い所見と考えられた。

謝辞ほか

本研究成果を取りまとめた原著論文は現在、執筆中であるため、詳細なデータを割愛して、Outline の記述に限定した。

文 献

1. Doi, H., et al.: Panaxanthone isolated from pericarp of *Garcinia mangostana* L. suppresses tumor growth and metastasis of a mouse model of mammary cancer: *Anticancer Res* 29: 2485-2495, 2009
2. Shibata, M. A., et al.: a-Mangostin extracted from the pericarp of the mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn) reduces tumor growth and lymph node metastasis in an immunocompetent xenograft model of metastatic mammary cancer carrying a p53 mutation: *BMC Med.* 9: 69, 2011
3. Shibata, M. A., et al.: Treatment with tenascin C antibody and/or a-mangositin reduces tumor growth and lymph node metastasis in a model of metastatic mammary cancer: *BAOJ Cancer Res Ther* 1: 011, 2015
4. Shibata, M. A., et al.: Effects of mangosteen pericarp extracts against mammary cancer: *Altern Integ Med* 2: 8, 2013
5. Iinuma, M., et al.: Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: *J Pharm Pharmacol* 48: 861-865, 1996
6. Itoh, T., et al.: Inhibitory effect of xanthenes isolated from the pericarp of *Garcinia mangostana* L. on rat basophilic leukemia RBL-2H3 cell degranulation: *Bioorg Med Chem* 16: 4500-8, 2008
7. Akao, Y., et al.: Anti-cancer effects of xanthenes from pericarps of mangosteen: *Int J Mol Sci* 9: 355-70, 2008
8. Kurose, H., et al.: Alterations in cell cycle and induction of apoptotic cell death in breast cancer cells treated with alpha-mangostin extracted from mangosteen pericarp: *J Biomed Biotechnol* 2012: 672428, 2012
9. Morimoto, J., et al.: New murine mammary tumor cell lines: *In vitro Cell Dev Biol* 27A: 349-351, 1991
10. Shibata, M. A., et al.: An immunocompetent murine model of metastatic mammary cancer accessible to bioluminescence imaging: *Anticancer Res* 29: 4389-4396, 2009
11. Shibata, M. A., et al.: Raloxifene inhibits tumor growth and lymph node metastasis in a xenograft model of metastatic mammary cancer: *BMC Cancer* 10: 566, 2010
12. Shibata, M. A., et al.: The endogenous soluble VEGF receptor-2 isoform suppresses lymph node metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model: *BMC Med* 8: 69, 2010
13. Shibata, M. A., et al.: Therapy with siRNA for Vegf-c but not for Vegf-d suppresses wide-spectrum organ metastasis in an immunocompetent xenograft model of metastatic mammary cancer: *Anticancer Res* 33: 4237-4247, 2013
14. Shibata, M. A., et al.: Haploid loss of bax leads to accelerated mammary tumor development in C3(1)/SV40-TAg transgenic mice: reduction in protective apoptotic response at the preneoplastic stage: *EMBO J.* 18: 2692-2701, 1999
15. Gorrin-Rivas, M. J., et al.: Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis: *Clin Cancer Res* 6: 1647-1654, 2000
16. Shibata, M. A., et al.: Suppression of murine mammary carcinoma growth and metastasis by HSVtk/GCV gene therapy using *in vivo* electroporation: *Cancer Gene Ther* 9: 16-27, 2002
17. Jung, H. A., et al.: Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen): *J Agric Food Chem* 54:

- 2077-82, 2006
18. Nabandith, V., et al.: Inhibitory effects of crude alpha-mangostin, a xanthone derivative, on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1, 2-dimethylhydrazine in the rat: *Asian Pac J Cancer Prev* 5: 433-8, 2004
 19. Aisha, A. F., et al.: In vitro and in vivo anti-colon cancer effects of *Garcinia mangostana* xanthenes extract: *BMC Complement Altern Med* 12: 104, 2012
 20. Bellacosa, A., et al.: Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain: *Oncogene* 17: 313-25, 1998
 21. Agarwal, A., et al.: The AKT/I kappa B kinase pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor-kappa B and beta-catenin: *Oncogene* 24: 1021-31, 2005
 22. Carter, C. L., et al.: Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases: *Cancer* 63: 181-187, 1989