

# がん移植マウスモデルにおけるベツリンの 抗腫瘍効果に関する検討

小笠原 勝, 宮本 (山口) 朋美, 松永 孝之, 長井 良憲<sup>1</sup>, 高津 聖志

<sup>1</sup>富山大学大学院医学薬学研究部免疫バイオ・創薬探索研究講座

## Anti-tumor effects of betulin in a tumor-burden mouse model.

Masaru OGASAWARA, Momomi YAMAGUCHI-MIYAMOTO, Takayuki MATSUNAGA,  
Yoshinori NAGAI<sup>1</sup>, Kiyoshi TAKATSU

<sup>1</sup>Department of Immunobiology and Pharmacological Genetics, Graduate School of  
Medicine and Pharmaceutical Science for Research, University of Toyama

### 要 約

我々はこれまでに、ポリ (I:C) により亢進した脾臓細胞の細胞傷害活性を指標に TGF- $\beta$ あるいはPGE<sub>2</sub>の抑制作用をいずれも解除できる化合物を探索し、植物成分ベツリンにその作用を見出した。本研究では、免疫抑制を伴うことが報告されている数種のがん移植マウスモデルを用いて、ベツリンの抗腫瘍効果について検討した。その結果、マウス大腸がん CT26細胞、悪性黒色腫 B16F10細胞、あるいはTリンパ腫 EL4 細胞の移植モデルにおいて、ポリ (I:C) と抗がん剤の2者併用による抗腫瘍効果に比較して、ベツリンを加えた3者併用ではより強い抑制効果が認められた。一方、いずれのモデルにおいても、ベツリン単独ではほとんど抑制効果は認められなかった。これらのことから、ベツリンは、がん細胞に対する直接的な細胞毒性とは異なる作用機序を介して、ポリ (I:C) 及び抗がん剤の抗腫瘍効果を増強していると考えられた。

### Summary

We previously screened of natural compounds for the restorative activity on the cytotoxicity of splenocytes inhibited by TGF- $\beta$  or PGE<sub>2</sub>. And we found betulin, a plant constituent, possessing the activity. In this study, using several kinds of *in vivo* tumor-burden models of mice, anti-tumor effects of betulin were examined. As a result, more potent anti-tumor effect was observed in combination of the three compounds of poly (I:C), an anti-cancer agent and betulin, compared to the combined effects of poly (I:C) and an anti-cancer agent in a mouse model of murine CT26 colon cancer, B16F10 melanoma, or EL4 T lymphoma. In any of tumor-burden mouse models used, administration of betulin alone did not exhibit anti-tumor effect. These results suggest that betulin increased the combined effect of anti-tumor activities of poly(I:C) and an anti-cancer agent via a mechanism different from direct cytotoxicity.

**キーワード：**ベツリン；抗腫瘍効果；担癌マウスモデル

**Key words：**Betulin；Anti-tumor effect；Tumor burden mouse model

がんの三大療法に次ぐ新しい治療法として、がん免疫療法が積極的に臨床応用されている。しかし、多くの場合当初期待されたほどの高い治療効果が得られていない<sup>1)</sup>。近年、その主な原因の一つは、がん細胞由来の免疫抑制因子 (TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> 等) による免疫機能の低下であることがわかってきた。そのため、がん免疫療法の効果を増強するには、免疫抑制因子の作用を阻止する薬剤が必要と考えられている<sup>2)</sup>。本研究ではこれまで、先行している研究開発との差別化、より有効性の高い薬剤の開発を目指し、TGF- $\beta$ に加えてPGE<sub>2</sub>の抑制作用も解除できる化合物を約800種の天然物等からスクリーニングし植物成分のベツリンに有

効性を見出した<sup>3)</sup>。

ベツリンは主に白樺の樹皮に含まれる成分であり、これまで抗ウイルス活性や抗炎症作用、最近では生活習慣病に対する有効性など様々な生物活性について報告がなされている<sup>4)</sup>。とりわけ、がん細胞の増殖能に対する阻害作用について多数の報告がなされており、増殖阻害活性に基づく抗がん剤としての開発が期待されている<sup>5-9)</sup>。一方、本研究のようにベツリンの免疫抑制解除作用をがん治療に応用しようとする試みについては報告がない。

本研究では、免疫抑制を伴うことが報告されている数種のがん移植マウスモデルを用いて<sup>10-14)</sup>、免疫賦活剤及び

抗がん剤と併用した際のベツリンのがん抑制増強効果について検討した。

## 実験方法

### 1. 実験試薬

ポリイノシン-ポリシチジン酸 (ポリ (I:C)) は, Invivo Gen より購入した. ベツリン, オキサリプラチン, ドキソルビシンは, それぞれ Extrasynthese, Wako, より購入し, いずれもジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して実験に供した.

### 2. 細胞及び細胞培養

マウス CT26 大腸がん細胞, マウス EL4 T リンパ腫細胞, マウス 4T1 乳がん細胞は, ATCC より入手した. マウス LLC 肺がん細胞は, 東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センターより入手した. マウス B16F10 悪性黒色腫細胞は, 涌沢伸哉 先生 (北陸大学) より恵与された. これら細胞は, 10% の非働化ウシ胎児血清, 100 U/ml のペニシリン, 0.1 mg/ml のストレプトマイシン及び 55 $\mu$ M の 2-メルカプトエタノールを含む RPMI-1640 培地中にて継代, 維持した.

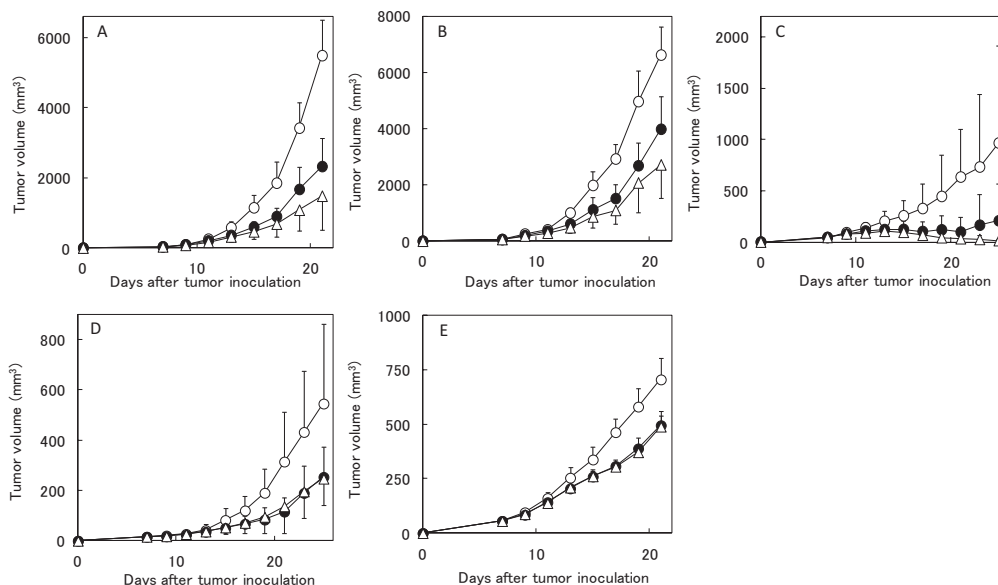
### 3. がん皮下移植マウスモデルでの評価

がん細胞を  $2 \times 10^5$  個/0.05ml PBS に調製し, BALB/c または C57BL/6 マウス (7 週令, 雌, 10 匹/群) にマウス当たり 0.05ml ずつ下腹部皮下に接種した. ベツリンはマウス当たり 45nmol の用量でがん接種 7 日目から解剖日前

日まで 1 日 1 回, 腹腔内に投与した. 対照群には溶媒 (DMSO) を同様に投与した (20 $\mu$ /マウス). ポリ (I:C) は腫瘍内に 20 $\mu$ g/0.05ml の用量で, がん接種後, 2, 5, 8, 11 日目に投与した. オキサリプラチンは, 1.5 または 5 mg/kg の用量でがん接種 7 日目にマウスの腹腔内に投与した. ドキソルビシンは, PBS で 2 $\mu$ M となるように調製しがん接種 7 日目に腫瘍内に投与した (50 $\mu$ /マウス). 腫瘍径は 2 日あるいは 3 日ごとに測定し, 見かけの腫瘍体積は, (長径 $\times$ 短径 $\times$ 短径) / 2 により算出した.

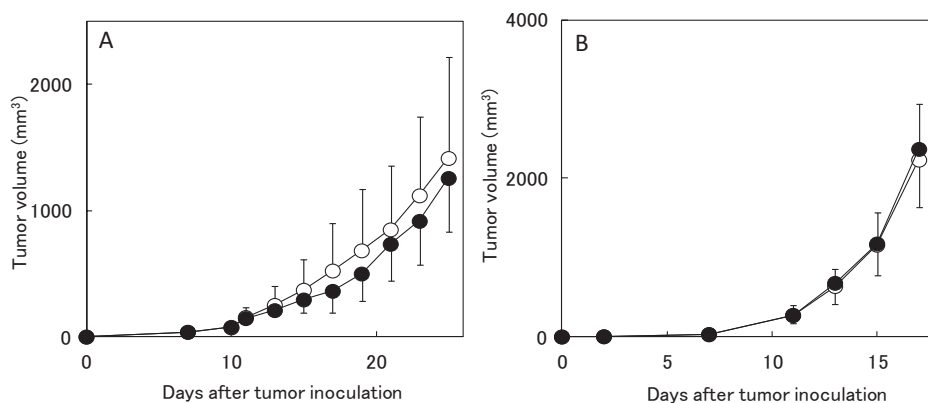
## 結果及び考察

昨年度までに, ポリ (I:C) により亢進した脾臓細胞の NK 活性を指標に, TGF- $\beta$  及び PGE<sub>2</sub> による抑制を克服する植物成分としてベツリンを見出し, その作用機序の一端を明らかにした<sup>3)</sup>. 本研究では, インビボでのベツリンの有効性を検証するため, TGF- $\beta$  あるいは PGE<sub>2</sub> による免疫抑制を誘導することが報告されている 4 種のがん細胞 (CT26 大腸がん細胞, EL4 T リンパ腫細胞, B16F10 悪性黒色腫細胞, LLC 肺がん細胞, あるいは 4T1 乳がん細胞) の皮下移植マウスモデルを用いて, ポリ (I:C) と抗がん剤の 2 者併用による抑制効果とベツリンを加えた 3 者併用による抑制効果を比較検討した. その結果, CT26 細胞, EL4 細胞, あるいは B16F10 細胞の移植モデルでは, ポリ (I:C) と抗がん剤の 2 者併用による抑制効果に比べて, ベツリンを加えた 3 者併用ではより強い抑制効果が認められた (Fig. 1). ベツリンについてはこれまでに, インビトロでのがん細胞増殖に対して直接的な阻害作用を



**Fig. 1 Differential effects of betulin on tumor growth in mice.**

B16F10 (A), EL4 (B), CT26 (C), LLC (D), or 4T1 (E) cells were subcutaneously inoculated into mice. An anti-cancer agent (doxorubicin or oxaliplatin) was administered 7 days after tumor inoculation. Poly (I:C) was administered on day 8, 11, and 14. Betulin was intraperitoneally administered once daily starting 8 days after tumor inoculation. Tumor volume was evaluated two or three times a week.



**Fig. 2 Betulin had marginal effects on the growth of tumor cells in mice.**

CT26 (A) or B16F10 (B) cells were subcutaneously inoculated into mice. Betulin was intraperitoneally administered once daily starting 8 days after tumor inoculation. Tumor volume was evaluated two or three times a week.

示すことが多数報告されている<sup>5-9)</sup>。また、がん皮下移植マウスモデルにおいても、ベツリン単独で抗腫瘍効果を示すことが少数ではあるが報告されている<sup>8,15)</sup>。そこで、本研究で認められたベツリンの増強効果にがん細胞に対する直接的な細胞毒性作用が関与しているかを明らかにするため、ベツリン単独投与による抗腫瘍効果について検討した (Fig. 2)。その結果、本研究の投与条件ではベツリン単独では明らかな抑制効果は認められなかった。これらのことから、ベツリンは、がん細胞に対する直接的な細胞毒性とは異なる作用機序を介して、ポリ (I:C) 及び抗がん剤の抗腫瘍効果を増強していると考えられた。

細胞毒性とは異なる作用機序としては、これまでの検討結果から免疫抑制の解除作用が考えられるが、今のところインビボで認められたベツリンの増強効果に免疫系が関与しているかは不明である。ただし、これまでの脾臓細胞を用いたインビトロでの検討では、ベツリンは TGF- $\beta$  あるいは PGE<sub>2</sub> による NK 活性抑制を 5 $\mu$ M においてほぼ完全に解除したのに対して、B16F10 細胞の増殖を 50% 阻害するのに 13 $\mu$ M のベツリンを必要とした。これらのことから考えると、ベツリンの免疫抑制解除効果の方がインビボにおいてより発現しやすいことが予想され、ベツリンの増強効果への免疫系の関与が推察される。この点については、今後、免疫不全マウス等を用いて検討を進める必要がある。

## 文 献

- 1) Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P.: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.*, **10**(9), 909-915 (2004)
- 2) Teicher B.A.: Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin. Cancer Res.*, **13**(21), 6247-6251 (2007)
- 3) 小笠原勝, 山崎思乃, 宮本朋美, 長井良憲, 松永孝之: がん細胞による免疫抑制を克服する天然物の探索(2), 富山県薬事研究所年報, **39**, 21-25 (2012)
- 4) Tang J.J., Li J.G., Qi W., Qiu W.W., Li P.S., Li B.L., Song B.L.: Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab.*, **13**(1), 44-56 (2011)
- 5) Jonnalagadda S.C., Corsello M.A., Sleet C.E.: Betulin-betulinic acid natural product based analogs as anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **13**(10), 1477-1499 (2013)
- 6) 国際公開第02-009719号
- 7) 特開2005-330261号公報
- 8) 特開平 1-14832号公報
- 9) Xu W., Zhu C., Cheng W., Fan X., Chen X., Yang S., Guo Y., Ye F., Shi J.: Chemical Constituents of the Roots of *Euphorbia micractina*. *J. Nat. Prod.*, **72**(9), 1620-1626 (2009)
- 10) Maeda H., Tsuru S., Shiraishi A.: Improvement of macrophage dysfunction by administration of anti-transforming growth factor-beta antibody in EL4-bearing hosts. *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**(11), 1137-1143 (1994)
- 11) Bixiang Z., Sunil K. H., Sanguo Z., Pran K. D.: Targeting Transforming Growth Factor- $\beta$  signaling in liver metastasis of colon cancer. *Cancer Lett.*, **277**(1), 114-120 (2009)
- 12) Liu J., Liao S, Diop-Frimpong B., Chen W., Goel S., Naxerova K., Ancukiewicz M., Boucher Y., Jain R.K., Xu L.: TGF- $\beta$  blockade improves the distribution and efficacy of therapeutics in breast carcinoma.

- noma by normalizing the tumor stroma. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **109(41)**, 16618-16623 (2012)
- 13) Hasmim M., Noman M.Z., Messai Y., Bordereaux D., Gros G., Baud V., Chouaib S.: Cutting edge: Hypoxia-induced Nanog favors the intratumoral infiltration of regulatory T cells and macrophages via direct regulation of TGF- $\beta$ 1. J. Immunol., **191(12)**, 5802–5806 (2013)
- 14) Morecki S., Yacovlev E., Gelfand Y., Trembovler V., Shohami E., Slavin S.: Induction of antitumor immunity by indomethacin. Cancer Immunol. Immunother., **48(11)**, 613–620 (2000)
- 15) Soica C., Dehelean C., Danciu C., Wang H.M., Wenz G., Ambrus R., Bojin F., Anghel M.: Betulin complex in  $\gamma$ -cyclodextrin derivatives: properties and antineoplastic activities in in vitro and in vivo tumor models. Int. J. Mol. Sci., **13(11)**, 14992–15011 (2012)