

閉経後 Luminal A 乳癌モデルにおける *Tabebuia avellanedae* の増殖阻害効果及び 抗アロマターゼ活性

NITIN TELANG¹, HAREESH B. NAIR² and GEORGE Y.C. WONG^{3,4}

¹Cancer Prevention Research Program, Palindrome Liaisons Consultants, Montvale, NJ 07645-1559; ²Department of Obstetrics and Gynecology, University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, TX 78229; ³American Foundation for Chinese Medicine, New York, NY 11103; ⁴Breast Center, Maimonides Medical Center, Brooklyn, NY 11219, USA

2019年4月25日受付; 2019年9月10日採録

DOI: 10.3892/br.2019.1244

抄録。 アロマターゼ阻害薬 (AI) は、単剤療法として、又はサイクリン依存性キナーゼ 4/6 阻害薬もしくは mTOR 阻害薬との併用療法として、閉経後エストロゲン受容体陽性 (ER⁺) 乳癌の代表的な治療選択肢となっている。これらの薬剤による長期治療は用量制限毒性や薬剤耐性をもたらす。天然物質が現行の治療法の試験可能な代替となる。*Tabebuia avellanedae* (TA、タベブイア・アベラネダエ) はアマゾン熱帯雨林原産の樹木である。TA の内部樹皮はタヒボ (Tahebo) と呼ばれる薬用栄養補助食品となっている。TA の非分画水抽出物は、Luminal A 乳癌及びトリプルネガティブ乳癌モデルにおいて有効な増殖阻害物質である。キノン誘導体のナフトフランジオン (NFD) が TA の主な生理活性物質である。本研究では、タヒボ NFD まるごと (TNM、Tahebo-NFD-Marugoto) の名で販売されている TA の内部樹皮の微粉末の効果を検証した。アロマターゼ遺伝子を安定的に導入した ER⁺MCF-7 細胞 MCF-7^{AROM} を、アロマターゼ発現閉経後乳癌のモデルとした。足場非依存性のコロニー形成、細胞周期進行、アポトーシス促進性のカスパーゼ 3/7 活性、アポトーシス関連遺伝子の発現、アロマターゼ活性及び特定のエストロジオール (E₂) 標的遺伝子発現を、機構的エンドポイントとした。MCF-7^{AROM} 細胞を TNM で処理したところ、E₂ により促進される足場非依存性のコロニー形成が用量依存的に減少した。TNM で処理した MCF-7^{AROM} 細胞の機構的アッセイにより、濃度 10 µg の TNM (NFD 含有量: 2 ng) は S 期停止を誘導し、アポトーシス促進性のカスパーゼ 3/7 活性を増加させ、アポトーシス促進性の BAX 遺伝子の発現を増加させ、抗アポトーシス性の BCL-2 遺伝子の発現を減少させ、アロマターゼ活性を阻害することが明らかになった。

さらに、TNM 処理は *ESR-1* (ER- α の遺伝子)、アロマターゼ及びプロゲステロン遺伝子の発現をダウンレギュレートし、E₂ 標的遺伝子 *pS2*、*GRB2* 及びサイクリン *DI* の mRNA レベルを低下させた。TNM の NFD 含有量に基づくアロマターゼ活性の阻害は、臨床で用いられる AI のレトロゾール及びエキセメスタンより優れていた。これらのデータから、アロマターゼ陽性閉経後乳癌の現行治療法に代わる栄養製品としての TNM の潜在的有効性が示された。

緒言

閉経後ホルモン受容体陽性、ヒト上皮増殖因子受容体 2 陰性乳癌の臨床治療選択肢には、選択的エストロゲン受容体調節薬とアロマターゼ阻害薬がある(1, 2)。アロマターゼ阻害薬は CDK4/6 及び mTOR 経路の選択的阻害薬と併用されることが多い。単剤療法又は多剤併用療法による長期治療はしばしば、主に癌幹細胞の発生による薬剤耐性の獲得を伴い、それにより治療効果に影響を及ぼし、疾患進行を促進する(3-5)。

アロマターゼ CYP19 A1 は、副腎アンドロステンジオンをエストロン (E₁) に変換し、その後エストロジオール (E₂) に変換することにより、増殖を促進するエストロゲンをもたらすという、腫瘍周辺及び腫瘍内のエストロゲン生合成にとって重要な酵素として機能する。薬理的薬剤のレトロゾール (LET) 及びエキセメスタン (EXM) はアロマターゼの選択的阻害薬である(1,2)。これらの薬剤は、アロマターゼ発現 Luminal A 乳癌の前臨床モデル、及びエストロゲン受容体陽性の臨床乳癌において腫瘍の耐性の獲得を示す(6-12)。

栄養補助食品や天然植物由来製品などの自然由来の非毒性物質が、補完・代替医療では広く用いられている。アロマターゼ活性の効果的な阻害を示す天然製品は、臨床で用いられるアロマターゼ阻害薬の制約に対して試験可能な代替となる可能性がある。

Tabebuia avellanedae (TA、タベブイア・アベラネダエ) は、アマゾン熱帯雨林原産の樹木である。TA の樹皮から作った飲み物は、多様な健康問題への対処として先住民により伝統的に用いられてきた。TA の内部樹皮の非分画粉末が、タヒボ (Tahebo) の名で、タヒ

連絡先著者: Dr Nitin Telang, Cancer Prevention Research Program, Palindrome Liaisons Consultants, Montvale, NJ 07645-1559, USA
E-mail: ntelang3@gmail.com

キーワード: *Tabebuia avellanedae*、増殖阻害、アロマターゼ阻害、乳癌細胞

ボジャパン株式会社 (Tahebo Japan, Co., Ltd.) から販売されている。タヒボの水抽出物は、臓器部位の癌の動物モデルで抗癌活性を示すこと (13)、また、前立腺癌及び乳癌のヒト癌由来細胞培養モデルにおいて複数の機序により増殖阻害効果を示すことが(14-16)、文献に記載されている。Luminal A 乳癌サブタイプのモデルにおける TA 抽出物の増殖阻害効果は、増殖及びアポトーシス関連遺伝子の差次的発現を伴う(17)。トリプルネガティブ乳癌モデルにおける TA の阻害効果は、G₁ 期から S 期への移行の阻害、アポトーシス促進性のカスパーゼ 3/7 活性の誘導及び RB 経路の調節によるものである(18)。

タヒボジャパンは最近、従来の TA 粉末よりかなり細かく粉砕した TA 粉末の製造が可能な独自のプロセスを考案した。タヒボジャパンがタヒボ NFD まるごと (TNM、Tahebo NFD Marugoto) の名称で販売する新製品は、粒径が小さくなり、水溶解度が高くなったことから、従来のタヒボよりすぐれた結果をもたらすと期待される。

TNM の増殖阻害作用及び抗アロマトーゼ活性を評価することを目的として、本研究の実験は、i) アロマトーゼ発現閉経後乳癌モデルにおける TNM の増殖阻害効果を調べること、ii) 細胞のアロマトーゼ活性に対する TNM の影響を評価すること、及び iii) TNM の有効性に関する推定分子機構を同定することを目的にデザインした。

材料及び方法

実験モデル。 MCF-7^{AROM} 細胞株を本研究の実験モデルとした。アロマトーゼ遺伝子を安定的に導入した、これらの ER⁺/PR⁺/HER-2⁻ヒト乳癌由来細胞は(6,10)、臨床乳癌のアロマトーゼ発現、閉経後 Luminal A 分子サブタイプの特性を有する。

試験化合物

タヒボ NFD まるごと (TNM)。 この化合物は生理活性物質ナフトフランジオン (NFD) を含有する TA の内部樹皮の微粉末から成り、タヒボジャパン株式会社から提供を受けた。供給者から提供されたプロトコルに従い、非分画水溶原液を調製した。この TNM の原液には 200 ng の NFD が含まれている (私信: Dr Fukuda、タヒボジャパン)。原液を培地で系列希釈し、用量反応実験のための TNM の最終濃度を得るとともに、機構的アッセイで使用した最小有効濃度、50% 有効濃度 (IC₅₀) 及び最大細胞増殖抑制濃度 (IC₉₀) を同定した。

レトロゾール (LET)。 LET の原液 (分子量: 285 kDa、Sigma-Aldrich ; Merck KGaA) を DMSO で調製し、培地で系列希釈して最終濃度 1 µM (285 ng) を得た。

エキセメスタン (EXM)。 EXM の原液 (分子量: 296 kDa、Sigma-Aldrich ; Merck KGaA) を DMSO で調製し、培地で系列希釈して最終濃度 10 µM (2,960 ng) を得た。

LET と EXM は代表的なプロトタイプのアロマトーゼ阻害薬である。濃度 1 µM の LET と 10 µM の EXM は細胞培養実験で従来使用される有効濃度と同等であり、臨床的に達成可能な有効濃度に相当する。今回の

実験では、これらの化合物を陽性対照として使用した。

足場非依存性増殖。 今回のアッセイでは、DNA グレード寒天 (Sigma-Aldrich ; Merck KGaA) を適切な量の 2X RPMI-1640 培地と混合して寒天原液を調製した。基底層を調製するため、この原液を 0.6% に希釈し、6 ウェルのプレートに分注し、37°C で一晩凝固させた。5×10⁵/ml の密度の MCF-7^{AROM} 細胞の懸濁液を、0.33% 寒天を含有する RPMI-1640 培地で調整し、この細胞懸濁液を、TNM の存在下又は非存在下で基底層の上に重ねた。この培養液を、CO₂ インキュベーター内で 37°C で 21 日間インキュベートした。足場非依存性 (AI) コロニーを 0.005% クリスタルバイオレットで染色し、コロニー数を 10 倍の倍率で測定した。データは AI コロニーの数で表した。

細胞周期進行。 細胞周期解析のため、5×10⁵ 個の細胞を T-25 フラスコに播種し、播種後 24 時間、1、5 及び 10 µg の TNM で 48 時間処理した。細胞をトリプシン処理により回収し、500 x g でペレット化し、冷たい PBS (Sigma-Aldrich ; Merck KGaA) で 2 回洗浄した。次に、細胞を冷たい 70% エタノールで固定し、冷たい PBS で洗浄し、ヨウ化プロピジウム (PI、50 µg/ml、Sigma-Aldrich ; Merck KGaA、PBS 溶液) で染色した後、リボスクレアーゼ (10 µg/ml、Sigma-Aldrich ; Merck KGaA) を添加し、暗所で 4 時間インキュベーションした。細胞周期解析はテキサス大学医療科学センター

(University of Texas Health Sciences Center) (サンアントニオ) の Core Facility で、i) PI 染色した細胞のソーティング、ii) 488 nm の励起フィルター及び 520 nm のバンドパスフィルターの使用、及び iii) 前方対側方散乱での蛍光イベントのゲーティングを含む最適化プロトコルを用いて行った。細胞周期進行を Becton Dickinson FACSCAN フローサイトメーター (BD Biosciences) を用いてモニターし、FACS Express ソフトウェア (De Novo Software) を用いてデータを解析した。データは細胞周期の G₁ 期、S 期及び G₂ 期における細胞のパーセンテージとして表した。

カスパーゼ活性。 MCF-7^{AROM} 細胞におけるカスパーゼ 3/7 活性を caspase-Glo アッセイキット (Promega) を用いて測定した。簡単に述べると、TNM で処理した細胞を均質化緩衝液 (25 mmol/l HEPES、pH 7.5、5 mmol/l MgCl₂、及び 1 mmol/l EGTA) 及びプロテアーゼ阻害薬 (すべて Sigma-Aldrich ; Merck KGaA) 中で超音波処理によりホモジナイズした。ホモジネートを 6,500 x g で 4°C で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。その後、10 µl のアッセイ試薬を 10 µl の上清に添加し、反応混合物を室温で 2 時間インキュベートした。結果として生じる発光を、Fluoroskan Luminometer (Thermo Scientific Co.) を用いて測定した。データは相対発光単位 (RLU) で表した。

遺伝子発現プロファイリング。 アポトーシス制御遺伝子 BAX 及び BCL-2、E₂ 制御標的遺伝子 ESR-1、AROM 及び PR 並びに E₂ 反応性遺伝子 pS2、GRB-2 及びサイクリン DI の発現に対する TNM の影響を、逆転写定量的 PCR (RT-qPCR) アッセイを用いて公表されたプロトコルに従って検証した(19)。

表 I. 逆転写定量的 PCR 解析に使用したプライマーセット

遺伝子名	プライマー配列
<i>ESR-1</i>	5'-TGTGCAATGACTATGCTTCA-3' (S) 5'-GCTCTTCTCCTGTTTTTTTA-3' (AS)
<i>AROM</i>	5'-AGCATGCTGTACCAGCCTGT-3' (S) 5'-TCATCATCACCATGGCCATGT-3' (AS)
<i>PR</i>	5'-ACAGAATTCATGAGCCGGTCCGGG TGCAAG-3' (S) 5'-ACAAGATCTCCACCCAGAGCCCCG AGTTTT-3' (AS)
<i>pS2</i>	5'-CATCGACGTCCCTCCAGAAGAG-3' (S) 5'-CTCTGGGACTAATCACCGTGCTG-3' (AS)
<i>GRB2</i>	5'-AAATGCTCAGCAAACAGCGG-3' (S) 5'-TGAAGTGCTGCACATCATTTC-3' (AS)
サイクリン	5'-ACGAAGGTCTGCGCGTGTT-3' (S)
<i>D1</i>	5'-CCGCTGGCCATGAACTACCT-3' (AS)
<i>BCL-2</i>	5'-CCTGTGGATGACTGAGTACC-3' (S) 5'-GAGACAGCCAGGAGAAATCA-3' (AS)
<i>BAX</i>	5'-GTTTCATCCAGGATCGAGCAG-3' (S) 5'-CATCTTCTTCCAGATGGTGA-3' (AS)
β -アクチン	5'-GACCTCTATGCCAACACAGT-3' (S) 5'-AGTACTTGCGCTCAGGAGGA-3' (AS)

簡単に述べると、TNM で処理した細胞と非処理の対照細胞の RNA を、RNeasy plus キット (Qiagen Inc.) を用いて、製造業者のプロトコルに従ってゲノム DNA 除去ステップにより単離した。Applied Biosystems キット (Applied Biosystems) を用いて逆転写 (RT) を行った。RT-qPCR 及びその後の解析は Cepheid Smart Cycler で 0.25X SYBR-Green により Smart Mix PCR ビーズ (Cepheid) を用いて行い、対象の E₂ 標的遺伝子と、標準化対照としてのハウスキーピング遺伝子 β -アクチン転写物を検出した。各 RT-qPCR サイクル後に融解曲線解析を実施し、PCR 産物の特異性を確認した。E₂ 標的遺伝子の指定のプライマーセット及び β -アクチンのプライマーセットの PCR 反応では、個々の増幅産物を示す、特有の融解ピークが得られた。MgCl₂ (2 mmol/l)、12.5 μ l の 2X Taq PCR Master Mix (Qiagen, Inc.)、0.25X SYBR-Green (Fisher Scientific Co.) 及び遺伝子特異的なプライマーセット (各 0.3 μ mol/l、テキサス大学の Core Facility から入手) を含有する反応混合物 (25 μ l) を調製した。PCR 反応は 40 サイクルに設定し、 β -アクチンの RNA レベルによる標準化後にデータを評価した。RT-qPCR アッセイは duplicate で実施し、少なくとも 3 回繰り返した。これらのデータは相対的遺伝子発現の定量化のため $\Delta\Delta Cq$ 値で表した(20)。*ESR-1* (ER- α の遺伝子)、*AROM*、*PR*、*pS2*、*GRB2*、サイクリン *D1*、*BCL-2*、*BAX* 及び β -アクチン遺伝子のセンス (S) 鎖及びアンチセンス (AS) 鎖のプライマー配列は 5'から 3'方向で表す (表 I)。

アロマトラーゼ活性。アロマトラーゼ酵素活性を測定するため、³H₂O 遊離アッセイを使用した。

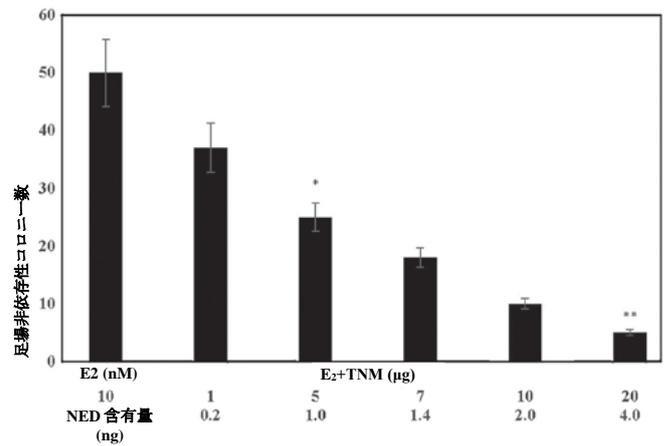


図 1. MCF-7^{AROM} 細胞における足場非依存性増殖に対するタヒボ NFD まるごと (TNM) の影響。TNM 処理は足場非依存性コロニー数の用量依存的減少を示した。TNM IC₅₀: 5 μ g* ($\alpha=0.05$) ; IC₉₀: 20 μ g** ($\alpha=0.05$)、E₂ で処理した対照との比較。結果は足場非依存性コロニー数 \pm SD (各処理群 n=4) で示した。データは ANOVA 及び Dunnett の検定により分析した。E₂: 17 β -エストロジオール、TNM: タヒボ NFD まるごと、NFD: ナフトフランジオン、SD: 標準偏差、ANOVA: 分散分析。

[³H]アンドロステジオンを基質とし、その E₁ への変換をアロマトラーゼ活性の指標とした。活性炭処理済みウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) を添加したフェノールフリー RPMI-1640 培地で増殖した MCF-7^{AROM} 細胞を、0.1% ウシ血清アルブミン、67 mmol/l KPO₄ (pH 7.4)、及び 2.0 μ mol/l プロゲステロンを含有するアッセイ混合物に懸濁させた。超音波処理後に、100 nmol/l の [³H]アンドロステジオン (25.3 ci/mmol, NET-962; Perkin-Elmer, Inc.) を添加し、混合物を室温で 10 分間インキュベートした。次に NADPH を最終濃度 1.2 mmol/l まで添加した後、37°C でインキュベートし、等容量の 5% トリクロ酢酸を添加した。上清を回収し、等容量のクロロホルムで抽出した。アッセイ混合物にデキストラン被覆炭を添加した後、ボルテックスし、6,500 x g で 40°C で 15 分間遠心分離した。次に、上清をシンチレーション液に加え、シンチレーションカウンター (Perkin-Elmer) で測定した。データは、1 時間あたりに、タンパク質 1 mg あたりに生成された E₁ の f モル数で示した(21)。

統計解析。足場非依存性増殖アッセイを用いた用量反応性の実験は quadruplicate で実施した。細胞周期進行、カスパーゼ 3/7 活性、アロマトラーゼ活性及び遺伝子発現プロファイリングの実験は triplicate で実施した。データは平均値 \pm SD で表した。対照群と処理群の間の統計的有意差を 2 標本の Student の t 検定により評価した。P<0.05 が統計的有意差を示すものとみなした。さらに、複数の処理群の比較で得られたデータを、分散分析 (ANOVA) 及び $\alpha=0.05$ を閾値とする事後検定としての Dunnett の検定を用いて分析した (Microsoft Excel 2013 XLSTAT-Base ソフトウェア)。

結果

足場非依存性増殖に対する TNM の影響。図 1 のデータは、E₂ により促進される足場非依存性コロニー数の TNM 用量依存的な減少を示している。

表 II. MCF-7^{AROM}細胞における TNM による細胞周期進行の阻害

処理	濃度 (μg)	細胞周期の段階		
		% G ₁	% S	% G ₂
対照	-	63.2 \pm 1.5	26.2 \pm 0.6 ^a	9.1 \pm 0.5
TNM	10	50.2 \pm 1.6	42.5 \pm 0.5 ^b	6.7 \pm 0.4
Δ 対照		-20.6%	+63.2%	-26.4%

結果は平均値 \pm SD (各処理群 n=3) で示した。
^{a,b}P=0.04。データは 2 標本の Student の t 検定で分析した。
 TNM : タヒボ NFD まるごと、SD : 標準偏差。

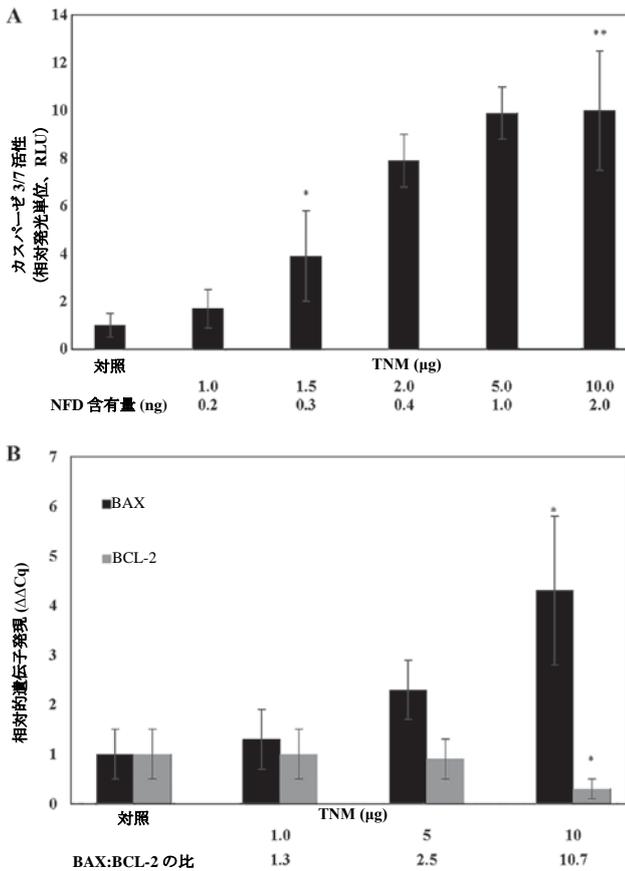


図 2. (A) MCF-7^{AROM}細胞におけるタヒボ NFD まるごと (TNM) によるカスパーゼ活性の誘導。TNM での処理により、カスパーゼ 3/7 活性は用量依存的に増加する。結果は RLU 平均値 \pm SD (各処理群 n=3) で示した。データは ANOVA 及び Dunnett の検定により分析した。非処理対照 < 1.5 μg TNM^{*}、非処理対照 < 10 μg TNM^{**} ($\alpha=0.05$)。TNM : タヒボ NFD まるごと、NFD : ナフトフランジオン、RLU : 相対発光単位、SD : 標準偏差、ANOVA : 分散分析。(B) タヒボ NFD まるごと (TNM) による MCF-7^{AROM}細胞におけるアポトーシス関連遺伝子の発現調節。TNM での処理により、BAX 遺伝子の発現はアップレギュレートされ、BCL-2 遺伝子の発現はダウンレギュレートされる。結果は相対的遺伝子発現 ($\Delta\Delta\text{Cq}$) 平均値 \pm SD (各処理群 n=3) で示す。データは 2 標本の Student の t 検定で分析した。BAX : ^{*}P=0.01、非処理対照との比較。BCL-2 : ^{*}P=0.02、非処理対照との比較。TNM : タヒボ NFD まるごと、BAX : BCL-2 結合 X タンパク質、BCL-2 : B 細胞リンパ腫 2、SD : 標準偏差。

これらのデータから、E₂で処理した対照との比較で、IC₅₀は 5 μg TNM ($\alpha=0.05$)、IC₉₀は 20 μg TNM ($\alpha=0.05$) と同定された。これらの濃度での TNM の NFD 含有量はそれぞれ 1.0 ng 及び 4.0 ng と推定された。

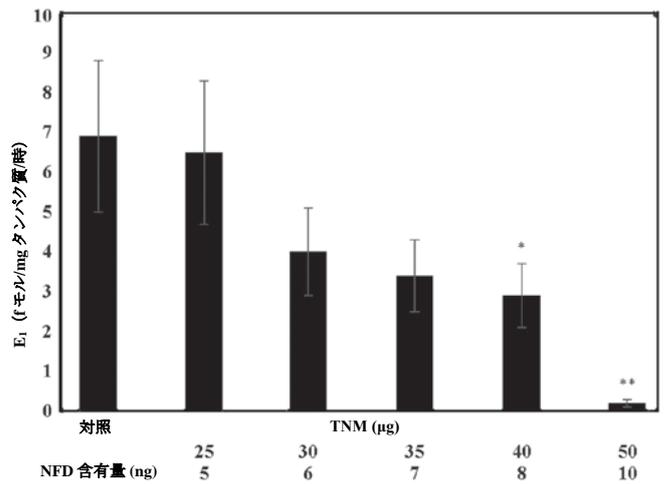


図 3. MCF-7^{AROM}細胞におけるタヒボ NFD まるごと (TNM) によるアロマトーゼ活性の阻害。TNM での処理により、アロマトーゼ活性は用量依存的に阻害される。結果は生成された E₁ (fモル/mgタンパク質/時) 平均値 \pm SD (各処理群 n=3) で示した。非処理対照 > 40 μg TNM^{*} ($\alpha=0.05$)、非処理対照 > 50 μg TNM^{**} ($\alpha=0.05$)。データは ANOVA 及び Dunnett の検定により分析した。TNM : タヒボ NFD まるごと、NFD : ナフトフランジオン、E₁ : エストロン、ANOVA : 分散分析、SD : 標準偏差。

細胞周期進行に対する TNM の影響。表 II に示すデータは、MCF-7^{AROM}細胞の細胞周期進行に対する TNM の影響を検討したものである。最大細胞増殖抑制濃度である 10 μg の TNM では、非処理対照と比較して、細胞周期の S 期で停止した細胞は 63.2%であった (P=0.04)。G₁ 期及び G₂ 期における阻害は小さくなく、統計的有意性はみられなかった。

TNM によるアポトーシス促進活性の誘導。TNM での処理による細胞のアポトーシスの誘導を、カスパーゼ 3/7 活性の状態のモニタリングにより検討した。TNM での処理に反応して、カスパーゼ 3/7 活性は用量依存的な増加を示した (図 2A)。すなわち、非処理対照と比較して、1.5 μg 、5 μg 及び 10 μg の TNM はそれぞれ、カスパーゼ 3/7 活性の 2.9 倍 ($\alpha=0.05$)、8.9 倍 ($\alpha=0.05$) 及び 9 倍 ($\alpha=0.05$) の増加を示した。

分子レベルでは、TNM 処理によりアポトーシス促進性の BAX 遺伝子発現は用量依存的に増加し、抗アポトーシス性の BCL-2 遺伝子発現は逆に減少した。すなわち、10 μg の TNM による処理では、それぞれの非処理対照と比較して、アポトーシス促進性の BAX の発現は 3.3 倍増加し (P=0.01)、抗アポトーシス性の BCL-2 の発現は 70%減少した (P=0.02)。このアポトーシス関連遺伝子の発現の相反的調節 (reciprocal modulation) の結果、BAX : BCL-2 の比は上昇した (図 2B)。

TNM によるアロマトーゼ活性の阻害。TNM での処理に反応して、MCF-7^{AROM}細胞は、アンドロステンジオンの E₁ への変換の程度を指標とするアロマトーゼ活性の用量依存的な阻害を示した。すなわち、30、40 及び 50 μg の TNM 処理により、非処理対照と比較して、アロマトーゼ活性の 42% ($\alpha=0.05$)、57.9% ($\alpha=0.05$) 及び 97.1% ($\alpha=0.05$) の低下が示された (図 3)。

表 III. MCF-7^{AROM} 細胞における TNM 及び LET によるアロマターゼ阻害の有効性の比較

処理	濃度	アロマターゼ活性 (E ₁ f モル/mg タンパク質/時)	阻害 (対照に対する割合 [%])
対照	-	6.9±0.4 ^a	-
TNM (40 µg)	8 ng NFD	2.5±0.1 ^b	63.8
LET (1 µM)	285 ng	2.6±0.1 ^b	62.3

結果は平均値 ± SD (各処理群 n=3) で示した。^{a,b}P=0.04。データは 2 標本の Student の t 検定で分析した。E₁: エストロン、TNM: タヒボ NFD まるごと、LET: レトロゾール、NFD: ナフトフランジオン、SD: 標準偏差。

表 IV. MCF-7^{AROM} 細胞における TNM 及び EXM によるアロマターゼ阻害の有効性の比較

処理	濃度	アロマターゼ活性 (E ₁ f モル/mg タンパク質/時)	阻害 (対照に対する割合 [%])
対照	-	6.9±0.30 ^a	-
TNM (100 µg)	20 ng NFD	0.1±0.08 ^b	98.5
EXM (10 µM)	2,960 ng	0.2±0.10 ^b	97.1

結果は平均値 ± SD (各処理群 n=3) で示した。^{a,b}P=0.01。データは 2 標本の Student の t 検定で分析した。E₁: エストロン、TNM: タヒボ NFD まるごと、EXM: エキセメスタン、NFD: ナフトフランジオン、SD: 標準偏差。

TNM、LET 及び EXM によるアロマターゼ活性の阻害の比較。アロマターゼ活性の阻害に関する TNM と LET の有効性の比較の結果、非処理対照と比較した、40 µg の TNM (NFD 含有量 8 ng) による阻害の程度 63.8%

(P=0.04) は、285 ng (1 µM) の LET による 62.3% の阻害 (P=0.04) と実質的に同程度であった (表 III)。

アロマターゼ活性の阻害に関する TNM と EXM の有効性の比較を表 IV に示す。これらのデータから、非処理対照と比較した、100 µg の TNM (NFD 含有量 20 ng) による阻害の程度 98.5% (P=0.01) は、2,960 ng (10 µM) の EXM による 97.1% の阻害 (P=0.01) と実質的に同程度であった。

TNM による E₂ 制御標的遺伝子発現の阻害。ESR-1

(ER-α の遺伝子)、AROM 及び PR 遺伝子の発現に対する TNM の影響から得られたデータを図 4A に示す。ESR-1 に関する 10 µg の TNM での阻害の程度は 90% (P=0.01) であり、AROM に関しては 61% (P=0.04)、PR に関しては 61% (P=0.04) であった。このように、TNM での処理の結果、E₂ により制御される特定の遺伝子の発現が大幅にダウンレギュレートされた。

TNM による E₂ 反応性遺伝子発現の阻害。図 4B に示すデータは、特定の E₂ 反応性遺伝子の発現に対する TNM の影響を検討したものである。pS2 に関する 10 µg の TNM での阻害の程度は 62% (P=0.04) であり、GRB2 に関しては 61% (P=0.04)、サイクリン D1 に関しては 82% (P=0.01) であった。このように、TNM 処理の結果、E₂ 反応性遺伝子発現が大幅にダウンレギュレートされた。

考察

転移性乳癌は、米国における女性の癌関連死亡の主要な原因である(22)。閉経後乳癌の ER-α 陽性、アロマターゼ発現 Luminal A サブタイプはアロマターゼ阻害

薬に反応する(6,10)。しかし、長期治療はしばしば耐性獲得を伴い、これは有効性にマイナスの影響を及ぼし、疾患進行を促進する。

今回使用した MCF-7^{AROM} モデル以外に、ヒト乳癌由来の MCF-7 及び T47D 細胞株から、アロマターゼ遺伝子を安定的に導入したその他の細胞モデルが作成されている。これらのモデルは、アロマターゼ阻害薬の効果を検証するため、また AI ベースの内分泌療法に対する耐性の機序を調べるために利用されている。例えば、MCF-7^{AROM} 細胞はフルベストラントに対して耐性を示し、レトロゾール、アナストロゾール、エキセメスタンに対して交差耐性を示している(9)。また、T47D^{AROM} 細胞はレトロゾールに対して耐性を示し、抗黄体ホルモンに対して感受性を示している(23)。さらに、AI 耐性は HER-2 発現のアップレギュレーションを伴うことが文献に記載されている(10)。総合すると、これら 3 つの細胞モデルは、有効なアロマターゼ阻害薬を同定するための、また、アロマターゼ阻害薬に対する耐性獲得の分子機構を調べるための、有用な実験的アプローチをもたらす。

非毒性の天然栄養製品が内分泌療法耐性の閉経後乳癌の試験可能な代替療法となる可能性があり(17,18, 28-31)、したがって、現行のアロマターゼ阻害薬ベースの治療法にみられる臨床的制約に対する治療選択肢を提供する可能性がある(2,3,6,9,10)。Tabebuia 属の 2 つの種に抗癌活性が実証されている。T. avellanadae 及び T. chrisantha の抗癌効果は、前臨床異種移植モデル(13)及びエールリッヒ腹水癌担癌マウス(24)において記録されている。伝統医学における TA の使用については十分な記録がない。しかし、TA の水抽出物の効果は、進行した転移期の多臓器部位の癌を有する患者の生活の質の状態に関して試験されている(25)。さらに、頭頸部癌及び肺転移患者に対する TA のキノン NFD の効果が文献に記載されている(26)。

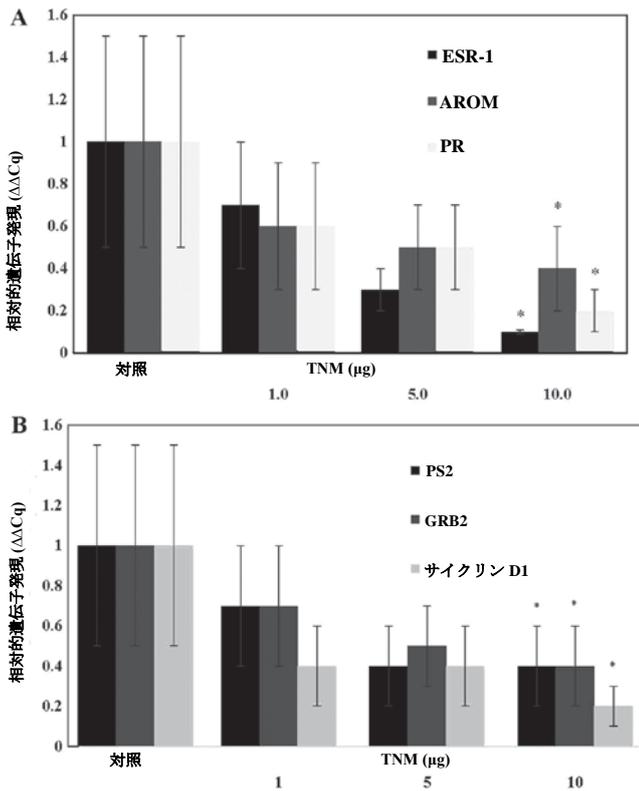


図 4. (A) MCF-7^{AROM} 細胞におけるタヒボ NFD まるごと (TNM) によるエストロゲン制御遺伝子発現の阻害。TNM での処理により、ESR-1、AROM 及び PR 遺伝子の発現はダウンレギュレートされる。結果は相対的遺伝子発現の平均値 (ΔΔCq) ± SD (各処理群 n=3) で示した。ESR-1: 非処理対照 >10 µg TNM* (α=0.05)、AROM: 非処理対照 >10 µg TNM* (α=0.05)、PR: 非処理対照 >10 µg TNM* (α=0.05)。データは ANOVA 及び Dunnett の検定により分析した。TNM: タヒボ NFD まるごと、ESR-1: ER-α の遺伝子。(B) MCF-7^{AROM} 細胞におけるタヒボ NFD まるごと (TNM) によるエストロゲン反応性遺伝子発現の阻害。TNM での処理により、PS2、GRB2 及びサイクリン D1 遺伝子の発現はダウンレギュレートされる。結果は相対的遺伝子発現 (ΔΔCq) の平均値 ± SD (各処理群 n=3) で示した。PS2: 非処理対照 >10 µg TNM* (α=0.05)、GRB2: 非処理対照 >10 µg TNM*、サイクリン D1: 非処理対照 >10 µg TNM*。データは ANOVA 及び Dunnett の検定により分析した。ESR-1: エストロゲン受容体 α の遺伝子、AROM: アロマトーゼ、PR: プログステロン、SD: 標準偏差、TNM: タヒボ NFD まるごと、PS2: エストロゲン反応性遺伝子、GRB2: 増殖因子受容体結合タンパク質 2、ANOVA: 分散分析、SD: 標準偏差。

本研究における実験は、閉経後乳癌のアロマトーゼ発現 Luminal A サブタイプの細胞モデルに対する TNM の非分画水抽出物の増殖阻害効果を調べるためにデザインされた。

ER-α 陽性ヒト乳癌由来の MCF-7 細胞株は、*in vitro* での足場非依存性増殖及び *in vivo* での腫瘍形成を E₂ に依存している。この *in vitro* エンドポイントと *in vivo* エンドポイントは強力な正の相関を示す(27)。したがって、AI コロニーの数を測定するこの *in vitro* エンドポイントは、癌リスクの代替 (surrogate) エンドポイントバイオマーカーとなる。MCF-7^{AROM} 細胞における TNM での処理に反応して、E₂ により促進される足場非依存性コロニー数は減少した。この点から、機構的に異なるいくつかの栄養ハープが MCF-7 細胞における足場非依存性コロニー形成に阻害効果を示し (28-31)、乳癌リスク低減の潜在的有効性が示唆されたことは注目される。

機構レベルでは、TNM の抗増殖効果は S 期停止の誘導及び結果としての細胞周期進行の阻害によって証明された。TNM のアポトーシス促進効果は、カスパーゼ 3/7 活性の用量依存的誘導によって証明された。アポトーシス促進性の BAX 遺伝子及び抗アポトーシス性の BCL-2 遺伝子は、ミトコンドリアの内因性アポトーシスにとって重要である(32)。TNM 処理により、アポトーシス促進性の BAX 遺伝子の発現は用量依存的に増加し、抗アポトーシス性の BCL-2 遺伝子の発現は減少した。これらの遺伝子の mRNA 発現の相対的調節を示すこれらのデータは、本研究で用いた MCF-7^{AROM} モデルにおける TNM のアポトーシス促進効果を裏付ける機構の手がかりとなる。E₂ 媒介性シグナル伝達経路において、pS2、GRB2 及びサイクリン D1 は古典的な E₂ 反応性標的遺伝子の代表である(11,12)。したがって、総合すると、E₂ 制御の ESR-1 (ER-α の遺伝子)、PR 及び AROM 遺伝子並びに E₂ 反応性の pS2、GRB2 及びサイクリン D1 遺伝子に対する TNM の阻害効果は、ER シグナル伝達経路を介した TNM の有効性の潜在的分子標的に関する機構の手がかりとなる。

アロマトーゼの薬理的阻害薬による長期治療はしばしば全身毒性及び薬剤耐性の獲得を伴い(2,3,6,10)、これは治療抵抗性幹細胞の発現につながる。対照的に、自然由来の TNM では全身毒性が低く、アロマトーゼ活性の薬理的阻害薬により誘導される薬剤耐性は生じないと思われる。アロマトーゼ活性に対する TNM の阻害効果は、MCF-7^{AROM} 細胞におけるアンドロステンジオンの E₁ への変換を用量依存的に減少させるその能力によって証明される。この効果の特異性は、2つの薬理的な選択的アロマトーゼ阻害薬 LET 及び EXM によるアロマトーゼ阻害の誘導によって示される。この点から注目すべきこととして、濃度 4 µg の TNM (NFD 含有量: 8 ng) は 285 ng の LET と実質的に同等なアロマトーゼ阻害を示す。したがって、TNM の NFD 含有量に基づく、LET では 35.6 倍の濃度が必要であり、これは TNM の効力が 35.6 倍であることを示す。さらに、濃度 100 µg の TNM (NFD 含有量: 20 ng) は 2,960 ng の EXM と実質的に同等なアロマトーゼ阻害を示す。したがって、TNM の NFD 含有量に基づく、EXM では 148 倍の濃度が必要であり、これは TNM の効力が 148 倍であることを示す。また、レスベラトロールやエラジタンニンの由来物質などの天然製品からの抽出物に抗アロマトーゼ活性が記録されていることも注目される(33,34)。さらに、スルフォラファン、ベンジルイソチオシアネート、ビタミン A 誘導体オールトランスレチノイン酸及びテルペノイドカルノソール (terpenoid carnosol) などの天然製品は癌幹細胞を標的とすることが文献に記載されている(35-37)。

本研究のデータにより、TNM が媒介する抗アロマトーゼ活性に関与する潜在的な機構の手がかりがいくつか確認された。例えば、臨床で用いられるアロマトーゼ阻害薬の LET はアロマトーゼ酵素の活性部位に結合し、EXM はアロマトーゼ酵素の基質アナログとして機能する(1)。TA は、ESR-1 及び E₂ 代謝酵素 CYP1A1 と CYP1B1 (17)、並びに ER-α をダウンレギュレートし、そのリガンドとして E₂ はアロマトーゼ発現

を誘導する(38)。このように、TNMが媒介するER- α 遺伝子 *ESR1* 及び *AROM* の阻害は、TNMが上記の機構の1つ以上を介して効果を示す可能性を提起する。

現時点では、TNMの有効成分の有効性を裏付ける直接的な証拠は不確かである。しかし、公表された証拠により、動物モデルにおけるNFDの抗癌活性が証明されている(13)。NFDに加えて、別のキノンである β -lapachone (β -LAP)が、TA及びTNMの非分画水抽出物中に微量に存在することが証明されている。この微量成分は、より高い薬理学的濃度で、臓器部位の上皮癌の前臨床異種移植モデルにおいて異なる分子機構を介して抗癌活性を示す(15,16,39-41)。しかし、使用した低濃度のTA又はTNMでは、 β -LAPの濃度は実質的に検出不能なレベルに留まることを認識することが重要である(42)。

本研究のデータにより、ヒト癌の細胞モデルにおけるTNMの阻害効果に関する潜在的な機構の手がかりがいくつか確認された。これらの手がかりには、RBシグナル伝達経路の調節、サイクリン依存性キナーゼの阻害、Cdcデュアルホスファターゼの阻害、シクロオキシゲナーゼ-2の阻害、テロメラーゼの阻害、並びに細胞周期進行、細胞のアポトーシス及びホルモン代謝に参与するいくつかの遺伝子の全体的発現のダウンレギュレーションが含まれる(14-18)。このように、総合すると、これらの一連の証拠は、本研究のモデルにおけるTNMの有効性はそのNFD含有量による可能性が高いという潜在的な手がかりを提供する。

結論として、本研究で提示したデータは、アロマターゼ発現閉経後乳癌の細胞モデルにおけるTNMの増殖阻害活性の証拠を提供する。より重要なこととして、これらのデータから、TNMは臨床で用いられるアロマターゼ阻害薬の代わりとなる優れた自然由来製品であるという概念実証としての機構の手がかりが確認される。全体として、本研究は、抗アロマターゼ活性を示すその他の天然製品の機構的評価のための実験的アプローチを検証するものである。この点で、この細胞培養研究におけるTNMの有効性の強力な機構の手がかりから、TNMの使用に関する臨床に応用可能な (clinically translatable) 治療上の証拠を提供するためにデザインされた将来の実験的アプローチが特定される。これらのアプローチには、腫瘍増殖に対するTNMの効果、及びE₂媒介性シグナル伝達経路に関連した腫瘍の分子的特性に対するTNMの効果を検証するための、MCF-7^{AROM} 移植モデルを用いた実験が含まれる。また、本前臨床研究の臨床への応用可能性 (clinical translatability) のため、TNMの吸収・分布・代謝・排泄 (ADME) に関する臨床データ及びTNMのヒトにおける安全性、忍容性及び有効性のデータを得るための実験により、有益な情報が得られると思われる。

謝辞

該当なし。

資金提供

本研究の主要な資金援助は、タヒボジャパン株式会社

(Taheebo Japan, Co., Ltd.、大阪)、並びに Randall and Barbara Smith Foundation 及び Sophie Stenbeck Family Foundation を通じた American Foundation for Chinese Medicine への慈善寄付から得た。

データ及び資料の入手

本研究で使用及び/又は分析したデータは、合理的な要請に応じて連絡先の著者から入手可能である。

著者の貢献

NTは研究デザインを考案し、実験のプロトコルを作り、原稿を作成した。HBNはすべての実験を実施し、データをまとめて分析し、原稿の作成に参加した。GYCWは検査薬を選択し、データの解釈及び原稿の作成に貢献した。すべての著者が最終原稿を読み、承認した。

倫理的承認と参加の同意

該当なし。

公表に関する患者の同意

該当なし。

競合する利益

著者らは、競合する利益がないことを宣言する。

参考文献

1. Johnston SRD and Dowsett M: Aromatase inhibitors for breast cancer: Lessons from the laboratory. *Nat Rev Cancer* 3: 821-831, 2003.
2. Ali S and Coombes RC: Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* 2: 101-112, 2002.
3. Ma CX, Reinert T, Chmielewska I and Ellis MJ: Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Nat Rev Cancer* 15: 261-275, 2015.
4. Ma CK, Gao F, Luo J, Northfeld DW, Goetz M, Forero A, Hoog J, Naughton M, Ademuyiwa F, Suresh R, *et al*: NeoPalAna: Neoadjuvant Palbociclib, a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, and Anastrozole for clinical stage 2 or 3 estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 23: 4055-4065, 2017.
5. Taglieri L, De Iulius F, Giuffrida A, Giantulli S, Silvestri I and Scarpa S: Resistance to the mTOR inhibitor everolimus is reversed by the downregulation of survivin in breast cancer cells. *Oncol Lett* 14: 3832-3838, 2017.
6. Brodie A, Jelovac D and Long BJ: Predictions from a preclinical model: Studies of aromatase inhibitors and antiestrogens. *Clin Cancer Res* 9: 455S-459S, 2003.
7. Boér K: Impact of palbociclib combinations on treatment of advanced estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor 2-negative breast cancer. *OncoTargets Ther* 9: 6119-6125, 2016.
8. Alves CL, Elias D, Lyng M, Bak M, Kirkegaard T, Lykkesfeldt AE and Ditzel HJ: High CDK6 protects cells from Fulvestrant-mediated apoptosis and is predictor of resistance to Fulvestrant in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 22: 5514-5526, 2016.
9. Hole S, Pedersen AM, Hansen SK, Lundqvist J, Yde CW and Lykkesfeldt AE: New cell culture model for aromatase inhibitor-resistant breast cancer shows sensitivity to fulvestrant treatment and cross-resistance between letrozole and exemestane. *Int J Oncol* 46: 1481-1490, 2015.

10. Sabnis G and Brodie A: Understanding resistance to endocrine agents: Molecular mechanisms and potential for intervention. *Clin Breast Cancer* 10: E6-E15, 2010.
11. Moy B and Goss PE: Estrogen receptor pathway: Resistance to endocrine therapy and new therapeutic approaches. *Clin Cancer Res* 12: 4790-4793, 2006.
12. O'Hara J, Vareslija D, McBryan J, Bane F, Tibbitts P, Byrne C, Conroy RM, Hao Y, Gaora PO, Hill ADK, *et al*: AIB1:ER α transcriptional activity is selectively enhanced in aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 18: 3305-3315, 2012.
13. Ebina T: Anti-tumor effect of hot water extract of Taheebo tea: Comparison with other biological preparations. *Biotherapy* 16: 321-327, 2002.
14. Brisson M, Nguyen T, Vogt A, Yalowich J, Giorgianni A, Tobi D, Bahar I, Stephenson CR, Wipf P and Lazo JS: Discovery and characterization of novel small molecule inhibitors of human Cdc25B dual specificity phosphatase. *Mol Pharmacol* 66: 824-833, 2004.
15. Choi YH, Kang HS and Yoo MA: Suppression of human prostate cancer cell growth by β -lapachone via down-regulation of pRB phosphorylation and induction of Cdk inhibitor p21 (WAF1/CIP1). *J Biochem Mol Biol* 36: 223-229, 2003.
16. Lee JH, Cheong J, Park YM and Choi YH: Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β -lapachone in human prostate carcinoma cells. *Pharmacol Res* 51: 553-560, 2005.
17. Mukherjee B, Telang N and Wong GYC: Growth inhibition of estrogen receptor positive human breast cancer cells by Taheebo from the inner bark of *Tabebuia avellanedae* tree. *Int J Mol Med* 24: 253-260, 2009.
18. Telang NT, Nair HB and Wong GYC: Efficacy of *Tabebuia avellanedae* extract on a cell culture model for triple negative breast cancer. *Cancer Res* 74 (Suppl): SABCS, P5-14-02, 2014.
19. Liu YG, Tekmal RR, Binkley PA, Nair HB, Schenken RS and Kirma NB: Induction of endometrial epithelial cell invasion and c-fms expression by transforming growth factor β . *Mol Hum Reprod* 15: 665-673, 2009.
20. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
21. Nair HB, Luthra R, Kirma N, Liu YG, Flowers L, Evans D and Tekmal RR: Induction of aromatase expression in cervical carcinomas: Effects of endogenous estrogen on cervical cancer cell proliferation. *Cancer Res* 65: 11164-11173, 2005.
22. American Cancer Society: Cancer facts and figures. American Cancer Society, Atlanta, GA, 2018.
23. Gupta A, Mehta R, Alimirah F, Peng X, Murillo G, Wiehle R and Mehta RG: Efficacy and mechanism of action of Proellex, an antiprogesterin in aromatase overexpressing and Letrozole resistant T47D breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 133: 30-42, 2013.
24. Panda SP, Panigrahy UP, Panda S and Jena BR: Stem extract of *Tabebuia chrysantha* induces apoptosis by targeting sEGFR in Ehrlich Ascites Carcinoma. *J Ethnopharmacol* 235: 219-226, 2019.
25. Bacowsky H: Investigations on effects of Taheebo extract on various blood parameters and quality of life in 12 patients suffering from different form of cancer in different stages. *J New Rem Clin* 55: 48-55, 2006.
26. Hirata S: An examination of supplement dose dependence and safety in integrative medicine for cancer: Based on the experience of *Tabebuia avellanedae*, a South American medicinal plant commonly known as Taheebo. *Int J Integr Med* 2: 140-144, 2010.
27. Lippman ME, Osborne CK, Knazek R and Young N: In vitro model systems for the study of hormone-dependent human breast cancer. *N Engl J Med* 296: 154-159, 1977.
28. Telang NT, Li G, Sepkovic DW, Bradlow HL and Wong GYC: Anti-proliferative effects of Chinese herb *Cornus officinalis* in a cell culture model for estrogen receptor-positive clinical breast cancer. *Mol Med Rep* 5: 22-28, 2012.
29. Telang N, Li G, Sepkovic D, Bradlow HL and Wong GYC: Comparative efficacy of extracts from *Lycium barbarum* bark and fruit on estrogen receptor positive human mammary carcinoma MCF-7 cells. *Nutr Cancer* 66: 278-284, 2014.
30. Telang N, Li G, Katdare M, Sepkovic D, Bradlow L and Wong G: Inhibitory effects of Chinese nutritional herbs in isogenic breast carcinoma cells with modulated estrogen receptor function. *Oncol Lett* 12: 3949-3957, 2016.
31. Telang NT, Li G, Katdare M, Sepkovic DW, Bradlow HL and Wong GYC: The nutritional herb *Epimedium grandiflorum* inhibits the growth in a model for the Luminal A molecular subtype of breast cancer. *Oncol Lett* 13: 2477-2482, 2017.
32. Tait SW and Green DR: Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 621-632, 2010.
33. Chottanapund S, Van Duursen MB, Navasumrit P, Hunsonti P, Timtavorn S, Ruchirawat M and Van den Berg M: Anti-aromatase effect of resveratrol and melatonin on hormonal positive breast cancer cells co-cultured with breast adipose fibroblasts. *Toxicol In Vitro* 28: 1215-1221, 2014.
34. Adams LS, Zhang Y, Seeram NP, Heber D and Chen S: Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. *Cancer Prev Res (Phila)* 3: 108-113, 2010.
35. Castro NP, Rangel MC, Merchant AS, MacKinnon G, Cuttitta F, Salomon DS and Kim YS: Sulforaphane suppresses the growth of triple negative breast cancer stem-like cells in vitro and in vivo. *Cancer Prev Res (Phila)* 12: 147-158, 2019.
36. Kim SH and Singh SV: Role of Krüppel-like factor4-p21^{CIP1} axis in breast cancer stem-like cell inhibition by benzyl isothiocyanate. *Cancer Prev Res (Phila)* 12: 125-134, 2019.
37. Telang N: Targeting drug resistant stem cells in a human epidermal growth factor receptor-2-enriched breast cancer model. *World Acad. Sci. J.* 1: 86-91, 2019.
38. Kinoshita Y and Chen S: Induction of aromatase (CYP19) expression in breast cancer cells through a nongenomic action of estrogen receptor α . *Cancer Res* 63: 3546-3555, 2003.
39. Woo HJ and Choi YH: Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by β -lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. *Int J Oncol* 26: 1017-1023, 2005.
40. Jeon YJ, Bang W, Shin JC, Park SM, Cho JJ, Choi YH, Seo KS, Choi NJ, Shim JH and Chae JI: Downregulation of Sp1 is involved in β -lapachone-induced cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 46: 2606-2612, 2015.
41. Bang W, Jeon YJ, Cho JH, Lee RH, Park SM, Shin JC, Choi NJ, Choi YH, Cho JJ, Seo JM, *et al*: Shim JH and Chae JI: β -lapachone suppresses the proliferation of human malignant melanoma by targeting specificity protein 1. *Oncol Rep* 35: 1109-1116, 2016.
42. Queiroz ML, Valadares MC, Torello CO, Ramos AL, Oliveira AB, Rocha FD, Arruda VA and Accorci WR: Comparative studies of the effects of *Tabebuia avellanedae* bark extract and β -lapachone on hematopoietic response of tumor bearing mice. *J Ethnopharmacol* 117: 228-235, 2008.