

Ehrlich 癌担癌マウスに対する米ぬかサプリメント MGN-3/ バイオブランの in vivo 抗腫瘍作用*

Nariman K. Badr El-Din

Department of Zoology, Faculty of Science, University of Mansoura, Mansoura, Egypt

Eman Noaman

Department of Radiation Biology, National Center for Radiation and Technology, Cairo, Egypt

Mamdooh Ghoneum

*Department of Otolaryngology, Drew University of Medicine and Science, 1621 E. 120th Street,
Los Angeles, California, USA*

本研究の目的は、修飾米ぬかアラビノキシランである MGN-3/バイオブランの in vivo における抗腫瘍活性を検討することである。Swiss albino マウスの右大腿部に Ehrlich 腹水癌 (EAC) 細胞を筋肉内注射した。固形 Ehrlich 癌 (SEC) 担癌マウスに対して、処置 8 日目に MGN-3 を腹腔内注射により投与した。MGN-3 の腫瘍増殖、サイトカイン産生およびアポトーシス作用を検討した。MGN-3 投与群では、腫瘍容積 (63.27%) および腫瘍質量 (45.2%) がコントロールと比較して非常に有意に小さかった ($P < 0.01$)。MGN-3 が抗腫瘍作用を発現するメカニズムには、MGN-3 のアポトーシスおよび免疫調整誘導能が関与しているようである。フローサイトメトリーおよび組織病理学的検査からは、MGN-3 によってアポトーシス SEC 細胞の割合が 1.8 倍増加することが示された。さらに、MGN-3 は血漿サイトカイン産生にも影響し、腫瘍壊死因子 α およびインターフェロン γ の濃度を増加させる一方で、免疫抑制サイトカインであるインターロイキン 10 の濃度を抑制した。また、データからは MGN-3 を筋肉内注射した非腫瘍担癌マウスではナチュラルキラー活性が 2 倍に増加することが示された。MGN-3 投与による副作用は認められず、すべてのマウスが正常な摂餌/飲水および生命活動パターンを示した。以上のデータは、MGN-3 を固形癌の治療に使用できる可能性を示唆するものである。

序 論

癌は世界各国で依然として最も高い死因であり、毎年六百万人以上が癌のために死亡している (1)。抗癌剤の投与によって癌細胞のアポトーシスが誘導されるが、多くの場合には毒性、免疫抑制作用、変異原性および癌原性がある (2~5)。過去の試験によって、ショウガ誘導體 (6)、*Allium sativum* (ニンニク) (7, 8)、ビタミン E (9)、漢方製剤 (PC SPES) (10)、タンパク質結合ポリ多糖 K (11)、酵母 (12~14) などの天然物質の中には抗腫瘍活性を有するものもあることが明らかにされている。このような研究により、MGN-3/バイオブランは抗癌剤のグループに入れることができる。MGN-3 は米ぬかから抽出され、シイタケ抽出物によって酵素処理されたアラビノキシランである (15)。これまでに MGN-3 が NK 細胞 (16~19)、T 細胞 (15)、B 細胞 (15) やマクロファージ (20) などのさまざまな免疫系を刺激する強力な生体反応物質 (BRM) であることが報告されている。さらに、MGN-3 はアポトーシスの誘発に関与するヒト白血病細胞表面の CD95 受容

2007 年 1 月 29 日提出、2007 年 5 月 7 日最終稿受理。

*食物、栄養、癌に関する AICR/WCRF 国際研究学会 (2006 年 7 月、ワシントン) にて一部公開。

連絡先: Nariman K. Badr El-Din, Department of Zoology, Faculty of Science, University of Mansoura, Mansoura, 35516 Egypt. Phone:2010101-6511. E mail:na_ri_eg@yahoo.com

体を感作できる (21)。本研究では、MGN-3/バイオブランの *in vivo* 抗腫瘍活性およびサイトカイン産生、NK 細胞の活性に及ぼす影響を検討する。本研究によって得られたデータから、腫瘍担癌マウスに MGN-3 を腹腔内 (IP) および腫瘍内 (IT) 投与すると、腫瘍容積が有意に減少することが判明した。この現象を支持するメカニズムは、MGN-3 の免疫調整作用およびアポトーシス機能に関連するものと考えられる。これらのデータは、MGN-3 を固形癌の治療に使用できることを示唆するものである。

材料および方法

動物

体重 19~21 g の Swiss albino 雌性マウス (月齢 2 ヶ月) を 1 ケージあたり 5 匹ずつ一定温度下 (24 ± 2°C) で飼育した。明暗周期は 12 時間ごととした。マウスに標準的なキューブペレットおよび水を自由摂取させた。ペレットの組成はカゼイン (12.5%)、脂肪 (1.0%)、小麦粉 (80%)、ふすま (3.3%)、オリーブ油 (2.3%)、dl-メチオニン (0.5%)、ビタミン類および塩類混合物 (0.2%) および水 (0.2%) である。総熱量の比率はタンパク質 18%、炭水化物 73% および脂肪 9% である。ペレットは Misr Oil & Soap Company (エジプト、カイロ) から購入した。実際の摂餌量をモニタリングしたところ、重量 20 ± 2 g のマウス 1 匹あたり 1 日 4~5 g であった。

腫瘍細胞系

本研究では、2 系統の腫瘍細胞を用いた。Ehrlich 腹水癌 (EAC) 細胞 (エジプトのカイロ大学国立癌研究所から提供を受けた) は、細胞 2.5×10^6 個を週 1 回 IP 移植した。酵母人工染色体 1 (YAC-1) 細胞系 (Moloney 白血病ウイルス誘発性 A/Sn マウス起源 T 細胞リンパ腫) は ATCC (米国微生物系統保存機関、メリーランド州ロックヴィル) から入手し、NK 活性分析に用いた。

完全培地 (CM)

細胞培養には、10% 熱不活化ウシ胎児血清、2 mM グルタミンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシンおよび 100 µg/mL ペニシリンを添加した RPMI 1640 培地を用いた。

MGN-3

MGN-3 は米ぬか由来ヘミセルロースをシイタケ由来の複数の炭水化物加水分解酵素によって処理して得られたものである。MGN-3 の主な化学構造はアラビノキシランであり、主鎖にはキシロースが 1 つ、側鎖にはアラビノースが 1 つ付いている (15)。また、MGN-3 には β 1, 3-グルカン および活性化ヘミセルロースなどの多糖類が含まれている。純度および MGN-3 産生バッチ間の一貫性を保証するため、9 種類のパラメータをそれぞれに特異的な方法および基準で測定した (表 1)。

さらに、MGN-3／バイオブラン原料の有効な割合は、標準アントロン法により測定した(22)。本研究では、0.9%生理食塩水に溶解したMGN-3を固形Ehrlich癌(SEC)担癌マウスにIPまたはIT注射した(体重[BW]1kgあたり40mg)。MGN-3は大和薬品株式会社(東京)から入手した。

表 1 MGN-3 のバッチ間分析

パラメータ	試験方法	基準
外観	官能検査	薄茶色粉末
含水量	乾燥減量検査	<8.0
タンパク質	ローリー法	8.0 - 15.0%
灰分	乾燥灰分法	5.0 - 10.0%
炭水化物	アントロン法	65.0 - 80.0%
砒素 (As ₂ O ₃ として)	DDTC-Ag 法	<5.0 ppm
重金属 (Pb として)	重金属検査	<20.0 ppm
細菌数	標準細菌数計数法	<3.0 × 10 ³ CFU/g
大腸菌群	気体生成確認 - BGLB 培地	陰性

略語は以下の通り； DDTC：ジエチルジチオカルバミン酸、CFU：コロニー形成単位、BGLB：ブリアントグリーン乳糖胆汁

実験デザイン

腫瘍移植およびMGN-3 のIP/IT 注射

0 日目に EAC 細胞 0.2 mL (2.5×10^6 個) を Swiss albino 雌性マウスの下肢の右大腿部に筋肉内注射した。腫瘍細胞移植後、固形 Ehrlich 担癌マウス (腫瘍容積は 100 mm³ 以下) をランダムに以下の IP 投与群 2 群に分割した：1) リン酸緩衝食塩水 (PBS) の IP 投与を受ける固形癌担癌マウス (n=13)、および 2) MGN-3 の IP 投与を受ける固形癌担癌マウス (n=13)。同様に、IT 投与マウスも以下の 2 群に分割した：1) PBS の IT 投与を受ける固形癌担癌マウス (n=10)、および 2) MGN-3 の IT 投与を受ける固形癌担癌マウス (n=10)。各実験には非担癌マウスからなるコントロール群 (n=8) を含め、すべてのパラメータのベースラインとした。MGN-3 投与量は 40 mg/kg BW とし、1 回の注射 (0.1 mL) で投与した。IP 投与群のマウスは EAC 細胞接種後 8 日目から投与を開始し、3 週間にわたって 1 週間に 3 回投与した。IT 投与群のマウスは EAC 細胞接種後 11 日目から投与を開始し、5 週間にわたって 1 週間に 2 度投与した。

腫瘍容積 (TV) および腫瘍重量 (TW) の分析

デジタル式副尺付きカリパスを用いた TV の時間間隔測定は、EAC 細胞接種後 8 日目から 35 日目または EAC 細胞接種後 11 日目から 45 日目まで実施した。収集したデータを以下の式にしたがって変換し、腫瘍容積を求めた：TV (mm³) = 0.52AB²、ただし A は短軸、B は長軸の長さとする。35 日目の MGN-3 の IP 投与後にマウスを安楽死させ、固形癌を切除して TW を測定し、腫瘍の退縮を確認するために腫瘍の写真を撮影し、組織病理学的検査のための処理を実施した。

BW 変化

MGN-3 または PBS の IP 投与を受けた SEC 担癌マウスの BW 変化を検討した：(0 日目の初期 BW、35 日目の最終的な BW および正味の最終的な BW)。正味の最終的な BW = (最終的な BW - 腫瘍重量)。BW 増加は初期 BW と正味の最終的な BW との差として求めた。

アポトーシス (フローサイトメトリーにより測定)

フリーサイトメトリー分析を利用して、PBS または MGN-3 の IP 投与を受けた担癌マウス中のアポトーシス性癌細胞の割合を求めた。死細胞はフルオレセイン結合アネキシン V およびヨウ化プロピジウム法 (アネキシン V-FITC アポトーシス検出キット、BioVision Research Products、カリフォルニア州マウンテンビュー) により検出した。懸濁液中の細胞は、Tribukait らの手法 (23) にしたがって調製した。細胞は FACScan (Becton Dickinson、カリフォルニア州サンノゼ) によって取得し、Cell-Quest ソフトウェアにより分析した。

組織病理学的検査

MGN-3 または PBS の IP 投与を受けた SEC 担癌マウスにおけるアポトーシスの状態を評価するため、組織病理学的検査を実施した。腫瘍組織を 10% 中性緩衝ホルマリンで 24 時間以上固定化し、パラフィン切片 (4 μm 厚) 作製のための処理を行なうとともに、ヘマトキシリン-エオシン (H&E) で染色した。光学顕微鏡下で切片のアポトーシス変化を検討した。

サイトカインの分析

35 日目に非担癌マウス (コントロール群)、PBS の IP 投与を受けた担癌マウスおよび MGN-3 の IP 投与を受けた担癌マウスの 3 群から血漿を採取した。サンプリングの 16 時間前から絶食させ、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターフェロン γ (IFN- γ) およびインターロイキン 10 (IL-10) 濃度を測定した。サイトカイン濃度は、CytImmune Science Inc. (メリーランド州ロックヴィル) から入手したマウスサイトカイン特異的酵素免疫吸着分析キットを用いて測定した。

NK 細胞の検討

脾細胞の調製

非担癌マウスの大腿に MGN-3 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 1 日 1 回投与した。投与開始から 14 日後に頸椎脱臼により安楽死させた。脾臓を切除して CM 中で細かく切断し、混入している赤血球を室温 (27°C) で 20 秒間にわたり蒸留水で溶血させた。1 つの細胞懸濁液をハンクス平衡塩溶液 (HBSS) で 1 回洗浄し、細胞密度が 1×10^7 個/ml CM となるように再懸濁した。血球計数器および光学顕微鏡

を用いて細胞を計数した。

⁵¹Cr 放出分析による NK 活性の測定

NK 細胞の活性を測定するための標準 Cr 放出分析を以下のように採用した: 0.1 ml CM 中で YAC-1 腫瘍ターゲット細胞 (5×10^6 個) を 100 μ Ci のクロム酸ナトリウムを用いて 1 時間標識化した。腫瘍細胞を 5 ml HBSS 中で 4 回洗浄し、細胞 1×10^4 個を 96 ウェルの丸底 Linbro プレート (Linbro Chemical Co.、コネティカット州ハムデン) に分注した。エフェクター細胞を 4 ウェルに分注し、エフェクター: ターゲット (E:T) 比を 100:1、50:1、25:1 および 12.5:1 とした。37°C で 4 時間インキュベート後に、各ウェルの上清 0.1 mL を回収し、ガンマカウンター内でカウントした。放出されたアイソトープの割合は、以下の式にしたがって算出した。

$$\text{溶解率 (\%)} = \frac{(\text{実験的放出} - \text{自発的放出}) \times 100}{(\text{最大放出} - \text{自発的放出})}$$

細胞の収率または異なる細胞集団からの回収の変動に対処するため、溶解能の単位を用いた。殺されたターゲット細胞の割合 (y 軸) と E:T 比 (x 軸) のプロットを細胞集団の用量反応曲線とした。溶解単位 (LU) は用量反応曲線から推定したエフェクター細胞数とし、1 LU は溶解率が 15% となるのに必要なエフェクター細胞数に対応するものと定義した (16)。LU/ 1×10^7 は、エフェクター細胞一千万個中の LU 数である。

エフェクター - ターゲット結合分析

MGN-3 投与群およびコントロール群の両方において、既述の方法 (24) にしたがって脾臓 NK エフェクター細胞の YAC-1 ターゲット細胞との結合能を測定した。脾細胞 (1×10^5 個) を 1 ml CM 中で 5×10^5 個のターゲット細胞とともにインキュベートした。細胞混合液を 130 g で 10 分間遠心分離してペレットとし、4°C で 1 時間インキュベートした。ペレットを穏やかに懸濁し、細胞遠心分離スメアを調製して、ギムザ染色を行なった。200 個のリンパ球 (結合体および遊離リンパ球) を計数して、結合体の割合を求めた。

MGN-3 の副作用 (毒性)

マウスに MGN-3 による副作用が見られないかどうかを検討するため、投与期間中を通じて正常な摂餌/飲水周期および生命活動パターンの変化を毎日評価した。また、BW 変化も毎週記録した。

統計解析

サイトカイン濃度は平均土標準誤差として報告した。データは片側分散分析法の後で post hoc 検定による多重比較を実施して分析した。その他のデータの統計学的有意差は、Student の t 検定に

よって決定した。P<0.05 で有意とみなした。

結果

MGN-3 の副作用（毒性）

MGN-3 投与による潜在的な毒性の副作用を観察するため、マウスのモニタリングを行なった。投与期間中（35 日間）に予期しない死亡の副作用は認められなかった。また、MGN-3 の IP 投与群のマウスにおいて、最終的な BW が有意に増加した。

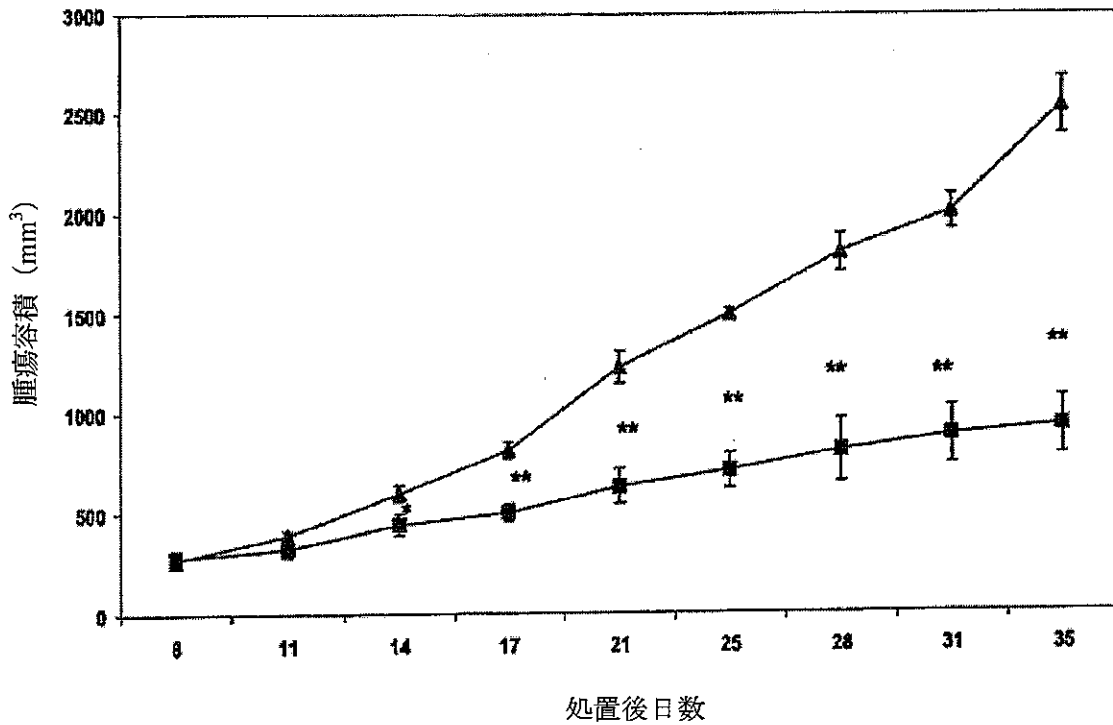
TV

MGN-3 の IP 投与

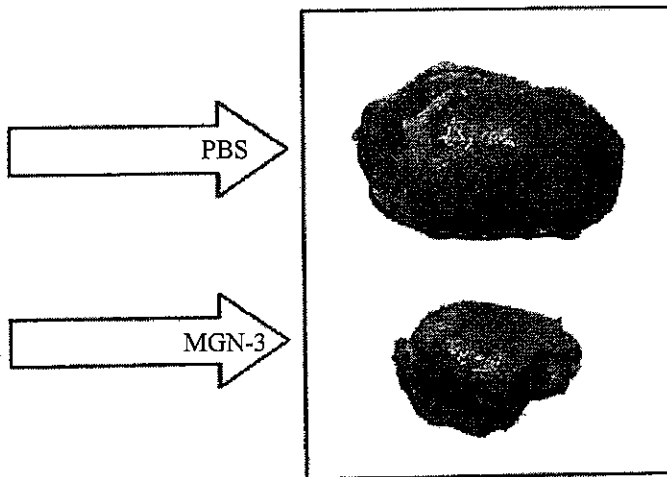
図 1A から、担癌マウスに MGN-3 を投与すると固形癌の進行が抑制され、この傾向は 14 日目という早い段階で有意となることが示された。35 日目までに MGN-3 投与群のマウス ($931.98 \pm 144.76 \text{ mm}^3$) と PBS 投与群のマウス ($2537.11 \pm 143.52 \text{ mm}^3$) とで TV の差異の割合 (%) が -63.27% に到達した (P<0.01)。MGN-3 投与群のマウスから切除した腫瘍の写真によると、PBS 投与群のマウスと比較して明白な腫瘍の退縮が認められた。検討したすべての群において、同程度の腫瘍退縮が認められた (図 1B)。

MGN-3 の IT 投与

MGN-3 が in vivo で抗腫瘍作用を示す代替経路を検討するため、IT 投与を実施した。図 2 から、MGN-3 の IT 投与によって 28 日目から腫瘍増殖が抑制されることが示された。TV の差異は 36 日目から有意となり、腫瘍増殖の遅延は -32.24% 、P<0.05 であった。MGN-3 投与群と PBS 投与群の担癌マウス間での TV の差異は、処置後 45 日目に -44.83% 、P<0.01 と非常に有意となった。



(a)



(b)

図1 A: MGN-3 の腹腔内投与が *in vivo* で腫瘍容積に及ぼす影響。マウスの右大腿部に Ehrlich 腹水癌細胞を接種した。腫瘍細胞接種後 8 日目に固形 Ehrlich 癌担癌マウスに対して MGN-3 を投与し (■)、8 日目から 35 日目まで腫瘍容積 (TV, mm³) の変化を測定した。図は TV (mm³) 変化の時間経過を示しており、結果をコントロールの PBS 投与担癌マウス (▲) と比較した。それぞれの値は平均±標準誤差である。†P<0.05、††P<0.01 (対応する時点の PBS 群と比較)。

B: PBS 投与担癌マウスおよび MGN-3 投与担癌マウスの腫瘍退縮。検討したすべての群の代表的なデータを示す。

TW

35 日目の実験終了時に検討した MGN-3 の IP 投与が TW に及ぼす影響を表 2 に示す。PBS 投与マウスの TW は 6.62 ± 0.38 g であった一方、MGN-3 投与群の TW は 3.63 ± 0.45 g であった。両群間の TW の差異は 45.2% であり、非常に有意であった ($P < 0.01$)。

BW

実験期間 (35 日間) にわたり、BW の変化を検討した。表 2 に示すように、MGN-3 を SEC 担癌マウスに IP 投与したところ、BW は +7.32% 有意に増加した ($P < 0.025$)。

MGN-3 の in vivo における抗腫瘍活性

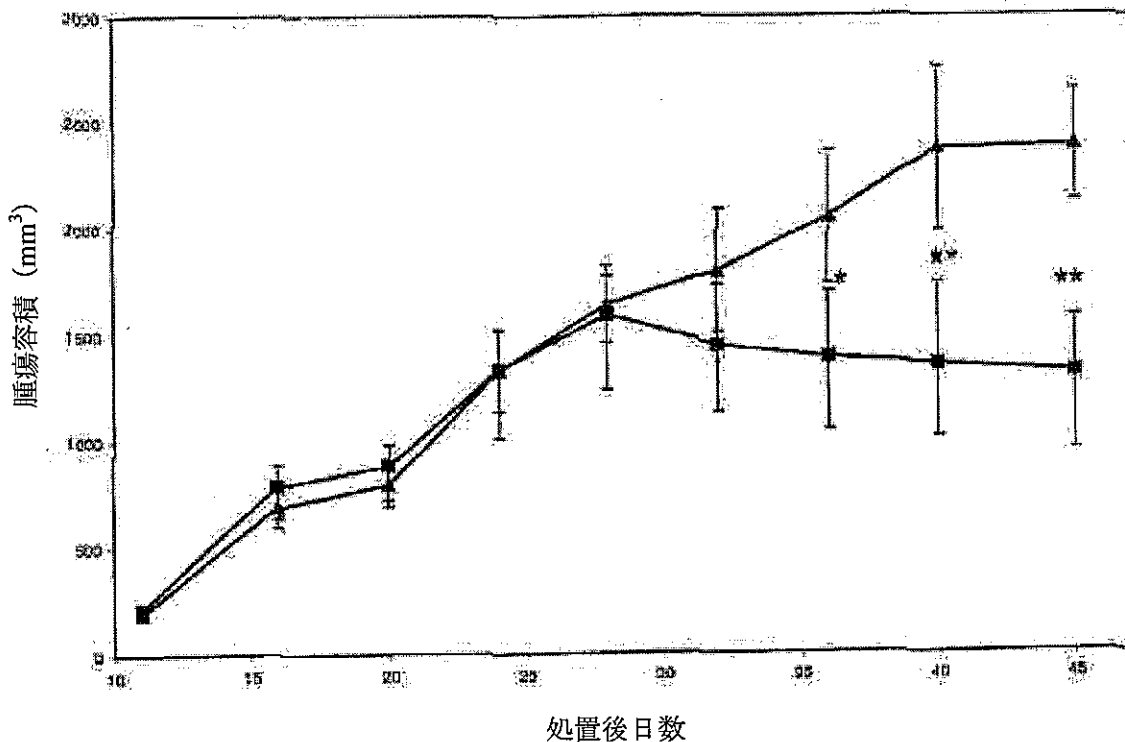


図 2 A : MGN-3 の腫瘍内投与が in vivo で腫瘍容積に及ぼす影響。マウスの右大腿部に Ehrlich 腹水癌細胞を接種した。腫瘍細胞接種後 11 日目に固形 Ehrlich 癌担癌マウスに対して MGN-3 を 40 mg/kg BW の濃度で 5 週間にわたって 1 週間に 2 度投与した (■)。11~45 日目に腫瘍容積 (mm³) の変化を測定し、結果をコントロールの PBS 投与担癌マウス (▲) と比較した。それぞれの値は平均±標準誤差である。† $P < 0.05$ 、†† $P < 0.01$ (対応する時点の PBS 群と比較)。

SEC のアポトーシス

フローサイトメトリー

表 3 のデータは、SEC 担癌マウスにおける 35 日目のアポトーシス細胞の割合を検討したフローサイトメトリー分析結果を示す。PBS 投与担癌マウスでは、アポトーシス細胞の割合が $42.61 \pm 5.56\%$ であった。MGN-3 の IP 投与によって、アポトーシス SEC 細胞の割合 ($74.68 \pm 4.22\%$) は有意に増加した。また、アポトーシス SEC 細胞の割合は 1.8 倍に増加した ($P < 0.0001$)。

組織病理学的検査

組織病理学的検査用の切片を用いて、MGN-3 を IP 投与後の投与担癌マウスにおけるアポトーシス細胞の有無を検討した。図 3A では、MGN-3 投与マウスにおけるアポトーシス腫瘍細胞の著しい増加が認められる。これに対して、PBS 投与 SEC 担癌マウスではそれぞれのアポトーシス細胞が散在しているだけであった (図 3B)。

サイトカイン濃度

MGN-3 の IP 投与が 35 日目の血漿中 TNF- α 、IFN- γ および IL-10 濃度に及ぼす影響を表 4 に示す。

TNF- α の血漿中濃度

表 4 のデータからは、コントロールの非担癌マウス ($1,100 \pm 10.4$ pg/mL) と PBS 投与担癌マウス ($1,146 \pm 16$ pg/mL) との間で TNF- α 濃度に有意差は認められない。しかしながら、MGN-3 投与によって、TNF- α 産生レベルが有意に増加した ($1,271.9 \pm 13.5$ pg/mL、 $P < 0.01$)。この値は SEC 担癌マウスと比較すると約 11% 高く、コントロールと比較すると約 15% 高い。

IFN- γ の血漿中濃度

PBS 投与担癌マウス (142.1 ± 10.6 pg/mL) では、コントロールの非担癌マウス (158.75 ± 19.82 pg/mL) と比較して IFN- γ 濃度に有意ではない差異が認められた。MGN-3 投与によって、血漿中 IFN- γ 濃度が増加した (404.1 ± 58.3 pg/mL、 $P < 0.01$)。この値は SEC 担癌マウスの血漿中 IFN- γ 濃度の 184.4%、コントロールの 154.54% である (表 4)。

IL-10 の血漿中濃度

表 4 のデータからは、免疫抑制サイトカインである IL-10 の血漿中濃度が PBS 投与担癌マウス (858.5 ± 140.9 pg/mL) ではコントロールの非担癌マウス (405.5 ± 25.0 pg/mL、111.71%) と比較

して2倍以上と劇的に増加することが判明した ($P < 0.01$)。MGN-3 投与によって血漿中 IL-10 濃度は 465.3 ± 30.0 pg/mL に増加したが、この濃度はコントロールの非担癌マウスと同等であった。

NK 細胞の検討

NK 細胞の活性

毎日の MGN-3 の IT 投与開始から2週間後に NK 細胞の活性を検討した。YAC-1 細胞をターゲットとしたところ、MGN-3 投与マウスではコントロールの未処理マウスと比較してさまざまな E:T 比で NK 細胞の活性が上昇した (図 4)。コントロールマウスおよび MGN-3 投与マウスでは各 E:T 比で有意な (2 倍の) 増加が検出され、E:T 比が 12.5:1 ではコントロールが 2.7%、MGN-3 投与マウスが 5.5%、25:1 ではコントロールが 5.1%、MGN-3 投与マウスが 13.6%、50:1 ではコントロールが 8.4%、MGN-3 投与マウスが 17.4%、100:1 ではコントロールが 10.6%、MGN-3 投与マウスが 22.1%であった。LU に関して算出した場合には、統計解析によって MGN-3 投与マウス (27.1 LU) でコントロール (8.3 LU) と比較して有意な NK 細胞の活性の増加が認められた ($P < 0.01$)。

結合形成の割合

MGN-3 投与が NK 細胞のターゲット腫瘍細胞との結合能に影響するかどうかを検討するため、MGN-3 投与マウスまたはコントロールマウスから得た NK 細胞を用いて YAC-1 腫瘍細胞との結合形成の割合を比較した。図 5 に示すように、MGN-3 投与マウスにおける結合形成細胞の割合 (27.5%) はコントロールマウス (14%) と比較して有意に高く ($P < 0.01$)、2 倍の増加が認められた。

表 2 MGN-3 の IP 投与が体重 (g) および腫瘍重量 (g) に及ぼす影響^a

群 パラメータ	担癌マウス	
	PBS	MGN-3
初期体重 (g, 0 日目)		
平均±標準誤差	20.21 ± 0.47	20.64 ± 0.51
マウス数	13/13	13/13
最終的な体重 (g, 35 日目)		
平均±標準誤差	26.67 ± 0.58	25.78 ± 0.54
マウス数	11/13	13/13
腫瘍重量 (g, 35 日目)		
平均±標準誤差	6.62 ± 0.38	3.63 ± 0.45^b
正味の最終的な体重 (g)	20.25 ± 0.48	22.15 ± 0.63^c
平均±標準誤差	-0.15 g	+1.51 g
体重増加量 (g)	(-0.79%)	(+7.32%)
初期体重からの変化率 (%)		

^a 略語は以下の通り；IP：腹腔内、PBS：リン酸緩衝食塩水
各値は対応するマウス/群の平均±標準偏差である。正味の最終的な体重 = (35 日目の最終的な体重 - 35 日目の腫瘍重量)、体重増加量 = (正味の最終的な体重 - 初期体重)

^b PBS 投与群と比較して $P < 0.01$ で有意

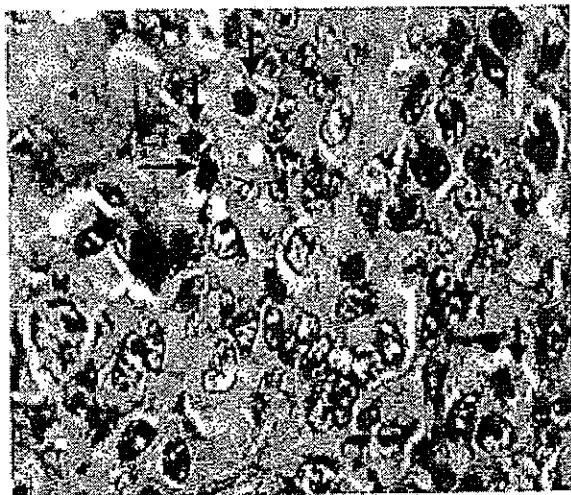
^c 初期体重と比較して $P < 0.025$ で有意

表3 MGN-3のIP投与が固形 Ehrlich 癌担癌マウスにおける腫瘍移植後35日目のアポトーシス細胞の割合に及ぼす影響（フローサイトメトリーにより測定）^a

群 パラメータ	担癌マウス	
	PBS	MGN-3
アポトーシス細胞の割合 (%)		
平均±標準誤差	42.61 ± 5.56%	74.68 ± 4.22%
コントロールとの変化率 (%)	-%	* 75.26%
有意性	-%	P<0.0001
マウス数	8	8

^a 略語は以下の通り；IP：腹腔内、PBS：リン酸緩衝食塩水

(A) MGN-3



(B) PBS

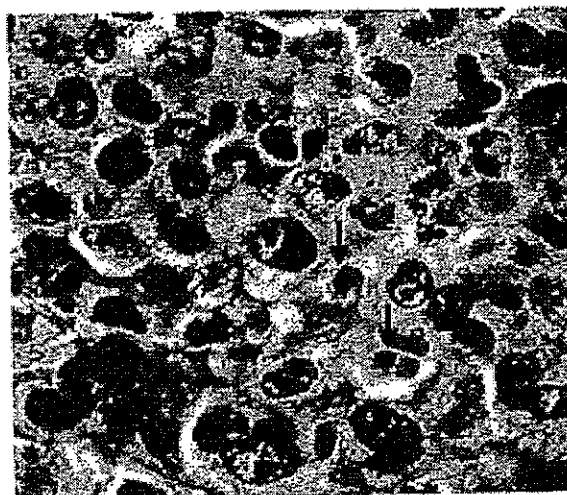


図3 固形 Ehrlich 癌担癌マウスの断面。A：MGN-3 投与群のマウスの腫瘍切片では、広範なアポトーシスが認められた。B：コントロールマウスの腫瘍切片では、数スポットのアポトーシス細胞を除き、大部分の腫瘍細胞が生存していた（倍率400倍、ヘマトキシリン-エオシン染色、矢印はアポトーシス細胞を示す）。PBS：リン酸緩衝食塩水

表4 MGN-3のIP投与が固形Ehrlich癌担癌マウスにおける腫瘍移植後35日目の血漿中サイトカイン濃度に及ぼす影響(フローサイトメトリーにより測定)^a

群 パラメータ	コントロール マウス(非担癌)	担癌マウス	
		PBS	MGN-3
TNF-α (pg/mL)			
平均±標準誤差	1,100 ± 10.4	1,146 ± 16	1,271.9 ± 13.5 ^{c,d}
変化率(%) ^b	-%	(4.17%)	(15.63%)
マウス数	8	11	10
IFN-γ (pg/mL)			
平均±標準誤差	158.75 ± 19.8	142.1 ± 10.6	404.1 ± 58.3 ^{c,d}
変化率(%) ^b	-%	-10.46%	154.54%
マウス数	8	11	10
IL-10 (pg/mL)			
平均±標準誤差	405.5 ± 25.0	858.5 ± 140.9 ^c	465.3 ± 30.0 ^d
変化率(%) ^b	-%	117.71%	14.75%
マウス数	8	11	10

^a 略語は以下の通り; IP:腹腔内、PBS:リン酸緩衝食塩水、TNF- α :腫瘍壊死因子 α 、IFN- γ :インターフェロン γ 、IL-10:インターロイキン10
^b 各値は記載されているマウス数の平均±標準偏差である。
^c コントロール群と比較した場合の変化率
^d コントロール群と比較してP<0.01で有意
^e PBS担癌マウス群と比較してP<0.01で有意

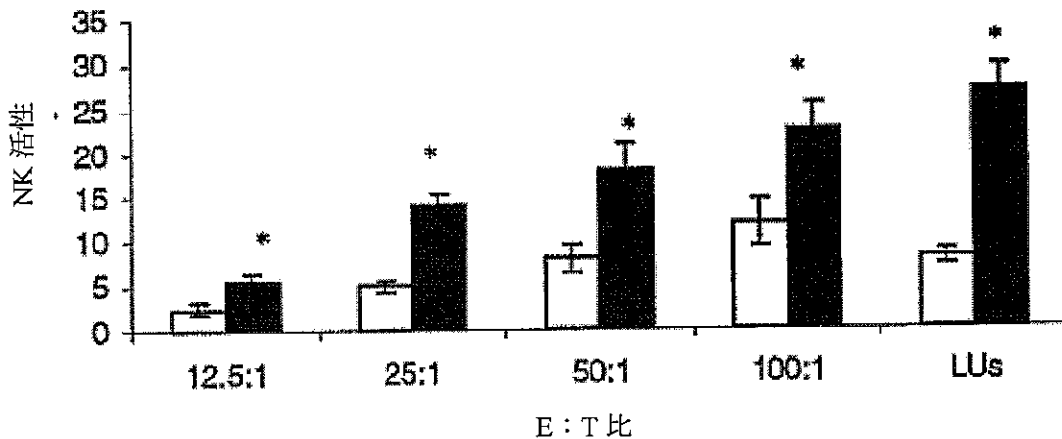


図4 MGN-3のナチュラルキラー(NK)活性に対するin vivoでの作用。非担癌マウスにMGN-3を2週間投与した。特異的NK活性を4時間のCr放出分析の平均として測定し、さまざまなエフェクター:ターゲット(E:T)比および溶解単位(LU)で示した。データは各群3匹の平均±標準偏差である。*未処置のコントロールマウスと比較してP<0.01

考察

本研究では、MGN-3 の腫瘍増殖に対する影響を SEC 担癌 Swiss albino マウスをモデルとして検討した。MGN-3 は *in vivo* で強力な抗腫瘍作用を示し、MGN-3 の IP および IT 投与後に有意な腫瘍退縮が認められた。MGN-3 が抗腫瘍作用を発現するメカニズムには、MGN-3 の免疫調整作用およびアポトーシス作用の両方が関与しているようである。腫瘍免疫学の観点から、腫瘍は宿主免疫系の回避能によって特徴付けられる (25~27)。Ehrlich 腫瘍は速やかに増殖する腫瘍であり、非常に攻撃的に振る舞う。Ehrlich 腫瘍は一連の免疫抑制性サイトカインを分泌することによって宿主免疫反応を回避できるが、その結果としてキラー細胞の免疫監視機構が機能しなくなる (25)。宿主の免疫監視機構は、腫瘍増殖の制御において役割を果たす (28, 29)。実際に、サイトカインネットワークの不均衡が腫瘍増殖に関連することを示す証拠に基づいて、腫瘍の根絶に適した状態にサイトカイン産生を調整する治療アプローチの基礎が確立されている (30)。

ここで示した結果から、MGN-3 が *in vivo* における TNF- α および IFN- γ の強力な誘導因子であることが判明した。この所見は、これまでにヒト末梢血リンパ球 (19)、マクロファージおよびマクロファージ細胞系 (20) を用いて *in vitro* で報告されていたものである。TNF- α および IFN- γ はいずれも、強力な抗腫瘍活性を示すことが知られている (31~33)。タイプ I インターフェロン (IFN- α および IFN- β) は肝細胞癌の治療に用いられる (34~36)。タイプ I IFN は IL-1、IL-6 および TNF- α 産生量の増加を介して NK 細胞 (37) および細胞溶解性 T 細胞 (38, 39) を活性化する (40~42)。さらに、MGN-3 は腫瘍によって誘発される免疫抑制性サイトカインである IL-10 の血漿中濃度の増加を下方制御する。この IL-10 については、Th1 細胞中では IL-2 や IL-3 など (43, 44)、Th2 細胞中では IL-4 や IL-5 など (30)、NK 細胞中では TNF- α や IFN- γ など (45, 46) のサイトカイン類の合成を阻害することが示されている。

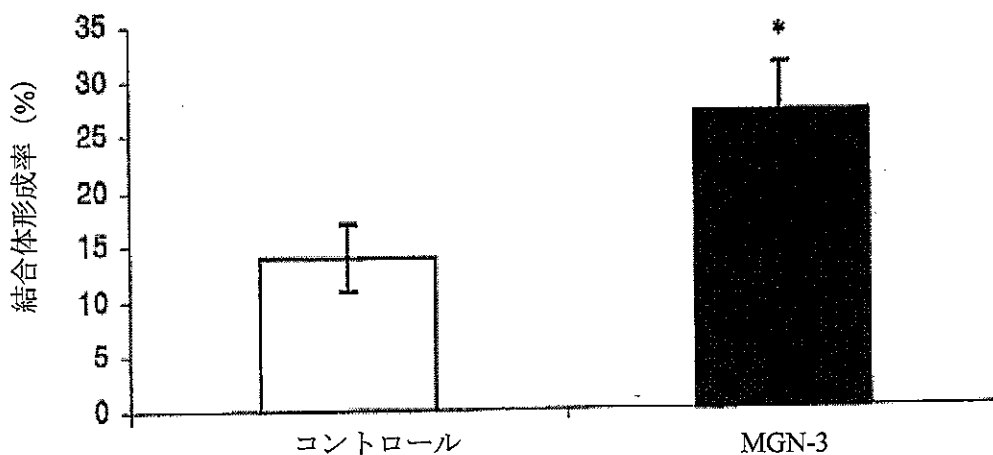


図5 MGN-3 を投与した非担癌マウスから採取したナチュラルキラー (NK) 細胞による YAC-1 ターゲット細胞との結合の程度。エフェクター細胞はコントロールおよび MGN-3 投与マウスから採取した。*未処置のコントロールマウスと比較して $P < 0.01$

MGN-3 が腫瘍を退縮させるもう一つのメカニズムは、MGN-3 が NK 細胞およびサイトカイン産生に対して及ぼす免疫調整作用を介した癌細胞のアポトーシス誘導である。NK 細胞は癌に対する免疫監視において重要な役割を果たし (46~48)、FasL を Fas 受容体に結合させてアポトーシスを誘導するなどのさまざまな経路を通じて腫瘍細胞などのターゲット細胞を殺すことが知られている (49~52)。過去の研究からは、正常なヒト (17、19) および癌患者 (18) において MGN-3 を経口投与、ならびに、高齢マウスにおいて MGN-3 を IP 投与 (16) すると、NK 細胞が活性化されることが示されている。本研究によって得られたデータからは MGN-3 を Swiss albino マウスの大腿部に筋肉内投与後にマウスの NK 細胞が活性化されることが証明され、これらの研究をさらに支持する。Takahara および Sano (53) によって化学療法を受けた癌患者に対して MGN-3 を経口投与すると NK 細胞の活性が上昇するが、化学療法単独を受けた患者と比較して余命が長くなることが証明されたことは興味深い。

同様に、MGN-3 は TNF- α および IFN- γ の産生量を増加させることにより、アポトーシス作用を発現するものと考えられる。タイプ I IFN は細胞周期の停止およびアポトーシスを誘発する (54~56)。また、IFN- γ および TNF- α はアポトーシスおよび壊死性の作用を通じて相乗的に癌細胞の細胞死を誘発することが示されている (57、58)。さらに、MGN-3 はアポトーシスの誘発に関与するヒト白血病細胞表面 CD95 受容体感作させることが示されており (21)、この天然産物が固形癌のアポトーシスにおいて直接的な役割を果たすことが示唆される。

抗癌治療薬は癌細胞におけるアポトーシスを誘導するが、ほとんどが毒性を保つ (2~5)。同様に、免疫調整に用いられる IL-2、IL-12、IL-15 およびインターフェロン類 (59~63) などの BRM についても、毒性のためにあまり成功していない。したがって、副作用の少ない新規の BRM が大いに必要とされている。MGN-3 は既知の副作用のない天然産物である。結論として、本研究の結果からは MGN-3 がマウスにおいて迅速かつ有意な腫瘍退縮を引き起こすことができるという重要な情報が得られた。この作用は MGN-3 の免疫調整作用およびアポトーシス誘導能に関係しているようである。これらのデータは、治療につながる *in vivo* 試験の基礎となるものと考えられる。

謝辞

本プロジェクトは、大和薬品株式会社 (東京) の資金援助を受けた。

参考文献

1. Abdullaev FI, Rivera-Luna R, Roitenburd-Belacortu V, and Espinosa-Aguirre J: Pattern of childhood cancer mortality in Mexico. *Arch Med Res* 31, 526-531, 2000.
2. Marty M, Mignot L, Gisselbrecht G, Morvan F, Gorins A, et al.: Teratogenic and mutagenic risks of radiotherapy: when and how to prescribe contraception. *Contracept Fertil Sex (Paris)* 13(Suppl), 181-186, 1985.
3. Mills KH, Grealley JF, Temperley JJ, and Mullins GM: Haematological and immune suppressive effects of total body irradiation in the rat. *Ir J Med Sci* 149, 201-208, 1980.
4. Sanderson BJ, Ferguson LR, and Denny WA: Mutagenic and carcinogenic properties of platinum-based anticancer drugs. *Mutat Res* 355, 59-70, 1996.
5. Sanin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Bellone S, Roman J, et al.: Effects of concurrent cisplatin administration during radiotherapy vs. radiotherapy alone on the immune function of patients with cancer of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48, 997-1006, 2000.
6. Lee E and Suh YJ: Induction of apoptosis in HL-60 cells by pungent vanilloids, [6]-gingerol and [6]-paradol. *Cancer Lett* 134, 163-168, 1998.
7. Lamm DL and Riggs DR: The potential application of *Allium sativum* (garlic) for the treatment of bladder cancer. *Urol Clin North Am* 27, 157-162, xi, 2000.
8. Fleischauer AT, Poole C, and Arab L: Garlic consumption and cancer prevention: meta-analyses of colorectal and stomach cancers. *Am J Clin Nutr* 72, 1047-1052, 2000.
9. Sigounas G, Anagnostou A, and Steiner M: dl-alpha-tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate, and breast cancer cells. *Nutr Cancer* 28, 30-35, 1997.
10. Halicka D, Ardeit B, Juan G, Mittelman A, and Chen S: Apoptosis and cell cycle effects induced by extracts of the Chinese herbal preparation PC SPES. *Int J Oncol* 11, 437-448, 1997.
11. Hattori TS, Komatsu N, Shichijo S, and Itoh K: Protein-bound polysaccharide K induced apoptosis of the human Burkitt lymphoma cell line, Namalwa. *Biomed Pharmacother* 58, 226-230, 2004.
12. Ghoneum M and Gollapudi S: Induction of apoptosis in breast cancer cells by *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro. *Anticancer Res* 24, 1455-1463, 2004.
13. Ghoneum M, Hamilton J, Brown J, and Gollapudi S: Human squamous cell carcinoma of the tongue and colon undergoes apoptosis upon phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro. *Anticancer Res* 25, 981-989, 2005.
14. Ghoneum M and Gollapudi S: Modified arabinosyloxylan rice bran (MGN-3/BioBran) enhances yeast-induced apoptosis in human breast cancer cells in vitro. *Anticancer Res* 25, 859-870, 2005.
15. Ghoneum M: Anti-HIV activity in vitro of MGN-3, an activated arabinosyloxylan from rice bran. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 25-29, 1998.
16. Ghoneum M and Abedi S: Enhancement of natural killer cell activity of aged mice by modified arabinosyloxylan rice bran (MGN-3/BioBran). *J Pharm Pharmacol* 56, 1581-1588, 2004.
17. Ghoneum M: Enhancement of human natural killer cell activity by modified arabinosyloxylan from rice bran (MGN-3). *Int J Immunother* 14, 89-99, 1998.
18. Ghoneum M and Brown J: NK immunorestitution of cancer patients by MGN-3, a modified arabinosyloxylan rice bran (study of 32 patients followed for up to 4 years). In *Anti-aging Medical Therapeutics, Volume III*, Klatz R, Goldman R (eds). Marina del Rey, CA: Health Quest Publications, 1999, pp. 217-226.
19. Ghoneum M and Jewett A: Production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma from human peripheral blood lymphocytes by MGN-3, a modified arabinosyloxylan from rice bran, and its synergy with interleukin-2 in vitro. *Cancer Detect Prev* 24, 314-324, 2000.
20. Ghoneum M and Matsuura M: Augmentation of macrophage phagocytosis by modified arabinosyloxylan rice bran (MGN-3/bioBran). *Int J Immunopathol Pharmacol* 17, 283-292, 2004.
21. Ghoneum M and Gollapudi S: Modified arabinosyloxylan rice bran (MGN-3/BioBran) sensitizes human T cell leukemia cells to death receptor (CD95)-induced apoptosis. *Cancer Lett* 201, 41-49, 2003.
22. Quanhuong L, Cailli F, Yukui R, Guanghui H, and Tongyi C: Effects of protein-bound polysaccharide isolated from pumpkin on insulin in diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutr* 60, 13-16, 2005.
23. Tribukait B, Moberger G, and Zetterberg A: Methodological aspects of rapid flow cytometry for DNA analysis of human urinary bladder cells. In *Pulse-Cytophotometry, Part I*. Ghent, Belgium: European press, Medicon, 1975, pp. 50-60.
24. Itoh K, Suzuki R, Umezaki Y, Hanaumi K, and Kumagai K: Studies of murine large granular lymphocytes: II. tissue, strain, and age distributions of LGL and LAL. *J Immunol* 129, 395-405, 1982.
25. Segura JA, Barbero LG, and Marquez J: Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunol Lett* 74, 111-115, 2000.
26. Piemonti L, Zerbi A, and Di Carlo V: Strategies for tumor immune escape. *Drugs Today (Bare)* 39, 701-724, 2003.
27. Queiroz ML, Valadares MC, Bincotto C, and Dieamant GC: Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 26, 511-525, 2004.
28. Herberman RB: Natural killer (NK) cells and their possible roles in resistance against disease. *Clin Immunol Rev* 1, 1-65, 1981.
29. Roder JC and Pross HF: The biology of the human natural killer cell. *J Clin Immunol* 2, 249-263, 1982.
30. Contasta I, Berghella AM, Pellegrini P, and Adorno D: Passage from normal mucosa to adenoma and colon cancer: alteration of normal SCD30 mechanism regulating TH1/TH2 cell functions. *Cancer Biother Radiopharm* 18, 549-557, 2003.
31. Baron S, Tyring SK, Fleischmann WR Jr, Copenhagen DH, Niesel DW, et al.: The interferons. Mechanisms of action and clinical applications. *JAMA* 266, 1375-1383, 1991.
32. Cha SS, Kim MS, Choi YH, Sung BJ, Shin NK, et al.: 2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity* 11, 253-261, 1999.
33. Borish LC and Steinke JW: 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111(2 Suppl), S460-S475, 2003.
34. Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S, Morimoto H, Takeda T, et al.: Randomised trial of effects of interferon-alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet* 346, 1051-1055, 1995.
35. Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, Arikawa Y, Ide T, et al.: Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IJIT Study Group. Inhibition of hepatocarcinogenesis by interferon therapy. *Ann Intern Med* 131, 174-181, 1999.
36. Kashiwagi K, Furusyo N, Kubo N, Nakashima H, Nomura H, et al.: A prospective comparison of the effect of interferon-alpha and interferon-beta treatment in patients with chronic hepatitis C on the incidence of hepatocellular carcinoma development. *J Infect Chemother* 9, 333-340, 2003.
37. Biron CA, Nguyen KB, Plon GC, Cousens LP, and Salazar-Matthier TP: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17, 189-220, 1999.
38. von Hoegen P: Synergistic role of type I interferons in the induction of protective cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Lett* 47, 157-162, 1995.
39. Hiroishi K, Tuting T, and Lotze MT: IFN-alpha-expressing tumor cells enhance generation and promote survival of tumor-specific CTLs. *J Immunol* 164, 567-572, 2000.
40. Ohzato H, Monden M, Yoshizaki K, Ogata A, Nishimoto N, et al.: Systemic production of interleukin-6 following acute inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 197, 1556-1562, 1993.
41. Kawakami Y, Hayashi J, Ueno K, Ohnishi M, Kishihara Y, et al.: Elevation of serum soluble interleukin-2 receptor levels in patients with hepatitis C virus infection. *Fukuoka Igaku Zasshi* 88, 274-282, 1997.
42. Furusyo N, Hayashi J, Ohnishi M, Sawayama Y, Kawakami Y, et al.: Differences between interferon-alpha and -beta treatment for patients with chronic hepatitis C virus infection. *Dig Dis Sci* 44, 608-617, 1999.
43. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, et al.: IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146, 3444-3451, 1991.

44. Fiorentino DF, Bond MW, and Mosmann TR: Two types of mouse T helper cell: IV. th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170, 2081-2095, 1989.
45. Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, et al.: Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* 250, 830-832, 1990.
46. Hsu DH, Moore KW, and Spits H: Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int Immunol* 4, 563-569, 1992.
47. Whiteside TL and Herberman RB: The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol* 7, 704-710, 1995.
48. Herberman RB: Cancer immunotherapy with natural killer cells. *Semin Oncol* 29(7Suppl), 27-30, 2002.
49. Wu J and Lanier LL: Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 90, 27-56, 2003.
50. Arase H, Arase N, and Saito T: Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med* 181, 1235-1238, 1995.
51. Velthuis JH, Gavric Z, de Bont JH, and Nagelkerke JF: Impaired activation of caspases and prevention of mitochondrial dysfunction in the metastatic colon carcinoma CCS31s-m2 cell line. *Biochem Pharmacol* 69, 463-471, 2005.
52. Walczak H and Krammer PH: The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256, 58-66, 2000.
53. Takahara K and Sano K: The life prolongation and QOL improvement effect of rice bran arabinoside derivative (MGN-3, BioBran) for progressive cancer. *Clin Pharmacol Ther* 14, 267-271, 2004.
54. Meurs EF, Galabru J, Barber GN, Katze MG, and Hovanessian AG: Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 232-236, 1993.
55. Yano H, Iemura A, Haramaki M, Ogasawara S, Takayama A, et al.: Interferon alpha receptor expression and growth inhibition by interferon alpha in human liver cancer cell lines. *Hepatology* 29, 1708-1717, 1999.
56. Murphy D, Detjen KM, Welzel M, Wiedenmann B, and Rosewicz S: Interferon-alpha delays S-phase progression in human hepatocellular carcinoma cells via inhibition of specific cyclin-dependent kinases. *Hepatology* 33, 346-356, 2001.
57. Suk K, Kim YH, Chang I, Kim JY, Choi YH, et al.: IFNalpha sensitizes ME-180 human cervical cancer cells to TNFalpha-induced apoptosis by inhibiting cytoprotective NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 495, 66-70, 2001.
58. Sasagawa T, Hlaing M, and Akaike T: Synergistic induction of apoptosis in murine hepatoma Hepa1-6 cells by IFN-gamma and TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 674-680, 2000.
59. Konjevic G, Jovic V, Jurisic V, Radulovic S, Jelic S, et al.: IL-2-mediated augmentation of NK-cell activity and activation antigen expression on NK- and T-cell subsets in patients with metastatic melanoma treated with interferon-alpha and DTIC. *Clin Exp Metastasis* 20, 647-655, 2003.
60. Smyth MJ, Taniguchi M, and Street SE: The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J Immunol* 165, 2665-2670, 2000.
61. Carson WE, Fehniger TA, Haldar S, Eckhart K, Lindemann MI, et al.: A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* 99, 937-943, 1997.
62. Allavena P, Giardino G, Sen S, Cotella G, Brogginini M, et al.: IFN-beta partially counteracts inhibition of natural killer activity induced by some antitumor agents. *J Interferon Cytokine Res* 18, 87-93, 1998.
63. Appasamy R, Bryant J, Hassanein T, Van Thiel DH, and Whiteside TL: Effects of therapy with interferon-alpha on peripheral blood lymphocyte subsets and NK activity in patients with chronic hepatitis C. *Clin Immunol Immunopathol* 73, 350-357, 1994.