



霊芝菌糸体培養培地抽出物 (MAK) のマウスメラノーマ細胞に対する抗腫瘍効果

Antitumor effect of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia (MAK) against mouse melanoma

○福原 千尋¹, 神内 伸也¹, 岩田 直洋¹, 岡崎 真理², 飯塚 博³, 日比野 康英¹
(¹城西大・薬・医療栄養、²城西大・薬・薬、³野田食菌(株))

背景および目的

癌は、異常な細胞が制御なく分裂する疾患であり、その免疫には主に細胞性免疫が関与し、T細胞、マクロファージ、natural killer細胞の活性化によるものと考えられていた。しかし、近年、腫瘍微小環境下で起こる免疫抑制を緩和することでも抗腫瘍効果を得られることが明らかになってきた。抗腫瘍効果を持つ食品としてキノコ類がよく知られている。中でも、霊芝はβ-グルカンやトリテルペンなどの多糖類を多く含み、免疫増強作用や抗酸化作用が強い生薬として子実体が使われている。霊芝菌糸体培養培地抽出物 (MAK) は、霊芝の菌糸体および培地を用いた健康食品であり、免疫活性化、細胞の保護、抗癌作用、ウイルス増殖抑制、アレルギー抑制など様々な効果がある。しかし、免疫抑制の緩和に対する効果については明らかになっていない。

本研究では、MAKの黒色腫メラノーマに対する抗腫瘍効果の検討およびメカニズム解析を行うことを目的とした。

方法

1. 実験材料

MAKは、霊芝(マンネンタケ)菌糸体をバガス(砂糖キビ搾汁残渣)と脱脂した米糠を含む混合固形培地に接種し、約3.5ヶ月間培養後、子実体発生直前に培地ごと粉碎し、熱水抽出・噴霧乾燥した粉末標品であり、野田食菌工業(株)から提供されたものを用いた。

2. 担癌マウスの作製

雌性のC57BL/6Jマウスの右足底球に、B16BL6メラノーマ細胞 (7.5 x 10⁵ cells) を接種した。接種の24時間後より、MAK群には1%または2% MAK含有飼料を自由摂取させて飼育した。飼育期間中は、摂食量および腫瘍体積を測定した。腫瘍体積の計測は、インフルラン麻酔下でマイクロノギスにて腫瘍の長径および短径を計測し、腫瘍体積 (mm³) = 長径 x 短径² / 2の計算式から腫瘍体積を算出した。播種後21日目に血漿、脾臓、リンパ節および腫瘍組織を採取した。

3. 免疫関連遺伝子の発現解析

担癌マウスより採取した脾臓および腫瘍からtotal RNAを抽出し、脾臓においてはIFN-γ mRNA量、腫瘍においてはFoxp3およびTGF-β mRNA量をReal-time RT-PCR法により解析した。

4. 脾臓細胞のペプチド刺激での腫瘍特異的T細胞の活性化による免疫関連遺伝子の発現解析

採取した脾臓を24 wellプレートで初代培養し、interleukin-2およびチロシナーゼ関連タンパク質 (H2Kb-binding) ペプチドまたはオボアルブミン (OVA) ペプチドで72時間刺激した。刺激後、細胞を回収し、IFN-γ およびTGF-β mRNA量をReal-time RT-PCR法により解析した。

腫瘍組織におけるTreg細胞関連遺伝子の発現

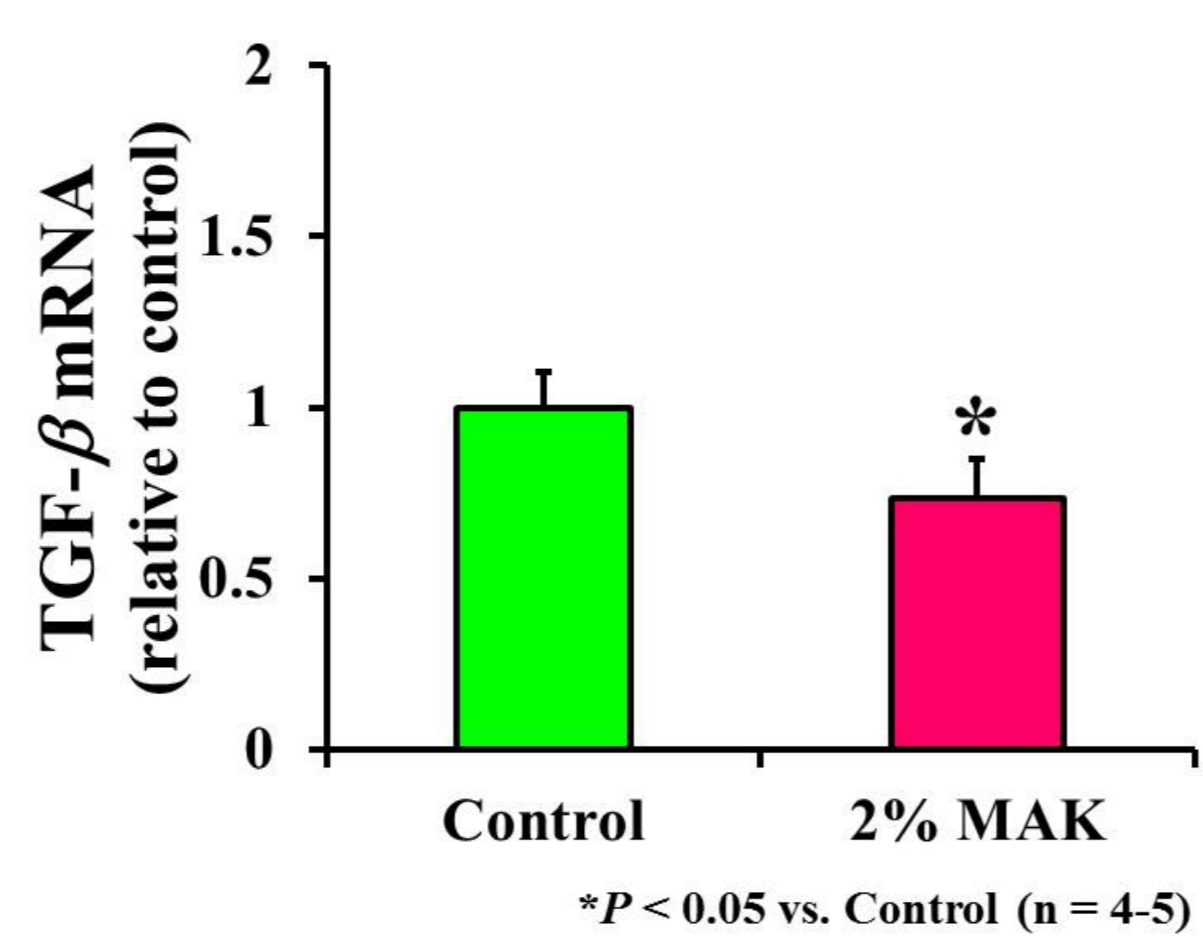
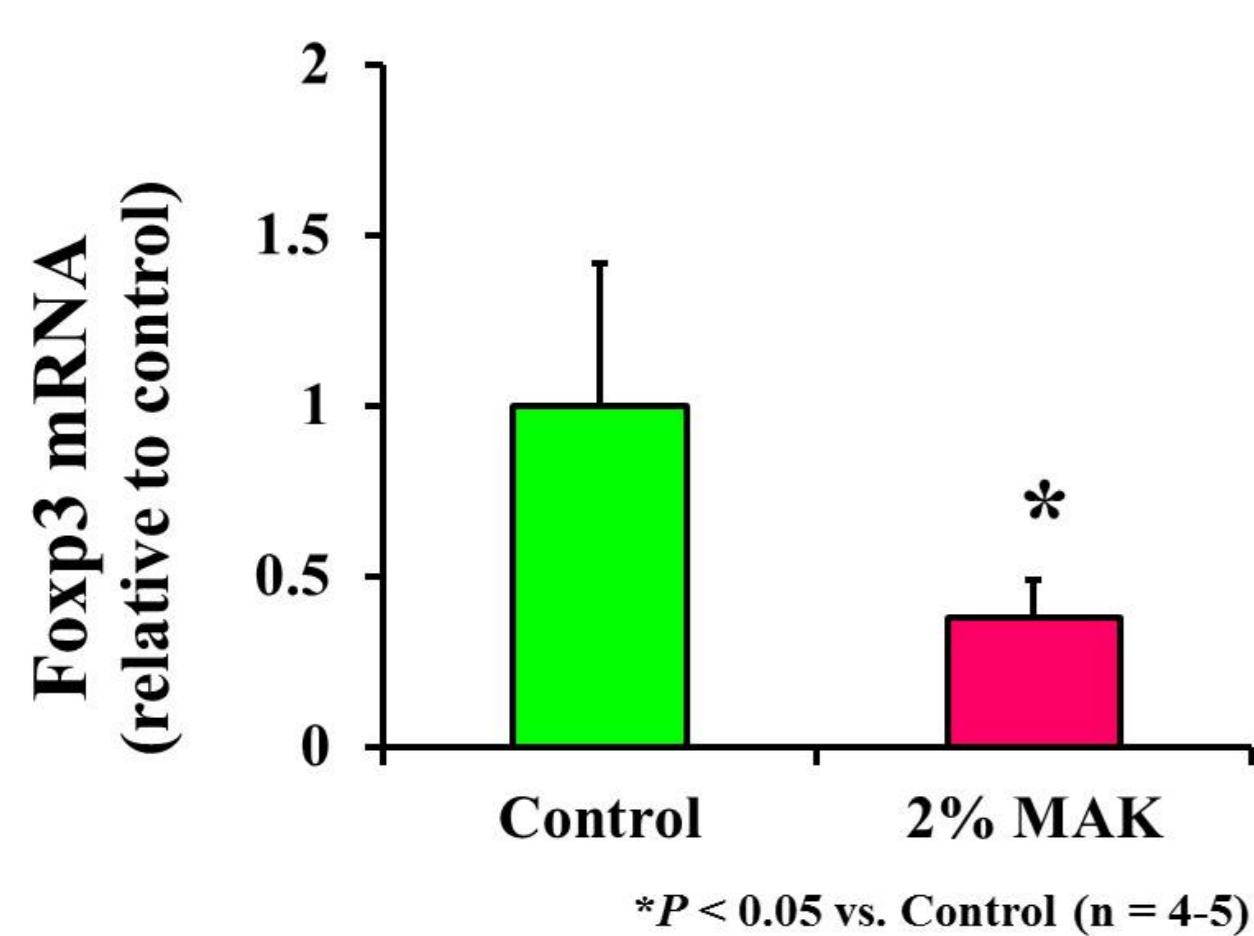


Fig. 5 腫瘍組織のTreg細胞関連遺伝子の発現解析

腫瘍組織中のTreg細胞由来遺伝子のFoxp3およびTGF-β mRNA発現量を検討した。その結果、両mRNAの発現は、2% MAK群で有意な減少が認められた。

結果

体重の推移

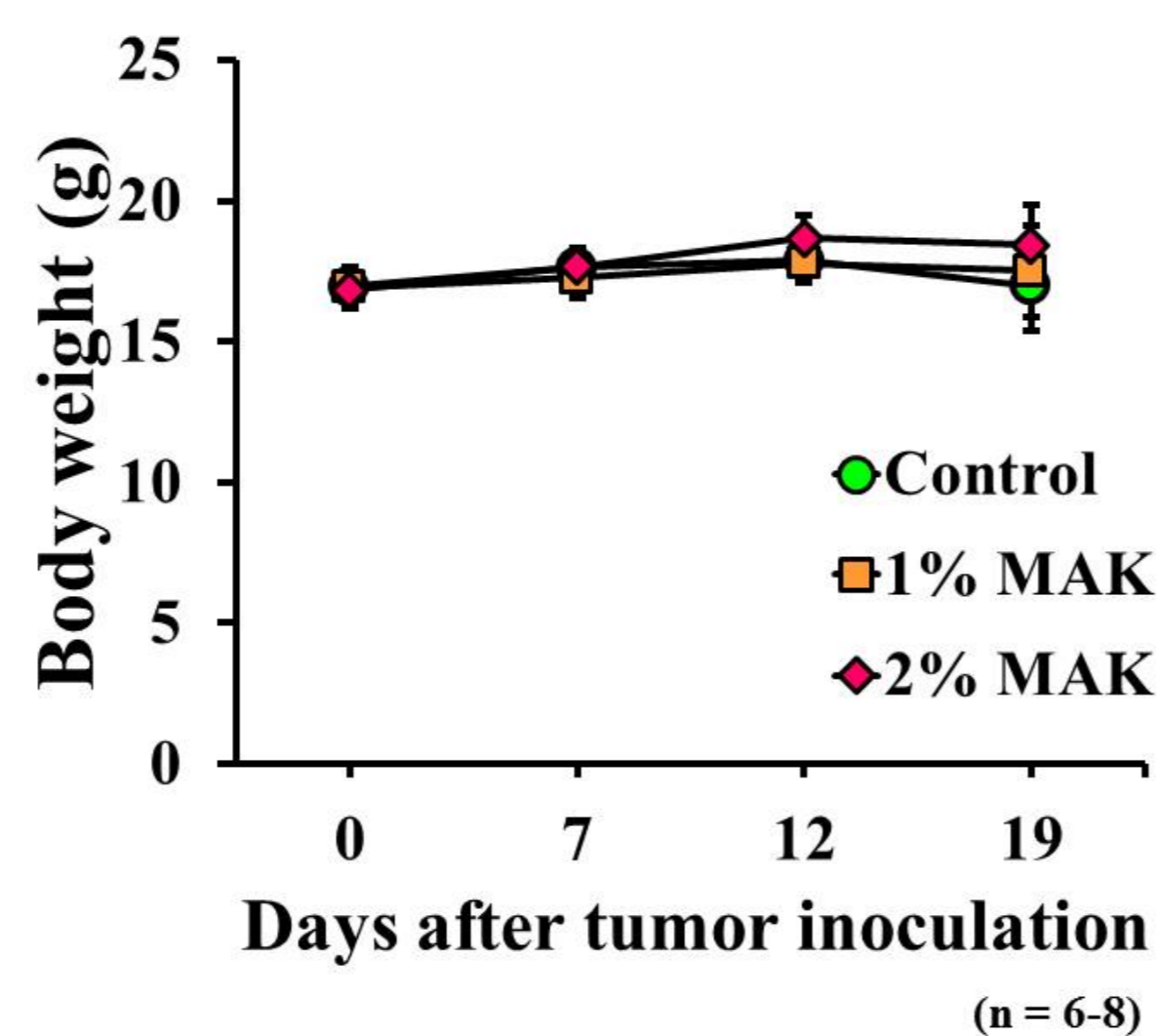


Fig. 1 マウスの体重の推移

マウスの体重をB16BL6の接種後0、7、12、19日目に測定した。Control群、1% MAK群および2% MAK群の間に体重差は認められなかった。

また、摂食量も3群間で差は認められなかった(データ未掲載)。

腫瘍の増殖抑制効果

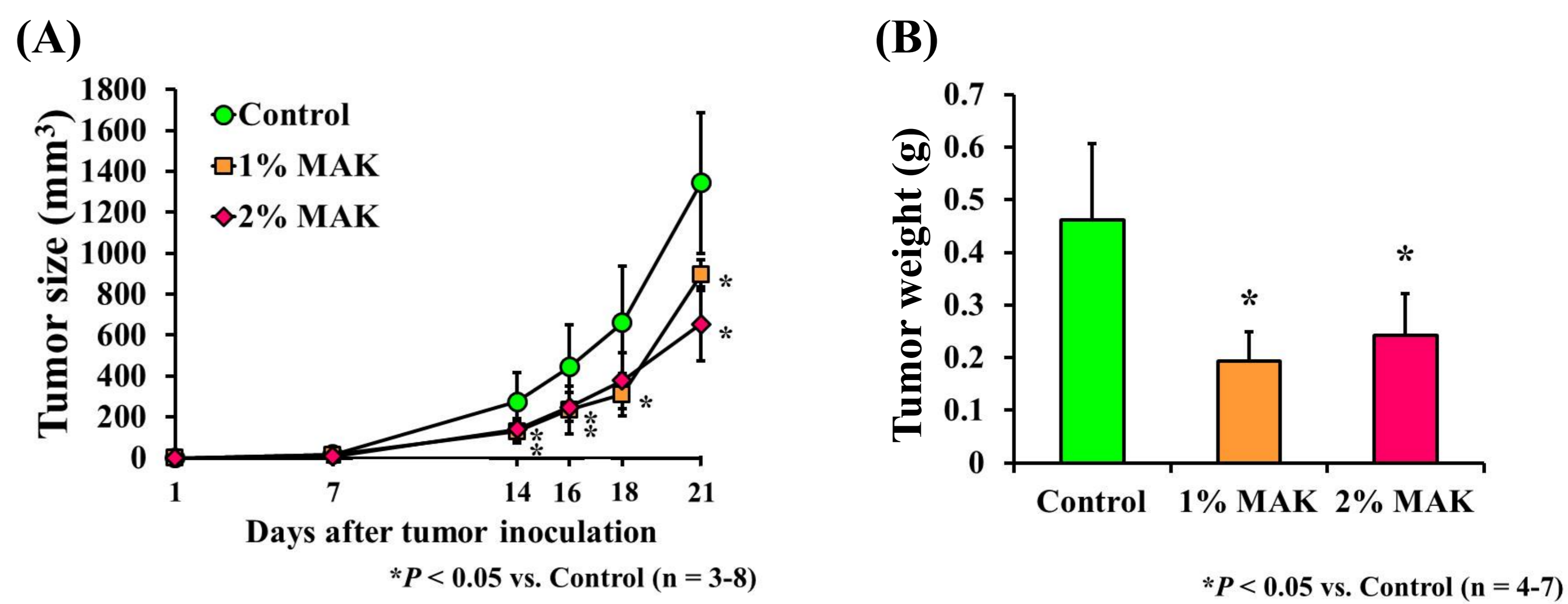


Fig. 2 MAKの摂取によるB16BL6細胞の増殖抑制効果

(A) B16BL6の腫瘍体積を接種後7、14、16、18、21日目にインフルラン麻酔下でマイクロノギスを用いて計測した。Control群は7日目まではほとんど体積が増加しなかったが、14日目以降顕著な増加が観察された。MAK群も、7日目まではほとんど増加せず、その後経時的に増加したが、Control群に比べて増殖の抑制が認められ、14日目以降1%、2%ともに有意な差を示した。21日目の体積はControl群と比較して1% MAK群で33.5%、2% MAK群で51.3%の縮小であった。

(B) 21日目の腫瘍重量を測定した結果、Control群と比較して1%および2% MAK群で有意な減少が認められた。1%と2%の間には有意な差はなかった。

これらの結果から、MAKの摂取によりB16BL6に対して増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

脾臓におけるIFN-γ mRNA発現

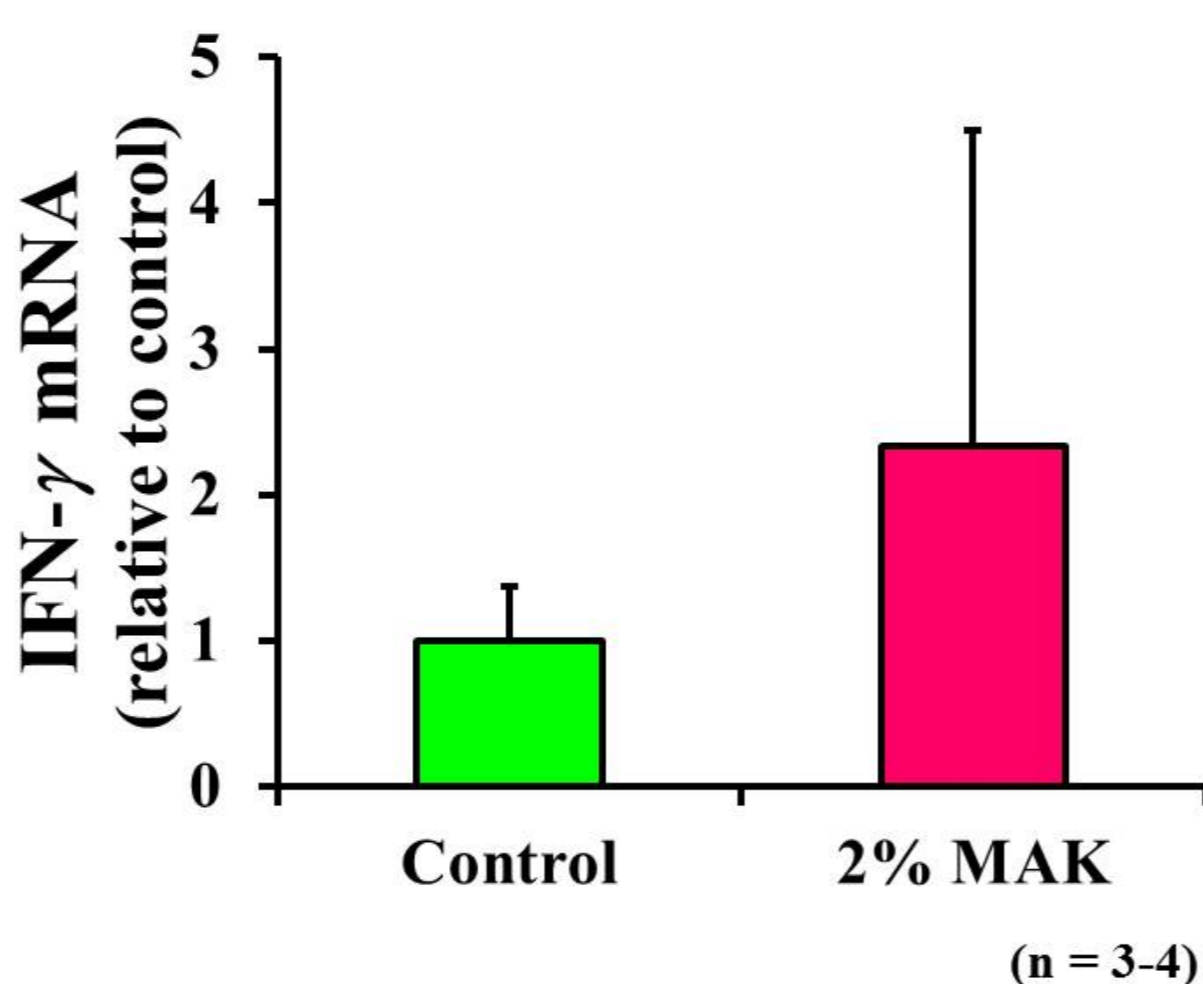


Fig. 3 脾臓におけるIFN-γ mRNA発現

脾臓におけるIFN-γ mRNA発現量をreal-time RT-PCRを行い、測定した。その結果、Control群と比較して2% MAK群において発現の増加傾向が認められた。

ペプチド刺激による脾臓での免疫関連遺伝子mRNA発現

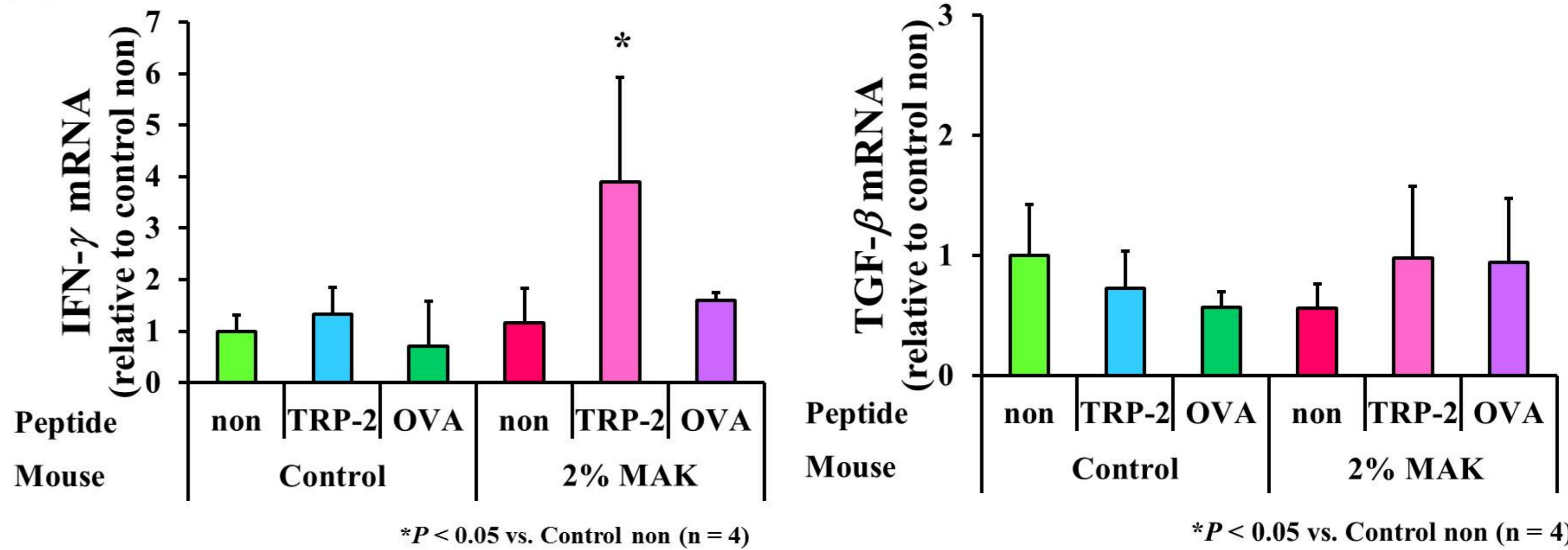


Fig. 4 担癌マウス脾臓細胞のペプチド刺激による免疫関連遺伝子の発現解析

担癌マウスより単離した脾臓細胞のペプチド刺激によるIFN-γ およびTGF-β mRNAの発現量を解析した。ペプチドは、B16メラノーマ由来抗原であるTRP-2のペプチドとネガティブコントロールとしてOVAのペプチドを用いた。その結果、IFN-γ 発現はControl群のnonと比較して、TRP-2刺激した2% MAK群の脾臓細胞で発現量が約4倍に増加した。一方、OVA刺激にはほとんど反応を示さなかった。また、TGF-β は、Control群および2% MAK群とも各刺激による大きな変動はなかった。

結果および考察

本研究では、まずMAKの経口摂取がマウスに接種したB16メラノーマに対して増殖抑制効果を示すか検討したところ、腫瘍体積ならびに腫瘍重量において抑制が認められ、MAKは抗腫瘍効果を示すと考えられた。

MAKによる抗腫瘍効果が、免疫の活性化によるものかについて検討するために、脾臓組織中のIFN-γ mRNA発現量を測定した。結果、MAK群において発現の増加傾向が認められた。IFN-γ は、Th1細胞より産生されkiller T細胞の細胞障害性を誘導することから、MAKは細胞性免疫を活性化することが示唆された。

次に、MAKの免疫活性化がB16メラノーマに起因したものなのかを明らかにするために、脾臓細胞をペプチド刺激し、それにより産生されるIFN-γ およびTGF-β mRNA発現を解析した。その結果、MAK群ではTRP-2の添加により、IFN-γ mRNA発現量が約4倍に増加した。IFN-γ の発現の増加は、抗原提示細胞を活性化させTh1細胞を誘導したことによるものと考えられ、MAKはB16メラノーマに対する特異的な腫瘍免疫を増強することが明らかとなった。

さらに、腫瘍組織中のTreg細胞由来遺伝子の発現量を検討した。近年、免疫の活性化は、免疫抑制の不活性化によるものがあることが明らかになってきている。免疫抑制にはTreg細胞の関与が明らかとなっていることから、Treg細胞由来遺伝子のFoxp3およびTGF-β のmRNA発現を検討した。その結果、両mRNAの発現は、MAK群において有意に低下し、腫瘍組織中のTreg細胞数が減少していることが示唆された。したがって、MAKは腫瘍免疫に対する抑制を緩和する機能を合わせ持つものと考えられた。以上の結果から、B16メラノーマに対するMAKの効果は、B16メラノーマ特異的な細胞性免疫の活性化および腫瘍微小環境下におけるTreg細胞の作用を減弱させ、免疫抑制の緩和による腫瘍増殖の抑制効果によるものと考えられた。