

27PO2-am1-07



# 霊芝菌糸体培養培地抽出物(MAK)によるB16BL6メラノーマ細胞増殖抑制機構の解析

Analysis of B16BL6 melanoma cell proliferation suppression mechanism by a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia (MAK)

○渡邊 葉月<sup>1</sup>, 神内 伸也<sup>1</sup>, 岩田 直洋<sup>1</sup>, 久保田 真<sup>2</sup>, 飯塚 大<sup>2</sup>, 日比野 康英<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>城西大・薬, <sup>2</sup>野田食菌工業(株)

## 背景および目的

癌は、正常な細胞の遺伝子が変異することで引き起こされ、日本においては、生涯のうち2人に1人が癌を発症すると言われており、身近な疾患の一つである。癌の治療には、薬物療法、放射線治療が知られており、近年では自己免疫力を高める免疫療法も注目されている。癌の免疫機構として、主にTh1細胞による細胞性免疫が関与しており、NK細胞やキラーT細胞を活性化し、腫瘍の増殖を抑制する。T細胞は他にも、免疫の抑制に働くTreg細胞、炎症を誘導するTh17細胞、アレルギーなどの体液性免疫に関与するTh2細胞がある。癌に対する免疫療法を効果的に進めるためには、Th1細胞、NK細胞、キラーT細胞、Th17細胞の活性化およびTreg細胞による抑制の緩和が必要であると考えられる。

健康食品として用いられている霊芝菌糸体培養培地抽出物(MAK)は、霊芝菌糸体をバガスと米糠の混合固形培地に接種し、得られた標品であるが、その成分は、水溶性リグニンをはじめとした固形培地の分解物や、霊芝菌由来のβ-グルカンなどが含まれており、多様な生物学的活性を持つと考えられる。MAKは、これまでに抗腫瘍効果や免疫賦活作用などが報告されているが、詳細なメカニズムは明らかになっていない。

本研究では、MAKの黒色腫瘍メラノーマに対する抗腫瘍効果およびそのメカニズムについての解析を目的とする。

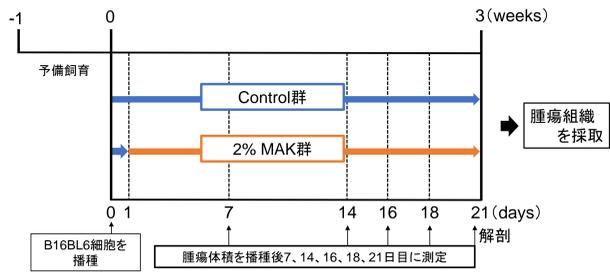
## 実験試料

### MAK(霊芝菌糸体培養培地抽出物)

霊芝菌糸体培養培地抽出物は、野田食菌工業(株)において製造された「MAK」を使用した。MAKは、霊芝菌糸体をバガスと脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、子実体発生直前に培地ごと粉砕し、熱水抽出、噴霧乾燥したものである。



## 方法



### ① 担癌マウスの作製と飼育群

6週齢の雌性C57BL/6Jマウスを粉末飼料のCE-2および水を自由摂取させ、1週間馴化した。その後、右足底球にB16BL6メラノーマ細胞(7.5 × 10<sup>5</sup> cells)を播種した。播種の24時間後より、MAK群にはCE-2に2% MAKを含有した飼料を自由摂取させた。腫瘍体積は、イソ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測定し、腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)=(長径×短径<sup>2</sup>)/2の計算式から算出した。播種後21日に解剖を行い、腫瘍組織を採取し、腫瘍重量を測定した。

### ② 免疫関連遺伝子の発現解析

担癌マウスより採取した腫瘍組織からRNAを抽出し、IFN-γ、IL-6、Foxp3、TGF-βおよびRORc mRNA発現量を、Real Time RT-PCR法により解析した。

## 結果・考察

飼育期間中のマウスの体重および摂食量に差はなかった(Fig. 1, 2)。腫瘍体積を計測した結果、播種後7日目まで両群ともに腫瘍増殖は認められなかったが、14日以降で顕著に増殖した。しかし、21日目の腫瘍体積はControl群で678.7 mm<sup>3</sup>に対して、2% MAK群で395.7 mm<sup>3</sup>であり、2% MAK群で有意な増殖抑制が認められた。また、21日目の腫瘍重量はControl群で0.46 gであるのに対して、2% MAK群では0.28 gと有意に低値を示したことから、MAKの摂取により腫瘍の増殖抑制効果を得られることが明らかとなった(Fig. 3)。

MAKによる抗腫瘍効果のメカニズムを検討するため、腫瘍組織を用いて、Th1細胞の分化を誘導するIFN-γ、Th2細胞やTh17細胞の分化を誘導するIL-6、Treg細胞に特異的に発現するFoxp3、Treg細胞の分化を誘導するTGF-β、Th17細胞に特異的に発現するRORc mRNA発現量をReal Time RT-PCR法により測定した。その結果、IFN-γおよびIL-6 mRNA量はControl群と比較して2% MAK群で有意に増加した。Foxp3およびTGF-β mRNA量はControl群と比較して2% MAK群で有意に減少した。これらの結果から、MAKの摂取により腫瘍組織中の細胞性免疫の活性化およびTreg細胞の減少による免疫抑制の緩和が示唆された(Fig. 4)。

MAKは、B16BL6メラノーマに対して抗腫瘍効果を示し、細胞性免疫の増強、Treg細胞の減少に伴う免疫抑制の緩和による腫瘍増殖の抑制効果であると考えられる。

## 結果

### 体重

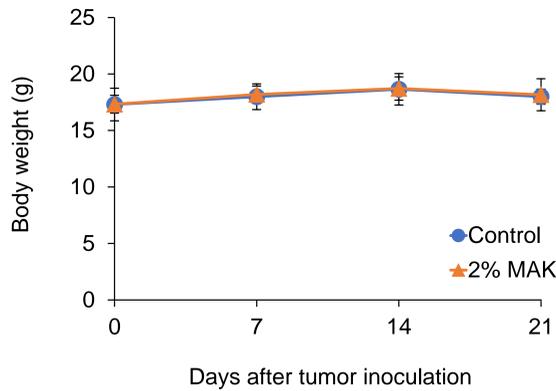


Fig. 1 体重の推移

体重を週に1度測定し、各群の平均値を示した。両群ともに約18gを示し、群間での差は認められなかった。(n = 10-11)

### 摂食量

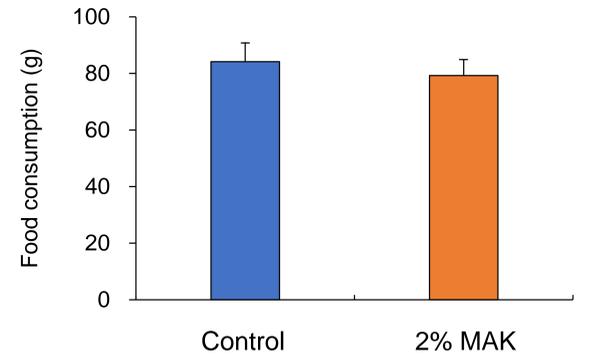
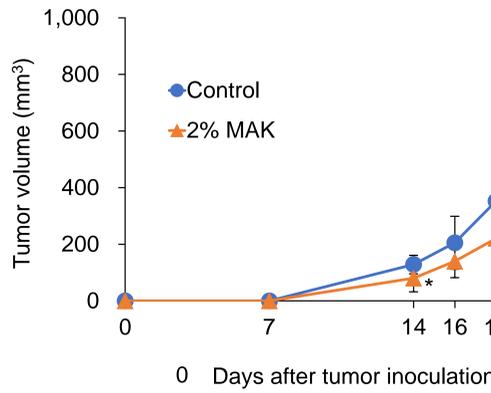


Fig. 2 総摂食量

摂食量を週に1度測定し、飼育期間中の摂食量を示した。両群ともに約80gを示し、群間での差は認められなかった。(n = 5)

## MAKの抗腫瘍効果

### (A) 腫瘍体積



### (B) 腫瘍重量

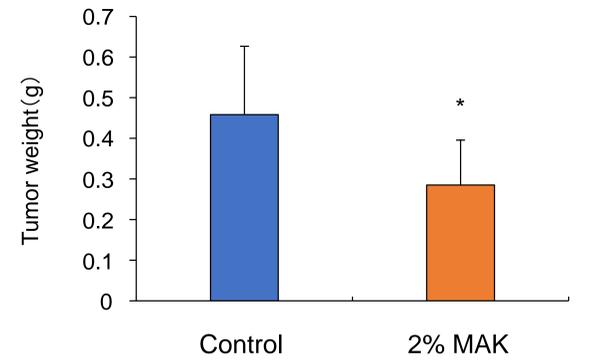


Fig. 3 腫瘍体積の推移および21日目の腫瘍重量

(A) マウスの右足底球にB16BL6細胞を播種後、7、14、16、18、21日目の腫瘍体積を計測した。Control群と比較して2% MAK群では14日目以降で腫瘍の増殖抑制が認められた。\*P < 0.05 vs. Control (n = 8)

(B) 21日目に解剖を行い腫瘍重量を測定した。Control群と比較して2% MAK群では有意に減少した。\*P < 0.05 vs. Control (n = 8)

## 腫瘍組織における免疫関連遺伝子の発現解析

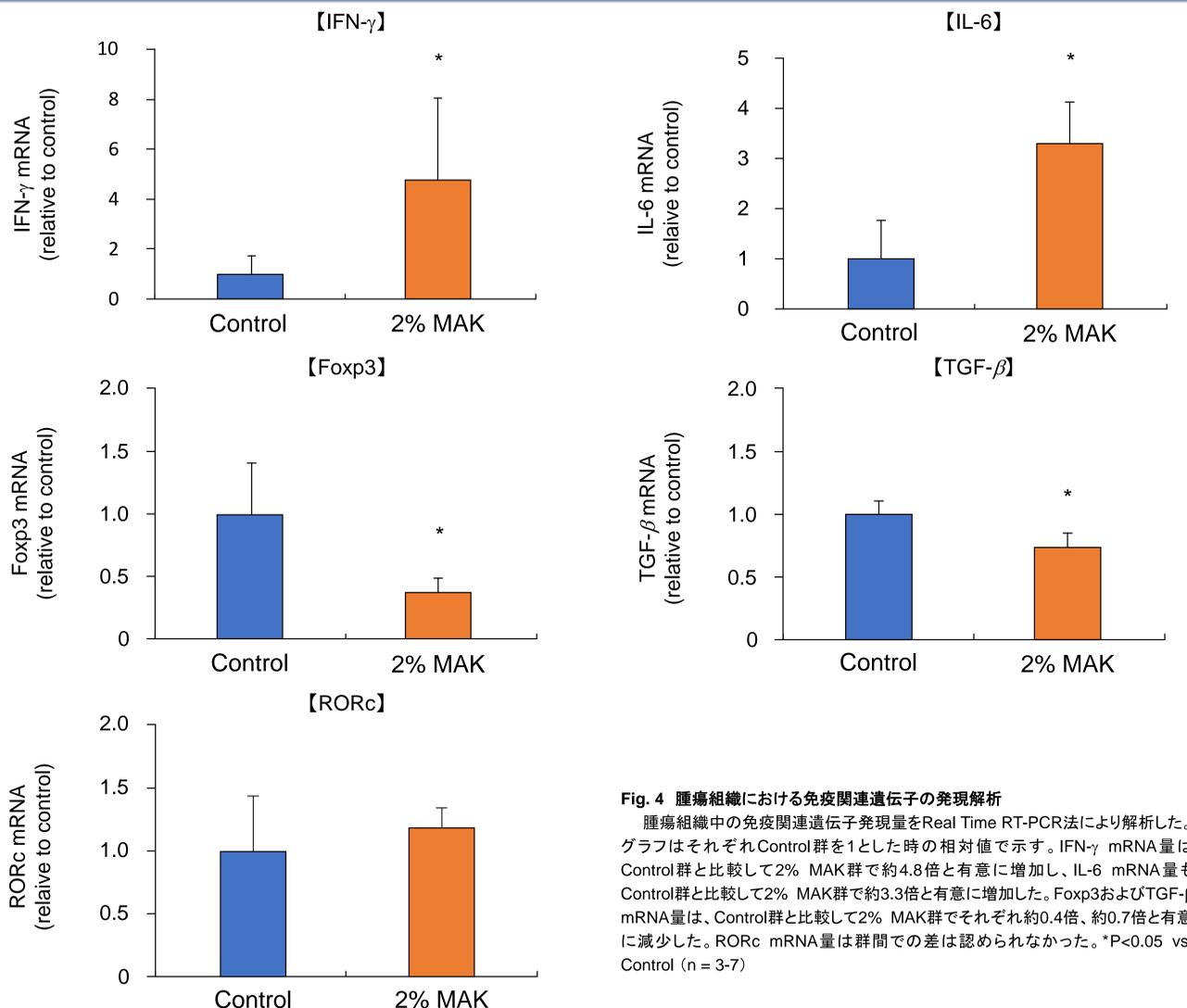


Fig. 4 腫瘍組織における免疫関連遺伝子の発現解析

腫瘍組織中の免疫関連遺伝子発現量をReal Time RT-PCR法により解析した。グラフはそれぞれControl群を1とした時の相対値を示す。IFN-γ mRNA量はControl群と比較して2% MAK群で約4.8倍と有意に増加し、IL-6 mRNA量はControl群と比較して2% MAK群で約3.3倍と有意に増加した。Foxp3およびTGF-β mRNA量は、Control群と比較して2% MAK群でそれぞれ約0.4倍、約0.7倍と有意に減少した。RORc mRNA量は群間での差は認められなかった。\*P < 0.05 vs. Control (n = 3-7)

日本薬学会第142年会  
利益相反 (COI) の開示

私の今回の演題に関連して、開示すべき利益相反は以下のとおりです。

⑥ 研究費または奨学寄附金 (指定寄附金) ; あり (野田食菌工業株式会社)