

原 著

シイタケ菌糸体の血管新生抑制効果に関する検討

小林製薬株式会社・中央研究所

松井 保公 川西 貴 山崎 寛生 内田 健志
湯川 博 為定 誠 浅野 健治

要旨 目的：シイタケ菌糸体抽出物 (extract of cultured *Lentinus edodes* mycelia, L.E.M.) の血管新生抑制効果を検証した。方法と結果：① L.E.M. は、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の増殖因子に対する走化を抑制した。② L.E.M. は、ヒト肺腺癌株 A549 により誘導される HUVEC 管腔形成を濃度依存的に抑制した。③ マウス dorsal air sac assay で L.E.M. は腫瘍血管新生を抑制した。結語：L.E.M. の抗腫瘍機序として、腫瘍血管新生抑制作用が示唆された。

[*Biotherapy* 18 (6) : 543-547, November, 2004]
(Received October 1, 2004/Accepted October 15, 2004)

Inhibitory Effect of *Lentinus Edodes* Mycelia on Angiogenesis

Yasunori Matsui, Takashi Kawanishi, Hiroo Yamasaki, Kenji Uchida,
Hiroshi Yukawa, Makoto Tamesada and Kenji Asano

R&D Center, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd

Summary

The inhibitory effect of the extract of cultured *Lentinus edodes* mycelia (L.E.M.) on angiogenesis was examined, and the following results were obtained: ① L.E.M. inhibited chemotaxis of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) to growth factors; ② L.E.M. dose-dependently inhibited lumen formation by HUVEC induced by human lung adenoma A549 cell strain; and ③ L.E.M. inhibited tumor angiogenesis in a mouse dorsal air sac assay. In conclusion, the inhibitory effect on tumor angiogenesis was shown to be an antitumor mechanism of L.E.M..

Key words: *Lentinus edodes* mycelia, Angiogenesis, HUVEC, Antitumor effect, Dorsal air sac assay

Address request for reprints to: Dr. Yasunori Matsui, R&D Center, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd., 1-30-3, Toyokawa, Ibaraki, Osaka 567-0057, Japan

はじめに

シイタケ菌糸体抽出物 (extract of cultured *Lentinus edodes mycelia*, L.E.M.) は、サトウキビの絞りかすであるバガスを主成分とした固体培地でシイタケ菌糸を培養したものを熱水抽出したエキスであり、これまでに抗ウイルス作用¹⁻³⁾、肝保護作用⁴⁻⁶⁾、免疫調節作用⁷⁾などの生理活性があることが報告されている。また、抗腫瘍作用^{8,9)}についても効果が認められているが、その機序は未知な部分も多い。

そこで今回われわれは、腫瘍形成に重要となる腫瘍血管新生に対する L.E.M. の効果を、血管内皮細胞に対する作用とマウス dorsal air sac 法で検証し、本剤の抗腫瘍素材としての可能性を評価した。

1. 材料と方法

1. 実験動物

実験には日本 SLC 株式会社より購入した ICR マウス (雌性, 6 週齢) を 1 週間の予備飼育後に用いた。

2. 細胞株

血管内皮細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞の HUVEC (CAMBREX) を使用し, endothelial cell basal medium 2 (以下, EBM2, CAMBREX) に付属の 2% FBS, hydrocortisone, FGF, VEGF, IGF-1, heparine, ascorbic acid, EGF, gentamicin, amphotericin B を添加した培地 (以下, 完全 EBM2) で培養し, 2~8 分裂までのものを使用した。腫瘍細胞として, ヒト肺腺癌細胞株 A549 (大日本製薬株式会社) およびマウス肉腫細胞株 Sarcoma 180 (S-180, 大日本製薬株式会社) を使用した。A549 は 10% FBS 含有 D-MEM で, S-180 は 10% FBS 含有 RPMI-1640 で培養した。培養はいずれも 5% CO₂, 37℃ 条件で行った。

3. 被験物質

L.E.M. は, バガス, 脱脂米糖を加えた固形培地にシイタケ菌を接種, 子実体発生直前まで培養し, 加水, 酵素添加, 加熱, ろ過し, 粉末化したもの (株式会社長岡 L・E・M 研究所) である。

4. HUVEC の浸潤, 走化に対する検討

フルオロブロックメンブレンインサート (以下, インサート。3 μm 孔, 24 ウェルプレート仕様, BD フェルコン) に 2% FBS 含有 EBM2 で調整した HUVEC を 200 μl (2.4×10⁴ cells/ウェル) 加え, 24 ウェルプレートに移した。浸潤試験ではあらかじめインサートを Matrigel (15 μg/インサート) でコーティングしたものを使用した。24 ウェルプレートのウェルには誘引物質として完全 EBM2 を 700 μl 加えた。さらに各種濃度の L.E.M. をインサート (上部) およびウェル (下部) に添加して 6 時間培養した後に, CalceinAM (株式会社同仁化学研究所) で細胞を染色 (4 μg/ml) し, インサートを通過した細胞を 492 nm の励起波長, 535 nm の蛍光波長で蛍光プレートリーダー (TECAN) を用いて測定した。

5. HUVEC の増殖に対する検討

EBM2 で調整した HUVEC を 96 ウェルプレート (4×10³ cells/ウェル) で培養し, 培養開始 24~72 時間後まで各濃度の L.E.M. を加えた。培養後, Cell Counting Kit-8 (株式会社同仁化学研究所) で生細胞数を測定した。

6. A549 による HUVEC 管腔形成に対する検討

50 μl の Matrigel (5 mg/ml) でコーティングした 96 ウェルプレートに A549 培養上清 (2×10⁵ cells/ml で 24 時間培養した上清) を 150 μl 加え, さらに EBM2 で調整した 50 μl の HUVEC 懸濁液 (2×10⁵ cells/ml) と各種濃度の L.E.M. を加え, 24 時間培養した。陰性コントロールは, A549 培養上清の代わりに D-MEM を加えた。培養後, 顕微鏡下で各ウェルを写真撮影し, 形成された管腔長をピクセル数で算出した。

7. マウス dorsal air sac assay

Oikawa ら¹⁰⁾の方法に従い, PBS (-) で調整した 100 μl の S-180 (2×10⁷ cells/ml) 懸濁液を注入したミリポアチャンバー (10 mm 径) を作製し, マウスの背中皮下に移植した。処置したマウスは 2 群に分け, 一方は L.E.M. 250 mg/kg/day を強制経口投与し, もう一方には水を投与した。陰性コントロール群は PBS (-) を封入したチャンバーを移植し, 水を投与した。チャンバー移植後 5 日後に背部皮を広く方形に切開し, チャンバーと背

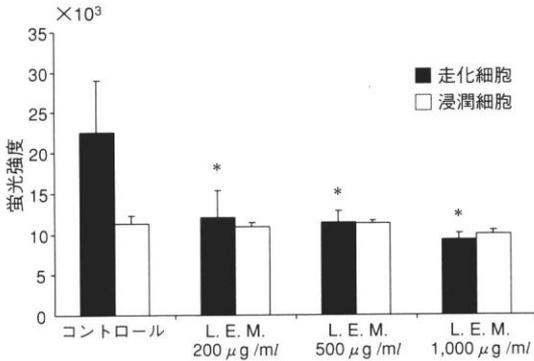


図 1 HUVEC の浸潤, 走化に対する L.E.M. の影響
 通常のインサートとあらかじめマトリゲルコーティングを施したインサートそれぞれに, HUVEC (2.5×10^4 cells) を加え, 下部の 24 穴プレートのウェル内に誘因物質として EBM2 完全培地を加えた。さらに, L.E.M. を添加して 6 時間培養した後に, Calcein AM ($4 \mu\text{g/ml}$) で細胞を染色し, インサートを通過した細胞を蛍光プレートリーダーで測定した。各濃度 3 ウェル使用し, 各ウェル内 4 点で測定した。試験は 3 回繰り返して同様の結果を得, 代表的な結果を示した。
 *: $p < 0.05$ コントロールに対して。

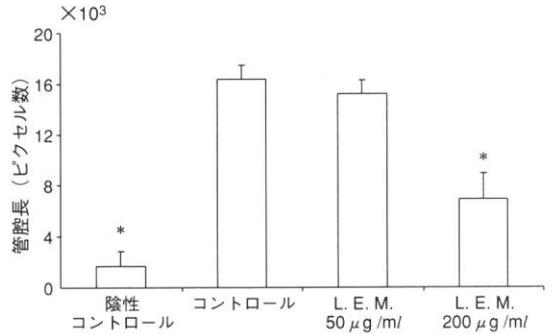


図 2 A549 細胞の HUVEC 管腔形成への影響と L.E.M. によるその抑制効果
 あらかじめマトリゲルでコーティングをした 96 穴プレートに A549 細胞培養上清 (2×10^5 cells/ml で 24 時間培養) を $150 \mu\text{l}$ 加え, さらに HUVEC 懸濁液 (2×10^5 cells/ml) $50 \mu\text{l}$ と L.E.M. を加えた。陰性コントロールは A549 細胞培養上清の代わりに培地を加えた。24 時間後に顕微鏡下で各ウェルを写真撮影し, 形成された管腔長をピクセル数換算し測定した。各濃度 $n=6$ で実施した。
 *: $p < 0.05$ コントロールに対して。

部皮をはがした。チャンバーが接触していた部分を顕微鏡下で観察し, 3 mm 以上の新生血管数を測定し, 0 本を angiogenesis index 0, 1 本を index 1, 2 本を index 2, 3 本以上を index 3 として 4 段階で評価した。

8. 統計解析

得られた測定値は, 平均値±標準偏差 (means ±SD) で表示し, 2 群間の検定には Student's t 検定を用い, p 値が 0.05 以下を有意差ありと判定した。

II. 結 果

1. HUVEC 浸潤, 走化に対する効果

L.E.M. を $1,000 \mu\text{g/ml}$ まで添加したが, HUVEC の浸潤抑制は認められなかった。HUVEC の走化に対しては, L.E.M. は $200 \mu\text{g/ml}$ 以上でこれを有意に抑制した (図1)。

2. HUVEC 増殖に対する効果

HUVEC の増殖に対し, $1,000 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で L.E.M. の作用は認めなかった。

3. HUVEC 管腔形成に対する効果

管腔形成を促進する A549 培養上清¹¹⁾を添加す

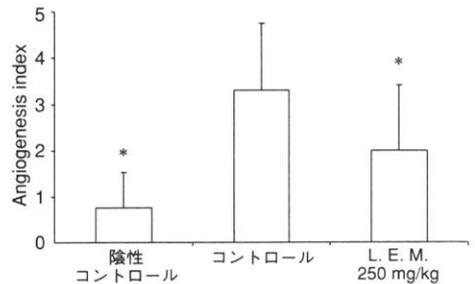


図 3 S-180 の血管新生誘導に対する L.E.M. の影響
 ICR マウス (6 週齢, 雌) の背部皮下に S-180 (2×10^7 cells) を封入したチャンバーを移植し, L.E.M. を 5 日間連続強制経口投与した。コントロール群には水を投与した。陰性コントロール群にはチャンバーに PBS (-) を封入したものを使用し, 水を投与した。5 日後に再度背部皮を広く方形に切開し, チャンバーが接触していた皮膚部分を顕微鏡下で写真撮影し, 新生血管の総数を測定した。
 *: $p < 0.05$ コントロール群に対して。

ることで, HUVEC 管腔形成は陰性コントロールに比して有意な増加を認めた。これに対し, L.E.M. $200 \mu\text{g/ml}$ 添加により, A549 培養上清による HUVEC 管腔形成の有意な抑制を認めた

(図2)。

4. マウス腫瘍血管新生に対する効果

S-180を封入したチャンバーを移植したコントロール群 (angiogenesis index=3.31±1.44, n=13)はPBS(-)を封入したチャンバーを移植した陰性コントロール群 (angiogenesis index=0.75±0.78, n=14)に対して、有意な血管新生誘導が認められた。一方、L.E.M.を250 mg/kg/day投与したL.E.M.群 (angiogenesis index=2.00±1.41, n=12)は、コントロール群に対し有意な血管新生誘導抑制が認められた(図3)。

III. 考 察

血管新生はいくつかの過程を経て完成する。すなわち、既存血管基底膜の浸潤、血管内皮細胞の走化、増殖、管腔形成である。今回、HUVECを用いた *in vitro* の試験を行い、L.E.M.の浸潤、走化、増殖、管腔形成に対する効果を検証し、走化、管腔形成を抑制する効果を認めた。biological response modifier (BRM) 製剤としてはこれまでに、PSKに血管新生阻害作用が報告されている¹²⁾。その作用機序の一つとしてPSKがbFGFに結合し、そのシグナル伝達を抑制することで血管内皮細胞の増殖を抑制することが示されている。しかし、今回bFGFを含む培地でHUVECの増殖に対するL.E.M.の作用を検討したが抑制効果は認めなかった。したがって、L.E.M.はPSKとは異なり、bFGFなどの血管内皮細胞増殖因子に対する作用は有さないか、有してもその作用は弱いと推察される。また、L.E.M.はHUVECの浸潤に対して抑制効果を認めなかったことから(図1)、plasminogen activator (PA)やmatrix metalloproteinase (MMP)などの線溶系への作用は有しないと推察される。一方、増殖因子や線溶因子とは別に、血管新生には各種の接着因子が重要な役割をもつことが知られており、血管内皮細胞の走化や管腔形成にも重要である¹³⁾。今回、HUVECの走化、管腔形成抑制作用が認められた(図1, 2)ことから、L.E.M.がこれらの接着因子の機能や発現を何らかの作用で抑制する可能性も考えられる。

以上の *in vitro* 試験を踏まえ、L.E.M.が血管内皮細胞の走化、管腔形成抑制を介して *in vivo*

で腫瘍血管新生阻害作用を有することが期待されたことから、さらにマウス dorsal air sac assay で *in vivo*での効果を検討した。その結果、*in vivo*でL.E.M.が腫瘍血管新生を抑制する効果を有することが示された(図3)。その機序としては、試験終了後のチャンバー内のS-180はL.E.M.投与群でもコントロール群と同等に増殖していた(データは非表示)ことから、L.E.M.によるS-180への増殖阻害などの影響はないと考えられ、その機序は *in vitro*と同様、血管内皮細胞の走化、管腔形成を抑制したことが推察される。加えて、L.E.M.の *in vivo*における抗腫瘍作用^{8,9)}はすでに報告されており、その作用機序は主に宿主免疫を介したものと考えられていることから、L.E.M.が宿主免疫を介して腫瘍血管新生に作用した可能性も考えられる。今回の試験ではS-180は0.45 μm孔のチャンバーに封入されていることから、L.E.M.により賦活された免疫細胞が直接S-180に作用したとは考えにくい。しかし、免疫系はサイトカインなどの液性因子を介して血管新生に作用し得る。たとえばIL-12は、IFN-γの誘導を介することで血管新生抑制作用を有することが報告されている¹⁴⁾。担癌状態では一般にTh1/Th2バランスがTh2優位の状態と考えられ¹⁵⁾、IL-12の産生低下がその一因であるが、L.E.M.はすでに担癌状態でTh2優位に傾いている免疫能をTh1優位にシフトさせることが報告されている⁹⁾。加えて、L.E.M.を投与した担癌マウスより調整した脾臓リンパ球のIL-12およびIFN-γ産生量が増加したことも報告されている⁹⁾。したがって、L.E.M.投与によって担癌状態で、IL-12およびIFN-γレベルが維持もしくは亢進され、L.E.M.がこのIL-12、IFN-γを介して、腫瘍血管新生を抑制した可能性も考えられる。今後この点について、さらなる検証が必要である。

おわりに

L.E.M.は *in vitro*で血管内皮細胞の走化、管腔形成を抑制することが示された。加えて、*in vivo*でL.E.M.は腫瘍血管新生を抑制することが認められた。以上のことより、L.E.M.の抗腫瘍作用機序の一つとして、L.E.M.が腫瘍血管新生を抑制することが示唆された。

文 献

- 1) Tochikura, T.S., Nakashima, H., Ohashi, Y., *et al.*: Inhibition (*in vitro*) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Med. Microbiol. Immunol.* **177** : 235-244, 1998.
- 2) Sorimachi, K., Niwa, A., Yamazaki, S., *et al.*: Anti-viral activity of water solubilized lignin derivatives *in vitro*. *Agric. Biol. Chem.* **54** : 1337-1339, 1998.
- 3) Suzuki, H., Okubo, A., Yamazaki, S., *et al.*: Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160** : 367-373, 1989.
- 4) Tsubura, E., Nishimoto, M. and Nishii, K.: Effect of LEM (*Lentinus edodes* mycelia) for chemotherapeutic hepatic side effects in the patients with pulmonary tuberculosis. *Prog. Med.* **19** : 1959-1964, 1999.
- 5) 梶本修身, 山口康代, 竹内豊実・他: シイタケ菌糸体抽出物における境界域及び軽度肝機能障害に対する臨床的検討. *日臨栄会誌* **22** : 22-31, 2000.
- 6) Suzuki, H., Iiyama, K., Yoshida, O., *et al.*: Structural characterization of the immunoreactive and antiviral water-solubilized lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Agric. Biol. Chem.* **54** : 479-487, 1990.
- 7) Mizoguchi, Y., Katoh, H., Kobayashi, K., *et al.*: Effects of extract of cultured *Lentinus edodes* mycelia (LEM) on polyclonal antibody response induced by pokeweed mitogen. *Gastroenterol. Jpn.* **122** : 627-632, 1987.
- 8) 伊藤元博, 佐野 純, 杉山保幸・他: 教室で樹立したラット自然高肺転移モデル (GKS-HL) を用いた *Lentinus edodes* mycelia の抗腫瘍効果に関する検討. *Biotherapy* **16**(6) : 605-611, 2002.
- 9) 山崎寛生, 川西 貴, 松井保公・他: 実験的マウス肺転移モデル (B16F10) を用いた *Lentinus edodes* mycelia の抗腫瘍効果に関する検討. *Biotherapy* **17**(5) : 467-472, 2003.
- 10) Oikawa, T., Sasaki, M., Inose, M., *et al.*: Effects of cytogenin, a novel microbial product, on embryonic and tumor cell-induced angiogenic responses *in vivo*. *Anticancer Res.* **17** : 1881-1886, 1997.
- 11) 阿久澤浩司, 高橋典明, 藤江俊雄・他: *In vitro* におけるヒト肺癌細胞の血管新生能の比較検討と TNP-470 によるその制御. *日大医誌* **60** : 17-23, 2001.
- 12) 和田 勉, 若松谷子, 安藤隆雄・他: PSK の血管新生阻害作用. *Biotherapy* **15**(3) : 389-392, 2001.
- 13) Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., *et al.*: Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** : 6273-6278, 1997.
- 14) Voest, E.E., Kenyon, B.M., O'Reilly, M.S., *et al.*: Inhibition of angiogenesis *in vivo* by interleukin 12. *J. Natl. Cancer Inst.* **87** : 581-586, 1995.
- 15) 柴田昌彦, 根津 健, 竹川本夫・他: 癌患者における末梢血単核球の IL-12 産生能と Th1/Th2 バランスの検討. *Biotherapy* **11**(3) : 281-283, 1997.