MGN-3/バイオブランのラットにおける腺胃発癌の化学的誘導に対する化学予防作用およびその胃癌細胞におけるアポトーシス効果

Nariman K. Badr El-Din, PhD[1], Salma M. Abdel Fattah, PhD[2],
Deyu Pan, MS[3], Lucilene Tolentino, MD[3], and Mamdooh Ghoneum, PhD[3]

1Department of Zoology, Faculty of Science, University of Mansoura,Mansoura, Egypt

2National Center for Radiation and Technology, Cairo, Egypt

3Charles Drew University of Medicine and Science, Los Angeles,CA, USA

Submitted Date: 15 December 2015; Revised Date: February 13 2016; Acceptance Date: 19 February 2016

要旨

本研究では、我々はラットにおける腺胃発癌の化学的誘導に対する米ぬかアラビノキシラン（MGN-3/バイオブラン）の化学予防作用について調べた。胃癌は発癌性物質であるメチルニトロニトロソグアニジン（MNNG）によって誘発した。ラットはMNNG単独もしくはMNNG＋バイオブラン（40 mg/kg 体重）を合計8ヵ月間投与された。2回の別個の診断の平均結果では、MNNGとバイオブランの併用投与によって、4.5/12匹のラット（9/24回の診断、 37.5%）で胃異形成ならびに胃癌（腺癌）、3.5/12匹のラット（7/24回の診断、29.2%）で異形成、1/12匹のラット（8.3%）で腺癌が見られた。対照的に、MNNG単独投与のラットでは、8/10匹のラット（80%）が異形成ならびに腺癌、6/10匹のラット（60%）が異形成、2/10匹のラット（20%）が腺癌を発症した。両物質の併用による効果は、腫瘍マーカーKi-67の発現の有意な抑制に関与し、p53発現の増加、Bax発現、Bcl-2 発現の抑制、Bax/Bcl-2比の増加、ならびにカスパーゼ-3の活性化に示されるミトコンドリア依存経路を介した胃癌細胞のアポトーシスの顕著な誘導にも関連していた。また、バイオブラン投与はsub-G1期での細胞周期の停止を誘導し、低二倍体細胞数が著明に増加させた。さらに、バイオブラン投与は、ラットをMNNGによるリンパ球レベルの有意な低下から防護した。我々は、バイオブランがラットで腺胃発癌の化学的誘導に対する防護を提供し、ヒト胃癌患者の治療に役立つ可能性があると結論付けた。

Keywords:
バイオブラン、化学予防、胃癌、異形成、腺癌

緒言

2015年、アメリカ合衆国のみで約24,500件の胃癌が診断され、10,000人以上がこの種の癌で死亡した[1]。胃癌は、世界中で2番目に多い癌関連死亡の原因であった。2012年には世界中で約723,000人が胃癌で死亡し、新たに951,500例が胃癌と診断された。胃癌の死亡率は75%に近く、世界中で4番目に多い悪性腫瘍である[3]。

治療方法の選択肢は増えたにもかかわらず、胃癌は進行期で発見されることが最も多く[4]、5年生存率は27%と低い[2]。胃癌は、ヘリコバクター・ピロリによって引き起こされる慢性炎症から生じると考えられている[5]。数十年間、胃癌の発症は以下の複数の段階を経ると理論づけられてきた:正常粘膜→慢性活動性胃炎→萎縮→腸上皮化生（I/II/III）→異形成→胃癌[6]。

N-メチル-*N*'-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン（MNNG）は、発癌性物質や変異原として使用される生化学的手法である。MNNGは、発癌性物質（IARC Group 2A）としてリストに記載されるヒト発癌性の可能性がある物質として認識されている[7]。MNNGは染色体異常、姉妹染色分体交換、DNA鎖切断を誘発する。MandellならびにGreenbergによる紹介[8]、およびSugimuraならびにFujimuraによる初期研究[9]以来、MNNGは大腸癌誘導のための優れたモデルとされている。MNNGの臓器特異性は、ラットへの経口投与後のDNAメチル化のレベルと相関する。初期の研究では、宿主および環境的要因がMNNG誘導性胃発癌に有意に影響を与えることが示唆された[10]。さらなる研究では、MNNGのホルモンの側面について胃上皮の発癌能力との関係から検討された。MNNGの作用は、糖質コルチコイドとアンドロゲン受容体、ならびにマウスの腺胃におけるヒドロコルチゾンとジヒドロテストステロンのターンオーバーに関与することが明らかになっている[11]。本研究では、我々はMNNGを使用して雄Wistar ラットに腺癌を誘発し、その増殖に対するMGN-3/バイオブラン（米ぬかアラビノキシラン）の効果を検討した。

手術、化学療法、ならびに抗炎症剤等の従来の治療方法には限界があるため[12、13]、科学者達は、腺癌を治療するための他の方法を模索してきたが、胃癌と食事の関係同様に、食習慣の管理が腺癌発症を減少させるために重要であることを発見した[14]。胃癌は進行期において発見されることが最も多いため、天然食物繊維であるMGN-3/バイオブランがラットの化学物質誘発性胃癌の発症を防止する能力を検討することは、特に興味深い。

MGN-3/バイオブランは、米ぬかから抽出したアラビノキシランをシイタケ由来の加水分解酵素で処理したものである[15]。MGN-3/バイオブランは、様々な生物学的作用が検討されてきた。MGN-3/バイオブランは、γ線全身照射に対する放射線防護物質[16]、慢性C型肝炎患者のウィルス負荷を有意に軽減することができる抗ウィルス物質[17]として特徴づけられる。さらに、バイオブランは抗癌物質としての可能性も明らかになっている。MGN-3/バイオブランは、固形エールリッヒ癌（SEC）の腫瘍を有するマウスに対する抗腫瘍作用を示し[18]、肝細胞癌患者の治療において従来療法と相乗効果を示した[19]。抗癌作用は、樹状細胞を活性化し[20-22]、ナチュラルキラー（NK）細胞の活性を高め[18、23-27]、ヒトTおよびB細胞の分裂促進因子への反応を高め[15]、マクロファージの貪食能を増強する[28]、強力な生物学的応答調節物質として機能する本物質の能力に起因する。さらなる研究によって、本物質がアポトーシス誘発に関与するヒト白血病細胞表面のCD95受容体の感受性を高める能力を有することも明らかになった[29]。また、本物質は、ヒトおよびマウスの乳癌細胞のダウノルビシンやパクリタキセルなどの化学療法剤に対する感受性を高める[30、31]。

本研究の目的は、ラットの腺胃癌の化学的誘導に対するバイオブランの化学予防作用を検討し、その作用の背景にあると考えられる機序を明らかにすることである。本研究の結果では、バイオブランが癌細胞のアポトーシス誘導を介して、ラットの化学物質誘発性腺癌に対する防護効果を

示したことが示唆された。

材料と方法

メチルニトロニトロソグアニジン

ラットに合計200mg/kg（体重）のMNNG（Sigma-Chemical、St Louis、MO）を2週間、毎日経口投与した。

MGN-3/バイオブラン

バイオブランは、シイタケ由来の加水分解酵素で処理した米ぬか由来アラビノキシランである。バイオブランの主な化学構造は、主鎖にキシロース、側鎖にアラビノース重合体を有するアラビノキシランである[15]。バイオブランは0.9%食塩水に溶解して新しく調製し、合計8ヵ月間、腹腔内（IP；隔日で40mg/kg（体重））に投与した。バイオブランは、大和薬品㈱、東京、日本から提供された。

動物

本研究では、生後4ヵ月の雄のWistarラット（～120g（体重））を使用した。動物は、眼科学研究所（Giza、エジプト）から購入し、試験開始前に1週間順化させた。ラットは光度および温度制御（20±2℃）下で個別にケージに入れ、標準実験用キューブ飼料を与えられた。

試験デザイン

38匹のラットを以下の4群に分けた：（1）未処置対照群（7匹）、（2）バイオブラン投与群（9匹）、（3）MNNG投与群（10匹）、および（4）MNNG+バイオブラン投与群（12匹）。胃癌誘発のための標準プロトコルを使用し、ラットに200mg/kg（体重）の発癌性物質（MNNG）を2週間、1日1回経口投与し、続いて塩化ナトリウム（1mL/ラット）を4週間、3日に1回経口投与した。化学物質による誘導と同時に、ラットに40mg/kg（体重）のバイオブラン単独（グループ2）を隔日投与、もしくはMNNG+バイオブラン（グループ4）を合計8ヵ月間投与した。投与終了（8ヵ月後）までにラットを屠殺し、胃組織の複数のパラメーターについて調べた。

検体収集と胃の組織

調製

投与期間（8ヵ月）後、ヘパリン処理済みガラス毛細管を使用して、ラットの眼窩静脈叢を穿刺し、容器に血液検体を採取した。組織を調製するために、ラットを頚椎脱臼によって屠殺し、大弯に沿って胃を切開、切除し、丁寧に観察した。その後、胃を大弯と小弯に沿って対称的に2個に分割した。片方の部分をフローサイトメトリー分析のため、懸濁液中で細胞を調製した；他方の部分は、病理組織学的検査のために10%のホルムアルデヒドで固定した。

フローサイトメトリー解析

細胞調製　異なる治療条件下のラットに生じた胃癌から腫瘍組織を切除、細断し、静かに細いナイロンガーゼ（40-50メッシュカウント/cm、HD140　Zuricher Buteltuch fabrik AG）に擦り通した。その後、検体をpH7.5のトリス/EDTA（エチレンジアミン四酢酸）緩衝液（3.029gの0.1Mトリス-（ヒドロキシメチル）アミノメタンと1.022gの0.07M塩酸、および0.47gの0.005Mエチレンジアミン四酢酸 ）でガーゼを通して洗浄した。細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で懸濁、200～300rpmで5分間遠心分離し、滅菌 PBS（セル密度約1×10^6細胞/mL）で再懸濁した後に氷冷70%エタノール/PBSで固定し、使用するまで-20℃で保管した。

ヨウ化プロピジウム（PI）による細胞周期解析　細胞周期は、細胞複製の過程で行われる一連の事象であり、細胞周期の観察によって、病気の診断と治療の予後について多くの情報を得ることができる。腫瘍細胞懸濁液を遠心分離し、細胞ペレットを1mLのPI溶液中で暗室において30分間再懸濁した後に、フローサイトメトリーで分析した。DNA解析プログラムMODFIT(Verity Software House、Inc、Topsham、ME）を使用してデータを解析した。コンピューターソフトウェアで、G_0/G_1ピーク周辺の変動係数だけでなく、各検体についてDNA細胞周期の各期（G_0/G_1、S、G_2/M）における細胞の割合を算出した。G_1における二倍体のピークに加えて、明確なピークが二倍体の内部標準より10%以上逸脱した場合、もしくはG_1自体が対応するG_2/Mピークから10%以上逸脱した場合に、異数体細胞が存在すると考えられた。アポトーシス指数（AI）/増殖指数（PrI）を算出した。

アネキシン-V/PI　アネキシン-Vは、正常な細胞ではないアポトーシス細胞の表面に露出するホスファチジルセリン（ps）残基に結合するたんぱく質である。アポトーシスの際、ps残基は細胞膜外層に露出する。PSのアネキシン-Vとの結合は、アポトーシスの生化学的マーカーとして確立されている。胃癌細胞におけるバイオブラン投与によるアポトーシス誘導をアポトーシス検出キット、アネキシンV結合Alexafluor 488を製造者（BD Biosciences, San Jose, CA）の指示に従って使用し、フローサイトメトリーで定量分析した。Alexa488で染色された初期アポトーシス細胞は緑の蛍光を発し、蛍光活性化細胞選別ヒストグラムの右下のクアドラントに位置し、Alexa488とヨウ化プロピジウムで染色された後期アポトーシス細胞は赤―緑の蛍光を発して、蛍光活性化細胞選別ヒストグラムの右上のクアドラントに位置する。

細胞増殖マーカー Ki-67　Ki-67は、癌細胞の早期予測因子として一般的に使用される腫瘍進行の細胞増殖マーカーである。PBSで懸濁した胃癌細胞を1×10^6細胞/mLの濃度で調製し、マウスKi-67抗体たんぱく質（sc-7846 Per CP；Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA）　を製造者の指示に従って使用してフローサイトメトリーによって分析した。

アポトーシス調節物質（p53、Bax、およびBc12）発現の分析 アポトーシス促進たんぱく質（p53、Bax）、もしくは抗アポトーシスたんぱく質（Bc12）発現の分析のため、バイオブランを投与／

非投与のラットの胃細胞（1×10^6）を、マウス抗p53、抗Bax、もしくは抗Bcl2抗体と室温で1時間反応させ、その後FITC結合ヤギ抗ウサギ抗体と反応させた。細胞を丁寧に洗浄し、フローサイトメーター（Becton Dickinson, San Jose,CA）で分析した。Cell Questソフトウェアを使用して合計20,000個の細胞を得て、FITC-蛍光（*x*軸）vs.細胞数（*y*軸）のヒストグラム・プロットを対数蛍光強度で示した。

カスパーゼ-3活性の定量　ab65613Caspase 3（活性型）FITC染色キット（Abcam）を用いて、カスパーゼ-3の活性を確認した。分析では、マーカーとしてFITCが結合したカスパーゼ-3阻害剤DEVD-FMK（FITC-DEVD-FMK）を使用した。FITC-DEVD-FMKは細胞透過性で毒性がなく、アポトーシス細胞において活性化されたカスパーゼ-3に不可逆的に結合する。FITC標識によって、アポトーシス細胞の活性化カスパーゼ-3を直接フローサイトメトリーで検出することが可能になる。細胞をFITC-DEVD-FMKと混合し、CO_2が5%のインキュベーターにおいて、37℃で0.5～1時間反応させた。細胞を3000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去した。細胞を300μLの洗浄バッファーで再懸濁した。検体は氷上で維持し、FL-1チャネルを使用してフローサイトメトリーで分析した。

腫瘍組織の病理組織学的検査

MNNG暴露の8ヵ月後、各群の胃組織の病理組織学的変化を調べた。組織を10%ホルマリン溶液で固定し、カセットで一晩固定した。パラフィン包埋組織をミクロトームで4μmの厚さに切り、ヘマトキシリンとエオジン（H&E）で染色して、光学顕微鏡下で過形成、異形成、癌病変の兆候を観察した。さらに、癌もしくは病変が見られるラットの数を同群のラット総数で割り、癌発症および癌の病変の割合を算出した。最初にMNNG単独投与ラット（10匹）とMNNG+バイオブラン投与ラット（12匹）の胃組織を、最初に異形成の存在について検討し、続いて癌の存在について再検討した。異形成ならびに腺癌の発生数については、腫瘍組織を2回調べ、結果の平均値を算出した。

リンパ球レベル

MNNG暴露の8ヵ月後、ヘパリン処理したプラスチック製注射器を使用し、異なる治療条件下のラットから心臓穿刺によって血液サンプルを採取した。血液は、リンパ球レベルを測定するために凝固剤が入った試験管に即座に移した。

統計解析

値は平均値±SEで報告し、平均値間の差の有意性は、一元配置分散分析（ANOVA）とニューマン-クールズ多重比較検定の組合せ、もしくは必要に応じてStudent’s *t*検定によって決定した。異なる病理学的病変をフィッシャー直接確立法、もしくは必要に応じてχ^2検定によって評価した。$P<.05$を統計学的に有意とした。

結果

異なる治療条件下のラットを以下のパラメーターについて調べた：胃癌の病理組織学、Ki-67発現、細胞周期解析、アポトーシス、アポトーシス調節因子、およびリンパ球レベル。

病理組織学

異形成および癌の割合　8ヵ月後の胃粘膜のH&Eで染色した病理組織における異形成や癌の割合を調べた。MNNG単独投与ラット（10匹）の胃組織およびMNNG＋バイオブラン投与のラット（12匹）の胃組織を異形成の存在について検討し、癌の有無について再検討した。報告する結果は、2種類の独立した診断の平均値である。図1は、MNNG単独投与によって、胃異形成ならびに腺癌が8/10匹のラット（80%）において発生したことを示す：6/10匹のラット（60%）は異形成を示し、2/10ラット（20%）が腺癌を発症した。対照的に、バイオブラン存在下でMNNGを投与したラットでは、異形成および腺癌の発症率は有意に低く、合計4.5/12匹のラット（9/24回の診断、37.5%、*P*<.01）においていずれかの症状が認められた：3.5/12匹のラット（7/24回の診断、29.2%；*P*<.01）において異形成が見られ、腺癌を発症したのは1/12匹（8.3%）のラットのみであった。

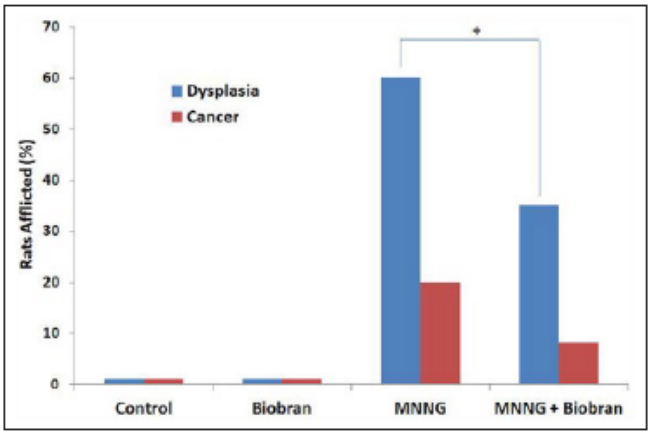

図 1.　MNNG+バイオブラン投与後の異形成もしくは腺癌の動物の割合　動物は、異なる条件下の処置を受けた：未処置対照群、バイオブラン単独群、と MNNG 単独群、MNNG+バイオブラン群。投与 8 ヵ月後、異形成ならびに腺癌の割合を検討した。異形成もしくは腺癌は未処置対照群もしくはバイオブラン単独投与群で検出しなかった。各群は、7～12 匹のラットが含まれる。*$P<.01$ MNNG+バイオブラン群との比較

胃組織の病理組織学的検査　発癌性物質処置の7週間後におけるH/Eで染色したラット胃粘膜組織の病理組織学的変化では、再生性異型を伴う慢性表層性胃炎を有する胃組織が見られた。16週間後に胃組織において、粘膜と粘膜下層に軽度から中等度の慢性炎症性細胞浸潤、および局所的な粘膜内リンパ球凝集が見られた。16週間後、異形成および悪性腫瘍のいずれも検出されなかった。

8ヵ月後、異なる治療条件下（対照、発癌性物質MNNG、およびMNNG＋バイオブラン）のラットの胃粘膜を調べた。7匹の対照未処置ラットの胃粘膜を調べたところ、体部および前庭部は正常範囲内であった。対照群の組織において過形成、異形成および発癌は検出されなかった（図2A～D）。MNNG投与ラットの胃の粘膜において、粘液腺の過形成と低度および高度の腺異形成が見られた（図2E～H）。さらに、浸潤性高分化型の角化細胞発癌も検出された（図2I）。対照的に、MNNG＋バイオブランを投与したラットでは、斑状で小領域の上皮内の高度異形成／癌が1/12匹（8.3%）のラットのみで見られ、斑状で小領域の軽度異形成は、3.5/12匹の組織（7/24検体、29.2%）の

みで見られた。これは、バイオブラン投与によって胃異形成および腺癌の程度が軽減することを示唆している。

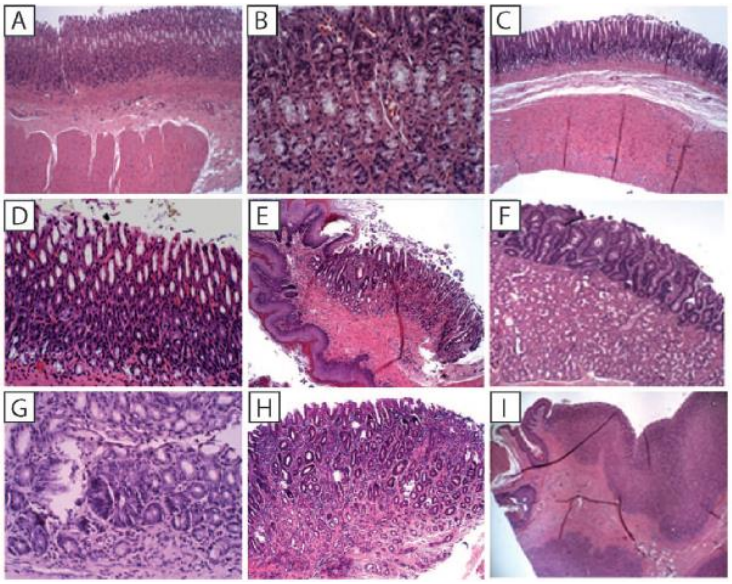

図 2.　8 ヵ月後の H&E で染色した胃組織の病理組織学的検査 A-D は、未処置対照群ラットの胃組織が正常範囲内であることを示す。(A) 正常な胃体部（4×）(B) 胃体部粘膜（10×）(C) 正常胃前庭部（4×）(D) 胃前庭部粘膜（10×）(E) 胃腺異形成を示す切片（2×）(F) 軽度の腺異形成および粘液腺過形成（10×）(G) 胃の高度腺異形成を示す切片（画像は小型病巣のみ）;（40×）(H) 高分化型胃腺癌（4×）;（I) 正常範囲内の胃食道粘膜（2×）

Ki-67発現

腫瘍増殖マーカーKi-67の発現に対するMNNGとバイオブラン投与の効果を検討した。MNNG単独投与ラットでは、胃腫瘍におけるKi-67発現が50.8%見られたが、MNNG+バイオブラン投与ラットでは39.8%で、21.6%減少した（図3）。

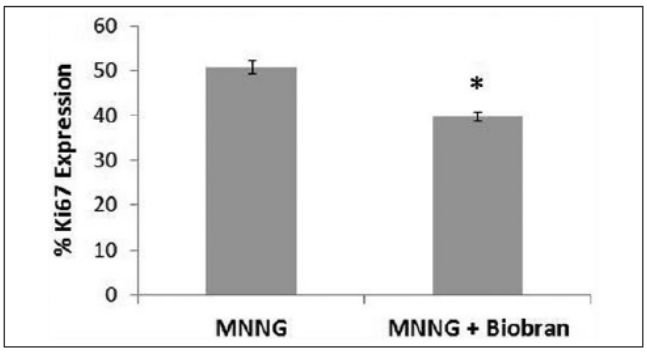

図 3.　フローサイトメトリー分析によるラットの胃腫瘍細胞における Ki-67 発現に対する MNNG+バイオブラン投与の効果。各値は、ラット 6 匹/群の平均値±SE を示す。* .01 レベルで MNNG 群と有意差がある（MNNG 群の%変化）

細胞周期分析

胃腫瘍細胞の細胞周期の異なるフェーズにおけるMNNG+バイオブラン投与の効果を検討した。図

4Aのデータでは、MNNG存在下でのバイオブラン投与はsubG1期の細胞周期停止を引き起こし、MNNG単独投与群に比べて低二倍体の細胞数が115.8%（$p<0.1$）まで顕著に増加したことが示されている。さらに、MNNG+バイオブラン投与後にAI/PrI比率が顕著に（66.65%）上昇し、MNNG単独投与と比べて1.67倍の上昇だった（図4B）。

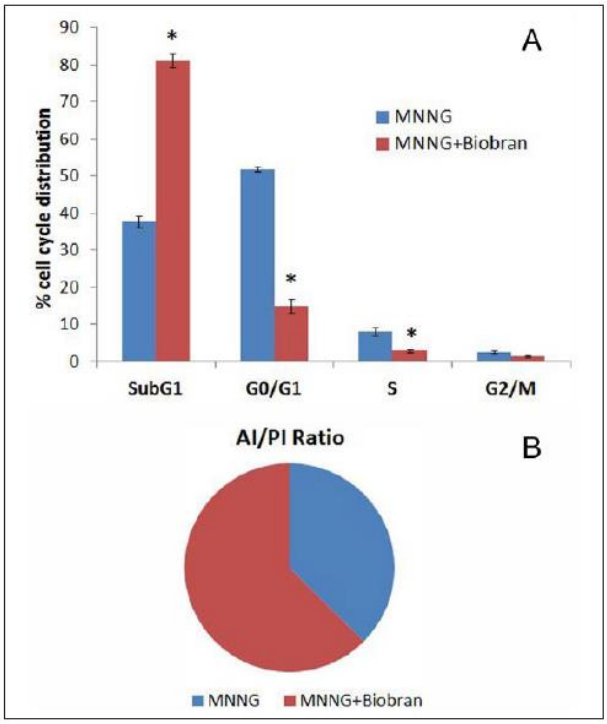

図4. (A) フローサイトメトリー分析によるMNNG+バイオブラン投与のラット胃腫瘍細胞の細胞周期分析に対する効果。各値は、ラット6匹/群の平均値±SEを示す。＊.01レベル（MNNG群の%変化）でMNNG値と有意差がある (B) AI/PrI比は、アポトーシス指数（AI=アポトーシス細胞/4期の総細胞数）の増殖指数（PrI=（S細胞+G_2M）/（G_0細胞数／G_1+S+G_2／M））に対する割合。

アネキシンV/PI染色によるアポトーシスの定量

アポトーシス（初期、後期、および合計）のレベルを分析するために、アネキシンV/PIを使用した。表１の結果は、高いレベルの癌細胞のアポトーシス（63.7%）を誘導する能力に示されるように、バイオブランが強力なアポトーシス物質であることを示している。また、バイオブランは、発癌性物質投与ラットと比較すると、初期アポトーシスを230.1%、後期アポトーシスを20.2%それぞれ誘導する効果があった。

	Groups	
Parameters	MNNG	MNNG + Biobran
Early apoptosis	7.6 ± 2.1	24.9 ± 3.1 (230.1%)*
Late apoptosis	28.9 ± 1.6	34.8 ± 1.1 (20.2%)*
Total apoptosis	36.5 ± 3.3	59.7 ± 2.7 (63.7%)*

表1. アネキシンV/PI細胞二重染色で測定した腫瘍細胞のアポトーシスに対するバイオブラン投与の効果

略語： PI、ヨウ化プロピジウム；MNNG、メチルニトロニトロソグアニジン。[a]各値は、ラット6匹/群の平均を示す（MNNG群の%変化）。＊ $P<.01$

アポトーシス調節因子の割合

フローサイトメトリーを用いて、MNNGおよびバイオブランが胃腫瘍細胞のアポトーシス調節因子

の割合に及ぼす影響を調べた。表2の結果は、p-53発現の37.3%増加、Bax発現の49.3%増加、Bcl-2発現の15.1%減少、Bax／Bcl-2比の75.7%増加、およびカスパーゼ-3活性の34.8%増加に示されるように、MNNG投与ラットに比べて、バイオブランがミトコンドリア依存性の経路を介して、*in vivo*における胃癌細胞のアポトーシスを誘導することを示している。

Parameters	Groups	
	MNNG	MNNG + Biobran
P53 expression	33.3 ± 1.0	45.8 ± 0.3* (37.3%)
Bax expression	20.6 ± 1.4	30.7 ± 1.8** (49.3%)
Bcl-2 expression	50.8 ± 1.9	43.1 ± 2.0* (−15.1%)
Bax/Bcl-2 ratio	0.4 ± 0.04	0.7 ± 0.06** (75.7%)
Activated caspase-3	39.4 ± 1.4	53.1 ± 0.9** (34.8%)

表2. フローサイトメトリー分析によるバイオブランが胃腫瘍細胞のアポトーシス調節物質の割合に及ぼす影響[a]
略語： MNNG、メチルニトロニトロソグアニジン、[a]データは、ラット6匹/群およびMNNG群%変化の平均値±SEを示す。*$P<.05$、**$P=<.01$; 未処置MNNG群と比較して（MNNG群の%変化）

リンパ球レベル

MNNGおよびバイオブランがリンパ球の割合に及ぼす効果を調べた。図5に示すように、MNNG単独投与のラットでは、リンパ球の割合の有意な減少が見られた（未処置対照ラットの−23.3%;$P<.01$）。一方、バイオブラン摂取によってリンパ球が回復し、通常レベルの範囲内にとどまった（$P<.05$）。

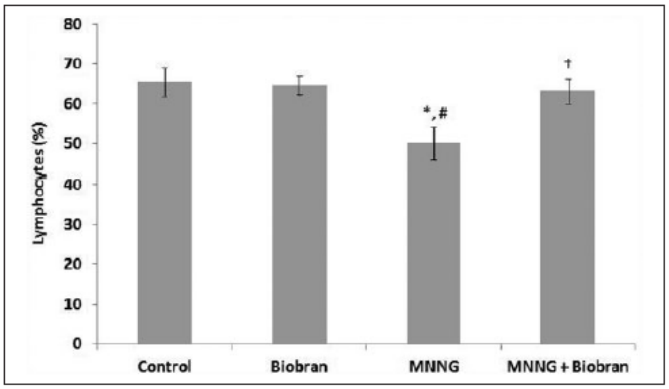

図5. リンパ球の割合それぞれの値は、ラット6匹/群の平均値±SEを示す。*対照群と比較して.01レベルの有意差。#バイオブラン群と比較して.01レベルの有意差。†MNNG群と比較して.05レベルの有意差。

考察

MGN-3／バイオブランは米ぬか由来の天然物質であり、様々な種類の腫瘍を有する動物モデルおよびヒトにおいて、癌治療での有効性が広く検討されてきた。本研究の結果は、動物の胃の異形成や腺癌の発生率の有意な低下に示されるように、バイオブラン投与によってラットの腺胃発癌の化学的誘導が顕著に抑制されたことを示している。発癌性物質MNNG単独投与ラットでは80%のラットで胃の異形成および腺癌が見られたが、これと比較して、MNNG+バイオブランへの暴露では37.5%のラットで見られた。

病理組織学的検査は、さらに腫瘍マーカー Ki-67発現の有意な減少で確認された。本試験におけるバイオブランの抗胃腫瘍効果は、異なる動物モデルでバイオブランの抗腫瘍効果を示した我々

および他の研究者による過去の研究と一致する。これらの研究では、SEC腫瘍[18、32]、神経芽細胞腫[33]、肝臓癌[34]について検討された。また、肝細胞癌患者の治療における従来の治療法（CT）とバイオブランの相乗効果によって、CT単独で治療した患者と比較して、腫瘍容積の減少、癌再発率の低下および生存率の上昇が見られることが明らかになった[19]。Markusらは、バイオブランの投与後の転移性血管外皮腫患者の完全な回復と治療の成功についても明らかにした。[35]

バイオブランのアポトーシス誘導能力は、本物質が胃腫瘍の退縮を誘導するメカニズムを示していると考えられる。MNNG投与ラットと比較して、バイオブラン投与によって胃癌細胞のアポトーシスが有意に増加した。バイオブランの高いアポトーシス効果は、*in vivo*におけるSEC細胞のフローサイトメトリー分析ならびに病理組織学的検査によっても明らかにされている[18]。胃癌細胞のバイオブラン誘導性アポトーシスは、低二倍体細胞数が顕著に増加するsub-G1期における胃癌細胞の細胞周期停止、ならびにp-53の増加、Baxの発現、Bcl-2発現、ならびにBax/Bcl-2比の上昇に示されるミトコンドリア依存性経路を介して引き起こされる。前述のアポトーシス分子の変化は、ミトコンドリア外膜の破壊ならびに最終的にカスパーゼ-3を活性化するシトクロムCの放出を誘発する可能性がある。従って、バイオブラン投与によってカスパーゼ-3の活性も増強するはずであり、実際に我々はMNNG投与ラットと比較してさらに34.8%の増加を計測した。バイオブラン投与がカスパーゼ-8、-9、および-3の活性化を介して、ヒト乳癌細胞のアポトーシスを誘導することを示している[36]。さらに、我々はバイオブラン投与後の胃癌細胞における初期および後期アポトーシスレベルの上昇も観察し、さらにバイオブランがミトコンドリア介在性アポトーシスを惹起する能力も確認した。複数の薬草が、ミトコンドリア依存性経路を介して様々な種類の癌細胞のアポトーシスを誘導することが明らかになっている；*Dryopteris fragrans (L.)* Schottから抽出したAspidin PBのヒト骨肉腫細胞に対する効果[37];天然クマリン化合物であるエスクレチンのヒト乳癌細胞ZR-75-1に対する効果；天然五環性トリテルペン酸であるオレアノール酸の大腸癌に対する効果[39]。

バイオブランによる胃腫瘍の退縮は、Ki-67発現の減少およびアポトーシス／増殖比の最大化、ならびに胃組織の病理組織診断によって観察された。 前述の結果は、バイオブラン投与後のSEC腫瘍の退縮[40]、ならびに薬草のセイヨウヤマハッカによる腫瘍容積抑制[41]の研究と一致する。バイオブラン投与後の胃癌細胞のアポトーシス誘導は、生細胞数の有意な抑制ならびに初期および後期のアポトーシス胃癌細胞の増加に関連していた。これらのデータは、バイオブランによるEAC癌細胞の初期および後期アポトーシス誘導についての我々の近年の研究と一致する[40]。バイオブランがアポトーシス誘導作用を発揮する正確なメカニズムは十分に明らかにされていないが、バイオブランがアポトーシスの誘導に関与する細胞膜表面のCD95受容体の感受性を高める能力[29]と関連している可能性がある。

バイオブランの免疫調節効果は、本物質が腺癌の増殖を抑制する他のメカニズムを示しているのかもしれない。発癌性化学物質は、強力な免疫抑制剤として知られている。我々ならびに他の研究者による先行研究では、発癌性物質への曝露によって、免疫細胞の活動が機能不全になることが明らかになっている。[42-44]

本研究では、MNNGおよびバイオブランがリンパ球レベルに及ぼす影響を検討した。リンパ球は、身体の免役能細胞とその前駆細胞を構成する白血球の一種である。MNNGを単独投与したラットでは、リンパ球の割合に有意な減少が見られた；しかし、バイオブランを併用投与した結果、MNNGによるリンパ球減少を防護した。他の研究において、バイオブランは樹状細胞[22-22]、NK細胞[23-27]、$CD8^+$T細胞[22]、ならびにインターフェロン産生[21、22、24]を含む抗腫瘍作用を有する免疫細胞を活性化する強力な生物学的応答調節物質であることが明らかになった。バイオブランが*in vivo*において神経芽細胞腫の増殖を抑制する能力は、NK細胞の細胞傷害活性の亢進およびNK細胞活性化マーカーの上昇と強く関連している[33]。

本研究の結果では、MNNGへの曝露によって赤血球（RBC）指数が低下し（RBC数およびHbならびにHctレベルの低下）、血小板レベルが上昇した。しかし、MNNG+バイオブランを投与したラットでは、赤血球指数レベルと白血球レベルが8ヵ月間安定していた（データ非掲載）。つまり、これらの研究結果は、バイオブランが発癌性物質から白血球数と造血組織全体の安定性を保護することを示している。また、我々は、バイオブランがMNNGによる脾臓と肝臓の重量の低下を防ぐことを確認した（データ非公開）。

本研究のデータでは、バイオブランが癌細胞のアポトーシスを特異的に誘導した。バイオブランは、安全で無毒性の物質であることが以前に明らかにされている。本物質の生物学的安全性は、以下の通り立証されている：LD_{50}＞36g/kg；変異原性Ames試験は陰性；ラットにおける亜慢性毒性試験、抗原性試験、および遺伝毒性試験のすべてにおいてバイオブランは無毒性であった[45、46]。肝臓の酵素（SGOT、SGPT）を含む血液化学分析を使用したヒト試験においても、安全であること明らかになっている[23]。また、CTとバイオブランを併用した肝細胞患者は、CT単独で治療した患者と比較して、α-フェトプロテインおよびアラニントランスアミナーゼのレベルが低いことが明らかになった[19]。本研究において、バイオブランを8ヵ月間投与したラットでは、行動、体重（非掲載）、および生存率に変化は見られなかった。

我々は、バイオブランがラットの腺胃発癌の化学的誘導に対する防護効果を発揮すると結論付けた。本研究では、胃癌の予防と治療において効果的なアジュバントとして使用できる可能性のある悪性細胞の強力なアポトーシス誘導物質としてのバイオブランの役割を強調する。

著者注記

本研究におけるデータの一部を米国癌学会年次総会（AACR）で発表した；2014年4月5〜9日；サンディエゴ、カリフォルニア。スポンサーは以下に関与しなかった；試験デザイン；データの収集、分析、もしくは解釈；論文の執筆；出版のための論文投稿の決定。

利益相反の宣言

著者は、本論文の研究、原作者、および／または出版について利益相反の可能性がないことを宣言する。

資金提供

著者は、本論文の研究、原作者、および／または出版について以下の資金的援助を受けたことを開示する。 本研究は、大和薬品（株）（東京都、日本）の援助を受けた。助成金#T0099108（M.Ghoneum）；およびNIH-NIMHDによる助成金U54MD007598（旧 U54RR026138）ならびにS21MD000103（D.Pan）。

References

1. American Cancer Society. Key statistics about stomach cancer. http://www.cancer.org/cancer/stomachcancer/detailedguide/stomach-cancer-key-statistics. Accessed March 19, 2016.
2. de Martel C, Forman D, Plummer M. Gastric cancer: epidemiology and risk factors. *Gastroenterol Clin North Am*. 2013;42:219-240.
3. American Cancer Society. Cancer facts and figures 2012. http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2012/. Accessed March 19, 2016.
4. Takahashi T, Saikawa Y, Kitagawa Y. Gastric cancer: current status of diagnosis and treatment. *Cancers (Basel)*. 2013;5:48-63.
5. Yakirevich E, Resnick MB. Pathology of gastric cancer and its precursor lesions. *Gastroenterol Clin North Am*. 2013;42:261-284.
6. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet*. 1975;2:58-60.
7. International Agency for Research on Cancer. N-Methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/Suppl7-109.pdf. Accessed December 2015.
8. Mandell JD, Greenberg J. A new chemical mutagen for bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1960;3:575-577.
9. Sugimura T, Fujimura S. Tumour production in glandular stomach of rat by N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature*. 1967;216:943-944.
10. Ohgaki H, Kleihues P, Sugimura T. Experimental gastric cancer. *Ital J Gastroenterol*. 1991;23:371-377.
11. Kodama M, Kodama T, Kodama M. Is N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine a hormonal carcinogen? *Anticancer Res*. 1991;11:941-946.
12. Tan VP, Wong BC. Gastric cancer chemoprevention: the current evidence. *Gastroenterol Clin North Am*. 2013;42:299-316.
13. Bathaie SZ, Miri H, Mohagheghi MA, Mokhtari-Dizaji M, Shahbazfar AA, Hasanzadeh H. Saffron aqueous extract inhibits the chemically-induced gastric cancer progression in the Wistar albino rat. *Iran J Basic Med Sci*. 2013;16:27-38.
14. Bertuccio P, Rosato V, Andreano A, et al. Dietary patterns and gastric cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2013;24:1450-1458.
15. Ghoneum M. Anti-HIV activity in vitro of MGN-3, an activated arabinoxylan from rice bran. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;243:25-29.
16. Ghoneum M, Badr El-Din NK, Abdel Fattah SM, Tolentino L. Arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) provides protection against whole-body γ-irradiation in mice via restoration of hematopoietic tissues. *J Radiat Res*. 2013;54:419-429.
17. Salama H, Medhat E, Shahin M, Ghoneum M. Effect of arabinoxylan rice bran (Biobran) on viremia level in patients with chronic HCV infection. Paper presented at: International Congress of Hepatitis C; July 20-22, 2015; Orlando, FL.
18. Badr El-Din NK, Noaman E, Ghoneum M. In vivo tumor inhibitory effects of nutritional rice bran supplement MGN-3/Biobran on Ehrlich carcinoma-bearing mice. *Nutr Cancer*. 2008;60:235-244.
19. Bang MH, Van Riep T, Thinh NT, et al. Arabinoxylan rice bran (MGN-3) enhances the effects of interventional therapies for the treatment of hepatocellular carcinoma: a three-year randomized clinical trial. *Anticancer Res*. 2010;30:5145-5151.
20. Cholujova D, Jakubikova J, Sedlak J. Biobran-augmented maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Neoplasma*. 2009;56:89-95.
21. Ghoneum M, Agrawal S. Activation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro by the biological response modifier arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran). *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24:941-948.
22. Ghoneum M, Agrawal S. MGN-3/biobran enhances generation of cytotoxic CD8+ T cells via upregulation of dec-205 expression on dendritic cells. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014;27:523-530.
23. Ghoneum M. Enhancement of human natural killer cell activity by modified arabinoxylan from rice bran (MGN-3). *Int J Immunother*. 1998;14:89-99.
24. Ghoneum M, Jewett A. Production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma from human peripheral blood lymphocytes by MGN-3, a modified arabinoxylan from rice bran, and its synergy with interleukin-2 in vitro. *Cancer Detect Prev*. 2000;24:314-324.
25. Ghoneum M, Abedi S. Enhancement of natural killer cell activity of aged mice by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran). *J Pharm Pharmacol*. 2004;56:1581-1588.
26. Ghoneum M, Brown J. NK immunorestoration of cancer patients by MGN-3, a modified arabinoxylan rice bran (study of 32 patients followed for up to 4 years). In: Klatz R, Goldman R, eds. *Anti-Aging Medical Therapeutics*. Vol. III. Marina del Rey, CA: Health Quest Publications; 1999:217-226.
27. Cholujova D, Jakubikova J, Czako B, et al. MGN-3 arabinoxylan rice bran modulates innate immunity in multiple myeloma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62:437-445.
28. Ghoneum M, Matsuura M. Augmentation of macrophage phagocytosis by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/biobran). *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2004;17:283-292.
29. Ghoneum M, Gollapudi S. Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) sensitizes human T cell leukemia cells to death receptor (CD95)-induced apoptosis. *Cancer Lett*. 2003;201:41-49.

30. Gollapudi S, Ghoneum M. MGN-3/Biobran, modified arabinoxylan from rice bran, sensitizes human breast cancer cells to chemotherapeutic agent, daunorubicin. *Cancer Detect Prev*. 2008;32:1-6.
31. Ghoneum M, Badr El-Din NK, Ali DA, Alaa El-Dein M. Modified arabinoxylan from rice bran, MGN-3/Biobran, sensitizes metastatic breast cancer cells to paclitaxel in vitro. *Anticancer Res*. 2014;34:81-87.
32. Noaman E, Badr El-Din NK, Bibars MA, Abou Mossallam AA, Ghoneum M. Antioxidant potential by arabinoxylan rice bran, MGN-3/biobran, represents a mechanism for its oncostatic effect against murine solid Ehrlich carcinoma. *Cancer Lett*. 2008;268:348-359.
33. Pérez-Martínez A, Valentín J, Fernández L, et al. Arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) enhances natural killer cell-mediated cytotoxicity against neuroblastoma in vitro and in vivo. *Cytotherapy*. 2015;17:601-612.
34. Badr El-Din NK, Ali DA, Othman R, Ghoneum M. Prevention of hepatocarcinogenesis in rats by arabinoxylan rice bran, MGN-3/Biobran. Paper presented at: AACR Annual Meeting; April 16-20, 2016; New Orleans, LA.
35. Markus J, Miller A, Smith M, Orengo I. Metastatic hemangiopericytoma of the skin treated with wide local excision and MGN-3. *Dermatol Surg*. 2006;32:145-147.
36. Ghoneum M, Gallapudi S. Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) enhances yeast-induced apoptosis in human breast cancer cells in vitro. *Anticancer Res*. 2005;25:859-870.
37. Wan D, Jiang C, Hua X, Wang T, Chai Y. Cell-cycle arrest and apoptosis induced by aspidin PB through the p53/p21 and mitochondria-dependent pathways in human osteosarcoma cells. *Anticancer Drugs*. 2015;26:931-941.
38. Chang HT, Chou CT, Lin YS, et al. Esculetin, a natural coumarin compound, evokes Ca^{2+} movement and activation of Ca^{2+}-associated mitochondrial apoptotic pathways that involved cell-cycle arrest in ZR-75-1 human breast cancer cells [published online October 28, 2015]. *Tumour Biol*. doi:10.1007/s13277-015-4286-1.
39. Li L, Wei L, Shen A, Chu J, Lin J, Peng J. Oleanolic acid modulates multiple intracellular targets to inhibit colorectal cancer growth. *Int J Oncol*. 2015;47:2247-2254.
40. Badr El-Din NK, Ali D, Moazen M, Ghoneum M. Biobran/MGN-3, arabinoxylan from rice bran, sensitizes breast adenocarcinoma tumor cells to paclitaxel in mice. Paper presented at: Annual meeting of the American Association for Cancer Research; April 18-22, 2015; Philadelphia, PA.
41. Saraydin SU, Tuncer E, Tepe B, et al. Antitumoral effects of *Melissa officinalis* on breast cancer in vitro and in vivo. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13:2765-2770.
42. Ghoneum M, Wojdani A, Alfred L. Effect of methylcholanthrene on human natural killer cell cytotoxicity and lymphokine production in vitro. *Immunopharmacology*. 1987;14:27-33.
43. Ghoneum M, Gill G, Wojdani A, Payne C, Alfred LJ. Suppression of basal and corynebacterium parvum-augmented NK activity during chemically induced tumor development. *Int J Immunopharm*. 1987;9:71-78.
44. Carlson EA, Li Y, Zelikoff JT. The Japanese medaka (*Oryzias latipes*) model: applicability for investigating the immunosuppressive effects of the aquatic pollutant benzo[a]pyrene (BaP). *Mar Environ Res*. 2002;54:565-568.
45. Jacoby HI, Wnorowski G, Sakata K, Maeda H. The effect of MGN-3 on cisplatin and doxorubicin induced toxicity in the rat. *J Nutraceticals Funct Med Foods*. 2001;3:3-11.
46. Daiwa Pharmaceutical Co, Ltd. BioBran rice bran arabinoxylan compound. http://www.daiwa-pharm.com/. Accessed December 2015.