

# ヒト胃癌細胞(KATOⅢ)およびヒト肺癌細胞(LU99)に対する *Ganoderma lucidum* (霊芝)由来の活性ステロイドによる アポトーシス誘導作用

## Induction of Apoptosis by an Active Steroid Prepared from *Ganoderma lucidum* (Reishi) in Human Stomach Cancer KATOⅢ and Human Lung Cancer LU99 Cells

伊藤浩子<sup>1),4)</sup>, 幹渉<sup>1)</sup>, 柿沼誠<sup>1)</sup>, 中田福佳<sup>2)</sup>, 佐々木啓之<sup>3)</sup>, 伊藤均<sup>4)</sup>  
Hiroko Itoh<sup>1),4)</sup>, Wataru Miki<sup>1)</sup>, Makoto Kakinuma<sup>1)</sup>, Fukuyoshi Nakata<sup>2)</sup>,  
Hiroyuki Sasaki<sup>3)</sup>, Hitoshi Ito<sup>4)</sup>

キーワード: 霊芝, 赤芝, ヒト癌細胞, アポトーシス誘導

### はじめに

霊芝はサルノコシカケ科のマンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) の子実体から得られる生薬であり、中国最古の薬物書といわれ、「神農本草経」の上品に収載されている。古来、人参と共に最も貴重な霊薬と考えられ、漢方では、強壯、補血、精神安定、利尿、補肝作用があるとされ、咳嗽、気管支炎、関節炎などの多様な疾病に有効とされている<sup>1)</sup>。

1977年、世界で初めて著者ら<sup>2)</sup>は、梅の古木で人工栽培された「古梅霊芝」から得られた多糖体や中国吉林省白山の山に自生している松杉霊芝<sup>3)</sup>や五岳霊芝<sup>4)</sup>が、マウスの Sarcoma 180 移植固型癌に対して抗癌作用を示すことを報告した。

近年、癌研究の分野ではアポトーシス、すな

わち細胞自滅に関する研究が盛んに行われている。アポトーシスは生物個体発生における組織、臓器の形成、生体の恒常性の維持と防衛に重要な働きをしているだけでなく、多くの病気の発生に深い関係があることが、解明されつつある。今回は抗癌作用が確認されている霊芝から抽出したステロイド画分を用いて、ヒト胃癌細胞および肺癌細胞におけるアポトーシス誘導作用について検討した。

### 実験材料および実験方法

#### 1. 被検物質

「神農本草経」の分類は、その色の違いによって赤芝、黒芝、青芝、白芝、黄芝、紫芝などと区別されているが、これらは全て、原植物が異なるわけではなく、系統、生育条件などの相

- 1) 三重大学生物資源学部海洋生物化学研究室 Laboratory of Marine Biochemistry, Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie, 514-8507, Japan
- 2) パワフル健康食品株式会社 Powerful Healthy Food Corporation
- 3) 株式会社リンクス Rinks Corporation
- 4) 菌類薬理研究所 Research Institute of Mycology and Pharmacology, Tsu, Mie, 514-0033, Japan

違によるものもある。

著者らは直井幸雄<sup>5)</sup>により、1968年から1992年にかけて五岳霊芝 GY (瑶輪) 系に属する品種が分類固定されている赤芝 (パワフル健康食品株式会社提供) を用いた。

アポトーシス誘導物質の抽出は前報<sup>6)</sup>に準じて行った。実験では赤芝 100g に 50%クロロホルム・メタノール等量混合液を 900ml 加えて、室温で 5 分間ホモジナイズし、50-60℃に温度を保ちながら、5 時間攪拌を行った。これを 4℃で 10 分間、9000×g で遠心分離し上清液を得た。得られた上清液を 50℃で 3 時間、エバポレーターで減圧濃縮し、さらに図 1 に示した抽出法により、最終的に得られた活性ステロイドをミリポアフィルター (0.22 μg) で濾過滅菌し、真空凍結乾燥したものを被検物質として実験に用いた。

## 2. 癌細胞増殖抑制の測定

癌細胞としては培養ヒト胃癌細胞 (KATO III)<sup>7)</sup> およびヒト肺癌細胞 (LU99) (JCRB0080) [Health Science Resources Research Bank (HSRRB), Species; Human (Japanese), Tissue: Lung cancer] を 10% 牛胎児血清 (Gibco Laboratories, USA)、ペニシリン G (50IU/ml) および、ストレプトマイシン (50 μg/ml) が含まれた RPMI1640 培地 (Sigma, USA) で培養した。被検物質をそれぞれ、胃癌細胞および、肺癌細胞 (5×10<sup>6</sup> cell/ml) を含む培地に添加し、37℃で 5% CO<sub>2</sub> を含むインキュベーター内で 3 日間培養後、癌細胞の増殖抑制率を算出した。

## 3. アポトーシス誘導作用の測定

癌細胞増殖抑制の測定と同様に 3 日間培養した細胞浮遊液を、それぞれ 5 分間、3000×g で遠心分離を行った。遠心分離後、上清を除去して残った細胞を採集し、これを PBS(-) (Sigma, USA) で 1 回洗浄した。得られた細胞ペレットに細胞融解用バッファーを 20 μl 加え、細胞を融解させた。次に融解させた細胞に RNase A 溶液

(DNA free) [Funakoshi, Japan] を加え、50℃で 2.5 時間反応させた後、プロテイナーゼ K 液 (Roch, USA) を加え、50℃で 2.5 時間反応させ、DNA 断片を抽出した。更に、アポトーシス誘導作用を形態学的に検討するために、得られた DNA 抽出液 10 μl にゲルローディング液 2-3 μl を混合し、その混合液を 2%アガロースゲル板のウェルに添加し、100V で電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを水に浸し、UV トランスイルミネーターでエチジウムブロマイド蛍光を発する DNA を検出し、検出された DNA の分布状態を写真撮影した。

何れについても、1%グルタルアルデヒド (Nacalai tesque, Japan) で癌細胞を固定し、ヘキスト 33258 色素 (Nacalai tesque, Japan) で染色した後、フジピクトグラフィー3000 と CCD デジタルイメージシステムカメラ (Olympus, Japan) で蛍光写真撮影を行った。

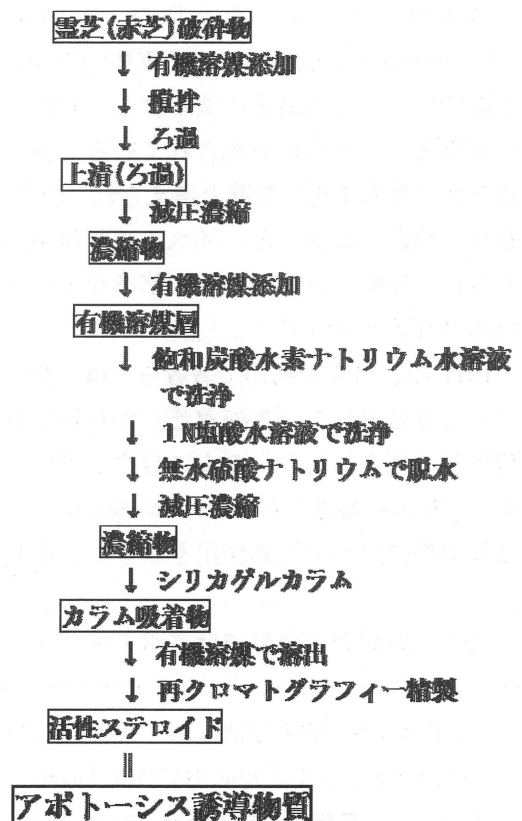


図1 アポトーシス誘導物質の抽出方法

## 実験結果

### 1. 活性ステロイドのヒト癌細胞増殖抑制作用

ヒト胃癌細胞(KATOⅢ)およびヒト肺癌細胞(LU99)  $5 \times 10^6$  cell/ml を含む細胞浮遊液に、生理食塩液に溶解させた活性ステロイドを0(対照), 25, 50 および  $100 \mu\text{g/ml}$  をそれぞれ添加し、 $37^\circ\text{C}$ のインキュベーター内で3日間培養して、細胞増殖抑制率を算出した結果を図2に示した。

活性ステロイド  $25 \mu\text{g/ml}$  の濃度では、ヒト癌細胞の死滅は認められなかった。しかし、 $50 \mu\text{g/ml}$  では、ヒト胃癌細胞で42%、ヒト肺癌細胞で58%の増殖抑制率が得られ、 $100 \mu\text{g/ml}$  では、胃癌細胞で71%、肺癌細胞で80%と何れも対照と比較して癌細胞数が著明に減少した。

### 2. 活性ステロイドのヒト癌細胞に対するアポ

### トーシス誘導作用

活性ステロイド ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) のヒト胃癌細胞(KATOⅢ)とヒト肺癌細胞(LU99)に対するアポトーシス誘導作用を形態学的に検討した結果を図3に示した。写真A(未処理のヒト胃癌細胞)、C(未処理のヒト肺癌細胞)、B(活性ステロイド  $100 \mu\text{g/ml}$  添加・ヒト胃癌細胞)、D(活性ステロイド  $100 \mu\text{g/ml}$  添加・ヒト肺癌細胞)は培養開始から、約10時間後にDNAの断片化が起こり、3日後でほぼ完全に癌細胞が死滅するのが観察された。矢印はアポトーシス小体を示している。

次に、エチジウムブロマイド蛍光を発するDNAを検討したところ、活性ステロイド  $100 \mu\text{g/ml}$  添加・ヒト胃癌細胞およびヒト肺癌細胞にDNAの断片化が発現し、特に肺癌細胞においてアポトーシス誘導作用がより強い傾向にあることが確認された(図4)。

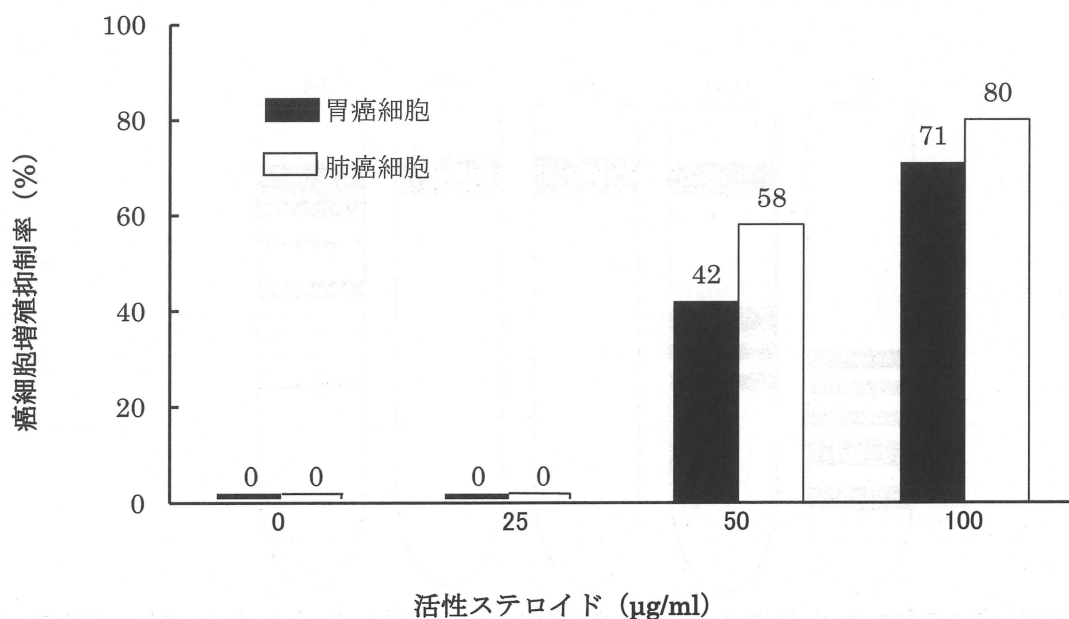


図2 活性ステロイドのヒト癌細胞増殖抑制作用

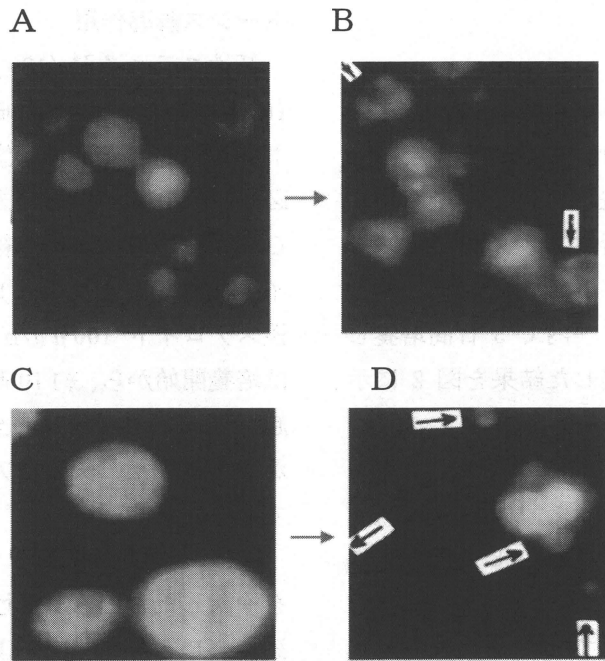


図3 ヒト癌細胞の形態学的変化

- A ; ヒト胃癌細胞 (対照)  
 B ; 活性ステロイド(100  $\mu$ g/ml)添加・ヒト胃癌細胞  
 C ; ヒト肺癌細胞 (対照) ,  
 D ; 活性ステロイド(100  $\mu$ g/ml)添加・ヒト肺癌細胞  
 矢印 (→) はアポトーシス小体を示す。

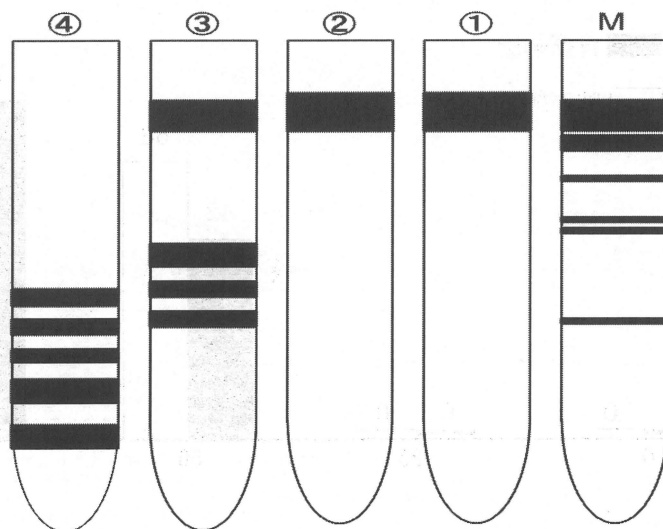


図4 エチジウムブロマイドによるヒト癌細胞のDNAフラグメントの検出 (模式図)

- M ; DNA 分子量マーカー, ① ; 活性ステロイド(25  $\mu$ g/ml)添加・ヒト胃癌細胞,  
 ② ; 活性ステロイド(25  $\mu$ g/ml)添加・ヒト肺癌細胞, ③ ; 活性ステロイド(100  $\mu$ g/ml)  
 添加・ヒト胃癌細胞, ④ ; 活性ステロイド(100  $\mu$ g/ml)添加・ヒト肺癌細胞

## 考察

最近、靈芝の栽培生産の成功によって大量供給が可能となり、漢方とは別のむしろ現代医学的な立場から、種々の疾病に適用された結果、高脂血症、狭心症、慢性気管支炎、肝炎、克山病、白血球減少症、神経衰弱、風湿性関節炎、硅肺、消化性潰瘍、腎炎、糖尿病、甲状腺機能亢進、脳發育不全症、網膜色素変性、不整脈、進行性筋栄養不良、萎縮性筋強直症など、多様な疾病に有効とされる<sup>8)</sup>。

「神農本草經」によると、本実験に用いた赤芝は「胸中の結するものを治し、心気を益し、中を補い、智慧を増し、忘れなくする」とあり、紫芝は「耳聾を主り、関節を利し、神を保ち、精気を益し、筋骨を堅くし、顔色を好くする」効があると記載されている。

近年、癌研究の分野ではアポトーシス、すなわち細胞自滅に関する研究が盛んに行われている。アポトーシスは生物個体発生における組織、臓器の形成、生体の恒常性の維持と防衛に重要な働きをしているだけでなく、多くの病気の発生に深い関係があることが解明されつつある。

著者らはこれまでに種々の植物から抗癌活性を持つ化合物のうち、アポトーシス誘導によって癌細胞を死滅させる作用のある物質を見出してきた<sup>6,9)</sup>。最近の「人口動態統計」によると、悪性新生物（癌）による死亡数は男性では、第1位が肺癌、第2位が胃癌で、女性ではこの順序が逆転しているが、男女とも、これらの癌による死亡数が圧倒的に多い。そこでこれらの癌に対する作用を検討した。

靈芝由来のステロイドを加えたヒト胃癌細胞(KATOIII)とヒト肺癌細胞(LU99)において、無処理の癌細胞と比べて、DNAの断片化がより顕著に認められた。

DNAとは細胞核の中の染色体を構成する基本物質のことで、全ての遺伝子情報が二重らせん状につながった塩基配列の中に書き込まれている。

このDNAの一部である遺伝子に何らかの障害

が起こると、正常であった細胞が異常細胞へと変化し、さらに運悪く悪性化すると、癌細胞が異常な速さで増殖したり、血液の流れにのって他の器官にまで移動し、転移という現象を引き起こす。

しかし、細胞の遺伝子には、ダメージを修復しきれず癌化してしまった細胞に「自殺」の命令を出す特殊な機構が備わっている。

すなわち、エンドヌクレアーゼと呼ばれる酵素の働きによって、司令塔の役割をする遺伝子が活性化され、「もう修復できない。自殺しなさい」という命令が癌細胞に送られる。その結果、癌細胞はその命令に従わざるを得なくなり、DNAの糸が細かく切断され、細胞自体も断片化して小さくなる。そこに、免疫細胞の一種であるマクロファージが急行し、細くなった癌細胞をひとつ残らず食食する。これが、「細胞の自殺」、アポトーシスと呼ばれる現象である。

この一連のメカニズムの中で、靈芝の活性ステロイドはエンドヌクレアーゼの働きを助ける役割を担い、アポトーシスのプログラムが組み込まれた遺伝子の働きを活性化する、アポトーシス誘導作用を持つことが認められた。

最近、靈芝のステロイド画分の主体は24-メチルコレステ-7,22-ジエン-3β-オールであり、エルゴステロールと24-メチルコレステ-7-エン-3β-オールは副成分であるとされ、さらにステロイドとして、ガノゲステロンを含有していると報告されている。

著者らの赤芝より得られたアポトーシス誘導を起こす活性ステロイドは、これらの単一成分か複合成分、あるいは新規成分によるものか、今後の解明が望まれる。

現在、癌細胞の増殖を抑えるために用いられている既存の抗癌剤には、様々な副作用があり、苦痛をとまうばかりか、白血球や血小板の減少など、生命の危険につながる副作用も少なくない。このような現況の中で、靈芝に含まれる天然成分を、癌の治療に応用することは有用と考えられる。

## 結論

最近、靈芝の健康食品としての利用が高まっている。漢方では靈芝は強壯、補血、精神安定、利水、補肝作用があるとされ、咳嗽、気管支炎、関節炎、耳聾などの治療に用いられている。本報では靈芝（赤芝）より得られた活性ステロイドのヒト胃癌細胞(KATOIII)およびヒト肺癌細胞(LU99)に対するアポトーシス誘導作用につき検討した。

活性ステロイドで処理したヒト胃癌細胞およびヒト肺癌細胞では、アポトーシス特有の形態学的変化が認められた。活性ステロイドによる胃癌細胞と肺癌細胞のDNAの断片化はアポトーシスの特徴である、オリゴヌクレオサイズの断片であり、濃度と時間依存性である。これは、靈芝（赤芝）より得られた活性ステロイドがヒト胃癌細胞およびヒト肺癌細胞に対して、アポトーシスを誘導することを明らかにした最初の報告である。

この事実は、活性ステロイドによる増殖阻害は、これらのヒト癌細胞におけるアポトーシス誘導に基づく結果であることを示唆する。

靈芝から得られた多糖類は動物移植癌に抗癌活性を示す。そのグルカンについて、構造活性相関が検討された結果、抗腫瘍性を現す最低単位は、分枝した(1-3)- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルコピラノシル残基の存在が必要で、特に分枝の頻度が活性にとって重要と結論された。今回、靈芝のステロイド画分に、ヒト癌細胞に対するアポトーシス誘導作用が認められたことは、癌治療における有用性が期待される。

## 文献

- 1) 中国科学院北京植物研究所北京医学院薬理教研組編著：靈芝 科学出版社 北京 1976
- 2) H. Ito, S. Naruse, K. Shimura : Antitumor effect of the polyccharides preparations from *Ganoderma lucidum* on mouse sarcoma 180. *Mie Med. J.* 26 147-152 1977
- 3) G. Wang, J. Zang, T. Mizuno et al. : Antitumor active polyccharide from the Chinese mushroom *Songshan Lingzhi*, the fruiting body of *Ganoderma tsugae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 894-900 1993
- 4) 佐々木啓之, 直井幸雄, 伊藤浩子, 伊藤均 : 五岳靈芝に属する GYN, GYK, GYG 由来多糖体の抗ガン作用 *医学と生物学* 137(1) 1-3 1998
- 5) 直井幸雄(芝僊) : 如意靈芝療法 p283-286 善文社 東京 1997
- 6) H. Itoh, M. Fujishima, Y. Arakawa, H. Hibasami, F. Nakata, H Ito : Induction of Apoptosis by Blazein of a New Steroid Isolated from *Agaricus blazei* Murrill (Himematsutake) in Human Colon Cancer COLO201 cells. *Medicine and Biology* 154(7) 310-316 2010
- 7) H. Hibasami, T. Fujikawa, H. Takeda, S. Nishibe, T. Satoh, T. Fujisawa, K. Nakashima : Induction of Apoptosis by *Acanthopanax senticosus* HARMS and its component, sesamin in human stomach cancer KATOIII cells. *Oncology Rports* 7 1213-1216 2000
- 8) ヒキノヒロシ : 靈芝の薬理 *漢方医学* 10 26-32 1986
- 9) 樋廻博重, 松本紘斉, 伊藤均, 伊藤浩子 : 梅肉エキス成分によるヒト胃癌細胞におけるアポトーシス誘導 *医学と生物学* 147(6) 91-95 2003