

Cytotherapy, 2045; 0: 1-12

## 米ぬかアラビノキシラン (MGN-3/BioBran) は *in vitro* および *in vivo* において神経芽細胞腫に対するNK細胞の細胞傷害性を高める

ANTONIO PÉREZ-MARTÍNEZ<sup>1,2</sup>, JAIME VALENTÍN<sup>2</sup>, LUCÍA FERNÁNDEZ<sup>3</sup>, ENRIQUE HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ<sup>2</sup>, EDUARDO LÓPEZ-COLLAZO<sup>2</sup>, PETRA ZERBES<sup>4</sup>, ELLEN SCHWÖRER<sup>4</sup>, FERNANDO NUÑEZ<sup>5</sup>, INMACULADA GÉNESIS MARTÍN<sup>5</sup>, HANNAH SALLIS<sup>6</sup>, MIGUEL ÁNGEL DÍAZ<sup>7</sup>, RUPERT HANDGRETINGER<sup>4</sup> & MATTHIAS MANUEL PFEIFFER<sup>4,23</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Hemato-Oncology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, <sup>2</sup>Innate Immune Research Group, Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, <sup>3</sup>Clinical Research Program, Cancer Research National Centre, Madrid, Spain, <sup>4</sup>University Children's Hospital, University of Tuebingen, Tuebingen, Germany, <sup>5</sup>Servicio Experimentación Animal, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Consejo Superior de Investigaciones Científicas Madrid, Spain, <sup>6</sup>School of Medicine, Cardiff University, Heath Park, Cardiff, Wales, and <sup>7</sup>Department of Hemato-Oncology and Stem Cell Transplantation, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain

### 要約

**背景および目的** ナチュラルキラー細胞 (NK) の細胞傷害活性は、悪性腫瘍に対する自然免疫防御において主要な役割を果たす。NK細胞はがんの養免疫療法的手段として注目を集めている。米ぬかアラビノキシラン (MGN-3/BioBran) は、NK細胞の細胞傷害活性を高めることができる生体応答調節物質として知られている。本研究は、NK細胞の活性化、増殖、および神経芽細胞腫細胞に対する細胞傷害性におけるMGN-3/BioBranの効果を評価した。**方法** NK細胞は磁気ビーズで単離し、MGN-3/BioBranで刺激した。NK細胞の活性化は表現型の分析によって評価し、その増殖能を観察した。活性化NK細胞の *in vitro* におけるK562、Jurkat、A673、NB1691、A-204、RD、およびRH-30細胞株に対する細胞傷害能、*in vivo* におけるNB1691細胞株に対する細胞傷害能を試験した。**結果** NK細胞をMGN-3/BioBranで刺激することによって、活性化に関与する受容体であるCD25およびCD69が、刺激していない細胞よりも多く発現した ( $P < 0.05$ )。NK G2D、DNAM、NCR、およびTLRの発現に変化は見られなかった。MGN-3/BioBranで一晩刺激することによって、*in vitro* で試験した全ての細胞株に対するNK細胞の細胞傷害活性が上昇し、*in vivo* における神経芽細胞腫の増殖が低下した。このメカニズムはMGN-3/BioBranに混在するリポ多糖類は、このメカニズムに介在していない。さらに、MGN-3/BioBranの添加は、*in vitro* においてNK細胞の増殖を促進し、T細胞を減少させた。**結論** 我々のデータによって、MGN-3/BioBranはNK細胞活性化マーカーを上方制御し、*in vitro* および *in vivo* において神経芽細胞腫に対するNK細胞の細胞傷害活性を刺激し、またNK細胞の増殖を選択的に高めることが明らかになった。これらの結果は、神経芽細胞腫治療における今後のNK細胞治療戦略に有用であると考えられる。

### 緒言

ナチュラルキラー (NK) 細胞の細胞傷害活性は、悪性腫瘍の発生に対する自然免疫防御において主要な役割を果たすが、このことはNK細胞細胞傷害活性の低下が健常人の腫瘍発生リスク上昇に関与することによって証明されている<sup>[1]</sup>。さらに、造血幹細胞移植後にNK細胞の傷害活性が上昇することは、再発リスクの低減に関係している<sup>[2]</sup>。NK細胞の細胞傷害活性は、健康な生活習慣<sup>[3-5]</sup>、生体応答調節物質<sup>[6, 7]</sup>、成長ホルモ

ン<sup>[8]</sup>、およびサイトカイン<sup>[9-12]</sup>によって高めることができる。悪性腫瘍細胞は、抑制性サイトカインの放出かつ/また、NK細胞受容体の活性化の抑制によって、NK細胞の細胞傷害活性を抑制することができる<sup>[13,14]</sup>。抗体<sup>[15,16]</sup>および化学療法薬剤<sup>[17]</sup>によってもNK細胞活性は抑制される。したがって、がん患者および健常人のいずれにおいても、NK細胞の高い細胞傷害活性の維持を目標とするべきである。MGN-3/BioBranは、シイタケの炭水化物加水分解酵素<sup>[18]</sup>で修飾した米ぬか由来のアラビノキシランである。この栄養補助食品は成人患者、*in vitro* および*in vivo*において、腫瘍に対するNK細胞の細胞傷害活性を高めることが報告されている<sup>[19,20]</sup>。さらに、乳癌および肝細胞癌<sup>[21-25]</sup>などのがんに対して従来療法との併用によって、相乗的に抗腫瘍効果を発揮することが報告されている。これらのデータから、成人患者におけるがんの補完療法としてMGN-3/BioBranの活用の可能性があることが明らかになった。しかし、小児の腫瘍に対する研究は報告されていない。本研究の目的は、様々なサイトカインの組合せと刺激細胞株を使用したMGN-3/BioBranのNK細胞増殖効果のみでなく、*in vitro*および*in vivo*における小児腫瘍に対するNK細胞刺激の役割を検討することである。

## 方法

### 細胞調製

我々の施設の倫理委員会がこの研究を承認した。健常なボランティアから採取した血液サンプルから、密度勾配遠心法によって末梢血単核球 (PBMC) を分離した。血液を等量のFicoll Paque Plus (GE Healthcare) の上に静かに載せ、室温で400gで20分間遠心分離した。中間層から採取したPBMCをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で2回洗浄し、400gで10分間遠心分離した。その後、NK細胞を磁気ビーズ分離法を用いて濃縮した (NK細胞分離キットもしくはCD56マイクロビーズ; Milteny Biotec) (オンライン補足資料図1参照)。全血をFicollクッション上に載せ、室温で1800rpm、30分間遠心分離した。リンパ球/単球分画を分離してPBSで洗浄したうえで、赤血球細胞溶解処理 (塩化アンモニウム液; Stem Cell Technologies) を5分間室温で行い、PBSで追加洗浄後にCO<sub>2</sub>が5%で加湿かつ37℃の条件下において、10%のウシ胎児血清を添加したRPMI1640培地 (Gibco-BRL, Life Technologies Ltd.) で単球を接着培養した。接着した単球を7-10日間培養してマクロファージに分化させた。マクロファージをバイオセンサーとして使用し、マクロファージを刺激することなくNK細胞を刺激するMGN-3/BioBranの至適用量を確定した。

### 試薬

本試験で使用した抗ヒト単クローン抗体 (mAbs) は、CD3PE-Cy7、CD45-FITC、CD69-FITC、およびCD314 (NK G2D) -APC (全てBecton Dickinson) ; CD56-APC、CD25-PE、CD336 (NKp44) -PEおよびCD335 (NKp46) -PE (すべてBeckman Coulterより) ; CD337 (NKp30) -PE (Miltenyi Biotec) である。TLR-4およびTLR-9に対する蛍光色素標識モノクローナル抗体はEnzo Life Science AGから購入した。インターロイキン (IL) -15はCell Genixから購入した。IL-2 (Proleukin) は、Novartis社から購入した。MGN-3/BioBranは大和薬品株式会社から提供された。リポ多糖 (LPS; Sigma0127:B8) をtoll様受容体4 (TLR-4) リガンドとして使用し、ポリミキシンB (InvivoGen) をLPS誘導によるTLR-4活性化の阻害物質として使用した。

## 細胞株

K562 赤白血病細胞株、Jurkat T細胞性白血病細胞株、A673 ユーイング肉腫細胞株（全てATCCより）、NB1691 神経芽腫細胞株（全てJude's Children's Research HospitalのDr. A. Davidoffから提供）、A-204 胎児横紋筋肉腫細胞株、RD 胎児横紋筋肉腫細胞株およびRH-30 胞巣状横紋筋肉腫細胞株（全てDSZM）を *in vitro*におけるNK細胞の自然細胞傷害性測定のための標的として使用した。ルシフェラーゼ導入神経芽細胞腫細胞株（NB1691luc）はDr. A. Davidoffから提供され、*in vitro*および定量的 *in vivo*マウスモデルにおいて使用された<sup>[26, 27]</sup>。照射K562および細胞膜結合型IL-15と4-1BBLを発現したK562（K562-mb15-41BBLはDr. D. Campana, National University of Singaporeが提供）をNK細胞の活性化および増殖のためのフィーダー細胞として使用した<sup>[28]</sup>。

## 表現型分析

3名の健康な成人ボランティアに由来するMGN-3/BioBran（100 $\mu$ g/mL）で一晩刺激したNK細胞、IL-15（10ng/mL）で一晩刺激したNK細胞、無刺激のNK細胞、ならびに培養増幅したNK細胞の細胞表面の表現型は6色の免疫蛍光染色を用いて決定した。適切なマウス抗ヒトモノクローナル抗体で、多様な条件で調製した5 $\times$ 10<sup>5</sup>個の新鮮なNK細胞を4 $^{\circ}$ Cの暗室において30分間染色した。細胞は冷却PBSで2回洗浄した後0.5mlのPBSで再懸濁し、FACSCantoIIフローサイトメーター（Becton Dickinson）で分析した。各々の表面抗原の陽性細胞の比率および平均蛍光強度（MFI）の比率を決定した。対照には適切なアイソタイプコントロール抗体を使用した。

## 細胞傷害性測定とNK細胞の刺激

NK細胞の自然細胞傷害性は従来の2時間europim-2, 2' : 6' , 2'' -terpyridine-6, 6'' -dicarboxylic acid 放出測定法(Perkin-Elmer Wallac)によって、前述のように観察した<sup>[29]</sup>。K562、Jurkat、A673、NB1691、A-204、RDおよびRH-30細胞株を標的細胞として使用した。簡潔に述べると、蛍光を増強させるリガンド（bis（acetoxymethyl）2, 2' : 6' , 2'' -terpyridine-6, 6'' -dicarboxylate）で標的細胞を標識した。この疎水性リガンドはすぐに細胞膜を通過する。細胞内において、エステル結合の加水分解によってリガンドが親水性になり、細胞膜を通過できなくなる。しかし、細胞溶解によってリガンドが放出され、最終的にリガンドがユウロピウムと反応して安定した蛍光性キレートを形成する。これを蛍光分析法により評価した（Infinite F200 reader TECAN Group Ltd.）。以下の数式によって、自発的細胞傷害性および特異的細胞傷害性を算出した：

$$\% \text{特異的放出量} = (\text{実験的放出量} - \text{自発的放出量}) / (\text{最大放出量} - \text{自発的放出量}) \times 100$$

$$\% \text{自発的放出量} = (\text{自発的放出量} - \text{バックグラウンド}) / (\text{最大放出量} - \text{バックグラウンド}) \times 100$$

健康なボランティアから採取したNK細胞を100 $\mu$ g/mLのMGN-3/BioBran、10ng/mLのIL-15、40IU/mLおよび1000IU/mLのIL-2、もしくはMGN-3/BioBranと40IU/mLのIL-2を併用して一晩刺激した。5%の二酸化炭素と95%の空気と加湿の環境で、完全培地（10%の熱失活ウシ胎児血清、100IU/mLのペニシリン、100ng/mLのストレプトマイシン、2mmol/L グルタミンを添加したRPMI1640）を使用して培養を実施した。前述のように細胞傷害活性を評価した。

## マウスモデル

NB16911uc神経芽細胞腫細胞 $2 \times 10^5$ 個を12週齢のNOD-scid-IL2Rgnullマウスに静注した。NK細胞の分離に際して、健常なボランティアから採取したPBMCを使用した。NK細胞を磁気ビーズ分離法（NK細胞分離キット、Milteny Biotech）によって単離した。生存率 $>90\%$ 、CD3陰性CD56陽性のNK細胞を得た。新鮮なNK細胞もしくは $100\mu\text{g}/\text{mL}$ のMGN-3/BioBranで一晩刺激したNK細胞を使用した。静脈内NK細胞療法を腫瘍細胞の注入の7日後に開始し、週に2回、4週間にわたって行った。2件の個別の実験（各群マウス4匹ずつ）において、我々は未処置群（対照群）を $1 \times 10^6$ の無刺激のNK細胞注入群（NK群）、および $100\mu\text{g}/\text{mL}$ のMGN-3/BioBranで一晩刺激したNK細胞の注入群（NK-BioBran群）と比較した。NK細胞療法開始後7、14、28、および42日目に $15\text{mg}/\text{mL}$ の濃度でPBSに溶解したルシフェリン $100\mu\text{L}$ を静注し、生物発光イメージングを行った。

基質を投与した5分後、イソフルランを使用してマウスに麻酔をかけ（3%で麻酔導入、その後1.5%で維持）、XenogenIVIS LuminaII（定量的蛍光画像解析・生物発光イメージング、Xenogen株式会社）へ移した。様々な露出で撮影し、Xenogen Living Image Software（バージョン 3.2）を使用して分析を行った。生物発光イメージングのプロットのために、胸部と腹部全体を取り囲む長方形の関心領域を各々のマウスに適用し、仰臥位と腹臥位で180sの露光で全入射量を計算した。この値は腫瘍のない、ルシフェリンを注入した対照マウス比較可能なバックグラウンド値を基準とした。全ての実験は、National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animalsに概説されている基準に準拠しているInstitutional Animal Care and Use Committeeのガイドラインを遵守して実施された。

## NK細胞の活性化と増殖

$100\mu\text{g}/\text{mL}$ のMGN-3/BioBranおよびサイトカイン（ $100\text{IU}/\text{mL}$ のIL-2または $100\text{IU}/\text{mL}$ のIL-2と $10\text{ ng}/\text{mL}$ のIL-15の混合）を添加もしくは非添加における14日間の培養によって、さらにK562またはK562-mb15-41BBLの照射フィーダー細胞の共培養を追加して増殖させた<sup>[28]</sup>。端的に述べると、PBMCは健常成人のボランティア5名から採取し、密度勾配遠心分離法（Ficoll）によって得た。PBMCは、6ウェル平底プレートを用いて、MGN-3/BioBranおよびヒトサイトカイン（IL-2、IL-2+IL-15）を添加/非添加の条件で、もしくは亜致死量照射したK562またはK562-mb15-41BBLフィーダー細胞と1:1.5の比率で共培養する条件で培養した。10%のAB新鮮凍結ヒト血漿、L-グルタミンおよびペニシリン・ストレプトマイシン（Biochrom）を添加したRPMI1640を培養液に使用した。新鮮な培地を2日毎に追加した。14日後に細胞を回収し、表現型と*in vitro*におけるNK細胞傷害活性を分析した。

## Cytometric Bead Arrayおよびフローサイトメトリー解析によるMGN-3/BioBranに不純物として含まれるTLRアゴニストの定量

Cytometric Bead Array 技術のFlex Set (BD BioSciences)を製造者の手順書通りに使用して、さらにBD FACSCalibur フローサイメーター (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリー解析を行って、LPS ( $10\text{ng}/\text{mL}$ ) もしくはMGN-3/BioBran (10、100、1,000、および $10,000\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 曝露後のヒトマクロファージにおける腫瘍壊死因子 (TNF)  $-\alpha$ 、IL-6およびIL-8の放出を検出した。炎症 (TNF  $-\alpha$ 、IL-6およびIL-8の上昇 図1) を誘導しないMGN-3/BioBranの最高濃度は $100\mu\text{g}/\text{mL}$ と決定した。TLR-2、-3、-4、-5、-7、-8、

および9に対するMGN-3/BioBranの潜在的なアゴニスト作用をInvivo Genによって調べた。MGN-3/BioBranが含有する微量のLPSは、TLR-4シグナル伝達によってNK細胞の細胞傷害性を高める可能性があるため、MGN-3/BioBran (100mg/mL) に混入しているリポ多糖/エンドトキシン (TLR-4リガンド) の定量をBioChem GmbHが行った。さらに、発色測定法 (ToxinSensor発色LALリポ多糖Assay Kit GenScript) を使用してLPS/エンドトキシンを定量した。NK細胞刺激剤としてLPS (10ng/mL) 、LPS誘導性TLR-4活性化の阻害剤としてポリミキシンB (100  $\mu$ g/mL) を使用して、K562およびNB1691細胞株をターゲットとする機能的*in vitro*細胞傷害性を測定した。最後に活性化阻害剤としてポリミキシンBを添加し、MGN-3/BioBranで刺激したNK細胞を使用して、NB1691細胞株に対する細胞傷害性を測定した。

2 A. Pérez-Martínez et al.

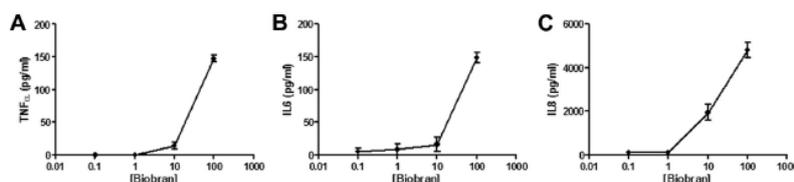


Figure 1. Cytokine levels in the culture supernatants were determined using the Cytometric Bead Array Flex Set (BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry using a BD FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). (A) TNF- $\alpha$  levels, (B) IL-6 levels and (C) IL-8 levels.

統計学的分析

平均値±SDで結果を示した。ノンパラメトリックWilcoxonテストを使用して、MGN-3/BioBranがNK細胞の表現型、細胞傷害性、および増殖率に及ぼす影響を比較した。マウスモデルにおいて、単変量 Kaplan-Meier 法によって生存率を推計し、ログランク検定を使用して比較した。統計学的有意を  $P < 0.05$  とした。

結果

NK細胞表現型

MGN-3/BioBranで刺激したNK細胞を添加することによって、CD69とCD25の陽性率の中央値がそれぞれ9%から88%、6%から90%に増加した (平均蛍光強度比はそれぞれ3.1倍、3.2倍増加した)。他の受容体の比率と平均蛍光強度についても調べたが、変化は見られなかった。IL-15で刺激したNK細胞 (ポジティブコントロール) は、それぞれの陽性率の中央値を以下の通り有意に上昇させた ; CD25 (6 %から92%、平均蛍光強度比は3.9倍上昇)、CD69 (9%から98%、平均蛍光強度比は35.5倍上昇)、NKG2D (92%から97%、平均蛍光強度比は2.1倍上昇)、DNAM (81%から96%、平均蛍光強度比は1.7倍上昇)、およびNKp30 (54から81に、平均蛍光強度比が3.8倍増加)。表1および図2A、Bは、NK細胞上の受容体をMGN-3/BioBranおよびIL-15で一晩刺激して活性化したことに対して示した反応を表している。

Table I. Biobran and IL-15 overnight stimulation effect on activating NK receptors.

	Resting		Biobran		IL-15		Biobran/resting Ratio	IL-15/resting Ratio
	MFI	SD	MFI	SD	MFI	SD		
CD69	508.3	889.2	1591.7	741.1	18032.6	14136.6	3.13	35.48
CD25	481	448.9	1537	520.3	1864	2843.8	3.2	3.88
NKG2D	4634.2	5762	5074.3	4761	9914.9	11491	1.09	2.14
DNAM	1960.6	2529	2501.1	1174	3344.8	5391	1.28	1.71
NKp44	1017.7	1473	1808	2780	886.3	2110	1.78	0.87
NKp30	1300.7	1990	1519.8	2508	4971.5	1567	1.17	3.82
NKp46	1134.4	1044	1159.4	1695	1568.8	1187	1.02	1.38
TLR4	2654	2858	1348	2533	1963	2150	0.51	0.74
TLR9	5854	6284	5200	6448	8779	6231	0.89	1.50

Data express MFI, SD, and ratios from 3 healthy controls. Bold indicates statistical significance.

*In vitro*細胞傷害性測定

MGN-3/BioBranで一晩刺激したことによって、試験した全ての細胞株に対するNK細胞の細胞傷害性が、静止したNK細胞と比較して、E/T比が8:1 (K562、NB1691、Jurkat、A673)、もしくは10:1 (A-204、RD、RH-30) で有意に上昇した (図3A、K562 80% vs. 69%、 $P=0.03$ 、NB1691 41% vs. 23%、 $P=0.03$ 、Jurkat 40% vs. 19%、 $P=0.03$ 、A673 34% vs. 13%、 $P=0.02$ 、A204 34% vs. 18%、 $P=0.03$ 、RD 45% vs. 22%、 $P=0.002$ 、RH-30 34% vs. 18%、 $P=0.02$ )。IL-15での刺激によって細胞の溶解率は更に高くなり、K562 (100%)、NB1691 (61%)、Jurkat (60%)、A673 (58%) であった (図3B)。IL-2とMGN-3/BioBranの相乗効果を試験するために、高用量IL-2 (1000IU/mL) による刺激を、低用量IL-2 (40IU/mL)、低用量IL-2 +MGN-3/BioBranによる刺激と比較した。MGN-3/BioBranを低用量IL-2に添加することにより、40IU/mLのIL-2による刺激効果をさらに高め、その結果1000IU/mLのIL-2と同等の細胞傷害性を発揮した (図3C)。MGN-3/BioBranで刺激したNK細胞の安全性プロファイルを試験するために、ネガティブコントロール (自家細胞CD56陰性細胞) に対する細胞傷害性を測定した結果、細胞傷害性がないことが明らかになった (補足資料図2および補足資料表1)。

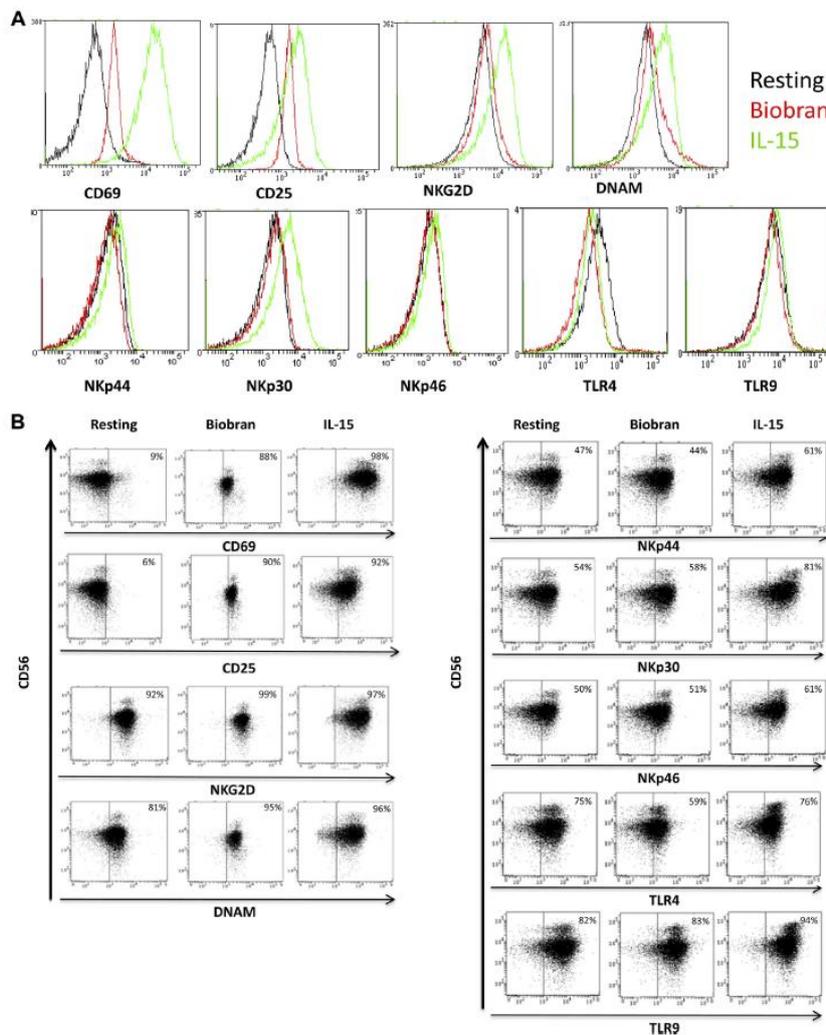


Figure 2. (A) Mean fluorescence intensity from activating NK cell receptors: at rest (black), MGN-3/BioBran (red) and IL-15 stimulated (green) in 3 healthy controls. (B) Percentages of activation markers expression on resting, MGN-3/BioBran- and IL-15-stimulated NK cells.

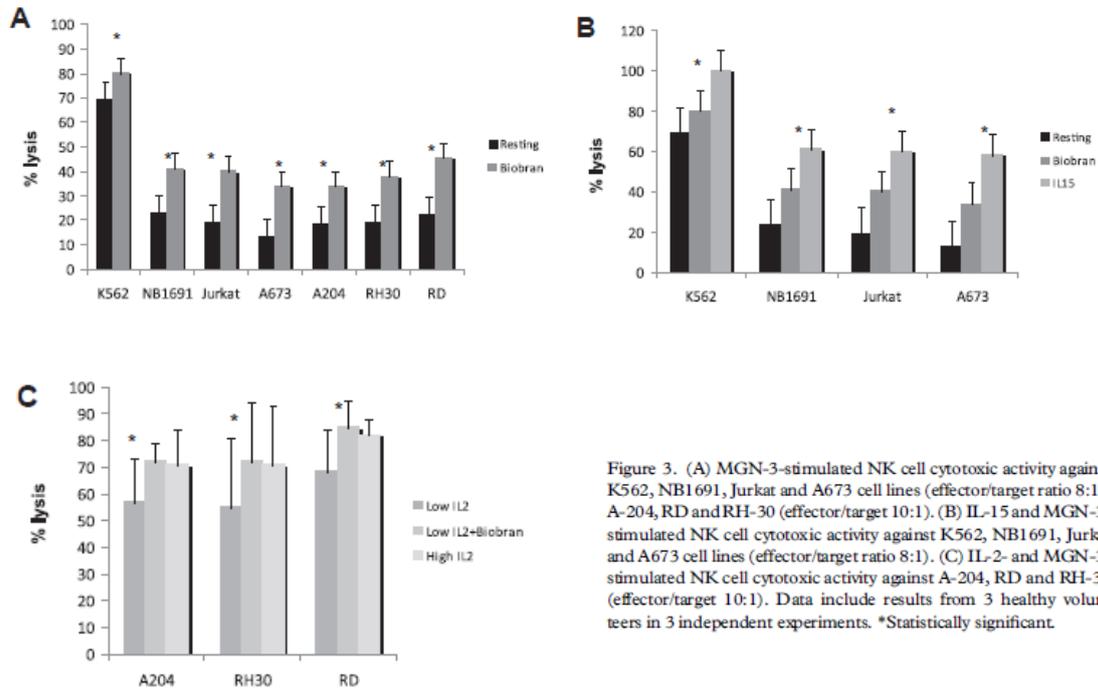


Figure 3. (A) MGN-3-stimulated NK cell cytotoxic activity against K562, NB1691, Jurkat and A673 cell lines (effector/target ratio 8:1), A-204, RD and RH-30 (effector/target 10:1). (B) IL-15 and MGN-3-stimulated NK cell cytotoxic activity against K562, NB1691, Jurkat and A673 cell lines (effector/target ratio 8:1). (C) IL-2- and MGN-3-stimulated NK cell cytotoxic activity against A-204, RD and RH-30 (effector/target 10:1). Data include results from 3 healthy volunteers in 3 independent experiments. \*Statistically significant.

### In vivo モデル

MGN-3/BioBranのNK細胞に対する *in vitro*での刺激効果に臨床的意義があるかを検討するために、我々は研究を、ルシフェラーゼを導入した神経芽細胞腫の *in vivo*異種移植モデルに広げた。図4AはPBS (対照群)、無刺激のNK細胞 $1 \times 10^6$ 個、およびMGN-3/BioBranで刺激したNK細胞 $1 \times 10^6$ 個を注入した典型的な3匹のマウスの腹側および背側の生体画像を示している。対照群および無刺激のNK細胞群においてNB1691腫瘍の顕著な増殖が見られたが、 $1 \times 10^6$ 個のBioBran/MGN-3で刺激したNK細胞群においては有意な神経芽細胞腫の増殖抑制が認められた (図4Bおよび補足資料表2)。

我々は、MGN-3/BioBranで刺激したNK細胞がNOD/scid/IL-2R $\gamma$  null-huモデルにおいて有意に生存期間を延長したことを確認した (P<0.05;図4C)。

### NK細胞増殖におけるMGN-3/BioBranの役割

2週間の培養後、MGN-3/BioBranを培地に添加するとNK細胞はより活発に増殖した (補足資料表III)。対照的に、MGN-3/BioBranを培地に添加するとT細胞の増殖は減少した (図5A)。MGN-3/BioBranをIL-2およびIL-2+IL15培地に添加したところ、NKT細胞およびB細胞に統計学的有意差は見られなかった。MGN-3/BioBranを培地に添加したところ、増殖したNK細胞の細胞傷害活性に有意な変化は見られなかった (図5B)。対照的に、IL-15を添加すると、導入したK562細胞株を使用した場合であっても、IL-2単独の場合に比べて細胞傷害活性が上昇した。

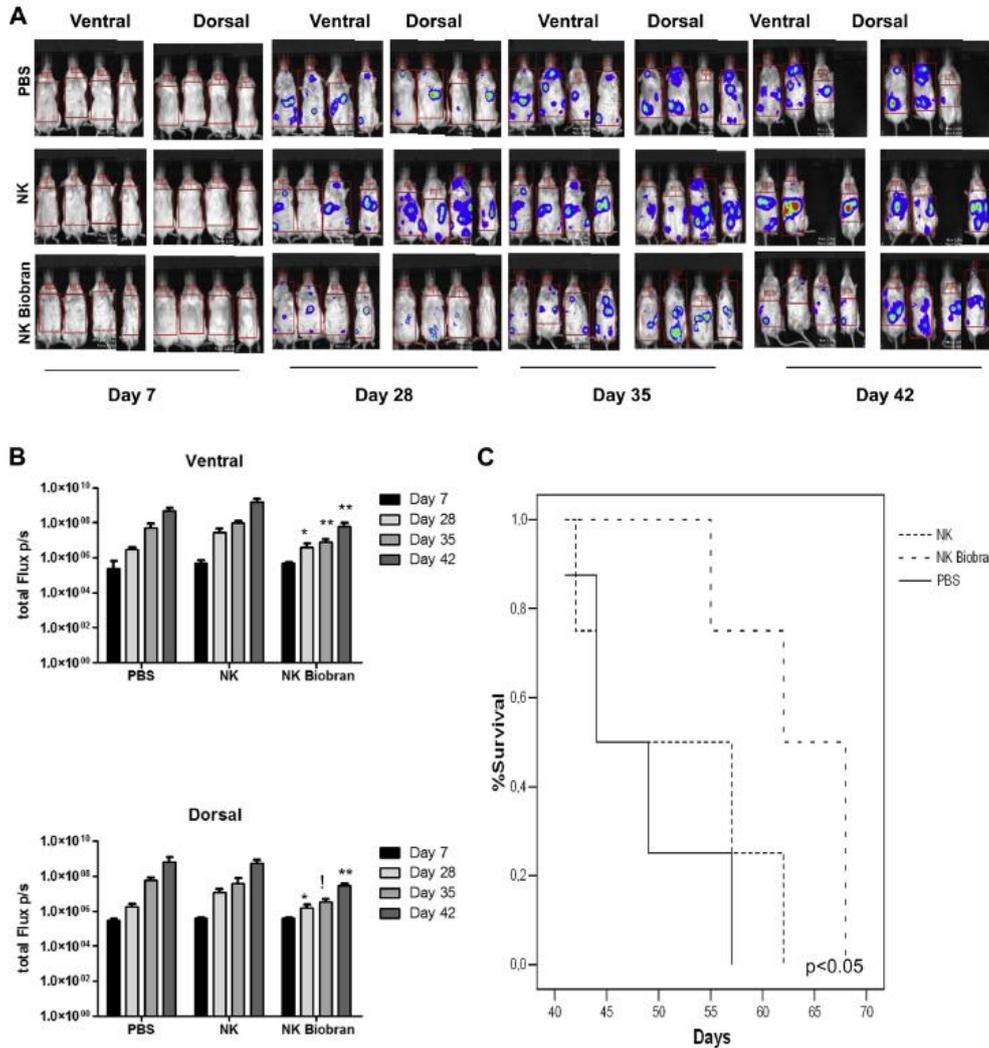


Figure 4. (A) Imaging of NB1691 tumors expressing luciferase illustrates the neuroblastoma burden in mice receiving PBS (control),  $1 \times 10^6$  freshly isolated unstimulated NK cells and  $1 \times 10^6$  MGN-3-stimulated NK cells (given by 8 intravenous injections, twice a week for 4 consecutive weeks). Three representative mice, ventral and dorsal, from each group are shown. ROI, region of interest. (B) The fold tumor volume relative to baseline values was significantly lower in the cohort of mice that received MGN-3-stimulated NK cells than in either the control group or the group that received resting NK cells. (C) Kaplan-Meier curves indicate the survival of each group of mice. †Statistically significant compared with control group. \*Statistically significant compared with unstimulated NK cells group. \*\*Statistically significant compared with both groups.

#### MGN-3/BioBranがNK細胞を刺激するメカニズム

ヒトNK細胞がTLRを介して刺激される可能性もあるため、ヒトマクロファージをバイオセンサーとして使用してMGN-3/BioBranによるTLRの活性化を試験し、マクロファージを刺激することなくNK細胞を刺激するMGN-3/BioBranの至適用量を調べた。MGN-3/BioBran (10mg/mL) の高用量のみがIL-8、IL-6とTNF- $\alpha$ の放出(それぞれ4776、164および132pg/ml)を誘導したことが図1に示されている。これらの測定結果は、LPS (10ng/mL) による刺激(それぞれ7487、362および208pg/mL)で観察されたものより有意に低かった。カプトガニ血球抽出成分(LAL)試験において、MGM-3/BioBranの中の微量のLPS混入(Eu/mL 1.68)を確認した。MGN-3/BioBranに混入しているLPSが刺激機構として果たす役割を調べるために、NB1691に対する*in vitro*における細胞傷害性を測定した。これらの測定では、静止期のNK細胞に比べて、LPSで刺激したNK細胞の細胞傷害活性は高く、ポリミキシンBはLPSの刺激作用を阻害した(図6A)。対照的に、NB1691に対

するNK活性にMGN-3/BioBranが与える刺激作用は、ポリミキシンBによって抑制されなかった (図6B)。MGN-3/BioBranに混入しているLPSは、NK細胞の刺激機構に関与していない。

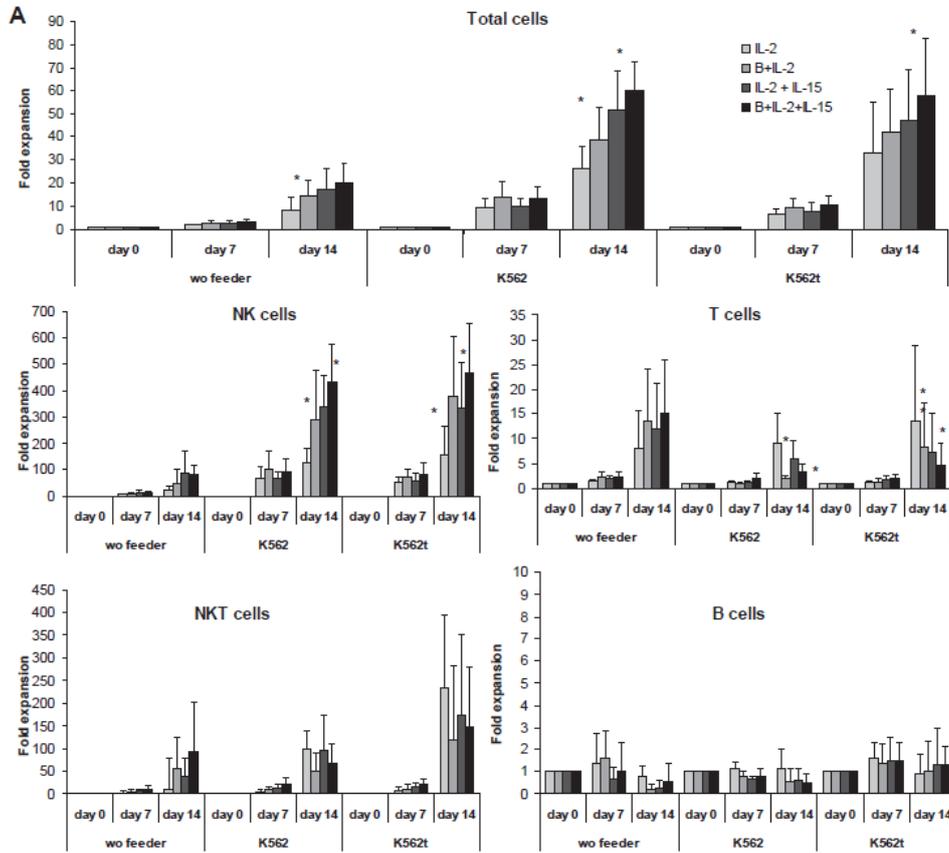


Figure 5. (A) Kinetics of total cells, NK cells, T cells, NKT cells and B cells after 14 days of culture expansion from 5 healthy donors with and without (wo) MGN-3/BioBran and cytokines (IL-2 or IL-2 + IL-15) or co-culture with irradiated feeder cells consisting of K562 cells or K562-mb15-41BBL. \*Statistically significant. (B) Cytotoxic activity of expanded NK cells adding MGN-3/BioBran to the culture medium.

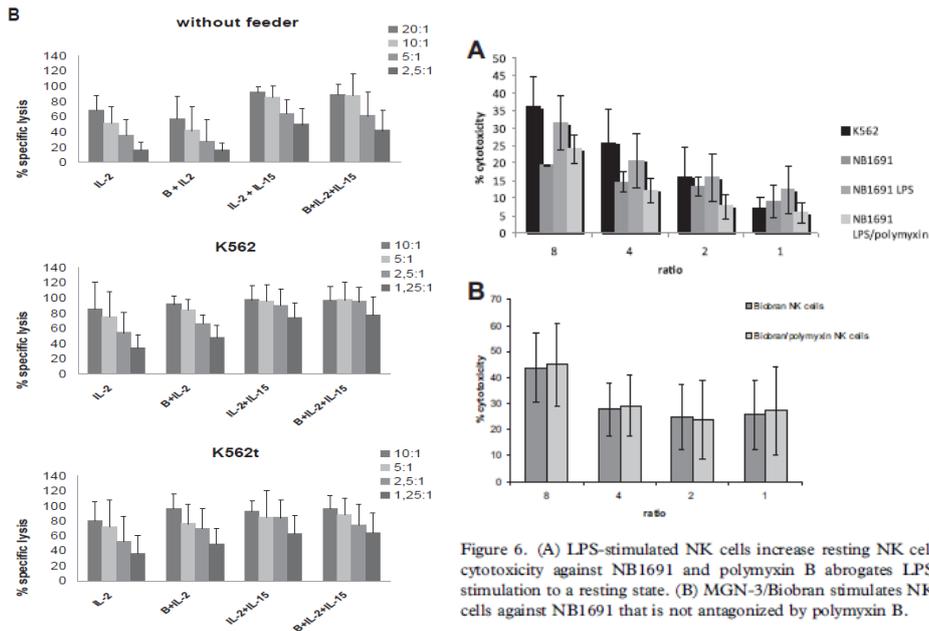


Figure 6. (A) LPS-stimulated NK cells increase resting NK cell cytotoxicity against NB1691 and polymyxin B abrogates LPS stimulation to a resting state. (B) MGN-3/BioBran stimulates NK cells against NB1691 that is not antagonized by polymyxin B.

Figure 5. (continued)

## 考察

これまで発表された研究では、がん治療でのMGN-3/BioBranの使用によって、一部の成人患者でアウトカムの改善が認められたことが報告されている<sup>[30,31]</sup>。成人肝細胞癌患者を対象とした臨床試験では、肝動脈化学塞栓術と経皮的エタノール注入、ラジオ波焼灼術および凍結療法などの介入治療へのMGN-3/BioBranの併用が全体の生存期間を改善させたことを明らかにした<sup>[21]</sup>。また、MGN-3/BioBranの併用がNK細胞の細胞傷害活性、骨髄樹状細胞のレベル、および1型ヘルパーT細胞に関係するサイトカインの濃度を高めることによって、多発性骨髄腫患者の自然免疫を活性化することも報告されている<sup>[32]</sup>。小児腫瘍に対するMGN-3/BioBranの使用に関するデータは報告されていない。

本研究は、MGN-3/BioBranがNK細胞に与える刺激によって、*in vitro*および*in vivo*で様々な小児腫瘍細胞株に対する細胞傷害活性が改善することを明らかにしている。我々は、*in vitro*においてMGN-3/BioBranによる刺激後に、NK細胞による急性白血病、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫、胞巣状横紋筋肉腫の細胞傷害が増強することを明らかにした。MGN-3/BioBranで刺激したNK細胞を用いた場合、神経芽細胞腫の増殖が有意に抑制され、NOD/scid/IL-2R $\gamma$  null神経芽細胞腫モデルで生存期間が有意に改善したことも確認した。これらのデータは、成人の悪性腫瘍についてこれまでに報告されたデータと合致する<sup>[20-25]</sup>。

MGN-3/BioBranがNK細胞活性を上昇させるメカニズムと用量は明らかになっていない。NK細胞のMGN-3/BioBran処理による有益な効果には、様々な免疫機構が関与していると推定される。高用量のMGN-3/BioBranがマクロファージをM0型からIL-6、IL-8、およびTNF- $\alpha$ を放出するM1型へ分化させたことから、低用量のMGN-3/BioBranが炎症を背景として活性化するNK細胞を除去すると考えられる。TLRアゴニストはヒトNK細胞を刺激できるため、MGN-3/BioBranに混在するLPSがTLR-4シグナル伝達によってNK細胞の細胞傷害活性を高める可能性があるかと仮定した。本研究では、微量のLPS混在が認められた。しかし、ポリミキシンBによるLPSの中和によって、MGN-3/BioBranがNK細胞を刺激する効果が阻害されなかったことから、LPSの混在は、MGN-3/BioBranがNK細胞の活性化を促す刺激機構ではないと考えられる。我々のデータでは、明らかにMGN-3/BioBranは静止期のNK細胞を活性化するが、同期間に増殖中のNK細胞をIL-15でさらに活性化させることはできなかった。この結果は、メカニズムがIL-15と部分的に重複していることを示唆している。また、NK細胞からのTNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ の放出の活性化によるアポトーシス効果を提唱する理論もある<sup>[30,33]</sup>。この理論は、化学療法へのMGN-3/BioBranの追加には、乳癌細胞のアポトーシスおよび細胞増殖阻害の上昇によって示されるような相乗効果があることを報告した近年のデータによって裏付けられている<sup>[34]</sup>。MGN-3/BioBranで刺激したNK細胞における受容体活性化の増強ももう一つの刺激機構として考えられる。健常人ドナーから採取し、MGN-3/BioBranで刺激したNK細胞において、活性化に関連する受容体であるCD69とCD25が増加することを確認した。NK細胞上のCD69の増加は、NK細胞傷害性の上昇と相関がある。さらに、NK細胞上のCD25の発現増加によって、増殖能が示唆されている。最後に、MGN-3/BioBranと他の免疫細胞との相互作用も報告されている<sup>[39,40]</sup>。

*In vitro*で活性化したNK細胞の養子移植は、現在、がんの治療に用いられている。K562-mb15-41BBLをフィーダー細胞に使用するなどの様々な方法を使って、NK細胞を*ex vivo*で大量に増殖させられることが、最近の研究で明らかにされている<sup>[28]</sup>。これらの増殖したNK細胞は、*in vitro*において様々な細胞株や成人もしくは小児のがんなどの悪性腫瘍に対して抗腫瘍効果を発揮した<sup>[41-43]</sup>。様々な増殖プロトコール

にMGN-3/BioBranを加えたところ、我々はNK細胞の増殖、細胞傷害活性の維持、T細胞の増殖抑制における改善を確認した。これらのデータは、特に移植片対宿主病を避けるためにT細胞が除去されるべき同種間設定において、細胞傷害性の高い臨床用NK細胞の大規模な増殖のために重要と考えられる。さらに、MGN-3/BioBranに低用量IL-2を併用することによって、NK細胞傷害活性が高用量のIL-2と同じレベルに高まった。これらのデータは過去の研究結果と一致している<sup>[44]</sup>。したがって、MGN-3/BioBranと低用量IL-2は相乗的に作用し、この方法によって *in vivo* における高用量IL-2治療に関連する毒性を回避することができる。

成人患者に対する研究のデータは、様々な免疫療法アプローチの代替または補助治療としてMGN-3/BioBranの使用が悪性腫瘍の治療に有益である可能性を示唆している。我々の研究結果はこの知見を小児の患者まで拡大し、*in vitro*での様々な小児腫瘍および*in vivo*における神経芽細胞腫に対するNK細胞の細胞傷害活性が、MGN-3/BioBranの併用によって高まることを明らかにした。我々は、MGN-3/BioBranの添加はNK細胞の増殖/活性化を亢進し、低用量IL-2と併用することで、神経芽細胞腫に対する免疫療法のためのNK細胞の活性化において有用であることを確認した。小児の臨床設定でのさらなる研究によって、免疫化学療法のプロトコールとの併用におけるMGN-3/BioBranの役割が明らかになるであろう。

#### 謝辞

大和薬品株式会社（東京都、日本）にMGN-3/BioBranの提供を感謝します。Torres Canizalesのフローサイトメトリー分析、Díez Sebastiánの統計学的解析、およびAimee Talleurの英語文法レビューへの助力に謝意を表します。

本研究は、Antonio Pérez-MartínezへのNational Health Service of Spainの補助金FIS PI12/01622 (Fundación de la Sociedad Española de Hemato- Oncología Infantil) およびCRISがん財団 (<http://www.criscancer.org/en/index.php>) の援助ならびに、Matthias Pfeifferへのドイツ ホセ・カレーラス白血病財団、およびドイツ小児がん財団 (DKS) の援助を一部受けました。

#### 利益相反の開示

本件研究の筆者達は、本研究で言及されている商品もしくは企業と販売、所有権、もしくは経済的利益関係を有していない。

#### References

- [1] Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000;356:1795–9.
- [2] Lang P, Pfeiffer M, Teltchik HM, Schlegel P, Feuchtinger T, Ebinger M, et al. Natural killer cell activity influences outcome after T cell depleted stem cell transplantation from matched unrelated and haploidentical donors. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011;24:403–11.
- [3] Nakachi K, Imai K. Environmental and physiological influences on human natural killer cell activity in relation to good health practices. *Jpn J Cancer Res* 1992;83:798–805.
- [4] Kusaka Y, Kondou H, Morimoto K. Healthy lifestyles are associated with higher natural killer cell activity. *Prev Med* 1992;21:602–15.
- [5] Li Q, Morimoto K, Nakadai A, Qu T, Matsushima H, Katsumata M, et al. Healthy lifestyles are associated with higher levels of perforin, granulysin and granzymes A/B-expressing cells in peripheral blood lymphocytes. *Prev Med* 2007;44:117–23.
- [6] Reale M, Boscolo P, Bellante V, Tarantelli C, Di Nicola M, Forcella L, et al. Daily intake of *Lactobacillus casei* Shirota increases natural killer cell activity in smokers. *Br J Nutr* 2012;108:308–14.
- [7] Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, Yoshikai Y, Tsuru T. Daily intake of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 augments acquired immunity in healthy adults. *J Nutr* 2006;136:3069–73.
- [8] Crist DM, Kraner JC. Supplemental growth hormone increases the tumor cytotoxic activity of natural killer cells in healthy adults with normal growth hormone secretion. *Metabolism* 1990;39:1320–4.

- [9] Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* 1981;291:335–8.
- [10] Kobayashi H, Dubois S, Sato N, Sabzevari H, Sakai Y, Waldmann TA, et al. Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood* 2005;105:721–7.
- [11] Kalina U, Kauschat D, Koyama N, Nuernberger H, Ballas K, Koschmieder S, et al. IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-2. *J Immunol* 2008;165:1307–13.
- [12] Watanabe M, Fenton RG, Wigginton JM, McCormick KL, Volker KM, Fogler WE, et al. Intradermal delivery of IL-12 naked DNA induces systemic NK cell activation and Th1 response *in vivo* that is independent of endogenous IL-12 production. *J Immunol* 1999;163:1943–50.
- [13] Szkaradkiewicz A, Karpiński TM, Drews M, Borejsza-Wysocki M, Majewski P, Andrzejewska E. Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta1) in patients with gastric cancer. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:901564.
- [14] Konjević G, Mirjčić Martinović K, Vuletić A, Jović V, Jurišić V, Babović N, et al. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clin Exp Metastasis* 2007;24:1–11.
- [15] Choi BS, Sondel PM, Hank JA, Schach H, Gan J, King DM, et al. Phase I trial of combined treatment with ch14.18 and R24 monoclonal antibodies and interleukin-2 for patients with melanoma or sarcoma. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:761–74.
- [16] Pahl JH, Ruslan SE, Buddingh EP, Santos SJ, Szuhai K, Serra M, et al. Anti-EGFR antibody cetuximab enhances the cytolytic activity of natural killer cells toward osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 2012;18:432–41.
- [17] Lundqvist A, Yokoyama H, Smith A, Berg M, Childs R. Bortezomib treatment and regulatory T-cell depletion enhance the antitumor effects of adoptively infused NK cells. *Blood* 2009;113:6120–7.
- [18] Ghoneum M, Abedi S. Enhancement of natural killer cell activity of aged mice by modified arabinosylan rice bran (MGN-3/Biobran). *J Pharm Pharmacol* 2004;56:1581–8.
- [19] Ghoneum M. Enhancement of human natural killer cell activity by modified arabinosylane from rice bran (MGN-3). *Int J Immunother* 1998;14:89–99.
- [20] Ghoneum M, Gollapudi S. Synergistic apoptotic effect of arabinosylan rice bran (MGN-3/Biobran) and curcumin (turmeric) on human multiple myeloma cell line U266 *in vitro*. *Neoplasma* 2011;58:118–23.
- [21] Bang MH, Van Riep T, Thinh NT, Song le H, Dung TT, Van Truong L, et al. Arabinosylan 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;30:5145–51.
- [22] Gollapudi S, Ghoneum M. MGN-3/Biobran, modified arabinosylan from rice bran, sensitizes human breast cancer cells to chemotherapeutic agent, daunorubicin. *Cancer Detect Prev* 2008;32:1–6.
- [23] Ghoneum M, Gollapudi S. Modified arabinosylan rice bran (MGN-3/Biobran) sensitizes human T cell leukemia cells to death receptor (CD95)-induced apoptosis. *Cancer Lett* 2003;201:41–9.
- [24] Ghoneum M, Gollapudi S. Synergistic role of arabinosylan rice bran (MGN-3/Biobran) in *S. cerevisiae*-induced apoptosis of monolayer breast cancer MCF-7 cells. *Anticancer Res* 2005;25:4187–96.
- [25] Markus J, Miller A, Smith M, Orenge I. Metastatic hemangiopericytoma of the skin treated with wide local excision and MGN-3. *Dermatol Surg* 2006;32:145–7.
- [26] Sims TL, Williams RF, Ng CY, Rosati SF, Spence Y, Davidoff AM. Bevacizumab suppresses neuroblastoma progression in the setting of minimal disease. *Surgery* 2008;144:269–75.
- [27] Perez-Martinez A, Iyengar R, Gan K, Chotsampancharoen T, Rooney B, Holladay M, et al. Blood dendritic cells suppress NK cell function and increase the risk of leukemia relapse after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:598–607.
- [28] Cho D, Shook DR, Shimasaki N, Chang YH, Fujisaki H, Campana D. Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin Cancer Res* 2010;16:3901–9.
- [29] Blomberg K, Granberg C, Hemmlä I, Lövgren T. Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. II. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. significance and specificity of the method. *J Immunol Methods* 1986;92:117–23.
- [30] 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. *Nutrition Cancer* 2008;60:235–44.
- [31] Takahara K, Sano K. The life prolongation and QOL improvement effect of rice bran arabinosylan derivative (MGN-3, BioBran) for progressive cancer. *Clin Pharmacol Therapy* 2004;14:267–71.
- [32] Cholujova D, Jakubikova J, Czako B, Martisova M, Hunakova L, Duraj J, et al. MGN-3 arabinosylan rice bran modulates innate immunity in multiple myeloma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:437–45.
- [33] Meurs EF, Galabru J, Barber GN, Katze MG, Hovanessian AG. Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:232–6.
- [34] Ghoneum M, Badr El-Din NK, Ali DA, El-Dein MA. Modified arabinosylan from rice bran, MGN-3/biobran, sensitizes metastatic breast cancer cells to paclitaxel *in vitro*. *Anticancer Res* 2014;34:81–7.
- [35] Dons'koi BV, Chernyshov VP, Osypchuk DV. Measurement of NK activity in whole blood by the CD69 up-regulation after co-incubation with K562, comparison with NK cytotoxicity assays and CD107a degranulation assay. *J Immunol Methods* 2011;372:187–95.
- [36] Benlahrech A, Donaghy H, Rozis G, Goodier M, Klavinskis L, Gotch F, et al. NK Cell up-regulation of CD69, HLA-DR, interferon  $\gamma$  secretion and cytotoxic activity by plasmacytoid dendritic cells is regulated through overlapping but different pathways. *Sensors (Basel)* 2009;9:386–403.
- [37] Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J, Solana R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* 1999;97:159–65.
- [38] Clausen JI, Vergeiner B, Enk M, Petzer AL, Gastl G, Günsilius E. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology* 2003;207:85–93.
- [39] Ghoneum M, Matsuura M. Augmentation of macrophage phagocytosis by modified arabinosylan rice bran (MGN-3/biobran). *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004;17:283–92.
- [40] Ghoneum M, Matsuura M, Gollapudi S. Modified arabinosylan rice bran (MGN-3/Biobran) enhances intracellular killing of microbes by human phagocytic cells *in vitro*. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008;21:87–95.
- [41] Alici E, Sutlu T, Bjorkstrand B, Gilljam M, Stellan B, Nahi H, et al. Autologous antitumor activity by NK cells expanded from myeloma patients using GMP-compliant components. *Blood* 2008;111:3155–62.
- [42] Voskens CJ, Watanabe R, Rollins S, Campana D, Hasumi K, Mann DL. *Ex-vivo* expanded human NK cells express activating receptors that mediate cytotoxicity of allogeneic and autologous cancer cell lines by direct recognition and antibody directed cellular cytotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:134–46.

- [43] Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockey T, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 2009;69:4010–7.
- [44] 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;24:314–24.

### **Supplementary data**

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.11.001>.