



PROCEEDINGS

Cytokines and Cancer: Regulation, Angiogenesis, and Clinical Applications

September 20-24, 2000
Vail Cascade Resort
Vail, Colorado

Conference Co-Chairpersons

JANICE P. DUTCHER
Our Lady of Mercy
Cancer Center
Bronx, NY

MICHAEL T. LOTZE
University of Pittsburgh
Pittsburgh, PA

GIORGIO TRINCHIERI
Schering-Plough Research
Center
Dardilly, France

**INHIBITION OF TUMOR CELL GROWTH AND MODULATION OF
CYTOKINE PRODUCTION BY THE IRON BASED COMPOUND MRN-100**

**Ken H. Tachiki¹, Ph.D., Koichi Uyemura^{1,2}, Ph.D., Mamdooh Ghoneum³, Ph.D.,
Takashi Makinodan^{1,2}, Ph.D. and Dean Yamaguchi¹, M.D., Ph.D.**

¹ Research Service and ² GRECC, VA Greater Los Angeles Healthcare System,
Los Angeles, CA 90073

³ Department Otolaryngology, Drew University Medicine and Science,
Los Angeles, CA 90059

There is great interest among health care professionals to explore the value of naturally derived biological response modifiers to enhance immune function. MRN-100, an iron-based compound derived from bivalent and trivalent ferrates, was reported previously to be a potent immunomodulator. We have previously shown that treatment with MRN-100 had an augmentory effect on natural killer [NK] cell activity in healthy control subjects, in patients with breast cancer, and in patients infected with HIV-1. In these studies, an effect on NK cell activity was noted as early as 4 weeks and did not show hyporesponsiveness with continued treatment for over 12 months, with absence of notable side effects.

In the present study, we demonstrate a direct effect of MRN-100 on tumor cell growth and cytokine production. Preliminary results showed that incubation of a squamous cell carcinoma [SCC13] cell line with MRN-100 arrested tumor cell growth, whereas control SCC13 cells grown in a NEM media in the absence of added MRN-100 continued to increase in cell number. Employing flow cytometry procedures, results showed that after 16 hours of treatment of SCC13 cells with MRN-100 a marked stimulation in production of Interlukin 10 [IL-10], but no apparent change in content of Interferon- γ [INF- γ]. ELISA analyses of the culture media bathing the cells 16 hours after treatment with MRN-100 also showed an increase in IL-10 production, little change in INF- γ concentration. However, a marked elevation in Interlukin-12 was also observed at 16 hours.

In conclusion, our findings indicate that MRN-100 acts by not only enhancing the activity of NK cells as previously reported, but also through a direct action on tumor cell production of cytokines. The production of cytokines such as IL-10 by cancer cells to alter the activity of the immune system is well known. Our findings indicate that the biological response modifier MRN-100 can alter the production and secretion of cytokines such as IL-10 and IL-12 by cancer cells such as SCC13; and thereby the activity of the immune system. Findings that treatment of cultures of SCC13 cells with MRN-100 also can arrest cell growth directly may reflect an alternate mechanism of control of tumor cell growth. Work in this direction is in progress. Supported in part by VA Medical Research Funds and by funds provided by ACM Co., LTD., Tokyo, Japan

Contents

- ① Abstract
- ② Introduction
- ③ Methods
- ④ Results
 - ④-A. SCC Skin
 - ④-B. MCF-7 Breast
 - ④-C. LNCAP prostatic
 - ④-D. MC3T3-E1 Bone
- ⑤ Conclusion

ABSTRACT

Cytokines and Cancer

INHIBITION OF TUMOR CELL GROWTH AND MODULATION OF CYTOKINE PRODUCTION BY THE IRON BASED COMPOUND MRN-100

Ken H. Tachiki¹, Ph.D., Koichi Uyemura^{1,2}, Ph.D., Mamdooh Ghoneum³, Ph.D., Takashi Makinodan^{1,2}, Ph.D. and Dean Yamaguchi¹, M.D., Ph.D.

¹ Research Service and ² GRECC, VA Greater Los Angeles Healthcare System, Los Angeles, CA 90073

³ Department Otolaryngology, Drew University Medicine and Science, Los Angeles, CA 90059

There is great interest among health care professionals to explore the value of naturally derived biological response modifiers to enhance immune function. MRN-100, an iron-based compound derived from bivalent and trivalent ferrates, was reported previously to be a potent immunomodulator. We have previously shown that treatment with MRN-100 had an augmentory effect on natural killer [NK] cell activity in healthy control subjects, in patients with breast cancer, and in patients infected with HIV-1. In these studies, an effect on NK cell activity was noted as early as 4 weeks and did not show hyporesponsiveness with continued treatment for over 12 months, with absence of notable side effects.

In the present study, we demonstrate a direct effect of MRN-100 on tumor cell growth and cytokine production. Preliminary results showed that incubation of a squamous cell carcinoma [SCC13] cell line with MRN-100 arrested tumor cell growth, whereas control SCC13 cells grown in a NEM media in the absence of added MRN-100 continued to increase in cell number. Employing flow cytometry procedures, results showed that after 16 hours of treatment of SCC13 cells with MRN-100 a marked stimulation in production of Interlukin 10 [IL-10], but no apparent change in content of Interferon- γ [INF- γ]. ELISA analyses of the culture media bathing the cells 16 hours after treatment with MRN-100 also showed an increase in IL-10 production, little change in INF- γ concentration. However, a marked elevation in Interlukin-12 was also observed at 16 hours.

In conclusion, our findings indicate that MRN-100 acts by not only enhancing the activity of NK cells as previously reported, but also through a direct action on tumor cell production of cytokines. The production of cytokines such as IL-10 by cancer cells to alter the activity of the immune system is well known. Our findings indicate that the biological response modifier MRN-100 can alter the production and secretion of cytokines such as IL-10 and IL-12 by cancer cells such as SCC13; and thereby the activity of the immune system. Findings that treatment of cultures of SCC13 cells with MRN-100 also can arrest cell growth directly may reflect an alternate mechanism of control of tumor cell growth. Work in this direction is in progress. Supported in part by VA Medical Research Funds and by funds provided by ACM Co., LTD., Tokyo, Japan

INTRODUCTION

MRN-100 is an iron-based compound derived from bi- and tri-valent iron ions, which form a coordination complex with water molecules. Ghoneum and co-workers have reported previously MRN-100 to be a potent, naturally derived Biological Response Modifier [BRM] that activates Natural Killer [NK] cells in vivo. In 15 normal healthy subjects and 10 cancer patients, MRN-100 administration produced a high increase in NK cell function, without evidence of hyporesponsiveness with continued treatment or of any notable side effects. With primary cultures of peripheral Mononuclear Cells [MNC], MRN-100 had a significant protective effect on the survival HIV-1 infected MNC, with a 53% reduction of HIV-1 p24 antigen production at 10 days post-treatment. In cultures of normal MNC, MRN-100 had no significant effect on cell proliferation, either alone or co-cultured with different mitogens.

We report here the effects of MRN-100 on the growth and on the cytokine production in cultures of breast cancer cells, “normal” breast cells, prostate cancer cells, squamous carcinoma cells and “normal” bone cells. The cytokines reported here include Interlukin 10 [IL-10], Interlukin 12 [IL-12] and gamma interferon [γ -IFN].

antibodies and antigens were purchase from Pharmagen (San Diego).

Cell counting was performed manually employing trypsinization to recover cells and trypan blue dye exclusion to exclude any dead cells. The cell count results were verified employing tetrazolium up-take (MTT assay).

Cytokines levels were assayed employing commercial ELISA kits purchased from Pharmagen (San Diego).

IL-10 mRNA expression by PCR. PCR amplification of specific DNA from a small number of cells was applied in a semi-quantitative manner. mRNA were isolated from cells with acid guanidinium isothiocyanate and used to synthesize cDNA by oligo d(T)-primed reverse transcription. cDNA was amplified by PCR using paired IL-10 specific primers (5'-primer: ATG CCC CAA GCT GAG AAC CAA GAC CCA and 3'-primer: TCT CAA GGG GCT GGG TCA GCT ATC CCA). Samples were compared to internal β -actin and cDNA normalized to yield equivalent levels of β -actin (5'primer: GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA and 3'-primer: CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC) amplification. IL-10 and β -actin templates are coamplified to eliminate the variables of PCR amplification conditions. PCR products are resolved by gel electrophoresis in 1.8% agarose.

③

METHODS

MRN-100 was provided in distilled water by ACM Co., Ltd., Japan with an Fe^{2+} and Fe^{3+} ion concentration of about 2 μM . In all of the studies, this material was diluted prior to use in appropriate cell culture media to give a final concentration of 15% (v/v: i.e., 0.3 μM iron). For all control samples, the volume of MRN-100 was replaced with double distilled water and run in parallel with the treatment samples. Although not reported, a non-treatment control was also run to test for any osmotic or concentration effects. No differences in the two types of control samples were found and only the proper reagent control data are reported.

Tissue Cultures. The various cell lines used in these studies were purchased from commercial sources. In all cases, the appropriate culture media for optimal growth were employed to grow the cells. Passage numbers were recorded. For the Squamous Carcinoma cells (SCC 13), cell passage numbers was not correlated with cell growth data. However, presence of endogenous levels and the stimulatory effects of MRN-100 on the cytosine levels were not observed with cell cultures of passage numbers less than 12; all values were zero. The cytosine data reported here for these cells are from cultures with passage numbers of 18 or greater.

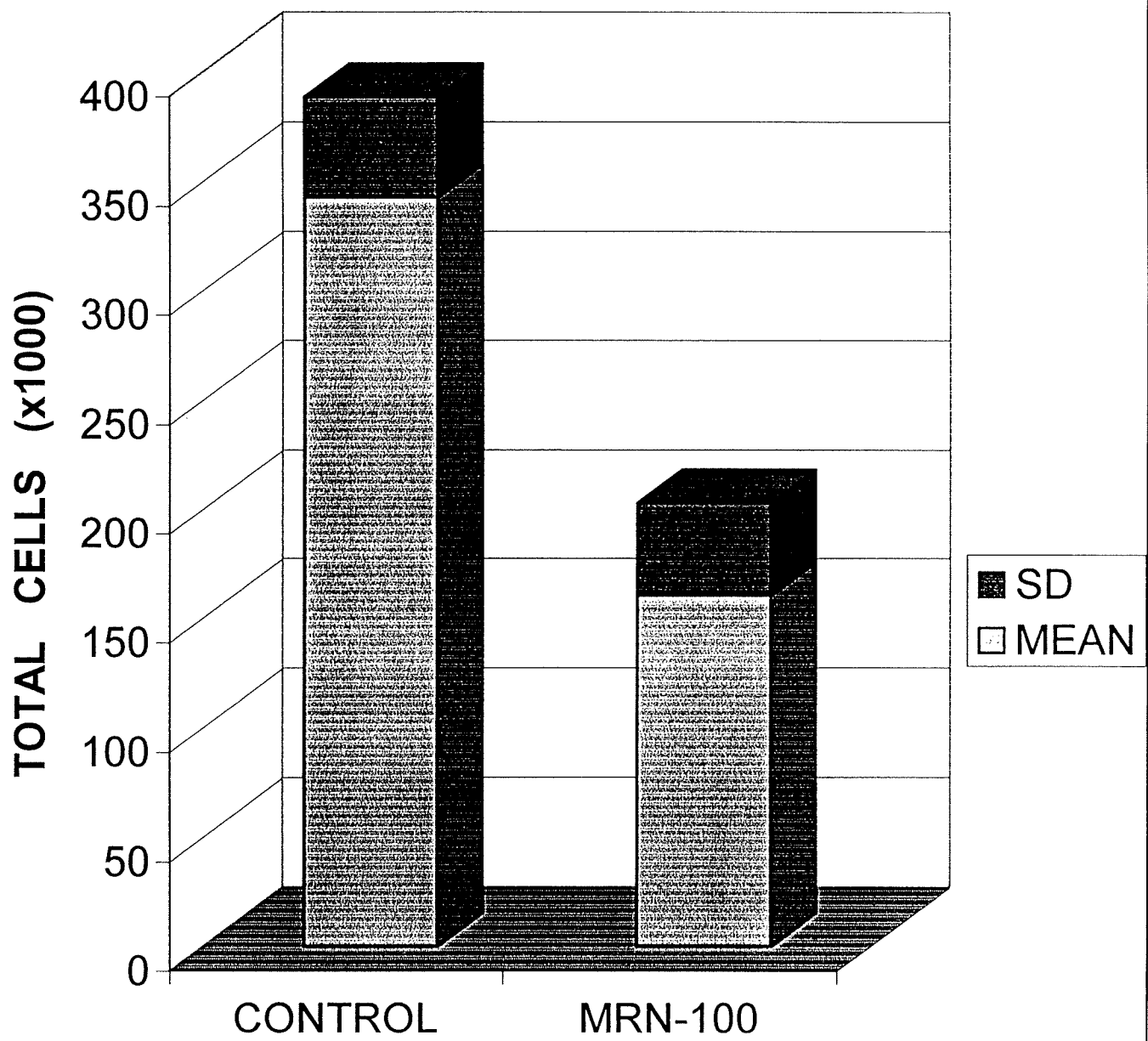
Flow cytometry studies were performed employing a FACS Vantage SE purchased from Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA. The

U

RESULTS

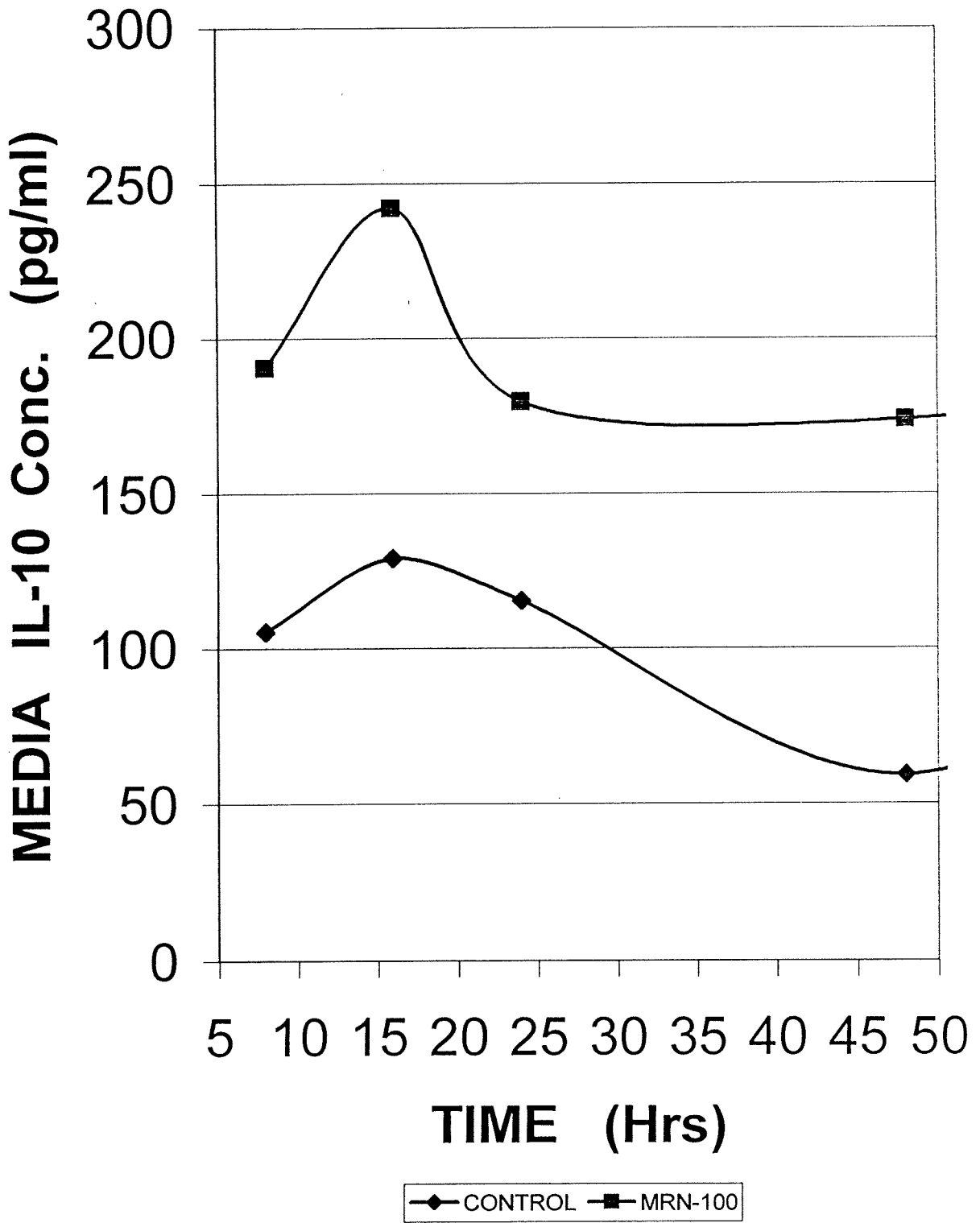
-A

SCC13 CELLS TREATED 16 hrs
with MRN-100

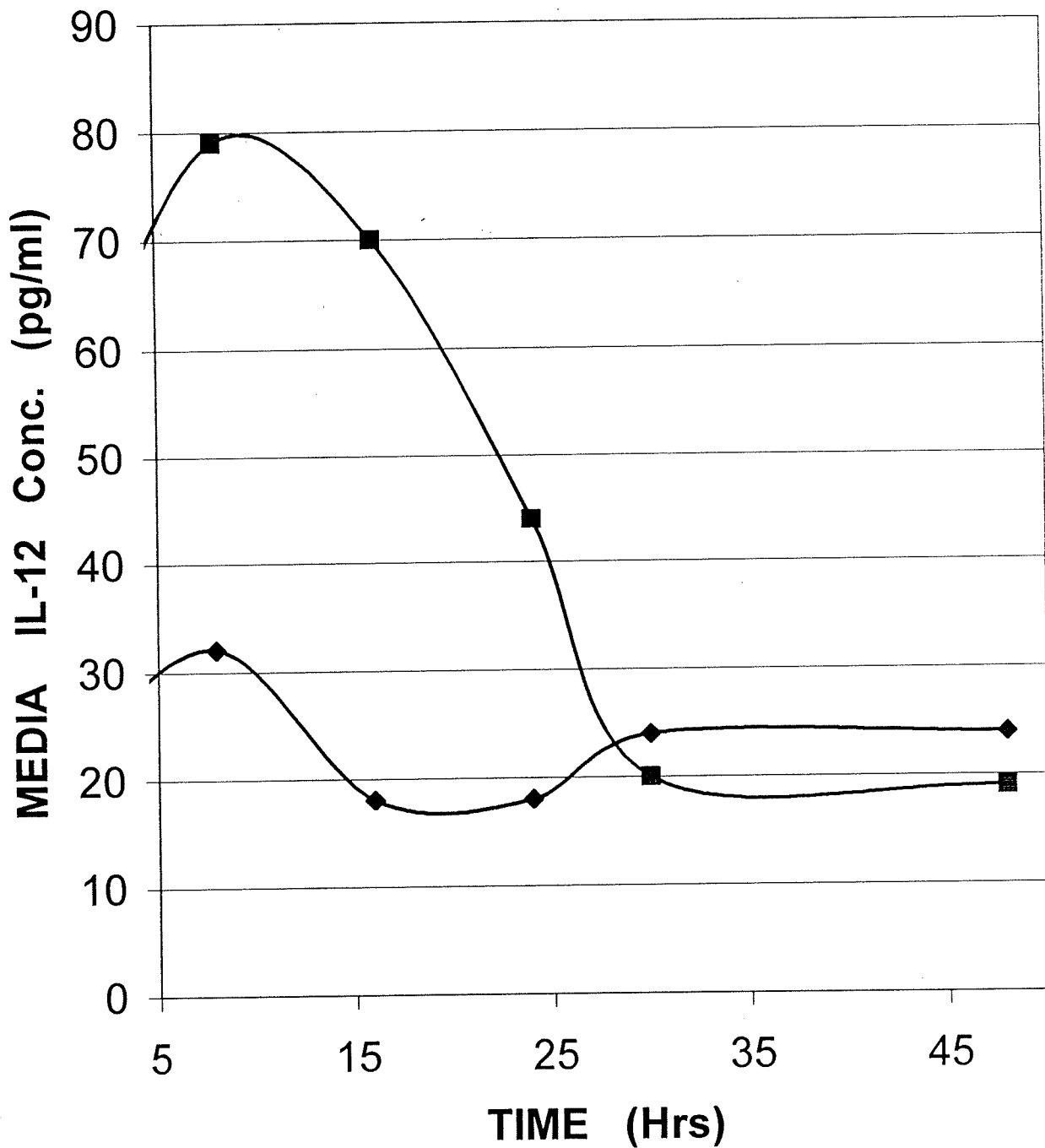


$p < 0.007$

SQUAMOUS CELL CARCINOMA

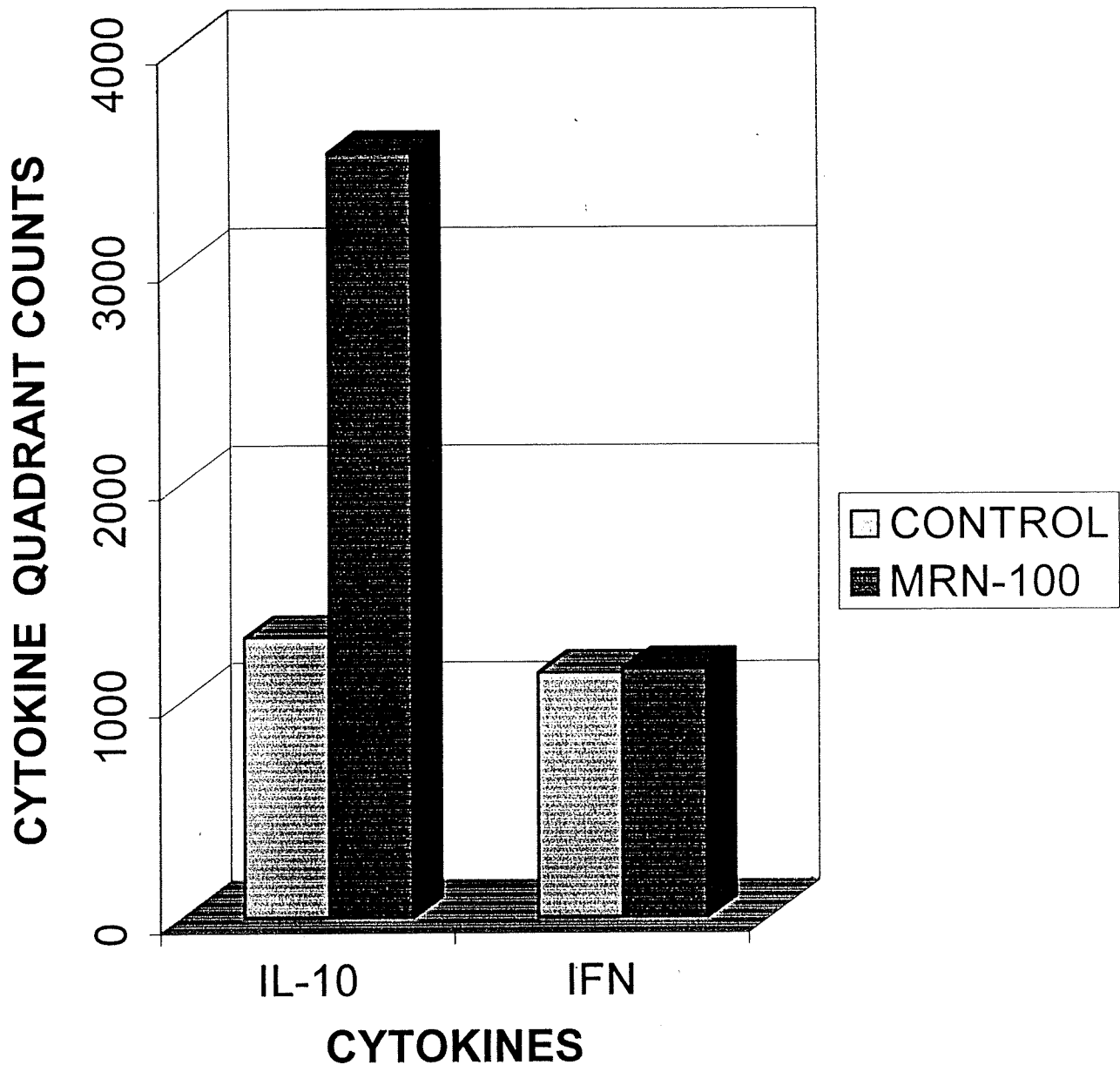


SQUAMOUS CELL CARCINOMA

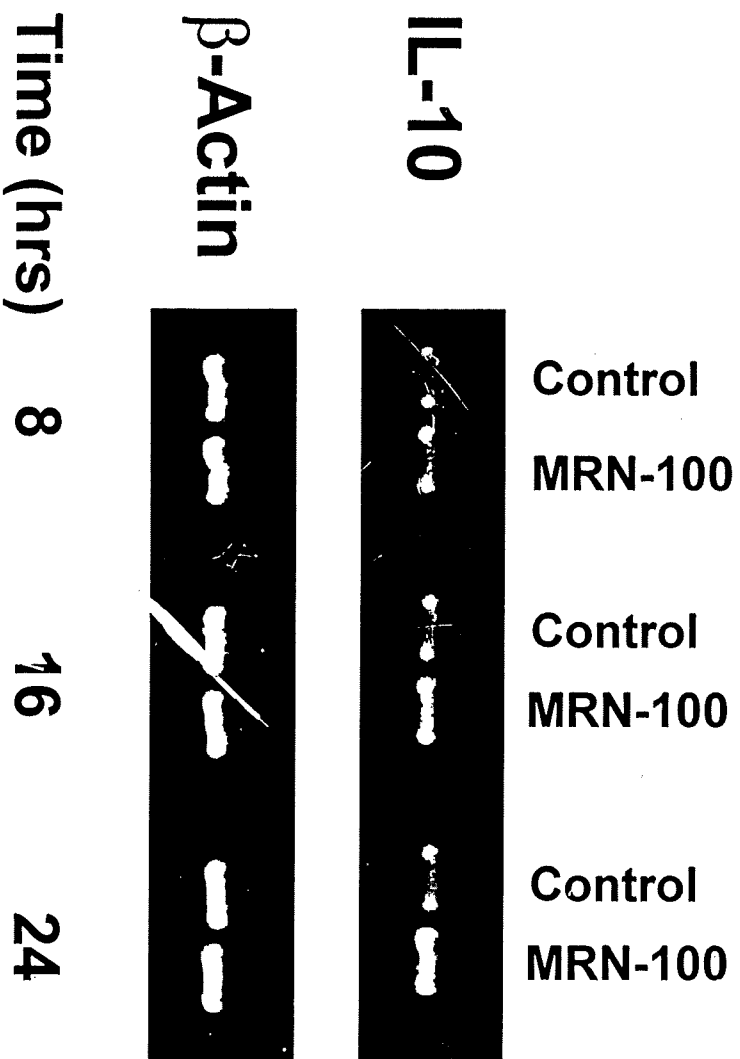


◆ CONTROL ■ MRN-100

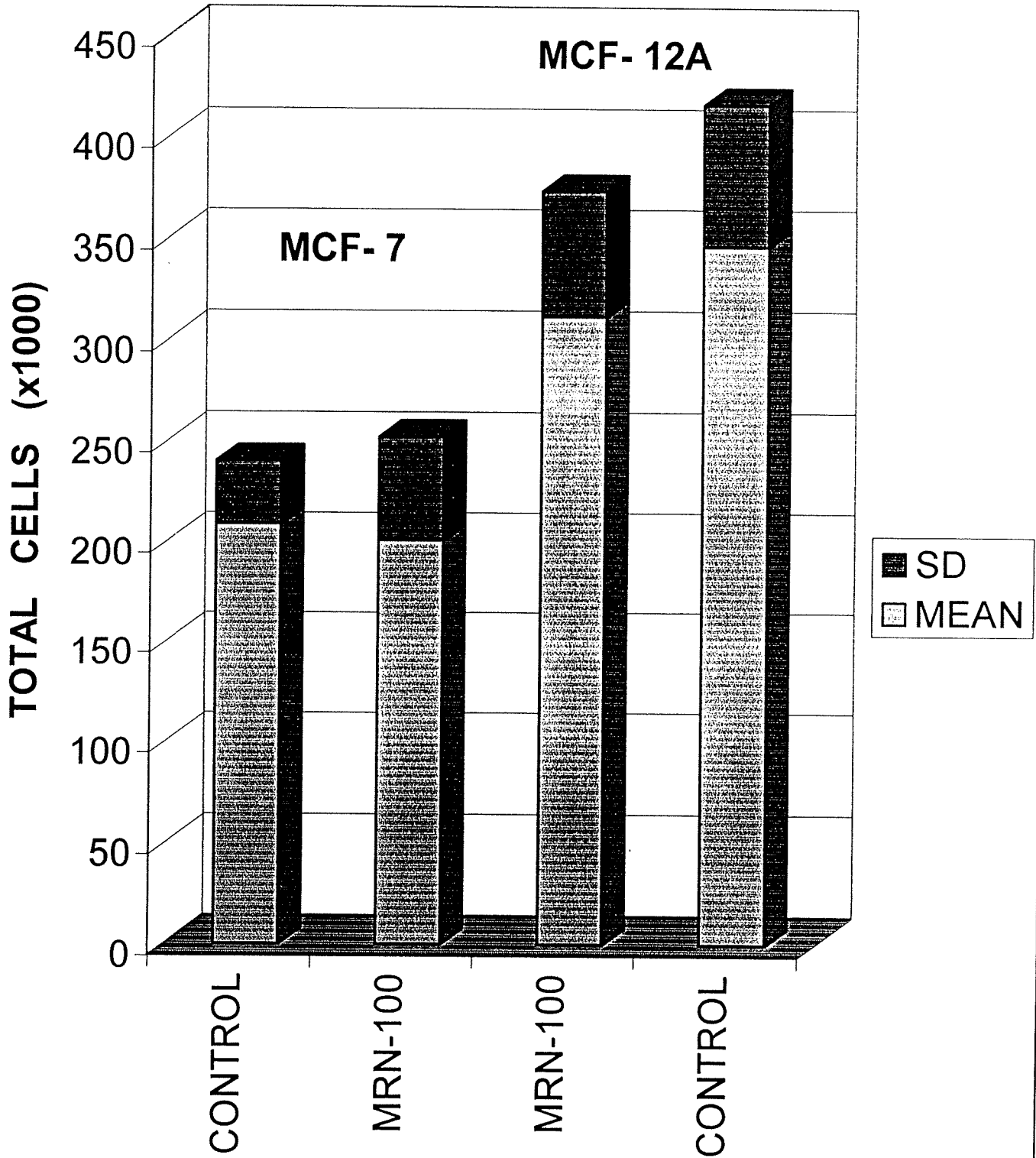
FLOW CYTOMETRY INTRACELLULAR CYTOKINES



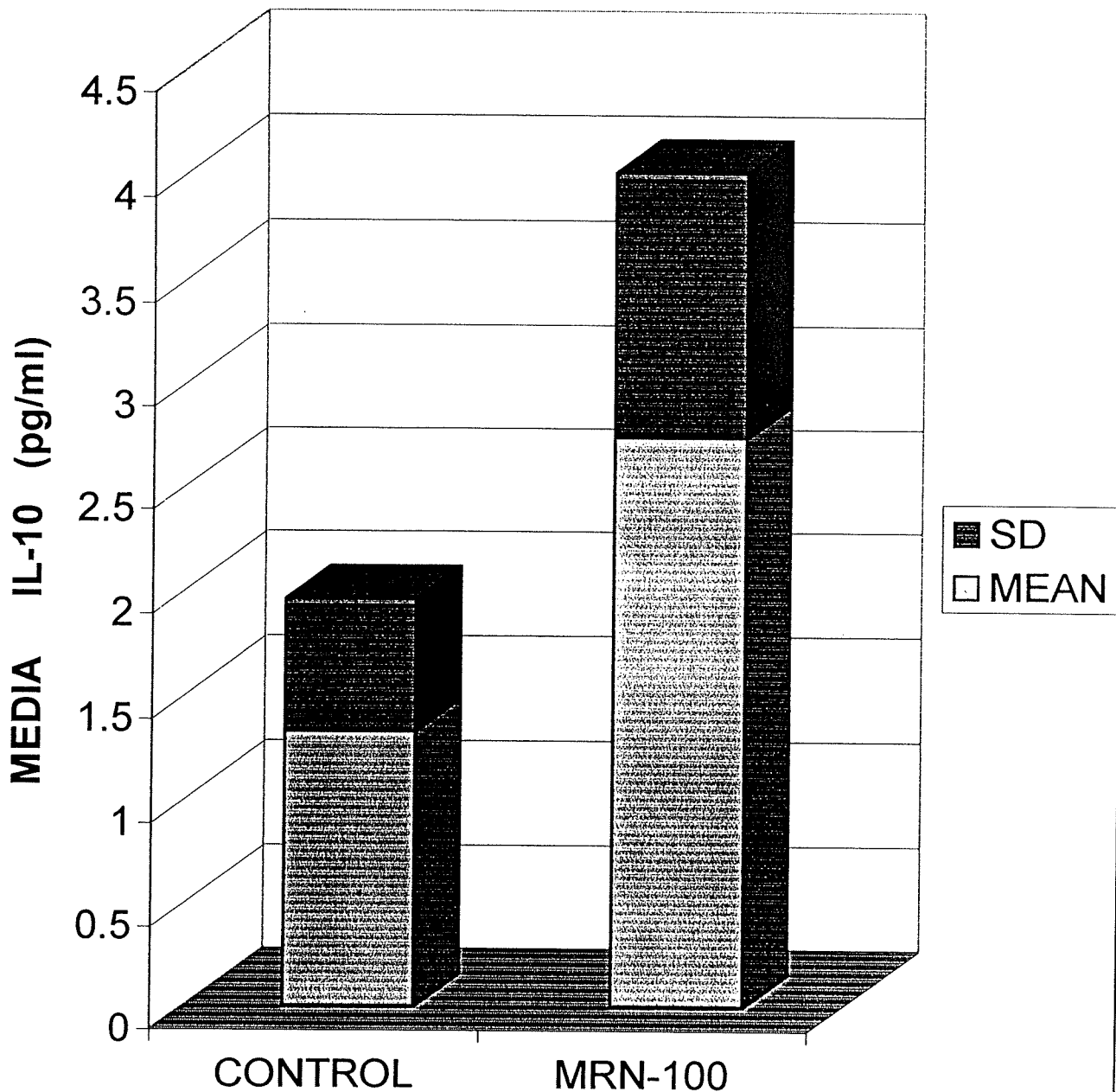
RT-PCR for IL-10 mRNA



BREAST CELLS TREATED 16 hrs WITH MRN-100



BREAST CANCER (MCF-7) CELLS



$p < 0.045$

BREAST CANCER (MCF-7) CELLS

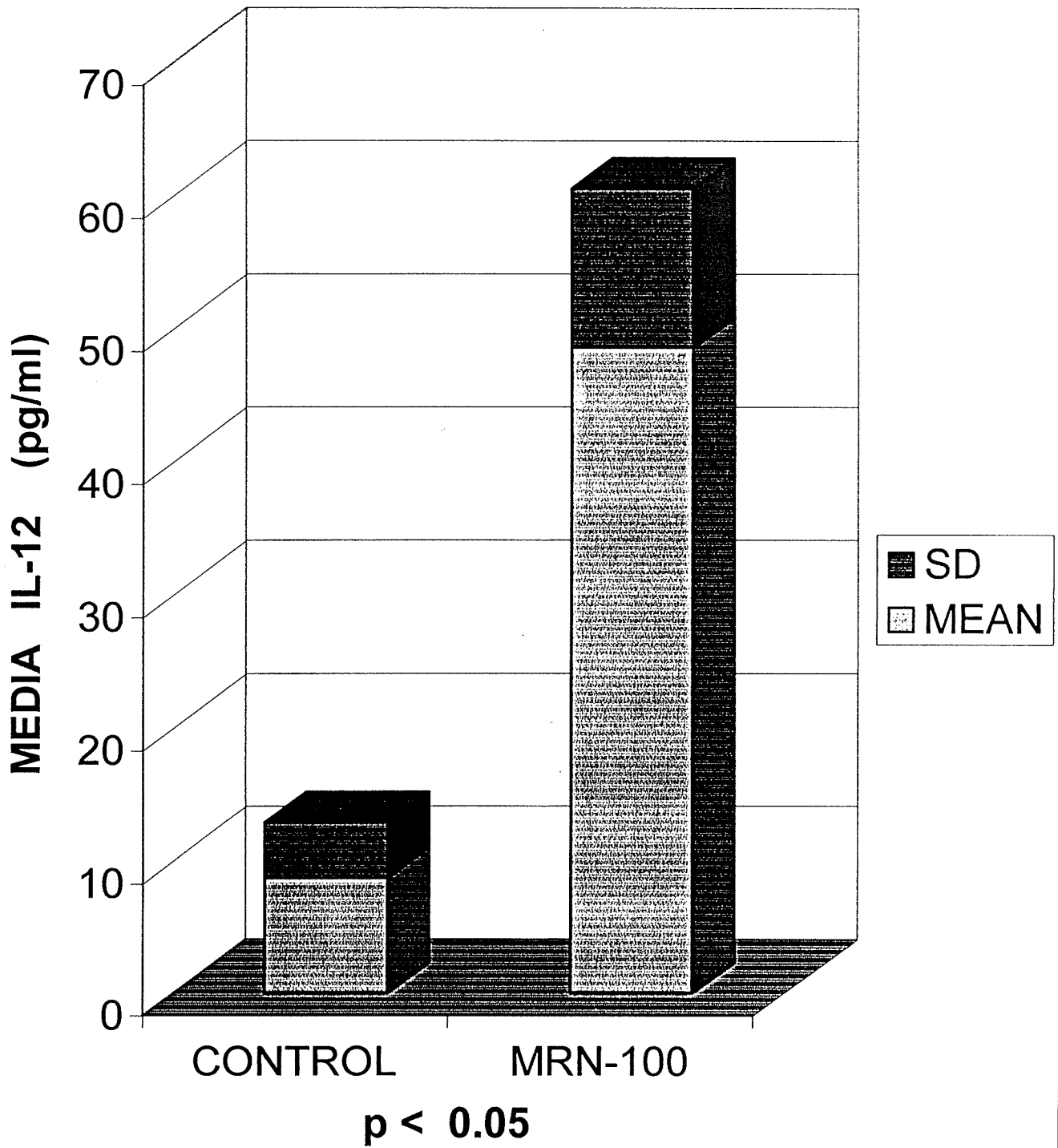


TABLE 1

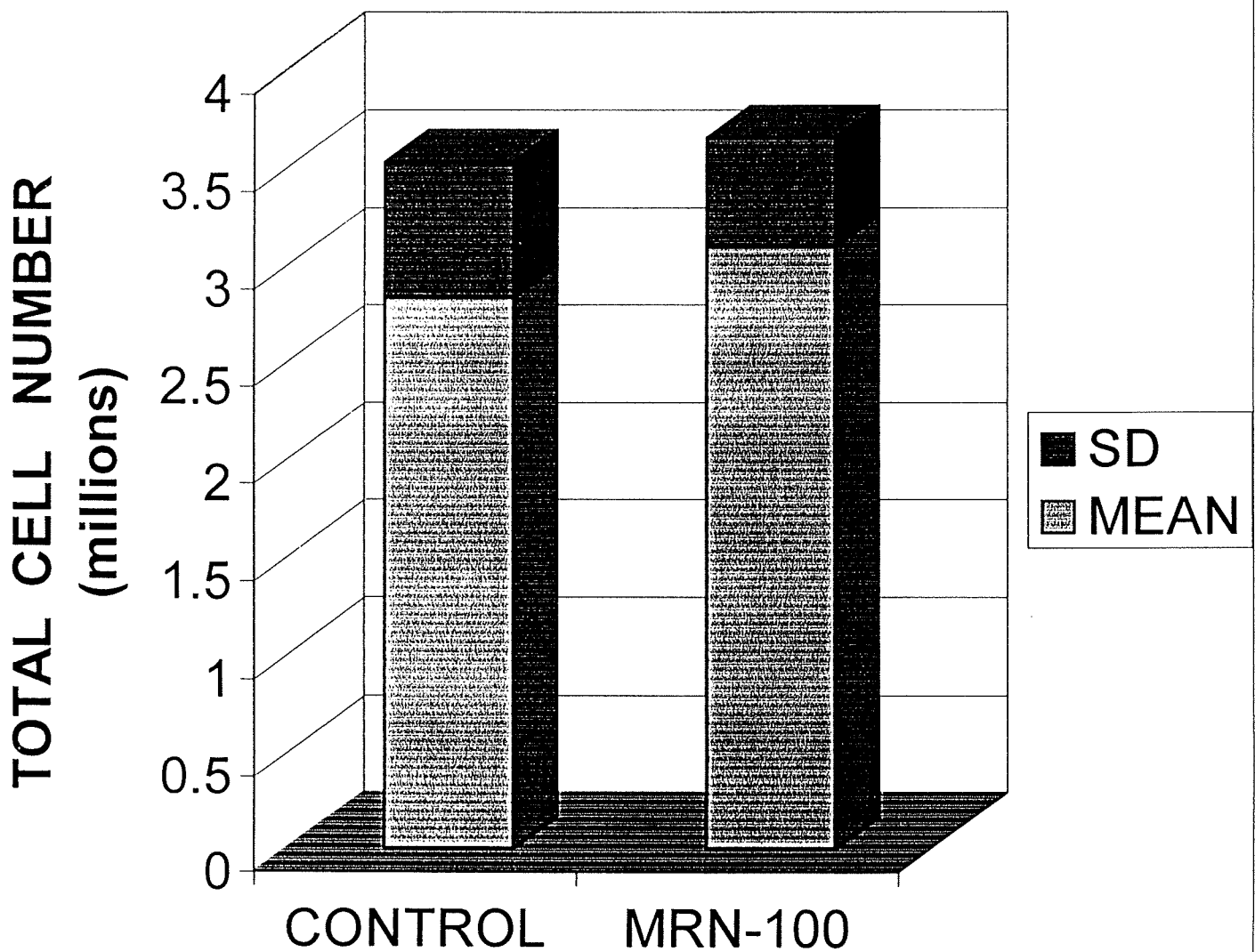
Effects of MRN-100 on IL-10, IL-12 and gamma-IFN levels
in tumor and normal breast cells

CELLS	gamma-IFN	IL-10	IL-12
MCF-12A (NORMAL)	TRACE- NO CHANGE	NONE DETECTED	TRACE- NO CHANGE
MCF-7 (TUMOR)	NO CHANGE	SEE FIGURE	SEE FIGURE

NOTE

The presence of IL-10, IL-12 or γ -IFN was NOT detected by ELISA assay of the bathing media of cell cultures of prostate cancer cells [LNCAP] and of normal bone cells [MC3T3-E1]. The addition of MRN-100 to cultures of these cells had no apparent effects on cell growth within the first 16 hours of treatment.

MC3T3-E1 CELLS TREATED 24 hrs. with MRN-100



CONCLUSIONS

1. The biological response modifier MRN-100 was found to stimulate the production and release of IL-10 and IL-12 in SCC13 and MCF-7 tumor cells.
2. MRN-100 had an inhibitory effect on the in vitro cell growth of SCC13 tumor cells at 16 hours of treatment.
3. Although MRN-100 stimulated the release of cytokines in the cancerous form [MCF-7] of breast cells, MRN-100 treatment had no observed effects on levels of cytokines assayed in the media of normal breast cells [MCF-12A].

AACR 米国癌研究学会

議事録

サイトカインと癌：
調節、脈管形成、
ならびに臨床適用について

2000年9月20～24日
ヴェール・カスケード・リゾート
(コロラド州ヴェール)

会議共同司会者

JANICE P. DUTCHER
当社レディー・オブ・
マーシー癌センター
(ニューヨーク州
ブロンクス)

MICHAEL T. LOTZE
ピッツバーグ大学
(ペンシルヴェニア州
ピッツバーグ)

GIORGIO TRINCHIERI
シェリング・プラウ
研究センター
(フランス、ダルディイ)

鉄剤 MRN-100 による腫瘍細胞増殖の抑制
およびサイトカイン産生の変調

Ken H. Tachiki^[1](PhD)、Koichi Uyemura^[1,2](PhD)、
Mamdooh Ghoneum^[3](PhD)、Takashi Makinodan^[1,2](PhD)、
Dean Yamaguchi^[1](MD,PhD)

^[1]Research Service、^[2]GRECC, VA Greater Los Angeles Healthcare System (Los Angeles, CA 90073)

^[3]ドルー大学医学部耳鼻咽喉科 (Los Angeles, CA 90059)

現在、天然由来生体応答調節因子の免疫機能向上能について探求することが医療専門家の間で大きな関心事となっている。2 価および 3 価鉄由来の鉄剤 MRN-100 が強力な免疫調節薬であることについては先に報告した。著者らは以前に行った各試験で、健康な対照被験者、乳癌患者、ならびに HIV-1 感染患者において、MRN-100 による処置がナチュラルキラー [NK] 細胞活性に対し付加的な効果を有することを示した。これらの試験では、NK 細胞活性に対する効果は 4 週間という早期に認められ、12 ヶ月以上にわたり処置を続行しても反応低下は認められず、顕著な副作用もなかった。

今回の試験では、腫瘍細胞増殖およびサイトカイン産生に対する MRN-100 の直接的効果を明らかにする。予備試験において、扁平上皮癌 [SCC13] 細胞株を MRN-100 とともに培養した場合には腫瘍細胞の増殖は抑制され、MRN-100 を添加しない NEM 媒質で培養した対照 SCC13 細胞は細胞数が増え続けた。フローサイトメトリー法では、SCC13 細胞の MRN-100 処置 16 時間後に、インターロイキン 10 [IL-10] の産生が顕著に刺激されたが、インターフェロン- γ [INF- γ] の量には明白な変化は認められなかった。細胞を浸した培養媒質の ELISA 分析でも、MRN-100 処置 16 時間後 IL-10 産生は増大し、INF- γ 濃度にはほとんど変化が見られなかった。ただし、インターロイキン 12 の著しい上昇も 16 時間後に認められた。

結論として、本試験の所見から、MRN-100 は先の報告のように NK

細胞活性の亢進により作用するだけでなく、腫瘍細胞産生に対するサイトカインの直接的作用を介しても作用すると考えられる。癌細胞によって IL-10 などのサイトカインが産生され、免疫系の活性が変化することはよく知られている。また今回の所見から、生体応答調節因子 MRN-100 は、SCC13 などの癌細胞によるサイトカイン (IL-10 や IL-12 など) の産生および分泌を変調することができると考えられる。さらに、SCC13 細胞培養の MRN-100 処置によって細胞増殖の直接的抑制も可能であるとの所見は、腫瘍細胞増殖のコントロールに関する第 2 の機序を示唆している可能性もあり、この方向での研究が現在進行中である。VA Medical Research Funds より一部支援を、また ACM Co., LTD (日本、東京) より資金援助を受けた。

目次

① 要約

② 緒言

③ 方法

④ 結果

④-A ScC 皮膚

④-B MCF-7 乳房

④-C LNCAP 前立腺

④-D MC3T3-E1 骨

⑤ 結論

要約

サイトカインと癌

鉄剤 MRN-100 による腫瘍細胞増殖の抑制 およびサイトカイン産生の変調

Ken H. Tachiki^[1](PhD)、Koichi Uyemura^[1,2](PhD)、
Mamdooh Ghoneum^[3](PhD)、Takashi Makinodan^[1,2](PhD)、
Dean Yamaguchi^[1](MD,PhD)

^[1]Research Service, ^[2]GRECC, VA Greater Los Angeles Healthcare System (Los Angeles, CA 90073)

^[3]ドルー大学医学部耳鼻咽喉科 (Los Angeles, CA 90059)

現在、天然由来生体応答調節因子の免疫機能向上能について探求することが医療専門家の間で大きな関心事となっている。2 価および 3 価鉄由来の鉄剤 MRN-100 が強力な免疫調節薬であることについては先に報告した。著者らは以前に行った各試験で、健康な対照被験者、乳癌患者、ならびに HIV-1 感染患者において、MRN-100 による処置がナチュラルキラー [NK] 細胞活性に対し付加的な効果を有することを示した。これらの試験では、NK 細胞活性に対する効果は 4 週間という早期に認められ、12 ヶ月以上にわたり処置を続行しても反応低下は認められず、顕著な副作用もなかった。

今回の試験では、腫瘍細胞増殖およびサイトカイン産生に対する MRN-100 の直接的効果を明らかにする。予備試験において、扁平上皮癌 [SCC13] 細胞株を MRN-100 とともに培養した場合には腫瘍細胞の増殖は抑制され、MRN-100 を添加しない NEM 媒質で培養した対照 SCC13 細胞は細胞数が増え続けた。フローサイトメトリー法では、SCC13 細胞の MRN-100 処置 16 時間後に、インターロイキン 10 [IL-10] の産生が顕著に刺激されたが、インターフェロン- γ [INF- γ] の量には明白な変化は認められなかった。細胞を浸した培養媒質の ELISA 分析でも、MRN-100 処置 16 時間後 IL-10 産生は増大し、INF- γ 濃度にはほとんど変化が見られなかった。ただし、インターロイキ

ン 12 の著しい上昇も 16 時間後に認められた。

結論として、本試験の所見から、MRN-100 は先の報告のように NK 細胞活性の亢進により作用するだけでなく、腫瘍細胞産生に対するサイトカインの直接的作用を介しても作用すると考えられる。癌細胞によって IL-10 などのサイトカインが産生され、免疫系の活性が変化することはよく知られている。また今回の所見から、生体応答調節因子 MRN-100 は、SCC13 などの癌細胞によるサイトカイン (IL-10 や IL-12 など) の産生および分泌を変調することができると考えられる。さらに、SCC13 細胞培養の MRN-100 処置によって細胞増殖の直接的抑制も可能であるとの所見は、腫瘍細胞増殖のコントロールに関する第 2 の機序を示唆している可能性もあり、この方向での研究が現在進行中である。VA Medical Research Funds より一部支援を、また ACM Co.,LTD (日本、東京) より資金援助を受けた。

緒 言

MRN-100 は、水分子と錯化合物を形成する 2 価および 3 価鉄イオン由来の鉄剤である。Ghoneum らは先に、MRN-100 について、*in vivo* でナチュラルキラー [NK] 細胞を活性化する天然由来の強力な生体応答調節因子 [BRM] であると報告している。正常かつ健康な被験者 15 例および癌患者 10 例において、MRN-100 投与によって NK 細胞機能が高度に亢進され、投与続行に対する反応低下の徴候も、また顕著な副作用もなかった。末梢単核細胞 [MNC] の 1 次培養において、MRN-100 は生存 HIV-1 感染 MNC に対する有意な防護効果を有し、処置 10 日後に HIV-1 p24 抗原の産生が 53% 低減した。正常な MNC の培養では、MRN-100 単独でも、また様々な分裂誘起物質とともに用いた場合でも、細胞増殖に対する有意な効果はなかった。

本稿では乳癌細胞、「正常な」乳房細胞、前立腺癌細胞、扁平上皮細胞、および「正常な」骨細胞の培養における増殖ならびにサイトカイン産生に対する MRN-100 の効果について述べる。本稿で述べるサイトカインには、インターロイキン 10 [IL-10]、インターロイキン 12 [IL-12]、および γ インターフェロン [γ -IFN] が含まれる。

方 法

MRN-100 Fe²⁺および Fe³⁺イオン濃度約 2 pM の蒸留水中 MRN-100 を ACM Co.,Ltd., (日本) より入手した。すべての試験において、本品は最終濃度 15%まで希釈 (v/v: 鉄 0.3 pM) し適切な細胞培養媒質で使用した。対照サンプルでは MRN-100 の代わりに 2 倍の量の蒸留水を用い、処置サンプルと並行比較した。浸透効果あるいは濃度効果の有無を調べるため、非処置対照も設けた。2 種類の対照サンプルに差は認められなかったため、妥当な試薬対照データのみを報告する。

組織培養 各試験で用いた各種細胞系は市販のものを購入した。どの場合にも、細胞の成長に最も適した培養媒質を用い、継代数を記録した。扁平上皮癌細胞 (SCC13) の場合、細胞継代数と細胞増殖データとの間に相関性はなかったが、内在性レベルの存在徴候ならびにシトシン濃度に対する MRN-100 の刺激効果は、細胞培養継代数 12 未満では認められなかった (値はすべてゼロであった)。同細胞について本稿で報告するシトシンデータは、継代数 18 以上の培養によるものである。

フローサイトメトリー 各試験は、Becton Dickinson Immunocytometry Systems (カリフォルニア州サンホゼ) から購入した FACS Vantage SE を用いて実施した。抗体および抗原は Pharmagen (サンディエゴ) から購入した。

細胞計数 細胞回収ではトリプシナイゼーション (trypsinization)、死んだ細胞の除去ではトリパンブルー染料排除法により用手的に計数した。細胞計数結果をテトラゾリウム取り込み測定法 (MTT アッセイ) を用いて確認した。

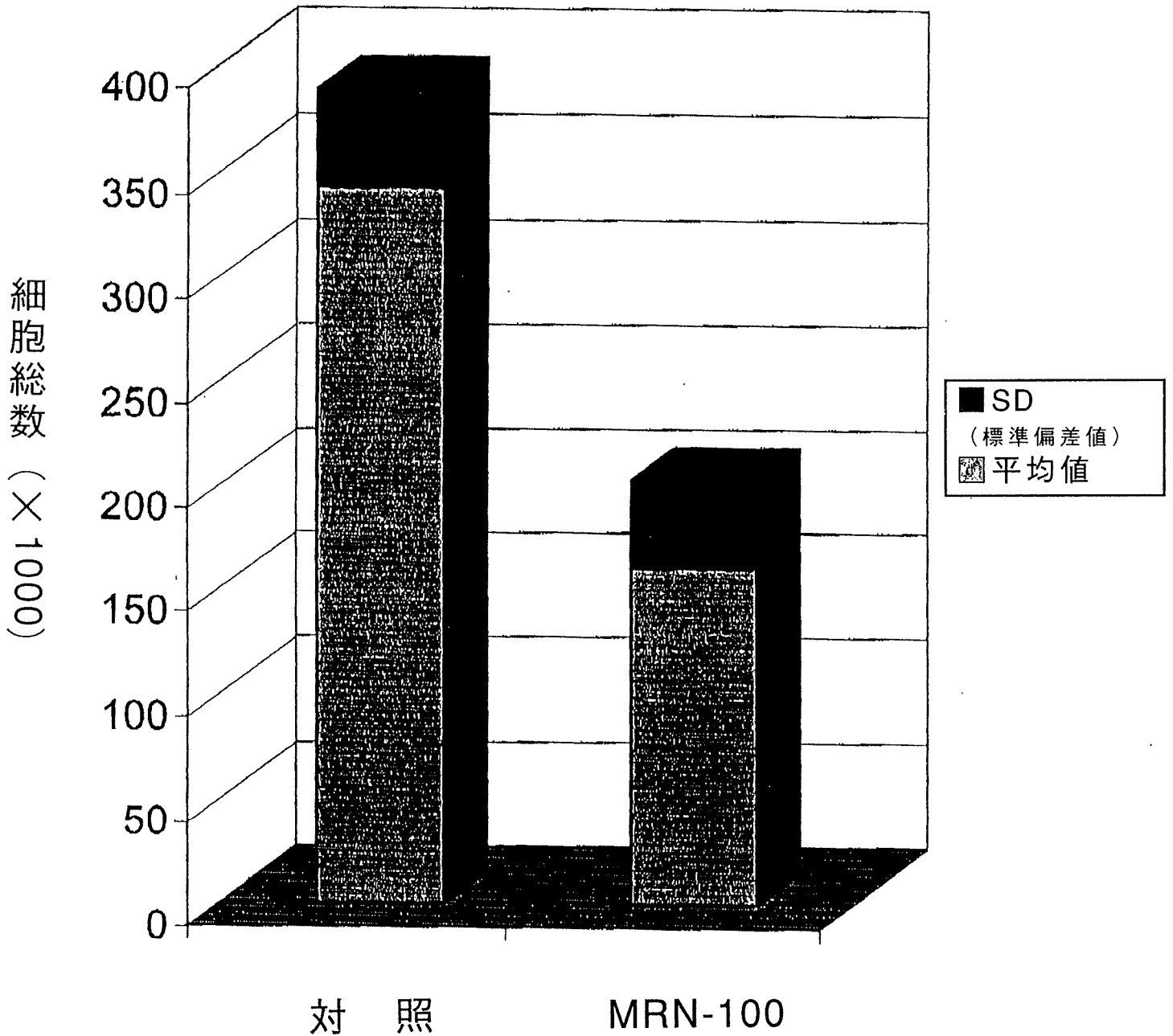
サイトカイン濃度 は、Pharmagen (サンディエゴ) から購入した市販の ELISA キットを用いて測定した。

PCRによるIL-10 mRNA発現 少数細胞由来の特定DNAのPCR増幅に関しては半定量法を用いた。グアニジンイソチオシアン酸(acid guanidinium isothiocyanate)により細胞からmRNAを分離し、これを用いてオリゴd(T)感作逆転写によりcDNAを合成した。ペアIL-10特異性プライマー(5'-primer:ATG CCC CAA GCT GAG AAC CAA GAC CCAおよび3'-primer:TCT CAA GGG GCT GGG TCA GCT ATC CCA)を用いPCRによりcDNAを増幅した。各サンプルを体内 β -アクチン、ならびに同等レベルの β -アクチン増幅を生成するようノーマライズしたcDNA(5'-primer:GTG GGG CGC CCC AGG CAC CAおよび3'-primer:CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC)と比較した。IL-10および β -アクチンのテンプレートを共増幅し、PCR増幅条件のバラツキを排除した。PCR産生物は1.8%アガロース中ゲル電気泳動法により消散した。

結 果

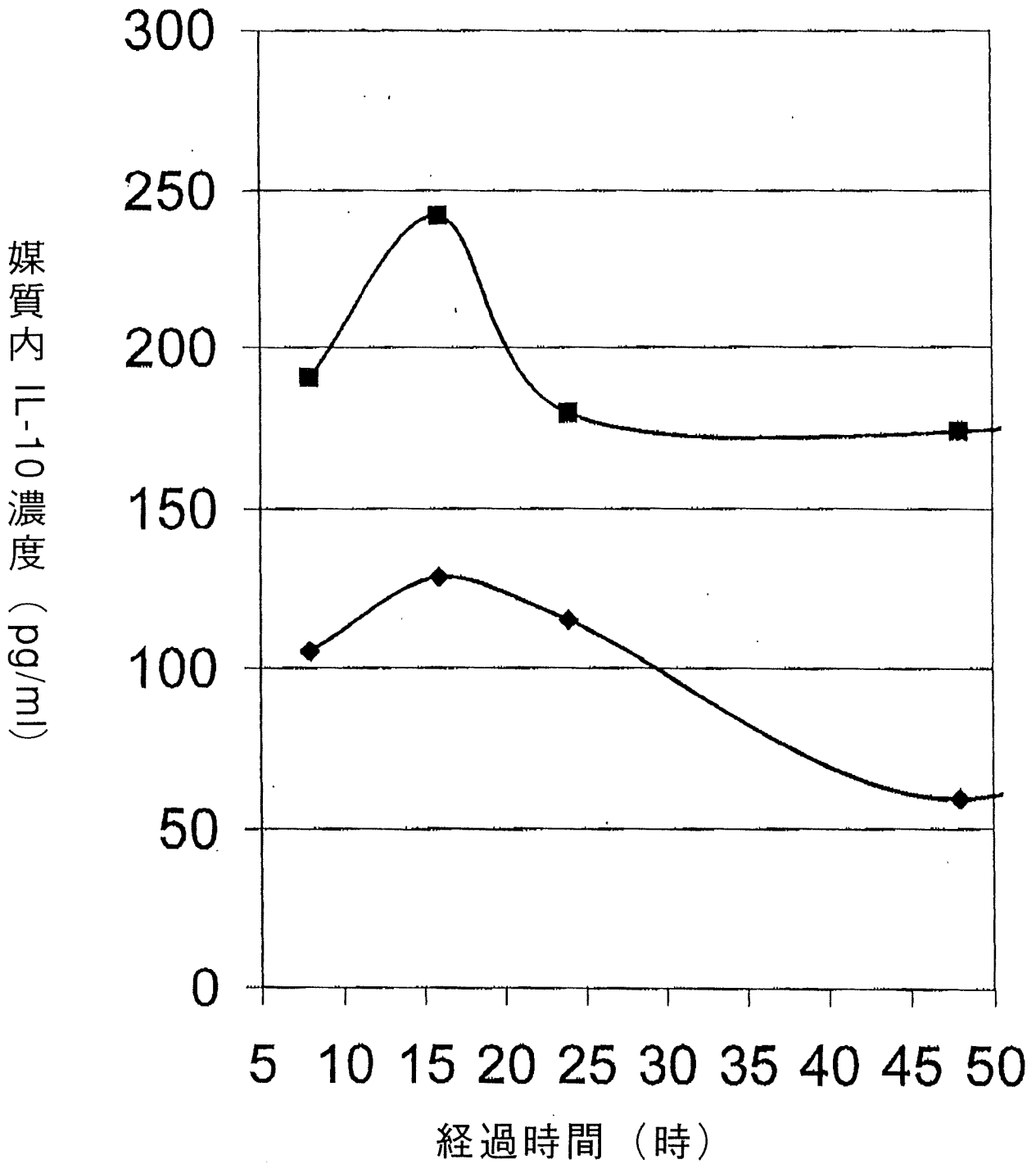
④-A

MRN-100 処置 16 時間後の SCC13 細胞



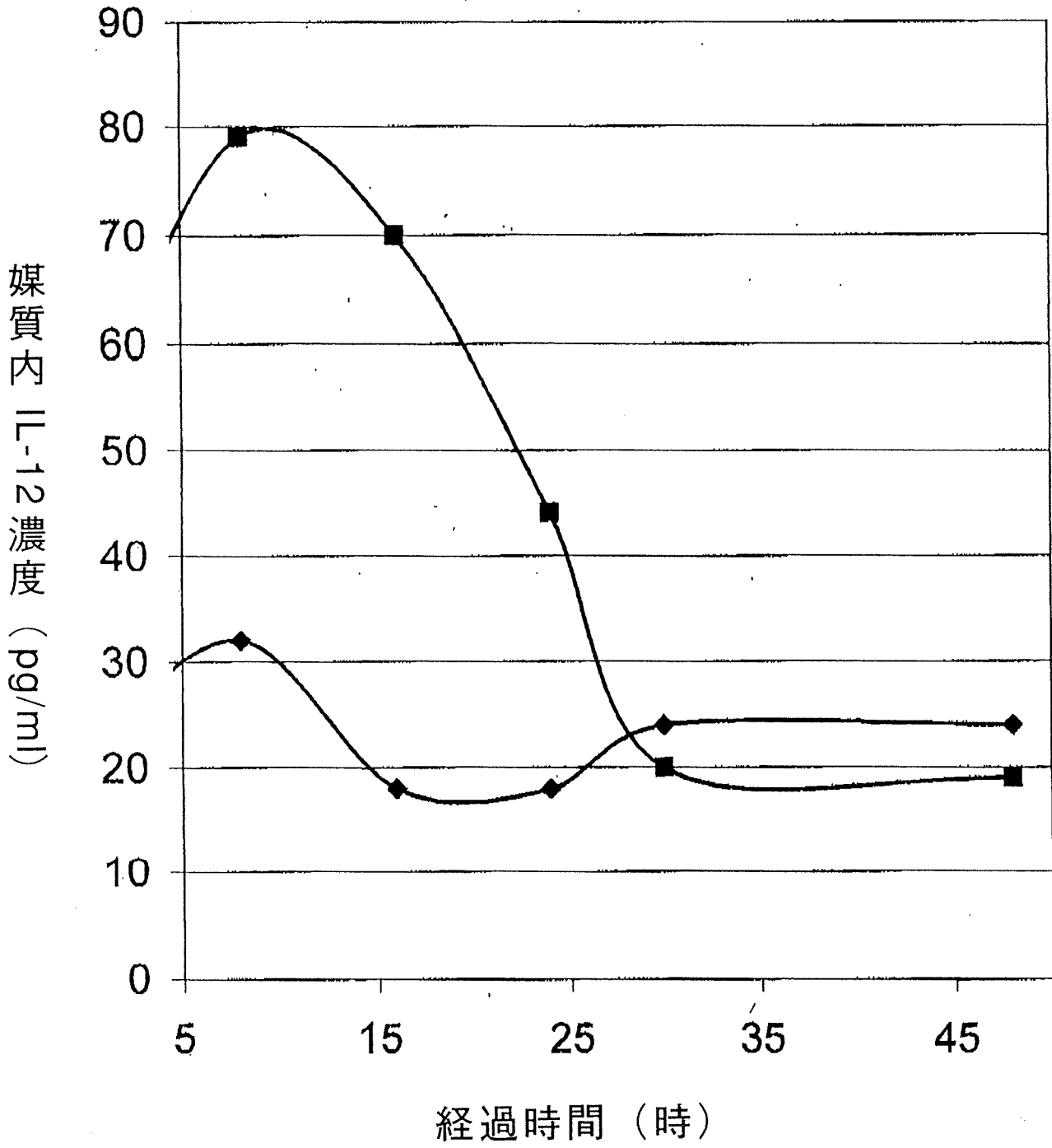
$p < 0.007$

扁平上皮癌



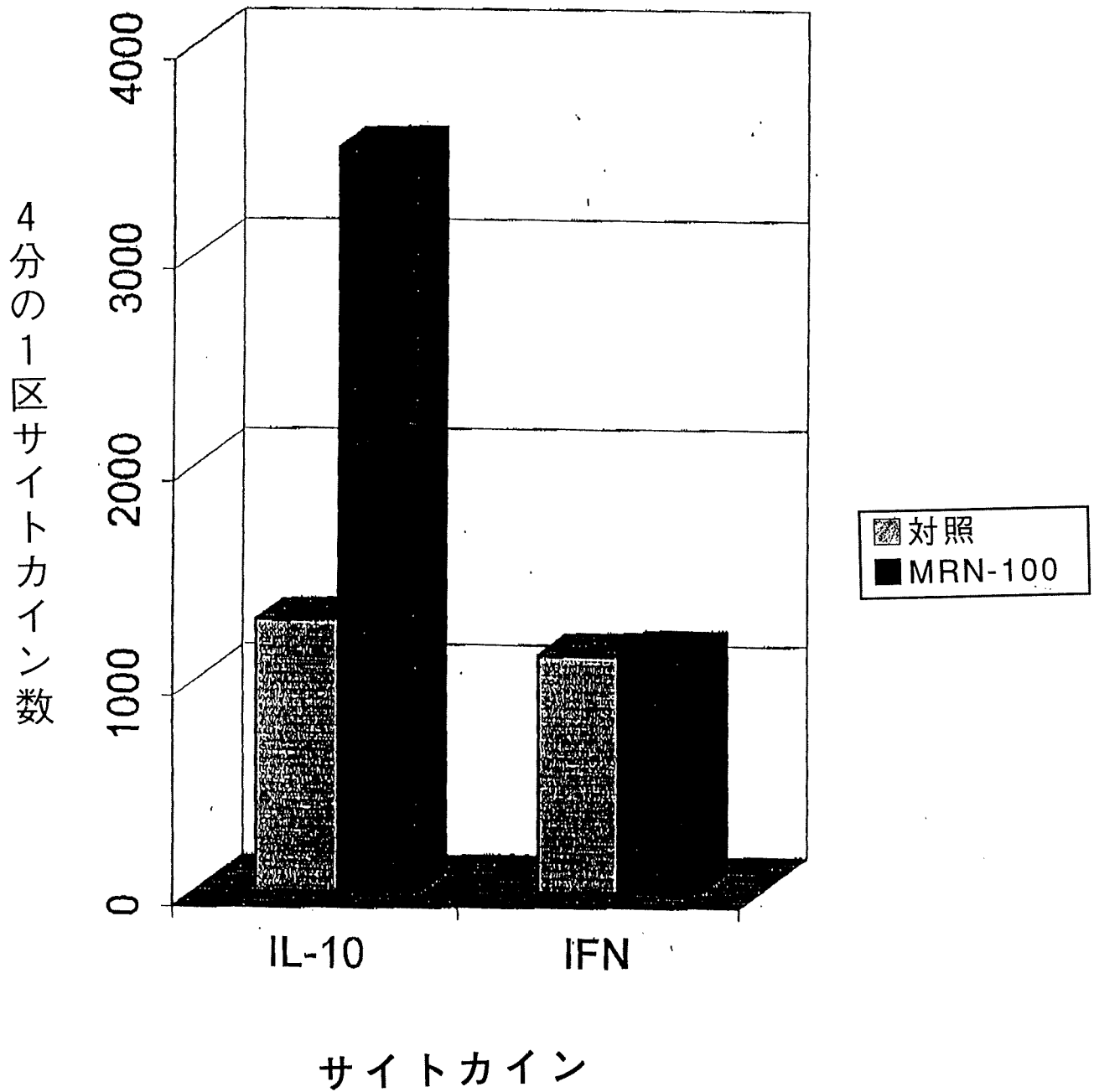
● 対照 ■ MRN-100

扁平上皮癌



● 対照 ■ MRN-100

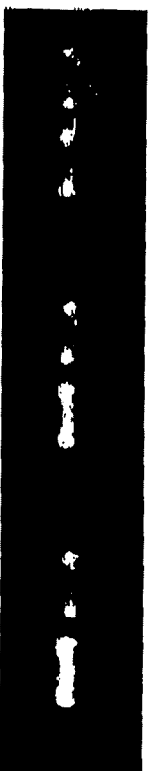
フローサイトメトリー
細胞内サイトカイン



RT-PCRによるIL-10 mRNA発現

対照 対照 対照
MRN-100 MRN-100 MRN-100

IL-10



β -アクトチン



経過時間 (時)

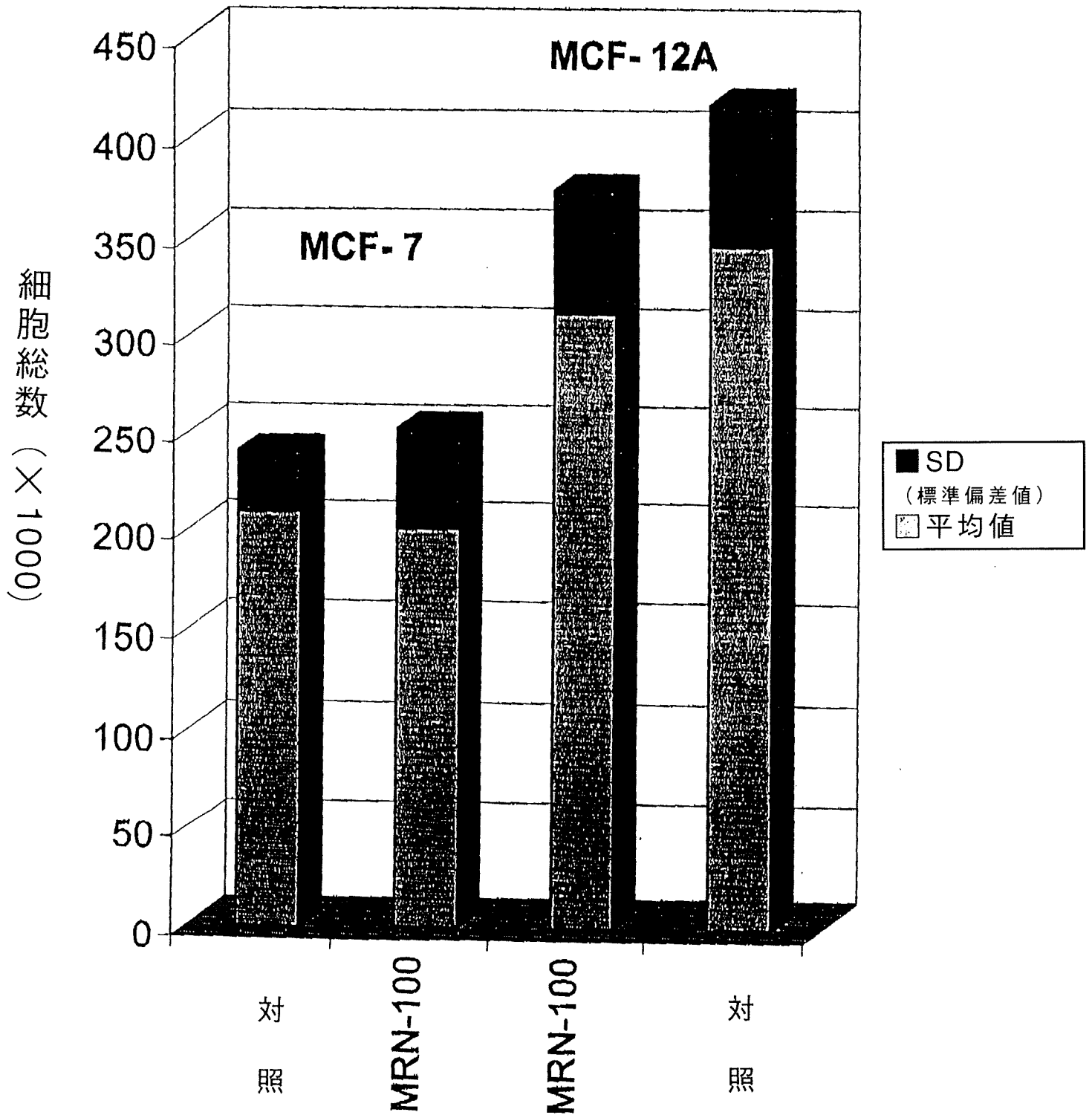
8

16

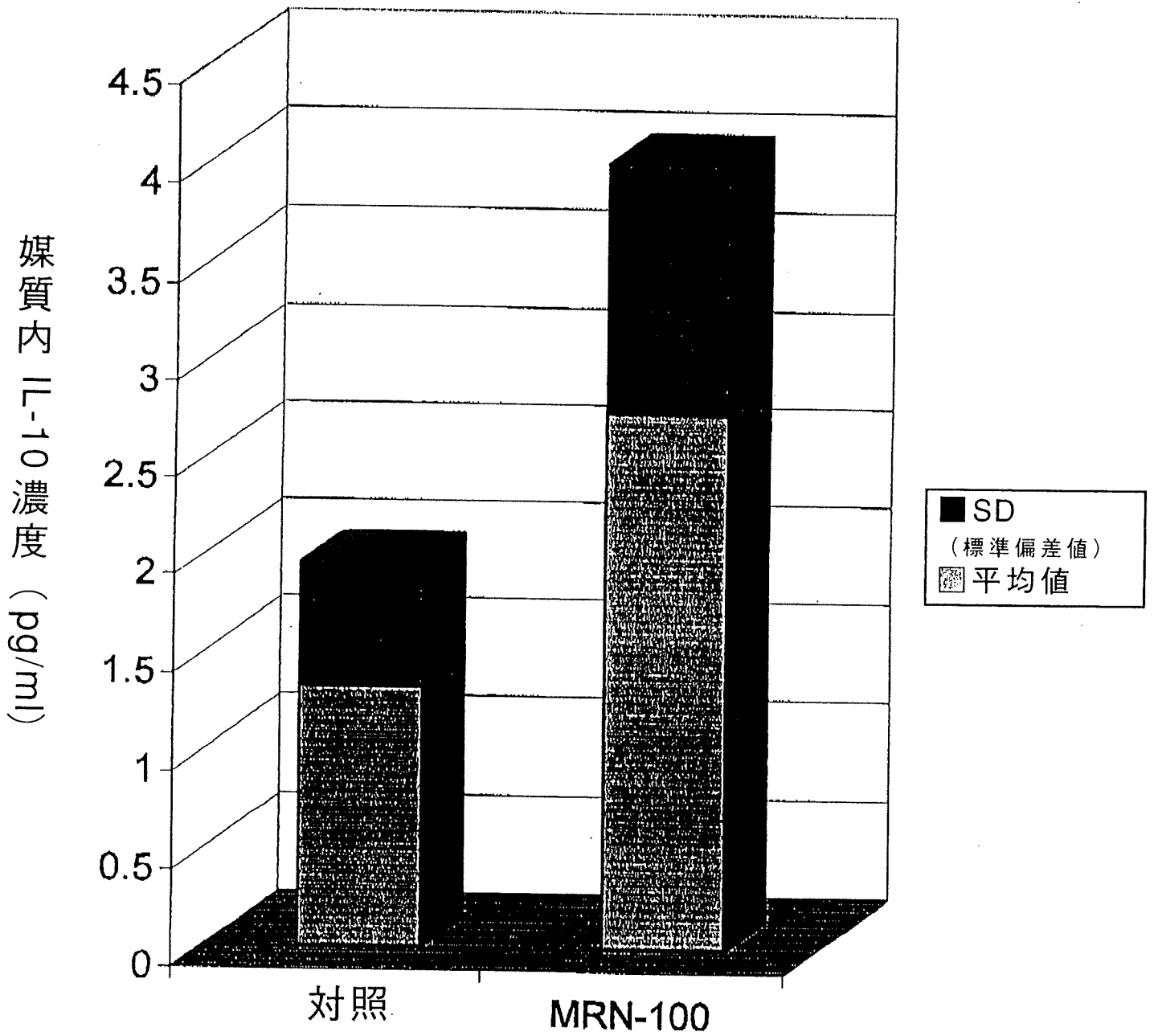
24

④-B

MRN-100 処置 16 時間後の乳房細胞

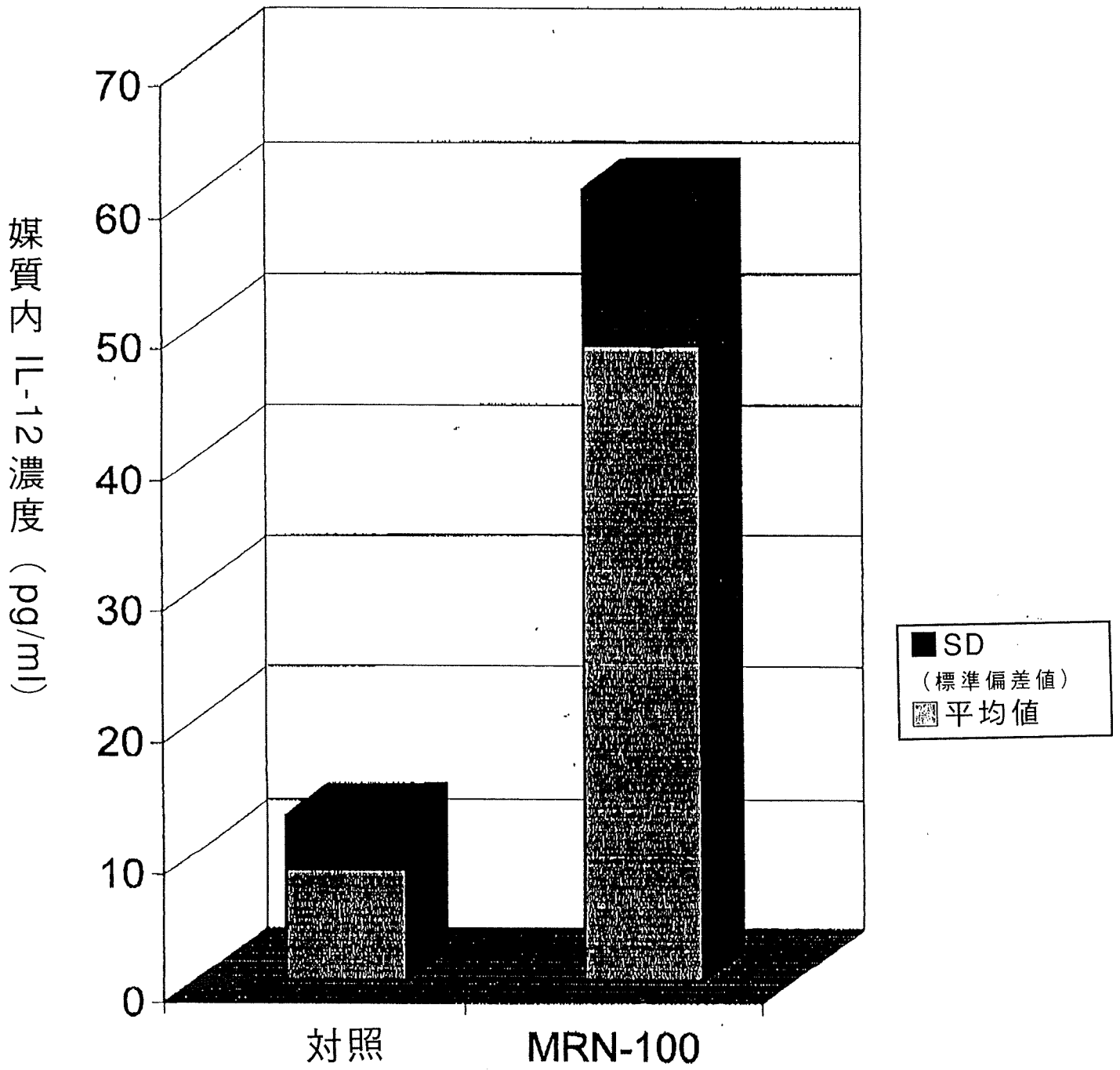


乳癌 (MCF-7) 細胞



$p < 0.045$

乳癌 (MCF-7) 細胞



$p < 0.05$

表 1

腫瘍および正常乳房細胞における
IL-10、IL-12 および γ -IFN 濃度に対する
MRN-100 の効果

細胞	γ -IFN	IL-10	IL-12
MCF-12A (正常)	トレース 変化なし	検出せず	トレース 変化なし
MCF-7 (腫瘍)	変化なし	図を参照	図を参照

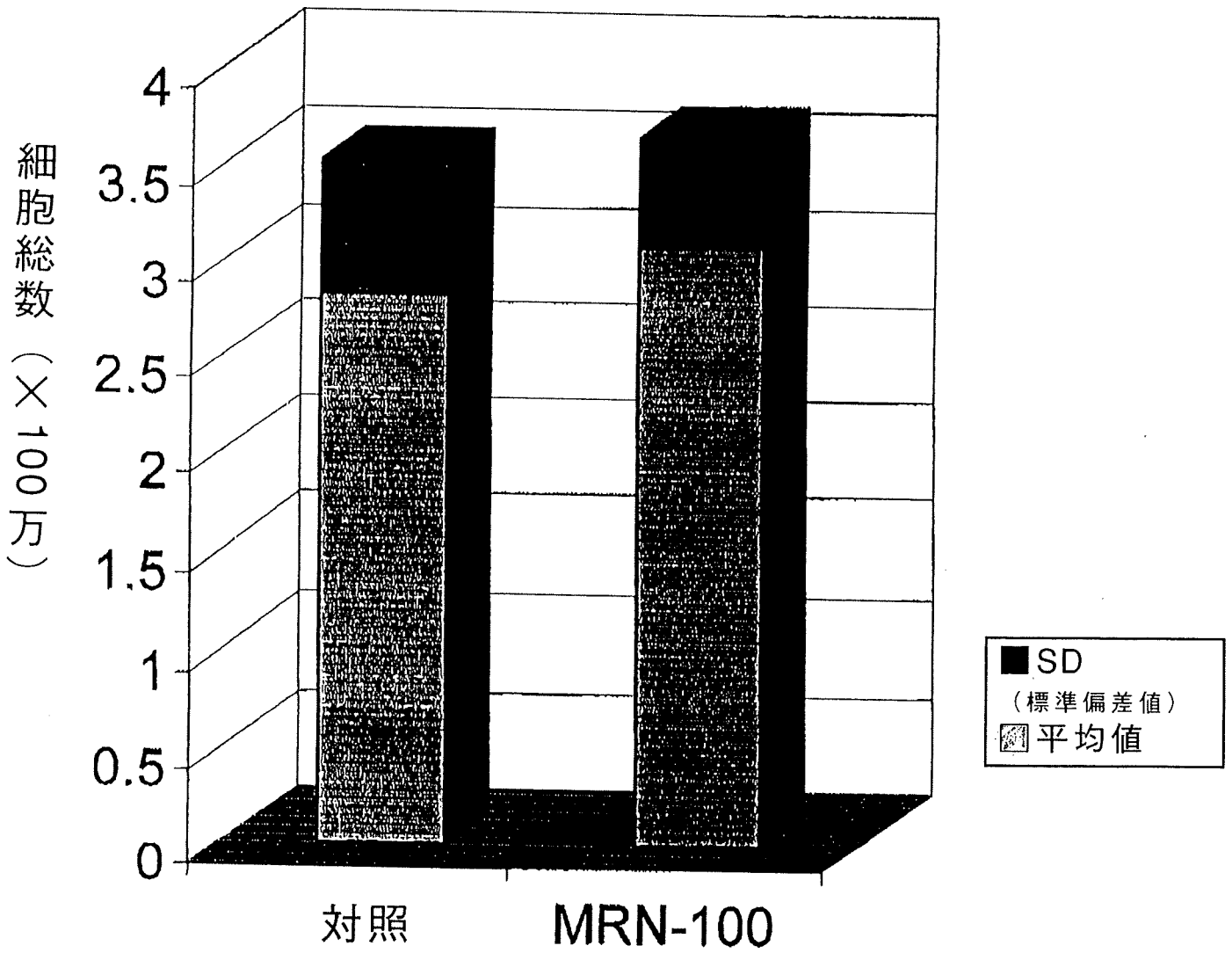
④-C

注

IL-10、IL-12 または γ -IFN の存在徴候は、前立腺癌細胞 [LNCAP] および正常骨細胞 {MC3T3-E1} の細胞浸潤培養媒質の ELISA アッセイでは検出されなかった。これらの細胞媒質に MRN-100 を添加した場合、処置後 16 時間以内には細胞増殖に対する明白な効果は認められなかった。

④-D

MRN-100 処置 24 時間後の MC3T3-E1 細胞



⑤

結 論

- 1 生体応答調節因子 MRN-100 は、SCC13 および MCF-7 腫瘍細胞において、IL-10 および IL-12 の産生および放出を刺激することが判明した。
- 2 MRN-100 による処置 16 時間後に SCC13 腫瘍細胞の in vitro 細胞増殖に対し抑制効果が認められた。
- 3 MRN-100 は乳房細胞の癌[MCF-7]形成においてサイトカイン放出を刺激したが、正常な乳房細胞[MCF-12A]の媒質で測定したサイトカイン濃度では、MRN-100 処置の効果は認められなかった。