

平成21年 5月 22日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592166  
 研究課題名(和文) 微生物由来リポタンパク質およびリポペプチドの腫瘍増殖に及ぼす影響  
 研究課題名(英文) Effects of microbial lipoproteins and lipopeptides on the growth of tumor  
 研究代表者  
 木浦 和人  
 北海道大学・歯学研究科・専門研究員  
 研究者番号：50435947

研究成果の概要：微生物由来物質と腫瘍抗原と一緒に免疫してマウスに腫瘍を接種すると、腫瘍の増殖が著しく抑制され、生存率も著しく伸びた。しかしながら、微生物由来物質を単独、FSL-1を単独で免疫した場合は、腫瘍の増殖が著しく増強され、生存率も著しく低下した。この相反する活性の原因を細胞レベルで明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：微生物由来リポペプチド FSL-1

## 1. 研究開始当初の背景

大腸菌の細胞壁外膜に含まれるリポ多糖(LPS)ならびにフロイントの完全アジュバントは細胞毒性が強く、ヒトに投与した場合には投与局所で壊死が引き起こされる危険性が高いために、ヒトに使用することはできない。宿主には存在せず、微生物のみに存在するパターン分子を認識する受容体であるToll-like-receptor (TLR)が発見されて以来、これらのアジュバントはTLRのリガンドであることが明らかにされている。近年増加傾向を示している感染症やガンの予防・治療には、アジュバント活性が強く、ヒトに対する細胞毒性の弱いアジュバントの開発が急務であ

る。そこで、我々はTLRのリガンドの中から、この目的にかなったアジュバントを検索することを重要な研究のテーマの一つと考えている。

Th1応答を誘導するTLR9のリガンドであるCpG DNAは現在抗腫瘍活性を有することが明らかにされ、腫瘍免疫のアジュバントとして注目されている。

*Mycoplasma salivarium*の細胞膜リポタンパク質(MLP)およびMLPのN末端構造をもとに合成したリポペプチド(FSL-1)の種々の生物活性を検索するだけでなく、TLRによる微生物認識機構についても研究している。最近、FSL-1がTLR2依存的なTh2応答優位の

アジュバント活性を有していることを明らかにした。

さらに、FSL-1 の腫瘍増殖に及ぼす影響を調べた。FSL-1 と C57BL/6 由来線維肉腫 QRsP に UV 照射したもの (QRsP(UV)) をマウスの皮下に免疫した後、QRsP を接種し、その体積を測定した。その結果、FSL-1+QRsP(UV) を免疫したマウスでは腫瘍の増殖を著しく抑制した。しかしながら、FSL-1 を単独で免疫した後、腫瘍を接種すると、逆に腫瘍の増殖を著しく増加させた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は微生物由来リポペプチド FSL-1 の有する相反する活性、すなわち抗腫瘍活性ならびに腫瘍増殖促進活性を細胞レベルならびに分子レベルで明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) FSL-1 による抗腫瘍免疫応答で誘導

Th1 あるいは Th2 の検証

マウスを FSL-1+QRsP(UV) で免疫した後、腫瘍細胞を接種し、血清中の腫瘍細胞に対する抗体価 (IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3) の測定を行う。また、所属リンパ節および脾臓から採取した細胞を、マイトマイシン C もしくは X 線照射して不活性化させた同腫瘍細胞で再刺激し、培養上清中に放出される IL-4、IFN- $\gamma$  を測定する。

### (2) FSL-1 による腫瘍細胞特異的 CTL の誘導

FSL-1+QRsP(UV) 免疫下で腫瘍細胞を接種したマウスから、腫瘍接種後 20 日~25 日に所属のリンパ節および脾臓細胞を蛍光色素 BCECF でラベルした同腫瘍細胞と共培養し、BCECF の上清中への放出量を蛍光高度計で測定する。

### (3) マクロファージによる腫瘍細胞傷害活性

TLR2<sup>+/+</sup> および TLR2<sup>-/-</sup> マウスの腹腔内に FSL-1+QRsP(UV) を投与し、1、3、5、7 日後に腹腔滲出細胞 (PEC) を採取し、*in vitro* において腫瘍細胞と共培養し、腫瘍の増殖能を  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みによって評価する。

### (4) FSL-1 による NK 細胞の活性化

- ① TLR2<sup>+/+</sup> および TLR2<sup>-/-</sup> マウスの脾臓細胞から MACS によって NK 細胞を分離し、FSL-1 刺激を行ない、上清中の IFN- $\gamma$  の産生および  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みによって評価する。
- ② TLR2<sup>+/+</sup> マウスの NK 細胞を MACS で negative selection し、TLR2<sup>-/-</sup> マウスの尾静脈より投与することで、TLR2<sup>-/-</sup> マウスにおいて NK 細胞のみが FSL-1 に反応できる状態にして腫瘍細胞を接種する。このマウスに

FSL-1 を免疫した後、腫瘍細胞を投与し、腫瘍接種数週間後の腫瘍の体積を測定する。また、TLR2<sup>+/+</sup> マウスに anti-mouse asialo GM1 抗体を腹腔内に投与し、NK 細胞を除去したマウスを作製し、FSL-1 の抗腫瘍活性を調べる。

### (5) FSL-1 の抑制性 T 細胞 (Treg) に及ぼす影響

- ① FSL-1+QRsP(UV) および FSL-1 を皮下および鼻腔に免疫し、所属リンパ節、脾臓中および末血中の Treg の割合を抗 CD4、CD25 抗体ならびに抗 Foxp3 抗体を用いてフローサイトメーターで調べる。また、*in vitro* においても、マウスより Treg を採取し、FSL-1 で刺激を行なった場合、増殖反応を示すかどうかを  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みによって評価する。
- ② CD4 陽性 T 細胞、Treg 細胞、抗原提示細胞 (APC) を B6 マウスから MACS で単離する。CD4 陽性 T 細胞を anti-CD3 抗体で刺激し、その増殖  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みによって評価し、その増殖が FSL-1 で刺激した Treg 細胞の存在で阻害されるかどうかを測定する。

## 4. 研究成果

### (1) FSL-1 の腫瘍増殖に及ぼす影響

FSL-1 と C57BL/6 (B6) 由来線維肉腫 QRsP に UV 照射したものをマウスの皮下に免疫した後、QRsP を接種し、その体積を測定した。その結果、FSL-1+QRsP(UV) を免疫したマウスでは腫瘍の増殖を著しく抑制した。しかしながら、FSL-1 を単独で免疫した後、腫瘍を接種すると、逆に腫瘍の増殖を著しく増加させた (図 1)。しかしながら、FSL-1 のこれらの活

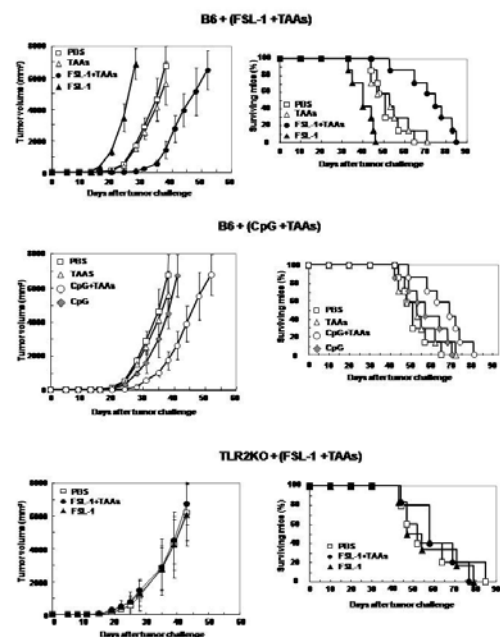


図1. TLR2<sup>+/+</sup> (B6) and TLR2<sup>-/-</sup> マウスでの QRsP 腫瘍の増殖と生存率の経日変化

性は TLR2<sup>-/-</sup> マウスではみられなかった。

(2) CTL の誘導

FSL-1 を QRsP (UV) と同時に免疫した場合は、

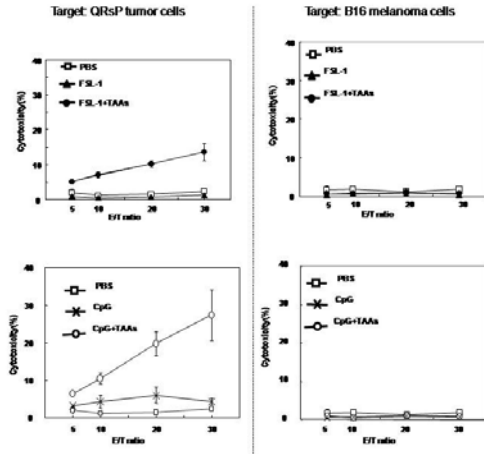


図2. QRsP tumor 特異的 CTL の誘導

CpG と同様に QRsP 特異的 CTL が誘導された (図 2)。

(3) NK 細胞の ADCC 活性

FSL-1 を QRsP (UV) と同時に免疫した場合は、CpG の場合と異なり、NK 細胞の ADCC 活性が検出され、実際 QRsP 細胞の有する 75kDa のタンパク質に対して抗体が産生されていた

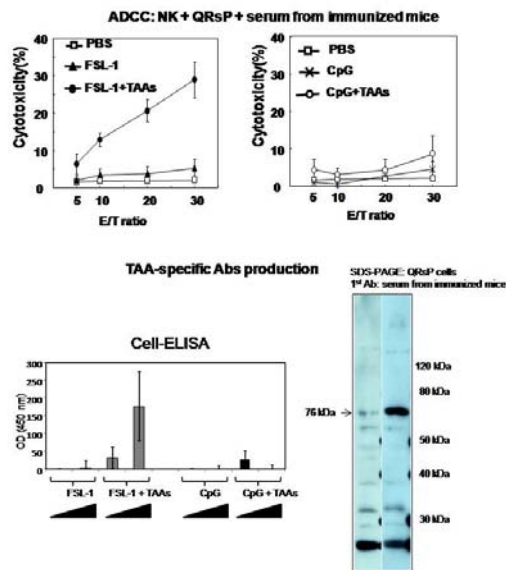


図3. NK 細胞の ADCC 活性と QRsP 特異的抗体の検出

(図 3)。

(4) 所属リンパ節における Treg の数

FSL-1 を QRsP (UV) と同時に免疫した場合は、CpG と同様に Treg の数が減少していた (図 4)。しなしながら、FSL-1 単独で免疫した場合には、逆に Treg の数が増加していた (図 4)。ただし、CpG 単独で免疫した場合には Treg の数が増加はみられなかった (図 4)。

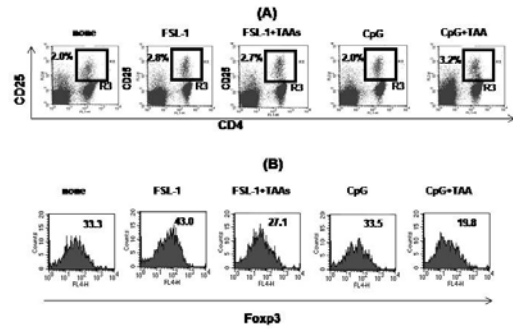


図4. 所属リンパ節での CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells の変動

(5) 抗 CD25 抗体の投与の QRsP 腫瘍増殖に及ぼす影響

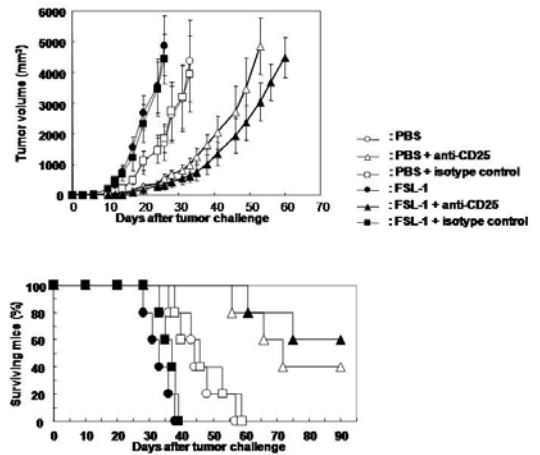


図5. anti-CD25 mAb を投与されたマウスでの QRsP 腫瘍の増殖

FSL-1 単独免疫の場合の腫瘍増殖促進活性は抗 CD25 抗体の in vivo での投与により消失した (図 5)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Mitsuhiro Iyori, Makoto Ohtani, Akira Hasebe, Yasunori Totsuka and K. Shibata \*. A role of the Ca<sup>2+</sup> binding site of DC-SIGN in the phagocytosis of *E. coli*. (査読あり) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377 (2): 367-372, 2008
2. M Iyori, H Kataoka, Haque M Shamsul, K Kiura, T Nakata, A Hasebe, M Yasuda, and K Shibata. Resveratrol modulates phagocytosis of bacteria through an NF- $\kappa$ B-dependent gene program. (査読あり) *Antimicrob Agents Chemother.* 52(1): 121-127, 2008.
3. Into T., Inomata M., Nakashima M., Shibata K., Hacker H., and Matsushita K. Regulation of MyD88-dependent signaling events by S-nitrosylation retards Toll-like receptor signal transduction and initiation of acute-phase immune responses. (査読あり) *Mol. Cell. Biol.* 28(4): 1338-1347, 2008.
4. Into T., Dohkan J., Inomata M., Nakashima M., Shibata K., and Matsushita K. Synthesis and Characterization of a dipalmitoylated lipopeptide derived from paralogous lipoproteins of *Mycoplasma pneumoniae*. (査読あり) *Infect. Immun.* 75(5):2253-2259., 2007.
5. Into T, Kanno Y, Dohkan JI, Nakashima M, Inomata M, Shibata K, Lowenstein CJ, Matsushita K. Pathogen recognition by Toll-like receptor 2 activates Weibel-Palade body exocytosis in human aortic endothelial cells. (査読あり) *J Biol Chem.* 282(11): 8134-8141, 2007.
6. Takeyama K, Mitsuzawa H, Nishitani C, Shimizu T, Sano H, Kunishima Y, Takahashi S, Hotta H, Matsukawa M, Shibata K, Tsukamoto T, Kuroki Y. The 6-fluoro-8-methoxy quinolone

gatifloxacin down-regulates interleukin-8 production in prostate cell line PC-3. (査読あり) *Antimicrob Agents Chemother.* 51:162-168, 2007.

7. Mae M, Iyori M, Yasuda M, Shamsul H, Kataoka H, Hasebe A, Kiura K, Totsuka Y, Shibata K. The diacylated lipopeptide FSL-1 enhances phagocytosis of bacteria by macrophages through Toll-like receptor 2-mediated signaling pathway. (査読あり) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49: 398-409, 2007.

[学会発表] (計 7 件)

1. 木浦 和人, 長谷部 晃, 柴田 健一郎. ジアシルリポペプチド FSL-1 による制御性 T 細胞の増殖と腫瘍免疫応答の抑制. 日本マイコプラズマ学会第 35 回学術集会. 2008 年 5 月 30~31 日. 東京. 日本マイコプラズマ学会第 35 回学術集会 講演要旨集: 37. 2008.

2. 木浦 和人, 柴田 健一郎. 腫瘍の増殖に及ぼすジアシルリポペプチド FSL-1 の影響. 自然免疫の最前線 -3 学会合同大会 2008- 第 73 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会・第 19 回日本生体防御学会学術総会・第 45 回補体シンポジウム. 2008 年 7 月 10~12 日. 札幌. 73 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会抄録集・第 19 回日本生体防御学会学術総会抄録集・第 45 回補体シンポジウム講演集: 172.

3. 木浦 和人, 長谷部 晃, 大谷 誠, 伊従 光洋, 柴田 健一郎. ジアシルリポペプチド FSL-1 による制御性 T 細胞の増殖と腫瘍免疫応答の抑制. 第 76 回日本細菌学会北海道支部学術総会. 2008 年 9 月 6 日 札幌 第 76 回日本細菌学会北海道支部学術総会抄録集 30

4. 木浦 和人, 安田 元昭, 長谷部 晃, 伊従 光洋, 脇田 稔, 山本 恒之, 井上 農夫男, 柴田 健一郎. マイコプラズマ由来ジアシルリポペプチド FSL-1 の抗腫瘍活性. 日本マイコプラズマ学会第 34 回学術集会. 2007 年 5 月 18~19 日. 和歌山. 日本マイコプラズマ学会第 34 回学術集会講演予稿集. 8.

5. 木浦 和人, 安田 元昭, 長谷部 晃, 伊従 光洋, 脇田 稔, 山本 恒之, 井上 農夫男, 柴田 健一郎. マイコプラズマ由来ジアシルリポペプチド FSL1 の腫瘍増殖に及ぼす

影響. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2007 年 8 月 30～31 日. 札幌 Journal of Oral Biosciences 49 Suppl: 131

6. 木浦 和人、長谷部 晃、伊従 光洋、脇田 稔、安田 元昭、山本 恒之、井上 農夫男、柴田 健一郎. ジアシルリボペプチド FSL-1 による腫瘍増殖の抑制と促進. 第 75 回日本細菌学会北海道支部学術総会. 2007 年 9 月 8 日. 札幌 第 75 回日本細菌学会北海道支部学術総会: 26-27

7. 木浦 和人、長谷部 晃、伊従 光洋、安田 元昭、大谷 誠、柴田 健一郎. ジアシルリボペプチド FSL-1 の腫瘍増殖に及ぼす影響. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会. 2007 年 11 月 20～22 日. 東京. 日本免疫学会総会・学術集会記録 第 37 巻: 217

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木浦 和人

北海道大学・大学院歯学研究科・専門研究員

50435947

### (2) 研究分担者

長谷部 晃

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

90281815

柴田 健一郎

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

50435947

### (3) 連携研究者