

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：83206

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590109

研究課題名(和文) TGF- β 及び PGE2 による腫瘍免疫抑制を解除する植物成分ベツリンの作用機序解析

研究課題名(英文) A mechanism of action of a plant ingredient betulin on restoring the suppression of antitumor activity of immune cells by TGF-beta or PGE2.

研究代表者

小笠原 勝 (OGASAWARA, MASARU)

富山県薬事研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：30443427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞から分泌されるTGF- β 及びPGE2は、免疫細胞の抗腫瘍活性を強力に抑制し、がん治療、とりわけ、がん免疫療法の効果を大きく減弱させる要因となっている。本研究では、これら両因子の抑制作用とともに解除できる植物成分(ベツリン)に焦点を当てその作用機序の解析を行った。その結果、ベツリンは免疫賦活物質の作用を増強することでTGF- β とPGE2の2つの免疫抑制作用を解除していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：TGF- β and PGE2 secreted by tumor cells strongly inhibit anti-tumor activity of immune cells, which greatly attenuates the effects of tumor therapy, especially cancer immunotherapy. In this study, we focused on the restoring effects of a plant ingredient betulin on the immunosuppression by TGF- β or PGE2, and conducted an analysis of its mechanism of action. It is suggested that betulin restores the suppressive activity of TGF- β or PGE2 through greatly promoting the effects of immune stimulators.

研究分野：免疫薬理学

キーワード：ベツリン 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

がんの免疫療法は、手術、放射線、抗がん剤に次ぐ第4の治療法として、近年、精力的に研究が進められ臨床応用されつつあるが、これまでのところ多くの場合十分な治療成績は得られていないと報告されている。この主な原因の一つとして、担がん状態で認められるT細胞やnatural killer (NK)細胞の抗腫瘍活性の減弱が指摘されている。より有効ながん免疫療法を確立するためには、これらの免疫抑制機構を解明し克服することが重要な課題とされている。

これまでの多くの研究から、がん局所で認められる免疫抑制には、主にtransforming growth factor (TGF)- β やprostaglandin E2 (PGE2)、IL-10の関与が明らかにされているが、とりわけTGF- β に着目した研究が数多く報告されている。申請者らはまず、どの因子に着目すべきかを独自に検証するため、文献等の検索を行うとともに、マウス脾臓細胞のNK活性を指標にTGF- β 、PGE2、IL-10の3因子の抑制活性を比較検討した。その結果、TGF- β が最も強力な抑制活性を有することを確認したが、PGE2にも比較的強い抑制活性を認めた。そこで以後、TGF- β に加えPGE2にも着目し、本申請課題に至るまでの基礎的データを蓄積してきた(富山県薬事研究所年報、38、2011)。TGF- β は、主にがん細胞から分泌され、NK活性の抑制に加えてTh1サイトカインの産生阻害やT細胞の増殖抑制、制御性T細胞の誘導などに関与している。また、そのシグナル伝達系には、Smadを介する経路と介さない経路(PI3K-Akt経路など)が知られており、NK活性の抑制には前者の重要性が示唆されている。一方、PGE2も主にがん細胞から分泌され、TGF- β と同様にNK活性の抑制に関与するとともに、Th1サイトカイン産生やT細胞増殖を阻害することで抗腫瘍免疫を負に制御している。PGE2のシグナ

ル伝達系には、細胞内cAMP-PKA経路が知られており、NK活性の抑制にもこの経路の関与が示されている。このように、TGF- β 及びPGE2の免疫抑制作用は互いに類似しているところもあるが、両者のシグナル伝達系は異なると考えられており、両因子に対する阻害物質の研究は各々別々に展開されてきた。

一方、我々は、TGF- β 及びPGE2によるNK活性抑制を克服するための阻害物質の探索研究から、これら両作用をとともに阻害する物質を見出した(特願2011-066087)。すなわち、脾臓細胞のNK活性を指標に約800種の天然物についてスクリーニングを行なったところ、植物成分のベツリンにその作用を認めた。脾臓細胞のNK活性は免疫賦活剤であるポリ(I:C)刺激により亢進するが、TGF- β により未処置群レベルにまで抑制されてしまう。ところが、ベツリン5 μ Mを共存させることでTGF- β による抑制は完全に解除された。同様の作用はPGE2による抑制に対しても認められた。この作用は、免疫賦活剤として各種のToll様受容体(TLR)アゴニストやIL-12あるいはIL-18を用いても同様に認められたことから、ポリ(I:C)に特異的な作用ではないと考えられる(一部は特願2011-066087)。また、ベツリンは単独では全くNK活性を亢進させないことから、TLRアゴニストのような免疫賦活物質とも異なる。さらに、脾臓細胞をポリ(I:C)で刺激した際に誘導されるパーフォリン(細胞傷害活性に関与) mRNAの発現に対しても、ベツリンはTGF- β 及びPGE2による抑制をいずれも解除することを明らかにしている(以上未発表データ)。ベツリンはルパン骨格を基本骨格とするトリテルペン化合物の一種であり、主に白樺の樹皮に含まれる。薬理作用としては、細胞増殖阻害や抗炎症作用、抗ウイルス作用が報告されているが、TGF- β あるいはPGE2によるNK活性抑制に対する有効性については明らかにさ

れていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、ベツリンのユニークな作用に焦点をあて、異なるシグナル伝達系を介する TGF- β と PGE2 の 2 つの免疫抑制作用を、どのようにしてベツリンが解除しているのかを解析し、TGF- β 及び PGE2 の新たな免疫抑制機構の解明に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 磁気ビーズを用いた細胞調製

マウス(BALB/c, 7-9 週令, 雌)より脾臓を採取し、脾臓細胞を調製した。この細胞群から、樹状細胞, B 細胞, T 細胞, あるいは, NK 細胞を除去した細胞群を調製した。得られた細胞群を細胞傷害活性の評価に用いた。

(2) 細胞傷害活性の評価

マウス(BALB/c, 7-8 週令, 雌)より脾臓を採取し、脾臓細胞を調製した。この細胞に化合物を添加し処置後、ポリ(1:10)および TGF-

あるいは PGE2 を添加し、96 ウェルプレートに播種してインキュベーター内で 20 時間処置した。1 群あたり 3 ウェル播種した。この細胞を培養液(10%FBS を含む RPMI1640 培地)で 3 回洗浄しエフェクター細胞とした。ターゲット細胞には予め蛍光物質を取り込ませた YAC-1 細胞を用い、エフェクター細胞と 4 時間共培養した。上清を採取して蛍光量を測定し、細胞傷害活性を次式により算出した。細胞傷害活性(%)=(測定値 - 自然放出量)/(最大蛍光量 - 自然放出量) × 100

(3) がん移植マウスモデルを用いた評価

マウス悪性黒色腫細胞(B16F10)をマウス(C57BL/6, 8 週令, 雌)の下腹部皮下に接種した。ベツリンはがん接種後 2 日目から 16 日目まで 1 日 1 回、腫瘍内に投与した。腫瘍径は 2 日あるいは 3 日ごとに測定し、見かけの腫瘍体積は、長径 × 短径 × 短径/2 で算出した。

(4) がん組織に集積した免疫細胞の解析

マウス悪性黒色腫細胞(B16F10)をマウス(C57BL/6, 8 週令, 雌)の下腹部皮下に接種した。がん接種後 2 日目から 9 日目まで 1 日 1 回、ベツリンを腫瘍内に投与した。がん組織は、がん接種後 3 日目、実験によっては 6 日目, あるいは, 10 日目に採取した。腫瘍組織から細胞を調製し、蛍光色素で標識された各種の抗体で処置した。細胞を洗浄後、7AAD を添加してフローサイトメーター(FACSCanto, 日本 BD)により測定した。

4. 研究成果

(1) 本研究では、まず、ポリ(1:10)により亢進した脾臓細胞の NK 活性を指標に、TGF- β または PGE2 の抑制作用に対するベツリンの解除効果にどの細胞が関与しているのかについて検討した。その結果、ベツリンの作用には、NK 細胞、樹状細胞、B 細胞、及び T 細胞が関与していることを明らかにした (Fig.1)

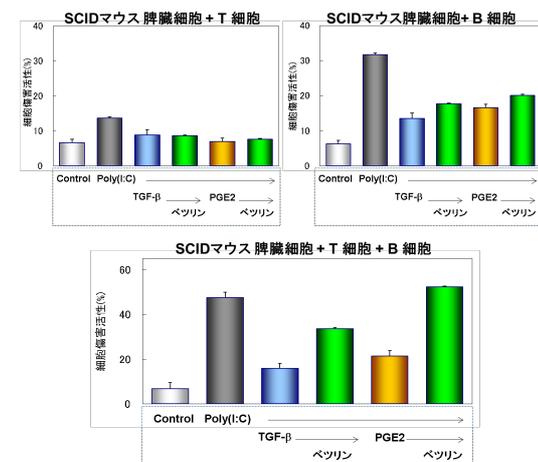


Fig.1 SCIDマウス由来脾臓細胞とTあるいはB細胞との共培養系での効果

(2) そこで、これら細胞を含む脾臓細胞を用いて、ベツリンが TGF- β のシグナル系を抑制しているかを明らかにするため、TGF- β シグナル伝達分子のリン酸化に及ぼすベツリンの影響を検討した。その結果、ベツリンは Smad2 及び Smad3 のリン酸化を阻害せず、また、PI3K シグナル系及び MAPK シグナル系に係る伝達分子のリン酸化にもベツリンはほとんど影響を与えなかった。これらのことが

ら、ベツリンは TGF- のシグナル伝達分子とは異なる分子に作用していると考えた。

(3) そこで、NK 活性の評価系から TGF- あるいは PGE2 を除き、ポリ(I:C)とベツリンの併用効果を検討した (Fig.2)。

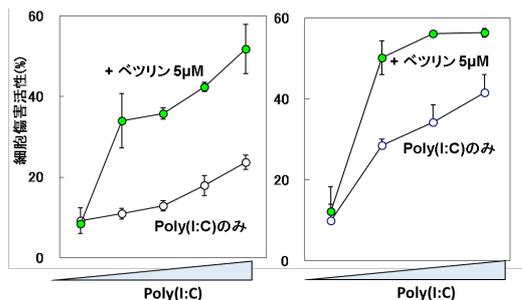


Fig.2 Poly(I:C)により誘導される細胞傷害活性に対するベツリンの増強効果

その結果、ベツリンがポリ(I:C)の作用を顕著に増強することを見出した。このことから、ポリ(I:C)に対するベツリン増強作用が TGF-

あるいは PGE2 の抑制に対する解除効果に寄与していると考え、次に、この増強効果にどのような細胞が関与しているのかについて検討した。その結果、ベツリンの増強効果には NK 細胞、樹状細胞及び B 細胞が関与していることが分かった。一方、NK 細胞にポリ(I:C)を添加しても NK 活性の亢進及びベツリンの増強作用は認められなかったことから、ベツリンは樹状細胞あるいは B 細胞に主に作用していると考えられた。

(4) ベツリンの増強効果に関与するサイトカインについて中和抗体により検討したところ、IL-2、IL-18、及び IFN- の関与が認められた (Fig.3)。

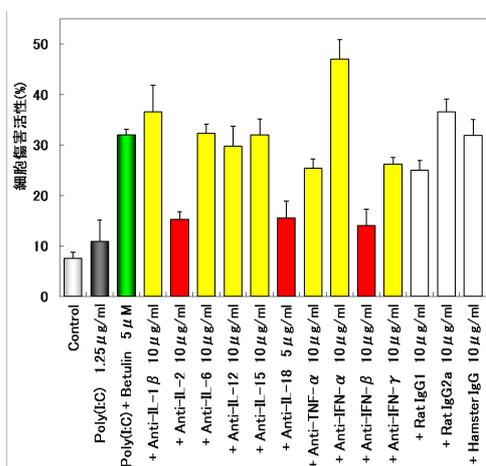


Fig.3 サイトカインに対する中和抗体の影響

さらに、ベツリンはこれらサイトカインのNK 活性亢進作用を強めると共に、ポリ(I:C)により誘導される IL-18 及び IFN- の産生を増加させることでポリ(I:C)の作用を増強していることを明らかにした。

(5) ベツリンがマウス個体レベルにおいて抗腫瘍効果を示すのか、また、その作用機序に免疫抑制に対する解除効果が関与しているのかを明らかにするため、TGF- による免疫抑制を誘導することが報告されている B16F10 悪性黒色腫細胞の皮下移植マウスモデルを用いて、ベツリンの抗腫瘍効果を検討した (Fig.4)。

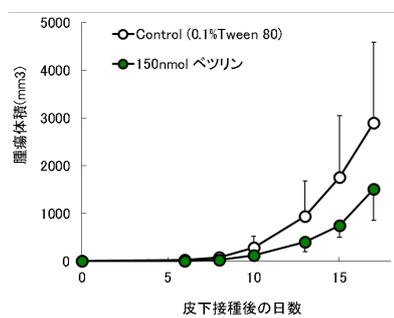


Fig.4 がん移植マウスモデルでのベツリンの抗腫瘍効果

その結果、ベツリン 150 nmol を腫瘍内に連日投与したところ、17 日目において約 40%の抗腫瘍効果が認められた。比較として TGF- 受容体キナーゼ阻害剤 45 nmol を同様に投与したところ、17 日目において約 50%の抑制効果が得られた。

(6) そこで、ベツリンの抗腫瘍効果に免疫細胞が関与しているかを明らかにするため、ベツリン投与の翌日に腫瘍組織に集積した白血球をフローサイトメトリーにより解析した (Fig.5)。

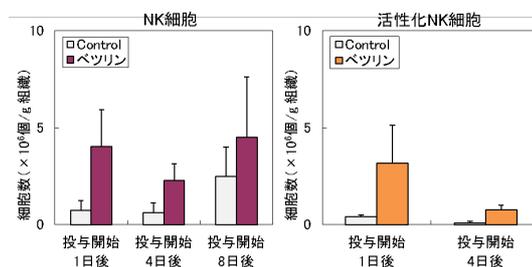


Fig.5 腫瘍組織におけるNK細胞のFACS解析

その結果、投与開始の1日後には、対照群に

比較してベツリン投与群では NK 細胞が約 5 倍に増加していることが分かった。さらに、活性化 NK 細胞 (CD69 陽性) についても、ベツリンの投与により有意に増加することが分かった。これらのことから、ベツリンの抗腫瘍効果には、TGF- により抑制された NK 細胞活性に対する解除効果が寄与している可能性が示唆された。

(7) 以上から、ベツリンの免疫抑制解除メカニズムには、NK 活性に対するベツリンの増強効果が寄与していることを示唆した。今後、この増強効果の分子メカニズムを明らかにすることで、TGF- 及び PGE2 の免疫抑制機構の解明に貢献できると思われる。

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 3 件)

Ogasawara M, Yamasaki S, Miyamoto T, Nagai Y, Matsunaga T: Screening of natural compounds for the restorative activity against immunosuppression by tumor cells. Annual Report of Toyama Pref. Inst. for Pharm. Res., 39, 21-25 (2012). 査読無.

Ogasawara M, Yamasaki S, Miyamoto T, Ikutani M, Nagai Y, Matsunaga T: Screening of natural compounds for the restorative activity against immunosuppression by tumor cells (2). Annual Report of Toyama Pref. Inst. for Pharm. Res., 40, 22-46 (2013). 査読無.

Ogasawara M, Miyamoto T, Matsunaga T, Nagai Y, Takatsu K: Anti-tumor effects of betulin in a tumor-burden mouse model. Annual Report of Toyama Pref. Inst. for Pharm. Res., 41, 17-20 (2014). 査読無.

〔その他〕

ホームページ等

富山県薬事研究所 研究業績

<http://www.toyama-yakuji.com/research/achievement/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原 勝 (Ogasawara Masaru)
富山県薬事研究所・主任研究員
研究者番号：30443427

(2) 連携研究者

長井 良憲 (Nagai Yoshinori)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
准教授
研究者番号：30431761

宮本 朋美 (Miyamoto Tomomi)
富山県薬事研究所・主任研究員
研究者番号：20443426

山崎 思乃 (Yamasaki Shimno)
富山県薬事研究所・研究員
研究者番号：50602182