

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791508

研究課題名(和文) 悪性グリオーマに対するスピルリナの免疫賦活作用を用いた新たな免疫療法の開発

研究課題名(英文) Novel immunotherapy for malignant glioma with Spirulina CPS

研究代表者

川西 裕 (Kawanishi, Yu)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：90527582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はSpirulina複合多糖体(CPS)がグリオーマに対して自然免疫のみならず細胞性免疫応答も賦活し抗腫瘍免疫応答を増強することを解明した。抗腫瘍効果の発現にはIL-17の制御による血管新生の抑制が関与することも見出した。Spirulina CPSにより免疫系を賦活し抗腫瘍効果を発揮させる免疫療法は副作用も少なく、現在の標準治療と併用することも可能と考えられる。今後の研究により悪性グリオーマに対する新たな治療の選択肢となり得る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：I represented the first report of the suppressive effect of Spirulina complex polysaccharides (CPS) on glioma growth. Murine RSV-M glioma cells were implanted in C3H/HeN mice and TLR4-mutant C3H/HeJ mice. Growth of RSV-M glioma cells was severely suppressed in C3H/HeN mice, but not in C3H/HeJ mice, after treatment with Spirulina CPS. Spirulina CPS suppressed IL-17 production from serum of glioma-bearing C3H/HeN. Furthermore, in C3H/HeN mice, Spirulina CPS treatment suppressed growth of re-transplanted glioma, suggesting enhancement of the immune response by Spirulina CPS. Lower level of angiogenesis was observed in gliomas from Spirulina CPS-treated mice compared to those from saline- or E. coli LPS-treated mice. These results suggest that Spirulina CPS antagonizes glioma cell growth by down-regulating angiogenesis, in part, by regulating IL-17 production in C3H/HeN mice. Spirulina CPS may constitute a novel treatment for malignant glioma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：スピルリナ 免疫療法 悪性グリオーマ

1. 研究開始当初の背景

Spirulina はラン藻類の一種であり、その細胞壁は強力な免疫賦活作用を持つ *E. coli* LPS (lipopolysaccharide) の lipid A に類似の構造を有していることを突き止めた。*E. coli* LPS と *Spirulina* CPS (complex polysaccharide) はともに Toll-like receptor 4 (TLR4) を介した作用で自然免疫系を賦活する。*E. coli* LPS は強い炎症反応を惹起するため臨床応用は困難であったが、*Spirulina* は古来より食用とされており安全性の高さが期待される。富永明 (高知大学・教育研究部総合科学系・教授) より *Spirulina* CPS のマウス肝細胞癌 (MH134) に対する抗腫瘍効果が報告され、研究代表者は *Spirulina* CPS のグリオーマに対する抗腫瘍効果について研究することとした。

2. 研究の目的

悪性グリオーマに対して標準治療として手術、放射線療法、化学療法が併用されるが、最悪性の膠芽腫では平均余命は約1年である。近年、非特異的免疫療法として IFN- γ を標準治療に併用することで抗腫瘍効果が増強することが解明され、臨床試験が開始された。免疫療法は副作用が少なく標準治療に併用することも可能であるが、効果が証明された薬剤は限られている。*Spirulina* のグリオーマへの抗腫瘍効果とその作用機序を解明することは、脳腫瘍に対する新たな免疫療法の開発にも極めて有用であると考えられる。

3. 研究の方法

E. coli LPS と *Spirulina* CPS の作用機序を比較するため、wild type の TLR4 を持つ C3H/HeN マウスと *tlr4* 遺伝子の細胞質領域に変異があり LPS に対し低反応の C3H/HeJ マウスを用いた。

(1) マウスグリオーマ RSV-M を C3H/HeN に皮下移植し、*Spirulina* CPS, *E. coli* LPS を投与する群に分け、腫瘍径を測定した。

(2) 獲得免疫について調べる目的で RSV-M 移植後 3 週間後腫瘍摘出を行い、1 週間後に C3H/HeN へ再移植を行った。

(3) マウス血清中サイトカインも測定した。

4. 研究成果

(1) C3H/HeN では *E. coli* LPS または *Spirulina* CPS を投与した群で有意に腫瘍増殖が抑制されたが、C3H/HeJ では腫瘍抑制効果は認められなかった。*E. coli* LPS または *Spirulina* CPS はともに TLR4 を介して抗腫瘍効果を発揮することを確認した (Fig.1)。

(2) *Spirulina* CPS 投与群は、抗腫瘍効果を保持しており獲得免疫が形成されていると考えられた。対して *E. coli* LPS 投与群は、生理食塩水を投与した対照群よりも弱い抗

腫瘍効果しか持たず獲得免疫は形成されなかった (Fig.2)。

(3) ELISA を用いサイトカイン分泌量を測定すると *Spirulina* CPS 投与群では血清中の IL-17 が抑制される傾向を認め、*E. coli* LPS 投与群では IFN- γ と IL-17 の産生が亢進する傾向を認めた。

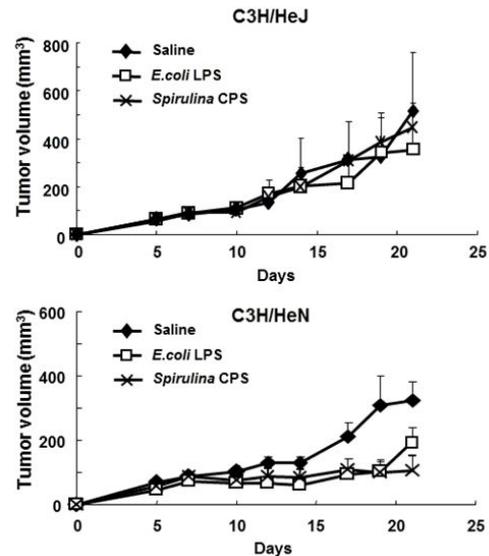


Fig.1

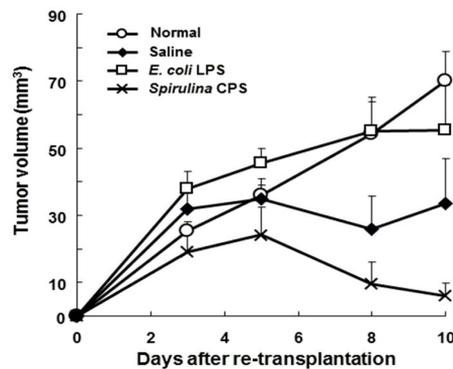


Fig.2

(4) 抗腫瘍効果を担うエフェクター細胞を同定する目的で、自然免疫系の免疫担当細胞である NK 細胞やマクロファージのマーカーである asialo GM1 に対する抗体を *Spirulina* CPS とともに投与した。

この結果、対照群に比べて早期に腫瘍増殖が認められ、*Spirulina* CPS の抗腫瘍効果には自然免疫系の関与が示唆された (Fig.3 上段)。*Spirulina* CPS では獲得免疫の形成を認めたため、Tリンパ球のマーカーである CD4, CD8 に対する抗体を *Spirulina* CPS とともに投与したところ、anti-asialo GM1 Ab 投与群に遅れて腫瘍増殖を認め、*Spirulina* CPS の抗腫瘍効果には Tリンパ球の関与が示唆された (Fig.3 下段)。

(5) RSV-M を移植したマウスに IL-17 に対する抗体を投与した。C3H/HeN においては、

抗 IL-17 抗体は *Spirulina* CPS と同様に腫瘍抑制効果を示した。C3H/HeJ においても *Spirulina* CPS 投与群では抗腫瘍効果を認めなかったが抗 IL-17 抗体投与群では腫瘍抑制効果を認め、グリオーマの増殖には IL-17 の産生が関与していることが示唆された。

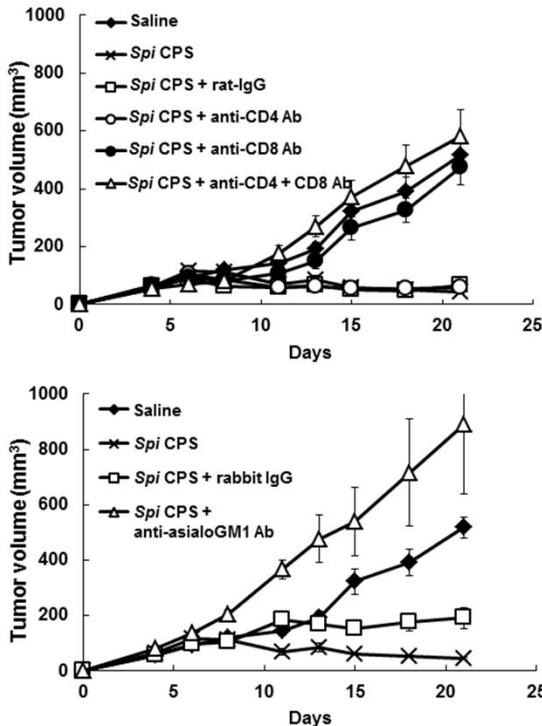


Fig.3

(6) IL-17 は血管新生を促進することで腫瘍増殖に関与すると報告されており、血管内皮マーカである CD31 に対する免疫染色を行い血管新生について評価した。*Spirulina* CPS 投与群では、対照群に比較して有意に血管新生が抑制されていた。*Spirulina* CPS の抗腫瘍効果には IL-17 の産生抑制による血管新生の抑制が関与しているものと考えられた (Fig.4)。

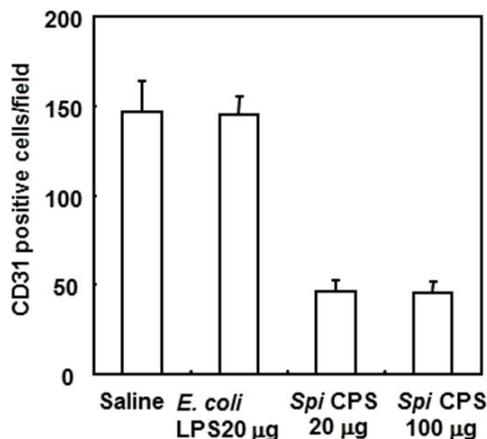


Fig.4

研究代表者は *Spirulina* CPS がグリオーマ

に対して自然免疫のみならず細胞性免疫応答も賦活することで抗腫瘍免疫応答を増強することを解明した。さらに、抗腫瘍効果の発現には IL-17 の分泌制御による血管新生の抑制が関与することも見出した (Fig.5)。

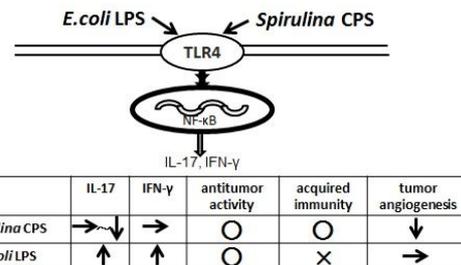


Fig.5

(7) 今後は以下に示す脳内に移植したグリオーマに対する抗腫瘍効果及び作用機序、TLR4 に作用する以降のシグナル伝達系、ワクチン療法に併用するアジュバントとしての有用性などについて解析することで臨床応用へ近づけたいと考えている。

マウス脳内に移植したグリオーマに対する抗腫瘍効果の検討

グリオーマは脳腫瘍であるため、*Spirulina* CPS を投与することにより免疫環境の異なる脳内に移植したグリオーマ細胞に対しても抗腫瘍効果を発揮することを確認する必要がある。マウス脳内に RSV-M を移植し、*Spirulina* CPS 投与群と対照群に分け腫瘍抑制効果を検討する。

TLR4 以降のシグナル伝達系の解析

E. coli LPS と *Spirulina* CPS が共に TLR4 に作用することを明らかにしたが、*Spirulina* CPS については TLR4 以降の経路についてはまだ解明されていない。*E. coli* LPS は TLR4 を活性化し MyD88 を介した経路で炎症性サイトカインを産生することが知られている。TLR4 の下流には MyD88 非依存性のシグナル伝達経路が存在することも知られており、この経路が T 細胞活性化や IFN- γ などの誘導に関与しており腫瘍免疫の形成にはこの経路の活性化が重要であると報告されている。そこで MyD88 のノックアウトマウスを用いて *Spirulina* CPS 投与により腫瘍効果やサイトカインの産生に影響が生じるかを調べることで TLR4 以下の経路について解明したいと考えている。

ワクチン療法のアジュバントとしての応用

WT1 ペプチドを標的とした膠芽腫に対する腫瘍抗原特異的な癌ワクチン療法は 2008 年に大阪大学から有効性が報告されており、ワクチン療法は副作用も少なく現在の標準治療に併用されることが期待されている。

現在ワクチン療法のアジュバントとして用いられる物質は主に IFN- γ を産生することで抗腫瘍免疫活性を上昇させようとするものが大半である。ただし、我々の実験結果

によれば IFN- はグリオーマには無効であった。脳腫瘍に対しては異なるアジュバントの開発が必要ではないかと考えられる。*Spirulina* CPS は IL-17 の産生を制御することで脳腫瘍に対しても抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。さらに現時点で IL-17 を抑制する物質は報告されていない。

我々が樹立したヒトグリオーマ細胞株に、WT1 ワクチンで感作した血清を加え、そこにアジュバントとして *Spirulina* CPS を加えた群と加えない群で CTL 活性に有意差が出るかどうかについて検討する。また同様の手法で現在用いられているアジュバント(百日咳不活化ワクチンなど)との比較も行いたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Kawanishi Y, Tominaga A, Okuyama H, Fukuoka S, Taguchi T, Kusumoto Y, Yawata T, Fujimoto Y, Ono S, Shimizu K:
Regulatory effects of *Spirulina* complex polysaccharides on growth of murine RSV-M glioma cells through Toll-like receptor 4, *Microbiol Immunol* 57(1), 2013, 63-73, 査読有

[学会発表](計 2 件)

川西裕, 富永明, 奥山洋美, 田口尚弘, 楠本豊, 八幡俊男, 小野史郎, 清水恵司:
スピルリナ複合多糖体のマウスグリオーマに対する TLR4 を介した抗腫瘍効果
第 12 回四国免疫フォーラム, 徳島文理大学香川キャンパス, 香川, 2013/6/22

川西裕, 富永明, 奥山洋美, 田口尚弘, 楠本豊, 八幡俊男, 藤本康倫, 小野史郎, 清水恵司:
Spirulina CPS を用いた悪性神経膠腫に対する免疫療法の検討, 第 16 回日本がん免疫学会総会, 北海道大学学術交流会館, 北海道, 2012/7/26-28

6. 研究組織

(1)研究代表者

川西 裕 (KAWANISHI, Yu)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 90527582