

平成 30 年 9 月 1 日現在

機関番号：83206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08041

研究課題名(和文)植物成分ベツリンの免疫抑制解除作用を活用した抗腫瘍免疫強化薬の研究開発

研究課題名(英文) Study on the drug development for tumor immunotherapy based on immune-restoring activity of a plant ingredient betulin.

研究代表者

小笠原 勝 (Ogasaawara, Masaru)

富山県薬事研究所・主任研究員

研究者番号：30443427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍局所では、様々な免疫抑制因子により免疫細胞の抗腫瘍活性が低下している。本研究では、免疫抑制解除作用を有する植物成分として見出したベツリンについて、その誘導体(誘導体A)に焦点を当て抗腫瘍効果の評価と作用機序の解析を行った。その結果、EG7細胞の皮下移植マウスモデルにおいて、誘導体AはEG7細胞の増殖能を抑制するとともに、PD-L1の発現を増強することにより抗PD-1抗体の抗腫瘍効果を増強していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Various factors dampen antitumor activity of immune cells in tumor microenvironment. Here we examined the antitumor mechanism of a derivate A of a plant product, betulin, which has recovering activity against immune cells suppressed by tumor. A derivative A remarkably inhibited the growth of EG7 cells subcutaneously implanted in mice. Moreover, increased expression of PD-L1 on EG7 cells is suggested to be responsible for augmentation of the antitumor activity of anti-PD-1 antibody.

研究分野：薬理学

キーワード：癌 ベツリン

### 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。しかし、多くの場合十分な治療成績は得られていない。この主な原因は、がん細胞から分泌される様々な免疫抑制因子が免疫抑制環境を形成しているためであることがわかってきた。そのため、治療効果の向上にはこれらの免疫抑制機構を解明し、抑制因子の作用を効果的に阻止する薬剤を開発することが不可欠であるとされている。

我々は、TGF- $\beta$  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- $\beta$  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 $\mu$ M を共存させることで TGF- $\beta$  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。ベツリンは TGF- $\beta$  による免疫抑制を伴うマウス B16F10 メラノーマの皮下移植モデルにおいて有意な抗腫瘍効果を示したこと、また、腫瘍局所への NK 細胞及び好中球の集積を約 2 倍に高めたことから、ベツリンは *in vivo* においても抗腫瘍免疫に対する抑制作用を解除している可能性があると考えた。ベツリンは新しいタイプの抗腫瘍免疫強化薬になる可能性があると考え、有効性の向上を目指し誘導体 60 種の合成と薬効評価を進めた。その結果、ベツリンの 3 位と 28 位の水酸基に水溶性の官能基を付加した化合物(誘導体 A)に極めて顕著な抗腫瘍効果を見出した。また、この抑制効果は、汎用抗がん剤の 5-フルオロウラシルの効果より

も強力であった。

### 2. 研究の目的

本研究は、申請者らの上記ベツリン及び誘導体 A に関するこれまでの知見に基づき、誘導体 A がどのようにして *in vivo* において抗腫瘍効果を示すのかという点について、とりわけ、誘導体 A の抗腫瘍効果が、腫瘍局所での免疫抑制の解除に依るのかという点に焦点を当て作用機序を詳細に解析し、新規がん治療薬の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 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)、マウス乳がん細胞(4T1)、マウス大腸がん細胞(CT26)あるいは OVA をモデル抗原として発現するマウス T リンパ腫(EG7)をマウス(C57BL/6 あるいは BALB/c、8 週令、雌)の下腹部皮下に接種した。誘導体 A 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。細胞傷害性 T 細胞の影響を検討する場合は、予め抗 CD8a 抗体を投与して CD8 陽性 T 細胞を除去したマウスを用いた(C57BL/6、8 週令、雌)。抗 PD-1 抗体は EG7 細胞を接種後、1 週間に 2 回の間隔で腹腔内に投与した。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 $\times$ 短径 $\times$ 短径/2 で算出した。

#### (2) OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞の検出

EG7 細胞を皮下移植し、誘導体 A あるいは溶媒を投与したマウスより 17 日目に腫瘍組織を摘出し、酵素処理により細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を蛍光標識された OVA テトラマー、抗 CD8 抗体、及び、抗 PD-1 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。

#### (3) PD-L1 分子の FACS 解析

試験管内で培養した EG7 細胞に種々の濃

度で誘導体 A を添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 3 日間処置した。細胞を洗浄後、蛍光色素で標識された抗 PD-L1 抗体で処置した。余分な抗体を洗浄除去後、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) ベツリンの誘導体 A (以下、誘導体 A) の抗腫瘍効果について、3 種の癌細胞株 (B16F10 細胞、4T1 細胞、CT26 細胞) の皮下移植マウスモデルを用いて比較検討した (Fig.1)

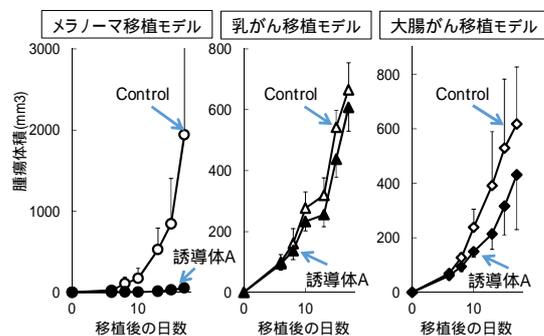


Fig 1. 誘導体Aの抗腫瘍効果

その結果、B16F10 メラノーマ細胞の皮下移植モデルにおいてのみ、顕著な抗腫瘍効果が認められることが分かった。また、この抑制効果はベツリンの抗腫瘍効果よりも明らかに強かった。そこで、まず B16F10 細胞の移植モデルを用いて作用機序の検討を進めた。免疫系の関与を検討するため、免疫不全マウスとして scid マウス及び nude マウスを用いて誘導体 A の抗腫瘍効果について検討したところ、いずれのマウスにおいても野生型マウスを用いた場合に比較して抑制効果が明らかに減弱することが分かった。この結果から、誘導体 A の抗腫瘍効果には T 細胞が関与していると考えられた。そこで、卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原として発現する EG7 細胞を皮下に移植したマウスモデルを用いて誘導体 A の抗腫瘍効果を検討した。その結果、誘導体 A を腫瘍移植後 2 日目より連日 16 日目まで腫瘍内に直接投与したところ、

EG7 の皮下増殖は有意に抑制された。誘導体 A の抗腫瘍効果への CD8 陽性 T 細胞の関与を明らかにするため抗 CD8a 抗体をマウスに投与して CD8 陽性 T 細胞を除去したところ、誘導体 A の抗腫瘍効果は顕著に減弱した。これらのことから、誘導体 A の抗腫瘍効果には CD8 陽性 T 細胞が関与していることが明らかとなった。(Fig.2)

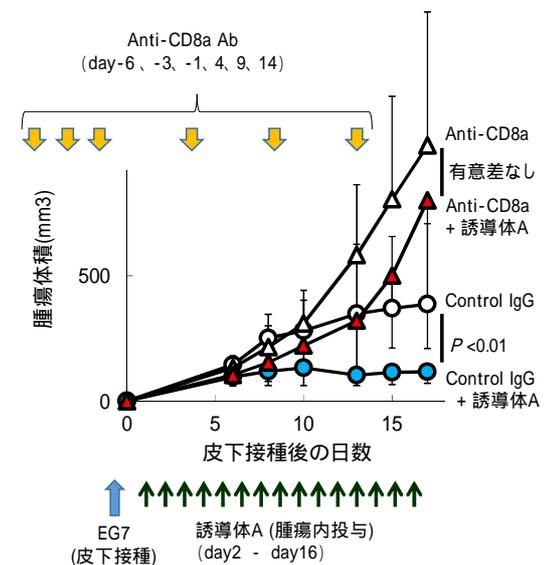


Fig 2. CD8陽性T細胞の関与

(2) 誘導体 A が OVA 特異的な CD8 陽性 T 細胞の誘導に影響を与えているのかを明らかにするため、腫瘍移植後 17 日目に腫瘍を摘出して細胞懸濁液を調製し、OVA テトラマーを補足する CD8 陽性 T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、OVA 特異的な CD8 陽性 T 細胞は誘導体 A の投与により有意に増加することが分かった (Fig.3)。その一方で、誘導体 A 投与群では腫瘍内に浸潤した CD8 陽性 T 細胞の腫瘍重量当たりの絶対数は対照群に比較して顕著に減少した。このため腫瘍重量当たりの絶対数で比較する

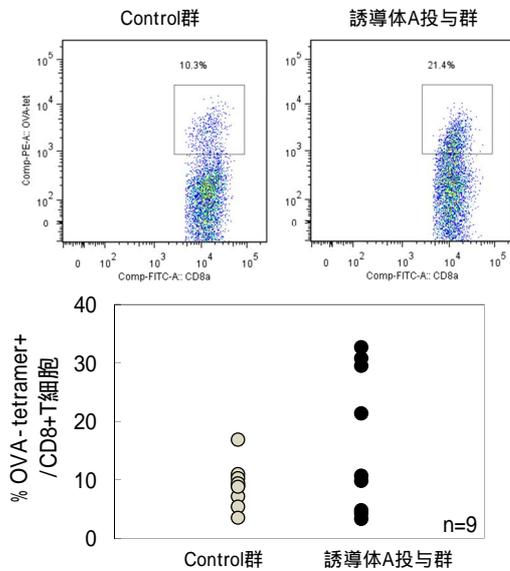


Fig 3. OVAテトラマー陽性CD8T細胞の解析

と対照群と誘導体 A 投与群との間で OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞に明らかな差を認めなかった。そこで、誘導体 A の抗腫瘍メカニズムについて、免疫抑制解除の視点から OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞における PD-1 分子に着目し、その発現量をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、誘導体 A 投与群では腫瘍内に浸潤した OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞における PD-1 分子の発現量が低下している傾向が認められた ( Fig.4 )

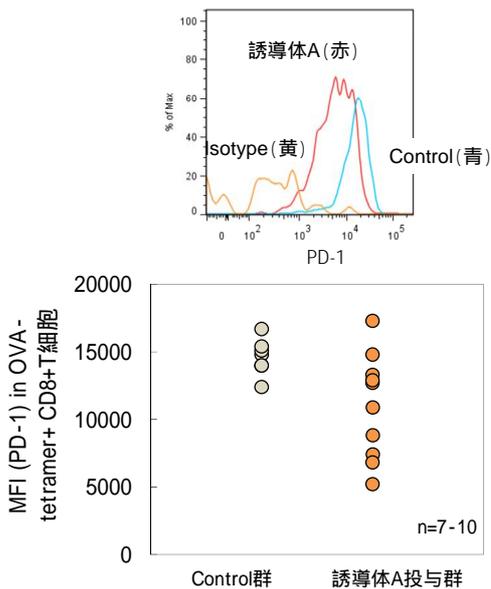


Fig 4. OVA-tet陽性CD8T細胞におけるPD-1の解析

( 3 )PD-1 分子のリガンドである PD-L1 分子の発現に与える誘導体 A の影響について検討

した。試験管内で培養した EG7 細胞に誘導体 A を添加し 3 日間処置したところ、処置した濃度に依存して EG7 細胞膜上に PD-L1 分子の発現が誘導されることが分かった ( Fig.5 )

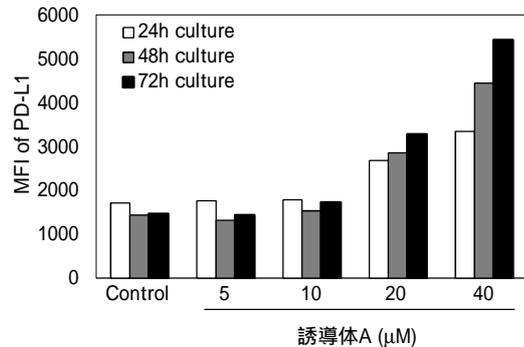


Fig 5. EG7におけるPD-L1の発現に与える誘導体Aの影響

一方、作用が認められた濃度範囲では EG7 細胞の増殖能も同様に抑制された。これらのことから、PD-L1 分子の発現抑制が細胞増殖阻害の結果である可能性が考えられた。そこで、5-フルオロウラシルを用いて EG7 細胞の増殖能を強く抑制する濃度において PD-L1 分子の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、5-フルオロウラシルは PD-L1 分子の発現には影響を与えなかった。これらのことから、誘導体 A は EG7 細胞の増殖能を阻害するとともに、PD-L1 分子の発現を顕著に増強することが明らかとなった。

( 4 ) PD-L1 分子の発現量の増加により、抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果が増強することが報告されている。そこで、抗 PD-1 抗体と誘導体 A の併用効果について EG7 皮下移植マウスモデルを用いて検討した( Fig.6 )。その結果、抗 PD-1 抗体と誘導体 A を併用することで顕著な抑制効果が認められた。

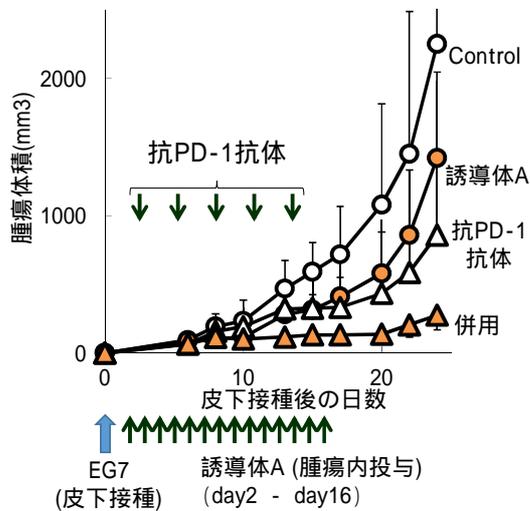


Fig 6. 抗PD-1抗体と誘導体Aの併用効果

(5) 以上から、誘導体Aの抗腫瘍メカニズムには細胞傷害性T細胞が関与していることを示唆した。今後、細胞傷害性T細胞の誘導機構やPD-L1分子の発現誘導メカニズムを明らかにすることで、新しいがん治療薬の開発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, Matsunaga T, Ohto M, Kawasuji T, Nagai Y, Takatsu K, Anti-tumor effects of betulin derivatives with amino acids in a tumor-burden mouse model. Annual Report of Toyama Pref. Inst. for Pharm. Res., 44, 17-20, 2017 (査読無)

Ogasawara M, Matsunaga T, Ohto M, Kawasuji T, Nagai Y, Takatsu K, Anti-tumor effects of a betulin derivative in a tumor-burden mouse model. Annual Report of Toyama Pref. Inst. for Pharm. Res., 43, 17-21, 2016 (査読無)

Ogasawara M, Matsunaga T, Nagai Y, Takatsu K, Mechanism of action of the

anti-tumor effects of betulin. Annual Report of Toyama Pref. Inst. for Pharm. Res., 42, 17-22, 2015 (査読無)

[その他]  
ホームページ等

薬事総合研究開発センター 研究業績  
<http://www.pref.toyama.jp/branches/1285/research/achievement/index.html>

#### 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