

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861154

研究課題名(和文)スピルリナを用いた悪性グリオーマに対する新たな免疫療法の開発

研究課題名(英文) Novel approach and mechanism of 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臨床医学部門・助教

研究者番号：90527582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまでSpirulina CPSがTLR4を介して免疫系を賦活し細胞性免疫を誘導することやIL-17産生制御による血管新生抑制作用を解明した。本研究ではTLR4以降のシグナル伝達系と抗腫瘍効果に關与する自然免疫系の免疫担当細胞について解析を行った。Spirulina CPSがNF- $\kappa$ B誘導能を有しPolymyxin Bで阻害されることが解明され、E. coli LPS類似した作用機序であることが判明した。腫瘍にはF4/80陽性細胞が有意に多く、腫瘍抑制効果との相関関係が認められた。Spirulina CPSの抗腫瘍効果は自然免疫系ではマクロファージによって担われることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Both Spirulina CPS and E. coli LPS induced NF- $\kappa$ B activation and their responses were suppressed by pre-incubating these polysaccharides with polymyxin B, suggesting that the chemical nature is shared between these two complex polysaccharides. Administration of anti-CD8 antibodies, anti-CD4 plus anti-CD8 antibodies or anti-asialo GM1 antibodies enhanced glioma growth, suggesting that T cells, and natural killer (NK) cells or macrophages were involved in the suppression of the tumor growth by Spirulina CPS. In this review, we focused on examining whether macrophages or NK cells are responsible for the suppression of the glioma growth. We found that both Spirulina CPS and E. coli LPS suppressed tumor growth by activating F4/80 positive macrophages. In conclusion, Spirulina CPS suppressed the tumor growth by activating both T cells and macrophages and down-regulating angiogenesis.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：スピルリナ グリオーマ 免疫療法

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もつ *E. coli* LPS 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とされていた。*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* は古来より食用されており安全性の高さが期待された。

以前から本学の富永明教授より *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ていた (Tomimaga et al. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 9: 238-50, 2010)。

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以下のように報告した Kawanishi et al. *Microbiol & Immunol* 57(1):63-73, 2013)。

(1) *Spirulina* CPS が TLR4 を介して免疫系を賦活することを解明した

*E. coli* と *Spirulina* は共にグラム陰性菌に分類され、*E. coli* LPS と *Spirulina* CPS は類似の構造を有することが予想されていた。*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。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、腫瘍径を測定すると C3H/HeN では *E. coli* LPS と *Spirulina* CPS を投与した群で有意に腫瘍増殖が抑制された。C3H/HeJ で同様の実験を行うと *Spirulina* CPS, *E. coli* LPS を投与しても腫瘍抑制効果は認めなかった。実験結果より、*Spirulina* CPS は TLR4 を介し抗腫瘍効果を発揮することが確かめられた。

(2) *Spirulina* CPS が獲得免疫を形成し細胞性免疫を誘導することを解明した

獲得免疫について調べる目的で RSV-M 移植後 3 週間で腫瘍摘出を行い、1 週間後に C3H/HeN へ再移植を行った。*Spirulina* CPS 投与群は抗腫瘍効果を保持しており獲得免疫の形成が認められたが、*E. coli* LPS 投与群では抗腫瘍効果は認められなかった。

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 とともに投与すると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が関与していることが示唆された。*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 リンパ球も関与していることが示された。これに対して *E. coli* LPS の抗腫瘍効果は NK 細胞とマクロファージによって担われている。

(3) *Spirulina* CPS の IL-17 産生制御による腫瘍の血管新生抑制作用を解明した

血清中のサイトカインを測定すると C3H/HeN マウスの *E. coli* LPS 投与群では、顕著に IFN- $\gamma$  と IL-17 が上昇したのに対し、*Spirulina* CPS 投与群では IFN- $\gamma$  がわずかに上昇するだけで、IL-17 はほとんど変化しないか、または低下を示した。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。

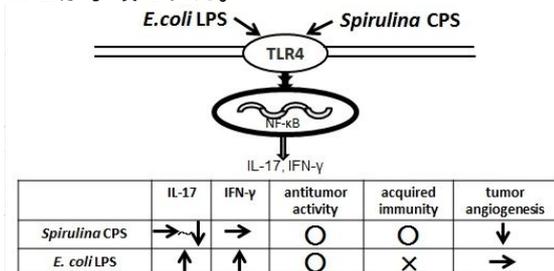


図 1. *Spirulina* CPS の抗腫瘍効果のまとめ

2. 研究の目的

*E. coli* LPS では TLR4 への刺激を介して感染防御や腫瘍増殖などに影響を与えるサイトカインの産生を誘導することが知られている。*Spirulina* CPS の抗腫瘍効果には IL-17 の分泌制御による血管新生の抑制が関与することを報告したが、TLR 以降の経路については未だ解明できておらず、更なる機序の解明を目的に本研究を行うこととした。

3. 研究の方法

*Spirulina* CPS の抗腫瘍効果をさらに詳しく解析するため以下の実験を行った。*Spirulina* CPS が作用する TLR4 以降のシグナル伝達系および *Spirulina* CPS の抗腫瘍効果に關与する免疫担当細胞と IL-17 以外のサイトカインの解析を行うこととした。

4. 研究成果

(1) *Spirulina* CPS が作用する TLR4 以降のシグナル伝達系の解析

*Spirulina* CPS の抗腫瘍効果について、TLR4 以降のシグナル伝達系の経路の解析を行った。Chinese hamster ovary cells を用いた実験系でフローサイトメトリーを用いて

NF B 誘導能を *E. coli* LPS と比較した。*Spirulina* CPS と *E. coli* LPS はともに NF B 誘導能を有しており、Polymyxin B で阻害された。よって、*Spirulina* CPS と *E. coli* LPS の作用部位が類似しておりともに NF B 誘導を介した作用機序であることが示唆された。

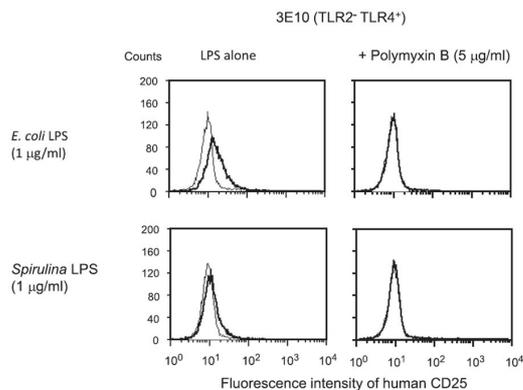


図2. *Spirulina* CPS と *E. coli* LPS による NF B 誘導

### (2) *Spirulina* CPS の抗腫瘍効果に関与する自然免疫系の免疫担当細胞の解析

細胞性免疫応答に関しては CD4 及び CD8 陽性 T リンパ球がともに賦活されることで抗腫瘍免疫応答が増強されることを報告した。一方、抗腫瘍効果を担う自然免疫系の免疫担当細胞に関しては asialo GM1 陽性細胞であるという以上の解析が行えていなかった。

今回、腫瘍細胞に含まれる NK 細胞のマーカーである CD49b 陽性細胞及びマクロファージのマーカーである F4/80 陽性細胞を比較すると有意に F4/80 陽性細胞数が多く、さらに抗腫瘍効果を比較検討すると F4/80 陽性細胞が多いほど腫瘍抑制効果が高い相関関係が認められた。以上の結果から、*Spirulina* CPS の抗腫瘍効果は自然免疫系では主にマクロファージによって担われていることが示唆された。

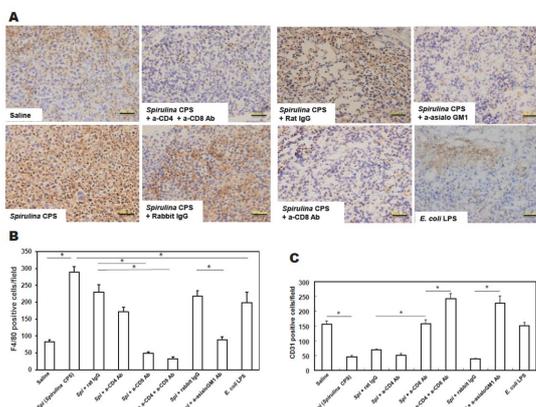


図3. F4/80 陽性細胞数と腫瘍抑制効果

### (3) *Spirulina* CPS の抗腫瘍効果に関与するサイトカインの解析

*Spirulina* CPS 投与後のサイトカイン解析も行った。以前からも報告しているように

IL-17 を低下させる作用のほかにも、現時点での解析では腫瘍の維持や増大に必要なとされる TGF- $\beta$ , IL-6, IL-23 を制御する効果を有することが示唆された。一方、*E. coli* LPS ではこれらのサイトカインが上昇しており、これが腫瘍に対する効果の違いを生じている可能性があると考えられた(未発表データ)。

また、近年の悪性グリオーマの解析で腫瘍細胞が血管内皮細胞を起源としている可能性が示唆されている。実験で用いたマウスグリオーマ細胞の解析を行ったところ腫瘍細胞は *in vitro* では血管内皮細胞のマーカーである CD31 が陽性であり、腫瘍細胞が血管内皮細胞を起源としている可能性が示唆された。

これまでの実験結果から、腫瘍の血管新生抑制とグリオーマの微小環境及び *Spirulina* CPS 投与によって影響を受けるサイトカインについてまとめた。IL-17 を産生する Th17 細胞及び免疫抑制効果を有する Treg 細胞は naïve T 細胞から TGF- $\beta$  と IL-6 により誘導される。グリオーマの微小環境では TGF- $\beta$  と IL-6 の濃度が高いことが知られており、通常の状態では Th17 細胞、Treg 細胞への分化が促進されていると考えられる。我々のグループの実験成果からは *Spirulina* CPS 投与で TGF- $\beta$  と IL-6 の産生を制御することが判明している。

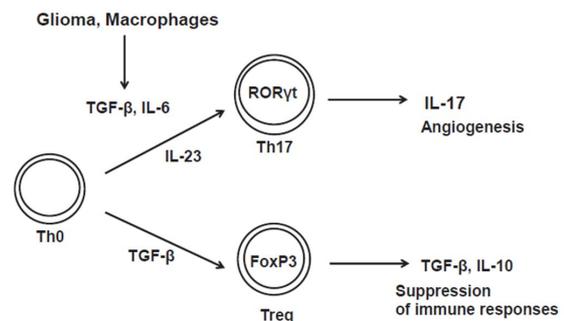


図4. グリオーマ微小環境とサイトカインの役割

グリオーマは脳腫瘍であるため、今後は *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。当教室にはマウスの脳定位固定装置を有しており、マウスの脳内に腫瘍細胞を移植することが可能である。マウス脳内にマウスグリオーマ細胞 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ことを計画している。

評価法についても脳腫瘍に対する治療効果は、従来マウスの脳を薄切し免疫組織化学的手法を用いることが一般的であったが、本学では *in vivo* imager (IVIS; caliper 社製) 及び実験動物用の MRI が導入されており生体での腫瘍細胞の動態や治療経過を観察可能である。*In vivo* imager で用いる蛍光蛋白

(tdTOMATO ; 蛍光極大波長 581nm , 非常に強い蛍光を示す DsRed バリエント) を遺伝子導入した RSV-M 細胞株も作成済みであり実験の準備も整っている

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Akira Tominaga, Yu Kawanishi, Takahiro Taguchi, Toshio Yawata, Hiromi Okuyama, Yutaka Kusumoto, Shiro Ono, Keiji Shimizu:

Spirulina Complex Polysaccharides Suppress the Growth of Glioma in T Lymphocyte- and Macrophage-dependent Manner , Kuroshio Science 2014 8-1, 101-108 査読有

<https://ir.kochi-u.ac.jp/dspace/bitstream/10126/5432/2/8-1.101.pdf>

#### 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臨床医学部門・助教

研究者番号 : 90527582