

細菌製剤ピシバニール (OK-432)に含まれる  
免疫活性化成分の研究

Studies on immunobiologically active compounds  
in immunotherapeutic agent Picibanil (OK-432)

2008年

学位論文

高重 克洋

鹿児島大学大学院理工学研究科  
ナノ構造先端材料工学専攻



# 目次

第一章	序論 .....	1
第二章	OK432 中に含まれる免疫活性成分の抽出検討 .....	10
第三章	腸内球菌由来免疫活性成分の検討 .....	28
第四章	トリトン X-114 相分離による OK-432 の抗腫瘍活性の増強検討 .....	50
第五章	総括 .....	69



## 第一章 序論

一般にがん患者の免疫能は、健常人に比べて低下した状態にあると考えられている。癌の免疫療法は、患者の低下した免疫能を人為的に操作、増強することにより癌の増殖を制御し、治療効果を高める療法であり、生体応答調整剤 (biological response modifiers; BRM) 療法として、現在臨床の場に用いられている。BRM とは、腫瘍に対する宿主の生物学的応答を調整することにより、癌治療効果を得ようとする物質または試みと定義され、非特異的免疫療法、抗体療法、ワクチン療法、細胞療法、遺伝子療法等、様々な療法に渡る。このうち、臨床の場で主として行われているのは、免疫賦活剤を用いたいわゆる非特異的免疫療法である。

非特異的免疫療法は、低下した癌患者の免疫能を非特異的に高め、腫瘍の増殖を抑制し、再発の防止および延命を期待するものである。免疫賦活剤には、レンチナン (lentinan)、シゾフィラン (sizofiran) やクレスチン (krestin) 等の抗腫瘍性多糖類 (1, 2, 3, 4, 5, 6)、OK-432 や nocardia cell-wall skelton 等の細菌製剤 (7, 8)、レバミゾール (levamisole) やベスタチン (bestatin) 等の合成化合物 (9, 10) がある。このうちグラム陽性菌 *Streptococcus pyogenes* 由来の細菌製剤である OK-432 は強力な癌の免疫療法剤として広く臨床に用いられている。

OK-432 (ピシバニール、中外製薬、東京) は、ヒト由来 A 群溶血性レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* 弱毒 Su 株を、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理後、ペニシリン G カリウム処理し、凍結乾燥した菌体製剤であり、1967 年に金沢大学の岡本、越村によって開発された (11)。OK-432 は強力な癌免疫療法剤として、胃癌や原発性胃癌症例に対する化学療法剤との併用による延命効果 (12, 13, 14, 15)、消化器癌や肺癌症例に対する腫瘍縮小効果 (16) をはじめ、頭頸部癌を含めて多くの領域の悪性腫瘍において用いられ、有効例が多数報告されている (15, 17, 18, 19, 20, 21)。

OK-432 の作用機序は、開発当初は腫瘍細胞に対する直接作用であると考えられていた。これまでに直接的な腫瘍細胞増殖抑制効果として、癌性胸・腹水の減少や化学療法との併用による生存期間の延長、また他剤無効の頭頸部癌、甲状腺癌、リ

リンパ管腫に対する有効性が報告されている (22, 23)。しかし現在では直接作用以外に、主にマクロファージ、T 細胞あるいは NK 細胞等の免疫担当細胞を刺激することにより、これらの細胞の癌細胞障害活性を増強させ抗腫瘍効果を発現すると考えられている。すなわち、マクロファージ、細胞障害 T 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞あるいはリンホカイン活性化キラー (LAK) 細胞等の抗腫瘍性エフェクター細胞の誘導と活性化を促進し、賦活された種々の宿主抗腫瘍免疫能を介して、抗腫瘍効果を示す (24)。またヘルパー T 細胞、NK 細胞、単球、マクロファージが、インターフェロン (interferon, IFN)、インターロイキン (interleukin, IL)-2、IL-12 及び腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等の抗腫瘍性サイトカインの産生を増強して抗腫瘍効果を発揮することも報告されている (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33)。また、OK-432 が IL-12 の誘導を介して Th1 型の反応を優位に誘導することにより抗腫瘍効果を発現すること (34)、OK-432 の腫瘍局所への投与が所属リンパ節において Th1 型の反応を増強させること (35)、また OK-432 により誘導された LAK 細胞が IL-2 で誘導された LAK 細胞と比較して高い抗腫瘍活性を示すこと (36) 等も報告された。これらのことは、OK-432 による Th1 型の反応の誘導が、抗腫瘍活性の発現に関与していることを示唆している。このように、OK-432 の抗腫瘍効果発現の細胞レベルにおける作業機序については多数の報告がある。しかし OK-432 は全菌体であるため、抗腫瘍免疫活性を増強させる成分以外に多くの夾雑物を含む。そのため副作用や効果減弱を引き起こし、必要とした効果が必ずしも得られていないのが現状である。

OK-432 の免疫反応には、OK-432 中に含まれる細菌由来免疫活性化成分が関与していると考えられる。古くから、微生物構成成分が免疫細胞を刺激してサイトカイン等の免疫活性化メディエーターの産生を誘導することが知られており、最近この刺激活性に、タイプ I 膜貫通受容体である自然免疫レセプター Toll-like receptor (TLR) が関与していることが示された (37)。現在まで、10 種類を超えるメンバーの TLR ファミリーが発見され、それらのほとんどのリガンドが明らかになっている。例えば、TLR4 は、補助分子である MD-2 とともにグラム陰性菌の外膜構成成分であるリポ多糖 (LPS) およびその活性中心である lipid A (38, 39) を、TLR9 は細菌由来の非メチル化 CpG 部分を持つ DNA (40) を、TLR3 および TLR7/8 は 2 本鎖及び 1 本鎖 RNA (41, 42) を、TLR5 は細菌のフラジェリン (43) を、TLR2 サブ

ファミリー (TLR1, 2, 6) は細菌のリポプロテインやリポペプチド (44, 45) をそれぞれ認識する。リガンドを認識した TLR は、細胞内シグナル伝達分子である myeloid differentiation protein (MyD) 88、IL-1R-associated kinase (IRAK)、そして TNFR-associated factor (TRAF) 6 や mitogen-activated protein kinases (MAPKs) を介して、転写因子 nuclear factor (NF)- $\kappa$ B を活性化し、サイトカイン産生を誘導する (46, 47)。また、TLR4/MD-2 複合体は、MyD88 を介さずに転写因子 IFN regulatory factor (IRF) 3 を活性化する経路に関与することも報告されている (48)。

自然免疫レセプターのうちのいくつかについては、抗腫瘍活性との関係が報告されている。例えば TLR9 は Th1 型の反応を誘導して抗腫瘍活性を発揮することが知られている (40, 49)。また、TLR4 に関しては、低濃度の LPS が Th2 型反応を誘導する一方で、高濃度の LPS が Th1 型反応を導くことが報告されている (50)。TLR2 に関しては、合成リガンドである Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> と FSL-1 が Th2 型のサイトカインを誘導することが知られているが (51)、TLR2 自身は Th1 のエフェクターとしても働くことが報告されている (52)。さらに、別の自然免疫レセプターである NOD2 が TLR による Th1/Th2 バランスを調整しうることも示されている (53, 54)。これらの報告は、OK-432 がこのようなレセプター群を活性化して抗腫瘍活性を発揮しており、それに関与する成分を含んでいることを示している。

これまで、OK-432 が属するグラム陽性菌の免疫活性成分として、細胞表層に存在する複合糖質であるリポテイコ酸 (LTA) が知られている。この LTA は免疫刺激および炎症性の活性を示すことが報告されており、主に抗腫瘍効果 (55, 56) や、TNF、IL-1 および IL-6 のような炎症性のサイトカインの誘導を引き起こすことが示されている (57, 58, 59)。OK-432 にも、TLR4 を活性化する LTA 様の成分の存在が報告されており、OK-432 の抗腫瘍活性成分の一つとして働いていると考えられている (60)。それ以外にも TLR9 を介して抗腫瘍効果を示す活性成分の存在も報告されており (61)、OK-432 が異なった経路を介して抗腫瘍免疫活性を発現する少なくとも 2 種類の活性成分を保有することが明らかになっている。これらの成分は、OK-432 のサイトカイン誘導や抗腫瘍効果において働く分子として重要な役割を担っており、OK-432 から調製される化学構造の明確にされた有効な BRM となる可能性が示唆されている。しかし、全菌体制剤である OK-432 中に含まれる成分のすべてが明ら

かにされているとはいえず、OK-432 の抗腫瘍効果の活性化機構の全容は明らかになっていない。

そこで本研究では、OK-432 に含まれる成分と宿主レセプターとの分子レベルにおける抗腫瘍メカニズムの解明の一助として、OK-432 に含まれる免疫活性化成分のさらなる分離精製およびその性質について研究した。

まず第二章では、OK-432 からの免疫活性成分の抽出を試みた。グラム陰性菌の複合糖質の抽出に用いられるフェノールクロロホルム-ヘキサン抽出 (Galanos 抽出法) (62) を用いて OK-432 を処理することにより、TNF- $\alpha$  誘導活性を示す可溶性画分である Gal-Ext を得た。この Gal-Ext は樹状細胞 (dendritic cell, DC) を介して免疫活性を示すのではなく、直接免疫活性を鼓舞する直接作用や好中球を介した経路の活性化に関与する新規の成分である可能性が強く示唆された。岡本らは別の方法により OK-432 中の活性成分の存在を示しており、OK-432 には抗腫瘍効果に関与する活性成分が複数存在しており、それらが複雑に作用することにより OK-432 の抗腫瘍効果を調整していることが示唆された。しかし、この Galanos 抽出法で得られた Gal-Ext 画分は微量であり、さらなる精製及びその機能解析の実施は困難であった。

そこで第三章では、OK-432 中の未知の免疫活性成分の検討を進めるために、類縁のグラム陽性菌である *Enterococcus hirae* をモデルとして免疫活性成分の検討を行った。まず、これまで活性成分と考えられていた *E. hirae* 由来の LTA 画分をターゲットとして、活性を中和するマウスモノクローナル抗体を作製した。抗体の結合特異性を検討した結果、グラム陽性菌の免疫活性化は LTA ではなく LTA 由来画分に少量含まれる TLR2 リガンドであるリポプロテインが関与していることが示唆された。我々のグループは様々なグラム陽性菌にリポプロテインが存在する可能性を示唆しており、同じグラム陽性菌である OK-432 中にも、リポプロテインが存在し、TLR2 を活性化していることが予想された。

第四章では、OK-432 中に含まれる TLR2 リガンドの抗腫瘍活性に対する影響を検討した。TLR2 のリガンドであるリポプロテインの抽出によく用いられるトリト



ン (Triton) X-114 (TX-114) による相分離法で OK-432 を処理し、得られた抽出物および抽出残渣画分を用いてインビトロとインビボで免疫生物学的検討を行った。その結果、全菌体である OK-432 に比べ抽出残渣が免疫系を Th1 優位に分化させ、高い抗腫瘍活性を発揮することが明らかとなった。OK-432 は Th1、Th2 両型のサイトカインを誘導することから、その二者の分離が抗腫瘍活性の増強や副作用の低減には重要であり、TLR2 リガンドの除去が OK-432 の免疫療法効果の改善に役立つものであることが示唆された。

## 参考文献

- (1) Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka, F. (1969) *Sing. Nature* 222 : 687-688.
- (2) Maeda, Y., Ishimura, K. and Chihara, G. (1976) *Protein Nucleic. Enzyme*. 21: 425-435.
- (3) Haba, S., Hamaoka, T., Takatsu, K. and Kitagawa, M. (1976) *Int. J. Cancer*. 18: 93-104.
- (4) Sasaki, T. and Takasuka, N. (1976) *Carbohydrate research*. 47: 99-104.
- (5) Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K. and Saito, G. (1969): *Jpn. J. Cancer Res*. 60: 137-140.
- (6) Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K. and Orita, K. (1984) *Cancer Treatment Review* 11: 131-155.
- (7) Azuma, I., Taniyama, T., Yamawaki, M., Sugimura, K. and Yamamura, Y. (1976) *Jpn. J. Cancer Res*. 67: 733-736.
- (8) Yanagawa, E., Yasumoto, K., Ohta, M., Nomoto, K., Azuma, I. and Yamamura, Y. (1979) *Jpn. J. Cancer Res*. 70: 141-146.
- (9) Thienpont, D., Vanparijs, O., Raeymaekers, A., Raeymaekers, A., Vandeverk, J., Demoen, P., Allewijn, F., Marsboom, R., Niemegeers, C., Schellekens, K. and Janssen, P. (1966) *Nature* 209: 1084-1086.
- (10) Renoux, G. and Renoux, M. (1971) *CR. Acad. Sci*. 272: 349-350.
- (11) Okamoto, H., Shoin, S. et al. (1967) *Jpn. J. Microbiol*. 11 : 323-336.
- (12) Tokai Research Group (1976) *Jpn. J. Cancer Chemotherapy* 3: 715-721.
- (13) Sakabe, T., Fujii, M., Osawa, T., Ueda, T., Nakajima, K., Noro, A., Funabashi, W. and Tanaka, T. (1987) *Jpn. J. Med. Pharm. Sci*. 18: 1907-1912.
- (14) Noumi, K., Uetsuna, A., Yamakido, M., Katsuta, S., Sasaki, H., Fukuhara, N., Mitsuyama, T. and Nagata, H. (1985) *Hiroshima J. Med. Sci*. 38: 405-408.
- (15) Watanabe, Y. and Iwa, T. (1987) *J. Biol. Res. Mod*. 6 : 169-180.
- (16) Kimura, I., Ohnoshi, Y., Yasuhara, S., Watanabe, T., Sugiyama, M. and Kiraki, K. (1974) *Acta Med Okayama* 28: 423-431.
- (17) Torisu, M., Katano, M. et al. (1983) *SURGERY*. 93: 357-364.
- (18) Uchida, A., Micksche, M. et al. (1984) *Cancer Immunol Immunother*. 18: 5-12.
- (19) Kikkawa, F., Kawai, M. et al. (1993) *Eur. J. Cancer*. 29: 1542-1546.

- (20) Sato, M., Yoshida, H. et al. (1984) *Int. J. Oral Surg.* 13: 7-15.
- (21) Sato, M., Harada, K. et al. (1997) *Apoptosis.* 2: 227-238.
- (22) Oshimi, K., Kano, S., Takaku, F. and Okumura, K. (1980) *J. Nat. Cancer Invest.* 65: 1265-1269.
- (23) Oshimi, K., Wakasugi, H., Seki, H. and Kano, S. (1980) *Cancer Immunother.* 9: 187-192.
- (24) Ebina, T., Sakai, A., Saito, M., Yamaguchi, T., Aso, H., Kodama, M., Kobayashi, E., Hayashi, Y., Takahashi, K., Abe, S., Kuroda, S., Wakasugi, H. and Ishida, N. (1981) *Igakunoayumi* 117: 229-234.
- (25) Hoshino, T., Iho, S., Kura, F. and Uchida, A. (1986) OK-432. A Biological Response Modifier, Tokyo Professional Postgraduate Services International. : 61-68.
- (26) Kaji, R., Yoshida, H., Yanagawa, T. and Sato, M. (1989) *J. Biol. Res. Mod.* 8: 488-500.
- (27) Fujii, M., Abo, T. and Kumagai, K. (1988) *Cancer Immunol Immunother.* 27: 97-102.
- (28) Talmadge, J., Herberman, B., Chirigos, A., Maluish, E., Schneider, A., Adams, S., Philips, H., Thurman, B., Varesio, L. and Long, C. (1985) *J. Immunol.* 135: 2483-2491.
- (29) Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. (1986) *J. Immunol.* 136: 2348-2357.
- (30) Takeuchi, T., Ueki, T., Sasaki, Y., Kajiwara, T. Li, B., Moriyama, N. and Kawabe, K. (1997) *Cancer Immunol Immunother.* 43 : 375-381.
- (31) Sato, M., Chamoto, K. and Nishimura, T. (2003) *Int. Immunol.* 15 : 837-843.
- (32) Sato, M., Kaji, R., Urata, M., Furumoto, N. and Saito, M. (1988) *J. Biol. Res. Mod.* 7 ; 211-228.
- (33) Okamoto, M., Kaji, R., Kasetani, H., Yoshida, H., Moriya, Y., Saito, M. and Sato, M. (1993) *J. Immunother.* 13: 232-242.
- (34) Fujimoto, T., Duda, R. B. et al. (1997) *L. Immunol.* 158: 5619-5626.
- (35) Okamoto, T., Harada, M., et al. (1997) *Int. J. Cancer* 70: 598-605.
- (36) Yamamoto, K., Tanaka, R. et al. (1999) *J. Immunother.* 22:33-40.
- (37) Underhill, D. M. and Ozinsky, A. (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 103-110.
- (38) Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Huffel, C. V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Castagnoli, P. R., Layton, B. and Beutler, B. (1998) *Science.* 282: 2085-2088.
- (39) Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K and Kimoto,

- M. (1999) *J. Exp. Med.* 189: 1777-1782.
- (40) Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000) *Nature*. 408: 740-745.
  - (41) Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2001) *Nature*. 413: 732-738.
  - (42) Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. and Bauer, S. (2004) *Science*. 303: 1526-1529.
  - (43) Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D.R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. and Aderem, A. (2001) *Nature*. 410: 1099-1103.
  - (44) Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlrad, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K. and Akira, S. (2001) *Int. Immunol.* 13: 933-940.
  - (45) Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L. and Akira, S. (2002) *J. Immunol.* 169: 10-14.
  - (46) Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C. , Ghosh, S. & Janeway, C. A., Jr. (1998) *Mol. Cell* **2**, 253-258.
  - (47) Muzio, M., Polentarutti, N., Bosisio, D., Manoj Kumar, P. P. and Mantovani, A. (2000) *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 563-566.
  - (48) Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlrad, P., Sato, S., Hoshino, K. and Akira, S. (2001) *J. immunol.* 167: 5887-5894.
  - (49) Krieg, A. M. (2002) *Annu. Rev. Immunol.* 20: 709-760.
  - (50) Eisenbarth, S. C., Piggott, D. A., Huleatt, J. W., Visintin, I., Herrick, C. A. and Bottomly, K. (2002) *J. Exp. Med.* 196: 1645-1651.
  - (51) Redecke, V., Hacker, H., Datta, S. K., Fermin, A., Pitha, P. M., Broide, D. H. and Raz, E. (2004) *J. Immunol.* 172: 2739-2743.
  - (52) Imanishi, T., Hara, H., Suzuki, S., Suzuki, N., Akira, S. and Saito, T. (2007) *J. Immunol.* 178: 6715-6719.
  - (53) Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J. and Strober, W. (2004) *Nat. Immunol.* 5: 800-808.
  - (54) Tada, H., Aiba, S., Shibata, K., Ohteki, T. and Takada, H. (2005) *Infect Immun.* 73: 7967-7976.
  - (55) Usami, H., Yamamoto, A., Yamashita, W., Sugawara, Y., Hamada, S., Yamamoto, T., Kato, K., Koikeguchi, S., Ohokuni, H. and Kotani, S. (1988) *Br. J. Cancer.* 57: 70-73.

- (56) Yamamoto, A., Usami, H., Nagamuta, M., Sugawara, Y., Hamada, S., Yamamoto, T., Kato, K., Kokeyuchi, S. and Kotani, S. (1985) *Br. J. Cancer*. 51: 739-742.
- (57) Bhakdi, S., Klonisch, T., Nuber, P. and Fischer, W. (1991) *Infect. Immun.* 59: 4614-4620.
- (58) Tsutsui, O., Kokeyuchi, S., Matsumura, T. and Kato, K. (1991) *FEMS Microbiol. Immunol.* 3: 211-218.
- (59) Usami, H., Yamamoto, A., Sugawara, Y., Hamada, S., Yamamoto, T., Kato, K., Kokeyuchi, S., Takada, H. and Kotani, S. (1987) *Br. J. Cancer*. 56 : 797-799.
- (60) Okamoto, M., Ohe, G., Oshikawa, T., Nishikawa, H., Furuichi, S., Yoshida, H., Matsuno, T., Saito, M. and Sato, M. (2000) *Immunopharmacology*. 49: 363-376.
- (61) Oshikawa, T., Okamoto, M. et al. (2005) *Jpn. J. Cancer. Immunother.* 32: 1559-1561.
- (62) Galanos, C., Luderitz, O. and Westphal, O. (1969) *Eur. J. Biochem.* 9: 245-249.

## 第二章 OK432 中に含まれる免疫活性成分の抽出検討

### 1. 序論

OK-432 は BRM として、癌の免疫化学療法に様々な投与法で用いられている。しかし、長年の活性物質探索の歴史があるにもかかわらず、OK-432 の活性を担っている分子の構造という観点では殆んど情報が無い。すなわち全菌体制剤である OK-432 中に含まれている如何なる分子が、免疫担当細胞上に発現する如何なる受容体分子と結合して、どのようなシグナル伝達経路を介して抗腫瘍効果を発現するかについて、その全容は明らかとされていない。

現在までに、数種類の OK-432 由来活性画分が調整されている。まず、標準的な DNA 精製法である細胞溶解後 DNA 画分を分離しイソプロパノールで沈殿させる方法を用いて OK-DNA が調整されている (1)。これは、TLR9 を介して細胞を活性化する。細菌由来の DNA に含まれる CpG DNA はよく知られた Th1 誘導成分であることから、同様に CpG DNA を含むと推察され、この OK-DNA は OK-432 の主要な抗腫瘍活性成分であると考えられる。また、OK-PSA と OK-PTF は、LPS や LTA などの細菌由来高分子複合糖質の抽出に広く用いられている方法であるブタノール抽出後 (2, 3) の画分をアフィニティー精製することで得ており、TLR4 と TLR2 を介して細胞を刺激する (4, 5)。岡本らは、OK-PSA が抗腫瘍活性を持つこと、その構造が LTA に類似していることを示唆しており (6)、複合糖質が OK-432 の抗腫瘍活性成分の 1 つである可能性を示している。一方、アフィニティー精製により結合しない画分として得られた OK-PTF は Th2 分化を誘導することが示されている。しかし、OK-PTF の原因物質については明らかではない。

そこで第 2 章では、OK-432 の抗腫瘍メカニズムの解明の一助として、Th2 分化を誘導を担う免疫活性成分の同定を目指して、OK-432 からの活性成分の抽出を試みるとともに、抽出物の性質について検討した結果を示した。

## 2. 材料及び方法

### 2-1. 細菌由来成分の調整

#### 2-1-1. OK-432（ピシバニール）

中外製薬(株)が製造販売する医薬品で、製品名ピシバニール、規制区分は生物由来製品/劇薬/指定医薬品/処方せん医薬品に指定されており、体の免疫機能を強化する抗悪性腫瘍剤（抗がん剤）で主な適応症はリンパ管腫である。*Streptococcus pyogenes* A 群 3 型弱毒 Su 株をペニシリン処理後に凍結乾燥した粉末で、主成分としての乾燥菌体以外に、硫酸マグネシウム、DL-メチオニン、マルトース、ベンジルペニシリンカリウム、リン酸二水素カリウム、水酸化ナトリウム、塩化ナトリウムを含む。

#### 2-1-2. OK-432 からの活性成分の抽出（Galanos 抽出）

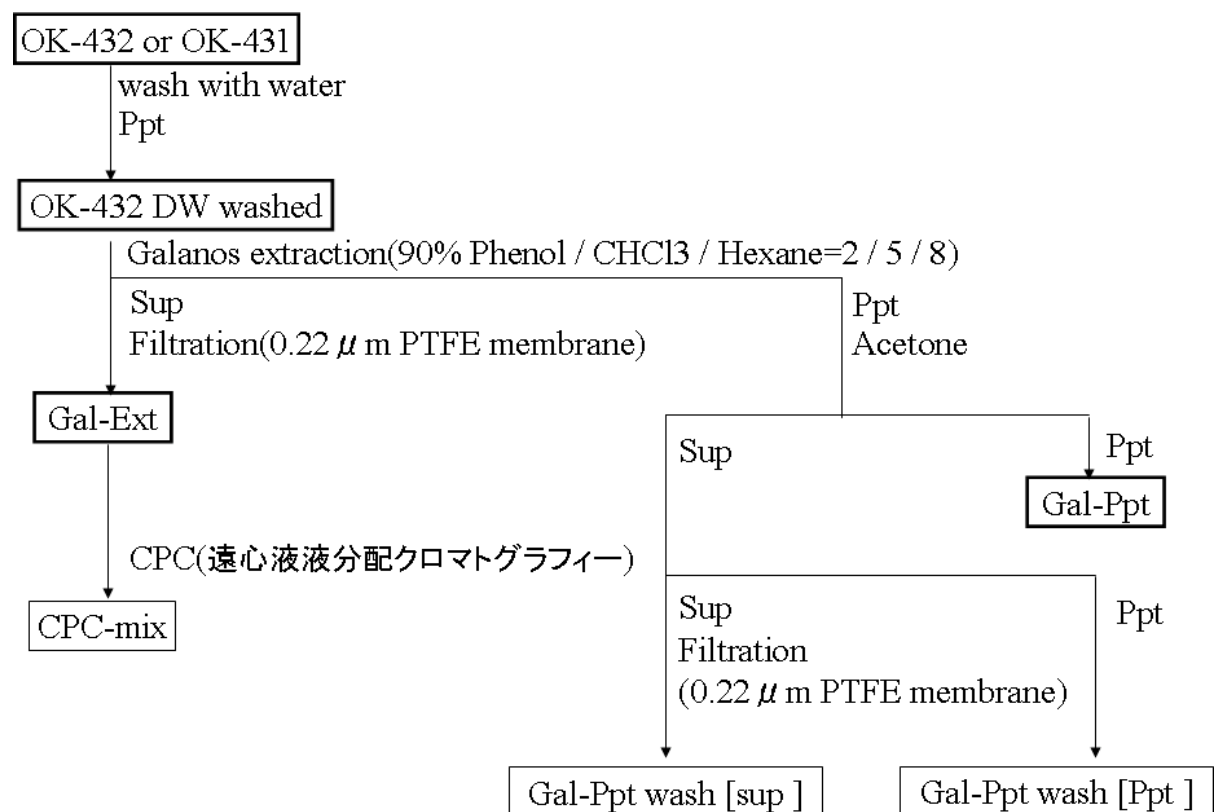
OK-432 を Scheme 1 に示した方法で処理することにより抽出物を得た。OK-432 に 10 mg/mL になるように大塚蒸留水を加え、1 分間 Vortex 処理後に遠心分離した。その操作を 2 回繰り返した後に凍結乾燥し、乾燥菌体 (OK-432w) を得た。OK-432w にフェノール／クロロホルム／ヘキサン = 2 : 5 : 8 （以後 PCH 液とする）を加え、超音波処理及び 20 分間の攪拌処理した後に、遠心分離（5000 rpm、20 分間、室温）により上清と沈殿物を分離した。沈殿物には再度 PCH 液を加え、同様の処理を計 3 回繰り返した。上清は混合した後、濃縮によりクロロホルム及びヘキサンを除去し、0.22  $\mu$ m メンブランフィルター (Millipore、マイレックス LG) でろ過し、透析・凍結乾燥を行い抽出物 (Gal-Ext) を得た。ろ過沈殿物にはアセトンを加え遠心分離（5000 rpm、20 分間、室温）することを 3 回繰り返す事により残渣 (Gal-ppt) を得た。

#### 2-1-3. OK-432 中の免疫活性化成分 (OK-PSA)

OK-432 中の免疫活性化成分である OK-PSA は徳島大学の岡本先生より恵与を受けた。

#### 2-1-4. その他細菌由来成分

大腸菌 O:111 由来の LPS は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 社から購入した。



**Scheme 1.** Galanos 抽出法による OK-432 からの免疫活性成分抽出



## 2-2. TLC 分析

試料をシリカゲルプレート (Merck、シリカゲル 60) にスポットし、クロロホルム／メタノール = 5.5 : 1.0 (A) またはクロロホルム／メタノール／酢酸／水 = 15 : 2 : 6 : 1 (B) の溶液を用いて展開させた。その後、リンモリブデン酸溶液に浸し、180°C で 1 分間加熱し可視化した。

## 2-3. TLC ブロットイング

Gal-Ext を TLC プレートにスポットした後に、展開溶媒 (A) で分離した。展開後に分離されたメインスポット (TLC-P1～TLC-P5) について semi-dry blotter AE-6677 (ATTO) を用いて熱によるニトロセルロース薄膜 (Bio-Rad) への転写を行った。ニトロセルロース薄膜に転写されたそれぞれのスポットは、クロロホルム／メタノール混合溶液に浸して抽出し、濃縮、凍結乾燥した。

## 2-4. 遠心液液分配クロマトグラフィー

(centrifugal liquid-liquid partition chromatography; CPC)

### 2-4-1. 溶液の調整

ヘプタン／クロロホルム／メタノール／1-ブタノール／酢酸／水 = 3 : 2 : 3 : 2 : 3 : 2 の割合で各溶液を混合した後に分液し、一昼夜静置した後の上層を固定相、下層を移動層として CPC に用いた。

### 2-4-2. CPC を用いた活性画分の分離

固定相を C.P.Chromatograph Model LLB-M 装置 (SANKI ENGINEERING LTD, KYOTO, JAPAN) に充填し移動層を通液して平衡化した後に、Gal-Ext を固定相 : 移動層 = 3:1 の溶媒に懸濁溶解したサンプルを導入した。サンプル導入後、遠心回転数を 1200 rpm、ascending モード、流速 2 mL/min の条件で、移動層を用いて溶出を行い、6 mL 毎に溶出液を分取した。分取した画分は TNF- $\alpha$  誘導活性を指標に分画し、活性画分 (CPC-Mix) を得た。

## 2-5. サイトカイン誘導活性試験

### 2-5-1. ヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) の調整

ヘパリン化ヒト末梢全血を等量の RPMI1640 (Sigma、3%メイロン含有) で希釈し、Histopaque1077 (Sigma) を下層にゆっくりと重層した後に、400 ×g で 30 分間室温で遠心分離した。血漿層と Histopaque 層の境界面の白濁層を回収し RPMI1640 で 2 回洗浄した後に、 $1 \times 10^6$  cells/mL 濃度になるように 10% FBS (Bio-Whittaker) 含有 RPMI1640 に懸濁し PBMC 懸濁液を得た。

### 2-5-2. PBMC によるサイトカイン誘導活性測定

細胞は 96 穴マイクロプレート上に 10% FBS 添加および無添加 RPMI-1640 を用いて、 $1 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ l 濃度になるように播種した。試料を生理食塩水（大塚製薬）で希釈した後に、PBMC 懸濁液を 4 倍量添加し、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 37°C、24 時間培養した。その後、培養液上清を回収し、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  測定キット (BIOSOURCE) を使用してメーカーのプロトコール通りにサイトカイン誘導活性を測定した。細胞が産生したサイトカイン濃度は、各々の試験系で同時に IL-6 の検量線を作成してそれとの比較により算出した。

## 2-6. FACS による樹状細胞からの CD86、class\_ 抗原の分化誘導活性測定

### 2-6-1. 樹状細胞調整

$3 \times 10^6$  cells/mL 濃度になるように PBMC 懸濁液を調整し、6 穴平底培養プレートに播種し、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で、37°C、1 時間培養した。ピペッティングにより浮遊細胞を回収した後に、接着細胞を PBS で洗浄した。各穴に IL-4、GM-CSF を混合した 10% FBS を含む RPMI1640 を添加し、同雰囲気下で 3 日間培養し単核球から未熟樹状細胞 (immature DC; iDC) へ分化誘導させた。

### 2-6-2. FACS (fluorescence activated cell sorting) 解析

2-6-1.で分化誘導した iDC に、試料を 10  $\mu$ L/well になるように加え、さらに 2 日間培養した。ピペッティングで細胞を剥離し回収した後、200 ×g、10 分間室温で遠心分離した。遠心分離後の上清はサイトカイン定量に用いた。回収した細胞は PBS

1 mL で再度洗浄した後に、各種蛍光抗体を加え 30 分間放置した。その後に 200 ×g、10 分間室温で遠心分離し、PBS で 2 回洗浄し、蛍光抗体結合細胞を得た。この細胞について、フローサイトメトリー (EPICS XL-MCL、Beckman) を用いて補助刺激分子 CD80、CD86、MHC class I、class II 抗原、DC 成熟化マーカー CD83 の発現量を測定した。

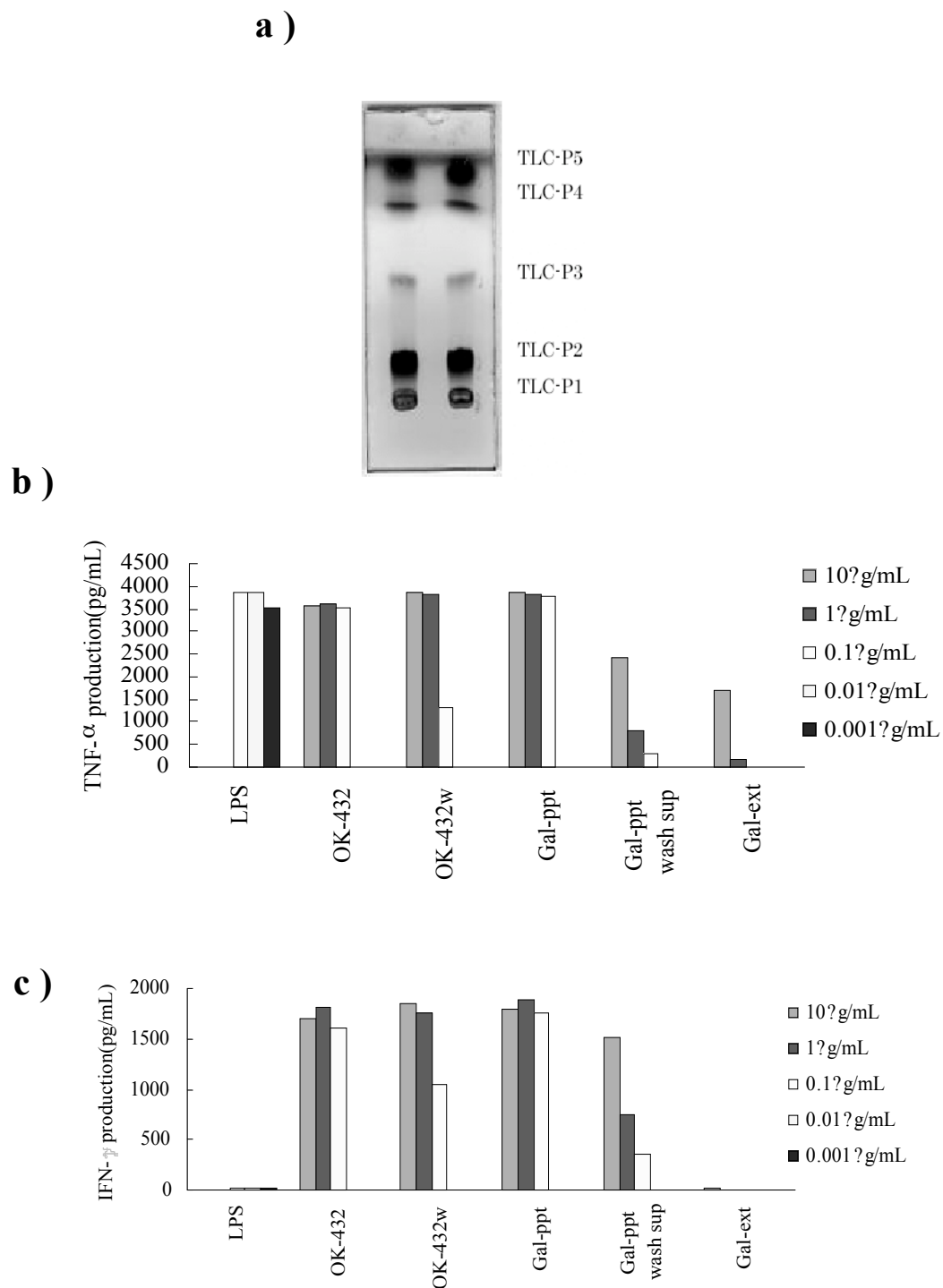
### 3. 結果

#### 3-1. OK-432 からの活性成分の抽出

OK-432 を洗浄した後の乾燥菌体 (OK-432w) を Galanos 抽出することにより抽出物 (Gal-Ext) と抽出後の残渣 (Gal-ppt) を得た。そこで、TLC 分析及び PBMC を用いた TNF- $\alpha$  及び IFN- $\gamma$  の誘導活性を検討した。TLC 分析の結果、Gal-Ext には TLC-P1 ~ TLC-P5 の主に5つのスポットが存在することが確認された (Fig. 1a)。IFN- $\gamma$  及び TNF- $\alpha$  誘導活性を測定した結果、OK-432 が IFN- $\gamma$  及び TNF- $\alpha$  ともに強い活性を示したのに比べ、Gal-Ext は IFN- $\gamma$  誘導活性を持たず、TNF- $\alpha$  誘導活性のみを持つことがわかった。一方 Gal-ppt は OK-432 同様に両活性を持つこともわかった (Fig. 1b, c)。またこの系で、LPS は TNF- $\alpha$  誘導活性のみ強い活性を示した。さらに Gal-Ext についてエンドトキシンの汚染が無いかどうかエンドスピー試験により Limulus 活性を測定したところ、LPS と比較して  $10^5$ – $10^7$  倍濃度でも活性は見られず、同一濃度での活性の強度と比較して LPS とは別のものであり、汚染は無いことがわかった。

#### 3-2. TLC ブロットニングによる活性成分の分析

まず、TLC による分離を試みた。Gal-Ext 中の5つのメインスポットについて、TLC ブロットニングによりそれぞれのスポットの分離を行い、サイトカイン誘導活性画分の同定を行った。TLC で展開した後、それぞれのスポットを別々のメンブランに熱転写し、クロロホルム/メタノール溶媒でメンブランから成分を回収した。TLC 分析の結果、5つのメインスポット (TLC-P1 ~ TLC-P5) がそれぞれ分離されていることが確認された (Fig. 2a)。それぞれの成分及び陰性コントロールとしてサンプル無負荷で同様に展開、熱転写、回収したもの (TLC-P6) について、TNF- $\alpha$  誘導活性を測定した結果、TLC-P1 にのみ活性が存在した。 (Fig. 2b)



**Fig. 1. Galanos 抽出画分の PBMC からのサイトカイン誘導活性**

Galanos 抽出画分について展開溶媒にクロロフォルム／メタノール = 5.5 : 1.0 を用いて TLC 分析を実施した (a)。また、OK-432 及び Galanos 抽出により得られた画分を用いてヒト PBMC を刺激したときの TNF- $\alpha$  (b) 及び IFN- $\gamma$  (c) 誘導活性について測定した。PBMC は健常人のボランティアの血液から得た後に、上記濃度で 24 時間刺激した。培養上清中のサイトカインのレベルは ELISA で測定した。

### 3-3. CPC による活性成分の精製

次に CPC による分離を試みた。固定相を CPC 装置に充填した後に Gal-Ext を固定相／移動相= 3 : 1 溶媒に溶解して負荷し、移動相を通液して分取を行った。分取した各溶出画分について TLC により確認したところ、Fr. 15-28 に TLC-P1 を含むことがわかった (Fig. 3a)。また、TNF- $\alpha$  誘導活性を測定したところ、TLC-P1 を含む画分のなかで Fr. 15-16 に強い TNF- $\alpha$  誘導活性がみられた (Fig. 3b)。そこで、展開溶媒の組成を変更して更に詳細な TLC 分析を行ったところ、TLC-P1 はメインスポット以外に少なくとも 2-3 個のスポットが存在することが明らかになった (Fig. 3c)。そこでこれらの活性画分を混合し、CPC-mix とした。

### 3-4. 樹状細胞活性化の検討

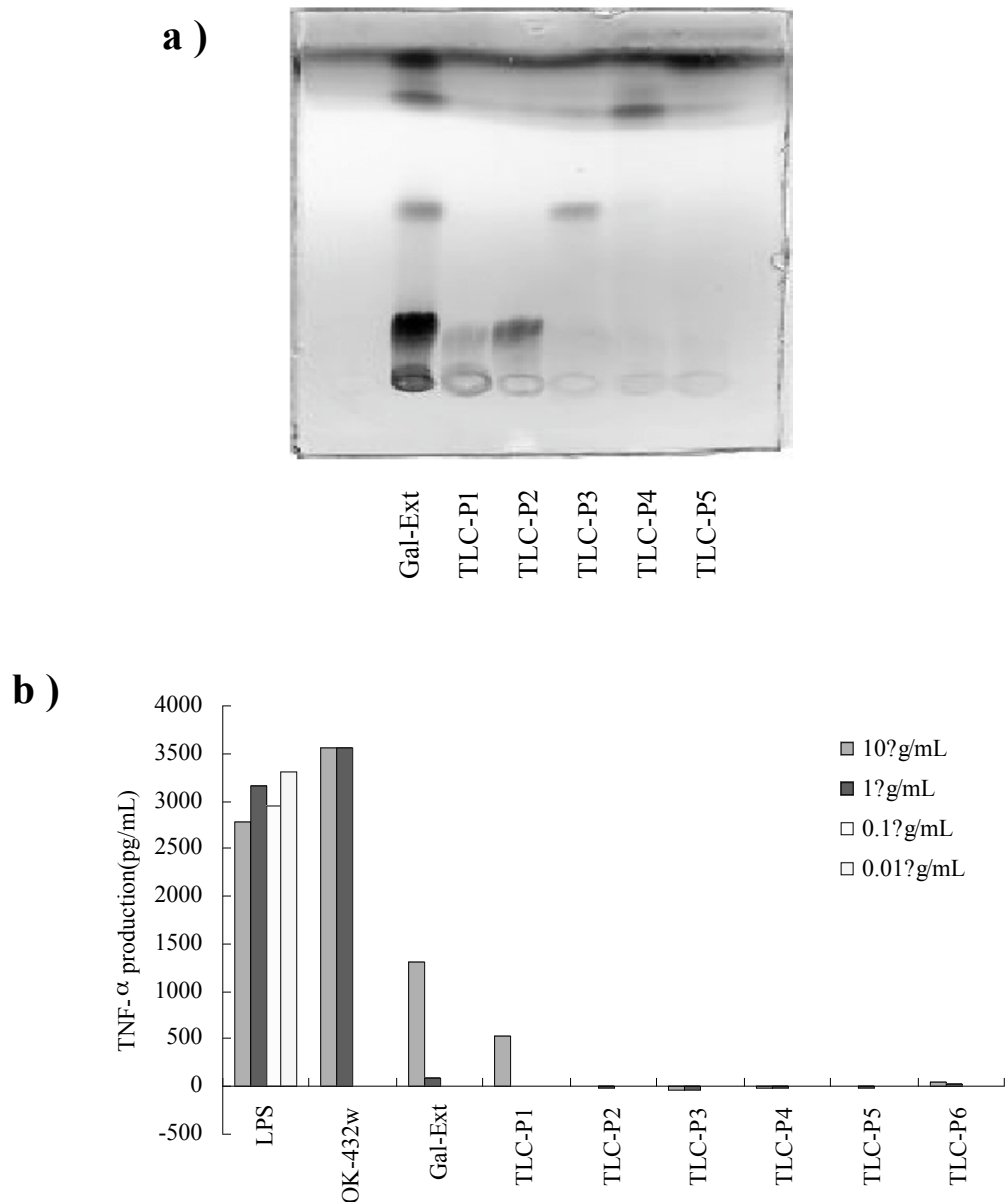
Gal-Ext 及び CPC-mix が、ヒト DC 細胞を刺激し、DC 細胞表面上に MHC や CD を発現するかどうかを検討した。

#### 3-4-1. iDC 表面上での補助刺激分子 CD80、CD86 の発現量測定

Gal-ext および CPC-mix を用いてヒト DC 細胞を刺激したあと、FACS を用いて、iDC 表面の CD80、CD86 等補助刺激分子の発現を検討した。陽性コントロールである OK-PSA は顕著に CD80、CD86 等の補助刺激分子の発現量が増加したが、Gal-ext および CPC-mix はそれらの発現量は増加しなかった (Fig. 4)。

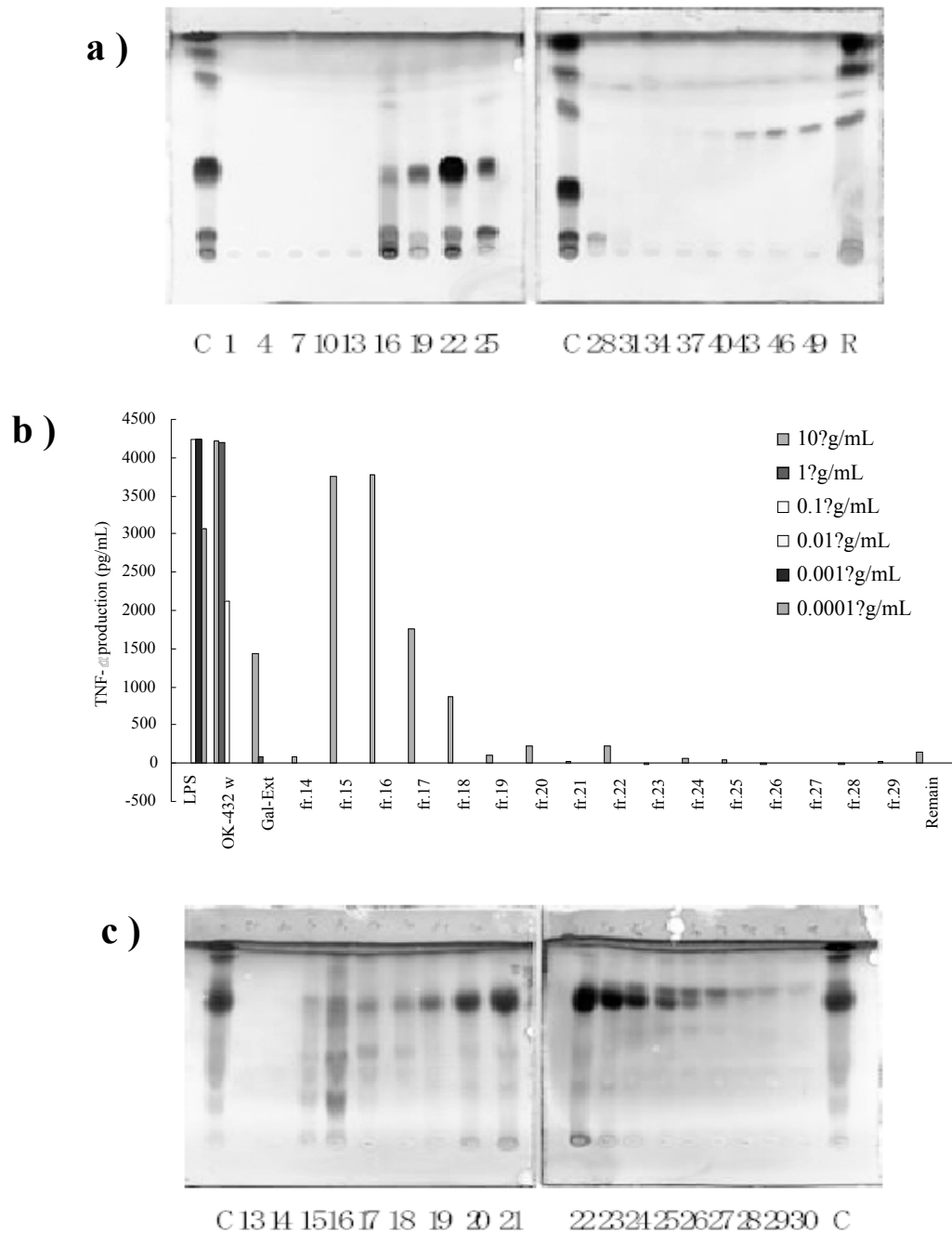
#### 3-4-2. iDC 表面上での DC 成熟化マーカー CD83 の発現量測定

3-4-1. と同様に DC 成熟化マーカーである CD83 の発現を FACS を用いて測定した。その結果、OK-432 や OK-PSA は顕著に DC 成熟化マーカーである CD83 の発現量が増加したが、Gal-ext および CPC-mix はその発現量は増加しなかった (Fig. 4)。



**Fig. 2. TLC ブロットニング法による Galanos 抽出画分中の活性画分の解析**

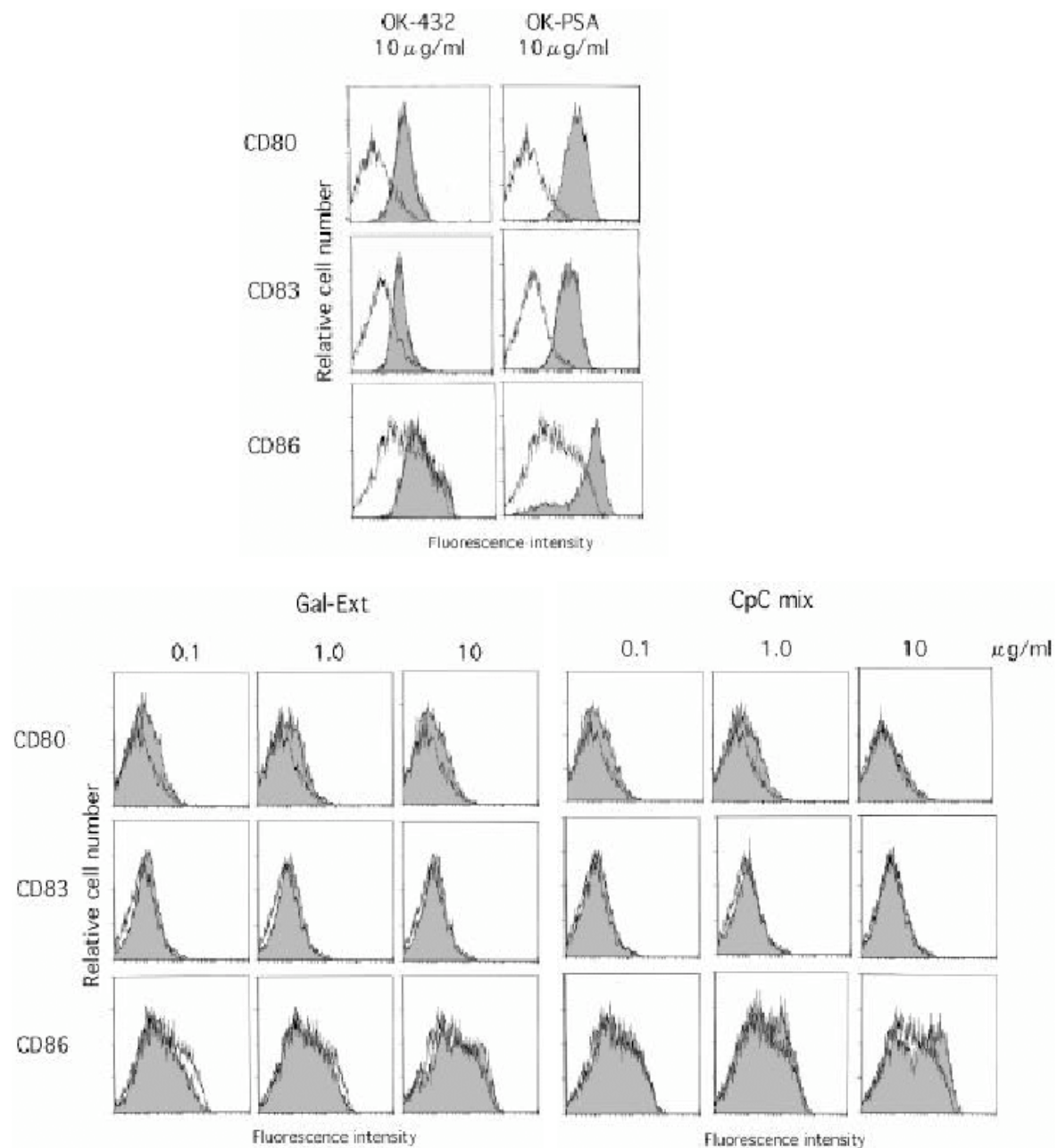
TLC ブロットニングにより展開溶媒にはクロロフォルム／メタノール= 5.5 : 1.0 の溶媒を用いて Gal-Ext を展開した後に、各スポットをニトロセルロース薄膜に熱転写した。ニトロセルロース薄膜から各成分を回収した後に再度 TLC 分析により解析した (a)。また、分離した各成分を用いてヒト PBMC を刺激したときの TNF- $\alpha$  (b) 誘導活性について測定した。PBMC は健常人のボランティアの血液から得た後に、上記濃度で 24 時間刺激した。培養上清中のサイトカインのレベルは ELISA で測定した。



**Fig. 3. CPC を用いた Galanos 抽出画分中の活性成分の精製**

CPC (遠心液\_液分配クロマトグラフィー) により Galanos 抽出画分の精製を行った。C は導入サンプル、数字はフラクション番号、R は精製後のカラム内残留物を示す。溶出後の各フラクションは、展開溶媒にクロロフォルム/メタノール=5.5 : 1.0 (a) 及びクロロフォルム/メタノール/酢酸/水 = 15 : 2 : 6 : 1 (c) を用いて TLC により解析した。また、分取画分を用いてヒト PBMC を刺激したときの TNF- $\alpha$  (b) 誘導活性について測定した。PBMC は健常人のボランティアの血液から得た後に、上記濃度で 24 時間刺激した。培養上清中のサイトカインのレベルは ELISA で測定した。





**Fig. 4. Galanos 抽出画分の DC 表面マーカーの発現への影響**

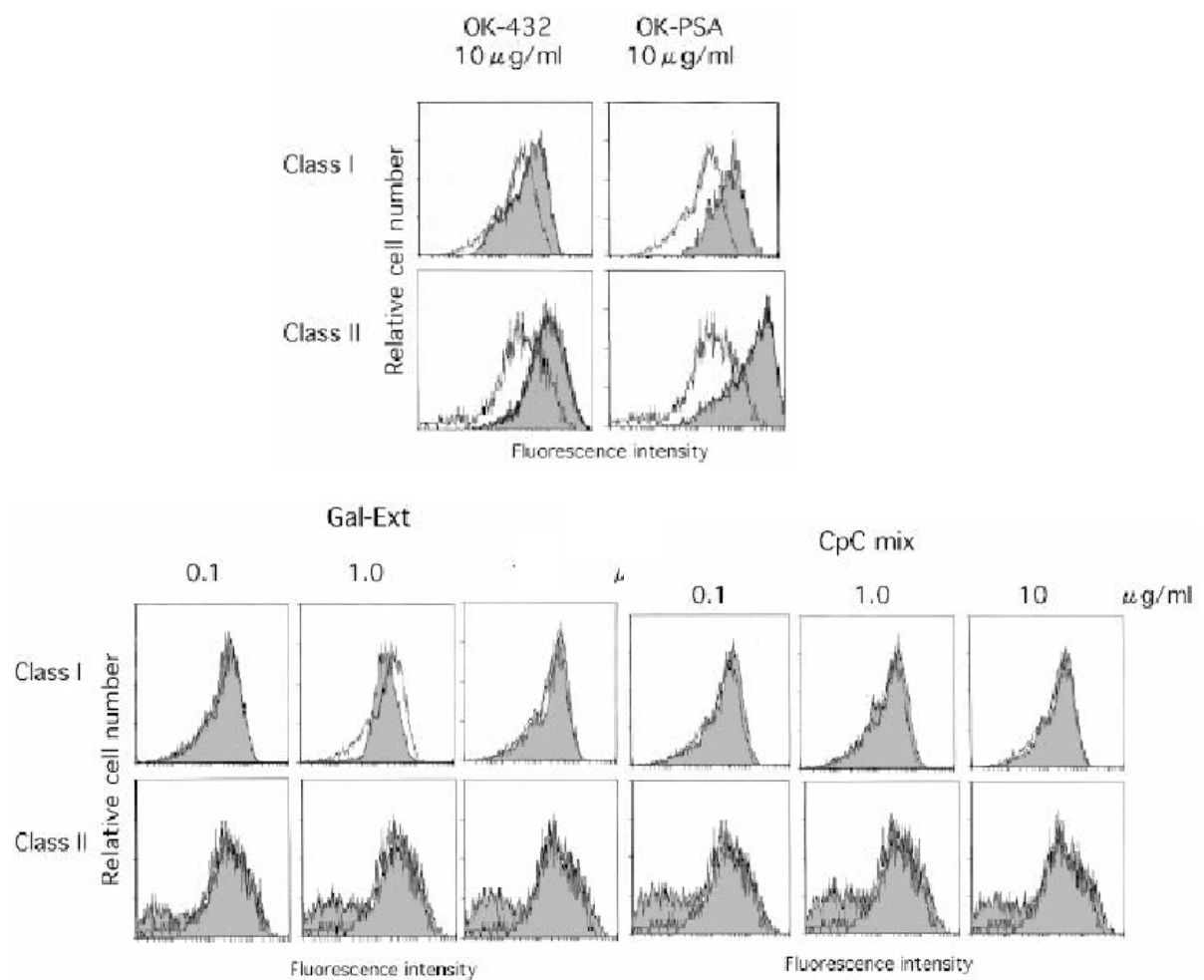
マウス骨髄細胞を GM-CSF および IL-4 存在下に 6 日間培養することにより iDC を誘導した。iDC をそれぞれの画分で 2 日間刺激した後に、DC 表面の DC 成熟マーカー CD83 や補助刺激分子 CD80、CD86 の発現を FACS により解析した。

### 3-4-3. iDC 細胞表面上での MHC 発現量

3-4-1. と同様に iDC 表面の MHC class I、class II の発現を FACS を用いて測定した。その結果、OK-432 や OK-PSA は顕著に MHC class I、class II 両方の発現量が増加したが、Gal-ext および CPC-mix はそれらの発現量は増強しなかった (Fig. 5)。

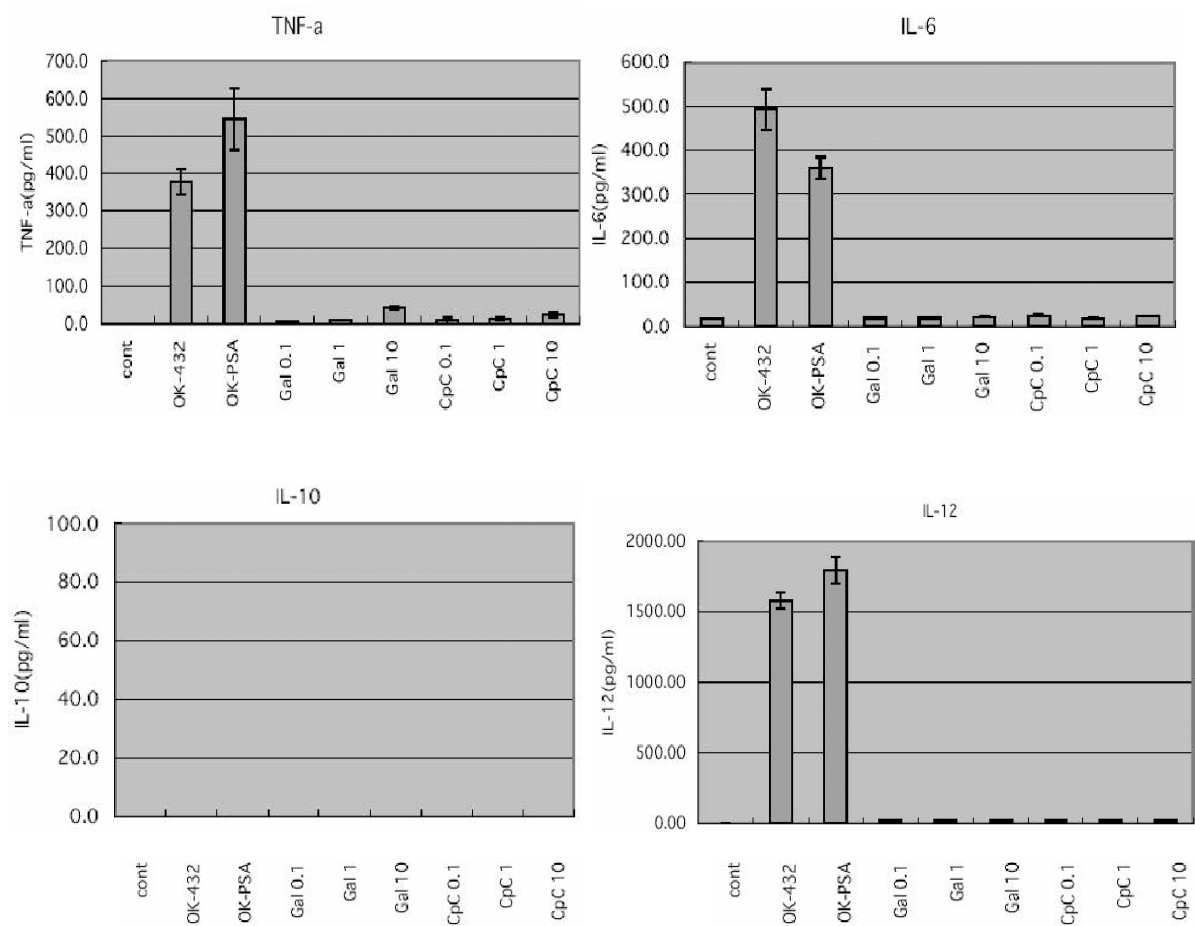
### 3-4-4. iDC からの各種サイトカイン誘導活性測定

3-4-1. と同様に Gal-ext および CPC-mix を用いて iDC を刺激した後に、得られた培養上清を用いて TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10、及び IL-12 の誘導活性測定を行った。その結果、OK-432 や OK-PSA は顕著に TNF- $\alpha$ 、IL-6、及び IL-12 の誘導活性を示したが、Th2 タイプのサイトカインである IL-10 の誘導活性は示さなかった。Gal-Ext や CPC-mix は TNF- $\alpha$  誘導活性が微弱に存在したものの、IL-12、IL-6 及び IL-10 の誘導活性はみられなかった (Fig. 6)。



**Fig. 5. Galanos 抽出画分の DC 表面マーカーの発現への影響**

マウス骨髄細胞を GM-CSF および IL-4 存在下に 6 日間培養することにより iDC を誘導した。iDC をそれぞれの画分で 2 日間刺激した後に、DC 表面の Class I、Class II 分子の発現を FACS により解析した。



**Fig. 6. Galanos 抽出画分の DC からのサイトカイン誘導活性**

マウス骨髄細胞を GM-CSF および IL-4 存在下に 6 日間培養することにより iDC を誘導した。iDC をそれぞれの画分で 2 日間刺激した後に、培養上清中のサイトカインのレベルを ELISA で測定した。

#### 4. 考察

OK-432 は様々なサイトカインを誘導し、強力な抗腫瘍活性を保有しているが、どの分子が直接働いているか不明な点が多い。

これまでに徳島大学の岡本らは、OK-432 の抗腫瘍活性において最も重要な働きをしていることが知られている IFN- $\gamma$  の誘導に着目して研究を行っており、OK-432 の IFN- $\gamma$  誘導部位を認識するマウス単クローン抗体 (TS-2) を産生するハイブリドーマクローンを開発している。そして、TS-2 抗体を結合させたアフィニティカラムを用いて OK-432 のブタノール抽出物より IFN- $\gamma$  誘導物質 (OK-PSA) を得た。また OK-PSA が LTA に類似した分子量 70 万の糖脂質であり、ヒト末梢単核球を *in vitro* において刺激して IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 ならびに IL-12 等を誘導すること、また NK、LAK 活性も誘導することを明らかとした。これらの研究結果は、OK-PSA が OK-432 のサイトカイン誘導、抗腫瘍に働く分子として重要な役割を担っており、また OK-PSA が OK-432 から調製される化学構造の明確にされた有効な BRM となる可能性を示唆している。また OK-PSA 以外にも TLR-9 を介して抗腫瘍効果を示す活性成分 OK-DNA の存在を示しており (7)、OK-432 が少なくとも 2 種類の活性成分を保有し、それぞれ異なった経路を介して抗腫瘍免疫活性を発現することを明らかとした。これらの結果から、OK-432 が樹状細胞療法の効果的なアジュバントとなることも強く示唆している (8)。

今回我々が、OK-432 からの活性成分の抽出に用いた Galanos 法は、元来グラム陰性菌の複合糖質の抽出に用いられている手法で、グラム陽性菌に対して用いられることは稀である。今回得た抽出物である Gal-Ext はフィルターろ過処理後も活性を保有しており、ヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) に対して TNF- $\alpha$  活性を示す、固形物を含まない可溶性の抽出物であった。

OK-PSA は、DC 細胞表面に CD80 や CD86 の補助刺激分子や MHC class I、class II を発現し、ヘルパー T 細胞を活性化し、さらに Th1/Th2 バランスを Th1 優位にすることにより抗腫瘍効果を示すと報告されている。しかし、Gal-Ext を用いて iDC を刺激しても iDC 細胞表面上に抗原提示される MHC class I、class II の発現

量や、ヘルパー T 細胞が抗原認識する際に必要な CD80、CD86 の発現に変化が見られず、マクロファージや DC が抗原提示する際に産生する IL-12 の誘導活性も示さなかった。このことは、Gal-Ext が DC の抗原提示能に影響を与えないことを示している。また、DC 成熟化マーカーである CD83 の発現も見られないこと、TNF- $\alpha$  誘導活性を微弱に有するものの、IL-6、IL-10、及び IL-12 の誘導活性も示さなかったことから、DC 自体の活性化もほとんど引き起こさないことがわかった。以上のことから Gal-Ext は、OK-PSA とは違う経路で活性を示す物質であることが示唆された。

また、Gal-Ext はヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) に対して TNF- $\alpha$  誘導活性を示すが、単球から刺激分化した iDC ではその活性が減少している。さらに、マクロファージや樹状細胞からのシグナルを受け分化誘導される Th 細胞のうち Th1 細胞が産生する IFN- $\gamma$  や Th2 細胞が産生する IL-10 の誘導活性も見られない。以上の結果は、Gal-Ext には iDC を介して T 細胞を活性化させ、Th1 系の免疫活性を増強させる OK-PSA とは全く異なった免疫活性成分が存在することを示している。OK-432 の作用機序として直接作用、好中球を介した経路、マクロファージに取り込まれてサイトカインを産生し、非特異的に作用するという経路が証明されており (9)、Gal-Ext は DC を介して免疫活性を示すのではなく、直接免疫活性を鼓舞する直接作用や好中球を介した経路の活性化に関与する新規の物質である可能性が示唆された。

この検討により、強力な癌免疫療法剤として臨床の場で使用されている OK-432 には未知の活性成分の存在が示唆された。またこの活性成分を含む Ga-Ext は、現在明らかにされている OK-432 の活性成分とは異なるサイトカイン誘導活性や MHC、CD 発現や提示パターンを示し、OK-432 には免疫応答に関与する成分がさらに存在する可能性が示唆された。また、それらが複雑に作用することにより、OK-432 の抗腫瘍効果を調整していることが予想された。

## 参考文献

- (1) Oshikawa, T., Okamoto, M., Tano, T., Sasai, A., Kan, S., Moriya, Y., Ryoma, Y., Saito, M., Akira, S. and Sato, M. (2006) *J. Immunother.* 29: 143-150.
- (2) Morrison, D. C. and Leive, L. (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 2911-2919.
- (3) Morath, S., Geyer, A. and Hartung, T. (2001) *J. Exp. Med.* 193: 393-397.
- (4) Okamoto, M., Kaji, R., Kasetani, H., Yoshida, H., Moriya, Y., Saito, M. and Sato, M. (1993) *J. Immunother.* 13: 232-242.
- (5) Oshikawa, T., Okamoto, M., Ohe, G., Furuichi, S., Nishikawa, H., Uddin, A. S., Yoshida, H., Moriya, Y., Matsubara, S., Ryoma, Y., Saito, M. and Sato M. (2003) *Int. Immunopharmacol.* 3: 643-655.
- (6) Okamoto, M., Ohe, G., Oshikawa, T., Nishikawa, H., Furuichi, S., Yoshida, H., Matsuno, T., Saito, M. and Sato, M. (2000) *Immunopharmacology.* 49: 363-376.
- (7) Oshikawa, T., Okamoto, M. et al. (2005) *Jpn. J. Cancer. Immunother.* 32: 1559-1561.
- (8) Okamoto, M., Oshikawa, T., Tano, T., Ahmed, S. U., Kan, S., Sasaki, A., Akashi, S., Miyake, K., Moriya, Y., Ryoma, Y., Saito, M. and Sato, M. (2006) *J. Immunother.* (29): 78-86.
- (9) Yamaguchi, Y. (1999) *Therapeutic Research* 20: 63-68.

### 第三章 腸内球菌由来免疫活性成分の検討

#### 1. 序論

第 2 章で示したように、Gal-Ext は DC を介して免疫活性を示すのではなく、直接免疫活性を鼓舞する直接作用や好中球を介して作用する経路を活性化する新規の成分である可能性が強く示唆されている。しかし、全菌体からの収率は低く、さらに 2 – 3 種類の成分が混在している可能性が示唆されたため、そのまま活性成分を追及することは困難であった。また、OK-432 には癌免疫応答に関与する種々の成分が Gal-ext 以外に存在する可能性も示唆されており、更なる抽出法の改善が必要であると考えられた。しかし、OK-432 の入手には制限があり、OK-432 を用いた検討は困難であった。そこで本章では、OK-432 中の未知の成分の検討を推進するために、同様のグラム陽性菌である腸内球菌 *E. hirae* をモデルとして活性成分の検討をおこなった。

古くからグラム陽性菌の免疫活性化物質成分としてリポタイコ酸 (LTA) が知られていた。しかし、その活性中心の構造については不明であり、その決定が望まれていた。以前、大阪大学の楠本・深瀬らは、*E. hirae* や *S. pyogenes* 由来 LTA の基本構造とそれらの糖脂質アンカー部分の構造をもとにして、化学合成により複合糖質を合成した (1, 2)。しかしながら、これらの合成品は免疫刺激活性を示さず、提案されている LTA 構造が活性の原因ではないことを示唆した (3)。そこで再検討を行った結果、温水–フェノール (PhOH) 抽出法を用いて *E. hirae* から抽出した LTA 画分が、サイトカイン誘導活性を持つ微量画分と活性を持たない主成分に分離できることが分かった (4)。さらに、活性を持たない主成分の構造が LTA の構造と同一であることも見いだした (5)。これらの結果は、LTA 画分中に共雑している微量の活性成分が免疫刺激に関わっていることを示唆している。

一方で、*S. aureus* 由来 LTA の構造と機能の関係が最近報告された。ドイツの Morath らは、ブタノール–水 (BuOH) 抽出法で得た粗抽出物を、疎水性相互作用クロマトグラフィーにより精製した LTA を用いて、LTA 自身がサイトカイン産生



を誘導することを報告した (6)。さらに、LTA とその糖脂質部分を合成し、合成 LTA が天然型 LTA と同様の活性を示すこと、また糖脂質部分も弱い活性を持つことも示し (7)、LTA が *S. aureus* 中の有力な免疫刺激活性成分であると結論した。

しかし、*S. aureus* の結論は、*E. hirae* を用いた我々のデータと一致しない。矛盾の原因の一つとして、LTA 構造の違いの影響が考えられる。例えば *E. hirae* の LTA の糖脂質アンカーはコージビオシル構造であり、*S. aureus* のゲンチオビオシル構造と異なる。また、*E. hirae* の LTA のポリグリセロールリン酸中のグリセロールは部分的にアラニル化されたオリゴグルコシル基で置換されているが、*S. aureus* の LTA では D-アラニル基およびグルコサミン基で置換されているなどの相違がある。また、*S. aureus* とは異なるリビトールリン酸構造を持つ *S. pneumoniae* (肺炎連鎖球菌) 由来の LTA (8) が *S. aureus* LTA の 1/100 の活性しか示さないという別の報告 (9) もあり、構造と活性には一定の相関関係がある可能性は否定できない。

また、抽出法の違いが活性に影響を与える可能性も示唆されている。Morath らは、*S. aureus* 由来の LTA 分子に含まれる D-アラニン含量が活性に重大な役割を果たすことを報告している (6)。すなわち、活性 LTA のアルカリ加水分解が LTA におけるアラニン置換の減少を引き起こし、活性を低下させることを示した。また細菌を PhOH 抽出した場合はアラニン含量が減少するが、BuOH 抽出はアラニンの加水分解を防ぐことも示された。これらは、PhOH 抽出された *E. hirae* の LTA に活性が無いことの原因であるかもしれない。しかし、*E. hirae* の LTA 画分に含まれる微量サイトカイン誘導活性成分については議論されておらず、その成分の役割については未知である。

そこで、第 3 章では、OK-432 と同じグラム陽性菌である *E. hirae* の LTA 画分中の活性成分を対象にして、グラム陽性菌の活性成分を再検討することとした。以下には、活性成分に対する活性中和抗体を作成し、その性質を検討した結果を示した。また、それらの結果をもとに OK-432 中に含まれる免疫活性化成分に関して考察した。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 細菌由来成分の調整

#### 2-1-1. LTA 画分の調整

*E. hirae* を Scheme 1 に示した方法で処理することにより抽出物を得た。*E. hirae* ATCC 9790 および *S. aureus* DSM 20231 菌体は以前に記載された方法で培養した (4)。粗 LTA 画分の抽出は BuOH 抽出法 (6) を用いて行った。粗抽出画分はデオキシリボヌクレアーゼとリボヌクレアーゼで処理して核酸を消化し、その後 Octyl Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) を使用して疎水性カラムクロマトグラフィーに供試した。試料は、1-プロパノール濃度 (15、40、60%) をステップワイズに変化させてバッチ法により溶出した (5)。LTA は 40% 1-プロパノール画分で主に溶出されたため、それらの画分を LTA 画分として使用し、それぞれ *E. hirae* 由来は Eh-B40、*S. aureus* 由来は Sa-B40 と称した。

#### 2-1-2. LTA 画分中の微量免疫活性化成分の調整

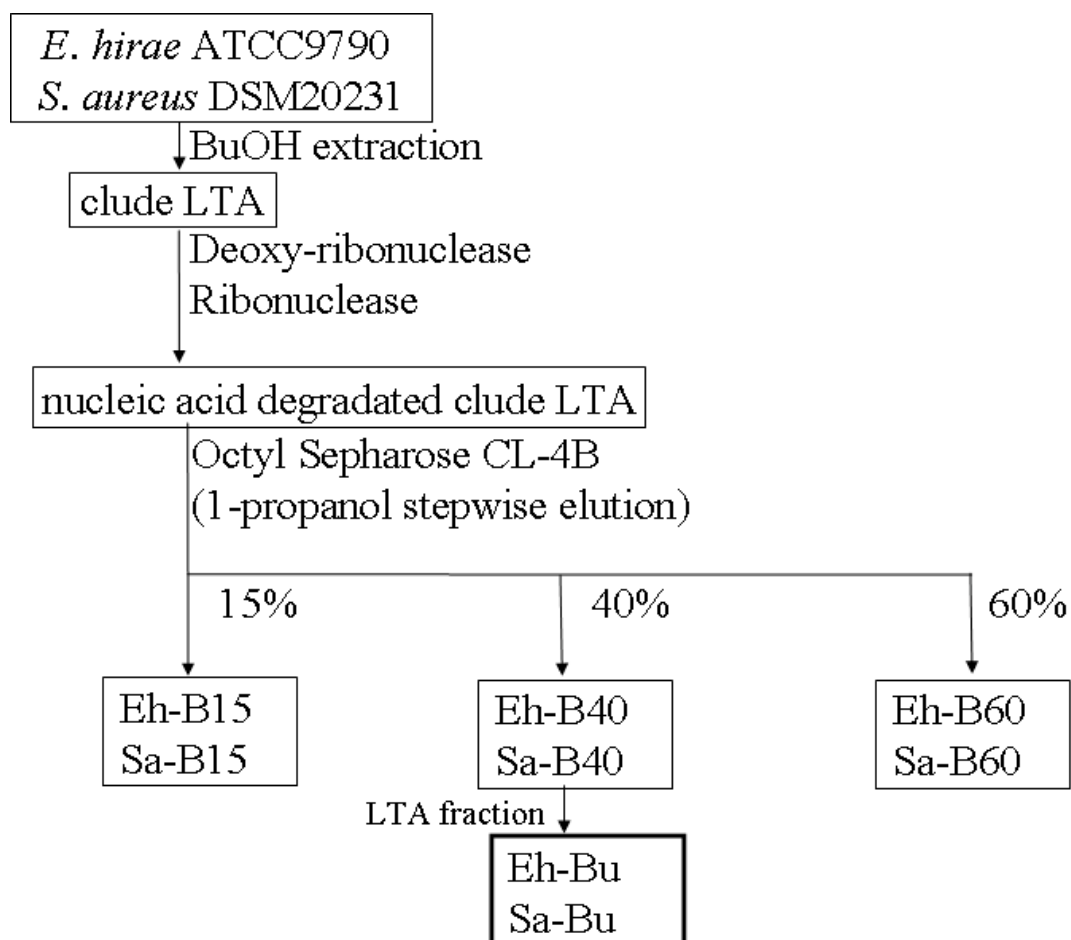
以前に本研究室において *E. hirae* LTA から調整された免疫刺激活性を持つ画分、HGL-A、HGL-B1 および HGL-B2 (10) を混合し、EhAF として免疫に使用した。*E. hirae* からの免疫活性成分の抽出は Scheme 2 に示した方法で行った。

#### 2-1-3. その他細菌由来成分

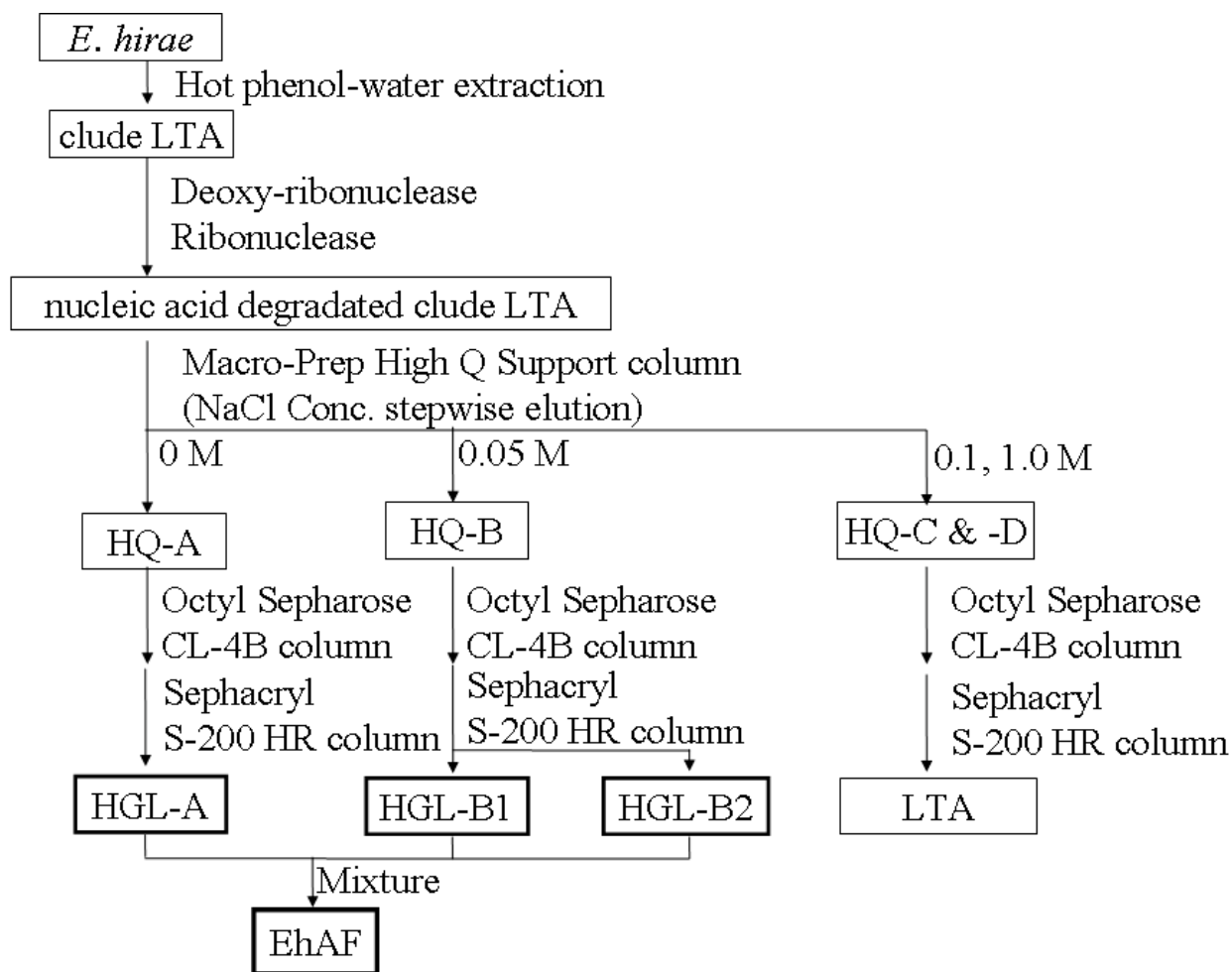
LTA の糖脂質アンカーである *E. hirae* の  $\beta$ -コージビオシルジパルミトイルグリセロール (1) と *S. aureus* の  $\beta$ -ゲンチオビオシルジパルミトイルグリセロールは、大阪大学の深瀬らにより合成されたものを用いた。

大腸菌 O:111 由来の LPS は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 社から購入し、デオキシコール酸ナトリウムを用いたフェノール再抽出により再度精製を行った (11)。

ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) およびホスファチジルイノシトール (PI) も Sigma-Aldrich 社製のものを使用した。



**Scheme 1.** BuOH 抽出法によるグラム陽性菌からの LTA 画分の抽出



**Scheme 2.** Hot phenol-water 抽出法による *E. hirae* からの免疫活性成分抽出

合成リポペプチド Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>、O,O'-ジアシル型 Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub>、FSL-1、N-アシル型 PamCSK<sub>4</sub>、及び脱アシル型の dhCSK<sub>4</sub> は、EMC microcollections (Tübingen, Germany) から購入した。

LTA のモノクローナル抗体は Biogenesis (England, UK) から購入した。

## 2-2. mAbEh1 の作製

モノクローナル抗体、mAbEh1 は標準的な方法で作製した。すなわち、BALB/c マウスは、0 日目および 21 日目に、フロイントの完全アジュバント (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) と共に EhAF (0.25 mg/マウス) で免疫した。24 日目に犠牲死させた後に脾臓細胞を得て、SP2/0-Ag14 骨髓細胞と融合した。ハイブリドーマ細胞は HAT 培地で培養し、限界希釈法によってサブクローンを得た。

EhAF の活性を中和する抗体を産生するハイブリドーマは、300 ng/ml の EhAF で刺激した THP-1 細胞の IL-6 産生を抑制する効果を基にスクリーニングし、その抗体を mAbEh1 とした。ハイブリドーマは CD ハイブリドーマ培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) で培養し、培養上清は抗体溶液として使用した。抗体は、BioGel A5m (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いたゲル濾過クロマトグラフィで精製した。抗体のアイソタイプは、mouse monoclonal isotyping kit (Serotech, Oxford, UK) を用いて行った。アイソタイプ決定時に用いたコントロールの抗体は e-Bioscience (San Diego, CA) から購入した。

## 2-3. サイトカインアッセイ

### 2-3-1. 使用細胞の調整

ヒト単球性白血病細胞株である THP-1 は、Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan) から購入し、10% ウシ胎児血清 (FBS; MBL, Nagoya, Japan)、50 µg/ml ペニシリン及び 50 µg/ml ストレプトマイシン含有の RPMI-1640 (Sigma) で培養した。THP-1 は、使用3日前より 10<sup>-7</sup> M の 1,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> (DHVD<sub>3</sub>) で処理し、マクロファージに分化させた後に使用した。ヒトの末梢血単核細胞 (PBMC) は、健康なボランティアから得たヘパリン化ヒト末梢血を Histopaque 1077 (シグマ) 密度勾配遠心分離することにより得た。

### 2-3-2. サイトカインアッセイ

細胞は96穴マイクロプレート上に 10% FBS 添加および無添加 RPMI-1640 を用いて、 $1 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ l 濃度になるようによく播種した。mAbEh1 を添加または無添加の状態で指定濃度の Eh-AF で24時間刺激した。その後、培養液上清を回収し、IL-6 ELISA kit (R&D systems、Minneapolis、MN) を用いてメーカーのプロトコール通りに分析した。細胞が産生した IL-6 濃度は、各々の試験系で同時に IL-6 の検量線を作成してそれとの比較により算出し、平均値 $\pm$ 標準偏差を決定した。

FBS と mAbEh1 の阻害作用は、Welch's *t* 検定を用いて統計的に評価した。図中のアスタリスク 1 つは危険率 0.05 以下 ( $p < 0.05$ )、2 つのアスタリスクは危険率 0.01 以下 ( $p < 0.05$ )、および 3 つのアスタリスクは危険率 0.001 以下 ( $p < 0.05$ ) を示している。

### 2-4. ルシフェラーゼアッセイ

#### 2-4-1. 使用細胞

NF- $\kappa$ B/DNA 結合活性に依存して転写されるルシフェラーゼレポーター遺伝子 p55IgkLuc を安定して発現する Ba/F3 細胞 (Ba/ $\kappa$ B)、マウス TLR2 および p55IgkLuc レポーター発現細胞 (Ba/mTLR2)、マウス TLR4/MD-2 および p55IgkLuc レポーター (Ba/mTLR4/mMD-2) 発現細胞は大学医科学研究所の三宅教授より恵与を受けた。

#### 2-4-2. ルシフェラーゼ活性測定

2-4-1. で記した細胞における NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェラーゼ活性は以下のように測定した。

細胞は 96 穴平底マイクロプレートに  $1 \times 10^5$  cells/80  $\mu$ l RPMI-1640、10% FBS になるように播種し、指定のサンプル濃度で刺激した。37°C、5% CO<sub>2</sub>、多湿雰囲気下で 4 時間インキュベートした後に、80  $\mu$ l の Bright-Glo™ ルシフェラーゼアッセイ試薬 (Promega、Madison WI) をそれぞれ添加した。また、発光量は、ルミノメーター ARVO SX multilabel counter (Perkin Elmer、Wellesley、MA) で測定した。

試験結果は、それぞれの細胞株において、サンプル非刺激時の発光量に対するサンプル刺激時の発光量の割合として相対的なルシフェラーゼ活性として示された。

## 2-5. 免疫ブロッティング

SDS-PAGE は、15%のゲルを使用し、ミニ PAGE 泳動槽 AE-6530 および AE-8450 パワーサプライ (ATTO) を用いて、トリス・グリシン法により行なった。

ゲル中の成分は、セミドライ転写機 AE-6677 (ATTO) を用いてニトロセルロース薄膜 (Bio-Rad) に転写した。

ドットブロット分析については、ニトロセルロース薄膜上にサンプル溶液を浸した後に、空气中で乾燥した。薄膜は、ブロッッキングバッファー (0.05% tween 20、3% スキムミルク含有 TBS) 中で 4°C で 12 時間インキュベートした後に、希釈溶液 (0.05% tween 20、1% スキムミルク含有 TBS) で 1/100 に希釈した mABEh1 に室温で 2 時間インキュベートした。希釈溶液で 1/2000 に希釈したペルオキシダーゼ標識 2 次抗体 (KPL、Gaithersburg、MD) を用いて 2 時間インキュベートした後に、ECL (Amersham Bioscience) で化学発光させ、発光分析器 LAS-1000 (Fuji Film、Kanagawa、Japan) を用いて記録した。

### 3. 結果

#### 3-1. LTA 画分の調整

*E. hirae* 及び *S. aureus* 菌体を BuOH 抽出し、それぞれ 1.5-2.1% と 1.6-2.6% の回収率で LTA 画分を得た。抽出物をヌクレアーゼ処理した後に、疎水性クロマトグラフィーで精製することにより、*E. hirae* の LTA 画分から回収率 15-28% で Eh-B40 を、*S. aureus* の LTA 画分から回収率 12-27% で Sa-B40 をそれぞれ得た。これらの画分は、両方ともヒト PBMC の系で IL-6 誘導活性を示した (Fig. 1)。

以前、当研究室において、THP-1 細胞を活性画分で刺激する際 FBS が存在すると IL-6 産生量が低下することを見いだしている (10)。今回も同様に、FBS の存在の影響について検討した結果、Eh-B40 および Sa-B40 の活性も、FBS の存在下で誘導活性が減少することがわかった (Fig. 1)。

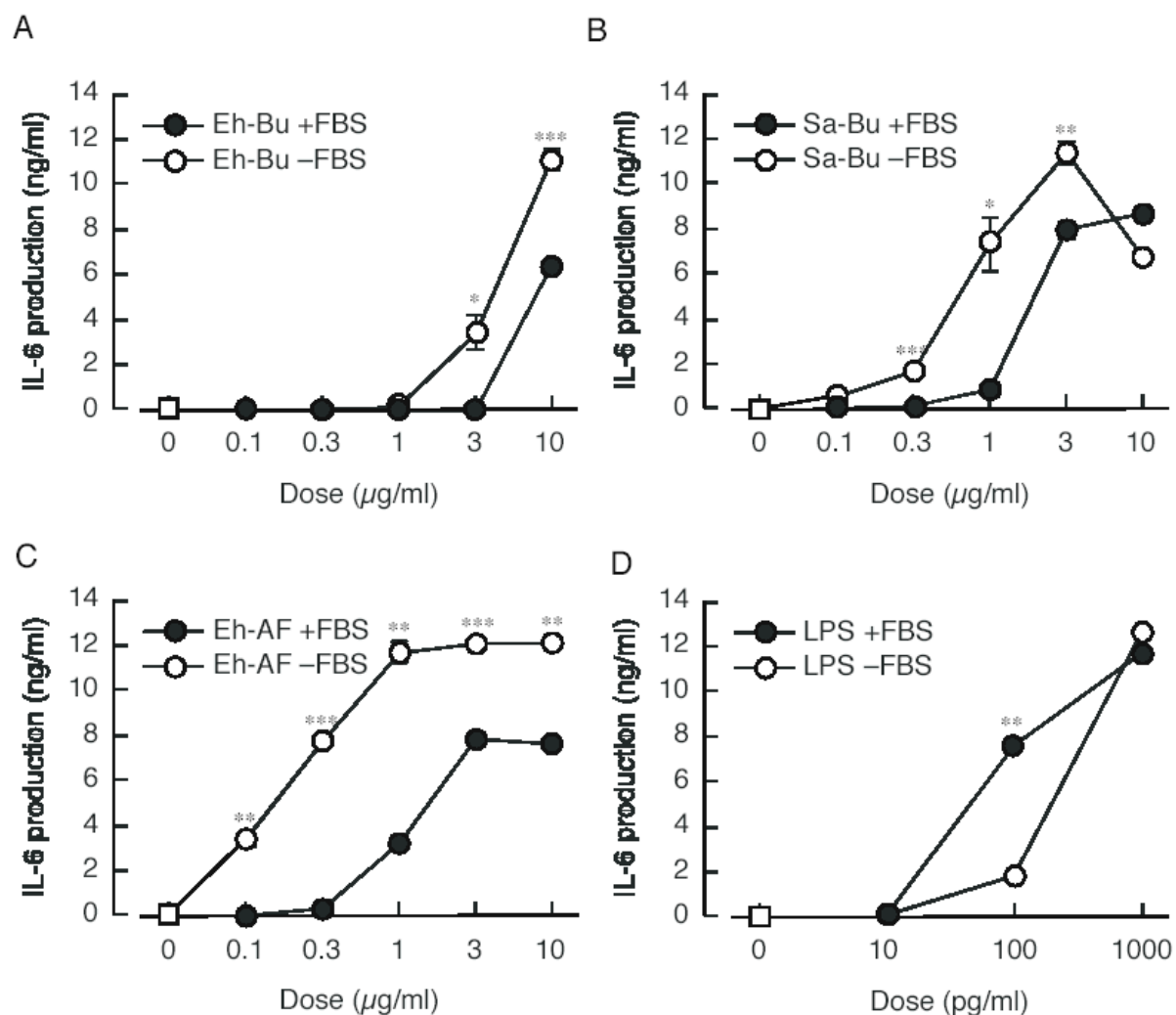
また、ルシフェラーゼアッセイの結果、両画分ともに、Ba/mTLR2 細胞のみを活性化した (Fig. 2)。両画分にエンドトキシンの汚染は無いことは、エンドスペシー試験により確認した。

#### 3-2. mAbEh1 の作成

LTA 画分に含まれる免疫活性を担う主成分を評価するために、画分の免疫活性を中和する抗体を作成した。

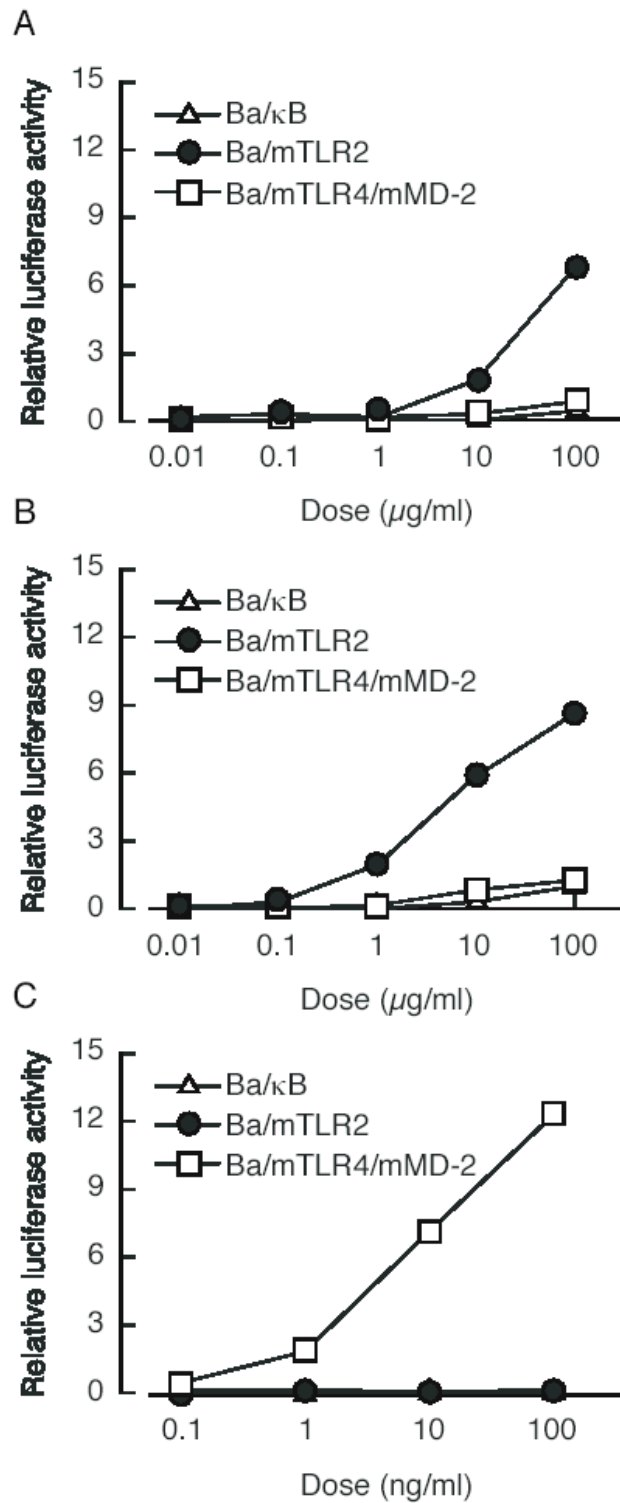
マウス・ハイブリドーマ細胞は、EhAF で免疫した Balb/c マウス由来脾臓細胞から調整した。サブクロニング後、EhAF の活性を中和する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした結果、ひとつのハイブリドーマ細胞が得られ、その細胞が産生する中和抗体を mAbEh1 とした。このハイブリドーマ細胞を無血清培養して得た培養上清をゲル濾過クロマトグラフィーで処理し、抗体を含む画分を mAbEh1 (1.06 mg protein/ml) 溶液として使用した。また、この中和抗体のアイソタイプは IgM であった。また mAbEh1 は、濃度依存的に Eh-AF の IL-6 誘導活性を 1 µg/ml まで抑制したが、LPS の誘導活性は阻害しなかった (Fig. 3)。





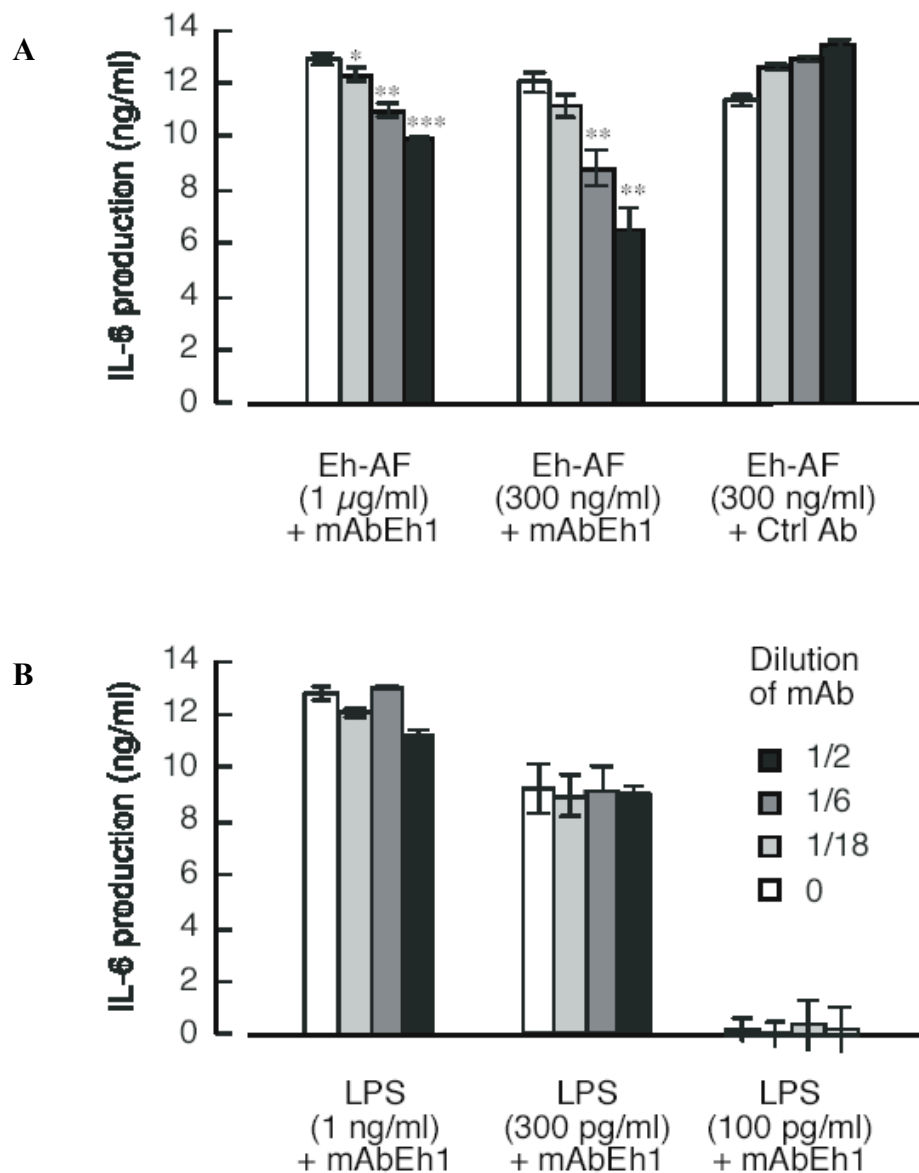
**Fig. 1. LTA 画分による PBMC からのサイトカイン誘導活性**

BuOH 抽出により得た LTA 画分を用いてヒト PBMC を刺激したときの IL-6 誘導活性を、FBS 存在／非存在下で測定した。PBMC は健常人のボランティアの血液から得た後に、上記濃度で 24 時間刺激した。培養上清中のサイトカインのレベルは ELISA で測定した。データは独立した 3 つの系で得られた数値の mean±SD で表示した。



**Fig. 2. LTA 画分のシグナル伝達経路の検討**

Ba/ $\kappa\text{B}$ , Ba/mTLR2, Ba/mTLR4/mMD-2 細胞における Eh-Bu (A)、Sa-Bu (B)、LPS (C)による NF- $\kappa\text{B}$  活性を測定した。細胞をそれぞれの濃度で 4 時間刺激した後に、NF- $\kappa\text{B}$  活性はルシフェラーゼアッセイにより測定した。結果は、非刺激時の値に対する刺激時の値の比として相対値を示した。



**Fig. 3. mAbEh1 抗体の結合能検討**

Eh-AF (A) もしくは LPS (B) で刺激したときの PBMC の IL-6 誘導活性に対する mAbEh1 抗体および isotype コントロール抗体の抑制効果を調査した。細胞は図に示した濃度で 24 時間 FBS 無添加培地中で刺激した後に、IL-6 産生量を ELISA により測定した。データは独立した 3 つの系で得られた数値の mean±SD で表示した。mAbEh1 の阻害作用は、Welch's *t* 検定を用いて統計的に評価した。図中のアスタリスク一つは危険率 0.05 以下 ( $p < 0.05$ )、2 つのアスタリスクは危険率 0.01 以下 ( $p < 0.01$ )、および 3 つのアスタリスクは危険率 0.001 以下 ( $p < 0.001$ ) を示している。

### 3-3. mAbEh1 の活性中和作用

次に mAbEh1 の活性中和作用を検討した。その結果 EhAF のみでなく、Eh-B40 および Sa-B40 の活性も抑制した (Fig. 4)。これらの結果から、Eh-B40 および Sa-B40 中の活性成分の構造が LTA フラクシオンに共通のもので、Eh-AF に類似したものであることが示唆された。

### 3-4. その他細菌由来成分のサイトカインアッセイ

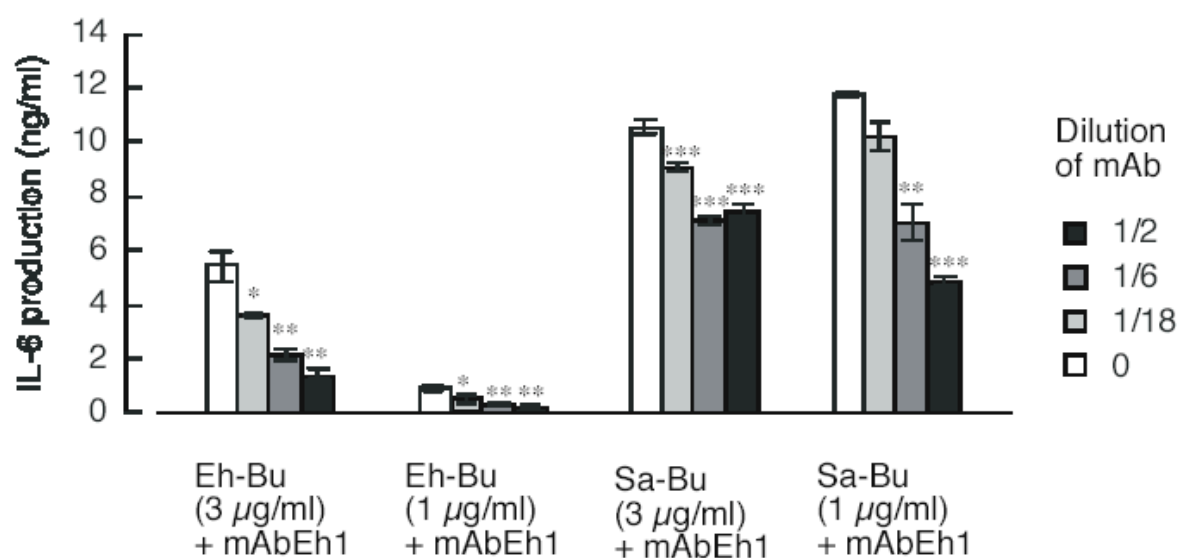
Morath らは、*S. aureus* の LTA の糖脂質アンカーがヒト抹消全血において TNF- $\alpha$  誘導活性を示すことを報告している (6)。そこで、*E. hirae* および *S. aureus* の合成糖脂質のヒト PBMC における IL-6 産生能を検討したが、両糖脂質は活性を示さなかった (Fig. 5A, B)。

最近我々の研究室では、リポプロテインが *S. aureus* の細胞壁構成成分の中で TLR-2 を活性化する主要なリガンドであることを示した (12)。そこで、合成リポペプチドである Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> および FSL-1 の IL-6 誘導活性に対する mAbEh1 の阻害作用を調査した。その結果、Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> および FSL-1 の IL-6 誘導活性は、濃度依存的に mAbEh1 の添加により抑制された (Fig. 6A)。また、EhAF、Eh-B40、Sa-B40 と同様に、FBS 存在下で IL-6 誘導活性が減少した (Fig. 6B, C)。

### 3-5. ドットブロット分析

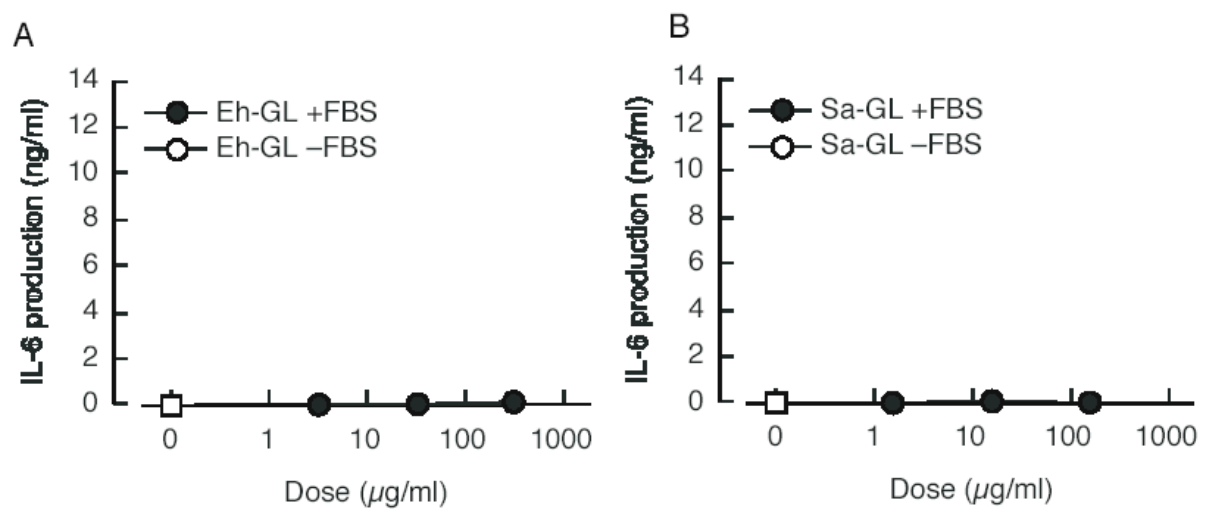
さらに、ドットブロット分析において、mAbEh1 の合成リポペプチドや脂質類との結合能を調査した結果、リポペプチドである Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>、Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub>、PamCSK<sub>4</sub> および FSL-1 と特異的に結合した (Fig. 7A)。

しかし市販の LTA 抗体は、これらのリポペプチドと結合しなかった (Fig. 7B)。



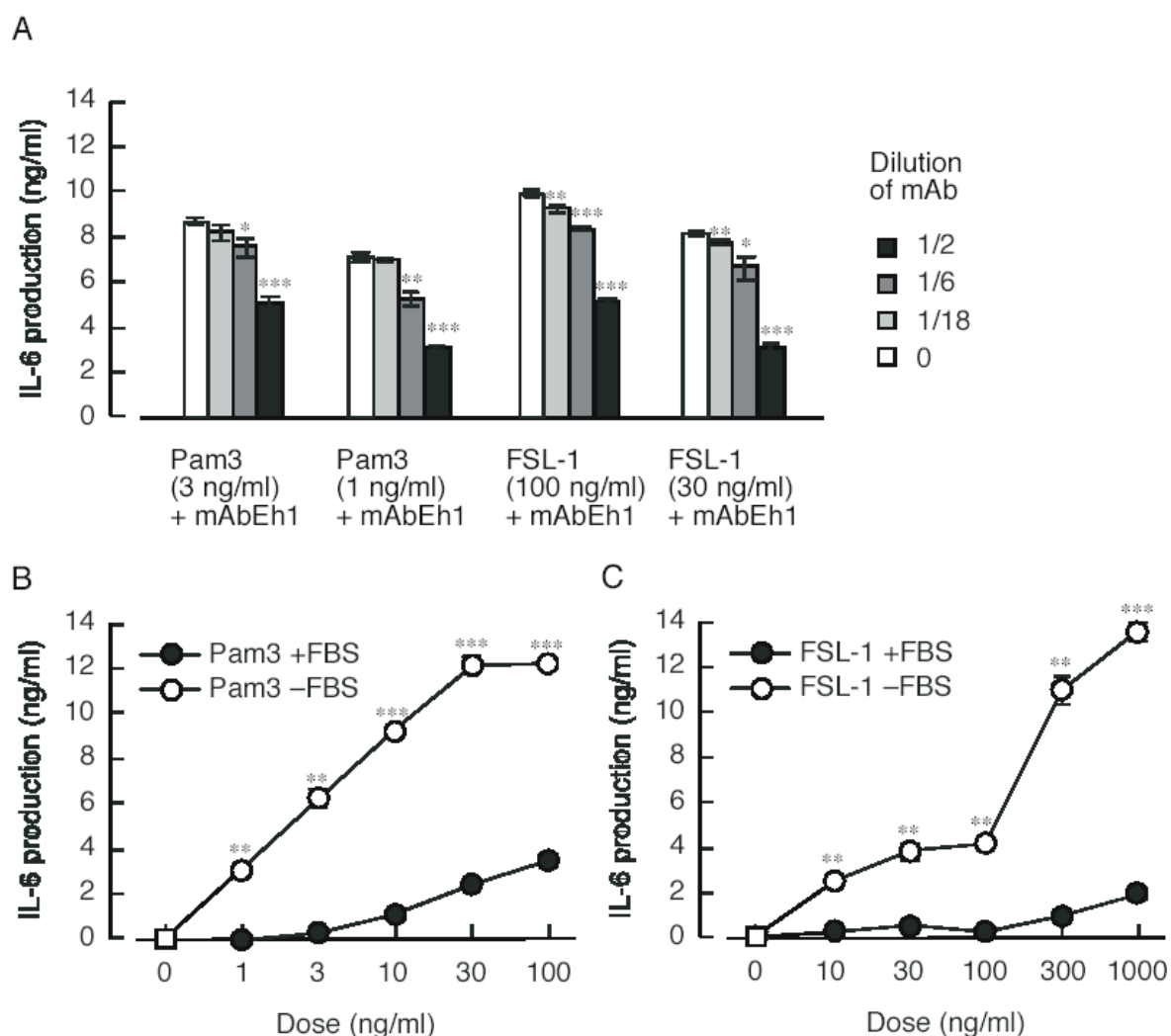
**Fig. 4. LTA 画分の mAbEh1 抗体による活性阻害**

Eh-Bu および Sa-Bu で刺激されたヒト PBMC における IL-6 誘導活性に対する mAbEh1 抗体の抑制効果を調査した。図に示した濃度の Eh-Bu、Sa-Bu で 24 時間 mAbEh1 の存在／非存在下で細胞を刺激した後に、IL-6 産生量を ELISA により測定した。データは独立した 3 つの系で得られた数値の mean±SD で表示した。mAbEh1 の阻害作用は、Welch's *t* 検定を用いて統計的に評価した。図中のアスタリスク一つは危険率 0.05 以下 ( $p < 0.05$ )、2つのアスタリスクは危険率 0.01 以下 ( $p < 0.01$ )、および3つのアスタリスクは危険率 0.001 以下 ( $p < 0.001$ ) を示している。



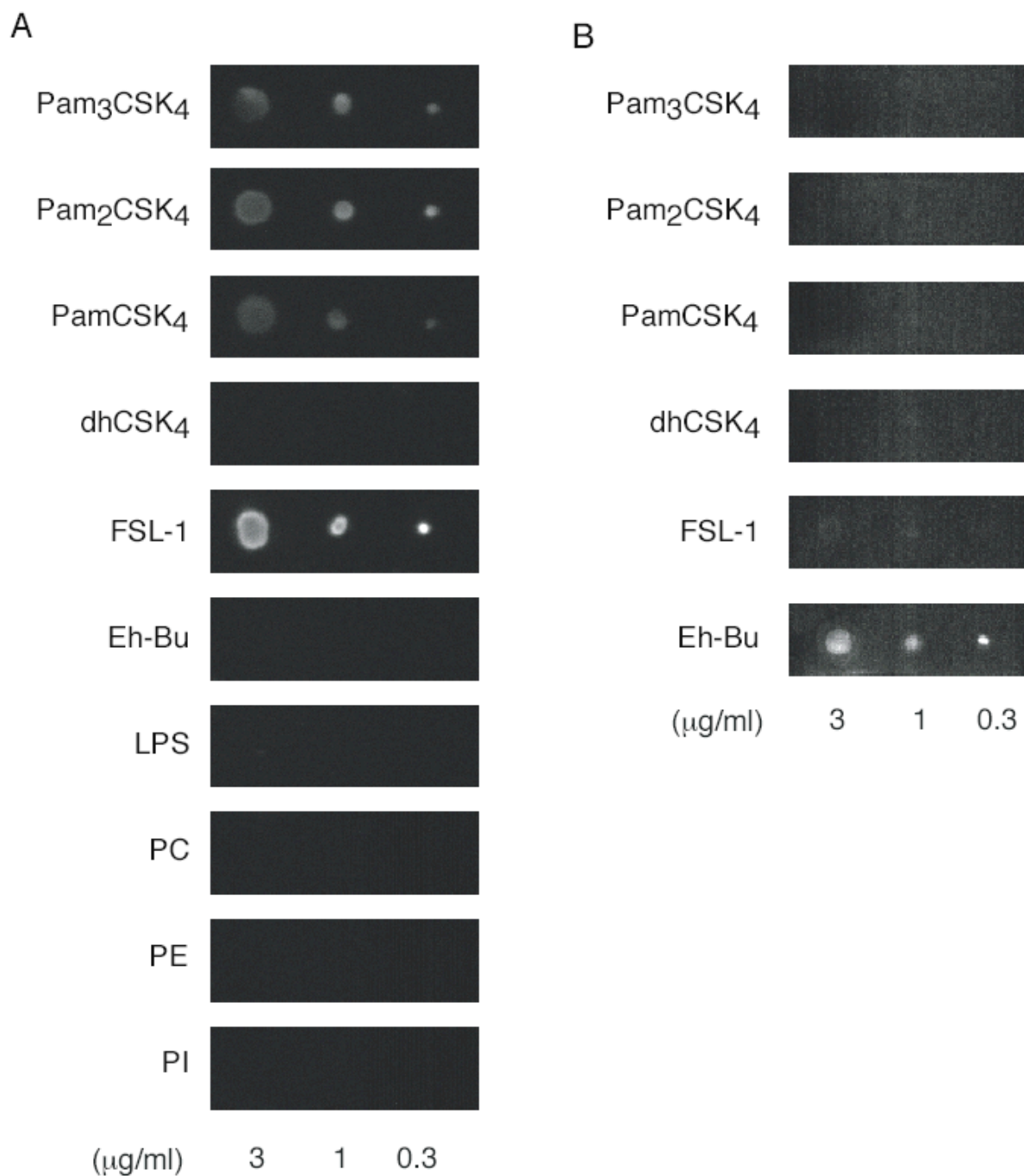
**Fig. 5. 合成糖脂質のサイトカイン誘導活性**

Eh-GL (A) および Sa-GL (B) で刺激したときの、ヒト PBMC からの IL-6 誘導活性について測定した。細胞を図に示した濃度の Eh-GL、Sa-GL で 24 時間 FBS 存在／非存在下で刺激した後に、IL-6 産生量を ELISA により測定した。データは独立した 3 つの系で得られた数値の mean±SD で表示した。



**Fig. 6. 合成リポペプチドのサイトカイン誘導活性および作製抗体の活性阻害効果**

Pam3CSK4 および FSL-1 で刺激された PBMC からの IL-6 誘導活性に対する MAbEh1 抗体の抑制効果を調査した。細胞を合成リポペプチドである Pam3CSK4 および FSL-1 を用いて図に示した濃度の刺激剤と抗体で 24 時間 FBS 無添加培地中で刺激した後に、IL-6 産生量を ELISA により測定した(A)。また FBS の存在の有無による合成リポペプチド Pam3CSK4(B)もしくは FSL-1(C)で刺激されたヒト PBMC における IL-6 誘導活性について測定した。データは独立した 3 つの系で得られたデータの mean  $\pm$  SD で表示した。FBS と mAbEh1 の阻害作用は、Welch's *t* 検定を用いて統計的に評価した。図中のアスタリスク一つは危険率 0.05 以下 ( $p < 0.05$ )、2つのアスタリスクは危険率 0.01 以下 ( $p < 0.01$ )、および 3つのアスタリスクは危険率 0.001 以下 ( $p < 0.001$ ) を示している。



**Fig. 7. 抗体の結合活性測定**

リポペプチドやその他の脂質に対する mAbEh1 (A) および LTA 抗体 (B) を用いたドットブロット分析を実施した。図に示した濃度の刺激剤をニトロセルロース膜にブロットした。薄膜はスキムミルクでブロッキングした後に、抗体とともにインキュベートした。抗体の結合活性は、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体とともにインキュベートした後に、ECL で化学発光させることにより測定した。



#### 4. 考察

LPS はグラム陰性菌の主要な免疫刺激活性複合糖質であり、TLR4 を介して細胞を活性化することが知られている。しかし、ある種のバクテリアの LPS は、TLR4 だけでなく TLR2 を経由して活性を示すことが報告されている (13, 14, 15)。最近我々の研究室などでは、TLR2 を活性化する複合糖質のうちのいくつかは少量のリポプロテインの混入が活性原因となっていることを証明している (16, 17)。リポプロテインは通常、トリトン X-114 のような界面活性剤によって細菌の細胞から抽出される (18)。このことは、親水性の多糖および疎水性のリピド A アンカーで構成される両親媒性物質である LPS が、界面活性剤の役割を担い、リポプロテインを抽出していることを示唆している。LTA も両親媒性複合糖質であることから、LPS と同様に界面活性剤として働いて細菌の細胞からリポプロテインを抽出することが推察された。また我々の研究室では、*S. aureus* の LTA 画分や BuOH 抽出物の生物活性はフッ化水素酸 (HF) 加水分解では失われないが、リポプロテインリパーゼ処理によって活性が下がることを示し (12)、LTA 分子ではなく共存するリポプロテインが LTA 画分の生物活性の原因であることを示唆している。

本章において、我々は、*S. aureus* に加えてさらに *E. hirae* の LTA 画分の中にもリポプロテインが存在している証拠を見出した。mAbEh1 は、LTA 画分の活性を抑制するだけでなく、合成リポペプチドである Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> や FSL-1 の免疫刺激活性を抑制した (Fig. 3, 4, 6)。これは、以前に *E. hirae* の LTA 画分から分離した微量の免疫活性を担う成分がリポプロテインであったことを示唆している (4)。今回の検討において高濃度で活性阻害効果を示さなかったことは、IgM 抗体の親和性が低いことに起因している可能性がある。また、リポプロテイン N 末端認識部位が LTA ミセルの中へ取り取り込まれたことにより抗体の結合が不可能になったという可能性も考えられる。リポプロテインが共雑する *S. aureus* の LTA 画分 (12) および *Porphyromonas gingivalis* の LPS 画分 (16, 未公表データ) を直接リポプロテインリパーゼ消化した際に、LTA や LPS の存在下ではそれらの画分の生物活性が減少しなかったという結果は、後者の仮定を支持している。

さらに mAbEh1 の結合の特徴についても検討した。ドットブロット分析の結果は、

mAbEh1 が合成リポペプチド Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>、O,O'-ジアシル型 Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub>、FSL-1 及び N-アシル型 PamCSK<sub>4</sub> に結合するが、脱アシル型の dhCSK<sub>4</sub> とは結合しないことを示した (Fig. 7A)。また mAbEh1 は LPS と結合しなかっただけでなく、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジリエタノールアミン (PE) およびホスファチジリンシトール (PI) とも結合しなかった (Fig. 7A)。一方、市販の LTA 抗体は、Eh-Bu とは結合するがリポペプチドとは結合しなかった (Fig. 7B)。これらの結果は、mAbEh1 がリポペプチド N 末端の脂質部分を認識することを示している。残念ながら、本研究では mAbEh1 を用いた LTA 画分のドットプロット分析及びウエスタンブロット分析の両方において、画分中に存在すると考えられるリポプロテインは検出できなかった。これは、我々が以前の論文 (4, 12)でも述べたように画分中の濃度が低いことに加えて、IgM 抗体の親和性が低いことが原因かもしれない。

一方、LTA 本体の活性についても検討した。以前我々は、*E. hirae* 由来の LTA 本体が自然免疫系を活性化しないことを示している (5)。また、*S. aureus* 由来の LTA 画分を HF 分解すると、SDS-PAGE 後にアルシアンブルーで可視化されるバンドが消失し、LTA が完全に分解される。これは HF が LTA の親水性部分であるポリグリセロリン酸塩中のリン酸ジエステル結合を開裂するため、リン酸塩、グリセロールおよびリン酸グリセロールのような小分子へ分解されることが原因である (19)。しかし、HF 処理後も LTA 画分は免疫活性を保持していた (12)。さらに本研究で、*E. hirae* および *S. aureus* 由来 LTA の糖脂質部分が両方とも活性を持たないことも示した (Fig. 5)。これらの様々な結果は、LTA それ自身が活性分子ではないことを示唆している。

しかし我々は、リポプロテインを選択的に取り除く方法を確立していないため、*S. aureus* の天然型の LTA が免疫生物活性を示さないことを完全には証明していない。以前 Morath らは、*S. aureus* の LTA が、*E. hirae* の LTA の分離に使用された疎水的相互作用クロマトグラフィーや陰イオン交換クロマトグラフィーでは、活性画分と非活性画分に分離できなかったことを報告している (7)。LPS に混入しているリポプロテインの抽出に使用する方法であるデオキシコール酸塩含有 PhOH を用いた抽出法 (11) を用いて、*S. aureus* の LTA 画分からリポプロテインの再抽出を試みたが、良好な結果は得られていない (data not shown)。また、*P. gingivalis* の LPS (11, 12) か

らのリポプロテインの再抽出を試みたが良好な結果は得られておらず、リポプロテインを取り込んだ LTA のミセル化が非常に強固であることが示唆された。

最近我々のグループは、リポプロテインを含まないリポプロテイン・ジアシルグリセロール・トランスフェラーゼ欠損変異型の *S. aureus* (20) 由来の LTA が野生型の LTA の1/100の活性しか示さないことを報告した (12)。この結果は、LTA 画分の活性のほとんどがリポプロテインによって引き起こされることを示唆している。今後、突然変異型の *S. aureus* の LTA 画分に残された免疫活性成分の特定やその化学構造の解析を行い、LTA 分子の生物活性について明らかにすることが必要である。

本章では、グラム陽性菌の免疫活性成分とされている LTA 画分の生物活性について検討することを目的として、天然型 LTA 画分の活性を中和するとともにリポペプチドの活性も抑制する抗体を作製した。また、mAbEh1 が、*E. hirae* や *S. aureus* 由来の天然型 LTA 画分に存在するリポプロテイン様構成成分の免疫活性を中和することも明らかにした。この抗体を用いて *E. hirae* を中心に様々なグラム陽性菌の LTA 画分について調査した結果、グラム陽性菌の活性成分は TLR2 活性化能を持つリポプロテインであることが強く示唆された。

## 参考文献

- (1) Fukase, K., Matsumoto, T., Ito, N., Toshimura, T., Kotani, S. and Kusumoto, S. (1992) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 65: 2643-2654.
- (2) Fukase, K., Toshimura, T., Kotani, S. and Kusumoto, S. (1994) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 67: 473-482.
- (3) Takada, H., Kawabata, Y., Arakaki, R., Kusumoto, S., Fukase, K., Suda, Y., Yoshimura, T., Koikeguchi, S., Kato, K., Komuro, T., Tanaka, N., Saito, M., Yoshida, T., Sato, M. and Kotani, S. (1995) *Infect. Immun.* 63: 57-65.
- (4) Suda, Y., Tochio, H., Kawano, K., Takada, H., Yoshida, T., Kotani, S. and Kusumoto, S. (1995) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12: 97-112.
- (5) Hashimoto, M., Yasuoka, J., Suda, Y., Takada, H., Yoshida, T., Kotani, S. and Kusumoto, S. (1997) *J. Biochem.* 121: 779-786.
- (6) Morath, S., Geyer, A. and Hartung, T. (2001) *J. Exp. Med.* 193: 393-397.
- (7) Morath, S., Stadelmaier, A., Geyer, A., Schmidt, R. R. and Hartung, T. (2002) *J. Exp. Med.* 195: 1635-1640.
- (8) Behr, T., Fischer, W., Katalinic, J. P. and Egge, H. (1992) *Eur. J. Biochem.* 207: 1063-1075.
- (9) Han, S. H., Kim, J. H., Martin, M., Michalek, S. M. and Nahm, M. H. (2003) *Infect. Immun.* 71: 5541-5548.
- (10) Hashimoto, M., Imamura, Y., Morichika, T., Arimoto, K., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S., Aoyama, K., Tamura, T., Kotani, S., Suda, Y. and Kusumoto, S. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 164-169.
- (11) Hirschfeld, M., Weis, J. J., Toshchakov, V., Salkowski, C. A., Cody, M. J., Ward, D. C., Qureshi, N., Michalek, S. M. and Vogel, S. N. (2001) *Infect. Immun.* 69: 1477-1482.
- (12) Hashimoto, M., Tawaratsumida, K., Kariya, H., Aoyama, K., Tamura, T. and Suda, Y. (2006) *Int. Immunol.* 18: 355-362.
- (13) Kirikae, T., Nitta, T., Kirikae, F., Suda, Y., Kusumoto, S., Qureshi, N., and Nakano, M. (1999) *Infect. Immun.* 67: 173-181.
- (14) Smith, M. F. Jr., Mitchell, A., Li, G., Ding, S., Fitzmaurice, A. M., Ryan, K., Crowe, S. and Goldberg, J. B. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 32552-32560.

- (15) Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C., Chuang, T. H., Kravchenko, V., Girons, I. S., Haake, D. A., Godowski, P. J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Kirschning, C. J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P. S. and Ulevitch, R. J. (2001) *Nat. Immunol.* 2:346-352.
- (16) Hashimoto, M., Asai, Y. and Ogawa, T. (2004) *Int. Immunol.* 16: 1431-1437.
- (17) Lee, H. K., Lee, J. and Tobias, P. S. (2002) *J. Immunol.* 168: 4012-4017.
- (18) Shibata, K., Hasebe, A., Sasaki, T. and Watanabe, T. (1997) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 19: 275-283.
- (19) Fischer, W. (1990). *Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acid. Plenum Press, New York* : 123-234.
- (20) Stoll, H., Dengjel, J., Nerz C. and Gotz, F. (2005) *Infect. Immun.* 73: 2411-2423.

## 第四章 トリトン X-114 相分離による OK-432 の抗腫瘍活性の増強

### 1. 序論

トル様受容体 (Toll-like receptor; TLR) は細胞表層の膜タンパク質であり、自然免疫系を活性化するレセプターとして働くことがわかっている (1)。個々の TLR はそれぞれ特定の病原関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns; PAMP) を認識して、細胞内のシグナル伝達経路を活性化し、サイトカインを産生させる。たとえば、TLR4 は補助分子である MD-2 とともに細菌細胞壁成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) を認識する (2)。また、TLR2 は細菌由来のリポタンパク質を (3,4)、TLR9 は細菌由来の非メチル化 CpG 部分を持つ DNA (CpG DNA) を (5) それぞれリガンドとして認識する。

このうち TLR9 は Th1 型の反応を誘導して抗腫瘍活性を発揮することが知られている (6)。一方、TLR2 と TLR4 による Th1/Th2 の制御機構に関しては議論のわかれるところである。TLR4 に関しては、低濃度の LPS が Th2 型反応を誘導する一方、高濃度の LPS が Th1 型反応を導くことが報告されている (7)。しかし、TLR4 によるシグナル伝達メカニズムの重要性は示されている (8)。TLR2 に関しては、合成リガンドである Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> と FSL-1 が Th2 型のサイトカインを誘導することが知られているが (9, 10)、TLR2 自身は Th1 のエフェクターとしても働くことが報告されている (11)。さらに、別の自然免疫レセプターである NOD2 が TLR による Th1/Th2 バランスを調整しうることも示されている (12, 13)。

これまでにいくつかの TLR が OK-432 の免疫反応に関与していることが岡本らにより報告されている。OK-PSA による抗腫瘍活性は TLR4 を介して Th1 型のサイトカイン誘導 (14) を、OK-PTF によるシグナルは TLR2 と TLR4 を介して Th1/Th2 バランスを Th2 優位 (14) に、OK-DNA による刺激は TLR9 を介して Th1 型のサイトカインを誘導し、キラー細胞活性を増強することを報告している (15)。このように OK-432 が複数のレセプターを介して免疫系を活性化しているため、OK-432 による Th1/Th2 の制御機構は複雑であると考えられる。このうち TLR9 と、

おそらく TLR4 は、OK-432 の Th1 型反応の原因であると考えられる。しかし、TLR2 の寄与に関しては不明である。

第 3 章で示したように、グラム陽性菌の免疫活性化には TLR2 リガンドであるリポプロテインの関与が示唆されていることから、OK-432 中にもリポプロテインが存在し、TLR2 を活性化していると予想された。そこで、OK-432 中に含まれると予想された TLR2 リガンドの抗腫瘍活性に対する影響を検討することにした。これまでに *S. aureus* を用いた検討から、TLR2 活性化リポプロテインがトリトン (Triton) X-114 (TX-114) による相分離法で抽出できることがわかっている (16)。そこで、OK-432 にもこの手法を用いることにした。

第 4 章では、OK-432 を TX-114 相分離法で分離した抽出物および抽出残渣画分の、インビトロおよびインビボの系における免疫生物学的挙動を調査した結果を示した。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 細菌由来成分の調整

#### 2-1-1. OK-432 からの活性成分の抽出 (TX-114 相分離法)

OK-432 は、凍結状態（凍結乾燥前の状態）で中外製薬（東京）から恵与を受けた。OK-432 は Scheme 1. に示したように TX-114 相分離 (17) 処理して抽出物を得た。OK-432 は乾燥重量の 95% 以上の塩や水溶性の安定剤を含んでいるため、水で 3 回洗浄してそれらを取り除き、菌体のみを OK-432w とし得たのちに、OK-432w を PBS に分散し、1/10 量の 10% TX-114 と混合した。4°C で 1 時間回転混和した後、遠心分離によって上清と細胞破片沈殿に分離した。細胞破片はメタノールで 2 回洗浄し、残渣を OK-TX-ppt とした。上清は 37°C に加温後に遠心分離し、TX-114 相と水相に分離した。水相は再度 TX-114 で処理した。TX-114 相を合わせた後、3 倍量のメタノールを加えて沈殿させ TX-114 を除去し、OK-TX-Me を得た。メタノール相は減圧濃縮した後、9 倍量のアセトンを加えて沈殿させ、OK-TX-A を得た。

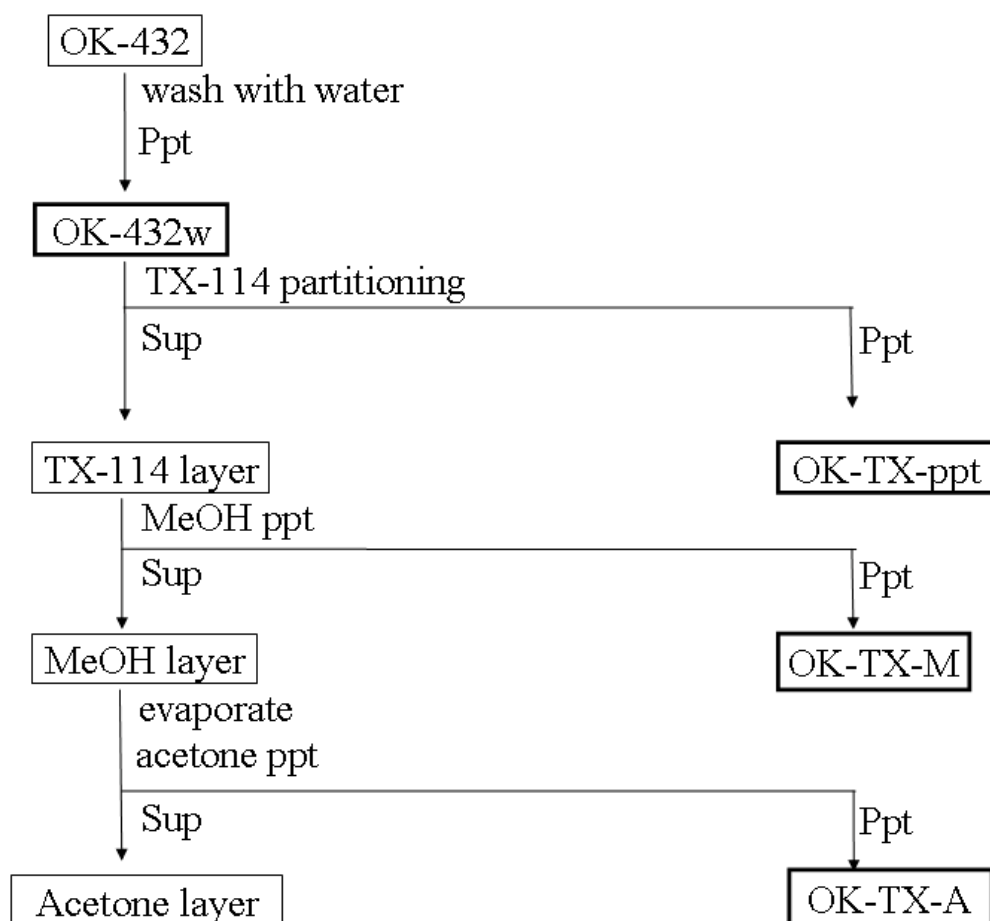
#### 2-1-2. その他の刺激剤

*Escherichia coli* O55:B5 由来の LPS は、シグマ\_アルドリッチ（セントルイス、ミズーリー、アメリカ）から購入し、デオキシコレート法 (18) を用いて混入するリポプロテインを取り除いた。合成リポプロテイン FSL-1 は EMC マイクロコレクション（チュービンゲン、ドイツ）から購入した。

### 2-2. サイトカインアッセイ

それぞれの培養上清、血清は、分泌されたサイトカインごとに ELISA キット (R&D システム、ミネアポリス、ミネソタ、アメリカ) をもちいてサイトカイン含有量を測定した。サイトカイン量は、リコンビナントサイトカインを用いた標準曲線から算出した。異なるグループ間のサイトカイン量は Welch's *t* 試験により統計的に分析した。





**Scheme 1.** TX-114 相分離法による OK-432 からの免疫活性成分抽出

### 2-2-1. インビトロアッセイ

インビトロの実験では以下の細胞を用いた。ヘパリン化ヒト由来抹消血液は、健康なボランティアから採血した。血液を Histopaque 1077 (シグマ\_アルドリッチ) を用いた密度遠心分離に供し、ヒト抹消血由来単核球 (human peripheral blood mononuclear cells; PBMC) を得た。細胞は 10% FBS を含む RPMI 1640 に分散し、96 穴マイクロプレートに 1 穴あたり  $2 \times 10^5$  個播種して用いた。また、8 週齢のオスの BALB/c マウスは九動 (熊本) から購入した。マウス由来脾臓細胞は、BALB/c から調整した後、10% FBS を含む RPMI-1640 に分散し、96 穴マイクロプレートに 1 穴あたり  $1 \times 10^6$  個播種して用いた。それぞれの細胞は、指定濃度の試験試料とともに 37°C で 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下培養し、その上清を得た。

### 2-2-2. インビボアッセイ

インビボの実験はマウスを用いて行った。500  $\mu$ g の OK-432w を 500  $\mu$ l の PBS に分散したもの、500  $\mu$ g の OK-TX-ppt を 500  $\mu$ l の PBS に分散したもの、500  $\mu$ l の PBS のみをそれぞれ 0 日目から 10 日目まで一日おきに腹腔注射によりマウスに投与した。11 日目にマウスを犠牲死させ、血液を採取後、血清を分離した。

## 2-3. ルシフェラーゼアッセイ

### 2-3-1. 使用細胞

NF $\kappa$ B/DNA 結合性ルシフェラーゼレポーターである p55IgLuc を安定発現させた Ba/F3 細胞株 (Ba/ $\kappa$ B)、マウス TLR2 と p55IgLuc を導入した株 (Ba/mTLR2)、マウス TLR4/MD-2 と p55IgLuc を導入した株 (Ba/mTLR4/mMD-2) は東京大学医科学研究所の三宅教授から恵与を受けた。

### 2-3-2. NF $\kappa$ B 依存的ルシフェラーゼアッセイ

NF $\kappa$ B 依存的ルシフェラーゼアッセイは論文記載の通りに行った (19)。すなわち、細胞を 96 穴マイクロプレートに 1 穴あたり  $1 \times 10^5$  個の細胞と 80  $\mu$ l の 10% FBS を含んだ RPMI 1640 と指定濃度の試験試料を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 4 時間培養後、80  $\mu$ l のルシフェラーゼ基質 (Bright Glo、プロメガ、マジソン、ワイオミング、アメリカ) を加えた。化学発光はルミノメータ ARVO-SX (パーキンエルマ

一、ウェルスレイ、マサチューセッツ、アメリカ）を用いて定量した。結果は、非刺激時の値に対する刺激時の値の比として相対値を示した。

#### 2-4. Meth-A 腫瘍細胞を移植した BALB/c マウスを用いた動物実験

BALB/c マウスに  $1 \times 10^5$  個の Meth-A 腫瘍細胞を腹腔投与により移植した。マウスに 100  $\mu$ g の OK-432w を 200  $\mu$ l の PBS に分散したもの、100  $\mu$ g の OK-TX-ppt を 200  $\mu$ l の PBS に分散したもの、200  $\mu$ l の PBS のみのそれぞれを、Meth-A を移植した翌日から 10 日目までの毎日に腹腔注射によって投与した。マウスの生死は移植後 42 日目まで観察した。

### 3. 結果

#### 3-1. OK-432 から活性成分の抽出

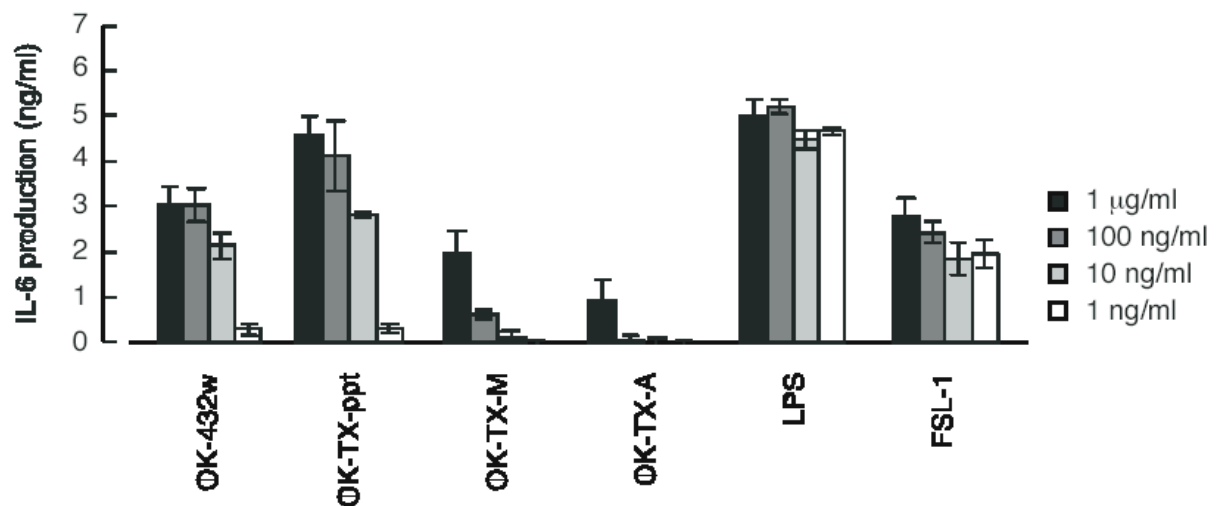
OK-432 の抽出は TX-114 相分離によって Scheme 1. のように行った。OK-TX-ppt、OK-TX-M、OK-TX-A の収率はそれぞれ 90%、0.1%、0.1% であった。それぞれの画分の PBMC に対する IL-6 誘導活性は Fig. 1 に示した。その結果、OK-TX-ppt の活性は OK-432w よりもわずかに高いものであることがわかった。一方、OK-TX-M と OK-TX-A の活性は OK-432w よりもかなり低いものであった。また、Ba/kB、Ba/mTLR2、Ba/mTLR4/mMD-2 を用いた TLR 依存的 NF $\kappa$ B 活性化試験の結果は Fig. 2 に示した。OK-432w は TLR2 を介して細胞を活性化したが、OK-TX-ppt は Ba/mTLR2 細胞を活性化せず、TLR2 依存的活性化能がないことがわかった。また、この系では TLR4 を介した活性化が起こらないことがわかった。

#### 3-2. OK-TX-ppt と OK-432w の PBMC に対するサイトカイン誘導

OK-TX-ppt と OK-432w のサイトカイン誘導活性はヒト PBMC を用いて検討した。結果は Fig. 3 に示した。OK-TX-ppt は OK-432w と同程度の TNF- $\alpha$  を誘導した。OK-TX-ppt の IL-12 誘導活性も OK-432w と同程度であった。また、両試料とも IL-4 は誘導しなかった。しかし、IFN- $\gamma$  誘導活性は、OK-TX-ppt が OK-432w よりも有為に ( $p<0.05$ ) 高く、IL-4 誘導は、OK-TX-ppt が OK-432w よりも有為に ( $p<0.01$ ) 低かった。

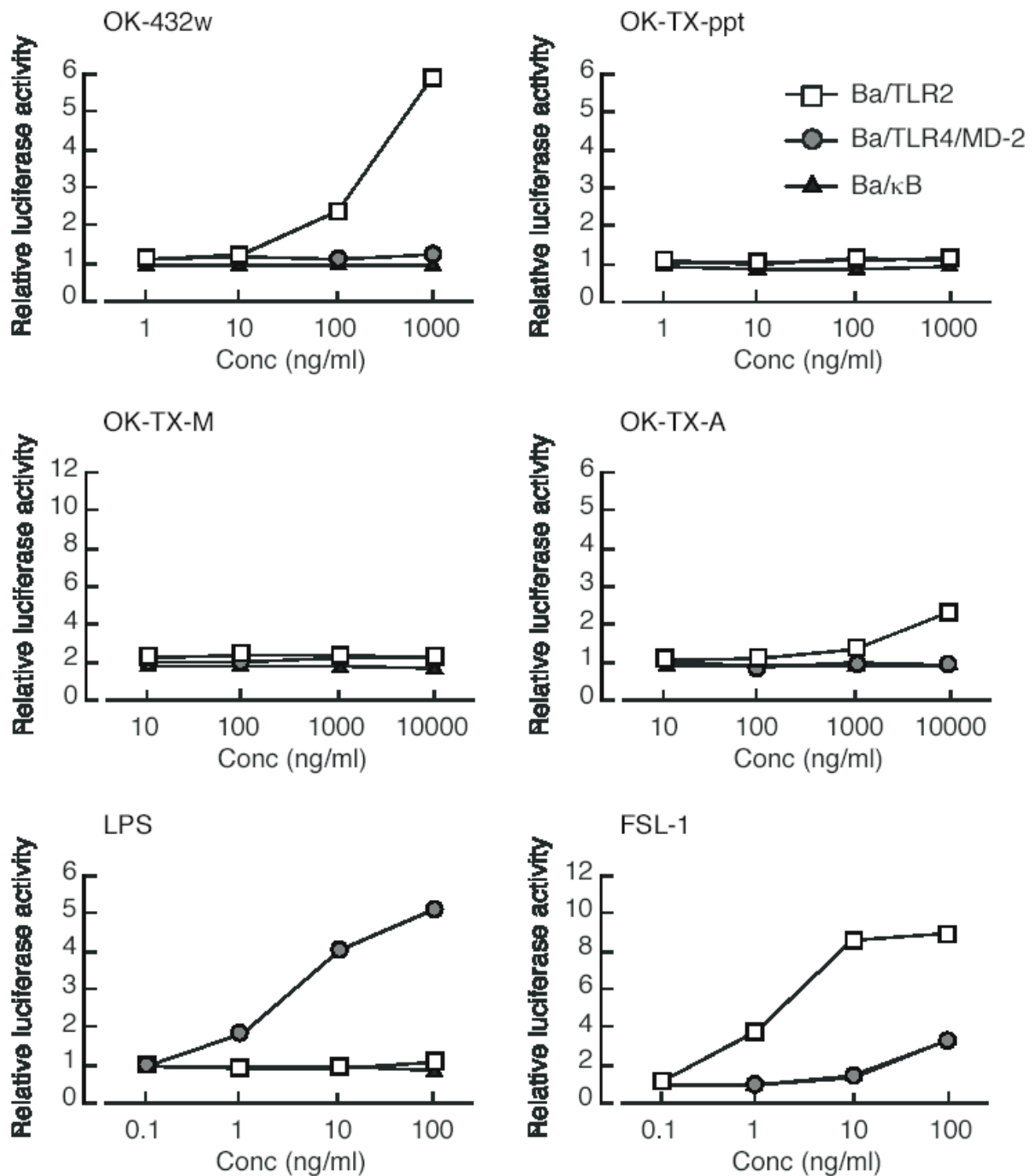
#### 3-3. Meth-A 移植マウスに対する OK-TX-ppt と OK-432w の抗腫瘍活性

OK-TX-ppt と OK-432w の腹腔投与による抗腫瘍活性は、Meth-A 移植マウスを用いて検討した (Fig. 4)。ネガティブコントロールとして用いた PBS の投与では、Meth-A 移植後 28 日目までにすべてのマウス (9 匹) が死亡した。ポジティブコントロールとして OK-432w を投与した場合では、生存期間が延長されたが、41 日目までにすべてのマウス (10 匹) が死亡した。OK-TX-ppt を投与した場合では、OK-432w よりもさらに生存期間が延長され、42 日目でも 11 匹中 8 匹が生存していた。



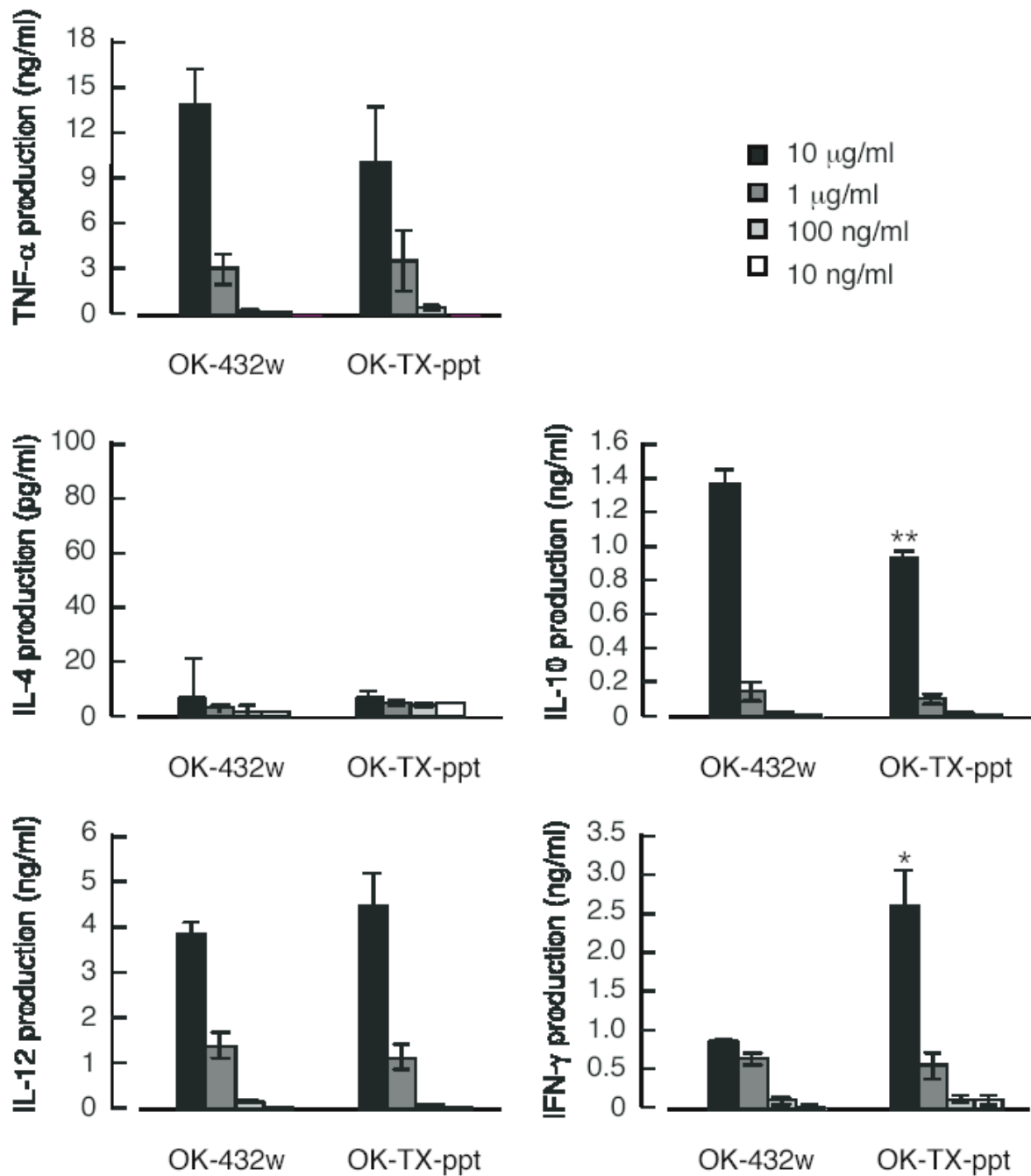
**Fig. 1. TX-114 相分離による OK-432 抽出画分のサイトカイン誘導活性**

TX-114 相分離法により得た OK-432 抽出画分を用いてヒト PBMC を刺激したときの IL-6 誘導活性を測定した。PBMC は健常人のボランティアの血液から得た後に、上記濃度で 24 時間刺激した。培養上清中のサイトカインのレベルは ELISA で測定した。データは独立した 3 つの系で得られた数値の mean±SD で表示した。



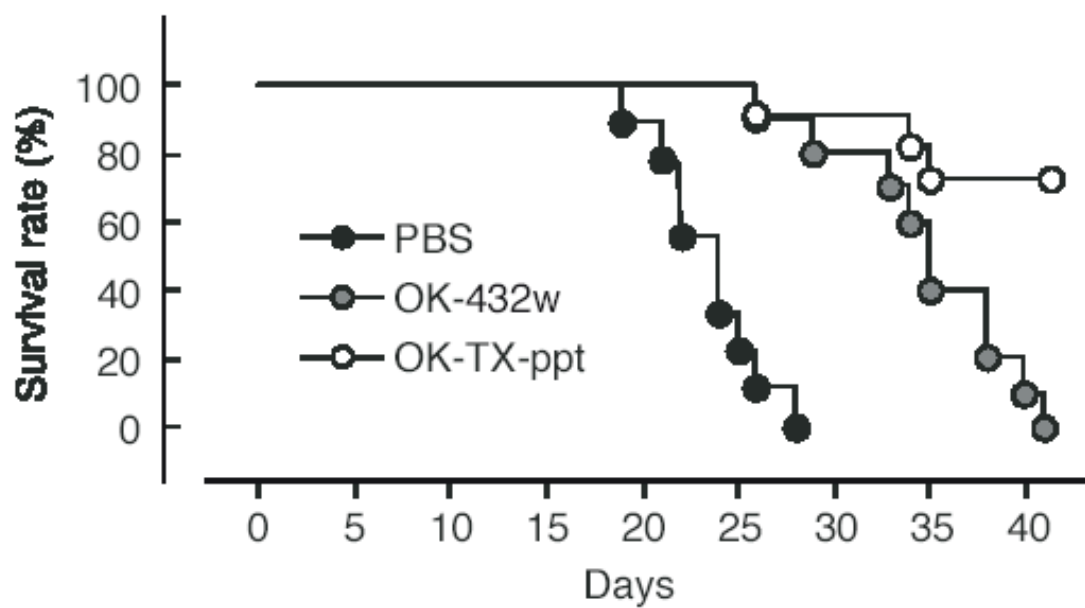
**Fig. 2. OK-432 抽出画分のシグナル伝達経路の検討**

Ba/κB、Ba/mTLR2、Ba/mTLR4/mMD-2 細胞における TX-114 相分離法により得た OK-432 抽出画分による NF-κB 活性を測定した。細胞をそれぞれの濃度で 4 時間刺激した後に、NF-κB 活性はルシフェラーゼアッセイにより測定した。結果は、非刺激時の値に対する刺激時の値の比として相対値を示した。



**Fig. 3. ヒト PBMC からのサイトカイン誘導活性**

OK-432w と OK-TX-ppt のヒト PBMC における各種サイトカイン誘導活性について測定した。PBMC は健常人のボランティア (MF) の血液から得た。PBMC は図に示した濃度で 24 時間刺激した。培養上清中のサイトカインのレベルは ELISA で測定した。データは独立した 3 つの系で得られた数値の mean±SD で表示した。



**Fig. 4. 腫瘍マウスを用いた抗腫瘍効果の検討**

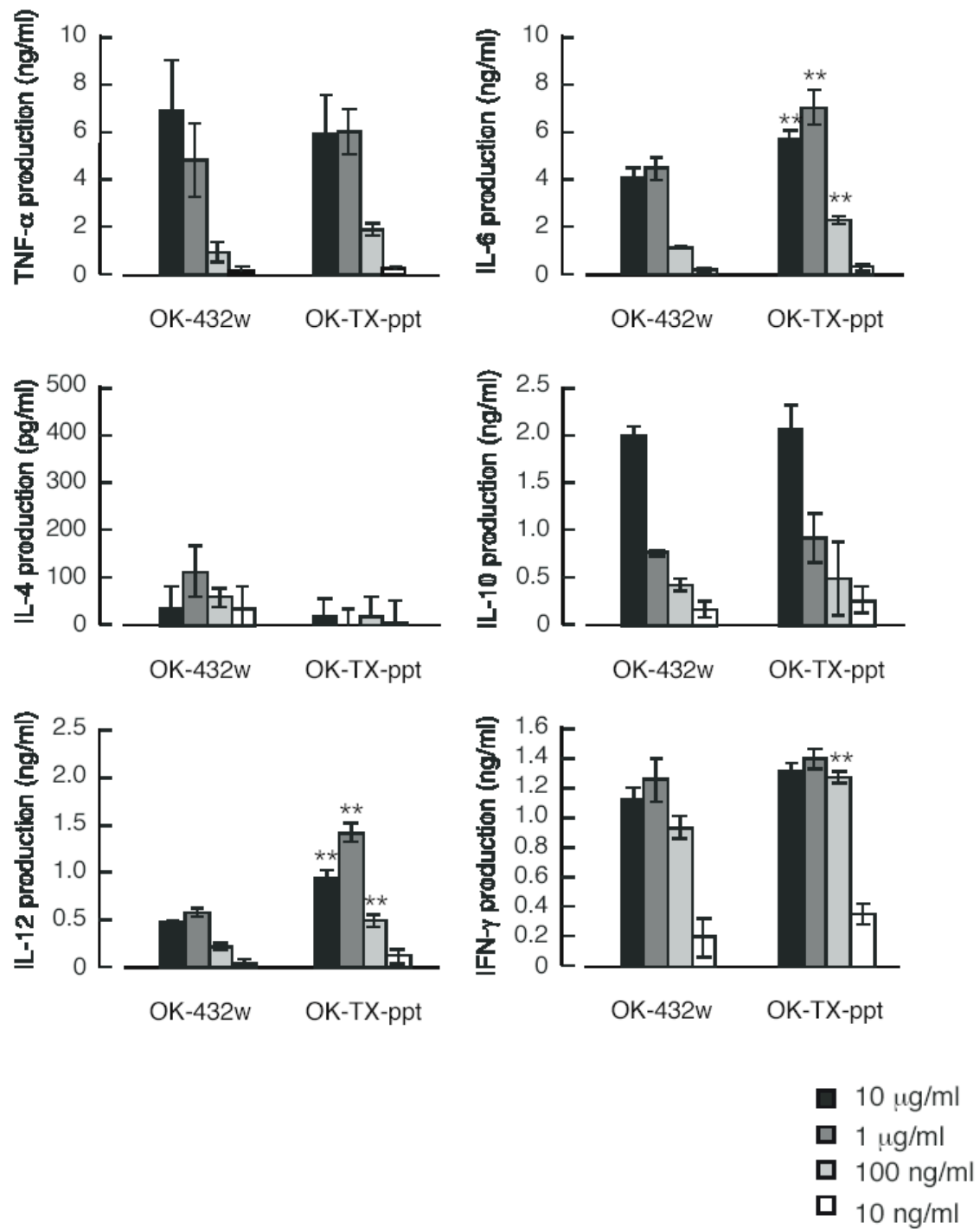
OK-432w と OK-TX-ppt の抗腫瘍効果を、腫瘍マウスを用いて、PBS をコントロール群として実施した。Meth-A 腫瘍細胞をマウス腹腔内投与した翌日より 10 日目までそれぞれを腹腔投与した後に、42 日目まで観察した。



### 3-4. OK-TX-ppt と OK-432w のマウスでのサイトカイン誘導

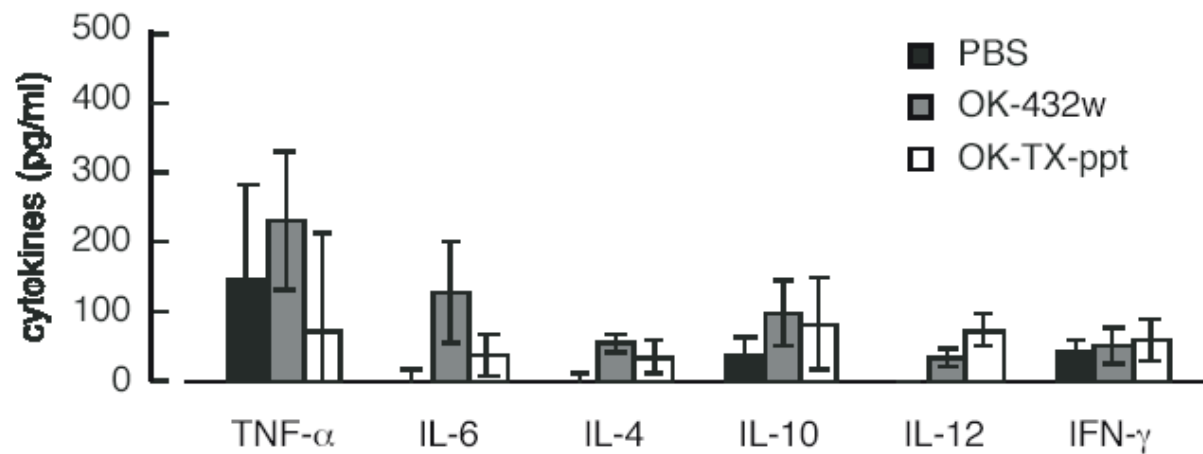
マウス脾臓細胞を OK-TX-ppt と OK-432w で刺激した際のサイトカイン産生の結果を Fig. 5 に示した。TNF- $\alpha$  と IL-10 の産生誘導は OK-TX-ppt と OK-432w の間に差はなかった。IL-6、IL-12、IFN- $\gamma$  の誘導は、OK-TX-ppt が OK-432w よりも高かった。OK-TX-ppt による IL-4 の産生はほとんどなかったが、OK-432 よりもわずかに低い傾向があった。

OK-TX-ppt と OK-432w を腹腔投与した際の血清中のサイトカイン量は Fig. 6 に示した。しかし、産生量は非常に低く、3 匹のマウスを用いた結果では両グループでの差はほとんどみられなかった。ただし IL-12 産生は、OK-TX-ppt が OK-432w よりも高い傾向 ( $p<0.08$ ) が見られた。



**Fig. 5. マウス脾臓細胞におけるサイトカイン誘導活性**

OK-432w と OK-TX-ppt のマウス脾臓細胞におけるサイトカイン誘導活性を調査した。脾臓細胞は BALB/c マウスから得た。細胞は図の濃度で 24 時間刺激した後に、培養上清中のサイトカインのレベルは ELISA で測定した。データは独立した 3 つの系で得られた数値の mean±SD で表示した。



**Fig. 6. マウス血清中の各種サイトカイン誘導活性**

500  $\mu$ g OK-432w / 500  $\mu$ l PBS、500  $\mu$ g OK-TX-ppt / 500  $\mu$ l PBS、500  $\mu$ l PBS のみ をそれぞれ 0 日目から 10 日目まで一日おきに腹腔注射によりマウスに投与した。11 日目にマウスを犠牲死させ、血清中のサイトカインのレベルを ELISA で測定した。データは独立した 3 つの系で得られた数値の mean  $\pm$  SD で表示した。

#### 4. 考察

岡本らは、標準的な DNA 精製法である細胞溶解後 DNA 画分を分離しイソプロパノールで沈殿させる方法を用いて TLR9 を介して細胞を活性化させる OK-DNA (15) や、LPS や LTA などの細菌由来高分子複合糖質の抽出に広く用いられている方法であるブタノール抽出 (20, 21) 後にアフィニティー精製することにより TLR4 を介し Th1 型のサイトカイン誘導する OK-PSA (14) や TLR2 と TLR4 を介して Th1/Th2 バランスを Th2 優位にする OK-PTF (14) などの存在を報告している。これらのうちで CpG DNA はよく知られた Th1 誘導成分であることから、OK-DNA は OK-432 の主要な抗腫瘍活性成分であると考えられる。また OK-PSA の構造が LTA に類似していることを示唆しており (22)、複合糖質が OK-432 の活性成分の 1 つであるかもしれないとしている。しかし、OK-PTF の原因物質については明らかではない。

そこで、筆者は OK-432 から Th2 分化を誘導する成分の抽出を試みることにした。第 2 章に示したように、フェノール\_クロロホルム\_石油エーテル (PCP) を用いた Galanos 抽出 (23) では、PCP 可溶性の Gal-Ext が、Th2 を誘導することが明らかになった。しかし、得られた収量が少なく、更なる分析を行うことが困難であった。

第 3 章に示したように、OK-432 と同様のグラム陽性菌である *E. hirae* は、そのブタノール抽出物中にリポプロテイン様の物質を含むことを、リポプロテイン認識抗体を用いた実験から明らかにした (21)。また、最近筆者の所属グループは、黄色ブドウ球菌のブタノール抽出物が TLR2 を介して細胞を活性化するリポプロテインを含むことをノックアウト株を用いた実験から明らかにした (21)。また、*S. aureus* のリポプロテインは TX-114 を用いた相分離によっても抽出可能であることがわかっている (21)。TLR2 リガンドが Th 細胞を Th2 に分化させることが報告されていることから (9, 10)、OK-432 中のこのような化合物が Th1 反応による抗がん活性に影響を与えている可能性が考えられる。

そこで本章では、OK-432 を TX-114 を用いて抽出することによってリポプロテ

イン様の成分の抽出を試みた。OK-432w の TX-114 抽出残渣菌体である OK-TX-ppt は、ルシフェラーゼアッセイの結果から TLR2 依存性活性を持たないことがわかった (Fig. 2)。これは、OK-432w 中に含まれていた TLR2 リガンドが、分配によって抽出できたことを示している。また、OK-TX-ppt はヒト PBMC に対して IL-6 だけでなく (Fig. 1)、TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-12、IFN- $\gamma$  をも誘導したことから (Fig.3)、OK-TX-ppt には、TLR2 リガンド以外の活性成分が存在していることがわかった。しかし、IL-10 産生量は OK-432w 刺激時よりも少なく、一方 IFN- $\gamma$  産生量は多かった (Fig. 3)。これらのことは、PBMC に対して OK-TX-ppt は OK-432w よりも優れた Th1 誘導剤であることを示している。

押川らは Th1 誘導剤である OK-PSA が腫瘍移植マウスに対して抗腫瘍活性を示すことを報告している (14)。そこで、OK-TX-ppt の抗腫瘍活性も同様なインビボの方法で検討し、OK-TX-ppt が OK-432w よりも抗腫瘍活性が強つたことを見いだした (Fig. 4)。この効果は、OK-TX-ppt がマウス細胞の Th1 型のサイトカインの産生を増強させること (Fig. 5) が原因であると考えられる。しかし、マウスに腹腔注射した際の血清中のサイトカイン量は、OK-TX-ppt と OK-432w との間でほとんど差がみられなかった (Fig. 6)。今回のインビボ実験では、腫瘍移植も薬剤投与も腹腔内で行ったことから、血中ではなく腹腔内での局所サイトカイン濃度の変化が抗腫瘍活性に寄与した可能性が考えられる。

今回得た結果は、OK-432w から TLR2 リガンドを除去することが Th1 分化誘導を導いた一つの原因であることを示唆している。TLR2 リガンドは、Th2 分化を誘導することが示唆されている。岡本らの分離した Th2 分化誘導能を持つ OK-PTF は、腫瘍移植マウスでの抗腫瘍活性が OK-PSA よりも弱いことが示されている (14)。OK-PTF は TLR2 と TLR4 の両方のリガンドを含んでいる。TLR4 リガンドが Th1 分化を誘導することは OK-PSA の実験で示されていることから、TLR2 リガンドが Th2 型のサイトカインを誘導して、抗腫瘍活性を減弱していると考えられる。

現在のところ OK-432w から TLR2 リガンド本体を定量的に分離できていないものの、今回の検討から TX-114 相分離による TLR2 リガンドの除去が OK-432 の抗がん活性を増強することが明らかとなった。OK-432 は Th1、Th2 両型のサイト

カインを誘導することから、その二者の分離が抗がん活性の増強や副作用の減弱には重要である。

残念ながら TLR2 リガンドを担う成分を特定するには至らなかったが、TX-114 相分離法を用いた方法により、Th2 型のサイトカインを誘導して抗腫瘍活性を減弱していると考えられる TLR2 リガンドの除去に成功し、インビボの系においても明らかにその効果が得られたことから、本方法は OK-432 の免疫療法の効果改善に役立つ成果となるものであると考えられる。

## 参考文献

- (1) Underhill, D. M., and Ozinsky, A. (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14:103-110.
- (2) Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. and Kimoto, M. (1999) *J. Exp. Med.* 189:1777-1782.
- (3) Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K. and Akira, S. (2001) *Int. Immunol.* 13: 933-940.
- (4) Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K. Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L. and Akira, S. (2002) *J. Immunol.* 169: 10-14.
- (5) Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000) *Nature.* 408: 740-745.
- (6) Krieg, A. M. (2002) *Annu Rev Immunol.* 20: 709-760.
- (7) Eisenbarth, S. C., Piggott, D.A., Huleatt, J. W., Visintin, I., Herrick, C.A. and Bottomly, K. (2002) *J. Exp. Med.* 196:1645-1651.
- (8) Kaisho, T., Hoshino, K., Iwabe, T., Takeuchi, O., Yasui, T. and Akira, S. (2002) *Int. Immunol.* 14:695-700.
- (9) Redecke, V., Hacker, H., Datta, S. K., Fermin, A., Pitha, P. M., Broide, D. H. and Raz, E. (2004) *J. Immunol.* 172: 2739-2743.
- (10) Kiura, K., Kataoka, H., Yasuda, M., Inoue, N. and Shibata, K. (2006) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48: 44-55.
- (11) Imanishi, T., Hara, H., Suzuki, S., Suzuki, N. and Akira, S. (2007) *J. Immunol.* 178: 6715-6719.
- (12) Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J. and Strober, W. (2004) *Nat. Immunol.* 5: 800-808.
- (13) Tada, H., Aiba, S., Shibata, K., Ohteki, T. and Takada, H. (2005) *Infect. Immun.* 73: 7967-7976.
- (14) Oshikawa, T., Okamoto, M., Ohe, G., Furuichi, S., Nishikawa, H., Uddin, A. S., Yoshida, H., Moriya, Y., Matsubara, S., Ryoma, Y., Saito, M. and Sato, M. (2003) *Int. Immunopharmacol.* 3: 643-655.
- (15) Oshikawa, T., Okamoto, M., Tano, T., Sasai, A., Kan, S., Moriya, Y., Ryoma, Y., Saito, M., Akira, S. and Sato, M. (2006) *J. Immunother.* 29: 143-150.
- (16) Hashimoto, M., Tawaratsumida, K., Kariya, H., Kiyohara, A., Suda, Y., Krikae, F.,

- Kirikae, T. and Gotz, F. (2006) *J. Immunol.* 177: 3162-3169.
- (17) Shibata, K., Hasebe, A., Sasaki, T. and Watanabe, T. (1997). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 19: 275.
- (18) Hirschfeld, M., Ma, Y., Weis, J. H., Vogel, S. N. and Weis, J. J. (2000) *J. Immunol.* 165 : 618-622.
- (19) Hashimoto, M., Asai, Y. and Ogawa, T. (2004) *Int. Immunol.* 16: 1431-1437.
- (20) Morrison, D. C. and Leive, L.(1975) *J. Biol. Chem.* 250: 2911-2919.
- (21) Morath, S., Geyer, A. and Hartung, T. (2001) *J. Exp. Med.* 193: 393-397.
- (22) Okamoto, M., Ohe, G., Oshikawa, T., Nishikawa, H., Furuichi, S., Yoshida, H., Matsuno, T., Saito, M. and Sato, M. (2000) *Immunopharmacology.* 49: 363-376.
- (23) Galanos, C., Luderitz, O. and Westphal, O. (1969) *Eur. J. Biochem.* 9: 245-249.



## 第五章 総括

OK-432 は日本では 1975 年に抗悪性腫瘍剤として製造承認され、その後 1989 年の再評価により効能・効果および用法・用量が変更されたが、現在でも臨床で応用されている。また、小児期に発症するリンパ管腫について 1993 年に希少疾病用医薬品の指定を受け、1995 年に追加承認された。

OK-432 は強力な癌免疫療法剤として、胃癌や原発性胃癌症例に対する化学療法剤との併用による延命効果、消化器癌や肺癌症例に対する腫瘍縮小効果をはじめ、頭頸部癌を含めて多くの領域の悪性腫瘍において用いられ、有効例が多数報告されている。しかし OK-432 は全菌体であるため、抗腫瘍免疫活性を増強させる成分以外に多くの夾雑物を含む。そのため副作用や効果減弱を引き起こし、必ずしも必要とした効果が得られていないのが現状である。

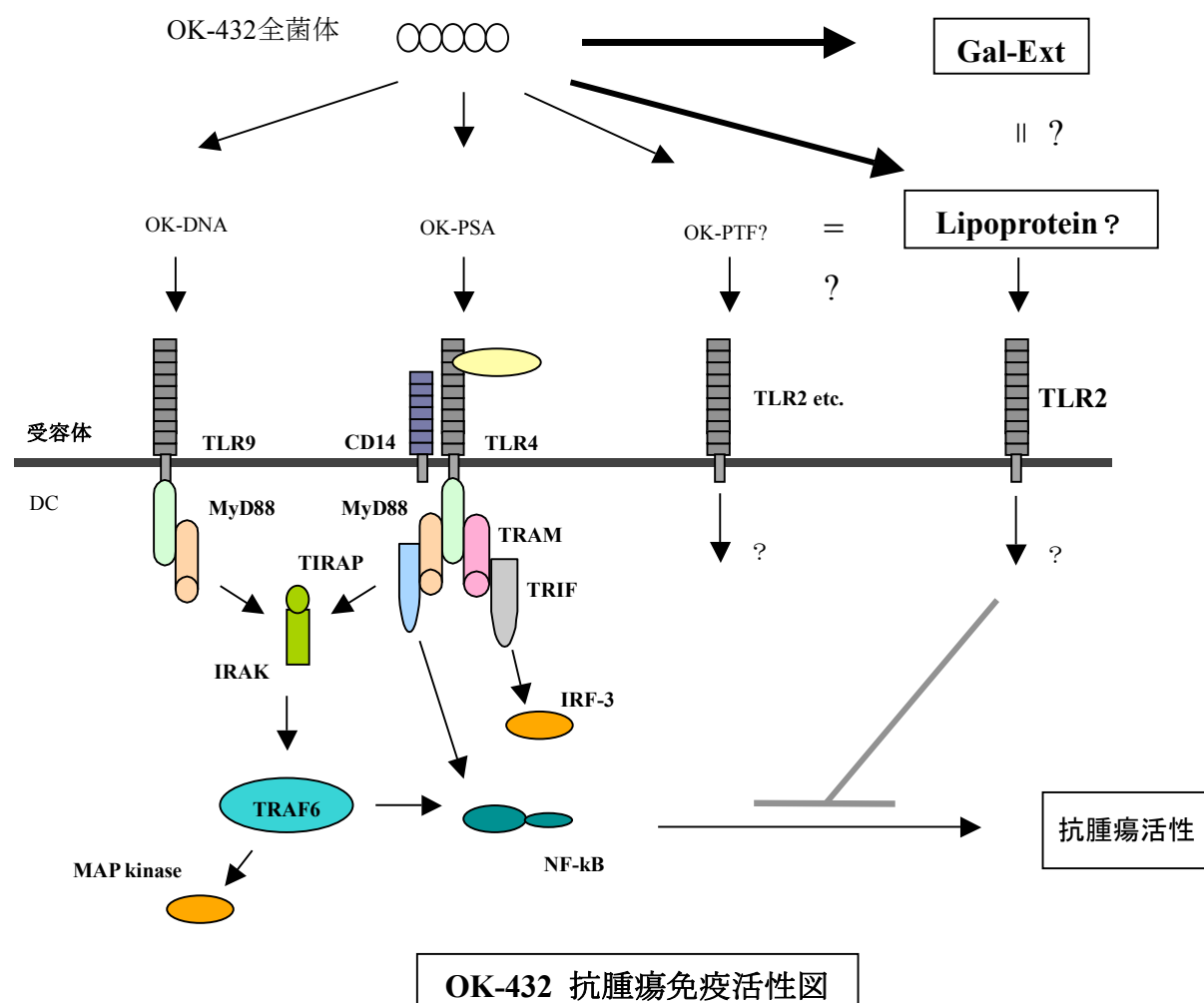
また、多くの研究者によりその抗腫瘍効果のメカニズム、抗腫瘍の分子メカニズムの研究が行われてきた。岡本らは、OK-432 が抗腫瘍効果を発現するためには、貪食細胞が OK-432 を取り込むことが重要であり (1)、貪食細胞は OK-432 を取り込むことにより TLR シグナルに関係なく活性化することを示している。しかし、その活性化は一過性のものであり *in vivo* で抗腫瘍効果を発現するには至らない。また、IFN- $\gamma$  を持続的に誘導し *in vivo* で抗腫瘍免疫活性を発現するためには TLR レセプター由来のシグナルが必要であることも示した。

また岡本らは、TLR9 を介して細胞を活性化させる OK-DNA や、TLR4 を介し Th1 型のサイトカイン誘導する OK-PSA や、TLR2 と TLR4 を介して Th1/Th2 バランスを Th2 優位にする OK-PTF などの存在を報告している。すなわち、OK-432 は少なくとも 2 種類の活性成分を保有し、それぞれが TLR4 および TLR9 の異なった経路を介して抗腫瘍免疫活性を発現することを明らかとした。さらに、OK-432 が樹状細胞療法の効果的なアジュバンドとなることも強く示唆している。

しかし、全菌体制剤である OK-432 中に含まれる成分のすべてが明らかにされているとはいえず、OK-432 の抗腫瘍活性の活性化機構の全容は明らかになっていない。特に本研究でその存在が示唆されたりポプロテイン成分については、これまで全く検討が行われておらず、抗腫瘍活性への影響を含めて本研究によって初めて明らかにされたものである。まず第 2 章で示したように、複合糖質の抽出に汎用され

る Galanos 抽出により得た、DC を介さずに直接免疫活性を鼓舞する直接作用や好中球を介した経路で作用する TNF- $\alpha$  誘導活性画分は、既知の OK-432 由来の免疫活性画分とは明らかにその作用が違い、OK-432 由来の新規免疫活性成分と考えられた。ついで第 3 章では、その成分がリポプロテインである可能性を示した。さらに第 4 章では、OK-432 からリポプロテインの抽出を試み、抽出後の菌体残渣が、未処理の OK-432 よりも高い IFN- $\gamma$  誘導活性と、担ガンマウスに対する高い抗腫瘍活性を示すことが明らかになった。これらのことは、リポプロテインが OK-432 の新規の免疫刺激成分であること、またその除去が OK-432 などの細菌製剤の免疫療法効果の改善に役立つ成果となる独創的で簡便な手法となりうることを示している。

我々は今回の研究において、岡本らが明らかにした OK-PSA や OK-DNA の他に、リポプロテイン様の TLR2 を活性化する物質の存在を示した。これらの検討結果をもとに、OK-432 の抗腫瘍免疫活性をまとめると以下の図のようになる。



本研究では、この活性成分の構造決定までは至らなかったが、これらの結果は、現在でも尚癌治療において有効な BRM として使用されている OK-432 の免疫メカニズムの解明の一助を担うものであると考える。

今後さらに、OK-432 中の TLR2 リガンドの構造について検討を行うことにより、OK-432 の抗腫瘍作用メカニズムの解明に寄与できるものと考ええる。また、簡便に TLR2 リガンド成分を抽出することができる TX-114 相分離法の、様々な細菌への効果を調査することにより、グラム陽性菌の免疫活性研究への更なる貢献が可能になると考える。

#### 参考文献

- (1) Sato, M., Kaji, R., Urata, M., Furumoto, N. and Saito, M. (1988) *J. Biol. Res. Mod.* 7: 211-228.



## 概要

本論文は、細菌製剤ピシバニール（OK-432）に含まれる免疫活性化成分の研究についてまとめたものである。

第1章では、序章として、本研究の意義について記載した。

癌の免疫療法は、患者の低下した免疫能を人為的に操作、増強することにより癌の増殖を制御し、治療効果を高める療法であり、生体応答調整剤 (Biological response modifiers : BRM)として、現在臨床の場に用いられている。なかでも非特異的免疫療法は、低下した癌患者の免疫能を非特異的に高め、腫瘍の増殖を抑制し、再発の防止および延命を期待するものである。OK-432 は 1975 年に抗悪性腫瘍剤として承認されて以来、強力な癌の免疫療法剤として広く臨床に用いられ、有効例が多数報告されている。しかし、OK-432 は全菌体であるため、抗腫瘍免疫活性を増強させる成分以外に多くの夾雑物を含む。そのため副作用や効果減弱を引き起こし、必ずしも必要とした効果が得られていないのが現状である。これまで、多くの研究者によりその抗腫瘍効果のメカニズム、抗腫瘍の分子メカニズムの研究が行われてきた。しかし、全菌体制剤である OK-432 中に含まれる成分のすべてが明らかにされてはおらず、どの成分が抗腫瘍活性を発揮し、一方でどの成分が抗腫瘍活性を抑制するものかも明らかとされていない。本研究では、OK-432 の分子レベルにおける抗腫瘍メカニズムの解明の一助として、OK-432 に含まれる免疫活性化成分について研究した。

第2章では、グラム陽性菌 *Streptococcus pyogenes* の全菌体である OK-432 からの免疫活性化成分の抽出を目的とした。OK-432 を通常グラム陰性菌で用いられる Galanos 抽出に供試することにより、TNF- $\alpha$  誘導活性を示す可溶性画分である Gal-Ext を得ることができた。この Gal-Ext は DC を介した免疫活性を示さず、直接免疫活性を鼓舞する直接作用や好中球を介した経路に関与する新規の物質である可能性が示唆された。この結果は、OK-432 が抗腫瘍効果に関与する様々な未知の活性分子を含むことを示唆するものである。

第3章では、類縁のグラム陽性菌である *Enterococcus hirae* をモデルとして新規の活性成分について検討した。第2章で得られた Gal-Ext 画分は微量であり、さらなる精製及びその機能解析は困難であったため、まず活性成分の性質を明らかにする

ために、これまで *E. hirae* の活性成分と考えられていた LTA 画分を用いて、その活性を中和するマウスモノクローナル抗体を作製した。ついで、この抗体を用いて免疫活性阻害試験およびウェスタンブロットによる認識構造の検討を実施した。その結果、グラム陽性菌の免疫活性化には LTA ではなく LTA 画分に微量含まれるリポプロテインが関与することが示唆された。OK-432 中におけるリポプロテインの存在はこれまで報告されておらず、またその活性化機構が Gal-Ext と一致することから、未知の成分がリポプロテインである可能性が示唆された。

第 4 章では、OK-432 中に含まれると考えられるリポプロテインの抗腫瘍活性に対する影響を検討した。まず、リポプロテインの抽出を試みた。その結果、バクテリア由来リポプロテインの抽出法であるトリトン X-114 (TX-114) 相分離法を用いて OK-432 を処理し、抽出物および抽出残渣画分 (OK-TX-ppt) を得た。ついで、それぞれについてインビトロとインビボにおける免疫生物学的を検討した。その結果、OK-TX-ppt が、リポプロテイン様活性化物質を含まないこと、抗腫瘍作用に重要とされている IFN- $\gamma$  誘導活性を有すること、担ガンマウスに対して未処理の OK-432w よりも高い延命効果を示すことが明らかになった。これらのことは、TX-114 相分離法による抽出が本製剤の抗腫瘍活性を増強することを示している。

第 5 章では、本研究を総括した。

OK-432 は抗腫瘍効果に関与する様々な活性分子が存在しており、活性亢進または活性抑制に働くことから、その二者の分離が抗腫瘍活性の増強や副作用の低減には重要となる。第 2 章では新規免疫活性成分の存在の可能性を示唆したものの、そのさらなる精製及び構造解析までは至らなかった。そこで第 3 章においてグラム陽性菌の免疫活性を抑制する中和抗体を作製し、グラム陽性菌に含まれるリポプロテインが活性成分である可能性を示唆した。さらに、第 4 章ではリポプロテインの抽出法として知られている TX-114 抽出により OK-432 からのリポプロテインの抽出を試み、リポプロテインの除去が、本製剤の抗腫瘍活性を増強することを明らかにした。本手法は、OK-432 に含まれる抗腫瘍効果を抑制する物質の抽出法として、免疫療法効果の改善に役立つ重要な成果となるものである。

## Summary

In this thesis, I described results of immunobiological research for the active components in immunotherapeutic agent Picibanil (OK-432).

Chapter 1 is an introduction of this research. Immune responses of cancer patients are relatively weaker than those of healthy people. Immunotherapy of cancer is a treatment which stimulates immune response in the patients to control multiplication of cancer cells and enhance the therapeutic effects of other treatment. Biological response modifier (BRM) treatment is often used as an immunotherapeutic method of cancer treatment. OK-432 is a BRM prepared from Gram-positive bacteria *Streptococcus pyogenes* and widely used as a powerful immunotherapeutic agent to exert antitumor activity. The effects of OK-432 are well studied and mechanisms of the actions are clarified as a whole agent level. However, structure-activity relationship of OK-432 has not been well studied in a molecular level. OK-432 is a bacterial agent and contains many components which may consist of contaminants which cause side effects or attenuation of the useful effects as well as compounds responsible for antitumor activity. In the present study, I separated active compounds from OK-432 and investigated their immunobiological properties.

In Chapter 2, I aimed at separation of immunobiologically active compounds from OK-432. OK-432 was subjected to Galanos extraction, which is usually used for an extraction of glycoconjugates from Gram-negative bacteria, to get a soluble fraction (Gal-Ext). Gal-Ext showed TNF- $\alpha$  inducing-activity, but did not stimulate DC cells. These results suggested that Gal-Ext contains a new component which activated immune system through a neutrophil-mediated pathway. However, Gal-Ext still contained multiple compounds and further purification and analysis were difficult because of the low yields of Gal-Ext.

In Chapter 3, model experiments for OK-432 were carried out to solve the problems arose in Chapter 2. Gram-positive *Enterococcus hirae* was used as a model bacteria. To clarify the active compounds, monoclonal antibody that neutralized the activity of *E. hirae* was established. The antibody inhibited the activity of active fraction separated from *E.*

*hirae* and specifically recognized chemically synthesized bacterial lipopeptides. These results suggested that lipopeptide-like compounds are responsible for the immunobiological activity of Gram-positive bacteria and OK-432 may contain similar active compounds.

In Chapter 4, the influence of lipopeptide-like compounds contained in OK-432 against the antitumor activity was studied. OK-432 was subjected to Triton X (TX)-114 phase partitioning which is used for the extraction of lipoproteins from bacterial cells to obtain extracts and residual cells (OK-TX-ppt). The immunobiological activities of the preparations were examined *in vitro* and *in vivo*. IFN- $\gamma$ -inducing activity of OK-TX-ppt *in vitro* was higher than that of OK-432. The survival time of tumor-bearing mouse administrated with OK-TX-ppt was also significantly longer than that with OK-432. These results showed that extraction of lipopeptide-like compounds from OK-432 improved the antitumor activity of OK-432.

Chapter 5 is a summary of this study. OK-432 consists of various kinds of immunoactivating components which participate in the antitumor effect or inhibit the effects. To improve the antitumor effect of OK-432, separation of these components were important. In Chapter 2, I showed a possibility that new immunoactive compound(s) existed in OK-432, but further purification and structural analysis was impossible because of low yields. In Chapter 3, I found that lipopeptide-like compounds were the active compounds in Gram-positive bacteria. In Chapter 4, removal of the lipopeptide-like compounds in OK-432 was examined by TX-114 phase partitioning and the residual extracted cells was found to exert stronger antitumor activity compared with the original OK-432. These result showed a possibility that lipopeptide-like compounds are responsible for the attenuation of antitumor effects of OK-432 and TX-114 phase partitioning is beneficial for an improvement of the immunotherapeutic effect of the agents.



## 論文リスト

- (a) Masahito Hashimoto, Maiko Furuyashiki, Ryoko Kaseya, Yuko Fukada, Mai Akimaru, Kazue Aoyama, Toshiomi Okuno, Toshihide Tamura, Teruo Kirikae, Fumiko Kirikae, Nobutaka Eiraku, Hirofumi Morioka, Yukari Fujimoto, Koichi Fukase, Katsuhiko Takashige, Yoichiro Moriya, Shoichi Kusumoto, and Yasuo Suda. Evidence of Immunostimulating Lipoprotein Existing in the Natural Lipoteichoic Acid Fraction. (2007) *Infection and Immunity*, Vol. 75, No. 4, 1926-1932.
- (b) Masahito Hashimoto, Katsuhiko Takashige, Maiko Furuyashiki, Keitaro Yoshidome, Ryoko Sano, Yutaka Kawamura, Shinji Ijichi, Hirofumi Morioka, Hiroyuki Koide, Naoto Oku, Yoichiro Moriya, Shoichi Kusumoto, Yasuo Suda. Enhancement of antitumor effect of OK-432 (Picibanil) by using Triton X114 phase partitioning. (2008) *International Immunopharmacology*, Vol. 8, No. 1, 12-19.

## 謝辞

本研究は、大阪大学大学院 理学研究科 化学専攻 学際化学講座 天然物有機化学研究室における派遣期間 2 年間及び、鹿児島大学大学院理工学研究科 ナノ構造先端材料工学専攻 生体適合材料工学講座 生体分子コンジュゲート材料研究室において 5 年間に渡り行った研究の成果であり、多くの方々の御指導・御支援を受け本研究を遂行することができました。

大阪大学派遣時から鹿児島大学に於ける 7 年間に渡り、様々な面で御指導・御鞭撻を頂いた、鹿児島大学 隅田泰生教授、橋本雅仁准教授に深謝致します。また、本研究を遂行するにあたり御協力頂いた、鹿児島大学 古屋舗舞子研究員に感謝致します。

本研究について審査・御指導頂いた、鹿児島大学 杉村和久教授に深謝致します。

大阪大学派遣時に、2 年間に渡り、暖かく時には厳しく御指導・御鞭撻頂いた、大阪大学楠本正一名誉教授に深謝致します。また、他にも様々な面で御指導・御鞭撻頂きました大阪大学 小谷尚三名誉教授、深瀬浩一教授に感謝致します。

本研究を遂行するにあたり御指導・御鞭撻を始め、多大に御協力頂いた、徳島大学岡本正人先生、押川哲也先生に深謝致します。

動物実験やヒトサイトカイン測定等で御協力頂きました静岡県立大学 奥直人教授、東京大学医科学研究所 三宅健介教授、兵庫医科大 田村俊秀教授・青山和枝先生に感謝致します。

本研究に携わる機会を与えて頂いた、野垣兼朗 元執行役員に感謝するとともに、本研究を遂行するにあたり最後まで御指導・御支援頂いた、中外製薬(株) 吉田彪 元常務、斉藤元男 常勤監査役、斉藤誠司 育薬研究部長、守屋陽一郎 育薬研究部課長、をはじめ多くの関係者の皆様に感謝致します。

最後に、7 年に渡る研究生活を影で支えてくれた妻 佐和子と、心の支えとなってくれた 3 人の息子達 翔平・佑太・陽生、および両親に感謝致します。