

# 学位論文の要旨

氏 名 高重 克洋

学位論文題目 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

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ならず、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。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第291号	氏 名	高 重 克 洋
審査委員	主 査	隅 田 泰 生	
	副 査	杉 村 和 久	橋 本 雅 仁

## 学位論文題目

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))

## 審査要旨

提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。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述べたもので、全文5章より構成されている。

第1章では、序章である。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、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、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の存在を明確にした結果について述べている。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を示唆している。また、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、その活性化機構が第2章で得た新規物質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も示唆した。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、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 を処理することにより抽出残渣画分 (OK-TX-ppt) を得、その 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-g 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-432 よりも高い延命効果を示すことを明らかにした。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おり、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とともに、OK-432の免疫メカニズムの解明の一助を大きく担うものである。第5章は、本研究の総括である。

以上、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に関する研究で、OK-432 に含まれる未知の免疫活性化成分について検討を行い、その存在を明らかとするとともに、その成分がリポプロテインであることを示唆した。またこの成分の独創的で簡便な選択的方法による除去により抗腫瘍活性が増強されることを明らかとした。これらの結果は、30年以上にも及ぶ OK-432 における免疫活性化成分の検討においては画期的なことであり、がん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大きく担うものであるとともに、臨床への応用も期待される本手法は高く評価できる。

よって、審査委員会は博士（工学）の学位論文として合格と判定する。

## 最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第291号	氏 名	高 重 克 洋
審査委員	主 査	隅 田 泰 生	
	副 査	杉 村 和 久	橋 本 雅 仁

平成20年2月8日15：30から行われた学位論文発表会において、審査委員を含む18名の前で学位論文の内容が説明され、その後、以下に示すような質疑応答が行われた。いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

〔質問1〕 今後この研究をどのように活かして発展させていくのか。

〔回答〕 OK-432は菌体制剤であり、現状では新規医薬品として承認されることはまず有り得ないと考える。しかし、本手法のような簡便かつ選択的な手法によるTLR2リガンド除去法およびその手法による抗腫瘍活性効果の増強は非常に魅力的でありまた、臨床場においては今後利用の可能性もあるかもしれない。今後、この物質の分子メカニズムの研究を行う必要があると考える。

〔質問2〕 抗腫瘍効果を減弱する成分を解析するのではなく、その成分を除去した後の残渣の抗腫瘍効果の増強を検討した意義はなにか。

〔回答〕 OK-432は菌体制剤であるために、抗腫瘍効果を示す物質以外にも多くの副作用や効果の減弱を含む物質を含んでいる。OK-432が期待した抗腫瘍効果を発揮しない原因は、これらの多くの免疫活性物質が複雑に絡み合い作用することにある。本研究では、量的な制限から構造決定までは辿り着いていないものの、効果減弱の原因となる物質の存在を明確に示した。また、その選択的除去により担癌マウスにおいてその抗腫瘍効果の明らかに増強することを見いだした。長年のOK-432研究の歴史の中で、明確な抗腫瘍活性増強効果を得た例は少なく、この点が本研究の特筆すべき成果である。原因物質の特定は今後の課題として重要であることは認識している。

〔質問3〕 通常精製されると活性は濃縮され強くなるが、TX抽出物においてそうならない理由は何か。

〔回答〕 今回の原因についてはまだ明らかになっていないので検討は必要である。しかし、我々は天然物からの免疫活性成分の抽出・精製検討においてこのような経験を多くしており、一概に精製することによって、成分の物性が変わり、その結果活性が期待するほど濃縮されない場合もあると考えている。またOK-432は菌体制剤であるため、今回我々が注目した成分以外にも微量の活性成分等が多く存在し、画分からは除かれている可能性も考えられる。

〔質問4〕 その他、TLCブロッティング法やサイトカイン測定等の実験に関する質問

〔回答〕 それぞれの質問について、実施方法・考え方等を適宜問題なく説明できた。

以上のことから審査委員会は、申請者が博士課程の修了者としての学力ならびに見識を有するものと認め、博士（工学）の学位を与えるに足る資格を有するものと判定した。