

学位論文題名

マウス実験モデルにおける合成リピドA誘導体による
癌転移および敗血症の抑制とその作用機序に関する研究

学位論文内容の要旨

グラム陰性桿菌細胞壁由来のリポ多糖(LPS; Lipopolysaccharide)は内毒素(endotoxin)として知られ、その生物活性中心がリピドAであることが報告されている。リピドAは、内毒素活性の他に、感染抵抗性の増強や抗腫瘍効果などの免疫賦活作用を有することから、癌や細菌およびウイルス感染症への臨床応用を目的として、免疫賦活作用を有しかつ低内毒素性のリピドA誘導体の開発が進められている。一方、細菌感染症による死因に敗血症が関係し、敗血症はLPSに起因することが知られている。近年、敗血症治療薬の開発を目的として、リピドA関連化合物のなかから内毒素活性が低く、LPSのアンタゴニストとして有効な化合物の探索が行われている。本研究では、マウス実験モデルにおいて低内毒素性合成リピドA誘導体DT-5461の腫瘍に対する抗転移効果と敗血症に対する防御効果を明らかにするとともに、それらの作用機構について検討した。

1. マウス悪性Tリンパ腫であるL5178Y-ML25細胞を用いた肝転移実験モデルおよびマウス悪性黒色腫であるB16-BL6細胞の肺転移実験モデルにおいて、DT-5461は転移抑制効果を有することが明らかとなった。また、悪性Tリンパ腫および悪性黒色腫の担癌マウスに対してDT-5461の投与は未処理群と比較して著明な延命効果を示した。以上の結果から、癌転移抑制剤としてのDT-5461の有効性が示唆された。
2. マウス腹腔マクロファージおよびヒト末梢血単球においてDT-5461はLPSあるいは合成リピドAと比較してIL-1とTNF- α 誘導能および腫瘍細胞傷害活性能が著しく減弱していたが、脾細胞のNK活性能についてはDT-5461はLPSとほぼ同等の増強効果を有することが明らかとなった。また、正常マウスにおいて、DT-5461の単独投与は血清中におけるIL-1あるいはTNF- α の誘導能が低いことが示された。一方、担癌マウスにおけるDT-5461の頻回投与は血清中では顕著なTNF- α の産生を誘導しなかったが、腫瘍組織中では著しいTNF- α の産生を誘導した。以上の結果から、DT-5461の腫瘍に対する抗転移効果の作用機序は宿主の免疫機構の活性化に基づくことが示唆された。

3. マウスにおいて、DT-5461は腫瘍誘導性血管新生と腫瘍細胞の増殖に対し阻害効果を示し、その作用機序として腫瘍組織内で誘導されたTNF- α による血管内皮細胞への増殖抑制効果に基づくことが示唆された。これらの結果から、DT-5461の癌転移抑制効果の作用機序の一つとして癌転移形成過程における腫瘍誘導性血管新生の阻害が示唆された。
4. マウスTリンパ腫肝転移実験モデルにおいて、LPSの連日頻回投与はLPSの有する転移抑制効果に対してリピドAに特異的な寛容状態(LPSトレランス)を誘導することが示された。LPSトレランスが誘導されたマウスでは正常マウスと比較して、LPS誘導性のTNF- α の産生およびマクロファージとNK細胞の腫瘍細胞傷害活性の低下が認められたが、TGF- β の産生の増強が観察された。LPSトレランス誘導マウスにおけるNK細胞の腫瘍細胞傷害活性の低下は、TGF- β の有するNK活性抑制効果に基づくことが示唆された。また、マクロファージのLPSに対する反応性の低下はLPS受容体のLPS結合能と発現の低下ではなく、LPSによるMAPKカスケードの活性化などの細胞内シグナル伝達の阻害が示唆された。以上の結果より、LPSはその癌転移抑制効果に対してトレランスを誘導し、トレランス誘導機構においてマクロファージおよびNK細胞の機能低下が重要な役割を担っていることが示唆された。
5. DT-5461はマウス腹腔マクロファージおよびヒト末梢血単球において、リピドA特異的にLPS誘導性のIL-1およびTNF- α の産生を抑制した。また、マウス実験的敗血症モデルにおいて、DT-5461はLPS誘導性のIL-1およびTNF- α の産生を抑制し、さらに、これらのマウスに対し延命効果を示した。これらの結果から、マウスにおいて、DT-5461は単球／マクロファージのLPS誘導性のサイトカインの産生に対するLPSアンタゴニストとして作用し、敗血症治療薬としての可能性が示唆された。
6. ヒト末梢血単球のIL-1およびTNF- α の産生におけるDT-5461のLPSアンタゴニズムはmRNAの発現の阻害に基づくことが明らかとなった。DT-5461によるLPSアンタゴニズムの機序として、LPSのLPS受容体への結合に対する競合結合阻害とLPSによるMAPKカスケードの活性化などの細胞内シグナル伝達の阻害が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	東	市 郎
副 査	教 授	谷 口 和 彌	
副 査	教 授	菊 池 九二三	
副 査	講 師	劉	永 春

学 位 論 文 題 名

マウス実験モデルにおける合成リピドA誘導体による 癌転移および敗血症の抑制とその作用機序に関する研究

グラム陰性桿菌細胞壁由来のリボ多糖(LPS; Lipopolysaccharide)は内毒素(endotoxin)として知られ、その生物活性中心がリピドAであることが報告されている。リピドAは、内毒素活性の他に、感染抵抗性の増強や抗腫瘍効果などの免疫賦活作用を有することから、癌や細菌およびウイルス感染症への臨床応用を目的として、免疫賦活作用を有しかつ低内毒素性のリピドA誘導体の合成がなされてきた。一方、細菌感染症による死因に敗血症が関係し、敗血症はLPSに起因することが知られている。近年、敗血症治療薬の開発を目的として、リピドA関連化合物のなかから内毒素活性が低く、LPSのアンタゴニストとして有効な化合物の探索が行なわれている。本論文では、マウス実験モデルにおいて低内毒素性合成リピドA誘導体DT-5461の腫瘍に対する抗転移効果と敗血症に対する防御効果ならびにその作用機構について検討し、以下の結果を示した。

1)マウス悪性Tリンパ腫L5178Y-ML25細胞の肝転移実験モデルおよびマウス悪性黒色腫B16-BL6細胞の肺転移実験モデルにおいて、DT-5461は転移抑制効果を有することが明らかとなり、悪性Tリンパ腫および悪性黒色腫の担痛マウスに対してDT-5461の投与は未処理群と比較して著明な延命効果を示した。また、その作用機序としてはマクロファージおよびnatural killer (NK)細胞の腫瘍細胞傷害活性に対する増強効果、腫瘍組織中でのtumor necrosis factor- α (TNF- α)の誘導効果、腫瘍組織内で誘導されたTNF- α による血管内皮細胞への増殖抑制に基づく腫瘍誘導性血管新生の阻害によることが示唆された。

2)マウスTリンパ腫肝転移実験モデルにおいて、LPSの連日頻回投与はLPSの有する転移抑制効果に対してリピドA特異的に寛容状態(LPSトレランス)を誘導することが示された。LPSトレランスが誘導されたマウスでは正常マウスと比較して、LPS誘導性のTNF- α の産生能およびマクロファージとNK細胞の癌細胞傷害活性の低下が認められたが、transforming growth factor- β (TGF- β)の産生能の増強が観察された。LPSトレランス誘導マウスにおけるNK細胞の癌細胞傷害活性の低下はTGF- β の有するNK活性抑制効果に基づくことが示唆された。また、マクロファ

ージのLPSに対する反応性の低下はLPS受容体のLPS結合能と発現の低下ではなく、LPS誘導性の細胞質内蛋白質チロシンリン酸化などの細胞内シグナル伝達機構の抑制に基づくことが示唆された。以上の結果より、LPSはその癌転移抑制効果に対してトレランスを誘導し、トレランス誘導機構においてマクロファージおよびNK細胞の機能低下が重要な役割を担っていることが示唆された。

3) DT-5461はマウス腹腔マクロファージおよびヒト末梢血単球において、リポD A特異的にLPS誘導性のinterleukin-1 (IL-1)およびTNF- α の産生を抑制した。また、マウス実験的敗血症モデルにおいてDT-5461はLPS誘導性のIL-1およびTNF- α の産生を抑制し、さらに、これらのマウスに対し延命効果を示した。IL-1およびTNF- α の産生におけるDT-5461のLPSアンタゴニズムはそのmRNAの発現の阻害に基づき、その機序として、LPSのLPS受容体への結合に対する競合結合阻害とLPS誘導性の細胞内シグナル伝達の阻害が示唆された。

このように申請者は、合成リポD A誘導体DT-5461の腫瘍転移抑制効果および敗血症抑制効果とその作用機構を免疫学的に明らかにし、腫瘍および敗血症への治療法を確立するうえでの基礎的研究に対し貢献するところ大なるものがある。

よって、申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認めた。