

博士（農学）竹田保之

学位論文題名

乳酸菌菌体外酵素により合成される抗腫瘍性多糖

S P R - 9 0 1 の作用メカニズムに関する研究

学位論文内容の要旨

Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum* の菌体外酵素により合成される抗腫瘍性の α -グルカンタイプの多糖 " S P R - 9 0 1 " の感染防御効果および抗腫瘍効果について調べ、その免疫賦活作用発現の機序について、免疫学的および生化学的に解析した。

免疫賦活性の多糖は生体の免疫担当細胞のうちマクロファージ (Mφ) の機能を亢進させることが知られている。そこでまず、Mφが防御細胞として重要な役割を担っている、リステリア菌感染における S P R - 9 0 1 の作用をマウスを用いて検討した。

S P R - 9 0 1 の経口投与はリステリア菌に対する感染防御効果を顕著に増強させた。すなわち、 1.8×10^5 CFUのリステリア菌をマウスに接種した場合、無処置のマウスでは60%程度の死亡例が見られたが、S P R - 9 0 1 を投与したマウスには死亡例は認められなかった。リステリア菌接種後の肝臓、脾臓および接種部位である腹腔内における同菌の増殖を経時的に測定したところ、無処置のマウスでは接種後翌日より対数增加的な増殖がみられ、3日目以降死亡する個体が現れた。一方、S P R - 9 0 1 を経口投与した場合は接種後3日目までは無処置マウスと同様なリステリア菌の増加が見られたが、その後5日目にかけて減少し宿主の防御効果が増強されていることが示唆された。感染後3～5日目以降のリステリア菌の

排除には、抗原特異的に感作されたT細胞により活性化されたMφが重要な役割を担っている。リステリア菌に対する抗原特異的免疫応答を遅延型足蹠反応で調べたところ、SPR-901の経口投与によりその反応は増強されていた。従って、SPR-901の経口投与は、T細胞を含めた抗原特異的な免疫応答を亢進させることが示唆された。

Mφは生体内に侵入した細菌や老廃物などの異物をその貪食能により処理する、いわゆる抗原非特異的な防御だけでなく、免疫応答の中心的役割を担うT細胞に抗原情報を提供したり、種々のサイトカインや生理活性物質を産生することにより、抗原特異的な防御にも関与している。MφによるT細胞への抗原提示は以下のステップから成り立つ。1) 抗原(異物)を取り込み断片化する、2) 断片化された抗原を主要組織適合抗原分子(MHCクラスII)とともに細胞表面へ提示する、3) ヘルパーT細胞がMHC分子と抗原分子を認識し増殖、活性化する。マウスMφのもつ抗原特異的なT細胞増殖を誘導する能力、いわゆる抗原提示能力をリステリア菌を抗原として測定したところ、SPR-901の投与により顕著に増強されていた。この時、SPR-901を投与したマウスMφの異物(細菌)貪食能、殺菌能には大きな変化は見られなかった。また、マウスマHCクラスII分子であるIa分子のMφでの発現にも変化はみられなかった。従って、SPR-901は前述した抗原提示のプロセスを活性化させるのではないと思われた。

MφはT細胞に抗原を提示するだけでなく種々のサイトカインを産生して免疫応答を調節していることが知られている。なかでもインターロイキン(IL)-1、IL-6などのサイトカインはT細胞の増殖、活性化に対して促進的に作用することが報告されている。これらのサイトカインのmRNAの発現や産生はSPR-901の投与により顕著に増強されてい

た。従って、SPR-901の経口投与によるT細胞を含めた免疫応答の増強は、MφからのIL-1、IL-6などのサイトカインの産生亢進によることが示唆された。

SPR-901はマウス同系腫瘍のMeth Aに対して経口投与により腫瘍増殖抑制効果を示す。しかし、この抗腫瘍効果は成熟T細胞を欠損しているヌードマウスでは認められなかった。従って、SPR-901の抗腫瘍効果においてもT細胞が重要な役割を担っていることが判明した。Meth A担癌マウスに再度Meth Aを移植して二度目に移植した腫瘍の増殖を見たところ、SPR-901投与群で有意にその増殖が抑制されていた。同様な実験において、二度目に移植する腫瘍を最初に移植した腫瘍とは抗原的に異なるものにした場合にはその増殖には差はなかった。従って、SPR-901は腫瘍に対しても宿主の抗原特異的な免疫応答を亢進させることが示唆された。

T細胞はその機能と細胞表面分子の発現様式から、ヘルパーT細胞(L3T4分子陽性)とキラー／サプレッサーT細胞(Lyt-2分子陽性)とに分けられる。SPR-901の抗腫瘍効果にこれらT細胞がどのように関係しているか検討した。まず、腫瘍の増殖を抑制できるエフェクター細胞について調べた。SPR-901を投与したMeth A担癌マウスのリンパ節細胞の腫瘍増殖中和活性は有意に増強されていた。この中和活性はおもにLyt-2分子陽性の細胞に見られたことから、Lyt-2陽性細胞がエフェクター細胞として働いていることが分かった。また、SPR-901を投与したマウスリンパ節細胞の*in vitro*で誘導した腫瘍傷害活性も有意に増強されていた。

SPR-901の抗腫瘍効果におけるT細胞の関与をさらに検討するた

め、L3T4分子陽性またはLyt-2分子陽性細胞を消失させたマウスにおけるSPR-901の抗腫瘍効果を検討したところ、いずれのマウスにおいても抗腫瘍効果は認められなかった。また、活性化T細胞からのIL-2産生を阻害するサイクロスボリンAを投与したマウスにおいてもSPR-901の効果は消失した。これらの結果はSPR-901の抗腫瘍効果におけるエフェクター細胞の一つはLyt-2分子陽性のキラーT細胞であるが、その誘導にはL3T4分子陽性のヘルパーT細胞の存在が必要であることを示している。

以上の結果より、SPR-901の経口投与により増強される感染防御効果と抗腫瘍効果はMφとT細胞の相互作用を介した抗原特異的免疫応答の亢進によることが明らかとなった。SPR-901は直接T細胞を活性化させる作用は持たないことから、この免疫応答の亢進はMφからのIL-1、IL-6などのサイトカインの産生増強が引き金となっているものと思われる。これらのサイトカインはT細胞の増殖・活性化因子であるヘルパーT細胞からのIL-2の産生に促進的に作用し結果的に免疫応答を亢進させるだけでなく、キラーT細胞などのエフェクター細胞の活性化を引き起こすものと考えられた。

SPR-901は成分的にも極めて純度が高い多糖体で毒性も少なく、さらに経口投与により全身性の免疫応答を増強させるという特徴を持つことからも新しいタイプの免疫療法剤となることが期待される。

学位論文審査の要旨

主査教授 千葉誠哉
副査教授 本間守
副査教授 富田房男

学位論文題名

乳酸菌菌体外酵素により合成される抗腫瘍性多糖 SPR-901の作用メカニズムに関する研究

本論文は、和文101頁、図18、表9、5章からなり、ほかに参考論文17篇が付されている。

癌の治療には外科的切除、放射線照射、化学療法剤などと共に免疫学的療法が用いられている。生体は外界からの侵入物はもとより、体内で生じた異常産物に対して恒常性を維持するため、それらを処理、排除しようとする防御機能を有している。免疫学的治療とは生体のもつ防御機能を賦活させることにより腫瘍の増殖を抑制・排除しようとするものであり、そのような抗腫瘍効果を示す物質は生物学的反応修飾物質と総称されている。乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* の菌体外酵素により合成される抗腫瘍性多糖SPR-901もそのような物質のひとつである。この多糖は、 α -1,6-結合のグルコースから構成される主鎖に約5%の α -1,3-結合の分岐を有する分子量約1,000万の α -グルカン（一種のデキストラン）であるが、経口投与によってマウスの腫瘍に対し抗腫瘍効果を示す。

本研究は、SPR-901のリステリア菌 (*Lysteria monocytogenens*) に対する感染防御効果とマウス纖維肉腫Meth Aに対する抗腫瘍効果について検討し、SPR-901の免疫賦活作用のメカニズムを明らかにすることを意図してなされたものであり、研究の結果は以下のように要約される。

1. 免疫賦活性多糖は、生体の免疫担当細胞のうちマクロファージ (Mφ) の機能を亢進させることが知られている。Mφが主な防御細胞となるリステリア菌感染に対するSPR-901の作用についてマウスを用いて検討した。リステリア菌をマウスに接種した場合、約60%の死亡率が見られたが、SPR-901を経口投与したマウスでは死亡例が見られず、SPR-901は感染後の生存率を著しく上昇させた。

2. SPR-901を投与したマウスの肝臓、脾臓のリステリア菌の増殖を測定したところ、接種後3日目までは無投与のマウスと同程度の増殖が観察されたがその後顕著に減少した。SPR-901の経口投与が感染抵抗を高めるのは、Tリンパ球（T細胞）を含めた抗原特異的な免疫応答を増強させることによると推定した。

3. 抗原特異的な免疫応答反応にはT細胞とMφとの相互作用が重要な役割を担っているが、SPR-901の投与によりMφにどのような機能変化がみられるかをマウス腹腔Mφにより検討した。SPR-901を投与したマウスのMφは抗原特異的なT細胞の増殖を亢進させた。Mφ自身の異物（細菌）貪飢能や殺菌能などの発現には影響を及ぼさないが、サイトカイン（インターロイキンIL-1, IL-6など）の産生やそのmRNAの発現を顕著に増強させることを明らかにした。これらの結果から、SPR-901の免疫応答の増強は、MφによるIL-1やIL-6などのサイトカインの産生増強がT細胞の活性化を促進させることによると指摘した。

4. SPR-901の抗腫瘍効果発現のメカニズムについて、マウス纖維肉腫Meth Aに対する効果をもとに検討した。SPR-901のMeth A腫瘍に対する抗腫瘍効果は、成熟T細胞を欠損したマウスでは認められなかった。Meth A担癌マウスに再度Meth Aを移植してその増殖を観察したところ、SPR-901の投与により増殖が顕著に抑制されることを認めた。これらの結果は、SPR-901の抗腫瘍効果にT細胞が重要な役割を担っており、腫瘍に対して抗原特異的な免疫応答を増強していることを指摘した。

5. T細胞は、その機能と細胞表面分子の発現様式からヘルパーT細胞とキラー／サプレッサーT細胞の二つのサブセットに分けられるが、SPR-901の抗腫瘍効果にこれらのT細胞がどのように関与しているかをMeth A担癌マウスリンパ節細胞を用いて検討した。SPR-901を投与したマウスの腫瘍増殖抑制には、T細胞の両サブセットの存在が必要であり、一方のみでは腫瘍抑制効果が認められないことを明らかにした。これらの結果からSPR-901は、ヘルパーT細胞の機能亢進を介してキラー／サプレッサーT細胞を誘導、活性化させることにより抗腫瘍効果を示すと推定した。

以上のように本研究は、 α -グルカンSPR-901の抗腫瘍作用のメカニズムを解析し、学術的に貴重な知見を提供している。従来報告されている抗腫瘍性多糖はすべて β -グルカンであるが、本研究によって α -グルカンが経口投与による新しいタイプの免疫療法剤となる可能性を示したことは高く評価される。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合せて、本論文の提出者竹田保之は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格あるものと認定した。