



Title	シイタケ菌糸体 (Lentinula Edodes Mycelia) は抗原提示細胞の機能を調整することで免疫細胞の活性化と腫瘍による免疫機能低下の阻止を行う
Author(s)	梶山, 祥太
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96132
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名（梶山祥太）	
論文題名	シイタケ菌糸体 (Lentinula Edodes Mycelia) は抗原提示細胞の機能を調整することで免疫細胞の活性化と腫瘍による免疫機能低下の阻止を行う
論文内容の要旨	
[背景・目的]	
<p>免疫細胞の活性化はがんの拒絶に不可欠であるが、がん細胞によってもたらされる免疫抑制環境は免疫機能の低下を誘発し、がんが免疫細胞からの攻撃から逃れ、生存・増殖する環境を作り出している。このため、がんを効率的に排除するためには、免疫細胞を活性化するとともに、がんによる免疫抑制環境を解除することが重要ながん攻略のアプローチとして理解されており、免疫細胞の活性化やがん細胞の免疫抑制を解除出来る物質の研究が進められている。こうしたなか、我々はこれまでに、シイタケ菌糸体エキス (Lentinula Edodes Mycelia ; L.E.M.) の経口摂取は、担癌マウスモデルにおいて腫瘍抗原特異的なT細胞の応答を増強し、がんにより増加する制御性T細胞の割合を抑制することで抗腫瘍効果を発揮することなどを報告した。しかしながら、こうしたL.E.M.によるT細胞機能の制御メカニズムは明らかにはなっていない。そこで、本研究では免疫システムの上流に位置し、T細胞応答を誘導する抗原提示細胞に着目し、L.E.M.が抗原提示細胞に与える影響を検討した。</p>	
[方法・結果]	
<p>初めにC57BL/6N雌マウス（4~7週齢）の骨髄細胞をGM-CSF存在下で6日間培養し、骨髄由来樹状細胞(BMDCs)を誘導した。BMDCsにL.E.M.を添加し12~24時間培養後、フローサイトメトリーとELISAでBMDCsの機能変化を解析した。その結果、L.E.M.はBMDCsのMHC-I、MHC-II、CD86、CD80、CD40の発現を用量依存的に増強し、Th1細胞を誘導するサイトカインであるIL-12の産生を強力に誘導した。次にC57BL/6N雌マウス（4~7週齢）の骨髄細胞をM-CSF存在下で6日間培養し、骨髄由来マクロファージ(BMDMs)を誘導した。BMDMsにIFN-γあるいはIL-4を添加し、M1様マクロファージあるいはM2様マクロファージを誘導しつつL.E.M.を添加し、3日間培養後、フローサイトメトリーとELISAでBMDMsの機能変化を解析した。その結果、L.E.M.は、M1様マクロファージのIL-12産生を増強し、M2様マクロファージが産生する免疫抑制性サイトカインであるIL-10とTGF-βの産生を抑制した。さらに、L.E.M.で刺激したBMDCsを抗CD3ε抗体刺激下でT細胞と5日間共培養し、L.E.M.で刺激したBMDCsがT細胞の機能に与える影響をフローサイトメトリーとELISAで検討した。その結果、L.E.M.で刺激したBMDCsは、CD8陽性T細胞からのIFN-γ産生を増強し、CD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞をエフェクターメモリー細胞へと誘導した。</p>	
<p>次に担癌マウスを用いたin vivo評価として、C57BL/6マウスの足蹠皮下に7.5×10^5 個のB16F10メラノーマ細胞を接種し、腫瘍接種後7日目よりL.E.M.を2 g/kgの用量で連日経口投与し、28日目に腫瘍重量を測定すると共に脾臓から回収した細胞をフローサイトメトリーで解析した。非担癌マウスとの比較から担癌に伴い脾臓の樹状細胞の割合と数が減少し、MHC-II陽性細胞とCD86陽性細胞の割合が減少していることが判明し、L.E.M.の摂取により樹状細胞の割合が改善し、MHC-II陽性細胞とCD86陽性細胞の割合が改善された。さらにはCD40陽性細胞の割合がL.E.M.摂取により向上された。また、担癌マウスの脾臓においては、CD11b⁻F4/80⁺マクロファージの数と割合が担癌により増加し、CD11b⁻F4/80⁺マクロファージにおけるCD86とCD80の発現割合が低下していることが判明した。L.E.M.摂取により、こうしたCD11b⁻F4/80⁺マクロファージの数と割合が改善し、CD86とCD80の発現割合が改善された。</p>	
[総括]	
<p>本研究ではL.E.M.が骨髄より誘導したBMDCsを用量依存的に直接活性化することを示し、骨髄より誘導したBMDMsを用いた検討では、L.E.M.がBMDMsの機能をM1様に維持・誘導する機能があることを示した。またL.E.M.により活性化したBMDCsはT細胞を活性化し、エフェクターメモリー細胞へと誘導することを示した。担癌マウスを用いた検討ではL.E.M.が担癌により減弱する樹状細胞とマクロファージの機能維持に働き、担癌による機能変化を抑制する可能性を示した。これらの発見は、L.E.M.は抗原提示細胞の機能を調整することでCTLを効率的に誘導し、さらに担癌による抗原提示細胞の活性状態の低下を抑制することで抗腫瘍免疫応答を維持している可能性を示唆している。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

	氏名(　梶山祥太　)	
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査　　招へい教授 副査　　教授 副査　　教授	國澤　純 中川　晋作 近藤　昌夫

論文審査の結果の要旨

本論文においては、これまで担癌マウスモデルにおいて腫瘍抗原特異的なT細胞の応答を増強し、さらには癌により増強される制御性T細胞の割合を抑制することで抗腫瘍効果を発揮することなどが報告されているシイタケ菌糸体エキス（L.E.M.）を対象に、免疫増強作用メカニズムについてT細胞応答の制御を担っている抗原提示細胞に焦点を当てた研究を遂行した。

まず初めに、in vitroの系において骨髄細胞より分化・誘導した樹状細胞ならびにマクロファージを用いた解析を行った。樹状細胞にL.E.M.を添加し培養したところ、MHC-IやMHC-II、CD86、CD80、CD40の発現を用量依存的に増強すると共に、Th1細胞を誘導するサイトカインであるIL-12の産生を強力に誘導した。一方、マクロファージについては炎症誘導性のM1マクロファージと炎症抑制性のM2マクロファージに着目した解析を行った。骨髄由来マクロファージにIFN- γ あるいはIL-4を添加し、M1様マクロファージあるいはM2様マクロファージを誘導しつつ、L.E.M.を添加し培養したところ、L.E.M.は、M1様マクロファージのIL-12産生を増強しつつ、M2様マクロファージが産生する免疫抑制性サイトカインであるIL-10とTGF- β の産生を抑制することを見出した。

次に樹状細胞の活性化によるT細胞への影響を検討した。L.E.M.で刺激した樹状細胞を抗CD3ε抗体刺激下でT細胞と共に培養した結果、CD8陽性T細胞からのIFN- γ 産生が増強され、さらにはCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞をエフェクターメモリー細胞へと誘導した。

これらin vitroでの解析に続き、in vivo評価として、C57BL/6マウスの足蹠皮下にB16F10メラノーマ細胞を接種する担癌マウスを用いた。腫瘍接種後7日目よりL.E.M.を2 g/kgの用量で連日経口投与し、28日目に腫瘍重量を測定すると共に脾臓から回収した細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、担癌マウスにおいては脾臓の樹状細胞の割合と数が減少し、MHC-II陽性細胞とCD86陽性細胞の割合が減少しているのに対し、L.E.M.の摂取により樹状細胞の割合が改善し、MHC-II陽性細胞とCD86陽性細胞の割合が改善していた。さらにはCD40陽性細胞の割合がL.E.M.摂取により向上すること、さらには担癌マウスの脾臓においては、CD11b $^+$ F4/80 $^+$ マクロファージの数と割合が担癌により増加し、CD11b $^+$ F4/80 $^+$ マクロファージにおけるCD86とCD80の発現割合が低下している一方で、L.E.M.摂取によりこうしたCD11b $^+$ F4/80 $^+$ マクロファージの数と割合が改善し、CD86とCD80の発現割合が改善していることを見出した。

以上、本研究は、これまで検討が行われていなかったL.E.M.の抗癌免疫誘導のメカニズムの一端を解明することが出来た。現在も有効成分や代謝に着目した研究を展開しているが、本研究はこれらの研究の基盤となる知見を提供了したものであり、L.E.M.の有する潜在的免疫制御機能を解明した研究として非常に優れたものであり、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。