



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	<a href="https://doi.org/10.18910/96132">https://doi.org/10.18910/96132</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 2023 年度博士学位論文

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

梶山祥太

大阪大学大学院薬学研究科  
創成薬学専攻ワクチン材料学分野

## 目次

略語.....	2
1. 序論.....	4
2. 実験方法.....	7
3. 結果.....	13
4. 考察.....	27
5. 総括.....	34
6. 謝辞.....	35
7. 参考文献.....	35

## 1. 略語

MHC: major histocompatibility complex

CCR7: C-C chemokine receptor type 7

IL: interleukin

CTL: cytotoxic T lymphocyte

PD-L1: programmed death 1-ligand 1

TGF- $\beta$ : transforming growth factor-beta

VEGF: vascular endothelial growth factor

MDSC: myeloid-derived suppressor cell

TAM: tumor associated macrophage

Treg: regulatory T cell

L.E.M.: Lentinula Edodes Mycelia

IFN- $\gamma$ : interferon-gamma

PD-1: programmed death 1

CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4

PBS: phosphate buffered saline

BMDCs: bone marrow-derived DCs

FBS: fetal bovine serum

GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor

MACS: magnetic separation system

LPS: lipopolysaccharide

BMDMs: bone marrow-derived macrophages

M-CSF: macrophage colony stimulating factor

ELISA: enzyme-linked immuno-sorbent assay

ANOVA: analysis of variance

MCM: melanoma conditioned medium

TLR: toll-like receptor

RPMs: red pulp macrophages

BMP4: bone morphogenetic protein-4

CCL2: C-C motif chemokine 2

CSF-1: colony stimulating factor 1

## 1. 序論

免疫システムは外敵の侵入を防ぎ、生体の恒常性を保つ最も重要な機構であり、ウイルスや細菌などの感染症に対する生体防御機構として機能する[1]。さらに、免疫システムは自身の身体に生じた癌細胞も異物と認識することで、癌細胞の排除においても重要な役割を担っている[2]。癌細胞を効率的に排除するためには癌免疫サイクルの各ステップが働くことが重要である (Figure 1) [3]。まず抗原提示細胞は癌細胞が放出した癌抗原を捕捉すると主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) や CD80、CD86、CD40 などの補助シグナル分子の発現を上昇させ、CC ケモカイン受容体 7 (CCR7) 依存的にリンパ管を通り所属リンパ節の T 細胞領域へと移動する[3-5]。リンパ節では抗原提示細胞が MHC-II を介して抗原を naïve CD4 陽性 T 細胞に提示するとともに、IL-12 や IL-10, IL-4 といった種々のサイトカインを放出することで Th1 細胞や Th2 細胞などのエフェクター T 細胞への分化を促進する[3]。また、抗原提示細胞は、MHC-I を介して抗原を naïve CD8 陽性 T 細胞に提示することで細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導する[6]。活性化した CTL は、癌の内部に浸潤した後で癌を直接排除し、破壊された癌細胞から癌抗原が放出されることで癌免疫サイクルが再び回る[3]。このように、癌を排除する上では、まず抗原提示細胞が癌抗原を補足して活性化することが必要であり、特に樹状細胞とマクロファージは T 細胞に抗原提示し強力な T 細胞の活性化を誘導することができるため、癌排除において非常に重要視されている[6-8]。

こうした免疫細胞の効率的な活性化や CTL の腫瘍局所への浸潤といった癌免疫サイクル

は、癌排除における主要なメカニズムである[2]。一方で、癌細胞が免疫監視システムを逃れ、癌の増殖に有利な環境を誘導する癌免疫逃避システムの理解も重要である[7]。癌細胞は癌抗原を消失させ、PD-L1 などの免疫チェックポイント分子の発現を通して免疫細胞からの認識から逃れ、トランスフォーミング増殖因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) や IL-6、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) など様々な免疫抑制性因子を産生することで樹状細胞やマクロファージ、T 細胞などの免疫細胞の活性化を抑制する[9, 10]。また、癌の微小環境に骨髄由来抑制細胞 (MDSC) や腫瘍随伴マクロファージ (TAM)、制御性 T 細胞(Treg)などの免疫抑制性細胞を動員することで、免疫から逃れる環境を構築する[11]。このような癌免疫サイクルや癌免疫逃避システムといった考え方を背景に免疫細胞の活性化や癌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[3, 9-11]。

癌は国民の約 2 人に 1 人が罹患すると言われており、日本人が一生のうちに癌と診断される確率は男性で 65.0%、女性で 50.2%であり、毎年約 100 万人が新たに癌に罹患する国民病となっているが、現在は免疫チェックポイント阻害剤といった癌による免疫抑制機構を解除する新薬の登場などの医療の進歩に伴い 5 年相対生存率は改善し、もはやがんは不治の病ではなく長く共に付き合っていく病へとシフトしてきている[12-14]。

こうしたなか、癌患者の半数近くが補完代替医療として健康補助食品を使用しているといった報告もあり、多くの患者が医薬品や手術といった保険診療以外の部分でもがんに対する対策を行っている実態が存在している[15]。このため、生活の質を維持・向上しながら患

者が疾病と長く付き合っていく上で、新規の医薬品開発の研究だけでなく健康補助食品をはじめとする食品成分の生体内での役割や作用メカニズムの詳細な解析、またその有効成分の同定といった研究データの蓄積は非常に意義のある研究課題である。

そのなかで我々は、安全性が高く、長年食品として販売されているシイタケ菌糸体エキス (*Lentinula edodes mycelia extract* ; L.E.M.) に着目し、L.E.M.を食品成分として摂取した際の免疫機構に与える影響について研究を進めている。L.E.M.はシイタケ菌をバガスと脱脂米糠からなる固形培地で培養し、発芽前に熱水抽出し粉末化したものであり、シリンガ酸やバニリン酸などの有機酸、 $\alpha$  グルカンやアラビノキシラン様多糖などの多糖類といった様々な成分を含む乾燥エキス粉末である[16, 17]。我々はこれまでに B16F10 メラノーマ接種マウスモデルや CT-26 大腸癌細胞接種マウスモデルといった担癌マウスモデルを用いて、L.E.M.の摂取が腫瘍抗原特異的 CTL を誘導し、癌の進行に伴う Treg の増加を抑制することを報告した[18, 19]。さらに B16 抗原を用いたペプチドワクチン投与マウスモデルでは L.E.M.の摂取とペプチドワクチンとの併用が B16 抗原特異的な T 細胞応答を強力に増強し、ペプチドワクチン単独投与に比べて腫瘍増殖を抑制することを報告した[20]。また L.E.M.の摂取により血中の IL-6 や T 細胞由来の TGF- $\beta$  の産生を抑制することを報告してきた[18-21]。また、液体培地で培養された標準化シイタケ菌糸体（多糖類、アミノ酸、脂質、ミネラルの混合物）を用いた研究では、B16F0 メラノーマ接種マウスモデルにおいて標準化シイタケ菌糸体では腫瘍発生タイミングを延長し、NK 細胞数を増加させ、IFN- $\gamma$  を産生する



腫瘍抗原特異的 CTL を増加させたことなどが報告されている[22]。さらに MC38 大腸癌細胞接種マウスモデルを用いた研究では標準化シイタケ菌糸体を併用することで PD-1 と CTLA-4 を同時に阻害した群に比べて腫瘍増殖の抑制や腫瘍に浸潤した CD8 陽性 T 細胞によるグランザイム B と Ki-67 の発現が増加することなども報告されている[23]。

このように L.E.M.の摂取は CTL の誘導に伴い抗腫瘍応答を誘導するなど抗腫瘍免疫の増強に有用であることが示されている。一方で、L.E.M.を食品成分として摂取した際に CTL をどのように誘導し、抗腫瘍免疫応答を高めているか明らかではない。L.E.M.の免疫機能賦活にかかわる詳細な作用機序の解明を進め、L.E.M.に含まれる多数の成分の中から免疫機能を賦活する実行分子を同定することにより、機能性表示食品の開発や医薬品開発につながる可能性がある。そこで、本研究では T 細胞応答の上流に位置し、免疫機能全体の活性化に関与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。

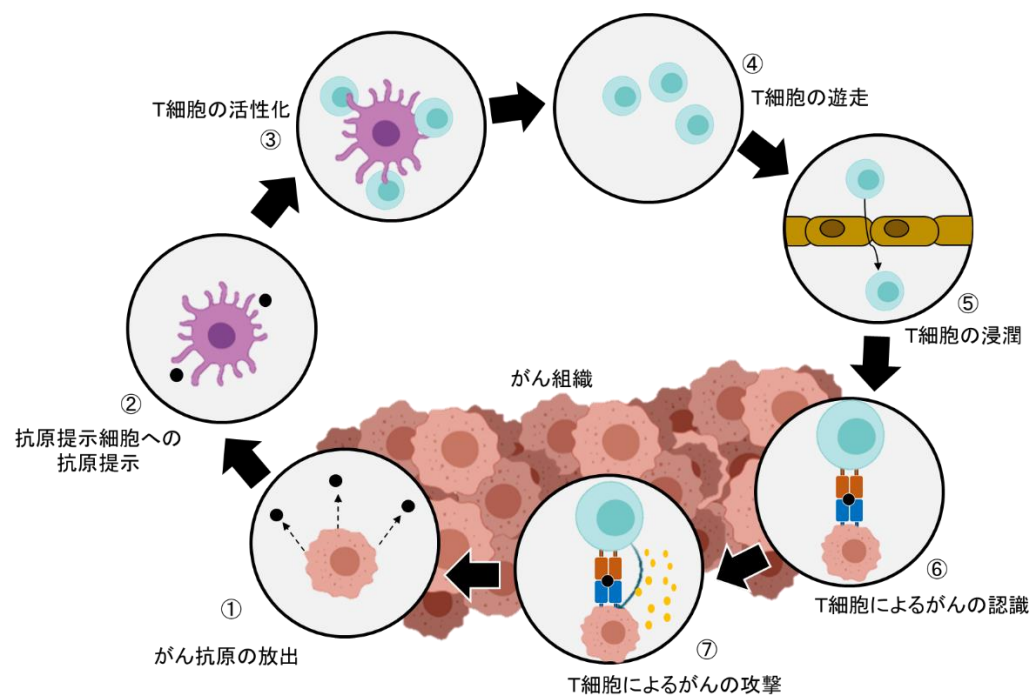


Figure 1 Cancer immunity cycle [modified from reference 3]

## 2. 実験方法

### 実験動物

野生型 C57BL / 6N 雌マウス（4～7 週齢）を Japan SLC, inc. (Shizuoka, Japan) から購入した。購入した動物は、22°C の SPF で管理された部屋で標準的なペレット飼料（CE-2、CLEA）を与え飼育した。実験開始前に 7 日間実験室条件に順応させた。動物はイソフルラン（FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan）による麻酔下で頸椎脱臼により安楽死された。動物を用いたすべての実験は小林製薬株式会社の動物実験倫理委員会の承認の上、小林製薬株式会社および国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所の動物実験の倫理ガイドラインに従って実施した。

### L.E.M.

L.E.M.は小林製薬株式会社より供与されたものを実験に用いた。L.E.M.の乾燥粉末抽出物はバガスと脱脂米糠からなる培地でシイタケ菌を 3 か月間培養し、発芽前に熱湯で抽出し粉末化することで製造された（Figure 2） [10]。また、製造に用いられるシイタケ菌株は、L.E.M.の品質を保つために凍結保存により特定の菌株のストックが作製されており、製造に際しては、小林製薬株式会社の品質基準のもとで一定の品質が保たれるように製造管理された。L.E.M.の乾燥粉末抽出物はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で適切な濃度に調製し、各実験に使用した。

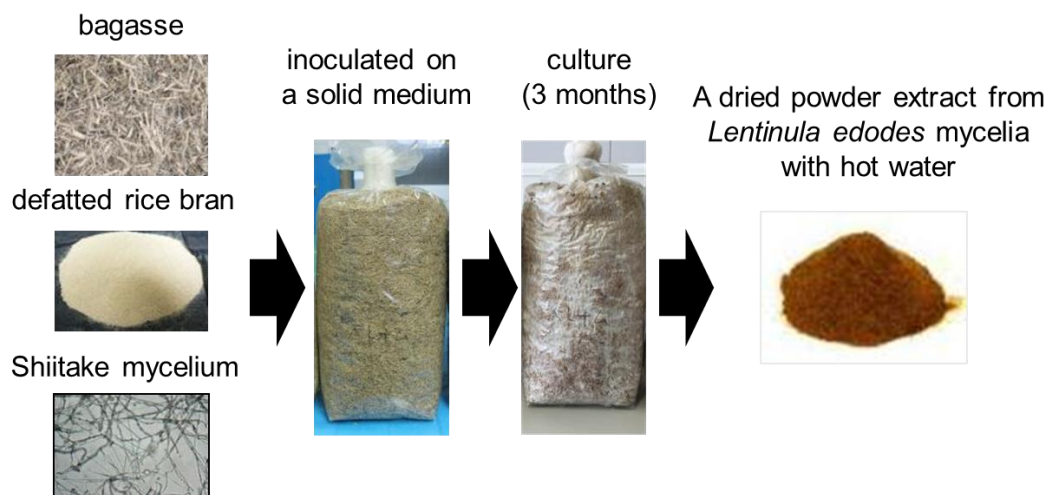


Figure 2 Preparation of L.E.M. reagents

#### L.E.M.の化学的プロファイル分析

L.E.M.の化学的プロファイル分析は、HPLC prominence (Shimazu, Kyoto, Japan) を用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で行った。分析条件は以下に示す条件にて実施した：カラム ; Atlantis T3 column (3  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  3 mm) (Waters, Milford, MA, USA)、カラム温度 ; 40°C、流速 ; 0.5 mL/min、注入量 ; 1.0  $\mu$ L、波長 ; 190-800 nm (photo diode array)、移動相 ; 水 (A) とアセトニトリル (B) の混合溶媒。溶離液の勾配は A-B (vol/vol) で 90:10 から 5:95 とした。

#### 骨髄由来樹状細胞と骨髄由来マクロファージの誘導

骨髄由来樹状細胞 (BMDCs) は以前に記載された方法を参考に調製した[24]。4~5 週齢の雌 C57BL/6N マウス大腿骨から骨髄細胞を回収した。回収した骨髄細胞を 1X RBC Lysis

Buffer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) で 1 分間処理した後、PBS で洗淨した。骨髓細胞は 10% ウシ胎仔血清 (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Inc.) および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical)、1 mmol/L ビルビン酸ナトリウム溶液 (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)、55 nmol/L メルカプトエタノール (FUJIFILM Wako Pure Chemical)、20 ng/mL の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) (PeproTech, Cranbury, NJ, USA) を含む RPMI1640 培地 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で 37°C で培養し、培地の半分は 2 日ごとに新鮮な培地と交換した。6 日目に CD11c microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 磁気分離システム (MACS; Miltenyi Biotech) を用いて、製造元のプロトコルに従って BMDCs を精製した。BMDCs ( $1.25 \times 10^4$  cell/well) を 96 well プレートに播種し、様々な濃度の L.E.M. (0.01 – 200  $\mu\text{g/mL}$ ) を添加し、RPMI1640 培地で 12 時間培養した。同様に、樹状細胞の活性化状況を確認する陽性コントロールとして、細胞死が起こらず樹状細胞の活性化を確認できる 10 ng/mL の濃度のリポポリサッカライド (LPS) (Sigma-Aldrich) を添加し、RPMI1640 培地で 12 時間培養した。培養後、上清と細胞を回収した。

骨髓由来マクロファージ (BMDMs) は以前に記載された方法を参考に 4~5 週齢の雌 C57BL / 6N マウス大腿骨から採取した骨髓細胞より誘導した[25, 26]. 簡単に、骨髓細胞を 50 ng/mL のマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) (PeproTech) を含む DMEM 培地 (10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液、55 nmol/L メルカプトエタノ

ール)を用いて Repcell (CellSeed Inc., Tokyo, Japan) で培養し、培地の半分は 2 日ごとに新鮮な培地と交換した。6 日目に浮遊細胞を洗浄除去し、プレートの底に接着した細胞を BMDMs として回収した。回収した BMDMs ( $2.0 \times 10^5$  cell/well) を 24 well プレートに播種し、20 ng/mL のインターフェロン  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (PeproTech) を加えることで M1 様マクロファージを誘導しつつ、L.E.M. (10  $\mu$ g/mL) あるいは LPS (10 ng/mL) を添加し、DMEM 培地で 3 日間培養した。同様に、20 ng/mL の IL-4 (PeproTech) を加えることで M2 様マクロファージを誘導しつつ、L.E.M. (10  $\mu$ g/mL) あるいは LPS (10 ng/mL) を添加し、DMEM 培地で 3 日間培養した。それぞれ培養後、細胞を回収した。

次に、上記と同様に骨髓から誘導し回収した BMDMs を 24 well プレートに播種し、20 ng/mL の IFN- $\gamma$  あるいは 20 ng/mL の IL-4 を加えた DMEM 培地でそれぞれ M1 様マクロファージと M2 様マクロファージを誘導しつつ L.E.M. (0.1, 10  $\mu$ g/mL) を添加し 3 日間培養した。培養後に LPS (10 ng/mL) で 6 時間刺激して上清を回収した。

同様に、BMDMs に IFN- $\gamma$  あるいは IL-4 を加えて M1 様マクロファージと M2 様マクロファージをそれぞれ誘導した。次に誘導した M1 様マクロファージに 20 ng/mL の IL-4 を加えて M1 様マクロファージから M2 様マクロファージに転換しつつ L.E.M. (0.1, 10  $\mu$ g/mL) を添加し、DMEM 培地で 3 日間培養した。誘導した M2 様マクロファージには 20 ng/mL の IFN- $\gamma$  を加えて M2 様マクロファージから M1 様マクロファージに転換しつつ L.E.M. (10  $\mu$ g/mL) を添加し、DMEM 培地で 3 日間培養した。それぞれ、培養後に LPS (10 ng/mL)

で 6 時間刺激して上清を回収した。

#### T 細胞と樹状細胞の共培養

7 週齢の C57BL / 6N 雌マウスの脾臓を回収し、脾臓中の naïve CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を、それぞれ CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T Cell isolation kit II (Miltenyi Biotec) および CD8a (Ly-2) MicroBeads, mouse (Miltenyi Biotec) を用いて、MACS の製造元のプロトコルに従って分離した。分離した naïve CD4 陽性 T 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/well) および CD8 陽性 T 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/well) を、L.E.M. ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) もしくは LPS ( $10 \text{ ng/mL}$ ) で 12 時間刺激した BMDCs ( $1 \times 10^5$  cells/well) と共に、あらかじめ  $3 \mu\text{g/mL}$  のマウス抗 CD3 $\epsilon$  抗体 (BioLegend, San Diego, CA, USA) を  $100 \mu\text{L}$  添加し一晩固相化した 96 well プレートに播種し、RPMI1640 培地 (10% FBS,  $1 \text{ mmol/L}$  ピルビン酸ナトリウム溶液、1%ペニシリン-ストربتマイシン混合溶液、 $55 \text{ nmol/L}$  メルカプトエタノール) で 5 日間培養した。培養後に上清と細胞を回収した。

#### フローライトメトリー解析

フローサイトメトリーは以前の方法に従って実施した[19]。まずは非特異的染色を防ぐために、細胞を抗 CD16/32 抗体 (Thermo Fisher Scientific) で染色した。次に 7-AAD (BioLegend) あるいは Zombie Green Fixable Viability Kit (Biolegend) で死細胞を染色し、下記に示すモ

ノクローナル抗体で染色後、MACSQuant (Miltenyi Biotec) あるいは BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を使用して分析した。下記抗体を染色に使用した : FITC-抗 CD11c 抗体 (Miltenyi Biotec; clone: N418) , FITC-抗 CD11b 抗体 (Thermo Fisher Scientific; clone: M1/70) , FITC-抗 CD80 抗体 (BioLegend clone: 16-10A1) , FITC-抗 I-Ab 抗体 (Biolegend clone: AF6-120.1) , PE-抗 CD80 抗体 (BioLegend clone: 16-10A1) , PE-抗 I-Ab 抗体 (Thermo Fisher Scientific; clone: AF6-120.1) , PE-抗 CD62L 抗体 (BD Biosciences clone: MEL-14) , APC-抗 CD86 抗体 (Miltenyi Biotec; clone: PO3) , APC-抗 CD40 抗体 (BioLegend clone: 3/23) , APC-抗 CD44 抗体 (BioLegend clone: IM7) , PerCP-抗 CD4 抗体 (BioLegend clone: RM4-5) , PE-Cy7-抗 CD86 抗体 (BioLegend; clone: GL-1) , PE-Cy7-抗 CD8a 抗体 (BioLegend clone: 53-6.7) , APC-Cy7-抗 CD11b 抗体 (BioLegend clone: M1/70) , BV421-抗 CD11c 抗体 (BioLegend clone: N418) , BV421-抗 F4/80 抗体 (BioLegend clone: BM8)。データは FlowJo LLC Software 10.2 (BD Biosciences) を使用して分析した。

#### サイトカイン測定

IL-12、IL-10、TGF- $\beta$  および IFN- $\gamma$  は、それぞれ IL-12 p70 Mouse Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific)、IL-10 Mouse Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific)、TGF beta-1 Human/Mouse Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific)、IFN gamma Mouse Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して、各キットの手順書に従



って定量した。

#### 腫瘍細胞株と *in vivo* 抗腫瘍アッセイ

C57BL / 6J マウスに由来する B16F10 マウスメラノーマ細胞株は ATCC (ATCC 番号 : CRL-6475) から購入した。5% CO<sub>2</sub>環境で維持し、10% FBS および 1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した RPMI1640 培地で培養した。合計  $7.5 \times 10^5$  個の B16F10 細胞をマウスの左足蹠に皮下注射で接種した。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た。接種後 28 日目にマウスを安楽死させ腫瘍重量を測定し、脾臓を回収した。腫瘍サイズは腫瘍の大きさは、腫瘍の幅 (mm) と腫瘍の長さ (mm) を週に 2 回測定し、 $0.5 \times \text{幅} \times \text{長さ} \times \text{長さ} \text{ (mm}^3\text{)}$  として計算した。回収した脾臓は、細胞懸濁液を 100  $\mu\text{m}$  のセルストレーナーを通した後に、1X RBC Lysis Buffer で 1 分間処理した後に洗浄を行い、脾臓中の細胞サブセットをフローサイトメトリーで解析した。

#### 統計解析

データは対応のない両側 Student の t 検定あるいは両側 Welch の t 検定、1 way ANOVA と Tukey-Kramers 検定を使用して評価した。0.05 未満の p 値で統計的有意性を示すと見なした。

### 3. 結果

#### 3.1. L.E.M.の化学的プロファイル

L.E.M.の化学的プロファイルを Figure3 に示した。L.E.M.には多様な成分が含まれていることが報告されており、特にシリンガ酸とバニリン酸はキノコの菌床抽出物の中でも最も豊富に含まれている[16, 17]。そこで、本研究で用いた L.E.M.においてシリンガ酸とバニリン酸の含有量について HPLC にて定量を行った。結果、L.E.M.には 650  $\mu\text{g/g}$  のシリンガ酸と 1000  $\mu\text{g/g}$  のバニリン酸が含まれていた。シリンガ酸やバニリン酸は抗炎症作用や抗酸化作用が報告されており、これらが L.E.M.の生物活性の一部を担っている可能性がある[27, 28]。

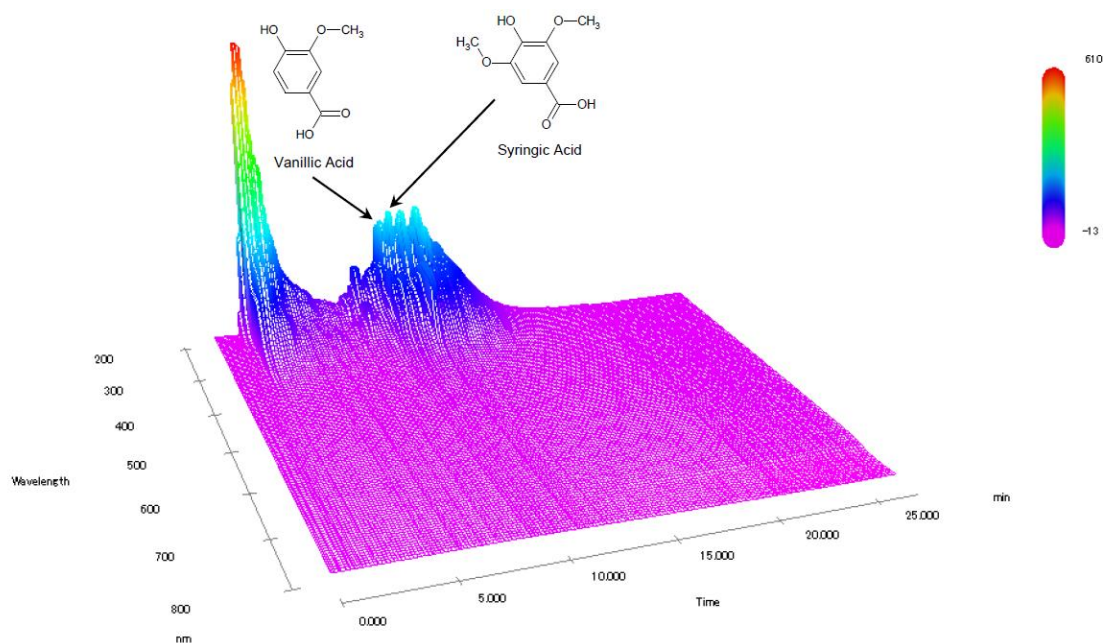


Figure 3 Chemical profile of L.E.M. extract obtained by HPLC

To detect representative compounds of L.E.M. extract, HPLC analysis was performed

through the wavelength of 190-800 nm and a 3D chromatograph was obtained. As previously reported, syringic acid and vanillic acid were detected as components of the L.E.M. extract. These were detected at 274 nm (retention time: 9.786 min) and 291 nm (retention time: 9.350 min), respectively.

### 3.2. L.E.M.は骨髄由来樹状細胞を活性化する

L.E.M.の T 細胞賦活作用が抗原提示細胞の活性化によるものであるか明らかにするため、まずマウス骨髄より BMDCs を誘導し、L.E.M. (0.01 – 200 µg/mL) で刺激した際の MHC-I、MHC-II および共刺激分子である CD80、CD86、CD40 の発現レベルをフローサイトメトリーで測定した。樹状細胞の活性化の程度を比較するために樹状細胞の活性化研究でよく用いられる LPS (10 ng/mL) を陽性対象として用いた。その結果、LPS で刺激した BMDCs は MHC-I、MHC-II、CD80、CD86、および CD40 の発現レベルを増加させた。L.E.M. で刺激した BMDCs も同様に MHC-I、MHC-II、CD80、CD86、および CD40 の発現レベルを用量依存的に有意に増加させた (Figure 4a)。さらに、L.E.M.で刺激した BMDCs 培養上清中の Th1 細胞誘導サイトカイン[29]である IL-12p70 の産生を ELISA で測定したところ、L.E.M.の用量依存的にその産生量を増強した。LPS で刺激した樹状細胞も IL-12p70 を産生したが、MHC-I、MHC-II、CD80、CD86、および CD40 の発現レベルが L.E.M.と同程度であった用量において、IL-12p70 の産生量は L.E.M.よりも低いものであった。(Figure 4b)。

これらのデータは、L.E.M.が LPS とは異なる機序によって樹状細胞を直接活性化し、特に Th1 細胞や CTL を中心とする T 細胞の活性化する可能性を示唆している。また、L.E.M.で刺激した BMDCs では CD80 と CD40 の発現レベルは 10  $\mu\text{g/mL}$  でピークとなっていたことから、以降の *in vitro* 実験では 10  $\mu\text{g/mL}$  の濃度を上限として実験を行った。

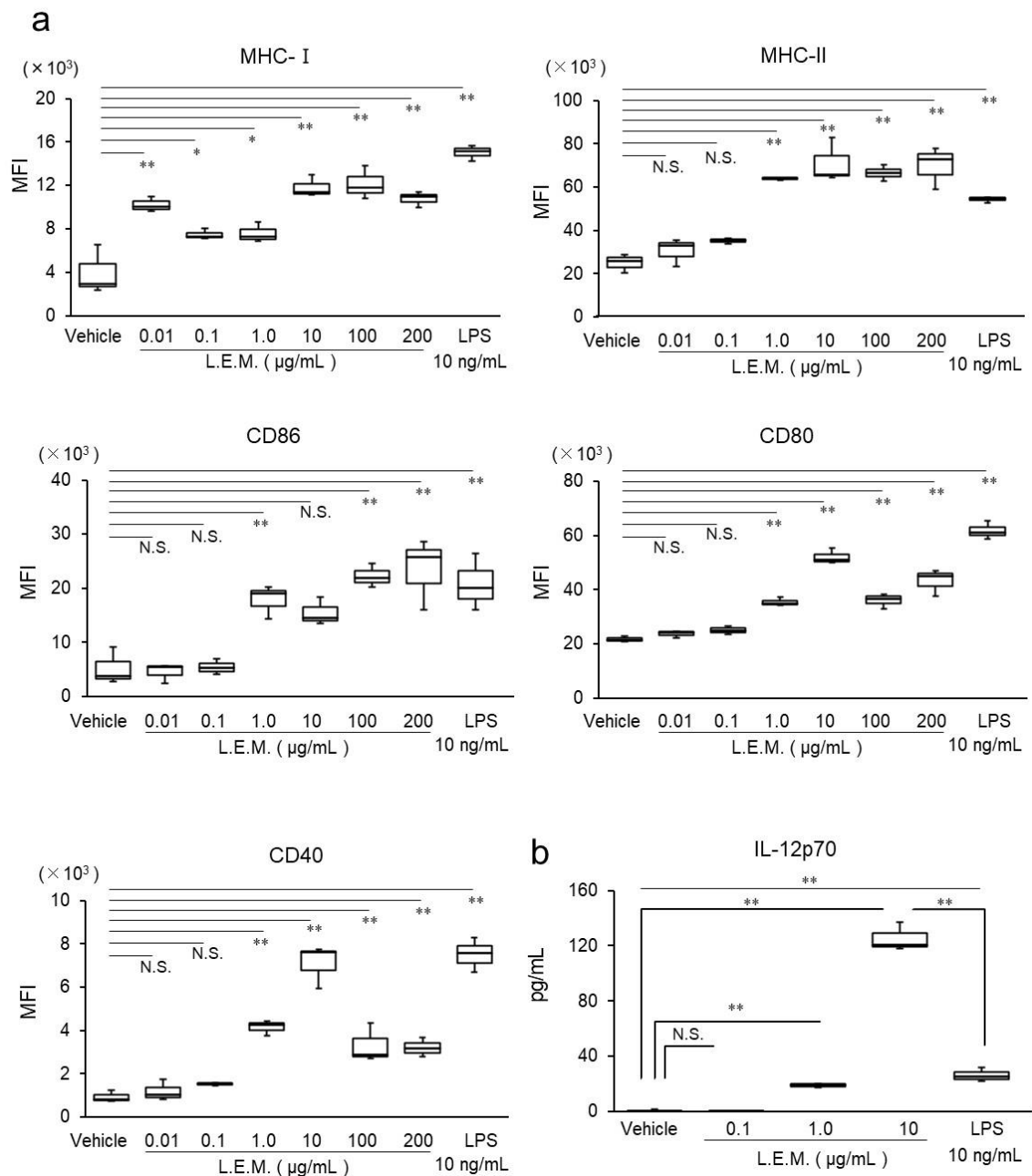


Figure 4 L.E.M. extract directly activates BMDCs

BMDCs were stimulated by either solvent, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, or 200 µg/mL L.E.M. extract, or 10 ng/mL LPS. After 12 h of incubation, the expression levels of (a) MHC-I, MHC-II, CD80, CD86 and CD40 were analyzed by flow cytometry (N = 3 per group). The median value is shown in the figure. The data are representative of two independent experiments and were statistically analyzed by one-way ANOVA (\*,  $p < 0.05$ , compared to vehicle; \*\*,  $p < 0.01$ , compared to vehicle; N.S., not significant, compared to vehicle). (b) ELISA measurement of IL-12p70 production in the culture supernatant (N = 3 per group). The median value is shown in the figure. The data are representative of two independent experiments and were statistically analyzed by one-way ANOVA (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; N.S., not significant).

### 3.3. L.E.M.で活性化した樹状細胞はT細胞の活性化を促す

上記の結果をもとに、L.E.M.で刺激した BMDCs が T 細胞に与える影響について検討した。まず脾臓より MACS を用いて CD8 陽性 T 細胞を単離し、L.E.M.あるいは LPS で刺激した BMDCs を抗 CD3ε 抗体による刺激存在下で 5 日間共培養し、上清中の IFN-γ を ELISA で測定した。その結果、L.E.M.や LPS で刺激した BMDCs では無刺激の BMDCs との共培養に比べ、有意に IFN-γ の産生を高めることが分かった (Figure 5a)。さらに T 細胞の機能

に着目した解析として、MACS を用いて naïve CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞を単離し、L.E.M.あるいは LPS で刺激した BMDCs と共培養した際の T 細胞の機能変化をフローサイトメトリーで解析した。その結果、無刺激の BMDCs との共培養に比べ、L.E.M.で刺激した BMDCs と共培養した CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞は CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> エフェクターメモリーT 細胞の割合が増加することがわかった (Figure 5b)。一方で、LPS で刺激した樹状細胞は、CD4 陽性 T 細胞の CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> エフェクターメモリーT 細胞の割合を上昇させたが、CD8 陽性 T 細胞の CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> エフェクターメモリーT 細胞の割合には影響を与えなかった。このことから、L.E.M.で刺激した BMDCs は T 細胞の IFN- $\gamma$  産生を高め、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞をエフェクターメモリーT 細胞へと誘導することが示唆された。

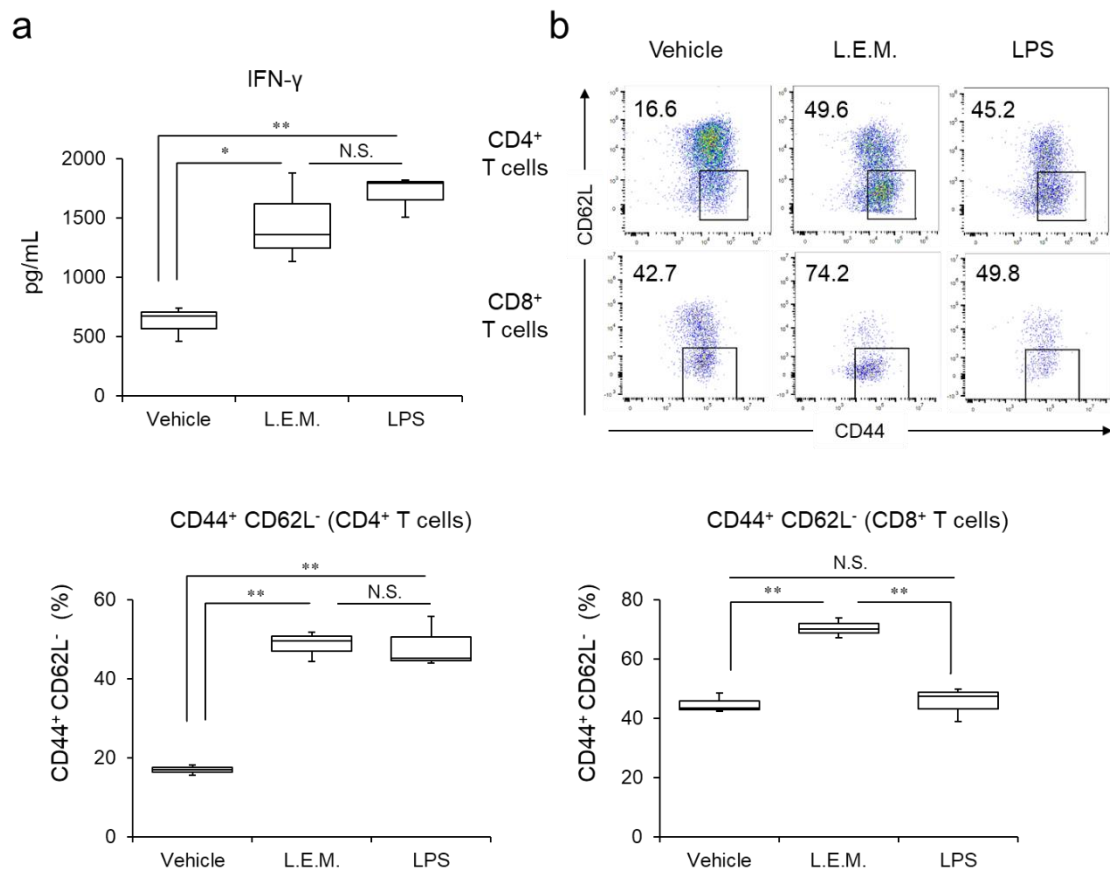


Figure 5 L.E.M. extract-stimulated BMDCs promote T-cell activation

CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from spleens using the MACS system and co-cultured for five days with BMDCs stimulated by 10  $\mu$ g/mL L.E.M. extract or 10 ng/mL LPS for 12 h. (a) IFN- $\gamma$  in CD8<sup>+</sup> T-cell culture supernatant measured by ELISA assay (N = 3 per group). (b) Proportion of cells expressing CD44 and CD62L analyzed by flow cytometry (N = 3 per group). The numbers show the percentage of CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> cells and typical flow cytometry results. The median value is shown in this figure. The data are representative of two independent experiments and were statistically analyzed by one-way ANOVA (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; N.S., not significant).

### 3.4. L.E.M.は骨髄由来マクロファージを活性化し、M1 様マクロファージを誘導する

マクロファージは樹状細胞と同様に抗原提示細胞として機能する。しかしながら、単一の性質を示すのではなく、少なくとも IL-12 などのサイトカインを放出し、T 細胞の活性化や腫瘍排除などを担う M1 様マクロファージと、IL-10 や TGF- $\beta$  などの免疫抑制性サイトカインを放出し、組織修復や腫瘍の増進に関与する M2 様マクロファージの 2 つの極性を持つ細胞であると理解されている[30, 31]。そこで、本検討ではマウス骨髄細胞より M-CSF 存在下で BMDMs を誘導し、IFN- $\gamma$  あるいは IL-4 存在下で M1 様マクロファージと M2 様マクロファージを誘導する際に L.E.M.あるいは LPS を添加し、M1 様あるいは M2 様のマクロファージに対する L.E.M.の影響を検討した。CD86 と CD80 の発現レベルをフローサイトメトリーで測定した結果、M1 様マクロファージ、M2 様マクロファージともに CD86 の発現レベルに L.E.M.添加による大きな影響はなかったが、CD80 の発現レベルが有意に増加した (Figure 6a)。一方で、LPS を添加したマクロファージでは M1 様マクロファージ、M2 様マクロファージともに CD86 と CD80 の発現レベルが有意に増加した。L.E.M.で刺激しつつ誘導した M1 様マクロファージの上清中の IL-12 産生を ELISA で測定したところ、L.E.M.は用量依存的に M1 様マクロファージから産生される IL-12 の産生量を高めた。一方で、L.E.M.で刺激しつつ誘導した M2 様マクロファージの上清中のサイトカイン産生を ELISA で測定したところ、L.E.M.は用量依存的に M2 様マクロファージから産生される免疫抑制性サイトカインである IL-10 と TGF- $\beta$  の産生量を抑制した (Figure 6b)。一方で、LPS を添



加しつつ誘導した M1 様マクロファージでは IL-12 産生量は Vehicle と有意な差は認められなかったが、LPS を添加しつつ誘導した M2 様マクロファージからの IL-10 と TGF- $\beta$  の産生を有意に抑制した。

マクロファージは周囲の環境に応じて、M1 マクロファージと M2 マクロファージが可逆的に変化する可塑性があることが報告されている[32]。そこで、M1 様マクロファージを M2 様マクロファージに転換する条件、あるいは M2 様マクロファージを M1 様マクロファージに転換する条件の際に、L.E.M.がマクロファージの可塑性に与える影響を検証した。M1 様マクロファージを誘導した後に IL-4 を添加し M2 様マクロファージを誘導すると IL-12p70 の産生が M1 様マクロファージに比べ低下したが、L.E.M.を添加していた場合、IL-12p70 の産生は低下することなく、もとの M1 様マクロファージと同程度であった (Figure 6c)。さらに、M2 様マクロファージを誘導した後に IFN- $\gamma$  を添加し M1 様マクロファージを誘導すると IL-12p70 の産生が M2 様マクロファージに比べ有意に高値を示し、L.E.M.を添加していた場合、IL-12p70 の産生がさらに増加した (Figure 5c)。このことから L.E.M.は直接マクロファージを活性化し、M1 様マクロファージの誘導を促進する作用に加え、M2 様マクロファージを誘導する環境でも M1 様の機能を維持する作用が示唆された。

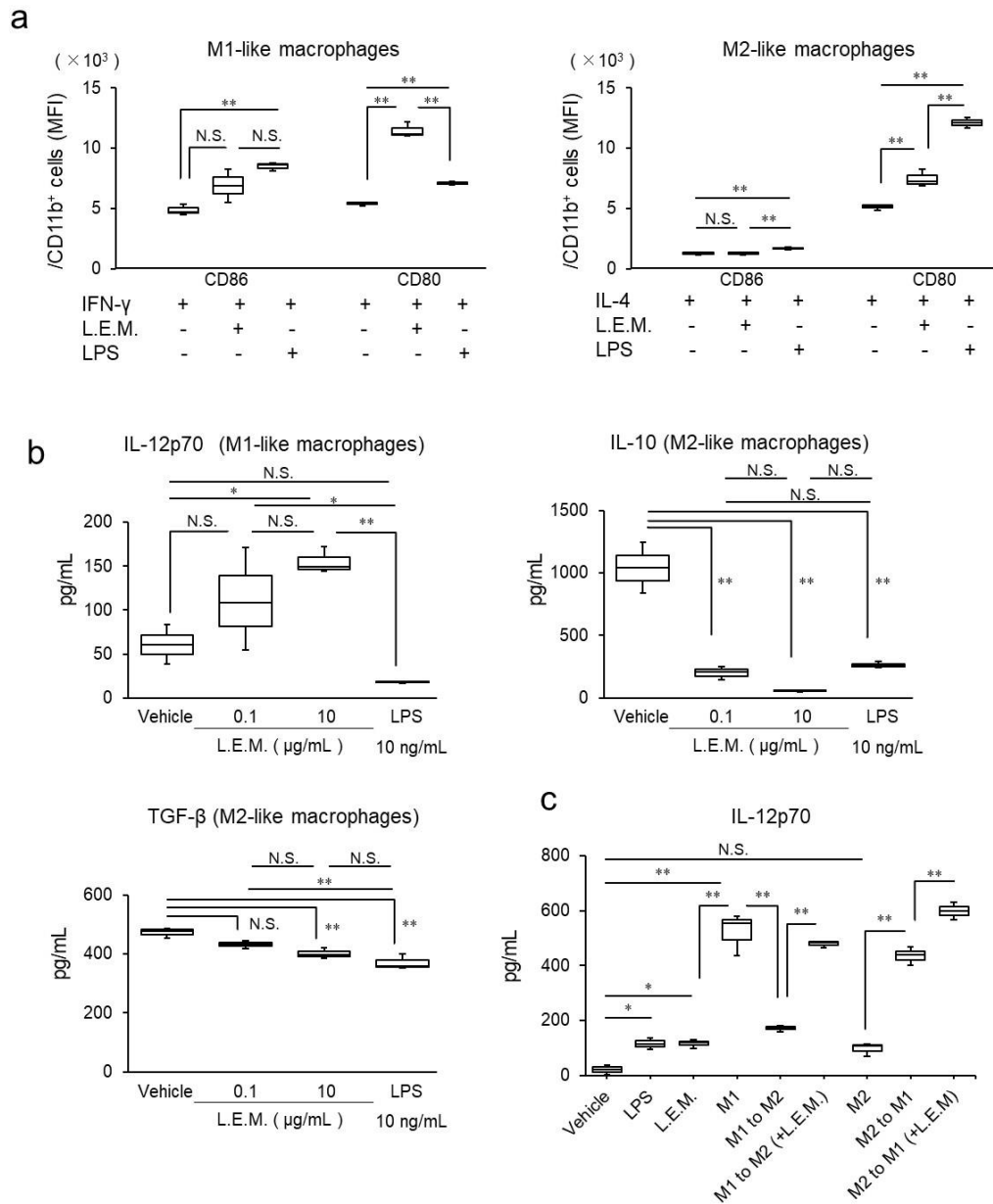


Figure 6 L.E.M. extract activates BMDMs and induces M1-like macrophages

L.E.M. extract activates BMDMs and induces M1-like macrophages. (a) IFN-γ (20 ng/mL) or IL-4 (20 ng/mL) were added to BMDMs to induce M1-like macrophages or M2-like macrophages, respectively, then stimulated with 10 μg/mL L.E.M. extract or 10 ng/mL LPS. After culturing for three days, the expression levels of CD86 and CD80 were analyzed by

flow cytometry (N = 3 per group). (b) Similarly, M1-like macrophages and M2-like macrophages were induced and stimulated with 0.1 or 10  $\mu\text{g/mL}$  L.E.M. extract. After culturing for three days, the macrophages were stimulated with 10 ng/mL LPS for 6 h, and the level of IL-12p70 production in the M1-like macrophage culture supernatant and level of IL-10 and TGF- $\beta$  production in the M2-like macrophage culture supernatant were measured by ELISA assay (N = 3 per group). (c) Similarly, M1-like macrophages and M2-like macrophages were induced, IL-4 (20 ng/mL) was added to M1-like macrophages to induce M2-like macrophages, and the cells were cultured for three days after stimulating with 10  $\mu\text{g/mL}$  L.E.M. extract (M1 to M2). IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) was added to M2-like macrophages to induce M1-like macrophages, whereas 10  $\mu\text{g/mL}$  L.E.M. extract was added to stimulate the cells, which were then cultured for three days (M2 to M1). After culturing, each set of cells were stimulated for 6 h with 10 ng/mL LPS, and the level of IL-12p70 production in the culture supernatant was measured by ELISA analysis (N = 3 per group). The median value is shown in the figure. The data are representative of two independent experiments and were statistically analyzed by one-way ANOVA (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; N.S., not significant).

### 3.5. L.E.M.は担癌により減弱する脾臓中の樹状細胞の数および割合とその活性状態を維持する

次に、担癌マウスを用いて、L.E.M.が生体内で樹状細胞やマクロファージへ与える影響について検討した。まず、マウスの足蹠に B16F10 メラノーマ細胞を接種し、腫瘍接種日より7日目から L.E.M.を 1 g/kg および 2 g/kg の用量で連日経口投与した。結果、これまでの報告通り、L.E.M.摂取で用量依存的に腫瘍増殖が抑制されていた (Figure 7)。以降の実験は、最も腫瘍増殖が抑制されていた 2 g/kg の用量の L.E.M.を用いて行った。

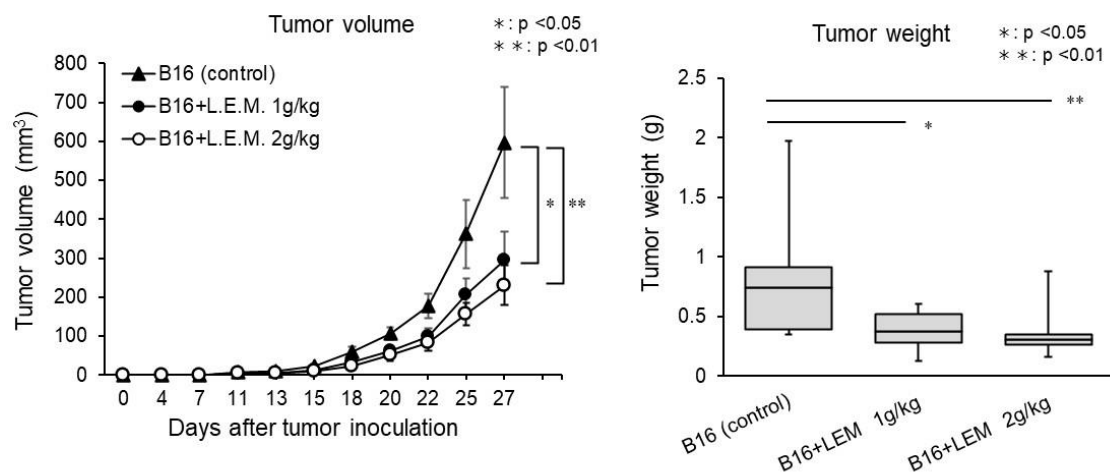


Figure 7 Tumor volume and weight changes after L.E.M. extract intake

Tumor volume and weight changes caused by L.E.M. extract intake. B16F10 cells ( $7.5 \times 10^5$  cells) were injected subcutaneously into the left sole of the mice, and from Day 7 after administering the tumor cells, the mice were orally administered 200  $\mu$ L of PBS or L.E.M. extract daily at a dose of 1 g/kg or 2 g/kg. Starting from the date of intake, the tumor volume was measured twice per week. On Day 28 after administration, the mice were euthanized

and the tumor weight was measured. Figure shows the changes in tumor volume and the tumor weight on Day 28 (N= 13). Tumor volume data are shown as mean  $\pm$  SEM. Data are representative of two independent experiments, and tumor volume data on the date of final measurement were analyzed by Student's t-test. The median values are shown for the median tumor weight data, and the data were analyzed by Student's t-test.

そこで、まず脾臓中の樹状細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、担癌マウスでは非担癌に比べて樹状細胞の数・割合が著しく減少していた (Figure 8a)。L.E.M.摂取群では樹状細胞の割合が担癌マウスに比べて有意に高く非担癌マウスと同程度であった。また樹状細胞の数については、有意差はないものの、減少抑制の傾向が認められたため、次に樹状細胞の活性化度合に着目した解析を実施した。樹状細胞の活性化マーカーをフローサイトで確認したところ、樹状細胞の MHC-II 陽性細胞と CD86 陽性細胞の割合が担癌マウスでは非担癌マウスに比べ有意に減少したものの、L.E.M.摂取では非担癌マウスと同程度であり、L.E.M.を摂取していない担癌マウスに比べて有意に高値を示した (Figure 8b)。また CD40 陽性細胞の割合については担癌マウスでは非担癌マウスと有意な差はなかったものの、L.E.M.摂取では非担癌マウスや担癌マウスに比べて有意に高値を示した。CD80 陽性細胞の割合は担癌で上昇するも L.E.M.摂取の影響は見られなかった。このことから担癌状態では樹状細胞が減少し、その活性レベルが低下し機能不全の状態となっていることが推定され、

L.E.M.はこうした樹状細胞の機能不全を抑制あるいは改善していることが示唆された。

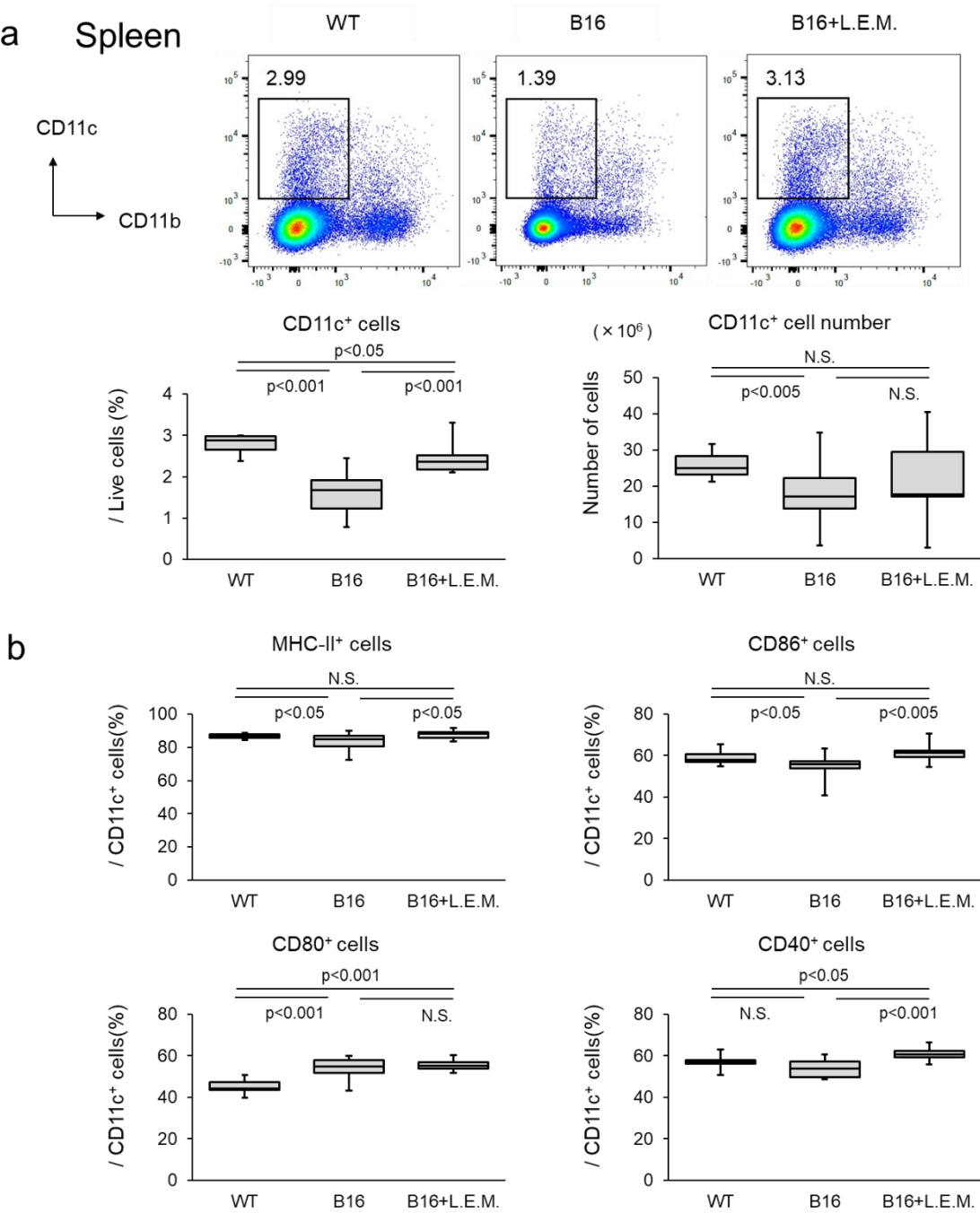


Figure 8 L.E.M. extract suppresses the attenuation of dendritic cells activity in cancer-bearing mice

L.E.M. extract suppresses the attenuation of dendritic cell activity in cancer-bearing mice.

B16F10 cells ( $7.5 \times 10^5$  cells) were injected subcutaneously into the left sole of the mice (WT, N = 8; B16 group, N = 15; B16-L.E.M. group, N = 15). From Day 7 after administering the tumor cells, the mice were orally administered 200  $\mu$ L of PBS or L.E.M. extract daily at a dose of 2 g/kg. Mice that showed tumor metastasis from the left sole to the thigh after tumor cell administration were euthanized (B16 group, N = 2; B16-L.E.M. group, N = 2). On Day 28 after administration, the mice were euthanized, the tumor weight was measured, and the spleen was recovered. (a) Proportion of dendritic cells in the spleen analyzed as CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> cells by flow cytometry. The figures show the percentage of CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> cells, as well as typical flow cytometry results. The median value is shown in the figure. Data were analyzed by Student's t-test or Welch's t-test (N.S., not significant). (b) Proportion of MHC-II<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, and CD40<sup>+</sup> cells in CD11c<sup>+</sup> cells analyzed by flow cytometry. The median value is shown in the figure. The data are representative of two independent experiments and were statistically analyzed by Student's t-test or Welch's t-test (N.S., not significant).

### 3.6. L.E.M.は担癌により減弱する脾臓中のマクロファージの割合とその活性状態の変化を維持する

次にマクロファージに着目した解析を行った。担癌状態では非担癌に比べて **CD11b-F4/80<sup>+</sup>** のマクロファージの数と割合が有意に増加しており、L.E.M.摂取群では L.E.M.を摂取しない担癌マウスに比べて有意に減少していた (**Figure 9a**)。そこで次に **CD11b-F4/80<sup>+</sup>**細胞の活性化度合に着目した解析を実施した (**Figure 9b**)。その結果、**CD11b-F4/80<sup>+</sup>**細胞の **CD80** や **CD86** の発現レベルが担癌マウスでは非担癌マウスに比べ有意に低下している一方で、L.E.M.摂取群ではこうした発現レベルの減少が有意に抑制されていた。このことから担癌状態では活性化状態の悪いマクロファージが増加し、L.E.M.はこうしたマクロファージの増加を抑制していることが示唆された。



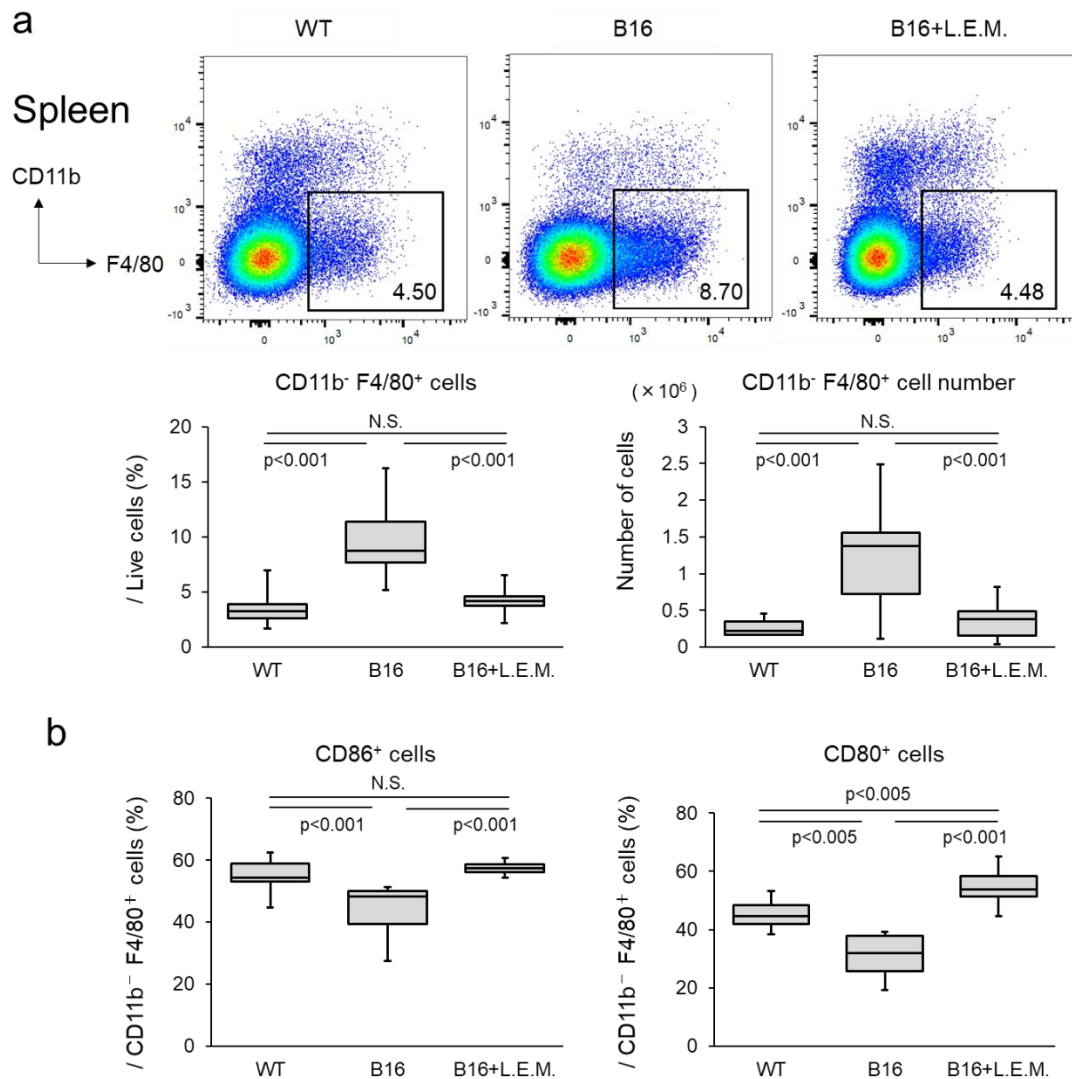


Figure 9 L.E.M. extract suppresses macrophage changes in cancer-bearing mice

L.E.M. extract suppresses macrophage changes in cancer-bearing mice. B16F10 cells ( $7.5 \times 10^5$  cells) were injected subcutaneously into the left sole of the mice (WT group, N = 8; B16 group, N = 15; B16-L.E.M. group, N = 15). From Day 7 after administering the tumor cells, the mice were orally administered 200  $\mu$ L of PBS or L.E.M. extract daily at a dose of 2 g/kg. Mice that showed tumor metastasis from the left sole to the thigh after tumor cell

administration were euthanized (B16 group, N = 2; B16-L.E.M. group, N = 2). On Day 28 after administration, the mice were euthanized, the tumor weight was measured, and the spleen was recovered (WT group, n = 5; B16 group, n = 6; B16-L.E.M. group, n = 4). (a) Percentage of macrophages in the spleen measured by CD11b and F4/80 and analyzed by flow cytometry. Figures show the percentage of CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells, as well as the typical flow cytometry results. The data are representative of two independent experiments and were statistically analyzed by Student's t-test or Welch's t-test (N.S., not significant). (b) Proportion of CD86<sup>+</sup> cells and CD80<sup>+</sup> cells in CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells analyzed by flow cytometry. The median value is shown in the figure. The data are representative of two independent experiments and were statistically analyzed by Student's t-test or Welch's t-test (N.S., not significant).

#### 4. 考察

癌を効率的に排除するためには免疫システムによる癌細胞の認識と排除といった免疫活性化の側面だけでなく、癌が免疫細胞からの攻撃を逃れる免疫抑制機構の理解も合わせて重要である。特に、樹状細胞やマクロファージは腫瘍抗原特異的 T 細胞の活性化や免疫抑制の誘導など複雑な免疫制御の起点として重要な細胞であり[33, 34]、L.E.M.の抗腫瘍効果を説明する鍵因子であると考えられた。本研究では、L.E.M.の作用点として樹状細胞やマクロファージを同定し、これら抗原提示細胞に作用することで抗原提示能を増強することを明らかにした。

今回見出された L.E.M.のユニークな機能は、L.E.M.は樹状細胞を直接活性化し IL-12 の産生を増強する機能、さらに L.E.M.で活性化させた樹状細胞は活性化に伴い、エフェクターメモリーT 細胞を誘導し、CD8 陽性 T 細胞の IFN- $\gamma$  産生を増強する機能であった。LPS を用いた研究では樹状細胞からの IL-12 の産生が Th1 応答を誘導し、抗原特異的 CTL の誘導に強く関与していることが示されている[35]。また、IL-12 は CD8 陽性 T 細胞の IFN- $\gamma$  産生を誘導し[36]、さらに抗原刺激時に CD44<sup>low</sup>CD8 陽性 T 細胞に直接作用して T 細胞の増殖を促し、CD44 の発現を高めることが報告されている[37]。また、IL-12 は STAT4 のリン酸化を介して抗アポトーシス作用を担う Bcl-3 および Bcl-2 関連遺伝子の発現を調節することにより長期免疫に関与する[38]。今回の検討では、L.E.M.は LPS に比して高い IL-12 産生誘導能を有していたことから、L.E.M.は IL-12 産生誘導を介して CD8 陽性 T 細胞の機能を調

節することで、効率的な CTL の誘導に有用であることを示唆している。一方、免疫抑制という観点では、腫瘍細胞から産生される IL-6 や TGF- $\beta$ 、IL-10 といった免疫抑制性因子が樹状細胞の活性化レベルを減弱させることが報告されている[39-41]。T 細胞活性化という観点においても、IL-6 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて樹状細胞を介した T 細胞の活性化が増強されることが報告されているため[42]、担癌状態では腫瘍細胞から産生される TGF- $\beta$  や IL-6、IL-10 などのサイトカインにより樹状細胞の分化や成熟が抑制され、腫瘍抗原特異的 CTL の誘導や抗腫瘍免疫応答が抑制されと考えられる。我々の *in vivo* での検討では、L.E.M.を摂取すると担癌状態で減弱する樹状細胞の活性化レベルが維持されることが分かった。この知見と合致し、L.E.M.を摂取することで担癌により増加する血中の TGF- $\beta$  や IL-6 が抑制されることも報告されている[19, 42]。さらに、L.E.M.に含まれるシリンガ酸やバニリン酸が、コンカナバリン A 誘発肝障害モデルマウスにおいて IL-6 の調節を介して免疫介在性肝炎を抑制すること[29]、またバニリン酸が LPS 刺激マウス腹膜マクロファージにおける IL-6 分泌を抑制すること[28]も報告されている。以上より、L.E.M.は樹状細胞を直接活性化することに加え、個体レベルでは腫瘍細胞に働き IL-6 の産生抑制を介した樹状細胞の機能維持というメカニズムも複合的に作用し抗腫瘍応答の誘導に寄与している可能性が考えられる。

本研究では L.E.M.は樹状細胞だけではなくマクロファージにも作用することが示唆された。マクロファージは循環する単球が組織に動員され、マクロファージに分化し、微生物や

サイトカインの影響などその周辺環境を通して、免疫を賦活するあるいは免疫を抑制するなど分極化された機能特性を発現させる[32]。L.E.M.は骨髓由来マクロファージを直接活性化し Th1 細胞などの誘導に関わる免疫賦活性サイトカイン IL-12 を産生する M1 様マクロファージを誘導する作用を示した。さらに L.E.M.は M1 様マクロファージを免疫抑制性サイトカイン TGF- $\beta$  や IL-10 を産生する M2 様マクロファージに変換する条件においても M1 様マクロファージに維持する作用があることが確認された。このことは担癌マウスなどの M2 様マクロファージが誘導される免疫抑制環境においても L.E.M.が M1 様マクロファージを誘導できる可能性を示唆している。実際に B16F10 細胞の培養上清 (MCM) はマクロファージを M2 様マクロファージに誘導することが報告されているが[43]、B16F10 細胞由来の MCM で骨髓由来マクロファージを培養する際に L.E.M.を添加すると M1 様マクロファージが誘導され、担癌による免疫抑制環境下でも L.E.M.の M1 様マクロファージの維持機能が発揮されることが示唆される (Figure 10)。

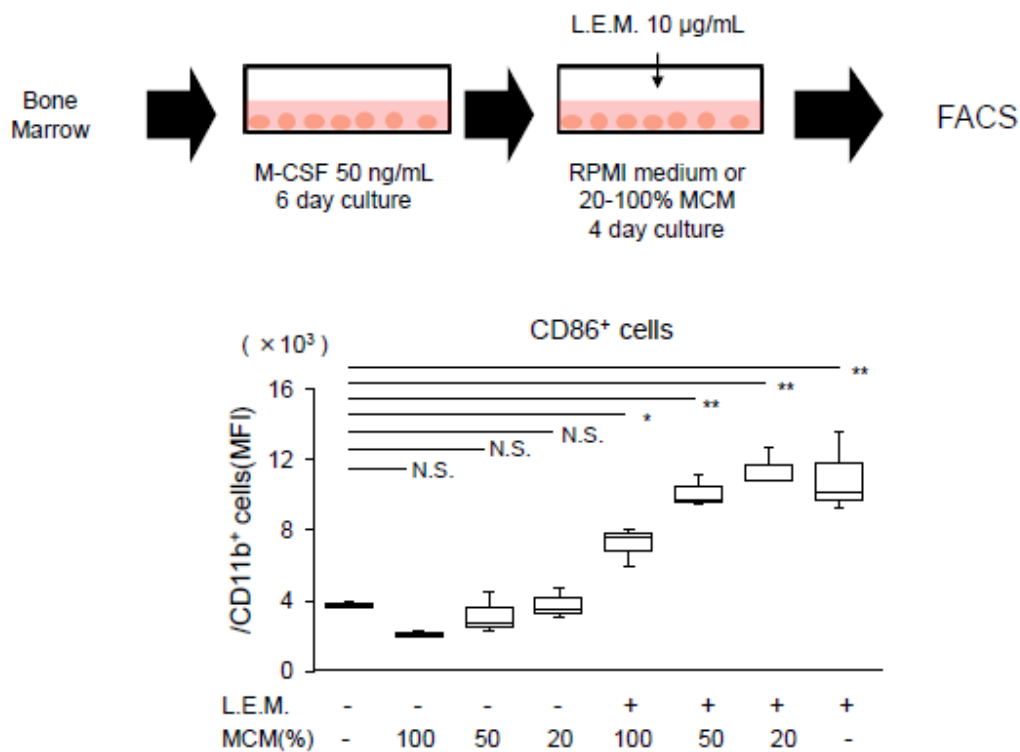


Figure 10 L.E.M. extract maintains bone-marrow derived macrophage activity under culture in melanoma culture supernatant

L.E.M. extract preserves macrophage activity under culture in tumor culture supernatant.

B16F10 cells were cultured in RPMI medium for four days and the culture supernatant was collected (100% MCM: melanoma conditioned medium). This was diluted with fresh RPMI medium to produce 20% and 50% MCM. BMDMs were cultured in RPMI medium or the prepared MCM for four days. L.E.M. extract was added at 10 µg/mL and the expression of CD86+ cells in CD11b+ cells was evaluated by mean fluorescence intensity via flow cytometry (N = 3 per group). The median value is shown in the figure. The data are representative of two independent experiments and were statistically analyzed by one-way ANOVA (\*,  $p < 0.05$ ,

compared to control; \*\*,  $p < 0.01$ , compared to control; N.S., not significant, compared to control).

担癌マウスを用いた検討では、担癌状態では脾臓中の **CD11b-F4/80<sup>+</sup>**マクロファージの数と割合が野生型マウスに比べて有意に増加し、**L.E.M.**摂取群ではこうした変化が抑制されていたことが示唆された。**CD11b-F4/80<sup>+</sup>**細胞は赤脾髄に存在する組織マクロファージであり、赤脾髄マクロファージ (**RPMs**) と呼ばれ老化した赤血球の除去や鉄の代謝に関与する[44]。**RPMs** は **M2** 様マクロファージや **TAM** に発現する **CD163** や **CD206** 陽性であることが示唆されている[45]。**RPMs** の癌における働きはほとんど明らかとなっていないが、乳癌由来の **4T1** 細胞接種マウスでは、脾臓のマクロファージを枯渇させると、骨形成タンパク質 **4** (**BMP4**) の発現を減少させ、赤脾髄における赤血球形成を阻害し、腫瘍増殖を抑制することが報告されている[46]。また、遺伝的に肺腺癌を起こす担癌マウスモデルでは、赤脾髄にマクロファージ前駆細胞が貯留し、腫瘍由来因子である **CC** ケモカインリガンド **2** (**CCL2**) やコロニー刺激因子 **1** (**CSF-1**) を介して腫瘍にマクロファージが動員されるとの報告があり、さらに中脾腫由来の **AE17** 担癌モデルマウスでは、抗 **F4/80** 抗体を投与しマクロファージを枯渇させると腫瘍増殖を遅らせることが報告されている[47]。興味深いことに、我々の検討では脾臓中の **CD11b-F4/80<sup>+</sup>**細胞の割合は腫瘍重量と正の相関を示し、その **CD86** や **CD80** の発現割合は腫瘍重量と負の相関を示した (**Figure 11**)。

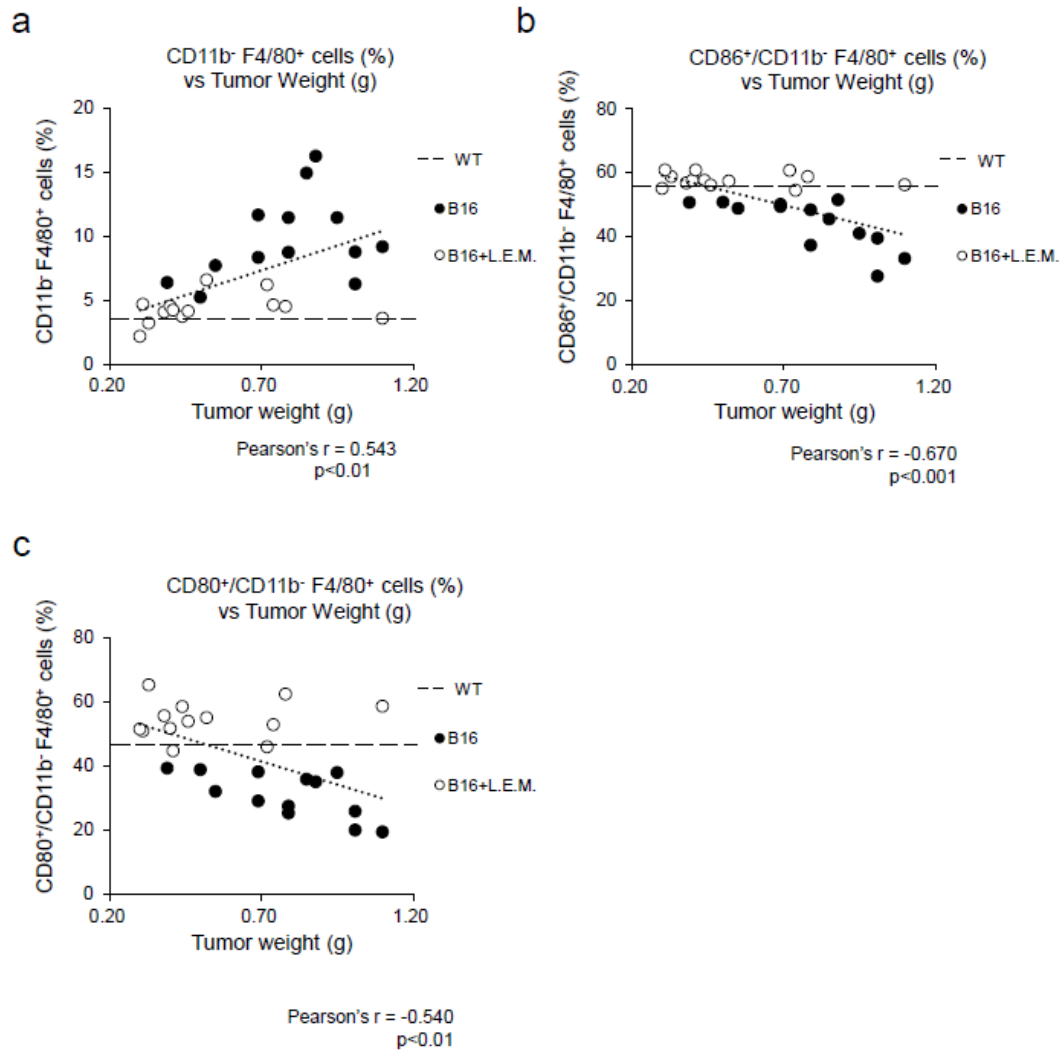


Figure 11 Correlation between macrophages and tumor weight

Correlation between macrophages and tumor weight. (a) Correlation between the proportion of CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells and tumor weight in the spleen of cancer-bearing mice administered with B16F10 cells (N=13). Dotted line shows the mean value of the proportion of CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells in the wild-type group. (b) Correlation between the proportion of CD86<sup>+</sup> cells in CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells and tumor weight (N = 13). Dotted line shows the mean value of



the proportion of CD11b-F4/80<sup>+</sup> cells in the wild-type group. (c) Correlation between the proportion of CD80<sup>+</sup> cells in CD11b-F4/80<sup>+</sup> cells and the tumor weight (N = 13). Dotted line shows the mean value of the proportion of CD11b-F4/80<sup>+</sup> cells in the wild-type group. We also calculated the Pearson correlation coefficient (r) and the probability (p value) of obtaining the test statistic (t value) according to the t distribution.

このことから担癌マウスでは脾臓中に活性化状態の悪い CD11b-F4/80<sup>+</sup>細胞が貯留し、これが腫瘍局所に動員され抗腫瘍免疫応答を減弱させている可能性が示唆される。また、L.E.M.を摂取することで脾臓中の CD11b-F4/80<sup>+</sup>細胞の変化が抑制されていたことから、L.E.M.は担癌により減弱する脾臓中のマクロファージの機能不全を改善することで抗腫瘍応答を維持している可能性が示唆される。

樹状細胞やマクロファージはトル様受容体 (TLR) や Dectin などの受容体に様々な真菌やカビなどの外来因子が結合して活性化する。例えば TLR2 はペプチドグリカンやザイモザンなどが結合し、TLR4 は LPS が結合することで抗原提示細胞を活性化する[48]。また、Dectin1 は  $\beta(1\rightarrow3)$ -グルカンの結合を介して抗原提示細胞を活性化する[49]。シイタケ由来の  $\beta$  グルカンから製造された抗腫瘍悪製剤レンチナンの研究では TLR2 や TLR4 の刺激を介して樹状細胞を活性化し、マラリア感染モデルにおける脾臓中の IL-12、IFN- $\gamma$  産生の増強と Th1 免疫応答を増強することが示唆されている[50]。L.E.M.は  $\beta$  グルカンを約 5%含ん

でいる[51]ことから TLR2 や TLR4、Dectin1 を介して抗原提示細胞を活性化する可能性がある。一方で L.E.M.は多糖類や有機酸など多数の成分を含有する製剤であるため、複数の成分が様々な受容体を刺激し協調的に働くことで抗原提示細胞を活性化している可能性もある。例えば、L.E.M.に含まれるバニリン酸はマクロファージの STING/TBK1/IRF3 経路を刺激し、IL-6R/JAK シグナルを介してマクロファージの M1 様の表現型への分極を促進し、貪食作用とアポトーシス誘導作用を増強することや、4T1 乳癌細胞接種マウスモデルにおいてバニリン酸の腹腔内投与により、腫瘍成長の有意な抑制が認められ、さらに腫瘍中のマクロファージが M1 様の表現型に変化し、腫瘍組織、脾臓、血中における CD8 陽性細胞数の増強したことが報告されている[52]。現在、我々は L.E.M.の分画物を作製し、L.E.M.に含まれる成分の同定を進めている。こうした成分研究から、本研究で示された L.E.M.の樹状細胞の活性化を促進する成分やマクロファージを M1 様の表現型に誘導する成分同定が進むことで、免疫機能を高める機能性表示食品や特定保健用食品、あるいは新規の医薬品開発への展開が期待される。

## 5. 総括

本研究では **L.E.M.**が免疫システムの上流に位置し、免疫機能全体の賦活化に関わる抗原提示細胞を直接活性化することを **BMDCs**、**BMDMs** 培養系により明らかにし、**L.E.M.**により活性化した抗原提示細胞が **T** 細胞の活性化を引き起こすことを **BMDCs** と **T** 細胞の共培養系により明らかにした。さらに担癌マウスを用いた検討では担癌状態では抗原提示細胞の活性化状態が減弱し、癌の増悪に関与する可能性を示し、**L.E.M.**の摂取によりこうした抗原提示細胞の活性化状態の減弱が抑制され、その結果、癌の増悪を抑制する可能性を明らかにした。本研究で明らかになった **L.E.M.**の本質的な作用は、抗原提示細胞の機能調節作用にあることから、**L.E.M.**は抗原提示細胞を介して身体の免疫機能を維持・調整し、癌のみならず感染症などにも有用であることが期待される。

## 6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご助力を賜りました大阪大学薬学研究科ワクチン材料学分野の國澤純教授（国立研究開発法人・医薬基盤・健康・栄養研究所 ヘルス・メディカル微生物研究センター センター長）、国立研究開発法人・医薬基盤・健康・栄養研究所の細見晃司主任研究員、明治大学農学部生命科学科の長竹貴広准教授に深く感謝申し上げます。

また、副査としてご指導賜りました、大阪大学薬学研究科医薬品・医療機器規制科学分野の近藤昌夫教授、薬剤学分野の中川晋作教授に深くお礼申し上げます。

実験上の助言やサポートをいただきました医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチンマテリアルプロジェクトの皆様にも感謝申し上げます。

医薬基盤・健康・栄養研究所での研究機会および大学進学のお机を後押しいただき、研究のサポートを賜りました小林製薬株式会社中央研究所の松嶋雄司所長、松井保公部長、西岡満智子グループ長、実験におけるサポートを賜りました小林製薬株式会社中央研究所の皆様にも多大なるに感謝を申し上げます。

## 7. 参考論文

1. Parkin J, Cohen B (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357(9270):1777-1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
2. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
3. Chen DS, Mellman I (2013) Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
4. Ma J, Wei K, Zhang H, Tang K, Li F, Zhang T, Liu J, Xu P, Yu Y, Sun W, Zhu L, Chen J, Zhou L, Liang X, Lv J, Fiskesund R, Liu Y, Huang B (2018) Mechanisms by which dendritic cells present tumor microparticle antigens to CD8(+) t cells. *Cancer Immunol. Res.* 6:1057-1068. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0716>
5. Kobayashi D, Endo M, Ochi H, Hojo H, Miyasaka M, Hayasaka H (2017) Regulation of CCR7-dependent cell migration through CCR7 homodimer formation. *Sci Rep* 7:8536. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09113-4>
6. Lanzavecchia A, Sallusto F (2001) Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106:263-266. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00455-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00455-x)
7. Unanue ER (1984) Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol*

2:395-428. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.02.040184.002143>

8. Martinez-Pomares L, Gordon S (2007) Antigen presentation the macrophage way. *Cell* 131:641-643. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.046>
9. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 331:1565-1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
10. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ (2019) Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 16:151-167. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>
11. Duan Q, Zhang H, Zheng J, Zhang L (2020) Turning cold into hot: firing up the tumor microenvironment. *Trends Cancer*. 6:605-618. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.02.022>
12. Cancer Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan (Vital Statistics of Japan, Ministry of Health, Labour and Welfare)
13. Monitoring of Cancer Incidence in Japan - Survival 2009-2011 Report (Center for Cancer Control and Information Services, National Cancer Center, 2020)
14. Population-based survival of cancer patients diagnosed between 1993 and 1999 in Japan: a chronological and international comparative study. *Japanese Journal of*

Clinical Oncology 2011; 41: 40-51. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyq167>

15. Hyodo I, Amano N, Eguchi K, Narabayashi M, Imanishi J, Hirai M, Nakano T, Takashima S (2005) Nationwide survey on complementary and alternative medicine in cancer patients in Japan. J Clin Oncol 23(12):2645-54. <https://doi.org/10.1200/jco.2005.04.126>
16. Tanaka T, Onuma H, Shigihara T, Kimura E, Fukuta Y, Shirasaka N, Moriyama T, Homma Y (2019) Anti-osteoporotic effects of syringic acid and vanillic acid in the extracts of waste beds after mushroom cultivation. J. Biosci. Bioeng. 128:622-629. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.04.021>.
17. Kojima H, Akaki J, Nakajima S, Kamei K, Tamesada M (2010) Structural analysis of glycogen-like polysaccharides having macrophage-activating activity in extracts of Lentinula edodes mycelia. J Nat Med 64:16-23. <https://doi.org/10.1007/s11418-009-0357-1>
18. Tanaka K, Ishikawa S, Matsui Y, Tamesada M, Harashima N, Harada M (2011) Oral ingestion of Lentinula edodes mycelia extract inhibits B16 melanoma growth via mitigation of regulatory T cell-mediated immunosuppression. Cancer Sci 102:516-521. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01841.x>
19. Tanaka K, Matsui Y, Ishikawa S, Kawanishi T, Harada M (2012) Oral ingestion of Lentinula

edodes mycelia extract can restore the antitumor T cell response of mice inoculated with colon-26 cells into the subserosal space of the cecum. *Oncol Rep* 27:325-332. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1549>

20. Tanaka K, Ishikawa S, Matsui Y, Kawanishi T, Tamesada M, Harashima N, Harada M (2012) Combining a peptide vaccine with oral ingestion of *Lentinula edodes* mycelia extract enhances anti-tumor activity in B16 melanoma-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother* 61:2143-2152. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1275-8>
21. Ishikawa S, Matsui Y, Wachi S, Yamaguchi H, Harashima N, Harada M (2016) Age-associated impairment of antitumor immunity in carcinoma-bearing mice and restoration by oral administration of *Lentinula edodes* mycelia extract. *Cancer Immunol Immunother* 65:961-972. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1857-y>
22. Shin MS, Park HJ, Maeda T, Nishioka H, Fujii H, Kang I (2019) The Effects of AHCC®, a Standardized Extract of Cultured *Lentinura edodes* Mycelia, on Natural Killer and T Cells in Health and Disease: Reviews on Human and Animal Studies. *J Immunol Res*. 2019:3758576. <https://doi.org/10.1155/2019/3758576>
23. Park HJ, Boo S, Park I, Shin MS, Takahashi T, Takanari J, Homma K, Kang I (2002) AHCC®, a Standardized Extract of Cultured *Lentinula Edodes* Mycelia, Promotes the Anti-Tumor Effect of Dual Immune Checkpoint Blockade Effect in Murine



Colon Cancer. *Front Immunol* 13:875872. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.875872>

24. Wang Y, Hosomi K, Shimoyama A, Yoshii K, Yamaura H, Nagatake T, Nishino T, Kiyono H, Fukase K, Kunisawa J (2020) Adjuvant Activity of Synthetic Lipid A of *Alcaligenes*, a Gut-Associated Lymphoid Tissue-Resident Commensal Bacterium, to Augment Antigen-Specific IgG and Th17 Responses in Systemic Vaccine. *Vaccines* (Basel) 8:395. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030395>
25. Zhu LF, Li L, Wang XQ, Pan L, Mei YM, Fu YW, Xu Y (2019) M1 macrophages regulate TLR4/AP1 via paracrine to promote alveolar bone destruction in periodontitis. *Oral Dis* 25:1972-1982. <https://doi.org/10.1111/odi.13167>
26. Podaru MN, Fields L, Kainuma S, Ichihara Y, Hussain M, Ito T, Kobayashi K, Mathur A, D'Acquisto F, Lewis-McDougall F, Suzuki K (2019) Reparative macrophage transplantation for myocardial repair: a refinement of bone marrow mononuclear cell-based therapy. *Basic Res Cardiol* 114:34. <https://doi.org/10.1007/s00395-019-0742-1>
27. Kim MC, Kim SJ, Kim DS, Jeon YD, Park SJ, Lee HS, Um JY, Hong SH (2011) Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF- $\kappa$ B in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 33(3):525-532. <https://doi.org/10.3109/08923973.2010.547500>
28. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Kobayashi M, Tamesada M, Yagi K (2009)

Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 32:1215-1219. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1215>

29. Henry CJ, Ornelles DA, Mitchell LM, Brzoza-Lewis KL, Hiltbold EM (2008) IL-12 Produced by Dendritic Cells Augments CD8<sup>+</sup> T Cell Activation through the Production of the Chemokines CCL1 and CCL17. *J Immunol* 181:8576-8584. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8576>
310. Gordon, S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23-35. <https://doi.org/10.1038/nri978>
31. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677-686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
32. Alberto M (2006) Macrophage diversity and polarization: in vivo veritas. *Blood* 108:408-409. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-019430>
33. Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621-667. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828>
34. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A (2008) Macrophage polarization in tumour progression. *Semin*

Cancer Biol 18:349-355. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.004>

35. Camporeale A, Boni A, Iezzi G, Degl'Innocenti E, Grioni M, Mondino A, Bellone M (2003)

Critical impact of the kinetics of dendritic cells activation on the in vivo induction of tumor-specific T lymphocytes. *Cancer Res* 63:3688-3694.

36. Curtsinger JM, Lins DC, Mescher MF (2003) Signal 3 Determines Tolerance versus Full

Activation of Naive CD8 T Cells. *J Exp Med* 197:1141–1151.

<https://doi.org/10.1084/jem.20021910>

37. Kieper WC, Prlic M, Schmidt CS, Mescher MF, Jameson SC (2001) IL-12 enhances CD8

T cell homeostatic expansion. *J Immunol* 166:5515-5521.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.9.5515>

38. Li Q, Eppolito C, Odunsi K, Shrikant PA (2006) IL-12-programmed long-term CD8<sup>+</sup> T cell

responses require STAT4. *J Immunol* 177:7618-7625.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7618>

39. Yu S, Liu C, Su K, Wang J, Liu Y, Zhang L, Li C, Cong Y, Kimberly R, Grizzle WE, Falkson

C, Zhang HG (2007) Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells. *J Immunol* 178:6867-6875. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6867>

40. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, Blay JY (1998)

Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor

cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92:4778-4791.

41. Bellone G, Carbone A, Smirne C, Scirelli T, Buffolino A, Novarino A, Stacchini A, Bertetto O, Palestro G, Sorio C, Scarpa A, Emanuelli G, Rodeck U (2006) Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. *J Immunol* 177:3448–3460.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3448>

42. Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, Kamimura D, Ueda N, Iwakura Y, Ishihara K, Murakami M, Hirano T (2004) IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 173:3844-3854.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3844>

43. Eriksson F, Tsagozis P, Lundberg K, Parsa R, Mangsbo SM, Persson MA, Harris RA, Pisa P (2009) Tumor-specific bacteriophages induce tumor destruction through activation of tumor-associated macrophages. *J Immunol* 182:3105-3111.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800224>

44. Kohyama M, Ise W, Edelson BT, Wilker PR, Hildner K, Mejia C, Frazier WA, Murphy TL, Murphy KM (2009) Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 457:318-321. <https://doi.org/10.1038/nature07472>

45. Franken L, Klein M, Spasova M, Elsukova A, Wiedwald U, Welz M, Knolle P, Farle M, Limmer A, Kurts C (2015) Splenic red pulp macrophages are intrinsically superparamagnetic and contaminate magnetic cell isolates. *Sci Rep* 5:12940. <https://doi.org/10.1038/srep12940>
46. Liu M, Jin X, He X, Pan L, Zhang X, Zhao Y (2015) Macrophages support splenic erythropoiesis in 4T1 tumor-bearing mice. *PLoS One* 10:e0121921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121921>
47. Duong L, Radley-Crabb HG, Gardner JK, Tomay F, Dye DE, Grounds MD, Pixley FJ, Nelson DJ, Jackaman C (2018) Macrophage depletion in elderly mice improves response to tumor immunotherapy, increases anti-tumor T cell activity and reduces treatment-induced cachexia. *Front Genet* 9:1-14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00526>
48. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
49. Brown GD, Gordon S (2001) Immune recognition. A new receptor for beta-glucans, *Nature* 413:36-37. <https://doi.org/10.1038/35092620>
50. Zhou LD, Zhang QH, Zhang Y, Liu J, Cao YM (2009) The shiitake mushroom-derived immuno-stimulant lentinan protects against murine malaria blood-stage infection by

evoking adaptive immune-responses. *Int Immunopharmacol* 9:455-462.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.01.010>

51. Morales D, Rutckeviski R, Villalva M, Abreu H, Soler-Rivas C, Santoyo S, Lacomini M,

Smiderle FR (2020) Isolation and comparison of  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-glucans from shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) with different biological activities. *Carbohydrate*

*Polymers* 229:115521. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115521>

52. Zhu M, Tang X, Zhu Z, Gong Z, Tang W, Hu Y, Cheng C, Wang H, Sarwar A, Chen Y, Liu

F, Huo J, Wang X, Zhang Y (2023) STING activation in macrophages by vanillic acid exhibits antineoplastic potential. *Biochem Pharmacol* 213:115618.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115618>