

特集

● がんペプチドワクチン療法の進歩と課題 ●

## シイタケ菌糸体抽出物の経口摂取による担癌での免疫抑制解除と抗癌ペプチドワクチン効果の増強

\*<sup>1</sup>小林製薬株式会社・中央研究所, \*<sup>2</sup>高根大学医学部・免疫学田中 公輔\*<sup>1</sup> 松井 保公\*<sup>1</sup> 原田 守\*<sup>2</sup>

**要旨** 癌に対する免疫療法を考えた場合、効率的に癌特異的 CTL を誘導して十分な抗癌効果を得るためには、担癌に伴う免疫抑制を軽減することが重要である。本研究でわれわれは、経口 biological response modifier (BRM) であるシイタケ菌糸体抽出物 (LEM) を経口摂取させた場合、担癌に伴う Treg による免疫抑制を軽減することで腫瘍の増殖が抑制されることを明らかにした。さらに LEM の経口摂取は、抗癌ペプチドワクチンにより誘導される抗癌効果も増強させた。以上の結果より、LEM の経口摂取は臨床応用が可能であり、抗癌ペプチドワクチン療法などの癌免疫療法に併用しても有用であると考えられる。

〔Biotherapy 25 (6) : 863-870, November, 2011〕

### Oral Ingestion of *Lentinula Edodes Mycelia* (LEM) Mitigates Immunosuppression in Tumor-Bearing Hosts and Enhances an Effect of Anti-Cancer Peptide Vaccine

Kousuke Tanaka\*<sup>1</sup>, Yasunori Matsui\*<sup>1</sup> and Mamoru Harada\*<sup>2</sup>\*<sup>1</sup>Central R&D Laboratory, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd., \*<sup>2</sup>Department of Immunology, Shimane University Faculty of Medicine

#### Summary

Mitigation of immunosuppression is therapeutically important for inducing cancer-reactive cytotoxic T-lymphocytes effectively and for obtaining sufficient anti-tumor effects in cancer patients. In the present study, we demonstrate that oral ingestion of *Lentinula edodes mycelia* extract (LEM), a biological response modifier, can inhibit *in vivo* tumor growth via mitigation of regulatory T-cell-mediated immunosuppression in tumor-bearing mice. Ingestion of LEM also augments an effect of anti-cancer peptide vaccine. These results indicate that oral ingestion of LEM can be clinically applicable and it is recommended for combinational use with anti-cancer immunotherapy, including peptide vaccine.

**Key words:** Regulatory T-cell, *Lentinula edodes mycelia*, Cancer peptide vaccine

**Address request for reprints to:** Yasunori Matsui, Central R&D Laboratory, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd., 1-30-3 Toyokawa, Ibaraki, Osaka 567-0057, Japan

## はじめに

1991年、Boonら<sup>1)</sup>がT細胞に認識されるヒトの癌抗原をコードする遺伝子を単離して以来、多くの癌関連抗原や抗原ペプチドが同定され、癌特異的細胞傷害活性Tリンパ球(CTL)の誘導を目的とした癌免疫療法が試みられている。なかでもペプチドワクチン療法は、治療の方法が比較的簡便で患者への負担も少ないことから、広く臨床応用が期待されている。一方で、1995年にSakaguchiらが<sup>2)</sup>免疫寛容にかかわる細胞として発見した制御性T細胞(Treg)は、担癌生体内でT細胞免疫応答を抑制する。癌ワクチン療法により効率的に抗癌効果を誘導するためには、CTLの効果的な誘導とともにTregなどによる免疫抑制の解除も必要であると考えられる。

Tregによる免疫抑制を軽減するために、抗GITR抗体や抗CTLA-4抗体<sup>3)</sup>などが開発されているが、Tregの抑制機能の過度な制御は、一方で自己免疫疾患のリスクが高まるという側面もあることから、実際の臨床応用には慎重を要する。われわれはTregの適切な制御をめざし、経口摂取できるシイタケ菌糸体抽出物(LEM)の研究を進めてきた。本稿では、LEMの担癌状態でのTregによる、免疫抑制の解除作用と抗癌ペプチドワクチンによる抗癌効果の増強作用について報告する。

## I. LEMとは

LEMは、シイタケの菌糸を固形培地で培養後、熱水抽出した茶褐色のエキス粉末である(図1)。その成分は単一ではなく、抗酸化作用と肝臓保護作用をもつシリンガ酸、バニリン酸<sup>4)</sup>や免疫調節作用のある $\alpha$ グルカンやキシラン様多糖<sup>5)</sup>などが含まれている。安全性については変異原性試験<sup>6)</sup>、染色体異常試験<sup>6)</sup>、ラット反復投与試験<sup>7)</sup>、ヒト投与安全性試験<sup>8)</sup>が報告されており、経口製剤としての高い安全性が確認されている。

## II. LEMの臨床応用

臨床においてLEMは、経口 biological response modifier (BRM)として800~1,800 mg/day摂取した際、以下の有用性が報告されている<sup>9-11)</sup>。Nagashimaらは、乳癌術後補助化学療法(FEC療法)時にLEMを併用した場合、QOL、NK活性が改善<sup>10)</sup>したと報告している。Yamaguchiらも消化器癌、乳癌の術後/再発癌化学療法時に、LEMを併用した場合、QOL、NK活性、LAK活性、免疫抑制糖蛋白(IAP)が改善したと報告している<sup>9)</sup>。また、われわれは、癌治療後に再発を認めない患者にLEMを20週間摂取させる試験を行った。評価した各種免疫パラメータのうち、摂取前の末梢血サイトカインのinterferon (IFN)- $\gamma$ /interleukin (IL)-10バランス(比)は、コントロールの健常者に比較し低値を示したが、LEM摂取20週後には健常者と同程度に改善したこと

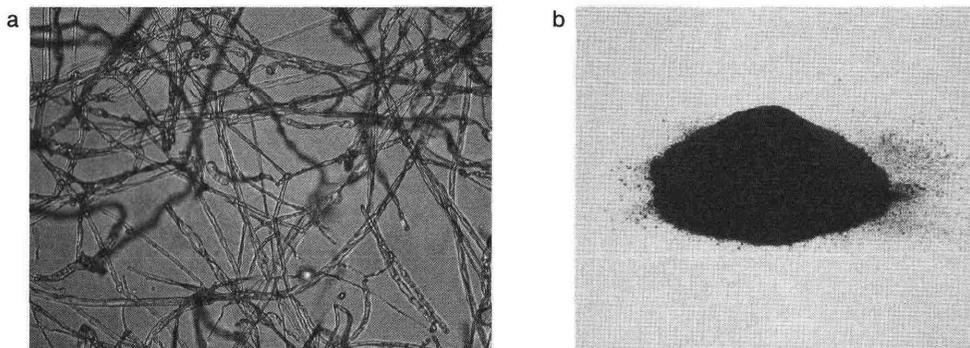


図1 LEM

a: シイタケ菌糸体拡大写真(×400)。

b: LEM(シイタケ菌糸体エキス)粉末。

を報告した<sup>11)</sup> (図2)。

以上のように、LEMは免疫活性増強能を有し、担瘤状態での免疫抑制因子であるIAPやIL-10を抑制する作用をもつことが臨床で観察されており、担瘤状態による免疫抑制を解除する可能性が示唆されていた。LEMのような経口BRM剤で

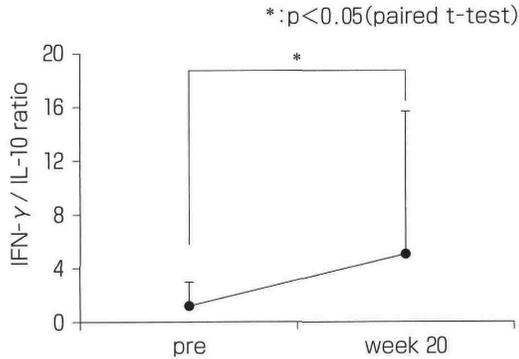


図2 LEM 摂取による IFN- $\gamma$ /IL-10 の改善 (文献<sup>11)</sup> より改変)

癌治療完了後に再発を認めない13名にLEM含有顆粒 (LEMとして800~1,800 mg/day)を20週間連日摂取させた。摂取前後のヘパリン採血の末梢全血に4倍量のRPMI-1,640培地を加え、LPSを最終濃度が20 pg/mLになるように添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>条件で24時間培養した。培養上清中のIFN- $\gamma$ およびIL-10濃度をELISAで定量し、IFN- $\gamma$ /IL-10比を算出した。

免疫抑制が解除されるなら、臨床上のメリットは大きいと考えられる。そこでわれわれは、Tregを中心とした担瘤状態の免疫抑制に対するLEMの作用と、その応用として、抗癌ペプチドワクチン療法による抗癌効果の増強の可能性について検討した。

### III. 抗癌効果と Treg 抑制の検討

B16メラノーマ移植マウスのモデル系を用いて、LEM経口投与による抗癌効果とTregの抑制ならびにCTLの誘導について検討を行った<sup>12)</sup>。7.5×10<sup>5</sup>個のメラノーマ細胞をC57BL/6マウスの右フットパッドに移植し、LEMを配合した餌を21日間与えると、LEM配合濃度依存的にメラノーマの増殖が抑制された。この効果はT細胞を欠損したBALB/c/nu/nuマウスでは認めないことから、LEMの経口摂取により誘導される抗癌効果はT細胞依存性と考えられた (図3)。さらに、所属リンパ節細胞をMHC class I分子であるH-2K<sup>b</sup>に提示されるB16メラノーマの抗原ペプチドであるTRP2<sub>181-188</sub>の存在下で刺激培養すると、LEM投与群で通常餌投与群に比べてIFN- $\gamma$ の産生が上昇した。また、B16メラノーマとの共培養でも、LEM投与群で通常餌投与群に比べてIFN- $\gamma$ の産生が上昇した。この上昇は、MHC class I欠損株であるB16L細胞との共培養では観察されなかったが、B16L細胞にH-2K<sup>b</sup>を発現させたB16L-K<sup>b</sup>細胞との共培養では回復した (図4)。

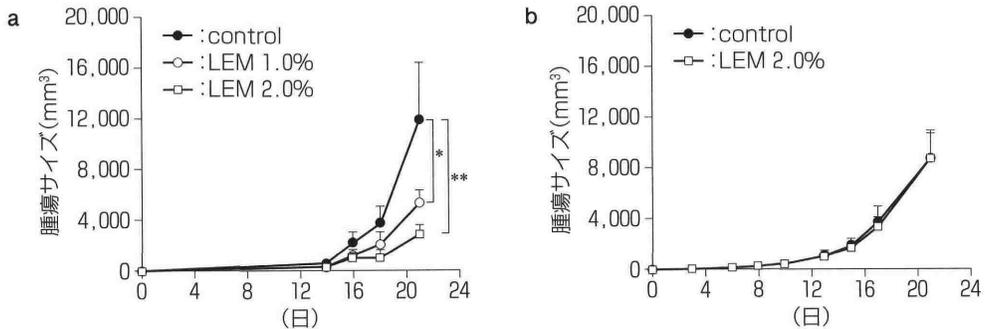


図3 B16メラノーマ増殖抑制作用 (文献<sup>12)</sup> より改変)

B16メラノーマ細胞をマウス右フットパッドに移植し、翌日から、LEM配合餌を20日間投与し、腫瘍サイズを経時的に測定した。

a: C57BL/6マウス。

b: BALB/c/nu/nuマウス (T細胞欠損)。\*: p<0.05, \*\*: p<0.01 (t-test)。

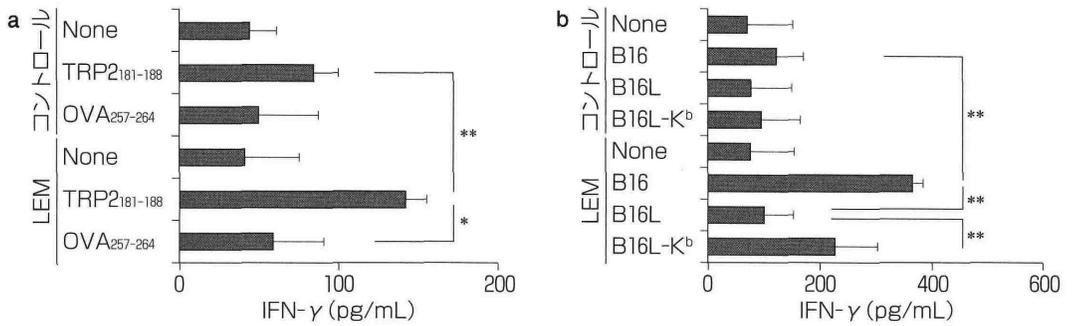


図4 腫瘍抗原ペプチドおよび B16 細胞反応性 T 細胞 (文献<sup>12)</sup> より改変)

a : B16 細胞移植マウス所属リンパ節リンパ球を 21 日目に調整し, B16 細胞抗原ペプチド TRP2<sub>181-188</sub> と IL-2 (20 U/mL) 存在下で 3 日間培養後, 培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度を ELISA で定量した。OVA<sub>257-264</sub> ペプチドをコントロールに用いた。

b : B16 細胞移植マウス所属リンパ節リンパ球を 21 日目に調整し, B16 細胞と IL-2 (20 U/mL) 存在下で 3 日間共培養し, 培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度を ELISA で定量した。B16L 細胞は MHC class I 欠損細胞として, B16L-K<sup>b</sup> 細胞は MHC class I 欠損回復細胞として用いた。

\* : p<0.05, \*\* : p<0.01 (t-test)。

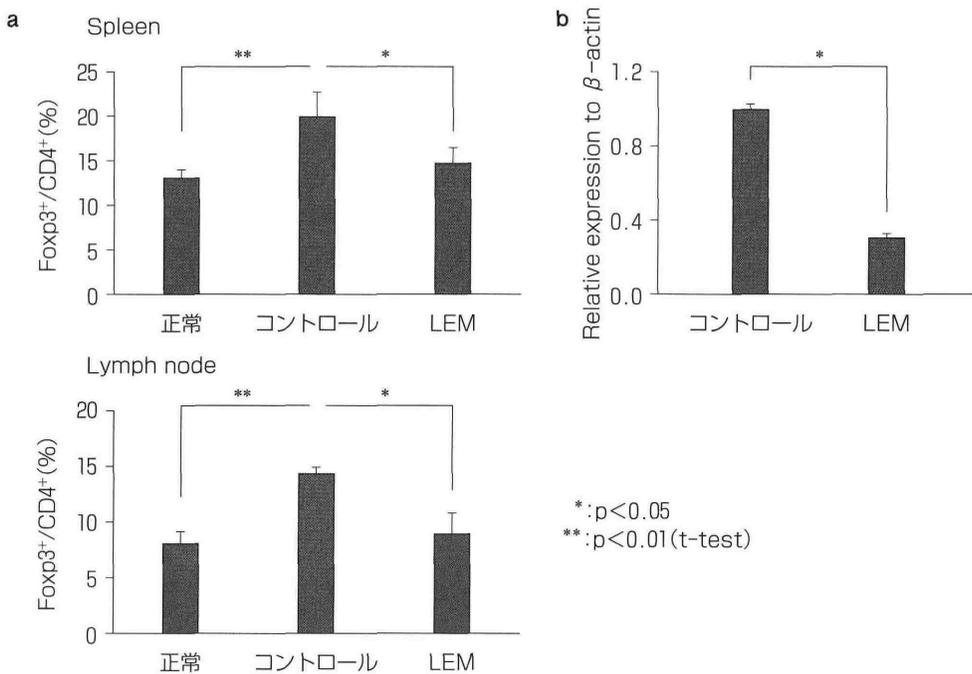


図5 脾臓, リンパ節 Treg 比および腫瘍局所 Fcpx3 発現量 (文献<sup>12)</sup> より改変)

a : B16 細胞移植 21 日目の脾臓リンパ球および所属リンパ節 CD4 陽性細胞中の Fcpx3 陽性細胞をフローサイトメーターで測定した。

b : B16 細胞移植 21 日目に腫瘍組織から RNA を調整し, Fcpx3 mRNA の発現量を real time PCR で定量した。

\* : p<0.05  
\*\* : p<0.01 (t-test)

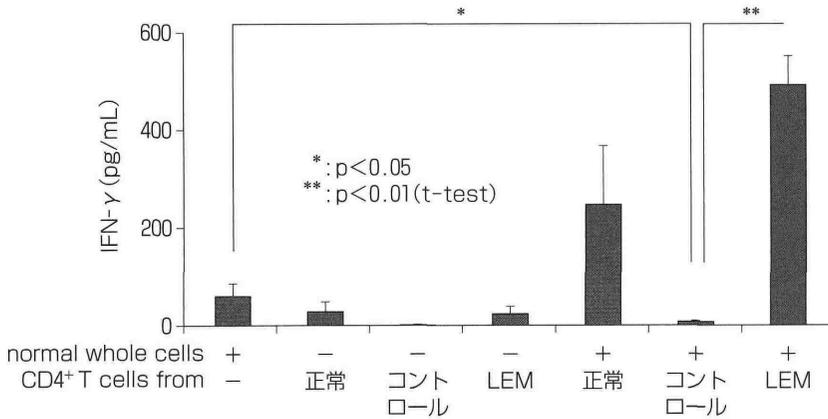


図6 Tregによる免疫抑制の解除 (文献<sup>12)</sup>より改変)  
 B16細胞移植21日目に脾臓からCD4<sup>+</sup>T cellsを調整し、正常マウスから調整した脾細胞のwhole cellsと抗CD3抗体コーティングプレートで3日間共培養した。培養上清中のIFN- $\gamma$ 濃度をELISAで定量した。

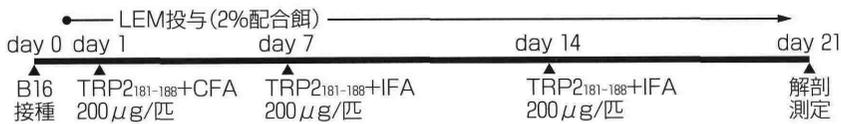


図7 B16メラノーマ移植マウス：ペプチドワクチン療法試験スケジュール

同様の結果は脾臓細胞でも認められた。これらの結果は、シイタケ菌糸体の経口摂取によって、癌特異的CTLの誘導が促進されたことを示唆している。さらにTregについても検討したところ、通常餌を投与した担癌マウスでは、リンパ節および脾臓中のTreg細胞の割合(Foxp3陽性/CD4陽性)が正常マウスに比べて増加していたが、LEM投与群ではこの増加が抑制された。同様に、癌組織中のTregマーカーであるFoxp3 mRNAの発現レベルは、通常餌投与群に比べ、LEM投与群で抑制されていた(図5)。さらに、Treg細胞によるT細胞機能の抑制に及ぼすLEMの影響を評価するため、B16メラノーマ移植マウスのリンパ節CD4陽性細胞を正常マウスのリンパ節リンパ球と共培養し、IFN- $\gamma$ の産生を定量した。その結果、通常餌投与群ではIFN- $\gamma$ 産生が顕著に抑制されたのに対し、LEM餌群ではIFN- $\gamma$ 産生の回復が観察された(図6)。以上の結果から、LEMの経口摂取は、所属リンパ節および癌局所において担癌状態で誘導されたTregを抑制し、

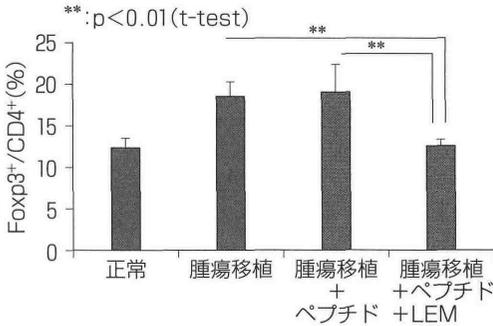
癌特異的CTLの誘導を回復させる作用をもつと考えられた。

#### IV. 抗癌ペプチドワクチンへの効果の検討

今までの結果から、LEMを経口摂取させた場合、担癌状態で増加したTregの抑制を解除し、その結果、癌特異的CTLを回復させることが示唆されたので、次に抗癌ペプチドワクチンへの効果を検討した。

検討はB16メラノーマ移植マウスモデルを用いて行い、ペプチドワクチンとLEM投与のスケジュールは図7のとおりとした。ペプチドは週1回×3回ワクチンし、LEMは餌に2%配合し、B16移植後、連日経口摂取させた。B16移植21日目の脾臓および所属リンパ節細胞中のTreg細胞の割合は、無治療群では正常マウスに比べ高値を示し、ワクチン単独治療群でも依然として高値を示した(図8)。そのため、このモデルではTregによってペプチドワクチンによる癌特異的CTL誘導が阻害されていると考えられた。一方、LEM

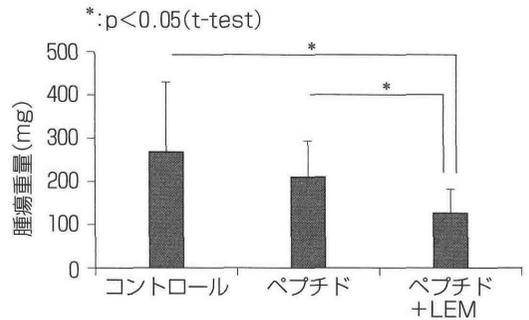
併用群では、Treg 値は正常マウスに近い値を示した(図8)。ワクチン/LEM 併用群でワクチンによる CTL 誘導の増強が予想されたが、確かにリ



**図8** B16 メラノーママウスペプチドワクチン接種時の Treg 値  
 B16 細胞移植 21 日目の所属リンパ節リンパ球中の Foxp3 陽性細胞をフローサイトメーターで測定した。  
 正常：正常マウス，腫瘍移植：B16 細胞移植で無治療，腫瘍移植+ペプチド：B16 細胞移植+TRP2 ペプチド投与，腫瘍移植+ペプチド+LEM：B16 細胞移植+TRP2 ペプチド投与+LEM 配合餌投与。

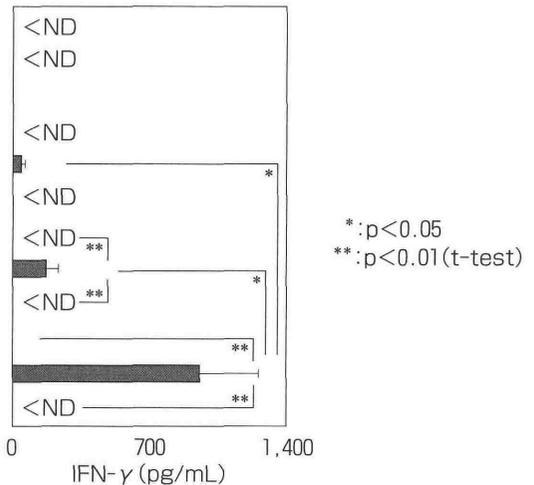
ンパ節リンパ球を TRP2<sub>180-188</sub> ペプチドで刺激した場合の IFN- $\gamma$  産生はワクチン単独群に比べ、ワクチン/LEM 併用群で増強していた(図9)。また、B16 メラノーマの *in vivo* での増殖もワクチン単独群に比べ、ワクチン/LEM 併用群で抑制された(図10)。

以上の結果から、LEM の経口摂取は担癌状態



**図10** 腫瘍重量  
 B16 細胞移植 21 日目の腫瘍重量  
 コントロール：B16 細胞移植，ペプチド：B16 細胞移植+TRP2 ペプチド投与，ペプチド+LEM：B16 細胞移植+TRP2 ペプチド投与+LEM 配合餌投与。

ペプチド	LEM	<i>In vitro</i> ペプチド刺激
(-)	(-)	(-)
(-)	(-)	TRP2 <sub>180-188</sub>
(-)	(-)	OVA <sub>257-264</sub>
-----		
(-)	(+)	(-)
(-)	(+)	TRP2 <sub>180-188</sub>
(-)	(+)	OVA <sub>257-264</sub>
-----		
(+)	(-)	(-)
(+)	(-)	TRP2 <sub>180-188</sub>
(+)	(-)	OVA <sub>257-264</sub>
-----		
(+)	(+)	(-)
(+)	(+)	TRP2 <sub>180-188</sub>
(+)	(+)	OVA <sub>257-264</sub>



**図9** 腫瘍抗原ペプチド反応性 IFN- $\gamma$  産生  
 B16 細胞移植マウス所属リンパ節リンパ球を 21 日目に調整し、B16 細胞抗原ペプチド TRP2<sub>180-188</sub> と IL-2 (20 U/mL) 存在下で 3 日間培養後、培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度を ELISA で定量した。OVA<sub>257-264</sub> ペプチドをコントロールに用いた。

で増加した Treg を抑えることにより、抗癌ペプチドワクチン療法を始めとする癌免疫療法の効果を増強することが期待される。われわれは他の癌種でも同様の検討を進めており、colon 26 移植マウスモデルでも LEM を併用することにより抗癌ペプチドワクチン効果を増強することを確認している（未発表データ）。

## V. LEM を経口摂取した場合の Treg 抑制の作用機序

LEM の経口摂取による Treg 抑制の機序は、いまだ十分明らかではないが、われわれは正常マウスに LEM を投与しても Treg が減少しないことを確認している<sup>12)</sup>。そのため、LEM は直接的に Treg に作用するのではなく、担癌状態で増加すると考えられる Treg を誘導する因子に作用するものと推察している。われわれは、二つの可能性を考えている。一つは、担癌状態で増加する TGF- $\beta$  抑制を介した作用である。TGF- $\beta$  は Treg の誘導因子であるが<sup>13)</sup>、B16 メラノーマ移植マウスにおいて、LEM 投与群では血漿中 TGF- $\beta$  濃度の上昇が抑制されていることを確認している<sup>12)</sup>。経口で摂取された LEM が担癌状態で過剰産生された TGF- $\beta$  の増加を抑えることで、全身性の免疫抑制状態を解除している可能性がある。もう一つの可能性は、LEM が担癌に伴う炎症を抑えている可能性である。担癌状態では、慢性的な炎症状態に陥っていることはよく知られていることである<sup>14)</sup>。また炎症は、indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) を産生する plasmacytoid dendritic cells を増加させて、Treg を増加させることが知られている<sup>15-17)</sup>。一方、LEM は抗炎症作用をもつことが報告されていることから<sup>4)</sup>、担癌状態における慢性的な炎症状態の解除により Treg の誘導が抑制され、結果として、癌特異的 CTL の誘導促進に働いている可能性も考えられる。これらの可能性について現在検証を進めている。

## おわりに

多くの癌抗原や抗原ペプチドが同定された結果、抗癌ペプチドワクチン療法の実施が可能となった。しかしながら、治療効果を高めるためには、担癌に伴う Treg 細胞の増加などの免疫抑制

状態を改善させる必要がある。そのために、抗体を中心とする直接的な Treg 制御というアプローチに加え、われわれが研究を進めてきた経口 BRM である LEM も患者への負担が少ない方法として、臨床応用の選択肢の一つになることを期待している。

## 文 献

- 1) van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., *et al.*: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**(5038):1643-1647, 1991.
- 2) Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., *et al.*: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**(3):1151-1164, 1995.
- 3) Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., *et al.*: Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364**(26):2517-2526, 2011.
- 4) Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., *et al.*: Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.* **32**(7):1215-1219, 2009.
- 5) Kojima, H., Akaki, J., Nakajima, S., *et al.*: Structural analysis of glycogen-like polysaccharides having macrophage-activating activity in extracts of *Lentinula edodes* mycelia. *J. Nat. Med.* **64**(1):16-23, 2010.
- 6) 吉岡康子, 松井保公, 小林正和・他: シイタケ菌糸体抽出物の遺伝毒性, 急性毒性および薬物代謝酵素, シトクロム P-450 3A4 阻害作用に関する検討. *日補完代替医療誌* **7**(1):51-57, 2010.
- 7) Yoshioka, Y., Tamesada, M. and Tomi, H.: A repeated dose 28-day oral toxicity study of extract from cultured *Lentinula edodes* mycelia in Wistar rats. *J. Toxicol. Sci.* **35**(5):785-791, 2010.
- 8) 吉岡康子, 為定 誠, 永山在明: 健康成人におけるシイタケ菌糸体抽出物 (L.E.M.) 配合食品過剰摂取時の安全性 *日補完代替医療誌* **6**(1):9-15, 2009.
- 9) Yamaguchi, Y., Miyahara, E. and Hihara, J.: Efficacy and safety of orally administered *Lentinula edodes* mycelia extract for patients undergoing cancer chemotherapy: a pilot study. *Am. J. Chin. Med.* **39**(3):451-459, 2011.
- 10) Nagashima, Y., Sanpei, N., Yamamoto, S., *et al.*: Evaluation of host immunity and side effects in breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy (FEC therapy). *Gan To Kagaku Ryoho* **32**(11):1550-1552, 2005.
- 11) Nagayama, A., Kawanishi, T., Matsui, Y., *et al.*: The ratio of IFN- $\gamma$ /IL-10 productions is a

- useful prognostic indicator and it was improved by mushroom extract in patients with malignant diseases. the 100<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR.); 2009.04.02.; Denver.: USA, 2009.
- 12) Tanaka, K., Ishikawa, S., Matsui, Y., *et al.*: Oral ingestion of Lentinula edodes mycelia extract inhibits B16 melanoma growth via mitigation of regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cancer Sci.* **102**(3): 516-521, 2011.
  - 13) Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., *et al.*: IL-2 is essential for TGF- $\beta$  to convert naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and for expansion of these cells. *J. Immunol.* **178**(4): 2018-2027, 2007.
  - 14) Erdman, S.E. and Poutahidis, T.: Cancer inflammation and regulatory T cells. *Int. J. Cancer* **127**(4): 768-779, 2010.
  - 15) Muller, A.J., Sharma, M.D., Chandler, P.R., *et al.*: Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2, 3 dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**(44): 17073-17078, 2008.
  - 16) Munn, D.H., Sharma, M.D., Hou, D., *et al.*: Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Clin. Invest.* **114**(2): 280-290, 2004.
  - 17) Sharma, M.D., Baban, B., Chandler, P., *et al.*: Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* **117**(9): 2570-2582, 2007.
-