

がん移植マウスモデルにおけるベツリンの 抗腫瘍メカニズムの解析

小笠原 勝, 松永 孝之, 長井 良憲¹, 高津 聖志

¹富山大学大学院医学薬学研究部免疫バイオ・創薬探索研究講座

Mechanism of action of the anti-tumor effects of betulin.

Masaru OGASAWARA, Takayuki MATSUNAGA, Yoshinori NAGAI¹, Kiyoshi TAKATSU

¹Department of Immunobiology and Pharmacological Genetics,

Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science for Research, University of Toyama

要 約

前報において、植物成分ベツリンが、ポリ (IC) により亢進した脾臓細胞の細胞傷害活性に対する TGF- β あるいは PGE₂ の抑制作用をいずれも解除することを報告した。ベツリンは抗腫瘍効果を示すことが報告されているが、その作用機序はがん細胞増殖に対する阻害作用であると考えられている。そこで本研究では、がん移植マウスモデルにおけるベツリンの抗腫瘍効果に免疫抑制解除作用が関与しているのかを検討した。B16F10細胞を皮下移植したマウスモデルを用いて、ベツリンの抗腫瘍効果を検討したところ、有意な抑制効果が得られることを確認した。免疫系への影響を検討するため、腫瘍内に浸潤した白血球の数を調べたところ、ベツリンの投与により約3倍に増加することが分かった。さらに詳細な解析から、この増加した白血球は、主にNK細胞、T細胞、マクロファージ、及び、好中球であることを明らかにした。これらのことから、ベツリンの抗腫瘍効果には腫瘍内に集積したこれら免疫細胞も関与していることが示唆された。

Summary

We have previously reported that betulin, a plant constituent, restored the reduced cytotoxicity of splenocytes caused by TGF- β or PGE₂. Betulin has been reported to exhibit an antitumor effect, their mechanism of action is believed to be an inhibitory effect on cancer cell proliferation. In this study, we examined whether the restorative activity of betulin is involved in its anti-tumor effect in a tumor-burden mice model. It was confirmed that betulin exhibited the antitumor effect in a mouse model subcutaneously inoculated with B16F10 melanoma. To reveal the effects of betulin on the anti-tumor immune system, the number of leukocytes accumulated in tumor tissues was examined, and found to increase to approximately 3-fold by administering of betulin. The more detailed analysis clarified that this increased leukocytes were mainly NK cells, T cells, macrophages, and neutrophils. From these observations, the antitumor effect of betulin is suggested to include the killing activity to tumor cells of these immune cells accumulated into tumor tissues.

キーワード: ベツリン; 悪性黒色腫; TGF- β ; PGE₂; 免疫抑制

Key words: Betulin; melanoma; TGF- β ; PGE₂; immunosuppression

がんの三大療法に次ぐ新しい治療法として、がん免疫療法が積極的に臨床応用されている。しかし、多くの場合当初期待されたほどの高い治療効果が得られていない¹⁾。近年、その主な原因の一つは、がん細胞由来の免疫抑制因子 (TGF- β , PGE₂ 等) による免疫機能の低下であることがわかってきた。そのため、がん免疫療法の効果を増強するには、免疫抑制因子の作用を阻止する薬剤が必要と考えられている²⁾。本研究ではこれまで、先行している研究開発との差別化、より有効性の高い薬剤の開発を目指し、TGF- β に加えてPGE₂の抑制作用も解除できる化合物を約800種の天然物等からスクリーニングし植物成分のベツリンに有効性を見出した³⁾。

ベツリンは主に白樺の樹皮に含まれる成分であり、これ

まで抗ウイルス活性や抗炎症作用、最近では生活習慣病に対する有効性など様々な生物活性について報告がなされている⁴⁾。とりわけ、がん細胞の増殖能に対する阻害作用について多数の報告がなされており、増殖阻害活性に基づく抗がん剤としての開発が期待されている^{5, 6, 7, 8, 9)}。また、最近では、ベツリンを γ -シクロデキストリン誘導体と複合化してマウスに投与することで、がん皮下移植マウスモデルにおいて有意な抗腫瘍効果が得られることも報告されている¹⁰⁾。しかし、ベツリンの免疫抑制解除作用が、がん移植マウスモデルにおいて認められるベツリンの抗腫瘍効果にどの程度寄与しているのかについては明らかにされていない。

本研究では、TGF- β あるいはPGE₂による免疫抑制を

伴うことが報告されているマウス悪性黒色腫（B16F10細胞）の皮下移植モデルを用いて^{11, 12)}、ベツリンの抗腫瘍効果及びその作用機序を免疫系に着目して検討した。

実験方法

1. 実験試薬

ベツリンはExtrasyntheseより購入し、試験管内の実験ではジメチルスルホキシドに溶解して実験に供し、マウスに投与する場合は0.1% Tween 80を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に懸濁して実験に供した。LY2157299（TGF- β 受容体タイプ I 阻害剤）あるいはNS-398（COX-2阻害剤）は、それぞれSellecchem, 和光純薬から購入し、0.1% Tween 80を含むPBSに懸濁して実験に供した。

2. 細胞及び細胞培養

マウスB16F10悪性黒色腫細胞は、涌沢伸哉先生（北陸大学）より恵与された。細胞は、10%の非働化ウシ胎児血清、100 U/mlのペニシリン、0.1 mg/mlのストレプトマイシン及び55 μ Mの2-メルカプトエタノールを含むRPMI-1640培地中にて継代、維持した。

3. がん移植マウスモデルを用いた評価

マウス悪性黒色腫細胞（B16F10）を 2×10^5 個/0.05 ml PBSに調製し、C57BL/6マウス（8週令、雌、8-10匹/群）にマウス当たり0.05 mlずつ下腹部皮下に接種した。化合物はがん接種後2日目から16日目まで1日1回、腫瘍内に投与した。対照群には溶媒（0.1% Tween 80を含むPBS）を同様に投与した（50 μ l/マウス）。腫瘍径は2日

あるいは3日ごとに測定し、見かけの腫瘍体積は、長径 \times 短径 \times 短径/2で算出した。

4. 細胞毒性の評価

10%FBSを含むDMEM培地（GIBCO）でB16F10細胞を 4×10^4 個/mlに調製し、96ウェルプレート（Corning）に各ウェル当たり 4×10^3 個を播種した。細胞がプレートに接着後、化合物を各濃度で添加し、インキュベーター内（37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂）で48時間培養した。コントロールにはジメチルスルホキシドを同様に添加した。培養終了後、各ウェルの培地を、WST-1（Wako）を5%含む10%FBS - DMEM培地に交換し、さらに4時間培養した後、波長450 nmにおける吸光度を測定した。

5. がん組織に集積した免疫細胞の解析

マウス悪性黒色腫細胞（B16F10）を 2×10^5 個/0.05 ml PBSに調製し、C57BL/6マウス（8週令、雌、3~6匹/群）にマウス当たり0.05 mlずつ下腹部皮下に接種した。がん接種後2日目から9日目まで1日1回、ベツリンをマウス当たり150 nmolの用量で腫瘍内に投与した。対照群には溶媒（0.1% Tween 80を含むPBS）を同様に投与した。がん組織は、がん接種後3日目、実験によっては6日目、あるいは、10日目に採取した。採取したがん組織を1 mg/mlコラゲナーゼA（ロシュ）及び200 U/ml DNase I（Sigma）で処置（37 $^{\circ}$ C, 30分間）し、ハサミで細切後、ナイロンフィルター（70 μ mポアサイズ）（Falcon）を通してデブリスを除去した。遠心（1500 rpm, 10 min）後、上清を除去し、得られた細胞を 10^5 個/mlとなるように調製した。細胞を抗CD16/32抗体（2A2G2）で処置（1.5 μ g/ml, 4 $^{\circ}$ C, 15 min）しFc受容体をブロックした後、各

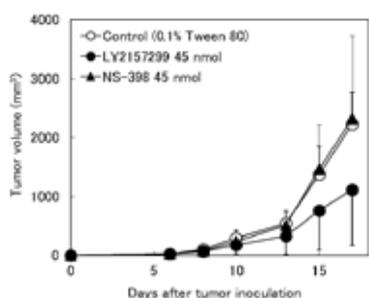


Fig. 1 Effects of LY2157299 or NS-398 on the growth of B16 melanoma in mice.

Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. LY2157299 or NS-398 was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. Tumor volume was evaluated two or three times a week. The data are expressed as mean \pm S.D. of 8 mice.

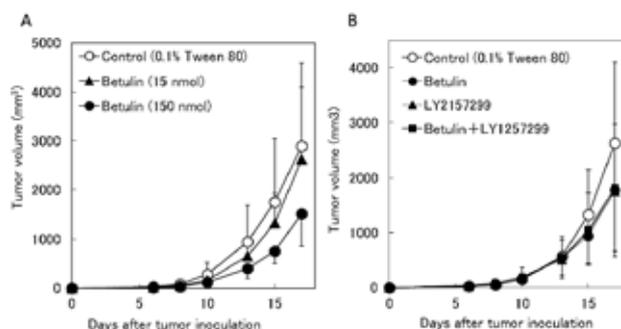


Fig. 2 Effects of betulin alone or the combination of betulin and LY2157299 on the growth of B16 melanoma in mice.

Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. (A, B)betulin, LY2157299, or their mixture was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. Tumor volume was evaluated two or three times a week. The data are expressed as mean \pm S.D. of 8-10 mice.

種の蛍光色素で標識された抗CD19抗体 (1D3), 抗CD3e抗体 (145-2C11), 抗NK1.1抗体 (PK136), 抗CD11b抗体 (M1/70), 抗Gr-1抗体 (RB6-8C5), 抗CD11c抗体 (HL3), 抗CD45抗体 (30-F11), 抗siglec-F抗体 (E50-2440) で処置 (0.25-1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 0.5時間) した. 細胞を洗浄後, 7AADを添加してフローサイトメーター (FACSCanto II, 日本BD) により測定した.

結 果

がん皮下移植マウスモデルにおけるベツリンの抗腫瘍効果

ベツリンの抗腫瘍効果を評価するに当たり, まず, 用いるがん移植モデル系にTGF- β あるいはPGE₂が関与することを確認するため, LY2157299 (TGF- β 受容体タイプ I 阻害剤) あるいはNS-398 (COX-2阻害剤) の影響を検討した (Fig. 1). その結果, LY2157299の投与によりがん移植17日目において約50%の抑制効果が認められた. このことから, 本研究で用いるがん移植モデル系にはTGF- β が腫瘍増殖に対して促進的に関与していることが確認された. 一方, NS-398は腫瘍増殖に影響を与えなかったことから, PGE₂の関与は少ないと考えられた.

当該皮下移植モデルを用いて, ベツリンの抗腫瘍効果を検討した (Fig. 2A). 腫瘍移植後2日目より16日目まで連日腫瘍内に投与したところ, 投与量に依存した抑制効果が認められ, 150 nmolの投与量では, がん移植17日目において約45%の抑制効果が認められた. また, ベツリンの抗腫瘍効果にTGF- β の作用に対する抑制効果が寄与しているかを推察するため, LY2157299とベツリンの併用効果について検討した (Fig. 2B). その結果, ベツリン, LY2157299ともに, いずれも単独では抑制作用を示した

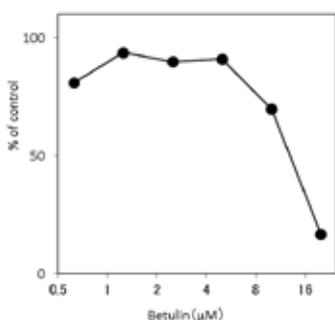


Fig. 3 Effects of betulin on the in vitro proliferation of B16 melanoma cells.

Tumor cells were cultured in 10% FBS-medium containing various concentrations of betulin for 48 h. After that, WST-1 solution was added into each well, and cells were incubated for an additional 4 h. Absorbance of each well was measured at 450 nm. Data are expressed as mean \pm S.D. of triplicate wells.

が, 両者を併用しても抑制効果は全く増強されなかった. このことから, ベツリンの抗腫瘍効果にはTGF- β の抑制作用に対する解除効果が関与している可能性が示唆された.

がん細胞の増殖能に対するベツリンの抑制作用

Fig. 2Bの結果から, ベツリンの抗腫瘍効果にTGF- β の抑制作用に対する解除効果の関与が示唆されたが, その一方で, ベツリンは様々ながん細胞に対して細胞増殖阻害作用を示すことが報告されている. このことから, Fig. 2Aで認められたベツリンの抗腫瘍効果に, がん細胞増殖に対する阻害作用が寄与している可能性もある. そこで, 試験管内でのB16F10細胞の増殖能に与えるベツリンの影響を検討した. その結果, ベツリンは濃度に依存した阻害作用を示し, 50%阻害濃度は13.0 μM であった. このことから, ベツリンの抗腫瘍効果には, TGF- β の抑制作用に対する解除効果に加えて, これまでに報告されているように, がん細胞の増殖能に対する阻害作用も寄与していると考えられた.

ベツリンの投与部位への白血球の集積

TGF- β は腫瘍局所において抗腫瘍免疫応答を負に制御していることが報告されている²⁾. したがって, Fig. 2Bの結果から推察されたように, ベツリンの抗腫瘍効果にTGF- β の抑制作用に対する解除効果が寄与しているならば, 腫瘍局所での免疫応答にベツリンが何らかの影響を与えている可能性がある. そこで, 腫瘍局所での白血球

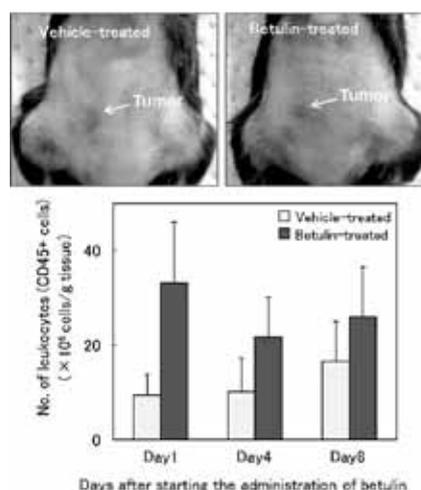


Fig. 4 Accumulation of leukocytes to the site of administration of betulin in mice.

Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice. Betulin was intratumorally administered for 1 to 8 consecutive days starting 2 days after tumor inoculation. On day 1, 4, or 8 of post of the initial injection of betulin, leukocytes accumulated in tumor sites were analyzed as CD45 positive cells in a flow cytometer. The data are expressed as mean \pm S.D. of 3-9 mice.

数に及ぼすベツリンの影響を検討した (Fig. 4). ベツリンを腫瘍内に投与したところ, 肉眼的には明らかな影響は認められなかったが, 腫瘍局所での白血球数はベツリンの投与により増加することが分かった. とりわけ, ベツリンの投与の翌日 (day 1) において, 腫瘍内に浸潤した白血球の数は対照群に比較して約3倍に増加した. そこで, この増加した白血球が何であるのかを明らかにするため, フローサイトメトリーを用いて各種免疫細胞について解析した (Figs. 5及び6). Fig. 5に示すように, NK細胞について解析したところ, ベツリンの投与により腫瘍内に浸潤した全白血球の数に占める割合及び絶対数が増加するとともに, CD69陽性の活性化NK細胞の数も増加した. また, ベツリンの投与の翌日 (day 1) において, 腫瘍内に浸潤したT細胞あるいはマクロファージの数は対照群に比較して約2倍に増加し, 好中球数は約3倍に増加することが分かった (Fig. 6). 一方, 好酸球の数には明らかな影響は認められなかった. これらのことから, ベツリンの抗腫瘍効果には, これら腫瘍内に集積したNK細胞, T細胞, マクロファージ, 好中球も関与していることが示唆された.

考 察

我々はこれまでに, 脾臓細胞のNK活性を指標としてTGF- β あるいはPGE₂の抑制作用を解除する天然化合物

を探索し, 白樺樹皮成分のベツリンに有効性を見出している³⁾. 本研究では, ベツリンの免疫抑制解除作用が担がんマウスモデルにおいて認められるベツリンの抗腫瘍効果に関与しているのかについて検討した. 研究を遂行するに当たり, 担がんマウスモデルとしてどのモデルを用いるかが重要であったが, ベツリンの抗腫瘍効果がメラノーマの皮下移植モデルにおいて報告されていること¹⁰⁾, ベツリンがB16F10細胞を皮下移植したマウスモデルにおいて免疫賦活剤と抗癌剤との併用効果を増強すること¹³⁾, 及び, 同細胞の皮下移植モデルにTGF- β あるいはPGE₂の関与が報告されていることから^{11, 12)}, 本研究ではB16F10細胞の皮下移植モデルを用いることとした. まず, 当該細胞の皮下移植モデルにおけるTGF- β あるいはPGE₂の関与を確認するため, TGF- β 受容体タイプI阻害剤あるいはCOX-2阻害剤の影響を検討した. その結果, TGF- β 受容体タイプI阻害剤では有意な抑制効果が認められた. また, 試験管内でのB16F10細胞の増殖はTGF- β 受容体タイプI阻害剤 (SB431542) では阻害されなかったことから (データ省略), B16F10細胞を移植した局所ではTGF- β が免疫抑制的に関与していると考えられた. そこで, このモデルを用いて, ベツリンを腫瘍局所に投与した際の抗腫瘍効果について検討したところ, 腫瘍増殖は有意に抑制されることが分かった. さらに, ベツリンとTGF- β 受容体タイプI阻害剤の併用効果を検討したところ, 併用による抗腫瘍効果の増強は全く認められなかった. もし

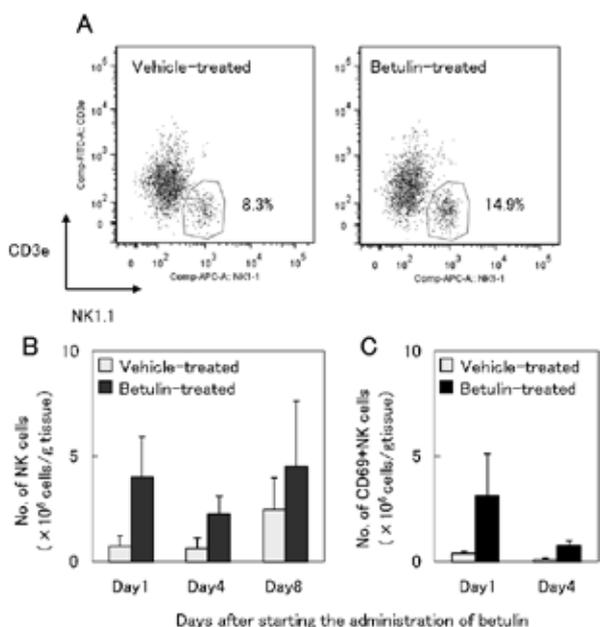


Fig. 5 Increase of NK cells in the accumulated leukocytes to the site of administration of betulin in mice.

Population of NK cells in the leukocytes accumulated in tumor sites as shown in fig. 4 were evaluated in their ratio to total leukocyte (A), the absolute cell number (B), and the absolute number of CD69+ NK cells (C) by flow cytometry. Data are expressed as mean \pm S.D. of 3-9 mice.

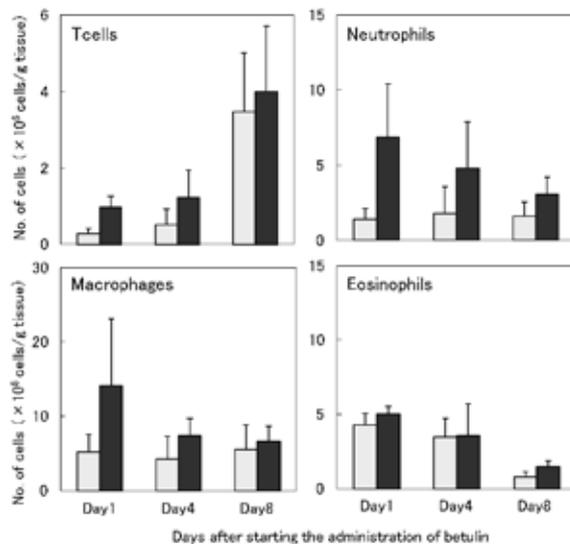


Fig. 6 Comparison of the cell number of each immune cell accumulated to the site of administration of betulin in mice.

The absolute cell number of each immune cell in the leukocytes accumulated in tumor sites as shown in fig. 4 were evaluated by flow cytometry. Data are expressed as mean \pm S.D. of 3-9 mice.

文 献

ベツリンの作用機序が同阻害剤と異なれば、両者の併用により抗腫瘍効果は各々単独よりも強くなると予想されたが、併用しても増強効果は認められなかったことから、ベツリンの作用にはマウス個体レベルにおいてもTGF- β の抑制作用に対する解除効果が寄与している可能性が考えられた。このことを別の視点から検証するため、ベツリンを腫瘍内に投与した際の投与部位における免疫細胞の動態について検討した。ベツリンはNK活性を指標とした評価系から見出された化合物であることから、まず、NK細胞について解析を進めた。その結果、ベツリン投与群では腫瘍内におけるNK細胞の割合及び絶対数が増加し、さらに、CD69陽性の活性化NK細胞の数も明らかに増加することが分かった。TGF- β がNK細胞の活性化や遊走を制御することを考えると^{14, 15)}、ベツリンの投与により活性化NK細胞が増加したことは、ベツリンがTGF- β の抑制作用を解除していることを示唆する。また、ベツリンの投与によりT細胞の集積も亢進した。TGF- β はT細胞の遊走に関与するケモカインの産生を阻害することから¹⁶⁾、このことから、ベツリンの免疫抑制解除作用の寄与が示唆される。既報のとおり¹⁷⁾、TGF- β により抑制されたNK活性を指標とした試験管内での解析では、ベツリンの作用にはNK細胞に加えて、樹状細胞、T細胞、及びB細胞が重要であることが分かっているが、その作用機序の詳細は不明である。しかし、本研究で示したように、ベツリンの投与部位にNK細胞やT細胞などが集積することを考えると、その部位ではCCL4やCCL5などのケモカインの産生が誘導されていると予想される。特にCCL5はTGF- β により産生が抑制されることから¹⁶⁾、その関与が推察される。一方、免疫系に及ぼすベツリンの影響として、最近、ベツリンが、①骨髄由来樹状細胞からのトル様受容体4刺激によるIL-12産生を増強すること、また、②OT-1マウス由来の脾臓細胞をトル様受容体4刺激下でOVA抗原を加えた際に誘導されるIL-2及びIFN- γ の産生を増強することが報告された¹⁸⁾。IL-12はNK細胞を強力に活性化すること、また、IL-2及びIFN- γ は抗原抗体反応により活性化したCD8陽性T細胞から分泌されることを考えると、ベツリンの抗腫瘍効果にこれらサイトカインの産生増強作用が関与している可能性も考えられる。今後、これらのケモカインやサイトカインの産生についても解析を進め、ベツリンの抗腫瘍メカニズムの詳細を明らかにしていく予定である。

謝 辞

本研究はJSPS科研費24590109の助成を受けて実施された。

- 1) Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P.: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.*, **10** (9), 909-915 (2004)
- 2) Teicher B.A.: Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin. Cancer Res.*, **13** (21), 6247-6251 (2007)
- 3) 小笠原勝, 山崎思乃, 宮本朋美, 長井良憲, 松永孝之: がん細胞による免疫抑制を克服する天然物の探索 (2), 富山県薬事研究所年報, **39**, 21-25 (2012)
- 4) Tang J.J., Li J.G., Qi W., Qiu W.W., Li P.S., Li B.L., Song B.L.: Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab.*, **13** (1), 44-56 (2011)
- 5) Jonnalagadda S.C., Corsello M.A., Sleet C.E.: Betulin-betulinic acid natural product based analogs as anticancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **13** (10), 1477-1499 (2013)
- 6) 国際公開第02-009719号
- 7) 特開2005-330261号公報
- 8) 特開平1-14832号公報
- 9) Xu W., Zhu C., Cheng W., Fan X., Chen X., Yang S., Guo Y., Ye F., Shi J.: Chemical Constituents of the Roots of *Euphorbia micractina*. *J. Nat. Prod.*, **72** (9), 1620-1626 (2009)
- 10) Soica C., Dehelean C., Danciu C., Wang H.M., Wenz G., Ambrus R., Bojin F., Anghel M.: Betulin complex in γ -cyclodextrin derivatives: properties and antineoplastic activities in in vitro and in vivo tumor models. *Int. J. Mol. Sci.*, **13** (11), 14992-15011 (2012)
- 11) Penafuerte C., Galipeau J.: TGF beta secreted by B16 melanoma antagonizes cancer gene immunotherapy bystander effect. *Cancer Immunol. Immunother.*, **57** (8), 1197-1206 (2008)
- 12) Parhar R.S., Lala P.K.: Amelioration of B16F10 melanoma lung metastasis in mice by a combination therapy with indomethacin and interleukin 2. *J. Exp. Med.*, **165** (1), 14-28 (1987)
- 13) 小笠原勝, 宮本 (山口) 朋美, 松永孝之, 長井良憲, 高津聖志: がん移植マウスモデルにおけるベツリンの抗腫瘍効果に関する検討, 富山県薬事研究所年報, **41**, 17-20 (2014)
- 14) Yang L., Pang Y., Moses H.L.: TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends*

Immunol, **31** (6) , 220-227 (2010)

- 15) Castriconi R., Dondero A., Bellora F., Moretta L., Castellano A., Locatelli F., Corrias M.V., Moretta A., Bottino C.: Neuroblastoma-derived TGF- β 1 modulates the chemokine receptor repertoire of human resting NK cells. J. Immunol., **190** (10) , 5321-5328 (2013)
- 16) Hu S., Chao C.C., Ehrlich L.C., Sheng W.S., Sutton R.L., Rockswold G.L., Peterson P.K. Inhibition of microglial cell RANTES production by IL-10 and TGF-beta. J. Leukoc. Biol., **65** (6) , 815-21 (1999)
- 17) 小笠原勝, 山崎 (屋敷) 思乃, 宮本 (山口) 朋美, 生谷尚士, 長井良憲, 松永孝之: がん細胞による免疫抑制を克服する天然物の探索 (3), 富山県薬事研究所年報, **40**, 22-26 (2013)
- 18) Pfarr K., Danciu C., Arlt O., Neske C., Dehelean C., Pfeilschifter J.M., Radeke H.H.: Simultaneous and dose dependent melanoma cytotoxic and immune stimulatory activity of betulin. PLoS One., **10** (3) , e0118802 (2015)