



2021年6月3日
ティーエフケイ株式会社
北海道大学

有用菌 RAP99 由来の LPS（リポポリサッカライド）が 病態モデルにて抗がん・抗ウイルス作用を持つことを示唆

—有効性成分は細胞壁成分の RAP99-LPS—

ポイント

- ・ RAP99-LPS は免疫細胞を活性化する。
- ・ RAP99-LPS は大腸菌-LPS による敗血症を抑制する。
- ・ RAP99-LPS は肺がんモデルの転移を抑制する。
- ・ RAP99-LPS はサイトカインストームモデルの過剰反応を抑制する。

研究成果の概要

北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野（村上正晃教授）の田中勇希助教の研究グループは、ティーエフケイ株式会社（兵庫県神戸市兵庫区 代表取締役会長 戸田順博）の保有する有用菌 *Rhodobacter azotoformans* BP0899 株（略称 RAP99 菌）に関して以下の研究成果を得ました。RAP99 は、光合成を行う細菌ですが、これまで細菌依存性の敗血症を抑制する可能性が示唆されており、その作用は、細胞壁外膜構成成分である RAP99-LPS（リポポリサッカライド）が TLR4*¹ 受容体を刺激することで生じると考えられていました。一方、過剰な反応を起こさないことも示唆されていました。今回、RAP99-LPS が、（1）自然免疫*² 系及び獲得免疫*³ 系の免疫細胞を活性化、（2）大腸菌-LPS による敗血症を抑制、（3）肺がんモデルの転移を抑制、（4）模擬ウイルスを用いたモデル実験におけるサイトカインストーム様の炎症性サイトカイン発現を抑制、などの研究成果を得ました。これらの成果は、有用菌 RAP99 が生体内にて同様の作用を有する可能性を示唆するものです。

なお、今回の研究成果は 2021 年 5 月 25 日（火）公開の「Frontiers in Immunology」にオンライン掲載されました。

<RAP99 菌とは>RAP99 菌は、光合成を行なう細菌ロドバクター属の一種です。細胞内に紅色（カロテノイド）の色素を持ち、良質なタンパク質を含有しているのが特徴です。RAP99 菌は、90 日間の反復毒性試験や遺伝毒性によって無毒であることがティーエフケイ株式会社にて確認されています。また、菌体抽出物は、健康食品として 20 年ほどにわたり延べ 1 万人以上の喫食実績があります。さらに、今回の研究で用いた RAP99 菌体から抽出・精製した LPS (RAP99-LPS) は、2020 年 2 月に国内にて物質特許を取得済みです。

<研究の背景と目的>

免疫機能は健康を維持向上する上で必要不可欠な生体の働きです。それは、病原性を持つ細菌やウイルスなどの感染防御のみならず、加齢による免疫機能の変化が様々な疾病の原因になる可能性があるからです。免疫機能を適度に活性化することが、疾病予防に重要な役割を果たす可能性も示唆されてきました。

さらに、新型コロナウイルスの流行に伴い、侵入してきた病原体に対して第一線で防御にあたる自然免疫システムと侵入した病原体に特異的に反応する獲得免疫システムへの関心がこれまでになく

高まっています。今回、有用細菌である RAP99 菌の主成分である RAP99-LPS を用いてこれら 2 つの免疫システムへの作用をマウスでの病態モデルの解析を含め検討しました。

<研究方法と結果>

本研究では、RAP99-LPS による免疫増強作用を確認するために、RAP99-LPS のマウスへの投与後の、①脾臓での免疫細胞数の変化を確認しました。脾臓は、免疫反応が主に生じる器官です。その結果、マウスの脾細胞の増加が認められました。樹状細胞^{*4}やマクロファージ^{*5}、NK 細胞^{*6} など自然免疫系の免疫細胞のみならず、活性化ヘルパーT 細胞^{*7}や活性化キラーT 細胞^{*8}などの獲得免疫系の数も増加していました。また、過去に研究例のある類似細菌由来の LPS と同様に大腸菌-LPS による敗血症を抑制しました。次に、②マウスモデルにてがん細胞の転移抑制作用について解析しました。マウスの黒色腫細胞 (B16-F1^{*9}) を用いて、血中から肺に転移したがん細胞数を計測したところ、RAP99-LPS 投与マウスでは転移の抑制が認められました。最後に、③模擬ウイルス物質を用いたマウスでの実験を行いました。RNA ウイルスを模倣する合成 2 本鎖 RNA (poly(I:C)^{*10}) を RAP99-LPS を事前投与したマウスに接種し、血清中の炎症性サイトカイン^{*11}の産生量を調べ、さらに脾臓中での炎症誘導機構 (IL-6 アンブ)^{*12}の活性化を解析しました。その結果、マウスに RAP99-LPS を投与することで、免疫細胞の遊走を促進する poly(I:C) 依存性のケモカイン発現が維持されたまま、免疫反応の暴走の原因である炎症性サイトカイン発現と脾臓での IL-6 アンブ活性化が抑制されました。①～③の実験の概要と結果は以下に示します。

① RAP99-LPS による免疫細胞活性化 (図 1)
RAP99-LPS は大腸菌-LPS に比較して強く全ての免疫細胞を増やした。樹状細胞や NK 細胞などの自然免疫系の免疫細胞と活性化ヘルパーT 細胞やキラーT 細胞などの獲得免疫系の免疫細胞も増加した。

RAP99-LPS を 8 日間注射

自然免疫系の免疫細胞の増加
樹状細胞 マクロファージ NK 細胞

獲得免疫系の免疫細胞の増加
活性化ヘルパーT 細胞 活性化キラーT 細胞

②マウス黒色腫細胞の肺転移抑制作用 (図 2)
血中のマウス黒色腫細胞 (B16-F1) の肺転移 (B) と体重減少 (A) を抑制した。

RAP99-LPS B16-F1 細胞を接種後に RAP99-LPS を 14 日間接種

15 日目に肺に転移したがん細胞のコロニー数を計測

③模擬ウイルス物質による免疫反応を抑制 (図 3)
RAP99-LPS の接種によって Poly(I:C) 依存性の炎症性 (B) と脾臓 IL-6 アンブ活性化 (C) が抑制される結果が得られた。

RAP99-LPS RAP99-LPS を毎日 5 回 5 日間接種

6 日目に模擬ウイルス (poly(I:C)) を感染

RAP99-LPS 投与にて Poly(I:C) 依存性免疫細胞遊走因子発現は維持され (A)、炎症サイトカイン発現 (B) と脾臓中の IL-6 アンブの活性化 (C) が抑制された。

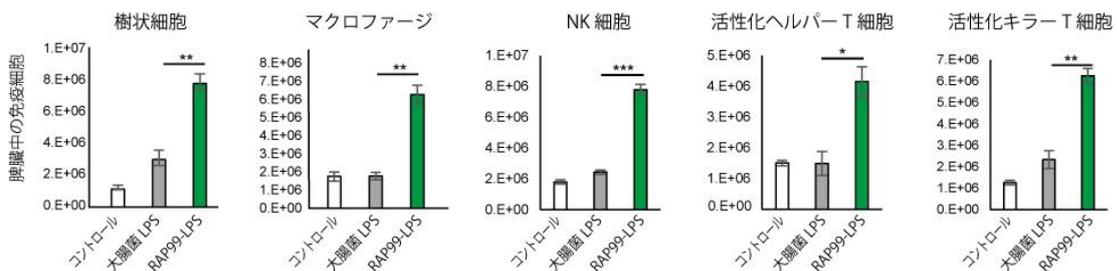


図 1 マウスの脾臓の免疫細胞の活性化

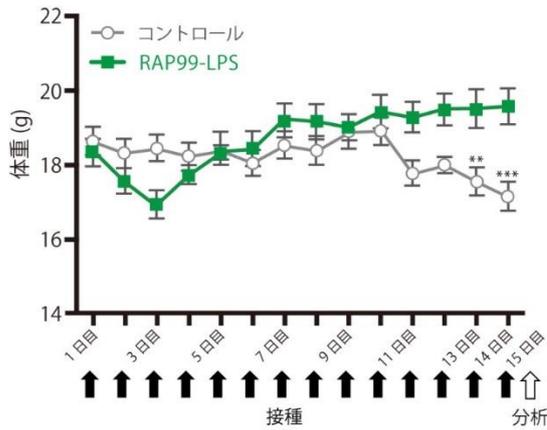
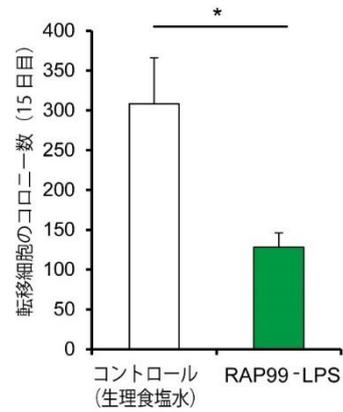


図 2 (A) B16-F1 細胞を接種したマウスの体重変動



(B) 転移細胞のコロニー数

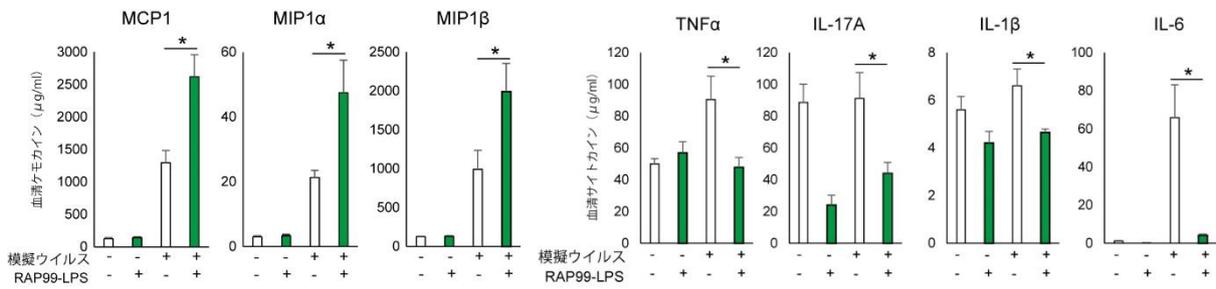


図 3 (A) マウス血清中のケモカイン

(B) マウス血清中の炎症性サイトカイン

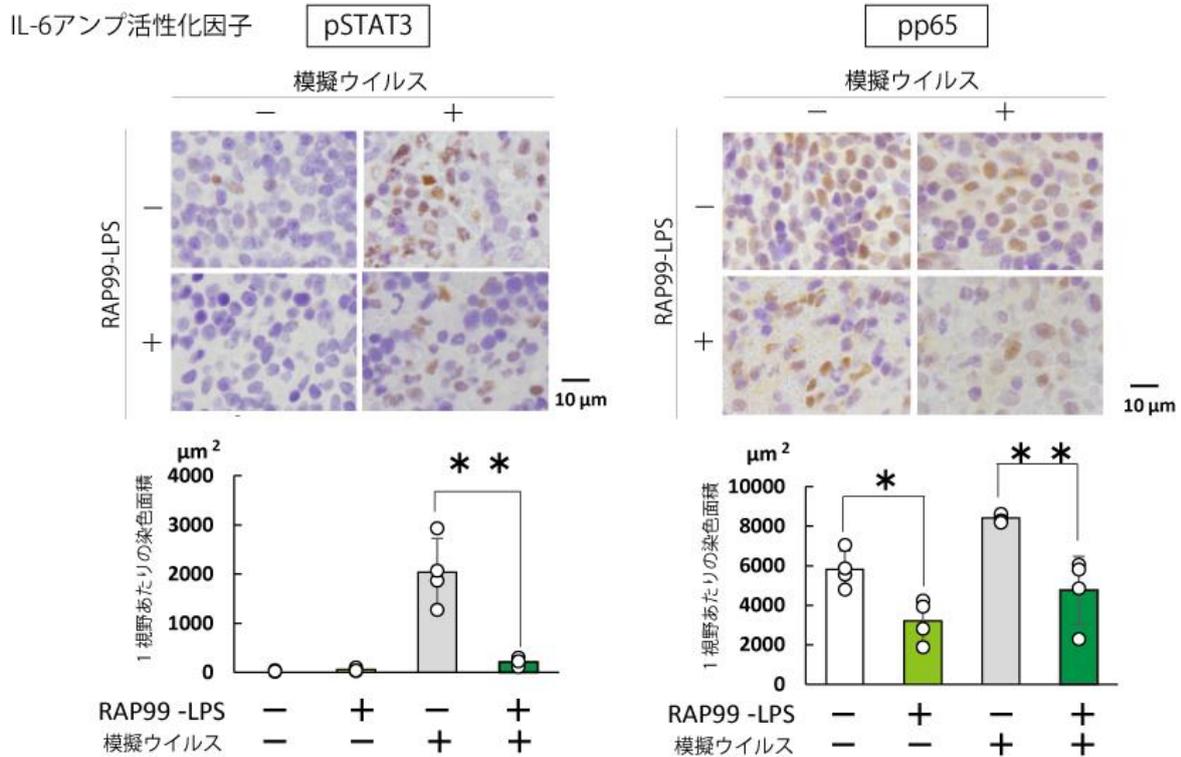


図 3 (C) マウス脾細胞中の IL-6 アンブ活性化因子の発現

＜今後への展開＞

今回の研究成果により、マウス肺がんモデルでは、血中から肺への癌細胞の転移抑制作用及びウイルス感染を模倣した実験では、ウイルス感染後の有害な免疫反応の暴走を抑制する可能性が示されました。これは、RAP99-LPS のサイトカインストームなどを引き起こさない副作用の少ない穏やかな免疫増強作用によるものと考えられます。昨今の新型コロナウイルス（SARS-CoV2）感染症では自然免疫のトレーニング（訓練免疫^{*13}）という概念が提唱され注目を集めています。RAP99-LPS は非常に効率よく訓練免疫を増強できる可能性も考えられます。今後、ティーエフケイ株式会社は、北海道大学との更なる共同研究によって、RAP99 菌に含まれる RAP99-LPS の訓練免疫を介した感染症に対する作用として、BSL-3 施設^{*14}での実際のウイルスを用いた抗ウイルス試験を検討したいと考えています。また、がんモデルでの抗転移作用についても、肺以外の臓器への転移、例えばリンパ節や脳転移に関する研究の実施について検討しています。これらの成果が得られればさらに有用菌 RAP99 を用いた健康増進が図られるものと思います。

論文発表の概要

研究論文名 : *Rhodobacter azotoformans* LPS (RAP99-LPS) is a TLR4 agonist that inhibits lung metastasis and enhances TLR3-mediated chemokine expression

著者 : 村上薫¹, 上村大輔¹, 長谷部理絵¹, 内田萌菜¹, 阿部靖矢¹, 山本励志¹, 蔣菁菁^{1,2}, 日高康博³, 中西悠子³, 藤田修三³, 戸田有紀³, 戸田順博³, 田中宏樹⁴, 審良静男⁴, 田中勇希¹, 村上正晃¹

(¹北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院医学研究院・分子神経免疫学教室, ²Institute of Preventive Genomic Medicine, School of Life Sciences, Northwest University, China, ³ティーエフケイ株式会社, ⁴大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

公表雑誌 : Frontiers in Immunology

DOI : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.675909/full>

公表日 : 2021年5月25日(火)

お問い合わせ先

北海道大学遺伝子病制御研究所/大学院医学研究院 分子神経免疫学教室 田中勇希 (たなかゆうき)

TEL : 011-706-5120 FAX : 011-706-7542 E-mail : tanaka@igm.hokudai.ac.jp

URL : <http://www.igm.hokudai.ac.jp/neuroimmune/index.html>

ティーエフケイ株式会社 広報担当 秋山朋子

TEL : 078-652-0203 FAX : 078-652-8532 E-mail : press@tfk-corp.co.jp

URL : <https://rap99.net/>

【用語解説】

- *1 TLR (Toll Like Receptor, トル様受容体) : 主に自然免疫系の細胞が異物を認識する時に使用する受容体の主なものには、TLR 受容体がある。細菌やウイルスなどの異物を感知するセンサーである。ヒトでは現在 10 種類 (TLR1~TLR10) が確認されている。TLR4 は LPS の、TLR3 はウイルス RNA の受容体である。
- *2 自然免疫 : ウイルス、細菌などの異物が、身体に侵入した時に、哺乳類とは異なる形の物質のパターンを認識して反応する免疫細胞 (マクロファージ、樹状細胞、NK 細胞など) が関与する免疫反応。獲得免疫の活性化に必須で獲得免疫よりも先行して反応する。
- *3 獲得免疫 : 主に B 細胞や T 細胞などリンパ球による免疫反応のこと。B 細胞や T 細胞は遺伝子再構

成される受容体、それぞれ B 細胞受容体、T 細胞受容体にて異物タンパクを認識して抗原特異的に反応する。特に正常な免疫反応が誘導されるためにはヘルパーT 細胞 (CD4+T 細胞) の活性化が必要である。B 細胞受容体は、異物の細胞表面の分子構造を認識し、T 細胞受容体は、MHC 分子上の抗原ペプチドを認識して反応、活性化する。また、獲得免疫系の細胞は、体内のサイトカインなどに反応して増殖する場合がある。活性化した B 細胞や T 細胞は、異物が除去された後では記憶細胞として体内に長期間存在する場合がある。麻疹に再感染しないのはこの免疫記憶が形成されるため。

- * 4 樹状細胞：樹の枝のような突起を多数もつ免疫細胞であり、自然免疫系に属する。体内に侵入した異物を認識、貪食してペプチドを分解して MHC 分子上に提示して当該ペプチドを認識する T 細胞を活性化する。活性化によって大量のサイトカインを放出する。体の全ての部位に存在し、異物を貪食してリンパ節、脾臓などに移動して T 細胞に抗原を提示する。
- * 5 マクロファージ：マクロファージは自然免疫系に属する。体内に侵入した異物を貪食し、消化・排出し、感染拡大を防ぐ。
- * 6 NK 細胞：ナチュラルキラー細胞はリンパ球様の形態をした自然免疫系の細胞。ウイルス感染、がん化によって細胞表面の MHC 分子が減少する場合があるが、それを感知して当該細胞にアポトーシスを引き起こして排除する。
- * 7 活性化ヘルパーT 細胞：近代免疫学では、免疫細胞の中の指揮者に例えられる重要な T 細胞。特異的なマーカーは CD4 分子である。樹状細胞の MHC クラス II 分子にて抗原提示を受け活性化するがその時、大量のサイトカインなどの可溶性分子を放出して周囲の免疫細胞の反応性を制御する。抗原提示時に周囲に存在するサイトカインにて自身が産生するサイトカインが決まる。それぞれ IFN γ 、IL-4、IL-17 を産生する Th1、Th2、Th17 細胞などがある。
- * 8 活性化キラーT 細胞：ウイルス感染細胞、がん化細胞に直接アポトーシスなどの細胞死を誘導する T 細胞。特異的なマーカーは CD8 分子である。樹状細胞の MHC クラス I 分子にて抗原提示を受け活性化する。体内でのウイルス感染細胞、がん化細胞を含む異物の存在を監視する細胞で正常な活性化に活性化ヘルパーT 細胞を必要とする。
- * 9 B16-F1 細胞：マウスの黒色種細胞を細胞株化した細胞でマウスに投与してがん細胞の増殖、がん細胞の転移の実験に用いられる。
- * 10 poly(I:C)：ポリイノシン酸：ポリシチジル酸の略であり、新型コロナウイルスなどの RNA ウイルス感染を模倣する。二本鎖 RNA の合成類似体であり、TLR3 分子にて認識される。
- * 11 炎症性サイトカイン：サイトカインは、もともと免疫細胞間の情報伝達を行い、免疫細胞の活性化状態を変化させる可溶性の分子として定義された。炎症性サイトカインは、それらの中で免疫細胞を活性化させるもので IL-6 をはじめ、IL-1 β 、IL-8、TNF α などがある。
- * 12 IL-6 アンプ：血管内皮細胞、線維芽細胞など非免疫細胞が活性化された免疫細胞が産生するサイトカインを受け取ると転写因子である STAT3 と NF κ B などの活性化が生じる。IL-6 アンプは 2008 年に発見されたコンセプトで非免疫細胞にて STAT3 と NF κ B が同時に活性化された場合に非常に強い NF κ B が生じて NF κ B の標的分子である IL-6、ケモカイン (遊走因子)、増殖因子などが局所産生され炎症が拡大する分子機構。炎症時の STAT3 活性化因子が IL-6 が主体であるためにこの名がある。
- * 13 訓練免疫：樹状細胞、マクロファージを含む自然免疫系の細胞が、ワクチンなどの投与にて活性化して獲得免疫系の免疫記憶と同様に長期にわたりその活性化を維持して、他の病原体の感染も含めて体を守る働きのこと。
- * 14 BSL-3 施設：病原性の高い細菌やウイルスなどを取り扱う高度に封じ込められた実験室のこと。新型コロナウイルスは BSL-3 実験室にて使用が可能となる。