

ペプチドグリカン様成分 Z-100 のメラノーマの  
リンパ行性転移抑制効果

2023 年度

堀井 孝幸

# 目次

[序論]	1
第1章 Z-100 のリンパ行性転移抑制効果	7
1.1 緒言	7
1.2 実験方法	9
1.2.1 使用細胞株および動物	9
1.2.2 Z-100	9
1.2.3 腫瘍モデル	9
1.2.4 細胞生存率アッセイ	9
1.2.5 フローサイトメトリー	10
1.2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	10
1.2.7 放射線照射	10
1.2.8 統計解析	10
1.3 結果	12
1.3.1 免疫賦活作用を介した Z-100 によるリンパ行性転移抑制	12
1.3.2 Z-100 によるリンパ節中の免疫細胞の増加	15
1.3.3 Z-100 によるリンパ節中のグランザイム B の増加	16
1.3.4 低用量の Z-100 と放射線照射の併用によるリンパ行性転移の抑制	17
1.4 考察	19
第2章 Z-100 のペプチドグリカン様物質によるサイトカイン応答	21
2.1 緒言	21
2.2 実験方法	22
2.2.1 試薬	22
2.2.2 Cell line	22
2.2.3 マウス	22
2.2.4 マウス骨髄由来マクロファージ (BMDM)	22
2.2.5 ヒト CD14 <sup>+</sup> 細胞	22
2.2.6 ELISA によるサイトカイン測定	23
2.2.7 投与部位におけるサイトカインの遺伝子発現測定	23
2.2.8 アニオン分画および非アニオン分画の調製	23
2.2.9 アミノ酸およびムラミン酸分析	23
2.2.10 統計解析	24
2.3 結果	25
2.3.1 Z-100 の RAW264.7 細胞における TNF- $\alpha$ 産生誘導	25
2.3.2 Z-100 の BMDM 細胞におけるサイトカイン産生誘導	26

2.3.3	Z-100 のヒト CD14 <sup>+</sup> 細胞におけるサイトカイン産生誘導.....	28
2.3.4	Z-100 によるマウス皮膚サイトカイン増加作用 .....	30
2.3.5	Z-100 中 PG 断片の同定 .....	32
2.3.6	PG および MDP のサイトカイン産生誘導作用.....	37
2.4	考察.....	39
第3章	Z-100 の受容体探索 .....	41
3.1.	緒言.....	41
3.2.	実験方法.....	43
3.2.1	分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) レポーターアッセイ .....	43
3.2.2	RAW264.7 細胞における <i>Nod2</i> 遺伝子の knockdown.....	43
3.2.3	ヒト CD14 <sup>+</sup> 細胞における <i>NOD2</i> 遺伝子の knockdown .....	43
3.2.4	各細胞の定量的 Real-time PCR 法.....	44
3.2.5	ウエスタンブロッティング用試薬の調製 .....	44
3.2.6	ウエスタンブロッティング .....	44
3.2.7	イメージングサイトメータによる細胞染色 .....	45
3.2.8	統計解析.....	45
3.3.	結果.....	46
3.3.1.	Z-100 による <i>Nod2</i> を介した下流シグナルの活性化.....	46
3.3.2.	RAW264.7 細胞に対する <i>Nod2</i> knockdown の影響.....	48
3.3.3.	Z-100 の IL-12p40 産生誘導作用に対する <i>Nod2</i> knockdown の影響 .....	51
3.3.4.	Z-100 および MDP による NF- $\kappa$ B の核内移行誘導.....	53
3.4.	考察.....	55
[総括]	.....	57
[謝辞]	.....	60
[研究成果の掲載誌]	.....	61
[引用文献]	.....	62

## 略語一覧

本論文中に使用した略語は以下の通りである。

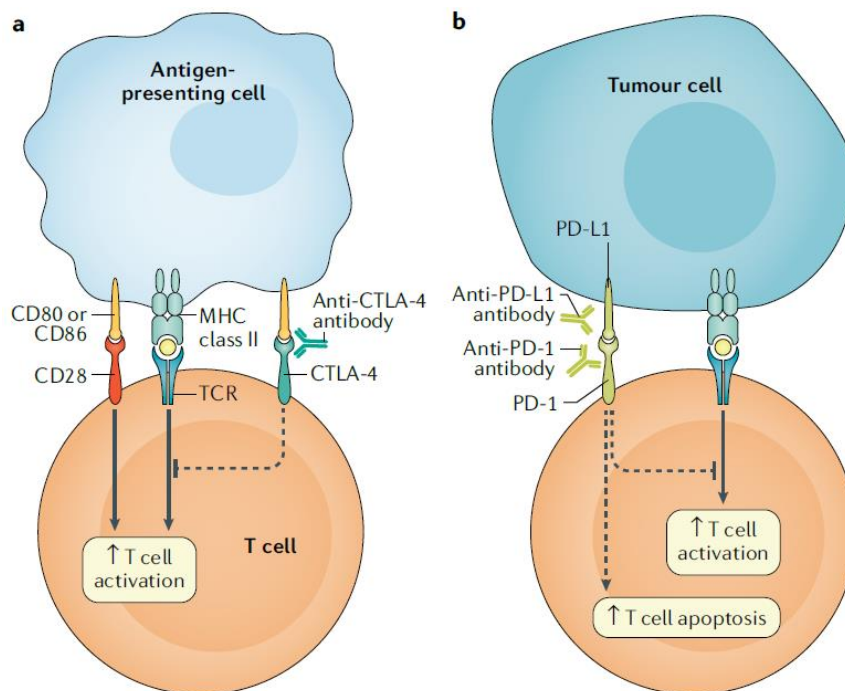
Ala: Alanine  
ANOVA: Analysis of variance  
BCG: *Bacillus Calmette-Guerin*  
BMDM: Bone marrow-derived macrophages  
CARD: Caspase recruitment domain  
CAR-T: Chimeric antigen receptor-T  
CD: Cluster of differentiation  
CpG: Cytosine-guanine  
CSF: Colony-stimulating factor  
CTLA-4: Cytotoxic T lymphocyte antigen-4  
DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline  
DRESS: Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms  
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay  
FBS: Fetal bovine serum  
GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
GlcNAc: *N*-acetylglucosamine  
Glu: Glutamic acid  
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
ICANS: Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome  
iE-DAP:  $\gamma$ -D-glutamyl-*meso*-diaminopimelic acid  
IFN: Interferon  
IgG: Immunoglobulin G  
IL: Interleukin  
irAE: Immune-related adverse event  
LC-MS/MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry  
LPS: Lipopolysaccharide  
LRR: Leucine-rich repeat  
MAPK: Mitogen-activated protein kinase  
M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor  
MDP: Muramyl dipeptide  
MurNAc: *N*-acetylmuramic acid  
MurNGlyc: *N*-glycolylmuramic acid  
NF- $\kappa$ B: Nuclear factor-kappa B

NK: Natural killer  
NKT: Natural killer T  
NLR: NOD-like receptor  
NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain  
PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns  
PCR: Polymerase chain reaction  
PD-1: Programmed cell death protein 1  
PD-L1: Programmed death ligand 1  
PG: Peptidoglycan  
PMR: Polymyalgia rheumatica  
PPIA: Cyclophilin A  
PRP: Pattern recognition receptor  
PVDF: Polyvinylidene fluoride  
RIP2: Receptor interacting protein 2  
S.E.: Standard error  
SEAP: Secreted embryonic alkaline phosphatase  
siRNA: short interference RNA  
Syk: Spleen tyrosine kinase  
TBST: Tris buffered saline with Tween 20  
TGF: Transforming growth factor  
Th1: T helper-1  
TLR: Toll-like receptor  
TNF: Tumor necrosis factor

## [序論]

がん治療では長い間、外科的療法、放射線療法および化学療法の三大療法が施行され、がん免疫療法は補助的な位置付けとみなされてきたり。しかしながら、2011年、Steinmanの「樹状細胞とその適応免疫系における役割の発見」のノーベル生理学・医学賞受賞で、がん免疫療法への注目が高まってきた。さらに、免疫チェックポイントと呼ばれるがん免疫における画期的な発見により<sup>2)</sup>、がん免疫療法は、がん治療法の一つとして認められるに至った。

生体は自己のT細胞からの攻撃を回避するために、T細胞表面のprogrammed cell death protein 1 (PD-1) および cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) を介し、抗原提示細胞からのT細胞活性化シグナルを抑制している<sup>2)</sup> (Figure 1a)。この制御機構は免疫チェックポイントと呼ばれ、通常はT細胞の過剰な活性化による自己免疫疾患の発症等を予防している。一方、同様な機構ががん細胞でも機能しており、PD-1のリガンドのPD-L1を細胞表面に発現したがん細胞は、T細胞の働きを抑制して免疫細胞からの攻撃を免れている (Figure 1b)。つまり、本機構が生体でのがん細胞の排除を妨げる機序の一つとなっている。免疫チェックポイント阻害薬は、がん細胞の免疫逃避機構を解除すべく開発され、2014年に抗PD-1抗体のニボルマブが上市されたのを皮切りに、同抗体のペムブロリズマブ、セミプリマブ、抗PD-L1抗体のデュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、抗CTLA-4抗体のイピリムマブおよびトレメリムマブが種々のがんに対して適応を取得している (Table 1)。



(Nat Rev Dis Primers. 2020 May 7;6(1):38. より引用)

Figure 1 免疫チェックポイント阻害薬の作用メカニズム

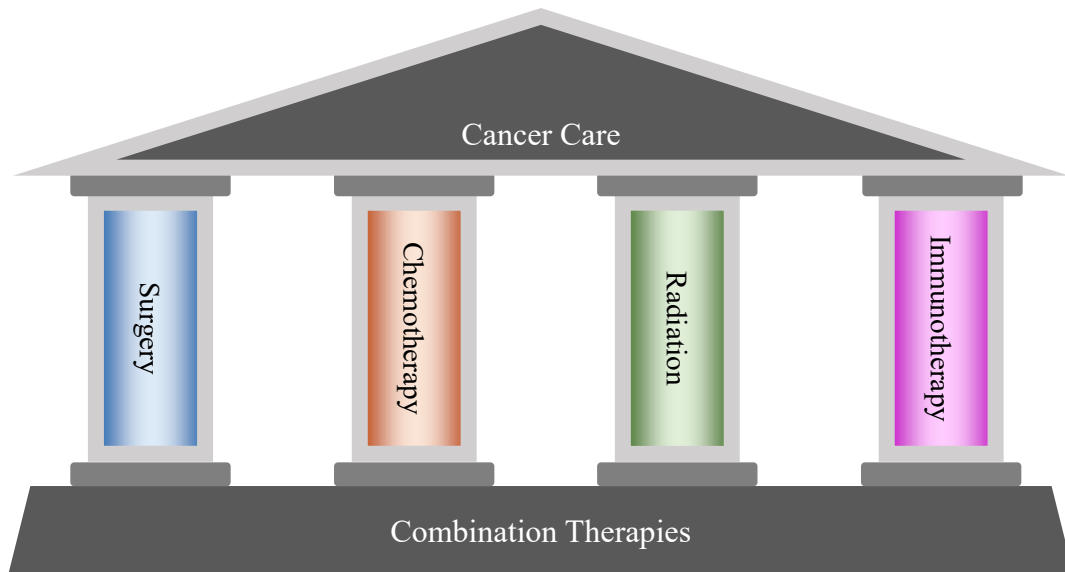
これらの抗体医薬のがん治療における評価は高く、臨床面ではステージ等の状況によってファーストラインとしての使用が考慮されている。学術面において、免疫逃避機構の発見が2018年のノーベル医学・生理学賞となっている。このような科学技術の発達により、免疫チェックポイント阻害薬を用いたがん免疫療法は、手術療法、放射線療法および化学療法の三大療法と並ぶがん治療法の一つとなっている<sup>1)</sup>。これに続き、chimeric antigen receptor (CAR) -T を中心とした養子免疫療法が臨床において顕著な効果を示し、さらにはがん抗原をターゲットとした治療や腫瘍溶解性ウイルスなど、次々と新規モダリティの医薬品開発が進み、がん免疫療法は進化し続けている<sup>3-5)</sup>。

**Table 1 本邦における免疫チェックポイント阻害薬とその適応 (2023年5月現在)**

薬剤の種類	一般名	適応
抗 PD-1 抗体	ニボルマブ	悪性黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌、古典的ホジキンリンパ腫、頭頸部癌、胃癌、悪性胸膜中皮腫、MSI-High を有する結腸・直腸癌、食道癌、原因不明癌、尿路上皮癌
	ペムブロリズマブ	悪性黒色腫、非小細胞肺癌、古典的ホジキンリンパ腫、尿路上皮癌、MSI-High を有する固形癌、腎細胞癌、頭頸部癌、食道癌、MSI-High を有する結腸・直腸癌、PD-L1 陽性のホルモン受容体陰性かつ HER2 陰性の乳癌、子宮体癌、TMB-High を有する固形癌、子宮頸癌
	セミプリマブ	子宮頸癌
抗 PD-L1 抗体	デュルバルマブ	非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肝細胞癌、胆道癌
	アテゾリズマブ	非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肝細胞癌、PD-L1 陽性のホルモン受容体陰性かつ HER2 陰性の乳癌
	アベルマブ	メルケル細胞癌、腎細胞癌、尿路上皮癌
抗 CTLA-4 抗体	イピリムマブ	悪性黒色腫、腎細胞癌、MSI-High を有する結腸・直腸癌、非小細胞肺癌、悪性胸膜中皮腫、食道癌
	トレメリムマブ	非小細胞肺癌、肝細胞癌

MSI: マイクロサテライト不安定性、TMB: Tumor mutational burden

(各添付文書から引用)



(Front Chem. 2020 Nov 10; 8: 598100. より引用 一部改変)

**Figure 2 現在のがん治療のイメージ**

しかしながら、人類は全がんの根治には、未だ到達していない。がん免疫療法の臨床応用が進む中で、それらが悪性度の高いがんに対しても効果を示す反面、全てのがんに効果を示すような万能な治療法ではないことが明らかになってきた<sup>6,7)</sup>。例えば、免疫チェックポイント阻害薬が著効するのはメラノーマ患者の約 30% とされ<sup>8,9)</sup>、CAR-T 療法は B 細胞性腫瘍に対しては著効するものの<sup>10)</sup>、固形がんに対する完全寛解例は非常に少ないことが示されている<sup>11-13)</sup>。がん免疫療法に対する不応性の主たる要因の一つに、腫瘍組織内の免疫細胞の存在および腫瘍組織の炎症状態が挙げられている<sup>14-16)</sup>。腫瘍の微小環境は一様ではなく、免疫細胞が集積して炎症が惹起されている腫瘍は *hot tumor* と呼ばれる<sup>14-16)</sup>。その一方で、免疫細胞が少なく、かつ炎症も見られないような腫瘍は *cold tumor* と区別される<sup>14-16)</sup>。免疫チェックポイント阻害薬などのがん免疫療法は、*hot tumor* に対して著効を示すものの、*cold tumor* には十分な効果を示さないことが分かってきており、*cold tumor* を *hot tumor* に変えることががん免疫療法における新たな課題となっている<sup>14-16)</sup>。

免疫チェックポイント阻害薬および CAR-T 療法が抱えるもう一つの大きな課題が、副作用である。免疫チェックポイント阻害薬は、その作用機序から *immune-related adverse event (irAE)* を引き起こすことが知られている<sup>17)</sup>。irAE はあらゆる臓器で発生が懸念されており (Figure 3)、特に胃腸障害、肝障害、皮膚障害などが高頻度に発生する。加えて、副腎不全、劇症 1 型糖尿病などの重篤な副作用も発現することがある<sup>18,19)</sup>。抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体の併用では、相乗的な抗悪性腫瘍効果を示す一方で、抗がん剤治療において「重症または医学的に重大で、薬物の減量や休薬を考慮すべき」とされる Grade 3 以上の irAE の発生が約半数の患者で観察されている<sup>18,19)</sup>。CAR-T 療法では、神経毒性の副作用が *immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome (ICANS)* として評価されている<sup>20)</sup>。CAR-T 療法における ICANS の頻度は低いものではなく、致死的な事象に至ることも報告されている<sup>21),22)</sup>。



### NEUROLOGIC

- Posterior Reversible Encephalopathy
- Neuropathy
- Guillian-Barre Syndrome
- Myelopathy
- Autoimmune Encephalitis
- Aseptic Meningitis
- Myasthenia gravis
- Transverse Myelitis
- Non-specific symptoms: headache, tremor, lethargy, memory disturbance, seizure

### RESPIRATORY

- Cough/dyspnea
- Laryngitis
- Pneumonitis
- Bronchitis
- Pleuritis
- Sarcoid-like granulomatosis

### RENAL



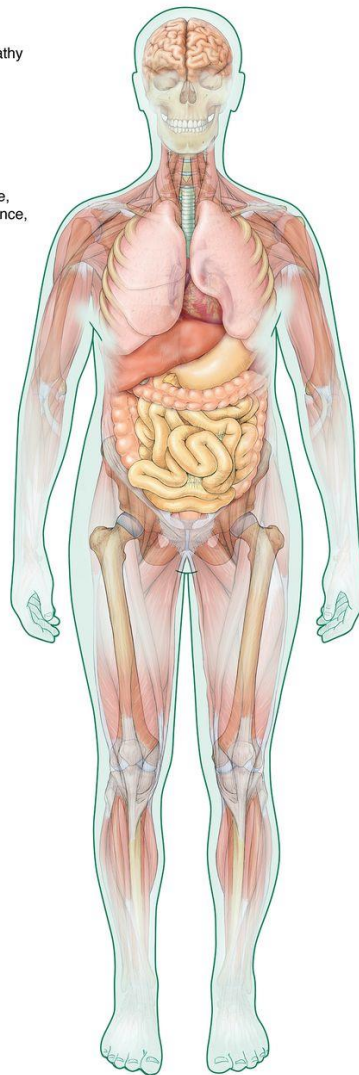
- Tubulointerstitial nephritis
- Acute renal failure
- Lupus nephritis
- Granulomatous lesions
- Thrombotic microangiopathy

### HEMATOLOGIC

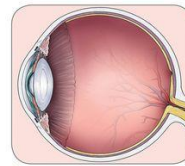
- Autoimmune hemolytic anemia
- Red cell aplasia
- Thrombocytopenia
- Leukopenia/Neutropenia
- Acquired hemophilia
- Myelodysplasia

### DERMATOLOGIC

- Rash/Pruritis
- Mucositis
- Psoriasis
- Vitiligo
- Bullous pemphigoid
- Steven-Johnson syndrome
- DRESS syndrome



### OCULAR



- Uveitis
- Conjunctivitis
- Scleritis, episcleritis
- Optic neuritis
- Blepharitis
- Retinitis
- Peripheral ulcerative keratitis
- Vogt-Koyanagi-Harada

### CARDIOVASCULAR

- Myocarditis
- Pericarditis
- Pericardial effusion
- Arrhythmia
- Hypertension
- Congestive heart failure

### ENDOCRINE

- Hyper or hypothyroidism
- Hypophysitis
- Adrenal insufficiency
- Diabetes

### GASTROINTESTINAL

- Diarrhea
- Gastritis
- Colitis
- Ileitis
- Pancreatitis
- Hepatitis

### RHEUMATOLOGIC

- Arthralgias/Myalgias
- Inflammatory Polyarthrits
- PMR-like
- Psoriatic Arthritis
- Oligoarthritis
- Vasculitis
- Sicca Syndrome
- Sarcoidosis
- Inflammatory myositis
- Resorptive bone lesions and fractures

(*J Rheumatol.* 2020 Feb;47(2):166-175. より引用)

**Figure 3** 免疫チェックポイント阻害薬による全身性の irAE

irAE: immune-related adverse event、PMR: リウマチ性多発筋痛症、DRESS syndrome: 薬剤性過敏症候群

**Table 2** がん免疫療法による主な副作用

薬剤	主な副作用	発生頻度	文献
ニボルマブ	irAE	全 Grade : 82.1% Grade 3 以上 : 16.3%	<i>N Engl J Med.</i> 2015; 373: 23-34.
イピリムマブ	irAE	全 Grade : 86.2~93% Grade 3 以上 : 24~27.3%	<i>N Engl J Med.</i> 2015; 372: 2006-17.
ニボルマブ + イピリムマブ	irAE	全 Grade : 91~99.5% Grade 3 以上 : 51~55.0%	
CD19 CAR-T	ICANS	全 Grade : 10~70% Grade 3 以上 : 10~35%	<i>Lancet Oncol.</i> 2019; 20: 31-42. <i>N Engl J Med.</i> 2019; 380: 45-56.

irAE: immune-related adverse event、ICANS: immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome

このように、がん免疫療法では治療不応性患者の存在および薬物による副作用に課題があり、それらの改善のために、多くのオンコロジストはがん免疫療法と他の治療法との併用療法に活路を見出そうとしている<sup>7, 23)</sup>。がん免疫療法と化学療法あるいは放射線療法との併用およびがん免疫療法同士の併用は、高い抗腫瘍効果が期待できるものの、副作用の危険性はより高まることが懸念される。そのため、安全性に配慮した併用療法の探索が急務となっている。その候補薬に求められる主な条件は、既存の免疫療法とは異なる作用機序を持ち、かつ安全性が高いことである。そのような治療薬により、治療薬の併用パターンの増加を介して、全てのがん患者の治療を網羅する目標に一步前進できると期待される。

Z-100 は結核菌青山 B 株の熱水抽出物であり、その主成分はアラビノマンナンおよびマンナン等の多糖類である<sup>24)</sup>。本邦ではアンサー®の商標名で、コロニー刺激因子 (CSF) および IL-3 の活性化を介し、放射線療法による白血球減少症への治療薬として用いられている。現在、がん治療薬として開発中であり、動物実験において免疫賦活作用を介した抗腫瘍効果を発揮することが報告されている<sup>25-27)</sup>。例えば、メラノーマの肺転移モデルを使用した実験では、Z-100 の用量依存的な転移抑制効果が認められている<sup>25)</sup>。このモデルにおいて Z-100 を投与したマウスの脾臓中 CD4<sup>+</sup>T 細胞は、非投与マウスのそれらよりも IL-2 および IFN- $\gamma$  の産生量が多く、かつ IL-4 および IL-10 の産生量が少なくなっていた。本実験モデルへの抗 IFN- $\gamma$  抗体の投与は、Z-100 の投与によるメラノーマの肺転移抑制作用を低下させ、脾臓中 CD4<sup>+</sup>T 細胞からの IL-2 および IFN- $\gamma$  産生増加作用を減弱させるだけでなく、IL-4 および IL-10 の産生低下作用も減弱させた。腫瘍免疫では IL-2 および IFN- $\gamma$  はがんの進展の抑制に働き、その一方で IL-4 および IL-10 はがんの悪性を促進させると考えられている<sup>28)</sup>。そのため、Z-100 の薬理作用はサイトカイン環境を抗腫瘍作用が発揮されるために有利な状態に変化させる作用であり、この中で IFN- $\gamma$  は重要な役割を担っていることが示唆された。Z-100 はメラノーマの皮下移植腫瘍に対しても、増殖抑制作用を示すことが報告されている<sup>26)</sup>。メラノーマの皮下移植モデル動物での Z-100 の延命効果は、CD4<sup>+</sup> 細胞欠損マウスで消失することも示されている。これらの知見から、Z-100 の抗腫瘍効果に対して CD4<sup>+</sup> 細胞を中心とした免疫細胞およびそれらが産生するサイトカイン等による免疫賦

活作用の関与が考えられる。特に IL-10 は、がんの免疫チェックポイント阻害薬への不応性に関与することが示唆されており<sup>29)</sup>、IL-10 の産生抑制効果を持つ Z-100 はがん免疫療法の不応性を改善できる可能性がある。さらに、一般的な菌由来成分は Toll-like receptor (TLR)、NOD-like receptor (NLR) あるいは C-type lectin 受容体を活性化し、腫瘍内への抗原提示細胞の浸潤およびその活性化を誘導して、免疫チェックポイント阻害薬の不応性を改善する可能性が示されている<sup>30-32)</sup>。これらを勘案すると、Z-100 も同様に抗腫瘍効果を発揮することが期待される。

ところで、本邦で上市されている結核菌由来製剤のがんへの臨床治療については、*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) の初期の膀胱がんに対する膀胱内注入療法がある。しかしながら、この治療法は副作用の発生率が高く、約 90% の患者で有害事象の発生が報告されている<sup>33)</sup>。一方、Z-100 は結核菌の副作用に起因する成分を排除する目的で熱水抽出して精製されており、臨床において高い安全性が確認されている。白血球減少症治療薬としての承認時には有害事象の発生率は 4.7% であり<sup>34)</sup>、子宮頸がん治療薬としての PII 試験では、放射線照射終了後の維持療法期間で最大での副作用発現率は 8.6% で、いずれも軽微なものに留まった<sup>35)</sup>。つまり、Z-100 は既存の免疫療法不応例に対する治療に有望性があり、かつ安全性が高く、様々な治療法との組み合わせにも対応する可能性を有している。

したがって、Z-100 のがん免疫療法治療薬としての可能性およびその作用機序を明らかにするため、本研究が企画された。第 1 章では、Z-100 のリンパ行性転移に対する作用を確認するとともに、免疫細胞レベルでの影響について検討した。第 2 章では、その作用機序解析のために、Z-100 によるサイトカイン誘導作用の確認およびその活性成分の探索を行った。さらに第 3 章では、これまで不明であった Z-100 の作用点について受容体に焦点を当てて検討した。



PG: ペプチドグリカン、MDP: ムラミルジペプチド、NOD2: nucleotide-binding oligomerization domain 2、KD: knockdown、NF-κB: nuclear factor-kappa B

Figure 4 本試験での検討の流れ

## 第1章 Z-100 のリンパ行性転移抑制効果

### 1.1 緒言

がん転移は、主に血行性、リンパ行性および播種性の経路を介して進行する<sup>36,37)</sup>。血行性転移では、がん細胞は近くの血管に侵入し、血流を介して他の臓器へ移動して転移巣を形成する。リンパ行性転移では、がん細胞はリンパ管に侵入し、リンパ節に転移巣を形成する。播種性転移では、がん細胞は胸腔や腹腔に侵入し、それら体腔に面した他の臓器に転移巣を形成する。この中でリンパ行性転移は種々のがんにおける進行期によく観察され、一般的にがん患者の予後不良との相関性が高い<sup>38)</sup>。しかしながら、リンパ行性転移を抑制する治療法は、現時点では十分な治療効果を得るレベルには至っていない<sup>39-41)</sup>。

がん組織の切除時にはがん組織に加え、その周辺にあるリンパ節も切除する「リンパ節郭清」が施される。リンパ節郭清はいくつかのがんで、リンパ行性転移の治療、その予防 (あるいは両者) を目的として行われる。本術式の有効性が認められているのは早期のがん患者に限られており、その有効性についても疑義が持たれている<sup>42,43)</sup>。リンパ節郭清はリンパ浮腫、感染症および神経・血管の損傷を誘発するリスクもあるとされ、特に鼠経リンパ節の郭清については、80% の患者でリンパ浮腫が発生している<sup>44-46)</sup>。リンパ行性転移の抑制を目的として、このような外科的処置の代わりに殺細胞効果を持つ抗がん剤あるいはリンパ管新生阻害剤が投与されるものの、これらの治療法は副作用面での課題およびリンパ組織への薬物移行に問題があるため、患者への恩恵は大きいものではない<sup>41,47-49)</sup>。そのため、いくつかの化学療法剤ではリポソームベースの送達システムなどを利用して薬物をリンパ組織に到達させる検討が行われている<sup>49-51)</sup>。このように、現時点での有効性および安全性の高いリンパ行性転移の治療法は十分に確立されておらず、新規治療薬の登場が強く求められている。

動物モデルにおいて、免疫学的アプローチによるリンパ行性転移への有効性が報告されており、ヒトでのリンパ行性転移治療への応用が期待されている<sup>52-55)</sup>。Z-100 は、これまでに皮下移植腫瘍および肺転移モデルへの効果が検討されており、そのメカニズムとして IFN- $\gamma$  や IL-10 等のサイトカイン産生調節作用が示されている<sup>25-27)</sup>。しかしながら、Z-100 のリンパ行性転移に対する効果および CD8<sup>+</sup>T 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞あるいはナチュラルキラー T (NKT) 細胞等の殺細胞効果を有する免疫細胞への関与については明らかにされていない。

本章では、がん細胞のリンパ行性転移モデルとして、非臨床研究で広く使われている B16 メラノーマモデルを用いた。本試験で使用した B16-BL6 株はマウスの足蹠に移植することで、リンパ行性に自然転移を生じる<sup>56-60)</sup>。本モデルを用いて、Z-100 が B16 メラノーマ細胞のリンパ行性転移に及ぼす抑制効果に加え、そのリンパ節での免疫細胞に及ぼす効果についても検討した。さらに、免疫細胞は、細胞傷害を誘発する時にグランザイム B を産生する<sup>61-64)</sup>。Z-100 のグランザイム B 産生に及ぼす効果についても、リンパ節で確認した。臨床での薬物療法は、多くの場合、late stage で使用されることから、放射線照射と併用される頻度が高い。放射線照射は骨髄抑制の結果、リンパ球数を減少させる<sup>65)</sup>。その一方で、近年、放射線照射が免疫活性化を促進させるこ

とも報告されている<sup>66)</sup>。そこで、Z-100 を放射線照射と併用することの有益性についても検討した。

## 1.2 実験方法

### 1.2.1 使用細胞株および動物

B16-BL6 メラノーマ細胞株は東北大学より入手し、RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) に 10% (v/v) のウシ胎児血清 (FBS、Hyclone Laboratories)、100 U/mL のペニシリンおよび 100  $\mu$ g/mL のストレプトマイシン (いずれも Meiji Seika ファルマ) を添加した培養液中で、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air で培養した。

雄性 C57BL/6 マウスはジャクソン・ラボラトリー・ジャパンから購入し、specific pathogen-free の環境下、23 $\pm$ 3°C の室温、55 $\pm$ 20% の湿度、照明は午前 7 時に点灯、午後 7 時に消灯、飼料は CRF-1 (オリエンタル酵母)、飲水は水道水を自由摂取とし、ゼリア新薬工業の動物倫理委員会のガイドラインに従って飼養した。なお、本研究での全ての動物実験は、ゼリア新薬工業の動物倫理委員会の審査・承認後に実施された。

### 1.2.2 Z-100

ゼリア新薬工業で製造された Z-100 を、生理食塩液にて希釈して本実験に使用した。投与時には 0.002、0.02、0.2 および 2 mg/mL に希釈し、1 回/日、右鼠径部皮下に投与した。対照群のマウスには生理食塩液を同様に投与した。マウスへの投与容量は 5 mL/kg とした。なお、本論文における Z-100 の用量および濃度は、いずれも Z-100 中の糖含量で示されている。

### 1.2.3 腫瘍モデル

B16-BL6 メラノーマ細胞を ( $1.5 \times 10^7$  cells/mL) の濃度で Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS、Thermo Fisher Scientific) 中に懸濁させ、27G 注射針を接続したシリンジ (ハミルトン) を用いて、8 週齢の C57BL/6 マウスの右足蹠皮下に 20  $\mu$ L 注入した ( $3 \times 10^5$  cells/mouse)。移植から 21 日後に右鼠経リンパ節を採取し、実体顕微鏡 (SCW-60L、カートン光学) を用いてブラインド下で転移の有無を評価した。原発腫瘍のサイズはシックネスゲージ (Peacock) で足の厚さを測定することで、評価した。

### 1.2.4 細胞生存率アッセイ

細胞生存率は Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて評価した。B16-BL6 メラノーマ細胞 ( $7.5 \times 10^2$  cells/well) を 96 ウェル培養プレートに播種し、24 時間培養 (37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air) した後、生理食塩液、Z-100 (最終濃度 100  $\mu$ g/mL) あるいはシスプラチン (最終濃度 1  $\mu$ g/mL、富士フイルム和光純薬) を各ウェルに添加した。添加から 48 時間後、Cell Counting Kit-8 を 10  $\mu$ L ずつウェルに添加した。3 時間後、マイクロプレートリーダー (Sunris Remote、TECAN Austria GmbH) を用いて、測定波長：450 nm、参照波長：600 nm の吸光度を測定した。各被験物質に対して triplicate で測定を行い、その平均値からブランクの吸光度の平均値を減じて 1 データとし、6 回実験を繰り返して 1 群 6 データを取得した。

### 1.2.5 フローサイトメトリー

移植から 21 日後の右鼠経リンパ節を採取し、その 4 匹分をプールして 1 サンプルとした後にガラスホモジナイザー (IWAKI) を用いて、ホモジナイズし細胞懸濁液を調製した。細胞を蛍光ラベルされた各モノクローナル抗体で染色し、MACSQuant Analyzer (Milteni Biotec) を用いて解析した。染色には以下の抗体を使用した。CD4-FITC (Milteni Biotec)、anti-CD8a PE-Cy7 (Thermo Fisher Scientific)、CD49b-PE (Milteni Biotec)、APC/Cy7-conjugated, anti-mouse TCR $\beta$  chain (BioLegend)。CD4 陽性 TCR $\beta$  陽性の細胞を CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8 陽性 TCR $\beta$  陽性の細胞を CD8<sup>+</sup>T 細胞、CD49b 陽性 TCR $\beta$  陰性の細胞を NK 細胞および CD49b 陽性 TCR $\beta$  陽性の細胞を NKT 細胞とみなした。各サンプルにつき、20,000 カウントの測定を行い、死細胞は propidium iodide で染色して解析から除外した。免疫細胞数はリンパ節当たりの細胞数として算出し、各細胞種の存在比率をリンパ節中の総細胞数に乗じて算出した。

### 1.2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

採取した右鼠経リンパ節は 3 匹分プールして 1 サンプルとした後に溶解してライセートを調製した。ライセートのグランザイム B 濃度は ELISA Kit for Granzyme B (CLOUD-CLONE) を用いて測定した。各ライセートのグランザイム B 濃度を算出後、下記の式にてリンパ節中のグランザイム B (pg/Lymph node) を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{リンパ節中のグランザイム B (pg/lymph node)} \\ & = \text{サンプルのグランザイム B 濃度 (pg/mL)} \times \text{ライセート容量 (0.3 mL)} / \text{リンパ節のプール数} \\ & (3) \end{aligned}$$

### 1.2.7 放射線照射

無麻酔下の担がんマウスに 10 mm アクリルフィルターを設置した軟 X 線照射装置 (Softex) にて放射線照射を行った。マウスを伏臥位の状態でフォルダーに入れ、担がん部位だけが照射されるように右足以外の部位を鉛で覆うことで遮蔽した。放射線は腫瘍移植から 4、7 および 11 日後にそれぞれ 5 Gy 照射した。腫瘍移植から 21 日後、シクネスゲージで足の厚さを測定することで、原発腫瘍のサイズを評価した。

### 1.2.8 統計解析

Z-100 単独投与および放射線併用によるリンパ節転移に対する統計解析は生理食塩液群とその他の群との間で Fisher の直接確率検定を固定順序検定法で行った。

細胞生存率アッセイについては、最初に Bartlett 検定を行って等分散性を確認した。その結果、いずれも等分散となったので Dunnett の多重比較検定を行った。

リンパ節中の免疫細胞およびグランザイム B 量については生理食塩液群と Z-100 群に対して F 検定を行ったところ、いずれも不等分散であったので, Aspin-Welch の *t* 検定を行った。

放射線照射時の足の厚さについては階層手順で統計を実施した。最初に生理食塩液群と陽性対照である放射線照射した生理食塩液群に対して F 検定を行ったところ、不等分散となったので、Aspin-Welch の  $t$  検定を行った。この結果が有意であったことから、放射線照射した生理食塩液群と放射線照射した各用量の Z-100 群に対し Bartlett 検定を行って等分散性を確認した。その結果、いずれも等分散であったため Dunnett の多重比較検定を行った。

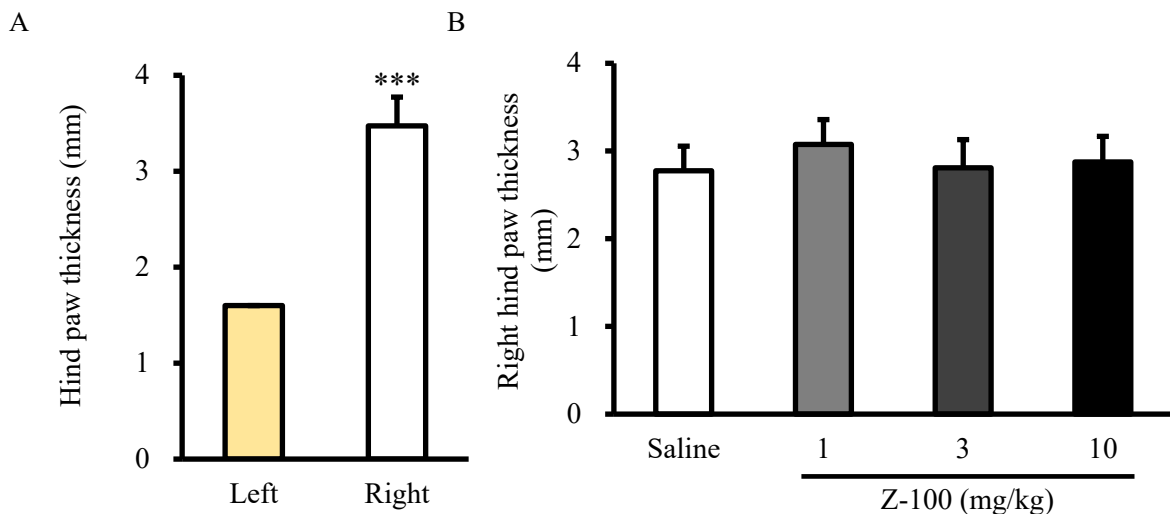
統計学的検定の有意水準はいずれも 5% とした。



### 1.3 結果

#### 1.3.1 免疫賦活作用を介した Z-100 によるリンパ行性転移抑制

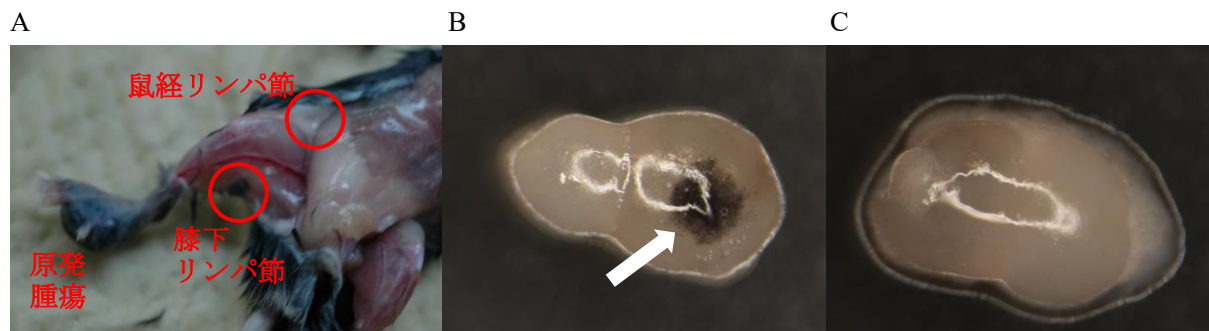
まず、C57BL/6 マウスの右足蹠皮下に  $3 \times 10^5$  個の B16-BL6 を移植し、移植から 21 日後に右足および左足の厚さを測定することで腫瘍サイズを評価した。その結果、Figure 5A に示すように B16-BL6 を移植した右足は著しく厚さが増加した。この移植条件にて生理食塩液、1 mg/kg Z-100、3 mg/kg Z-100 および 10 mg/kg Z-100 を 20 日間皮下投与し、20 日目の右足の厚さを測定して腫瘍サイズを評価した。その結果、Figure 5B に示すようにいずれの群においても足の厚さは生理食塩液群と変わらなかった。



**Figure 5 Effect of Z-100 and irradiation on hind paw thickness**

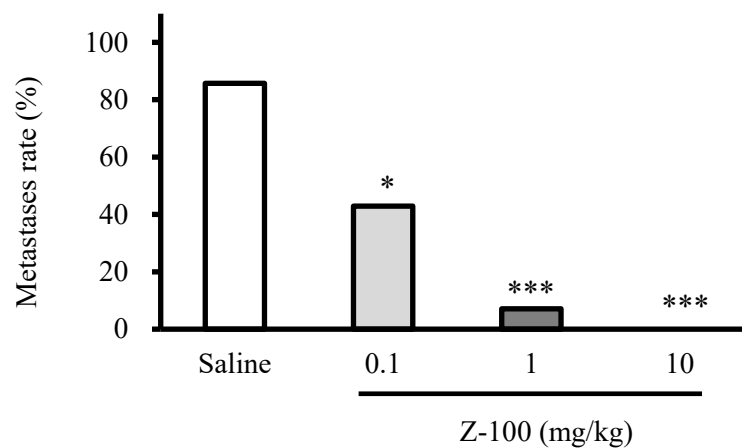
(A) B16-BL6 cells ( $3 \times 10^5$ ) were injected into the right hind footpad of C57BL/6 mice ( $n=11$ ). The thickness of the hind paw was measured 21 d after injection of B16-BL6 cells. Values are expressed as mean $\pm$ S.E. The thickness of the right hind paw was significantly different from that of the left hind paw (\*\*\*)  $p<0.001$ , Aspin-Welch  $t$ -test). (B) B16-BL6 cells ( $3 \times 10^5$ ) were injected into the right hind footpad of C57BL/6 mice ( $n=12$ ) and were given either physiological saline or Z-100 (1, 3, 10 mg/kg) subcutaneously in the right inguinal region once daily for 20 d. The thickness of the hind paw was measured 20 d after injection of B16-BL6 cells. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.

次に、上述の B16-BL6 の足蹠皮下移植モデルで、移植されたメラノーマ細胞に対する Z-100 の転移抑制効果を検討した。C57BL/6 マウスの右足蹠皮下に  $3 \times 10^5$  個の B16-BL6 を移植し、移植から 21 日後に右鼠経リンパ節への転移を実体顕微鏡下で観察することで評価した (Figure 6)。その結果、Figure 7 に示すように Z-100 は用量依存的に転移を抑制し、生理食塩液、0.1 mg/kg Z-100、1 mg/kg Z-100 および 10 mg/kg Z-100 の投与でそれぞれ転移率は 85.7%、42.9%、7.1% および 0% となった。



**Figure 6 Lymphatic metastasis of B16-BL6 cells in mice after injection of B16-BL6 cells into the footpad**

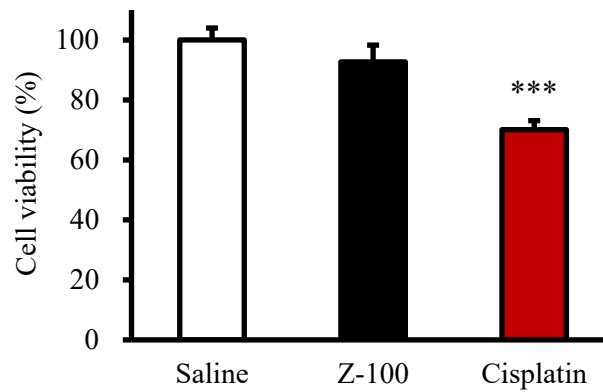
Photographs of overall view from the primary tumor to the inguinal lymph node (A), inguinal lymph node with metastases (B), and a normal inguinal lymph node (C).



**Figure 7 Z-100 Inhibited lymph node metastases in mice injected with B16-BL6 cells**

B16-BL6 cells ( $3 \times 10^5$ ) were injected into the right hind footpad of C57BL/6 mice (n=14) and were given either physiological saline or Z-100 (0.1, 1, 10 mg/kg) subcutaneously in the right inguinal region once daily for 21 d. Afterwards, the right inguinal lymph nodes were excised, and the presence of metastases was assessed via stereomicroscopy under blinded conditions. Significant differences between saline and Z-100-treated groups: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (Fisher's exact test).

さらに、Z-100 の B16-BL6 に対する直接的な殺細胞効果を確認するため、培養中の B16-BL6 に Z-100 を添加した時の B16-BL6 の生存率を測定した。その結果、Z-100 は B16-BL6 の生存率に影響しなかった (92.7%)。一方、陽性対照として用いたシスプラチンは、その生存率を 70.1% まで低下させた (Figure 8)。

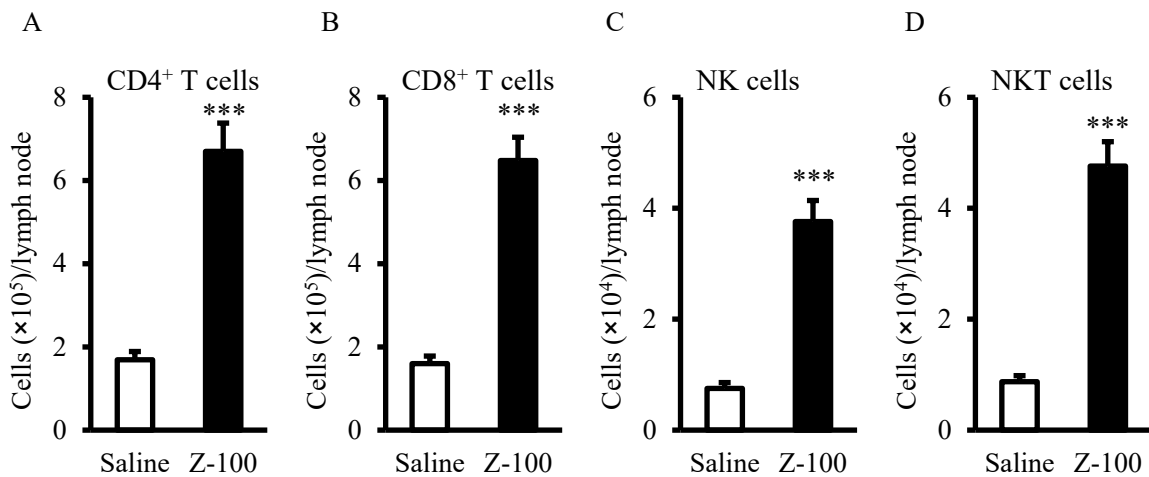


**Figure 8 Effect of Z-100 on the viability of cultured B16-BL6 cells**

B16-BL6 cells ( $7.5 \times 10^2$  cells/100  $\mu$ L/well) were seeded into 96-well culture plates and cultured for 24 h, followed by the addition of physiological saline, Z-100 (final concentration 100  $\mu$ g/mL) or cisplatin (final concentration 1  $\mu$ g/mL) to each well. After 48 h of incubation, the cells were reacted with Cell Counting Kit-8 reagent for 3 h and absorbance was measured at 450 nm (reference wavelength 600 nm) using a microplate reader. Values were obtained by subtracting the absorbance of the blank. Cell viability (%) was calculated by dividing each absorbance of the treated group by the mean absorbance of the saline group. The data shown represent the mean $\pm$ S.E. of six experiments. Significant difference between saline and cisplatin-treated groups: \*\*\*  $p < 0.001$  (Dunnett's multiple comparison).

### 1.3.2 Z-100 によるリンパ節中の免疫細胞の増加

Figure 8 で示すように、Z-100 による転移抑制は免疫賦活作用を介することが示唆された。そこで 1.3.1 項と同様に右鼠経リンパ節を採取し、1 mg/kg の Z-100 が免疫細胞に与える効果について検討した。その結果、Z-100 群では右鼠経リンパ節中の CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T、NK および NKT 細胞数が生理食塩液群のそれらよりも、いずれも約 5 倍に増加した (Figure 9)。

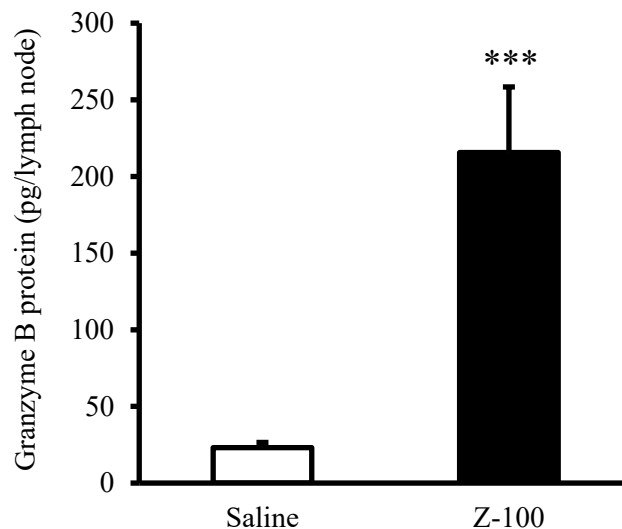


**Figure 9 Z-100 increased the number of immune cells in the lymph nodes**

C57BL/6 mice injected with B16-BL6 cells ( $3 \times 10^5$  cells) in the right hind footpad were given either physiological saline (n=6) or Z-100 (1 mg/kg, n=7) subcutaneously in the right inguinal region once daily for 21 d. Afterwards, the right inguinal lymph nodes were excised and cell suspensions were prepared using four excised lymph nodes. Flow cytometry was used to analyze the presence of CD4<sup>+</sup>T (A), CD8<sup>+</sup>T (B), NK (C), and NKT (D) cells. Values are expressed as mean±S.E. Significant difference between saline and Z-100-treated group: \*\*\* p<0.001 (Aspin–Welch *t*-test).

### 1.3.3 Z-100 によるリンパ節中のグランザイム B の増加

グランザイム B は、細胞障害性 T 細胞 (CD8<sup>+</sup> T 細胞)、NK 細胞および NKT 細胞で産生され、病原菌の駆除およびがん細胞のアポトーシス誘導を生じさせる<sup>61-64</sup>)。そこで、Z-100 のリンパ行性転移抑制作用におけるグランザイム B の関与を示すため、1.3.1 項と同様に右鼠径部リンパ節を採取し、グランザイム B 量を ELISA 法で測定した。Figure 10 に示すように、Z-100 (1 mg/kg) 群のグランザイム B 量は、生理食塩液群のそれより約 9 倍の高値となった。



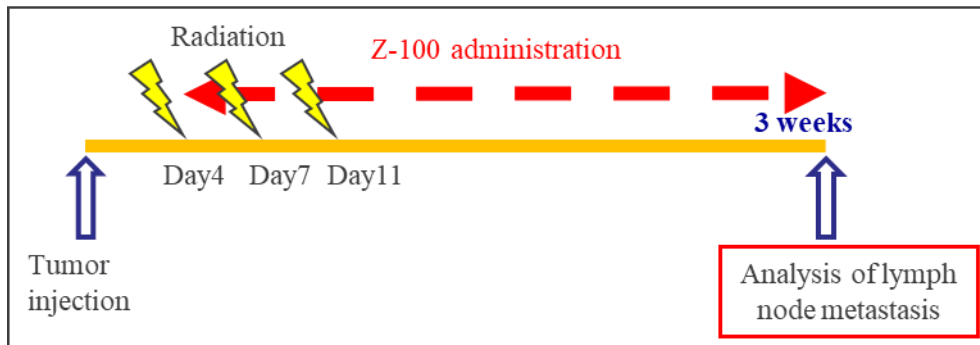
**Figure 10 Z-100 increased the amount of granzyme B in the lymph nodes**

B16-BL6 cells ( $3 \times 10^5$ ) were injected into the right hind footpad of C57BL/6 mice ( $n=9$ ) and were given either physiological saline or Z-100 (1 mg/kg) subcutaneously in the right inguinal region once daily for 21 d. Afterwards, the right inguinal lymph nodes were excised and tissue lysates were prepared using three excised lymph nodes. ELISA was used to measure the amount of granzyme B in the lysates, and the total amount of granzyme B per lymph node was calculated. Values are expressed as mean $\pm$ S.E. Significant difference between saline and Z-100-treated group: \*\*\*  $p<0.001$  (Aspin–Welch *t*-test).

### 1.3.4 低用量の Z-100 と放射線照射の併用によるリンパ行性転移の抑制

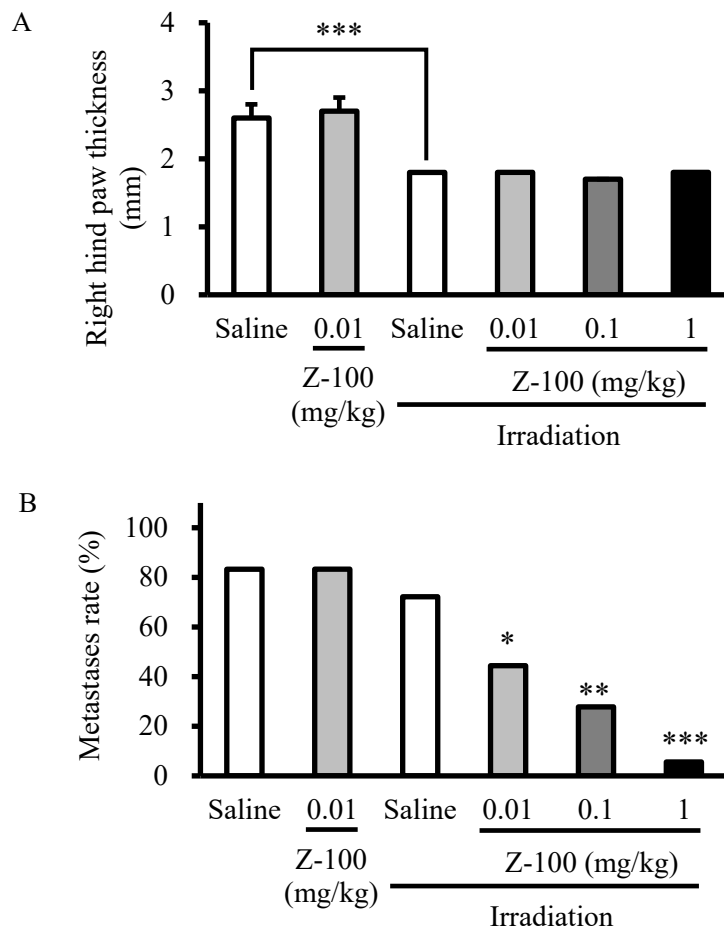
B16-BL6 のリンパ行性転移モデルを用い、Z-100 と放射線の併用効果を確認した。1.3.1 項と同様に B16-BL6 の移植を行い、移植から 4、7 および 11 日後にマウスの右後足に放射線を照射した。Z-100 は移植 4 日目から 21 日目まで 1 回/日、右鼠径部皮下に投与した。移植から 21 日後に、右後足の厚さを測定した後、右鼠経リンパ節を採取し転移の有無を確認した。

右後足の厚さを Figure 12A に、右鼠経リンパ節の転移率を Figure 12B に示す。右後足の厚さについては、生理食塩液+放射線照射群で低下が認められた。一方、生理食塩液+放射線照射群と Z-100 + 放射線照射群との比較ではいずれの用量でも差が無かった (Figure 12A)。右鼠経リンパ節の転移率は、0.01 mg/kg Z-100 群および生理食塩液+放射線照射群で生理食塩液のそれと同程度の値となり、Z-100 + 放射線照射群では 0.01、0.1 および 1 mg/kg のいずれの用量でも転移率の低下が認められた (Figure 12B)。したがって、低用量の 0.01 mg/kg Z-100 の単独投与では転移抑制は認められないものの、放射線照射を併用することで B16-BL6 転移が抑制される結果となった。



**Figure 11** The experimental design of combination study of Z-100 and irradiation

B16-BL6 cells ( $3 \times 10^5$ ) were injected into the right hind footpad of C57BL/6 mice (n=18). The right hind paw of mice was irradiated 4, 7 and 11 d after injection. On the first day of irradiation, either physiological saline or Z-100 (0.01, 0.1, 1 mg/kg) was subcutaneously administered in the right inguinal region once daily for 17 d.



**Figure 12 Effect of Z-100 and irradiation on lymph node metastasis**

(A) The thickness of the right hind paw was measured 21 d after injection of B16-BL6 cells. Values are expressed as mean±S.E. The thickness of the irradiation saline group was significantly different from that of the saline group (\*\*\*)  $p < 0.001$ , Aspin–Welch *t*-test) but no significant difference was observed between the irradiation saline group and the group that received irradiation and Z-100 (Dunnett’s multiple comparison). (B) The right inguinal lymph nodes were excised, and the presence of metastases was assessed via stereomicroscopy under blinded conditions. Significant differences between saline and treated groups: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (Fisher’s exact test).

## 1.4 考察

リンパ行性転移は多くの進行がんで観察され、がん患者の予後を不良にする。その一方で、リンパ行性転移を制御できる有効な治療法は存在しない。本章での、Z-100 投与は原発腫瘍に対する腫瘍増殖抑制効果を示さないが (Figure 5B)、リンパ節における免疫細胞数およびグランザイム B 量を増加させ (Figure 9 および Figure 10)、それを介してメラノーマ細胞 B16-BL6 のリンパ行性転移が抑制されることを示した (Figure 7)。これは、Z-100 が免疫細胞を介して抗腫瘍効果を示すために、免疫細胞が豊富に存在するリンパ組織において、Z-100 が高感度に抗腫瘍効果を示したことによると考えられた。さらに、Z-100 は *in vitro* 実験系において B16-BL6 への直接的な殺細胞効果を示さなかったことから (Figure 8)、Z-100 によるリンパ行性転移の抑制は免疫賦活作用を介することが示唆された。Z-100 は放射線との併用において、さらに強いリンパ行性転移の抑制作用を示したことから (Figure 12)、Z-100 はリンパ行性転移に対する新規治療薬となり得ることが示された。

本試験において増加した CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞、NK 細胞および NKT 細胞は、それぞれ抗腫瘍作用に関与している<sup>14, 53, 54, 67</sup>)。CD4<sup>+</sup> T 細胞は様々なサイトカイン産生能を有する、ヘルパー T 細胞である。Z-100 は 1 型のヘルパー T (Th1) 細胞を増加させる作用を有することが報告されている<sup>25-27</sup>)。Th1 細胞は、直接、がん細胞に障害を与える作用に加え CD8<sup>+</sup> T 細胞および NK 細胞を活性化し、これら細胞のがんへの殺細胞効果を高める<sup>67</sup>)。CD8<sup>+</sup> T 細胞は腫瘍免疫の中核を担う細胞として知られており、対象となる細胞側からの抗原提示を介してがん細胞および感染細胞を攻撃する<sup>14</sup>)。NK 細胞は一次防御的のがん細胞および感染細胞を攻撃する自然免疫を担う。B16-BL6 のリンパ行性転移モデルでは、NK 細胞を枯渇させるとがん細胞の転移を進展させる<sup>53</sup>)。NKT 細胞は NK 細胞マーカーを発現すると同時に、T 細胞受容体も有していることを特徴としている。自然免疫的な殺細胞効果を持つ細胞として知られており、そのリガンドである  $\alpha$ -galactosylceramide 処置は B16-BL6 のリンパ行性転移を抑制する<sup>54</sup>)。本試験ではこれらの全ての細胞が Z-100 の投与により増加したため、それぞれの寄与の度合いまで明らかにすることは出来なかったが、いずれの細胞も本試験で観察された転移抑制効果に関与する可能性が示された。

グランザイム B は CD8<sup>+</sup> T、NK および NKT 細胞で産生され、がん細胞のアポトーシスを誘導する<sup>61-64</sup>)。リンパ行性転移のない口腔扁平上皮がんでは、転移する上皮がんよりも、腫瘍組織周囲のグランザイム B 陽性細胞数が多かったと報告されている<sup>68</sup>)。さらに、腫瘍組織周囲のグランザイム B 陽性細胞が多い患者は、少ない患者より生存期間が長かったことも併せて報告されている<sup>68</sup>)。従って、本研究において観察された Z-100 によるリンパ節でのグランザイム B 量の増加は (Figure 10)、リンパ節においてがん細胞のアポトーシスを誘導することで、B16-BL6 のリンパ行性転移の抑制に寄与したと考えられた。

本章の放射線照射単独処置では原発巣への腫瘍増殖抑制効果を示したものの、リンパ行性転移を抑制することは出来なかった。Z-100 の併用は原発巣への放射線の腫瘍増殖への抑制効果を保持した状態で、B16-BL6 のリンパ行性転移を Z-100 単独投与よりも強く抑制した (Figure 12)。がんへの放射線照射は、死滅したがん細胞から放出された核酸が免疫刺激作用を有することやがん抗原が放出されてがんに対する獲得免疫が成立することなどが報告されており、免疫療法との併



用によって相乗的に効果を発揮する可能性がある<sup>66,69)</sup>。本章においてもこのような放射線による免疫刺激作用と Z-100 の併用が相乗的なリンパ行性転移抑制作用を発揮させたと考えられた。

本章では、Z-100 が免疫細胞応答を介して B16-BL6 のリンパ行性転移を抑制することを示したことから、Z-100 は新規リンパ行性転移治療薬の候補となり得ることが提示された。そのリンパ行性転移抑制作用は、原発巣への放射線照射によって相乗的に強められることも示すことができた。

## 第2章 Z-100 のペプチドグリカン様物質によるサイトカイン応答

### 2.1 緒言

第1章では Z-100 によるリンパ行性転移抑制作用について検討した。Z-100 は結核菌を熱水抽出することで調製されているため、複数成分で構成されており<sup>24)</sup>、これらの中の活性成分(有効成分)に関しては、明確にされていない。Z-100 中の活性成分の探索には、より詳細に Z-100 のメカニズムを解明する必要がある。第1章において、Z-100 は B16-BL6 に対して、直接的な殺細胞効果ではなく、そのリンパ行性転移を抑制したことから、免疫賦活作用を発揮する可能性が示された。加えて、Z-100 はリンパ節において免疫細胞の増加を誘導することも明らかにした。Z-100 は結核菌熱水抽出物であるように、多くの菌体由来成分がサイトカイン産生誘導を介して免疫細胞を増加させる免疫賦活作用を有している<sup>70, 71)</sup>。そこで、本章では、Z-100 による免疫細胞のサイトカイン誘導作用を明らかにすることとした。

Z-100 は皮下投与によって免疫賦活作用を発揮するため、皮膚に存在する免疫細胞が Z-100 の作用発揮に寄与する可能性が高い。皮膚に存在し、免疫賦活作用の出発点を担うことが可能な細胞として、マクロファージが第一候補になる<sup>70)</sup>。結核菌は、マクロファージが主たる感染の標的であることから<sup>72)</sup>、結核菌熱水抽出物の Z-100 もマクロファージに作用する可能性がある。マクロファージは生体内に普遍的に存在し、組織の発達・恒常性、死細胞片の除去、病原体の除去および炎症反応の調節など、多くの機能を備えた可塑性の高い細胞である<sup>73)</sup>。通常、マクロファージのサブタイプは、M1(古典的活性化マクロファージ)および M2(選択的活性化マクロファージ)に分類される。M1 マクロファージは、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、interferon (IFN)  $\gamma$ 、tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ 、lipopolysaccharide (LPS) およびその他の pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) の存在下で分化誘導され、抗腫瘍作用の発揮に寄与すると考えられている<sup>74)</sup>。一方、M2 マクロファージは、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)、interleukin (IL) -4、IL-10、IL-13、transforming growth factor (TGF)  $\beta$ 、glucocorticoid および免疫複合体の存在下で分化誘導され、がんの進展を促進させると考えられている<sup>74)</sup>。M1 マクロファージによる抗腫瘍作用は直接的な食作用 (phagocytosis) によるがん細胞の貪食に加え、取り込んだがん抗原を抗原提示して T 細胞にがんを認識させる作用およびサイトカイン産生作用などを介した間接的な免疫細胞の賦活作用を担う<sup>75)</sup>。特に、M1 マクロファージは Th1 細胞を活性化し<sup>76)</sup>、第1章の 1.4 項で前述したように、Th1 細胞は CD8<sup>+</sup>T 細胞および NK 細胞を活性化する。Th1 細胞は、Z-100 によって増加することが報告されており<sup>25-27)</sup>、Z-100 の作用はマクロファージから Th1 細胞を介して各細胞を増加させたと推察された。これらを勘案するとマクロファージが Z-100 の免疫賦活作用の出発点となっている可能性がある。

そこで、培養細胞で Z-100 のマクロファージに対する免疫賦活作用について検討した。さらに、実際に Z-100 を投与した際の皮膚での免疫応答に関する知見は無いことから、Z-100 を投与したマウスの皮膚組織で、培養細胞で確認された免疫応答の有無について検討した。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試薬

リコンビナントマウス IFN- $\gamma$  は PeproTech、ムラミルジペプチド (MDP)、 $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP) およびペプチドグリカン (PG) は InvivoGen から購入した。Pam3CSK4 は Novus Biologicals から、LPS は Sigma Aldrich から購入した。

### 2.2.2 Cell line

RAW264.7 細胞 (DS Pharma Biomedical) は 37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air 下でダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、Life Technologies) に 10% (v/v) の FBS (Hyclone Laboratories) および 1% のペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (Life Technologies) を添加した培養液中で培養した。RAW264.7 細胞は  $7.5 \times 10^4$  cells/well で 96 ウェルプレートに播種した。24 時間培養後、さらにウェルに Z-100、iE-DAP および MDP を IFN- $\gamma$  存在下および非存在下で添加し、3、6、9、12、16、20 および 24 時間培養した。曝露後上清を回収し、培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度を測定した。

### 2.2.3 マウス

雄性 C57BL/6 マウスはジャクソン・ラボラトリー・ジャパンから購入し、specific pathogen-free の環境下、23 $\pm$ 3°C の室温、55 $\pm$ 20% の湿度、照明は午前 7 時に点灯午後 7 時に消灯、飼料は CRF-1 (オリエンタル酵母)、飲水は水道水を自由摂取とし、ゼリア新薬工業の動物倫理委員会のガイドラインに従って飼養した。なお、本研究での全ての動物実験は、ゼリア新薬工業の動物倫理委員会の審査・承認後に実施された。

### 2.2.4 マウス骨髄由来マクロファージ (BMDM)

8 週齢の C57BL/6 マウスを頸椎脱臼により犠殺し、骨髄細胞を採取した。採取した骨髄細胞は RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) に 10% (v/v) の FBS、200 U/mL のペニシリン、200  $\mu$ g/mL のストレプトマイシン (いずれも Meiji Seika ファルマ) および 20 ng/mL のマウス GM-CSF (PeproTech) を添加した培養液 (BMDM 培養液) 中で、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air で培養した。培養から 2 日目に培地の 75% (v/v) を交換し、4 日目に全ての培地を交換した。7 日目に dish に接着した細胞をスクレーパーで採取して BMDM とした。採取した細胞懸濁液をコラーゲンコーティングされた 96 ウェルプレート (Becton Dickinson) に播種し ( $2 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ L/well)、BMDM 培養液で 30 分間、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air でインキュベートした。30 分後培養上清を除去し、0.3 ng/mL の LPS を加えた BMDM 培養液を各ウェルに添加した後に各刺激剤を添加した。Pam3CSK4 を添加剤とする場合には LPS を加えない BMDM 培養液を用いた。培養終了後、上清を回収した。

### 2.2.5 ヒト CD14<sup>+</sup> 細胞

ヒト CD14<sup>+</sup> 細胞は Lonza から購入した。チューブ中に凍結されたヒト CD14<sup>+</sup> 細胞を解凍し、RPMI 1640 に 10% (v/v) の FBS、200 U/mL のペニシリン、200  $\mu$ g/mL のストレプトマイシン、

2 mmol/L の L-グルタミン (Thermo Fisher Scientific) および 50 ng/mL のヒト GM-CSF (PeproTech) を添加した培養液中で、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air で培養した (1 × 10<sup>5</sup> cells/150 μL/well、96 ウェルプレート)。培養から 5 日目と 6 日目に培地交換を行い、7 日目に GM-CSF を添加しない上記 CD14<sup>+</sup> 細胞用培地に各刺激薬を添加し、培養した。刺激剤添加から 24 時間後に培養上清を回収した。

## 2.2.6 ELISA によるサイトカイン測定

培養上清の各サイトカイン濃度は、いずれも R&D Systems から購入した ELISA キットを用いて測定した。

## 2.2.7 投与部位におけるサイトカインの遺伝子発現測定

8 週齢の C57BL/6 マウスの右鼠径部に Z-100 を 1 mg/kg、1 日 1 回、1 週間反復皮下投与した。1 週間後、マウスを頸椎脱臼により犠殺し、投与部位 (右側) の皮膚と反対側 (左側) の同じ部位の皮膚を採取した。皮膚サンプルから ReliaPrep<sup>TM</sup> RNA Tissue Miniprep System (Promega) を用いて、total RNA を調製した。調製した total RNA サンプル量およびその質は、各サンプルの 260 nm および 280 nm の吸光度で確認した。続いて、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies) を用い、total RNA を cDNA に変換した。メーカーによって設計されたグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH、ID: Mm9999915\_g1)、IL-12p40 (ID: Mm01288992\_m1)、TNF-α (ID: Mm00443258\_m1) 又は IL-1β (ID: Mm00434228\_m1) TaqMan プローブ/プライマーセット (Life Technologies) を cDNA に加えた後、Absolute qPCR ROX Mix (Thermo Fisher Scientific) を加え、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて polymerase chain reaction (PCR) を行った。データは GAPDH 遺伝子の発現量で補正し、ABI User Bulletin に従って比較 C<sub>T</sub> 法で算出した。

## 2.2.8 アニオン分画および非アニオン分画の調製

Z-100 を限外ろ過装置 (Amicon ultra 3KDa、Merck Millipore) に添加し、遠心分離した。フィルターの上の残渣を回収し、20 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加えた後、HiTrap QFF カラム (GE healthcare) に通し、フロースルーを非アニオン画分とした。1 mol/L 塩化ナトリウムに 20 mmol/L トリス塩酸緩衝液を加え、pH 8.0 とした溶出バッファーをこのカラムに添加し、溶出した液体をアニオン画分とした。Amicon ultra 3KDa を用いて、非アニオン画分およびアニオン画分の溶出バッファーを蒸留水 (大塚製薬) に置換した。

## 2.2.9 アミノ酸およびムラミン酸分析

アミノ酸の分析時には 200 μL のサンプルに 100 μL の 6 mol/L 塩酸を加え 110°C で 22 時間、加水分解を行った。アミノ糖およびムラミン酸の分析時には 400 μL のサンプルに 200 μL の 4 mol/L 塩酸を加え 100°C で 6 時間、加水分解を行った。中性糖の分析時には 20 μL のサンプルに 100 μL の 2 mol/L トリフルオロ酢酸を加え 100°C で 6 時間、加水分解を行った。加水分

解後の各サンプルの測定については、アミノ酸およびムラミン酸は高速アミノ酸分析計を用いて行った。アミノ糖および中性糖は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

PG フラグメントの分析は、Z-100 とアニオン画分を Amicon ultra 3KDa に添加し、遠心分離した。フィルターの上の残渣を回収し、5000 U のムタノリシン (Sigma Aldrich) で処理した (37°C で 16 時間)。その後、100°C で 5 分間加熱し、Amicon ultra 10KDa に添加してフロースルーを回収し、LC-MS/MS を用いて測定した。アニオン画分は 100 倍、Z-100 は 20 倍濃縮下で測定を行った。

#### 2.2.10 統計解析

多重比較においては最初に Bartlett 検定を行って等分散性を評価し、等分散であった場合には Dunnett の多重比較検定を、不等分散であった場合には Steel の多重比較検定を行った。

2 群の検定においては最初に F 検定を行って等分散性を評価し、等分散であった場合には Student の  $t$  検定を、不等分散であった場合には Aspin-Welch の  $t$  検定を行った。

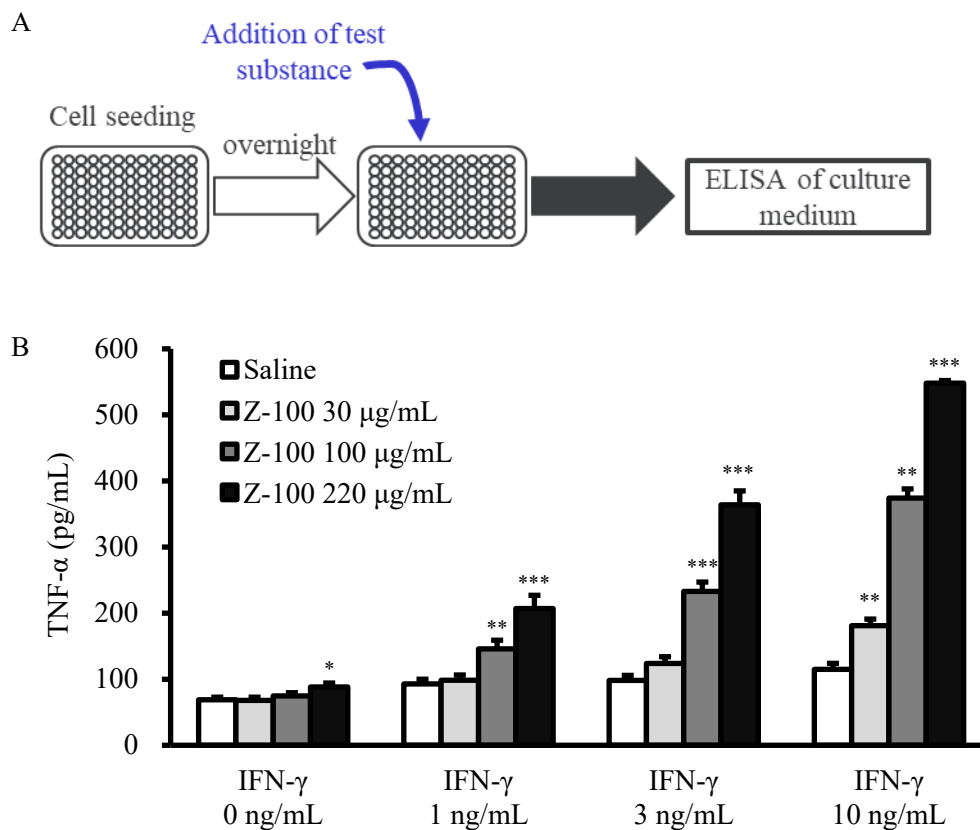
経時的な検討においては経時型分散分析で解析を行った。

統計学的検定の有意水準はいずれも 5% とした。

## 2.3 結果

### 2.3.1 Z-100 の RAW264.7 細胞における TNF- $\alpha$ 産生誘導

Z-100 のマクロファージへの作用を確認するため、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に Z-100 を曝露させ、その 16 時間後に培養上清を回収し、培養上清の TNF- $\alpha$  濃度を測定した。その結果、IFN- $\gamma$  の非存在下では Z-100 による TNF- $\alpha$  産生量は 220  $\mu\text{g/mL}$  Z-100 処置群でも Saline 処置群の約 1.3 倍であった。一方、1 ng/mL の IFN- $\gamma$  存在下では 220  $\mu\text{g/mL}$  Z-100 処置群での TNF- $\alpha$  産生量は Saline 処置群のそれの約 2.2 倍、3 ng/mL の IFN- $\gamma$  存在下では約 3.7 倍、10 ng/mL の IFN- $\gamma$  存在下では約 4.8 倍となった (Figure 13)。

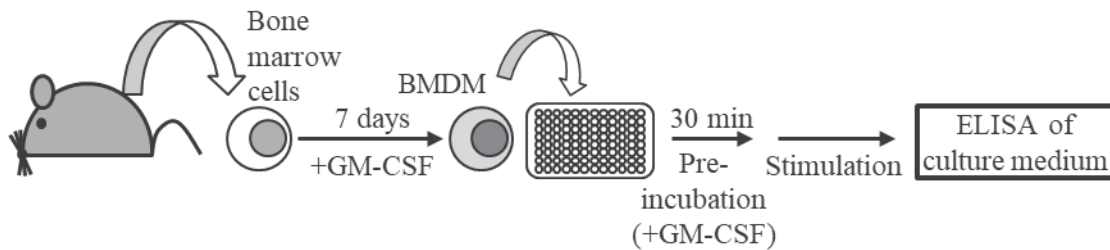


**Figure 13 TNF- $\alpha$  production from RAW264.7 following Z-100 stimulation**

(A) Schematic of experimental design. RAW264.7 cells treated with Z-100 (30, 100 and 220  $\mu\text{g/mL}$ ) and varying concentrations of IFN- $\gamma$  (1-10 ng/mL). Supernatants were collected 16 h later, and TNF- $\alpha$  levels were determined by ELISA. (B) TNF- $\alpha$  production from RAW264.7 cells. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n=6-9, pooled from 3 experiments), and significant differences are shown. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, and \*\*\* p < 0.001 (Dunnett's multiple comparison) vs. saline in each IFN- $\gamma$  concentration group. Results are representative of three independent experiments.

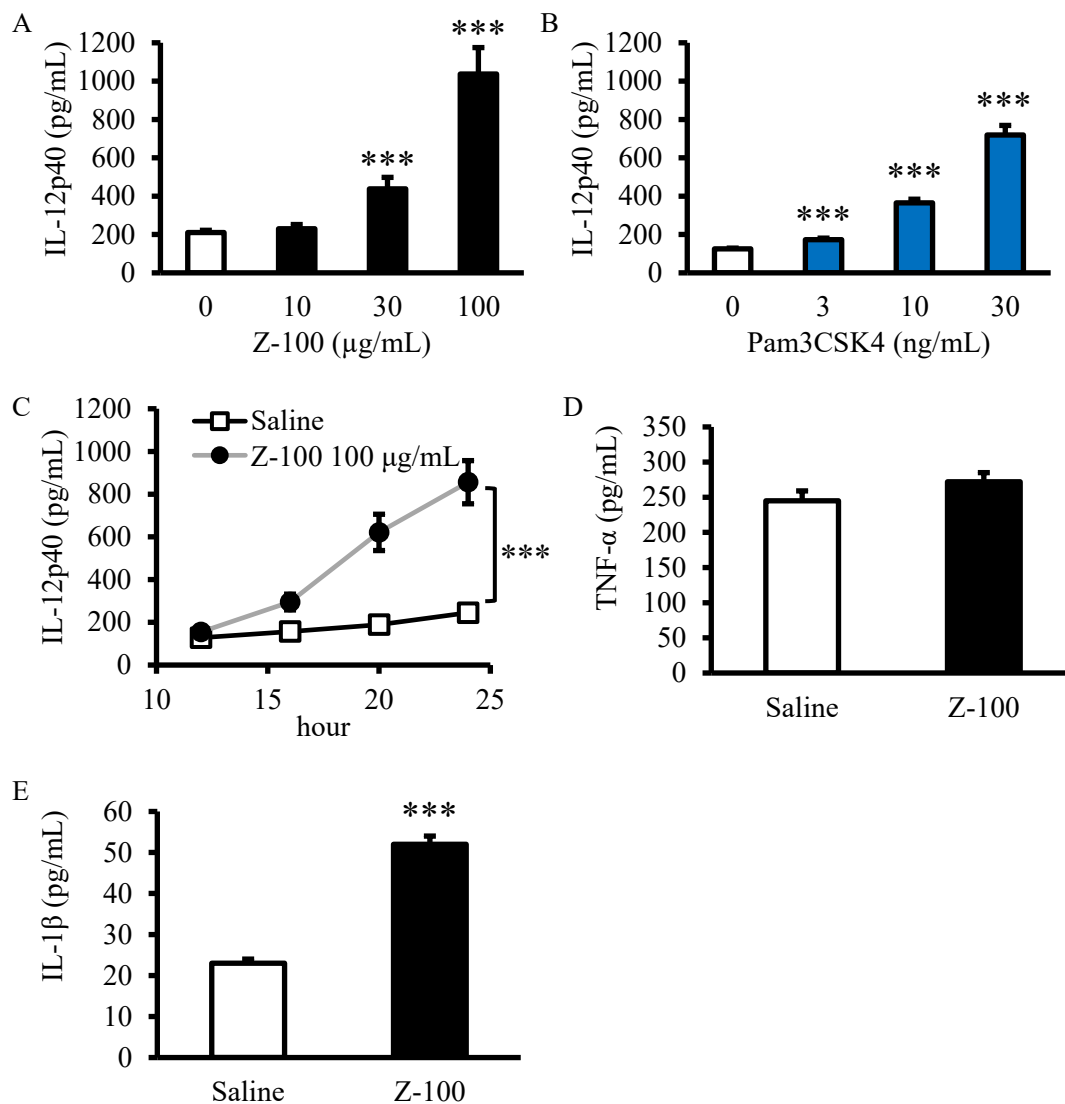
### 2.3.2 Z-100 の BMDM 細胞におけるサイトカイン産生誘導

次にマウス骨髄細胞を GM-CSF 存在下でマクロファージ様細胞に分化誘導し (BMDM)、Z-100 で曝露した時のサイトカイン産生を評価した (Figure 14)。Z-100 を 10、30 および 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で BMDM に暴露させ、24 時間後の培養上清中の IL-12p40 濃度を測定した。その結果、Z-100 濃度依存的に IL-12p40 産生能は上昇した (Figure 15A)。Figure 15B は、マクロファージの刺激薬として一般的に使用される Pam3CSK4 曝露から 24 時間後の IL-12p40 産生を示す。Z-100 と同様に、IL-12p40 産生が誘導された。Z-100 曝露から 12、16、20 および 24 時間後の培養上清中の IL-12p40 濃度を測定したところ、その 16 時間目以降で IL-12p40 の産生が誘導された (Figure 15C)。マクロファージから産生される代表的なサイトカインの TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  について、Z-100 曝露から 24 時間後の培養上清で測定した。TNF- $\alpha$  産生量は Z-100 曝露によって増減することはなかったものの (Figure 15D)、IL-1 $\beta$  は顕著な産生量の増大が観察された (Figure 15E)。



**Figure 14 The experimental design of BMDM assay**

Bone marrow cells were cultured with GM-CSF for 7 days before being seeded onto plates and pre-incubated for 30 minutes. After pre-incubation, stimulation was started.



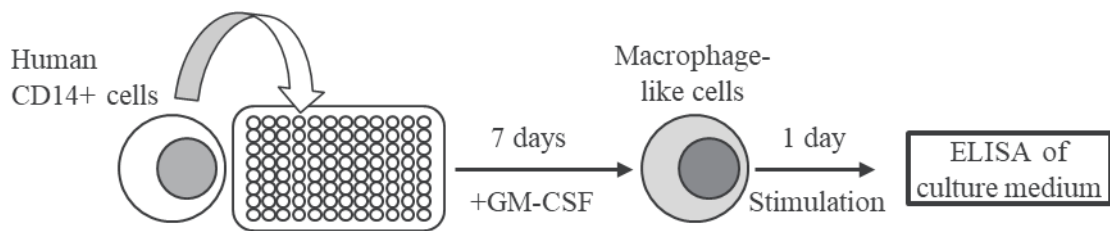
**Figure 15 Cytokine production from BMDM following Z-100 stimulation**

(A-B) IL-12p40 concentration in culture supernatant of BMDM after stimulation with Z-100 (A; 10, 30 or 100 µg/mL) or Pam3CSK4 (B; 3, 10 or 30 ng/mL) for 24 hours. Symbols indicate a significant difference compared with the 0 µg/mL (Saline) group; \*\*\* P<0.001 (Steel's multiple comparison). (C) Time course of IL-12p40 production induced by Z-100 (100 µg/mL). IL-12p40 concentrations in culture supernatants at 12, 16, 20 and 24 hours after stimulation were measured. Symbols indicate a significant difference compared with the Saline group; \*\*\* P<0.001 (Repeated measures ANOVA). (D-E) TNF- $\alpha$  (D) and IL-1 $\beta$  (E) concentration in the culture supernatant of BMDM after stimulation with Z-100 (100 µg/mL) for 24 hours. Symbols indicate a significant difference compared with the Saline group; \*\*\* P<0.001 (Student's *t*-test). Data show mean  $\pm$  S.E.; n = 12 per group, pooled from 3 experiments.



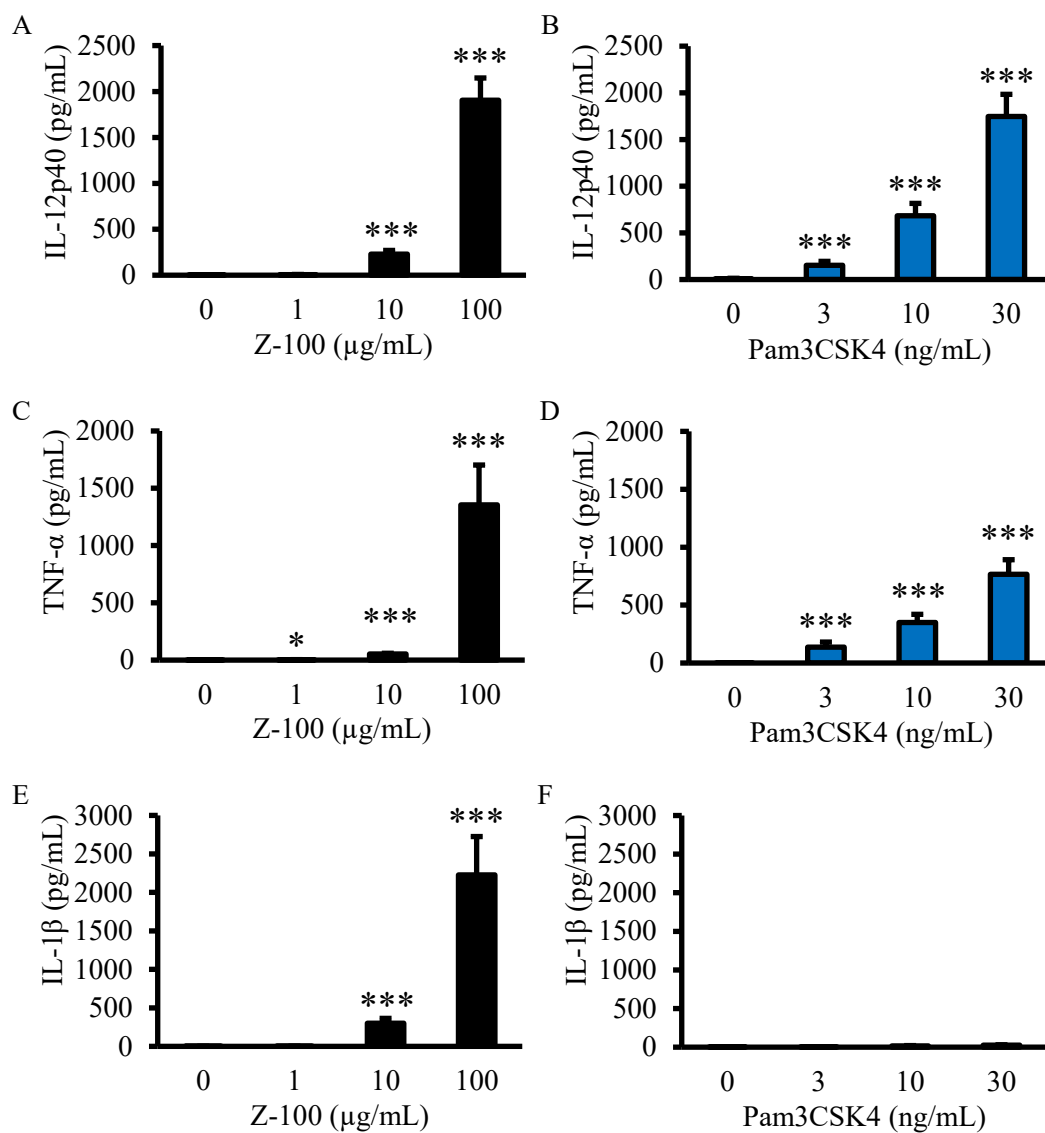
### 2.3.3 Z-100 のヒト CD14<sup>+</sup> 細胞におけるサイトカイン産生誘導

非臨床試験において、ヒト試料を用いて薬物への応答を検討することは、臨床での効果を予測する上で重要である。そこで、Z-100 のヒト CD14<sup>+</sup> 細胞でのサイトカイン応答について検討した。ヒト CD14<sup>+</sup> 細胞は GM-CSF 存在下でマクロファージ様細胞に分化する<sup>77, 78)</sup>。Figure 16 に示すように、CD14<sup>+</sup> 細胞を GM-CSF 存在下で 7 日間培養した後、被験物質に 24 時間曝露させ、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法で測定した。その結果、Figure 17A に示すように、Z-100 10 µg/mL 以上の濃度に曝露された時、CD14<sup>+</sup> 細胞の IL-12p40 産生量が増大した。マクロファージの刺激薬として一般的に用いられる Pam3CSK4 も Z-100 処置同様に IL-12p40 産生誘導が観察された (Figure 17B)。一方、マウス BMDM での結果とは対照的に、ヒト CD14<sup>+</sup> 細胞では TNF- $\alpha$  産生量も Z-100 処置後に増大した (Figure 17C)。さらに、Z-100 処置は IL-1 $\beta$  産生量も増大させ、その産生量はマウス BMDM でのそれ (約 50 pg/mL) の約 40 倍となった (Figure 17E)。Pam3CSK4 はヒト CD14<sup>+</sup> 細胞の TNF- $\alpha$  の産生量を増大させたが (Figure 17D)、IL-1 $\beta$  の誘導作用は全く観察されなかった (Figure 17F)。



**Figure 16** The experimental design of human CD14<sup>+</sup> cells assay

Human CD14<sup>+</sup> cells were cultured with GM-CSF for 7 days before being stimulated for 24 hours.

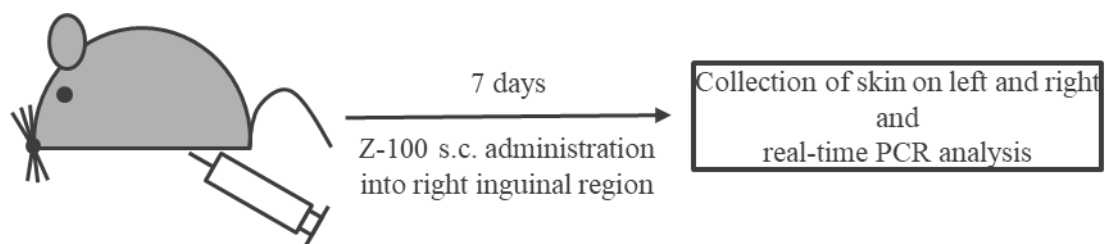


**Figure 17 Cytokine production from human CD14<sup>+</sup> cells after stimulation with Z-100**

Cytokine concentration in the culture supernatant of human CD14<sup>+</sup> cells after stimulation with Z-100 (A, C, E; 1, 10 or 100 μg/mL) or Pam3CSK4 (B, D; 3, 10 or 30 ng/mL). Symbols indicate a significant difference compared with the 0 μg/mL (Saline) group; \* P<0.05, \*\*\* P<0.001 (Steel's multiple comparison). Data show mean ± S.E.; n = 4-12 per group, pooled from 3 experiments.

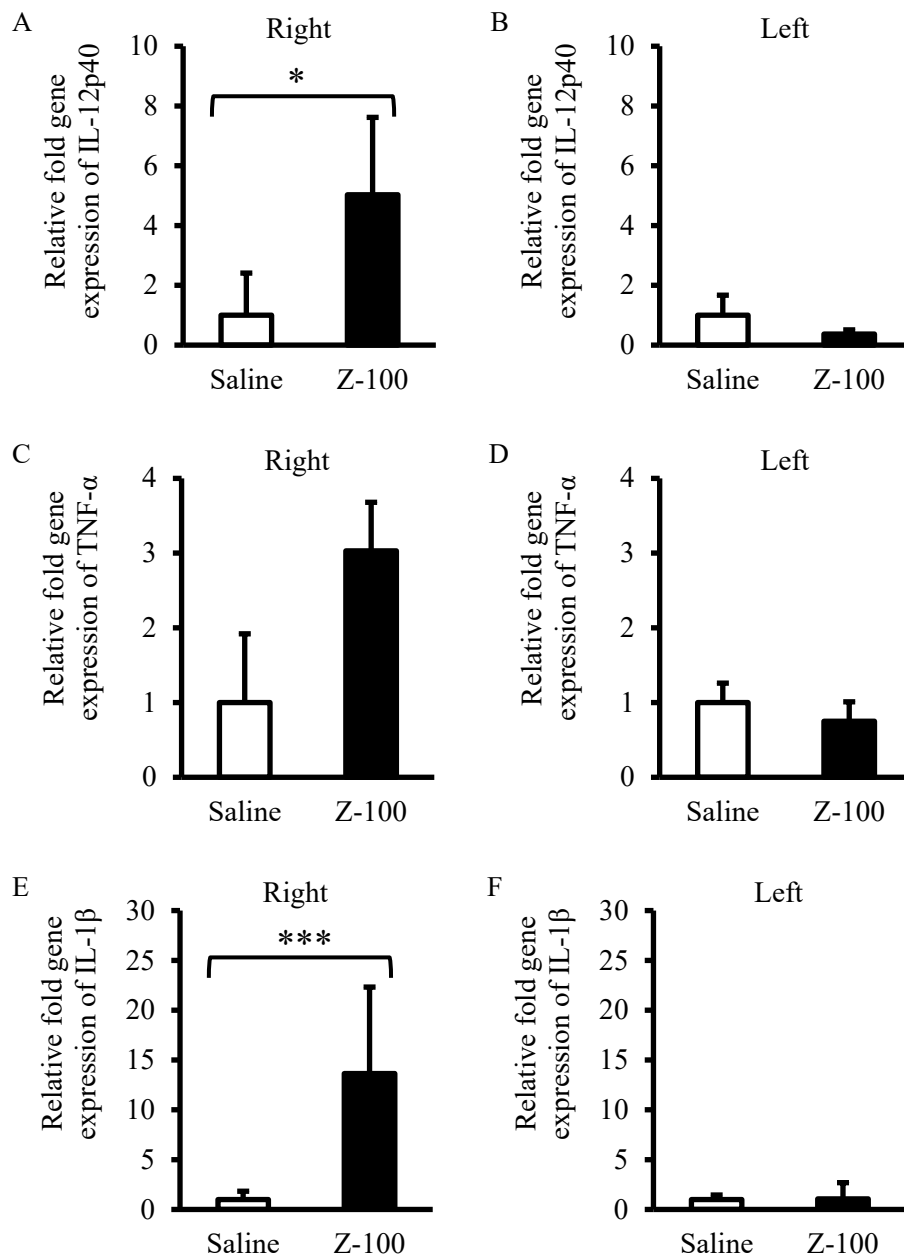
#### 2.3.4 Z-100 によるマウス皮膚サイトカイン増加作用

前節までの知見から、Z-100 がマウス BMDM およびヒト CD14<sup>+</sup> 細胞でサイトカインを直接誘導する作用を発揮することを示した。一方、臨床にて Z-100 は皮下投与で使用されていることから、Z-100 の皮下投与での反応を確認しなければならない。そこで、マウスの右鼠径部皮下に Z-100 を 1 回/日、1 週間、反復皮下投与し、左右鼠径部の皮膚を採取して、サイトカイン遺伝子は発現レベルを Real-time PCR 法で測定した (Figure 18)。その結果、IL-12p40 および IL-1 $\beta$  の皮膚での遺伝子発現は Z-100 の投与部位で生理食塩液の投与部位のそれよりも増加した (Figure 19A および Figure 19E)。さらに TNF- $\alpha$  の遺伝子発現でも、Z-100 投与群では上昇傾向にあった (Figure 19C)。その一方で、投与をしていない側 (左側) の皮膚組織ではいずれのサイトカインの発現量も増減は観察されなかった (Figure 19B、D および F)。



**Figure 18** The experimental design of cytokine expression *in vivo*

After administering Z-100 into the right inguinal region for 7 days, skin samples were collected from the left inguinal region and right inguinal region.

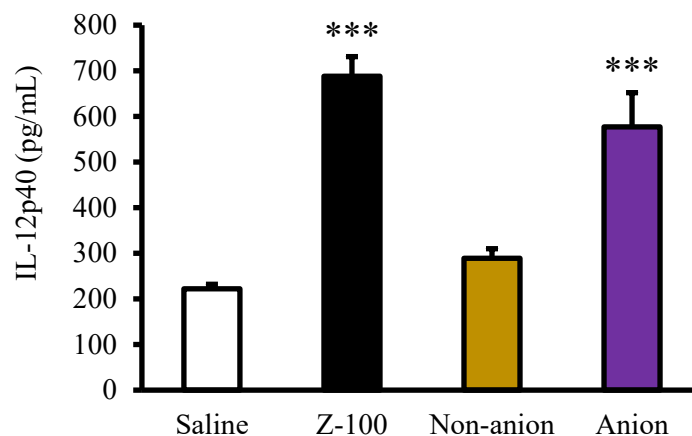


**Figure 19 Z-100-mediated increase in cytokine expression *in vivo***

Relative fold gene expression of IL-12p40 (A, B), TNF- $\alpha$  (C, D) or IL-1 $\beta$  (E, F) in skin samples from the left and right. Data show mean  $\pm$  range; n = 4-6 per group. The ranges were determined by evaluating the expression:  $2^{-\Delta\Delta CT}$  with  $\Delta\Delta CT + S.E.$  and  $\Delta\Delta CT - S.E.$ , where S.E. = the standard error of the mean of the  $\Delta\Delta CT$  value. TNF- $\alpha$  in skin samples from the right and IL-1 $\beta$  in skin samples from the left were analyzed using Aspin-Welch's *t*-test; all other analyses were performed using Student's *t*-test (\*  $P < 0.05$  and \*\*\*  $P < 0.001$  vs. Saline).

### 2.3.5 Z-100 中 PG 断片の同定

Z-100 中に含まれるサイトカイン産生に寄与する成分について検討した。過去の報告において Z-100 の主要成分は中性糖であることが明らかにされた<sup>24)</sup>。これら中性糖とその他の成分を分画するため、イオン交換カラム (HiTrap QFF column) を用いてアニオン性の画分と非アニオン性の画分に分画した。調製した画分で BMDM を曝露すると、アニオン画分に IL-12p40 産生の誘導作用が観察された。他方、非アニオン画分の方では IL-12p40 産生誘導作用は観察されなかった (Figure 20)。そこで、Z-100 およびこれらの画分に含まれているアミノ酸、アミノ糖および中性糖の成分分析を行った (Table 3)。その結果、Z-100 の主な成分は中性糖であり、アミノ酸の含有量は微量となったことは既報と一致していた。非アニオン画分では中性糖の含量が多くなり、アニオン画分ではアミノ酸含量が多くなっていた。興味深いことに、アニオン画分には PG の構成成分のグルタミン酸、アラニン、ジアミノピメリン酸、グルコサミンおよびムラミン酸含量が多くなっていた。この結果から Z-100 およびアニオン画分には PG 様物質が含まれている可能性が示されたため、さらに詳細な検討として Z-100 およびアニオン画分中の PG 断片を質量分析計で確認した。分析の前処理として Z-100 およびアニオン画分をムタノリシン (ムタノリシン) で酵素消化した。ムタノリシンは *N*-アセチルムラミン酸 (MurNAc) と *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の結合を切断し、単量体の PG 断片を生成する (Figure 21C)。酵素消化されたアニオン画分を LC-MS/MS で解析したところ、マスペクトル上 (Figure 21A) にて複数のピークが見られた。各番号で示したピークについては、それぞれ Table 4 で示した PG 断片と関連した。一方、ムタノリシンで酵素消化した Z-100 を LC-MS/MS で解析すると、多数の夾雑なピークが存在し、明確に分離されたピークを検出できなかった (Figure 21B)。

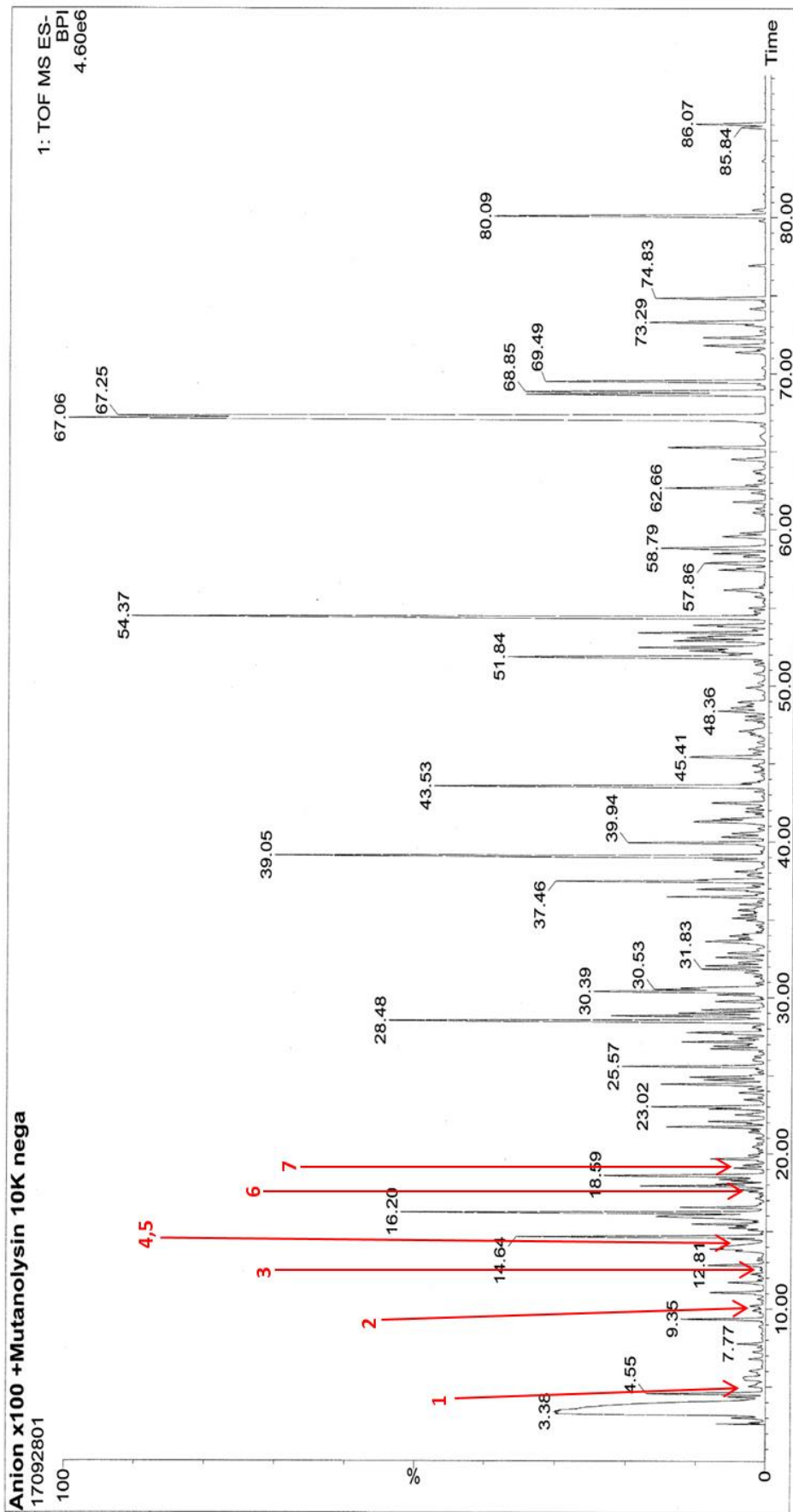


**Figure 20 IL-12p40 production from BMDM following Non-anion or Anion fraction stimulation**  
IL-12p40 concentration in the culture supernatant of BMDM after stimulation with Z-100 (100  $\mu$ g/mL), the non-anion fraction or anion fraction for 24 hours. Symbols indicate a significant difference compared with the Saline group; \*\*\*  $P < 0.001$  (Steel's multiple comparison). Data show mean  $\pm$  S.E.;  $n = 16$  per group, pooled from 4 experiments.

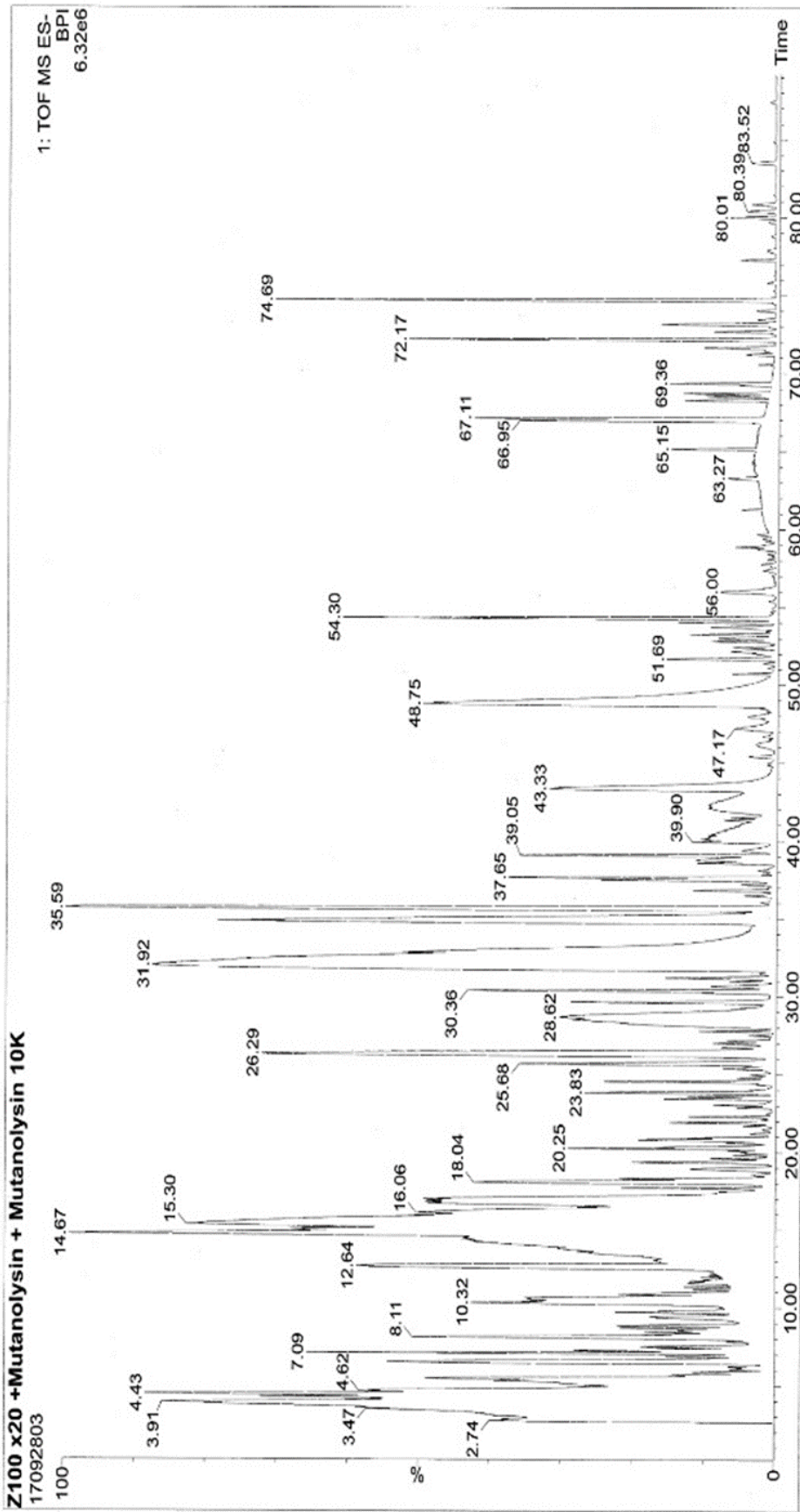
**Table 3 Concentration of amino acids, amino sugars and neutral sugars in Z-100, non-anion or anion fractions.**

	Concentration (nmol/mL)		
	Z-100	Non-anion	Anion
Aspartic acid	49.42	2.36	10.22
Threonine	51.91	7.68	10.13
Serine	32.98	3.53	6.32
Glutamic acid	88.86	8.06	29.58
Glycine	112.13	6.01	17.27
Alanine	122.91	12.94	39.34
Valine	37.04	3.03	7.76
Methionine	0.71	0.19	0.59
Isoleucine	13.85	0.93	3.02
Leucine	21.02	1.08	4.43
Tyrosine	6.55	0.42	1.95
Phenylalanine	4.19	0.18	0.69
Lysine	14.60	1.44	2.72
Histidine	8.05	0.28	2.23
Arginine	12.40	0.88	3.51
Proline	39.05	5.97	8.02
Diaminopimelic acid	38.33	5.39	18.33
Glucosamine	33.80	7.79	11.49
Galactosamine	18.22	13.44	<2.33
Muramic acid	10.69	1.22	7.09
Arabinose	2951.44	2304.34	101.25
Mannose	6014.23	4843.58	56.06
Glucose	1277.78	725.20	12.77
Galactose	364.02	237.57	37.19

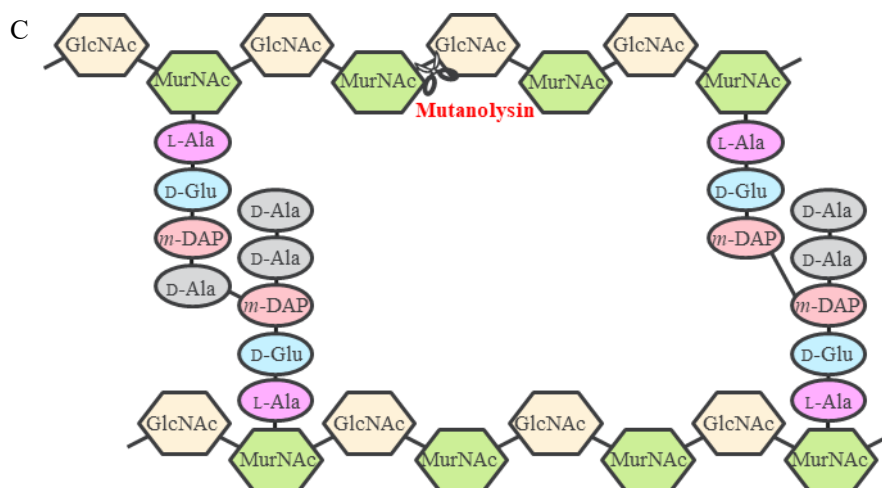
A



B







**Figure 21 LC-MS/MS analysis of the anion fraction and Z-100**

(A-B) LC-MS/MS analysis of the anion fraction (A) and Z-100 (B). The anion fraction was measured at 100-fold concentration and Z-100 was measured at 20-fold concentration. (C) General PG structure of *Mycobacterium tuberculosis* and digestion site of mutanolysin. Mutanolysin cleaves the bond between MurNAc and GlcNAc. GlcNAc: *N*-acetylglucosamine. MurNAc: *N*-acetylmuramic acid. L-Ala: L-alanine. D-Ala: D-alanine. D-Glu: D-glutamic acid. *m*-DAP: *meso*-diaminopimelic acid.

**Table 4 Predicted structures for peaks 1 to 7 (from Figure 21B)**

No.	PG fragment	Composition formula	$m/z$ [M-H] Calculated	$m/z$ [M-H] Observed
1	GlcNAc-MurNGlyc-Ala-Glu(NH <sub>2</sub> )-DAP(NH <sub>2</sub> )	C <sub>34</sub> H <sub>58</sub> N <sub>8</sub> O <sub>19</sub>	881.3818	881.3765
2	GlcNAc-MurNGlyc-Ala-Glu(NH <sub>2</sub> )-DAP(NH <sub>2</sub> )-Ala	C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>9</sub> O <sub>20</sub>	952.4189	952.4339
3	GlcNAc-MurNGlyc-Ala-Glu(NH <sub>2</sub> )-DAP(NH <sub>2</sub> )-Ala-Ala	C <sub>40</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>21</sub>	1023.4560	1023.4672
4	GlcNAc-MurNGlyc-Ala-Glu(NH <sub>2</sub> )	C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>17</sub>	710.2810	710.2682
5	GlcNAc-MurNGlyc(Anhydro)-Ala-Glu(NH <sub>2</sub> )-DAP(NH <sub>2</sub> )	C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> N <sub>8</sub> O <sub>18</sub>	863.3713	863.3717
6	GlcNAc-MurNGlyc(Anhydro)-Ala-Glu(NH <sub>2</sub> )-DAP(NH <sub>2</sub> )-Ala	C <sub>37</sub> H <sub>61</sub> N <sub>9</sub> O <sub>19</sub>	934.4084	934.4144
7	GlcNAc-MurNGlyc(Anhydro)-Ala-Glu(NH <sub>2</sub> )-DAP(NH <sub>2</sub> )-Ala-Ala	C <sub>40</sub> H <sub>66</sub> N <sub>10</sub> O <sub>20</sub>	1005.4455	1005.4597

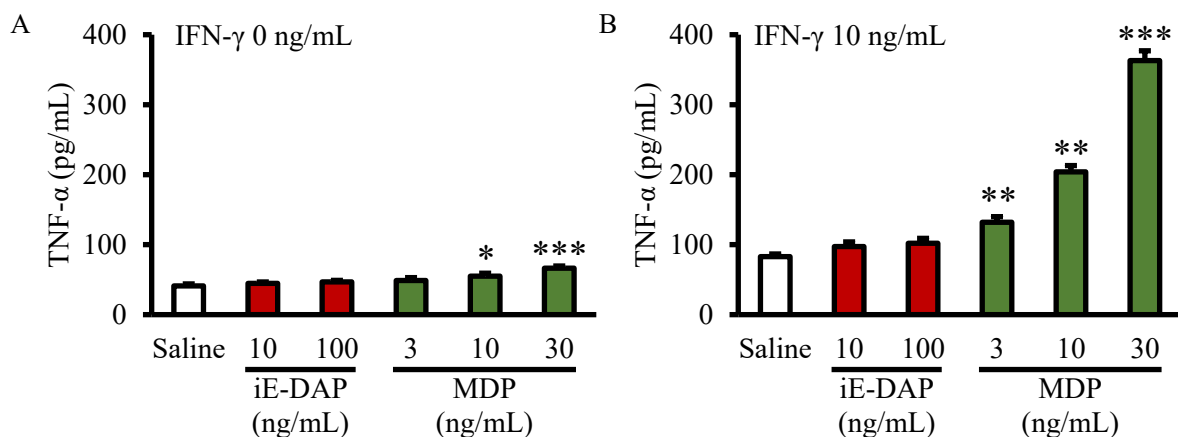
GlcNAc: *N*-acetylglucosamine. MurNGlyc: *N*-glycolylmuramic acid. Ala: Alanine. Glu: Glutamic acid. DAP: Diaminopimelic acid.

### 2.3.6 PG および MDP のサイトカイン産生誘導作用

前節では、Z-100 中に PG 様物質が含まれていることを示した。そこで、PG 又は PG の最小活性構造として知られる MDP<sup>79)</sup> のサイトカイン産生誘導能に及ぼす効果について検討した (Figure 22)。

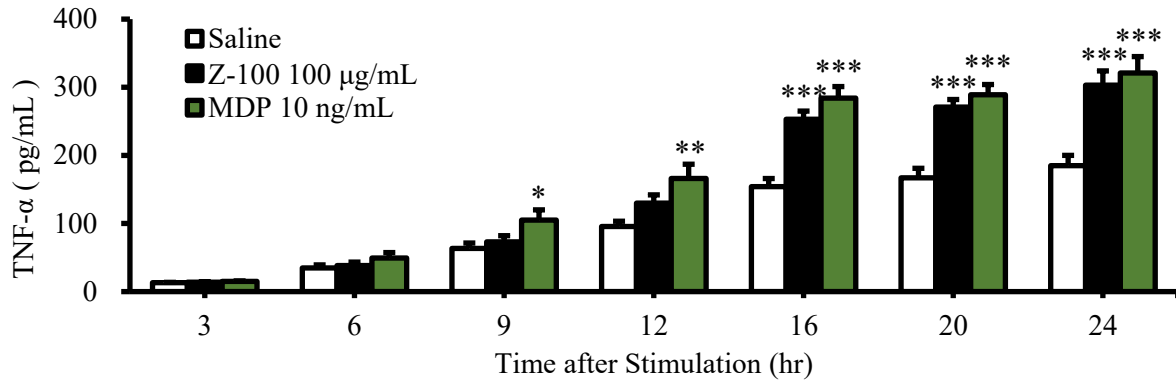
RAW264.7 を MDP で曝露したところ、Z-100 同様に IFN- $\gamma$  非存在下では TNF- $\alpha$  産生誘導作用は非常に小さく (Figure 22A)、その一方で、IFN- $\gamma$  存在下では顕著な産生誘導が観察された (Figure 22B)。PG に含まれるもう一つの活性構造である iE-DAP<sup>80)</sup> を RAW264.7 に曝露させたところ、IFN- $\gamma$  存在下でも TNF- $\alpha$  産生は誘導されなかった (Figure 22B)。

さらに Z-100 あるいは MDP の曝露後 3、6、9、12、16、20 および 24 時間目の培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度を測定した。その結果、Z-100 および MDP はいずれの時間でも TNF- $\alpha$  産生能の増幅が観察された (Figure 23)。BMDM に対しては MDP および PG で曝露することで Z-100 同様に IL-12p40 産生誘導が認められた (Figure 24A)。また、ヒト CD14<sup>+</sup> 細胞に対しても MDP 添加によって濃度依存的に IL-12p40 産生誘導が認められた (Figure 24B)。



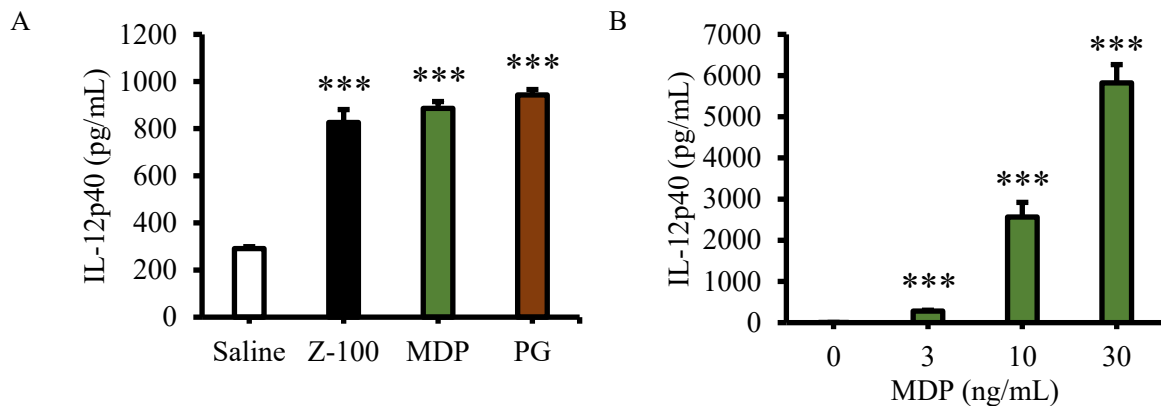
**Figure 22** TNF- $\alpha$  production from RAW264.7 following iE-DAP or MDP stimulation

RAW264.7 cells stimulated with iE-DAP (10, 100 ng/mL) or MDP (3, 10, 30 ng/mL) in the absence (A) or presence of IFN- $\gamma$  (10 ng/mL, B) for 16 h. Supernatants were collected 16 h later, and TNF- $\alpha$  concentrations were measured. Data are expressed as mean $\pm$ S.E. (n=9), and significant differences are shown. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, and \*\*\* p < 0.001 (Dunnett's multiple comparison) vs. saline. Results are representative of three independent experiments.



**Figure 23 Time course of TNF- $\alpha$  production induced by Z-100 or MDP**

RAW264.7 cells stimulated with Z-100 (100  $\mu\text{g/mL}$ ) or MDP (10  $\text{ng/mL}$ ) in the presence of IFN- $\gamma$  (10  $\text{ng/mL}$ ). Supernatants were collected 3, 6, 9, 12, 16, 20 and 24 h later, and TNF- $\alpha$  concentrations were measured. Data are expressed as mean $\pm$ S.E. (n=9), and significant differences are shown. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, and \*\*\* p < 0.001 (Dunnett's multiple comparison) vs. saline at each time point. Results are representative of three independent experiments.



**Figure 24 IL-12p40 production after stimulation with MDP and PG**

(A) IL-12p40 concentration in the culture supernatant of BMDM after stimulation with Z-100 (100  $\mu\text{g/mL}$ ), MDP (100  $\text{ng/mL}$ ) or PG (2  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 hours. Data show mean  $\pm$  S.E.; n = 16 per group, pooled from 4 experiments. (B) IL-12p40 concentration in the culture supernatant of human CD14<sup>+</sup> cells after stimulation with MDP (3, 10 or 30  $\text{ng/mL}$ ). Data show mean  $\pm$  S.E.; n = 10-12 per group, pooled from 3 experiments. Symbols indicate a significant difference compared with the Saline or 0  $\text{ng/mL}$  group; \*\*\* P < 0.001 (Steel's multiple comparison).

## 2.4 考察

本章では、RAW264.7、BMDM およびヒト CD14<sup>+</sup> 細胞から分化誘導されたマクロファージを Z-100 で曝露した後の TNF- $\alpha$ 、IL-12p40 および IL-1 $\beta$  産生を追跡した (Figure 13、Figure 15 および Figure 17)。Z-100 は皮下投与後にこれらサイトカイン遺伝子の発現量を増加させ (Figure 19)、*in vivo* 実験条件下でも Z-100 はサイトカイン発現を誘導することが示された。

TNF- $\alpha$  は主に単球およびマクロファージで産生される炎症性サイトカインで、細胞増殖、細胞分化、細胞生存および細胞死に関与する<sup>81)</sup>。RAW264.7 細胞では IFN- $\gamma$  存在下では Z-100 による TNF- $\alpha$  産生が促進されたものの、Z-100 単独では TNF- $\alpha$  産生の促進は軽微であった (Figure 13)。BMDM では Z-100 による TNF- $\alpha$  産生の誘導は認められなかった (Figure 15)。IFN- $\gamma$  は STAT1 活性化を介し、抗腫瘍効果に寄与する M1 マクロファージへの極性を誘導する<sup>82)</sup>。その結果、IFN- $\gamma$  によってマクロファージの LPS、CpG-DNA あるいは MDP など様々な曝露に対する応答を増強させることが報告されている<sup>83)</sup>。本章の結果から、Z-100 のマウスマクロファージでの TNF- $\alpha$  産生誘導には IFN- $\gamma$  との共刺激など、特定の条件が必要となることが示された。

IL-12 は、IL-12p40 と IL-12p35 のヘテロダイマーで構成されている。マクロファージなどの抗原提示細胞で産生される IL-12 は、T 細胞および NK 細胞での IFN- $\gamma$  産生を誘導し、免疫系を活性化させる。IL-12p40 は、IL-12p19 とともにヘテロダイマーを形成し、さらに他のパートナーとも複合体を形成する<sup>84)</sup>。Oka et al. は IL-12p40 KO マウスでは Z-100 の肺転移抑制効果が消失することを報告した<sup>27)</sup>。この論文では BCG を投与されたマウスから採取した腹腔マクロファージに Z-100 を曝露することで IL-12 産生能が増強されることも報告された。しかしながら、この腹腔マクロファージはマウスに BCG を投与した後に採取したものであり、結核菌の熱水抽出物の Z-100 には BCG と同一の成分が含まれている可能性が高い。つまり BCG に対しての「ブースター」様の作用により、BCG の効果が増強された結果に過ぎないことが懸念される。Z-100 のみの作用機序を解析するには、BCG 投与を含まない実験系が必要である。近年の研究では、BMDM は腹腔マクロファージよりも免疫学的応答性が高いことが報告されている<sup>85)</sup>。そこで、本研究では BCG 投与をしていないマウスの BMDM を用い、その IL-12p40 産生量を測定した。本研究では BCG 投与がない状態でも、Z-100 曝露によって BMDM での IL-12p40 産生の誘導を検出することができた (Figure 15)。さらに、ヒト CD14<sup>+</sup> 細胞からの IL-12p40 産生も Z-100 曝露によって誘導されたため (Figure 17)、ヒト CD14<sup>+</sup> 細胞を用いた系も BMDM の系同様に高感度に Z-100 に応答する系であることを示すことができた。

強力な炎症誘導性のサイトカインの IL-1 $\beta$  は、主に単球およびマクロファージで産生される<sup>86)</sup>。Z-100 による IL-1 $\beta$  産生誘導は、本研究で初めての報告となった (Figure 15E および Figure 17E)。なお、マウス BMDM とヒト CD14<sup>+</sup> 細胞ではその産生増加の度合いに大きな差があったため、高いレベルの産生誘導には TNF- $\alpha$  同様に特定の条件が必要になると推察された。

TNF- $\alpha$ 、IL-12 および IL-1 $\beta$  は、M1 マクロファージから産生される<sup>74)</sup>。さらに、IFN- $\gamma$  によるマクロファージの刺激は M1 マクロファージへの極性に寄与するので、Z-100 は M1 マクロファージに作用してサイトカイン産生を誘導すると考えられた。そのため、Z-100 が TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の産生を増大させる条件として「M1 マクロファージへの極性化」の可能性が示され

た。M1 マクロファージは、抗腫瘍効果に寄与すると考えられているので、M1 マクロファージの活性化を介して、Z-100 が抗腫瘍効果を発揮していることが示唆された。

Z-100 の組成分析では、arabinose、mannose および glucose といった中性糖が主成分として検出された (Table 3)。これは、以前行われた Z-100 の組成分析の結果と一致した<sup>24)</sup>。Z-100 による IL-12p40 産生誘導作用はアニオン画分の方で示され (Figure 20)、このアニオン画分の組成分析を行ったところ、PG の構成成分のグルタミン酸、アラニン、ジアミノピメリン酸、グルコサミンおよびムラミン酸が検出された (Table 3)。さらにムタノリシンで酵素消化すると PG 断片が検出されたため (Figure 21 および Table 4)、アニオン画分には PG が含まれていることを明らかにした。市販品の PG および MDP でも Z-100 と同様のサイトカイン産生誘導作用を示したことから (Figure 22、Figure 23 および Figure 24)、サイトカイン産生誘導作用における Z-100 の活性成分は中性糖ではなく、PG 様物質であることが示された。

## 第3章 Z-100 の受容体探索

### 3.1. 緒言

第2章では Z-100 のサイトカイン産生誘導作用を指標にその活性成分を検討した。その結果、Z-100 に含まれる PG 様物質が、サイトカイン産生誘導作用を発揮していることを見出した。そこで本章では、このサイトカイン産生誘導の機序について解析するため、Z-100 が作用する受容体について検討した。

Table 3 に示すように、Z-100 の組成成分は中性糖が主となる。この中性糖由来の多糖として、 $\alpha$ -mannan、 $\beta$ -glucan、lipomannan および lipoarabinomannan を含む細菌由来の成分は免疫賦活作用を発揮することが知られる<sup>87, 88)</sup>。これらの多糖は、dectin-1、dectin-2、mannose receptor、mincle、SIGNR3 および DC-SIGN などの C 型レクチン受容体を介して作用を示す<sup>88)</sup>。

一方、Toll like receptor (TLR) および Nod like receptor (NLR) 等のパターン認識受容体 (PRR) は、細菌および PAMPs を認識する自然免疫系受容体である<sup>70, 89, 90)</sup>。TLR のサブタイプごとに認識される PAMPs は異なっており、TLR3 はウイルスの二本鎖 RNA、TLR4 は LPS、TLR5 は flagellin、TLR9 は細菌とウイルスの CpG DNA を認識する<sup>91-94)</sup>。これらの受容体はリガンドによる刺激を受けると、炎症性サイトカイン、ケモカインおよび I 型インターフェロンを誘導する個別のシグナル伝達経路を活性化する。

NLR ファミリーの一員である nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 (NOD1) は、N 末端の 1 つの caspase recruitment domain (CARD)、中央の nucleotide oligomerization domain (NOD) および C 末端の leucine-rich repeat (LRR) から構成される核内受容体である。NOD2 は、N 末端の CARD を 2 つ持つ細胞内受容体である。NOD1 のリガンドとして iE-DAP、NOD2 のリガンドとして MDP が知られており<sup>79, 80)</sup>、いずれもリガンドを認識すると receptor interacting protein 2 (RIP2) を介して下流の NF- $\kappa$ B および p38 MAPK シグナル伝達経路を活性化する<sup>95-97)</sup>。

これら C 型レクチン受容体、PRR および NLR の刺激は自然免疫を活性化することでがんへの抑制効果を示すと考えられている。C 型レクチン受容体は dectin-1 を介してメラノーマ、神経膠腫、リンパ腫、卵巣がん、乳がん、肺がんおよび胃がんへの抑制効果を示すことが示唆されており、他方、dectin-2 を介して肝転移への抑制効果も示すことが報告されている<sup>98)</sup>。その一方で、mincle は膵管腺がんの発生に寄与することが示唆されている<sup>98)</sup>。TLR では、TLR2、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8 および TLR9 のアゴニストの種々のがんへの臨床効果について検討されている<sup>99)</sup>。これらは単独での治療効果よりも、むしろ化学療法、ペプチドワクチン、抗体療法および放射線療法との併用試験が広く実施されている<sup>30, 99)</sup>。NLR について、NOD1 のアゴニストはマウス担癌モデルに抗腫瘍効果を示すことおよびメラノーマの肺転移モデルで転移抑制作用を示すことが報告されている<sup>100)</sup>。NOD2 は欧州において、そのアゴニストである mifamurtide が骨肉腫への治療に使用されている<sup>100)</sup>。これらを勘案すると、Z-100 がこれらの受容体に作用するならば、第1章で示したリンパ行性転移抑制作用などのがんに対する抑制作用を示すことが期待される。

以上のことから、主成分が菌体由来の多糖体であり、それらが免疫賦活物質を発揮していると仮定すると、TLR が Z-100 の作用を担う候補として挙げられる。しかしながら、第2章では、Z-

100 中には PG 様物質も含まれており、Z-100 は PG と同様のサイトカイン産生誘導作用を發揮することも示された。PG は NOD1 および NOD2 を介して免疫賦活作用を示し、それぞれの特異的なリガンドとして MDP および iE-DAP が知られている<sup>79-80)</sup>。第 2 章では NOD2 のリガンドである MDP が Z-100 と同様のサイトカイン産生誘導作用を示す一方で、NOD1 のリガンドである iE-DAP 様の作用を示さないことを見出した。そこで、本章では Z-100 の NOD2 への作用について検討した。

## 3.2. 実験方法

### 3.2.1 分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) レポーターアッセイ

HEK-Blue NOD2 細胞 (InvivoGen) は 37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air 下で DMEM (Life Technologies) に 10% (v/v) の FBS (Hyclone Laboratories)、1% (v/v) のペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (Life Technologies)、100 µg/mL の normocin、30 µg/mL の blasticidin および 100 µg/mL の zeocin (いずれも InvivoGen) を添加した培養液中で培養した。HEK-Blue-NOD2 細胞を BD BioCoat Collagen I Cellware 96-well plate (Corning) に  $8.0 \times 10^4$  cells/well で播種した。一晩培養後、Z-100、MDP、iE-DAP、LPS 又は Pam3CSK4 に 32 時間曝露させた。曝露された HEK-Blue NOD2 細胞の各培養上清を 20 µL 採取し、180 µL の QUANTI-BLUE (InvivoGen) 溶液と 37°C、2 時間インキュベートした。2 時間後マイクロプレートリーダーを用いて 650 nm の吸光度を測定した。

### 3.2.2 RAW264.7 細胞における *Nod2* 遺伝子の knockdown

基本的な RAW264.7 細胞の培養法は第 2 章の 2.2.2 項で示した通りに行った。*Nod2* の siRNA のトランスフェクションのため、RAW264.7 細胞を 96 ウェルプレートに  $4.0 \times 10^4$  cells/well で播種した。一晩培養後、マウス *Nod2* 遺伝子の GeneSolution siRNA (QIAGEN) あるいは AllStars Negative Control siRNA (QIAGEN) を INTERFERin transfection reagent (Polyplus Transfection) を使用して細胞にトランスフェクションした。使用した *Nod2* 特異的 siRNA の配列は *Nod2* siRNA#1: CAGGATGTTCTAGATTATAA および *Nod2* siRNA#2: ATGGTTGTCTTGTTGTAA であった。RAW264.7 細胞をそれぞれ 10 nmol/L の siRNA で 6 時間トランスフェクションし、トランスフェクション後、培地交換して 3 時間培養した後に、IFN- $\gamma$  存在下あるいは非存在下で Z-100 および MDP に 16 時間曝露した。培養後上清を採取して buffer RLT (QIAGEN) で細胞を溶解し、測定時まで -80°C にて凍結保存した。上清の TNF- $\alpha$  濃度は、第 2 章の 2.2.6 項に準じて ELISA で測定し、細胞の *Nod2* 遺伝子発現量を定量的 Real-time PCR 法および NOD2 タンパクはウエスタンブロットティング法で測定した。

### 3.2.3 ヒト CD14<sup>+</sup> 細胞における *NOD2* 遺伝子の knockdown

基本的なヒト CD14<sup>+</sup> 細胞の培養法は第 2 章の 2.2.5 項に示した通りに行い、培養開始後 5 日目に培地を交換し、6 日目にトリプシン EDTA (Sigma Aldrich) を使用して細胞を回収した。RPMI 1640 に 5% (v/v) の FBS、200 U/mL のペニシリン、200 µg/mL のストレプトマイシンおよび 2 mmol/L の L-グルタミンを添加した培養液で細胞を再懸濁し、CytoPathfinder 製の siRNA カスタムプレートに播種した ( $6 \times 10^4$  cells/100 µL/well)。siRNA カスタムプレートの作製に、用いた siRNA (*NOD2* siRNA#1: CTGCCACATGCAAGAAGTATA、*NOD2* siRNA#2: TTGCGCGATAACAATCTCA) は QIAGEN から購入した。siRNA カスタムプレートに播種してから 2 日後に各種刺激物質を曝露させ、24 時間培養後の上清を回収した。上清の IL-12p40 濃度は、第 2 章の 2.2.6 項に準じて ELISA で測定し、細胞の *NOD2* 遺伝子発現は定量的 Real-time PCR 法で評価した。



### 3.2.4 各細胞の定量的 Real-time PCR 法

RNeasy Mini kit (QIAGEN) を使用し、細胞溶解物から total RNA を調製した。調製した total RNA サンプルの量および質は、各サンプルの 260 nm および 280 nm の吸光度を測定することで確認した。High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies) を用いて、total RNA を cDNA に変換した。mouse GAPDH、mouse Nod2 (ID: Mm00467543 m1)、 Human PPIA (Cyclophilin A) Endogenous Control および human NOD2 (ID: Hs00223394 m1) の TaqMan プローブ/プライマーセット (Life Technologies) を作製し、cDNA に加えた後、Absolute qPCR ROX Mix を加え、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて PCR を行った。RAW264.7 細胞の PCR データは GAPDH 遺伝子の発現量で、CD14<sup>+</sup> 細胞の PCR データは Cyclophilin A 遺伝子の発現量で補正して算出した。

### 3.2.5 ウェスタンブロッティング用試薬の調製

細胞溶解液は蒸留水 (大塚製薬) に 1/10 量の lysis buffer 10 × (Cell Signaling Technology) および 1/100 量の protease inhibitor cocktail 100 × (Cell Signaling Technology) を添加して混和することで調製した。Tris buffered saline with Tween 20 (TBST) は蒸留水に 1/10 量の 10 × トリス緩衝生理的食塩水 (Bio-Rad) および 1/200 量の 10% Tween20 solution (Bio-Rad) を添加して混和することで調製した。5% (w/v) blocking buffer は TBST に 5% (w/v) となるように ECL prime blocking reagent (Cytiva) を加えて溶解させることで調製した。1% (w/v) blocking buffer は TBST に 1/5 量の 5% (w/v) blocking buffer を添加することで調製した。Anti-Nod2 buffer は 1% (w/v) blocking buffer に 1/1000 量の Nod2 monoclonal antibody (Thermo Fisher Scientific) を添加して混和することで調製した。Anti-alpha-tubulin buffer は 1% (w/v) blocking buffer に 1/4000 量の monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin antibody produced in mouse (Sigma Aldrich) を添加することで調製した。ラット 2 次抗体溶液は 1% (w/v) blocking buffer に 1/1000 量の Rat IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody (R&D Systems) と混和することで調製した。マウス 2 次抗体溶液は 1% (w/v) blocking buffer に 1/1000 量の anti-mouse IgG, HRP-linked whole Ab sheep (Cytiva) を添加することで調製した。

### 3.2.6 ウェスタンブロッティング

細胞を細胞溶解液で溶解し、18 ウェル分の細胞溶解液をまとめてチューブに回収した後、氷上で 10 分間インキュベートした。10,000 × g、4°C で 10 分間遠心分離後、得られた上清を回収し、BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク定量を行った。上清を還元条件下で煮沸することでタンパク質を変性させた後、タンパク質量として 10  $\mu$ g をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ゲル中に分離されたタンパク質をポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレン (Bio-Rad Laboratories) に転写した。転写後このメンブレンを 5% (w/v) blocking buffer 中で室温にて 30 分間インキュベートした。その後メンブレンを TBST で 5 分間、1 回洗浄し、anti-Nod2 buffer あるいは anti-alpha-tubulin buffer 中にて 4°C で一晩インキュベーションを行った。それぞれのメンブレンを TBST で 3 回洗浄後、anti-NOD2 buffer で処理したメンブレンにはラット 2 次抗体溶液に、anti-alpha-tubulin buffer で処理したメンブレンにはマウス 2 次抗体溶液に入

れ、室温で 1 時間インキュベートした。TBST で 3 回洗浄した後、ECL prime western blotting detection reagent (Cytiva) を用いて目的とするタンパク質バンドを発光させ、Hyperfilm ECL (Cytiva) を用いて検出した。

### 3.2.7 イメージングサイトメータによる細胞染色

RAW264.7 細胞を 96 ウェルプレートに  $2.0 \times 10^4$  cells/well で播種した。37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air 下で一晩培養後、10 ng/mL の IFN- $\gamma$  存在下で Z-100 (220  $\mu$ g/mL) あるいは MDP (10 ng/mL) に 3、9、13、16 時間曝露させた。曝露後、4% パラホルムアルデヒド (Electron Microscopy Sciences) を含んだ phosphate-buffered saline で 10 分間室温にて細胞を固定した。Cellomics Buffer Kit #2 (1  $\times$  permeabilization buffer、1  $\times$  blocking buffer、1/10  $\times$  blocking buffer および Hoechst Dye を含む) (Thermo Scientific) を用い、細胞の膜透過化、ブロッキングおよび染色を行った。細胞は 1  $\times$  permeabilization buffer で室温にて 10 分間処理した後に、1  $\times$  blocking buffer で室温にて 30 分間処理し、その後 1/10  $\times$  blocking buffer で 250 倍希釈したウサギ抗 NF- $\kappa$ B p65 ポリクローナル抗体 (Thermo Scientific) にて室温で 1 時間反応させた。1 時間後、1/10  $\times$  blocking buffer で 2000 倍希釈した Hoechst Dye 又は 1/10  $\times$  blocking buffer で 500 倍希釈した Dylight 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG2 次抗体 (Thermo Scientific) にて室温で 1 時間反応させた。1 時間後、IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare) にて、 $\times 20$  対物レンズ用いて画像を取得した。Hoechst dye に対しては 390 nm の励起フィルターおよび 435 nm の蛍光フィルターを使用した。Dylight 488 に対しては 475 nm の励起フィルターおよび 511 nm の蛍光フィルターを使用した。NF- $\kappa$ B p65 核移行は IN Cell Developer Toolbox (GE Healthcare) を用いて、Hoechst Dye で染色された領域を各細胞の核の位置情報として規定し、Dylight 488 で染色された領域を細胞全体の領域として規定して解析した。画像データから得られた、核の蛍光強度と細胞質の蛍光強度の比を求めた。NF- $\kappa$ B が核内に移行した細胞は以下の様に定義した。

核領域の単位面積当たりの Dylight 488 の蛍光強度

/細胞質領域の単位面積当たりの Dylight 488 の蛍光強度 >1

各ウェルについて、全細胞数に対して NF- $\kappa$ B が核内に移行した細胞数の割合を算出した。

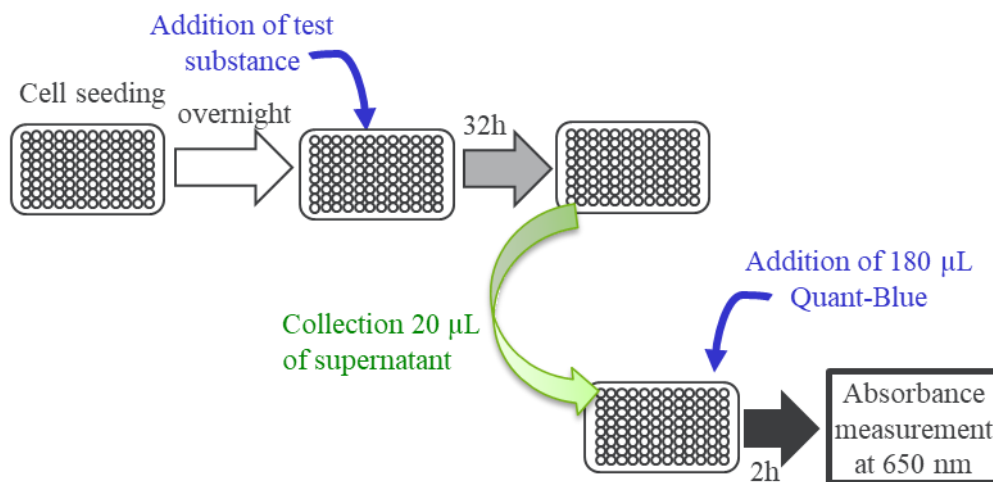
### 3.2.8 統計解析

多重比較においては最初に Bartlett 検定を行って等分散性を評価し、等分散であった場合には Dunnett の多重比較検定を、不等分散であった場合には Steel の多重比較検定を行った。

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. Z-100 による Nod2 を介した下流シグナルの活性化

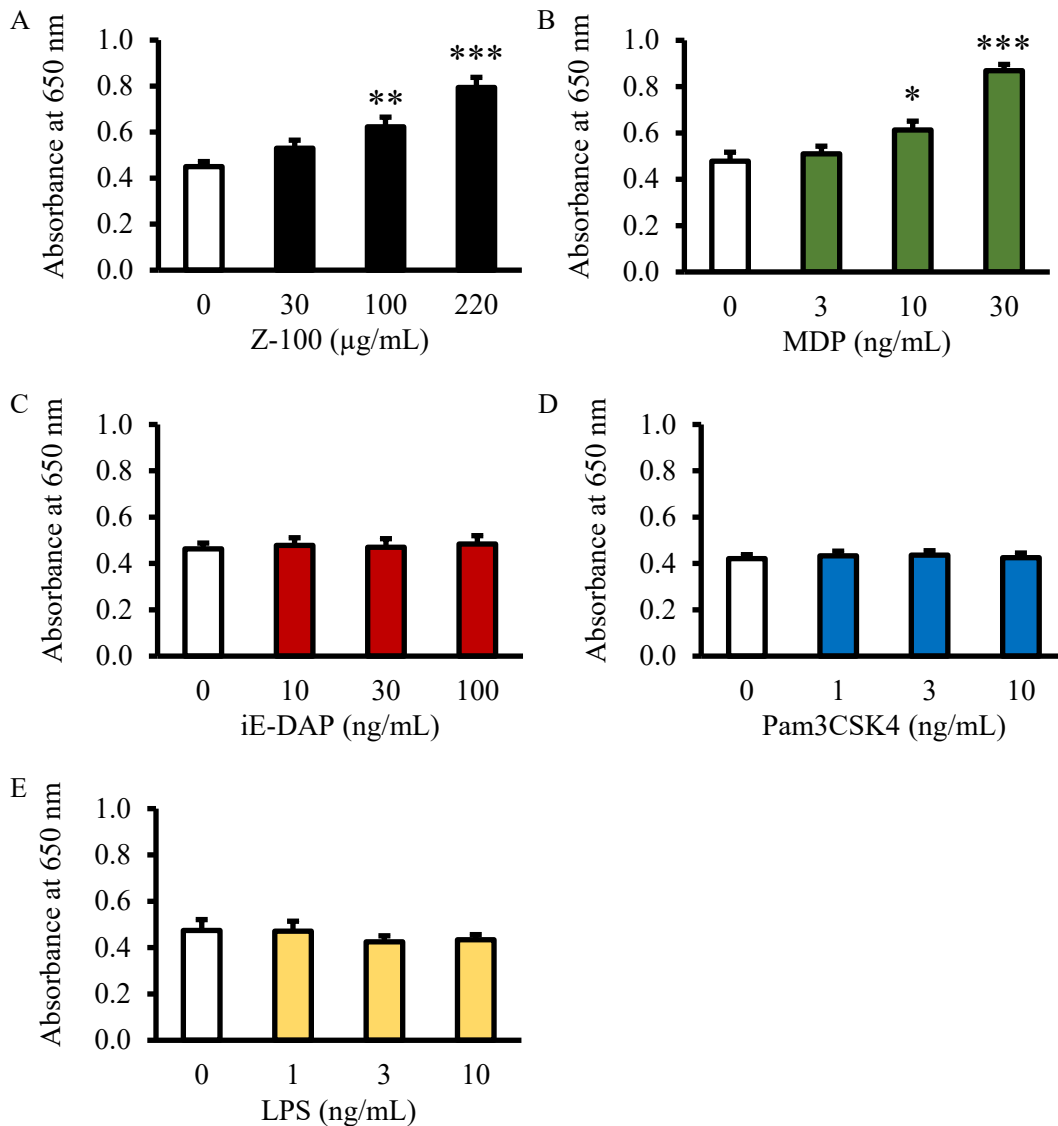
マウス *Nod2* 遺伝子と *SEAP* レポーター遺伝子がトランスフェクションされた HEK-Blue-mNOD2 細胞を用い、Z-100 の NOD2 への作用を観察した。本細胞は NOD2 依存的な NF- $\kappa$ B 活性化を介して SEAP が産生されるので、Figure 25 に示すように被験物質曝露後の培養上清へ Quant-Blue を添加すると、その被験物質が NOD2 に及ぼす効果を確認することが出来る。



**Figure 25** The experimental design of HEK-Blue-mNOD2 cells assay

HEK-Blue-mNOD2 cells were treated with stimulants for 32 h. After stimulation, supernatants were collected and incubated with QUANTI-Blue for 2 h at 37°C. Absorbance at 650 nm was measured using a microplate reader.

この細胞を用いて Z-100 で試験した結果、Figure 26A に示すように、Z-100 は曝露濃度依存的に SEAP を増加させた。つまり、Z-100 は NOD2 の活性化作用を有することが示された。MDP についても、Z-100 と同様、曝露濃度依存的に SEAP を増加させた (Figure 26B)。一方、他の自然免疫系受容体を刺激するため、iE-DAP、Pam3CSK4 および LPS についても本試験系にてそれらの効果を観察した。その結果、いずれも SEAP を増加させる作用は観察されなかった (Figure 26C-E)。



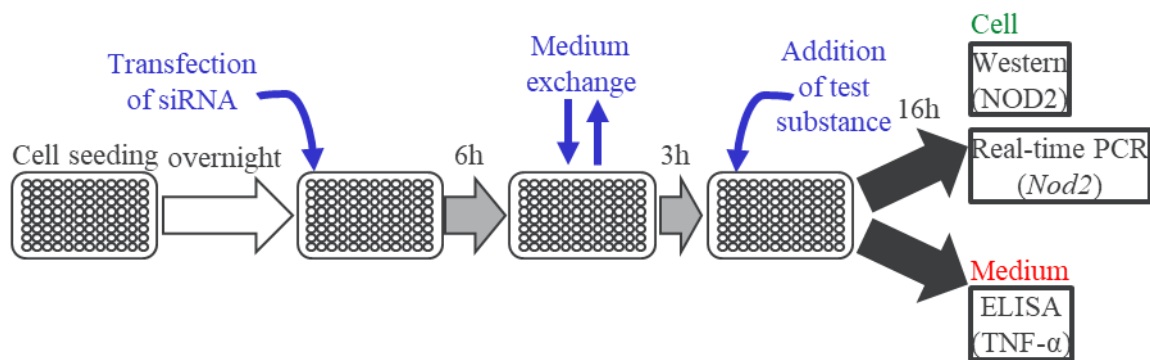
**Figure 26 Z-100 and MDP promote NF- $\kappa$ B activity in a murine Nod2-dependent manner in HEK-Blue-mNOD2 cells**

Absorbance of this assay for Z-100 (A; 30, 100 or 220  $\mu$ g/mL), MDP (B; 3, 10 or 30 ng/mL), iE-DAP (C; 10, 30 or 100 ng/mL), Pam3CSK4 (D; 1, 3 or 10 ng/mL), or LPS (E; 1, 3 or 10 ng/mL). Data are expressed as mean $\pm$ S.E. (n=9), and significant differences are shown. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, and \*\*\* p < 0.001 (Dunnett's multiple comparison) vs. saline. Results are representative of three independent experiments.

### 3.3.2. RAW264.7 細胞に対する *Nod2* knockdown の影響

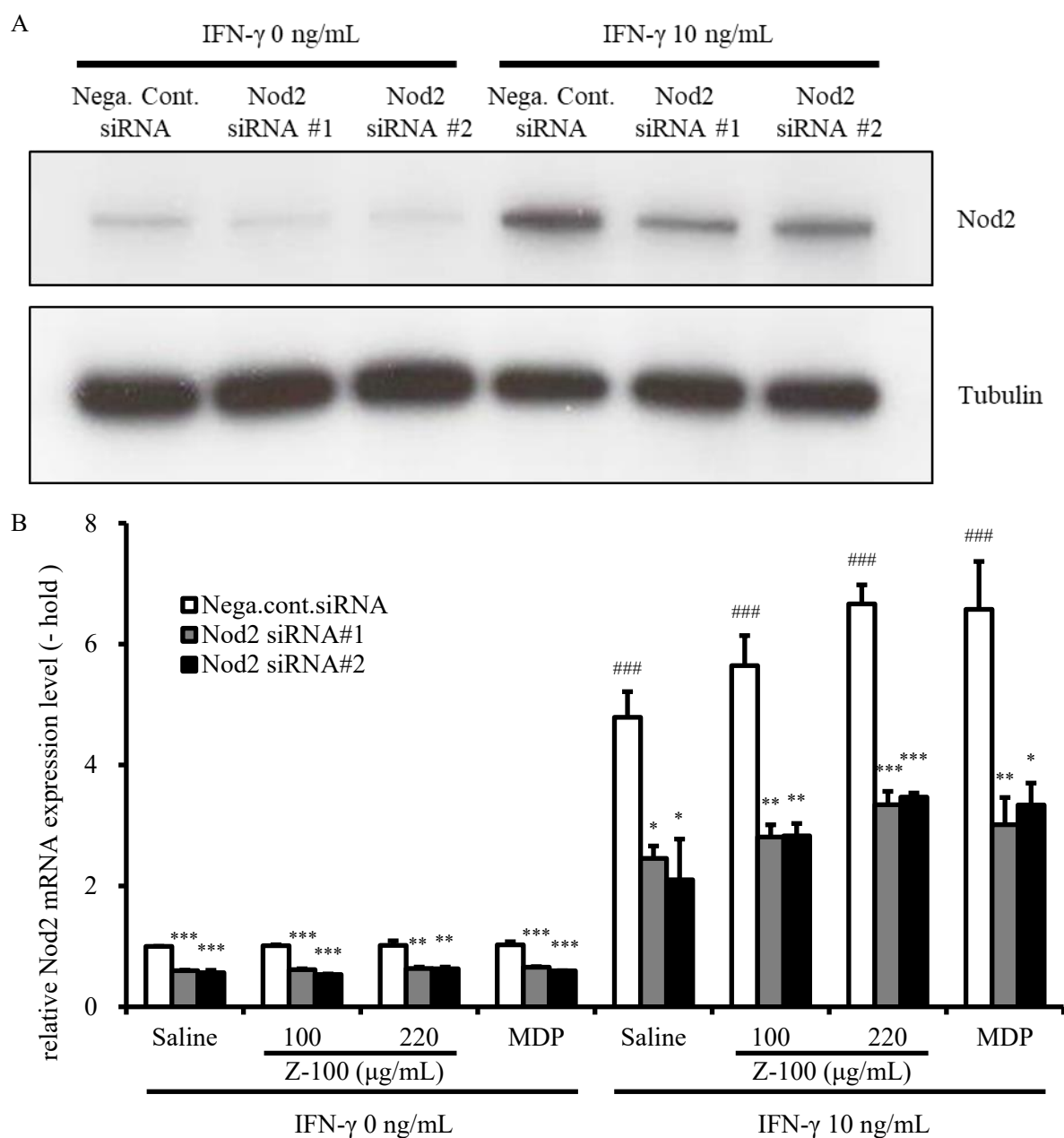
Z-100 曝露後の RAW264.7 細胞の TNF- $\alpha$  産生誘導作用への *Nod2* の寄与について検討するため、RAW264.7 細胞中の *Nod2* を 2 つの siRNA (#1 又は #2) で knockdown した。Figure 27 に示すように、アッセイ系で培養している RAW264.7 の *Nod2* を knockdown し、培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度を測定し、その後、細胞を採取して NOD2 タンパク質量と *Nod2* 遺伝子発現量を測定した。その結果、NOD2 タンパク質および *Nod2* 遺伝子は、いずれも *Nod2* の knockdown で減少した (Figure 28)。さらに、IFN- $\gamma$  曝露によって NOD2 タンパク質量および *Nod2* 遺伝子発現量が増加することも示された。

一方、培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度を測定した結果、Z-100 および MDP による TNF- $\alpha$  産生誘導レベルは #1 又は #2 の siRNA による *Nod2* の knockdown によって、低下することも示された (Figure 29)。



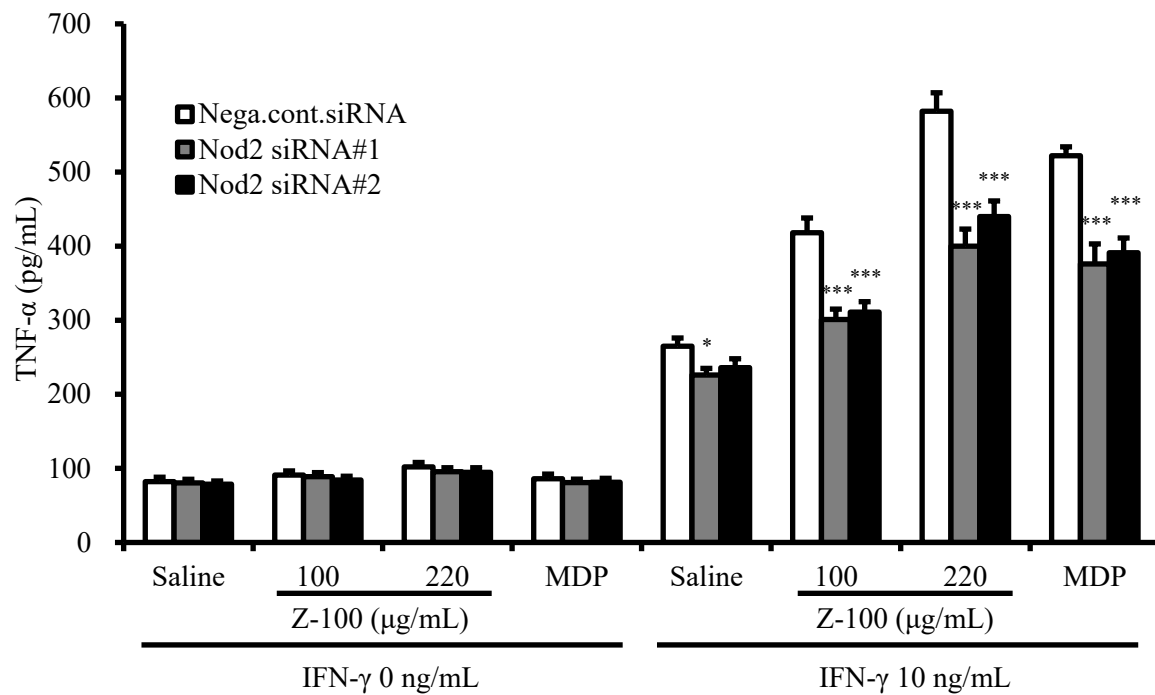
**Figure 27 The experimental design of *Nod2* knockdown of RAW264.7**

RAW264.7 cells were transfected with negative control siRNA (Nega. cont. siRNA) or *Nod2*-specific siRNA (*Nod2* siRNA#1, *Nod2* siRNA#2) for 6 h. After siRNA transfection, medium was changed to culture medium containing 10% FBS, and 3 h after this medium change, siRNA-transfected cells were stimulated with Z-100 (100, 220  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or MDP (10  $\text{ng}/\text{mL}$ ) in the absence or presence of IFN- $\gamma$  for 16 h. Supernatants and cells were then collected.



**Figure 28 Nod2 level in NOD2 knockdown RAW264.7**

Expression levels of NOD2 were determined by western blot analysis (A) and real-time qPCR (B). Data are expressed as mean $\pm$ S.E. (n=3), and significant differences are shown. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, and \*\*\* p < 0.001 vs. Nega. cont. siRNA transfection in each stimulation (Dunnett's multiple comparison). ### p < 0.001 vs. saline treatment without IFN- $\gamma$  in Nega. cont. siRNA transfection group (Dunnett's multiple comparison).



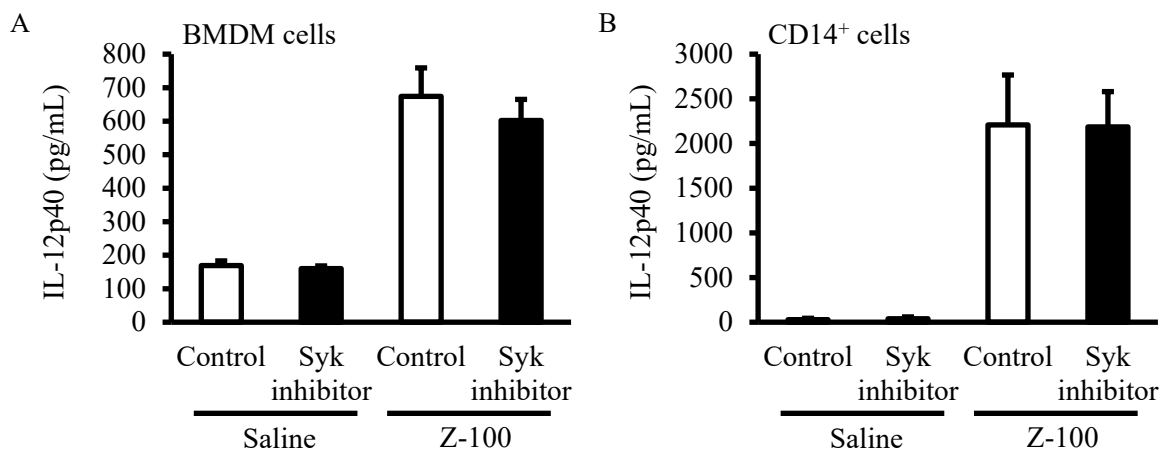
**Figure 29 TNF- $\alpha$  production from NOD2 knockdown RAW264.7**

TNF- $\alpha$  concentrations were measured by ELISA. Data are expressed as mean $\pm$ S.E. (n=9), and significant differences are shown. \* p < 0.05 and \*\*\* p < 0.001 vs. saline treatment in each group (Dunnett's multiple comparison). Results are representative of three independent experiments.

### 3.3.3. Z-100 の IL-12p40 産生誘導作用に対する *Nod2* knockdown の影響

Z-100 による IL-12p40 産生誘導作用に関与する受容体について検討した。第 2 章の Table 3 で示すように、Z-100 の主たる組成成分は arabinose、mannose および glucose などの中性糖である。したがって、 $\alpha$ -mannan、 $\beta$ -glucan および lipoarabinomannan が C 型レクチン受容体に作用して免疫賦活作用を示す可能性がある<sup>87, 88)</sup>。一方、第 2 章の結果から、Z-100 中に PG 様物質が含まれており、第 3 章の前項で示すように RAW264.7 細胞からの TNF- $\alpha$  産生と同様に NOD2 を介する作用の可能性もある。

そこで、C 型レクチン受容体に及ぼす Z-100 の作用を確認するため、その下流シグナルに寄与するとされる脾臓チロシンキナーゼ (Syk) 阻害薬を用いた<sup>88)</sup>。その結果、Figure 30A および Figure 30B に示すように、Z-100 によるマウス BMDM からの IL-12p40 産生誘導作用およびヒト CD14<sup>+</sup> 細胞からの IL-12p40 産生誘導作用は Syk 阻害による影響を受けなかった。

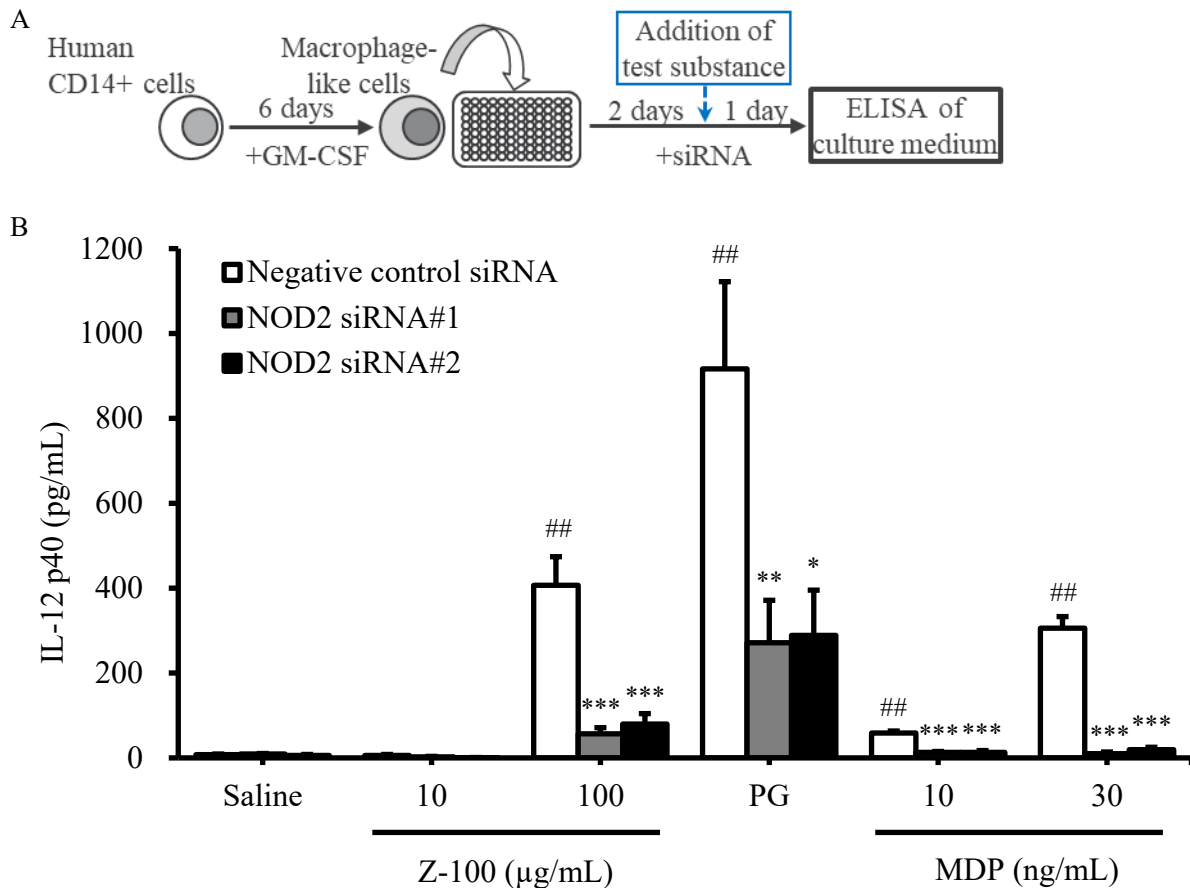


**Figure 30 Influence of Syk inhibition on IL-12p40 production**

(A) IL-12p40 concentration in the BMDM culture supernatant in the presence of Z-100 (100  $\mu$ g/mL) and a Syk inhibitor (100 nmol/L) for 24 hours. Data show mean  $\pm$  S.E.; n = 12 per group, pooled from 3 experiments. (B) IL-12p40 concentration in the human CD14<sup>+</sup> cell culture supernatant in the presence of Z-100 (100  $\mu$ g/mL) and a Syk inhibitor (100 nmol/L). Data show mean  $\pm$  S.E.; n = 7 per group, pooled from 2 experiments.



さらに NOD2 を阻害するために 2 つの NOD2 siRNA (#1 および#2) を合成し、それらをヒト CD14<sup>+</sup> 細胞にトランスフェクションした (Figure 31A)。Figure 31B に示すように、#1 又は #2 の NOD2 siRNA は、いずれも Z-100 による IL-12p40 産生誘導作用を軽減した。NOD2 の siRNA は、PG および MDP による IL-12p40 産生誘導作用も減弱させた。加えて、ヒト CD14<sup>+</sup> 細胞での NOD2 siRNA による knockdown によって、NOD2 遺伝子発現レベルが低下していることも確認した (Table 5)。



**Figure 31 IL-12p40 production from NOD2 knockdown human CD14<sup>+</sup> cells**

(A) Schematic of the knockdown experimental design. Human CD14<sup>+</sup> cells were cultured with GM-CSF for 6 days before being seeded onto siRNA custom plates (NOD2 siRNA#1, NOD2 siRNA#2 and negative control siRNA) and incubated for 48 hours. After 48 hours, stimulants were added to the medium and the cells were cultured for 24 hours. (B) IL-12p40 concentration in the culture supernatant of human CD14<sup>+</sup> cells with siRNAs. The cells were stimulated with Z-100 (10 or 100 µg/mL), PG (2 µg/mL) or MDP (10 or 30 ng/mL). Data show mean ± S.E.; n = 9 per group, pooled from 3 experiments. ## P<0.01 vs. Saline treatment in negative control siRNA transfection group (Steel's multiple comparison). \* P<0.05, \*\* P<0.01 and \*\*\* P<0.001 vs. negative control siRNA transfection in each stimulation condition (PG and MDP 10 ng/mL group; Dunnett's multiple comparison, other groups; Steel's multiple comparison).

**Table 5 Suppression of NOD2 gene expression by NOD2 siRNA in human CD14<sup>+</sup> cells**

Stimulant	Relative fold gene expression of NOD2		
	Negative control siRNA	NOD2 siRNA#1	NOD2 siRNA#2
Saline	1.00	0.42	0.38
Z-100 10 $\mu$ g/mL	1.10	0.32	0.39
Z-100 100 $\mu$ g/mL	0.98	0.33	0.42
PG	1.21	0.32	0.48
MDP 10 ng/mL	1.08	0.25	0.32
MDP 100 ng/mL	0.88	0.39	0.48

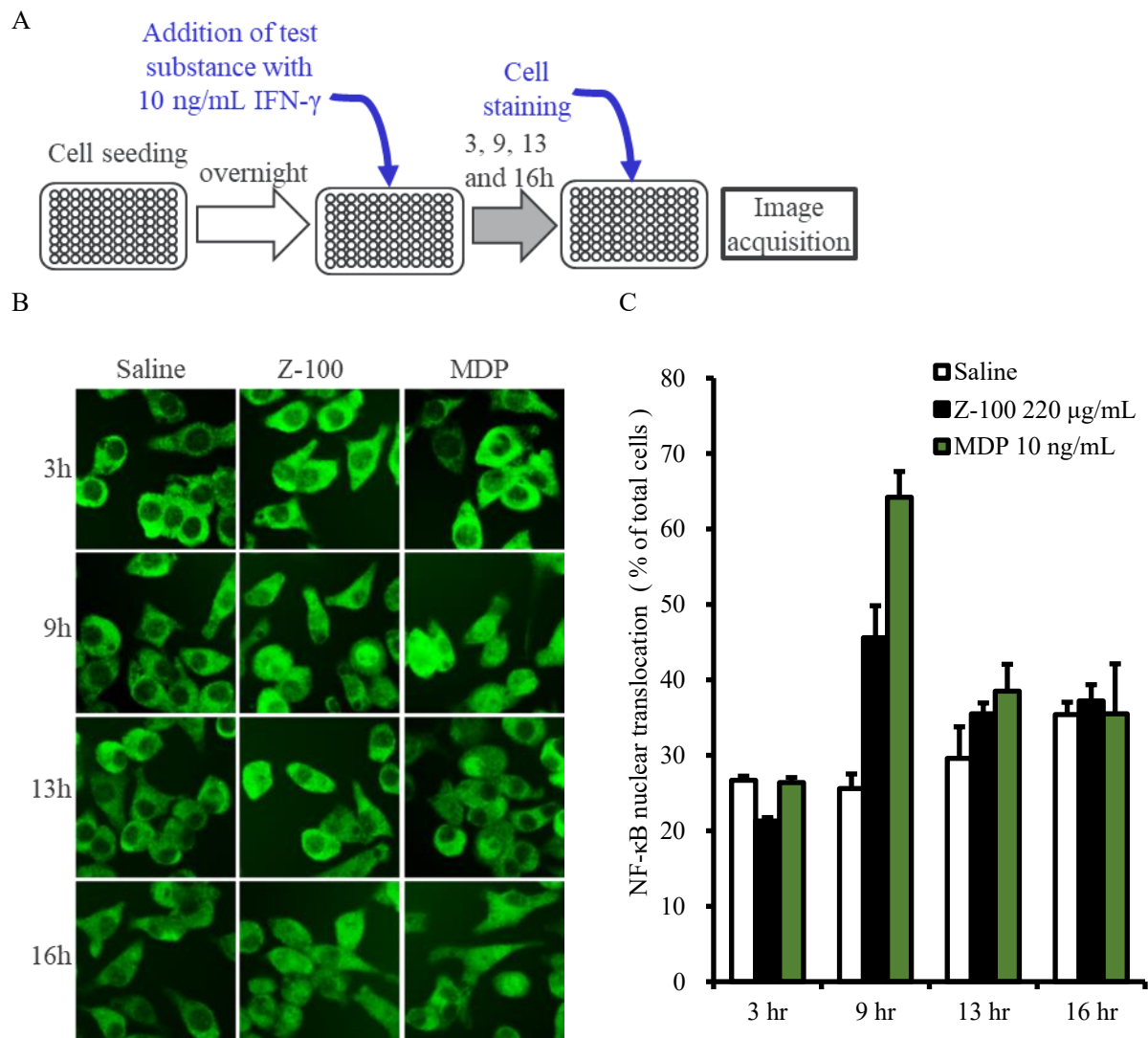
Endogenous Control: Human PPIA (Cyclophilin A) Endogenous Control (Life Technologies)

NOD2 TaqMan probes/primer sets: ID Hs00223394\_m1 (Life Technologies)

### 3.3.4. Z-100 および MDP による NF- $\kappa$ B の核内移行誘導

既報において、Nod2 の活性化により、NF- $\kappa$ B の活性化およびその核内移行が誘発され、それを介して免疫応答遺伝子の転写レベルの上昇を誘導することが報告されている<sup>97, 101, 102</sup>。これまで示してきたように、Z-100 は Nod2 を活性化することで、Nod2 シグナル伝達経路を介した TNF- $\alpha$  および IL-12p40 の産生を誘導することが示された。そこで、RAW264.7 細胞における Z-100 曝露後の NF- $\kappa$ B 核内移行について検討した。

RAW264.7 細胞を Z-100 あるいは MDP に 3、9、13 および 16 時間曝露した。その後、細胞を固定して NF- $\kappa$ B 特異的抗体を用いた免疫染色で、画像解析した。その結果、Z-100 あるいは MDP 曝露から 9 時間目に、NF- $\kappa$ B の核移行が観察された (Figure 32)。



**Figure 32 Z-100 and MDP stimulation promotes nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in RAW264.7 cells**  
 (A) Schematic of the experimental design. RAW264.7 cells were stimulated with Z-100 (220  $\mu$ g/mL) or MDP (10 ng/mL) in the presence of 10 ng/mL IFN- $\gamma$  for 3, 9, 13, and 16 h. After stimulation, cells were fixed and labeled with NF- $\kappa$ B p65-specific antibody and then reacted with a second Dylight 488-labeled antibody and Hoechst dye. (B) Cell images were acquired on an IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare). Cells exhibiting NF- $\kappa$ B nuclear translocation were defined as those with a ratio of intensity of Dylight 488 per unit area of nuclear region/cytoplasmic region exceeding 1. These data were quantified using the analytic software IN Cell Developer Toolbox. (C) The percentage of cells exhibiting NF- $\kappa$ B nuclear translocation in total cells in each well was then calculated. Results are representative of three independent wells, and data are expressed as mean $\pm$ S.E. (n=3).

### 3.4. 考察

本章では Z-100 の作用点となる受容体を明らかにするため、第 2 章の結果から NOD2 に着目した。NOD2 がトランスフェクションされた細胞では、Z-100 曝露によって NOD2 下流シグナルが応答することを示した (Figure 26)。加えて、RAW264.7 およびヒト CD14<sup>+</sup> 細胞での NOD2 の knockdown では、いずれの細胞でも Z-100 曝露後の TNF- $\alpha$  および IL-12p40 産生誘導が減弱されることを示した (Figure 29 および Figure 31)。これらの結果から、Z-100 は NOD2 を作用点として免疫賦活作用を発揮することを示した。

第 2 章で示した TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-12p40 産生誘導では、NOD2 の関与が報告されている<sup>103-106</sup>。ヒト単球様細胞への NOD2 アゴニスト刺激で TNF- $\alpha$  産生誘導が起こる<sup>103, 104</sup>。マウスから採取した腹腔マクロファージを MDP で曝露すると IL-1 $\beta$  産生が誘導され、*Nod2* KO マウスではその IL-1 $\beta$  産生誘導作用が消失する<sup>105</sup>。さらに骨髄由来細胞では、MDP によって TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-12p40 のいずれのサイトカインも産生誘導され、*Nod2* KO でこれらサイトカイン産生能が低下する<sup>106</sup>。これらの知見からも、Z-100 が NOD2 を介して免疫賦活作用を示している可能性は高いと考えられた。

RAW264.7 細胞からの TNF- $\alpha$  産生について、Figure 13 で示すように、IFN- $\gamma$  存在下で産生能の増強が示された。本章では、*Nod2* が IFN- $\gamma$  曝露後にアップレギュレーションされる結果を得た (Figure 28)。この IFN- $\gamma$  によるアップレギュレーションは既報でも報告されている<sup>107</sup>。加えて、第 2 章で「M1 マクロファージへの極性化」が Z-100 のサイトカイン誘導能を増強させる可能性について考察したように、M1 マクロファージへの極性化に伴う NOD2 発現レベルの上昇も報告されている<sup>108</sup>。つまり、IFN- $\gamma$  が M1 マクロファージへの極性化を誘導することで NOD2 発現が促進され、Z-100 のサイトカイン産生誘導作用を増強させたことが示唆された。

一方、Syk 阻害は、マウス BMDM およびヒト CD14<sup>+</sup> 細胞における IL-12p40 産生誘導作用に影響しなかった。Syk は *dectin-1*、*dectin-2* および *mincle* 等の C 型レクチン受容体の刺激によって活性化される<sup>88</sup>。つまり、本研究で見出された Z-100 による IL-12p40 産生誘導作用は、これらの受容体を介した作用の可能性は低いと考えられた。

本章の 3.3.4 項に記載したように、*Nod2* 活性化は NF- $\kappa$ B を核内に移行させ、免疫応答遺伝子転写を誘導する<sup>97, 101, 102</sup>。本章にて Z-100 による NF- $\kappa$ B の核内への移行について検討したところ、NF- $\kappa$ B が Z-100 曝露の 9 時間後に核内に存在していることを見出した (Figure 32)。第 2 章での TNF- $\alpha$  および IL-12p40 のマクロファージ様細胞の培地中濃度はいずれも曝露後 16 時間目以降に上昇したことから (Figure 15C および Figure 23)、NF- $\kappa$ B の核内移行後にサイトカイン産生が誘導され、その後経時的に培地中に放出されることが示された。

NOD2 のアゴニストは本章の緒言で前述したように、欧州においてそのアゴニスト *mifamurtide* が骨肉腫の治療に用いられている<sup>100</sup>。NOD2 活性化は上皮細胞の再生制御を介して発がんを抑制する可能性が報告されている<sup>109</sup>。NOD2 の遺伝子多型は、リンパ腫、結腸直腸がん、胃がん、乳がん、卵巣がん、肺がんおよび喉頭がんのリスク増加に関与するとの仮説が示されている<sup>109</sup>。リンパ行性転移では膀胱がんでの NOD2 多型が転移の発生頻度を上昇させることも示唆されている<sup>110</sup>。これらを勘案すると、NOD2 シグナルの活性化が、がん抑制およびリンパ行性

転移抑制に寄与する可能性があることから、Z-100 も NOD2 を介して抗がん作用を発揮する新たな作用機序が提示された。

## [総括]

本研究で、Z-100 は B16-BL6 を用いたリンパ行性転移モデルで、メラノーマ細胞の転移抑制作用を示した。同細胞に対して Z-100 が直接的な殺細胞効果を示さなかったことから、Z-100 の転移抑制効果は免疫賦活作用を介することが示唆された。Z-100 投与はリンパ節での免疫細胞およびグランザイム B を増加させ、Z-100 の転移抑制効果がこれらを介した作用であることも示した。さらに、原発巣である足蹠の腫瘍への放射線照射が Z-100 の転移抑制効果を強めることも示した。

Z-100 の作用点として、マクロファージに注目し、マウスマクロファージ様細胞株のマウス骨髄由来マクロファージおよびヒト CD14<sup>+</sup> 細胞由来マクロファージを用いて Z-100 がサイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-12p40 および IL-1 $\beta$  産生を誘導することを示した。マウスへの Z-100 皮下投与後の皮膚組織中でこれらサイトカイン量が増加することも示した。その活性成分の探索では Z-100 のアニオン分画と非アニオン分画のうち、アニオン分画に IL-12p40 産生増加作用があることを示した。このアニオン分画では、PG の構成成分として知られるグルタミン酸、アラニン、ジアミノピメリン酸、グルコサミンおよびムラミン酸が検出された。さらにムタノリシンでの消化で PG 断片が検出されたことなどから、アニオン画分には PG 様物質が含まれていることを明らかにした。市販の PG やその最小活性構造である MDP にも、本研究の試験系で Z-100 添加と同様のサイトカイン産生誘導が観察されたことから、Z-100 中の PG 様物質が活性に関与する可能性が示された。PG および MDP は NOD2 に作用して活性を発揮するので、NOD2 のレポーターアッセイおよび NOD2 の knockdown により、Z-100 は NOD2 を介して作用することを示した。さらに、Z-100 曝露後に NOD2 シグナルの下流にある NF- $\kappa$ B の核内移行が誘導されたことから、Z-100 中の PG 様物質が NOD2 を介して抗腫瘍作用を示す機序を提示することができた (Figure 33)。

本研究結果から、PG 様物質が Z-100 の主要な活性成分であることを示した。市販品の PG および MDP も Z-100 と同様に非臨床腫瘍モデルに対して抗腫瘍効果を示すことが報告されているが<sup>111, 112)</sup>、PG や MDP の実験動物への投与では発熱や眠気を中心とした毒性も報告されている<sup>113-116)</sup>。しかしながら、Z-100 については、序論で述べたように、ヒトへの投与による有害事象の発現頻度は非常に低く、かつヒト以外の実験動物でもそれらはほとんど観察されていない<sup>34)</sup>。このように Z-100 の投与による副作用の発現頻度の低さは、Z-100 中の PG 様物質の含量に起因する可能性がある。精製品の PG および MDP の毒性については 0.1~5 mg/kg の高用量を投与した時の毒性である。一方、本試験で使用した Z-100 は糖含量として 0.1~10 mg/kg となる。Table 3 に示すように、Z-100 中の構成成分はほとんどが中性糖であり、PG 様物質の構成成分であるグルタミン酸、アラニン、ジアミノピメリン酸、グルコサミンおよびムラミン酸の含量は非常に少なく、特にムラミン酸は全体の 0.1% 程度であった。そのため、仮に組成分析で検出されたムラミン酸の全量が PG 様物質由来のものであったと仮定しても、本試験で投与した Z-100 中の PG 様物質の用量は 0.0001~0.01 mg/kg と換算される。したがって、投与された Z-100 中の PG 様物質は非常に少量になるため、PG および MDP の投与で観察された毒性は現れなかったと推測さ

れる。しかしながら、この推定では薬効面での用量に矛盾が生じる。前述した PG および MDP が抗腫瘍効果を示した報告では、それぞれ 5 µg/body PG あるいは 0.5 mg/kg MDP を投与した結果であり、PG 様物質換算で 0.0001 mg/kg から転移抑制を示した Z-100 の用量とは大きく乖離している。その一方で、Z-100 の抗腫瘍効果は IL-12 の KO マウスにて消失することも報告されていることから<sup>27)</sup>、本研究で得られたサイトカイン誘導作用と抗腫瘍効果との関連性は否定できない。この用量の不一致については、MDP が他の免疫賦活薬あるいはサイトカインと併用することで飛躍的に抗腫瘍効果および免疫賦活作用を高めることが報告されていることから説明できる<sup>117-120)</sup>。つまり、Z-100 には PG 様物質の他にも免疫賦活作用を有する物質が含有されており、それらの相乗効果によって PG および MDP をよりも高い抗腫瘍効果を示すことが考えられた。その他の可能性として「PG の違い」もある。PG の詳細な構造は菌種毎に異なっている<sup>121-123)</sup>。PG は Figure 21C で示す様にユニットが繰り返し連なって螺旋状の構造をとっており<sup>124, 125)</sup>、それらの繰り返し回数は一律ではない。市販品の PG であっても繰り返し回数が異なるものが混在しており、抽出法によって、この繰り返し構造の先端にアラビノガラクトサンが結合したものが得られる可能性もある<sup>126)</sup>。さらに、Figure 21C に示すような PG を生合成する過程の中間生成物も混在している<sup>127)</sup>。これらは、構造の違いによる受容体結合能に影響を及ぼすだけでなく、物性あるいは分子量の差異による体内動態、細胞内への移行性および投与液の安定性にも大きな影響を及ぼすと推定される。特に本研究の様にマクロファージ中の細胞内受容体をターゲットとした試験では、リガンドの分子量や形状等によって細胞内への取り込まれ方が異なる可能性がある。これら生物特性および動態の差異により、異なる作用が現れることあるいは、異なる細胞に作用してしまうことも考えられる。これらの理由から、Z-100 中の PG について、今後、詳細な検討が期待される。

Z-100 の抗腫瘍薬として臨床応用を鑑みると、Z-100 の適応患者についても考察が必要となる。本研究においてメラノーマのリンパ行性転移に対して Z-100 は低用量から有効性を示した。このことは、リンパ行性転移が生命予後を大きく左右するがん種あるいはリンパ行性転移が頻発するステージの患者に、治療上有益な効果がもたらされる可能性を示している。原発巣への放射線照射が Z-100 の転移抑制効果を高めたことから、放射線治療を標準療法とされている患者への併用も効果的と期待される。Z-100 の NOD2 を介した作用に注目すると、NOD2 の多型がリスクとなる可能性のあるがんであるリンパ腫、結腸直腸がん、胃がん、乳がん、卵巣がん、肺がんおよび喉頭がんが対象のがん種となる<sup>109)</sup>。

序論で記載したように、既存のがん免疫療法は全ての患者に恩恵をもたらしているわけではない。その大きな要因として、cold tumor の存在が考えられる<sup>14-16)</sup>。本研究では、メラノーマのリンパ行性転移モデルにおいて、Z-100 投与は転移リンパ節で免疫細胞を増加させることを明らかにした。したがって、Z-100 は腫瘍局所へ免疫細胞を誘引する作用をもつと考えられ、cold tumor 状態を改善できる可能性がある。腫瘍の cold tumor 化に IL-12p40 の産生抑制の寄与が報告されているため<sup>128)</sup>、Z-100 の IL-12p40 の産生誘導作用により、腫瘍の cold tumor 化を抑制できる可能性がある。そして、Z-100 は IL-10 産生を低下させる作用を持つことも報告されていることから<sup>26)</sup>、この点においても免疫チェックポイント阻害薬の応例に効果を示すことが期待できる。

本研究は、Z-100 は単体としての抗腫瘍効果に加えて既存のがん免疫療法の不応例に併用効果をもたらすことが期待できることを示した。Z-100 の臨床応用に向けて、迅速かつ確度の高い臨床試験の実施のために対象患者を考察できたことから、がん免疫療法の実力を最大限発揮するために Z-100 はその候補薬として期待される。

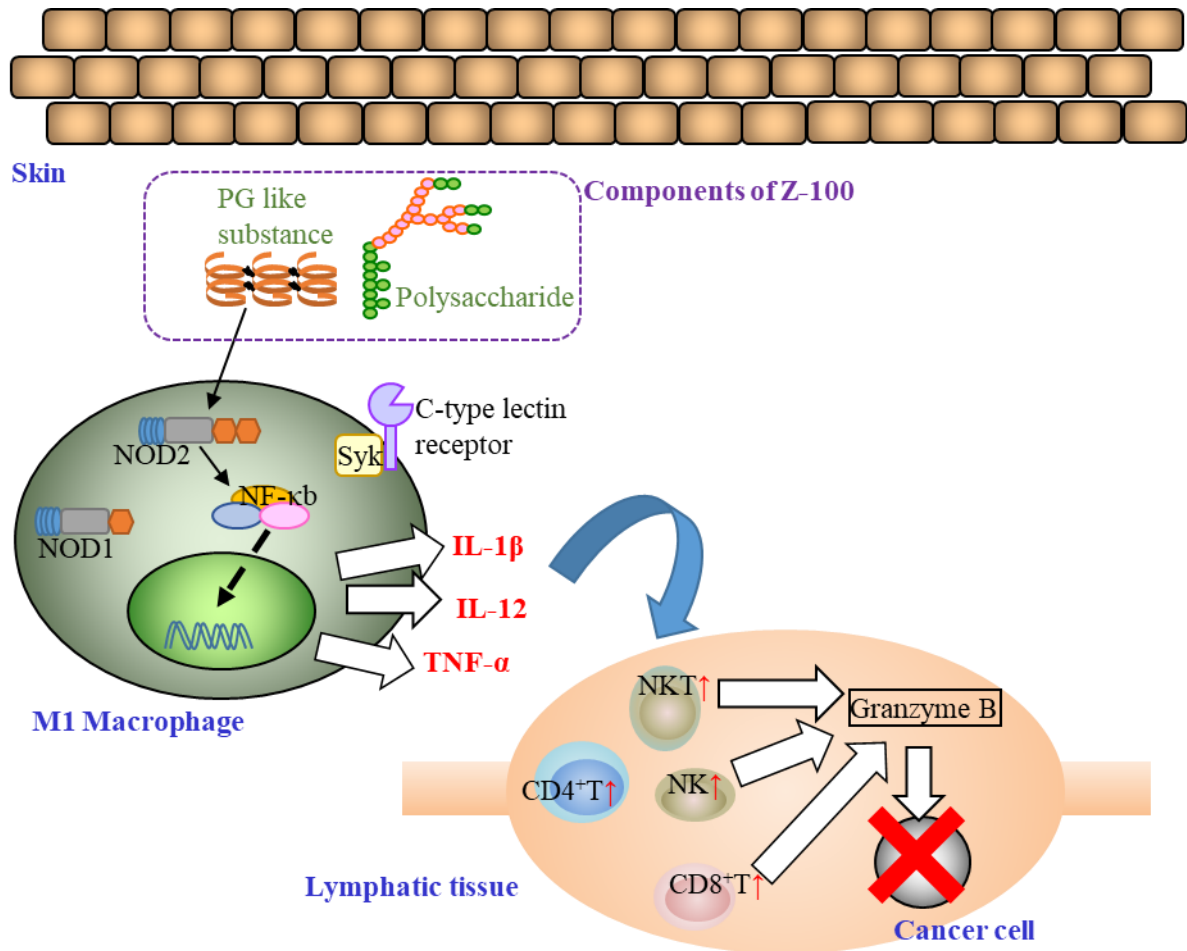


Figure 33 Z-100 のリンパ行性転移抑制効果の作用機序



## [謝辞]

本論文の作成につき、ご懇篤な指導およびご鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部、田野中浩一教授に心から感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を頂きましたゼリア新薬工業株式会社、中央研究所の皆様心から感謝いたします。

学部学生及び大学院生の頃から様々な面でご指導およびご助言賜りました山田純司教授および大友隆之助教に心から感謝いたします。

最後に常に私を支え続けてくれた家族に心から感謝いたします。

[研究成果の掲載誌]

本博士学位申請論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

第1章

**Z-100, an immunomodulatory extract of Mycobacterium tuberculosis strain Aoyama B, prevents spontaneous lymphatic metastasis of B16-BL6 melanoma.**

Horii T, Yoshinaga K, Kobayashi N, Seto K, Orikiawa Y, Okamoto M, Eta R, Ohira Y, Katsunuma K, Hori Y, Tanaka T, Takei M.

*Biol Pharm Bull.*, **37**, 642-647 (2014).

第2章、第3章

**Z-100, extracted from Mycobacterium tuberculosis strain Aoyama B, promotes TNF- $\alpha$  production via nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (Nod2)-dependent NF- $\kappa$ B activation in RAW264.7 cells.**

Katsunuma K, Yoshinaga K, Ohira Y, Eta R, Sato T, Horii T, Tanaka T, Takei M, Seto K.

*Mol Immunol.*, **64**, 218-227 (2015).

**Peptidoglycan-Like components in Z-100, extracted from Mycobacterium tuberculosis strain Aoyama B, increase IL-12p40 via NOD2.**

Horii T, Orikiawa Y, Ohira Y, Eta R, Tominaga U, Sato T, Tanaka T.

*J Immunol Res.* **22**, 3530937 (2022).

[引用文献]

- 1) Igarashi Y, Sasada T. Cancer Vaccines: Toward the next breakthrough in cancer immunotherapy. *J Immunol Res.*, **17**, 2020:5825401 (2020)
- 2) Ramos-Casals M, Brahmer JR, Callahan MK, Flores-Chávez A, Keegan N, Khamashta MA, Lambotte O, Mariette X, Prat A, Suárez-Almazor ME. Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors. *Nat Rev Dis Primers.*, **6**, 38 (2020)
- 3) Le TMD, Yoon AR, Thambi T, Yun CO. Polymeric systems for cancer immunotherapy: A review. *Front Immunol.*, **13**, 826876 (2022)
- 4) Kumar AR, Devan AR, Nair B, Vinod BS, Nath LR. Harnessing the immune system against cancer: current immunotherapy approaches and therapeutic targets. *Mol Biol Rep.*, **48**, 8075-8095 (2021)
- 5) Siamof CM, Goel S, Cai W. Moving beyond the pillars of cancer treatment: perspectives from nanotechnology. *Front Chem.*, **8**, 598100 (2020)
- 6) Dobosz P, Stępień M, Golke A, Dzieciatkowski T. Challenges of the immunotherapy: perspectives and limitations of the immune checkpoint inhibitor treatment. *Int J Mol Sci.*, **23**, 2847 (2022)
- 7) Archilla-Ortega A, Domuro C, Martin-Liberal J, Muñoz P. Blockade of novel immune checkpoints and new therapeutic combinations to boost antitumor immunity. *J Exp Clin Cancer Res.*, **41**, 62 (2022)
- 8) Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, Torrejon DY, Abril-Rodriguez G, Sandoval S, Barthly L, Saco J, Homet Moreno B, Mezzadra R, Chmielowski B, Ruchalski K, Shintaku IP, Sanchez PJ, Puig-Saus C, Cherry G, Seja E, Kong X, Pang J, Berent-Maoz B, Comin-Anduix B, Graeber TG, Tumei PC, Schumacher TN, Lo RS, Ribas A. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med.*, **375**, 819-829 (2016)
- 9) Robert C, Ribas A, Schachter J, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil CM, Lotem M, Larkin JMG, Lorigan P, Neyns B, Blank CU, Petrella TM, Hamid O, Su SC, Krepler C, Ibrahim N, Long GV. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.*, **20**, 1239-1251 (2019)
- 10) Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, Qayed M, De Moerloose B, Hiramatsu H, Schlis K, Davis KL, Martin PL, Nemecek ER, Yanik GA, Peters C, Baruchel A, Boissel N, Mechinaud F, Balduzzi A, Krueger J, June CH, Levine BL, Wood P, Taran T, Leung M, Mueller KT, Zhang Y, Sen K, Lebwohl D, Pulsipher MA, Grupp SA. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.*, **378**, 439-448 (2018)
- 11) Haas AR, Tanyi JL, O'Hara MH, Gladney WL, Lacey SF, Torigian DA, Soulen MC, Tian L, McGarvey M, Nelson AM, Farabaugh CS, Moon E, Levine BL, Melenhorst JJ, Plesa G, June CH, Albelda SM, Beatty GL. Phase I study of lentiviral-transduced chimeric antigen receptor-modified T cells recognizing mesothelin in advanced solid cancers. *Mol Ther.*, **27**, 1919-1929 (2019)

- 12) O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrissette JJD, Martinez-Lage M, Brem S, Maloney E, Shen A, Isaacs R, Mohan S, Plesa G, Lacey SF, Navenot JM, Zheng Z, Levine BL, Okada H, June CH, Brogdon JL, Maus MV. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med.*, **9**, eaaa0984 (2017)
- 13) Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, Robertson C, Ghazi A, Gerken C, Liu E, Dakhova O, Ashoori A, Corder A, Gray T, Wu MF, Liu H, Hicks J, Rainusso N, Dotti G, Mei Z, Grilley B, Gee A, Rooney CM, Brenner MK, Heslop HE, Wels WS, Wang LL, Anderson P, Gottschalk S. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) -specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma. *J Clin Oncol.*, **33**, 1688-1696 (2015)
- 14) Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer.*, **124**, 359-367 (2021)
- 15) Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov.*, **18**, 197-218 (2019)
- 16) Janji B, Hasmim M, Parpal S, Berchem G, Noman MZ. Firing up the cold tumors by targeting Vps34. *Oncoimmunology.*, **9**, 1809936 (2020)
- 17) Jamal S, Hudson M, Fifi-Mah A, Ye C. Immune-related adverse events associated with cancer immunotherapy: A review for the practicing rheumatologist. *J Rheumatol.*, **47**, 166-175 (2020)
- 18) Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, Carlino MS, Haanen JB, Maio M, Marquez-Rodas I, McArthur GA, Ascierto PA, Long GV, Callahan MK, Postow MA, Grossmann K, Sznol M, Dreno B, Bastholt L, Yang A, Rollin LM, Horak C, Hodi FS, Wolchok JD. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med.*, **373**, 23-34 (2015)
- 19) Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, Linette GP, Meyer N, Giguere JK, Agarwala SS, Shaheen M, Ernstoff MS, Minor D, Salama AK, Taylor M, Ott PA, Rollin LM, Horak C, Gagnier P, Wolchok JD, Hodi FS. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med.*, **372**:2006-2017 (2015)
- 20) Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, Ghobadi A, Turtle CJ, Brudno JN, Maus MV, Park JH, Mead E, Pavletic S, Go WY, Eldjerou L, Gardner RA, Frey N, Curran KJ, Peggs K, Pasquini M, DiPersio JF, van den Brink MRM, Komanduri KV, Grupp SA, Neelapu SS. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biol Blood Marrow Transplant.*, **25**:625-638 (2019)
- 21) Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, Lin Y, Braunschweig I, Hill BT, Timmerman JM, Deol A, Reagan PM, Stiff P, Flinn IW, Farooq U, Goy A, McSweeney PA, Munoz J, Siddiqi T, Chavez JC, Herrera AF, Bartlett NL, Wiezorek JS, Navale L, Xue A, Jiang Y, Bot A, Rossi JM, Kim JJ, Go WY, Neelapu SS. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory

- large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol.*, **20**, 31-42 (2019)
- 22) Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, Jäger U, Jaglowski S, Andreadis C, Westin JR, Fleury I, Bachanova V, Foley SR, Ho PJ, Mielke S, Magenau JM, Holte H, Pantano S, Pacaud LB, Awasthi R, Chu J, Anak Ö, Salles G, Maziarz RT; JULIET Investigators. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med.*, **380**, 45-56 (2019)
- 23) Zhu S, Zhang T, Zheng L, Liu H, Song W, Liu D, Li Z, Pan CX. Combination strategies to maximize the benefits of cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.*, **14**, 156 (2021)
- 24) 小島 寛, 末包 孝広, 村上 幸利, 丹羽 誠一, 岡平 明, 櫛田 秀雄. 人型結核菌体熱水抽出物質に関する研究(第1報)多糖成分の化学構造. *薬学雑誌*, **101**, 713-722 (1981)
- 25) Oka H, Emori Y, Sasaki H, Shiraishi Y, Yoshinaga K, Kurimoto T. Anti-tumor mechanism of Z-100, an immunomodulatory Arabinomannan extracted from Mycobacterium tuberculosis strain Aoyama B, on pulmonary metastases of B16F10 melanoma: restoration of helper T cell responses via suppression of glucocorticoid-genesis. *Microbiol Immunol.*, **46**, 343-351 (2002)
- 26) Oka H, Sasaki H, Shiraishi Y, Emori Y, Yoshinaga K, Takei M. Z-100, an immunomodulatory arabinomannan extracted from Mycobacterium tuberculosis strain Aoyama B, augments anti-tumor activities of X-ray irradiation against B16 melanoma in association with the improvement of type 1T cell responses. *Biol Pharm Bull.*, **27**, 82-88 (2004)
- 27) Oka H, Shiraishi Y, Sasaki H, Yoshinaga K, Emori Y, Takei M. Antimetastatic effect of an immunomodulatory arabinomannan extracted from Mycobacterium tuberculosis strain Aoyama B, Z-100, through the production of interleukin-12. *Biol Pharm Bull.*, **26**, 1336-1341 (2003)
- 28) Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.*, **39**, 1-10 (2013)
- 29) O'Donnell JS, Long GV, Scolyer RA, Teng MW, Smyth MJ. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treat Rev.*, **52**, 71-81 (2017)
- 30) Shekarian T, Valsesia-Wittmann S, Brody J, Michallet MC, Depil S, Caux C, Marabelle A. Pattern recognition receptors: immune targets to enhance cancer immunotherapy. *Ann Oncol.*, **28**, 1756-1766 (2017)
- 31) Griffin ME, Espinosa J, Becker JL, Luo JD, Carroll TS, Jha JK, Fanger GR, Hang HC. Enterococcus peptidoglycan remodeling promotes checkpoint inhibitor cancer immunotherapy. *Science.*, **373**, 1040-1046 (2021)
- 32) van Dinther D, Stolk DA, van de Ven R, van Kooyk Y, de Gruijl TD, den Haan JMM. Targeting C-type lectin receptors: a high-carbohydrate diet for dendritic cells to improve cancer vaccines. *J Leukoc Biol.*, **102**, 1017-1034 (2017)
- 33) Koch GE, Smelser WW, Chang SS. Side effects of intravesical BCG and chemotherapy for bladder cancer: What they are and how to manage them. *Urology.*, **149**, 11-20 (2021)

- 34) ゼリア新薬工業株式会社, アンサー皮下注 20 $\mu$ g, インタビューフォーム
- 35) Noda K, Ohashi Y, Okada H, Ogita S, Ozaki M, Kikuchi Y, Takegawa Y, Niibe H, Fujii S, Horiuchi J, Morita K, Hashimoto S, Fujiwara K. Randomized phase II study of immunomodulator Z-100 in patients with stage IIIB cervical cancer with radiation therapy. *Jpn J Clin Oncol.*, **36**, 570-577 (2006)
- 36) Tan DS, Agarwal R, Kaye SB. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol.*, **7**, 925-934 (2006)
- 37) Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.*, **147**, 275-292 (2011)
- 38) Stacker SA, Williams SP, Karnezis T, Shayan R, Fox SB, Achen MG. Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat Rev Cancer.*, **14**, 159-172 (2014)
- 39) Zwaans BM, Bielenberg DR. Potential therapeutic strategies for lymphatic metastasis. *Microvasc Res.*, **74**, 145-158 (2007)
- 40) Wu J, Meng J, Du Y, Huang Y, Jin Y, Zhang J, Wang B, Zhang Y, Sun M, Tang J. RACK1 promotes the proliferation, migration and invasion capacity of mouse hepatocellular carcinoma cell line in vitro probably by PI3K/Rac1 signaling pathway. *Biomed Pharmacother.*, **67**, 313-319 (2013)
- 41) Liu S, Chen X, Lin T. Lymphatic metastasis of bladder cancer: Molecular mechanisms, diagnosis and targeted therapy. *Cancer Lett.*, **505**, 13-23 (2021)
- 42) Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha S, McCall LM, Morrow M. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA.*, **305**, 569-575 (2011)
- 43) Galimberti V, Cole BF, Viale G, Veronesi P, Vicini E, Intra M, Mazzarol G, Massarut S, Zgajnar J, Taffurelli M, Littlejohn D, Knauer M, Tondini C, Di Leo A, Colleoni M, Regan MM, Coates AS, Gelber RD, Goldhirsch A. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with breast cancer and sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): 10-year follow-up of a randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.*, **19**, 1385-1393 (2018)
- 44) Mahon SM, Carr E. Lymphedema: Common side effect. *Clin J Oncol Nurs.*, **25**, 29 (2021)
- 45) Schmid SC, Seitz AK, Haller B, Fritsche HM, Huber T, Burger M, Gschwend JE, Maurer T. Final results of the PräVAC trial: prevention of wound complications following inguinal lymph node dissection in patients with penile cancer using epidermal vacuum-assisted wound closure. *World J Urol.*, **39**, 613-620 (2021)
- 46) Iancu G, Mustata LM, Cigaran R, Gica N, Botezatu R, Median D, Panaitescu AM, Peltecu G. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer. Principle, difficulties and pitfalls. *Chirurgia.*, **116**, 533-541 (2021)
- 47) Sini P, Samarzija I, Baffert F, Littlewood-Evans A, Schnell C, Theuer A, Christian S, Boos A, Hess-Stumpp H, Foekens JA, Setyono-Han B, Wood J, Hynes NE. Inhibition of multiple vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR) blocks lymph node metastases but inhibition of VEGFR-2 is sufficient to sensitize tumor cells to platinum-based chemotherapeutics. *Cancer Res.*, **68**, 1581-1592 (2008)

- 48) McAllaster JD, Cohen MS. Role of the lymphatics in cancer metastasis and chemotherapy applications. *Adv Drug Deliv Rev.*, **63**, 867-875 (2011)
- 49) Liu R, Gilmore DM, Zubris KA, Xu X, Catalano PJ, Padera RF, Grinstaff MW, Colson YL. Prevention of nodal metastases in breast cancer following the lymphatic migration of paclitaxel-loaded expansile nanoparticles. *Biomaterials.*, **34**, 1810-1819 (2013)
- 50) Xie Y, Bagby TR, Cohen MS, Forrest ML. Drug delivery to the lymphatic system: importance in future cancer diagnosis and therapies. *Expert Opin Drug Deliv.*, **6**, 785-792 (2009)
- 51) Kato S, Yoshida S, Mori S, Kodama T. Optimization of the delivery of molecules into lymph nodes using a lymphatic drug delivery system with ultrasound. *Int J Pharm.*, **597**, 120324 (2021)
- 52) Chikamatsu K, Reichert TE, Kashii Y, Saito T, Kawashiri S, Yamamoto E, Whiteside TL. Immunotherapy with effector cells and IL-2 of lymph node metastases of human squamous-cell carcinoma of the head and neck established in nude mice. *Int J Cancer.*, **82**, 532-537 (1999)
- 53) Burke S, Lakshmikanth T, Colucci F, Carbone E. New views on natural killer cell-based immunotherapy for melanoma treatment. *Trends Immunol.*, **31**, 339-345 (2010)
- 54) Nakui M, Iwakabe K, Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Makuuchi H, Kawano T, Taniguchi M, Nishimura T. Natural killer T cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide inhibited lymph node metastasis of highly metastatic melanoma cells. *Jpn J Cancer Res.*, **90**, 801-804 (1999)
- 55) Garnier L, Pick R, Montorfani J, Sun M, Brighthouse D, Liaudet N, Kammertoens T, Blankenstein T, Page N, Bernier-Latamani J, Tran NL, Petrova TV, Merkler D, Scheiermann C, Hugues S. IFN- $\gamma$ -dependent tumor-antigen cross-presentation by lymphatic endothelial cells promotes their killing by T cells and inhibits metastasis. *Sci Adv.*, **8**, eab15162 (2022)
- 56) Chen S, Kawashima H, Lowe JB, Lanier LL, Fukuda M. Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment. *J Exp Med.*, **202**, 1679-1689 (2005)
- 57) Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu MT, Hwang ST. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst.*, **93**, 1638-1643 (2001)
- 58) Qian F, Li YP, Sheng X, Zhang ZC, Song R, Dong W, Cao SX, Hua ZC, Xu Q. PRL-3 siRNA inhibits the metastasis of B16-BL6 mouse melanoma cells in vitro and in vivo. *Mol Med.*, **13**, 151-159 (2007)
- 59) Talmadge JE, Fidler IJ. Cancer metastasis is selective or random depending on the parent tumour population. *Nature.*, **297**, 593-594 (1982)
- 60) Hart IR. The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. *Am J Pathol.*, **97**, 587-600 (1979)
- 61) Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol.*, **26**, 389-420 (2008)
- 62) Lord SJ, Rajotte RV, Korbitt GS, Bleackley RC. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev.*, **193**, 31-38 (2003)

- 63) van Gisbergen KP, Kragten NA, Hertoghs KM, Wensveen FM, Jonjic S, Hamann J, Nolte MA, van Lier RA. Mouse hobit is a homolog of the transcriptional repressor Blimp-1 that regulates NKT cell effector differentiation. *Nat Immunol.*, **13**, 864-871 (2012)
- 64) Rousalova I, Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). *Int J Oncol.*, **37**, 1361-1378 (2010)
- 65) Nishiyama N, Suzuki K, Fujino K, Nishioka K, Okimoto T, Nishio M. Irradiation influence on the bone marrow function of patients who received external radiotherapy to the bone metastasis lesion. *Radioisotopes.*, **62**, 623-630 (2013)
- 66) McKelvey KJ, Hudson AL, Back M, Eade T, Diakos CI. Radiation, inflammation and the immune response in cancer. *Mamm Genome.*, **29**, 843-865 (2018)
- 67) Basu A, Ramamoorthi G, Albert G, Gallen C, Beyer A, Snyder C, Koski G, Disis ML, Czerniecki BJ, Kodumudi K. Differentiation and regulation of Th cells: A balancing act for cancer immunotherapy. *Front Immunol.*, **12**, 669474 (2021)
- 68) Costa NL, Alencar Rde C, Valadares MC, Silva TA, Mendonça EF, Batista AC. The clinicopathological significance of the expression of Granzyme B in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, **46**, 185-189 (2010)
- 69) Storzynsky Q, Hitt MM. The impact of radiation-induced DNA damage on cGAS-STING-mediated immune responses to cancer. *Int J Mol Sci.*, **21**, 8877 (2020)
- 70) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.*, **124**, 783-801 (2006)
- 71) Schluns KS, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol.* **3**, 269-279 (2003)
- 72) Shi L, Jiang Q, Bushkin Y, Subbian S, Tyagi S. Biphasic dynamics of macrophage immunometabolism during mycobacterium tuberculosis infection. *mBio.*, **10**, e02550-18 (2019)
- 73) Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annu Rev Pathol.*, **15**, 123-147 (2020)
- 74) Anderson NR, Minutolo NG, Gill S, Klichinsky M. Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy. *Cancer Res.*, **81**, 1201-1208 (2021)
- 75) Ocaña-Guzman R, Torre-Bouscoulet L, Sada-Ovalle I. TIM-3 regulates distinct functions in macrophages. *Front Immunol.*, **7**, 229 (2016)
- 76) Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.*, **11**, 889-896 (2010)
- 77) Quero L, Hanser E, Manigold T, Tiaden AN, Kyburz D. TLR2 stimulation impairs anti-inflammatory activity of M2-like macrophages, generating a chimeric M1/M2 phenotype. *Arthritis Res Ther.*, **19**, 245 (2017)
- 78) Neu C, Sedlag A, Bayer C, Förster S, Crauwels P, Niess JH, van Zandbergen G, Frascaroli G, Riedel CU. CD14-dependent monocyte isolation enhances phagocytosis of listeria monocytogenes by proinflammatory, GM-CSF-derived macrophages. *PLoS One.*, **8**, e66898 (2013)



- 79) Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem.*, **278**, 5509-5512 (2003)
- 80) Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nuñez G, Inohara N. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol.*, **4**, 702-707 (2003)
- 81) Mahdavi Sharif P, Jabbari P, Razi S, Keshavarz-Fathi M, Rezaei N. Importance of TNF- $\alpha$  and its alterations in the development of cancers. *Cytokine.*, **130**, 155066 (2020)
- 82) Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, Li J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal.*, **26**, 192-197 (2014)
- 83) Adachi Y, Kindzelskii AL, Petty AR, Huang JB, Maeda N, Yotsumoto S, Aratani Y, Ohno N, Petty HR. IFN- $\gamma$  primes RAW264 macrophages and human monocytes for enhanced oxidant production in response to CpG DNA via metabolic signaling: roles of TLR9 and myeloperoxidase trafficking. *J Immunol.*, **176**, 5033-5040 (2006)
- 84) Abdi K, Singh NJ. Making many from few: IL-12p40 as a model for the combinatorial assembly of heterodimeric cytokines. *Cytokine.*, **76**, 53-57 (2015)
- 85) Zajd CM, Ziemba AM, Miralles GM, Nguyen T, Feustel PJ, Dunn SM, Gilbert RJ, Lennartz MR. Bone marrow-derived and elicited peritoneal macrophages are not created equal: The questions asked dictate the cell type used. *Front Immunol.*, **11**, 269 (2020)
- 86) Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **22**, 189-195 (2011)
- 87) Ishikawa E, Mori D, Yamasaki S. Recognition of mycobacterial lipids by immune receptors. *Trends Immunol.*, **38**, 66-76 (2017)
- 88) Kingeter LM, Lin X. C-type lectin receptor-induced NF- $\kappa$ B activation in innate immune and inflammatory responses. *Cell Mol Immunol.*, **9**, 105-112 (2012)
- 89) Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nuñez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem.*, **74**, 355-383 (2005)
- 90) Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev.*, **227**, 106-128 (2009)
- 91) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature.*, **413**, 732-738 (2001)
- 92) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.*, **282**, 2085-2088 (1998)

- 93) Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, Cookson BT, Aderem A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol.*, **4**, 1247-1253 (2003)
- 94) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.*, **408**, 740-745 (2000)
- 95) Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem.*, **276**, 4812-4818 (2001)
- 96) Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galán JE, Núñez G, Janeway CA, Medzhitov R, Flavell RA. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature.*, **416**, 194-199 (2002)
- 97) Park JH, Kim YG, McDonald C, Kanneganti TD, Hasegawa M, Body-Malapel M, Inohara N, Núñez G. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol.*, **178**, 2380-2386 (2007)
- 98) Chiffolleau E. C-type lectin-like receptors as emerging orchestrators of sterile inflammation represent potential therapeutic targets. *Front Immunol.*, **9**, 227 (2018)
- 99) Pahlavanneshan S, Sayadmanesh A, Ebrahimiyan H, Basiri M. Toll-like receptor-based strategies for cancer immunotherapy. *J Immunol Res.*, **2021**, 9912188 (2021)
- 100) Nabergoj S, Mlinarič-Raščan I, Jakopin Ž. Harnessing the untapped potential of nucleotide-binding oligomerization domain ligands for cancer immunotherapy. *Med Res Rev.*, **39**, 1447-1484 (2019)
- 101) Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.*, **307**, 731-734 (2005)
- 102) Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, Nakano H, Fukase K, Núñez G, Inohara N. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF- $\kappa$ B activation. *EMBO J.*, **27**, 373-383 (2008)
- 103) Jakopin Ž, Corsini E. THP-1 cells and pro-inflammatory cytokine production: An in vitro tool for functional characterization of NOD1/NOD2 antagonists. *Int J Mol Sci.*, **20**, 4265 (2019)
- 104) Wolfert MA, Murray TF, Boons GJ, Moore JN. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J Biol Chem.*, **277**, 39179-39186 (2002)
- 105) Hsu LC, Ali SR, McGillivray S, Tseng PH, Mariathasan S, Humke EW, Eckmann L, Powell JJ, Nizet V, Dixit VM, Karin M. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **105**, 7803-7808 (2008)
- 106) Yang S, Wang B, Humphries F, Jackson R, Healy ME, Bergin R, Aviello G, Hall B, McNamara D, Darby T, Quinlan A, Shanahan F, Melgar S, Fallon PG, Moynagh PN. Pellino3 ubiquitinates RIP2 and mediates Nod2-induced signaling and protective effects in colitis. *Nat Immunol.*, **14**, 927-936 (2013)

- 107) Töttemeyer S, Sheppard M, Lloyd A, Roper D, Dowson C, Underhill D, Murray P, Maskell D, Bryant C. IFN- $\gamma$  enhances production of nitric oxide from macrophages via a mechanism that depends on nucleotide oligomerization domain-2. *J Immunol.*, **176**, 4804-4810 (2006)
- 108) Awad F, Assrawi E, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Cobret L, Duquesnoy P, Piterboth W, Thomas L, Stankovic-Stojanovic K, Louvrier C, Giurgea I, Grateau G, Amselem S, Karabina SA. Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One.*, **12**, e0175336 (2017)
- 109) Kutikhin AG. Role of NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 gene polymorphisms in cancer etiology. *Hum Immunol.*, **72**, 955-968 (2011)
- 110) Guirado M, Gil H, Saenz-Lopez P, Reinboth J, Garrido F, Cozar JM, Ruiz-Cabello F, Carretero R. Association between C13ORF31, NOD2, RIPK2 and TLR10 polymorphisms and urothelial bladder cancer. *Hum Immunol.*, **73**, 668-672 (2012)
- 111) Ibrahim HM, Mohamed AH, Salem ML, Osman GY, Morsi DS. Anti-neoplastic and immunomodulatory potency of co-treatment based on bovine lactoferrin and/or muramyl dipeptide in tumor-bearing mice. *Toxicol Res.*, **9**, 137-147 (2020)
- 112) Patidar A, Selvaraj S, Chauhan P, Guzman CA, Ebensen T, Sarkar A, Chattopadhyay D, Saha B. Peptidoglycan-treated tumor antigen-pulsed dendritic cells impart complete resistance against tumor rechallenge. *Clin Exp Immunol.*, **201**, 279-288 (2020)
- 113) Roth J, Hopkins SJ, Hoadley ME, Tripp A, Aslan T, Störr B, Luheshi GN, Zeisberger E. Fever and production of cytokines in response to repeated injections of muramyl dipeptide in guinea-pigs. *Pflugers Arch.*, **434**, 525-533 (1997)
- 114) Liang H, Song XM, Wu XJ, Li JG, Han Y, Wang YL, Li H, Zhang ZZ, Le LL, Xu Y. Muramyl dipeptide enhances thermal injury-induced inflammatory cytokine production and organ function injury in rats. *Shock.*, **42**, 161-167 (2014)
- 115) Myhre AE, Aasen AO, Thiemermann C, Wang JE. Peptidoglycan--an endotoxin in its own right? *Shock.*, **25**, 227-235 (2006)
- 116) Johannsen L, Toth LA, Rosenthal RS, Opp MR, Obal F Jr, Cady AB, Krueger JM. Somnogenic, pyrogenic, and hematologic effects of bacterial peptidoglycan. *Am J Physiol.*, **258**, R182-186 (1990)
- 117) Fujimura T, Yamasaki K, Hidaka T, Ito Y, Aiba S. A synthetic NOD2 agonist, muramyl dipeptide (MDP)-Lys (L18) and IFN- $\beta$  synergistically induce dendritic cell maturation with augmented IL-12 production and suppress melanoma growth. *J Dermatol Sci.*, **62**, 107-115 (2011)
- 118) Paßlick D, Piradashvili K, Bamberger D, Li M, Jiang S, Strand D, R Wich P, Landfester K, Bros M, Grabbe S, Mailänder V. Delivering all in one: Antigen-nanocapsule loaded with dual adjuvant yields superadditive effects by DC-directed T cell stimulation. *J Control Release.*, **289**, 23-34 (2018)
- 119) Saiki I, Fidler IJ. Synergistic activation by recombinant mouse interferon- $\gamma$  and muramyl dipeptide of tumoricidal properties in mouse macrophages. *J Immunol.*, **135**, 684-648 (1985)

- 120) Tukhvatulin AI, Dzharullaeva AS, Tukhvatulina NM, Shcheblyakov DV, Shmarov MM, Dolzhikova IV, Stanhope-Baker P, Naroditsky BS, Gudkov AV, Logunov DY, Gintsburg AL. Powerful complex immunoadjuvant based on synergistic effect of combined TLR4 and NOD2 activation significantly enhances magnitude of humoral and cellular adaptive immune responses. *PLoS One.*, **11**, e0155650 (2016)
- 121) Mahapatra S, Crick DC, McNeil MR, Brennan PJ. Unique structural features of the peptidoglycan of *Mycobacterium leprae*. *J Bacteriol.*, **190**, 655-661 (2008)
- 122) Schleifer KH, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.*, **36**, 407-477 (1972)
- 123) Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.*, **32**, 149-167 (2008)
- 124) Dmitriev BA, Ehlers S, Rietschel ET, Brennan PJ. Molecular mechanics of the mycobacterial cell wall: from horizontal layers to vertical scaffolds. *Int J Med Microbiol.*, **290**, 251-258 (2000)
- 125) Batt SM, Burke CE, Moorey AR, Besra GS. Antibiotics and resistance: the two-sided coin of the mycobacterial cell wall. *Cell Surf.*, **6**, 100044 (2020)
- 126) Jankute M, Cox JA, Harrison J, Besra GS. Assembly of the mycobacterial cell wall. *Annu Rev Microbiol.*, **69**, 405-423 (2015)
- 127) Maitra A, Munshi T, Healy J, Martin LT, Vollmer W, Keep NH, Bhakta S. Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiol Rev.*, **43**, 548-575 (2019)
- 128) Kanemaru H, Mizukami Y, Kaneko A, Tagawa H, Kimura T, Kuriyama H, Sawamura S, Kajihara I, Makino K, Miyashita A, Aoi J, Makino T, Masuguchi S, Fukushima S, Ihn H. A mechanism of cooling hot tumors: Lactate attenuates inflammation in dendritic cells. *iScience.*, **24**, 103067 (2021)