

大豆イソフラボンによる新たながん免疫チェックポイント療法の開発

酒井 徹^{*1}・山本 真子¹・中本 晶子¹・中本 真理子¹・八木田 秀雄²

¹徳島大学大学院医歯薬学研究部実践栄養学分野

²順天堂大学医学部免疫学講座

Effects of Soy Isoflavones on Immune Checkpoint Therapy against Cancer

Tohru SAKAI^{*1}, Mako YAMAMOTO¹, Akiko NAKAMOTO¹,
Mariko NAKAMOTO¹ and Hideo YAGITA²

¹Department of Applied and Public Health Nutrition, Institute of Biomedical Sciences,
Tokushima University Graduate School, Tokushima 770-8503

²Department of Immunology, Faculty of Medicine, Juntendo University, Tokyo 113-8421

ABSTRACT

In this study, we examined the effect of soy isoflavone genistein on cancer immunotherapy in mice. C57BL/6 were inoculated with B16F1 melanoma cells and treated with either genistein or anti-mouse PD-1 monoclonal antibody (mAb) or with both. Mice treated with genistein or anti-PD-1 mAb showed lower tumor growth *in vivo*. In contrast, the reduction of tumor growth by treatment with genistein or anti-PD-1 mAb was canceled in mice treated with genistein and anti-PD-1 mAb. Flow cytometric analysis showed that frequencies of T cell receptor β^+ CD4⁺ cell and T cell receptor β^+ CD8⁺ in the tumor were the same between the 4 groups. The concentration of IFN- γ in mouse tumor treated genistein, anti-PD-1 mAb and both were smaller than those in control mouse tumor. A significant difference in TNF- α concentration in tumors was not observed among the 4 groups. These results show that the treatment of soy isoflavone genistein is effective for tumor therapy but the combination with anti-PD-1 mAb attenuates the tumor therapy. *Soy Protein Research, Japan* **25**, 93-99, 2022.

Key words : soy isoflavone, genistein, PD-1, cancer immunotherapy, IFN- γ

*〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

大豆は良質なたん白質および脂質に富み、日本人の食生活を代表する食品である¹⁾。多くの疫学的研究、*in vivo*および*in vitro*での研究から大豆イソフラボン^{2,3)}は乳がん・前立腺がんの発症抑制^{2,3)}、骨粗鬆症予防および更年期障害の緩和⁴⁾などに効果があるとされている。疫学的な例としては、日本をはじめとするアジアの国々は欧米諸国と比較して大豆製品を多く摂取し、乳がんや前立腺がんの発症率および死亡率が低いことが明らかになっている^{2,5,6)}。大豆イソフラボンには、ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテインの3種類のアグリコンとそれぞれの配糖体およびそれらのマロニル化配糖体、アセチル化配糖体の12種類がある⁷⁾。

がんの主な治療法としては外科治療や放射線治療、化学療法、免疫療法などがある。外科治療や放射線治療、化学療法は手術などによって腫瘍を外科的に摘出するなど腫瘍組織に直接作用する治療法であるのに対し、がん免疫療法は免疫細胞を介した方法であり、自身の免疫細胞を活性化させがん細胞に対する攻撃力を高める治療法である。

PD-1は、T細胞の細胞死誘導時に発現が増強される遺伝子として単離・同定された免疫グロブリンに属する膜たん白質である^{8,9)}。PD-1はリガンドであるPD-L1と結合することによりT細胞の活性化を抑制することが明らかにされている¹⁰⁾。PD-1は様々な免疫細胞に発現しており、PD-L1はがん細胞や感染細胞などに恒常的に発現している¹¹⁾。また、腫瘍の局所においてはキラーT細胞およびナチュラルキラー細胞がPD-1を高発現しており、抗腫瘍免疫応答の減弱の原因とされている。このPD-1/PD-L1結合を阻害する抗PD-1抗体の投与により、抗腫瘍免疫応答を増強できることが報告されている^{11,12)}。

これまでの研究で、大豆イソフラボンの一種であるゲニステインはB16メラノーマ肺転移の*in vivo*の実験系において抗腫瘍作用が報告されている。臨床の場で広く用いられているがん免疫チェック療法であるが、未だ有効な効果が得られる例は限られているのが現状である。現在、がん免疫チェック療法の効果を高める併用療法の研究が行なわれている。本研究では、がん免疫チェック療法に大豆イソフラボンであるゲニステインがどのように作用するのかメカニズムを含めて解析を行なった。

実験方法

試薬

ゲニステインは、東京化成工業より購入した。抗マ

ウスPD-1抗体を産生するハイブリドーマをICRヌードマウスの腹腔に投与し腹水を採取した。抗体の精製はカプリル酸とアンモニウム硫酸法の組み合わせで行なった。腹水の2倍量の0.06 Mの酢酸バッファー(pH 4)を加え、塩酸にてpHを4.8に調整をした。その溶液に腹水容量の3.3%のカプリル酸を攪拌しながら徐々に添加し室温で30分間攪拌した。溶液を遠心(4℃, 10,000 g, 30分)し、得られた上清はPBS溶液で透析を行なった。抗体溶液に等量の飽和硫酸溶液(pH 8)を加え30分間攪拌後、遠心(10,000 g, 20分)した。沈殿物はPBSに懸濁し、PBS溶液にて透析を行なった。

実験デザイン

6週齢雌C57BL/6マウスを日本SLC社より購入した。飼育は全て、温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、明暗周期12時間(明期 8:00 ~ 20:00)で行なった。マウスは実験期間を通じspecific-pathogen-free環境下で飼育し、食餌と飲水は自由摂取とした。マウスは、対象群、ゲニステイン群、PD-1群およびゲニステイン群 + PD-1群の4群にランダムに分けた。ゲニステインの投与は、マウス1匹体重1 kg当たりゲニステイン50 mgをB16F1腫瘍移入1週間前より毎日行なった。抗PD-1抗体投与は、B16F1細胞移入17日後からマウス1匹当たり500 μg の抗マウスPD-1抗体を3日ごとに投与を行なった。腫瘍の大きさは肉眼的に観察することが可能な時点より経時的に測定を行なった。腫瘍の大きさは次式により算出した [$\pi/6 \times [(\text{腫瘍長径} \times \text{腫瘍短径})^{0.5}]^3$]。

本研究は、徳島大学動物実験委員会によって承認されたものである。

フローサイトメトリー解析

腫瘍組織約100 mgを計り、はさみで細かくきざみ0.5%コラゲナーゼを含む10%牛血清添加RPM1 1640培地中で攪拌しながら37℃で1時間インキュベートした。攪拌細胞溶液を遠心したのち細胞をPBSにて2回洗浄し、40%Percol溶液に懸濁し70%Percol溶液に重層を行なった。1,800 rpmにて20分間遠心後、40%Percol溶液と70%Percol溶液の中間層にある細胞を回収した。細胞をPBSにて洗浄後1%牛血清を含むPBS溶液に懸濁し、FITC標識抗マウスCD8 抗体、PE標識抗マウスCD4 抗体、PE/Cy5標識抗マウスCD45抗体およびAPC標識抗マウスTCR- β 抗体を添加し4℃で30分インキュベートした。染色細胞を洗浄後、Guava easy CyteおよびIncyteソフトウェア(メルクミリア株式会社)にて解析を行なった。

IFN- γ およびTNF- α 測定

腫瘍組織約100 mgを計り、テフロンホモジナイザーにて組織を処理した。組織液を遠心分離後、上清を回収しサイトカイン測定時まで -30°C にて保存した。IFN- γ およびTNF- α 測定はBioLegend社のIFN- γ およびTNF- α ELISAキットを用いて測定を行なった。

統計処理

データは、平均 \pm 標準偏差として示した。群間の統計的有意差 ($*P < 0.05$) は、SPSSを用い一元配置分析の後、多重比較検定Tukey HSDを用いた。 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。

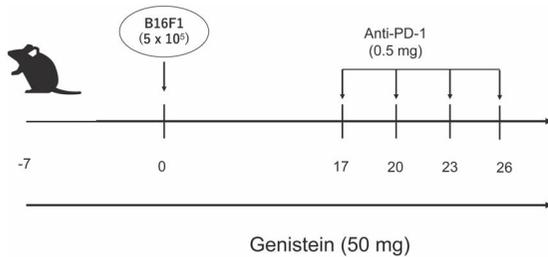


Fig. 1. Experimental protocol in this study.

結 果

ゲニステインおよびPD-1抗体投与がB16F1腫瘍増殖に対する作用

Fig. 1に示すプロトコールによりゲニステインおよびPD-1抗体投与を行なった。ゲニステインまたは抗PD-1抗体の投与により腫瘍移植後23日および26日目において対照群と比べ腫瘍の体積の縮小が認められた。ゲニステインおよび抗PD-1抗体の両者を投与した群においては腫瘍移植後23日目には統計学的に有意な腫瘍増殖の抑制が認められたが、26日目には対処群との間に差を認めなかった (Fig. 2およびFig. 3)。腫瘍の重量を測定したところ、4群間に統計学的な有意な差を認めなかったが、腫瘍の体積と同様な傾向が認められた (Fig. 4)。

ゲニステインおよびPD-1抗体投与と腫瘍内免疫細胞浸潤

抗腫瘍作用を発揮するのは白血球を中心とした免疫細胞である。フローサイトメトリー法を用いて腫瘍内に浸潤する免疫細胞の種類について解析を行なった。腫瘍内に浸潤した白血球のほとんどはT細胞レセプターを発現した細胞群であった。それら細胞群においてヘルパー T細胞のマーカーとしてCD4分子、細胞傷害性T細胞のマーカーとしてCD8分子の発現を解析

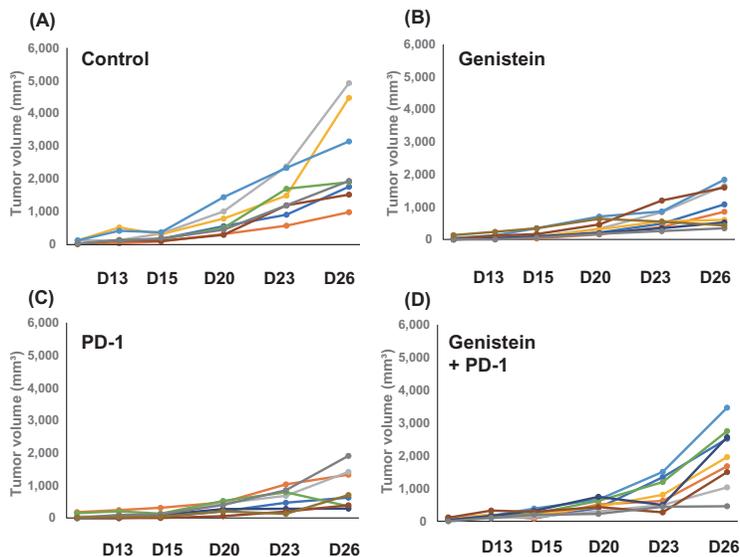


Fig. 2. Effect of genistein and anti-PD-1 mAb treatment on B16F1 melanoma cells in C57BL/6 mice. Tumor-inoculated C57BL/6 mice were given either genistein, anti-PD-1 mAb or genistein plus anti-PD-1 mAb. Tumor growth was investigated and data were shown in individual mice.

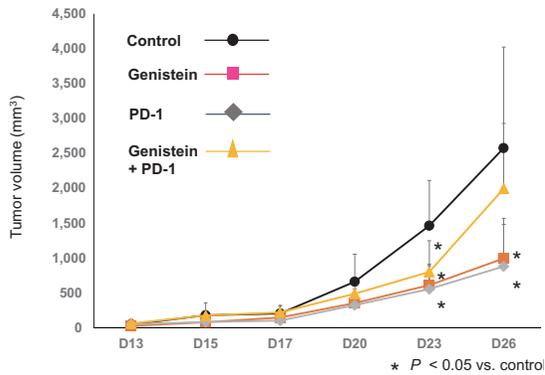


Fig. 3. Effect of genistein and anti-PD-1 mAb treatment on B16F1 melanoma cells in C57BL/6 mice. Tumor-inoculated C57BL/6 mice were given either genistein, anti-PD-1 mAb or genistein plus anti-PD-1 mAb. The data were shown as mean \pm SD. $P < 0.05$ compared with the control.

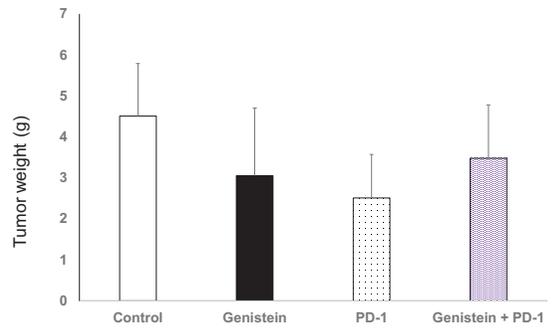


Fig. 4. Weight of tumor in mice treated with genistein, anti-PD-1 mAb or genistein plus anti-PD-1 mAb. The data were shown as mean \pm SD.

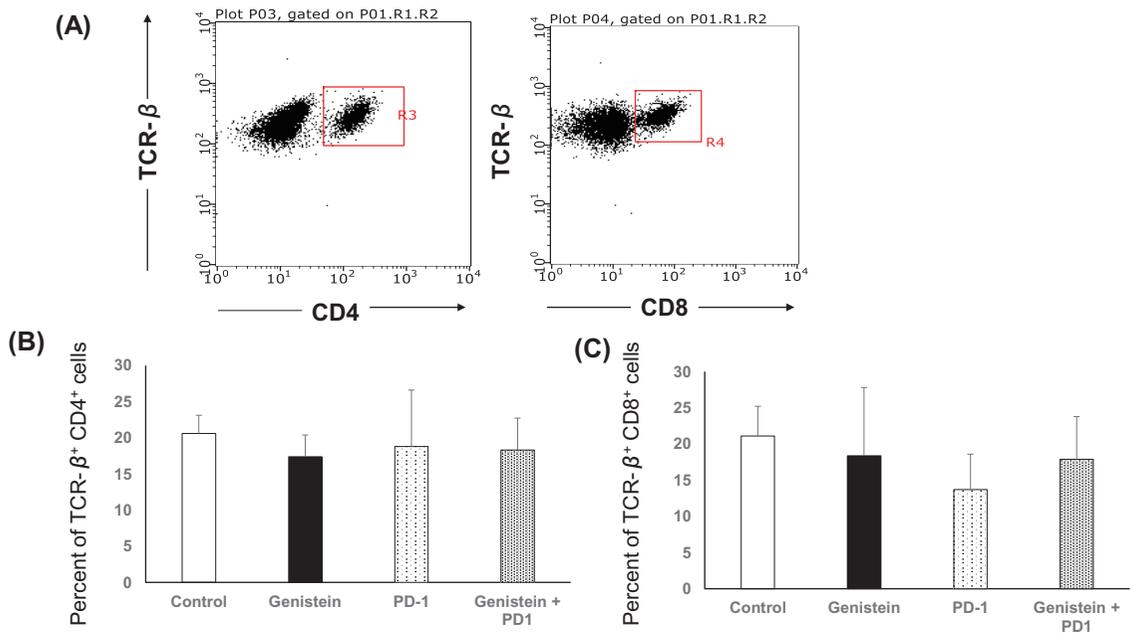


Fig. 5. Percentages of TCR- β ⁺CD4⁺ cells and TCR- β ⁺CD8⁺ cells in the tumor. Cells were purified from the tumor according to the "Materials and Methods" section. Representing flow cytometric profile (A). Percentages of TCR- β ⁺CD4⁺ cells (B) and TCR- β ⁺CD8⁺ cells (C) were analyzed using flow cytometry. Lymphocyte subsets were defined as CD45⁺ cells. The data were shown as mean \pm SD.

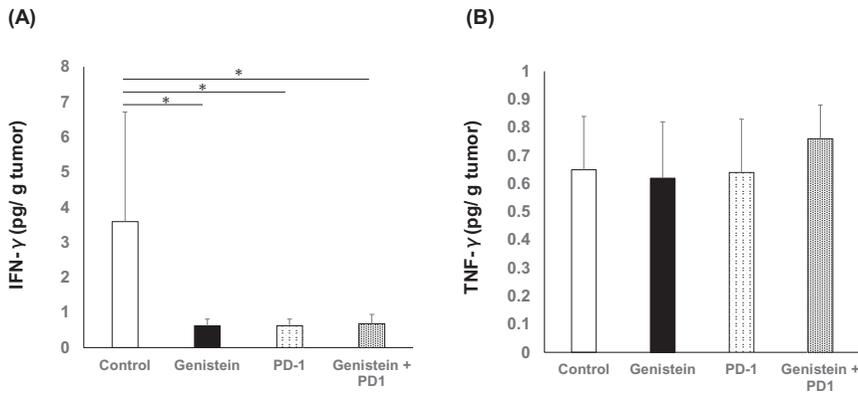


Fig. 6. The concentration of IFN- γ and TNF- α in the tumor. Tumor tissue was homogenized and centrifuged to remove debris. The concentration of IFN- γ (A) and TNF- α (B) were determined by ELISA methods. The data were shown as mean \pm SD. $P < 0.05$ compared with the control.

した。T細胞レセプター陽性細胞においてCD4またはCD8陽性細胞の割合は4群間で統計学的な有意な差を認めなかった (Fig. 5)。

ゲニステインおよびPD-1抗体投与とIFN- γ およびTNF- α サイトカイン

腫瘍傷害に関わる免疫細胞から産生される主要なサイトカインとしてIFN- γ およびTNF- α が知られている。腫瘍組織におけるIFN- γ およびTNF- α 含量をELISA法にて測定を行なった。IFN- γ に関しては対照群が他の群に比べ最も高い値を示した。一方、TNF- α に関しては、4群間で差を認めなかった (Fig. 6)。

考 察

本研究では、がん免疫チェック療法の一つである抗PD-1抗体投与に大豆イソフラボン的一种であるゲニステインを組み合わせることによる影響を観察した。ゲニステインおよび抗PD-1抗体の単独投与は抗腫瘍作用を示した。ゲニステインおよび抗PD-1抗体の同時投与も腫瘍移植23日目においては対照群と比べ腫瘍増殖が有意に抑えられていたが、ゲニステインおよび抗PD-1抗体による相加的な作用は認められなかった (Fig. 2 およびFig. 3)。これまでの報告で、B16F10メラノーマ細胞を接種したマウスに20 mg/kgのゲニステインを投与する実験系では、ゲニステインの投与により有意な腫瘍の増殖抑制が観察されており、その作用機序としてはナチュラルキラー細胞および細胞傷害性T細胞を介した細胞傷害性反応や、T細胞からのサイトカイン産生を高めることが示唆された¹³⁾。ゲニステインは抗腫瘍効果を有することが報告されているが、一方

で免疫反応を抑制することも報告されている。高濃度のイソフラボンをマウスに投与すると胸腺において成熟過程の分化段階であるCD4⁺CD8⁺細胞が著しく減少し、胸腺の萎縮が起こるといった報告である¹⁴⁾。胸腺の萎縮に伴い成熟型の末梢Tリンパ球の減少、遅延型過敏症反応の減弱といった機能性低下が起こる。OVA免疫マウスにゲニステインを投与すると、OVA特異的な増殖反応、サイトカイン産生 (IFN- γ およびIL-4) および抗体産生が抑制される^{14, 15)}。また、ゲニステインは、チロシinkinナーゼの阻害活性を有しているので¹⁶⁾、細胞内シグナル経路を減弱させる可能性もある。

腫瘍内におけるリンパ球集団の解析をフローサイトメトリー法にて行なったところ、ほとんどの細胞がT細胞マーカーであるT細胞レセプター β 鎖を発現していた。また、CD4およびCD8分子の発現を解析したところ、その発現比率に関しては4群間で差を認めなかった (Fig. 5)。一般的にT細胞レセプター β 鎖は成熟型T細胞が発現する分子であり、CD4またはCD8分子を発現している。今回の解析では、CD4およびCD8陽性の細胞割合は合わせて40%程度で、残りはCD4およびCD8を発現していない細胞群であり、細胞特性が解析されていない細胞集団である。これらの知見は、新たな抗腫瘍免疫機構の糸口となる発見かもしれない。

主要な抗腫瘍免疫を司るサイトカインとしてIFN- γ およびTNF- α が知られている。今回、IFN- γ およびTNF- α を測定したが、IFN- γ に関しては対照群が最も高いという結果が得られた (Fig. 6)。対照群では腫瘍の大きさは最も大きく、免疫細胞が活発に働いていることを反映した結果であることが推察される。

要 約

大豆イソフラボンには、骨粗鬆症、乳がんおよび前立腺がんといったホルモン依存性のがん予防作用があることが知られている。大豆イソフラボンの中でもゲニステインは、大豆中の含有量が高く、また生理活性が強い。がんの新たな治療法としてがん免疫チェック療法が開発され、現在臨床で広く用いられている。がん免疫チェック療法は、がん細胞から免疫細胞への抑制シグナルを抗体により遮断するものであり、その効果を高める手法の開発に注目が集まっている。今回は、がん免疫チェック療法の効果を高める手法としてゲニステインの効果を検証した。B16F1メラノーマを移植したマウスに、ゲニステイン投与あるいは抗PD-1抗体を投与すると腫瘍増殖の抑制が認められた。一方、両者の投与による相加的な影響は認められなかった。腫瘍内に浸潤する細胞群について検討を行なったが、T細胞レセプター陽性のCD4およびCD8陽性細胞の割合はいずれの群においても統計学的な有意差を認めなかった。腫瘍内におけるIFN- γ 濃度は対照群で最も高く、ゲニステインあるいは抗PD-1抗体を投与した群で低値を示した。これらの結果は、ゲニステインあるいは抗PD-1抗体の単独投与は抗腫瘍作用を示すが、両者の併用は相加的な作用を認めないことを示唆している。

文 献

- 1) 山内文男, 大久保一良 (1992): 大豆の科学. 朝倉書店, 東京.
- 2) Barnes S (1998): Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med*, **217**, 386-392.
- 3) Hoffman R (1995): Potent inhibition of breast cancer cell lines by the isoflavonoid kievitone: comparison with genistein. *Biochem Biophys Res Commun*, **211**, 600-606.
- 4) Suthar AC, Banavalikar MM and Biyani MK (2001): Pharmacological activities of Genistein, an isoflavone from soy (*Glycine max*): part II-anti-cholesterol activity, effects on osteoporosis & menopausal symptoms. *Indian J Exp Biol*, **39**, 520-525.
- 5) Messina MJ, Persky V, Setchell KD and Barnes S (1994): Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr Cancer*, **21**, 113-131.
- 6) Adlercreutz H (1990): Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, **201**, 3-23.
- 7) 家森幸男, 太田静行, 渡邊 昌 (2001): 大豆イソフラボン. 幸書房, 東京.
- 8) Ishida Y, Agata Y, Shibahara K and Honjo T (1992): Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*, **11**, 3887-3895.
- 9) Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M and Honjo T (1994): Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics*, **23**, 704-706.
- 10) Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S and Honjo T (2013): A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol*, **14**, 1212-1218 (2013).
- 11) Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, Rietz C, Flies DB, Lau JS, Zhu G, Tamada K and Chen L (2005): Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res*, **65**, 1089-1096.
- 12) Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T and Minato N (2002): Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci*, **99**, 12293-12297.

- 13) Guo TL, McCay JA, Zhang LX, Brown RD, You L, Karrow NA, Germolec DR, White KL, Jr (2001): Genistein modulates immune responses and increases host resistance B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice. *J Nutr*, **131**, 3251-3258.
- 14) Yellayi S, Naaz A, Szewczykowski MA, Sato T, Woods JA, Chang J, Segre M, Allred CD, Helferich WG and Cooke PS (2002): The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern?. *Proc Natl Acad Sci*, **99**, 7616-7621.
- 15) Kogiso M, Sakai T, Mitsuya K, Komatsu T and Yamamoto S (2006): Genistein suppresses antigen-specific immune responses through competition with 17 β -estradiol for estrogen receptors in ovalbumin-immunized BALB/c mice. *Nutrition*, **22**, 802-809.
- 16) Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y (1987): Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, **262**, 5592-5595.