

2020年10月1～3日に開催された「第79回日本癌学会学術総会」にて、「有機ゲルマニウム化合物 THGP はマクロファージ株 RAW 264.7 を M1 マクロファージへと分化させ抗腫瘍活性を誘導する」と題して、研究成果を報告いたしました。

研究の背景

アサイゲルマニウムは、20年以上前から「抗腫瘍作用」が報告されてきました。しかしながら、そのメカニズムの全容は明らかにされていません。

過去の研究では、アサイゲルマニウムを摂取した際、異物に反応して分泌される、免疫関連タンパク質のインターフェロン（IFN）が活性化することが明らかになっています。本研究は IFN で活性化されるマクロファージに着目し、マクロファージによるがん細胞の貪食能力へのアサイゲルマニウムの影響を確認しました。

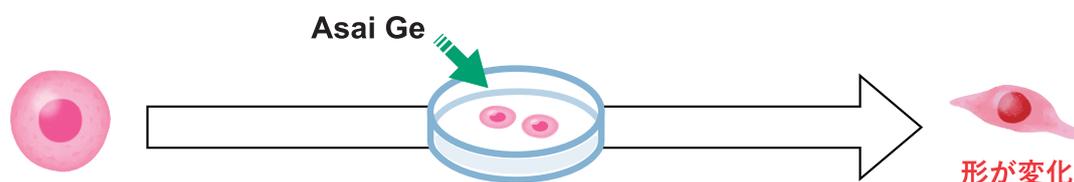
抑えておきたい『5つの細胞』

- ① **マクロファージ**：がん免疫において重要な役割を果たす免疫細胞。自然免疫としてはたらく細胞の一つ。マクロファージが活性化すると、M1 又は M2 のどちらかのタイプになる。
- ② **M1 マクロファージ**：IFN や LPS によって炎症促進性の機能を持つ＝抗腫瘍活性を持つ。
- ③ **M2 マクロファージ**：IL-4 によって抗炎症性の機能を持つ＝がん細胞の進展や転移を促進する。
※M1 と M2 は常にバランスを保っているが、抗腫瘍領域においては、M1>M2 となることが望ましい。
- ④ **RAW 264.7**：マウス由来のマクロファージ細胞。細胞を用いた実験でよく用いられる。通称 M0 マクロファージと呼ばれ、M1 又は M2 のどちらかに分化する。
- ⑤ **マウスメノラーマ細胞 B164A5**：マウス実験用のがん細胞。

研究の内容

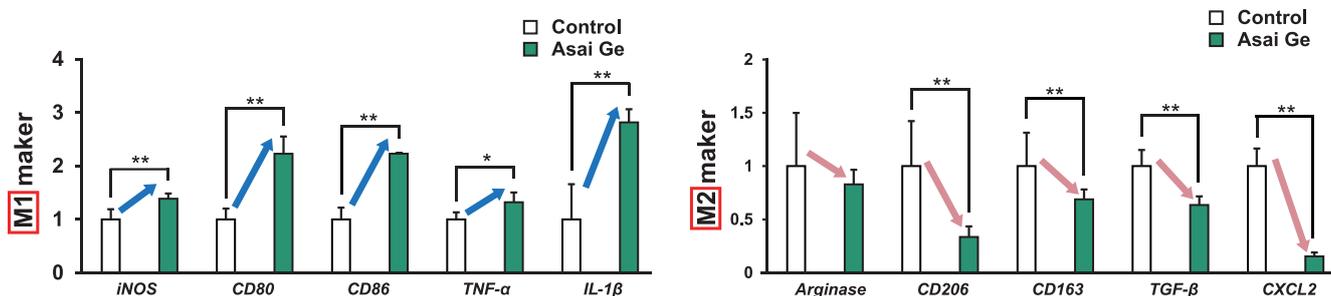
実験1:RAW264.7(M0 マクロファージ)に、アサイゲルマニウムを与え続けるどうなるか!?

RAW264.7 を、アサイゲルマニウムの添加を繰り返しながら、長期間培養しました。その結果、形を変える(活性化)ことが明らかになりました。



実験 2：形が変わった(活性化した)RAW264.7 は、M1 か？ M2 か？ ?

続いて、Real time-RT-PCR 法という分析法で、RAW264.7 の形の変化が、M1 や M2 への分化によるものなのかを調べました。



左側のグラフが M1 に関与するマーカー、右側が M2 に関与するマーカーの発現を解析した結果です。Control は何もしていない RAW264.7 (白グラフ)、Asai Ge は、アサイゲルマニウムを添加した RAW264.7 (緑グラフ) を示しています。

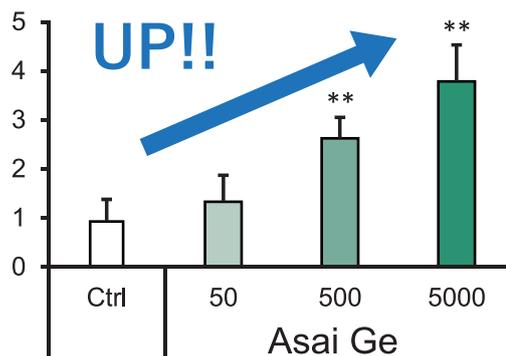
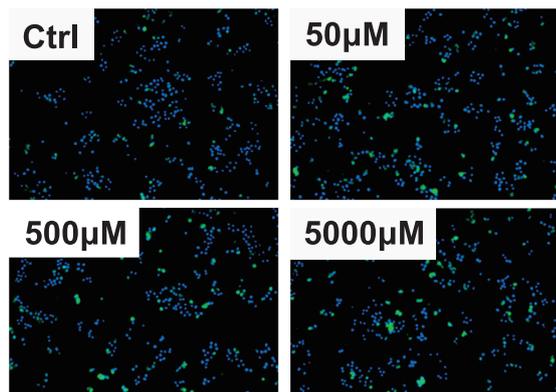
アサイゲルマニウムを添加すると M1 マーカーが増え、M2 マーカーは減ることが明らかになりました。

つまり、アサイゲルマニウムを与えたマクロファージ (RAW264.7) は、抗腫瘍活性を持つ M1 マクロファージに分化(活性化)したのです。

実験 3：M1 に活性化したマクロファージは、きちんと機能しているか？ ?

活性化し M1 マクロファージとなったとしても、機能しない細胞だと意味がありません。

『Rabbit IgG FITC-latex beads』というキットを用いて、アサイゲルマニウムで M1 様に分化したマクロファージの異物に対する貪食能(食能)を調べました。



左側の写真は、貪食能の強弱を蛍光色(緑)で示しています。また、右側のグラフは、アサイゲルマニウムを添加していない細胞(Ctrl)とアサイゲルマニウムを添加した細胞(Asai Ge)、それぞれの貪食能を数値化したものです。数字が大きくなるほどアサイゲルマニウムの濃度が高いことを示しています。

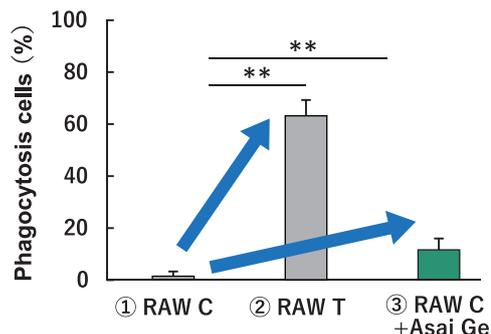
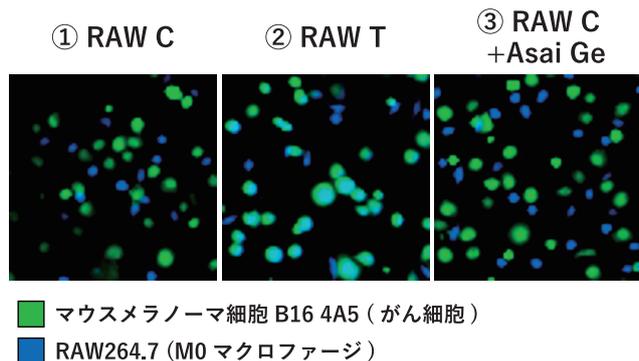
その結果、アサイゲルマニウム濃度が高くなるほど、マクロファージの貪食能が高くなる(緑色の蛍光が強くなる)ことが確認されました。

実験 4：活性化した M1 マクロファージはがん細胞を貪食することができるか？

RAW264.7 (M0 マクロファージ) にアサイゲルマニウムを長期間添加し、マウスメラノーマ細胞 B16 4A5 (がん細胞) と共培養しました。

<実験群構成>

- ① RAW C：RAW264.7(M0 マクロファージ)とがん細胞を共培養。
- ② RAW T：アサイゲルマニウムで長期処理した RAW264.7(活性化した M1 マクロファージ) とがん細胞を共培養。
- ③ RAW C+Asai Ge：RAW C の共培養系にアサイゲルマニウムを短時間だけ添加したもの。



がん細胞を示す緑色とマクロファージを示す青色が重なった水色の蛍光の部分が、マクロファージががん細胞を貪食していることを示しています。

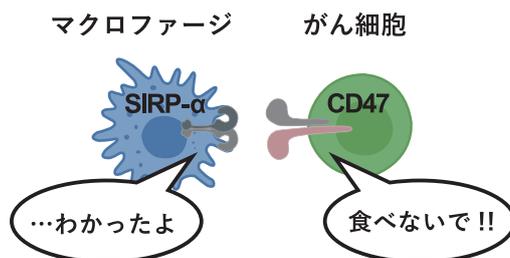
②のアサイゲルマニウムを添加した RAW264.7(RAW T)は、①の何も添加していない RAW C と比較して、貪食能が上がっている様子が画像で確認できます。また、グラフで示すとおり、アサイゲルマニウムを添加し、短時間だけ共培養した時も、マクロファージの貪食能の向上が確認されました。

RAW264.7 (M0 マクロファージ) にアサイゲルマニウムを添加し長期間培養すると、アサイゲルマニウムを添加していない通常の RAW264.7 と比べて、有意に貪食能が上がる事が確認されました。

実験 5：抗腫瘍作用のメカニズムに迫る！！がん細胞の“Don't eat me signal (食べるなシグナル)”を無視できるようになる！？

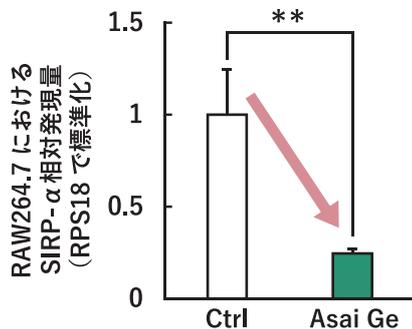
がん細胞は、CD47 という“Don't eat me signal (食べるなシグナル)”を発することが知られています。CD47 のシグナルをマクロファージが持つ SIRP- α という認識レセプターで受け取ってしまうと、マクロファージはがん細胞を攻撃できなくなってしまいます。

本研究では、アサイゲルマニウムを添加し長期間培養した RAW264.7 (活性化した M1 マクロファージ) が、がん細胞の CD47 (食べるなシグナル) に対してどのような影響を持つか調べました。

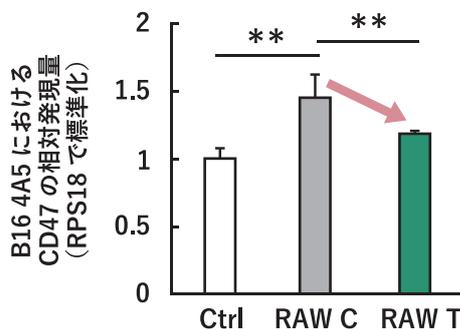


アサイゲルマニウムを添加し 10 日間以上培養した RAW264.7 の SIRP- α の発現を、Real time RT-PCR 法を用いて調べました。

① マクロファージ(RAW264.7)にアサイゲルマニウムを添加すると SIRP- α の発現が低下



② アサイゲルマニウムで活性化したマクロファージの培養上清を B16 4A5 に添加すると CD47 が減少



その結果、通常の RAW264.7 (Ctrl) に比べ、アサイゲルマニウムを添加した RAW264.7(Asai Ge) では、SIRP- α の発現が減少することが確認されました。

さらに、B16 4A5(がん細胞)の CD47(食べるなシグナル)発現量を調べたところ、通常の RAW264.7(RAW C) の培養上清を B16 4A5 に添加すると CD47 の発現増加が見られました。一方で、アサイゲルマニウムを添加した RAW264.7(RAW T) の培養上清を B16 4A5 に添加すると、CD47 の発現増加が抑えられました。

つまり、アサイゲルマニウムにより活性化したマクロファージは、「食べるなシグナル」を受容しにくくなるとともに、がん細胞の「食べるなシグナル」の発現を抑えることで、がん細胞の貪食性が上がっている可能性が示されました。

まとめ

今回の研究により、RAW264.7 に長期間アサイゲルマニウムを添加することで下記のことが分かりました。

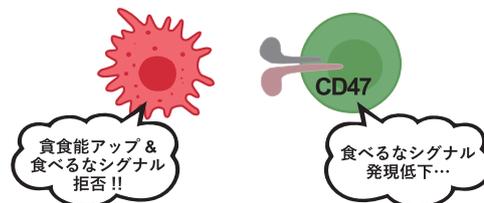
- ① マクロファージは抗腫瘍活性をもつ M1 マクロファージに分化(活性化)する。
- ② アサイゲルマニウム処理によって分化した M1 マクロファージは貪食能が有意に上がる。
- ③ アサイゲルマニウム処理によって分化した M1 マクロファージは、「食べるなシグナル」によるがん細胞の免疫回避のはたらきを抑制する。

本研究により、アサイゲルマニウムの「抗腫瘍作用」のメカニズムの一端が明らかになりました。

今後も健康に役立つ利用法を確立するため、作用メカニズムの解明を進めてまいります。

M1 マクロファージ

がん細胞



お問い合わせ



株式会社

浅井ゲルマニウム研究所

ASAI Germanium Research Institute Co., Ltd.

〒215-0004 神奈川県川崎市麻生区万福寺
1-1-1 新百合ヶ丘シティビルディング 3F
TEL: 044-954-2101 FAX: 044-954-2066

無断複写・無断転載禁止