

201008019A

厚生労働科学研究補助金
創薬基盤推進研究事業

漢方薬による免疫がん微小環境の改善と作用機序の

解明に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 河上裕

平成23（2011）年5月

厚生労働科学研究補助金
創薬基盤推進研究事業

漢方薬による免疫がん微小環境の改善と作用機序の
解明に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 河上裕

平成23（2011）年5月

目次

I. 総括研究報告	
漢方薬による免疫がん微小環境の改善と作用機序の解明	4
II. 分担研究報告	12
1. 研究対象となる漢方方剤・成分の選択	12
2. 漢方方剤の <i>in vivo</i> 作用の検討	12
1) 担がんマウス免疫細胞に対する <i>in vivo</i> 作用	16
2) 腸管免疫系に対する <i>in vivo</i> 作用	23
3. がん細胞と免疫細胞に作用する漢方成分の同定	27
1) ヒトがん細胞からの免疫抑制性サイトカインの産生を抑制する漢方成分の同定	27
2) 制御性 T 細胞の誘導を抑制する漢方成分の同定	33
3) 腫瘍免疫と腸管免疫に重要な免疫細胞 (Treg, Th17, $\gamma\delta$ T など) に関与する AhR に作用する漢方成分のスクリーニングと免疫細胞やがん細胞への作用の検討	35
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	46

I. 厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）総括研究報告書

漢方薬による免疫がん微小環境の改善と作用機序の解明に関する研究

研究代表者 河上裕 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所・教授

研究要旨

本研究では、漢方による、がん治療にとって重要な「担がん生体の免疫抑制環境の改善作用」と「抗腫瘍免疫の増強作用」を検討し、その有効成分を同定し、作用機構を解明して、がん治療に応用できる漢方成分、創薬へのリード化合物を同定することを目的としている。そのために、研究担当者が今までに開発してきた、がん細胞による免疫抑制機構の解析法や漢方の解析法を駆使して、有用な漢方成分の同定を目指した。本年度は、漢方処方（十全大補湯と小柴胡湯）の経口投与によるがん微小環境の免疫抑制状態改善作用を検討したが、そのような作用は認められるが、効果は強力ではないので、漢方処方中の有効な漢方成分の同定を試みた。62種類の漢方成分を用いて、研究者が今までに見いだしてきた適切なヒトがん細胞スクリーニング系を用いて、がん細胞からの免疫抑制性サイトカイン産生の抑制作用、担がん生体での免疫抑制に重要な制御性 T 細胞誘導の阻害作用、さらに、がん細胞および制御性 T 細胞などの分化・機能に關与する芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor (AhR))の阻害作用をもつ漢方成分を探索し、複数の候補分子の同定に成功した。次年度以降は、本年度同定した漢方成分などの、*in vivo* 効果の検討や分子標的の同定などのさらなる解析により、がん治療の併用薬として有用な漢方成分、あるいは、がん治療創薬においてリード化合物となる漢方成分の同定を目指す。

研究分担者

工藤 千恵、免疫学的解析、慶應義塾大学医学部
藤田 知信、免疫学的解析、慶應義塾大学医学部
渡辺 賢治、漢方薬の解析、慶應義塾大学医学部
山本 雅浩、漢方薬の解析、慶應義塾大学医学部
今津 嘉宏、漢方薬の解析、慶應義塾大学医学部
木内 文之、漢方薬の解析、慶應義塾大学薬学部

A. 研究目的

我々は、がん免疫療法の開発を1つの目標として、ヒトがん細胞に対する免疫応答の解析を行ってきた。その結果、免疫の標的となるがん抗原は存在するが、それに対する免疫応答は弱いこと、さらに担がん生体では、全身性、また、がん関連微小環境における局所的な免疫抑制環境のために、免疫療法の効果が得られにくいことを明らかにしてきた。そして、免疫抑制環境構築の細胞・分子機構の解明とその改善法の開発を進めてきた。その機序の1つとして、がん細胞における、がん遺伝子異常に起因する MAPK シグナルなどの恒常的シグナル活性化による TGF- β などの免疫抑制性サイトカインの産生や制御性 T 細胞などの免疫抑制性細胞の誘導があり、シグナル阻害薬等の分子標的薬が、がん細胞、場合によっては免疫細胞にも作用して、がん免疫抑制環境の改善や抗腫瘍免疫応答の増強を化能にすることを報告してきた(*JEM2006, CCR 2009, Cancer Cell 2009*)。また、 β -グルカンなどのキノコや細菌等から抽出した成分は、樹状細胞などの自然免疫系細胞の活性化を介して抗腫瘍免疫応答を増強することを示してきた(*CCR 2009*)。同時に、漢方処方では、Th1/Th2 バランスや免疫細胞の分化・機能の調節など免疫調節作用をもつことを明らかにしてきた (*IJI 2000, JJP 2002, EJP2005*)。これら漢方処方には、多数の免疫調節物質やシグナル伝達分子阻害剤が含有されていることが示唆されている。

そこで、本研究では、漢方による担がん生体免疫抑制環境の改善作用と抗腫瘍免疫の増強作用を、新しい視点から科学的に解明する。具体的には、十全大補湯などの漢方処方の経口投与による直接、あるいは腸管免疫を介したがん免疫応答への *in vivo* 作用と、すでに抽出・合成されている漢方成分のがん細胞や免疫細胞のシグナル伝達分子や転写因子（腸管とがん微小環境に存在し、がん免疫応答に負に作用する制御性 T 細胞や Th17 細胞が発現する AhR など）を介した、がん免疫応答への *in vitro* と *in vivo* 作用を明らかにし、漢方成分による担がん生体免疫抑制病態の改善と抗腫瘍免疫応答の増強の可能性を追究する。

本研究の成果は、がん治療における漢方の科学的意義の解明を通じて、日本の漢方研究に貢献できるだけでなく、現在、日本で死因第一位であるがんに対して、標準治療への併用による治療効果や QOL の向上につながり、また、今後の漢方のがん医療における役割の明確化につながり、国民の健康・医療への貢献と、行政施策の決定、漢方の産業化につながる基礎データとなると考えられる。

B. 研究方法

in vitro 解析においては、すでに同定されている漢方成分を用いて、ヒトがん細胞や各種免疫細胞に対する効果を検討し、その標的（シグナル伝達分子や転写因子等）の同定を考慮しながら、*in vivo* でのがん微小環境の免疫抑制病態の改善や抗腫瘍免疫応答の増強に有用な漢方成分の同定を目指す。特に、がん細胞やがん組織に浸潤し免疫病態に関与する免疫細胞、さらに、漢方経口投与で直接影響を受け、全身性免疫への影響が期待される腸管免疫細胞への作用を検討する。

In vivo 解析においては、我々が開発してきたマウス腫瘍モデルなどを用いて、各種漢方処方剤の経口投与、あるいは同定した漢方成分の経口投与や全身性投与により、がん微小環境免疫病態や腸管免疫への作用を解析する。最終的には、同定した漢方処方剤や成分の併用によるがん免疫療法の効果増強作用を解析して、臨床応用の可能性を検討する。

このような3年計画の中で、本年度の具体的な研究方法は、以下である。

1. 研究対象となる漢方方剤・成分の選択

2. 漢方方剤の*in vivo*作用の検討

(ア) 担がんマウス免疫細胞に対する*in vivo*作用

(イ) 腸管免疫細胞に対する*in vivo*作用

3. がん細胞と免疫細胞に作用する漢方成分の同定

1) ヒトがん細胞からの免疫抑制性サイトカインの産生を抑制する漢方成分の同定

2) 制御性T細胞(iTreg)の誘導を抑制する漢方成分の同定

3) がん細胞および腫瘍免疫と腸管免疫に重要な免疫細胞に関与するAhRに作用する漢方成分の同定と、免疫細胞やがん細胞への作用の検討

本研究を実施するにあたり以下の倫理的配慮を行っている。組換え遺伝子実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第三条の規定に基づく基本的事項」、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律施行規則」、「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散

防止措置等を定める省令」、「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令の規定に基づき認定宿主ベクター系等を定める件」に基づき作成された実験計画を組換え実験安全委員会に申請し、既に承認を受けている。実験従事者は毎年遺伝子組換え実験安全委員会の講習を受けたのち、登録され研究を行っている。動物実験は、文部省学術交際局長通知「大学等における動物実験について」に基づき大学の動物実験ガイドラインに従って行われている。実験の計画を動物実験委員会に申請し、承認を受け、動物実験従事者はすべて講習を受け従事者登録の後、実験を行っている。ヒト検体を用いた解析は「ヒトを対象とする医学研究」であることから、ヘルシンキ宣言（2000年改定）、厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に従い研究計画書を作成し、倫理委員会の承認を受けて実施する。

C. 研究結果

文献調査等により「がん細胞による免疫抑制環境の改善」と「抗腫瘍免疫応答の増強」をもつ可能性のある漢方方剤を優先順位を付けて選択し、品質安定性の優れるツムラの処方を用いることとした。日本薬局方における生薬類の確認試験法の際の標準品となる化合物が市販されていることから、62種類の漢方成分を購入入手した。

担がんマウス免疫細胞に対する漢方処方の*in vivo*作用の検討では、十全大補湯の経口投与では、抗腫瘍効果が期待できるCD8⁺T細胞とNK細胞の割合の増加と、免疫抑制性に働く骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)と制御性T細胞(Treg)の減少が認められた。小柴胡湯の経口投与でも、抗腫瘍性のCD8⁺T細胞とNK細胞の増強作用と、MDSCとTreg細胞の抑制作用がある可能性が示唆された。腸管免疫に対する*in vivo*作用の検討では、十全大補湯では、腸管粘膜固有層のCD8⁺T細胞の増加、Treg誘導性のCD103⁺DCの減少、小柴胡湯では、腸管粘膜固有層のTreg細胞の減少作用が認められ、腸管免疫を介した抗腫瘍免疫応答の増強の可能性もあることが示唆された。

がん細胞と免疫細胞に作用する漢方成分の同定において、ヒトがん細胞からの免疫抑制性サイトカインの産生を抑制する漢方成分の同定では、ヒト卵巣癌細胞株からのIL6産生を減少させる4漢方成分が、ヒト悪性黒色腫細胞株からのIL10産生を減少させる5漢方成分が、ヒト膵臓癌細胞株からのTGF- β 産生を減少させる6漢方成分が同定された。誘導性

制御性 T 細胞(iTreg)の誘導を抑制する漢方成分の同定では、TGF- β による iTreg 誘導を抑制する多数の漢方成分が同定された。

がん細胞および腫瘍免疫や腸管免疫に重要な免疫細胞に関与する AhR に作用する漢方成分の研究においては、まず、ヒト大腸癌がん組織検体の AhR 免疫染色により、がん細胞や、がん組織に浸潤するリンパ球での AhR 発現と核移行が認められ、AhR ががん細胞やがん浸潤リンパ球で活性化されており、その機能に関与することが示唆された。次に、漢方成分から AhR 作動薬をスクリーニングするアッセイ系を開発し、漢方成分 62 種類を用いて AhR 作動薬をスクリーニングしたところ、AhR アゴニスト候補となる 4 漢方成分と AhR アンタゴニスト候補となる 8 漢方成分を同定した。これら AhR アゴニスト候補は TGF- β による *in vitro* iTreg 誘導を促進し、また AhR アンタゴニストは iTreg 誘導を軽度であるが抑制した。

D. 考察

漢方処方である十全大補湯も小柴胡湯も、腫瘍縮小効果は単独ではほとんど認められないが、抗腫瘍性リンパ球などの活性化や免疫抑制性細胞の抑制により、担癌生体の免疫抑制環境の改善や抗腫瘍免疫応答の増強を起こす可能性が示された。したがって、漢方処方の併用により、免疫療法などのがん治療の効果を改善できる可能性が示唆された。しかし、その効果は強くないので、漢方処方中の活性成分を同定して使用することが期待される。また、十全大補湯と小柴胡湯は、腸管免疫系への作用を介して、全身性の抗腫瘍免疫応答を増強する可能性も示唆された。今後、免疫療法との併用により、免疫療法の効果を増強する可能性を検討する予定である。

ヒトがん細胞からの IL6, IL10, TGF- β などの免疫抑制性サイトカインの産生を抑制して、担がん生体の免疫抑制環境を改善し得る漢方成分を同定した。これらの漢方成分は、我々が今までに見いだしてきたシグナル阻害剤（分子標的薬）と同様に、免疫抑制性サイトカインの産生を抑えて、担がん生体の免疫抑制環境を改善し、免疫療法の効果を増強できる可能性がある。シグナル阻害剤は、がん細胞の増殖生存を直接抑制する場合も多く、抗腫瘍製剤としても有用である可能性がある。また、*in vitro*での TGF- β による iTreg 誘導を阻害する漢方成分を同定した。これらの漢方成分の投与は、やはり、免疫抑制病態を改善で

きる可能性がある。今後、我々が開発したマウス腫瘍モデルを用いて *in vivo* 効果を検討する予定である。

本研究では、がん細胞、およびがん組織浸潤リンパ球や腸管リンパ球 (Treg, Th17, $\gamma\delta$ T など) に発現する AhR に作用する漢方成分の同定を試みた。AhR 作動薬をスクリーニングするアッセイ系を新たに構築して、AhR アンタゴニストや AhR アゴニストとなる漢方成分を同定した。AhR アンタゴニストは TGF- β による iTreg 誘導を抑制したので、これらの AhR 作動薬は、がん微小環境免疫抑制病態の改善や抗腫瘍免疫応答増強に有用である可能性が示唆された。今後、マウス腫瘍モデルを用いた *in vivo* 効果の検討や、がん細胞の浸潤能などへの作用を検討予定である。

E. 結論

本年度の研究により、マウス腫瘍モデルに対する漢方処方（十全大補湯と小柴胡湯）の経口投与では、がん微小環境の免疫抑制状態を改善する可能性はあるものの、その効果は強くないので、漢方処方から活性成分を同定することが重要である。そこで、購入入手した 62 種類の漢方成分を用いて、各種方法で有用な成分の同定を試みた。その結果、NF- κ B などのシグナル伝達分子を標的として、がん細胞からの複数の免疫抑制分子の産生を抑制したり、AhRなどを標的として、制御性 T 細胞などの免疫抑制細胞を抑える可能性のある漢方成分を同定した。次年度以降、本年度同定した漢方成分の作用強度、さらに *in vivo* 効果の検討により、がん微小環境の免疫抑制状態の改善作用、あるいは抗腫瘍免疫の増強作用により、同定した漢方成分が、がん治療における併用薬として臨床応用の可能性があるかどうかをさらに検討して行く予定である。また、同定した漢方成分をリード化合物として、より有効な化合物を合成することも考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

海外

1. Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Ueda R, Iwata-Kajihara T, Nishio H, Kawamura N, Kawakami Y. The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies. *Int J Hematol.* 93(3):294-300. 2011

国内

1. 河上裕. がん免疫ネットワークの総合的制御によるがん治療の可能性. *日本臨床.* 68(6):1094-1099.2010.
2. 河上裕、梶原-岩田知子、宮崎潤一郎、川村直. がんに対する免疫応答の細胞分子機構とその制御法. *Mebio.* 27(12):19-27.2010.

著書

1. 河上裕、工藤千恵、塚本信夫、植田良、住本秀敏、谷口智憲. 担がん生体における免疫病態とがん転移. 丸義朗監修. *細胞工学.別冊「がん転移」*:170-175.2010.

学会発表

国際学会

1. Yutakawa Kawakami, Development of immunotherapy combined with in site tumor destruction., World Cancer Congress 2010, SingaporeEXPO, 2010/6/24
2. Yutaka kawakami, Chie Kudo-Saito, Hidetoshi Sumimoto, Nobuo Tsukamoto, Ryo Ueda, Tomonori Yaguchi., Immunosuppression by human cancer cells and it's control for effective immunotherapy., 14thInternational Congress of Immunology 2010, Kobe International Convention Center, 2010/8/24
3. Tomonori Yaguchi, Yasufumi Goto, Kenji Kido, Hiroshi Mochimaru, Toshiharu Sakurai, Nobuo Tsukamoto, Chie Kudo-Saito, Tomonobu Fujita, Hidetoshi Sumimoto, Yutaka Kawakami., Immune escape of human melanoma via activated Wnt/ β -catenin signaling., 14thInternational Congress of Immunology 2010, Kobe International Convention Center, 2010/8/25

国内学会

1. 河上裕, がん関連微小環境における免疫抑制病態とがん細胞の免疫抵抗性の分子機構の解明とその制御, 第 19 回日本癌病態治療研究会, 東京ステーションコンファレンス, 2010/7/1
2. 西尾浩、谷口智憲、岩田卓、桜井敏晴、塚本信夫、工藤千恵、藤田知信、河上裕, 卵巣癌における NF- κ B シグナルの亢進は、IL-6 の産生および MDSC の誘導により、免疫抑制に関与する, 第 14 回日本がん免疫学会, KKR ホテル熊本, 2010/7/23
3. 谷口智憲、守井賢二、西尾浩、桜井敏晴、塚本信夫、工藤千恵、藤田知信、河上裕, 悪性黒色腫および樹状細胞での Wnt/ β -catenin シグナル亢進はがん微小環境での免疫抑制に関与する, 第 14 回日本がん免疫学会, KKR ホテル熊本, 2010/7/23
4. Yutaka Kawakami, Chie Kudo-saito, Hidetoshi Sumimoto, Nobuo Tsukamoto, Ryo Ueda, Naoshi Kawamura, Tomonori Yaguchi., Immunosuppressions by human cancer cells and their control for effective immunotherapy., 第 72 回日本血液学会総会, パシフィコ横浜, 2010/9/24
5. Chie Kudo-Saito, Eradication of cancer metastasis by breaking a crucial link to systemic immunosuppression underlying poor outcome., 第 69 回日本癌学会, 大阪国際会議場, 2010/9/23
6. 河上裕, がん細胞と免疫系の相互作用の解明 -効果的な免疫療法の開発を目指して-, 第 189 回 生命科学フォーラム, 東京, 2011/1/19

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告書

研究代表者が統括し、分担者が全てに関わりながら研究を実施したことから、研究代表者が各研究項目について報告する。

1. 研究対象となる漢方方剤・成分の選択

「漢方薬による免疫がん微小環境の改善と作用機序の解明」(H22-創薬総合-一般-003)を実施するに際し、「がん細胞による免疫抑制環境の改善」と「抗腫瘍免疫応答の増強」という作用をスクリーニングの目標に設定した。混合物である漢方方剤から生理活性を指標に単一の有効成分を単離することはきわめて困難であることがこれまでの経験から分かっているため、方剤から有効成分を単離する方法だけでなく、最初から入手可能な精製標品からのスクリーニングを重視した。すなわち、漢方方剤の *in vivo* スクリーニングと、漢方成分精製標品の *in vitro* スクリーニングを同時に開始した。多数の漢方方剤の中から、文献調査等により、「がん細胞による免疫抑制環境の改善」と「抗腫瘍免疫応答の増強」をもつ可能性のある方剤を、優先順位を付けて選択した。

漢方センター研究者と文献調査等を行い、本研究の目的に合う処方として、十全大補湯、小柴胡湯、補中益気湯、大建中湯、黄連解毒湯、五苓散、桃核承気湯、防風通聖散、防己黄耆湯が候補としてあがり、その構成生薬を再確認した。(表)

	処方構成生薬（「新一般用漢方処方の手引き」より）								
	防己黄耆湯	防風通聖散	十全大補湯	大建中湯	桃核承気湯	五苓散	補中益気湯	黄連解毒湯	小柴胡湯
甘草	○	○	○		○		○		○
生姜	○	○		○			○		○
白朮	○ (蒼朮可)	○	○ (蒼朮可)				○ (蒼朮可)		
蒼朮						○ (白朮可)			
人参			○	○			○		○
黄耆	○		○				○		
黄芩		○						○	○
桂皮			○		○	○			

大棗	○						○		○
當歸		○	○				○		
芒硝		○			○				
山梔子		○						○	
芍藥		○	○						
川芎		○	○						
大黃		○			○				
茯苓			○			○			
黃柏								○	
黃連								○	
滑石		○							
桔梗		○							
荊芥		○							
柴胡							○		○
山椒				○					
熟地黃			○						
升麻							○		
石膏		○							
沢瀉						○			
猪苓						○			
陳皮							○		
桃仁					○				
膠飴				○					
薄荷		○							
半夏									○
防己	○								
防風		○							
麻黃		○							
連翹		○							

これらの候補処方の中でも、十全大補湯では マクロファージ・NK 細胞活性化が、小柴胡湯、補中益気湯、柴朴湯、柴苓湯などは Th1 活性化が、四君子湯、六君子湯などは TGF β 活性化抑制などの本研究の目的に合致する研究報告が存在する。しかし、最近のがん免疫学の進歩を考慮した解析はまだ十分に行われていない。

この中で、十全大補湯は 臨床でがん治療にも用いられており、特に、化学療法などの治療後の免疫低下状態におけるマクロファージなどの自然免疫系の免疫細胞の賦活作用が報告されており、本研究における良い候補となる。また、小柴胡湯も、マクロファージや B 細胞などの賦活作用が報告されており、本研究の候補となる。したがって、初年度は、まずは、この 2 処方から *in vivo* スクリーニングを開始することに決定した。

同じ名前の方剤でも処方により生薬の配合が異なることが知られているので、本邦でも多く使用され品質安定性を重視しているツムラの処方を用いることとした。平成 22 年 8 月 25 日に株式会社ツムラに試験物質提供に関する契約書を締結し、非臨床用試験物質提供依頼を提出し、ツムラ漢方処方の十全大補湯、小柴胡湯、補中益気湯、大建中湯エキス末を入手した。

漢方成分物質の選択

入手可能な漢方成分物質の調査を行い、日本薬局方における生薬類の確認試験法の際の標準品となる化合物が市販されていることから、以下の 62 種類の漢方成分を購入した。

Albiflorin (Wako), Alisol A (Wako), Amygdalin (Wako), Arbutin (Wako), Astragaloside IV (Wako), Baicalin (Wako), (E)-Cinnamaldehyde (Wako), (E)-Cinnamic Acid (Wako), [6]-Gingerol (Wako), Ginsenoside Rc (Wako), Ginsenoside Rg1 (Wako), Glycyrrhizic Acid (Wako), Glycyrrhetic Acid (東京化成), (Z)-Liquiritin (Wako), Loganin (Wako), Paeoniflorin (Wako), Paeonol (Wako), Palmatine Chloride (Wako), Puerarin (Wako), Saikosaponin a (Wako), Sennoside A (Wako), [6]-Shogaol (Wako), Wogonin (Wako), Baicalein (Wako), Berberine Chloride (Wako), Capsaicin (Wako), Catalpol (Wako), Dehydrocostuslacton (Wako), b-Eudesmol (Wako), Glabridin (Wako), Naringin (Wako), Rosmarinic Acid (Wako), Sinomenine (Wako), Curcumin (Wako), Corydaline (Wako), Evodiamine (Wako), Formononetin (Calbiochem), Ginsenoside Rb1 (LKT), Ginsenoside

Rd (LKT), n-Butylidenphthalide, Xanthotoxin (ASB), Saikosaponin B1 (LKT), Saikosaponin b2 (Wako), Saikosaponin D (LKT), Betulinic acid (Calbiochem), Oleanolic acid (Wako), Hesperidin (Wako), Limonin (Wako), Nobiletin (Wako), Tangeretin (Wako), Synephrine (LKT), Liquiritigenin (ASB), Isoliquiritigenin (ASB), Epicatechin (ASB), Catechin (ASB), Procyanidin B-2 (ChromaDex), Stachyose (Wako), Homogentisic acid (MP Biomedicals), Chrysin (Sigma), Bergapten (TrontoResearch), Honokiol (Wako), Resveratrol (Sigma).

さらに、各処方における成分の含有について調査した。(以下に、十全大補湯と小柴胡湯に含有される生薬と化合物をあげる(表)。

十全大補湯						
黄 耆	formononet in	astragaloside I	astragaloside II	astragaloside III	astragaloside IV	calycosi n
桂 皮	cinnamic aldehyde	epicatechin	catechin	cinnamic acid	procyanidin B-2	
地 黄	catalpol	stachyose				
芍 薬	paeoniflorin	albiflorin	paeonol			
川 芎	butylidenephthalide					
蒼 朮	atractylodin	β -eudesmol				
当 歸	butylidenephthalide	scopoletin	xanthotoxin	bergapten		
人 参	ginsenoside Rb1	ginsenosid e Rg1	ginsenoside Rc	ginsenosid e Rd		
茯 苓						
甘 草	liquiritigenin	glycyrrhizin	isoliquiritigeni n			

小柴胡湯							
柴 胡	saikosa ponin b2	saikosaponin b1		saikosaponin a	saikosaponin d		
半 夏	homogentisic acid						
黄 芩	baicalin		baica lein	wogonin	skullkapflavon e I	chry sin e	Benzoylacetone Benzylideneaceto ne
大 棗	betsulinic acid		oleanolic acid	cyclic AMP			
人 参	ginsenoside Rb1		ginsenoside Rg1	ginsenoside Rc	ginsenoside Rd		
甘 草	liquiritigen in	glycyrrhizin		isoliquiritigenin			
生 姜	[6]-gingerol		[6]-shogaol				

2. 漢方方剤の *in vivo* 作用の検討

1) 担がんマウス免疫細胞に対する *in vivo* 作用

材料と方法

マウスモデル: 5×10^5 – 1×10^6 個の B16 マウス悪性黒色腫細胞株を 6-8 週齢のメスの C57BL/6 マウス (三協ラボサービス株式会社) の側腹皮下に移植し、当日から滅菌水に溶解した漢方方剤を 1 日 2 回 (2mg/g/day) 経口投与し、終了時まで投与を継続した。対照群は滅菌水のみとした。体重、腫瘍径を経時的に測定し、7 日目と 14 日目における脾臓、リンパ節、腫瘍における免疫細胞の割合を比較検討した。試験は慶應義塾大学医学部動物実験委員会承認の上実施した。

漢方方剤: 小柴胡湯と十全大補湯 (ツムラより分与) を実験に用いた。方剤は滅菌蒸留水に溶解し、フィーディングニードルを用いて経口投与した。

フローサイトメトリー解析: C57BL/6 マウスより脾臓、移植した腫瘍近傍とその反対側の鼠径リンパ節、腸管膜リンパ節、腫瘍から細胞を得たのち、細胞内および細胞表面マーカーで染色して、フローサイトメトリー(BD FACSCalibur) にて解析した。細胞は FITC, PE, PerCP-Cy5.5 および APC でラベルした抗 CD3, CD4, CD8, NK1.1, TCR β , TCR $\gamma\delta$, CD11b, Gr-1, B220, CD11c, I-Ab, CD86, PD-L1, CD25, Foxp3 で染色し、細胞内染色は使用説明書に従い、細胞の固定、穴開けを施して染色をした (BD Cytotfix/Cytoperm)。

結果

① 十全大補湯

i) マウスの体重、腫瘍径の変化

マウス悪性黒色腫 B16 細胞を C57BL/6 マウス腹側の皮下に移植し、十全大補湯、あるいは対照群として水を経口投与したマウスで、経時的に体重と腫瘍径を測定したところ、十全大補湯を投与したマウスは計測最終日まで体重を維持し、投与しなかった群では腫瘍の大きさが増すにつれ、若干体重が減る傾向にあったが、2群の間に有意な差は認められなかった(図 1a)。腫瘍径の大きさも、十全大補湯を投与したマウスは、投与しなかった群に比べ小さい傾向があったが、中には大きく増殖したマウスもあり、投与しなかった群との有意差は認められなかった(図 1b)。これより、十全大補湯は B16 担癌マウスモデルでは、有意ではないが、若干 腫瘍の増殖を抑える傾向が認められた。

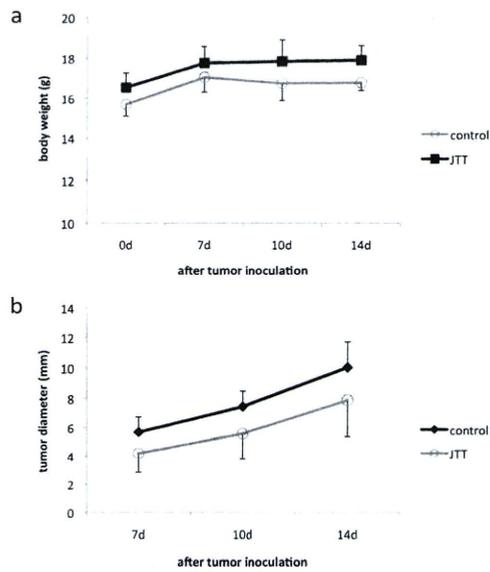


図 1. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植における十全大補湯 (JTT) の効果
a. 腫瘍皮下移植後の体重の変化、および b. 腫瘍径の変化

ii) 脾臓、リンパ節、腫瘍における免疫細胞分画の変化

マウス悪性黒色腫 B16 細胞を腹側の皮下に移植後、7 日目と 14 日目に脾臓、膝下リンパ節、腸管膜リンパ節、腫瘍を取り出し、免疫細胞分画の差異を比較検討した。それぞれの組織において、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $\gamma\delta T$ 細胞の分画には十全大補湯を投与したマウスとしないマウスとで違いは見られなかったが、NK 細胞分画において投与したマウス群で投与後 7 日目と 14 日目の両方で増加傾向が認められた (図 2.a, b, c)。また、脾臓において、7 日目に $CD11b^+Gr-1^+MDSC$ が対照群では増加したが、投与群では低いままであった (図 3)。他の樹状細胞や Treg 細胞には違いは認められず (データは示さず)、腫瘍における細胞分画にも特別な差はなかった (データは示さず)。これらの結果より、十全大補湯は、一部の抑制性細胞の増加を抑制することで、抗腫瘍応答に働いている可能性が示唆された。

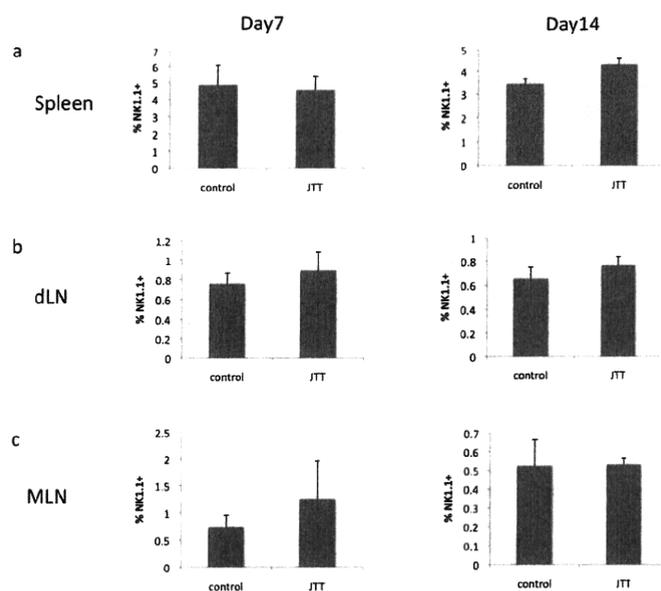


図 2. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植における十全大補湯 (JTT) の免疫細胞に与える影響

a. 脾臓、b. 腫瘍近傍膝下リンパ節、c. 腸管膜リンパ節における NK 細胞の割合

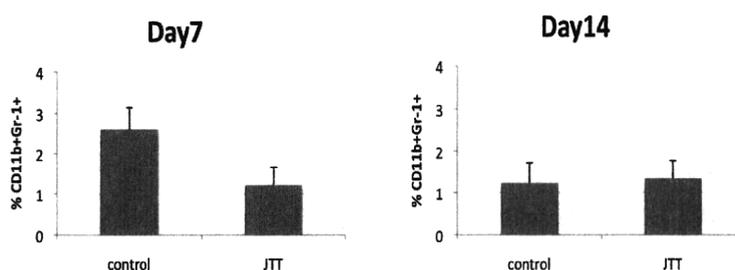


図 3. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植における十全大補湯 (JTT) の脾臓 MDSC の割合の変化

② 小柴胡湯

i) マウスの体重、腫瘍径の変化

マウス悪性黒色腫 B16 細胞を C57BL/6 マウス腹側の皮下に移植し、小柴胡湯あるいは対照群として水を経口投与したマウスで、経時的に体重と腫瘍径を測定したところ、十全大補湯で見られたような傾向も、小柴胡湯では見られず、違いはほとんど見受けられなかった(図 4a,b)。小柴胡湯は B16 原発腫瘍の増殖を抑制する作用はないと思われた。

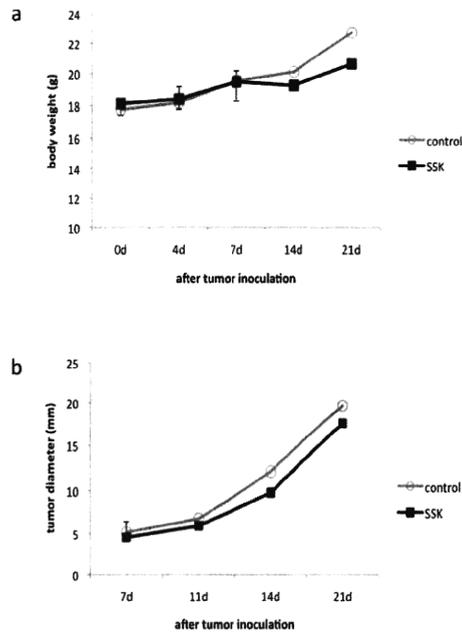


図 4. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植における小柴胡湯 (SSK) の効果
a. 腫瘍皮下移植後の体重の変化、および b. 腫瘍径の変化

ii) 脾臓、リンパ節、腫瘍における免疫細胞分画の変化

マウス悪性黒色腫 B16 細胞を側腹の皮下に移植し、小柴胡湯を経口投与後 4 日目と 7 日目の脾臓、膝下リンパ節、腸管膜リンパ節、腫瘍における免疫細胞分画の差異を比較検討した。脾臓において $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $\gamma\delta T$ 細胞の分画には小柴胡湯を投与したマウスとしないマウスとの間に違いはなかったが(図 5a)、投与 4 日目に $NK1.1^+NK$ 細胞(図 5b)、 $CD11c^+$ 樹状細胞の割合が少し増加し(図 5c)、逆に $Foxp3^+Treg$ 細胞が少ない傾向を示した(図 5d)。また腫瘍近傍の鼠径リンパ節と反対側のリンパ節の両方で、投与したマウスでは $CD8^+T$ 細胞が増加していた(図 6)。投与 7 日目にも投与したマウスの脾臓で NK 細胞が多く(図 7b)、 $CD11b^+Gr-1^+$ 骨髄由来抑制性細胞 (MDSC) が対照群で増加していたのに比べて少なかった(図 7c)。腸管膜リンパ節と腫瘍においては特に違いはみとめられなかった(データは示さず)。これらより、小柴胡湯は、抗腫瘍性の NK 細胞と $CD8^+T$ 細胞の増加、さらに、MDSC や $Treg$ などの免疫を負に制御する細胞の増加の抑制が見られ、全体的に、抗腫瘍効果増強作用をもつことが示唆された。