

図5. 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) の脾臓免疫細胞に与える影響

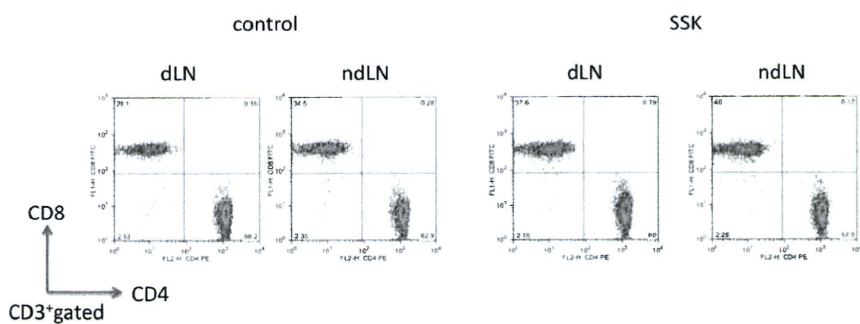


図6. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植 4 日目の、小柴胡湯 (SSK) の腫瘍近傍 (draining LN) および反対側膝下リンパ節 (non-draining LN) に与える影響

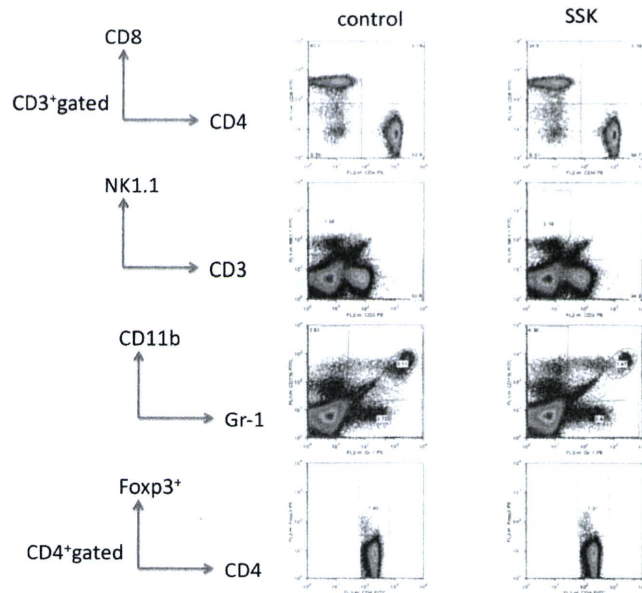


図 7. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植 7 日めの、小柴胡湯 (SSK) の脾臓免疫細胞に与える影響

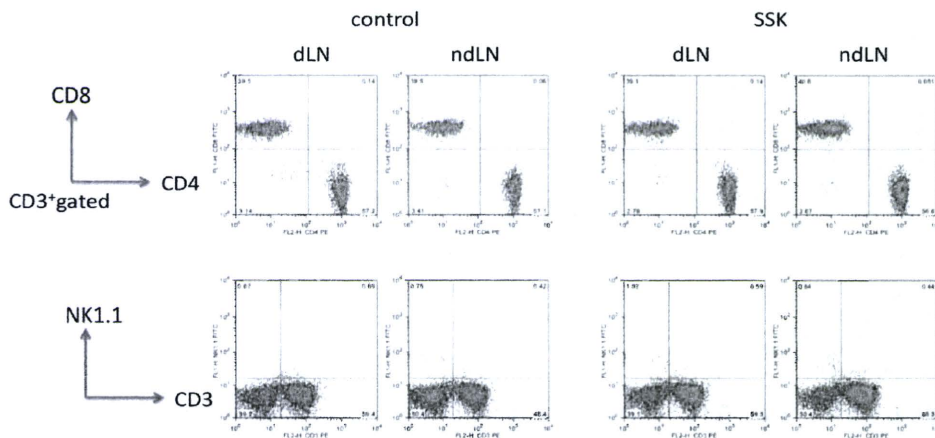


図 8. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植 7 日めの、小柴胡湯 (SSK) の腫瘍近傍 (draining LN) および反対側膝下リンパ節 (non-draining LN) に与える影響

### 考察

十全大補湯経口投与において、B16 メラノーマモデルにおいて見られた変化は、抗腫瘍効果が期待できる CD8<sup>+</sup>T 細胞と NK 細胞の割合の増加と、免疫抑制性に働く Myeloid-derived suppressor cell (MDSC)と Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞の減少である。T 細胞応答などの抑制作用をもつ Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞は、多くのヒトがん組織やリンパ節での増加が認められており、担がん生体の免疫抑制病態に関与する重要な細胞である。MDSC は腫瘍細胞由

来の IL-10, TGF- $\beta$ , IL-6, VEGF, GM-CSF, PGE2 のような各種免疫抑制因子が骨髄の common myeloid precursor に作用して誘導される Treg 細胞と双璧をなす強力な多様な免疫抑制細胞である。末梢血中から移行してがん組織内、リンパ組織内に集積する。MDSC は多くの免疫抑制因子を産生して T 細胞不応答を引き起こし (anergy)、また Treg を誘導する。十全大補湯は、腫瘍増殖を抑える程の効果は見られなかったが、これら免疫抑制性細胞の割合を減少させることにより、担がん生体の免疫抑制環境を改善して、その併用により、免疫療法などのがん治療の効果を改善できる可能性がある。また、小柴胡湯経口投与においても、B16 メラノーマモデルにおいて見られた変化から、十全大補湯と同様な、抗腫瘍性の CD8<sup>+</sup>T 細胞と NK 細胞の増強作用と、MDSC と Treg 細胞の抑制作用をもつ可能性が示唆された。

今後、腫瘍抗原ワクチンや抗腫瘍 T 細胞投与などの免疫療法との併用により、上記の免疫抑制細胞の抑制と抗腫瘍性細胞の増強作用を介して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。さらに、これら処方に含まれ、かつ、入手可能で本研究で実施される *in vitro* スクリーニングにより、抗腫瘍免疫応答増強に有用と考えられる漢方成分を用いて、その単独、および免疫療法との *in vivo* 併用効果を検討する予定である。

## 2) 腸管免疫系に対する *in vivo* 作用

消化管粘膜固有層では、Treg 細胞、Th17 細胞、 $\gamma\delta$ 細胞、Th1 細胞、Th2 細胞、IgA 産生 B 細胞など多種多様な免疫細胞が存在し、ユニークで複雑な免疫系を形成している。これら免疫細胞の多くは、腸内フローラによりその分化機能が制御されており、消化管粘膜組織のみならず、全身臓器の免疫ホメオスタシスにも貢献することが最近分かってきた。特に、粘膜固有層には、Treg 細胞や Th17 細胞や樹状細胞が多く存在し、腸内細菌との相互作用による、消化管粘膜免疫ホメオスタシスに重要である。腸管の樹状細胞やマクロファージには特有のサブセットが存在し、Treg 細胞や Th17 細胞の制御に関与している。消化管粘膜下で活性化されたリンパ球は腸間膜リンパ節 (MLN) を経由し、リンパ行性に胸管へ移行する。さらに血流に乗って全身を循環した後、パイエル版の近傍、あるいは遠隔の腸管粘膜固有層へとホーミングする。最近、このような腸管免疫系が局所のみならず全身性の免疫応答にも影響を与えていることが分かってきた。例えば、腸内細菌由来の分子が腸管免疫に作用し、その結果、全身性の自己免疫応答に影響を与えることが判明した。漢方は、経口投与されて、腸管免疫に作用を及ぼすことが分かっている。したがって、漢

方は、腸管免疫への作用を介して、全身性の抗腫瘍免疫応答に作用する可能性がある。特に、腸管に多数存在する Treg などは、がん組織や所属リンパ節などのがん微小環境で免疫抑制病態に関与する重要な細胞であり、腫瘍免疫への漢方の作用解明において、腸管免疫への漢方の作用を検討することは重要である。

## 材料と方法

**マウスモデル:**  $5 \times 10^5$ – $1 \times 10^6$  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（2 mg/g/day）、試験終了時まで経口投与した。対照群は滅菌水のみとした。慶應義塾大学医学部動物実験委員会承認の基に本研究を実施した。

**漢方方剤:** 小柴胡湯と十全大補湯の 2 種漢方方剤（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。

**小腸粘膜固有層細胞の分離:** それぞれのマウスの小腸を摘出して、1.5%FBS 加 Hank's 培地で洗浄して腸内容物を取り除いた。取り出した小腸は細かく刻み、1mM DTT, 5mM EDTA を加えた Hank's 培地で 37°C, 30 分振盪した。上皮を剥がした後に 1mg/ml Collagenase A, 0.1mg/ml DNase I を加えた Hank's 培地に置いて 37°C, 1 時間振盪した。メッシュを通した組織を 40%Percoll に浮遊させ、70%Percoll の上に重層し 20min 遠心した。境界面の細胞を回収し、小腸粘膜固有層細胞とした。

**フローサイトメトリー解析:** C57BL/6 マウスの小腸粘膜固有層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)で測定し、FlowJo (TreeStar Inc.) にて解析を行った。細胞は FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC ラベルされた抗 CD3, CD4, CD8, NK1.1, CD11c, CD103, Foxp3 抗体 (BD Pharmingen) で染色した。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行った (BD Cytotfix/Cytoperm)。

## 結果

小腸粘膜固有層における免疫細胞分画の変化



### ① 十全大補湯

マウス悪性黒色腫 B16 細胞を側腹の皮下に移植し、十全大補湯あるいは対照群として水を経口投与し、7日目と14日目のマウスの小腸粘膜固有層の細胞の割合の変化を調べたところ、十全大補湯を投与したマウスでは7日目には CD8<sup>+</sup>T 細胞の割合がコントロールマウスより多く(図 1b)、また Treg 細胞を誘導する CD103<sup>+</sup>DC が少ないことが見られた(図 1c)。しかしながら、Treg 細胞には有意な差は無かった(図 1d)。また、7日目に見られた変化は、14日目には見られなかった(図 2a,b,c,d)。これらのことから、十全大補湯は粘膜固有層の CD8<sup>+</sup>T 細胞を増加させて、CD103<sup>+</sup>DC を減少させることにより、腸管において抗腫瘍免疫に有用な免疫状態を誘導する可能性が示唆された。

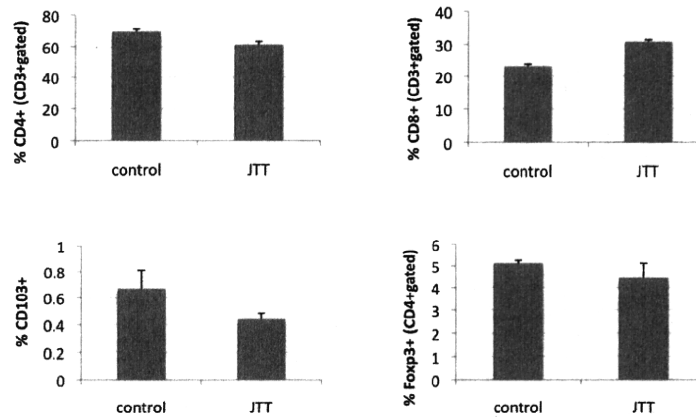


図 1. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植 7 日目の、十全大補湯 (JTT) が小腸粘膜固有層免疫細胞に与える影響

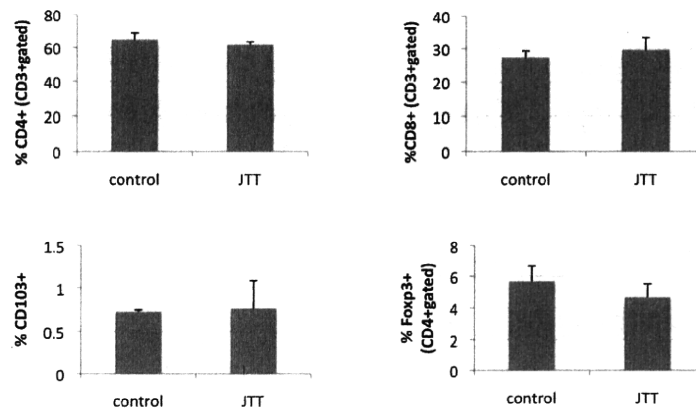


図 2. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植 14 日目の、十全大補湯 (JTT) が小腸粘膜固有層免疫細胞に与える影響

## ② 小柴胡湯

マウス悪性黒色腫 B16 細胞を側腹の皮下に移植し、小柴胡湯あるいは対照群として水を経口投与し、7日目の小腸粘膜固有層の細胞の割合を調べたところ、小柴胡湯を投与した CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$ T 細胞分画には変わりはないが(図 3a,b)、Treg 細胞の割合が対照群に比べて低かった(図 3c)。これらの結果より、小柴胡湯は粘膜固有層において Treg 細胞を有意に抑制し、腸管において抗腫瘍免疫に有用な免疫状態を誘導するを可能性が示唆された。

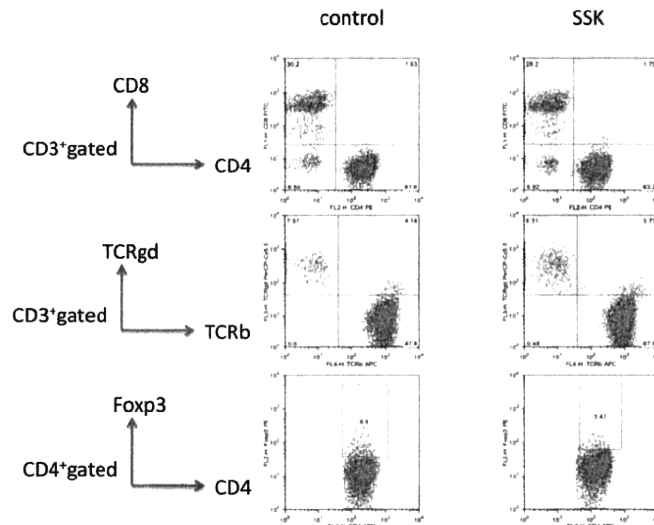


図 3. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植 7 日目の、小柴胡湯 (SSK) が小腸粘膜固有層免疫細胞に与える影響

## 考察

漢方は、腸管免疫への作用を介して、腫瘍免疫などの全身性の抗腫瘍免疫応答にも作用する可能性がある。この場合、漢方成分による直接的な腸管免疫細胞への作用、あるいは、漢方がもつ、腸内細菌に影響を与える antibiotics/prebiotics 作用による腸内細菌の変化を介した間接的な腸管免疫への作用が考えられる。今回、十全大補湯では、腸管粘膜固有層の CD8<sup>+</sup>T 細胞の増加、Treg 誘導性の CD103<sup>+</sup>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た。

上記のように、十全大補湯と小柴胡湯のがん組織や全身性での抗腫瘍性免疫細胞の増強や免疫抑制性細胞の低下などの作用と考え合わせると、漢方は、腸管免疫への作用を介して、全身性の抗腫瘍免疫応答を増強する可能性がある。今後、*in vitro* スクリーニングによ

り同定する、抗腫瘍免疫応答増強に有用と考えられる漢方成分の腸管免疫の作用を検討する予定である。

### 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

我々は、今までに、がん細胞ががん微小環境において免疫抑制環境を構築する機序について明らかにしてきた。その機構の一つとして、がん細胞が、遺伝子異常による恒常的なシグナル伝達亢進により、がん細胞の増殖生存を促進するだけでなく、免疫を抑制するサイトカインの産生亢進にも関与していることを明らかにしている。そして、適切なシグナル阻害剤（分子標的薬）を用いると担がん生体の免疫抑制環境の改善により、免疫療法の効果が増強されることが分かっている。また、今までに、漢方成分には、NF- $\kappa$ B などのシグナル伝達分子阻害作用が示唆されている物質が報告されている。

そこで、本研究では、我々が同定した、BRAF 遺伝子変異による MAPK シグナル亢進と、 $\beta$ -catenin 遺伝子変異による Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル亢進、さらに STAT3 シグナル亢進により、IL6, IL10, VEGF などの複数の免疫抑制サイトカインを分泌するヒト悪性黒色腫細胞株、NF- $\kappa$ B の恒常的活性化により IL-6 を高産生するヒト卵巣癌細胞株、TGF- $\beta$  を高産生するヒト膵臓癌細胞株を用いて、これらの免疫抑制性サイトカイン産生に及ぼす漢方成分をスクリーニングして、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と、その作用分子標的の同定を試みた。

すでに我々の研究では、上記シグナル阻害剤を適切に用いると、*in vitro*、および *in vivo*（ヒトがん細胞移植免疫不全マウスを利用した解析法による）で、がん細胞やさらに免疫細胞の免疫抑制状態を改善できることが分かっており、同様な作用を示す漢方成分が同定できれば、その併用により、免疫療法などのがん治療の効果改善が期待できる。

#### 材料と方法

**試薬:** 上記の入手購入した 62 種類の漢方成分を DMSO に溶解して実験に用いた。

**ヒト癌細胞株:** ヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3 を一晩 24-well プレートに  $6 \times 10^4$  個/well 播種し、

漢方成分を加えて 4 時間培養した後、上清を除去し、再び同濃度の成分を加えて 4 時間培養して上清を回収した。上清はサイトカインの測定まで-20℃に保存した。ヒト悪性黒色腫細胞株 888mel と ヒト膵臓がん細胞株 PK59 はそれぞれ一晩 24-well プレートに  $5 \times 10^4$  個/well 播種し、漢方成分を加えて 24 時間培養後、上清を回収し、サイトカイン測定のサンプルとした。

サイトカインの測定：上清中の IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  は、OptiEIA ELISA sets (BD Biosciences)を用いて測定した。

## 結果

### 1) 恒常的な NF- $\kappa$ B 活性化により、IL6 を高産生するヒト卵巣がん細胞株を用いたスクリーニング

ヒト卵巣癌細胞株 Ovar3 に 61 種類の漢方成分を加えて、*in vitro*での IL6 産生をスクリーニングしたところ、IL6 の産生を減少させる 4 漢方成分 (4, 31, 58, 59) が同定された。特に、31 では、陽性コントロールに用いた NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ と同様の強力な IL-6 産生抑制作用が認められた(図 1)。

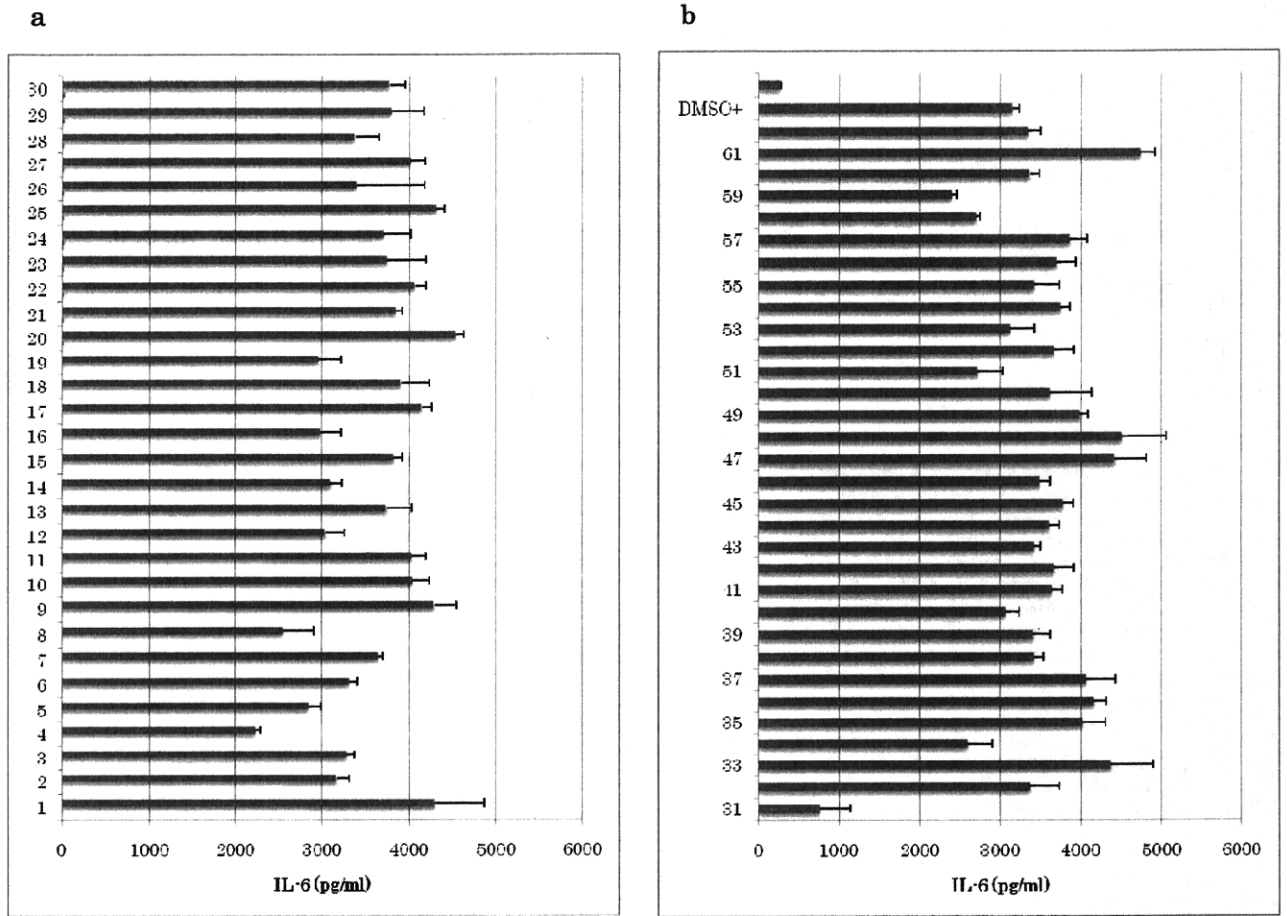


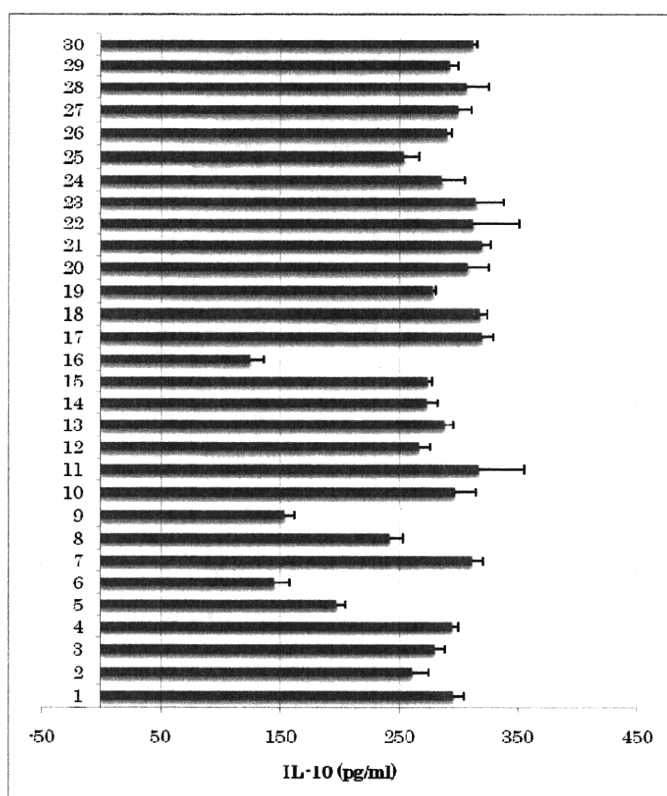
図 1. 漢方成分 (10 $\mu$ M) のヒト卵巣癌細胞株 Ovar3 の IL-6 産生に及ぼす影響



2) 恒常的な $\beta$ -catenin シグナル活性化、MAPK シグナル活性化、STAT3 シグナル活性化により、IL10、IL6、VEGFなどを高産生するヒト悪性黒色腫がん細胞株を用いたスクリーニング

ヒト悪性黒色腫細胞株 888mel 細胞に 62 種類の漢方成分化合物を加えて、*in vitro*での IL10 産生をスクリーニングしたところ、IL10 の産生を減少させる 5 漢方成分 (5, 6, 9, 16, 31) が同定された。(図 2a-b)。

a



b

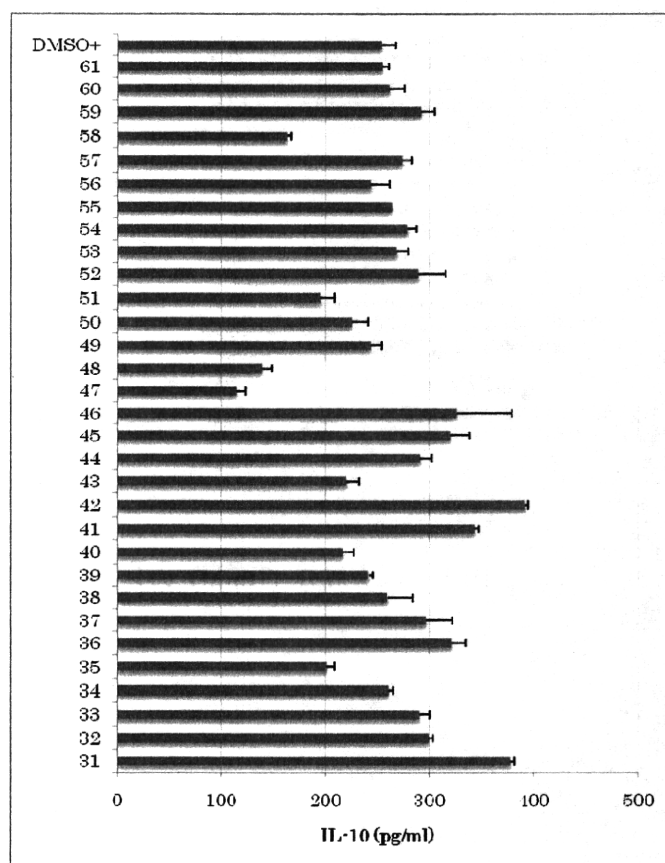


図 2. 漢方成分 (1 $\mu$ g/ml) のヒト悪性黒色腫細胞株 888mel の IL-10 産生に及ぼす影響

### 3) TGF- $\beta$ を高産生するヒト膵臓癌細胞株を用いたスクリーニング

ヒト膵臓癌細胞株 PK59 細胞に 61 種類の漢方成分化合物を加えて、*in vitro* での TGF- $\beta$  産生をスクリーニングしたところ、TGF- $\beta$ の産生を減少させる 6 漢方成分(1, 4, 5, 6, 22, 60)が同定された(図 3)。

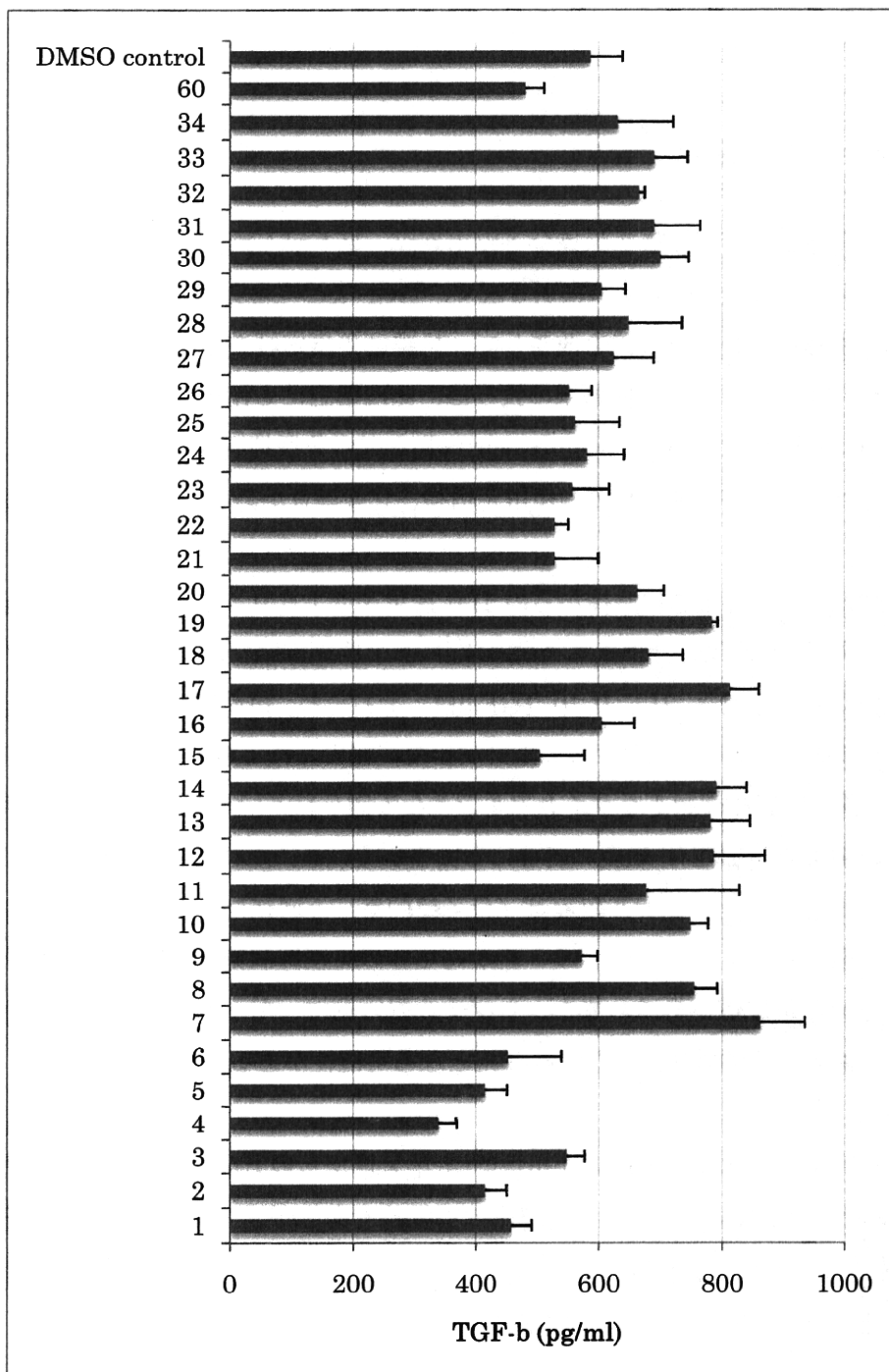


図 3. 漢方成分 (1 $\mu$ g/ml)のヒト膵臓癌細胞株 PK59 の TGF- $\beta$ 産生に及ぼす影響

これらの結果から、本研究では、ヒトがん細胞からの IL6, IL10, TGF- $\beta$ 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が同定できた。また、その作用標的は、上記システムでのスクリーニング結果から、NF- $\kappa$ B,  $\beta$ -catenin, MAPK, STAT3 などのシグナル関連分子であることが示唆された。

## 考察

我々は、今までに、シグナル伝達分子阻害剤が、ヒトがん細胞に作用して、免疫抑制性サイトカインの産生低下や、それに引き続く、Treg などの免疫抑制性細胞の誘導を阻害して、担がん生体の免疫抑制環境を改善して、抗腫瘍免疫応答を増強できることを報告してきた。また、適切なシグナル阻害剤の投与は、免疫細胞にも作用して、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC: myeloid derived suppressor cell)などの免疫抑制性細胞の動員や免疫抑制作用を減少させたり、樹状細胞などの作用を増強させる場合があることが判明している。

本研究では、ヒト卵巣癌細胞株からの IL6 産生を低下させる漢方成分、ヒト悪性黒色腫細胞株からの IL10 産生を低下させる漢方成分、ヒト膀胱癌細胞株から TGF- $\beta$ 産生を低下させる漢方成分が同定された。IL6, IL10, TGF- $\beta$ は それぞれ、抗原提示樹状細胞からエフェクターT 細胞まで、様々なレベルでの免疫抑制作用が報告されており、特に担がん生体において、抗腫瘍免疫応答を抑制するサイトカインとして知られている。IL10 や TGF- $\beta$ は免疫抑制性樹状細胞や制御性 T 細胞の誘導にも関与している。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、これらの免疫抑制性サイトカインの産生を抑えることにより、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。また、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となる可能性がある。

本研究で同定された漢方成分の作用標的は、卵巣癌からの IL6 産生を抑制した化合物は、NK- $\kappa$ B あるいは NK- $\kappa$ B シグナルに関連する標的である可能性が高く、悪性黒色腫からの IL10 産生を抑制した化合物は、 $\beta$ -catenin 関連シグナル、あるいは、MAPK や STAT3 シグナル関連分子が標的である可能性が高い。

今後、これらの化合物の免疫抑制サイトカイン産生抑制作用の強度の判定と、我々が開

発したマウス腫瘍モデルを用いての *in vivo* 効果の検討、さらに作用標的の同定を進める予定である。特に効果の高い化合物に関しては、免疫療法との併用効果を検討する予定である。

## 2) 制御性 T 細胞の誘導を抑制する漢方成分の同定

制御性 T 細胞は、担がん生体における免疫抑制病態に関わる重要な免疫細胞である。制御性 T 細胞には、nTreg, iTreg, Tr1, Th3 などが知られているが、担がん生体においては、がん細胞などが産生する TGF- $\beta$ などで誘導される Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>制御性 T 細胞(iTreg: induced Treg)の重要性が知られている。そこで、本研究では、TGF- $\beta$ によりナイーブT細胞からの iTreg 誘導を阻害できる漢方成分の同定を試みた。

### 材料と方法

試薬: 上記の入手購入した 63 種類の漢方成分を DMSO に溶解して実験に用いた。

*in vitro* における iTreg 細胞の分化誘導とそれを阻害する漢方成分化合物の同定: CD62L<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup>ナイーブ T 細胞を C57BL/6 マウスより分離し、TGF- $\beta$  (10ng/ml)存在下で、プレートコートした抗 CD3 抗体 (1 $\mu$ g/ml)と抗 CD28 抗体(1 $\mu$ g/ml) で活性化させて、iTreg を誘導した。この iTreg 誘導系に、漢方成分化合物 (10nM) を添加して、72 時間後に細胞を回収し、フローサイトメトリーで解析した。

フローサイトメトリー解析: 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)で測定し、FlowJo (TreeStar Inc.) にて解析した。細胞は FITC 結合抗 CD4 抗体, PE 結合抗 Foxp3 抗体, APC 結合抗 CD25 抗体で染色した。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行った (BD Cytofix/Cytoperm)。

### 結果

TGF- $\beta$ による iTreg を抑制する多数の漢方成分(28, 49, 53, 54 など)が同定された(図 1)。

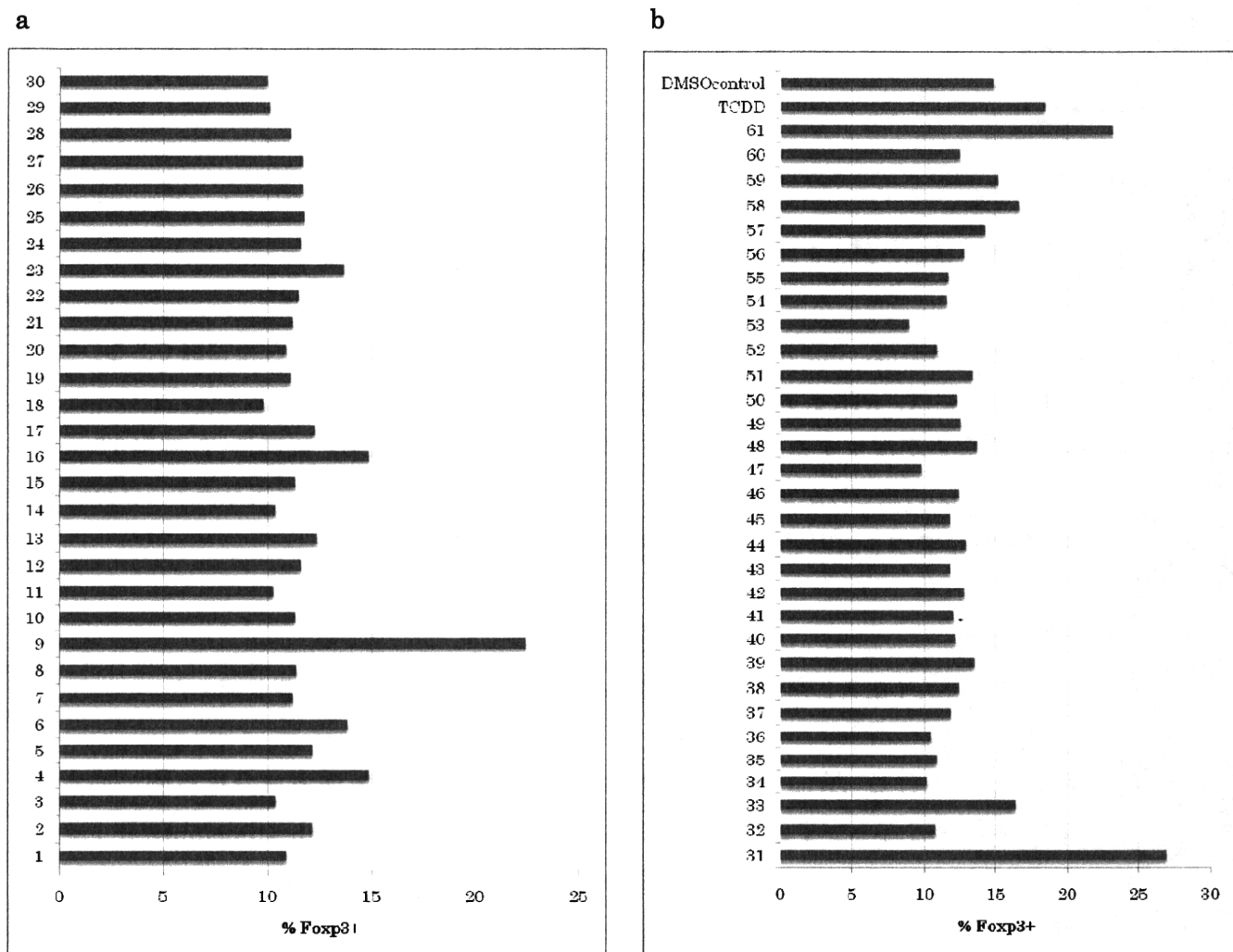


図 1. 漢方成分 (10 $\mu$ M) の Treg 細胞誘導に与える影響

### 考察

TGF- $\beta$ による iTreg は担がん生体における免疫抑制病態に関与する細胞であり、本研究で同定された iTreg 誘導を阻害する漢方成分の投与は、担がん生体において、がん細胞や浸潤免疫細胞などが産生する TGF- $\beta$ による iTreg 誘導を阻害して、免疫抑制病態を改善できる可能性がある。今後、これらの漢方成分の iTreg 誘導抑制作用の強度の判定と、我々が開発したマウス腫瘍モデルを用いての *in vivo* 効果の検討を進める予定である。特に効果の高い化合物に関しては、免疫療法との併用効果を検討する。また、同定された iTreg 誘導抑制作用をもつ漢方成分の中には、下記の AhR アンタゴニストも含まれていたもので、AhR も標的となる可能性があるが、今後、これら漢方成分の作用標的の同定を試みる必要がある。



### 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

芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor (AhR)) は、様々な細胞に発現する核内受容体であり転写因子である。薬物代謝酵素 Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) は、代表的な AhR 標的遺伝子であり、AhR 活性の測定アッセイにも利用されている。多数の AhR リガンドが知られているが、リガンドにより標的遺伝子発現や機能発現が異なることが報告されている。外来性リガンドとして 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) など、内在性リガンドとして 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) などが見つかったが、植物由来成分、漢方生薬成分にも AhR 作動物質があることが知られている。

AhR は、がん細胞では、その高発現と予後不良との相関や、がん転移に重要な、上皮間葉転換 (EMT: epithelial-mesenchymal transition) や MMP 発現による浸潤能亢進への関与などが報告されており、がん細胞の治療標的となり得ると考えられる。また、免疫細胞では、担がん生体の免疫病態や腸管免疫において重要な Treg や Th17 や  $\gamma\delta$ T 細胞における発現とその分化や機能への関与が示されている。例えば、TGF $\beta$  によるナイーブ T 細胞から Treg 細胞への分化や、TGF $\beta$  と IL-6 による Th17 細胞への分化、さらにマクロファージや樹状細胞などでも、AhR の機能への関与が報告されている。我々は、ヒトがん細胞や、がん組織に浸潤しているリンパ球における AhR 発現と核内移行、すなわち、免疫抑制状態にあるがん組織における、がん細胞と免疫細胞の両者における AhR の活性化を見いだしている。したがって、漢方成分の中には、AhR を作用標的として、担がん生体でがん細胞増殖浸潤促進的な微小環境の構築に関与する Treg や Th17 や  $\gamma\delta$ T 細胞、さらに、がん細胞自体に作用して、総合的にがん免疫環境を改善して抗腫瘍免疫応答を増強できる AhR 作動物質が存在する可能性がある。そこで、本研究では、担がん生体免疫抑制病態や抗腫瘍免疫応答増強に関与する漢方成分の同定にあたって、この AhR に着目し、ヒト AhR 作動性の漢方成分のスクリーニング法を開発して、その AhR 作動薬の同定を行った。

#### 材料と方法

**細胞株と漢方成分:** ヒト乳がん細胞株 MCF-7 の培養には 10% fetal bovine serum を添加した DMEM を用いた。陽性コントロールとなる、2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) や AhR アンタゴニスト (CH-223191) は、それぞれ和光純薬、Sigma で購入した。漢方薬成分として、上記 63 種類を用いた。

AhR ルシフェラーゼアッセイ: 4 個の XRE 配列と thymidine kinase promoter を持つルシフェラーゼレポーターベクター(0.1  $\mu$ g)と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現ベクター(0.3  $\mu$ g)を、FuGENE6 (ロシュ) を用いたリポフェクション法で、MCF-7 に導入した。漢方薬成分化合物はそれぞれ 10  $\mu$ M の濃度で加え、その 1 時間後に TCDD を 10nM の濃度で加えた。TCDD を加えてから 48 時間後にピッカジーン培養細胞溶解剤(東洋インキ)によって回収、ピッカジーン発光キット(東洋インキ)を用いてルシフェラーゼ活性を計測した。計測には Micro Lumat Plus (Wallac Berthold) を使用し、ルシフェラーゼ活性の値は同じ細胞抽出液を用いた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の値によって補正した。

**RT-PCR / 定量 PCR:** 様々な癌細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN)により total RNA を抽出し、SuperScriptIII (Invitrogen)を用いて cDNA を合成した。AhR, CYP1A1, GAPDH の発現はそれぞれに特異的なプライマーを用い、ExTaq (Takara)により PCR 増幅した。定量 PCR は、MCF-7 に 10  $\mu$ M の漢方薬成分を加え、その 1 時間後に 10nM の TCDD を加えた後、さらに 24 時間後に抽出した total RNA から cDNA を合成した。CYP1A1, GAPDH 特異的プライマーと FastStart Universal SYBR GreenMaster (ロシュ)を用い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (ABI) で測定した。

**免疫染色:** 細胞株における AhR の免疫染色では、8 well chamber slide (LAB-TEK)中で 12 時間培養した PC3 に 10 $\mu$ M CH-223191 を加え、1 時間後に 10nM TCDD を加えた。TCDD を加えてから 24 時間後にパラフォルムアルデヒド固定し、抗 AhR 抗体によって 12 時間染色後、Alexa488 でラベルされた抗ラビット IgG 抗体で染色した。核は TO-PRO-3 により染色した。検出には共焦点顕微鏡 LSM 700 (ZEISS)を用いた。大腸癌組織での AhR 免疫組織染色は、脱パラフィン処理、親水化、クエン酸バッファー中でのオートクレーブによる抗原賦活化後、上記抗 AhR 抗体を用いた ABC 法での染色を行い、DAB で発色させた。

## 結果

### 1. ヒトがん細胞株での AhR の発現および活性化状態の解析

まず、漢方薬成分中から AhR 作動薬をスクリーニングする目的に適したがん細胞株の選定を行った。51 種類のがん細胞株について、AhR の発現量、および AhR の活性化マーカーである CYP1A1 の発現を RT-PCR によって解析した (図 1)。これらの中で、AhR の発現が比較的高く、かつ AhR の恒常的な活性化がない (CYP1A1 の発現が低い) 細胞株として、U87-MG (神経膠芽腫)、HS578 (乳がん)、RERF-LC-MA (肺がん)、PC3 (前立

腺がん)、PK8 および PK59 (膵がん)、DLD-1 (大腸がん) を選んだ。これらのがん細胞株、および文献で同様の性質が示されている MCF-7 (乳がん) と、HeLa (子宮頸がん)、HT144 (悪性黒色腫) に対して、AhR アゴニストである TCDD を加えて 24 時間後の AhR 活性化の程度を比較した (図 2)。これらのうち MCF-7 において、TCDD 刺激前後の AhR 活性化マーカー CYP1A1 の発現量変化が最も顕著に認められた。そこで、以下の AhR 作動薬のスクリーニングには MCF-7 を用いることとした。

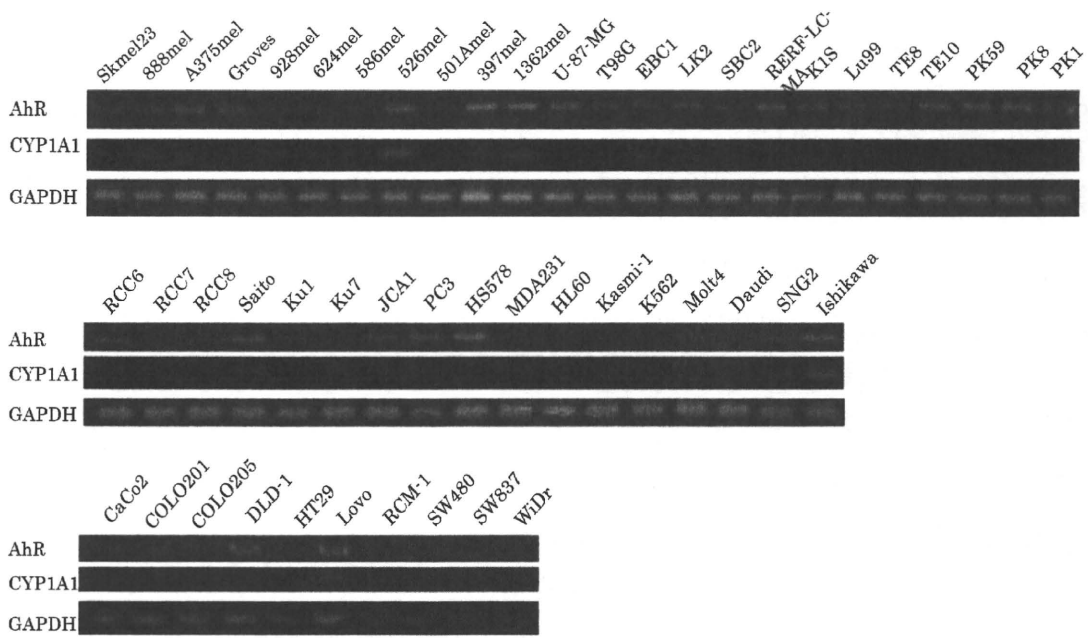


図 1. 様々な細胞株での AhR 及び CYP1A1 の発現

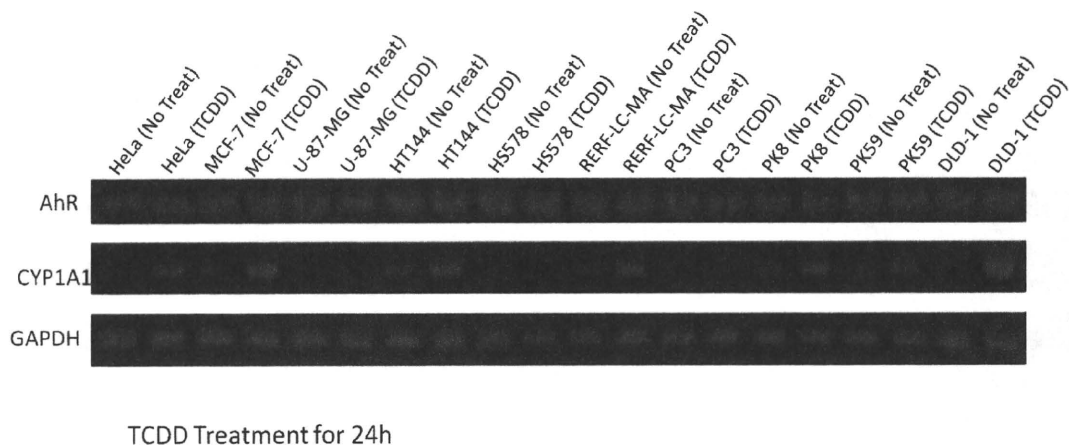
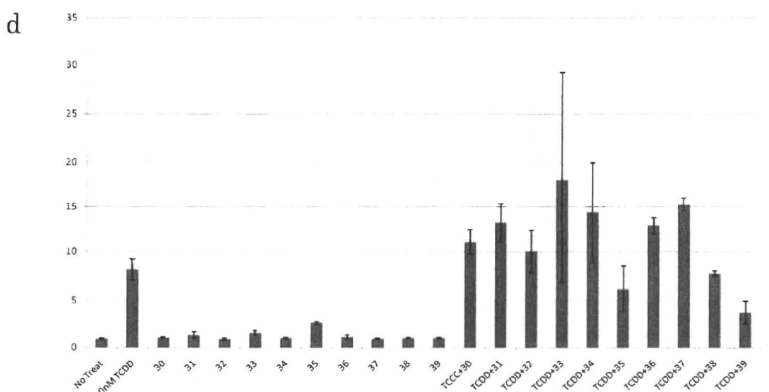
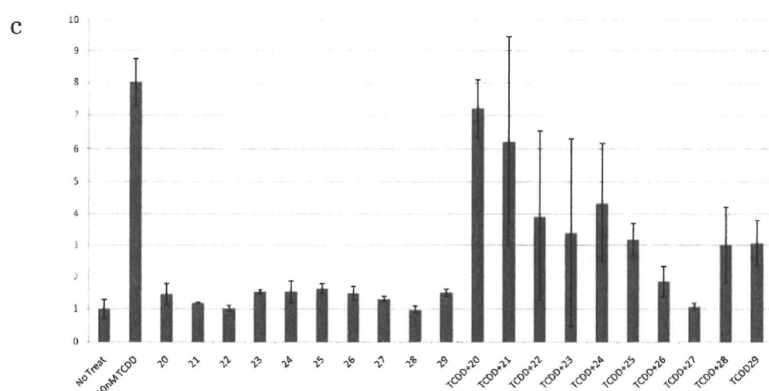
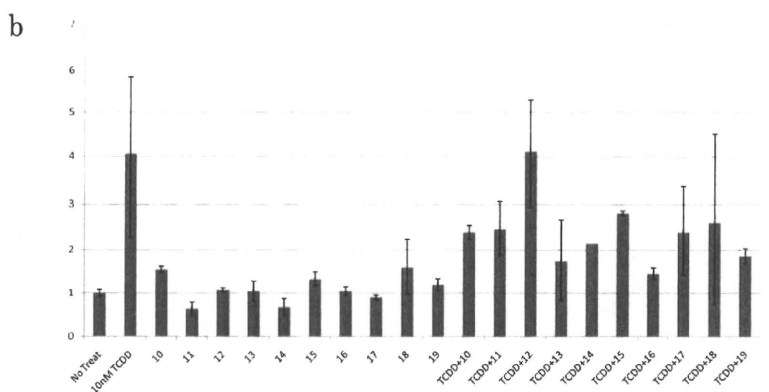
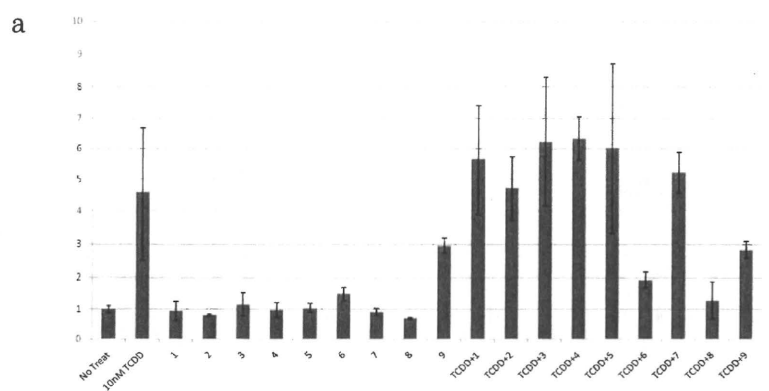


図 2. AhR 発現細胞株での TCDD による CYP1A1 の発現誘導

## 2. XRE レポーターアッセイによる AhR 作動薬のスクリーニング

漢方成分の中に AhR の作動薬となる物質があることが報告されている。そこで、上記、入手購入した 62 種類の漢方成分を用いて AhR 作動薬のスクリーニングを行った。スクリーニングには、ルシフェラーゼ遺伝子上流に AhR - ARNT 複合体の認識配列である XRE を 4 つタンデムにもつ XRE レポーターベクターを用いた。MCF-7 に XRE レポーターベクターと  $\beta$  ガラクトシダーゼ発現ベクターをトランスフェクションした後、 $10\mu\text{M}$  の漢方薬成分のみを加えた系列と、 $10\mu\text{M}$  の漢方薬成分を加えた 1 時間後に  $10\text{nM}$  の TCDD も加えた系列を作成した。TCDD を加えてから 48 時間後に細胞抽出液を作成し、ルシフェラーゼ活性を測定した (図 3-8)。漢方成分のみの系列は AhR に対するアゴニスト活性を、漢方成分と TCDD の両方を加えた系列は AhR に対するアンタゴニスト活性を測定できる。漢方成分の溶媒として DMSO のみを加えたコントロールのルシフェラーゼ活性に比べて 2 倍以上の活性を示した漢方成分をアゴニスト候補、そして TCDD と共に加えることによって、TCDD 単独でのルシフェラーゼ活性の 1/2 以下に活性を抑える漢方成分をアンタゴニスト候補とした一次スクリーニングにより、18 種の候補漢方成分が同定された (図 3a-f)。





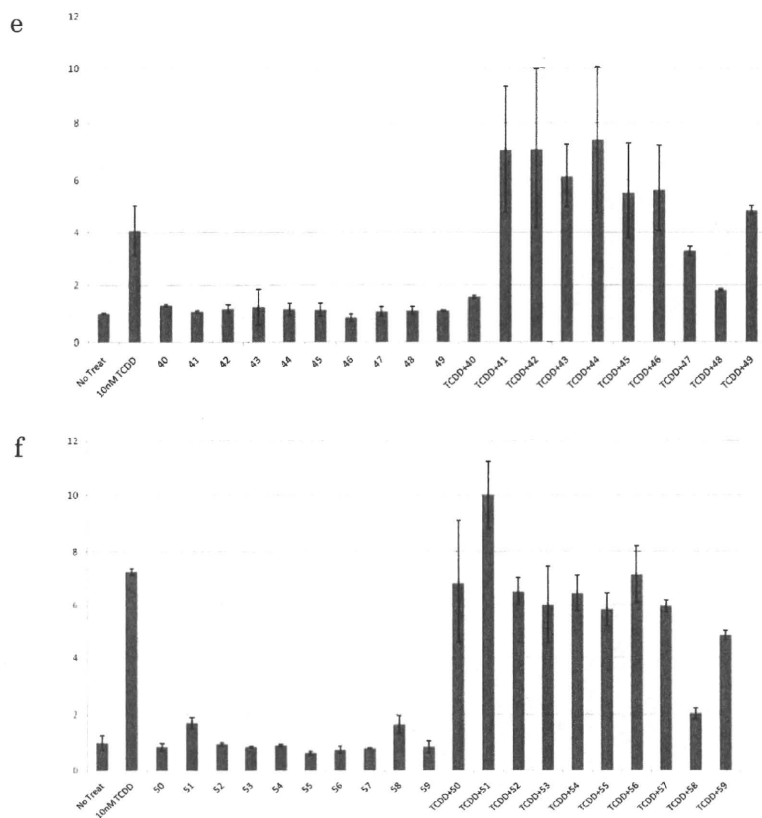


図 3. レポーターアッセイによる AhR 作動薬同定

さらに 2 回同じ系での二次スクリーニングを行った結果 (図 4)、の 4 種類の漢方成分 (6, 9, 35, 58) がアゴニスト候補として、の 8 種類の漢方成分 (8, 16, 26, 27, 28, 29, 39, 48) がアンタゴニスト候補として同定された。

