

201110010A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 河上裕
平成24（2012）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23年度 総括研究報告書

研究代表者 河上裕
平成24（2012）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	
1. 漢方処方による免疫改善作用の検討	9
2. がん細胞と免疫細胞に作用する漢方成分の同定	11
2.1) ヒト卵巣がん細胞株からの IL-6 産生を抑制する漢方成分の同定	12
2.2) ヒト悪性黒色腫細胞株からの IL-10、VEGF 産生を抑制する漢方成分の同定	14
2.3) ヒト膵がん細胞株からの TGF- β 産生を抑制する漢方成分の同定	17
2.4) マウス大腸がん細胞株からの VEGF 産生を抑制する漢方成分の同定	17
2.5) 制御性 T 細胞の誘導を抑制し、Th1 細胞の分化は阻害しない漢方成分の同定	18
3. がん細胞と免疫細胞に作用する植物由来エキスの探索	20
3.1) ヒト卵巣がん細胞株からの IL-6 産生を抑制する植物由来エキスの同定	21
3.2) ヒト悪性黒色腫細胞株からの IL-10 産生を抑制する植物由来エキスの同定	21
3.3) 制御性 T 細胞の誘導を抑制する植物由来エキスの同定	22
4. 同定した漢方成分の標的シグナル・分子の同定	24
4.1) Electrophoretic Mobility Shift Assay による NF- κ B 抑制成分の同定	25
4.2) Western blotting による STAT3 および ERK 抑制成分の同定	26
5. AhR に作用する漢方成分のスクリーニング	27
5.1) XRE レポーターアッセイによる AhR アンタゴニストのスクリーニング	28
5.2) XRE レポーターアッセイによるアンタゴニスト活性の有効濃度解析	29
5.3) AhR アンタゴニストによるマウス悪性黒色腫細胞の浸潤能への抑制作用	29
5.4) AhR アンタゴニストによるがん細胞からの免疫抑制分子産生低下作用	30
6. 担がんマウスモデルにおける候補漢方成分の <i>in vivo</i> 作用の検討	33
6.1) 漢方成分 No.9:	35
6.2) 漢方成分 No.16:	38
6.3) 漢方成分 No.17:	41
6.4) 漢方成分 No.23:	45
6.5) 漢方成分 No.24:	49
6.6) 漢方成分 No.25:	53
6.7) 漢方成分 No.35:	57
7. 同定した漢方成分の免疫作用の評価法の開発	62
7.1) IL-10 産生性樹状細胞の誘導抑制作用	62
7.2) キヌレニン高産生性 IDO 遺伝子導入マウスがん細胞移植モデルの作製	62
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	64
IV. 研究成果の刊行物・別刷	65

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、「担がん生体の免疫抑制環境の改善」と「抗腫瘍免疫の増強」に有効な漢方成分を同定し、その作用機構を解明するとともに、それをリード化合物としてがん治療に応用可能な創薬につなげることを目的としている。そのため、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、有用な漢方成分の同定を目指している。本年度は、漢方処方のうち小柴胡湯に関して、担がんマウスへの経口投与によって免疫改善効果が認められることを示したが、より強い免疫改善効果と抗腫瘍効果を得るため、昨年度に続いて、抽出・合成された漢方成分から免疫改善に有効な成分の同定を試みた。昨年度のスクリーニングから選定された成分と新規追加成分を含む35種類について、ヒトがん細胞からの免疫抑制性サイトカイン産生の抑制、Treg 分化の抑制、Th1 分化の維持、AhR (aryl hydrocarbon receptor) 活性の抑制を指標として有効な成分の候補を得た。また、各有効成分についてその作用の分子機構を解析した。今年度は新たに植物由来エキスから、ヒトがん細胞からの免疫抑制性サイトカイン産生の抑制、Treg 分化の抑制に有効な成分を同定した。さらに、選定された漢方成分のうち7種類を担がんマウスへ腹腔内投与した結果、腫瘍増殖の抑制効果を認め、幾つかの成分については免疫改善効果を示唆する結果を得た。次年度以降は、本年度までに同定した漢方成分の *in vivo* での効果を詳細に検討し、作用機構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

塚本 信夫、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

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. 漢方処方の *in vivo* 作用の検討

小柴胡湯の投与期間を延長し、以下を解析する。

- 1) 担がんマウス免疫細胞に対する *in vivo* 作用
- 2) 腸管免疫細胞に対する *in vivo* 作用

2. がん細胞と免疫細胞に作用する漢方成分の同定

- 1) ヒトおよびマウス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)の誘導を抑制するが、Th1分化を抑制しない漢方成分の同定

3. がん細胞と免疫細胞に作用する植物由来エキスの探索

4. 同定した漢方成分の標的シグナル・分子の同定

5. 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

6. *in vitro*スクリーニングから同定された漢方成分の担がんマウス投与による有効性の検討

7. 同定した漢方成分の免疫作用の評価法の開発

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。

A. 研究結果

担がんマウスへの漢方処方を経口投与による *in vivo*での免疫細胞に対する効果の検討として、小柴胡湯の投与期間を延長してがん微小環境における *in vivo* 免疫動態を解析した。がん細胞移植当日から移植後14日まで連日投与したところ、対照群よりNK細胞とCD8⁺T細胞の割合が高く、Tregの割合の低い傾向が見られたものの、強力な抗腫瘍効果増強作用は確認できなかった。腸管膜リンパ節については対照群との間に特に違いは認められなかった。

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、ヒトおよびマウス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、ヒト卵巣がん細胞株からのIL-6産生、ヒト悪性黒色腫細胞株からのIL-10、VEGF産生、ヒト膵がん細胞株からのTGF- β 産生、マウス大腸がん細胞からのVEGF産生をそれぞれ減少させる漢方成分が同定された。また、誘導性制御性T細胞(iTreg)の誘導を抑制するがTh1分化を抑制しない漢方成分を見いだすことができた。

新たに109種類の植物エキスをを用いて、がん細胞からのサイトカイン産生やiTreg誘導を阻害するものを複数同定した。

ヒト卵巣がん細胞株からのIL-6産生を抑制する漢方成分のうち5種類は卵巣がん細胞株のNF- κ B活性を抑制することが明らかになった。ヒト卵巣がん細胞株からのIL-6産生を抑制した漢方成分やヒト悪性黒色腫細胞株からのIL-10産生を抑制した漢方成分のうち7成分でSTAT3の抑制が認められ、6成分でERKの抑制が認められた。

AhRアンタゴニストとして作用する複数の漢方成分を同定し、これらの成分ががんの浸潤能や免疫抑制性サイトカイン産生を抑制できることを示した。同時に、AhRが関与するがん免疫抑制機構を明らかにし、それを用いて、有効な漢方成分の免疫作用を評価する系を確立した。

これまでの *in vitro*スクリーニングから選定された漢方成分のうち7種類を担がんマウスへ腹腔内投与した結果、腫瘍増殖の抑制効果を認め、幾つかの成分については免疫改善効果を示唆する結果を得た。

B. 考察

昨年度から検討してきた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、担がん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す傾向が認められている。したがって、漢方処方を免疫療法などに併用することにより、その治療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ため、漢方処方中の活性成分を同定して使用することがより有効であると考えられる。

ヒトがん細胞からの IL-6, IL-10, 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。実際、今年度の解析から、これらの成分の中には、NF- κ B、STAT3、ERK の活性化を抑制するものも複数あることが明らかになった。また、*in vitro*での TGF- β による iTreg 誘導を阻害する漢方成分として同定した漢方成分の中には、抗腫瘍免疫誘導に重要な Th1 に対して分化抑制をかけない有望な成分も存在した。これらの漢方成分の投与は、免疫抑制病態を改善できる可能性がある。

また、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, γ δ T など) に発現する AhR に対してアンタゴニストとして作用する漢方成分を同定した。同定した AhR アンタゴニストは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し、さらに、がん細胞の浸潤能を抑制する活性を示したことから、これらの AhR アンタゴニストは、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、AhR 活性化を阻害する機構の解明とともに、マウス腫瘍モデルを用いた *in vivo* 効果の詳細な検討を進める予定である。

この一年で、漢方成分を用いた各種スクリーニングにより、最終目標の達成に有用と考えられる漢方化合物を複数同定した。これらの一部は *in vivo* 投与の有効性を示すことができた。今後、漢方処方の方の *in vivo* 作用の検討を継続するとともに、同定した漢方成分の免疫細胞やがん細胞への作用を *in vivo* で詳細に検討する予定である。

C. 結論

本年度までの研究により、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ことが示されたため、漢方処方から活性成分を同定することの重要性が確認できた。そこで、昨年度のスクリーニングから選定された成分と新規追加成分を含む 3 5 種類についてさらにスクリーニングを進め、NF- κ B、STAT3、ERK などのシグナル伝達分子を標的としてヒトがん細胞からの複数の免疫抑制性サイトカイン産生を抑制する成分、Treg 分化を抑制するが Th1 分化を阻害しない成分、AhR を標的として免疫抑制性サイトカイン産生やがん細胞の浸潤を抑制する漢方成分を同定できた。その一部は実際に、担がんマウスモデルへの投与で有効性が確認できた。次年度以降、本年度同定した漢方成分の作用機構の解析、さらに *in vivo* 効果の詳細な検討により、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、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。

D. 健康危険情報 特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

海外

1. Iwata-Kajihara T, Sumimoto H, Kawamura N, Ueda R, Takahashi T, Mizuguchi H, Miyagishi M, Takeda K, Kawakami Y. Enhanced Cancer Immunotherapy Using STAT3-Depleted Dendritic cells with High Th1-Inducing Ability and Resistance to Cancer Cell-Derived Inhibitory Factors. *J Immunol.* 187(1):27-36,2011

国内

1. 河上裕、小室美紗、小林明日香、梶原岩田知子、宮崎潤一郎、川村直、谷口智憲. ヒトがん細胞に対する免疫応答機構と免疫制御の可能性. 腫瘍内科. 8(5):409-416. 2011.5.

著書

1. Ueda R, Yaguchi T, Kawakami Y. Human tumor antigens recognized by T cells and their implications for cancer immunotherapy in "Innate immune regulation and Cancer immunotherapy", Wang RF ed, Springer Science /Business Media, New York USA.

2. 学会発表

国際学会

1. Yutaka Kawakami, Hiroshi Nishio, Tomonori Yaguchi, Yoshie Kawase, Azusa Ohizumi, Shinobu Noji, Toshiharu Sakurai, Kazuo Umezawa, Tomonobu Fujita, Role of IL6/IL8-NF- κ B axis in the Immunosuppression and resistance to immunotherapy, 26th Annual Meeting Society for Immunotherapy of Cancer, North Bethesda, MD,
2. Tomonori Yaguchi, Yasufumi Goto, Tomoki Kurihara, Asuka Kobayashi, Kenji Morii, Hidetoshi Sumimoto, Yutaka Kawakami, The immunosuppressive role of Wnt/beta-catenin signals in melanoma cancer microenvironments, 26th Annual Meeting Society for Immunotherapy of Cancer, North Bethesda, MD,

国内学会

1. 河上裕、住本秀敏、岩田知子、川村直、谷口智憲、西尾浩、工藤千恵、塚本信夫, がん免疫逃避機構とその制御, 第15回日本がん免疫学会, 千里ライフサイエンスセンター, 2011/7/1
2. 西尾浩、谷口智憲、藤田知信、杉山重里、岩田卓、守井賢二、青木大輔、河上裕, NF- κ B 阻害剤の投与はヒト卵巣がんによる免疫抑制病態を改善し、腫瘍の免疫学的排除効果を増強する, 第15回日本がん免疫学会, 千里ライフサイエンスセンター, 2011/6/30
3. 川村直、梶原知子、住本秀敏、水口裕之、竹田潔、河上裕, がん微小環境免疫抑制病態における樹状細胞 STAT3 の意義とその制御, 第15回日本がん免疫学会, 千里ライフサイエンスセンター, 2011/6/30
4. 川村直、岩田知子、住本秀敏、植田良、水口裕之、竹田潔、河上裕, がん微小環境免疫抑制病態における樹状細胞 STAT3 の意義解明とその制御による効果的な免疫療法開発, 第70回日本癌学会, 名古屋国際会議場, 2011/10/4
5. 西尾浩、谷口智憲、住本秀敏、梅澤一夫、藤田知信、岩田卓、藤井多久磨、青木大輔、河上裕, ヒト卵巣癌における NF- κ B の活性化は免疫抑制状態を誘導する, 第70回日本癌学会, 名古屋国際会議場, 2011/10/3
6. 中村公子、谷口智憲、小林明日香、川村直、樋口肇、新部彩乃、高石官均、日比紀文、河上裕, 腫瘍産生性 TGF- β はセンチネルリンパ節において免疫抑制を誘導し、抗腫瘍免疫応答を抑制する, 第70回日本癌学会, 名古屋国際会議場, 2011/10/3
7. 谷口智憲、栗原智樹、後藤康文、伊藤有毅、守井賢二、小林明日香、西尾浩、住本秀敏、河上裕, 悪性黒色腫で異所性に発現する Histatin-1 は細胞運動能と免疫抑制能を亢進させる, 第70回日本癌学会, 名古屋国際会議場, 2011/10/3
8. 小室美紗、塚本信夫、松村友美子、河上裕, トリプトファン代謝産物による芳香族炭化水素受容体を介したがん免疫抑制, 第40回日本免疫学会, 幕張メッセ, 2011/11/28

F. 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

研究代表者の統括のもとで、密接に関連した全ての研究項目を総合的に実施したことから、研究代表者が各研究項目について報告する。

1. 漢方処方による免疫改善作用の検討

昨年度の文献調査等により「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に関して優先順位を付けて選択し、まず十全大補湯と小柴胡湯から担がんマウス免疫細胞に対する漢方処方の *in vivo* 作用の検討を開始した。昨年度の結果として、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。

昨年度の報告では、B16 マウス悪性黒色腫モデルを用い、十全大補湯経口投与 7 日目と 14 日目及び小柴胡湯経口投与 4 日目と 7 日目の脾臓、鼠径リンパ節、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て報告した。今年度は、小柴胡湯においても長期投与によって、免疫がん微小環境に変化が見られるかを検討するため、小柴胡湯の経口投与 14 日目を追加し、脾臓、鼠径リンパ節、腫瘍の免疫細胞分画の差異について比較検討を行った。

材料と方法

マウスモデル: 5x10⁵ 個の B16 マウス悪性黒色腫細胞株を雌性 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処方を 1 日 2 回 (1g/kg/回) 経口投与し、実験終了日の 14 日目まで連日投与を継続した。対照群は滅菌水のみとした。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。以下全ての動物実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: ツムラより供与された小柴胡湯を実験に用いた。処方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、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を行った。検体は BD FACSCalibur で測定し、FlowJo (TreeStar Inc.) にて解析を行った。細胞は APC 標識または PE 標識抗 CD3 抗体、PE 標識または FITC 標識抗 CD4 抗体、FITC 標識抗 CD8 抗体、FITC 標識抗 NK1.1 抗体、APC 標識抗 CD25 抗体、PE 標識抗 Foxp3 抗体で染色し、細胞内染色は BD Cytotfix/Cytoperm を用いて行った。

研究結果

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、14 日目に小柴胡湯投与群と対照群の脾臓、鼠径リンパ節、腫瘍を取り出し、免疫細胞分画の割合についてフローサイトメトリーを用いて比較検討した。腫瘍近傍の鼠径リンパ節では CD8⁺T 細胞分画の割合が対照群より有意に高かった (図 1a)。脾臓や腫瘍においても対照群より CD8⁺T 細胞分画の割合が高い傾向があり (図 1b、c)、NK 細胞分画の割合も高い傾向にあった (図 2a、b)。一方で免疫抑制に働く Treg 細胞の割合は脾臓と腫瘍において低い傾向にあった (図 2c、d)。また、前年度の報告では 7 日目の脾臓において対照群で高い傾向にあった MDSC 分画は、14 日目においては違いが見られなくなった (データは示さず)。腸管膜リンパ節についても対照群との間に特に違いは認められなかった (データは示さず)。小柴胡湯の投与群では NK 細胞と CD8⁺T 細胞の割合は高く、Treg の割合の低い傾向が見られたものの、強い抗腫瘍効果増強作用は確認できなかった。

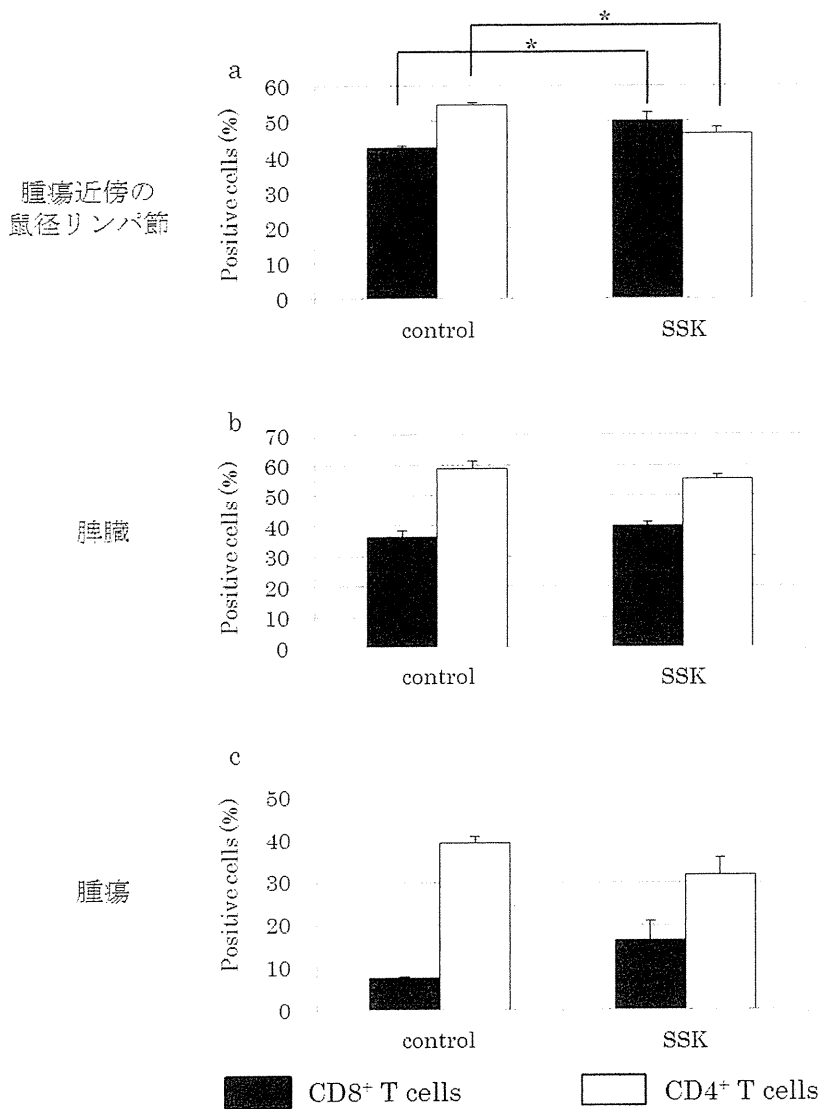


図1 マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植において小柴胡湯(SSK) が CD4⁺、CD8⁺ T 細胞に与える影響
 a) 小柴胡湯投与 14 日目の腫瘍近傍の鼠径リンパ節、b) 脾臓、c) 腫瘍における CD3⁺ T 細胞中の CD4⁺、CD8⁺ T 細胞の割合 *p<0.05

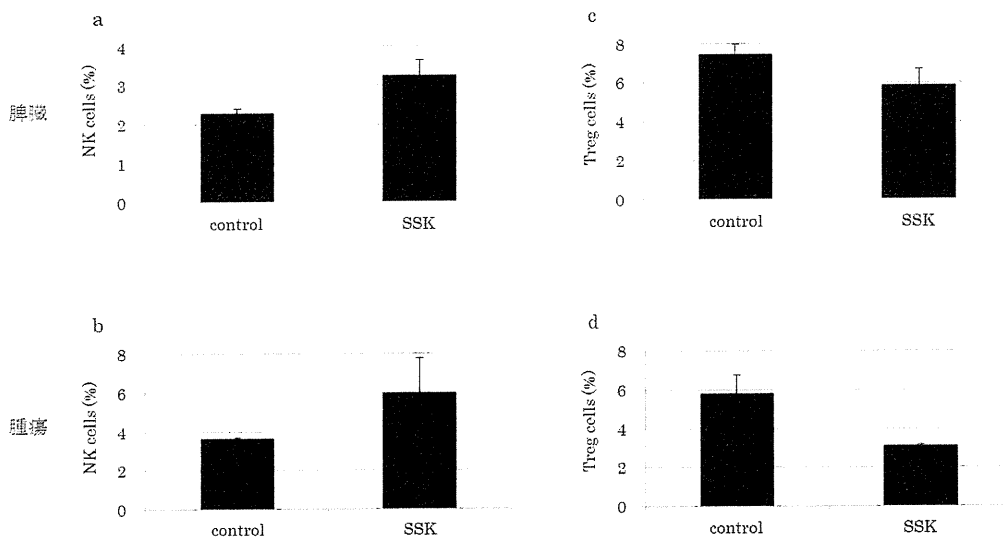


図2 マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植において小柴胡湯(SSK) が NK 細胞、Treg 細胞に与える影響
 a) 小柴胡湯投与 14 日目の脾臓、b) 腫瘍における CD3⁻ NK1.1⁺ NK 細胞の割合
 c) 小柴胡湯投与 14 日目の脾臓、d) 腫瘍における CD4⁺ T 細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 細胞の割合

考察

前年度にて報告したように、小柴胡湯による B16 原発腫瘍の増殖抑制作用は認められなかったことから、小柴胡湯単独投与でのがんに対する直接的な傷害作用は期待できないと考えられる。一方、免疫細胞への影響として、今回小柴胡湯投与 14 日目において、CD8⁺ T、NK 細胞の割合は高く、Treg 細胞の割合は低いといった傾向が見られた。有意差が出るほどの差は認められなかったため、免疫を介する強力な抗がん作用は期待できないものの、連日内服が可能な小柴胡湯を免疫賦活剤として補助的に使用し、時間的間隔のある化学療法や免疫療法と組み合わせることによって、包括的な抗がん作用が得られる可能性はある。

我々はこれまでマウスモデルを用いて、十全大補湯、小柴胡湯の投与による免疫がん微小環境の変化を観察してきた。しかし、いずれも免疫状態の多少の改善は見られたものの、強力な抗がん効果は認められなかった。より強力に免疫がん微小環境を改善する薬剤を探索するためには、漢方方剤に含まれる個々の成分の作用に注目し、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効果の見られる成分を同定した上で、それらの新しい組み合わせることにより、より効果的な処方を開発することが有効であると考えられる。

2. がん細胞と免疫細胞に作用する漢方成分の同定

我々は、がん細胞における様々な遺伝子異常に起因したシグナル伝達の亢進が、がん細胞の増殖生存を促進するだけでなく、免疫抑制性因子の産生亢進や免疫抑制性の細胞集団の誘導・集積に関与していることを明らかにしてきた。さらに、これらのシグナル伝達を阻害する適切な分子標的薬を用いることによって、担がん生体の免疫抑制環境を改善し、抗腫瘍免疫応答を増強できることを示してきた。本研究では、このような目的に用い得る漢方成分を同定するため、ERK、Wnt/ β -catenin、STAT3 のシグナル亢進により IL-10、VEGF などを分泌するヒト悪性黒色腫細胞株、NF- κ B の恒常的活性化により IL-6 を高産生するヒト卵巣がん細胞株、何らかのシグナル異常により TGF- β を高産生するヒト膵がん細胞株を用いてスクリーニングを行った。昨年度のスクリーニングから何らかの効果が認められた漢方成分と今年度新たに追加した成分からなる 35 成分について再度スクリーニングを行い、さらに詳細な作用機序の解明を試みた。今年度は VEGF を高産生するマウス大腸がん細胞株を用いたスクリーニングも行った。

一方で、漢方成分が免疫細胞に直接作用して免疫抑制環境の改善と抗腫瘍免疫応答の増強につながる可能性についても検討を進めた。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 細胞群はいくつか存在し、Foxp3⁺ CD4⁺ 制御性 T 細胞のうち、naturally occurring regulatory T cells (nTreg) は胸腺由来であり、induced regulatory T cell (iTreg) は TGF- β を添加することで誘導される。また、IL-10 添加により誘導される T regulatory type 1 (Tr1) は Foxp3⁻ の免疫抑制活性をもつ細胞であり、Foxp3⁺ Treg とは別の細胞群と考えられる。さらに TGF- β を産生する T helper type 3 (Th3) 細胞なども免疫抑制能をもつ細胞群として知られている。昨年度に続き、TGF- β による iTreg 細胞誘導を阻害する漢方成分のスクリーニングを行うとともに、今年度は抗腫瘍免疫応答に必要な Th1 細胞への分化を阻害しないという新たな指標を加えて有効な漢方成分の同定を試みた。

材料と方法

漢方成分: 前年度に報告した 62 種類の漢方成分のうち、昨年度のスクリーニングのいずれかで効果があると推測された成分と新たに追加した成分からなる 35 種類について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を購入した。各漢方成分は各々 10mM となるよう DMSO で溶解して用いた。

ヒトがん細胞株: ヒト卵巣がん細胞株 OVCAR3、ヒト悪性黒色腫細胞株 888mel、ヒト悪性黒色腫細胞株 624mel とヒト膵がん細胞株 PK59 のそれぞれの細胞株は 10% FBS を添加した RPMI 1640 (invitrogen) で培養した。ヒト卵巣がん細胞株 JHOC5 の細胞株は 10% FBS を添加した DMEM/F12 (sigma) で培養した。ヒト卵巣がん細胞株 RMG1 は 10% FBS を添加した F12 (sigma) で培養した。OVCAR3 は 24 well プレートに 5×10^4 cells/well として播種し、10mM の漢方成分を加えて 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。JHOC5 と RMG1 はそれぞれ 24well プレートに 1×10^4 個/well 播種し、漢方成分を加えて 6 時間培養後、上清を回収し、サイトカイン測定サンプルとした。888mel、624mel と PK59 はそれぞれ 24 well プレートに 5×10^4 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、サイトカイン測定サンプルとした。

マウスがん細胞株: マウス大腸がん細胞株 CT26 は 10% FBS を添加した RPMI 1640 (invitrogen) で培養し

た。マウス大腸がん細胞株 CT26 は 24 well プレートに 5×10^4 cells/well として播種し、10mM の漢方成分を加えて 24 時間培養した後、上清を回収し、サイトカイン測定用のサンプルとした。

サイトカインの測定: ヒト IL-6、IL-10 と TGF- β は、OptiEIA ELISA sets (BD Biosciences) を用いて測定した。またヒトあるいはマウスの VEGF は、それぞれに対する DuoSet ELISA Development System (R&D Systems) を用いて測定した。

マウス: 6 週齢の雌性 C57BL/6 マウスと BALB/c マウスを三協ラボサービス株式会社より購入した。

***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の同定:** Miltenyi Biotec 社の CD4⁺CD62L⁺ T Cell Isolation Kit II を用いて、CD4⁺ CD62L⁺ ナイーブ T 細胞を C57BL/6 マウス及び BALB/c マウスの脾臓細胞より分離した。その細胞を TGF- β (10ng/mL) 存在下において、プレートコートした抗 CD3 抗体 (1 μ g/mL) と抗 CD28 抗体 (10 μ 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 (10 μ M) 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。

***in vitro* における Th1 細胞の分化誘導とそれを阻害しない漢方成分の同定:** CD4⁺ CD62L⁺ ナイーブ T 細胞を C57BL/6 マウス及び BALB/c マウスの脾臓細胞より分離した。その細胞を IL-12p70 (10ng/mL) および IL-2 (10ng/mL) 存在下において、プレートコートした抗 CD3 抗体 (1 μ g/mL) と抗 CD28 抗体 (10 μ g/mL) で活性化させて、Th1 を誘導した。この Th1 誘導系に、漢方成分化合物 (10 μ M) を添加して、4 日後に細胞を回収し、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後、BD FACSCalibur で測定し、BD CellQuest Pro にて解析した。細胞は FITC 標識抗 CD4 抗体、PE 標識抗 Foxp3 抗体、PerCP 標識または APC 標識抗 CD25 抗体で染色した。細胞内染色は BD Cytotfix/Cytoperm を用いて行った。

結果

2.1) ヒト卵巣がん細胞株からの IL-6 産生を抑制する漢方成分の同定

ヒト卵巣がん細胞株 OVCAR3 に最終 10 μ M で 35 種の漢方成分を加えて、IL-6 産生に対する影響を評価した結果、漢方成分 No.17, 34, 27, 25, 10, 33 の順に IL-6 産生を抑制した(図 3)。

ヒト卵巣がん細胞株 JHOC5 からの IL-6 産生に対する影響を同様に評価した結果、漢方成分 No.17, 33, 25, 27, 23, 22, 24, 19, 13, 29 の順に IL-6 産生を抑制した(図 4)。特に漢方成分 No.17, 33 の IL-6 産生抑制作用が顕著であった。

ヒト卵巣がん細胞株 RMG1 からの IL-6 産生に対する影響を同様に評価した結果、漢方成分 No.17 が顕著に IL-6 産生を抑制し、漢方成分 No.18, 6, 16 でわずかな抑制がみられた(図 5)。一方で、JHOC5 で IL-6 産生を抑制する漢方成分 No.23, 24, 34 が RMG1 に対しては IL-6 産生を増加させた。

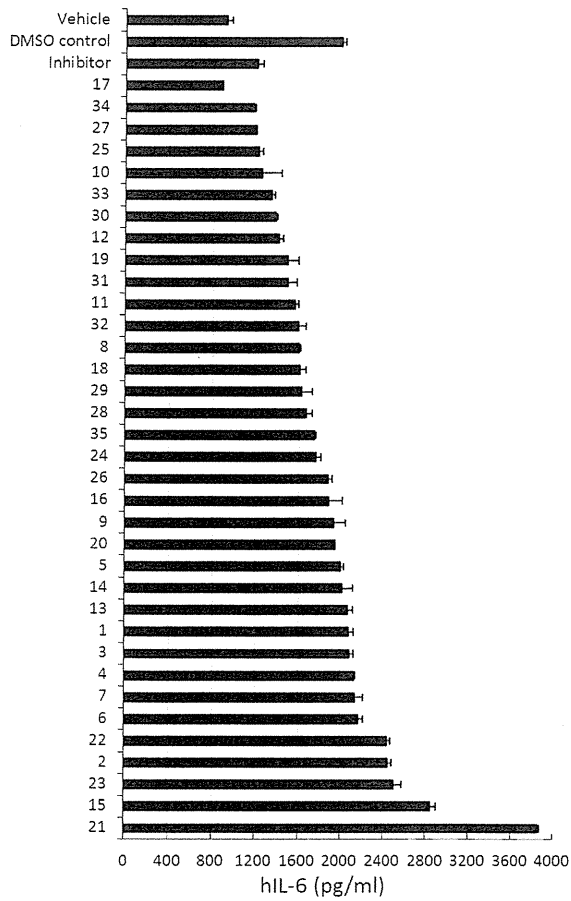


図 3. 漢方成分 (10 μ M) のヒト卵巣がん細胞株 OVCAR3 の IL-6 産生に及ぼす影響
inhibitor: DHMEQ

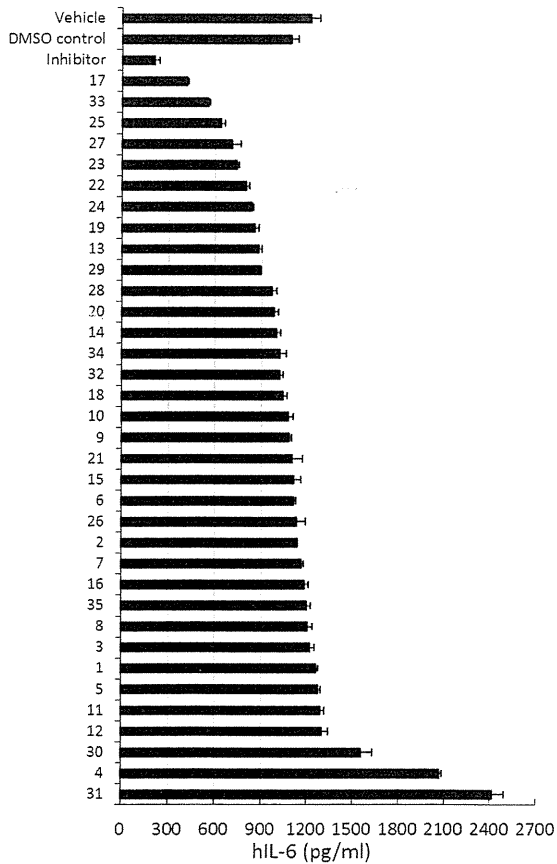


図 4. 漢方成分 (10 μ M) のヒト卵巣がん細胞株 JHOC5 の IL-6 産生に及ぼす影響
inhibitor: DHMEQ

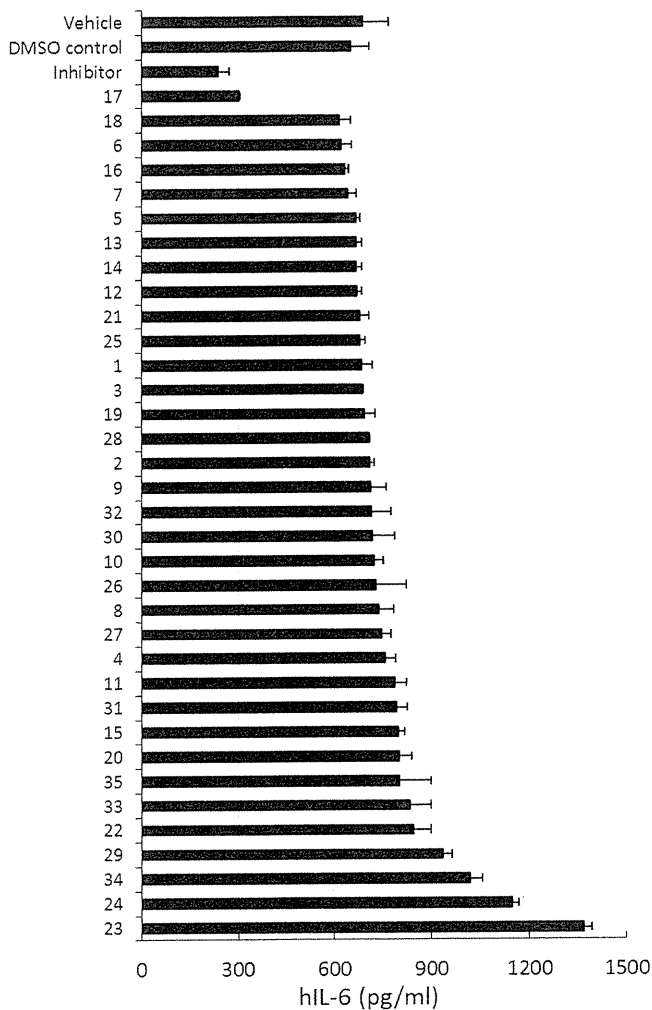


図5. 漢方成分 (10 μ M) のヒト卵巣がん細胞株 RMG1 の IL-6 産生に及ぼす影響
inhibitor: DHMEQ

2.2) ヒト悪性黒色腫細胞株からの IL-10、VEGF 産生を抑制する漢方成分の同定

悪性黒色腫細胞株 888mel に 10 μ M の 35 種漢方成分を加えて、*in vitro* での IL-10 産生と VEGF 産生についてスクリーニングを行った。漢方成分 No.16, 15, 21, 17, 23, 14, 33 の順に IL-10 産生の抑制がみられた(図 6 a)。VEGF 産生に関しては、漢方成分 No.21, 28, 16, 35 の順に産生抑制がみられた(図 6 b)。

悪性黒色腫細胞株 624mel に 10 μ M の 35 種漢方成分を加えて、*in vitro* での IL-10 産生と VEGF 産生をスクリーニングしたところ、IL-10 の産生は漢方成分 No.21, 32, 28 の順に抑制がみられた(図 7 a)。VEGF 産生は漢方成分 No.28, 23 などが抑制した(図 7 b)。漢方成分 No.17 は 888mel と 624mel の IL-10 を抑制するが VEGF 産生は増加させることがわかる。

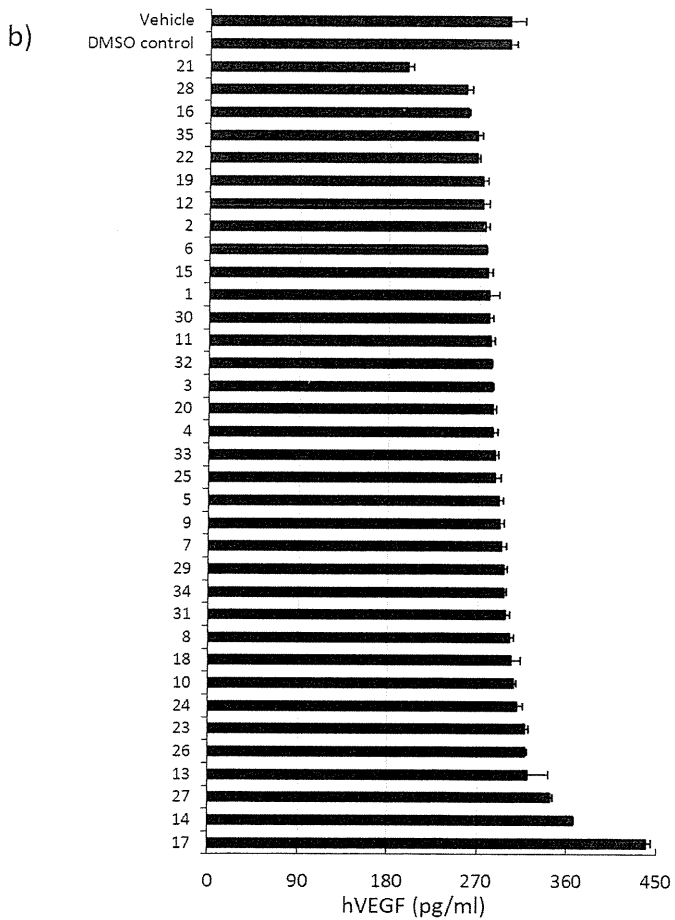
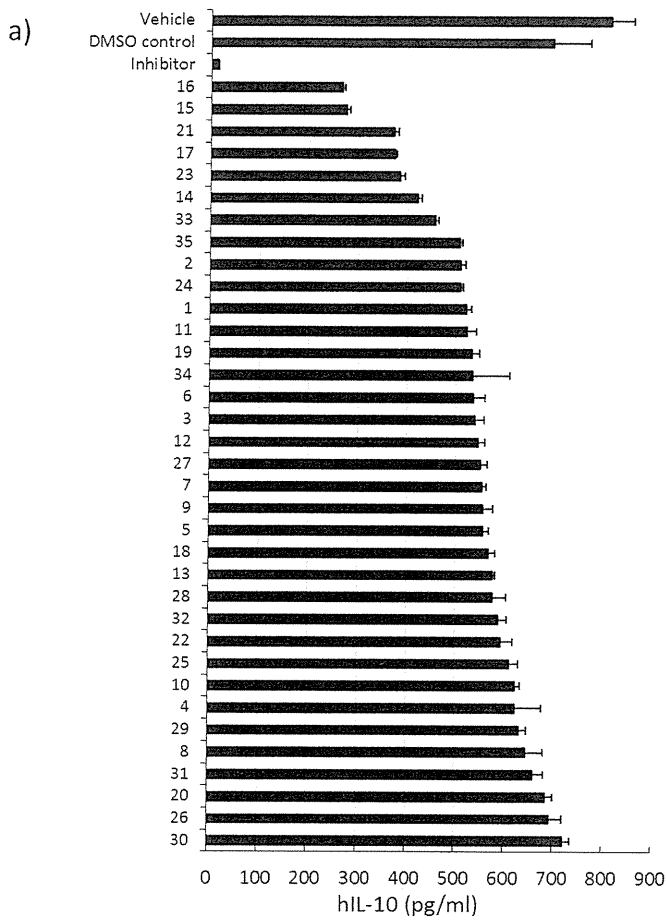


図6.漢方成分 (10 μ M) のヒト悪性黒色腫細胞株 888mel のサイトカイン産生に及ぼす影響
a) IL-10 b) VEGF (inhibitor: U0126)

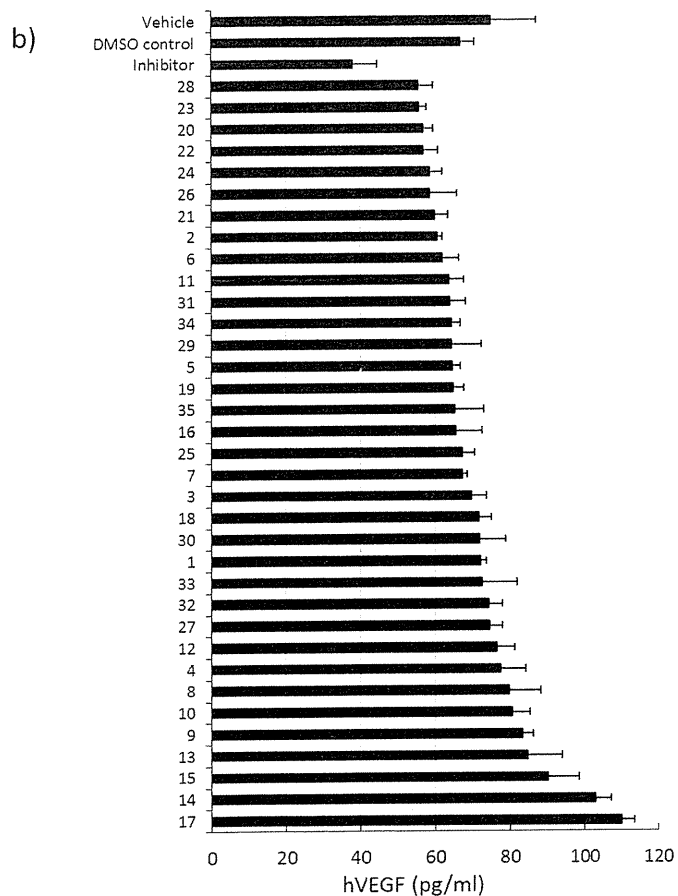
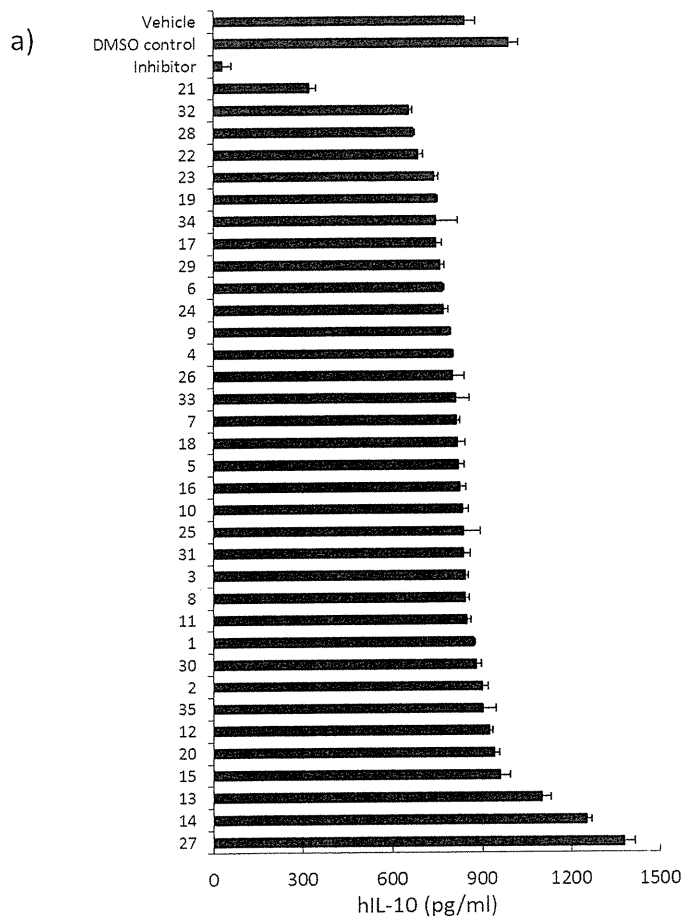


図7.漢方成分 (10 μ M) のヒト悪性黒色腫細胞株 624mel のサイトカイン産生に及ぼす影響
 a) IL-10, b) VEGF (inhibitor: U0126)

2.3) ヒト膀胱がん細胞株からの TGF-β産生を抑制する漢方成分の同定

ヒト膀胱がん細胞株 PK59 細胞に 10μM の 35 種漢方成分を加えて、*in vitro* での TGF-β産生をスクリーニングしたところ、漢方成分 No.10, 6, 13, 3, 24 の順に TGF-β産生の減少がみられた(図 8)。

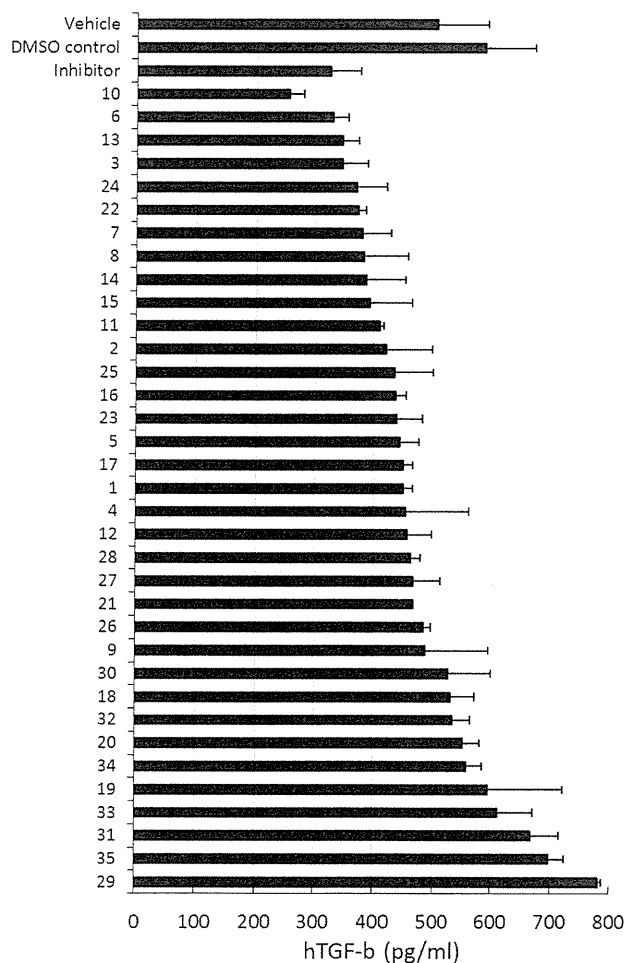


図 8. 漢方成分 (10μM) のヒト膀胱がん細胞株 PK59 の TGF-β産生に及ぼす影響
inhibitor: AG490

2.4) マウス大腸がん細胞株からの VEGF 産生を抑制する漢方成分の同定

マウス大腸がん細胞株 CT26 に 10μM の 35 種の漢方成分を加えて、*in vitro* での VEGF 産生をスクリーニングしたところ、漢方成分 No.21 は 888mel, 624mel と同様 VEGF 産生を有意に減少させ、漢方成分 No.16 や No.35 は 888mel と同様 VEGF 産生を抑制した ((図 9)。

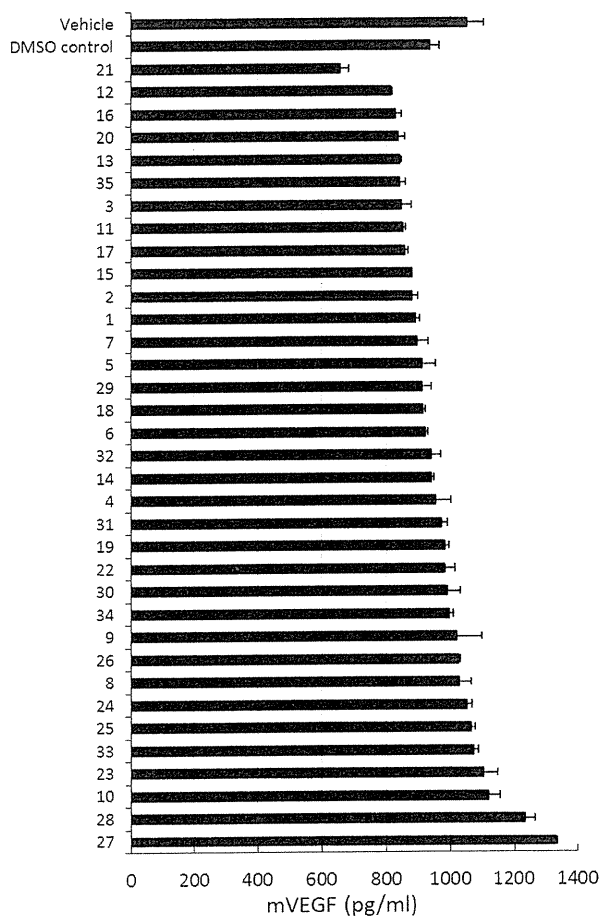


図9. 漢方成分 (10 μ M) のマウス大腸がん細胞株 CT26 の VEGF 産生に及ぼす影響

2.5) 制御性 T 細胞の誘導を抑制し、Th1 細胞の分化は阻害しない漢方成分の同定

C57BL/6 マウスもしくは BALB/c マウスの脾臓から分離した CD4⁺ CD62L⁺ ナイーブ T 細胞を iTreg または Th1 へ誘導した際に、漢方成分化合物(10 μ M)を添加し、その誘導効率について比較検討した。C57BL/6 マウスでは iTreg 誘導を DMSO control と比較して有意に抑制した漢方成分は 10 種類(No.8、9、13、16、17、19、20、21、23、25)であった。そのうち、Th1 誘導を抑制しなかった漢方成分は 5 種類(No.8、No.9、20、23、25)であった(図 10)。BALB/c マウスでは、漢方成分 7 種類(No.9、13、16、17、19、23、25)が Treg 誘導を抑制し、そのうち 5 種類(No.9、13、19、23、25)が Th1 誘導を抑制しなかった(図 11)。

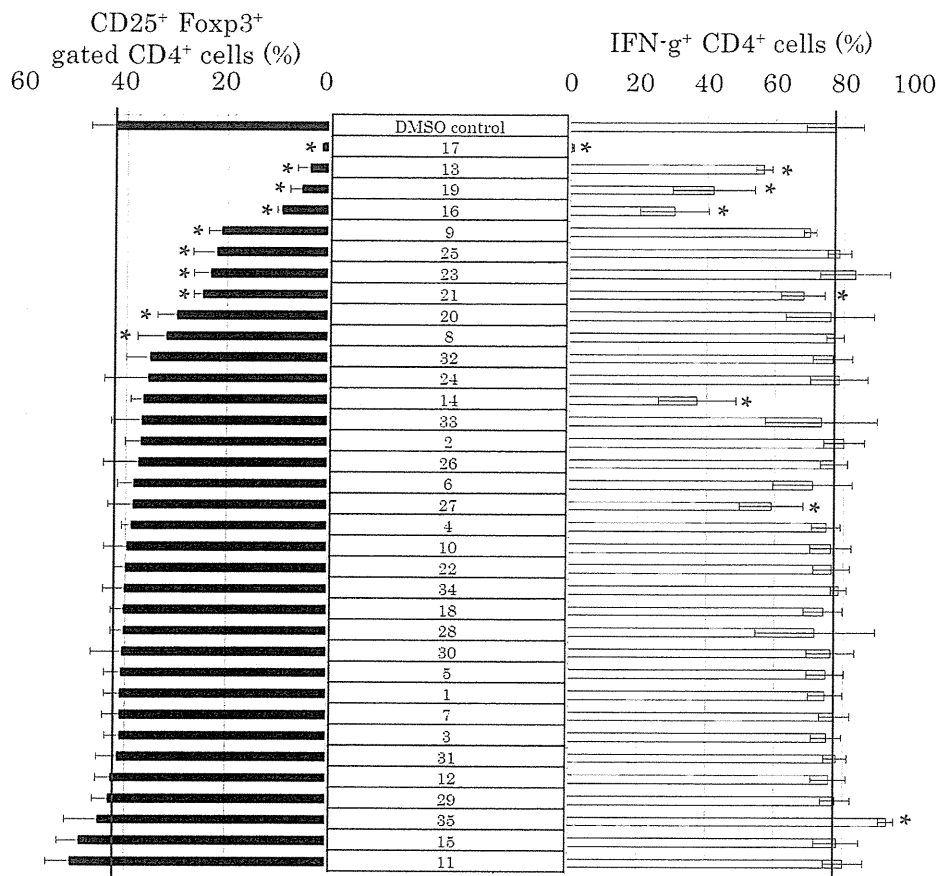


図 10 漢方成分 (10µM) が C57BL/6 マウス由来の iTreg 細胞誘導に与える影響
*p<0.05 (vs DMSO control)

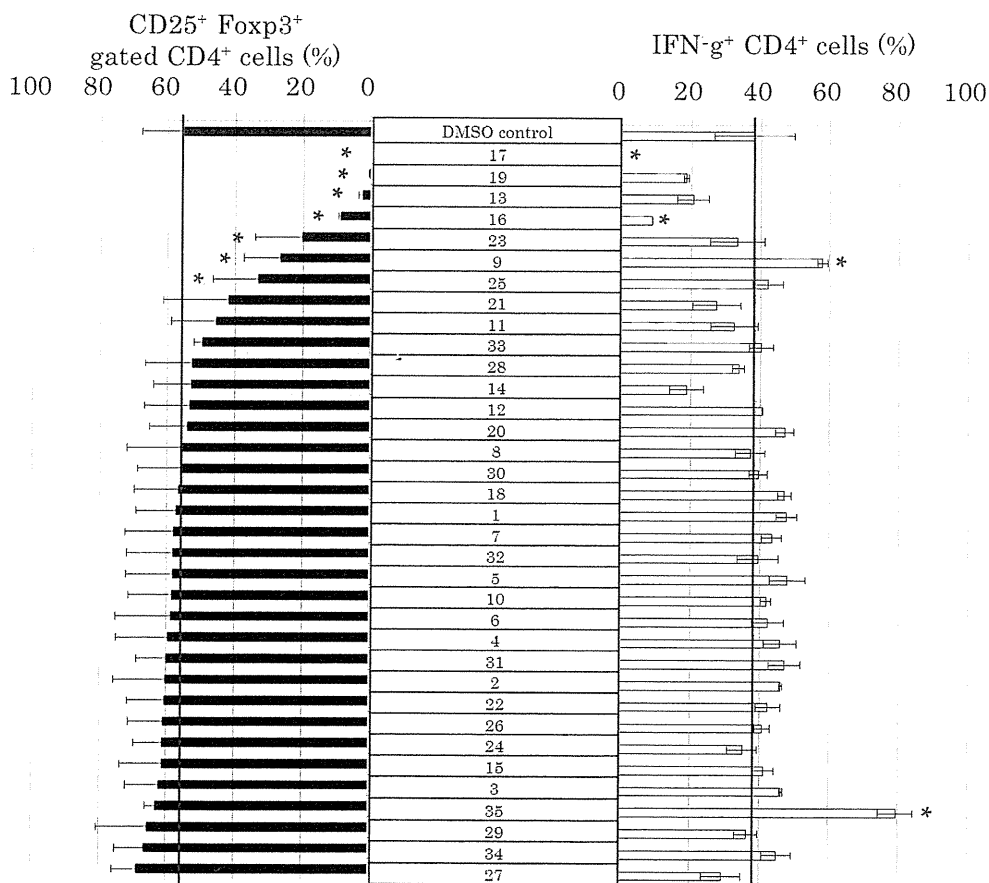


図 11 漢方成分 (10µM) が BALB/c マウス由来の iTreg 細胞誘導に与える影響
* p<0.05 (vs DMSO control)

考察

我々は、これまでに、ヒトがん細胞で活性化しているシグナル伝達分子に対する阻害剤が、免疫抑制性サイトカインの産生を低下させ、また 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の改善、抗腫瘍免疫応答の増強につながることを報告してきた。また、適切なシグナル伝達阻害剤は、がん細胞のみならず宿主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その機能を抑制し、樹状細胞などの抗腫瘍効果を増強させることも見出している。

今回の結果から、がん細胞の種類により、つまり、活性化しているシグナル伝達経路と高産生されているサイトカインの種類によって、有効な漢方成分が異なることが分かった。また一方で、特定のがん細胞のみにサイトカイン抑制効果を示す漢方成分も存在する。これらの共通性、または特定の作用機序を解明することで漢方成分由来の新規な治療薬・免疫応答改善薬の開発が期待できる。

今回の解析で有効性が示された漢方成分の中には、これまで報告されていないサイトカイン産生抑制作用をもつ化合物が含まれている。これらの分子メカニズムを明らかにすることで、漢方処方 of 科学的な作用機序が理解され、より効果的な処方の開発が可能になると思われる。

TGF- β により誘導される 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- β 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。今回、C57BL/6 マウスと BALB/c マウスからそれぞれ iTreg と Th1 を誘導し、その際に漢方成分が与える影響について検討した。iTreg 誘導の抑制作用が認められた漢方成分のうち、一部はヒトがん細胞からの IL-6、IL-10、TGF- β などの免疫抑制性サイトカインの産生を抑制するものも含まれており(詳細は別項にて報告)、これらの漢方成分を投与することにより、免疫抑制環境を改善できる可能性が示唆された。特に iTreg 誘導を阻害するが Th1 分化は阻害しない漢方成分は臨床応用に有効であると期待される。本研究の結果を踏まえ、別項にて、マウス担がんモデルを用いて漢方成分投与によるがん微小環境の改善及び抗腫瘍効果について検討を行った。

3. がん細胞と免疫細胞に作用する植物由来エキスの探索

昨年度及び今年度の漢方成分を用いた様々なスクリーニングに加えて、さらに新たな有効成分を同定する目的で植物由来エキス 109 種類を用いたスクリーニングを行った。ヒト卵巣がん細胞株 OVCAR3 からの IL-6、ヒト悪性黒色腫細胞株 888mel からの IL-10 産生、マウスでの iTreg 誘導に対する阻害活性を指標とした。

材料と方法

植物由来エキス: 池田剛准教授(崇城大学薬学部生薬学研究室)より供与された 109 種類の植物由来エキスを実験に用いた。

ヒトがん細胞株: ヒト卵巣がん細胞株 OVCAR3 とヒト悪性黒色腫細胞株 888mel の細胞株は 10% FBS を添加した RPMI 1640 (invitrogen)で培養した。ヒト卵巣がん細胞株 OVCAR3 は 96 well プレートに 1×10^4 cells/well として播種し、DMSO 濃度が 0.1%となるように希釈した植物由来エキスを加えて 4 時間培養した後、上清を除去し、再び同濃度のエキスを加えて 4 時間培養して上清を回収した。ヒト悪性黒色腫細胞株 888mel は 96 well プレートに 1×10^4 個/well 播種し、DMSO 濃度が 0.1%となるように希釈した植物由来エキスを加えて 24 時間培養後、上清を回収し、サイトカイン測定用のサンプルとした。

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

マウス: 6 週齢の雌性 C57BL/6 マウス (三協ラボサービス株式会社)より脾臓を摘出し、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植物エキスの同定: Miltenyi Biotec 社の CD4⁺CD62L⁺ T Cell Isolation Kit II を用いて、CD4⁺CD62L⁺ ナイーブ T 細胞を C57BL/6 マウスの脾臓細胞より分離した。その細胞を TGF- β (10ng/mL)存在下において、プレートコートした抗 CD3 抗体 (1 μ g/mL) と抗 CD28 抗体 (10 μ g/mL) で活性化させて、iTreg を誘導した。この iTreg 誘導系に、植物エキスを添加して、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後、BD FACSCalibur で測定し、BD