

CellQuest Proにて解析した。細胞は FITC 標識抗 CD4 抗体、PE 標識抗 Foxp3 抗体で染色した。細胞内染色は BD Cytofix/Cytoperm を用いて行った。

結果

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

ヒト卵巣がん細胞株 OVCAR3 に 109 種の植物由来エキスを加えて、*in vitro*での IL-6 産生をスクリーニングしたところ、IL-6 の産生を減少させる 10 種の植物由来エキス (E11、E18、E19、E20、E21、E23、E47、E104、E105、E106) が同定された。特に E21、E23、E104 では、IL-6 産生抑制作用が顕著であった (図 1 2)。

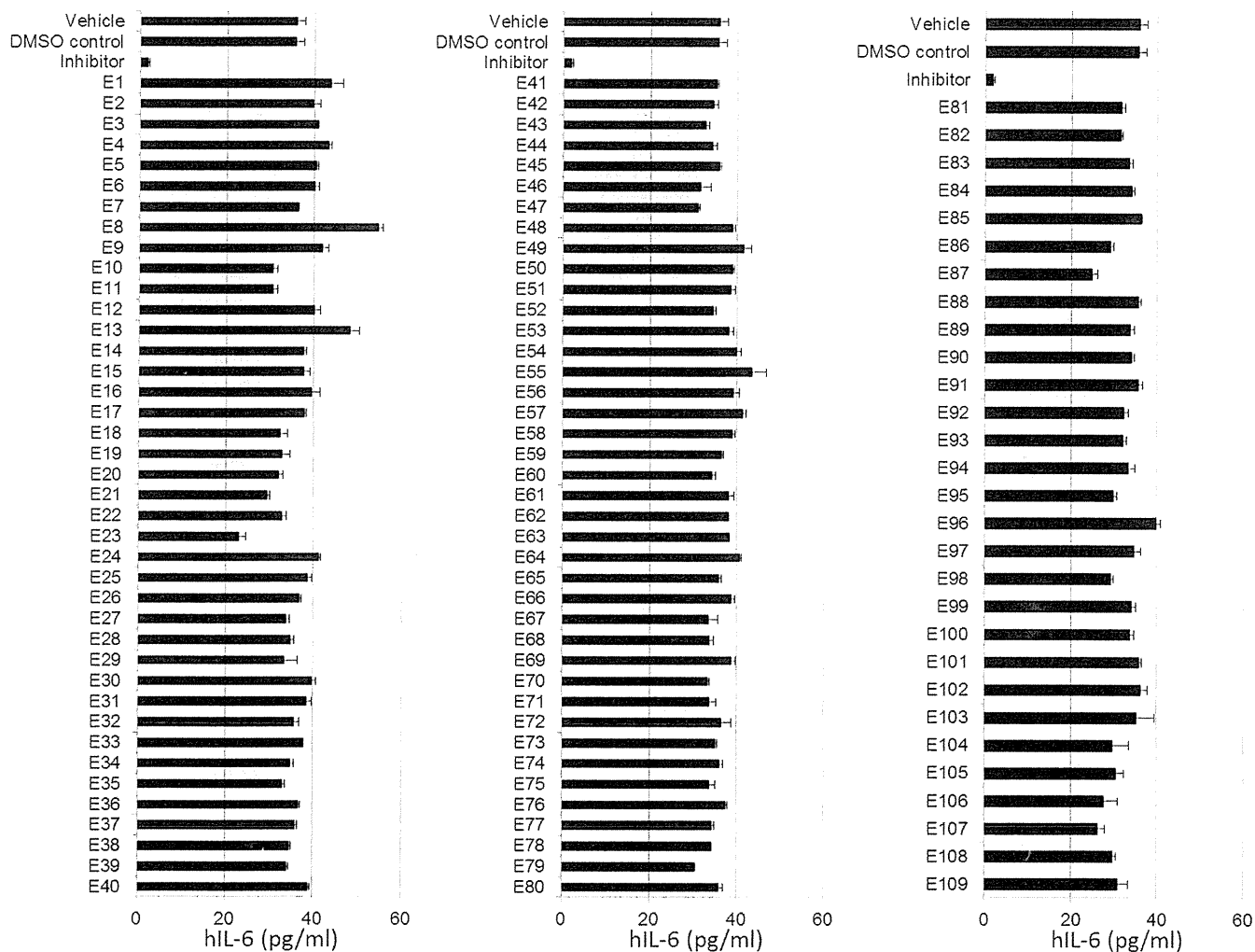


図 1 2. 植物由来エキスのヒト卵巣がん細胞株 OVCAR3 の IL-6 産生に及ぼす影響

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

悪性黒色腫細胞株 888mel に 109 種の植物由来エキスを加えて、*in vitro*での IL-10 産生についてスクリーニングを行った。IL-10 の産生を減少させる 11 種の植物由来エキス (E11、E18、E19、E20、E21、E23、E49、E62、E104、E105、E106) が同定された (図 1 3)。特に E11、E19、E104、E106 では、IL-10 産生抑制作用が顕著であった。

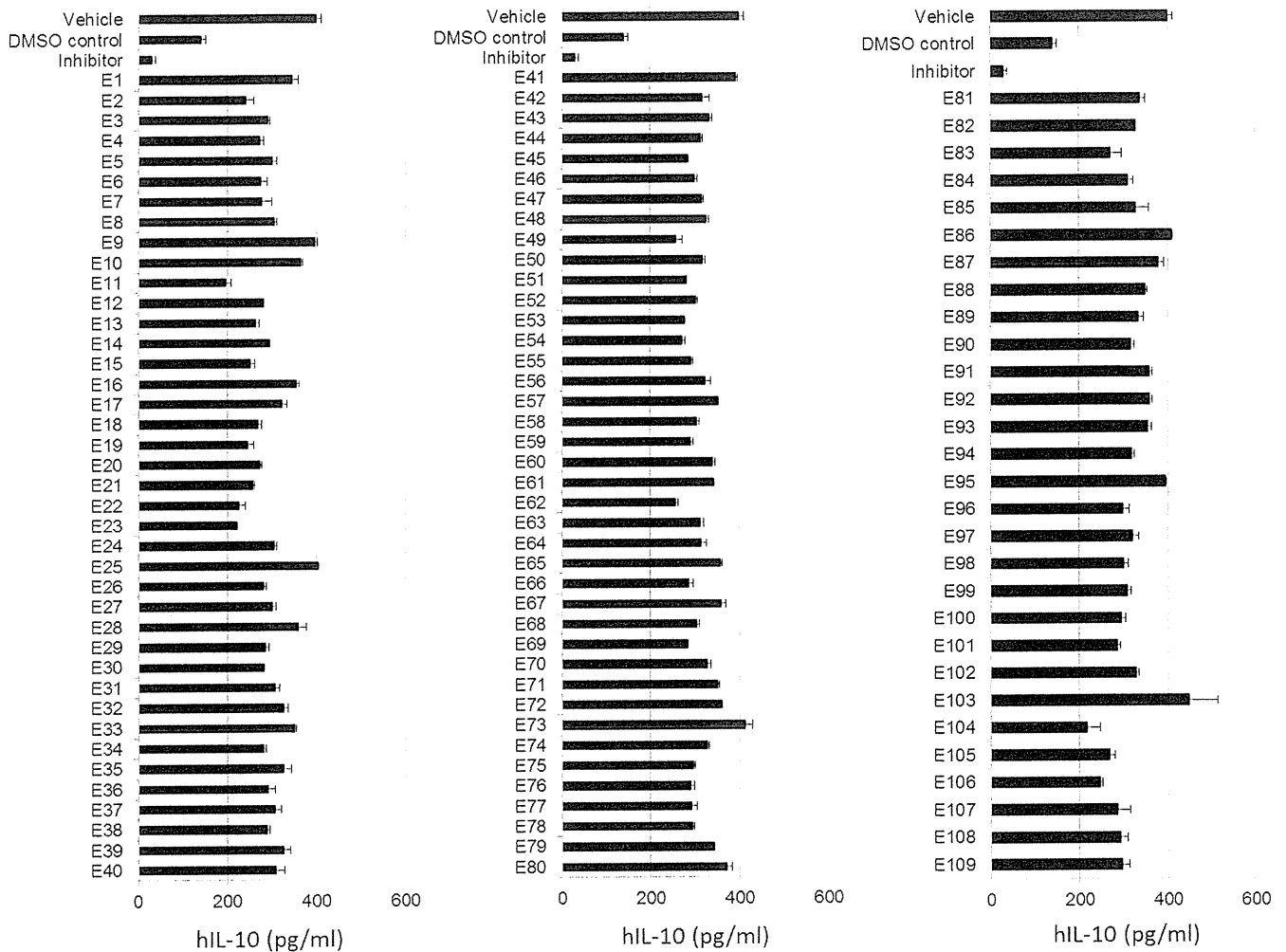


図 1 3. 植物由来エキスのヒト悪性黒色腫細胞株 888mel の IL-10 産生に及ぼす影響

3. 3) 制御性 T 細胞の誘導を抑制する植物エキスの同定

C57BL/6 マウスの脾臓から分離した CD4⁺ CD62L⁺ ナイーブ T 細胞を TGF-β (10ng/mL) 存在下で iTreg へ誘導した際に、植物エキスを添加し、その誘導効率について比較検討した。その結果、109 種類の植物エキスのうち、TGF-β による iTreg 誘導を DMSO control と比較して 70% 未満に抑制した植物エキスは 48 種類であった(図 1 4、1 5)。具体的には E5、E6、E8、E11、E13、E14、E15、E16、E17、E21、E23、E27、E30、E31、E34、E35、E36、E38、E40、E42、E44、E46、E48、E49、E50、E51、E55、E58、E59、E60、E61、E63、E68、E69、E71、E73、E76、E78、E79、E81、E83、E85、E86、E87、E91、E93、E94、E104 である。

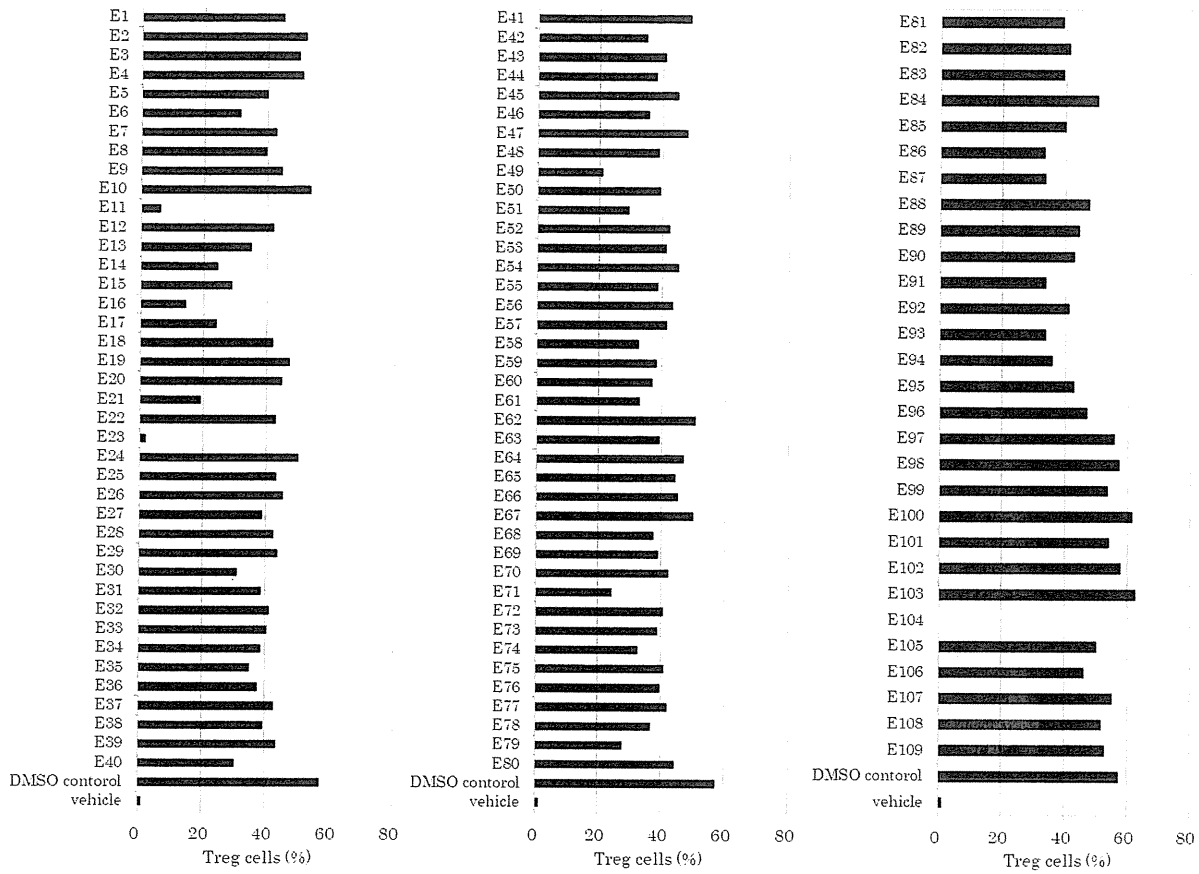


図 1 4 植物エキ스가 C57BL/6 マウス由来の iTreg 細胞誘導に与える影響

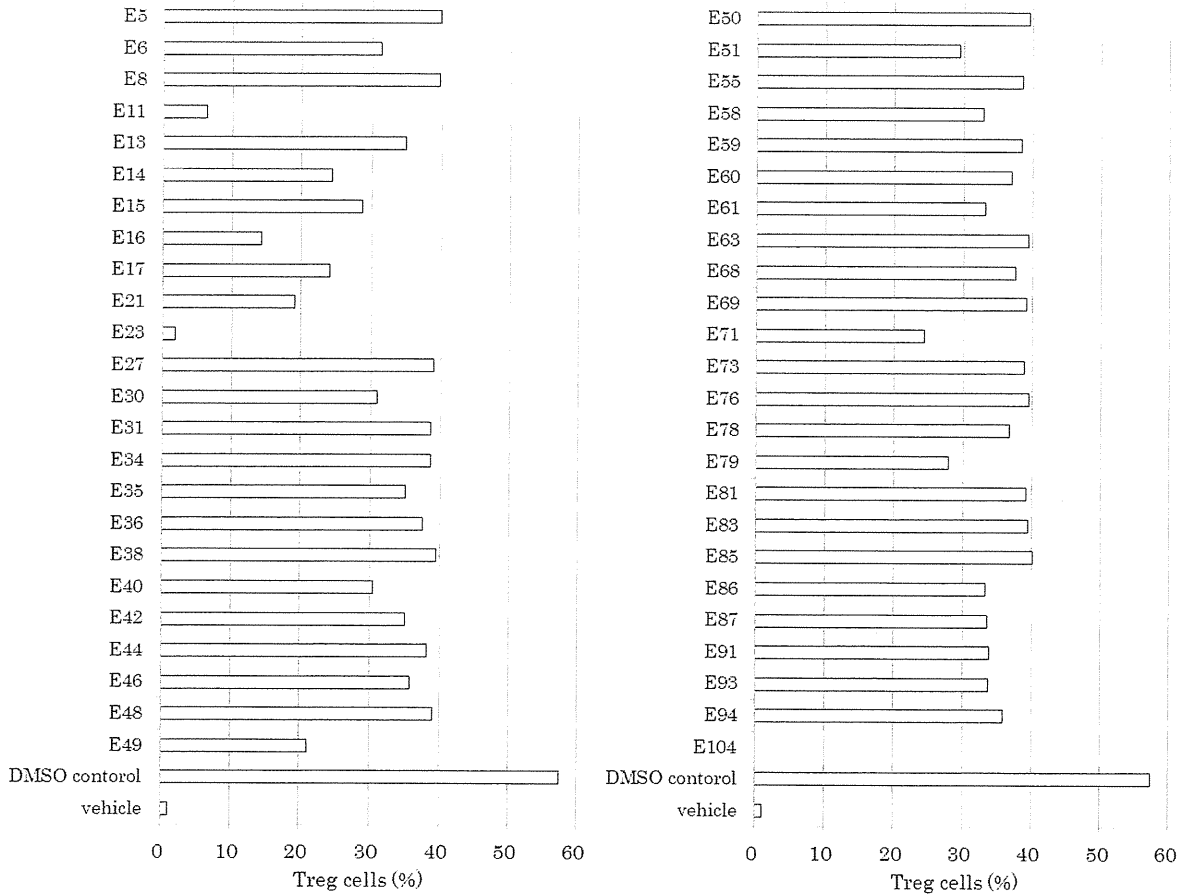


図 1 5 C57BL/6 マウス由来の iTreg 細胞誘導を抑制する植物エキスの候補

考察

C57BL/6 マウスの iTreg 誘導に対し、植物エキスが与える影響について検討した。今回 iTreg 誘導を抑制するものとして同定された植物エキスの中には、本研究で抑制作用が確認されている漢方成分化合物を含有しているものがあつた。具体的には、E6 の成分の No.19、E14 と E16 の成分の No.9 と 16、E27、E30、E85 (E30 と E85 はほぼ同じ生薬)の成分の No.23、E71 の成分の No.13、E104 の成分の No.17 がそれに該当する。また、E27 とほぼ同じ生薬である E29 でも E27 よりは弱い抑制傾向が見られた。これらの植物エキスは E16 以外、エキスによる iTreg 誘導抑制よりもその成分化合物単独での抑制作用の方が高いもしくはほぼ同等の結果が得られており、その成分の影響を多大に受けていることが考えられる。E16 は今回検討した漢方成分のうち、漢方成分 No.9 と 16 を含有している。No.9 と E16 を比較すると E16 の方が iTreg 誘導抑制効果が高かったが、漢方成分 No.16 と E16 を比較すると漢方成分 No.16 でより高い抑制効果が得られた。このことから、E16 は、含有成分の No.9 と No.16 の両方もしくはより強く No.16 の影響を受け、No.9 より iTreg 誘導抑制効果が強く出たものと考えられる。これらのことから、上記の植物エキスに関しては生薬を構成している漢方成分が生薬自体の効果に大きく影響している可能性が示された。

一方、漢方成分 No.13 を含む E24、漢方成分 No.9 を含む E33 や漢方成分 No.25 を含む E47 は漢方成分単体では iTreg 誘導を抑制していたが、複合体である植物エキスでは抑制効果は見られなかった。原因として、植物エキスに含まれる漢方成分の濃度が抑制効果を発揮する濃度に満たなかった可能性がある。効果のあつた漢方成分については、最小有効濃度と植物エキス中の含有量を照査する必要がある。

漢方成分単体では抑制作用が確認されなかったが、複合体である植物エキスでは抑制作用が確認されたものとしては漢方成分 No.2、14、15 を含有する E13 や、漢方成分 No.12 を含有する E79、漢方成分 No.3 や 4 を含有する E91 があつた。これらの植物エキスには、まだ iTreg 誘導抑制効果の検討を行っていない成分も含まれているため、それらの成分によって抑制作用が認められた可能性がある。

今回、iTreg 誘導を抑制する植物エキスを選出し、その中に我々が注目した漢方成分も含有する生薬を見出した。複合的な漢方方剤や生薬の効果を包括的に確認し、効果が認められた薬剤について、さらに個々の構成成分が持つ作用の仕組みを解明していくことは、科学的根拠に基づいた新しい漢方処方の開発につながると思われる。

4. 同定した漢方成分の標的シグナル・分子の同定

漢方成分を用いたこれまでのスクリーニングから、NF- κ B の活性化が顕著なヒト卵巣がん細胞株からの IL-6 産生、ERK, STAT3, Wnt/ β -catenin 活性化が認められるヒト悪性黒色腫細胞株からの IL-10 や VEGF の産生に対して阻害活性をもつ複数の漢方成分が同定されてきた。これらの成分がサイトカイン産生を抑制する機構を明らかにするため、ヒト卵巣がん細胞株の NF- κ B 活性、ヒト悪性黒色腫細胞株の ERK, STAT3 活性に対する影響をそれぞれ Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)、ウエスタンブロット法により解析した。

材料と方法

漢方成分:漢方成分は各々10mM となるよう DMSO で溶解し、実験に用いた。

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 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 は 10% FBS を添加した DMEM/F12 (sigma)で培養した。

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA): OVCAR3 あるいは JHOC5 を 60mm dish に 5×10^5 cells/dish で播種し、 $10 \mu\text{M}$ の漢方成分を加えて 6 時間培養した。核抽出液は Andrews and Faller (Nucleic Acids Res 1991;19:2499)の方法に従って作成した。 $14 \mu\text{g}$ の核抽出液及び $1 \mu\text{g}$ の poly(dI-dC)を ^{32}P ラベルした NF- κ B 結合配列を含む DNA プローブと結合させた後、4%ポリアクリルアミドゲルで泳動し分離した。検出には BAS-5000 (Fujifilm)を用いた。

ウエスタンブロット法: OVCAR3 は 6 well プレートに 2×10^5 cells/well として播種し、 $10 \mu\text{M}$ の漢方成分を加えて 6 時間培養した。888mel は 6 well プレートに 2×10^5 個/well 播種し、 $10 \mu\text{M}$ の漢方成分を加えて 24 時間培養した。細胞をよく冷やした PBS で 3 回洗浄した。細胞内タンパク質は Pierce RIPA buffer (Thermo

scientific)を用いて抽出し、2時間氷中に静置した。抽出液を遠心分離（1500xg、4°C、10分）し、上清を細胞溶解液とした。Bradford法により、BSAを検量線として用いてタンパク定量を行い、各サンプルのタンパク量を一定にした（20μg）。10%ゲルを用いてSDS-PAGEを行った後、PVDF膜（Millipore）に転写（15V、定電圧、15分）した。Blocking One（Nakarai tesque）中にPVDF膜を浸し、室温90分間ブロッキングした。その後、一次抗体を用いて4°C、一晚一次抗体反応を行った。その後、TBSTを用いて3回洗浄し、二次抗体 horseradish peroxidase-linked goat anti-rabbit IgG（Santa Cruz）を用いて、室温、90分間で二次抗体と反応させた。抗体反応終了後、PVDF膜をTBSTにより4回洗浄した。検出にはImmuno star（Wako Pure Chemical Industries）を利用し、反応の検出には、Bioimaging analyzer LAS3500 mini（Fuji Film）を用いた。

一次抗体として使用した抗体を以下に示した： rabbit polyclonal antibody for phosph-specific STAT3（Ser 727）（Cell signaling; diluted to 1/200 in TBST）、 mouse polyclonal antibody for STAT3（Cell signaling; diluted 1/200 in TBST）、 rabbit polyclonal antibody for phosph-specific p44/42 MAPK（Erk1/2）（Ther202/Tyr 204）（Cell signaling; diluted to 1/200 in TBST）、 rabbit polyclonal antibody for ERK2（Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA ;diluted to 1/200 in TBST）、 anti-β-actin antibody（Shigma Aldrich ; diluted 1/500 in TBST）。

結果

4.1) Electrophoretic Mobility Shift Assay による NF-κB 抑制成分の同定

ヒト卵巣がん細胞株 OVCAR3（図16）および JHOC5（図17）からの IL-6 産生を抑制した漢方成分でこれらの細胞を6時間処理した後の NF-κB 活性化を EMSA 法により調べた結果、漢方成分 No.13, 17, 19, 25, 33 で NF-κB の抑制が認められた。

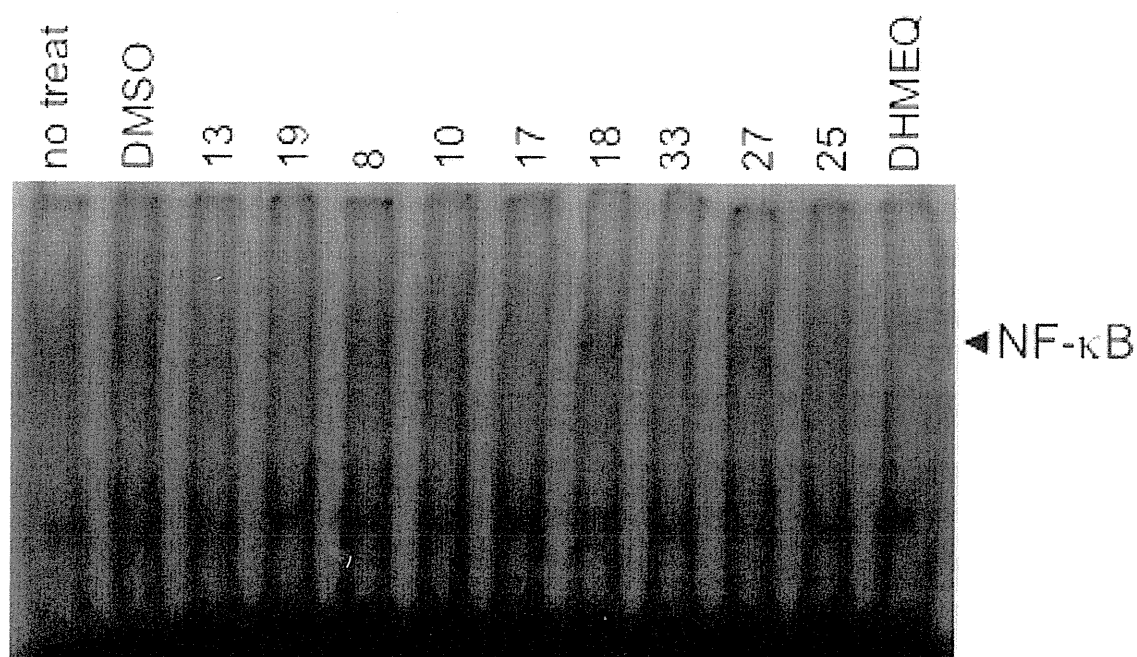


図16 OVCAR3 の NF-κB 活性を抑制する漢方成分の同定

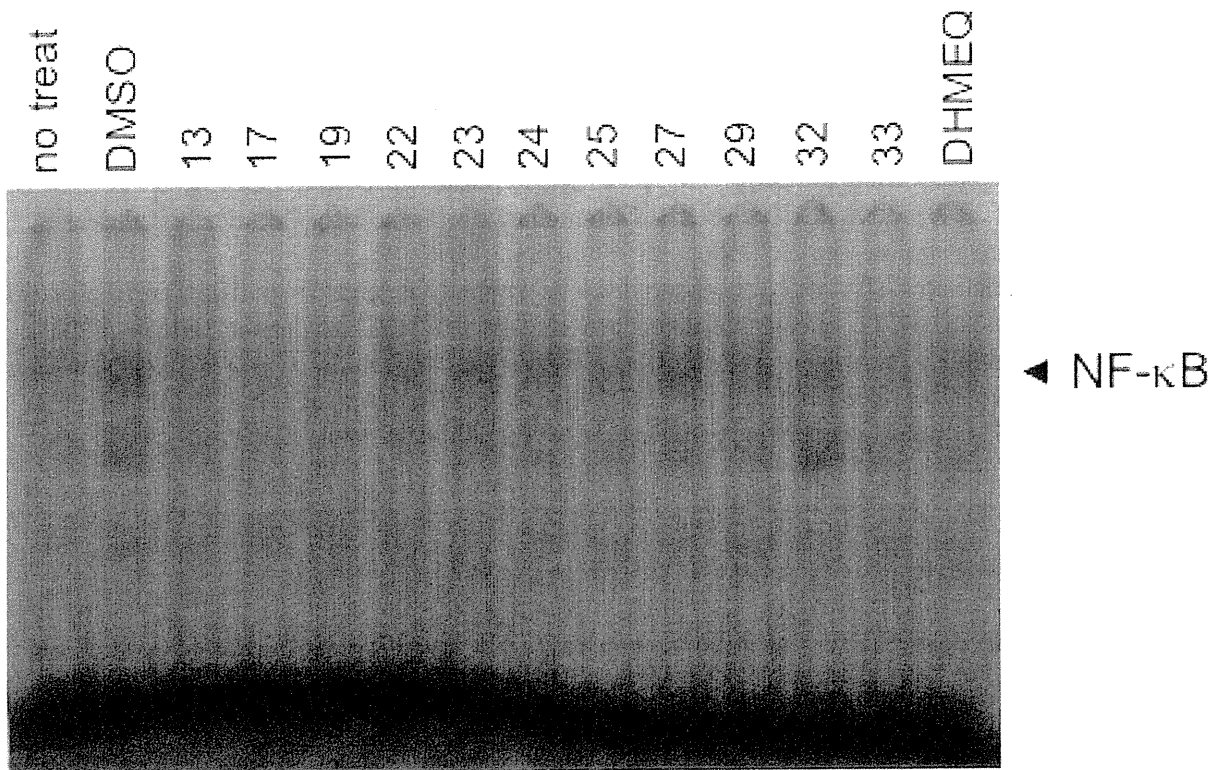


図 1 7 JHOC5 の NF-κB 活性を抑制する漢方成分の同定

4.2) Western blotting による STAT3 および ERK 抑制成分の同定

ヒト卵巣がん細胞株 OVCAR3 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 888mel からの IL-10 産生を抑制した漢方成分の一部について STAT3 および ERK 活性化を Western blotting 法により調べた結果、漢方成分 No.8, 9, 10, 16, 17, 19, 23 で STAT3 の抑制が認められ (図 1 8)、漢方成分 No.8, 9, 10, 16, 19, 23 で ERK の抑制が認められた (図 1 9)。

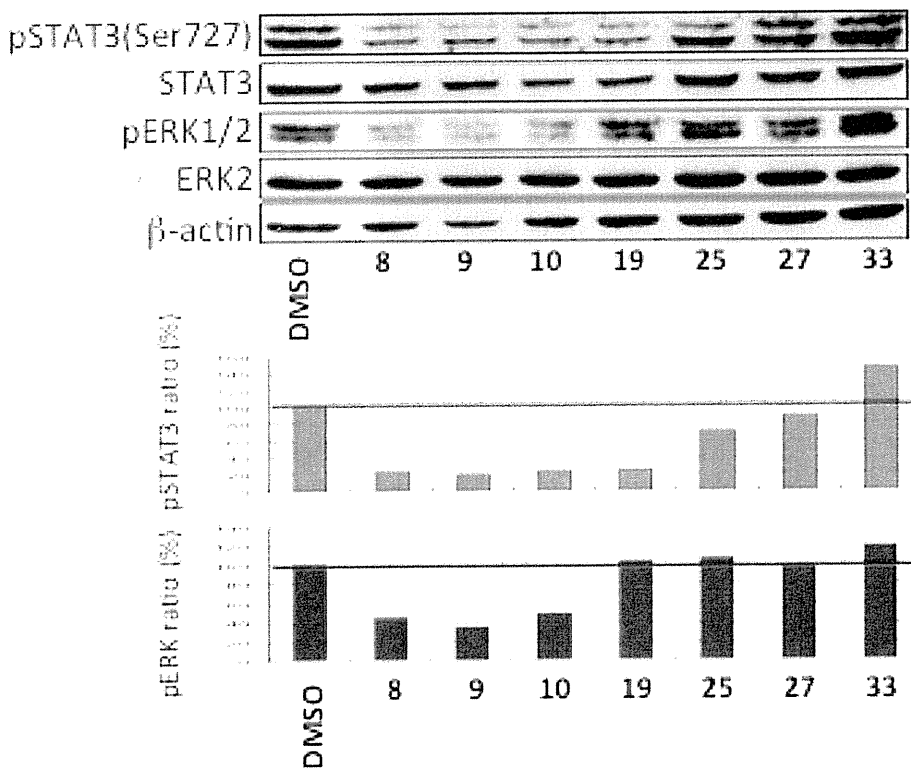


図 1 8 OVCAR3 の STAT3, ERK の活性を抑制する漢方成分の同定

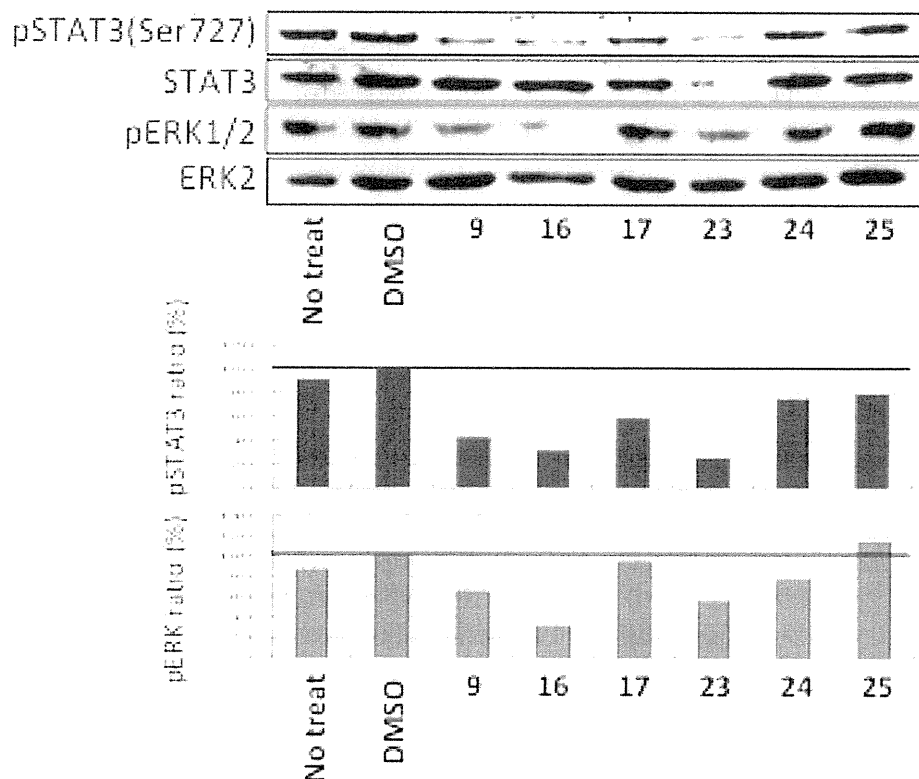


図 1 9 888mel の STAT3, ERK の活性を抑制する漢方成分の同定

考察

卵巣がん細胞株 OVCAR3、JHOC5 は NF-κB の恒常的活性化が認められるとともに、IL-6 を高産生している。我々は、これまでに、OVCAR3 や JHOC5 を NF-κB 阻害剤 DHMEQ で処理することでそれらからの IL-6 産生が顕著に抑制されることを示してきた。今回の漢方成分を用いたスクリーニングによって OVCAR3、JHOC5 からの IL-6 産生を抑制した化合物のうち少なくとも 5 種類は NF-κB 活性を抑制することが明らかになった。特に IL-6 産生の抑制が顕著であった漢方成分 No. 17, 33 では NF-κB の抑制も顕著にみられることから、これらの卵巣がん細胞からの IL-6 産生には NF-κB が重要な寄与をしていることが示唆される。

一方、OVCAR3 からの IL-6 産生を抑制した漢方成分や 888mel からの IL-10 産生を抑制した漢方成分の一部について STAT3 および ERK 活性化への影響を調べた結果、7 種類の漢方成分で STAT3 の抑制が認められ、6 種類の漢方成分で ERK の抑制が認められた。これらの結果は、これらの漢方成分が STAT3 や ERK の活性化抑制を介して IL-6 や IL-10 の産生を抑制している可能性を示唆しているが、今後より詳しい機構の解析が必要である。

5. AhR に作用する漢方成分のスクリーニング

芳香族炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor; AhR) は、さまざまな細胞にその発現を認める核受容体であり、リガンド依存的に活性化すると転写因子として働くことが知られている。結合することが知られるリガンドとしてはダイオキシンやベンゾピレンなどが知られているが、生体内における AhR の内在性リガンドは未だ明らかになっていない。細胞質に存在する AhR は Hsp90 などの分子と結合し安定化を図っているが、リガンドの結合により活性化・核内移行し、その結合パートナーである AhR Nuclear Translocator (ARNT) とヘテロ二量体を形成する。この二量体は Xenobiotic Responsive element (XRE) と呼ばれる配列に特異的に結合し、さまざまな遺伝子の発現調節を行っている。なかでも Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) は、AhR-ARNT 複合体による直接的な発現制御を受けていることが知られており、AhR 活性の測定アッセイにも利用されている。

AhR の発現上昇は多くのがん種で報告されており、予後不良との相関解析やがん転移との関連などが研究されている。ヒト悪性黒色腫において AhR の活性化が MMP の発現を誘導し浸潤能を亢進させることがわか

っており、また尿路上皮がんにおいては AhR の発現と予後不良との相関が明らかとなっていることから、AhR はがん細胞の治療標的となり得ると考えられる。また免疫細胞において、制御性 T 細胞や Th17 の分化において AhR が重要な役割を担っていることが示唆されており、さらにマクロファージや樹状細胞においても分化や機能に AhR の活性化が深く関与していることが報告されている。我々はヒトがん細胞やがん組織に浸潤している免疫細胞における AhR の発現や核内移行を確認しており、免疫抑制環境にあるがん組織において、がん側・免疫側双方における AhR の重要性が示唆される。したがって AhR を制御することによって、免疫抑制的ながん微小環境の改善が期待される。そこで本研究では、抗腫瘍免疫応答増強に参与する漢方成分の同定にあたって AhR に着目し、ヒト AhR 作動性の漢方成分同定を試みた。

材料と方法

細胞株と漢方成分：ヒト乳がん細胞株 MCF-7 とマウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 の培養には 10% FBS を添加した DMEM を用いた。陽性コントロールとなる 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。漢方成分は前述のものと同様である。

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 μ g)と β -ガラクトシダーゼ発現ベクター(0.3 μ 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。漢方成分をそれぞれ記述の濃度に加え、その 1 時間後に TCDD を 10nM の濃度で添加した。TCDD 添加から 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 β -ガラクトシダーゼ活性の値によって補正した。TCDD による活性化を阻害する漢方成分をアンタゴニストとして同定した。

マトリゲルインベーションアッセイ：10 μ M 漢方成分、CH-223191、もしくは 10nM TCDD を 24h 作用させた B16F10 の浸潤能を測定した。細胞の浸潤能は、上チャンバーの FBS(-)の培養液から、FBS(+)培養液入りの下チャンバーに向かって間に置かれた 2.5%マトリゲルに浸潤していく細胞を xCELLigence システム(ロシュ)によって 48h 計測した。

結果

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

漢方成分中に AhR の作動薬となる分子があることが報告されており、前年までに 62 種類の成分から 12 種類の AhR 作動薬候補分子を同定した。そこで今回、長期保存による成分分子の劣化・変化の可能性を排除するため、購入したばかりの漢方成分を用いてレポーターアッセイを行った。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 β 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、漢方成分を添加して 1h 後に 10nM の TCDD を添加した。TCDD 添加 48h 後に細胞抽出液を作製しルシフェラーゼ活性を測定することによって、AhR に対するアンタゴニスト活性の測定とした。その結果、漢方成分 No.9、15、16、22、24、27、34 の 7 種の成分がアンタゴニスト候補として同定された(図 20)。7 種のうち漢方成分 No.22、27 の 2 種は弱いアゴニスト活性も示した。また漢方成分 No. 9、21 の 2 種は 10 μ M 濃度において MCF-7 への細胞障害性を認め、ルシフェラーゼ活性を測定することができなかったが、AhR 作動薬であることがすでに報告されているため、これより後の解析にも用いた。

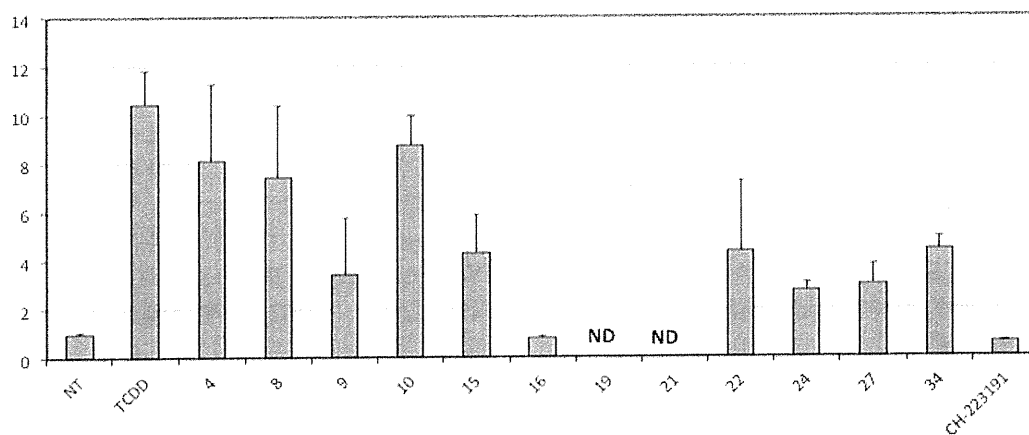


図 20. XRE レポーターアッセイによる AhR アンタゴニストの同定

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

同定された AhR 作動薬のアンタゴニスト活性の有効濃度を明らかにするため、10 μ M よりもさらに低い濃度でのアンタゴニスト活性を XRE レポーターアッセイによって解析した。その結果、漢方成分 No. 16、24、27、34 の4種は 1.25 μ M の濃度においてもルシフェラーゼ活性を強く抑制し、漢方成分 No. 15、22 の2種も 2.5 μ M より強い抑制作用を示した (図 21)。

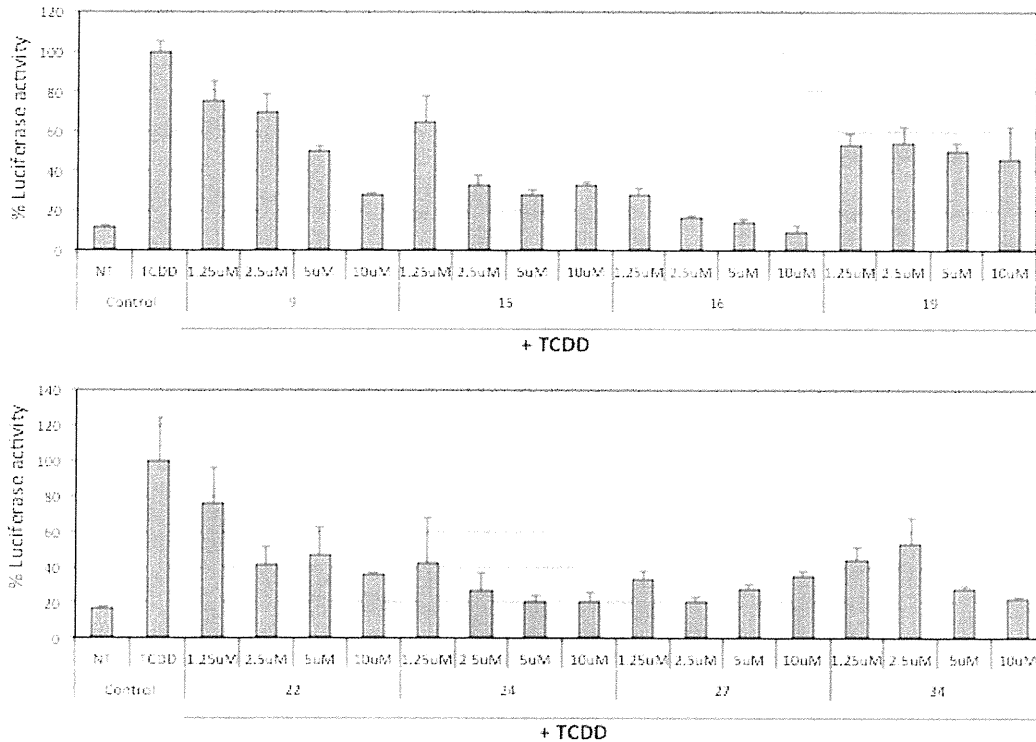


図 21. XRE レポーターアッセイによるアンタゴニスト活性の有効濃度解析

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

次に、同定された成分が AhR 依存的な細胞の形質に作用するかを検証した。ヒト悪性黒色腫細胞の浸潤能が AhR の制御を受けていることは明らかになっており、今回我々はマウス悪性黒色腫細胞株の B16F10 を用いて実験を行った。まず B16F10 の浸潤能が AhR による制御を受けているかを確認するため、B16F10 に AhR アゴニストである TCDD、キヌレン、もしくはアンタゴニストである CH-223191 を添加し、その浸潤能を解析した。AhR アゴニスト/アンタゴニストは浸潤能計測の 24h 前に B16F10 に添加され、xCELLigence システムを用いて 2.5%マトリゲルに浸潤する細胞をそれぞれ計測した。その結果、AhR アゴニスト TCDD 添加によって B16F10 の浸潤能が亢進し、アンタゴニスト CH-223191 によって浸潤能が強く抑制された (図 22)。この結果より、B16F10 の浸潤能もまた AhR の制御を受けていることが示唆された。次に同じ系を用いて、レポーターアッセイによって同定した AhR アンタゴニストが B16F10 の浸潤能に影響を及ぼすか検証した。その結果、漢方成分 No. 15、24、27、34 の4種の漢方成分は B16F10 の浸潤能を強く抑制した (図 23、24)。漢方成分 No.9、22 の2種は浸潤能には影響を与えず、また漢方成分 No.16、19、21 の3種は B16F10 に毒性が強くそのバイアビリティに著しく影響を与えたため解析不能とした。

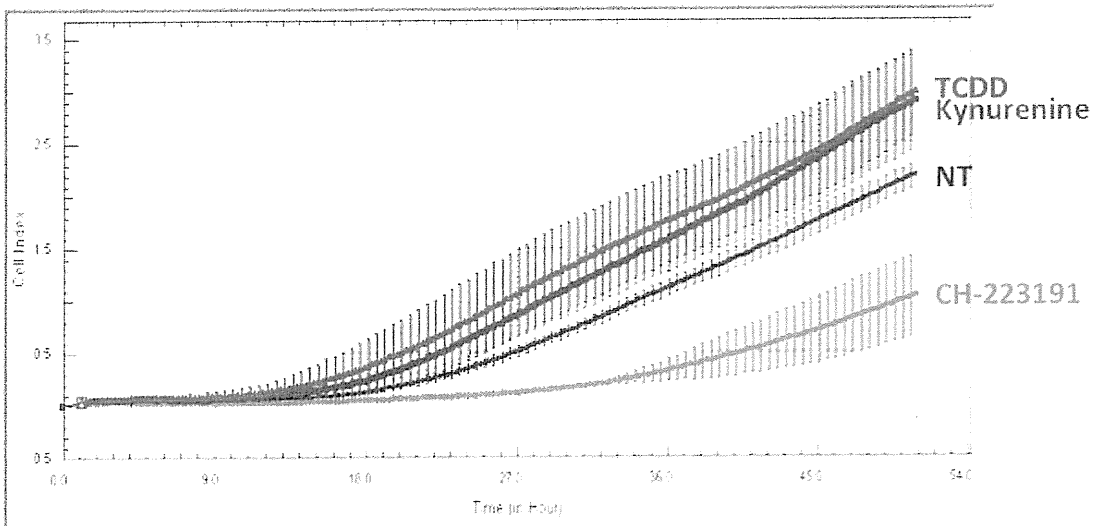


図 2 2. AhR 依存的な B16F10 の浸潤能

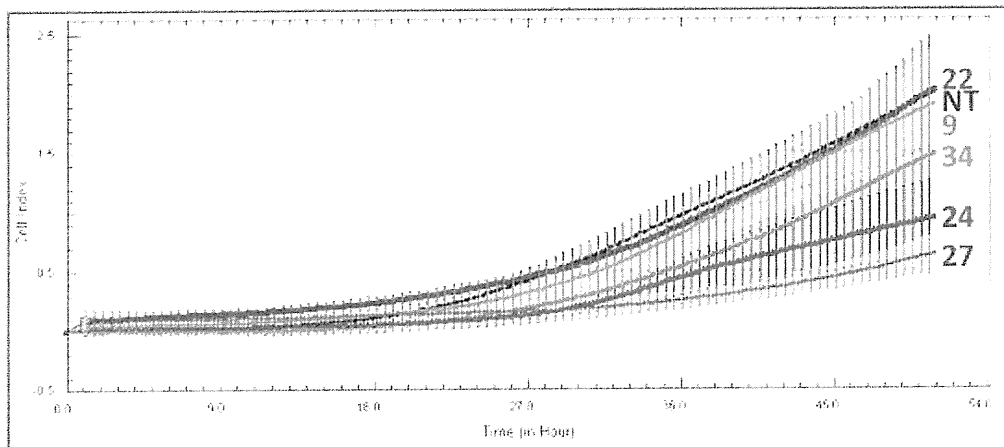


図 2 3. 漢方成分による B16F10 浸潤能の抑制効果

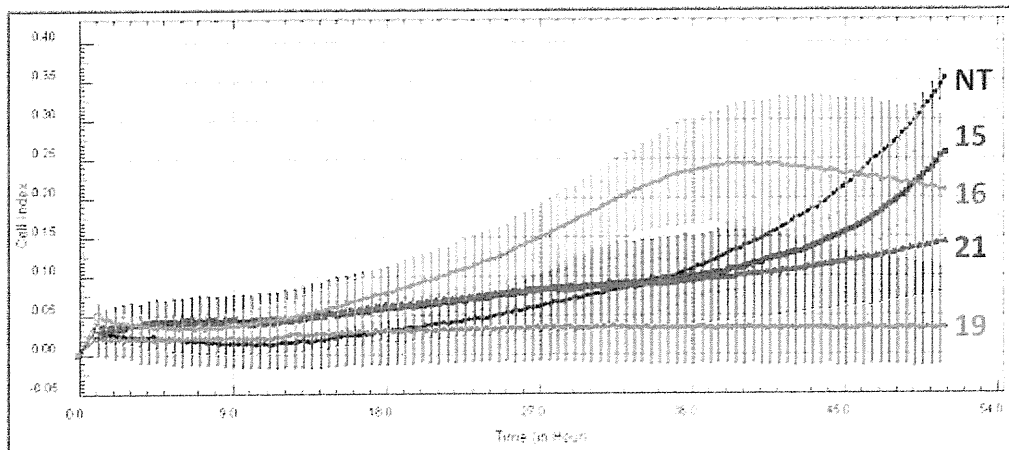


図 2 4. 漢方成分による B16F10 浸潤能の抑制効果

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

ヒト悪性黒色腫細胞株 526mel, 624mel, 888mel に AhR アンタゴニストである CH-223191 を添加し、これらのがん細胞から産生される免疫抑制性のサイトカイン・ケモカイン IL-8, IL-10, VEGF に対する影響を解析した。その結果 IL-8, IL-10, VEGF の産生いずれもが CH-223191 によって抑制された (図 2 5)。さらに今回同定した 9 種の漢方成分を 888mel に添加し、IL-10 および VEGF の産生を調べたところ、これら成分の一部は IL-10 や VEGF の産生を抑制した (図 2 6)。

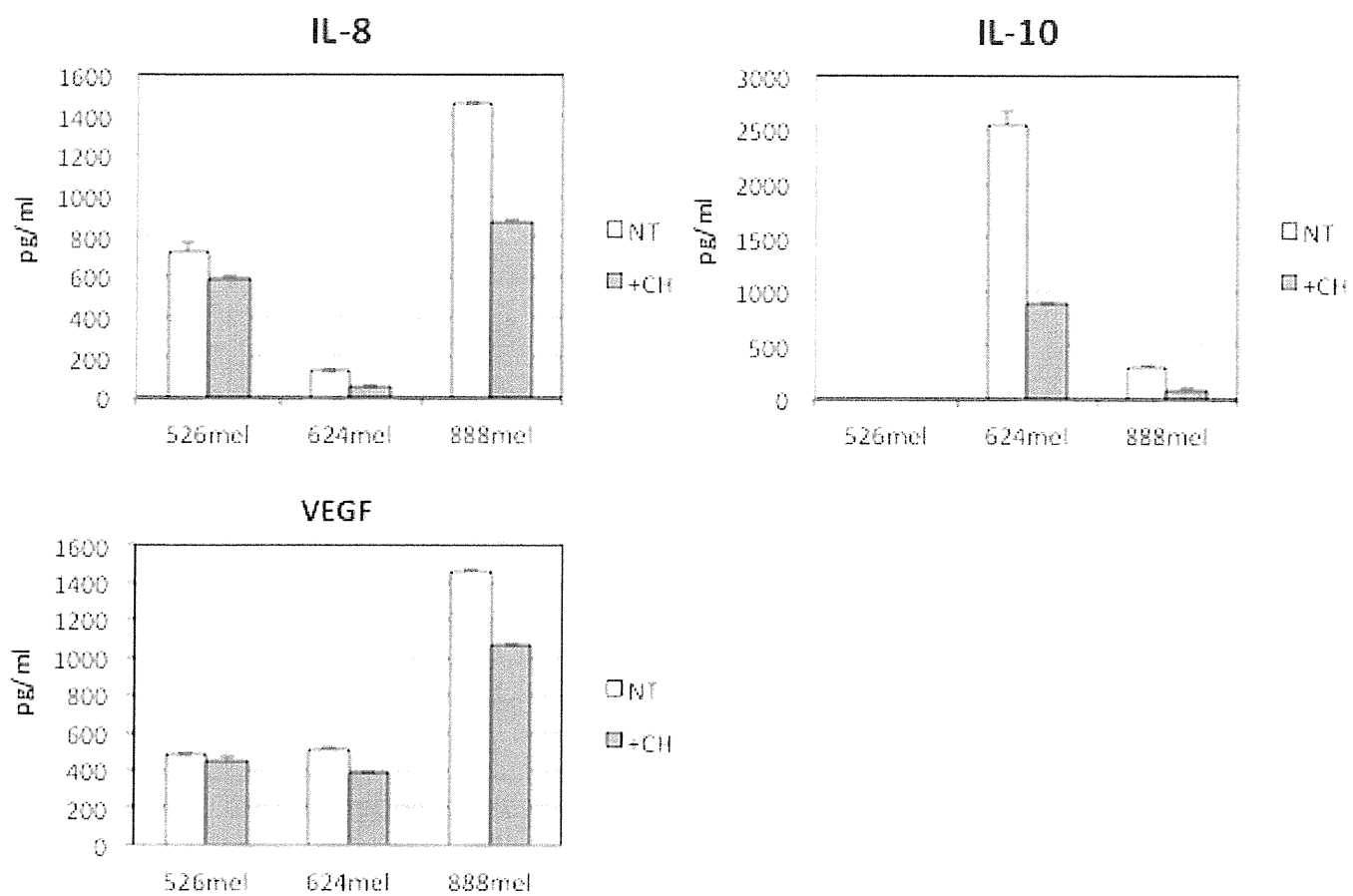


図 25. AhR によるヒトがん細胞サイトカイン産生制御

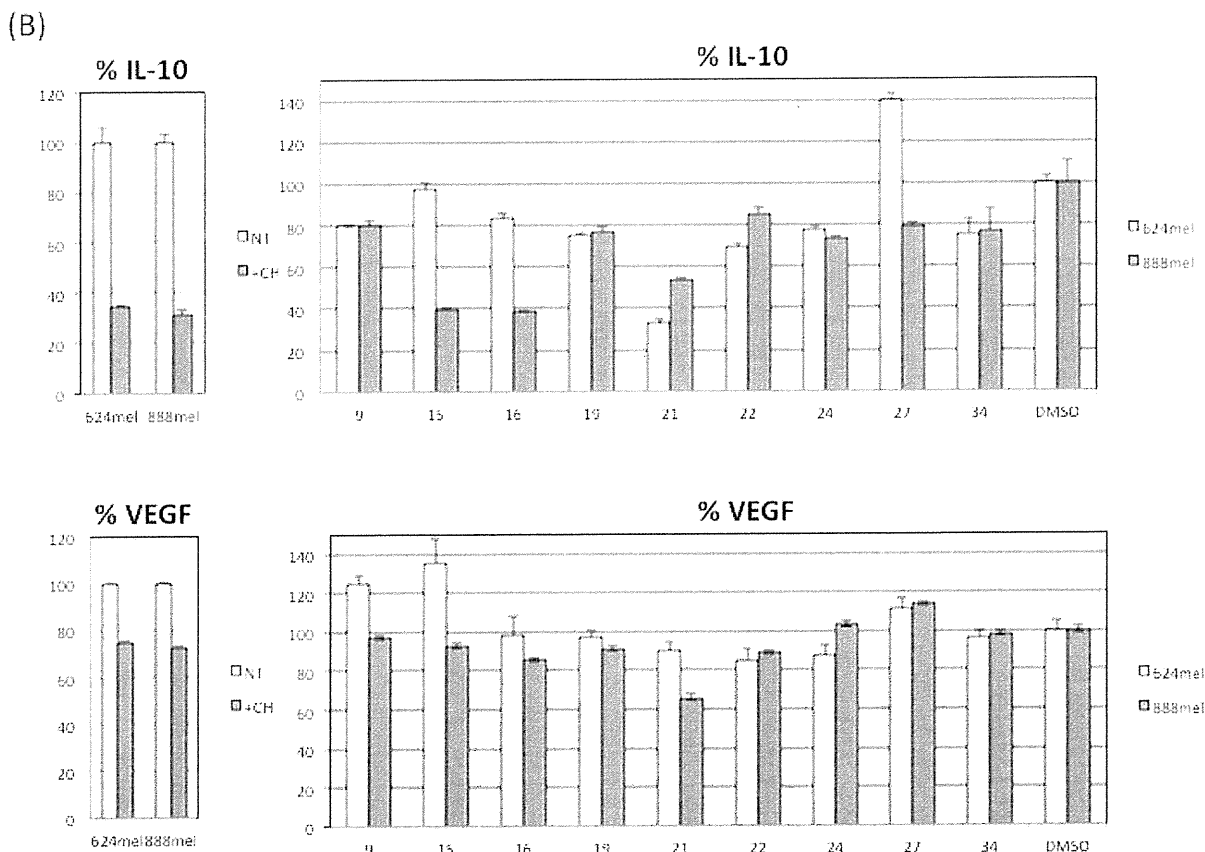
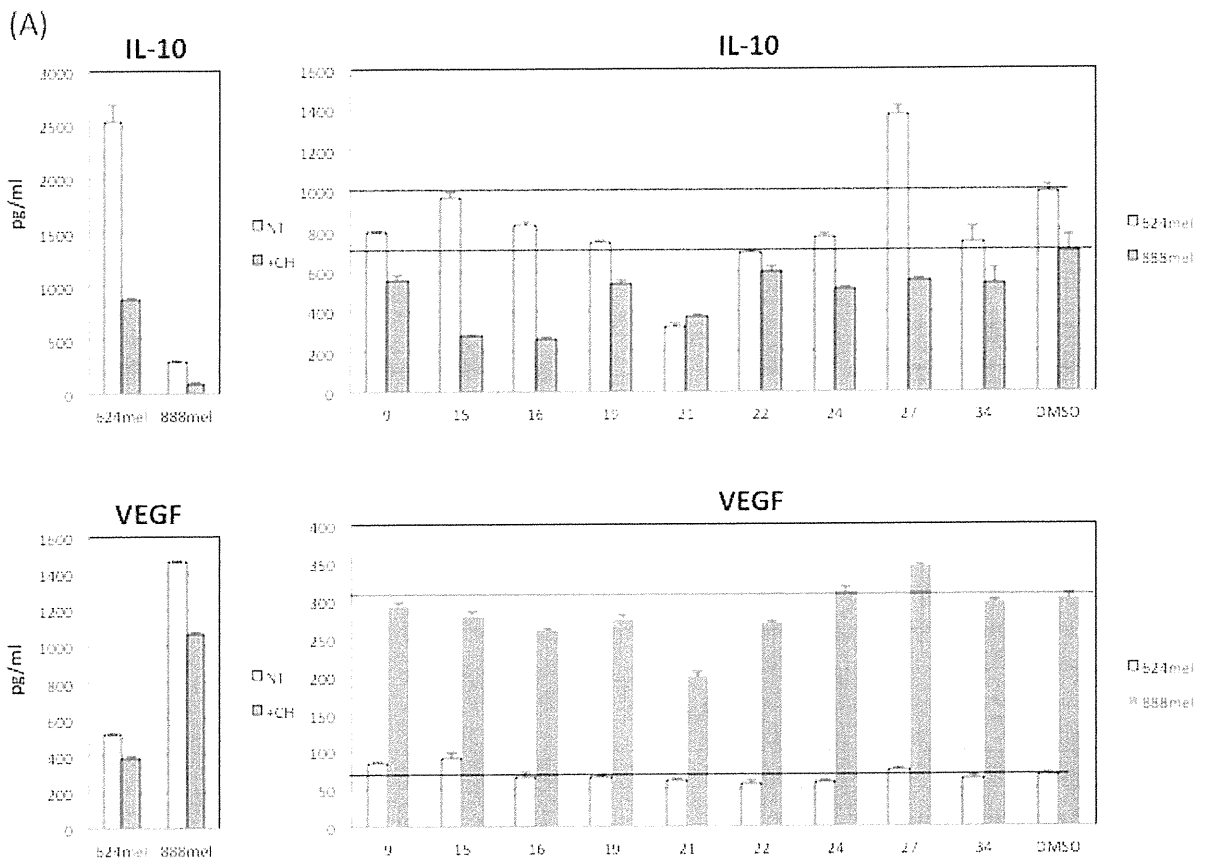


図 26. ヒト悪性黒色腫細胞 624mel、888mel からの免疫抑制分子 IL-10、VEGF 産生低下作用 (B)は DMSO control を 100%として(A)を換算した。

考察

免疫抑制的ながんの微小環境の構築に AhR が重要な役割を担っていることが徐々に明らかとなっており、その制御が抗腫瘍免疫増強へとつながることが期待される。我々は今回、レポーターアッセイによって 7 種の AhR アンタゴニスト活性を持つ漢方成分を同定した。それらは濃度依存的にルシフェラーゼ活性の抑制作用を示し、うち 4 種(No.16、24、27、34)は低濃度でも強い抑制作用を持つことが明らかとなった。我々はまた、マウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 の浸潤能が AhR によって制御されていることを示した。そして同定された 9 種の漢方成分のうち 4 種(No.15、24、27、34)は B16F10 の浸潤能を顕著に抑制することがわかり、AhR を介した機序での抑制であることが示唆される。

AhR は IL-10 の産生を制御していることはすでに報告されている。ヒト悪性黒色腫細胞株 526mel, 624mel, 888mel に AhR アンタゴニストである CH-223191 を添加した結果、IL-10 のみならず IL-8, VEGF の産生も抑制され (図 25)、これらの産生も AhR に制御されていることがわかった。これらサイトカイン産生制御に加えて、がん細胞浸潤能制御における AhR の重要性が本研究においても確認され、漢方成分を用いた AhR 活性化の制御によって抗腫瘍免疫が増強されることが大いに期待される。

6. 担がんマウスモデルにおける候補漢方成分の *in vivo* 作用の検討

昨年度および今年度の上述の様々なスクリーニングから、免疫がん微小環境の改善と抗腫瘍免疫応答の増強が期待できる以下の 7 種類の漢方成分について、大腸がん CT26 を用いた担がんマウスに対する *in vivo* の効果の解析を試みた。

漢方成分 No.9 はヒトがん細胞の免疫抑制性サイトカインの顕著な産生抑制作用は持たないが、AhR アンタゴニスト活性を示した。また iTreg 誘導を抑制するが Th1 誘導は阻害しない特徴をもつ。

漢方成分 No.16 は、888mel の IL-10、PK59 の TGF- β に対して産生抑制効果を示した。また強い AhR アンタゴニスト活性をもつとともに、iTreg 誘導を顕著に抑制したが、Th1 誘導も顕著に抑制した。

漢方成分 No.17 は OVCAR3、JHOC5、RMG1 からの IL-6 を顕著に抑制し、888mel、624mel からの IL-10 も抑制したが、888mel、624mel からの VEGF は増強させた。AhR に関しては顕著な効果をもたないが、iTreg 誘導を顕著に抑制するとともに、Th1 誘導も顕著に抑制した。

漢方成分 No.23 は JHOC5 からの IL-6 は抑制したが、OVCAR3、RMG1 からの IL-6 は顕著に増加させた。また 888mel、624mel からの IL-10 産生を抑制し、624mel からの VEGF と PK59 からの TGF- β に対しても若干の抑制効果を示した。AhR に対しては弱いアンタゴニスト活性をもち、iTreg 誘導を抑制するが Th1 誘導は阻害しない特徴を示した。

漢方成分 No.24 は JHOC5 からの IL-6 は抑制したが、RMG1 細胞からの IL-6 は顕著に増加させた。また 888mel、624mel からの IL-10 産生を抑制し、624mel からの VEGF と PK59 からの TGF- β のに対しても抑制効果を示した。このように、サイトカインに対する効果は No.23 と類似した挙動を示した。AhR に対して強いアンタゴニスト活性を示した。しかしながら、iTreg 誘導および Th1 誘導に対しては顕著な作用は認められなかった。

漢方成分 No.25 は OVCAR3、JHOC5 の産生する IL-6 を顕著に抑制する作用を示した。また、iTreg 誘導を抑制するが Th1 誘導は阻害しない特徴を示した。

漢方成分 No.35 は 888mel からの IL-10、VEGF 産生や CT26 細胞からの VEGF 産生を抑制する活性を示した。iTreg 誘導には影響しなかったが、Th1 誘導を増強した。また、AhR に対するアンタゴニスト活性をもつことが報告されている化合物である。

材料と方法

実験動物: 6 週齢の雌性 BALB/c マウス、C57/BL6 マウス (三協ラボサービス) を使用した。全ての動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験委員会の承認を受けた。

漢方成分: 本研究で使用した漢方成分は 10mg/mL として DMSO に溶解した。

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

細胞増殖解析法: マウス大腸がん細胞株 CT26 細胞 1×10^4 cells/well を 96 ウェルプレートに加え、異なる濃度の漢方成分を添加して培養した。健常 C57/BL6 マウスの脾臓細胞 2×10^4 cells/well を 96 ウェルプレートに加え、異なる濃度の漢方成分、および Concanavalin A (0.05 μ g/ml) を添加して培養した。プレートを 37°C、5%CO₂、24 時間培養した。細胞増殖は WST-1 assay (Roche) 用い、そのプロトコルに準じて測定した。

LDH-細胞傷害活性測定法: マウス大腸がん細胞株 CT26 細胞および漢方成分と一緒に、96 ウェルプレートに加え、 1×10^4 cells/well として培養した。C57/BL6 健常マウス脾細胞を異なる濃度の漢方成分と一緒に、96 ウェルプレートに加え、 2×10^4 cells/well として培養した。プレートは 37°C、5%CO₂、24 時間培養し、漢方成分による細胞傷害性を Cytotoxicity Detection Kit (Roche) を用いて測定した。操作はプロトコルに準じて行った。Positive control はキットに付属の試薬を用いた。

担がんマウスモデル: マウス大腸がん CT26 細胞 2×10^5 個(漢方成分 No.9、16、23)あるいは 4×10^5 個(漢方成分 No.17、24、25)を BALB/c マウスの腹側皮下に移植し、移植 7 日目から実験最終日の 27 日目まで 2 日に 1 度、漢方成分投与群は漢方成分 10mg/kg body weight を、対照群のマウスには対応する溶媒を腹腔内投与した。体重と腫瘍径を経時的に測定し、実験最終日における脾臓、局所リンパ節である腫瘍近傍のリンパ節、腫瘍の免疫細胞の割合を解析した。漢方成分 No. 35 については、CT26 細胞 5×10^5 個を、BALB/c マウスの腹側皮下に移植し、移植 6 日目から 9 日目まで一日一回 50 mg/kg body weight を経口投与した。対照群のマウスには対応する溶媒を経口投与した。移植 14 日目に脾臓、腫瘍、小腸の免疫細胞の割合を解析した。

フローサイトメトリー: 各個体の脾臓細胞、腫瘍近傍の局所リンパ節、腫瘍を細胞内および細胞表面マーカーで染色した。細胞は APC 標識抗 CD3 抗体、FITC 標識抗 CD4 抗体、PE 標識抗 CD8 抗体、APC 標識抗 CD25 抗体、PE 標識抗 Foxp3 抗体、FITC 標識抗 CD49b 抗体で染色した。細胞内染色は BD Cytotfix/Cytoperm を用いて染色を行った。なお、これら使用した標識抗体の細胞への非特異的な結合に対するコントロールとして、それぞれの蛍光標識に応じたアイソタイプコントロール染色し、測定した。BD FACSCalibur にて測定し、BD CellQuest Pro にて解析した。漢方成分 No.35 に関しては、脾臓、腫瘍、小腸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た。染色には、PE-Cy5 標識抗 CD4 抗体、PE-Cy7 標識抗 CD25 抗体、PE 標識抗 FoxP3 抗体、そして FITC 標識抗 CD8 抗体(BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)を使用した。Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter)で測定し、Kaluza (Beckman Coulter) にて解析した。

腫瘍抗原特異的な T 細胞応答の解析: 各個体の脾臓細胞(1×10^7)にマウス大腸がん細胞株 CT26 腫瘍抗原ペプチド AH-1 (1 μ g/ml、SPSYVYHQF)を加え、6 日間培養し、細胞を回収した。その後、24 ウェルプレートにペプチド(1 μ g/ml)と 1×10^6 cells/well として再度、共培養した。プレートは 37°C、5%CO₂、24 時間培養し、培養上清を回収し、BD OptEIA™ Set Mouse IFN- γ (BD Biosciences, San Diego, CA)を使用して IFN- γ の産生を測定した。漢方成分 No.35 に関しては、パーコール(GE Healthcare)の密度勾配遠心分離法を使用し、40%と 75%の界面の細胞として腫瘍内浸潤単核球を単離した。単離した単核球に 1 μ g/ml の AH-1 ペプチドを加えて培養した。培養開始から 5 日後に細胞を回収し、次の stimulator と共培養した: 1) CT26 細胞、2) AH-1 ペプチドをパルスした MethA 細胞、3) 無関連ペプチド H-2L^d β -gal をパルスした MethA 細胞、又は、4) コントロールとして medium のみ。翌日、培養上清を回収し、BD OptEIA™ Set Mouse IFN- γ (BD Biosciences, San Diego, CA)を用いて、IFN- γ の産生を測定した。

統計学的解析: 得られたデータは平均値±標準誤差、または平均±標準偏差で示した。統計学的有意差は、二群の比較には両側分散の student's t test を用いた。不等分散の場合は Mann Whitney の U 検定を用いた。いずれの解析においても p<0.05 の場合に有意差有りとした。

結果

6.1) 漢方成分 No. 9

マウス大腸がん細胞 CT26 と健常マウス脾臓細胞の培養上清中に放出された LDH 量を測定することで漢方成分 No. 9 の細胞毒性を確認した。漢方成分 No. 9 溶液 0.123-10 μM の濃度範囲で細胞毒性は見られず、細胞は生存していた (図 2 7 a,c)。

CT26 と健常マウス脾臓細胞の細胞増殖に対する漢方成分 No. 9 の作用を調べた (図 2 7 b,d)。どちらの細胞の細胞増殖に対しても漢方成分 No. 9 溶液 0.123-10 μM の濃度範囲では増殖抑制作用はなく、むしろ CT26 細胞に対しては高濃度領域で、細胞増殖をわずかに亢進させる働きがみられた。

全実験期間を通して漢方成分 No. 9 溶液投与群の体重増加は対照群と差はなく、マウスの成長に影響を及ぼさなかった (図 2 8 a)。

漢方成分 No. 9 投与群の担がんマウスは対照群と比較して投与開始早期から腫瘍径が小さい傾向が見られた (図 2 8 b)。

フローサイトメトリーを用い、免疫担当細胞の頻度を解析した。脾臓や、腫瘍近傍の鼠径リンパ節では差が認められないものの、腫瘍中で CD4^+ T 細胞の割合が増加していた (図 2 9)。また、NK 細胞と、NK T 細胞が局所リンパ節で頻度が増加していた (図 3 0)。本実験において、Treg 細胞頻度はどの臓器でも変化がなかった (図 3 1)。

CT26 の腫瘍抗原である AH1 ペプチドを用いて、腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導を行い、誘導後の抗原特異的な T 細胞が産生する $\text{IFN}\gamma$ を ELISA 法により測定した。漢方成分 No. 9 溶液投与群は対照群と比較し、有意に $\text{IFN}\gamma$ 産生が高かった (図 3 2)。

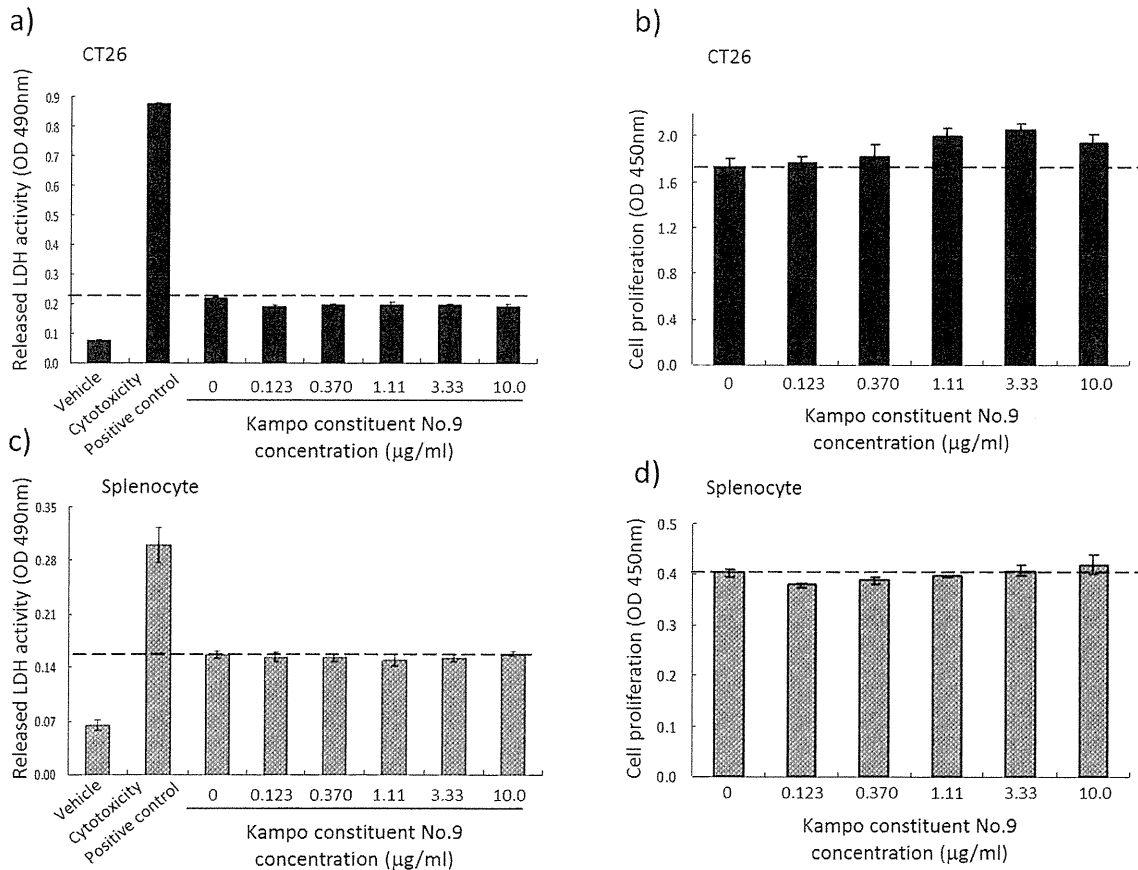


図 2 7. マウス大腸がん細胞株 CT26 と健常マウス脾細胞に対する漢方成分 No. 9 の影響

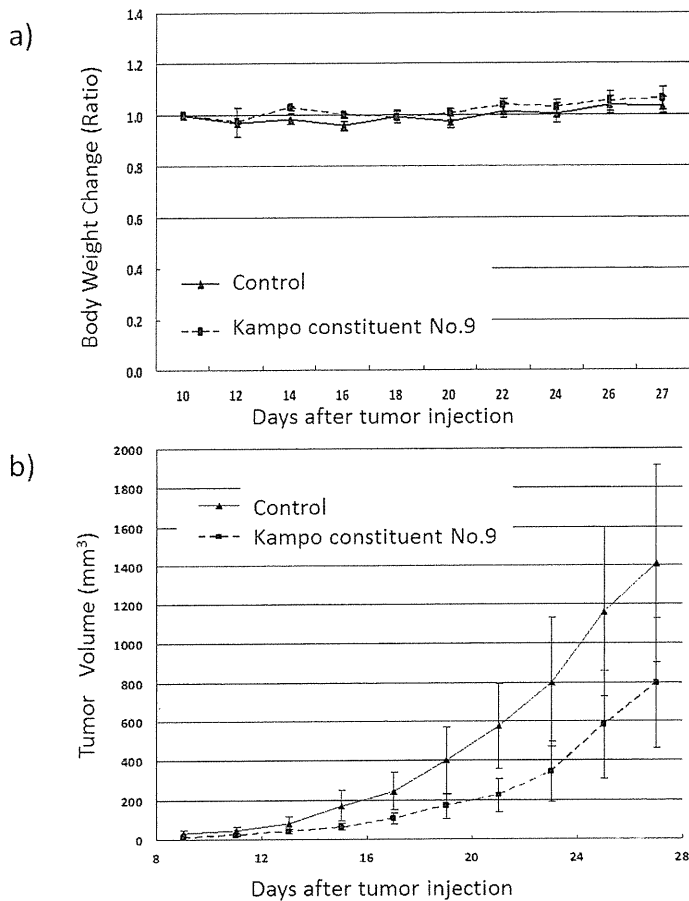


図 28. 化合物漢方成分 No.9 投与による担がんマウスへの *in vivo* 作用
a) 体重変化、b) 腫瘍径変化

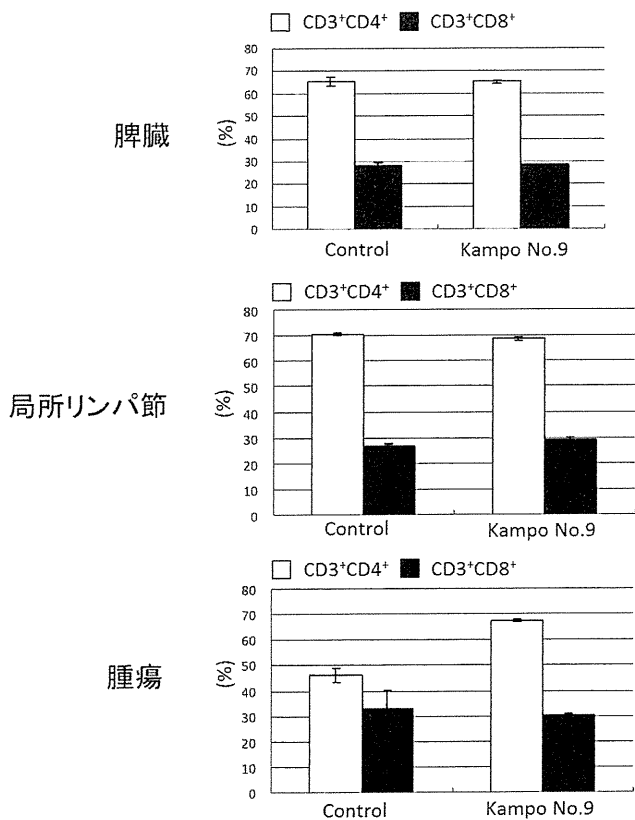


図 29. 漢方成分 No.9 投与による担がんマウスの T 細胞への効果

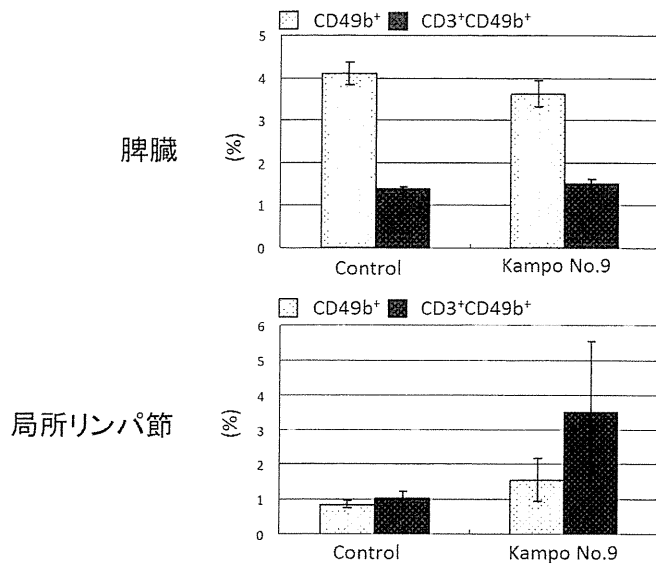


図 30. 漢方成分 No.9 投与による担がんマウスの NK/NKT 細胞への効果

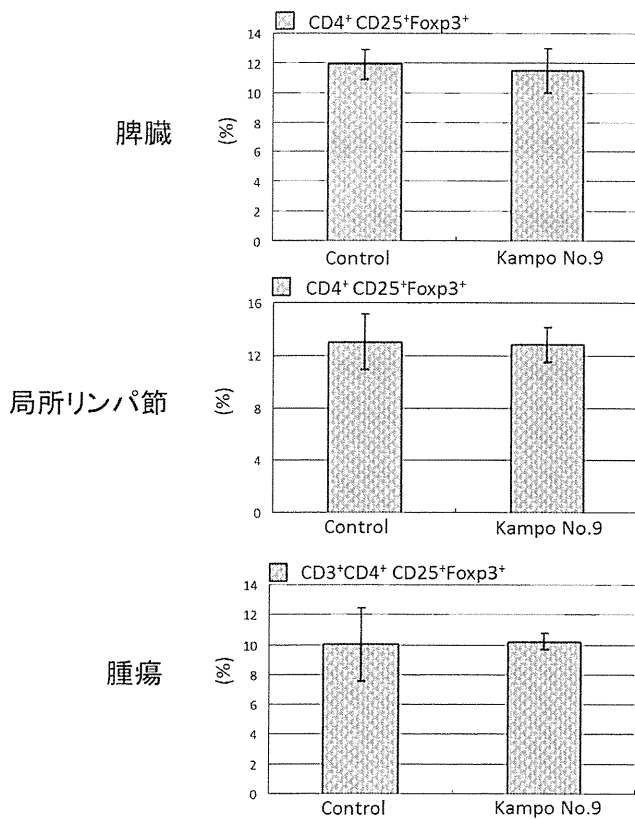


図 31. 漢方成分 No.9 投与による担がんマウスの Treg 細胞への効果

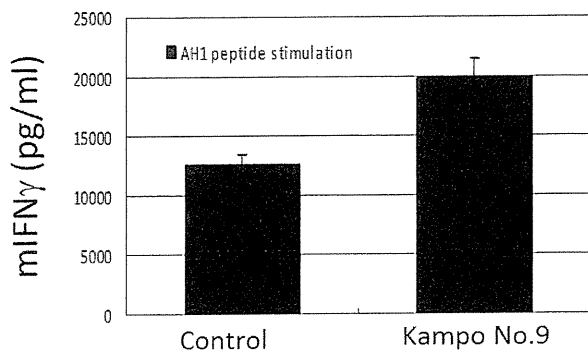


図3 2. 漢方成分 No. 9 投与による担がんマウスの腫瘍抗原特異的 T 細胞の誘導

6. 2) 漢方成分 No. 16

マウス大腸がん細胞 CT26 と健常マウス脾臓細胞の培養上清中に放出された LDH 量を測定することで漢方成分 No. 16 の細胞毒性を確認した。漢方成分 No. 16 溶液 0.123-10 μM の濃度範囲で細胞毒性は見られず、漢方成分 No. 16 処理後も細胞は生存していた (図 3 3)。

CT26 と健常マウス脾臓細胞の細胞増殖に対する漢方成分 No. 16 作用を調べた (図 3 3)。CT26 細胞の細胞増殖に対して、0.123-10 μM の濃度範囲の漢方成分 No. 16 溶液では増殖抑制を生じることはなかった。しかしながら、健常マウス脾臓細胞に対しては 10 μM の濃度において有意に細胞増殖抑制がみられた。

全実験期間を通して漢方成分 No. 16 溶液投与群の体重増加は対照群と差はなく、マウスの成長に影響を及ぼさなかった (図 3 4 a)。

漢方成分 No. 16 投与した担がんマウスは対照群と比較して投与開始早期から腫瘍の増大を抑制する傾向が見られた (図 3 4 b)。

フローサイトメトリーを用い、免疫担当細胞の発現頻度を解析した。脾臓や、腫瘍では差が認められないものの、腫瘍近傍の鼠径リンパ節中で CD8^+ T 細胞の割合が増加していた (図 3 5)。また、NK T 細胞が脾臓で頻度が増加していた (図 3 6)。Treg 細胞頻度は腫瘍において減少傾向が見られた (図 3 7)。

CT26 の腫瘍抗原である AH1 ペプチドを用いて、腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導を行い、誘導後の抗原特異的 T 細胞が産生する IFN γ を ELISA 法により測定した。漢方成分 No. 16 溶液投与群は対照群と比較し、IFN γ 産生量が増加する傾向が見られた (図 3 8)。

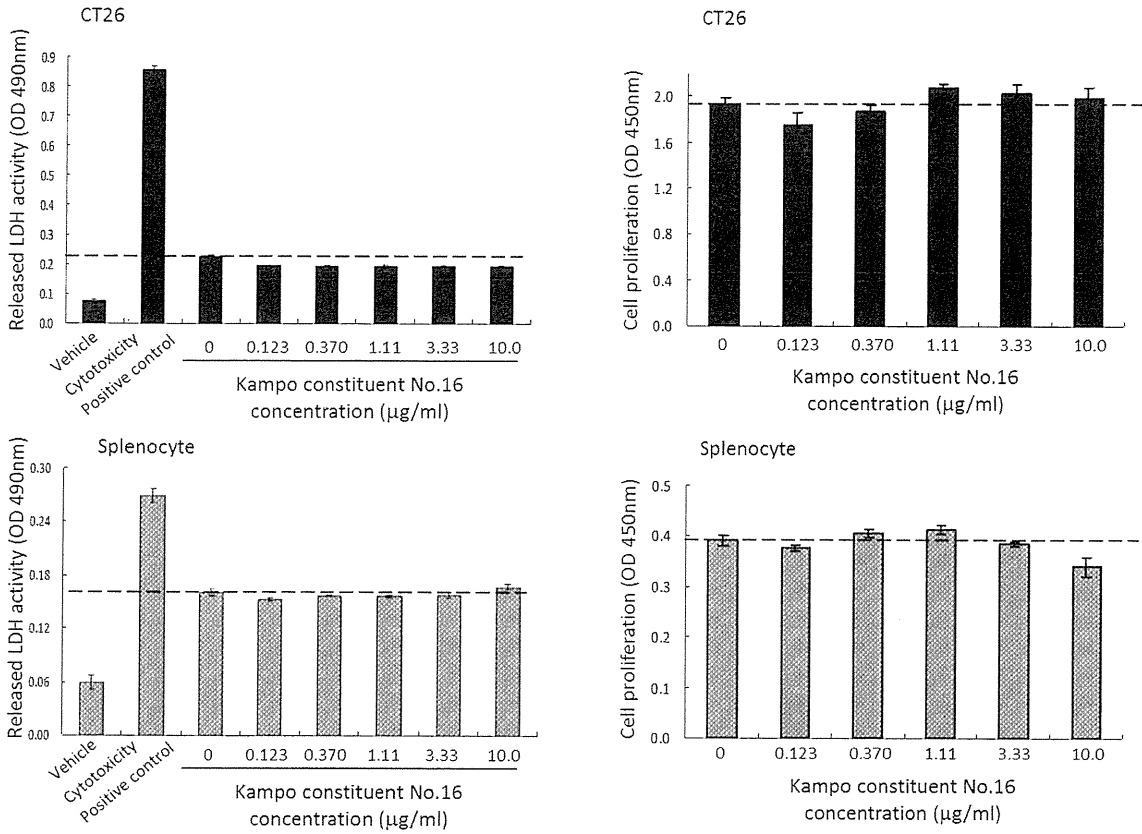


図 3.3. マウス大腸がん細胞株 CT26 と健常マウス脾細胞に対する漢方成分 No. 16 の影響

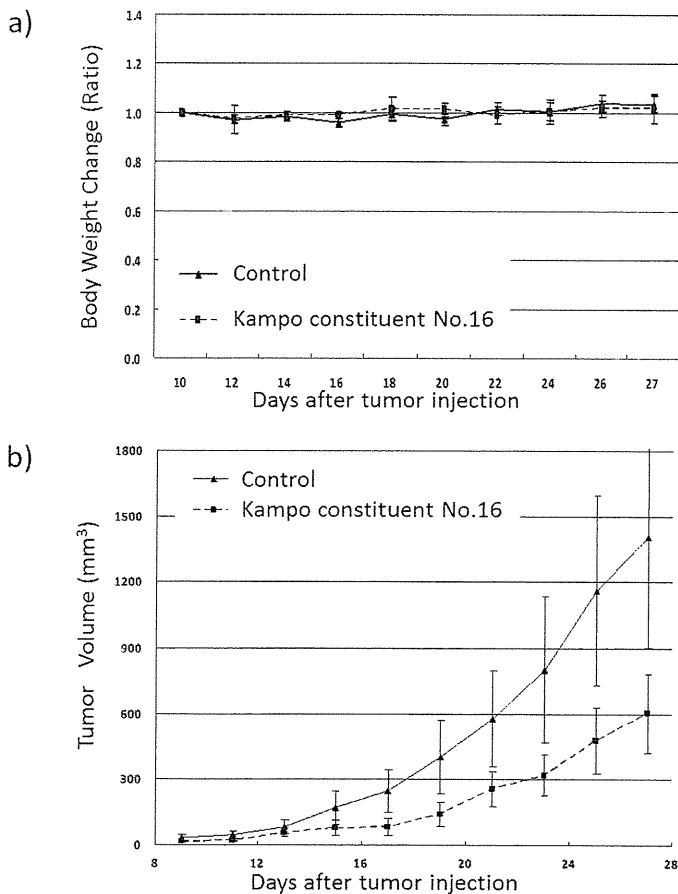


図 3.4. 漢方成分 No. 16 投与による担がんマウスへの *in vivo* 作用
a) 体重変化、b) 腫瘍径変化

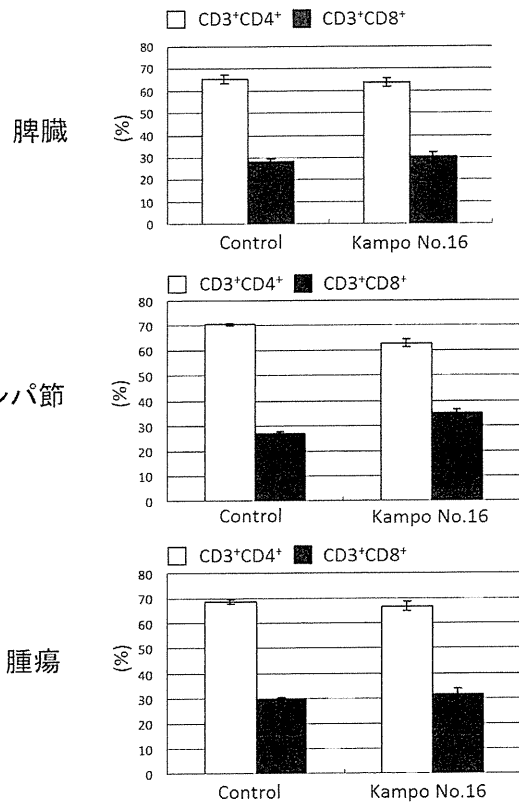


図 3 5. 漢方成分 No. 16 投与による担がんマウスの T 細胞への効果

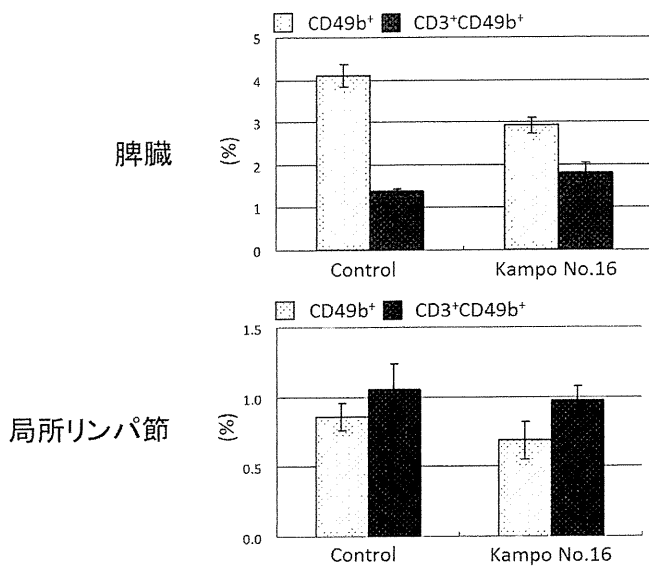


図 3 6. 漢方成分 No. 16 投与による担がんマウスの NK/NKT 細胞への効果