

201208003A

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

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 河上裕
平成25（2013）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24年度 総括研究報告書

研究代表者 河上裕
平成25（2013）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-----	1
--------------------------------	---

II. 分担研究報告

1. 担がんマウスモデルに用いるマウスがん細胞株のシグナル活性化状態の評価-----	6
2. 免疫抑制的がん微小環境における AhR の役割とその阻害剤による効果の検討-----	8
3. 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-----	12
3.1) 漢方成分 No.13-----	13
3.2) 漢方成分 No.14-----	14
3.3) 漢方成分 No.15 -----	17
3.4) 漢方成分 No.21-----	18
3.5) 漢方成分 No.22-----	20
3.6) 漢方成分 No.25-----	22
3.7) 漢方成分 No.35-----	24
4. 臨床応用を目指した候補漢方成分の担がんマウスモデルにおける <i>in vivo</i> 作用の検討-----	28
4.1) 漢方成分 No.16-----	28
4.2) 漢方成分 No.19-----	36
4.3) 漢方成分 No.23-----	38
4.4) 漢方成分 No.24-----	40

III. 研究成果-----	43
----------------	----

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	45
-------------------------	----

V. 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

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進めてきた。昨年度までに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得られた有効な成分について、今年度、11種類の漢方成分を担がんマウスへ投与し、*in vivo* 効果の詳細な検討を進めた結果、6種類の漢方成分において腫瘍増殖の抑制を認め、また5種類の漢方成分において抗腫瘍免疫応答の増強効果が得られた。がん微小環境の免疫抑制状態の改善作用、抗腫瘍免疫の増強作用に特に有効であると判断した4種類の成分に関して、臨床応用を視野に入れて研究を進めており、1つの成分については、がん患者を対象として、IL-6 抑制によるがん治療あるいは悪液質の改善（緩和医療）を目的とした臨床試験を企業と共同で進めている。他の有望な成分についても、臨床用製剤の検討とがんに対する臨床試験を検討している。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開発することを検討している。したがって、本研究により「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、がん治療や緩和治療として、がん医療に貢献できる創薬につながる具体的な成果を得ることができた。

研究分担者

塚本 信夫、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
工藤 千恵、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、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. 担がんマウスモデルに用いるマウスがん細胞株の STAT3, ERK, NF- κ B, AhR の各シグナルの活性化状態を評価する。
2. 免疫抑制的がん微小環境における AhR の役割を解明し、その阻害によって得られる効果を検討する。
3. 担がんマウスモデルを用いて、候補漢方成分の *in vivo* 作用を検討する。
4. 臨床応用を目指した候補漢方成分について、担がんマウスモデルを用いて *in vivo* 作用を検討する。

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

C57BL/6 由来および Balb/c 由来のマウスがん細胞株について、サイトカイン TGF- β 1、IL-6、IL-10 の産生、STAT3、ERK、NF- κ B、AhR の活性化状態を解析した結果、各サイトカインを産生するがん細胞株、STAT3、ERK、NF- κ B、AhR それぞれに活性化しているがん細胞株を同定し、担がんマウスモデルでの漢方成分の評価に適したがん細胞株を決定できた。

昨年度のヒト悪性黒色腫細胞株に加えて、今年度、ヒト腎がん細胞株、ヒト悪性黒色腫細胞株、ヒト卵巣がん細胞株に AhR 阻害剤 CH-223191 を $10\mu\text{M}$ で作用させ、各がん細胞株からのサイトカイン産生に対する影響を調べた結果、これらのがん種それぞれの複数のがん細胞株からの IL-6、VEGF、IL-8 産生を CH-223191 が抑制しうることが示された。

がん細胞内の AhR が活性化したがん細胞モデルとして、IDO 遺伝子を過剰発現したマウス肉腫細胞株を作製し、マウスに皮下移植した。がん細胞内の AhR が活性化している IDO 過剰発現株を移植されたマウスでは脾臓内の抗原特異的、あるいはがん細胞反応性の T 細胞応答が低下した。

担がんモデルマウスの生体内でがん細胞内 AhR の活性をモニターするため、Cyp1a1 プロモーター依存性に発光するマウスがん細胞を樹立し、*in vitro* で AhR 活性依存性に発光すること、AhR アンタゴニストとして同定した漢方成分の幾つかが TCDD による発光を抑制することを確認した。

昨年度のがん細胞と免疫細胞に作用する漢方成分の探索から、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、および誘導性制御性 T 細胞の誘導を抑制するが Th1 分化を抑制しない漢方成分として選定されたもののうち、11 種類の漢方成分について、担がんモデルマウスに投与して、腫瘍の増殖、免疫細胞分画、腫瘍抗原特異的 T 細胞応答に対する影響を解析した結果、6 種類の漢方成分において腫瘍増殖の抑制を認め、また 5 種類の漢方成分において抗腫瘍免疫応答の増強効果が得られた。

これらの漢方成分のうち、免疫抑制環境の改善と抗腫瘍免疫の増強に有効であると判断した 4 種類の成分に関して、臨床応用を視野に入れて研究を進めており、そのうち 1 つの成分については企業との共同研究として水溶性を高めた製剤の提供を受け、卵巣明細胞性腺がんからの IL-6 の顕著な抑制と樹状細胞の機能回復に有効であることが示された。また、別の 1 つの成分において、がん細胞での ERK の顕著な阻害、樹状細胞からの IL-10 産生抑制と TNF- α 産生促進が認められた。

D. 考察

各種マウスがん細胞株の性質の解析から、我々が昨年度までに選定した漢方成分の評価に適した担がんモデルマウスとして、C57BL/6 マウスへの MC38 の移植、あるいは Balb/c マウスへの CT26 の移植が有効であると考えられた。

ヒト腎がん、ヒト悪性黒色腫、ヒト卵巣がんについて、それぞれの複数のがん細胞株からの IL-6、VEGF、IL-8 産生を AhR 阻害剤が抑制しうること、がん細胞内の AhR が活性化している IDO 過剰発現株を移植された

マウスでは脾臓内の抗原特異的、あるいはがん細胞反応性のT細胞応答が低下したことから、担がん生体においてAhR活性を阻害することは抗腫瘍免疫応答の増強に有効であることを示す結果であり、AhRアンタゴニストとして我々が同定してきた漢方成分の投与によって担がん生体の免疫抑制環境の改善と抗腫瘍免疫の増強が期待される。

昨年度のがん細胞と免疫細胞に作用する漢方成分の探索から選択された11種類の漢方成分について、担がんモデルマウスへの投与により解析した結果、6種類の漢方成分において腫瘍増殖の抑制を認め、また5種類の漢方成分において抗腫瘍免疫応答の増強効果が得られた。今後、これらの化合物をもとにして調合した処方や、これらの化合物をリード化合物にしたより有効な化合物の開発につなげていきたいと考えている。

特に、免疫抑制環境の改善と抗腫瘍免疫の増強に有効であると判断した4種類の成分に関して、臨床応用を視野に入れた研究を進めており、そのうちの1つは、がん患者を対象として、IL-6抑制によるがん治療あるいは悪液質の改善（緩和医療）を目的とした臨床試験を企業と共同で進めている。他の有望な成分についても、臨床用製剤の検討とがんに対する臨床試験を検討している。

E. 結論

昨年度までの研究により、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転移を抑制する漢方成分を同定できた。これらのうち11種類の漢方成分を担がんマウスモデルへ投与し、*in vivo*効果の詳細な検討を進めた結果、6種類の漢方成分において腫瘍増殖の抑制を認め、また5種類の漢方成分において抗腫瘍免疫応答の増強効果が得られた。がん微小環境の免疫抑制状態の改善作用、抗腫瘍免疫の増強作用に特に有効であると判断した4種類の成分に関して、臨床応用を視野に入れて研究を進めており、1つの成分については、がん患者を対象として、IL-6抑制によるがん治療あるいは悪液質の改善（緩和医療）を目的とした臨床試験を企業と共同で進めている。他の有望な成分についても、臨床用製剤の検討とがんに対する臨床試験を検討している。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開発することを検討している。したがって、本研究により「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、がん治療や緩和治療として、がん医療に貢献できる創薬につながる具体的な成果を得ることができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

海外

1. Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Iwata-Kajihara T, Nakamura S, Miyzaki J, Kawamura N, Hoon Park J, Popivanova B, Tsujikawa T. Improvement of cancer immunotherapy by combining molecular targeted therapy. *Frontiers in Tumor Immunity*. in press,;
2. Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Iwata-Kajihara T, Nakamura S, Nishio H, Satomi R, Kobayashi A, Tanaka M, Hoon Park J, Kamijuku H, Tsujikawa T, and Kawamura N. Cancer-induced immunosuppressive cascades and their reversal by molecular-targeted therapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1284(1):80-86,2013
3. Yaguchi T, Goto Y, Kido K, Mochimaru H, Sakurai T, Tsukamoto N, Kudo-Saito C, Fujita T, Sumimoto H, Kawakami Y. Immune suppression and resistance mediated by constitutive activation of Wnt/ β -catenin signaling in human melanoma cells. *J Immunol*. 189(5):2110-2117,2012

国内

1. 河上裕.担がん生体における免疫病態.医学のあゆみ.244(9):745-750.2013.
2. 谷口智慧、河上裕.化学療法・分子標的薬による免疫応答増強.医学のあゆみ.244(9):817-823.2013.
3. 河上裕.II.基礎研究 分子標的薬の作用機序・薬理作用 がん関連標的分子・標的経路 「がん免疫

療法開発における制御ポイント」. 分子標的薬 --がんから他疾患までの治療をめざして.日本臨床.144-148.2012.

4. 河上裕、谷口智憲、中村公子、川瀬芳恵、野路しのぶ、大泉梓、南雲春菜、長谷川舞、徐明利、岡本正人、桜井敏晴、藤田知信.がん免疫病態と免疫動態の評価：特集「がん免疫学と免疫療法の新展開」.血液フロンティア.22(8):1183-1190.2012.

著書

1. Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Iwata-Kajihara T, Nakamura S, Nishio H, Satomi R, Kobayashi A, Tanaka M, Kamijuku H, Tsujikawa T, Kawamura N. Roles of signaling pathways in cancer cells and immune cells in generation of immunosuppressive tumor associated microenvironments. in “The Tumor Immunoenvironment” Eds, Michael Shurin, Anatoli Malyguine, Viktor Umansky, Springer Science. :307-323,2013

2. 学会発表

国際学会

1. Yukata Kawakami, Mechanisms for cancer induced immunosuppression in tumor associated microenvironment and their reversal by targeting altered signaling pathways in cancer cells and immune cells, CSH Asia/ICMS Joint Conference on Tumor Microenvironment, Suzhou, China, 2012/11/16、招待
2. Yutaka Kawakami, Reversal of Multiple Cancer Induced Immunosuppressive Cascades by Molecular Targeted Therapy for Effective Immunotherapy, The 7th International Cancer Vaccine Symposium, Convitto Dlla Calza, Florence, Italy, 2012/9/11、招待

国内学会

1. Kamijuku Hajime, Tanaka Mayuri, Tsukamoto Nobuo, Shimamura Kanae, Inoue Kei, Park Jeong Hoon, Fujita Tomonobu, Kawakami Yutaka., Augmentation of anti-tumor immune responses by Kampo medicine compound which inhibits signaling associated with cancer induced immunosuppression., 第41回日本免疫学会, 神戸国際会議場, 2012/12/7
2. Yutaka Kawakami, Cancer induced immunosuppressive cascades in tumor associated microenvironment and their reversal by targeting altered signaling pathways in cancer cells and immune cells, IEIIS2012 Homeostatic Inflammation Symposium, National Center of Sciences Building, Tokyo, Japan, 2012/10/26、招待
3. 塚本信夫、小室美紗、朴正薫、井上敬、嶋村香苗、河上裕, がん微小環境における芳香族炭化水素受容体のがん悪性化への役割, 第71回日本癌学会, ロイトン札幌, 2012/9/21
4. 河上裕, がん関連微小環境の免疫病態の解明と診断・治療への応用, 第71回日本癌学会, ロイトン札幌, 2012/9/21
5. 河上裕, がん細胞遺伝子シグナル異常に起因する免疫抑制カスケードとシグナル阻害剤による制御, 第71回日本癌学会, ロイトン札幌, 2012/9/20
6. 河上裕, がん患者における免疫病態とその制御-効果的ながん免疫療法開発を目指して-, 千里ライフサイエンスセミナーD3「がん免疫療法の新展開」, 千里ライフサイエンスセンタービル5階ライフホール, 2012/9/7、招待
7. 田中麻優里、塚本信夫、嶋村香苗、小室美紗、岡田典久、神宿元、藤田知信、河上裕, 漢方成分化合物によるがん免疫抑制病態の改善作用と抗腫瘍免疫応答の増強, 第16回日本がん免疫学会, 北海道大学学術交流会館, 2012/7/27

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

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. 担がんマウスモデルに用いるマウスがん細胞株のシグナル活性化状態の評価

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。これらの成分を担がんマウスモデルに投与して、担がん生体での免疫抑制環境を改善し、抗腫瘍免疫応答を増強できるかを評価するため、マウスに移植するマウスがん細胞株について、これらのシグナルの活性化状態と産生するサイトカインを解析した。

材料と方法

細胞培養

マウスがん細胞株 B16、B16F10、CT26、MC38、MCA205 は 10% FBS を含む RPMI1640 (Invitrogen) を用いて、マウスがん細胞株 4T1 は 10% FBS を含む DMEM (Invitrogen) を用いて培養した。

マウスがん細胞株のサイトカイン測定

マウスがん細胞株を 6well 培養プレートに 5×10^5 細胞個/well として播種し、37°C で over night 培養した。翌日、各ウェルを PBS で洗浄し、最終濃度 10 μ M の漢方成分を含んだ培地を加え、37°C で 24 時間培養し上清を回収した。

回収した培養上清中の IL-10、IL-6、TGF- β は OptiEIA ELISA sets (BD Biosciences) を用いて、VEGF は DuoSet ELISA Development System (R&D Systems) を用いて測定した。

タンパク質のリン酸化測定

マウスがん細胞株を 6well 培養プレートに 5×10^5 細胞個/well として播種し、37°C で over night 培養した。翌日、各ウェルを PBS で洗浄し、新鮮な培地を加え 37°C でインキュベートした。

ウェスタンブロッティング法で解析する場合は、インキュベート終了後の細胞は、冷 PBS で洗浄後セルスクレーパーを用い細胞を回収し、phosphatase inhibitor (PhosSTOP: Roche) と protease inhibitor (Complete: Roche) を加えた RIPA buffer を用いてタンパク質を回収した。回収したタンパク質は 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測定した。20 μ g のタンパク質抽出液を 7.5% のアクリルアミドゲルを用いて、SDS-PAGE を行った後、ウェスタンブロッティング法でタンパク質のリン酸化を測定した。

フローサイトメトリー法で解析する場合は、インキュベート後の細胞をトリプシンを用いて回収し、冷 PBS にて洗浄し、BD PhosFlow Lyse/Fix (BD Biosciences) を用い細胞内リン酸化タンパク質の測定を行った。

リン酸化を測定する抗体は、rabbit polyclonal antibody for phosph-specific STAT3 (Ser 727) (Tyr705) (Cell signaling)、mouse polyclonal antibody for STAT3 (BD Biosciences)、rabbit polyclonal antibody for phosph-specific p44/42 MAPK (Erk1/2) (Cell signaling)、rabbit polyclonal antibody for ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)、anti- β -actin antibody (Sigma Aldrich) を使用した。

NF- κ B 測定

マウスがん細胞株を 6well 培養プレートに 5×10^5 細胞個/well として播種し、37°C で over night 培養した。翌日、各ウェルを PBS で洗浄し、新鮮な培地を加え 37°C でインキュベートした。24 時間後、細胞をセルスクレーパーにより回収し、核内タンパク質を抽出した。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。抽出したタンパク質 5 μ g を用い、NF- κ B filter plate assay (Signosis) のプロトコールに従って NF- κ B (p65) の活性を測定した。

結果

C57BL/6 由来のマウスがん細胞株 B16、B16F10、MC38、MCA205、Balb/c 由来のマウスがん細胞株 CT26、4T1 について、サイトカイン TGF- β 1、IL-6、IL-10 の産生量を ELISA 法により測定した (図 1)。調べた細

胞株では、いずれにおいても TGF- β 1 の産生が認められたが (図 1 A)、IL-6 は MC38 のみが (図 1 B)、IL-10 は B16、B16F10、CT26 が (図 1 C) 産生していた。

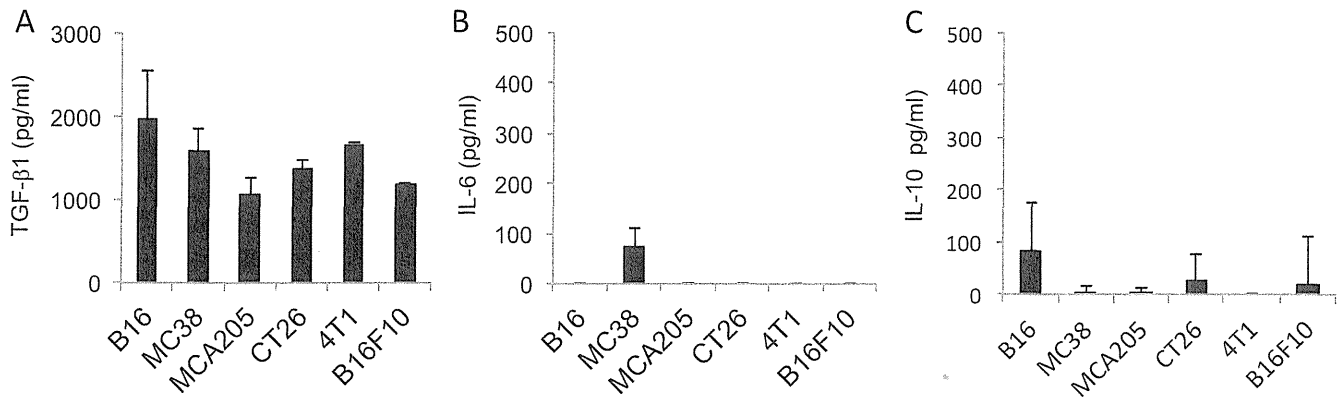


図 1 マウスがん細胞株からのサイトカイン産生

次に、これらのがん細胞株における STAT3 と ERK1/2 の活性化状態をウェスタンブロット法により調べた (図 2)。STAT3 Ser727 のリン酸化はいずれの細胞株でも認められたが、Tyr705 のリン酸化は MC38 と MCA205 で強く、B16 と CT26 で弱く認められた。ERK に関しては、CT26、4T1、B16 で強くリン酸化され、MC38 で弱くリン酸化されていた。

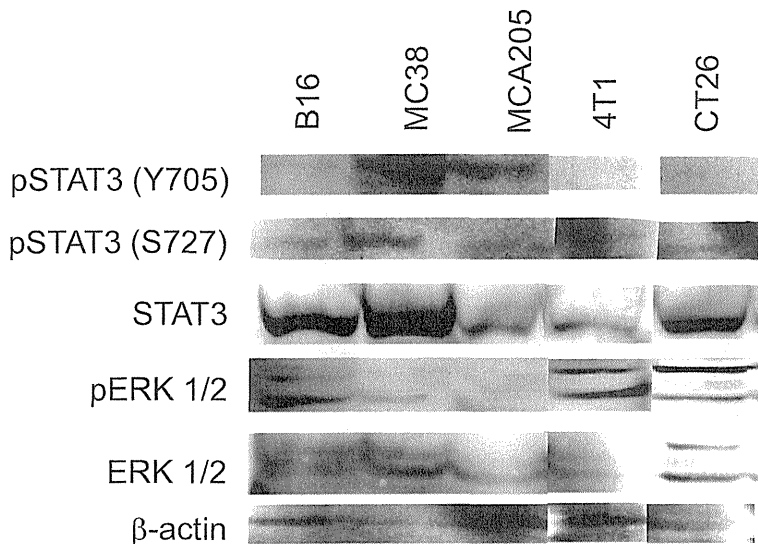


図 2 マウスがん細胞株における STAT3 と ERK の活性化状態

さらに、これらの細胞株の NF- κ B 活性を NF- κ B filter plate assay kit を用いて測定した。これは、NF- κ B の結合する DNA プローブをコートしたプレートに、細胞の核抽出液を入れ、結合した NF- κ B の p65 サブユニット量を抗体で検出するものである。B16、B16F10、MC38、4T1 が高い NF- κ B 活性を示し、MCA205 と CT26 で弱い活性が認められた (図 3)。

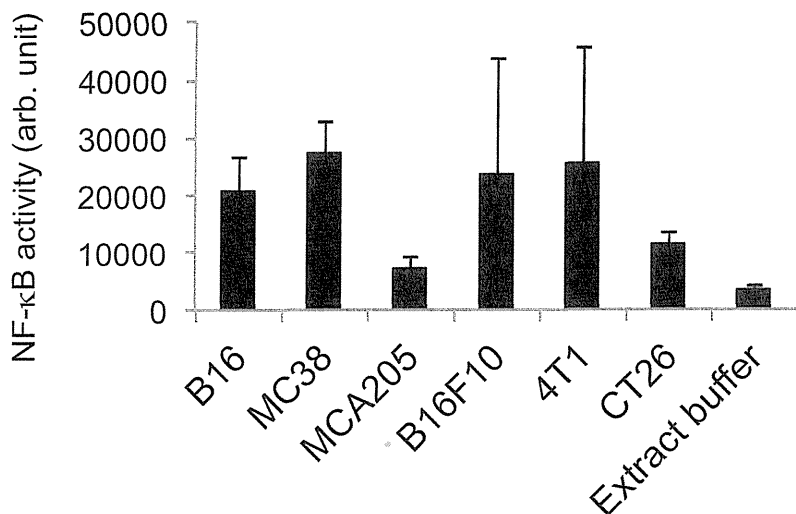


図3 マウスがん細胞株における NF-κB の活性化状態

これらの細胞株について、AhR の mRNA 発現量、および AhR 活性化状態の指標としての Cyp1a1 の mRNA 発現量を定量 PCR によって解析した (図4)。

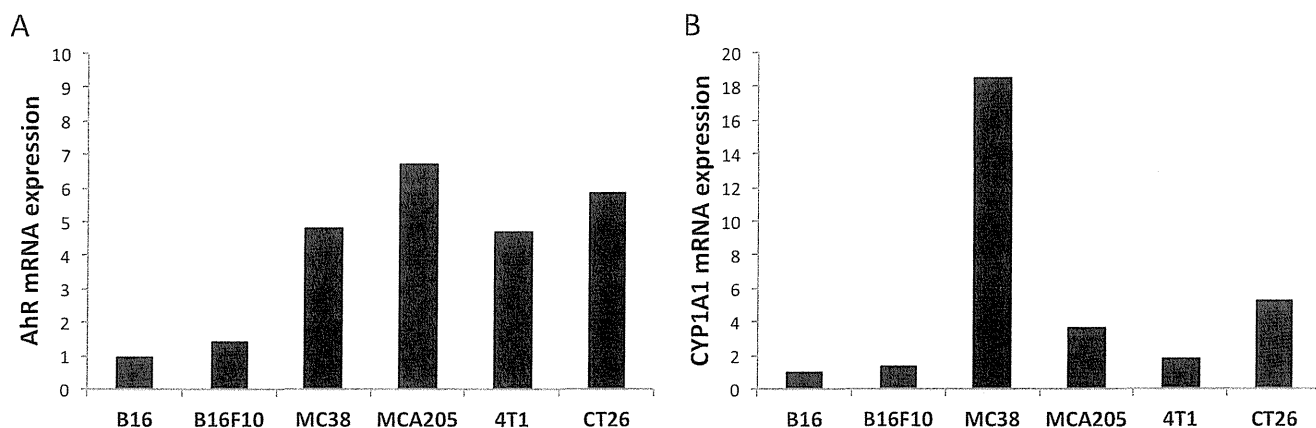


図4 マウスがん細胞株における AhR の発現と活性化状態

考察

C57BL/6 由来のマウスがん細胞株 B16、B16F10、MC38、MCA205、Balb/c 由来のマウスがん細胞株 CT26、4T1 について、サイトカイン TGF-β1、IL-6、IL-10 の産生、STAT3、ERK1/2、NF-κB、AhR の活性化状態を解析した結果、TGF-β1 阻害効果にはすべての細胞株が、IL-6 阻害効果には MC38 が、IL-10 阻害効果には B16、B16F10、CT26 が、STAT3 阻害効果には MC38、MCA205、CT26 が、ERK 阻害効果には CT26、4T1、B16、MC38 が、AhR 阻害効果には MC38、CT26 が、それぞれ評価系として用いることが明らかになった。そこで、本年度の担がんマウスでの漢方成分の評価には C57BL/6 マウスへの MC38 の移植、あるいは Balb/c マウスへの CT26 の移植を用いることとした。

2. 免疫抑制的がん微小環境における AhR の役割とその阻害剤による効果の検討

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。

本研究では、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 AhR に着目し、ヒト AhR 作動性の漢方成分同定を試みてきた。昨年度までに漢方成分 No. 9、漢方成分 No. 15、漢方成分 No. 16、漢方成分 No. 19、漢方成分 No. 21、漢方成分 No. 22、漢方成分 No. 24、漢方成分 No. 27、漢方成分 No. 34 の 9 種が AhR アンタゴニスト活性を持つ漢方成分として同定された。

AhR が IL-10 の産生を制御することはすでに報告されているが、昨年度、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 の産生も抑制されることを示すことができ、これらの産生も AhR に制御されていることがわかった。そこでどのようながん種において、これらの免疫抑制性のサイトカイン、ケモカインの産生を AhR アンタゴニストにより抑制できるのかを明らかにするため、ヒトの腎細胞がん、悪性黒色腫、卵巣がん細胞株に CH-223191 を作用させ、これらの産生が抑制できるか検討した。

また、昨年度、AhR が活性化したがん細胞株として、AhR の内在性リガンドとして働く Kynurenine を産生する酵素 IDO を過剰発現したマウスがん細胞株を作製した。この細胞株では mock control に比べ顕著に CYP1A1 の発現が誘導され、AhR が活性化しており、この IDO 高発現マウスがん細胞を皮下移植したマウスの腫瘍内の免疫細胞を解析したところ、CD8⁺ T 細胞の割合が減少し、Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の割合が増加することを示した。この結果より、Kynurenine による AhR の活性化によって免疫抑制的な腫瘍環境が誘導されることが示唆された。今年度、さらに、がん細胞内の AhR が活性化することによって、生体内の腫瘍抗原特異的な T 細胞応答が受ける影響を解析し、AhR アンタゴニスト作用をもつ漢方薬成分にどのような抗腫瘍免疫環境の改善効果が期待できるかを示すモデルとした。

材料と方法

細胞株と薬剤

ヒト腎がん細胞株、ヒト悪性黒色腫細胞株、ヒト卵巣がん細胞株の培養には 10% FBS を添加した RPMI1640、DMEM、HAM's F-12、DMEM/HAM's F-12 のいずれかの培地を用いた。MCA205、B16F10 の培養には 10% FBS を添加した RPMI1640、DMEM をそれぞれ用いた。AhR アンタゴニスト(CH-223191)、Tryptophan、TCDD は、それぞれ Sigma、Sigma、和光純薬で購入した。

AhR inhibitor を用いたヒトがん細胞株のサイトカイン測定

ヒト腎がん細胞株、ヒト悪性黒色腫細胞株、もしくはヒト卵巣がん細胞株を 6 cm 培養ディッシュに 5×10^5 細胞個/dish として播種し、最終濃度 $100 \mu\text{M}$ の Tryptophan と $10 \mu\text{M}$ の CH223191 を含んだ培地を加え、over night 培養した。翌日、各ディッシュを PBS で洗浄し、最終濃度 $100 \mu\text{M}$ の Tryptophan と $10 \mu\text{M}$ の CH223191 を含んだ培地を加え、24 時間培養し上清を回収した。回収した培養上清中の IL-6、IL-8、VEGF は OptiEIA ELISA sets (BD Biosciences)を用いて測定した。

AhR 関連担がんマウスモデル実験と腫瘍抗原特異的 T 細胞応答の解析

IDO 遺伝子導入したマウス肉腫細胞株 MCA205 を作製し、6 週齢のメスのマウスに 5×10^5 細胞個の IDO 高発現 MCA205 もしくは mock control を皮下移植した。腫瘍移植から 15 日後に、脾臓の瘍抗原特異的な T 細胞応答の解析を行った。各個体の脾臓細胞(1×10^7 cell/ml)に MCA205 腫瘍抗原ペプチド gp70 ($1 \mu\text{g/ml}$ 、KSPWF^{TTL})を加え、5 日間培養し、細胞を回収した。その後、生細胞をフィコール密度勾配遠心分離法 (リンフォセパール：免疫生物研究所)で回収し、96 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well で播種し、ペプチド($1 \mu\text{g/ml}$)あるいは放射線照射した 1×10^5 個の MCA205 細胞と共培養した。24 時間培養後に培養上清を回収し、BD OptEIA Set Mouse IFN- γ (BD Biosciences)を用いて IFN- γ の産生量を測定した。

結果

昨年度の 526mel, 624mel, 888mel に加えて、今年度、ヒト腎がん細胞株、ヒト悪性黒色腫細胞株、ヒト卵巣がん細胞株に AhR 阻害剤 CH-223191 を 10 μ M で作用させ、各がん細胞株からのサイトカイン産生に対する影響を調べた (図 5)。多くのがん細胞株からの IL-6, VEGF, IL-8 産生を CH-223191 が抑制しうることが示された。

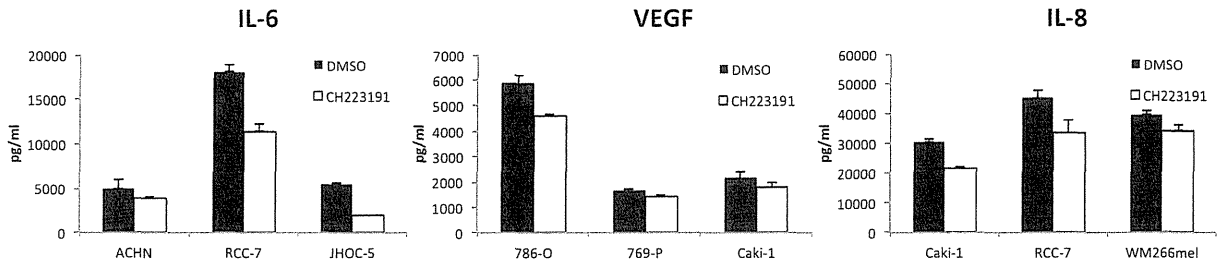


図 5 各種がん細胞株からのサイトカイン産生に対する AhR 阻害剤 CH-223191 の影響

次に、IDO 遺伝子導入したマウス肉腫細胞株 MCA205 を作製し、マウスに IDO 高発現 MCA205 もしくは mock control を皮下移植した。腫瘍増殖には有意な差は認められなかった (図 6 A)。腫瘍移植から 15 日後に、脾臓の瘍抗原特異的な T 細胞応答の解析を行った。各個体の脾臓細胞に腫瘍抗原 gp70 のペプチド存在下 5 日間培養後、ペプチドと共培養、あるいは MCA205 と共培養し、IFN- γ の産生量を測定した。がん細胞内の AhR が活性化している IDO 過剰発現株を移植されたマウスでは脾臓内の抗原特異的、あるいはがん細胞反応性の T 細胞応答が低下した (図 6 B,C)。

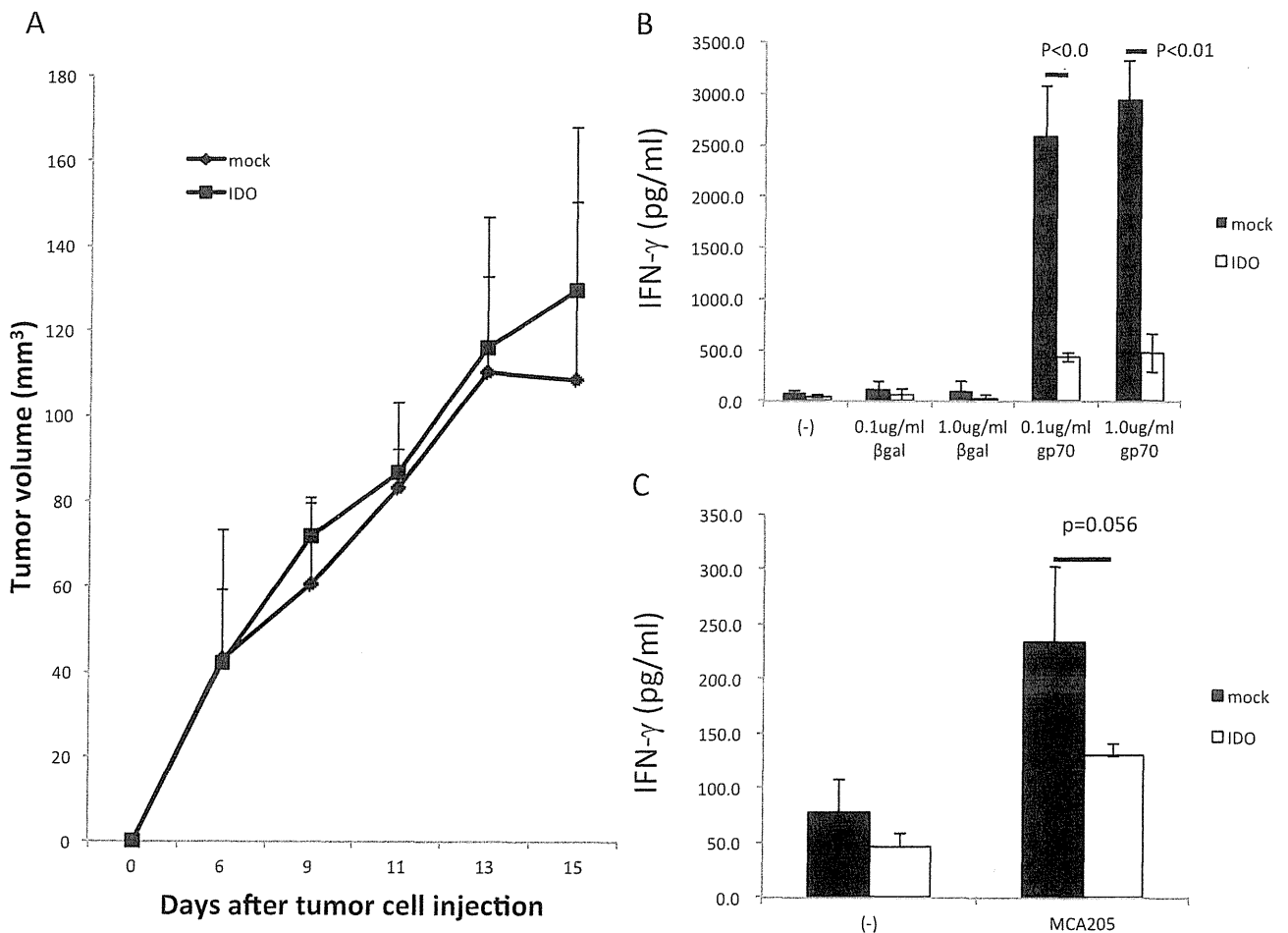


図 6 IDO 過剰発現がん細胞移植マウスの腫瘍体積変化と抗原特異的及びがん細胞特異的 T 細胞応答の低下

担がんマウスの *in vivo* で AhR 活性をモニターすることを目的として、Cyp1a1 のプロモーター活性依存的に Green Fluorescent Protein (GFP) が発光するマウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 を作成した。この細胞株に AhR アゴニストとして 10nM TCDD を加えて 24hr 後に GFP の発光が確認でき (図 7 B)、10 μ M CH-223191 を添加して 1hr 後に 10nM TCDD を加えた場合は 24hr 後の GFP の発光はみられなかった (図 7 D)。このことから、作成した細胞株は AhR の活性を反映して GFP 発光することがわかった。本研究で同定された AhR アンタゴニストの幾つかを 10 μ M で添加して 1hr 後に 10nM TCDD を加えて 24hr 後の GFP 発光を測定すると、TCDD 単独に比べて有意に GFP 発光が抑制されていた (図 7 E-J)。

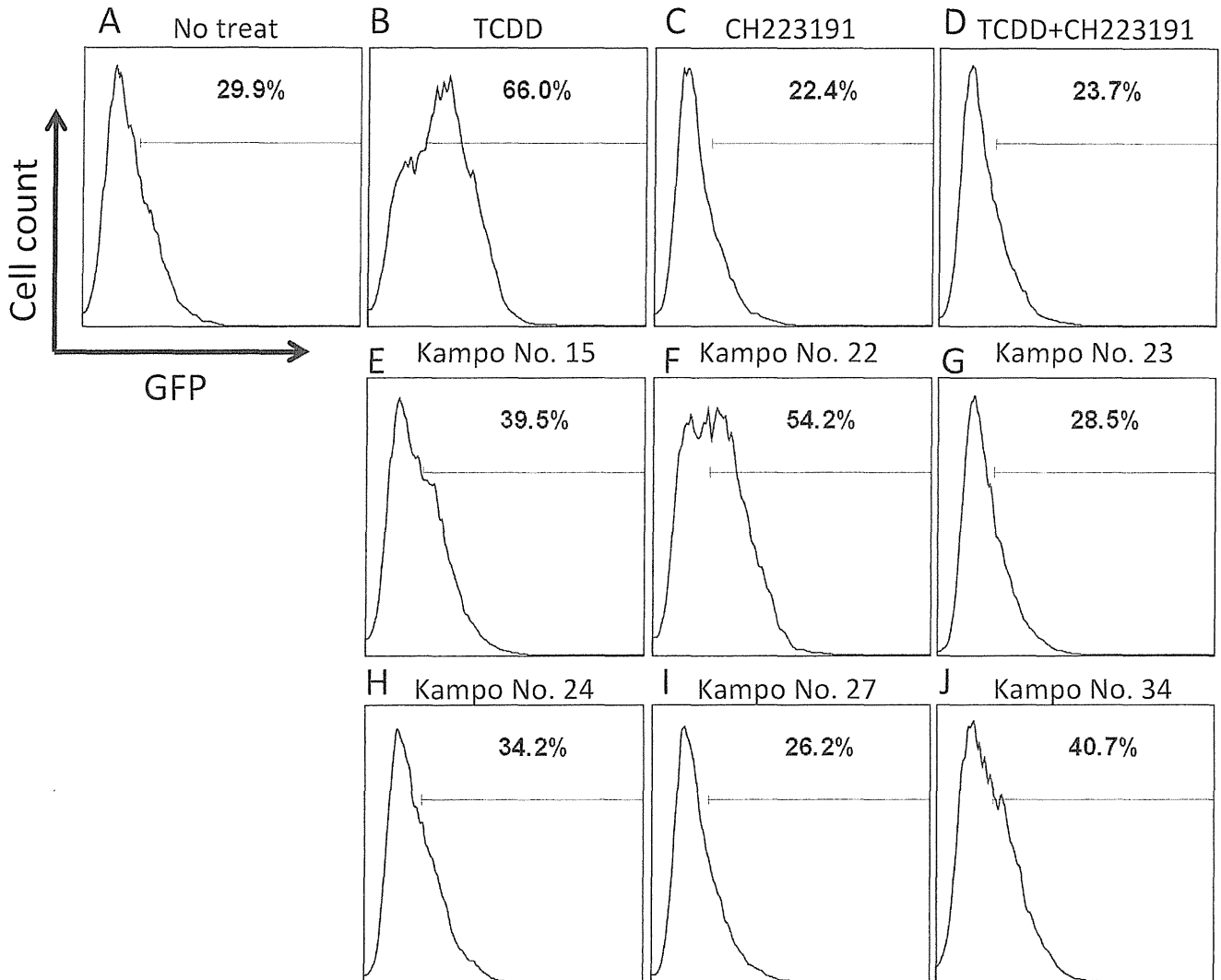


図7 Cyp1a1 プロモーター依存性に GFP 発光する B16F10 がん細胞株による AhR アンタゴニストの評価考察

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。昨年度示した悪性黒色腫 3 株以外にも図 5 のように幾つかの悪性黒色腫、腎細胞がん、卵巣がんの細胞株においても AhR アンタゴニストである CH-223191 の作用によって、IL-10, IL-8, VEGF の産生が抑制されることがわかった。

がん細胞において IDO がトリプトファンを代謝することによって産生されるキヌレニンが AhR のアゴニストであることが明らかとなった。IDO を過剰発現したがん細胞株では、Cyp1a1 の発現が顕著に増加し AhR が活性化していること、IDO を過剰発現したがん細胞株を移植したマウスでは CD8⁺ T 細胞の減少と Treg の増加が起こることを昨年度報告した。今年度の解析から、IDO を過剰発現したがん細胞株を移植したマウスでは腫瘍抗原特異的及びがん細胞特異的な T 細胞応答が顕著に低下することが明らかになった。このことか

ら、漢方成分から同定された AhR アンタゴニストを担がん生体に投与することによって、CD8⁺ T 細胞の増加、Treg の減少、腫瘍抗原特異的及びがん細胞特異的な T 細胞応答の増強を介して、抗腫瘍免疫応答の改善につながることを期待できる。

さらに、Cyp1a1 プロモーター依存性に GFP 発光するマウスがん細胞株の開発によって、AhR の活性に依存して GFP 発光するマウスがん細胞株ができ、本研究で AhR アンタゴニストとして同定された漢方成分の幾つかが TCDD による GFP 発光を抑制することを確認した。これを用いれば、担がんマウス生体内でのがん細胞の AhR 活性化状態をモニターすることができ、同定された AhR アンタゴニストが生体内で AhR 活性を抑制できるかどうかを観察することが可能になる。さらに、現在、より高感度の検出系を開発している。

3. 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

昨年度まで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漢方成分について、担がんマウスに対する *in vivo* の効果の解析を試みた。CT26 を移植した BALB/c マウスあるいは MC38 を移植した C57BL/6 マウスにこれらの成分を投与して、その *in vivo* の効果を明らかにすることを試みた。

以下の漢方成分を用いた解析において、材料と方法の共通するものをここに記述し、各漢方成分に特有の材料と方法については各節内に記述する。

材料と方法

細胞培養

ヒト悪性黒色腫細胞株 624 mel、888 mel、928 mel は 10% FBS を含む RPMI1640 (Invitrogen) を用いて培養した。マウスがん細胞株 B16、B16F10、CT26、MC38、MCA205 は 10% FBS を含む RPMI1640 (Invitrogen) を用いて培養した。マウスがん細胞株 4T1 は 10% FBS を含む DMEM (Invitrogen) を用いて培養した。

マウス

BALB/c、C57BL/6J マウスは三協ラボサービスから購入し、慶応義塾大学医学部動物実験倫理規定に従い、実験、飼育を行った。

漢方成分

本研究で使用した漢方成分は *in vitro* で使用する際は 10mM として、*in vivo* で使用する際は 10mg/mL として DMSO に溶解した。

担がんマウスモデル実験

6 週令のメスのマウスに 5×10^5 細胞個のマウス大腸がん細胞株 CT26 もしくは MC38 を皮下投与し移植した。移植後 5 日目以降に 200 μ g の漢方成分を 2 日に 1 回腹腔内投与と腫瘍サイズのモニタリングを行った。初回の漢方成分投与から 14 日後以降に、治療マウスを解剖し、各臓器の細胞分布をフローサイトメトリーを用いて解析した。また、脾臓においては瘍抗原特異的な T 細胞応答の解析を行った。

解析に使用した抗体は Biolegend もしくは ebioscience から購入した。FITC anti-mouse CD3e Antibody、PE anti-mouse CD49b (pan-NK cells) Antibody、Alexa Fluor® 700 anti-mouse CD4 Antibody、APC anti-mouse CD8a Antibody、PE anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Antibody、FITC anti-mouse/human CD11b Antibody、PE/Cy7 anti-mouse CD11c Antibody、Alexa Fluor® 700 anti-mouse F4/80 Antibody、Pacific Blue™ anti-mouse CD45 Antibody、PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD45、APC anti-mouse CD25 Antibody (Biolegend)、Rat IgG2a K Isotype Control PE Anti-Mouse/Rat Foxp3 PE (ebioscience)。

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) もしくは MC38 腫瘍抗原ペプチド gp70 (1 μ g/ml、KSPWFTTL) を加え、5 日間培養し、細胞を回収した。その後、生細胞をフィコール密度勾配遠心分離法 (リンフォセパール：免疫生物研究所) で単離し、Mouse CD8 α MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用い CD8 陽性細胞を単離し、96 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well で播種し、ペプチド (1 μ g/ml) 及び 1×10^5 cells の naïve マウスの脾臓細胞と共培養、あるいは放射線照射し

た 1×10^5 個のがん細胞と共培養した。プレートは 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、24 時間培養し、培養上清を回収し、BD OptEIA™ Set Mouse IFN- γ (BD Biosciences) を使用して IFN- γ の産生を測定した。

フローサイトメトリー

フローサイトメトリー法による解析は FACSscalibur (BD bioscience) もしくは Galioss (Becton Deckinson) を用いて測定し、全てのデータは FlowJo software 7.2 (FlowJo) を用いて解析した。

統計学的解析

全ての解析データは t 検定を用いて統計学解析を行った。

3.1) 漢方成分 No.13

昨年度までの解析から、漢方成分 No. 13 は JHOC5 からの IL-6、PK59 からの TGF- β 、CT26 からの VEGF 産生を抑制し、OVCAR3 と JHOC5 において NF- κB を抑制する活性を示した。また Th1 誘導を若干阻害するが、iTreg 誘導を顕著に抑制することが明らかになっている。本年度、担がんマウスモデルに漢方成分 No. 13 を投与し、抗腫瘍効果および免疫細胞への影響を解析した。

結果

Balb/c マウスに CT26 を皮下移植し、移植後 8 日目から $200\mu\text{g}$ の漢方成分を 2 日に 1 回腹腔内投与し、腫瘍サイズのモニタリングを行った。DMSO 投与群と比較し、漢方成分 No. 13 投与群において腫瘍径は増大した (図 8 A)。

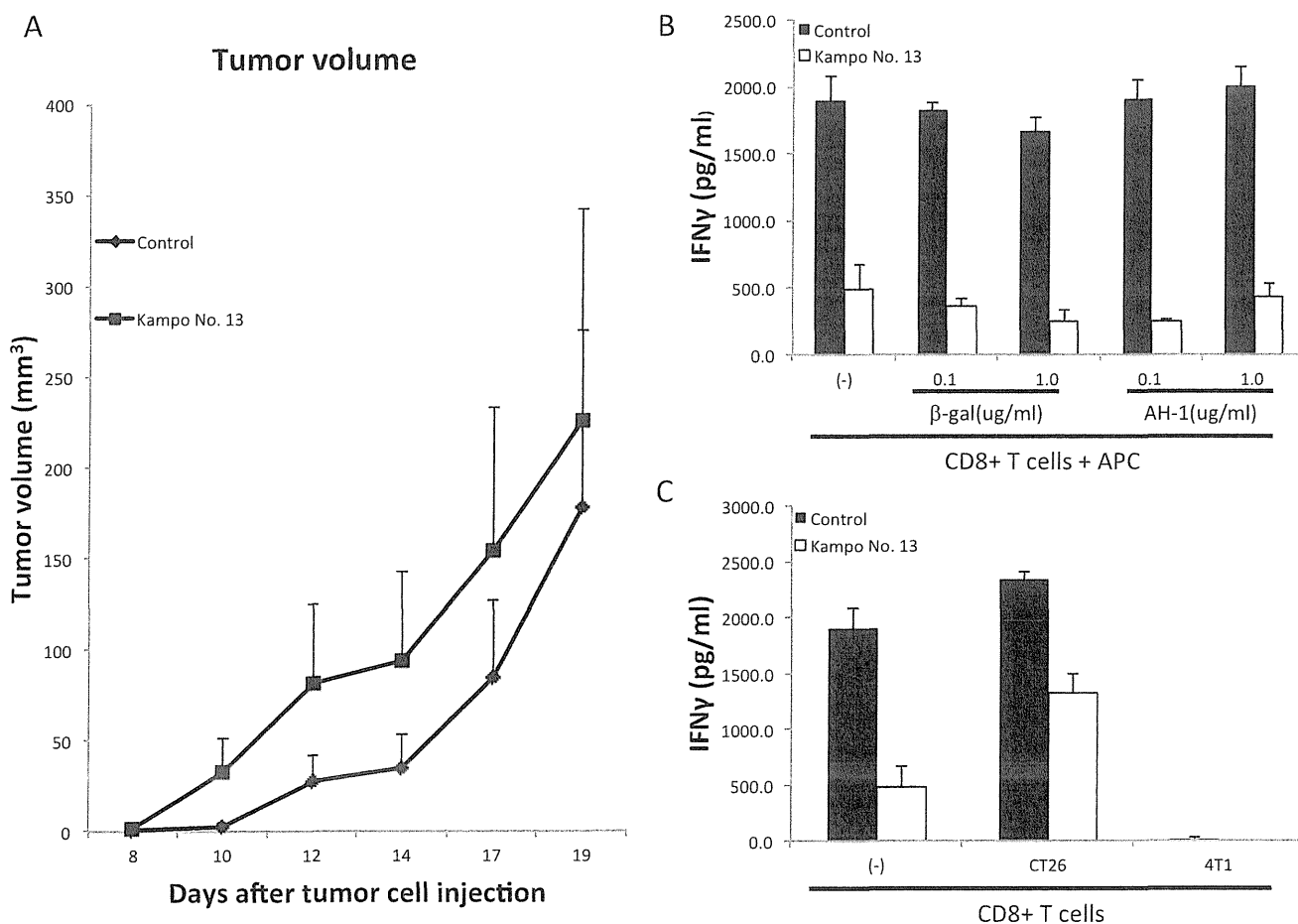


図 8 担がんマウスへの漢方成分 No. 13 投与による腫瘍増殖および抗腫瘍 T 細胞応答への影響

脾臓、所属リンパ節、がん組織内の免疫細胞の割合を解析したところ、脾臓、所属リンパ節、がん組織内での CD8 陽性 T 細胞の増加の傾向と、脾臓での Treg 減少の傾向がみられたが、がん組織内での Treg や MDSC といった免疫抑制性細胞の増加傾向や脾臓、所属リンパ節でのマクロファージの増加がみられた (図 9)。

各群の脾臓細胞を腫瘍抗原 AH-1 のペプチド存在下で 5 日間培養後、それに含まれる CD8 陽性 T 細胞を回収し、腫瘍抗原ペプチド、コントロールペプチド、腫瘍抗原陽性のがん細胞 CT26、腫瘍抗原陰性のがん細胞 4T1 に対する反応を解析したところ、漢方成分 No. 13 投与マウスでは IFN- γ 産生が非特異的に阻害されていた。

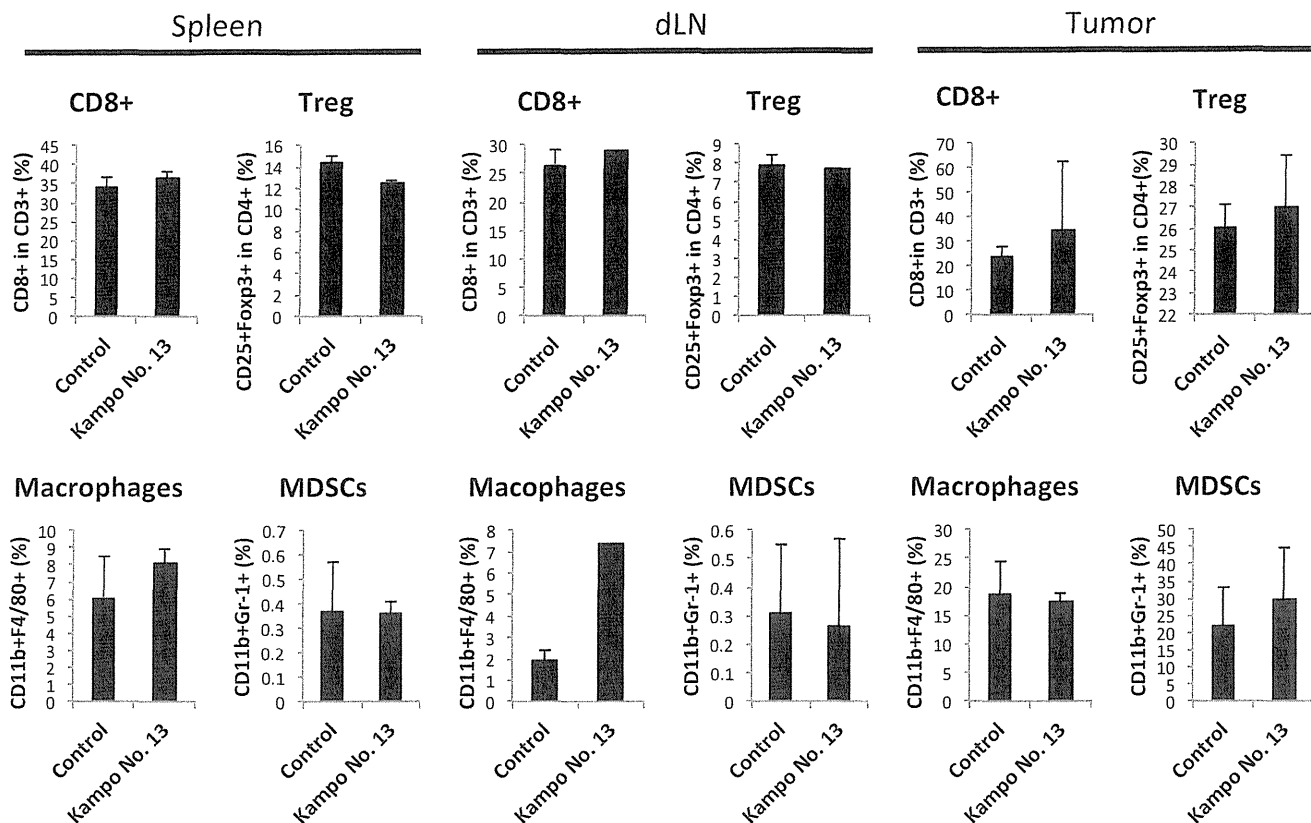


図9 漢方成分 No. 13 投与による脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

考察

漢方成分 No. 13 は JHOC5 からの IL-6 や CT26 からの VEGF 産生を抑制し、NF- κ B が活性化しているがん細胞で NF- κ B を抑制する活性を示した。また Balb/c と C57BL/6 のいずれの脾臓細胞からでも iTreg 誘導が顕著に抑制されたことから、担がんマウスでの抗腫瘍免疫応答が増強されることを期待した。しかしながら、少なくとも Balb/c への CT26 移植モデルにおいては、末梢での CD8 陽性 T 細胞の増加と Treg 減少といった良い傾向よりも、腫瘍内での Treg や MDSC の増加、末梢でのマクロファージの増加、CD8 陽性 T 細胞からの IFN- γ 産生の非特異的な抑制といった悪い影響によって、腫瘍径の増大という結果に至ったことが示唆される。より NF- κ B の活性化が見られる MC38 を C57BL/6 に移植する系において、投与量や投与頻度を減らすなどによって NF- κ B 阻害の良い効果が得られる可能性はあるかもしれない。

3.2) 漢方成分 No.14

昨年度までの解析から、漢方成分 No. 14 は 888mel からの IL-10、PK59 からの TGF- β 産生を抑制した。888mel において ERK, STAT3 を抑制する活性を認めた。ただし、脾臓細胞からの Th1 誘導には抑制的に働くことが示されている。本年度、担がんマウスモデルに漢方成分 No. 14 を投与し、抗腫瘍効果および免疫細胞への影響を解析した。

結果

IL-10 を産生する 3 種類のヒト悪性黒色腫細胞株を 10 μ M の漢方成分 No. 14 存在下で培養し、24hr 後の IL-10 量を測定した (図 10)。888mel からの IL-10 産生は抑制したが、他の 2 株には抑制効果を示さなかった。

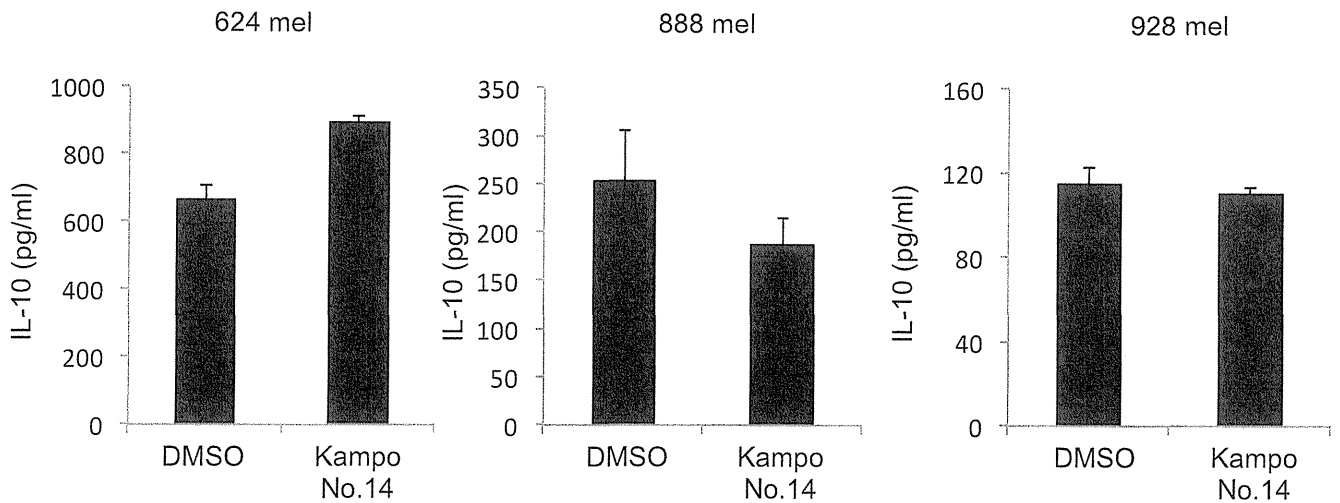


図 1 0 ヒト悪性黒色腫細胞株からの IL-10 産生に対する漢方成分 No. 14 の効果

C57BL/6 マウスに MC38 を皮下移植し、生着後 200 μ g の漢方成分を 2 日に 1 回腹腔内投与し、腫瘍サイズのモニタリングを行った。DMSO 投与群と比較し、漢方成分 No. 14 投与群において腫瘍増殖の抑制効果は観察されなかった (図 1 1 A)。各群の脾臓細胞を腫瘍抗原 gp70 のペプチド存在下で 5 日間培養後、それに含まれる CD8 陽性 T 細胞を回収し、腫瘍抗原ペプチド、コントロールペプチド、腫瘍抗原陽性のがん細胞 MC38、腫瘍抗原陰性のがん細胞 EL4 に対する反応を解析したところ、脾臓細胞中の CD8⁺ T 細胞のがん細胞に対する反応は変化なかったが、腫瘍抗原に対する反応は漢方成分 No. 14 投与によって抑制されていた (図 1 1 B, C)。

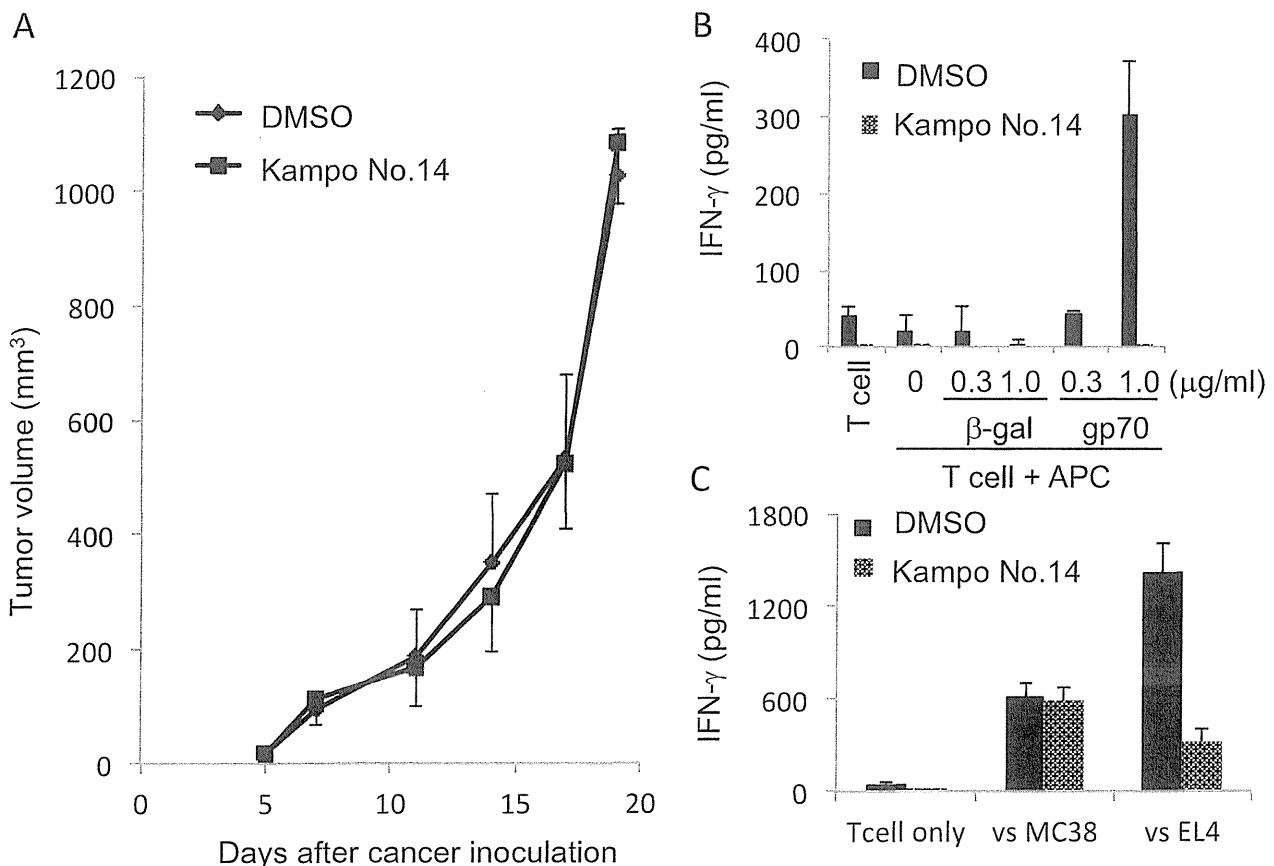


図 1 1 担がんマウスへの漢方成分 No. 14 投与による腫瘍増殖および抗腫瘍 T 細胞応答への影響

末梢、リンパ節、腫瘍内浸潤リンパ球における細胞分画の解析を行ったところ、漢方成分 No. 14 の投与によって末梢と腫瘍内において MDSC の増加傾向が、所属リンパ節においては樹状細胞の割合に有意な減少が

確認された (図 1 2)。

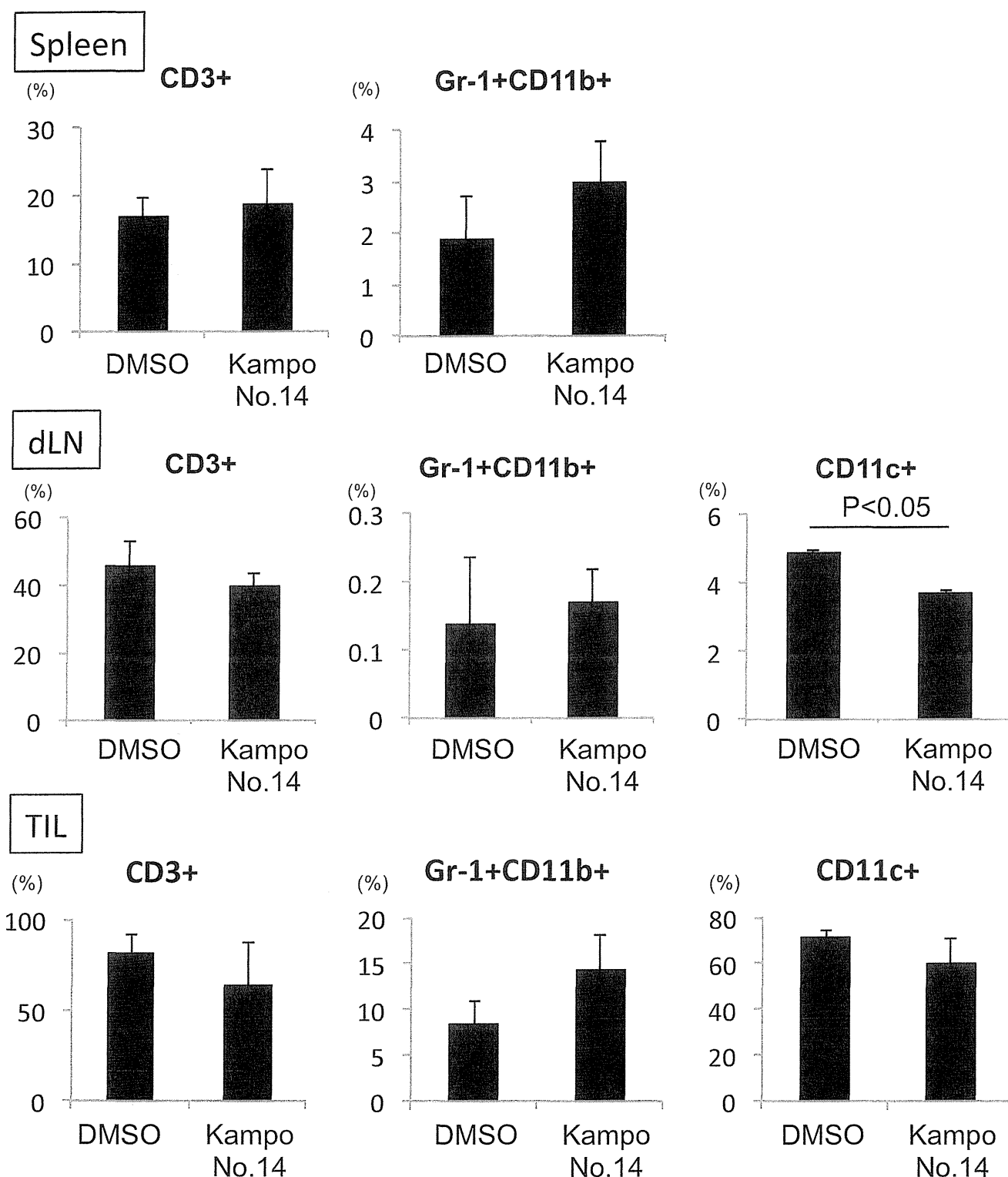


図 1 2 漢方成分 No. 14 投与による脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

考察

漢方成分 No. 14 は、*in vitro* において 888mel の STAT3、ERK に対する抑制効果が観察されたが、担がんマウス治療実験においては、腫瘍増殖の抑制効果は確認できなかった。脾臓細胞中の CD8⁺ T 細胞からの腫瘍抗原特異的 IFN- γ 産生も抑制されていた。これらは、末梢や腫瘍内での MDSC の増加、所属リンパ節での樹状細胞の減少など抗腫瘍免疫に対して抑制的な免疫細胞分画の変化が起きたことが影響していると考えられ、更なる解析の対象から除外した。

3.3) 漢方成分 No.15

昨年までの解析から、漢方成分 No. 15 は 888mel からの IL-10、PK59 からの TGF- β 産生を抑制した。また、AhR に対するアンタゴニスト活性を示した。本年度、担がんマウスモデルに漢方成分 No. 15 を投与し、抗腫瘍効果および免疫細胞への影響を解析した。

結果

C57BL/6 マウスに MC38 を皮下移植し、生着後 200 μ g の漢方成分を 2 日に 1 回腹腔内投与し、腫瘍サイズのモニタリングを行った (図 1 3 A)。DMSO 投与群と比較し、漢方成分 No. 15 投与群において腫瘍増殖の抑制効果は観察されなかった (図 1 3 B)。各群の脾臓細胞を腫瘍抗原 gp70 のペプチド存在下で 5 日間培養後、それに含まれる CD8 陽性 T 細胞を回収し、腫瘍抗原ペプチド、コントロールペプチド、腫瘍抗原陽性のがん細胞 MC38、腫瘍抗原陰性のがん細胞 EL4 に対する反応を解析したところ、脾臓細胞中の CD8⁺ T 細胞のがん細胞に対する反応の増加がみられたものの、腫瘍抗原に対する反応は漢方成分 No. 15 投与によって抑制されていた (図 1 3 C,D)。

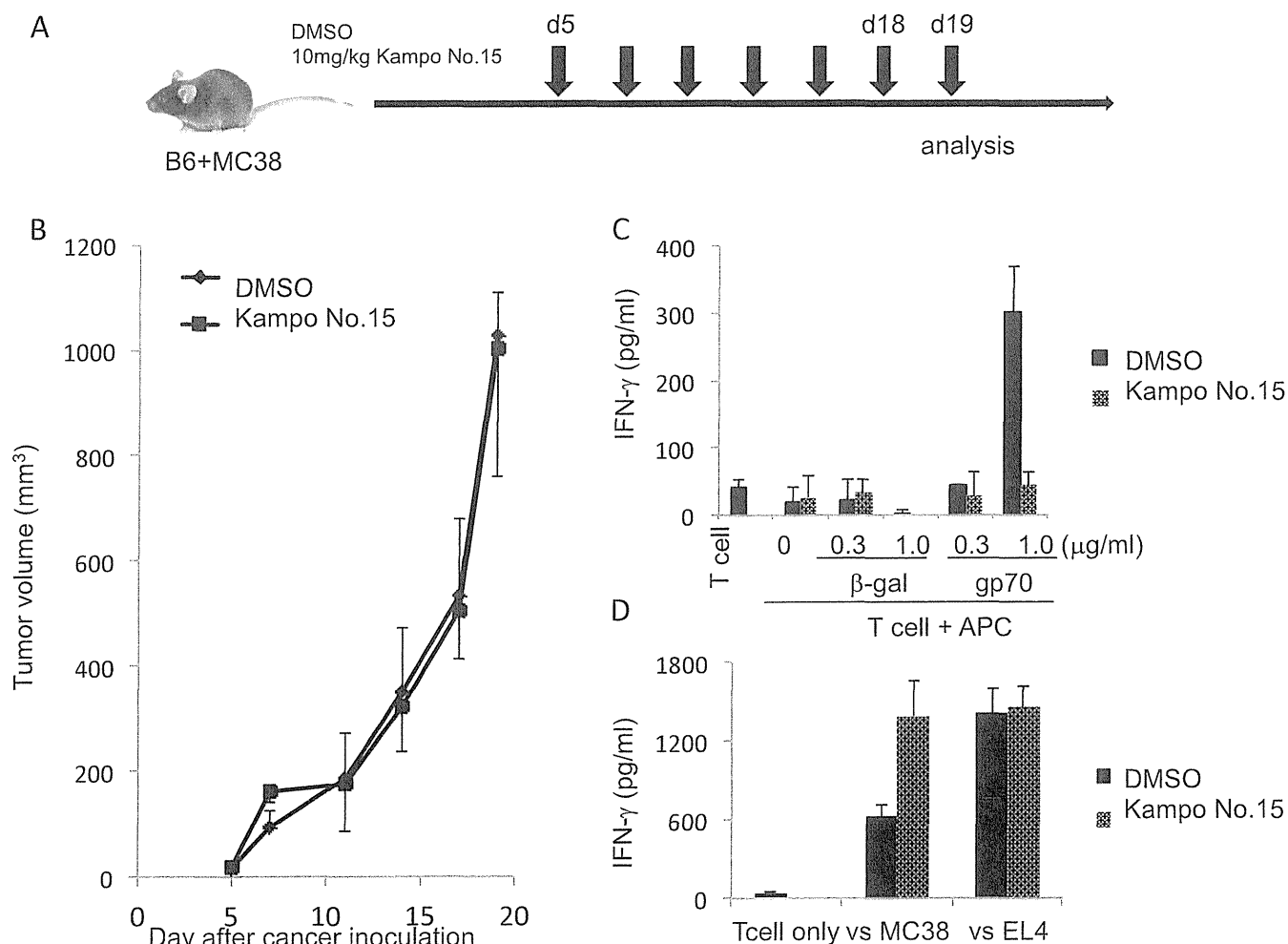


図 1 3 担がんマウスへの漢方成分 No. 15 投与による腫瘍増殖および抗腫瘍 T 細胞応答への影響

末梢、リンパ節、腫瘍組織における細胞分画の解析を行ったが、末梢、リンパ節のいずれの細胞の割合においても有意な差は示さず、腫瘍組織において CD8⁺ T 細胞や NK/NKT 細胞の減少傾向がみられた (図 1 4)。