

図 1 4 漢方成分 No. 15 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.15 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、腫瘍増殖の抑制あるいは抗腫瘍免疫応答の増強はみられなかったため、更なる解析の対象から除外した。

### 3.4) 漢方成分 No.21

昨年度までの解析において、漢方成分 No. 21 は 888mel, 624mel からの IL-10 及び VEGF、CT26 からの VEGF の産生を抑制した。また、iTreg 誘導を抑制したが Th1 誘導は阻害しなかった。さらに、AhR に対するアンタゴニスト活性を示した。ただし、がん細胞への直接的傷害活性も認められた。本年度、担がんマウスモデルに漢方成分 No. 21 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 9 日目から 200 $\mu$ 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。漢方成分 No. 21 投与群において DMSO 投与群と比較し、腫瘍増殖の顕著な抑制が認められた (図 1 5 A)。脾臓細胞中の T 細胞の腫瘍抗原やがん細胞に対する反応性の上昇はみられなかったが、それらの著しい低下もみられなかった (図 1 5 B,C)。脾臓、所属リンパ節、腫瘍における細胞分画の解析から、所属リンパ節において CD3+ T 細胞の増加と MDSC の減少がみられたが、末梢や腫瘍組織での細胞集団の顕著な増加も減少も認められなかったことから、漢方成分 No. 21 による免疫細胞への傷害活性はみられなかった (図 1 6)。

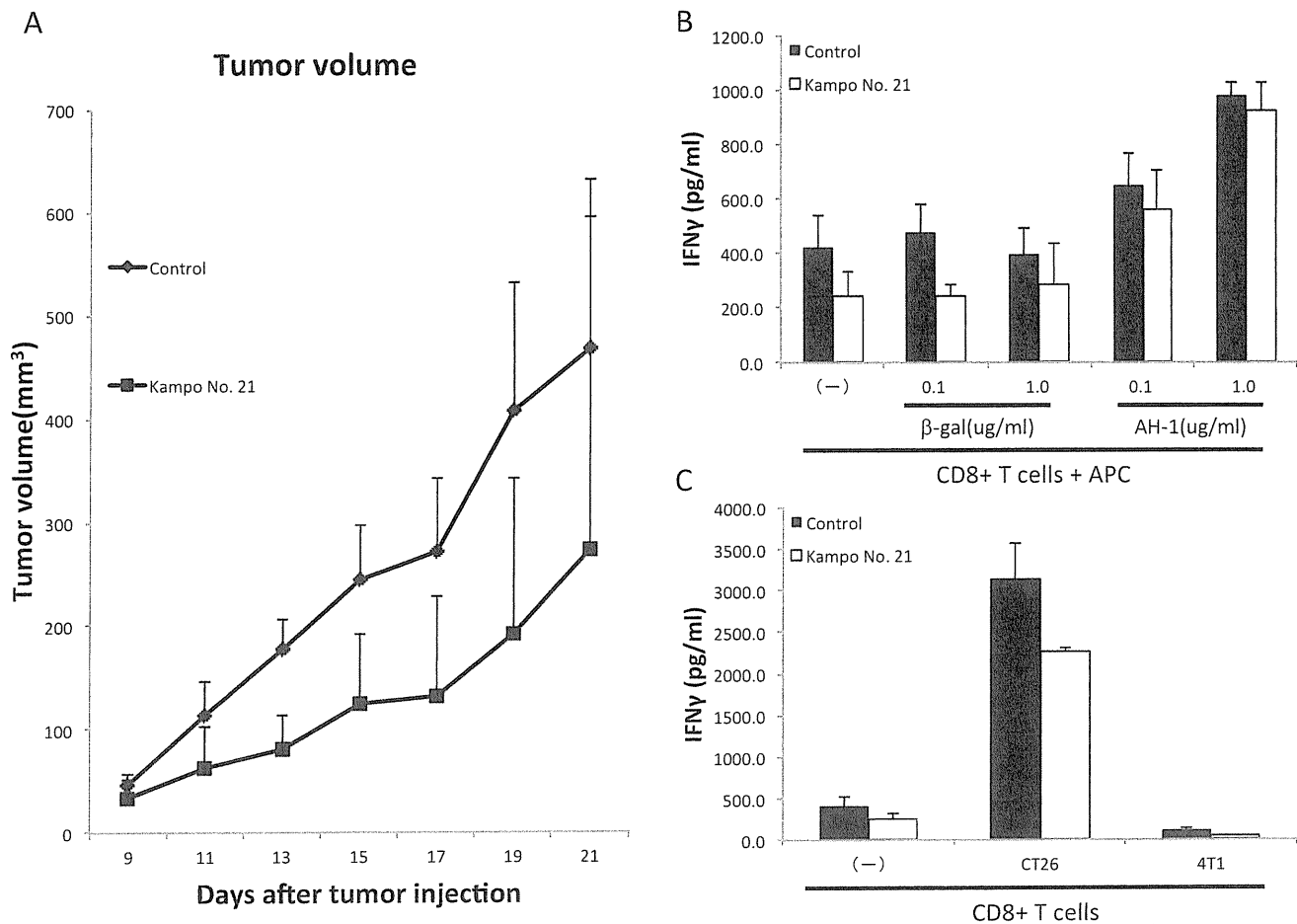


図 1 5 担がんマウスへの漢方成分 No. 21 投与による腫瘍増殖および抗腫瘍 T 細胞応答への影響

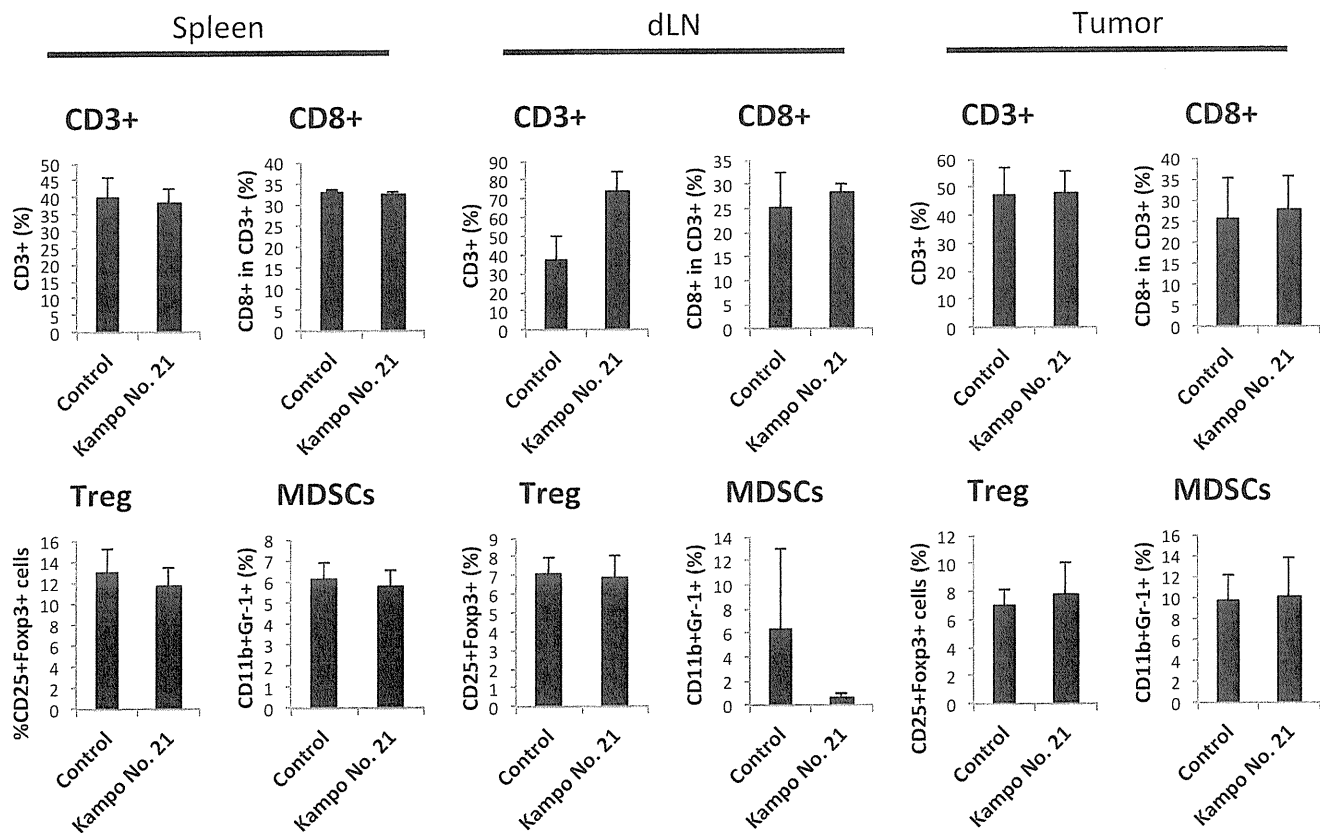


図 1 6 漢方成分 No. 21 投与による脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

## 考察

昨年度までの解析から、漢方成分 No. 21 はがん細胞からの IL-10 及び VEGF の産生を抑制し、脾臓細胞からの iTreg 誘導を抑制するとともに、がん細胞への直接的傷害活性も認められた。がん細胞のみならず正常免疫細胞に対しても細胞傷害活性が起こる可能性が危惧されたが、担がんマウスで解析した結果、腫瘍増殖は抑制したが、正常免疫細胞への毒性はほとんど認められなかった。In vitro で見られた Treg 誘導の抑制や積極的な抗腫瘍免疫増強は in vivo で起こらなかったものの、がん細胞への直接的傷害による抗腫瘍剤としての可能性はあると考えられた。

### 3.5) 漢方成分 No.22

昨年度までの解析から、漢方成分 No. 22 は JHOC5 からの IL-6、624mel からの IL-10 及び VEGF、PK59 からの TGF- $\beta$ 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、担がんマウスに漢方成分 No. 22 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 $\mu$ M の漢方成分 No. 22 存在下で培養し、24hr 後の IL-10 量を測定した (図 17)。3 株のいずれにおいても IL-10 産生は抑制された。

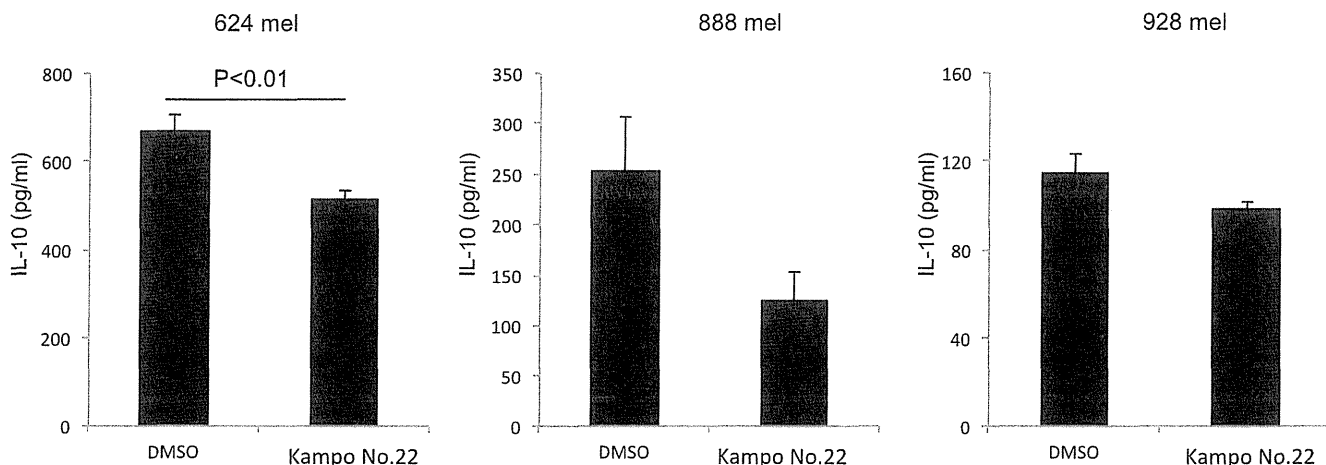


図 17 ヒト悪性黒色腫細胞株からの IL-10 産生に対する漢方成分 No. 22 の効果

昨年度、NF- $\kappa$ B EMSA により幾つかの漢方成分に NF- $\kappa$ B 阻害活性があることを示したが、漢方成分 No. 22 で処理した JHOC-5 と MC38 の NF- $\kappa$ B 活性を NF- $\kappa$ B filter plate assay で測定したところ、NF- $\kappa$ B が阻害されており、漢方成分 No. 22 にも NF- $\kappa$ B 阻害活性があることが示された (図 18)。

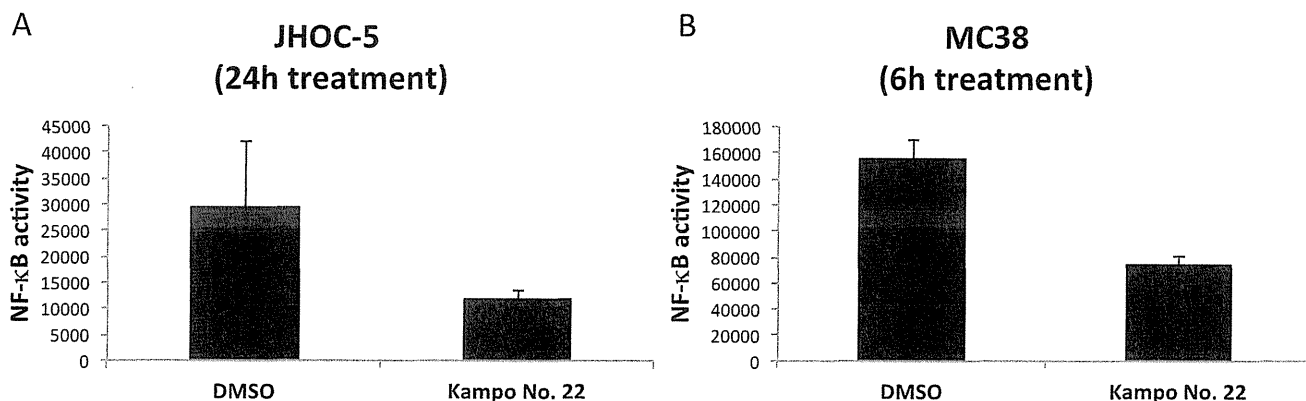


図 18 ヒト卵巣がん細胞株 JHOC-5 とマウス大腸がん細胞株 MC38 での漢方成分 No. 22 による NF- $\kappa$ B の阻害

Balb/c マウスに CT26 を皮下移植し、移植後 9 日目から 200 $\mu$ 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。漢方成分 No. 22 投与群と DMSO 投与群間で腫瘍増殖に有意な差はみられ

なかった (図 1 9 A)。脾臓細胞中の T 細胞の腫瘍抗原やがん細胞に対する反応性は低下した (図 1 9 B,C)。

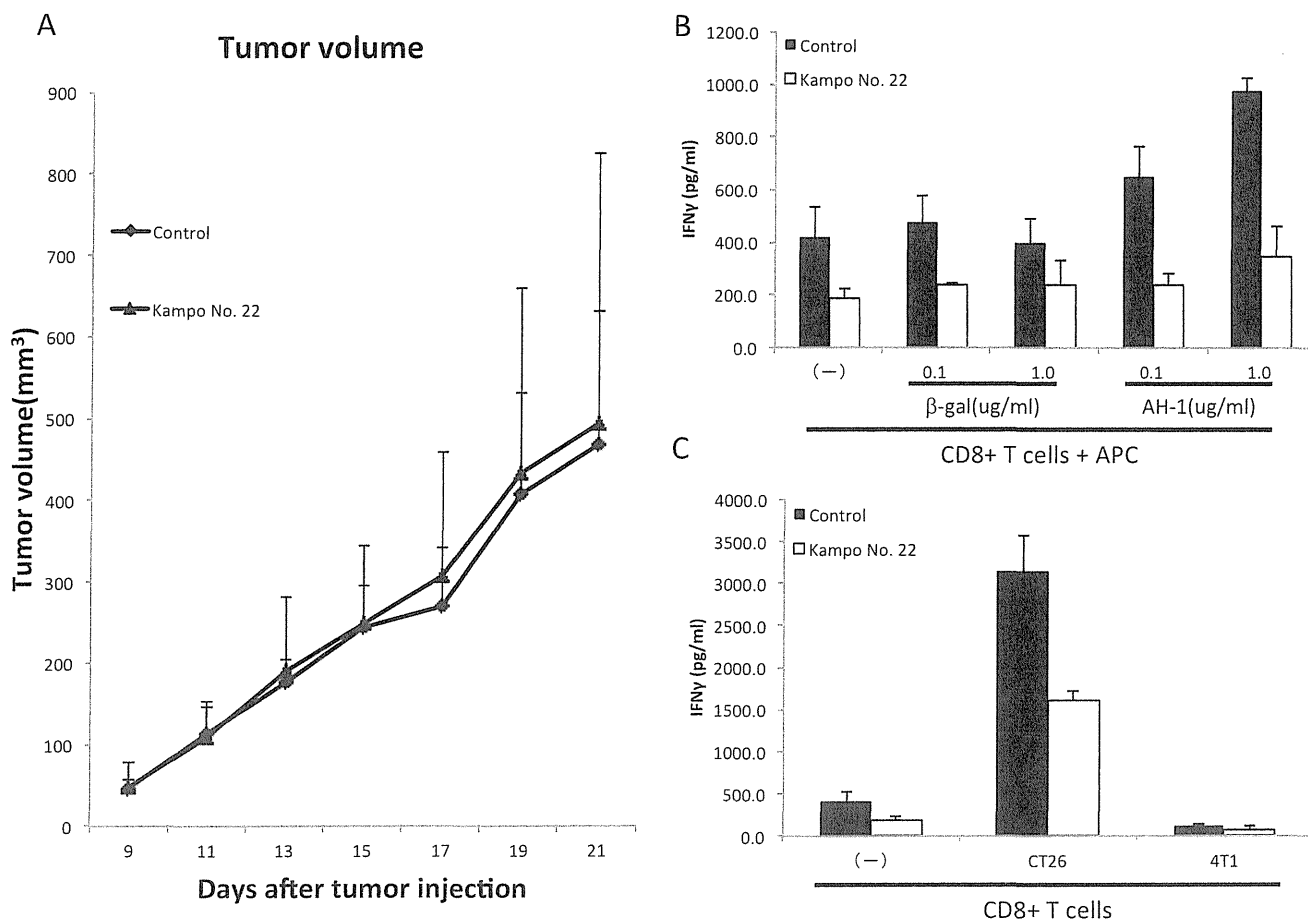


図 1 9 担がんマウスへの漢方成分 No. 22 投与による腫瘍増殖および抗腫瘍 T 細胞応答への影響

脾臓、所属リンパ節、腫瘍における細胞分画の解析から、所属リンパ節において、CD3<sup>+</sup> T 細胞の有意な増加と CD8<sup>+</sup> T 細胞の増加傾向、Treg および MDSC の減少傾向がみられたが、末梢や腫瘍組織において、逆の傾向がみられた (図 2 0)。

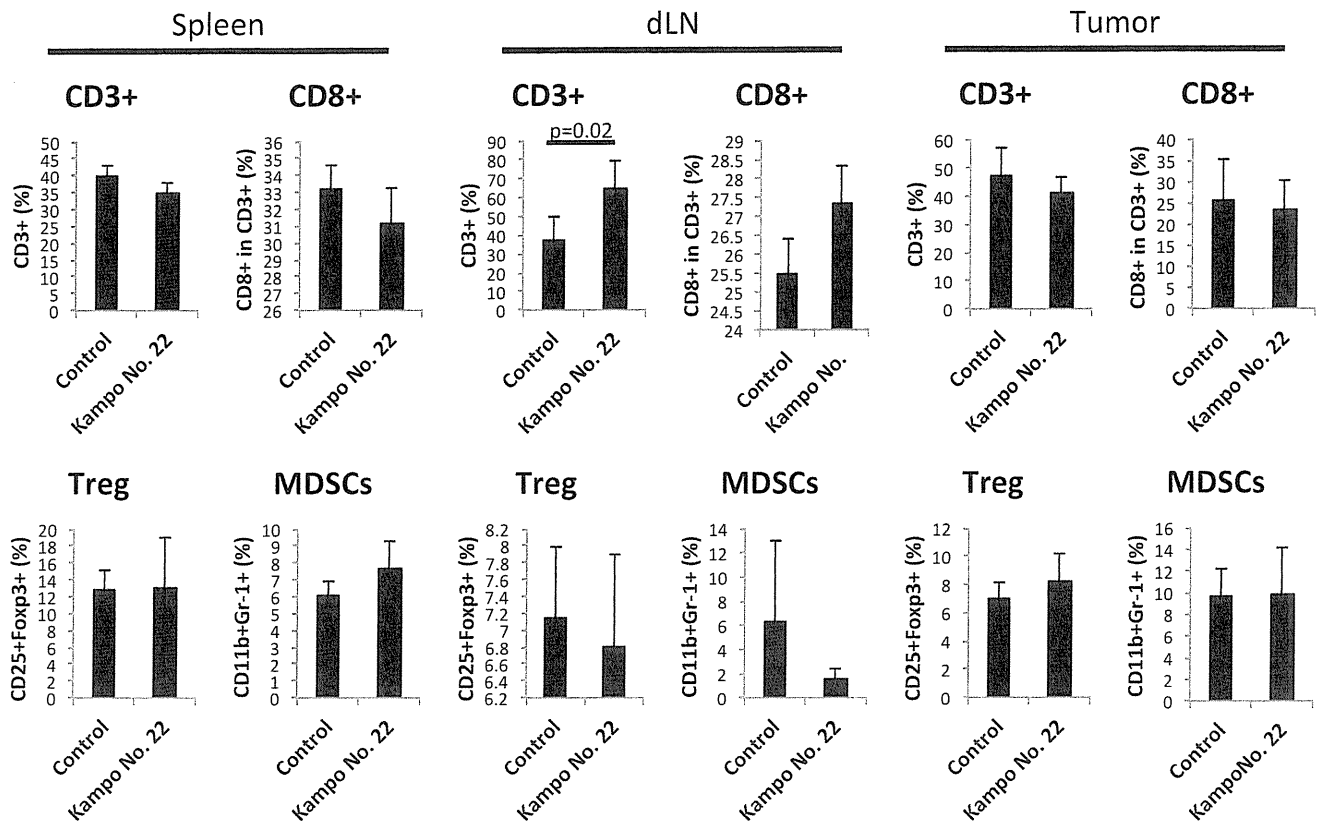


図 2.0 漢方成分 No. 22 投与による脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

### 考察

昨年度までの結果において、漢方成分 No. 22 は JHOC5 からの IL-6、624mel からの IL-10 及び VEGF、PK59 からの TGF- $\beta$  産生を抑制し、AhR に対するアンタゴニスト活性を示した。888mel、928mel からの IL-10 産生も抑制することから、IL-10 産生抑制には共通して効果が期待できる。Balb/c マウスに CT26 を移植するモデルでは、漢方成分 No. 22 のがん細胞への作用より免疫細胞への作用を解析する目的であったが、所属リンパ節で CD3<sup>+</sup> T 細胞の有意な増加と CD8<sup>+</sup> T 細胞の増加傾向、Treg および MDSC の減少傾向がみられたものの、末梢や腫瘍組織での免疫細胞に顕著な効果はみられなかった。結果として、腫瘍の増殖に対する抑制効果や抗原特異的 T 細胞の増強にはつながらなかった。MC38 あるいは B16 を用いたモデルで効果が見られる可能性はあると考えている。

### 3.6) 漢方成分 No.25

昨年度までの解析から、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。Balb/c マウスに移植した CT26 の増殖を抑制し、AH-1 特異的 T 細胞応答の増強がみられていた。腫瘍組織での Treg のわずかな減少や末梢での NKT 細胞のわずかな増加などがみられていたが、今年度は他の免疫細胞を含めた解析を進めた。

### 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 $\mu$ M の漢方成分 No. 25 存在下で培養し、24hr 後の IL-10 量を測定した (図 2.1)。624mel と 888mel おいて IL-10 産生は抑制された。

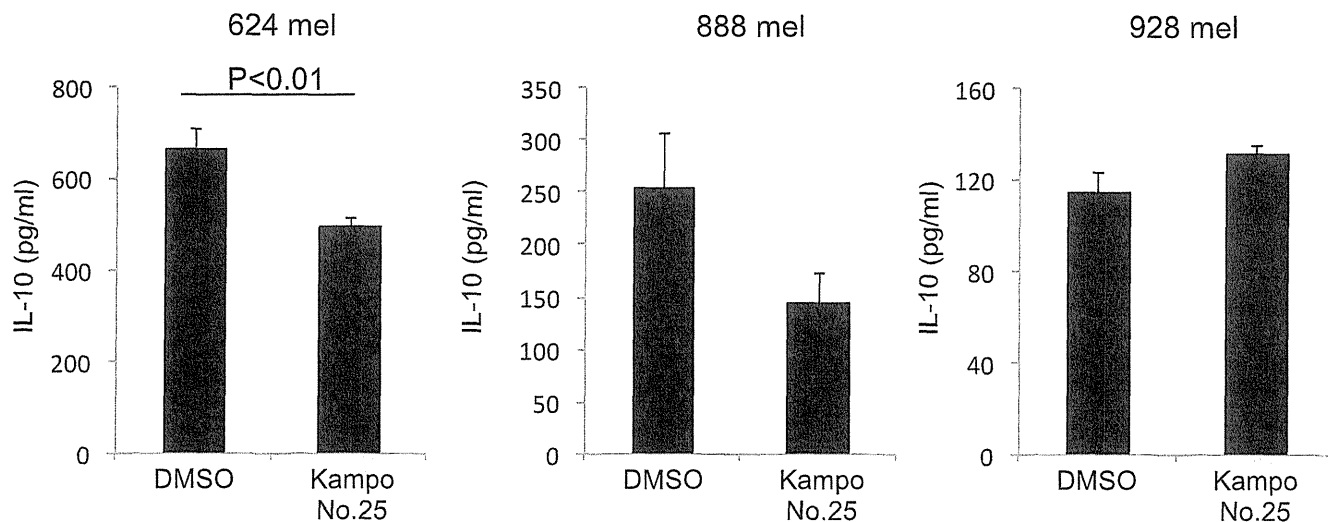


図 2 1 ヒト悪性黒色腫細胞株からの IL-10 産生に対する漢方成分 No. 25 の効果

Balb/c マウスに CT26 を皮下移植し、生着後 200 $\mu$ g の漢方成分を 2 日に 1 回腹腔内投与した (図 2 2 A)。漢方成分 No. 25 投与群と DMSO 投与群間で腫瘍増殖に昨年度ほどの有意な差はみられなかった (図 2 2 B)。脾臓細胞中の T 細胞の腫瘍抗原やがん細胞に対する反応性は顕著に増強した (図 2 2 C,D)。

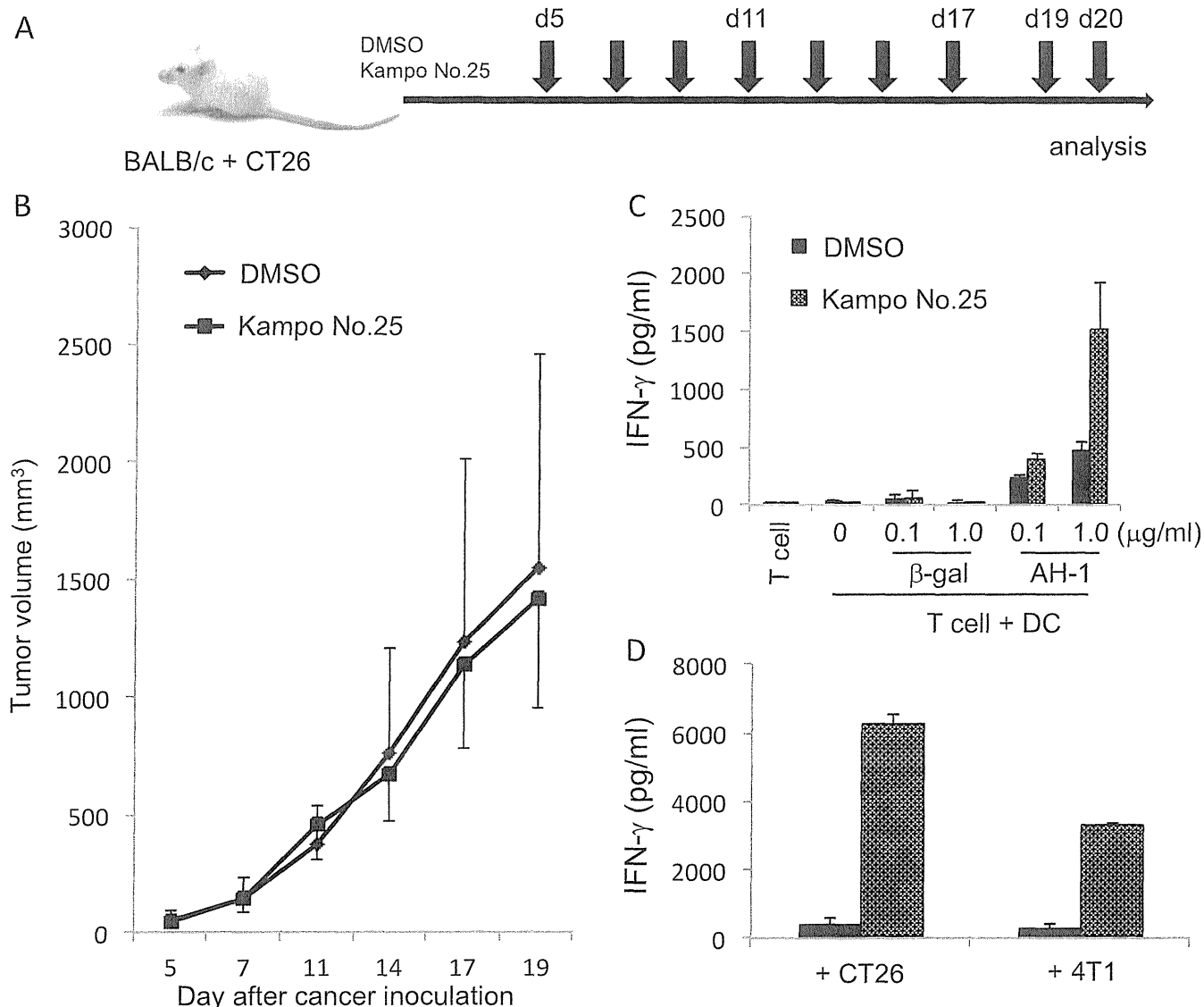


図 2 2 担がんマウスへの漢方成分 No. 25 投与による腫瘍増殖および抗腫瘍 T 細胞応答への影響

脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織での免疫細胞分画の解析から、末梢において、CD3 陽性細胞の割合が低下した一方、CD11c 陽性細胞、CD25 陽性 T 細胞の割合が増加していた。脾臓内の全細胞数が漢方成分 No. 25 投与群で増加しており、細胞数はどの分画も増加していた (図 2 3A)。しかし、所属リンパ節および腫瘍組織内リンパ球の全細胞数が漢方成分 No. 25 投与群で有意に減少しており、これら全ての分画の細胞数が減少していた (図 2 3B,C)。

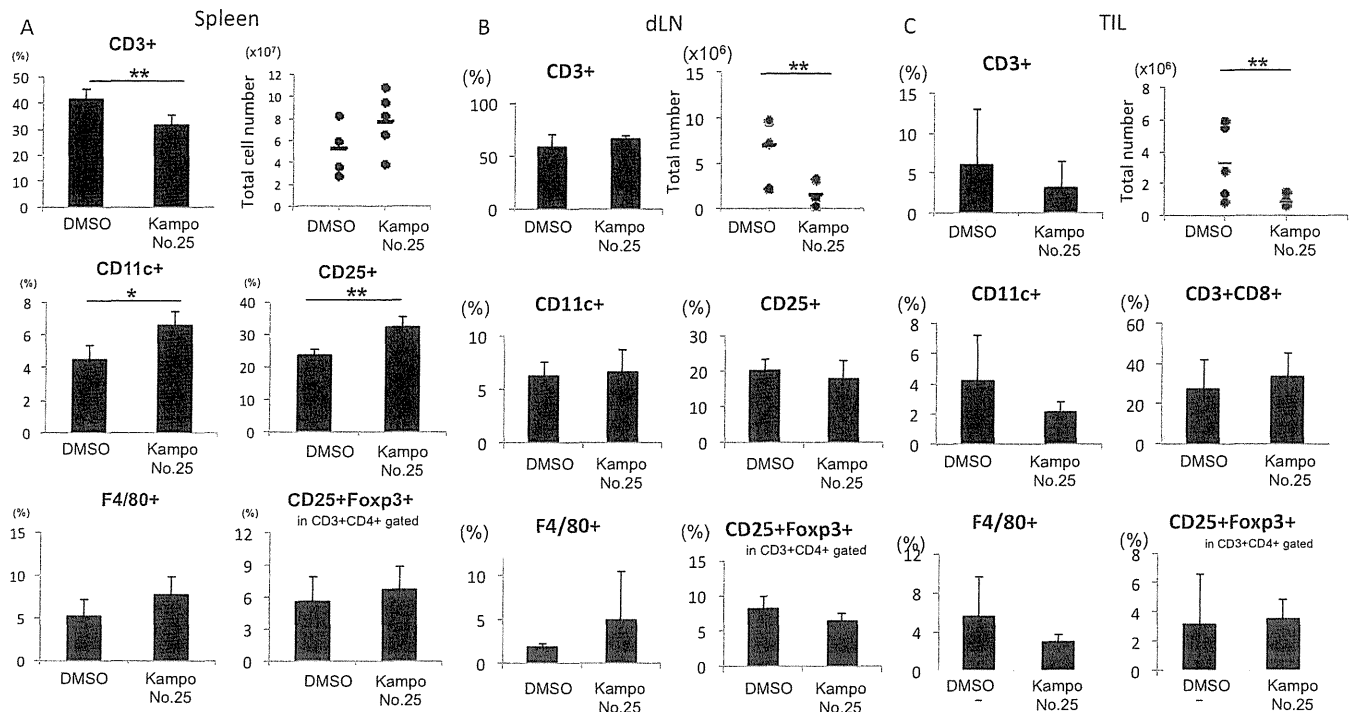


図 2 3 漢方成分 No. 25 投与による脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

### 考察

脾臓細胞中の T 細胞の抗原特異的な IFN- $\gamma$  産生能は漢方成分 No. 25 投与群で有意に増加するにも関わらず、所属リンパ節さらには腫瘍組織に動員される免疫細胞群の細胞数が減少するため、抗原特異的な T 細胞が腫瘍組織内に供給されていないことが考えられる。これは末梢での Treg の割合の増加が寄与しているのかもしれない。腫瘍組織への抗原特異的な T 細胞の動員を増加させるような処置と組み合わせることができれば、漢方成分 No. 25 を抗腫瘍免疫応答の増強に利用できる可能性があると考えている。

### 3.7) 漢方成分 No.35

昨年度までの解析から、漢方成分 No.35 は、*in vitro* で濃度依存的にマウス大腸がん細胞株 CT26 の細胞増殖を阻害することに加え、CT26 の VEGF 産生やヒト悪性黒色腫細胞株 888mel の IL-10、VEGF 産生を抑制した。また、脾臓細胞からの iTreg の誘導には影響しないが、Th1 の誘導を増強することが明らかになった。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。CT26 を移植した担がんマウスに、漢方成分 No.35 を経口投与したところ、脾臓、腫瘍、小腸中の免疫細胞の細胞数に顕著な変化はみられなかったが、漢方投与群の腫瘍から単離した単核球において、CT26 腫瘍抗原ペプチド AH-1 や CT26 細胞特異的な IFN- $\gamma$  産生の増加がみられた。この結果から、漢方成分 No.35 には、腫瘍増殖と血管新生の阻害に加えて、腫瘍抗原特異的な免疫応答を増強する作用があることが示された。今年度、抗腫瘍免疫促進のメカニズムを解明するために、さらなる研究を進めた。

### 材料と方法

#### 実験動物

日本クレア株式会社より購入した、5-6 週齢のメスの BALB/c マウスを、慶應義塾大学医学部動物実験倫理

委員会の規定に従い、飼育、実験を行った。マウス大腸がん細胞株 CT26 ( $5 \times 10^5$  cells)を、0 日目にマウスの右側腹部に皮下投与により移植し、移植後 10 日目から 13 日目まで一日一回、対照群のマウスには DMSO を、漢方成分 No.35 投与群には漢方成分 No.35 を 50 mg/kg/day を経口投与した。そして移植から 26 日目に、マウスを解剖し、解析した。腫瘍サイズは経時的に測定し、体積は下記の数式により計算した。 $V$  (volume) =  $S^2 \times L/2$  (S は腫瘍の短径、L は腫瘍の長径)

### フローサイトメトリー解析

担がんマウスの脾臓細胞と腫瘍細胞は、Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter)を用いて解析を行った。染色には、PE-Cy5.5 標識抗 CD4 抗体、FITC 標識抗 CD8 抗体 (BioLegend)、FITC 標識抗 CD11b (eBioscience)、PE 標識抗 F4/80 抗体、APC 標識抗 Ly6C (BioLegend)、そして PE-Cy7 標識抗 Ly6G 抗体 (BD Pharmingen) を使用した。

### 結果

Balb/c マウスに CT26 を皮下移植し、移植後 10 日目から 13 日目まで一日一回、漢方成分 No.35 を 50 mg/kg/day で経口投与した (図 2 4 A)。漢方成分 No.35 の経口投与により、対照群に比べて腫瘍の増殖が抑制された (図 2 4 B)。また、腫瘍の増殖速度も漢方成分 No.35 投与群において低かった (図 2 4 C)。

漢方成分 No.35 の投与による、脾臓中の CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の細胞数に変化はみられなかった (図 2 5)。しかし、腫瘍においては、CD8 陽性細胞が対照群と比較して増加していた (図 2 6)。また、腫瘍関連マクロファージ (TAMs) の細胞数も漢方投与群で増加した (図 2 7)。脾臓中の MDSC (CD11b+Ly-6G<sup>+</sup> および CD11b+Ly-6C<sup>+</sup>) は、漢方成分 No.35 の投与で僅かに減少した (図 2 8)。漢方成分 No.35 投与による CD11b+Ly-6G<sup>+</sup> および CD11b+Ly-6C<sup>+</sup> 細胞の減少は、腫瘍において、より顕著であった (図 2 9)。

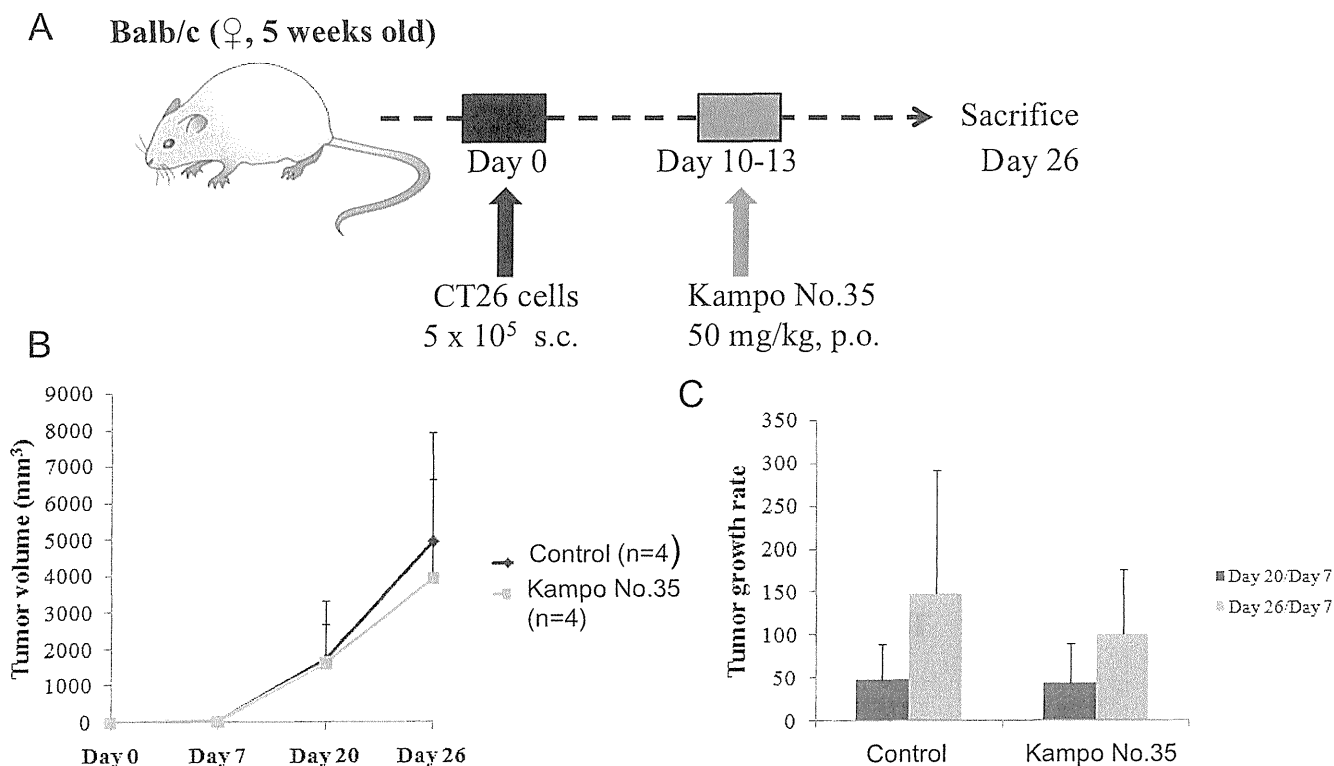


図 2 4 漢方成分 No.35 投与による腫瘍増殖の抑制



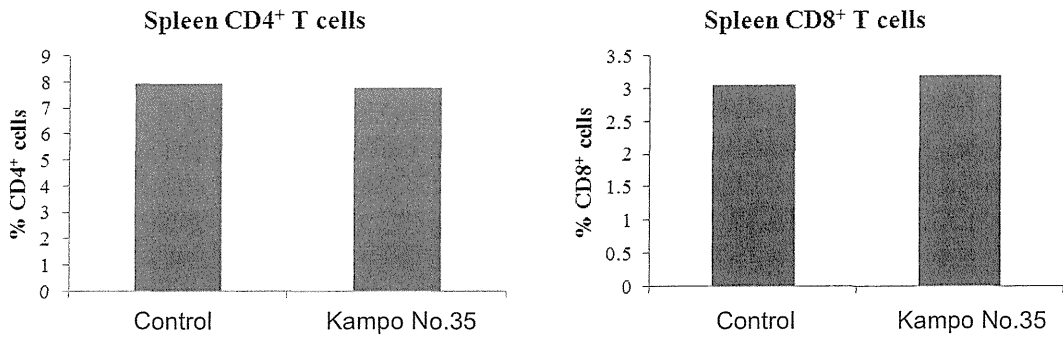
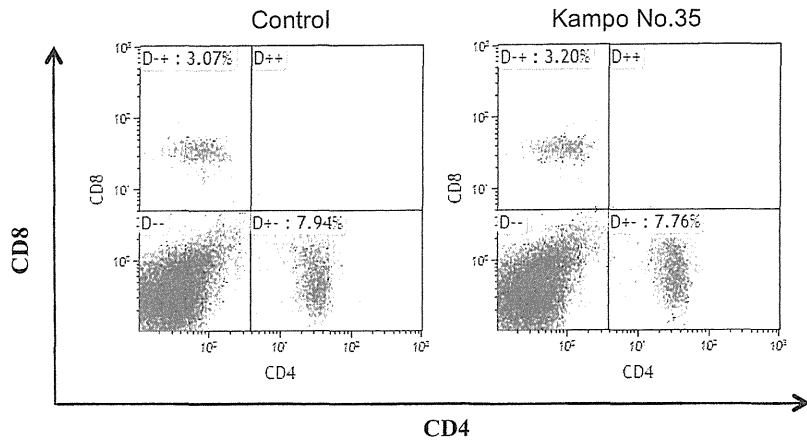


図 2 5 漢方成分 No.35 投与による脾臓内 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup> T 細胞の割合の変化

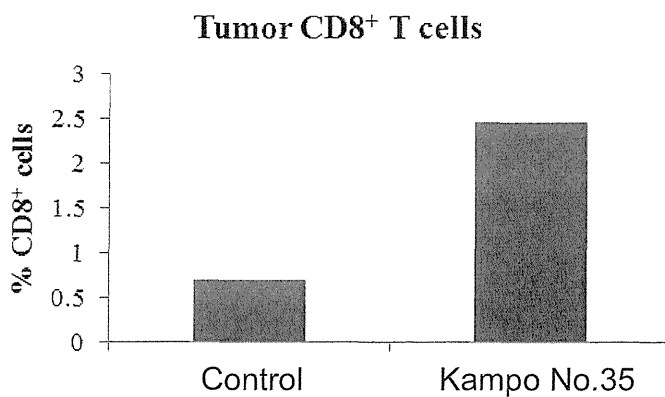
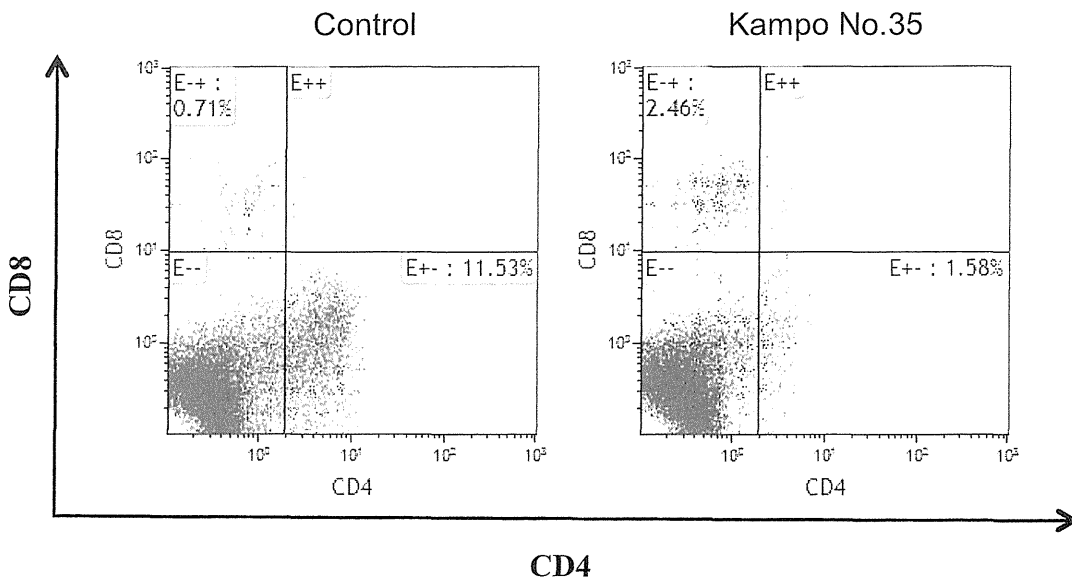
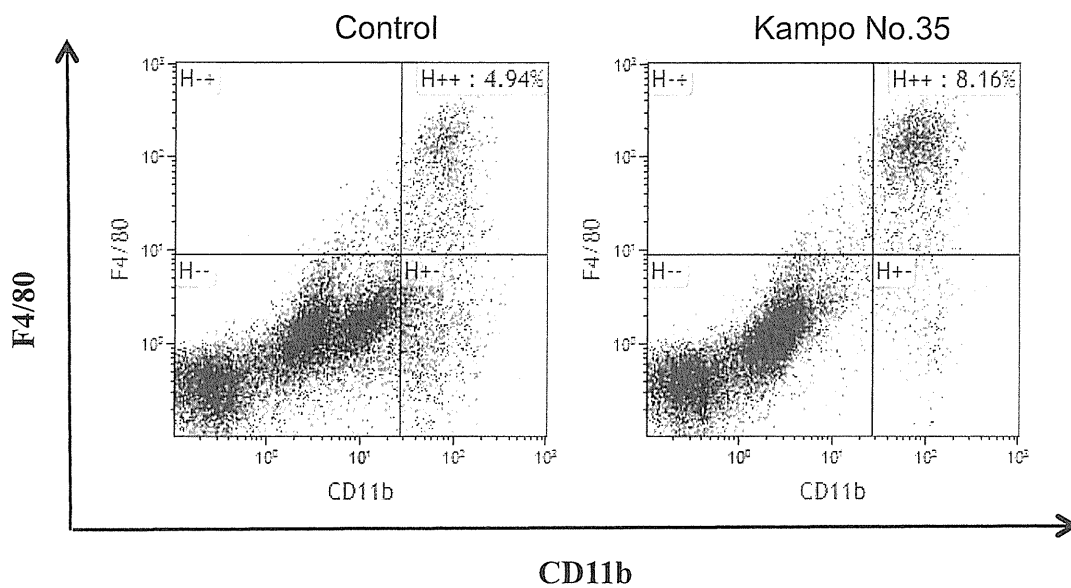


図 2 6 漢方成分 No.35 投与による腫瘍内 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup> T 細胞の割合の変化



TAMs

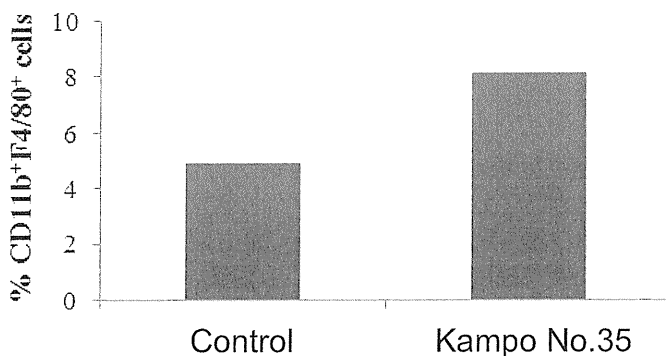


図 2 7 漢方成分 No.35 投与による腫瘍内マクロファージの割合の変化

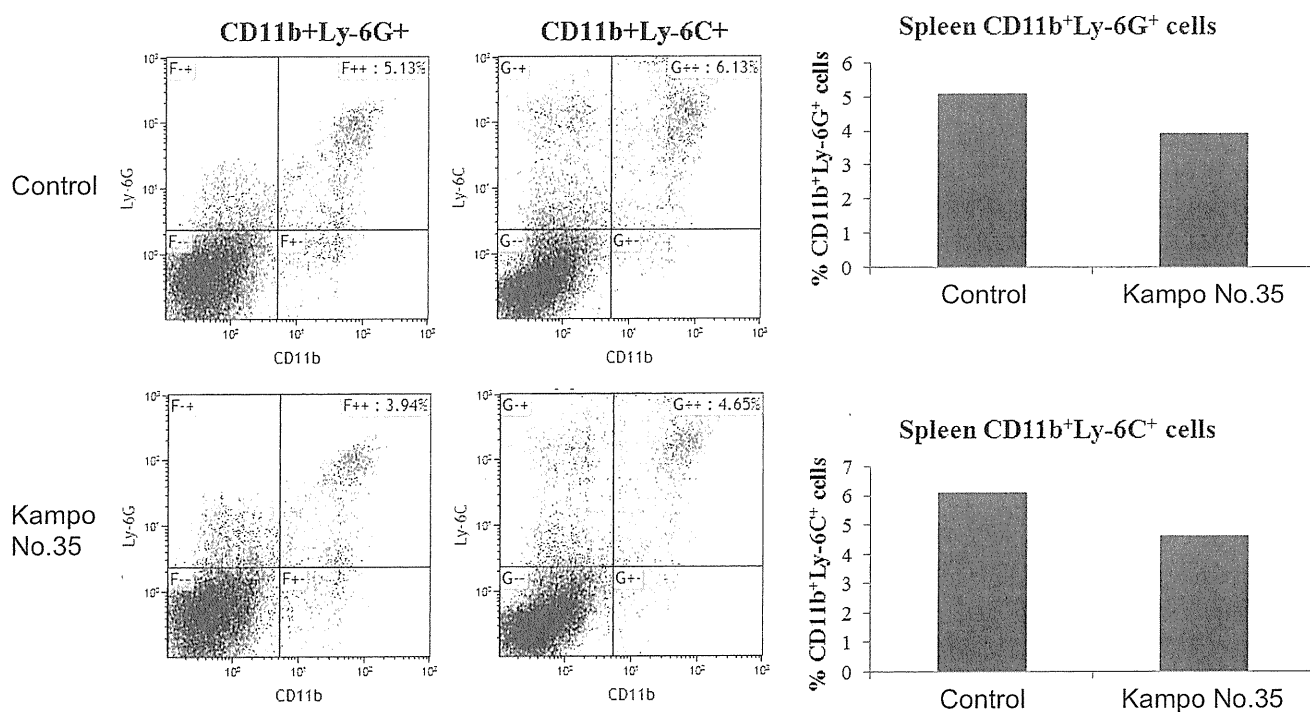


図 2 8 漢方成分 No.35 投与による脾臓内 MDSC の割合の変化

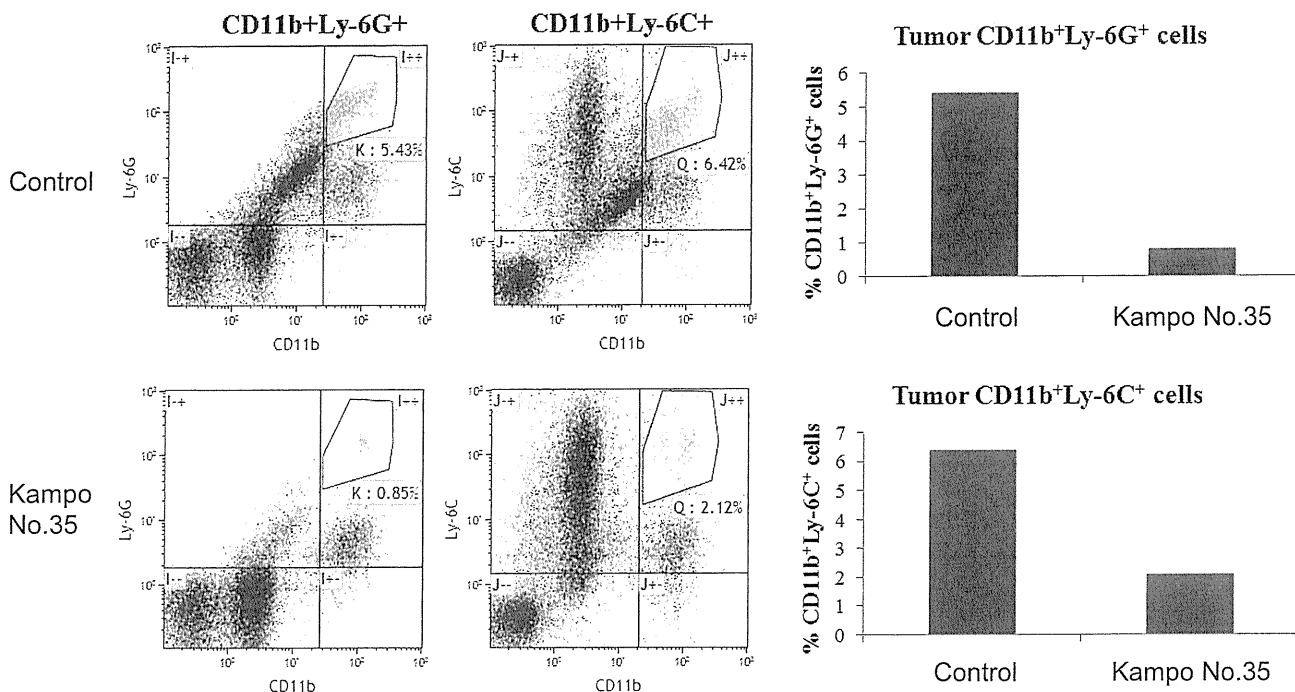


図 29 漢方成分 No.35 投与による腫瘍内 MDSC の割合の変化

## 考察

これまで、漢方成分 No.35 による抗腫瘍効果の様々な分子機序が報告されたが、漢方成分 No.35 による抗腫瘍免疫反応の誘導効果については、未だ明らかにされていない。漢方成分 No.35 の投与は、マウス大腸がん細胞株 CT26 を移植した担がんマウスの腫瘍増殖を抑制した。漢方成分 No.35 による抗腫瘍効果は、腫瘍細胞の増殖抑制や細胞周期停止の誘導、腫瘍細胞アポトーシスの誘導、血管新生の抑制、腫瘍浸潤と転移の抑制など、複数のメカニズムを介して起こりうることを示されている。漢方成分 No.35 は抗炎症効果をもつと報告されているが、ジニトロフロオロベンゼンを投与したマウスの遅延型過敏症アッセイにおいては、免疫反応を増強する。このことから、漢方成分 No.35 と免疫系の相互作用は複雑であることが示唆される。CT26 担がんマウスの脾臓中の CD4<sup>+</sup> T 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞においては、漢方成分 No.35 投与で変化がみられなかったが、腫瘍内の CD8<sup>+</sup> T 細胞の細胞数は漢方成分 No.35 投与により増加した。この結果を支持するものとして、小腸がんを自然発症する遺伝子改変マウスの Min マウスにおいて、漢方成分 No.35 が免疫細胞の誘引と活性化に関連する遺伝子 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4, leukemia inhibitory factor receptor, monocyte chemotactic protein 3) の発現を増加させることが報告されている。

漢方成分 No.35 投与により、腫瘍関連マクロファージ (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) の細胞数は増加したが、同時に、腫瘍中の骨髄由来免疫抑制細胞 (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> および CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup>) の細胞数は減少した。この結果から、漢方成分 No.35 の抗腫瘍効果の一部は、腫瘍微小環境の免疫抑制細胞の減少によるものだと考えられる。

## 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 *in vivo* 作用の検討

これまでの様々な解析から「担がん生体の免疫抑制環境の改善」と「抗腫瘍免疫の増強」に有効だと期待された4つの漢方成分について、担がんマウスモデルでの解析を進めた。

### 4.1) 漢方成分 No.16

昨年度までの解析から、漢方成分 No. 16 は、888mel の IL-10、PK59 の TGF- $\beta$  に対して産生抑制効果を示し、また強い AhR アンタゴニスト活性をもつとともに、Th1 型 T 細胞誘導及び iTreg 誘導を *in vitro* において顕著に抑制する能力を有することを示してきた。また、CT26 と健常マウス脾臓細胞に対しては、細胞毒性が認められないこと、さらには細胞増殖に対しても抑制的な影響がない事を *in vitro* において確認した。

888mel や PK59 のサイトカイン産生を抑制することから、*in vivo* において免疫環境を調整する能力を有すると仮説を立て、担がんマウスモデルに対して漢方成分 No. 16 投与による免疫担当細胞への影響と、抗腫瘍効果の評価を行ってきた。本実験により、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、また免疫細胞解析の結果、CD8<sup>+</sup> T 細胞の割合が増加と、Treg

細胞頻度の減少について傾向が見られたことをこれまでに報告してきた。加えて、投与後の脾臓 T 細胞の抗腫瘍効果の評価においては、漢方成分 No. 16 投与群は対照群と比較し、IFN- $\gamma$  産生量が増加する傾向が見られたことを報告してきた。今年度、*in vivo* での抗腫瘍免疫応答への漢方成分 No. 16 の影響とその作用機構をより詳細に検討した。

## 材料と方法

### 骨髄由来樹状細胞の誘導と漢方成分 No. 16 が成熟化に及ぼす影響の解析

C57BL/6 マウスの骨髄から骨髄細胞を回収し、大腸菌培養ディッシュで  $2 \times 10^5$  細胞個/dish として 10ml の 20ng/ml GM-CSF 入り RPMI1640 で 3 日間培養した。培養開始から 3 日後、10ml の 20ng/ml GM-CSF 入り RPMI1640 を加え、さらに 3 日間培養し非付着性の細胞を未成熟樹状細胞として回収した。

未成熟樹状細胞は、 $5 \times 10^5$  細胞個/dish と大腸菌培養ディッシュに播種し、100ng/ml Poly(I:C)、100ng/ml LPS、100ng/ml R848 または 100ng/ml CpG 入りの RPMI1640 で 2 日間培養し非付着性細胞を成熟樹状細胞として回収した。

漢方成分 No. 16 の樹状細胞成熟化への影響を解析する実験では、成熟樹状細胞の誘導の際に、最終濃度  $10 \mu\text{M}$  となるように漢方成分 No.16 を添加し、成熟樹状細胞の誘導を行った。回収した樹状細胞は細胞表面マーカーの解析をフローサイトメーターを用いて行った。解析に使用した抗体は FITC anti-mouse H-2D<sup>b</sup> Antibody、PE anti-mouse CD83 Antibody、APC anti-mouse CD80 Antibody (BD Biosciences)、PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD11c Antibody、Alexa Fluor® 647 anti-mouse I-A<sup>b</sup> Antibody、APC/Cy7 anti-mouse CD86 Antibody (Biolegend)。また、培養上清に含まれている IL-10、IL-12p70、TNF- $\alpha$  は、BD OptEIA™ Set (BD Biosciences) を用いて測定した。

### 漢方成分 No.16 が樹状細胞に与える影響の解析

脾臓細胞由来樹状細胞もしくは骨髄由来樹状細胞を  $1 \times 10^6$  細胞個/well となるように 96 穴培養プレートに播種し、最終濃度  $10 \mu\text{M}$  となるように漢方成分 No. 16 を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 6 時間インキュベートした。インキュベート後の樹状細胞を 2 回 RPMI1640 で洗浄し、 $1 \mu\text{g/ml}$  CD40L 入り RPMI1640 を加え、48 時間培養した。培養後の上清を回収し、培養上清に含まれている IL-10、IL-12p70、TNF- $\alpha$  を、BD OptEIA™ Set (BD Biosciences) を用いて測定した。

## 結果

我々はこれまでに、漢方成分 No. 16 が細胞内シグナルである ERK や STAT3 が恒常的に活性化している 888mel のサイトカイン産生を抑制することを示してきた。888mel と同様に ERK や STAT3 が恒常的に活性化しているヒト悪性黒色腫細胞株 624mel や 928mel においても、漢方成分 No. 16 は IL-10 の産生を有意に抑制することが確認された (図 3 0A)。

IL-10 は STAT3 や ERK によってその発現が調節されていることが報告されている。そこで、フローサイトメトリーとウェスタンブロッティング法により 888mel での ERK と STAT3 の活性化に対する漢方成分 No. 16 の影響を解析した。この結果、漢方成分 No. 16 添加後 60 分において ERK や STAT3 のリン酸化は阻害された (図 3 0B, C)。

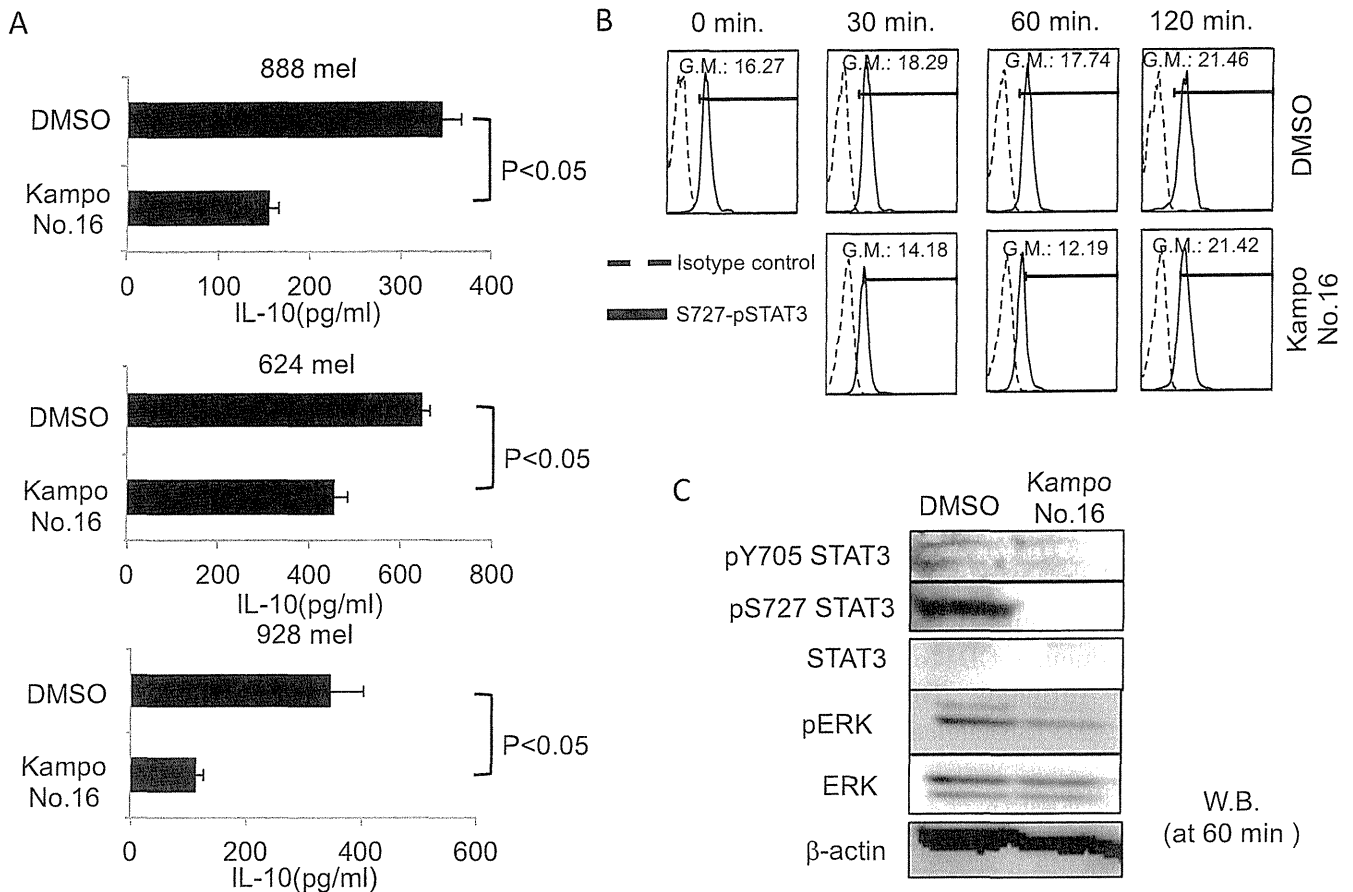


図3 0 漢方成分 No.16 のヒト悪性黒色腫細胞株のサイトカイン産生と細胞内シグナルへの影響

また、同様の現象は一部のマウスがん細胞株でも見られた。マウスがん細胞株 MC38 においては、ERK、STAT3、NF-κB といった細胞内シグナルが恒常的に活性化している。この細胞株に対して漢方成分 No. 16 を作用させると、ERK の阻害剤である U0126 で処理した時と同様に、IL-6 や VEGF といったサイトカインの産生を抑制させることができた (図 3 1 A)。しかしながら、STAT3 阻害剤 stattic や NF-κB 阻害剤 DHMEQ では、顕著なサイトカイン産生の抑制は認められなかった。一方で、ERK や STAT3 の恒常的な活性化が認められるマウス大腸がん細胞 CT26 に対して漢方成分 No. 16 を作用させても、サイトカインの産生を抑制できなかった (図 3 1 B)。すなわち、漢方成分 No. 16 は MC38 においては ERK の阻害を介して免疫抑制性サイトカインの産生を阻害することができる一方、CT26 においてはこれらサイトカインの産生を阻害できない可能性が示唆された。

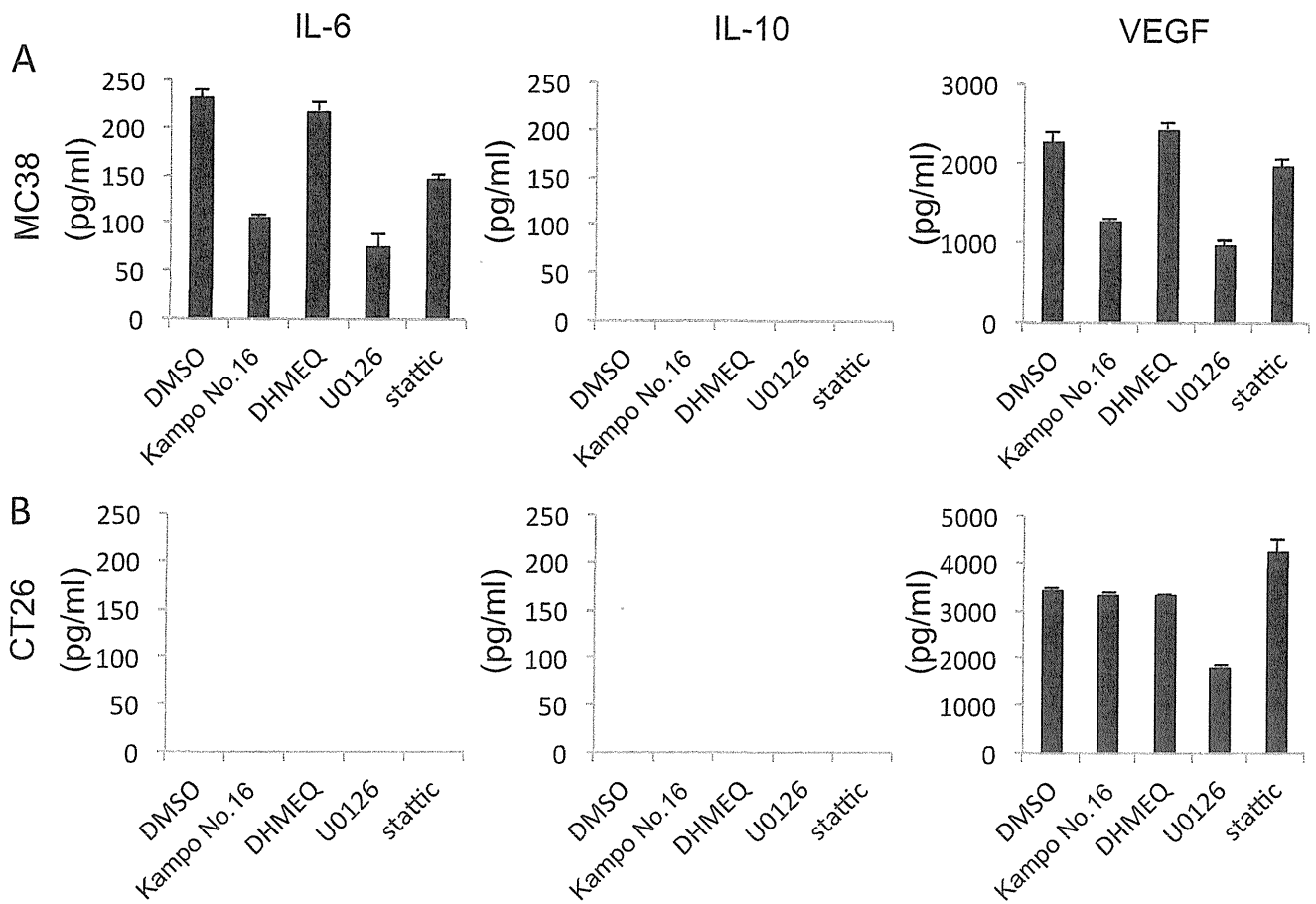


図 3 1 マウスがん細胞株のサイトカイン産生に対する漢方成分 No. 16 の影響

実際、MC38 に *in vitro* で漢方成分 No. 16 添加した後、経時的に ERK のリン酸化状態をウェスタンブロッティングにより評価したところ、添加後 24hr において ERK のリン酸化は阻害された (図 3 2)。

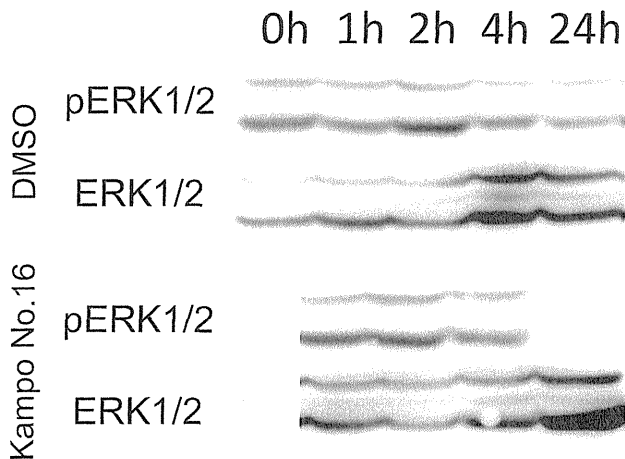


図 3 2 漢方成分 No. 16 による MC38 の ERK1/2 リン酸化阻害

次に我々は担がんマウスにおける *in vivo* での漢方成分 No. 16 の評価を試みた。図 3 1 より、漢方成分 No. 16 には MC38 の免疫抑制性サイトカインを抑制する効果が認められたため、MC38 担がんマウスモデルにおいて、漢方成分 No. 16 を投与し、漢方成分 No. 16 ががん微小環境に及ぼす影響と免疫細胞に対する影響を解析した (図 3 3 A)。しかしながら、同マウスの脾臓細胞から T 細胞を取出し、MC38 の腫瘍抗原ペプチドである gp70 もしくは MC38 に対する抗腫瘍応答を *in vitro* にて確認したところ、共に特異的な IFN- $\gamma$  の産生が見られず (図 3 3 B, C)、したがって、いずれの場合においても特異的な抗腫瘍免疫応答の誘導は確認できなかった。

また、CT26 担がんマウスモデルにおいて、漢方成分 No. 16 を投与し、免疫環境における影響を評価する実

験を行った (図 3 4)。漢方成分 No. 16 を投与した群では、コントロール群と比較して腫瘍増殖を抑制させる傾向が見られた (図 3 4A)。また、同マウスの脾臓細胞から T 細胞を取出し、CT26 に対する腫瘍抗原ペプチドである AH-1 もしくは CT26 に対する抗腫瘍応答を *in vitro* にて確認したところ、共に特異的な IFN- $\gamma$  の産生を確認することができ、特に CT26 に対しては有意にその産生量が増加した (図 3 4B, C)。

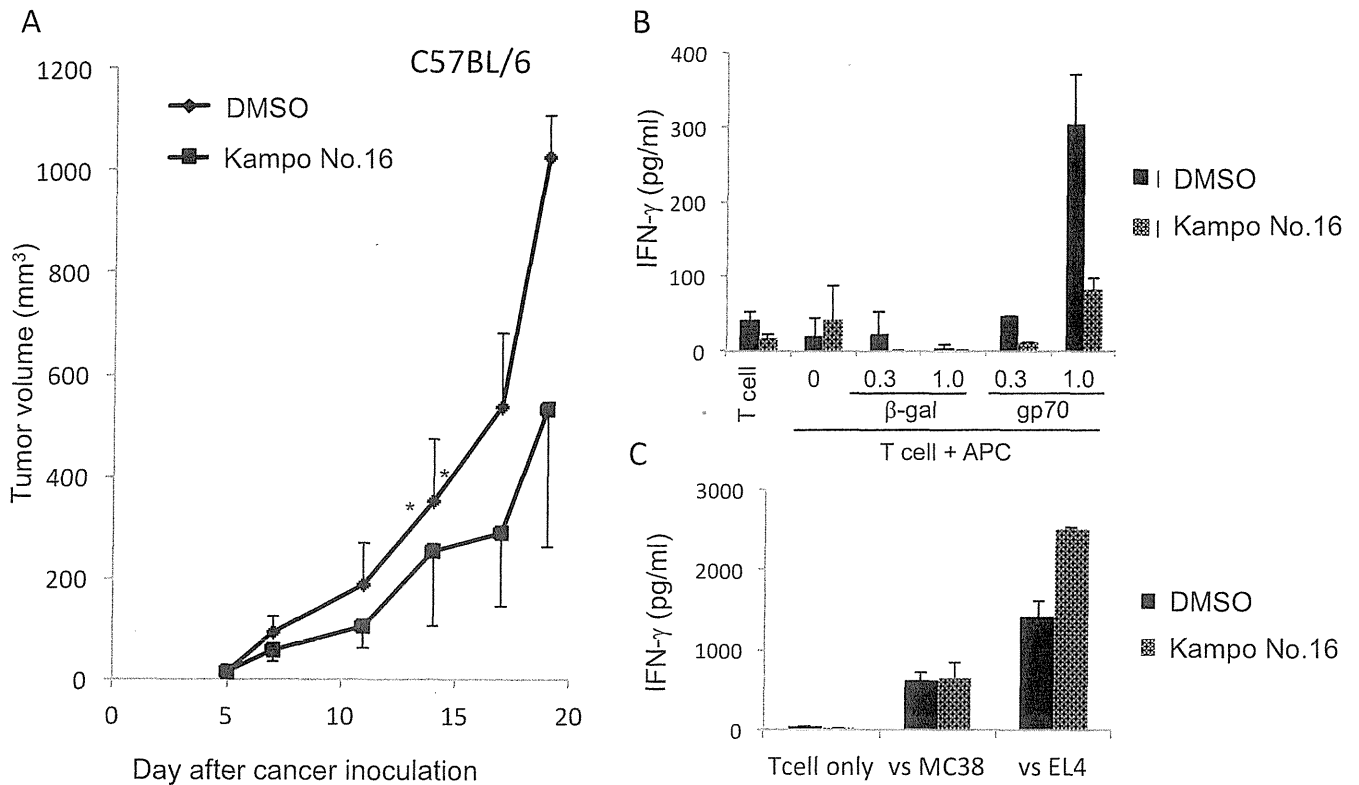


図 3 3 MC38 担がんマウスモデルに対する漢方成分 No. 16 の治療効果

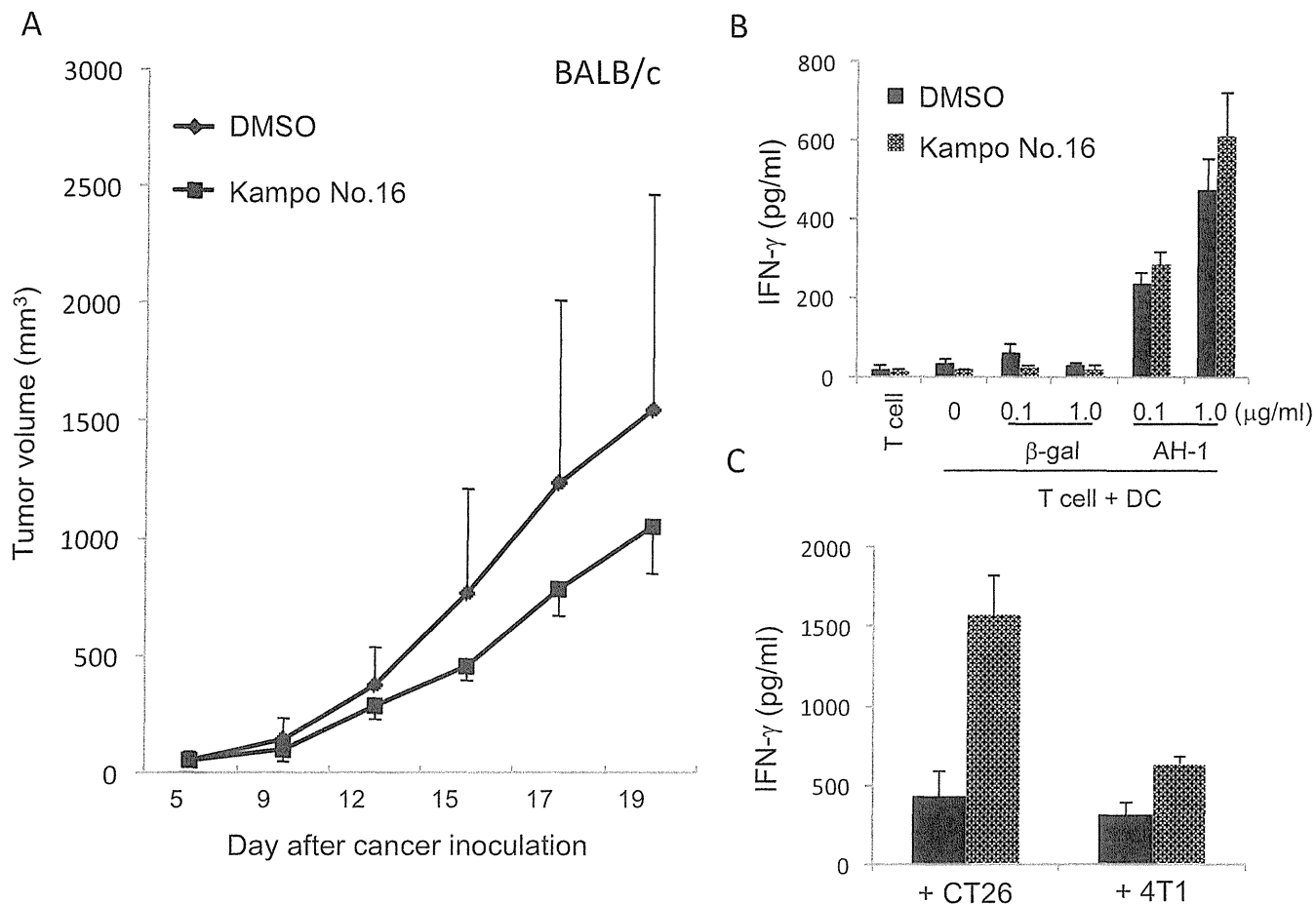


図3 4 CT26 担がんマウスモデルに対する漢方成分 No. 16 の治療効果

図3 4において、抗腫瘍免疫応答が上昇する可能性が示唆されたが、次に漢方成分 No. 16 がどの免疫細胞に作用しているのかを解析するため、CT26 担がんマウスの系において脾臓細胞、腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL)、リンパ節の細胞分画をフローサイトメトリーにより解析した。

脾臓細胞において、コントロール群と比較して、有意に CD8 陽性 T 細胞の割合と細胞数が増加していた。また、CD11c 陽性細胞の割合に上昇傾向が見られ、細胞数は有意に増加していた (図3 5)。

一方で、TIL においては、CD11c 陽性細胞と F4/80 陽性細胞の割合が上昇する傾向が見られた。また、Treg 細胞の割合が減少傾向にあった (図3 5)。

所属リンパ節や非所属リンパ節の解析では、所属リンパ節において NK 細胞の割合の低下が有意に見られたが、CD3 陽性 T 細胞の割合が増加しているためにこのような結果になったと考えられる。また、CD11c 陽性細胞の割合も減少傾向が見られた (図3 6)。

脾臓細胞、TIL のフローサイトメトリーの解析結果から、漢方成分 No. 16 は T 細胞や樹状細胞に影響を及ぼした結果、抗腫瘍免疫が上昇したと推測された。



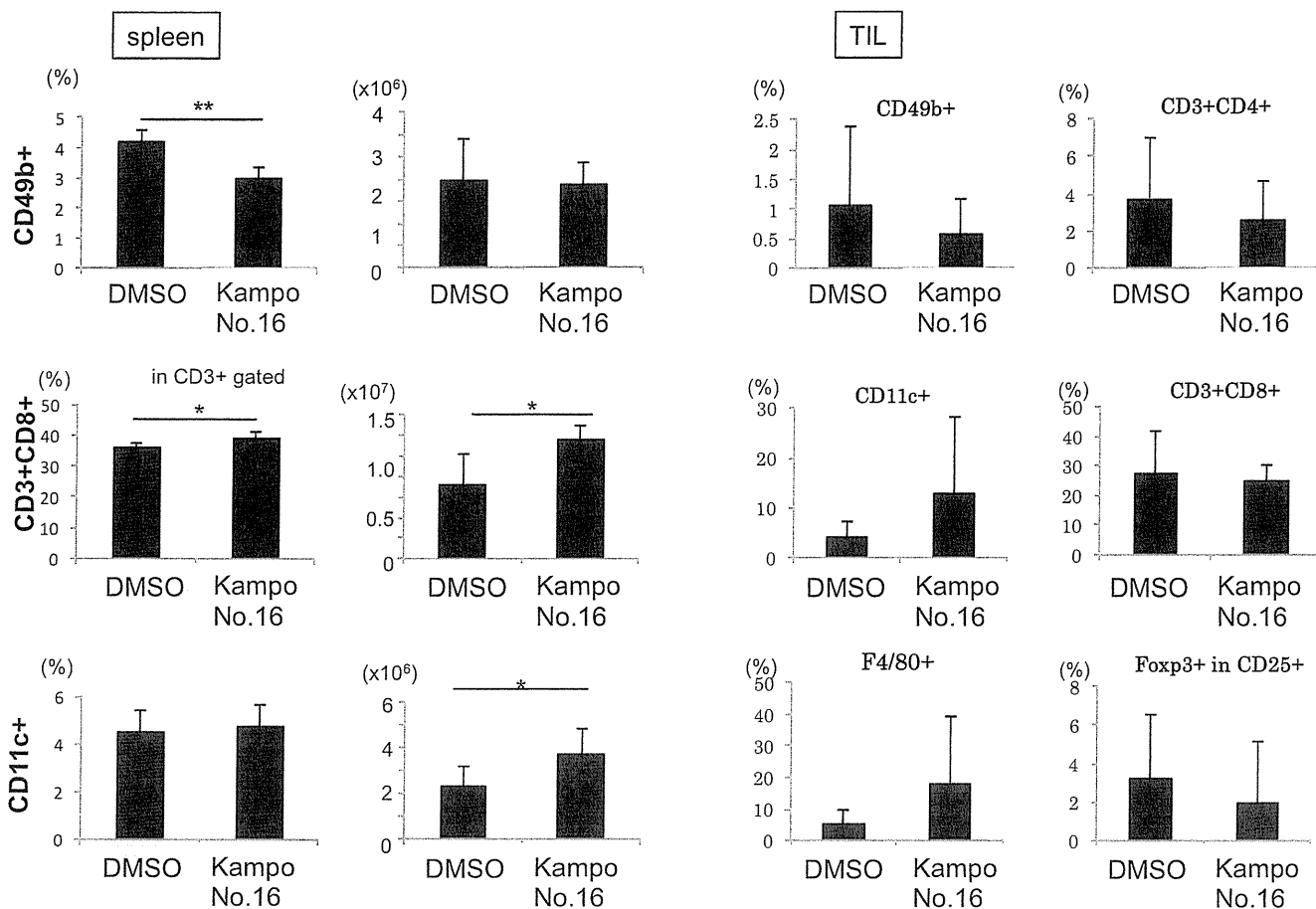


図 3 5 漢方成分 No. 16 の *in vivo*における免疫細胞への影響 1

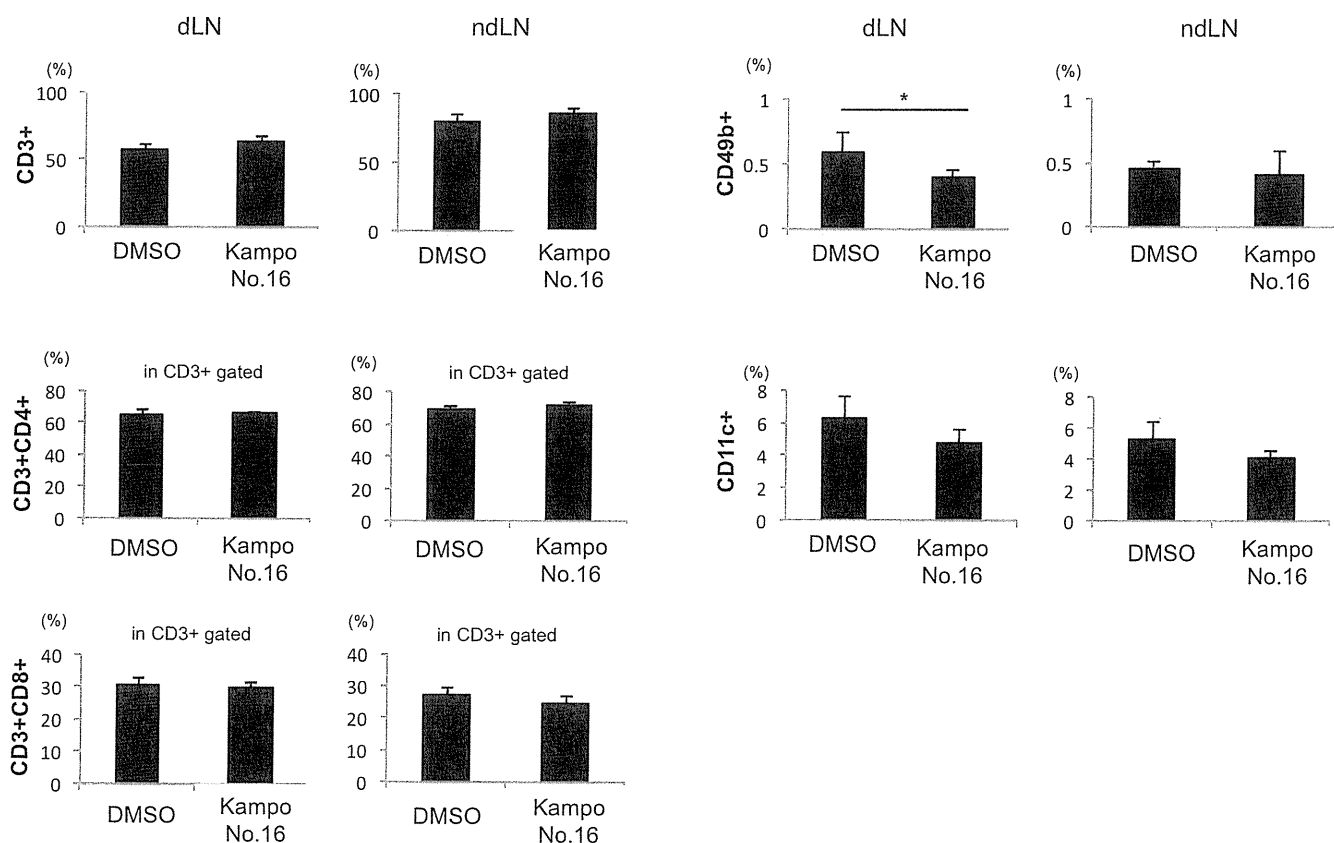


図 3 6 漢方成分 No. 16 の *in vivo*における免疫細胞への影響 2

そこで次に、漢方成分 No. 16 が樹状細胞に与える影響について検討した。骨髓由来樹状細胞の誘導の際に、

様々な成熟化刺激と共に漢方成分 No. 16 を加えて誘導した樹状細胞の表面分子の変化をフローサイトメーターで解析した (図 3 7)。予想に反して、いずれの成熟化刺激においても、漢方成分 No. 16 を加えることで CD83 といった成熟マーカーや T 細胞活性に重要な役割を果たす CD80、CD86 などの共刺激分子の発現が低下するとともに、MHC class II の発現も低下していることが分かった。しかし、誘導された樹状細胞の産生したサイトカインを測定してみると、IL-10 の産生が抑制されており、また、LPS (TLR4) による刺激で誘導した樹状細胞においては、TNF- $\alpha$  の産生が上昇していることが確認された (図 3 8)。

以上のことから、漢方成分 No. 16 は、樹状細胞の共刺激分子の発現は低下させる傾向がみられるものの、免疫抑制性サイトカインである IL-10 の産生を抑える作用や炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の産生を促進させる作用を持つ可能性が示された。

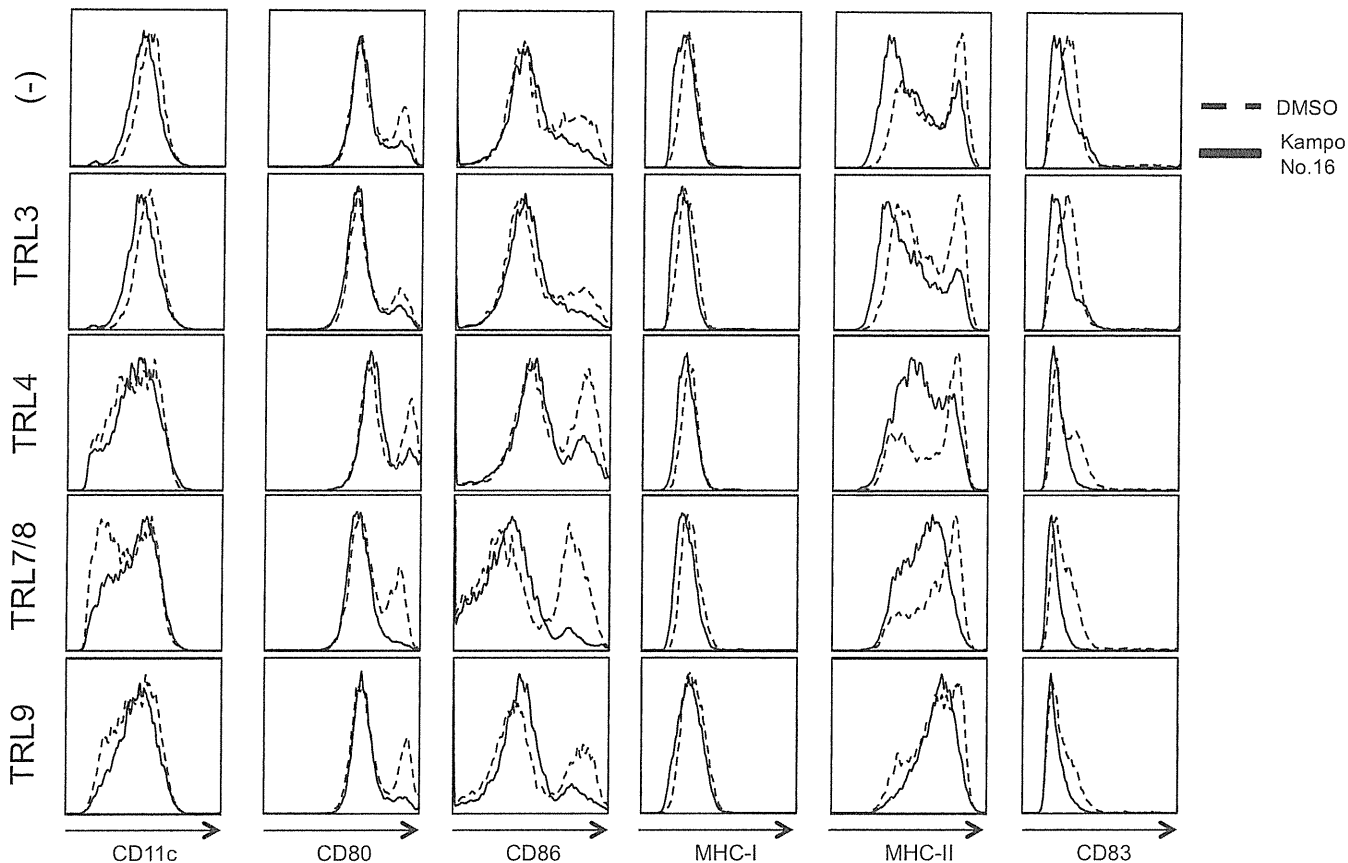


図 3 7 樹状細胞の成熟化における漢方成分 No. 16 の影響

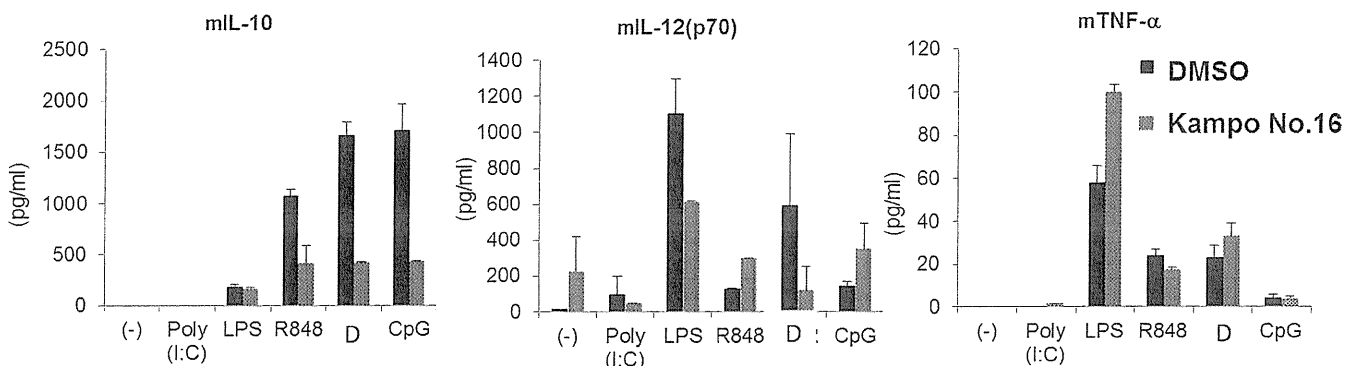


図 3 8 樹状細胞のサイトカイン産生に対する漢方成分 No. 16 の影響

## 考察

これまでの解析から、漢方成分 No. 16 には ERK や STAT3 といった細胞内シグナリングを抑制する働きがあ

ることが示唆された。ERK や STAT3 はがんの増殖のみならず、免疫抑制性サイトカインの産生に関与していることが近年の研究で報告されている。このことから、漢方成分 No. 16 は腫瘍細胞や免疫細胞における免疫抑制性のサイトカインの産生の抑制や、それに付随した免疫抑制環境を改善する可能性があることが示唆された。実際、ヒト悪性黒色腫細胞株からのサイトカイン産生を抑制した (図 3 0)。一方で、漢方成分 No. 16 はがん細胞に対する直接的な作用だけでなく腫瘍微小環境や免疫環境を改善することで、がん免疫を改善する働きが期待できる結果が得られた。すなわち、腫瘍細胞への直接的影響が確認できない CT26 担がんマウスモデルにおいて、腫瘍増殖は抑制され、また抗腫瘍 T 細胞反応は上昇し (図 3 4)、CD8 陽性細胞や CD11c 陽性細胞といった抗腫瘍免疫に重要な役割を持つ細胞集団の割合を末梢において増加させる傾向が認められた (図 3 5)。また、T 細胞活性の抑制に関与する Treg 細胞の割合を有意ではないが減少させていた (図 3 5)。

これらの結果から、漢方成分 No. 16 は ERK, STAT3 活性化を低下させることでがん細胞の悪性形質を軽減するとともに、がん微小環境への何らかの作用を介して CD8 陽性細胞の抗腫瘍免疫応答を上昇させ、その結果腫瘍増殖を抑制することができたと考えられる。後者の機構として、樹状細胞の活性化を介しての変化を考えたが、予想に反して骨髄由来樹状細胞の成熟過程において漢方成分 No. 16 は活性化マーカーの低下を誘導した (図 3 7)。しかしながら、漢方成分 No. 16 は骨髄由来樹状細胞からの IL-10 産生を抑制し、また TNF- $\alpha$  産生を促進することが明らかとなった (図 3 8)。本研究で漢方成分 No. 16 の免疫環境に対する効果がより明らかになることで、樹状細胞ワクチン療法を初めとする免疫細胞療法との併用によるがん治療への応用が期待される。

#### 4.2) 漢方成分 No.19

卵巣明細胞性腺がん患者ではしばしば、IL-6 が血清、腹水中で上昇しており、予後不良因子として知られている。我々は、卵巣明細胞性腺がんでは NF- $\kappa$ B シグナルの活性化で IL-6 が産生され、樹状細胞の機能抑制や、MDSC の活性化が起こり、免疫抑制が誘導されていることを報告した (Nishio et al. *JJ in submission*)。これにより、NF- $\kappa$ B は免疫抑制解除の良い標的となることが分かったが、現在ヒトに安全に投与できる NF- $\kappa$ B 阻害薬は存在しない。前年度までの本研究において、漢方成分 No. 19 は、NF- $\kappa$ B 阻害効果を持つことが判明していたが、漢方成分 No. 19 は不溶性であり、経口摂取時の吸収効率が非常に悪い点が問題であった。今年度、我々は、特殊な加工により吸収性を飛躍的に向上させた漢方成分 No. 19s を企業 A より提供を受ける事が出来た。そこで、本研究では、漢方成分 No. 19s を用いた、卵巣明細胞性腺がんの免疫抑制解除を試みた。

漢方成分 No. 19、漢方成分 No. 19s は *in vitro* にて、ヒト卵巣明細胞性腺がん細胞株 R1、R2、R3、R4 の細胞増殖を高濃度において抑制した (図 3 8 A)。R1、R2、R3 に関しては、細胞増殖に影響を及ぼさない低濃度から IL-6 産生を抑制した (図 3 8 B)。

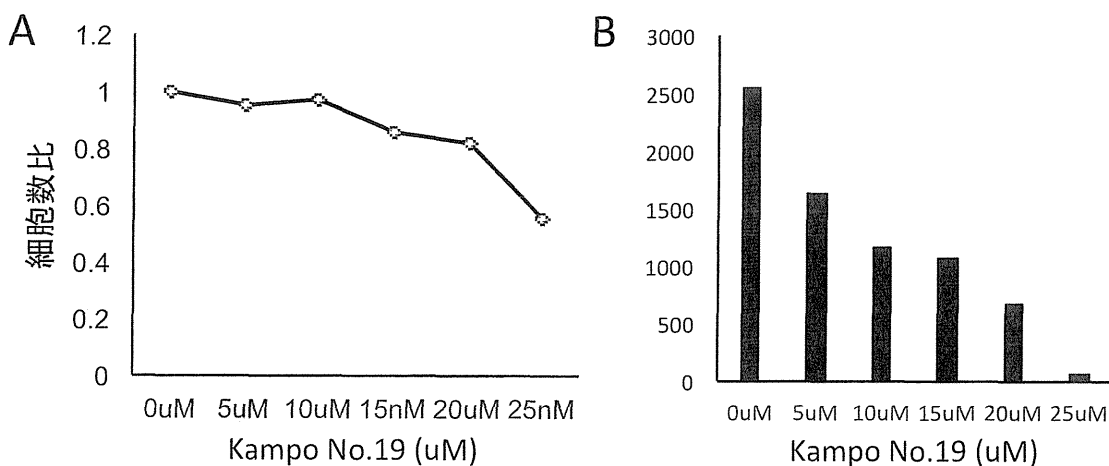


図 3 8 ヒト卵巣明細胞性腺がん細胞株 R3 に漢方成分 No. 19 を *in vitro* で作用させ、3 日後に増殖を WST-1 アッセイを用いて (A)、24 時間後に IL-6 産生を ELISA を用いて (B) 測定した。

次に、ヒト単球由来樹状細胞 (Mo-DC) に対する漢方成分 No. 19 の影響を *in vitro* で検討した。ヒト末梢血中の CD14 陽性細胞から GM-CSF と IL-4 で樹状細胞 (DC) に分化させ、LPS で成熟化させる際に、漢方成分 No. 19 を作用させた。すると、allogeneic MLR (リンパ球混合試験) における DC の T 細胞刺激能は、漢方成分 No. 19 高濃度では抑制されたが、5uM 程度では、影響を及ぼさなかった。以上より、漢方成分 No. 19 の至適濃度を選べば、DC に直接の抑制作用を与えずに、卵細胞がんからの IL-6 の産生を抑制でき、IL-6 による免疫抑制を

解除できる可能性が考えられた。

次に、漢方成分 No. 19s による *in vivo* での免疫抑制解除を検討した。ヒト卵巣明細胞性腺がん細胞株 R3 をヌードマウスに皮下移植し、6 日目より漢方成分 No. 19s の経口投与 (0 mg/kg/day、5mg/kg/day、30mg/kg/day) を開始した。漢方成分 No. 19s 投与 30 分後の平均血中濃度は 5mg/kg、30mg/kg 投与群 で、それぞれ 322 ng/ml、1174ng/ml であった (図 3 9)。なお、ヒトにおいて漢方成分 No. 19s 400mg 投与時の血中濃度は 440 ng/mL (range, 179-1380 ng/mL) と報告されており、さらに現在 1000mg 投与の臨床試験も行われている。よって、今回のマウスモデルにおける投与量は、ヒトにおいても十分に達成可能な投与量であった。

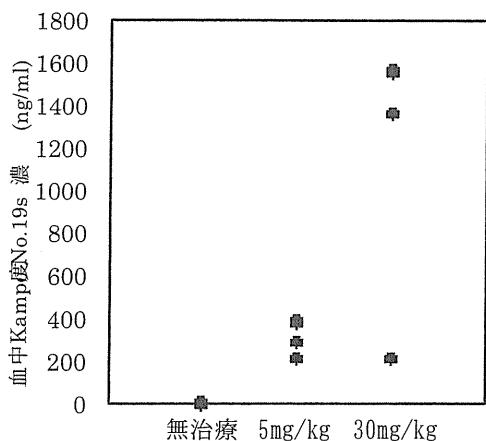


図 3 9 ヒト卵巣明細胞性腺がん細胞株 R3 を移植したヌードマウスに (各群 n=4)、漢方成分 No. 19s を経口投与し、30 分後の血中濃度を測定した。

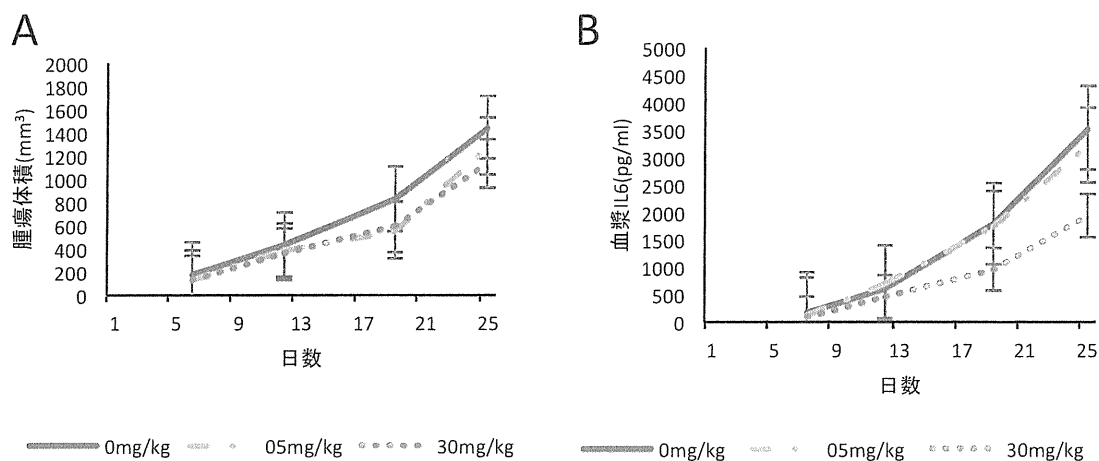


図 4 0 ヒト卵巣明細胞性腺がん細胞株 R3 を移植したヌードマウスに (各群 n=4)、漢方成分 No. 19s を投与し、腫瘍体積 (A) と血漿中のヒト IL-6 濃度 (B) を測定した。(\*<0. 05)

漢方成分 No. 19s 投与によって、腫瘍体積は各投与群間での有意差が見られないが、R3 由来のヒト IL-6 の血漿中濃度は低下した (図 4 0)。26 日目に脾臓、腫瘍組織から DC (CD11c 陽性細胞) を分離し、T 細胞活性を評価したところ、漢方成分 No. 19s 投与による回復が認められた (図 4 1)。また、脾臓、腫瘍内の MDSC (Gr1<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>)、マクロファージ (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) の細胞数及び、CD11b 陽性細胞の Arginase 活性に関しては、漢方成分 No. 19s 投与による変化を認めなかった。