


201208003B

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22年度～24年度 総合研究報告書

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22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 河上裕
平成25（2013）年5月

目次

I. 総合研究報告

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-----	1
河上裕	

II. 各項目の説明

1. 研究対象となる漢方方剤・成分の選択-----	9
2. 漢方処方による免疫改善作用の検討-----	11
2.1) 十全大補湯および小柴胡湯の担がんマウス免疫細胞に対する <i>in vivo</i> 作用	
2.2) 十全大補湯および小柴胡湯の腸管免疫系に対する <i>in vivo</i> 作用	
3. がん細胞と免疫細胞に作用する漢方成分の同定-----	20
3.1) 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-----	21
3.2) 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-----	23
3.3) 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-----	26
3.4) マウス大腸がん細胞からの VEGF の産生を抑制する漢方成分の同定-----	26
3.5) 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-----	27
4. がん細胞と免疫細胞に作用する植物由来エキスの探索-----	29
4.1) 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-----	30
4.2) ヒト悪性黒色腫がん細胞株からの IL-10 産生を抑制する植物由来エキスの同定-----	30
4.3) 制御性 T 細胞の誘導を抑制する植物由来エキスの同定-----	31
5. 同定した漢方成分の標的シグナル・分子の同定-----	33
5.1) Electrophoretic Mobility Shift Assay による NF- κ B 抑制成分の同定-----	34
5.2) Western blotting による STAT3 および ERK 抑制成分の同定-----	35
6. AhR に作用する漢方成分のスクリーニング-----	36
6.1) AhR アンタゴニストのスクリーニングに適したヒトがん細胞株の選定-----	37
6.2) 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-----	39
6.3) XRE レポーターアッセイによるアンタゴニスト活性の強度解析-----	39
6.4) 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-----	40
6.5) 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-----	41
7. AhR アンタゴニストの評価系の確立-----	44
7.1) IL-10 産生性樹状細胞の誘導抑制作用-----	44
7.2) Kynurenine 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-----	44
7.3) AhR 活性を <i>in vivo</i> でモニタリングできるマウス悪性黒色腫細胞の樹立-----	46
8. 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-----	48
9. 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（平成 23 年度）-----	50
9.1) 漢方成分 No.9-----	52
9.2) 漢方成分 No.16-----	56
9.3) 漢方成分 No.17-----	59
9.4) 漢方成分 No.23-----	63
9.5) 漢方成分 No.24-----	67
9.6) 漢方成分 No.25-----	71
9.7) 漢方成分 No.35-----	75
10. 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（平成 24 年度）-----	79
10.1) 漢方成分 No.13-----	80

10.2) 漢方成分 No.14-----	82
10.3) 漢方成分 No.15 -----	85
10.4) 漢方成分 No.21-----	86
10.5) 漢方成分 No.22-----	88
10.6) 漢方成分 No.25-----	90
10.7) 漢方成分 No.35-----	92
11. 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-----	96
11.1) 漢方成分 No.16-----	96
11.2) 漢方成分 No.19-----	104
11.3) 漢方成分 No.23-----	106
11.4) 漢方成分 No.24-----	108
III. 研究成果-----	111
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	114
V. 研究成果の刊行物・別刷-----	116

1. 厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）総合研究報告

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。漢方処方（十全大補湯と小柴胡湯）の経口投与によるがん微小環境の免疫抑制状態改善作用を検討したが、そのような作用は認められるが、強い効果は認められなかったため、漢方処方中の有効な漢方成分の同定を試みた。62種類の漢方成分を用いて、研究者が今までに見いだしてきた適切なヒトがん細胞スクリーニング系を用いて、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、制御性T細胞分化の抑制、Th1分化の維持、AhR(aryl hydrocarbon receptor)活性の抑制を指標として漢方成分を探索し、複数の候補分子の同定に成功した。効果が期待できる幾つか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	(平成 23 年度～平成 24 年度)
藤田 知信、免疫学的解析、慶應義塾大学医学部	(平成 22 年度～平成 24 年度)
工藤 千恵、免疫学的解析、慶應義塾大学医学部	(平成 22 年度～平成 24 年度)
渡辺 賢治、漢方薬の解析、慶應義塾大学医学部	(平成 22 年度～平成 24 年度)
山本 雅浩、漢方薬の解析、慶應義塾大学医学部	(平成 22 年度～平成 24 年度)
今津 嘉宏、漢方薬の解析、慶應義塾大学医学部	(平成 22 年度)
木内 文之、漢方薬の解析、慶應義塾大学薬学部	(平成 22 年度～平成 24 年度)

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ことを試みた。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した。

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試みた。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した。

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した。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した。

具体的には、以下の項目について研究を進めた。

1. 研究対象となる漢方方剤・成分の選択
2. 漢方処方による免疫改善作用の検討
3. がん細胞と免疫細胞に作用する漢方成分の同定
4. がん細胞と免疫細胞に作用する植物由来エキスの探索
5. 同定した漢方成分の標的シグナル・分子の同定

6. AhR に作用する漢方成分のスクリーニング

7. AhR アンタゴニストの評価系の確立

8. 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

9. 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

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

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を優先順位を付けて選択し、品質安定性の優れるツムラの処方を用いることとした。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が市販されていることから、62種類の漢方成分を購入入手した。

担がんマウス免疫細胞に対する漢方処方の *in vivo* 作用の検討では、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。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、ヒト卵巣癌細胞株からの IL-6 産生、ヒト悪性黒色腫細胞株からの IL-10、VEGF 産生、ヒト膵臓癌細胞株からの 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。

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。

ヒト卵巣癌細胞株からの IL-6 産生を抑制する漢方成分のうち 5 種類は卵巣癌細胞株の 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転移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評価系を確立した。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。脾臓の瘍抗原特異的な T 細胞応答の解析を行った結果、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* では AhR 活性依存性に発光することを確認した。

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、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。

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(iTreg)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、効果が期待できる漢方成分について、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ベンチャー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

漢方処方である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、担癌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こ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ので、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、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、やはり、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, $\gamma\delta$ 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の抑制し、さらに、がん細胞の転移・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。

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 アンタゴニスト活性をもつもの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。

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

本研究により、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
4. Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Ueda R, Iwata-Kajihara T, Nishio H, Kawamura N, Kawakami Y. The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies. *Int J Hematol*. 93(3):294-300,2011
5. 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.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. 谷口智憲、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.
5. 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.
6. 河上裕.がん治療ワクチン. 分子予防環境医学.本の泉社.819-826.2010.
7. 河上裕.がん関連微小環境における免疫抑制とその制御. バイオテクノロジーシリーズがん免疫療法-実用化へのチャレンジ- Cancer Immunotherapy; Challenge to Practical Use.シーエムシー出版.158-169.2010.
8. 河上裕.がん免疫ネットワークの総合的制御によるがん治療の可能性.日本臨床.68(6):1094-1099.2010.
9. 河上裕、梶原-岩田知子、宮崎潤一郎、川村直.がんに対する免疫応答の細胞分子機構とその制御法.Mebio.27(12):19-27.2010.
10. 河上裕、工藤千恵、塚本信夫、植田良、住本秀敏、谷口智憲.担がん生体における免疫病態とがん転移.細胞工学.別冊:170-175.2010.

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
3. Yutaka Kawakami, Mechanisms of Immunosuppression Caused by Human Cancer Cells and Their Control for Effective Immunotherapy, 9th China-Japan Joint Conference of Cancer, Shanghai (China) , 2011/12/23、招待
4. Yutaka Kawakami, Hiroshi Nishio, Tomonori Yaguchi, Yoshie Kawase, Azusa Ohizumi, Shinobu Noji, Toshiharu Sakurai, Kazuo Umezawa, Tomonobu Fujita, Role of IL6/IL8-NF-KB AXIS in the Immunosuppression and resistance to immunotherapy, 26th Annual Meeting Society for Immunotherapy of Cancer, North Bethesda, MD, 2011/11
5. Yutaka Kawakami, Hidetoshi sumimoto, Tomoko Iwata-Kajihara, Tomonori Yaguchi, Naoshi Kawamura, Chie Kudo-Saito, Nobuo Tsukamoto., Reversal of cancer induced immunosuppression by targeting altered signaling molecules in cancer cells and immune cells., 14th International Congress of Immunology 2010, Kobe International Convention Center, 2010/8/27
6. Yutaka kawakami, Chie Kudo-Saito, Hidetoshi Sumimoto, Nobuo Tsukamoto, Ryo Ueda, Tomonori Yaguchi., Immunosuppression by human cancer cells and its control for effective immunotherapy., 14th International Congress of Immunology 2010, Kobe International Convention Center, 2010/8/24
7. Hidetoshi Sumimoto, Tomoko Iwata-Kajihara, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyoshi Takeda, Yutaka

Kawakami., STAT3-inactivated dendritic cell vaccination could induce stronger anti-tumor immune responses, 13th 2010 American Society of Gene Therapy, Marriott Wardman park hotel, Washington,DC, USA, 2010.5

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. 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
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. 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
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
8. Yutaka Kawakami, Reversal of Cancer Induced Immune-Suppression by Targeting Signaling Molecules in Cancer and Immune Cells, The 27th Nagoya International Cancer Treatment Symposium, 愛知県がんセンター (名古屋), 2012/2/12
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 河上裕, 工藤千恵, 住本秀敏, 塚本信夫, 岩田知子, 西尾浩, 川村直, 谷口智憲, がん微小環境免疫抑制病態による転移促進とその制御, 第 70 回日本癌学会, 名古屋国際会議場, 2011/10/4
14. 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
15. 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
16. Yutaka Kawakami, Chie Kudo-saito, Hidetoshi Sumimoto, Nobuo Tsukamoto, Ryo Ueda, Naoshi Kawamura, Tomonori Yaguchi., Immunosuppressions by human cancer cells and their control for effective immunotherapy., 第 72 回日本血液学会総会, パシフィコ横浜, 2010/9/24
17. Hiroshi Nishio, Tomonori Yaguchi, Tomonobu Fujita, Kazuo Umezawa, Takashi Iwata, Takuma Fujii, Hidetoshi Sumimoto, Daisuke Aoki, Yutaka Kawakami, Blockade of activated NF- κ B in cancer and immune cells may eliminate immunosuppressive state in human ovarian cancer, 第 69 回日本癌学会, 大阪国際会議場, 2010/9/24
18. Yutaka Kawakami, Chie kudo-Saito, Hidetoshi Sumimoto, Ryo Ueda, Nobuo Tsukamoto,

Tomonobu Fujita, Toshiharu Sakurai, Tomonori Yaguchi, Possible improvement of cancer immunotherapy based on the analyses of anti-tumor immune responses in human., 金沢国際がん生物学シンポジウム, KKR ホテル金沢, 2010/8/29

19. 河上裕、住本秀敏、工藤千恵、塚本信夫、植田良、梶原知子、川村直、谷口智憲, シンポジウム2「次世代がん免疫療法の開発に向けた基礎・応用研究「がん免疫逃避機構とその制御」, 第14回日本がん免疫学会, KKR ホテル熊本, 2010/7/23
20. 西尾浩、谷口智憲、岩田卓、桜井敏晴、塚本信夫、工藤千恵、藤田知信、河上裕, 卵巣癌におけるNF- κ Bシグナルの亢進は、IL-6の産生およびMDSCの誘導により、免疫抑制に関与する, 第14回日本がん免疫学会, KKR ホテル熊本, 2010/7/23
21. 河上裕, がん関連微小環境における免疫抑制病態とがん細胞の免疫抵抗性の分子機構の解明とその制御, 第19回日本癌病態治療研究会, 東京ステーションコンファレンス, 2010/7/1

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. 各項目の説明

1. 研究対象となる漢方方剤・成分の選択

「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」(H22-創薬総合-一般-003)を実施するに際し、「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」という作用をスクリーニングの目標に設定した。混合物である漢方方剤から生理活性を指標に単一の有効成分を単離することはきわめて困難であることがこれまでの経験から分かっているため、方剤から有効成分を単離する方法だけでなく、最初から入手可能な精製標品からのスクリーニングを重視した。すなわち、漢方方剤の *in vivo* スクリーニングと、漢方成分精製標品の *in vitro* スクリーニングを同時に開始した。多数の漢方方剤の中から、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方剤を、優先順位を付けて選択した。

漢方センター研究者と文献調査等を行い、本研究の目的に合う処方として、十全大補湯、小柴胡湯、補中益気湯、大建中湯、黄連解毒湯、五苓散、桃核承気湯、防風通聖散、防己黄耆湯が候補としてあがり、その構成生薬を再確認した。(表)

	処方構成生薬（「新一般用漢方処方の手引き」より）								
	防己黄耆湯	防風通聖散	十全大補湯	大建中湯	桃核承気湯	五苓散	補中益気湯	黄連解毒湯	小柴胡湯
甘草	○	○	○		○		○		○
生姜	○	○		○			○		○
白朮	○ (蒼朮可)	○	○ (蒼朮可)				○ (蒼朮可)		
蒼朮						○ (白朮可)			
人參			○	○			○		○
黄耆	○		○				○		
黄芩		○						○	○
桂皮			○		○	○			
大棗	○						○		○
当歸		○	○				○		
芒硝		○			○				
山梔子		○						○	
芍薬		○	○						
川芎		○	○						
大黄		○			○				
茯苓			○			○			
黄柏								○	
黄連								○	
滑石		○							
桔梗		○							
荊芥		○							
柴胡							○		○
山椒				○					
熟地黄			○						
升麻							○		
石膏		○							
沢瀉						○			
猪苓						○			
陳皮							○		
桃仁					○				
膠飴				○					
薄荷		○							
半夏									○

防己	○								
防風		○							
麻黄		○							
連翹		○							

これらの候補処方の中でも、十全大補湯ではマクロファージ・NK細胞活性化が、小柴胡湯、補中益気湯、柴朴湯、柴苓湯などはTh1活性化が、四君子湯、六君子湯などはTGFβ活性化抑制などの本研究の目的に合致する研究報告が存在する。しかし、最近のがん免疫学の進歩を考慮した解析はまだ十分に行われていない。

この中で、十全大補湯は臨床でがん治療にも用いられており、特に、化学療法などの治療後の免疫低下状態におけるマクロファージなどの自然免疫系の免疫細胞の賦活作用が報告されており、本研究における良い候補となる。また、小柴胡湯も、マクロファージやB細胞などの賦活作用が報告されており、本研究の候補となる。したがって、まずは、この2処方から *in vivo* スクリーニングを開始した。

同じ名前の方剤でも処方により生薬の配合が異なることが知られているので、本邦で最も多く使用され品質安定性を重視しているツムラの処方を用いることとした。平成22年8月25日に株式会社ツムラに試験物質提供に関する契約書を締結し、非臨床用試験物質提供依頼を提出し、ツムラ漢方処方の十全大補湯、小柴胡湯、補中益気湯、大建中湯エキス末を入手した。

漢方成分物質の選択

入手可能な漢方成分物質の調査を行い、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が市販されていることから、62種類の漢方成分を購入した。

さらに、各処方における成分の含有について調査した。(以下に、十全大補湯と小柴胡湯に含有される生薬と化合物をあげる(表)。

十全大補湯									
黄耆	formononetin	astragaloside I		astragaloside II		astragaloside III		astragaloside IV	calycosin
桂皮	cinnamic aldehyde		epicatechin		catechin		cinnamic acid		procyanidin B-2
地黄	catalpol		stachyose						
芍薬	paeoniflorin		albiflorin		paeonol				
川芎	butylidenephthalide								
蒼朮	atractylodin		β-eudesmol						
当帰	butylidenephthalide		scopoletin		xanthotoxin		bergapten		
人參	ginsenoside Rb1		ginsenoside Rg1		ginsenoside Rc		ginsenoside Rd		
茯苓									
甘草	liquiritigenin		glycyrrhizin		isoliquiritigenin				

小柴胡湯									
柴胡	saikosaponin b2		saikosaponin b1		saikosaponin a		saikosaponin d		
半夏	homogentisic acid								
黄芩	baicalin		baicalein		wogonin	skullkapflavone I		chrysin	Benzoylacetone Benzylideneacetone
大棗	betsulinic acid		oleanolic acid		cyclic AMP				
人參	ginsenoside Rb1		ginsenoside Rg1		ginsenoside Rc		ginsenoside Rd		
甘草	liquiritigenin		glycyrrhizin		isoliquiritigenin				
生姜	[6]-gingerol		[6]-shogaol						

2. 漢方処方による免疫改善作用の検討

2.1) 十全大補湯および小柴胡湯の担がんマウス免疫細胞に対する *in vivo* 作用

材料と方法

マウスモデル

5x10⁵–1x10⁶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(2mg/g/day)経口投与し、終了時まで投与を継続した。対照群は滅菌水のみとした。体重、腫瘍径を経時的に測定し、7日目と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。試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

小柴胡湯と十全大補湯(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。

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、腸管膜リンパ節、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して、フローサイトメトリー(BD FACSCalibur)にて解析した。細胞はFITC, PE, PerCP-Cy5.5 およびAPCでラベルした抗CD3, CD4, CD8, NK1.1, TCR β , TCR $\gamma\delta$, CD11b, Gr-1, B220, CD11c, I-Ab, CD86, PD-L1, CD25, Foxp3で染色し、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した(BD *Cytofix*/Cytoperm)。

結果

① 十全大補湯

i) マウスの体重、腫瘍径の変化

マウス悪性黒色腫 B16 細胞を C57BL/6 マウス腹側の皮下に移植し、十全大補湯、あるいは対照群として水を経口投与したマウスで、経時的に体重と腫瘍径を測定したところ、十全大補湯を投与したマウスは計測最終日まで体重を維持し、投与しなかった群では腫瘍の大きさが増すにつれ、若干体重が減る傾向にあったが、2群の間に有意な差は認められなかった(図 1a)。腫瘍径の大きさも、十全大補湯を投与したマウスは、投与しなかった群に比べ小さい傾向があったが、中には大きく増殖したマウスもあり、投与しなかった群との有意差は認められなかった(図 1b)。これより、十全大補湯は B16 担癌マウスモデルでは、有意ではないが、若干腫瘍の増殖を抑える傾向が認められた。

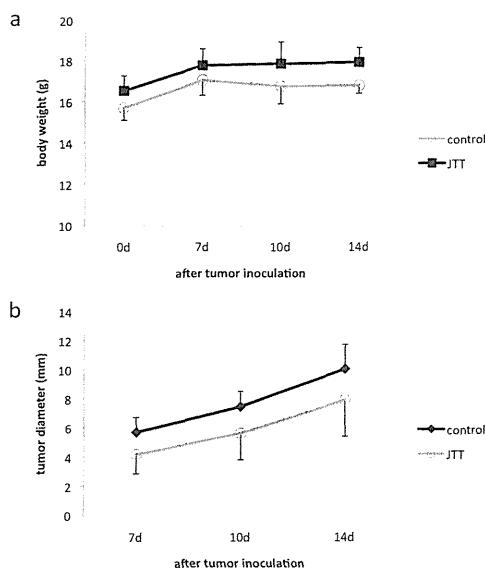


図 1. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植における十全大補湯 (JTT) の効果
a. 腫瘍皮下移植後の体重の変化、および b. 腫瘍径の変化

ii) 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、7 日目と 14 日目に脾臓、鼠径リンパ節、腸管膜リンパ節、腫瘍を取り出し、免疫細胞分画の差異を比較検討した。それぞれの組織において、CD4⁺、CD8⁺、 $\gamma\delta$ T 細胞の分画には十全大補湯を投与したマウスとしなかったマウスとで違いは見られなかったが、NK 細胞分画において投与したマウス群で投与後 7 日目と 14 日目の両方で増加傾向が認められた (図 2.a, b, c)。また、脾臓において、7 日目に CD11b⁺Gr-1⁺MDSC が対照群では増加したが、投与群では低いままであった (図 3)。他の樹状細胞や Treg 細胞には違いは認められず (データは示さず)、腫瘍における細胞分画にも特別な差はなかった (データは示さず)。これらの結果より、十全大補湯は、一部の抑制性細胞の増加を抑制することで、抗腫瘍応答に働いている可能性が示唆された。

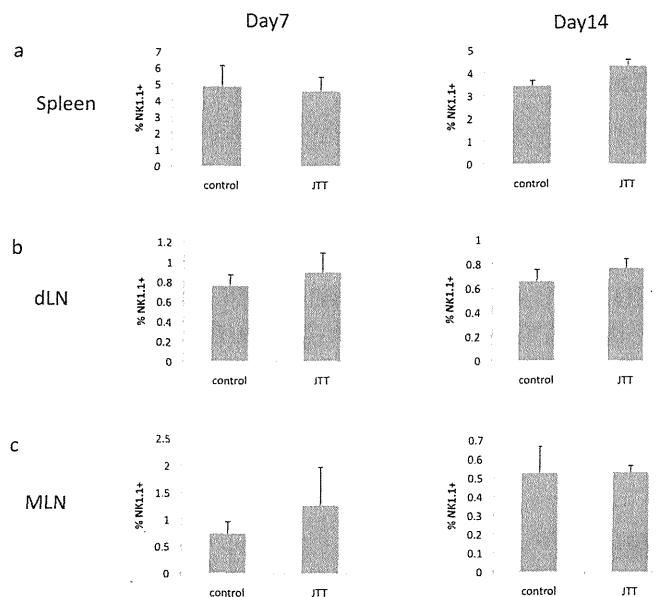


図 2. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植における十全大補湯 (JTT) の免疫細胞に与える影響
a. 脾臓、b. 腫瘍近傍鼠径リンパ節、c. 腸管膜リンパ節における NK 細胞の割合

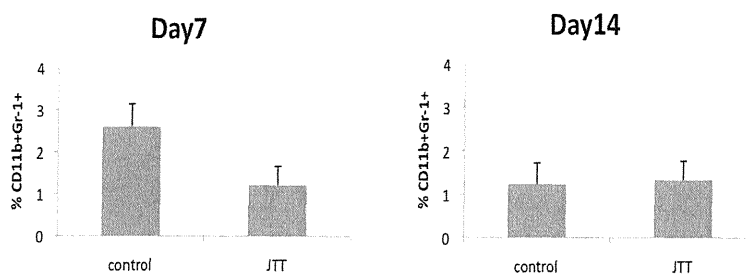


図 3. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植における十全大補湯 (JTT) の脾臓 MDSC の割合の変化

② 小柴胡湯

i) マウスの体重、腫瘍径の変化

マウス悪性黒色腫 B16 細胞を C57BL/6 マウス腹側の皮下に移植し、小柴胡湯あるいは対照群として水を経口投与したマウスで、経時的に体重と腫瘍径を測定したところ、十全大補湯で見られたような傾向も、小柴胡湯では見られず、違いはほとんど見受けられなかった (図 4a,b)。小柴胡湯は B16 原発腫瘍の増殖を抑制する作用はないと思われた。

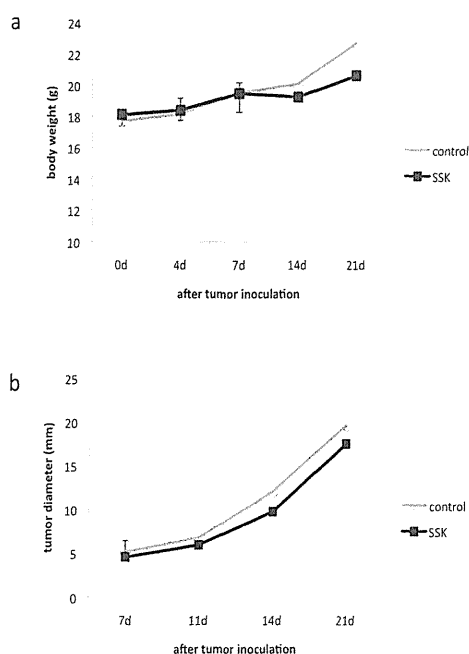


図 4. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植における小柴胡湯 (SSK) の効果
 a. 腫瘍皮下移植後の体重の変化、および b. 腫瘍径の変化

ii) 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 細胞を側腹の皮下に移植し、小柴胡湯を経口投与後 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た。脾臓において CD4⁺、CD8⁺、 $\gamma\delta$ T 細胞の分画には小柴胡湯を投与したマウスとしないマウスとの間に違いはなかったが(図 5a)、投与 4 日目に NK1.1⁺NK 細胞(図 5b)、CD11c⁺樹状細胞の割合が少し増加し(図 5c)、逆に Foxp3⁺Treg 細胞が少ない傾向を示した(図 5d)。また腫瘍近傍の鼠径リンパ節と反対側のリンパ節の両方で、投与したマウスでは CD8⁺T 細胞が増加していた(図 6)。投与 7 日目にも投与したマウスの脾臓で NK 細胞が多く(図 7b)、CD11b⁺Gr-1⁺骨髄由来抑制性細胞 (MDSC) が対照群で増加していたのに比べて少なかった(図 7c)。腸管膜リンパ節と腫瘍においては特に違いはみとめられなかった(データは示さず)。これらより、小柴胡湯は、抗腫瘍性の NK 細胞と CD8⁺T 細胞の増加、さらに、MDSC や Treg などの免疫を負に制御する細胞の増加の抑制が見られ、全体的に、抗腫瘍効果増強作用をもつことが示唆された。

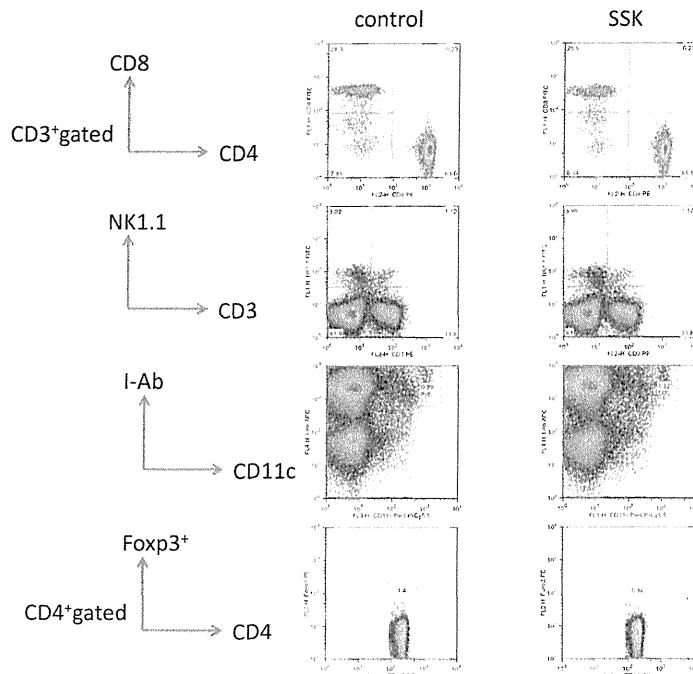


図 5. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植における小柴胡湯 (SSK) の脾臓免疫細胞に与える影響

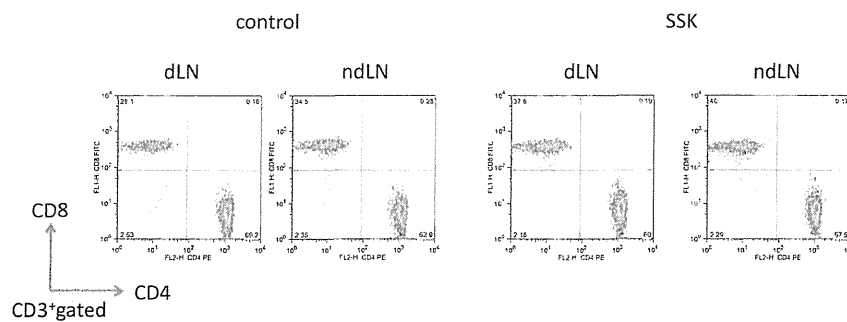


図 6. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植 4 日目の、小柴胡湯 (SSK) の腫瘍近傍 (draining LN) および反対側鼠径リンパ節 (non-draining LN) に与える影響

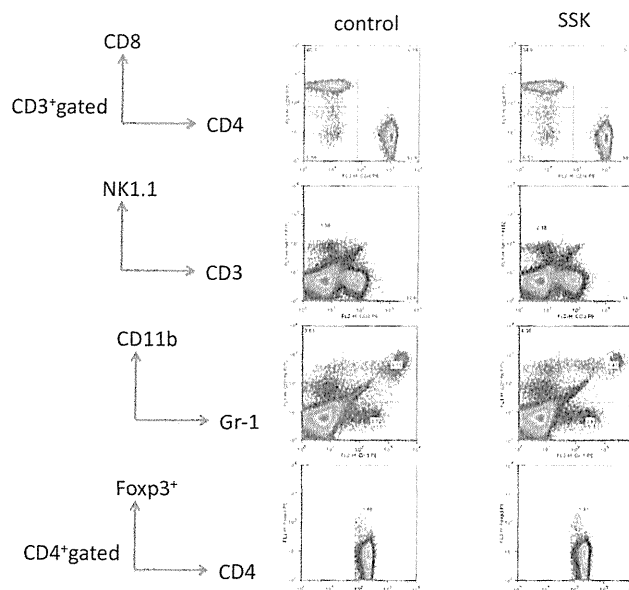


図 7. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植 7 日目の、小柴胡湯 (SSK) の脾臓免疫細胞に与える影響

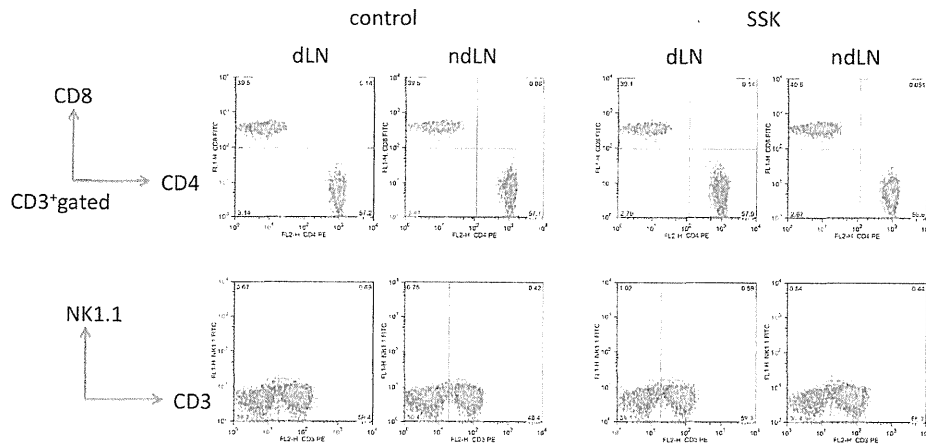


図 8. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植 7 日目の、小柴胡湯 (SSK) の腫瘍近傍 (draining LN) および反対側鼠径リンパ節 (non-draining LN) に与える影響

iii) 小柴胡湯投与期間延長の効果

i)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た。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。

5×10^5 個の B16 を C57BL/6 マウス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 (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 9 a)。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 9 b, c)、NK 細胞分画の割合も高い傾向にあった(図 10 a, 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 10 c, d)。また、i)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、強力な抗腫瘍効果増強作用は確認できなかった。

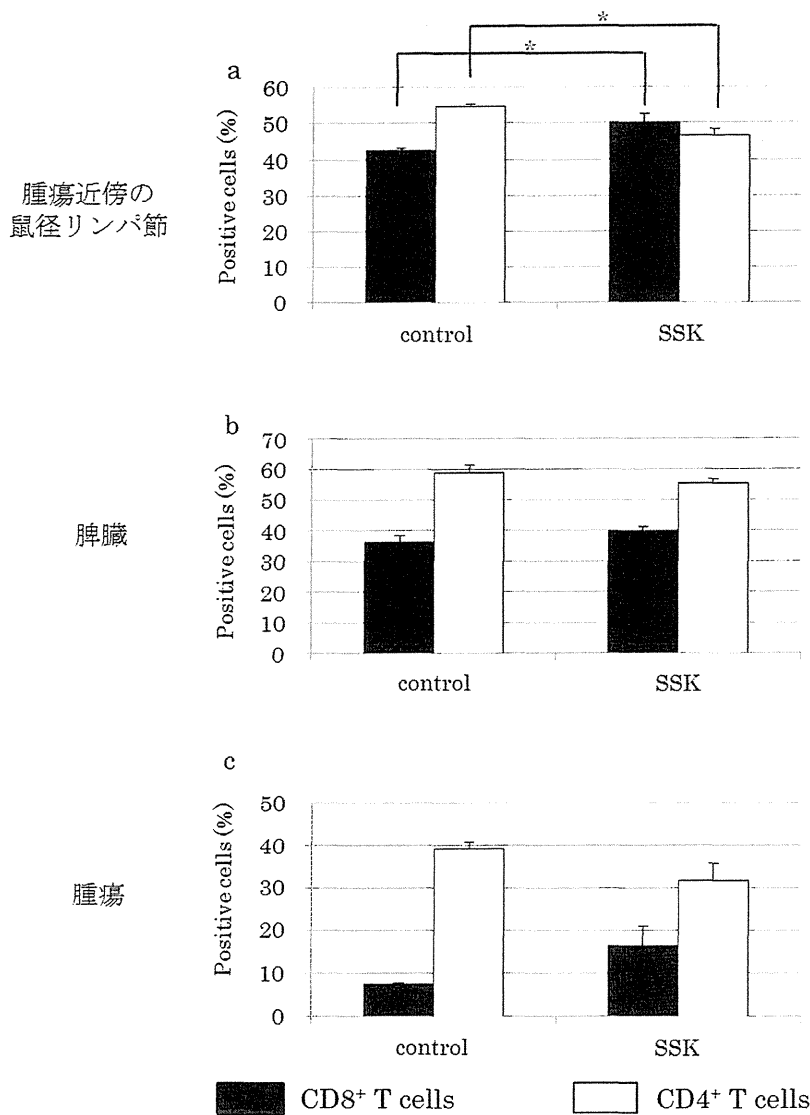


図9 マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植において小柴胡湯(SSK) が CD4⁺、CD8⁺ T 細胞に与える影響
 a) 小柴胡湯投与 14 日目の腫瘍近傍の鼠径リンパ節、b) 脾臓、c) 腫瘍における CD3⁺ T 細胞中の CD4⁺、CD8⁺ T 細胞の割合 *p<0.05

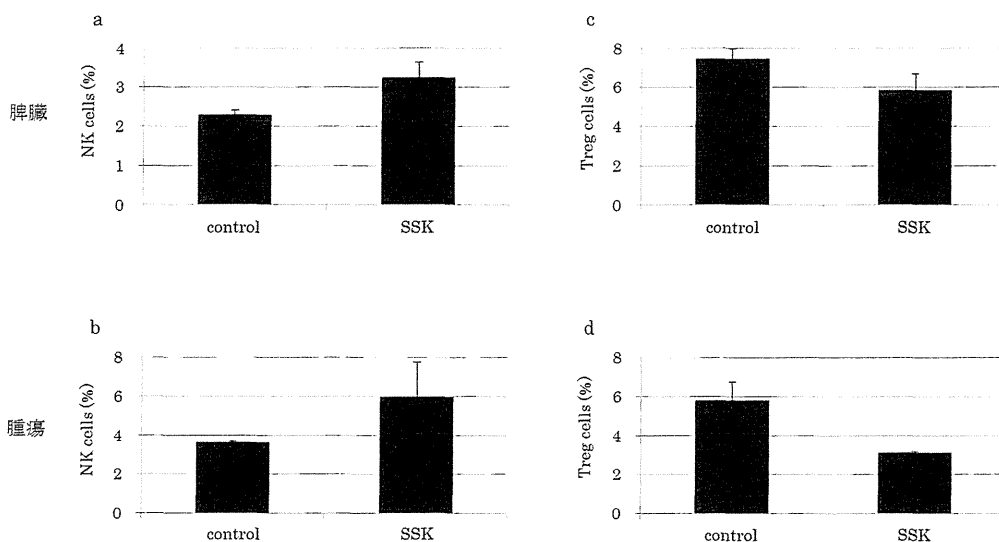


図10 マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植において小柴胡湯(SSK) が NK 細胞、Treg 細胞に与える影響
 a) 小柴胡湯投与 14 日目の脾臓、b) 腫瘍における CD3⁻ NK1.1⁺ NK 細胞の割合
 c) 小柴胡湯投与 14 日目の脾臓、d) 腫瘍における CD4⁺ T 細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 細胞の割合