

## 考察

十全大補湯経口投与において、B16 悪性黒色腫モデルにおいて見られた変化は、抗腫瘍効果が期待できる CD8<sup>+</sup>T 細胞と NK 細胞の割合の増加と、免疫抑制性に働く Myeloid-derived suppressor cell (MDSC) と Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞の減少である。T 細胞応答などの抑制作用をもつ Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞は、多くのヒトがん組織やリンパ節での増加が認められており、担がん生体の免疫抑制病態に関与する重要な細胞である。MDSC は腫瘍細胞由来の IL-10, TGF- $\beta$ , IL-6, VEGF, GM-CSF, PGE2 のような各種免疫抑制因子が骨髄の common myeloid precursor に作用して誘導される Treg 細胞と双璧をなす強力な多様な免疫抑制細胞である。末梢血中から移行してがん組織内、リンパ組織内に集積する。MDSC は多くの免疫抑制因子を産生して T 細胞不応答を引き起こし (anergy)、また Treg を誘導する。十全大補湯は、腫瘍増殖を抑える程の効果は見られなかったが、これら免疫抑制性細胞の割合を減少させることにより、担がん生体の免疫抑制環境を改善して、その併用により、免疫療法などのがん治療の効果を改善できる可能性がある。また、小柴胡湯経口投与においても、B16 悪性黒色腫モデルにおいて見られた変化から、十全大補湯と同様な、抗腫瘍性の CD8<sup>+</sup>T 細胞と NK 細胞の増強作用と、MDSC と Treg 細胞の抑制作用をもつ可能性が示唆された。

小柴胡湯については、投与期間を延長してその影響を解析したが、マウスの体重と腫瘍径については小柴胡湯による B16 原発腫瘍の増殖を抑制する作用は認められなかったことから、小柴胡湯単独投与でのがんに対する直接的な傷害作用は期待できないと考えられる。一方、免疫細胞への影響として、小柴胡湯投与 14 日目において、CD8<sup>+</sup>T、NK 細胞の割合は高く、Treg 細胞の割合は低いといった傾向が見られた。有意差が出るほどの差は認められなかったため、免疫を介する強力な抗がん作用は期待できないものの、連日内服が可能な小柴胡湯を免疫賦活剤として補助的に使用し、時間的間隔のある化学療法や免疫療法と組み合わせることによって、包括的な抗がん作用が得られる可能性はある。

### 2.2) 十全大補湯および小柴胡湯の腸管免疫系に対する *in vivo* 作用

消化管粘膜固有層では、Treg 細胞、Th17 細胞、 $\gamma\delta$ 細胞、Th1 細胞、Th2 細胞、IgA 産生 B 細胞など多様な免疫細胞が存在し、ユニークで複雑な免疫系を形成している。これら免疫細胞の多くは、腸内フローラによりその分化機能が制御されており、消化管粘膜組織のみならず、全身臓器の免疫ホメオスタシスにも貢献することが最近分かってきた。特に、粘膜固有層には、Treg 細胞や Th17 細胞や樹状細胞が多く存在し、腸内細菌との相互作用による、消化管粘膜免疫ホメオスタシスに重要である。腸管の樹状細胞やマクロファージには特有のサブセットが存在し、Treg 細胞や Th17 細胞の制御に関与している。消化管粘膜下で活性化されたリンパ球は腸間膜リンパ節 (MLN) を経由し、リンパ行性に胸管へ移行する。さらに血流に乗って全身を循環した後、パイエル板の近傍、あるいは遠隔の腸管粘膜固有層へとホーミングする。最近、このような腸管免疫系が局所のみならず全身性の免疫応答にも影響を与えていることが分かってきた。例えば、腸内細菌由来の分子が腸管免疫に作用し、その結果、全身性の自己免疫応答に影響を与えることが判明した。漢方は、経口投与されて、腸管免疫に作用を及ぼすことが分かっている。したがって、漢方は、腸管免疫への作用を介して、全身性の抗腫瘍免疫応答に作用する可能性がある。特に、腸管に多数存在する Treg などは、がん組織や所属リンパ節などのがん微小環境で免疫抑制病態に関与する重要な細胞であり、腫瘍免疫への漢方の作用解明において、腸管免疫への漢方の作用を検討することは重要である。

## 材料と方法

### マウスモデル

5x10<sup>5</sup>–1x10<sup>6</sup> 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 (2 mg/g/day)、試験終了時まで経口投与した。対照群は滅菌水のみとした。慶應義塾大学医学部動物実験委員会承認のもとに本研究を実施した。

### 漢方方剤

小柴胡湯と十全大補湯の 2 種漢方方剤 (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。

### 小腸粘膜固有層細胞の分離

それぞれのマウスの小腸を摘出して、1.5%FBS 加 Hank's 培地で洗浄して腸内容物を取り除いた。取り出した小腸は細かく刻み、1mM DTT, 5mM EDTA を加えた Hank's 培地で 37°C, 30 分振盪した。上皮を剥がした後に 1mg/ml Collagenase A, 0.1mg/ml DNase I を加えた Hank's 培地に置いて 37°C, 1 時間振盪した。メッシュを通した組織を 40%Percoll に浮遊させ、70%Percoll の上に重層し 20min 遠心した。境界面の細胞を回収し、小腸粘膜固有層細胞とした。

### フローサイトメトリー解析

C57BL/6 マウスの小腸粘膜固有層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) で測定し、FlowJo (TreeStar Inc.) にて解析を行った。細胞は FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC ラベルされた抗 CD3, CD4, CD8, NK1.1, CD11c, CD103, Foxp3 抗体 (BD Pharmingen) で染色した。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行った (BD Cytotfix/Cytoperm)。

## 結果

### 小腸粘膜固有層における免疫細胞分画の変化

#### ① 十全大補湯

マウス悪性黒色腫 B16 細胞を側腹の皮下に移植し、十全大補湯あるいは対照群として水を経口投与し、7 日目と 14 日目のマウスの小腸粘膜固有層の細胞の割合の変化を調べたところ、十全大補湯を投与したマウスでは 7 日目には CD8<sup>+</sup>T 細胞の割合がコントロールマウスより多く (図 1b)、また Treg 細胞を誘導する CD103<sup>+</sup>DC が少ないことが見られた (図 1c)。しかしながら、Treg 細胞には有意な差は無かった (図 1d)。また、7 日目に見られた変化は、14 日目には見られなかった (図 2a,b,c,d)。これらのことから、十全大補湯は粘膜固有層の CD8<sup>+</sup>T 細胞を増加させて、CD103<sup>+</sup>DC を減少させることにより、腸管において抗腫瘍免疫に有用な免疫状態を誘導する可能性が示唆された。

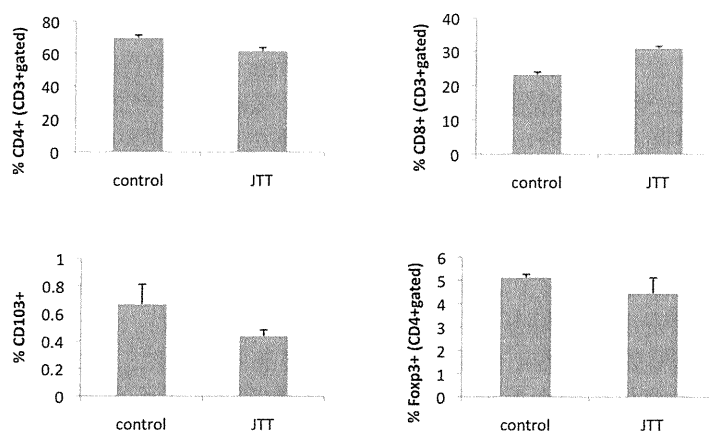


図 1. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植 7 日目の、十全大補湯 (JTT) が小腸粘膜固有層免疫細胞に与える影響

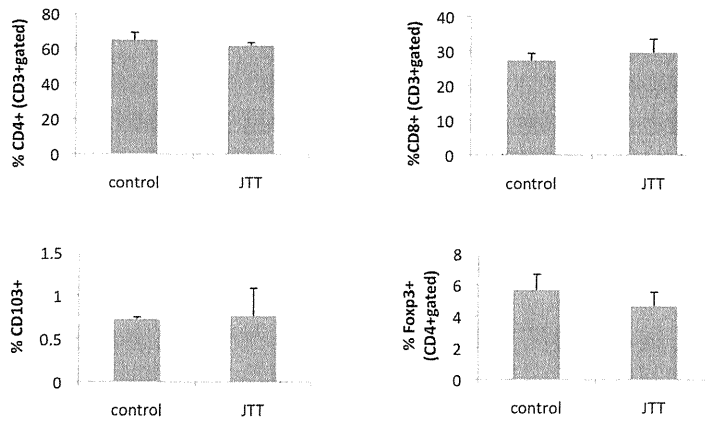


図 2. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植 14 日目の、十全大補湯 (JTT) が小腸粘膜固有層免疫細胞に与える影響

## ② 小柴胡湯

マウス悪性黒色腫 B16 細胞を側腹の皮下に移植し、小柴胡湯あるいは対照群として水を経口投与し、7 日目の小腸粘膜固有層の細胞の割合を調べたところ、小柴胡湯を投与した CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、 $\gamma\delta$ T 細胞分画には変わりはないが(図 3a,b)、Treg 細胞の割合が対照群に比べて低かった(図 3c)。これらの結果より、小柴胡湯は粘膜固有層において Treg 細胞を有意に抑制し、腸管において抗腫瘍免疫に有用な免疫状態を誘導するを可能性が示唆された。

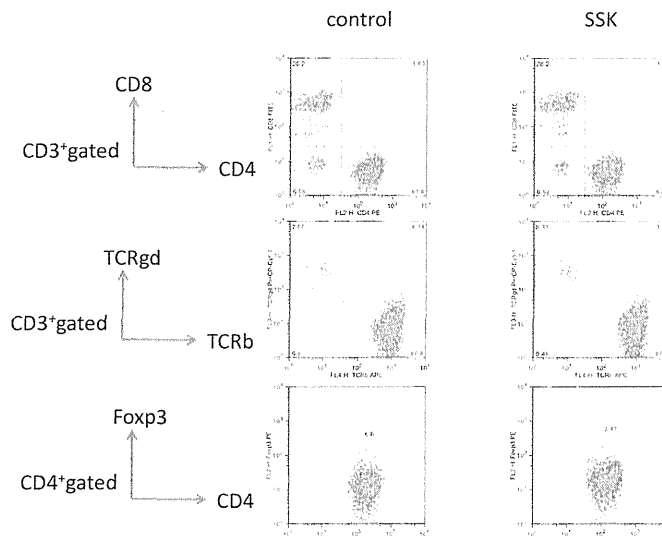


図 3. マウス悪性黒色腫 B16 細胞の皮下移植 7 日目の、小柴胡湯 (SSK) が小腸粘膜固有層免疫細胞に与える影響

## 考察

漢方は、腸管免疫への作用を介して、腫瘍免疫などの全身性の抗腫瘍免疫応答にも作用する可能性がある。この場合、漢方成分による直接的な腸管免疫細胞への作用、あるいは、漢方がもつ、腸内細菌に影響を与える antibiotics/prebiotics 作用による腸内細菌の変化を介した間接的な腸管免疫への作用が考えられる。今回、十全大補湯では、腸管粘膜固有層の CD8<sup>+</sup>T 細胞の増加、Treg 誘導性の CD103<sup>+</sup>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た。

上記のように、十全大補湯と小柴胡湯のがん組織や全身性での抗腫瘍性免疫細胞の増強や免疫抑制性細胞の低下などの作用と考え合わせると、漢方は、腸管免疫への作用を介して、全身性の抗腫瘍免疫応答を増強する可能性がある。今後、*in vitro* スクリーニングにより同定する、抗腫瘍免疫応答増強に有用と考えられる漢方成分の腸管免疫の作用を検討する予定である。

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

### 3. がん細胞と免疫細胞に作用する漢方成分の同定

我々は、がん細胞における様々な遺伝子異常に起因したシグナル伝達の亢進が、がん細胞の増殖生存を促進するだけでなく、免疫抑制性因子の産生亢進や免疫抑制性の細胞集団の誘導・集積に関与していることを明らかにしてきた。さらに、これらのシグナル伝達を阻害する適切な分子標的薬を用いることによって、担がん生体の免疫抑制環境を改善し、抗腫瘍免疫応答を増強できることを示してきた。本研究では、このような目的に用い得る漢方成分を同定するため、ERK、Wnt/ $\beta$ -catenin、STAT3 のシグナル亢進により IL-10、VEGF などを分泌するヒト悪性黒色腫細胞株、NF- $\kappa$ B の恒常的活性化により IL-6 を高産生するヒト卵巣癌細胞株、何らかのシグナル異常により TGF- $\beta$  を高産生するヒト膵臓癌細胞株を用いてスクリーニングを行った。初年度の 62 成分の第一次スクリーニングから何らかの効果が認められた漢方成分と新たに追加した成分からなる 35 成分について第二次スクリーニングを行い、さらに詳細な作用機序の解明を試みた。第二次スクリーニングでは VEGF を高産生するマウス大腸がん細胞株を用いたスクリーニングも行った。

一方で、漢方成分が免疫細胞に直接作用して免疫抑制環境の改善と抗腫瘍免疫応答の増強につながる可能性についても検討を進めた。制御性 T 細胞は、担がん生体における免疫抑制病態に関わる重要な免疫細胞である。制御性 T 細胞群はいくつか存在し、Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 制御性 T 細胞のうち、naturally occurring regulatory T cells (nTreg) は胸腺由来であり、induced regulatory T cell (iTreg) は TGF- $\beta$  を添加することで誘導される。また、IL-10 添加により誘導される T regulatory type 1 (Tr1) は Foxp3<sup>-</sup> の免疫抑制活性をもつ細胞であり、Foxp3<sup>+</sup> Treg とは別の細胞群と考えられる。さらに TGF- $\beta$  を産生する T helper type 3 (Th3) 細胞なども免疫抑制能をもつ細胞群として知られている。第二次スクリーニングでは、TGF- $\beta$  による iTreg 細胞誘導を阻害する漢方成分のスクリーニングを行うとともに、抗腫瘍免疫応答に必要な Th1 細胞への分化を阻害しないという新たな指標を加えてより有効な漢方成分の同定を試みた。

## 材料と方法

### 漢方成分

初年度に選定した 62 種類の漢方成分のうち、第一次スクリーニングのいずれかで効果があると推測された成分と新たに追加した成分からなる 35 種類について日本薬局方における生薬類の確認試験法の際の標準品となる化合物を購入した。各漢方成分は各々 10mM となるよう DMSO で溶解して用いた。

### ヒト癌細胞株

ヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3、ヒト悪性黒色腫細胞株 888mel、ヒト悪性黒色腫細胞株 624mel と ヒト膵臓がん細胞株 PK59 のそれぞれの細胞株は 10% FBS を添加した RPMI 1640 (invitrogen) で培養した。ヒト卵巣癌細胞株 JHOC5 の細胞株は 10% FBS を添加した DMEM F-12 HAM (sigma) で培養した。ヒト卵巣癌細胞株 RMG1 は 10% FBS を添加した F-12 (sigma) で培養した。OVCAR3 は 24 well プレートに  $5 \times 10^4$  cells/well として播種し、10mM の漢方成分を加えて 4 時間培養した後、上清を除去し、再び同濃度の成分を加えて 4 時間培養して上清を回収した。JHOC5 と RMG1 はそれぞれ 24well プレートに  $1 \times 10^4$  個/well 播種し、漢方成分を加えて 6 時間培養後、上清を回収し、サイトカイン測定サンプルとした。888mel、624mel と PK59 はそれぞれ 24 well プレートに  $5 \times 10^4$  個/well 播種し、漢方成分を加えて 24 時間培養後、上清を回収し、サイトカイン測定サンプルとした。

### マウス癌細胞株

マウス大腸がん細胞株 CT26 は 10% FBS を添加した RPMI medium 1640 (invitrogen) で培養した。マウス大腸がん細胞株 CT26 は 24 well プレートに  $5 \times 10^4$  cells/well として播種し、10mM の漢方成分を加えて 24 時間培養した後、上清を回収し、サイトカイン測定サンプルとした。

### サイトカインの測定

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

## マウス

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

### *in vitro* における iTreg 細胞の分化誘導とそれを阻害する漢方成分の同定

Miltenyi Biotec 社の CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II を用いて、CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> ナイーブ T 細胞を C57BL/6 マウス及び BALB/c マウスの脾臓細胞より分離した。その細胞を TGF- $\beta$  (10ng/mL) 存在下において、プレートコートした抗 CD3 抗体 (1 $\mu$ g/mL) と抗 CD28 抗体 (10 $\mu$ g/mL) で活性化させて、iTreg を誘導した。この iTreg 誘導系に、漢方成分化合物 (10 $\mu$ M) を添加して、72 時間後に細胞を回収し、フローサイトメトリーで解析した。

### *in vitro* における Th1 細胞の分化誘導とそれを阻害しない漢方成分の同定

Miltenyi Biotec 社の CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II を用いて、CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> ナイーブ T 細胞を C57BL/6 マウス及び BALB/c マウスの脾臓細胞より分離した。その細胞を IL-12p70 (10ng/mL) および IL-2 (10ng/mL) 存在下において、プレートコートした抗 CD3 抗体 (1 $\mu$ g/mL) と抗 CD28 抗体 (10 $\mu$ g/mL) で活性化させて、Th1 を誘導した。この Th1 誘導系に、漢方成分化合物 (10 $\mu$ M) を添加して、4 日後に細胞を回収し、フローサイトメトリーで解析した。

## フローサイトメトリー解析

細胞内および細胞表面マーカーで染色後、BD FACSCalibur で測定し、BD CellQuest Pro にて解析した。細胞は FITC 標識抗 CD4 抗体、PE 標識抗 Foxp3 抗体、PerCP 標識または APC 標識抗 CD25 抗体で染色した。細胞内染色は BD Cytotfix/Cytoperm を用いて行った。

## 結果

### 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

ヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3 に最終 10 $\mu$ M で 35 種の漢方成分を加えて、IL-6 産生に対する影響を評価した結果、漢方成分 No.17, 漢方成分 No.34, 漢方成分 No.27, 漢方成分 No.25, 漢方成分 No.10, 漢方成分 No.33 の順に IL-6 産生を抑制した(図 1)。

ヒト卵巣癌細胞株 JHOC5 からの IL-6 産生に対する影響を同様に評価した結果、漢方成分 No.17, 漢方成分 No.33, 漢方成分 No.25, 漢方成分 No.27, 漢方成分 No.23, 漢方成分 No.22, 漢方成分 No.24, 漢方成分 No.19, 漢方成分 No.13, 漢方成分 No.29 の順に IL-6 産生を抑制した(図 2)。特に漢方成分 No.17, 漢方成分 No.33 の IL-6 産生抑制作用が顕著であった。

ヒト卵巣癌細胞株 RMG1 からの IL-6 産生に対する影響を同様に評価した結果、漢方成分 No.17 が顕著に IL-6 産生を抑制し、漢方成分 No.18, 漢方成分 No.6, 漢方成分 No.16 でわずかな抑制がみられた(図 3)。一方で、JHOC5 で IL-6 産生を抑制する漢方成分 No.23, 漢方成分 No.24, 漢方成分 No.34 が RMG1 に対しては IL-6 産生を増加させた。

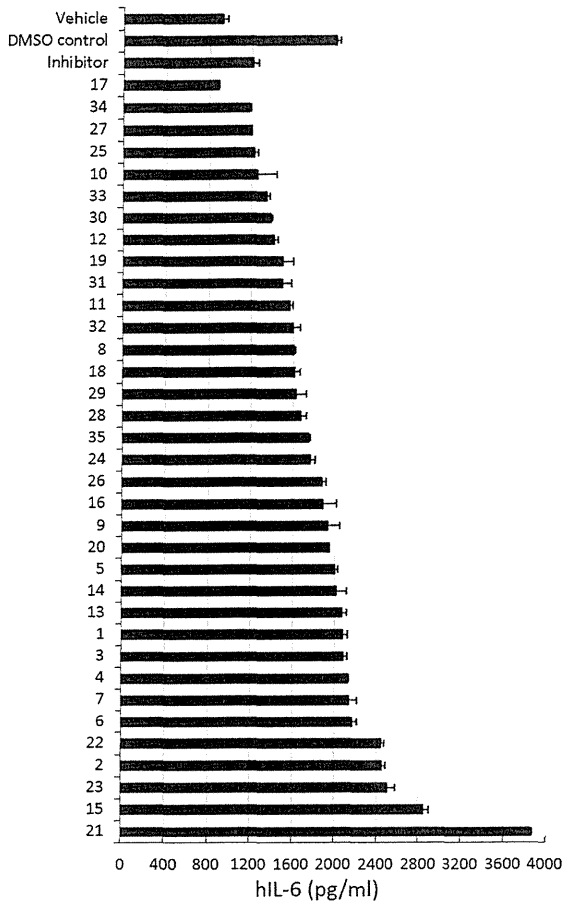


図1. 漢方成分 (10 $\mu$ M) のヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3 の IL-6 産生に及ぼす影響  
inhibitor: DHMEQ

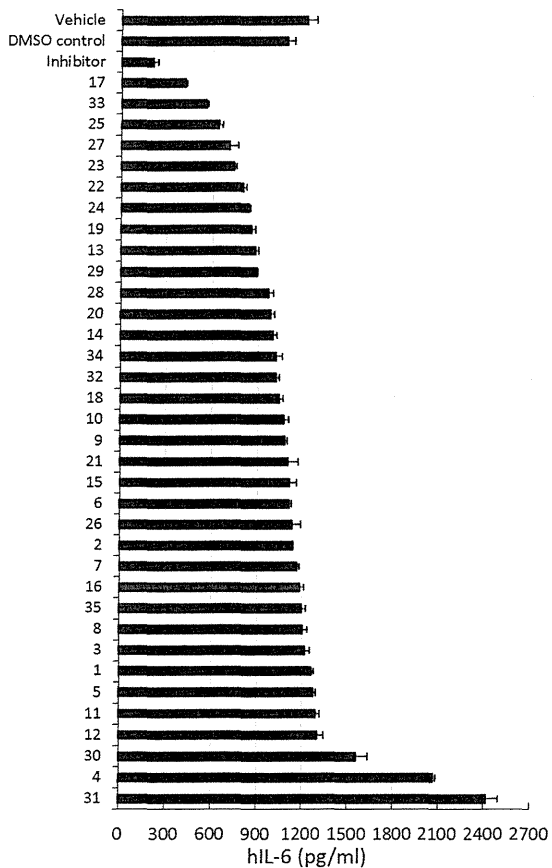


図2. 漢方成分 (10 $\mu$ M) のヒト卵巣癌細胞株 JHOC5 の IL-6 産生に及ぼす影響  
inhibitor: DHMEQ

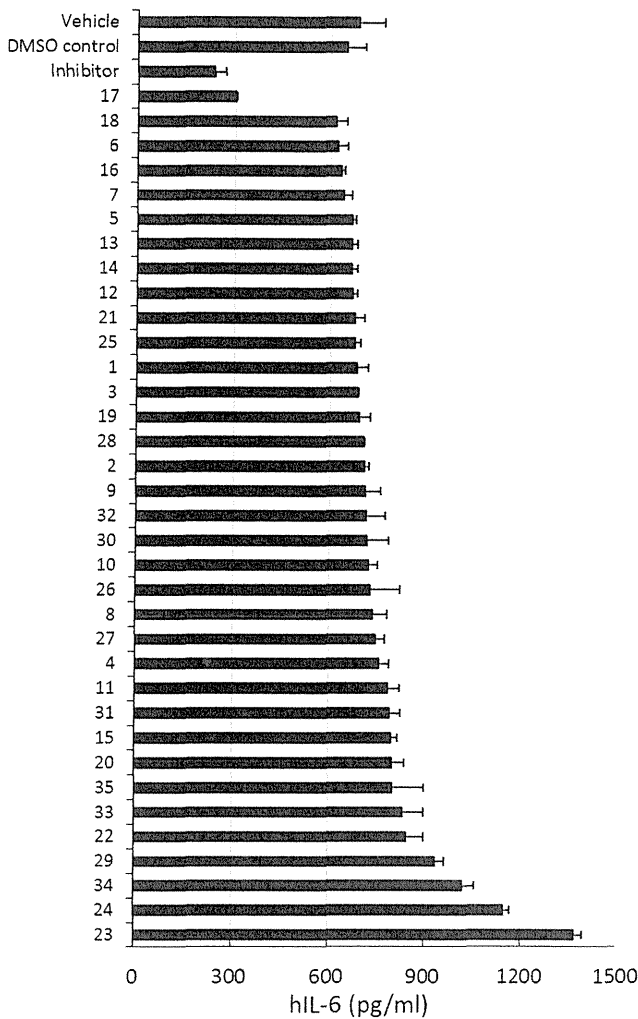


図 3. 漢方成分 (10 $\mu$ M) のヒト卵巣癌細胞株 RMG1 の IL-6 産生に及ぼす影響  
inhibitor: DHMEQ

### 3.2) ヒト悪性黒色腫がん細胞株 888mel、624mel からの IL-10、VEGF 産生を抑制する漢方成分の同定

悪性黒色腫細胞株 888mel に 10 $\mu$ M の 35 種漢方成分を加えて、*in vitro*での IL-10 産生と VEGF 産生についてスクリーニングを行った。漢方成分 No.16, 漢方成分 No.15, 漢方成分 No.21, 漢方成分 No.17, 漢方成分 No.23, 漢方成分 No.14, 漢方成分 No.33 の順に IL-10 産生の抑制がみられた(図 4 a)。VEGF 産生に関しては、漢方成分 No.21, 漢方成分 No.28, 漢方成分 No.16, 漢方成分 No.35 の順に産生抑制がみられた(図 4 b)。

悪性黒色腫細胞株 624mel に 10 $\mu$ M の 35 種漢方成分を加えて、*in vitro*での IL-10 産生と VEGF 産生をスクリーニングしたところ、IL-10 の産生は漢方成分 No.21, 漢方成分 No.32, 漢方成分 No.28 の順に抑制がみられた(図 5 a)。VEGF 産生は漢方成分 No.28, 漢方成分 No.23 などが抑制した(図 5 b)。漢方成分 No.17 は 888mel, 624mel とともに IL-10 を抑制するが VEGF 産生は増加させることがわかる。

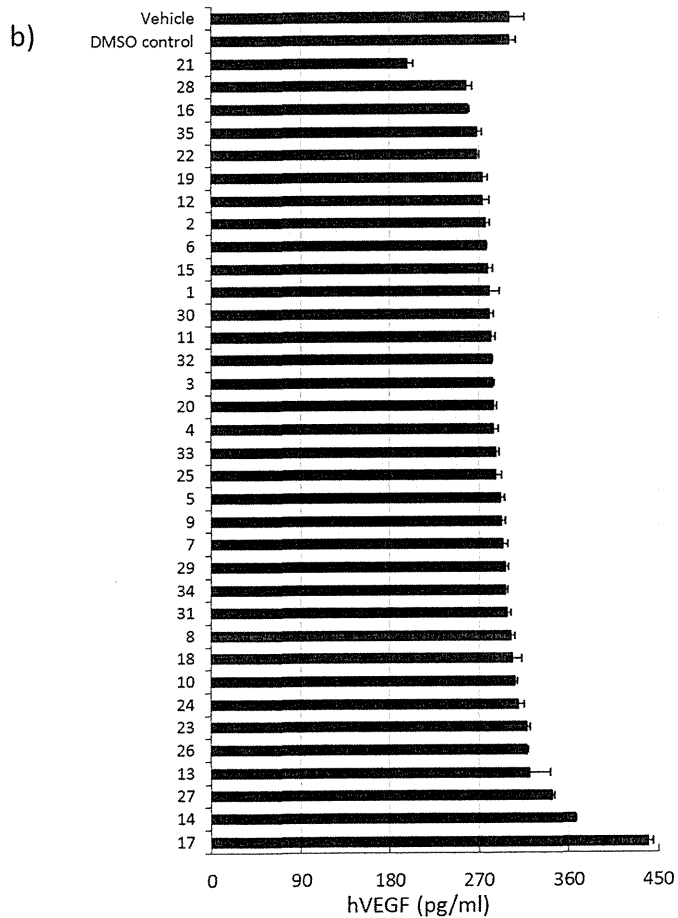
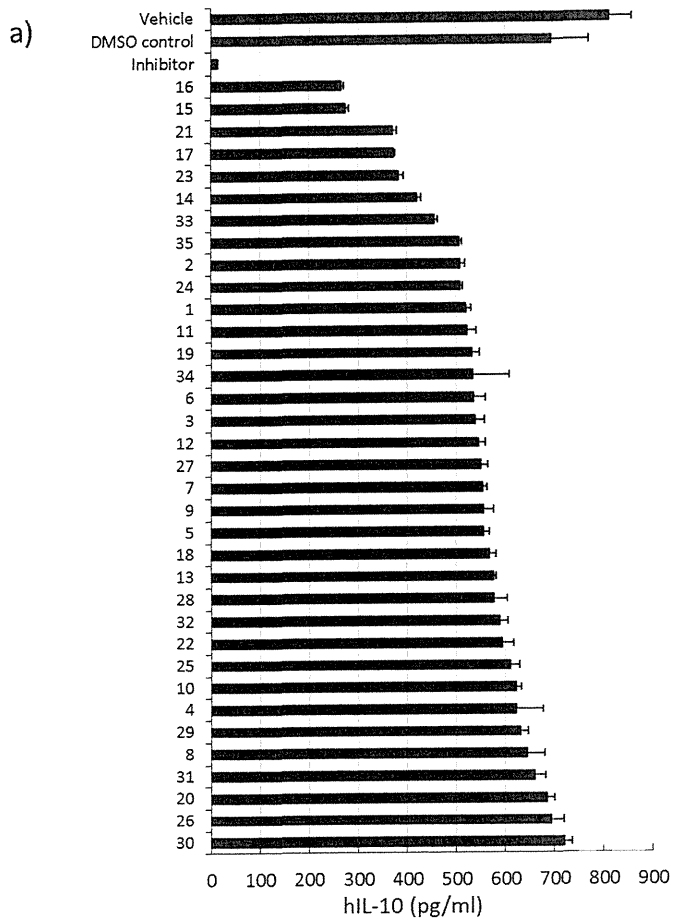


図4.漢方成分 (10 $\mu$ M) のヒト悪性黒色腫細胞株 888mel のサイトカイン産生に及ぼす影響  
a) IL-10 b) VEGF (inhibitor: U0126)



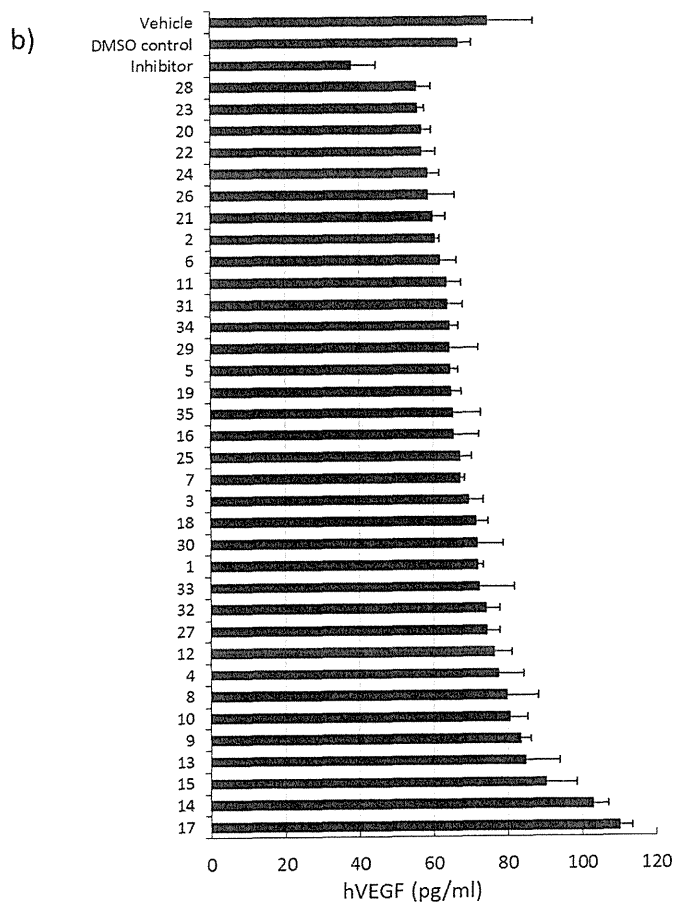
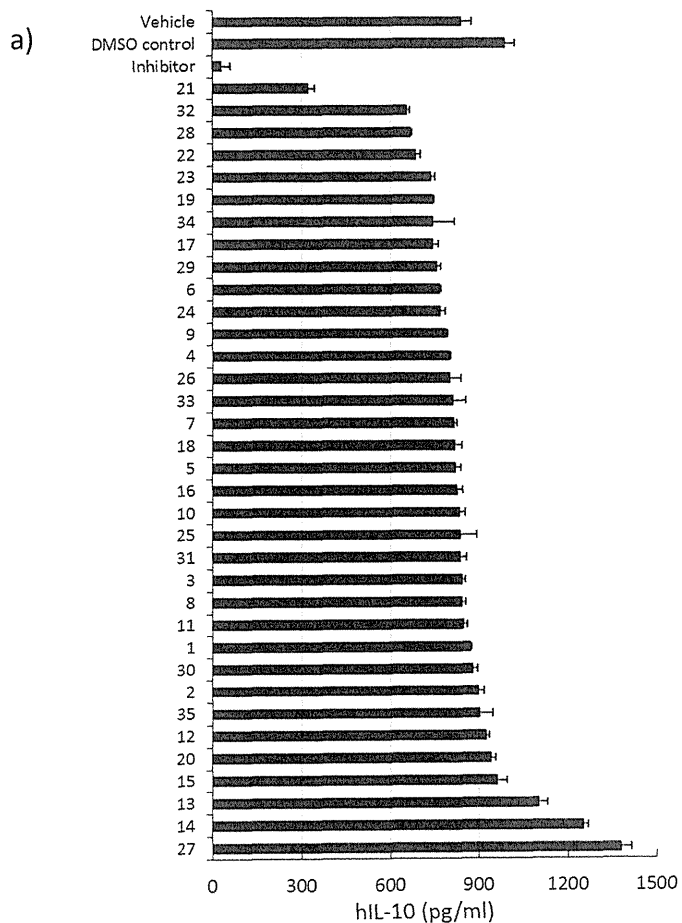


図5.漢方成分 (10 $\mu$ M) のヒト悪性黒色腫細胞株 624mel のサイトカイン産生に及ぼす影響  
a) IL-10, b) VEGF (inhibitor: U0126)

### 3.3) ヒト膵臓癌細胞株からの TGF-β産生を抑制する漢方成分の同定

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

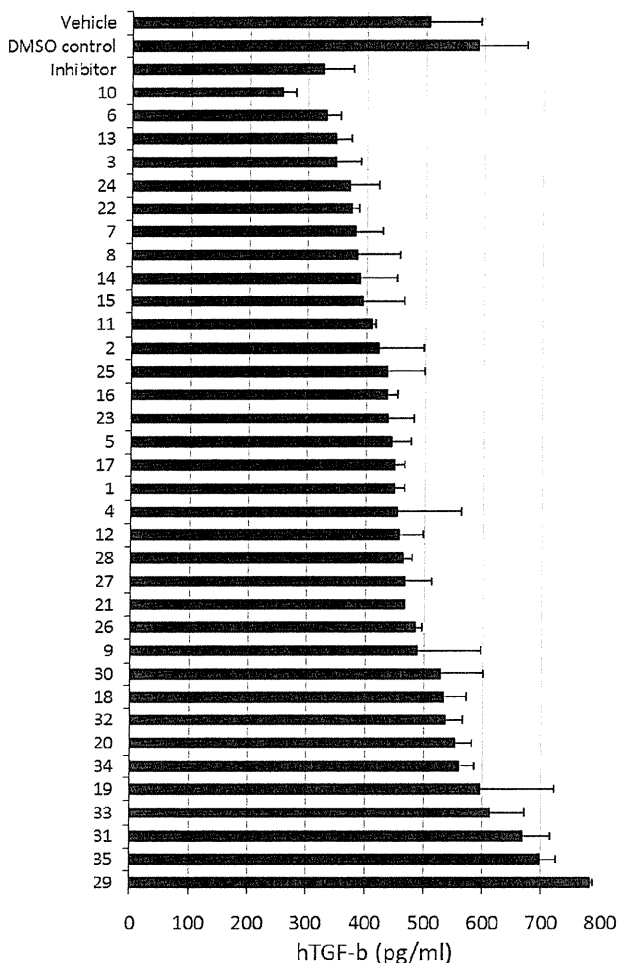


図 6. 漢方成分 (10μM) のヒト膵臓癌細胞株 PK59 の TGF-β産生に及ぼす影響  
inhibitor: AG490

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

マウス大腸がん細胞株 CT26 に 10μM の 35 種の漢方成分を加えて、*in vitro*での VEGF 産生をスクリーニングしたところ、漢方成分 No.21 は 888mel, 624mel と同様 VEGF 産生を有意に減少させ、漢方成分 No.16 や漢方成分 No.35 は 888mel と同様 VEGF 産生を抑制した (図 7)。

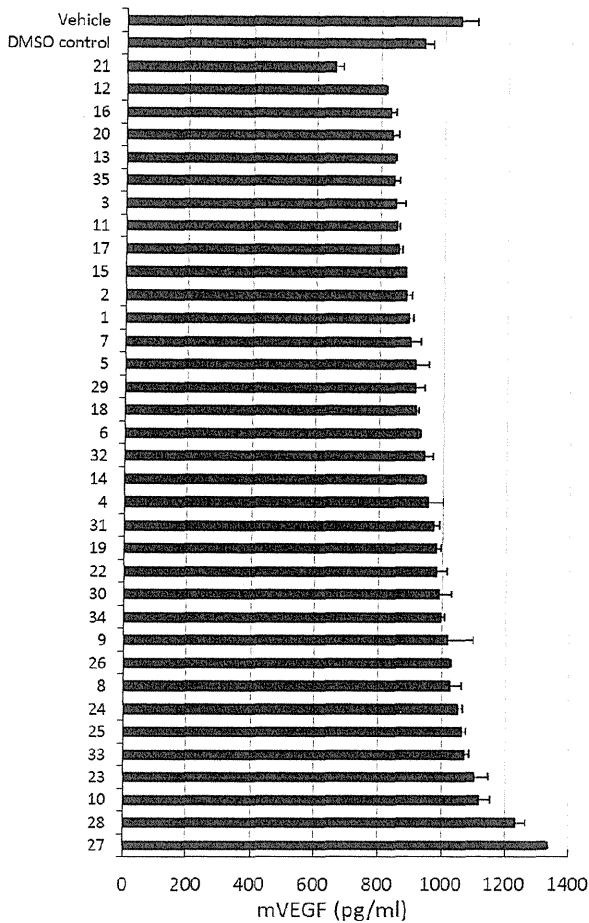


図7. 漢方成分 (10 $\mu$ M) のマウス大腸がん細胞株 CT26 の VEGF 産生に及ぼす影響

### 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

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

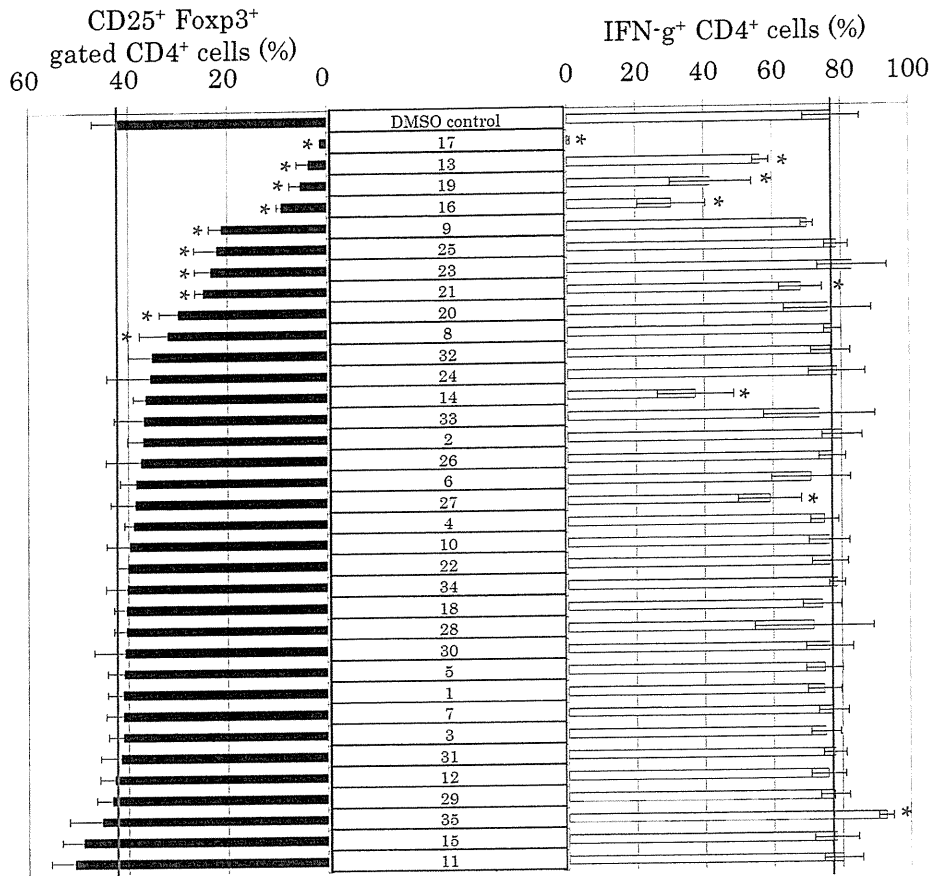


図8 漢方成分 (10µM) が C57BL/6 マウス由来の iTreg 細胞誘導に与える影響  
\*p<0.05 (vs DMSO control)

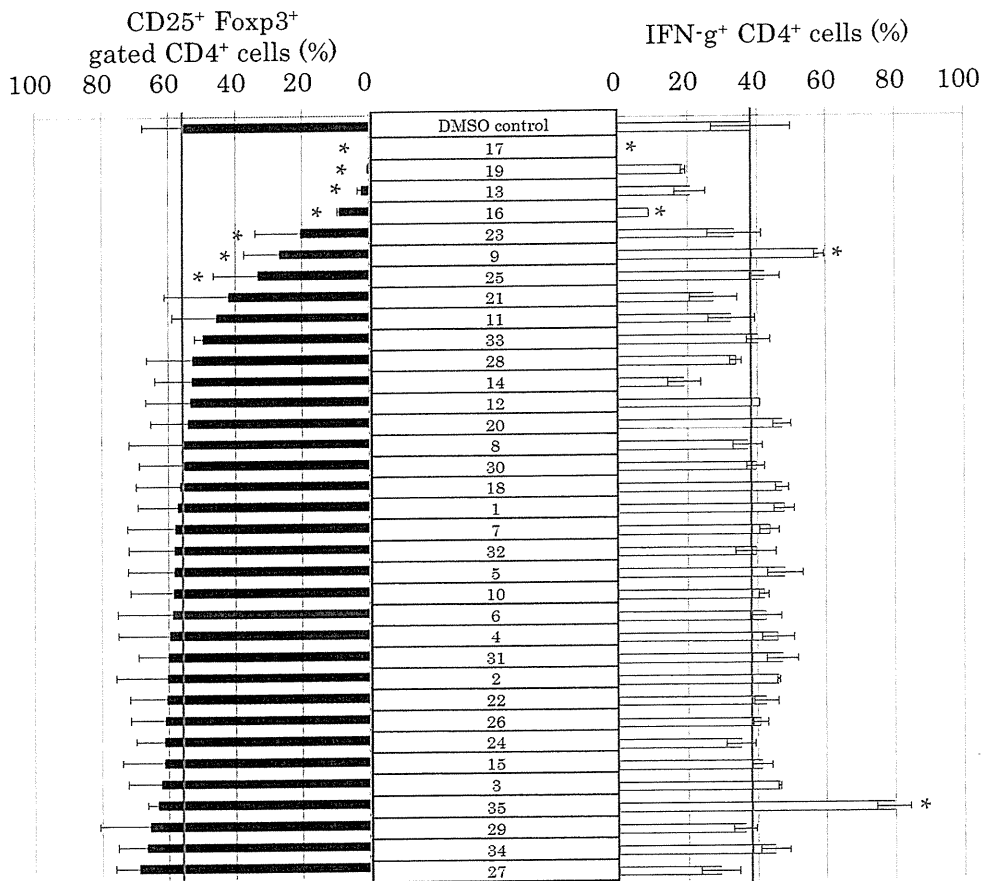


図9 漢方成分 (10µM) が BALB/c マウス由来の iTreg 細胞誘導に与える影響  
\* p<0.05 (vs DMSO control)

## 考察

我々は、これまでに、ヒトがん細胞で活性化しているシグナル伝達分子に対する阻害剤が、免疫抑制性サイトカインの産生を低下させ、また Treg などの免疫抑制性細胞の誘導を阻害して、担がん生体の免疫抑制環境の改善、抗腫瘍免疫応答の増強につながることを報告してきた。また、適切なシグナル伝達阻害剤は、癌細胞のみならず宿主免疫細胞にも作用して、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC: myeloid derived suppressor cell)などの免疫抑制性細胞の動員やその機能を抑制し、樹状細胞などの抗腫瘍効果を増強させることも見出している。

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

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

TGF- $\beta$ により誘導される iTreg は担がん生体における免疫抑制病態に関与する細胞であり、本研究で同定された iTreg 誘導を阻害する漢方成分の投与は、担がん生体においてがん細胞や浸潤免疫細胞などが産生する TGF- $\beta$ による iTreg 誘導を阻害して、免疫抑制病態を改善できる可能性がある。今回、C57BL/6 マウスと BALB/c マウスからそれぞれ iTreg と Th1 を誘導し、その際に漢方成分が与える影響について検討した。iTreg 誘導の抑制作用が認められた漢方成分のうち、一部はヒトがん細胞からの IL-6、IL-10、TGF- $\beta$ などの免疫抑制性サイトカインの産生を抑制するものも含まれており、これらの漢方成分化合物を投与することにより、免疫抑制環境を改善できる可能性が示唆された。特に iTreg 誘導を阻害するが Th1 分化は阻害しない漢方成分は臨床応用に有効であると期待される。本研究の結果を踏まえ、別項にて、マウス担がんモデルを用いて漢方成分化合物投与によるがん微小環境の改善及び抗腫瘍効果について検討を行った。

## 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

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

## 材料と方法

### 植物由来エキス

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

### ヒト癌細胞株

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

### サイトカインの測定

上清中の IL-6 と IL-10 は OptiEIA ELISA sets (BD Biosciences) を用いて測定した。

### マウス

6 週齢の雌性 C57BL/6 マウス (三協ラボサービス株式会社) より脾臓を摘出し、実験に用いた。

### *in vitro* における iTreg 細胞の分化誘導とそれを阻害する植物エキスの同定

Miltenyi Biotec 社の CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II を用いて、CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> ナイーブ T 細胞を C57BL/6 マウスの脾臓細胞より分離した。その細胞を TGF- $\beta$  (10ng/mL) 存在下において、プレートコートした抗 CD3 抗体 (1 $\mu$ g/mL) と抗 CD28 抗体 (10 $\mu$ g/mL) で活性化させて、iTreg を誘導した。この iTreg 誘導

系に、植物エキス (0.1%)を添加して、72 時間後に細胞を回収し、フローサイトメトリーで解析した。

### フローサイトメトリー解析

細胞内および細胞表面マーカーで染色後、BD FACSCalibur で測定し、BD 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 Cytotfix/Cytoperm を用いて行った。

## 結果

### 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

ヒト卵巣癌細胞株 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)。

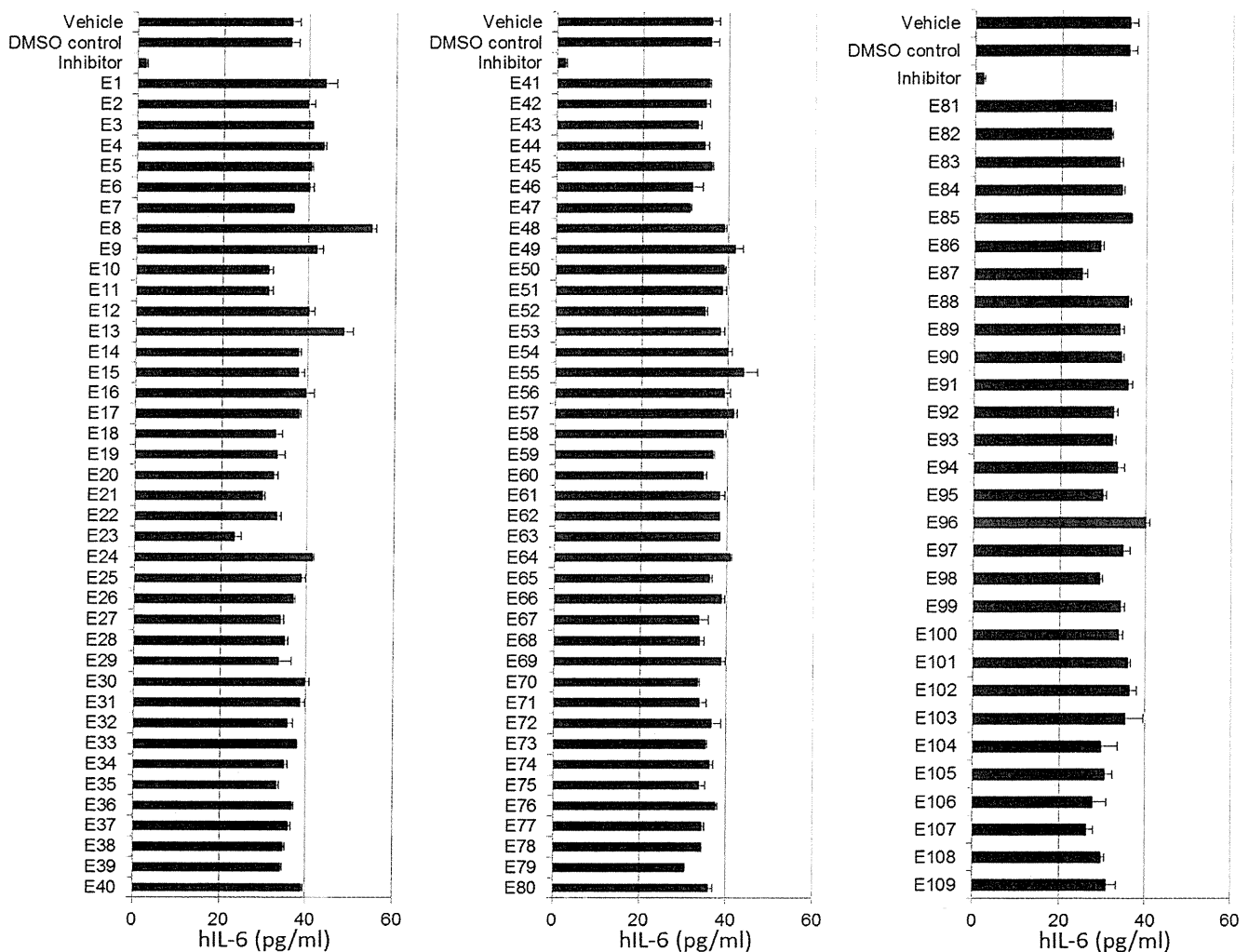


図 1. 植物由来エキスのヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3 の IL-6 産生に及ぼす影響

### 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

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 2)。特に E11、E19、E104、E106 では、IL-10 産生抑制作用が顕著であった。

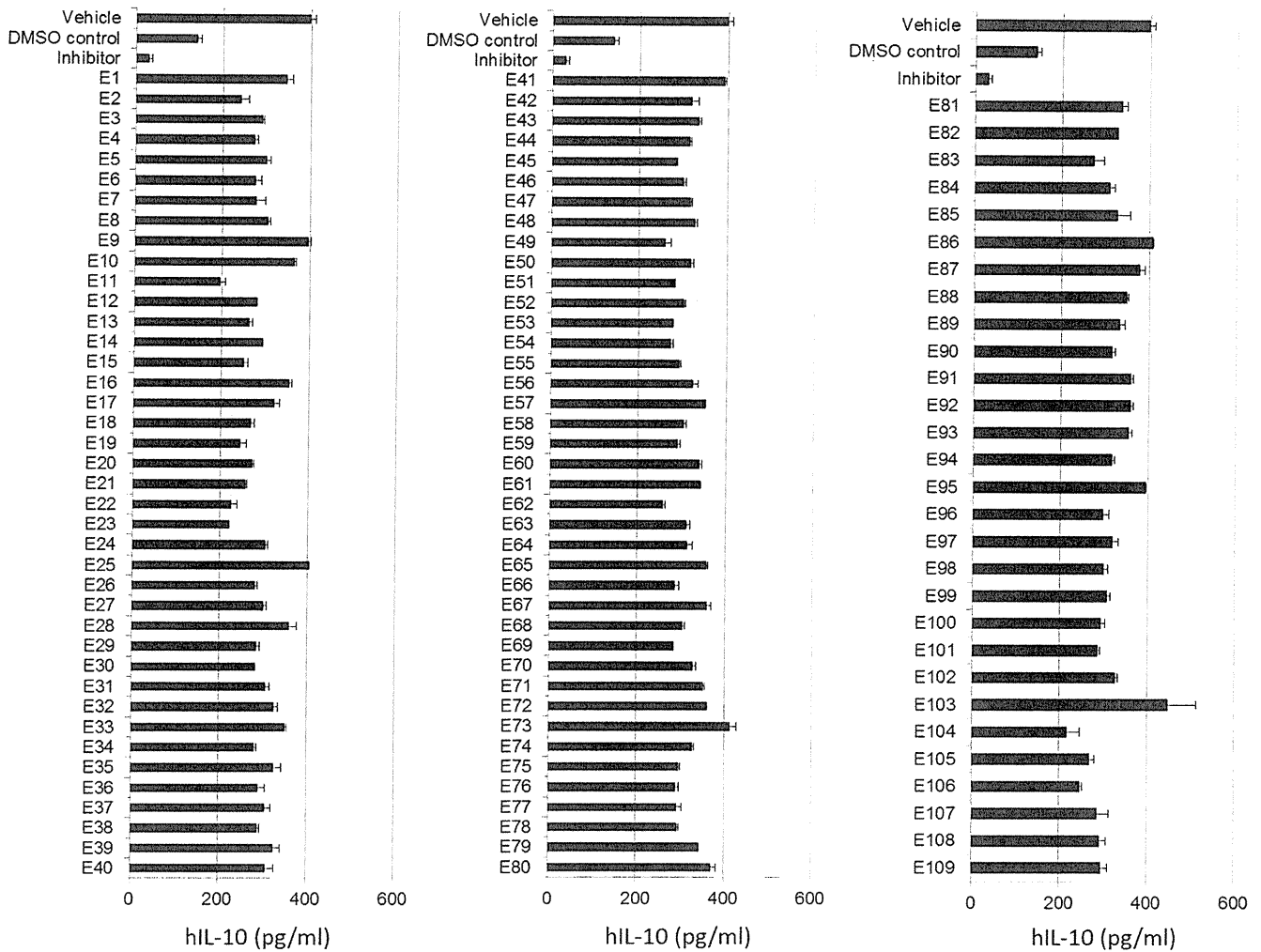


図 2. 植物由来エキスのヒト悪性黒色腫細胞株 888mel の IL-10 産生に及ぼす影響

#### 4. 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<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> ナイーブ T 細胞を TGF- $\beta$  (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- $\beta$  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 3、4)。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。

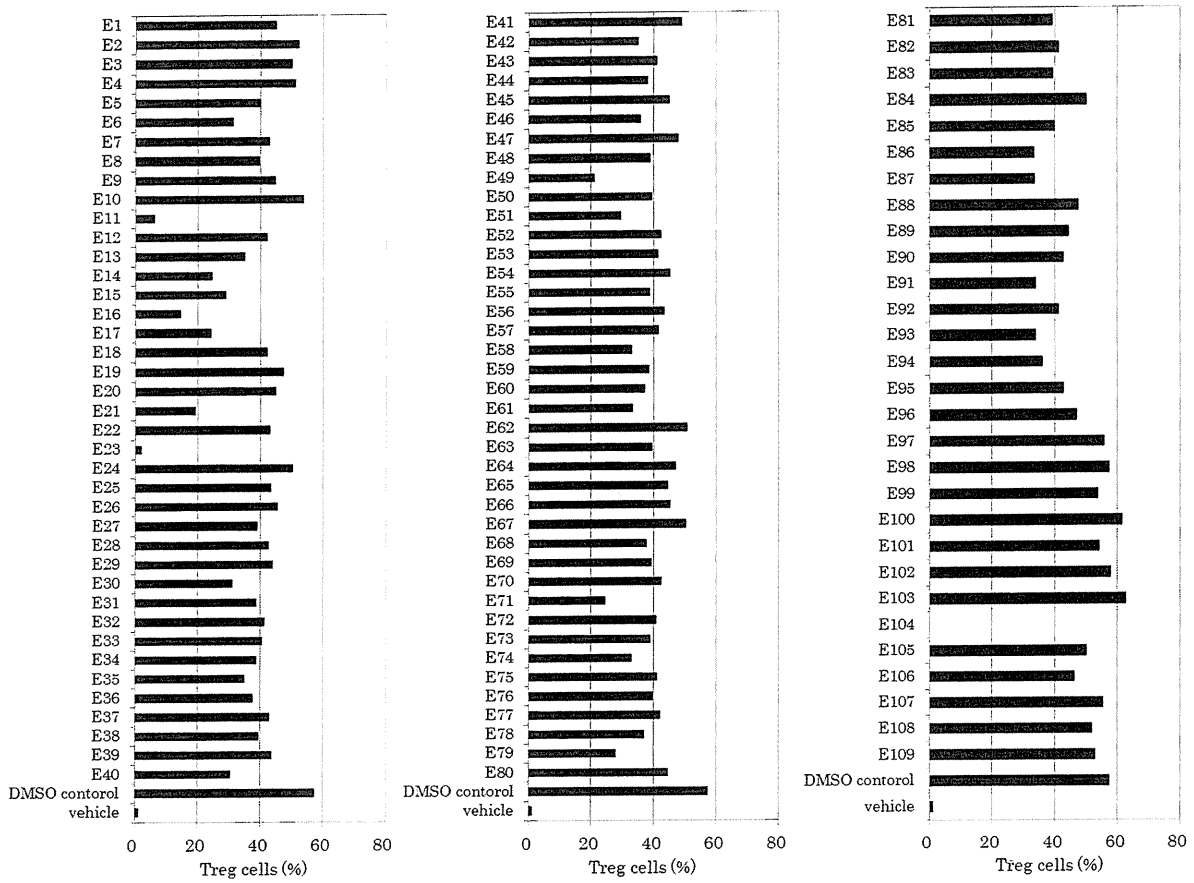


図3 植物エキスが C57BL/6 マウス由来の iTreg 細胞誘導に与える影響

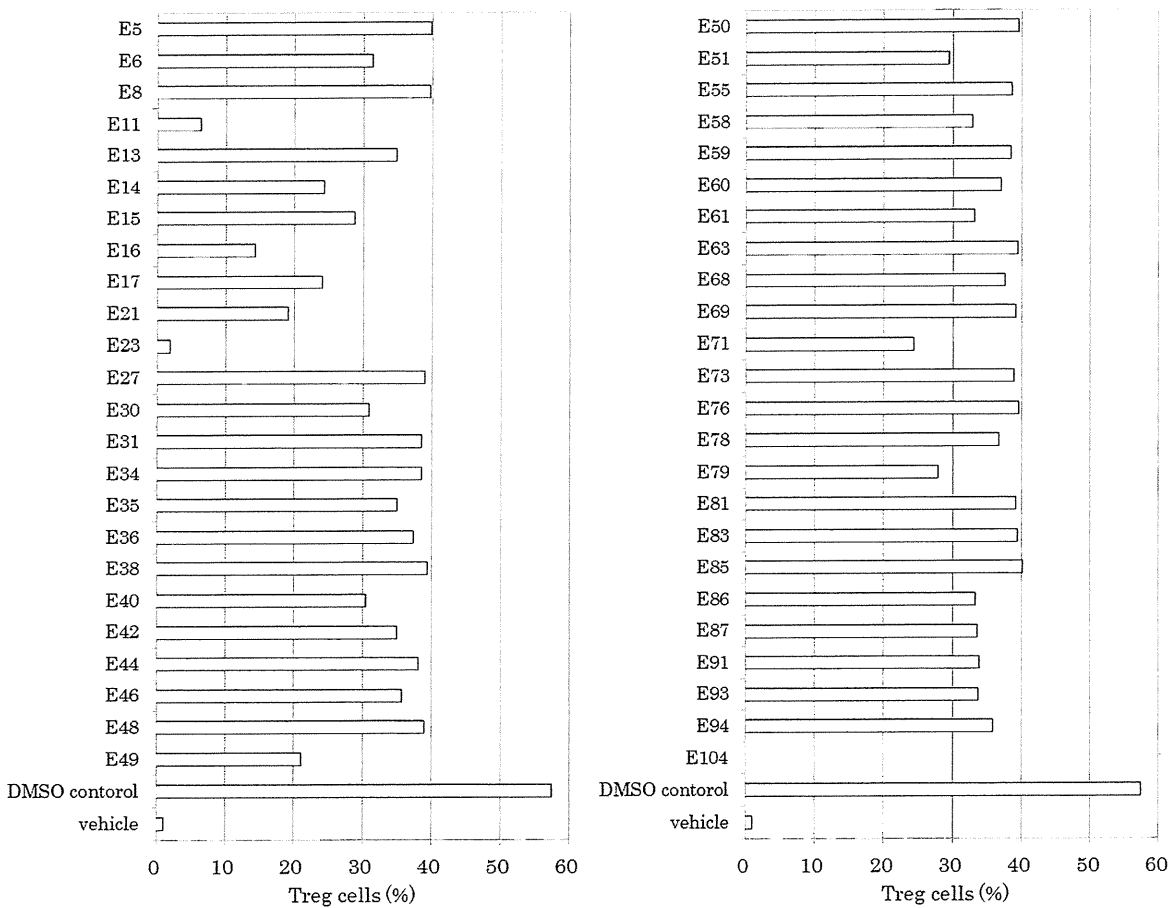


図4 C57BL/6 マウス由来の iTreg 細胞誘導を抑制する植物エキスの候補



## 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 の成分の漢方成分 No.19、E14 と E16 の成分の漢方成分 No.9 と漢方成分 No.16、E27、E30、E85 (E30 と E85 はほぼ同じ生薬)の成分の漢方成分 No.23、E71 の成分の漢方成分 No.13、E104 の成分の漢方成分 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化合物のうち、漢方成分 No.9 と漢方成分 No.16 を含有している。漢方成分 No.9 と E16 を比較すると E16 の方が iTreg 誘導抑制効果が高かつたが、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、含有成分の漢方成分 No.9 と漢方成分 No.16 の両方もしくはより強く漢方成分 No.16 の影響を受け、漢方成分 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成分化合物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つた。原因として、植物エキスに含まれる成分化合物の濃度が抑制効果を発揮する濃度に満たなかつた可能性がある。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つたが、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、漢方成分 No.14、漢方成分 No.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 や漢方成分 No.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化合物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考える。

## 5. 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- $\kappa$ 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/ $\beta$ -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- $\kappa$ 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)、ウェ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。

#### ヒト癌細胞株

ヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3、ヒト悪性黒色腫細胞株 888mel の細胞株は 10% FBS を添加した RPMI 1640 (invitrogen)で培養した。ヒト卵巣癌細胞株 JHOC5 の細胞株は 10% FBS を添加した DMEM F-12 HAM (sigma)で培養した。

#### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

ヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3 あるいは JHOC5 を 6cm dish に  $5 \times 10^5$  cells/dish で播種し、10 $\mu$ 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 $\mu$ g の核抽出液及び 1  $\mu$ g の poly(dI-dC)を  $^{32}$ P ラベルした NF- $\kappa$ 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。

## ウェスタンブロット法

ヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3 は 6 well プレートに  $2 \times 10^5$  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。ヒト悪性黒色腫細胞株 888mel は 6 well プレートに  $2 \times 10^5$  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 ( $1500 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 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 ( $20 \mu\text{g}$ )。10%ゲルを用いて SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜 (Millipore) に転写 ( $15 \text{V}$ 、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  $4^\circ\text{C}$ 、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- $\beta$ -actin antibody (Sigma Aldrich ; diluted 1/500 in TBST)。

## 結果

### 5.1) Electrophoretic Mobility Shift Assay による NF- $\kappa$ B 抑制成分の同定

ヒト卵巣がん細胞株 OVCAR3 (図 1) および JHOC5 (図 2) 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- $\kappa$ B 活性化を EMSA 法により調べた結果、漢方成分 13, 17, 19, 25, 33 で NF- $\kappa$ B の抑制が認められた。

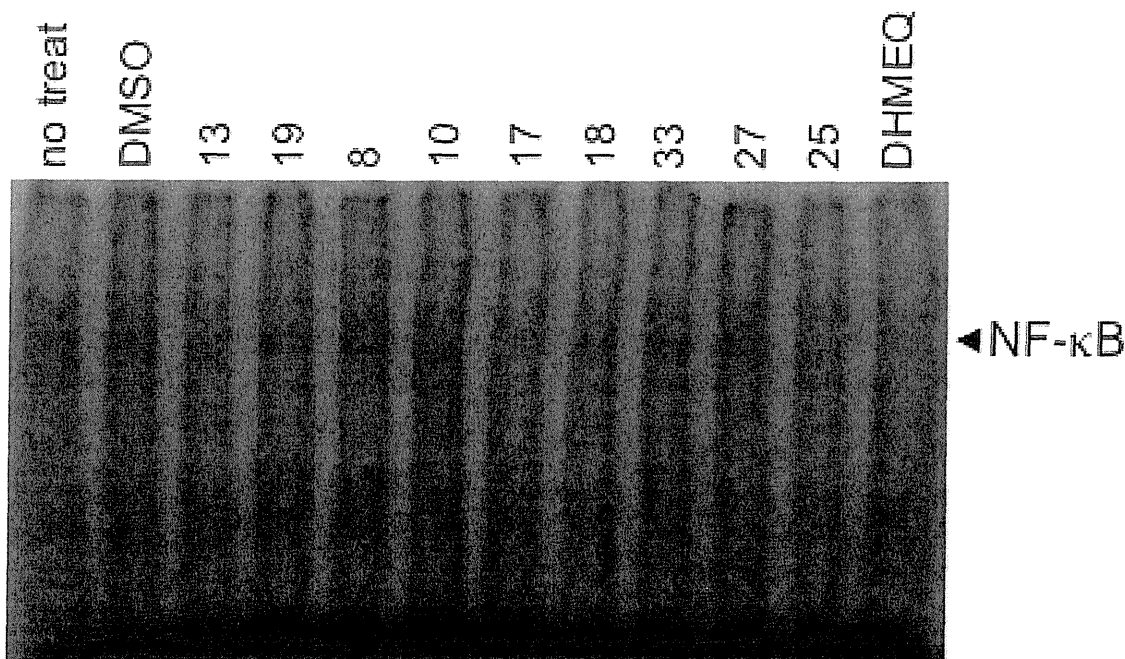


図 1 OVCAR3 の NF- $\kappa$ B 活性を抑制する化合物の同定

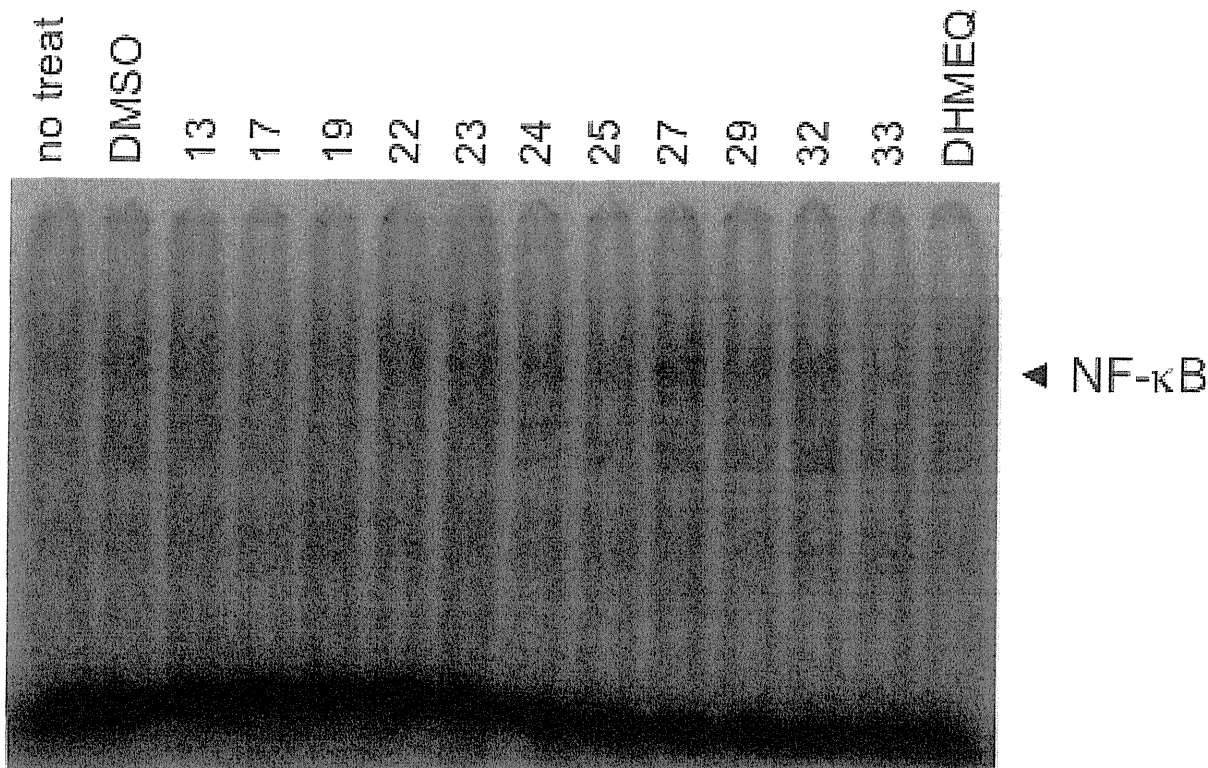


図2 JHOC5 の NF-κB 活性を抑制する化合物の同定

### 5.2) 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 8, 9, 10, 16, 17, 19, 23 で STAT3 の抑制が認められ (図3)、漢方成分 8, 9, 10, 16, 19, 23 で ERK の抑制が認められた (図4)。

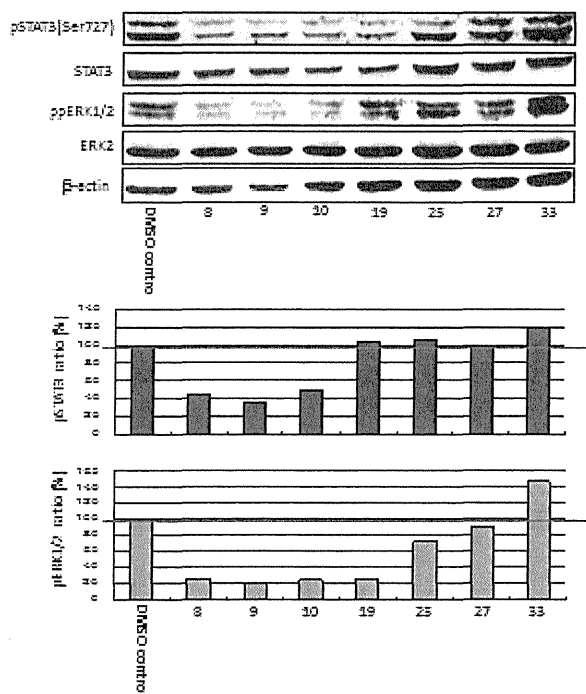


図3 OVCAR3 の STAT3, ERK の活性を抑制する漢方成分の同定

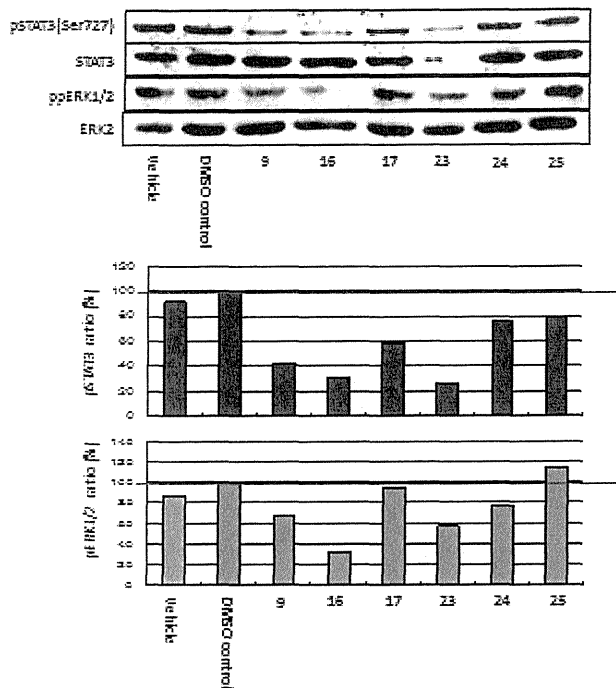


図4 888mel の STAT3, ERK の活性を抑制する漢方成分の同定

## 考察

卵巣がん細胞株 OVCAR3, JHOC5 は NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B 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化合物 17, 33 では NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B 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。

## 6. 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、また尿路上皮癌においては 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