

している免疫細胞における AhR の発現や核内移行を確認しており、免疫抑制環境にあるがん組織において、がん側・免疫側双方における AhR の重要性が示唆される。したがって AhR を制御することによって、免疫抑制的ながん微小環境の改善が期待される。そこで本研究では、抗腫瘍免疫応答増強に参与する漢方成分の同定にあたって AhR に着目し、ヒト AhR 作動性の漢方成分同定を試みた。

## 材料と方法

### 細胞株と漢方成分

ヒトがん細胞株の培養には 10% fetal bovine serum を添加した RPMI1640 または DMEM を用いた。陽性コントロールとなる、2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)や AhR アンタゴニスト(CH-223191)は、それぞれ和光純薬、Sigma で購入した。

### RT-PCR / 定量 PCR

様々な癌細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN)により total RNA を抽出し、SuperScript III (Invitrogen)を用いて cDNA を合成した。AhR, CYP1A1, GAPDH の発現はそれぞれに特異的なプライマーを用い、ExTaq (Takara)により PCR 増幅した。定量 PCR は、MCF-7 に 10  $\mu$ M の漢方薬成分を加え、その 1 時間後に 10nM の TCDD を加えた後、さらに 24 時間後に抽出した total RNA から cDNA を合成した。CYP1A1, GAPDH 特異的プライマーと FastStart Universal SYBR GreenMaster (ロシュ)を用い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (ABI) で測定した。

### 免疫染色

細胞株における AhR の免疫染色では、8 well chamber slide (LAB-TEK)中で 12 時間培養した PC3 に 10 $\mu$ M CH-223191 を加え、1 時間後に 10nM TCDD を加えた。TCDD を加えてから 24 時間後にパラフォルムアルデヒド固定し、抗 AhR 抗体によって 12 時間染色後、Alexa488 でラベルされた抗ラビット IgG 抗体で染色した。核は TO-PRO-3 により染色した。検出には共焦点顕微鏡 LSM 700 (ZEISS)を用いた。

### AhR ルシフェラーゼアッセイ

4 個の XRE 配列と thymidine kinase promoter を持つルシフェラーゼレポーターベクター(0.1  $\mu$ g)と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現ベクター(0.3  $\mu$ g)を、FuGENE6(ロシュ)を用いたりポフェクション法で MCF-7 に導入した。漢方成分をそれぞれ記述の濃度で加え、その 1 時間後に TCDD を 10nM の濃度で添加した。TCDD 添加から 48 時間後にピッカジーン培養細胞溶解剤(東洋インキ)によって回収、ピッカジーン発光キット(東洋インキ)を用いてルシフェラーゼ活性を計測した。計測には Micro lumat Plus (Wallac Berthold)を使用し、ルシフェラーゼ活性の値は同じ細胞抽出液を用いた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の値によって補正した。TCDD による活性化を阻害する漢方成分をアンタゴニストとして同定した。

### 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 5x10<sup>5</sup> 細胞個/dish として播種し、最終濃度 100  $\mu$ M の Tryptophan と 10  $\mu$ 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  $\mu$ M の Tryptophan と 10  $\mu$ 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。

### マトリゲルインベーションアッセイ

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

## 結果

### 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

まず、漢方薬成分中から AhR 作動薬をスクリーニングする目的に適したがん細胞株の選定を行った。51 種類のがん細胞株について、AhR の発現量、および AhR の活性化マーカーである CYP1A1 の発現を RT-PCR によって解析した (図 1)。これらの中で、AhR の発現が比較的高く、かつ AhR の恒常的な活性化がない (CYP1A1 の発現が低い) 細胞株として、U87-MG (神経膠芽腫)、HS578 (乳がん)、RERF-LC-MA (肺が

ん)、PC3 (前立腺がん)、PK8 および PK59 (膵がん)、DLD-1 (大腸がん) を選んだ。これらのがん細胞株、および文献で同様の性質が示されている MCF-7 (乳がん) と、HeLa (子宮頸がん)、HT144 (悪性黒色腫) に対して、AhR アゴニストである TCDD を加えて 24 時間後の AhR 活性化の程度を比較した (図 2)。これらのうち MCF-7 において、TCDD 刺激前後の AhR 活性化マーカー CYP1A1 の発現量変化が最も顕著に認められた。そこで、以下の AhR 作動薬のスクリーニングには MCF-7 を用いることとした。

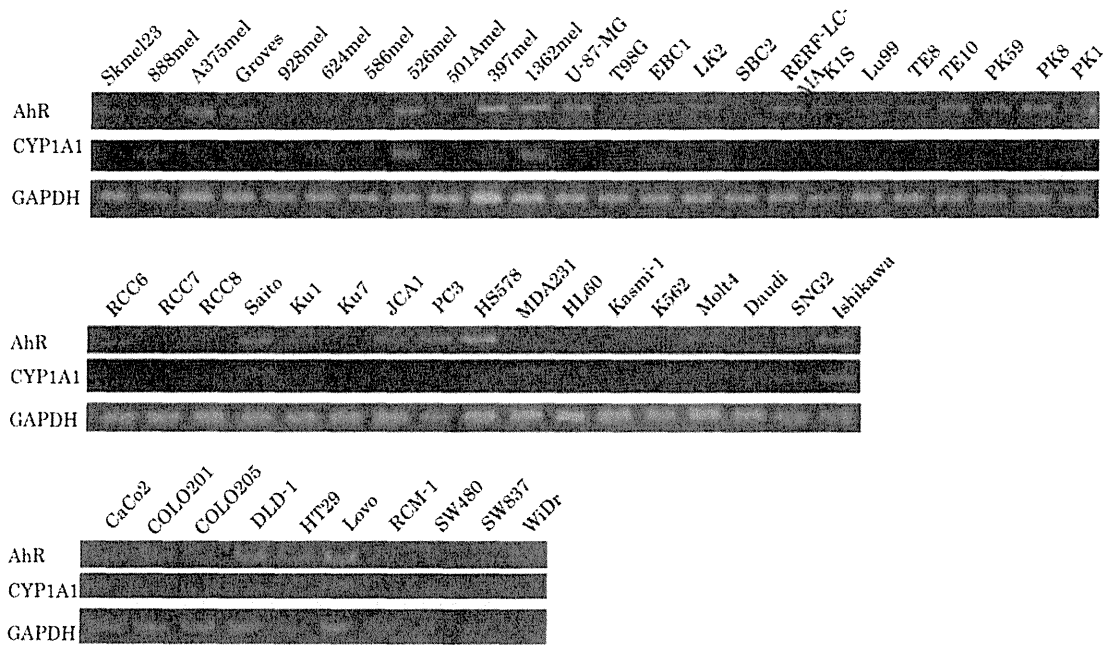


図 1. 様々な細胞株での AhR 及び CYP1A1 の発現

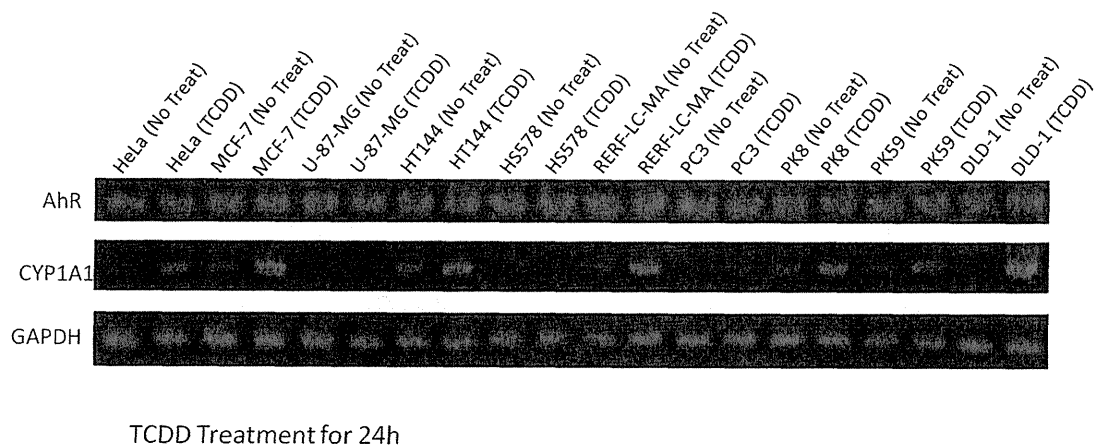


図 2. AhR 発現細胞株での TCDD による CYP1A1 の発現誘導

AhR アントゴニストの作用機序の一つとして、AhR の核移行阻害が考えられるため、AhR 核移行の検出が容易ながん細胞株について検討した。MCF-7 細胞では TCDD による AhR 核移行が明確でなかったが、前立腺がん細胞株 PC3 において TCDD による核移行や AhR アントゴニスト CH-223191 による核移行阻害が認められた (図 3)。今後、PC3 細胞を用いて、アントゴニスト候補が AhR 核移行阻害により AhR 活性を阻害するかを検証予定である。

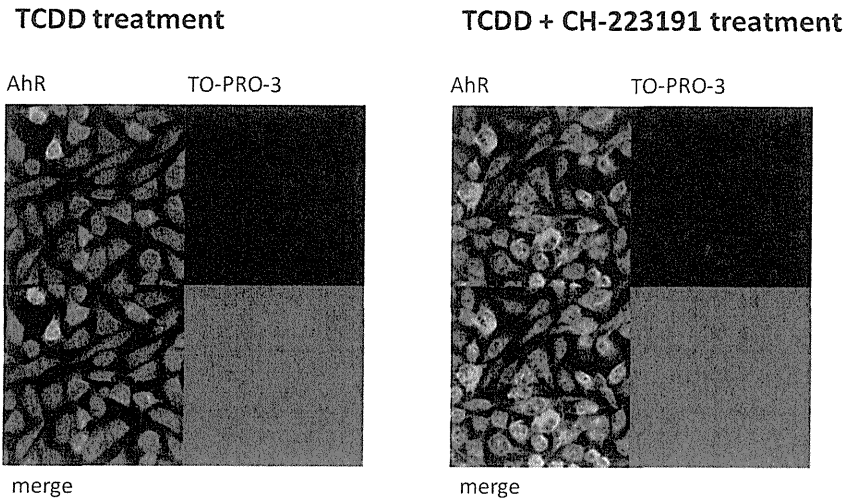


図 3. AhR アンタゴニストによる AhR 核移行の阻害

### 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

漢方薬成分中に AhR の作動薬となる分子があることが報告されており、一次スクリーニングから 62 種類の成分から 12 種類の AhR 作動薬候補分子を同定した。長期保存による成分分子の劣化・変化の可能性を排除するため、購入したばかりの漢方成分を用いてレポーターアッセイを行った。スクリーニングには、ルシフェラーゼ遺伝子上流に AhR-ARNT 複合体の認識配列である XRE を 4 つタンデムにもつ XRE レポーターベクターを用いた。MCF-7 に XRE レポーターベクターと  $\beta$  ガラクトシダーゼ発現ベクターをトランスフェクションし、漢方薬成分を添加して 1h 後に 10nM の TCDD を添加した。TCDD 添加 48h 後に細胞抽出液を作製しルシフェラーゼ活性を測定することによって、AhR に対するアンタゴニスト活性の測定とした。その結果、漢方成分 No.9、漢方成分 No.15、漢方成分 No.16、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 7 種の成分がアンタゴニスト候補として同定された (図 4)。7 種のうち漢方成分 No.22、漢方成分 No.27 の 2 種は弱いアゴニスト活性も示した。また漢方成分 No.19、漢方成分 No.21 の 2 種は 10  $\mu$ M 濃度において MCF-7 への細胞障害性を認め、ルシフェラーゼ活性を測定することができなかったが、AhR 作動薬であることがすでに報告されているため、これより後の解析にも用いた。

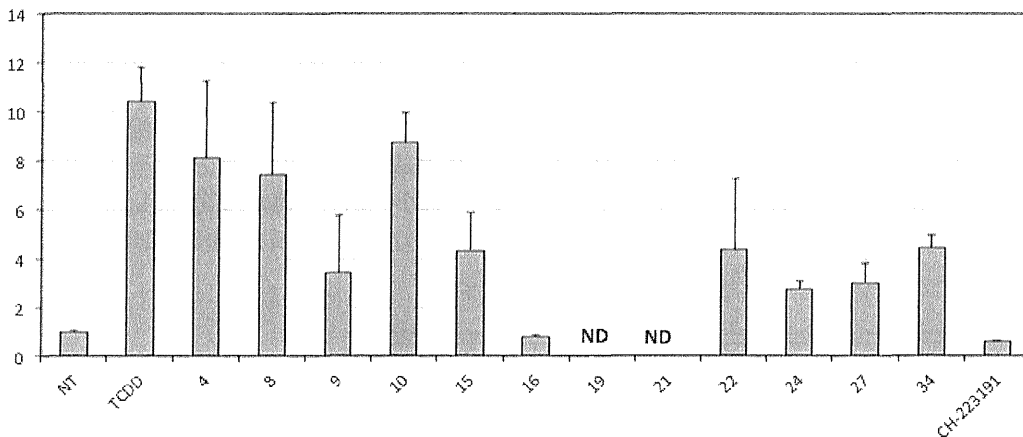


図 4. XRE レポーターアッセイによる AhR アンタゴニストの同定

### 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

同定された AhR 作動薬のアンタゴニスト活性強度を明らかとするため、10  $\mu$ M よりもさらに低い濃度でのアンタゴニスト活性を XRE レポーターアッセイによって解析した。その結果、漢方成分 No.16、漢方成分 No.24、漢方成分 No.27、漢方成分 No.34 の 4 種は 1.25  $\mu$ M の濃度においてもルシフェラーゼ活性を強く抑制し、漢方成分 No.15、漢方成分 No.22 の 2 種も 2.5  $\mu$ M より強い抑制作用を示した (図 5)。

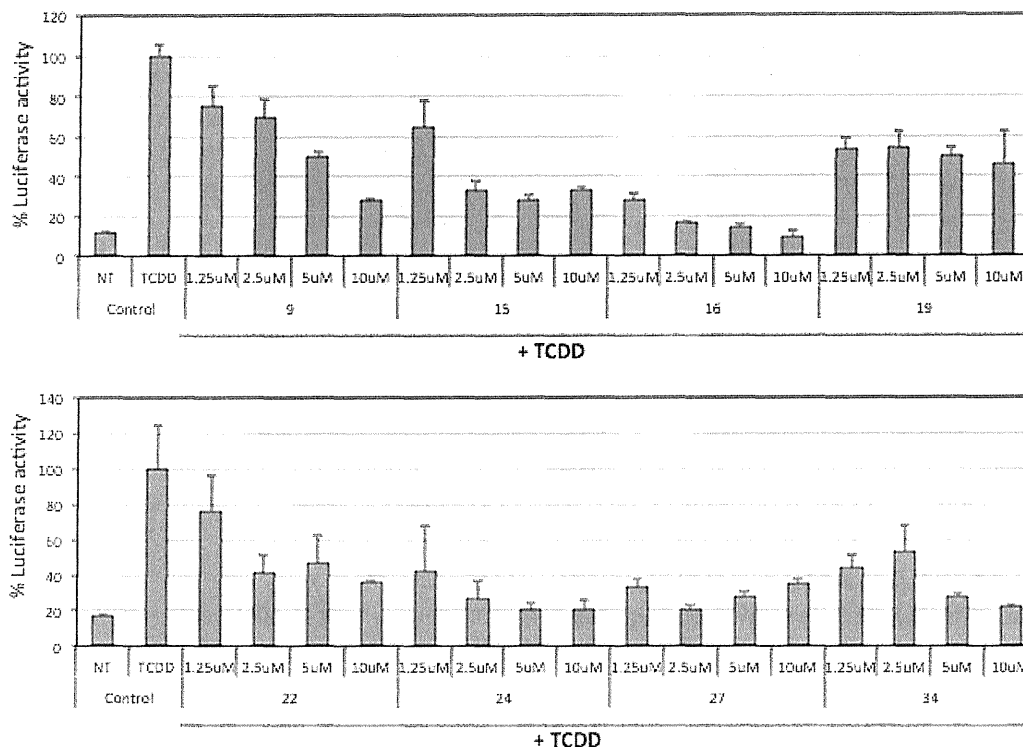


図5. XRE レポーターアッセイによるアンタゴニスト活性の強度解析

#### 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

次に、同定された成分が AhR 依存的な細胞の形質に作用するかを検証した。ヒト悪性黒色腫細胞の浸潤能が AhR の制御を受けていることは明らかになっており、今回我々はマウス悪性黒色腫細胞株の B16F10 を用いて実験を行った。まず B16F10 の浸潤能が AhR による制御を受けているかを確認するため、B16F10 に AhR アゴニストである TCDD、Kynurenine、もしくはアンタゴニストである CH-223191 を添加し、その浸潤能を解析した。AhR アゴニスト/アンタゴニストは浸潤能計測の 24h 前に B16F10 に添加され、xCELLigence システムを用いて 2.5%マトリゲルに浸潤する細胞をそれぞれ計測した。その結果、AhR アゴニスト TCDD 添加によって B16F10 の浸潤能が亢進し、アンタゴニスト CH-223191 によって浸潤能が強く抑制された (図6)。この結果より、B16F10 の浸潤能もまた AhR の制御を受けていることが示唆された。次に同じ系を用いて、レポーターアッセイによって同定した AhR アンタゴニストが B16F10 の浸潤能に影響を及ぼすか検証した。その結果、漢方成分 No.15、漢方成分 No.24、漢方成分 No.27、漢方成分 No.34 の4種の漢方薬成分は B16F10 の浸潤能を強く抑制した (図7、8)。漢方成分 No.9、漢方成分 No.22 の2種は浸潤能には影響を与えず、また漢方成分 No.16、漢方成分 No.19、漢方成分 No.21 の3種は B16F10 に毒性が強くそのパイアビリティに著しく影響を与えたため解析不能とした。

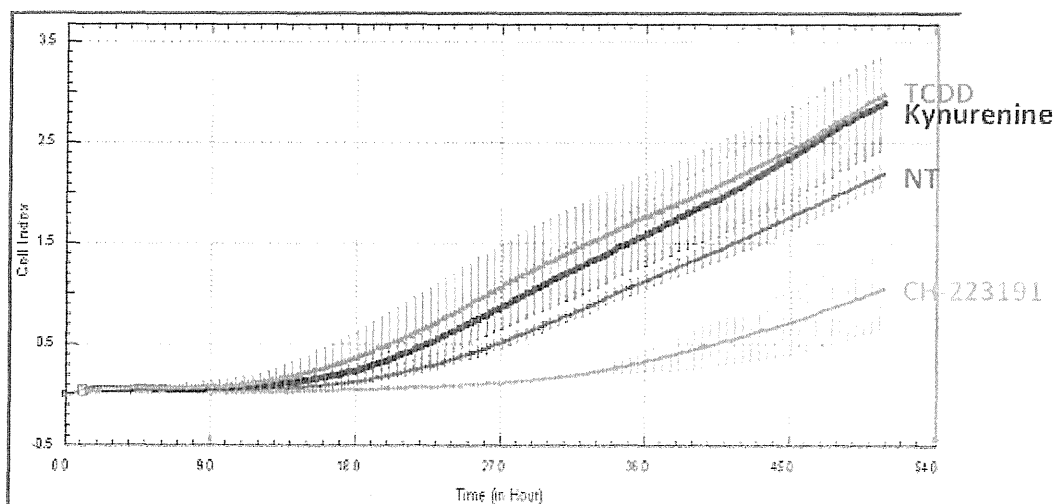


図6. AhR 依存的な B16F10 の浸潤能

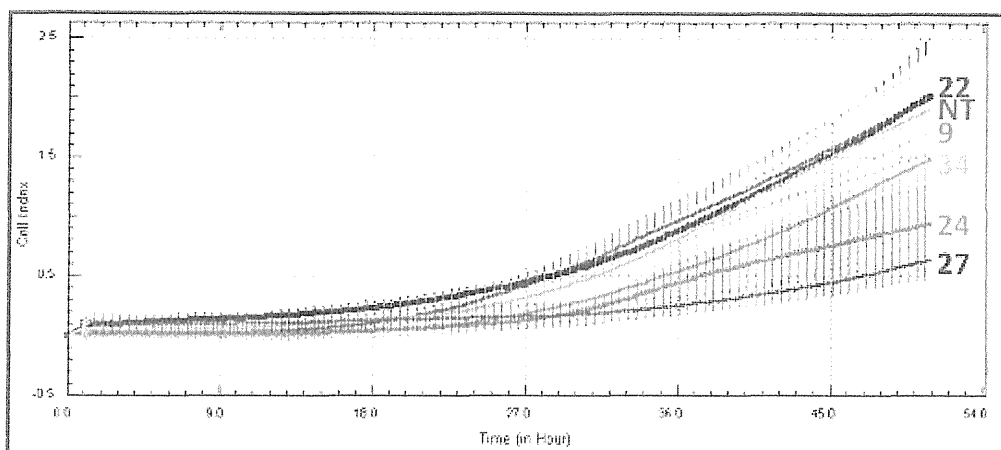


図7. 漢方薬成分による B16F10 浸潤能の抑制効果

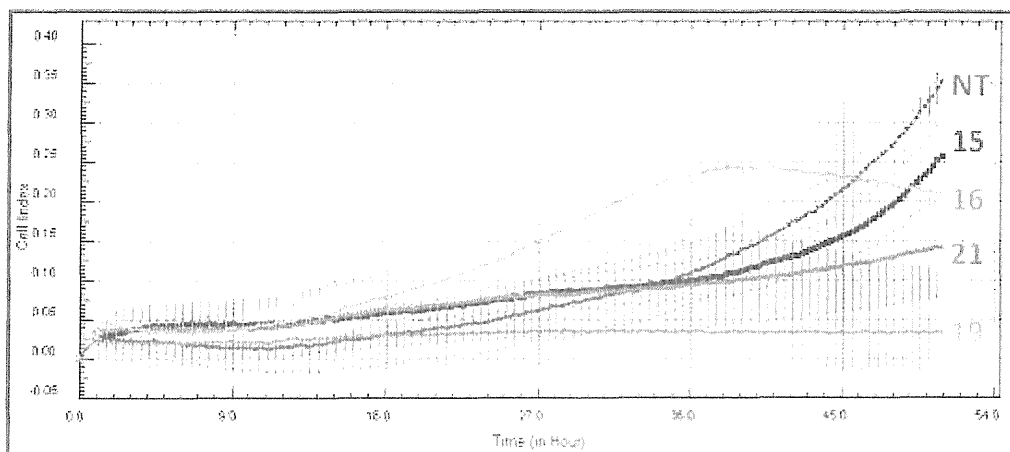


図8. 漢方薬成分による B16F10 浸潤能の抑制効果

#### 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

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

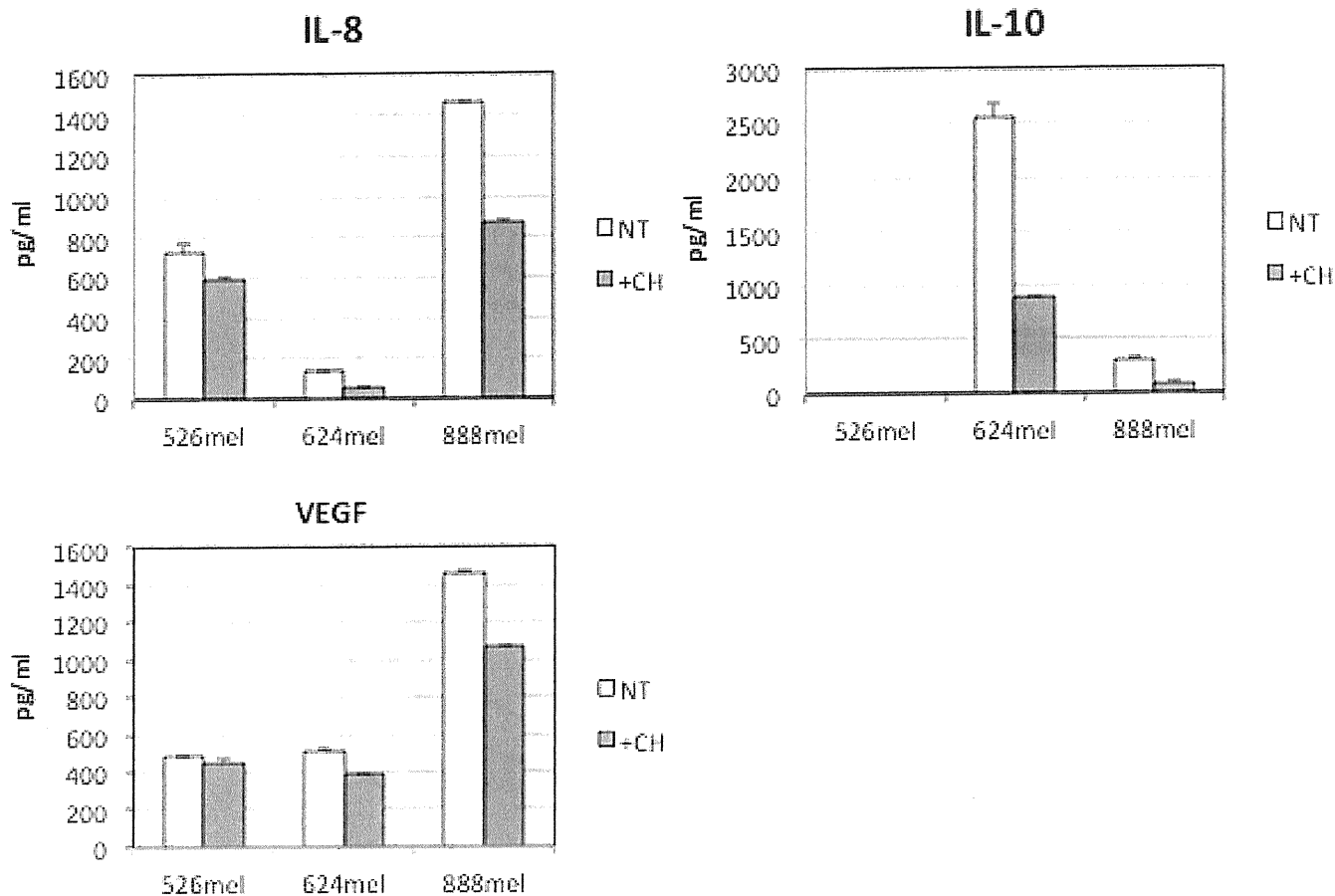
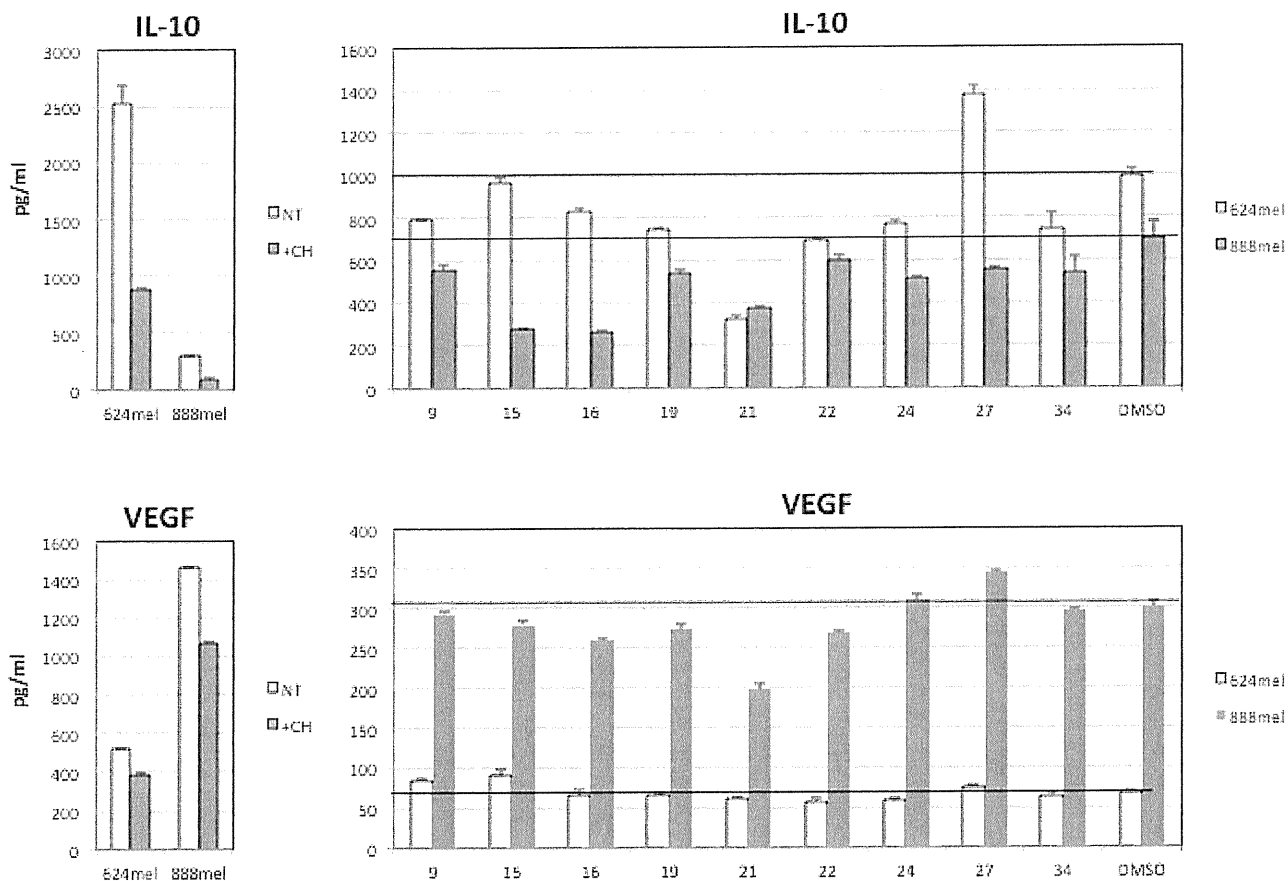


図9. AhRによるヒトがん細胞サイトカイン産生制御



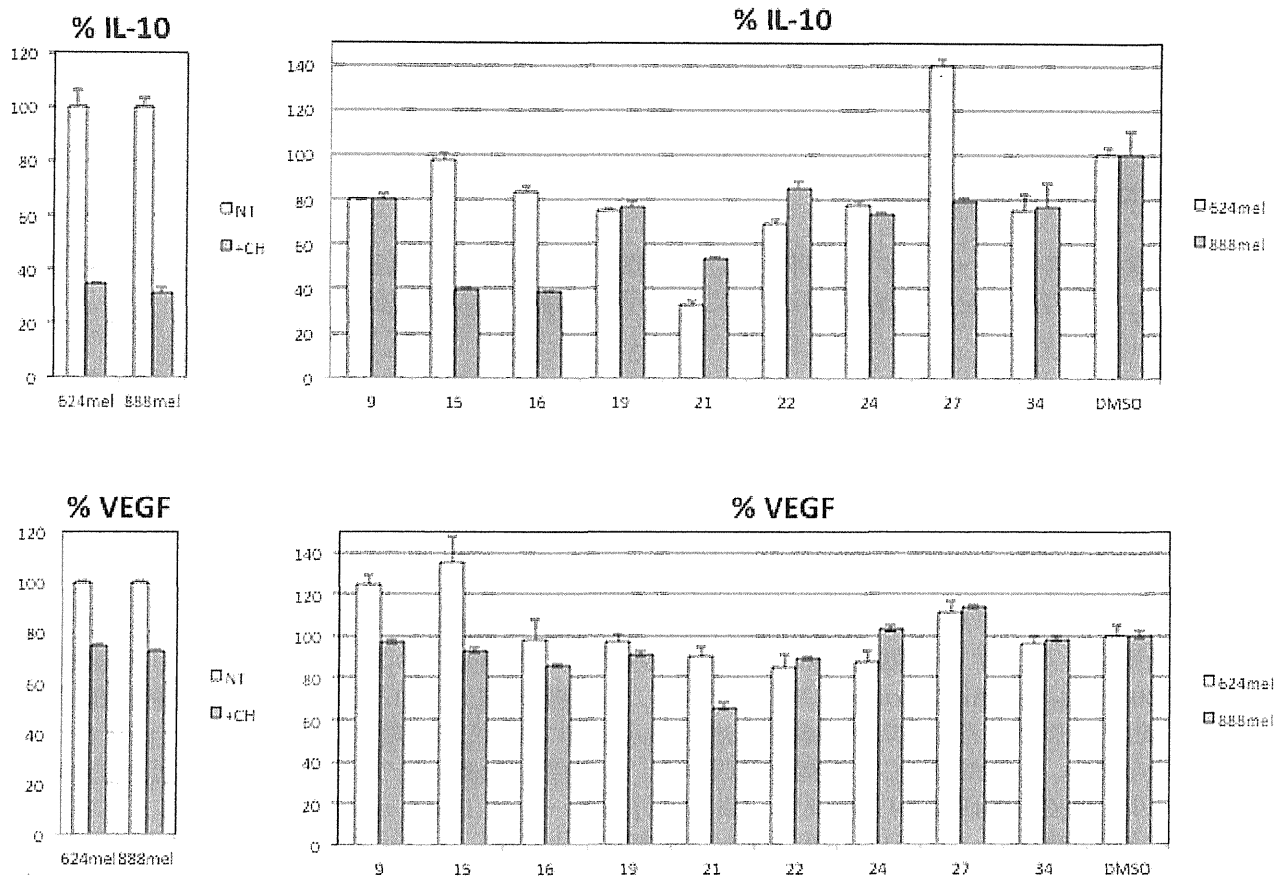


図 10. ヒト悪性黒色腫細胞 624mel、888mel からの免疫抑制分子 IL-10、VEGF 産生低下作用

526mel, 624mel, 888mel に加えて、幾つかのヒト腎がん細胞株、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 (図 11)。多くのがん細胞株からの IL-6, VEGF, IL-8 産生を CH-223191 が抑制していることが示された。

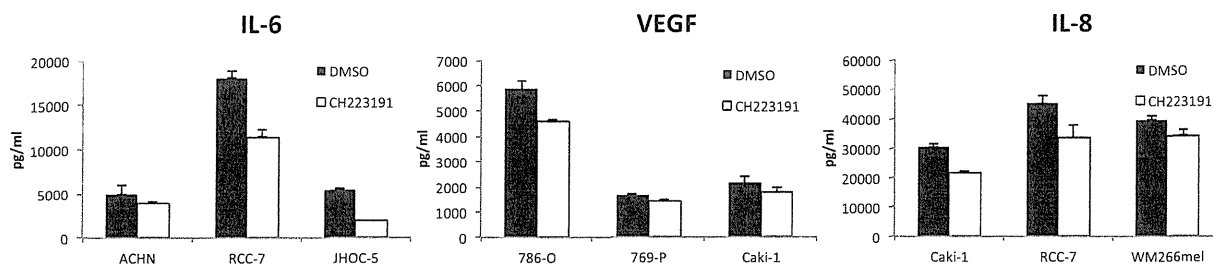


図 11 各種がん細胞株からのサイトカイン産生に対する AhR 阻害剤 CH-223191 の影響

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

AhR は IL-10 の産生を制御していることはすでに報告されている。ヒト悪性黒色腫細胞株 526mel, 624mel,

888mel に AhR アンタゴニストである CH-223191 を添加した結果、IL-10 のみならず IL-8, VEGF の産生も抑制され (図 9)、これらの産生も AhR に制御されていることがわかった。これらサイトカイン産生制御に加えて、がん細胞浸潤能制御においての AhR の重要性が本研究においても確認され、漢方成分を用いた AhR 活性化の制御によって抗腫瘍免疫が増強されることが大いに期待される。

## 7. AhR アンタゴニストの評価系の確立

これまでの様々なスクリーニングから得られた漢方薬成分の一部は、AhR に対するアンタゴニスト活性を持っている。これらの作用を今後評価するために、今年度、評価系の確立を試みた。

### 材料と方法

#### 細胞株と薬剤

4T1, B16F10 の培養には 10% FBS を添加した DMEM を用いた。MCA205 の培養には 10% FBS を添加した RPMI1640 を用いた。AhR アンタゴニスト(CH-223191)、TCDD は、それぞれ Sigma、和光純薬で購入した。漢方成分は前述のものと同様である。

#### 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  $5 \times 10^5$  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( $1 \times 10^7$  cell/ml)に MCA205 腫瘍抗原ペプチド gp70 ( $1 \mu\text{g/ml}$ 、KSPWF<sup>T</sup>TLL)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  $1 \times 10^5$  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  $1 \times 10^5$  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- $\gamma$ (BD Biosciences)を用いて IFN- $\gamma$ の産生量を測定した。

### 結果

#### 7.1) IL-10 産生性樹状細胞の誘導抑制作用

AhR の発現は樹状細胞にも認められ、その活性化が樹状細胞の機能に影響を及ぼすことが示唆される。マウスの骨髄細胞を採取し AhR アンタゴニスト存在下で樹状細胞の誘導を行ったところ、コントロールの樹状細胞と比較して IL-10 の産生が低下し、IL-12 の産生が上昇した (図 1 A)。この結果より、AhR の活性化が樹状細胞を免疫抑制的な形質へと誘導することが示唆される。この系を用いれば、AhR アンタゴニストとしてこれまでに同定した漢方薬成分が AhR による免疫抑制的な樹状細胞の誘導を阻害できるか評価することが可能になる。

#### 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成

AhR の内在性リガンドとして働き得る Kynurenine を高産生させ AhR 活性化阻害の影響をよりわかりやすく観察するため、Kynurenine を産生する酵素 IDO を遺伝子導入したマウスがん細胞株を作製した。この細胞株は AhR の活性化が mock control に比べ顕著に誘導されていることを CYP1A1 の発現によって確認している (図 1 B)。IDO 高発現マウスがん細胞をマウスに皮下移植し、2 週間後に腫瘍内の免疫細胞を解析したところ、CD8<sup>+</sup> T 細胞の割合が減少し、Foxp3<sup>+</sup> 制御性 T 細胞の割合が増加する傾向が見られた。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る。この系を用いれば、AhR アンタゴニストとして同定した漢方薬成分が生体内の抑制的な抗腫瘍免疫環境を改善できるか検証することが可能になる。



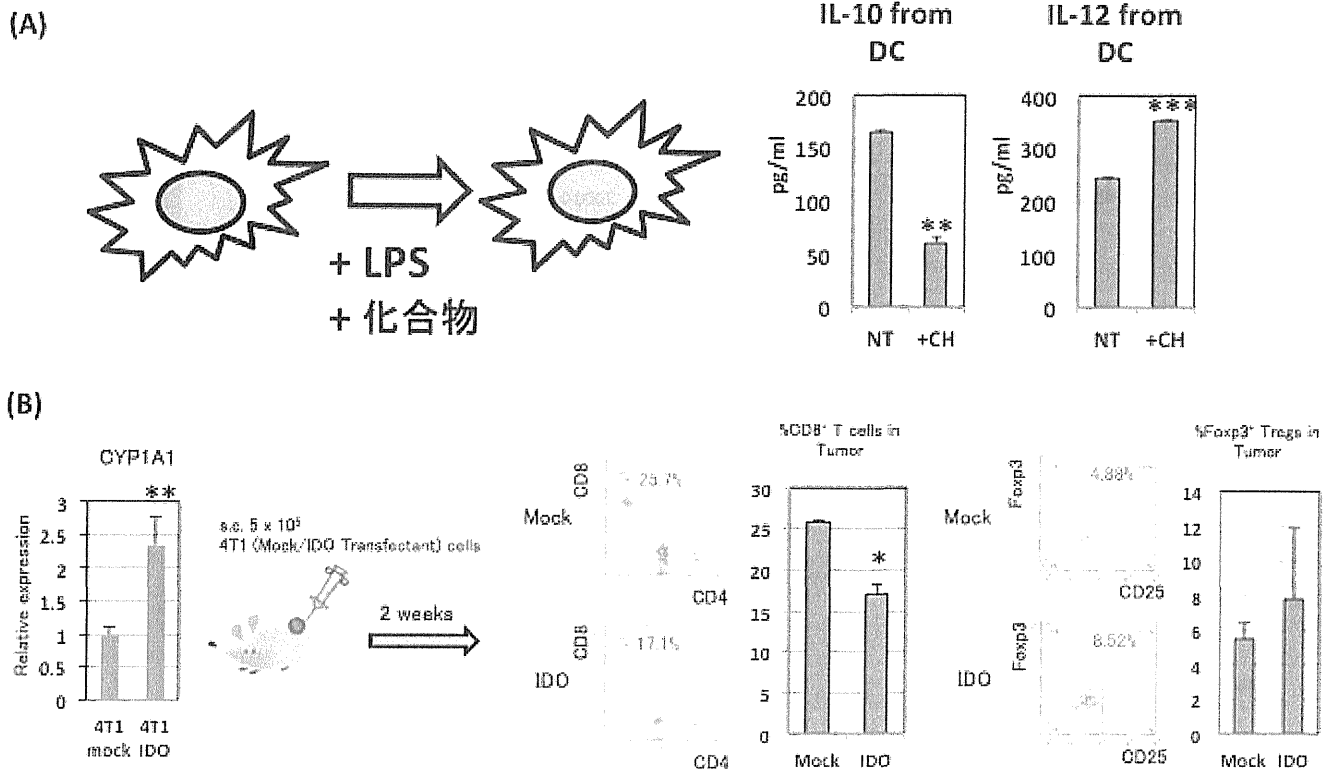


図1. 同定した漢方薬成分の免疫作用の評価法の開発

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 2 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- $\gamma$  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 2 B,C)。

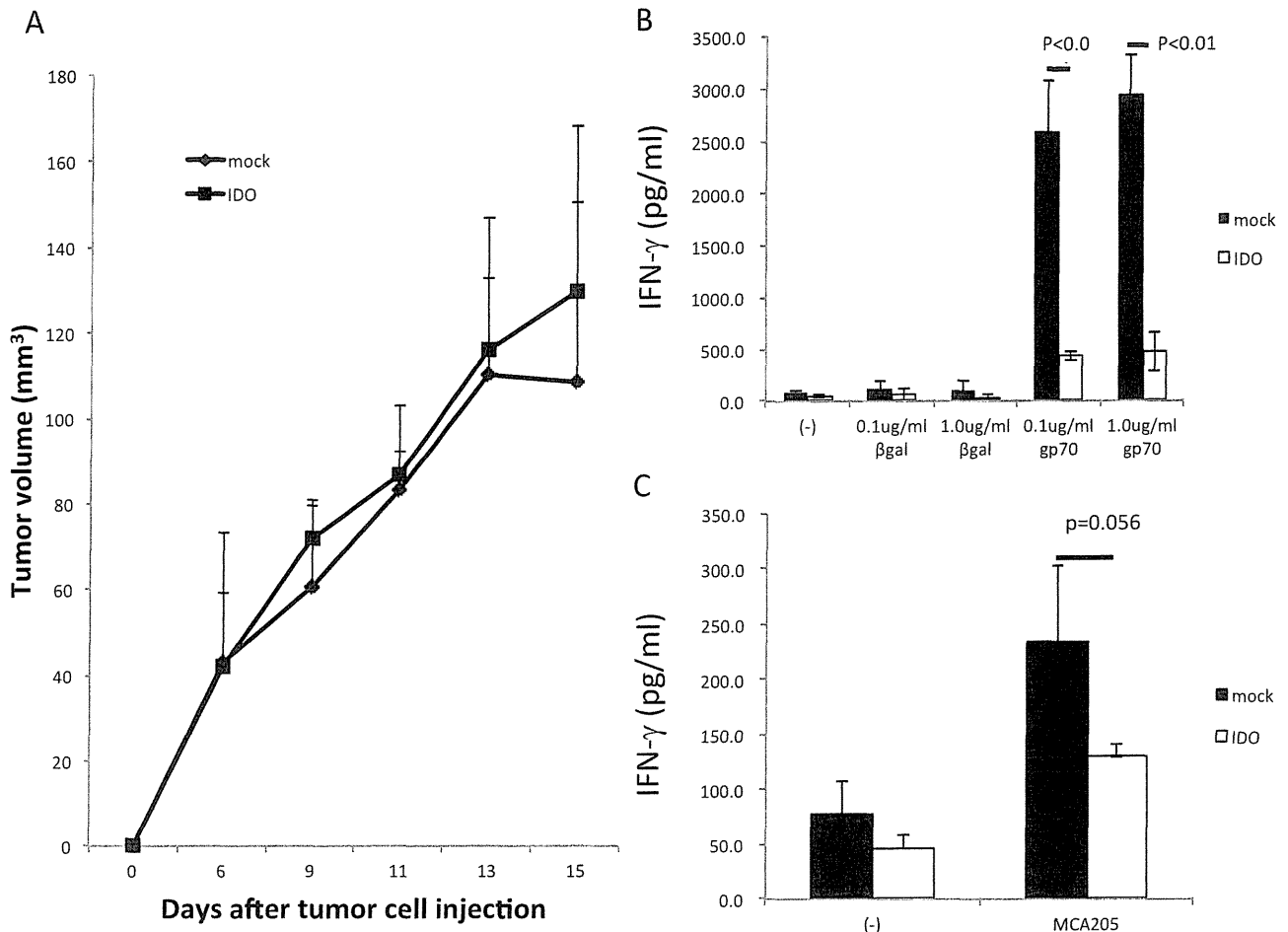


図2 IDO 過剰発現がん細胞移植マウスの腫瘍体積変化と抗原特異的及びがん細胞特異的 T 細胞応答の低下

### 7.3) AhR 活性を *in vitro* でモニタリングできるマウス悪性黒色腫細胞の樹立

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 3 B)、10μM 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 3 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 10μM 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 3 E-J)。

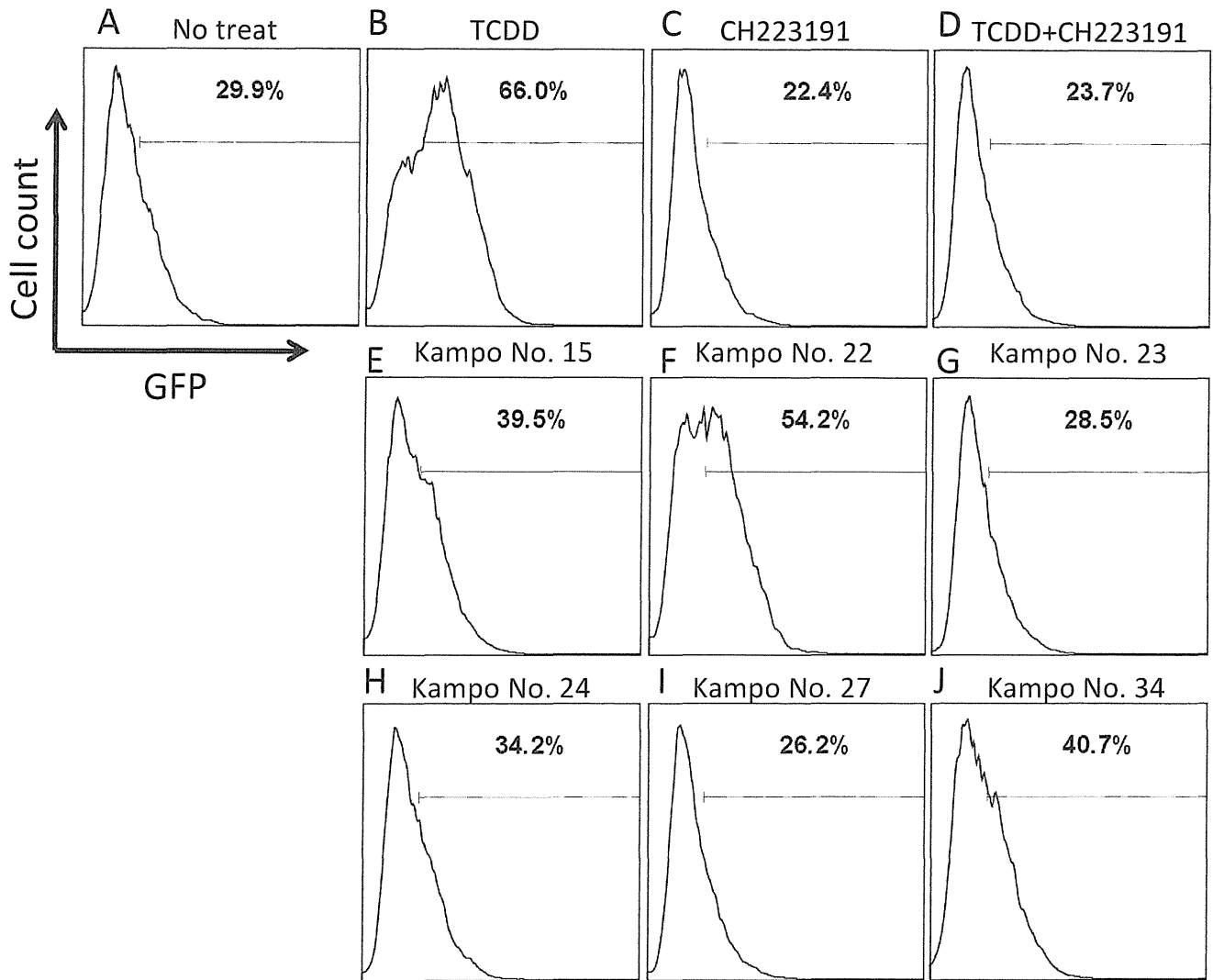


図3 Cyp1a1 プロモーター依存性に GFP 発光する B16F10 がん細胞株による AhR アンタゴニストの評価  
考察

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 Kynurenine は AhR のアゴニストであることが明らかとなった。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<sup>+</sup> T 細胞の割合が減少し、Foxp3<sup>+</sup> 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。さらに、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<sup>+</sup> 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。

## 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

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  $5 \times 10^5$  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 $\mu$ 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- $\beta$  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  $5 \times 10^5$  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 $\mu$ 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- $\beta$ -actin antibody (Sigma Aldrich) を使用した。

#### NF- $\kappa$ B 測定

マウスがん細胞株を 6well 培養プレートに  $5 \times 10^5$  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 $\mu$ g を用い、NF- $\kappa$ B filter plate assay (Signosis) のプロトコールに従って NF- $\kappa$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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。

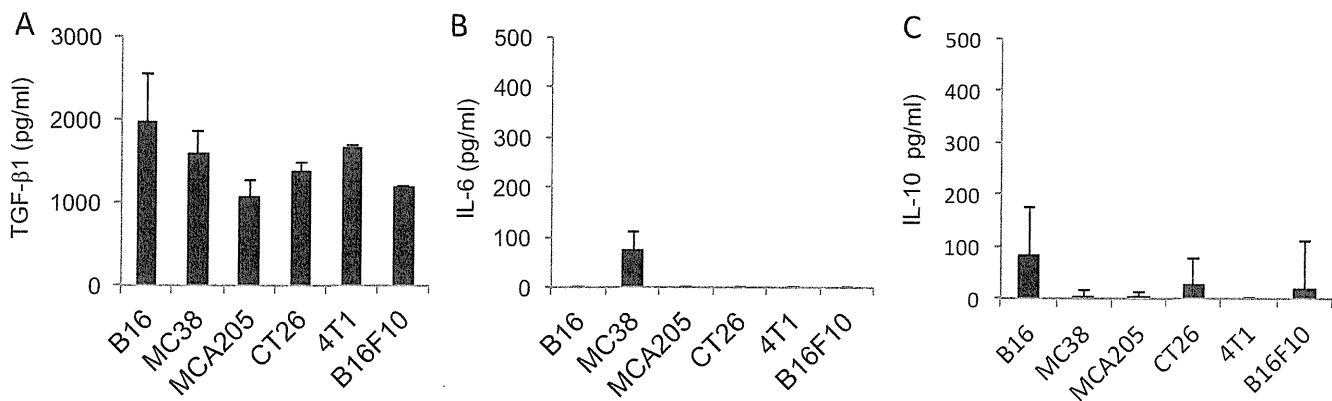


図1 マウスがん細胞株からのサイトカイン産生

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。

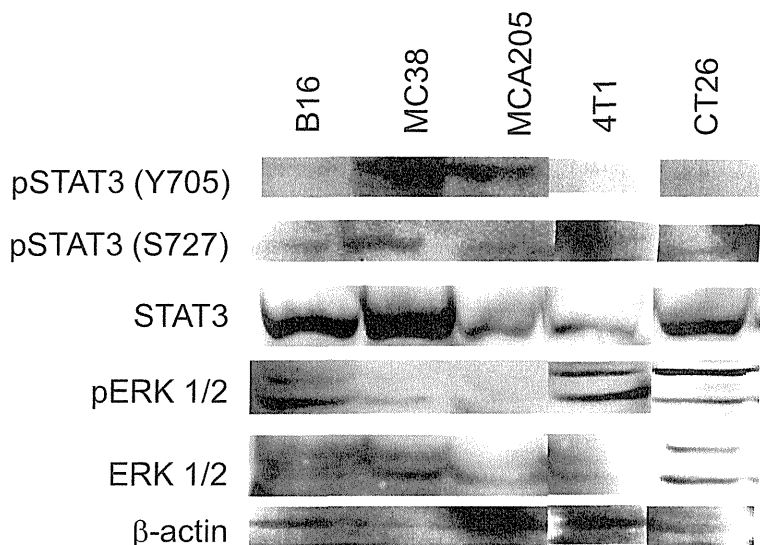


図2 マウスがん細胞株における STAT3 と ERK の活性化状態

さらに、これらの細胞株の NF-κB 活性を NF-κB filter plate assay kit を用いて測定した。これは、NF-κB 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-κB 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-κB 活性を示し、MCA205 と CT26 で弱い活性が認められた (図3)。

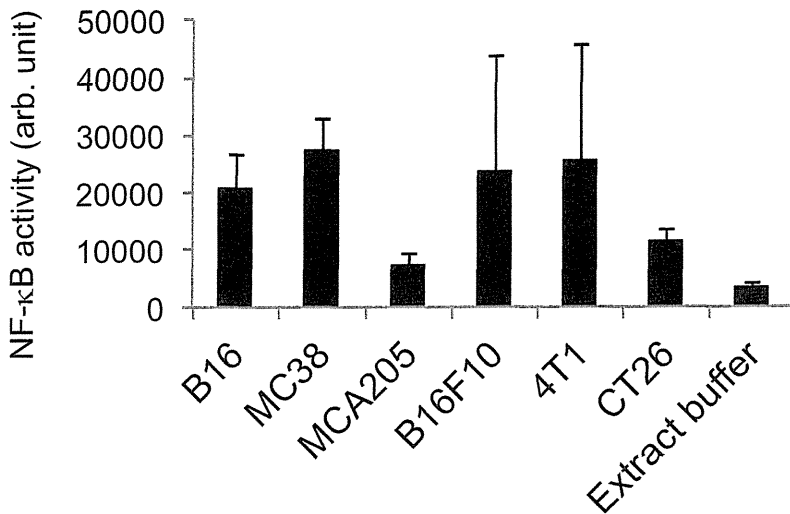


図3 マウスがん細胞株における NF-κB の活性化状態

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)。

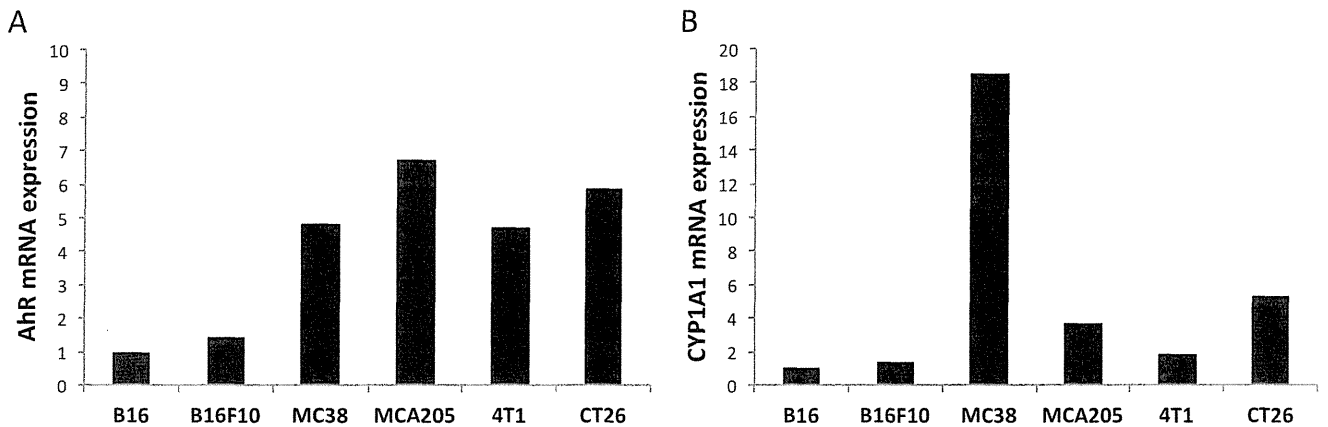


図4 マウスがん細胞株における AhR の発現と活性化状態

### 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。

### 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(平成 23 年度)

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

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

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

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

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

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

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

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

我々は、大腸がん細胞 CT26 を移植したマウスにこれらの成分を投与して、その *in vivo* での効果を明らかにすることを試みた。

## 材料と方法

### 実験動物

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

### 漢方成分

本研究で使用した漢方成分は 10mg/mL として DMSO に溶解した。

### マウス癌細胞株

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

### 細胞増殖解析法

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

### LDH-細胞傷害活性測定法

マウス大腸がん細胞株 CT26 細胞および漢方成分と一緒に、96 ウェルプレートに加え、 $1 \times 10^4$  cells/well とし て培養した。C57/BL6 健常マウス脾細胞を異なる濃度の漢方成分と一緒に、96 ウェルプレートに加え、 $2 \times 10^4$  cells/well とし て培養した。プレートは 37°C、5%CO<sub>2</sub>、24 時間培養し、漢方成分による細胞傷害性を Cytotoxicity Detection Kit (Roche) を用いて測定した。操作はプロトコールに準じて行った。

## 担がんマウスモデル

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

## フローサイトメトリー

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

## 腫瘍抗原特異的な T 細胞応答の解析

各個体の脾臓細胞( $1 \times 10^7$ )にマウス大腸がん細胞株 CT26 腫瘍抗原ペプチド AH-1 (1  $\mu$ g/ml、SPSYVYHQF)を加え、6 日間培養し、細胞を回収した。その後、24 ウェルプレートにペプチド(1  $\mu$ g/ml)と  $1 \times 10^6$  cells/well として再度、共培養した。プレートは 37°C、5%CO<sub>2</sub>、24 時間培養し、培養上清を回収し、BD OptEIA™ Set Mouse IFN- $\gamma$  (BD Biosciences, San Diego, CA)を使用して IFN- $\gamma$  の産生を測定した。漢方成分 No.35 に関しては、腫瘍より回収した、単核球(MNC)の単離には、パーコール密度勾配遠心分離法(GE Healthcare)を使用し、40% から 90%インターフェイスの細胞を採取した。単核球の培養には 1  $\mu$ g/ml の CT26 腫瘍固有抗原ペプチド AH-1 (SPSYVYHQF)を加えて行った。培養開始から 5 日後に細胞を回収して、次の刺激要因と共培養した：1) CT26 細胞、2) AH-1 で 1 時間ほど刺激された MethA 細胞、3) 関連性のないペプチド H-2L<sup>d</sup>  $\beta$ -gal で 1 時間ほど刺激された MethA 細胞、又は、4) コントロールとして medium のみ。そして、次の日、培養上清を回収し、BD OptEIA™ Set Mouse IFN- $\gamma$  (BD Biosciences, San Diego, CA)を用いて、IFN- $\gamma$  の産生を測定した。

## 統計学的解析

得られたデータは平均値±標準誤差、または平均±標準偏差で示した。統計学的有意差の評価には、t 検定を用いた。p<0.05 の場合に有意差有りとした。

## 結果

### 9.1) 漢方成分 No.9

マウス大腸がん株化細胞 CT26 と健常マウス脾臓細胞の培養上清中に放出された LDH 量を測定することで漢方成分 No. 9 の細胞毒性を確認した。漢方成分 No. 9 0.123-10  $\mu$ M の濃度範囲で細胞毒性は見られず、細胞は生存していた (図 1 a,c)。

マウス大腸がん株化細胞 CT26 と健常マウス脾臓細胞の細胞増殖に対する漢方成分 No. 9 の作用を調べた (図 1 b,d)。どちらの細胞の細胞増殖に対しても漢方成分 No. 9 0.123-10  $\mu$ M の濃度範囲では増殖抑制作用はなく、むしろ CT26 株化細胞に対しては高濃度領域で、細胞増殖をわずかに亢進させる働きがみられた。

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

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

フローサイトメトリーを用い、免疫担当細胞の頻度を解析した。脾臓や、腫瘍近傍の鼠径リンパ節では差が認められないものの、腫瘍中で CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合が増加していた (図 3)。また、NK 細胞と、NK T 細胞



胞が局所リンパ節で頻度が増加していた (図 4)。本実験において、Treg 細胞頻度はどの臓器でも変化が無かった (図 5)。

マウス大腸がん株化細胞 CT26 の腫瘍抗原である AH1 ペプチドを用いて、腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導を行い、誘導後の抗原特異的 T 細胞が産生する IFN $\gamma$  を ELISA 法を用いて測定した。漢方成分 No. 9 投与群は対照群と比較し、有意に IFN $\gamma$  産生が高かった (図 6)。

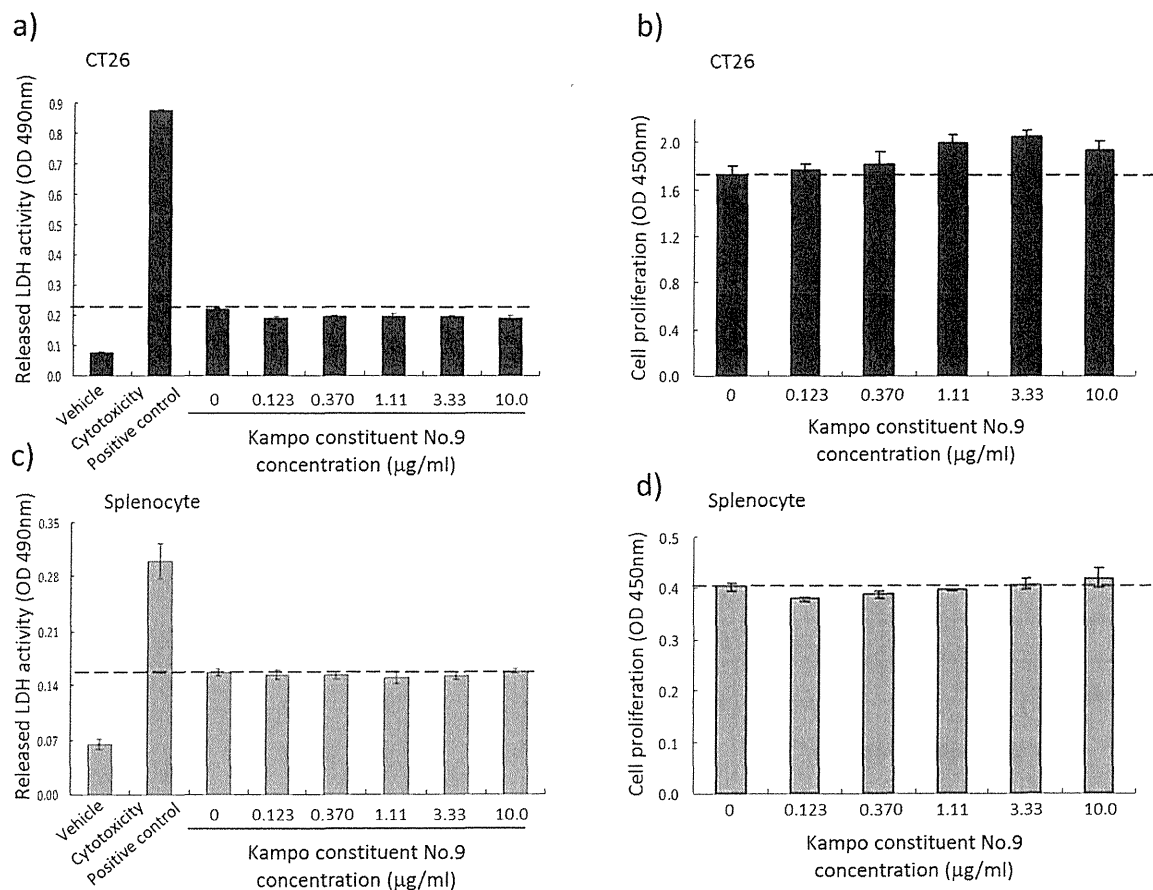


図 1. マウス大腸がん細胞株 CT26 と健常マウス脾細胞に対する漢方成分 No. 9 の影響

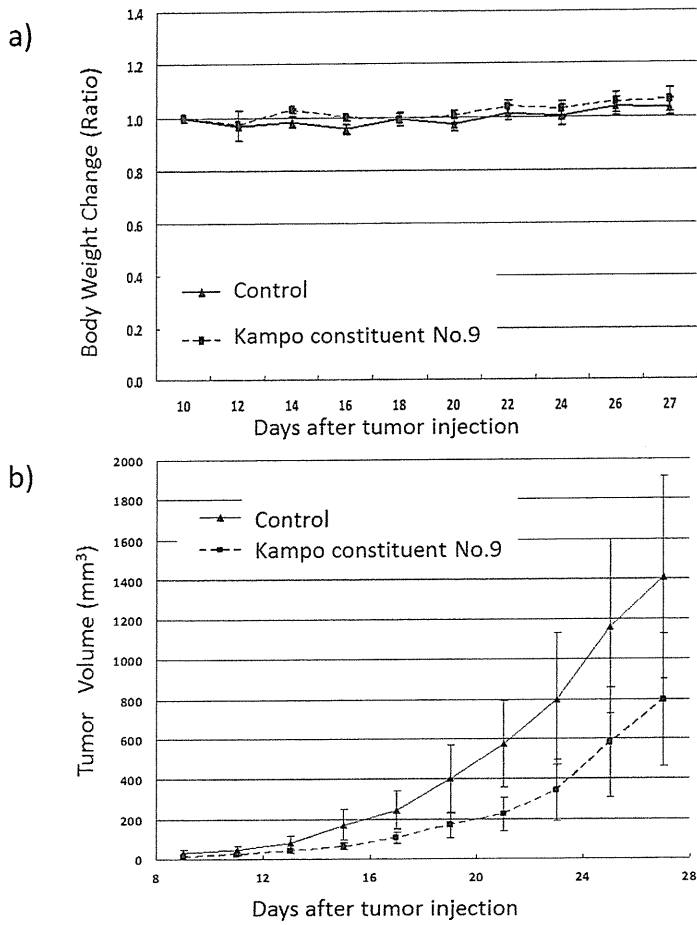


図2.漢方成分 No.9 投与による担がんマウスへの *in vivo* 作用  
a) 体重変化、b) 腫瘍径変化

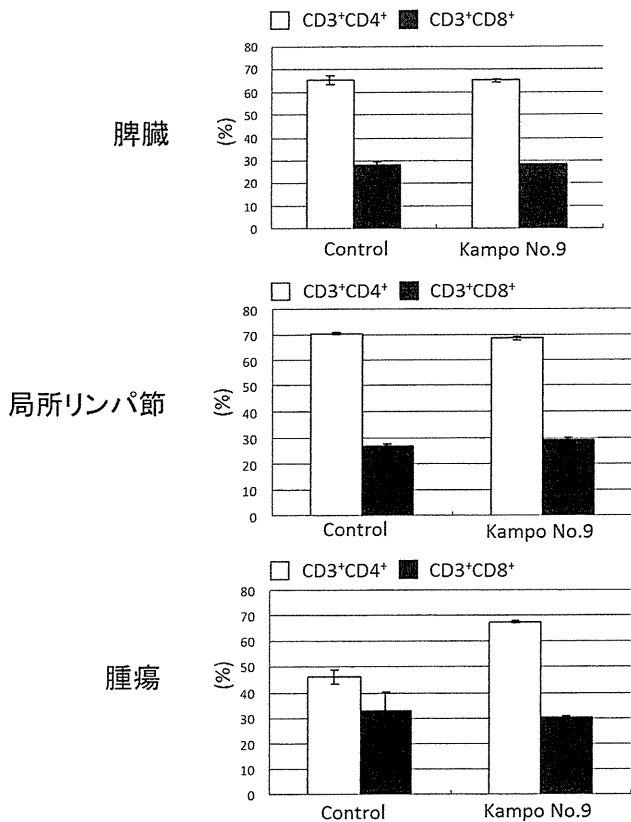


図3. 漢方成分 No.9 投与による担がんマウスの T 細胞への効果

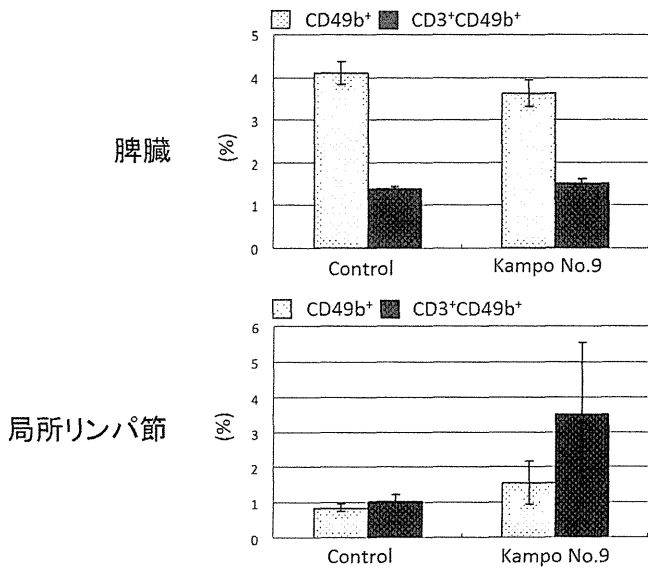


図4. 漢方成分 No.9 投与による担がんマウスのNK/NKT 細胞への効果

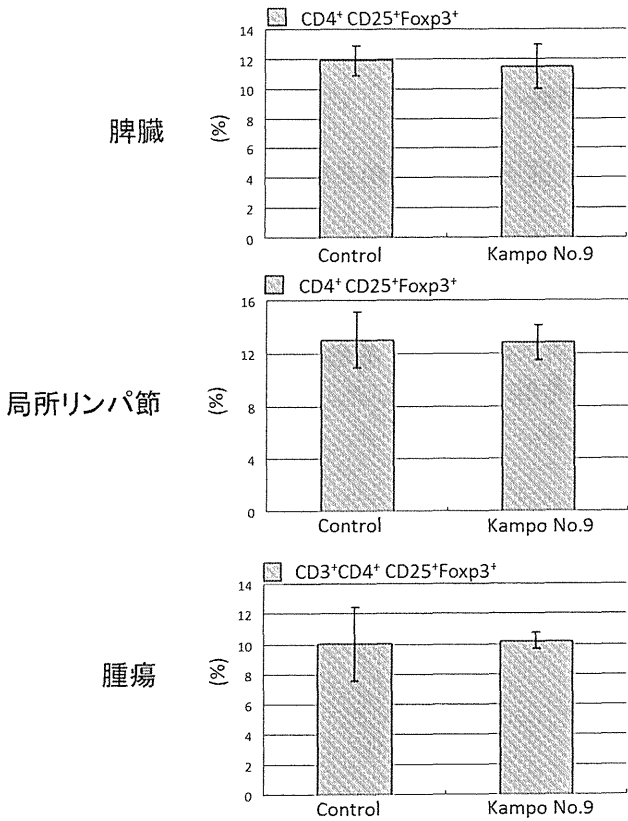


図5. 漢方成分 No.9 投与による担がんマウスのTreg 細胞への効果

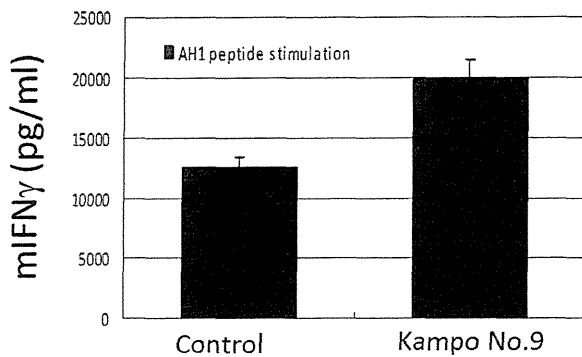


図6. 漢方成分 No. 9 投与による担がんマウスの腫瘍抗原特異的 T 細胞の誘導

## 9.2) 漢方成分 No.16

マウス大腸がん株化細胞 CT26 と健常マウス脾臓細胞の培養上清中に放出された LDH 量を測定することで漢方成分 No. 16 の細胞毒性を確認した。漢方成分 No. 16 0.123-10  $\mu$ M の濃度範囲で細胞毒性は見られず、漢方成分 No. 16 処理後も細胞は生存していた (図 7)。

マウス大腸がん株化細胞 CT26 と健常マウス脾臓細胞の細胞増殖に対する漢方成分 No. 16 の作用を調べた (図 7)。CT26 細胞の細胞増殖に対して、0.123-10  $\mu$ M の濃度範囲の漢方成分 No. 16 では増殖抑制を生じることとはなかった。しかしながら、健常マウス脾臓細胞に対しては 10  $\mu$ M の濃度において有意に細胞増殖抑制がみられた。

全実験期間を通して漢方成分 No. 16 投与群の体重増加は対照群と差はなく、マウスの成長に影響を及ぼさなかった (図 8 a)。

漢方成分 No. 16 を投与した担がんマウスは対照群と比較して投与開始早期から腫瘍の増大を抑制する傾向が見られた (図 8 b)。

フローサイトメトリーを用い、免疫担当細胞の発現頻度を解析した。脾臓や、腫瘍では差が認められないものの、腫瘍近傍の鼠径リンパ節中で  $CD8^+$  T 細胞の割合が増加していた (図 9)。また、NK T 細胞が脾臓で頻度が増加していた (図 10)。Treg 細胞頻度は腫瘍において減少傾向が見られた (図 11)。

マウス大腸がん株化細胞 CT26 の腫瘍抗原である AH1 ペプチドを用いて、腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導を行い、誘導後の抗原特異的 T 細胞が産生する IFN $\gamma$  を ELISA 法を用いて測定した。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 (図 12)。