

図 4 3. 漢方成分 No. 35 投与による担がんマウスの腫瘍内 T 細胞、Treg 細胞への効果

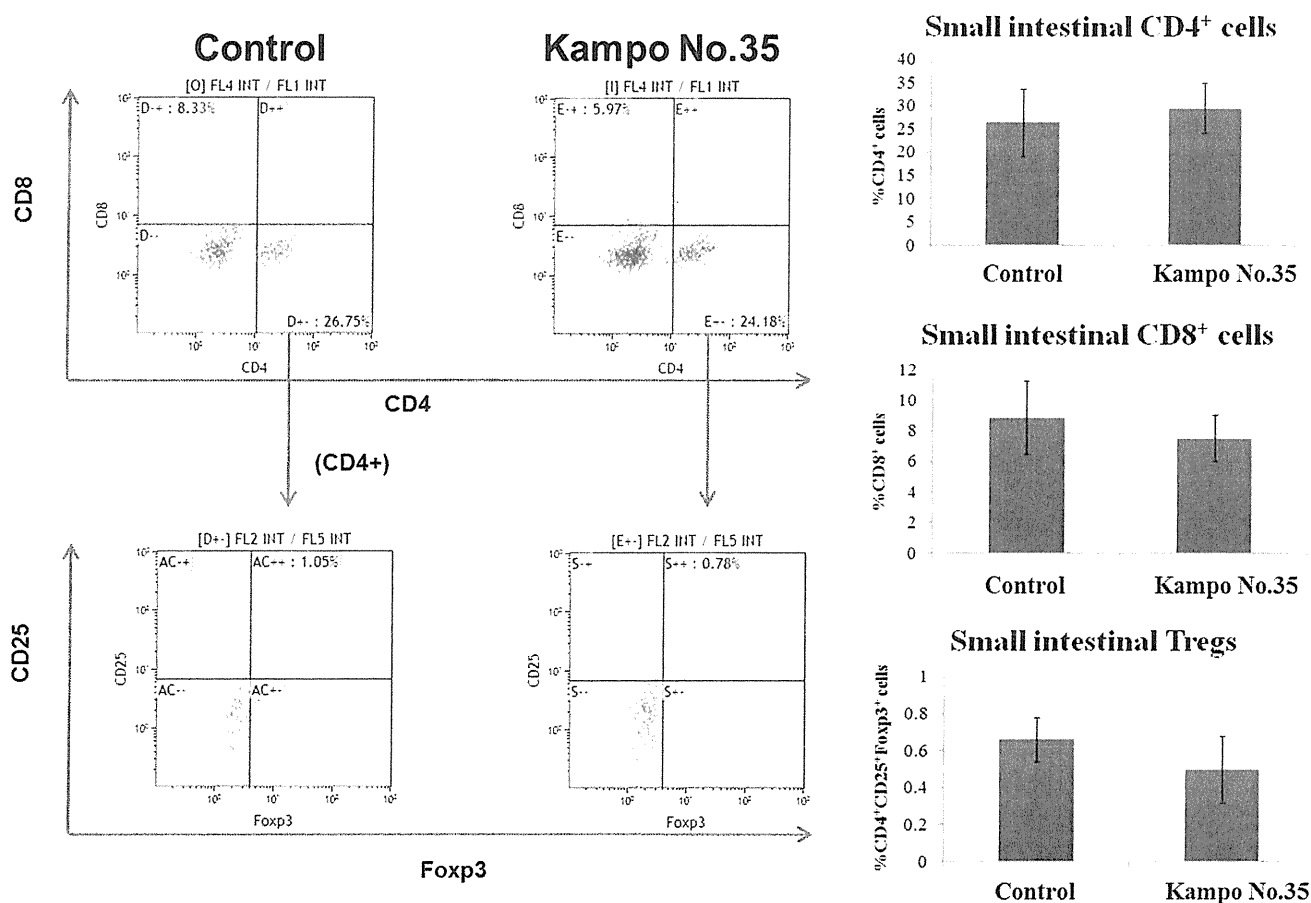


図 4 4. 漢方成分 No. 35 投与による担がんマウスの小腸内 T 細胞、Treg 細胞への効果

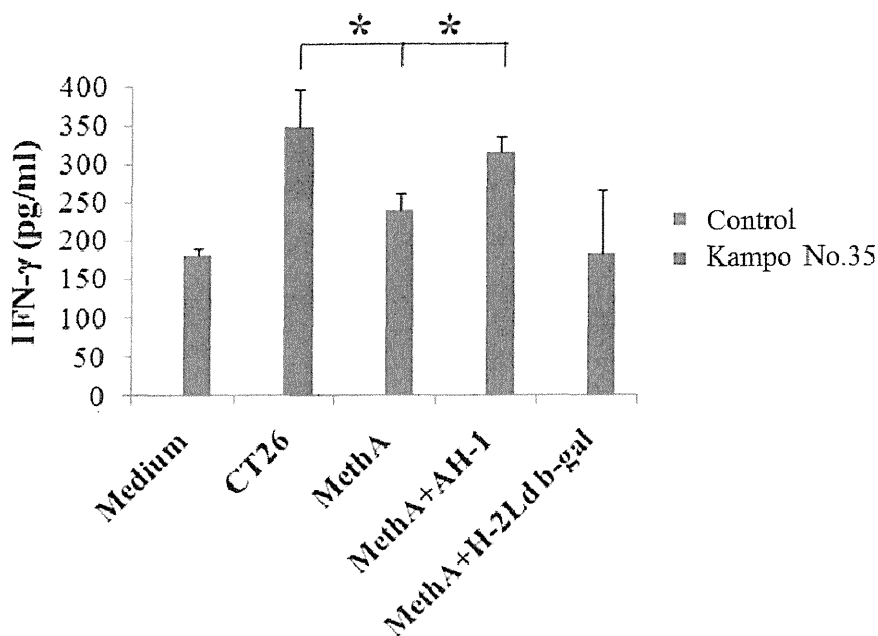


図4.5. 漢方成分 No. 35 投与による担がんマウスの腫瘍抗原特異的 T 細胞の誘導

考察

漢方成分 No. 9 を担がんマウスに投与し、漢方成分 No. 9 の抗腫瘍効果を検討した。実験最終日までの体重減少が顕著ではないことから、著しい毒性はないと推測される。腫瘍株化細胞と健常マウス脾細胞に対しても細胞傷害性が認められなかった。一方、高濃度領域の漢方成分 No. 9 は CT26 細胞増殖を亢進させる作用があった。腫瘍径の増大を抑える働きがみられたことから、生体内では必ずしも腫瘍の増殖を促進しているとは言えず、むしろ漢方成分 No. 9 の何らかの作用により癌免疫状態を改善している可能性がある。フローサイトメトリーによる解析結果では顕著な差は見られなかった。しかしながら、腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導による IFN γ の産生量は有意に増加しており、漢方成分 No. 9 の投与により抗原特異的な CTL の誘導が促進されたことを示唆する。今後更に抗腫瘍免疫応答のメカニズムを明らかとすべく、研究を進める必要がある。

漢方成分 No. 16 の抗腫瘍効果を担がんマウスモデルを利用して検討した。実験最終日までの体重減少が顕著ではないことから、著しい毒性はないといえる。腫瘍株化細胞と健常マウス脾細胞に対しても細胞傷害性が認められず、細胞増殖に影響を与えるのは 10 μ M 作用時の健常マウス脾細胞だけであった。従って、漢方成分 No. 16 の抗腫瘍効果は腫瘍細胞へ直接的な細胞毒性作用ではないと考えられる。フローサイトメトリーによる解析結果では顕著な差は見られなかったが、腫瘍近傍の鼠径リンパ節中で CD8⁺T 細胞の割合が増加する傾向があった。また、腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導による IFN γ の産生量も増加させており、漢方成分 No. 16 の投与により抗原特異的な応答の誘導が促進されたことを示唆する。

漢方成分 No. 17 を担がんマウスに投与し、漢方成分 No. 17 の抗腫瘍効果を検討した。実験最終日までの体重減少が顕著ではないことから、著しい毒性は作用していないといえる。また、担がん状態による脾腫を回避しており、腫瘍細胞の浸潤が少ないことが示唆される。腫瘍株化細胞と健常マウス脾細胞に対しても高濃度領域で細胞傷害活性が存在し、細胞増殖に対しても漢方成分 No. 17 の濃度依存的に細胞増殖を有意に抑制した。従って、漢方成分 No. 17 の抗腫瘍効果は細胞毒性や、各種細胞に対する細胞増殖抑制による作用を含んでおり、マウスに投与する濃度や腫瘍細胞への直接的作用を考慮する必要がある。フローサイトメトリーによる解析結果では顕著な差は見られなかった。また腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導による IFN γ の産生量は対照群と比較し、むしろ顕著に低下していた。漢方成分 No. 17 はヒトがん細胞からの免疫抑制性サイトカイン産生を抑制において OVCAR3、JHOC5 の産生する IL-6 を顕著に抑制する作用、888mel と 624mel の産生する IL-10 を抑制する作用が確認された。腫瘍細胞の産生するサイトカインに対しては抑制方向に働いており、何らかのシグナル阻害剤として作用している可能性がある。今後更に *in vivo* の実験を行い宿主の免疫担当細胞の活性への影響を検討する必要がある。

漢方成分 No. 23 を担がんマウスに投与し、漢方成分 No. 23 の抗腫瘍効果を検討した。腫瘍株化細胞に対しては細胞傷害性も細胞増殖抑制も確認されなかったが、健常マウス脾細胞に対しては 3.33-10 μM の濃度範囲で細胞傷害性が確認され、10 μM の濃度範囲で細胞増殖抑制が認められた。健常細胞に対する侵襲性は今後も検討すべきであるが、実験最終日までの体重減少が顕著ではないことから、著しい毒性は作用していないと示唆される。*In vitro* の実験結果で、腫瘍株化細胞へ直接的作用が確認されなかった。つまり、腫瘍径の増大を抑える働きがみられたことは漢方成分 No. 23 の宿主免疫応答への何らかの作用が影響していると考えられる。フローサイトメトリーによる解析結果では、腫瘍内で CD4^+ T 細胞頻度の増加、また抗腫瘍免疫を担う NK 細胞、NK T 細胞が局所リンパ節で頻度が増加していた。また腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導によって産生する $\text{IFN}\gamma$ 産生量が有意に増加したことからも抗腫瘍免疫応答の増強作用が推測される。今後更に抗腫瘍免疫応答のメカニズムを明らかとすべく、研究を進める必要がある。

漢方成分 No. 24 を担がんマウスに投与し、漢方成分 No. 24 の抗腫瘍効果を検討した。腫瘍株化細胞に対しては細胞傷害性も細胞増殖抑制も確認されなかったが、健常マウス脾細胞に対しては 10 μM で細胞傷害性、3.33-10 μM の濃度範囲で細胞増殖抑制が認められた。健常細胞に対する侵襲性は今後も検討すべきであるが、実験最終日までの体重減少が顕著ではないことから、著しい毒性は作用していないと示唆される。*In vitro* の実験結果で、腫瘍株化細胞へ直接的作用が確認されなかった。つまり、腫瘍径の増大を抑える働きがみられたことは漢方成分 No. 24 の宿主免疫応答への何らかの作用が影響していると考えられる。フローサイトメトリーによる解析結果では、脾臓中で CD8^+ T 細胞の割合が増加する傾向、NKT 細胞頻度が増加する傾向が見られた。また腫瘍中の Treg 細胞頻度が減少する傾向が見られた。また、腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導によって産生する $\text{IFN}\gamma$ 産生量が増加していたことからも、T 細胞応答を増強していたことが明らかである。今後更に抗腫瘍免疫応答のメカニズムを明らかとすべく、研究を進める必要がある。

漢方成分 No. 25 を担がんマウスに投与し、漢方成分 No. 25 の抗腫瘍効果を検討した。腫瘍株化細胞に対しては細胞傷害性も細胞増殖抑制も確認されなかったが、健常マウス脾細胞に対しては 10 μM で細胞傷害性、3.33-10 μM の濃度範囲で細胞増殖抑制が認められた。健常細胞に対する侵襲性は今後も検討すべきであるが、実験最終日までの体重減少が顕著ではないことから、著しい毒性は作用していないと示唆される。*In vitro* の実験結果で、腫瘍株化細胞へ直接的作用が確認されなかった。つまり、腫瘍径の増大を抑える働きがみられたことは漢方成分 No. 25 の宿主免疫応答への何らかの作用が影響していると考えられる。フローサイトメトリーによる解析結果では脾臓で抗腫瘍免疫を担う NK T 細胞が脾臓で頻度が増加する傾向、Treg 細胞頻度は腫瘍において減少傾向が見られた。*In vitro* で漢方成分 No. 25 は Treg 細胞誘導抑制効果を示しており、マウスモデルにおいても効果的に免疫抑制解除に作用しているか、今後更に詳細な実験を行う必要がある。また腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導による $\text{IFN}\gamma$ の産生量は対照群と比較し、有意に増加した。フローサイトメトリーの結果で示された NKT 細胞の頻度増加と合わせて、どの免疫担当細胞が $\text{IFN}\gamma$ 産生増加に寄与するのかを明らかにする必要がある。

漢方成分 No. 35 による抗がん作用の分子機構は、*in vitro* と *in vivo* の両方の実験で明らかとなった。漢方成分 No. 35 の抗がん作用の一つは、がん細胞の増殖阻害であり、CT26 細胞で増殖が抑えられたことを確認した。また、抗がん作用の別の一つは、血管新生を阻害することによって生じた可能性がある。我々は、マウス大腸がん細胞株 CT26 細胞に漢方成分 No. 35 を加えた際、容量依存的に細胞増殖が抑制されることを確認した。これらの結果は腫瘍細胞の増殖や血管新生の抑制が *in vivo* における漢方成分 No. 35 の抗腫瘍作用として、がん細胞へ直接的に作用することを示唆している。また、がん細胞に対する細胞傷害性の実験でコントロールと差がなかったことは、漢方成分 No. 35 の作用に直接的な細胞毒性が伴わないことを示唆している。漢方成分 No. 35 による腸管・全身・腫瘍免疫への効果を検証するために、我々は漢方成分 No. 35 をマウスに経口投与した。脾臓、腫瘍、小腸の免疫細胞の数に大きな変化はなかったが、漢方成分 No. 35 を投与したマウスでは腫瘍抗原特異的な T 細胞の誘導が確認された。この結果は、腫瘍増殖と血管新生に加えて、漢方成分 No. 35 が腫瘍抗原特異的な免疫応答を促進する可能性を示唆している。しかし、漢方成分 No. 35 による抗腫瘍作用は複雑であり、*in vivo* での抗腫瘍作用の免疫性メカニズムを解明するためにも、さらなる研究が必要である。

10. 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24年度)

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

CT26 を移植した BALB/c マウスあるいは MC38 を移植した C57BL/6 マウスにこれらの成分を投与して、その *in vivo*での効果を明らかにすることを試みた。

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

材料と方法

細胞培養

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

マウス

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

漢方成分

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

担がんマウスモデル実験

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

解析に使用した抗体は Biolegend もしくは ebioscience から購入した。FITC anti-mouse CD3 ϵ Antibody、PE anti-mouse CD49b (pan-NK cells) Antibody、Alexa Fluor® 700 anti-mouse CD4 Antibody、APC anti-mouse CD8a Antibody、PE anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Antibody、FITC anti-mouse/human CD11b Antibody、PE/Cy7 anti-mouse CD11c Antibody、Alexa Fluor® 700 anti-mouse F4/80 Antibody、Pacific Blue™ anti-mouse CD45 Antibody、PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD45、APC anti-mouse CD25 Antibody (Biolegend)、Rat IgG2a K Isotype Control PE Anti-Mouse/Rat Foxp3 PE (ebioscience)。

腫瘍抗原特異的な T 細胞応答の解析

各個体の脾臓細胞(1×10^7)にマウス大腸がん細胞株 CT26 腫瘍抗原ペプチド AH-1 (1 μ g/ml、SPSYVYHQF) もしくは MC38 腫瘍抗原ペプチド gp70 (1 μ g/ml、KSPWFRTL)を加え、5 日間培養し、細胞を回収した。その後、生細胞をフィコール密度勾配遠心分離法 (リンフォセパール：免疫生物研究所)で単離し、Mouse CD8 α MicroBeads (Miltenyi Biotec)を用い CD8 陽性細胞を単離し、96 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well で播種し、ペプチド(1 μ g/ml) 及び 1×10^5 cells の naïve マウスの脾臓細胞と共培養、あるいは放射線照射した 1×10^5 個のがん細胞と共培養した。プレートは 37°C、5%CO₂、24 時間培養し、培養上清を回収し、BD OptEIA™ Set Mouse IFN- γ (BD Biosciences)を使用して IFN- γ の産生を測定した。

フローサイトメトリー

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

統計学的解析

全ての解析データは t 検定を用いて統計学解析を行った。

10.1) 漢方成分 No.13

昨年度までの解析から、漢方成分 No. 13 は JHOC5 からの IL-6、PK59 からの TGF- β 、CT26 からの VEGF 産生

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

結果

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

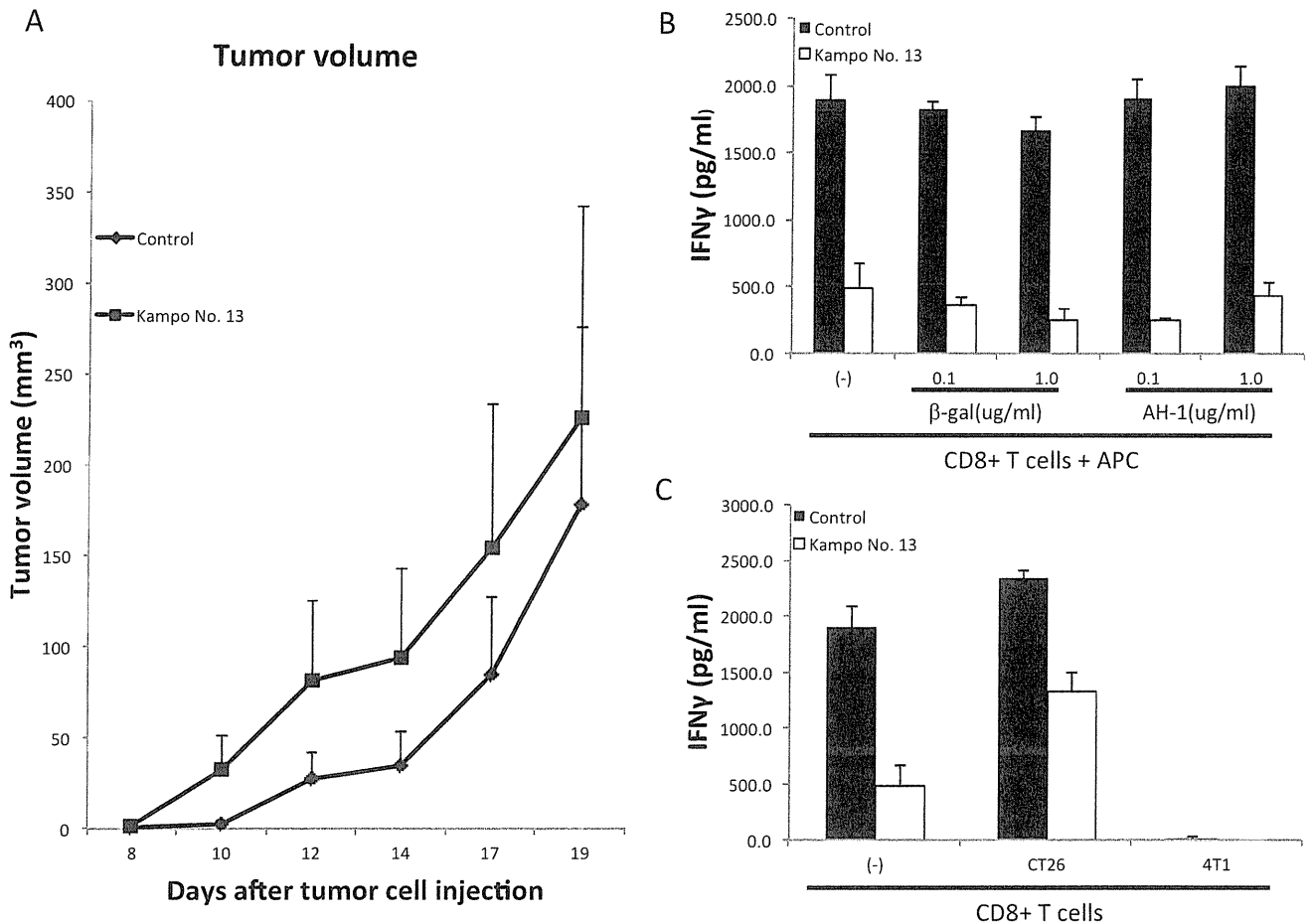


図 1 担がんマウスへの漢方成分 No. 13 投与による腫瘍増殖および抗腫瘍 T 細胞応答への影響

脾臓、所属リンパ節、がん組織内の免疫細胞の割合を解析したところ、脾臓、所属リンパ節、がん組織内での CD8 陽性 T 細胞の増加の傾向と、脾臓での Treg 減少の傾向がみられたが、がん組織内での Treg や MDSC といった免疫抑制性細胞の増加傾向や脾臓、所属リンパ節でのマクロファージの増加がみられた (図 2)。各群の脾臓細胞を腫瘍抗原 AH-1 のペプチド存在下で 5 日間培養後、それに含まれる CD8 陽性 T 細胞を回収し、腫瘍抗原ペプチド、コントロールペプチド、腫瘍抗原陽性のがん細胞 CT26、腫瘍抗原陰性のがん細胞 4T1 に対する反応を解析したところ、漢方成分 No. 13 投与マウスでは IFN- γ 産生が非特異的に阻害されていた。

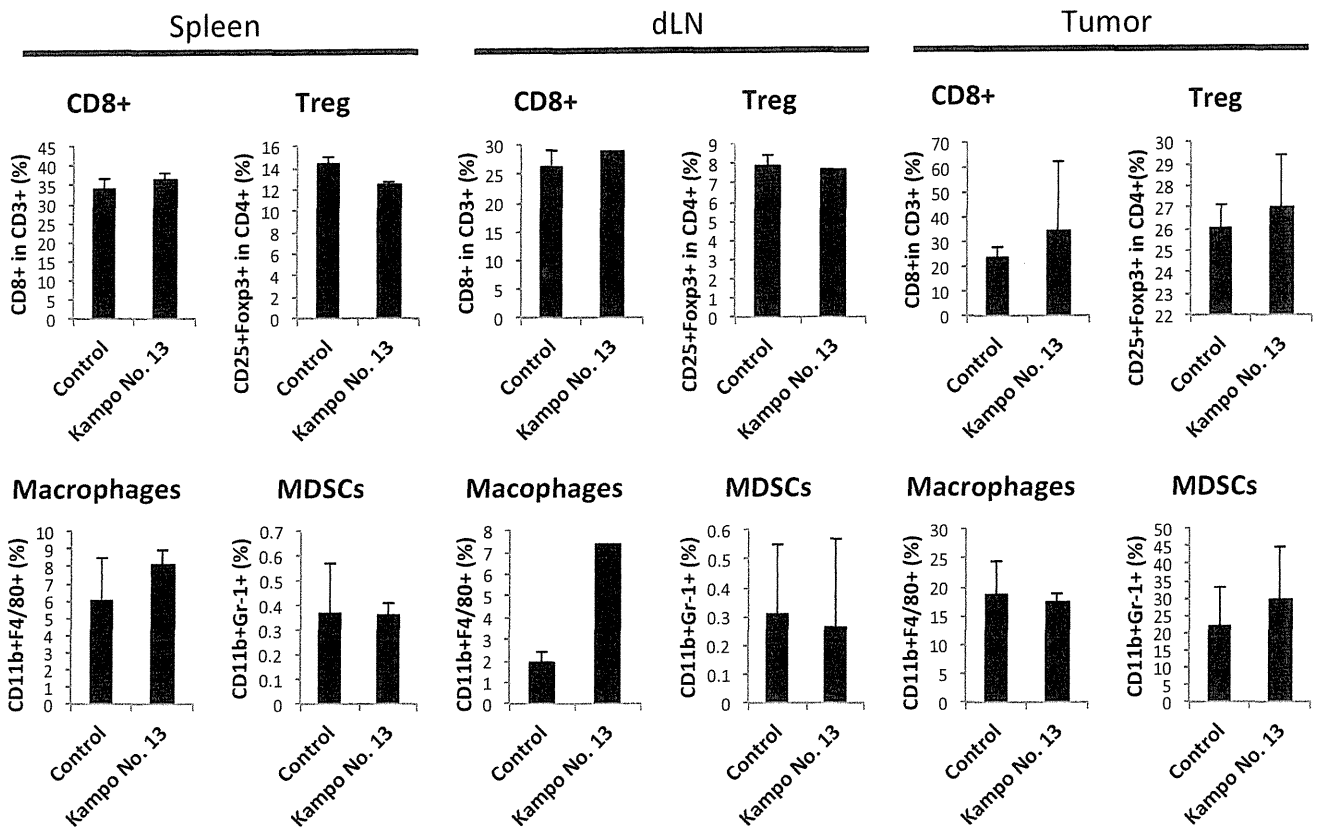


図2 漢方成分 No. 13 投与による脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

考察

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

10.2) 漢方成分 No.14

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

結果

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

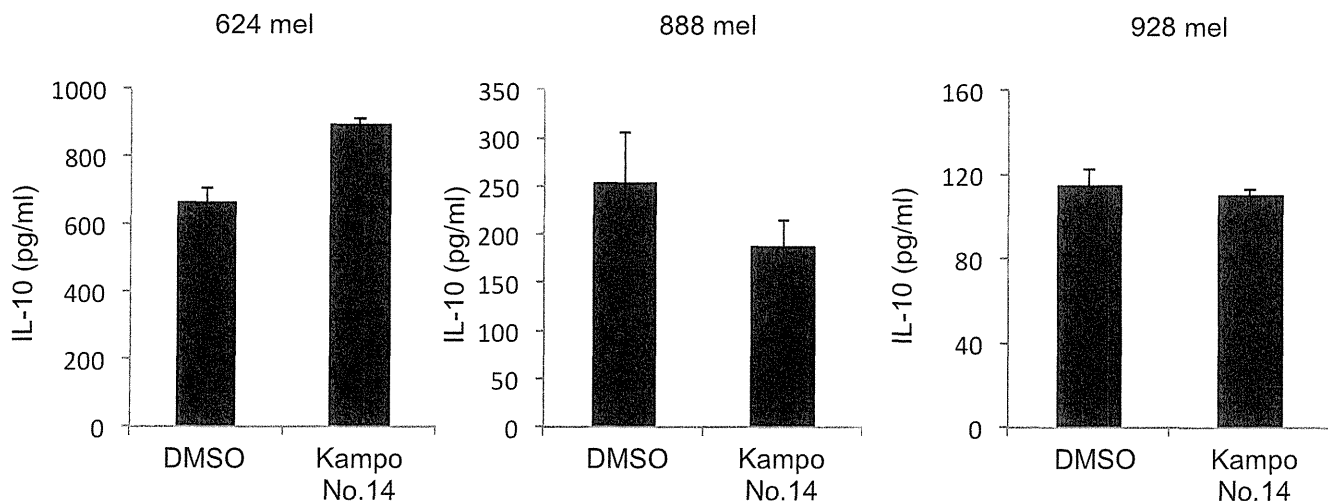


図3 ヒト悪性黒色腫細胞株からの IL-10 産生に対する漢方成分 No. 14 の効果

C57BL/6 マウスに MC38 を皮下移植し、生着後 200 μ g の漢方成分を 2 日に 1 回腹腔内投与し、腫瘍サイズのモニタリングを行った。DMSO 投与群と比較し、漢方成分 No. 14 投与群において腫瘍増殖の抑制効果は観察されなかった (図 4 A)。各群の脾臓細胞を腫瘍抗原 gp70 のペプチド存在下で 5 日間培養後、それに含まれる CD8 陽性 T 細胞を回収し、腫瘍抗原ペプチド、コントロールペプチド、腫瘍抗原陽性のがん細胞 MC38、腫瘍抗原陰性のがん細胞 EL4 に対する反応を解析したところ、脾臓細胞中の CD8⁺ T 細胞のがん細胞に対する反応は変化なかったが、腫瘍抗原に対する反応は漢方成分 No. 14 投与によって抑制されていた (図 4 B, C)。

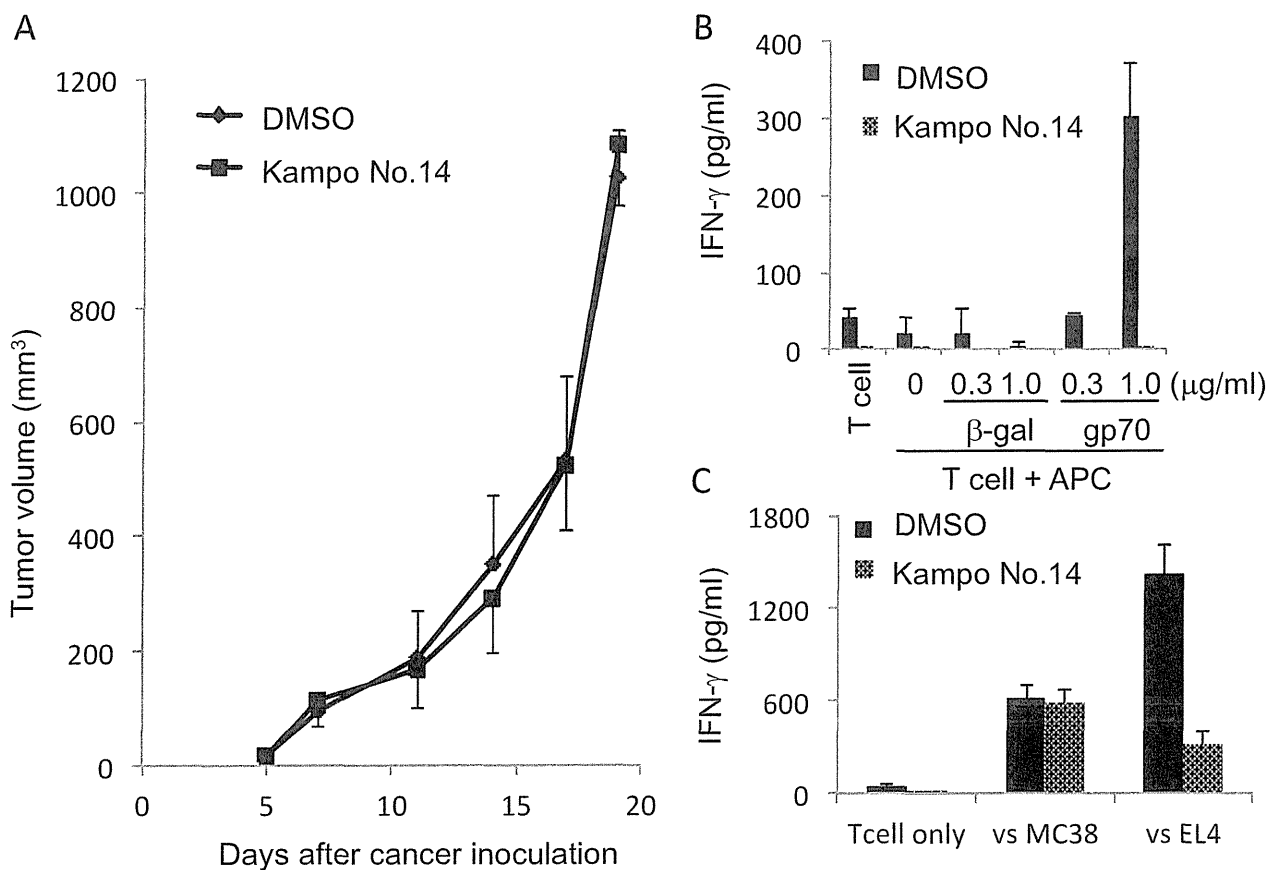


図4 担がんマウスへの漢方成分 No. 14 投与による腫瘍増殖および抗腫瘍 T 細胞応答への影響

末梢、リンパ節、腫瘍内浸潤リンパ球における細胞分画の解析を行ったところ、漢方成分 No. 14 の投与によって末梢と腫瘍内において MDSC の増加傾向が、所属リンパ節においては樹状細胞の割合に有意な減少が確認された (図 5)。

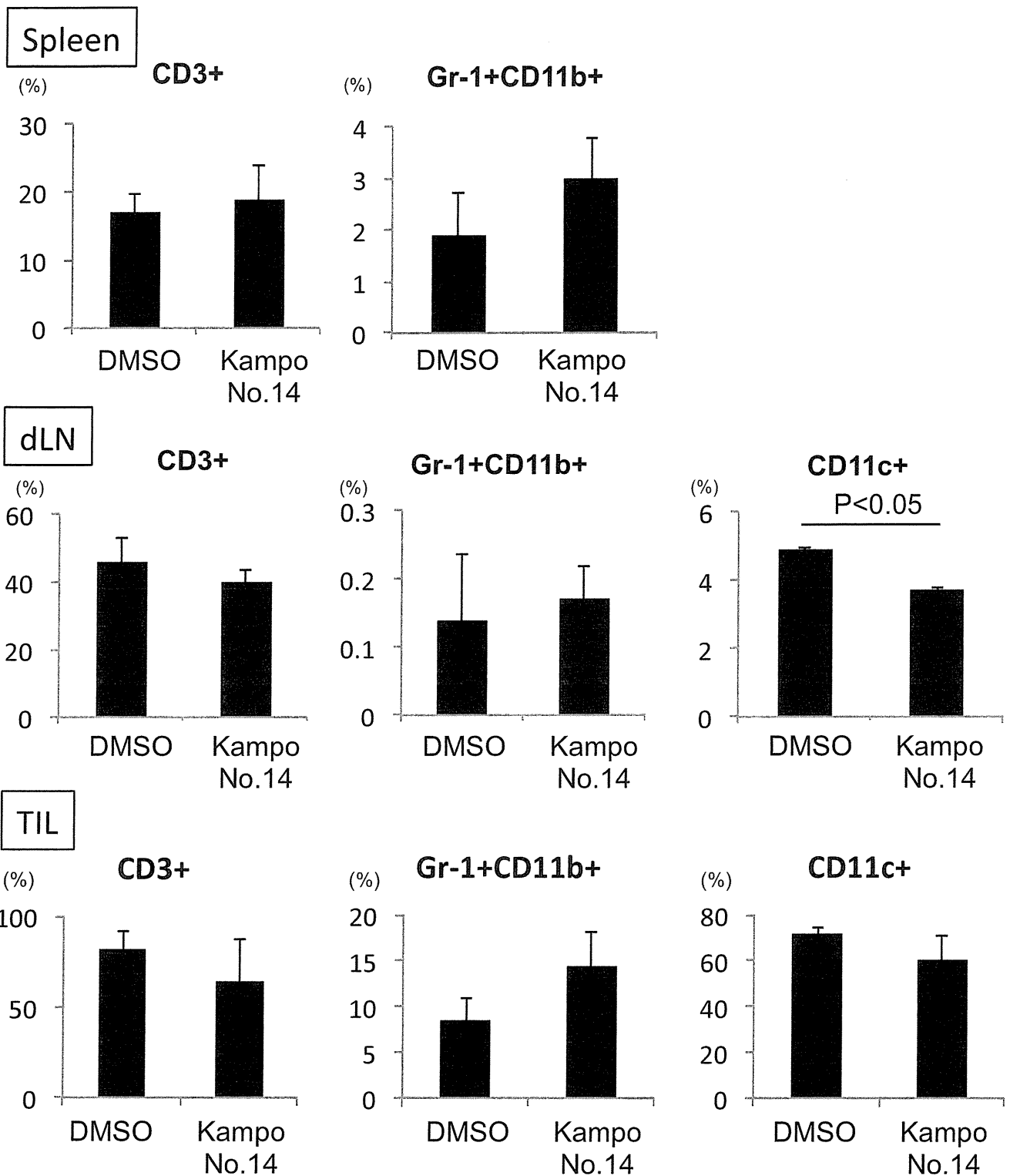


図5 漢方成分 No. 14 投与による脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

考察

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

10.3) 漢方成分 No.15

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

結果

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

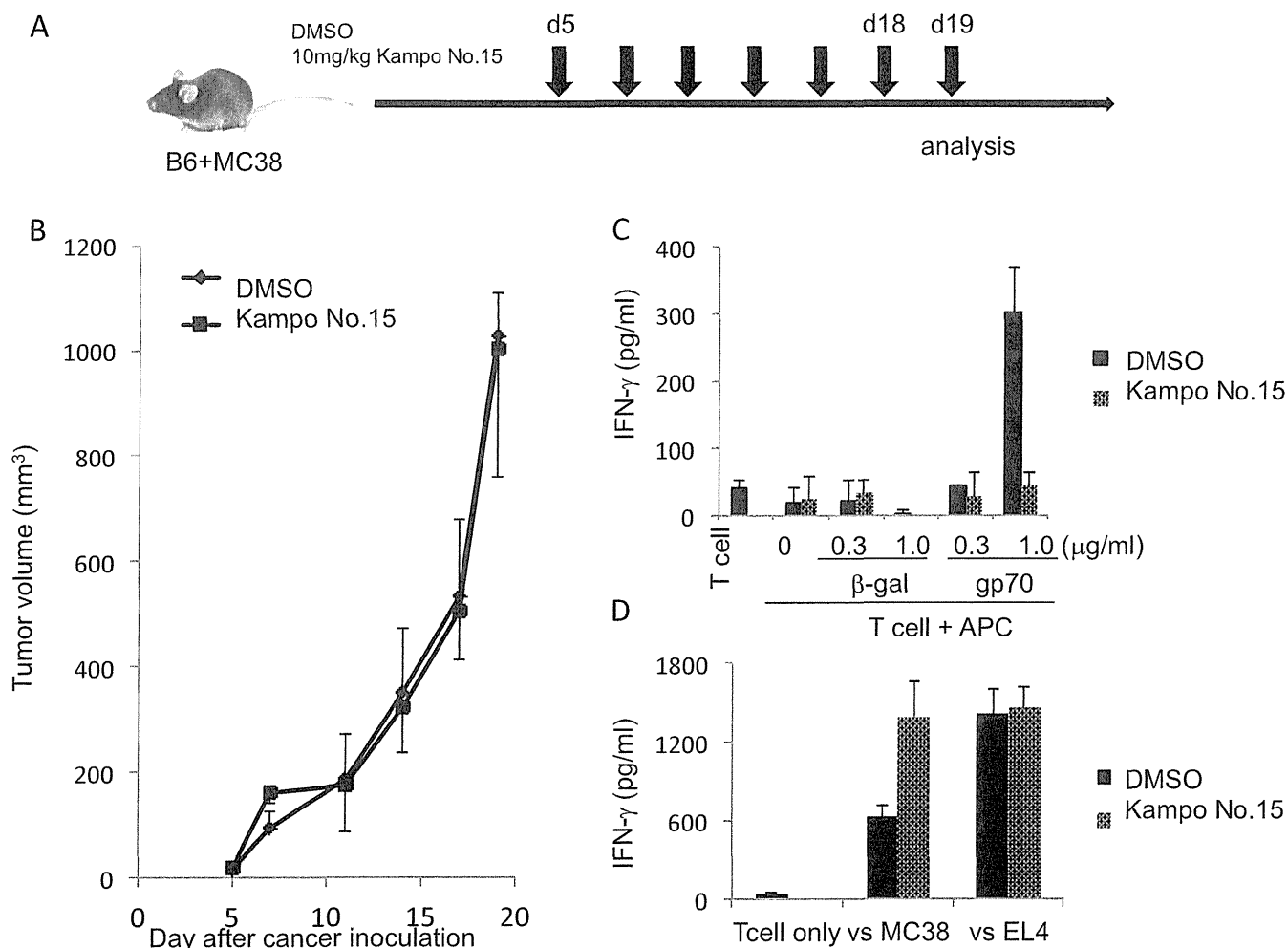


図 6 担がんマウスへの漢方成分 No. 15 投与による腫瘍増殖および抗腫瘍 T 細胞応答への影響

末梢、リンパ節、腫瘍組織における細胞分画の解析を行ったが、末梢、リンパ節のいずれの細胞の割合においても有意な差は示さず、腫瘍組織において CD8⁺ T 細胞や NK/NKT 細胞の減少傾向がみられた (図 7)。

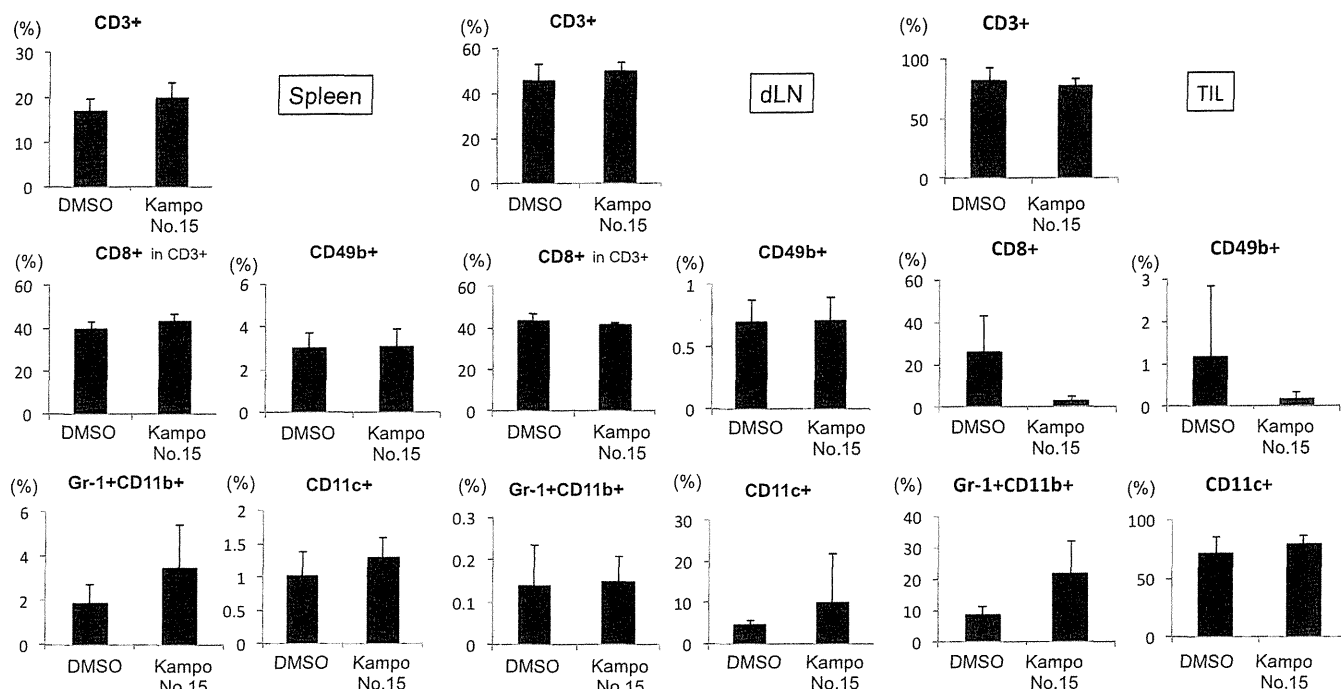


図7 漢方成分 No. 15 投与による脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

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。

10.4) 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 μ g の漢方成分を 2 日に 1 回腹腔内投与と腫瘍サイズのモニタリングを行った。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 8 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 8 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 9)。

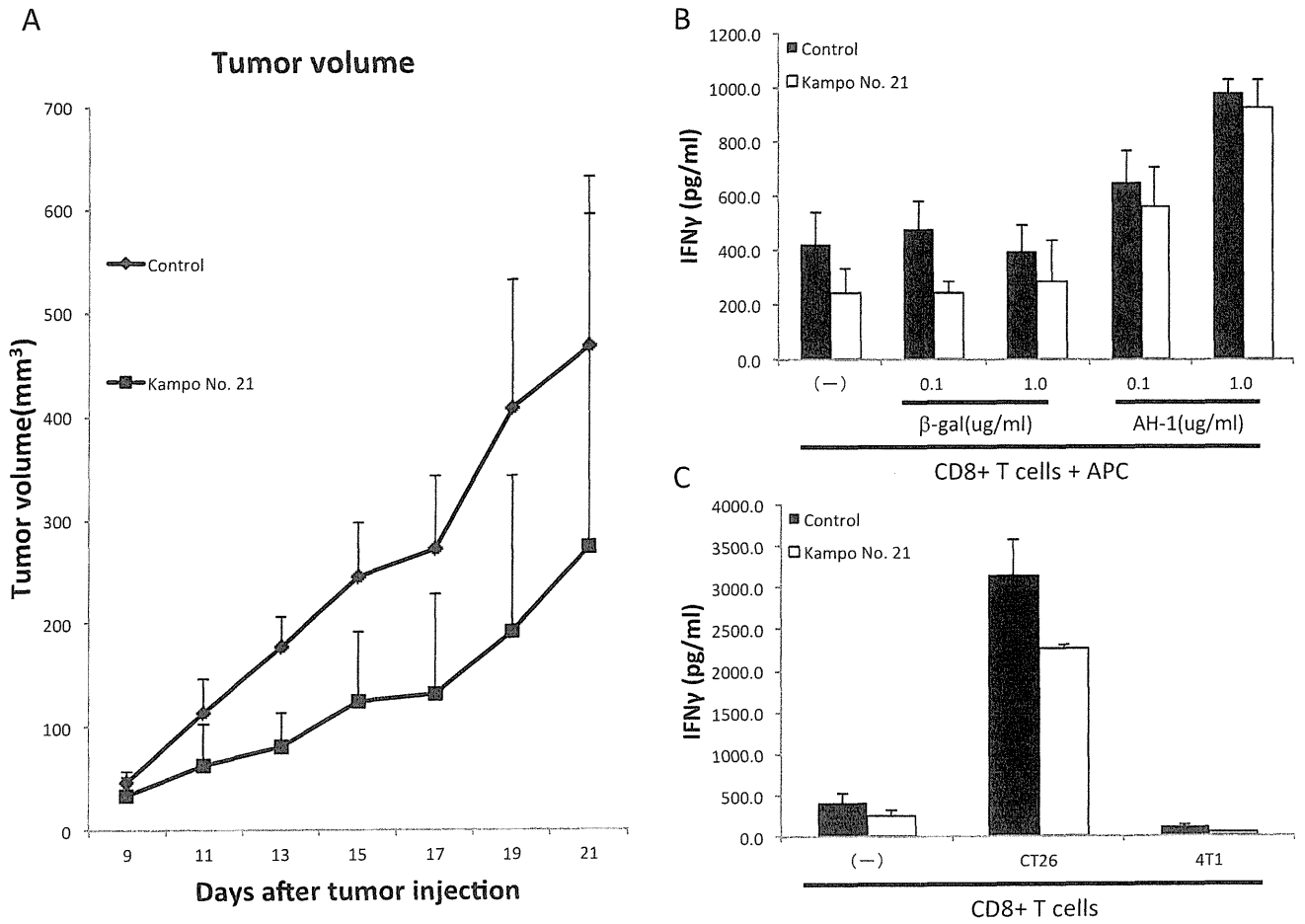


図8 担がんマウスへの漢方成分 No. 21 投与による腫瘍増殖および抗腫瘍 T 細胞応答への影響

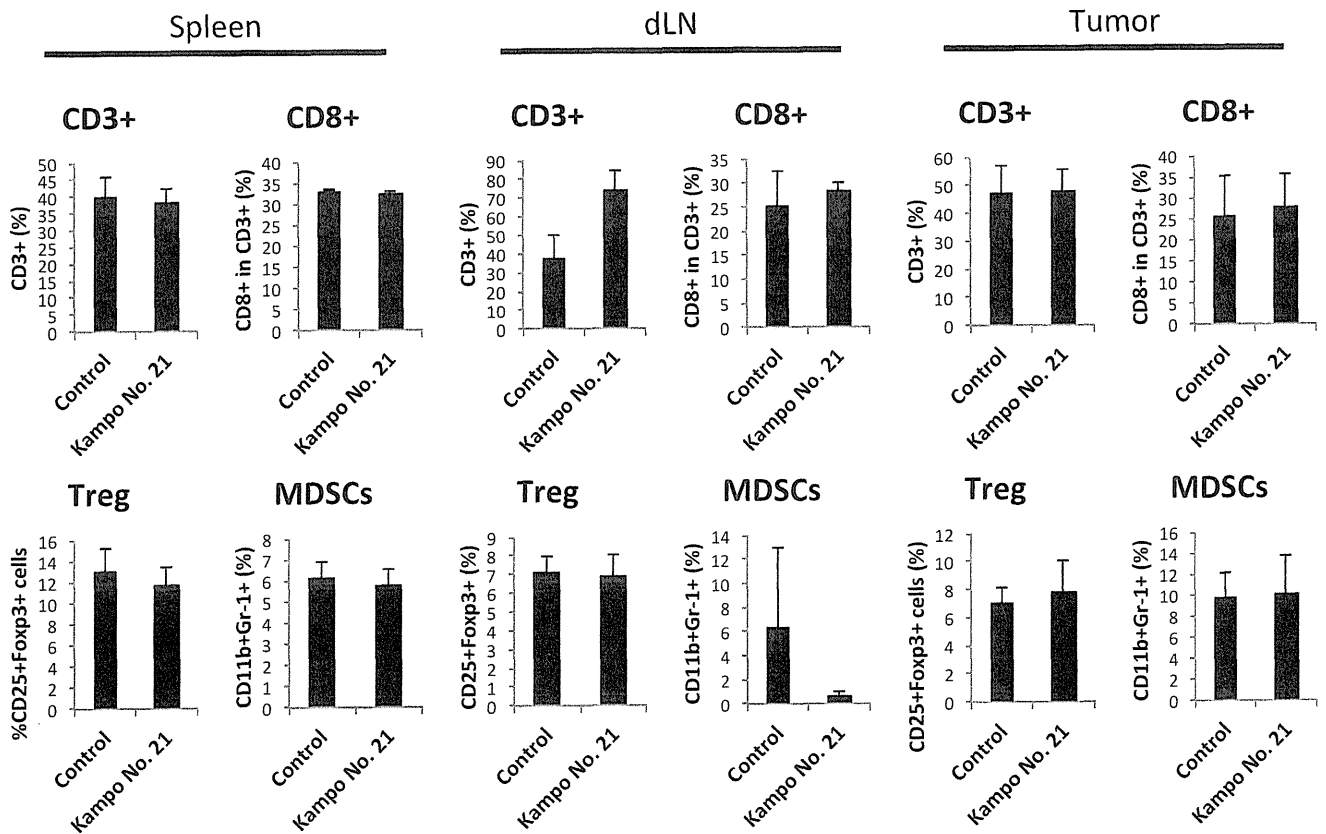


図9 漢方成分 No. 21 投与による脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

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。

10.5) 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-β 産生を抑制した。また、AhR に対するアンタゴニスト活性を示した。本年度、担がんマウスに漢方成分 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 10μM 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 10)。3 株のいずれにおいても IL-10 産生は抑制された。

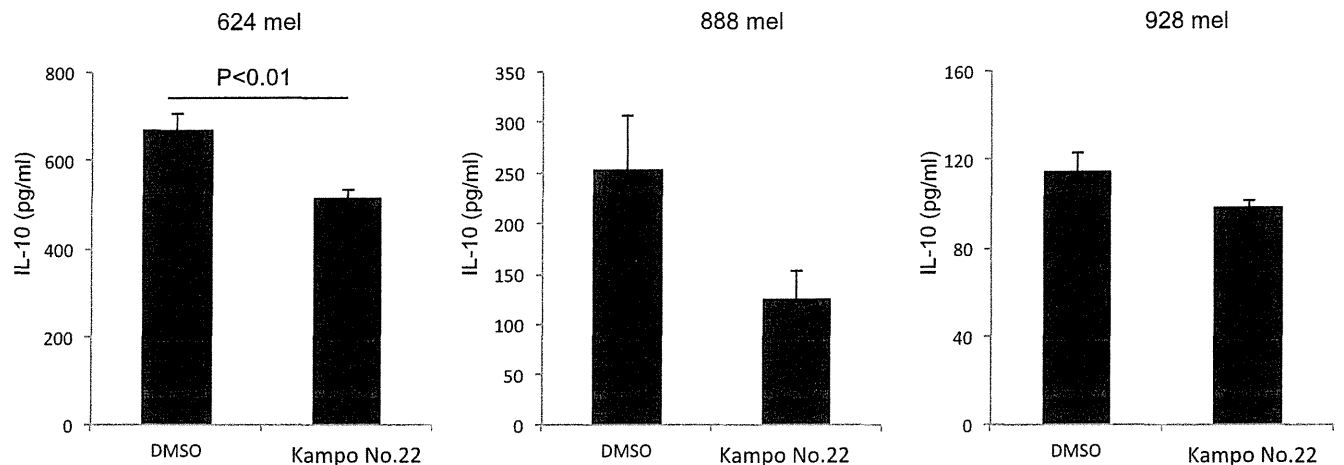


図 10 ヒト悪性黒色腫細胞株からの IL-10 産生に対する漢方成分 No. 22 の効果

昨年度、NF-κB EMSA により幾つかの漢方成分に NF-κB 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-κB 活性を NF-κB filter plate assay で測定したところ、NF-κB が阻害されており、漢方成分 No. 22 にも NF-κB 阻害活性があることが示された (図 11)。

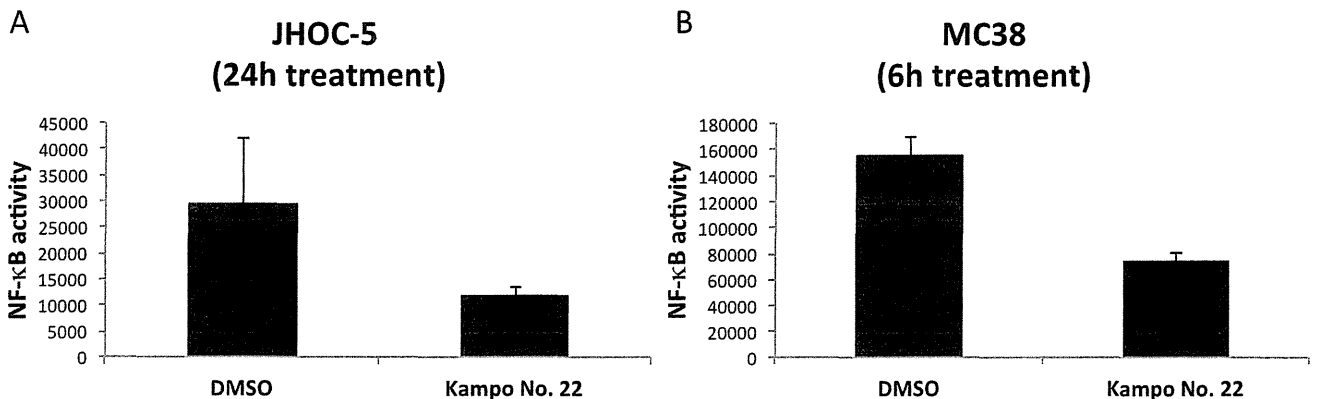


図 11 ヒト卵巣がん細胞株 JHOC-5 とマウス大腸がん細胞株 MC38 での漢方成分 No. 22 による NF-κB の阻害

Balb/c マウスに CT26 を皮下移植し、移植後 9 日目から 200μg 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 2 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 2 B,C)。

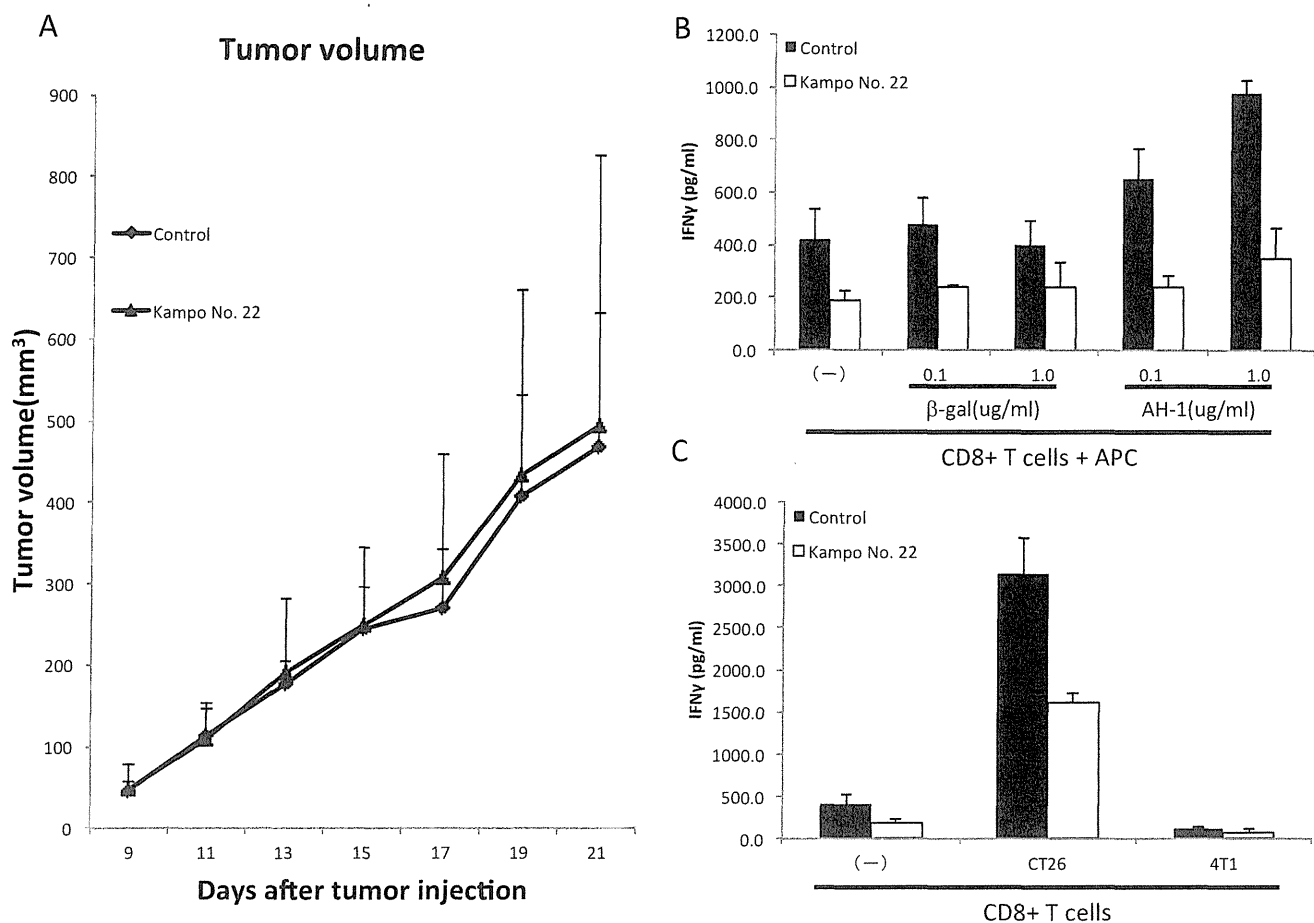


図 1 2 担がんマウスへの漢方成分 No. 22 投与による腫瘍増殖および抗腫瘍 T 細胞応答への影響

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⁺ T 細胞の有意な増加と CD8⁺ 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 1 3)。

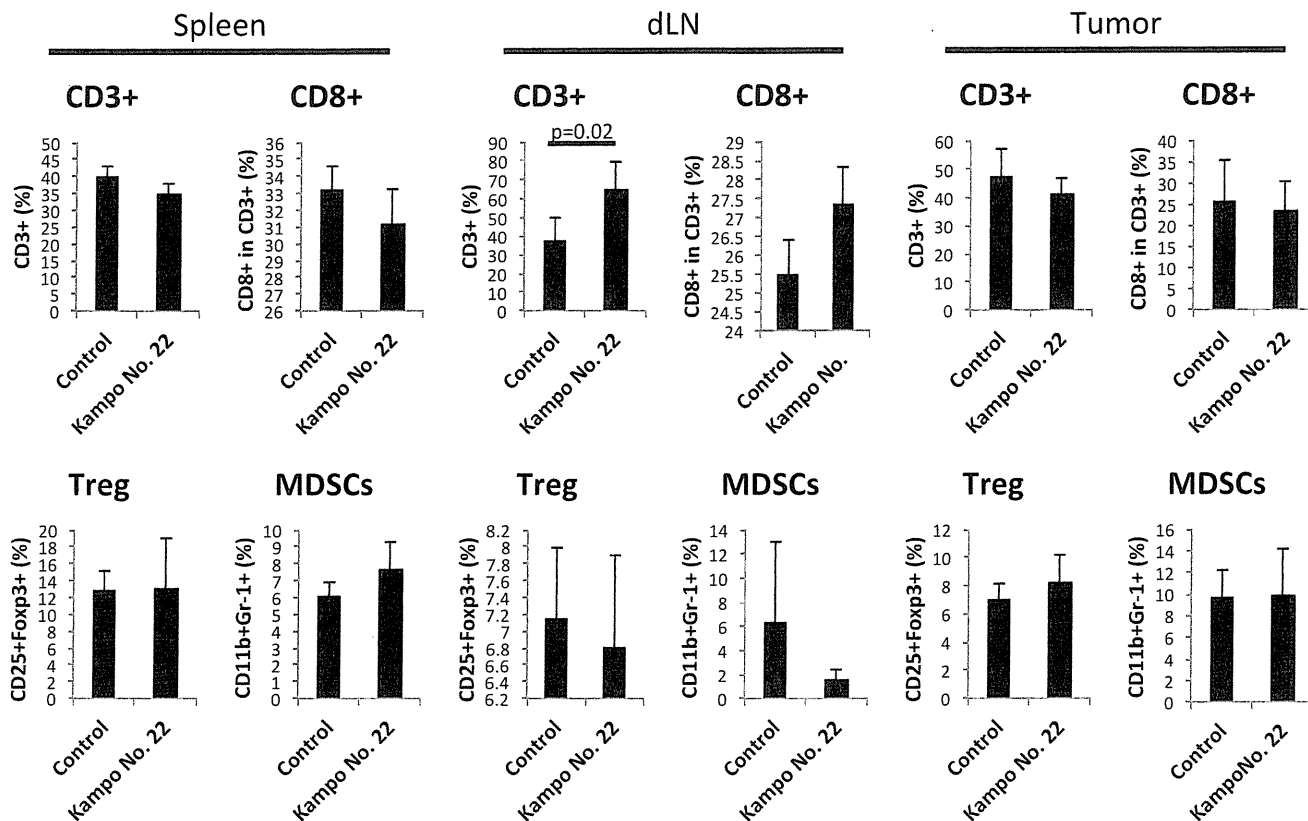


図 1 3 漢方成分 No. 22 投与による脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

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-β 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+ T 細胞の有意な増加と CD8+ 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。

10.6) 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 10μM 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 1 4)。624mel と 888mel おいて IL-10 産生は抑制された。

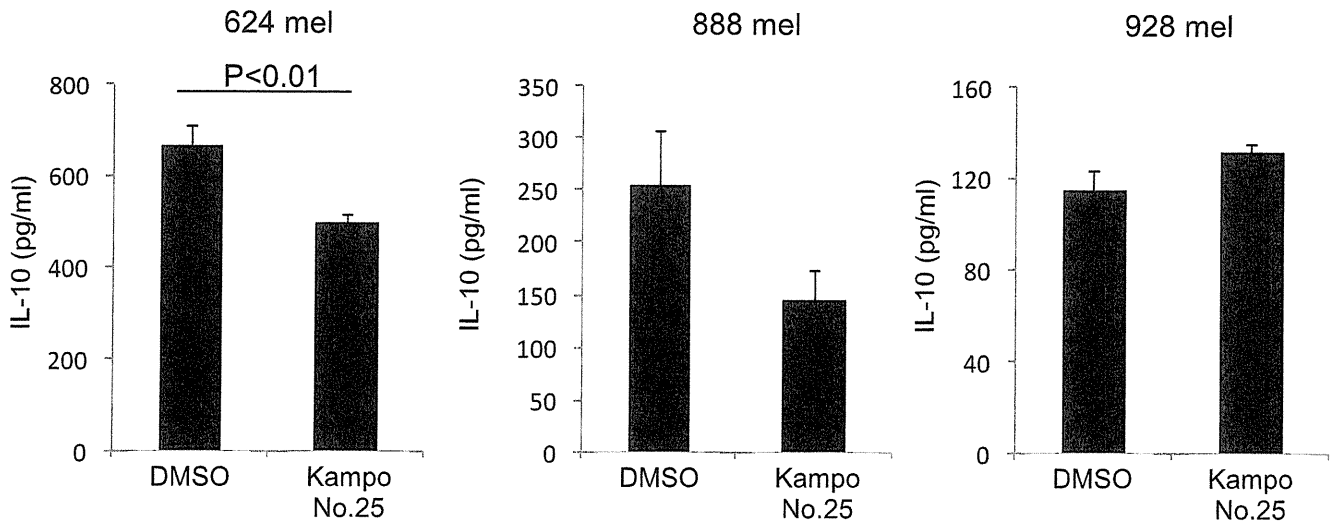


図 1 4 ヒト悪性黒色腫細胞株からの IL-10 産生に対する漢方成分 No. 25 の効果

Balb/c マウスに CT26 を皮下移植し、生着後 200 μ g の漢方成分を 2 日に 1 回腹腔内投与した (図 1 5 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 1 5 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 1 5 C,D)。

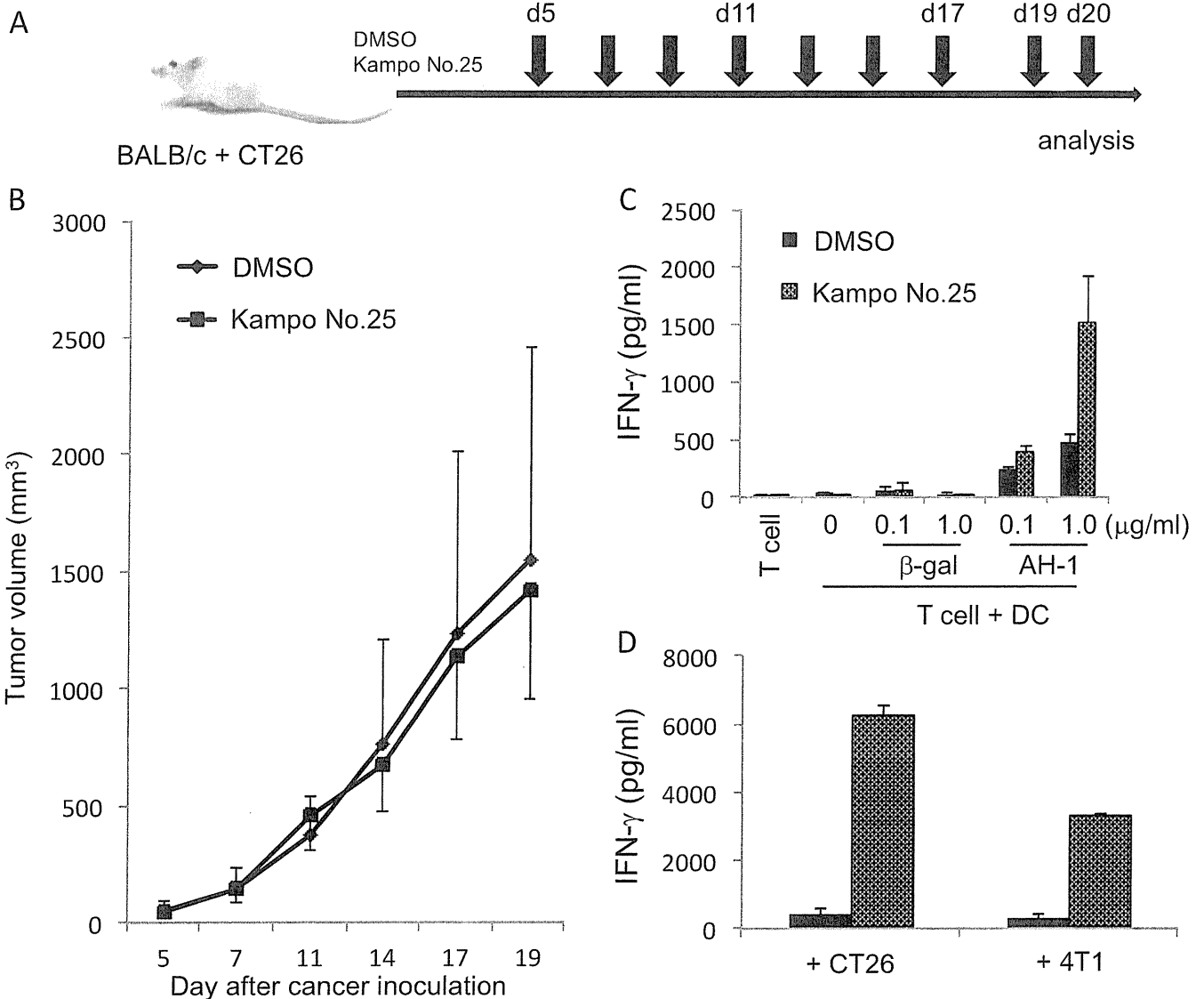


図 1 5 担がんマウスへの漢方成分 No. 25 投与による腫瘍増殖および抗腫瘍 T 細胞応答への影響

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 1 6 A)。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 1 6 B,C)。

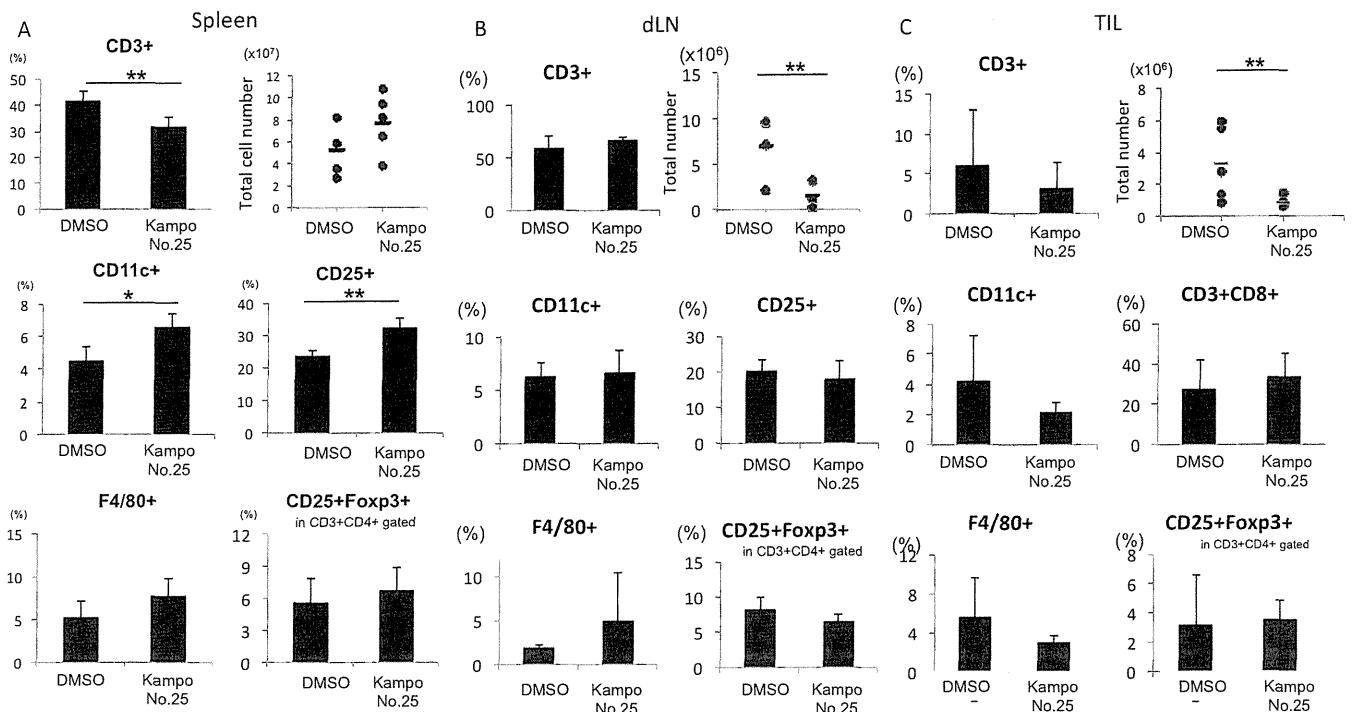


図 1 6 漢方成分 No. 25 投与による脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

考察

脾臓細胞中の T 細胞の抗原特異的な IFN- γ 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。

10.7) 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- γ 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 x 10⁵ 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。 $V(\text{volume}) = S^2 \times L/2$ (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 1 7 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 1 7 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 1 7 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 1 8)。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 1 9)。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 0)。脾臓中の MDSC (CD11b+Ly-6G⁺ および CD11b+Ly-6C⁺) は、漢方成分 No.35 の投与で僅かに減少した (図 2 1)。漢方成分 No.35 投与による CD11b+Ly-6G⁺ および CD11b+Ly-6C⁺ 細胞の減少は、腫瘍において、より顕著であった (図 2 2)。

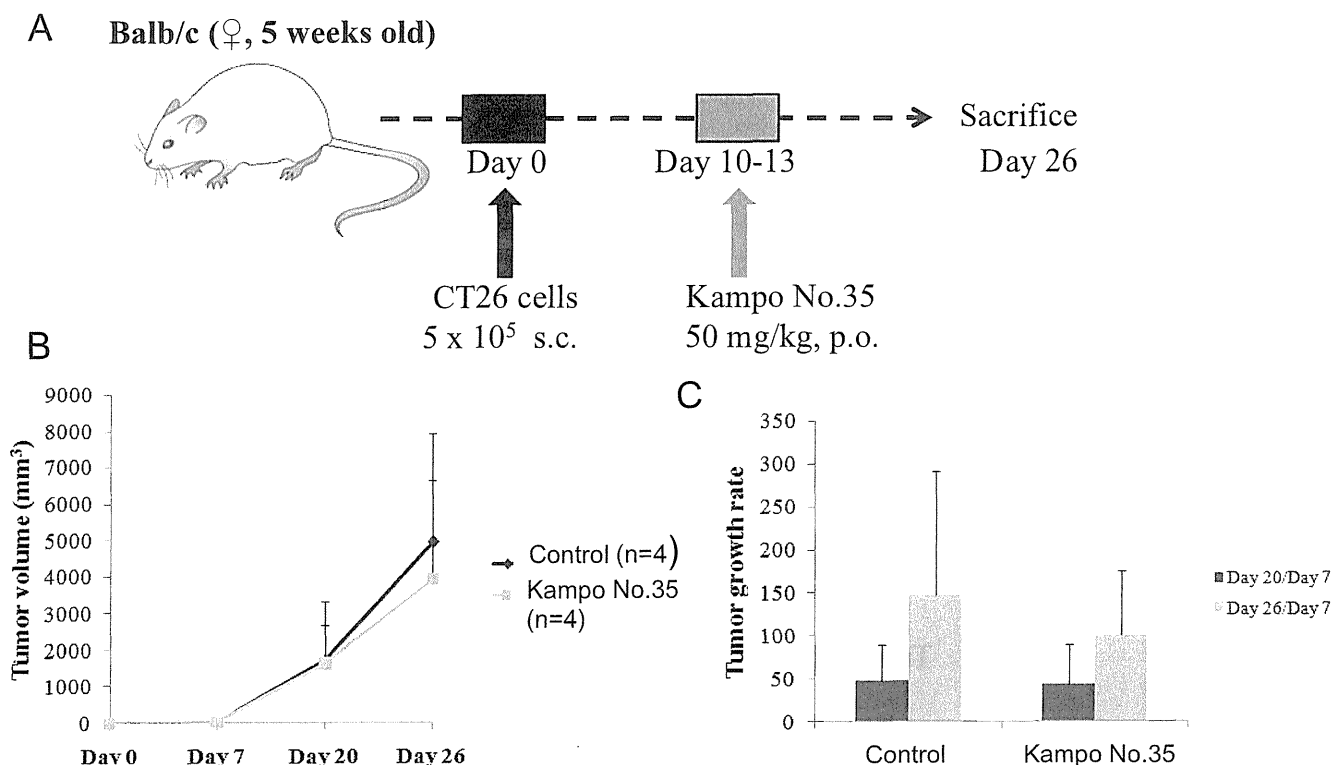


図 1 7 漢方成分 No.35 投与による腫瘍増殖の抑制

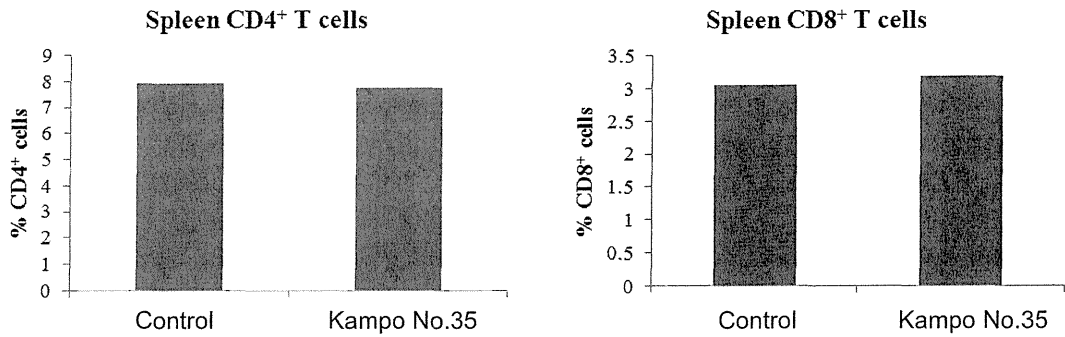
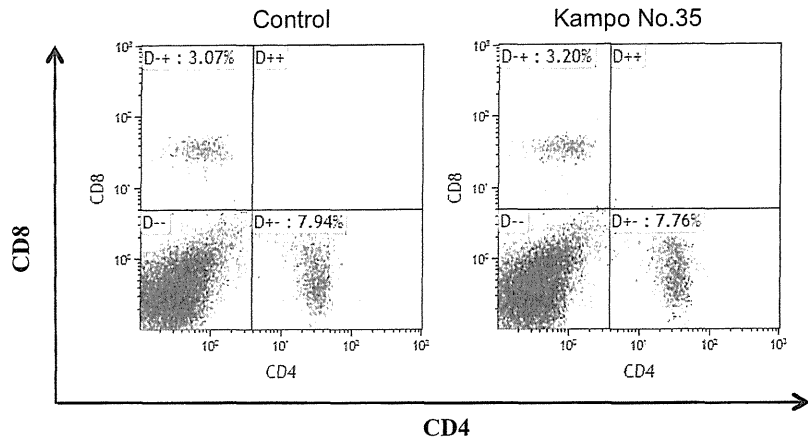


図 1 8 漢方成分 No.35 投与による脾臓内 CD4⁺および CD8⁺ T 細胞の割合の変化

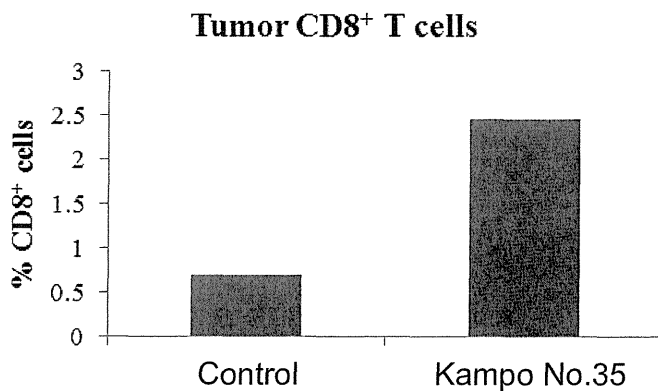
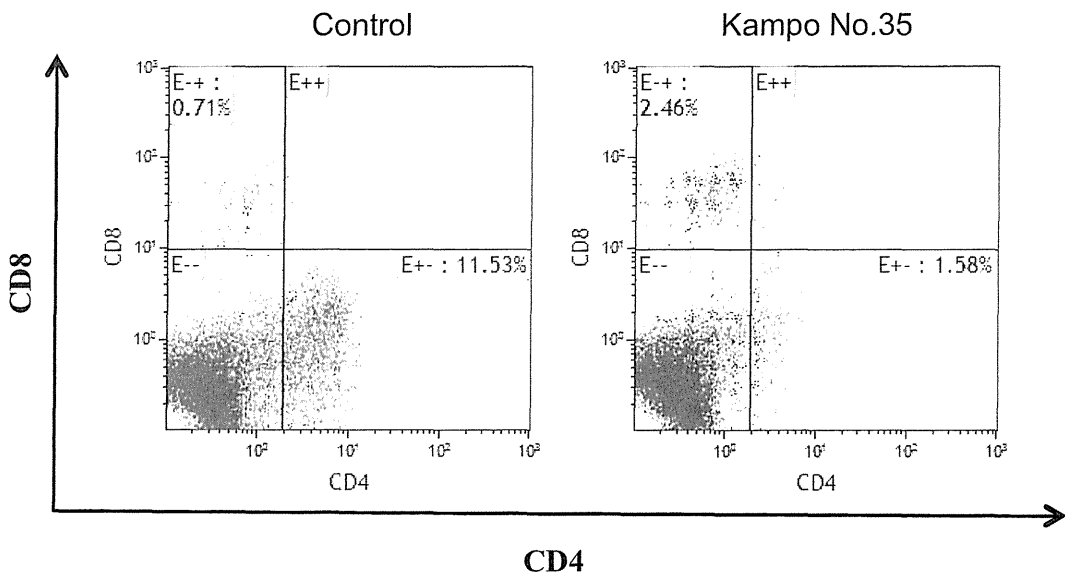
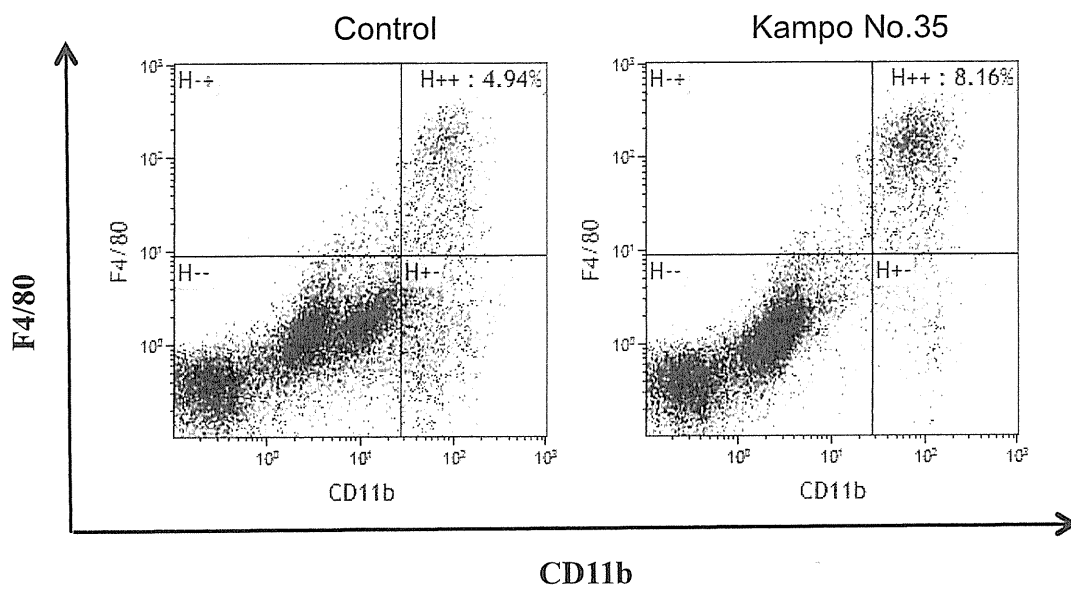


図 1 9 漢方成分 No.35 投与による腫瘍内 CD4⁺および CD8⁺ T 細胞の割合の変化



TAMs

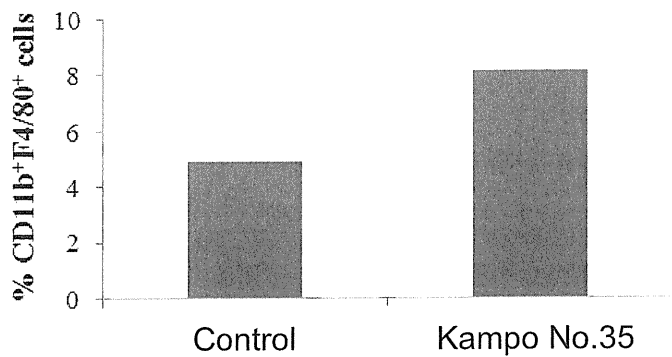


図 2 0 漢方成分 No.35 投与による腫瘍内マクロファージの割合の変化

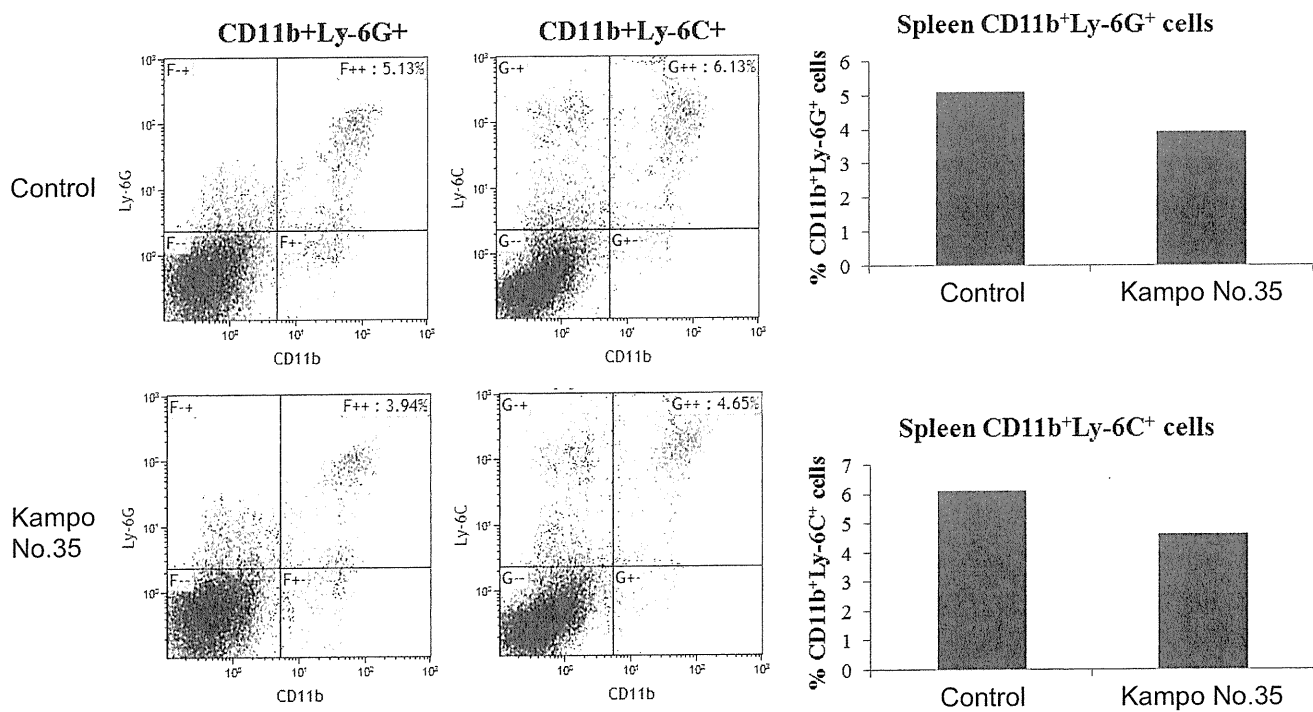


図 2 1 漢方成分 No.35 投与による脾臓内 MDSC の割合の変化

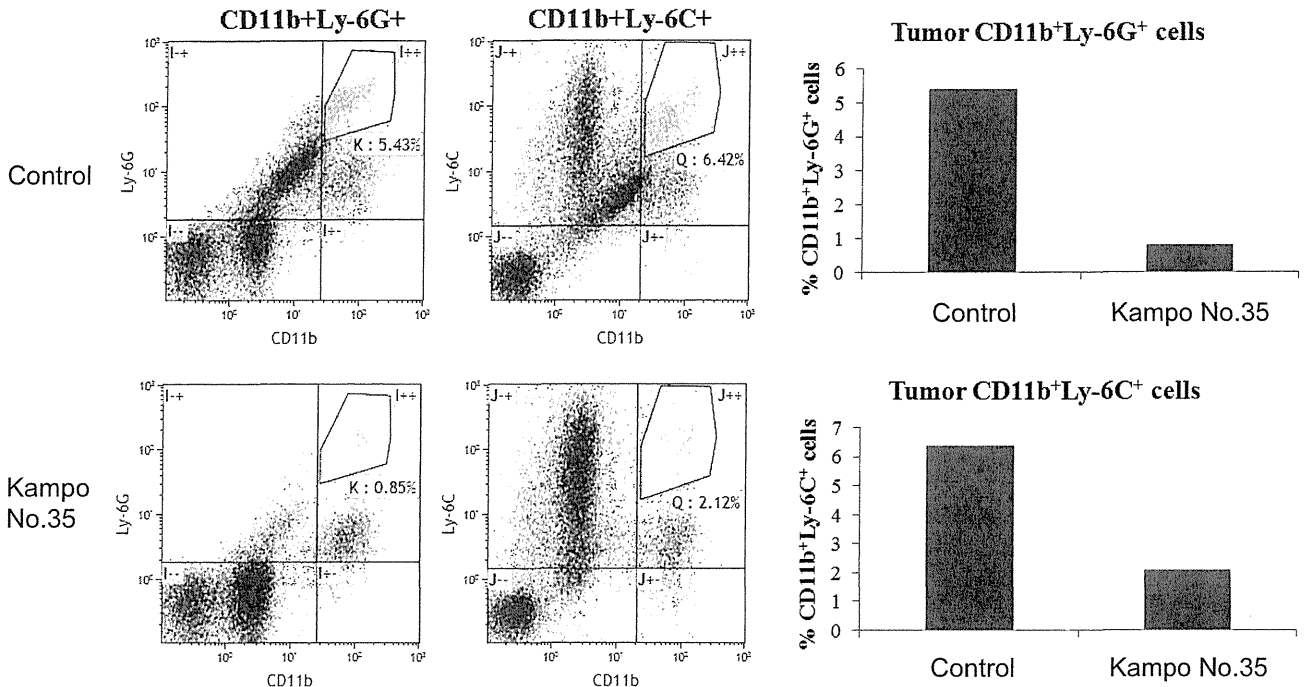


図 2 2 漢方成分 No.35 投与による腫瘍内 MDSC の割合の変化

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⁺ T 細胞と CD8⁺ 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⁺ 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⁺ F4/80⁺) 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⁺ Ly6G⁺ および CD11b⁺ Ly6C⁺) 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。

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 *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。

11.1) 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- β 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