

始早期から腫瘍の増大を抑制する傾向が見られ、また免疫細胞解析の結果、CD8⁺T細胞の割合が増加と、Treg細胞頻度の減少について傾向が見られたことをこれまでに報告してきた。加えて、投与後の脾臓 T 細胞の抗腫瘍効果の評価においては、漢方成分 No. 16 投与群は対照群と比較し、IFN- γ 産生量が増加する傾向が見られたことを報告してきた。今年度、*in vivo* での抗腫瘍免疫応答への漢方成分 No. 16 の影響とその作用機構をより詳細に検討した。

材料と方法

骨髓由来樹状細胞の誘導と漢方成分 No. 16 が成熟化に及ぼす影響の解析

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

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

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

漢方成分 No.16 が樹状細胞に与える影響の解析

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

結果

我々はこれまでに、漢方成分 No. 16 が細胞内シグナルである ERK や STAT3 が恒常的に活性化している 888mel のサイトカイン産生を抑制することを示してきた。888mel と同様に ERK や STAT3 が恒常的に活性化しているヒト悪性黒色腫細胞株 624mel や 928mel においても、漢方成分 No. 16 は IL-10 の産生を有意に抑制することが確認された (図 1 A)。

IL-10 は STAT3 や ERK によってその発現が調節されていることが報告されている。そこで、フローサイトメトリーとウェスタンブロッティング法により 888mel での ERK と STAT3 の活性化に対する漢方成分 No. 16 の影響を解析した。この結果、漢方成分 No. 16 添加後 60 分において ERK や STAT3 のリン酸化は阻害された (図 1 B, C)。

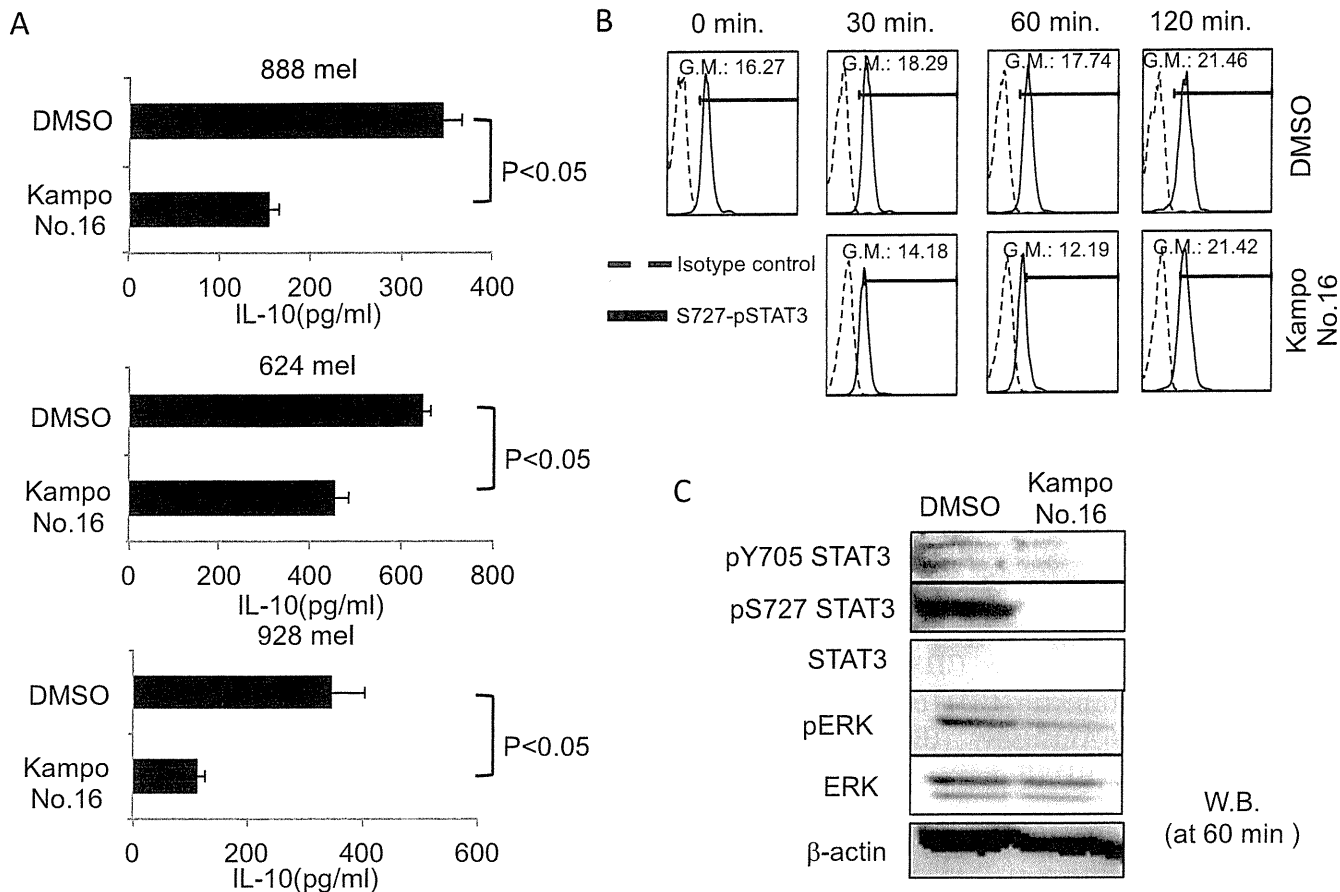


図1 漢方成分 No. 16 のヒト悪性黒色腫細胞株のサイトカイン産生と細胞内シグナルへの影響

また、同様の現象は一部のマウスがん細胞株でも見られた。マウスがん細胞株 MC38 においては、ERK、STAT3、NF- κ B といった細胞内シグナルが恒常的に活性化している。この細胞株に対して漢方成分 No. 16 を作用させると、ERK の阻害剤である U0126 で処理した時と同様に、IL-6 や VEGF といったサイトカインの産生を抑制させることができた (図 2 A)。しかしながら、STAT3 阻害剤 stattic や NF- κ B 阻害剤 DHMEQ では、顕著なサイトカイン産生の抑制は認められなかった。一方で、ERK や STAT3 の恒常的な活性化が認められるマウス大腸がん細胞 CT26 に対して漢方成分 No. 16 を作用させても、サイトカインの産生を抑制できなかった (図 2 B)。すなわち、漢方成分 No. 16 は MC38 においては ERK の阻害を介して免疫抑制性サイトカインの産生を阻害することができる一方、CT26 においてはこれらサイトカインの産生を阻害できない可能性が示唆された。

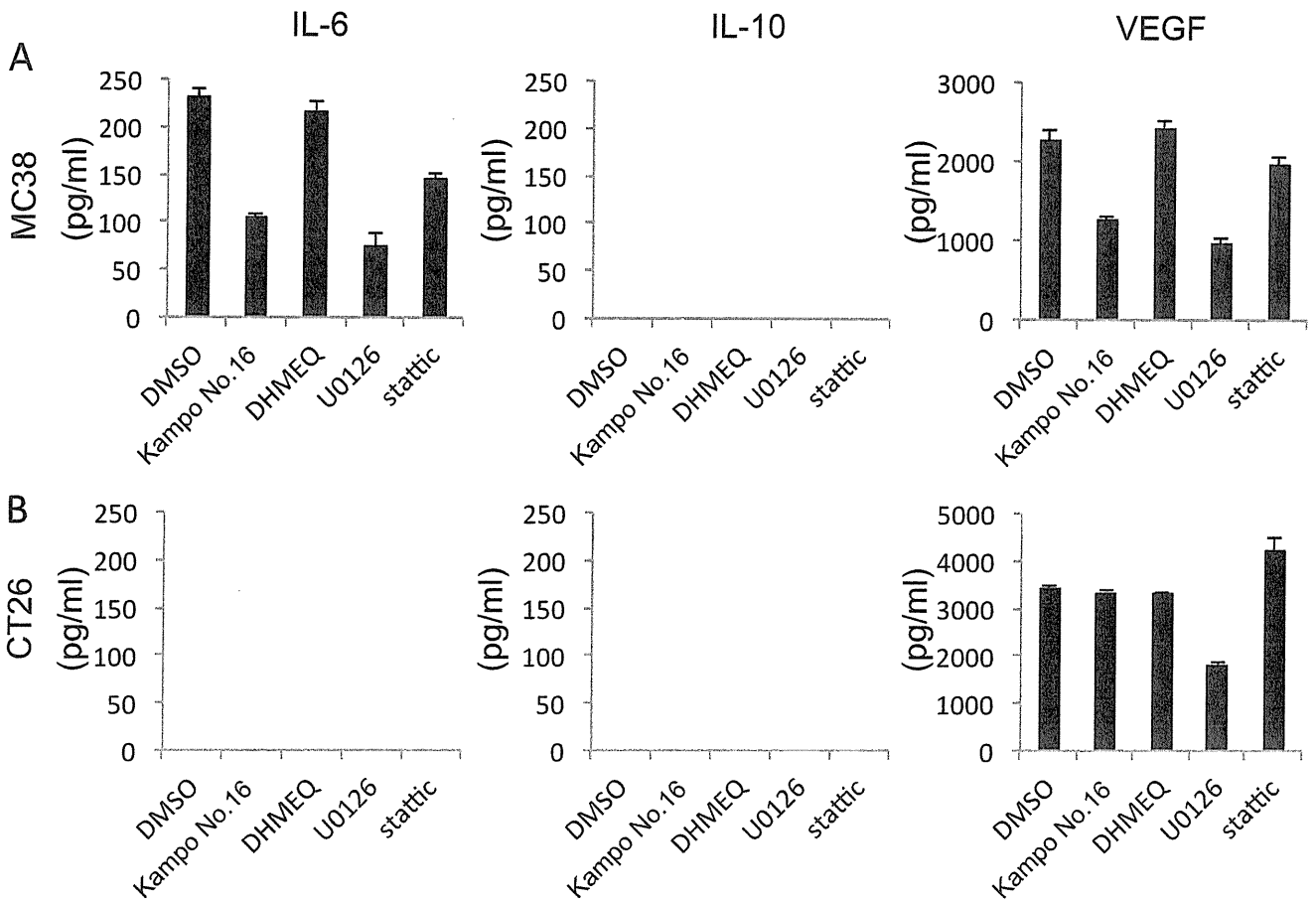


図2 マウスがん細胞株のサイトカイン産生に対する漢方成分 No. 16 の影響

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

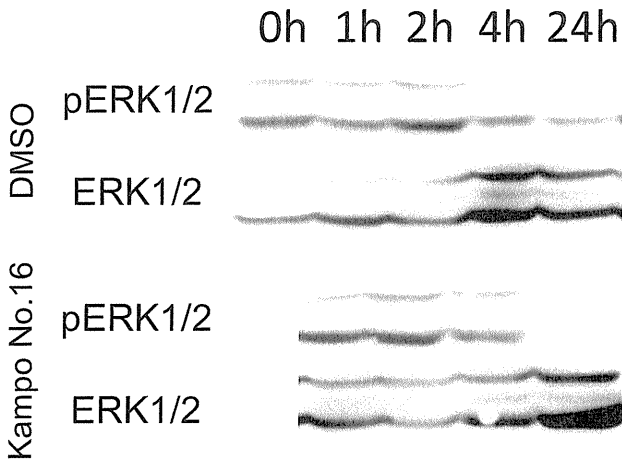


図3 漢方成分 No. 16 による MC38 の ERK1/2 リン酸化阻害

次に我々は担がんマウスにおける *in vivo* で漢方成分 No. 16 の評価を試みた。図 2 より、漢方成分 No. 16 には MC38 の免疫抑制性サイトカインを抑制する効果が認められたため、MC38 担がんマウスモデルにおいて、漢方成分 No. 16 を投与し、漢方成分 No. 16 ががん微小環境に及ぼす影響と免疫細胞に対する影響を解析した (図 4)。漢方成分 No. 16 を投与した群では、コントロール群と比較して有意に腫瘍増殖を抑制できた (図 4A)。しかしながら、同マウスの脾臓細胞から T 細胞を取出し、MC38 の腫瘍抗原ペプチドである gp70 もしくは MC38 に対する抗腫瘍応答を *in vitro* にて確認したところ、共に特異的な IFN- γ の産生が見られず (図 4 B, C)、したがって、いずれの場合においても特異的な抗腫瘍免疫応答の誘導は確認できなかった。

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

験を行った (図 5)。漢方成分 No. 16 を投与した群では、コントロール群と比較して腫瘍増殖を抑制させる傾向が見られた (図 5 A)。また、同マウスの脾臓細胞から T 細胞を取出し、CT26 に対する腫瘍抗原ペプチドである AH-1 もしくは CT26 に対する抗腫瘍応答を *in vitro* にて確認したところ、共に特異的な IFN- γ の産生を確認することができ、特に CT26 に対しては有意にその産生量が増加した (図 5 B, C)。

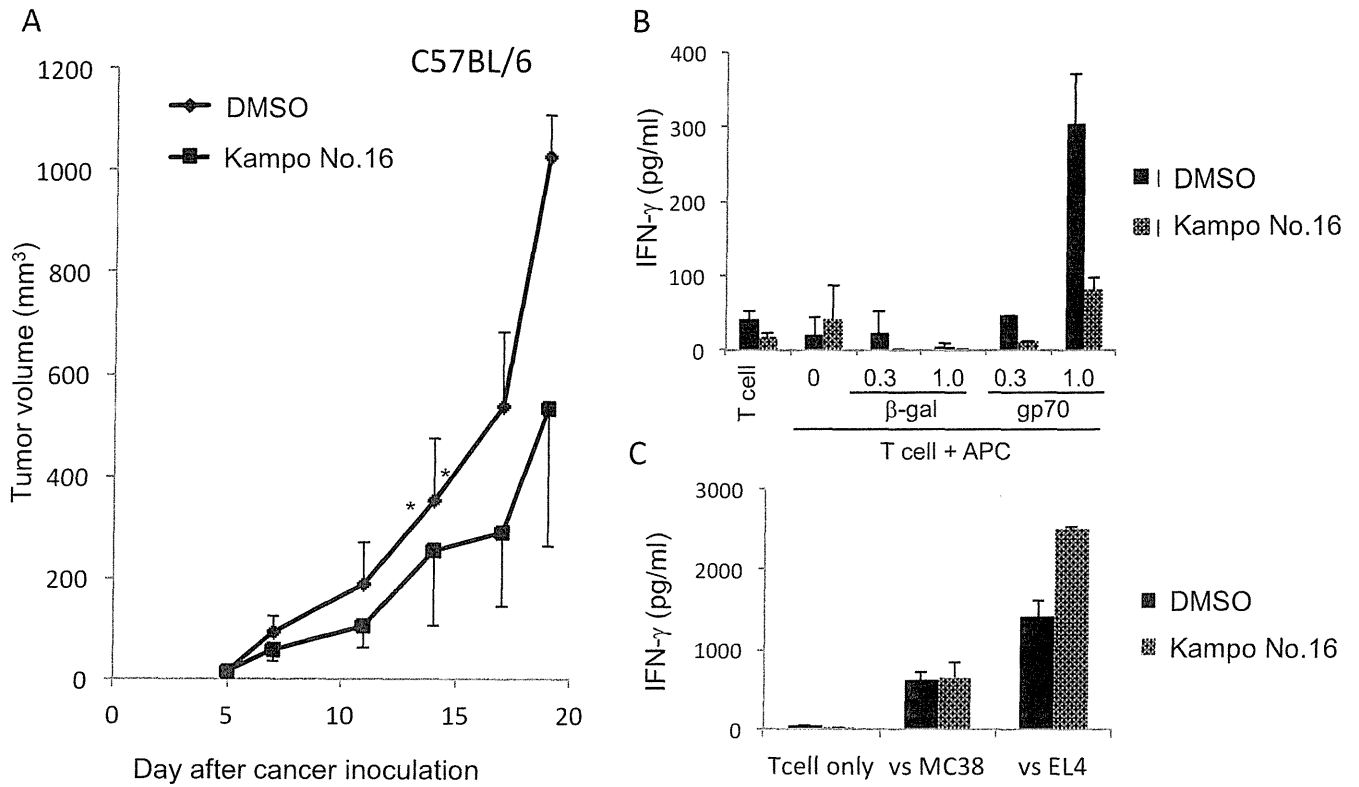


図 4 MC38 担がんマウスモデルに対する漢方成分 No. 16 の治療効果

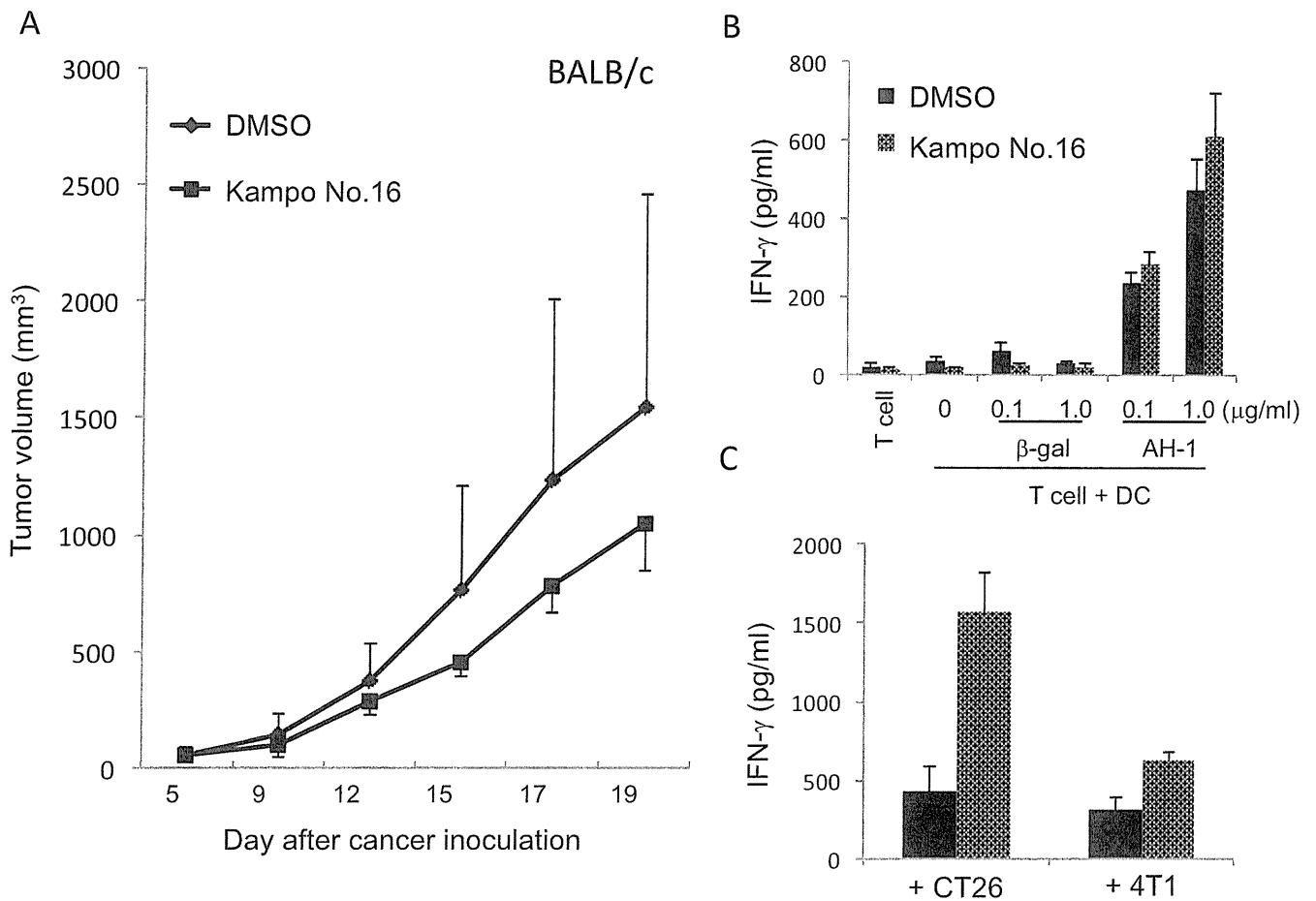


図5 CT26 担がんマウスモデルに対する漢方成分 No. 16 の治療効果

図5において、抗腫瘍免疫応答が上昇する可能性が示唆されたが、次に漢方成分 No. 16 がどの免疫細胞に作用しているのかを解析するため、CT26 担がんマウスの系において脾臓細胞、腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL)、リンパ節の細胞分画をフローサイトメトリーにより解析した。

脾臓細胞において、コントロール群と比較して、有意に CD8 陽性 T 細胞の割合と細胞数が増加していた。また、CD11c 陽性細胞の割合に上昇傾向が見られ、細胞数は有意に増加していた (図6)。

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

所属リンパ節や非所属リンパ節の解析では、所属リンパ節において NK 細胞の割合の低下が有意に見られたが、CD3 陽性 T 細胞の割合が増加しているためにこのような結果になったと考えられる。また、CD11c 陽性細胞の割合も減少傾向が見られた (図7)。

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

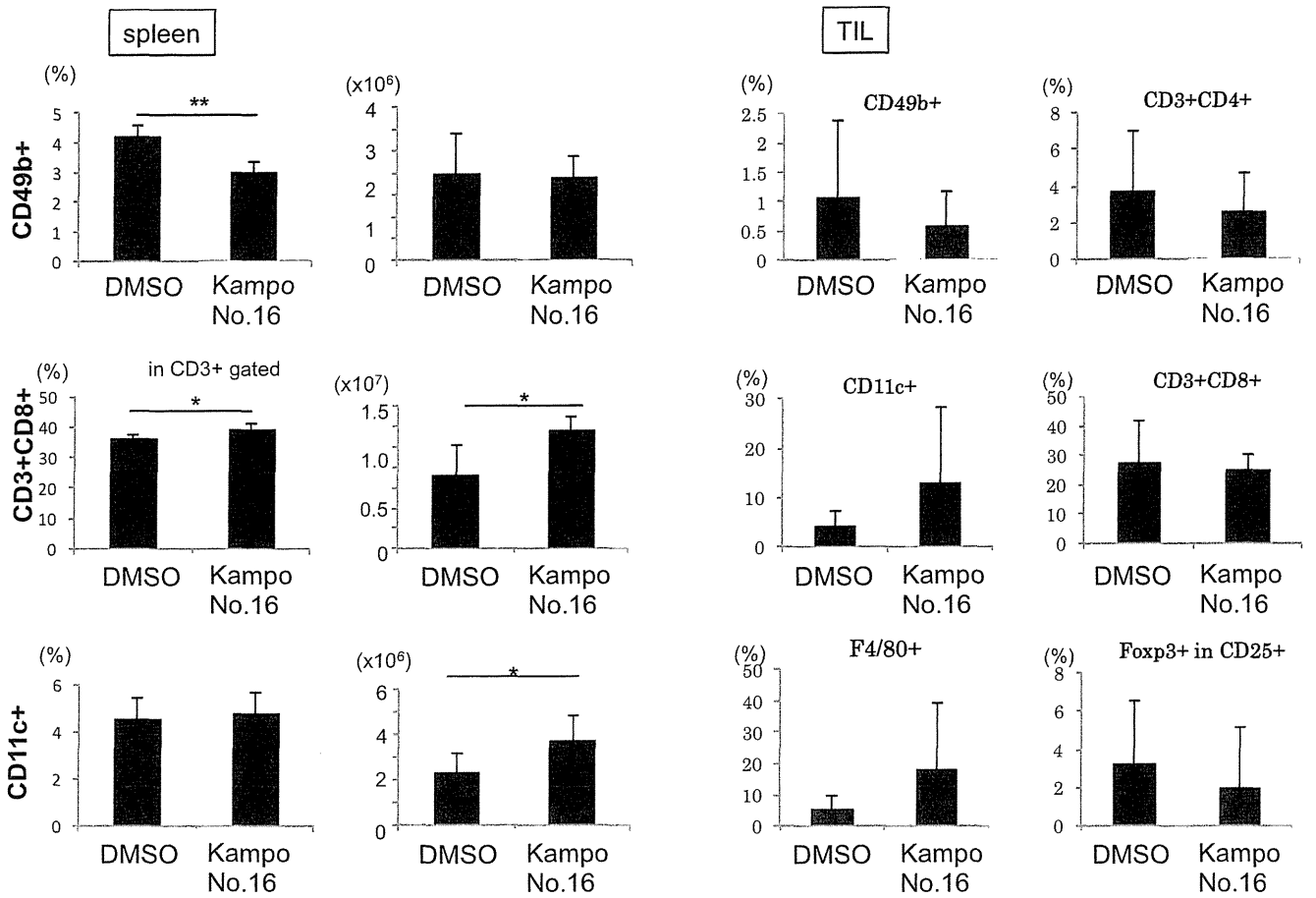


図6 漢方成分 No. 16 の *in vivo*における免疫細胞への影響 1

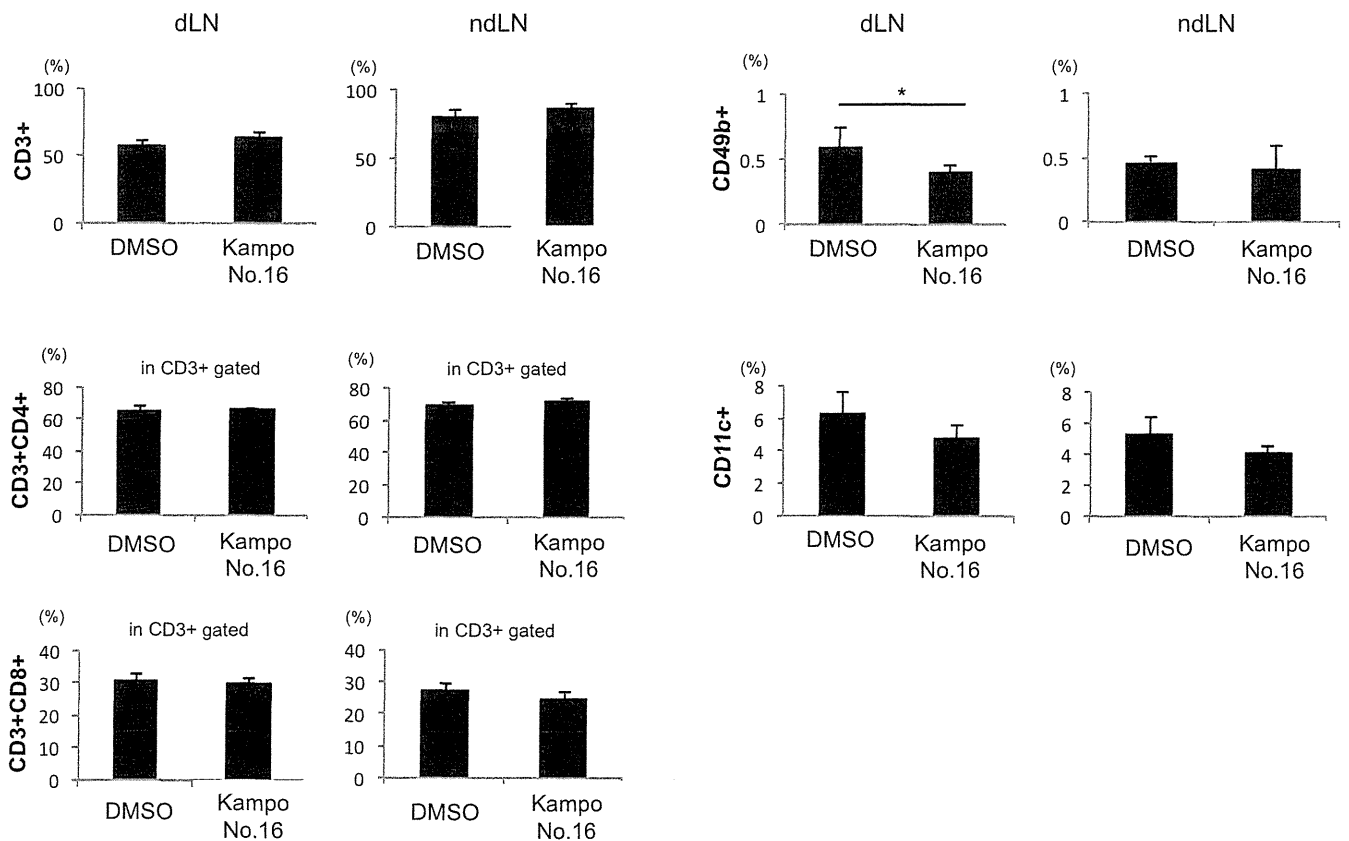


図7 漢方成分 No. 16 の *in vivo*における免疫細胞への影響 2

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

様々な成熟化刺激と共に漢方成分 No. 16 を加えて誘導した樹状細胞の表面分子の変化をフローサイトメーターで解析した (図 8)。予想に反して、いずれの成熟化刺激においても、漢方成分 No. 16 を加えることで CD83 といった成熟マーカーや T 細胞活性に重要な役割を果たす CD80、CD86 などの共刺激分子の発現が低下するとともに、MHC class II の発現も低下していることが分かった。しかし、誘導された樹状細胞の産生したサイトカインを測定してみると、IL-10 の産生が抑制されており、また、LPS (TLR4) による刺激で誘導した樹状細胞においては、TNF- α の産生が上昇していることが確認された (図 9)。

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

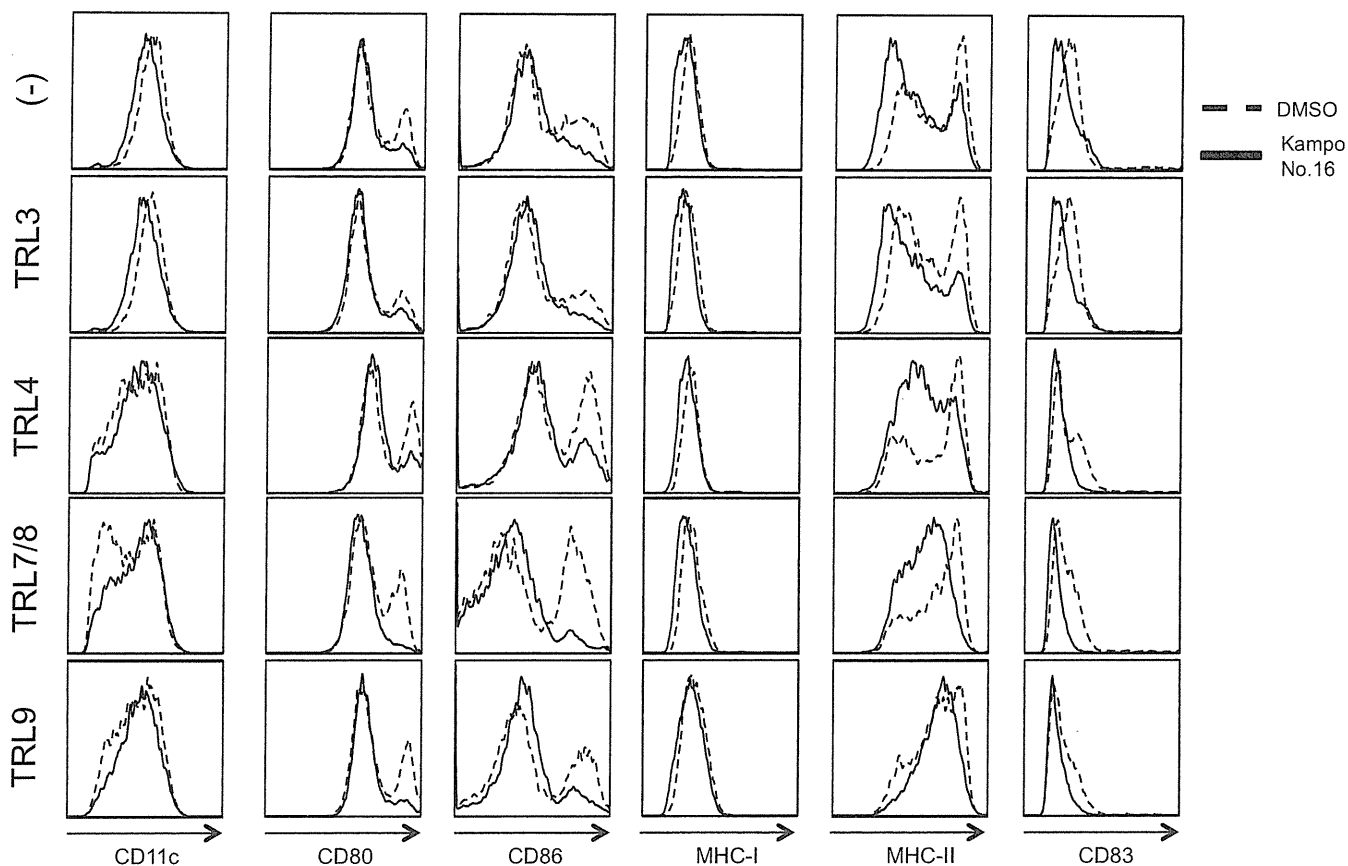


図 8 樹状細胞の成熟化における漢方成分 No. 16 の影響

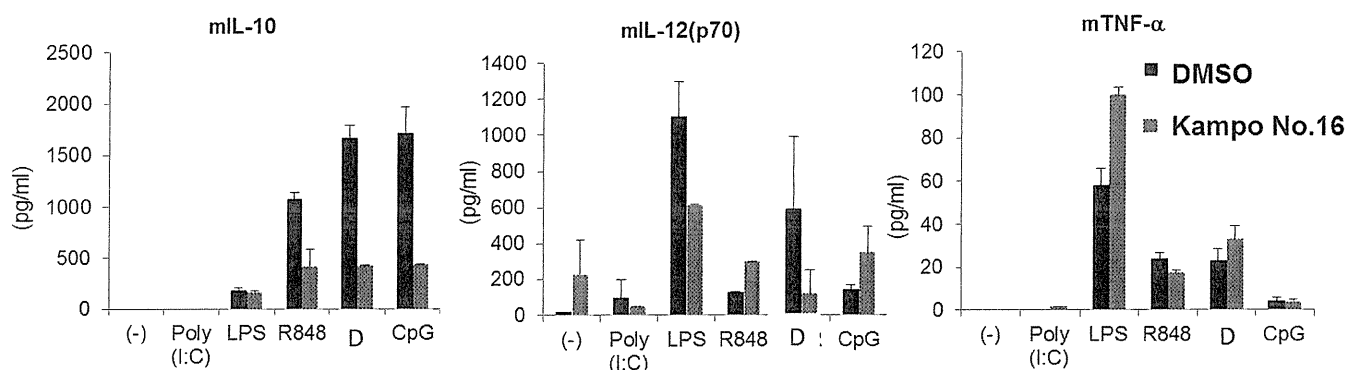


図 9 樹状細胞のサイトカイン産生に対する漢方成分 No. 16 の影響

考察

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

ることが示唆された。ERK や STAT3 はがんの増殖のみならず、免疫抑制性サイトカインの産生に参与していることが近年の研究で報告されている。このことから、漢方成分 No. 16 は腫瘍細胞や免疫細胞における免疫抑制性のサイトカインの産生の抑制や、それに付随した免疫抑制環境を改善する可能性があることが示唆された。実際、ヒト悪性黒色腫細胞株からのサイトカイン産生を抑制した (図 1)。一方で、漢方成分 No. 16 はがん細胞に対する直接的な作用だけでなく腫瘍微小環境や免疫環境を改善することで、がん免疫を改善する働きが期待できる結果が得られた。すなわち、腫瘍細胞への直接的影響が確認できない CT26 担がんマウスモデルにおいて、腫瘍増殖は抑制され、また抗腫瘍 T 細胞反応は上昇し (図 5)、CD8 陽性細胞や CD11c 陽性細胞といった抗腫瘍免疫に重要な役割を持つ細胞集団の割合を末梢において増加させる傾向が認められた (図 6)。また、T 細胞活性の抑制に参与する Treg 細胞の割合を有意ではないが減少させていた (図 6)。

これらの結果から、漢方成分 No. 16 は ERK, STAT3 活性化を低下させることでがん細胞の悪性形質を軽減するとともに、がん微小環境への何らかの作用を介して CD8 陽性細胞の抗腫瘍免疫応答を上昇させ、その結果腫瘍増殖を抑制することができたと考えられる。後者の機構として、樹状細胞の活性化を介しての変化を考えたが、予想に反して骨髄由来樹状細胞の成熟過程において漢方成分 No. 16 は活性化マーカーの低下を誘導した (図 8)。しかしながら、漢方成分 No. 16 は骨髄由来樹状細胞からの IL-10 産生を抑制し、また TNF- α 産生を促進することが明らかとなった (図 9)。本研究で漢方成分 No. 16 の免疫環境に対する効果がより明らかになることで、樹状細胞ワクチン療法を初めとする免疫細胞療法との併用によるがん治療への応用が期待される。

11.2) 漢方成分 No.19

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

漢方成分 No. 19、漢方成分 No. 19s は *in vitro* にて、ヒト卵巣明細胞性腺がん細胞株 R1、R2、R3、R4 の細胞増殖を高濃度において抑制した (図 10A)。R1、R2、R3 に関しては、細胞増殖に影響を及ぼさない低濃度から IL-6 産生を抑制した (図 10B)。

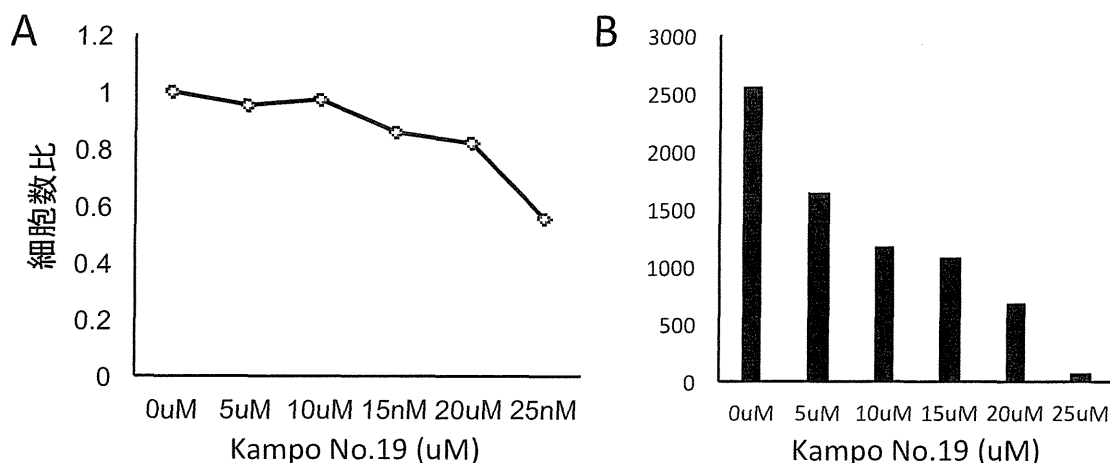


図 10 ヒト卵巣明細胞性腺がん細胞株 R3 に漢方成分 No. 19 を *in vitro* で作用させ、3 日後に増殖を WST-1 アッセイを用いて (A)、24 時間後に IL-6 産生を ELISA を用いて (B) 測定した。

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

解除できる可能性が考えられた。

次に、漢方成分 No. 19s による *in vivo* での免疫抑制解除を検討した。ヒト卵巣明細胞性腺がん細胞株 R3 をヌードマウスに皮下移植し、6 日目より漢方成分 No. 19s の経口投与 (0 mg/kg/day, 5mg/kg/day, 30mg/kg/day) を開始した。漢方成分 No. 19s 投与 30 分後の平均血中濃度は 5mg/kg, 30mg/kg 投与群 で、それぞれ 322 ng/ml, 1174ng/ml であった (図 1 1)。なお、ヒトにおいて漢方成分 No. 19s 400mg 投与時の血中濃度は 440 ng/mL (range, 179-1380 ng/mL) と報告されており、さらに現在 1000mg 投与の臨床試験も行われている。よって、今回のマウスモデルにおける投与量は、ヒトにおいても十分に達成可能な投与量であった。

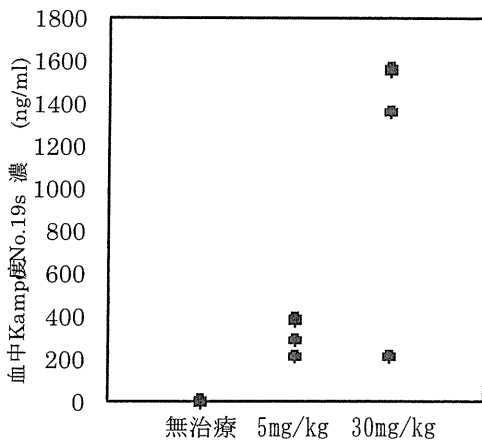


図 1 1 ヒト卵巣明細胞性腺がん細胞株 R3 を移植したヌードマウスに (各群 n=4)、漢方成分 No. 19s を経口投与し、30 分後の血中濃度を測定した。

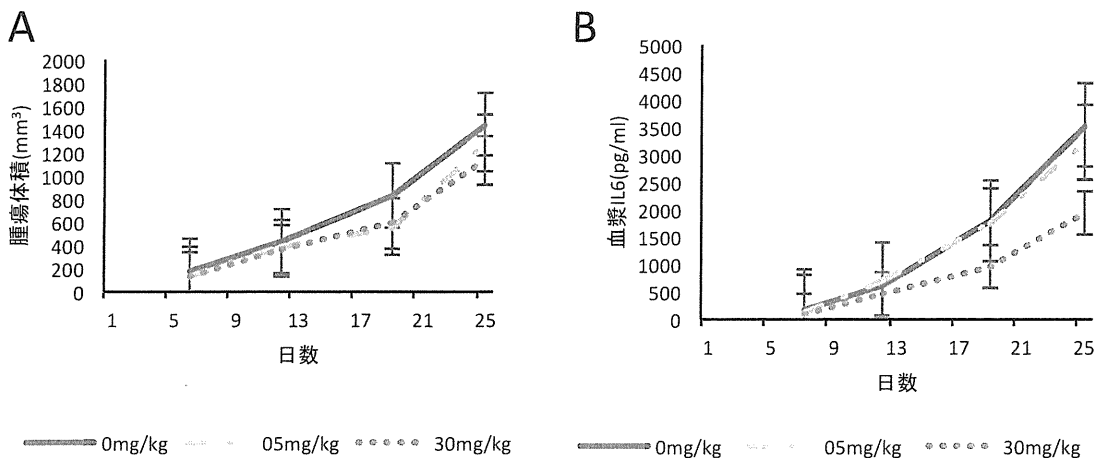


図 1 2 ヒト卵巣明細胞性腺がん細胞株 R3 を移植したヌードマウスに (各群 n=4)、漢方成分 No. 19s を投与し、腫瘍体積 (A) と血漿中のヒト IL-6 濃度 (B) を測定した。(*<0.05)

漢方成分 No. 19s 投与によって、腫瘍体積は各投与群間での有意差が見られないが、R3 由来のヒト IL-6 の血漿中濃度は低下した (図 1 2)。26 日目に脾臓、腫瘍組織から DC (CD11c 陽性細胞) を分離し、T 細胞活性を評価したところ、漢方成分 No. 19s 投与による回復が認められた (図 1 3)。また、脾臓、腫瘍内の MDSC (Gr1⁺CD11c⁺)、マクロファージ (CD11b⁺F4/80⁺) の細胞数及び、CD11b 陽性細胞の Arginase 活性に関しては、漢方成分 No. 19s 投与による変化を認めなかった。

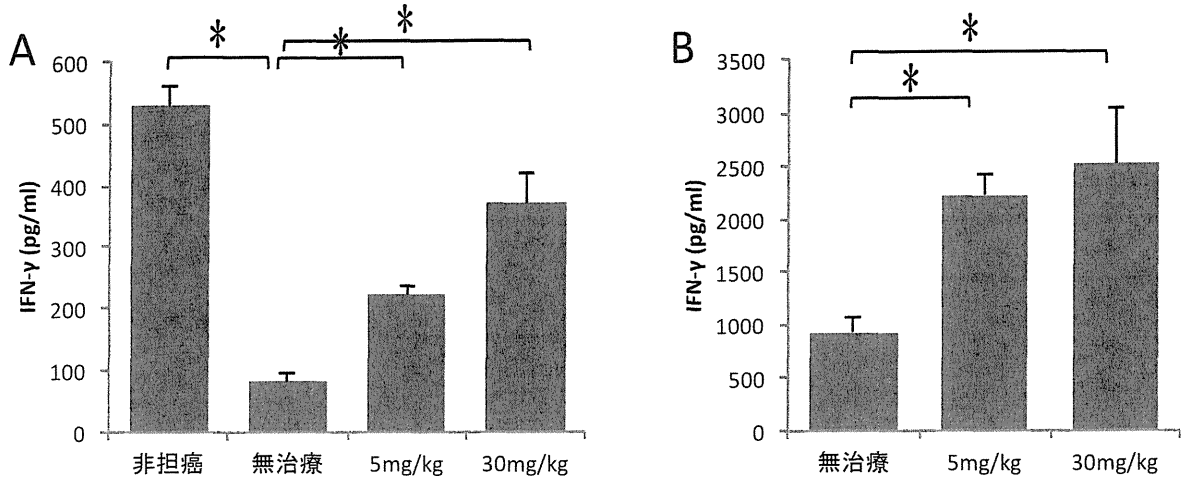


図 1 3 脾臓 (A)、腫瘍組織内 (B) より樹状細胞 (CD11c 陽性細胞) を分離し、Balb/c 由来のナイーブ T 細胞と CD3 抗体存在下で 3 日間培養し、T 細胞より産生される IFN- γ を ELISA で測定した。n=4。* < 0.05

以上のことから、漢方成分 No. 19 および漢方成分 No. 19s は、卵巣明細胞性腺がんにおいて、IL-6 産生を抑制し、DC の機能を回復させ、免疫抑制を解除できる可能性が示された。本研究の結果をうけ、現在、卵巣がん患者で、漢方成分 No. 19s を用いた IL-6 の抑制による悪液質の改善を目的とした臨床試験を、企業 A と共同で計画している。

11.3) 漢方成分 No.23

昨年度までの解析において、漢方成分 No. 23 は JHOC5 からの IL-6、888mel、624mel からの IL-10 産生を抑制し、624mel からの VEGF と PK59 からの TGF- β に対しても若干の抑制効果を示した。AhR に関しては、MCF7 では弱いアンタゴニスト活性を示したが、B16F10 では AhR を強く抑制していた。マウス脾臓細胞からの *in vitro* での 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 CT26 を移植した担がんマウスへの漢方成分 No. 23 投与により投与開始早期から腫瘍の増殖を抑制する傾向が見られた。腫瘍中で CD4⁺T 細胞の頻度の増加、局所リンパ節での NK/NKT 細胞の頻度の増加が見られていた。Treg 細胞頻度はどの臓器においても差が見られなかった。漢方成分 No. 23 投与群の脾臓細胞から誘導した腫瘍抗原特異的な T 細胞では対照群と比較して抗原特異的 IFN- γ 産生量が若干増加していた。今年度は、C57BL/6 担がんマウスを用いて昨年度の結果を検証するとともに、細胞分画のより詳細な解析を試みた。

結果

C57BL/6 マウスにがん細胞 MC38 を皮下移植し、腫瘍が生着した 5 日目から 200 μ g の漢方成分を 2 日に 1 回腹腔内投与した。漢方成分 No. 23 投与群は DMSO 投与群と比較して、有意に腫瘍増殖を抑制することが確認できた (図 1 4 A)。移植後 18 日目の脾臓細胞に腫瘍抗原 gp70 のペプチドをパルスして誘導した抗原特異的 T 細胞は、gp70 発現陰性の腫瘍細胞 EL4 に比べて gp70 発現陽性の腫瘍細胞 MC38 に対して高い IFN- γ を産生するが、その産生量は漢方成分 No. 23 治療群において上昇してはいなかった (図 1 4 B)。

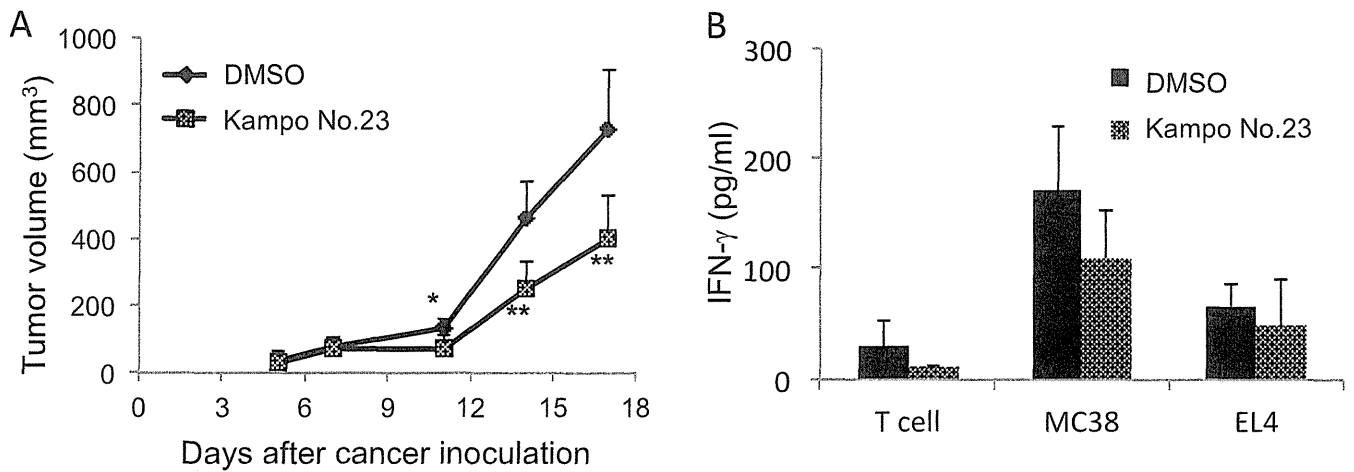


図 1 4 MC38 担がんマウスモデルに対する漢方成分 No. 23 の治療効果

各群の治療後の脾臓、腫瘍組織における免疫細胞分画を解析したところ、末梢の脾臓細胞では、漢方成分 No. 23 投与群において CD3 陽性 T 細胞の割合の増加傾向、CD11b⁺Gr-1⁺ の MDSC 細胞の割合の減少、Treg 細胞の減少傾向が見られたが、腫瘍浸潤リンパ球では、漢方成分 No. 23 投与群において、CD3 陽性 T 細胞と CD11c 陽性樹状細胞の割合が減少傾向にあった (図 1 5)。

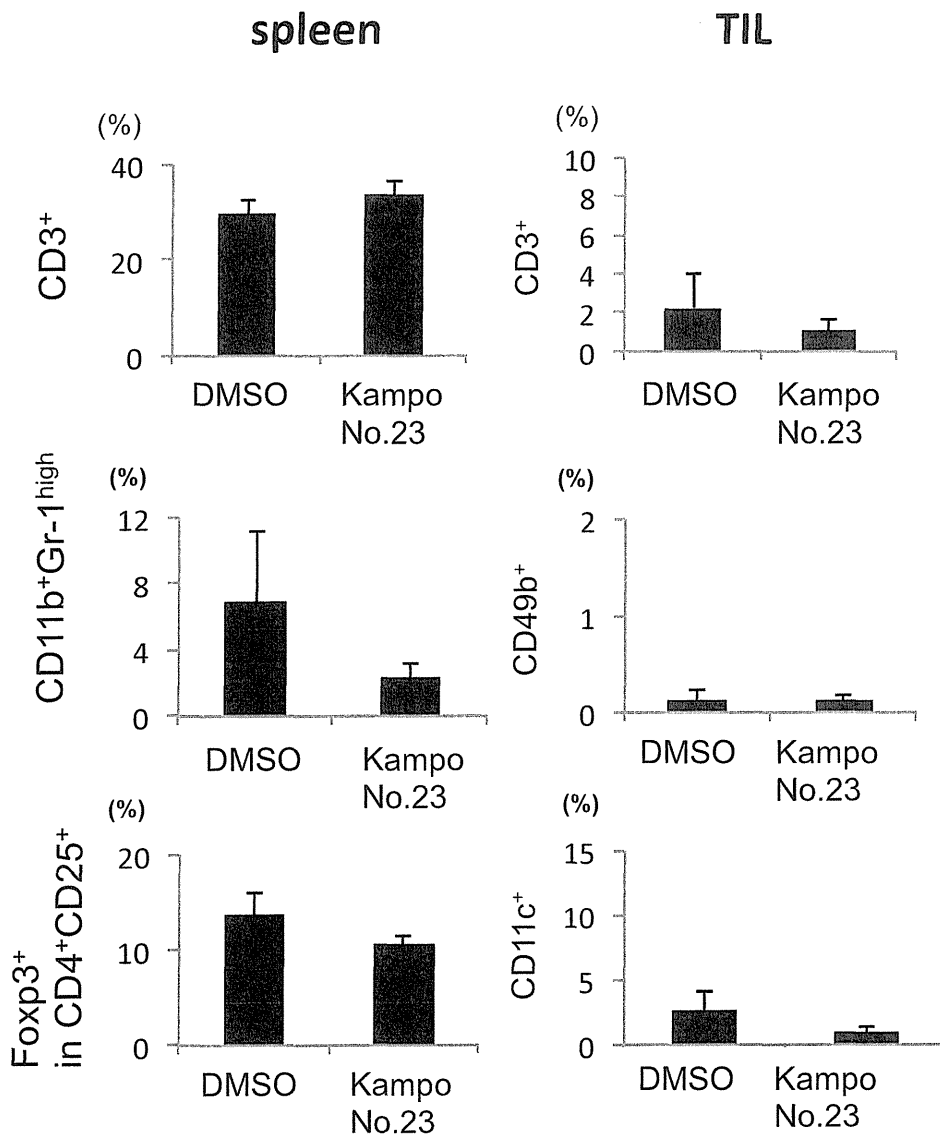


図 1 5 漢方成分 No. 23 投与による脾臓、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

考察

これまでの解析から漢方成分 No. 23 は JHOC5 からの IL-6、888mel、624mel からの IL-10 産生を抑制し、AhR に対してもアンタゴニスト活性を示した。888mel を漢方成分 No. 23 存在下で培養すると STAT3 と ERK1/2 のリン酸化が減少することも昨年度示した。マウス脾臓細胞からの iTreg 誘導を抑制するが Th1 誘導は阻害しないという抗腫瘍免疫に有利な特徴も示した。これらの *in vitro* の結果に基づき、担がんマウスへの投与による治療効果の解析を進めてきた結果、Balb/c マウスに CT26 を移植した場合と C57BL/6 マウスに MC38 を移植した場合の両方において、漢方成分 No. 23 投与により腫瘍の増殖は抑制された。脾臓細胞から誘導した腫瘍抗原特異的な T 細胞の解析では、Balb/c マウスに CT26 を移植した系では漢方成分 No. 23 投与により抗原特異的 IFN- γ 産生量が若干増加していたが、C57BL/6 マウスに MC38 を移植した系では抗原特異的 IFN- γ 産生量の増加は見られなかった。今年度の解析では、末梢において、CD3 陽性 T 細胞の割合の増加傾向、CD11b+Gr-1⁺ の MDSC 細胞の割合の減少、Treg 細胞の減少傾向がみられたものの、腫瘍組織では T 細胞や樹状細胞の浸潤が減少傾向にあり抗腫瘍免疫応答の増強にはつながっていないと考えられた。漢方成分 No. 23 は、がん細胞の STAT3 や ERK といったシグナル経路を阻害する働きがあることが示唆され、腫瘍の増殖にかかわるこれらの因子に影響を及ぼした結果、腫瘍増殖を抑制したのではないかと考えられた。

11.4) 漢方成分 No.24

漢方成分 No. 24 は JHOC5 からの IL-6、888mel、624mel からの IL-10 産生を抑制し、624mel からの VEGF と PK59 からの TGF- β に対しても若干の抑制効果を示した。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。また、MCF7 と B16F10 の両方において、AhR に対する強いアンタゴニスト活性を示した。マウス脾臓細胞からの *in vitro* での 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。Balb/c マウスに CT26 を移植した担がんマウスへの漢方成分 No. 24 投与により腫瘍の増殖を顕著に抑制する傾向が見られた。このとき、脾臓中で CD8⁺T 細胞と NKT 細胞の頻度が増加する傾向、腫瘍中の Treg 細胞頻度が減少する傾向が見られた。漢方成分 No. 24 投与群の脾臓細胞から誘導した腫瘍抗原 AH-1 特異的な T 細胞では対照群と比較して抗原特異的 IFN- γ 産生量が顕著に増加していた。今年度は、C57BL/6 担がんマウスを用いて昨年度の結果を検証するとともに、細胞分画のより詳細な解析を試みた。

結果

C57BL/6 マウスにがん細胞 MC38 を皮下移植し、腫瘍が生着した 5 日目から 200 μ g の漢方成分を 2 日に 1 回腹腔内投与した。漢方成分 No. 24 投与群は DMSO 投与群と比較して、有意に腫瘍増殖を抑制することが確認できた (図 1 6 A)。移植後 18 日目の脾臓細胞に腫瘍抗原 gp70 のペプチドをパルスして誘導した抗原特異的 T 細胞は、gp70 発現陰性の腫瘍細胞 EL4 に比べて gp70 発現陽性の腫瘍細胞 MC38 に対して高い IFN- γ を産生するが、その産生量は漢方成分 No. 24 治療群において上昇していた (図 1 6 B)。

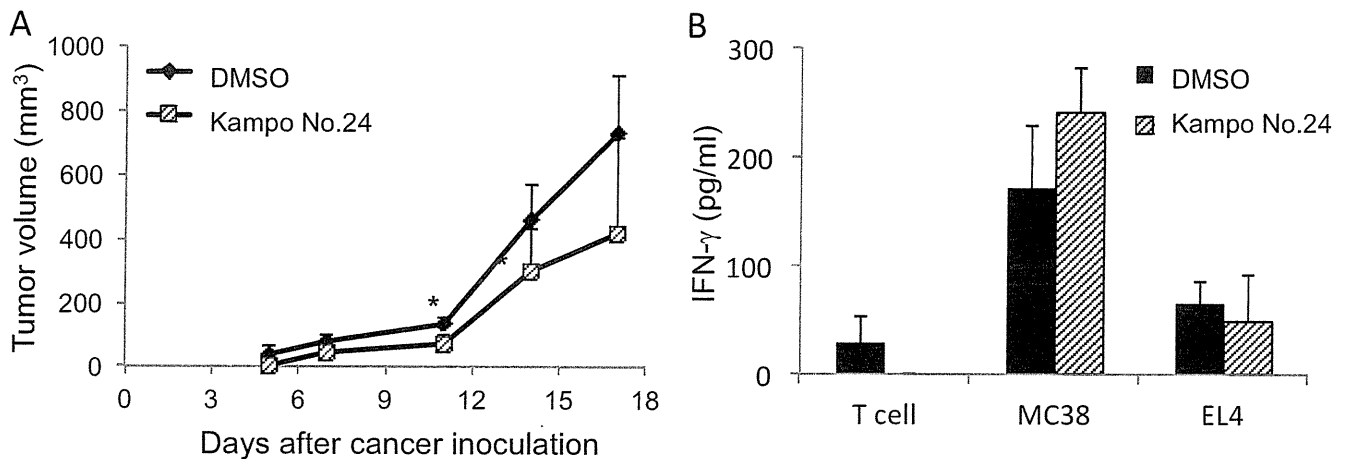


図 1 6 MC38 担がんマウスモデルに対する漢方成分 No. 24 の治療効果

各群の治療後の脾臓、腫瘍組織における免疫細胞分画を解析したところ、末梢の脾臓細胞では、漢方成分 No. 24 投与群において CD3 陽性 T 細胞の割合の増加傾向、CD11b+Gr-1⁺ の MDSC 細胞の割合の減少、Treg 細胞の

減少傾向が見られ、さらに、腫瘍浸潤リンパ球では、漢方成分 No. 24 投与群において、CD3 陽性 T 細胞、NK/NKT 細胞、樹状細胞の割合の増加が見られた (図 1 7)。

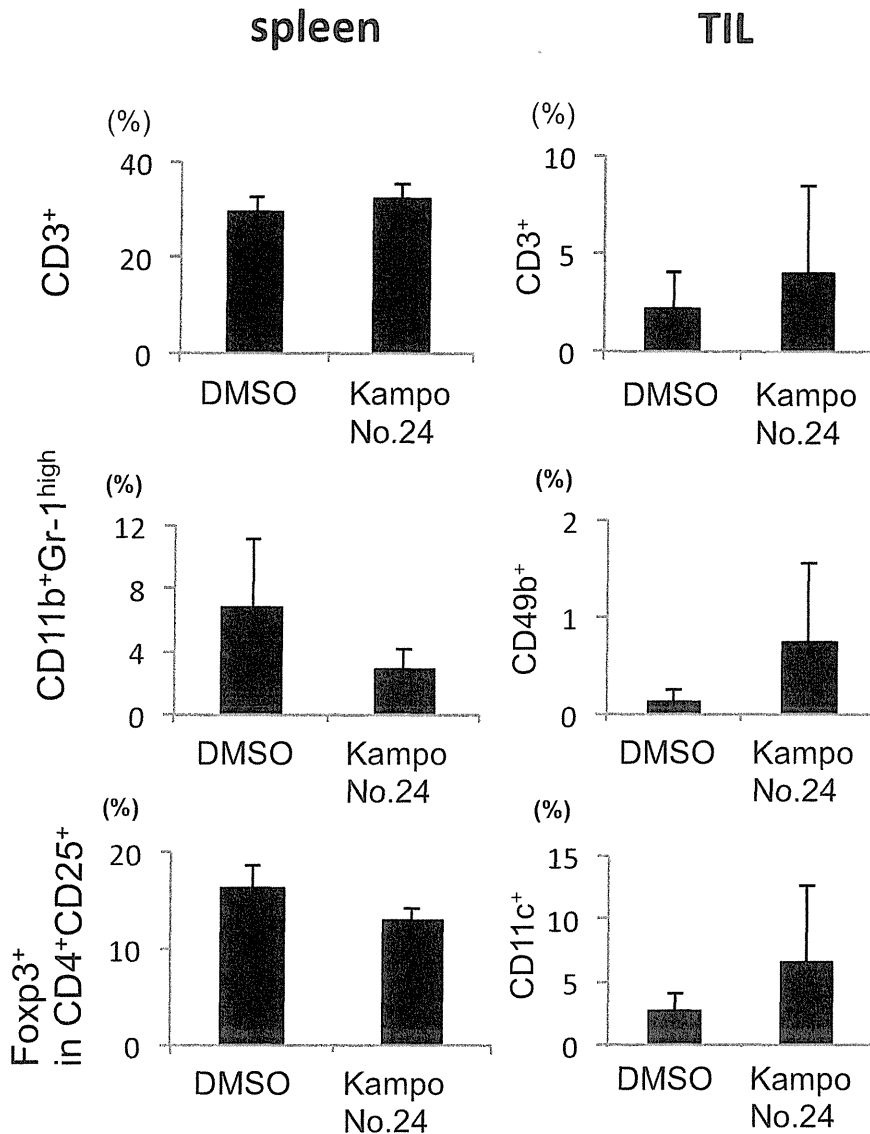


図 1 7 漢方成分 No. 24 投与による脾臓、腫瘍組織における免疫細胞分画の変化

考察

漢方成分 No. 24 は漢方成分 No. 23 と非常に類似した化学構造をもつ化合物である。これまでの解析から漢方成分 No. 24 は JHOC5 からの IL-6、888mel、624mel からの IL-10 産生を抑制し、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。また、AhR に対して強いアンタゴニスト活性を示した。888mel を漢方成分 No. 24 存在下で培養した際の STAT3 と ERK1/2 のリン酸化は漢方成分 No. 23 よりも少ない程度ながら減少させた。マウス脾臓細胞からの *in vitro*での 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。これらの *in vitro*の結果に基づき、担がんマウスへの投与による治療効果の解析を進めてきた結果、Balb/c マウスに CT26 を移植した場合と C57BL/6 マウスに MC38 を移植した場合の両方において、漢方成分 No. 24 投与により腫瘍の増殖は顕著に抑制された。脾臓細胞から誘導した腫瘍抗原特異的な T 細胞の解析では、Balb/c マウスに CT26 を移植した系で漢方成分 No. 24 投与により抗原特異的 IFN- γ 産生量が顕著に増加し、C57BL/6 マウスに MC38 を移植した系においても抗原特異的 IFN- γ 産生量の増加が見られた。今年度の解析では、末梢において、CD3 陽性 T 細胞の割合の増加傾向、CD11b+Gr-1⁺の MDSC 細胞の割合の減少、Treg 細胞の減少傾向がみられた点は漢方成分 No. 23 と共通していた。漢方成分 No. 23 投与マウスの腫瘍組織では T 細胞や樹状細胞の浸潤が減少傾向にあり抗腫瘍免疫応答の増強にはつなげていないと考えられたのに対し、漢方成分 No. 24 投与マウスの腫瘍組織では CD3 陽性 T 細胞、NK/NKT 細胞、樹状細胞の割合の増加が見られ、抗腫瘍免疫応答の増強が起きている可能性が示唆された。漢方成分 No. 23 が、がん細胞の STAT3 や

ERK の阻害を介してがん細胞自体の増殖に影響を及ぼして腫瘍増殖を抑制したと考えられたのに対し、漢方成分 No. 24 はがん細胞自体の増殖に対する影響に加えて、抗腫瘍免疫応答の増強をも介して腫瘍の増殖を抑制させたのではないかと考えられる。

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研究を進めてきた。担がん生体のがん微小環境が免疫抑制的になる一つの要因は、がん細胞内でのシグナル伝達の異常に起因して起こるがん細胞からの免疫抑制性因子の放出や、それに付随した免疫抑制性細胞群の誘導と動員であり、がん細胞のシグナル伝達異常を解除することが免疫抑制環境の改善につながることを我々は示してきた。昨年度までの *in vitro* および *in vivo* での様々な解析結果をもとに、この目的に有効であろうと考えられた漢方成分について、本年度は担がんモデルマウスの治療実験を中心に進めた。

最終年度の解析に用いた成分の内、漢方成分 No. 21、漢方成分 No. 35、漢方成分 No. 16、漢方成分 No. 19、漢方成分 No. 23、漢方成分 No. 24 で担がんマウスでの腫瘍増殖を抑制する効果がみられた。また、漢方成分 No. 25、漢方成分 No. 35、漢方成分 No. 16、漢方成分 No. 19、漢方成分 No. 24 で抗腫瘍免疫の増強効果がみられた。

最終年度に解析した漢方成分 No. 13、漢方成分 No. 22、漢方成分 No. 25、漢方成分 No. 19 は NF- κ B 阻害作用をもっている。漢方成分 No. 16 は顕著に STAT3 と ERK を阻害する活性をもち、漢方成分 No. 16、漢方成分 No. 24、漢方成分 No. 15、漢方成分 No. 19、漢方成分 No. 22、漢方成分 No. 35 は AhR アンタゴニストとしての作用をもっている。NF- κ B は正常な免疫応答においても重要な働きを担う転写因子であるため、その阻害が抗腫瘍免疫応答を弱める危険性も秘めている。漢方成分 No. 13、漢方成分 No. 22 でみられた腫瘍抗原特異的 T 細胞応答の減弱は免疫細胞の NF- κ B に作用した弊害の可能性がある。しかしながら、漢方成分 No. 25 は腫瘍抗原特異的 T 細胞応答を有意に増強しており、現時点でその作用機序の違いは明らかでないが、漢方成分によっては抗腫瘍免疫応答の増強につながる可能性を示している。漢方成分 No. 25 は腫瘍組織への T 細胞の動員を促進する処置との併用が有効であると考えられる。漢方成分 No. 35、漢方成分 No. 16、漢方成分 No. 19、漢方成分 No. 24 はいずれも AhR アンタゴニストであり、AhR の阻害が腫瘍増殖の抑制と抗腫瘍免疫の増強の両方に効果的であることが示唆される。

本研究の結果、漢方成分 No. 16、漢方成分 No. 19、漢方成分 No. 24 (および類似化合物である漢方成分 No. 23) が、がん細胞や免疫細胞のシグナル伝達分子や転写因子の阻害作用などを介して抗腫瘍免疫応答を制御できることを明らかにした。次のステップとして、これら 4 化合物をリード化合物として、より有効な化合物の開発することを検討中である。また漢方成分 No. 16 は、すでに既存薬としてがん以外の疾患に使用されており、漢方成分 No. 16 を、がん免疫病態制御作用の観点から、がん患者に対して臨床試験を実施することを検討している。漢方成分 No. 23 は、将来の臨床試験の可能性を検討するために、A 社から濃縮製剤を入手し検討中である。漢方成分 No. 19 は、世界的に様々な疾患で臨床試験が行われていたが、体内吸収性に問題があった。上記のように高吸収性製剤を開発した A 社と共同で、A 社の製剤がヒトがん細胞やマウス腫瘍モデルで抗腫瘍免疫制御作用をもつことを明らかにし、すでに臨床教室と共同でがんに対する臨床試験プロトコールの作成を進めている。臨床試験においては、他のがん治療との併用による治療効果の増強、また、NF- κ B 抑制による悪液質誘導作用をもつ IL-6 などの炎症性サイトカインの産生低下による緩和治療目的での利用を検討している。

III. 研究成果

1. 論文発表

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, 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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

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. 谷口智恵、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、谷口智恵、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、谷口智恵. 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、谷口智恵. 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.

2. 学会発表

22. 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
23. 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
24. 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 HomeostaticInflammation Symposium, National Center of Sciences Building, Tokyo, Japan, 2012/10/26、招待
 25. 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
 26. 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
 27. 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
 28. Yutaka Kawakami, Reversal of Multiple Cancer Induced Immunosuppressive Cascades by Molecular Targeted Therapy for Effective Immunotherapy, The 7thInternational Cancer Vaccine Symposium, Convitto Dlla Calza, Florence, Italy, 2012/9/11、招待
 29. 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
 30. 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
 31. Yutaka Kawakami, Reversal of Cancer Induced Immune-Suppression by Targeting Signaling Molecules in Cancer and Immune Cells, The 27thNagoya International Cancer Treatment Symposium, 愛知県がんセンター (名古屋), 2012/2/12
 32. Yutaka Kawakami, Mechanisms of Immunosuppression Caused by Human Cancer Cells and Their Control for Effective Immunotherapy, 9thChina-Japan Joint Conference of Cancer, Shanghai (China), 2011/12/23、招待
 33. 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
 34. 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, 26thAnnual Meeting Society for Immunotherapy of Cancer, North Bethesda, MD, 2011/11
 35. 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
 36. 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
 37. 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
 38. 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
 39. 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
 40. 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
 41. 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
 42. Hiroshi Nishio, Tomonori Yaguchi, Tomonobu Fujita, Kazuo Umezawa, Takashi Iwata, Takuma Fujii, Hidetoshi Sumimoto, Daisuke Aoki, Yutaka Kawakami, Blockade of activated NF-kB 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
43. 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
 44. 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
 45. 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
 46. 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
 47. 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
 48. 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
 49. 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

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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.	Michael S Hurin, Anatoli Malyguine, Viktor Umanisky,	The Tumor Immunoenvironment	Springer Science	Heidelberg, New York, London	2013	307-323

雑誌

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
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	244(9)	817-823	2013
谷口智憲、西尾浩、里見良輔、川村直、小林明日香、河上裕	分子標的薬を用いたがん免疫応答の制御。	血液フロンティア	22(8)	1229-1238	2012

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	70(8)	144-148	2012.11
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

V. 研究成果の刊行物・別刷