

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09328

研究課題名(和文) 担がん個体の抗ウイルス細胞性免疫の維持向上に果たす漢方薬の役割

研究課題名(英文) Kampo medicine as a promising antiviral adjuvant in an immunosuppressive state caused by tumours.

研究代表者

高久 俊 (Takaku, Shun)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50445813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：担がん宿主における抗ウイルス免疫の改善に果たす漢方薬の役割を明らかにするため、担がんマウスに十全大補湯を投与しウイルス感染後の細胞性免疫を評価した。十全大補湯はin vivoで何らの抗腫瘍効果も示さない一方、同マウスで低下していた抗ウイルス細胞性免疫を改善した。また抗ウイルス免疫を抑制する制御性T細胞および骨髄由来抑制細胞への介入も抗腫瘍効果はないものの、担がんマウスの抗ウイルス細胞性免疫の改善に有用であったが、十全大補湯はこれら細胞とは無関係にその改善に寄与することが明らかとなった。以上の結果は担がん患者など易感染性宿主の抗ウイルス免疫向上に漢方薬が有用であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、新興・再興感染症に対して特異的ワクチンや薬剤が開発されるまで対症療法で凌ぐしかない今日において、比較的安全性が高く経済的な十全大補湯ががん患者をはじめとする免疫低下した患者群に対して有用である可能性を示唆するものである。また感染症治療は病原体自体への対応に目が行きがちであるが、宿主の免疫の向上という視点に立ったアプローチも必要であり、本研究はその一端を示したものとも言えよう。古来より感染症の治療や予防などに多様な漢方薬が使用されてきたことを考えると、今後、科学的な観点から同様の研究を推進し易感染性宿主に対する感染症への備えを固めることは有用であると信ずる。

研究成果の概要(英文)：We tested whether oral administration of Japanese Kampo medicine juzentaihoto (JTT) plays a role in the improvement of antiviral cellular immunity in tumour-bearing hosts. Murine colorectal cancer CT26-bearing mice fed control or JTT diet were inoculated with recombinant vaccinia virus expressing HIV-1 gp160 (vSC25). Seven days post infection, anti-vSC25 cellular immunity was evaluated by the frequency of splenic viral-specific CD8+ T cells. JTT, despite the lack of antitumour effect, augmented anti-vSC25 cellular immunity in CT26-bearing mice. Depletion of either regulatory T cells or myeloid-derived suppressor cells also enhanced anti-vSC25 cellular immunity in tumour-bearing mice. However, JTT had no impact on the frequency of those immune-suppressive cells. Taken together, JTT may contribute to the enhancement of anti-vSC25 cellular immunity in tumour-bearing hosts, suggesting that it can act as a promising antiviral adjuvant in immunosuppressive state caused by tumours.

研究分野：東洋医学

キーワード：漢方薬 抗ウイルス細胞性免疫 担がん宿主 十全大補湯 免疫制御系細胞

1. 研究開始当初の背景

一般にがん患者は免疫低下状態にあると考えられウイルス感染症に罹患しやすく重症化しやすい。従って、かかる患者群の感染症対策は生命予後に関わる重要な問題である。一部の感染症の予防にはワクチン接種が有効である一方、その多くは中和抗体(液性免疫)のみ誘導可能な不活化ワクチンであり、本来ウイルス制御に不可欠なウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) など細胞性免疫の誘導活性化はできない。従って抗ウイルス免疫、特に現行のウイルスワクチンでは誘導が困難である細胞性免疫を維持・活性化する方法の構築は担がん患者の感染症によるダメージの軽減を考える上で強く望まれる。ところで、日常臨床において近年がんを含む様々な疾病に対して漢方薬が使用され、特に一部の漢方薬(十全大補湯、人參養榮湯、補中益気湯)は、実際に、がん患者の QOL の改善に寄与している。また免疫学的にも特に細胞性免疫に与える影響について十全大補湯や人參養榮湯が、腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞を介して抗腫瘍免疫を増強することが報告されている。更に、易感冒患者の罹患頻度の低下や罹患時自覚症状の軽減に一部の漢方薬(玉屏風散末)が極めて有効であるという知見も加味すると、漢方薬が生体の細胞性免疫および抗ウイルス免疫の増強に寄与しうることが推察される。そこで今回報告者は漢方薬が担がん個体の感染症に対する免疫の維持向上に貢献するのではないかと仮説を立て、特に現行のワクチンではカバーするのが困難なウイルスに対する細胞性免疫の維持向上における意義の解明に向けて研究を展開した。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ本研究は以下の解明を目指して実施された。

- (1) 担がん個体で実際に抗ウイルス細胞性免疫が低下しているか否か動物モデルを用いて明らかにする。
- (2) (1)の結果を踏まえ、漢方薬摂取が担がん動物の抗ウイルス細胞性免疫の維持向上に寄与するか否かを明らかにする。
- (3) (2)で漢方薬摂取が担がん動物の抗ウイルス細胞性免疫の維持向上に寄与するならば、その免疫学的メカニズムについて解明する。

3. 研究の方法

担がん個体の抗ウイルス免疫、特に現行のワクチンでは誘導活性化が困難である細胞性免疫の維持向上に漢方薬が寄与するか否かを明らかにするため以下の方法で研究を遂行した。

(1) 担がん個体における抗ウイルス免疫誘導能を評価するマウスモデルの作成

まず担がん個体における抗ウイルス免疫誘導能を評価するための動物モデルを作成した。マウス大腸がん細胞 CT26 を野生型 BALB/c マウスに経皮的に接種すると腫瘍塊が形成され、その腫瘍内および脾臓内において抗腫瘍免疫および抗ウイルス免疫双方に対して抑制的に働く免疫制御系細胞である制御性 T 細胞(Treg 細胞)および骨髄由来抑制細胞(myeloid-derived suppressor cells; MDSCs)が増加する。一方、HIV-1 gp160 を発現する組み替えワクチニアウイルス vSC25 を未処置の野生型マウスに感染させると HIV-1 gp160 特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) がマウス脾臓内で誘導される。そこで、これらを組み合わせてウイルスに対する細胞性免疫を評価するための担がんマウスモデルを作成した。すなわち 1×10^6 個の CT26 を接種後 14 日目に、担がんマウスに本ウイルスを感染 (1×10^7 PFU)させ、その 7 日後(腫瘍接種 21 日後)に同マウスの脾臓細胞中の HIV 特異的 CTL 数を、腫瘍接種せずウイルス感染のみさせたマウスと比較し、担がんマウスにおいてその数の減少が認められるか否かを FACS を用いて gp160 内のエプトープペプチド P18-I10/H-2D^d テトラマー陽性細胞数で評価した。

(2) 担がん個体における抗ウイルス細胞性免疫誘導能に与える漢方薬の役割

(1)で担がんマウスにおいて抗ウイルス細胞性免疫誘導能の低下が認められたため、次に漢方薬がこのような免疫低下の予防に有効か否かを検討した。具体的には(1)においてCT26を接種すると同時に各種漢方薬含有飼料のマウスへの自由経口摂取を開始(実験終了まで)し、腫瘍接種14日後にvSC25を感染させ、その1週間後に、脾臓内のテトラマー陽性細胞数をFACSで測定した。尚、本研究で使用した漢方薬および生薬混合物エキスのうち、十全大補湯エキス粉末は株式会社ツムラより無償提供を受けた。

(3) 免疫制御系細胞群が担がん個体における抗ウイルス細胞性免疫に与える影響

免疫制御系細胞群が抗ウイルス細胞性免疫を抑制するという知見が、報告者のマウス担がんモデルにも該当するか否かを確認するため、腫瘍接種14日目にvSC25感染と同時に抗CD25抗体あるいは抗Gr-1抗体を経腹膜的に投与して、各々CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性Treg細胞、

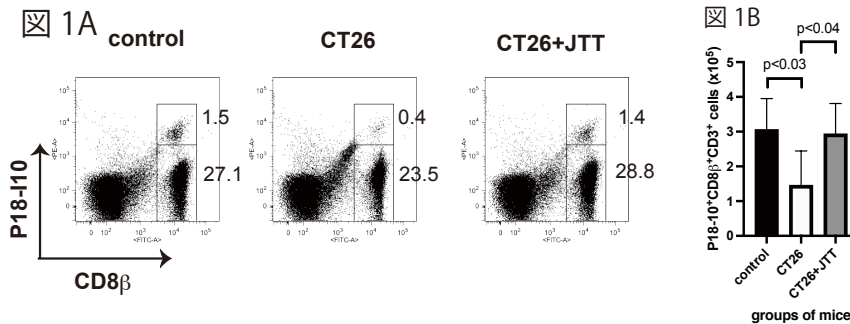
MDSCs を除去し、その 1 週間後に脾臓内の P18-I10 陽性 T 細胞数を FACS を用いて測定し、抗体非接種群と比較することで、これら細胞群の除去が抗ウイルス免疫向上に資するか否かを調べた。

(4) ウイルス接種担がん個体への漢方薬の投与が免疫制御系細胞群に及ぼす影響
漢方薬摂取がウイルス接種担がん個体の免疫制御系細胞群に及ぼす影響を知るため(2)において腫瘍接種 21 日目(ウイルス感染 7 日目)に脾臓細胞中の Treg 細胞数および MDSCs 数を FACS にて測定し、漢方薬摂取の有無で、その数が変動するか否かを評価した。

4. 研究成果

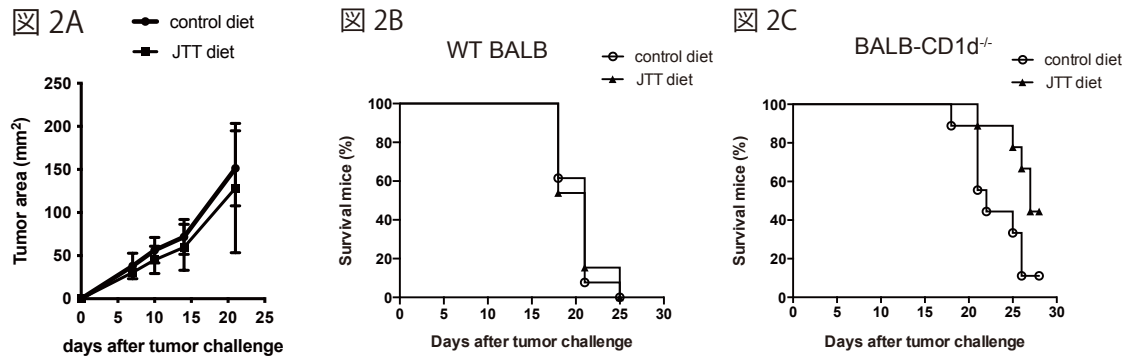
(1) 担がん個体において抗ウイルス細胞性免疫は低下する

vSC25 感染で誘導される抗ウイルス細胞性免疫応答について、同ウイルス感染で発現する HIV-1 ENV gp160 の CTL エピトープペプチド P18-I10 に特異的な CD8 陽性 T 細胞数で評価したところ、CT26 腫瘍負荷のないマウスと比較し、担がんマウスにおいて感染後の P18-I10/H-2D^d テトラマー陽性 T 細胞数が有意に低下していた(図 1A と 1B)。本結果から、担がん個体において実際にウイルス感染時に特異的細胞性免疫応答が低下することが示唆された。



(2) 漢方薬十全大補湯は担がん個体で低下した抗ウイルス細胞性免疫の改善に貢献する

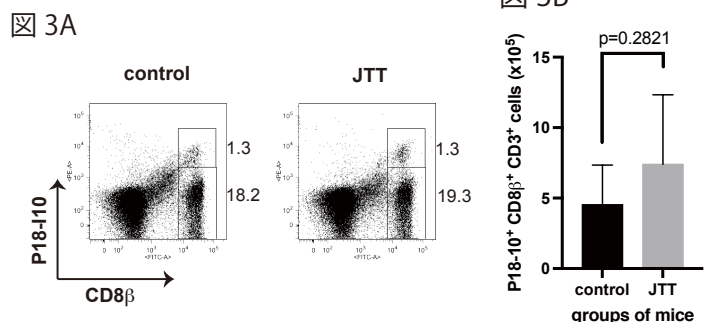
(1) の結果を踏まえ、担がん個体で低下した抗ウイルス細胞性免疫の改善に漢方薬が果たす役割について調べるため、マウスを漢方非含有飼料群および十全大補湯含有飼料群に分け同様の実験を施行した。十全大補湯は野生型マウスに対しては、なんらの腫瘍増殖抑制効果も示さない(図 2A) 一方、抗腫瘍に働く type I NKT 細胞および抗腫瘍免疫抑制に働く type II NKT 細胞を双方とも欠く結果、免疫抑制が若干緩和された BALB-CD1d^{-/-}マウスにおいては、一定の抗腫瘍効果を示した(図 2B と 2C)。しかし野生型マウスにおいて、十全大補湯群は担がん



マウスで認められた vSC25 感染後のテトラマー陽性細胞数の低下を有意に回復させた(図 1A と 1B)。以上から十全大補湯は担がん個体の抗ウイルス細胞性免疫の改善に寄与する可能性が示唆された。尚、野生型マウスを用いて玉屏風散でも同様の実験を施行したが、抗腫瘍効果および抗ウイルス細胞性免疫改善ともに認められなかった。また、非担がん(がんを接種していない)野生型マウスにおいて十全大補湯は抗ウイルス細胞性免疫に何らの影響も

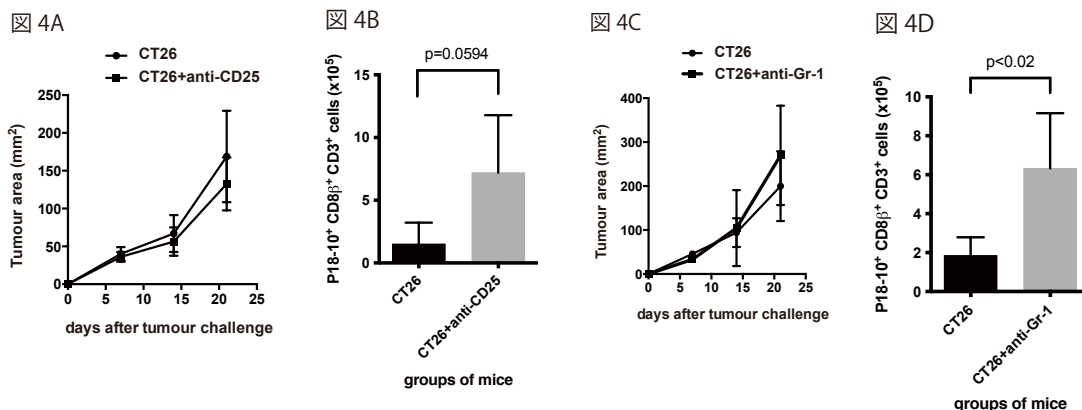
与えなかった(図 3A と 3B)。

一方で、ヘルペスウイルスなどに対して抗ウイルス活性を示すといわれている霊芝含有生薬混合物である WTMCGEP エキス(藤の木、菱の実、肉豆蔻、薏苡仁、霊芝、梅寄生、石榴皮)含有飼料の摂取は腫瘍負荷のない状態で抗ウイルス細胞性免疫活性を増強した。尚、WTMCGEP は十全大補



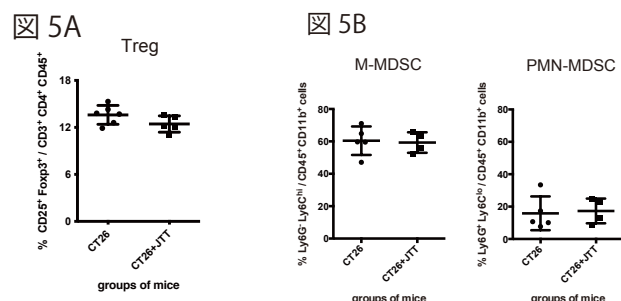
湯と同様に野生型マウスに対して何らの抗腫瘍効果も示さない一方、BALB-CD1d^{-/-}マウスにおいて有意な抗腫瘍効果を示した。

(3) 免疫制御系細胞群への介入は担がん個体の抗ウイルス細胞性免疫を改善させる
 免疫制御系細胞群であるTreg細胞およびMDSCsは抗腫瘍免疫を抑制することが知られているが、同様に、抗ウイルス免疫をも抑制する。そこで本実験系の担がんマウスの抗ウイルス細胞性免疫に与えるTreg細胞およびMDSCsのインパクトを調べるため、担がんマウスに抗CD25抗体あるいは抗Gr-1抗体を経腹膜的に投与し、各々Treg細胞、MDSCsを除去した場合のvSC25感染後のテトラマー陽性細胞数を測定した。するとこれら抗体投与は腫瘍増殖に何らの影響も与えない(図4Aと4C)一方、vSC25感染後のテトラマー陽性細胞数は抗体未接種群と比較して増加していた(図4Bと4D)。従って、担がん個体において免疫制御系細胞群への介入は抗ウイルス細胞性免疫を改善させることが示唆された。



(4) 十全大補湯はウイルス感染担がん個体における免疫制御系細胞群の存在とは無関係に抗ウイルス細胞性免疫の改善に寄与する

最後に、十全大補湯が担がんマウスの抗ウイルス細胞性免疫を改善するメカニズムを調べるため、十全大補湯摂取ウイルス感染担がんマウスの脾臓内のTreg細胞数およびMDSCs数を測定したが、漢方摂取の有無は、これら細胞数に何らの影響も与えなかった(図5Aと5B)。従って、十全大補湯はTreg細胞およびMDSCs非依存的に担がんマウスの抗ウイルス細胞性免疫の改善に貢献する可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takaku S, Shimizu M, Takahashi H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Japanese Kampo Medicine Juzentaihoto Enhances Antitumor Immunity in CD1d -/- Mice Lacking NKT Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Integrative Cancer Therapies	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1534735419900798.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takaku Shun, Shimizu Masumi, Morita Rimpei	4. 巻 2022
2. 論文標題 Japanese Kampo Medicine Juzentaihoto Improves Antiviral Cellular Immunity in Tumour-Bearing Hosts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/6122955	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takaku Shun, Shimizu Masumi, Morita Rimpei	4. 巻 2023
2. 論文標題 CD8+ T Cell-Mediated Therapeutic Antitumor Effect of an Herbal Mixture Containing Ganoderma lucidum	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2023/9630816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takaku S, Shimizu M, Morita R, Takahashi H
2. 発表標題 Japanese Kampo Medicine Juzentaihoto enhances antitumor immunity in CD1d-/- mice that lack NKT cells.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高久俊、森田林平
2. 発表標題 腫瘍免疫制御系細胞群が十全大補湯の抗腫瘍効果に与える影響
3. 学会等名 第71回日本東洋医学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------