

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501335

研究課題名(和文) 漢方薬が免疫制御系細胞群に与える影響～腫瘍ワクチン効果の増強を目指して

研究課題名(英文) Synergistic enhancement of tumor vaccine efficacy mediated by herbal medicines

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍免疫における漢方薬の役割を明らかにするため、X線照射した腫瘍細胞を腫瘍ワクチンとし、人参養栄湯がワクチン効果に及ぼす影響についてマウスを用いて検討した。腫瘍ワクチンは単独で一定の腫瘍増殖抑制効果を示す一方、人参養栄湯単独では全く抗腫瘍効果が認められなかった。しかし腫瘍ワクチンと人参養栄湯を併用した場合、著明な抗腫瘍効果の増強が認められた。そして、その効果増強のためにはCD8陽性T細胞が必要であること、またワクチン接種時からの継続的な漢方薬の内服が必要であることが明らかとなった。以上の知見は漢方薬がシナジー効果によりCD8陽性T細胞依存的に腫瘍ワクチンの効果を増強する可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the anti-tumor effect by an oral administration of a Japanese herbal medicine, Ninjin-Yoei-To (NYT), in conjunction with or without an irradiated tumor cell vaccine. When mice were fed with control diet, the irradiated tumor cell vaccine in prophylactic setting somewhat delayed tumor growth, although NYT-mixed diet alone did not show any anti-tumor effect. Nonetheless, tumor growth was significantly inhibited in vaccinated mice treated with NYT and depletion of CD8+ T cells completely abrogated the tumor vaccine efficacy. The anti-tumor immunity was augmented only when vaccinated mice were fed with NYT throughout the experiments, but neither before nor after tumor challenge. Taken together, these data indicated that NYT feeding synergistically enhances prophylactic vaccine efficacy mediated by CD8+ T cells and that such Japanese herbal medicines may be useful as excellent adjuvants for cancer immunotherapy.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：漢方薬 アジュバント ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では癌治療において術後の全身状態の改善あるいは放射線照射や化学療法による副作用の軽減などを目的に漢方薬が頻用されている。これら漢方薬の中には免疫応答修飾剤として作用するものが存在し、主にマウスを用いた研究から漢方薬が結腸癌の門脈内移入で生じる肝転移やメラノーマの肺転移などの抑制に寄与することが報告されている。一方で漢方薬による原発腫瘍制御の報告は非常に少ない。また漢方薬が抗腫瘍効果を発揮するメカニズムの詳細も不明である。ところで昨今の腫瘍免疫学の研究の進歩から 癌患者では腫瘍排除の要となる腫瘍特異的CD8陽性細胞傷害性T細胞 (CTL) が存在するにも関わらず腫瘍が排除できないこと その原因の一つとして腫瘍免疫を負に制御する制御性T細胞やII型NKT細胞などによるCTLの機能抑制が挙げられること このような制御性細胞群が産生し実際にCTLの機能を抑制するTGF $\beta$  を抗TGF $\beta$  抗体でブロックした場合、同抗体単独での抗腫瘍効果はないものの、腫瘍ワクチンとの併用により抗腫瘍効果が有意に増強されること、などが判明している。そこで、漢方薬は単独では原発腫瘍を制御できなくても腫瘍ワクチンとの併用により、免疫系への何らかの働きかけを通じて抗腫瘍効果の増強に寄与しているのではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

保険収載の漢方薬でありマウスでの研究で肺転移抑制効果が報告されている人參養栄湯を腫瘍ワクチンと併用した場合、原発腫瘍に対する増殖抑制効果が増強されるか否か、そのメカニズムも含めて明らかにし、ワクチン効果増強剤としての漢方薬の可能性を追求する。具体的には

マウス原発腫瘍モデルを用いて人參養栄湯と腫瘍ワクチンの併用が原発腫瘍増殖に与える影響を検討する。

漢方薬とワクチンを併用した場合、実際に抗腫瘍効果を発揮するeffector細胞群を同定する。

漢方薬投与による腫瘍ワクチン効果増強の免疫学的機序の一端を解明する。

## 3. 研究の方法

### 1) 漢方薬単独経口投与による抗腫瘍効果の検討

人參養栄湯単独の抗腫瘍効果を検討するため、6週齢の雌のBALB/cマウスを2群に、すなわち 通常 (漢方薬非含有) 飼料摂取マウス 1%人參養栄湯配合飼料摂取マウスに分けて、各々の飼料を腫瘍接種3週間前から実験終了 (腫瘍接種4週間後) まで継続摂取させた。飼料摂取開始3週間後に  $1 \times 10^6$  のマウス結腸癌細胞株 CT26 を右側腹部に経皮的に接種し、経時的に腫瘍径を測定した。

尚、本研究で使用した人參養栄湯エキス粉末はすべて株式会社ツムラより無償提供を受けた。

### 2) 腫瘍ワクチンアジュバントとしての漢方薬の抗腫瘍効果

腫瘍ワクチンに与える漢方薬の影響を検討するため、マウスを3群、すなわち 通常飼料摂取群 腫瘍ワクチン + 通常飼料摂取群 腫瘍ワクチン + 1%人參養栄湯配合飼料摂取群に分けて CT26 に対する抗腫瘍効果を検討した。尚、腫瘍ワクチンとして、 $1 \times 10^5$  の X 線照射 (20,000rad) した CT26 を whole cell vaccine を使用した。6週齢の雌のBALB/cマウスに経皮的に同ワクチンを接種すると同時に漢方含有あるいは非含有飼料摂取を開始した。尚、同飼料は実験終了 (腫瘍接種4週間後) まで継続した。ワクチン接種3週間後に、各々のマウスに  $1 \times 10^6$  の CT26 を経皮的に接種し、その後の腫瘍径を経時的に評価した。

尚、本研究で使用した人參養栄湯エキス粉末はすべて株式会社ツムラより無償提供を受けた。

#### 4. 研究成果

##### 1) 漢方薬単独の抗腫瘍効果の検討

まず、漢方薬単独の抗腫瘍効果を検討するため、6週齢の雌のBALB/cマウスに通常(漢方薬非含有)飼料、あるいは、1%人参養栄湯配合飼料、を腫瘍接種3週間前から実験終了(腫瘍接種4週間後)まで継続摂餌させた。飼料摂餌開始3週間後に $1 \times 10^6$ のCT26を右側腹部に経皮的に接種した。するといずれの群においても腫瘍は有意差なく増殖し、漢方薬経口摂取のみでの抗腫瘍効果は全く認められなかった。

##### 2) 腫瘍ワクチンのアジュバントとしての漢方薬の抗腫瘍効果

次にX線照射したCT26細胞を予防的な腫瘍ワクチンとして用い通常飼料群 ワクチン+通常飼料群 ワクチン+1%人参養栄湯配合飼料群に分けて、ワクチンと漢方薬を併用した場合の同腫瘍に対する抗腫瘍効果を検討した。すると、群では群と比較して、ある程度の腫瘍増殖抑制効果が認められたものの、その効果には比較的大きなバラツキが認められた。しかし、群と群を比較した場合、群では統計学的にも有意な著明な腫瘍増殖抑制効果が認められた。以上の結果から、人参養栄湯は単独では抗腫瘍効果を示さないものの、腫瘍ワクチンとの併用によりシナジー効果を発揮して抗腫瘍効果を増強する可能性が示唆された。

##### 3) 漢方薬併用時、実際に抗腫瘍効果を発揮するeffector細胞群の同定

次に、人参養栄湯を摂取したワクチン接種マウスで実際に抗腫瘍に働く免疫細胞群を同定するため、2)で用いた群のマウスから腫瘍投与前後(投与2日前、1日前、投与後4日後、7日後、10日後、14日後)に抗CD8抗体(2.43)を経腹膜的投与することでCD8陽性T細胞を除去したところ、その抗腫瘍効果は完全に消失した。従って人参養栄湯を摂取したワクチン接種マウスで認められ

る抗腫瘍効果は、腫瘍特異的CD8陽性T細胞に依存することが示唆された。

##### 4) 腫瘍ワクチン効果増強のための漢方薬摂取のタイミング

更に、漢方薬の内服期間および内服のタイミングが腫瘍ワクチンの効果に与える影響を検討するため、2)の群のマウス(ワクチン接種から腫瘍投与4週間後までの継続漢方薬内服)に加えて、ワクチン接種から腫瘍投与までの3週間漢方薬を摂取する群腫瘍投与後から実験終了までの4週間漢方薬を摂取する群を設定し、その抗腫瘍効果を同様の方法で検討した。すると前述と比較した場合、群でのみ統計学的に有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。従って、人参養栄湯の腫瘍ワクチンとのシナジー効果による抗腫瘍活性の増強を引き出すためには、ワクチン接種から実験終了までの継続した漢方薬の経口摂取が必要であることが推察された。

##### 5) 漢方薬が腫瘍免疫を関与する細胞群に与える影響

ところで申請者のこれまでの検討により i)抗腫瘍免疫に大きな影響を与える免疫細胞群であるNKT細胞を欠損したBALB-CD1d KOマウスにCT26を経皮的に接種した場合、野生型のBALB/cマウスと比較して、腫瘍の完全排除には至らないものの有意な腫瘍増殖の抑制が認められること ii)しかし本CD1d KOマウスに本研究と同量のwhole cell ワクチンを接種しても更なる抗腫瘍効果の増強は認められないこと、が判明している。そこで最後に人参養栄湯の腫瘍ワクチン効果増強メカニズムの一端の解明を目的として、人参養栄湯摂取により腫瘍ワクチン接種CD1d KOマウスの抗腫瘍効果が増強するか否かを検討した。しかしながら、同マウスでは漢方薬摂取の有無に関わらずwhole cell vaccineの抗腫瘍効果に変化がなかった。NKT細胞の存在しないCD1d KOマウスにおいて人参養栄

湯の効果が認められないという以上の結果は、人參養栄湯のワクチン効果増強における作用点が NKT 細胞にある可能性を示唆する。従って、今後ワクチン接種マウスの NKT 細胞の機能が人參養栄湯の摂取の有無で変化するか否かを検討して行きたいと考えている。  
総括)

我々の今回の研究から 漢方薬である人參養栄湯は単独では全く抗腫瘍効果をもたないものの whole cell vaccine とのシナジー効果により抗腫瘍効果を増強させること  
このような抗腫瘍効果は腫瘍特異的な CD8 陽性 T 細胞に依存すること 抗腫瘍効果増強を引き出すには持続的な人參養栄湯の摂取が必要であること、が判明した。残念ながら今回の研究では人參養栄湯による腫瘍ワクチン効果増強の詳細なメカニズムは解明できなかった。しかし本漢方薬は保険収載された比較的安全性の高い安価な薬剤であり、今後、安全安価な腫瘍ワクチンの新しいアジュバントとして応用の可能性は十二分にあると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 特になし。

#### 6. 研究組織

##### (1) 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

##### (2) 研究分担者

なし( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし( )

研究者番号：