

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460922

研究課題名(和文) 悪性黒色腫に対する補完代替医療的観点からの漢方治療戦略

研究課題名(英文) Kampo treatment for malignant melanoma

研究代表者

久光 正 (Hisamitsu, Tadashi)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：20167604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：日本では悪性腫瘍に対して西洋薬及び東洋薬(漢方薬)を組み合わせ治療が施される。本研究ではマウス悪性黒色腫(B16細胞)を用いて、十全大補湯(JTT)のNK細胞の活性ならびに、免疫チェックポイント薬との併用によるJTTの有効性を調査した。今回の結果、JTT投与群ではB16細胞の肺転移が有意に抑制され、NK細胞を予め除去したモデルではJTTの効果は消失した。JTT投与群ではIL-12およびIFN- γ の活性化を介してNK細胞の細胞障害性が有意に増加することが示唆された。さらにJTTおよび抗PD-1抗体との併用によりB16細胞の転移抑制作用は強化された。

研究成果の概要(英文)：Medical care in Japan treats cancer patients by fusing western medicine and Kampo medicine. Juzentaihoto (JTT) has also been reported to prevent cancer metastasis and recurrence. In this study, we examined the JTT efficacy for natural killer (NK) cell activity, and on the metastasis characteristics by the combination with the anti PD-1 antibody using melanoma metastasis model mice. JTT significantly suppressed of mouse malignant melanoma metastasis, B16 cell metastasis, but injection of anti asialo-GM1 antibody into mice abrogated inhibitory action of JTT on tumor cell metastasis. JTT significantly increased Interleukin (IL)-12 and interferon (IFN)- γ level in serum, and NK cell activity. JTT increased inhibitory action of anti PD-1 antibody on B16 cell metastasis. The results suggested that JTT inhibits B16 cell metastasis through NK cell activity. Additionally, therapies of combination with JTT and anti PD-1 antibody appear to be a means of increasing response rates for melanoma.

研究分野：東洋医学

キーワード：東洋医学 漢方薬 十全大補湯 悪性黒色腫

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫(メラノーマ)は、メラノサイトや母斑細胞(ほくろ)が悪性化した腫瘍と考えられ、他の悪性腫瘍と同様に手術・化学療法・放射線治療が施される。その特徴として初期の段階であっても原発巣周囲に複数転移して衛星病巣を発生することが多く、初発病巣のみを小切除してもその周囲に高い確率で腫瘍が再発し、遠隔転移の足場が形成されると考えられている。一般的に放射線治療の効果が期待できないこともあり、多くの場合、原発巣の外科的処置後に化学療法が適応される。しかしながら抗癌剤の副作用による体力低下が腫瘍の再発や食欲不振をまねき、化学療法そのものが継続できないなどの問題が生じている。

十全大補湯(JTT)および補中益気湯(HET)は、年齢や疲労による体力の低下を補う目的で(東洋医学における虚証に対する補剤として)処方される漢方薬で、病中・病後の体力低下、食欲低下、手足の冷えなどの症状の改善に用いられてきた。近年、悪性腫瘍に対する化学療法にともなう発熱や全身倦怠感などの副作用の緩和や免疫機能を介した抗癌作用が報告され、予後を改善することを目的として多くの医療現場で使用されている。これまでに我々は十全大補湯を長期投与した患者において免疫を賦活させるIL-18の分泌が亢進することを発見した(K.Fujiki, T.Matsuda, Int J Mol Sci. 9(7):2008)。またマウスの悪性黒色腫であるB16メラノーマ細胞(B16細胞)を用いた発癌モデルで十全大補湯の抗腫瘍作用を観察したところ、IL-12とIFN- γ が中心的役割を果たしてB16細胞の肺転移を抑制することが判明した(T.Matsuda, T.Hisamitsu, eCAM, 2009, online)。IL-18、IL-12、IFN- γ は、抗腫瘍作用をもつNK細胞およびNKT細胞を活性化させることから十全大補湯はこれらを介して腫瘍を直接抑制すると予想している。さらに我々は十全大補湯がB16細胞からの血管新生因子(VEGF)分泌を抑制し、その結果として原発巣周囲での血管新生が抑制されることを報告し、B16細胞の転移を多角的に制御している可能性を示した(S.Ishikawa, T.Hisamitsu, eCAM, 2011, online)。

2. 研究の目的

十全大補湯がB16細胞の転移を抑制する可能性が強く示唆され、今後さらに病態モデルでの作用機序解明に関する検討が有益であると考えている。また十全大補湯と構成生薬の半数が共通である補中益気湯における悪性黒色腫への効果の検討、および十全大補湯と補中益気湯を比較した転移への効果と副作用改善に関するエビデンスの構築は、臨床での治療効果を向上させる可能性があると考え、本研究を立案した。

3. 研究の方法

研究期間を3年間とし、転移性の検討(平成26-27年)ではB16細胞をC57BL/6マウスへ接種して作製する悪性黒色腫モデルを用い、*vivo*および*ex-vivo*による手法で免疫学的側面から十全大補湯の効果を検討した。初年度には十全大補湯の肺への転移に対する影響を組織学的に観察するとともに、脾臓から免疫担当細胞を採取し、サイトカインの産生能およびNK細胞およびNKT細胞の活性作用を解析した。また次年度には、同モデルを用いて補中益気湯の効果を検討し、十全大補湯の効果と比較を行った。最終年次はシスプラチン誘発性食欲不振モデルを用いて、十全大補湯と補中益気湯による副作用への効果を検討した。詳細については以下に示す。

A. 悪性黒色腫転移モデルにおける漢方製剤の効果の検討

(1) 悪性黒色腫転移モデルの作製

使用動物

悪性黒色腫転移モデルは、雄性C57BL/6マウスに同動物種由来のB16F10メラノーマ細胞を尾静脈より接種して作製した。

漢方薬投与

(株)ツムラより提供された漢方薬原末(十全大補湯および補中益気湯)をマウス用エサに0.1-3%の濃度で混合して当該動物に自由摂取させた。

(2) NK細胞の活性化

anti-asialo-GM1 antibodyによる検討

anti-asialo-GM1 antibodyを腹腔投与してNK細胞を不活性化したのちに、B16メラノーマ細胞を投与して漢方製剤による転移性を検討した。

脾細胞の分離

当該モデル動物から脾臓を採取し、ホモジナイズ後に脾細胞から磁気ビーズ法を用いてNK細胞を分離した。

NK細胞活性の検討

NK細胞高感受性の腫瘍細胞(YAC-1細胞)をターゲットとして、NK細胞による細胞障害性を観察した。

(3) 組織学的検討及びサイトカインの測定

B16細胞接種3週後に当該動物を解剖し、肺表面の黒色コロニーを観察した。

(4) 免疫チェックポイント剤との併用

B16細胞を上記同様に接種した動物に、腹腔注射により抗PD-1抗体を投与して漢方薬との併用での効果を調査した。

B. シスプラチン誘導性機能性ディスぺプシアに対する十全大補湯の効果

臨床において十全大補湯や補中益気湯などの補剤類は抗がん剤投与後の機能的ディスぺプシアなどの副作用の軽減を目的として併用されることが多い。また補剤は患者の体力減退や消化機能の改善を目的として古くから利用されてきた。そこでシスプラチン誘発性機能性ディスぺプシアに対する十全大

補湯の有効性を検討した。

(1) 使用動物と実験グループ: 4週齢SD系雄性ラットを用いた。ラットを無作為に各群6匹ずつ、control群、cisplatin群、JTTおよびcisplatin投与群(JTT+cis群)の3群に分けた。

(2) 薬剤と投与方法: cisplatinは和光純薬工業(株)から購入し、十全大補湯は(株)ツムラより提供された原末を使用した。cisplatin群は、cisplatin 2mg/kgを実験日に1mlの生理食塩水で溶解して腹腔内注射した。JTT+cis群は、JTT原末を粉末餌に3%の割合で混合して1週間自由摂取させ、実験日にcisplatinを腹腔内に注射した。なおcontrol群には実験日に溶媒である生理食塩水のみを腹腔内注射した。

(3) 行動学的検討: 摂餌量、パイカ行動、胃排出能の3項目を観察した。

摂餌量の測定: cisplatin投与によるFD発現の指標としてcisplatin投与後24時間内に摂取した餌の量を測定した。

パイカ行動の測定: 齧歯類動物は嘔吐反射を示さないが、抗がん薬などの催吐刺激によりカオリン(含水ケイ酸アルミニウムを成分とする粘土)など栄養価がなく本来食べ物とならない鉱物などに対して食欲を示すパイカ行動(異味症)が現れることが知られている。そこで本実験では、カオリンに蒸留水と1%アラビアゴムを添加し混合した後、通常の餌と同様に形成・乾燥させた擬餌を作製し、シスプラチン投与後24時間内に摂取された擬餌量をパイカ行動の指標とした。

胃排出能の測定: ヒトでは胃もたれ感などの原因となり、FDの指標として測定した。当該動物は24時間前から絶食させ、実験日にcisplatinを投与した直後から2時間餌を自由摂食させ摂餌量を求めた。その後、再び絶食させ1時間後に解剖・開腹し、胃内の残渣量を求めた上で次式にて胃排出能を算出した。【式】胃排出能 = (1-残渣量/摂食量) × 100

(4) 生化学的検討: 摂食関連ペプチドとしてcisplatin投与3時間後の血液中の活性型グレリン、セロトニンを測定した。

(5) 蛍光免疫組織学的検討: cisplatin投与3時間後に当該動物を4%ホルマリンにより灌流固定後に延髄を採取し、凍結包埋した。嘔吐中枢である延髄最後野を含む薄切切片を作製し、抗5-HT3B抗体、抗c-fos抗体を用いて蛍光免疫組織学的染色して観察した。

4. 研究成果

A. 悪性黒色腫転移モデルにおける漢方製剤の効果の検討

(1) B16細胞の肺転移に対する漢方薬の有効性
3%十全大補湯混餌を摂取させた動物において有意にB16メラノーマ細胞の肺転移を有意に抑制した。また補中益気湯を0.1-3%混合さ

せ摂取した動物では薬剤濃度依存性に肺転移を抑制した。

(2) NK細胞の関与に関する検討

anti-asialo-GM1 antibody
anti-asialo-GM1 antibody前投与でNK細胞を不活性化した動物では漢方製剤(十全大補湯あるいは補中益気湯)を投与した群では易転移性が確認された。

NK細胞活性の検討

YAC-1細胞に対する細胞障害性は十全大補湯投与群で有意に増加した。

(3) 免疫チェックポイント剤との併用

十全大補湯と免疫チェックポイント剤(抗PD-1抗体)の併用による検討した。その結果B16メラノーマ細胞の肺転移は2剤の併用で相殺することなく転移を抑制した。

B. シスプラチン誘導性機能性ディスペプシアに対する十全大補湯の効果

(1) 行動学的検討:

摂餌量: cisplatin群はcontrol群と比較して有意に減少していた。またJTT+cis群はcontrol群と有意差を認めなかった。

パイカ摂食量: cisplatin群のパイカ摂食量はcontrol群と比較して有意に増加した。またJTT+cis群ではcisplatinで増加するパイカの摂食が抑制された。

胃排出能: 各群間で有意な差を認めなかった。

(2) 生化学的検討

血中活性化グレリン濃度: 3群間で有意な差を認めなかった。

血中セロトニン濃度: cisplatin群ではcontrol群と比較して有意に増加したのに対して、JTT+cis群は有意差を認めなかった。

(3) 蛍光免疫組織学染色法による検討

延髄の最後野における5-HT3Bセロトニン受容体、および細胞の活動性を示すc-fosの発現を蛍光免疫組織学的染色法を用いて検討した。上段は5-HT3Bセロトニン受容体を下段はc-fosの発現を示す。cisplatin群では、5-HT3B受容体およびc-fosの発現が増加し、それらが一致した部位に出現していた。対照的に、JTT+cis投与群では5-HT3B受容体、c-fosの発現が抑制されていた。

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1件)

Shintaro Ishikawa, Takako Ishikawa, Chiaki Tezuka, Kazuhito Asano, Masataka Sunagawa and Tadashi Hisamitsu, Efficacy of Juzentaihoto for tumor immunotherapy in B16 melanoma metastasis model, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2017 (2017), Article ID 6054706, 8 pages
<https://doi.org/10.1155/2017/6054706>

< 査読有 >

〔学会発表〕(計2件)

1) Ishii Masato, Ishikawa Shintaro, Hisamitsu Tadashi, Suppressive effect of Hochuekkito on lung metastasis of B16 melanoma cells in mice, 第93回 日本生理学会大会 (2016.03.22 札幌)

2) 石井雅人, 石川慎太郎, 久光正. シスプラチン誘導性機能性ディスペプシアに対する十全大捕湯の効果, 昭和大学総合薬学研究発表会 (2014.10.01 東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

久光正 (Hisamitsu Tadashi)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号: 20167604

(2)研究分担者

砂川正隆 (Sunagawa Masataka)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号: 20514467

石川慎太郎 (Ishikawa Shintaro)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号: 70439355