

査

The Cancer Cell Killing Effects of *Gynura procumbens*, Toleaf Are Associated with CD4+ T Lymphocyte Activation

高梨慶太¹、ダン勝明^{2、*}、松岡高明³、鳥居和仁⁴¹ 神奈川県横浜市戸塚区松野町601 横浜薬科大学医学教育センター245-0068² 生物活性研究機構、東京都新宿区信濃町18 信濃町ハウス#202,160-0016³ 東京170-0062都港区南青山5-9-15青山大日本ビル3F大山ヘレンクリニック

* Correspondence: Katsuaki Dan, Email: kdan@iyakushigen.jp; 電話:
+81-3-5379-2522; Fax: +81-3-5372-2522.

抄録

背景:トリーフは、*Gynura procumbens* (Lour.) Merrからの寒冷抽象抽出物である。植物*G. procumbens*から抽出された化合物は、様々な癌に対して抗癌効果を発揮する。しかしながら、これらの作用の根底にある詳細なメカニズムは不明のままである。以前の研究は、*G. procumbens*エタノール抽出物も免疫調節特性を有することを示した。したがって、著者らは、*in vitro*および*in vivo*でのToleafの抗癌効果と免疫系応答との関係を調べた。

方法:6週齢の雄BALB/cまたはC57BL/6マウスから得られた初代脾臓細胞およびマウス脾臓細胞から単離されたTリンパ球におけるIFN- γ 、IL-2、IL-4、およびIL-12発現を測定するために、ELISA、RT-PCR、およびフローサイトメトリーを用いて免疫応答に対するトリーフの効果を評価した。トリーフの抗癌およびT細胞活性化効果を、CT-26、EL-4、およびB16癌細胞生存率を測定することによって評価した。

結果:トリーフ処理は脾臓細胞IFN- γ 産生とCD4+ Tリンパ球IL-2,IL-4,IL-12-mRNAレベルを増加させた。3つの癌細胞系は全て、トリーフ処理Tリンパ球への曝露後に生存率の低下を示した。しかし、Toleafはこれらの細胞に対して直接的な細胞毒性効果を発揮しなかった。

結論: Toleafは1型および2型Tヘルパー応答を活性化し、その抗癌効果がCD4+ Tリンパ球活性化と関連することを示唆する。

KEYWORDS:免疫系;抗癌効果; *Gynura*; Tリンパ球; Toleaf

🔒 オープンアクセス

令和1年5月29日受領
受付:令和1年6月20日
令和1年6月21日公表

著者による著作権© 2019。
Licensee Hapres, London, United Kingdom.本書は、Creative Commons Attribution 4.0 International Licenseの条件に基づき配布されるオープンアクセス記事である。

導入

CD4+ Tヘルパー細胞(Th)応答刺激は癌免疫において重要である。癌免疫療法は、細胞傷害性T細胞(CTL)応答を誘発することに焦点を当てており、CD4+ Th細胞は、免疫応答発生の中心として最近になって認識された。CD4+ Th細胞は、抗原特異的エフェクター細胞を活性化し、先天性免疫系細胞を動員することによって作用する[1]。

免疫系調節を介して抗腫瘍効果を誘発する天然植物産物の能力は、広く研究されている。しかしながら、大多数の研究は、1つの腫瘍モデルにおける薬剤の効果に限定されており、複数の癌モデルにわたる効果を研究する研究はほとんどない[2~5]。

トリーフ(*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.)は、多くの病気を治療するために広く使用されている[6,7]。G. プロクベンス葉抽出物は乳癌細胞系の増殖を阻害するが、エタノール葉抽出物は7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン誘導生きているラットモデルで抗増殖活性を示す[7,8]。G. プロコンベンスエタノール抽出物には免疫調節作用がある[9]。

逆に、*Houttuynia cordata*抽出物は、日本において同様の機能性食品として用いられている。H. コーダタ抽出物は、ヒト乳癌[10]、原発性結腸直腸癌[11]および結腸腺癌細胞増殖を阻害する[12]。H. *Cordata*抽出物中の多糖類は、肺癌細胞において有効であること[13]および黒色腫においてアポトーシスを誘導すること[14]が示されている。

我々は、同様の機能性食品の参照としてH. *cordata*を用いて、免疫系とToleaf媒介性抗腫瘍効果との関係を決定した。ナイーブマウス脾臓細胞およびCD4+ Tリンパ球におけるIFN分泌およびいくつかのサイトカインmRNA発現レベルを評価した。ToleafおよびToleaf-treated CD4+ Tリンパ球のいくつかの癌細胞株に対する直接的な細胞毒性効果を調べた。Toleafと同時培養したCD4+ Tリンパ球は細胞毒性を有意に増強した。

材料及び方法

マウスおよび外植細胞培養

6週齢の雄BALB/cおよびC57BL/6マウスを、Charles River Laboratories Japan, Inc. (神奈川県、日本)から購入した。MHCハプロタイプは、BalB/cおよびC57BL/6マウスについて、それぞれH-2dおよびH-2bであった。麻酔下でこれらのマウスから得られた一次脾臓細胞[15]を、10%ウシ胎児血清(FBS; Carson, CA, USA)、ペニシリン(100 U/mL)、ストレプトマイシン(100 µg/mL)、カナマイシン(10 µg/mL)、およびL-グルタミンを含有するRoswell Park Memorial Institute (RPMI)培地(Wako, Osaka, Japan)中で、5% CO₂中37°Cで培養した。全ての実験は、Institutional Animal Care and Use Committee of Omotesando Helene Clinic (許可番号: ROBA#201704002、31-03-2017)によって承認され、Research Organization of Bioactivity animal ethics guidelinesに従って実施された。

がん細胞株

マウス結腸腺癌(H-2d)由来のCT-26細胞;マウスTリンパ球リンパ腫(H-2b)由来のEL-4細胞;およびマウス皮膚黒色腫(H-2b)由来のB16-F10細胞をATCC(登録商標)(東京、日本)から購入した。CT-26細胞をダルベッコ改変イーグル培地(Wako, Osaka, Japan)中で増殖させ、一方EL-4およびB16細胞をRPMI中で増殖させた。両方の培地に10% FBS、ペニシリン(100 U/mL)、ストレプトマイシン(100 μg/mL)、カナマイシン(10 μg/mL)、およびL-グルタミンを補充した。全ての細胞を5% CO₂中37°Cで維持した。これらの癌細胞株は、固形体癌、血液系癌および表皮癌の典型的な細胞として選択された。

薬草

Toleafおよび*H. cordata*は、GHM Co., Ltd. (Tokyo, Japan)から入手した。低温除湿乾燥法を用いて葉を乾燥し、小片化した後、水を加えた。Toleaf抽出物の成分は同定されていないが、フラボノイドを含有することが示されている[16]。これらの葉を30%エタノールに333mg/mL (未希釈濃度)で溶解し、培養培地で希釈して最終濃度0.0333mg/mLを達成した。*H. コーダタ*葉を30%エタノールを用いて抽出し、培養培地を用いて希釈して、同様の濃度を達成した。様々な濃度での様々な薬用植物抽出物細胞毒性を、細胞生存率アッセイを用いて評価した;最小毒性濃度(0.0333mg/mL)を、さらなる調査のために選択した(図1)。EL-4、B-16-F10およびヒト線維芽細胞についても同様の生存率であった(データは示さず)。0.333mg/mLを超える高濃度Toleaf処理を試験した場合でさえ、生存率は、いずれの考慮される細胞においても0.69(Abs: 450nm)未満に低下しなかった。

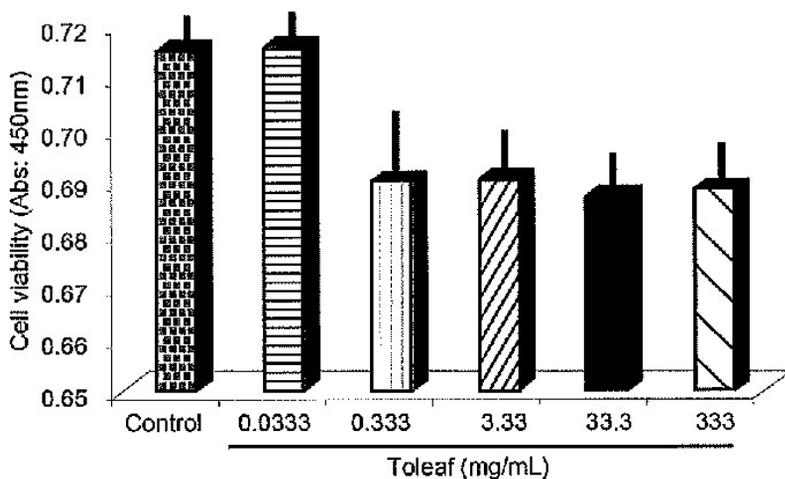


図1. CT-26細胞におけるトリーフ抽出物処理後の細胞生存率。異なる濃度のToleaf抽出物で処理されたCT-26細胞を4日間インキュベートした。細胞生存率は、乳酸デヒドロゲナーゼ放出アッセイを用いて評価した。

ELISAを用いたマウス脾細胞IFN- γ 分泌能評価

薬用植物抽出物で処理した外植マウス脾臓細胞を16時間インキュベートした。検出された上清IFN- γ レベルを、マウスIFN- γ Quantikine ELISAキット(R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)を用いて定量した。

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

TRIzol試薬(Life Technologies, CA, USA)を用いて全RNAを抽出し、これをPrimeScript RT Master Mix (TaKaRa, Shiga, Japan)を用いてcDNAに逆転写し、SYBR Premix EX Taq II (TaKaRa)を用いて増幅した。反応を、50 μ Lの最終容量(25 μ Lの2 \times SYBR混合物、1 μ LのcDNA、2 μ Lのプライマー対混合物(5 pmol/ μ Lの各プライマー)、および22 μ LのH₂O)で行った。PCRを以下の条件下で行った: 95°Cで30秒間、続いて95°Cで5秒間および60°Cで30秒間50サイクル。相対遺伝子発現は $\Delta\Delta$ Ct法を用いて計算し、ハウスキーピング遺伝子GAPDHを正規化に用いた。RT-PCRにおいて使用されるプライマーを表1に示す。 $\Delta\Delta$ Ctが>2である場合、差異は有意であると考えられた。

表1:リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応プライマー。

遺伝子	Sequence (5' →3')
IL-2	AACCTGAAACTCCCGCAGGAT (forward)
	TCATCGAATTGGCACTCAAA (reverse)
IL-4	TGAACCGCCAGCTAGTTGTC (forward)
	AAATATGCGAAGCACCTTGG (reverse)
IL-12	AGGTGCGTTCCTCGTAGAGA (フォワード)
	AAAGCCAACCAAGCAGAAGA (reverse)
GAPDH	

GGTGGGCTGAGCTTTACTACTTCTGGT (フォワード)CCACACTGATTTGGGGA (リバース) IL、インターロイキン; GAPDH、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ。

マクロファージミクロスフェア食作用検出

マウス腹腔内からマクロファージを単離した[17]。単離されたマクロファージをToleaf/Hで処理した。コーデータ抽出物を1時間インキュベートした後、Fluoresbrite(登録商標)Carboxylate 0.75 Micron Microspheres (Polysciences Inc., PA, USA)と共に8時間インキュベートする。蛍光顕微鏡法(BZ-X710; KEYENCE, Osaka, Japan)を使用して、ミクロスフェア蛍光を検出した。

CD4⁺ T細胞単離およびフローサイトメトリー

CD4⁺ T細胞を、CD4⁺ T細胞単離キット(Miltenyi Biotec, Surrey, UK)を使用して、磁気活性化細胞選別(MACS)によりマウス脾臓細胞懸濁液から単離した。Toleaf/Hで処理された単離T細胞。コードタ抽出物を、モノクローナルフィコエリトリン(PE)結合ラット抗マウスIFN- γ (カタログ番号562020; BD Biosciences, CA, USA)およびモノクローナルPEラット抗マウスIL-4(カタログ番号562044; BD Biosciences, CA, USA)抗体で7日間処理し、それぞれIFN- γ およびIL-4産生T細胞を検出した。Muse(登録商標)Cell Analyzer (Millipore, MA, USA)を用いて細胞を分析した。

細胞生存率アッセイによる植物抽出物抗癌効果評価

細胞生存率は、LDH細胞毒性検出キット(TaKaRa)を使用して、上清中の細胞質ゾル乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)存在の有無を検出することにより決定した。結果は、対応する対照のパーセンテージとして提示される。癌細胞に対するToleafおよびH. cordata抽出物の直接的な細胞毒性効果を測定するために、CT-26、EL-4、およびB16細胞を、 2×10^5 細胞/ウェルで96ウェルプレートに播種し、24時間培養した。次いで、細胞を1000倍希釈Toleaf/Hで処理した。細胞培養培地中で7日間コードタ抽出物を採取し、その時点で細胞生存率測定のために上清を回収した。Tリンパ球活性化を介した癌細胞に対するToleafおよびH. cordata抽出物の間接的効果を評価するために、単離したTリンパ球を1000倍希釈Toleaf/Hで処理した。細胞適応培養培地中のcordata 7日間。次いで、これらのTリンパ球を、 2×10^6 細胞/ウェルで、 2×10^5 CT-26、EL-4/B16細胞/ウェルで、96ウェルプレート中で7日間共培養した。

統計解析

データは、3つの個々の実験からの平均値±標準偏差として表した。群間差は、分散の一方向分析、続いてIBM SPSS Statistics Baseソフトウェアを使用するTukeyの事後検定を使用して評価した。0.01または0.001のP値を統計学的に有意であるとみなした。

結果及び考察

扁桃抽出物は脾臓細胞の免疫応答を増強する

マウスナイーブ脾臓細胞に対するToleafおよびH. cordata抽出物の免疫刺激効果を、IFN- γ 分泌を評価することによって評価した。IFN- γ は、抗腫瘍免疫の重要なエフェクター分子であり[18]、そして腫瘍増殖を抑制する際に重要な役割を果たす[19]。従って、本発明者らは、Toleaf抽出物がマウス脾臓細胞において免疫応答を誘導するかどうかを決定するために、ELISAを使用して上清IFN- γ レベルを測定した;それは、有意なマウス脾臓細胞IFN- γ 分泌を促進したが、H. cordata抽出物はそれを阻害した(図2)。この現象は、BALB/cおよびC57BL/6マウス由来の細胞において一般的に観察された。

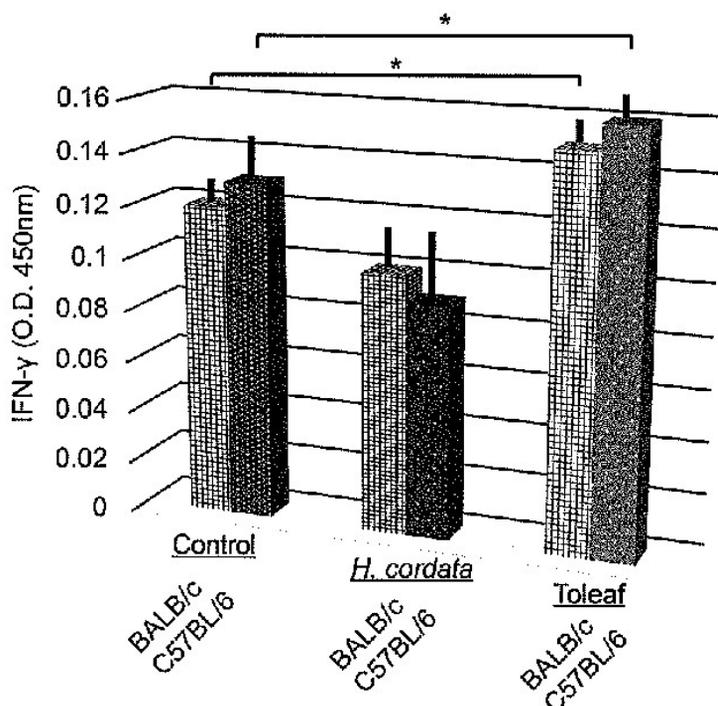


図2.マウス脾臓細胞インターフェロン(IFN)- γ 分泌能評価(ELISAを使用する)。薬用植物抽出物で処理した外植マウス脾臓細胞を16時間インキュベートした。上清中へのIFN- γ 放出を、ELISA (平均光学密度(O.D.))としてを用いて評価した。* 対照と比較して $p < 0.01$ 。

Toleafは脾臓細胞においてIL-2,IL-4,IL-12発現を誘導する

最初の抗原刺激時に、Th1細胞はIFN- γ およびIL-2を産生し、一方、Th2細胞は他の物質の中でもIL-4を産生する[20,21]。したがって、脾臓細胞におけるToleaf extract誘導免疫学的応答の役割をより正確に区別するために、定量的RT-PCRを用いていくつかのサイトカイン(IL-2,IL-4,IL-12) mRNA発現レベルを測定した。トリーフ抽出物で処理したC57BL/6脾臓細胞は、IL-2、IL-4、およびIL-12 mRNAレベルの有意な増加を示した(図3)。しかし、*H. cordata*抽出物はIL2レベルを誘導したが、IL-4レベルを抑制した。BALB/c脾臓細胞は同様の傾向を示した。

したがって、*H. cordata*ではなくToleaf抽出物は、未刺激脾臓細胞においてIL-2、IL-4、およびIL-12発現を促進する。IL-2は細胞増殖にも関与するTh1型サイトカインであるのに対し、IL-4はTh2型サイトカインであり、IL-12産生はマクロファージおよび樹状細胞活性化のマーカである。Th1細胞およびTh2細胞によって産生されるこのサイトカインアップレギュレーション[20,21]は、Toleaf抽出物が適応免疫系を活性化することを示唆する。

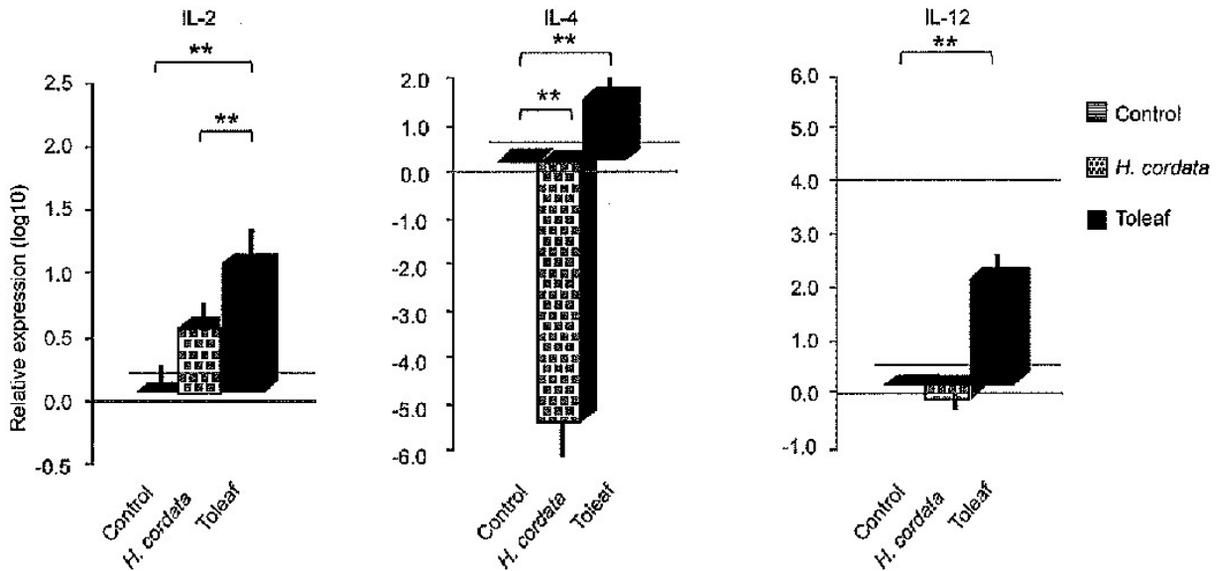


図3. マウス脾臓細胞におけるインターロイキン(IL)-2、IL-4、およびIL-12 mRNA発現。Toleaf/Hで処理したマウス脾臓細胞を外植する。脊索抽出物を16時間インキュベートした。IL-2,IL-4,IL-12 mRNA発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応により分析した。相対的な発現レベルは、対照(未処理細胞)に対して正規化されたlog10比として示される。** p < 0.001.

Toleafは適応免疫系を活性化する

この仮説を確認するために、フローサイトメトリーを用いてマウス脾臓CD4+ T細胞を調べた。Th1細胞は、IFN- γ およびTNF- α 分泌および抗原提示細胞活性化によって特徴づけることができる。Th2細胞は主に体液性応答を支持し、Th2細胞の発生はIL-4によって促進される。トリーフおよびH. cordata処理T細胞集団は、約20%のIFN- γ 産生T細胞を含んでいた(図4A)。しかし、Toleaf処理T細胞集団は、H. cordata処理集団よりも2倍多くのIL-4産生T細胞を含んでいた(図4B)。これらの知見は、Toleaf処理がTh1およびTh2 T細胞分化を誘導し、一方、H. cordataはTh1細胞形成のみを誘導することを示す。Th2/Th1比を反映するIFN- γ 対IL-4産生T細胞比を図4Cに示す。H. コルデータ抽出物処理は、トリーフ抽出物処理よりも高い比率をもたらした。

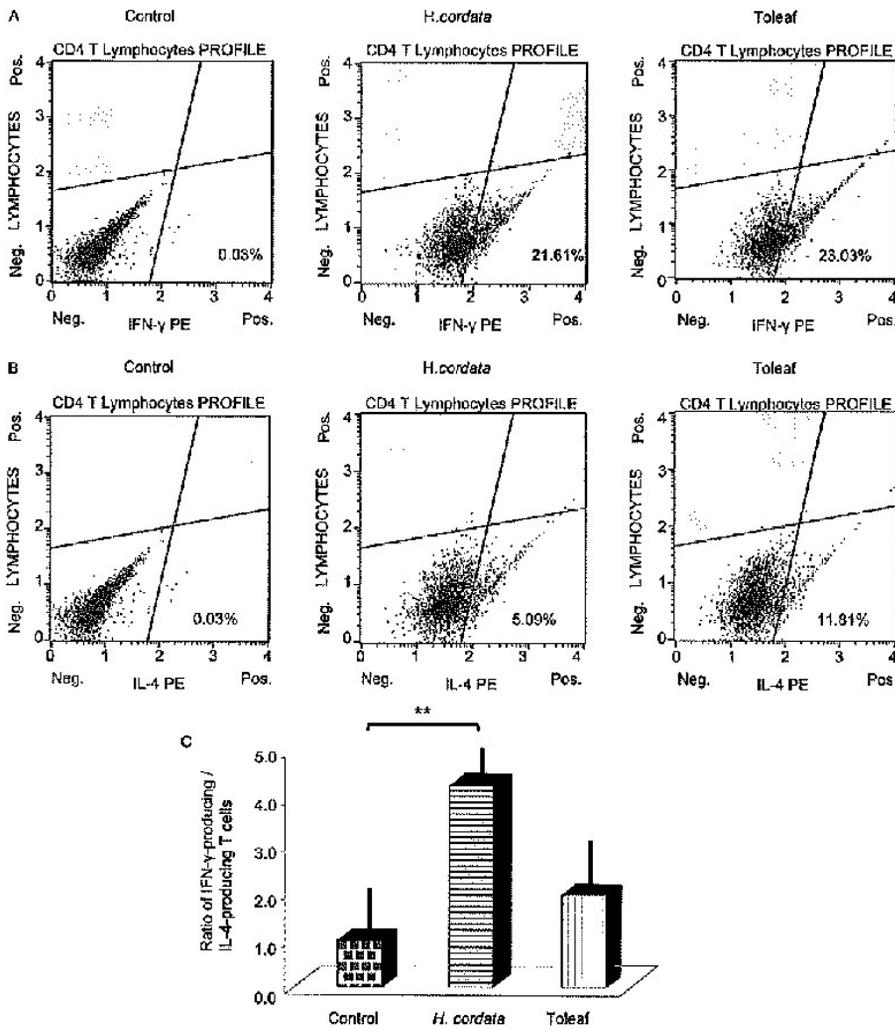


図4. Toleafおよび*H. cordata*抽出物の適応免疫系に対する効果。CD4+ T細胞をMAGSによりマウス脾臓細胞懸濁液から単離した。単離されたT細胞をToleaf/Hで処理した。腎臓抽出物を7日間。フローサイトメトリーを用いて、(A)インターフェロン(IFN)- γ および(B)インターロイキン(IL)-4産生T細胞集団を定量した。対照は、IFN- γ /IL-4(全CD4+ T細胞)を標的とするPEモノクローナルラット抗マウス抗体と共にインキュベートした未処理細胞を示す。(C)IFN- γ 産生T細胞とIL-4産生T細胞の比は、Th1とTh2の活性化のバランスを示している。** p < 0.001.

これらの薬用植物抽出物が先天性免疫系に影響を及ぼすかどうかを決定するために、ミクスフェアを用いてマクロファージ食作用活性を評価した。食作用の存在は、単離されたマウス腹膜マクロファージ活性化を示す。マクロファージ活性における顕著な差異は、薬用植物抽出物処理サンプルとコントロールとの間で観察されなかった(図5)。このように、Toleaf活性化CD4+ Th1およびTh2細胞は、その抗癌効果を媒介する可能性がある。

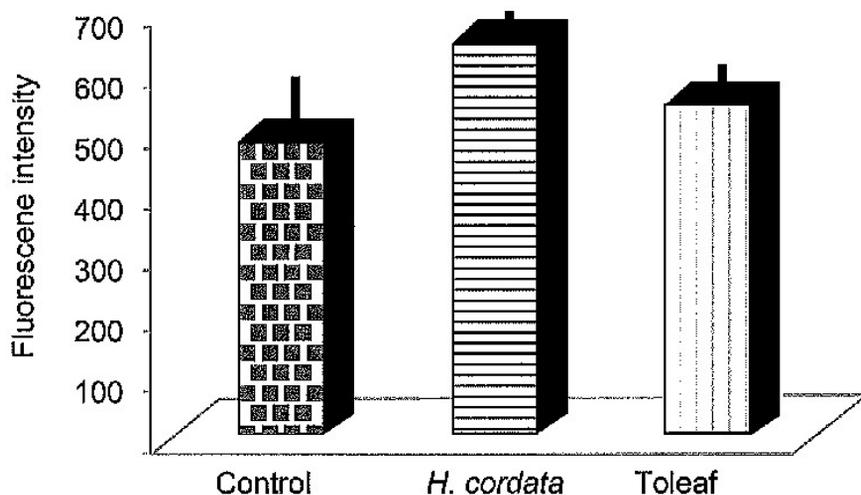


図5.ToleafおよびH. cordata抽出物の自然免疫系に対する効果。先天性免疫系活性を、ミクロスフェアを用いたマクロファージ食細胞活性によって調べた。マウス腹腔内からマクロファージを単離し、単離した細胞をToleaf/Hで処理した。cordata抽出物を1時間インキュベートし、次いでミクロスフェアと共にインキュベートする。微小球の蛍光強度を、蛍光顕微鏡を介して分析した。統計的有意差は観察されなかった。

Toleafの抗癌作用はTリンパ球活性化によって媒介される

この仮説を確認し、Tリンパ球活性化とToleafの抗癌作用関係を決定するために、3種の癌細胞系と薬用植物抽出物処理単離Tリンパ球を共培養し、それらの生存率を評価した。これらの細胞株は、3つの癌型(固形癌、リンパ球癌、および表皮癌)を表し、したがって、癌型が抗癌活性に影響を及ぼすかどうかを評価することを可能にした。

まず、ToleafおよびH. cordata抽出物の癌細胞株に対する直接的な効果を調べた。H. CT-26抽出物は、対照およびトリーフ処理細胞生存率と比較して、コーダタ細胞生存率を有意に減少させたが、トリーフは、試験した細胞系のいずれにも影響を及ぼすことができなかった(図6A)。ただし、Toleaf/H. コーダタ抽出物で処理したTリンパ球は、対照生存率と比較してCT-26およびEL-4細胞生存率を有意に減少させた; Toleaf-treated Tリンパ球は、より顕著な抗癌効果を示した(図6B)。Toleaf処理CD4+ Tリンパ球のみがB-16細胞に対して抗癌効果を示した。

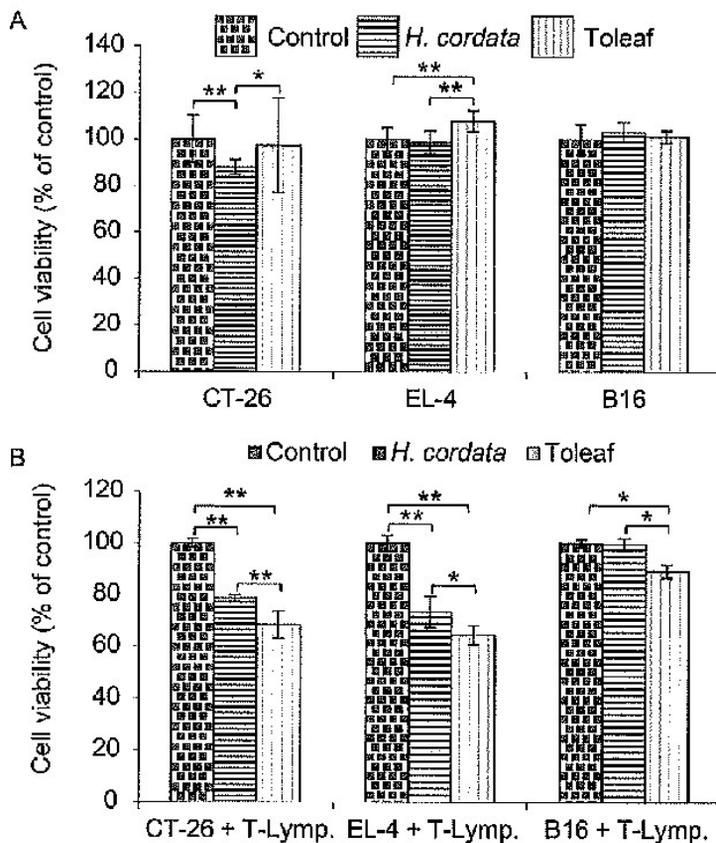


図6. ToleafおよびH. cordata抽出物の癌細胞生存率への影響の評価。(A)CT-26、EL-4、およびB16癌細胞をToleaf/Hで処理した。cordata抽出物を7日間インキュベートした。(B)細胞を、Toleaf/Hで予め処理した単離Tリンパ球と7日間共立方体化した。cordata抽出物を7日間。細胞生存率は、乳酸デヒドロゲナーゼ放出アッセイを用いて評価した。データは、対応する対照値(n = 8)のパーセンテージとして提示される。* p < 0.01, ** p < 0.001(Tukey's post hoc検定による一方向分散解析を用いて測定)。

ToleafもH. cordataも、癌細胞を直接殺すのに有効であることは見出されなかった。一方、リンパ球を介して癌細胞を死滅させる効果が観察され、その効果はToleafでより強かった。

したがって、Toleafの抗癌効果はCD4+ Tリンパ球活性化によって媒介されることを提案する[6]。

H. cordataはCT-26細胞の生存率を直接低下させることができたが、Toleaf-mediated CD4+ Tリンパ球細胞傷害性応答は、3つの癌細胞株すべてに対してより強力であり、おそらくToleaf抽出物とH. cordata抽出物との間の作用機序の差を示した。

Toleaf処理の効果は、癌細胞死滅とCD4+ Th細胞(Th1およびTh2)活性化との間の関係を示唆する。癌免疫において、いくつかのCD4+ T細胞サブセット(Th1、Th1、T調節、Th17、Th22、および卵胞Th)が記載されている[22]。ここで、CD4+ Th細胞の活性化は、Th2/Th1比を増加させるよりも重要であるように思われた。

結論

Toleafの免疫系と抗癌作用との関係を調べた。Toleafは癌細胞死を直接誘導したりマクロファージを活性化したりしなかった。その代わりに、CD4⁺ Th細胞を活性化することによって癌細胞の生存を妨げた。

AUTHORの拠出金

KT、KD、TMおよびKTが研究を設計した。KTおよびKDは実験を行った。KTおよびKDはデータを分析した。KT、KD、TM、KTは科学的な議論に貢献した。KTとKDは、すべての著者からのインプットを用いてこの論文を書いた。

利益相反

著者らは利害の対立はないことを宣言する。

資金源

これらの研究は、GHM Co., Ltdにより支援された。

確認応答

原稿の英語によるレビューについては、Baious Co., Ltd.及びEnago (www.enago.jp)に感謝したい。

参考文献

1. Knutson KL, Disis ML. 癌免疫および免疫治療における腫瘍抗原特異的Tヘルパー細胞。Cancer Immunol Immunother.2005;54(8):721-8. doi: 10.1007/s00262-004-0553-2
2. Leung J, St-Onge P, Stagg J, Suh WK. マウスモデルにおける腫瘍退縮および抗腫瘍T細胞免疫に対する宿主B7-H4欠損およびゲムシタピン処置の相乗効果。Cancer Immunol Immunother.2017;66(4):491-502. doi: 10.1007/s00262-016-1950-2
3. Highton AJ, Girardin A, Bell GM, Hook SM, Kemp RA. キトサンゲルワクチンは、全身性免疫応答を調節することによって、癌の盲腸内マウスモデルにおける腫瘍増殖に対して保護する。BMC Immunol.2016;17(1):39. doi: 10.1186/s12865-016-0178-4
4. Lim SL, Goh YM, Noordin MM, Rahman HS, Othman HH, Abu Bakar NA, et al. Morinda citrifolia 食用薬抽出物は肺癌に対する免疫応答を増強した。Food Funct.2016;7(2):741-51. doi: 10.1039/c5fo01475a
5. Zhang J, Wang L, Zhang Y, Li L, Tang S, Xing C, et al. 韓国のAngelica根抽出物のTRAMP発癌および罹患神経内分泌癌の統合的「omic」プロファイリングに対する化学予防効果。Mol Carcinog.2015;54(12):1567-83. doi: 10.1002/mc.22230
6. Tan HL, Chan KG, Pusparajah P, Lee LH, Goh BH. Gynura procumbens: 生物学的活性の概観。フロントファーマコール2016;7:52. doi: 10.3389/fphar.2016.00052

7. Hew GS, Khoo BY, Gam LH. *Gynura procumbens* (Lour.) Merrから抽出したタンパク質の抗癌特性。PLoS One.2013;8(7):e68524. doi: 10.1371/journal.pone.0068524
8. Nisa F, Hermawan A, Murwanti R, Meiyanto E. Antiproliferative effect of *Gynura procumbens* (lour.) Merr.7,12ジメチルベンズ(a)アントラセン上の葉エタノール抽出物は雄ラット肝臓を誘導した。Adv Pharm Bull.2012;2(1):99-106. doi: 10.5681/apb.2012.014
9. Dwijayanti D, Rifa'i M. Immunomodulator testing on ethanol extract of *Gynura procumbens* leaves to mus musculus adaptive immune system: in vitro study. J Exp Life Sci.2014;4(1):10-4.
10. Cheng WL, Lin TY, Tseng YH, Chu FH, Chueh PJ, Kuo YH, et al. *Aralia cordata* Thunbから単離したアラリアジオールによるp21媒介G1細胞周期停止を介するヒト乳癌細胞増殖の阻害効果。Planta Med.2011;77(2):164-8. doi: 10.1055/s-0030-1250177
11. Lai KC, Chiu YJ, Tang YJ, Lin KL, Chiang JH, Jiang YL, et al. *Houttuynia cordata* Thunb抽出物は、ヒト原発性結腸直腸癌細胞において細胞増殖を阻害し、アポトーシスを誘導する。抗がん剤研究所2010;30(9):3549-56.
12. Tang YJ, Yang JS, Lin CF, Shyu WC, Tsuzuki M, Lu GC, et al. *Houttuynia cordata* Thunb抽出物は、HT-29ヒト結腸腺癌細胞においてミトコンドリア依存性経路を介してアポトーシスを誘導する。Oncol Rep. 2009;22(5):1051-6. doi: 10.3892/or.00000535
13. Han K, JC, Chen H, Wang P, Yu M, Ding K. Structural characterization, および *Houttuynia cordata* 由来の多糖類の抗A549肺癌細胞生物活性。Int J Biol Macromol.2018;120(Pt A):288-96. doi: 10.1016/j.jbiomac.2018.08.061
14. Yanarajana M, Nararatwanchai T, Thairat S, Tancharoen S. Antiproliferative Activity and Induction of Apoptosis in Human Melanoma Cells by *Houttuynia cordata* Thunb Extract. 抗がん剤研究所 2017;37(12):6619-28. doi: 10.21873/anticancer.12119
15. Jungblut M, Oeltze K, Zehnter I, Hasselmann D, Bosio A. Preparation of singlecell suspensions from mouse spleen with the gentleMACS dissociator. J Vis Exp.2008;22:e1029. doi: 10.3791/1029
16. Pramita AD, Kristanti AN, Sugiharto, Utami ESW, Manuhara YSW. *Gynura procumbens* (Lour.) Merrのバイオマスおよびフラボノイドの生産は、一時的な浸漬系で培養物をシュートする。J Genet Eng Biotechnol.2018;16(2):639-43. doi: 10.1016/j.jgeb.2018.05.007
17. Ray A, Dittel BN. マウス腹腔細胞の単離。J Vis Exp.2010;35:e1488. doi: 10.3791/1488
18. Mojic M, Takeda K, Hayakawa Y. The dark side of IFN- γ : its role in promoting cancer immunoevasion. Int J Mol Sci.2017;19(1):E89. doi: 10.3390/ijms19010089
19. Ashrafi S, Shapouri R, Mahdavi M. Immunological consequences of immunization with tumor lysate vaccine and propranolol as an adjuvant: A study on cytokine profiles in breast tumor microenvironment. Immunol Lett.2017;181:63-70. doi: 10.1016/j.imlet.2016.11.014
20. Paul WE, Seder RA. リンパ球応答およびサイトカイン。Cell.1994;76(2): 241-51. doi: 10.1016/0092-8674(94)90332-8

21. Mosmann TR, Sad S. T細胞サブセットの拡大宇宙: Th1, Th2およびそれ以上。 *Immunol Today*.1996;17(3):138-46. doi: 10.1016/0167-5699(96)80606-2
22. Protti MP, De Monte L, Di Lullo G. Tumor antigen-specific CD4+ T細胞 in cancer immunity:抗原同定から腫瘍予後および治療戦略の開発まで。 *組織の抗原*。20014;83(4):237-46. doi: 10.1111/tan. 12329

この記事の引用方法:

Takanashi K, Dan K, Matsuoka T, Torii K. The Cancer Cell Killing Effects of *Gynura procumbens*, Toleaf Are Associated with CD4+ T Lymphocyte Activation. *Pharm Front*.2019;1:e190004. <https://doi.org/10.20900/pf20190004>