

# 補剤の免疫調節作用における骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の役割

申請代表者	堀江 一郎	東京理科大学薬学部応用薬理学研究室	助教
所外共同研究者	磯濱洋一郎	東京理科大学薬学部応用薬理学研究室	教授
所内共同研究者	済木 育夫	病態生化学分野	教授

## 【報告セミナー要旨】

### 【背景および目的】

補剤には免疫機能調節作用があり、がんや炎症性疾患などの様々な免疫異常を伴う疾患での有効性が示されている。しかし、その詳細な作用機序については不明な点が多く、例えば十全大補湯と補中益気湯の薬理作用特性に基づく使い分けも明確ではない。一方、近年になって、免疫システムを構築する新たな細胞集団として、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の存在が明らかになり、免疫抑制系の中心的役割を果たしていることが分かってきた。本研究では、補剤による免疫調節作用の一部がこのMDSC機能調節によるのではないかと仮説のもと、骨髄細胞からのMDSC分化誘導に対する十全大補湯および補中益気湯の作用を調べた。

### 【方法】

雄性C57BL/6マウス (8-10週齢) から骨髄細胞を単離し、IL-6 (40 ng/ml) およびGM-CSF (40 ng/ml) 存在下に4日間培養してMDSCへ分化誘導した。この培養液中に代表的補剤である十全大補湯または補中益気湯を処理し、MDSCマーカーであるCD11bおよびGr-1が両陽性となる細胞をフローサイトメーターで検出、骨髄細胞からMDSCへの分化への影響を調べた。

### 【結果および考察】

十全大補湯は処理濃度 (0.1-1 mg/ml) および処理時間 (1-4日間) 依存的にMDSC数を減少させ、1 mg/mlの濃度ではコントロールの約60%まで減少させた。一方、補中益気湯の処理ではMDSC数は増加傾向を示し、十全大補湯と補中益気湯が本細胞に対して全く異なる作用を示すことが分かった。MDSCは表面抗原のLy-6G陽性 (顆粒球型MDSC) とLy-6C陽性の (単球型MDSC) の2種類の分化型が存在する。この分化型についても調べると、十全大補湯はLy-6G陽性MDSC数には影響せず、Ly-6C陽性すなわち単球型MDSC数を選択的に減少させることが分かった。一般に、MDSCは一酸化窒素、IL-10およびTGF- $\beta$ の産生を介して免疫抑制能を示す。そこでさらに、MDSCの主たるNO合成酵素iNOSのmRNA発現に対する作用を調べると、十全大補湯はMDSC数の減少とよく一致して、iNOS mRNAの発現を減少させた。本研究の成績は、十全大補湯の免疫調節作用の一部にMDSCの分化および機能抑制という新たな機序が関わる可能性を示すものである。また、本作用の有無が十全大補湯と補中益気湯との作用特性の違いとも関連する可能性があり興味深い。

## ■背景および目的

十全大補湯や補中益気湯などの「補剤」は免疫系に作用し、がん、感染症および炎症性疾患などの様々な病態に対して一定の薬効を示すことが明らかにされつつある。特に、がんについては、十全大補湯や補中益気湯が腫瘍免疫を活性化することによる劇的な転移、増殖の抑制作用が報告されている。これら補剤の作用機序として、十全大補湯ではマクロファージおよびT細胞の活性化、補中益気湯ではNK細胞の活性化が示唆されているが、これらの細胞が薬物の直接の作用点であるか否かは不明である。

一方、最近になって、免疫系の抑制系として、制御性T細胞 (Treg) に加えて骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) が注目を集めている。MDSCは未成熟な骨髄由来の細胞であり、単球、顆粒球、樹状細胞などに特徴的な表面抗原を発現するヘテロな細胞集団である。MDSCは様々な病態や刺激に応じて誘導されるが、特にがん病態時に過剰に増加・活性化し、腫瘍組織に集積する。このMDSCはIL-10、アルギナーゼ (Arg-1)、一酸化窒素 (NO) や活性酸素種 (ROS) を分泌することで、T細胞の増殖・活性化の抑制、NK細胞やマクロファージの活性化を抑制するだけでなく、これまで免疫抑制において中心的な役割を果たしていると考えられてきたTregを誘導するといった一面も有し、がん悪性化の原因の一つであると考えられている。すなわち、MDSCはがんの免疫療法を考える上で重要な標的細胞であることに間違いはない。しかし、MDSC機能の薬理的調節については未だ確立しておらず、これまでの研究は表面抗原であるGr-1に対する中和抗体を用いてその活性を抑制するのが一般的である。しかし、これまでに明らかにされた補剤の作用を考えると、これら補剤が免疫反応系の上流に存在するMDSC機能を阻害することで、担癌状態での免疫抑制を解除し、その結果として免疫賦活作用を示している可能性が想定できる。

そこで本研究では、補剤による免疫調節作用にMDSCが関与しているという仮説のもと、MDSCの機能に対する十全大補湯および補中益気湯の作用およびその作用機序の解明を目的とした。

## ■方法

### MDSCの分化誘導方法および薬物処理

C57BL/6J系雄性マウス (8-10週齢) の大腿骨および脛骨から骨髄細胞を単離し、40 ng/ml IL-6 (PEPROTECH) および40 ng/ml GM-CSF (PEPROTECH) を含むRPMI-1640 (10% FBS) にて4日間培養することでMDSCへと分化・誘導した。十全大補湯または補中益気湯 (ツムラより供与) はDMSOにて溶解し、MDSC分化誘導培地中にて処理した。

### フローサイトメトリー法

分化誘導したMDSC ( $1.0 \times 10^6$  cells) をRat Anti-Mouse CD16/CD32 (BD Pharmingen™) にてFc blockingし、Rat Anti-Mouse CD11b-FITC (M1/70, BD Pharmingen™) およびRat Anti-Mouse Gr-1-PE (RB6-8C5, BD Pharmingen™) で染色し、BD FACSAria (BD Bioscience) にてCD11b、Gr-1両陽性細胞をMDSC数として測定した。

### 定量的RT-PCR法

分化誘導したMDSCから抽出したtotal RNAを鋳型とし、逆転写反応を行った。Real-time PCR反応には、SYBR® Premix EX Taq™ (TaKaRa) を用い、CFK connect (Bio-Rad) にて反応させた。

## Western blotting法

分化誘導したMDSCから抽出したwhole-cell lysates (20 µg) を10% polyacrylamide gelでSDS-PAGEで分離後、PVDF膜に転写した。転写したPVDF膜は5% skim milkでブロッキングし、Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) XP<sup>®</sup> Rabbit mAb (Cell Signaling) またはStat3 (124H6) Mouse mAb (Cell Signaling) にて1次抗体反応を行った (4°C, 8時間)。その後、2次抗体反応を行い、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) により抗体反応を検出した。

## ■結果および考察

MDSCに対する補剤の作用を検討するため、まずIL-6およびGM-CSFによる骨髓細胞からMDSCへの分化・増殖に対する十全大補湯の作用を検討した。その結果、十全大補湯は著明かつ濃度依存的 (0.1-1 mg/ml) にMDSC数を減少させることがわかった (Fig. 1)。また、十全大補湯の処理日数 (1-4日間) 依存的にMDSC数が減少させ、従って、十全大補湯は*in vitro*で分化・誘導したMDSCを減少させることが明らかになった。MDSCには表面抗原のLy-6G陽性 (顆粒球型MDSC) とLy-6C陽性 (単球型MDSC) の2種類の分化型が存在する。この分化型についても調べたところ、十全大補湯はLy-6G陽性MDSC数には影響しなかったが、Ly-6C陽性のMDSC数を処理濃度依存的に減少させた (Fig. 2)。すなわち、十全大補湯は単球型MDSCサブセットに対して選択的に作用している可能性が示唆された。MDSCに発現する重要な免疫抑制因子であるNO合成酵素iNOSおよびArg-1に対する十全大補湯の作用を調べたところ、MDSC数の結果と一致して、十全大補湯はArg-1 mRNA発現を減少させ (Fig. 3)、十全大補湯がMDSCの数だけでなく機能も抑制することが考えられた。

さらに、十全大補湯の作用機序を解明するため、MDSCの分化に重要なJAK-STATシグナルに対する作用も検討したところ、IL-6およびGM-CSFにより生じたSTAT3のリン酸化は十全大補湯により濃度依存的に抑制された (Fig. 4)。すなわち、十全大補湯のMDSC抑制作用の一部にJAK-STATシグナルの阻害が寄与していると考えられた。

これらの成績から、十全大補湯にはこれまで全く知られていなかったMDSC抑制作用が存在することが明らかになった。

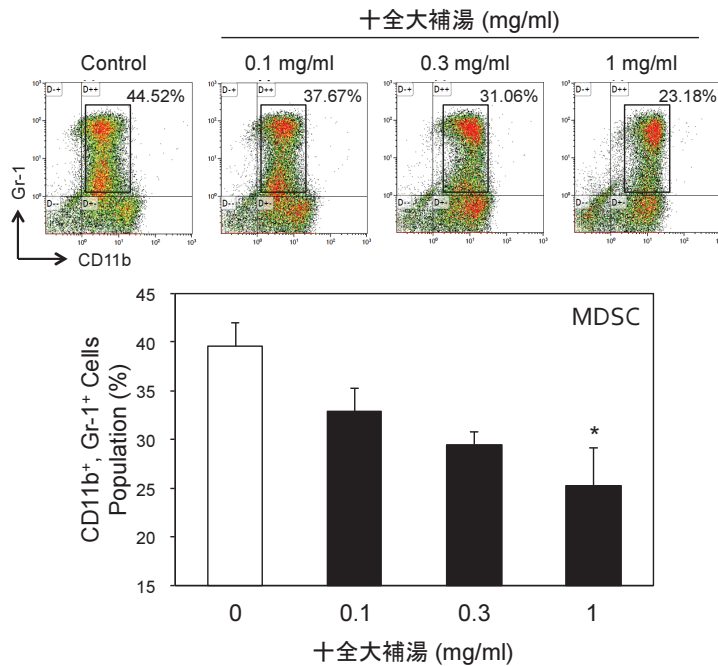


Fig. 1. 十全大補湯は濃度依存的にMDSCを減少させる  
IL-6およびGM-CSFによりMDSCを分化誘導中に十全大補湯 (0.1-1mg/ml) を共処理し, MDSC数をフローサイトメトリー法により解析した. Mean  $\pm$  S.E. (n=3), \*,  $p < 0.05$  vs. 0 mg/ml.

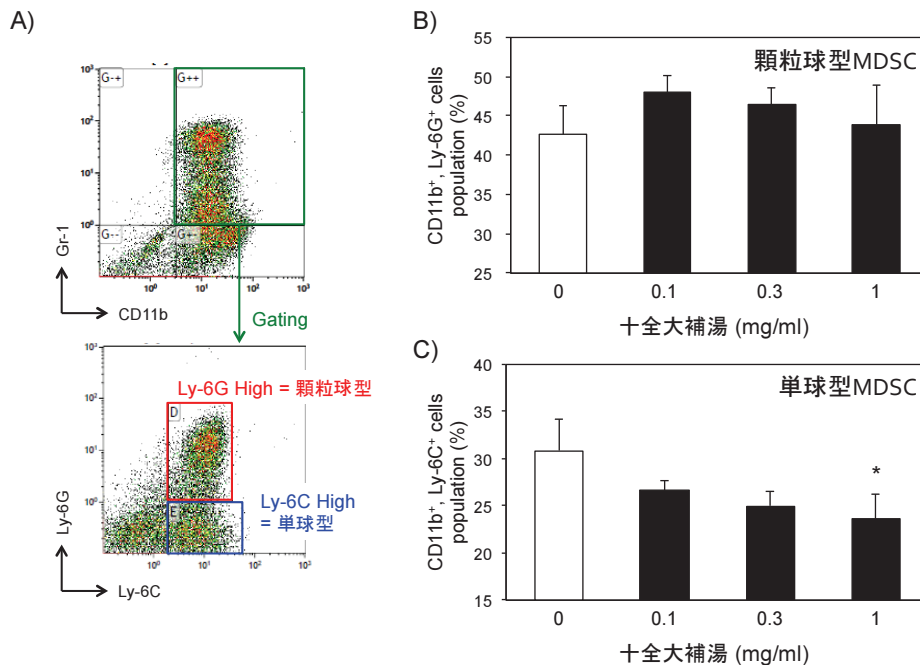


Fig. 2. 十全大補湯は単球型MDSCを減少させる  
A) 分化誘導後のMDSCをCD11b, Gr-1, Ly-6GおよびLy-6C抗体を用いて染色し, Ly-6GおよびLy-6C発現をもとに顆粒球型と単球型にGatingした. B, C) MDSCを分化誘導中に十全大補湯 (0.1-1mg/ml) を共処理し, 顆粒球型 (B) または単球型 (C) MDSC数をフローサイトメトリー法により解析した. Mean  $\pm$  S.E. (n=3), \*,  $p < 0.05$  vs. 0 mg/ml.

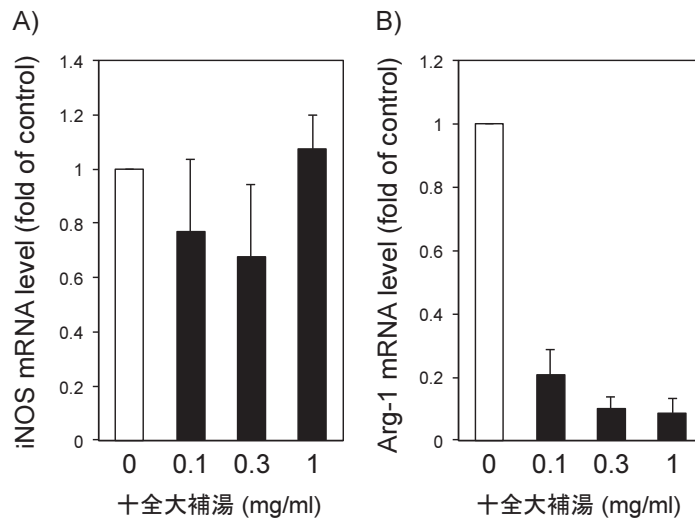


Fig. 3. 十全大補湯はMDSCにおける Arg-1 発現を減少させる  
IL-6およびGM-CSFによりMDSCを分化誘導中に十全大補湯 (0.1-1mg/ml) を共処理し, total RNAを抽出した. iNOS (A) および Arg-1 (B) mRNA 発現量は定量的RT-PCR法により測定した. Mean ± S.E. (n=3).

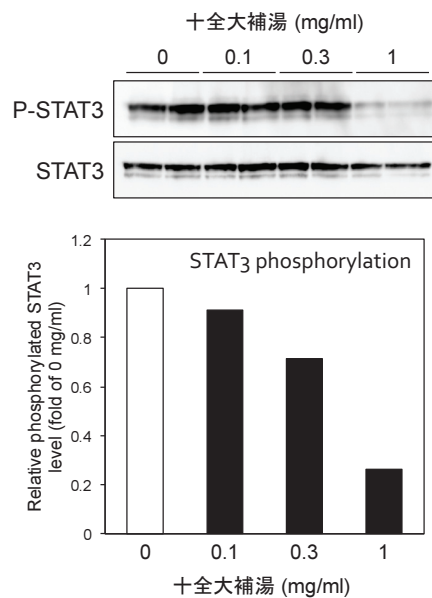


Fig. 4. 十全大補湯はSTAT3リン酸化を抑制する  
IL-6およびGM-CSFによりMDSCを分化誘導中に十全大補湯 (0.1-1mg/ml) を共処理し, whole-cell lysatesを抽出した. リン酸化STAT3およびSTAT3発現量はimmunoblottingにより測定した. Mean ± S.E. (n=3).

一方, 補中益気湯についても同様の実験を行ったところ, 十全大補湯とは異なり, 補中益気湯の処理により, MDSC数は濃度依存的に増加する傾向を示した (Fig. 5). 従って, 同じ補剤でありながら十全大補湯と補中益気湯の2つの補剤の免疫調節機序が明確に異なることが明らかになった. この結果と一致して, 補中益気湯はSTAT3のリン酸化レベルにほとんど影響しなかった (Fig. 6). 今後はこの2つの補剤の作用プロファイルの違いについて, 作用機序および構成生薬の違いを中心に追求していく予定である.

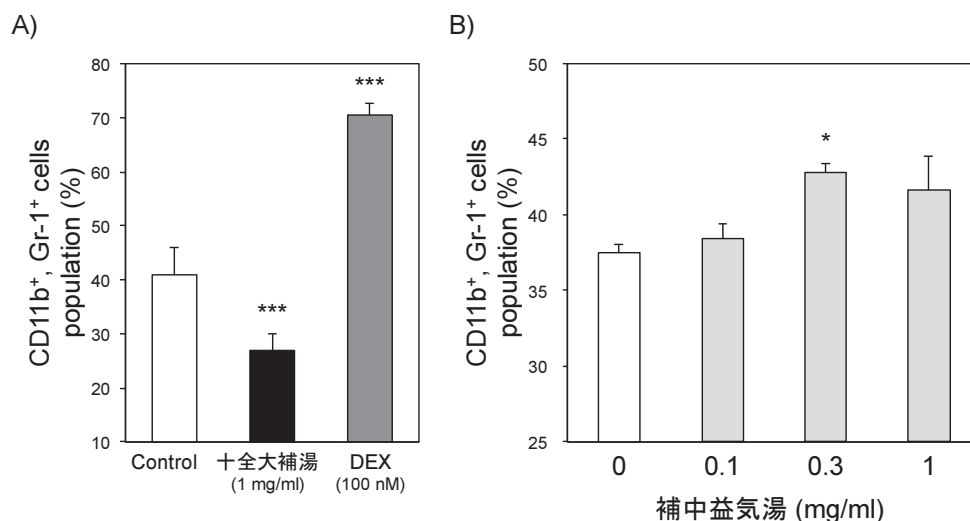


Fig. 5. 補中益気湯は濃度依存的にMDSCを増加させる  
IL-6およびGM-CSFによりMDSCを分化誘導中にDEX (100 nM), 十全大補湯 (1 mg/ml) または補中益気湯 (0.1-1mg/ml) を共処理し, MDSC数をフローサイトメトリー法により解析した. Mean ± S.E. (n=3), \*,  $p < 0.05$  vs. 0 mg/ml.

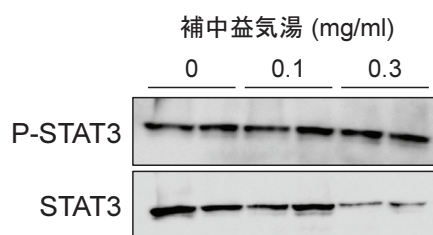


Fig. 6. 補中益気湯はSTAT3リン酸化に影響しない  
IL-6およびGM-CSFによりMDSCを分化誘導中に補中益気湯 (0.1-0.3mg/ml) を共処理し, whole-cell lysatesを抽出した, リン酸化STAT3およびSTAT3発現量はimmunoblottingにより測定した.

## ■結論

これまで十全大補湯や補中益気湯などの補剤が腫瘍免疫を活性化し, 抗腫瘍作用を示すことが示されてきた. しかしながら, 免疫調節に関わる決定的な作用機序は不明のままであった. 今回, 十全大補湯に免疫抑制系の中心的細胞であるMDSCを抑制する作用を見出した. この作用は単球型MDSCサブセットに選択的であり, MDSC分化を調節している可能性が示唆された. 一方, 補中益気湯は, 十全大補湯とは逆にMDSCを増加させる作用があり, この作用の違いが十全大補湯と補中益気湯の抗腫瘍作用プロファイルに影響しているものと想定している. これらの成績は, 十全大補湯と補中益気湯のMDSC調節作用が抗腫瘍作用に関わることを明らかにするとともに, これら補剤が慢性炎症や自己免疫疾患などのMDSCが関わる異常免疫病態に対する新たなアプリケーションとなることを示す興味深い知見である.