

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】

十全大補湯や補中益気湯などの補剤は、免疫調節作用を有し、がんや感染症、慢性炎症などに対して有効性を示す。特に腫瘍免疫については、十全大補湯がマクロファージおよびT細胞を活性化し、一方、補中益気湯はNK細胞を活性化するという違いが示されているものの、これら方剤が異なる作用特性を示す詳細な機序については未だ不明な点が多い。ところで、近年、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) が注目されている。MDSCは骨髄由来の未成熟でヘテロな細胞集団で、特に担がん状態で誘導され、T細胞やマクロファージの活性化を抑制することに加え、制御性T細胞を誘導して腫瘍免疫を低下させるなど、免疫システムを考える上で非常に重要な役割を果たしている。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、MDSCの分化および機能に対する補剤の作用を調べた。

【結果および考察】

雄性C57BL/6マウスから骨髄細胞を単離し、これをIL-6およびGM-CSF共存下に培養して、MDSCへと分化誘導する*in vitro*実験系を用い、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調べた。本培養系で十全大補湯を処理すると、その濃度 (0.1-1 mg/ml) 依存的にMDSC数が減少し、最大1 mg/mlの濃度ではコントロールの約60%まで減少した。さらに、十全大補湯はMDSCの免疫抑制能に関わるarginase-1の発現量も低下させ、MDSCの活性を抑制することがわかった。一方、補中益気湯は分化したMDSC数を減少させることはなく、むしろ僅かに増加させる傾向を示した。すなわち、本細胞の分化にこれらの補剤が全く異なる作用をもつことが明らかとなった。加えて、十全大補湯の構成生薬のうち、茯苓が強いMDSC抑制作用を有することも明らかにした。また、雌性BALB/cマウスに乳がん細胞株4T1細胞を尾静脈投与し、肺に腫瘍組織を形成させると、脾臓および骨髄のMDSC数が顕著に増加したが、十全大補湯を経口投与 (40 mg/mouse/day) することで、この増加を抑制できることもわかった。これらの十全大補湯の作用は、担がん状態でマクロファージおよびT細胞を活性化させる機序として合理的であり、本方剤のがん免疫賦活作用の根幹をなす作用である可能性がある。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」は免疫調節作用を有し、特に、がんにおいて、腫瘍免疫を活性化することで転移、増殖を劇的に抑制することが報告されている。しかしながら、これら補剤の直接の作用点は未だ不明である。

一方、最近になって、免疫系の抑制系として、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制御性T細胞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ないが、MDSC機能の薬理的調節については未だ確立されていない。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、担がん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。

昨年度の共同研究では、*in vitro*でMDSC分化誘導系を用い、本培養系に補剤を処理したところ、十全大補湯が強力にMDSCの分化を抑制することを見出した。そこで本年度はこの十全大補湯のMDSC抑制作用を詳細に解析するとともに、*in vivo*における作用についても併せて検討した。

■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 (1.0×10^6 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。

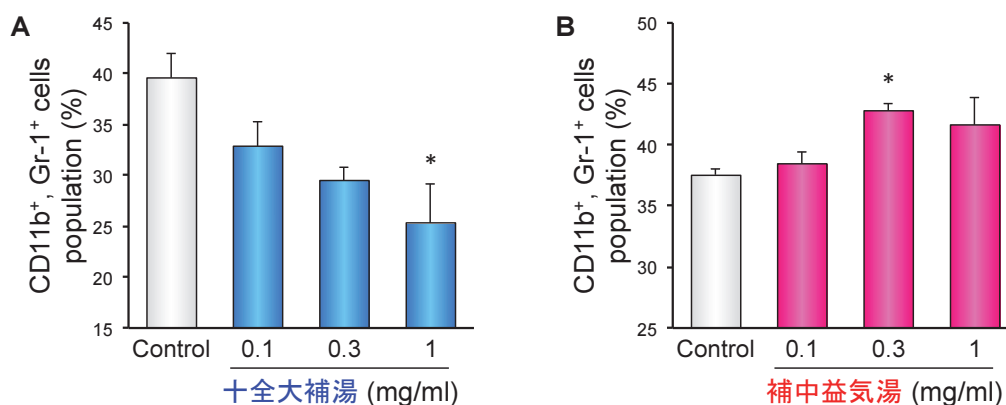


Fig. 1. 十全大補湯は濃度依存的にMDSCを減少させる

IL-6およびGM-CSFによりMDSCを分化誘導中に十全大補湯 (A: 0.1-1 mg/ml) または補中益気湯 (B: 0.1-1 mg/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=4), *: $p < 0.05$ vs. 0 mg/ml.

In vivo がん転移モデルマウスの作製

BALB/c系雌性マウス (6週齢) にルシフェラーゼ遺伝子を過剰発現させたマウス乳がん細胞株4T1細胞 (4T1-Luc) を 1×10^6 cells/mouse で尾静脈から投与し、肺に転移がんを形成するモデルを作成した。4T1-Luc細胞投与の4日後から十全大補湯 (40 mg/mouse) を1日1回3日間連続で経口投与し、最終投与の24時間後に骨髄、脾臓および肺を摘出した。骨髄および脾臓は単細胞に処理した後、MDSC数をフローサイトメトリー法にて測定した。また、本モデルの肺における腫瘍病変はホモジネートを用いたルシフェラーゼアッセイにて測定した。

■結果および考察

(1) *In vitro* MDSC分化誘導系に対する十全大補湯の作用

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による骨髄細胞からMDSCへの分化・増殖に対する補剤の作用を検討した。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、最大1 mg/mlの濃度ではコントロールの約60%まで減少することが明らかとなった (Fig. 1A)。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. 1B)。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。また、MDSCに発現する重要な免疫抑制因子である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、iNOSの発現にはほとんど影響しなかったものの、十全大補湯はArg-1 mRNA発現を減少させ (Fig. 2)、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。十全大補湯は当帰、川芎、芍薬、地黄、蒼朮 (または白朮)、茯苓、人參、桂皮、黄耆および甘草という10種の生薬成分から構成される。これらの生薬の中から、十全大補湯のMDSC抑制作用に関わる成分を明らかにするため、各生薬エキス単独のMDSC分化に対する作用を検討したところ、茯苓エキスに十全大補湯と同様のMDSC抑制作用が認められた (Fig. 3A)。茯苓エキスは濃度依存的 (0.01-0.1 mg/ml) にMDSCを減少させ (Fig. 3B)、すなわち十全大補湯のMDSC抑制作用に茯苓が少なくとも一部寄与していることが明らかになった。茯苓は補中益気湯には含まれておらず、補

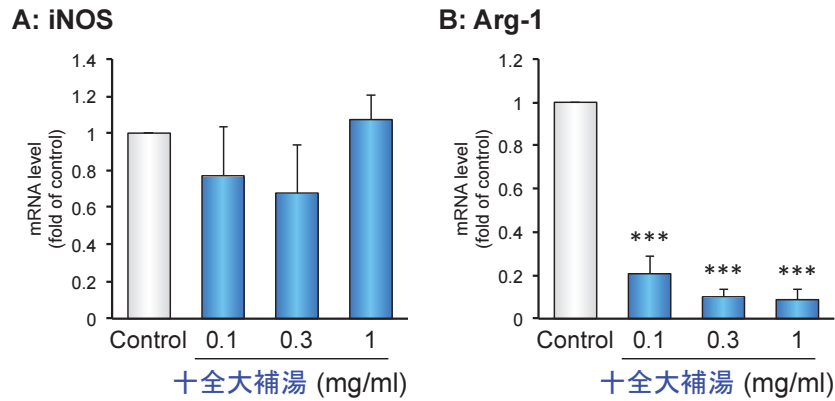


Fig. 2. 十全大補湯はMDSCにおけるArg-1発現を減少させる

IL-6およびGM-CSFによりMDSCを分化誘導中に十全大補湯 (0.1-1 mg/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 \pm S.E. (n=4), ***, $p < 0.001$ vs. 0 mg/ml.

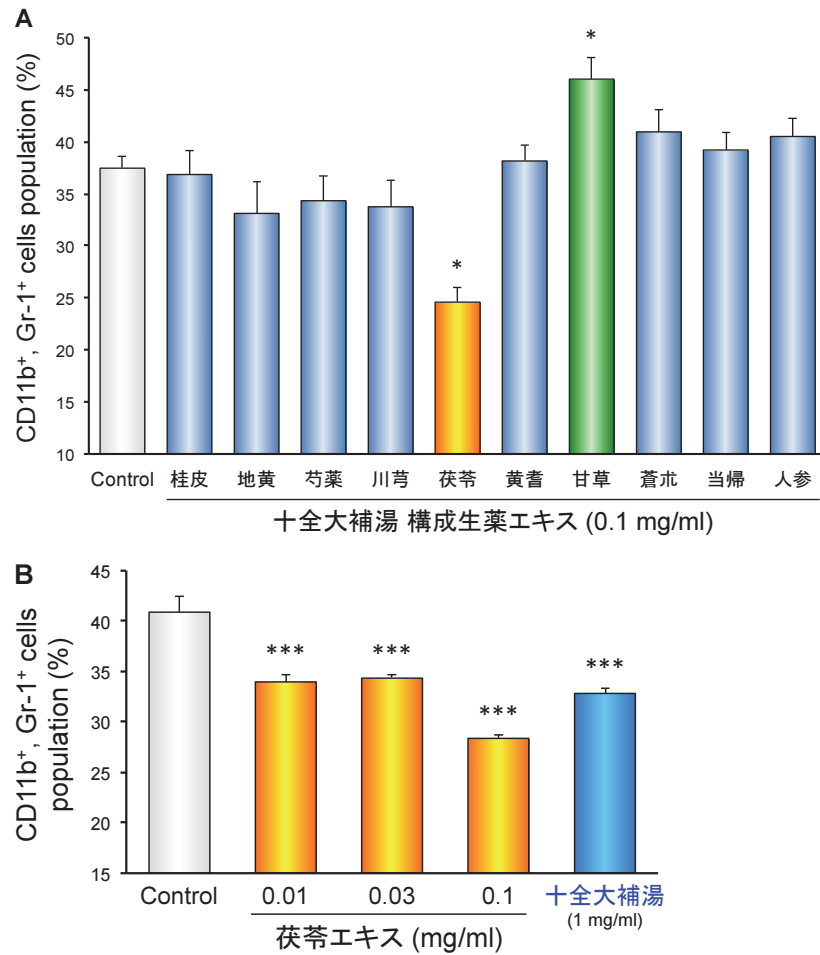


Fig. 3. 茯苓エキスは濃度依存的にMDSCを減少させる

A: IL-6およびGM-CSFによりMDSCを分化誘導中に十全大補湯の構成生薬エキス (0.1 mg/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.

B: IL-6およびGM-CSFによりMDSCを分化誘導中に茯苓エキス (0.01-0.1 mg/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), *, ***, $p < 0.05, 0.001$ vs. Control.

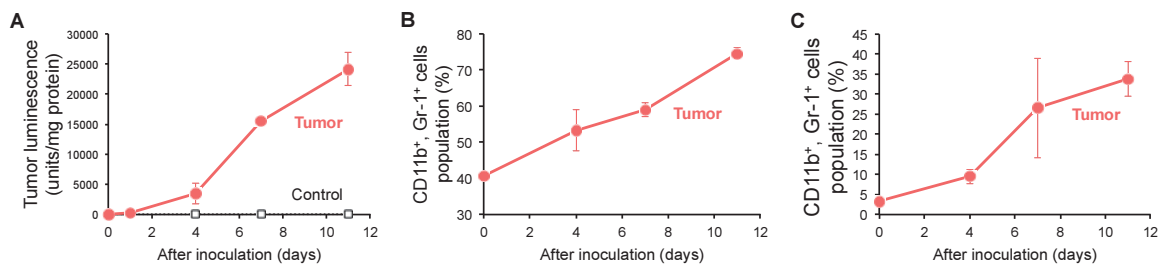


Fig. 4. 担がんモデルマウスの骨髄および脾臓でMDSCが増加する

A: 雌性BALB/cマウスに乳がん細胞株4T1-Luc細胞を尾静脈投与し、肺に転移腫瘍組織を形成させた。肺組織を採取し、破碎したホモジネートを用いたシフェラーゼアッセイにより肺の転移病変を解析した。

B and C: 担がんモデルマウスから骨髄 (B) および脾臓組織 (C) を採取し、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).

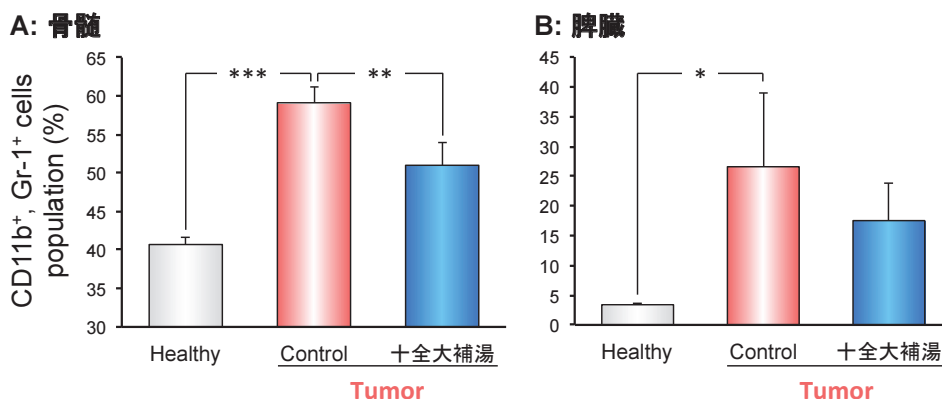


Fig. 5. 十全大補湯は担がんモデルマウスの骨髄および脾臓でMDSCが減少させる

雌性BALB/cマウスに乳がん細胞株4T1-Luc細胞を尾静脈投与し、肺に転移腫瘍組織を形成させた。十全大補湯はがん細胞投与4日後から3日間経口投与 (40 mg/day/mouse) し、十全大補湯の最終投与から24時間後に骨髄 (A) および脾臓組織 (B) を採取し、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=6), *, **, ***; $p < 0.05, 0.01, 0.001$

中益気湯にMDSC抑制作用が認められなかった結果とも一致する。

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

(2) *In vivo* 担がんモデルのMDSCに対する十全大補湯の作用

In vivo のMDSCに対する十全大補湯の作用を検討するため、乳がん細胞株4T1-Luc細胞を雌性BALB/cマウスに投与し、担がんモデルを作製した。今回作製したモデルでは、投与4日後から肺において転移病変が認められ (Fig. 4A), それに伴って骨髄および脾臓におけるMDSCが日数依存的に増加することがわかった (Fig. 4BおよびC)。本モデルに対して、MDSCが増加し始めるがん細胞投与4日後から3日間連続で十全大補湯を経口投与 (40 mg/day/mouse) したところ、骨髄および脾臓のMDSCが著明に減少し、特に骨髄において有意に低下することが明らかとなった (Fig. 5)。

これらの成績から、十全大補湯は *in vitro* だけでなく、*in vivo* の担がん状態においても MDSC を抑制することが示唆された。

■結論

本研究の成績から、十全大補湯は *in vitro* および *in vivo* の両方で MDSC を抑制することが明らかとなった。この結果は、十全大補湯が腫瘍免疫を活性化し、がんの転移・浸潤を抑制した過去の報告と符合する。十全大補湯の MDSC 抑制作用は、がん化学療法の補助治療として十全大補湯を用いることの有用性を示唆するだけでなく、MDSC を標的とした新規がん免疫療法の開発に繋がるとも考えられ、非常に重要な基礎的データであると考えている。