

和漢薬の骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の 調節作用とその意義

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 儀濱洋一郎 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 病態制御部門病態生化学分野 教授(現 名誉教授)

【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もち、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薬効を示す。特に、がんでは、これら補剤は腫瘍免疫系を活性化し、劇的に転移、浸潤を抑制することが報告されている。我々はこれまでの共同研究から、十全大補湯が骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) を抑制することを見出してきた。MDSC は、未成熟な骨髄由来の細胞であり、担がん状態で過剰に増加する。この MDSC は NO やアルギナーゼ (Arg-1) を分泌することで、T 細胞やマクロファージの増殖および活性化を抑制し、腫瘍免疫低下に基づく転移や浸潤といった悪性化の要因となる。従って、十全大補湯による MDSC 抑制作用は本方剤によるがん免疫賦活作用の重要な機序となっている可能性が高い。そこで本研究では、十全大補湯による MDSC 抑制作用の詳細な機序や、本作用と *in vivo* での抗腫瘍効果の関連性を明らかにするため、種々の実験を行った。

【結果および考察】

In vitro 実験には、雄性 C57BL/6 系マウスから骨髄細胞を単離し、IL-6 および GM-CSF 存在下に MDSC へと分化誘導する培養系を用いた。本培養系において、十全大補湯が MDSC 数を濃度依存的に減少させるというこれまでの成績と相関して、MDSC に発現する免疫抑制因子の一つである Arg-1 の発現量も十全大補湯によって著明に低下した。また、分化誘導した MDSC と単離 T 細胞を共培養したところ、MDSC の T 細胞増殖抑制作用は十全大補湯を処理した MDSC では有意に減弱し、免疫抑制能が一部解除された。これらの結果から、十全大補湯は MDSC の数を減少させ、その免疫抑制機能までも低下させることが明らかとなった。本培養系では、単離直後の MDSC は、2つの亜型である顆粒球型 MDSC と単球型 MDSC が 7:3 という割合で存在したが、分化誘導の過程で単球型が優位となった。この分化過程において、単球型が優位となる培養 24-48 時間後で、十全大補湯は単球型 MDSC 数を著明に減少させた。従って、十全大補湯は、少なくとも本培養系においては前駆細胞から単球型 MDSC への分化を抑制する可能性が示唆された。さらに、肺がん転移モデルマウスにおいて、十全大補湯は転移巣である肺での MDSC 増加も抑制した。本研究で見出した十全大補湯の MDSC 分化抑制作用は、本方剤のがん免疫賦活作用を考える上で非常に合理的なものであることはもちろん、PD-1 抗体などの免疫チェックポイント阻害薬とも明らかに異なるユニークな作用であるため、和漢薬を応用した新たながん免疫療法を提唱するために非常に重要な基礎的知見であると考えている。

■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、免疫抑制に関わる新たな細胞として、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。

これまでの共同研究では、*in vitro* での MDSC 分化誘導系を用い、十全大補湯が強力に MDSC の分化を抑制することを見出ししてきた。すなわち、十全大補湯による MDSC の分化抑制作用が本方剤によるがん免疫活性化作用の重要な機序となっている可能性が高い。そこで本年度の共同研究では、十全大補湯による MDSC 分化抑制作用の詳細な機序や、本作用と *in vivo* での抗腫瘍効果の関連性を明らかにすることを目的として実施した。

■方法

MDSC の分化誘導および薬物処理

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 (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

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

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。

T 細胞増殖試験

C57BL/6J 系雄性マウスから脾臓を摘出し、単離脾細胞を調製した。単離脾細胞に CFSE (TONBO Biosciences) をロード・ラベルした後、2 μg/ml の Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 (VERITAS) を含む RPMI-1640 (10% FBS) にて培養し、T 細胞を選択的に増殖させた。CFSE 蛍光強度をフローサイトメトリー法にて解析し、T 細胞増殖を評価した。前項の分化 MDSC を本培養系に

添加し、MDSC の T 細胞増殖抑制能を評価した。

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、肺に転移腫瘍巣を形成するモデルを作成した。4T1-Luc 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、脾臓および肺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 の免疫抑制能に対する十全大補湯の作用

これまでの共同研究で、十全大補湯が MDSC の数を減少させることは見出してきたが、この減少作用が MDSC の免疫抑制能にまで影響するか否かは不明のままであった。そこで、MDSC の免疫抑制能に対する十全大補湯の作用を明らかにするため、はじめに、種々の免疫抑制関連因子の発現に対する十全大補湯の作用を定量的 RT-PCR 法にて調べたところ、MDSC に発現する Arg-1 の発現量が十全大補湯の処理濃度 (0.1-1 mg/ml) 依存的に減少した (Fig. 1)。一方、別の免疫抑制関連因子である

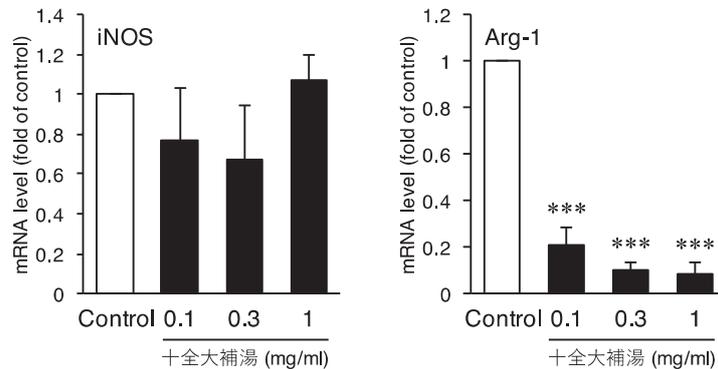


Fig. 1. 十全大補湯は MDSC における Arg-1 発現を濃度依存的に減少させた

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) を添加処理し、total RNA を抽出した。iNOS および Arg-1 mRNA 発現量は定量的 RT-PCR 法により測定した。Mean \pm S.E. (n=3), ***: $p < 0.001$ vs control.

NO 合成酵素 (iNOS) の発現量にはほとんど影響しなかった。第二に、MDSC の免疫抑制能を直接調べるため、C57BL/6 系マウスより単離した脾細胞を蛍光ラベル後、分化誘導した MDSC と共培養して T 細胞増殖を評価した。脾細胞のみを培養した場合、日数依存的な T 細胞の増殖が生じたが、分化誘導した MDSC と共に培養すると、MDSC の数依存的に T 細胞の増殖は著明に抑制された。一方、十全大補湯を処理した MDSC でも同様の実験を行ったところ、T 細胞の増殖抑制効果はコントロールの MDSC に比べ有意に減弱し、免疫抑制能が一部解除された (Fig. 2)。従って、これらの結果から、十全大補湯は MDSC の数を減少させた結果、その免疫抑制能までも低下させることが明らかとなった。

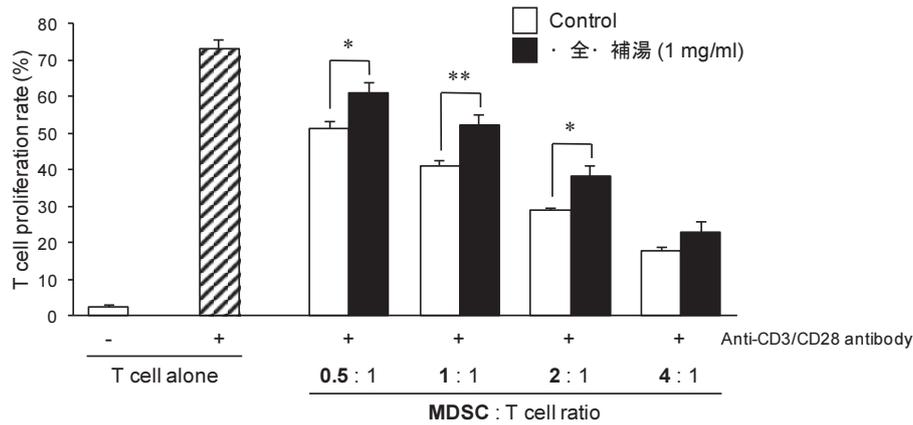


Fig. 2. 十全大補湯は MDSC の T 細胞増殖抑制能を減弱させた

単離脾細胞に CFSE をロード・ラベルした後、抗 CD3/CD28 抗体を処理し、T 細胞を増殖させた。十全大補湯の存在または非存在下に分化誘導した MDSC を本培養系に添加し、72 時間後の CFSE 蛍光強度をフローサイトメトリーにて解析、T 細胞増殖を評価した。Mean ± S.E. (n=4), *, **; $p < 0.05, 0.01$.

(2) 十全大補湯の MDSC 抑制作用の薬理学的特性

次に、十全大補湯の MDSC 分化抑制作用の薬理学的特性を調べた。MDSC には、顆粒球型 (PMN-MDSC: Ly-6G⁺) と単球型 (M-MDSC: Ly6C⁺) の 2 つのサブセットが存在する。本培養系でも、骨髄から単離した直後は、PMN-MDSC が約 70%、M-MDSC が約 30% という割合で存在している。これら MDSC の割合は、*in vitro* での分化誘導の過程で逆転し、M-MDSC が優位となる (Fig. 3A)。この分化過程に対する十全大補湯の作用を検討したところ、M-MDSC が優位となる培養後 24 ~ 48 時間で、十全大補湯は M-MDSC 数を著明に減少させた (Fig. 3B)。以前の研究成績から、十全大補湯

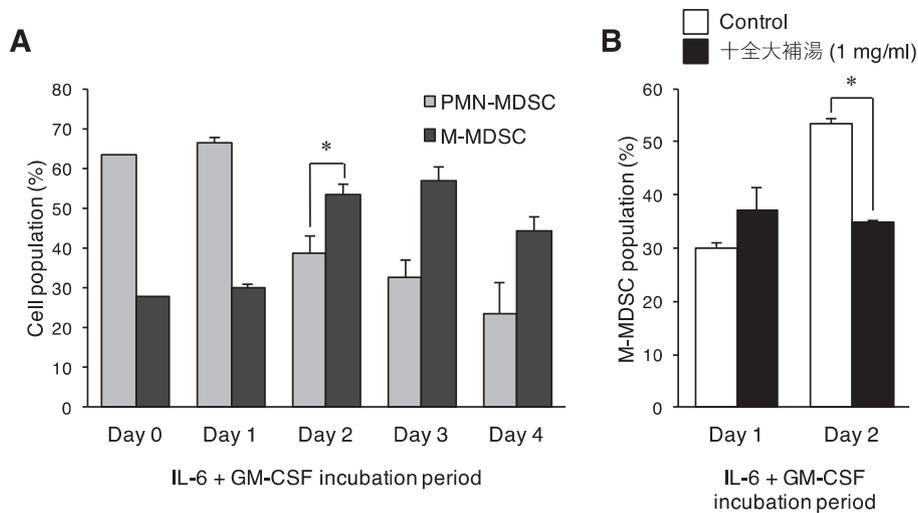


Fig. 3. 十全大補湯は M-MDSC への分化を抑制した

A: 骨髄細胞に IL-6 および GM-CSF を処理し、MDSC を分化誘導した。分化誘導 1-4 日後に PMN-MDSC (Ly-6G⁺) および M-MDSC (Ly-6C⁺) 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 を分化誘導中に十全大補湯 (1 mg/ml) を添加処理し、M-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), *; $p < 0.05$.

は STAT3 のリン酸化を抑制することを見出しているが、STAT3 は未熟骨髄前駆細胞 (IMC) から M-MDSC への分化に重要なシグナルであり、本研究で得られた知見と一致する。従って、十全大補湯は、少なくとも本培養系においては前駆細胞から M-MDSC への分化を抑制した結果、MDSC 数を減少させる可能性が示唆された。さらに、十全大補湯の MDSC 抑制作用に関わる責任生薬を調べた

ところ、茯苓にのみ MDSC 抑制作用が認められ (Fig. 4)、本生薬中に MDSC 分化抑制作用をもつ活性成分が含まれている可能性が考えられた。

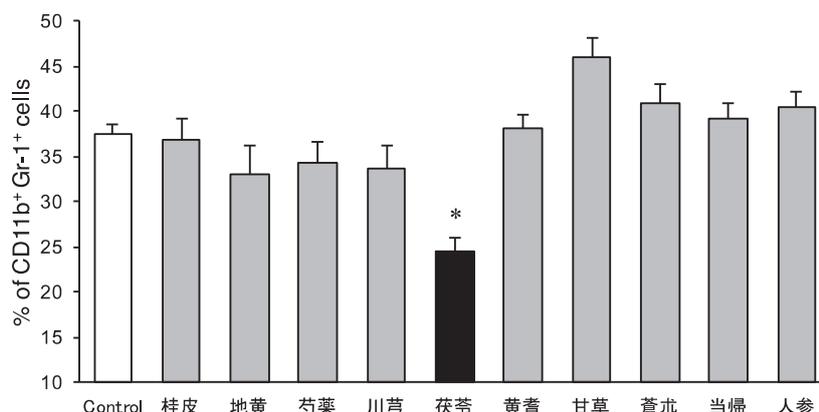


Fig. 4. 茯苓エキスが MDSC 分化を抑制した

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) を添加処理し、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 control.

(3) *In vivo* MDSC に対する十全大補湯の作用

最後に、がん組織周辺での MDSC に対する十全大補湯の作用を検討するため、担がんモデルマウスに十全大補湯を投与した。その結果、骨髓や脾臓だけでなく、腫瘍転移巣である肺において MDSC は劇的に増加したが、十全大補湯の投与により、MDSC 数が有意に減少した (Fig. 5)。今後、がん組織周辺でのその他の免疫細胞の活性を調べる必要があるが、がん局所でも十全大補湯は MDSC 機能を抑制し、腫瘍免疫を活性化していることが示唆された。

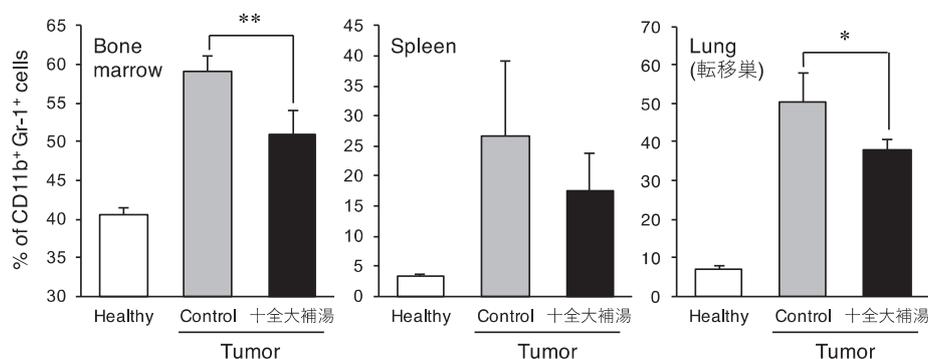


Fig. 5. 十全大補湯は担がんモデルマウスの骨髓およびがん組織周辺の MDSC を減少させた

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 時間後に骨髓、脾臓および肺を採取し、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.

■ 結論

本研究の成績から、十全大補湯は前駆細胞から M-MDSC への分化を抑制することで MDSC を減少させ、その免疫抑制能までも低下させることが明らかとなった。さらに、実際の腫瘍微小環境においても十全大補湯の投与によって MDSC 数は減少し、十全大補湯が腫瘍病巣において MDSC を減少させることで腫瘍免疫を活性化し、抗腫瘍効果を発揮していると想定された。今後、十全大補湯の

MDSC 抑制作用と抗腫瘍効果の関係についてさらに追求する必要があるが、本研究の成果は、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考えている。

また、近年では腫瘍免疫の阻害因子である PD-1 に対する中和抗体である抗 PD-1 抗体 (ニボルマブ) による新規がん免疫療法が一定の効果を挙げている一方で、その高額な医療費 (3,000 万円 / 年) が問題となっている。本研究で見出した十全大補湯の MDSC 抑制作用は、ニボルマブによる T 細胞抑制の解除とは全く異なるユニークなものであり、従って、この両薬物の併用は、腫瘍免疫の低下を引き起こす 2 つの要素を同時に解除する非常に効果的なコンセプトとなる可能性が高い。この併用療法の実効性を立証できれば、画期的ながん免疫療法になることはもちろん、ニボルマブの減量にも繋がり、医療経済学的な貢献は計り知れないと考えている。