

## がん免疫療法における補剤の有用性に関する基礎研究

申請代表者	磯濱 洋一郎	東京理科大学 薬学部	教授
所外共同研究者	堀江 一郎	山口東京理科大学 薬学部	講師
研究統括者	早川 芳弘	研究開発部門病態制御分野野生体防御学領域	教授

### ■背景・目的

十全大補湯、補中益気湯および人参養栄湯などの補剤とよなれる漢方方剤は、病的状態での体力や栄養状態の改善を目的に処方されることが多い。一方、これらの方剤には免疫活性化作用があることも知られており、腫瘍免疫の活性化作用や補中益気湯によるインフルエンザワクチンに対するアジュバント効果などが示されている。我々は、これら補剤による免疫活性化作用の一部は、担がん状態などに分化誘導される骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）の抑制ではないかとの仮説のもと研究に着手し、昨年度までに人参養栄湯および十全大補湯が骨髄前駆細胞から MDSC の分化を抑制する効果を持つことを *in vitro* の実験系で明らかにしてきた。一方、MDSC は腫瘍組織や炎症部位などに遊走することで免疫抑制機能を発揮するが、遊走先の微小環境によってその活性が変化することも予想される。そこで今年度は、この MDSC 分化抑制作用の実効性を担がん動物を用いて検証するとともに、MDSC の免疫抑制活性の調節機構並びに MDSC 活性に対する補剤の直接的な作用を検討した。

### ■結果・考察

まず、人参養栄湯および十全大補湯による MDSC 分化抑制作用を、担がんマウスを用いた *in vivo* 実験で調べた。Balb/c 系の雄性マウス（6 週齢）の背部皮下に Matrigel®中に懸濁した 4T1-Luc2 乳がん細胞を  $1 \times 10^5$  個投与し、その後、3～6 日目に十全大補湯あるいは人参養栄湯（40 mg/mouse）を 1 日 1 回経口投与し、7 日目の骨髄および脾臓中の MDSC 数および腫瘍サイズを計測した。4T1-Luc2 細胞の移植によって、両臓器中の MDSC 数は健常動物の約 2 倍と著明に増加した（図 1A および B）。これに対し、人参養栄湯および十全大補湯（各々 40 mg）を投与したマウスでは、コントロール群に比べ低値を示す傾向にはあったものの、予想に反して統計学的な違いは得られなかった。しかし、7 日目に測定した腫瘍サイズは、十全大補湯および人参養栄湯を投与した動物では、コントロールの約 1/3 と著明に縮小され（図 1C）、明確な腫瘍成長抑制作用が観察された。

これまでに、補剤による腫瘍成長抑制の機序は免疫系の活性化に基づくことが示されており、特に人参養栄湯および十全大補湯ではマクロファージおよび T 細胞の関与が示唆されている。これらの免疫細胞種は、MDSC によって抑制されることがよく知られている。そこで次に、これらの補剤が MDSC の活性に影響するか否かを調べた。MDSC は免疫抑制因子として arginase-1 および一酸化窒素（NO）を産生する。単離したマウスの骨髄細胞を IL-6（40 ng/ml）および GM-CSF（40 ng/ml）存在下に 3 日間培養し、MDSC へと分化させた細胞標本を用いて、その後、これらの方剤エキスの存在下にさらに 3、6、12 あるいは 24 時間培養した。その結果、両方剤は arginase-1 の mRNA 発現を作用時間依存的に低下させ、12 時間以上の処理によってコントロールの約 1/5 となった（図 2A）。一方、iNOS の mRNA 量については今回の検討では著明な作用は認めなかった（図 2B）。すなわち、人参養栄湯および十全大補湯は、MDSC の分化を抑制するのみならず、arginase-1 の発現を抑制することにより、本細胞による免疫抑制作用を強力に阻害すると推定された。

種目（特定研究）

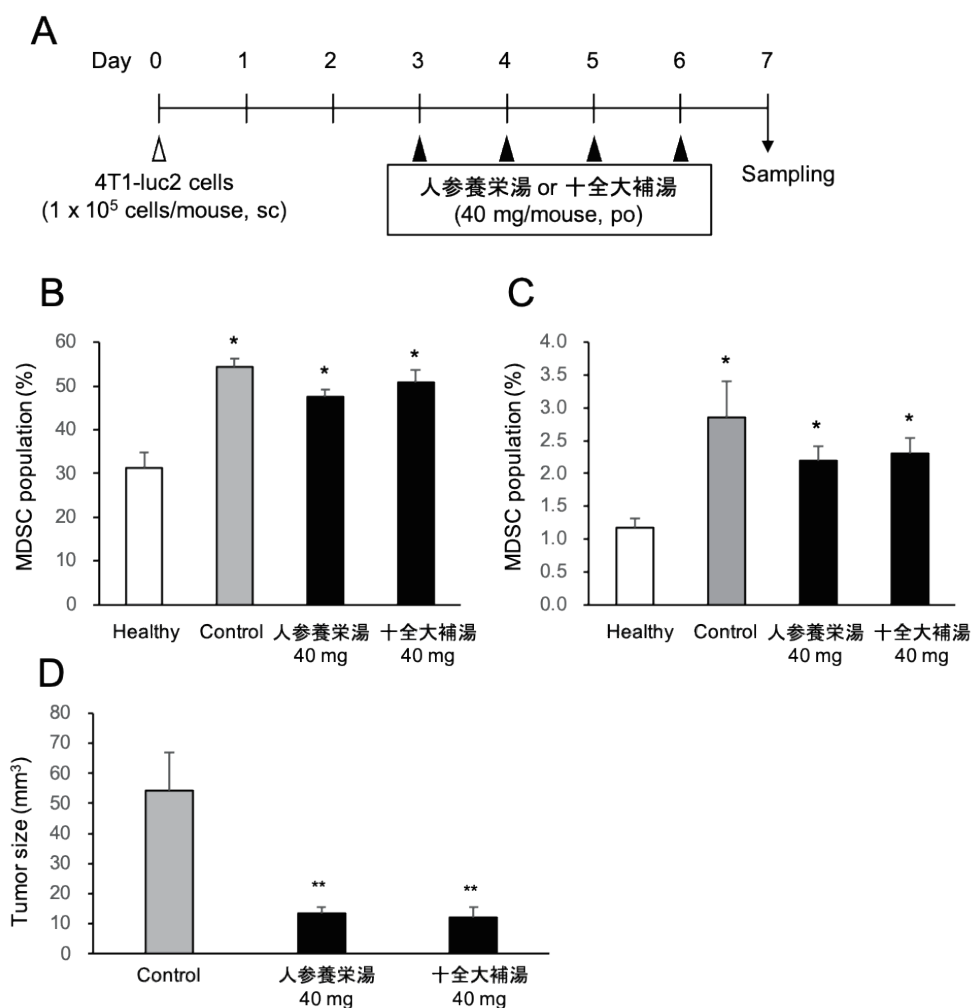


図1. 担がん動物の骨髄、脾臓中の MDSC 数および腫瘍成長に対する人參養榮湯および十全大補湯の作用

マウスの背部皮下に 4T1-luc2 細胞 (1 x 10<sup>5</sup> cells) を移植し、腫瘍増殖および骨髄中の MDSC 分化を誘発した。人參養榮湯および十全大補湯は腫瘍移植後、3-6 日目に投与した (A)。第 7 日目に骨髄 (B) および脾臓 (C) を摘出し、組織中の MDSC 数を計測するとともに腫瘍サイズ (D) を測定した。

Mean ± SE (n=6), \*: p<0.05 vs healthy (B, C), \*\*: p<0.01 vs control (D).

上記の実験結果により、MDSC による免疫抑制活性が薬理的に調節可能であることが示唆された。上述のように、MDSC は腫瘍など様々な病態を生じた組織に遊走し、その機能を発揮するが、遊走先の環境下でもその活性が変化する可能性が考えられる。そこで、MDSC の活性を調節し得る刺激を調べるために、骨髄細胞より分化誘導した MDSC を標本として、arginase-1 の mRNA 発現に対する種々の刺激に対する反応を調べた (データは示さず) が、その中で最も著明な作用を示したのは Th2 サイトカインの IL-4 であった。IL-4 は処理濃度 (1-20 ng/ml) 依存的に MDSC による arginase-1 発現を促進し、最大作用を示した 10 ng/ml ではコントロールの約 40 倍の高値を示した。

種目 (特定研究)

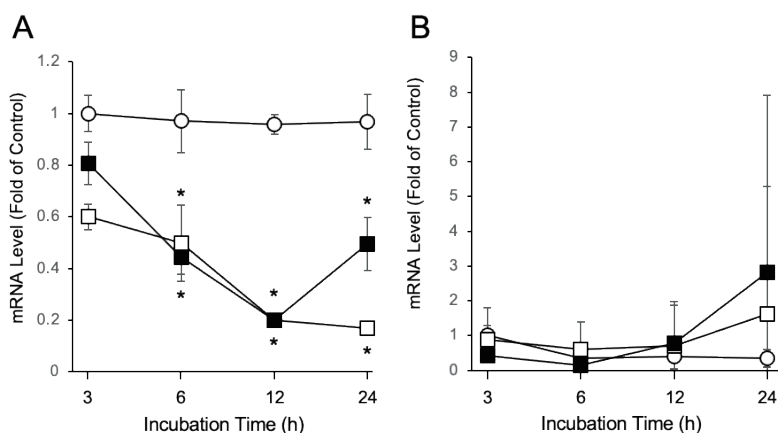


図2. MDSCの免疫抑制因子の mRNA 発現に対する人参養栄湯および十全大補湯の作用  
 マウスの骨髄細胞より分化させた MDSC を、vehicle (○)、人参養栄湯 (1 mg/ml, □) または十全大補湯 (1 mg/ml, ■) 存在下に表記の時間培養し、arginase-1 (A) および iNOS (B) の mRNA 量を測定した。  
 Mean± SE (n=3), \*: p<0.05 vs. control.

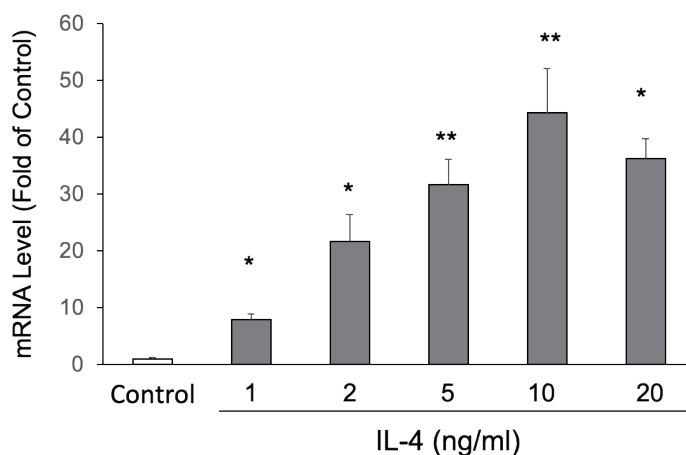


図3. MDSCの arginase-1 mRNA 発現に対する IL-4 の作用  
 マウスの骨髄細胞より分化させた MDSC を、表記濃度の IL-4 存在下に 24 時間培養し、arginase-1 の mRNA 量を測定した。Mean± SE (n=3), \*: p<0.05 vs. control.

■結論

従来、補剤による腫瘍免疫の活性化作用は、動物実験によって示されてきたが、その明確な作用点や作用機序の多くは不明であった。本研究では、人参養栄湯および十全大補湯の少なくとも2方剤が、MDSCの分化を抑制するだけでなく、免疫抑制因子である arginase-1 の mRNA 発現を抑制することで、その活性を著明に抑制することを示唆した。また、MDSCによる arginase-1 の発現が IL-4 によって亢進したことも興味深く、Th2 サイトカインが病態形成に関わる間質性肺炎などの線維症を伴う病態でも本細胞が増悪因子として機能することが推定された。すなわち、人参養栄湯や十全大補湯による MDSC 機能の阻害は肺線維症などの疾患の悪化予防にも応用できる可能性が考えられ興味深い。