

## 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 (現 山口東京理科大学薬学部 生体防御学分野)	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	早川 芳弘	病態制御研究部門 病態生化学分野	教授

### ■背景・目的

十全大補湯や補中益気湯、人参養栄湯などの補剤は西洋薬では認められない「免疫賦活作用」を有し、がん、感染症および慢性炎症といった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ものの、その詳細な作用点は不明なままであった。

一方、近年、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。

我々はこれまでの共同研究から、十全大補湯がMDSCを抑制することを明らかにしてきた。すなわち、十全大補湯の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であり、補剤の作用特性の違いに影響する可能性がある。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、各補剤のMDSCに対する作用についてより詳細に検討した。

### ■結果・考察

#### 【方法】

#### 1. 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、補中益気湯（ツムラより供与）、人参養栄湯（クラシエより供与）および各種シグナル阻害薬はDMSOにて溶解し、MDSC分化誘導培地中にて処理した。

#### 2. フローサイトメトリー

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した後、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およびGr-1両陽性細胞をMDSC数として測定した。

### 3. Western blotting

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® 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】

##### 1. 十全大補湯の MDSC 抑制作用の機序解明

まず、十全大補湯の MDSC 抑制作用の薬理的機序の解明を目指した。MDSC はその前駆細胞である未熟骨髄細胞 (IMC) から分化し、さらにマクロファージや顆粒球などの終末細胞へとさらに分化することが知られる。従って、十全大補湯の MDSC 抑制作用には、① IMC からの分化抑制、② MDSC の細胞死誘導、③ MDSC から終末細胞への分化 (脱分化) 促進、といった 3 つの可能性が考えられた。第一に MDSC の細胞死に対する十全大補湯の作用を調べるため、分化誘導後の MDSC を 7-aminoactinomycin D (7-AAD) で染色し、フローサイトメーターにて apoptosis 細胞数を測定したところ、陽性対照薬である mitomycin C (1 µg/ml) で認められたような顕著な細胞死は、十全大補湯の処理 (0.1-1 mg/ml) では認められなかった (Fig. 1)。第二に、MDSC からその他の細胞への分化に対する作用を調べるため、分化誘導後の MDSC に十全大補湯を処理し、MDSC 数を調べた。その結果、コントロールの MDSC は、IL-6 および GM-CSF 存在下においても経時的に減少した。一方、この時十全大補湯を処理しても MDSC の減少率は変わらず、減少時間もコントロールとほぼ同じであった (Fig. 2) ことから、十全大補湯は MDSC の細胞死や脱分化に影響しないことが明らかとなった。第三に、IMC から MDSC への分化に対する十全大補湯の作用を詳細に解析した。MDSC には、顆粒球型 (PMN-MDSC: Ly-6G<sup>+</sup>) と単球型 (M-MDSC: Ly6C<sup>+</sup>) の 2 つのサブセットが存在し、これら 2 つの亜型は IMC からそれぞれ直接分化する。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)。一方、PMN-MDSC には著明な影響がなかった (データ示さず) ことから、十全大補湯は IMC から M-MDSC への分化を抑制し、MDSC 数を減少させることが明らかとなった。

次に、十全大補湯の MDSC 分化抑制作用に関わる機序を明らかにするため、MDSC 分化に関わるとされる様々な細胞内シグナルの阻害薬を用い、十全大補湯の作用と比較した。その結果、STAT3 阻害薬 cucurbitacin I, p38 阻害薬 SB203580, PI3-kinase 阻害薬 LY294002 が十全大補湯と同様に MDSC 数を有意に減少させた (Fig. 4)。そこで、これらシグナル分子の活性化についてリン酸化を指標として western blotting により調べたところ、十全大補湯は MDSC 中の p38 リン酸化にはほとんど影響しなかった。一方、コントロールの MDSC において、STAT3 のリン酸化は IL-6 および GM-CSF 処理 6 時間後という極めて初期化から著明に亢進したが、十全大補湯を処理した MDSC ではこの 6 時間後以降全てのタイムポイントにおいて STAT3 のリン酸化が抑制された (Fig. 5)。PI3-kinase に対する作用は現在検討中ではあるが、STAT3 のリン酸化が M-MDSC への分化に重要であることを考え併せると、少なくとも十全大補湯は一部 STAT3 の活性化を阻害することで IMC から M-MDSC への分化を抑制していると考えられた。

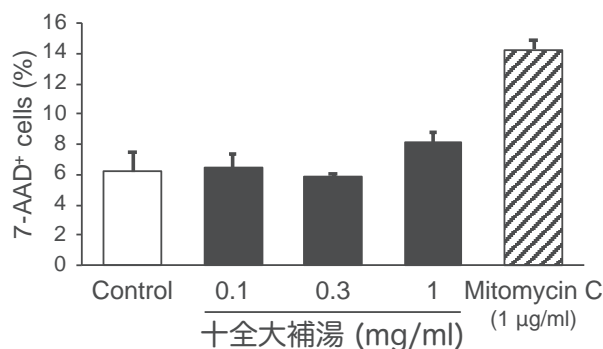
##### 2. MDSC に対する各補剤の作用とその特性

続いて、代表的な補剤である十全大補湯、補中益気湯および人参養栄湯の MDSC に対する作用を比較検討した。各補剤の MDSC 分化に対する作用を検討したところ、補中益気湯 (0.1-1 mg/ml) はこれにほとんど影響しなかったものの、人参養栄湯 (0.05-0.5 mg/ml) は十全大補湯と同様に濃度依存的に MDSC 分化を抑制した (Fig. 6)。興味深いことに、MDSC の亜型に対する作用を検討したところ、前述のとおり十全大補湯の作用は M-MDSC に対する選択性が高かったのに対し、人参養栄湯は PMN-MDSC と M-MDSC に対して同様に減少作用を示した。この結果と一致して、PMN-MDSC の主な免疫抑制因子である ROS 産生に対しても、人参養栄湯は十全大補湯よりも強い抑制作用を示した (Fig. 7)。これらの結果から、補剤の中でも、十全大補湯と人参養栄湯は MDSC 分化抑制作用をもち、これが両補剤の腫瘍免疫賦活に伴う抗腫瘍効果に寄与する可能性がある。その一方で、この 2 つの補剤は抗腫瘍効果を示すがん種やマウス系統に違いがあることもわかっているため、MDSC の亜型に対する作用の違いがこうした補剤の作用特性を生み出す一要因となっていることも考えられ、非常に興味深い。

## ■結論

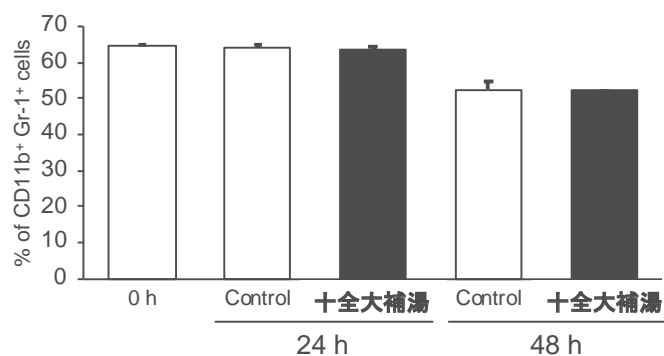
本研究の成績から、十全大補湯は未熟骨髄細胞から M-MDSC への分化を抑制することで MDSC を減少させ、その免疫抑制能までも低下させることが明らかとなった。さらに、補剤ごとに MDSC に対する作用の違いも認められ、これが補剤の作用特性に繋がる可能性が考えられた。現在、十全大補湯の MDSC 分化抑制作用と抗腫瘍効果の関係についてさらに追求しているが、本研究の成果は、がん化学療法の補助治療として補剤を用いることの有用性、さらには MDSC を標的とした新規がん免疫療法の開発に繋がるだけでなく、様々な病態に対して科学的な根拠に基づく補剤の使い分けの重要性を示唆する非常に意義深い知見であると考えている。

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（免疫チェックポイント阻害薬）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。本研究で見出した補剤の 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。



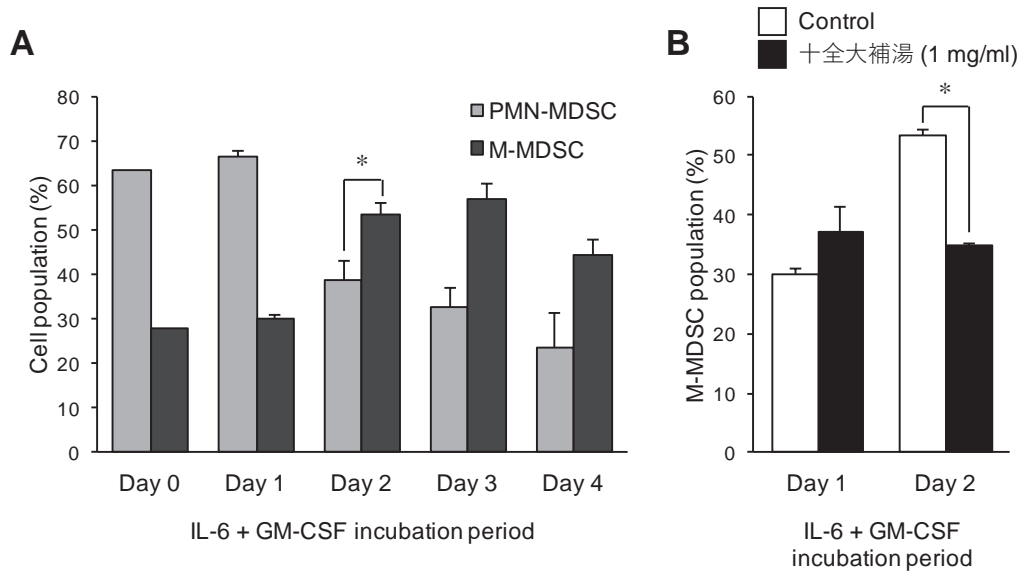
**Fig. 1. 十全大補湯は MDSC の apoptosis を誘導しなかった**

IL-6 および GM-CSF により骨髄細胞から MDSC を分化誘導中に十全大補湯 (0.1-1 mg/ml) または mitomycin C (1 µg/ml) を添加処理し, 7-AAD 陽性細胞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).



**Fig. 2. 十全大補湯は MDSC の脱分化を誘導しなかった**

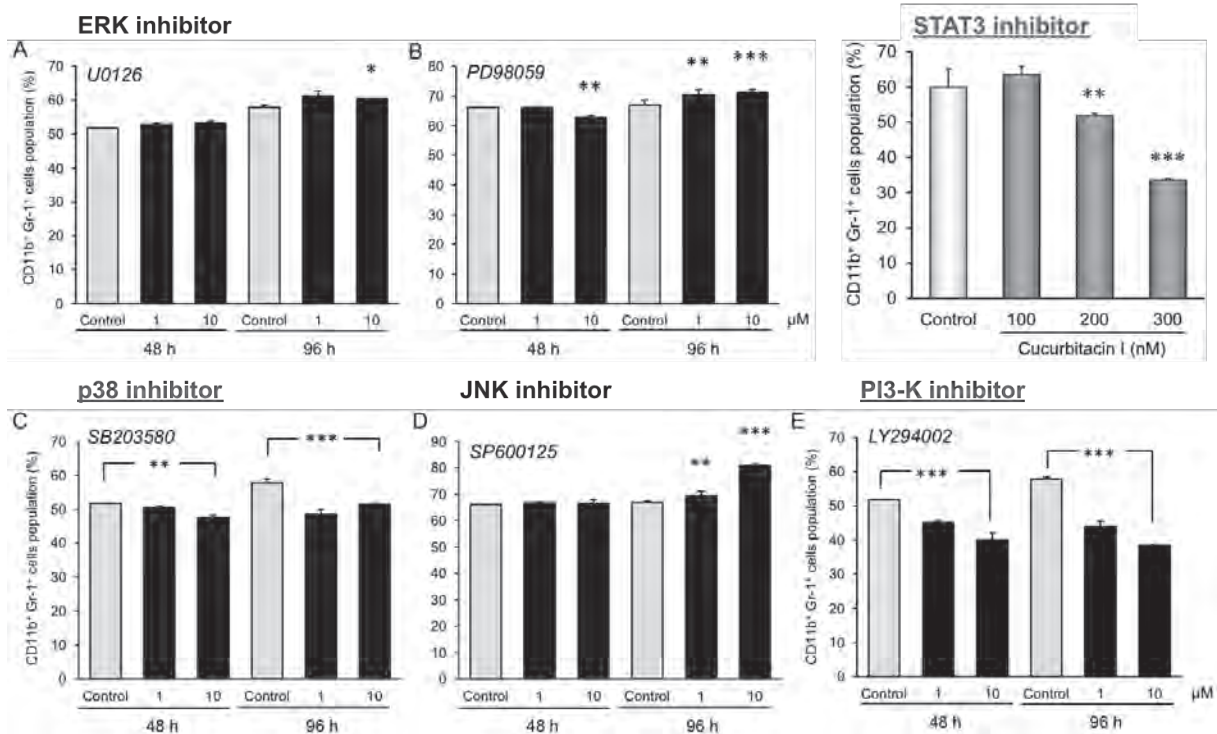
IL-6 および GM-CSF を含む培地にて骨髄細胞を 4 日間培養し, MDSC を分化誘導した. 分化誘導後の細胞に十全大補湯 (1 mg/ml) を添加処理し, 24 または 48 時間後の MDSC 数をフローサイトメトリー法により解析した. Mean ± S.E. (n=3).



**Fig. 3. 十全大補湯は M-MDSC の分化を抑制した**

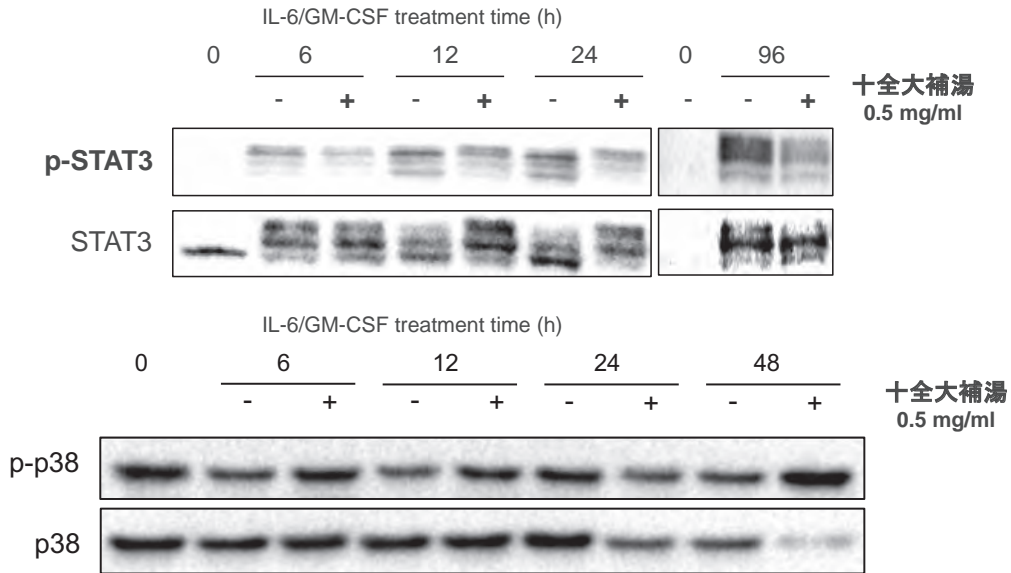
A: 骨髓細胞に IL-6 および GM-CSF を処理し, MDSC を分化誘導した. 分化誘導 1-4 日後に PMN-MDSC (Ly-6G<sup>+</sup>) および M-MDSC (Ly-6C<sup>+</sup>) 数をフローサイトメトリー法により解析した.

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  $\pm$  S.E. (n=4), \*;  $p < 0.05$ .



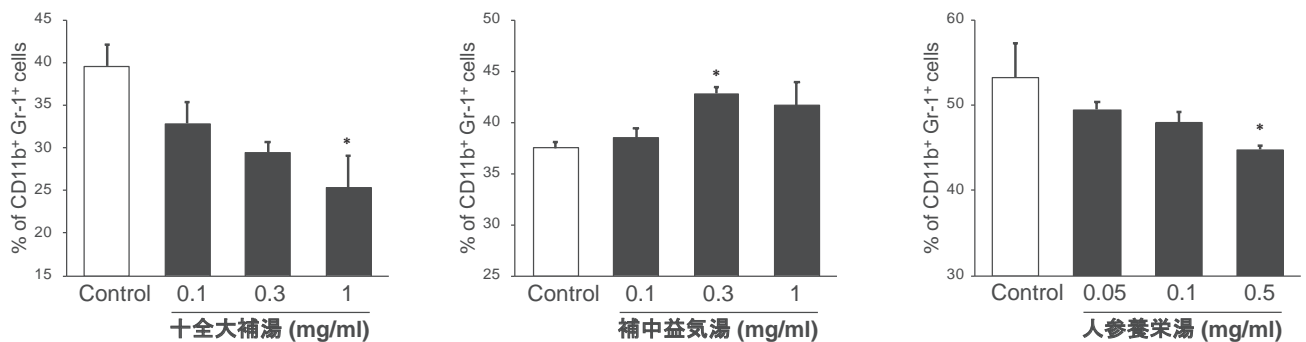
**Fig. 4. STAT3 阻害薬は濃度依存的に MDSC の分化を抑制した**

IL-6 および GM-CSF により MDSC を分化誘導中に各濃度の U0126, PD98059, cucurbitacin I, SB203580, SP600125 または LY294002 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=4), \*, \*\* and \*\*\*;  $p < 0.05$ , 0.01, and 0.001 vs. control.



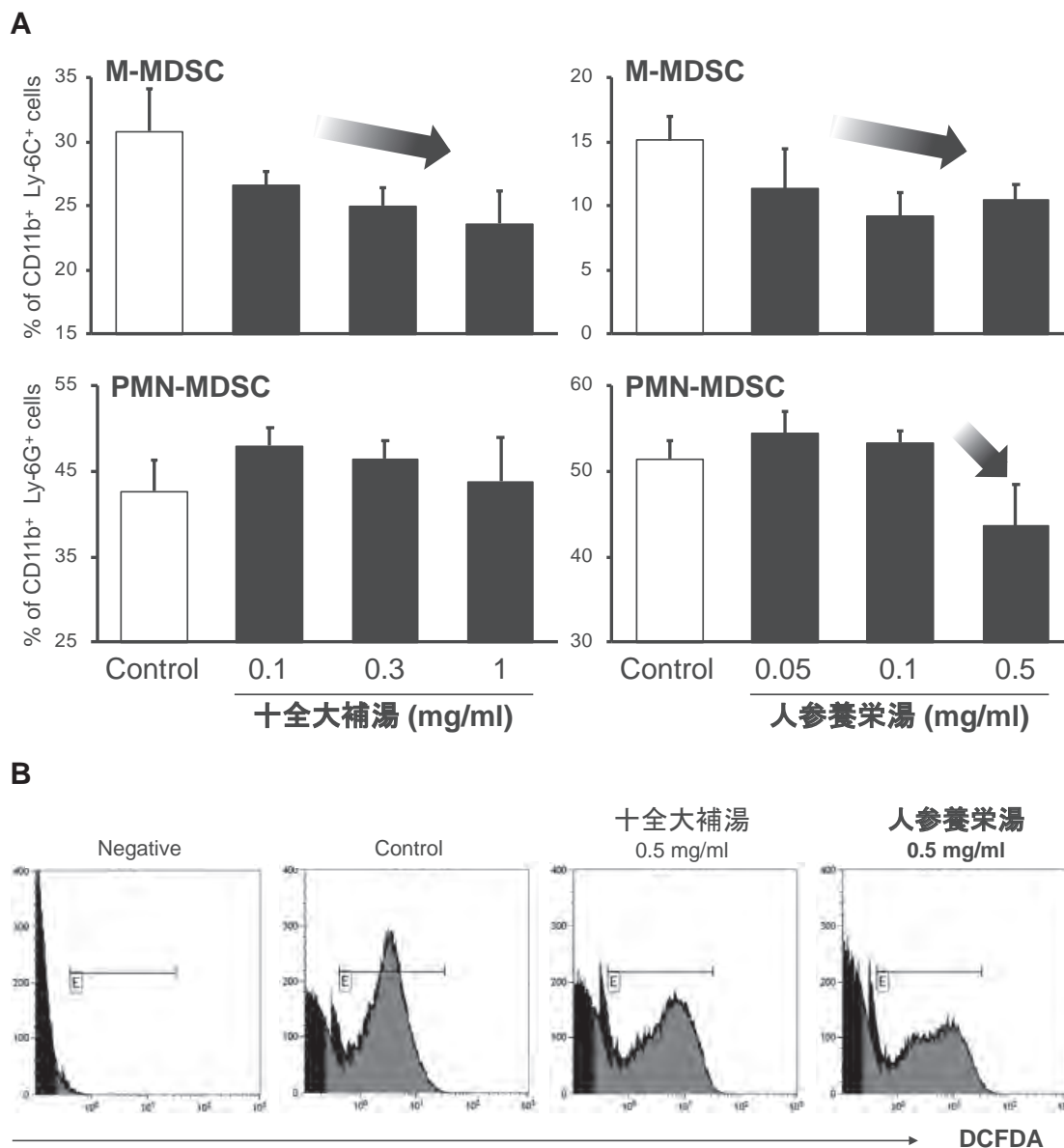
**Fig. 5. 十全大補湯は MDSC の STAT3 リン酸化を抑制した**

IL-6 および GM-CSF により MDSC を分化誘導中に十全大補湯 (0.5 mg/ml) を添加処理し, whole-cell lysates を抽出した. リン酸化 STAT3 (p-STAT3), STAT3, リン酸化 p38 (p-p38) および p38 発現量は western blotting により検出した.



**Fig. 6. 十全大補湯および人參養榮湯は MDSC の分化を抑制した**

IL-6 および GM-CSF により MDSC を分化誘導中に各濃度の十全大補湯, 補中益気湯または人參養榮湯を添加処理し, 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=4), \*;  $p < 0.05$  vs. control.



**Fig. 7. 人參養栄湯は PMN-MDSC の分化を抑制し, ROS 産生を低下させた**

A: IL-6 および GM-CSF により MDSC を分化誘導中に各濃度の十全大補湯または人參養栄湯を添加処理し, PMN-MDSC (Ly-6G<sup>+</sup>) および M-MDSC (Ly-6C<sup>+</sup>) 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=4).

B: IL-6 および GM-CSF により MDSC を分化誘導中に十全大補湯 (0.5 mg/ml) または人參養栄湯 (0.5 mg/ml) を添加処理し, DCFDA 陽性細胞数をフローサイトメトリー法により解析し, ROS 産生を評価した.