

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	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、補中益気湯および人參養栄湯といった補剤は、東洋医学的には「虚証」すなわち気あるいは血の不足した患者でこれらを補うことを目的に用いられる。従って、補剤の臨床的な応用は、高齢者や病気回復期の患者の体力あるいは栄養状態の向上を目的とすることが多い。一方、がん細胞を移植したがん転移モデル動物に補剤を投与すると、腫瘍免疫が活性化され抗腫瘍効果が得られることが示されるなど、免疫系を活性化させる作用は補剤のもう一つの特徴と考えられている。しかし、これら補剤による免疫活性化作用は、十全大補湯および人參養栄湯がマクロファージおよび T 細胞系を活性化するのに対し、補中益気湯は NK 活性を亢進するなど、方剤選択性があることがわかっているものの、作用機序の詳細は依然不明である。免疫活性化という、西洋薬にはほとんどない補剤の特徴的薬理作用を現代医学の中で有効に活用するためには、これらの薬物による免疫細胞への作用プロファイルや作用点を明確にすることが重要である。特に、近年ではニボルマブなどの生物学的製剤が用いられるようになり、癌治療における補剤との併用も想定される。

そこで本研究では、補剤の薬理的機序すなわち作用点および含有される活性成分の同定を究極的目的とし、各種免疫細胞の分化および活性に対する補剤の作用をプロファイリングする。特に本年度は、NK 細胞および骨髄由来免疫抑制作用 (MDSC) の分化に対する補剤の作用を *in vitro* 分化培養系を用いて検討した。

■結果・考察

まず、NK 細胞の分化に対する補剤の作用を調べるために、分化培養系を用いて検討した。C57BL/6J マウスより単離した骨髄細胞を、Tst-4 細胞をフィーダーとして共培養し、IL-15 刺激によって NK 細胞へと分化誘導した。本培養系に、十全大補湯あるいは補中益気湯 (0.1 mg/ml) を加え、16 日後の NK 細胞数を FACS で解析し

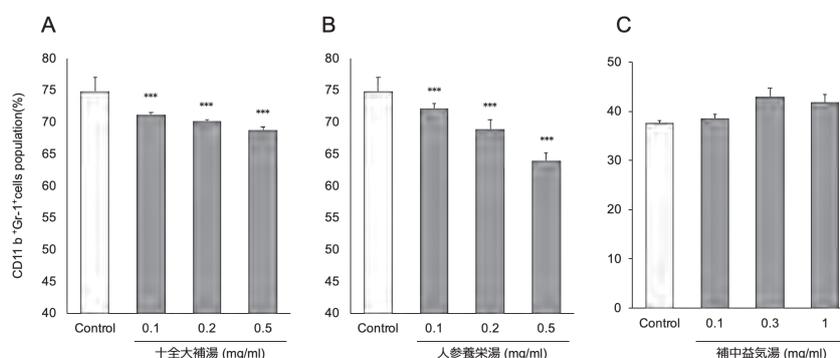


図 1. MDSC の分化に対する十全大補湯、人參養栄湯および補中益気湯の作用

マウスより単離した骨髄細胞を IL-6 および GM-CSF 存在下に 4 日間培養し、分化した MDSC は CD-11b、Gr-1 両陽性細胞として FACS にて検出した。Mean ± SE (n=4)、***: p<0.001 vs. control.

種目 (特定研究)

た。その結果、いずれの方剤も著明な作用は示さず、少なくとも今回の実験条件では、補剤による NK 細胞の分化を直接誘導する作用は捉まらなかった (データは示さず)。

次に、免疫抑制系の細胞である MDSC の分化に対する補剤の作用を調べた。C57/BL6J マウスより単離した骨髓細胞を IL-6 および GM-CSF 存在下に 4 日間培養して MDSC へと分化誘導した。本培養系の培養液に補剤のエキスを添加し、4 日目の細胞を FACS にて解析し、CD11b および Gr-1 両陽性細胞を MDSC として評価した。その結果、十全大補湯および人参養栄湯を添加した培養系では処理濃度依存的 (0.1~0.5 mg/ml) かつ有意な ($p < 0.001$ vs コントロール培養) 分化抑制作用が認められた (図 1)。両方剤による MDSC 分化抑制が得られたエキス濃度はほぼ同じであったが、最大抑制反応を示した 0.5 mg/ml での作用を比較すると人参養栄湯の方が強い傾向にあった。一方、補中益気湯は最大で 1 mg/ml の濃度まで試したが、MDSC の分化に著明な作用はなかった。

補剤による MDSC の分化抑制作用の機能的意義を検証するために、補剤存在下に培養した MDSC の T 細胞の増殖に対する作用を調べた。C57BL/6J マウスの脾臓より単離した CD4 陽性細胞を CD3/28 で刺激して増殖を誘発した。この T 細胞と骨髓細胞より分化させた MDSC を細胞数 1 : 0.125 の比率で混合し、48 時間後に Ki-67 陽性の CD4 陽性細胞を FACS で検出し、増殖した T 細胞数として計測した。コントロール MDSC は T 細胞の増殖を約 50%まで抑制したが、人参養栄湯存在下に培養した MDSC では T 細胞の増殖抑制効果が有意に ($p < 0.05$) に減弱し (図 2)、本方剤が MDSC の分化を機能的にも抑制すると考えられた。なお、データは示さないが、十全大補湯存在下に培養した MDSC でも同様の機能阻害が認められた。

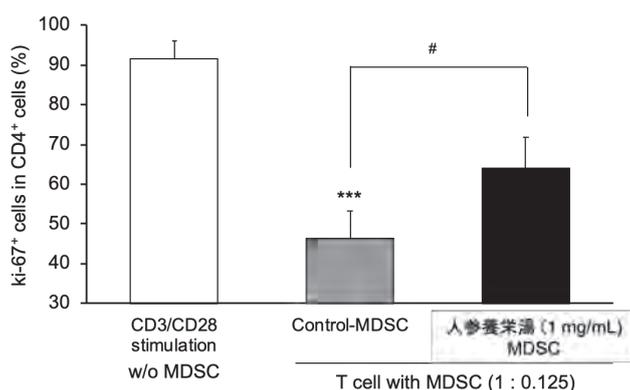


図 2. MDSC による T 細胞増殖抑制効果に対する人参養栄湯の作用

コントロール (溶媒のみ) あるいは人参養栄湯存在下に分化させた MDSC を T 細胞と共培養し、T 細胞の増殖を FACS にて解析した。

Mean \pm SE (n=3), ***: $p < 0.001$ vs Tell without MDSC, #: $p < 0.05$ vs control MDSC.

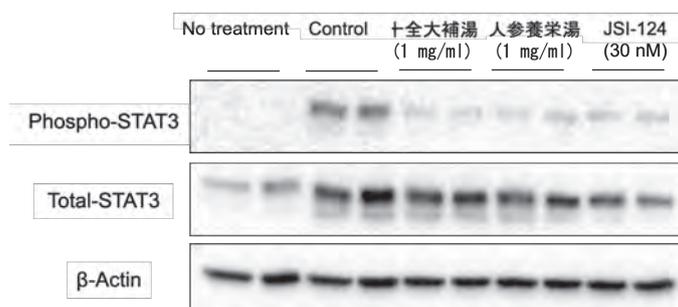


図 3. MDSC の分化培養系における STAT3 リン酸化に対する十全大補湯および人参養栄湯の作用
両方剤を IL-6 および GM-CSF 共処理し、48 時間後にリン酸化 STAT-3 を Western blot 法にて検出した。

種目 (特定研究)

十全大補湯と人参養栄湯による MDSC 分化抑制作用の機序を推定するために、MDSC の分化誘導に重要なシグナルである STAT3 の活性化すなわちリン酸化状態について調べた。両方剤あるいは陽性対照薬としての STAT3 阻害薬 JSI-124 の存在下に IL-6 および GM-CSF で分化誘導した骨髄細胞を 48 時間後に可溶化し、得られたタンパク質中の STAT3 およびリン酸化 STAT3 を Western blot 法にて検出した。その結果、両方剤はともに、JSI-124 と同様に IL-6 および GM-CSF の処理によって活性化されたリン酸化 STAT3 を著明に減少させた (図 3)。すなわち、両方剤による MDSC 分化抑制作用には、少なくとも一部、この STAT3 の活性化抑制が関わると考えられた。

さらに、十全大補湯および人参養栄湯による MDSC 分化抑制に関わる構成生薬について調べた。両方剤は、人参、当帰、蒼朮、黄耆、甘草、芍薬、地黄、茯苓および桂皮と多くの生薬が共通して含まれる。これらの共通する生薬エキスの各単味での作用を調べたが、MDSC の分化に著明な作用を示すものはなかった (データは示さず)。一方、十全大補湯だけに含まれる川芎および人参養栄湯だけに含まれる遠志で、単味エキスでの分化抑制作用が認められた (図 4)。

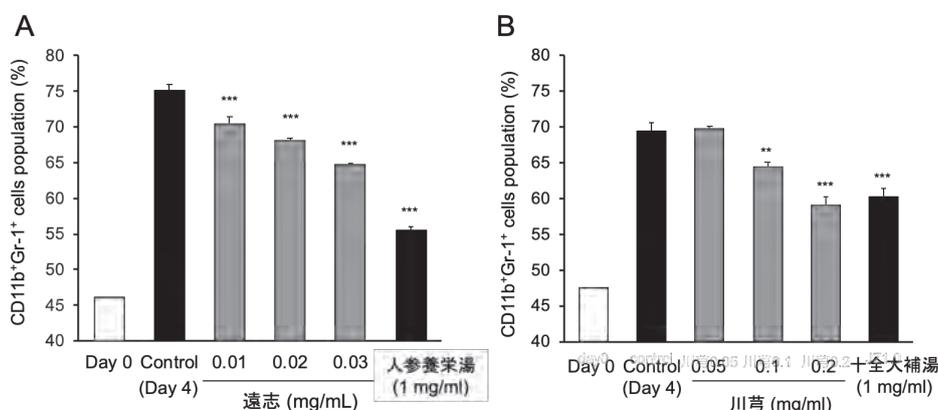


図 4. MDSC の分化に対する遠志および川芎エキスの作用
Mean ± SE (n=4)、* and ***: p<0.01 and 0.001 vs. control.

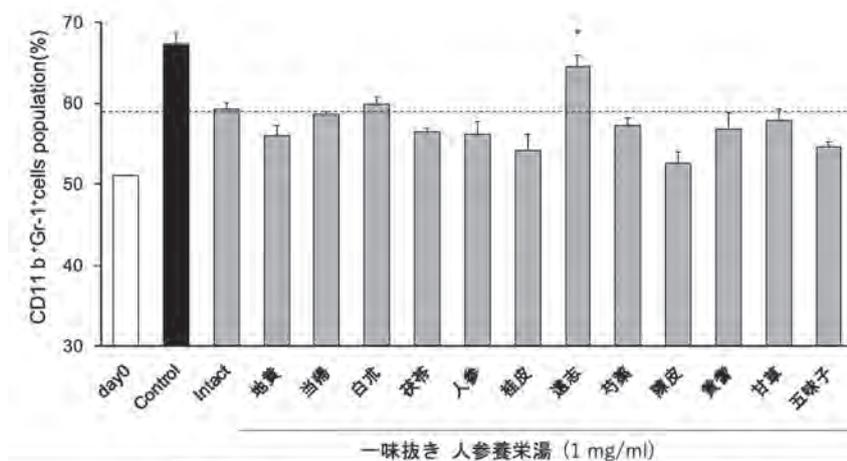


図 5. 人参養栄湯一味抜きエキスによる MDSC 分化抑制作用
Mean ± SE (n=4)、*: p<0.05 vs intact 人参養栄湯.

種目（特定研究）

さらに、人参養栄湯については、12種類の構成生薬の一味抜きエキスを調製し、その作用を調べたが、遠志抜きの方剤だけで、MDSC 分化抑制作用が消失した（図 5）。この結果より、人参養栄湯による MDSC 分化抑制作用の責任生薬は主に遠志であると推定された。

■結論

従来、補剤による腫瘍免疫の活性化作用は、in vivo の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。また、活性化される免疫細胞が方剤によって異なるなどの選択性についても、それが生じる機序は明らかでなく、臨床での適正な利用に科学的な指標を見出せずにいた。本研究では、免疫関連細胞の分化への調節作用に注目し、その手始めとしてNK 細胞と MDSC の分化に対する補剤の作用を調べた。NK 細胞の分化に対する明確な調節作用は捉まらなかったが、MDSC については十全大補湯および人参養栄湯だけに著明な分化抑制作用を見出した。MDSC は担がん状態でその産生が亢進することが知られており、T 細胞やマクロファージの活性化を強力に抑制するため、腫瘍細胞が免疫を回避するための機序として近年注目されている。十全大補湯および人参養栄湯が本細胞の分化を抑制したことは、これらの方剤によって T 細胞およびマクロファージの活性化が生じるという従来の知見ともよく付合する。興味深いことに、十全大補湯および人参養栄湯による MDSC 分化抑制作用は、STAT3 のリン酸化抑制という共通の機序を介すると推定されたものの、これを担う構成生薬としては、十全大補湯では川芎、人参養栄湯では遠志と、異なる生薬の重要性が示唆された。このことは、これら異なる生薬中に、MDSC 分化を抑制する作用を持つ類似の成分が含まれることを示唆している。

近年、DSC は担がん時だけでなく、種々の炎症性の疾患時にも増加することが知られている。MDSC 増加の病態生理学的な意義は完全には解明されていないが、MDSC の免疫抑制機能を考えると、炎症時の本細胞の増加は、生体防御反応の一種とも考えられる。しかし、特に間質性肺炎などの線維化を伴う疾患では、MDSC が線維化を促進する増悪要因であるとの報告もなされている。十全大補湯および人参養栄湯による MDSC 分化抑制によって、線維化を伴う疾患にも一定の治療効果が得られる可能性があり興味深い。