

## 略 歴

2000年	3月	宇都宮大学農学部 卒業
2002年	3月	お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 (博士前期課程) 修了
2005年	3月	お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 (博士後期課程) 修了
2005年	4月	東京女子医科大学 医学部薬理学教室 助教
2009年	5月	アメリカ国立 アレルギー感染症研究所 客員研究員
2012年	8月	独立行政法人理化学研究所 研究員
2013年	4月	岡山大学大学院 自然科学研究科 助教 (特任)
2018年	4月	岡山大学大学院 ヘルスシステム統合科学研究科 助教 現在に至る

## がんの進行に伴う免疫細胞の変化に抗酸化物質の摂食が与える影響

活性酸素種 (ROS) は、酸素の不完全な還元によって生成される化学的に活性な酸化促進剤分子である。多くのがん細胞において ROS の発生は正常細胞より亢進しているが、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) のような ROS を除去する酵素群の発現も亢進することで細胞内 ROS 濃度を制御している。しかし過剰な ROS が産生された場合、がん細胞はアポトーシスや DNA、タンパク質および脂質膜のような細胞構成物質の損傷によるネクローシスを伴う細胞死を引き起こす。実際、がん化学療法で使用される多くの抗がん剤はがん細胞内 ROS を亢進させる働きがある。そのため抗酸化物質の摂取は抗がん剤の持つ ROS 亢進作用と拮抗する可能性があり、がん治療時の抗酸化物質摂取の有効性は専門家でも議論が分かれている。一方、がん細胞の増殖によって体内に増加する骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) は ROS の発生によって活性化 T 細胞を抑制することが明らかになっており、がん細胞だけでなく免疫細胞も ROS 発生によって多くの機能や分化が制御されている可能性がある。しかし、がん細胞も免疫細胞も存在する生体において抗酸化物質がどのように作用するか、詳細な機序は明らかになっていない。そこで本研究では、抗酸化物質の摂取が免疫細胞に及ぼす影響を明らかにするための基礎として、がん形成時における免疫細胞とがん組織における抗酸化物質膜輸送体 (トランスポーター) の発現の違いとその機能について知見を得るための実験を、がんモデルマウスを用いて行った。

## 1. 研究背景と目的

高い抗酸化力をもった食品によるがん予防とがん治療への効果を期待し、開発され消費されているものの、抗酸化物質摂取によるがんへの有効性や抗癌剤との相乗効果においては是非は専門家でも未だ議論が分かれている。消費者である国民の抗酸化食品による期待と予防医学への関心の高まりからも、最新の研究技術を用いた抗酸化物質摂取のがん有効性の評価と機能の解明、および新評価系の確立が喫緊の課題である。

これまで抗酸化物質研究の多くががん細胞と抗酸化物質との直接的な作用のみに焦点を当てたものであったが、摂食した抗酸化物質はがん細胞に到達する前に腸管から吸収され血液循環へと移行するため、生体では抗酸化物質の摂取の影響はがん細胞だけでなく全身の免疫細胞も少なからず受けるはずである。がんの増殖に伴って増加する骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）によって免疫細胞によるがん殺傷能力が抑制されるが<sup>1</sup>、抗酸化物質の摂取がMDSCの増加を抑制することで免疫細胞によるがん殺傷能力が維持されることで発がんと腫瘍の増大が抑制される可能性を癌モデルマウスにおいて見出している<sup>2</sup>。しかし、抗酸化物質の摂取による免疫細胞を介したがん抑制の具体的な分子メカニズムは未だ詳細を明らかになっていない。

そこで本研究では、抗酸化物質の免疫細胞を介した腫瘍抑制メカニズムを探るために、抗酸化物質が免疫細胞と癌細胞のどちらに取り込まれやすいか、そして抗酸化物質が取り込まれた際の各細胞（免疫細胞・癌細胞）の質的・量的変化を *in vitro* 実験により明らかにし、生体で実際に抗酸化物質の摂食が免疫細胞を介した癌の縮小効果が認められるか明らかにすることで抗酸化物質による癌抑制の未知なる機構を解明することを目的に、抗酸化物質エルゴチオネイン（EGT）とN-アセチルシステイン（NAC）の膜輸送体であるOCTN1とASCT2の遺伝子発現の変化を解析した。

## 2. 研究方法

### 2-1. 実験動物

5週齢のBALB/c系統雌マウスは日本チャールズリバー社から購入し、岡山大学動物資源部門津島北施設にて、22-26℃、50%湿度、12時間照明、12時間消灯の照明サイクル下において、MF飼料（オリエンタル酵母工業社）の自由摂食および電解次亜水（NDX-65KM-H、オーク社）の自由飲水で飼育した。なお、この研究における動物実験は岡山大学動物実験委員会による審査を経て、承認を得た。

### 2-2. 細胞培養

マウスマクロファージ細胞株Raw 264.7（TIB-71）、線維芽細胞株BALB/3T3（3T3;CCL-163）、結腸腺癌細胞株CT26（CRL-2638）は、ATCCから得た。乳がん細胞株4T1-luc（JCRB1447）は、医薬基盤・健康・栄養研究所JCRB細胞バンクから購入した。B16/BL6（TKG 0598）およびB16/F10（TKG 0348）は、東北大学開発加齢医学研究所異様細胞資源センター・細胞バンクから購入した。

Raw 264.7、3T3、B16/BL6およびB16/F10は、10%(v/v)牛胎児血清(fetal bovine serum: FBS, Gibco社)および1%(v/v)抗生物質-抗真菌剤(10,000U/mlペニシリン, 10,000μg/mlストレプトマイシンおよび25μg/mlアンホテリシンB, Life Technologies社)添加Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培地(Sigma-Aldrich社)で37℃、5%CO<sub>2</sub>下のインキュベーター内(APC-30D, ASTEC社)で培養した。CT26および4T1-luc細胞は10%(v/v)FBSおよび1%(v/v)抗生物質-抗真菌剤添加Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640培地で37℃、5%CO<sub>2</sub>下のインキュベーター内で培養した。

### 2-3. 腫瘍皮下移植

CT26細胞(5×10<sup>5</sup>細胞/200μL/匹)を6週齢のマウス(メス)に皮下移植した。対照実験として、マウスにPBSのみ(200μL)を注射した。21日目にマウスを安楽死させた後、腫瘍移植および組織の摘出を行った。

### 2-4. 骨髄細胞(BM)からマクロファージへの分化

BM細胞をマウス大腿骨および脛骨から採取し、1×10<sup>5</sup>個の細胞を、50μMの2-メルカプトエタノール(ナカライテスク社)、10%(v/v)FBSおよび1%(v/v)抗生物質-抗真菌剤含有RPMI1640培地で培養した。MDSC(BM-MDSC)を得るために、BM細胞を10ng/mL GM-CSFで5日間培養した<sup>3</sup>。BM由来マクロファージ(BM-Mφ)を得るために、BM細胞を10ng/mL M-CSFで2日間培養した後、10ng/mL M-CSFを含む半量の培地を添加し、さらに3日間培養した<sup>4</sup>。

### 2-5. 細胞内ROSレベルの検出

フローサイトメトリーによる細胞中ROS(過酸化水素)の検出は、は以前報告した方法で行った。[9, 22]。端的にPBSで洗浄した後、細胞をフェノールレッド非含有HBSS(ナカライテスク社)に2.5μMのROS検出試薬CM-H<sub>2</sub>DCFDA(Thermo Fisher Scientific社)とともに37℃で30分間インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し5mM EDTAで細胞を剥離した後、1500rpmで5分間遠心し、フローサイトメトリー用FACSバッファー(2%FBSおよび1mM EDTAを含むPBS)で再懸濁して検出した。

### 2-6. フローサイトメトリー

細胞染色は以前報告した方法で行い<sup>1</sup>、蛍光染色細胞解析装置(AccuriC6, BD Biosciences社)を用いて検出し、FlowJoソフトウェア(ver. 7.6, Tree Star社)を用いて解析した。

### 2-7. 定量的リアルタイムPCR

RNeasy<sup>®</sup> Mini

Kitを(Qiagen社)を使用して全RNAを抽出し、ゲノム除去とcDNA合成をReverTra Ace<sup>®</sup>(TOYOBO社)を用いて行った。

リアルタイムPCRは、Luna<sup>®</sup> Universal qPCR Master Mix(New England Biolabs社)を用い、LightCycler<sup>®</sup> 96システム(Roche Diagnostics社)を用いて測定した。使用したPCRプライマー配列は、ASCT2(mASCT2F 5'-CATCATCCTGGAAGCAGTCA-3'; mASCT2R 5'-CCTTCCACGTTGAGGACAGT-3'); OCTN1(mOCTN1F 5'-GGAACATTGCCACCAT

AACC-3'; mOCTN1R 5'-AGAGCAAAGTAACCCACTGAGG-3');  $\beta$ -アクトン (m $\beta$ -ActinF5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'; m $\beta$ -ActinR5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3')。  $\beta$ -アクトンを用いて相対的な発現レベルを比較し、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を使用して定量化した。

## 2-8. 統計解析

標準誤差算出と有意差検定は、GraphPad Prism version 9 software package (GraphPad Software 社)で行った。2群間の統計解析はスチューデントの *t* 検定またはウェルチの *t* 検定で解析を行った。グラフ値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。P 値が0.05以下の時に有意差があると判断した。

## 3. 結果

### 3-1. マウス骨髄細胞由来MDSCはOCTN1もASCT2も高発現している

マウスマクロファージのOCTN1発現はCD4<sup>+</sup>T細胞に比べ有意に高いことが知られているものの<sup>4</sup>、MDSC細胞のOCTN1発現に関する検討はない。そこでマウス骨髄細胞をMDSCに分化させた時のOCTN1発現をASCT2発現とともに解析した。

骨髄細胞をM-CSF添加条件で培養した培養細胞はマクロファージに高発現するMHCクラスII (MHCII)を高発現する一方で、骨髄細胞をGM-CSF添加条件で培養した細胞は、MDSC細胞マーカーであるARG1の高発現が認められた。これにより骨髄細胞からそれぞれマクロファージ様細胞 (BM-M $\phi$ )とMDSC様細胞 (BM-MDSC)が得られた事を確認した (図1. A, B)。そしてBM-MDSC細胞のOCTN1およびASCT2発現はBM-M $\phi$ よりも有意に高いことが明らかとなった (図1. C, D)。この結果はMDSCが他の免疫細胞よりも積極的にEGTを取り込むことでROSの制御ができる可能性があることを示唆した。

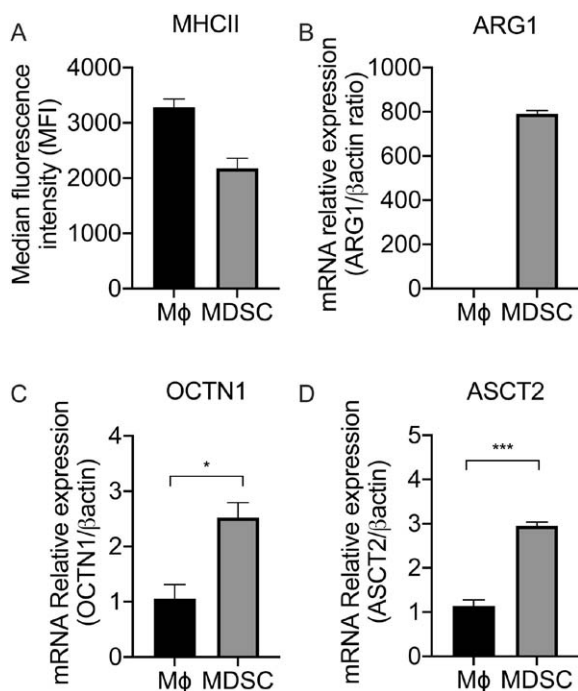


図1. 骨髄由来分化細胞のトランスポーター発現。BALB/cの骨髄細胞を摂取し、M-CSFあるいはGM-CSF存在下の培地で5日間培養後、(A)抗MHCクラスII (MHCII)抗体を用いFACSでマクロファージ (M $\phi$ )の分化マーカーであるMHCクラスII平均蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定した。また、(B)MDSC分化マーカーであるArginase-1 (ARG)の発現量をqPCR法により測定した。この細胞の全mRNAを抽出し、OCTN1 (C)およびASCT2 (D)の遺伝子発現をqPCR法により定量化した。

\**p* < 0.05; \*\*\**p* < 0.001; *n* = 4/group.

### 3-2. LPS 刺激によりマクロファージ培養細胞 (RAW264.7) の OCTN1 発現は増加する

次に MDSC と近縁であるマクロファージ系培養細胞である RAW264.7 を用いて様々な LPS 濃度刺激から 24 時間後の OCTN1 発現を ASCT2 発現とともに解析した。OCTN1 発現は LPS 濃度に依存して発現が増え、そして 0.5 $\mu$ g/ml 以上では飽和に達し、発現が抑制された一方で (図 2. A)、NAC のトランスポーター ASCT2 発現は LPS 濃度に依存し発現が減少した (図 2. B)。このように LPS 刺激による OCTN1 の発現は ASCT2 とは全く異なるため、抗酸化物質であっても EGT によって細胞が受ける影響や機能は NAC 等の他の抗酸化物質とは異なる可能性が示唆された。

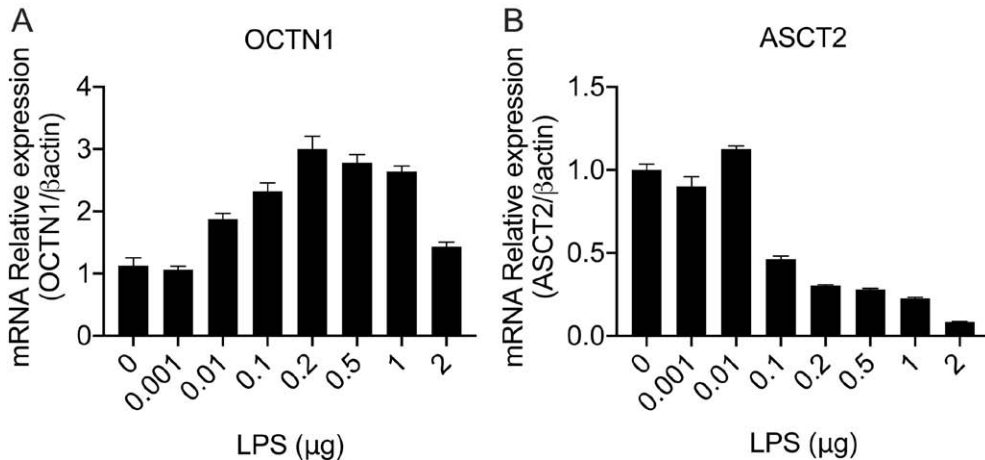


図 2. LPS 刺激によるトランスポーターの遺伝子発現。

RAW264.7 を LPS (0~2 $\mu$ g/mL) 存在下の培地で 24 時間培養後、OCTN1 (A) ASCT2 (B) の遺伝子発現量を qPCR 法にて測定し定量した。

### 3-3. マクロファージ培養細胞 (RAW264.7) の OCTN1 発現は IL-4 濃度に依存する

様々なサイトカインが免疫細胞だけではなく腫瘍微小環境にも存在しているが、その中でも抗炎症性サイトカインである IL-4 は腫瘍内および末梢血中に多く存在し、受容体を介して MDSC 細胞の蓄積に積極的に関与し MDSC による抗腫瘍免疫の抑制を担うとの報告がある<sup>5</sup>。しかし一方で、MDSC の機能は IL-4 に依存しないとも報告されている<sup>6</sup>。様々なサイトカインの分泌によって MDSC が

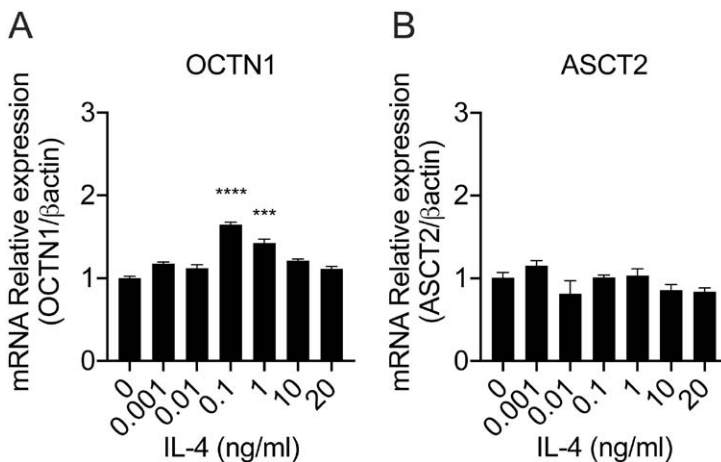


図 3. IL-4 添加時のトランスポーターの遺伝子発現。

RAW264.7 を IL-4 (0~20 $\mu$ g/mL) 存在下の培地で 24 時間培養後、OCTN1 (A) ASCT2 (B) の遺伝子発現量を qPCR 法にて測定し定量した。

\*\*\* $p$  < 0.001 ; \*\*\*\* $p$  < 0.0001  
n = 4/group.

蓄積しやすい腫瘍微小環境下においてどのように抗酸化物質の影響を受けるかを予想するために、IL-4 存在時における MDSC の抗酸化物質トランスポーター発現の変化を、RAW264.7 を用いて解析した。OCTN1 発現は IL-4 濃度が 0.1 $\mu$ g/ml の時に最も発現が上昇した (図 3. A)。しかし様々な LPS 濃度刺激をした時の ASCT2 発現は IL-4 濃度に依存しなかった (図 3. B)。

### 3-4. がん細胞株の OCTN1 および ASCT2 発現

線維芽細胞および各がん細胞株から全 mRNA を抽出し、OCTN1 および ASCT2 の遺伝子発現を定量した。図 4 のように線維芽細胞 (3T3) と比べ、大腸がん細胞 (CT26) や肺がん細胞株 (LLC) の OCTN1 発現は顕著に高い一方で (図 4. A)、メラノーマ細胞 (B16/BL6 および B16/F10) では ASCT2 の発現が顕著に高かった (図 4. B)。

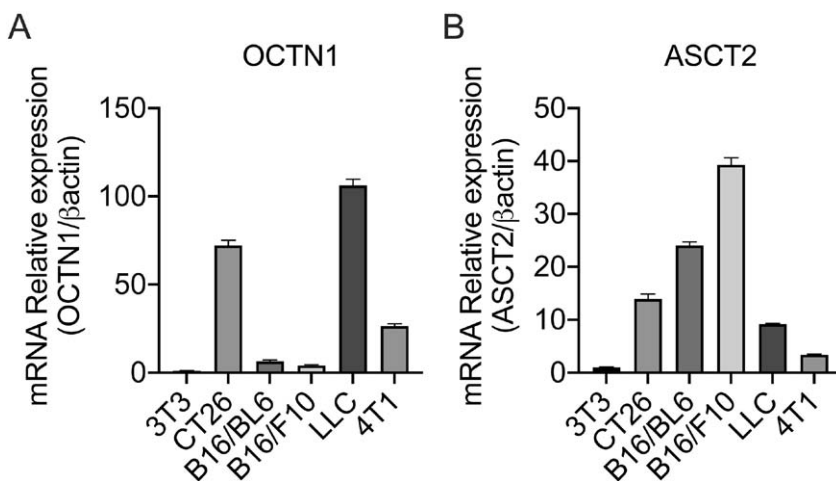


図 4. がん細胞株のトランスポーター発現.

線維芽細胞 3T3 及び各がん細胞株の ASCT2 発現量を qPCR 法により測定した。がん細胞株には、大腸がん細胞株 CT26、メラノーマ細胞株 B16/BL6、メラノーマ細胞株 B16/F10、肺がん細胞株 LLC、乳がん細胞株 4T1 を用いた。

### 3-4. がん形成で脾臓内 MDSC 細胞以外の免疫細胞の OCTN1 発現が上がる

図 4 の結果を踏まえ、生体におけるがん細胞と免疫細胞の OCTN1 発現を比較するために、転移性がなく OCTN1 発現の高い CT26 を皮下移植することで異種異所性移植モデルを作成した。MDSC 細胞はヘテロな CD11b<sup>+</sup> 細胞集団で主に Gr-1<sup>high</sup> Ly6G<sup>+</sup> と Gr-1<sup>dim</sup> Ly6G<sup>-</sup> の細胞集団に分類される<sup>1</sup>。CT26 非移植 (sham) 群と CT26 移植群の脾臓の Gr-1<sup>high</sup> Ly6G<sup>+</sup>、Gr-1<sup>dim</sup> Ly6G<sup>-</sup> の OCTN1 遺伝子発現に有意差はなく (図 5. A, B)、Gr-1<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> において CT26 移植群の発現が有意に増加した (図 5. C)。ここで示される Gr-1<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> は主に MDSC 細胞以外の免疫細胞だと考えられ、この結果はがんに伴い MDSC 細胞以外の細胞の OCTN1 発現が増加することを示した。

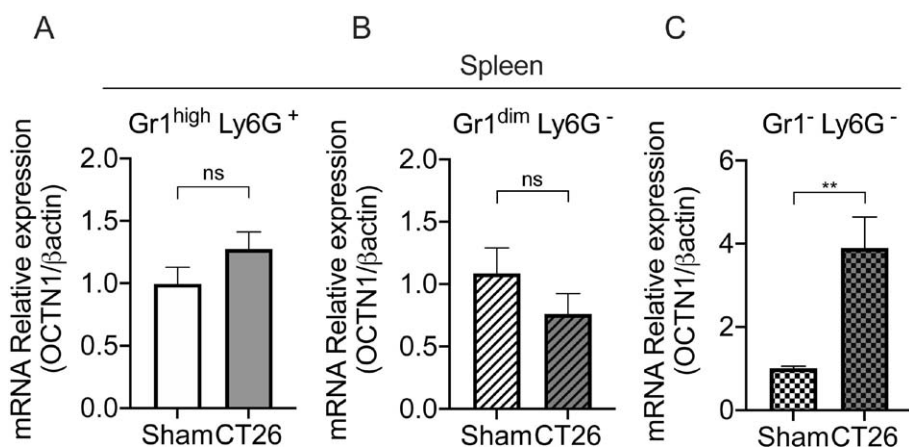


図5. がん形成に伴い免疫細胞のOCTN1発現が増加する。

BALB/c マウスに大腸がん細胞株 CT26 を移植し、3 週間後に脾臓を摘出した。MDSC isolation キットにより脾臓から抽出した Gr-1<sup>high</sup> Ly6G<sup>+</sup> (A)、Gr-1<sup>dim</sup> Ly6G<sup>-</sup> (B) および Gr-1<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> (C) の OCTN1 遺伝子発現量を qPCR 法により測定し定量した。

\*\*p<0.01; ns=有意差なし; n=8/group.

### 3-5. がんマウスの脾臓内とがん組織で MDSC の OCTN1 発現は変化しない

CT26 移植群の脾臓とがん組織を摘出後、脾臓とがん組織由来の MDSC の OCTN1 遺伝子発現量を比較した。脾臓とがん組織内の2つの MDSC 集団は Gr-1<sup>high</sup> Ly6G<sup>+</sup> と Gr-1<sup>dim</sup> Ly6G<sup>-</sup> の両群ともに差は見られなかった。この結果から組織局在による MDSC の OCTN1 遺伝子発現に変化は起こらないことが明らかになった (図6. A, B)。

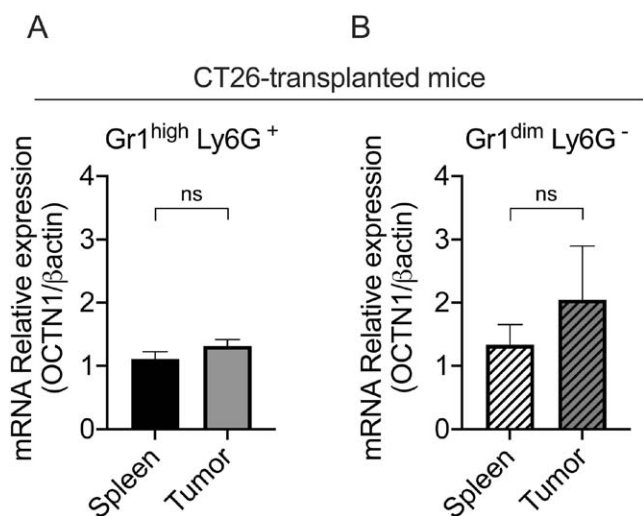


図6. MDSC の OCTN1 遺伝子発現は局在する組織によって変化しない。

BALB/c マウスに大腸がん細胞株 CT26 を移植し、3 週間後にがん組織を摘出した。MDSC isolation キットによりがん組織から抽出した Gr-1<sup>high</sup> Ly6G<sup>+</sup> (A) および Gr-1<sup>dim</sup> Ly6G<sup>-</sup> (B) の OCTN1 遺伝子発現量を qPCR 法により測定し定量した。

ns=有意差なし; n=12/group.

### 3-6. がん移植によって OCTN1 遺伝子発現は変化しない

CT26 移植群のがん組織から2つの MDSC 集団 (Gr-1<sup>high</sup> Ly6G<sup>+</sup> および Gr-1<sup>dim</sup> Ly6G<sup>-</sup>) と Gr-1<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> に分離し、それぞれの OCTN1 遺伝子発現を定量し比較したところ、Gr-1<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> 群の発現が有意に高かった (図7. A)。ここで示される Gr-1<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> 群は少量の免疫細胞も含まれるが主にがん組織であると考えられ、この結果はがん組織においてがん細胞のほうが MDSC よりも

OCTN1 遺伝子発現が高いことを示した。また、CT26 移植前の CT26 株と CT26 移植マウスから抽出したがん組織における OCTN1 遺伝子発現は等しく、移植によって OCTN1 発現が変化することはないことが明らかになった (図 7. B)。

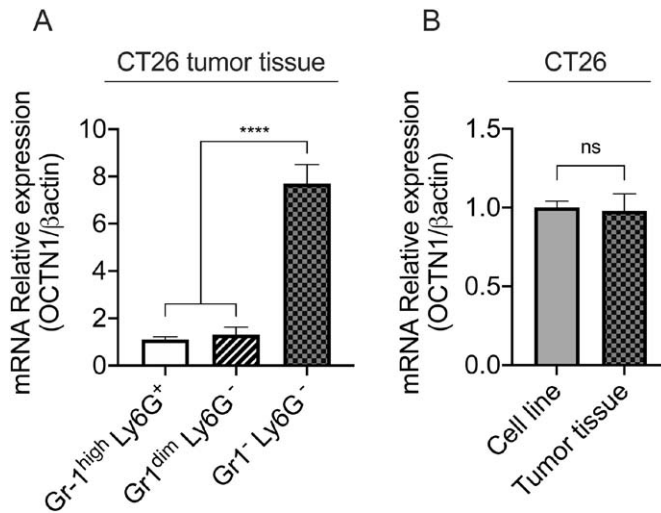


図 7. がん組織内の OCTN1 発現.

BALB/c マウスに大腸がん細胞株 CT26 を移植し、3 週間後に脾臓を摘出した。MDSC isolation キットにより脾臓から抽出した Gr-1<sup>high</sup> Ly6G<sup>+</sup> (A)、Gr-1<sup>dim</sup> Ly6G<sup>-</sup> (B) および Gr-1<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> (C) の OCTN1 遺伝子発現量を qPCR 法により測定し定量した。

\*\*p < 0.01 ; n = 8/group.

### 3-7. EGT によって LPS 刺激による ROS 産生は抑制される。

図 2 に示したように、RAW264.7 の OCTN1 発現は LPS 刺激により増加する。この時 RAW264.7 の ROS 産生量は LPS 刺激濃度依存的に増加した (図 8. A)。LPS を刺激前に RAW264.7 に EGT を添加すると細胞の ROS 産生量は劇的に抑制できることが明らかになった (図 8. B)。

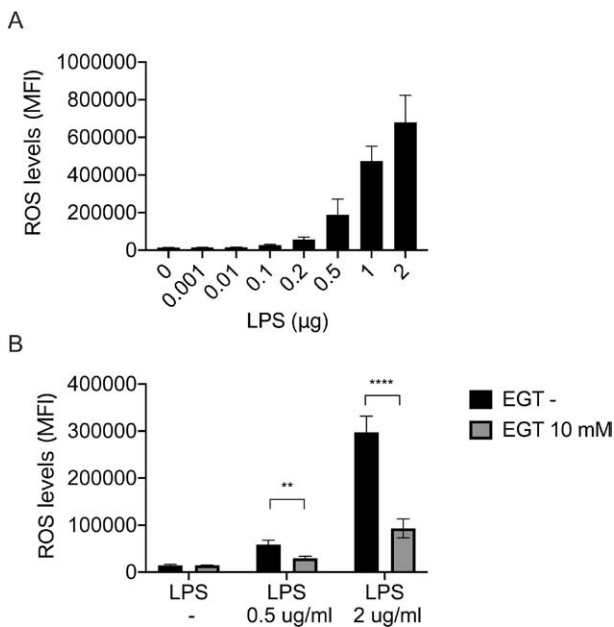


図 8. EGT による LPS 刺激時の細胞内 ROS 量. (A) RAW264.7 を LPS (0 ~ 2  $\mu$ g/mL) 存在下で 24 時間培養後、細胞内 ROS 量 (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) をフローサイトメトリーにて測定した。(B) RAW264.7 に 10mM の EGT を 1 時間添加後、LPS 存在下で 24 時間培養後、細胞内 ROS 量 (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) をフローサイトメトリーにて測定した。

\*\*p < 0.01 ; \*\*\*p < 0.001 ; n = 12/group.



## 4. 考察

EGTは食用キノコや藻類に含まれるヒト体内では生合成できない水溶性抗酸化物質として注目されている。ビタミンCやビタミンEのように細胞内に存在する脂質過酸化反応(Lipid peroxidation)の停止に必須の分子ではないが、細胞膜に存在する膜輸送体(トランスポーター)を介して消化管から体内に取り込まれ、腎臓で再吸収されながらも体内の各組織に安定して存在しているため、体内において重要な役割を担っている可能性がある。実際にリウマチ性関節炎やクローン病など多くの炎症性疾患とOCTN1発現に関連性があるとの報告がある一方で、EGTを取り込むことができないOCTN1ノックアウトマウスでは表現型が見られないなど未だ不明な点が多く、がん疾患とEGTとの関連もほとんど解っていない。

MDSCは正常時には血中にほとんど存在しないが、がん罹患時に血中および腫瘍微小環境内に多く出現することで抗腫瘍に働く免疫細胞の不活性化やがん細胞にとって成長因子となりうるサイトカインを分泌することでがんの増殖や悪性化に関与している幼稚なミエロイド系免疫細胞である。MDSCを抑えることで抗腫瘍活性が維持できるため、MDSCを抑制するための様々な試みが行われている。MDSCはROS産生量に伴い活性化するため、ROSの制御はがん成長そのものを左右する可能性がある。しかしMDSCのOCTN1発現もEGT取り込み能についての報告は未だない。そこで我々は本研究において、がん細胞とMDSCにおけるOCTN1遺伝子発現を明らかにすることでEGTの細胞内取り込み能の推察を試みた。

本研究でMDSCのOCTN1遺伝子発現は高発現と報告されているマクロファージより有意に発現が高いことを示した(図1. C)。しかし用いた骨髄由来の分化細胞は組織由来のMDSCやマクロファージとは分化マーカーの発現強度が異なるため、がん細胞とMDSCのOCTN1発現強度を比較するためにはマウス生体からがん組織と全身性の免疫細胞が多く存在する脾臓を摘出し、それぞれからMDSCを分離することでOCTN1発現を測定する必要があった。OCTN1は消化管に多く存在することで食物由来のEGTを取り込むため、大腸がん細胞であるCT26においてもOCTN1の発現が高いが(図3. A)、MDSCのOCTN1発現は脾臓内でも腫瘍微小環境でもCT26よりずっと低いため(図7. A)、もしOCTN1発現がEGT取り込み能と正の相関を示すならば、EGTは大腸がんの代謝亢進や抗がん剤投与時のROSストレス軽減を担うことでがんの増殖を助ける役割があるのかもしれない。一方で、OCTN1発現の低いメラノーマ細胞ではEGTは積極的にMDSCのROS消去を担うことでMDSCの増殖を抑え、がん増殖を抑制する役割があるかもしれない。しかし培養細胞を用いた検討では、OCTN1の発現強度に関わらずEGTは細胞内のROSを消去することができるので(図8. A, B)、今後がん細胞とMDSCやがんに伴いOCTN1発現が増加する免疫細胞が存在した時にEGTがどの細胞に積極的に取り込まれどのような機能が見られるのか試験管内試験で詳細に明らかにしていきたい。また、定常状態にCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞のOCTN1はほとんど発現していないが、本研究によってがん増殖に伴いMDSCよりもOCTN1発現が上昇する免疫細胞が存在することが明らかになった(図5. C)。今後、がん増殖によってOCTN1発現が増加する免疫細胞を解明していきたい。

## 5. 謝辞

研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人アサヒグループ学術振興財団に厚く感謝申し上げます。

## 6. 文献

1. Masuda, J. *et al.* Tumor growth limited to subcutaneous site vs tumor growth in pulmonary site exhibit differential effects on systemic immunities. *Oncol. Rep.* **38**, 449–455 (2017).
2. Masuda, J. *et al.* Dietary Supplementation of Selenoneine-Containing Tuna Dark Muscle Extract Effectively Reduces Pathology of Experimental Colorectal Cancers in Mice. *Nutrients* **10**, 1380 (2018).
3. Lee, C. R., Lee, W., Cho, S. K. & Park, S. G. Characterization of multiple cytokine combinations and TGF- $\beta$  on differentiation and functions of myeloid-derived suppressor cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 869 (2018).
4. Yoshida, S. *et al.* The anti-oxidant ergothioneine augments the immunomodulatory function of TLR agonists by direct action on macrophages. *PLoS One* **12**, e0169360 (2017).
5. Mandruzzato, S. *et al.* IL4R $\alpha$  + Myeloid-Derived Suppressor Cell Expansion in Cancer Patients. *J. Immunol.* **182**, 6562–6568 (2009).
6. Sinha, P., Parker, K. H., Horn, L. & Ostrand-Rosenberg, S. Tumor-induced myeloid-derived suppressor cell function is independent of IFN- $\gamma$  and IL-4R $\alpha$ . *Eur. J. Immunol.* **42**, 2052–2059 (2012).