

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08854

研究課題名(和文) リポソーム誘導B7-H3陽性MDSCの誘導機序とT細胞抑制機序の分子基盤の究明

研究課題名(英文) Search into the mechanism of B7-H3 expressing MDSC generation by liposome and its T cell suppression

研究代表者

東 寛 (Azuma, Hiroshi)

旭川医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：00167909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：リポソーム粒子をラットに静注すると脾臓内にT細胞の増殖を抑制する細胞が一過性に誘導される。この細胞は、リポソームを捕捉した脾マクロファージで、T細胞の抑制にはcell-to-cell contactが必要であり、直接的なエフェクターはnitric oxideである。B7-H3分子がその細胞表面マーカであり、iNOSが陽性で、NFkB及びMAP kinaseが活性化している。以上より、当該細胞は、腫瘍組織内に出現しているB7-H3陽性の骨髄由来免疫抑制性細胞(MDSC)と類似していると結論された。また、リポソーム粒子は主として、マクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれる実験結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リポソーム粒子が免疫抑制性細胞を誘導しうる事は、リポソームの薬理作用として新規の発見であり、リポソーム粒子を含むナノ粒子の免疫機能への影響に関する新たな研究に繋がる可能性がある。また、リポソームが脂質二重膜の小胞で、細胞膜由来のmicrovesicle(MV)と類似するので、本成果は、生体内でMVを捕捉したマクロファージがMDSC様細胞に変化する事を示唆する。この事と、MDSC内には脂質の蓄積があるという最近の報告から、担がん状態におけるMDSC誘導機序の一つとして、腫瘍周辺のマクロファージががん細胞由来のMVを捕捉して脂質を蓄積し、MDSC様に変化するという仮説を立てることができた。

研究成果の概要(英文)：We found that injection of liposome into rat transiently induce accumulation of cells in spleen that have the potential to suppress T cell proliferation. These cells are splenic macrophages which internalized liposome and expressed B7-H3 molecule on their surface. Execution of the suppressive function require cell-to-cell contact and the direct effector for suppression is nitric oxide. They are positive for iNOS. NFkB and all MAP kinase (ERK1/2, JUK, and p38) were shown to be activated. Based on these findings, we concluded that these cells are similar to B7-H3 positive myeloid derived suppressor cells(MDSC) which infiltrated in the tumor. In addition, we found that the main pathway for the endocytosis of liposome used in the experiment is macropinocytosis.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：MDSC liposome fatty acid NFkB macrophage MAP kinase micro vesicle ER stress

1. 研究開始当初の背景

我々はヒト Hb 分子をリポソーム内部に包埋した人工赤血球(Hb vesicle)の生体適合性を検討する中で、本剤を投与したラットの脾臓内に T 細胞の増殖を強力に抑制する機能を持つマクロファージが誘導されるという極めてユニークな現象を見出していた。そのマクロファージはリポソームを捕捉したマクロファージであり、T 細胞の増殖抑制には **cell-to-cell contact** が必要で、直接的なエフェクターは **Nitric oxide(NO)**であった¹⁾。その後の解析では、リポソーム投与後の脾細胞では **iNOS** が誘導されている事、同時に **iNOS** の転写因子の一つである **NFκB** が活性化されていることを示す結果が得られていた。これらの事から、当該マクロファージがいわゆる **Myeloid derived suppressor cell (MDSC)**と類似の細胞である事が示唆されていた。同時に、実験に使用したリポソームの主成分が長鎖脂肪酸(**Dipalmitoyl phosphatidyl choline; DPPC**)である事、異なる長鎖脂肪酸(**Dipalmitoyl phosphatidyl serine; DPPS**)を主成分とするリポソームでも **MDSC** 様活性を誘導する事が示された事から、一連のデータは、長鎖脂肪酸が **MDSC** の誘導に関与していることを示しているとして論文化した²⁾。一方、脾細胞の **flow cytometer** を用いた解析から、リポソームを投与すると脾臓マクロファージの一部がその細胞表面に **B7-H3 (CD276)** 分子を発現する事も見出していた。この **B7-H3** を発現している細胞が T 細胞の抑制に関与しているのか、またそうだとすると、この当該細胞内で **NFκB** が活性化し **iNOS** が検出されていることを示すことができれば、リポソーム粒子の投与により **B7-H3** を表面マーカーとして持つ **MDSC** 様細胞が誘導されている事を示す事ができると思われた。こうした背景を元に、2019 年度に本研究がスタートした。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに本研究は以下の事柄を検討することを目的とした。

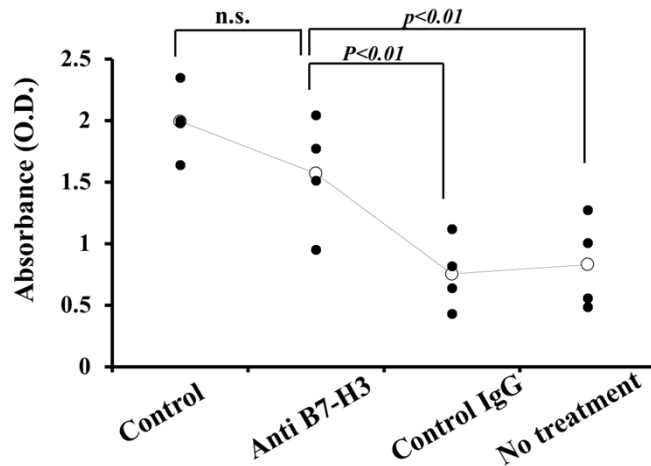
- (1)リポソームにより誘導される T 細胞の増殖を抑制する機能を獲得したマクロファージ (MDSC 様細胞) と **B7-H3** 分子を発現したマクロファージが同一のものであるか
- (2)**B7-H3** 陽性マクロファージでは **NFκB** の活性化と **iNOS** の誘導があるか
- (3) **NFκB** 経路以外の刺激伝達経路 (**MAP kinase**) が活性化しているかどうか
- (4)リポソームの細胞内取り込み (**Endocytosis**) が如何なる経路で行われているか

3. 研究の方法

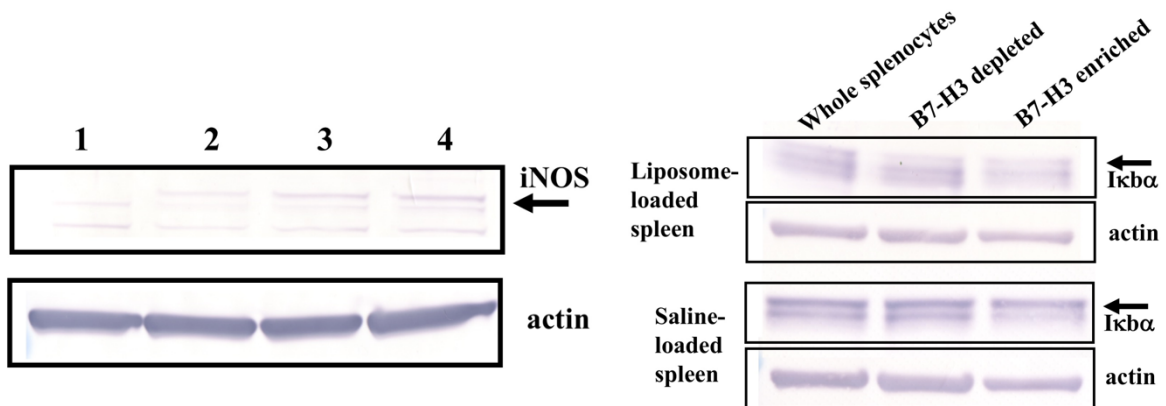
- (1) ラットにリポソーム懸濁液を静注して、翌日に脾臓を摘出し、10% FCS 添加 **RPMI1640** にて単細胞浮遊液($1 \times 10^6/ml$)を調整した。この脾細胞浮遊液を 96 穴マイクロプレートに分注し、**Concanavalin A (Con A)** の存在下に培養し、T 細胞の増殖を **BrdU** の細胞内取り込みにてアッセイするキットを用いて検討した。その際に
 - ① 培養系に **recombinant B7-H3(Fc Tag)** を添加し、**B7-H3** と T 細胞との接触をブロックすることにより、T 細胞の増殖抑制が解除されるか否かを検討した。
 - ② リポソーム懸濁液を静注後の脾臓より得られた脾細胞浮遊液から、磁気ビーズを用いて **B7-H3** 陽性細胞を除去したのち、**Con A** 存在下で培養し、T 細胞の増殖抑制が解除されるか否かを検討した。
- (2) リポソームを投与したラットの脾細胞では、**NFκB** の活性化と **iNOS** が検出されていたが、**B7-H3** 陽性マクロファージにおいて同様の事が示されるか否かを検討するために、リポソームを投与したラット由来の脾細胞より、磁気ビーズを用いて **B7-H3** 陽性細胞を分離し、分離した細胞において、**NFκB** の活性化と **iNOS** の存在を検討した。
 - ① **NFκB** の活性化は **Western blot** 法を用いて **Iκba** の **degradation** を検出してその指標とした。
 - ② **iNOS** の検出は **Western blot** 法を用いて行った。
- (3) マウスマクロファージ細胞株 **RAW264.7** がリポソームを取り込むことが判明したので、この細胞を用いて、**NFκB** 以外の刺激伝達経路として、古典的 **MAP kinase** である **ERK1/2**、ストレス応答性 **MAP kinase** である **JNK**, **p38 MPK** の活性化について、それぞれのリン酸化の有無を **Western blot** 法にて検討した。
- (4) **DiI(DiIC₁₈(3))**により蛍光標識したリポソーム粒子の **RAW264.7** 細胞への取り込みをフローサイトメーターにて検討する実験系を確立した。その系を用いてリポソーム粒子の **RAW264.7** 細胞への取り込み (**Endocytosis**) が、効果的に抑制できる **endocytosis** 抑制剤を検索した。用いた抑制剤は、**Chlorpromazine**, **Cytochalasin D**, **Amiloride(EIPA)**で、それぞれ、**Pinocytosis**, **Macropinocytosis**, **Macropinocytosis** と **Phagocytosis** を抑制するとされている。**Alexa Fluor 647** 標識高分子デキストラン及び **FITC** 標識 **Zymosan** 粒子をそれぞれ **Macropinocytosis** 及び **Phagocytosis** の陽性コントロールとして用いた。

4. 研究成果

- (1) リポソームを捕捉したマクロファージの細胞表面に発現してくる B7-H3 の Recombinant B7-H3(Fc Tag)を用いて、当該マクロファージと T 細胞との B7-H3 分子を介した cell-to-cell contact を阻害することにより T 細胞増殖抑制の解除を試みたが、抑制の解除を観察できなかった。しかしながら、磁気ビーズを用いてリポソーム静注後の脾細胞より B7-H3 陽性細胞を除去すると T 細胞増殖の抑制が有意に解除する事が示された。従って、B7-H3 が抑制機能の発現に関与しているのか否かは不明のままだが、少なくとも、リポソームを捕捉して B7-H3 陽性となったマクロファージが T 細胞増殖抑制能を有している事を明らかにすることができた。



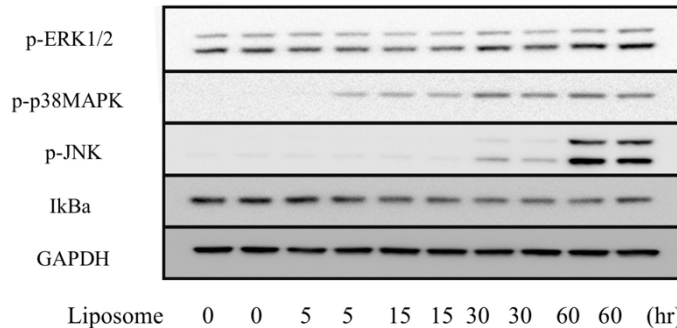
- (2) B7-H3 陽性細胞分画においても *Iκbα* の分解が生じている事が示された(下図右)。また、脾臓細胞から B7-H3 陽性細胞を除去すると iNOS を示すシグナルが減少する事が示された。これらの結果から B7-H3 陽性細胞では NFκB が活性化し、iNOS 蛋白が誘導されている事が明らかになった(下図左)。これらの結果から、(1)の結果と合わせて、リポソームにより誘導される T 細胞増殖抑制活性を有する細胞が、MDSC、特に M-MDSC の定義によく当てはまる特徴を有している事が明らかとなった。B7-H3 陽性 MDSC は、腫瘍組織内部に存在するとの報告があることから、一連の実験結果から、少なくともラットにおいては、リポソームの投与により、B7-H3 陽性 MDSC 様細胞が生体内に誘導できると言える。



Lane 1: saline- loaded spleen
 Lane 2: B7-H3 positive cell depleted liposome-loaded cells
 Lane 3: B7-H3 positive cell depletion using control antibody
 Lane 4: liposome-loaded spleen

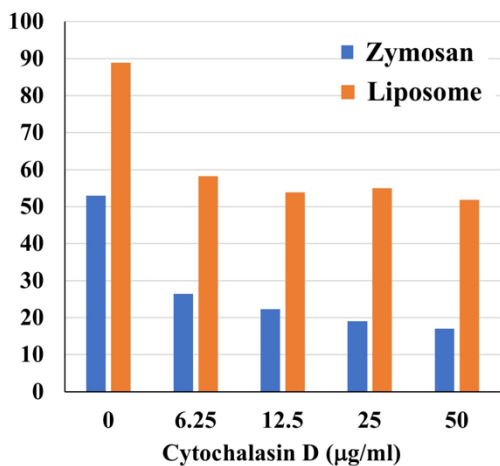
- (3) リポソームの細胞内への取り込みにより 3 種類の MAP kinase (ERK1/2, p38MAPK, JNK) の活性化が生じているか否かを検討した結果、投与後数時間で、それぞれのリン酸化が生じる事が示された。すなわち 3 種類の MAP kinase も NFκB と同様に活性化される事が判明した。実験はマウス細胞株 RAW264.7 を用いているが、生体内のマクロファージでも同様の事が生じている可能性があると考えられる。

RAWcell(マクロファージ) のリポソーム取り込みによる NFκB/MAPK活性化

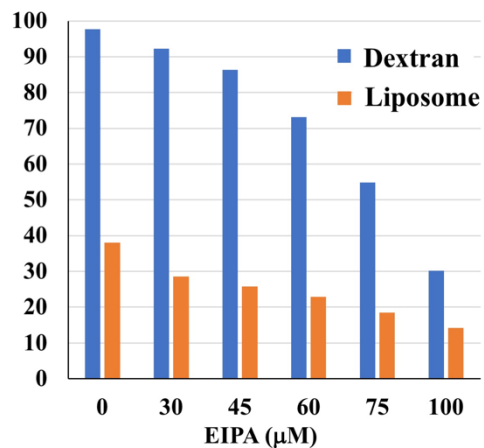


- (4) Chlorpromazine では、細胞障害を誘発しない濃度において、リポソーム粒子の取り込みの抑制を認めなかった。一方、Cytochalasin D 及び EIPA によりリポソーム粒子の取り込みが濃度依存性に抑制された (下図)。Cytochalasin D は actin の重合を阻害して Phagocytosis と Macropinocytosis の両方を抑制する。これに対し、EIPA は、actin への作用の無い、Macropinocytosis 特異的阻害剤であるとされている。従って、得られた実験結果は、リポソーム粒子が、主として Macropinocytosis を介して RAW264.7 細胞に endocytosis されることを示していると考えられる。

Effect of Cytochalasin D on uptake of liposomal particle and Zymosan by Raw cells



Effect of EIPA on uptake of liposomal particle and Dextran by Raw cells



上記の結果を含めた一連の結果を総合すると、少なくともラットにおいては、リポソーム粒子の生体内投与により B7-H3 陽性 MDSC 様細胞が誘導される事の確認を得ることが出来た。また、その機序として以下の事柄が生体内で起こっていると推定できる。生体内において、マクロファージが主として Macropinocytosis を介してリポソーム粒子を捕捉し、種々の刺激伝達経路が活性化され、B7-H3 の細胞表面への発現が誘導される。同時に、NFκB の活性化が iNOS の誘導に寄与し、NO の産生に繋がっていると考えられる。Recombinant B7-H3(Fc-Tag) により T 細胞増殖の抑制機能は解除できなかったが、B7-H3 分子の機能に関しては今後のさらなる検討が必要である。

リポソーム粒子を取り込んだマクロファージ内には、その構成成分である長鎖脂肪酸が大量に蓄積する。このことは、脂質の蓄積がマクロファージの MDSC 様細胞への変化(T 細胞増殖抑制機能の獲得)に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。一方、リポソームは脂

質二重膜の小胞であり、細胞膜由来の *microvesicle* と構造的に類似しているとも考えられる。従って、得られた実験結果は、腫瘍細胞由来の *microvesicle* をマクロファージが取り込む事により、脂質が蓄積し、MDSC 様機能を持つ細胞に変化する可能性のあることを示唆している。(1),(2)で得られた結果は、長鎖脂肪酸の蓄積と MDSC 細胞の誘導の関連を論じた論文として発表した³⁾。結果の (3), (4)に関しては、さらなる検討を加えて、論文化する予定である。

<引用文献>

1. Takahashi D, Azuma H, Sakai H, et al. Phagocytosis of liposome particles by rat splenic immature monocytes makes them transiently and highly immunosuppressive in *ex vivo* culture conditions. *J. Pharmacol Exp Ther* 337, 2011: 42-49. doi: 10.1124/jpet.110.172510
2. Azuma H, Yoshida Y, Takahashi H, et al. Liposomal microparticle injection can induce myeloid-derived suppressor cells (MDSC)-like cells *in vivo*. *Immunopharm Immunot* 39, 2017: 140-147. doi.org/10.1080/08923973.2017.1306867
3. Yoshida Y, Nagamori T, Ishibazawa E et al. Contribution of long-chain fatty acid to induction of myeloid-derived suppressor cell (MDSC) like cells - induction of MDSC by lipid vesicles(liposome). *42*, 2020: 614-624. doi: 10.1080/08923973.2020.1837866

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Yoshida Y, Nagamori T, Ishibazaawa E, Kobayashi H, Kure T, Sakai H, Takahashi D, Fujihira F, Azuma h | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 Contribution of long-chain fatty acid to induction of myeloid-derived suppressor cell (MDSC)-like cells- Induction of MDSC by lipid vesicles (liposome) | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY | 6. 最初と最後の頁 614-624 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/08923973.2020.1837866 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 東 寛、酒井 宏水 |
| 2. 発表標題 HbVを構成しているリポソームの細網内皮系細胞への取り込み機序の検討 |
| 3. 学会等名 第27回日本血液代替物学会年次大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Azuma H, Yoshida Y, Nagamori T, Ishibazawa E, Kobayashi H, Skai H, Takahashi D, Fujihara M |
| 2. 発表標題 Induction of B7-H3 positive myeloid-derived suppressor cells(MDSC) by liposomal nanoparticles |
| 3. 学会等名 The 17th international Symposium on Blood Substitute and Oxygen Therapeutics (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|------------------------------|----|
| 研究分担者 | 鳥海 尚久 (Toriumi Naohisa) (30516399) | 旭川医科大学・医学部・助教 (10107) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 長森 恒久 (Nagamori Tsunehisa) (40400098) | 旭川医科大学・医学部・講師 (10107) | |
| 研究分担者 | 更科 岳大 (Sarashina Takeo) (40431407) | 旭川医科大学・大学病院・講師 (10107) | |
| 研究分担者 | 酒井 宏水 (Sakai Hiromi) (70318830) | 奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601) | |
| 研究分担者 | 吉田 陽一郎 (Yoshida Yoichiro) (80750306) | 旭川医科大学・大学病院・助教 (10107) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |