

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590443

研究課題名（和文） 骨髄球系抑制細胞の産生機構とインターロイキン 17 の関与の解明

研究課題名（英文） Elucidation of mechanisms underlying production of myeloid derived suppressor cells and possible involvement of interleukin-17 in the process.

研究代表者

稲葉 亨 (Inaba Tohru)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：60203204

研究成果の概要（和文）：骨髄球系抑制細胞 (myeloid derived suppressor cells :MDSCs) の産生調節機構について検討した。インターロイキン 17(IL-17)受容体のシグナルは MDSCs の誘導に必須であるが、二つの主要なリガンドである IL-17A または IL-17F のいずれのノックアウトマウスでも MDSCs の誘導に異常は認められなかった。これらは MDSCs の誘導に関して機能的に重複していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： The developmental process of Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) remains unknown. In IL-17A or IL-17F knockout mice, MDSCs were induced at similar frequency as wild type mice. Taking into account the previous report showing that IL-17 receptor signaling is necessary for MDSCs induction, these results suggest that IL-17A and IL-17F are functionally redundant in MDSCs induction.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,800,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：骨髄球系抑制細胞、インターロイキン 17、造血、腫瘍、免疫

1. 研究開始当初の背景

癌細胞はさまざまな機構により生体内で宿主の免疫による監視網をくぐり抜けている。最近になり腫瘍が産生を誘導する骨髄球系(Myeloid)の細胞が、免疫系の抑制に大きな役割を果たしていることがマウスの実験系および癌患者の解析から明らかとなってき

た(Nagaraj S. et al. Cancer Research 2008)。これらの細胞はマウスでは細胞表面に CD11b および Gr-1 を発現しており、細胞の由来及び作用に基づいて骨髄球由来抑制細胞(Myeloid Derived Suppressor Cells: MDSCs)と呼ばれている。MDSC は担癌状態で誘導される骨髄、脾臓、腫瘍中、末梢血中

の CD11b+Gr-1+細胞であり、単球系の細胞と顆粒球系の細胞が混在した不均一な細胞集団である。MDSC は CD4 および CD8 陽性 T 細胞の他、NK 細胞の活性化を抑制することによって免疫システムの監視網を攪乱している (Marigo I. et al. Immunological Reviews 2008)。

研究分担者の平位らは骨髄球系の造血は定常状態と感染など緊急時の造血では転写調節機構に差があると報告している (Hirai H. et al. Nat Immunol. 2006)。担癌状態における液性因子による刺激はくすぶり続けるような慢性炎症刺激となり定常状態とは異なる造血制御がおこなわれているために通常の骨髄球系の細胞とは異なる機能を持つ細胞が産生されている可能性もある。このように造血の視点から MDSC の発生源を明らかにすることは癌患者の免疫状態の制御にとって重要な課題と考えられる。

腫瘍由来あるいは腫瘍周囲の組織から分泌されて MDSC の産生を誘導する液性因子としてはこれまでに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) やマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) のほか、インターロイキン 6 (Interleukin-6: IL-6)、インターロイキン 1 β (IL-1 β)、インターロイキン 13 (IL-13) などが報告されている (Movahedi K. et al. Blood 2008)。これらの腫瘍由来の液性因子が MDSC の産生を刺激していると考えられているが、腫瘍の種類や宿主側の遺伝的要素などによりどのような因子が重要であるかが異なっている可能性もあり、さらに他の液性因子の関与の検討が重要な課題となっている。IL-17 は炎症性サイトカインであり主にヘルパー T 細胞のサブセットである Th17 細胞から分泌され、組織からの IL-6 や IL-8、G-CSF やケモカインの分泌を誘導する

(McGeachy MJ. et al. Immunity 2008)。この結果、顆粒球を中心とした骨髄球系細胞の増殖を促進する作用を持つ (Tan W. et al. Exp. Hematol. 2008、Schwarzenberger P. et al. J. Immunology 1998)。IL-17 は自己免疫病をはじめとする様々な疾患の発症と関わりがあると考えられており (Stockinger B. et al. Curr Opin Immunol 2007)、申請者および研究分担者である喜多らも炎症性腸疾患モデルやヘリコバクター感染症において IL-17 が重要な働きをしていると報告してきた (Ito R. et al. BBRC 2008)。悪性腫瘍においては腫瘍の増殖を促進するという報告や胃癌患者において Th17 細胞が増加しており病期の進行と関連があるなどとする報告が相次いでいる (Numasaki M. et al. Blood 2003, Zhang B. et al. BBRC 2008)。IL-17 は免疫反応と骨髄球系造血いわば仲介者として作用し、炎症反応の中心となって骨髄球系細胞の産生を促しているため MDSC の産生調節への関与の可能性は非常に高いと考えられる。しかしながら IL-17 あるいはその主たる産生細胞である Th-17 細胞と MDSC の直接の関連についての報告は申請書作成時点で皆無であった。

2. 研究の目的

従来の MDSC に関わる研究は主に免疫抑制機構に主眼がおかれていたが、本研究は骨髄内での産生調節機構に注目し、a)造血幹細胞からの分化のメカニズムと、b)その誘導にかかわる可能性の高い液性因子としてインターロイキン 17 (IL-17) に注目してその関与を解明することを目的とした。

本研究課題ではフローサイトメーターの技術を駆使してマウスでの MDSC の誘導において骨髄中の造血がどのように変化をしているかを詳細に検討する。またどのような分子メカニズムにより免疫系を抑制するよ

うな細胞が出現するのかということ定常状態の造血と対比させながら明らかにしていきたい。さらに炎症性サイトカインである IL-17 が MDSC の誘導にどのように関わっているかを IL-17 のノックアウトマウスの解析を中心として明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

MDSC の産生を誘導するために従来からマウスに腫瘍細胞を接種することで担癌状態を人工的に作成するという手法がとられている。本研究では大腸癌細胞株 CT26(Bulb/c) および胸腺腫細胞株 EG7(C57BL/6)を用いる。これらの細胞株は主要組織適合抗原の一致したマウスの側腹部に注射する。腫瘍細胞摂取後 3 日から 4 日毎に末梢血、脾細胞を採取し、CD11b⁺Gr-1⁺細胞数の推移を経時的に観察する。また同時に骨髓細胞を採取し、蛍光抗体を組み合わせで染色し、造血幹細胞、骨髓球系前駆細胞 (CMP)、顆粒球・マクロファージ前駆細胞 (GMP)、CD11b⁺Gr-1⁺細胞など骨髓球系細胞の分化にかかわる細胞集団の推移をフローサイトメーターを用いて観察する。この実験により骨髓中で MDSC はどの細胞集団が刺激されて増殖することにより供給されているかを推測することができる。

IL-17 が MDSC の誘導にとって必須であるかどうかを明らかにするため IL-17 ノックアウトマウスを用いた研究を行う。IL-17 受容体を刺激する主なリガンドは IL-17A および IL-17F であり、これらそれぞれのノックアウトマウスに腫瘍細胞株を接種し、接種した腫瘍細胞による腫瘍サイズの経時変化を野生型のマウスあるいはノックアウトマウスに接種した場合とで比較する。ついで腫瘍細胞株を摂取されたノックアウトマウスの末梢血、脾臓、骨髓での MDSC および造

血幹・前駆細胞の変化を観察し、野生型のマウスあるいはヘテロ接合体のマウスに接種した場合の MDSC の誘導の様子と比較検討する。この実験によって IL-17 が MDSC の誘導や免疫抑制作用にとって必須であるかどうか、また IL-17 による腫瘍細胞の増殖速度への関与を明らかにすることができる。

4. 研究成果

近年さまざまな蛍光色素で標識されたものクローナル抗体が多数入手可能となり、フローサイトメトリの技術的な進歩もあり、造血の各分化段階の変化を詳細に観察することが可能となっている。そこでわれわれは MDSC の誘導時に骨髓での造血に変化が観察できるかどうかについて検証した。腫瘍のモデルとしてはマウス悪性黒色腫の細胞株である B16 細胞を C57BL6 マウスに接種するという系を用いた。細胞株摂取後 21 日目には脾臓で CD11b⁺Gr-1⁺細胞が 6%から 14%へと増加し、MDSC が誘導されていることが示された。この状況でマウスの造血幹細胞および骨髓球系の前駆細胞の頻度について検討した。Lin⁻c-kit⁺Sca-1⁺の造血幹細胞の頻度は MDSC の誘導に際して変化を認めなかった。骨髓球系細胞前駆細胞(lin⁻c-kit⁺Sca-1⁻CD16/32^{low}CD34⁺)は lin⁻c-kit⁺細胞中 22%から 26%へと増加し、顆粒球マクロファージは前駆細胞(lin⁻c-kit⁺Sca-1⁻CD16/32^{high}CD34⁺)は lin⁻c-kit⁺細胞中 19%から 14%と減少したが、いずれの変化も統計学的に有意ではなく、軽微なものであった。

IL-17 が癌の病態においてどのような働きをしているかについてはまだ議論の余地のあるところである。本研究実施期間中に IL-17 受容体からのシグナルが MDSC の誘導に重要であるという報告が学術誌に掲載された(He D et al. Journal of Immunology,

2010)。IL-17 受容体の主要なリガンドとしては IL-17A と IL-17F が知られているため、それぞれのノックアウトを用いて MDSC の誘導に関して野生型マウスとの間で比較検討した。B16 細胞株接種により野生型マウスでは脾臓中の CD11b+Gr-1+細胞が $1.9 \pm 0.56\%$ から $12.9 \pm 4.5\%$ へと増加した。同じ条件で IL-17A ノックアウトマウスでは $3.3 \pm 1.3\%$ から $9.7 \pm 5.4\%$ 、IL-17F ノックアウトマウスでは $5.9 \pm 0.16\%$ から $14.1 \pm 9.17\%$ への増加となり、三群間で統計学的に有意なさは認められなかった。このことは IL-17A と IL-17F は MDSC の誘導に関して機能的な重複を有していることを示唆していると考えられた。

以上より MDSC の誘導において骨髄中の造血の変化は微細なものであることが明らかとなり、IL-17 は MDSC の誘導において重要な役割を担っており、主要なリガンドである IL-17A と IL-17F は機能的に重複していると考えられた。今後 IL-17 を標的として MDSC の誘導を制御するという新たな癌の治療の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Sakai K, Kawata E, Ashihara E, Nakagawa Y, Yamauchi A, Yao Y, Nagao R, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi T, Hirai H, Kimura S, Hirashima M, Yoshimura N, Maekawa T: Galectin-9 ameliorates acute Graft-versus-host disease through the induction of T-cell apoptosis. *Eur J Immunol* 41:67-75, 2011.

2. Growth inhibition of imatinib-resistant CML cells with the T315I mutation and

hypoxia-adaptation by AV65--a novel Wnt/ β -catenin signaling inhibitor.

Nagao R, Ashihara E, Kimura S, Strovel JW, Yao H, Takeuchi M, Tanaka R, Hayashi Y, Hirai H, Padia J, Strand K, Maekawa T. *Cancer Lett.* 2011 Dec 15;312(1):91-100. Epub 2011 Aug 17.

3. Kamio N, Hirai H, Ashihara E, Tenen DG, Maekawa T, Imanishi J : Use of bicistronic vectors in combination with flow cytometry to screen for effective small interfering RNA target sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 393:498-503, 2010

[学会発表] (計 3 件)

1. Hayashi Y, Hirai H, Yao H, Yoshioka S, Satake S, Kamio N, Miura Y, Ashihara E, Fujiyama Y, Tenen DG, Maekawa T : BCR/ABL-Mediated Myeloid Expansion Is Promoted by C/EBP β , a Regulator of Emergency Granulopoiesis. 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, US, December 11-13, 2011

2. Nagao R, Hirai H, Satake S, Yao H, Tanaka R, Hayashi Y, Ashihara E, Maekawa T: The developmental process of myeloid-derived suppressor cells in the bone marrow of tumor-bearing mice. Kyoto University Global COE "Center for Frontier Medicine" International Symposium/Retreat 2010. (Hyogo, Japan) (November 5, 2010)

3. Kamio N, Hirai H, Satake S, Tanaka R, Nagao R, Yao H, Hayashi Y, Takeuchi M,

Ashihara E, Maekawa T: A flow cytometry-based method for screening of effective small interfering RNA target sequences. 第16回日本遺伝子治療学会年次学術集会(栃木) 平成22年7月2日(2010)

[その他]

ホームページ等

京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部
(<http://dtm.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 亨 (Inaba Tohru)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：60203204

今西 二郎 (Imanishi Jiro)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：40112510

(2) 研究分担者

喜多 正和 (Kita Masakazu)

京都府立医科大学・医学研究科・準教授

研究者番号：60153087

平位 秀世 (Hirai Hirai)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50315933

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：