

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430120

研究課題名(和文) 骨髄由来抑制性細胞の分化におけるNF- κ B-inducing kinaseの役割研究課題名(英文) Role of NF- κ B-inducing kinase (NIK) in the differentiation of myeloid-derived suppressor cells

研究代表者

江島 耕二 (Eshima, Koji)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：30327324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：NF- κ B-inducing kinase (NIK) 遺伝子の変異マウスの末梢に、免疫抑制活性をもつ骨髄由来抑制性細胞(Myeloid-derived suppressor cell：MDSC)様細胞が自然蓄積することから、本研究ではMDSCの分化にNIKが関与している可能性を考え、このマウスのMDSC様細胞について詳細に解析した。その結果、この細胞はMDSC同様3つのサブセットに分けられること、また同じような免疫抑制機能を有することが明らかとなり、NIK欠損によりMDSCの分化が誘導される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are known to inhibit immune responses against tumors or in chronic infections, although their developmental mechanisms have remained unclear. In this study, we noticed that MDSC-like cells are spontaneously accumulated in alymphoplasia, the mice bearing a mutation in NF- κ B-inducing kinase. We analyzed the phenotypes and function of these cells comparing them with those of tumor-induced MDSCs, and following results were obtained. (1) MDSC-like cells in aly mice were divided into three populations in terms of their expression of Ly6C and Ly6G. (2) All of these three population exhibited the ability to suppress T cell proliferation at similar level as tumor-induced MDSCs. (3) These populations were not observed in aly mice lacking mature lymphocytes. These results collectively indicated that lack of functional NIK may lead to the development of MDSC, and that the development of (subsets of) MDSC may be dependent on the function of lymphocytes.

研究分野：免疫学

キーワード：骨髄由来抑制性細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 自然突然変異マウス *alyphoplasia* マウス (以下 *aly* マウス) は NF- κ B の活性化に重要なセリンスレオニンキナーゼ

NF- κ B-inducing kinase (NIK) 遺伝子に機能欠損型の変異を有している。このマウスは自己免疫疾患を自然発症する一方、非自己抗原に対しては低反応性を示すことが知られている。*aly* マウスにおける自己免疫反応については、胸腺髄質上皮細胞の形成不全のために自己反応性 T 細胞の除去が正常に行われないうちに起因することが示されているが、非自己抗原に対する低反応性については、その機序は不明という状況にあった。我々は、*aly* マウスの免疫不全の原因を探索する中で、このマウスの末梢に、骨髄由来抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cell: MDSC) と同様のマーカー (CD11b / Gr-1) を発現している細胞が自然蓄積することを観察した。MDSC は免疫抑制作用を示す細胞であり、*aly* マウス内のこれらの細胞が MDSC と同様の活性を示す細胞であれば、これらの細胞が *aly* マウス内の免疫応答を抗原非特異的に抑制していることが説明できる。この可能性を検証するためには *aly* マウスに自然蓄積する MDSC 様細胞の特徴や性質について詳細に解析することが不可欠であると考えた。

(2) MDSC は、癌や感染などの慢性炎症によって誘導される未熟なミエロイド系列の細胞である。MDSC は複数のサブセットからなる不均一な細胞群で、それぞれ異なる機構により免疫機能を抑制することが知られている。担癌個体の中では、MDSC が免疫系による腫瘍の拒絶を阻止しているケースが考えられるため、MDSC の免疫抑制機能を阻害すべく、MDSC の免疫抑制機構の詳細について精力的な研究がなされている。しかし、もし MDSC の発生そのものを制御できれば、さらに有効な抗腫瘍治療につながる可能性があり、MDSC 発生機構解明も急務と考えられる

が、これについての知見は未だほとんど得られていない。

2. 研究の目的

我々は、MDSC の分化や機能発現の分子基盤を解明することを最終目的とし、その中で本研究課題では、*aly* マウスにおいて自然蓄積する MDSC 様細胞が真に腫瘍接種等で誘導される MDSC と同等であるかの評価、および MDSC 様細胞が自然発生する機序の解析を行うことにより、MDSC の分化や免疫抑制機能発現における NIK の役割について知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *alyphoplasia* マウスは日本クレア (株) より購入したマウスを C57BL/6 マウスに 10 回戻し交配したものを交配ペアに用いた。*aly/aly* マウスの雌は乳腺発達異常を示し、仔を育てられないため、*aly/+* の雌と *aly/aly* の雄を交配して得られた仔を実験に用いた。実験には可能な限り同腹のマウスの *aly/+* と *aly/aly* で比較を行った。マウスのタイピングは尾のゲノム DNA をテンプレートに用いて PCR で行った。またマウスの遺伝子型はリンパ節の有無により確認した。RAG-2 遺伝子や 2m 遺伝子欠損マウスは C57BL/6 背景のものを用いた。

(2) フローサイトメトリー解析は FACSVerse を、細胞のソーティングは FACS Aria (いずれもベクトンディッキンソン社) を用いて行った。

(3) MDSC 様細胞の免疫抑制活性は、T 細胞増殖抑制能で評価した。野生型 C57BL/6 マウスよりソーティングした CD8⁺ T 細胞を、アロ抗原 (C3H/HeN マウスの脾臓細胞に 20Gy の X 線照射を施したもので) を刺激し、その後の増殖を ³H 標識のチミジンの取り込みで検討した。そこにソーティングした MDSC 様細胞のサブセットを加え、その効果を解析した。

(4) MDSC 様細胞の活性酸素産生能は、ジクロロフルオレセイン DCF を用いて、フローサイトメトリーで解析した。arginase-1 の mRNA の発現はリアルタイム PCR を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍接種等により誘導される

CD11b⁺/Gr1⁺の MDSC は Ly6C と Ly6G の発現パターンにより Ly6C^{lo}G^{hi} の顆粒球型 MDSC と Ly6C^{hi}G⁺の単球型 MDSC に分類されるが、*aly* マウスの末梢血、及び脾臓内の CD11b⁺/Gr1⁺ 細胞には、Ly6C^{lo}G^{hi} の顆粒球型細胞、Ly6C^{hi}G⁺の単球型細胞に加えて、Ly6C^{lo}G^{lo}、SiglecF⁺の好酸球様細胞の顕著な増加も見られた。Ly6C^{lo}G^{lo}の細胞群をさらに詳細に解析したところ、Siglec-F や CCR3 などの好酸球マーカーを発現していない細胞も含まれており、これらの細胞もヘテロマウスに比べて増加していた。

(2) *aly* マウス内 MDSC 様細胞のサブセットについて、F4/80 や CD115、CD244 などのマーカーの発現について調べたところ、腫瘍接種マウス内の CD11b⁺/Gr1⁺細胞と比較して、発現パターンは同様であった。

(3) *aly* マウス内の MDSC 様細胞が免疫抑制活性を有しているか検討するために、3つのサブセットを、セルソーターを用いてソーティングし、T細胞増殖に対する抑制活性を解析した。*aly* マウスで成熟する MDSC 様細胞のサブセットのうち、好酸球様細胞の免疫抑制活性は比較的弱かったが、他の2つのサブセットの免疫抑制活性は、腫瘍接種マウス内に誘導されてくる2つのサブセットと同程度であった。

(4) *aly* マウスとヘテロマウス内の CD11b⁺/Gr1⁺の細胞について、活性酸素の産生を、ジクロロフルオレセイン DCF を用いてフローサイトメトリーで解析したところ、

両者の細胞間で有意な差異は見られなかった。しかし arginase-1 の mRNA の発現について、リアルタイム PCR で定量したところ、*aly* マウス内の単球型サブセットと顆粒球型サブセットでは、ヘテロマウス内の細胞と比較して arginase-1 の発現が高い傾向が見られた。すなわち、*aly* の細胞による T 細胞の増殖抑制に arginase-1 が寄与している可能性が示唆された。

(5) *aly* マウスで成熟する MDSC 様細胞はリンパ球を欠失した RAG2 遺伝子欠損背景では観察されず、その成熟はリンパ球依存的であることが考えられる。RAG2 遺伝子欠損背景の *aly* マウスに、*aly*、もしくはヘテロマウスの CD4 陽性細胞を移入したところ、*aly* マウスの細胞を移入した場合に好酸球様サブセットの増加が観察された。*aly* マウスの CD4 陽性細胞を RAG-2 遺伝子欠損ヘテロマウスに移入しても好酸球様細胞の増加は認められなかった。これらの結果は、*aly* マウス内に蓄積する MDSC 様細胞のうち、好酸球様サブセットの増加には CD4 陽性細胞とミエロイド系の前駆細胞両者に NIK 欠損が必要であることを示唆していると考えられる。

(6) *aly* マウス内の MDSC 様細胞の蓄積における CD8 陽性細胞の寄与について解析するために *aly* マウスを $\beta 2m$ 分子欠損マウスと交配し、 $\beta 2m$ 分子を欠損した *aly* マウスを作成した。 $\beta 2m$ 分子欠損 *aly* マウスでは CD8 陽性細胞の数が激減したが、MDSC 様細胞の分化に違いは見られず、MDSC 様細胞の分化・維持には CD8 陽性細胞は必須ではないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Eshima K, Misawa K, Ohashi C, Iwabuchi K. (2018) Role of T-bet, the master regulator of Th1 cells, in the cytotoxicity of murine CD4⁺ T

cells. *Microbiol Immunol*, 62: 348-356. (doi: 10.1111/1348-0421.12586), 査読有り

Noma H, Eshima K*, Satoh M, Iwabuchi K. (2015) Differential dependence on nuclear factor- κ B-inducing kinase among natural killer T-cell subsets in their development. *Immunology*. 146: 89-99 (10.1111/imm.12484) (* corresponding author), 査読有り

江島耕二 (2015) 「T細胞の分化におけるNF- κ B-inducing kinaseの役割について」*生化学* 87: 770-775, 査読無し

[学会発表](計 8件)

江島耕二 CD8陽性T細胞の分化と機能におけるEomesoderminの役割について 第28回日本生体防御学会学術総会(相模原市, 2017年6月29日)

江島耕二, 三澤佳奈, 大橋千尋, 岩淵和也 Implication of T-bet, the master regulator of Th1 cells, in the cytotoxicity of murine CD4⁺ T cells 第46回日本免疫学会総会・学術集会(仙台市, 2017年12月13日)

三澤佳奈, 江島耕二, 岩淵和也 Analyses of genes expressed in the cortical thymic epithelial cells in immuno-compromised, *alymphoplasia* mice 第46回日本免疫学会総会・学術集会(仙台市, 2017年12月14日)

大橋千尋, 江島耕二, 岩淵和也 Spontaneous accumulation of myeloid-derived suppressor cell (MDSC)-like CD11b⁺/Gr-1⁺ cells in the periphery of NF- κ B-inducing kinase (NIK) mutant mice 第46回日本免疫学会総会・学術集会(仙台市, 2017年12月13日)

江島耕二, 三澤佳奈, 岩淵和也 Transgenic expression of a T-box molecule, Eomesodermin, in naive T cells induced expression of some activation/exhaustion markers without conferring functionality. 第45回日本免疫学

会総会・学術集会(沖縄県宜野湾市, 2016年12月5日)

Koji Eshima, Haruka Noma, Kana Misawa, Kazuya Iwabuchi The effects of transgenic expression of a T-box molecule, Eomesodermin, in naïve T cells on their activation and exhaustion status. 第15回国際免疫学会議(オーストラリア・メルボルン, 2016年8月22日)

江島耕二, 野間春香, 岩淵和也 On the *in vivo* effects of enforced expression of eomesodermin, a T-box family molecule, in naïve T cells on their differentiation and function. 第44回日本免疫学会総会・学術集会(札幌市, 2015年11月19日)

江島耕二, 野間春香, 岩淵和也 正常なマウス胸腺皮質上皮細胞維持におけるNF- κ B-inducing kinase (NIK)の関与 第34回日本胸腺研究会(相模原市, 2015年2月7日)

[その他]

ホームページ

<https://www.kitasato-u.ac.jp/med/research/departments/medicine/immunol.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

江島 耕二 (ESHIMA, Koji)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号: 30327324

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし