

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10010

研究課題名(和文) リポソーム誘導MDSCに発現するB7-H3分子誘導機序とその免疫抑制効果への関与

研究課題名(英文) Mechanism of B7-H3 expression on liposome induced MDSC-like cell and its influence on immunosuppression

研究代表者

東 寛(Hiroshi, Azuma)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：00167909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は今まで、ある種のリポソームをラットに投与すると、脾内T細胞の増殖を抑制するマクロファージが誘導されること、それが、myeloid derived suppressor cell に類似している事を見出し報告した。本研究では、これらの細胞に表面にはB7-H3 (CD276) 分子が発現している事及び、これらの細胞がT細胞の増殖を抑制していることを示す結果を得た。さらに、リポソームを投与してラットの脾臓ではiNOSが誘導されていること及び、NFkB signaling pathwayが活性化されている事も明らかにした。しかし、抗B7-H3抗体によりT細胞の増殖抑制効果を解除する事ができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リポソームの免疫機能へ及ぼす影響に関しては、今までよく知られていなかった。リポソームの投与により免疫抑制機能を持つ細胞が誘導されるという実験結果は新しい知見である。リポソームはdrug delivery systemとして実臨床で使われていることを考えると、本知見は重要である。一部の抗がん剤はリポソームをその担体としている。リポソームの持つ免疫抑制細胞を誘導する性質が内在しているとすれば、抗がん剤の薬理作用と相反するものになる可能性がある。この事は、今後のリポソームを用いた創薬を考える上で重要な情報になると思われる。

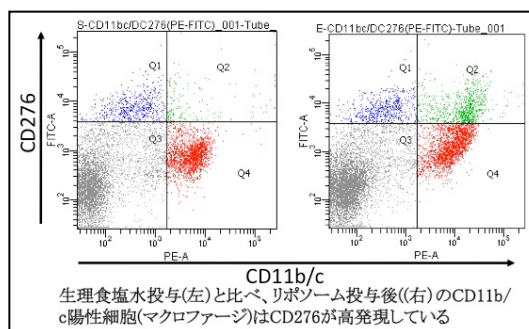
研究成果の概要(英文)：We had reported that when some liposome was injected into rat, immunosuppressive macrophages were induced in rat spleen and these macrophages meets some of the criteria for myeloid derived suppressor cells. In this study, we revealed that these macrophages are positive for B7-H3 molecule on their surface and they have the ability to suppress T cell proliferation. In addition, we revealed that splenocyte derived from liposome-loaded rat express iNOS and NFkB signaling pathways in these cells are activated. However, anti-B7-H3 antibody failed to restore T cell proliferation.

研究分野：小児感染免疫学、輸血医学、小児血液腫瘍学

キーワード：リポソーム MDSC B7-H3 macrophage iNOS

1. 研究開始当初の背景

Myeloid derived suppressor cell (MDSC) は、様々な病的状態下で GM-CSF 等のサイトカインの影響を受けて生体内に出現し、強力な T 細胞機能障害を誘導する未熟な骨髄由来細胞の不均一な細胞集団である。腫瘍特異的 T 細胞の抑制にも関与する MDSC を如何にコントロールするかは免疫学における重要な研究課題の一つである¹⁾。MDSC の効果発現には活性化した T 細胞との cell-to-cell contact (C-C) が必要だが^{2, 3)}、それに関与する分子基盤に関しては、未だ



明らかにされていない。一方、腫瘍組織から分泌される microvesicle が免疫応答の制御に関与している事が指摘され注目を集めている⁴⁾。しかし骨髄由来細胞が microvesicle を捕捉した際、如何なる刺激伝達経路をとおして、その刺激が核内に伝達されるのかは知られていない。我々は血液代替物として国内で開発中の、ヒトヘモグロビン(Hb)をリン脂質2重膜小胞体(リポソーム)に内包したナノ粒子(Hb vesicle (HbV))の生体適合性を検討する過程で、ラットへ当該リポソームを静注すると、脾内に T 細胞増殖反応を強力に抑制する細胞が一過性に出現することを見いだした。その機序を調べ

- 1) T 細胞はアナジーの状態となる。
- 2) 増殖反応の抑制に Nitric Oxide(NO)の産生増強が関与している。
- 3) 抑制にはリポソームを捕捉した脾マクロファージと T 細胞との C-C が必要であり、これらの細胞がラット MDSC 細胞と類似している事を示した⁵⁾。

| | Exp. 1 | Exp. 2 |
|--------|--------|--------|
| Mmp14 | 57.2 | 51.3 |
| Ccl9 | 37.4 | 46.43 |
| ApoE | 16.8 | 9.8 |
| IL18bp | 11.39 | 13.1 |
| IL1a | 5.6 | 9.9 |
| CD276 | 5.27 | 7.21 |

リポソームを投与後に抽出した脾細胞からCD11b/c陽性細胞の純度をあげたのち遺伝子発現プロファイルを網羅的に検索し、再現性をもって発現の増強を認めた遺伝子群。数字は増幅率。

この事を元に科研費基盤研究(C)H25-27の研究を進める中で、リポソーム誘導 MDSC 様細胞で発現の増強する遺伝子を探索し、その中の一つが免疫応答の制御に関与する B7-family の一つ、B7-H3(CD276)であり(表)、この分子がリポソームを捕捉した細胞群で高発現する事を突き止めた(図)。こうした背景から、CD276分子が MDSC と活性化 T 細胞との C-C に関与する分子の一つで、NOの産生増強にも深く関わっていると想定するに至った。

翻って、使用するリポソームは、その構造やサイズから脂質で構成された人工的な microvesicle と見なされる。この事から、我々の実験系は、腫瘍や炎症の場で産生される microvesicle によりマクロファージが MDSC に分化する現象の実験モデルと見なせるとの発想に至った。従ってリポソームを捕捉したマクロファージ内のシグナル伝達経路の変化を検討すれば、骨髄由来細胞が microvesicle を捕捉した際、如何なる刺激伝達経路をとおして、その刺激が核内に伝達されるのかを知る手がかりになると思われる。

2. 研究の目的

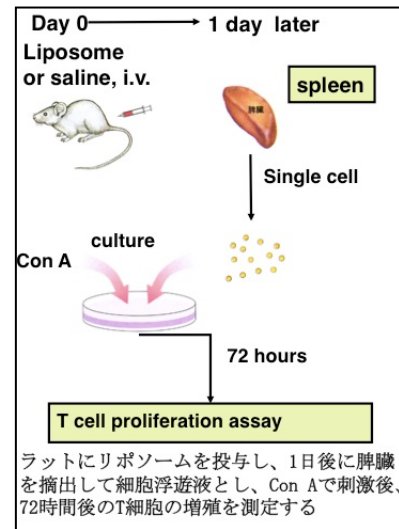
研究の目的は以下の2点を明らかにする事である。

- 1) CD276 の発現が MDSC 様細胞の機能発現とどのように関わっているのか。
具体的には T 細胞の増殖抑制あるいは増殖抑制の増強に関与しているか否か。
- 2) リポソームの捕捉後の機能変化に関与している細胞内シグナル伝達経路は何か
を明らかにする事である。

3. 研究の方法

リポソームを捕捉し CD276 陽性となった脾細胞を抗体で特定し、磁気ビーズや flow cytometry を駆使して、反応系 (Con A 刺激による T 細胞の増殖反応系) から除去し、T 細胞増殖抑制効果を検討した。抗体による CD276 分子のブロックによる効果も検討した。また、リポソームの捕捉で細胞の如何なる刺激伝達系が主として活性化されるのかを、Western blot 法を用いて NF κ b pathway の活性化の有無を検討した、

T 細胞増殖抑制効果の基本的アッセイ系 (図) は、調製したリポソームをラットの尾静脈から輸注し、1 日後に脾臓を摘出し、脾細胞を非特異的マイトोजェン Concanavalin A (Con A) 存在下で培養し、BrdU の DNA への取り込みを吸光度で測定する non isotope アッセイ系に行った。



ラットにリポソームを投与し、1日後に脾臓を摘出して細胞浮遊液とし、Con Aで刺激後、72時間後のT細胞の増殖を測定する

4. 研究成果

1) 脾細胞から、抗 CD276 抗体と磁気ビーズを用いて CD276 陽性細胞を除去すると、Con A 刺激下での T 細胞の増殖反応抑制効果が解除され、コントロール脾細胞の増殖ほぼ同等の増殖を認めた。コントロールとして IgG 処理後の磁気ビーズによる操作を行ったものでは、抑制の解除は認められなかった (Fig. 1)。

しかしながら、リポソーム投与後に摘出した脾臓 T 細胞の増殖アッセイ系に抗体 CD276 抗体を投与し、CD276 分子をブロックしたが、増殖抑制の解除は認められなかった。

従って、リポソームを取り込んだ後に、CD276 分子を発現した脾マクロファージが T 細胞増殖抑制効果を持つ事が示された。抗体による CD276 分子のブロッキングでは、抑制の解除は認められなかったが、この結果を持って、CD276 分の T 細胞抑制効果発現に関与する事を否定することはできない。

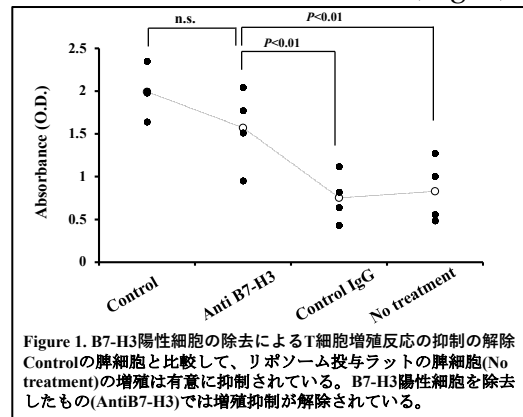
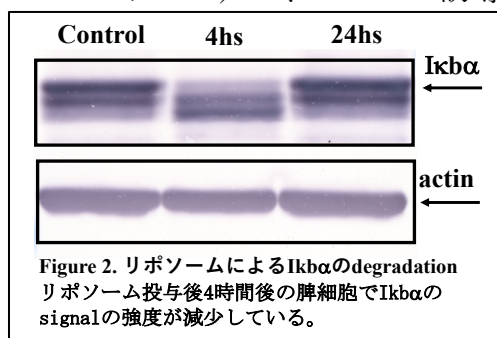


Figure 1. B7-H3陽性細胞の除去によるT細胞増殖反応の抑制の解除 Controlの脾細胞と比較して、リポソーム投与ラットの脾細胞(No treatment)の増殖は有意に抑制されている。B7-H3陽性細胞を除去したもの(AntiB7-H3)では増殖抑制が解除されている。

2) リポソーム投与したラットの脾細胞（脾マクロファージ）で、iNOS が誘導されていた。このことから、iNOS の誘導につながる刺激伝達系である NF κ B pathway が活性化しているか否かを I κ b α の degradation の有無にて検討した。その結果、リポソーム投与4時間に摘出した脾細胞では I κ b α に degradation を認めた (Fig. 2)。このことから、脾マクロファージは、リポソームを取り込み、その結果、NF κ B pathway の活性化が起こっていると判断された。



<引用文献>

- 1 Ostrand-Rosenberg S and Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: Linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182,2009, 4499-4506.
- 2 Dugast AS, Haudebourge T, Coulon F et al. J Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *Immunol* 180, 2008, 7898-7906.
- 3 De Wilde V, Van Rompaey N, Hill M et al. Endotoxin-induced myeloid-derived suppressor cells inhibit alloimmune responses via hemeoxygenase-1. *J Transplant* 9:2009,2034-2047.
- 4 Sadallah S, Eken C, Schifferli JA. Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clin Exp Immunol*;163: 26,2010)
- 5 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: 201142-49

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Azusa H, Yoshida Y, Takahashi H, et al | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Liposomal micro particle injection can induce myeloid-derived suppressor cells(MDSC)-like cells in vivo | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Immunopharm Immunotoxi | 6. 最初と最後の頁 140-147 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/08923973.2017.1306867 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 Azuma H, Fujihara M, Sakai H | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Biocompatibility of HbV: Liposome-Encapsulated Hemoglobin Molecules-Liposome Effects on Immune Function | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 J Funct Biomate | 6. 最初と最後の頁 24 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jfb8030024 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 東 寛 |
| 2. 発表標題 HbVに使用されているリポソーム粒子のマクロファージへの影響について |
| 3. 学会等名 第24回日本血液代替物学会年次大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 東 寛 |
| 2. 発表標題 Membrane-derived microvesicleによる免疫抑制細胞(MDSC)の誘導について |
| 3. 学会等名 北日本小児科学会 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 東 寛 |
| 2. 発表標題 リボソームにより誘導される抑制性マクロファージの機能解析 |
| 3. 学会等名 第23回日本血液代替物学会 |
| 4. 発表年 2016年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 旭川医科大学 学術成果リポジトリ http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/modules/xoonips/detail.php?item_id=5693 |
|---|

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 | 更科 岳大 (Sarashina takeo) (40431407) | 旭川医科大学・医学部・助教 (10107) | |
| 研究分担者 | 高橋 弘典 (Takahashi Hironori) (50431408) | 旭川医科大学・医学部・助教 (10107) | |
| 研究分担者 | 岡嶋 一樹 (okajima kazuki) (70213931) | 旭川医科大学・大学病院・医員 (10107) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 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・医員 (10107) | |