

令和元年5月20日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10720

研究課題名(和文) 骨髄由来免疫抑制細胞に着目した脳梗塞における新規炎症制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Clarification of roles of myeloid-derived suppressor cells on the regulation of post-ischemic inflammation

研究代表者

島村 宗尚 (Shimamura, Munehisa)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：60422317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：MDSCには好中球由来のG-MDSC(別称PMN-MDSC)と単球由来のM-MDSCが存在するが、本検討ではPMN-MDSCを中心に検討した。脳梗塞24時間後には、まず脾臓のPMN-MDSCが複製され、その後、72時間では、骨髄でPMN-MDSCが増加し、脳内に浸潤してくる可能性が示唆された。また、正常側にも少量のPMN-MDSCが発現していたが、梗塞側と正常側のPMN-MDSCにはNox2の発現量に差があるため、梗塞側と正常側のPMN-MDSCの機能差についてはさらなる検討が必要であると考えられた。本検討により、脳梗塞後におけるPMN-MDSCの発現の時間的および空間的推移を明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞においてT細胞による細胞性免疫は脳虚血24時間以降のlateフェーズでの炎症や組織障害に関与しているが、T細胞の動態制御については明らかとなっていなかった。本検討により、癌免疫においてT細胞の機能を制御することが報告されているPMN-MDSCが、脳梗塞部位においてもT細胞が発現してくるタイミングで発現してくることが明らかとなったことから、癌と同じように、PMN-MDSCをターゲットにしたT細胞制御による新たな脳梗塞治療の可能性につながる可能性が見いだされた点に意義がある。

研究成果の概要(英文)：Although T cells play important roles in the pathophysiology of ischemic stroke, the dynamics of T cells remains unclear. Therefore, we examined the temporal and spatial profiles of PMN-MDSCs, which suppress T cells activation. The number of CD11b+Ly6ClowLy6G+ cells was increased in the ischemic hemisphere and bone marrow at 72 hours, as well as in the spleen 24 hours after ischemic stroke in mice. CD11b+Ly6ClowLy6G+ cells sorted from brain and spleen 72 hours after ischemia had greater expression of Nox2 and CHOP mRNA than neutrophils in bone marrow, suggesting that these cells constitute PMN-MDSCs. CD11b+Ly6G+ cells were located in the ischemic core and border zone, indicating that PMN-MDSCs might be endemic to these regions. Although neutrophils are believed to invade infarct regions, the present study suggested that some of these cells are PMN-MDSCs.

研究分野：脳血管障害、神経内科

キーワード：骨髄由来免疫抑制細胞 脳梗塞 炎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞において T 細胞による細胞性免疫は脳虚血 24 時間以降の late phase での炎症や組織障害に関与しているが、T 細胞の動態制御については明らかとなっていなかった。我々は癌免疫において T 細胞の機能を制御する骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC: Myeloid-derived suppressor cell) に着目し、脳梗塞でも MDSC が T 細胞の制御に関連する可能性を想定した。MDSC には骨髄から分化遊走される好中球由来の G-MDSC (別名 PMN-MDSC) と単球由来の M-MDSC が存在し、いずれも T 細胞の消去あるいはアポトーシスを引き起こすことにより免疫反応を抑制する (Duffy, et al. *Cancer Immunol Immunother* 2013)。ガンでは、低酸素状態による HIF-1 α がその分化と誘導に関わっている (Corzo et al. *JEM* 2010) とされている一方で、下肢虚血においては、MDSC は虚血部位に集積し、血管新生を促進させる作用があることも報告されていた (Kim et al. *Blood* 2010)。

しかし、研究開始当時には PMN-MDSC, M-MDSC の定義についてはコンセンサスがなく、我々は Youn, et al. *J Leukoc Biol* 2012 の報告にもとづき、CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low}CD244⁺細胞を PMN-MDSC と定義し、一過性中大脳動脈閉塞モデルにて、脳梗塞部位においての PMN-MDSC の発現を明らかにしていた。一方で、2015 年には、PMN-MDSC が M-MDSC に比較し免疫抑制作用がより強いこと (Marvel, et al. *JCI* 2015) が報告され、また、2016 年には Bronte らが MDSC の定義についての提唱を行い、そのなかで、PMN-MDSC は CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺であり機能的に T 細胞の活性を抑制するものとされた (Bronte, et al. *Nat Commun* 2016)。これらのことから、PMN-MDSC に注目し、Bronte 基準に従って PMN-MDSC の解析を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、マウス脳梗塞モデルでの脳梗塞部位における PMN-MDSC の発現を、FACS およびソーティングした細胞からの mRNA の発現、免疫染色を用いて明らかにし、MDSC を選択的に deletion することが報告されていた Doxorubicin (Alizadeh, *Cancer Res* 2014)、および 5-FU (Eggert, *PLOS ONE* 2014) を用いて、MDSC の脳梗塞への作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

C57BL/6J マウスを 40 分中大脳動脈閉塞モデルにすることにより、脳における PMN-MDSC の発現の時間的および空間的な変化を FACS および免疫染色で検討した。また、セルソーターで分離した CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞を分離培養し、T 細胞の活性抑制機能についての検討を試みた。また、好中球、M-MDSC とは異なり、CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞にて発現が上昇することが報告されている *CHOP*、*Nox2* の mRNA の発現 (Bronte, et al. *Nat Commun* 2016) を realtime RT-PCR で検討した。さらに、脾臓および骨髄における発現も FACS で解析し、脳との関連性を検討した。MDSC の由来臓器については、脾摘を行ったマウスでの検討を行うとともに、PMN-MDSC の機能については、MDSC を選択的に deletion することが報告されている 5-FU および doxorubicin を投与後に脳梗塞を作成し、脳梗塞体積、サイトカインの発現を確認することを試みた。

4. 研究成果

CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞の発現をまず、FACS にて確認した。脳梗塞後の脳では、CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞が 72 時間と 120 時間後に優位に脳梗塞部位で増加している事に対し、

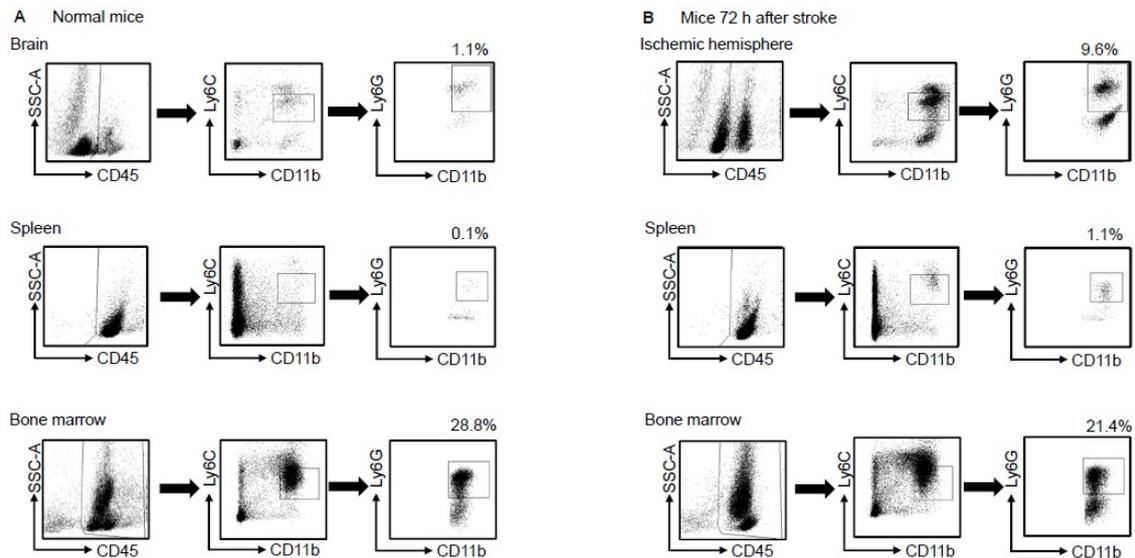


図 1 正常マウス(A)および脳梗塞 72 時間後(B)の脳、脾臓、骨髄の CD45⁺CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞。

反対側の脳では明らかな上昇を認めなかった。また、CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞は骨髄でも 72-120 時間後に増加する傾向にあった。一方で、脾臓では 24 時間後に発現が上昇し、次第に低下傾向となった。これらの結果から、CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞は脾臓で増加した後、脳と骨髄で増えることを示していた (図 1、図 2)。

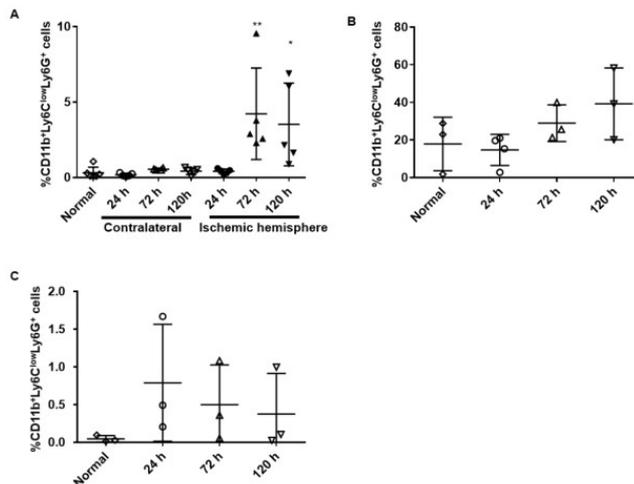


図 2 CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞発現の時間的推移。(A)脳、(B)骨髄、(C)脾臓。

次に、脳における CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞が MDSC の特徴である機能的な T 細胞活性抑制作用を有するか検討するために、セルソーターで分離した CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞の培養を各種試みたが、採取できる細胞数が少ないため、培養は困難であったため、Bronte らの基準に従い、好中球および M-MDSC とは異なり、PMN-MDSC で発現が上昇すると報告されている *Nox2* および *CHOP* の mRNA の発現を確認したところ、正常骨髄の CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞 (好中球) とは異なり、脳梗塞後の脳、脾臓から分離した CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞は、*Nox2* および *CHOP* の mRNA 発現が増加していたが、*Nox2* については、むしろ正常側の脳での発現が増加していた。これらのことから、脳梗塞後に発現している CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞は PMN-MDSC を多く含んでいることが示された。

次に、脳梗塞部位における CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺細胞の空間的な発

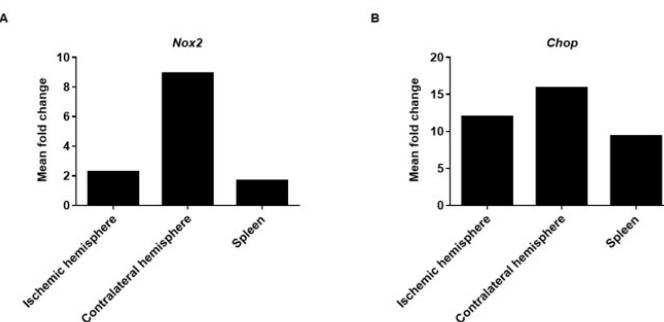


図 3 *Nox2* および *CHOP* mRNA の発現。正常骨髄に対する mean fold change (縦軸)。

現を免疫染色にて検討した。この検討では、 $CD11b^+Ly6C^{low}Ly6G^+$ の検討が免疫染色では難しいため、 $CD11b^+Ly6G^+$ を PMN-MDSC として報告している報告に基づき(Nault, et al. Nat Commu 2013, Fufait, et al. Oncotarget 2015)、 $CD11b^+Ly6G^+$ の発現を検討したところ、これらの細胞は core および脳梗塞周辺のいずれでも発現していることがわかった (図 4)。

また、PMN-MDSC を選択的に除去し、PMN-MDSC の脳梗塞における機能評価を試みるために、過去に MDSC を選択的に除去することが報告されている 5-FU および doxorubicin を用いた検討を行ったが、 $CD11b^+Ly6C^{low}Ly6G^+$ 細胞だけでなく、CD45 陽性細胞数自体の低下を認めたため、評価は困難であった。また、脾摘を行うことによって、脳での PMN-MDSC が、脾臓由来であるかどうかの検討も行ったが、脾摘を行ったマウスで脳梗塞を作成した場合、24 時間後には死亡したため、こちらも評価が困難であった。

通常、PMN-MDSC は骨髄にて産生され、脾臓は PMN-MDSC の貯蔵あるいは複製の場所とされている。本検討の時間経過の結果からは、脳梗塞後にまず脾臓の PMN-MDSC が複製されるが、この PMN-MDSC は脳に migration することなく、その後に骨髄で増加してくる PMN-MDSC が脳内に浸潤してくる可能性が示唆された。また、脳梗塞マウスの正常側の脳では、 $CD11b^+Ly6C^{low}Ly6G^+$ の細胞数の増加はないものの、*Nox2* および *CHOP* mRNA の発現は増加しており、*Nox2* の発現量は梗塞側よりも多く認められた。mRNA の発現量が PMN-MDSC の活性には関連しないとされているが (Bronte, et al. Nat Commun 2016)、正常側と脳梗塞側の PMN-MDSC の機能解明は今後の一つの課題と考えられた。また、PMN-MDSC の分布をみるために、便宜上、免疫染色にて $CD11b^+Ly6G^+$ 陽性細胞を脳梗塞部位全体に観察したが、これらには好中球も含まれていると考えられる。T 細胞は主に脳梗塞周囲領域 (Jander, et al. J Cereb Blood Flow Metab 1995) に分布し、また、PMN-MDSC の T 細胞活性抑制には細胞間の直接作用が必要なことから (Kumar, et al. Trends Immunol 2016)、PMN-MDSC は脳梗塞周囲領域に発現していることが予想された。

以上より、脳梗塞における PMN-MDSC の機能を十分には明らかにできなかったが、Bronte らの提唱した PMN-MDSC の基準に則して、脳梗塞後での PMN-MDSC の発現の時間的および空間的推移を明らかにすることができた。

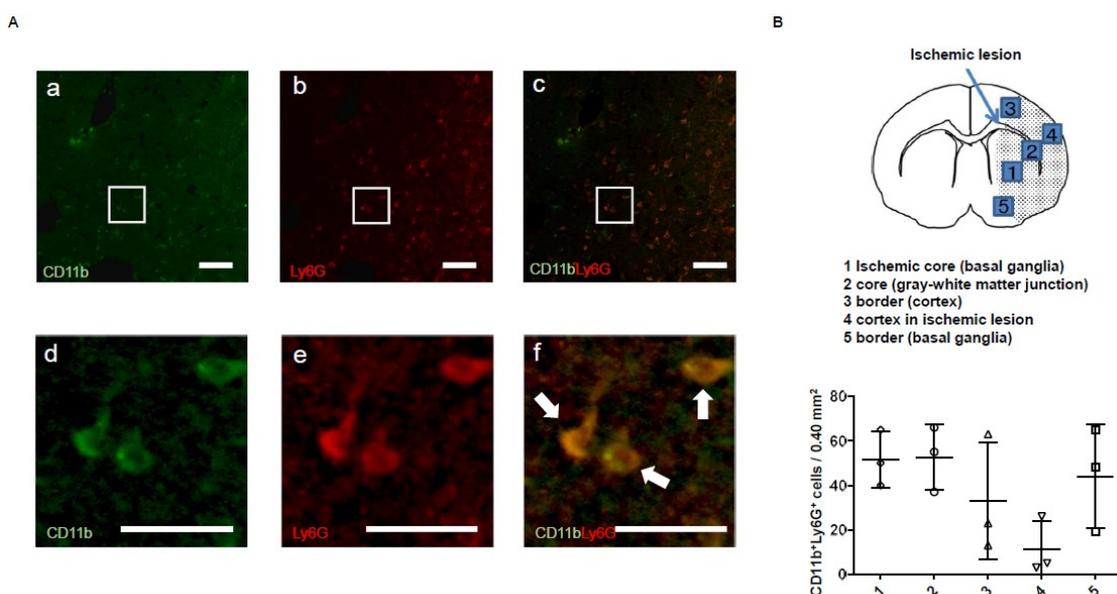


図 4 $CD11b^+Ly6G^+$ 細胞の免疫染色(矢印)。A: 脳梗塞 72 時間後の脳梗塞周囲部の組織像。B:脳梗塞の各領域での $CD11b^+Ly6G^+$ 細胞の発現。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

①Kawano T, Shimamura M, Nakagami H, Kanki H, Sasaki T, Mochizuki H. Temporal and spatial profile of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSCs) in ischemic stroke in mice. PLoS One. 2019 2;14(5):e0215482 査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

①河野友裕、島村宗尚 他「脳梗塞における PMN-MDSC の経時的および空間的発現解析」第 44 回日本脳卒中学会学術集会、2019 .3.22、横浜<口演>

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：栗波 仁美

ローマ字氏名： Hitomi Kurinami

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号（8 桁）：10638555

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。