

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07345

研究課題名(和文) 骨髄由来免疫抑制細胞を標的とした免疫老化制御の基盤構築

研究課題名(英文) Establishment foundation of regulation against immunosenescence targeting myeloid-derived suppressor cells

研究代表者

堀江 一郎 (Horie, Ichiro)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・講師

研究者番号：10609514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢社会で増加する加齢性疾患を予防するためには、老化の過程で疾患発症に寄与する免疫老化を制御する必要があるが、免疫老化の全容や標的細胞は未だ明らかにされていない。近年、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)が免疫老化に関わる可能性が示唆されたため、本研究では、老化モデルマウスを用いて、MDSCの動態や機能を調べた。本研究の結果、老化モデルマウスの加齢に伴い、免疫抑制能の高いMDSCが増加することを見出し、この増加が肝臓の線維化や慢性炎症に先行して生じることが明らかになり、免疫老化制御における標的細胞としてのMDSCの重要性を示唆することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MDSCは、従来がん免疫の回避に寄与することは示唆されていたものの、MDSCと老化の関連性は、老齢マウスでMDSCが増加するという情報のみで、動態や機能的変化の時系列やその役割は明確ではなかった。本研究によって、加齢性表現型の中でも、MDSCの増加が極めて早期に生じ、炎症や線維化に先行することが判明したことで、MDSCを標的とした抗老化戦略の有用性が明確となり、MDSCの分化・機能を調節するという新たな抗老化戦略を提唱し、その実効性を検証するための重要な基盤を構築することができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To prevent age-related diseases increasing in super-aging society, it is necessary to control immunosenescence, which contributes to the onset of disease during the aging process, however, the complete mechanisms and target cells of immunosenescence have not been elucidated. Recently, it has been suggested the possibility that myeloid-derived suppressor cells (MDSC) may be involved in immunosenescence, in this study, I investigated the dynamics and the function of MDSC using aging-model mice (SOD1-KO mice). As a result of this study, I found that MDSC with high immunosuppressive ability increased in an age-dependent manner in SOD1-KO mice, and this increase happened prior to liver fibrosis and chronic inflammation, suggesting the importance of MDSC as target cells in regulating immunosenescence.

研究分野：薬理学

キーワード：骨髄由来免疫抑制細胞 老化 免疫老化 細胞分化 慢性炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界に先駆けて「超高齢社会」に突入している我が国にとって、「老化」とそれに関連する疾患群に対処し、健康寿命を延伸することは喫緊の課題である。加齢で生じる生物学的変化の中でも、「免疫老化 (immunosenescence)」は、極めて早期に生じる特性であり、病原菌などに対する免疫応答が低下するだけでなく、がん免疫の低下による発がん・転移の増加、異常な免疫応答の結果生じる慢性炎症 (関節リウマチなど) など極めて多くの加齢性疾患に寄与する。すなわち、免疫老化のメカニズムを理解し、それを阻止すれば、老化とその関連疾患を予防できる可能性が高い。

近年、免疫抑制系に関わる因子として、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) と呼ばれる新たな細胞集団が同定された。MDSC は、マウスでは表面抗原の CD11b, Gr-1 両陽性細胞として定義され、一酸化窒素 (NO) や arginase-1, 活性酸素種 (ROS) などを産生し、免疫細胞の増殖・活性化を直接抑制するだけでなく、制御性 T 細胞を誘導することも知られ、広範な免疫抑制能を示すため、免疫抑制系の極めて上流に位置する細胞であると考えられている。特にがんの領域において注目され、実際にヒトの担がん時にも MDSC は増加していることが報告されている。興味深いことに、最近では、老齢マウスの様々な組織において MDSC が著明に増加することが報告され、MDSC が広範な免疫抑制能を示すことを踏まえると、MDSC が免疫老化および個体老化に関わる可能性が高いと考えられるが、加齢によって生じる MDSC の数的・機能的変化が生じるタイミングやその役割については不明な点が多く残る。

2. 研究の目的

本研究では、免疫老化制御による老化の予防的医療の確立という最終目標を達成するために、免疫老化における MDSC の役割を明らかにし、その機能調節が抗老化に繋がるという実効性を立証するために実施した。まず、加齢に伴う MDSC の数的・機能的変化の詳細を明らかにするために、老化モデルマウスを用い、経時的に組織をサンプリングし、MDSC の数的変化を調べた。また、同時に各タイミングで MDSC のみをソーティングし、MDSC の機能的変化も併せて解析することで、加齢における MDSC の動態を統合的に評価した。さらに、老化モデルマウスにおける加齢性表現型の出現についても調べ、MDSC の動態と老化の時系列的関連性を明らかにした。

一方、MDSC の変動が実際の免疫応答に与える影響を明らかにするために、LPS に対する炎症応答に関して、MDSC の変動前後でそれぞれ評価し、免疫老化に MDSC が関与する可能性について追求した。

3. 研究の方法

(1) 老化モデルマウス

本研究では、老化モデルマウスとして、SOD1 欠損マウス (SOD1-KO, C57BL/6 background) を使用した。マウスは、全て山口東京理科大学薬学部動物舎で飼育し、飼料および水は自由摂取させた。本研究の実施にあたっては、山口東京理科大学の動物実験委員会による講習を受講の上、動物実験計画を申請し、その承認を受けた (承認番号: 動 2021 6 GA1, 動 2022 6 GA1 および 動 2023 6 GA1)。

(2) 骨髄および脾臓における MDSC の解析

野生型 (WT) および SOD1-KO マウスから大腿骨を摘出し、その両端を切断した後、冷 PBS にて押し出すことで骨髄細胞を回収した。また、脾臓は摘出後にすり潰し、脾細胞を回収した。標本細胞は ACK buffer にて溶血した後、抗体を反応させた。CD16/CD32 抗体にて Fc blocking を行った後、MDSC マーカーである CD11b, Gr-1, Ly-6G および Ly-6C に対する蛍光標識抗体で染色し、セルアナライザーにて染色細胞を測定・解析した。また、CD11b および Gr-1 に対する蛍光標識抗体で染色し、セルソーターを用いて、CD11b および Gr-1 両陽性細胞のみを単離し、後述の遺伝子発現解析を実施した。

(3) サイトカイン類の遺伝子発現解析

WT および SOD1-KO マウスから採取した脾臓、肝臓、脳、肺およびソーティングした MDSC より total RNA を回収し、サイトカイン類の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法により測定した。

(4) LPS 炎症モデルの作製および評価

免疫応答の評価として、細菌毒素である LPS を WT および SOD1-KO マウスの腹腔内に投与し、炎症応答性を評価した。LPS 投与 24 時間後に脾臓、肝臓および肺を採取し、各種遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法により測定した。

4. 研究成果

(1) 老化モデルマウスにおける脾臓および骨髄 MDSC 数の変化

ジェノタイピングおよび western blotting 法により SOD1 が発現していないことを確認した SOD1-KO マウスを老化モデルマウスとして目的の週齢 (18, 20, 22, 24 または 36 週齢) まで飼育した後、骨髄および脾臓を採取し、CD11b および Gr-1 両陽性細胞を MDSC として解析したところ、WT マウスでは、今回解析した 18 週齢から 36 週齢までの間に脾臓および骨髄中の MDSC 数はほとんど変動しなかった。一方で、SOD1-KO マウスの脾臓では、20-22 週齢頃から WT に比べて MDSC 数が著明に高値を示しはじめ、その後 36 週齢まで週齢依存的に増加し続けた (図 1A)。

一方、MDSC の産生源である骨髄においても同様に調べたところ、WT および SOD1-KO とともに今回用いた週齢の間では骨髄中の MDSC の総数には著明な変動は認められなかった (図 1B)。MDSC は、表面抗原の発現量の違いから 2 つの亜型に分類され、好中球に類似した形態をもつ polymorphonuclear MDSC (PMN-MDSC; CD11b⁺Ly-6C^{low}Ly-6G^{high}) と単球に類似した形態をもつ monocytic MDSC (M-MDSC; CD11b⁺Ly-6C^{high}Ly-6G⁻) に分類されるため、それぞれの MDSC 亜型の割合についても調べたところ、SOD1-KO マウスの脾臓および骨髄の両組織で、MDSC 数の増加と相関し、20-22 週齢頃から M-MDSC の割合が WT に比べて増加した (図 1C)。

これらの成績より、加齢に伴い体内の MDSC 数が増加するとともに、骨髄における MDSC の分化状態も変化することが示唆された。

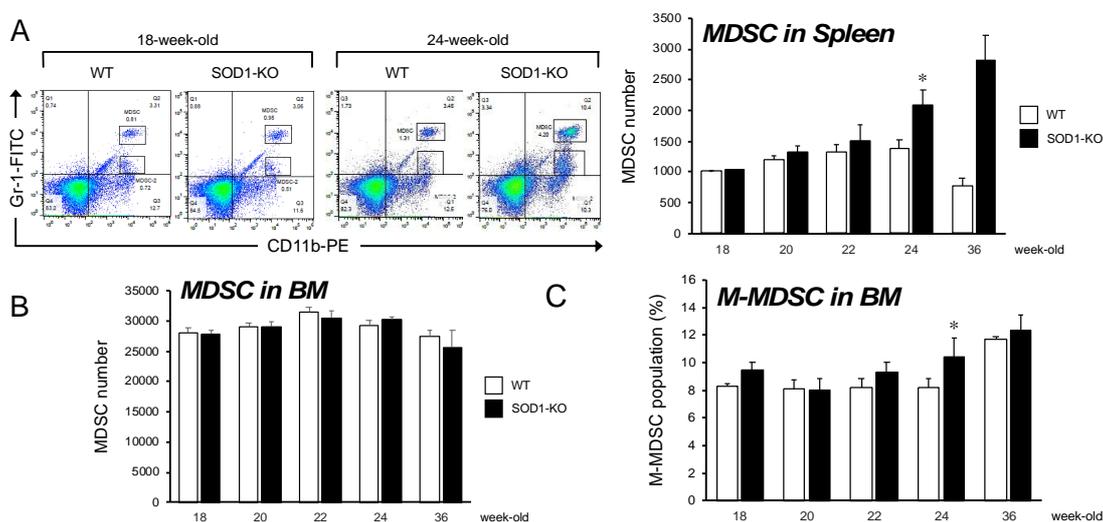


図1. WTおよびSOD1-KOマウスにおけるMDSC解析

A: 脾臓中MDSCのフローサイトメトリー典型例および定量グラフ, B: 骨髄中MDSCのフローサイトメトリー定量グラフ, C: 骨髄中M-MDSCおよびPMN-MDSC割合
SOD1-KOマウスでは、週齢依存的にMDSCおよびM-MDSC割合が増加した。

(2) 加齢に伴う MDSC 機能の変化

次に、加齢に伴い SOD1-KO マウスで増加した MDSC の機能的変化について明らかにするために、CD11b⁺Gr-1⁺細胞のみをソーティングし、機能的マーカーの発現を調べた。MDSC の免疫抑制能に関わる ROS、NO および PGE2 の産生酵素である NOX2、iNOS およびシクロオキシゲナーゼ-2 (COX2) および免疫抑制性サイトカインである IL-10 について評価したところ、WT 由来の MDSC では全ての週齢でこれら mRNA の発現に大きな違いは認められなかった。一方で、興味深いことに SOD1-KO マウス由来の MDSC では、MDSC が増加し始める 20 週齢以前から NOX2、COX2 および IL-10 の mRNA 発現が WT に比べ著明に高く、その後週齢依存的にさらに増加した (図 2)。

従って、加齢に伴い増加を始める前から、免疫抑制能の高い MDSC の割合が増加していることが示された。

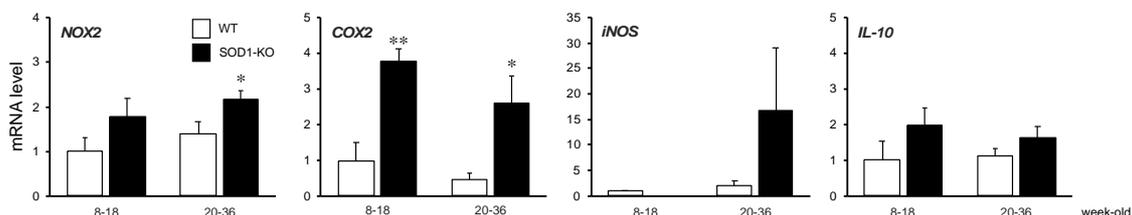


図2. WTおよびSOD1-KOマウス由来のMDSC中における免疫抑制因子の発現解析

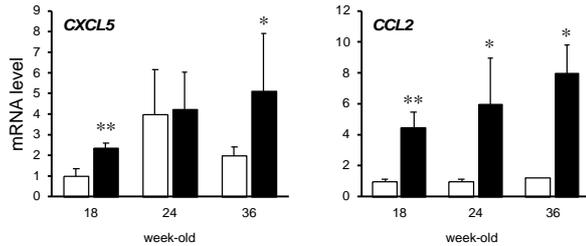
SOD1-KOマウス由来のMDSCでは、8-18週齢の段階からNOX2、COX2およびIL-10などの免疫抑制に関わる遺伝子発現量がWTに比べ高値を示した。

(3) 加齢に伴う MDSC 増加に関わる機序の解明

ここまでの成績から、免疫抑制能の高い MDSC が老化モデルマウスで加齢に伴い増加することを見出した。骨髄では、MDSC の大きな変化は認められなかったことから、全身組織への MDSC の遊走が促進されているのではないかと考えられた。そこで、MDSC の遊走に関連するケモカイン類の発現を調べたところ、PMN-MDSC の遊走に関わる CXCL5、M-MDSC の遊走に関わる CCL2 の発現が WT に比べ SOD1-KO マウスの脾臓および肝臓で増加しており、これらの発現増加は脾臓での MDSC 増加のタイミングとほぼ一致した (図 3A および B)。

従って、老化過程での末梢組織におけるケモカインの増加が骨髄からの MDSC 遊走を促進することが示唆された。

A Liver



B Spleen

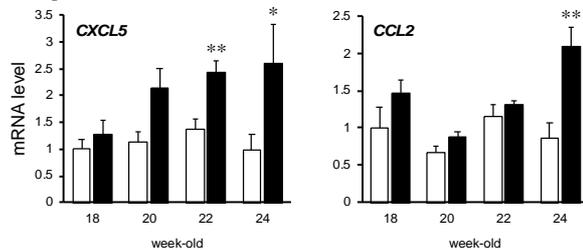


図3. WTおよびSOD1-KOマウスの肝臓および脾臓におけるMDSC遊走ケモカインの発現解析

SOD1-KOマウスの肝臓 (A) および脾臓 (B) では、WTに比べ、ケモカインのCXCL5およびCCL2の発現量が週齢依存的に増加し、これはMDSC増加タイミングと一致した。

(4) 加齢性表現型の出現タイミングと MDSC 動態の関係

老化モデルマウスにおいて MDSC が増加することは既に述べたが、MDSC 増加のタイミングで他の加齢性表現型は出現しているか否かについて詳細に検討した。老化の重要な指標として、獲得免疫系および自然免疫系の様々な免疫細胞の異常な活性化や炎症性サイトカインの蓄積が特徴として挙げられ、老化に伴って IL-6 や TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインが慢性的に増加することが知られている。まず、各週齢のマウスの脳、肺、肝臓および脾臓における炎症性サイトカイン発現を調べたところ、脳、肺および脾臓では炎症性サイトカイン発現量に WT と SOD1-KO マウスの間に大きな差は認められなかった (データ示さず)。一方、SOD1-KO マウスの肝臓において、WT に比べて、TNF- α および IL-1 β ともに 18 週齢から有意に増加した (図 4A)。SOD1-KO マウスの肝臓における炎症性サイトカイン発現の増加から、肝臓で早期に老化表現型が出現している可能性を考え、肝臓の各種病態に関わるバイオマーカーの発現についても検討した結果、肝線維化の指標である TGF- β および α -SMA が 36 週齢以降で顕著に増加した (図 4B)。さらに、肝臓切片を H&E 染色し、組織学的な解析も行ったところ、36 週齢の SOD1-KO マウスの肝臓では、白血球の浸潤が一部認められ、炎症病態が生じ始めていることが明らかとなった (図 4C)。

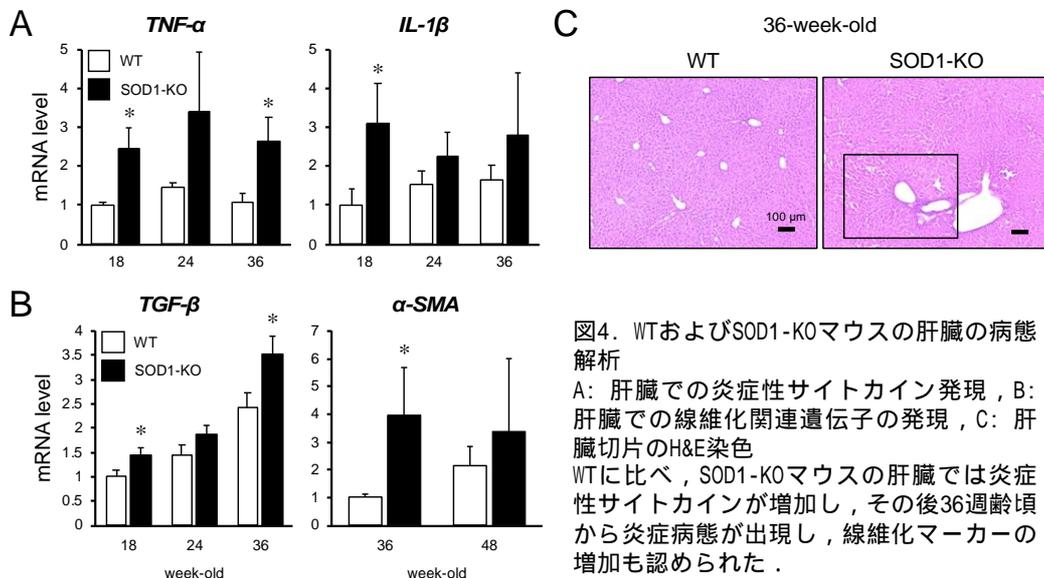


図4. WTおよびSOD1-KOマウスの肝臓の病態解析

A: 肝臓での炎症性サイトカイン発現, B: 肝臓での線維化関連遺伝子の発現, C: 肝臓切片のH&E染色
WTに比べ、SOD1-KOマウスの肝臓では炎症性サイトカインが増加し、その後36週齢頃から炎症病態が出現し、線維化マーカーの増加も認められた。

これらの成績から、SOD1-KO マウスにおいて MDSC が増加した 24 週齢前後では、低レベルのサイトカイン増加は認められるものの、老化関連疾患の発症は生じていないと考えられ、加齢に伴う MDSC の増加は老化表現型の出現に先行することが示唆された。

(5) 老化モデルマウスにおける炎症応答性と MDSC の関連性

これまでの成績から、様々な加齢性表現型に先行して MDSC が増加することが示されたため、この MDSC が増加したタイミングで免疫応答が変化するか否かについて検討した。本実験では、細菌性毒素である LPS に対する炎症応答性として評価した。MDSC が増加する前の 12 週齢において、WT では LPS 投与量依存的に肝臓の TNF- α 発現が増加した。同じ 12 週齢の SOD-1 KO マウスでは、WT に比べ、弱いものの LPS による TNF- α 発現増加が認められた。一方、MDSC が増加した後の 30 週齢では、WT では LPS による TNF- α 発現増加が生じたものの、SOD1-KO マウスでは、LPS による TNF- α の発現誘導は全く認められず（図 5）、MDSC が増加した老化モデルマウスでは、通常の炎症応答が起きず、免疫老化に類似した状態に陥っていると考えられた。

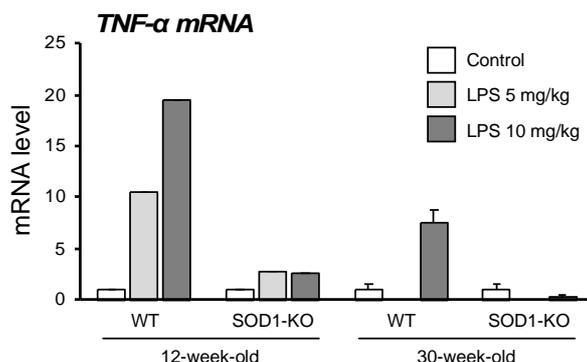


図5. WTおよびSOD1-KOマウスLPS応答性
MDSCが増加したSOD1-KOマウス（30週齢）
では、LPSを投与しても炎症性サイトカインは増加しなかった。

MDSC は、これまでがん免疫の回避に関わる免疫抑制系の細胞として認識され、実際の疾患が生じた後に機能すると考えられてきた。本研究では、老化モデルマウスを用いた解析により、MDSC が加齢の過程で増加することを見出し、明確な疾患が存在しない状態でも機能し、疾患の発症そのものに寄与する可能性を示した。さらに、炎症や線維化などの加齢性表現型に先行して MDSC が増加すること、さらには、MDSC が増加した個体では免疫応答に異常が生じている、すなわち「免疫老化」が起きている可能性を示唆したことで、MDSC が免疫老化制御の治療標的になり得ることを示した。本研究の成績は、MDSC の分化・機能を調節するという新たな抗老化戦略を提唱するために重要な基盤研究であり、非常に興味深い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yoshino Tetsuhiro, Yoneda Taichi, Yang Ximeng, Nishihara Masakazu, Ogawa Keiko, Kitamura Masashi, Ando Hirokazu, Nakashima Souichi, Horie Ichiro | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Conference report: Second annual young researcher forum of the Japan Society of Medical and Pharmaceutical Sciences for Traditional Medicine | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine | 6. 最初と最後の頁 144 ~ 147 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tkm2.1311 | 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 Murakami Kazuhito, Horie Ichiro, Isohama Yoichiro | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Goreisan inhibits vascular endothelial cell migration and angiogenesis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine | 6. 最初と最後の頁 83-90 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tkm2.1275 | 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 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Murakami Kazuhito, Horie Ichiro, Hara Chikuma Mariko, Shimizu Tomofumi, Matsumoto Chinami, Isohama Yoichiro | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Goreisan regulates AQP3 expression and improves diarrhea | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine | 6. 最初と最後の頁 91-99 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tkm2.1276 | 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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 上園 帆風、畠山 瑞生、中村 雪菜、濱崎 莉恵、川上 広宣、篠原 久明、堀江 一郎 |
| 2. 発表標題 Dexamethasoneはヒト骨髄由来免疫抑制細胞の顆粒球型分化を促進する |
| 3. 学会等名 日本薬学会第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 畠山 瑞生、上園 帆風、前田 真奈、徳本 裕乃、嶋本 顕、清水 孝彦、川上 広宣、篠原 久明、堀江 一郎 |
| 2. 発表標題 老化モデルマウスにおいて加齢に伴い骨髄由来免疫抑制細胞が増加する |
| 3. 学会等名 日本薬学会第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡村 康平、井山 浩気、上松 大佑、服部 祐里香、堀江 一郎、篠原 久明、川上 広宣 |
| 2. 発表標題 ORC結合性ssDNAの出芽酵母細胞内からの精製 |
| 3. 学会等名 令和5年度九州大学西風塾研究発表会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡崎 夢歩、小畑 綾夏、島田 瞭大、堀江 一郎、篠原 久明、川上 広宣 |
| 2. 発表標題 出芽酵母の増殖を相加的に制御するゲノム断片 |
| 3. 学会等名 令和5年度九州大学西風塾研究発表会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小畑 綾夏、岡崎 夢歩、島田 瞭大、堀江 一郎、篠原 久明、川上 広宣 |
| 2. 発表標題 出芽酵母ORCを正負に制御する遺伝子の遺伝学的探索 |
| 3. 学会等名 令和5年度九州大学西風塾研究発表会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 瀨崎 莉恵、中村 雪菜、上園 帆風、畠山 瑞生、上原 巧、福島 弘人、川上 広宣、篠原 久明、堀江 一郎 |
| 2. 発表標題 ヒト骨髄由来免疫抑制細胞の分化特性と薬物応答性 |
| 3. 学会等名 第40回日本薬学会九州山口支部大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 徳本 裕乃、畠山 瑞生、前田 真奈、上園 帆風、森永 真衣、嶋本 顕、清水 孝彦、川上 広宣、篠原 久明、堀江 一郎 |
| 2. 発表標題 老化モデルマウスにおいて加齢に伴い骨髄由来免疫抑制細胞が増加する |
| 3. 学会等名 第40回日本薬学会九州山口支部大会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |