

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659473

研究課題名(和文) MDSCに着目した自己免疫病態の解明と新規治療法開発

研究課題名(英文) Role for MDSC in the pathogenesis of autoimmune diseases and its application for the rapy

研究代表者

森信 暁雄 (Morinobu, Akio)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10294216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：SKG関節炎モデルマウスにおけるMDSCの動態を解析した。関節炎惹起によりMDSCが誘導された。MDSCを経静脈的に投与するとマウスの関節炎は軽快した。従って、MDSCは関節炎を抑制することが明らかとなった。さらに、JAK阻害剤はMDSCを誘導すること、JAK阻害剤による関節炎抑制効果は抗GR-1抗体でMDSCを除去することにより解除された。すなわちJAK阻害剤による関節炎抑制の一部はMDSCを介している。MDSCは関節炎治療の標的細胞の一つであることが結論された。

研究成果の概要(英文)：We have examined the role for MDSC (myeloid derived suppressor cells) in SKG arthritis model mouse. MDSC number was increased in arthritic mice and injection of MDSC reduced arthritis, indicating that MDSC is induced in arthritis and inhibits arthritis. Furthermore, we found that a JAK inhibitor or up-regulates MDSCs in arthritis model mouse in vivo, and depletion of MDSC by anti-Gr-1 antibody accelerated arthritis, indicating that JAK inhibitor ameliorates arthritis in part by inducing MDSC. MDSC is deeply involved in arthritis and could be a therapeutic target.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ 抑制性単球 JAK阻害剤

### 1. 研究開始当初の背景

MDSC は担癌マウス・ヒトのリンパ節、脾臓、癌組織に集積する myeloid 系の heterogeneous な細胞集団であり、顆粒球系と単球系が存在する。MDSC は骨髄の myeloid 系前駆細胞から癌細胞由来の因子により誘導されると考えられており、アルギニン代謝等を介して様々な T 細胞活性を抑制し、癌に対する免疫を抑制する。MDSC は、ある意味では免疫寛容を誘導する強力な免疫抑制細胞であるにも関わらず、他の疾患における役割はほとんど研究されていない。感染症や移植免疫ではわずかに報告されているが、特に免疫寛容が病態に関連している RA や SLE では全く報告がない。

### 2. 研究の目的

関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの膠原病では、免疫寛容機構の異常が病態に関与していると考えられるが、その詳細は明らかでない。

近年、癌組織には myeloid-derived suppressor cells (MDSC) と呼ばれる細胞集団が浸潤し、癌に対する T 細胞活性を抑制することが明らかになった。MDSC は癌に対する免疫寛容を誘導する細胞であるが、癌以外の分野ではほとんど研究されていない。

本研究では、自己免疫疾患における MDSC の動態を明らかにし、自己免疫疾患の細胞治療として MDSC の有効性を明らかにする。そして MDSC からみた新しい自己免疫疾患の病態を提唱する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ループモデルマウス、関節炎モデルマウスにおける MDSC の存在を明らかにする。

NZB/NZW マウスを用いて、8, 16, 24, 32, 40 週でリンパ節、脾臓、骨髄および腎臓の MDSC を FACS で検出する。マーカーは MHCclassII<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>GR1<sup>high</sup>Ly6C<sup>low</sup>Ly6

G<sup>high</sup>CD49d<sup>-</sup> の顆粒球系と MHCclassII<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>GR1<sup>int</sup>Ly6C<sup>high</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD49d<sup>+</sup> の単球系を検出する。存在が明らかになれば、さらに CD16, CD31, CD40, CD80, CD115, CD124, IL-4Ra などのマーカーで染色する。現在フローサイトメーターで 8 カラー染色が研究室では動いており、実験可能である。次に MDSC を単離して、T 細胞抑制活性を明らかにする。その作用機序として、iNOS, arginase, hemoxygenase, NADPH oxidase, などの発現を検討する。

SKG マウスでも Zymosan 投与前、1、2、4、6 週で同様の解析を行う。

以上の作業により、NZB/NZW マウスおよび SKG マウスにおける MDSC の存在の有無と、癌マウスにおいて報告されている MDSC との共通点、相違点を明らかにする。

これらのマウスで全く MDSC が認められない可能性もある。この場合には、腫瘍を移植して MDSC が誘導されるかどうかを確認する。または、の実験に進む。

#### (2) ループモデルマウス、関節炎モデルマウスに MDSC を投与し、治療効果を明らかにする。

SKG マウス骨髄から MDSC を作製する。作製のためのプロトコールはいくつか提唱されている。GM-CSF、G-CSF、IL-6、などを組み合わせて作製する。作製した MDSC の機能を a110MLR や代謝酵素の測定などで確認する。作製した MDSC を SKG マウスに静注する。関節炎スコアにてその治療効果を評価する。

同様に NZB/NZW マウス骨髄から MDSC を作製し細胞移入する。蛋白尿、生存

率などを指標にその効果を判定する。  
 作製した MDSC の表現型や機能が癌由来のものと異なる場合は、担癌マウスを作製し脾臓から MDSC を単離して投与する。

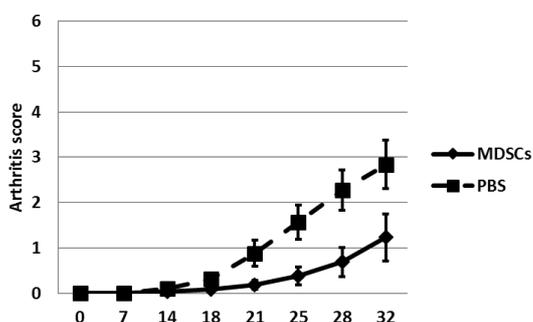
(3) SLE および RA 患者における MDSC の存在を明らかにする。

マウスにおいて MDSC が見られた場合には、SLE および RA 患者検体を用いてヒト MDSC を検出する。ヒト MDSC のマーカーは MHCclassII<sup>low</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>、および MHCclassII<sup>low</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup> とする。存在が明らかになれば、同様に CD16, CD31, CD40, CD80, CD115, CD124, IL-4Ra などのマーカーで染色する。RA 患者関節液を用いて同様の解析を行う。単離出来た場合には、iNOS, arginase, hemeoxygenase, NADPH oxidase, などの発現と活性を検討する。

4. 研究成果

(1) FACS で MDSC を検出することに成功した。脾臓や骨髄において、MDSC は SKG マウスで上昇していた。

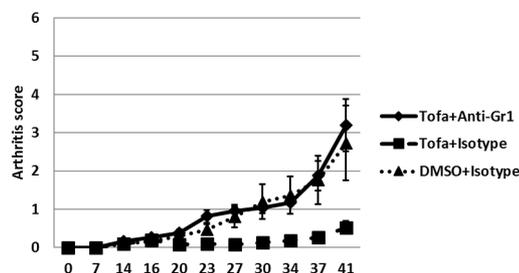
(2) MDSC を投与することにより、関節炎は軽減した。



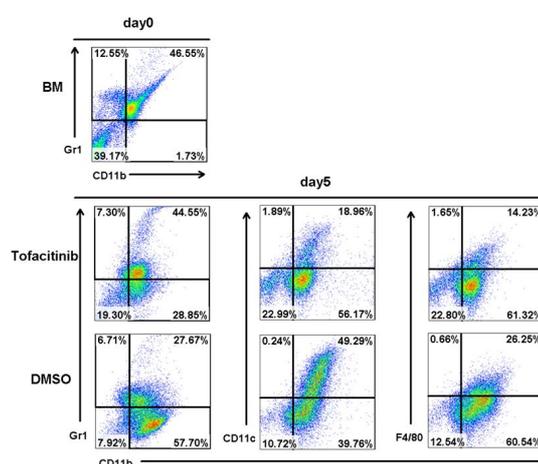
(3) MDSC を増加させる薬剤として、JAK 阻害剤を見つけた。

(4) さらに JAK 阻害剤の効果は抗 GR-1 抗体でキャンセルされることから、JAK 阻害剤の効果は、少なくとも一部は MDSC の誘導に

よることが明らかとなった。



(5) さらに JAK 阻害剤は試験管内で骨髄細胞からの MDSC を誘導し、樹状細胞の誘導を抑えることが明らかとなった



以上の検討により、関節リウマチにおいて MDSC は重要な役割を果たすこと、また、MDSC を誘導する薬剤は新たな創薬の標的となることが示された。

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2件)

1. Saegusa J, Irino Y, Yoshida M, Tanaka S, Kogata Y, Kageyama G, Tsuji G, Takenawa T, Kawano S, Kumagai S, Morinobu A. GC/MS-based metabolomics detects metabolic alterations in serum from SLE patients. Clin Exp Rheumatol. 2014

Jan-Feb;32(1):148. (査読有)

2. Matsuki F, Saegusa J, Miyamoto Y, Misaki K, Kumagai S, Morinobu A. CD45RA-Foxp3high activated/effector regulatory T cells in the CCR7+CD45RA-CD27+CD28+central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Sep 6;438(4):778-83. doi:p11: S0006-291X(13)00938-8. (査読有)

[学会発表](計4件)

1. Tofacitinib は Myeloid-derived suppressor cell を誘導し、SKG マウス関節炎を抑制する。西村 啓佑、三枝 淳、明石 健吾、西田 美和、高橋 宗史、古形 芳則、蔭山 豪一、森信 暁雄。日本リウマチ学会学術集会 東京 2014年4月24日
2. Tofacitinib facilitates expansion of myeloid derived suppressor cells and ameliorates arthritis in SKG mice. Nishimura K, Saegusa J, Akashi K, Morinobu A. 第42回日本免疫学会学術集会 幕張 2013年12月12日
3. Tofacitinib は Myeloid-derived suppressor cell を誘導し、マウス関節炎を抑制する。西村 啓佑、三枝 淳、松木 郁親、田中 姿乃、明石 健吾、森信 暁雄。日本臨床免疫学会 下関 2013年11月27日
4. CD45RA-FoxP3 high activated/effector T regulatory cells in the CCR7+CD45RA-CD27+CD28+ central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with RA. Saegusa J, Kumagai S, Morinobu A. 第

42回日本免疫学会学術集会 幕張 2013年12月12日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

森信 暁雄 (Akio Morinobu)

神戸大学大学院・医学研究科・准教授

研究者番号:10294216

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号: