

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461578

研究課題名(和文) リポソーム投与により誘導されるMDSC様細胞の機能発現に関わる分子基盤の解明

研究課題名(英文) Detection of molecules involved in the induction of immunosuppressive function of MDSC-like cells induced by liposome

研究代表者

東 寛 (AZUMA, Hiroshi)

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Myeloid-derived suppressor cell(MDSC)は、T細胞免疫応答を抑制する機能を有する。その抑制にはT細胞とMDSCとのcell-to-cell contact が必要だが、その分子は不明である。ラットにリポソーム粒子を静注すると、短期間で脾内に大量にMDSC様細胞(リポソーム捕捉細胞)が蓄積する。この細胞を用いて、当該分子の候補を探索した。

MDSC様細胞では、CD276(B7-H3)の発現の増加および細胞表面でのB7-H3の発現量が増加を見いだした。MDSCの機能の発現にB7-H3分子の関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Myeloid-derived suppressor cell (MDSC) appears in various pathological condition and suppress T cell immune response. Although cell-to-cell contact between MDSC and T cell is required for the suppression, the molecules involved in the contact remains unknown. When liposome particles are intravenously injected into rat, Considerable amount of MDSC-like cells (liposome-internalized cells) can rapidly accumulate in spleen. We further addressed its ability to produce cytokine. At the same time, tried to search the molecules involved in the cell-to-cell contact. Like MDSC, MDSC-like cells produce more IL-10 than normal macrophage. DNA microarray analysis revealed that B7-H3 message was amplified and cell surface expression B7-H3 was enhanced. Therefore, it is suggested that liposome can induce MDSC-like cells in vivo and B7-H3 molecules might be involved in T cell suppression.

研究分野：免疫学

キーワード：リポソーム MDSC immunosuppression liposome ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

免疫応答の調節を司る細胞群の一つに myeloid-derived suppressor cell(MDSC)がある。MDSC は T 細胞との cell-to-cell contact を通じて T 細胞の増殖を抑制するが、その分子基盤は不明である。MDSC を十分量得るには、動物を担がん状態にしなければならないなどの制限があった。我々はラットに、ある種のリポソームを経静脈的に投与すると、翌日には、脾内にリポソームを捕捉したマクロファージが大量に集積すること、それらの細胞が T 細胞の増殖を強力に抑制する機能を一過性に獲得すること、およびその機序が以下の2点で MDSC と類似している事をあきらかにしてきた。即ち、機能の発現には cell-to-cell contact が必要であること、そして NO が主たるエフェクターであることの2点である(1)。この方法を用いて、一匹のラットの脾臓から大量の MDSC 様の細胞を得て、それを MDSC の代替として実験に使用する事を思い立った。特に、MDSC と T 細胞との cell-to-cell contact に関与する分子 (T 細胞増殖抑制に関与する分子)を明らかにできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

また、リポソームを捕捉したマクロファージが如何なる機序で T 細胞の増殖に抑制的に作用するのか、分子レベルで明らかにする事を最終目的としている。その為に以下の事を明らかにする事を計画した。

- (1)投与されたリポソームを捕捉した脾マクロファージで、発現が増強している (あるいは減少している) 遺伝子を明らかにする。
- (2)(1)の遺伝子の中から、免疫応答の制御に関連し、かつ細胞膜上に発現している (cell-to-cell contact に関与していると想定される) 遺伝子
- (3) (2)の遺伝子産物が T 細胞に増殖抑制に関与しているか否か
- (4)サイトカインの産生動態がどのように影

響をうけているか

3. 研究の方法

(1)リポソーム溶液の調製

リポソームは、共同研究者の酒井(奈良県立医科大学学生化学)が調製したものを使用。

(2)動物およびリポソームと投与ルート

WKAH male rat (8-12 week)は、Japan SLC, Inc.(Shizuoka, Japan)より購入した。推定循環血液量の 20%(v/v)のリポソーム懸濁液を尾静脈より静注した。リポソーム懸濁液の脂質濃度はおおよそ 10g/dl 脂質である。また、リポソームのサイズは 250nm である。

(3)脾細胞浮遊液の調製

リポソーム投与 24 時間後に麻酔下で、無菌的に脾臓を摘出し、細胞浮遊液とした。赤血球を溶血剤(IBM International GmbH; Hamburg, Germany)を用いて溶血した後、10% FCS 加 RPMI1640 で洗浄した後に、1%FCS/PBS で2回洗浄したのち10% FCS 加 RPMI1640 にて 2×10^6 /ml の細胞浮遊液とした。これらをリポソーム負荷脾細胞とした。コントロールとして生理食塩水を投与したラットから摘出した脾細胞を用いた。

(4)CD11b/c 陽性細胞の除去

リポソーム負荷脾細胞を PE 標識 rabbit-antiCD11b/c (OX-42)(BD Pharmingen, Lee Pont de Claix, France)で染色したのち、CD11b/c 陽性細胞を抗 PE Microbeads(Meltny Biotec, Singapore, Singapore)を用いて濃縮した。

(5)遺伝子発現プロファイルの検討

リポソーム負荷脾細胞およびコントロール脾細胞のそれぞれから磁気ビーズを用いて濃縮した CD11b/c 陽性細胞より、mRNA を抽出し遺伝子発現プロファイルの比較検討を Agilent 社のラット用 DNA マイクロアレイを用いて行い(受託検査を依頼)、リポソーム負荷脾細胞で発現の増強しているメッセージを選び出した。

(6)Flow cytometry による細胞表面抗原の解

析

細胞表面抗原の検出に用いた一次抗体は、PE 標識 rabbit-antiCD11b/c(OX-42) (BD Pharmingen, Lee Pont de Claix, France)、rabbit anti-rat CD276(B7-H3) antibody (polyAb, sc-66814, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)および rabbit anti-rat CD274(B7-H1, PD-L1) antibody (polyAb, ab131073, Abcam)。二次抗体として FITC 標識 goat anti-rabbitIgG(H & L)(polyAb, ab6717, Abcam)を使用した。

(7)培養液中のサイトカインの測定

Con A 存在下でリポソーム負荷脾細胞あるいはコントロール脾細胞を 72 時間培養したのち、上清を回収し、測定まで凍結保存した。培養液中の NO 濃度は NO assay kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN)を用いて行った。IL-10, IL- β , そして VEGF の測定は Bioplex system (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA)を用いて行った。また、LPS 存在下で脾細胞を 24 時間培養し、上清中の IL- β を測定した。この場合は rat IL-b assay kit (R&D Systems Inc., MN)を用いた。各々のアッセイは duplicate あるいは triplicate で行い、それらの平均値を統計解析に用いた。

(1) リポソームを捕捉したマクロファージが T 細胞の増殖を抑制する機能を一過性に持つ。その際に、リポソームを捕捉したマクロファージ内で発現の増強する 6 個の遺伝子を見つける事ができた(表 1)。その中で、cell-to-cell contact に必要な条件である細胞表面に発現していて、かつ免疫応答に関与している事が知られている分子が、CD276(B7-H3)であった。

4. 研究成果

(1) リポソームを捕捉したマクロファージが T 細胞の増殖を抑制する機能を一過性に持つ。その際に、リポソームを捕捉したマクロファ

ージ内で発現の増強する 6 個の遺伝子を見つける事ができた(表 1)。その中で、cell-to-cell contact に必要な条件である細胞表面に発現していて、かつ免疫応答に関与している事が知られている分子が、CD276(B7-H3)であった。

表 1. 濃縮したCD11b/c陽性細胞で発現の増強している遺伝子

	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

実験は2回行い、2回とも同じ結果であったもの6遺伝子を発現の増強しているものとした。数字はコントロールを1とした場合の値である。

(2) 実際にリポソームを捕捉したマクロファージでは、B7-H3 の発現が高まっている事が確認できた(図 1)事から、B7-H3 が MDSC と T 細胞との cell-to-cell contact に関与している分子の候補の一つであると判断された。

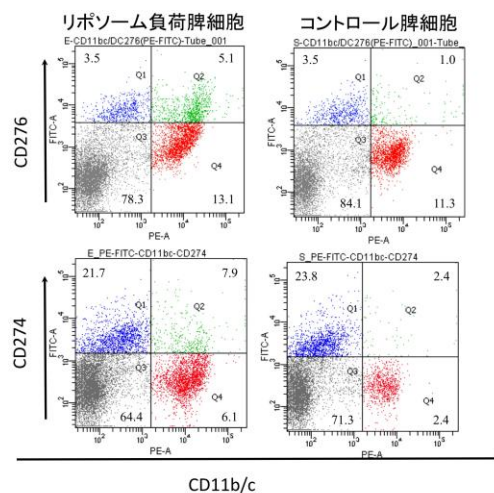


図 1. リポソーム負荷脾細胞のマクロファージ(CD11b/c陽性細胞)では、CD276の(B7-H3)発現が増強している。一方、CD274(B7-H1)の発現の増強はごく僅かである

(3) また、リポソームを補足したマクロファージ (MDSC 様細胞) と MDSC の新たな類似点として、IL-10 の産生が高まっている事を示す事ができた(図 2)。

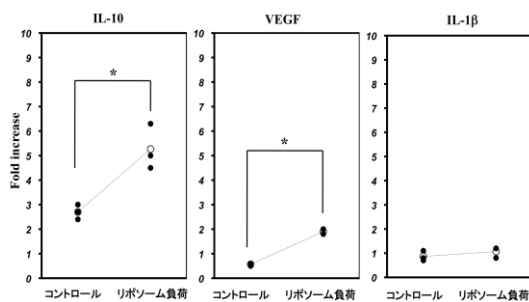


図 2. リポソーム負荷脾細胞ではCon A 刺激に対して、IL-10の産生の増強率が明らかに高まっている事がわかる。VEGFやIL-1βでは、僅かに傾向があるのみ

リポソームのようなナノ粒子の静脈内投与により、MDSC 様の細胞が誘導出来る事は極めて興味深い発見である。また、この細胞では B7-H3 分子の発現が増強しているという結果から、いままで不明であった、T 細胞と MDSC との cell-to-cell contact に関与する分子の一つが B7-H3 である可能性が高まった。今後の検討で機能との関連性が否定されたとしても、B7-H3 が MDSC のマーカーの一つとなりうると思われる。また、一連の研究成果は、リポソームのような、生体内で分解されるナノ粒子を用いて MDSC を誘導する方法や、H7-H3 をマーカーとして MDSC を除去する方法の開発につながる事が期待される。

<引用文献>

(1) Takahashi T, Azuma H, Sakai H, Sou K, Wakita D, Abe H, Fujihara M, Horinouchi H, Nishimura T, Kobayashi K, Ikeda H. Phagocytosis of liposome particles by rat splenic immature monocytes makes them transiently and highly immunosuppressive in *ex vivo* culture condition. *J Pharmacol Exp Ther* 337, 2011, 42-49.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Azuma H, Yoshida Y, Takahashi H, Ishibazawa E, Kobayashi H, Sakai H, Takahashi D, Fujihara M. Liposomal microparticle injection can induce

myeloid-derived suppressor cells

(MDSC)-like cells in vivo. *Immunopharm.*

Immunot. 39, 2017, 140-147.

Doi: 10.1080/08923973.2017.1306867

② Fujihara M, Takahashi D, Abe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Ikeda H, Azuma H. Primary and secondary immune response to keyhole limpet hemocyanin in rats after infusion of hemoglobin vesicle, an artificial oxygen carrier. *Artif. Organs*, 38, 2014, 234-238.

[学会発表] (計 5 件)

① 第 68 回 北日本小児科学会 H28.9.10 弘前

「membrane-derived microvesicle による免疫抑制細胞(MDSC)の誘導について

② 日本血液代替物学会 第 23 回年次大会 H28.11.24-25 東京

「リポ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 第 22 回日本血液代替物学会年次大会 H27.10.22-23 熊本

シンポジウム I 「人工赤血球製剤の臨床への橋渡研究」

「人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) を構成する脂質 2 重膜の薬理作用について

④ 第 62 回日本輸血細胞治療学会総会 H26. 5. 15-17 奈良

シンポジウム 12 輸血治療を補完する人工赤血球製剤の効力と安全性

S-12-2 人工赤血球製剤の血液学的、免疫学的安全性 東 寛、藤原満博、酒井宏水

⑤ 第 21 回日本血液代替物学会年次大会 H26. 12. 8-9 東京

シンポジウム: 人工赤血球製剤(ヘモグロビン小胞体)の効力と安全性

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)を構成する脂質 2 重膜のもつ免疫調節効果について

[図書] (計 1 件)

① Azuma, H.; Fujihara, M.; Sakai, H.

Biocompatibility of hemoglobin vesicles,
a cellular-type artificial oxygen carrier,
on blood cells and plasma proteins in vitro
and in vivo. In Oxygen Carriers and Red
Cell Substitutes and Oxygen Therapeutics
ed.; Kim, H.W.; Greenberg, A.G., Eds.;
Springer-Verlag: Heidelberg New York,
2013; P:385-397, DOI:
10.1007/978-3-642-40717-8_22

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：リポソームを含有する免疫抑制剤及び
これを用いた抑制性マクロファージの誘導
方法

発明者：東 寛、酒井 宏水

権利者：旭川医科大学

種類：特許

番号：特許願 2015-068296 号

出願年月日：平成 27 年 3 月 30 日

国内外の別： 国外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 寛 (AZUMA, Hiroshi)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：00167909

(2) 研究分担者

酒井 宏水 (SAKAI, Hiromi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70318830

長森 恒久 (NAGAMORI, Tsunehisa)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：40400098

岡嶋 一樹 (OKAJIMA, Kazuki)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：70213931

高橋 弘典 (TAKAHASHI, Hironori)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：50431408