

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2014.02) 14巻1号:85～87.

平成24年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題
抑制性マクロファージの機能発現に関わる分子基盤の解明

東 寛、小林 博也、木村 昭治

依頼稿 (報告)

平成 24 年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題 抑制性マクロファージの機能発現に関わる分子基盤の解明

東 寛* 小林博也** 木村昭治***

背 景

マクロファージは活性化されると、大きく二つの性質を持つものに分化する。これを macrophage polarization 呼び、一方を M1 type、他方を M2 あるいは classically activated macrophage および alternatively activated macrophage という。M1 type は、IFN- γ 単独あるいはそれと TNF- α や GM-SCF 等のサイトカイン、LPS 等の細菌由来の刺激により誘導される。一方、M2 type は、Th2 サイトカインである IL4, IL13 等により誘導される。M1 type が antimicrobial/inflammatory response を荷なっているのに対して M2 type は、その対局として anti-inflammatory 作用とともに組織修復にも重要な役割を荷なっているとされている。

Tumor associated macrophage (TAM) は M2 のフェノタイプを持ち、担がん状態の宿主で、特に腫瘍周辺に集積し、腫瘍免疫応答を抑制することが知られている。M2 type macrophage に関連するもう一つの細胞群として、immunosuppressive macrophage (Mis) がある。肺胞マクロファージの一部あるいは mycobacterial infection、protozoal infection において見いだされることが古くから報告されており、これも強力な T 細胞増殖抑制効果をもっている¹⁾。

Myeloid derived suppressor cell (MDSC) は、様々な病的状態 (癌、感染等) において生体内に出現し、強力な T 細胞機能抑制を誘導する、未熟な骨髄由来細胞の不均一な細胞集団と定義される。腫瘍組織周辺に存在する MDSC は、TAM と同じく腫瘍特異的 T 細

胞の抑制に関与している。実際、MDSC の一部は in vivo で TAM に変化するとの報告もある²⁾。現状では、MDSC の機能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となっている³⁾。

MDSC, TAM そして Mis はいずれも M2 polarization 側に位置するものと考えられており、実際これらの細胞群の T 細胞増殖抑制の機序には幾つかの共通点がある。例えば、作用の発現に NO が関与していること、多くの場合、抑制効果の発現には cell-to-cell contact が必要な事などである^{1,4,5,6)}。しかしながら、cell-to-cell contact に関与する分子基盤に関しては、MDSC 側および T 細胞側とも未だ明らかにされていない。

我々はラットにある種のリポソームを投与すると、脾臓内に強力な T 細胞増殖抑制効果を持つマクロファージが誘導されることを見いだした⁷⁾。その作用機序を解析した結果、抑制効果の発現に NO が関与していること、かつ cell-to-cell contact が必要であることを見いだした。即ち、誘導される Mis は、その作用機序からは、既に報告されている MDSC (あるいは TAM) 細胞群との共通点を有する。この系を用いれば、T 細胞増殖抑制効果を持つ Mis そして MDSC 細胞群に特徴的に発現している遺伝子群および cell-to-cell contact に関与する分子を見いだすことができると考えられる。

方 法

1. ラットへの操作

リポソームをラットに投与後、脾臓を摘出し、リポ

*旭川医科大学 小児科学講座 **病理学講座 (免疫病理分野) ***看護学講座

ソーム貪食細胞を CD11b/c をマーカーとし、磁気ビーズを用いて純化した。純化した脾細胞分画から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析の試料とした。コントロールは生理食塩水を静注したラットから採取した脾臓を用いて作成した。

2. DNA マイクロアレイによる遺伝子プロファイルの解析

上記のように抽出した RNA をから Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用い cDNA の合成と cRNA のラベルと増幅をおこなった。ラベルした cRNA をマイクロアレイ (whole rat, 44,000 gene, Agilent Technologies) にアプライし、ハイブリダイゼーションをおこなった。マイクロアレイの洗浄と乾燥後、Agilent Technologies Microarray Scanner を用いてスキャンした。得られた数値化データはグローバルノーマライゼーションによってアレイ間の補正をおこなった。生理食塩水 i.v. 後とリポソーム i.v 後の結果を比較し、前者と比較して 2.6 倍以上発現量の差がみとめられた場合を有意と判定した。

結果および考察

1. CD11b/c陽性細胞の純化結果

磁気ビーズを用いた純化操作により CD11b/c + 細胞の割合は数%から 50% 前後に高めることができたので、当該細胞集団の遺伝子発現プロファイルをよく反映することができるものと判断した。

2. 遺伝子プロファイルの解析結果

遺伝子発現量をコントロールと比較した結果、2 回の実験で 2 回とも Fold increase が 2.6 以上であったものが 168 遺伝子あった。

その中から、数個の遺伝子についての結果を表にした (表 1)。

表 1

	Exp. 1	Exp. 2
Mmp14	57.2	51.3
Ccl9	37.4	46.43
ApoE	16.8	9.8
IL-18bp	11.39	13.1
IL-1 α	5.6	9.9
CD276	5.27	7.21

ApoE メッセージの増加は、貪食したリポソームの構成成分である脂質を代謝する為には、必須の反応であると考えられる。ApoE メッセージの増強が観察されたことから、回収した細胞群が、目的の細胞を十分に含んでいたことを示しているものと考えられる。

Mmp14 と Ccl9 はいずれの実験でも非常に強い発現の増強を認めたが、その意義については不明である。

CCL9 は主にマクロファージから産生され、その受容体が CCR1 である。実験結果から、リポソーム貪食細胞が、CCR9 を産生して、CCR1 を発現している細胞を集積する作用を発揮する事が推測できる。

IL-1 α は主としてマクロファージから産生されるものであり、リポソーム投与後の CD11b/c + 細胞群で遺伝子発現の増強を認めていることが示されたが、IL-1 β のメッセージの増強は認めなかった。

IL18bp もマクロファージから産生され、IL18 と結合することにより、IL-18 の IFN- γ の産生増強効果を減弱する作用を有する。この事が、T 細胞増殖抑制にどのように関与しているのかは、不明である。

いずれにしても、CCL9, IL-1 α , IL-18bp はいずれもマクロファージの産生する物質であり、我々の実験系における immuno suppressive macrophage を特徴的づける遺伝子発現パターンを示しているものと思われる。

CD276 は、B7-H3 分子と同じものであり、免疫応答の制御に関わる分子である。その機能に関しては、T 細胞機能を促進するという報告と抑制するという相反する 2 つの報告がある⁸⁾。我々の系においては、B7-H3 が T 細胞の増殖を抑制する事に関与している可能性があるため、今後 B7-H3 の役割について、検討を進めて行きたいと考えている。

参考文献

- 1) Tomioka H, Tatano Y, Maw WW, Sano C, Kanehiro Y, Shimizu T. Characteristics of suppressor macrophages induced by mycobacterial and protozoal infections in relation to alternatively activated Ms macrophages. Clinical and Developmental Immunology 2012 doi:10.1155/2012/635451.
- 2) Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C, Locati M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the

- diversity of macrophage activation. *Human Immunology* 70: 325-330, 2009.
- 3) Osbrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182 4499-56, 2009.
- 4) Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in Kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* 180:7898-7906, 2008.
- 5) De Wilde V, Van Rompaey N, Hill M, et al. Endotoxin-induced myeloid-derived suppressor cells inhibit alloimmune responses via hemeoxygenase-1. *J Transplant* 9:2034-2047, 2009.
- 6) Gabrilovich D, Kusmartsev S. STAT 1 signaling regulates tumor-associated macrophage mediated T cell depletion *J Immunol* 174:4880-4891, 2005.
- 7) 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* 337:42-49, 2011.
- 8) Leitner J, Klauser C, Pickl WF, Stockl J, Majdic O, Bradet AF, Kreil AP, Dong C, Yamazaki T, Zlabinger G, Pfistershammet K, Steinberger P. B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: No evidence for B7-H3 and TREML2 interaction. *Immunology* 39: 1754-1764, 2009.