

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	吉田 陽一郎
学位論文題目			
Contribution of long-chain fatty acid to induction of myeloid-derived suppressor cell (MDSC)-like cells - induction of MDSC by lipid vesicles (liposome) (長鎖脂肪酸による骨髄由来免疫抑制細胞様細胞誘導への関与 -脂質小胞(リポソーム)によるMDSCの誘導)			
共著者名			
長森恒久,石羽澤映美,小林博也,久禮智子,酒井宏水,高橋大輔,藤原満博,東寛 Immunopharmacology and Immunotoxicology 誌 42巻 614-624頁 令和2年			
研究目的			
<p>リポソームとは脂質二重膜を有する小胞である。既に我々はPEG化リポソーム (DPPC/CHOL/DHSG/PEG-DSPE-liposome) をラットに静脈内投与すると、脾内に脾T細胞の増殖反応を強力に抑制する細胞が誘導される事を見出し報告した。今までの検討で、以下の事が明らかになっている。1:当該細胞はリポソームを捕捉した脾マクロファージである、2: T細胞増殖抑制にはcell-to-cell contactが必要である、3: T細胞増殖抑制の直接的エフェクターがNOである。これらの結果から、当該細胞が骨髄由来免疫抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell:MDSC) に類似していることが明らかとなった。本研究は、この細胞に関して、以下の点について明らかにすることを目的とした。すなわち、1)このMDSC様細胞を特徴付ける細胞表面マーカー、2)リポソームに誘導されたMDSC様細胞で活性化される刺激伝達系、特にNFκB経路の活性化について、3)MDSC様細胞の誘導がPEG化リポソームに特異的な現象であるか否か、の3点である。</p>			
材料・方法			
<p>1) リポソーム浮遊液の調製 研究に使用したリポソームは、1,2-dipalmitoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) / cholesterol (CHOL) / 1,5-<i>O</i>-dihexadecyl-<i>N</i>-succinyl-L-glutamate (DHSG) / polyethylene glycol-conjugated 1,2-distearoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphatidylethanolamine (PEG5000-DSPE) を含み、それぞれのモル比が5/4/0.9/0.03となる様に調製した (DPPC/CHOL/DHSG/PEG-DSPE-liposome)。他に1,2-dimyristoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC), 1-palmitoyl-2-oleyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC), そして 1,2-oleyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC) のみで構成されたりポソーム、あるいはそれぞれにコレステロールを加えたりポソームを調製した(DPPC-liposome, POPC-liposome, DMPC-liposome, DOPC-liposome, DPPC/CHOL-liposome, POPC/CHOL-liposome, DMPC/CHOL-liposome, DOPC/CHOL-liposome)。各リポソームは脂質濃度が5.6g/dlになるように生理食塩水に懸濁した。</p>			
<p>2) リポソーム注入と脾細胞浮遊液の調製 ラットの尾静脈よりにリポソーム懸濁液を投与し、18時間後に脾臓を切除して、plain RPMI1640に浸漬し摩砕した。得られた脾細胞浮遊液中の赤血球を溶血したのち、最終的に10%FCS加RPMI1640を用いて2×10^6 (cells/mL) の脾細胞浮遊液とした。これをリポソーム負荷脾細胞と定義した。</p>			
<p>3) ConA刺激下のT細胞増殖の評価 リポソーム負荷脾細胞をConcanavalin A (0.3 or 3μg/ml)存在下で72時間培養し、プロモデオシキウリジンもしくはトリチウムチミジンのDNAへの取り込みを指標としてT細胞の細胞増殖反応を評価した。</p>			

4) CD11b/c+細胞におけるB7-H3の発現の解析／ウエスタンブロット法によるiNOS、I κ b α の検出

ウサギ抗ラットCD276(B7-H3)抗体およびFITC標識抗ウサギIgGとPE標識マウス抗ラットCD11b/c抗体を使い、flow cytometryにてtwo color 解析を行った。また、リポソーム負荷脾細胞をPE標識マウス抗ラットCD11b/c抗体で染色し、抗PEマイクロビーズを用いてCD11b/c+濃縮分画と枯渇分画を得て、それぞれの分画をウエスタンブロットし、iNOS (inducible nitric oxide synthase) 、I κ b α の検出を試みた。

5) 磁気ビーズを用いたB7-H3+細胞の分離

B7-H3+分画の分離には、 1×10^7 個の脾細胞の細胞ペレットにウサギ抗ラットCD276(B7-H3)抗体を添加し、抗ウサギIgG磁気マイクロビーズを用いて、B7-H3+細胞とB7-H3-細胞画分を得た。

6) 遺伝子発現の解析

ラットにリポソームを負荷し、24時間後に脾臓を摘出し、脾細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液から磁気ビーズを用いてMHCクラスII-/CD11b/c+細胞の分離を行った。分離した細胞から抽出したTotal RNAをサンプルとして、マイクロアレイシステム (Whole Rat Genome; Agilent Technologies Inc.) を用いて、遺伝子発現解析を行った。解析は2回施行し、コントロールと比較して再現性を持って発現が増強した遺伝子を検索した。

7) 脾臓重量の比較と組織染色

脾臓摘出前のラットの体重と摘出した脾臓の重量を測定しその比を算出したものについて解析した。また、切除した脾臓をホルマリンで固定し、ヘマトキシリン-エオジンで染色し光学顕微鏡で観察した。

結 果

遺伝子発現の解析

磁気ビーズを用いてCD11b/c+ MHCクラスII-細胞分画を濃縮し遺伝子発現解析を行い、リポソーム負荷後に発現が増加する遺伝子を探索した。32遺伝子において再現性をもってコントロールと比べ5倍以上の発現の増加が認められた。それらのなかでCc1-9, IL-18bp, IL-1 α , B7-H3の4遺伝子が免疫反応に関与していると判断された。

Flow cytometerを用いたB7-H3分子の細胞表面への発現

リポソーム静注24時間後のラット摘出脾細胞のうち、CD11b/c+細胞の一部がB7-H3を発現していた。

B7-H3発現CD11b/c+細胞はT細胞増殖抑制の活性を有した

リポソームと投与したラットの脾細胞から、磁気ビーズを用いてB7-H3+細胞を除去するとT細胞の増殖は明らかに正常に近いレベルまで回復した。

Inducible NOS (iNOS) はCD11b/cを発現しているB7-H3細胞でも観察された

B7-H3+細胞のiNOS及びI κ b α の発現の有無をWB法を用いて検討した。リポソーム負荷脾細胞からB7-H3+細胞を除去すると、iNOSのシグナルは低下し、I κ b α のシグナルはより増強された。

T細胞抑制の誘導はDPPCを含むリポソームに特異的ではない

各種リポソームのうち、DOPC-liposomeを除きDPPC-liposome、DMPC-liposome、POPC-liposomeはT細胞抑制を誘導した。さらに、光顕像および脾臓重量の評価のいずれにおいても、これら3つのリポソームは脾臓に蓄積するが、DOPC-liposomeは蓄積しないことが示された。DOPC-liposomeはT細胞抑制を誘導しなかったが、膜にコレステロールを含有したDOPC/CHOL-liposomeはT細胞抑制を誘導した。

考 案

T細胞抑制を担う細胞はB7-H3陽性

リポソーム負荷ラット脾細胞の遺伝子発現解析スクリーニングの結果、32遺伝子の発現が亢進しており、うち4つの遺伝子が免疫反応に関与していると判断された。その中でも、B7-H3分子は細胞表面に発現し、免疫調節因子として機能するB7ファミリーに属していることから、MDSC様細胞を特徴付けるマーカーとなる可能性があると思われた。予想通り、リポソーム負荷脾臓にCD11b/c+ B7-H3+細胞が出現した。さらに、これらからB7-H3+細胞を除去すると、Con A誘導T細胞の増殖が有意に回復した。このことから、B7-H3+分子がMDSC様細胞のマーカーの一つと考えられる。B7-H3+細胞においてiNOSが検出された事は、この事を支持すると考える。

リポソームの内包化がNF κ Bシグナル伝達経路を活性化する可能性

NF κ Bシグナル伝達経路の活性化は、MDSCの免疫抑制活性を高めることが報告されている。よって我々が注目したB7-H3発現CD11b/c+細胞においてもNF κ B経路が活性化されていると推測された。予想通りリ

ポソーム負荷脾細胞のCD11b/c+細胞濃縮画分では、Ikbaのシグナル強度の低下が観察された。この結果は、リポソーム内在化マクロファージでは、NFκBシグナル伝達経路が活性化されていることを示している。さらに、B7-H3発現CD11b/c+細胞でもNFκBシグナル伝達経路が同様に活性化されていた。これらの結果は、B7-H3+細胞がT細胞抑制活性を有することを示したデータと矛盾しない。NFκBシグナル伝達経路の活性化が、iNOS産生およびNO放出に関与していると思われる。

細菌由来のLPSやリポペプチドとともに、パルミチン酸などの長鎖脂肪酸が、Toll様受容体2 (TLR-2) 依存性またはTLR-4依存性のシグナル伝達経路を直接誘導することが報告されている。DPPCを構成する脂肪酸がパルミチン酸であることから、リポソームを内包した細胞内には外因性パルミチン酸が過剰に蓄積していると考えられる。その結果、パルミチン酸の一部が細胞外に排出され、細胞表面に発現しているTLR2やTLR4の活性化につながった可能性がある。また、過剰なパルミチン酸の細胞内への蓄積は、小胞体 (ER) ストレスを誘発することも知られている。従って、ERストレスが引き金となり、Ikbaの分解が起こり、その結果、NFκBシグナル伝達経路が活性化される可能性もあると考える。

免疫抑制細胞を誘導するためには安定したリポソーム形成が重要

我々は既に、リポソームを構成する成分の中のDPPCが、T細胞抑制活性を誘導する因子であることを報告している。今回の研究ではDPPC-liposomeに加え、DMPC-liposome、POPC-liposomeにも有意なT細胞抑制活性が見られ、これらは全て脾臓へ蓄積していた。一方で、DOPC-liposomeはT細胞抑制活性を誘導せず、かつ脾臓への蓄積が認められなかった。4つのリポソームの中で、DOPC-liposomeは最も低い相転移温度 T_c (-20°C) を有しており不安定なリポソームである。そのため、血中で小胞状の形態を保持することができずマクロファージによるDOPC-liposomeの内包化がわずかであった可能性がある。一方でコレステロールを含有したDOPC/CHOL-liposomeは、安定であり小胞状の形態を保持するので、脾臓マクロファージによって内包化され、同時にマクロファージがT細胞増殖抑制能を獲得したと推論できる。すなわち、血中で安定したリポソーム小胞が存在していることが重要であると思われる。また、DPPC-liposomeといったパルミチン酸から構成されるリポソームのみならず、その他の長鎖脂肪酸を含有するリポソームにおいてもT細胞抑制活性が見られたことは、MDSC様細胞の誘導がDPPC/CHOL/DHSG/PEG-DSPE-liposomeに特異的な現象ではなく、長鎖脂肪酸のマクロファージへの内包化こそが免疫抑制活性の誘導に重要である事を示していると思われる。

長鎖脂肪酸の蓄積が免疫抑制機能の誘導に関与している可能性がある

最近の報告では、脂質の過剰な蓄積が細胞を解糖から脂肪酸酸化へと代謝経路を再プログラムさせ、酸化した脂質をエネルギー源として利用することがMDSCsの免疫抑制機能の増強に極めて重要であるとされている。実際に担癌状態の患者やマウスのMDSCsでは脂質蓄積が高いことが報告されている。腫瘍細胞から放出された細胞膜由来のMicrovesicle(MV)は腫瘍関連マクロファージに取り込まれ、免疫抑制機能を獲得していることが報告されており、MVに含まれているタンパク質や核酸がこの事に関与しているとされている。しかし、MVを構成している細胞膜(脂質)の影響は不明である。本研究で使用したリポソームはリン脂質二重膜から構成されていることから、人工的なMVとみなすこともできる。すなわち、得られた結果は、MVの脂質成分もマクロファージの免疫機能影響を与えている可能性を示唆していると考えられる。しかし、マクロファージのリポソーム内包化のメカニズムや、脂質蓄積によって引き起こされると推察されるERストレスのメカニズムの詳細は不明であり今後の重要な検討課題である。

結 論

マクロファージはリポソームを内包化することによりB7-H3を発現するMDSC様細胞へと変化しうることを明らかにした。リポソーム構成成分の中でも長鎖脂肪酸がマクロファージの生体内での免疫抑制活性獲得に関係している知見を得た。MDSC様細胞を生体内で人工的に誘導しうるという本研究結果は、腫瘍関連マクロファージの免疫抑制機能のメカニズムの解明や炎症病態をコントロールするための創薬につながると思われる。

引用文献

1. Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C, Locati M, et al. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum Immunol*. 2009 May;70(5):325–30.
2. Takahashi D, Azuma H, Sakai H, Sou K, Wakita D, Abe 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*. 2011 Apr;337(1):42–9.
3. Azuma H, Yoshida Y, Takahashi H, Ishibazawa E, Kobayashi H, Sakai H, et al. Liposomal microparticle injection can induce myeloid-derived suppressor cells (MDSC)-like cells in vivo. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2017 Jun;39(3):140–7.

参考文献

1. Nagamori T, Yoshida Y, Takahashi H, Oka H, Kajihama A, Nakau K, et al. A Marked Response to Immunosuppressive Intervention for Abruptly Occurring Cardiac Complications in a Case of Juvenile Systemic Sclerosis Overlapped with Dermatomyositis. *Case Rep Pediatr*. 2017 Feb 21;2017:1479012.
2. Yoshida Y, Nagamori T, Takahashi H, Ishibazawa E, Shimada S, Kawai T, et al. A novel STAT3 mutation associated with hyper immunoglobulin E syndrome with a paucity of connective tissue signs. *Pediatr Int*. 2021 May;63(5):510-515.
3. Marvel D, Gabrilovich DI, et al. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest*. 2015 Sep;125(9):3356–64.
4. Al-Khami AA, Zheng L, Del Valle L, Hossain F, Wyczechowska D, Zabaleta J, et al. Exogenous lipid uptake induces metabolic and functional reprogramming of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*. 2017 Jun 30;6(10):e1344804.

