



# Immunosuppressive effects and mechanisms of three MDSC subsets including M-MDSC, G-MDSC, and I-MDSC

Nagatani, Yoshiaki

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2021-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8110号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008110>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Immunosuppressive effects and mechanisms of three MDSC subsets including M-MDSC, G-MDSC, and I-MDSC

骨髄由来免疫抑制細胞である M-MDSC, G-MDSC, I-MDSC の免疫抑制機能とメカニズム

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
腫瘍・血液内科学  
(指導教員：南 博信教授)

長谷 善明

#### 【背景】

骨髄由来免疫抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cells: MDSC) は、骨髄系免疫細胞の不均一な集団で、がん患者に多く蓄積され、免疫を抑制することが知られている。がん患者において末梢血中の MDSC の増加が予後不良と関連することが報告されており、MDSC ががん患者の生存に関与していることが明らかになっている。これまでの報告では、ヒト MDSC は単球系の MDSC (monocytic-myeloid-derived suppressor cells: M-MDSC) と顆粒球系の MDSC (granulocytic-myeloid-derived suppressor cells: G-MDSC) の2つの集団に分かれると言われていたが、最近の報告では、より未熟な細胞と考えられる MDSC (immature-myeloid-derived suppressor cells: I-MDSC) が3つ目の集団として見つかった。MDSC は複数のメカニズムで T 細胞の活性化を抑制することが示されているが、その多くは免疫抑制性の代謝酵素 (アルギナーゼ、Indoleamine 2, 3-dioxygenase: IDO、inducible nitric oxide synthase: iNOS) の産生を介して行われている。しかしながら、これらの知見は MDSC に対する理解を深めるものであったが、これらの結果は主にマウス実験で得られたものであった。マウスでの MDSC に関する研究結果が必ずしもヒトに適用できるとは限らないため、ヒトの検体を用いたさらなる研究が必要である。特に、ヒトの各 MDSC の集団 (M-MDSC、G-MDSC、I-MDSC) の免疫抑制効果やメカニズムの詳細については、ほとんど知られていないため、さらなる解明を行うために、我々はヒトの検体を用いて MDSC と各 MDSC の集団の免疫抑制機能および抑制メカニズムについて研究を行った。

#### 【方法】

MDSC および各 MDSC の集団がフローサイトメトリーにて獲得できるか確認を行い、メイ・ギムザ染色にて、それぞれの細胞の特徴を観察した。表現型は既報より MDSC (CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-low</sup>)、M-MDSC (CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-low</sup>CD14<sup>+</sup>CD15<sup>-</sup>)、G-MDSC (CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-low</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>)、I-MDSC (CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-low</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>-</sup>)を用いて行った。得られた MDSC と各 MDSC の集団における免疫抑制機能とそのメカニズムを評価するために、最初に健康人の末梢血を用いて実験を行った。MDSC または各 MDSC の集団と T 細胞との共培養を用いた T 細胞抑制試験 (T 細胞の分裂抑制、クラスター形成の抑制、IFN- $\gamma$  産生低下) にて免疫抑制機能の評価を行い、各 MDSC の集団の単培養上清中の免疫抑制分子 [IL-1 受容体アンタゴニスト (Interleukin 1 receptor antagonist: IL-1RA), アルギナーゼ, IL-4, IL-5, IL-10, IL-11, IL-13, CCL17, IDO] を ELISA 法で測定することで T 細胞抑制のメカニズムを明らかにした。次に、これらの結果をがん患者の検体を用いて検証し、最後に健康人とがん患者における各集団の頻度の違いについて調べた。

## 【結果】

既知の表現型を用いることで、3つの集団を得ることができた。それぞれの MDSC の集団をメイ・ギムザ染色で染色したところ、M-MDSC は単球に似た大きな馬蹄形の核を持ち、G-MDSC は好中球に似た多形核を持っていた。I-MDSC は、N/C 比が高く、サイズが小さい未熟な形態であった。健康人の T 細胞抑制試験では、M-MDSC および G-MDSC は濃度依存的に T 細胞の活性化を抑制したが、I-MDSC は T 細胞の活性化を抑制しなかった。免疫抑制メカニズムを評価する実験では、単培養上清中に M-MDSC では IL-1RA が、G-MDSC ではアルギナーゼが高濃度に含まれていた。しかしながら、I-MDSC ではどの抑制分子の産生も認めなかった。また、どの集団でも IL-4、IL-5、IL-10、IL-11、IL-13、CCL17 の有意な濃度の上昇は見られず、M-MDSC と G-MDSC では IDO 濃度がわずかに上昇した。がん患者でも健康人の結果と同様に T 細胞抑制試験で M-MDSC および G-MDSC は T 細胞の活性化を抑制したが、I-MDSC は抑制しなかった。また、免疫抑制メカニズムをみる同様の実験においても、M-MDSC では IL-1RA が、G-MDSC ではアルギナーゼが著明に上昇していたが、I-MDSC では、これらの産生を認めなかった。最後に、健康人とがん患者における各 MDSC の集団の割合を評価したが、がん患者では免疫抑制機能を有する MDSC (M-MDSC および G-MDSC) の集団が健康人に比べて有意に増加していた。

## 【考察】

IL-1 は、単球、樹状細胞、好中球、T 細胞、マクロファージ、内皮細胞など様々な細胞で広く産生される炎症性のサイトカインで、T 細胞の IL-1 受容体を刺激すると、T 細胞の増殖が促進されることが示されている。IL-1RA は、IL-1 受容体の競合阻害剤として T 細胞の活性を抑制することができる。実際、ピーズで刺激した CD3<sup>+</sup>T 細胞の増殖は、rhIL-1RA を添加することで、濃度依存的に抑制された。IL-1RA と MDSC の関係について報告している研究は非常に少ない。ある研究グループは、マウスにおいて MDSC が IL-1RA を放出することを報告したが、IL-1RA とヒト MDSC との関係は知られていない。我々の知る限り、今回の報告は、ヒトの MDSC が IL-1RA を産生することを確認した初めての報告であり、重要なことは、M-MDSC のみが IL-1RA 産生集団として同定されたことである。

I-MDSC は、3つの集団の中で最も新しい概念である。従来他の2つの集団とは対照的に、I-MDSC の機能はあまり理解されていない。I-MDSC について評価を行った研究グループは、我々が知る限り2つあるが、ひとつのグループは M-MDSC や G-MDSC 同様に免疫抑制機能を有すると報告し、もう一方の研究グループは、I-MDSC は M-MDSC や G-MDSC と比較して免疫抑制機能が非常に弱いことを示した。さらに、I-MDSC は、活性化 T 細胞からの INF-放出も抑制しなかったことより、I-MDSC が免疫抑制効果を有していないことを示している。相反する結果が報告さ

れているが、我々の結果からは、I-MDSC は免疫抑制機能を持たないことが示唆される結果であった。なお、M-MDSC と G-MDSC の培養上清には、それぞれ免疫抑制分子として IL-1RA とアルギナーゼが検出されたが、I-MDSC の培養上清には IL-1RA とアルギナーゼを含む免疫抑制分子が検出されなかったことは注目に値する。

健康人でも、少数の免疫抑制機能を持つ細胞集団が存在し、ホメオスタシスを維持して免疫のバランスをとっているが、腫瘍細胞の何らかの影響により、このホメオスタシスが破壊され、免疫抑制機能を持つ細胞集団が増加する。近年、がん患者における MDSC の臨床的役割が注目されている。多くの研究で、さまざまな種類のがんにおける MDSC がモニタリングされ、乳がん、膀胱がん、甲状腺がん、頭頸部がん、非小細胞肺がん患者の末梢血中の MDSC が、健康人のレベルと比較して有意に増加していることが明らかにされた。メタアナリシスでは、末梢血中の MDSC 数は、固形がん患者の予後不良の独立した指標であることが判明している。以前の報告と同様に、本研究では、MDSC の総量は、健康人よりもがん患者の方が有意に高かった。特に、MDSC 全体に占める機能性 MDSC (M-MDSC および G-MDSC) の割合は、健康人の割合に比べて、がん患者で有意に増加していた。がん患者では免疫系が抑制されている可能性があるため、これらの結果は妥当であると考えられる。これらの結果から、機能性 MDSC は、がん患者の免疫を抑制するための重要な集団であり、がんの治療標的となる可能性があることが示唆された。

## 【結語】

IL-1RA とアルギナーゼを分泌する M-MDSC と G-MDSC はそれぞれ T 細胞の活性化を抑制したが、I-MDSC は抑制機能を持たなかった。また、M-MDSC が免疫抑制分子である IL-1RA を産生することを初めて明らかにした。さらに、がん患者では、機能性 MDSC (M-MDSC および G-MDSC) の割合が健康人に比べて増加していることも確認した。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第3086号	氏名	長谷 善明
論文題目 Title of Dissertation	骨髄由来免疫抑制細胞である M-MDSC, G-MDSC, I-MDSC の免疫抑制機能とメカニズム Immunosuppressive effects and mechanisms of three MDSC subsets including M-MDSC, G-MDSC, and I-MDSC		
審査委員 Examiner	主 査 榎 地 昌 弘 Chief Examiner 副 査 横 峰 光 Vice-examiner 副 査 河 野 誠 司 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字~2, 000字程度)

【背景】骨髄由来免疫抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cells: MDSC) は、骨髄系免疫細胞の不均一な集団で、がん患者に多く蓄積され、免疫を抑制することが知られている。がん患者において末梢血中の MDSC の増加が予後不良と関連することが報告されており、MDSC ががん患者の生存に関与していることが明らかになっている。これまでの報告では、ヒト MDSC は単球系の MDSC (monocytic-myeloid-derived suppressor cells: M-MDSC) と顆粒球系の MDSC (granulocytic-myeloid-derived suppressor cells: G-MDSC) の2つの集団に分かれると言われていたが、最近の報告では、より未熟な細胞と考えられる MDSC (immature-myeloid-derived suppressor cells: I-MDSC) が3つ目の集団として見つかった。MDSC は複数のメカニズムで T 細胞の活性化を抑制することが示されているが、その多くは免疫抑制性の代謝酵素 (アルギナーゼ、Indoleamine 2, 3-dioxygenase: IDO、inducible nitric oxide synthase: iNOS) の産生を介して行われている。しかしながら、これらの知見は MDSC に対する理解を深めるものであったが、主にマウス実験で得られたものであった。我々はヒトの検体を用いて MDSC と各 MDSC の集団の免疫抑制機能および抑制メカニズムについて研究を行った。

【方法】MDSC および各 MDSC の集団がフローサイトメトリーにて獲得できるか確認を行い、メイ・ギムザ染色にて、それぞれの細胞の特徴を観察した。得られた MDSC と各 MDSC の集団における免疫抑制機能とそのメカニズムを評価するために、最初に健康人の末梢血を用いて実験を行った。MDSC または各 MDSC の集団と T 細胞との共培養を用いた T 細胞抑制試験 (T 細胞の分裂抑制、クラスター形成の抑制、IFN- $\gamma$  産生低下) にて免疫抑制機能の評価を行い、各 MDSC の集団の単培養上清中の免疫抑制分子 [IL-1 受容体アンタゴニスト (Interleukin 1 receptor antagonist: IL-1RA)、アルギナーゼ、IL-4、IL-5、IL-10、IL-11、IL-13、CCL17、IDO] を ELISA 法で測定することで T 細胞抑制のメカニズムを明らかにした。次に、これらの結果をがん患者の検体を用いて検証し、最後に健康人とがん患者における各集団の頻度の違いについて調べた。

【結果】それぞれの MDSC の集団をメイ・ギムザ染色で染色したところ、M-MDSC は単球に似た大きな馬蹄形の核を持ち、G-MDSC は好中球に似た多形核を持っていた。I-MDSC は、N/C 比が高く、サイズが小さい未熟な形態であった。健康人の T 細胞抑制試験では、M-MDSC および G-MDSC は濃度依存的に T 細胞の活性化を抑制したが、I-MDSC は T 細胞の活性化を抑制しなかった。免疫抑制メカニズムを評価する実験では、単培養上清中に M-MDSC では IL-1RA が、G-MDSC ではアルギナーゼが高濃度に含まれていた。しかしながら、I-MDSC ではどの抑制分子の産生も認めなかった。また、どの集団でも IL-4、IL-5、IL-10、IL-11、IL-13、CCL17 の有意な濃度の上昇は見られず、M-MDSC と G-MDSC では IDO 濃度がわずかに上昇した。がん患者でも健康人の結果と同様に T 細胞抑制試験で M-MDSC および G-MDSC は T 細胞の活性化を抑制したが、I-MDSC は抑制しなかった。また、免疫抑制メカニズムをみる同様の実験においても、M-MDSC では IL-1RA が、G-MDSC ではアルギナーゼが著明に上昇していたが、I-MDSC では、これらの産生を認めなかった。最後に、健康人とがん患者における各 MDSC の集団の割合を評価したが、がん患者では免疫抑制機能を有する MDSC (M-MDSC および G-MDSC) の集団が健康人に比べて有意に増加していた。

【考察】IL-1 は、単球、樹状細胞、好中球、T 細胞、マクロファージ、内皮細胞など様々な細胞で広く産生される炎症性のサイトカインで、T 細胞の IL-1 受容体を刺激すると、T 細胞の増殖が促進されることが示されている。IL-1RA と MDSC の関係について報告している研究は非常に少ない。今回の報告は、ヒトの MDSC が IL-1RA を産生することを確認した初めての報告であり、重要なことは、M-MDSC のみが IL-1RA 産生集団として同定されたことである。I-MDSC の培養上清には IL-1RA とアルギナーゼを含む免疫抑制分子が検出されなかったことは注目に値し、I-MDSC は免疫抑制機能を持たないことが示唆される。健康人でも、少数の免疫抑制機能を持つ細胞集団が存在し、ホメオスタシスを維持して免疫のバランスをとっているが、腫瘍細胞の何らかの影響により、このホメオスタシスが破壊され、免疫抑制機能を持つ細胞集団が増加する。メタアナリシスでは、末梢血中の MDSC 数は、固形がん患者の予後不良の独立した指標であることが判明している。以前の報告と同様に、本研究では、MDSC の総量は、健康人よりもがん患者の方が有意に高かった。特に、MDSC 全体に占める機能性 MDSC (M-MDSC および G-MDSC) の割合は、健康人の割合に比べて、がん患者で有意に増加していた。これらの結果から、機能性 MDSC は、がん患者の免疫を抑制するための重要な集団であり、がんの治療標的となる可能性があることが示唆された。

【結語】IL-1RA とアルギナーゼを分泌する M-MDSC と G-MDSC はそれぞれ T 細胞の活性化を抑制したが、I-MDSC は抑制機能を持たなかった。また、M-MDSC が免疫抑制分子である IL-1RA を産生することを初めて明らかにした。さらに、がん患者では、機能性 MDSC (M-MDSC および G-MDSC) の割合が健康人に比べて増加していることも確認した。

以上、本研究は、ヒトの検体を用いて MDSC と各 MDSC の集団の免疫抑制機能および抑制メカニズムを明らかにした。I-MDSC は抑制機能を持たず、M-MDSC が免疫抑制分子である IL-1RA を産生するなど、重要な知見を得ており、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。