

# HMGB1 が制御する骨髄由来免疫抑制細胞における 免疫抑制メカニズムの解明

所属： 大阪大学 薬学研究科 薬剤学分野

助成対象者：立花 雅史

## 概要

骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) はがん病態や慢性炎症病態下で増加してくる細胞群であり、がんの進展を促進する。また、HMGB1 は細胞死により放出される分子で、免疫応答を正にも負にも制御することが報告されている。我々は、MDSC の分化誘導過程において HMGB1 を添加すると、MDSC の免疫抑制機能の亢進が認められることを見出した。さらに、HMGB1 による免疫抑制機能の亢進には IFN- $\alpha$  が重要な役割を果たしていることを明らかにした。今後は、本研究をさらに展開し、新規がん治療の標的分子を新たに見つけ出し、新規がん治療法の開発に繋げていく。

## abstract

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) accumulate under the pathological conditions, including cancer and chronic inflammation, and suppress variable immune responses such as T cell proliferation. Although several inflammatory signals enhance the differentiation and/or function of MDSCs, it is not clear which factors trigger the differentiation of MDSCs.

Recently, it has been highlighted that damage-associated molecular patterns (DAMPs) plays important roles in the induction of inflammation. One of the DAMPs, high mobility group box 1 (HMGB1), is released from necrotic cells, and HMGB1 level increases in tumor. It has been reported that HMGB1 transduces the intracellular signal

via several receptors, including RAGE and TLR4, which enhance the differentiation and/or function of MDSCs. However, the effects of HMGB1 on MDSCs are still unclear. To reveal the effects of HMGB1 on the differentiation and/or function of MDSCs, we cultured bone marrow cells in the presence of HMGB1 and GM-CSF. We found that HMGB1 enhanced the suppressive activity of *in vitro* MDSCs through IFN- $\alpha$  production. Thus, our findings suggest that IFN- $\alpha$  enhances the suppressive function of MDSCs.

## 研究内容

### 【背景・目的】

我が国における死因の第一位は悪性新生物（がん）であり、第二位の心疾患による死者の約 2 倍の死亡率となっており、自殺・事故による死因を除けばほとんどの世代で最も死亡率が高い死因である（平成 27 年厚生労働省人口動態統計年報）。このような背景から、がんに対する有効な治療法の開発は国民の保健医療向上のためには必要不可欠であると言える。さて、現在行われている外科的ながん治療法の場合、物理的に完全にがん細胞を取り除くことができれば極めて有効な治療法であるが、侵襲的であるため患者への負担が大きい。さらに、転移性のがんに対しては効果的な治療法であるとは必ずしも言えない。一方で、抗がん剤を用いた治療法は非侵襲的であるため、転移性のがんやリンパ腫に対しても効果的であるものの、抗がん剤の正常細胞に対する副作用が強力であるがゆえに患者は身体的に苛酷な生活を余儀なくされる。

このような背景の下、非侵襲的かつ副作用の少ないがん治療の開発を目指して、革新的ながん治療戦略として「がん免疫療法」の開発が進められてきたが、がんを排除する細胞傷害性 T 細胞および NK 細胞、NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、抗腫瘍マクロファージといった免疫エフェクター細胞の増殖・活性化というストラテジーでは、期待されたほどの成果が得られていない。この原因として、生体に存在する抑制性免疫細胞が抗がん免疫系細胞の機能を阻害していることが、近年明らかとなってきた。そこで、免疫抑制分子である PD-1 を標的とし、PD-1 の機能を阻害することで抑制機構を解除するという戦略（免疫チェックポイント療法）である抗 PD-1 抗体が開発され、極めて劇的ながん退縮効果があることが明らかにされた。以上のことから、がん治療における免疫系の重要性が再認識され、免疫抑制を解

除することが重要であると考えられている。

さて、抑制性免疫細胞の中でも、骨髄系細胞である骨髄由来免疫抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cells : MDSC) は担がん病態や炎症病態下で増加してくる細胞群であり、T細胞の活性化を抑制する性質を有し、がんの進展を促すと考えられている。一方で、前述の抗 PD-1 抗体が効果を示さない患者においては MDSC の増加が報告されていることから、MDSC はがん免疫療法における重要な治療標的であると期待されている。さらには、前述のようながん免疫療法と併用することで抗がん作用を増強できることも期待される。本研究では、MDSC の免疫抑制機能の分子基盤を明らかにすることで、新規がん治療薬の開発に繋げることを目的とする。

## 【結果】

### < HMGB1 による MDSC の T 細胞増殖抑制能増強 >

抗がん剤によって、がん細胞は細胞死（ネクローシス）によりその細胞内成分を放出する。ネクローシスによって放出されることが知られている High mobility group box (HMGB) 1 は自然免疫系を活性化することが知られている一方で、免疫応答を抑制することも報告されており<sup>1)</sup>、免疫学的に極めて興味深い分子である。マウス骨髄細胞を GM-CSF 存在下で 4 日間培養することで *in vitro* MDSC を得られることが明らかにされている<sup>2)</sup>。これまでに我々は、*in vitro* MDSC 分化誘導系において HMGB1 を添加することで MDSC の T 細胞増殖抑制能が亢進することを明らかにしている。さらに、この抑制能亢進は HMGB1 の受容体の 1 つである Toll-like receptor (TLR) 4 依存的であることを、TLR4 ノックアウトマウスを用いて証明している。一方、TLR4 のリガンドとして広く知られている LPS を添加した場合においては、MDSC の抑制能が低下するという、HMGB1 とは逆の作用を見出していた。以上のように、TLR4 という共通のレセプターを介するにも関わらず、HMGB1 と LPS とでは MDSC に対して正反対の作用を示す興味深い知見を示している。

### < MDSC の T 細胞増殖抑制能増強を担う分子の同定 >

MDSC の抑制機能を担う因子として、arginase, iNOS, ROS が広く知られているが、これらの分子の遺伝子発現については、HMGB1 による MDSC の T 細胞増殖抑制能増強を説明できるような発現変動が認められなかったことから、他の分子の関与が示された。TLR4 下流シグナルには、TLR4 が細胞膜上でリガンドと結合することで MyD88 依存的に IL-6 や IL-12 $\beta$  の発現を誘導する経路と、エンドソームでリガンドと結合することでシグナルが伝達され

る TRIF 依存的に Type I IFN の発現を誘導する経路がある<sup>3)</sup>。そこで次に、MDSC における IL-6 および IL-12 $\beta$ 、Type I IFN である IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  の遺伝子発現解析を行った。*Il6* は GM-CSF 群と比べて、HMGB1 による発現変動が認められなかった一方で、LPS による顕著な発現上昇が認められた。*Il12b* については HMGB1 群および LPS 群のいずれにおいても発現上昇が認められたが、LPS 群でより顕著だった。また、*Ifnb* は HMGB1 群および LPS 群のいずれにおいても発現上昇が認められた。一方、*Ifna* は HMGB1 の濃度依存的に発現が上昇したのに対して、LPS では濃度依存的に発現が低下し、HMGB1 と LPS で異なる発現変動が認められた。このことから、HMGB1 による MDSC の T 細胞増殖抑制能の増強には IFN- $\alpha$  が関与する可能性が考えられた。

#### < MDSC の T 細胞増殖抑制能に対する IFN- $\alpha$ の影響 >

*in vitro* MDSC 分化誘導系に IFN- $\alpha$  を添加したところ、低濃度 (10 pg/mL) で分化誘導した MDSC において T 細胞増殖抑制能の増強が認められた。しかしながら、IFN- $\alpha$  を高濃度 (100, 1000 pg/mL) で添加して分化誘導した MDSC の T 細胞増殖抑制能は減弱していた。これについては、高濃度の IFN- $\alpha$  添加により MDSC (Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) の割合が減少していたことから、MDSC の分化が阻害された結果、T 細胞増殖抑制能が減弱したのではないかと考えられた。以上の結果から、IFN- $\alpha$  を低濃度で添加して MDSC を分化誘導することで、MDSC の T 細胞増殖抑制能が増強することが明らかになった。このことから、HMGB1 により発現上昇した IFN- $\alpha$  はごく微量であり、それが MDSC の T 細胞増殖抑制能を増強させる可能性が考えられた。

#### 【今後】

本研究成果から、HMGB1 による MDSC の抑制能増強に IFN- $\alpha$  が関与することが示された。HMGB1 はがん組織において発現上昇が認められていることから、がんで上昇した HMGB1 が MDSC の T 細胞増殖抑制能を増強することはがんの悪性化の促進につながる。したがって、HMGB1 による MDSC の分化や機能における制御機構の解明は、HMGB1 シグナルをターゲットにした MDSC の制御による新規がん免疫チェックポイント療法の開発において必須である。今後、本研究から得られた知見が MDSC を標的とした疾患治療に活かされることを期待する。

#### 引用文献

- 1) Magna M, Pisetsky DS. The role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases. *Mol Med*. 2014;20:138-46.

- 2) Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernandez A, Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, Biciato S, Falisi E, Calabrese F, Basso G, Zanovello P, Cozzi E, Mandruzzato S, Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity*. 2010;32(6):790-802.
- 3) Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(2):145-51.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

該当なし

[口頭発表]

1. 立花雅史、甲田美樹、幸田裕造、大屋有佳子、櫻井文教、小檜山康司、石井健、審良静男、水口裕之  
HMGB1-TLR4 シグナルによる骨髄由来免疫抑制細胞の機能制御  
第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016 年 10 月 15 日
2. 森川直祐、立花雅史、吾郷由希夫、合田寛、櫻井文教、水口裕之  
代謝型グルタミン酸受容体 2/3 アンタゴニストによる骨髄由来免疫抑制細胞の機能阻害を介したがん退縮効果  
日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日～27 日

[ポスター発表]

1. Masashi Tachibana, Miki Koda, Yukako Oya, Yuzo Koda, Fuminori Sakurai, Kouji Kobiyama, Ken J. Ishii, Shizuo Akira, Hiroyuki Mizuguchi  
TLR4 signaling governs the differentiation of myeloid-derived suppressor cells  
第 24 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム、2016 年 6 月 4 日～5 日
2. Masashi Tachibana, Fuminori Sakurai, Kouji Kobiyama, Ken J. Ishii, Shizuo Akira, Hiroyuki Mizuguchi  
Role of TLR4 signaling in myeloid-derived suppressor cells  
第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年 12 月 5 日～7 日

3. Naosuke Morikawa, Masashi Tachibana, Zifei Fan, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi

IL-4 signaling inhibits proliferation and survival of myeloid-derived suppressor cells

第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年 12 月 5 日～7 日

4. 合田寛、立花雅史、櫻井文教、水口裕之

*In vitro* MDSC 分化誘導系の最適化に関する基礎的検討

日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日～27 日

[その他]

【受賞】平成 28 年度 日本薬学会近畿支部奨励賞

「HMGB1-TLR4 シグナルによる骨髄由来免疫抑制細胞の機能制御」