

論文の内容の要旨

# 未成熟ミエロイド系抑制性細胞の起源 ならびに腫瘍浸潤機序に関する研究

指導教員 松島 綱治

社会医学専攻

平成 15 年進学

沢登 祥史

## 背景

がんは先進国における主要な死因の一つである。免疫系は宿主の細胞が変異して生じた腫瘍細胞に対して応答を示し、これを排除しようとするが、最終的に失敗して病態が進行する理由のひとつとして、免疫系自体に腫瘍増殖を促進する細胞群が出現してくることがあげられる。このような細胞の一種として、未成熟ミエロイド系細胞 (ImC) が近年盛んに報告されている。

この細胞群は、マウスにおいては CD11b、Gr-1 といった細胞表面マーカーで同定されるが、分化途上の未成熟な細胞を含む、ミエロイド系細胞のヘテロな集団であり、含まれる細胞サブポピュレーションの詳細については報告が乏しく、またサブポピュレーションそれぞれの機能特性や誘導とターンオーバーの動態については報告されていなかった。

ImC の腫瘍増殖促進機能としては、T 細胞応答抑制および VEGF、MMP9 を介した血管新生、組織再構築が考えられる。しかしこれまでの報告では、腫瘍内や腫瘍所属リンパ節の ImC よりも、脾臓や末梢血の ImC が優先的に解析され、その免疫抑制能は、主に *in vitro* でのアッセイによって検討されてきた。病態の進行に伴って数が増加することが報告されることとあわせて、ImC は腫瘍の増殖を促進させることが予想されてきたが、実際の *in vivo* における直接的な検討に関する報告は乏しかった。

そこでこれらの疑問を検証するため、マウス腫瘍モデルを用い、腫瘍に浸潤する ImC のサブセットの形態学的/機能的解析や動態の解析を行った。さらにケモカインレセプターを欠損させることにより ImC の誘導を阻害し、ImC の腫瘍成長における役割を検討した。

## 結果と考察

まず ImC がどのような細胞サブポピュレーションから構成されているかを明らかにするため、3LL、B16、Meth A の三種の腫瘍細胞それぞれのマウス腫瘍モデルにおいて、腫瘍内浸潤 ImC をフローサイトメーターを用いて解析した。側方散乱光、CD11b、Gr-1 分子の発現強度を指標にして細胞を分取し、ギムザ染色による形態学的解析を行ったところ、腫

瘍内浸潤 ImC はマクロファージ、好中球そしてごく少数の好酸球へと分割できることが示された (図 1A)。またその傾向は三種類の腫瘍細胞のモデルで保存された (図 1B)。

ImC が腫瘍成長を促進するメカニズムとしては、iNOS、アルギナーゼによる T 細胞応答抑制および MMP9、VEGF による組織再構築や血管新生が考えられる。ImC のサブポピュレーションそれぞれの腫瘍増殖への関与を検討するため、ImC のサブセットごとにこれらの分子の発現を RT-PCR で解析したが、iNOS およびアルギナーゼはマクロファージに、MMP9 は好中球に優勢に発現しており、それぞれの画分が別々のメカニズムで腫瘍の成長に関与することが示唆された (図 2)。

これまで ImC は主として末梢血および脾臓から単離、解析されてきたが、抗腫瘍免疫を抑制する場と考えられる腫瘍所属リンパ節には、担癌状態においてもきわめて少数の ImC しか存在せず、ImC が担癌状態において抗腫瘍免疫を阻害するという仮説には疑問がもたれた (図 3)。また腫瘍接種より 40 日がたち、高度に進行した病態において、脾臓 ImC にはマクロファージ、好中球以外にも未熟なミエロイド系細胞を含む細胞画分が出現したが、腫瘍においてはこのような細胞画分は出現せず、脾臓と腫瘍の ImC はそれぞれ異なる細胞集団からなることが示唆された (図 4)。

ImC の腫瘍局所への浸潤を制御することによる治療戦略の有用性を検討するために、担癌状態における ImC の誘導と浸潤の時間的な動態および、どのようなケモカインに依存して ImC が腫瘍局所に浸潤するのかを明らかにする必要があった。BrdU の取り込みおよび、コンジェニックマウスを結合することによる Parabiosis アッセイを用いて ImC サブセットの動態およびターンオーバーを検討した。BrdU 投与後の各組織内の ImC の染色速度の差より、ImC は骨髄で造成されて抹消へと供給されていることが示唆された (図 5A)。パラバイオーシスにより、腫瘍 ImC のうち、マクロファージ画分は 2-4 日で、好中球画分は 4-7 日に入れ替わっており、これらの細胞サブセットが比較的短時間で入れ替わることが示唆された (図 5B)。

また、腫瘍内 ImC のケモカイン受容体発現に基づき (図 6A)、ImC の腫瘍浸潤に関与すると思われるケモカイン受容体を予想し、各種ケモカイン受容体欠損マウスを用意して腫瘍を接種し、腫瘍内に浸潤する ImC の数を計測したところ、*CCR2*<sup>-/-</sup>マウスで著明なマクロファージの減少と好中球の増加を認めた。マクロファージと好中球には、数の上で相互に補填しあうメカニズムがあるのかもしれない。*CCR5*<sup>-/-</sup>マウスでも *CCR2*<sup>-/-</sup>マウスに比べれば穏やかであるが、有意なマクロファージの減少と好中球の増加を認めた (図 6B)。

*CCR2* は単球の遊走に重要なケモカイン受容体であるが、*CCR2*<sup>-/-</sup>マウスでは骨髄から末梢血への単球の遊出が阻害されるため、*CCR2* が腫瘍組織への単球の浸潤に必要なかは検討できなかった。そこで、コンジェニックシステムを利用し、*CCR2*<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスの骨髄細胞を混合してレシピエントに養子移入し、24 時間後に移入した細胞中の単球画分の各臓器での *CCR2*<sup>-/-</sup>野生型の比を求めた。骨髄では *CCR2*<sup>-/-</sup>マウス由来の単球が優勢であったが、腫瘍では野生型マウス由来のマクロファージが顕著に多く、腫瘍への単球の

浸潤にも CCR2 が重要な役割を果たすことが示唆された(図 7A、B)。また、腫瘍内の CCR2 リガンドの発現を RT-PCR にて測定したところ、*CCR2*<sup>-/-</sup>マウスにおいても CCR2 リガンドの発現は低下しておらず、腫瘍組織からの CCR2 リガンドの発現が末梢血単球を腫瘍に浸潤させることが示唆された (図 7C)。

これまでの報告では、ImC の免疫抑制活性や腫瘍増殖促進機能は主にマクロファージにより担われていることが示唆されてきた。そこでマクロファージ画分の欠損により抗腫瘍免疫の抑制が解除されて腫瘍の増殖が低下することを予想し、ケモカイン受容体欠損マウスに腫瘍を接種した。予想に反して、*CCR2*<sup>-/-</sup>マウスでも腫瘍内浸潤 T 細胞の数は増えず、腫瘍所属リンパ節での細胞傷害性 T 細胞の誘導も増強されなかった (図 8A、B)。ImC マクロファージ画分の浸潤が顕著に抑制される *CCR2* 欠損マウスでも腫瘍の増殖の速さは変化がなかった (図 8C)。これまでの報告から予想されていたように、ImC マクロファージ画分が T 細胞抑制により腫瘍の増殖を促進するというメカニズムは、*in vivo* では単純に成立しないと考えられた。

一方で腫瘍の増殖のみならず、腫瘍内の病態の変化に着目して解析を進めると、*CCR2*<sup>-/-</sup>マウスの腫瘍内では壊死領域が拡大していた (図 9A、B)。また、好中球の数の増加と関連し、*CCR2*<sup>-/-</sup>マウスの腫瘍では MMP9 と VEGF の発現がともに上昇していた (図 9C)。

本研究では、ImC のサブポピュレーション構成と担癌状態における動態、腫瘍浸潤におけるケモカイン依存性が明らかとなった。さらにこれらの知見に基づき、ケモカイン受容体を標的として、T 細胞抑制を担う画分と予測される ImC マクロファージ画分の腫瘍浸潤を CCR2 の欠損により阻害したが、腫瘍の増殖には影響がなかった。*in vivo* においては腫瘍局へのマクロファージの浸潤阻止のみでは腫瘍の増殖に影響を与えられないことが示唆された。ただし、腫瘍内では壊死領域の拡大、MMP9 と VEGF の発現増強などの病態の変化が現れた。

*CCR2*<sup>-/-</sup>マウスによるマクロファージの腫瘍浸潤阻害は、同時に好中球を増加させることが今回示されたが、それゆえにそれぞれのサブポピュレーションの増減の影響を区別し考察することが難しいという問題点が課題として浮かび上がった。今後マクロファージと好中球それぞれの数をケモカイン受容体の欠損、表面分子に対する中和抗体などでコントロールすることにより、*in vivo* での腫瘍増殖における ImC およびそのサブポピュレーションの役割をより明確に示せることを期待する。