



Title	抗腫瘍エフェクター細胞の誘導におけるNK2Rの役割に関する研究
Author(s)	SHEN, Weidong
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15575号
Issue Date	2023-06-30
DOI	10.14943/doctoral.k15575
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91139
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 :
File Information	SHEN_Weidong.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

抗腫瘍エフェクター細胞の誘導における

NK2R の役割に関する研究

(Studies on the role of NK2R in the induction

of anti-tumor effector cells)

2023年6月

北海道大学

沈 煒棟

学位論文

抗腫瘍エフェクター細胞の誘導における

NK2R の役割に関する研究

(Studies on the role of STAT1 in the induction

of anti-tumor effector cells)

2023 年 6 月

北海道大学

沈 煒棟

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	9 頁
結果	16 頁
考察	44 頁
結論	47 頁
謝辞	49 頁
利益相反	50 頁
引用文献	51 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Weidong Shen, Xiangdong Wang, Huihui Xiang, Shunsuke Shichi, Hiroki Nakamoto, Saori Kimura, Ko Sugiyama, Akinobu Taketomi, Hidemitsu Kitamura
IFN- γ -STAT1-mediated NK2R expression is involved in the induction of antitumor effector CD8⁺ T cells *in vivo*.
Cancer Science, 114(5):1816-1829 (2023).
2. Huihui Xiang, Yujiro Toyoshima, Weidong Shen, Xiangdong Wang, Naoki Okada, Shuhei Kii, Ko Sugiyama, Toshihiro Nagato, Hiroya Kobayashi, Kazuho Ikeo, Shinichi Hashimoto, Mishie Tanino, Akinori Taketomi, Hidemitsu Kitamura
IFN- α/β -mediated NK2R expression is related to the malignancy of colon cancer cells.
Cancer Science, 113(8):2513-2525, (2022)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 沈 輝棟, 王 向東, 志智 俊介, 木村 沙織, 杉山 昂, 武富 紹信, 北村 秀光
担がん生体における IFN-STAT1 信号伝達経路の活性化は抗腫瘍エフェクター細胞の誘導に重要である
第 25 回 日本がん免疫学会学術総会, 2021 年 7 月 3 日・和歌山
2. 沈 輝棟, 王 向東, 志智 俊介, 木村 沙織, 杉山 昂, 武富 紹信, 北村 秀光
担がん生体における IFN-STAT1 を介した神経ペプチドシグナルの活性化は抗腫瘍エフェクターT 細胞の誘導に関与する
第 26 回 日本がん免疫学会学術総会, 2022 年 7 月 21 日・松江市
3. Weidong Shen, Xiangdong Wang, Shunsuke Shichi, Saori Kimura, Hiroki Nakamoto, Chisato Shirakawa, Ko Sugiyama, Akinobu Taketomi, Hidemitsu Kitamura
IFN-STAT1-mediated activation of neuropeptide signals in cancer-bearing organisms is involved in the induction of antitumor effector T cells
The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2022 年 9 月 29 日・横浜

要旨

【背景と目的】

近年、免疫チェックポイント阻害やキメラ抗原受容体 T 細胞の養子移入などのがん免疫治療が確立され、がん患者の予後の改善に貢献しているが、全ての患者さんに対して有効ではない。一般に、担がん生体内の腫瘍微小環境における抗腫瘍エフェクター細胞の持続的な誘導は、より有効ながん免疫治療の実施において重要である。ニューロキニン受容体 2 (NK2R) は、ニューロキニン A (NKA) の G タンパク質共役型受容体で、NK2R を介した神経ペプチドシグナルは標的細胞の多様な生理機能を制御している。これまで I 型あるいは II 型 IFN や自然免疫アジュバント LPS や Poly I:C による刺激が STAT1 依存的にマウス骨髄由来樹状細胞やヒト単球由来樹状細胞に NK2R を発現誘導することを見出した。また、NK2R アンタゴニストを使用した NK2R シグナルの遮断は、樹状細胞の抗原提示能や抗原特異的 T 細胞応答を著しく抑制することを確認した。しかしながら、担がん生体における抗腫瘍エフェクター細胞の誘導に対する NKA-NK2R シグナル伝達の作用効果は不明である。そこで、本研究では、抗腫瘍エフェクター細胞の誘導における NK2R の役割について、マウス生体モデルおよび *in vitro* 評価実験にて明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

野生型 C57BL/6 マウスに対して蛍光タンパク質 mCherry を導入したマウス肝がん Hepa1-6 細胞株を脾臓内に移植し、肝臓組織で腫瘍を形成させる肝がんモデルを構築した。Hepa1-6 細胞の移植後における腫瘍形成について、肝臓組織の生体イメージング法および HE 染色により解析した。腫瘍組織における各種免疫細胞の浸潤について、肝臓組織の免疫組織化学染色法およびフローサイトメトリーにより解析した。またマウスから脾臓細胞を回収し、サイトカインの遺伝子発現レベルを検証した。さらに poly I:C および抗 CD8 抗体を生体内投与し、腫瘍形成に及ぼす効果を検討した。肝臓組織に浸潤した CD8 陽性 T 細胞について、Granzyme B の細胞内発現レベルについてフローサイトメトリーにより、解析・評価した。野生型 C57BL/6 マウスに加え、STAT1 欠損マウスあるいは NK2R 欠損マウスを使用し、肝がんの腫瘍形成および免疫細胞の腫瘍内浸潤への影響を比較検討した。

in vitro 評価実験にて、脾臓細胞および脾臓から単離した CD8 陽性 T 細胞に対する CD3、CD28 および NKA 刺激による IFN- γ および Granzyme B の産生誘導レベルを検証した。さらに野生型 C57BL/6 マウス、STAT1 欠損マウスの脾臓より CD8 陽性 T 細胞を単離し、IFN- γ で刺激を行った後、神経ペプチドシグナル経路関連分子の遺伝

子発現誘導レベルについて、定量 PCR 法により解析した。また野生型 C57BL/6 マウスと NK2R 欠損マウスの脾臓より CD8 陽性 T 細胞を単離し、CD3 と CD28 の刺激による、ERK1/2 のリン酸化および I κ B のタンパク質発現レベルについてウエスタンブロット法により検証した。

【結果】

肝がんマウスモデルに対して poly I:C を投与した結果、脾臓細胞における IFN- α/β および IFN- γ の産生レベルが増強されるとともに、肝臓組織での腫瘍形成が著しく抑制されること、腫瘍内における CD8 陽性 T 細胞の浸潤が著しく増強されることを見出した。また、poly I:C 投与による抗腫瘍効果および腫瘍内への CD8 陽性 T 細胞の浸潤は、STAT1 欠損マウスで著しく抑制された。また Poly I:C 投与による抗腫瘍効果はマウスに抗 CD8 抗体を投与することにより抑制されることを確認した。野生型マウスおよび STAT1 欠損マウスの脾臓細胞より CD8 陽性 T 細胞を単離し、IFN- γ で刺激を加えたところ、STAT1 依存的に NK2R が発現誘導されることを見出した。また脾臓細胞および単離した CD8 陽性 T 細胞において、CD3 および CD28 の刺激による IFN- γ および Granzyme B の産生誘導が、NKA を添加することにより増強することを確認した。さらに、STAT1 および NK2R を欠損した CD8 陽性 T 細胞に対して CD3 および CD28 の刺激を行った結果、IFN- γ および Granzyme B の産生誘導レベルが低下することを見出した。また NK2R 欠損マウスを使用した肝がんモデルにおいて、腫瘍形成が亢進するとともに CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤が抑制されること、Poly I:C 投与による抗腫瘍効果が減弱することを確認した。最後に、野生型あるいは NK2R 欠損マウスから単離した CD8 陽性 T 細胞に対して、CD3 および CD28 の刺激を行った結果、野生型 CD8 陽性 T 細胞において認められる ERK1/2 のリン酸化レベルの増加および I κ B のタンパク質レベルの減少が、NK2R 欠損 CD8 陽性 T 細胞において認められなかった。

【考察】

本研究結果より、肝がんモデルに対する Poly I:C の投与は、脾臓細胞における IFN- α/β および IFN- γ の産生レベルを増加するとともに、STAT1 依存的に肝臓組織の腫瘍形成が抑制され、CD8 陽性 T 細胞の浸潤を増強することが明らかとなった。また Poly I:C による抗腫瘍効果は、抗 CD8 抗体の投与により減弱することから、IFN-STAT1 シグナル伝達経路は肝臓組織における腫瘍形成を抑制する抗腫瘍エフェクター CD8 陽 T 細胞の導入に関与する可能性が考えられた。また、CD8 陽性 T 細胞において、IFN- γ の刺激により、STAT1 依存的に NK2R の発現が誘導されること、NKA の添加

により CD3/28 の刺激による IFN- γ および Granzyme B の産生誘導が増強されることから、CD8 陽性 T 細胞における NK2R の発現誘導を介した神経ペプチドシグナルは、抗腫瘍免疫応答の亢進に関与することが考えられた。さらに CD3/28 を介して刺激した CD8 陽性 T 細胞の ERK1/2 および NF- κ B シグナル伝達経路の活性化において、NK2R は関与し、IFN- γ および Granzyme B の産生誘導をさらに増強することを見出した。従って、NK2R は、抗腫瘍免疫を賦活する制御メカニズムに関与する可能性が考えられた。

本研究で得られた知見により、肝がん領域において新しい抗腫瘍エフェクター細胞の導入、活性化に繋がる可能性があり、今後、より効果の高いがん免疫治療法の確立に貢献できると考えられる。

【結論】

担がん生体内における IFN-STAT1 の活性化は、CD8 陽性 T 細胞における神経ペプチド受容体 NK2R の発現を誘導し、抗腫瘍エフェクター T 細胞の誘導に関与することが明らかとなり、NK2R を介した神経ペプチドシグナルは、がん免疫治療の新たな標的の一つとなる可能性が示唆された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

7AAD	7-Aminoactinomycin D
FBS	fetal bovine serum
IFN	interferon
IFN- α	interferon-alpha
IFN- β	interferon-beta
IFN- γ	interferon-gamma
HE	hematoxylin eosin
IHC	immunohistochemistry
JAK	Janus kinase
MFI	mean fluorescence intensity
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
NKA	neurokinin A
NK1R	neurokinin receptor 1
NK2R	neurokinin receptor 2
OVA	ovalbumin
PD-L1	programmed death-1
Poly I:C	polyinosinic-polycytidylic acid
SP	substance P
TCR	T cell receptor
TIL	tumor-infiltrating lymphocyte.
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
I κ B α	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

緒言

近年、免疫チェックポイント阻害やキメラ抗原受容体 T 細胞の養子移入などのがん免疫療法が開発され、がん患者の予後の改善に貢献している (O'Donnell et al., 2019)。一般に、腫瘍特異的なキラー T 細胞の誘導と活性化、および腫瘍微小環境へのそれらの導入は、効果的ながん免疫療法にとって重要な課題の一つである (Waldman et al., 2020)。これまで多くの論文が、腫瘍微小環境におけるキラー T 細胞が減少したがん患者、いわゆる「コールド腫瘍」が、がん免疫療法の抗腫瘍効果の低下を示すことを報告している (Galon et al., 2019)。従って、現在、がん免疫療法の有効性を向上させるために、免疫抑制細胞の除去や免疫アジュバントの投与など、エフェクター T 細胞を腫瘍微小環境に効率的に導入するための、様々な方策が試みられている。

タキキニンファミリーに属するサブスタンス P (SP)、ニューロキニン A (NKA) および B、ヘモキニン-1、エンドキニンなどの神経ペプチドは、中枢神経系および末梢神経系に広く分布している。これらのタキキニン類は、ニューロキニン-1 受容体 (NK1R)、ニューロキニン-2 受容体 (NK2R)、ニューロキニン-3 受容体 (NK3R) という 3 種類の G タンパク質共役受容体を介して作用し、末梢および中枢神経系で神経伝達物質として機能する (Griebel et al., 2012; Steinhoff et al., 2014; Suvas., 2017)。一般に、神経ペプチドの受容体を介したシグナル伝達は、疼痛反応の誘導、平滑筋の弛緩、血管の拡張、血管透過性など、様々な生理機能を調節することが知られている。タキキニン類は当初、神経伝達物質としてのみの作用を有すると考えられていたが、その後の研究で、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞、炎症細胞、およびさまざまな種類のがん細胞を含む非神経組織におけるタキキニン受容体の発現がいくつかの論文で報告されており、タキキニン類が神経系と腫瘍組織を含む他の組織、器官との間で生理的に機能していることが考えられている (Munoz et al., 2019; Nizam et al., 2018; Severini et al., 2002; Tuluc et al., 2009)。

これまでの先行研究で、抗腫瘍免疫の活性化に重要なサイトカインである IFN- γ または自然免疫アジュバントの一つであるリポ多糖 (LPS) による刺激が、Janus kinase (JAK) および Signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 依存的にマウス樹状細胞で NKA および NK2R の発現を誘導し、NK2R の発現増強を介した NKA シグナル伝達は、オボアルブミン (OVA) 抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の誘導を増強したことを報告した (Kitamura et al., 2012)。さらに、IFN- α 、IFN- β 、または人工合成核酸で自然免疫アジュバントの一つであるポリイノシン-ポリシチジル酸 (Poly I:C) は、STAT1 依存的にヒト単球由来樹状細胞の NK1R および

NK2R の発現を誘導することを見出すとともに、NK1R あるいは NK2R を介した神経ペプチドシグナル伝達は、樹状細胞の活性化、アレルゲン特異的 T 細胞の誘導、および重篤化喘息の病状に関与している可能性を示した (Ohtake et al., 2015)。

I 型 IFN である IFN- α と IFN- β は、ウイルスや細菌感染の防御に関与するサイトカインであり (McNab et al., 2015; Trinchieri et al., 2010)、これまでの研究で、腫瘍の微小環境で産生される IFN- α/β が、樹状細胞や非がん細胞を標的として抗腫瘍免疫を活性化することが報告されている (Dunn et al., 2005; Dunn et al., 2006)。IFN- α/β がそれらの受容体である IFN-AR1 に結合すると、STAT1 および STAT2 が活性化され、さらに JAK が活性化される。一般に、IFN- α/β -JAK-STAT シグナル経路は、細胞免疫、増殖、アポトーシス、分化など多くの細胞機能を調節する。これまで IFN- α/β は自然免疫系の骨髄系細胞や線維芽細胞から産生され、一方、IFN- γ はナチュラルキラー (NK) 細胞、NKT 細胞、T 細胞から産生されることが知られている (Decker et al., 2002; Ivashkiv et al., 2018)。最近の研究で、IFN- α/β 刺激による STAT1 の活性化を介した NK2R 発現が大腸がん細胞の ERK-MAPK シグナル伝達経路を亢進し、腫瘍形成能や転移巣形成能などの促進、悪性化に関連していることを明らかにした (Xiang H et al., 2022)。しかしながら、腫瘍微小環境における抗腫瘍エフェクター細胞の誘導における IFN-STAT1 を介した NKA-NK2R シグナル伝達の関与については未だ不明である。

肝細胞がん (HCC) は、世界中で散見される肝臓領域のがんであり、手術後の再発率が高く、世界のがん関連死の二番目に多い原因となっている (Ferlay et al., 2015; Kato et al., 2001)。一般に HCC は、化学療法、手術、肝移植により治療されるが、切除不能な HCC に対する選択肢は限られている。これまでチロシンキナーゼ阻害剤のソラフェニブとレンバチニブが進行性 HCC の全身治療に承認されているが、HCC は化学療法抵抗性と考えられており、全身化学療法は日常的に使用されていない (Kato et al., 2001; Jiang et al., 1997)。さらに、進行 HCC 患者は、通常、基礎疾患を有しており、全身化学療法に対する忍容性が低いことが知られている。そのため、切除不能な HCC 患者に対して、より優れた抗腫瘍効果とより少ない副作用を有する新しい治療の方策が求められている。

肝がんにおける抗腫瘍免疫応答に関する詳細な制御メカニズムの解明は、HCC 患者に対する、より効果的な治療法を確立するために重要な課題の一つとなっている。最近、HCC 患者の標準治療における免疫チェックポイント阻害剤の優れた治療効果がいくつか報告されている (Donisi et al., 2020; Sangro et al., 2021)。また JAK/STAT1 シグナル伝達の活性化は、肝臓がんの増殖を抑制し、抗腫瘍効果を高める研究成果が報告されている (Byun et al., 2020; Zou et al., 2018)。以前の研究で、担がん生体における STAT1 の欠損が、抗腫瘍エフェクター細胞の導入を減少させることにより、

HCC の腫瘍形成を増強することが示された (Deng et al., 2021; Deng et al., 2020; Jin et al., 2019)。さらに最近の研究で、抗 Programmed death-1 (PD-L1) 抗体とジアシルグリセロール キナーゼ アルファ (DGK α) 阻害の併用投与による優れた抗腫瘍効果が明らかになった。さらに IFN- γ 産生抗腫瘍エフェクター T 細胞が DGK α の阻害により、効率的に腫瘍微小環境に導入されることが示された (Okada et al., 2022)。

本研究では、より効果的ながん免疫治療法の確立を目指し、担がん生体モデルに対する自然免疫アジュバント Poly I:C の投与による抗腫瘍免疫の賦活メカニズムを精査するとともに、担がん生体で産生される IFN による STAT1 依存的な NK2R の誘導を検討した。また NK2R 欠損 マウスを使用し、CD8 陽性 T 細胞の抗腫瘍エフェクター機能に及ぼす効果を確認した。さらに NK2R 欠損条件下での腫瘍形成、および腫瘍組織における CD8 陽性 T 細胞の浸潤に及ぼす効果を検討した。この論文では、担がん生体の腫瘍微小環境における IFN-STAT の活性化による NK2R の発現誘導を介した抗腫瘍エフェクター細胞の誘導と抗腫瘍効果について報告する。

方法

試薬および抗体

フローサイトメトリー用の蛍光色素標識抗マウス CD45 抗体 (30-F11) 、抗マウス CD4 抗体 (GK1.5)、抗マウス CD8a 抗体 (53-6.7) 抗体、抗マウス IFN- γ 抗体 (XMG1.2) および抗マウス granzyme B 抗体 (QA61A02) は BioLegend 社 (San Diego, CA, USA) および BD Biosciences 社 (San Diego, CA, USA) より購入した。7AAD は Beckman Coulter (Brea, CA, USA) 社より購入した。 *in vitro* 評価系で T 細胞を刺激するための抗マウス CD3e (145-2C11) および抗マウス CD28 (37.51) 抗体は BioLegend 社 (San Diego, CA, USA) および BD Biosciences 社 (San Diego, CA, USA) より購入した。CD8 陽性 T 細胞の除去抗体 (clone 53.6.7) は BioXCell (West Lebanon, NH) 社より購入した。免疫組織化学染色用の抗 CD4 抗体(D7D2Z)および抗 CD8 抗体(D4W2Z)は Cell Signaling Technology 社 (Danvers, MA, USA) より購入した。リコンビナントマウス IFN- γ (315-05) は PeproTech EC (London, UK) より購入した。ウエスタンブロット用の抗 phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) 抗体 (D13.14.4E)、抗 I κ B α 抗体 (C-21) およびホースラディッシュ ペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG は Signaling Technology (Danvers, MA, USA) より購入した。抗 α -tubulin 抗体 (DM1A) は Abcam (Cambridge, UK) より購入した。Poly I:C は InvivoGen (San Diego, CA, USA) より購入した。NK2R に対するアゴニスト (ニューロキニン A) は PEPTIDE INSTITUTE, INC (Osaka, Japan) より購入した。T-Select H-2Kb OVA Tetramer-SIINFELK-PE は MBL 社(Nagano, Japan) より購入した。

実験動物

野生型 C57BL/6 マウスおよび野生型 BALB/c マウスは日本チャールズリバー (Kanagawa, Japan) より購入した。STAT1 遺伝子 (*Stat1*) が欠損したマウスは、Dr. R. Schreiber (Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA) から得た。C57BL/6 バックグラウンド NK2R 遺伝子 (*Tacr2*) を欠損したマウスの精子は、カリフォルニア大学 (Davis, CA, USA) の KOMP リポジトリから入手した。体外受精は実験動物中央研究所 (Kawasaki, Kanagawa, Japan) で行った。野生型 BALB/c マウスと 8 回戻し交配して BALB/c 系統背景の NK2R 欠損マウスを作出した。全てのマウスは、特定病原体不在 (SPF) 環境下で飼育され、8~12 週齢にて実験に使用した。本研究の遂行に伴う動物実験の計画 (19-0036, 19-0065, 21-0026) は、北海道大学の審査を受け承認された後に実施した。また動物実験は全て北海道大学の動物実験に関する規定に従って行った。

細胞株

マウス肝がん Hepa1-6 細胞株 (CRL-1830) 、マウス大腸がん CT26 細胞株 (CRL-2638) およびマウスリンパ腫 EG7-OVA 細胞株 (CRL-2113) は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) より購入した。細胞株は最大 20 回まで継代を行ない、マイコプラズマおよびマウス肝炎ウイルステストで陰性を確認した細胞を使用した。細胞株は、実験に使用するまで -80 °C にて凍結保存した。

細胞培養

Hepa1-6 細胞は、10 % FBS (#172012, ニチレイバイオサイエンス) 、200 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン (Meiji Seika ファルマ株式会社) 、10 mM HEPES (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を添加した DMEM 細胞培地 (Wako Pure Chemical Industries) を使用し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。CT26 細胞は、10 % FBS (#172012, ニチレイバイオサイエンス) 、200 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン (Meiji Seika ファルマ株式会社) 、10 mM HEPES (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 、0.05 mmol/L メルカプトエタノール (ナカライテスク株式会社、京都) を添加した RPMI-1640 細胞培地 (Wako Pure Chemical Industries) を使用し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。EG7-OVA 細胞は、10 % FBS (#172012, ニチレイバイオサイエンス) 、200 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン (Meiji Seika ファルマ株式会社) 、10 mM HEPES (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 、100 µg/mL G418 (Wako Pure Industries, Ltd., Osaka, Japan) を添加した RPMI-1640 細胞培地 (Wako Pure Chemical Industries) を使用し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。

担がんマウスモデル

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、麻酔下で同系の野生型 C57BL/6 マウス、STAT1 欠損マウス、あるいは NK2R 欠損マウスの脾臓内に移植した (Okada et al., 2022) 。移植 14 日後における肝臓組織の腫瘍形成について生体イメージングシステム (IVIS Spectrum, Xenogen) および HE 染色法により解析・評価した。マウスを安楽死させた後、回収した肝臓はすぐに氷上の PBS を浸した dish 内に静置させ、mCherry(570/640 nm/ex filters) 標識の Hepa1-6 および GFP (540/465 nm/ex filters) 標識の CT26 細胞を蛍光イメージングにより評価した。IVIS の条件は次の通りである : exposure time = 10 seconds, Lamp level = high, binning = small, and F/Stop = 2。腫瘍由来のシグナル量は total radiant efficiency (p/s/cm²/sr)/(mW/cm²) で

表記した。画像は Living Image 4.0 software を用いて解析し、ROI (Region Of Interest) は、manual contours により臓器の辺縁内とした。また一部の実験で GFP 遺伝子を導入したマウス大腸がん CT26 細胞 (2×10^5) を、麻酔下で野生型 BALB/c マウスと NK2R 欠損マウスの脾臓内に移植し、肝臓における転移巣形成能を評価した (Toyoshima et al., 2019)。

抗 CD8 抗体 ($200 \mu\text{g} / \text{mouse}$) あるいはコントロール IgG ($200 \mu\text{g} / \text{mouse}$) を、マイナス 1 日目、4 日目、9 日目に野生型 C57BL/6 マウスに腹腔内投与した。Poly I:C ($10 \mu\text{g} / \text{マウス}$) またはコントロール PBS を、5 日目に野生型、STAT1 欠損、または NK2R 欠損マウスに腹腔内投与し、その後 3 日毎に投与した。移植 14 日後における肝臓組織の腫瘍形成について生体イメージングシステム (IVIS Spectrum, Xenogen) および HE 染色法により解析・評価した。(図 1)

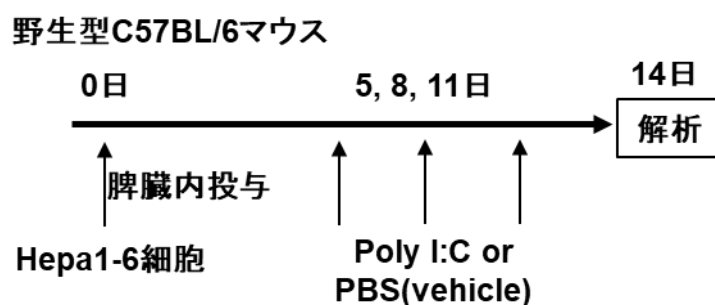


図 1. 肝がんマウスモデルの概略図。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞 (1×10^6) を、野生型 BALB/c マウス (0 日) の脾臓内に接種した。その後、5、8、11 日目に Poly I:C または溶媒コントロールである PBS ($10 \mu\text{g} / \text{マウス}$) を腹腔内投与した。Hepa1-6 細胞移植 14 日後に、肝臓における腫瘍の形成や免疫細胞を解析した。

腫瘍抗原特異的 T 細胞の解析

EG7-OVA マウスリンパ腫細胞株 (1×10^6) を野生型 C57BL/6 マウスあるいは NK2R 欠損マウスに皮内移植した。移植 14 日後に、マウスの皮内腫瘍組織から得られた Hepa1-6 がん細胞および腫瘍浸潤細胞を含む全細胞を回収した、H-2Kb 拘束性 OVA Tetramer-SIINFEKL-PE を使用し、フローサイトメトリー法により腫瘍内浸潤 OVA 抗原特異的 T 細胞解析・評価した。

免疫組織化学染色 (IHC)

マウス肝がん Hepa1-6 細胞あるいはマウス大腸がん CT26 細胞を使用担がんマウスモデルから得た肝臓組織について、4 %パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を使用して固定した後、パラフィンを用いて包埋処理した。脱パラフィンした後、CD4 お

よび CD8 の発現について、それぞれ抗原賦活化液 pH9 (#415211, ニチレイ、95°C・20 分間)、および 1 スライドあたり約 200 μ L のプロテアーゼ溶液 (0.4 mg/mL; #S3004, Dako、常温・5 分間) を使用して抗原を賦活化し、また内因性ペルオキシダーゼについて、0.3 %の過酸化水素を使用し、室温、10 分間処理することで不活化した。トリス緩衝生理食塩水で洗浄後、一次抗体として抗 CD4 抗体 (D7D2Z) (1:100, #25229) を常温・60 分間、もしくは抗 CD8 α 抗体 (D4W2Z) (1:100, #98941) を 4°C・一晚反応させた。反応後に 1 回洗浄し、ヒストファインシンプルステイン MAX-PO (R; #424144, ニチレイ、常温・30 分間) もしくは二次抗体としてウサギ抗ハムスターIgG 抗体 (#6215-01, SouthernBiotech) 、ヒストファインシンプルステイン MAX-PO (R; #424144)を常温・30 分間、TSA PLUS Biotin Kit (#NEL749A001、パーキンエルマー・ジャパン、常温・5 分間) および VECTASTAIN Elite ABC 試薬 (#PK6100, VECTOR、常温・30 分間) で反応させた。洗浄後に 3-3'-diaminobezidine-4 HCL を加え常温で 5 分間反応させ、CD3 あるいは CD11c タンパク質の発現を可視化した。さらに 1 回洗浄後 Mayer のヘマトキシリン液で核染色 (HE 染色) を行った。すべての解析は腫瘍標本上で 400 倍の視野で行われた、腫瘍組織における免疫細胞のシグナル強度は、ImageJ ソフトウェアで評価した。

フローサイトメトリーによる解析

マウス担がんモデルより腫瘍組織を切除して回収し、さらに細切した後、コラゲナーゼ(1 mg/mL)で処理した。マウスの腫瘍組織から得られた Hepa1-6 がん細胞および腫瘍浸潤細胞を含む全細胞を回収した。各種蛍光標識抗体を用いて細胞を染色し、FACSCanto II (BD Biosciences)によるフローサイトメトリーを行なった。得られたデータを FlowJo ソフトウェア(Tree Star, Ashland, OR, USA)を用い解析し、CD45 陽性細胞における CD8 陽性細胞あるいは CD4 陽性細胞の割合を評価した。

細胞内染色

CD8 陽性 T 細胞における Granzyme B、IFN- γ 、p-ERK1/2 と I κ B の発現を評価するため、野生型 C57BL/6 マウス、および STAT1 欠損、あるいは NK2R 欠損マウスの脾臓細胞、あるいは脾臓から分離した CD8 陽性細胞を 24 穴の細胞培養プレートに 1×10^6 個播種し、抗 CD3 抗体 (50 ng / mL) および抗 CD28 抗体 (50 ng / mL)あるいは NKA (1 μ M) を添加し 20 時間・37°Cに培養後、Brefeldin A (10 μ g / mL; Sigma-Aldrich, #B7651) を添加し、さらに 4 時間・37°Cで培養した。培養後、細胞を回収し、抗 CD45 抗体、抗 CD8 抗体、7-AAD およびアイソタイプコントロールを用いて、表面抗原分子を 15 分間染色した。Cytofix/Cytoperm (200 μ l / tube) を加え室温、20 分で反応させ

て、細胞の固定化および細胞膜の透過処理を行った後に、1 × Perm wash Buffer (500 μ l/tube) で2回洗浄した。固定化した細胞は抗 Granzyme B 抗体あるいは、抗 IFN- γ 抗体を使用して細胞内染色を 45 分間行った後に、フローサイトメトリーによる解析を行った。

あるいは、前述の細胞を 12 穴の細胞培養プレートに 1×10^7 個播種し、抗 CD3 抗体(50 ng / mL) および抗 CD28 抗体 (50 ng / mL)を添加し、20 分間、37 °Cにて培養後、細胞を回収し、抗 CD45 抗体、抗 CD8a 抗体、7-AAD およびアイソタイプコントロールで表面抗原の染色を行った。PerFix EXPOSE (Beckman Coulter) 試薬を使用して、透過・固定処理を行った後、抗リン酸化 ERK1/2 抗体あるいは、抗 I κ B 抗体で細胞内染色し、フローサイトメトリーによる解析を行った。

各サンプルの平均蛍光強度 (MFI) 比率は、以下の式 (サンプル Δ MFI (標的マーカー MFI-アイソタイプコントロール MFI) / コントロールサンプル Δ MFI) \times 100 にて、計算して求めた。

ELISA

野生型 C57BL/6 マウス、STAT1 欠損、あるいは NK2R 欠損マウスの脾臓細胞、あるいは脾臓から分離した CD8 陽性細胞を 96 穴の細胞培養プレートに 5×10^5 個播種し、抗 CD3 抗体 (50 ng / mL) および抗 CD28 抗体 (50 ng / mL) あるいは NKA (1 μ M) を添加し 24 時間・37 °Cに培養後、上清液を回収し、IL-2 もしくは IFN- γ の誘導能を OptEIA Mouse IL-2 ELISA kits (BD Biosciences) および OptEIA Mouse IFN- γ ELISA kits (BD Biosciences) を用いて製造元の説明書に従い定量した。

PCR 解析

野生型 C57BL/6 マウス、STAT1 欠損、あるいは NK2R 欠損マウスの脾臓から分離した CD8 陽性細胞を 96 穴の細胞培養プレートに 5×10^5 個播種し、抗 CD3 抗体 (50 ng/mL) および NKA(1 μ M)、あるいは、抗 IFN- γ 抗体 (50 ng/mL) を添加し 24 時間・37 °Cに培養後、細胞を回収した。回収した細胞を、全 RNA を ISOGEN RNA extraction kit (Nippon gene, Toyama, Japan, #311-07361) を用いて抽出し、NanoDrop 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific, #ND-1000) を用いて波長 260 nm の吸光度で RNA 濃度を測定した。得られた全 RNA はサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) を使用して逆転写を行い、cDNA を調製した。得られた cDNA をプレートとし、NK1R (*Tacr1*), NK2R (*Tacr2*), tachykinin precursor 1 (*Tac1*), STAT1 (*Stat1*), IFN- γ (*Ifng*), granzyme B (*gzmb*), および β -actin (*Actb*) について、下記特異的プライ

マーおよびユニバーサルプローブを用い、CFX 連接定量 PCR 測定システム (BIORAD, CA, USA) により標的遺伝子の増幅を行った。

マウス NK1R (*Tacr1*) (left: 5'-ggatggacaaggttgcag-3', right: 5'-tgacaaaaactagaagcggatg-3'), マウス NK2R (*Tacr2*) (left: 5'-gcaggtctacctggcactct-3', right: 5'-ggaatccagagcgaaacct-3'), マウス tachykinin precursor 1 (*Tacr1*) (left: 5'-ggcactggaaatgatctgg-3', right: 5'-aatctttctcaaattctcaccttca-3'), マウス STAT1 (*Stat1*) ; (left: 5'-tgagatgtcccggatagtg-3', right: 5'-cgccagagagaaattcgtgt-3'), マウス IFN- α (*Ifna*) (left: 5'-tcaagccatccttgctaa-3', right: 5'-gtctttgatgtgaagaggttcaa-3'), マウス IFN- β (*Ifnb*) (left: 5'-ctggctccatcatgaacaa-3', right: 5'-agagggctgtggtggagaa-3'), マウス IFN- γ (*Ifng*) (left: 5'-atctggaggaactggcaaaa-3', right: 5'-ttcaagacttcaaagagtctgagg-3'), マウス granzyme B (*gzmb*) (left: 5'-tgctgctcactgtgaaggaa-3', right: 5'-ttaccataggataactgctg-3'), および マウス β -actin (*Actb*) (left: 5'-aaggccaacctgaaaagat-3', right: 5'-gtggtacgaccagaggcatac-3'). 各遺伝子の発現レベルは、ハウスキーピング遺伝子として β -actin の発現レベルにより標準化し、 $\Delta\Delta C_t$ 法 ($\Delta C_t = \Delta C_{t\text{sample}} - \Delta C_{t\text{reference}}$) により相対的発現値として示した。

ウエスタンブロット

野生型 C57BL/6 マウス、および NK2R 欠損マウスの脾臓から分離した CD8 陽性細胞を 24 穴の細胞培養プレートに 1×10^6 個播種し、抗 CD3 抗体 (50 ng / mL) および抗 CD28 抗体 (50 ng / mL) を添加し、20 分間、37 °C にて培養後、細胞を回収した。電気泳動用のサンプルは、その回収した細胞からプロテアーゼインヒビターカクテル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) およびホスファターゼインヒビター (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した RIPA 緩衝液 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて調製した。サンプルは SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜 (Millipore, Danvers, MA, USA) に転写した。転写した膜は 10 % スキムミルクあるいは Blocking One-P 試薬 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用して、ブロッキングを行なった。ブロッキング試薬に希釈した一次抗体を用いて転写した膜を 4 °C で一晩インキュベーションした。Tween-PBS を使用して洗浄した後、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗ウサギ IgG (GE healthcare Japan, Tokyo, Japan) またはマウス IgG (7076; 細胞シグナル技術) 二次抗体を用いて 2 時間、室温にてインキュベートした。各タンパク質由来のシグナルを ECL Prime Western Blotting 試薬 (Cytiva, Amersham, Buckinghamshire, UK) を使用し、LAS4000 mini (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) にて検出した。 α -tubulin に対する I κ B の発現について、また ERK1/2 に対するリン酸化 ERK1/2 発現レベルについて、それぞれアメリカ国立衛生研究所 Image J ソフトウェアを用いて解析した。

統計学的分析

in vitro の評価系では少なくとも 2~4 回以上、独立して行なった。マウス生体モデルの実験は、各群 4~10 匹マウスずつ、2~3 回以上独立して実施した。各データ群について平均値および SD を計算して求めた。実験で、二群間の差を評価する場合、Student の t 検定または Tukey's HSD 検定を用いて評価した。本研究では $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。データは Windows 用 JMP 統計ソフトウェア (version 16.1.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) あるいは Mac 用 Microsoft(R) Excel (version 16.61.1) を用いて解析した。

結果

Poly I:C 投与による STAT1 の活性化は肝がん細胞の腫瘍形成の抑制に関与する。

これまで我々は、大腸がんマウスモデルに対する自然免疫アジュバント Poly I:C の投与や IL-6 が産生誘導されない腫瘍微小環境下において STAT1 の活性化を介した宿主抗腫瘍免疫の賦活とともに、腫瘍形成が著しく抑制されることを見出した (Toyoshima et al., 2019; Xiang et al., 2022)。そこで本研究では、生体内での肝がん細胞の腫瘍形成における STAT1 の関与と肝がんを制御する新たな抗腫瘍メカニズムを明らかにするため、肝がんマウスモデルを構築して解析、検討した。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株を樹立し、同系の野生型 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した (Okada et al., 2022)。移植後 5 日目から 3 日毎に Poly I:C または溶媒コントロールとして PBS を腹腔内投与し、移植後 14 日に、肝がん細胞の腫瘍形成を解析、評価した結果、Poly I:C を投与したマウスは、PBS コントロール群に比べ、肝がん細胞の腫瘍形成が有意に抑制されることを確認した (図 2、図 3)。

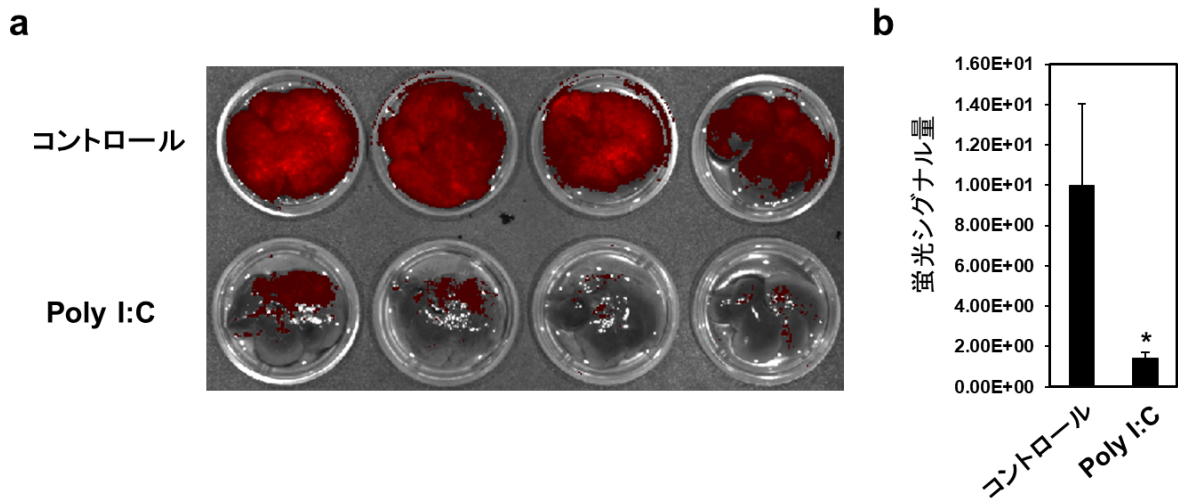


図 2. 自然免疫アジュバント Poly I:C の肝がんモデルマウスへの投与は、腫瘍形成を有意に抑制する。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。5 日目に Poly I:C ($10 \mu\text{g}/\text{マウス}$) または溶媒コントロールの PBS を腹腔内投与し、その後 3 日おきに投与した。(a) 移植後 14 日における肝臓組織の肝がん細胞の腫瘍形成能について、生体イメージング法により評価し、代表的な写真を示した。(b) 移植後 14 日における肝臓組織における蛍光シグナル量を解析し、それぞれの平均値と標準偏差を示した ($n=4$)。*は Student の t 検定による有意差 ($P<0.05$) を示す。

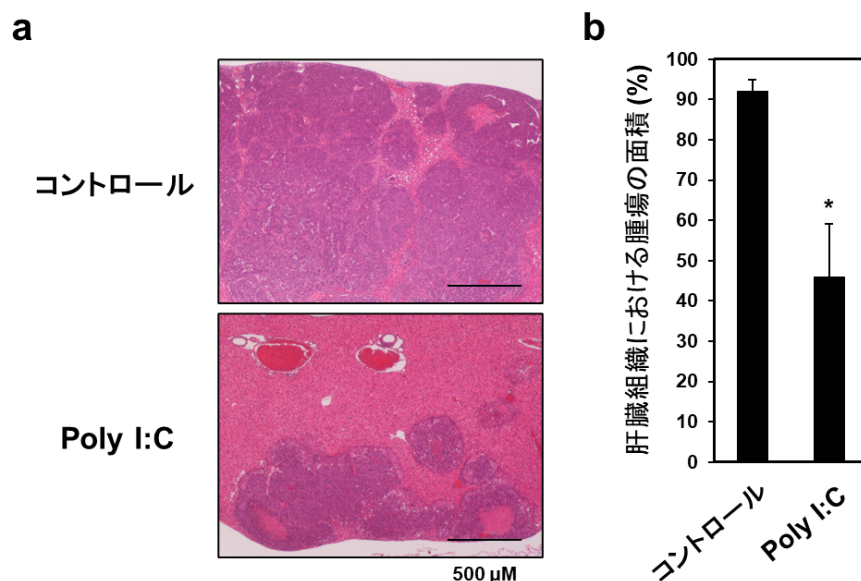


図 3. 肝がんマウスモデルに対して、自然免疫アジュバント Poly I:C を投与することにより、肝がん細胞の腫瘍形成が有意に抑制される。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。5 日目に Poly I:C (10 μg / マウス) またはコントロールの PBS を腹腔内投与し、その後 3 日おきに投与した。(a) 移植後 14 日における代表的な肝臓組織の HE 染色像を示した。写真内の直線は 500 μm を示す。(b) 肝臓組織に対する腫瘍部位の面積を計算し、それぞれ平均値および標準偏差を示した。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

これらの結果から、肝がん Hepa1-6 細胞を使用した担がんモデルに対する自然免疫アジュバント Poly I:C の投与は肝がんの腫瘍形成を抑制する効果があることが示された。

次に、本モデルにおける免疫応答を検討するために、Poly I:C を投与した肝がんモデルマウスの脾臓組織における IFN- α 、IFN- β あるいは IFN- γ 遺伝子の発現レベルを調べた。その結果、Poly I:C 投与したマウスの脾臓細胞における IFN- α 、IFN- β および IFN- γ 遺伝子の発現レベルが、それぞれ亢進したことが確認された (図 4)。

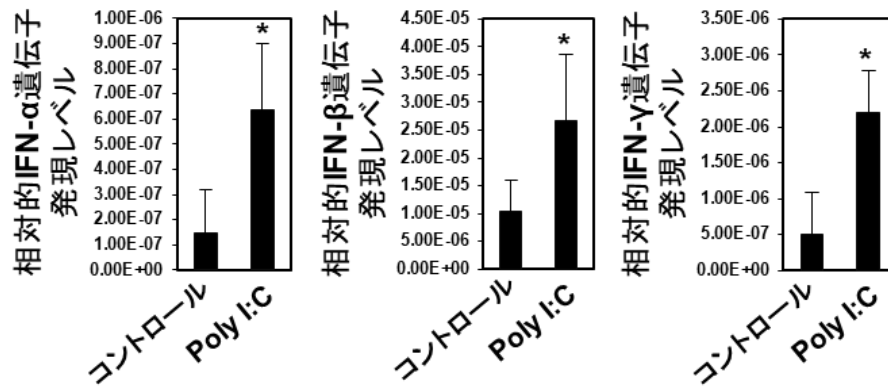


図 4. Poly I:C 投与は、担がんマウスモデルの脾臓細胞における IFN- α 、IFN- β および IFN- γ 遺伝子の発現レベルを増加する。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepal-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。5 日目に Poly I:C ($10 \mu\text{g} / \text{マウス}$) またはコントロールの PBS を腹腔内投与し、その後 3 日おきに投与した。移植後 14 日における脾臓細胞の IFN- α 、IFN- β および IFN- γ 遺伝子の発現レベルを評価した、それぞれ平均値および標準偏差を示した。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

本結果より、Poly I:C の投与によって誘導された I 型 IFN あるいは II 型 IFN は、肝がん細胞の腫瘍形成を抑制する可能性が示唆された。

そこで、肝がん細胞の腫瘍形成における STAT1 の関与を確認するために、STAT1 欠損マウスを用いて肝がんマウスモデルを構築した。その結果、野生型 C57BL/6 マウスと比較して、STAT1 欠損マウスにおいて、肝がん細胞の腫瘍形成が著しく増悪することを見出した (図 5、図 6)。

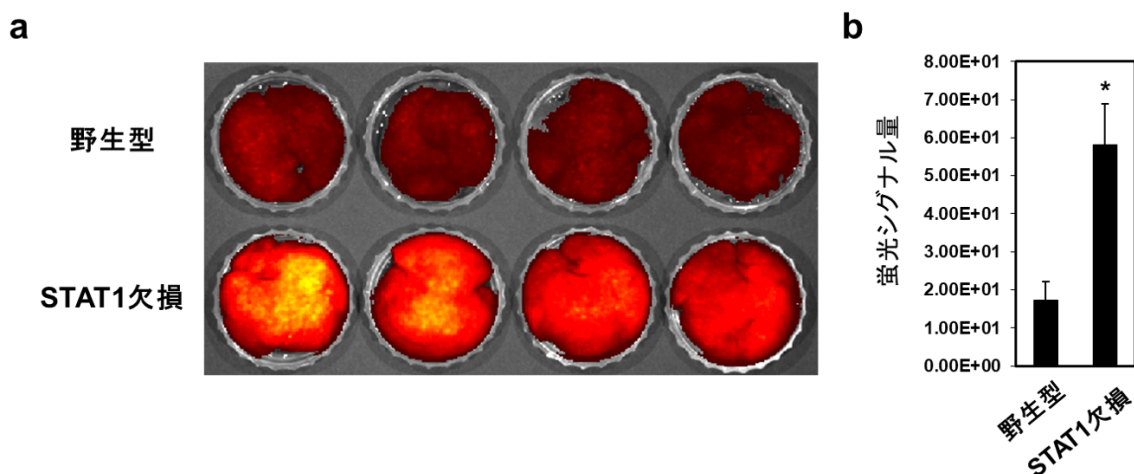


図 5. 肝がんマウスモデルにおける STAT1 の欠損は、肝がん細胞の腫瘍形成を著しく増悪させる。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepal-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウス、あるいは STAT1 欠損マウスの脾臓内に移植した。(a) 移植後 14 日における肝臓組織の腫瘍形成について、生体イメージング法により評価し、代表的な写真を示した。(b) 移植後 14 日における肝臓組織における蛍光シグナル量を解析し、それぞれの平均値と標準偏差を示した ($n = 4$)。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

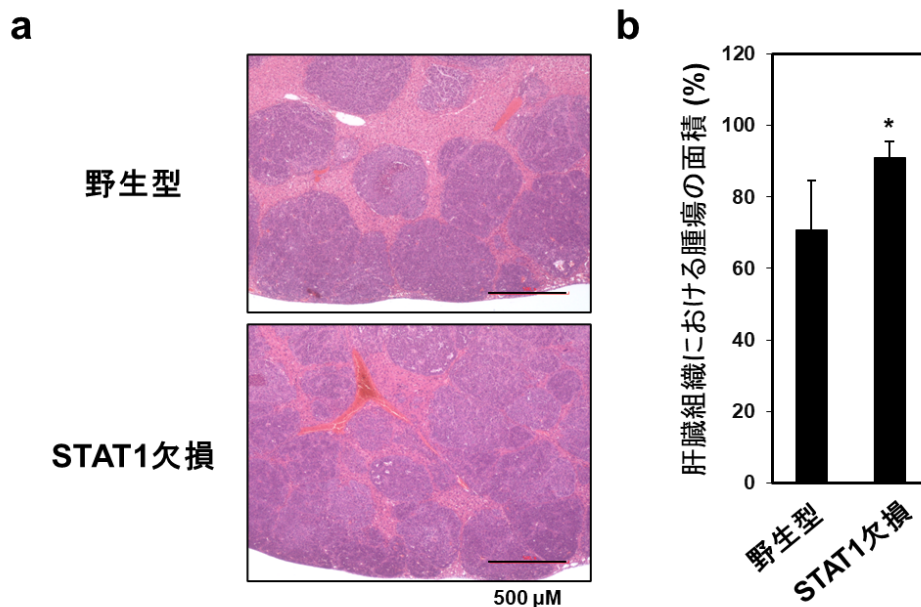


図 6. STAT1 欠損マウスを使用した肝がんモデルにおいて、肝がん細胞の腫瘍形成は有意に亢進する。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepal-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウス、あるいは STAT1 欠損マウスの脾臓内に移植した。(a) 移植後 14 日における代表的な肝臓組織の HE 染色像を示した。写真内の直線は 500 μm を示す。(b) 肝臓組織に対する腫瘍部位の面積を計算し、それぞれ平均値および標準偏差を示した。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

これらの結果より、肝がん Hepal-6 細胞を使用した肝がんモデルの腫瘍形成において、STAT1 は抑制的に関与する可能性が示唆された。

そこで次に、STAT1 を欠損したマウスを使用した肝がんモデルに対して、Poly I:C を投与したところ、肝がん細胞の腫瘍形成は、溶媒コントロールである PBS を投与した実験群とで有意な差は認められなかった (図 7、図 8)。

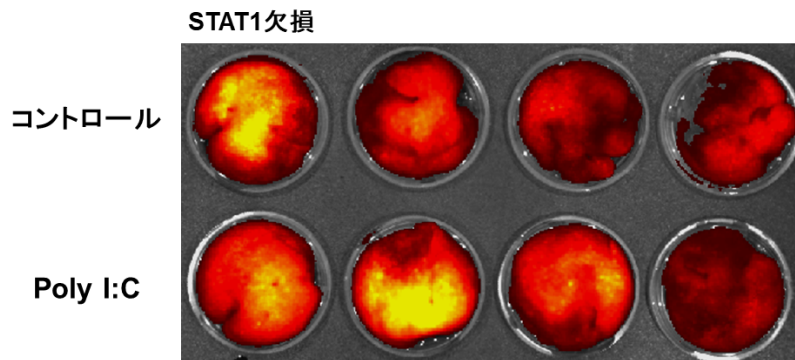
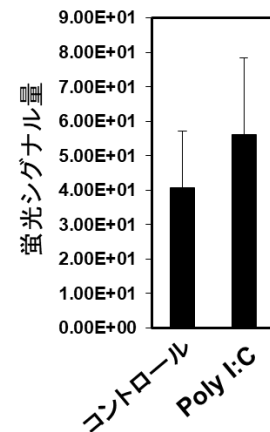
a**b**

図 7. STAT1 を欠損した肝がんモデルに対する Poly I:C の投与による腫瘍形成への効果は認められない。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の STAT1 欠損 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。5 日目に Poly I:C ($10 \mu\text{g}$ / マウス) またはコントロールの PBS を腹腔内投与し、その後 3 日おきに投与した。(a) 移植後 14 日における腫瘍形成について、生体イメージング法により評価し、代表的な写真を示した。(b) 移植後 14 日の肝臓組織における蛍光シグナル量を解析し、それぞれの平均値と標準偏差を示した ($n = 4$)。Student の t 検定による有意な差はないことを示す。

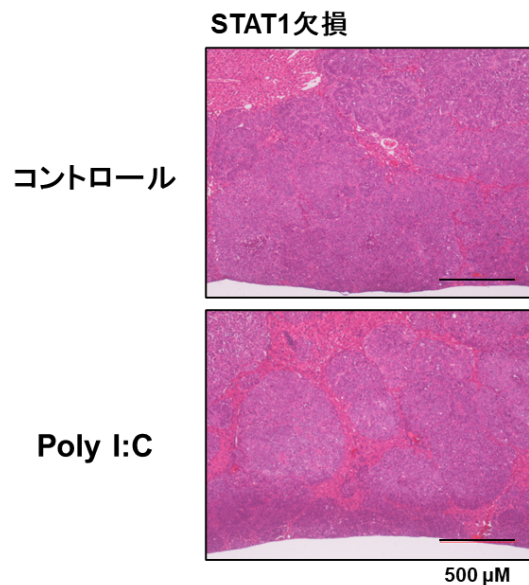
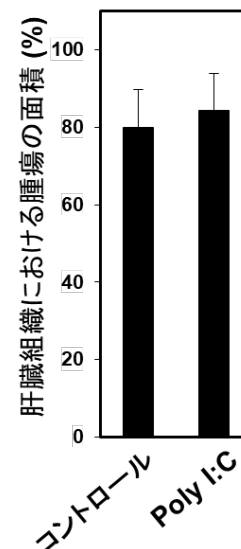
a**b**

図 8. STAT1 欠損 C57BL/6 マウスを使用した肝がんモデルに対する Poly I:C の投与による腫瘍形成の抑制効果に有意差は認められない。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の STAT1 欠損 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。5 日目に Poly I:C ($10 \mu\text{g}$ / マウス) またはコントロールの PBS を腹腔内投与し、その後 3 日おきに投与した。(a) 移植後 14 日における代表的な肝臓組織

の HE 染色像を示した。写真内の直線は 500 μm を示す。(b) 肝臓組織に対する腫瘍部位の面積を計算し、それぞれ平均値および標準偏差を示した。Student の t 検定による有意な差はないことを示す。

以上の結果より、肝がんモデルに対する Poly I:C の投与による抗腫瘍効果において、STAT1 の関与は重要であることが示唆された。

肝がんマウスモデルに対する Poly I:C の投与は、STAT1 依存的に CD8 陽性キラー T 細胞の抗腫瘍エフェクター機能を亢進させる。

次に、肝がんマウスモデルに対する Poly I:C 投与による各種免疫担当細胞への影響を検証した。まず肝がんモデルマウスの腫瘍組織について免疫組織化学染色を施行した結果、溶媒コントロールである PBS を投与したマウスに比べ、Poly I:C を投与したマウスの肝臓の腫瘍内で、より高い CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の集積を認めた (図 9)。

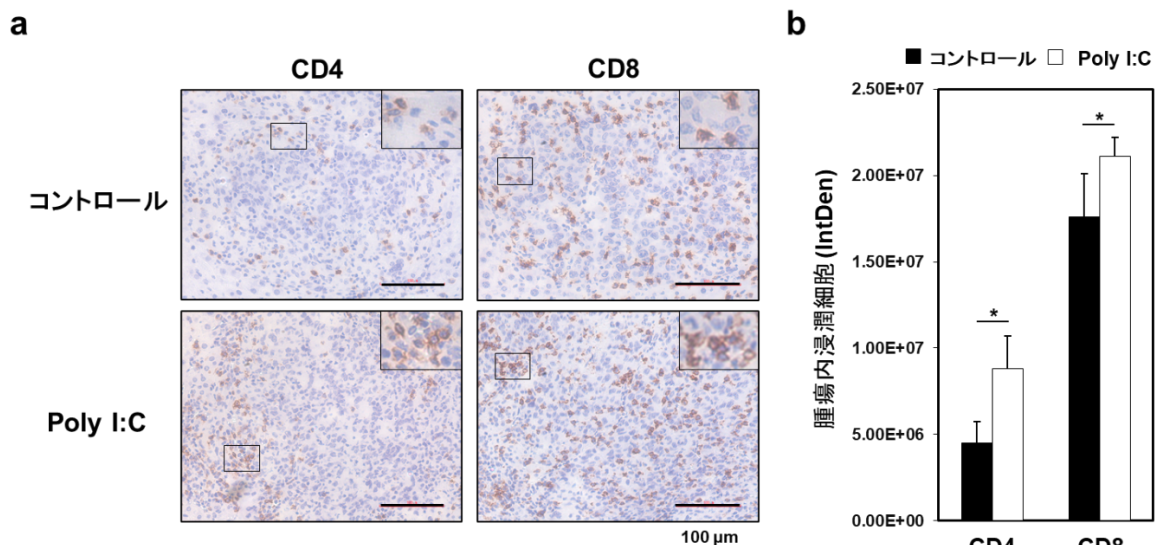


図 9. 肝がんマウスモデルにおいて、Poly I:C 投与することにより、肝臓組織の腫瘍内において、CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞の集積が有意に亢進する。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。5 日目に Poly I:C (10 μg / マウス) またはコントロールの PBS を腹腔内投与し、その後 3 日おきに投与した。(a) 移植後 14 日における肝がん腫瘍組織における CD4 および CD8 の発現について、それぞれ代表的な免疫染色像の写真を示した。写真内の線は 100 μm を示す。(b) 移植後 14 日における腫瘍組織に浸潤している CD4 および CD8 陽性 T 細胞のシグナル発現レベルは ImageJ で評価し、それぞれ平均値および標準偏差を示した。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

一方、腫瘍を含む肝臓全体から回収した細胞について、フローサイトメトリーで CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の割合を解析した結果、PBS を投与したコントロール群と Poly I:C を投与した群の間に有意な差は認めなかった (図 10)。

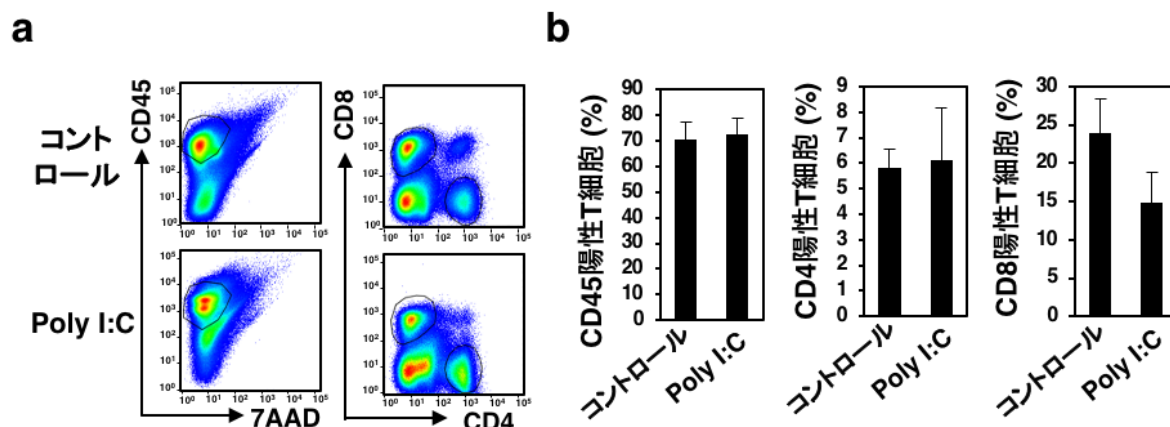


図 10. 肝がんマウスモデルの腫瘍を含む肝臓の全体において、Poly I:C 投与による CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞の割合に有意差は認められない。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepal-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。移植後 5 日目に Poly I:C ($10 \mu\text{g} / \text{マウス}$) または溶媒コントロールの PBS を腹腔内投与し、その後 3 日おきに投与した。(a) 移植後 14 日における、腫瘍を含む肝臓中の 7AAD 陰性 CD45 陽性細胞、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の検出。(b) それぞれの陽性細胞の割合の平均値と標準偏差 ($n = 4$)。Student の t 検定で有意な差は無かった。

このフローサイトメトリー解析の結果は、免疫組織化学染色の結果 (図 9) と異なる。これは、図 9 の解析が腫瘍のみを対象にしたものである一方で、図 10 の解析は腫瘍を含む肝臓全体を対象にしたことがこの違いを生んだ可能性がある。すなわち、肝臓の正常部分に存在する他の免疫細胞が増えたため、全体に占める腫瘍内 T 細胞の存在割合が低下した可能性がある。

そこで次に、免疫担当細胞のエフェクター機能について検討した。肝がんモデルの肝臓組織に浸潤した CD8 陽性 T 細胞について細胞傷害性分子である Granzyme B の細胞内発現レベルをフローサイトメトリーにより解析した。その結果、溶媒コントロールである PBS を投与したマウスに比べ、Poly I:C を投与したマウスの肝臓組織に浸潤している CD8 陽性 T 細胞において、有意に Granzyme B の発現レベルが高いことが分かった (図 11)。

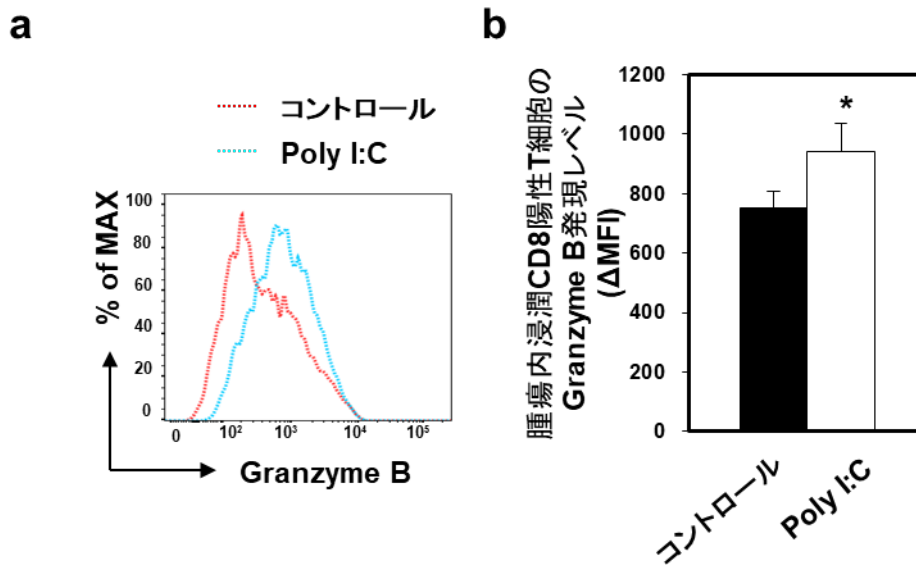


図 11. 肝がんマウスモデルにおける肝組織において CD8 陽性 T 細胞の Granzyme B 発現レベルは Poly I:C 投与したマウスで上昇する。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepal-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。5 日目に Poly I:C ($10 \mu\text{g} / \text{マウス}$) またはコントロールの PBS を腹腔内投与し、その後 3 日おきに投与した。(a) 移植後 9 日における代表的な肝臓組織から回収した CD8 陽性 T 細胞の Granzyme B の細胞内発現レベルをヒストグラムで示した。(b) アイスotypeコントロールと比較した ΔMFI を計算して求め、それぞれの平均値と標準偏差を示した ($n = 4$)。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

本結果より、肝がんモデルマウスに対する Poly I:C の投与は CD8 陽性 T 細胞の抗腫瘍エフェクター機能を亢進する作用を持つことが示唆された。

次に、肝がん腫瘍組織への免疫細胞の浸潤における STAT1 の効果を検討した。STAT1 欠損 C57BL/6 マウスを使用した肝がんモデルの腫瘍組織における免疫染色を施行した結果、野生型 C57BL/6 マウスと比較して、STAT1 欠損マウスの肝臓の腫瘍組織において、CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞の集積が著しく減弱することを認めた (図 12)。

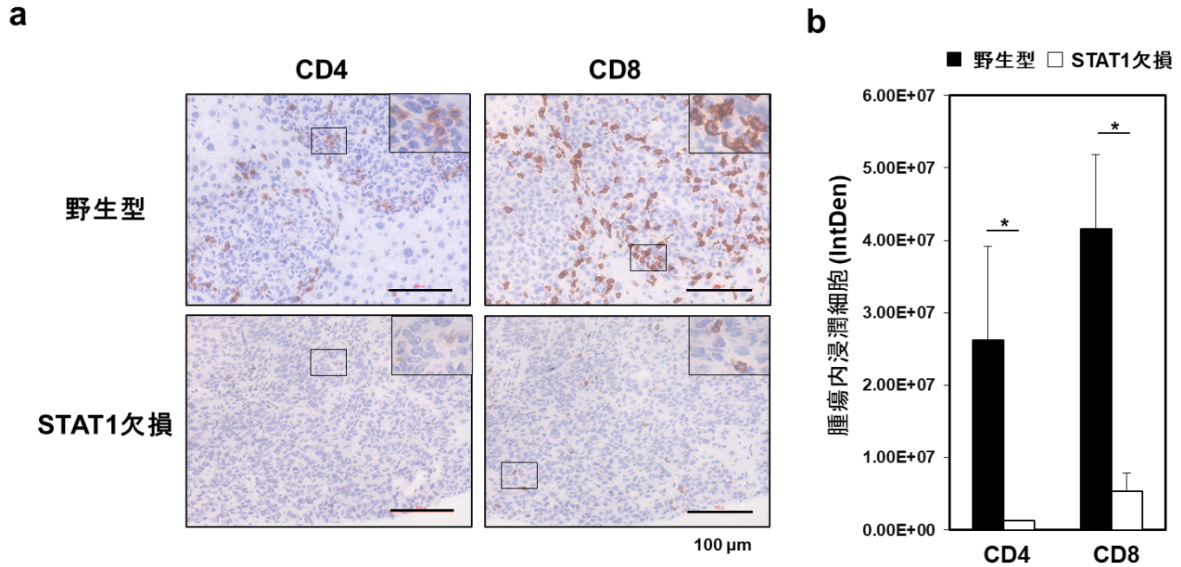


図 12. 肝がんマウスモデルにおいて、STAT1 の欠損により、腫瘍組織に対する CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞の集積が有意に減弱する。
 蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepal-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウス、あるいは STAT1 欠損マウスの脾臓内に移植した。(a) 移植後 14 日における腫瘍組織における CD4 および CD8 タンパク質の発現レベルについて、それぞれ代表的な免疫染色像の写真を示した。写真内の線は 100 μm を示す。(b) 移植後 14 日における腫瘍組織に浸潤している CD4 および CD8 陽性 T 細胞由来のシグナルレベルについて、ImageJ で評価し、それぞれ平均値および標準偏差を示した。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

さらに、肝がんモデルマウスの肝臓組織から回収した全細胞についてフローサイトメトリーにより、免疫担当細胞を解析した結果、野生型 C57BL/6 マウスに比べ、STAT1 欠損マウスの肝臓組織において、CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞の集積が有意に減弱することが確認された (図 13)。

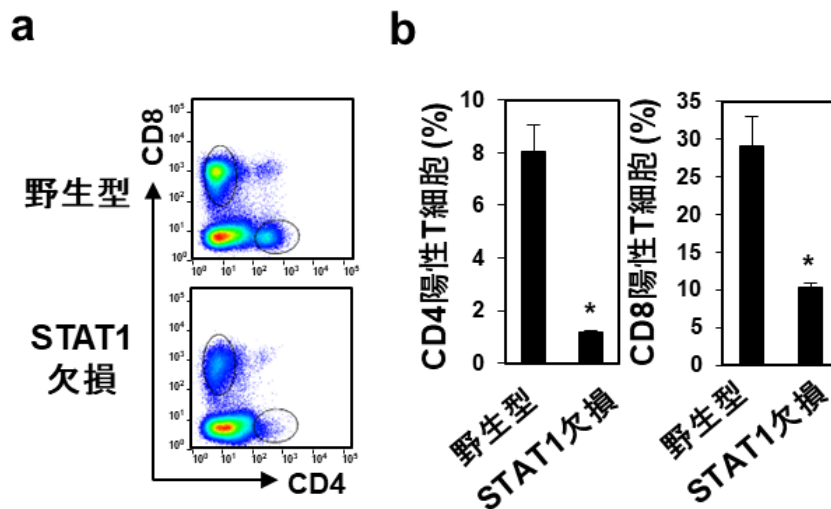


図 13. STAT1 を欠損した肝がんマウスモデルの肝臓組織において、CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞の集積割合が有意に低下する。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウス、あるいは STAT1 欠損マウスの脾臓内に移植した。(a) 移植後 14 日における肝臓組織における CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞の浸潤割合について代表的な二次元プロットを示す。(b) さらにそれぞれの陽性細胞の割合について、その平均値と標準偏差を示した ($n = 4$)。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

これらの結果から、肝がんモデルの腫瘍組織への CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の集積において STAT1 が関与する可能性が示唆された。

そこで次に、*in vitro* 評価系で、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞のサイトカイン産生および細胞傷害活性に及ぼす STAT1 の効果を検討した。その結果、STAT1 欠損マウスの脾臓細胞は、野生型 C57BL/6 マウスと比較して、CD3 および CD28 刺激による IL-2 産生の増加が認められる一方で、IFN- γ の産生が抑制されること、および STAT1 を欠損した CD8 陽性 T 細胞は CD3 および CD28 刺激による Granzyme B の発現が抑制されることが明らかとなった (図 14)。

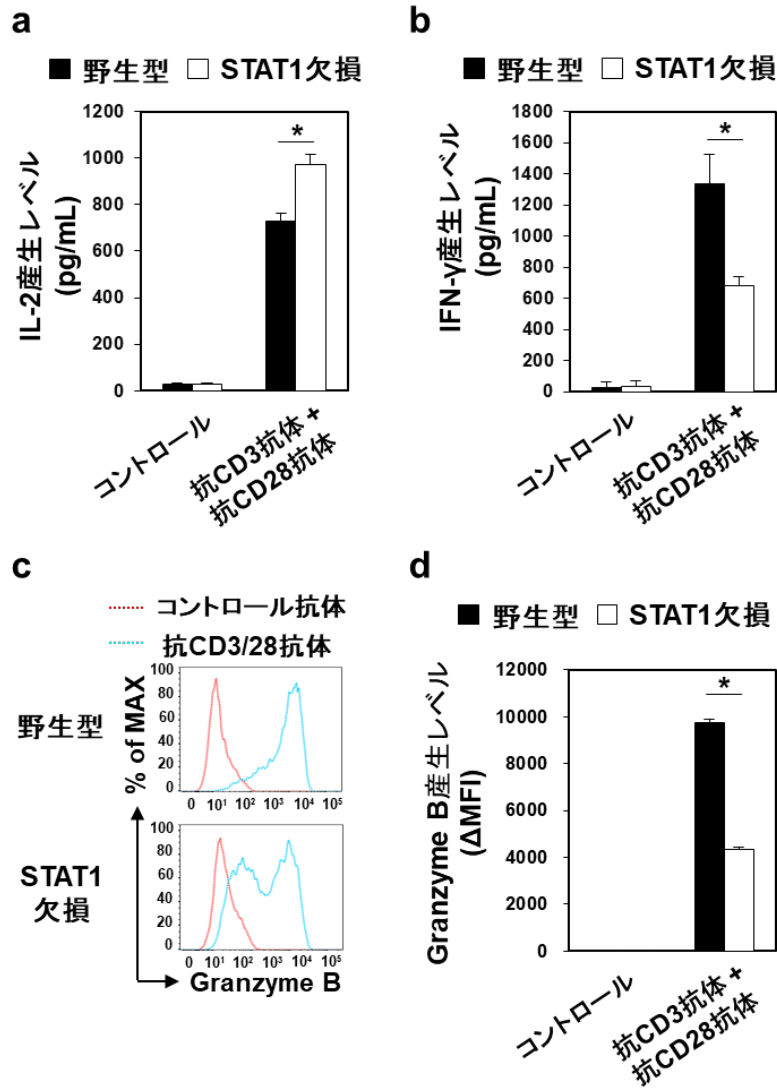


図 14. STAT1 の欠損は、抗 CD3 抗体および CD28 抗体で刺激したマウス脾臓組織あるいは CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ およびグランザイム B の発現を抑制する。

野生型 C57BL/6 マウスおよび STAT1 欠損マウスの脾臓細胞 (5×10^5) を 96 穴細胞培養プレートに播種し、抗 CD3 抗体 (50 ng/ml) および抗 CD28 抗体 (50 ng/ml) 存在下で 37°C、24 時間培養した。(a)、(b) 培養 24 時間後、培養上清液を回収し、ELISA 法により IL-2 および IFN- γ 発現レベルを評価した、それぞれの平均値と標準偏差を示した (n=4)。(c) 培養 24 時間後、回収した脾臓細胞において CD8 陽性 T 細胞の Granzyme B の細胞内発現レベルをヒストグラムで示した。(d) アイソタイプコントロールと比較した Δ MFI を計算して求め、それぞれの平均値と標準偏差を示した (n=4)。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

これらの結果から、マウス脾臓細胞において T 細胞の活性化による IFN- γ の産生誘導と CD8 陽性 T 細胞の抗腫瘍エフェクター機能に STAT1 が関与することが示唆された。

Poly I:C を投与した肝がんマウスモデルにおいて CD8 陽性 T 細胞が、腫瘍形成の抑制に寄与している。

次に、肝がんマウスモデルにおける抗腫瘍エフェクター細胞を同定することを試みた。CD8 陽性 T 細胞の除去抗体を Poly I:C 投与した野生型 C57BL/6 マウスに前投与し、Hepa1-6 細胞を移植した結果、Poly I:C 投与による抗腫瘍効果が有意に減弱することを確認した (図 15、図 16)。

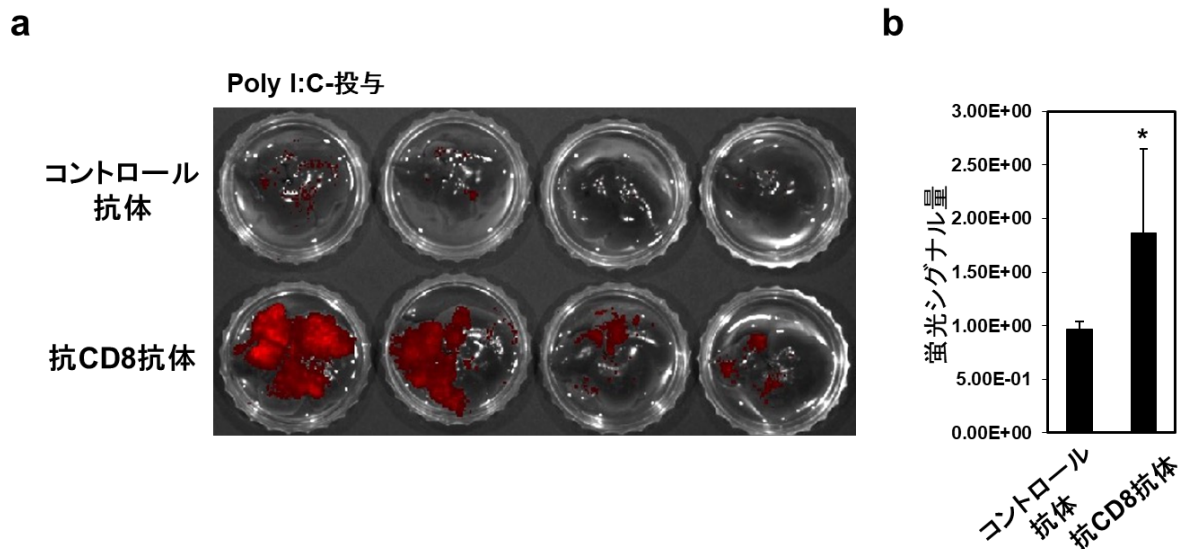


図 15. Poly I:C 投与した肝がんマウスモデルにおいて CD8 陽性 T 細胞を除去することで肝がんの腫瘍形成が増悪する。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。コントロール IgG (200 μ g)、あるいは抗 CD8 抗体 (200 μ g / マウス) を Hepa1-6 細胞の移植前日から 4 日毎に腹腔内投与した。5 日目に Poly I:C (10 μ g / マウス) を腹腔内投与し、その後 3 日おきに投与した。(a) 移植後 14 日における肝臓組織の腫瘍形成について、生体イメージング法により評価し、代表的な写真を示した。(b) 移植後 14 日における肝臓組織における蛍光シグナル量を解析し、それぞれの平均値と標準偏差を示した (n=4)。* は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

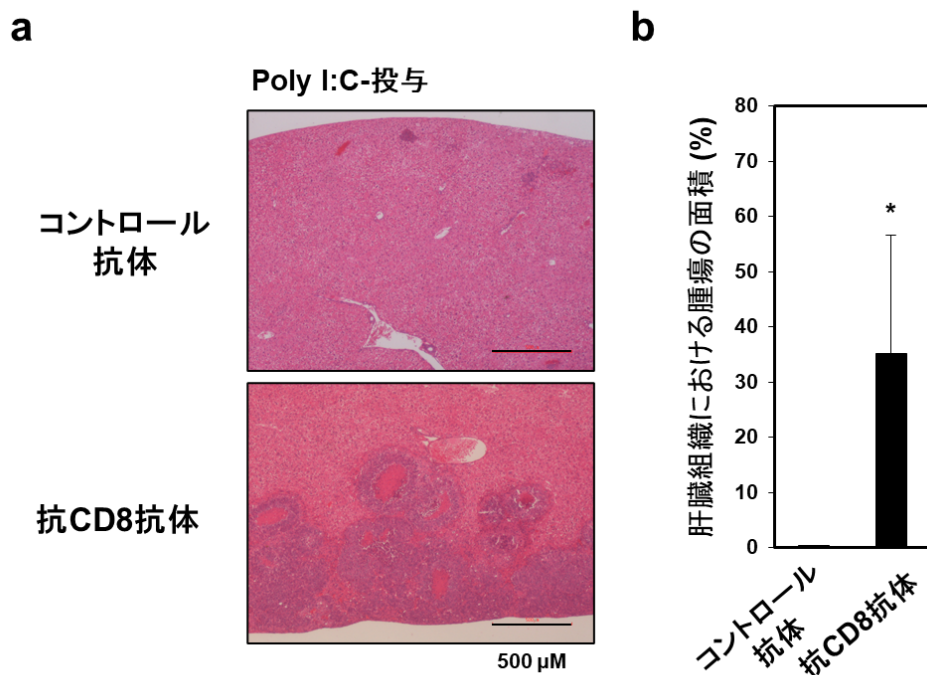


図 16. Poly I:C 投与した肝がんマウスモデルにおいて CD8 陽性 T 細胞を除去することで肝がんの腫瘍形成が有意に増悪する。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。コントロール IgG (200 μ g/ マウス)、あるいは抗 CD8 抗体 (200 μ g/ マウス) を Hepa1-6 細胞の移植前日から 4 日毎に腹腔内投与した。5 日目に Poly I:C (10 μ g/ マウス) を腹腔内投与し、その後 3 日おきに投与した。(a) 移植後 14 日における代表的な肝臓組織の HE 染色像を示した。写真内の直線は 500 μ m を示す。(b) 肝臓組織に対する腫瘍部位の面積を計算し、それぞれ平均値および標準偏差を示した。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

以上の結果から、肝がんマウスモデルにおいて Poly I:C の投与による STAT1 の活性化を介した抗腫瘍効果は、担がん生体で誘導される CD8 陽性 T 細胞が抗腫瘍エフェクター細胞として関与する可能性が示唆された。

CD8 陽性 T 細胞における STAT1 依存的な NK2R の誘導は、肝がん細胞の腫瘍形成の抑制に関与する。

以前の研究で、IFN- γ または LPS の刺激が、STAT1 依存的にマウス樹状細胞で NKA および NK2R の発現を誘導すること、また NK2R 発現を介した神経ペプチドシグナルは、OVA 抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の応答性を増強することを報告した (Kitamura et al., 2012)。また IFN- α 、IFN- β 、または Poly I:C の刺激が、STAT1 依存的にヒト単球由来樹状細胞で NK1R および NK2R の発現を誘導することを明らかにした (Ohtake et al., 2015)。さらに最近の研究で、IFN- α/β 刺激による JAK-STAT を介した NK2R の発現誘導が大腸がんの悪性化に関与することを

明らかにしました (Xiang et al., 2022)。そこで、本研究では、肝がんモデルの腫瘍微小環境における CD8 陽性 T 細胞の抗腫瘍エフェクター機能に及ぼす IFN-STAT1 を介した NKA-NK2R シグナルの関与を検討した。

はじめに、CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ 刺激による神経ペプチドシグナル関連因子の発現誘導メカニズムについて検討した。STAT1 欠損マウスの脾臓由来 CD8 陽性 T 細胞は、野生型 C57BL/6 マウス由来の CD8 陽性 T 細胞と比較して、IFN- γ 刺激による NK1R 遺伝子 (*Tacr1*) の発現誘導に有意な差は認められなかったが、NK2R 遺伝子 (*Tacr2*) および SP や NKA をコードする Tachykinin precursor 1 遺伝子 (*Tac1*) の発現誘導が有意に抑制されていることがわかった (図 17)。

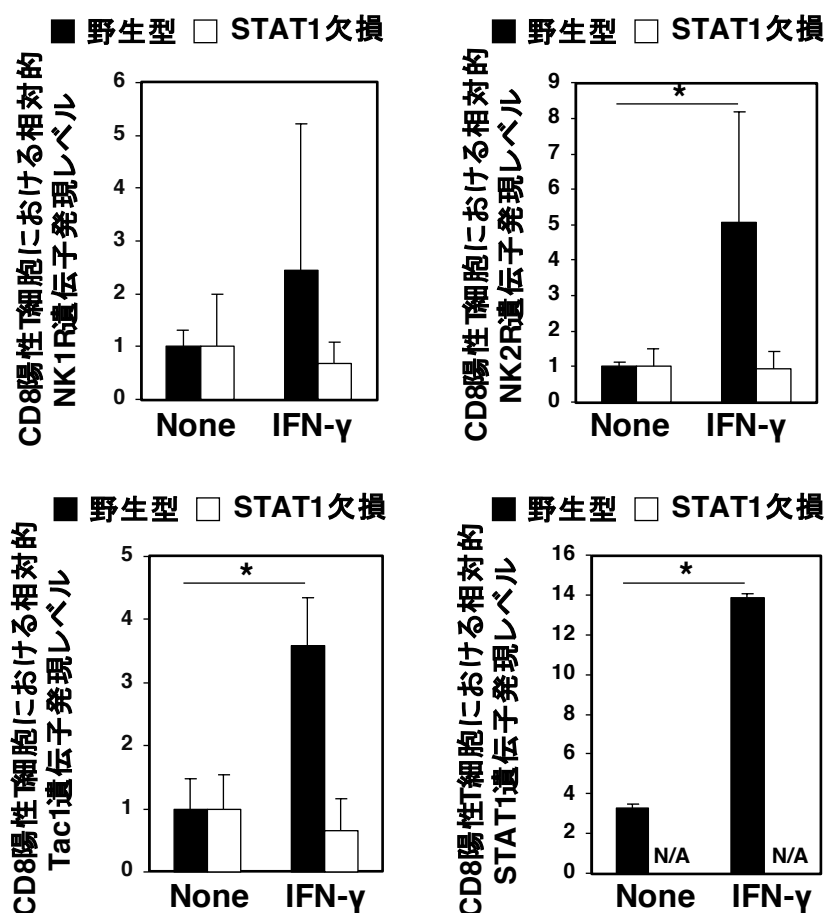


図 17. STAT1 欠損は、IFN- γ で刺激したマウス脾臓組織由来 CD8 陽性 T 細胞における *Tacr2* および *Tacr1* 遺伝子発現を抑制する。

野生型 C57BL/6 マウスおよび STAT1 欠損マウスの脾臓から単離した CD8 陽性 T 細胞を IFN- γ (50 ng/ml) 存在下で 37°C、12 時間インキュベートした。培養 12 時間後、PCR 法により CD8 陽性 T 細胞の NK1R、NK2R、*Tacr1* および STAT1 遺伝子発現レベルを解析した。それぞれの平均値と標準偏差を示した (n = 4)。*は Student の t 検定による有意差 (P < 0.05) を示す。

これらの結果から、CD8 陽性 T 細胞において、IFN- γ の刺激により、STAT1 依存的に NK2R の発現誘導を介した NKA シグナルが亢進する可能性を示唆した。

次に、肝がん細胞の腫瘍形成を抑制における NK2R の関与を確認するために、NK2R 欠損マウスを用いて肝がんマウスモデルを構築して検討した。その結果、野生型 C57BL/6 マウスと比較して、NK2R 欠損マウスにおける肝がん細胞の腫瘍形成が有意に増悪することを確認した (図 18、図 19)。

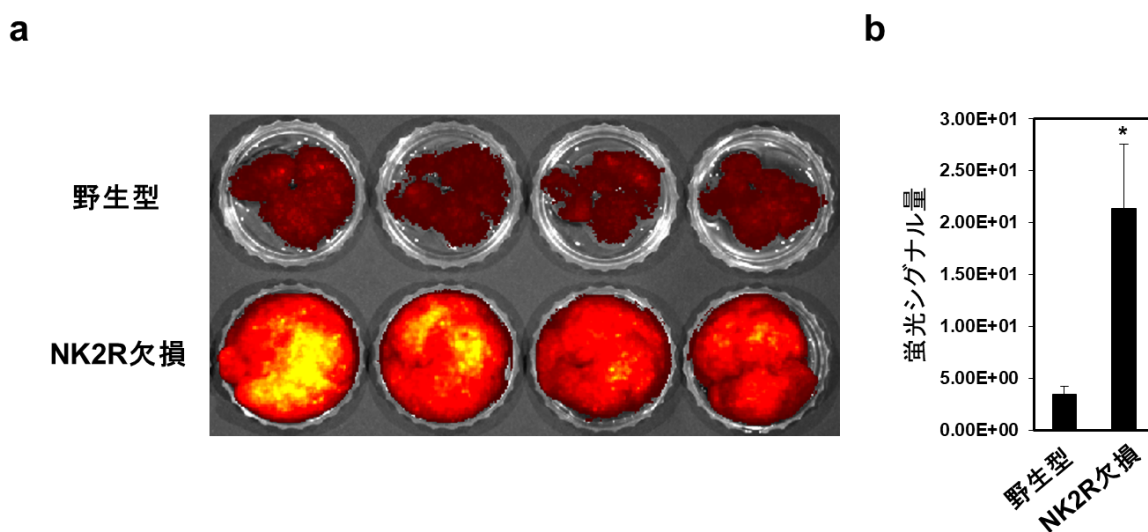


図 18. 肝がんマウスモデルにおいて、NK2R の欠損は、肝臓がん細胞の生体内腫瘍形成が亢進する。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepal-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウス、あるいは NK2R 欠損マウスの脾臓内に移植した。(a) 移植後 14 日における肝臓組織での腫瘍形成について、生体イメージング法により評価し、代表的な写真を示した。(b) 移植後 14 日における肝臓組織における蛍光シグナル量を解析し、それぞれの平均値と標準偏差を示した ($n=4$)。*は Student の t 検定による有意差 ($P<0.05$) を示す。

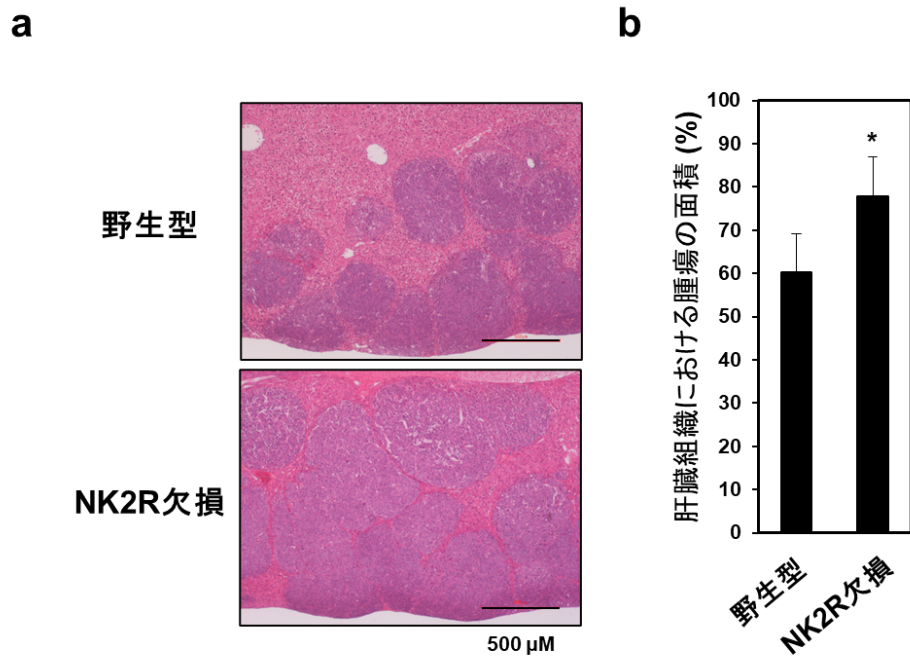


図 19. NK2R 欠損マウスは、肝がん細胞の腫瘍形成が有意に増加する。
 蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウス、あるいは NK2R 欠損マウスの脾臓内に移植した。(a) 移植後 14 日における代表的な肝臓組織の HE 染色像を示した。写真内の直線は 500 μm を示す。(b) 肝臓組織に対する腫瘍部位の面積を計算し、それぞれ平均値および標準偏差を示した。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

以上の結果から、Hepa1-6 を移植した肝がんモデルの腫瘍形成に対して、NK2R は抑制的に関与する可能性が示された。

そこで、肝がんモデルに対する Poly I:C 投与による抗腫瘍効果に及ぼす NK2R の関与を検討した。NK2R 欠損マウスを使用した肝がんモデルに対して Poly I:C を投与したところ、肝がんの腫瘍形成において、コントロール PBS 投与群と有意な差は認められなかった (図 20、図 21)。

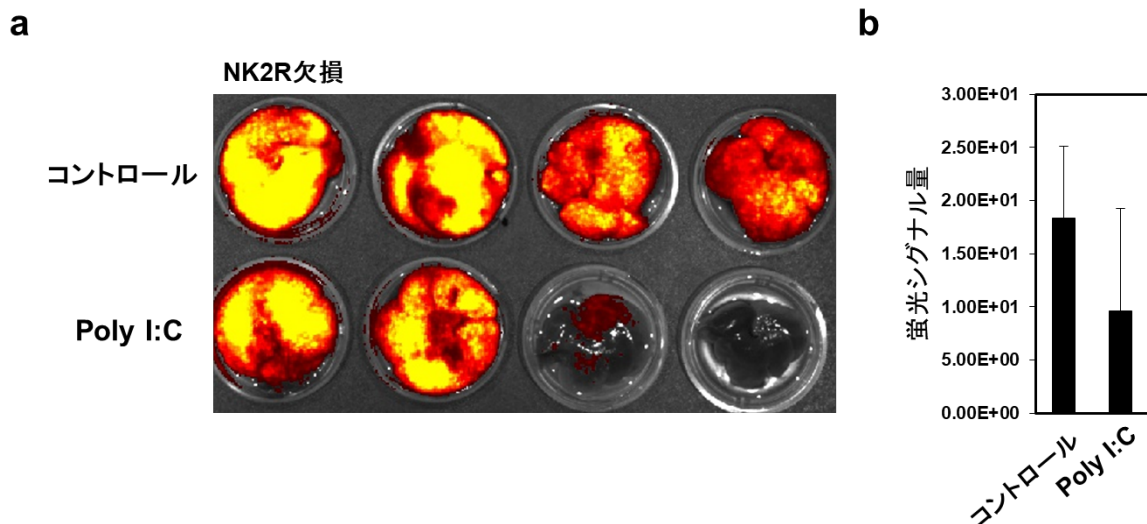


図 20. NK2R を欠損したマウスを使用した肝がんモデルにおいて Poly I:C 投与による腫瘍形成に及ぼす効果に有意差は認められない。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の NK2R 欠損 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。5 日目に Poly I:C ($10 \mu\text{g}$ / マウス) またはコントロールの PBS を腹腔内投与し、その後 3 日おきに投与した。(a) 移植後 14 日における肝臓組織の腫瘍形成について、生体イメージング法により評価し、代表的な写真を示した。(b) 移植後 14 日における肝臓組織における蛍光シグナル量を解析し、それぞれの平均値と標準偏差を示した ($n=4$)。Student の t 検定による有意な差はないことを示す。

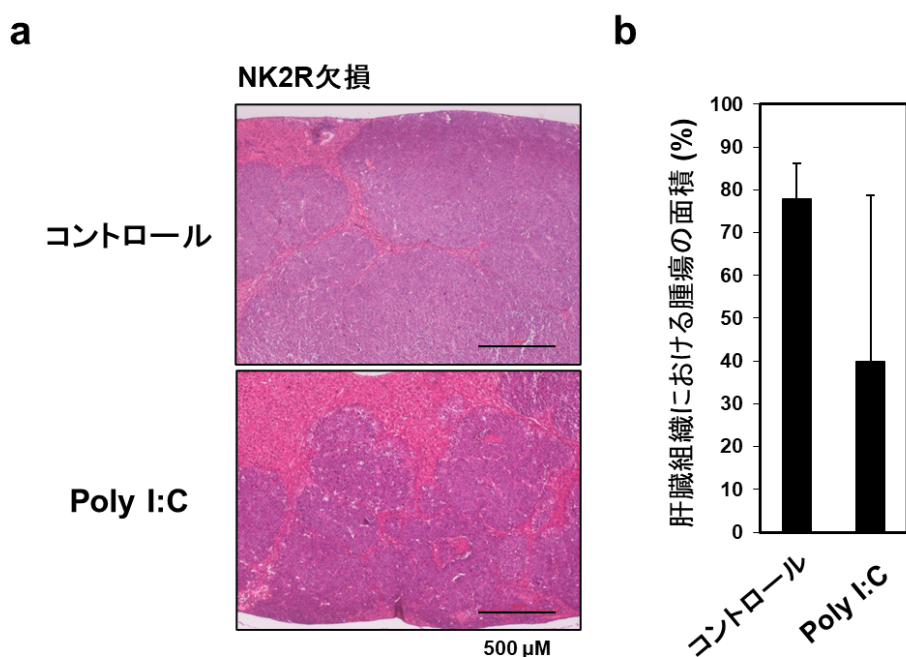


図 21. NK2R を欠損したマウスを使用した肝がんモデルにおいて Poly I:C 投与による腫瘍形成に及ぼす効果については有意差が認められない。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の NK2R 欠損 C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。5 日目に Poly I:C ($10 \mu\text{g}$ / マウス) またはコントロールの PBS を腹腔内投与し、その後 3 日おきに投与した。(a) 移植後 14 日における代表的な肝臓組織の HE 染色像を示した。写真内の直線は $500 \mu\text{m}$ を示す。(b) 肝臓組織に対する腫瘍部位の面積を計

算し、それぞれ平均値および標準偏差を示した。Student の t 検定による有意な差はないことを示す。

以上の結果から、肝がんモデルに対する Poly I:C 投与による抗腫瘍効果について、NK2R が関与する可能性が示唆された。

肝がんマウスモデルにおいて、NK2R の欠損により CD8 陽性キラーT 細胞の抗腫瘍エフェクター機能が減弱する。

そこで次に、肝がんモデルマウス腫瘍組織への免疫細胞の浸潤に対する NK2R の影響を検討した。NK2R 欠損マウスを使用した肝がんモデルの腫瘍組織における各種免疫細胞の解析を行った結果、野生型 C57BL/6 マウスと比較して、NK2R 欠損マウスの肝臓組織に対する CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の集積が有意に減弱することを確認した (図 22)。

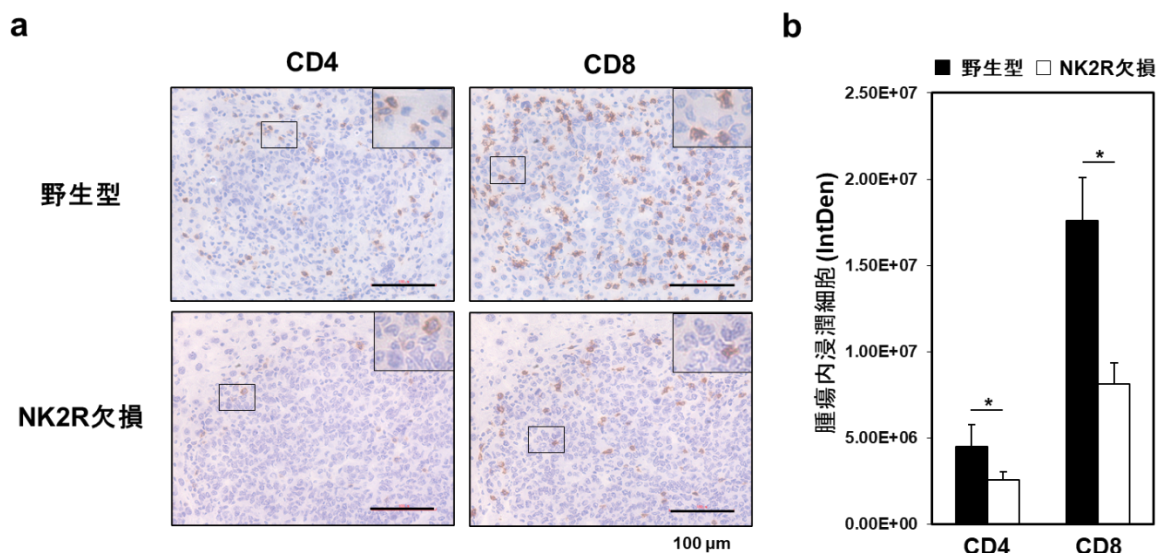


図 22. NK2R を欠損した肝がんマウスモデルの肝臓組織において、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の集積が有意に低下する。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウス、あるいは NK2R 欠損マウスの脾臓内に移植した。(a) 移植後 14 日の肝臓組織における CD4 および CD8 タンパク質の発現について、それぞれ代表的な免疫染色像の写真を示した。写真内の線は 100 μm を示す。(b) 移植後 14 日における腫瘍組織に浸潤している CD4 および CD8 陽性 T 細胞のシグナル発現レベルは imageJ で評価し、それぞれ平均値および標準偏差を示した。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

また、肝がんモデルの肝臓組織から回収した細胞についてフローサイトメトリーにより、免疫担当細胞を解析した結果、野生型マウスに比べ、NK2R 欠損マウスの肝臓組織において、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の浸潤が有意に減弱すること認めた(図 23)。

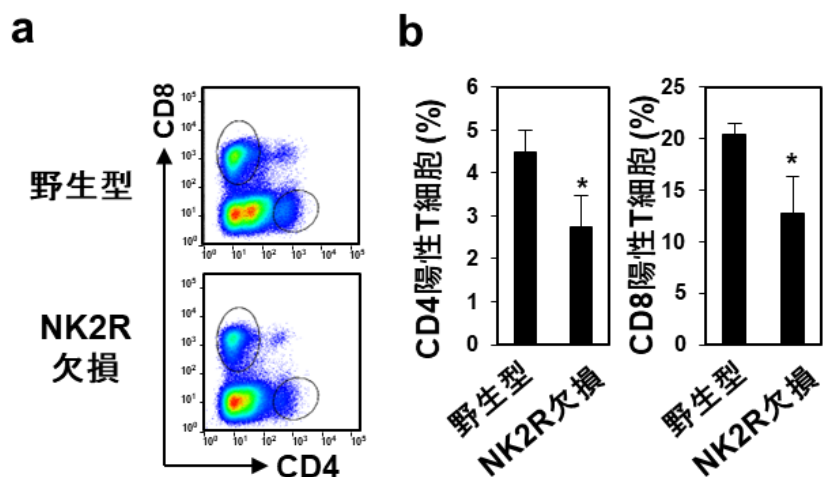


図 23. NK2R を欠損した肝がんマウスモデルの肝臓組織において、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の集積割合が有意に低下する。

蛍光タンパク質 mCherry を導入した Hepa1-6 マウス肝がん細胞株 (1×10^6) を、同系の野生型 C57BL/6 マウス、あるいは NK2R 欠損マウスの脾臓内に移植した。(a) 移植後 14 日における肝臓組織中全細胞において、CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞の割合について代表的な二次元プロットを示す。(b) さらにそれぞれの陽性細胞の割合について、その平均値と標準偏差を示した ($n = 4$)。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

本研究から、肝がんモデルにおける腫瘍組織への CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の集積において、NK2R が関与する可能性が示唆された。

そこで次に、*in vitro* 評価系で、CD8 陽性 T 細胞の抗腫瘍エクフェクター機能に対する NK2R の関与を検討した。その結果、NK2R 欠損マウスの脾臓由来の CD8 陽性 T 細胞は、野生型マウス由来の CD8 陽性 T 細胞と比較して、CD3 および CD28 の刺激による IL-2 のタンパク質産生レベルには差が認められなかったが、IFN- γ および グランザイム B のタンパク質発現レベルが有意に抑制されていることがわかった。(図 24)。

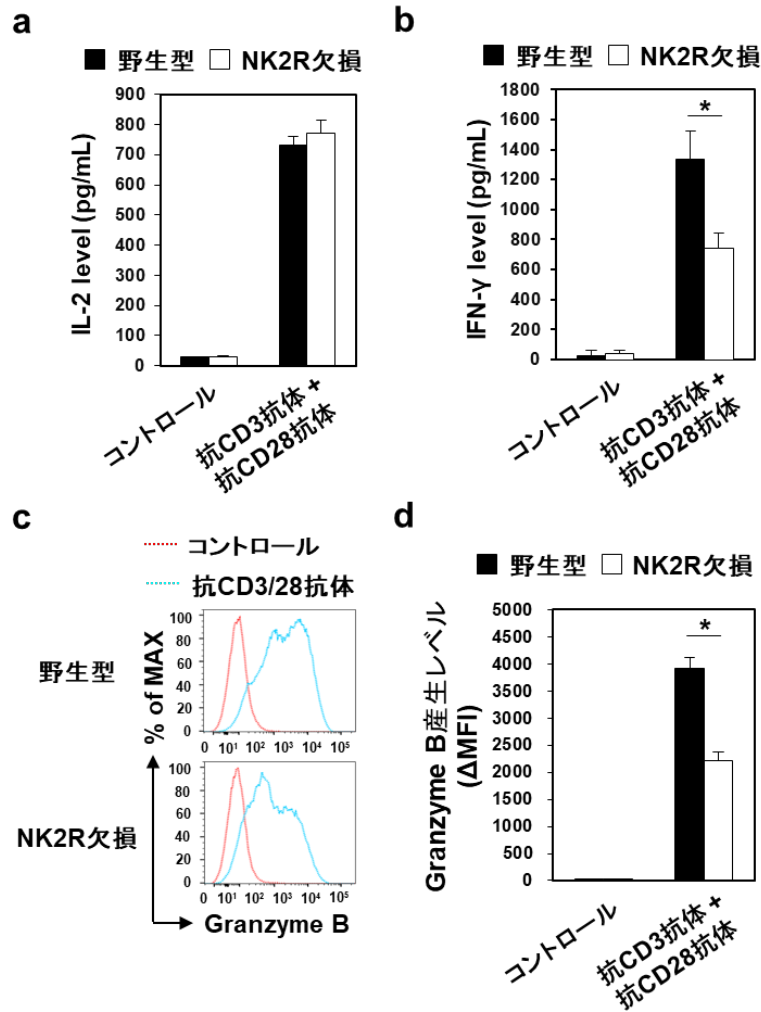


図 24. NK2R 欠損は、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で刺激したマウス脾臓組織由来の CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ およびグランザイム B の発現を抑制する。

野生型 C57BL/6 マウスおよび NK2R 欠損マウスの脾臓組織由来の CD8 陽性 T 細胞 (5×10^5) を 96 穴の細胞培養プレートに播種し、抗 CD3 抗体 (50 ng/ml) および抗 CD28 抗体 (50 ng/ml) 存在下で 37°C、24 時間インキュベートした。(a)、(b) 培養 24 時間後、上清液を回収し、ELISA 法により IL-2 および IFN- γ 発現レベルを評価した、それぞれの平均値と標準偏差を示した (n = 4)。(c) 培養 24 時間後、回収した CD8 陽性 T 細胞の Granzyme B の細胞内発現レベルをヒストグラムで示した。(d) アイソタイプコントロールと比較した Δ MFI を計算して求め、それぞれの平均値と標準偏差を示した (n = 4)。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

さらに、NK2R 欠損マウスの脾臓由来の CD8 陽性 T 細胞は、野生型マウス由来の CD8 陽性 T 細胞と比較して、CD3 および CD28 の刺激による IFN- γ およびグランザイム B の遺伝子発現誘導も有意に抑制されていることが確認された (図 25)。

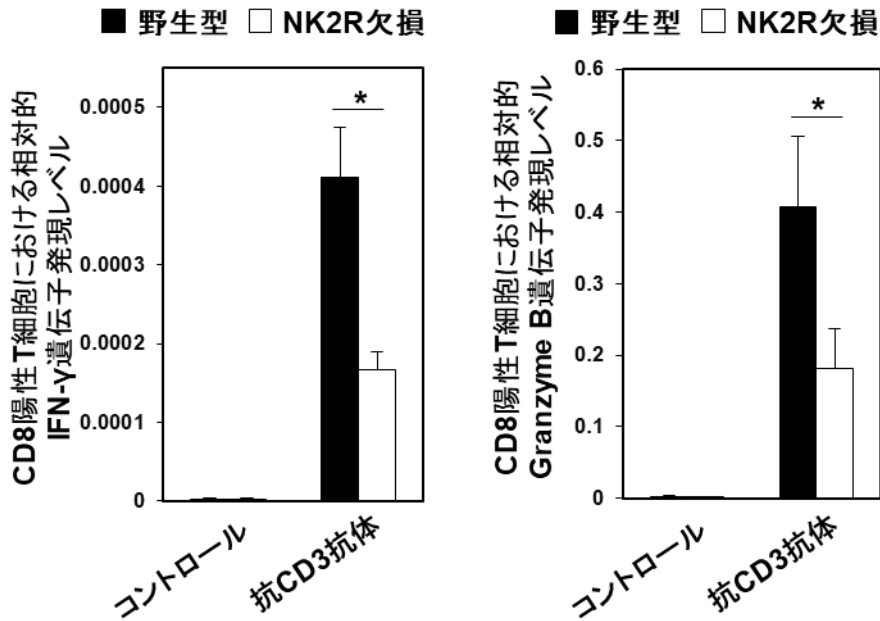


図 25. NK2R 欠損は、抗 CD3 抗体で刺激したマウス脾臓組織由来の CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ およびグランザイム B の遺伝子発現を抑制する。

野生型 C57BL/6 マウスおよび NK2R 欠損マウスの脾臓組織由来の CD8 陽性 T 細胞 (5×10^5) を 96 穴の細胞培養プレートに播種し、抗 CD3 抗体 (50 ng / ml) 存在下で 37°C、24 時間インキュベートした。培養 24 時間後回収した CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ およびグランザイム B の遺伝子発現を検討した、それぞれの平均値と標準偏差を示した (n = 4)。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

以上の結果から、CD8 陽性 T 細胞の活性化によるサイトカイン産生や細胞傷害性分子の発現誘導の抗腫瘍エフェクター機能において、NK2R が関与する可能性が示唆された。

そこで、野生型マウス由来 CD8 陽性 T 細胞を使用し、NKA 刺激による活性化および細胞傷害活性に及ぼす効果を検討した。その結果、NKA は、CD3 を介した活性による CD8 陽性 T 細胞からの IFN- γ 産生および Granzyme B のタンパク質発現誘導をさらに増強する作用を持つことが明らかとなった (図 26)。

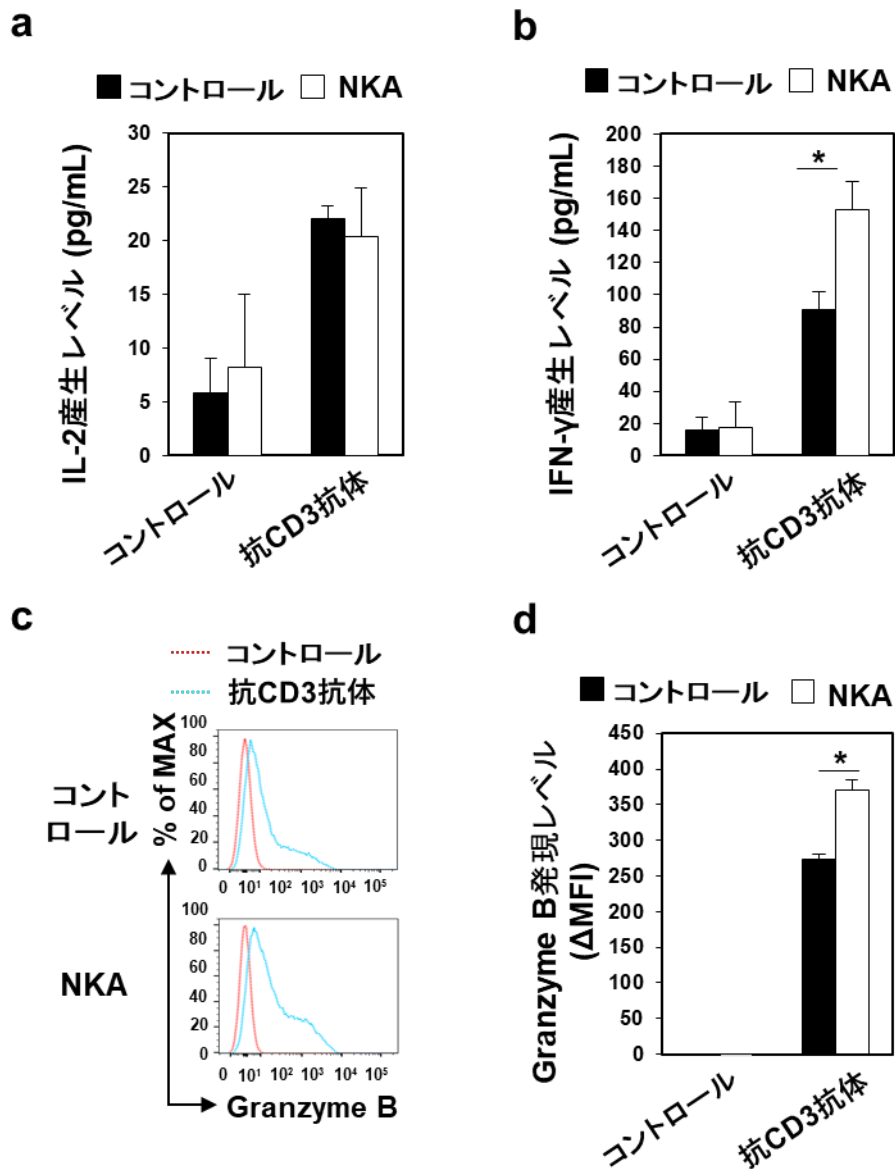


図 26. NKA は、抗 CD3 抗体で刺激したマウス脾臓組織由来の CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ およびグランザイム B の発現を増強する。

野生型 C57BL/6 マウスの脾臓組織由来の CD8 陽性 T 細胞(5×10^5)を 96 穴の細胞培養プレートに播種し、抗 CD3 抗体 (50 ng / ml) および NKA (1 μ M) 存在下で、37°C、24 時間インキュベートした。(a)、(b) 培養 24 時間後、上清液を回収し、ELISA 法により IL-2 および IFN- γ 発現レベルを評価した、それぞれの平均値と標準偏差を示した (n=4)。(c) 培養 24 時間後、回収した CD8 陽性 T 細胞の Granzyme B の細胞内発現レベルをヒストグラムで示した。(d) アイソタイプコントロールと比較した Δ MFI を計算して求め、それぞれの平均値と標準偏差を示した (n=4) 。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

さらに、NKA は、CD3 を介した活性による CD8 陽性 T 細胞からの IFN- γ および Granzyme B の遺伝子発現誘導をさらに亢進することも確認された (図 27) 。

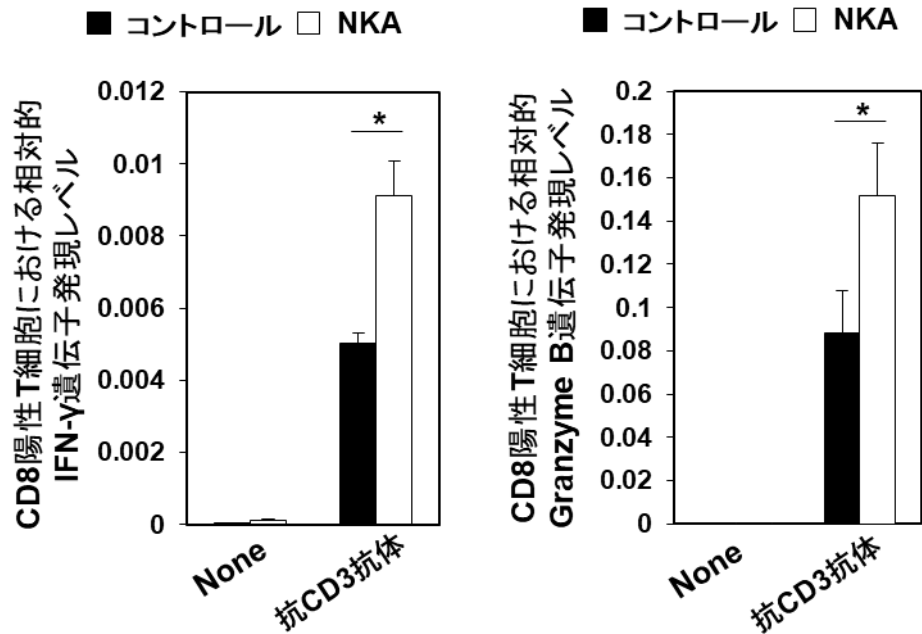


図 27. NKA の投与は、抗 CD3 抗体で刺激したマウス脾臓組織由来の CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ およびグランザイム B の遺伝子発現誘導レベルを増強する。

野生型 C57BL/6 マウスの脾臓組織由来の CD8 陽性 T 細胞 (5×10^5) を 96 穴の細胞培養プレートに播種し、抗 CD3 抗体 (50 ng/ml) および NKA (1 μ M) 存在下で、37°C、24 時間インキュベートした。培養 24 時間後回収した CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ およびグランザイム B の遺伝子発現を検討した、それぞれの平均値と標準偏差を示した (n=4) 。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

本研究結果から、CD8 陽性 T 細胞の活性化によるサイトカイン産生や細胞傷害性分子の発現誘導において、NK2R を介した NKA 刺激が関与する可能性が示唆された。

そこで、CD8 陽性 T 細胞の活性化における NK2R の分子制御メカニズムを検討した。CD8 陽性 T 細胞に対して CD3 および CD28 の刺激を行い、TCR シグナル下流関連分子に与える影響を検討した。NK2R を欠損した CD8 陽性 T 細胞は、CD3 および CD28 で刺激した CD8 陽性 T 細胞の活性化の過程で認められる p-ERK1/2 発現レベルの増強および I κ B 発現レベルの低下が認められないことが明らかとなった (図 28)。

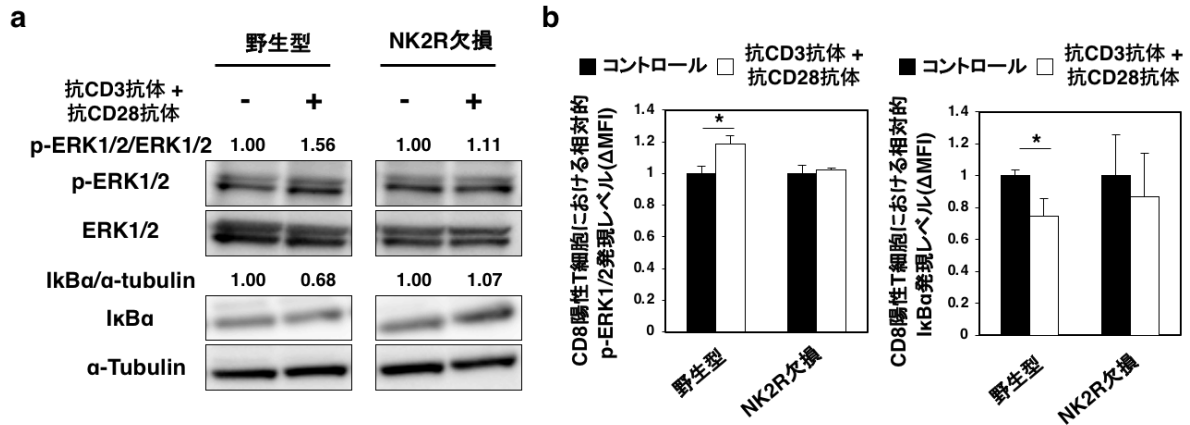


図 28. NK2R の欠損は、CD8 陽性 T 細胞の活性化に伴う p-ERK1/2 発現レベルの上昇や、IκBα 発現レベルの低下を減弱させる。

野生型 C57BL/6 マウスおよび NK2R 欠損マウスの脾臓組織由来の CD8 陽性 T 細胞 (1×10^6) を 24 穴の細胞培養プレートに播種し、抗 CD3 抗体 (50 ng/ml) 存在下で 37°C、20 分間インキュベートした。(a) 培養後、回収した CD8 陽性 T 細胞の p-ERK1/2、ERK1/2、IκB および α-tubulin のタンパク発現レベルについて解析し、それらの代表的なデータを示す。(b) 培養後、回収した CD8 陽性 T 細胞の p-ERK1/2 および IκB の細胞内発現レベルを検討した。(アイソタイプコントロールと比較した ΔMFI を計算して求め、それぞれの平均値と標準偏差を示した (n = 4) 。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

以上の結果から、CD8 陽性 T 細胞の TCR 刺激を介した ERK/MAPK シグナルおよび NKκB シグナル伝達経路の活性化において、NK2R が関与する可能性が示唆された。

さらに本研究で、抗原特異的 T 細胞による抗腫瘍効果に対する NK2R の影響を検討した。はじめに卵白アルブミン(OVA)を発現しているマウスリンパ腫 EG7 細胞株を野生型 C57BL/6 マウスあるいは NK2R 欠損マウスに皮内移植し、移植 14 日後に、腫瘍形成を確認したところ、野生型 C57BL/6 マウスに比べ NK2R 欠損マウスの腫瘍形成は有意に増加することを確認した (図 29) 。

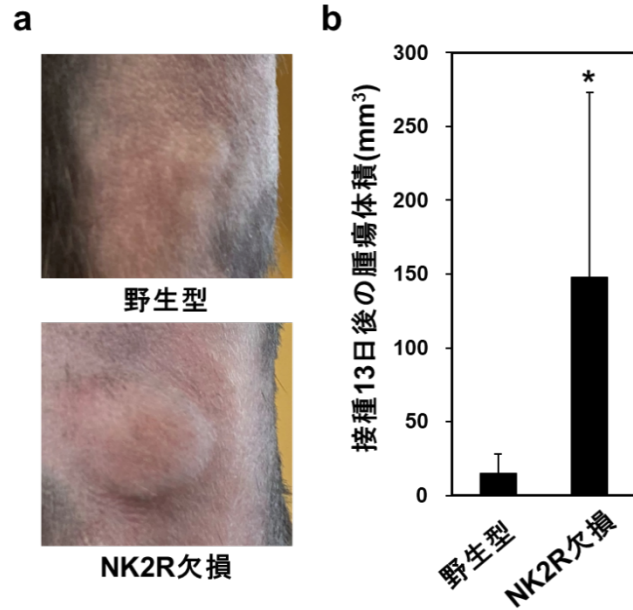


図 29. リンパ腫マウスモデルにおいて、NK2R の欠損は、リンパ腫細胞の生体内腫瘍形成が亢進する。

卵白アルブミン(OVA)を発現しているマウスリンパ腫 EG7 細胞株 (1×10^6) を野生型 C57BL/6 マウスあるいは NK2R 欠損マウスに皮内移植した。(a) 移植 13 日後の代表的な腫瘍を示した。(b) 移植後 13 日における腫瘍量の比較。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

さらに EG7 細胞を移植したマウスの腫瘍組織から細胞を回収し、クラス I 拘束性 OVA テトラマーを使用したフローサイトメトリーにより腫瘍内に浸潤している OVA 抗原特異的 T 細胞を評価した。その結果、野生型マウスに比べ、NK2R 欠損マウスの腫瘍組織において、OVA 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導が著しく減弱することが分かった(図 30)。

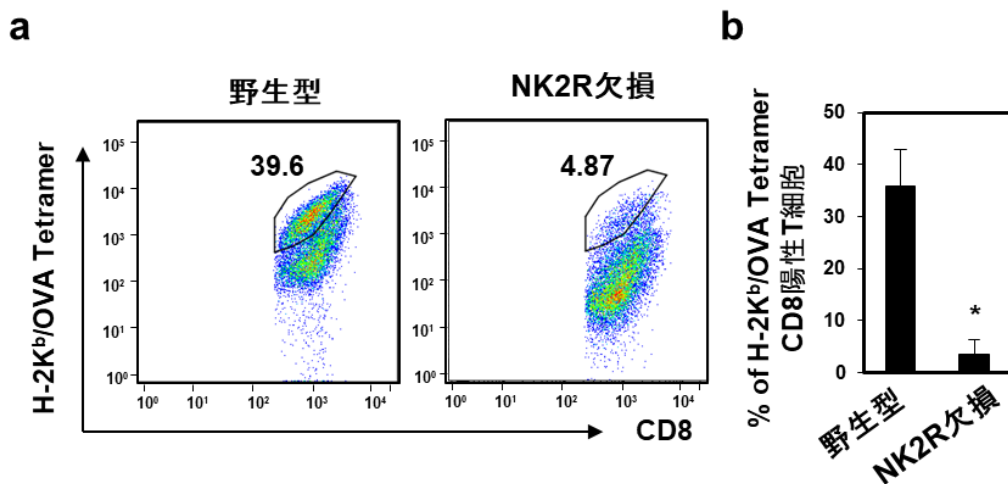


図 30. NK2R を欠損したリンパ腫マウスモデルの腫瘍組織において、腫瘍抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の割合が有意に低下する。

EG7-OVA マウスリンパ腫細胞株 (1×10^6) を野生型 C57BL/6 マウスあるいは NK2R 欠損マウスに皮内移植した。(a) 移植 14 日後に、マウスの皮内腫瘍組織から得られた細胞について、MHC クラス I 拘束性 OVA テトラマー試薬を使用したフローサイトメトリーで解析した。OVA 抗原特異的

CD8 陽性 T 細胞について代表的な二次元プロットを示す。(b) 腫瘍組織から回収した CD45 陽性細胞における OVA 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の割合について、その平均値と標準偏差を示した (n = 4) 。*は Student の t 検定による有意差 (P < 0.05) を示す。

本検討結果から、NK2R は担がん生体における抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導に参与する可能性が示された。

以上のマウス生体モデルおよび *in vitro* 評価系の結果から、担がん生体から産生される IFN- γ は CD8 陽性 T 細胞に対して STAT1 依存的に NK2R を発現誘導することで、NKA-NK2R シグナル伝達の活性化を惹起し、さらに ERK-MAPK シグナルおよび NF- κ B シグナル伝達経路を亢進することで、細胞傷害活性を有する腫瘍抗原特異的抗腫瘍エフェクター T 細胞を誘導する活性化メカニズムが示唆された (図 31) 。

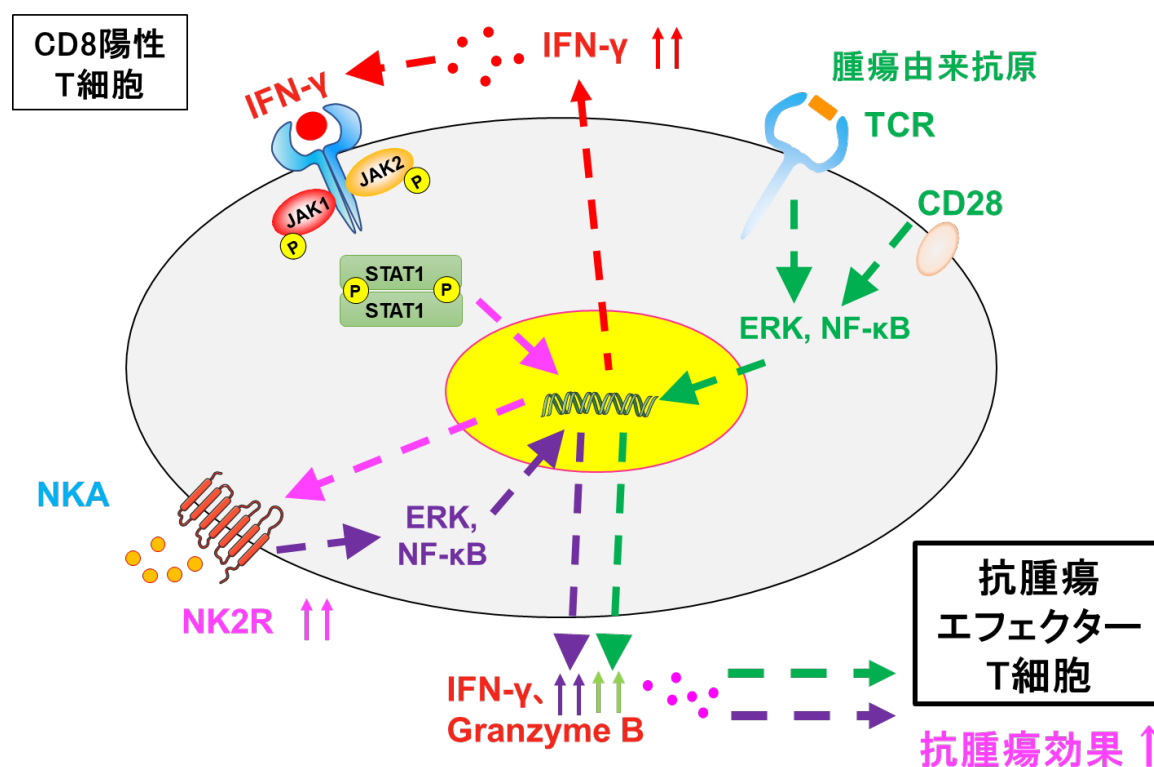


図 31. IFN- γ -STAT1-NK2R の発現誘導を介した抗腫瘍エフェクター T 細胞の活性化モデル
CD8 陽性 T 細胞において、T 細胞受容体 (TCR) と副刺激分子 (CD28) の刺激により、ERK/NF- κ B シグナルカスケードの活性化を介して IFN- γ の産生を誘導する。産生された IFN- γ はオートクライン機構で JAK/STAT1 経路を活性化し、NK2R の発現を誘導する。NK2R を介した NKA シグナルは ERK/NF- κ B シグナル伝達経路を上乗せして活性化し、IFN- γ と Granzyme B の産生をさらに誘導することで、CD8 陽性 T 細胞の抗腫瘍エフェクター細胞としての機能を亢進する。

最後に、肝がん Hepa1-6 細胞以外の他のがん種について、NK2R の腫瘍形成に及ぼす作用効果を検討した。GFP を導入したマウス大腸がん CT26 細胞を脾臓内に

移植する肝転移巣形成モデル (Toyosima et al., 2019) を使用して検討した。マウス大腸がん細胞の肝転移巣の形成を解析した結果、野生型 BALB/c マウスに比べて、NK2R 欠損 BALB/c マウスにおいて肝転移巣の形成が有意に亢進することを確認した (図 32、図 33)。

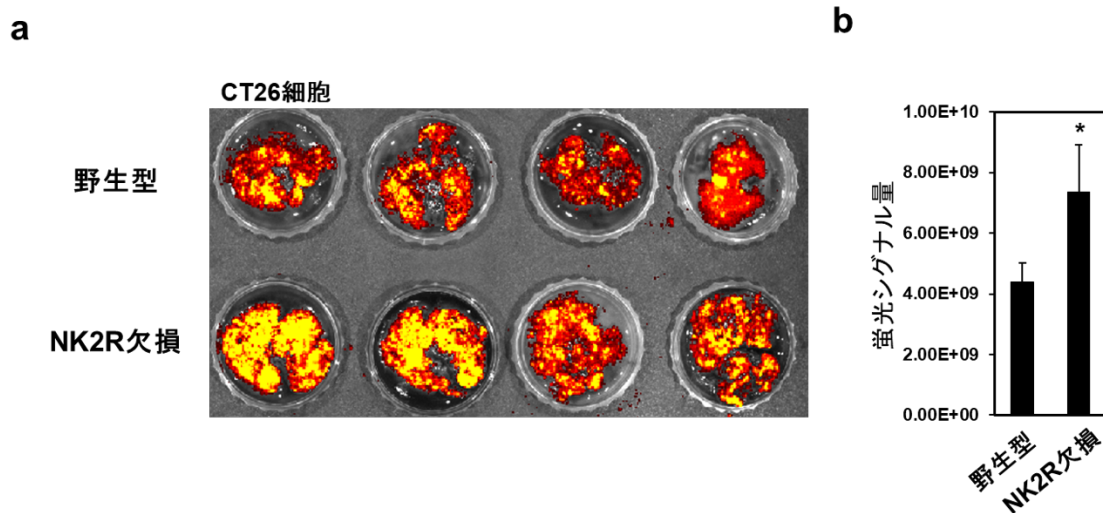


図 32. 肝転移巣形成マウスモデルにおいて、NK2R の欠損は、肝臓転移巣形成が増悪する。GFP を導入したマウス大腸がん CT26 細胞 (2×10^5 個) を野生型 BALB/c マウス、あるいは同系の NK2R 欠損マウスの脾臓内に移植した。(a) 移植後 14 日における肝転移巣の形成について、生体イメージング法により評価し、代表的な写真を示した。(b) 移植後 14 日における肝臓組織における蛍光シグナル量を解析し、それぞれの平均値と標準偏差を示した ($n=4$)。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

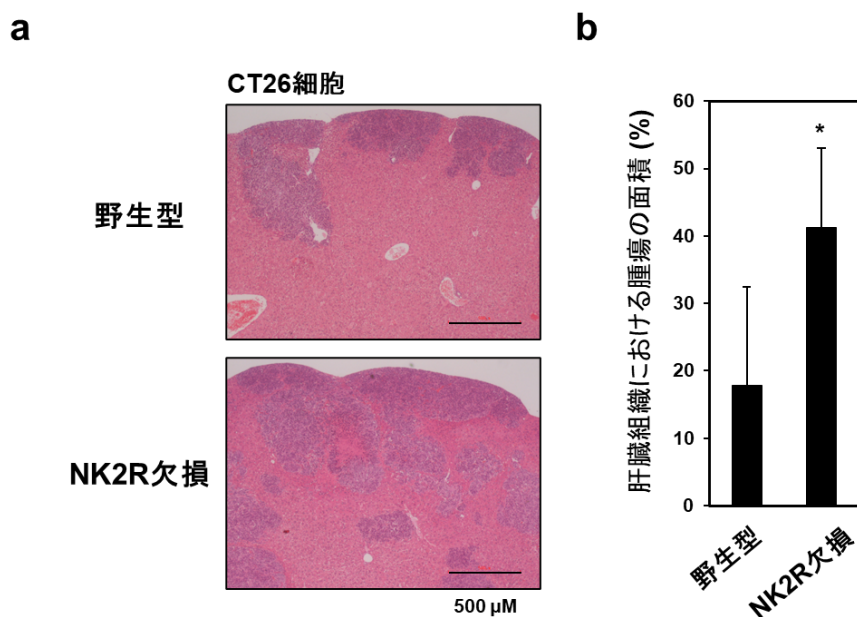


図 33. NK2R 欠損マウスにおいて、大腸がん CT26 の肝臓における転移巣の形成を亢進する。GFP を導入したマウス大腸がん CT26 細胞 (2×10^5 個) を野生型 BALB/c マウス、あるいは同系の NK2R 欠損マウスの脾臓内に移植した。(a) 移植後 14 日における代表的な肝臓組織の HE 染色像

を示した。写真内の直線は 500 μm を示す。(b) 肝臓組織に対する腫瘍部位の面積を計算し、それぞれ平均値および標準偏差を示した。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

本検討結果から、肝がん細胞の腫瘍形成に加え、大腸がん細胞の転移巣形成においても、NK2R が関与する可能性が示唆された。

さらに大腸がん細胞の肝転移巣形成における免疫細胞の浸潤に及ぼす NK2R の影響を検討した。NK2R 欠損マウスを使用した大腸がん肝転移巣形成モデルの肝臓組織において、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の集積が有意に減弱することを確認した (図 34)。

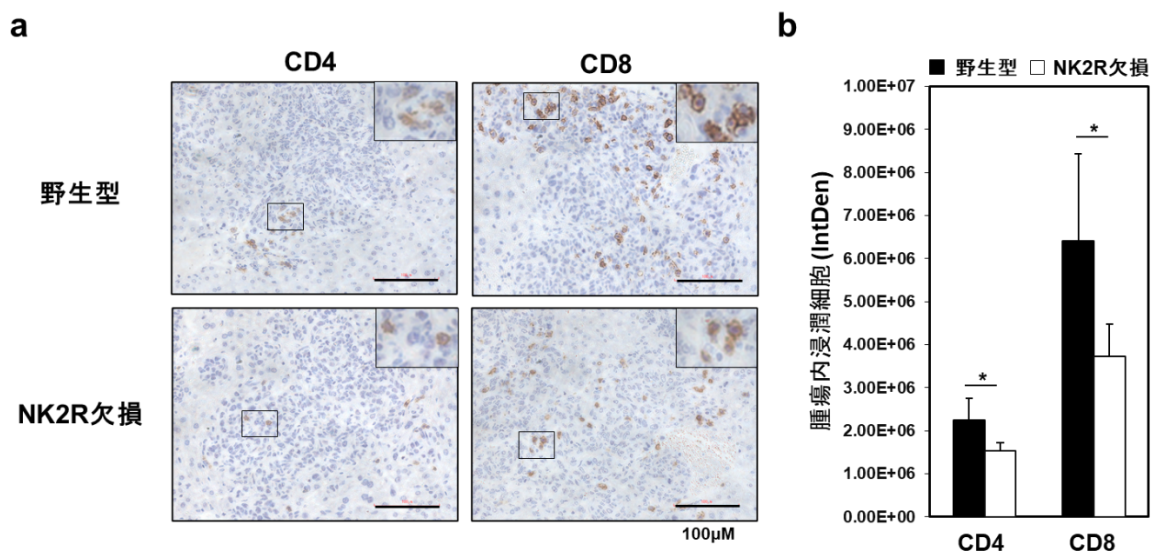


図 34. 大腸がん細胞の肝転移巣形成マウスモデルにおいて、NK2R の欠損により、肝臓組織への CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の集積が有意に減弱する。

GFP を導入したマウス大腸がん CT26 細胞 (2×10^5 個) を野生型 BALB/c マウス、あるいは同系の NK2R 欠損マウスの脾臓内に移植した。(a) 移植後 14 日における肝転移巣における CD4 および CD8 の発現について、それぞれ代表的な免疫染色像の写真を示した。写真内の線は 100 μm を示す。(b) 移植後 14 日における腫瘍組織に浸潤している CD4 および CD8 陽性 T 細胞のシグナル発現レベルは imageJ で評価し、それぞれ平均値および標準偏差を示した。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

以上の結果から、肝がんと同様に、大腸がん細胞の肝転移巣腫瘍組織へ集積においても、NK2R が関与する可能性が示唆された。

考察

本研究で、CD8 陽性 T 細胞について T 細胞受容体と副刺激分子の刺激により産生された IFN- γ はオートクライン機構により、JAK-STAT1 シグナル伝達経路を活性化し、自身の NK2R の発現を誘導することが明らかとなった。また CD8 陽性 T 細胞に発現誘導された NK2R を介した神経ペプチドシグナルは、ERK・MAPK シグナルおよび NF- κ B シグナル伝達経路をさらに活性化し、IFN- γ と Granzyme B の産生を上乗せして誘導することで、CD8 陽性 T 細胞の抗腫瘍エフェクター細胞としての機能を亢進する新たな制御メカニズムの存在を見出した。

神経ペプチド、タキキニン類の一つ NKA は、末梢神経系および中枢神経系の G タンパク質共役型受容体である NK2R を発現している標的細胞に作用し、様々な生理機能を制御する (Griebel et al., 2012; Steinhoff et al., 2014; Suvas et al., 2017)。一般に NK2R を介した NKA シグナル伝達経路は、気道収縮、血管拡張、血管透過性などの生体反応を制御することが知られている (Gleason et al., 2010; Mostafa et al., 2008; Schelfhout et al., 2009)。また神経細胞 (Sculptoreanu et al., 2008) に加え、マクロファージ (Sun et al., 2008)、樹状細胞 (Kitamura et al., 2012; Ohtake et al., 2015) などの免疫細胞、さらにはがん細胞 (Nizam et al., 2018; Xiang et al., 2022) において、NK2R の発現が報告されている。これまでの先行研究で、マウスあるいはヒトの樹状細胞において NKA および NK2R の発現レベルが STAT1 依存的に増加し、NK2R の発現増強を介した NKA シグナルがアレルギー特異的 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の誘導を増強すること、喘息の病態に関与することを明らかにした (Kitamura et al., 2012; Ohtake et al., 2015)。一方、担がん生体の宿主抗腫瘍免疫系における NK2R 発現の役割については、これまで不明であった。本研究で、担がん生体で産生される IFN- γ が STAT1 依存的に CD8 陽性 T 細胞の NK2R 発現レベルを増加させることを見出したことから NK2R の発現誘導を介した神経ペプチドシグナルの亢進により CD8 陽性 T 細胞の機能が制御される可能性を考えた。そこで実際に NK2R を欠損した CD8 陽性 T 細胞の応答性を精査したところ、CD3 および CD28 刺激による IFN- γ の産生を介して、NK2R の発現誘導が関与する可能性を見出すとともに、NKA 刺激により CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ およびグランザイム B の産生レベルが上昇することを明らかにした。以上の結果から、NK2R を介した NKA シグナルが生体内の抗腫瘍エフェクター T 細胞の誘導に関与していると推測した。

NK2R は、細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たすロドプシン様ファミリー 1 に属する GPCR である (Eisingdrelo et al., 2013; Hauger et al., 2012; Zhang et al., 2019)。一般に、GPCR のリガンド刺激は、ERK1/2 および NF- κ B シグナル伝達経路

を活性化し、標的細胞の機能を調節することが知られている。以前の研究で、NK1R を介した SP シグナル伝達は、NF- κ B のシグナル伝達経路を活性化して TCR 活性 CD8 陽性 T 細胞の生存を維持することが示された (Morelli et al., 2020)。本研究では、CD8 陽性 T 細胞の TCR および副刺激分子を介した刺激後、ERK1/2 のリン酸化レベルの増加および I κ B のタンパク質レベルの減弱が、NK2R を欠損した CD8 陽性 T 細胞で認められないことから、IFN-STAT1 を介した NK2R の発現は、自身の ERK1/2 および NF- κ B シグナル伝達経路の活性化をさらに亢進することで、抗腫瘍エフェクター T 細胞を誘導すると考えられた。

抗腫瘍エフェクター T 細胞の腫瘍微小環境への導入は、効果的ながん免疫治療の実施において極めて重要である。TLR3 リガンドである人工合成核酸 Poly I:C は、T 細胞、樹状細胞あるいはマクロファージにおいて STAT1 のリン酸化を誘導し (Anfray et al., 2021; Dempoya et al., 2012; Ohno et al., 2017)、担がん生体における I 型および II 型 IFN の産生レベルを増加させることで、抗腫瘍免疫を誘導する強力な自然免疫アジュバントである (Ohno et al., 2017; Wang et al., 2020)。本研究では、肝がんモデルに対する Poly I:C の投与により STAT1 依存的に腫瘍組織における抗腫瘍エフェクター T 細胞の浸潤を促進すること、また腫瘍形成が著しく抑制されることを確認した。さらに、NK2R 欠損条件下では、腫瘍組織への CD8 陽性 T 細胞の浸潤が有意に減少し、肝がん細胞の腫瘍形成が増強されることを見いだした。さらに、Poly I:C 投与による抗腫瘍効果は、NK2R の欠損条件下で認められなかった。これらの研究結果から、担がん生体に対する Poly I:C の投与により活性化した IFN-STAT1 シグナルを介した NK2R の発現が、腫瘍微小環境における抗腫瘍エフェクター CD8 陽性 T 細胞の集積を促し、生体内での肝がん細胞の腫瘍形成を抑制すると考えられた。以前の研究で、NK1R を介した SP シグナル伝達が、毛細血管内皮細胞 (Ziche et al., 1991)、線維芽細胞 (Kant et al., 2021)、間葉系幹細胞 (Jin et al., 2015)、および白血球 (Engel et al., 2011; Corrigan et al., 2016) の遊走能を制御することが示された。本研究で、NK2R 欠損条件下では、腫瘍組織への CD8 陽性 T 細胞の浸潤が有意に減少することを見出した。これらの研究結果から、SP-NK1R シグナル伝達経路と同様に NK2R を介した NKA シグナル伝達が腫瘍組織における CD8 陽性 T 細胞の集積の亢進と関連する可能性が考えられた。

肝細胞がんは予後不良であり、最も一般的な原発性肝がん、症例の 90% を占める (Llovet et al., 2021)。肝細胞がんは、手術、肝移植、化学療法が適応されるが、切除不能な肝細胞がんに対する選択肢は限られている。進行性肝細胞がんに対しては、アテゾリズマブおよびベバシズマブの併用、ソラフェニブ、レンバチニブ、レゴラフェニブ、カボザンチニブ、あるいはラムシルマブの投与が承認されているが、肝細胞が

んは化学療法抵抗性と考えられており、全身化学療法には困難な症例も存在する (Kato et al., 2001; Jiang et al., 1997) 。さらに、進行性肝細胞がん患者はしばしば基礎疾患を有するため、全身化学療法の耐性は低いことから、切除不能な肝細胞がん患者に対しては、副作用が少なく、より効果的な治療法が必要とされている。最近、肝細胞がんの標準治療における免疫チェックポイント阻害剤の優れた治療効果がいくつか報告されている (Donisi et al., 2020; Sangro et al., 2021) 。最近の研究で、IFN- γ 産生 CD8 陽性 T 細胞が生体内の腫瘍組織に蓄積する肝がんモデルにおいて、DGK α 阻害が抗腫瘍効果を増強することを明らかにした (Okada et al., 2022) 。これらの先行研究から、腫瘍の微小環境下で肝がん細胞を駆逐するための抗腫瘍免疫の誘導には、IFN- γ の産生と CD8 陽性 T の腫瘍組織への集積が重要であると推測した。さらに、本研究において大腸がん細胞を使用した転移性肝がんモデルにおいても、NK2R を介した神経ペプチドシグナルが、腫瘍微小環境への CD8 陽性 T 細胞の集積と抗腫瘍効果に関与することが示されたことから、他のがん種、がん疾患においても同様の作用効果を示す可能性が考えられた。

本研究成果から、IFN- γ -STAT1 を介した NK2R の発現が、担がん生体の腫瘍微小環境における抗腫瘍エフェクターCD8 陽性 T 細胞の誘導に寄与することが明らかとなり、今後、NK2R を介した神経ペプチドシグナルの制御は、肝がん領域に対する新たな治療法の確立に資すると考えている。

結論

① 本研究から得られた新知見

- ・肝がんマウスモデルに対して、Poly I:C 投与することにより、肝臓組織における腫瘍形成が低下し、IFN- α/β 、IFN- γ 産生誘導レベルが上昇するとともに、CD8 陽性 T 細胞の細胞傷害性分子の産生レベルが亢進した。
- ・STAT1 欠損マウスを使用した肝がんモデルにおいて、野生型マウスと比較して肝臓組織における腫瘍形成が増悪し、CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内への集積が著しく減弱した。
- ・STAT1 欠損マウスを使用した肝がんモデルに対して Poly I:C を投与しても、肝臓組織における腫瘍形成は抑制されなかった。
- ・野生型マウスに Poly I:C 投与する肝がん治療モデルに対して、抗 CD8 抗体を投与することで腫瘍の形成が増悪した。
- ・NK2R 欠損マウスを使用した肝がんモデルにおいて、野生型マウスと比較して肝臓組織における腫瘍形成が増悪し、CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内への集積が減弱した。
- ・*in vitro* 評価系において、CD8 陽性 T 細胞に対する IFN- γ の刺激により、NK2R 遺伝子および Tac1 遺伝子発現が STAT1 依存的に誘導された。
- ・NK2R 欠損マウスの脾臓由来 CD8 陽性 T 細胞は、野生型マウス由来の CD8 陽性 T 細胞と比較して、CD3 および CD28 の刺激による IFN- γ および Granzyme B の産生レベルが低値であった。
- ・*in vitro* 評価系において、NKA の添加は、CD3 を刺激した野生型マウス由来の CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ および Granzyme B の発現誘導をさらに増加した。
- ・CD8 陽性 T 細胞における NK2R の欠損は、CD3 および CD28 の刺激による ERK1/2 のリン酸化の増強および I κ B 発現の低下が減弱する。

② 新知見の意義

本研究において、肝がんマウスモデルを使用した検討により、担がん生体内における IFN-STAT1 シグナル伝達経路の活性化は、CD8 陽性 T 細胞における神経ペプチド受容体 NK2R の発現を誘導するとともに、抗腫瘍エフェクター T 細胞の腫瘍内浸潤を増強し、肝がんの腫瘍形成を抑制することが明らかとなった。従って、NK2R を介した神経ペプチドシグナルは新たな抗腫瘍エフェクター細胞を誘導するメカニズムの一つとして考えられる。神経ペプチドシグナルと宿主免疫系との関連は未知の部分

が多く、肝がん領域において新しい制御法の確立に繋がる可能性があり、今後、肝がん患者に対するより効果の高い治療法の開発への貢献が期待される。

③ 本研究で得られた新知見に基づいた今後の展開

本研究結果から、NK2R の発現誘導を介した神経ペプチドシグナルの活性化による抗腫瘍エフェクターT 細胞を担がん生体に導入する方策の一つとして期待され、新たながん免疫治療標的として有望である可能性が示唆された。従って、今後の展開として、神経ペプチドシグナルの下流標的分子による詳細な制御メカニズムを明らかにするとともに、肝がん患者における NK2R および関連分子の発現レベルと抗腫瘍免疫応答性、および生命予後との関連を検証することを考えている。

④ 今後の課題

担がん生体の腫瘍微小環境における NK2R を介した神経ペプチドシグナル伝達経路が、CD8 陽性 T 細胞以外の免疫細胞を媒介する可能性を解明する必要がある。また NK2R を介した刺激が、がん細胞や血管内皮細胞、および神経系に対する作用効果も確認する必要がある。さらに、NKA や NK2R の下流標的分子が、肝がんを標的とした抗腫瘍エフェクター細胞を制御する新規治療ターゲットとなり得るかについて、ヒト臨床検体を使用して検討するとともに、個々のがん患者に対する治療の最適化に資する新規バイオマーカーとなり得ることを検証・証明する必要があると考えている。

謝辞

本研究の機会を与えていただき、ご指導とご鞭撻をいただきました北海道大学遺伝子病制御研究所免疫機能学分野の北村秀光准教授に深謝いたします。

本研究を実施するにあたり、数多くのご協力をいただきました北海道大学遺伝子病制御研究所免疫機能学分野の王向東さん、神奈川県立がん研究センター臨床研究所の項慧慧さんに深謝いたします。

本研究の遂行において多くの有意義なご指導をいただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Iの志智俊介先生、杉山昂先生、木村沙織先生、中本裕紀先生、武富紹信先生に心より感謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Anfray, C., Mainini, F., Digifico, E., Maeda, A., Sironi, M., Erreni, M., Anselmo, A., Ummarino, A., Gandoy, S., Expósito, F., et al. (2021). Intratumoral combination therapy with poly(I:C) and resiquimod synergistically triggers tumor-associated macrophages for effective systemic antitumoral immunity. *J Immunother Cancer*. *9*, e002408.

Byun, C. S., Hwang, S., Woo, S. H., Kim, M. Y., Lee, J. S., Lee, J. I., Kong, J. H., Bae, K. S., Park, I. H., Kim, S. H., and Eom, Y. W. (2020). Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Suppress Growth of Huh7 Hepatocellular Carcinoma Cells via Interferon (IFN)-beta-Mediated JAK/STAT1 Pathway in vitro. *Int J Med Sci*. *17*, 609-619.

Corrigan, F., Mander, K. A., Leonard, A. V., and Vink, R. (2016). Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *J Neuroinflammation*. *13*, 264.

Decker, T., Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Müller, M., and Kovarik, P. (2002). IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest*. *109*, 1271-77.

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Sheehan, K. C., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J. D., Diamond, M. S., Koebel, C. M., Arthur, C., White, J. M., et al. (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol*. *6*, 722-729.

Dunn, G. P., Koebel, C. M., and Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* 6, 836-848.

Douglas, S. D., and Leeman, S. E. (2011). Neurokinin-1 receptor: functional significance in the immune system in reference to selected infections and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 1217, 83-95.

Dempoya, J., Matsumiya, T., Imaizumi, T., Hayakari, R., Xing, F., Yoshida, H., Okumura, K., & Satoh, K. (2012). Double-Stranded RNA Induces Biphasic STAT1 Phosphorylation by both Type I Interferon (IFN)-Dependent and Type I IFN-Independent Pathways. *J Virol.* 86,12760-12769.

Deng, R., Zuo, C., Li, Y., Xue, B., Xun, Z., Guo, Y., Wang, X., Xu, Y., Tian, R., Chen, S., et al. (2020). The innate immune effector ISG12a promotes cancer immunity by suppressing the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cell Mol Immunol.* 17, 1163-1179.

Donisi, C., Puzzoni, M., Ziranu, P., Lai, E., Mariani, S., Saba, G., Impera, V., Dubois, M., Persano, M., Migliari, M., et al. (2021a). Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of HCC. *Front Oncol.* 10: 601240.

Deng, H., Kan, A., Lyu, N., He, M., Huang, X., Qiao, S., Li, S., Lu, W., Xie, Q., Chen, H., et al. (2021b). Tumor-derived lactate inhibit the efficacy of lenvatinib through regulating PD-L1 expression on neutrophil in hepatocellular carcinoma. *J Immunother Cancer*. 9, e002305

Engel, M. A., Becker, C., Reeh, P. W., and Neurath, M. F. (2011). Role of sensory neurons in colitis: increasing evidence for a neuroimmune link in the gut. *Inflamm Bowel Dis*. 17, 1030–1033.

Eishingdrelo, H., and Kongsamut, S. (2013). Minireview: Targeting GPCR Activated ERK Pathways for Drug Discovery. *Curr Chem Genom Transl Med*. 7, 9-15.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 136, E359-386.

Gleason, N. R., Gallos, G., Zhang, Y., and Emala, C. W. (2010). Propofol Preferentially Relaxes Neurokinin Receptor-2-induced Airway Smooth Muscle Contraction in Guinea Pig Trachea. *Anesthesiology*. 112, 1335-1344.

Griebel, G., and Holsboer, F. (2012). Neuropeptide receptor ligands as drugs for psychiatric diseases: the end of the beginning? *Nat Rev Drug Discov*. 11, 462-478.

Galon, J., Bruni, D. (2019). Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov.* 18, 197-218.

Hauger, R.L., Olivares-Reyes, J.A., Dautzenberg, F.M., Lohr, J.B., Braun, S., and Oakley, R.H. (2012). Molecular and cell signaling targets for PTSD pathophysiology and pharmacotherapy. *Neuropharmacology.* 62, 705-714.

Ivashkiv, L.B. (2018). IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 18, 545-58.

Jiang, W., Lu, Z., He, Y., and Diasio, R.B. (1997). Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in hepatocellular carcinoma: implication in 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 3, 395-399.

Jin, Y., Hong, H. S., and Son, Y. (2015). Substance P enhances mesenchymal stem cells-mediated immune modulation. *Cytokine.* 71, 145–153.

Jin, Y., Sun, Z., Geng, J., Yang, L., Song, Z., Song, H., Wang, J., and Tang, J. (2019). IL-21 reinvigorates exhausted natural killer cells in patients with HBV-associated hepatocellular carcinoma in STAT1-dependent pathway. *Int Immunopharmacol.* 70, 1-8.

Kato, A., Miyazaki, M., Ambiru, S., Yoshitomi, H., Ito, H., Nakagawa, K., Shimizu, H., Yokosuka, O., and Nakajima, N. (2001). Multidrug resistance gene (MDR-1) expression as a useful prognostic factor in patients with human hepatocellular carcinoma after surgical resection. *J Surg Oncol.* 78, 110-115.

Kitamura, H., Kobayashi, M., Wakita, D., and Nishimura, T. (2012). Neuropeptide Signaling Activates Dendritic Cell-Mediated Type 1 Immune Responses through Neurokinin-2 Receptor. *The Journal of Immunology.* 188, 4200–4208.

Kant, V., Mahapatra, P. S., Gupta, V., Bag, S., Gopalakrishnan, A., Kumar, D., and Kumar, D. (2021). Substance P, a Neuropeptide, Promotes Wound Healing via Neurokinin-1 Receptor. *Int J Low Extrem Wounds.* 2021. Advance online publication.

Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., and Finn, R. S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 7, 6.

Mostafa, G.A., Reda, S.M., Abd El-Aziz, M.M., and Ahmed, S.A. (2008). Sputum neurokinin A in Egyptian asthmatic children and adolescents: relation to exacerbation severity. *Allergy.* 63, 1244-1247.

McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol.* *15*, 87-103.

Munoz, M., Rosso, M., and Covenas, R. (2019). Neurokinin-1 Receptor Antagonists against Hepatoblastoma. *Cancers (Basel).* *11*, 1258.

Morelli, A. E., Sumpter, T. L., Rojas-Canales, D. M., Bandyopadhyay, M., Chen, Z., Tkacheva, O., Shufesky, W. J., Wallace, C. T., Watkins, S. C., Berger, A., et al. (2020). Neurokinin-1 Receptor Signaling Is Required for Efficient Ca²⁺ Flux in T-Cell-Receptor-Activated T Cells. *Cell Reports.* *30*, 3448-3465.

Nizam, E., and Erin, N. (2018). Differential consequences of neurokinin receptor 1 and 2 antagonists in metastatic breast carcinoma cells; Effects independent of Substance P. *Biomed Pharmacother.* *108*, 263-270.

Ohtake, J., Kaneumi, S., Tanino, M., Kishikawa, T., Terada, S., Sumida, K., Masuko, K., Ohno, Y., Kita, T., Iwabuchi, S., et al. (2015). Neuropeptide signaling through neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors augments antigen presentation by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* *136*, 1690-1694.

Ohno, Y., Toyoshima, Y., Yurino, H., Monma, N., Xiang, H., Sumida, K., Kaneumi, S., Terada, S., Hashimoto, S., Ikeo, K., et al. (2017). Lack of interleukin-6 in the tumor microenvironment

augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci.* *108*, 1959-1966.

O'Donnell, J.S., Teng, M.W.L., and Smyth, M.J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* *16*, 151-167.

Okada, N., Sugiyama, K., Shichi, S., Shirai, Y., Goto, K., Sakane, F., Kitamura, H., and Taketomi, A. (2022). Combination therapy for hepatocellular carcinoma with diacylglycerol kinase alpha inhibition and anti-programmed cell death-1 ligand blockade. *Cancer Immunol Immunother.* *71*, 889-903.

Severini, C., Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S., and Erspamer, V. (2002). The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev.* *54*, 285-322.

Sculptoreanu, A., Aura Kullmann, F., and De Groat, W.C. (2008a). Neurokinin 2 receptor-mediated activation of protein kinase C modulates capsaicin responses in DRG neurons from adult rats. *Eur J Neurosci.* *27*, 3171-3181.

Sun, J., Ramnath, R.D., Tamizhselvi, R., and Bhatia, M. (2008b). Neurokinin A engages neurokinin-1 receptor to induce NF- κ B-dependent gene expression in murine macrophages: implications of ERK1/2 and PI 3-kinase/Akt pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* *295*, C679-C691.

Schelfhout, V., Van De Velde, V., Maggi, C., Pauwels, R., and Joos, G. (2009). The effect of the tachykinin NK2 receptor antagonist MEN11420 (nepadutant) on neurokinin A-induced bronchoconstriction in asthmatics. *Ther Adv Respir Dis.* 3, 219-226.

Steinhoff, M.S., von Mentzer, B., Geppetti, P., Pothoulakis, C., and Bunnett N.W. (2014). Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. *Physiol Rev.* 94, 265-301.

Suvas S. (2017). Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J Immunol.* 199, 1543–1552.

Sangro, B., Sarobe, P., Hervas-Stubbs, S., and Melero, I. (2021). Advances in immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 18, 525-543.

Tuluc, F., Lai, J.P., Kilpatrick, L.E., Evans, D.L., and Douglas, S.D. (2009). Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity. *Trends Immunol.* 30, 271-276.

Trinchieri, G. (2010). Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med.* 207, 2053-2063.

Toyoshima, Y., Kitamura, H., Xiang, H., Ohno, Y., Homma, S., Kawamura, H., Takahashi, N., Kamiyama, T., Tanino, M., and Taketomi, A. (2019). IL6 Modulates the Immune Status of the

Tumor Microenvironment to Facilitate Metastatic Colonization of Colorectal Cancer Cells. *Cancer Immunol Res.* 7, 1944-1957.

Waldman, A.D., Fritz, J.M., and Lenardo, M.J. (2020a). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol.* 20, 651-668.

Wang, Z., Chen, T., Lin, W., Zheng, W., Chen, J., Huang, F., and Xie, X. (2020b). Functional tumor specific CD8 + T cells in spleen express a high level of PD-1. *Int Immunopharmacol.* 80, 106242.

Xiang, H., Toyoshima, Y., Shen, W., Wang, X., Okada, N., Kii, S., Sugiyama, K., Nagato, T., Kobayashi, H., Ikeo, K., et al. (2022). IFN- α/β -mediated NK2R expression is related to the malignancy of colon cancer cells. *Cancer Sci.* 113, 2513-2525.

Ziche, M., Morbidelli, L., Geppetti, P., Maggi, C. A., and Dolaro, P. (1991). Substance P induces migration of capillary endothelial cells: a novel NK-1 selective receptor mediated activity. *Life Sci.* 48, PL7–PL11.

Zou, J., Zhuang, M., Yu, X., Li, N., Mao, R., Wang, Z., Wang, J., Wang, X., Zhou, H., Zhang, L., et al. (2018). MYC inhibition increases PD-L1 expression induced by IFN-gamma in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Immunol.* 101, 203-209.

Zhang, S., and Lin, X. (2019). CARMA3: Scaffold Protein Involved in NF- κ B Signaling. *Front Immunol.* *10*, 176.