



Title	インターロイキン34の転写メカニズム及び腫瘍微小環境における治療抵抗性誘導に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	韓, ナヌミ
Description	配架番号 : 2710
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14973号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85849
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HAN_Nanumi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 韓 ナ ヌ ミ

学位論文題名

インターロイキン 34 の転写メカニズム及び腫瘍微小環境における治療抵抗性誘導に関する研究

(Studies on the transcription mechanism of interleukin-34 and its role in the induction of treatment resistance in tumor microenvironment)

【背景と目的】 がん治療としては従来の手術療法、放射線療法、化学療法の三大治療法に加え、近年開発された免疫チェックポイント阻害剤 (Immune checkpoint blockade; ICB) を用いた免疫療法があり、これらの治療法を組み合わせた治療が行われている。ICB が様々ながんにおいて高い治療効果を示し、生存率の改善および完治例の増加がみられている。しかし、がんが治療に対して抵抗性となり、再発及び転移を示す症例は未だ多く報告されている。近年、ICB に対して治療抵抗性を獲得した腫瘍の微小環境において、腫瘍関連マクロファージ (TAM) の浸潤が増加すると報告されている。TAM はコロニー刺激因子 1 受容体 (CSF-1R) を発現している。CSF-1R のリガンド、インターロイキン (IL) -34 は卵巣がん、大腸がんなど様々ながん組織にて発現が報告されている。これまでの研究にて、ドキシルピシンなどの抗がん剤に抵抗性となった腫瘍にて IL-34 の発現増加が認められたことから、IL-34 が誘導する TAM が治療抵抗性に関与する可能性が示唆された。これらにより、IL-34 発現を制御することにより治療抵抗性が改善することが期待される。しかし、転写レベルで IL-34 の発現を制御するメカニズムは未だ不明である。IL-34 の転写調節因子を明らかにするために、IL-34 発現阻害の可能性のある低分子化合物に着目し解析を試みた (第 1 章)。また、ICB に抵抗性を示す腫瘍における IL-34 の作用機序はこれまで明らかにされていない。そこで ICB 抵抗性腫瘍を用い、同サイトカインの役割とその阻害による治療効果の変化について検討を行うこととした (第 2 章)。

【方法と結果】 (第 1 章) NCBI データベースの探索にて、IL-34 発現を減少させる可能性を持つ低分子化合物として BET ファミリー阻害剤 JQ1 が候補に挙がった。恒常的に IL-34 を産生するマウス卵巣がん細胞株 OV3121-Ras4 と HM-1 に対し JQ1 を添加して培養を行ったところ、両方の細胞にて *Il34* 遺伝子及び IL-34 タンパク質の発現が有意に低下した。JQ1 は Brd2、Brd3、Brd4、Brdt を含む BET ファミリー分子を標的とする薬剤である。そのうち Brd4 は転写調節因子として知られており、*Il34* の転写制御に関与する可能性を考えた。*Il34* 遺伝子上における Brd4 の結合可能な部位を Ensembl Genome データベースから探索した。推定プロモーター領域を中心に、4つの部分を任意に決め、その部分に対する Brd4 の結合をクロマチン免疫沈降法 (ChIP-qPCR) にて解析した。その結果 Brd4 は *Il34* 遺伝子上エクソン 1 の領域に結合することが判明し同部位にプロモーター活性があることが示唆された。続いてマウス生体を用い、JQ1 の投与による *Il34* の発現抑制が腫瘍の増大にどのような影響を及ぼすか検討を行った。マウスに HM-1 を皮下移植後、JQ1 を腹腔内に投与し腫瘍サイズを観察した。27 日の時点で JQ1 投与群において有意に腫瘍の成長が抑制されることが分かった。

(第 2 章) マウス大腸がん細胞株 CT26 に対し、*Il34* 遺伝子を強制発現 (*Il34*^{OE}) させると ICB に抵抗性となり、*Il34* 遺伝子をノックアウト (*Il34*^{KO}) すると ICB に感受性があることが以前の研究で観察されている。本研究では *Il34*^{OE} と *Il34*^{KO} の組織学的な違いを HE

染色法及び免疫染色法にて解析した。その結果、*Il34*^{KO}の組織にてリンパ球ならびに *Nos2* 陽性マクロファージの浸潤が増加していた。さらに、*Il34*^{OE}にて抗 PD-1 と抗 IL-34 抗体を併用投与することにより、これまで観察されなかったリンパ球の浸潤が出現し、*Nos2* 陽性マクロファージの浸潤が増加していた。同様に、IL-34 を恒常的に発現するマウス乳がん細胞株 4T1 においても、ICB 感受性がある *Il34*^{KO} では *Nos2* 陽性マクロファージの浸潤は増加していることが分かった。マウスモデルにて IL-34 阻害による治療抵抗性の低減が観察されたため、ヒトがん組織においても同様なことが観察されるか **patient-derived xenograft (PDX)** モデルを用いて検討した。PDX モデルの作製のために、まず投与する抗体ならびに移植するヒトがん患者由来組織を検討した。ヒト末梢血単核球に **recombinant human IL-34 (rhIL-34)** を加えて培養する系において抗 IL-34 抗体をいくつか添加し、阻害効果がある抗体を選択した。次に、PDX 組織を保有する DNA Link 社のデータベースから *IL34* 及び *CD274* (**programmed death-ligand 1; PD-L1**) を発現するヒト由来がん組織を選択し、免疫染色法にて実際の発現量を検討して移植する組織を決めた。最後に免疫不全マウスにヒト胎児肝臓由来 *CD34* 陽性造血幹細胞を移植する免疫ヒト化 PDX マウスに抗 PD-1 及び抗 IL-34 抗体の併用投与を 28 日間行った。腫瘍成長を観察した結果、抗 PD-1 もしくは抗 IL-34 抗体の単独投与に比較し、併用投与群にて平均腫瘍サイズが小さい個体を認めた。併用投与群の 3 匹中 1 匹は腫瘍組織が液状化していた。各個体において HE 染色を行った結果、併用投与群のみにてリンパ球の浸潤が見られた。

【考察】(第 1 章) *Il34* プロモーター領域に *Brd4* が結合することで発現調節が行われるものの、何が *Brd4* の結合を促進させているかは未だ分かっていない。したがって今後の課題は *Il34* プロモーター領域と *Brd4* の結合を促進させるメカニズムの解明である。*Runx1* や *NF-κB* のような転写因子が *Il34* 遺伝子発現に関連していると知られているため、*Brd4* 以外にも *Runx1* や *NF-κB* と関連する転写調節因子を検討する必要があると考えられる。また *JQ1* のみでは *Il34* 発現が完全に抑制できなかったことから、*Il34* 発現を調節する他のシグナリング経路や転写調節因子の存在が推測される。この点については関連転写制御因子に対するスクリーニング等で明らかになると期待される。最後に、*Brd4* は様々な腫瘍関連転写因子を制御することが知られている。本研究で観察された *JQ1* の抗腫瘍効果は IL-34 の阻害によるものか、他の腫瘍関連転写因子の制御による付加的な現象なのかを検討する必要があると考えられる。

(第 2 章) *Il34*^{KO} 細胞株の作製や抗 IL-34 抗体の投与実験により IL-34 特異的な阻害を行った結果、ICB 抵抗性の原因として腫瘍組織における炎症作用を誘導する *Nos2* 発現マクロファージならびにリンパ球浸潤の減少がその要因として考えられた。PDX モデルにおいて抗 IL-34 抗体併用群では腫瘍の大きさが顕著に小さいものや内部が液状化したものが認められたことから、併用投与により抗腫瘍反応が誘導された可能性がある(ただし、統計学的な有意差は得られなかった)。また、PDX モデルにて抗 IL-34 抗体の単独投与群では腫瘍が縮小したマウスは観察できず、抗 PD-1 抗体との併用のみで IL-34 阻害効果が見られることが分かった。すなわち T 細胞による抗腫瘍反応が存在しない場合には、IL-34 の阻害効果は得られないと推察された。

【結論】(第 1 章) *Brd4* は *Il34* 遺伝子の転写調節因子の一つであり、エクソン 1 領域に存在するプロモーター領域に結合する。*JQ1* は *Il34* への *Brd4* の結合を阻害する低分子化合物である。マウス生体を用いた実験で、*JQ1* を投与し *Il34* の発現を抑制することにより腫瘍の成長が低下したことから、IL-34 発現の転写レベルでの調節は抗腫瘍効果を改善しうる可能性がある。

(第 2 章) IL-34 を発現する ICB 抵抗性腫瘍ではリンパ球及び *Nos2* 陽性マクロファージの浸潤が低下する。IL-34 を発現するヒトがん組織を用いた免疫ヒト化 PDX モデルを樹立した。従来の治療法に加え治療抵抗性因子の阻害併用療法の効果を検討するのに活用できる可能性が示唆された。