HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14973
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86155
Type	doctoral thesis
File Information	HAN_Nanumi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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)

2022 年 3 月

北海道大学

韓　ナヌミ

学　位　論　文

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)

2022 年 3 月

北海道大学

韓　ナヌミ

目次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3 頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・6 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8 頁

第 1 章： インターロイキン 34 の転写メカニズム及び発現制御に関する検討

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13 頁
方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15 頁
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32 頁

第 2 章：免疫チェックポイント阻害剤抵抗性腫瘍微小環境におけるインターロイキン 34 の役割および同因子の阻害による治療効果に関する検討

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35 頁
方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・37 頁
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・42 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・57 頁

結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・59 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・60 頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・61 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・62 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．Nanumi Han, Delnur Anwar, Naoki Hama, Takuto Kobayashi, Hidefumi Suzuki, Hidehisa Takahashi, Haruka Wada, Ryo Otsuka, Muhammad Baghdadi, and Ken-ichiro Seino
Bromodomain-containing protein 4 regulates interleukin-34 expression in mouse ovarian cancer cells
Inflammation and Regeneration, 14・40:25 (2020)

２．Naoki Hama*, Takuto Kobayashi*, Nanumi Han*, Fumihito Kitagawa, Nabeel Kajihara, Ryo Otsuka, Haruka Wada, Hee-kyung Lee, Hwanseok Rhee, Yoshinori Hasegawa, Hideo Yagita, Muhammad Baghdadi, and Ken-ichiro Seino
Interleukin-34 Limits the Therapeutic Effects of Immune Checkpoint Blockade
iScience, 23・10:101584 (2020) *Equally contributed

３．Nanumi Han, Hye Yoon Jang, Naoki Hama, Takuto Kobayashi, Ryo Otsuka, Haruka Wada, and Ken-ichiro Seino
An optimized protocol for patient-derived xenograft in humanized mice to evaluate the role of IL-34 in immunotherapeutic resistance
STAR Protocols, 2・100460 (2021)

本研究の一部は以下の学会に発表した

１．Nanumi Han, Muhammad Baghdadi, Haruka Wada, Ken-ichiro Seino
Evaluation of interleukin-34 in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma and metastatic cancer to liver
第 47 回日本免疫学会総会、2018 年 12 月、福岡

２．Nanumi Han, Muhammad Baghdadi, Haruka Wada, Ken-ichiro Seino
Identification of factors that affect myeloid cells in immunotherapeutic-resistant tumors.
第 16 回日本免疫治療学会学術集会、2019 年 2 月、東京

３．Nanumi Han, Delnur Anwar, Hidehisa Takahashi, Haruka Wada, Muhammad Baghdadi, Ken-ichiro Seino
Inhibition of IL-34 production by JQ1 as a novel therapeutic strategy in cancer therapy.
第 38 回札幌国際がんシンポジウム、2019 年 7 月、札幌

４．Nanumi Han, Delnur Anwar, Hidehisa Takahashi, Haruka Wada, Muhammad Baghdadi, Ken-ichiro Seino
Inhibition of IL-34 production by JQ1 as a novel therapeutic strategy in cancer therapy.
第 17 回日本免疫治療学会学術集会、2020 年 2 月、東京

要旨

【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、ドキソルビ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 発現阻害の可能性が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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

Ab	Antibody
Arg1	Arginase1
BET	Bromodomain and extra-terminal motif
BRD	Bromodomain
BRDT	Bromodomain testis associated
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	Complementary DNA
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
Citta	Class II major histocompatibility complex transactivator
CSF-1	Colony stimulating factor-1
CSF-1R	Colony stimulating factor-1 receptor
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
CycT1	Cyclin-T1
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4'6-Diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylene-diamine-tetraacetic acid
EF1α	Elongation factor 1 alpha
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
GEO	Gene expression omnibus
GFP	Green fluorescent protein
HE	Hematoxylin-eosin
HRP	Horseradish peroxidase
HuNSG	Humanized NOD scid gamma
IFNγ	Interferon gamma
IL	Interleukin
KO	Knockout
LDB1	LIM domain binding 1

Mcp1	Monocyte chemoattractant protein1
MED	Mediator complex
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MEM	Minimum essential medium
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NCBI	National Ccenter for Bbiotechnology Iinformation
ND	Not detected
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer-of activated B cell
NGS	Next-generation sequencing
Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible
NS	Not significant
OCT	Optimal cutting temperature compound
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed cell death protein-1
PD-L1	Programmed cell death-ligand 1
PDX	Patient derived xenografts
Pol II	RNA Polymerase II
PTP-ζ	Protein-tyrosine phosphatase-zeta
qPCR	Quantitaive polymerase chain reaction
rhIL-34	Recombinant human IL-34
RMA	Robust Multichip-array Average
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute1640
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
S.C.	Subcutaneous
SDC-1	Syndecan-1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TAM	Tumor-associated macrophage
TGF-β	Transforming growth factor beta
TME	Tumor microenvironment
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
Treg	Regulatory T cell

緒言

現在がんは日本人の主要な死亡原因の一つであり、2 人に 1 人は生涯のうち一回はがんに罹患し、男性の場合は 4 人に 1 人が、女性の場合は 6 人に 1 人ががんで死亡する（国立がん研究センターがん情報サービス）。世界におけるがんの罹患率は国や地域によって異なるが、年々増加する傾向を示している。2018 年の統計によると世界の 6 人に 1 人ががんで死亡しており、心血管疾患に続いて死因の第 2 位であった(Bray *et al.*, 2018)。がんの治療方法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 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。その結果、様々ながん種において高い治療効果が得られ、生存率の改善および完治例の増加が報告されるようなった（Sung *et al.*, 2021)。しかし、免疫療法の治療効果にもかかわらず、再発及び転移などの治療抵抗性を獲得した症例が多数報告されている(Postow *et al.*, 2015; Schadendorf *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017)。これらの治療抵抗性獲得メカニズムを明らかにするためにがん細胞内シグナリング、がん幹細胞、代謝などの様々な分野で研究が進められている。近年はがん細胞に限らず、腫瘍微小環境を構築している要素とがん細胞のネットワークが治療抵抗性を誘導する原因として注目されている。

腫瘍組織内には、がん細胞を中心とし、腫瘍組織の支持構造を構成する間質細胞と細胞外マトリックスが周辺に存在し、マクロファージ、リンパ球などの免疫細胞と細胞間相互作用に関与するサイトカインが混在している（Baghban *et al.*, 2020)。ICB に対して治療抵抗性を獲得した腫瘍微小環境において、制御性 T 細胞（Treg）及び TAM の浸潤が増加すると報告されている(Chaudhary and Elkord, 2016; Li *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2020)。

Treg は細胞傷害性 T リンパ球抗原-4（CTLA-4）を介してキラーT 細胞やヘルパーT 細胞と樹状細胞との結合を阻止することや、トランスフォーミング増殖因子（TGF-β）、IL-10 などの抑制性サイトカインを産生することが報告されている（Tanaka and Sakaguchi, 2016)。TAM は PD-L1 を発現して T 細胞、B 細胞、NK 細胞と結合することで免疫反応を抑制する(Kumar *et al.*, 2016; Davidov *et al.*, 2020)。また、T 細胞の活性化に必要なアミノ酸を分解する酵素を産生し、T 細胞を疲弊させる(Jiang, Li and Zhu, 2015)。さらに TAM は血管新生、がん細胞の増殖と浸潤能の亢進にも寄与している（Pollard, 2004; Condeelis and Pollard, 2006)。そのため、TAM の浸潤、分化マーカーをターゲットとした治療法開発の研究が進められている（Cotechini, Medler and Coussens, 2015)。

TAM とその前駆細胞である単球はCSF-1R を発現している(Inamura *et al.*, 2018)。CSF-1R のリガンドとして二つの分子が知られている。従来は、CSF-1R の発見以来コロニー刺激因子 1（CSF-1）が唯一のリガンドとして同定されていた（Sherr, Roussel and Rettenmier, 1988)。2002 年、CSF-1R 欠損マウス（*Csf1r*$^{-}$/*Csf1r*$^{-}$）において骨減少症が重篤であり、全身のマクロファージが枯渇していることが発見された。一方で CSF-1 欠損マウス（*Csf1*^{op}/*Csf1*^{op}）においては脳のミクログリアと皮膚のランゲルハンス細胞は比較的に正常な数を示した(Dai *et al.*, 2002)。従って、CSF-1R に対する新規のリガンドが存在することが予測された。2008 年、単球の生存に関わる分泌型タンパク質の同定を目的にCSF-1R の特異的阻害剤や阻害抗体を用いた実験が行われた。この時に初めて CSF-1R に対する新たなリガンドとして IL-34 が発見された（Lin *et al.*, 2008)。その後、IL-34 の構造、発現組織、病態における発現変化などが次々と報告された。

定常状態において IL-34 は、皮膚のケラチノサイト及び大脳皮質のニューロンで産生され、それぞれランゲルハンス細胞及びミクログリアの分化および増殖に重要な役割を果たしている（Wang *et al.*, 2012)。また、がん、自己免疫疾患、炎症、感染などの様々な疾患において IL-34 の発現変化が報告されている（Baghdadi *et al.*, 2017)。がんの中でも乳がん、卵巣がん、骨肉腫、大腸がんでは発現量が正常組織と比較して上昇していることが報告されている（Franzè *et al.*, 2020)。さらに、がん細胞由来の IL-34 が化学療法剤及び ICB に対して抵抗性を誘導し、予後不良因子であることが示唆された（Baghdadi *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2018)。これらのことから腫瘍微小環境において IL-34 と CSF-1R の結合は腫瘍進行、悪性度及び治療抵抗性に大きく関与していると考えられる。

臨床試験においてCSF-1R とCSF-1 の単独阻害療法が行われたが、全奏効率は20%未満、臨床的有用率も 30%未満であった（Cannarile *et al.*, 2017)。ICB と CSF-1R 阻害剤を併用する臨床試験は進行中であり、未だ治療効果に関する報告はなされていない。一方でパクリタキセルとの併用により臨床的有用率は 61%まで上昇したが、70%の患者で貧血、好中球減少、リンパ球減少、疲労、高血圧の副作用が認められた(Wesolowski *et al.*, 2019)。これらの報告から全身でユビキタスに発現する CSF-1 と CSF-1R を阻害するよりも、腫瘍選択的な IL-34 をターゲットにした方が副作用を低減できる可能性がある。また、IL-34 は CSF-1R 以外にも Syndecan-1（SDC-1）に結合し免疫抑制性マクロファージの分化を促進させることが知られている（Ségaliny *et al.*, 2015)。すなわち、化学療法を含め様々な治療法と CSF-1/CSF-1R 阻害療法を併

用しても効果が得られない場合、IL-34 と SDC-1 発現が原因となり治療抵抗性を誘導している可能性がある。

以上のことから IL-34 の発現や機能の阻害を行うことで、副作用が少ない、治療抵抗性を解除するような治療法を開発できる可能性があると考えた。しかし、がん細胞における IL-34 発現メカニズムの全貌は未だ明らかになっていない。また腫瘍組織における IL-34 の働き、特にヒトがんにおける治療抵抗性に対する役割は明らかになっていない。そこで私は博士課程の間に、これら 2 つの問題に対して取り組むことを決意しこれまで研究を行ってきた。

本論文は 2 部構成になっており、第 1 章では IL-34 の転写メカニズムとその制御法について検討した結果を記載した。第 2 章では IL-34 によるがんの治療抵抗性についてマウスモデルの免疫組織学的検討の結果をまとめ、さらにそれらの結果をヒト免疫系でも検討するため免疫ヒト化 PDX モデルの樹立と治療法検討の結果をまとめた。本研究の概要を図 1 に示した。

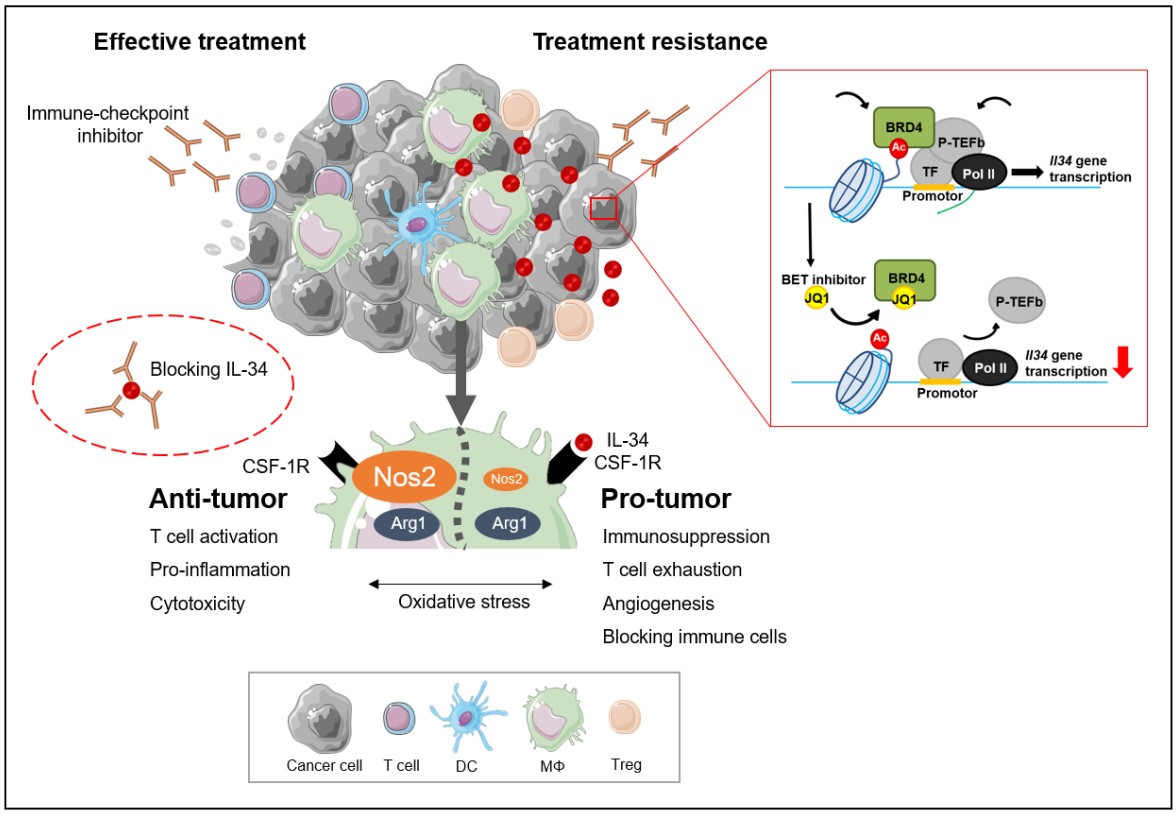

図 1. 本研究の概要

第 1 章では、がん細胞における IL-34 転写メカニズムの解析を行った（赤い四角）。第 2 章では、IL-34 発現により誘導される ICB 抵抗性についてマクロファージに関連した解析を行った（灰色の矢印）。続いて免疫ヒト化 PDX モデルにて IL-34 阻害併用 ICB による治療効果を検討した（赤い丸）。

第１章

インターロイキン 34 の転写メカニズム及び発現制御に関する検討

緒言

卵巣がん、腎がんなど様々ながんにおいてIL-34の発現は予後不良と相関することが報告されている(Uhlen *et al.*, 2017)。乳がん及び肝がんにおいてはIL-34発現が転移の促進に寄与していることも示唆されている(Ségaliny *et al.*, 2015; Shoji *et al.*, 2016)。これらのことから、がん細胞によるIL-34の産生を阻害することによりがんの予後不良を改善できる可能性がある。IL-34の産生を阻害するためにはその発現メカニズムを把握する必要がある。これまでのがん細胞におけるIL-34発現メカニズムに関する報告としては、肺がん及び悪性胸膜中皮腫にてDNA損傷剤ドキソルビシン、シスプラチン、ペメトレキセドがNF-κBを活性化する結果発現が増加するというものがある(Cioce *et al.*, 2014; Baghdadi *et al.*, 2016)。がん細胞以外の線維芽細胞や脂肪細胞などの細胞においてもNF-κBシグナリングの活性化によりIL-34が発現されると報告されている(Baghdadi *et al.*, 2017; Guillonneau, Bézie and Anegon, 2017)。一方、IL-34の転写を調節する分子やメカニズムについてはこれまで明らかになっていない。そこで本研究ではIL-34の転写調節メカニズムを明らかにすることを目的とした。

2018年、BRAF-V600E阻害剤に抵抗性を示すヒトメラノーマ細胞においてCSF-1R及びIL-34発現の増加が報告された(Giricz *et al.*, 2018)。この報告によると、BRAF-V600E阻害によりERK経路活性化が低下され、転写因子Runt-related transcription factor 1（RUNX1）が誘導される。RUNX1はパートナータンパク質Core-binding factor subunit β（CBFβ）とヘテロ二量体を形成し、*CSF1R*及び*IL34*のプロモーター領域への結合によりCSF-1RとIL-34が産生されることが示された。一方、RUNX1は造血前駆細胞にて、Bromodomain-containing protein 4（BRD4）、Fli-1 proto-oncogene（FLI1）、Cyclin-dependent kinase（CDK）、LIM domain-binding protein 1（LDB1）など様々な分子と複合体を形成して遺伝子発現を誘導することが報告されている(Gilmour *et al.*, 2018)。

上記の様々な分子を含め、哺乳類の遺伝子発現は約1,500種類の転写因子により制御されていることが知られている(Vaquerizas *et al.*, 2009)。IL-34の転写メカニズムを解明するために、転写を調節する薬剤を用いたスクリーニングを行う方法が考えられるが、1,500種類の転写因子すべてに対しスクリーニングを行うことは困難である。そこで、IL-34遺伝子の発現パターンを把握するために遺伝子発現情報データベースNCBI Gene Expression Omnibus（GEO）(Barrett *et al.*, 2005)を用い探索を試みた。NCBI GEOは、マイクロアレイ、次世代シーケンサー、メチル化などに関

する解析データが共有されている世界最大規模のデータベースである。NCBI GEO のインターフェイスでは多様ながん細胞株及び組織における IL-34 発現を探索することが可能である。更に MEK 阻害剤やチロシンキナーゼ阻害剤など、様々な阻害剤添加による遺伝子発現の変化に関する閲覧も可能である。NCBI GEO のデータベースにおける様々な阻害剤を利用した実験結果を分析することで、IL-34 の転写調節因子を発見することが可能であると考えた。

従って、本研究ではまず NCBI GEO のデータベースを用い IL-34 の発現を調節する可能性がある因子をスクリーニングし、実際にその因子が発現を調節するか ChIP-qPCR 法を用いて検討することを目的とした。また、がん細胞における IL-34 発現が抑制された場合に抗腫瘍効果が見られるか検討を行うことを目的とした。

方法

マウス

B6C3F1 を日本エスエルシーより購入した。本研究における動物実験は北海道大学動物実験に関する規定に基づいて取り扱った（承認番号：14-0171）。

細胞培養

マウス卵巣がん細胞株 OV3121 と OV3121-Ras4 は広島大学原爆放射線医科学研究所瀬山敏雄博士に供与して頂いた。マウス卵巣がん細胞株 HM-1 は理化学研究所バイオリソース研究センターから導入した。OV3121 と HM-1 を培養するため、予め 0.5 μg/mL ラミニン iMatrix-511（Nippi）で細胞培養用ディッシュのコートを行った。OV3121 は RPMI 1640（Fujifilm）に 10% FBS（Sigma-Aldrich Japan）、1% MEM 非必須アミノ酸（Nacalai Tesque）、1% ペニシリン/ストレプトマイシン（Nacalai Tesuqe）の組成になるよう作製した培養液を用いて培養した。OV3121-Ras4 は Dulbecco's Modified Eagle's（Fujifilm）に 10% FBS（Sigma-Aldrich Japan）、1% MEM 非必須アミノ酸（Nacalai Tesque）、1% ペニシリン/ストレプトマイシン（Nacalai Tesuqe）の組成になるよう作製した培養液を用いて培養した。HM-1 は Minimum Essential Medium α（Fujifilm）に 10% FBS（Sigma-Aldrich Japan）、1% MEM 非必須アミノ酸（Nacalai Tesque）、1% ペニシリン/ストレプトマイシン（Nacalai Tesuqe）の組成になるよう作製した培養液を用いて培養した。培養条件は 37℃、5% CO_2 であった。

JQ1 処理

JQ1 は Selleckchem から購入し、ジメチルスルホキシド（DMSO、Fujifilm）に溶解したものを最終濃度 0.1%で用いた。OV3121 と OV3121-Ras4 は 10 μM の濃度で、HM-1 は 0.01 μM、0.1 μM、1 μM、10 μM の濃度で 48 時間処理した。コントロール群は 0.1% DMSO を用いた。

NCBI データベースを利用した解析

IL-34 の転写を制御する候補薬剤を選別するにあたり、NCBI データベースを用いた検索を行った。NCBI データベース解析で使用したサンプルの情報を以下に記載する。変異型 BRAF（V600E）阻害剤 Vemurafenib で処理したヒトメラノーマ細胞株 A375 サンプルのアクセッション番号は GSE42872 であり、Peter MacCallum Cancer Centre にて RMA（Robust Multichip Array）法を用いて解析されたものである。グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3（GSK3）で処理したヒト白血病細胞株 RS4.11 サンプ

ルのアクセッション番号はGSE19736であり、Stanford Universityにて Expression Console (Affymetrix) data processing法を用いて解析されたものである。プロテアソーム阻害剤 Bortezomib で処理したヒト乳がん細胞株 MCF7 サンプルのアクセッション番号は GSE30931 であり、University Medical Center Göttingen にて BeadArray を行ったデータである。チロシンキナーゼ阻害剤 Immatinib で処理したヒト好酸球性白血病細胞株 EOL-1 サンプルのアクセッション番号はGSE53633であり、University of Bologna にて Expression Console (Affymetrix) data processing 法を用いて解析されたものである。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 SAHA で処理したヒト卵巣がん細胞株SKOV-3サンプルのアクセッション番号はGSE53603であり、Panagiotis KonstantinopoulosにてGC-RMA解析法を用いて解析されたものである。BET 阻害剤 JQ1 で処理した MYC 遺伝子増幅髄芽腫細胞株 D458 サンプルのアクセッション番号は GSE51020 であり、DANA-FARBER CANCER INSTITUTE にて RMA 法を用いて解析されたものである。MEK 阻害剤 PD-0325901 で処理したマウス悪性末梢神経鞘腫瘍組織サンプルのアクセッション番号は GSE57141 であり、Harvard Medical School－Brigham Women's Hospital にて BRB array 法を用いて解析されたものである。

*Il34*過剰発現細胞株の作製

マウス脳細胞から抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA より PCR 増幅を用いて *Il34* cDNA を獲得し、レンチウイルスベクターの pLenti-EF1a-C-Myc-DDK-IRES-Puro（OriGene）に導入した後にクローン化した。Lenti-X293T 細胞に *Trans*IT-X2（Takara bio）を用いて上記のレンチウイルスプラスミド及び pCMV-VSV-G-RSV-Rev（RIKEN BRC DNA BANK）、pCAG-HIVgp（RIKEN BRC DNA BANK）を同時に感染させ、三日間培養した。培養上清を回収し、野生型 HM-1 の培養液と 1:1 の比率で混ぜて細胞培養を行った後 puromycin を用いてセレクションを行った。

ELISA

LEGEND MAX™ マウス IL-34 ELISA kit（BioLegend）を用いて測定した。測定サンプルは 96-well plate にて 2×10^5 個の細胞を 48 時間培養した後の上清を用いた。主波長 450 nm 及び副波長 570nm で Multiskan FC（Thermo Fisher Scientific）を用いて測定し、培養液中の IL-34 濃度を算出した。

細胞生存アッセイ

MTT cell count kit（Nacalai Tesque）を用いた。測定波長 570 nm、参照波長 670 nm で Multiskan FC（Thermo Fisher Scientific）を用いて解析した。細胞生存は培養開始後二日間観察した。

RT-PCR 解析

培養細胞及び腫瘍組織から TriPure Isogen Reagent（Roche）を用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA を鋳型とし、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix（TOYOBO）を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA をもとに KAPA SYBR Fast qPCR Kit（日本ジェネティック）を用いて、以下のプライマーで qPCR を行った。

mouse-Interleukin-34 : Il34
Forward 5'- CTTTGGGAAACCAGAATTTGGAG -3'
Reverse 5'- GCAATCCTGTAGTTGATGGGGAA -3'

mouse-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase : Gapdh
Forward 5'- TCAAATGGGGTGAGGCCGGT-3'
Reverse 5'- TTGCTGACAATCTTGAGTGA -3'

ChIP-qPCR

5×10^6 個の HM-1 細胞を 10 cm 細胞培養ディッシュにて 2 日間培養した。培養液を除去し、PBS を用いて 2 mM に調節した disuccinimidyl glutarate で 22℃－26℃、30 分間タンパク質―DNA 間をクロスリンクさせた。その後 PBS を溶媒とする 1%ホルムアルデヒドを用いて 22℃－26℃で 10 分間固定を行った。固定後細胞を回収し、ChIP lysis buffer にて細胞を 1 mg/mL になるように懸濁させた。細胞懸濁液を Bioruptor（Sonic Bio）にて 30 秒ずつ 15 回破砕し、Micrococcal Nuclease（Takara Bio）を加え DNA の切断処理を行った。Protein G Magnetic beads（Bio-Rad）とターゲットとする抗体（表 1）を懸濁液に加え 4℃で 2 時間培養した。200 mM KCl、2 mM $CaCl_2$、50 mM Tris-HCl（pH8.0）を含む ChIP buffer で 2 回洗浄した後、500 mM KCl の ChIP wash buffer で 2 回洗浄し、10 mM Tris-EDTA buffer で 1 回洗浄を行った。100 mM $NaHCO_3$、1% SDS を加え 50 ℃にて 30 分間静置することで beads からクロマチンを溶出させた後、65℃で一晩静置し、クロマチンの脱クロスリンクを行った。Immunoprecipitated DNA 及び input DNA を 45℃にて RNase 及び proteinase K で処理し、QIAquick PCR purification kit (Qiagen)及び MinElute PCR purification kit (Qiagen)で DNA 精製を行った。

表 1.　ChIP-qPCR にて用いた抗体

抗体名	抗体量	メーカー
Anti-Brd4 polyclonal antibody	10 µg	Bethyl Laboratories
Normal rabbit polyclonal IgG	5 µg	Medical & Biological Laboratories
Anti-H3K27ac polyclonal antibody	5 µg	Abcam
Dynabeads M-280 sheep anti-rabbit polyclonal IgG	30 µg	Thermo Fisher Sientific

Il34 遺伝子上の Brd4 結合領域を決定するために、推定プロモーター領域 R2 を中心に、上流領域 R1、翻訳領域 R3 と R4 と命名し、以下のプライマーを使用し ChIP-qPCR を行った。

R1
Forward 5'-GTGGTGGCACAAGCCTATAA-3'
Reverse 5'-GCTGGGACAACATCTCTTTCT-3'

R2
Forward 5'-TGTCTCAGGCTTTGGTGTTAG-3'
Reverse 5'-TGGTTTGTTTGTTTGGCTTGT-3'

R3
Forward 5'-GTGCCTTGGAGTCCTTTCTT-3'
Reverse 5'-GAAGGAGGAGAGAGAGACTGATTA-3'

R4
Forward 5'-TACTCCAGGTGACAAGTCCT-3'
Reverse 5'-TAGCTGAATCAACCACCATCC-3'

H3K27ac と H3K4 me3 の ChIP–qPCR に使用されたプライマーは以下の通りである。

R2
Forward 5'-GAGAAGACTGTAGGCTGAACAC-3'
Reverse: 5'-GTCGCCGGAAGCTTTGA-3'

R3
Forward: 5'-TGAGCTGCAATGGGACTG-3'
Reverse: 5'-GGCCACCAAGTCCAGAAA-3'

R4
Forward: 5'-TACTCCAGGTGACAAGTCCT-3'
Reverse: 5'-TAGCTGAATCAACCACCATCC-3'

各実験はトリプリケートで行い、以下の ΔCt 法の計算式を用いて input DNA で補正した。

$\Delta Ct = Ct^{Input} - Ct^{Sample}$
Promoter occupation (%) = $2^{\Delta Ct}$

In vivo における薬剤有効性の評価

担がんマウスにおいて JQ1 の IL-34 発現阻害効果及び抗腫瘍効果を評価するために以下の実験を行った。はじめに 6〜8 週齢の B6C3F1 雌マウスの脇腹に *Il34*^{WT} HM-1、*Il34*^{OE} HM-1 細胞 1×10^6 個を皮下注射した。皮下注射 7 日後、マウスを無作為に 2 群に分け、一方に DMSO に溶解した JQ1（50 mg/kg）を、もう一方にはコントロール群として JQ1 の溶媒である DMSO のみを週 3 回、3 週間腹腔内投与を行った。薬剤投与期間中、腫瘍の大きさは週 3 回測定した（長径×短径×高さ）。細胞注射後 28 日目で安楽死させて腫瘍を写真撮影した後、腫瘍組織を回収し、TriPure Isogen Reagent（Roche Diagnostics）を用いて組織を溶解し RT-PCR 法にて遺伝子発現解析を行った。

統計学的解析

統計学的解析は Student *t*-test にて 2 群間平均値の差を検定した。本研究における有意水準は 5%とし、p 値が 5%を下回る場合に統計学的に有意差ありと判断し

た。各図内には、$p<0.05$ の場合にアスタリスク（＊）1 つ、$p<0.01$ の場合にアスタリスク（＊＊）2 つを付与した。有意差が認められなかった群間には NS（Not significant）を付与した。

結果

ヒトがん細胞株を用いた各種阻害剤による *IL34* 発現変化

がん細胞による IL-34 の発現を制御することができる薬剤をスクリーニングする目的で、NCBI データベース(Geer *et al.*, 2009)の GEO profile にて様々な低分子化合物による *IL34* 発現量の変化を検索した。その結果、BET 阻害剤である JQ1 が *IL34* の発現を低下させる傾向にあることが分かった（reference series: GSE51020）（図 2）。

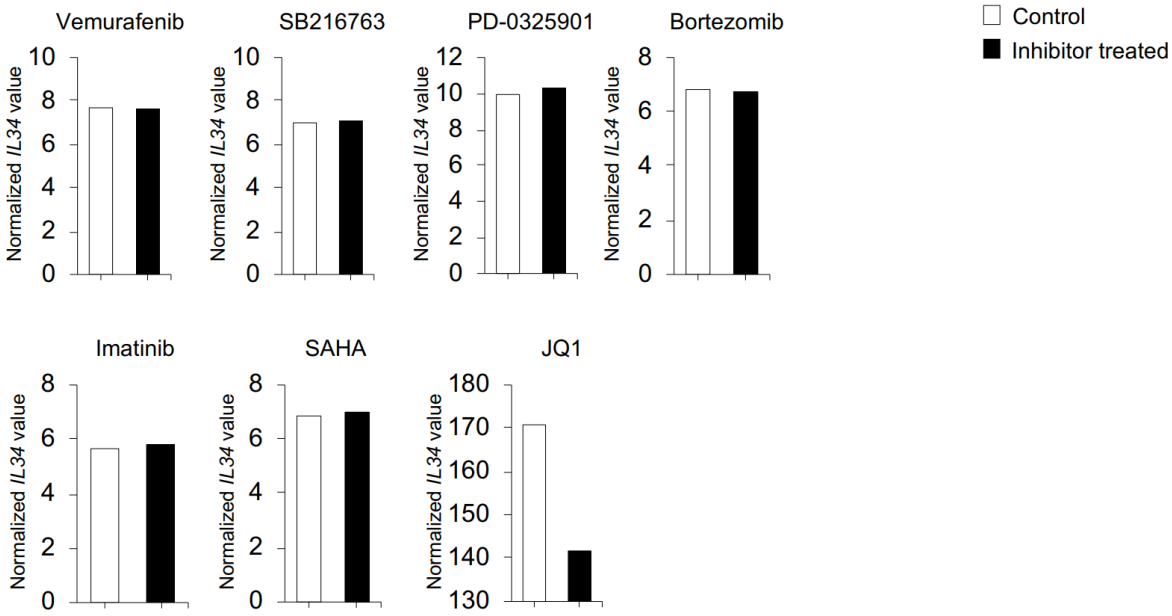

図 2. がん細胞の *IL34* mRNA 発現に対する様々な阻害剤の影響

Vemurafenib（BRAF 阻害剤）を添加したメラノーマ細胞株 A375、SB216763（グリコーゲンシンターゼ阻害剤）を添加した白血病細胞株 RS4.11、Bortezomib（プロテアソーム阻害剤）を添加した乳がん細胞株 MCF7、Imatinib（チロシンキナーゼ阻害剤）を添加した白血病細胞株 EOL-1、SAHA（ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤）を添加した卵巣がん細胞株 SKOV-3、JQ1 を添加した MYCN-増幅神経芽細胞株 CHP-212、PD-0325901（MEK 阻害剤）投与した悪性抹消神経腫瘍の組織における *IL34* mRNA 発現量を示す。これらのデータは NCBI データベース解析から得た。

実際に JQ1 が IL-34 の産生を抑制するかを検討するためにマウス卵巣がん細胞株 OV3121、OV3121-RAS4、HM-1 を用いて以下の実験を行った。各細胞株に 10 μM の JQ1 もしくは溶媒である DMSO をコントロールとして加え、二日間の培養後、qPCR、ELISA を用いて IL-34 の mRNA 発現量及びタンパク質の産生量を評価した。OV3121 では DMSO 処理群、JQ1 処理群の双方にて IL-34 の遺伝子発現及びタンパク質の産生は検出されなかった。一方、OV3121-RAS4 と HM-1 に DMSO を処理した群では IL-34 の遺伝子発現及びタンパク質の産生が観察され、JQ1 の添加により IL-34 の発現が有意に低下することが認められた。また、IL-34 発現の低下は細胞死によるものではないことを細胞増殖アッセイにて確認した（図 3）。

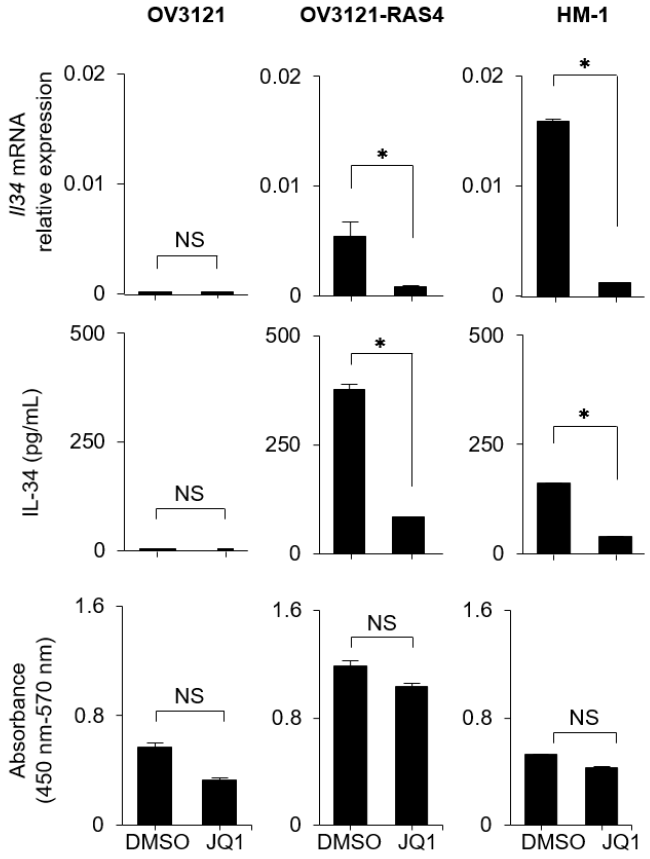

図 3. がん細胞における BET 阻害剤 JQ1 添加の影響

Il34 mRNA 発現量の分析（上）、培養上清における IL-34 タンパク質の濃度の分析（中間）、細胞生存率の分析（下）（n = 3）。NS, not significant; *$p < 0.05$; Student's *t* test. エラーバーは SEM

続いて OV3121、OV3121-RAS4、HM-1 の DMSO 添加群と JQ1 添加群における細胞の変化(数ならびに形態)を観察した。すべての細胞株の DMSO 添加群と JQ1 添加群における細胞数及び形態に大きな変化は観られなかった(図 4)。この結果から IL-34 の発現低下は細胞数の減少によるものではなく、生細胞内における BET 阻害剤 JQ1 の作用であることが示唆された。JQ1 による IL-34 の遺伝子発現及びタンパク質産生量の変化はこれまで報告されておらず、本実験で初めて観察された現象である。

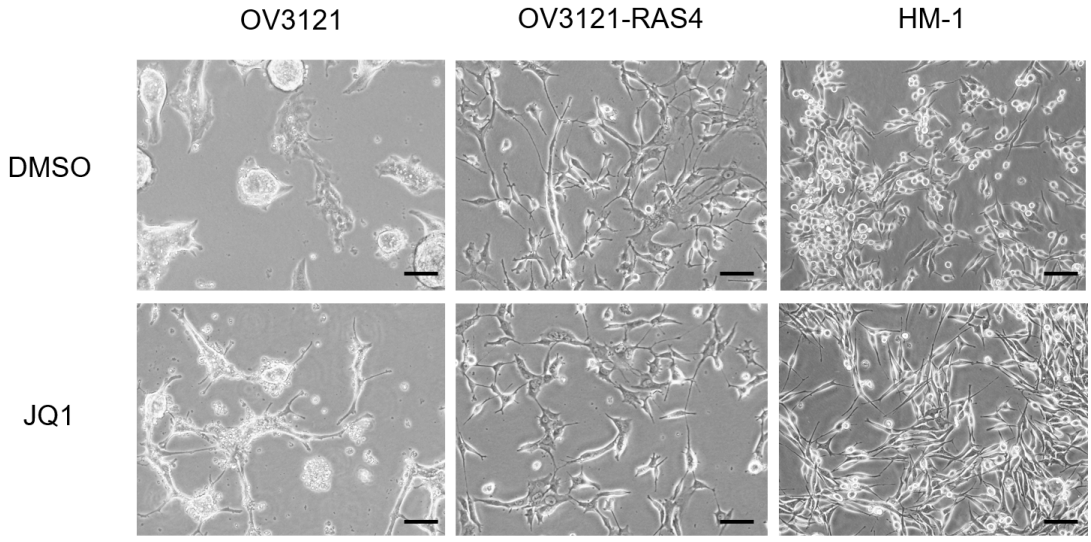

図 4. JQ1 添加後の細胞数及び形態観察、Scale bars：50 μm

Il34 遺伝子のプロモーター領域における発現制御に関する検討

JQ1 はヒトがん細胞内において BRD4 に高い親和性で結合し、プロモーター領域における RNA POL II（Pol II）、転写伸長因子 P-TEFb 複合体との結合を阻害する(Filippakopoulos *et al.*, 2010; Fiskus *et al.*, 2014)。マウス細胞 OV3121-Ras 及び HM-1 にて JQ1 により低下した *Il34* の発現は *Il34* プロモーター領域に結合する Brd4 の阻害によるものかを検討するために ChIP-qPCR 法を試みた。まず *Il34* プロモーター領域を把握するため Ensembl Genomes データベース(Cunningham *et al.*, 2019)における マウス *Il34* 遺伝子について検索を行った。データベースによると、マウス *Il34* の染色体上位置は 8 番染色体の 110,741,829 から 110,805,949 であり、エクソン領域は１から 7 まで存在する（図 5)。そのうち翻訳されるコーディングシーケンスはエクソン２から 7 の間に存在し、エクソン１と２そして 7 に非翻訳部分が含まれる（図 5、白い四角)。これらの情報から Brd4 がプロモーターに結合し得る領域を R1 から R4 と定め ChIP-qPCR 解析を行った（図 5)。

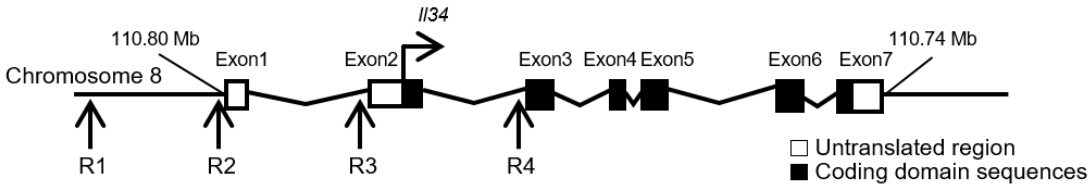

図 5. マウス *Il34* 遺伝子座の模式図

白い四角と黒い四角はそれぞれ *Il34* の非翻訳領域とコーディングドメインシーケンスを示している。R1 から R4 までは、Ensembl Genomes データベースにおけるプロモーター領域の候補である。

ChIP-qPCR 解析の結果、JQ1 添加により R2、R3 領域における Brd4 結合の低下が検出された。特に R2 では JQ1 添加により *Il34* プロモーター領域と Brd4 の結合が顕著に低下していることが観察された（図 6）。これらの結果は Brd4 が直接的に *Il34* 遺伝子の転写に関係し、*Il34*転写調節が主に R2 領域にて起きていることを示唆する。

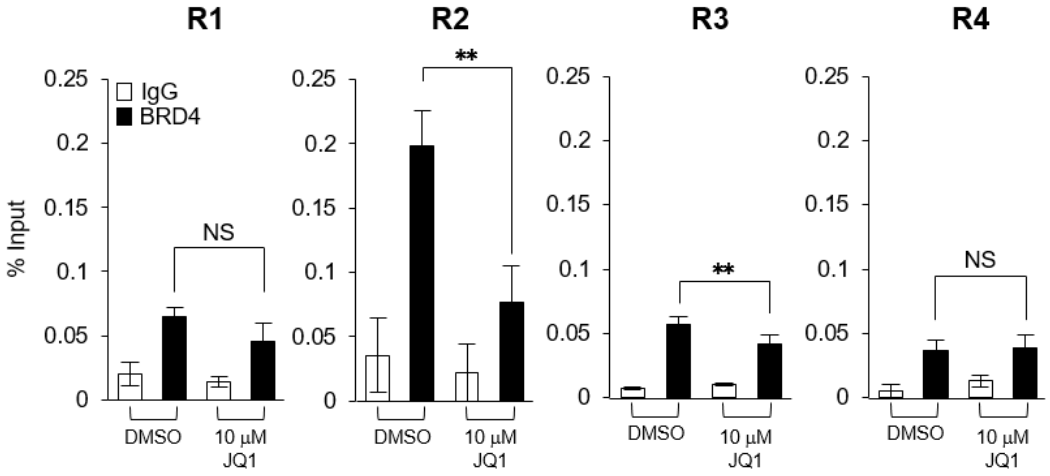

図 6.　*Il34* プロモーター領域における Brd4 結合の ChIP-qPCR 解析

HM-1 に 10 μM の JQ1 及び DMSO を添加し、抗 Brd4 抗体及びコントロール抗体を用いて免疫沈降を行った。その後各領域 R1 から R4 に対するプライマーを用いて qPCR 法にて解析を行った（n = 3）。実験は 2 回独立して行われ、代表的なデータを示した。NS, not significant; $^{**}p < 0.01$; Student's *t* test. エラーバーは SEM

ヒトメルケル細胞がんにて BRD4 は H3K27 のアセチル化（H3K27ac）を受けたヒストンに結合してエンハンサーとして働き、c-Myc などがん原遺伝子（proto-oncogenes）の発現を上昇させることが報告されている(Sengupta *et al.*, 2015)。そこで、HM-1 細胞の *Il34* の発現においても Brd4 が H3K27ac との結合によりエンハンサーとして働くかを検討した。R2、R3、R4 の *Il34* 遺伝子領域におけるヒストン修飾を ChIP-qPCR 解析にて検討した。その結果、H3K27ac 修飾はすべての領域にて観察された一方、JQ1 添加による H3K27ac 修飾の低下は見られなかった（むしろ R4 において若干の増加が観察された）（図 7）。

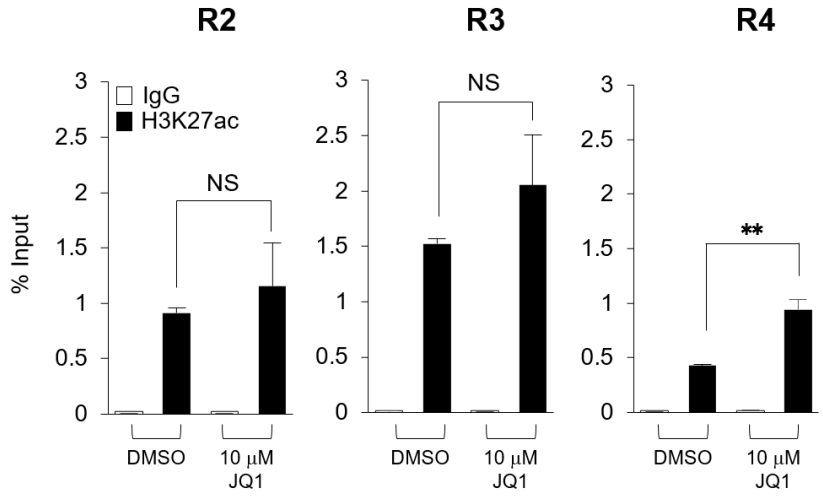

図 7.　*Il34* プロモーター領域における H3K27ac の ChIP-qPCR 解析

HM-1 に 10 μM の JQ1 及び DMSO を添加し、抗 H3K27ac 抗体及びコントロール抗体を用いて免疫沈降を行った。その後各領域 R2、R3、R4 に対するプライマーを用いて qPCR 法にて解析を行った（n = 3）。実験は 2 回独立して行われ、代表的なデータを示した。NS, not significant; $^{**}p < 0.01$; Student's *t*-test. エラーバーは SEM

ヒト乳がん細胞にて BRD4 は、H3K4 のトリメチル化（H3K4me3）修飾されたヒストンに結合し、エストロゲンの発現が上昇させるエンハンサーとして働くことが報告されている(Nagarajan *et al.*, 2014)。そこで H3K4me3 が *Il34* の発現に関与するかを ChIP-qPCR 法を用いて検討した。その結果、すべての領域にてメチル化観察され、JQ1 による抑制は見られなかった（図 8)。

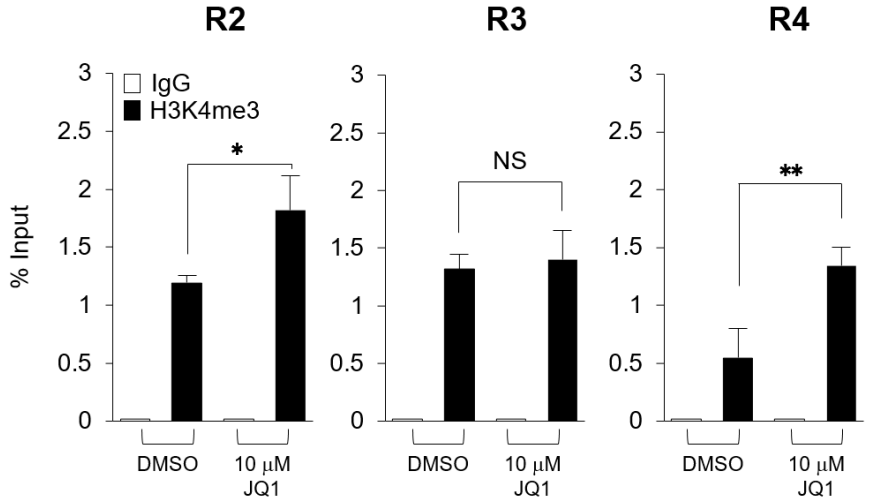

図 8.　*Il34* プロモーター領域における H3K4me3 の ChIP-qPCR 解析

HM-1 に 10 μM の JQ1 及び DMSO を添加し、抗 H3K4me3 抗体及びコントロール抗体を用いて免疫沈降を行った。その後各領域 R2、R3、R4 に対するプライマーを用いて qPCR 法にて解析を行った（n = 3)。実験は 2 回独立して行われ、代表的なデータを示した。NS, not significant; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$; Student's *t* test. エラーバーは SEM

以上の結果により、JQ1 によるマウス *Il34* 発現の低下は H3K27ac、H3K4me3 のヒストン修飾の変化ではなく、Brd4 の *Il34* プロモーター領域への結合阻害によりもたらされている可能性が高いと考えられた。

In vivo 腫瘍実験における JQ1 投与の評価

多種多様ながん細胞株を用いた *in vivo* 実験により、生体内にて JQ1 は腫瘍の増殖を抑制することが報告されている(Shao *et al.*, 2014; Berenguer-Daizé *et al.*, 2016)。しかし、そのことと IL-34 発現との関係は不明である。先行研究にて IL-34 の阻害は腫瘍の生体における増殖を顕著に抑制することが示されている(Baghdadi *et al.*, 2016)。そこで、JQ1 による腫瘍由来 IL-34 の発現阻害が抗腫瘍効果をもたらすかどうか検討した。

マウス卵巣がん細胞株 HM-1 は *in vivo* にて高い増殖能及び転移能を有し、生存予後が悪いと報告されている(Hashimoto *et al.*, 1989)。図 3 にて示されたように、HM-1 は恒常的に *Il34* 遺伝子を発現している。この細胞株を *Il34* 野生型細胞株（$Il34^{WT}$ HM-1）とし、それに対して Brd4 の転写制御下にないことが知られている *EF1α* プロモーター(Niu *et al.*, 2016)を介して IL-34 を過剰に発現する細胞株（$Il34^{OE}$HM-1）を遺伝子導入法を用いて作製した。

In vitro にて *Il34*^{WT} HM-1 及び *Il34*^{OE} HM-1 に JQ1 を添加し、濃度依存的に *Il34* の発現量に変化があるかを、qPCR にて解析した。*Il34*^{WT} HM-1 は濃度依存的に発現量の低下が観察されたのに対し、*EF1α* プロモーターによって発現制御を受ける *Il34*^{OE} HM-1 においては *Il34* の発現量に変化はみられなかった（図 9）。

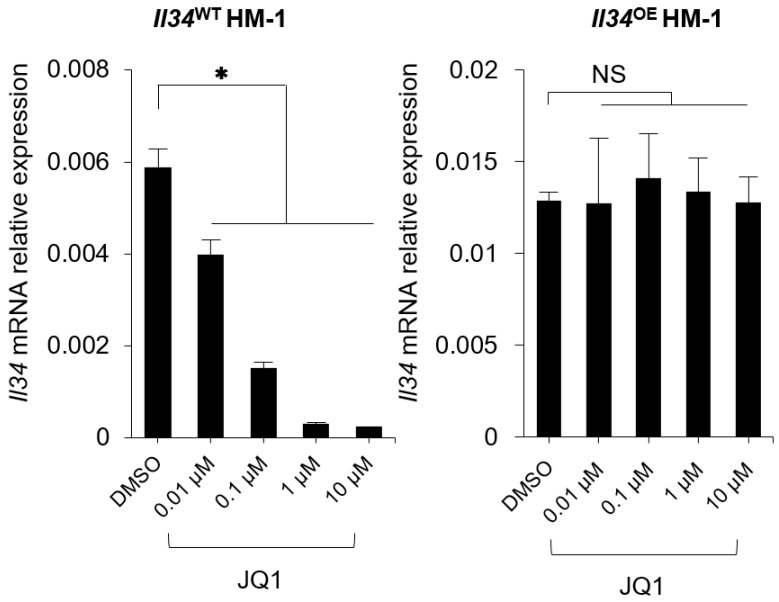

図 9.　JQ1 添加による *Il34*^{WT} HM-1 及び *Il34*^{OE} HM-1 における *Il34* の発現制御
JQ1 添加後、*Il34*^{WT} HM-1 と *Il34*^{OE} HM-1 における *Il34* 発現量を qPCR 法にて分析した（n = 3）。NS, not significant; *$p < 0.05$; Student's *t* test. エラーバーは SEM

次に、体内にて実際に JQ1 が *Il34* 発現を阻害し腫瘍の増殖を抑制するか担がんマウスを用い検討した。*Il34*^{WT} HM-1 または *Il34*^{OE} HM-1 を B6C3F1 マウスに皮下移植し、一週間後より JQ1（50 mg/kg）またはコントロールである DMSO の腹腔内投与を行った。投与スケジュールは週に 3 回、計 3 週間投与した（図 10）。

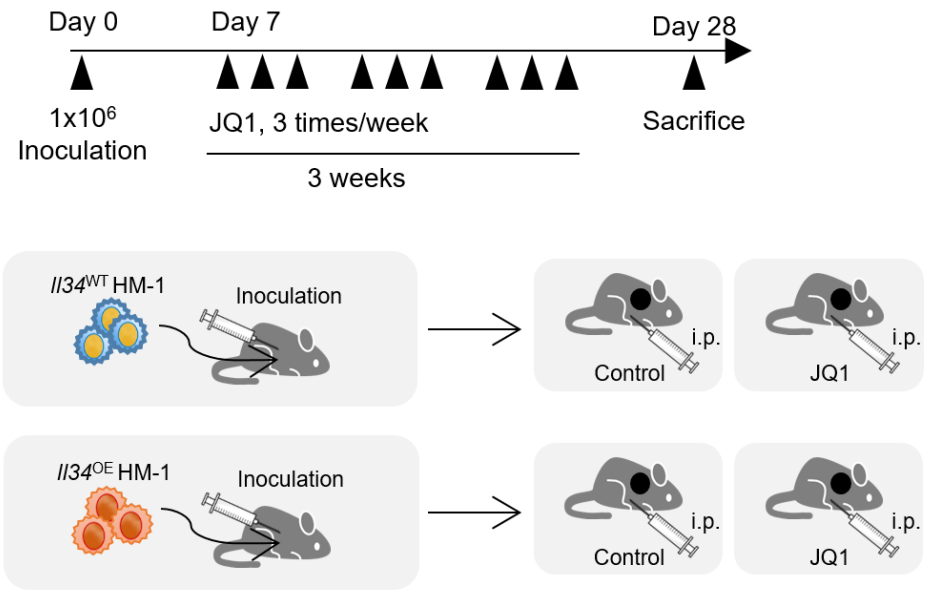

図 10.　マウス生体内における JQ1 投与スケジュール

Il34^{WT} HM-1 及び *Il34*^{OE} HM-1 細胞株をマウスに皮下移植した。移植 7 日後、JQ1 及びコントロール（DMSO）を週に 3 回ずつ 3 週間腹腔内投与した。腫瘍の大きさは皮下移植後 28 日間観察された。

腫瘍の大きさは JQ1 投与期間中継続的に測定した。*Il34*^{OE} HM-1 移植群においては JQ1 投与による腫瘍増大の抑制効果は観察されなかったのに対し、*Il34*^{WT} HM-1 移植群においては、JQ1 投与による腫瘍増大の抑制が有意に認められた（図 11）。

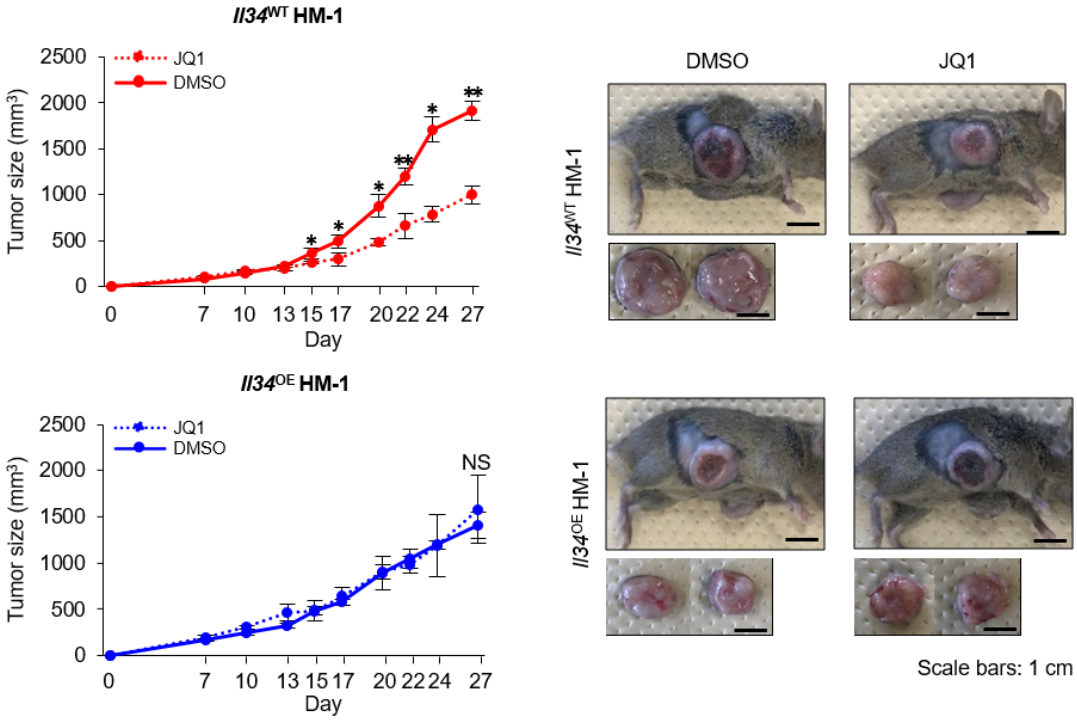

図 11. JQ1 投与後の腫瘍の増殖観察

28 日間の腫瘍の大きさを測定した。*Il34*^{WT} HM-1 移植群を上（赤）、*Il34*^{OE} HM-1 移植群を下（青）に示す。JQ1 投与群は点線で示し、コントロールの DMSO 投与群は実線で示した（Control: n = 4, JQ1: n = 3）。皮下移植 28 日後のマウスにおける腫瘍の様子を右に示す。Scale bars : 1 cm, NS, not significant; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$; Student's t-test. エラーバーは SEM

JQ1 により腫瘍組織中における *Il34* mRNA 発現が抑制されたかどうか検討するために、皮下移植後 28 日に腫瘍組織を回収し、qPCR 法を用いて *Il34* mRNA 発現量を測定した。JQ1 投与により *Il34*^{WT} HM-1 腫瘍の *Il34* 発現量は有意に減少し、*in vitro* 実験と一致する結果が得られた。一方で、*Il34*^{OE} HM-1 移植群では JQ1 投与による *Il34* 発現量の減少は観察されなかった（図 12）。以上より、生体内の腫瘍組織にて BET 阻害剤 JQ1 によりがん細胞内在性 IL-34 の発現が抑制され、腫瘍の増殖も抑制されたことが示唆された。

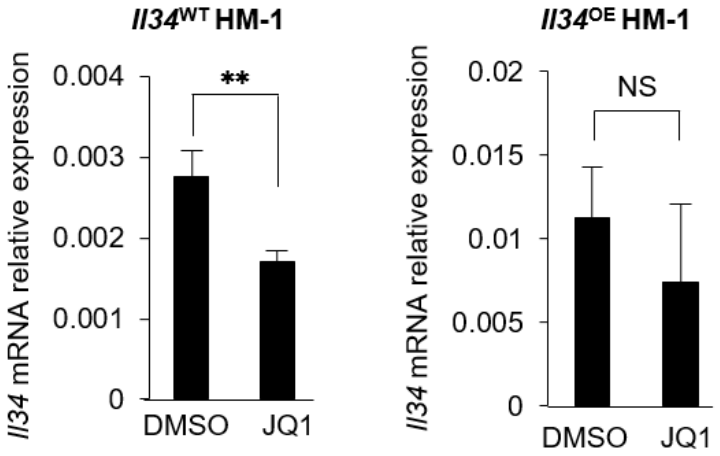

図 12. JQ1 投与後の腫瘍組織における *Il34* mRNA 発現量

28 日目に回収した HM-1 における *Il34* 発現量（Control: n = 4, JQ1: n = 3）。 NS, not significant; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$; Student's t-test. エラーバーは SEM

考察

これまでがん細胞における IL-34 の発現メカニズム、特に転写レベルでのメカニズムは明らかになっていなかった。本研究では BET 阻害剤 JQ1 を用いて Brd4 が *Il34* の転写調節因子であることを初めて同定した。*Il34* 遺伝子上にて Brd4 が結合する部位は、エクソン 1 の前（R2）であることが分かった。エクソン 2 の前の領域（R3）においても JQ1 により Brd4 の結合が有意に減少していたため（図 6）、R3 も Brd4 が結合する部位として考えられた。しかし、R2 におけるコントロール群（DMSO）にて Brd4 の結合率が最も高かったことから、Brd4 は主に R2 の領域に結合する可能性が高いと推測される。

Brd4 は転写調節因子以外にもエピジェネティック調節因子（ヒストンリーダー）の役割を持ち、エンハンサー及びスーパーエンハンサーに影響を与えることが報告されている(Lovén *et al.*, 2013; Jia, Chng and Zhou, 2019)。Ensembl のデータベース解析によると、*Il34* 遺伝子においていくつかのエンハンサー領域が存在することが示唆されている(Hunt *et al.*, 2018; Qian *et al.*, 2019)。更に、スーパーエンハンサーに対するデータベース解析によると、ヒト *IL34* 遺伝子には 7 つのスーパーエンハンサー領域が存在し、少なくとも 2 か所の領域にて BRD4 が結合すると報告されている(Khan and Zhang, 2016)。マウスの場合は、約 10 か所の *Il34* のスーパーエンハンサー領域が存在すると推測されている。JQ1 は *Il34* 遺伝子領域におけるプロモーターだけでなく、*Il34* 遺伝子に関するエンハンサーもしくはスーパーエンハンサーも阻害する可能性が考えられる。しかし、*Il34* 遺伝子におけるエンハンサー、スーパーエンハンサーの存在や *Il34* のプロモーター領域との位置関係については不明であり、この点に関してはさらなる検討が必要である。

IL-34 発現メカニズム解明において今後の課題としては 3 つの課題が残されている。まず、*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。BRAF-V600E 阻害剤に抵抗性を示すヒトメラノーマ細胞にて Runx1 が *IL34* プロモーター領域に結合し、IL-34 産生を増加させることが報告されている(Giricz *et al.*, 2018)。Runx1 は Fli1、Cdk などのいくつかの分子と複合体を形成し、複合体を形成する分子のうちには Brd4 が存在している(Gilmour *et al.*, 2018)。このことから、Runx1 複合体は Brd4 が *Il34* プロモーター領域に結合することを促進する一つの因子として推察される。

二点目としては、マウス体内の腫瘍組織においてJQ1のみでは*Il34*発現が完全に抑制できなかったことから（図12）、*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。そのために、Brd4を介さない別の転写調節因子について調べる必要があると考えられる。

最後に、Brd4はIL-34以外にも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。代表的にはc-Mycのような腫瘍化にかかわる遺伝子の転写を調節すると報告されている(Delmore *et al.*, 2011)。さらにJQ1は*in vitro*、*in vivo*両方の実験系において*TNF-α*、*Il6*、*Mcp1*などのタンパク質の産生を抑制することが知られている(Belkina and Denis, 2012)。このような性質によりJQ1は近年がん研究分野で広く検討されており、抗腫瘍効果をもたらす薬剤として期待されている化合物である(Shao *et al.*, 2014; Berenguer-Daizé *et al.*, 2016)。従って、本研究で観察されたJQ1の抗腫瘍効果は他の腫瘍関連転写因子の影響も含めた付加的な現象なのかを検討する必要がある。

第 2 章

免疫チェックポイント阻害剤抵抗性腫瘍微小環境におけるインターロイキン 34 の役割および同因子の阻害による治療効果に関する検討

緒言

近年、抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体など ICB を用いた免疫療法が開発された。免疫療法は体内における免疫を活性化させ、がんを縮小させることを目的とした治療法である。ICB は、メラノーマをはじめとしたいくつかのがんの治療法として既に使用されており、既存の治療法より高い治療効果を得られることが知られている(Lei *et al.*, 2021)。しかし、ICB に対して治療抵抗性を示す症例も多く報告されている（Postow *et al.*, 2015; Schadendorf *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017)。

がんが ICB の作用に対し治療抵抗性を獲得するメカニズムとして、腫瘍の微小環境における細胞傷害性 T 細胞の浸潤減少やインターフェロンガンマ（IFNγ）産生の減少など、様々な原因があると考えられている（Pardoll, 2012; O'Donnell *et al.*, 2017)。本研究では、腫瘍微小環境において細胞傷害性 T 細胞の免疫反応を抑制する分子と細胞の増加に着目した。腫瘍の微小環境において免疫抑制性細胞である Treg や TAM が増加することが報告されている（Li *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2020)。特に TAM が IL-10、TGF-β、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）など発現し、その増加ががん細胞の増殖、血管新生、浸潤による転移能を上昇させることが報告されている（Pollard, 2004; Condeelis and Pollard, 2006)。また TAM はアルギナーゼ（Arg）など、細胞傷害性 T 細胞の増加を阻害する因子を発現し、がんが免疫反応から回避する能力を獲得するように働く(Xiang *et al.*, 2021)。近年には TAM の役割により ICB の治療効果が低下することが報告され(Xiang *et al.*, 2021)、治療抵抗性に関する多くの研究で TAM に関係するサイトカイン及びシグナリングが注目されるようになった。

TAM 及び単球は CSF-1R を発現しており、CSF-1 が結合することで免疫抑制の性質を獲得することが報告されている（Noy and Pollard, 2014)。また、メラノーマ、肝がん、膵がんなどの様々ながんが CSF-1R の活性化により ICB に対して抵抗性を獲得することが示唆されている（Cannarile *et al.*, 2017; Gyori *et al.*, 2018; Neubert *et al.*, 2018; Quaranta *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2019)。近年、CSF-1 に続き、CSF-1R のリガンドとして IL-34 が新しく同定された（Lin *et al.*, 2008)。IL-34 の発現は、腎がんや乳がんなどの様々ながんにて予後不良と相関することが示されている（Uhlen *et al.*, 2017)。乳がん及び肝がんにおいては IL-34 発現が転移の促進に寄与していることも示唆されている(Ségaliny *et al.*, 2015; Shoji *et al.*, 2016)。以上の報告より IL-34 は様々ながん組織にて発現され、転移の促進に関係があり、予後不良と相関していることが分かった。さらに、IL-34 は DNA 損傷剤及び ICB の治療抵抗性とも関係が示唆

されている。DNA 損傷剤ドキソルビシン抵抗性肺がんにおいては IL-34 の発現が上昇するとともに、腫瘍組織にて CD163 陽性の免疫抑制性マクロファージの増加がみられた(Baghdadi *et al.*, 2016)。また ICB に抵抗性を示すメラノーマ組織にて IL-34 の発現が増加し、ともに CD163 陽性マクロファージも増加していることが観察された(Han *et al.*, 2018)。以上の報告から、IL-34 の発現が免疫抑制性マクロファージを誘導することが示唆されているが、ICB 抵抗性のがんにおいて、実際に IL-34 により分化されたマクロファージが腫瘍においてどのような働きをするかはまだ明らかになっていない。そこで本研究ではこれらの点を明らかにすることを目的とした。

以前からがんにおける CSF-1/CSF-1R の影響に関して多くの研究が行われており、CSF-1 または CSF-1R の阻害剤を用いた臨床試験が実施されている。臨床試験において阻害剤単独投与による全奏効率は 10%以下であり、パクリタキセルとの併用の全奏効率も 20%未満であった (Cannarile *et al.*, 2017)。一方、がんにおける IL-34 阻害の臨床的効果については未だ検証されていない。

そこで、ヒト腫瘍組織にて IL-34 阻害の効果を評価するために PDX モデルを用いた実験を試みた。PDX モデルは、免疫力が非常に弱く拒絶反応が起きにくい免疫不全マウス（NSG）に患者の腫瘍組織を移植する実験である。我々は本研究においてまずヒト由来の造血幹細胞（$CD34^+$）を NSG マウスに移植して免疫ヒト化マウスを作製した後、ヒト腫瘍組織を移植した。このような免疫ヒト化 PDX モデルはヒト由来の血液細胞に置換され、腫瘍のヘテロジェナイティ（不均一性）が保たているため、株化されている細胞を用いる方法より患者体内の状態と似た環境を示す。

従って、本研究はマウスモデルならびに免疫ヒト化 PDX モデルを用い、ICB に抵抗性を示す腫瘍に対して IL-34 阻害を行い、それに伴う腫瘍微小環境の変化を解析し、ICB と IL-34 阻害の併用による治療効果を評価した。

方法

マウス

BALB/c は日本エスエルシーより購入した。本研究における動物実験は北海道大学動物実験に関する規定に基づいて取り扱った（承認番号 : 14-0171）。PDX モデルに用いた超免疫不全マウス（NOD.Cg-Prkdc <scid> Il2rg <tm1Wjl>/SzJ, NSG mice）はジャクソン研究所（米国）より購入した。

細胞培養

マウス大腸がん細胞株 CT26 は北海道大学遺伝子病制御研究所免疫機能分野に供与して頂いた。マウス乳がん細胞株 4T1 は Ameican Type Culture Collection より購入した。CT26 及び 4T1 は RPMI 1640（Fujifilm）に 10% FBS（Sigma-Aldrich Japan）、1% MEM 非必須アミノ酸（Nacalai Tesque）、1% ペニシリン/ストレプトマイシン（Nacalai Tesuqe）の組成となるよう作製した培養液を用いて培養した。培養条件は 37℃、5% CO_2 である。

Il34 過剰発現細胞株の作製

マウス脳細胞より抽出した total RNA を鋳型として作製した cDNA から PCR 増幅を用いて *Il34* cDNA を獲得し、レンチウイルスベクターの pLenti-EF1a-C-Myc-DDK-IRES-Puro（OriGene）を用いてクローン化した。Lenti-X293T 細胞（Takara bio）に *Trans*IT-X2（Mirus Bio）を用いてレンチウイルス及びプラスミド pCMV-VSV-G-RSV-Rev（RIKEN BRC DNA BANK）と pCAG-HIVgp（RIKEN BRC DNA BANK）の感染を行い、三日間培養した。培養上清を回収し、野生型 CT26 及び野生型 4T1 の培養液と 1:1 の比率で混ぜて細胞培養を行った後 puromycin を用いて細胞のセレクションを行った。

Il34 ノックアウト細胞株の作製

Neon Transfection system (Thermo Fisher Scientific) を用いて IL-34 CRISPR/Cas9 KO Plasmid (m) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を野生型 CT26 及び野生型 4T1 細胞内に導入して作製した。導入 48 時間後 GFP を発現している細胞をソーティングにより分取した。

がん細胞の皮下移植

凍結保存していた CT26 もしくは 4T1 を融解して 2 日間培養を行った。細胞の皮下移植を 6～8 週齢の BALB/c マウスに対し行った。細胞は回収した後 10 µl のマト

リゲル（Corning）に 2×10^5 個の細胞が含まれるように調製した。調整した 10 µl のマトリゲルを 30 G の注射器に充填し、予め毛剃りしておいたマウスの脇腹に皮下注射した。

CT26、4T1 担がんマウスにおける抗 PD-1 抗体、抗 IL-34 抗体投与

CT26 は皮下移植後、5 日目と 12 日目にて抗 PD-1 抗体（RMP1-14）投与を行った。4T1 は皮下移植後、5、7、9、12 日目にて抗 PD-1 抗体（RMP1-14）投与を行った。抗 IL-34 抗体（C054-35）は CT26 の皮下移植後 5 日目から週に 3 回ずつ 19 日目まで投与を行った。抗 PD-1 抗体は 250 µg、抗 IL-34 抗体は 200 µg を腹腔内投与した。対照群には ChromPure Rat IgG, whole molecule（Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.）を同量で腹腔内投与した。抗 PD-1 抗体は順天堂大学医学部 八木田秀雄先任准教授に供与して頂いた。抗 IL-34 抗体は BioLegend より購入した。

凍結切片作製

凍結切片は腫瘍摘出後、組織における水分を除去して OCT コンパウンド（Sakura Finetek Japan）に泡が含まれないように包埋し、液体窒素を用いて凍結ブロックを作製した。薄切はクライオスタット（Leica）を用いて凍結ブロックから厚さ 7 µm になるように行い、スライドガラスに付着させて 22℃−26℃条件下で 1 時間乾燥を行った。

パラフィン切片作製

摘出した組織を 10%中性緩衝ホルマリン(Fujifilm)にて 24 時間固定を行い、モルフォテクノロジーにパラフィンブロック及び切片の作製を受託した。

ヘマトキシリン&エオジン（HE）染色

切片はキシレン（Fujifilm）にて 5 分間 3 回、脱パラフィンを行った。100%、90%、80%エタノール、PBS の順に各 5 分間浸水作業を行った。HE 染色は以下の手順で行った。初めに Mayer's Hematoxylin 溶液（Fujifilm）に 5 分間浸漬した。水道水にて 1 分間洗浄を行い、1% Eosin Y 溶液（Fujifilm）に 2 分間浸漬した後に 100%エタノールにて 5 分間脱水させ、キシレンにて 5 分間透徹を行った。封入はマリノール（武藤化学株式会社）を用いて行った。

免疫染色

DAB（3,3'-Diaminobenzidine、Dojindo Laboratories）を用いた PD-L1 の組織化学染色は北海道大学大学病院 ゲノム・コンパニオン診断研究部門 畑中豊特任准教授により行われた。蛍光染色は以下の手順で実施した。組織切片の凍結融解後、10%中性緩衝ホルマリン液（Fujifilm）を用いて 10 分間固定を行った。ブロッキングは 4%ブロックエース及び 2%BSA と 0.5%ヤギ血清を用いて行った。ブロッキング後の洗浄は全て 0.3% Triton X－PBS（PBS-T）を用いて行った。一次抗体の 200 倍希釈液を 4℃ にて 8－12 時間反応させた。洗浄後 22℃－26℃にて 30 分間二次抗体の 200 倍希釈液を反応させた。用いた抗体は表 2 に示す。多重染色は Opal 4-color fluorescent IHC kit（Perkin-Elmer）を用いて行った。

表 2. 免疫染色にて用いた抗体

抗体名	クローン	メーカー	カタログ番号
Anti-mouse F4/80	BM8	BioLegend	123101
Anti-mouse Arg1	D4E3M	CST	93668
Anti-mouse Nos2	Rabbit polyclonal	Abcam	Ab15323
Anti-human IL-34	1D12	Millipore	MABT493
Anti-PD-L1 (CD274)	E1L3N	CST	13684
Anti-CD45	30-F11	BioLegend	10302
HRP Goat anti-mouse IgG	Poly4053	BioLegend	405306
Purified Mouse IgG1,κ Isotype control antibody	MG1-45	BioLegend	401401
Goat anti-Mouse IgG H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 555	Polyclonal	ThermoFisher Scientific	AB_2535844

抗ヒト IL-34 抗体による IL-34 阻害能の評価

Lonza 株式会社からヒト末梢血 $CD14^+$単球（2W-400C）を購入し、RPMI 1640（Fujifilm）に 10% FBS（Sigma-Aldrich Japan）、1% MEM 非必須アミノ酸（Nacalai Tesque）、1% ペニシリン/ストレプトマイシン（Nacalai Tesuqe）の組成になるよう作製した培養液に播種した。その後 100 ng/ml の rhIL-34（BioLegend）

と阻害抗体（クローン名：E033B8、E0320E7、BioLegend）を添加して 5 日間培養し、細胞の形態及び数を顕微鏡にて観察した。培養条件は 37℃、5% CO_2 である。

PDX モデルに移植する組織の選択

株式会社 DNA Link オンラインデータベース（DNA Link：https://www.dnalink.com/pdx-about.html）にて PDX モデル組織内の IL-34 及び PD-L1 遺伝子発現を検索した。データベースにデポジットされている PDX モデル組織は Samsung Medical Center（韓国）にて手術により得られ、DNA Link にて凍結保存された組織である。PDX モデルにおける検体採取及び動物実験は Samsung Medical Center の臨床試験審査委員会の規定に基づいて取り扱った（承認番号：2018-03-110）。データベースの遺伝子発現量情報をもとに移植候補組織を二つ選別し、それぞれのパラフィン切片を用いて IL-34 及び PD-L1 の発現を免疫染色にて評価した。

免疫ヒト化マウス作製

免疫ヒト化マウス（HuNSG）の作製はジャクソン研究所（米国）にて行われた。RS-2000 放射線照射機械（Rad Source）を用いて 3 週齢の雌の NSG マウスに 140 cGy の全身放射線照射を行った。4 時間後ヒト胎児肝臓由来 CD34 陽性造血幹細胞（1×10^5 個）を移植した。12 週間後、マウスの末梢血におけるヒト CD45 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析し、25%以上の割合を示すマウスのみを免疫がヒト化されたマウスとした(Shultz *et al.*, 2005)。

PDX モデルにおける抗 PD-1 抗体及び抗 IL-34 抗体投与

PDX モデルの作製及び抗体投与、観察は DNA Link にて行われた。ヒト造血幹細胞移植より 12 週後、凍結保存された PDX 移植用組織の融解及びマウスへの皮下移植を行った。融解された組織は 1%ペニシリン/ストレプトマイシン RPMI1640 無血清培地中にて $1mm^3$ の大きさになるよう細断し、切断した組織は 13 G のトロッカー針を用いてマウスの脇腹皮下に移植した。術中、2% isoflurane（Seoul University Hospital Biomedical Research Institute）を用いてマウスに麻酔を施した。生着し、500 mm^3 まで増大した腫瘍組織のみを回収し再び別の個体に移植を施した後、すべてのマウスにおける腫瘍の大きさが 70—120 mm^3 に達した時点より抗体の腹腔内投与を開始した。Pembrolizumab（抗 PD-1 抗体、Selleckchem）は初回に 10 mg /kg、その後は 5 mg/kg を 5 日毎に投与した。抗 IL-34 抗体は 12.5 mg/kg を週

に 3 回、4 週間投与した。対照群には生理食塩水（Sigma Aldrich）を週に 3 回、実験終了時まで腹腔内投与した。

統計解析

統計学的有意性は JMP14®（SAS Institute Inc.）を用いて以下の方法にて検討した。比較対象が 2 群の場合 Student's *t*-test にて 2 群間の平均値の差の検定を実施した。比較対象が 3 群以上の場合は Tukey's multiple comparison test 及び Steel-Dwass nonparametric multiple comparison test にて多群間群間の平均値の差の検定を実施した。本研究における有意水準は 5%とし、p 値が 5%を下回る場合に統計学的に有意差ありと判断した。各図内には、$p<0.05$ の場合にアスタリスク（*）を付与した。

結果

ICB 抵抗性がん組織における組織学的解析

当研究室の先行研究にてマウス大腸がん細胞株 CT26 及びマウス乳がん細胞株 4T1 それぞれの *Il34*^{KO} 細胞株が作製されている。また CT26 では IL-34 発現ベクターの導入により IL-34 を過剰に発現する *Il34*^{OE} 株も樹立されている。以下のことは当研究室の主に小林、北川により明らかになったことである。作製されていた細胞株をマウスの皮下に移植し、抗 PD-1 抗体投与の効果を評価した結果、*Il34*^{OE} 細胞移植群（*Il34*^{OE}）と比較し、*Il34*^{KO} 細胞移植群（*Il34*^{KO}）で腫瘍サイズが有意に減少した。また各腫瘍組織から抽出した total RNA をサンプルとした NGS 解析の結果から、抗腫瘍効果があった群（*Il34*^{KO}）ではリンパ球マーカー *Cd3e*、*Cd4*、*Cd8a* の遺伝子発現及び、炎症性サイトカインマーカー *Tnfa*、*Ifng*、*Cxcl9* の発現と炎症性マクロファージマーカー *Cd86*、*Ciita*、*Nos2* の遺伝子発現上昇が観察された。(Hama *et al.*, 2020)。

これらの先行研究から治療効果が示された腫瘍内では免疫細胞の浸潤が亢進していると考えられたため、組織内構造および免疫細胞の浸潤度と浸潤細胞の性質を組織学的に評価した。はじめに抗 PD-1 抗体を投与した CT26 腫瘍組織における HE 染色を行った結果、*Il34*^{KO}群にてリンパ球様細胞の浸潤及び腫瘍組織の壊死を示唆する膠原繊維が観察された（図 13）。一方このような現象は *Il34*^{OE}群では観察されなかった（図 13）。

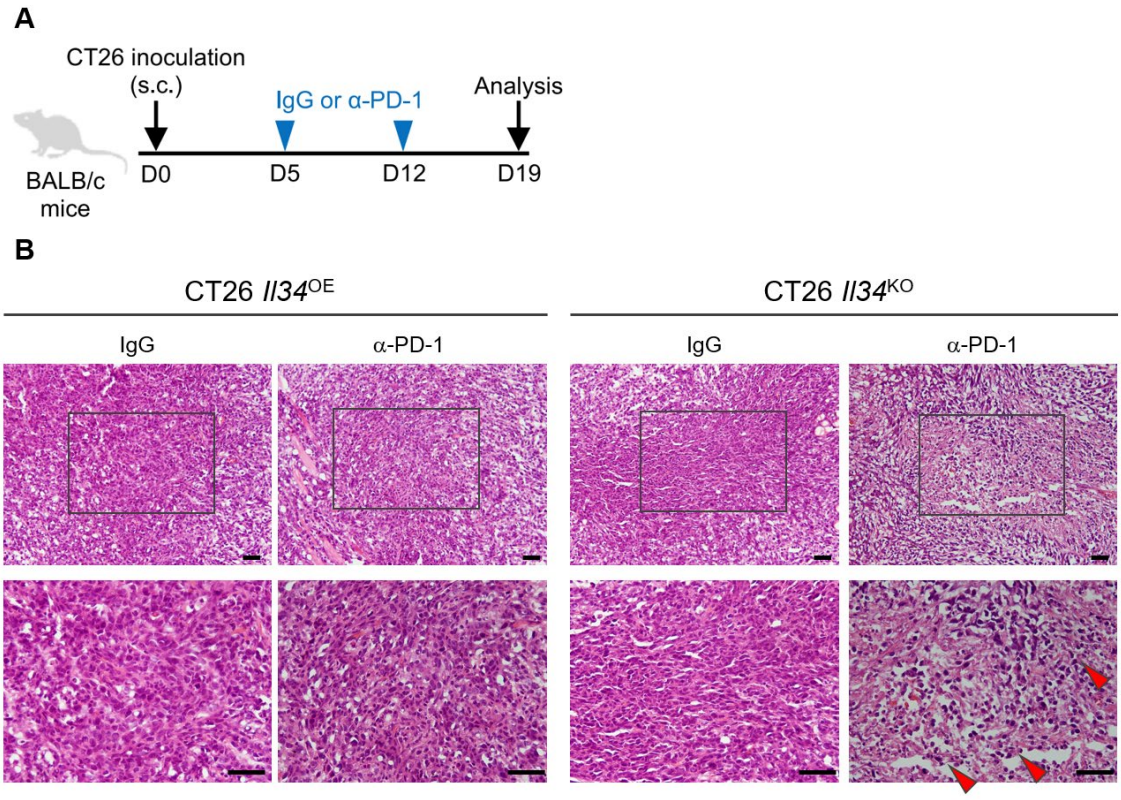

図 13.　*Il34*^{OE}及び *Il34*^{KO} CT26 における HE 染色図

（A）*Il34*^{OE}及び *Il34*^{KO} CT26 の皮下移植及び抗 PD-1 抗体、コントロール抗体投与のスケジュール

（B）下の画像は上段の画像（黒四角）の拡大図である。赤い三角は浸潤しているリンパ球を示している。Scale bar: 100 μm

IL-34 がマクロファージを免疫抑制性サブセットに分化させるという報告 (Foucher *et al.*, 2013; Baghdadi *et al.*, 2016; Boulakirba *et al.*, 2018) から、腫瘍組織に浸潤するマクロファージの性質をマクロファージマーカーF4/80 と炎症性マーカーNos2 もしくは抗炎症性マーカーArg1 の蛍光免疫染色法（共染色）で評価した。抗 PD-1 抗体投与後の *Il34*^{OE} 群と *Il34*^{KO} 群における F4/80 陽性細胞の数に差はなかったが（図 14A、C）、F4/80 陽性細胞中 Nos2 陽性細胞は *Il34*^{KO} 群にて多く観察された（図 14B）。一方、F4/80 陽性細胞中の Arg1 陽性細胞数には差は認められなかった（図 14D）。

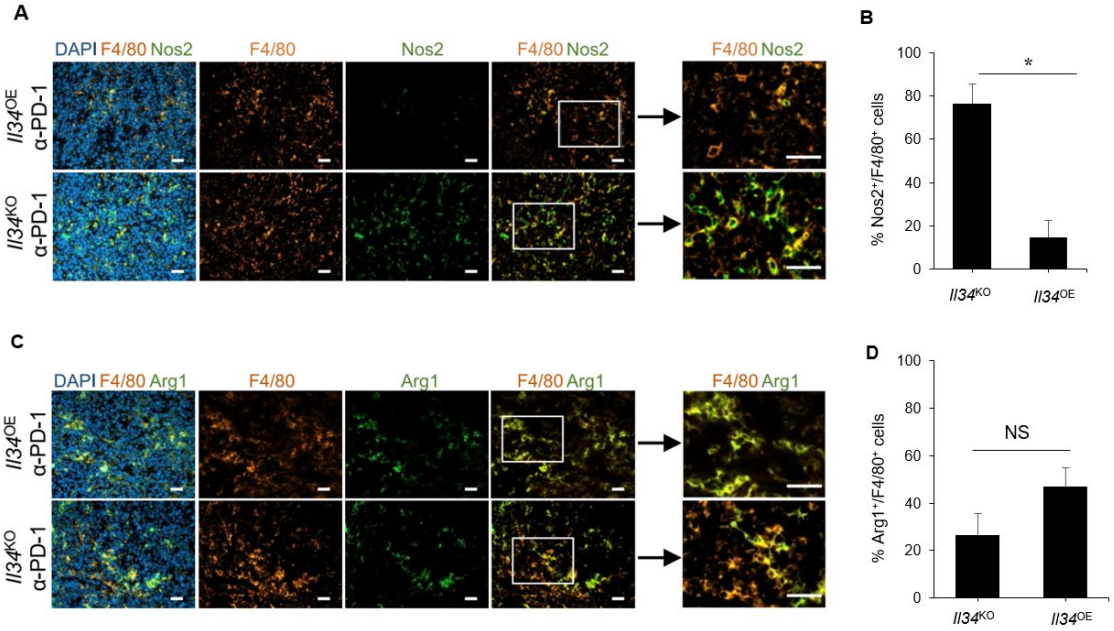

図 14. *Il34*^{OE} 及び *Il34*^{KO} CT26 における蛍光免疫染色図

（A）F4/80 及び Nos2 の蛍光免疫染色図。対照染色は DAPI で細胞核を染色した（青）。Scale bar: 20 μm

（B）免疫染色図における F4/80 陽性細胞中の Nos2 陽性細胞の数を定量化した（n = 7）。*$p < 0.05$; Student's t-test. エラーバーは SEM

（C）F4/80 及び Arg1 の蛍光免疫染色図。対照染色は DAPI で細胞核を染色した（青）。Scale bar: 20 μm

（D）免疫染色図における F4/80 陽性細胞中の Arg1 陽性細胞の数を定量化した（n = 7）。NS, not significant. エラーバーは SEM

同様に 4T1 細胞株に関しても蛍光免疫染色法にて分析を行った。Mock 群及び *Il34*^{KO} 群における腫瘍内の観察結果は CT26 細胞株を用いた実験（図 14）と一致した。*Il34*^{KO} 群にて F4/80 陽性細胞中 Nos2 陽性細胞が多く観察され、F4/80 陽性細胞中の Arg1 陽性細胞数に大きな差は観察されなかった（図 15）。

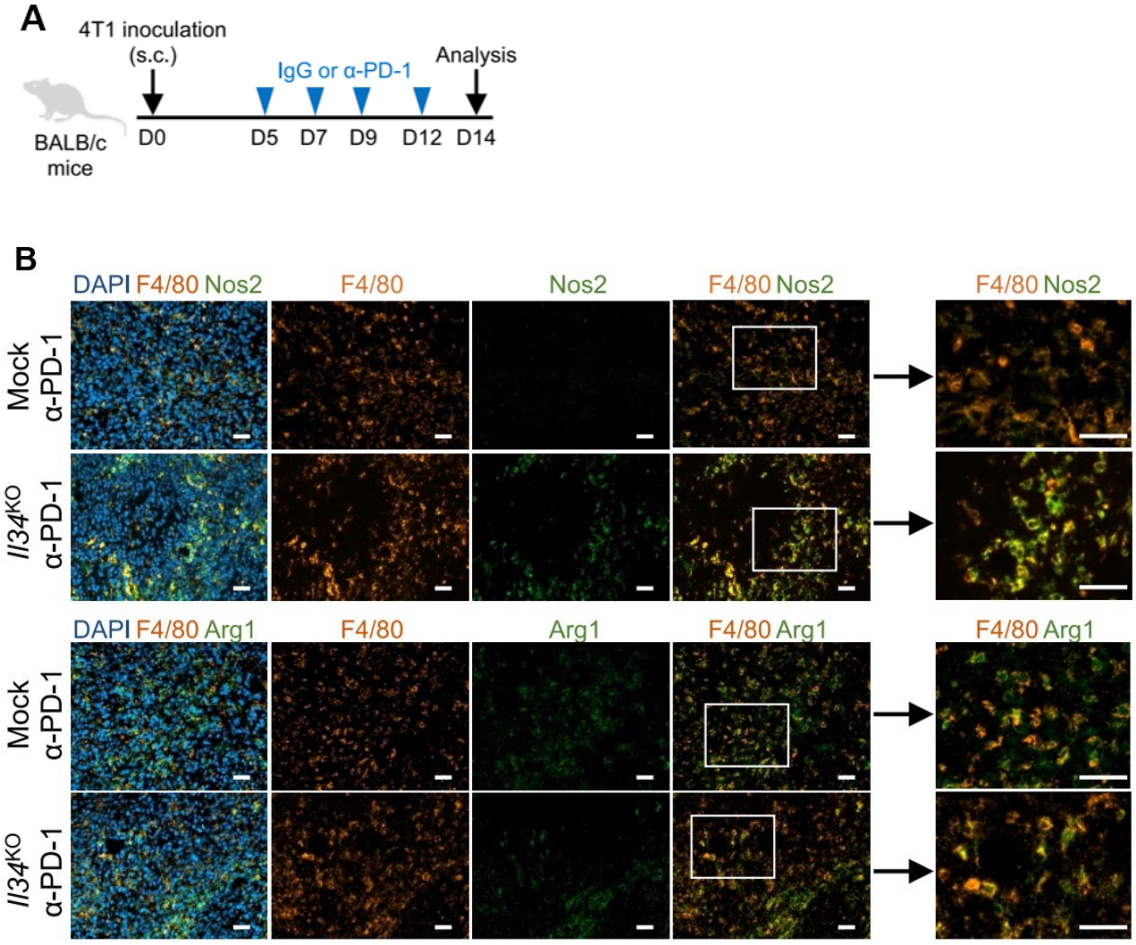

図 15. Mock 及び *Il34*^{KO} 4T1 における蛍光免疫染色図

（A）Mock 及び *Il34*^{KO} 4T1 の皮下移植及び抗 PD-1 抗体、コントロール抗体投与のスケジュール

（B）F4/80 及び Nos2 の蛍光免疫染色図（上）、F4/80 及び Arg1 の蛍光免疫染色図（下）、対照染色は DAPI で細胞核を染色した（青）。Scale bar: 20 μm

IL-34 発現腫瘍組織では炎症性マクロファージの数が減少し、相対的に抗炎症性マクロファージの発現が増加したため、エフェクターT 細胞の活性化が低下したと考えられる。次に CT26 の *Il34*^{KO} 群と *Il34*^{OE} 群に抗 PD-1 抗体を投与したものと、*Il34*^{OE} 群に抗 PD-1 及び抗 IL-34 抗体を併用投与した群（*Il34*^{OE} の併用群）に対して HE 染色法を用いて組織学的な分析を行った。*Il34*^{KO} 群にて多数のリンパ球様細胞の浸潤及び壊死部分が観察されたが、*Il34*^{OE} 群では観察されなかった。一方、*Il34*^{OE} の併用群では *Il34*^{KO} 群と同様に壊死部分が観察された（図 16）。

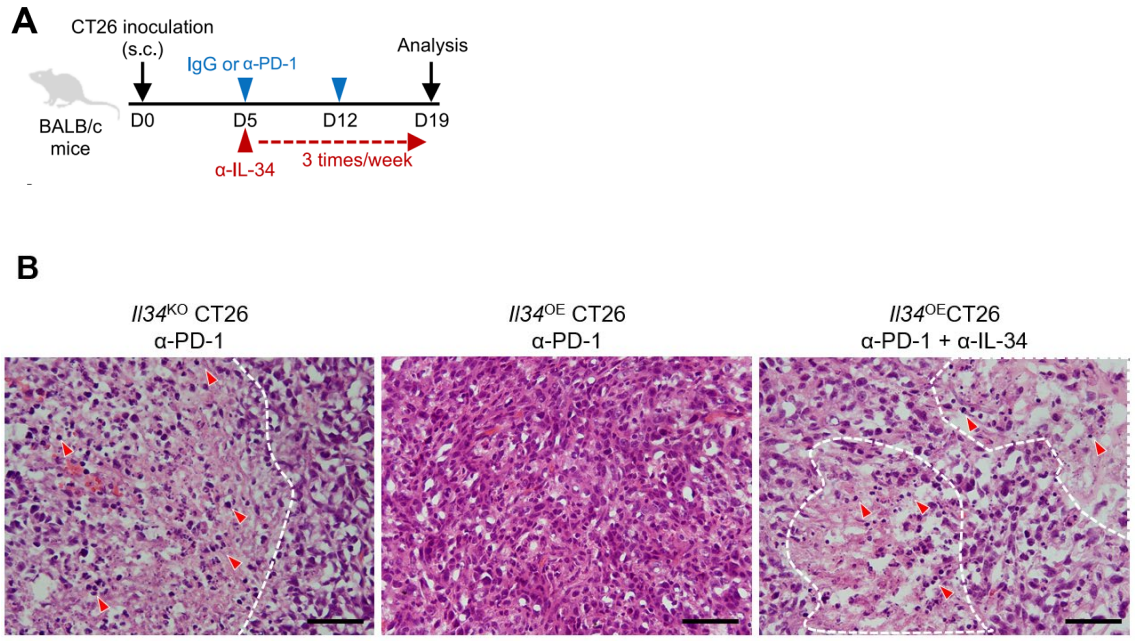

図 16.　抗 PD-1 及び抗 IL-34 抗体の併用投与後組織における HE 染色図

（A）*Il34*^{KO} 及び *Il34*^{OE} CT26 の皮下移植後、抗 PD-1 及び抗 IL-34 抗体投与のスケジュール

（B）赤い三角は浸潤しているリンパ球を示している。がん細胞とリンパ球浸潤部分の境界を白い点線で示している。Scale bar: 100 μm

続いて免疫染色法を用いて腫瘍組織における CD45、F4/80、Nos2 の発現を検証した。*Il34*^{OE}群では観察されなかった Nos2 発現が *Il34*^{KO}群と *Il34*^{OE}の併用群にて観察された（図 17A）。得られた染色像における $CD45^+$ $F4/80^+$ $Nos2^+$細胞の数を測定した結果、*Il34*^{OE}群にて有意に減少していた（図 17B）。このことから IL-34 がマクロファージの Nos2 発現を抑制し、ICB に対する治療抵抗性を誘導する可能性が示唆された。

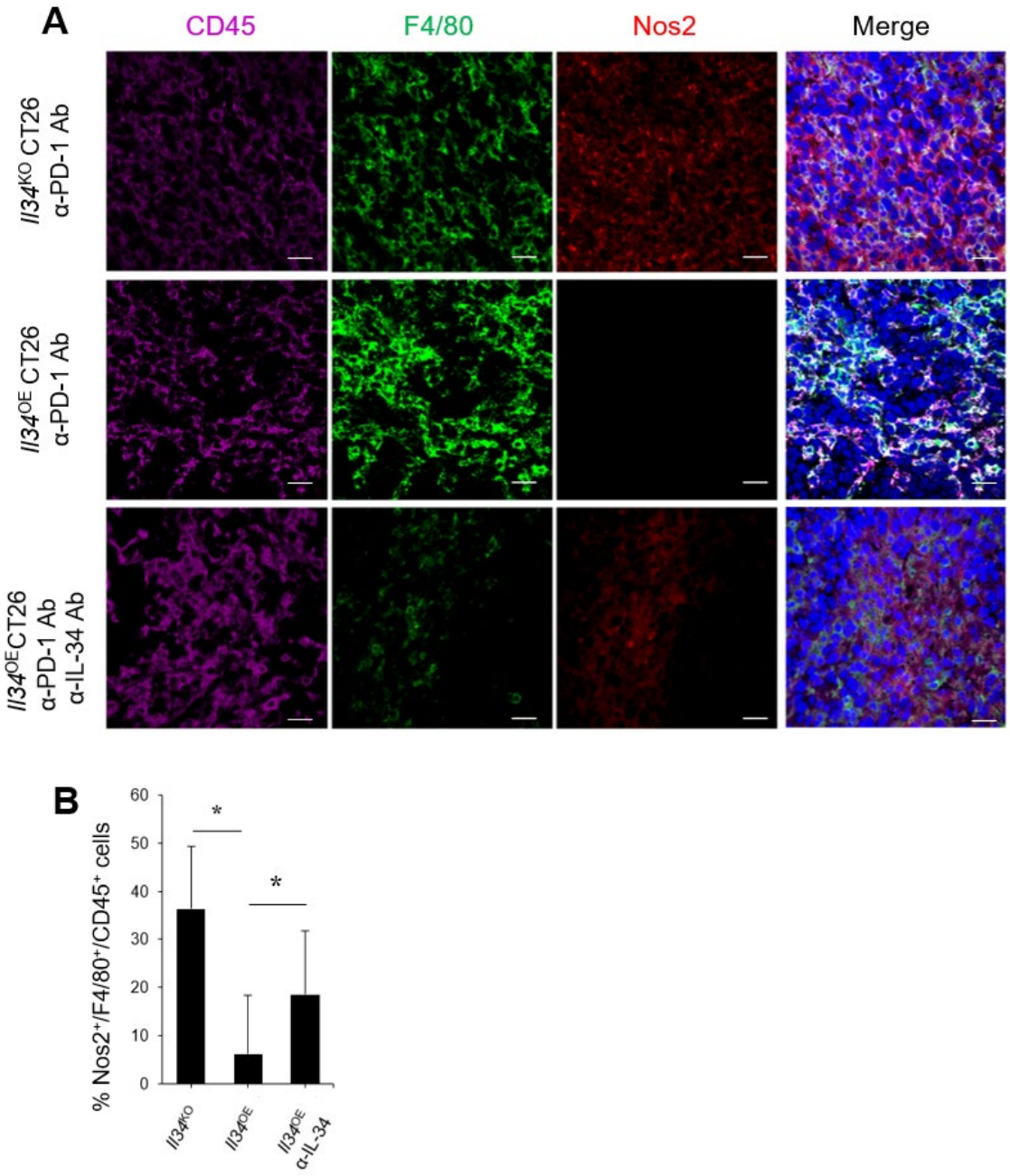

図 17. IL-34 阻害によるマクロファージ性質の変化

（A）Merge は CD45、F4/80、Nos2 の画像を合わせた。対照染色は DAPI で細胞核を染色した（青）。Scale bar: 20 μm

（B）一視野における $CD45^+F4/80^+Nos2^+$細胞の割合に対する検討。$^*p < 0.05$; Tukey's multiple comparison test. エラーバーは SEM

PDX モデルを用いた IL-34 の役割の解析

ヒトにおいても抗 PD-1 及び抗 IL-34 抗体の併用療法により抗腫瘍効果が得られるかを検証するために PDX モデルを用いて解析した。PDX モデルを用いた検討は、阻害効果を有する抗ヒト IL-34 抗体選定、IL-34 陽性腫瘍組織の選定、マウスへの腫瘍組織の移植、そして IL-34 併用療法の治療効果評価の 4 段階で実験を行った（図 18）。

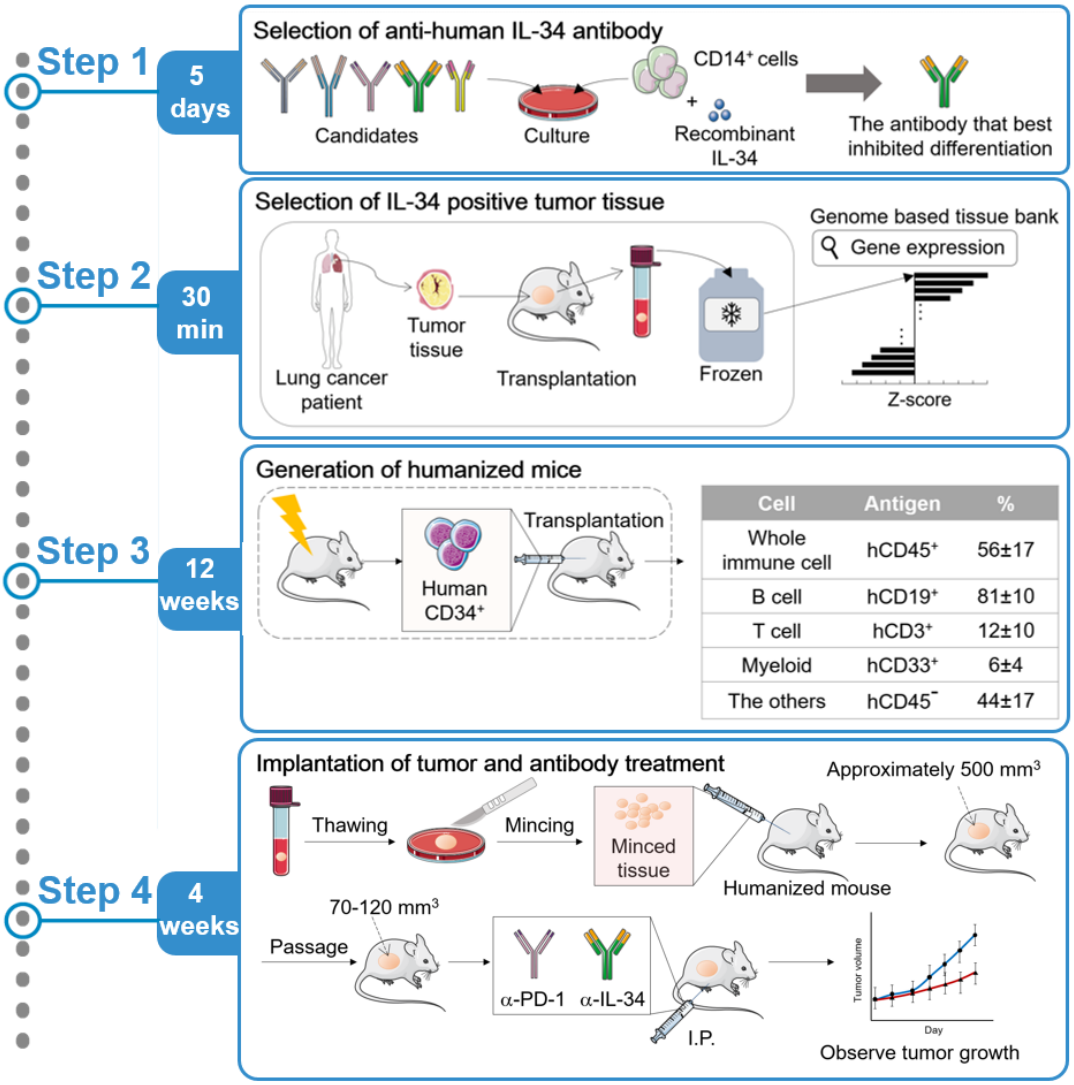

図 18.　PDX モデルを用いた阻害実験の概要図

まず阻害効果を有するヒト IL-34 抗体選定のために非蛍光標識抗体を探索し、候補抗体を 2 つ選定した。次に、ヒト末梢血から単離された CD14 陽性細胞を rhIL-34 および各候補抗体の存在下にて 5 日間培養し、細胞の数及び形態を観察した。rhIL-34 を添加した培養細胞では、培地のみで培養を行った細胞に比べ、細胞数の増加及び紡錘状の形態を示す細胞が観察された（図 19）。抗 IL-34 抗体である E0320E7 と E033B8 を添加した培養条件下においては紡錘状の細胞は観察されなかったことから、両抗体に IL-34 阻害作用があると判断した。E033B8 において光沢が少なく、細胞の表面が収縮している死細胞が多く観察された。E0320E7 より E033B8 の方が rhIL-34 を阻害する能力が高いと考え、E033B8 を PDX モデルマウスに投与する阻害抗体として選択した。

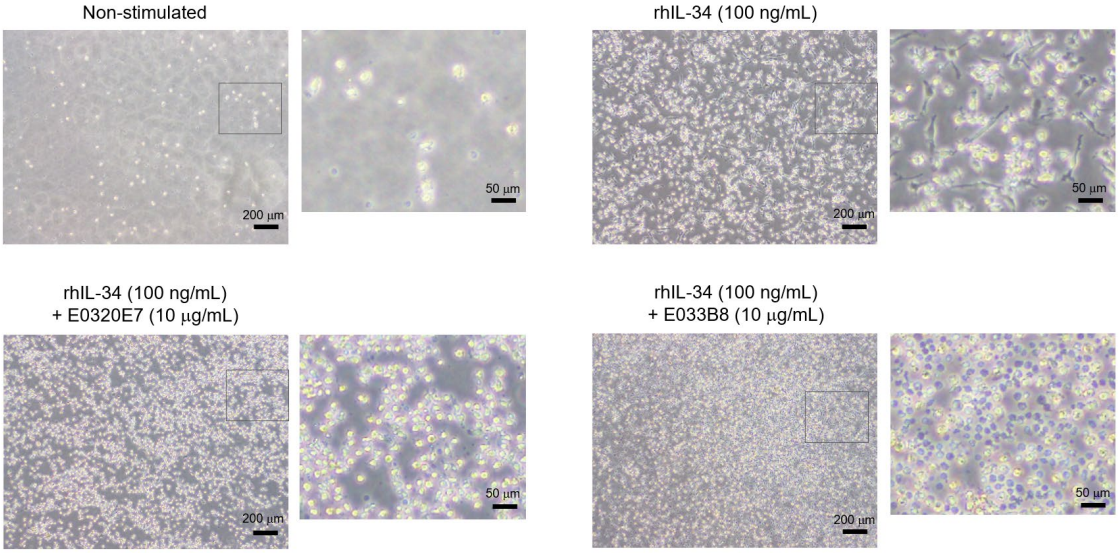

図 19. 抗 IL-34 抗体の阻害能の評価

ヒト末梢血由来 CD14 陽性培養細胞の様子。培地のみで培養した細胞（左上、Non-stimulated）、rhIL-34 のみ添加した細胞（右上）、rhIL-34 と抗 IL-34 抗体 E0320E7 を添加した細胞（左下）、rhIL-34 と抗 IL-34 抗体 E033B8 を添加した細胞（右下）。Scale bars：200 µm（左）、50 µm（右）

次に、ICB（抗 PD-1 抗体）と IL-34 阻害の併用療法による治療効果を評価するのに適切な腫瘍組織を選定するために株式会社 DNA Link のデータベースを調査した。ここで利用した DNA Link のデータベースはすでに PDX モデルとして確立された 264 個の組織の情報を保有しており、特定の遺伝子の発現量を調べることが可能である。我々は *IL34* と *CD274*（PD-L1）の遺伝子発現を検索し、両方の遺伝子がともに発現している上位２つの PDX に着目した（表 3)。

表 3. DNA LINK のデータベースにおける遺伝子発現量

Model ID	Primary Site	PDX Pathology	Tumor Site	Tumor Type	Genes expression	
					IL34	***CD274***
LU-TM-0007	Lung	Adenocarcinoma	Lung	Primary	13.575	29.841
LU-TM-0112	Lung	Squamous cell carcinoma	Lung	Primary	29.883	0.503

表 3 に示した組織にて免疫染色を行った結果、2 つの組織はともに IL-34 をタンパク質レベルで発現していた。特に LU-TM-0112 にて IL-34 発現が多く検出されたが PD-L1 の発現が少ないことから適切でないと判断し、LU-TM-0007 を抗 PD-1 抗体治療と IL-34 阻害による併用療法の評価に用いることとした（図 20）。

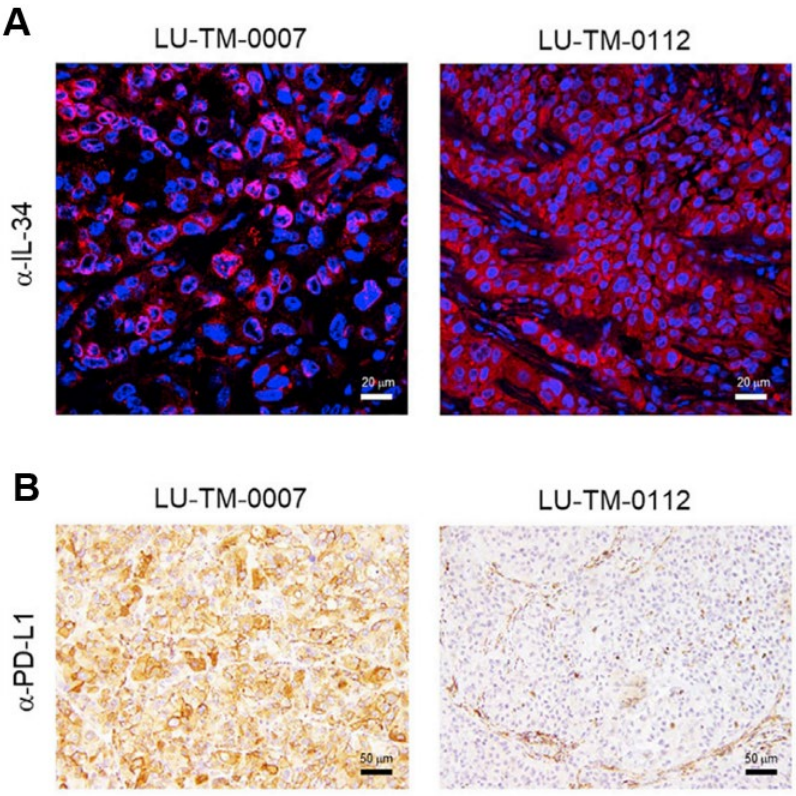

図 20. PDX モデルヒトがん組織における IL-34 発現量の評価

（A）LU-TM-0007 及び LU-TM-0112 の IL-34 に対する蛍光免疫染色図。IL-34 は赤で示しており、核は青で示している。Scale bar: 20 μm

（B）LU-TM-0007 及び LU-TM-0112 の PD-L1 に対する免疫組織化学染色図。PD-L1 は茶色で示しており、核は紫で示している。Scale bar: 50 μm

次に、実験方法の「免疫ヒト化マウス作製」に記したように免疫不全マウスにヒトのヒト胎児肝臓由来 CD34 陽性造血幹細胞を静注し生着させた免疫ヒト化マウスに対し、LU-TM-0007 を移植して PDX モデルを作製した。腫瘍サイズが 70-120 mm^3 に達した時点から Pembrolizumab（抗 PD-1 抗体、α-PD-1）及び E033B8（抗 IL-34 抗体、α-IL-34）を腹腔内に投与した（図 21A）。28 日間観察し体重と腫瘍の大きさを測定した。抗体投与による体重変化は観察されなかった（図 21B）。腫瘍サイズは、pembrolizumab と E033B8 の併用（α-PD-1 + α-IL-34）群にて最も小さい平均値が示された。しかし、各抗体単剤投与群に比し併用群で有意な低下は認められなかった（図 21C）。

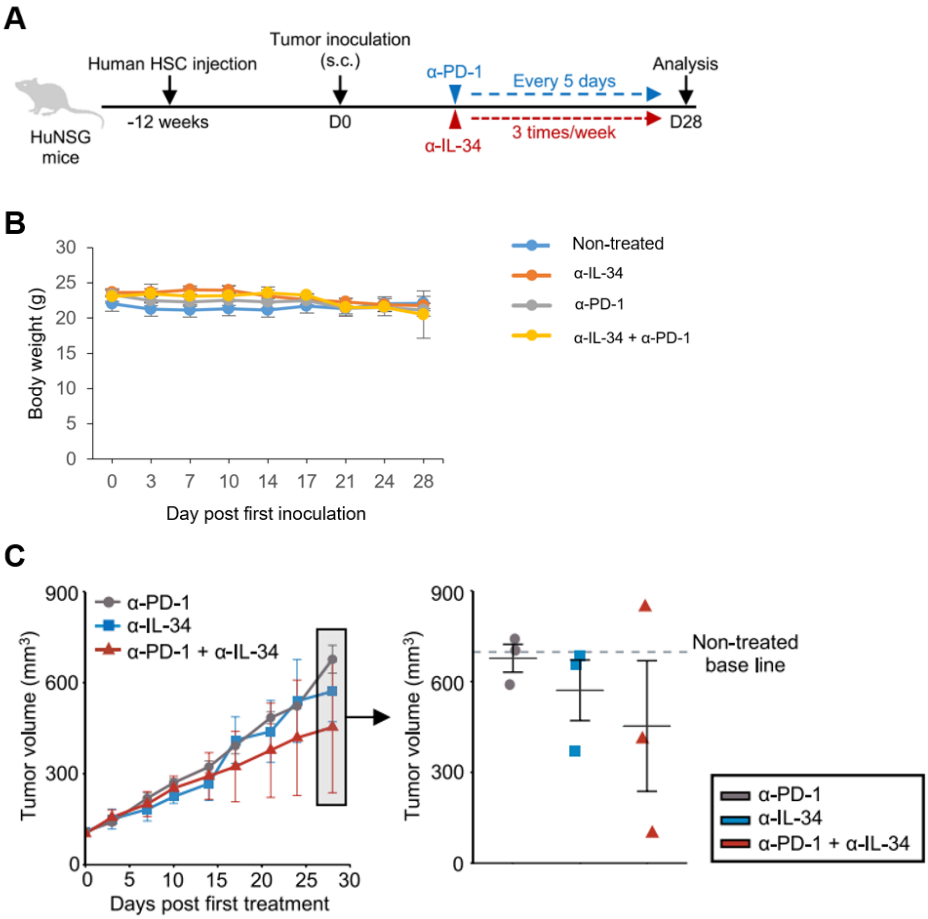

図 21. ICB 治療 PDX モデルにおける IL-34 阻害効果に対する評価

（A）LU-TM-0007 が移植された PDX モデルにおける pembrolizumab（α-PD-1）及び E033B8（α-IL-34）投与のスケジュール

（B）α-PD-1 及び α-IL-34 投与開始日からの体重（n = 3、Non-treated mouse は n = 1）

（C）α-PD-1 及び α-IL-34 投与開始日からの腫瘍の大きさ（n = 3）。Non-treated mouse の大きさを点線で示した（n = 1）。

各腫瘍を摘出して比較を行った。α-PD-1 + α-IL-34 群において一つの腫瘍は他に比べて非常に小さく、もう一つは液状化していることが観察された（腫瘍サイズの測定では中間値を示した腫瘍）。液状化した腫瘍は回収できなかった（図 22）。

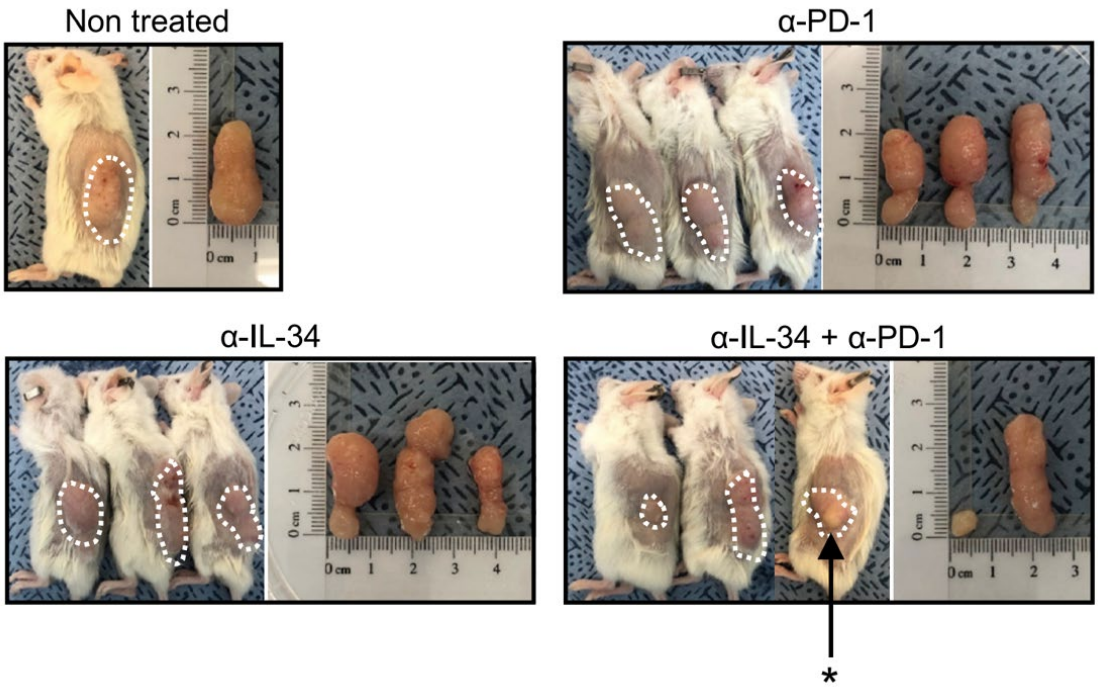

図 22. Pembrolizumab 及び E033B8 の投与開始から 28 日目に観察した様子
液状化している腫瘍をアスタリスク（*）で示している。

HE 染色法にて各個体の腫瘍における組織学的解析を行った。α-PD-1 + α-IL-34 群のうち、大きさが最も小さかった組織にてリンパ球様細胞が観察された（図 23）。このことから抗 PD-1 及び抗 IL-34 抗体の併用投与によりリンパ球の浸潤が促進することが示唆された。以上により、ヒトにおいて ICB に加え抗 IL-34 抗体の併用投与が ICB 抵抗性がんにおいて治療効果を上昇させる可能性が示唆された。

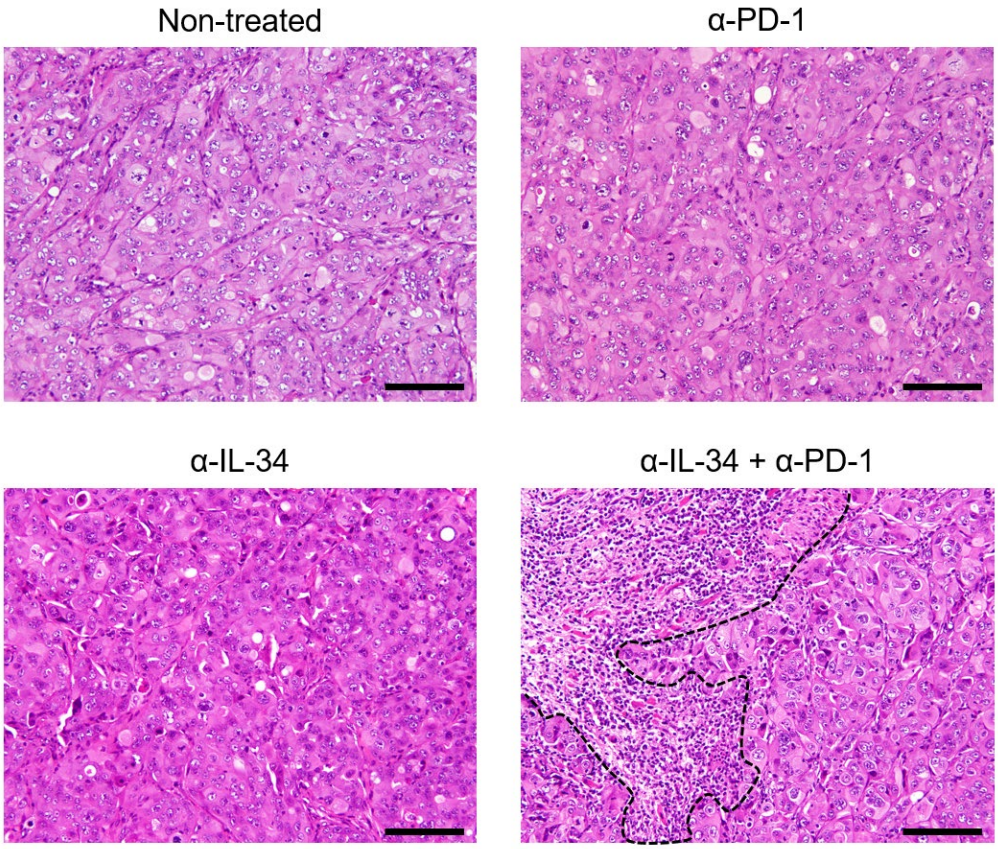

図 23. ICB 及び IL-34 阻害併用 PDX モデル組織の HE 染色図

皮下移植後 28 日目の腫瘍に対する HE 染色図。リンパ球の浸潤とがん細胞の境界を黒い点線で示している（右下）。Scale bar: 100 μm

考察

本研究では、IL-34 が ICB に対する抵抗性を誘導するメカニズムについて検証した。マウス大腸がん細胞株 CT26 担がんマウスにおいて、抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体投与による治療効果は報告されている（Jure-Kunkel *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2019）。しかし *Il34* を強制発現させた CT26 担がんマウスでは抗 PD-1 抗体の治療に対して抵抗性を示す(Hama *et al.*, 2020)。恒常的に IL-34 を発現する 4T1 担がんマウスにおいては抗 PD-1 抗体投与に対して抵抗性を示すことがすでに報告されている(De Henau *et al.*, 2016)。本研究においてこれらのメカニズムを組織学的に解析した結果、腫瘍組織内に存在しているマクロファージ（$F4/80^+$）の数に変化は認められなかったが、マクロファージの性質に変化が生じていることが観察された。IL-34 と Nos2 陽性マクロファージの関係については、急性腎障害モデルの IL-34 欠損マウスの腎臓において Nos2 陽性（$Nos2^+$）マクロファージが減少することが報告されている（Baek *et al.*, 2015)。一方で、マウス大腸がん細胞株 MC38 担がんマウスにおいては、抗 IL-34 抗体の単独投与を行っても $Nos2^+$ マクロファージ数の変化はないことが報告されている（Lin *et al.*, 2019)。しかし、ICB を用いた腫瘍モデルにおける IL-34 と Nos2 に関しては未だ報告されておらず、本研究で得られた結果が初めての報告である。

Arg1 陽性（$Arg1^+$）マクロファージは T 細胞の代謝抑制を通じた免疫抑制能を有することが知られている（Chen *et al.*, 2019)。そのために、腫瘍において $Arg1^+$ マクロファージが増加し、ICB に対して抵抗性を誘導しているのではないかと推測した。しかし、ICB 抵抗性腫瘍において $Arg1^+$ マクロファージ数の増加は観察されなかった（図 14、15)。この結果から、腫瘍組織における $Nos2^+$ マクロファージや $Arg1^+$ マクロファージの数より、各細胞種の存在比率のバランスが重要であると推察した。

以前の報告から、IL-34 が腫瘍の増殖、転移、血管新生、治療抵抗性を誘導することが示唆されており（Jones *et al.*, 2016; Chen, Tan and Wang, 2018)、中和抗体を用いた IL-34 阻害による治療効果が期待された。本研究では初めて PDX モデルを用いてヒト肺がん組織における ICB と IL-34 阻害併用の治療効果を検討した。実験サンプル数に限りがあり統計学的な有意差は見られなかったが、抗 PD-1 抗体治療に抗 IL-34 抗体の治療を追加した方が抗腫瘍効果が高まることが示唆された。特に、α-PD-1 + α-IL-34 群の縮小していた腫瘍組織においてリンパ球の浸潤が認められたこ

とから、CT26 担がんマウスの腫瘍組織において IL-34 阻害によりリンパ球浸潤が観察されたように、抗腫瘍免疫応答が増強されたことが示唆された。

抗 PD-1 抗体と抗 IL-34 抗体の併用時の IL-34 阻害による抗腫瘍効果は、がん免疫においてがん抗原特異的に免疫反応が起きる免疫原性の活性化によるものである可能性が考えられる。免疫サイクルは以下の 4 段階にて構成される（Zhou *et al.*, 2019)。死滅したがん細胞からダメージ関連分子パターン（DAMPs）とがん抗原が放出される。未成熟な樹状細胞ががん抗原の刺激を受けて成熟な樹状細胞へ分化する。成熟な樹状細胞はリンパ節において CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化させる。活性化された T 細胞はがん抗原特異的に攻撃を行う。このうち IL-34 が関与しうる段階は、樹状細胞が成熟する段階である。樹状細胞の前駆細胞が CSF-1R を発現していることは報告されているが（Fogg *et al.*, 2006; Waskow *et al.*, 2008)、その発現は骨髄内に限られる。マクロファージは樹状細胞と同様に抗原提示能を有しているが、IL-34 が作用することで分化したマクロファージは T 細胞を活性化させる能力が低いと推察される。一方、抗 IL-34 抗体の単独投与のみでは治療効果が得られなかった原因として、免疫サイクルの最初の段階において死滅するがん細胞がないために、DAMPs とがん抗原が抗原提示細胞に伝わっていないと推察される。

以上、ICB を用いた免疫治療における IL-34 の治療抵抗性の誘導メカニズムの解析を行なった。ヒト免疫系においても IL-34 阻害が免疫治療効果を高める可能性が示唆された。

結論

本研究全体から得られた新知見

（第 1 章）

- Brd4 は *Il34* 遺伝子の転写調節因子の一つであり、Brd4 はエクソン 1 領域に結合する。
- JQ1 は Brd4 の *Il34* 遺伝子への結合を阻害する。
- JQ1 の投与より IL-34 を発現する腫瘍の成長が低下する。

（第 2 章）

- IL-34 を発現する腫瘍組織にて Nos2 陽性マクロファージの浸潤が減少している。
- 免疫ヒト化 PDX モデルにおいて免疫チェックポイント阻害と IL-34 阻害を併用した場合、抗 PD-1 もしくは抗 IL-34 抗体を単独で投与した群では観察されなかったリンパ球の浸潤や腫瘍組織の縮小が起きる。

新知見の意義

JQ1 は *Il34* 遺伝子発現を抑制して抗腫瘍効果を示す化合物であり、JQ1 は新規治療として有用である可能性がある。

担がんマウス及び免疫ヒト化 PDX モデルを用い、腫瘍成長における IL-34 の阻害効果を初めて検討し、がん治療法としての可能性を提示した。

新知見から今後どのような研究が展開されうるか

JQ1 以外にも IL-34 発現を調節する低分子化合物を探索し、抗腫瘍効果に対する検討が展開されうる。

ICB 以外の DNA 損傷剤や放射線照射による治療法においても IL-34 により治療抵抗性が誘導されるかを検討し、新規治療法として IL-34 阻害が効果を有するかといった研究が展開されうる。

今後の課題

Runx1 や NF-κB のような転写因子の動きによる *Il34* 発現誘導について明らかにする必要がある。*Il34* 発現を調節する Brd4 以外の転写調節因子の存在に対して検討する必要がある。JQ1 による抗腫瘍効果は IL-34 の阻害によるものか検討する必要がある。

IL-34 阻害効果は T 細胞の抗腫瘍反応を随伴する場合のみ観察されたため、T 細胞と IL-34 の相互作用を明らかにする必要がある。

謝辞

本研究の遂行にあたり、機会を与えて下さいました北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門免疫生物分野 清野研一郎教授に深甚なる謝意を申し上げます。また、様々な多大なるご指導を頂きました同所属 和田はるか准教授およびムハンマド・バグダーディー講師に深く御礼を申し上げます。また、ご協力を頂きました北海道大学大学病院 ゲノム・コンパニオン診断研究部門畑中豊特任准教授、DNA LINK Heekyung Lee 博士、Hwanseok Lee 博士、Hye Yoon Jang、横浜市立大学大学院医学研究科　分子生物学分野　高橋秀尚教授、および北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門免疫生物分野の皆様に感謝いたします。

利益相反

この研究内容に関する利益相反事項はありません。

引用文献

Baek, J.H., Zeng, R., Weinmann-Menke, J., Valerius, M.T., Wada, Y., Ajay, A.K., Colonna, M., and Kelley, V.R. (2015). IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease. J. Clin. Invest. *125*, 3198–3214.

Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T., and Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. Cell Commun. Signal. 2020 181 *18*, 1–19.

Baghdadi, M., Wada, H., Nakanishi, S., Abe, H., Han, N., Wira, E.P., Endo, D., Watari, H., Sakuragi, N., Hida, Y., et al. (2016). Chemotherapy-induced IL34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells. Cancer Res. *76*, 6030–6042.

Baghdadi, M., Endo, H., Tanaka, Y., Wada, H., and Seino, K. ichiro (2017). Interleukin 34, from pathogenesis to clinical applications. Cytokine *99*, 139–147.

Barrett, T., Suzek, T.O., Troup, D.B., Wilhite, S.E., Ngau, W.C., Ledoux, P., Rudnev, D., Lash, A.E., Fujibuchi, W., and Edgar, R. (2005). NCBI GEO: mining millions of expression profiles--database and tools. Nucleic Acids Res. *33*.

Belkina, A.C., and Denis, G. V. (2012). BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. Nat. Rev. Cancer *12*, 465–477.

Berenguer-Daizé, C., Astorgues-Xerri, L., Odore, E., Cayol, M., Cvitkovic, E., Noel, K., Bekradda, M., MacKenzie, S., Rezai, K., Lokiec, F., et al. (2016). OTX015 (MK-8628), a novel BET inhibitor, displays in vitro and in vivo antitumor effects alone and in combination with conventional therapies in glioblastoma models. Int. J. Cancer *139*, 2047–2055.

Boulakirba, S., Pfeifer, A., Mhaidly, R., Obba, S., Goulard, M., Schmitt, T., Chaintreuil, P., Calleja, A., Furstoss, N., Orange, F., et al. (2018). IL-34 and CSF-1 display an equivalent macrophage differentiation ability but a different

polarization potential. Sci. Reports 2018 81 *8*, 1–11.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA. Cancer J. Clin. *68*, 394–424.

Cannarile, M.A., Weisser, M., Jacob, W., Jegg, A.M., Ries, C.H., and Rüttinger, D. (2017). Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. J. Immunother. Cancer *5*, 1–13.

Chaudhary, B., and Elkord, E. (2016). Regulatory T cells in the tumor microenvironment and cancer progression: Role and therapeutic targeting. Vaccines *4*.

Chen, Y., Tan, W., and Wang, C. (2018). Tumor-associated macrophage-derived cytokines enhance cancer stem-like characteristics through epithelial–mesenchymal transition. Onco. Targets. Ther. *11*, 3817–3826.

Chen, Y., Song, Y., Du, W., Gong, L., Chang, H., and Zou, Z. (2019). Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. J. Biomed. Sci. 2019 261 *26*, 1–13.

Cioce, M., Canino, C., Goparaju, C., Yang, H., Carbone, M., and Pass, H.I. (2014). Autocrine CSF-1R signaling drives mesothelioma chemoresistance via AKT activation. Cell Death Dis. *5*.

Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. Cell *124*, 263–266.

Cotechini, T., Medler, T.R., and Coussens, L.M. (2015). Myeloid Cells as Targets for Therapy in Solid Tumors. Cancer J. *21*, 343.

Cunningham, F., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, J., Amode, M.R., Armean, I.M., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., et al. (2019). Ensembl 2019. Nucleic

Acids Res. *47*, D745–D751.

Dai, X.M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., and Stanley, E.R. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. Blood *99*, 111–120.

Davidov, V., Jensen, G., Mai, S., Chen, S.-H., and Pan, P.-Y. (2020). Analyzing One Cell at a TIME: Analysis of Myeloid Cell Contributions in the Tumor Immune Microenvironment. Front. Immunol. *0*, 1842.

Delmore, J.E., Issa, G.C., Lemieux, M.E., Rahl, P.B., Shi, J., Jacobs, H.M., Kastritis, E., Gilpatrick, T., Paranal, R.M., Qi, J., et al. (2011). BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. Cell *146*, 904–917.

Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W.B., Fedorov, O., Morse, E.M., Keates, T., Hickman, T.T., Felletar, I., et al. (2010). Selective inhibition of BET bromodomains. Nat. 2010 4687327 *468*, 1067–1073.

Fiskus, W., Sharma, S., Qi, J., Valenta, J.A., Schaub, L.J., Shah, B., Peth, K., Portier, B.P., Rodriguez, M., Devaraj, S.G.T., et al. (2014). Highly Active Combination of BRD4 Antagonist and Histone Deacetylase Inhibitor against Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. Mol. Cancer Ther. *13*, 1142–1154.

Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone harrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. Science (80-.). *311*, 83–87.

Foucher, E.D., Blanchard, S., Preisser, L., Garo, E., Ifrah, N., Guardiola, P., Delneste, Y., and Jeannin, P. (2013). IL-34 Induces the Differentiation of Human Monocytes into Immunosuppressive Macrophages. Antagonistic Effects of GM-CSF and IFNγ. PLoS One *8*, e56045.

Franzè, E., Stolfi, C., Troncone, E., Scarozza, P., and Monteleone, G. (2020). Role

of Interleukin-34 in Cancer. Cancers (Basel). *12*.

Fu, C., Zhu, X., Xu, P., and Li, Y. (2019). Pharmacological inhibition of USP7 promotes antitumor immunity and contributes to colon cancer therapy. Onco. Targets. Ther. *12*, 609–617.

Geer, L.Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R.C., Han, L., He, J., He, S., Liu, C., Shi, W., and Bryant, S.H. (2009). The NCBI BioSystems database. Nucleic Acids Res. *38*, D492–D496.

Gilmour, J., Assi, S.A., Noailles, L., Lichtinger, M., Obier, N., and Bonifer, C. (2018). The Co-operation of RUNX1 with LDB1, CDK9 and BRD4 Drives Transcription Factor Complex Relocation During Haematopoietic Specification. Sci. Reports 2018 81 *8*, 1–14.

Giricz, O., Mo, Y., Dahlman, K.B., Cotto-Rios, X.M., Vardabasso, C., Nguyen, H., Matusow, B., Bartenstein, M., Polishchuk, V., Johnson, D.B., et al. (2018). The RUNX1/IL-34/CSF-1R axis is an autocrinally regulated modulator of resistance to BRAF-V600E inhibition in melanoma. JCI Insight *3*.

Guillonneau, C., Bézie, S., and Anegon, I. (2017). Immunoregulatory properties of the cytokine IL-34. Cell. Mol. Life Sci. *74*, 2569–2586.

Gyori, D., Lim, E.L., Grant, F.M., Spensberger, D., Roychoudhuri, R., Shuttleworth, S.J., Okkenhaug, K., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (2018). Compensation between CSF1R+ macrophages and Foxp3+ Treg cells drives resistance to tumor immunotherapy. JCI Insight *3*.

Hama, N., Kobayashi, T., Han, N., Yagita, H., Baghdadi, M., and Seino, K.-I. (2020). Interleukin-34 Limits the Therapeutic Effects of Immune Checkpoint Blockade.

Han, N., Baghdadi, M., Ishikawa, K., Endo, H., Kobayashi, T., Wada, H., Imafuku, K., Hata, H., and Seino, K. (2018). Enhanced IL-34 expression in Nivolumab-resistant metastatic melanoma. Inflamm. Regen. *38*.

Hashimoto, M., Niwa, O., Nitta, Y., Takeichi, M., and Yokoro, K. (1989). Unstable Expression of E-Cadherin Adhesion Molecules in Metastatic Ovarian Tumor Cells. Japanese J. Cancer Res. *80*, 459–463.

De Henau, O., Rausch, M., Winkler, D., Campesato, L.F., Liu, C., Cymerman, D.H., Budhu, S., Ghosh, A., Pink, M., Tchaicha, J., et al. (2016). Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3Kγ in myeloid cells. Nature *539*, 443–447.

Hunt, S.E., McLaren, W., Gil, L., Thormann, A., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Parton, A., Armean, I.M., Trevanion, S.J., Flicek, P., et al. (2018). Ensembl variation resources. Database *2018*.

Inamura, K., Shigematsu, Y., Ninomiya, H., Nakashima, Y., Kobayashi, M., Saito, H., Takahashi, K., Futaya, E., Okumura, S., Ishikawa, Y., et al. (2018). CSF1R-Expressing Tumor-Associated Macrophages, Smoking and Survival in Lung Adenocarcinoma: Analyses Using Quantitative Phosphor-Integrated Dot Staining. Cancers (Basel). *10*, 252.

Jia, Y., Chng, W.J., and Zhou, J. (2019). Super-enhancers: critical roles and therapeutic targets in hematologic malignancies. J. Hematol. Oncol. 2019 121 *12*, 1–17.

Jiang, Y., Li, Y., and Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. Cell Death Dis. 2015 66 *6*, e1792–e1792.

Jones, V.S., Huang, R.Y., Chen, L.P., Chen, Z.S., Fu, L., and Huang, R.P. (2016). Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer *1865*, 255–265.

Jure-Kunkel, M., Masters, G., Girit, E., Dito, G., Lee, F., Hunt, J.T., and Humphrey, R. (2013). Synergy between chemotherapeutic agents and CTLA-4 blockade in preclinical tumor models. Cancer Immunol. Immunother. *62*, 1533–1545.

Khan, A., and Zhang, X. (2016). dbSUPER: a database of super-enhancers in mouse and human genome. Nucleic Acids Res. *44*, D164–D171.

Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., and Gabrilovich, D.I. (2016). The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. Trends Immunol. *37*, 208.

Lei, Y., Li, X., Huang, Q., Zheng, X., and Liu, M. (2021). Progress and Challenges of Predictive Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade. Front. Oncol. *11*, 609.

Li, C., Jiang, P., Wei, S., Xu, X., and Wang, J. (2020). Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. Mol. Cancer 2020 191 *19*, 1–23.

Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., Halenbeck, R., Wu, G., Zhou, A., Behrens, D., et al. (2008). Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. Science (80-.). *320*, 807–811.

Lin, W.Y., Xu, D., Austin, C.D., Caplazi, P., Senger, K., Sun, Y., Jeet, S., Young, J., Delarosa, D., Suto, E., et al. (2019). Function of CSF1 and IL34 in Macrophage Homeostasis, Inflammation, and Cancer. Front. Immunol. *10*, 2019.

Lovén, J., Hoke, H.A., Lin, C.Y., Lau, A., Orlando, D.A., Vakoc, C.R., Bradner, J.E., Lee, T.I., and Young, R.A. (2013). Selective Inhibition of Tumor Oncogenes by Disruption of Super-Enhancers. Cell *153*, 320–334.

Nagarajan, S., Hossan, T., Alawi, M., Najafova, Z., Indenbirken, D., Bedi, U., Taipaleenmäki, H., Ben-Batalla, I., Scheller, M., Loges, S., et al. (2014). Bromodomain Protein BRD4 Is Required for Estrogen Receptor-Dependent Enhancer Activation and Gene Transcription. Cell Rep. *8*, 460.

Neubert, N.J., Schmittnaegel, M., Bordry, N., Nassiri, S., Wald, N., Martignier, C., Tillé, L., Homicsko, K., Damsky, W., Maby-El Hajjami, H., et al. (2018). T cell-induced CSF1 promotes melanoma resistance to PD1 blockade. Sci. Transl. Med.

10, 3311.

Niu, N., Shao, R., Yan, G., and Zou, W. (2016). Bromodomain and Extra-terminal (BET) Protein Inhibitors Suppress Chondrocyte Differentiation and Restrain Bone Growth. J. Biol. Chem. *291*, 26647–26657.

Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. Immunity *41*, 49–61.

O'Donnell, J.S., Long, G. V., Scolyer, R.A., Teng, M.W.L., and Smyth, M.J. (2017). Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. Cancer Treat. Rev. *52*, 71–81.

Pan, Y., Yu, Y., Wang, X., and Zhang, T. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. Front. Immunol. *0*, 3151.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer 2012 124 *12*, 252–264.

Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. Nat. Rev. Cancer 2004 41 *4*, 71–78.

Postow, M.A., Chesney, J., Pavlick, A.C., Robert, C., Grossmann, K., McDermott, D., Linette, G.P., Meyer, N., Giguere, J.K., Agarwala, S.S., et al. (2015). Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. N. Engl. J. Med. *372*, 2006–2017.

Qian, F.C., Li, X.C., Guo, J.C., Zhao, J.M., Li, Y.Y., Tang, Z.D., Zhou, L.W., Zhang, J., Bai, X.F., Jiang, Y., et al. (2019). SEanalysis: a web tool for super-enhancer associated regulatory analysis. Nucleic Acids Res. *47*, W248–W255.

Quaranta, V., Rainer, C., Nielsen, S.R., Raymant, M.L., Ahmed, M.S., Engle, D.D., Taylor, A., Murray, T., Campbell, F., Palmer, D.H., et al. (2018). Macrophage-Derived Granulin Drives Resistance to Immune Checkpoint Inhibition in Metastatic Pancreatic Cancer. Cancer Res. *78*, 4253–4269.

Schadendorf, D., Hodi, F.S., Robert, C., Weber, J.S., Margolin, K., Hamid, O., Patt, D., Chen, T.T., Berman, D.M., and Wolchok, J.D. (2015). Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. J. Clin. Oncol. *33*, 1889–1894.

Ségaliny, A.I., Mohamadi, A., Dizier, B., Lokajczyk, A., Brion, R., Lanel, R., Amiaud, J., Charrier, C., Boisson-Vidal, C., and Heymann, D. (2015). Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment. Int. J. Cancer *137*, 73–85.

Sengupta, D., Kannan, A., Kern, M., Moreno, M.A., Vural, E., Stack, B., Suen, J.Y., Tackett, A.J., and Gao, L. (2015). Disruption of BRD4 at H3K27Ac-enriched enhancer region correlates with decreased c-Myc expression in Merkel cell carcinoma. Epigenetics *10*, 460–466.

Shao, Q., Kannan, A., Lin, Z., Stack, B.C., Suen, J.Y., and Gao, L. (2014). BET protein inhibitor JQ1 attenuates myc-amplified MCC tumor growth in vivo. Cancer Res. *74*, 7090–7102.

Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. Cell *168*, 707–723.

Sherr, C.J., Roussel, M.F., and Rettenmier, C.W. (1988). Colony - stimulating factor - 1 receptor (c - fms). J. Cell. Biochem. *38*, 179–187.

Shoji, H., Yoshio, S., Mano, Y., Kumagai, E., Sugiyama, M., Korenaga, M., Arai, T., Itokawa, N., Atsukawa, M., Aikata, H., et al. (2016). Interleukin-34 as a fibroblast-derived marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Sci. Rep. *6*.

Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., et al. (2005). Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz- scid IL2R γ null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells. J. Immunol. *174*, 6477–6489.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA. Cancer J. Clin. *71*, 209–249.

Tanaka, A., and Sakaguchi, S. (2016). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. Cell Res. 2017 271 *27*, 109–118.

Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhori, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., et al. (2017). A pathology atlas of the human cancer transcriptome. Science (80-.). *357*.

Vaquerizas, J.M., Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A., and Luscombe, N.M. (2009). A census of human transcription factors: function, expression and evolution. Nat. Rev. Genet. 2009 104 *10*, 252–263.

Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., and Colonna, M. (2012). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. Nat. Immunol. *13*, 753–760.

Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jèze, G., Guermonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., and Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. Nat. Immunol. 2008 96 *9*, 676–683.

Wesolowski, R., Sharma, N., Reebel, L., Rodal, M.B., Peck, A., West, B.L., Marimuthu, A., Severson, P., Karlin, D.A., Dowlati, A., et al. (2019). Phase Ib study of the combination of pexidartinib (PLX3397), a CSF-1R inhibitor, and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. Ther. Adv. Med. Oncol. *11*.

Xiang, X., Wang, J., Lu, D., and Xu, X. (2021). Targeting tumor-associated macrophages to synergize tumor immunotherapy. Signal Transduct. Target. Ther. 2021 61 *6*, 1–12.

Zhou, J., Wang, G., Chen, Y., Wang, H., Hua, Y., and Cai, Z. (2019). Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. J. Cell. Mol. Med. *23*, 4854–4865.

Zhou, S.-L., Hu, Z.-Q., Zhou, Z.-J., Dai, Z., Wang, Z., Cao, Y., Fan, J., Huang, X.-W., and Zhou, J. (2016). miR-28-5p-IL-34-macrophage feedback loop modulates hepatocellular carcinoma metastasis. Hepatology *63*, 1560–1575.

Zhu, Y., Yang, J., Xu, D., Gao, X.M., Zhang, Z., Hsu, J.L., Li, C.W., Lim, S.O., Sheng, Y.Y., Zhang, Y., et al. (2019). Disruption of tumour-associated macrophage trafficking by the osteopontin-induced colony-stimulating factor-1 signalling sensitises hepatocellular carcinoma to anti-PD-L1 blockade. Gut *68*, 1653–1666.

国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」（厚生労働省人口動態統計）