



Title	腫瘍由来IL34 依存的に誘導される免疫抑制機構の解明およびIL34 を基軸とした新規がん治療法の検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	羽馬, 直希
Description	配架番号 : 2779
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15461号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90007
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HAMA_Naoki_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 羽 馬 直 希

学 位 論 文 題 名

腫瘍由来 IL34 依存的に誘導される免疫抑制機構の解明および
IL34 を基軸とした新規がん治療法の検討
(Elucidation of immunosuppressive mechanisms induced by
tumor-derived IL34 and examination of novel cancer therapy
targeting IL34)

【背景と目的】腫瘍内には多種多様な免疫細胞が存在し、細胞間のクロストークに立脚した独自の免疫システムが構築されている。各症例に合わせた個別化治療の確立を目指す上で、罹患者の腫瘍組織、末梢組織における免疫学的解析が肝要であり、大規模且つ網羅的なデータ収集が世界中で推進されている。多岐にわたる固形がん種において、最も大きい浸潤比率を占める免疫細胞がマクロファージ (MΦ) である。MΦは主に骨髄前駆細胞から分化した単球を由来とする細胞であり、周囲の分子生物学的環境に応じて自身の表現系を変化させる。腫瘍内においてMΦは免疫抑制性の機能を獲得し得ることが知られており、抗腫瘍免疫を抑制することで増腫瘍効果をもたらす。そのような背景より、単球から MΦの分化に必須とされる CSF1/CSF1R シグナルの阻害をはじめとした、腫瘍内 MΦを標的とした治療が試みられてきた。しかし、その効果は期待に反し限定的で、一部の患者では重篤な肝障害が認められる結果となり、現在でも実臨床に適した新たな MΦ標的療法が模索されている。CSF1/CSF1R 阻害による MΦ標的療法の問題点として、腫瘍内における抗腫瘍効果をもたらす表現系を有した MΦさえも除去し得ること、また他臓器の恒常性を維持する MΦの機能不全に寄与する可能性があること等が考えられる。それらを克服した新たな標的として、以下の理由をもとに我々が着目した分子が IL34 である。

IL34 は CSF1R に結合する第二のリガンドとして、CSF1 に次いで同定された分子である。脳および皮膚の組織 MΦであるミクログリア、ランゲルハンス細胞の分化、維持に寄与することが示されており、IL34 KO マウスではそれらの細胞が著減する。一方で、CSF1 KO および CSF1R KO マウスで観察される全身での MΦの減少や個体の致死は、IL34 KO マウスでは認められない。近年 IL34 はがん細胞からも多量に産生され得ることが明らかとなり、がんの浸潤、血管新生、転移、さらに免疫抑制性 MΦの誘導に寄与することが示された。これらの背景より、我々は IL34 を標的とした治療法が既存の MΦ標的療法と比べ、より効率的に免疫抑制性 MΦの除去を促進するだけでなく、副作用の低減化も望めると考えた。本研究では、がん細胞から産生される IL34 とがんの悪性度の向上との相関を示すとともに、IL34 標的療法の有用性および IL34 依存的に誘導される MΦの詳細な免疫学的作用を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】本研究では、5 年生存率が不良とされる卵巣がんを主に解析対象とした。複数種のヒト卵巣がん細胞株に加え、北海道大学病院および聖マリアンナ医科大学病院から提供を受けた患者検体における IL34 の発現を qPCR, ELISA, 免疫染色にて評価した。得られた結果を元に、腫瘍組織における IL34 の発現率と患者の予後との相関解析を実施した。また、IL34 を恒常的に発現するマウス卵巣がん細胞株 HM-1 および同株から樹立した *IL34*^{KO} HM-1 を移植した担がんマウス用い、がんの増悪への IL34

の寄与を検討した。さらに同モデルを用い、免疫チェックポイント阻害 (ICB) 治療への抵抗性における IL34 の関与も評価した。IL34 が治療標的として有用であることを検討した上で、single cell RNA sequence (scRNA-seq) を用い、抗 IL34 抗体の投与によりマウス腫瘍内にて減少する腫瘍関連 MΦ (IL34-TAM) サブセットの同定および機能予測を実施し、IL34-TAM を基軸とした免疫制御機構の解明を目指した。

【結果】免疫染色にて卵巣がん腫瘍組織における IL34 の発現を認め、多変量解析の結果 IL34 が予後不良因子であることが示された。また、化学療法の治療歴をもつ患者の原発巣および再発巣 (治療抵抗性) における IL34 の発現を比較したところ、再発巣での発現が有意に高いことが示された。このことは *in vitro* にて樹立したシスプラチン耐性株 KF28 における IL34 の発現量が、シスプラチン感受性株の 50 倍以上の値を示すという結果により補填された。

Luciferase を遺伝子導入した Mock HM-1 および *Il34*^{KO} HM-1 をマウスの卵巣に同所性移植し、がん細胞の動態およびマウスの個体生存期間を比較した。その結果、*Il34*^{KO} HM-1 移植群においてがん細胞の腹腔、胸腔内浸潤率の低下および有意な個体生存期間の延長を認めた。また、細胞移植後の腹腔内免疫環境を解析したところ、*Il34*^{KO} HM-1 移植群において T 細胞、中でも CD8 陽性 T 細胞の浸潤率が増加し、その一方で MΦ の浸潤率が減少していることが分かった。

IL34 が ICB 治療に対する抵抗性に寄与し得るかを検討するため、Mock HM-1 および *Il34*^{KO} HM-1 をマウスの皮下に移植し、抗 PD-1 抗体治療を行った。その結果、*Il34*^{KO} HM-1 移植群でのみ ICB 治療による腫瘍増大の抑制が認められた。治療後の腫瘍塊における遺伝子発現を解析したところ、*Il34*^{KO} HM-1 移植群において T 細胞遊走に寄与する *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, さらに炎症性サイトカインである *Ifng*, *Tnfa* の発現が有意に高いことが示された。また、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の浸潤率に関しても *Il34*^{KO} HM-1 移植群で有意に高いことから、がん細胞由来 IL34 が抗腫瘍免疫の抑制に寄与することが示された。Mock HM-1 移植群に抗 IL34 抗体と抗 PD-1 抗体の併用治療を行った際にも同様の結果が認められた。

腫瘍内にて IL34 依存的に誘導される MΦ の免疫学的機能を検討するため、scRNA-seq を実施した。Wild type HM-1 を皮下移植後、抗 CSF1 抗体または抗 IL34 抗体 (および control IgG 抗体) を投与した各群の腫瘍塊より分取した MΦ を解析サンプルとした。解析により IL34-TAM の同定に成功し、gene ontology 解析にてサブセット特有の生物学的機能を推定した。

【考察】これまで腫瘍内における CSF1R シグナルを介した MΦ の誘導分子は CSF1 一辺倒で考えられてきた。本研究では腫瘍免疫分野に IL34 を基軸とした新知見をもたらすと共に、IL34 を標的とした新規がん治療法の有用性を示した。一方で、前述したように IL34 は脳のミクログリアおよび皮膚のランゲルハンス細胞の維持に重要な役割を果たしているため、IL34 標的療法による副作用の検討は注意深く行われるべきである。また、本研究では IL34-TAM の機能を推定することはできたが、マーカータンパク質の同定には至れず、実験的な IL34-TAM の機能評価はできていない。したがって、今後の更なるマーカータンパク質の探索と機能評価の完遂によって初めて、IL34-TAM に立脚した免疫制御機構の解明が成される。

【結論】卵巣がん患者検体およびマウスモデルを用いた解析により、腫瘍組織における IL34 の発現が予後悪化に寄与することを示した。また、既存の治療に抵抗性を示す IL34 発現腫瘍に対し抗 IL34 抗体治療を施すことで、治療抵抗性が解除されることを明らかにした。このことは IL34 標的療法の実臨床での有用性を示唆する。IL34 誘導性 MΦ が CSF1 誘導性 MΦ とは機能的に異なることを示し、MΦ を基軸とした腫瘍免疫構築メカニズムに新たな知見をもたらした。