



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15461
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90049
Type	doctoral thesis
File Information	HAMA_Naoki.pdf



学 位 論 文

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)

2023年3月

北海道大学

羽馬 直希

学 位 論 文

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)

2023年3月

北海道大学

羽馬 直希

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
要旨	3
略語表	6
緒言	8
材料と方法	12
結果	25
考察	67
結論	73
謝辞	74
利益相反	75
引用文献	76

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。

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)

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)

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 (*co-first author)
Interleukin-34 Limits the Therapeutic Effects of Immune Checkpoint Blockade
iScience, 23 · 101584 (2020)

Hiraku Endo*, Naoki Hama*, Muhammad Baghdad, Kozo Ishikawa, Ryo Otsuka Haruka Wada, Hiroshi Asano, Daisuke Endo, Yosuke Konno, Tatsuya Kato, Hidemichi Watari, Akiko Tozawa, Nao Suzuki, Tomoyuki Yokose, Atsushi Takano, Hisamori Kato, Yohei Miyagi, Yataro Daigo, and Ken-ichiro Seino (*co-first author)
Interleukin-34 expression in ovarian cancer: A possible correlation with disease progression
International Immunology, 32 · 175–186 (2019)

本研究の一部は、以下の学会にて発表した。

1. 羽馬直希, 和田はるか, 清野研一郎
マクロファージを基軸とした腫瘍免疫構築メカニズムにおける新知見
第 19 回日本免疫治療学会学術集会, 2022 年 5 月 22 日, 東京都
2. 羽馬直希, 和田はるか, 清野研一郎
Tumor-cell-derived IL-34 has the potential to be a new therapeutic target
based on macrophage characteristics
第 50 回日本免疫学会学術集会, 2021 年 12 月 8-10 日, 奈良県
3. 羽馬直希, 八木田秀雄, 和田はるか, ムハンマド・バグダーディ,
清野研一郎
腫瘍由来 Interleukin-34 を標的とした新規がん治療法の確立
第 80 回日本癌学会学術集会, 2021 年 9 月 30 日-10 月 2 日, 神奈川県
4. 羽馬直希, 小林拓斗, 韓ナヌミ, 北川郁人, 梶原ナビール, 大塚亮,
和田はるか, ムハンマド・バグダーディ, 清野研一郎
Interleukin-34 を基軸とした免疫チェックポイント阻害治療に対する抵抗性獲得メカニズムの理解 -Interleukin-34 limits the therapeutic effects of immune checkpoint blockade-
第 18 回日本免疫治療学会学術集会, 2021 年 5 月 23 日, オンライン開催
5. 羽馬直希, 小林拓斗, 韓ナヌミ, 北川郁人, 梶原ナビール, 大塚亮,
八木田秀雄, 長谷川嘉則, 和田はるか, ムハンマド・バグダーディ,
清野研一郎
腫瘍由来 Interleukin-34 を標的とした新規がん治療法の確立
第 24 回日本がん免疫学会学術総会, 2020 年 10 月 7-9 日, オンライン開催

要旨

【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は主に骨髓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マウスではこ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。

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。

APCs	antigen presenting cells
ARG1	arginase 1
BMM Φ	bone marrow-derived macrophage
cDNA	complementary DNA
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CSF1	colony stimulating factor 1
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCs	dendritic cells
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
FBS	fetal bovine serum
FPKM	fragments per kilobase of exon per million mapped sequence reads
FSC	forward scattered light
GFP	green fluorescent protein
MHC	major histocompatibility complex
IFN γ	interferon-gamma
IVIS	in vivo imaging system
IL	interleukin
KD	knockdown
KO	knockout
mAb	monoclonal antibody
M Φ	macrophage
PBS	phosphate buffered saline
PD-1	programmed cell death 1
PD-L1	programmed cell death ligand 1
PFS	progression free survival

POC	proof of concept
SSC	side scattered light
TAM	tumor-associated macrophage
TNF α	tumor necrosis factor-alpha
UMAP	uniform manifold approximation and projection
WT	wild type

緒言

近年がん治療における免疫学の重要性が提起され、これまで主な療法であった外科的療法、放射線療法、化学療法に加え、免疫の力を利用してがんに対抗する”免疫療法”の適応が広がりつつある。悪性腫瘍に対する免疫（抗腫瘍免疫）の活性化には複数の分子生物学的ステップが存在する。元々は自己の細胞であるにもかかわらず、免疫ががん細胞を非自己として認識し攻撃する要因として、がん細胞が発現するがん抗原の存在がある (Gilboa, 1999)。がん抗原は正常細胞には発現していないが、遺伝的要因や正常細胞の遺伝子突然変異により誘発され、細胞死を期に周辺環境に放出される。放出されたがん抗原は樹上細胞 (dendritic cells: DCs) をはじめとした抗原提示細胞 (antigen presenting cells: APCs) によって取り込まれ、その後 APCs は所属リンパ節へと移行し、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) 上にがん抗原ペプチドを提示することでがん抗原特異的に反応する T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) を有する T 細胞を活性化させる。このステップを priming phase と呼び、活性化した T 細胞はリンパ管から血管へと流入し、腫瘍組織へと移行する。移行した T 細胞はがん抗原を発現する細胞特異的に障害性を発揮し、細胞死を誘導する。このステップを effector phase と呼び、この 2 つの phase を合わせた一連の流れは「がん免疫サイクル」と称される (Chen and Mellman, 2013)。抗腫瘍免疫は上記 2 つの phase が遂行されることで初めて成立するが、多くの場合でがん免疫サイクルはがん細胞の免疫逃避機構等の要因によって抑制されている。それらを打開し、より効果的に抗腫瘍免疫の活性化を促す免疫療法の開発が未だ渴望されている。

がん免疫サイクルの概念は抗腫瘍免疫を大まかに説明するに足るが、如何なる要因によってそれらが抑制されるかを分子生物学的に示すためには、網羅的且つ詳細な腫瘍内の免疫環境を解析し、理解することが不可欠である。そのような背景に基づき、近年脚光を浴びているのが 1 細胞単位で網羅的な遺伝子発現解析が可能な single cell RNA sequence (scRNA-seq) をはじめとした革新的な解析手法である (Tang et al., 2009)。元来、複数種の細胞を包含する細胞集団をサンプルとする際には、塊 (バルク) での解析が広く用いられていたが、がん浸潤する免疫細胞は非常に不均一な集団であり、それらが平均化されてしまうバルク解析では微小な集団の解析が困難であった。一方 scRNA-seq 等を

用いることで、個々の細胞の遺伝子発現パターンを元に類似する細胞集団を分画し、それぞれの存在比および生物学的機能の推定することが可能となった。このような技術革新に伴い、膨大な数の患者コホートを対象とした腫瘍内免疫細胞の解析が世界中で推進されている。多岐に渡る種類の固形がん患者の腫瘍内浸潤細胞において、大きな割合を占めている細胞が腫瘍関連マクロファージ (TAM) である (Gentles et al., 2015)。

マクロファージ (MΦ) は骨髄前駆細胞から分化した単球と、卵黄嚢および胎児肝臓を起源にもつ細胞であり、ほぼ全ての組織、臓器に存在する (Davies et al., 2013)。TAM を含む MΦ はその機能の異なりにより、古典的に M1 と M2 の 2 つのサブタイプに大別される (Mills et al., 2000)。M1-MΦ は interferon-gamma (IFN γ) や tumor necrosis factor-alpha (TNF α) といった炎症性サイトカインの産生やファゴサイトーシスによる異物の貪食、さらに抗原提示等を活発に行うことで自然免疫応答を担っており、ヘルパー T 細胞 (Th) 1 型反応に関与している。一方、M2-MΦ は Th2 サイトカインである IL4 や IL13 等により誘導され、arginase1 (ARG1) や prostaglandin E2 等の免疫抑制分子を産生して炎症に伴う免疫反応を抑制する他、血管新生や組織修復等にも関与する。健全状態において MΦ は周辺環境に応じて M1 と M2 のバランスを保ちながら、組織や臓器の恒常性の維持に寄与している。一方で、がん等の特殊な病変環境においてはそのバランスが崩れ、病状の悪化に寄与する場合がある。もっとも、病巣には多様な表現系を示す MΦ が混在しており 2 極化することは困難であるため、MΦ を基軸とした免疫環境の構築メカニズムはより複雑なものとなる。近年、“疾患特異的 MΦ” という概念も生み出され、がんをはじめとした複雑な免疫環境内でのみ誘導される MΦ の機能解明および治療標的としての有用性の検討が進められている。

多岐に渡るがん種の免疫環境において、免疫抑制能を有する MΦ が抗腫瘍免疫の活性化を妨げる要因の一つとなることが示されている (Galon and Bruni, 2020)。それ故に、がん治療のアプローチとして TAM の除去を目的とした治療法が考案され、現在複数の治験が実施されている (Mantovani et al., 2022)。中でも古くから治療標的として着目されているのが、単球から MΦ の分化誘導において中心的役割を担っている colony-stimulating factor (CSF) 1 およびその受容体である CSF1 受容体 (CSF1R) によるシグナルカスケードである (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990)。CSF1R は単球の細胞表面に発現している膜

貫通型タンパク質であり、CSF1 の結合による細胞内ドメインのリン酸化とその下流のカスケードの活性化を介し、MΦへの分化に寄与する。抗体または低分子化合物を用いた CSF1R 阻害により、新たに腫瘍内で免疫抑制性の TAM が誘導されることを妨げ、抗腫瘍免疫の再活性化を目的とした治験が様々ながん種の患者に対し試行されている (Mantovani et al., 2022)。しかし現在までの報告によると、それらの治療効果は予想と反し乏しく、治験参加者の中には治療介入に因る重篤な肝障害が生じる例も散見された (Tap et al., 2019)。その原因を考察するに、一つは CSF1/CSF1R シグナルを完全に阻害してしまうことで TAM の中でも抗腫瘍免疫を活性化させ得る MΦサブセットさえも減少させてしまうことが考えられる。その結果、効率的な抗腫瘍免疫を誘導できず著明な治療効果が発揮されていないという仮説を立てることができる。また、CSF1 および CSF1R の遺伝子が全身にユビキタスに発現していることから、CSF1/CSF1R のシグナル阻害の影響が非特異的に腫瘍以外の臓器にまでおよび、組織恒常性の破綻に寄与してしまうことが考えられる。実際に CSF1R KO マウスおよび CSF1 KO マウスは全身での MΦが著しく減少し、65%以上の個体は生育段階で骨粗鬆症等を発症し死に至る (Dai et al., 2002a)。したがって、現行の MΦ標的療法に対し、腫瘍内における免疫抑制能と有した MΦへの特異性を付与させることが現状の大きな課題である。そこで我々が着目した分子が interleukin-34 (IL34) である。

IL34 は CSF1 と同様に CSF1R 介したシグナルを駆動し、単球からの MΦの分化、増殖を誘導する分子として発見されたサイトカインである (Lin et al., 2008; Stanley and Chitu, 2014)。機能面では CSF1 と類似する点が多いものの、アミノ酸配列レベルでの相同性は乏しく (15%以下) CSF1R との結合における結合部位も両者で異なることが知られている (Chihara et al., 2010; Droin and Solary, 2010; Nakamichi et al., 2013)。また全身の組織においてユビキタスに遺伝子発現が認められる CSF1, CSF1R とは対照的に、IL34 の遺伝子発現は脳や皮膚といった部位に限局しており、それぞれの組織 MΦであるミクログリアとランゲルハンス細胞の発生に寄与する (Wang et al., 2012a)。実際に IL34 KO マウスでは、ミクログリアおよびランゲルハンス細胞が著減するが、CSF1 および CSF1R KO マウスで観察された個体致死は認められない (Greter et al., 2012)。近年、IL34 はがん細胞からも多量に産生されることが明らかとなり、腫瘍環境における IL34 はがん細胞の増殖、血管新生、転移、薬剤

耐性の獲得などに加え、免疫抑制性の MΦ の誘導に関与することが報告されている (Baghdadi et al., 2017) . また、当研究室の先行研究において、肺がんや大腸がん患者の腫瘍組織における IL34 の発現が高いほど予後が不良であることが明らかとなった (Baghdadi et al., 2016a; Kobayashi et al., 2019) . 一方で腫瘍内における IL34 の詳細な分子生物学的機能の解析を実施した報告は乏しく、IL34 標的療法 of 非臨床 POC も不十分である . また、IL34 特異的に誘導される TAM の詳細な機能解析を実施した研究はこれまでにない . このような背景に基づき、腫瘍環境における IL34 の免疫抑制機構の詳細な解析と治療標的としてのポテンシャルの検討、さらに CSF1 誘導性 TAM と IL34 誘導性 TAM の機能的相違の解明により、TAM を基軸とした腫瘍免疫構築システムに新たな知見をもたらすことを目的として研究を行った .

材料と方法

マウス

B6C3F1 マウス (♀6-8 週齢) は日本 SLC 株式会社から購入したものおよび、C57BL/6J マウスと C3H/He マウスを北海道大学遺伝子病制御研究所内の動物実験施設で交配し、繁殖させたものを使用した。これらの動物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)

臨床サンプル

本研究に使用したヒト卵巣がん検体 (細胞株, 組織標本) は北海道大学病院産婦人科, 聖マリアンナ医科大学病院産婦人科, 神奈川県立がんセンター臨床研究所にて 2006-2016 年の期間中に卵巣がんと診断された患者のものを使用した。進行ステージは FIGO 進行期分類, クラスは世界保健機関 (WHO) のガイドラインに基づき決定した。全ての患者からインフォームドコンセントを取得し, 北海道大学病院 (承認番号 17-0001), 北海道大学遺伝子医療研究所 (17-0001), 神奈川県立がんセンター, 聖マリアンナ医科大学 (3520) の施設倫理委員会が示す関連指針および規則に従って承認を得た後, 検体を使用した。

細胞培養

本研究に使用したヒト卵巣がん細胞株 KF28 は Prof. Yoshihiro Kikuchi (National Defense Medical College) より分与いただき, OWISE, OVTOKO およびマウス卵巣がん細胞株 OV2944-HM-1 (HM-1) は Japanese Collection of Bioresources (JCBR) より購入した。KF28, OWISE, OVTOKO の培養液には 10% FBS (Sigma-Aldrich), 1% penicillin/streptomycin (ナカライテスク) 含有の RPMI-1640 (富士フィルム和光製薬株式会社) を, HM-1 の培養液には 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin 含有の MEM- α (富士フィルム和光製薬株式会社) を使用した。細胞は全て CO₂ インキュベータ (37°C, 5% CO₂/95% air) 内で培養した。

レンチウイルスの作製に使用した Lenti-X 293T 細胞株 (タカラバイオ) の培養液には 10% FBS 含有の D-MEM (富士フィルム和光製薬株式会社) を使用した。培養は CO₂ インキュベータ (37°C, 5% CO₂/95% air) 内で行った。レンチウイルス作製手順は後述する。

細胞の継代は以下の手順で行った。まず培養液を除去し、PBS で dish 内の残液を洗浄した後に Trypsin (0.5 g/l-Trypsin 0.53 mmol/l-EDTA Solution, ナカライテスク) を 0.5-1 ml 加え、CO₂ インキュベータ (37°C, 5% CO₂/95% air) 内にて 5 分間静置した。ピペッティングにより細胞を dish から剥離し、Trypsin の 5 倍量の培養液を加えて酵素反応を中和した。細胞懸濁液を遠心用チューブへ回収し、1,500 rpm で 5 分間遠心した。遠心後に上清を除去し、形成された細胞のペレットを適量の培養液にて再懸濁した。この一部を細胞培養用ディッシュに播種し、再び培養した。

薬剤耐性株樹立

KF28, OVISe, OVTOKO の培養液中に、シスプラチン (日医工株式会社) またはドキソルビシン (日医工株式会社) を 0.01-0.1 μmol/L の濃度で添加し、72 時間培養した。抗がん剤含有培養液を除去した後に PBS でディッシュを洗浄し、新たに抗がん剤を含まない培養液を加え、生存した細胞が増殖しコンフルエントの状態になるまで回復させた。その後、再度抗がん剤含有培地に置換し培養した。上記の工程を 0.01 μmol/L から段階的に抗がん剤の濃度を上げながら繰り返し、0.1 μmol/L にて細胞障害が認められなくなった時点で薬剤耐性株が樹立されたと判断した。

Bone marrow-derived macrophages (BMMΦ) の分化誘導

マウスの大腿骨より骨髓液を回収し、15 ml tube 内にて大腿骨 1 本につき 1 ml の lysis buffer で細胞のペレットをピペッティングにより懸濁した。Lysis buffer 1 ml につき 1 分間常温で静置した後、全量が 15 ml となるまで PBS でメスアップし 1,500 rpm, 4°C で 5 分間遠心した。上清を除去し、10% FBS, 1% penicillin/streptomycin 含有の RPMI-1640 を用いてペレットを再懸濁し、70 μm フィルターに通した後にセルカウントを実施した。5×10⁶/tube で 15 ml tube に細胞を分注し、培養液で 10 ml までメスアップした後 recombinant IL34 または recombinant CSF1 を 20-50 ng/ml で添加し混和した。10 cm dish (アズワン) へ細胞を播種して CO₂ インキュベータ (37°C, 5% CO₂/95% air) 内で培養した。72 時間後、培養上清を 5 ml 回収し、recombinant 含有培養液 (誘導開始時より 2 倍の濃度) を 5 ml 加え、更に 72 時間培養した。播種後 day6 時点で dish に接着している細胞を BMMΦ とした。上清を除去した後に

10 ml の 10 mM EDTA PBS (同人化学) を添加し, CO₂ インキュベータ (37°C, 5% CO₂/95% air) 内で 10-15 分間静置して BMMΦ を dish より剥離させ, 15 ml tube に回収した. その後 assay buffer 等で細胞を wash し, assay および解析に使用した.

【Lysis buffer 組成】

NH₄Cl (Wako) 8.29 g, KHCO₃(Wako)1.0 g, 2Na · EDTA 37.2 g, MiliQ up to 1 L

T 細胞の分取と CFSE 染色

マウスから摘出した脾臓を 10 cm dish 内でスライドガラスを用いてすり潰し, PBS で dish を洗いながら細胞を 15 ml tube に回収した. 1,500 rpm, 4°C で 5 分間遠心した後, lysis buffer を用いて溶血 (lysis buffer 3 ml, 3 分間静置) し, 再度遠心してペレットにした. 上清を除去し 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin 含有の RPMI-1640 を用いてペレットを再懸濁し, 70 μm フィルターに通した後にセルカウントを実施した. 1-5×10⁷ cells を 15 ml tube へ分注し, 遠心した後のペレットを FACS buffer で×10 希釈した CD90.2 Microbeads, mouse (Miltenyi Biotec) 溶液で再懸濁する (1×10⁷ cells/100 μl). 暗所, 氷上で 15 分間静置した後に, FACS buffer 1 ml を加えピペッティングした後 1,500 rpm, 4°C で 5 分間遠心した. ペレットを FACS buffer 500 μl で再懸濁し, 強力な磁器に装着した LS Columns (Miltenyi Biotec) を用いて CD90.2 陽性 T 細胞を分取した.

分取した T 細胞を PBS で 2 度 wash した後, 0.33 μM CFSE 溶液 (同人化学) を用いて 1×10⁶ cells/ml で懸濁し vortex でよく混合した. その後 tube をアルミホイルで遮光し, 37°C water bath 内で 15 分間静置した. Tube を遠心後, 上清を除去し, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin 含有の RPMI-1640 で wash, 再懸濁し, セルカウントを実施した後に assay に用いた.

【FACS buffer 組成】

1% FBS, 2.5mM 2Na · EDTA, PBS up to 1L

【CFSE 溶液組成】

2 mM CFSE (DMSO) 5 μl, PBS 30 ml

T細胞とBMMΦの共培養

CFSEで染色したT細胞を 2×10^5 cells/wellで96 well plateに播種した後、誘導したBMMΦを 4×10^4 cells/wellで同wellに添加した。共培養には55 μ M 2-メルカプトエタノール (ナカライテスク)、10% FBS、1% penicillin/streptomycin含有のRPMI-1640を培養液として用い、液量は200 μ l/wellとした。Syngeneicの実験系の場合、培養液にUltra-LEAF™ Purified anti-mouse CD3 ϵ Antibody (Biolegend) およびUltra-LEAF™ Purified anti-mouse CD28 Antibody (Biolegend)をそれぞれ1 μ g/ml、5 μ g/mlの最終濃度となるように添加した。72時間後、細胞をピペッティングにより回収し解析サンプルとした。

レンチウイルス作成・感染

レンチウイルスはpLenti-luc CMV-PuroおよびpLenti-GFP CMV-NeoをLenti-X 293T細胞にトランスフェクションして作製した。パッケージングプラスミドはpCMV-VSV-G-RSおよびpCAG-HI-Vgpを用いた。

Lenti-X 293T細胞 4.4×10^6 cellsを10 cm dishに撒き、CO₂インキュベータ(37°C, 5% CO₂/95% air)内で24時間培養した。トランスフェクション用のプラスミド溶液は以下の組成で調整した。

pCMV-VSV-G-RS	1.1 μ g
pCAG-HI-Vgp	1.1 μ g
pLenti-luc CMV-Puro	3.7 μ g
<hr/>	
OptiMEM (Gibco)	250 μ l
pCMV-VSV-G-RS	1.1 μ g
pCAG-HI-Vgp	1.1 μ g
pLenti-GFP CMV-Neo	3.7 μ g
<hr/>	
OptiMEM (Gibco)	250 μ l

プラスミド溶液を静かにピペッティングし、室温で5分間静置した。その後TransIT-X2® Reagent (タカラバイオ)を12 μ l添加し、再び静かにピペッティングした後、室温で20分間静置した。10 mlの培養液にプラスミド溶液を全量

添加し、24 時間培養後の Lenti-X 293 細胞の培養液と置換してさらに 48 時間培養した (以降の操作はクリーンベンチ内で実施)。レンチウイルス含有上清を遠心用チューブに回収し、1,500 rpm で 5 分間遠心した。その後、上清を 0.44 μm フィルターに通しレンチウイルス含有液とし、培養液と 1:1 の割合で混合した溶液で被感染細胞を 48 時間培養した。培養後、感染細胞を継代し puromycin または neomycin による薬剤耐性株のセレクションを行った。

RNA 抽出, complementary DNA (cDNA) 合成

培養細胞 ($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells) から TRIsureTM (meridian BIOSCIENCE) を用いて total RNA を抽出した。また、卵巣腫瘍組織および正常組織からの total RNA 抽出については Maxwell 16 LEV simply RNA Tissue Kit (Promega) を用いた。得られた total RNA を鋳型とした cDNA 合成は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて行った。

Quantitative-PCR (qPCR)

培養細胞および組織より抽出した total RNA をもとに、作製した cDNA を用いて qPCR を実施した。2 \times KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (KAPABIOSYSTEMS, Boston, MA), 10 μM PCR プライマー (Forward および Reverse) , cDNA を混合し、PCR を実施した (Step One Real-Time PCR System, Applied Biosystems)。PCR の反応条件は以下の通りである。

温度	ステップ	時間	
95°C	変性反応	20 秒	} 40 サイクル
95°C	変性反応	3 秒	
プライマー Tm 値 (°C)	アニーリング/伸長反応	30 秒	
95°C	Melt Curve	15 秒	
プライマー Tm 値 (°C)	Melt Curve	1 分	
95°C	Melt Curve	15 秒	

内部標準として *Gapdh* を用い、各遺伝子の mRNA 発現量を相対的に算出した。qPCR に用いたプライマーの塩基配列を【表 1】に示す。

【表 1】 qPCR に使用したプライマー配列

	Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Mouse	<i>Cxcl9</i>	AATGCACGATGCTCCTGCA	AGGTCTTTGAGGGATTTGTAGTG
	<i>Cxcl10</i>	AGTGCTG CCGTCATTTTCTG	TCCCTATGGCCCTCATTCTCA
	<i>Cxcl11</i>	GTAATTTACCCGAGTAACGGC	CACCTTTGTCGTTTATGAGCCTT
	<i>Ifng</i>	AAGACAATCAGGCCATCAGCA	AGCGACTCCTTTTCCGCTTC
	<i>Tnfa</i>	TTCTATGGCCCAGACCCTCA	CTTGGTGGTTTGCTACGACG
	<i>Il34</i>	TGAGCTGCAATGGGACTG	GGCCACCAAGTCCAGAAA
	<i>Gapdh</i>	TCAAATGGGGTGAGGCCGGT	TTGCTGACAATCTTGAGTGA
Human	<i>IL34</i>	GTGCCTTACGAGGGGGTGTTC	CACCTTGGGGCTGACCTCCAC
	<i>CSF1</i>	CCTGAAGAGCTGCTTCACCAA	CATTCTTGACCTTCTCCAGCAA
	<i>CSF1R</i>	TGCCTTACAACGAGAAGTGGGAG	ATCTTCACAGCCACCTTCAGGAC
	<i>B-ACTIN</i>	TCACCCACACTGTGCCCATCTACG	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATG

Enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA)

細胞株由来のサイトカインを測定するために、ELISA を実施した。 1×10^6 cells/well で 6 well plate に細胞を播種し、2 ml の培養液中で 48 時間培養した。上清を回収し、0.44 μ m フィルターを通した溶液をサンプルとした。IL34 の測定には LEGEND MAX Human IL-34 ELISA kits with Pre-Coated Plates (Biolegend), LEGEND MAX Mouse IL-34 ELISA kits with Pre-Coated Plates (Biolegend) を使用した。CSF1 の測定には Mouse M-CSF Quantikine ELISA Kit (R&D) を使用した。

CRISPR-Cas9 システムを用いた KO 株の作製

HM-1 が恒常的に発現している IL34 および CSF1 それぞれの KO 株を作製するため、CRISPR/Cas9 プラスミドを HM-1 に導入した。プラスミドは IL-34 CRISPR-Cas9 KO Plasmid (m) (Santa Cruz Biotechnology), M-CSF CRISPR/Cas9 KO Plasmid (m2) (Santa Cruz Biotechnology) および実験内コントロールとして Control CRISPR/Cas9 Plasmid (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。まず HM-1 を 1×10^5 cells/well で 6 well plate

に播種し、24 時間培養する。その後、以下に示した混合液をそれぞれのプラスミドを用いて作製した。

CRISPR/Cas9 Plasmid	2 µg
TransIT-X2® Reagent	10 µl
<hr/>	
OptiMEM (Gibco)	250 µl

混合液を静かにピペッティングし室温で 20 分間静置した後、培養液 2 ml に添加してプラスミド含有培養液とした。6 well plate より培養上清を除去し、上記のプラスミド含有培養液を全量加え、48 時間培養した。その後 GFP 陽性細胞 (形質転換細胞) をソーティングし、培養した。遺伝子の KO 効率は培養上清中の IL34 もしくは CSF1 が ELISA における検出の有無により検討した。樹立した KO 株をそれぞれ *Il34*^{KO} HM-1, *Csf1*^{KO} HM-1 とし、コントロールプラスミドを導入した株は Mock HM-1 とした。

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは FACS Celesta (BD Biosciences) もしくは FACS Aria II (BD Biosciences) を用いて行った。ソーティングに関しては FACS Aria II または SONY SH800 (SONY) を用いた。得られたデータ解析には FlowJo software V7.6.5, V10.6.1 (Tree Star, Ashland, OR) を用いた。フローサイトメトリーおよびソーティングに使用した抗体を【表 2】に示す。死細胞染色には 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) を用い、FCS と SSC のゲートに加え DAPI で染色されない細胞を生細胞とし、解析対象とした。

【表 2】 フローサイトメトリーおよびソーティングに使用した抗体

Antibody	Conjugation	Clone	Supplier
CD3ε	APC	145-2C11	Biolegend
CD4	APC-Cy7	RM4-5	Biolegend
CD8α	FITC	53-6.7	Biolegend
CD11b	FITC	M1/70	Biolegend
CD11c	APC	N418	Biolegend
CD16/32	Purified	2.4G2	TONBO bioscience
CD45	FITC, PE, APC, PE- Cy7, APC- Cy7, Pacific blue	30-F11	Biolegend
CD80	FITC	16-10A1	Biolegend
CD86	FITC	GL-1	Biolegend
CD115	APC	AFS98	Biolegend
CD273 (PD-L2)	PE	TY25	Biolegend
CD274 (PD-L1)	APC	MIH5	Biolegend
I-A/I-E	FITC	M5/114.15.2	Biolegend
F4/80	APC	BM8	Biolegend
anti-Rat IgG	FITC, PE, APC, PE- Cy7, APC- Cy7	Rabbit polyclonal	Biolegend

組織免疫染色

前述した医療機関から提供を受けたホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織標本をサンプルとした免疫染色を実施し、IL34 の発現を評価した。

キシレンおよびエタノールを用いてパラフィンを除去した後、適切な容器内にて、Immunosaver® (日新 EM 株式会社) 超純水 100 ml に対し 500 μl 加えた溶液に標本を浸漬させ、水道水を入れた電気ポット内で 98°C、40 分間加熱した

(抗原不活化処理)．標本を PBS で洗浄した後、0.3% 過酸化水素水加メタノールをマウントし、室温で 10 分間浸漬した (内因性ペルオキシターゼの除去)．PBS にて洗浄し、0.3% Triton PBS (PBS-T) をマウントして 5 分間浸漬後、2% BSA PBS をマウントし 60 分間浸漬した (タンパク質ブロッキング)．再度 PBS-T にて洗浄した後、PBS-T にて×200 希釈したマウス抗ヒト IL34 抗体 (Clone; 1D12, Millipore) をマウントし、4°Cで一晩浸漬した．ネガティブコントロール標本は PBS-T で浸漬した (一次抗体反応)．翌日、標本を PBS-T で 3 度洗浄した後、5%ウマ血清をマウントし、室温で 30 分間浸漬した (ブロッキング処理)．水分を除去した後、polymer 式 HRP 二次抗体 (ImmPRESS UNIVERSAL Regent, Anti-Mouse/Rabbit Ig Anti-Mouse/Rabbit IgG PEROXIDASE, Vector)を一滴マウントした．乾燥を防ぐためパラフィルムを被せ、室温で 30 分浸漬した (二次抗体反応)．その後、PBS-T にて 3 度洗浄した．DAB (3,3'-diaminobenzidine) 3 mg を Tris-HCl (0.05M Tris-HCl (pH7.6)) 6 ml に溶解し、DAB 溶液を作製した (遮光する)．DAB 溶液 1 ml に H₂O₂ を 3 μl 混合し、直後に標本にマウントして光学顕微鏡で観察しながら露光した．バックグラウンドが褐色を呈さない頃合いで標本を超純水に浸し、発色反応を停止させた (DAB 発色)．ネガティブコントロール標本と同一時間を発色時間と設定し、同様の手順でサンプル標本の発色を行った．Mayer's Hematoxylin Solution (和光純薬工業株式会社) をマウントし、室温で 3 分間浸漬した (Hematoxylin によるカウンター染色)．その後、純水で 15 分間浸して色出しを行った．染色終了後、100%エタノールおよびキシレンで脱水、透徹した後封入剤マリノール (武藤化学株式会社) をマウントし、カバーガラスで標本を封入した．IL34 の発現を定量するにあたり、正立顕微鏡を用いて染色像を観察した．2 名の研究者が 200×の倍率で各標本における腫瘍部位を判定し、20×の倍率で腫瘍部分を無作為に撮影した．撮影した画像を画像解析ソフトウェア Image J (National institutes of Health) の color deconvolution 機能を用いて DAB 画像、Hematoxylin 画像、補色画像に分別した．DAB 画像を 2 値化し、全体像に対する陽性率を算出した．任意の色の画素強度値は 0 から 255 の範囲で、0 は最も暗い色調を、255 は最も高い色調を基準として表した．0, 1-85, 85-170, 171-255 の解析数値をそれぞれ negative, absent, weak, strong とし、標本ごとに IL34 の発現強度を判定した．

マウスへのがん細胞株の移植

本研究ではマウス卵巣がん細胞株をマウスの卵巣に移植する同所性移植と、腹側部への皮下移植を行った。培養細胞を回収しセルカウントを実施後、目的の細胞数 (同所性移植: 1×10^6 , 皮下移植: 2×10^5) を 1.5 ml チューブへ分注し、 $400 \times g$ で 5 分間遠心した。上清を除去した後に PBS で細胞を洗浄し、再び遠心、上清の除去を行った。形成されたペレットを 5-10 μ l のマトリゲル (Corning) で再懸濁し、移植した。同所性移植には BD ロードーズ™ (BD), 皮下移植にはマイショット® (NIPRO) をそれぞれ用いた。

In Vivo Imaging System (IVIS)

Luciferase (Luc) を遺伝子導入した HM-1 の Luc 発現強度を評価するため、IVIS を用いた発光観察を行った。96 well plat に細胞を播種し、200 μ l の培養液で懸濁する。その後、30 mg/ml で PBS に溶解した A-Luciferin 溶液 (Avidin Ltd) を 2 μ l 加え、IVIS Spectrum Imaging Systems (Caliper Life Sciences Ltd) を用いて発光強度を測定した。発光が認められた Luc 陽性株をマウスの卵巣内に移植し、経時的にがん細胞の動態を観察、撮影した。In vivo における撮影時は、マウスの尾静脈より A-Luciferin 溶液を 150 mg/kg で投与し、露光時間は 1 分間とした。

抗体投与治療

PBS にて希釈した *in vivo* 実験用の抗体をマウス腹腔内に投与した。がん細胞株を皮下移植した後、形成された腫瘍の直径が 5 mm となった日を投与開始日とした。抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体は 2 回/週、その他の抗体は 3 回/週で投与した。使用した抗体および投与濃度を【表 3】に示す。

【表 3】 *In vivo* 実験にて使用した治療用抗体

Antibody	Clone	Dose Concentration	Supplier
PD-1	RMP1-14	12.5 mg/kg	From Dr. Yagita
CTLA-4	UC10-4F10	12.5 mg/kg	From Dr. Yagita
IL34	C054-35	10 mg/kg	Biolegend
CSF1	5A1	10 mg/kg	Bio X Cell
CSF1R	AFS98	10 mg/kg	Bio X Cell
Rat IgG whole molecule	N/A	10-12.5 mg/kg	Jackson Immuno Research LABORATORIES, INC.

Ion AmpliSeq-targeted sequencing analysis

術前に卵巣癌と診断された患者 39 名から、手術時に腫瘍組織を採取した。組織は RNA later (Qiagen) を含むバイアルに速やかに (腫瘍切除後 10 分以内に) 採取し、使用時まで -80 °C で保存した。RNeasy Mini (Qiagen) を用いて腫瘍組織から total RNA を抽出し、Qubit 3.0 Fluorimeter (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。10 ng の total RNA をサンプルとし、Ion AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてトランスクリプトーム用ライブラリーを調製した。調製したライブラリーは AMPure XP (Beckman Coulter) で精製し、Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) で定量した後、50 pM に希釈して 1 プール 8 サンプルで均等にプーリングした。エマルジョン PCR は Ion Chef™ System も用いて実施した。その後、Ion P1 Hi-Q Chef Kit と Ion P1 Chip Kit v3 (Thermo Fisher Scientific) を用い、Ion Proton™ システムで鋳型ライブラリーの塩基配列を決定した。この方法に基づき、AmpliSeq の値から *IL34*, *CSF1*, *CSF1R*, *CD163* の発現中央値を算出し (RPM : reads per million), コホートを各遺伝子の発現が高い患者または低い患者に分別した (*IL34* (≥ 0.40 or < 0.40), *CSF1* (≥ 1.62 or < 1.62), *CSF1R* (≥ 1.79 or < 1.79), *CD163* (≥ 1.78 or < 1.78)). その後、遺伝子発現と予後との相関を評価するため、Kaplan-Meier 曲線を作製した。

Single cell RNA sequence (scRNA-seq)

WT HM-1 腫瘍からソーティングにより分取した TAM 分画 (CD11b⁺ F4/80⁺) をサンプルとし, scRNA-seq 解析を実施した. 腫瘍の直径が 5 mm に達した日より, 抗 IL34 抗体または抗 CSF1 抗体 (コントロール群には Control Rat IgG 抗体) を 3 回/週で腹腔内投与した. 細胞移植後 day19 で腫瘍を回収し, BD Horizon™ Dri Tumor & Tissue Dissociation Reagent (BD) を用いて腫瘍内浸潤免疫細胞を分取した. その後ソーティングにより CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ DAPI 細胞を TAM 分画として分取した. 取得した細胞を BANBANKER® (日本ジェネティクス) 1 ml に懸濁し, -80°C で凍結保存した. 凍結した細胞を公益財団法人かずさ DNA 研究所 遺伝子構造解析グループにて, 1 細胞 RNA-seq ライブラリ調整, シーケンス解析, 2 次データ解析を実施した. 各ステップで使用した試薬および解析プログラムを【表 4】に示す.

【表 4】 scRNA-seq 解析の各ステップにおける使用試薬および解析プログラム

Step	Reagent/Program	Supplier
1 細胞 RNA-seq ライブラリ調整	Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3.1	10x Genomics
	Chromium i7 Multiplex Kit	10x Genomics
	SPRIselect	BECKMAN COULTER
	MGIEasy Universal Library Conversion Kit (App-A)	MGI
	AMPure XP ビーズ	BECKMAN COULTER
シーケンス	DNBSEQ-G400RS	MGI
	DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set (App-A FCL PE100)	MGI
2 次データ解析	cellranger count	10x Genomics
	RStudio	RStudio®

RStudio を用いた 2 次データ解析を実施する際, Satija Lab が提供するパッケージである Seurat を使用した (<https://satijalab.org/seurat/>).

統計解析

統計解析は JMP® 14 (SAS Institute Inc.)を用いて行った。有意性の判定には Student's t-test, Tukey's multiple comparison test, または Steel-Dwass nonparametric multiple comparison test を用い, 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 (*), $p < 0.01$ の場合にはアスタリスク 2 つ (**), $p < 0.001$ の場合はアスタリスク 3 つ (***) を付与した。

結果

1. 卵巣がんにおける IL34 の新規治療標的としての有用性

当研究室の先行研究にて、肺癌患者の腫瘍局所における IL34 の発現が患者の予後悪化と正の相関関係にあること、更に肺癌の化学療法抵抗性の獲得に寄与することが明らかとなった (Baghdadi et al., 2016b). それらを踏まえ、当研究室では多岐にわたるがん種について IL34 の発現解析を行っており、本研究では特に卵巣がんに着目した実験を行った。

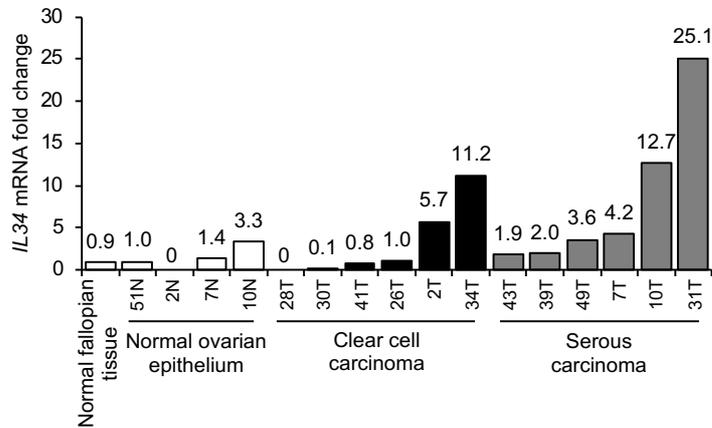
卵巣がんは婦人科がんにおいて、罹患率こそ子宮頸がんや子宮体がんと比較し高くないものの、罹患者数に対する死亡者が多いことが特徴であり、婦人科がんの中でも予後が悪いとされている (Funston et al., 2018). その要因として、初期症状の乏しさにより診断が遅れる傾向にあることや、再発率が高いことが挙げられる。化学療法の感受性が比較的高く、およそ 70% の患者において外科的手術の後にタキサン製剤、プラチナ製剤を用いた化学療法が実施される。しかし、III-IV 期の進行性の場合 2 年以内に約 55%, 5 年以内には約 70% の患者で再発が認められ、化学療法に対する抵抗性を有する症例も散見される (Pignata et al., 2017). 既存の治療に抵抗性を示す卵巣がん症例に対する治療法の確立は未だ challenging である。そこで、肺癌において予後悪化および化学療法抵抗性の獲得に寄与するとされる IL34 が卵巣がん治療における新たな標的となり得るかを検討するため、以下の実験を行った。

1-1. 卵巣がんにおける IL34 の発現と予後への影響

1-1-1. 卵巣がん検体における IL34 の発現解析

IL34 の遺伝子発現は多岐にわたるがん種にて認められているが、卵巣がんにおける発現はこれまでに報告されていない (Baghdadi et al., 2018a). そこで始めに、神奈川県立がんセンター臨床研究所にて 2006-2016 年の間に卵巣がんと診断された患者の病片から精製された cDNA をサンプルとし、IL34 の発現を qPCR にて解析した。コントロールとして正常な卵巣上皮組織または卵管組織から精製した cDNA を使用した。腫瘍組織検体はすべて原発巣であり、術前化学療法を実施していない患者を選別しサンプルとした。解析の結果、卵巣腫瘍組織において IL34 の発現が有意に高いことが明らかとなった (図 1A, B).

A



B

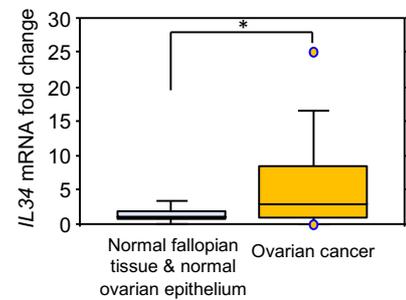


図 1. 卵巣腫瘍組織における *IL34* の発現解析

- A) 正常卵管組織 (n=1), 正常卵巣上皮組織 (n=4), 明細胞腫瘍組織 (n=6), 漿液性腫瘍組織 (n=6) における *IL34* の発現の相対値. 正常卵巣上皮組織である 51N を対照コントロールとし, その他のサンプルにおける倍率変化 (fold change) を示した.
- B) 正常組織と腫瘍組織に分類し, *IL34* 発現の倍率変化を比較した. グラフは平均値と標準誤差を示す. * $p < 0.05$, Student's t-test.

1-1-2. 卵巣腫瘍組織における IL34 のタンパク質発現解析

卵巣腫瘍組織において *IL34* の発現が高いことが示されたが、実際に IL34 が活性を有し、腫瘍局所で生理学的に機能し得るかはタンパク質発現を認めない限り定かではない。そこで卵巣がん検体の組織標本をサンプルとし、DAB を用いた組織免疫染色にて IL34 のタンパク質発現を定量した。組織標本は、北海道大学病院産婦人科にて 2006-2016 年の間に漿液性がんまたは明細胞がんの診断を受けた患者から摘出された原発巣より作製した。各標本における DAB 陽性率の解析結果より、腫瘍組織および正常組織において IL34 の発現が認められる検体と認められない検体の両方が観察された (図 2A)。次に、Image J を用いた画像解析により IL34 の発現強度を定量したところ、発現が認められる検体間においてその強度が異なることが分かった。肺がんを用いた先行研究により、組織検体における IL34 の発現強度はステージの進行に依存して高くなることが示されている (Baghdadi et al., 2018b)。そこで検体を進行期別に分け、IL34 の発現強度を画像解析処理にて absent, weak, strong に分類したところ、IL34 の検出率は進行ステージ前期である Stage I, II では 15.7%, 12.5% であり、進行ステージ後期である Stage III, IV では 21.9%, 42.8% であった。また、ステージ後期における IL34 の検出率が有意に高いことが示された ($p=0.002$, Fisher's exact test) (data not shown)。つまり肺がんコホートと同様に、卵巣がんコホートにおいて、進行ステージ後期で IL34 の発現が認められる検体の割合が高いことが示された (図 2B)。

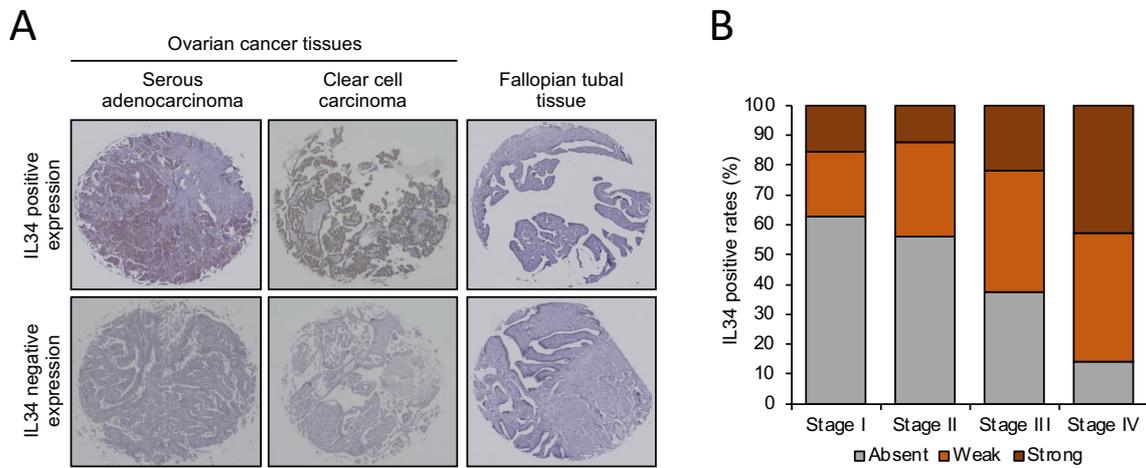


図 2. 卵巣腫瘍組織における IL34 のタンパク質発現と進行期との関係

- A) 抗ヒト IL34 抗体を用いた DAB 染色による染色像. 褐色に染まっている部分が IL34 の陽性反応を示す. 上段には IL34 の発現が認められる検体, 下段には IL34 の発現が認められない検体を示す.
- B) 各進行期の患者検体における IL34 の発現強度とその割合を示す. IL34 の発現が認められる検体の割合はそれぞれ Stage I (37.3%, n=19/51), Stage II (43.8%, n=7/16), Stage III (62.5%, n=20/32), Stage IV (85.6%, n=12/14) であった.

1-1-3. 腫瘍組織における IL34 が罹患者の予後に及ぼす影響の解析

進行ステージ後期の患者の腫瘍組織において、IL34 の発現が認められる患者の割合が高いことが示された。しかし IL34 の発現が患者の予後に及ぼす影響については不明である。そこで、腫瘍組織における IL34 の発現強度と患者の overall survival rate の相関解析を実施した。進行期による分別は行わず、全ての検体における IL34 の発現強度をもとに IL34 positive expression (weak & strong) と IL34 absent expression (absent only) の 2 群にて Kaplan-Meier 法を用いた解析を行った。その結果、腫瘍組織における IL34 の発現が患者の overall survival rate を有意に低下させることが明らかとなり、IL34 が独立した予後不良因子であることが示された (図 3A)。次に進行ステージ前期の段階において IL34 の発現が予後悪化の予測指標となり得るかを検討するため、検体をステージ前期とステージ後期に分別し、IL34 の発現と overall survival rate との相関を Kaplan-Meier 法により解析した。その結果、ステージ前期、後期共に IL34 の発現と予後悪化に相関は認められなかった (図 3B)。つまり、腫瘍組織における IL34 の発現は予後不良に寄与するものの、ステージ進行における独立した要因ではないことが示唆された。また、FIGO に基づいたクラス分析をした結果、IL34 の発現は漿液性がんにおいて他の卵巣がんと比較し有意に高い頻度で認められることも明らかとなった (data not shown)。これらの知見より、IL34 の発現は複数の要因による影響を受けていると考えられる。

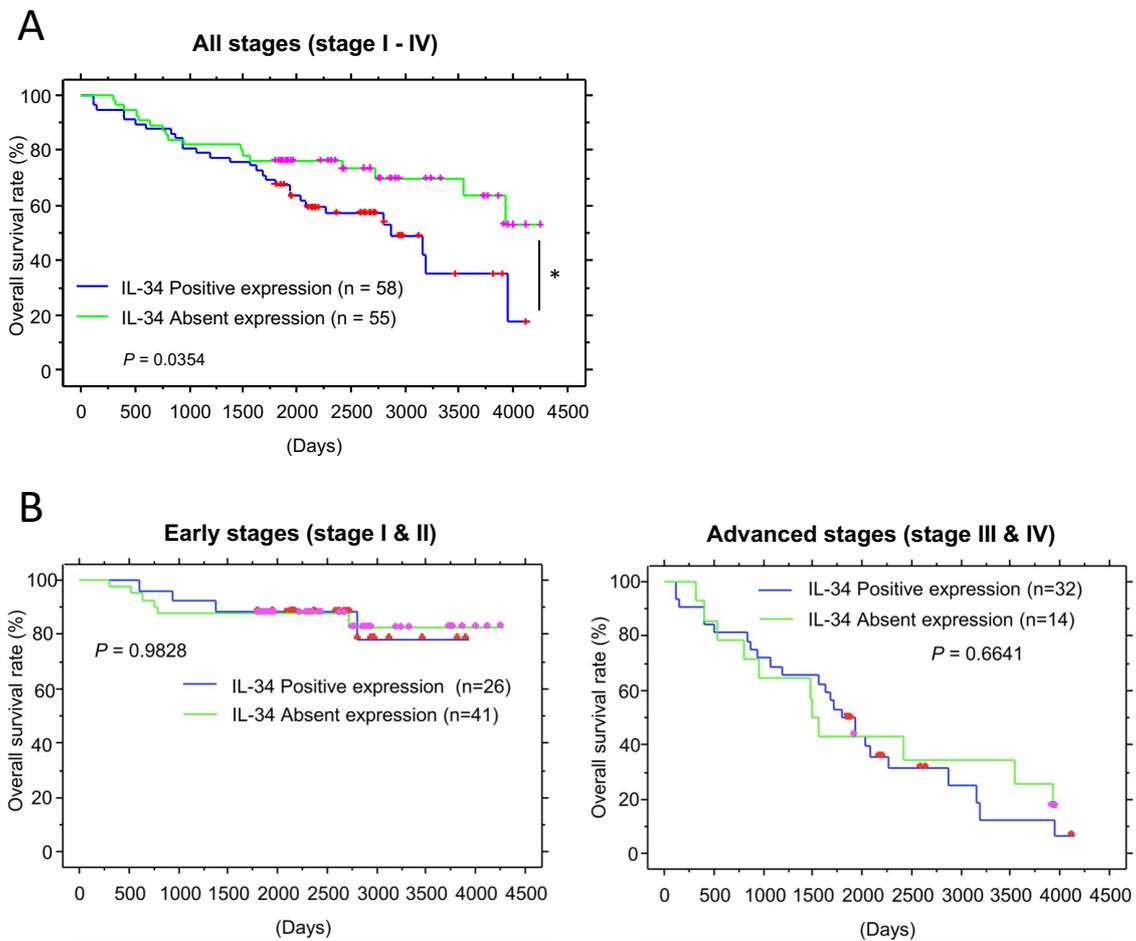


図 3. 腫瘍組織における IL34 の発現と患者の overall survival rate との相関

A) IL34 発現群および IL34 非発現群における overall survival rate の Kaplan-Meier 曲線を示す。横軸は原発巣摘出日から腫瘍性致死および最終フォローアップまでの日数を示す。* $p < 0.05$, log-rank test.

B) 進行ステージ前期 (stage I, II) および後期 (stage III, IV) における IL34 発現検体群と IL34 非発現検体群の, overall survival rate の Kaplan-Meier 曲線を示す。Statistics; log-rank test.

1-2. 網羅的遺伝子発現解析に則る IL34 を起点とした多変量解析

がん罹患者の予後を予測し、適正な治療を選択することががん治療において重要である。特定のがん種の進行促進に寄与する因子の探索研究は 21 世紀に飛躍的に進み、現在数多の分子標的薬を用いた臨床試験が進行中である (Min and Lee, 2022)。その背景には RNA sequencing (RNA-seq) をはじめとした網羅的遺伝子発現解析技術の進歩がある。本研究では Ion AmpliSeq-targeted sequencing analysis を用いて、各検体において MΦ 関連遺伝子である IL34, CSF1, CSF1R, CD163 (M2-MΦ マーカータンパク質) の発現を定量した。定量には reads per million (RPM) を値として用い、それぞれの遺伝子の相対的な発現量を RPM の中央値で high と low に分けた (*IL34* (≥ 0.40 or < 0.40), *CSF1* (≥ 1.62 or < 1.62), *CSF1R* (≥ 1.79 or < 1.79), *CD163* (≥ 1.78 or < 1.78)).

次に、Kaplan-Meier 法による解析を実施したところ、*CSF1* は発現と予後に相関はなかったが、*IL34*, *CSF1R*, *CD163* の発現は有意に progression free survival (PFS) rate を低下させることが明らかとなった (図 4A)。この結果は、腫瘍組織における *IL34*, *CSF1R*, *CD163* の発現が予後不良を予測するマーカーとなり得ることを示唆している。さらに、pearson correlation analysis により、上記の遺伝子間の相関解析を実施した。その結果、腫瘍組織における *IL34* の発現と *CSF1R* の発現は正の相関関係にあることが示された (図 4B)。

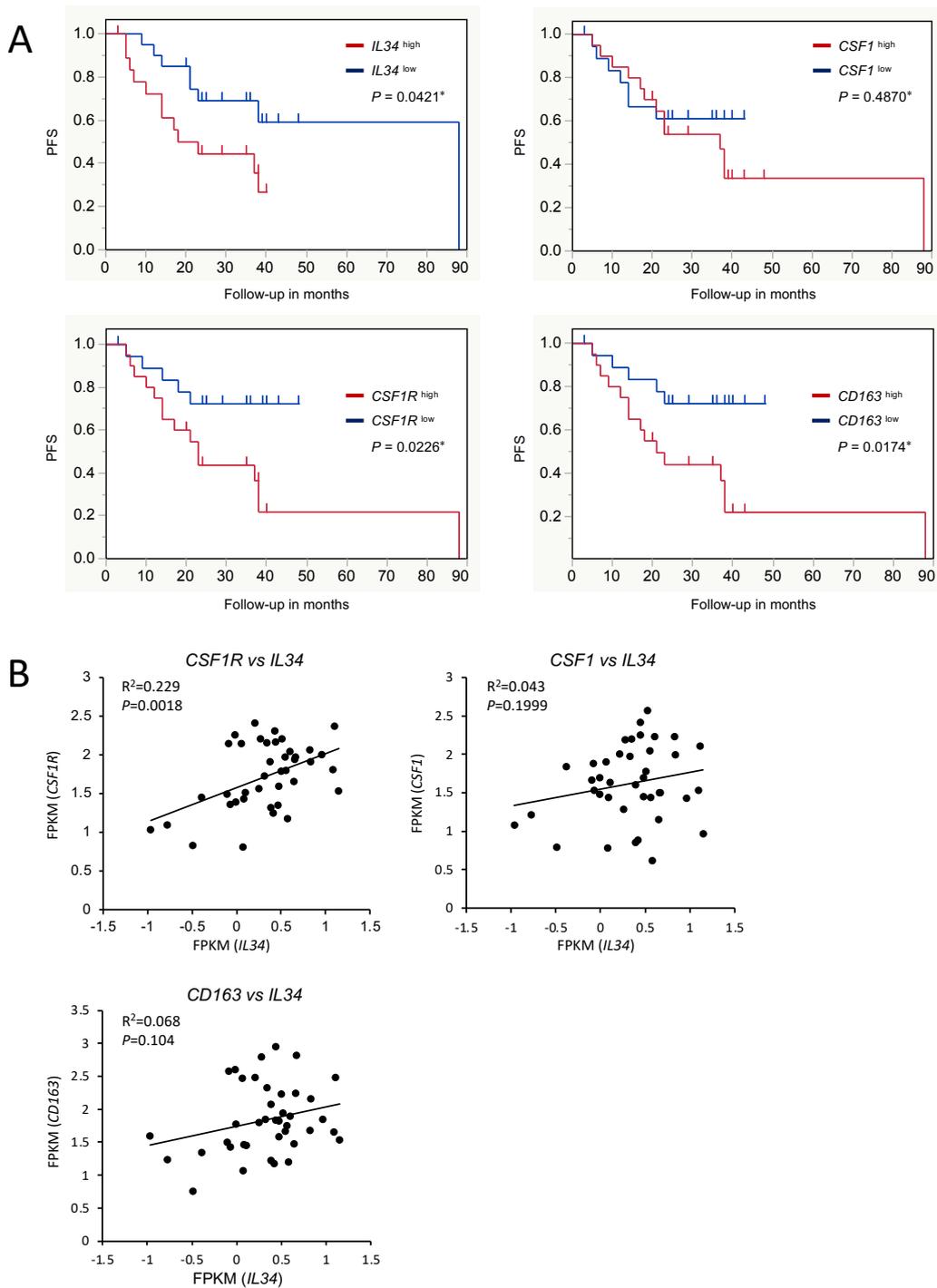


図 4. RNA-seq を用いた腫瘍組織における網羅的な遺伝子発現解析

A) 腫瘍組織における *IL34*, *CSF1*, *CSF1R*, *CD163* の発現と PFS の相関解析.

* $p < 0.05$, log-rank test.

B) Pearson correction analysis による各遺伝子間の相関係数解析. ** $p < 0.01$,

Spearman's correlation test.

次に、独立した予後不良予測因子として示された *IL34*, *CSF1R*, *CD163* の解析結果を統合し、【*IL34* & *CSF1R*】、【*IL34* & *CD163*】、【*IL34* & *CSF1R* & *CD163*】という組み合わせの遺伝子発現と患者の予後との相関を Kaplan-Meier 法を用いて解析した。その結果、*IL34* と *CSF1R* または *CD163* の共発現が腫瘍組織で認められる患者の予後は、その他の患者と比較し有意に不良であることが示された (図 5A, B)。さらに、上記の遺伝子全てが高発現している患者においても、その他の患者と比較し有意に予後が不良であり、最も大きな統計学的有意性が認められた (図 5C)。以上の結果より、*IL34* の発現と *CSF1R* および *CD163* の発現を統合して評価することで、より正確に卵巣がん患者の予後を予測することが可能であると考えられる。

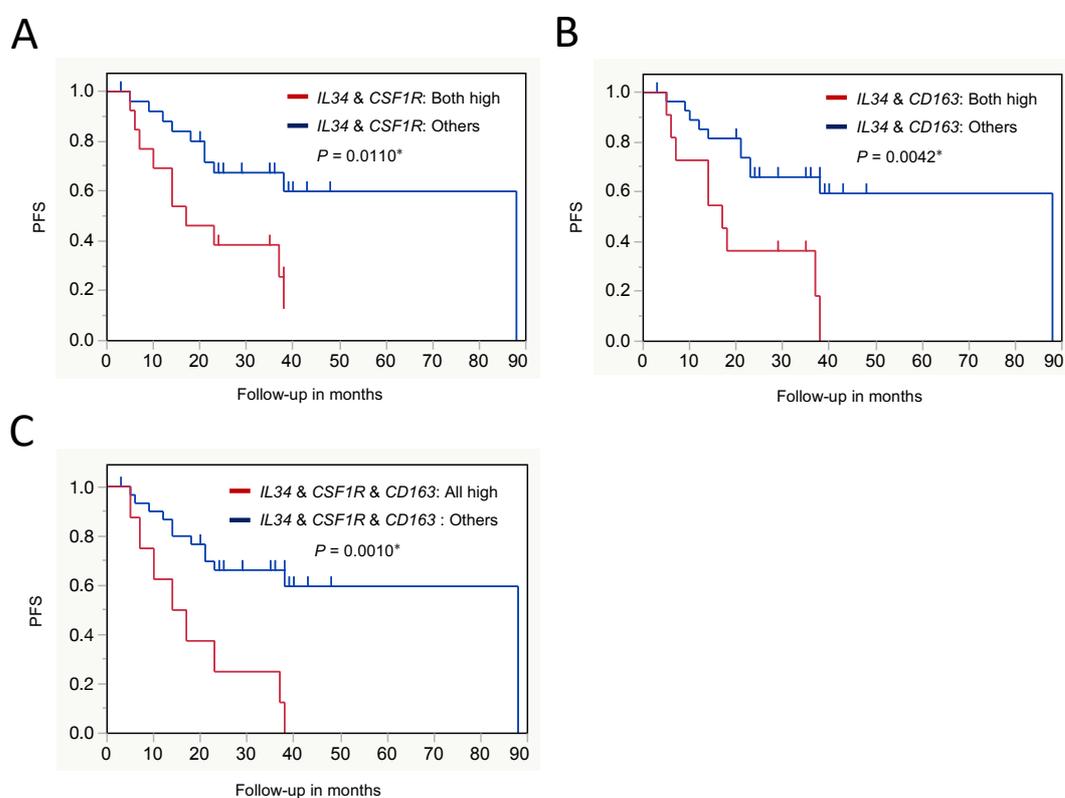


図 5. *IL34*, *CSF1R*, *CD163* の発現を基軸とした患者の予後予測解析
A-B) 腫瘍組織における *IL34* と *CSF1R*, もしくは *IL34* と *CD163* の発現と PFS の相関解析. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, log-rank test.
C) 腫瘍組織における *IL34*, *CSF1R*, *CD163* 全ての発現と PFS の相関解析. *** $p < 0.001$, log-rank test.

1-3. 化学療法耐性を獲得したがんにおける IL34 の発現解析

1-3-1. 化学療法耐性ヒト卵巣がん細胞株の樹立と IL34 の発現解析

肺がんを用いた先行研究において、化学療法耐性を獲得したがん細胞株より IL34 が多量に産生されることが示され、さらに IL34 産生株から IL34 の発現を KD (knockdown) することにより治療感受性を再び示すことが明らかとなった (Baghdadi et al., 2016b). このことは、がん細胞由来の IL34 の発現の有無が化学療法における奏功の指標となることを示しており、耐性を有したがんに対する治療戦略としての IL34 標的療法の有用性を示唆するものである. 本研究では以上の知見を卵巣がんへ応用することを考えた. 始めにヒト卵巣がん細胞株である KF28, OVISe, OVTOKO のシスプラチンまたはドキソルビシンそれぞれの耐性株の樹立を目指した. 1×10^0 nM, 1×10^1 nM, 1×10^2 nM, 1×10^3 nM, 5×10^3 nM, 1×10^4 nM の濃度で抗がん剤を含有する培養液 (コントロール培養液には薬剤の溶媒である生理食塩水または DMSO を添加) を用いて 3 種の細胞を培養し, 48 時間後の viability が 50-60% となる濃度を選定した (図 6A, B). 薬剤含有培養液と非含有培養液を用いた培養を交互に行い薬剤耐性株を樹立した後, qPCR にて *IL34* の発現を測定したところ, 肺がん細胞株を用いた際と同様に薬剤耐性株における *IL34* の発現上昇が認められた (図 6C, D). また, ELISA によるタンパク質発現を定量したところ, 遺伝子発現と同様に薬剤耐性株における IL34 の発現の上昇を認めた (図 6E, F). 以上より, 卵巣がんの系においても, 抗がん剤耐性を獲得した株において IL34 の発現が誘導されることが示された.

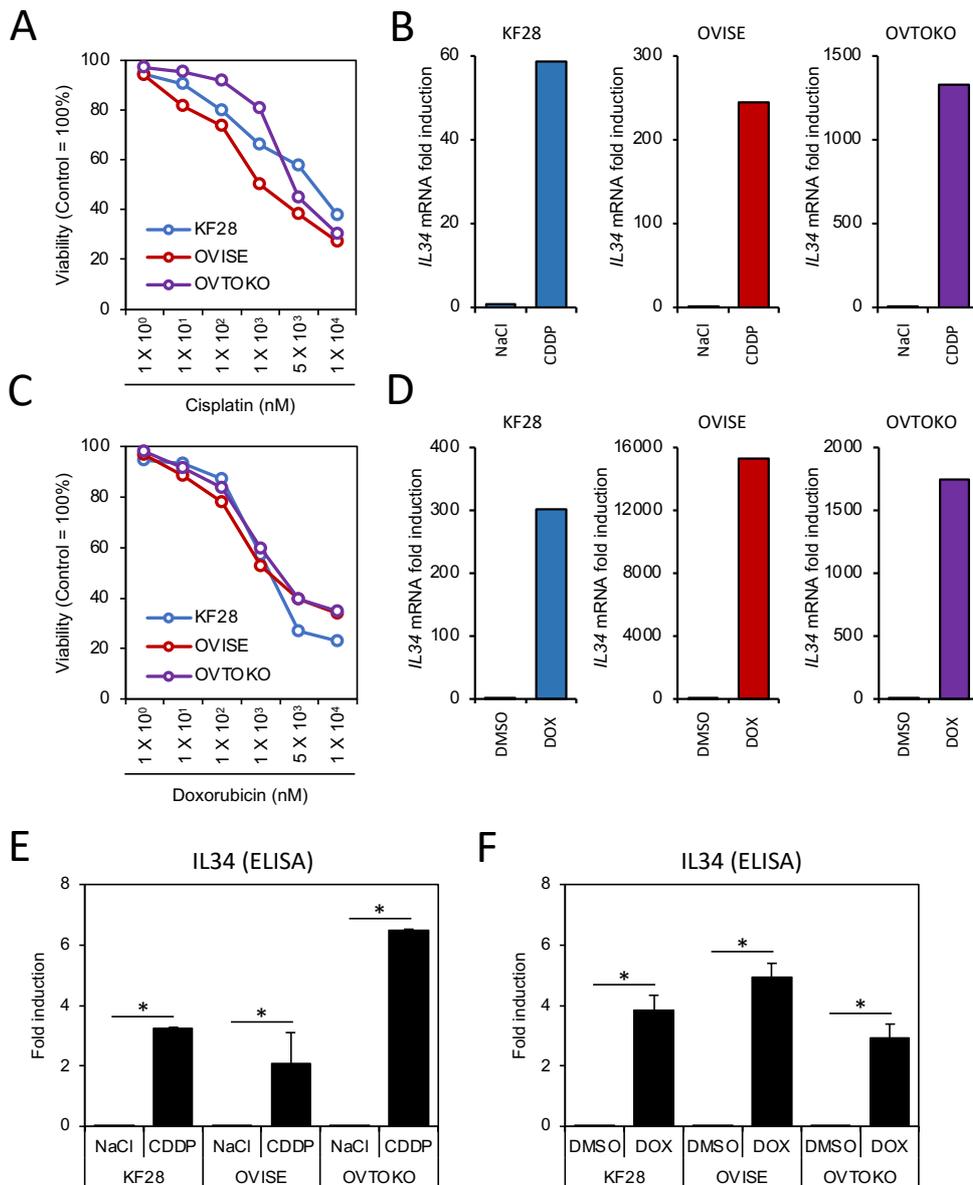


図6. 抗がん剤耐性株の樹立と IL34 の発現解析

A,C) KF28, OVISE, OVTOKO を用いたシスプラチン, ドキソルビシンへの耐性能の検討. 縦軸は細胞の生存率, 横軸は薬剤の濃度を示す. 培養期間は 48 時間とした.

B,D) 各細胞におけるコントロール株および耐性株における *IL34* の発現解析. 内部標準として *B-ACTIN* を用いた. 独立して実施した 3 回の実験の平均値および標準誤差を示す.

E-F) 細胞培養液中の IL34 の濃度測定. * $p < 0.05$, Student's t-t test.

1-3-2. 卵巣がん再発巣における IL34 の発現解析

細胞株を用いた検討にて、抗がん剤耐性を獲得したがん細胞において IL34 の発現が誘導されていることが示された。この知見が臨床検体においても観察されるかを検討するため、手術および初回化学療法を行った後に再発してしまった患者の原発巣および再発巣における IL34 の発現を免疫染色法にて評価した。診断から再発腫瘍の摘出までのスケジュールを示す (図 7A)。本検討では、薬剤治療後の再発巣を *in vitro* 実験系における薬剤耐性株に対応した条件であると定義した。計 9 検体の内、patient-5 と patient-9 は 3 度の再発を経験しており、都度再発巣を摘出している。解析の結果、9 検体の内 5 検体 (約 56%) で再発巣における IL34 の発現が有意に高いことが示された (図 7B)。Patient-9 においては初回の再発時における IL34 の発現が原発巣よりも減少していたが、複数の再発を経ると共に、病巣における IL34 の発現上昇が認められた。以上より、実臨床においても化学療法による治療介入が病巣ににおける IL34 の発現を増加させ得ることが示された。

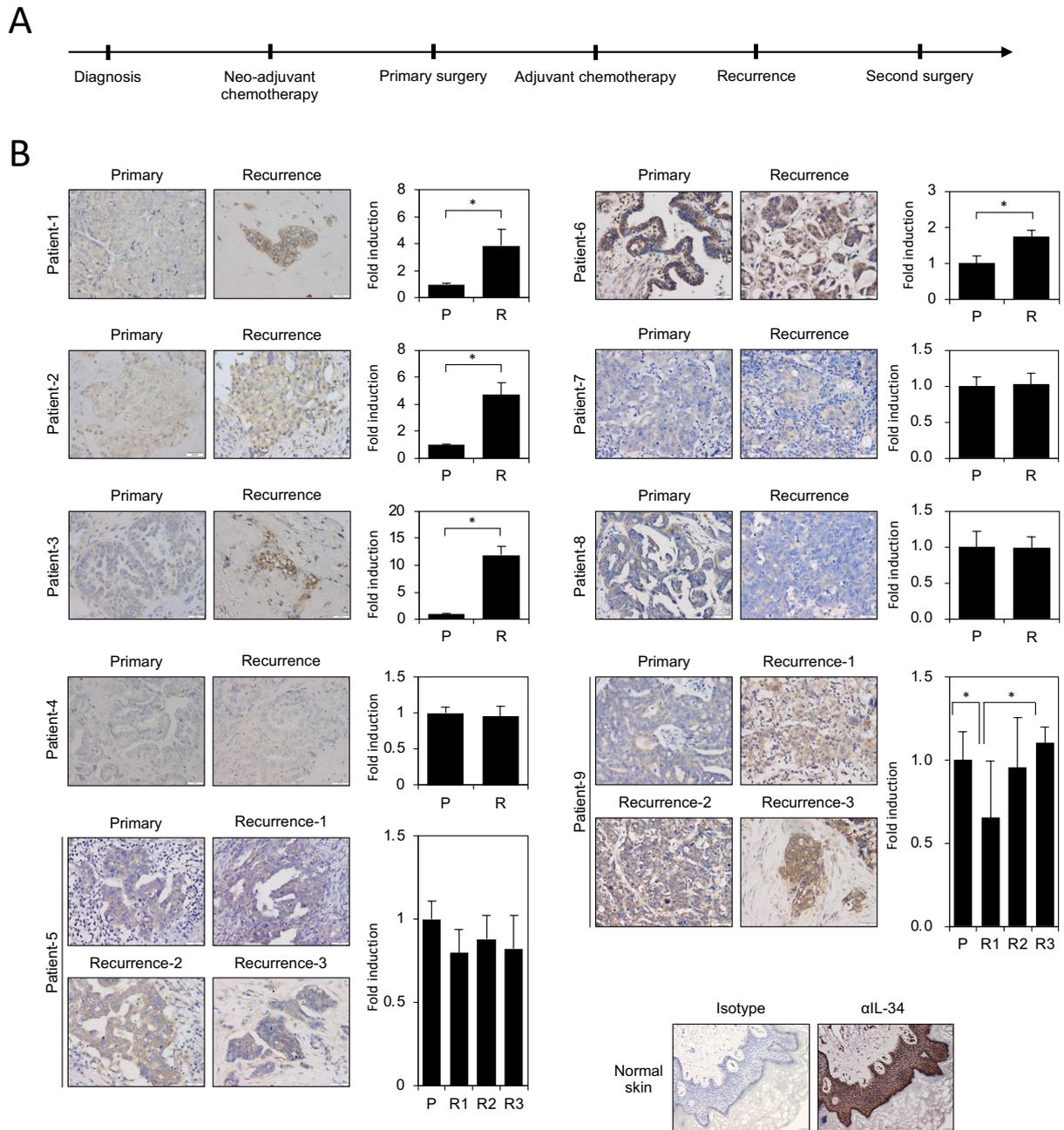


図7. 抗がん剤治療歴を有する患者の病巣におけるIL34の発現解析

A) 診断から手術，薬剤治療を含めた治療介入歴の概略図。

B) 各患者検体におけるIL34の免疫染色像。棒グラフは原発巣の発現強度に対する再発巣でのfold changeを示し，平均値と標準誤差を示す。* $p < 0.05$ (log-rank test)。ポジティブコントロールとして正常なヒトの皮膚組織を用いた(右下画像)。

1-4. マウスモデルを用いた IL34 とがんの悪性度との相関解析

これまでの検討により、腫瘍組織における *IL34* の発現は卵巣がん患者の予後不良因子であり、また抗がん剤治療抵抗性の獲得にがん細胞由来の *IL34* が寄与することが示された。これらの知見は *IL34* が卵巣がん治療における有用な標的となり得ることを示唆している。そこで非臨床 POC を獲得するため、マウスを用いた *in vivo* 実験を実施した。

始めに、*IL34* を恒常的に発現するマウス卵巣がん細胞株 HM-1 より CRISPR-Cas9 システムを用いて *IL34* KO (knockout) 株 (*IL34*^{KO} HM-1) および Mock HM-1 を樹立した (図 8A)。これらの株を B6C3F1 (♀ 6-8 週齢) の皮下に移植し、経時的に腫瘍の大きさを計測することで病勢の違いを検討した。その結果、がん細胞由来 *IL34* を KO することで、腫瘍の増大が抑制されることが示された (図 8B)。

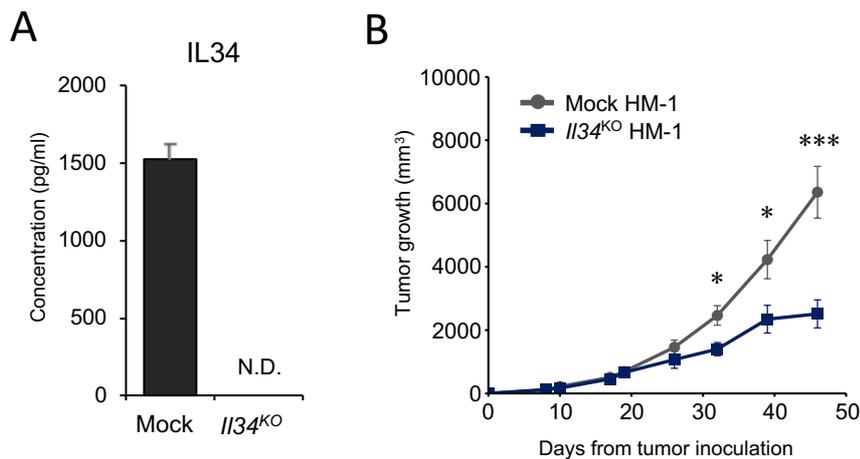


図 8. マウス卵巣がん細胞株由来 *IL34* が腫瘍の増大に及ぼす影響

A) 6 well plate に 1×10^6 /well で細胞を播種し、2 ml の培養液中で 48 時間培養した後、培養上清に含まれる *IL34* の濃度を ELISA にて測定した。独立した 3 回の実験の平均値と標準語差をグラフに示す。N.D.=not detected.

B) 2×10^5 cells をマウスの右腹側部に皮下移植し、経時的に腫瘍の大きさを測定した (各群 $n=5$). * $p<0.05$, *** $p<0.001$, Student's t-test.

より実臨床に近い状況を模すため、卵巣への同所性移植法を検討した。本モデルは皮下移植モデルのように大きさによる腫瘍の増大を測定することが困難である。そこで細胞株に luciferase を遺伝子導入し、*in vivo* イメージングにより腫瘍の動態を観察することとした (Toyoshima et al., 2009)。レンチウイルスを用いた遺伝子導入法により Mock HM-1 および *I34*^{KO} HM-1 に luciferase を発現させ、検出効率を IVIS にて定量した。その結果、両細胞株において同等レベルの luciferase の発現が検出された (図 9A, B)。次に luciferase の強制発現による増殖速度への影響を検討するため、MTT assay を実施した。結果、細胞間の増殖速度に有意な差は認められなかった (図 9C, D)。また、マウスに移植した後に発光の検出が可能であるかを移植直後のマウスを用いて検討したところ、観察可能な発光強度を認めた (図 9E)。

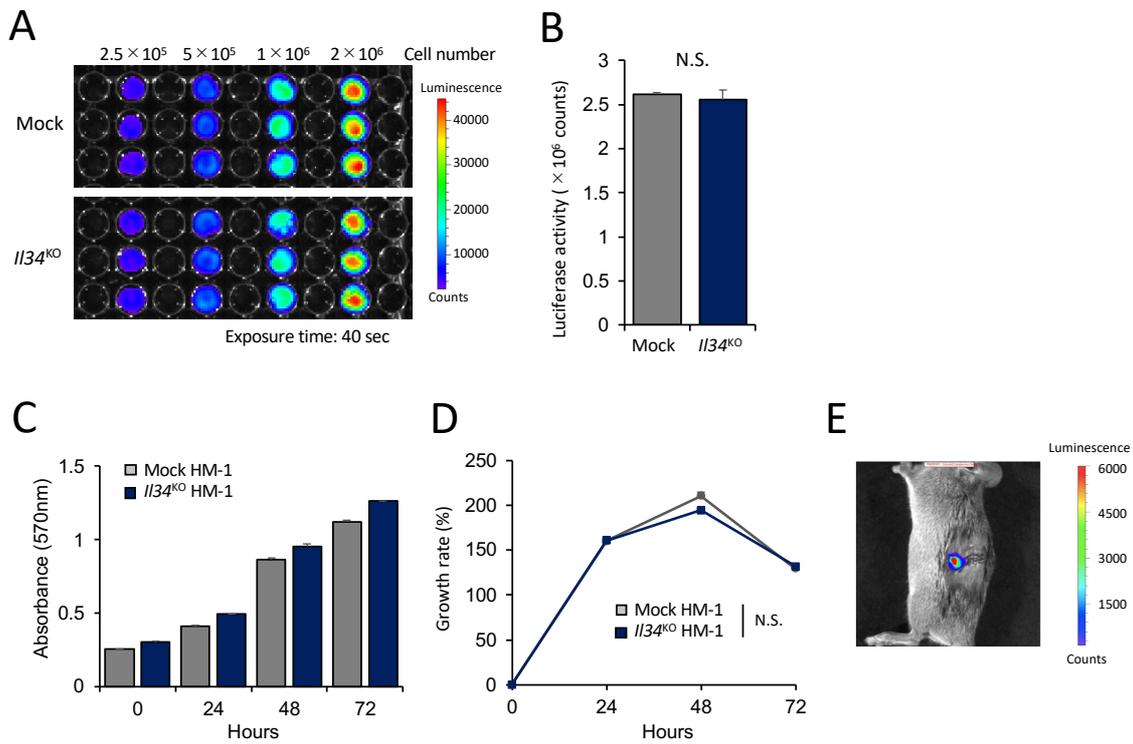


図 9. 細胞株への luciferase の導入効率の検討および *in vivo* における定量

A) *In vitro* における luciferase の発現解析. 各細胞数の条件毎に 3 well ずつ用意した.

B) 2×10^6 cells/well で細胞を播種した際の luciferase 発光強度. グラフは実験内の平均値と標準語差を示す. Statistics; Student's t-test.

C) MTT assay による細胞増殖速度の測定. グラフは平均値と標準語差を示す.

D) MTT assay により検出された各計測日の absorbance の前日比. グラフは平均値を示す.

E) Luciferase 発現細胞 1×10^6 を卵巣内に移植した直後の IVIS による発光検出.

樹立した luciferase 発現細胞株をマウスの卵巣に同所性移植し、経時的にがん細胞の動態を観察した。イメージング解析における最終観察日を細胞移植後 day21 とし、luciferase の検出範囲を IVIS により測定した。その結果、Mock HM-1 移植群では腹腔および胸腔を含む広範囲で luciferase のシグナルが観察された一方で、*IL34*^{KO} HM-1 移植群では卵巣付近でのシグナルは観察されたものの、胸腔を含む広範囲な広がりには認められなかった (図 10A)。また、移植後の個体生存期間を比較したところ、*IL34*^{KO} HM-1 移植群において有意な生存期間の延長が認められた (図 10B)。これらの結果はヒト検体を用いた解析にて得られた知見と一致し、がん細胞由来 IL34 ががんの増悪に寄与する因子であることが示された。

細胞移植後 day21 に回収した腫瘍塊に浸潤している免疫細胞の解析を FACS にて行った結果、*IL34*^{KO} HM-1 移植群において T 細胞、特に CD8 陽性 T 細胞の浸潤率が上昇する傾向を認めた。一方で MΦ (CD11b⁺ F4/80⁺ CD45⁺ cells) の浸潤率は Mock HM-1 移植群と比較し *IL34*^{KO} HM-1 移植群において有意に減少していた (図 10C)。以上より、がん細胞由来 IL34 の腫瘍微小環境における免疫学的作用により、腫瘍の増大が促進されることが示された。

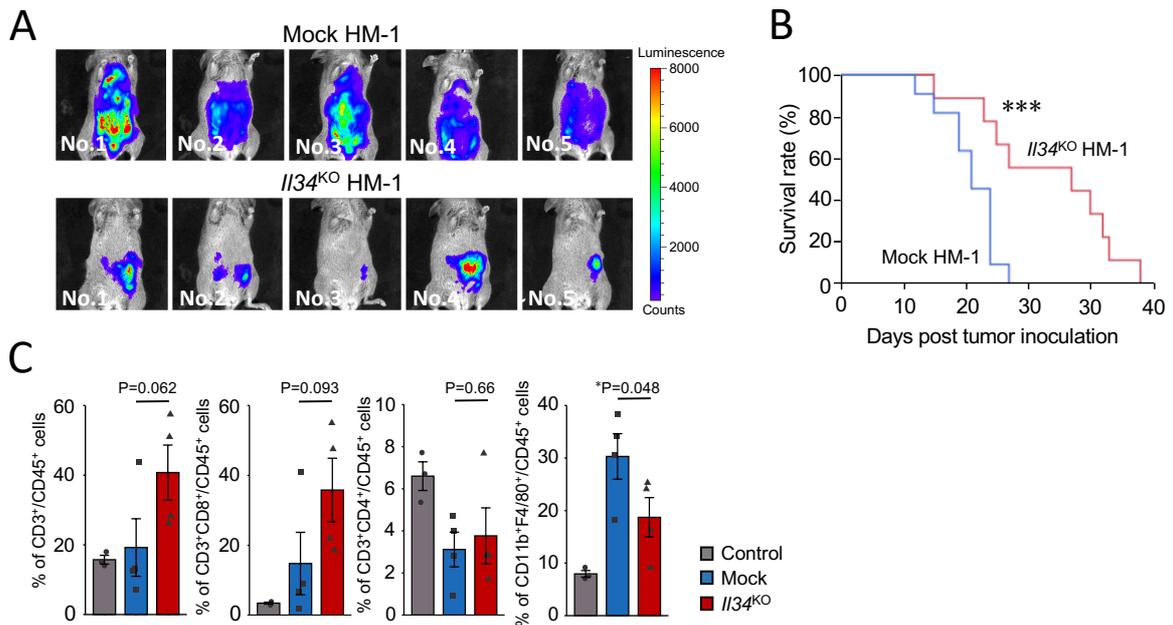


図 10. 同所性移植モデルにおける IL34 の予後と免疫環境への影響

A) 同所性移植した luciferase 発現細胞株の動態解析 (各群 n=5).

B) 同所性移植モデルにおける個体生存期間を Kaplan-Meier 曲線にて示す.

***p<0.001, Log-rank test.

C) 腫瘍内に浸潤する免疫細胞 (CD45⁺ cells) に対する各細胞分画の割合解析. グラフは平均値と標準誤差を示す (Control 群; n=3, Mock 群; n=4, I134^{KO} 群; n=4). *p<0.05, Student's t-test.

2. 免疫チェックポイント阻害療法への抵抗性における IL34 の寄与

PD-1, CTLA-4 を始めとした免疫チェックポイント分子は、がん免疫サイクルの priming phase および effector phase にて働き、T 細胞の増殖・活性化を抑制することで、がんの免疫逃避機構を成立させる主要因の一つである。本邦では 2015 年に悪性黒色腫に対する免疫チェックポイント阻害 (ICB) 治療が認可されたことを皮切りに、2022 年現在では非小細胞肺癌、ホジキンリンパ腫、食道扁平上皮がんなどへの適応拡大が進んでいる (Iranzo et al., 2022)。多種のがんに対し治療効果が認められていることは、ICB 治療が抗腫瘍免疫の主軸となるメカニズムをターゲットとして据えられていることの裏付けとなる。一方、ICB 治療を実施した患者の予後解析が進むと共に、単剤での奏率が 2-3 割に留まってしまふことや、治療抵抗性を有する症例が認められることが明らかとなった (Iranzo et al., 2022)。そのような背景より、近年 ICB 治療の奏功を予測するためのバイオマーカーの探索や、抵抗性の解除を促すような治療介入法が模索されている。

前述した通りがん細胞由来 IL34 は化学療法に対する治療抵抗性に寄与することが示され、そのメカニズムには IL34 を基軸として形成された腫瘍環境内の免疫系が関与することが示唆された。特にがん細胞由来 IL34 を KO することで、抗腫瘍免疫におけるエフェクター細胞である T 細胞の浸潤率が腫瘍局所で増加したことから、抗 PD-1 阻害療法などの T 細胞を標的とした治療において IL34 が治療の奏功率を低下させる要因になることが考えられた。そこで以降の実験では、がん細胞由来 IL34 が ICB 治療抵抗性に及ぼす影響をマウスモデルを用いて検討する。

2-1. がん細胞由来 IL34 の発現阻害による ICB 治療感受性への影響解析

HM-1 は IL34 のみならず、CSF1 も恒常的に発現する細胞株である。先に述べた様に IL34 と CSF1 は共に CSF1R に結合する。一方で、両者の homology は 15%以下であり、CSF1R に結合した後に生じる細胞内ドメインにおけるリン酸化部位が異なることから、誘導される分子シグナル、引いては誘導される細胞の生物学的機能に違いがあることが示唆されている (Boulakirba et al., 2018)。また、HM-1 の *in vivo* モデルは抗 PD-1 抗体による ICB 治療への抵抗性を有することが先行研究で明らかとなっていた (data not shown)。そこで、がん細胞由来 IL34 または CSF1 の ICB 治療抵抗性への寄与を検討するため、

WT の HM-1 から Mock HM-1, $Il34^{KO}$ HM-1 に加え $Csf1^{KO}$ HM-1 を樹立し、種々の検討を実施することとした (図 11A). *In vitro* にて遺伝子 KO による細胞の増殖速度への影響が無いことを MTT assay にて示した (図 11B). 次に各細胞株の皮下移植モデルに抗 PD-1 抗体を用いた ICB 治療を施し、腫瘍の大きさを経時的に測定した. その結果, $Il34^{KO}$ HM-1 移植群でのみ治療による腫瘍増大の抑制が認められた (図 11C, D). このことは、腫瘍微小環境における IL34 の発現が, CSF1 の有無にかかわらず ICB 治療の奏効率を低下させる一因であることを示唆する. 以降の実験では, Mock HM-1 および $Il34^{KO}$ HM-1 を用いた検討を行うこととした.

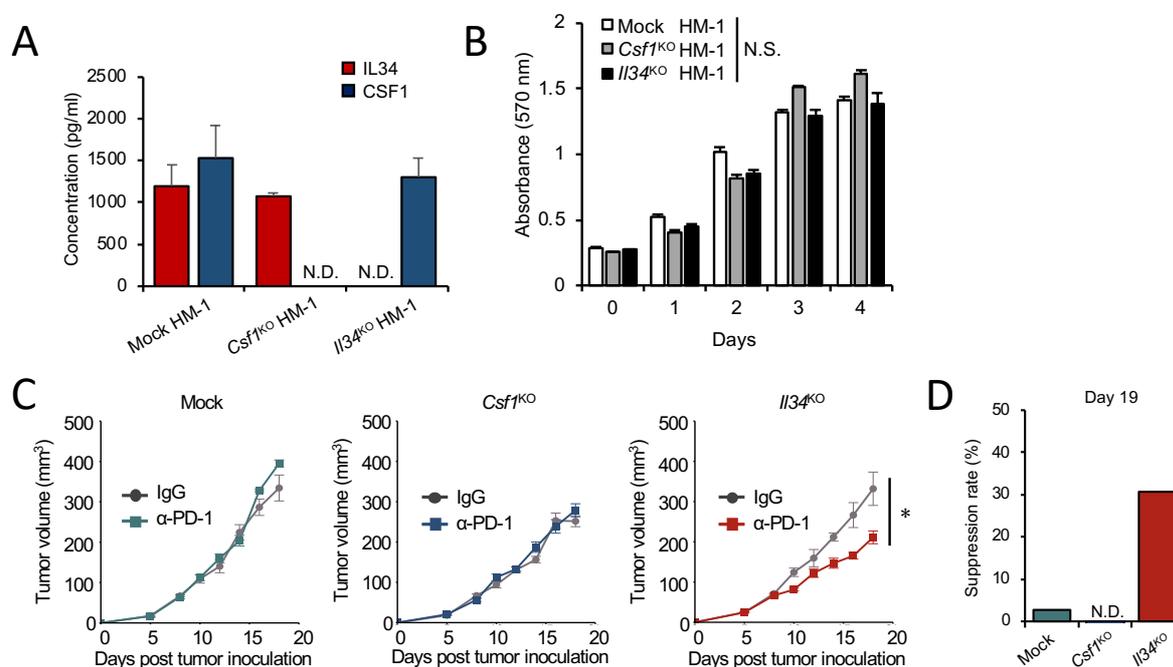


図 11. がん細胞由来 IL34 および CSF1 の ICB 治療抵抗性への寄与

A) ELISA による IL34 および CSF1 のタンパク質発現解析. グラフは平均値と標準誤差を示す (各群 n=3). N.D.=not detected.

B) MTT assay による *in vitro* での各細胞株の増殖速度の検討. グラフは平均値と標準誤差を示す (各群 n=3). N.S.=not significant, Tukey's multiple comparison test.

C) 皮下移植した細胞株により形成された腫瘍の増殖曲線 (各群 n=4). 実験は独立して 2 回行った. * $p < 0.05$, two-tailed Student's t-test.

D) 細胞移植後 day19 における腫瘍の増大抑制率. N.D.=not detected. グラフは平均値を示す.

2-2. がん細胞由来 IL34 を基軸とした腫瘍内免疫環境の解析

PD-1/PD-L1 結合阻害療法の奏功率は、腫瘍組織における PD-L1 の発現と正の相関を示す (Nishino et al., 2018). また、腫瘍免疫環境における CD8 陽性 T 細胞および CD4 陽性 T 細胞の浸潤率が高いほど ICB 治療の奏効率は高い (van der Leun et al., 2020; Tay et al., 2021). これらの背景より、*Il34*^{KO} HM-1 移植群において抗 PD-1 抗体治療による効果が認められた理由として、細胞株における PD-L1 の発現変化および腫瘍微小環境における T 細胞をはじめとした免疫細胞の浸潤率の変化が生じているという仮説を立て、以下の実験を行った。

始めに樹立した Mock HM-1 と *Il34*^{KO} HM-1 の細胞表面における PD-L1 の発現を FACS にて解析した結果、細胞株間に発現の差異は認められなかった (図 12A). 次にそれぞれの細胞株の担がんマウスに抗 PD-1 抗体治療を施した後、細胞移植後 day19 で腫瘍を摘出し、腫瘍内における免疫細胞の割合を FACS にて解析した。その結果、腫瘍内浸潤免疫細胞 (CD45⁺ DAPI⁻ cells) に対する CD8 陽性 T 細胞 (CD3e⁺ CD8a⁺ cells) および CD4 陽性 T 細胞 (CD3e⁺ CD4⁺ cells) の割合が *Il34*^{KO} HM-1 移植群において有意に上昇していることが示された (図 12B, C). 一方、がん細胞由来 IL34 の KO による MΦ (CD11b⁺ F4/80⁺ cells) の浸潤率の変化は認められなかった (図 12D).

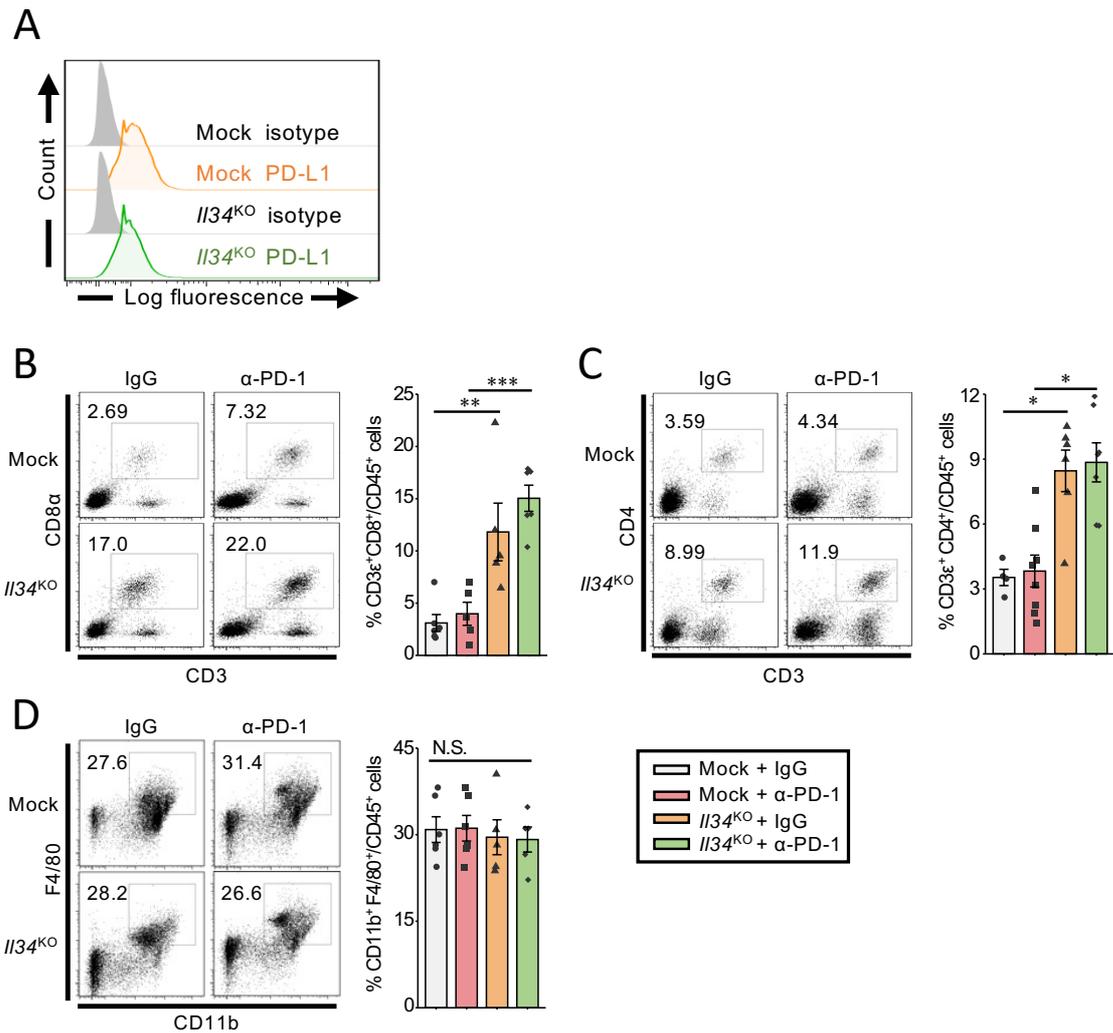


図 12. 細胞株由来 IL34 の KO による PD-L1 発現および免疫環境への影響解析
 A) FACS による Mock HM-1 および *Il34*^{KO} HM-1 の細胞表面における PD-L1 の発現解析.

B) 腫瘍内浸潤免疫細胞に対する CD8 陽性 T 細胞の割合解析. Dot plot 上には解析対象分画の割合数値を示す. グラフは平均値と標準誤差を示す (各群 n=4-6). **p<0.01, ***p<0.001, Tukey's multiple comparison test.

C) 腫瘍内浸潤免疫細胞に対する CD4 陽性 T 細胞の割合解析. Dot plot 上には解析対象分画の割合数値を示す. グラフは平均値と標準誤差を示す (各群 n=4-6). *p<0.05, Tukey's multiple comparison test.

D) 腫瘍内浸潤免疫細胞に対する MΦ の割合解析. Dot plot 上には解析対象分画の割合数値を示す. グラフは平均値と標準誤差を示す (各群 n=4-6).

N.S.=not significant, Tukey's multiple comparison test.

IL34の有無が腫瘍内の免疫環境に影響を及ぼすことが示されたが、浸潤したT細胞等の活性化の是非については検討されていない。そこで、腫瘍内における免疫細胞の活性化および局所での炎症のマーカーとして用いられる炎症性サイトカインIFN- γ , TNF- α , およびT細胞の遊走を促進するケモカインであるCXCL9, CXCL10, CXCL11の遺伝子発現をqPCRにて定量した。その結果、*Ifng*の発現は抗PD-1抗体治療の有無に関わらずがん細胞由来IL34のKOによって上昇することが示された。また、*Tnfa*, *Cxcl9*は抗PD-1抗体治療を施した場合にのみ、*Il34*^{KO} HM-1移植群における発現の上昇が認められた。一方で、*Cxcl10*, *Cxcl11*の発現は変化しなかった(図13)。このことから、IL34は腫瘍環境において*Cxcl9*の発現抑制を介したT細胞の遊走阻害および免疫細胞の活性化に立脚した局所炎症の抑制に寄与することが示唆された。

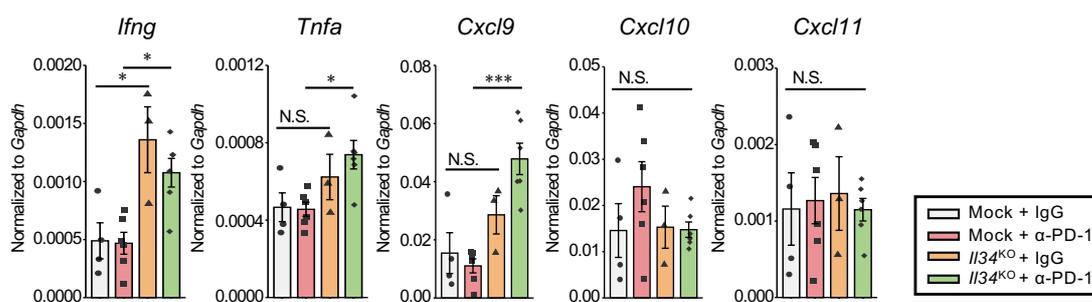


図13. 腫瘍内における炎症関連遺伝子の発現解析

各細胞株移植群より回収した腫瘍塊をサンプルとした遺伝子発現解析。グラフは平均値と標準誤差を示す(各群n=3-6)。N.S.=not significant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Tukey's multiple comparison test.

2-3. HM-1 腫瘍内に浸潤する CSF1R 発現細胞の解析

CSF1, IL34 が結合する受容体 CSF1R (CD115) は, 免疫細胞において主に骨髓由来細胞に発現することが知られている (Dai et al., 2002b). サイトカインを介した細胞内シグナル伝達は受容体/リガンドのインタラクションに依存し, CSF1, IL34 は CD115 発現細胞に対し生理的活性を有していると考えられる. これまでに HM-1 を用いた *in vivo* モデルにおいて CD115 の発現が如何なる細胞にて認められるかは検討されてこなかった. そこで Mock HM-1 および *Il34*^{KO} HM-1 により形成された腫瘍内に浸潤する CD115 陽性免疫細胞の同定した上で, がん細胞由来 IL34 の有無によるそれらの細胞の population の変化を解析した. その結果, CD115 発現細胞は免疫細胞中の割合の高い順に DCs (CD11c⁺MHC class II⁺ cells), MΦ (CD11b⁺F4/80⁺ cells), T 細胞 (CD3ε⁺ cells), そして分類が困難であった細胞 (other cells) であると同定できた (図 14A). また, がん細胞由来 IL34 を KO することにより CD115 を発現する DCs および T 細胞の増加, MΦ および other cells の減少傾向が認められた (図 14B). さらに, CD115 陽性免疫細胞の全体に対する割合の変化を比較したところ, *Il34*^{KO} HM-1 移植群において有意な増加が認められた (図 14C). つまり, HM-1 腫瘍組織における IL34 の発現が, CD115 陽性免疫細胞の分化, 増殖, 遊走などの生理学的機能を抑制することが示唆された.

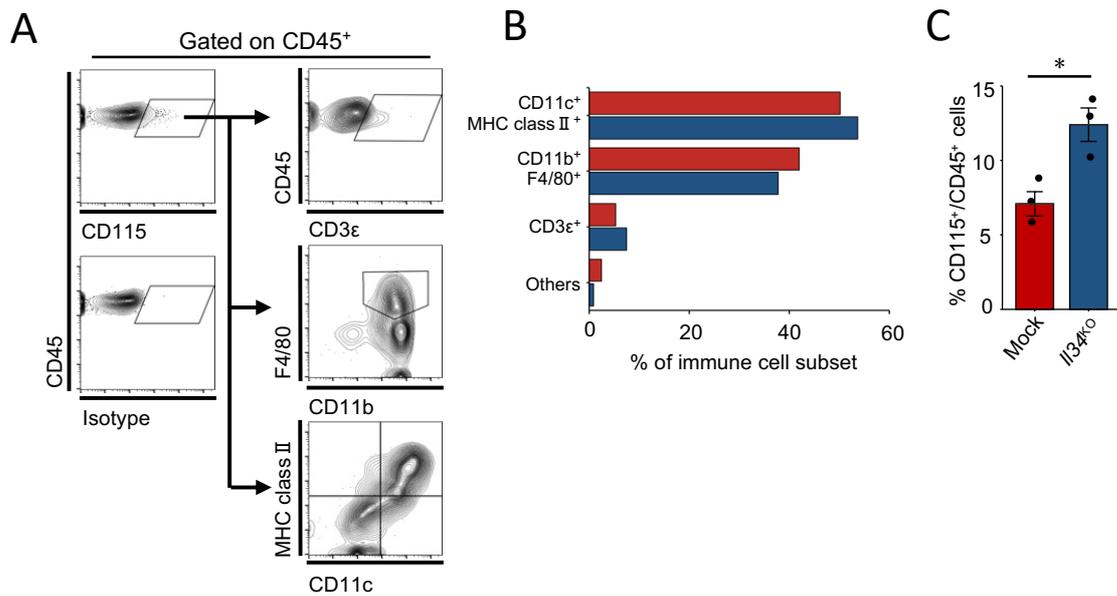


図 14. HM-1 腫瘍における CD115 陽性細胞の同定

A) FACS 解析による CD115 陽性免疫細胞の同定.

B) CD115 陽性免疫細胞における各細胞サブセットの割合. グラフは割合の平均値を示す (各群 n=3).

C) 腫瘍内免疫細胞全体に対する CD115 陽性細胞の割合解析. グラフは平均値と標準誤差を示す (各群 n=3). *p<0.05, two-tailed Student's t-test.

2-4. 抗 IL34 療法の非臨床 POC の獲得

2-4-1. 抗 PD-1 抗体と抗 IL34 抗体の併用療法による治療効果の検討

ここまでの解析より、がん細胞由来 IL34 が T 細胞の浸潤率を低下させ、抗 PD-1 抗体を用いた ICB 治療への抵抗性に寄与することを示した。実臨床にて IL34 を標的とした治療介入を考慮した際に、がん細胞特異的に遺伝子発現調節を施し IL34 の発現を抑制することは現状困難であることから、中和抗体による IL34 の不活化が有用であると考えた。そこで抗 IL34 抗体による治療効果をマウスモデルにて実施し、非臨床 POC の獲得を目指した。

始めに Mock HM-1 をマウスの腹側部に皮下移植し、抗 PD-1 抗体単剤投与群と抗 PD-1 抗体および抗 IL34 抗体併用群における腫瘍の増大を経時的に観察した (図 15A)。その結果、もとより細胞株が有していた抗 PD-1 抗体治療に対する抵抗性は抗 IL34 抗体投与により解除され、腫瘍の増大が治療により有意に抑制された (図 15B)。また、細胞移植後 day19 における腫瘍塊の重量においても併用群で有意に低下していた (図 15C)。摘出した腫瘍塊に浸潤する免疫細胞の解析を実施したところ、*Il34*^{KO} HM-1 移植群の解析時と同様に、併用群において CD8 陽性 T 細胞の浸潤免疫細胞に対する割合の増加を認めた。一方で CD4 陽性 T 細胞の浸潤率は治療群間で差異はなく、MΦ の浸潤率は併用群にて有意に減少していた (図 15D)。つまり、抗 IL34 抗体投与モデルにおいて観察された腫瘍内免疫環境の変化は *Il34*^{KO} HM-1 移植モデルとは異なるものの、ICB 治療感受性の獲得は同様に認められた。

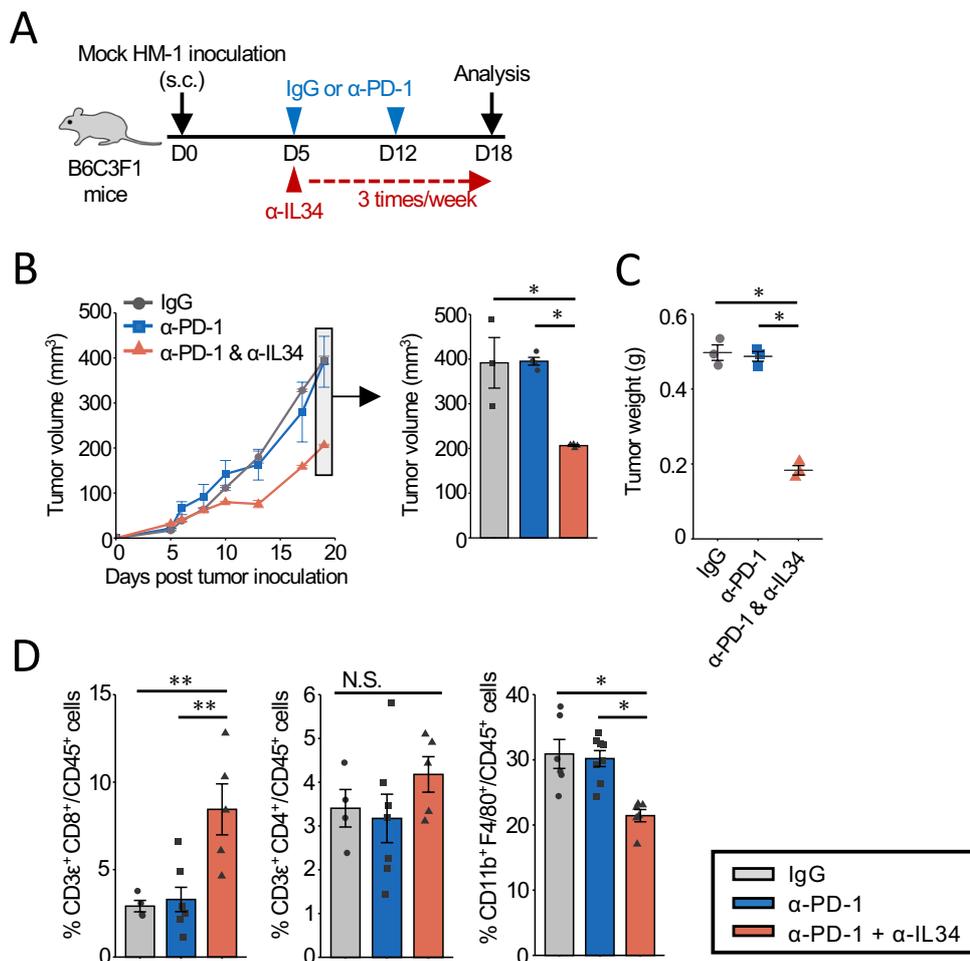


図 15. 抗 PD-1 抗体と抗 IL34 抗体の併用療法による治療効果の検討

A) 抗体の投与スケジュールを示す。

B) 皮下に形成された腫瘍の増殖曲線および細胞移植後 day19 における腫瘍サイズの棒グラフ (control IgG 群 n=3, 抗 PD-1 抗体単剤群 n=4, 抗 PD-1, 抗 IL34 抗体併用群 n=4). グラフは平均値と標準誤差を示す. *p<0.05, Tukey's multiple comparison test.

C) 細胞移植後 day19 に摘出した腫瘍塊の重量. グラフは平均値と標準誤差を示す. *p<0.05, Tukey's multiple comparison test.

D) 腫瘍塊より抽出した免疫細胞中における CD8 陽性 T 細胞, CD4 陽性 T 細胞, MΦの割合解析. グラフは平均値と標準誤差を示す (各群 n=3-7).

N.S.=not significant, *p<0.05, **p<0.01, Tukey's multiple comparison test.

2-4-2. 抗 CSF1R 抗体による治療効果との比較検討

現在構想されている MΦ 標的療法の一つである抗 CSF1R 抗体治療の奏功と抗 IL34 抗体治療の奏功を比較するため、前項で示した実験系に抗 PD-1 抗体および抗 CSF1R 抗体併用群を加え、追加実験を行った (図 16A). その結果、抗 IL34 抗体による治療は抗 CSF1R 抗体を用いた際の治療と同等の腫瘍の増大抑制効果を示した (図 16B, C). この結果は、IL34 標的療法が CSF1R 標的療法の代替となり得ることを示す。

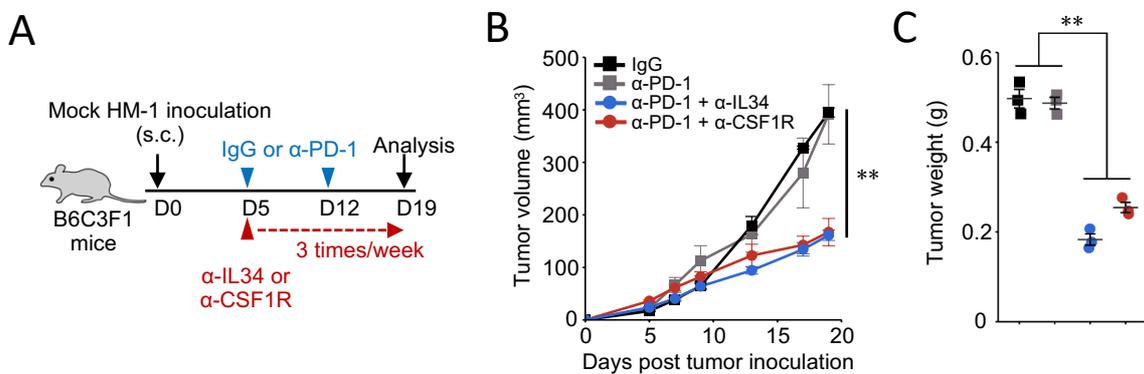


図 16. 抗 CSF1R 抗体と抗 IL34 抗体による治療効果の比較検討

A) 抗体の投与スケジュールを示す。

B) 皮下に形成された腫瘍の増殖曲線を示す (各群 n=3-4). グラフは平均値と標準誤差を示す. * $p < 0.05$, Tukey's multiple comparison test.

C) 細胞移植後 day19 に摘出した腫瘍塊の重量. グラフは平均値と標準誤差を示す. ** $p < 0.05$, Tukey's multiple comparison test.

3. IL34 依存的に誘導される TAM の同定

CSF1R を介した MΦ の誘導におけるリガンドは CSF1 一辺倒で考えられてきたが, IL34 の発見により知見が広がった. 両サイトカインの homology が低い (<15%) ことや CSF1R の細胞内ドメインにおけるリン酸化部位が異なることなどに立脚し, それぞれのサイトカインによって誘導される MΦ には機能的な差異があることが示唆されてきた (Boulakirba et al., 2018). しかし, 実験的にその違いを示した報告は乏しく, 未だ不明瞭である.

本研究結果より, IL34, CSF1 共に発現が認められる細胞から一方の発現を KO した株の担がんマウスにおいて, 抗 PD-1 抗体治療への抵抗性が *Il34*^{KO} HM-1 移植群のみで認められたことから (図 11C), IL34 と CSF1 は腫瘍内で異なる免疫学的作用を発揮することが示唆された. そこで, IL34 または CSF1 依存的に誘導される TAM (IL34-TAM および CSF1-TAM) の腫瘍微小環境における機能を同定することで, TAM を基軸とした腫瘍免疫構築メカニズムにおける新たな知見をもたらすことができると考えた. 以降の実験では次世代シーケンス (NGS) 解析による網羅的遺伝子発現解析および scRNA-seq を用いた TAM の詳細なサブセット解析を実施し, IL34-TAM の同定に加え, CSF1-TAM との機能的差異について検討する.

3-1. IL34 または CSF1 により誘導される BMMΦ の機能比較

3-1-1. BMMΦ の誘導効率と形態の比較

TAM の機能解析を実施するにあたり, *in vitro* 実験系において IL34, CSF1 によって誘導された MΦ が異なる機能を有し得るのかを検討するため, マウス骨髄細胞 (bone marrow cells; BMCs) より誘導した骨髄細胞由来 MΦ (BMMΦ) を用いた解析を行った (図 17A). 始めに recombinant IL34 または recombinant CSF1 (rIL34, rCSF1) を用いて BMCs より BMMΦ (IL34-BMMΦ, CSF1-BMMΦ) を誘導し, 細胞表面における MΦ マーカータンパク質である CD11b および F4/80 の発現を比較した. その結果, 細胞間における発現に差異は認められなかった (図 17B). 一方, サイトカイン添加時より誘導される BMMΦ の細胞数を経時的に算出したところ, CSF1 でより効率的に BMMΦ が誘導されることが分かった (図 17C). 誘導された BMMΦ の形態上の差異は認められなかった (図 17D).

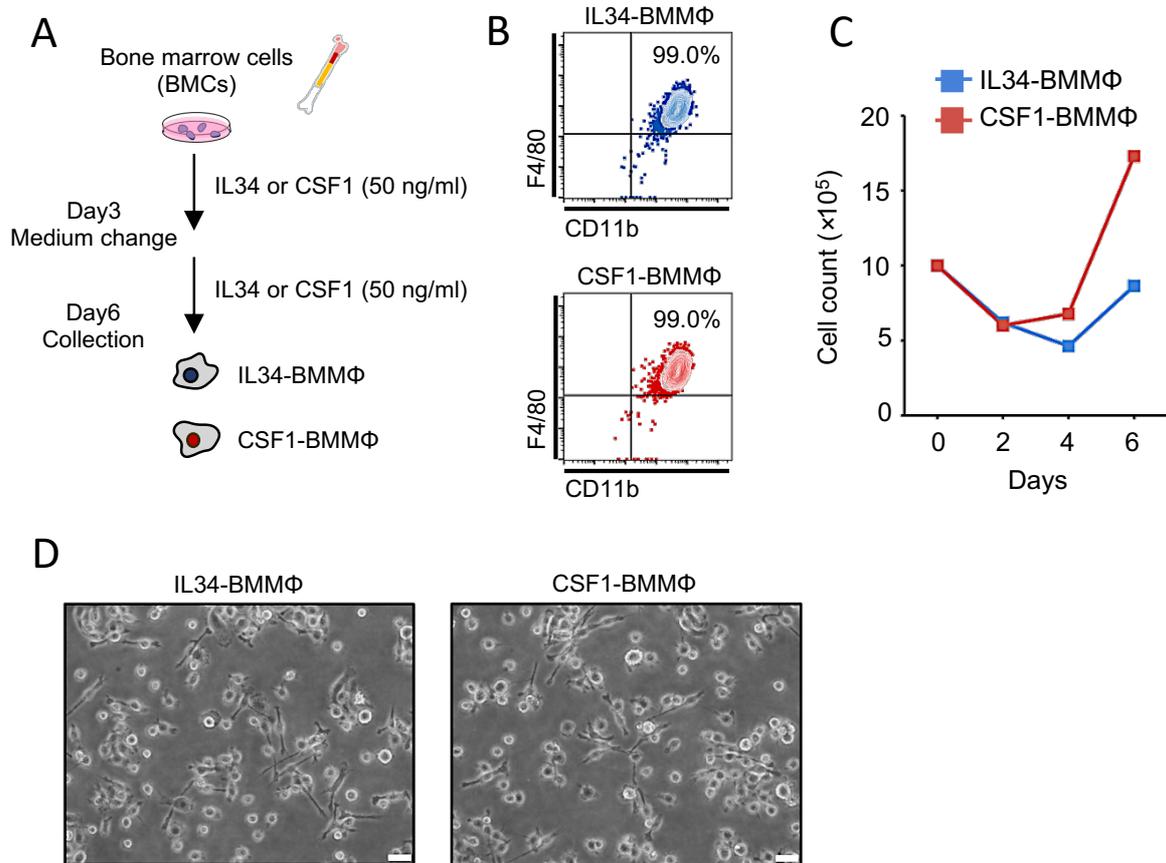


図 17. IL34-BMMΦ, CSF1-BMMΦの誘導効率と形態の比較

A) BMMΦの誘導プロトコル. マウスの BMCs を 5×10^6 cells/10 cm dish で播種し培養する. 播種後 day3 で新たに培養液を調整し, 既存の細胞上清と 1:1 の割合で混合した後, さらに 72 時間培養を続けた.

B) 誘導した IL34-BMMΦ と CSF1-BMMΦ の細胞表面における CD11b と F4/80 の発現解析.

C) IL34-BMMΦ と CSF1-BMMΦ の経時的な細胞数の推移. Day0 は誘導開始時点を示す. グラフは各解析日の細胞数の平均値を示す. 実験は独立して 3 回実施し, 代表的な実験系の結果を示す.

D) 誘導開始後 day6 における IL34-BMMΦ と CSF1-BMMΦ の形態観察. スケールバーは 200 μm を示す.

3-1-2. IL34-BMMΦ, CSF1-BMMΦに特徴的な生物学的機能の推定

各 BMMΦが有する生物学的機能を推定するため、BMMΦから抽出した total RNA をサンプルとし、NGS による遺伝子発現解析を実施した (図 18A). 解析結果より、IL34-BMMΦで有意且つ 2 倍以上発現の高い 82 種の遺伝子と、CSF1-BMMΦで有意且つ 2 倍以上発現の高い 91 種の遺伝子を同定した (p-value<0.05, data not shown). これらの遺伝子群を gene ontology (GO) 解析ソフトウェアである Metascape (National Institutes of Health) に入力し、各 BMMΦが有する生物学的機能の推定を行った. 解析の結果、複数の特徴を抽出することに成功した (図 18B). 中でも、IL34-BMMΦの特徴として認められた GO:0002478 antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen (抗原提示能) に着目し、BMMΦ間で T 細胞との相互作用に違いがあるという仮説を立て、以降の実験を行った.

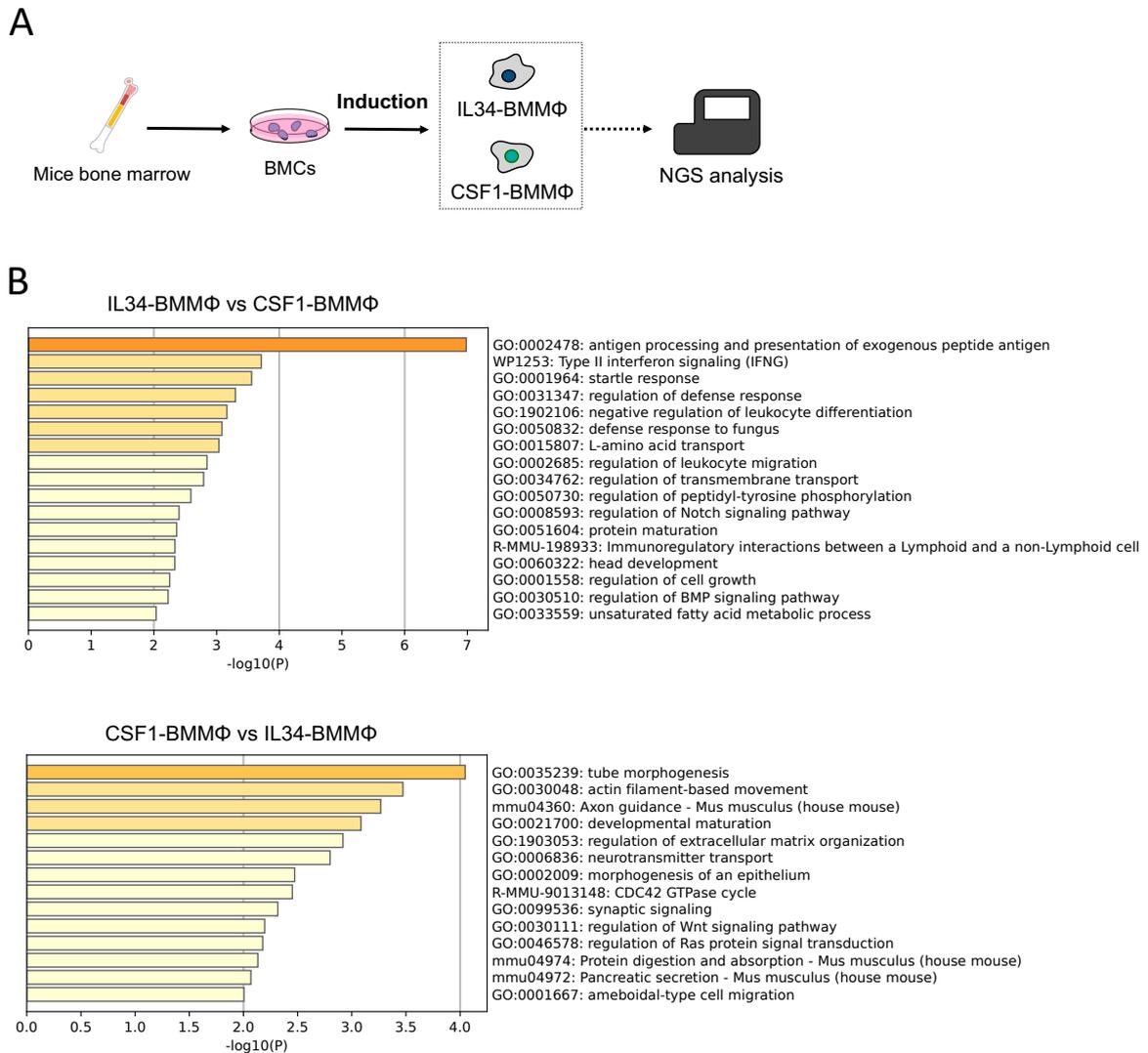


図 18. IL34-BMMΦと CSF1-BMMΦにおける遺伝子発現解析および機能予測
 A) 実験概要図. マウスから採取した BMCs を rIL34 または rCSF1 含有培地を用いて誘導した BMMΦをサンプルとし, 遺伝子発現解析を実施した.
 B) 各 BMMΦで有意に発現が高い遺伝子群と関連する生物学的機能の一覧. 横軸は p-value を示す. Statistics; Benjamini-Hochberg test.

3-1-3. 各 BMMΦにおける抗原提示能の比較検討

GO:0002478 antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen に該当する遺伝子群には, MHC class II の構造関連分子をコードする *Ciita*, *Cd74*, *H2-Eb1*, *H2-Aa* 等が含まれることが分かった (図 19A). そこで各 BMMΦの MHC class II の発現を FACS を用いて解析したところ, IL34-BMMΦにおいて MHC class II の発現率が高いことが分かった (図 19B). また, DCs の分化に関与するとされる転写因子 GATA2 や C/EBP α をコードする遺伝子 (*Gata2*, *Cebpa*) の発現が IL34-BMMΦで高いことから (*Gata2* (FPKM); IL34-BMMΦ/CSF1-BMMΦ ratio \approx 1.81, p= 0.014654888, *Cebpa* (FPKM); IL34-BMMΦ/CSF1-BMMΦ ratio \approx 1.37, p= 0.00133832), DCs のマーカータンパク質である CD11c の発現を BMMΦ間で比較した. その結果, IL34-BMMΦにおける CD11c 発現率が CSF1-BMMΦよりも高いことが示された (図 19C). これは IL34-BMMΦが DCs 様の特性を有する可能性を示唆するものである.

MΦにおける MHC class II の発現率は T 細胞への抗原提示能と正の相関関係にあることが報告されている (Buxadé et al., 2018). したがって, BMMΦ間の T 細胞への抗原提示能を比較するため, allogenic のマウスを用いた実験を行った.

APCs の抗原提示能を評価する方法として, allogenic の関係にある系統のマウス同士の APCs/T 細胞の共培養実験がある (Munn et al., 1999). APCs は MHC class II を介して恒常的に自己抗原を提示するため, allogenic T 細胞と共培養した際, 反応性サブセットは TCR を介した刺激を受けて増殖する. 本実験系を C57BL/6J 系統マウスの BMCs より誘導した IL34-BMMΦおよび CSF1-BMMΦと, BALB/c 系統マウスの脾臓より分離した T 細胞を用いて実施した. T 細胞への刺激が MHC class II 依存的であること示すために各 BMMΦを用いた系に MHC class II のブロッキング抗体を添加した実験群も用意した. 解析の結果, MHC class II の発現率の違いから予想される結果と反し, IL34-BMMΦの T 細胞増殖能は CSF1-BMMΦよりも低いことが示された (図 19D). つまり, IL34-BMMΦは CSF1-BMMΦと比較し MHC class II の細胞表面における発現率は高いものの, 抗原提示能は低いことが示された.

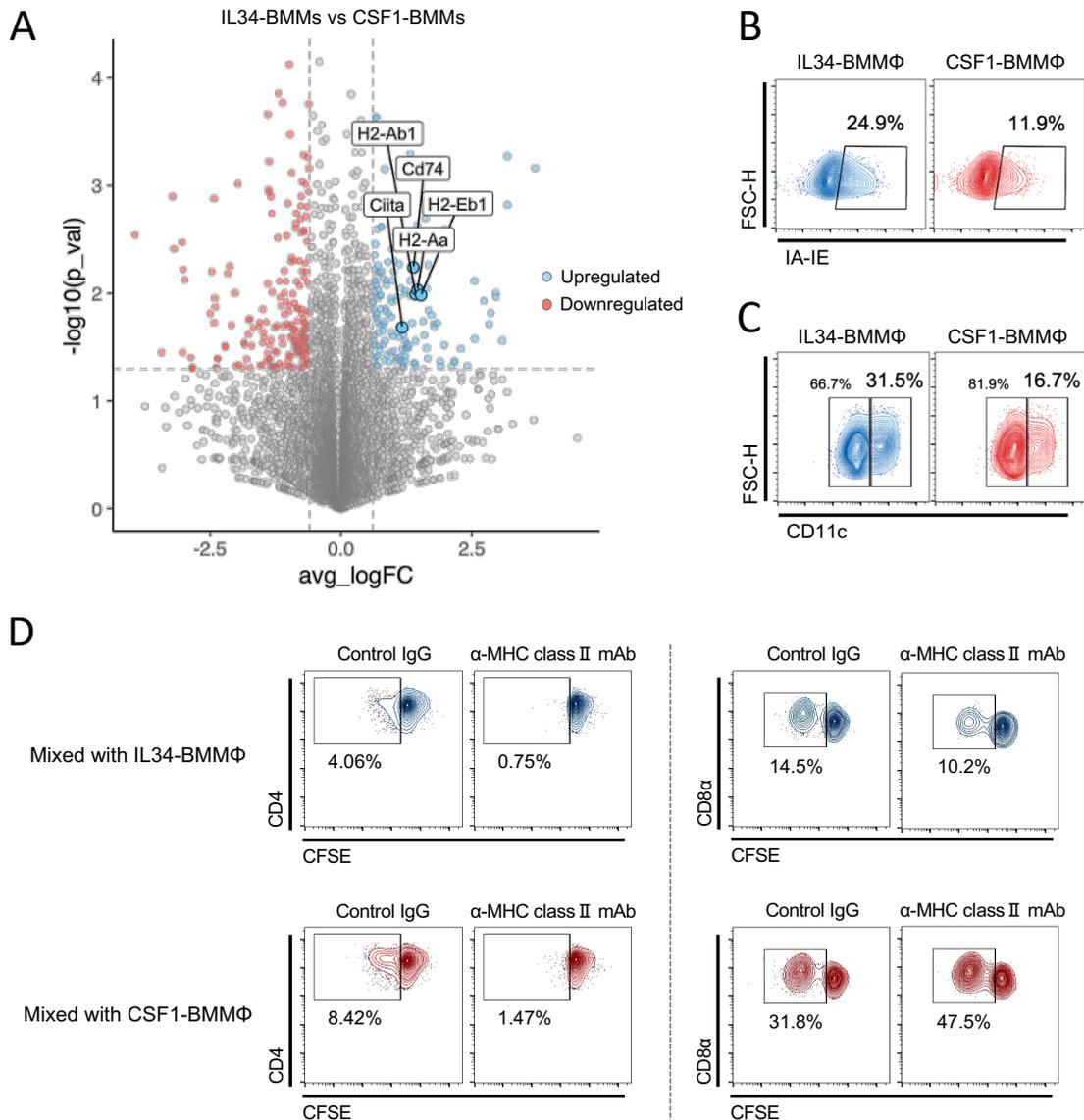


図 19. BMMΦにおける MHC class II の発現と抗原提示能の評価

A) 各 BMMΦにおける遺伝子発現 (FPKM 値) をもとに描いた volcano-plot. FPKM 値が 2 倍以上異なり, かつ p-value<0.05 以下の遺伝子を有色点 (青: IL34-BMMΦ>CSF1-BMMΦ, 赤: IL34-BMMΦ<CSF1-BMMΦ) で示す.

Statistics; Student's t-test.

B) 各 BMMΦの細胞表面における MHC class II (IA-IE) の発現解析.

C) 各 BMMΦの細胞表面における CD11c の発現解析.

D) 各 BMMΦと allogenic T 細胞を共培養した際の T 細胞活性化能の比較. T 細胞は CFSE で蛍光標識しており, 分裂する毎に蛍光強度が減少する.

MΦには炎症誘発性や炎症抑制性をはじめとした、多様な表現型を有するサブタイプが存在する (Ross et al., 2021). 先行研究により, IL34 の影響を受けた MΦは免疫抑制能を有することが示されていることから (Baghdadi et al., 2016b), 各 BMMΦにおける T 細胞の活性化抑制能を比較することとした.

T 細胞は抗 CD3/CD28 抗体の結合刺激により活性化し増殖する. そこで, CFSE で標識した T 細胞を抗体にて刺激すると共に, 各 BMMΦと共培養することで T 細胞の増殖抑制率を比較した (図 20A). その結果, CD8 陽性 T 細胞の増殖抑制は BMMΦ間で差異は認められなかったのに対し, CD4 陽性 T 細胞において IL34-BMMΦでより強い増殖抑制能が示された (図 20B). この結果は, IL34-BMMΦと CSF1-BMMΦには生物学的機能, 特に CD4 陽性 T 細胞の抑制効果にことを示す. 一方で, 細胞表面における MHC class II や CD11c の発現率と T 細胞の活性化抑制能との関係については不明である.

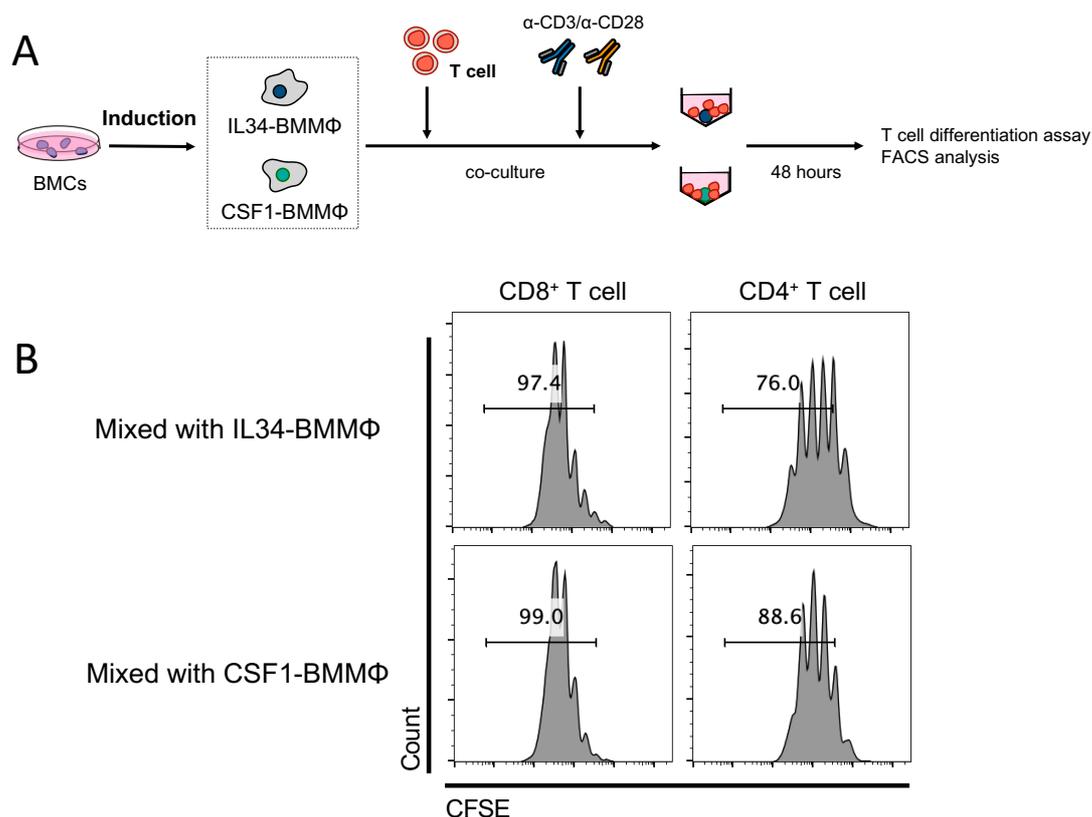


図 20. BMMΦの T 細胞増殖抑制能の評価

A) 共培養実験のプロトコル. BMMΦ, T 細胞は共に C57BL/6J マウス由来.

B) 各 BMMΦと T 細胞を共培養した際の T 細胞増殖抑制能の比較. T 細胞は CFSE で標識しており, 分裂する毎に蛍光強度が減少する.

3-2. IL34-TAM および CSF1-TAM の同定と生物学的機能の推定

3-2-1. TAM サブセットの同定法の検討と抗体の活性評価

2020年, Zhang らは大腸がん細胞株の担がんマウスに抗 CSF1R 抗体を投与した後, 腫瘍内の TAM をサンプルとした scRNA-seq 解析を実施した. その結果 Isotype 抗体投与群と比較し, 特定の TAM サブセットの割合が著減していることを明らかにし, それらのサブセットを CSF1R シグナル依存的に誘導される TAM (CSF1R-TAM) として同定した (Zhang et al., 2020). 我々はこの手法を参考とし, 抗 CSF1R 抗体ではなく, サイトカイン中和活性を有する抗 IL34 抗体または抗 CSF1 抗体を用いて同様の解析を実施することで, 各抗体投与により腫瘍内存在比率が減少するサブセットをそれぞれ IL34-TAM, CSF1-TAM として同定することが可能だと考えた (図 21).

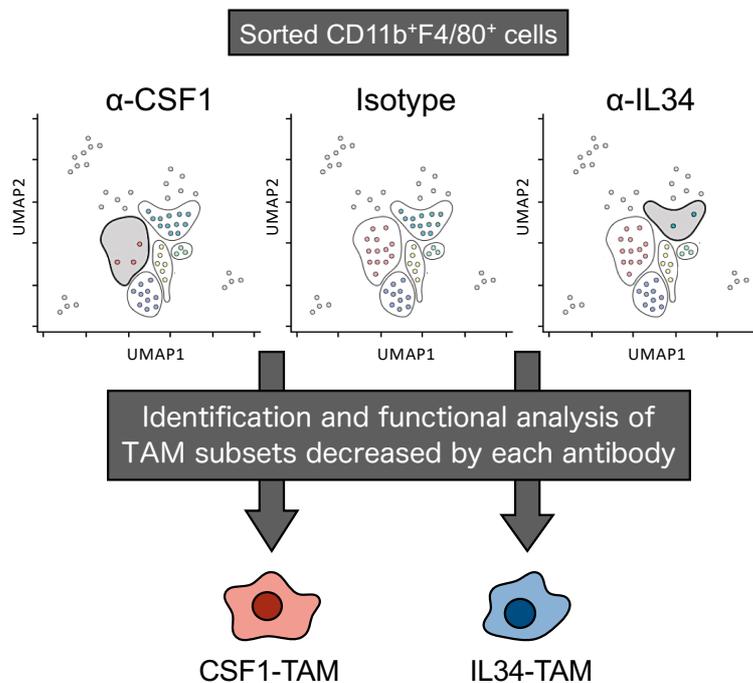


図 21. scRNA-seq 解析を用いた IL34-TAM, CSF1-TAM の同定

Isotype 抗体投与群の腫瘍内に存在する TAM サブセットを基準とし, それぞれの抗体投与群にて存在比が低下するサブセットを「IL34 依存的に誘導される TAM」または「CSF1 依存的に誘導される TAM」と定義する.

In vivo 実験に使用する抗 IL34 抗体および抗 CSF1 抗体のサイトカイン中和活性を示すため、BMMΦ 誘導時にそれぞれの抗体を培養液中に添加することで誘導が阻害されるかを検討した (図 22A). 結果, どちらの抗体においても BMMΦ の誘導阻害能が示された (抗 IL34 抗体を用いた検討は 2-4. 実験の実施以前に終えていた) (図 22B).

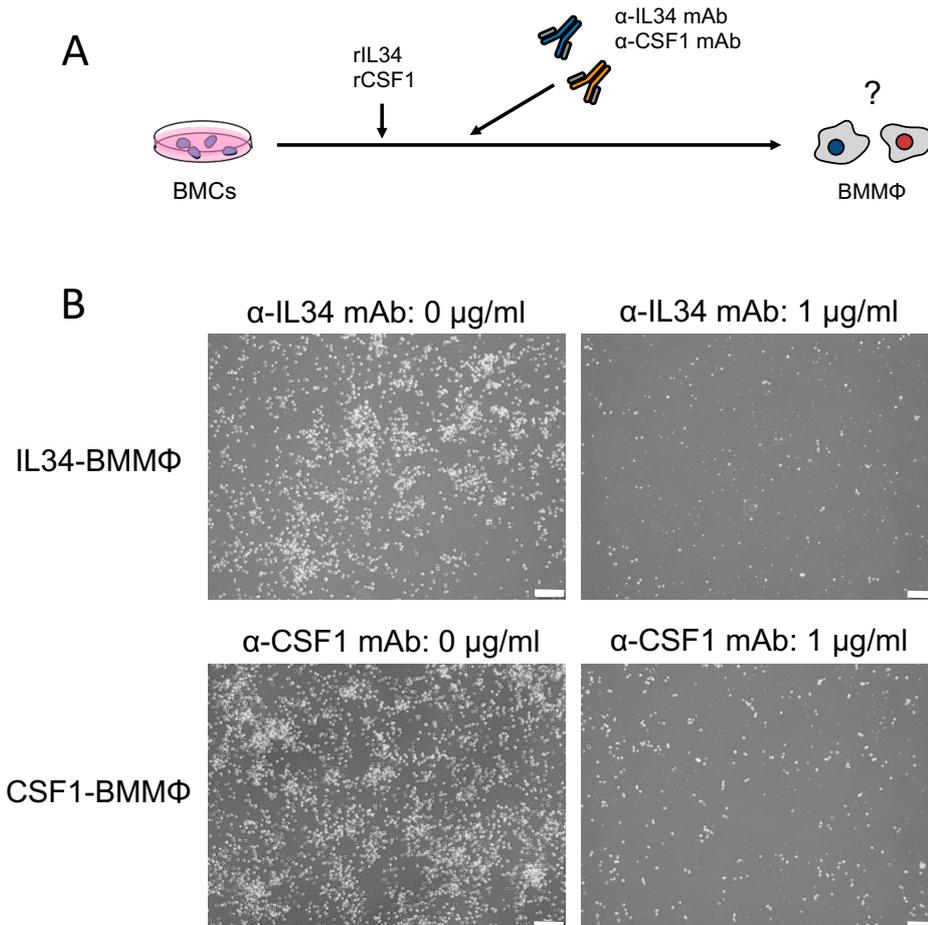


図 22. 抗 IL34 抗体および抗 CSF1 抗体のサイトカイン中和活性の検討

A) 実験概要図. BMMΦ の誘導阻害が生じれば, その抗体はサイトカイン中和活性を有すると判定する.

B) 誘導開始後 day6 の BMMΦ の様子を撮影した. スケールバーは 100 μm を示す.

3-2-2. scRNA-seq による IL34-TAM および CSF1-TAM の同定と機能予測

前項の抗体を WT HM-1 担がんマウスに 3 回/週で投与した後、腫瘍より分取した TAM (CD11b⁺F4/80⁺ cells) をサンプルとして scRNA-seq 解析を実施した (図 23A). 解析により得られた遺伝子発現パターンをもとに、TAM を 8 つの cluster に分類した (図 23B). 加えて cluster 毎の割合を算出し、群間で比較したところ、抗 IL34 抗体投与群でのみ Cluster 6 の割合の増加と Cluster 7 の割合の減少が認められた。また、抗 CSF1 抗体投与群でのみ Cluster 2 の増加と Cluster 3 の減少が認められた (図 23C, D). 本研究のコンセプトに則り、それぞれのサイトカインの影響を強く受ける TAM として、Cluster 7 を IL34-TAM, Cluster 3 を CSF1-TAM と定義した。

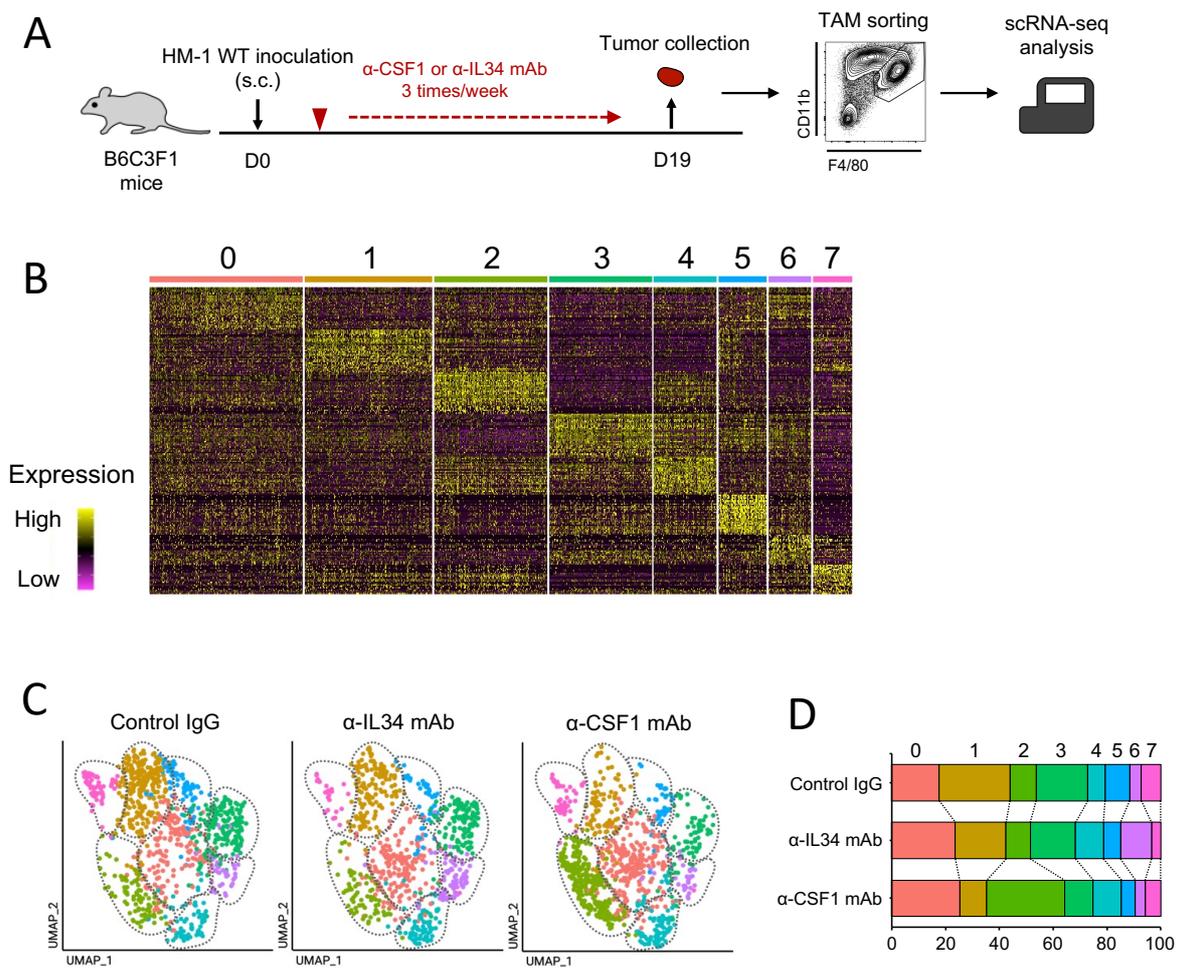


図 23. scRNA-seq を用いた TAM サブセット解析

- A) 実験概要図. 各群 n=3 ずつの TAM サンプルを作製し, 解析時は 3 サンプルを混同し計 3 群とした.
- B) 各 cluster において相対的に発現の高い遺伝子 TOP30 を示す heatmap. 定量には FPKM 値を用いた.
- C) 1 細胞毎の遺伝子発現パターンをもとに描いた UMAP plot.
- D) 各抗体投与群における各 cluster の割合を示す.

次に、それぞれの cluster で有意に発現の高い遺伝子群を Metascape にインプットし、gene ontology 解析を実施した (図 24)。以上の解析結果より、IL34 または CSF1 の影響を受けて誘導が促進される特定の TAM サブセットの同定および、それらが有する生物学的機能の推定ができた。

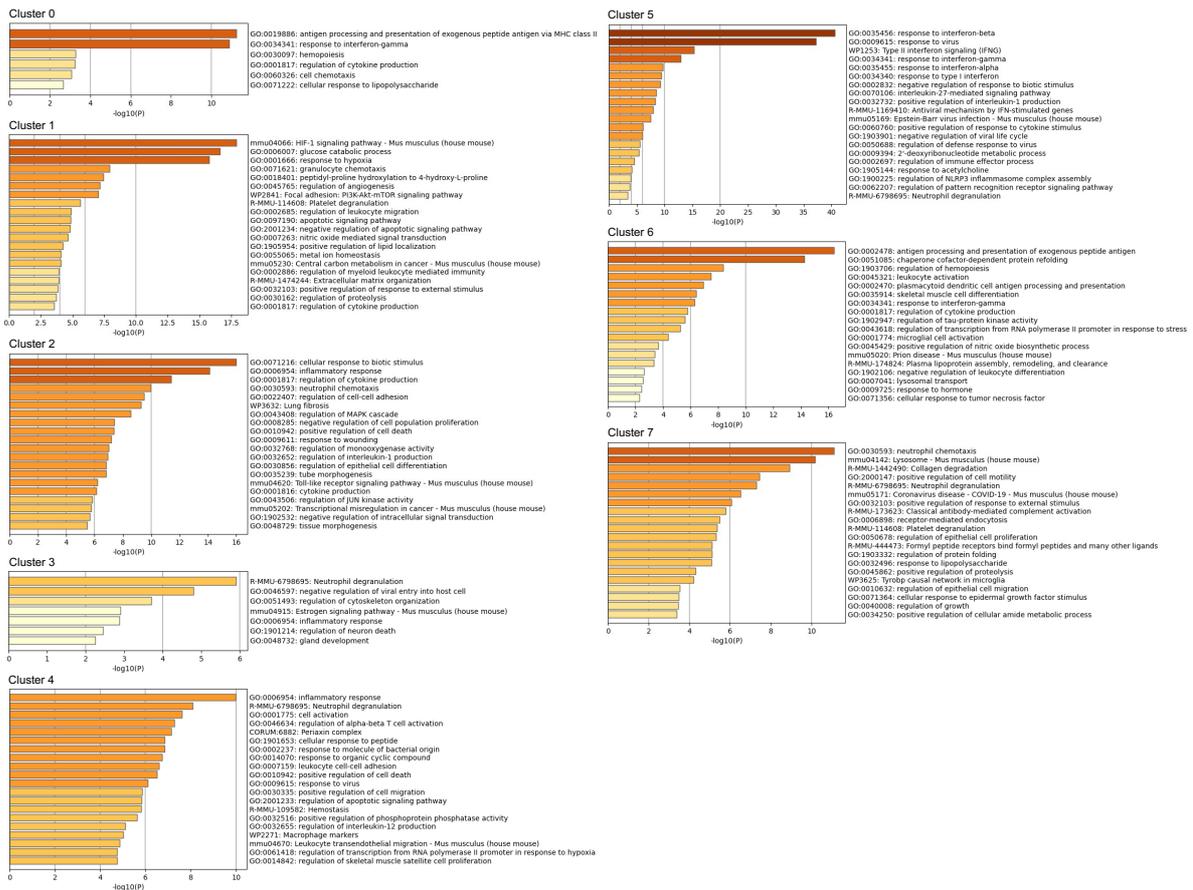


図 24. GO 解析による各 TAM サブセットの生物学的機能の推定
各 cluster において有意に発現の高い遺伝子群を用いて GO 解析を実施した。
p 値は以下の式を用いて算出した (N =data base 上の全ての遺伝子数, M =入力した遺伝子数, K =特定の機能に関与する遺伝子数, $n=M$ における解析対象となった遺伝子数, $k=K$ における解析対象となった遺伝子数)。

$$p = \sum_{i=n}^{\min(M,K)} \binom{i}{n} \binom{N-k}{M-i}$$

3-2-3. ソーティングによる TAM の分取と機能評価の試み

scRNA-seq はあくまで遺伝子発現解析であり、実際に細胞が有する生物学的機能を実験的に示すには IL34-TAM (Cluster 7), CSF1-TAM (Cluster 3) をソーティングにより分取し, *in vitro* 実験系による検討が必要である. ソーティングを実施するためには各 cluster に特異的に発現している細胞表面マーカータンパク質を同定する必要がある. そこで, 各 cluster において有意に発現の高い遺伝子群の中から細胞表面タンパク質をコードする遺伝子を抽出し, FPKM 値にて他のクラスターにおける発現と比較することでマーカーとなり得るタンパク質を推定した. 検討の結果, Cluster 3, Cluster 7 それぞれで有意に発現の高い遺伝子群の中には細胞表面タンパク質をコードする遺伝子が 10 種ずつ含まれていることが明らかとなった (図 25). 本研究では始めに, CD206 (*Mrc1*), CD63 (*Cd63*), CD38 (*Cd38*), CD137 (*Tnfrsf9*) に対するモノクローナル抗体を用いて Cluster 7 の分取を試みた.

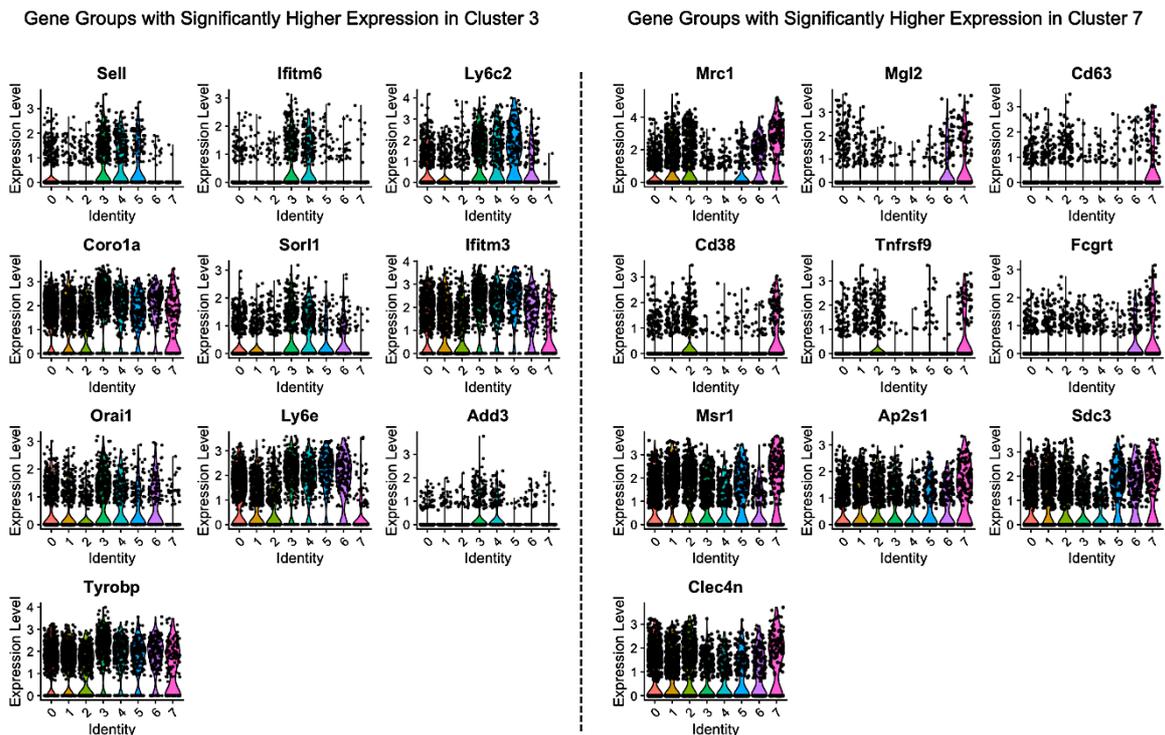


図 25. 各 cluster における特定の遺伝子発現レベル (FPKM 値)

Cluster 3 および Cluster 7 にて, 有意に発現の高い 10 種の細胞表面タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを示す.

WT HM-1 腫瘍より分取した免疫細胞をサンプルとし、CD206, CD63, CD38, CD137 の TAM における発現を FACS にて解析した. その結果, 上記すべてを発現するサブセットの存在を認めた (図 26A). 同定したサブセットの存在比が抗 IL34 抗体投与により減少するかを検討するため, WT HM-1 担がんマウスに control rat IgG 抗体もしくは抗 IL34 抗体を投与した群をそれぞれ用意し, TAM における CD206⁺ CD63⁺ CD38⁺ CD137⁺ 細胞の割合解析を行った. 解析の結果, 予想とは反し, 群間でのサブセットの割合に有意な差は認められなかった (図 26B). これは, 上記したタンパク質の発現パターンでは IL34-TAM (CSF1-TAM) の分取が困難であることを意味する. 本研究では IL34-TAM および CSF1-TAM の機能評価の実施には至れず, 今後は目的とする TAM サブセット分取法の更なる検討が必要である.

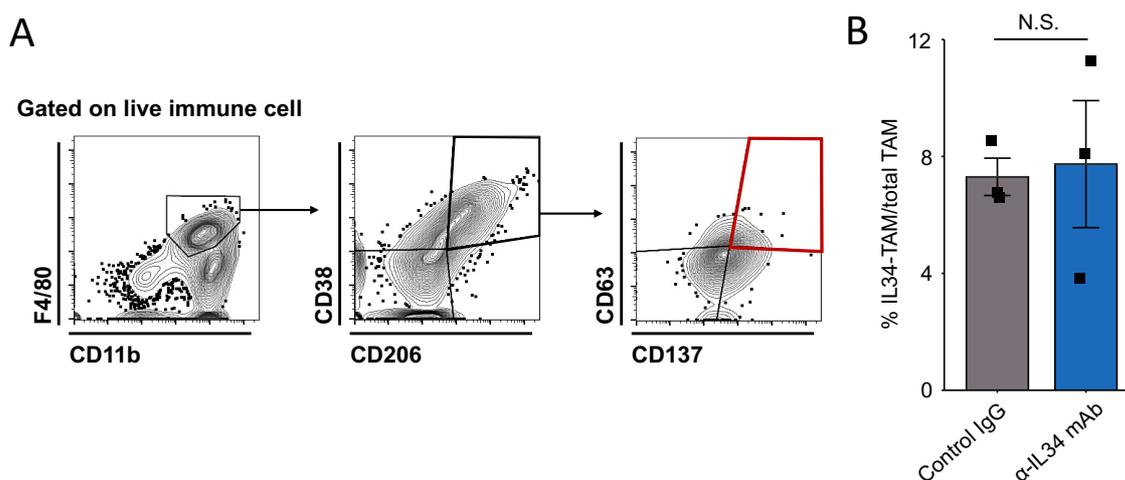


図 26. 細胞表面タンパク質の発現パターンによる IL34-TAM の同定

- A) 遺伝子発現から予測した細胞表面タンパク質の発現解析. 赤枠で示した細胞集団を IL34-TAM と定義した.
- B) 抗 IL34 抗体投与群による IL34-TAM 分画の割合の変化を検討した. グラフは平均値と標準誤差を示す. Statistics; Student's t-test.

考察

卵巣がんの治療において化学療法は外科的手術と並び不可欠な治療法である。しかし、がんは治療経過中に化学療法に対する耐性を獲得し、腫瘍の再発や転移を引き起こすことで患者を死に至らしめる。現状、ステージ後期のがんや再発がんに対する画一的な治療法が存在しないことから、これら悪性度の高い卵巣がんに対する新規治療法の確立が切望されている。本研究では、卵巣がん患者およびマウスモデルにおいて、IL34の発現と病勢の悪化との相関を初めて評価した。

臨床研究や実験動物モデルを用いた研究から、腫瘍組織におけるIL34の発現と腫瘍の進行、転移、血管新生、がん治療に対する治療抵抗性との関連を示唆する報告が増加している。これらの報告と一致する形で、血液がん、脳腫瘍、大腸がん、肺がん等の患者の生存率の低さとIL34の発現が相関することが示された (Baghdadi et al., 2017)。本研究では卵巣がん病巣においてもIL34が検出されることを初めて明らかにした。さらに卵巣腫瘍組織におけるIL34の発現をIon-AmpliSeq解析を用いて定量し、患者の予後との相関解析を実施したところ、IL34の発現が卵巣がん患者のPFS (progression free survival) の低下と相関することを示した。この結果を受け、cBioPortalデータベースの独立した別のコホートデータにおいてもIL34の発現と患者の予後との相関解析を行ったところ、IL34の発現率と卵巣がん患者のOS (overall survival) の悪化は正の相関関係にあることが示された。近年このようなビッグデータを用いた解析手法は様々な疾患における診断、予後、治療への応用が期待できる強力なツールとして用いられており、卵巣がん患者に限らず多くがん患者におけるRNA-seqをベースとした生存解析法の予測性能を向上させ得る。

IL34とは対照的に、CSF1の発現は本研究で用いた卵巣がん患者コホートにおいて、PFSおよびOSに影響を及ぼさないことが示された。これはCSF1が卵巣がんの予後不良因子であるという既報と矛盾する結果であった (Baghdadi et al., 2018b)。この要因として、IL34とCSF1の生物学的な差異が挙げられると考察した。まず、IL34はCSF1と比較しCSF1Rに結合する際の親和性が高いことが示されており、双方が発現する環境において結合の優先性が生じる可能性がある (Wei et al., 2010)。また、IL34とCSF1それぞれが結合した際にCSF1Rの細胞内ドメインにおけるリン酸化部位が異なることから、下流のシグ

ナル強度に差異が生じることも示されている (Boulakirba et al., 2018). したがって, TME (tumor microenvironment) における IL34 の発現レベルが上昇すると, CSF1R を発現している細胞 (腫瘍, 非腫瘍を問わず) は IL34 による強いシグナル伝達経路の活性化を受け, 結果として腫瘍の進行をより促進させることが予想される. 加えて, CSF1 の結合活性は CSF1R に限定されているが, IL34 は CSF1R のみならず protein tyrosine phosphatase, receptor type Z, polypeptide 1 (PTPRZ1) や Syndecan1 といった他の分子とも相互作用することが示されている (Nandi et al., 2013; Segaliny et al., 2015). このことは IL34 が多種の細胞に作用し, より多角的に TME に影響を及ぼすことを示唆している. したがって, 既報の患者コホートにおいても IL34 の発現を合わせて評価することで, 患者の予後予測や治療介入法の最適化をより効果的に検討することが可能だと考えられる.

がんの増悪への IL34 の寄与を, マウスを用いた *in vivo* 実験にて検討した. 実臨床において卵巣がんが腹膜播種を伴う割合が高いことを考慮し, まず初めにマウスの腹腔内に細胞を移植するモデルを用いた検討を実施した (Hernandez et al., 2016). Mock HM-1 移植群と比較し, *IL34*^{KO} HM-1 移植群では腫瘍の浸潤, 拡散が抑制され, マウスの個体生存期間が延長した. さらに, FACS による TME (腹腔内) の免疫環境の解析により, *IL34*^{KO} HM-1 移植群では CD11b⁺ F4/80⁺ MΦ の population が低下し, CD3⁺ T 細胞, 中でも CD8⁺ T 細胞の population が増加する傾向が認められた (data not shown). 卵巣腫瘍内における M2-MΦ の浸潤は, 腫瘍の増悪および患者の予後悪化に寄与することが報告されている (Galon and Bruni, 2020). さらに, 腫瘍部位における CD3⁺ T 細胞の数が進行性卵巣がん患者の長期生存期間を有意に延長させることが示されている (Zhang et al., 2003). これらを踏まえ, 本研究における臨床検体を用いた解析結果および複数の *in vivo* モデルで得られたデータを解釈すると, 卵巣がん細胞由来 IL34 は MΦ や T 細胞の population を変化させることで腫瘍の増悪を促す微小環境を形成し, 予後の悪化に寄与すると考えられる. したがって, IL34 は化学療法への抵抗症例を含む卵巣がんに対し, 新たな治療標的となることが示唆された.

近年, 適応が広がり続けている ICB 治療は, がん免疫サイクルにおける急所をターゲットにした画期的な治療法であり, 特定のがん種に対し大きな効果を発揮する. 一方で, ICB 治療による効果をもたらし得る免疫環境が構築されてい

ない場合、その効果は限定的となる。実状、ICB 治療介入歴のある患者全体に対する奏効率は 20-30%に留まっている (Chowell et al., 2022)。そのような背景のもと、ICB 治療抵抗性の解除が可能となる新たな治療介入法の探索が世界的に推進されている。本研究では、がん細胞由来 IL34 を基軸として形成された免疫環境が化学療法抵抗性の獲得に寄与するという知見を、ICB 治療抵抗性の打開を目指す研究に応用した。

本稿では HM-1 を用いた卵巣がんモデルを主に記したが、他にもマウス乳がん細胞 4T1 およびマウス大腸がん細胞 CT26 を用いた検討も行っている。それぞれのがん種において *Il34*^{KO} 株を樹立し、IL34 の治療標的としての有用性を *in vivo* モデルにて検討した。用いた全てのがん種において、*Il34*^{KO} 株移植群において有意に ICB 治療による腫瘍の増大抑制が認められたことから、IL34 は卵巣がんのみならず、複数のがん種における ICB 治療抵抗性に寄与していることが示唆された (Hama et al., 2020)。また、抗 IL34 抗体の投与により、抗 PD-1 抗体治療への抵抗性の解除を認めたことから、実臨床における IL34 標的療法が有効である可能性を示した。*In vivo* モデルにおける抗 IL34 抗体および抗 PD-1 抗体併用投与群の腫瘍内免疫環境を解析したところ、T 細胞の浸潤率が低下していることが明らかとなった。一方で、MΦ 標的療法として構想されている CSF1R 阻害療法で認められる TAM の劇的な減少は IL34 標的療法では認められず、TAM の減少は有意であったものの著しくなかった (図 15D)。この結果より、IL34 は腫瘍環境において TAM の効率的な分化、増殖ではなく、機能的変化への寄与を中心的作用として有する分子であるという仮説を立てた。この仮説を支える結果として、がん細胞由来 IL34 の有無により TAM の浸潤率に変化が認められなかった一方で、主に MΦ が産生するとされる *Cxcl9* の発現が IL34 により抑制されていたことが挙げられる (Chow et al., 2019) (図 13)。また、炎症性因子である *Ifng*, *Tnfa* 等の発現レベルが IL34 の KO により上昇することも上記の仮説を支持すると考えられる。

IL34 はがん細胞の CSF1 発現に依存せず、単体で ICB 治療抵抗性に寄与することを示した (図 11C)。また、健常状態において IL34 の発現が脳や皮膚といった特定の部位に制限されていることは、IL34 標的療法における副作用の低減化が望めることを示唆する (Wang et al., 2012b)。一方、IL34 は他の受容体 PTPRZ1 や Syndecan-1 とともに結合することが報告されており、本研究においてそれらの受容体に関する検討は実施していないことを考慮すべきである。

PTPRZ1 は主に神経前駆細胞やグリア細胞に発現している。IL34 は PTPRZ1 を介して細胞内シグナル伝達経路を制御し、ターゲット細胞の増殖、クローン形成、および運動性を阻害することが示されており、この作用は CSF1R 非依存的である (Nandi et al., 2013)。また、Syndecan-1 はターゲット細胞の増殖、遊走、マトリックス相互作用に関与しており、幅広い組織で発現している。

Syndecan-1 と IL34 の結合は、IL34 による CSF1R の活性化を調節し、特定の骨髄系細胞の遊走に影響を与えることが示されている (Segaliny et al., 2015)。総じて、IL34 は腫瘍環境のみならず全身において CSF1R との相互作用に加え、PTPRZ1 や Syndecan-1 との結合を介して生物学的活性を発揮している可能性がある。これらの受容体と IL34 の結合阻害が抗腫瘍効果、引いては全身の免疫系に及ぼす影響は未だ不明であることから、IL34 中和抗体による副作用については今後も深く検討されるべきである。

ここまで IL34 と CSF1 の生理学的活性の差異について既報を交えて論じたが、腫瘍環境において IL34 もしくは CSF1 の影響を受けたそれぞれの TAM の機能的解析が実施された報告は存在しない。そこで本研究では IL34 依存的に誘導される TAM に着目し、IL34-TAM サブセットの同定とその免疫学的機能解析を scRNA-seq 技術を用いて試みた。2020 年に Zhang らは、マウス大腸がんモデルにて CSF1R 抗体の投与により減少、消失するサブセットと、抗体の影響を受けないサブセットが存在することを見出し、それぞれのサブセットに特徴的な生物学的機能の解析を実施した (Zhang et al., 2020)。彼らは抗 CSF1R 抗体により F4/80 を高発現するサブセットが優先的に減少することを示し、そのサブセットでは *Mki67* の発現が誘導されていることから増殖スコアが高いことを明らかにした。対して、抗 CSF1R 抗体非感受性サブセットでは *Vegf* 等の血管新生に寄与する因子や、*Cd274*, *Arg1* といった免疫抑制に関する遺伝子の発現が有意に高いことが示された。この報告により、CSF1R 標的療法の見直しの必要性が提示されると同時に、TAM を基軸とした腫瘍内免疫環境の複雑さが改めて提示された。本研究では上記の方法を応用し、抗 IL34 抗体感受性および抗 CSF1 抗体感受性の TAM を IL34-TAM, CSF1-TAM サブセットとして同定し、遺伝子発現パターンをもとに生物学的機能の推定した。

恒常的に IL34 および CSF1 を発現する HM-1 細胞株の担がんマウスに抗 IL34 抗体または抗 CSF1 抗体を投与した後、腫瘍より分取した TAM をサンプルとして scRNA-seq 解析を実施した。遺伝子発現パターンをもとに TAM を

8つの cluster に分類し、抗 IL34 抗体感受性サブセットとして Cluster 7, 抗 CSF1 抗体感受性サブセットとして Cluster 3 をそれぞれ IL34-TAM, CSF1-TAM と定義した. Cluster 1 に関しても抗体投与により減少したサブセットではあるものの, 双方の抗体に感受性を示したため, IL34-TAM, CSF1-TAM と定義しなかった. 各 cluster において有意に発現の高い遺伝子群の情報をもとに GO 解析を実施し, それぞれの TAM サブセットが有する生物学的特徴を推定した. 中でも IL34-TAM と定義した Cluster 7 に特徴的な「Collagen degradation」に着目した. 腫瘍微小環境における collagen の機能について一貫した知見は存在しない. 特定のモデルにおいてがん細胞と, 免疫細胞や周辺環境に存在するマトリックス分子との相互作用を補助することでがんの増殖や浸潤に寄与するという報告がある一方で, 臨床試験において腫瘍組織中の collagen の存在ががんの進行を遅延させるという知見も存在する (Xu et al., 2019). IL34-TAM で高発現していた「Collagen degradation」に関連する遺伝子群には, がんの転移を促進するとされる因子である matrix metalloproteinase (MMP)が含まれており, 中でも *Mmp9*, *Mmp12*, *Mmp13* は Cluster 7 において有意に発現が高いことが示された (Deryugina and Quigley, 2006). また, *Luc*⁺ *Il34*^{KO} HM-1 を腹腔内移植した際にごん細胞のシグナルの広がりが抑制されたことに加え (図 10A), 同モデルにて肺への転移率の低下が認められた (data not shown). さらに, 皮下移植モデルにおいて, 腋窩リンパ節への転移が *Il34*^{KO} HM-1 移植群にて抑制されることを観察している (data not shown). これらの現象は, がん細胞由来 IL34 ががん細胞の浸潤, 転移に寄与することを示すと同時に, IL34-TAM ががんの転移を促進する特性を有したサブセットであることを示唆している.

GO 解析にて予測された IL34-TAM の生物学的機能を *in vitro* 実験にて評価するため, 遺伝子発現情報から細胞表面タンパク質の発現パターンを推定し, TAM 集団からの IL34-TAM の分取を試みた. *CD206*⁺ *CD63*⁺ *CD38*⁺ *CD137*⁺ 細胞を IL34-TAM として定義した後, そのサブセットが抗 IL34 抗体投与により減少するかを検討した. 結果, 抗 IL34 抗体投与によるサブセット割合の減少は認められず, 選定した細胞表面マーカーが不適切もしくは不十分であることが示唆された. 画一的な IL34-TAM の分取法を確立するためには, 遺伝子発現解析の条件を再考し, 発現が特徴的な遺伝子をさらに探索することや, 本稿では示さなかった「Cluster 7 (3) で発現が有意に低い遺伝子」を利用するといった

手法を検討する必要がある。仮にこれらの方法でも分取が困難な場合は、「抗 IL34 抗体 (抗 CSF1 抗体) を用いた後に形成された TAM 集団」と「抗体未投与時に形成された TAM 集団」というように TAM 全体を 1 サンプルとして *in vitro* 実験を行い、特定の機能評価を実施することも考慮すべきである。

免疫療法の確立によってがん治療は大きな転換期を迎えた。患者一人ひとりの病巣および全身の免疫環境を網羅的に解析することが可能となったことで、“がん免疫療法の個別化”の実現が着実に近づいてきている。治療標的となる細胞や分子の同定、それらに対する治療介入のアプローチ法には未だ限りがある一方で、今後も新鋭な技術を駆使しながら革新的な治療法確立へ向かって研究は進められていく。本研究にて示された IL34 の治療標的としての有用性や、IL34-TAM を基軸とした免疫環境構築メカニズムにおける知見が、更なる研究開発の一助となることを期待する。

結論

① 本研究全体から得られた新知見

- 卵巣がん患者の腫瘍組織における IL34 の発現は予後悪化に寄与する.
- がん細胞由来 IL34 はがんの悪性度の向上に寄与するため、治療標的として有用である.
- IL34 標的療法は ICB 治療抵抗性を有したがんの治療抵抗性を解除する.
- IL34 は特定の TAM サブセットの誘導に寄与しており、腫瘍内免疫環境を変化させることで腫瘍の増悪に寄与する.

② 新知見の意義

卵巣がんにおける IL34 の治療標的としての有用性を示したことにより、化学療法や ICB 治療に対する治療抵抗性を有した再発症例患者に対する新規治療法の提案につながる。また、これまでに構想されてきた TAM を基軸とした腫瘍免疫構築メカニズムに IL34 の知見を加えることは、今後の TAM 標的治療法の開発の一助となる。

③ 今後展開され得る研究

TAM を標的とした治療研究において IL34-TAM の動態解析が実施されることで、治療の有用性を評価できる可能性がある。また、MΦ は特定の疾患 (肝線維化等) への治療用細胞としても注目が集まっている。既報では度々 CSF1 誘導性の BMMΦ を用いているが、本研究における遺伝子発現解析結果に立脚し、治療用細胞としての IL34 誘導性 MΦ の有用性も検討され得る。

④ 今後の課題

- IL34 標的療法による副作用の有無を検討すること
- PDX (patient derived xenograft) モデル等のヒト検体を用いた系における IL34 標的療法の治療効果を評価すること
- IL34 が正常組織においても発現している以上、IL34-TAM のみをターゲットとするための特異的マーカーを同定した上で、治療標的としての有用性を評価する必要があること

謝辞

本研究の遂行にあたり、組織検体を提供して下さった患者の皆様と、研究協力をしてくださった滋賀医科大学医学部医学科 醍醐弥太郎教授、地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)、臨床研究所 宮城洋平所長、公益財団法人かずさ DNA 研究所ゲノム事業推進部遺伝子構造解析グループ 長谷川嘉則グループ長、北海道大学医学研究院 渡利英道教授に深く御礼を申し上げます。そして、研究に従事する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学分野 清野研一郎教授に深甚なる謝意を申し上げます。また、多大なるご指導を頂きました和田はるか准教授、Muhammad Baghdadi 元講師、大塚亮元助教に深く御礼を申し上げます。最後に、ご協力を頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門 免疫生物学分野の皆様には感謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

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

Baghdadi, M., Wada, H., Nakanishi, S., Abe, H., Han, N., Wira, E.P., Endo, D., Watari, H., Sakuragi, N., Hida, Y., et al. (2016b). 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.

Baghdadi, M., Umeyama, Y., Hama, N., Kobayashi, T., Han, N., Wada, H., and Seino, K. ichiro (2018a). Interleukin-34, a comprehensive review. *J. Leukoc. Biol.* *104*, 931–951.

Baghdadi, M., Endo, H., Takano, A., Ishikawa, K., Kameda, Y., Wada, H., Miyagi, Y., Yokose, T., Ito, H., Nakayama, H., et al. (2018b). High co-expression of IL-34 and M-CSF correlates with tumor progression and poor survival in lung cancers. *Sci. Rep.* *8*, 1–10.

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. Rep.* *8*, 1–11.

Buxadé, M., Encabo, H.H., Riera-Borrull, M., Quintana-Gallardo, L., López-Cotarelo, P., Tellechea, M., Martínez-Martínez, S., Redondo, J.M., Martín-Caballero, J., Flores,

J.M., et al. (2018). Macrophage-specific MHCII expression is regulated by a remote Ciita enhancer controlled by NFAT5. *J. Exp. Med.* *215*, 2901–2918.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* *39*, 1–10.

Chihara, T., Suzu, S., Hassan, R., Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Motoyoshi, K., Kimura, F., and Okada, S. (2010). IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ.* *17*, 1917–1927.

Chow, M.T., Ozga, A.J., Servis, R.L., Frederick, D.T., Lo, J.A., Fisher, D.E., Freeman, G.J., Boland, G.M., and Luster, A.D. (2019). Intratumoral Activity of the CXCR3 Chemokine System Is Required for the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy. *Immunity* *50*, 1498-1512.e5.

Chowell, D., Yoo, S.K., Valero, C., Pastore, A., Krishna, C., Lee, M., Hoen, D., Shi, H., Kelly, D.W., Patel, N., et al. (2022). Improved prediction of immune checkpoint blockade efficacy across multiple cancer types. *Nat. Biotechnol.* *40*, 499–506.

Dai, X.M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., and Stanley, E.R. (2002a). 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.

Dai, X.M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., and Stanley, E.R. (2002b). 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.

- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* *14*, 986–995.
- Deryugina, E.I., and Quigley, J.P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* *25*, 9–34.
- Droin, N., and Solary, E. (2010). Editorial: CSF1R, CSF-1, and IL-34, a “menage a trois” conserved across vertebrates. *J. Leukoc. Biol.* *87*, 745–747.
- Funston, G., O’Flynn, H., Ryan, N.A.J., Hamilton, W., and Crosbie, E.J. (2018). Recognizing Gynecological Cancer in Primary Care: Risk Factors, Red Flags, and Referrals. *Adv. Ther.* *35*, 577–589.
- Galon, J., and Bruni, D. (2020). Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. *Immunity* *52*, 55–81.
- Gentles, A.J., Newman, A.M., Liu, C.L., Bratman, S. V., Feng, W., Kim, D., Nair, V.S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C.D., et al. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* *21*, 938–945.
- Gilboa, E. (1999). The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* *11*, 263–270.
- Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Kündig, T.M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M., et al. (2012). Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity* *37*, 1050–1060.
- Hama, N., Kobayashi, T., Han, N., Kitagawa, F., Kajihara, N., Otsuka, R., Wada, H., Lee, H. kyung, Rhee, H., Hasegawa, Y., et al. (2020). Interleukin-34 Limits the Therapeutic Effects of Immune Checkpoint Blockade. *iScience* *23*, 101584.

Hernandez, L., Kim, M.K., Lyle, L.T., Bunch, K.P., House, C.D., Ning, F., Noonan, A.M., and Annunziata, C.M. (2016). Characterization of ovarian cancer cell lines as in vivo models for preclinical studies. *Gynecol. Oncol.* *142*, 332–340.

Iranzo, P., Callejo, A., Assaf, J.D., Molina, G., Lopez, D.E., Garcia-Illescas, D., Pardo, N., Navarro, A., Martinez-Marti, A., Cedres, S., et al. (2022). Overview of Checkpoint Inhibitors Mechanism of Action: Role of Immune-Related Adverse Events and Their Treatment on Progression of Underlying Cancer. *Front. Med.* *9*. 875974.

Kobayashi, T., Baghdadi, M., Han, N., Murata, T., Hama, N., Otsuka, R., Wada, H., Shiozawa, M., Yokose, T., Miyagi, Y., et al. (2019). Prognostic value of IL-34 in colorectal cancer patients. *Immunol. Med.* *42*, 169–175.

van der Leun, A.M., Thommen, D.S., and Schumacher, T.N. (2020). CD8⁺ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nat. Rev. Cancer* *20*, 218–232.

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* *320*, 807–811.

Lin, Z., Jose R., Conejo-Garcia, Dionyssios, K., Phyllis, A.G., Marco, M., Giorgia, R., Antonis, M., Heidi, G., Katia, S., Michael, N. (2003). Intratumoral T cells and survival in epithelial ovarian cancer. *Natl. Med. J. India* *16*, 150–151.

Mantovani, A., Allavena, P., Marchesi, F., and Garlanda, C. (2022). Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *21*, 799–820.

Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.* *164*, 6166–6173.

Min, H., and Lee, H. (2022). Molecular targeted therapy for anticancer treatment. *Exp. Mol. Med.* *54*, 1670–1694.

Nishino, M., Ramaiya, N.H., Hatabu, H., and Hodi, F.S. (2018). Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development. *Physiol. Behav.* *176*, 139–148.

Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A.L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* *189*, 1363–1372.

Nakamichi, Y., Udagawa, N., and Takahashi, N. (2013). IL-34 and CSF-1: Similarities and differences. *J. Bone Miner. Metab.* *31*, 486–495.

Nandi, S., Cioce, M., Yeung, Y.G., Nieves, E., Tesfa, L., Lin, H., Hsu, A.W., Halenbeck, R., Cheng, H.Y., Gokhan, S., et al. (2013). Receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ is a functional receptor for interleukin-34. *J. Biol. Chem.* *288*, 21972–21986.

Pignata, S., Cecere, S.C., Du Bois, A., Harter, P., and Heitz, F. (2017). Treatment of recurrent ovarian cancer. *Ann. Oncol.* *28*, viii51–viii56.

Ross, E.A., Devitt, A., and Johnson, J.R. (2021). Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. *Front. Immunol.* *12*, 1–22.

Segaliny, A.I., Brion, R., Mortier, E., Maillason, M., Cherel, M., Jacques, Y., Le Goff, B., and Heymann, D. (2015). Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1853*, 1010–1021.

Stanley, E.R., and Chitu, V. (2014). CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*.

Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B.B., Siddiqui, A., et al. (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat. Methods* *6*, 377–382.

Tay, R.E., Richardson, E.K., and Toh, H.C. (2021). Revisiting the role of CD4⁺ T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. *Cancer Gene Ther.* 28, 5–17.

Tap, W.D., Gelderblom, H., Palmerini, E., Desai, J., Bauer, S., Blay, J.Y., Alcindor, T., Ganjoo, K., Martín-Broto, J., Ryan, C.W., et al. (2019). Pexidartinib versus placebo for advanced tenosynovial giant cell tumour (ENLIVEN): a randomised phase 3 trial. *Lancet* 394, 478–487.

Toyoshima, M., Tanaka, Y., Matsumoto, M., Yamazaki, M., Nagase, S., Sugamura, K., and Yaegashi, N. (2009). Generation of a syngeneic mouse model to study the intraperitoneal dissemination of ovarian cancer with in vivo luciferase imaging. *Luminescence* 24, 324–331.

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

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

Wei, S., Nandi, S., Chitu, V., Yeung, Y.-G., Yu, W., Huang, M., Williams, L.T., Lin, H., and Stanley, E.R. (2010). Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 88, 495–505.

Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A.W., Ahmed-Ansari, A., Sell, K.W., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (1990). Total absence of colony-stimulating factor 1 in

the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 4828–4832.

Xu, S., Xu, H., Wang, W., Li, S., Li, H., Li, T., Zhang, W., Yu, X., and Liu, L. (2019). The role of collagen in cancer: From bench to bedside. *J. Transl. Med.* *17*, 1–22.

Zhang, C., Zhang, L., Xu, T., Xue, R., Yu, L., Zhu, Y., Wu, Y., Zhang, Q., Li, D., Shen, S., et al. (2020). Mapping the spreading routes of lymphatic metastases in human colorectal cancer. *Nat. Commun.* *11*, 1–11.