Title	抗腫瘍免疫の誘導を目指した治療および再発予防研究
Author(s)	梶原，ナビール
Description	配架番号：2803
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15643号
Issue Date	2023-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15643
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90967
Type	doctoral thesis
File Information	KAJIHARA_Nabeel.pdf

学　位　論　文

抗腫瘍免疫の誘導を目指した治療および再発予防研究

(Studies on cancer therapy and recurrence prevention
aimed at inducing anti-tumor immunity)

２０２３年９月

北海道大学

梶原　ナビール

学　位　論　文

抗腫瘍免疫の誘導を目指した治療および再発予防研究

(Studies on cancer therapy and recurrence prevention
aimed at inducing anti-tumor immunity)

２０２３年９月

北海道大学

梶原　ナビール

目次

<u>発表論文目録および学会発表目録</u>

本研究の一部は以下の論文に発表または投稿した。

1. <u>**Nabeel Kajihara**</u>, Fumihito Kitagawa, Takuto Kobayashi, Haruka Wada, Ryo Otsuka, and Ken-ichiro Seino (2020) Interleukin-34 contributes to poor prognosis in triple-negative breast cancer. Breast Cancer 27, 1198-1204.

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

3. <u>**Nabeel Kajihara**</u>, Takuto Kobayashi, Ryo Otsuka, Junko Nio-Kobayashi, Tomohiro Oshino, Masato Takahashi, Seiichi Imanishi, Ari Hashimoto, Haruka Wada, and Ken-ichiro Seino (2023) Tumor-derived interleukin-34 creates an immunosuppressive and chemoresistant tumor microenvironment by modulating myeloid-derived suppressor cells in triple-negative breast cancer. Cancer Immunol Immunother 72, 851-864.

4. Takayoshi Nakamura, <u>**Nabeel Kajihara**</u>, Naoki Hama, Takuto Kobayashi, Ryo Otsuka, Nanumi Han, Haruka Wada, Yoshinori Hasegawa, Nao Suzuki, and Ken-ichiro Seino (2023) Interleukin-34 cancels anti-tumor immunity by PARP inhibitor. J Gynecol Oncol 34, e25.

5. <u>**Nabeel Kajihara**</u>, Yoshino Tanaka, Riko Takeuchi, Takuto Kobayashi, Masafumi Tanji, Tsukasa Ataka, Shiho Nakano, Taisho Yamada, Akinori Takaoka, Yoshinori Hasegawa, Ken-ichiro Seino, and Haruka Wada (2023) Augmented interferon regulatory factor 7 axis in whole tumor cell vaccines prevents tumor recurrence by inducing interferon gamma-secreting B cells. OncoImmunology 12, 2213132.

6. <u>**Nabeel Kajihara**</u>, Yunqi Ge, and Ken-ichiro Seino (2023) Blocking of estrogen signals improves anti-tumor effect regardless of estrogen receptor alpha expression in cancer cells. Br J Cancer, In press.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Nabeel Kajihara, Takuto Kobayashi, Ryo Otsuka, and Ken-ichiro Seino. Interleukin-34; A Key Molecule Responsible for Poor Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer. 第 85 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2021 年 5 月 21 日-5 月 22 日・オンライン

2. Nabeel Kajihara, Takuto Kobayashi, Ryo Otsuka, and Ken-ichiro Seino. Interleukin-34, as a therapeutic target for Triple-Negative Breast Cancer. 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

3. Nabeel Kajihara, Takuto Kobayashi, Ryo Otsuka, and Ken-ichiro Seino. Interleukin-34; A Key Molecule Responsible for Poor Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer. 第 25 回日本がん免疫学会学術総会, 2021 年 7 月 1 日-7 月 3 日・和歌山県

4. Nabeel Kajihara and Ken-ichiro Seino. Establishment of Estrogen Inhibition Therapy Targeting IL-34 in Triple-Negative Breast Cancer. 第 81 回日本癌学会学術集会, 2022 年 9 月 29 日-10 月 1 日・神奈川県

5. Nabeel Kajihara and Ken-ichiro Seino. Establishment of Anti-Estrogenic Therapy Targeting IL-34 in Triple-Negative Breast Cancer. 第 51 回日本免疫学会学術集会, 2022 年 12 月 7 日-12 月 9 日・熊本県

<u>要旨</u>

【背景と目的】

近年注目を集めている免疫療法は、がん患者の生存率改善および再発率減少をもたらしている。しかしながら、その治療効果や再発抑制効果は十分とは言えず、ほとんどの腫瘍が最終的に治療抵抗性を獲得するため、より効果的な治療法や再発予防法の開発が期待されている。

そこで我々は、1. 腫瘍内に浸潤している免疫細胞の大半を占める免疫抑制性のミエロイド細胞に着目し、これらを減少させる治療法の開発 (第一章)、2. 腫瘍内に浸潤している細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を直接活性化させる治療法の開発 (第二章)、3. がんの再発を予防するための新規がんワクチンの開発 (第三章)、の三つのテーマに取り組んだ。

【方法と結果】

(第一章)

ほとんどの腫瘍には免疫抑制性ミエロイド細胞が大量に浸潤しており、それらは、がん細胞に対して攻撃性を持つ CTL などの免疫細胞機能を抑制することで免疫抑制的な腫瘍微小環境 (TME) を構築する。特に、トリプルネガティブ乳がん (TNBC) は免疫抑制性ミエロイド細胞の浸潤が豊富ながん種として報告されている。そこで、ミエロイド細胞の分化を抑制性に傾けるサイトカインである Interleukin-34 (IL-34) の TNBC における病理学的役割について調査した。

まず、TCGA (The Cancer Genome Atlas) データセットを用いて TNBC における IL-34 の遺伝子発現を調査したところ、TNBC 患者の腫瘍組織では IL-34 が高発現しており、多変量解析の結果 IL-34 発現そのものが独立した予後不良因子となることが判明した。そのメカニズムを、IL-34 恒常発現マウス TNBC 細胞株 4T1 (Ctrl) と IL-34 欠損 4T1 (KO) を用いて探ったところ、KO 腫瘍の方がマウス生体内における成長速度が遅いことがわかった。また、フローサイトメトリーを用いてその腫瘍内を解析してみると、単球系骨髄由来抑制細胞 (M-MDSC) が減少し多形核 MDSC (PMN-MDSC) が増加していた。さらに、試験管内での実験により、これらの結果が IL-34 による直接的なものであることが判明した。

M-MDSC は強力な免疫抑制能を持ち、PMN-MDSC は血管新生を促進するため、両腫瘍における制御性 T 細胞 (Treg) と腫瘍内血管量を比較したところ、KO 腫瘍において Treg の減少と血管浸潤の大幅な増加が観察された。腫瘍内血管は薬剤の送達性を制御するため、それぞれの腫瘍を接種したマウスに抗がん剤を投与したところ、Ctrl 腫瘍に対しては全く治療効果を示さなかったが、KO 腫瘍の成長は有意に抑制された。

最後に、ここまで得られたマウス実験結果の外挿性を、ヒト TNBC 組織を用いた免疫染色により評価し、ほとんどがヒトでも反映されていることがわかった。

(第二章)

抗腫瘍免疫サイクルの様々なステップが抑制されることで最終的には CTL の機能が制限され治療抵抗性を呈する。本章では、最終エフェクターである CTL を直接活性化させる手法を探索した。この課題に取り組むべく文献を調査したところ、ICI の治療効果に性差があり女性の方がその恩恵を受けないこと、妊娠中のホルモンレベルの増加は T 細胞免疫を抑制すること、などが報告されていたため、性ホルモンであるエストロゲンの TME における CTL への関与を予測し、マウスエストロゲン非感受性腫瘍を用いて調査した。

まず、4T1 とマウス結腸がん細胞株 CT26 がエストロゲン受容体 (ER) 陰性で、エストロゲン感受性を持たないことを確認した。これら細胞株をそれぞれエストロゲン枯渇マウスに移植すると、エストロゲン循環マウスと比較して腫瘍の増大が有意に抑制された。一方で、エストロゲン枯渇マウスに腫瘍を接種したのちエストロゲンを投与すると腫瘍増殖が促進された。さらには、ER 陰性がんを接種したマウスに抗エストロゲン薬を投与すると腫瘍増殖が抑制され、その腫瘍浸潤免疫細胞を解析してみると活性化 CTL が増加していた。また、ヒト末梢血中およびマウス脾臓中 CTL を用いた実験により、エストロゲンが CTL を直接抑制し、抗エストロゲン薬の添加によりこの抑制を解除できることが判明した。このメカニズムとして、エストロゲンが CTL からの Interleukin-2 (IL-2) 産生量を減少させ、それにより自己分泌活性化経路が抑制されていることが、次世代シーケンシング解析の結果から示唆された。

腫瘍内 CTL の浸潤レベルや機能は ICI の治療効果に大きく関与することが報告されているため、最後に、ER 陰性腫瘍を接種したマウスに対して抗エストロゲン薬と ICI の併用治療を行ったところ、これらの併用治療が劇的な抗腫瘍効果をもたらすことが確認された。

(第三章)

様々な治療法を駆使してがんが一度寛解に至ったとしても、後に再発するケースが多く存在するため、この克服も重要課題の一つである。本章では、腫瘍細胞に発現する多様な腫瘍関連抗原 (TAA) を宿主免疫の標的にできうる全腫瘍細胞ワクチン (WTCV) のワクチンに注目し、より効果的な WTCV の開発を目指した。

まず、4T1A (本章では一般的な 4T1 のことをそのように呼ぶ)・4T1S (当研究室で 2015 年に樹立された 4T1 の亜株)・CT26・マウスメラノーマ細胞株 B16・マウスルイス肺がん細胞株 3LL・マウス線維肉腫細胞株 MCA205 に放射線を照射することで

不活性化したのち、WTCV としてマウスに接種し、その二週間後に放射線照射していないワクチン時と同種のがん細胞を接種することで、それぞれの細胞株を用いた WTCV におけるワクチン効果の違いを比較した。そして、4T1A・B16・3LL は WTCV 無効細胞株、4T1S・CT26・MCA205 は WTCV 有効細胞株として同定された。その後、各細胞株を次世代シーケンシング解析し、WTCV 有効細胞株では Irf7、Ifi44、Usp18、および Oas3 の四遺伝子が高発現していることが判明した。さらに、遺伝子導入細胞株を用いたワクチン実験により Oas3 以外の三遺伝子 (Irf7、Ifi44、Usp18) がワクチン効果に重要であることが明らかになった。

その機序を解明するべく、WTCV 無効細胞株と有効細胞株をワクチン接種したマウスの所属リンパ節中免疫細胞を単一細胞解析→差分的発現遺伝子解析→遺伝子オントロジー解析→フローサイトメトリーにより評価したところ、Interferon-γ (IFNγ) 産生 B 細胞がワクチン効果に重要であることが示唆された。また、B 細胞除去抗体を用いたワクチン実験により、$IFN\gamma^{+}$ B 細胞のワクチン効果における重要性が示された。

【考察と結論】

(第一章)

IL-34 の発現は NF-κB と関連している。TNBC においては NF-κB 経路の亢進が報告されているため、IL-34 の高発現に繋がっていると考えられる。本章で得られた結果は、TNBC の TME における IL-34-MDSC 軸を介した免疫抑制と化学療法抵抗性の存在を示唆している。故に、IL-34 阻害治療により腫瘍内の免疫抑制と化学療法抵抗性を解除できる可能性がある。

(第二章)

IL-2 は CTL からも産生され、自己分泌経路により CTL 自身の増殖を促進することが報告されている。本章で得られた結果は、エストロゲンが TME において、CTL における IL-2 自己分泌経路を直接抑制することによってがん細胞の ER 非依存的にがんの進行を促進することを示唆している。故に、がん患者におけるエストロゲンシグナルの遮断が TME 内の CTL を活性化および増加させ、結果として ICI の有効性の向上をもたらす可能性がある。

(第三章)

Irf7・Ifi44・Usp18 は免疫細胞内の自然免疫応答において密接に関わっていることがわかっている。本章で得られた結果は、Irf7・Ifi44・Usp18 ががん細胞内においても協力的に機能でき、これらをがん細胞に導入することで、WTCV による再発を想定した腫瘍の抑制効果が高まることを示唆している。また、上記三因子がワクチン効果を高

めるメカニズムとして IFNγ^{+} B 細胞の重要性を提示した。故に、がん細胞内の自然免疫経路を活性化させたがんワクチンは将来の再発を予防する可能性があり、最終的に臨床現場での予防的治療として適用され得る。

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。

ATCC	American type culture collection
CCLE	Cancer cell line encyclopedia
cDNA	Complementary DNA
CSF1	Colony stimulating factor 1
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
ER	Estrogen receptor
FBS	Fetal bovine serum
FPKM	Fragments per kilobase of exon per million mapped sequence reads
FSC	Forward scattered light
GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
ICI	Immune checkpoint inhibitor
IFI44	Interferon-induced protein 44
IFN	Interferon
IHC	Immunohistochemistry
IL	Interleukin
IRF7	Interferon regulatory factor 7
KO	Knockout
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
MHC	Major histocompatibility complex
M-MDSC	Monocytic myeloid-derived suppressor cell
OAS3	2´-5´-origoadenylate synthetase 3
OVX	Ovariectomy
PBS	Phosphate buffered saline
PgR	Progesterone receptor

PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PMN-MDSC	Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cell
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
SSC	Side scattered light
TAM	Tumor-associated macrophage
TCGA	The cancer genome atlas
TME	Tumor microenvironment
TNBC	Triple-negative breast cancer
TNF	Tumor necrosis factor
Treg	Regulatory T cell
tSNE	T-distributed Stochastic Neighbor Embedding
USP18	Ubiquitin-specific peptidase 18
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World health organization
WT	Wild type

緒言

世界保健機関 (WHO) によると、全世界で約 2,000 万人ががんに罹患し、約 1,000 万人ががんにより死亡していると推計されている (Sung et al. 2021)。特に、日本においては男性の 65.5%、女性の 51.2% ががんに罹患しており、疾患別死亡率のトップに位置することから国民病とまで呼ばれている (国立がん研究センターがん情報サービス)。また、その罹患者数は年々増加しており、現代社会において最も深刻な健康問題の一つとなっている。がんは様々な要因によって引き起こされ、その要因は、喫煙・飲酒・肥満・放射線・遺伝的要因など多岐にわたる。このような発生要因の多様性から、治療においても複雑な問題を抱えていることが伺える。

がん治療は近年急速に発展しており、化学療法・放射線療法・手術療法といったがん三大療法に加え、免疫療法・細胞療法・遺伝子療法を含む様々な治療法が開発されている。がん三大療法は、がん細胞を除去するために周囲の正常組織にまで傷害が及び副作用等を伴うことから、がん細胞特異的な傷害を可能にする治療法の開発が求められてきた。そんな中、免疫療法ががん治療にパラダイムシフトをもたらした。免疫療法は、宿主免疫系の絶妙な力と特異性を利用してがん細胞のみの攻撃を可能にする。さらに、がんを根絶するだけでなく将来の再発リスクを大幅に低減させる (Pardoll 2012)。実際、免疫療法の一つである免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) は、メラノーマ・肺がん・腎がん・膀胱がん等の様々ながん種に対して高い治療効果を示しており、生存率の改善および再発率の減少をもたらしている (Sung et al. 2021)。

しかしながら、ICI に反応するがん患者は全体の 20% 程度に留まっており、ほとんどの腫瘍は最初から治療抵抗性を示すか、一回目の反応後に治療抵抗性を獲得する (Conforti et al. 2018)。治療抵抗性を引き起こすメカニズムは、大きく二つに分類できる。一つは、がん細胞内の特定の遺伝的特性に起因する内因性メカニズムであり、もう一つは、サイトカインや間質細胞などの周囲の状況から生じる外因性メカニズムである (Zhao and Subramanian 2017)。特に、最近の研究は、治療抵抗性の獲得における外因性メカニズムの重要性を示しており、ICI の有効性は抗腫瘍免疫サイクルの各段階のさまざまな外因性免疫抑制要素によって強く抑制されていることが明らかになっている (Tie et al. 2022)。例えば、腫瘍関連マクロファージ (TAM)・制御性 T 細胞 (Treg)・骨髄由来抑制細胞 (MDSC) などの免疫抑制細胞は、がん細胞に対する最終エフェクターである細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を、直接もしくは間接的に抑制することで治療抵抗性の獲得を促進する (Tie et al. 2022)。さらに、これらの免疫抑制細胞や腫瘍細胞によって分泌されるサイトカインも腫瘍の進行および免疫逃避に寄与する (Tie et al. 2022)。ここで紹介した治療抵抗性獲得メカニズムは、免疫療法に限らず化学療法や放射線療法においても報告されている (Holohan et al. 2013; Ruffell and Coussens 2015)。以

上より、がんは依然として完治が困難な病気であるため、治療抵抗性を解除する手法や抗腫瘍免疫の活性化を促し、がん治療の奏功率向上に寄与する治療法の確立が期待されている。

そこで我々は、第一章にて、がん腫瘍内に浸潤している免疫細胞の大部分を占める免疫抑制性のミエロイド細胞に着目し、これらを除去もしくは減少させる治療法の開発を目指した。具体的には、Interleukin-34 (IL-34) という抑制性ミエロイド細胞の分化に関与する免疫抑制因子に着目し、ミエロイド細胞の浸潤が豊富なことで知られるトリプルネガティブ乳がん (TNBC) における病理学的役割および治療標的としての可能性を検討した。第二章では、いかなる要因によって引き起こされる治療抵抗性をも克服するべく、がん細胞に対する最終エフェクターとしての役割を担う CTL を直接活性化させる治療法の開発を目指した。妊娠中のホルモンレベルの増加が T 細胞免疫を抑制することなどを含む様々な報告にて、エストロゲンの T 細胞に対する抑制的な働きが明らかになっていることに加え、ICI の治療効果が男性よりも女性で低いことを踏まえて、TME におけるエストロゲンの CTL 抑制を予測し調査した。第三章では、がんにおいて克服すべき課題の一つであるの再発を予防するための新規がんワクチンの開発を目指した。特に、多様な腫瘍関連抗原 (TAA) を含むことから強力な抗腫瘍免疫を誘導できる可能性を持つ全腫瘍細胞ワクチン (WTCV) に注目し、再発予防効果向上に寄与する因子を探索した。

第 1 章

トリプルネガティブ乳がんにおける IL-34 標的治療の開発

緒言

乳がんは、世界中の女性において最も罹患率の高いがんであり、がん関連死の大きな要因となっている (Sung et al. 2021)。実際、女性が一生のうちに乳がんを発症するリスクは 12% にものぼるとされている (Liu et al. 2020)。GLOBOCAN 2020 によると、2020 年の全世界における乳がん罹患者数は 2,261,419 人、乳がんによる死亡者数は 684,996 人にまで及んでいる (Sung et al. 2021)。

乳がんは、生物学的・臨床的特性にばらつきのある不均一性の高いがん種であり、治療法や生存率がサブタイプによって多様である (Kajihara et al. 2022)。乳がんのサブタイプを区別するために、乳がん腫瘍組織の免疫組織化学 (IHC) 染色が一般的に用いられており、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR)、ヒト上皮成長因子関連受容体 2 (HER2) の発現に基づいて四つのサブタイプに分類できる。このうち、トリプルネガティブ乳がん (TNBC) は、これら三つの受容体を欠くことが特徴で、乳がん全体の 15~20% を占める (Keenan and Tolaney 2020)。特に TNBC は、細胞分裂が速く、ゲノムが不安定な高悪性度腫瘍であり、予後の悪さや高い再発率を呈する (Kajihara et al. 2020)。また、ホルモン療法や分子標的治療に反応しないため、主な治療法として化学療法が用いられている (Cha and Koo 2020)。しかし、TNBC 患者の多くは、化学療法に対する感受性が低いか、治療中に化学療法に対して抵抗性を示すようになる (Nedeljković and Damjanović 2019)。したがって、化学療法抵抗性は TNBC 治療を成功させるために対処すべき重要な問題である。

これまで多くの研究が、化学療法抵抗性誘導メカニズムの解明を目指してきており、その多くは、アポトーシス回避機構や DNA 修復機構など、がん細胞内部で生じる内因性メカニズムに焦点を当ててきた (Wilson et al. 2006; Holohan et al. 2013; Zheng et al. 2015)。一方、最近の医学的進歩により、外因的なメカニズムも重要であることがわかってきた (Karin et al. 2002; Pardoll 2012)。その代表例が、腫瘍微小環境 (TME) 内での腫瘍と免疫細胞の相互作用である。TME には、ミエロイド細胞、リンパ球、血管内皮細胞など様々な免疫系要素が存在する。特に、腫瘍関連マクロファージ (TAM) や骨髄由来抑制細胞 (MDSC) といったミエロイド細胞は、様々な腫瘍において支配的な免疫細胞集団を構成し、TME の複数の側面において重要な役割を担っている (Cha and Koo 2020; Veglia et al. 2021)。また、TAM と MDSC の腫瘍への浸潤の増加は、化学療法抵抗性出現の特徴であり、予後不良と相関している (Noy and Pollard 2014; Anestakis et al. 2020)。TME におけるこれらミエロイド細胞の役割としては、血管新生・免疫抑制・腫瘍進行など腫瘍形成促進プロセスの多くに関与していることが明らかになっている (Ruffell and Coussens 2015; Cha and Koo 2020)。さらに興味深いことに、TNBC 腫瘍はミエロイド細胞の浸潤が豊富ながん種として報告されている (Cha and

Koo 2020)。一方で、TNBC におけるミエロイド細胞を介した化学療法抵抗性獲得メカニズムについては、詳細に解明されておらず、明らかにする必要がある。

ミエロイド細胞の分化と活性化は、コロニー刺激因子 1 受容体 (CSF1R) を介したシグナル伝達に大きく依存している (Baghdadi et al. 2018)。そこで本研究では、2008 年に CSF1R の第二のリガンドとして同定された Interleukin-34 (IL-34) に着目した (Kajihara et al. 2020)。IL-34 は、様々ながん種において、腫瘍の進行・転移・血管新生などの予後不良に関与することが示されている (Baghdadi 2018)。また、いくつかの既報にて、腫瘍由来の IL-34 が化学療法抵抗性を引き起こす重要な分子となり得ることが示されている (Baghdadi et al. 2016; Nakajima et al. 2021)。実際、化学療法抵抗性における IL-34 の重要性は、がん細胞に抗がん剤を暴露すると IL-34 の産生が増加することを示す肺がん研究によって裏付けられている (Baghdadi et al. 2016)。さらに、IL-34 は TAM のような免疫抑制性ミエロイド細胞を誘導することが知られており、予後不良および化学療法抵抗性の引き金となっている可能性がある (Hama et al. 2020)。以上より、IL-34 が TNBC の病態や予後および化学療法抵抗性に関与している可能性があると考え、検証することにした。

材料と方法

臨床データ解析

Breast Invasive Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas) データセット (N=1083) における IL-34・CSF1・CSF1R の遺伝子発現データおよび臨床データは、www.cbioportal.org から取得した。これらのサンプルを PAM50 分類に基づき乳がんサブタイプ (TN (N=171)、HER2+ (N=78)、Luminal A (N=499)、Luminal B (N=197)) に割り当て、各サブタイプにおける IL-34・CSF1・CSF1R の遺伝子発現量を比較した。次に、これらの遺伝子発現が高い (上位 50%) または低い (下位 50%) 各乳がんサブタイプ患者のカプランマイヤー生存曲線を作成した。何らかの情報が欠落しているデータは、この解析から除外した。TNBC 患者の遺伝子発現および臨床データから、診断時年齢、IL-34 発現レベル、CSF1 発現レベル、CSF1R 発現レベル、T ステージ、N ステージ、および M ステージが 10 年生存に及ぼす影響について多変量解析を行った。

ヒトがん細胞株解析

ヒト TNBC (N=17) または非 TNBC (N=24) 細胞株における IL-34、HER2、ER、PgR、および β-actin の遺伝子発現量データは、Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) から得た。何らかの情報が欠落しているデータおよび American Type Culture Collection (ATCC) から入手できない細胞株のデータは、この解析から除外した。

細胞培養

マウス TNBC 細胞株 4T1 は ATCC から入手し、RPMI-1640 (富士フイルム和光純薬) 中で培養した。培養液には、10% FBS (Sigma-Aldrich)、1% Penicillin-Streptomycin (ナカライテスク)、および 1% MEM Nonessential Amino Acids (ナカライテスク) を添加し、全て CO_2 インキュベータ (37°C, 5% CO_2, 95% air) 内で培養した。実験に使用する全細胞株のマイコプラズマ汚染が無いことを、MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza) を用いて確認した。

IL-34 欠損がん細胞株の作製

IL-34 の欠損がん細胞株を作製するため、mIL-34 CRISPR/Cas9 KO Plasmid (Santa Cruz Biotechnology) を 4T1 に導入した。コントロールプラスミドとしては、Control CRISPR/Cas9 Plasmid (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。これらのプラスミドを Neon® Transfection system (Thermo Fisher Scientific) を用いて 2×10^6 細胞に導入し、24 時間培養した。その後、プラスミドの導入効率を、蛍光顕微鏡 ObserverZ1 (Zeiss) を用いた緑色蛍光タンパク質 (GFP) の検出によって視覚的に確認した。プラスミドを取

り込んだ細胞は、導入から 48 時間後に FACS Aria セルソーター (BD Biosciences) を用いて GFP 発現により選別した。その後、培地にピューロマイシン (2 μg/ml) を添加し、48 時間培養して導入細胞を選択した。

がん細胞培養上清中における IL-34 の定量

コントロールおよび IL-34 欠損 4T1 細胞株からの IL-34 の産生量の測定は、LEGEND MAX Mouse IL-34 ELISA Kits with Pre-Coated Plates (BioLegend) を用いた酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) により行った。細胞上清は、6 ウェルプレートに 2 ml の培養液を加え、1×10^6 細胞を播種してから 48 時間後に 0.44 μm フィルターを通して回収した。

がん細胞の増殖アッセイ

コントロールおよび IL-34 欠損 4T1 細胞株の細胞増殖は、MTT Cell Count Kit (ナカライテスク) を用いた MTT アッセイにより評価した。まず、96 ウェルプレートに 5×10^3 細胞を播種し、4 日間細胞増殖を追跡した。試験波長 570 nm、参照波長 650 nm の吸光度を MULTISKAN FC (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

動物実験

6~7 週齢のメス BALB/c および MMTV-PyMT (FVB/N-Tg (MMTV-PyVT) 634Mul/J) マウスを日本 SLC および The Jackson Laboratory から購入した。これらのマウスは、北海道大学動物施設において 12 時間の明暗サイクルおよび特定の病原体を含まない条件下で飼育された。マウスへのがん細胞移植実験用の細胞を準備するために、培養細胞を回収後、1×10^5 細胞を 1.5 ml チューブに分注し、500×g で 5 分間遠心した。上清を除去後、形成されたペレットを 10 μl のマトリゲル (Corning) で懸濁し同系マウスの右脇腹に皮下接種した。抗 IL-34 抗体 (200 μg/マウス, BioLegend) および/またはパクリタキセル (1.3 mg/kg, BioLegend) は腫瘍径が 5 mm に達した時点で腹腔内投与を開始した。がん細胞皮下移植時および薬剤腹腔内投与時にはマイショット® (ニプロ) を用いた。腫瘍の大きさは、週に 3 回ノギスで測定した。がん細胞移植から 14 日後に腫瘍を切除し次の実験にまわした。免疫組織化学 (IHC) 染色に用いる個体に関しては、腫瘍切除前に灌流固定した。本研究内の全ての動物実験は、北海道大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号: 14-0171, 19-0094)。

免疫組織化学染色

灌流固定後のマウスから切除した腫瘍を 4% パラホルムアルデヒド (富士フイルム和光純薬) で 24 時間固定した。その腫瘍を 70~100% エタノールで脱水し、キシ

レンに浸漬した後、パラフィンに包埋した。包埋したサンプルを 5 µm 厚にスライスし、スライドグラスに貼り付けることで切片を作製した。染色ステップに進む前に切片を脱パラフィンし、0.3% H_2O_2 を含む蒸留水中に 20 分間浸漬することで内因性ペルオキシダーゼをブロックした。FOXP3 を染色する切片は、クエン酸緩衝液で 1 分間煮沸することにより抗原を賦活化した。その後、切片を 4% BlockAce (DS ファーマバイオメディカル) で 1 時間インキュベートすることで非特異反応をブロックした。マウス切片の染色ステップでは、ラット抗マウス CD4 (1:100, Thermo Fisher Scientific)、FOXP3 (1:100, Thermo Fisher Scientific)、または CD31 (1:500, BD Pharmingen) 抗体で一晩反応させた。ヒト切片は、マウス抗ヒト IL-34 (1:4000, Sigma-Aldrich)、FOXP3 (1:200, Thermo Fisher Scientific)、CD14 (1:500, Cell Signaling Technology)、CD15 (1:200, BD Pharmingen)、または CD31 (1:1000, Proteintech) 抗体で一晩反応させた。次に、マウスおよびヒト切片をビオチン化ロバ抗ラット/マウス IgG (Jackson ImmunoResearch) で 1 時間反応させた後、VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories) を用いて 1 時間インキュベートした。最後に、H_2O_2 を含む Tris-HCl 中の 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (富士フイルム和光純薬) で 5~20 分間インキュベートし、マイヤーヘマトキシリン溶液 (富士フイルム和光純薬) で対比染色した。そして、トルエン (富士フイルム和光純薬) を用いて切片を封入し、光学顕微鏡 BX53F (オリンパス) で観察した。

フローサイトメトリーによる腫瘍浸潤免疫細胞の解析

切除した腫瘍から BD HorizonTM Dri Tumor and Tissue Dissociation Reagent (BD Biosciences) を用いて腫瘍浸潤免疫細胞を分取した。細胞外染色では、細胞 ($2×10^5$ 細胞 / ウェル) を FcR Blocking Reagent (TONBO biosciences) でブロックし、CD45/CD3ε/CD4/CD8α/CD11b/F4/80/Ly6C/Ly6G 分子を抗体 (BioLegend) で染色した。細胞外染色後に Cytofix/Cytoperm™ Buffer (BD Biosciences) で細胞を固定・透過させ、FOXP3 分子を抗体 (BioLegend) で染色した。データは FACS Celesta フローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて取得し、FlowJo ソフトウェアで解析した。ゲーティング戦略としては、まず、前方散乱と側方散乱に基づいて生細胞を選択し、その後ダブレットを除去した。T 細胞については、$CD45^+CD3^+$ 細胞を展開した後、$CD4^+CD8^-$ 細胞、$CD8^+CD4^-$ 細胞、および $CD4^+CD8^-FOXP3^+$ 細胞を選択した。マクロファージについては、$CD45^+$ 細胞を展開した後、$CD11b^+F4/80^+$ 細胞を選択した。MDSC については、$CD45^+$ 細胞を展開した後、$CD11b^+Ly6C^+Ly6G^-$ 細胞および $CD11b^+Ly6C^{lo}Ly6G^+$ 細胞を選択した。

腫瘍組織における遺伝子発現レベルの解析

TriPure Isolation Reagent (Roche) を用いて切除した腫瘍から RNA を抽出し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (東洋紡) を用いて mRNA を cDNA に逆転写した。その後、下に示すプライマーと KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x) ABI Prism® (Kapa Biosystems) を用いて cDNA に対して StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) で定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) を実施した。この実験では *Gapdh* をハウスキーピング遺伝子として使用した。

Species	Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
	Gapdh	TCAAATGGGGTGAGGCCGGT	TTGCTGACAATCTTGAGTGA
Mouse	*Tnfa*	TTCTATGGCCCAGACCCTCA	CTTGGTGGTTTGCTACGACG
	Il6	CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT	GAAGTAGGGAAGGCCGTGG

骨髄由来 MDSC の誘導

メス BALB/c マウスの大腿骨から骨髄を採取し、ACK 溶解バッファー (富士フイルム和光純薬) で赤血球を破壊した。その後、1×10^6 細胞の骨髄を、10% FBS (Sigma-Aldrich)、1% Penicillin-Streptomycin (ナカライテスク)、50 ng/ml GM-CSF (BioLegend)、および 50 ng/ml IL-34 (BioLegend) を含んだ 2 ml の RPMI-1640 (富士フイルム和光純薬) 中で培養した。誘導した細胞は 3 日目に回収し、フローサイトメトリーで分析した。

統計解析

統計解析は JMP® 14 (SAS Institute) を用いて行った。二群間の有意性の判定には Student's *t*-test が使用された。唯一、CCLE から抽出した TNBC と非 TNBC 細胞株間の遺伝子発現レベルの比較には Mann-Whitney U test を使用した。また、三群間以上の有意性の判定には Tukey-Kramer test が使用された。カプランマイヤー曲線の比較には Log-rank test を使用した。相関を調べる解析では、ピアソン相関係数を使用した。多変量解析は Cox proportional hazard model で行った。本研究における全ての統計解析において、P 値が 5% を下回る場合に統計的に有意差ありと判断した。

結果

TNBC における IL-34 の重要性の検討

まず、The Human Cancer Genome Atlas (TCGA) データセットに登録されている乳がん患者コホートを用いて、各乳がんサブタイプ (TNBC、HER2+、Luminal A、Luminal B) における IL-34 の発現を評価し、IL-34 と各サブタイプの病理的関係を探った。また、IL-34 と比較するために CSF1 および CSF1R の発現も調べた。すると、TNBC においてのみ IL-34 の高発現が観察され (図 1a, b)、その他の CSF1 や CSF1R に関しては、いずれのサブタイプにおいても顕著な発現パターンは認められなかった (図 1a, b)。

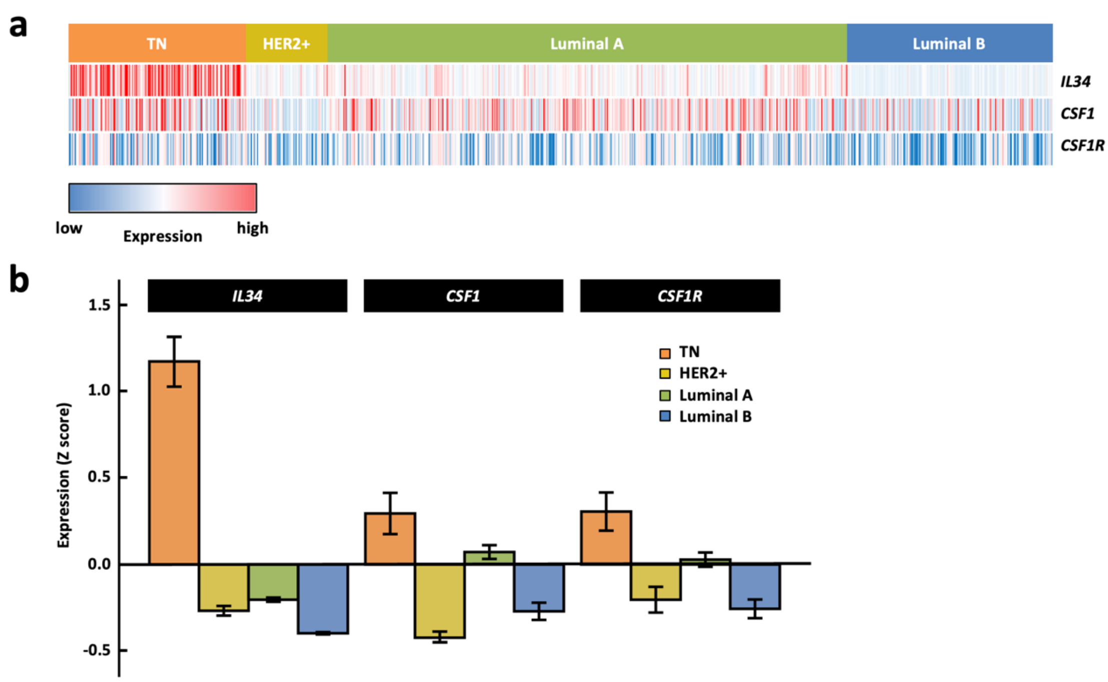

図 1. TCGA データセットを用いたヒト乳がん組織における遺伝子発現

(a) 各サブタイプのヒト乳がん組織における IL-34、CSF1、CSF1R の遺伝子発現プロファイルをヒートマップで示している。

(b) 各サブタイプのヒト乳がん組織における IL-34、CSF1、CSF1R の遺伝子発現強度の平均を示している。

上記の結果がヒト TNBC 細胞株においても再現されているのかを調べるために、Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) を用いてヒト TNBC 細胞株における IL-34 の発現レベルを検証した。すると、これまでの結果を反映するように、TNBC 細胞株における IL-34 の発現が非 TNBC 細胞株よりも有意に高かった (図 2)。また、ユニバーサルコントロールとして使用した HER2、ER、PgR は、TNBC 細胞株では非 TNBC 細胞株と比較して有意に低い発現レベルを示した (図 2)。

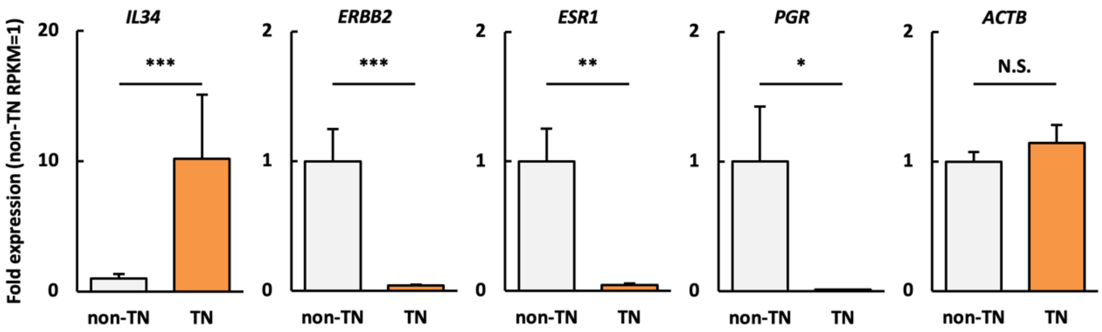

図 2. CCLE を用いたヒト乳がん細胞株における遺伝子発現
ヒト TNBC および非 TNBC 細胞株における IL-34、HER2、ER、PgR、および β-actin 遺伝子発現の平均を示している。TNBC における遺伝子発現レベルは、非 TNBC と比較した倍数表記で示している。
(統計: Mann-Whitney U test, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

次に、TCGA データセットの各乳がんサブタイプ患者をそれぞれの遺伝子発現が高い患者上位 50% と低い患者下位 50% に分けてカプランマイヤー曲線を作成し、遺伝子発現と患者生存率との関係を調査した。既報と一致して (Zins et al. 2018)、HER2+ および Luminal B サブタイプでは、IL-34 が高発現している患者において有意に良好な生存率を示した (図 3)。一方で、IL-34 を高発現している TNBC 患者は IL-34 を低発現している TNBC 患者と比較して有意に低い生存率をあらわした (図 3)。ちなみに、CSF1 および CSF1R においては、その発現と各サブタイプの生存との間に何の関係も観察されなかった (図 3)。

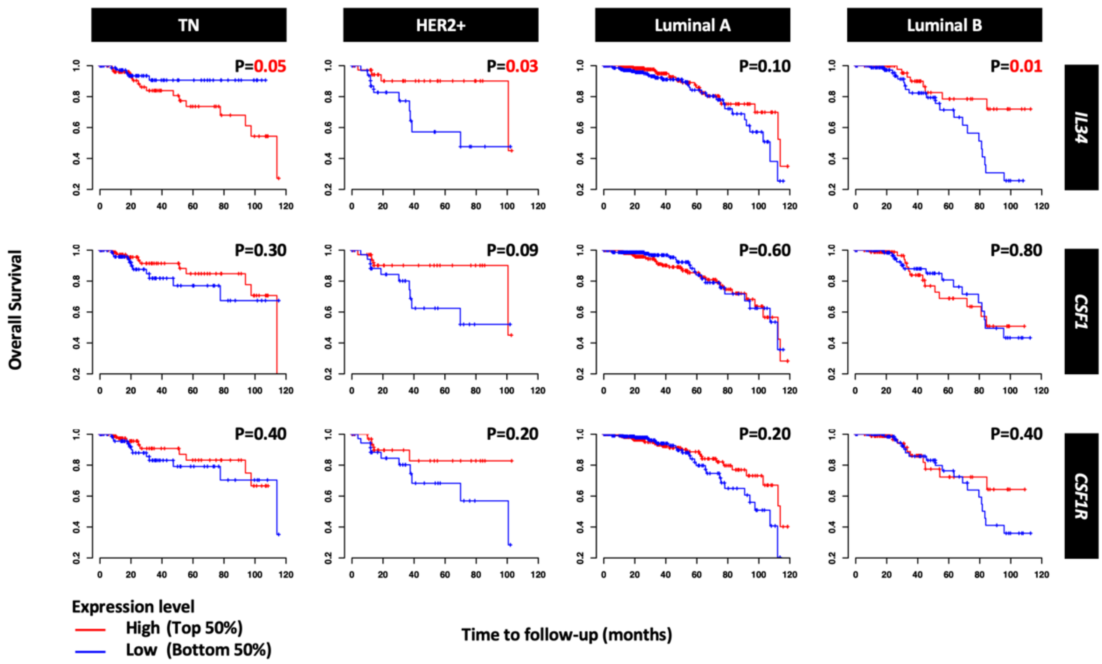

図 3. TCGA データセットを用いたヒト乳がん組織内遺伝子発現と生存の関係
各サブタイプのヒト乳がん組織における IL-34、CSF1、CSF1R 高発現および低発現患者における全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。
(統計: Log-rank test)

以上より、IL-34 が TNBC の予後に影響を及ぼす可能性が示唆されたため、その影響をより明らかにするために多変量解析を行った。結果として、IL-34 は TNBC における独立した予後不良因子となることが判明した (表 1)。

表 1. TNBC 患者の 10 年生存率に関するコックス比例ハザードモデル

TNBC 患者において IL-34、CSF1、CSF1R、年齢、壁深達度、リンパ節転移、および遠隔転移が生存に及ぼす影響を示している。

Characteristic	Factor	HR	95%CI	*P*-value
IL-34 (continuous variable)		20.66	1.61-265.34	0.02
CSF1 (continuous variable)		0.2	0.00-19.27	0.491
CSF1R (continuous variable)		6.13	0.02-1922.89	0.536
Age	≤ 50 yrs	Reference		
	> 50 yrs	1.46	0.54-3.97	0.451
T stage	T1	Reference		
	T2-4	2.52	0.61-17.45	0.258
N stage	N0	Reference		
	N1-3	4.48	1.65-13.38	0.005
M stage	M0	Reference		
	M1	6.47	0.25-92.02	0.174

以上まとめると、IL-34 は TNBC で高発現し、その高発現は単独で予後不良に関連していることが示された。

TNBC の TME における IL-34 の効果の検討

IL-34 が TNBC の予後不良をどのようにもたらすかを明らかにするため、マウス TNBC 細胞株 4T1 を使用し、IL-34 の腫瘍増殖への寄与を検討した。4T1 細胞株は大量の IL-34 を産生したため、最初に IL-34 欠損 4T1 細胞株 (IL-34KO 4T1) を樹立した (図 4a)(以下、IL-34 産生 4T1 を Ctrl、IL-34 欠損 4T1 を KO と呼ぶ)。これら両細胞株は試験管内において増殖速度に差はなかった (図 4b)。一方で、マウス皮下接種モデルでは、Ctrl 細胞と比較して KO 細胞が有意に遅い腫瘍増殖を示した (図 4c)。

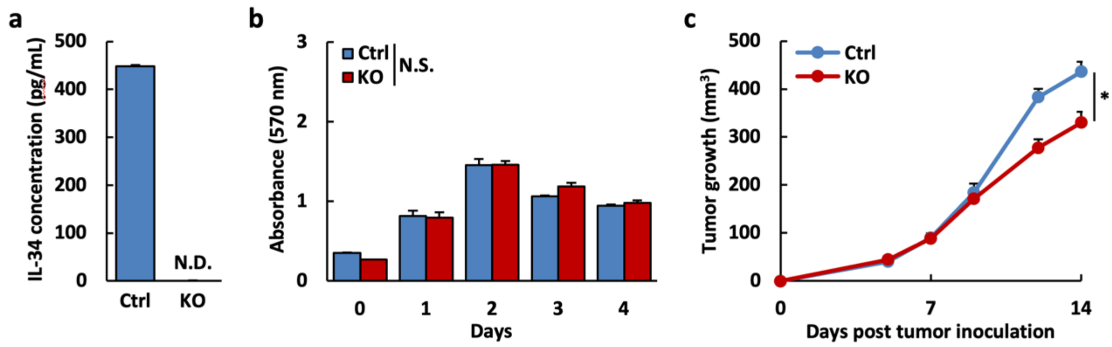

図 4. IL-34 がマウス TNBC の増殖に及ぼす影響

(a) Ctrl または IL-34KO 4T1 細胞培養時の上清中に含まれる IL-34 濃度を示している。

(b) Ctrl または IL-34KO 4T1 細胞の試験管内での増殖速度を示している。

(c) Ctrl または IL-34KO 4T1 細胞 (1×10^5 細胞) を接種した BALB/c マウスにおける皮下腫瘍成長曲線を示している (統計検定は Day 14 時点)。
(統計: Student's *t*-test, *P<0.05)

次に、IL-34 がマウス生体内でどのように腫瘍の成長を促進するかを調べるために各腫瘍における腫瘍浸潤免疫細胞をフローサイトメトリーにより分析したところ、TAM や T 細胞集団には変化が見られなかった (図 5a)。一方で、各腫瘍に浸潤する MDSC の割合に顕著な変化が観察された (図 5a)。MDSC は、単球に類似し TAM への分化能を有する単球系 MDSC と、好中球によく似た表現型を呈する多形核 MDSC の二つのサブセットが確認されている (Kumar et al. 2016)。KO 腫瘍では、Ctrl 腫瘍と比較して、M-MDSC が著しく減少しており、逆に、PMN-MDSC が増加していた (図 5a)。M-MDSC は CSF1R を高発現しており、制御性 T 細胞 (Treg) を誘導することなどにより強い免疫抑制能を持つことが知られているため (Gabrilovich et al. 2012)、各腫瘍における腫瘍浸潤 Treg の数を比較した。予想通り、KO 腫瘍では、Ctrl 腫瘍と比較して Treg の大幅な減少が観察された (図 5b)。以上のように、KO 腫瘍において M-MDSC や Treg といった免疫抑制細胞集団の浸潤レベルが減少したことから、免疫抑制が緩和されているのではないかと考え、腫瘍内の炎症性サイトカインレベルを比較した。予想通り、KO 腫瘍において TNFα や IL-6 といった炎症性サイトカインが増加していた (図 6)。これらの結果は、TME において IL-34 が M-MDSC に作用することで免疫抑制環境を構築し腫瘍増殖を促進している可能性を示唆している。

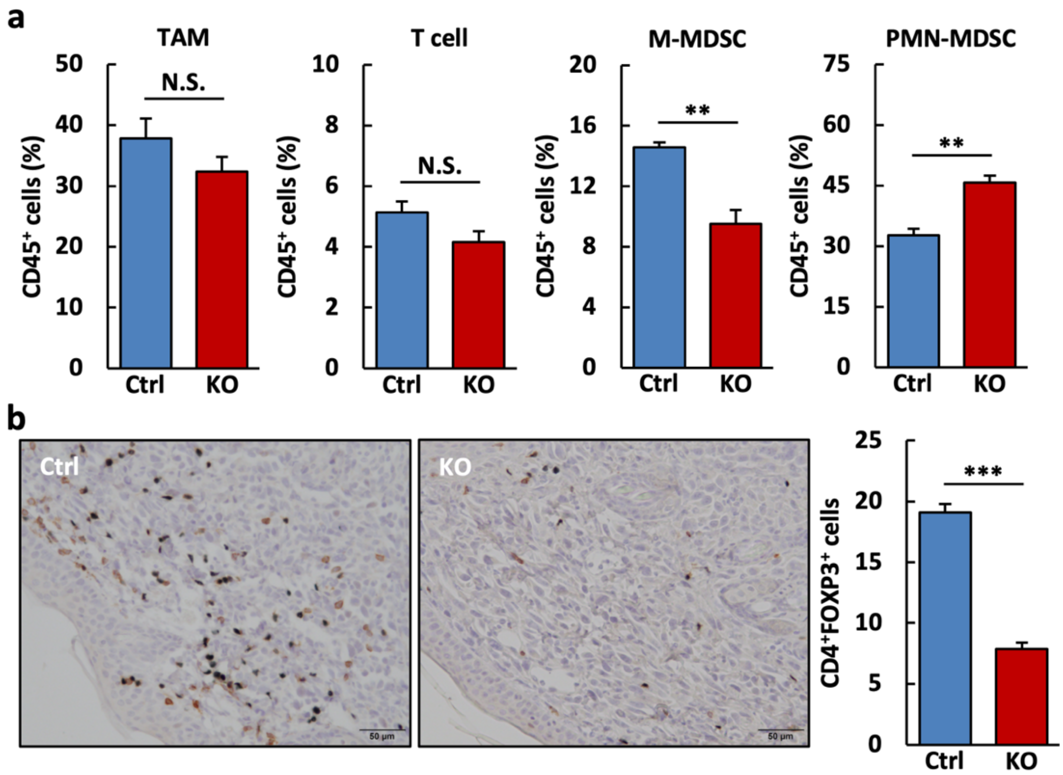

図 5. IL-34 がマウス TNBC の腫瘍浸潤免疫細胞に及ぼす影響

(a) 図 4c に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している $CD45^+$ 細胞における TAM ($CD11b^+F4/80^+$ 細胞)、T 細胞 ($CD3^+$ 細胞)、M-MDSC ($CD11b^+Ly6C^+Ly6G^-$ 細胞)、および PMN-MDSC ($CD11b^+Ly6C^{lo}Ly6G^+$ 細胞) の割合を示している。

(b) 図 4c に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している Treg ($CD4^+FOXP3^+$ 細胞) の免疫染色画像と明視野内の数を示している (赤: CD4, 黒: FOXP3)。

(統計: Student's *t*-test, **P<0.01, ***P<0.001)

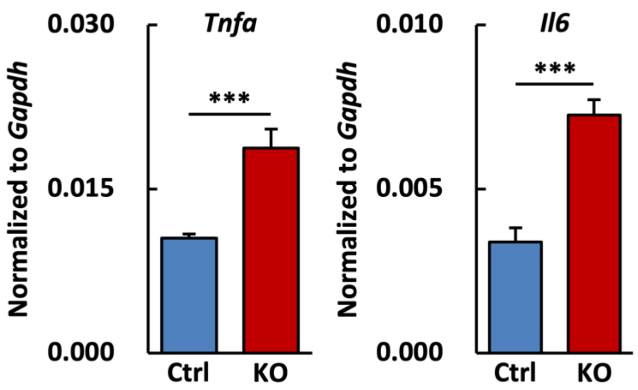

図 6. IL-34 がマウス TNBC の TME に及ぼす影響

図 4c に記載した Day 14 の腫瘍の TME における *Tnfa* および *Il6* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。

(統計: Student's *t*-test, ***P<0.001)

ここまでに IL-34 の MDSC への関与が示唆されたため、MDSC の誘導に対する IL-34 の直接的な効果を試験管内で調べることにした。既報によると、MDSC は顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を用いて骨髄から誘導できる (Höchst et al. 2015)。この培養系に IL-34 を添加すると、M-MDSC 誘導の顕著な増加および PMN-MDSC 誘導のわずかな減少が観察された (図 7a)。また、IL-34 が MDSC の分化に影響するという見解をさらに強化するために、乳がんを自然発癌する MMTV-PyMT マウスに抗 IL-34 抗体を投与し、腫瘍浸潤免疫細胞を解析した。それにより、抗 IL-34 抗体投与群の TME では M-MDSC の明らかな減少と PMN-MDSC の増加が観察された (図 7b)。さらに、M-MDSC の減少に伴い Treg も減少した (図 7c)。これらのデータは全体として、TNBC における IL-34-MDSC 軸の存在を示しており、IL-34 が MDSC に作用することで TME を免疫抑制性に傾けているという概念を支持するものである。

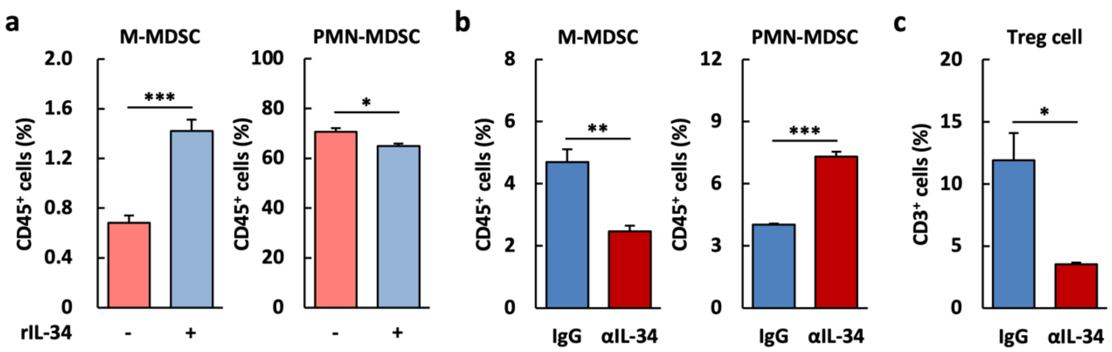

図 7. IL-34 が MDSC 分化に及ぼす影響

(a) IL-34 の存在下または非存在下における骨髄から分化した $CD45^+$ 細胞における M-MDSC および PMN-MDSC の割合を示している。

(b) MMTV-PyMT マウスの自然発癌腫瘍に浸潤している $CD45^+$ 細胞における M-MDSC および PMN-MDSC の割合を示している。

(c) MMTV-PyMT マウスの自然発癌腫瘍に浸潤している $CD45^+CD3^+$ 細胞における Treg の割合を示している。

(統計: Student's *t*-test, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

IL-34 による M-MDSC の誘導促進と同時に PMN-MDSC の誘導抑制も観察されているため、PMN-MDSC の減少が腫瘍に及ぼす影響を調査することにした。PMN-MDSC は、M-MDSC と比較しても免疫抑制能の低い細胞集団であるが、興味深いことに腫瘍内血管の誘導に関与していることが報告されている (Gabrilovich et al. 2012; Kajihara et al. 2022)。実際、PMN-MDSC の抗体による除去は腫瘍内血管を劇的に減少させる (Yang et al. 2004)。そのため、Ctrl および KO 腫瘍における腫瘍内血管レベルを比較した。すると、Ctrl 腫瘍においては、血管が腫瘍の外層のみに観察されたのに対し、KO 腫瘍では、腫瘍中心部まで大量の血管が浸潤していた (図 8)。腫瘍内血管は、薬剤を腫瘍深部にまで送達させるドラッグデリバリーの面で利点があるため (Dass 2004)、ここで示したデータは、IL-34 存在下および非存在下における薬剤治療効果の差異を示唆している。

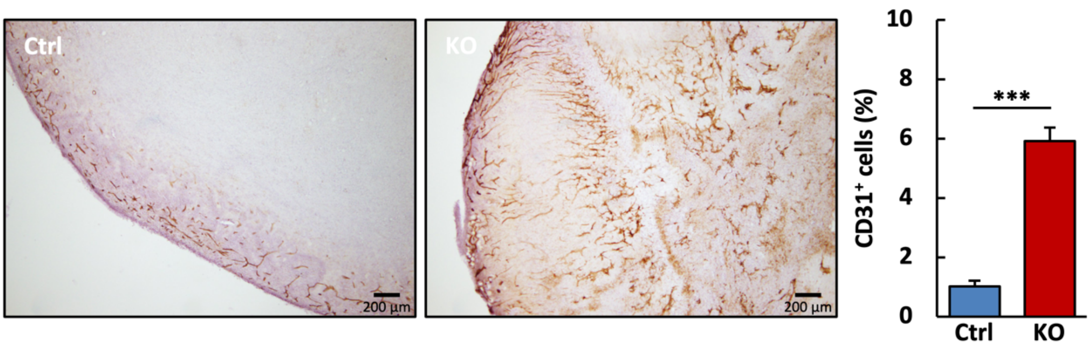

図 8. IL-34 がマウス TNBC の腫瘍内血管浸潤に及ぼす影響

図 4c に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している血管内皮細胞 (CD31^{+} 細胞) の免疫組染色画像と明視野内の割合を示している。

(統計: Student's *t*-test, ***P<0.001)

TNBC における IL-34-MDSC 軸が化学療法の効果に及ぼす影響の検討

IL-34 による PMN-MDSC を介した腫瘍内血管新生の抑制に加え、M-MDSC を介した免疫抑制作用を考慮し、パクリタキセル治療 (TNBC に対する標準治療の一つ) による抗腫瘍効果における IL-34-MDSC 軸の重要性を検討した。興味深いことに、Ctrl 腫瘍ではパクリタキセルが全く治療効果を示さなかったのに対し (図 9a)、KO 腫瘍に対しては有意な抗腫瘍効果を発揮した (図 9b)。

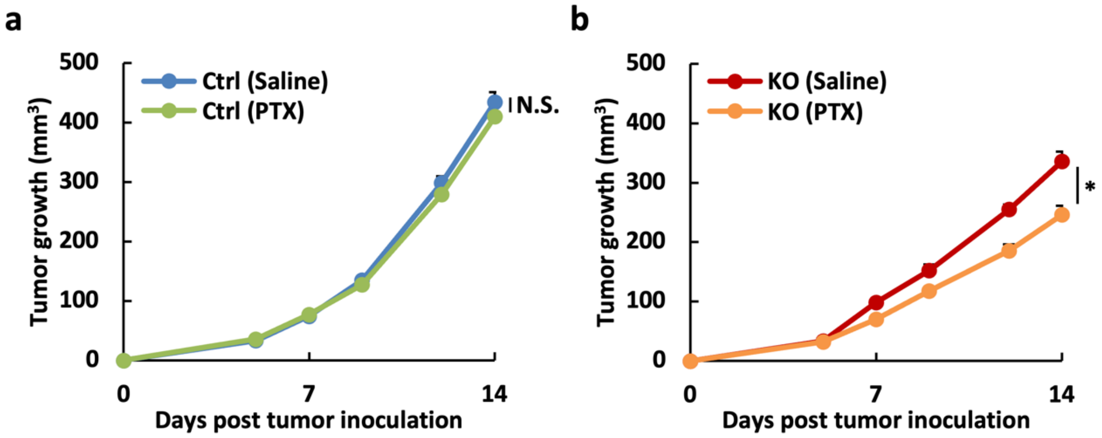

図 9. IL-34-MDSC 軸がパクリタキセルによる抗腫瘍効果に及ぼす影響

(a) Ctrl 4T1 細胞 (1×10^5 細胞) を接種した BALB/c マウスにおける皮下腫瘍成長曲線を示している。パクリタキセル (PTX, 1.3 mg/kg) または生理食塩水 (Saline) を Day 5~14 の間毎日腹腔内投与した (統計検定は Day 14 時点)。

(b) IL-34KO 4T1 細胞 (1×10^5 細胞) を接種した BALB/c マウスにおける皮下腫瘍成長曲線を示している。パクリタキセル (PTX, 1.3 mg/kg) または生理食塩水 (Saline) を Day 5~14 の間毎日腹腔内投与した (統計検定は Day 14 時点)。

(統計: Student's *t*-test, *P<0.05)

以上の結果より、TNBC 腫瘍由来の IL-34 が PMN-MDSC を抑制することによってパクリタキセルの治療効果を制限しているという仮説を立て、マウス TNBC 腫瘍モデルに抗 IL-34 抗体を用いることでこれを検証した。結果として、抗 IL-34 抗体の単独投与により、腫瘍内血管の密度が有意に増加し (図 10a)、PMN-MDSC の増加傾向が観察された (図 10b)。これらの結果は、IL-34 の阻害がパクリタキセル等の薬剤の送達性を向上させる可能性を示唆している。

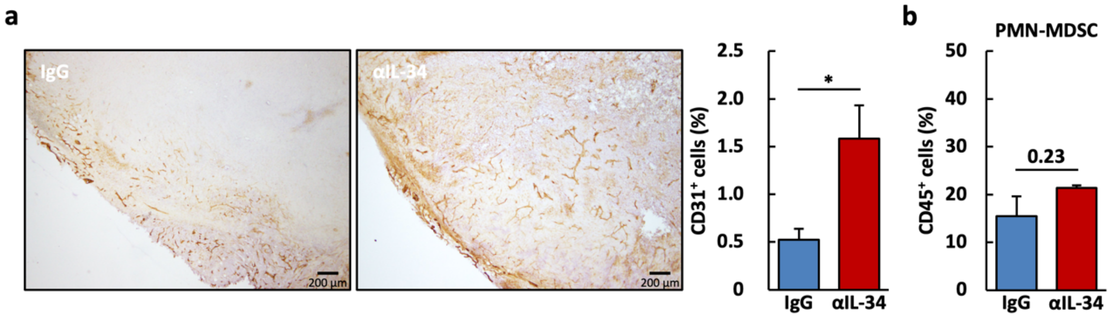

図 10. IL-34 阻害が腫瘍内血管および PMN-MDSC 浸潤に及ぼす影響

(a) Ctrl 4T1 細胞 (1×10^5 細胞) を接種し、抗 IL-34 抗体 (αIL-34, 200 µg/body) またはコントロール IgG を Day 5~14 の間毎日腹腔内投与した BALB/c マウスにおける Day 14 の腫瘍に浸潤している血管内皮細胞 ($CD31^+$ 細胞) の免疫組染色画像と明視野内の割合を示している。

(b) 図 10a に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している $CD45^+$ 細胞における PMN-MDSC の割合を示している。

(統計: Student's *t*-test, *P<0.05)

最後に、Ctrl 腫瘍を抗 IL-34 抗体とパクリタキセルの組み合わせで治療した。Ctrl 腫瘍はもともとパクリタキセルに感受性を示さなかったが、抗 IL-34 抗体との併用治療は劇的な腫瘍抑制をもたらした (図 11a)。また、想定通り、併用治療を施したマウスの腫瘍内では M-MDSC の減少と PMN-MDSC の増加が観察された (図 11b)。さらに、併用治療群では、パクリタキセル単独療法群に比べ T 細胞や TAM が増加していた (図 11c)。これらの結果は、IL-34-MDSC 軸を標的とすることにより、免疫抑制性 TME からの離脱とパクリタキセル耐性腫瘍の感作を誘導できることを実証している。

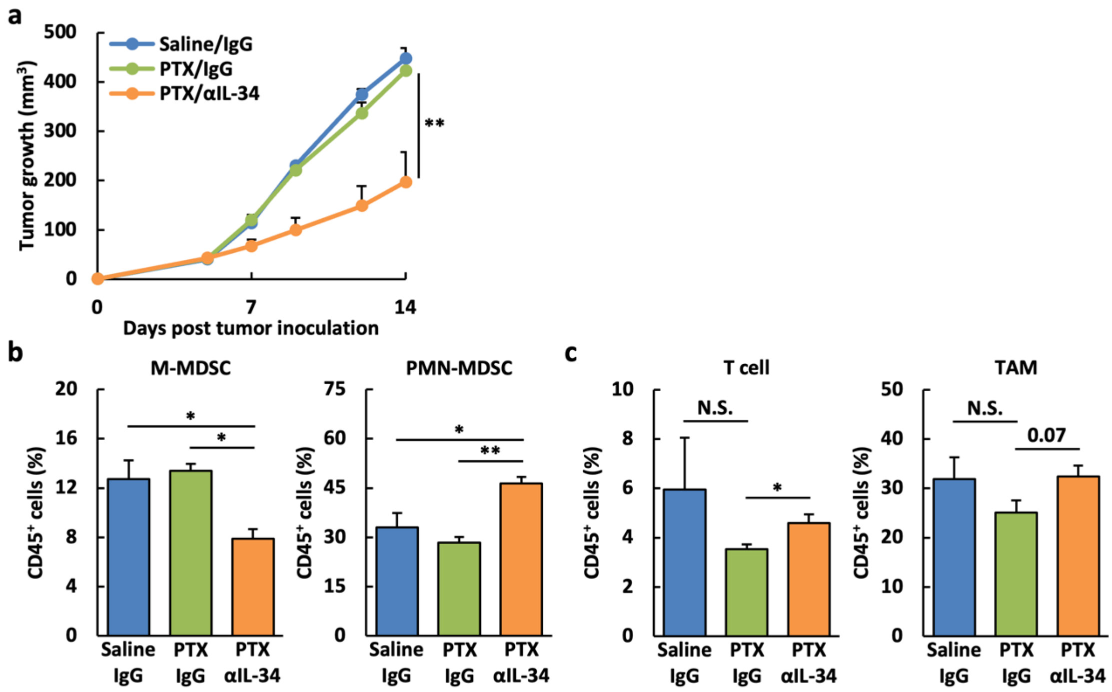

図 11. IL-34 阻害がパクリタキセルによる抗腫瘍効果に及ぼす影響

(a) Ctrl 4T1 細胞 ($1{\times}10^5$ 細胞) を接種した BALB/c マウスにおける皮下腫瘍成長曲線を示している。パクリタキセル (PTX, 1.3 mg/kg) または生理食塩水 (Saline) と抗 IL-34 抗体 (αIL-34, 200 μg/body) またはコントロール IgG を Day 5~14 の間毎日腹腔内投与した (統計検定は Day 14 時点)。

(b) 図 11a に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している $CD45^+$ 細胞における M-MDSC および PMN-MDSC の割合を示している。

(c) 図 11a に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している $CD45^+$ 細胞における T 細胞および TAM の割合を示している。

(統計: Tukey-Kramer test, *P<0.05, **P<0.01)

ヒト TNBC における IL-34-MDSC 軸の関与の検討

マウス実験で得られた知見をヒト TNBC の TME に外挿できるかを評価するために、TNBC 患者 35 名の腫瘍組織における IL-34 の発現および免疫細胞浸潤を解析したところ、IL-34 発現は M-MDSC 浸潤レベルと正の相関があり、さらに M-MDSC と Treg 浸潤レベルにも正の相関があった (図 12)。また、本研究で用いた TNBC 腫瘍組織サンプルでは、IL-34 発現と PMN-MDSC 浸潤レベルの間に関係はなかったものの、PMN-MDSC と血管内皮細胞の浸潤レベルに強い正の相関が得られた (図 12)。このように一部マウスの結果を裏付ける証拠となり得なかったものもあるが、患者の TME はマウスモデルに増して複雑であるため、大規模患者コホートでのさらなる解析研究が必要である。

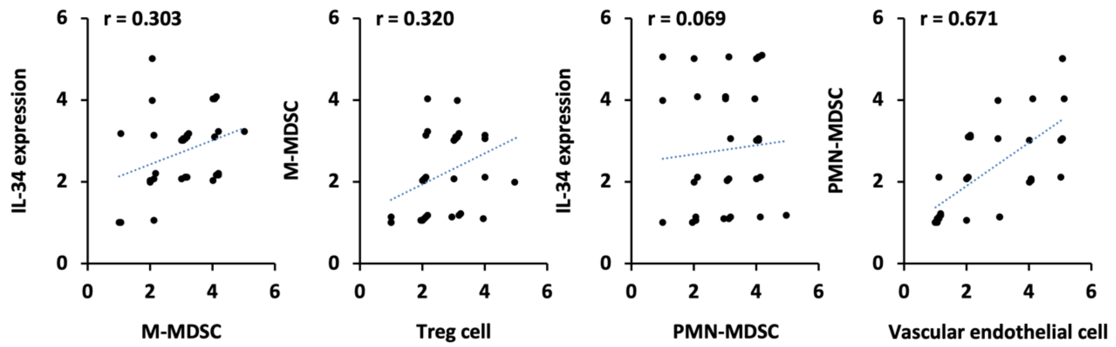

図 12. ヒト TNBC における IL-34-MDSC 軸の関与の可能性

ホルマリン固定パラフィン包埋 TNBC 組織における IL-34 発現と M-MDSC 浸潤、M-MDSC 浸潤と Treg 浸潤、IL-34 発現と PMN-MDSC 浸潤、PMN-MDSC 浸潤と血管内皮細胞浸潤レベルとのピアソン相関係数を示している。

考察

本研究では、乳がんの中でも TNBC においてのみ IL-34 が高発現しており、腫瘍由来の IL-34 が MDSC のバランス調節因子として機能する、すなわち骨髄から M-MDSC の分化を誘導し、PMN-MDSC への分化を抑制することで TNBC の予後不良に寄与していることを初めて明らかにした。これまで IL-34 は、MDSC の誘導因子ではなく、TAM の誘導を介した免疫抑制因子として報告されてきたため (Baghdadi 2018)、今回の発見は、IL-34 が TME の免疫制御にどのように影響しているかについて新たな知見を提供するものである。

ほとんどの TNBC では NF-κB 経路が亢進していることが報告されている (Nedeljković and Damjanović 2019)。また、IL-34 の発現は炎症のマスターレギュレーターである NF-κB によって上方制御される (Baghdadi et al. 2016)。これらの知見を鑑みると、TNBC において IL-34 が高発現していることは理にかなっていると考えられる。一方で、CSF1 および CSF1R については、どの乳がんサブタイプにおいても顕著な発現は認められず予後への関与もなかった。以上から、IL-34 と CSF1 は受容体を共有するだけで、細胞内にもたらすシグナルの質や強度には大きな差があることが予想される。事実、そのような報告もいくつか見受けられる (Baghdadi et al. 2018)。

MDSC の誘導は、腫瘍によって惹起される重要な免疫逃避機構である。腫瘍内の M-MDSC は PMN-MDSC よりも強力な免疫抑制因子であり (Gabrilovich et al. 2012)、実際、M-MDSC の浸潤レベルこそが抗腫瘍 T 細胞抑制と直接相関していることが示されている (Mandruzzato et al. 2009)。M-MDSC は、自身の免疫抑制能に加え、CCL22 等の産生を介して Treg を動員することで間接的にも免疫応答を減衰させる (Yang et al. 2020)。我々のデータは、IL-34 がこの経路を誘引することで免疫抑制性 TME を構築し、結果として腫瘍増殖を促進することを示唆している。一方、PMN-MDSC の減少は、TME における血管新生を抑制し、薬剤が腫瘍深部に到達できない環境が形成されていると考えられる。したがって、これら二種類の MDSC のバランスを制御する IL-34 は、TME を制御する重要な因子であると考えられる。

血管新生と腫瘍の悪性度の関係については多くの論文で議論されており (Yang et al. 2004; Finke et al. 2011; Vetsika et al. 2019)、無治療時、血管新生は腫瘍の成長を促進する事象であるが (Finke et al. 2011)、治療時、ドラッグデリバリーの点では有利に働く (Dass 2004)。実際、我々の結果においても一貫して、血管の多い腫瘍に対して化学療法が劇的な治療効果を示している。血管新生を誘導する最も一般的なメカニズムとしては、腫瘍や MDSC による血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の産生が知られている (Finke et al. 2011; Vetsika et al. 2019)。これらの背景をもとに我々の結果を考察すると、多くの血管が観察される IL-34 欠損腫瘍に多くの PMN-MDSC が浸潤していたこと

は注目すべきである。以前の研究で、腫瘍接種時に腫瘍細胞と PMN-MDSC を混合して移植すると、腫瘍細胞のみを接種したマウスよりも腫瘍内血管密度が高くなることが報告されている (Yang et al. 2004)。つまり、PMN-MDSC は腫瘍の血管形成を促進する能力が高く、その腫瘍内浸潤の増加によって IL-34 欠損腫瘍内の血管が飛躍的に増加した可能性が考えられる。また、このシナリオは、IL-34 産生腫瘍に抗 IL-34 抗体を投与すると腫瘍内の PMN-MDSC の浸潤レベルが増加し、さらには腫瘍内血管が増加したという観察結果によって裏付けられている。これらを総合すると、腫瘍における IL-34-MDSC 軸は、血管新生抑制に大きな役割を果たし、化学療法抵抗性の獲得に寄与していると考えられる。

TNBC は、薬剤治療に対する感受性が最も低い乳がんサブタイプとも言われており、様々なメカニズムを介して化学療法抵抗性を示すことが明らかになっている (Nedeljković and Damjanović 2019)。我々は、IL-34 が TNBC でのみ特徴的に発現し、化学療法抵抗性の獲得に重要な役割を担うことを実証している。本研究では、IL-34 が腫瘍内の MDSC を調節し、それが Treg の浸潤と血管新生に影響を与えるという新しいメカニズムを初めて明らかにした。この研究は、化学療法以外にも抗がん薬全般の効果を高めるために IL-34 を阻害することで TNBC の免疫系を操作するべき根拠を提供している可能性がある。実際、我々の別の研究では、IL-34 を発現する腫瘍を持つマウスに抗 IL-34 抗体を投与すると、免疫チェックポイント阻害剤治療の効果が向上している (Hama et al. 2020)。また、腫瘍組織における IL-34 の発現を評価することは TNBC 患者の予後を予測するのに役立つ可能性があり、本研究は診断や治療といった複数の側面において臨床的に重要であると考える。

第 2 章

がん細胞 ER 非依存的な抗エストロゲン療法の開発

緒言

エストロゲンは、すべての脊椎動物に存在する性ステロイドホルモンで、女性の生殖器官や乳房をはじめとする性的発達に関与している (Tohyama et al. 2017; Chen et al. 2019)。閉経前、エストロゲンは主に卵巣から分泌され、閉経後は卵巣ではなく脂肪細胞等から分泌されるようになる (Chen et al. 2019)。しかしその活性は低く、閉経後分泌されたエストロゲンの活性は閉経前の 1/10 程度までに低下する (Yaşar et al. 2017)。そのほか、エストロゲンは、更年期のホルモン補充療法や経口避妊薬としても使用されている (Gompel 2019)。エストロゲンの作用は、DNA に結合することで様々な遺伝子の発現を制御するエストロゲン受容体 (ER) によって媒介される (Lin et al. 2004)。ER は、卵巣・子宮・乳房などの特定の組織だけでなく、ほとんどの免疫細胞でも発現している (Cunningham and Gilkeson 2011)。エストロゲンは、他のステロイドホルモンと同様に、受動的に細胞内に入り ER に結合して活性化する (Lin et al. 2004)。これにより、ER は分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) やホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) などのシグナル伝達分子を活性化し、細胞の生存および増殖シグナルを開始する (Wang et al. 2021b)。その結果、ER 媒介シグナルの調節不全は、乳がんや卵巣・子宮内膜がんの発生につながる (Chuffa et al. 2017)。

がんの発生と進行におけるエストロゲンシグナルの重要性は、早発月経と遅発閉経が乳がん発症率の高さと関連していること、すなわちエストロゲンへの曝露期間の長さが乳がんの発症に影響するという報告によって強調されている (Hsieh et al. 1990)。しかし幸いにも、乳がん症例の約 75% が診断時に ER 陽性であり、これらは内分泌療法としての抗エストロゲン療法により腫瘍退縮が期待できる (Zattarin et al. 2020)。そのため、がん細胞における ER 陽性は予後良好と関連している (Morgan et al. 2011)。確かに、ER 陽性乳がん患者の治療に用いられているエストロゲン合成抑制や ER 阻害による抗エストロゲン療法は、抗がん剤治療において最も成功した標的治療法の一つと言える (Braun et al. 2013)。一方、トリプルネガティブ乳がん (TNBC) のような ER 陰性腫瘍は治療標的が無いことが特徴であり、より攻撃的で転移性のものが多い。実際、がん細胞における ER 発現がリンパ節転移と逆相関するという報告からも予後の悪さが伺える (Backes et al. 2016)。さらに、ほとんどの抗がん治療に対する反応が悪く、腫瘍微小環境 (TME) がもたらす障壁が大きく関係している (Deepak et al. 2020)。

様々な免疫系要素を含む TME は腫瘍の運命を支配しており、免疫細胞の浸潤が少ない、あるいは免疫抑制性免疫細胞の浸潤が多い非炎症性 TME は予後不良と相関する (Hangai et al. 2021)。一方、多くの抗腫瘍免疫細胞、特に、多くの細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 浸潤を伴う炎症性 TME は、良好な臨床成績と相関している (Kajihara et al. 2022)。これまでの研究により、エストロゲンが骨髄由来抑制細胞 (MDSC) や腫

瘍関連マクロファージ (TAM) を誘導することで免疫抑制環境を形成し、結果的に腫瘍の進行を促進することが報告されている (Márquez-Garbán et al. 2019; Chakraborty et al. 2021)。また、エストロゲンは、リンパ球のサイトカイン産生や活性化レベルを調節でき、試験管内で T 細胞を介した免疫反応を直接抑制することが実証されている (Salem 2004; Cunningham and Gilkeson 2011)。さらに、生体内では、妊娠中のエストロゲンレベルの増加が活性化リンパ球を減少させた (Nakamura et al. 1993; Haghmorad et al. 2014)。中でも、最も注目すべき事実は、男性における免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) の反応性が女性よりも高いことである (Conforti et al. 2018)。

以上の背景から、エストロゲンシグナルが TME の調節に関与していることは明らかであり、免疫細胞はエストロゲン誘導性免疫抑制の潜在的な標的であると考えられる。しかしながら、TME の免疫細胞におけるエストロゲンシグナルの重要性は十分に解明されておらず、本研究ではエストロゲンと抗腫瘍免疫の関係に焦点を当てた。

材料と方法

細胞培養

マウス TNBC 細胞株 4T1、マウス大腸がん細胞株 CT26、およびヒト ER 陽性乳がん細胞株 T47D は American Type Culture Collection (ATCC) から入手した。全細胞株は RPMI-1640 (富士フイルム和光純薬) 中で培養した。培養液には、10% FBS (Sigma-Aldrich)、1% Penicillin-Streptomycin (ナカライテスク)、および 1% MEM Nonessential Amino Acids (ナカライテスク) を添加し、全て CO_2 インキュベータ (37°C, 5% CO_2, 95% air) 内で培養した。実験に使用する全細胞株のマイコプラズマ汚染が無いことを、MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza) を用いて確認した。

細胞内タンパク質発現解析

4T1、CT26、および T47D 細胞株における ERα、$CD8^+$ T 細胞における STAT3 および STAT5 のタンパク質発現は、ウェスタンブロッティングにより確認した。各細胞株を RIPA バッファー (ナカライテスク) で溶解することによって細胞溶解液を取得し、遠心分離して上清サンプルを採取した。次に、各上清サンプルに 4×SDS サンプルバッファー (Sigma-Aldrich) を加え、100°Cで煮沸した。タンパク質は、10% アクリルアミドゲルを用いて 200 V で電気泳動分離し、25 V で PVDF 膜に転写した。膜を 3% スキムミルク を含む TBS-T 中でブロックした後、マウス抗ヒト/マウス ER 抗体 (1:500, Thermo Fisher Scientific)、ラビット抗マウス STAT3 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology)、またはラビット抗マウス STAT5 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) で穏やかに振盪しながら一晩反応させた。続いて、HRP 結合抗マウス IgG 抗体 (1:1000, BioLegend) または HRP 結合抗ラビット IgG 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) で膜をインキュベートした。最後に、Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク質を可視化した。内在性コントロール (HPRT または ACTB) には、抗 HPRT 抗体 (1:1000, Proteintech) または抗 β-actin 抗体 (1:3000, Cell Signaling Technology) を用いて検出した。

がん細胞の増殖アッセイ

4T1、CT26、および T47D 細胞株の細胞増殖は、MTT Cell Count Kit (ナカライテスク) を用いた MTT アッセイにより評価した。まず、96 ウェルプレートに 3×10^3 細胞を播種し、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶かした様々な濃度 (1 nM-1 μM) の 17β-Estradiol (E2, ナカライテスク) 存在下で 3 日間細胞増殖を追跡した。試験波長

570 nm、参照波長 650 nm の吸光度を MULTISKAN FC (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

マウス腫瘍移植実験

6~7 週齢のメス BALB/c (wild type および nude) マウスを日本 SLC から購入した。これらのマウスは、北海道大学動物施設において 12 時間の明暗サイクルおよび特定の病原体を含まない条件下で飼育され、性成熟した 8 週齢で実験に使用した。マウスへのがん細胞移植実験用の細胞を準備するために、培養細胞を回収後、1×10^5 細胞を 1.5 ml チューブに分注し、500×g で 5 分間遠心した。上清を除去後、形成されたペレットを 10 µl のマトリゲル (Corning) で懸濁し同系マウスの右脇腹に皮下接種した。フルベストラント (1.25 mg/3 days, 東京化成工業)、E2 (10 µg/day, ナカライテスク)、タモキシフェン (1 mg/day, ナカライテスク)、アナストロゾール (1 mg/day, AstraZeneca)、抗 IL-2 抗体 (200 µg/4 days, BioLegend)、または抗 CTLA-4 抗体 (250 µg/3 days, BioXCell) は腫瘍径が 5 mm に達した時点で腹腔内投与を開始した。抗 CD8 抗体 (100 µg/injection, BioLegend) は、腫瘍接種の前日と 6 日前に腹腔内投与した。がん細胞皮下移植時および薬剤腹腔内投与時にはマイショット® (ニプロ) を用いた。腫瘍の大きさは、週に 3 回ノギスで測定した。がん細胞移植から 14 日後に腫瘍を切除し以下の実験にまわした。本研究内の全ての動物実験は、北海道大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号: 19-0094)。

マウス卵巣切除実験

がん細胞移植の 1 週間前に、メス BALB/c マウスに対して卵巣切除 (OVX) または偽手術 (Sham) を行った。まず、マウスを麻酔した後、左右両脇腹を電子カミソリで剃毛し、皮膚をアルコールで滅菌した。そして、皮膚と筋壁を切開し、卵巣を体外に取り出してから摘出した。偽手術の場合は、卵巣を取り出した後、内部に戻した。切除後、筋壁と皮膚をそれぞれ縫合し、麻酔から回復させた。

フローサイトメトリーによる腫瘍浸潤免疫細胞の解析

切除した腫瘍から BD HorizonTM Dri Tumor and Tissue Dissociation Reagent (BD Biosciences) を用いて腫瘍浸潤免疫細胞を分取した。細胞外染色では、細胞 (2×10^5 細胞 / ウェル) を FcR Blocking Reagent (TONBO biosciences) でブロックし、CD45/CD3ε/CD4/CD8α/CD11b/CD69/CD86/CD206/F4/80/Ly6C/Ly6G 分子を抗体 (BioLegend) で染色した。データは FACS Celesta フローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて取得し、FlowJo ソフトウェアで解析した。ゲーティング戦略としては、まず、前方散乱と側方散乱に基づいて生細胞を選択し、その後ダブレットを

除去した。T 細胞については、$CD45^+CD3^+$ 細胞を展開した後、$CD4^+CD8^-$ 細胞および $CD8^+CD4^-$ 細胞を選択し、最後に $CD8^+$ 細胞中の $CD69^+$ 細胞を選択した。マクロファージについては、$CD45^+CD11b^+$ 細胞を展開した後、$CD86^+$ 細胞および $CD206^+$ 細胞を選択した。MDSC については、$CD45^+$ 細胞を展開した後、$CD11b^+Ly6C^{lo}Ly6G^+$ 細胞を選択した。

腫瘍組織における遺伝子発現レベルの解析

TriPure Isolation Reagent (Roche) を用いて切除した腫瘍から RNA を抽出し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (東洋紡) を用いて mRNA を cDNA に逆転写した。その後、下に示すプライマーと KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x) ABI Prism® (Kapa Biosystems) を用いて cDNA に対して StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) で定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) を実施した。この実験では *Gapdh* をハウスキーピング遺伝子として使用した。

Species	**Gene**	**Forward (5'-3')**	**Reverse (5'-3')**
	Gapdh	TCAAATGGGGTGAGGCCGGT	TTGCTGACAATCTTGAGTGA
	Gzmb	ACTCTTGACGCTGGGACCTA	AGTGGGGCTTGACTTCATGT
Mouse	*Prf1*	TCATCATCCCAGCCGTAGT	ATTCATGCCAGTGTGAGTGC
	Ifng	AAGACAATCAGGCCATCAGCA	AGCGACTCCTTTTCCGCTTC
	Il2	AGATGAACTTGGACCTCTGCG	AAAGTCCACCACAGTTGCTG

CTL 刺激アッセイ

メス BALB/c マウスから脾臓細胞を単離し、ACK 溶解バッファー (富士フイルム和光純薬) で赤血球を破壊した。マウス CTL (＝$CD8^+$ T 細胞) は、マウス CD8α MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて磁気活性化細胞選別法 (MACS) にて脾臓細胞から選別した。ヒト CTL は、ヒト CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて MACS にて購入した末梢血単核球 (Sigma-Aldrich) から選別した。CTL を 96 ウェルプレートに 2×10^5 細胞播種し、抗マウス CD3ε 抗体 (1 μg/ウェル) および抗マウス CD28 抗

体 (2 μg/ウェル) (BioLegend) と、E2 (1 μM) およびフルベストラント (10 μM) を加えて刺激した。E2 もしくはフルベストラントを含まないウェルには、等量の DMSO を添加した。培養した CTL は 4 日目に回収し、フローサイトメトリー分析、遺伝子発現解析、または遺伝子オントロジー解析のためのサンプルとして使用した。

CTL 培養液清中における IL-2 の定量

DMSO またはフルベストラント (10 μM) と E2 (10 nM-1 μM) で培養した CTL からの IL-2 産生は、LEGEND MAX Mouse IL-2 ELISA Kits with Pre-Coated Plates (BioLegend) を用いた酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) により測定した。細胞上清は CTL 刺激アッセイ開始から 4 日後に 0.44 μm フィルターを通して回収した。

遺伝子オントロジー解析

DMSO または E2 または E2+フルベストラントで処理した CTL から抽出した RNA を次世代シーケンシングにより解析した。次世代シーケンシングは、かずさ DNA 研究所で実施し、得られた解析結果の遺伝子リストに基づき、各処理群における差次的発現遺伝子を ShinyGO 0.76.2 bioinformatics graphical web application を用いて遺伝子オントロジー解析を実施した。PANTHER Pathways データセットから得られた T 細胞活性化遺伝子を参考とし、遺伝子濃縮スコアの高い上位 10 項目 (生物学的プロセス) を表示した。図 12a では、上の図が E2 処理によって抑制された経路、下の図がフルベストラント処理によって活性化した経路を表している。

統計解析

統計解析は JMP® 16 (SAS Institute) を用いて行った。二群間の有意性の判定には Student's *t*-test が使用された。三群間以上の有意性の判定には Tukey-Kramer test が使用された。カプランマイヤー曲線の比較には Log-rank test を使用した。本研究における全ての統計解析において、P 値が 5% を下回る場合に統計的に有意差ありと判断した。

結果

ER 陰性がんの TME におけるエストロゲン作用の検討

エストロゲンの TME におけるがん細胞ではなく免疫細胞に対する役割を明らかにするために、エストロゲン感受性を持たないマウス ER 陰性腫瘍モデルを用いて実験した。まず、マウス TNBC 細胞株 4T1 およびマウス大腸がん細胞株 CT26 における ER の発現を確認し、両細胞とも ER 陰性であることが判明した (図 1a)。次にこれら細胞株のエストロゲン感受性を試験管内で調査した。脊椎動物の体内には、エストロン (E1)、エストラジオール (E2)、エストリオール (E3) の三種類のエストロゲンがほぼ同レベルで存在しており、中でも E2 が最も強力なエストロゲン活性を持つ (Grumbach and Auchus 1999)。そこで、4T1 および CT26 の培養液中に E2 を添加したところ、両細胞ともエストロゲンに反応しないことを確認した (図 1b)。本実験では、ヒト ER 陽性乳がん細胞株 T47D をポジティブコントロールとして使用し、この細胞株は ER 発現およびエストロゲン反応性を示した (図 1a, b)。

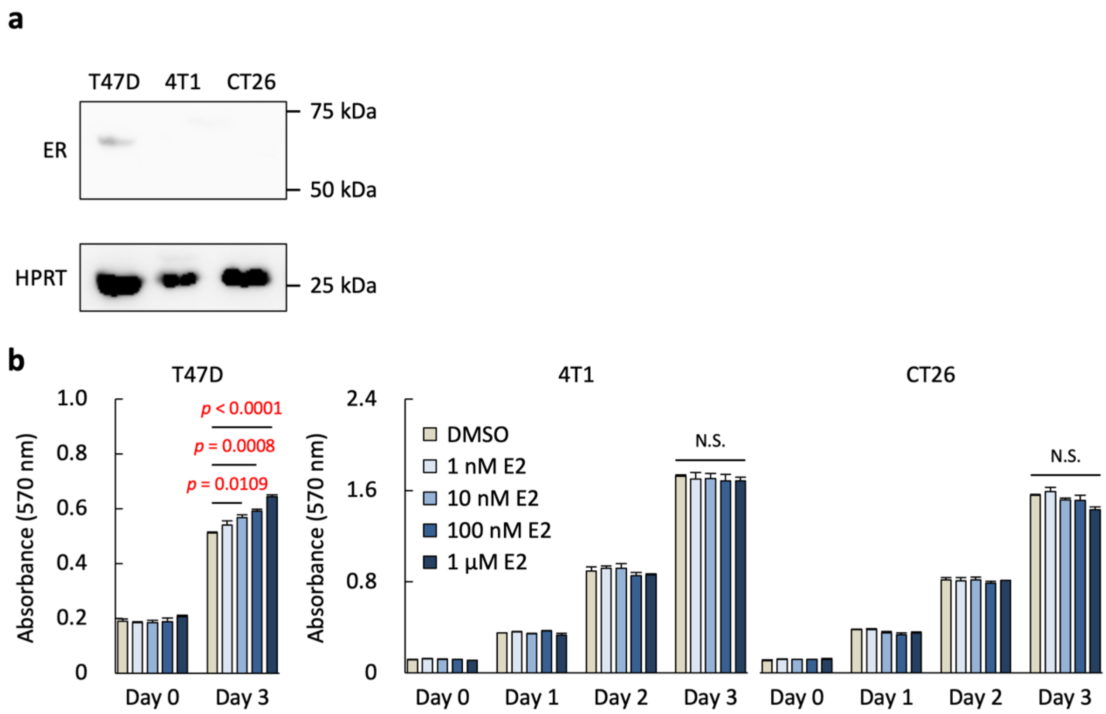

図 1. がん細胞株における ER 発現およびエストロゲン感受性

(a) 4T1 および CT26 細胞における ER のタンパク質発現を示している。T47D 細胞はポジティブコントロールとして使用した。

(b) 様々な濃度 (1 nM-1 μM) の E2 を添加し三日間培養した 4T1 および CT26 細胞の増殖を示している。T47D 細胞はポジティブコントロールとして使用した。(統計: Tukey-Kramer test)

次に、エストロゲンが生体内において ER 陰性がんの腫瘍増殖や TME に与える影響を調べるために、メスの BALB/c マウスに対して卵巣切除術を行い、エストロゲン欠損マウス (OVX マウス) を作製した。また、コントロールとして偽手術を施した Sham マウスを用意した。OVX または Sham マウスに 4T1 もしくは CT26 細胞を移植したところ、両腫瘍ともに OVX マウスにおける腫瘍増大が Sham マウスと比較して大幅には抑制された (図 2a)。一方、OVX マウスにエストロゲン (E2) を連日投与すると、卵巣切除による腫瘍退縮効果が失われた (図 2a)。さらに、これらの結果を裏付けるように、4T1 を移植した OVX マウスは Sham マウスと比較して生存期間が延長した (図 2b)。逆に、OVX マウスへのエストロゲン投与は、卵巣切除による生存利益を無効化した (図 2b)。最も注目すべきは、BALB/c マウス (=免疫正常マウス) で観察されていた卵巣切除による腫瘍縮小効果が、全身の T 細胞を欠損している Nude マウス (=免疫不全マウス) では消失したことである (図 2c)。以上より、エストロゲン欠損による腫瘍退縮には T 細胞免疫が必要であることがわかった。これらのデータは全体として、エストロゲンが ER 陰性がんにおいて、免疫系を媒介することで腫瘍の進行と予後不良に寄与することを示している。

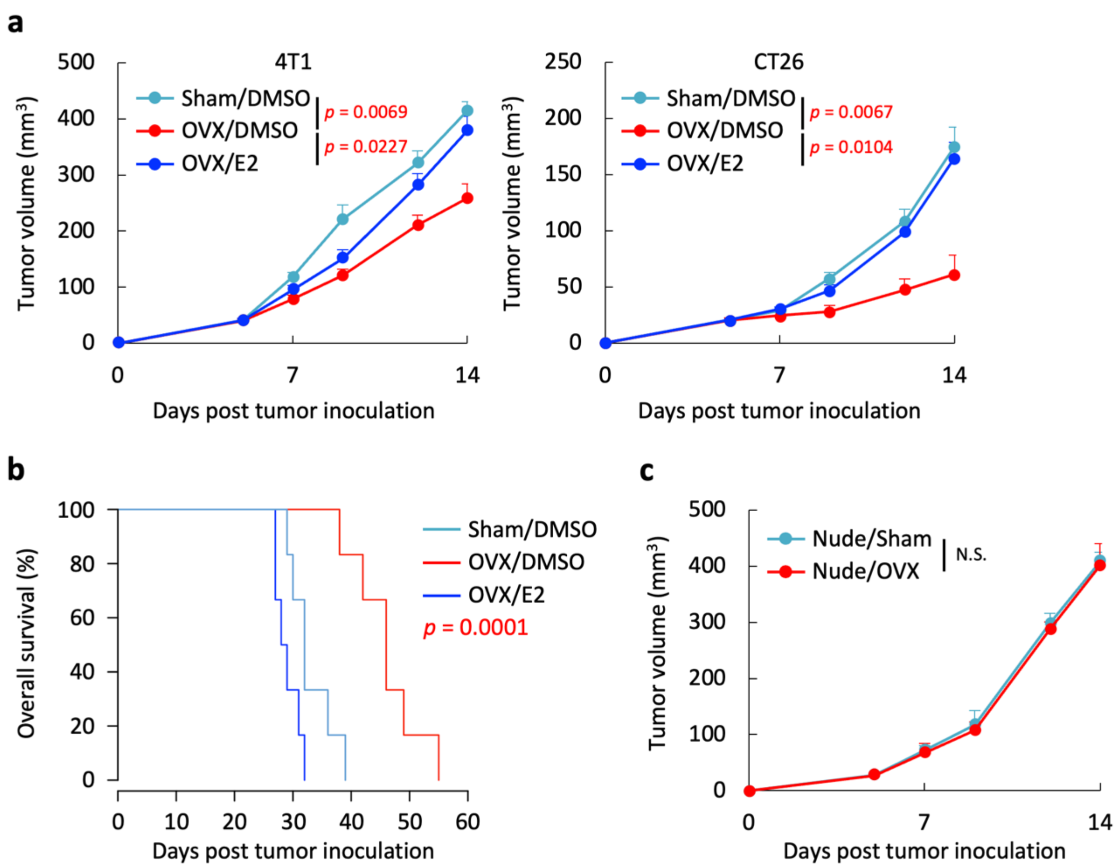

図 2. エストロゲンが ER 陰性がんの増殖に及ぼす影響

(a) 4T1 または CT26 細胞 (1×10^5 細胞) を接種した BALB/c の OVX または Sham マウスにおける皮下腫瘍成長曲線を示している。E2 (10 μg/body) またはジメチルスルホキシド (DMSO) を Day 5~14 の間毎日静脈内投与した (統計検定は Day 14 時点)。

(b) 4T1 または CT26 細胞 (1×10^5 細胞) を接種した BALB/c の OVX または Sham マウスにおける全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。E2 (10 μg/body) または DMSO を Day 5~14 の間毎日静脈内投与した。

(c) 4T1 細胞 (1×10^5 細胞) を接種した BALB/c *nu*/*nu* (Nude) の OVX または Sham マウスにおける皮下腫瘍成長曲線を示している (統計検定は Day 14 時点)。

(統計: (a) Tukey-Kramer test, (b) Log-rank test, (c) Student's *t*-test)

抗エストロゲン薬が ER 陰性がんの腫瘍増殖に及ぼす影響の検討

エストロゲンが腫瘍細胞の ER 発現とは無関係に腫瘍増殖を促進するという見解を強化するために、抗エストロゲン薬が ER 陰性がんに対して抗腫瘍効果をもたらすかを検証した。結果として、ER アンタゴニストとして臨床で用いられているフルベストラントは、4T1 ならびに CT26 腫瘍の成長を顕著に抑制した (図 3)。さらに、タモキシフェンやアナストロゾールといった他の抗エストロゲン薬を用いた場合にも、同様の結果が観察された (図 4)。

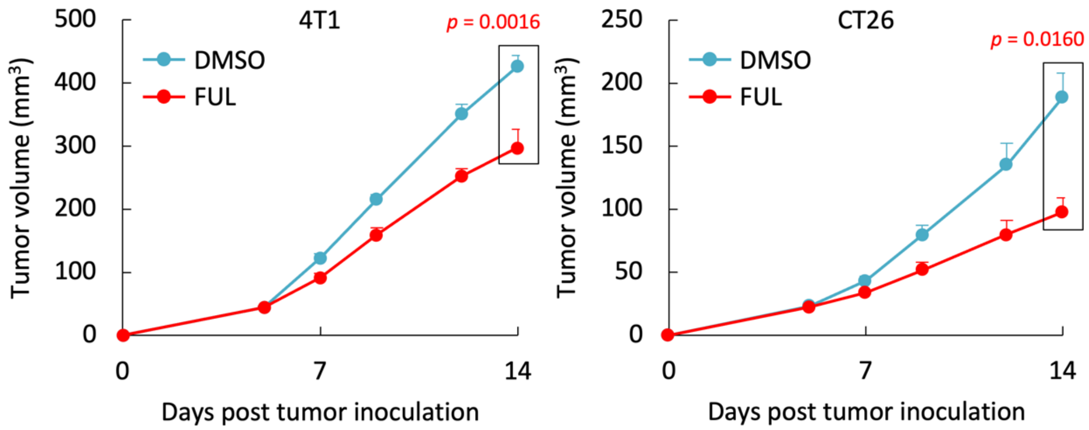

図 3. フルベストラントが ER 陰性がんの増殖に及ぼす影響

4T1 または CT26 細胞 (1×10^5 細胞) を接種した BALB/c マウスにおける皮下腫瘍成長曲線を示している。フルベストラント (FUL, 1.25 mg/body) または DMSO を Day 5~14 の間 3 日に 1 回皮下投与した。

(統計: Student's *t*-test)

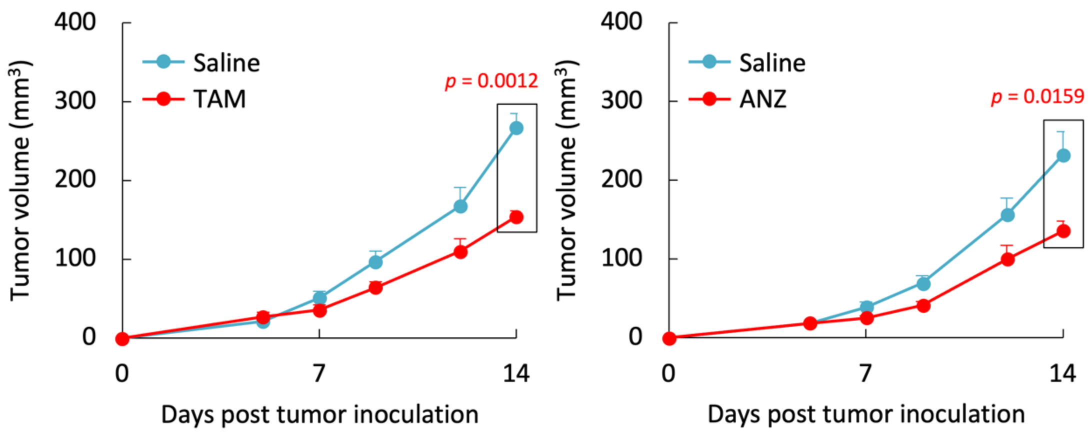

図 4. 抗エストロゲン薬が ER 陰性がんの増殖に及ぼす影響

4T1 細胞 (1×10^5 細胞) を接種した BALB/c マウスにおける皮下腫瘍成長曲線を示している。タモキシフェン (TAM, 1 mg/body)、アナストロゾール (ANZ, 1 mg/body) または生理食塩水を Day 5~14 の間毎日腹腔内投与した。
(統計: Student's *t*-test)

抗エストロゲン薬が ER 陰性がんの TME に及ぼす影響の検討

抗エストロゲン薬がどのように腫瘍退縮を導くのかを解明するために、フローサイトメトリーを用いて腫瘍浸潤免疫細胞を分析したところ、フルベストラントで治療した 4T1 腫瘍内では、MDSC の減少、マクロファージと T 細胞の増加が観察された (図 5a)。マクロファージの分画をより詳細に解析してみると、フルベストラント投与群では、免疫応答を促進する M1 マクロファージが増加し、免疫を抑制する M2 マクロファージが減少していた (図 5b)。T 細胞分画では、フルベストラント治療により $CD8^+$ T 細胞の増加、つまり CTL の増加が見られた (図 5c)。また、注目すべきことに、フルベストラント治療群の腫瘍内ではグランザイム B・パーフォリン 1・インターフェロン γ といったエフェクター CTL から産生される因子が高発現していた (図 5d)。

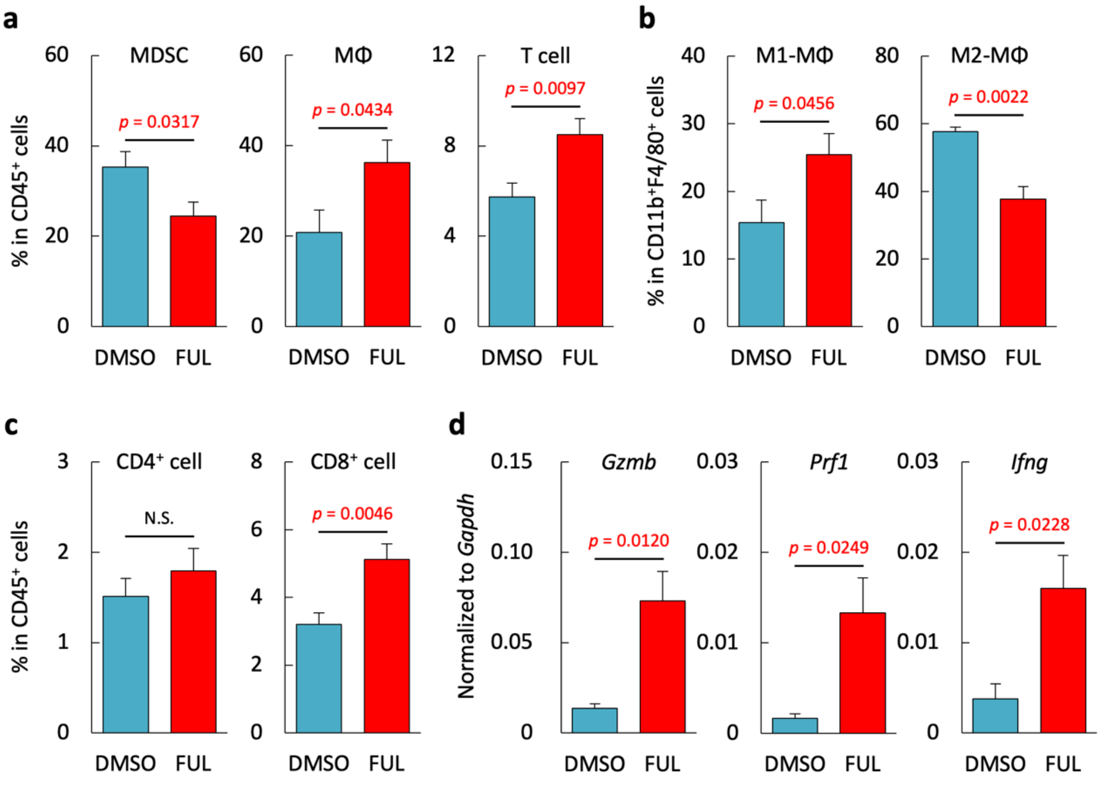

図 5. フルベストラントが 4T1 の TME に及ぼす影響

(a) 図 3 左に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している $CD45^+$ 細胞における MDSC ($CD11b^+Ly6C^{lo}Ly6G^+$ 細胞)、マクロファージ ($CD11b^+F4/80^+$ 細胞)、および T 細胞 ($CD3^+$ 細胞) の割合を示している。

(b) 図 3 左に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している $CD11b^+F4/80^+$ 細胞における M1 マクロファージ ($CD69^+$ 細胞) および M2 マクロファージ ($CD206^+$ 細胞) の割合を示している。

(c) 図 3 左に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している $CD45^+$ 細胞における $CD4^+$ T 細胞 ($CD3^+CD4^+$ 細胞) および $CD8^+$ T 細胞 ($CD3^+CD8^+$ 細胞) の割合を示している。

(d) 図 3 左に記載した Day 14 の腫瘍の TME における *Gzmb*、*Prf1*、および *Ifng* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。
(統計: Student's *t*-test)

フルベストラントを投与したマウスの CT26 腫瘍内に対しても同様の解析をしたところ、M1 マクロファージ、M2 マクロファージ、および MDSC の浸潤レベルに変化はなく (図 6a)、腫瘍浸潤 T 細胞、特に $CD8^+$ T 細胞のみの増加が確認された (図 6a, b)。すなわち、フルベストラントは、ER 陰性がんにおいて、少なくとも CTL を増加させることが明らかになった。

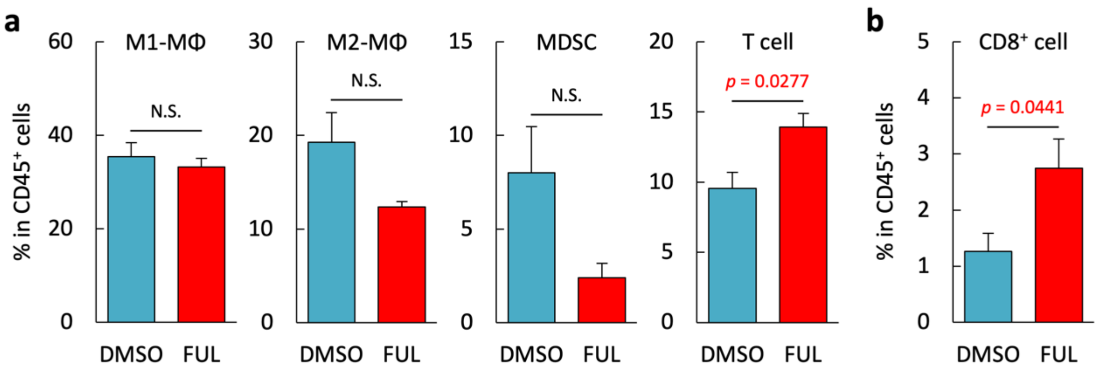

図 6. フルベストラントが CT26 の TME に及ぼす影響

(a) 図 3 右に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している $CD45^+$ 細胞における M1 マクロファージ ($CD11b^+F4/80^+CD69^+$ 細胞)、M2 マクロファージ ($CD11b^+F4/80^+CD206^+$ 細胞)、MDSC ($CD11b^+Ly6C^{lo}Ly6G^+$ 細胞)、および T 細胞 ($CD3^+$ 細胞) の割合を示している。

(b) 図 3 右に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している $CD45^+$ 細胞における $CD8^+$ T 細胞 ($CD3^+CD8^+$ 細胞) の割合を示している。
(統計: Student's *t*-test)

さらに、タモキシフェンやアナストロゾールを投与したマウスの腫瘍浸潤免疫細胞も調べたところ、コントロール群と比較して治療群において $CD8^+$ T 細胞のみが一貫して増加していた (図 7a, b)。ここまでの観察結果をまとめると、エストロゲンが ER 陰性がんであっても腫瘍の成長を促進し、その阻害剤は、腫瘍内のエフェクター CTL を増加させることによって腫瘍の進行を抑制できることを示唆している。

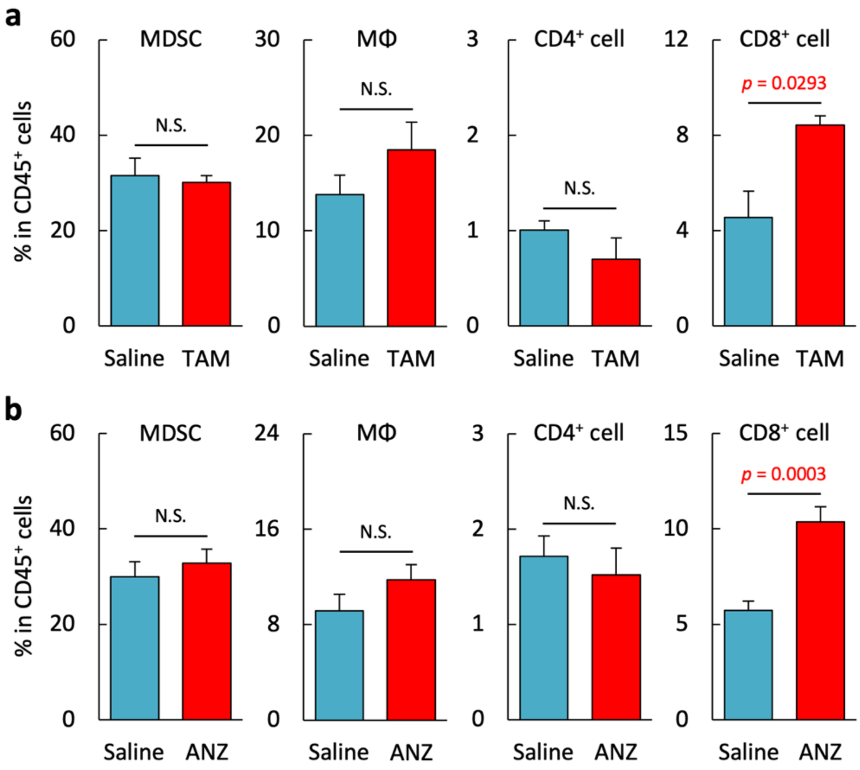

図 7. 抗エストロゲン薬が ER 陰性がんの TME に及ぼす影響

(a) 図 4 左に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している $CD45^+$ 細胞における MDSC ($CD11b^+Ly6C^{lo}Ly6G^+$ 細胞)、マクロファージ ($CD11b^+F4/80^+$ 細胞)、$CD4^+$ T 細胞 ($CD3^+CD4^+$ 細胞)、および $CD8^+$ T 細胞 ($CD3^+CD8^+$ 細胞) の割合を示している。

(b) 図 4 右に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している $CD45^+$ 細胞における MDSC ($CD11b^+Ly6C^{lo}Ly6G^+$ 細胞)、マクロファージ ($CD11b^+F4/80^+$ 細胞)、$CD4^+$ T 細胞 ($CD3^+CD4^+$ 細胞)、および $CD8^+$ T 細胞 ($CD3^+CD8^+$ 細胞) の割合を示している。(統計: Student's *t*-test)

エストロゲンが腫瘍浸潤 CTL に及ぼす影響の検討

ここでは、抗エストロゲン薬が ER 陰性腫瘍において CTL をどのように拡大させるかについて調査した。この目的に取り組む前に、まず、抗エストロゲン薬によってもたらされる腫瘍退縮における $CD8^{+}$T 細胞の重要性を評価した。抗 CD8 抗体の投与により全身の $CD8^{+}$T 細胞を除去したマウスに、4T1 を移植し、そのマウスにフルベストラント治療を施したところ、腫瘍の増大は全く抑制されなかった (図 8a, b)。これにより、抗エストロゲン療法による ER 陰性がんの腫瘍退縮における CTL 依存性が示された。

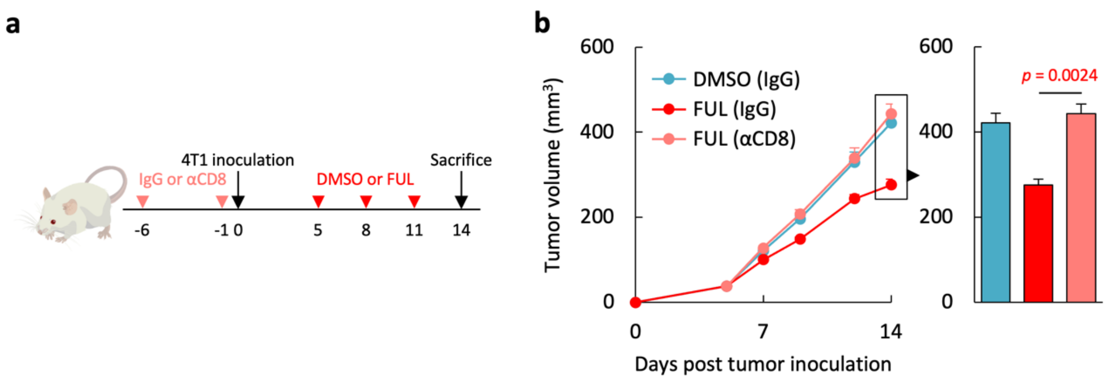

図 8. ER 陰性がんに対するフルベストラント治療効果における CTL の寄与

(a) 抗体およびフルベストラントの投与スケジュールを示している。

(b) 抗 CD8 抗体 (100 μg/body) を投与したのち 4T1 細胞 (1×10^{5} 細胞) を接種した BALB/c マウスにおける皮下腫瘍成長曲線および Day 14 時点での腫瘍体積を示している。フルベストラント (FUL, 1.25 mg/body) または DMSO を Day 5~14 の間 3 日に 1 回皮下投与した。

(統計: Tukey-Kramer test)

次に、エストロゲンの CD8$^+$T 細胞に対する影響を評価するために、ヒト末梢血およびマウス脾臓から CD8$^+$T 細胞を単離し、それらをエストロゲンに暴露した。興味深いことに、エストロゲンはヒトとマウス両方で CD8$^+$ および CD8$^+$CD69$^+$T 細胞の増殖を直接抑制し、フルベストラントはエストロゲンによる CD8$^+$T 細胞の抑制を回復させた (図 9a, b)。これらの結果は、エストロゲンが CTL の増殖と活性化を直接的に抑制しており、抗エストロゲン薬がその抑制を解除できることを示している。

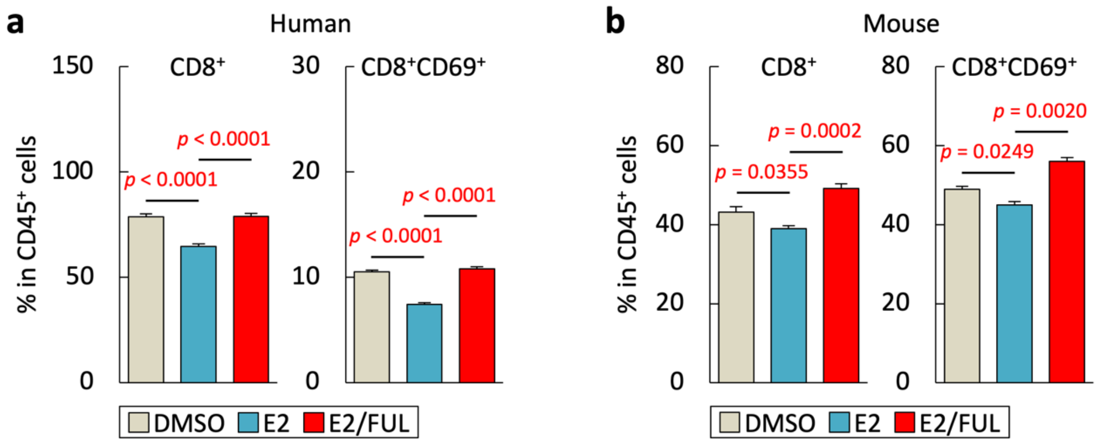

図 9. エストロゲンが CTL の増殖および活性化に及ぼす影響

(a) ヒト末梢血から CD8$^+$ T 細胞を単離し、E2 (1 µM) または DMSO とフルベストラント (FUL, 10 µM) で 4 日間培養した。Day 4 の CD45$^+$ 細胞における CD8$^+$ および CD8$^+$CD69$^+$T 細胞の割合を示している。

(b) マウス脾臓から CD8$^+$ T 細胞を単離し、E2 (1 µM) または DMSO とフルベストラント (FUL, 10 µM) で 4 日間培養した。Day 4 の CD45$^+$ 細胞における CD8$^+$ および CD8$^+$CD69$^+$T 細胞の割合を示している。

(統計: Tukey-Kramer test)

ここまでにエストロゲンによる CTL の直接的な抑制が明らかになったので、次にその詳細なメカニズムについて検討した。IL-2 は CTL を含む T 細胞の分化や増殖に影響し、T 細胞全般の運命を決定する重要な因子である (Ross and Cantrell 2018)。特に、CTL によって産生される IL-2 は、オートクライン経路を通じて最適なクローン拡大を可能にする (Feau et al. 2011)。また、高レベルの IL-2 は、エフェクター CTL の発達に有利に働くことが実証されている (Dai et al. 2000)。以上の背景から、エストロゲンが腫瘍浸潤 CTL における IL-2 シグナルの調節因子として機能しているという仮説を立てた。実際、エストロゲンを $CD8^+$ T 細胞に添加すると、IL-2 mRNA レベルが劇的に抑制され (図 10a)、エストロゲン濃度依存的に IL-2 タンパク質の産生が減少した (図 10b)。一方、フルベストラントは、エストロゲンによる $CD8^+$ T 細胞からの IL-2 産生抑制を回復させた (図 10a, b)。

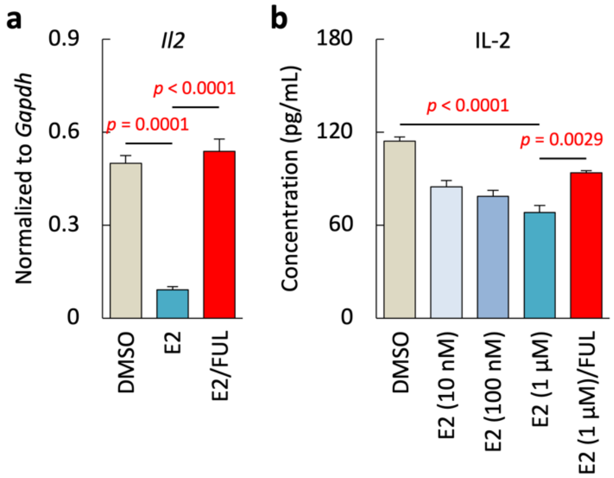

図 10. エストロゲンが CTL 由来の IL-2 産生に及ぼす影響

(a) マウス脾臓から $CD8^+$ T 細胞を単離し、E2 (1 μM) または DMSO とフルベストラント (FUL, 10 μM) で 4 日間培養した。Day 4 の $CD8^+$ T 細胞における *Il2* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。

(b) マウス脾臓から $CD8^+$ T 細胞を単離し、様々な濃度の E2 (10 nM-1 μM) または DMSO とフルベストラント (FUL, 10 μM) で 4 日間培養した。Day 4 の $CD8^+$ T 細胞の培養上清中 IL-2 濃度を示している。

(統計: Tukey-Kramer test)

最も注目すべきは、4T1 腫瘍に対するフルベストラントの抗腫瘍効果が IL-2 阻害によって消失したことである (図 11a)。あわせて各治療群の腫瘍浸潤 $CD8^+$ T 細胞を確認したところ、フルベストラントによる $CD8^+$ T 細胞の増殖と活性化が IL-2 阻害により打ち消されていることが判明した (図 11b)。

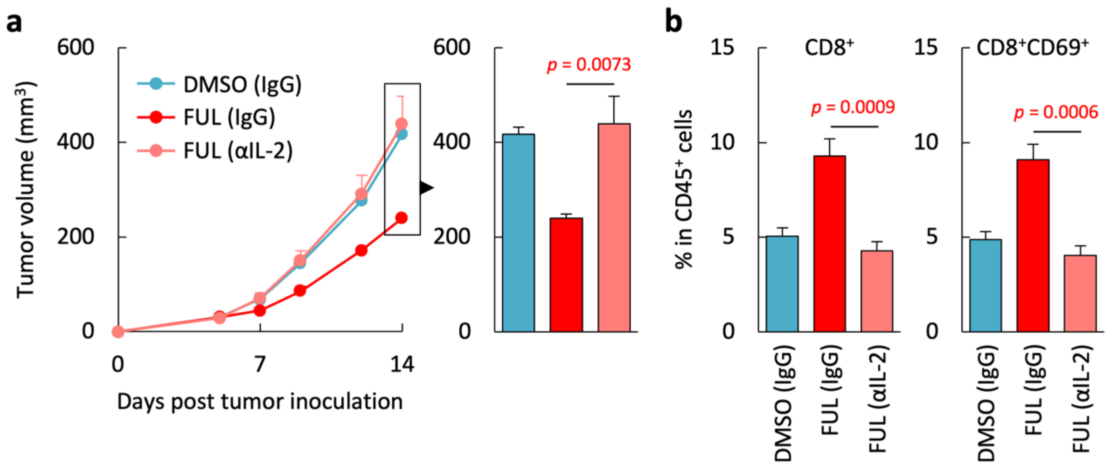

図 11. ER 陰性がんに対するフルベストラント治療効果における IL-2 の寄与

(a) 4T1 細胞 (1×10^5 細胞) を接種した BALB/c マウスにおける皮下腫瘍成長曲線および Day 14 時点での腫瘍体積を示している。フルベストラント (FUL, 1.25 mg/body) または DMSO を Day 5~14 の間 3 日に 1 回、抗 IL-2 抗体 (200 μg/body) またはコントロール IgG を Day 5~14 の間 4 日に 1 回皮下投与した。

(b) 図 11a に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している $CD45^+$ 細胞における $CD8^+$ および $CD8^+CD69^+$ T 細胞の割合を示している。

(統計: Tukey-Kramer test)

次に、IL-2 産生レベルを調節する CTL 内の制御因子を同定するために、エストロゲンまたはエストロゲンとフルベストラントで処理した各 CTL を次世代シーケンシング解析した。それにより得られた遺伝子発現リストを用いて遺伝子オントロジー解析を行ったところ、エストロゲンは CTL の JAK-STAT 経路を抑制しており、フルベストラントがその抑制を解除することが明らかになった (図 12a)。JAK-STAT 経路は、IL-2 を介した T 細胞の活性化と増殖に密接に関係しており、特に STAT3 および STAT5 が T 細胞機能におけるマスターレギュレーターとして報告されている (Johnston et al. 1995)。そこで、各処理を施した CTL における STAT3/5 の発現量を調べたところ、エストロゲンによる STAT3/5 の抑制とフルベストラントによるそれらの回復効果が認められた (図 12b)。

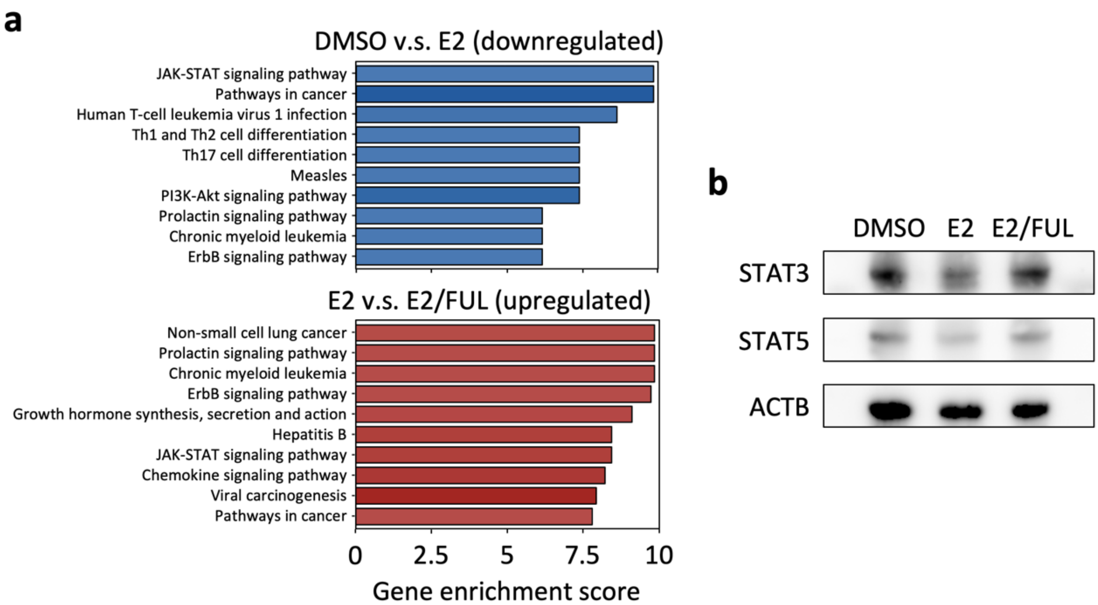

図 12. エストロゲンが CTL の JAK-STAT 経路に及ぼす影響

(a) マウス脾臓から $CD8^+$ T 細胞を単離し、E2 (1 μM) または DMSO とフルベストラント (FUL, 10 μM) で 4 日間培養した。Day 4 の $CD8^+$ T 細胞を次世代シーケンシング解析にかけ、その遺伝子発現データをもとにした遺伝子オントロジー解析結果を示している。E2 により下方制御された経路と FUL により上方制御された経路をそれぞれ示している。

(b) マウス脾臓から $CD8^+$ T 細胞を単離し、E2 (1 μM) または DMSO とフルベストラント (FUL, 10 μM) で 4 日間培養した。Day 4 の $CD8^+$ T 細胞における STAT3 および STAT5 のタンパク質発現を示している。ACTB 発現は内在性コントロールとして使用した。

これらのデータを総合すると、エストロゲンは、CTL の STAT3/5 を介した IL-2 産生を転写レベルで抑制することで CTL の自己活性化能を排除しており、抗エストロゲン療法がその抑制を解除し CTL の増殖・活性化を誘導することで、ER 陰性がんに対して抗腫瘍効果を発揮していると考えられる。

抗エストロゲン薬が ICI の治療効果に及ぼす影響の検討

腫瘍の進行とがん治療の効果は、TME における免疫細胞の構成と存在量に強く影響される (Kajihara et al. 2022)。また、大腸がん・乳がん・腎がん・皮膚がん・肺がん患者における数多くの研究により、がん治療効果や生存の予測因子としての腫瘍浸潤リンパ球の重要性が示されている (Balkwill et al. 2012)。特に、がん細胞に対する最終エフェクター細胞である CTL の役割は、いかなるがんにおいても極めて重要である。実際、メラノーマや尿路上皮がんでは、CTL が ICI に対する反応性と関連していることが報告されている (Liu et al. 2021)。また、胃がんでは、CTL の浸潤レベルが奏効率の上昇と関連していた (Liu et al. 2021)。以上のような背景をもとに、TME 内の CTL に対する抗エストロゲン薬の作用を考慮すると、抗エストロゲン薬が ICI の有効性を向上させることができる可能性があるのではないかと推測し、これについて検討した。

結果は注目すべきことに、抗 CTLA-4 抗体に対して反応性を全く持たない ER 陰性がん (4T1 および CT26) は、抗 CTLA-4 抗体とフルベストラント投与の併用により劇的な腫瘍退縮を示した (図 13)。この結果と一致して、タモキシフェンまたはアナストロゾールと抗 CTLA-4 抗体の併用も顕著な抗腫瘍効果を示した (図 14)。

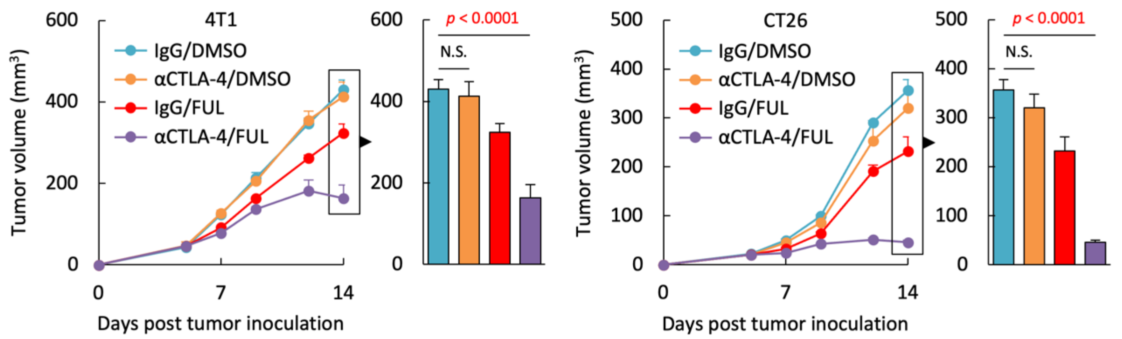

図 13. ER 陰性がんに対する ICI とフルベストラントの併用治療効果

4T1 細胞 (1×10^5 細胞) を接種した BALB/c マウスにおける皮下腫瘍成長曲線を示している。フルベストラント (FUL, 1.25 mg/body) または DMSO および抗 CTLA-4 抗体 (250 μg/body) またはコントロール IgG を Day 5~14 の間 3 日に 1 回皮下投与した。

(統計: Tukey-Kramer test)

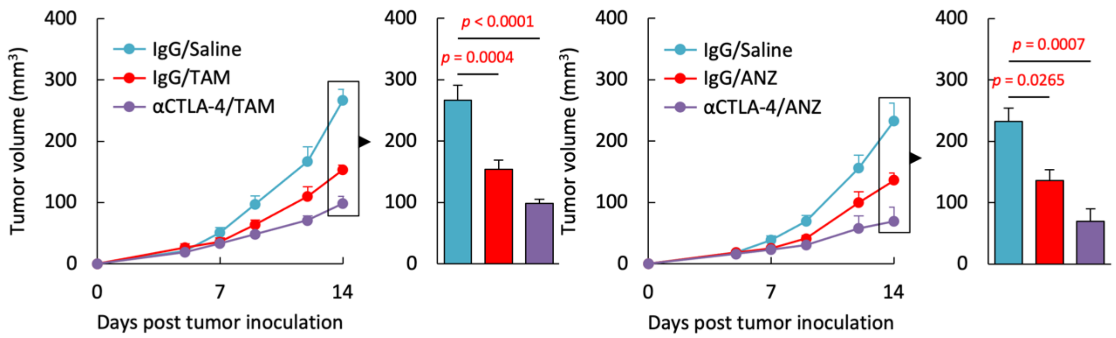

図 14. ER 陰性がんに対する ICI と抗エストロゲン薬の併用治療効果

4T1 細胞 (1×10^5 細胞) を接種した BALB/c マウスにおける皮下腫瘍成長曲線を示している。タモキシフェン (TAM, 1 mg/body)、アナストロゾール (ANZ, 1 mg/body) または生理食塩水および抗 CTLA-4 抗体 (250 µg/body) またはコントロール IgG を Day 5~14 の間 3 日に 1 回皮下投与した。

(統計: Tukey-Kramer test)

最後に、様々ながんに対して最も高い治療効果を示す抗 CTLA-4 抗体と抗 PD-1 抗体の併用治療 (Chapman et al., 2021) にフルベストラントを追加投与することで、相乗的な抗腫瘍効果がもたらされるかを検討した。すると、三剤併用療法により、TNBC 腫瘍の増殖は無治療群の 1/4 程度に遅延し (図 15a)、腫瘍内の活性化 T 細胞、特に活性化 CD8^{+} T 細胞は無治療群の 10 倍以上に増加した (図 15b)。

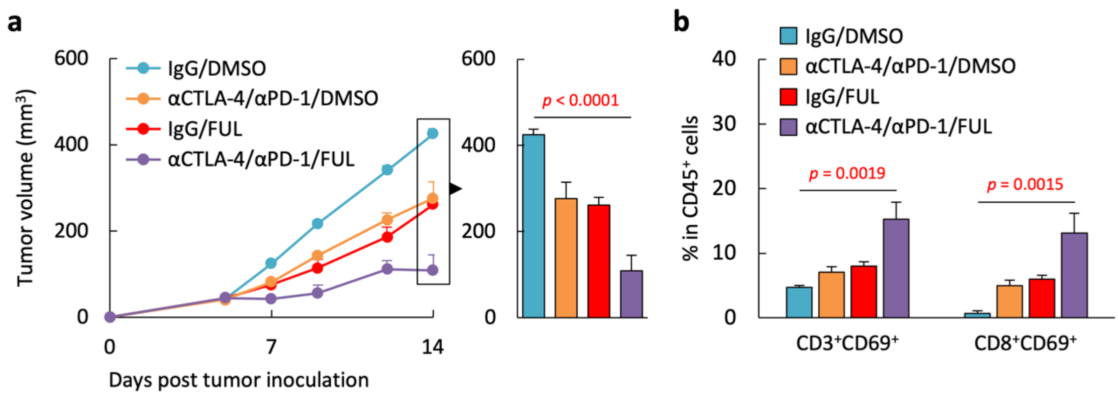

図 15. ER 陰性がんに対する ICI 二剤とフルベストラントの併用治療効果

(a) 4T1 細胞 (1×10^{5} 細胞) を接種した BALB/c マウスにおける皮下腫瘍成長曲線を示している。フルベストラント (FUL, 1.25 mg/body) または DMSO および抗 CTLA-4 抗体/抗 PD-1 抗体 (250 μg/body) またはコントロール IgG を Day 5~14 の間 3 日に 1 回皮下投与した。

(b) 図 15a に記載した Day 14 の腫瘍に浸潤している CD45^{+} 細胞における CD3^{+}CD69^{+} および CD8^{+}CD69^{+} T 細胞の割合を示している。

(統計: Tukey-Kramer test)

これらの結果を総合すると、エストロゲンが CTL を抑制することで免疫抑制的な TME を形成し、その阻害剤がその抑制を解除することで腫瘍が ICI に対する感受性を獲得するという概念を示している。本研究での発見は、がん細胞を排除するために、T 細胞免疫を増強することによって治療抵抗性を克服する新しい戦略となり得る。

考察

本研究では、エストロゲンが CTL の IL-2 シグナルを抑制することで CTL の機能を制限し、がん細胞が ER を発現していなくても腫瘍の進行を促進することを初めて明らかにした。エストロゲンは、閉経前の健康な女性の体内では、常に大量に生成され女性らしさの維持に寄与しているが、がん状態では、腫瘍細胞ではなく腫瘍内の免疫細胞に局所的かつ持続的に作用することで TME を免疫抑制状態に傾け、結果として腫瘍増殖を促進させる。一方、抗エストロゲン薬は、CTL の増殖・活性化を誘導することで TME を改善し、腫瘍細胞 ER 非依存的に腫瘍の進行を抑制した。さらに、ICI に代表される免疫療法と抗エストロゲン療法の併用は、ICI 抵抗性の ER 陰性がんの成長を劇的に抑制したため、特に興味深い結果であった。

ICI は従来の細胞毒性治療からがん治療にパラダイムシフトをもたらしたが、ICI が著効するがん患者は一部に限られており、ほとんどの腫瘍が治療抵抗性を獲得してしまう (Conforti et al. 2018)。治療抵抗性獲得メカニズムとして現在最も盛んに研究されているのが免疫細胞を標的としたものである。抗腫瘍免疫を成立させるためには、がん細胞を攻撃する CTL を活性化させる必要があり、通常、腫瘍内においては免疫抑制細胞等の外的要因によりこれらが抑制状態に陥っている (Tie et al. 2022)。治療抵抗性を解除することを目的とした免疫抑制細胞を標的とした多くの研究が世界中で進行中であり、実際、いくつかのアプローチは前臨床モデルにおいて ICI 抵抗性腫瘍の感作に成功している (Hama et al. 2020; Guan et al. 2022)。

しかし、このような前臨床の知見が実臨床の場でうまく活用された例はこれまでほとんどない。これは、ヒトの自然発生したがんにおける TME と治療抵抗性獲得メカニズムの複雑さに起因していると考えられる。臨床応用を成功させるには、治療抵抗性の根底にあるメカニズムを完全に理解するか、適応免疫の最終エフェクター細胞である CTL を直接的かつ強力に駆動する必要である (Sade-Feldman et al. 2018)。注目すべきは、本研究で提案した抗エストロゲン療法は CTL に直接作用するため、治療抵抗性獲得のメカニズムに関わらず、TME を改善し抵抗性を逆転させる可能性があることである。実際、フルベストラント・タモキシフェン・アナストロゾールの投与により ICI 不応性腫瘍が感作され、ICI との併用で劇的な抗腫瘍効果をもたらした。

治療メカニズムとしては、腫瘍内で、エストロゲンが CTL からの IL-2 産生を抑制することで IL-2 によるオートクライン作用が失われるエストロゲン由来の CTL 直接抑制を抗エストロゲン薬が逆転させることが判明した。腫瘍浸潤 CTL は、様々ながんにおいて ICI に対する反応性と正の相関を持つ因子として知られている (Sade-Feldman et al. 2018; Liu et al. 2021)。さらに、CTL を含むエフェクター T 細胞の増殖は、STAT3/5 を介した IL-2 産生によって制御されている (Johnston et al. 1995; Boyman and Sprent 2012)。様々な状況下で、IL-2 はエフェクター T 細胞の分化に影響を与え、抗原受容体活性化 T 細胞の運命を決定している (Dai et al. 2000)。急性ウイルス感染が発生すると、IL-2 欠損マウスでは野生型マウスに比べ CTL の拡大が 1/3 に低下し、ウイルス特異的 CTL によるウイルスクリアランスが顕著に抑制される (Boyman and Sprent 2012)。また、がんにおいても、IL-2 受容体欠損マウスでは、抗原特異的 CTL の拡大が野生型マウスの 1/2-1/5 に低下することが報告されている (Mitchell et al. 2010)。これとは逆に、CTL が高濃度の IL-2 に暴露されると激しく増殖する (Cho et al. 2007)。しかし、注目すべきは、IL-2 が腫瘍組織において低濃度でしか産生されていないことである (Sun et al. 2019)。これらの背景から、エストロゲンが自己分泌型 IL-2 産生を阻害することにより腫瘍内 CTL を抑制し、その結果 ICI 抵抗性が誘導されるという我々のデータは、十分理にかなっていると考えられる。

現在、生検や手術で採取した乳がん細胞の ER を免疫組織化学的に検査し、ホルモン療法を行う患者を選択している。その結果、ER 陽性の乳がん患者のみが、抗エストロゲン薬で治療される。一方、TNBC は ER の発現がないため、抗エストロゲン薬で治療することができない。したがって、化学療法が唯一の治療選択肢となる (Kajihara et al. 2020)。言うまでもなく、大腸がんや皮膚がんなどのがんも抗エストロゲン療法の対象外である。しかし、これからはエストロゲンががん細胞に直接作用するだけでなく、TME の免疫細胞にも作用することを覚えておく必要がある。つまり、免疫細胞の浸潤を伴うすべてのがん種に対して、抗エストロゲン療法を行うことができると考えられる。特に、我々のデータが示すように、この治療は CTL の浸潤レベルが高いがんに対してより効果的である可能性がある。

エストロゲンが多くの疾患の調節に関与していることを示す報告が増えているにもかかわらず (Cunningham and Gilkeson 2011; Kovats 2015)、腫瘍細胞にエストロゲン感受性がないがん患者の抗腫瘍免疫反応におけるその役割は、これまでほとんど知られていなかった。本研究では、TME におけるエストロゲンの作用が、がん細胞の ER 発現とは無関係にがんの進行に影響を与えること、言い換えれば、CTL を直接媒介することが明らかになった。さらに、エストロゲンシグナルを遮断することで、ICI の効果を向上させ、治療抵抗性を逆転させる有望な治療法であることを証明した。この治療戦略の研究開発が進めば、免疫療法の適用範囲が様々ながん種に広がり、より多くの患者が恩恵を受けることができるようになるかもしれない。

第 3 章

全腫瘍細胞ワクチンによる新規再発予防戦略の開発

緒言

がん治療の進歩に伴い、外科的切除・化学療法・放射線療法などの標準治療で完全寛解に至る患者がいる一方で、これらの治療では残存腫瘍細胞や微小転移腫瘍細胞を排除できず、後に再発する症例が数多く存在する (Sheikhi et al. 2016)。近年、新たながん治療として注目されているがん免疫療法は、免疫系の持つ特異性を利用して、がんに対する宿主の自然免疫反応を高め、悪性腫瘍を根絶するだけでなく、将来のがん再発リスクを大幅に低減させる (Wang et al. 2021a)。

がん免疫療法の中でも、がんワクチンは、腫瘍特異抗原に対する T 細胞集団を確立することにより、がん細胞を破壊することを目的としている (Aikins et al. 2020)。がんワクチンは、細胞ベース、タンパク質/ペプチドベース、遺伝子ベースの三つに分類される (Lollini et al. 2015)。タンパク質/ペプチドベースのワクチンや遺伝子ベースのワクチンを製造するためには予め最適な腫瘍特異抗原を決定する必要があるが、細胞ベースのワクチンの製造にはその必要がない (Keenan and Jaffee 2012)。細胞ベースワクチンには、全腫瘍細胞ワクチンや樹状細胞に腫瘍関連抗原 (TAA) を結合させた樹状細胞ワクチンがあり、一般的に患者由来の自己細胞で製造される (Wang et al. 2021a)。樹状細胞ワクチンの一つである Sipuleucel-T は米国において進行性前立腺がんの治療薬として臨床使用が承認されていたが (Liu et al. 2022)、患者の全生存期間を四カ月しか改善できていないのが実情である (Huber et al. 2012)。この理由としては、1. 移植した樹状細胞がリンパ節に移動して T 細胞と相互作用するように制御することが困難であること、2. 移植した樹状細胞の数によってロードできる TAA の種類や数が制限されてしまうこと、が挙げられる。結局、商業的・費用対効果上の問題から承認は取り下げられた。

一方、患者から採取した全腫瘍細胞ワクチン (WTCV) には多様な TAA が含まれており、理論的には、体内に接種することで幅広い抗腫瘍免疫応答を引き起こすことができる (Aikins et al. 2020)。しかし、メラノーマ患者に対する臨床試験では、臨床効果が 10% 未満しか観察されず、結果は限定的であった (Joshi et al. 2014)。この主な理由としては WTCV の供給源であるほとんどの腫瘍が、免疫編集により本来強力な免疫原性を失っていることである。腫瘍細胞は、宿主免疫系との継続的な相互作用の中で進化し、最終的には免疫監視から逃れることができるようになる (Al-Tameemi et al. 2012)。したがって、この治療法を成功させるためには、腫瘍細胞の免疫原性を改善する必要がある。

最近の研究では、免疫刺激分子を発現させたりサイトカインを分泌させたりするように腫瘍細胞を遺伝子改変することによって、免疫原性を高め、抗腫瘍免疫応答を誘導できることが報告されている (Sheikhi et al. 2016)。例えば、顆粒球マクロファージコ

ロニー刺激因子 (GM-CSF) を分泌するように遺伝子改変した腫瘍細胞を WTCV として使用すると、強力な全身性免疫を誘導することがマウス腫瘍モデルを用いた多くの研究により実証されている (Soiffer et al. 2021)。このメカニズムとしては、ワクチン接種部位で GM-CSF が樹状細胞を分化・活性化させることに起因している (Hege et al. 2006)。この戦略はまだ実臨床で用いられてはいないが、いくつかの臨床試験で有望な結果を示している (Hege et al. 2006)。他の戦略としては、インターフェロン (IFN) によって惹起される抗ウイルス反応も有用であると考えられている (Gansbacher et al. 1990; Omori et al. 2012)。IFN 経路の増強は、自然免疫と適応免疫のあらゆる側面において最も強力な免疫誘導法の一つである (Castaldello et al. 2010)。実際、I 型または II 型 IFN を腫瘍細胞に導入すると、特定のがんにおいてがんワクチンの有効性が高まることが判明している (Gansbacher et al. 1990; Omori et al. 2012)。

がんワクチンに関する多くの研究がなされているにもかかわらず、現在のところ、WTCV として臨床適応された例はない。したがって、がんワクチンに関する基礎研究は重要であり、臨床的に有益な方法を模索する絶好の機会である。本研究では、ワクチン効果の高いがん細胞に特徴的ないくつかの IFN 関連因子を特定し、ワクチン効果の低いがん細胞に導入することで、新しいがんワクチンの可能性を探ることを目的とした。この研究により、少なくとも、今後のがんワクチン開発におけるヒントが得られると考えている。

材料と方法

細胞培養

マウス TNBC 細胞株 4T1、マウス結腸がん細胞株 CT26、マウス肺がん細胞株 3LL、マウスメラノーマ細胞株 B16、およびマウス線維肉腫細胞株 MCA205 は American Type Culture Collection (ATCC) から入手した。本研究において、一般的な 4T1 は 4T1-ATCC (4T1A) とし、2015 年に樹立した 4T1A の高免疫原性サブクローンを 4T1-Sapporo (4T1S) と命名した (Abe et al. 2016)。全細胞株は RPMI-1640 (富士フイルム和光純薬) 中で培養した。培養液には、10% FBS (Sigma-Aldrich)、1% Penicillin-Streptomycin (ナカライテスク)、および 1% MEM Nonessential Amino Acids (ナカライテスク) を添加し、全て CO_2 インキュベータ (37°C, 5% CO_2, 95% air) 内で培養した。実験に使用する全細胞株のマイコプラズマ汚染が無いことを、MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza) を用いて確認した。

遺伝子導入がん細胞株および Irf7 欠損がん細胞株の作製

Irf7、Ifi44、Usp18、および Oas3 のコード配列は、放射線照射した 4T1S cDNA を鋳型として合成し、pPyCAG ベクター (理化学研究所・丹羽博士より提供) にサブクローニングした。IRF7 Double Nickase Plasmid (Santa Cruz Biotechnology) を用いて、Irf7 欠損 (KO) 細胞株を作製した。IRF7 Expressing Plasmid、IFI44 Expressing Plasmid、USP18 Expressing Plasmid、OAS3 Expressing Plasmid、および IRF7 Double Nickase Plasmid を Neon® Transfection system (Thermo Fisher Scientific) を用いて 2×10^6 細胞に導入し、24 時間培養した。IRF7 Double Nickase Plasmid の細胞への導入効率は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発現により確認し、FACS Aria™ II セルソーター (BD Biosciences) により全ての GFP 陽性細胞を選別した。その後、培地にピューロマイシン (6 µg/ml) を添加し、96 時間培養して導入細胞を選択した。最後に、この細胞株における IRF7 の発現をウェスタンブロッティングで調べた。Irf7、Ifi44、Usp18、および Oas3 の発現プラスミドには GFP レポーター遺伝子が含まれていないため、培地にピューロマイシン (2~10 µg/ml) を添加し、96 時間培養して導入細胞を選択した。各導入遺伝子 (Irf7、Ifi44、Usp18、および Oas3) の発現を定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) で調べた。

マウスワクチン接種実験

6~7 週齢のメス BALB/c (wild type および nude)、および C57BL/6 マウスを日本 SLC から購入した。これらのマウスは、北海道大学動物施設において 12 時間の明暗サイクルおよび特定の病原体を含まない条件下で飼育された。マウスへのワクチン接種実験用の細胞を準備するために、培養細胞を回収後、2×10^6 細胞を 200 µl の PBS

に懸濁した状態で 1.5 ml チューブに分注した。それに 300 Gy の X 線を照射し、照射後 1 時間以内に WTCV として同系マウスの右背部に皮下接種した。ワクチン接種の 2 週間後、X 線を照射していない 5×10^4 細胞を 200 µl の PBS に懸濁し、チャレンジ腫瘍として左乳腺に皮下接種した。触知可能な腫瘍が確認できた日をカプランマイヤー曲線における腫瘍発症日と定義した。抗 CD20 抗体 (250 µg/injection, BioLegend) は、ワクチン接種の 7 日前、1 日前、7 日後に腹腔内投与した。ワクチン接種時および薬剤腹腔内投与時にはマイショット® (ニプロ) を用いた。チャレンジ腫瘍接種後 100 日目まで無腫瘍または生存が延長した場合、その日のうちに観察を終了した。脾臓やリンパ節の免疫細胞を調べる実験では、マウスを頸椎脱臼した後、脾臓・腋窩リンパ節・鼠径リンパ節を単離した。本研究内の全ての動物実験は、北海道大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号: 22-0138)。

フローサイトメトリーによる脾臓およびリンパ節内免疫細胞の解析

切除した脾臓およびリンパ節を 2 枚のスライドグラスを用いて擦り潰し、細胞を単離した。細胞外染色では、細胞 (2×10^5 細胞/ウェル) を FcR Blocking Reagent (TONBO biosciences) でブロックし、CD45/CD3ε/CD11b/CD11c/CD19/ CD20/F4/80/Ly6G 分子を抗体 (BioLegend) で染色した。細胞外染色後に Cytofix/Cytoperm™ Buffer (BD Biosciences) で細胞を固定・透過させ、IFNγ 分子を抗体 (BioLegend) で染色した。データは FACS Celesta フローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて取得し、FlowJo ソフトウェアで解析した。ゲーティング戦略としては、まず、前方散乱と側方散乱に基づいて生細胞を選択し、その後ダブレットを除去した。各免疫細胞を分析するために、$CD45^+$ 細胞を選択し、その後ターゲット集団を展開した。

腫瘍組織における遺伝子発現レベルの解析

TriPure Isolation Reagent (Roche) を用いて切除した腫瘍から RNA を抽出し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (東洋紡) を用いて mRNA を cDNA に逆転写した。その後、下に示すプライマーと KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x) ABI Prism® (Kapa Biosystems) を用いて cDNA に対して StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) で定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) を実施した。この実験では *Gapdh* をハウスキーピング遺伝子として使用した。

Species	Gene	Forward (5’-3’)	Reverse (5’-3’)
Mouse	*Gapdh*	TCAAATGGGGTGAGGCCGT	TTGCTGACAATCTTGAGTGA
	Irf7	TCCTGAGCGCAGCCTTG	GTTCTTACTGCTGGGGCCAT
	Ifi44	TACACGTGGATAGCCTGGA	CTCAGTGCCGAGGATCA
	Usp18	CAGGAGTCCCTGATTTGCGT	GGGCTGGACGAAACATCTCA
	Oas3	CCTGATCCGGCTGTGAAAT	CCCAGGCGTACAGTTAGGG
	Ifna	ATGGCTAGCTCTGTGCTTTCCT	AGGGCTCCAGATTCTGCTCTG
	Ifnb	ATCAACCTCACCTACAGGGC	ATCTCTTGGATGGCAAAGGCA
	Ifng	AAGACAATCAGGCCATCAGCA	AGCGACTCCTTTTCCGCTTC

細胞内タンパク質発現解析

4T1A、4T1S、および Irf7KO 4T1S 細胞株における IRF7 のタンパク質発現は、ウェスタンブロッティングにより確認した。また、放射線による IRF7 発現量の変化を調べるために、細胞に 300 Gy の X 線を照射し 24 時間後に細胞を回収した。各細胞株を RIPA バッファー (ナカライテスク) で溶解することによって細胞溶解液を取得し、遠心分離して上清サンプルを採取した。次に、各上清サンプルに 4×SDS サンプルバッファー (Sigma-Aldrich) を加え、100°Cで煮沸した。タンパク質は、10% アクリルアミドゲルを用いて 200 V で電気泳動分離し、25 V で PVDF 膜に転写した。膜を 3% スキムミルク を含む TBS-T 中でブロックした後、ラビット抗マウス Irf7 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) で穏やかに振盪しながら一晩反応させた。続いて、HRP 結合抗ラビット IgG 抗体 (1:3000, Cell Signaling Technology) で膜をインキュベートした。最後に、Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク質を可視化した。バンドは ImageJ を用いて定量化し、内在性コントロールの検出には抗 αTubulin 抗体 (1:3000, Cell Signaling Technology) を用いた。

単一細胞解析

4T1A または 4T1S によるワクチン接種の 14 日後に、各マウスからリンパ節を採取した。単離したリンパ節細胞を溶解し、BD Rhapsody™ WTA Amplification Kit (BD Biosciences) を用いて cDNA を合成し、BD Rhapsody™ Library Preparation Kit (BD Biosciences) を用いてライブラリーを作成した。増幅された cDNA を断片化し、BD Rhapsody™ Tagging Kit (BD Biosciences) を用いて UMI でタグ付けした。タグ付けされた断片を増幅、精製し、かずさ DNA 研究所にて MGI Tech DNBSEQ G400RS を用いてペアエンド 100 塩基対リードを行った。得られた配列データは、BD Rhapsody™ Analysis Pipeline (BD Biosciences) を用いて処理し、各細胞の遺伝子発現マトリクスを作成した。得られたカウントマトリックスをさらに R パッケージ Seurat (v4.0.1) を用いて処理し、検出された遺伝子数が 200 未満である低品質細胞、ミトコンドリアリード、およびリボソーム RNA リードを解析から除外した。正規化、スケーリング、可変遺伝子の選択は Seurat の SCTransform 関数を用いて行い、得られた遺伝子発現マトリックスに対して主成分分析を実施した。次に、tSNE 解析により、細胞を 12 のクラスターに割り当てた。細胞タイプは、既知の細胞マーカーと遺伝子発現の差分解析に基づき、Louvain アルゴリズムを用いて注釈付けした。4T1S 接種マウスリンパ節細胞内の CD4、CD8α、および CD19 クラスターにおける高発現遺伝子を、4T1A 接種マウスリンパ節細胞と比較した平均発現量と分散により特定した。

遺伝子オントロジー解析

上記で得られた各クラスターの差分的発現遺伝子 (4T1S 接種マウスのリンパ節内の各免疫細胞における高発現遺伝子) を ShinyGO 0.76.2 bioinformatics graphical web application を用いて遺伝子オントロジー解析を実施した。4T1S を接種したマウスリンパ節内の CD4、CD8α、および CD19 クラスターにおいて、遺伝子濃縮スコアが高い上位 10 項目 (生物学的プロセス) を示した。図 10b, d および 12b は、4T1S 接種マウスの細胞において活性化された経路を示している。

統計解析

統計解析は JMP® 16 (SAS Institute) を用いて行った。二群間の有意性の判定には Student's *t*-test が使用された。三群間以上の有意性の判定には Tukey-Kramer test が使用された。カプランマイヤー曲線の比較には Log-rank test を使用した。本研究における全ての統計解析において、P 値が 5% を下回る場合に統計的に有意差ありと判断した。

<u>結果</u>

高免疫原性腫瘍に特徴的な遺伝子の探索

WTCV を含むがんワクチン全般の前処置として、がん細胞への放射線照射が効果的であることがわかっている (Kepp et al. 2014)。これは、がん細胞の増殖能を不活性化するだけでなく、がん細胞内の DNA を損傷することによりがん細胞の免疫原性細胞死を誘発することができるからである (Golden and Apetoh 2015)。実際、前臨床試験・臨床試験で、放射線照射がワクチン増強の役割を果たすことが示されている (Perez et al. 2009; Muragaki et al. 2011)。しかし、ワクチン効果の程度はがんの種類や特性によって異なり、ワクチンの有効性を調節する因子や詳細なメカニズムについては明らかになっていない。

そこで、六種類のマウスがん細胞株を用い、再発を想定した腫瘍チャレンジの二週間前に WTCV (がん細胞に放射線を照射したもの) として免疫することで各がん細胞の有効性を調査した。本研究では、2015 年に我々の研究グループが発表した論文に基づき、ATCC から入手できる 4T1 を 4T1A、札幌で樹立された 4T1 の高免疫原性亜株を 4T1S と呼んでいる (Abe et al. 2016)。確かに、それぞれのがん細胞でワクチン効果に顕著な違いが観察され、4T1A・3LL・B16 の WTCV ではチャレンジした腫瘍の発生を阻止できなかった (図 1a)。一方で、4T1S・CT26・MCA205 での WTCV は対照群と比較して有意な腫瘍抑制効果を得た (図 1b)。

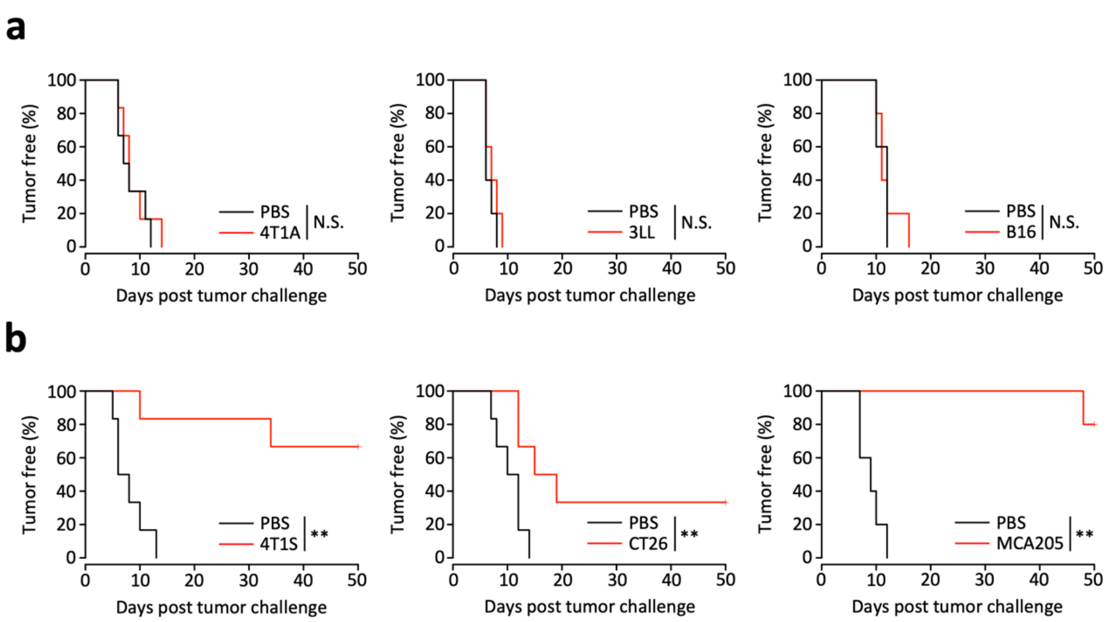

図 1. 六種類のがん細胞株による WTCV の効果

(a) 300 Gy の放射線照射後に 4T1A、3LL、または B16 細胞 (2×10^6 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、それぞれ放射線をあてていない 4T1A、3LL、B16、4T1S、CT26、または MCA205 細胞 (5×10^4 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレンジ接種) した BALB/c または C57BL/6 マウスにおける無腫瘍期間のカプランマイヤー曲線を示している。

(b) 300 Gy の放射線照射後に 4T1S、CT26、または MCA205 細胞 (2×10^6 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、それぞれ放射線をあてていない 4T1A、3LL、B16、4T1S、CT26、または MCA205 細胞 (5×10^4 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレンジ接種) した BALB/c または C57BL/6 マウスにおける無腫瘍期間のカプランマイヤー曲線を示している。

(統計: Log-rank test, $^{**}P<0.01$)

上記の結果をもとに、腫瘍増殖抑制作用を持つ因子ががん細胞内で高発現もしくは低発現することによってワクチン効果に影響を与えているのではないかという仮説を立て、放射線照射後の各がん細胞株における遺伝子発現を次世代シーケンシングにより解析した。すると、ワクチン効果のあるがん細胞三種では、ワクチン効果のないがん細胞三種と比較して、発現量の多い順に、IFN regulatory factor 7 (Irf7)、IFN-induced protein 44 (Ifi44)、ubiquitin-specific peptidase 18 (Usp18)、2´-5´-origoadenylate synthetase 3 (Oas3) という四つの自然免疫関連遺伝子が五倍以上高発現していた (表 1)。

表 1. 放射線照射後のワクチン効果のあるがん細胞における高発現遺伝子

ワクチン効果のないがん細胞からワクチン効果のあるがん細胞にすべての組み合わせで五倍以上の遺伝子発現量を示し、ワクチン効果のあるがん細胞での fragments per kilobase of exon per million reads mapped (FPKM) 値が 20 以上の遺伝子リストを示している。ワクチン効果のあるがん細胞において遺伝子発現量の多い順に並べた。

	Gene	B16	4T1A	3LL	CT26	4T1S	MCA205
1	*Irf7*	0.728359	10.8379	0.802327	74.6452	171.426	179.428
2	*Ifi44*	0.0573365	5.71249	0.229391	40.3954	121.101	84.4698
3	*Usp18*	1.47266	2.61571	0.709883	49.4265	102.497	29.8158
4	*Oas3*	0.0431175	3.82767	1.21418	26.4166	50.2315	28.879

Irf7、Ifi44、Usp18、および Oas3 は、ウイルス感染に対する免疫応答時に誘導される IFN の制御に重要な役割を果たすが (McDonald et al. 2016; Coit et al. 2020)、興味深いことに、I〜III 型を含むあらゆる IFN の発現は、ワクチン効果のないがん細胞とあるがん細胞間で差が認められなかった (表 2)。

表 2. 放射線照射された各がん細胞における IFN ファミリー遺伝子の発現
ワクチン効果のないがん細胞とあるがん細胞における IFN ファミリーの遺伝子発現を示している。

Gene	B16	4T1A	3LL	CT26	4T1S	MCA205
Ifna1	0	0.119172	0	0	0	0.055595
Ifna2	0	0	0	0.11328	0	0
Ifna4	0	0	0	0	0.194503	0
Ifna5	0	0	0	0	0	0.055595
Ifna6	0	0	0	0	0	0
Ifna7	0.0976421	0	0	0	0	0
Ifna9	0	0	0	0	0	0
Ifna11	0	0	0	0	0	0
Ifna12	0	0	0	0	0	0
Ifna13	0	0	0	0	0.0708513	0
Ifna14	0	0	0	0	0	0
Ifnab	0	0	0	0	0	0
Ifnb1	0.0658191	0	0	0.529973	2.99051	0.0737542
Ifng	0.0379548	0	0.022282	0	0	0.042493
Ifne	0	0.0961778	0	0	0	0.0897744
Ifnk	0	0	0	0	0	0
Ifnz	0.259398	0.0367919	0.165214	0.247496	0.06106	0.104543

以上の結果より、がん細胞における Irf7、Ifi44、Usp18、および Oas3 が IFN 産生非依存的にワクチン効果をもたらし、WTCV として使用した場合に再発防止をもたらす可能性が示唆された。

WTCV における Irf7、Ifi44、Usp18、および Oas3 の重要性の検討

WTCV としての腫瘍抑制効果に関する Irf7、Ifi44、Usp18、および Oas3 の重要性を評価するため、まず、ワクチン効果のあるがん細胞で最も発現量の高い Irf7 を、ワクチン効果を持たない 4T1A に遺伝子導入したがん細胞株を樹立した。樹立したがん細胞株での Irf7 の発現は、RNA およびタンパク質レベルで確認した (図 2a, b)。放射線照射した Irf7 導入 4T1A を皮下免疫し、二週間後に野生型 4T1A をチャレンジ接種したマウスは、コントロールベクター導入 4T1A を免疫した対照群と比較して、腫瘍発生の遅延および生存期間の延長を示した (図 2c)。さらに、既に中程度のワクチン効果を有している CT26 を用いて Irf7 導入細胞株を樹立し (図 2d, e)、ワクチン接種実験によりその能力を評価したところ、4T1A での結果と同様の結果が得られた (図 2f)。これらのデータは、WTCV によるワクチン効果における Irf7 の重要性を示している。

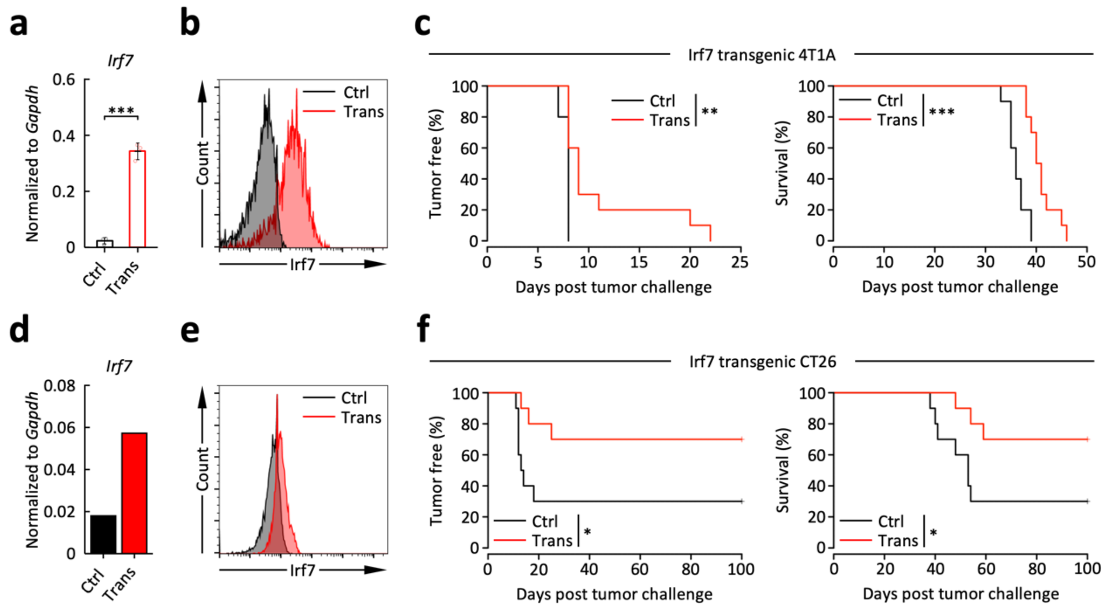

図 2. がん細胞への Irf7 の遺伝子導入が WTCV の効果に及ぼす影響

(a) コントロール (Ctrl) および Irf7 導入 4T1A (Trans) 細胞株における *Irf7* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。

(b) コントロール (Ctrl) および Irf7 導入 4T1A (Trans) 細胞株における Irf7 のタンパク質発現を示している。

(c) 300 Gy の放射線照射後にコントロール (Ctrl) および Irf7 導入 4T1A (Trans) 細胞 (2×10^6 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、放射線をあてていない野生型 4T1A 細胞 (5×10^4 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレ

ンジ接種) した BALB/c マウスにおける無腫瘍および全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。

(d) コントロール (Ctrl) および Irf7 導入 CT26 (Trans) 細胞株における *Irf7* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。

(e) コントロール (Ctrl) および Irf7 導入 CT26 (Trans) 細胞株における Irf7 のタンパク質発現を示している。

(f) 300 Gy の放射線照射後にコントロール (Ctrl) および Irf7 導入 CT26 (Trans) 細胞 (2×10^6 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、放射線をあてていない野生型 CT26 細胞 (5×10^4 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレンジ接種) した BALB/c マウスにおける無腫瘍および全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。

(統計: (a) Student's *t*-test, (c, f) Log-rank test, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

次に、より優れた腫瘍抑制率を得るために、Irf7 に加えて、ワクチン効果を持つがん細胞で二番目に高発現する Ifi44 を導入した 4T1A を確立した (図 3a)。この細胞株を用いた WTCV でも、対照群と比較して腫瘍抑制や生存延長が認められたが (図 3b)、Irf7 単独導入によるワクチン効果をさらに高めているようには見えなかった。

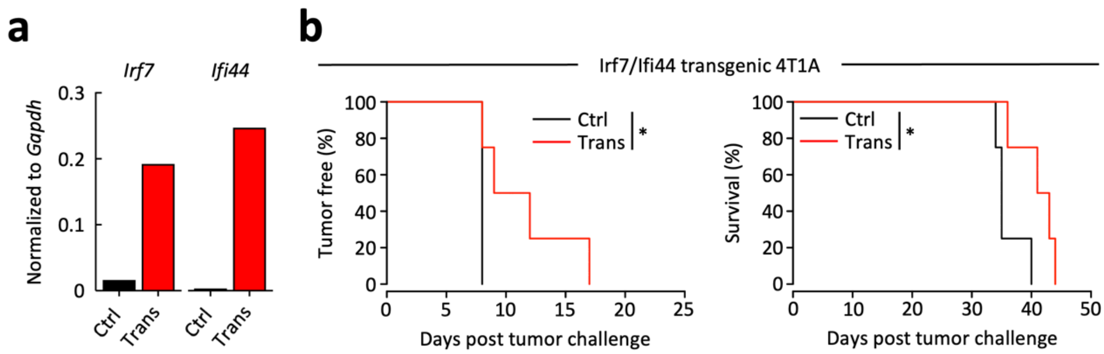

図 3. がん細胞への Irf7/Ifi44 導入が WTCV の効果に及ぼす影響

(a) コントロール (Ctrl) および Irf7/Ifi44 導入 4T1A (Trans) 細胞株における *Irf7* および *Ifi44* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。

(b) 300 Gy の放射線照射後にコントロール (Ctrl) および Irf7/Ifi44 導入 4T1A (Trans) 細胞 (2×10^6 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、放射線をあてていない野生型 4T1A 細胞 (5×10^4 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレンジ接種) した BALB/c マウスにおける無腫瘍および全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。

(統計: Log-rank test, *P<0.05)

さらに、ワクチン効果を持つがん細胞で三番目に高発現する Usp18 を Irf7/Ifi44 導入 4T1A に遺伝子導入することで (図 4a)、Irf7/Ifi44/Usp18 導入 4T1A による WTCV がチャレンジ腫瘍の増殖を抑制できるか調べた。これまでと同様にワクチン接種の二週間後、マウスに野生型腫瘍をチャレンジしたところ、Irf7/Ifi44/Usp18 導入 4T1A をワクチン接種したマウスは、チャレンジ腫瘍の発症を劇的に抑制し、一部のマウスはチャレンジから 100 日間無腫瘍状態を維持した (図 4b)。また、最も注目すべきことに、Irf7/Ifi44/Usp18 を導入した CT26 による WTCV は (図 4c)、チャレンジ腫瘍の発生を完全に抑制し 100% の生存率をもたらした (図 4d)。

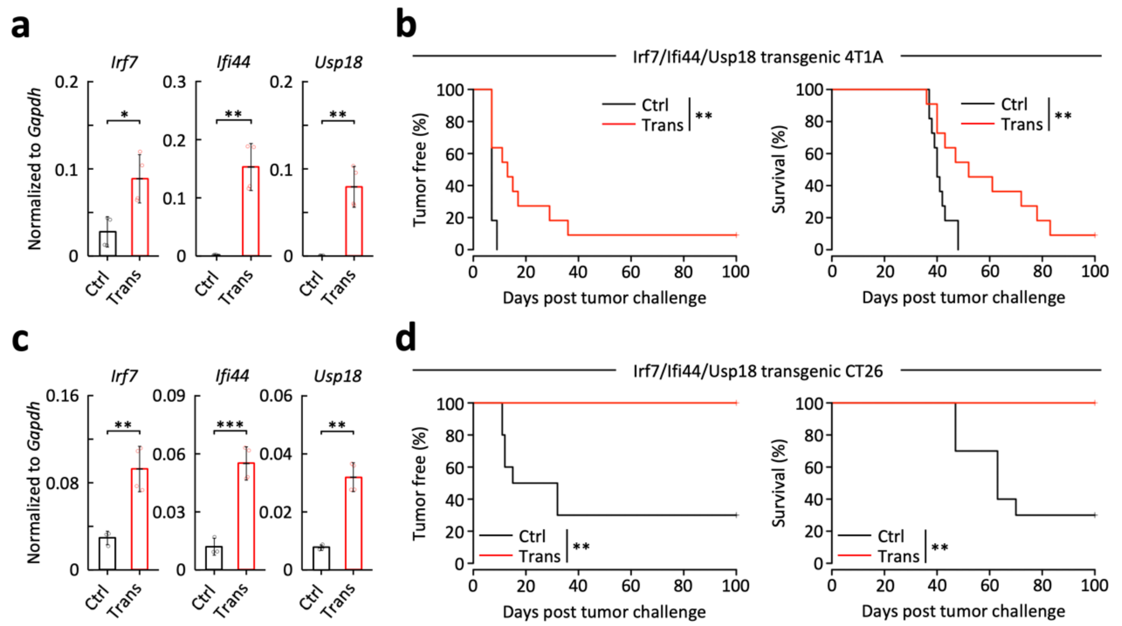

図 4. がん細胞への Irf7/Ifi44/Usp18 導入が WTCV の効果に及ぼす影響

(a) コントロール (Ctrl) および Irf7/Ifi44/Usp18 導入 4T1A (Trans) 細胞株における *Irf7*、*Ifi44*、および *Usp18* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。

(b) 300 Gy の放射線照射後にコントロール (Ctrl) および Irf7/Ifi44/Usp18 導入 4T1A (Trans) 細胞 ($2×10^6$ 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、放射線をあてていない野生型 4T1A 細胞 ($5×10^4$ 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレンジ接種) した BALB/c マウスにおける無腫瘍および全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。

(c) コントロール (Ctrl) および Irf7/Ifi44/Usp18 導入 CT26 (Trans) 細胞株における *Irf7*、*Ifi44*、および *Usp18* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。

(d) 300 Gy の放射線照射後にコントロール (Ctrl) および Irf7/Ifi44/Usp18 導入 CT26 (Trans) 細胞 (2×10^6 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、放射線をあてていない野生型 CT26 細胞 (5×10^4 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレンジ接種) した BALB/c マウスにおける無腫瘍および全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。

(統計: (a, c) Student's *t*-test, (b, d) Log-rank test, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

以上のように、CT26 では極めて良好な結果が得られたが、4T1A では 100% の腫瘍抑制効果が得られていない。そこで、より高いワクチン効果を得るために、ワクチン効果を有するがん細胞で Irf7、Ifi44、Usp18 に次いで四番目に高発現する遺伝子である Oas3 も導入した (図 5a)。興味深いことに、ここまでがん細胞への遺伝子導入がワクチン効果にもたらしてきた恩恵は、Oas3 の導入により相殺された (図 5b)。

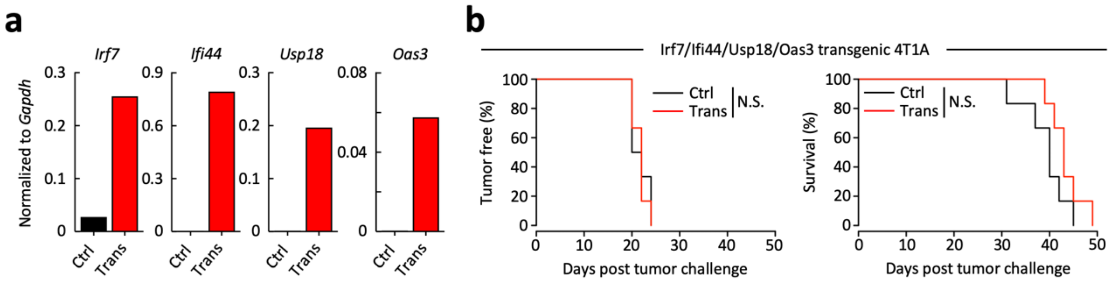

図 5. がん細胞への Irf7/Ifi44/Usp18/Oas3 導入が WTCV の効果に及ぼす影響

(a) コントロール (Ctrl) および Irf7/Ifi44/Usp18/Oas3 導入 4T1A (Trans) 細胞株における *Irf7*、*Ifi44*、*Usp18*、および *Oas3* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。

(b) 300 Gy の放射線照射後にコントロール (Ctrl) および Irf7/Ifi44/Usp18/Oas3 導入 4T1A (Trans) 細胞 (2×10^6 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、放射線をあてていない野生型 4T1A 細胞 (5×10^4 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレンジ接種) した BALB/c マウスにおける無腫瘍および全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。

(統計: Log-rank test)

これらを踏まえると、4T1S のようなワクチン効果を持つがん細胞が生み出す抗腫瘍効果は、Irf7・Ifi44・Usp18 に依存している可能性が示唆された。一方、ワクチン効果を持たないがん細胞は、それらの発現が少なすぎる、あるいは不足しているために悪い結果を示しているのかもしれない。

WTCV における Irf7 軸の重要性の検討

自然免疫応答において Irf7・Ifi44・Usp18 が密接に関係していることから、これら三遺伝子においてどの因子かが上流に位置しており、他の二つの遺伝子発現を誘導しているのではないかと仮説を立て、これについて検証した。まず、Irf7 導入 4T1A、Ifi44 導入 4T1A、Usp18 導入 4T1A の三種類の細胞株を作製し各遺伝子の発現を解析したところ、確立した各細胞株においてそれぞれの導入遺伝子が発現していることが確認された (図 6a)。さらに、Irf7 導入 4T1A では、Irf7 のみならず Ifi44 や Usp18 も発現しており (図 6a)、同様の結果が Irf7 導入 CT26 でも観察された (図 6b)。以上より、Irf7 は、Irf7・Ifi44・Usp18 の三遺伝子において上流に位置することが判明した。

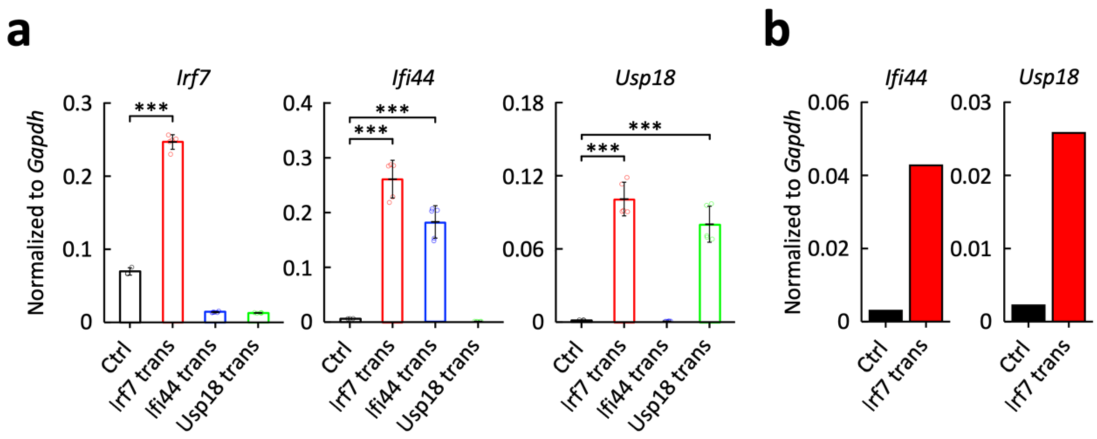

図 6. がん細胞における Irf7 が Ifi44 および Usp18 の発現に及ぼす影響

(a) コントロール (Ctrl)、Irf7 導入 4T1A (Irf7 trans)、Ifi44 導入 4T1A (Ifi44 trans)、および Usp18 導入 4T1A (Usp18 trans) 細胞株における *Irf7*、*Ifi44*、および *Usp18* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。

(b) コントロール (Ctrl) および Irf7 導入 CT26 (Irf7 trans) 細胞株における *Ifi44* および *Usp18* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。(統計: Tukey-Kramer test, ***P<0.001)

上記の結果より、Irf7 を起点とした Irf7 軸がワクチン効果に重要である可能性が示唆された。この見解を検証にするために、ワクチン効果を有する 4T1S で Irf7 欠損株 (Irf7KO 4T1S) を作製した (図 7a)。この Irf7 欠損株を用いてワクチンすると、4T1S による腫瘍抑制効果が無効化され、80% 以上のマウスが 25 日以内にチャレンジ腫瘍を発生させた (図 7b)。以上のデータから、Irf7 は WTCV がもたらす抗腫瘍効果に不可欠であることが示された。

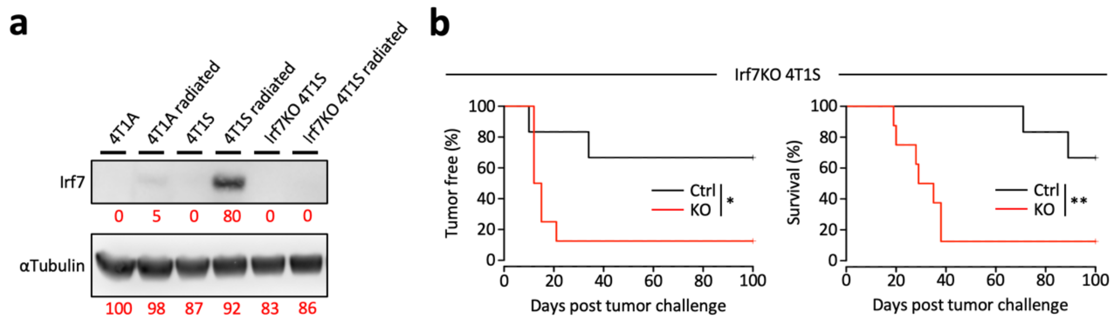

図 7. がん細胞おける Irf7 欠損が WTCV の効果に及ぼす影響

(a) 放射線照射前後の 4T1A、4T1S、および Irf7KO 4T1S 細胞における Irf7 のタンパク質発現を示している。発現レベルは ImageJ で定量化し、赤文字で示している。

(b) 300 Gy の放射線照射後にコントロール (Ctrl) および Irf7 欠損 4T1A (KO) 細胞 ($2×10^6$ 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、放射線をあてていない野生型 4T1A 細胞 ($5×10^4$ 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレンジ接種) した BALB/c マウスにおける無腫瘍および全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。

(統計: Log-rank test, *P<0.05, **P<0.01)

Irf7 軸が WTCV の効果を制御するメカニズムの検討

がん細胞の Irf7 が WTCV の抗腫瘍効果を高める仕組みを理解するため、Irf7 がほとんど発現していない 4T1A と Irf7 が高発現している 4T1S を WTCV としてマウスに接種し、3・7・14 日後に脾臓とリンパ節における各免疫細胞集団を比較した。予想に反して、脾臓とリンパ節の両方において、4T1A 接種マウスと 4T1S 接種マウスで T 細胞や B 細胞分画 (二次リンパ組織における主要集団) に変化が見られなかった (図 8a, b)。また、その他の免疫細胞も変化しないか、ほとんど存在しなかった (図 8a, b)。

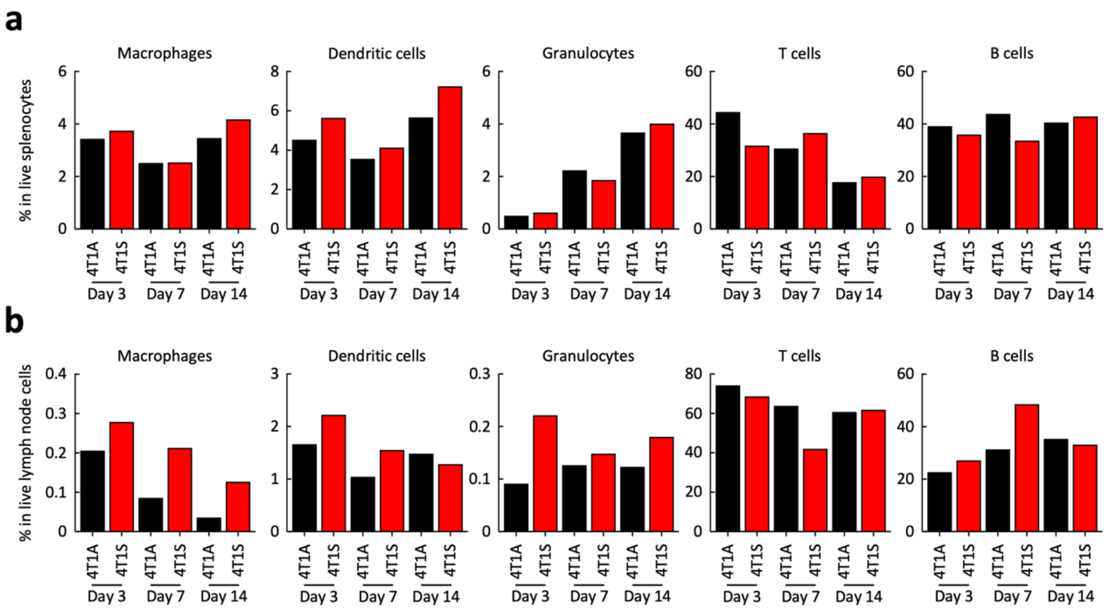

図 8. WTCV を接種したマウス二次リンパ組織における各免疫細胞集団

(a) 4T1A または 4T1S の接種から 3・7・14 日後の脾臓中 $CD45^+$ 細胞におけるマクロファージ ($CD11b^+F4/80^+$ 細胞)、樹状細胞 ($CD11b^+CD11c^+$ 細胞)、顆粒球 ($CD11b^+Ly6G^+$ 細胞)、T 細胞 ($CD3^+$ 細胞)、および B 細胞 ($CD19^+$ 細胞) の割合を示している。

(b) 4T1A または 4T1S の接種から 3・7・14 日後のリンパ節中 $CD45^+$ 細胞におけるマクロファージ ($CD11b^+F4/80^+$ 細胞)、樹状細胞 ($CD11b^+CD11c^+$ 細胞)、顆粒球 ($CD11b^+Ly6G^+$ 細胞)、T 細胞 ($CD3^+$ 細胞)、および B 細胞 ($CD19^+$ 細胞) の割合を示している。

上記の解析では注目すべき差を観察できなかったため、ワクチン接種の 14 日後 (腫瘍チャレンジの日) に、4T1A および 4T1S 接種マウスのリンパ節細胞を単一細胞解析した (図 9a)。その結果、4T1A または 4T1S のワクチン接種によって誘導された $CD4^+$ T、$CD8^+$ T、および $CD19^+$ B 細胞分画に顕著な差が見られた (図 9b)。

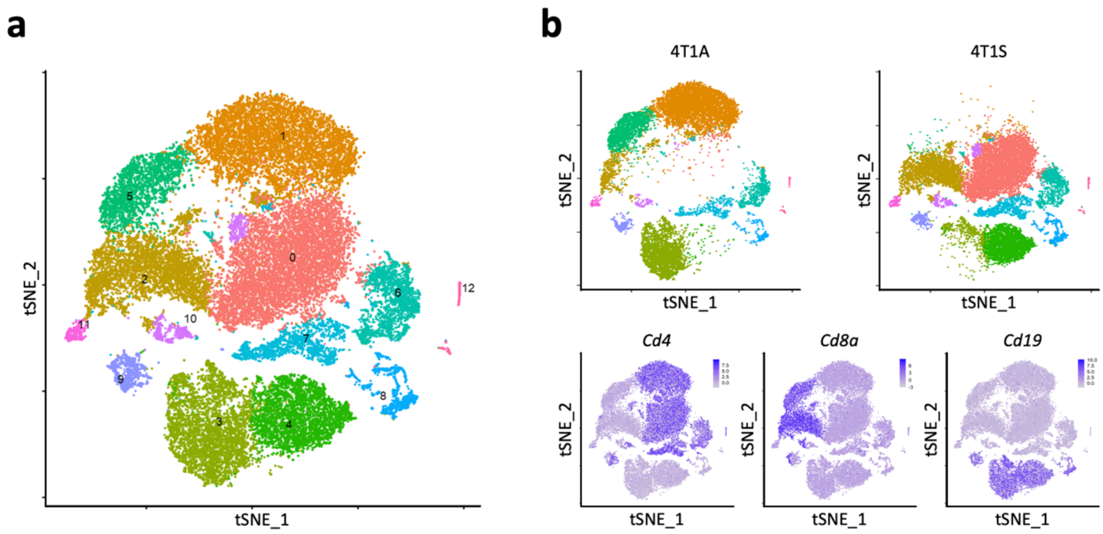

図 9. 4T1A および 4T1S を接種したマウスのリンパ節におけるリンパ球集団

(a) 4T1A および 4T1S を接種したマウスにおける Day 14 のリンパ節内の細胞 (36814 細胞) を表す tSNE プロットを示している。12 個のクラスターが同定され、異なる色で示されている。

(b) 4T1A または 4T1S を接種したマウスにおける Day 14 のリンパ節内の細胞 (4T1A: 16295 細胞, 4T1S: 20519 細胞) を表す tSNE プロットを示している。紫色で *Cd4*、*Cd8a*、および *Cd19* クラスターを強調している。

まず、CD4$^+$ T 細胞画分において、各ワクチンによって誘導された集団の違いを探るために二群で発現差のある遺伝子を抽出した結果、4T1S 接種マウスのリンパ節内のCD4$^+$ T 細胞では、4T1A 接種マウスのリンパ節内と比較して 14 遺伝子の発現が有意に増加していた (図 10a)。これらの遺伝子を遺伝子オントロジー解析にかけた結果、ミエロイド細胞の分化やサイトカインに対する応答といった免疫関連の生体プロセスに関与している可能性が示された (図 10b)。CD8$^+$ T 細胞分画についても同様の解析を行ったところ、4T1S 接種マウスのリンパ節内の細胞では 7 つの遺伝子が高発現し (図 10c)、これもサイトカインへの応答など免疫関連の生物学的プロセスに関与している可能性が示された (図 10d)。

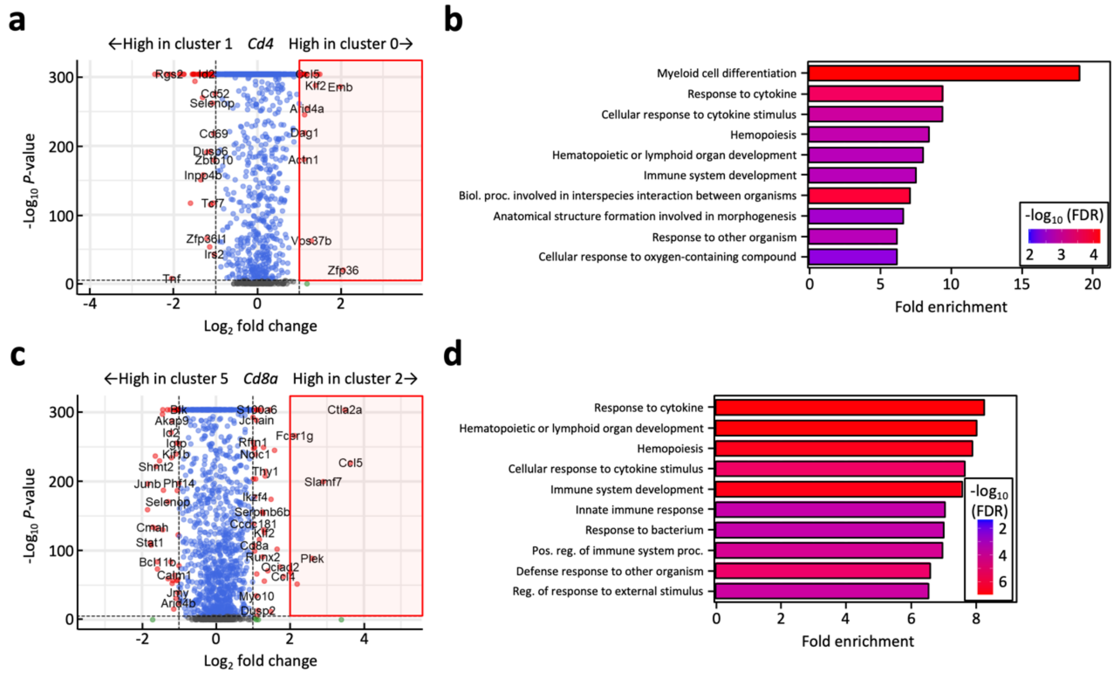

図 10. 4T1S を接種したマウスのリンパ節における T 細胞の特徴

(a) 4T1A および 4T1S 接種マウスの *Cd4*$^+$ 細胞における差次的発現遺伝子の火山プロットを示している。

(b) 4T1S 接種マウスの *Cd4*$^+$ 細胞における高発現遺伝子の遺伝子オントロジー解析結果を示している。

(c) 4T1A および 4T1S 接種マウスの *Cd8a*$^+$ 細胞における差次的発現遺伝子の火山プロットを示している。

(d) 4T1S 接種マウスの *Cd8a*$^+$ 細胞における高発現遺伝子の遺伝子オントロジー解析結果を示している。

上記のデータは、4T1S のワクチン接種によって誘導されたリンパ節内の T 細胞が、4T1A 接種マウスのリンパ節内と比較して、活発な免疫関連応答を起こしていることを示唆している。一般的に、T 細胞は抗腫瘍免疫においてがん細胞に対する最終エフェクターとして機能するため、胸腺を欠き T 細胞を作れない Nude マウスを用いて 4T1S ワクチンの効果に対する T 細胞の関与を調査した。その結果、Nude マウスでは 4T1S によるワクチン効果は認められず (図 11)、本論文で示した有効な WTCV の動態には、少なくとも T 細胞の寄与が必要であることが示された。

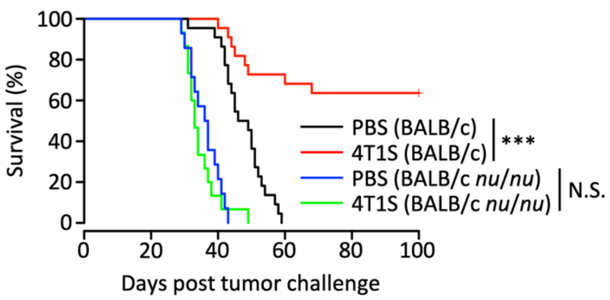

図 11. 4T1S による WTCV の効果に T 細胞が及ぼす影響

300 Gy の放射線照射後に 4T1S 細胞 (2×10^6 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、放射線をあてていない 4T1S 細胞 (5×10^4 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレンジ接種) した BALB/c または BALB/c *nu/nu* (Nude) マウスにおける全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。

(統計: Log-rank test, ***P<0.001)

次に、CD19$^+$B 細胞画分についても、CD4$^+$ および CD8+T 細胞と同様の解析を行ったところ、4T1S 接種マウスのリンパ節内の細胞で、*Isg15* を含む 9 つの遺伝子が高発現していた (図 12a)。ISG15 は IFNγ 分泌のドライバーとして知られており、ISG15 を先天的に欠損している患者は十分量の IFNγ を産生できない (Bogunovic et al. 2012)。実際、4T1S 接種マウスのリンパ節内の CD19$^+$B 細胞は、IFNγ 産生を正に制御している可能性が示された (図 12b)。

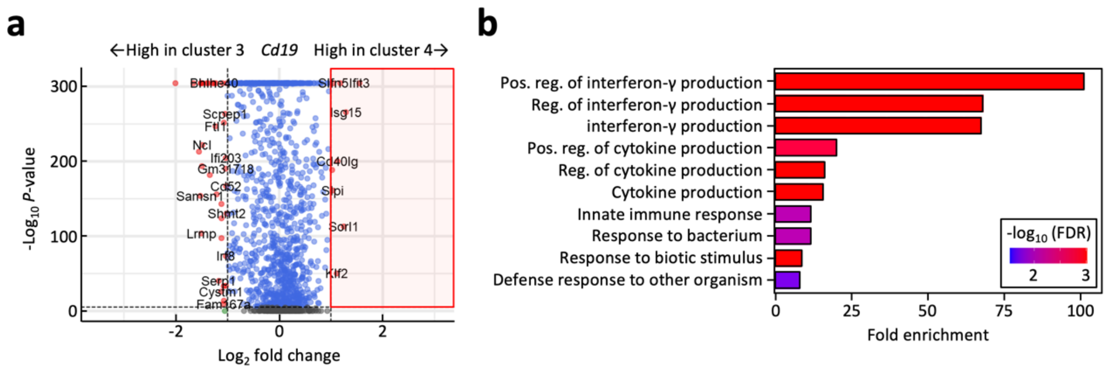

図 12. 4T1S を接種したマウスのリンパ節における B 細胞の特徴

(a) 4T1A および 4T1S 接種マウスの *Cd19*$^+$ 細胞における差次的発現遺伝子の火山プロットを示している。

(b) 4T1S 接種マウスの *Cd19*$^+$ 細胞における高発現遺伝子の遺伝子オントロジー解析結果を示している。

以前の研究で、二次リンパ組織における IFNγ 産生がワクチン効果に関与している可能性が示唆されたため (Omori et al. 2012)、IFNγ 産生との関与が示唆された B 細胞の変化に注目した。この単一細胞解析結果を他の実験で確認するために、4T1A または 4T1S をワクチン接種し、その 7 日後と 14 日後のリンパ節細胞における IFN ファミリーの発現を qPCR やフローサイトメトリーにより調べた。すると、IFNα や IFNβ ではなく、IFNγ のみが高レベルで発現しており (図 13a)、その発現量は 4T1A 接種マウスよりも 4T1S 接種マウスで高かった (図 13a)。これと一致して、4T1S 接種マウスでは $IFN\gamma^{+}$ リンパ節細胞の増加が観察された (図 13b)。そこで、4T1S 接種マウスのリンパ節内でどの細胞が IFNγ を分泌しているかを特定するために、$IFN\gamma^{+}$ 細胞における各免疫細胞の割合を調べたところ、$CD19^{+}$ B 細胞が IFNγ 産生の主な供給源であることが判明した (図 13c)。

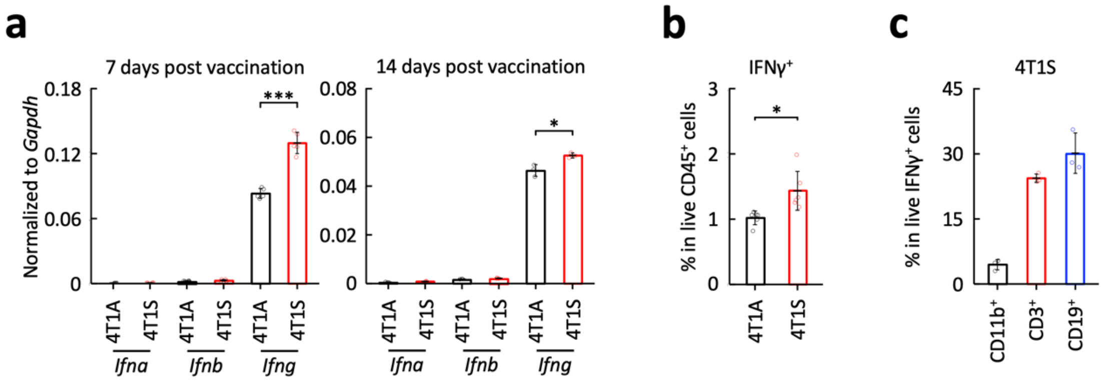

図 13. 4T1S を接種したマウスのリンパ節における IFNγ の発現

(a) 4T1A および 4T1S の接種から 7・14 日後のリンパ節細胞における *Ifna*、*Ifnb*、および *Ifng* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。

(b) 4T1A および 4T1S の接種から 14 日後のリンパ節中 $CD45^{+}$ 細胞における $IFN\gamma^{+}$ 細胞の割合を示している。

(c) 4T1S の接種から 14 日後のリンパ節中 $IFN\gamma^{+}$ 細胞における $CD11b^{+}$ 細胞、$CD3^{+}$ 細胞、および $CD19^{+}$ 細胞の割合を示している。

(統計: Student's *t*-test, *P<0.05, ***P<0.001)

IFNγ⁺CD19⁺ B 細胞は CD20 も発現していることを確認した (図 14a)。そこで、CD20 除去抗体を投与したマウスで 4T1S の WTCV による抗腫瘍効果を調べることで、IFNγ⁺CD19⁺ B 細胞のワクチン効果に対する寄与を検討した。CD20 除去抗体を投与すると 40 日以内に全ての腫瘍が発生し、最終的に全個体が死亡する結果となり、ワクチン効果は完全にキャンセルされた (図 14b)。

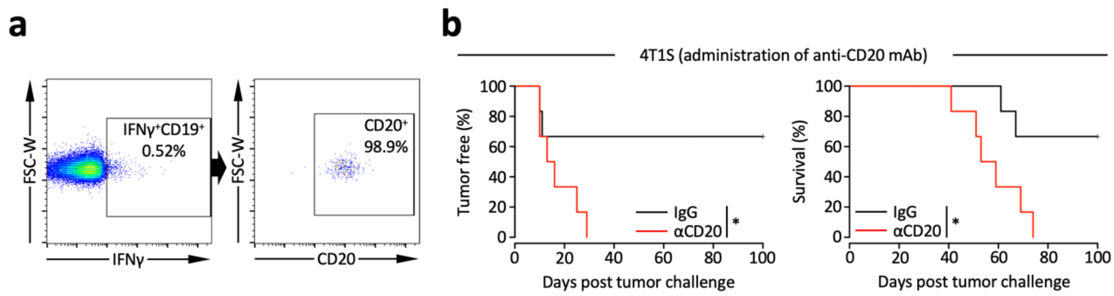

図 14. 4T1S による WTCV の効果における IFNγ 産生 B 細胞の影響

(a) 4T1S の接種マウスのリンパ節細胞における $CD19^+$ 細胞内の $IFN\gamma^+$ 細胞 (左) とそこから展開された $CD20^+$ 細胞 (右) の代表的なプロットを示している。

(b) 300 Gy の放射線照射後に 4T1S 細胞 (2×10^6 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、放射線をあてていない 4T1S 細胞 (5×10^4 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレンジ接種) した BALB/c マウスにおける無腫瘍および全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。ワクチン接種の七日前、一日前、七日後に抗 CD20 抗体 (250μg) を腹腔内投与した。
(統計: Log-rank test, *$P<0.05$)

最後に、Irf7 とその下流因子を導入したがん細胞のワクチン接種後にもリンパ節中の IFNγ 発現が上昇するかを確認したところ、Irf7/Ifi44/Usp18 導入 4T1A または CT26 接種群のリンパ節で IFNγ 発現が増加し (図 15a, c)、その発生源を除去することを目的とした CD20 除去抗体の投与により、腫瘍抑制効果が消失した (図 15b, d)。

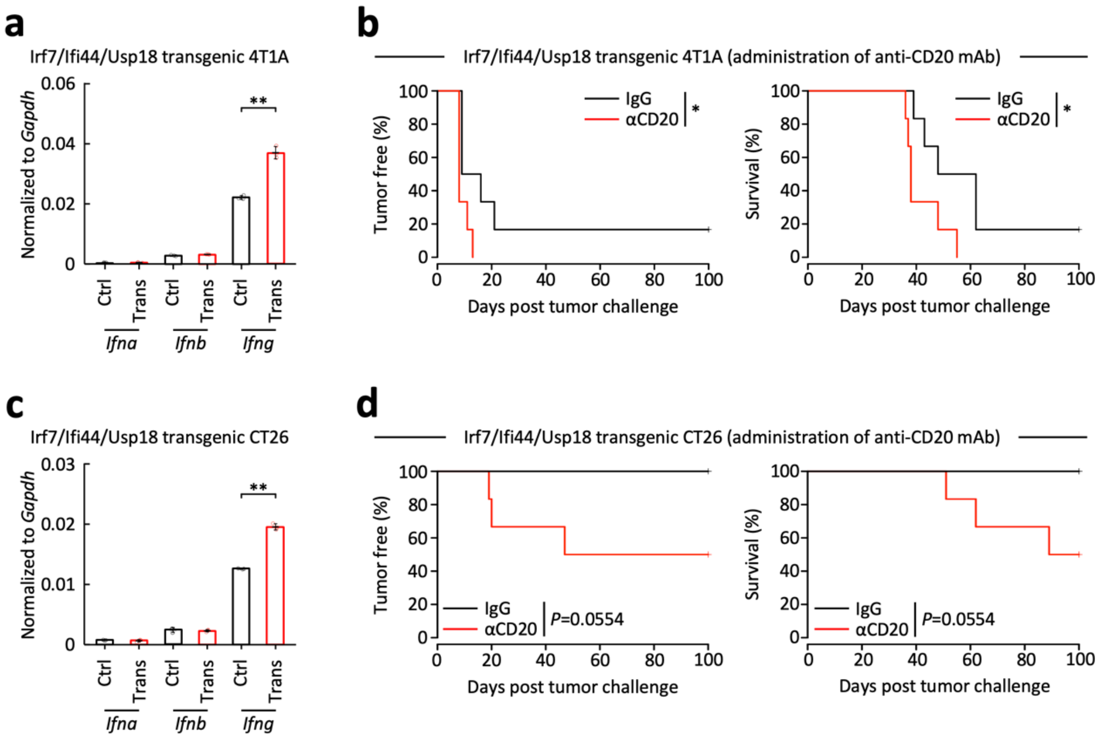

図 15. Irf7/Ifi44/Usp18 導入がん細胞による WTCV の効果における IFNγ 産生 B 細胞の影響

(a) コントロール (Ctrl) および Irf7/Ifi44/Usp18 導入 4T1A (Trans) 細胞を接種したマウスのリンパ節細胞における *Ifna*、*Ifnb*、および *Ifng* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。

(b) 300 Gy の放射線照射後に Irf7/Ifi44/Usp18 導入 4T1A 細胞 (2×10^6 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、放射線をあてていない野生型 4T1A 細胞 (5×10^4 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレンジ接種) した BALB/c マウスにおける無腫瘍および全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。ワクチン接種の七日前、一日前、七日後に抗 CD20 抗体 (250 μg) を腹腔内投与した。

(c) コントロール (Ctrl) および Irf7/Ifi44/Usp18 導入 CT26 (Trans) 細胞を接種したマウスのリンパ節細胞における *Ifna*、*Ifnb*、および *Ifng* 発現レベルを示している。遺伝子発現レベルは *Gapdh* で正規化した。

(d) 300 Gy の放射線照射後に Irf7/Ifi44/Usp18 導入 CT26 細胞 ($2×10^6$ 細胞) を右背部に皮下投与 (ワクチン接種) し、その二週間後に、放射線をあてていない野生型 CT26 細胞 ($5×10^4$ 細胞) を左乳腺に皮下投与 (チャレンジ接種) した BALB/c マウスにおける無腫瘍および全生存期間のカプランマイヤー曲線を示している。ワクチン接種の七日前、一日前、七日後に抗 CD20 抗体 (250μg) を腹腔内投与した。

(統計: (a, c) Student's *t*-test, (b, d) Log-rank test, *P<0.05, **P<0.01)

以上の結果をまとめると、ワクチン接種時に、がん細胞内の Irf7 およびその下流因子 (Ifi44 および Usp18) が B 細胞に直接または間接的に作用することで B 細胞由来の IFNγ 産生を増加させ、これらの細胞集団が T 細胞と協力しながら再発予防効果を発揮するというシナリオが示唆される。

考察

本研究では、Irf7 とその下流因子をがん細胞に導入することで免疫原性の低いがん細胞の特性を変える、すなわち免疫原性を高めるための新たな戦略を、免疫原性細胞死を検出するための代表的な手法であるワクチン接種実験により初めて実証した。Irf7・Ifi44・Usp18 を導入したがん細胞による WTCV は、チャレンジ接種したすべてのがん種で腫瘍発症リスクを劇的に低下させ、結果としてマウスの生存期間を延長させた。さらに、そのメカニズムとしては、B 細胞の II 型 IFN 応答によって媒介されているようであった。

Irf7・Ifi44・Usp18 は、病原体に対する自然免疫反応において免疫細胞内で重要な役割を果たす (McDonald et al. 2016; Coit et al. 2020)。それにも関わらず、これらはワクチン効果を有するがん細胞でも高発現し、最終的に B 細胞の II 型 IFN 応答を引き起こした。これまでに腫瘍細胞における自然免疫経路に着目した研究は数少なく、その一例として、マウスモデルを用いた実験で、腫瘍細胞での Irf7 発現が免疫系を活性化することで転移を抑制し生存期間を延長することが報告されている (Bidwell et al. 2012)。その他にも、ヒトの臨床データ解析において、乳がん組織における Irf7 制御遺伝子の発現レベルが高いと骨への転移が少ないことが示されている (Bidwell et al. 2012)。

このように Irf7 は IFN 誘導経路全体を制御することができるが、既報における Irf7 関連メカニズムのほとんどは、今回我々が示したデータとは異なり、I 型 IFN 経路を媒介する (Ning et al. 2011)。実際、Ifnra1 欠損マウスでは、腫瘍細胞で Irf7 発現が誘導されても転移が促進され、Irf7 が転移抑制作用を発揮できかった (Bidwell et al. 2012)。さらに、IFNα の投与により転移が抑制され、無転移生存期間が延長された (Bidwell et al. 2012)。従って、腫瘍細胞における Irf7 は、免疫細胞における I 型 IFN 応答を誘導し転移を抑制することができる。しかしながら、WTCV の Irf7 ががんの再発を抑制することを示す先行研究はこれまでない。

Irf7 は、免疫細胞における II 型 IFN 応答にも関与している (Castaldello et al. 2010)。具体的には、IFNα 導入がん細胞で免疫したマウスの脾臓細胞において、IFNγ の産生が増強されることが明らかにされた (Omori et al. 2012)。IFNγ は主に T 細胞やナチュラルキラー (NK) 細胞から産生されることがわかっている (Aldridge et al. 2021)。また、Irf7 は IFNγ を産生する抗原特異的 $CD8^+$ T 細胞の頻度を高めることができる (Castaldello et al. 2010)。一方で、我々のデータは、Irf7 軸が IFNγ 産生 B 細胞を増加させる可能性を示し、Irf7 に由来する抗腫瘍免疫の新しい動態を示唆している。

これまで数々の報告により、強力な抗腫瘍免疫の誘導における IFNγ 分泌の利点が実証されている (Abdel-Wahab et al. 1996; Abdel-Wahab et al. 1997)。IFNγ によって誘導

される免疫応答は、最初は局所的に現れ、最終的には腫瘍特異的な長期記憶免疫に至る (Gansbacher et al. 1990)。II 型 IFN を産生できる免疫細胞のうち、抗原提示細胞として機能する B 細胞は、Th1 細胞の活性化と IFNγ の産生を引き起こすことができる (Jackson et al. 2016)。これとは逆に、Th1 細胞は B 細胞の活性化とその IFNγ 産生を誘導することができる (Harris et al. 2005)。また、IFNγ を産生する B 細胞は、I 型免疫応答を増幅するだけでなく、B 細胞自身に I 型表現型を刷り込むことができる。その結果、IFNγ は、細菌やウイルスに対する免疫応答において B 細胞を介したポジティブフィードバックループを駆動する (Harris et al. 2005)。興味深いことに、B 細胞における IFNγ 受容体の欠失は、全身の自己免疫反応を消失させる (Jackson et al. 2016)。さらに、腫瘍免疫においても、B 細胞が Th1 細胞の影響を受けて IFNγ を産生する表現型に分極することが報告されている (Guo and Cui 2019)。また、IL-12 を腫瘍内に注入することで B 細胞を活性化させると、免疫グロブリンと IFNγ の産生が誘導され、頭頸部がん患者の良好な治療成績につながった (Van Herpen et al. 2008)。これらの報告は、IFNγ を産生する B 細胞が抗腫瘍免疫において多面的な役割を持ち、がんに対する自然免疫応答と適応免疫応答の両方に寄与することを示唆している。このような背景を考慮すると、IFNγ 産生 B 細胞の除去が WTCV の効果を阻害するという我々のデータは、十分に説得力があるように見える。

I 型および II 型 IFN が様々な疾患の調節因子であることを示す証拠が増えているにもかかわらず、WTCV の抗腫瘍免疫応答における Irf7 軸の役割はこれまで全く解明されていなかった。本研究により、Irf7 軸の三因子 (Irf7・Ifi44・Usp18) をがん細胞に導入することで、WTCV の再発予防効果を増強できることが明らかとなった。Irf7 軸がワクチン効果を高めるメカニズムとして、IFNγ を産生する T 細胞や NK 細胞ではなく B 細胞が抗腫瘍免疫応答を高めることがわかった。がん細胞の Irf7 が B 細胞を刺激しその後 B 細胞からの IFNγ 産生を増加させる仕組みなど不明な点も多いため、さらなる基礎研究が必要である。この治療戦略の研究開発が進めば、がんの再発を予防する新しい治療法が確立され、より多くの患者がその恩恵を受けられるようになるかもしれない。具体的な臨床戦略としては、手術で摘出した腫瘍組織からがん細胞を単離し、候補遺伝子の導入や放射線による不活性化を行なった後に、その自己改変がん細胞を WTCV として患者に接種することで、再発予防に繋げるアプローチが考えられる。

結論

本研究全体から得られた新知見

(第一章)

乳がんの中でも TNBC でのみ IL-34 が高発現しており、その発現が独立した予後不良因子となることが判明した。メカニズムとしては、IL-34 が TNBC 腫瘍内の MDSC を制御することで Treg の浸潤を促進し、同時に、血管新生が抑制されることで化学療法抵抗性の獲得に寄与することを初めて明らかにした。

(第二章)

TME において、エストロゲンが CTL に直接作用することでその増殖および活性化を抑制し、がん細胞の ER 非依存的にがんの成長を促進することを明らかにした。逆に、抗エストロゲン薬の投与により CTL の抑制が解除され、これにより ICI の治療効果が向上することを証明した。

(第三章)

Irf7 軸の三因子 (Irf7・Ifi44・Usp18) をがん細胞に導入することで低免疫原性細胞を高免疫原性細胞に転換し、WTCV による再発予防効果を増強できることを明らかにした。また、そのメカニズムとして、IFNγ を産生する B 細胞が抗腫瘍免疫応答を高めていることが判明した。

新知見の意義

(第一章)

腫瘍組織における IL-34 の発現を評価することは TNBC 患者の予後を予測するのに役立ち、IL-34 高発現患者に対しては IL-34 阻害治療を施すという新規がん個別化医療の可能性を明らかにした。

(第二章)

エストロゲンシグナルを阻害することで免疫療法に対する治療抵抗性が解除されたため、抗エストロゲン療法の追加は ICI の適用範囲をさらに広げ、ICI の奏功率を高める可能性を明らかにした。

(第三章)

手術で摘出した腫瘍組織から単離した自己がん細胞に Irf7・Ifi44・Usp18 を導入し放射線照射後に WTCV として患者に接種することで、がんの再発を予防する予防的治療として応用できる可能性を明らかにした。

今後展開されうる研究

(第一章)

免疫ヒト化患者腫瘍組織移植モデル (PDX) マウスを用いた解析が実施されることで、TNBC 患者における IL-34 標的治療の臨床での実現可能性および有用性を推定できる可能性がある。また、IL-34 標的治療後に各臓器の組織病理を評価することで治療の安全性および副反応の出現を確認できるかもしれない。

(第二章)

CTL 特異的 ER 欠損マウスを用いた解析が実施されることで、TME においてエストロゲンが CTL に及ぼす影響をより鮮明に捉えることができる可能性がある。また、実際に抗エストロゲン薬の投与を受けている患者の薬剤投与前後の血液細胞を比較することで、ヒト体内におけるエストロゲンと CTL の関係に関する知見を深められるかもしれない。

(第三章)

蛍光色素により標識した Irf7 を用いた解析が実施されることで、がん細胞内に導入した Irf7 がどのように B 細胞を刺激するのかを明らかにできる可能性がある。また、B 細胞による抗腫瘍免疫の向上を目指した B 細胞活性化療法の研究が活発になるかもしれない。

今後の課題

(第一章)

- 4T1 以外のマウス TNBC 細胞株を用いた実験で IL-34-MDSC 軸が成立しているかを検証すること。
- 腫瘍内の PMN-MDSC を増やすことによる負の側面を評価すること。
- より効果的な IL-34 阻害薬をドラッグリポジショニングにより探索または開発すること。

(第二章)

- 4T1 や CT26 以外のできる限り多くのマウスがん細胞株を用いた実験で抗エストロゲン薬がもたらす抗腫瘍効果の範囲を明らかにすること。
- 卵巣切除マウスに腫瘍を移植した後に抗エストロゲン療法を施すことで閉経前後での抗エストロゲン薬による抗腫瘍効果の差異を評価すること。

(第三章)

- 活性化させた B 細胞とがん細胞を試験管内で共培養することで、B 細胞がもたらす抗がん効果を評価すること。
- がん内の目的因子を標識した実験により、がん細胞内の因子がどのように B 細胞に渡るのかを明らかにすること。
- B 細胞内で IFNγ の発現レベルが上昇するメカニズムを明らかにすること。

謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 (日本学術振興会特別研究員奨励費, #22KJ0121) および JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム (#JPMJSP2119) の助成を受けたものである。

本研究の遂行にあたって、多大な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高橋將人教授、和田はるか准教授、Muhammad Baghdadi 元講師、大塚亮元助教、および韓ナヌミ元助教に心より御礼を申し上げます。最後に、実験材料の取得、実験技術のご指導、またはデータ解析についてご協力を頂きました北海道大学病院乳腺外科 押野智博医員、北海道大学大学院医学院分子生物学分野 橋本あり助教、独立行政法人労働者健康安全機構大阪ろうさい病院 今西清一医員、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、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申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Abdel-Wahab Z, Dar MM, Hester D, Vervaert C, Gangavalli R, Barber J, Darrow TL and Seigler HF (1996) Effect of Irradiation on Cytokine Production, MHC Antigen Expression, and Vaccine Potential of Interleukin-2 and Interferon-g Gene-Modified Melanoma Cells. Cell Immunol 171, 246-254.

Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D, Pickett N, Vervaert C, Barber JR, Jolly D and Seigler HF (1997) A phase I clinical trial of immunotherapy with interferon-γ gene-modified autologous melanoma cells: Monitoring the humoral immune response. Cancer 80, 401-412.

Abe H, Wada H, Baghdadi M, Nakanishi S, Usui Y, Tsuchikawa T, Shichinohe T, Hirano S and Seino KI (2016) Identification of a highly immunogenic mouse breast cancer sub cell line, 4T1-S. Hum Cell 29, 58-66.

Aikins ME, Xu C and Moon JJ (2020) Engineered Nanoparticles for Cancer Vaccination and Immunotherapy. Acc Chem Res 53, 2094-2105.

Aldridge DL, Phan AT, de Waal Malefyt R and Hunter CA (2021) Limited Impact of the Inhibitory Receptor TIGIT on NK and T Cell Responses during Toxoplasma gondii Infection. Immunohorizons 5, 384-394.

Al-Tameemi M, Chaplain M and D'onofrio A (2012) Evasion of tumours from the control of the immune system: consequences of brief encounters. Biol Direct 7, 31.

Anestakis D, Petanidis S, Domvri K, Tsavlis D, Zarogoulidis P and Katopodi T (2020) Carboplatin chemoresistance is associated with CD11b+/Ly6C+ myeloid release and upregulation of TIGIT and LAG3/CD160 exhausted T cells. Mol Immunol 118, 99-109.

Backes FJ, Walker CJ, Goodfellow PJ, Hade EM, Agarwal G, Mutch D, Cohn DE, Suarez AA (2016) Estrogen receptor-alpha as a predictive biomarker in endometrioid endometrial cancer. Gynecol Oncol 141, 312-317.

Baghdadi M, Wada H, Nakanishi S, Abe H, Han N, Putra WE, 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, Umeyama Y, Hama N, Kobayashi T, Han N, Wada H and Seino KI (2018) 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 (2018) High co-expression of IL-34 and M-CSF correlates with tumor progression and poor survival in lung cancers. Sci Rep 8, 418.

Balkwill FR, Capasso M and Hagemann T (2012) The tumor microenvironment at a glance. J Cell Sci 125, 5591-5596.

Bidwell BN, Slaney CY, Withana NP, Forster S, Cao Y, Loi S, Andrews D, Mikeska T, Mangan NE, Samarajiwa SA, et al. (2012) Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. Nat Med 18, 1224-1231.

Bogunovic D, Byun M, Durfee LA, Abhyankar A, Sanal O, Mansouri D, Salem S, Radovanovic I, Grant AV, Adimi P, et al (2012) Mycobacterial disease and impaired IFN-γ immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. Science 337, 1684-1688.

Boyman O and Sprent J (2012) The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. Nat Rev Immunol 12, 180-190.

Braun L, Mietzsch F, Seibold P, Schneeweiss A, Schirmacher P, Chang-Claude J, Sinn HP and Aulmann S (2013) Intrinsic breast cancer subtypes defined by estrogen receptor signalling - Prognostic relevance of progesterone receptor loss. Mod Pathol 26, 1161-1171.

Castaldello A, Sgarbanti M, Marsili G, Brocca-Cofano E, Remoli AL, Caputo A and Battistini A (2010) Interferon regulatory factor-1 acts as a powerful adjuvant in tat DNA based vaccination. J Cell Physiol 224, 702-709.

Cha YJ and Koo JS (2020) Role of Tumor-Associated Myeloid Cells in Breast Cancer. Cells 9, 1785.

Chakraborty B, Byemerwa J, Shepherd J, Haines CN, Baldi R, Gong W, Liu W, Mukherjee D, Artham S, Lim F, et al (2021) Inhibition of estrogen signaling in myeloid cells increases tumor immunity in melanoma. J Clin Invest 131, e151347.

Chen C, Gong X, Yang X, Shang X, Du Q, Liao Q, Xie R, Chen Y and Xu J (2019) The roles of estrogen and estrogen receptors in gastrointestinal disease. Oncol Lett 18, 5673-5680.

Cho JH, Boyman O, Kim HO, Hahm B, Rubinstein MP, Ramsey C, Kim DM, Surh CD and Sprent J (2007) An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2. J Exp Med 204, 1787-1801.

Chuffa LG de A, Lupi-Júnior LA, Costa AB, Amorim JP de A and Seiva FRF (2017) The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers. Steroids 118, 93-108.

Coit P, Ortiz-Fernandez L, Lewis EE, McCune WJ, Maksimowicz-McKinnon K and Sawalha AH (2020) A longitudinal and transancestral analysis of DNA methylation patterns and disease activity in lupus patients. JCI Insight 5, e143654.

Conforti F, Pala L, Bagnardi V, De Pas T, Martinetti M, Viale G, Gelber RD and Goldhirsch A (2018) Cancer immunotherapy efficacy and patients' sex: a systematic review and meta-analysis. Lancet Oncol 19, 737-746.

Cunningham M and Gilkeson G (2011) Estrogen Receptors in Immunity and Autoimmunity. Clin Rev Allergy Immunol 40, 66-73.

Dai Z, Konieczny BT and Lakkis FG (2000) The Dual Role of IL-2 in the Generation and Maintenance of CD8+ Memory T Cells. J Immunol 165, 3031-3036.

Dass CR (2004) Tumour angiogenesis, vascular biology and enhanced drug delivery. J Drug Target 12, 245-255.

Deepak KGK, Vempati R, Nagaraju GP, Dasari VR, Nagini S, Rao DN and Malla RR (2020) Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. Pharmacol Res 153, 104683.

Feau S, Arens R, Togher S and Schoenberger SP (2011) Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8+ memory T cells. Nat Immunol 12, 908-913.

Finke J, Ko J, Rini B, Rayman P, Ireland J and Cohen P (2011) MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy. Int Immunopharmacol 11, 856-861.

Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S and Bronte V (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat Rev Immunol 12, 253-268.

Gansbacher B, Bannerji R, Daniels B, Zier K, Cronin K and Gilboa E (1990) Retroviral Vector-mediated 7-Interferon Gene Transfer into Tumor Cells Generates Potent and Long Lasting Antitumor Immunity1. Cancer Res 50, 7820-7825.

Golden EB and Apetoh L (2015) Radiotherapy and Immunogenic Cell Death. Semin Radiat Oncol 25, 11-17.

Gompel A (2019) Hormone and breast cancer. Presse Med 48, 1085-1091.

Grumbach MM and Auchus RJ (1999) Estrogen: Consequences and implications of human mutations in synthesis and action. J Clin Endocrinol Metab 84, 4677-4694.

Guan X, Polesso F, Wang C, Sehrawat A, Hawkins RM, Murray SE, Thomas GV, Caruso B, Thompson RF, Wood MA, et al (2022) Androgen receptor activity in T cells limits checkpoint blockade efficacy. Nature 606, 791-796.

Guo FF and Cui JW (2019) The role of tumor-infiltrating B cells in tumor immunity. J Oncol 2019, 2592419.

Haghmorad D, Amini AA, Mahmoudi MB, Rastin M, Hosseini M and Mahmoudi M (2014) Pregnancy level of estrogen attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in both ovariectomized and pregnant C57BL/6 mice through expansion of Treg and Th2 cells. J Neuroimmunol 277, 85-95.

Hama N, Kobayashi T, Han N, Kitagawa F, Kajihara N, Otsuka R, Wada H, Lee HK, Rhee H, Hasegawa Y, et al (2020) Interleukin-34 Limits the Therapeutic Effects of Immune Checkpoint Blockade. iScience 23, 101584.

Hangai S, Kawamura T, Kimura Y, Chang CY, Hibino S, Yamamoto D, Nakai Y, Tateishi R, Oshima M, Oshima H, et al (2021) Orchestration of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment by ubiquitous cellular protein TCTP released by tumor cells. Nat Immunol 22, 947-957.

Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL and Lund FE (2005) Regulation of IFN-γ Production by B Effector 1 Cells: Essential Roles for T-bet and the IFN-γ Receptor. J Immunol 174, 6781-6790.

Hege KM, Jooss K and Pardoll D (2006) GM-CSF gene-modifed cancer cell immunotherapies: Of mice and men. Int Rev Immunol 25, 321-352.

van Herpen CM, van der Voort R, van der Laak JA, Klasen IS, de Graaf AO, van Kempen LC, de Vries IJ, Boer TD, Dolstra H, Torensma R, et al (2008) Intratumoral rhIL-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients induces B cell activation. Int J Cancer 123, 2354-2361.

Höchst B, Mikulec J, Baccega T, Metzger C, Welz M, Peusquens J, Tacke F, Knolle P, Kurts C, Diehl L, et al (2015) Differential induction of Ly6G and Ly6C positive myeloid derived suppressor cells in chronic kidney and liver inflammation and fibrosis. PLoS One 10, e0119662.

Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB and Johnston PG (2013) Cancer drug resistance: An evolving paradigm. Nat Rev Cancer 13, 714-726.

Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K and Yuasa S (1990) Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: Associations and interactions in an international case-control study. Int J Cancer 46, 796-800.

Huber ML, Haynes L, Parker C and Iversen P (2012) Interdisciplinary Critique of Sipuleucel-T as immunotherapy in castration-resistant prostate cancer. J Natl Cancer Inst 104, 273-279.

Jackson SW, Jacobs HM, Arkatkar T, Dam EM, Scharping NE, Kolhatkar NS, Hou B, Buckner JH and Rawlings DJ (2016) B cell IFN-γ receptor signaling promotes autoimmune germinal centers via cell-intrinsic induction of BCL-6. J Exp Med 213, 733-750.

Johnston JA, Bacon CM, Finbloom DS, Rees RC, Kaplan D, Shibuya K, Ortaldo JR, Gupta S, Chen YQ, Giri JD, et al (1995) Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. Proc Natl Acad Sci USA 92, 8705-8709.

Joshi VB, Geary SM, Gross BP, Wongrakpanich A, Norian LA and Salem AK (2014) Tumor lysate-loaded biodegradable microparticles as cancer vaccines. Expert Rev Vaccines 13, 9-15.

Kajihara N, Kitagawa F, Kobayashi T, Wada H, Otsuka R and Seino KI (2020) Interleukin-34 contributes to poor prognosis in triple-negative breast cancer. Breast Cancer 27, 1198-1204.

Kajihara N, Kobayashi T, Otsuka R, Nio-Kobayashi J, Oshino T, Takahashi M, Imanishi S, Hashimoto A, Wada H and Seino KI (2023) Tumor-derived interleukin-34 creates an immunosuppressive and chemoresistant tumor microenvironment by modulating myeloid-derived suppressor cells in triple-negative breast cancer. Cancer Immunol Immunother 72, 851-864.

Karin M, Cao Y, Greten FR and Li ZW (2002) NF-κB in cancer: From innocent bystander to major culprit. Nat Rev Cancer 2, 301-310.

Keenan BP and Jaffee EM (2012) Whole cell vaccines-Past progress and future strategies. Semin Oncol 39, 276-286.

Keenan TE and Tolaney SM (2020) Role of immunotherapy in triple-negative breast cancer. J Natl Compr Canc Netw 18, 479-489.

Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, Apetoh L, Aranda F, Barnaba V, Bloy N, et al (2014) Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. Oncoimmunology 3, e955691.

Kovats S (2015) Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. Cell Immunol 294, 63-69.

Kumar V, Patel S, Tcyganov E and Gabrilovich DI (2016) The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. Trends Immunol 37, 208-220.

Lin CY, Ström A, Vega VB, Kong SL, Yeo AL, Thomsen JS, Chan WC, Doray B, Bangarusamy DK, Ramasamy A, et al (2004) Discovery of estrogen receptor alpha target genes and response elements in breast tumor cells. Genome Biol 5, R66.

Liu J, Fu M, Wang M, Wan D, Wei Y and Wei X (2022) Cancer vaccines as promising immunotherapeutics: platforms and current progress. J Hematol Oncol 15, 28.

Liu R, Yang F, Yin JY, Liu YZ, Zhang W and Zhou HH (2021) Influence of Tumor Immune Infiltration on Immune Checkpoint Inhibitor Therapeutic Efficacy: A Computational Retrospective Study. Front Immunol 12, 685370.

Liu Y, Qiu N, Shen L, Liu Q, Zhang J, Cheng YY, Lee KH and Huang L (2020) Nanocarrier-mediated immunogenic chemotherapy for triple negative breast cancer. J Control Release 323, 431-441.

Lollini PL, Cavallo F, Nanni P and Quaglino E (2015) The promise of preventive cancer vaccines. Vaccines 3, 467-489.

Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, Francescato S, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, Zanon A, Rossi CR, Nitti D, Bronte V, et al (2009) IL4Rα+ Myeloid-Derived Suppressor Cell Expansion in Cancer Patients. J Immunol 182, 6562-6568.

Márquez-Garbán DC, Deng G, Comin-Anduix B, Garcia AJ, Xing Y, Chen HW, Cheung-Lau G, Hamilton N, Jung ME and Pietras RJ (2019) Antiestrogens in combination with immune checkpoint inhibitors in breast cancer immunotherapy. J Steroid Biochem Mol Biol 193, 105415.

McDonald JU, Kaforou M, Clare S, Hale C, Ivanova M, Huntley D, Dorner M, Wright VJ, Levin M, Martinon-Torres F, et al (2016) A Simple Screening Approach To Prioritize Genes for Functional Analysis Identifies a Role for Interferon Regulatory Factor 7 in the Control of Respiratory Syncytial Virus Disease. mSystems 1, e00051-16.

Mitchell DM, Ravkov EV and Williams MA (2010) Distinct Roles for IL-2 and IL-15 in the Differentiation and Survival of CD8+ Effector and Memory T Cells. J Immunol 184, 6719-6730.

Morgan DAL, Refalo NA and Cheung KL (2011) Strength of ER-positivity in relation to survival in ER-positive breast cancer treated by adjuvant tamoxifen as sole systemic therapy. Breast 20, 215-219.

Muragaki Y, Maruyama T, Iseki H, Tanaka M, Shinohara C, Takakura K, Tsuboi K, Yamamoto T, Matsumura A, Matsutani M, et al (2011) Phase I/IIa trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine concomitant with fractionated radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma - Clinical article. J Neurosurg 115, 248-55.

Nakajima S, Mimura K, Saito K, Thar Min AK, Endo E, Yamada L, Kase K, Yamauchi N, Matsumoto T, Nakano H, et al (2021) Neoadjuvant chemotherapy induces IL34 signaling and promotes chemoresistance via tumor-associated macrophage polarization in esophageal squamous cell carcinoma. Mol Cancer Res 19, 1085-1095.

Nakamura N, Miyazaki K, Kitano Y, Fujisaki S and Okamura H (1993) Suppression of cytotoxic T-lymphocyte activity during human pregnancy. J Reprod Immunol 23, 119-130.

Nedeljković M and Damjanović A (2019) Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. Cells 8, 957.

Ning S, Pagano JS and Barber GN (2011) IRF7: Activation, regulation, modification and function. Genes Immun 12, 399-414.

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

Omori R, Eguchi J, Hiroishi K, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Kajiwara A, Ito T, Kogo M, et al (2012) Effects of interferon-α-transduced tumor cell vaccines and blockade of programmed cell death-1 on the growth of established tumors. Cancer Gene Ther 19, 637-643.

Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 12, 252-264.

Perez CA, Fu A, Onishko H, Hallahan DE and Geng L (2009) Radiation induces an antitumour immune response to mouse melanoma. Int J Radiat Biol 85, 1126-1136.

Ross SH and Cantrell DA (2018) Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. Annu Rev Immunol 36, 411-433.

Ruffell B and Coussens LM (2015) Macrophages and therapeutic resistance in cancer. Cancer Cell 27, 462-472.

Sade-Feldman M, Yizhak K, Bjorgaard SL, Ray JP, de Boer CG, Jenkins RW, Lieb DJ, Chen JH, Frederick DT, Barzily-Rokni M, et al (2018) Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. Cell 175, 998-1013.e20.

Salem ML (2004) Estrogen, a double-edged sword: Modulation of TH1- and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 3, 97-104.

Sheikhi A, Jafarzadeh A, Kokhaei P and Hojjat-Farsangi M (2016) Whole Tumor Cell Vaccine Adjuvants: Comparing IL-12 to IL-2 and IL-15. Iran J Immunol 13, 148-166.

Soiffer RJ, Kooshesh KA and Ho V (2021) Whole tumor cell vaccines engineered to secrete GM-CSF (GVAX). ImmunoMedicine 1, e1025.

Sun Z, Ren Z, Yang K, Liu Z, Cao S, Deng S, Xu L, Liang Y, Guo J, Bian Y, et al (2019) A next-generation tumor-targeting IL-2 preferentially promotes tumor-infiltrating CD8+ T-cell response and effective tumor control. Nat Commun 10, 3874.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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.

Tie Y, Tang F, Wei YQ and Wei XW (2022) Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. J Hematol Oncol 15, 61.

Tohyama S, Ogino Y, Lange A, Myosho T, Kobayashi T, Hirano Y, Yamada G, Sato T, Tatarazako N, Tyler CR, et al (2017) Establishment of estrogen receptor 1 (ESR1)-knockout medaka: ESR1 is dispensable for sexual development and reproduction in medaka, Oryzias latipes. Dev Growth Differ 59, 552-561.

Veglia F, Sanseviero E and Gabrilovich DI (2021) Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. Nat Rev Immunol 21, 485-498.

Vetsika E, Koukos A and Kotsakis A (2019) Myeloid-Derived Suppressor Cells: Major Figures that Shape the Immunosuppressive and Angiogenic Network in Cancer. Cells 8, 1647.

Wang F, Gao J, Wang S, Jiang J, Ye Y, Ou J, Liu S, Peng F and Tu Y (2021) Near infrared light activation of an injectable whole-cell cancer vaccine for cancer immunoprophylaxis and immunotherapy. Biomater Sci 9, 3945-3953.

Wang T, Jin J, Qian C, Lou J, Lin J, Xu A, Xia K, Jin L, Liu B, Tao H, et al (2021) Estrogen/ER in anti-tumor immunity regulation to tumor cell and tumor microenvironment. Cancer Cell Int 21, 295.

Wilson TR, Longley DB and Johnston PG (2006) Chemoresistance in solid tumours. Ann Oncol 17 (Suppl 10), 315-324.

Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, Matrisian LM, Carbone DP and Lin PC (2004) Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. Cancer Cell 6, 409-421.

Yang Y, Li C, Liu T, Dai X and Bazhin AV (2020) Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumors: From Mechanisms to Antigen Specificity and Microenvironmental Regulation. Front Immunol 11, 1371.

Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G and Muyan M (2017) Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. Reprod Med Biol 16, 4-20.

Zattarin E, Leporati R, Ligorio F, Lobefaro R, Vingiani A, Pruneri G and Vernieri C (2020) Hormone Receptor Loss in Breast Cancer: Molecular Mechanisms, Clinical Settings, and Therapeutic Implications. Cells 9, 2644.

Zhao X and Subramanian S (2017) Intrinsic resistance of solid tumors to immune checkpoint blockade therapy. Cancer Res 77, 817-822.

Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS and Kalluri R (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. Nature 527, 525-530.

Zins K, Heller G, Mayerhofer M and Schreiber M (2018) Differential prognostic impact of interleukin-34 mRNA expression and infiltrating immune cell composition in intrinsic breast cancer subtypes. Oncotarget 9, 23126-23148.

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)