

論文の内容の要旨

氏名：向井裕紀

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：腫瘍微小環境を介した免疫抑制機構の解明

背景・目的

我が国において、がんは死因の中で割合が最も高く、年々増加傾向にある。近年開発された免疫チェックポイント阻害剤等を用いた免疫療法は、がんの治療成績を飛躍的に向上させている。一方、免疫療法に効果を示さない不応答性の患者やがん種が一定数存在しており、腫瘍内における免疫システムの更なる理解が必要とされている。

固形がんにおいて、その腫瘍の形成・発達にはがん細胞だけでなく、周囲の種々の免疫細胞や血管内皮細胞、線維芽細胞といった正常な細胞が関与していることが知られている。これらの腫瘍組織に混在する正常細胞やその細胞由来の代謝産物を総称して“腫瘍微小環境”と呼んでおり、様々なメカニズムにより抗腫瘍免疫を抑制する環境を構築することが知られている。腫瘍微小環境を構築する代表的な免疫細胞として、自然免疫系の細胞である腫瘍関連マクロファージ（TAM）と腫瘍関連好中球（TAN）が知られている。例えば、TAMは腫瘍において血管新生を促進したり細胞傷害性T細胞の機能を抑制したりする。一方、TANは好中球細胞外トラップ（NETs）と呼ばれる生体防御応答に伴って、がん細胞の転移に関与している事が知られている。がん細胞はこうした微小環境に局在する免疫細胞をコントロール・利用し、長命且つ恒常的に増殖を繰り返している。しかし、がん細胞が、どちらの細胞を優位的に浸潤させているか、あるいはどのようにして浸潤してきたTAMやTANをコントロール・利用しているのかについての詳細な分子機構については明らかになっていない。

細胞死は、生体の発生・形成、そして恒常性維持のために必須の生理的応答である。腫瘍において、細胞傷害がもたらす外的要因によって起こるネクローシスが、腫瘍微小環境を制御して抗腫瘍免疫を抑制することが報告されている。一方、綿密に制御されたプログラム細胞死（＝アポトーシス）も腫瘍内で一定頻度起きていることが知られているが、その生理的意義については明らかになっていない。従って、本研究では、がん細胞が腫瘍内で起こすアポトーシスの生理学的意義について、特に腫瘍微小環境に浸潤している免疫細胞の構成および機能に与える影響について解明することを目的とした。

1 異なるがん細胞株による腫瘍微小環境の特徴

腫瘍微小環境の構成が、がん細胞株の種類によってどのように異なるかを検討するため、BALB/cマウス由来の乳がん細胞株である4T1細胞と大腸がん細胞株であるCT26細胞をそれぞれ皮下に移植するモデルを用いて腫瘍微小環境に浸潤している自然免疫系細胞を解析した。

移植から21日後に腫瘍を単離し、フローサイトメーターを用いてTAMおよびTANの割合を比較した。その結果、CD11b⁺ Ly6G⁺で定義されるTAN、およびCD11b⁺ Ly6C⁺ MHC-II⁺のTAMは、4T1

細胞で誘導した腫瘍内で多く浸潤していた。中でも、TANはTAMやCD11b⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁺の細胞である単球型-骨髄由来抑制細胞(M-MDSC)よりもはるかに多量に浸潤しており、4T1細胞で誘導した腫瘍の微小環境を構築する主要な免疫細胞であることが明らかとなった。腫瘍内に浸潤しているTANの特徴を比較したところ、CT26に対し4T1腫瘍において高い頻度でNETsが起きていることが明らかになった。次に、腫瘍微小環境とがん細胞の生理的細胞死の関係性を検討するため組織切片を用意し、アポトーシスを検出するcleaved-Caspase-3およびTUNELでそれぞれ染色したところ、4T1腫瘍ではCT26に対し高い頻度でアポトーシスが起きていることが観察された。以上の結果から、乳がん細胞株4T1細胞で誘導した腫瘍は、高い頻度でアポトーシスを起こしながら、多量の好中球を浸潤させ、NETsを引き起こすという特徴的な微小環境を構築していることが明らかとなった。

2 がん細胞のパネキシン1 (Panx1) が腫瘍微小環境に与える影響

正常細胞がアポトーシスを起こす際に、カスパーゼ依存的に活性化されるイオンチャネルPanx1を介して代謝産物を放出することが報告されている。これらの代謝産物が、マクロファージなどの免疫細胞に作用し、細胞死に対する免疫反応を抑制すると考えられている。このことから、一部の腫瘍においても、積極的にアポトーシスを誘導することにより、Panx1依存的に放出される代謝産物を利用して、腫瘍微小環境における抗腫瘍活性を抑制しているのではないかと仮説を立てた。本仮説を検証するため、ゲノム編集技術を用いてPanx1欠損4T1細胞株を樹立し、腫瘍微小環境に与える影響について検討した。

Panx1欠損4T1細胞株は*in vitro*での増殖は野生型の4T1細胞株と比較して同等のレベルであったが、*in vivo*での皮下移植モデルでは、有意に腫瘍体積と腫瘍重量の抑制が観察された。この時の腫瘍微小環境を解析したところ、同程度のTANの浸潤が認められた一方、NETsの頻度はPanx1欠損4T1細胞株で誘導した腫瘍内において著しく低下していた。NETsの誘導に必須の酵素PAD4の遺伝子欠損マウスに野生型の4T1を移植するモデルにおいては、好中球の細胞傷害活性に関わる遺伝子の発現が増加していることおよび腫瘍重量の低下が認められたことから、4T1細胞株は、Panx1を介してアポトーシス依存的代謝産物を産生することにより、浸潤してきた好中球にNETsを誘導することで好中球の細胞傷害すなわち抗腫瘍免疫を抑制していることが推察された。

3 Panx1を介した代謝産物が腫瘍微小環境へ与える影響

正常細胞がアポトーシスを起こした際に、Panx1を介して放出される炎症反応を抑制する代謝産物の一つに、ポリアミンの1種であるスペルミジンが報告されている。4T1細胞のアポトーシスに由来するPanx1を介したスペルミジンがTANの抗腫瘍活性の低下に関わるNETsの形成を促進している因子だと仮定し、スペルミジンが腫瘍微小環境の構築およびNETs形成に与える影響について検討した。

骨髄由来好中球を4T1細胞の培養上清で刺激することによるNETsの誘導実験を行ったところ、スペルミジン産生量が低下しているPanx1欠損4T1細胞の培養上清およびアポトーシス阻害剤を添加した野生型4T1細胞の培養上清では、NETsの誘導能が低下していた。加えて、試薬グレードのスペル

ミジンで骨髄由来好中球を刺激すると、無刺激と比較して高い頻度で NETs が誘導されていた。生体内でのスペルミジンの合成を阻害するため、細胞内のスペルミジンの濃度を低下させることが知られているジフルオロメチルオルニチン (DFMO) をマウスに摂取させたところ、腫瘍内の NETs の抑制と腫瘍体積の減少が観察された。

以上の結果から、アポトーシス依存的に Panx1 を介して産生されるスペルミジンが、TAN の NETs を誘導することにより、抗腫瘍免疫を抑制するための微小環境を構築していると考えられた。

4 総括

本研究では、一部のがん細胞がアポトーシスを起こす際に、Panx1 を介してスペルミジンを分泌し、TAN の NETs を誘導することにより好中球の細胞傷害活性を低下させることを明らかにした。本研究は、がん細胞が自身に有利な環境を構築するため、故意にアポトーシスを起こしていることおよびそのメカニズムは正常細胞と同様であることを明らかにしており、がん細胞の新たな免疫抑制機構の一端を解明することに成功した。4T1 細胞は免疫チェックポイント阻害剤に対して不応答性の細胞株であることが知られている。従って、本研究で明らかになった新たな免疫抑制機構が、チェックポイント阻害剤不応答のがん患者に対する、新たな治療標的となる可能性が期待できる。