

# 腫瘍微小環境を介した 免疫抑制機構の解明

日本大学生物資源科学研究科応用生命科学専攻

博士後期課程

向井裕紀

2022

## 目次

緒言	・ ・ ・ 1
第一章 大腸がんおよび乳がん細胞株由来腫瘍微小環境の特徴	・ ・ ・ 10
第一節 CT-26 および 4T1 腫瘍に浸潤する ミエロイド系細胞の解析	・ ・ ・ 11
第二節 CT-26 および 4T1 腫瘍における NETsおよびアポトーシス頻度の比較	・ ・ ・ 21
第二章 アポトーシス依存的チャネルPanx1の 腫瘍微小環境形成および腫瘍成長に対する作用	・ ・ ・ 30
第一節 各がん細胞株におけるPanx1の mRNA 発現の比較	・ ・ ・ 31
第二節 Panx1欠損型4T1細胞株の樹立	・ ・ ・ 38
第三節 がん細胞のPanx1が 腫瘍増殖およびNETs形成に与える影響	・ ・ ・ 51
第四節 NETs形成が腫瘍の成長に与える影響 ( Padi4 欠損マウスを用いた解析 )	・ ・ ・ 62

第三章	Panx1を介して放出される NETs 誘導因子の解析	・ ・ ・	72
第一節	Panx1由来代謝産物が <i>in vitro</i> での NETs 形成に与える影響	・ ・ ・	73
第二節	スペルミジンが <i>in vivo</i> での 腫瘍増殖および NETs 形成に与える影響	・ ・ ・	84
総合討論		・ ・ ・	91
引用文献		・ ・ ・	97
謝辞		・ ・ ・	101

## 緒 言

2020 年度の死亡者は 137 万 2648 人で、このうち 27.6%にあたる 37 万 8385 人が悪性新生物<腫瘍>すなわちがんによって死亡している(2020 年度、人口動態統計：厚生労働省)。がんの罹患者数は年々増加傾向にあり、過去 30 年以上にわたり死亡原因の第一位となっている。

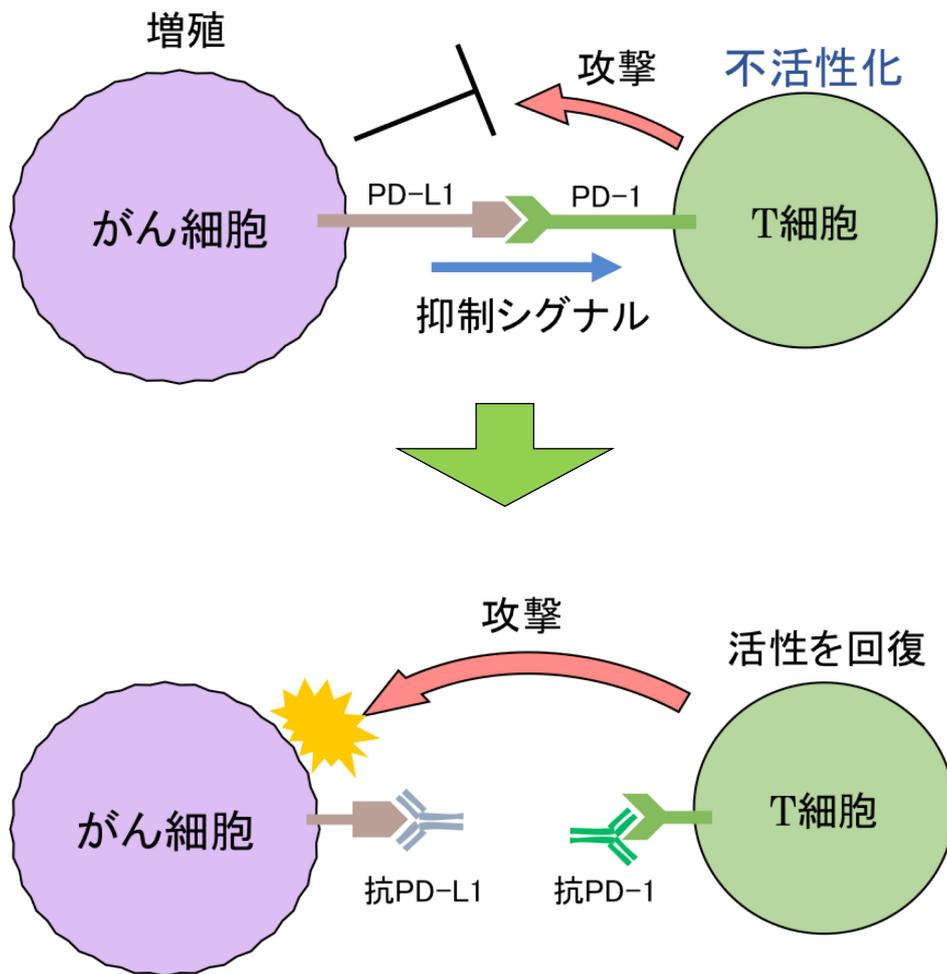
ヒトの体を構成する細胞は約 38 兆個程度と言われており、正常な細胞は一定の秩序に従い、必要に応じて分化・増殖する。がんは、正常な細胞の遺伝子突然変異によって細胞が無秩序・無制限に増殖することによって腫瘍となり、組織の恒常性を破綻することによって発症する。変異を起こすことによりがんを誘発あるいは抑制する遺伝子はがん関連遺伝子と呼ばれ、前者が「がん遺伝子」、後者が「がん抑制遺伝子」である。「がん遺伝子」は主に細胞増殖に関わる遺伝子であり、「がん抑制遺伝子」は細胞増殖の抑制、細胞死の誘導、DNA の修復といった機能を持つ遺伝子である。遺伝子の突然変異は、個人の遺伝的要因、生活習慣や細菌・ウイルス感染などの環境要因に起因していることが知られている。また、遺伝子の突然変異だけでなく、DNA のメチル化、すなわちエピジェネティックな変異によってがん細胞が生じることも知られている。がんの発症は、一つの遺伝子変異だけで起こるわけではなく、これらの要因が複数かつ複雑に絡み合っていると考えられている。

これまでのがん治療は、がん組織そのものを摘出する外科療法、抗がん剤の投与によってがんの増殖を抑制する化学療法、患部に放射線を当て、がん細胞の DNA を損傷させることによってがん細胞の細胞死を誘導する放射線療法の 3 つが主力であった。しかしこれらの治療法は正常な細胞にも影響を与えてしまう副作用や、再発を防ぐのが難しいといった課題がある。

近年、抗 PD-1(Programmed death 1)/PD-L1(Programmed death ligand 1)

抗体をはじめとするチェックポイント阻害剤を使用したがん免疫療法が開発された。がん細胞となり得る変異細胞は一日に数千個発生すると言われているが、免疫システムが異物と認識し、その都度排除している。細胞傷害性T細胞（CTL）は、がん細胞の抗原を認識し、がん細胞を攻撃している。これによって細胞死が誘導されたがん細胞からはがん抗原が放出されるため、一連の免疫応答が繰り返される。これはがん免疫サイクルと呼ばれている

（1）。しかし、がん細胞が発現するPD-L1がCTLのPD-1に結合すると免疫抑制シグナルが送られ、CTLの細胞傷害活性が抑制され、がん細胞は攻撃から逃れることができる（図A）。このようながんの免疫逃避の仕組みを免疫チェックポイントという。抗PD-1/PD-L1抗体はPD-1・PD-L1結合、すなわちチェックポイント分子の結合阻害によってCTLの細胞傷害活性を回復させる効果を持った抗体医薬である。こうした免疫チェックポイント阻害剤を使用した免疫療法はその名の通り免疫本来の力を利用することから、抗癌剤を使用した化学療法よりも副作用が少ないと期待されている。しかしながら、抗PD-1/PD-L1抗体を用いたがん免疫療法の対象となるがん種はまだ限定されている（2）。また、がん細胞側のPD-L1の発現強度に効果が依存するなどの問題点が存在しており、異なる免疫システムを介した治療法の開発が必要とされている。



図A がんの免疫逃避機構と免疫チェックポイント阻害による免疫療法  
 がんの免疫逃避をもたらす代表的なチェックポイントとして、T細胞の  
 PD-1 とがん細胞のPD-L1の結合があり、この結合によりT細胞の抗腫瘍応  
 答が抑制される。がん免疫療法では、この結合を阻害する各抗体によってT  
 細胞の活性を回復させることができる。

腫瘍中にはがん細胞だけでなく、正常細胞である血管内皮細胞、線維芽細胞、種々の免疫細胞、そしてこれらの細胞に由来する代謝産物が存在し、これらを総称して腫瘍微小環境と呼んでいる（図 B）。中でも、腫瘍関連マクロファージ（Tumor associated macrophage: TAM）や腫瘍関連好中球（Tumor associated neutrophil: TAN）といった自然免疫細胞は、がん細胞と相互作用し、腫瘍の増殖に有利な環境を構築するためのサポートをしていることが知られている。例えば TAM は、細胞増殖因子や血管新生因子の産生、T 細胞の細胞傷害活性の抑制、制御性 T 細胞の分化誘導といった作用をもたらす（3）。マクロファージは通常、M1 型と呼ばれる炎症性のサブセットか M2 型と呼ばれる免疫抑制性のサブセットへ適材適所単球から分化する。このような腫瘍をサポートする機能は M2 型マクロファージに由来するが、M2 型マクロファージへの分化誘導はがん細胞から産生される乳酸により促進されることが報告されている（5）。また、好中球にも N1 型と N2 型が存在し、がん細胞由来の代謝産物に起因して免疫抑制性の N2 型機能を獲得し、腫瘍増殖や転移を促進することが報告されている（4）。しかしマクロファージと比較してその機能や誘導機構については未知な部分が多く、腫瘍微小環境中での機能に関するさらなる理解が必要である。

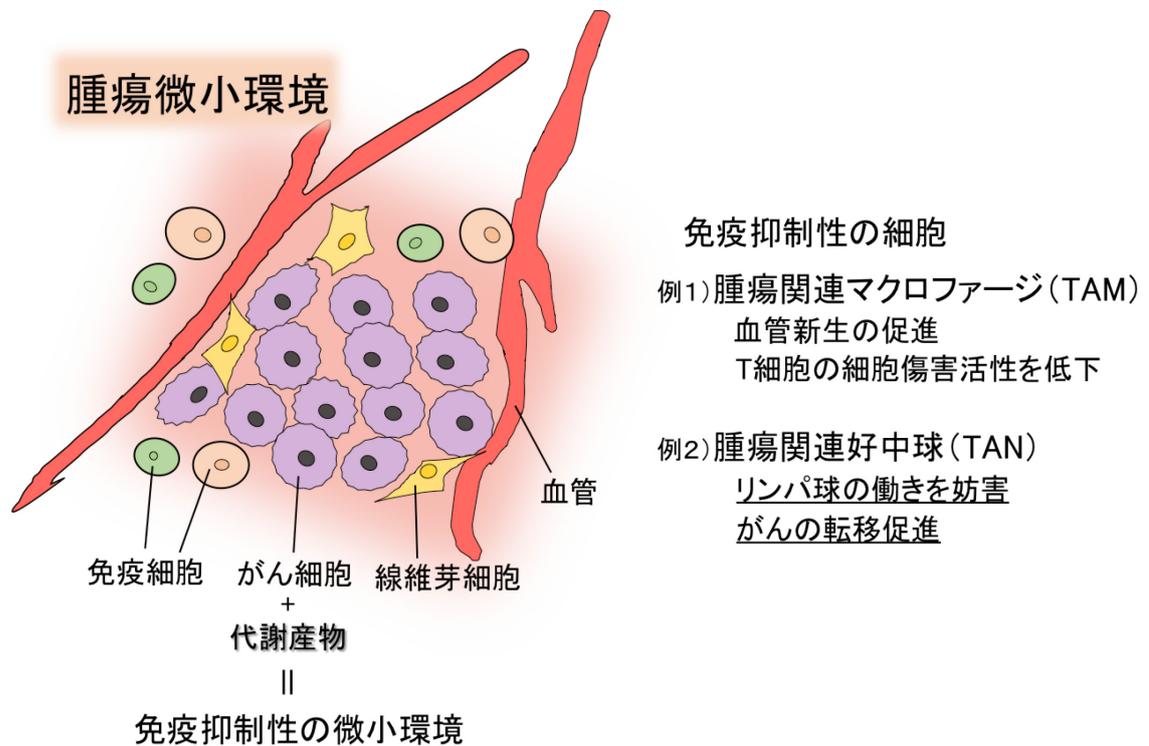


図 B 腫瘍微小環境

腫瘍微小環境とは、がん細胞だけでなく免疫細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞といった正常細胞とそれらの代謝産物を含めた微小環境を指す。免疫抑制性の細胞が、これらの細胞に由来する代謝産物によって誘導される例が多く報告されている。

TAN の腫瘍増殖や転移を促進する機能には、好中球細胞外トラップ（Neutrophil Extracellular Traps: NETs）と呼ばれる特殊な生体防御応答が関与していることが報告されている。NETs は、細菌感染への防御応答として 2004 年に発見された現象である（6）。核内からクロマチンが細胞外へ網目状に放出され、それが物理的に細菌を捕捉して貪食作用をサポートすると同時に、好中球エラスターゼやミエロペルオキシダーゼといった抗菌タンパク質を放出して殺菌作用を示す（図 C）。NETs 形成にはヒストンタンパク質中のアルギニン残基のシトルリンへの変換が必要で、これによりクロマチンの脱凝集が起こり、細胞膜の破綻と共に細胞外へと NETs が放出される。また、*Padi4* 遺伝子にコードされる PAD4（Peptidylarginine deiminase type 4）は、アルギニンからシトルリンへの変換を担う酵素で、*Padi4* を欠損したマウスは NETs を形成することができない。最近のがん研究では、腫瘍における NETs 形成が細胞傷害性 T 細胞（CTL）や NK 細胞のがん細胞への接触を妨害することにより腫瘍の成長を促進することや、がん細胞の転移先での定着を促進することが報告されている（7）。がんの予後不良は好中球 / リンパ球比（NLR 値）と相関があり免疫機能の指標となっているが、NETs 形成が腫瘍に与える影響については未解明な点が多く、腫瘍微小環境と NETs 形成の間に相関があるかどうかは不明である。

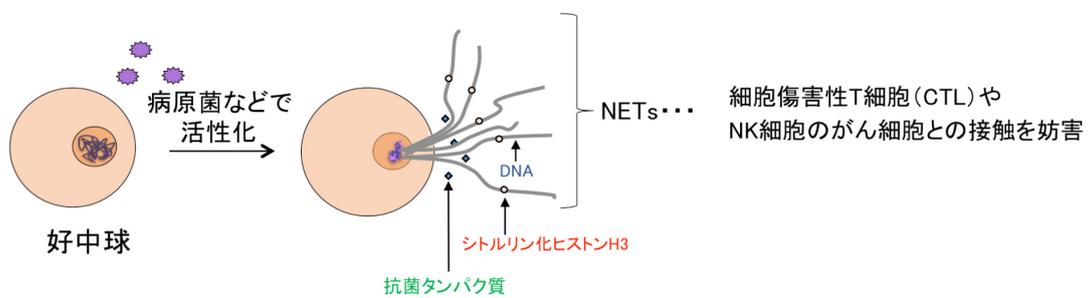


図 C 細菌感染時に誘導される NETs(neutrophil extracellular traps) の形成

好中球は、細菌感染時に特殊な防御応答として NETs を形成する。NETs は、核内のクロマチンの脱凝集、細胞膜の崩壊に伴って DNA を細胞外へ放出することにより形成される。網目状の構造を取ることで細菌を物理的に捕捉し、抗菌タンパク質を放出して殺菌、あるいは他の細胞による貪食作用をサポートする。また、近年の研究で NETs の形成はがんの増殖や転移を促進することが明らかとなった。

免疫抑制性の腫瘍微小環境の構築には、がん細胞の細胞死が関与している。がんを含む非感染性炎症においては、組織の損傷やストレスによって死細胞や損傷組織から Damage associated molecular patterns ( DAMPs ) と呼ばれる分子が放出され、主に自然免疫系による炎症や創傷治癒応答を誘導することが分かっている ( 8-10 )。最近、一部のがんにおいて、免疫による細胞傷害や高い酸化ストレスといった外的要因によりがん細胞にネクローシスが引き起こされ、これに伴って放出された DAMPs が TAN や TAM のような免疫抑制性の細胞を腫瘍微小環境へ誘導することが明らかになった ( 11, 12 )。

一方で、綿密に制御されて起こるアポトーシスも腫瘍では一定頻度起きている。正常組織におけるアポトーシスは生体の発生・形成、そして恒常性の維持に必須の生理的応答であるが、腫瘍におけるがん細胞のアポトーシスにはどのような生理的意義があるかは明らかになっていない。近年、正常細胞におけるアポトーシスがなぜ炎症反応を誘導しないのかについて新たな発見が報告された ( 13 )。正常細胞がアポトーシスを起こす際、カスパーゼ依存的に活性化される細胞膜チャネルである Pannexin1 ( Panx1 ) を介して、炎症反応を抑制する分子を放出することが明らかになった。この発見は、アポトーシスは不要になった細胞が起こす現象ではなく、炎症抑制によって組織の恒常性を維持することを目的とした能動的な応答であるという、新しい概念を見いだしている。このことから、一部のがんにおいても、この機構を利用し免疫抑制性の微小環境を構築している可能性が考えられた。

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的意義について、特に腫瘍微小環境に浸潤す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。第一章では、2種類のがん細胞株 ( 大腸がん細胞株 CT-26 と乳がん細胞株 4T1 ) の皮下移植によって誘導した腫瘍モデルマウスを用いて、腫瘍微小環境中のミエロイド系細胞の構成と NETs 形

成、腫瘍のアポトーシス頻度について比較を行ない、がん細胞のアポトーシスと腫瘍微小環境、特に TAN との関係を解析した。第二章では、腫瘍微小環境での NETs 形成における Panx1 の役割を明らかにするために、Panx1 を欠損させた 4T1 細胞株で誘導した腫瘍モデルマウスの NETs 頻度と腫瘍成長を評価した。また、NETs の形成が腫瘍増殖に与える影響を検討するため、NETs 形成に必須の酵素 PAD4 の遺伝子を欠損した *Padi4*<sup>-/-</sup> マウスを用い、4T1 腫瘍モデルを作製し腫瘍増殖と TAN の抗腫瘍活性を評価した。第三章では、NETs 形成と腫瘍成長を促進する、Panx1 を介して放出される代謝産物について検討した。がん細胞株の培養上清および Panx1 依存的に放出されることが報告されている代謝産物について NETs 誘導能を *in vitro* で評価するとともに、4T1 腫瘍モデルマウスに活性の認められた代謝産物の合成阻害剤を投与し *in vivo* における評価を行なった。

## 第一章

### 大腸がん細胞株および乳がん細胞株 由来の腫瘍微小環境の特徴

## 第一節 CT-26 および 4T1 腫瘍に浸潤するミエロイド系細胞の解析

### 【序論】

腫瘍に浸潤する細胞のうち、免疫抑制性の機能が誘導される細胞の代表的な例として、腫瘍関連マクロファージ ( TAM ) や腫瘍関連好中球 ( TAN ) が存在する。これらの細胞のはたらきは血管新生の促進やリンパ球の細胞傷害活性の抑制や制御性 T 細胞の誘導、さらにがん転移の促進にまで及び、腫瘍促進に働く。しかし、がん細胞種の違いやクローンの違いにより、TAM や TAN といったミエロイド系の自然免疫細胞のうちどのような細胞が優先的に浸潤してそれぞれ特徴的な腫瘍微小環境を形成するかについては明らかになっていない。よって、BALB/c マウス由来の大腸がん細胞株である CT-26 と乳がん細胞株である 4T1 の 2 種類を BALB/c マウスの皮下に移植するモデルを用いて、がん細胞種の違いが腫瘍組織に浸潤するミエロイド系細胞に与える影響について検討を行った。

### 【実験材料・方法】

#### (1) 試薬・器具類

- ・ RPMI-1640 with L-glutamine and phenol red ( 富士フィルム和光純薬株式会社 )
- ・ ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液 ( ナカライテスク )
- ・ 2-メルカプトエタノール ( 富士フィルム和光純薬株式会社 )
- ・ Fetal Bovine Serum (FBS, CAPRICORN Lot:cp17-1930)
- ・ トリプシン・EDTA 溶液(0.25% trypsin, 0.02% EDTA Sigma)
- ・ PBS (-) 粉末 「ニッスイ」 ( 日水製薬 )
- ・ EDTA-2Na ( 富士フィルム和光純薬株式会社 )
- ・ Liberase™ Research Grade (Roche)
- ・ Matrigel 基底膜マトリックス (Corning)

- ・ パーコール (GEヘルスケア・ジャパン)
- ・ RBC Lysis Buffer (10 ×) (BioLegend)
- ・ マイジェクター (テルモ、27G × 1/2" 0.40 × 13 mm)
- ・ 採血管 Heparinized Micro-Hematocrit Capillary Tubes (Fisherscientific)
- ・ セルストレイナー (BD Falcon)
- ・ Anti-mouse CD16/32 (Fc shield) Purified Clone:2.4G (TONBO bioscience)
- ・ Biotin- anti-mouse CD170 Clone:S17007L(BioLegend)
- ・ FITC anti-mouse/human CD11b Clone:M1/70 (BioLegend)
- ・ PE anti-mouse Ly-6C Clone:HK1.4(BioLegend)
- ・ PE/Dazzle ™ 594 anti-Ly-6G Clone:1A8(BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse CD3 ε Clone:145-2C11(BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse CD19 Clone:6D5 (BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse NK1.1 Clone:PK136(BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse TER-119/Erythroid Cells Clone:TER-119(BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse streptavidin
- ・ PE/cy7 anti-mouse CD54 Clone:YN/1.74(BioLegend)
- ・ APC/Fire ™ 750 anti-mouse CD45 Clone:30-F11(BioLegend)
- ・ Alexa Fluor 700 anti-mouse I-A/I-E ( MHC-II )  
Clone:M5/114.15.2(BioLegend)
- ・ 7-AAD Viability Staining Solution (BioLegend)

## (2) 試薬の調製

### FBS

常温まで融解後、恒温槽で 56 °C, 30 分間の非働化処理を行った。

### RPMI 培地

RPMI1640にペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液（終濃度：1%）、2-メルカプトエタノール（終濃度：50  $\mu$ M）、非働化したFBS（終濃度：10% v/v）をそれぞれ添加し、4  $^{\circ}$ Cで保存した。（以降「調製済みRPMI培地」とする）

#### 1xPBS

PBS(-)粉末「ニッスイ」（日水製薬）を添付のプロトコールに従い調製した。オートクレーブ滅菌後、4  $^{\circ}$ Cで保存した。

#### 10xPBS

1xPBSの10倍の濃度で作成した。オートクレーブ滅菌後、常温保存した。

#### パーコール溶液

原液のパーコールと10xPBSを9：1で混合し100%パーコール溶液とした。40%または80%パーコール溶液は100%パーコール溶液と調製済みRPMI培地を混合しそれぞれ作成した。

#### 0.5 M EDTA 溶液 (pH8.0)

EDTA-2NaをMilliQ超純水で溶解して作成した。オートクレーブ滅菌後に常温で保存した。pH調整には1規定の塩酸と水酸化ナトリウム水溶液を使用した。

#### FACS バッファー

1xPBS（滅菌済み）に、0.5 M EDTA 溶液（滅菌済み）を終濃度 0.5 mM になるように、さらに非働化FBSを終濃度 1%(v/v) になるようにそれぞれ加

え、4℃にて保存した。

#### Liberase 溶液

滅菌済みMilliQ超純水で 2.5 mg/mlになるように調製し、これを原液とした。Liberase 溶液は原液を調製済み RPMI 培地で 100 倍希釈し実験に使用した。

#### RBC Lysis Buffer (1x)

RBC Lysis Buffer (10x) を MilliQ 水で 10 倍に希釈し、使用した。

#### (3) 使用機器

FACS Aria II( セルソーター)(Becton Dickinson)

#### (4) マウスがん細胞株

マウス大腸がん細胞株である CT-26、マウス乳がん細胞株である 4T1 はアメリカンタイプカルチャーコレクション ( ATCC ) から購入した。

#### (5) マウス

すべての動物実験は、「日本大学動物実験運営内規」に則り実施した。雌性の BALB/c マウスを日本 SLC から購入し、日本大学生物資源科学部実験動物施設のコンベンショナルな環境下において室温 (22-25℃)、湿度 50 ± 10%、12 時間の明暗周期 ( 明 : 8:00-20:00 ) に維持された室内で飼育を行った。餌は固形飼料 MF (オリエンタル酵母工業)、飲み水はオートクレーブ滅菌した脱イオン交換水を自由摂取させて飼育した。

#### (6) 方法

### i . 細胞培養

CT-26、4T1はいずれも調製済みRPMI培地を使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で培養し、2-3日後にフラスコ内で70-80%コンフルエントの状態になるよう播種した。細胞の回収・継代の際には1xPBS 4 mlで洗浄してから0.25%トリプシン/EDTA溶液で5分インキュベーター内に静置し、細胞を剥離させて行った。

### ii . がん細胞株の皮下移植

CT-26は $5 \times 10^5$  cells、4T1は $3 \times 10^4$  cellsを1xPBS 30  $\mu$ lとMatrigel 30  $\mu$ l（計60  $\mu$ l）で懸濁し、マイジェクターに充填した。雌性BALB/cマウス（7週齢）の右下腹部から背中にかけてバリカンで毛刈りをし、それぞれのがん細胞株を右脇腹に皮下移植した。各腫瘍モデルは3匹ずつ作成した。本節では、がん細胞の移植から21日後に腫瘍を単離し解析を行った。

### iii . 腫瘍の単離・腫瘍組織浸潤細胞の調製

イソフルランによる麻酔下で頸椎脱臼を行い安楽死させた後、解剖用ハサミを用いて腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍は、ハサミで小さく切り刻み、Liberase溶液4.5 mlで懸濁した。腫瘍組織懸濁液は37℃、170 rpmの条件で30分振盪し、10分毎にボルテックスで腫瘍の塊をほぐした。この操作の後、100  $\mu$ mのセルストレイナーの中でホモジナイズし、懸濁液をろ過した。回収したろ液をボルテックスしてから、4℃、1500 rpmで5分遠心し、上清を除去した。ペレットは7 mlの40%パーコール溶液で懸濁した後、続いて2 mlの80%パーコール溶液を40%パーコール溶液の下層に重層した。その後、室温、2000 rpmで20分間、加速・減速を最小にし遠心した。遠心後、40%パーコール溶液（上層）と80%パーコール溶液（下層）の中間層の付近4 mlをピペットマン（P1000）で回収し、FACSバッファを等量加えて

4 °C, 2000 rpm で 10 分間遠心し、腫瘍組織浸潤細胞を得た。このペレットに赤血球が多く見られた場合、ペレットに対し 2~3 ml の RBC Lysis Buffer (1x) を加え懸濁し、5~10 分室温で静置した。その後 4 °C, 1500 rpm で 5 分遠心した。

#### iv . 腫瘍組織浸潤細胞の免疫染色・フローサイトメトリー

Anti-Mouse CD16/32 (Fc-shield) を 10 µg/ml、Biotin- anti-mouse CD170 を 1.6 µg/ml となるように FACS Buffer で希釈し、1 サンプルあたり 50 µl で懸濁した後、冷蔵庫 ( 4 °C ) で静置した。15 分後 FACS Buffer 1 ml を加え、4 °C, 4500 rpm で 5 分遠心した。その後上清を捨て、50 µl の FACS Buffer で希釈した各標識抗体 (PE/cy5 streptavidin 含む) を添加し、15 分冷蔵庫で静置した。また、死細胞を区別するため、同時に 7-AAD Viability Staining Solution を添加した。各抗体の濃度を以下に示す。15 分後、1 ml の FACS Buffer を加え、4 °C, 4500 rpm で 5 分遠心した。その後上清を捨て、500 µl の FACS Buffer で懸濁し、35 µm フィルター付きラウンドチューブへ移した。その後 FACS Aria II にて測定を行った。データの解析は Flow Jo software (Tree Star, Inc.) で行った。各標識抗体の添加量を以下に示す。

- ・ FITC anti-mouse/human CD11b : 1 µg/ml
- ・ PE anti-mouse Ly-6C : 1 µg/ml
- ・ PE/Dazzle ™ 594 anti-Ly-6G : 0.67 µg/ml
- ・ PE/cy5 anti-mouse CD3 ε : 0.67 µg/ml
- ・ PE/cy5 anti-mouse CD19 : 0.67 µg/ml
- ・ PE/cy5 anti-mouse NK1.1 : 0.67 µg/ml
- ・ PE/cy5 anti-mouse TER-119/Erythroid Cells : 0.67 µg/ml
- ・ PE/cy5 streptavidin : 0.4 µg/ml
- ・ PE/cy7 anti-mouse CD54 : 1 µg/ml

- ・ APC/Fire™ 750 anti-mouse CD45 : 0.67 µg/ml
- ・ Alexa Fluor 700 anti-mouse I-A/I-E : 0.4 µg/ml
- ・ 7-AAD Viability Staining Solution : 2 µg/ml

## v . 解析

腫瘍中のミエロイド系細胞集団の分析を行った。まず FSC-A vs. SSC-A で全細胞を展開し、死細胞や細胞以外の粒子を除外した。次にダブレットを除き、CD45（免疫細胞系マーカー）陽性の細胞集団から、リンパ球である T, B, NK 細胞、RBC Lysis Buffer で除去しきれなかった赤血球、PE/cy5 streptavidin で標識した好酸球、7-AAD で染めた死細胞を除いた。次に CD11b<sup>+</sup> の集団（ミエロイド系細胞）に絞り、Ly6G vs. Ly6C で展開し、Ly6G<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup> のサブセットを好中球（ TAN ）とした。また、Ly6G<sup>-</sup> のサブセットを Ly6C vs. MHC-II で展開した。Ly6C<sup>+</sup>, MHC-II<sup>-</sup> の細胞を単球型ミエロイド由来抑制性細胞（ monocytic myeloid-derived suppressor cell, M-MDSC ）、Ly6C<sup>-</sup>, MHC-II<sup>+</sup> の細胞をマクロファージ（ TAM ）と定義した（図 1 ）。

## 【結果・考察】

2 つのがん細胞株 CT-26 および 4T1 の皮下移植により異なる腫瘍モデルマウスを作製して、腫瘍に浸潤するミエロイド系の細胞の比較と、各腫瘍の形態学的観察を行った。CT-26 は大腸がん由来する間葉系の細胞で、4T1 は乳がん由来する上皮系の細胞である。これらの細胞株は、*in vitro* における増殖のスピードにも差があり、CT-26 は 1 日あたり約 2.1 倍、4T1 は 1 日で約 3.2 倍の速度で細胞数が増加することを確認している。同じ量の細胞数を皮下移植した場合、4T1 腫瘍の成長が圧倒的に早いため、最初の皮下移植で注入する細胞数を CT-26 は  $5 \times 10^5$  cells、4T1 は  $3 \times 10^4$  cells に設定すること

で 21 日後におよそ等しい腫瘍体積になるよう調整した。皮下移植した CT26 と 4T1 が形成する腫瘍の形状や性質は全く異なるものであった。4T1 は約 14 日目以降から厚みの増加が停滞し、むしろ腫瘍の中央部分から痂皮を形成して最終的には平たい形状を取る。対して CT-26 は立体的に成長する。これは、4T1 腫瘍内の血管新生が腫瘍体積の増加に追いつかず、腫瘍の中心部に栄養が行き渡らないことに起因していると考えられる。また、摘出した腫瘍をホモジナイズする際、CT-26 の腫瘍はハサミで崩れやすく、水分量が多いのに対し、4T1 は堅く、水分量も比較的少ない。このことから 4T1 は血管新生が十分ではなく栄養が隅々まで行き渡っておらず、逆に、成長の遅い CT-26 は血管の構築に比較的猶予があり増殖に必要な栄養を腫瘍全体に供給しやすいのではないかと考えられる。しかし、過酷な微小環境の中でもアグレッシブに増殖する 4T1 は栄養が不足した状態でも何らかの方法で増殖するメカニズムを持っていることを示唆している。

フローサイトメトリーによる各腫瘍中のミエロイド系細胞の割合を比較した結果、CT-26 に対し 4T1 腫瘍モデルにおいては TAN と TAM の割合が高かった。特に TAN は 8 倍近くの差があり、4T1 腫瘍に TAN が多量に浸潤しているのは非常に特徴的であった（図 2）。

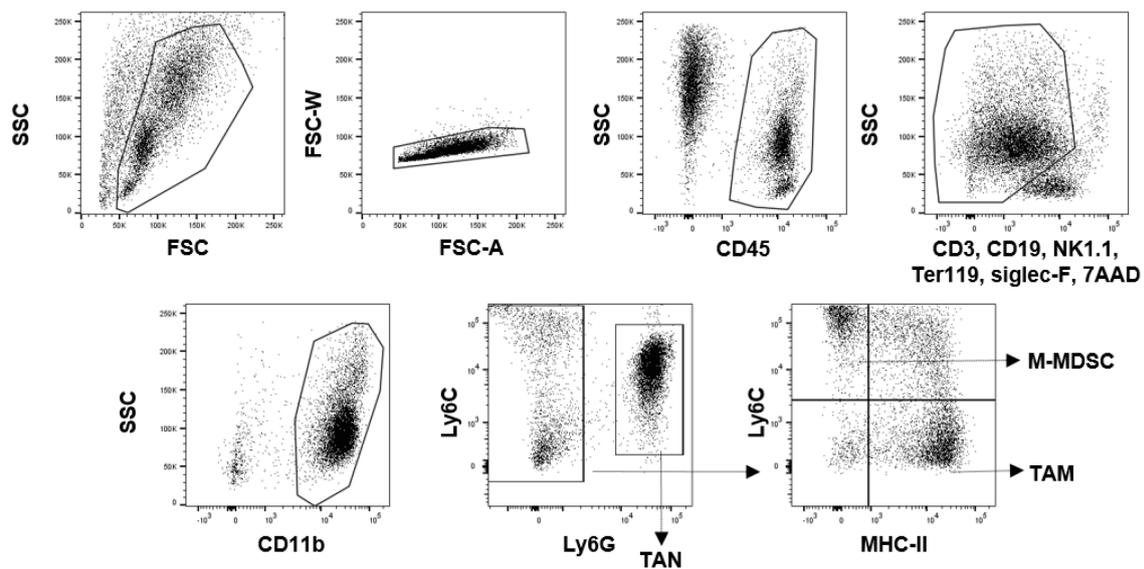


図1 腫瘍中ミエロイド系細胞のフローサイトメトリ解析におけるgating strategy

CD45<sup>+</sup>の細胞集団からリンパ球（T, B, NK細胞）と好酸球、死細胞を除外し、CD11b<sup>+</sup>の細胞をミエロイド系細胞とした。Ly6G<sup>+</sup>の細胞をTAN、Ly6G<sup>-</sup>の細胞の内、Ly6C<sup>+</sup>, MHC-II<sup>-</sup>の細胞を単球型ミエロイド由来抑制性細胞（M-MDSC）、Ly6C<sup>-</sup>, MHC-II<sup>+</sup>の細胞をTAMと定義した。

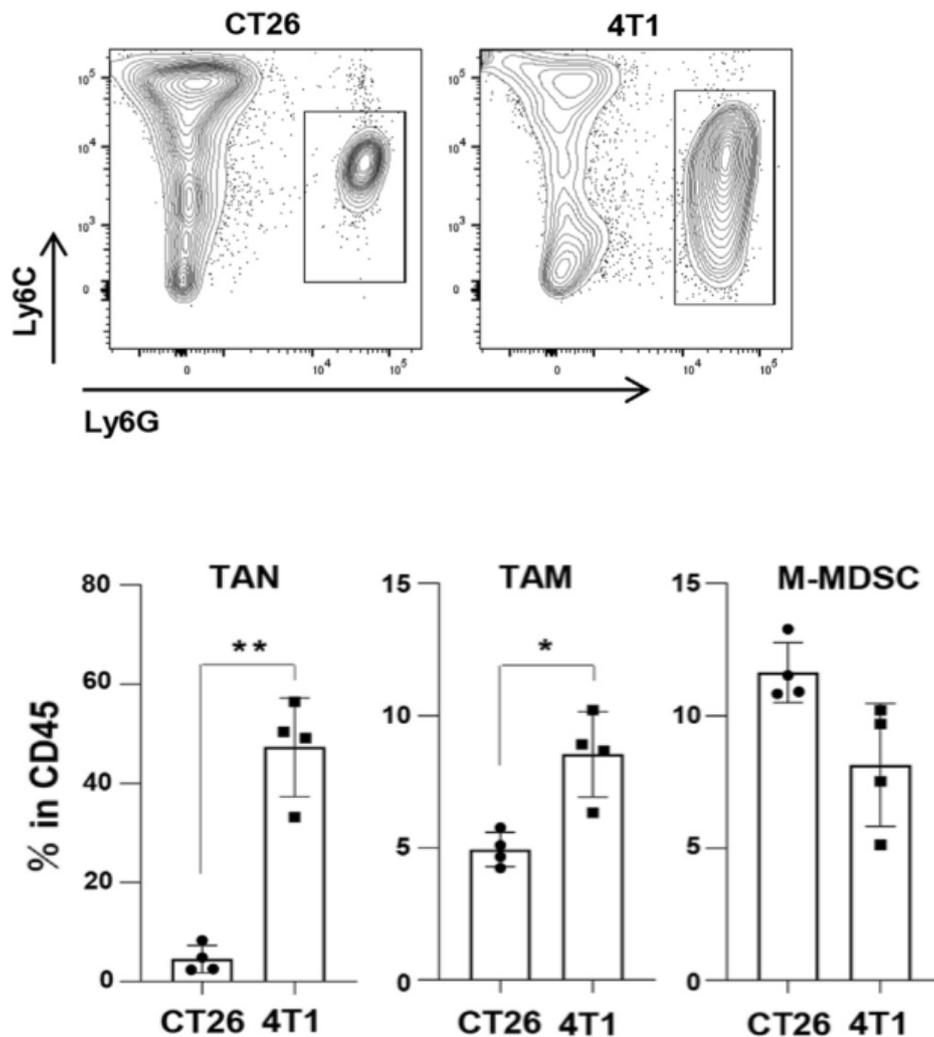


図2 CT-26 および 4T1 腫瘍に浸潤するミエロイド系細胞の比較

上図：CT-26 および 4T1 腫瘍中の TAN のフローサイトメトリー解析。四角で囲った Ly6G<sup>+</sup> の集団が TAN に相当する。

下図：CD45 陽性細胞中の TAN, TAM, M-MDSC の割合をフローサイトメトリーにより解析し定量化した ( n=4 )。\* p<0.05, \*\* p<0.01

## 第二節 CT-26 および 4T1 腫瘍における NETs およびアポトーシス頻度の比較

### 【序論】

第一節では、4T1 腫瘍に多量の好中球が浸潤していることが明らかになった。第二節では、これらの好中球の役割を明らかにするために、CT-26, 4T1 腫瘍に浸潤している好中球が NETs を起こしているかどうかと、その頻度がどれほどであるかを検討した。このために、腫瘍組織切片を作製しシトルリン化ヒストン H3(CitH3) に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、NETs の検出を行った。また、がん細胞のアポトーシス頻度と NETs 形成との関係を調べる為に、Cleaved caspase-3 の蛍光免疫染色と TUNEL 染色によってアポトーシスを検出した。

### 【実験材料・方法】

#### (1) 試薬・器具類

- ・ RPMI-1640 with L-glutamine and phenol red (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)
- ・ 2-メルカプトエタノール (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ Fetal Bovine Serum FBS (CAPRICORN Lot:cp17-1930)
- ・ トリプシン・EDTA 溶液(0.25% trypsin, 0.02% EDTA Sigma)
- ・ PBS (-) 粉末 「ニッスイ」 (日水製薬)
- ・ EDTA-2Na (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ Matrigel 基底膜マトリックス (Corning)
- ・ マイジェクター (テルモ、27G × 1/2" 0.40 × 13 mm)
- ・ 4%PFA (4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液) (Wako)

- ・ スクロース ( Wako )
- ・ 川本法用凍結包埋剤 SCEM-(L1) ( SECTION-LAB )
- ・ クリオモルド 2号 ( サクラファンティックジャパン )
- ・ コートスライドガラスフロンティアブルー ( 松浪硝子 )
- ・ TritonX-100 ( ナカライテスク )
- ・ Bovine Serum Albumin ( Sigma )
- ・ ロバ血清 (Wako)
- ・ 抗シトルリン化ヒストン H3 抗体 ( 抗 Cit-H3 抗体 ) (abcam)(ab5103)
- ・ Goat anti-rabbit IgG H&L Alexa Fluor 647 (abcam)
- ・ Alexa Fluor 488 rat anti-mouse Ly6G Clone:1A8 (BioLegend)
- ・ Cleaved caspase-3 (D175) rabbit antibody (cell signaling) (#9661)
- ・ Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG Clone:Poly4064 (BioLegend)
- ・ In situ Apoptosis Detection Kit (TaKaRa)
- ・ DAPI 封入剤 ( ProLong Gold Anifade Reagent with DAPI ) (invitrogen)

## (2) 試薬の調製

### FBS

常温まで融解後、恒温槽で 56 °C , 30 分間の非働化処理を行った。

### RPMI 培地

第一節と同様に調製した。

### 1xPBS

PBS(-)粉末 「ニッスイ」 ( 日水製薬 ) を添付のプロトコールに従い調製した。オートクレーブ滅菌後、4 °Cで保存した。

### 30%スクロース溶液

w/v で30%となるように超純水で攪拌し溶解した。

### 浸透液

PBSに TritonX-100 を終濃度 0.5% で添加して作成した。

### ブロッキングバッファー

PBSにBSAを終濃度10%、ロバ血清を終濃度 1% になるよう調製した。

### 抗体希釈用バッファー

PBSに TritonX-100 を終濃度 0.3% 、BSAを終濃度 1% になるように調製した。切片に抗体を反応させる際はこのバッファーで希釈して使用した。

### TUNEL 染色 ラベリング液

Labeling buffer : TdT Enzyme を 9 : 1 で混合し調製した。

### (3) 使用機器

クリオスタット HM550

共焦点レーザー顕微鏡 LEICA TCS SP8

### (4) マウスがん細胞株

CT-26、4T1はATCCから購入した。

### (5) マウス

第一節と同様に扱った。

## (6) 方法

### i . 細胞培養

第一節と同様に扱った。

### ii . がん細胞株の皮下移植

第一節と同様に行った。

### iii . 腫瘍の単離、包埋処理、ブロッキング

イソフルランによる麻酔下で頸椎脱臼を行い安楽死させた後、解剖用ハサミを用いて腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍は、カッターで慎重に約 5 mm 角になるように切った。切片は 4 %PFA に常温で 2 時間浸した後、水分を取り 30 %スクロース溶液に 2 時間浸した。その後水分を取り除き SCEM-(L1) でクリオモルドに包埋し直ちに -80 °C へ静置した。翌日以降にクリオスタットで厚さ 10 μm に切り、剥離防止のスライドガラス上に載せた。PAP ペンで切片の周囲を囲み、4 %PFA を満載した。15 分後 1xPBS で 3 回洗浄し、浸透液を溢れないように注意して載せた。15 分後 1xPBS で 3 回洗浄し、ブロッキングバッファーを載せ 4 °C で一晩静置した。このとき、静置用のタッパーに水分をしみ込ませたキムワイプを敷き、その上にスライドガラスを載せた。

### iv -a. Ly6G および Cit-H3 の標識 (免疫染色)

ブロッキング後の切片に Alexa Fluor 488 rat anti-mouse Ly6G を 0.166 mg/ml になるよう添加した。4 °C で 1 時間静置した後、1xPBS で 3 回洗浄した。次に 1 次抗体として抗 Cit-H3 抗体を 0.083 mg/ml で添加し 4 °C で 1 時間静置後に 1xPBS で 3 回洗浄した。次に 2 次抗体として goat anti-rabbit IgG H&L Alexa Fluor 647 を 0.333 mg/ml で添加し、4 °C で 1 時間静置した

後、1xPBSで3回洗浄した。最後に DAPI 封入剤を必要最低量垂らし上からカバーガラスをかぶせてマニキュアで固定した。観察は共焦点レーザー顕微鏡で行った。

#### iv -b. Cleaved caspase-3 の標識（免疫染色）

ブロッキング後の切片に1次抗体として抗cleaved caspase-3抗体を1/400の濃度で添加し4℃で1時間静置後に1xPBSで3回洗浄した。次に2次抗体としてAlexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgGを0.083 mg/mlで添加し4℃で1時間静置後に1xPBSで3回洗浄した。最後に DAPI 封入剤を必要最低量垂らし上からカバーガラスをかぶせてマニキュアで固定した。観察は共焦点レーザー顕微鏡で行った。

#### iv -c. TUNEL 染色

In situ Apoptosis Detection Kit 付属のプロトコールに準じて行った。スライドガラスに切片を張り付けた後、PAPペンで切片の周囲を囲み、4%PFAを満載した。15分後に4%PFAを除去し、1xPBSを載せて20分静置した。その後30 µl の permeabilization buffer を添加し氷上で5分静置した。その後1xPBSで1回洗浄し15 µl の調製済みラベリング液を添加し、高湿度下の37℃中に90分静置した。その後1xPBSで3回洗浄し、最後に DAPI 封入剤を必要最低量垂らし上からカバーガラスをかぶせてマニキュアで固定した。観察は共焦点レーザー顕微鏡で行った。

## 【結果・考察】

第二節では、CT-26 と 4T1 が形成する腫瘍について、主に免疫組織染色法で観察を行った。第一節のフローサイトメトリーで示された結果と同様、Ly6G で標識された好中球は、CT-26 腫瘍と比較して 4T1 腫瘍において多量に浸潤していることが分かった。そして Cit-H3 で標識される NETs は、4T1 腫瘍で高い頻度で起きていることが明らかとなった（図 3）。

免疫蛍光染色で観察された Ly6G と Cit-H3 の局在は細胞単位で見した場合一致していないが、Ly6G 陽性の領域にのみ、Cit-H3 は観察されている。Ly6G は細胞表面に発現するマーカーであるのに対し、Cit-H3 は細胞外に放出される分子であるため、局在は異なる。また、NETs 形成時の細胞膜構造の破綻に伴い、Ly6G の局在が不安定化すると考えられる。以上の理由から、Ly6G と Cit-H3 の局在は必ずしも一致しないと考えられる。

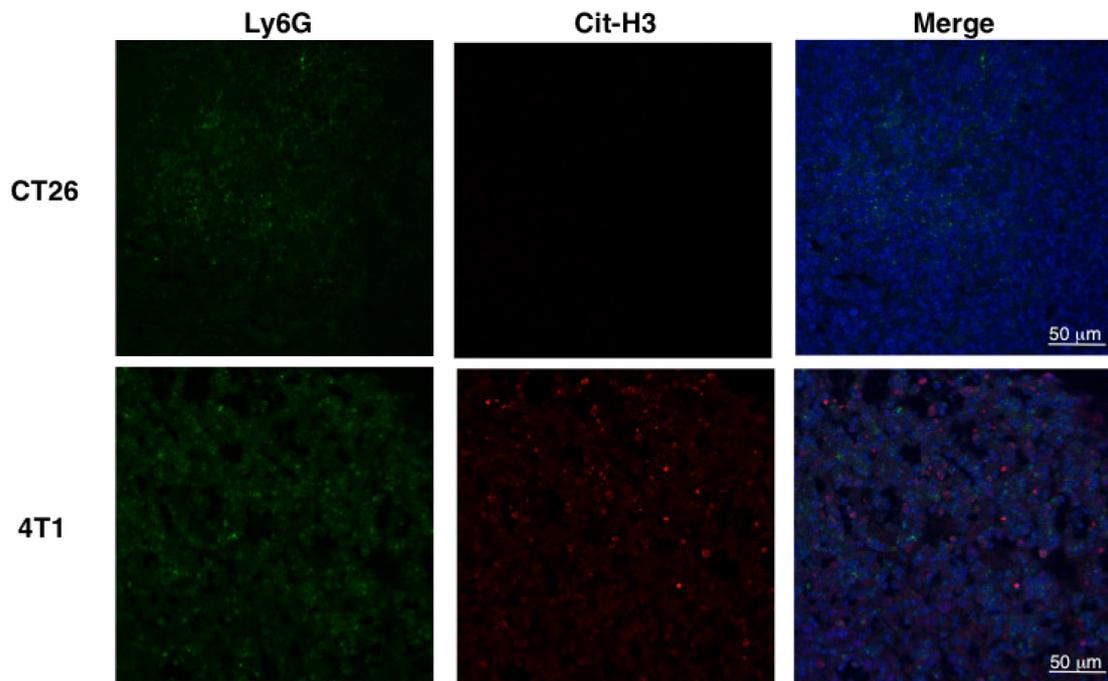


図3 CT-26, 4T1 腫瘍における NETs 形成 (免疫染色法)

CT26 および 4T1 腫瘍組織における NETs 形成を免疫蛍光染色により解析した。

緑：好中球マーカー Ly6G

赤：NETs に特徴的に見られる Cit-H3

青：DAPI (DNA を染色する)

続いて、Cleaved caspase-3 と TUNEL 染色では、どちらの染色法においても 4T1 腫瘍で高頻度のアポトーシスを起こしていることが明らかとなった（図 4A）。また、Image J を用いて、1 画像あたりの蛍光強度を定量化した（図 4B）。

第一節で、腫瘍の形態学的観察において、4T1 腫瘍は増殖が早すぎるあまり、栄養不足状態であると考察した。よって、第二節で 4T1 腫瘍に観察された高頻度のアポトーシスは、栄養不足によって導かれた帰結と考えられる。

以上の結果から、4T1 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、NETs を起こしている多量の好中球を含む特徴的な腫瘍微小環境を構築していることが明らかになった。

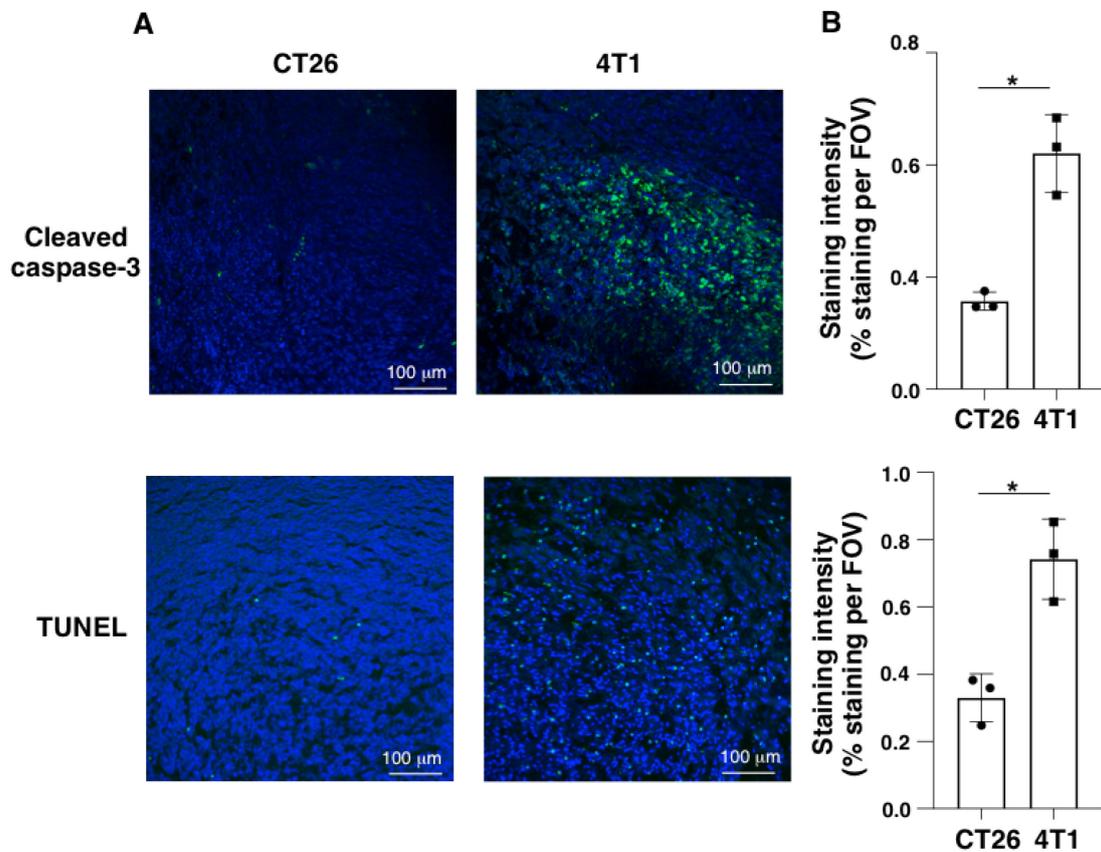


図4 Cleaved caspase-3と TUNEL による CT26, 4T1 腫瘍のアポトーシス検出  
 CT26 および 4T1 腫瘍におけるアポトーシス頻度を Cleaved caspase-3 の免疫蛍光染色および TUNEL 染色により解析した。

A 上図： Cleaved caspase-3 (緑) +DAPI (青)

下図： TUNEL (緑) +DAPI (青)

B： FOV ( field of view ) 中の Cleaved caspase-3 または TUNEL の蛍光強度を Image J で定量化した。( n=3 ) \* p<0.05

## 第二章

アポトーシス依存的チャネル Panx1 の  
腫瘍微小環境形成および腫瘍成長に対  
する作用

## 第一節 各がん細胞株におけるPanx1の mRNA 発現の比較

### 【序論】

正常な細胞においては、細胞膜に存在するチャネルであるPanx1がアポトーシス誘導時に活性化され、このチャネルを介して炎症反応を抑制する分子を細胞外へ放出することが報告されている(13)。既述の通り、本研究では、腫瘍微小環境中の免疫細胞に及ぼす影響に注目してがん細胞のアポトーシスの生理的意義を明らかにすることを目指している。そこで、がん細胞がアポトーシス誘導時にPanx1を介して免疫を抑制する分子を放出するのではないかという仮説を立て検証することとした。第一章第二節では、4T1で誘導した腫瘍内により多数のアポトーシス細胞が検出された。このことから、4T1細胞株がアポトーシスを起こす際に、Panx1を介して代謝産物を放出して腫瘍微小環境中の免疫細胞の活性を負に制御する可能性が考えられたが、4T1細胞株がPanx1をどの程度発現しているのかは不明である。よって本節ではまず、CT26 および4T1のPanx1の mRNA 発現を定量 PCR 法によって比較した。

### 【実験材料・方法】

#### (1) 試薬・器具類

- ・ RPMI-1640 with L-Glutamine and phenol red (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)
- ・ 2-メルカプトエタノール (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ Fetal Bovine Serum (FBS, CAPRICORN Lot:cp17-1930)
- ・ トリプシン・EDTA 溶液(0.25% trypsin, 0.02% EDTA Sigma)
- ・ PBS (-) 粉末 「ニッスイ」 (日水製薬)
- ・ Fast Gene™ RNA Premium Kit 50 preps

- ・ 50  $\mu$ M Origo (dT) primer RETROscript™ kit (invitrogen Thermo Fisher Scientific)
- ・ 10 mM dNTP Mix(Deoxynucleotide Solution Mix)(NEW ENGLAND BioLabs)
- ・ 5xSS IV Buffer (invitrogen Thermo Fisher Scientific)
- ・ 100 mM DTT (invitrogen Thermo Fisher Scientific)
- ・ RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor(invitrogen Thermo Fisher Scientific)
- ・ Super script® IV Reverse Transcriptase(200U/ $\mu$ l) (invitrogen Thermo Fisher Scientific)
- ・ KAPA SYBR FAST Universal (KAPA BIOSYSTEMS)
- ・ プライマー  
GAPDH-Forward ( 5'-TGTG TCCG TCGT GGAT CTGA-3' )  
GAPDH-Reverse ( 5'-CCTG CTTC ACCA CCTT CTTG A-3' )  
Panx1-Forward ( 5'-CCAGCTGCTCAGCCTCATTA-3' )  
Panx1-Reverse ( 5'-TGTCCGTTTTCTGCCGGAAT-3' )
- ・ PCR grade water
- ・ FrameStar®96 Well Skirted PCR Plate(4titude)

## (2) 試薬の調製

### FBS

常温まで融解後、恒温槽で 56 °C , 30 分間の非働化処理を行った。

### RPMI 培地

第一章第一節と同様に調製した。

1xPBS

第一章第一節と同様に調製した。

(3) 使用機器

ナノドロップ ( ND-1000 Spectrophotometer )

CFX96 Touch Real Time PCR ( BIORAD )

(4) マウスがん細胞株

第一章第一節と同様に扱った。

(5) 方法

i . 細胞培養

CT-26、4T1はいずれも調製済みRPMI培地を使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で培養し、2-3日後にフラスコ内で70-80%コンフルエントの状態になるよう播種した。細胞回収は1xPBS 4 mlで洗浄してから0.25%トリプシン/EDTA溶液で5分インキュベーター内に静置し、細胞を剥離して行った。

1x10<sup>6</sup> cellsを1xPBSで洗浄した後、RNA抽出に使用した。

ii . RNA抽出

各細胞株1x10<sup>6</sup> cellsからRNAを抽出した。抽出はFast Gene™ RNA Premium Kitに添付のプロトコール従って行った。

iii . RNA の逆転写 ( cDNA の合成 )

抽出した RNA の濃度を、ナノドロップで測定した。測定した濃度から、1000 ng を SuperScript® IV Reverse Transcriptase を用いて、添付のプロトコールに従い cDNA を作成した。逆転写反応時の組成と条件を以下に示す。

50 $\mu$ M Oligo d(T) primer	1 $\mu$ l
10 mM dNTP mix	1 $\mu$ l
Template RNA	1000 ng
PCR Grade Water	up to 13 $\mu$ l
<hr/>	
	total 13 $\mu$ l

Heat the RNA-primer mix at 65 °C 5min

5 x SS IV Buffer	4 $\mu$ l
100 mM DTT	1 $\mu$ l
RNaseOUT™ Recombinant Rnase Inhibitor	1 $\mu$ l
SuperScript® IV Reverse Transcriptase	1 $\mu$ l
<hr/>	
	20 $\mu$ l

Incubate reaction at 55 °C 10 min

80 °C 10 min

#### iv . 定量 PCR

逆転写により得られた cDNA を鋳型として、CFX96 Touch Real Time PCR Detection System を用いて定量 PCR 行った。PCR 反応時の組成と条件を以下に示す。

mRNA 発現は GAPDH との相対値から算出して解析した。

cDNA		2.0 $\mu$ l
Primer (10 $\mu$ M)	Fw	0.4 $\mu$ l
	Rv	0.4 $\mu$ l
2 $\times$ Master mix		10 $\mu$ l
PCR Grade Water		7.2 $\mu$ l
<hr/>		
1 well		20 $\mu$ l

95 °C 3 min

95 °C 3 sec

60 °C 30 sec

95 °C 10 sec

65 °C 5 sec

} 40 cycle

### 【結果・考察】

定量 PCR 法によって CT-26 と 4T1 の Panx1 の mRNA 発現を解析した。その結果、4T1 は CT-26 に比べ高いレベルで Panx1 の mRNA を発現していることが明らかとなった（図 5）。このことから、4T1 細胞株は腫瘍内で高頻度のアポトーシスを起こし、Panx1 を介して代謝産物を放出している可能性並びにその代謝産物が腫瘍微小環境に影響を与えている可能性が示唆された。

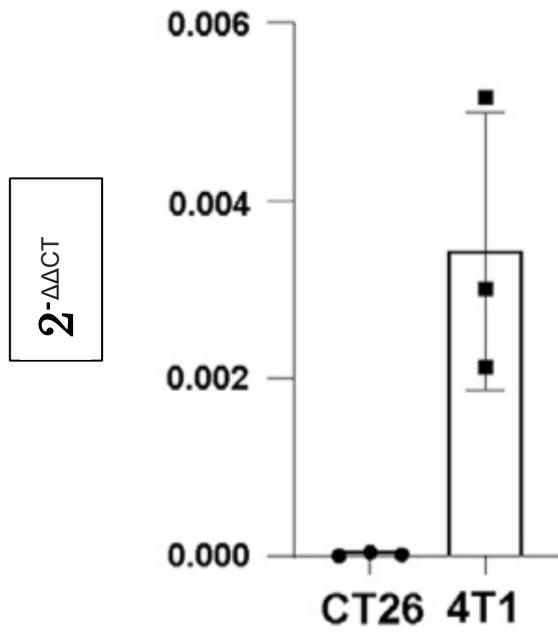


図5 CT-26 および 4T1 細胞における Panx1 mRNA の発現  
 定量 PCR 法によって CT-26 および 4T1 細胞における Panx1 の mRNA の発現を比較した。( n=3 )

## 第二節 Panx1欠損型4T1細胞株の樹立

### 【序論】

第一節より、マウスに皮下移植した際に高いアポトーシス頻度が観察される4T1細胞株において、Panx1遺伝子の発現が高いことが明らかとなった。このことから4T1はアポトーシス時にPanx1を介して代謝産物を放出し、腫瘍微小環境に影響を与える可能性が示唆された。そこで、4T1細胞株のPanx1が、腫瘍の成長と腫瘍に多量浸潤しているTANのNETs形成に与える影響について検討するため、本節では、CRISPR-Cas9システムによるゲノム編集技術を用いてPanx1欠損型の4T1 (Panx1-KO) を作製した。また、作製したPanx1-KO細胞について、*in vitro*における増殖速度およびアポトーシスの頻度を評価した。

### 【実験材料・方法】

#### (1) 試薬・器具類

- ・ RPMI-1640 with L-Glutamine and phenol red (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)
- ・ 2-メルカプトエタノール (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ Fetal Bovine Serum FBS (CAPRICORN Lot:cp17-1930)
- ・ トリプシン・EDTA溶液(0.25% trypsin, 0.02% EDTA Sigma)
- ・ PBS (-) 粉末 「ニッスイ」 (日水製薬)
- ・ Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific)
- ・ RIPA バッファー (ナカライテスク)
- ・ EDTA-2Na (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ Bovine Serum Albumin (Sigma)
- ・ ラウリル酸ナトリウム (SDS) (ナカライテスク)

- ・ トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（ナカライテスク）
- ・ 塩化ナトリウム（ナカライテスク）
- ・ 0.1 M DTT (Thermo Fisher Scientific)
- ・ ブロモフェノールブルー（富士フィルム和光純薬）
- ・ アクリルアミド（富士フィルム和光純薬）
- ・ ビスアクリルアミド（富士フィルム和光純薬）
- ・ 塩化ナトリウム（ナカライテスク）
- ・ 塩酸（富士フィルム和光純薬）
- ・ Pierce BCA protein assay kit （ Thermo Fisher Scientific ）
- ・ グリセリン（ナカライテスク）
- ・ プロテアーゼ阻害剤カクテル（ナカライテスク）
- ・ ペルオキソニ硫酸アンモニウム（APS）（ナカライテスク）
- ・ N,N,N,N- テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）（富士フィルム和光純薬）
- ・ アクリルアミド（富士フィルム和光純薬）
- ・ Tween 20（ナカライテスク）
- ・ グリシン（ナカライテスク）
- ・ メンブレン：Immobilon-P Transfer Membrane（ミリポア）
- ・ メタノール（富士フィルム和光純薬）
- ・ ブロックエース（株式会社ケー・エー・シー）
- ・ Can Get Signal Solution 1&2 （ TOYOBO ）
- ・ Pannexin1 polyclonal antibody (#487900)(Invitrogen)
- ・ Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody (cell signaling technology)
- ・ HRP anti-beta actin antibody （ abcam ）
- ・ Chemi-Lumi-One L, Super, Ultra （ ナカライテスク ）
- ・ レンドール液（現像液）（FUJIFILM）

- ・ レンフィックス（定着液）（FUJIFILM）
- ・ 酢酸（Wako）
- ・ Amersham Hyperfilm ECL 18 × 24（Cytiva）
- ・ 6 ウェルプレート（140675, Thermo Fisher Scientific）
- ・ 接着培養フラスコ 25（小フラスコ）（住友ベークライト）
- ・ ATB-737（abcam）
- ・ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD（BioLegend）

## (2) 試薬の調製

### FBS

常温まで融解後、恒温槽で 56 °C , 30 分間で非働化处理を行った。

### RPMI 培地

第一章第一節と同様に調製した。

### 1xPBS

第一章第一節と同様に調製した。

### 0.5 M EDTA 溶液 (pH8.0)

第一章第一節と同様に調製した。

### RIPA バッファー（調製済み）

0.5 M EDTA 溶液 (pH8.0) を終濃度 1 mM 、プロテアーゼ阻害剤カクテルを終濃度 1x になるよう RIPA バッファーに加え混合した。

### 1M Tris-HCl (pH6.8)

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを終濃度 1M になるよう超純水で溶解し、塩酸で pH6.8 に調製した。

#### 1M Tris-HCl (pH8.8)

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを終濃度 1M になるよう超純水で溶解し、塩酸で pH8.8 に調製した。

#### 2xSDS-PAGE サンプルバッファー

Tris-HCl( 終濃度 100 mM, pH6.8), SDS ( 終濃度 40 mg/ml ), グリセリン ( 終濃度 20% ), ブロモフェノールブルー ( 終濃度 2 mg/ml ), DTT ( 終濃度 20 mM ) を混合し、-20 °C で保存した。

#### 30% アクリルアミド

アクリルアミド 29 g、ビスアクリルアミド 1 g を超純水で溶解し、100 ml にメスアップした。

#### 10% SDS

SDS 10g を超純水で溶解後、100 ml にメスアップした。

#### 10% APS

APS 10 g を超純水で溶解後、100 ml にメスアップした。

#### 10x Tris-Glycine

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを終濃度 250 mM、グリシンを終濃度 1.92 M になるよう超純水で溶解した。

#### 分離ゲル (12.5%)

超純水 2.2 ml、30%アクリルアミド 4.2 ml、1M Tris-HCl (pH6.8) を 3.4 ml、10%SDSを 0.1 ml、10%APSを 0.1 ml、TEMEDを 7  $\mu$ l で混合した。

#### 濃縮ゲル(5%)

超純水 2.8 ml、30%アクリルアミド 0.666 ml、1M Tris-HCl (pH6.8) を 0.504 ml、10%SDSを 0.04 ml、10%APSを 0.04 ml、TEMEDを 4  $\mu$ l で混合した。

#### ランニングバッファー

1xTris-Glycine、0.1%SDS になるように超純水で調製した。

#### トランスファーバッファー

10xTris-Glycine を 10 ml、メタノールを 20 ml、超純水を 70 ml 混合し調製した。

#### 10xTBS

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを 24.233 g、塩化ナトリウムを 87.66 g 超純水で溶解し、1 L にメスアップした。

#### TBST

10xTBS を超純水で 10 倍希釈し、Tween 20 を終濃度 0.1% になる添加した。

#### ストリッピングバッファー

1M Tris-HCl (pH6.8) を 1.25 ml 、10%SDSを4 ml、2-メルカプトエタノールを 0.4  $\mu$ l 超純水を 14.6 ml 混合し調製した。

#### FACS バッファー

第一章第一節と同様に調製した。

### (3) 使用機器

マルチモードプレートリーダー SpectraMax iD3

Trans-Blot Turbo ( Bio-Rad )

### (4) 方法

#### i . Panx1-KO 4T1 の作製

ATCC から購入した 4T1 に、Guide-it™ CRISPR/Cas9 System ( Green ) ( タカラバイオ ) を用いてガイド RNA 配列 ( 図 6 ) を組み込んだプラスミドをトランスフェクションし、Panx1-KO を樹立した。対照として、Control オリゴ DNA を挿入したプラスミドを導入したものを準備した。トランスフェクションには Lipofectamine 3000 を使用した。

#### ii . 細胞培養

Panx1-KO および Control 4T1 は、いずれも調製済み RPMI 培地を使用し、37 °C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、2-3 日後にフラスコ内で 70-80% コンフルエントの状態になるよう播種した。細胞回収は 1xPBS 4 ml で洗浄してから 0.25%トリプシン/EDTA溶液で 5 分インキュベーター内に静置し、細胞を剥離して行った。

#### iii . 細胞ライセートの調製

トリプシンで剥がした細胞を回収後、 $1 \times 10^6$  cells を 1xPBS で洗浄し、細胞ペレットに調製済み RIPA バッファー 40  $\mu$ l を加えてピペティングし、氷上で 30 分間インキュベートした。その後、4 °C で 20000 g, 10 分間遠心し、上清を回収した。

#### iv . タンパク定量

細胞ライセート中のタンパク質濃度は、Pierce BCA protein assay kit を用い、付属のプロトコールに従い定量した。マルチモードプレートリーダー SpectraMax iD3 を用い、562 nm の吸光値を測定した。

#### v . SDS-PAGE

ゲルを泳動槽にセットし、ランニングバッファーを適量まで注いで各レーンにサンプルをアプライした。サンプルは、2xSDS-PAGE サンプルバッファーと 1 : 1 で混合し、加熱変性する為に 95 °C で 5 分間インキュベートして使用した。120 V, 約 80 分間泳動を行った。

#### vi . 転写

ゲルのサイズに合わせてカットしたメンブレンをメタノールに 30 秒間浸した後、超純水で 2 回洗浄した。その後トランスファーバッファーに浸しながら 1 時間で振盪し平衡化した。その後 Trans-Blot Turbo を用い 2.25 V、10 A で 30 分間転写を行った。

#### vii . ウェスタンブロットによる Panx1 の検出

転写後のメンブレンを TBST に浸し 5 分間振盪した。その後、ブロックエース 7 ml に浸し振盪した。5 ml の Can Get Signal Solution-1 に対し 20  $\mu$ l の Pannexin1 polyclonal antibody を添加し ( 250 倍希釈 )、一晩振盪した。

翌日、TBSTを3回置換して抗体を軽く洗い流した後、再度TBSTに浸し1時間振盪し洗浄した。この時10分ごとにTBSTを交換した。次に、2次抗体として6mlのCan Get Signal Solution-2に0.3 $\mu$ lのanti-rabbit IgG HRP-linked antibodyを添加し(20000倍希釈)、1時間振盪した。その後TBSTを10分ごとに交換しながら1時間振盪して洗浄した。

次にメンブレンをラップではさみ、基質(Chemi-Lumi-One L、SuperまたはUltra)を適量流し込んだ。Hyperfilmに感光し、現像した。

#### viii . ウェスタンブロットによるアクチンの検出

Panx1の現像を行った後、TBST中にて5分x3回洗浄した。洗浄後、ストリッピングバッファー6mlに浸し、30分間振盪した。再びTBSTで90rpmで5分x3回洗浄した後、ブロックエース5ml中で30分間振盪した。次に、6mlのブロックエースと0.2 $\mu$ lのHRP anti-beta Actin antibodyを混合した抗体溶液中にて30分間振盪した。その後、TBSTで90rpmで5分x3回洗浄した。

最後にメンブレンをラップではさみ、基質(Chemi-Lumi-One LまたはSuper)を適量流し込んだ。Hyperfilmに感光し、現像した。

#### ix . 細胞増殖アッセイ

0日目にControl及びPanx1-KOの4T1を6ウェルプレートに3連で $5 \times 10^4$  cellsずつ播種した。その後、2日ごとに細胞を剥離してセルカウントし、8分の1の細胞数を再び6ウェルプレートに3連で播種した。これを6日目まで行った。カウントにより得られた細胞数に希釈分の倍率を乗算し、これを増殖した細胞数に相当するものとした。

#### x . Annexin V アッセイ

Control 及び Panx1-KO 型の 4T1 を  $1.7 \times 10^5$  cells ずつ小フラスコに播種した。24 時間後に、抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 ファミリーを阻害する ATB-737 を終濃度  $10 \mu\text{M}$  で添加した。さらに 24 時間培養後に細胞を剥離し、 $100 \mu\text{l}$  の FACS バッファーで懸濁した。細胞懸濁液に FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD に付属の FITC Annexin V を  $2 \mu\text{l}$ 、7-AAD を  $2 \mu\text{l}$  添加し、ボルテックス後に室温・暗所で 15 分間インキュベートした。その後、 $400 \mu\text{l}$  の Annexin V Binding Buffer を加え、フローサイトメトリーで解析した。

## 【結果・考察】

4T1に高発現するPanx1が腫瘍微小環境に与える影響を検討する為、Panx1-KO型の4T1を樹立した。シーケンスの結果から、Panx1-KOの4T1細胞株はPanx1遺伝子の第1エクソンに1塩基の欠損を起こしていることが明らかとなった(図6)。さらに、ウエスタンブロットによって、Panx1-KO 4T1にはPanx1タンパク質が発現していないことを確認した(図7)。

次に、Panx1欠損により増殖力に変化が起きていないかを *in vitro* での増殖アッセイにより検討した。その結果、Panx1-KO細胞はControlと同等の増殖力を持っていることが確認された(図8)。

最後に、Annexin Vと7-AADを用いた染色によりアポトーシス頻度を比較した。Annexin V<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>-</sup>の集団を初期アポトーシス細胞と定義した。その結果、Panx1-KOとControlの細胞間でアポトーシス頻度に差はなかった(図9)。

以上の *in vitro* 実験の結果から、Panx1の欠損は、4T1細胞自体の増殖力には影響を与えないことが明らかになった。

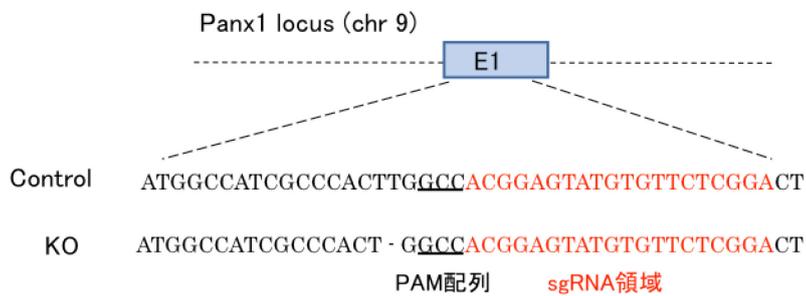


図6 4T1細胞株のPanx1遺伝子のゲノム編集

CRISPR-Cas9 システムを用いて4T1細胞株の9番染色体上のPanx1遺伝子第1エクソン(E1)中のコーディング領域から1塩基を欠損させた。

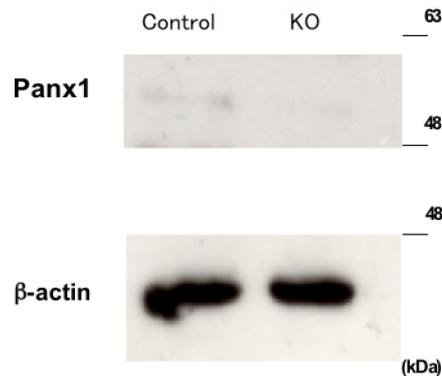


図7 ウェスタンブロッティングによるPanx1の発現解析

ウェスタンブロッティングによって Control および Panx1-KO 型 4T1 細胞株の Panx1 タンパク質の発現を比較した。

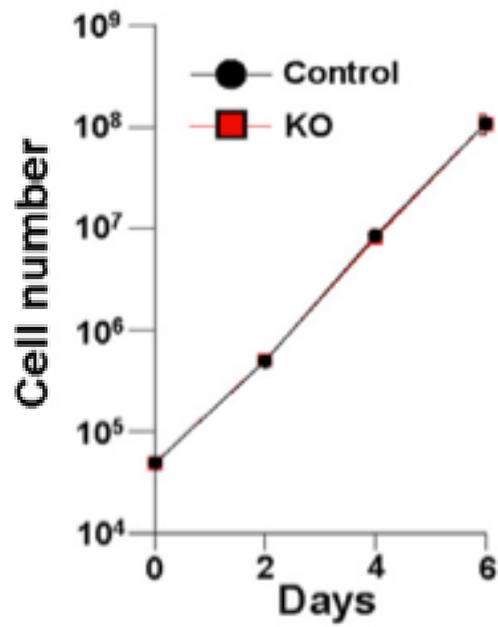


図8 *in vitro* における細胞増殖アッセイ

*in vitro* で培養した Control, Panx1-KO 株の細胞数を 1 日おきにカウントした。( n=3 )

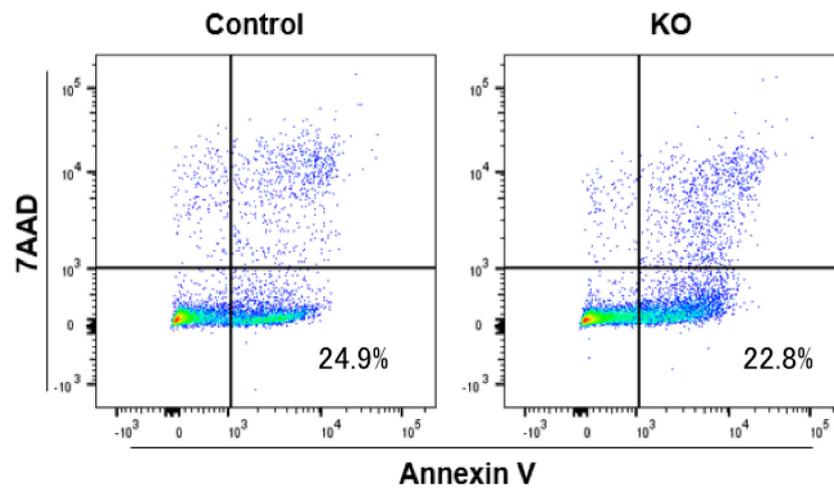


図9 Annexin Vアッセイ

*in vitro* でアポトーシス促進剤ATB-737存在下にて培養した Control および Panx1-KO 株のアポトーシス頻度を比較した。フローサイトメトリーを用い、Annexin V<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>-</sup>の集団を初期アポトーシス細胞と定義しその割合を解析した。

### 第三節 がん細胞のPanx1が腫瘍増殖およびNETs形成に与える影響

#### 【序論】

第二節では、Panx1-KO型4T1はControlと同等の増殖力を持っており、アポトーシスの頻度も同等であることが明らかとなった。よって本節では*in vivo*においてPanx1が腫瘍形成およびTANの機能に与える影響について検討することを目的とし、マウスにControlまたはPanx1-KOの4T1を皮下移植し、形成された腫瘍の経時的な体積変化と最終的な重量を測定して比較を行った。また、TANの浸潤割合についてフローサイトメトリーによって解析すると同時に、それぞれの腫瘍の組織切片を作製し、シトルリン化ヒストンを蛍光免疫染色で検出することにより、Panx1がTANのNETs形成に与える影響について評価した。

#### 【実験材料・方法】

##### (1) 試薬・器具類

- ・ RPMI-1640 with L-glutamine and phenol red (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)
- ・ 2-メルカプトエタノール (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ Fetal Bovine Serum (FBS, CAPRICORN Lot:cp17-1930)
- ・ トリプシン・EDTA溶液(0.25% trypsin, 0.02% EDTA Sigma)
- ・ PBS (-) 粉末 「ニッスイ」 (日水製薬)
- ・ EDTA-2Na (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ Liberase™ Research Grade (Roche)
- ・ Matrigel 基底膜マトリックス (Corning)
- ・ パーコール (GEヘルスケア・ジャパン)
- ・ RBC Lysis Buffer (10x) (BioLegend)

- ・ マイジェクター（テルモ、27G × 1/2” 0.40 × 13 mm）
- ・ 採血管 Heparinized Micro-Hematocrit Capillary Tubes (Fisherscientific)
- ・ セルストレイナー（BD Falcon）
- ・ Anti-mouse CD16/32 (Fc shield) purified Clone:2.4G (TONBO bioscience)
- ・ Biotin- anti-mouse CD170 Clone:S17007L(BioLegend)
- ・ FITC anti-mouse/human CD11b Clone:M1/70 (BioLegend)
- ・ PE anti-mouse Ly-6C Clone:HK1.4(BioLegend)
- ・ PE/Dazzle ™ 594 anti-Ly-6G Clone:1A8(BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse CD3 ε Clone:145-2C11(BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse CD19 Clone:6D5 (BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse NK1.1 Clone:PK136(BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse TER-119/Erythroid Cells Clone:TER-119(BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse streptavidin
- ・ PE/cy7 anti-mouse CD54 Clone:YN/1.74(BioLegend)
- ・ APC/Fire ™ 750 anti-mouse CD45 Clone:30-F11(BioLegend)
- ・ Alexa Fluor 700 anti-mouse I-A/I-E（MHC-II）  
Clone:M5/114.15.2(BioLegend)
- ・ 7-AAD Viability Staining Solution (BioLegend)
- ・ 4%PFA（4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液）（Wako）
- ・ スクロース（Wako）
- ・ 川本法用凍結包埋剤 SCEM-(L1)（SECTION-LAB）
- ・ クリオモルド 2号（サクラファンティックジャパン）
- ・ コートスライドガラスフロンティアブルー（松浪硝子）
- ・ TritonX-100（ナカライテスク）
- ・ Bovine Serum Albumin（Sigma）
- ・ ロバ血清（Wako）

- ・ 抗シトルリン化ヒストン H3 抗体 ( 抗 Cit-H3 抗体 ) ( abcam )( ab5103 )
- ・ Goat anti-rabbit IgG H&L Alexa Fluor 647 ( abcam )
- ・ Alexa Fluor 488 rat anti-mouse Ly6G Clone:1A8 ( BioLegend )
- ・ Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG Clone:Poly4064 ( BioLegend )
- ・ DAPI 封入剤 ( prolong Gold anifade reagent with DAPI ) ( invitrogen )

## (2) 試薬の調製

### FBS

常温まで融解後、恒温槽で 56 °C , 30 分間の非働化処理を行った。

### RPMI 培地

第一章第一節と同様に調製した。

### 1xPBS

第一章第一節と同様に調製した。

### 10xPBS

第一章第一節と同様に調製した。

### パーコール溶液

第一章第一節と同様に調製した。

### 0.5 M EDTA 溶液 (pH8.0)

第一章第一節と同様に調製した。

### FACS バッファー

第一章第一節と同様に調製した。

#### Liberase 溶液

第一章第一節と同様に調製した。

#### RBC Lysis Buffer(1x)

第一章第一節と同様に調製した。

#### 30%スクロース溶液

w/v で30%となるように超純水で攪拌し溶解した。

#### 浸透液

PBSに TritonX-100 を終濃度 0.5% で溶解して作成した。

#### ブロッキングバッファー

PBSにBSAを終濃度10%、ロバ血清を終濃度 1% になるよう調製した。

#### 抗体希釈用バッファー

第一章第二節と同様に調製した。

### (3) 使用機器

FACS AriaII(セルソーター)(Becton Dickinson)

クリオスタット HM550

共焦点レーザー顕微鏡 LEICA TCS SP8

### (4) マウスがん細胞株

第二節で作製した Control および Panx1-KO4T1 細胞株を使用した。

(5) マウス

第一章第一節と同様に扱った。

(6) 方法

i . 細胞培養

第二章第二節と同様に扱った。

ii . がん細胞株の皮下移植

Control 、 Panx1-KO 4T1 のいずれも  $3 \times 10^4$  を 1xPBS 30  $\mu$ l と Matrigel 30  $\mu$ l (計 60  $\mu$ l ) で懸濁し、マイジェクターに充填した。雌性 BALB/c マウス (7 週齢) の右下腹部から背中にかけてバリカンで毛刈りをし、それぞれのがん細胞株を右脇腹に皮下移植した。各腫瘍モデルは 5 匹ずつ作成した。本節では、がん細胞の移植から 19 日後に腫瘍を単離し、組織切片を作製した。

iii . 腫瘍サイズの測定・体積の計算

皮下移植 7 日後～解剖当日である 19 日後にかけて 2-3 日毎に腫瘍の長径 (L) と短径 (W) をデジタルノギスで測定した。体積 (V) は、

$$V = \frac{L \times W^2}{2}$$

で計算した。

iv . 腫瘍の単離・腫瘍組織浸潤細胞の調製

第一章第一節と同様に操作を行った。

v . 腫瘍組織浸潤細胞の免疫染色・フローサイトメトリー

第一章第一節と同様に操作を行った。

vi .FACS解析

第一章第一節と同様の解析を行った。

vii . 腫瘍の単離、包埋処理、ブロッキング

第一章第二節と同様に行った。

viii . Ly6Gおよび Cit-H3 の標識（免疫染色）

第一章第二節と同様に行った。

## 【結果・考察】

Panx1-KO 4T1 は *in vitro* では Control と同等の増殖力を示したが、移植モデルマウスに形成された腫瘍の体積（図 10A）および重量（図 10B）は Control と比較して有意に減少していた。

また、フローサイトメトリーによってそれぞれの群の腫瘍組織における TAN の割合を比較した結果、同程度の割合を示していた（図 11）。

これらの結果から、4T1 の Panx1 は腫瘍の成長促進に働いていることが明らかになった。一方で、浸潤する TAN の割合に変化は認められなかったことから、腫瘍組織への TAN の浸潤誘導には関わらないと考えられた。

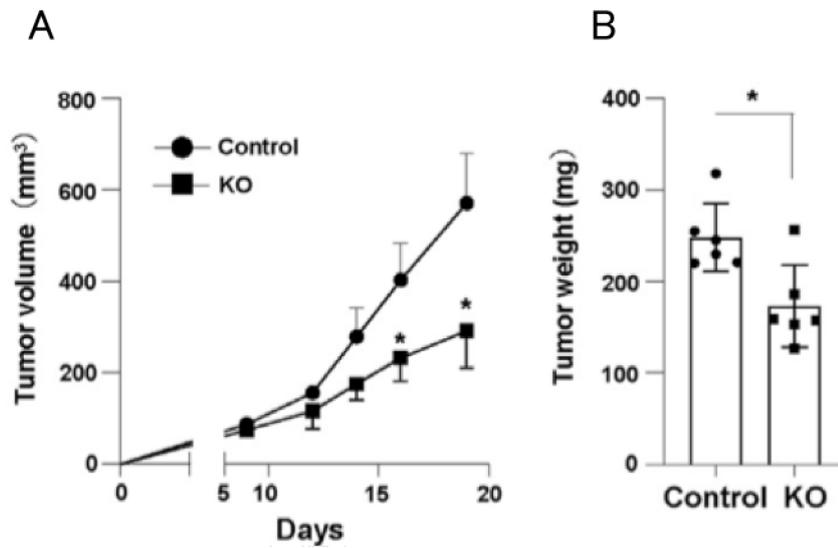


図 10 腫瘍体積の推移 ( A ) と最終的な腫瘍重量 ( B )

A : Control および Panx1-KO 型 4T1 をマウスに皮下移植し、腫瘍の体積を皮下移植 7 日目以降 2-3 日毎に測定した。

B : Control および Panx1-KO 型 4T1 腫瘍の重量を皮下移植の 19 日後に測定した。

( n=5 ) \* p<0.05

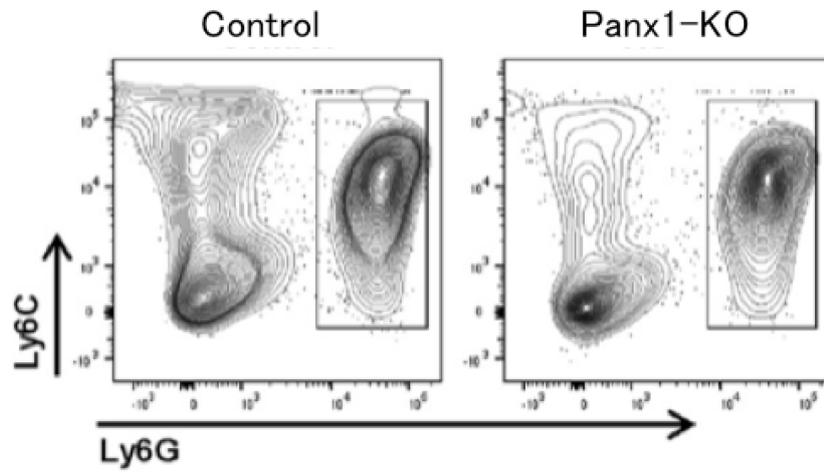


図 11 Control および Panx1-KO 腫瘍に浸潤する TAN

Control および Panx1-KO 腫瘍中の TAN の割合をフローサイトメトリーによって解析した。

一方、蛍光免疫染色法による解析では、Panx1-KO 4T1 で誘導した腫瘍内では Cit-H3 で標識される NETs の形成頻度が著しく低下しており、NETs 形成が 4T1 の Panx1 に依存的であることが明らかとなった ( 図 12 )。

これらの結果を総合的に評価すると、NETs 形成がほとんど見られない Panx1-KO 4T1 の腫瘍は成長が抑制されていたことから、4T1 腫瘍における NETs は腫瘍を促進する働きを持つことが示唆された。また、既述の通り、腫瘍における NETs は CTL や NK 細胞の抗腫瘍活性を妨害する働きを持つことが報告されている。したがって、4T1 腫瘍における TAN の NETs 形成は、この機構により腫瘍微小環境の抗腫瘍免疫の低下をもたらすと予想される。さらに、TAN 自体の抗腫瘍活性が低下している可能性も考えられる。

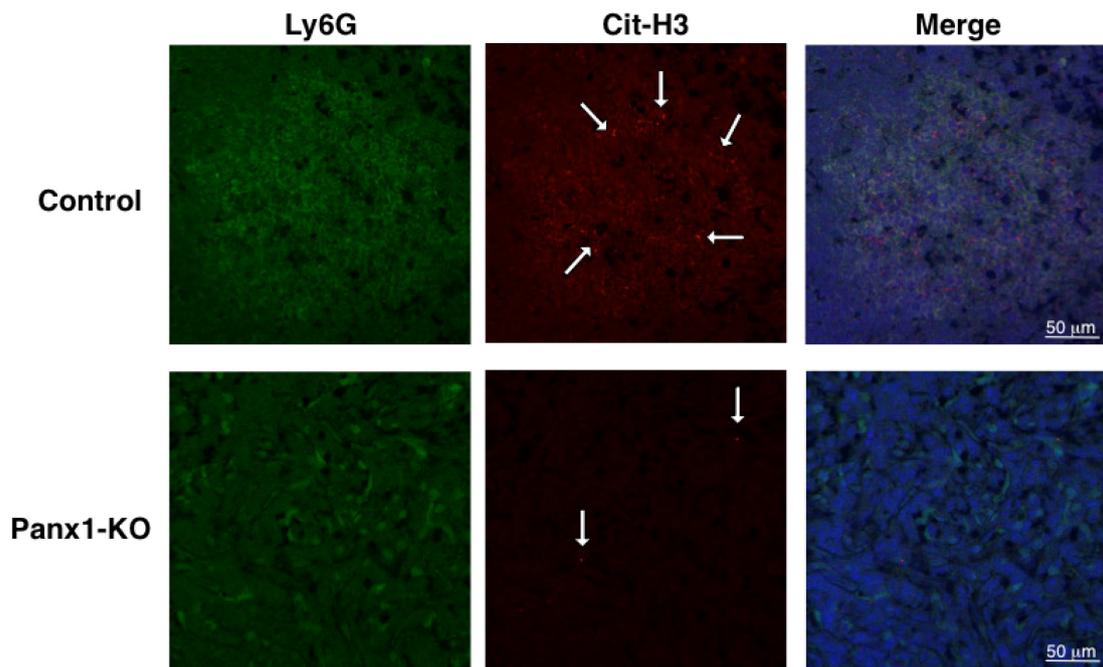


図 12 Control, Panx1-KO 腫瘍における NETs 形成 (免疫染色法)  
Control および Panx1-KO 腫瘍における NETs 形成を免疫蛍光染色により解析した。

緑：好中球マーカー Ly6G

赤：NETs に特徴的に見られる Cit-H3

青：DAPI (DNA を染色する)

#### 第四節 NETs 形成が腫瘍の成長に与える影響(Padi4欠損マウスを用いた解析)

##### 【序論】

前節までの結果から、4T1 腫瘍における NETs 形成は、腫瘍の成長を促進する働きを持っていることが示唆された。本節では、NETs 形成が腫瘍に与える影響を明らかにするため、NETs 形成に必須の酵素 PAD4 の遺伝子を欠損した *Padi4*<sup>-/-</sup> マウスに 4T1 を皮下移植し、形成された腫瘍の経時的な体積変化と最終的な重量を測定した。また、浸潤している TAN の割合についてフローサイトメトリーによって解析した。さらに、TAN をソーティングして回収し、抗腫瘍活性を評価する為に、関連する遺伝子 (TNF $\alpha$ , Nox2, Nadph ) の mRNA 発現を定量 PCR 法で解析した。

##### 【実験材料・方法】

###### (1) 試薬・器具類

- ・ RPMI-1640 with L-glutamine and phenol red (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)
- ・ 2-メルカプトエタノール (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ Fetal Bovine Serum (FBS, CAPRICORN Lot:cp17-1930)
- ・ トリプシン・EDTA 溶液(0.25% trypsin, 0.02% EDTA Sigma)
- ・ PBS (-) 粉末 「ニッスイ」 (日水製薬)
- ・ EDTA-2Na (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ Liberase<sup>TM</sup> Research Grade (Roche)
- ・ Matrigel 基底膜マトリックス (Corning)
- ・ パーコール (GEヘルスケア・ジャパン)
- ・ RBC Lysis Buffer (10x) (BioLegend)

- ・ マイジェクター (テルモ、27G × 1/2" 0.40 × 13 mm)
- ・ 採血管 Heparinized Micro-Hematocrit Capillary Tubes (Fisherscientific)
- ・ セルストレイナー (BD Falcon)
- ・ Anti-mouse CD16/32 (Fc shield) purified Clone:2.4G (TONBO bioscience)
- ・ Biotin- anti-mouse CD170 Clone:S17007L(BioLegend)
- ・ FITC anti-mouse/human CD11b Clone:M1/70 (BioLegend)
- ・ PE anti-mouse Ly-6C Clone:HK1.4(BioLegend)
- ・ PE/Dazzle ™ 594 anti-Ly-6G Clone:1A8(BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse CD3 ε Clone:145-2C11(BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse CD19 Clone:6D5 (BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse NK1.1 Clone:PK136(BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse TER-119/Erythroid Cells Clone:TER-119(BioLegend)
- ・ PE/cy5 anti-mouse streptavidin
- ・ PE/cy7 anti-mouse CD54 Clone:YN/1.74(BioLegend)
- ・ APC/Fire ™ 750 anti-mouse CD45 Clone:30-F11(BioLegend)
- ・ Alexa Fluor 700 anti-mouse I-A/I-E ( MHC- II )  
Clone:M5/114.15.2(BioLegend)
- ・ 7-AAD Viability Staining Solution (BioLegend)
- ・ Fast Gene ™ RNA Premium Kit 50 preps
- ・ 50 μM Origo (dT) primer RETROscript ™ kit (invitrogen Thermo Fisher Scientific)
- ・ 10 mM dNTP Mix(Deoxynucleotide Solution Mix)(NEW ENGLAND BioLabs)
- ・ 5xSS IV Buffer (invitrogen Thermo Fisher Scientific)
- ・ 100 mM DTT (invitrogen Thermo Fisher Scientific)
- ・ RNase OUT ™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor(invitrogen)

- ・ Super script® IV Reverse Transcriptase(200U/μl) (invitrogen Thermo Fisher Scientific)
- ・ KAPA SYBR FAST Universal (KAPA BIOSYSTEMS)
- ・ プライマー
  - GAPDH-Forward ( 5'-TGTG TCCG TCGT GGAT CTGA-3' )
  - GAPDH-Reverse ( 5'-CCTG CTTC ACCA CCTT CTTG A-3' )
  - TNF-Forward ( 5'-ATCC GCGA CGTG GAAC TG-3' )
  - TNF-Reverse ( 5'-ACCG CCTG GAGT TCTG GAA-3' )
  - NOX2-Forward ( 5'-TTTG TCAA GTGC CCCA AGGT-3' )
  - NOX2-Reverse ( 5'-GGCA TCTT GGAA CTCC TGCT-3' )
  - Nadph-Forward ( 5'-GCGA TTCG GTGT GATG TTCG-3' )
  - Nadph-Reverse ( 5'-ATGG TCTT CCAG CCAT TGGG-3' )
- ・ PCR grade water
- ・ FrameStar®96 Well Skirted PCR Plate(4titude)

## (2) 試薬の調製

### FBS

常温まで融解後、恒温槽で 56 °C , 30 分間の非働化処理を行った。

### RPMI 培地

第一章第一節と同様に調製した。

### 1xPBS

第一章第一節と同様に調製した。

### 10xPBS

第一章第一節と同様に調製した。

#### パーコール溶液

第一章第一節と同様に調製した。

#### 0.5 M EDTA 溶液 (pH8.0)

第一章第一節と同様に調製した。

#### FACS バッファー

第一章第一節と同様に調製した。

#### Liberase 溶液

第一章第一節と同様に調製した。

#### RBC Lysis Buffer(1x)

第一章第一節と同様に調製した。

### (3) 使用機器

FACS Aria II( セルソーター)(Becton Dickinson)

ナノドロップ ( ND-1000 Spectrophotometer )

CFX96 Touch Real Time PCR ( BIORAD )

### (4) マウスがん細胞株

4T1 は ATCC から購入した。

## (5) マウス

理化学研究所生命医科学研究センターから供与された *Padi4*<sup>-/-</sup>C57/B6 マウスから BALB/c マウスへ F10 世代まで戻し交配を行い、実験に使用した。飼育などは第一章第一節と同様に行った。なお、*Padi4*<sup>-/-</sup> マウスは *Padi4* 遺伝子がネオマイシン耐性遺伝子に置換されている。ジェノタイピングに用いたプライマーの配列を以下に示す。

Padi4\_Foward: CAGTGGGTCAGTGA CTGTC

Padi4\_Reverse: CGAGAGCTAGCCTGGGATC

Neo\_Forward: CAGCTGTGCTCGACGTTGTC

Neo\_Reverse: CAACGCTATGTCCTGATAGC

## (6) 方法

### i . 細胞培養

第一章第一節と同様に行った。

### ii . がん細胞株の皮下移植

4T1 を  $3 \times 10^4$  cells、1xPBS 30  $\mu$ l と Matrigel 30  $\mu$ l (計 60  $\mu$ l) で懸濁し、マイJECTA に充填した。雌性の野生型または *Padi4*<sup>-/-</sup> マウス (7 週齢) の右下腹部から背中にかけてバリカンで毛刈りをし、4T1 細胞株を右脇腹に皮下移植した。各腫瘍モデルは 5 匹ずつ作成した。本節では、がん細胞の移植から 19 日後に腫瘍を単離し、解析した。

### iii . 腫瘍サイズの測定・体積の計算

第三節と同様に行った。

iv . 腫瘍の単離・調製

第一章第一節と同様に操作を行った。

v . 腫瘍の細胞の抗体染色 , FACS 解析 , TAN のソーティング

抗体染色と FACS 解析は第一章第一節と同様に操作を行った。

TAN は、 $1 \times 10^5$  cells ソーティングし、回収した。

vi . FACS 解析

第一章第一節と同様の解析を行った。

vii . RNA 抽出

抽出は Fast Gene™ RNA Premium Kit を用いて添付のプロトコールに従って行ったが、RNA 濃度を高める為、抽出に用いる RE (キットに付属の試薬) は  $14 \mu\text{l}$  にとどめた。

viii . RNA 逆転写 ( cDNA の合成 )

第二章第一節と同様に行った。

ix . 定量 PCR

第二章第一節と同様に行った。

### 【結果・考察】

NETs が腫瘍増殖に与える影響を検討する為、遺伝的に NETs を起こせない *Padi4*<sup>-/-</sup> マウスを用いて 4T1 腫瘍の経時的体積変化・実験終了時の重量を計測した。その結果、*Padi4*<sup>-/-</sup> マウスは野生型マウスと比較して腫瘍の体積が有意に減少し（図 13A）、腫瘍重量も低下する傾向を示していた（図 13B）。このことから、NETs 形成は 4T1 腫瘍の成長を促進していることが明らかとなった。

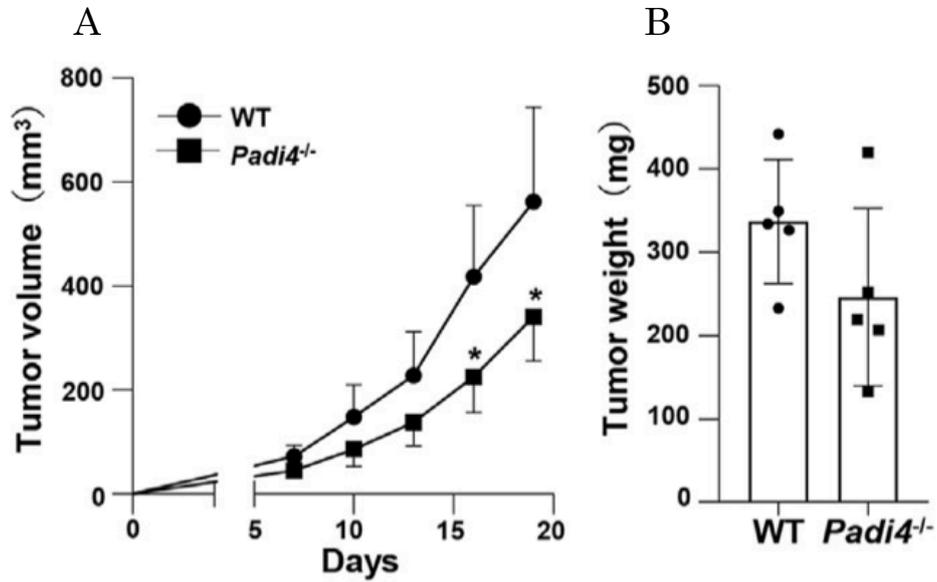


図 13 腫瘍体積の推移 ( A ) と最終的な腫瘍重量 ( B )

A : 野生型および *Padi4*<sup>-/-</sup> マウスに 4T1 を皮下移植し、腫瘍体積を皮下移植 7 日目以降 2-3 日毎に測定した。

B : 野生型および *Padi4*<sup>-/-</sup> マウスの腫瘍重量を皮下移植の 19 日後に測定した。

( n=5 ) \* p<0.05

また、腫瘍組織中の TAN の割合に両マウス間で差は無かったが（図 14 ）、定量 PCR によって TAN に発現する抗腫瘍活性に関わる遺伝子（*TNF $\alpha$* ：炎症性サイトカイン，*Nox2/Nadph*：活性酸素種の合成に関与）の発現を比較した結果、野生型マウスの TAN は *Padi4*<sup>-/-</sup> マウスに比べこれらの遺伝子の発現が低く、抗腫瘍活性が低いことが示唆された（図 15）。

このことから、TAN の NETs 形成は、これまでの報告により明らかにされているように CTL や NK 細胞の抗腫瘍作用を阻害するのみでなく、TAN 自身の抗腫瘍活性の低下も伴っていることが明らかになった。

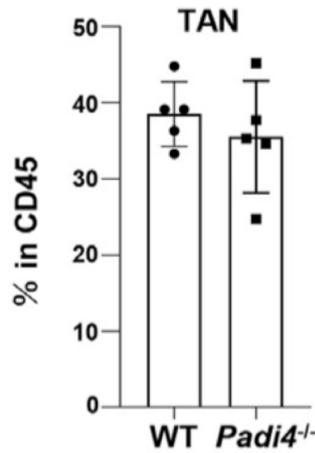


図 14 野生型および *Padi4*<sup>-/-</sup> マウスの腫瘍における TAN の割合  
 野生型および *Padi4*<sup>-/-</sup> マウスに 4T1 を皮下移植し、腫瘍における TAN の割合をフローサイトメトリーで解析した。( n=5 )

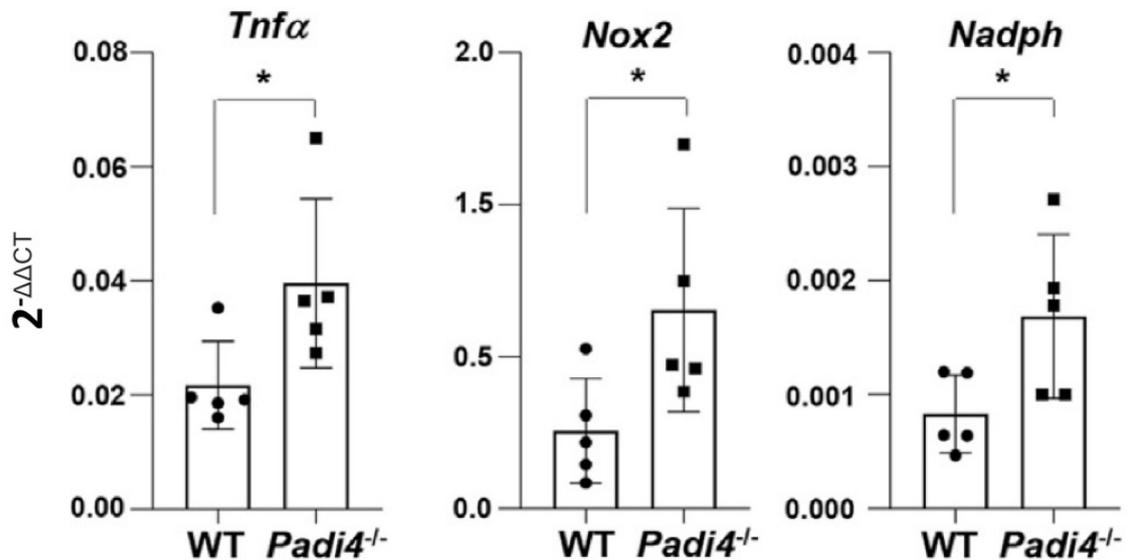


図 15 TAN における抗腫瘍活性に関わる遺伝子発現の解析  
 4T1 を皮下移植した野生型および *Padi4*<sup>-/-</sup> マウスの腫瘍中から TAN をソーティングし、抗腫瘍活性に関わる遺伝子の発現を定量 PCR によって比較した。( n=5 ) \* p<0.05

### 第三章

Panx1 を介して放出される  
NETs 誘導因子の解析

## 第一節 Panx1由来代謝産物が *in vitro* での NETs 形成に与える影響

### 【序論】

前章までの結果から、4T1細胞株で誘導した腫瘍に浸潤した TAN が NETs を形成することで腫瘍の成長を促進すること、さらに NETs の形成は 4T1細胞株の Panx1 依存的であることが明らかになった。このことから、4T1細胞がアポトーシスを起こす際に活性化した Panx1 を介して放出される代謝産物が、NETs 形成を誘導すると考えられた。本節では、この NETs を誘導する代謝産物を明らかにするために、骨髓由来好中球に 4T1細胞株の培養上清を添加することにより以下の検証を行った。

まず、Control および Panx1-KO の 4T1細胞株の培養上清を用いて好中球を刺激し、どの程度 NETs が誘導されるか蛍光免疫染色法で評価した。これにより、4T1細胞株から Panx1 依存的に放出される代謝産物に NETs を誘導する活性を有するものがあるか検討した。また、NETs 誘導活性を示す代謝産物がアポトーシス時に放出される分子であるかどうか検討するために、アポトーシス阻害剤である z-VAD-FMK で処理した 4T1細胞株の培養上清を用いて評価した。

正常細胞がアポトーシスを起こす際、Panx1 を介し放出される炎症抑制性の分子の一つとして、スペルミジンが報告されている ( 13 )。スペルミジンは、細胞の生存、増殖、ミトコンドリアの機能維持に必須のポリアミンの一種で免疫調節にも関わる分子であり、好中球の NETs 形成に関わっている可能性が考えられた。従って、スペルミジンがアポトーシスの際に 4T1細胞から Panx1 を介して放出され、NETs 形成を誘導するのではないかと仮定した。そこで、Control および Panx1-KO の 4T1細胞株の培養上清中のスペルミジン濃度を ELISA 法によって比較した。さらに、試薬グレードのスペルミジンで好中球を刺激し、蛍光免疫染色法で NETs の誘導を評価した。

## 【実験材料・方法】

### (1) 試薬・器具類

- ・ RPMI-1640 with L-Glutamine and phenol red (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)
- ・ 2-メルカプトエタノール (富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・ Fetal Bovine Serum (FBS, CAPRICORN Lot:cp17-1930)
- ・ PBS (-) 粉末 「ニッスイ」 (日水製薬)
- ・ DISMIC-25CS (0.2  $\mu$ m フィルター) (ADVANTEC)
- ・ Ultracel®-3k (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filters)
- ・ テトロンメッシュ (三商 Cat:91-1226)
- ・ RBC Lysis Buffer (10x) (BioLegend)
- ・ マイジェクター (テルモ、27G  $\times$  1/2" 0.40  $\times$  13 mm)
- ・ LS Columns (Miltenyi Biotec Cat:130-042-401)
- ・ Neutrophil Isolation kit (Miltenyi Biotec Cat:130-097-658)
- ・ PMA (ホルボール 12- ミリステート 13- アセテート)  
(Cat:AG-CN2-0010-M001 Funakosshi)
- ・ Lab-Tek II Chamber Slide w/Cover RS Glass Slide Sterile (Thermo Fisher Scientific Cat:154526)
- ・ 4%PFA (4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液) (Wako)
- ・ TritonX-100 (ナカライテスク)
- ・ Bovine Serum Albumin (Sigma Lot:SLBX5725)
- ・ ロバ血清 (Wako)
- ・ 抗シトルリン化ヒストン H3 抗体 (抗 Cit-H3 抗体) (abcam)(ab5103)
- ・ Goat anti-rabbit IgG H&L Alexa Fluor 647 (abcam)
- ・ DAPI 封入剤 (prolong Gold antifade reagent with DAPI) (invitrogen)

- ・ 接着培養フラスコ 25 (小フラスコ) (住友ベークライト)
- ・ Dimethyl sulfoxide (DMSO) (和光純薬)
- ・ z-VAD(OMe)-FMK (コスモ・バイオ)
- ・ ELISA Kit For Spermidine (Cat:CEX053Ge Cloud-Clone Corp.)
- ・ スペルミジン (Cat:191-13831 和光純薬)

## (2)試薬の調製

### FBS

常温まで融解後、恒温槽で 56 °C, 30 分間の非働化処理を行った。

### RPMI 培地

第一章第一節と同様に調製した。

### z-VAD-FMK 原液

z-VAD-FMK を 10.7 mM となるように DMSO に溶解した。

### 1xPBS

PBS(-)粉末 「ニッスイ」 (日水製薬) を添付のプロトコールに従い調製した。オートクレーブ滅菌後、4 °C で保存した。

### FACS バッファー

第一章第一節と同様に調製した。

### 浸透液

PBSに TritonX-100 を終濃度 0.5% で添加して作成した。

### ブロッキングバッファー

PBSにBSAを終濃度10%、ロバ血清を終濃度1%になるように添加して調製した。

### 抗体希釈用バッファー

PBSにTritonX-100を終濃度0.3%、BSAを終濃度1%になるように添加して調製した。免疫染色に用いる抗体は、このバッファーで希釈して使用した。

### (3)使用機器

MACS Miltenyi Biotec

共焦点レーザー顕微鏡 LEICA TCS SP8

### (4) マウスがん細胞株

第二章第二節で作製したControlおよびPanx1-KO 4T1細胞株を使用した。

### (5) マウス

第一章第一節と同様に扱った。

### (6) 方法

#### i . がん細胞株の培養

4T1はATCCから購入し、第一章第一節と同様に扱った。また、Panx1-KOおよびControlの4T1は、第二章第二節と同様に扱った。

#### ii . 培養上清の回収・限外ろ過

Control または Panx1-KO の 4T1 細胞株を調製済み RPMI 培地 3.5 ml 中に  $5 \times 10^5$  cells となるように準備して小フラスコに播種し、72 時間培養した。培養上清を回収し、0.20  $\mu\text{m}$  フィルターを通してろ過した後、Ultracel-3k を用いて 2300 rpm で 40 分、4  $^{\circ}\text{C}$  で遠心を行い、 $<3\text{kDa}$  画分を得た。培養上清は凍結融解を避けるため ELISA または好中球刺激の実験当日に合わせて回収した。

また、z-VAD-FMK 処理および未処理の 4T1 の培養上清を同様に調製した。z-VAD-FMK (原液 10.7 mM) は 4T1 細胞の培養開始 48 時間後に終濃度 100  $\mu\text{M}$  になるよう培地 3.5 ml に対し 32.7  $\mu\text{l}$  を添加し、さらに 24 時間培養した後に培養上清を回収し限外ろ過分画を行わずに使用した。DMSO の細胞毒性を考慮して培地中の DMSO が 1% 未満になるようにした。

### iii . ELISA

限外ろ過した Control または Panx1-KO 4T1 の培養上清中のスペルミジン濃度を ELISA Kit For Spermidine を用いて測定した。方法はキットに付属のプロトコールに従った。

### iv . 骨髄由来好中球の調製

8-12 週齢の雌性 BALB/c マウスをイソフルラン麻酔下で頸椎脱臼した後、ハサミを使用して片足の脛骨・大腿骨を摘出した。マイJECTターに PBS を充填し骨髄内の細胞を押し出し 4  $^{\circ}\text{C}$ , 1500 rpm, 5 min で遠心した。上清を除去し、3 ml の 1xRBC Lysis Buffer で懸濁し常温で 10 分静置した。その後 PBS を 10 ml 加え、RBC 処理を停止し、4  $^{\circ}\text{C}$ , 2000 rpm, 10 min で遠心した。細胞を RPMI 培地 4-5 ml で懸濁し、4  $^{\circ}\text{C}$ , 1500 rpm 10 min で遠心をした。その後、MACS 法により下記のようにして好中球を単離した。200  $\mu\text{l}$  の FACS バッファーで懸濁し、Neutrophil Biotin-Antibody cocktail を  $1 \times 10^8$

cellsに対し 25  $\mu$ l 加え、10 分間冷蔵庫で静置した。静置中は5分おきにボルテックスにより攪拌した。その後5~10 ml の FACS バッファーを加え、4  $^{\circ}$ C , 1500 rpm, 10 min 遠心を行った。上清を除去し、400  $\mu$ l の FACS バッファーで懸濁し、Anti-Biotin Microbeads を  $1 \times 10^8$  cells に対し 50  $\mu$ l 添加し、冷蔵庫で 15 分間静置した。静置中は5分おきにボルテックスにより攪拌した。その後5~10 ml の FACS バッファーを加え、4  $^{\circ}$ C , 1500 rpm, 10 min 遠心を行った。上清を除去し、500  $\mu$ l の FACS バッファーで懸濁した。最後に LS Columns を用いてネガティブセレクションにより好中球を回収した。

#### v . 好中球の播種・蛍光免疫染色

回収した好中球  $1 \times 10^5$  cells を 500  $\mu$ l の RPMI 培地、Control および Panx1-KO 4T1 培養上清の <3kDa画分、または未処理および z-VAD-FMK 処理した 4T1 の培養上清で懸濁し、チャンバースライドのウェルに播種した。スペルミジン添加の場合、終濃度 100  $\mu$ M になるよう RPMI 培地に溶解した。これらの上清には NETs 活性を持つ PMA を終濃度 100 nM となるよう添加し、37  $^{\circ}$ C, 5 %CO<sub>2</sub> のインキュベーターで培養した。4-6 時間後に上清を除去し、風乾後、4%PFA を 200  $\mu$ l 滴下し、室温で 15 分静置した。その後 PBS で 3 回洗浄し、浸透液 200  $\mu$ l を滴下して室温で 15 分静置した。再び PBS で 3 回洗浄し、ブロッキングバッファーを 200  $\mu$ l を滴下して室温で 1 時間静置した。次に 1 次抗体として抗 Cit-H3 抗体を 0.083 mg/ml で添加し、4  $^{\circ}$ C で 1 時間静置後に PBS で 3 回洗浄した。次に 2 次抗体として Goat anti-rabbit IgG H&L Alexa Fluor 647 を 0.333 mg/ml で添加し、4  $^{\circ}$ C で 1 時間静置した後、PBS で 3 回洗浄した。最後に DAPI 封入剤を必要最低量垂らし、上からカバーガラスをかぶせてマニキュアで固定した。観察は、共焦点レーザー顕微鏡で行った。

## 【結果・考察】

本節では、4T1からPanx1を介して放出されNETsを誘導する代謝産物について解析を行った。ControlおよびPanx1-KO 4T1の培養上清の<3kDa画分を用いて骨髓由来好中球を刺激した結果、Control 4T1の培養上清を用いた場合にはNETsの誘導が認められたのに対し、Panx1-KOの上清を用いた場合にはNETs頻度が著しく低下していた(図16)。したがって、4T1の培養上清にはNETs誘導活性をもつ3kDa以下の低分子代謝産物が含まれること、この代謝産物の放出はPanx1に依存することが明らかになった。また、アポトーシス阻害剤で処理した4T1の培養上清のNETs誘導活性は顕著に低下していたことから(図17)、NETs誘導活性を持つ代謝産物はアポトーシス依存的に放出されることが示された。

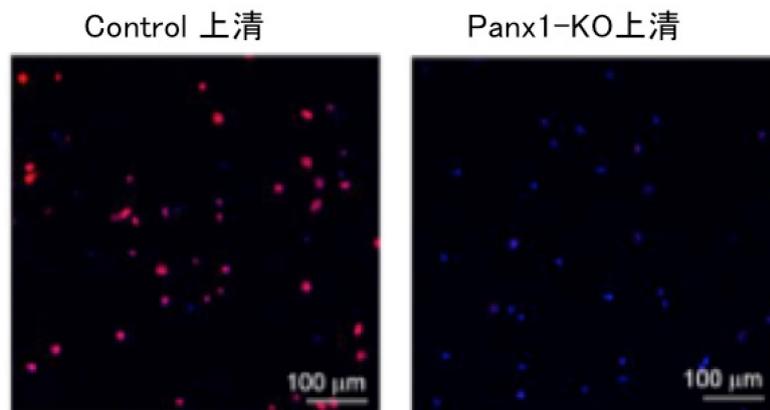


図 16 Control および Panx1-KO 4T1 の培養上清による NETs の誘導  
Control および Panx1-KO 4T1 の培養上清を用いて骨髓由来好中球を刺激し、免疫蛍光染色を行った。

赤：NETs に特徴的に見られる Cit-H3

青：DAPI

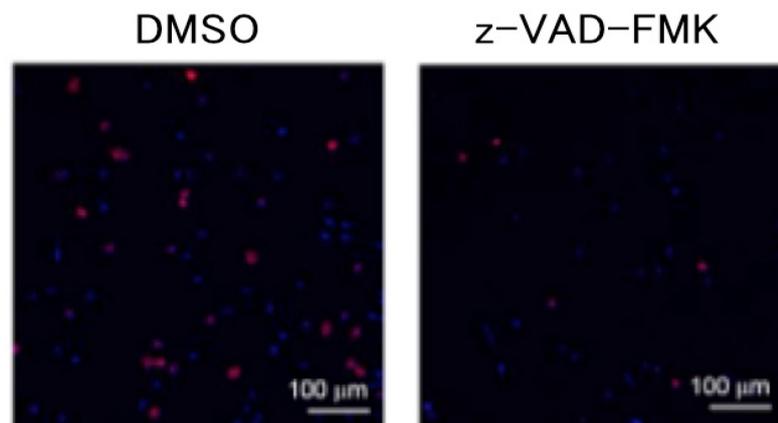


図 17 4T1 のアポトーシス阻害による NETs の抑制

z-VAD-FMK を添加することでアポトーシスを阻害して培養した 4T1 の培養上清を用い、骨髓由来好中球を刺激し、免疫蛍光染色を行なった。

赤：NETs に特徴的に見られる Cit-H3

青：DAPI

次に、正常細胞において Panx を介して放出されることが報告されているスペルミジンに注目して解析を行った。Panx1-KO の 4T1 細胞株の培養上清中のスペルミジン濃度を ELISA により測定したところ、Control 4T1 の培養上清と比較してスペルミジン濃度が低下していることが明らかになった（図 18）。よって、4T1 から Panx1 を介して培養上清中へスペルミジンが放出されることが示された。さらに、試薬グレードのスペルミジンを用いて骨髓由来好中球を刺激した結果、無刺激と比較して高い頻度で NETs が誘導され、スペルミジンが NETs 誘導活性を示すことが明らかになった（図 19）。

以上、アポトーシスを起こした 4T1 から Panx1 を介して放出される低分子代謝産物が NETs を誘導することが明らかとなり、NETs 誘導活性を示す低分子代謝産物の少なくとも 1 つはスペルミジンであると推定された。4T1 細胞株の Panx1 の欠損、アポトーシス阻害による Panx1 の活性化の抑制は、いずれも培養上清中へのスペルミジン分泌の低下を引き起こし、好中球の NETs 形成が抑制されたと考えられる。

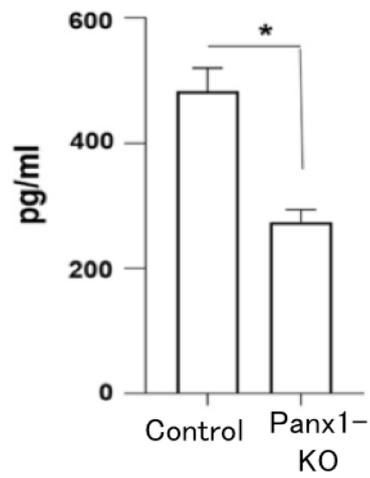


図 18 Controlおよび Panx1-KO 4T1 の培養上清中スペルミジン濃度  
Control および Panx1-KO 4T1 の培養上清中スペルミジン濃度を ELISA に  
よって測定した。( n=3 ) \* p<0.05

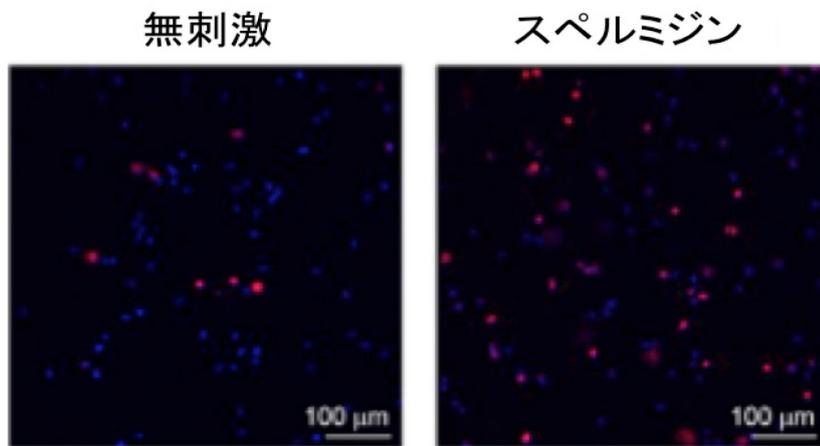


図 19 試薬グレードのスペルミジンによる NETs 形成の誘導  
骨髄由来好中球を、試薬グレードのスペルミジンを用いて刺激し、蛍光免疫  
染色を行った。  
赤：NETs に特徴的に見られる Cit-H3  
青：DAPI

## 第二節 スペルミジンが*in vivo*での腫瘍増殖および NETs 形成に与える影響

### 【序論】

前節での *in vitro* における検証から、4T1 細胞株のアポトーシスによって Panx1 依存的に放出されたスペルミジンが、好中球の NETs 形成を促進し、腫瘍を促進していると考えられた。本節では、スペルミジンが腫瘍形成に与える影響について *in vivo* で検討するため、ポリアミンの合成を担う酵素である ODC ( ornithine decarboxylase ) を標的とした阻害剤 DFMO ( Eflornithine hydrochloride hydrate ) を 4T1 腫瘍モデルマウスに投与し、腫瘍体積の経時的変化と最終的な腫瘍重量の比較を行った。また、腫瘍内の NETs 頻度を比較するために、腫瘍の組織切片を作製し、シトルリン化ヒストンを免疫蛍光染色により検出し評価した。

### 【実験材料・方法】

#### (1) 試薬・器具類

- ・ RPMI-1640 with L-glutamine and phenol red ( 富士フィルム和光純薬株式会社 )
- ・ ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液 ( ナカライテスク )
- ・ 2-メルカプトエタノール ( 富士フィルム和光純薬株式会社 )
- ・ Fetal Bovine Serum FBS (CAPRICORN Lot:cp17-1930)
- ・ トリプシン・EDTA 溶液(0.25% trypsin, 0.02% EDTA Sigma)
- ・ PBS (-) 粉末 「ニッスイ」 ( 日水製薬 )
- ・ マイジェクター ( テルモ、27G × 1/2" 0.40 × 13 mm)
- ・ 4%PFA ( 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 ) ( Wako )
- ・ スクロース ( Wako )
- ・ 川本法用凍結包埋剤 SCEM-(L1) ( SECTION-LAB )
- ・ クリオモルド 2 号 ( サクラファンティックジャパン )

- ・ コートスライドガラスフロンティアブルー（松浪硝子）
- ・ TritonX-100（ナカライテスク）
- ・ Bovine Serum Albumin（Sigma）
- ・ ロバ血清（Wako）
- ・ 抗シトルリン化ヒストン H3 抗体（抗 Cit-H3 抗体）（abcam)(ab5103)
- ・ Goat anti-rabbit IgG H&L Alexa Fluor 647 (abcam)
- ・ Alexa Fluor 488 Rat anti-mouse Ly6G Clone:1A8 (BioLegend)
- ・ Alexa Fluor 488 Donkey anti-rabbit IgG Clone:Poly4064 (BioLegend)
- ・ DAPI 封入剤（prolong Gold antifade reagent with DAPI）（invitrogen)
- ・ Eflornithine hydrochloride hydrate (DFMO)  
（Cat:HY-B0744BMedChemexpress）

## (2) 試薬の調製

### FBS

常温まで融解後、恒温槽で 56 °C , 30 分間の非働化処理を行った。

### RPMI 培地

第一章第一節と同様に調製した。

### 1xPBS

第一章第一節と同様に調製した。

### 30%スクロース溶液

w/v で30%となるように超純水に溶解した。

### 浸透液

PBSに TritonX-100 を終濃度 0.5% で添加して作成した。

#### ブロッキングバッファー

PBSにBSAを終濃度10%、ロバ血清を終濃度 1% になるよう調製した。

#### 抗体希釈用バッファー

第一章第二節と同様に調製した。

### (3) 使用機器

FACS Aria II( セルソーター)(Becton Dickinson)

クリオスタット HM550

共焦点レーザー顕微鏡 LEICA TCS SP8

### (4) マウスがん細胞株

4T1はATCCから購入した。

### (5) マウス

第一章第一節と同様に扱った。4T1の移植7日後から、DFMOを飲み水に2% (w/v)で溶解し、自由摂取させた。

### (6) 方法

#### i . 細胞培養

第一節と同様に行った。

#### ii . がん細胞株の皮下移植

4T1を  $3 \times 10^4$  cells、1xPBS 30  $\mu$ l と Matrigel 30  $\mu$ l(計 60  $\mu$ l)で懸濁し、マ

インジェクターに充填した。雌性 BALB/c マウス（7 週齢）の右下腹部から背中にかけてバリカンで毛刈りをし、4T1 細胞株を右脇腹に皮下移植した。各腫瘍モデルは 3 匹ずつ作成した。本節では、がん細胞の移植から 19 日後に腫瘍を単離し、解析した。

### iii . 腫瘍サイズの測定・体積の計算

第二章第三節と同様に行なった。

### iv . 腫瘍の単離、包埋処理、ブロッッキング

第一章第二節と同様に行った。

### v . Ly6Gおよび Cit-H3 の標識（免疫染色）

第一章第二節と同様に行った。

## 【結果・考察】

4T1を移植したマウスへのDFMOの投与によって、スペルミジン合成を阻害し、NETs形成および腫瘍増殖への影響を検討した。その結果、

DFMO投与群のマウスの腫瘍は対照群と比較して腫瘍体積の増加の著しい遅延と（図20A）、最終的な腫瘍重量の低下（図20B）が見られ、腫瘍形成が顕著に遅延することが示された。また、蛍光免疫染色法によって腫瘍組織中のNETsの検出を行った結果、DFMO投与群においてNETsの形成頻度が著しく低下していた（図21）。

これらの結果は、*in vitro*の結果と一致して、スペルミジンがTANのNETs形成を誘導していることを支持するものである。また、第二章でNETs形成は腫瘍の成長を促進することが示されており、DFMO投与による腫瘍成長の遅延は、スペルミジンの合成阻害によってNETs形成が抑制された結果だと考えられた。DFMOの投与は腫瘍成長に対して非常に強い抑制作用を示したが、TANのNETs形成抑制に加えて、DFMOがNETsの誘導抑制以外の作用や腫瘍微小環境中の免疫細胞など4T1以外の細胞への作用を介しても寄与している可能性が考えられる。

以上、本研究により得られた結果をまとめると、高頻度でアポトーシスを起こす4T1は、Panx1依存的にTANのNETs形成を誘導することにより腫瘍形成を促進することが明らかになった。さらに、NETsの誘導による抗腫瘍免疫の抑制機構として、これまでに報告されている周囲のリンパ球の妨害に加えて、TAN自身の抗腫瘍活性が低下することを明らかにした。また、4T1からPanx1を介して放出される低分子代謝産物にNETs誘導活性があることを示し、活性因子としてスペルミジンを同定した。

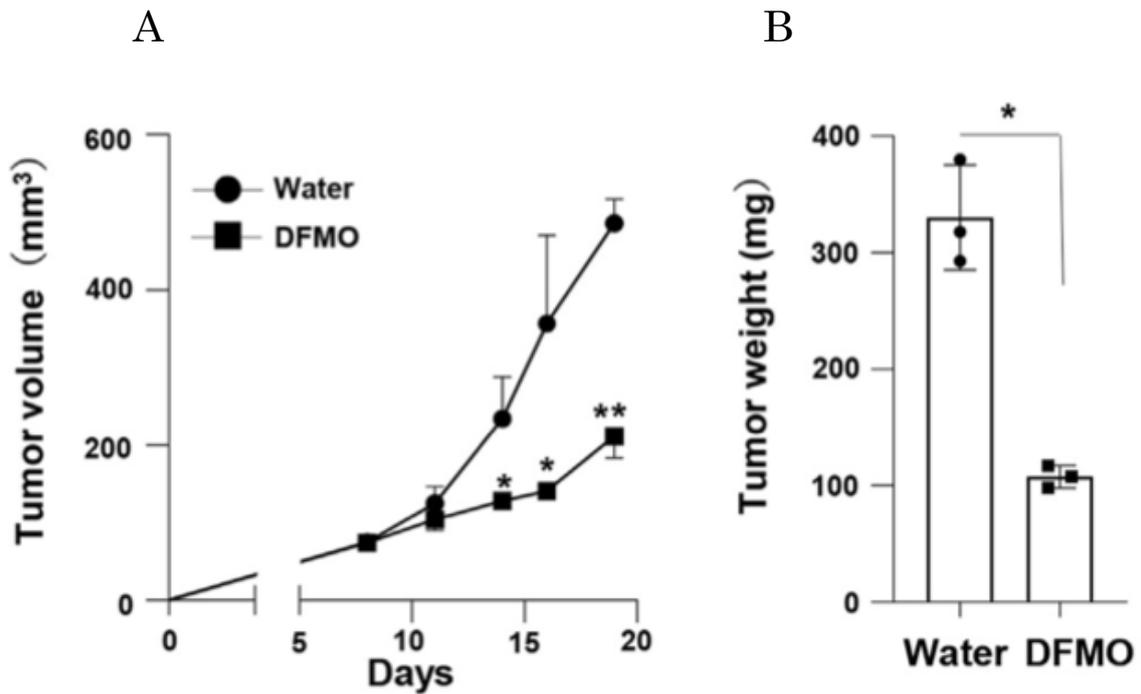


図 20 腫瘍体積の推移 ( A ) と最終的な腫瘍重量 ( B )

4T1 腫瘍モデルマウスに皮下移植の 7 日目以降、Water または 2%DFMO を自由摂取させた。

A : Water または DFMO 投与マウスの腫瘍体積を皮下移植の 8 日目以降 2-3 日毎に測定した。

B : Water または DFMO 投与マウスの腫瘍重量を皮下移植の 19 日後に測定した。

( n=3 ) \* p<0.05 \*\* p<0.01

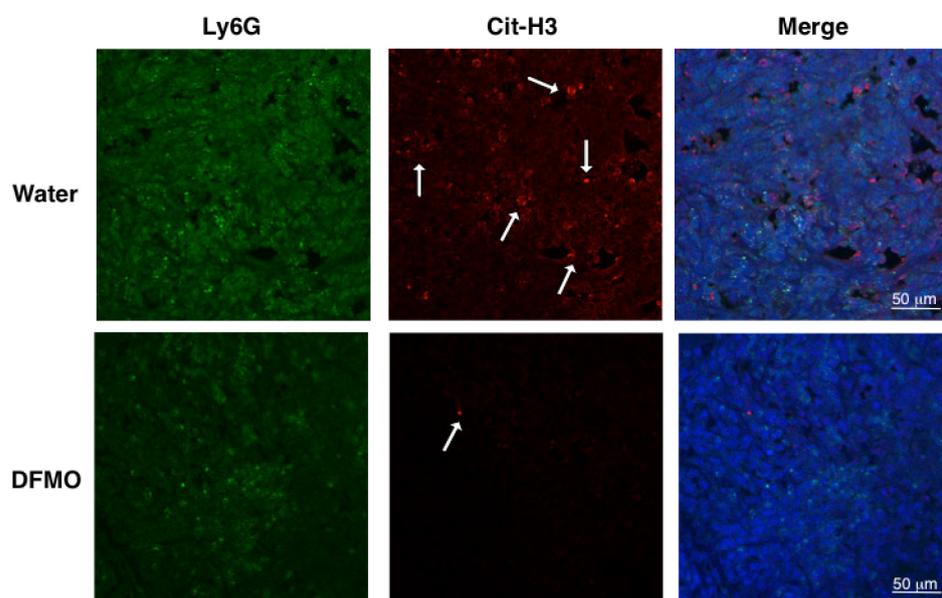


図 21 DFMO 投与による NETs 形成への影響

Water および DFMO 投与マウスの 4T1 腫瘍における NETs 形成を免疫  
 蛍光染色により解析した。

緑：好中球マーカー Ly6G

赤：NETs に特徴的に見られる Cit-H3

青：DAPI ( DNA を染色する )

## 総 合 討 論

がんは、正常な細胞へのがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異の蓄積によって細胞が無秩序・無制限に増殖することによって発症する。変異の蓄積には個人の遺伝子という先天的要因と、生活習慣や他の病変、DNAのエピジェネティックな変異などの後天的要因が複雑に絡み合う。がん細胞は周囲に腫瘍微小環境を構築し、自身の増殖により有利になるように周囲の免疫細胞などを教育・支配することで成長し続ける。

このようながんの支配的な環境の構築をがんの免疫逃避機構というが、近年開発された免疫チェックポイント阻害剤はこれを打破し、がんの根本的な治療を可能にした。しかし、不応答性の患者が多く、適用範囲が限定的と言わざるを得ず、腫瘍組織中の免疫システムについてさらなる理解が必要とされている。よって本研究では、がんの新たな免疫逃避（抑制）機構を解明することを目的とした。

そこで本研究では、免疫チェックポイント阻害剤に応答性のマウス大腸がん細胞株 CT-26 と不応答性のマウス乳がん細胞株 4T1 を用い、それぞれ腫瘍モデルマウスを作製し研究対象とした。まず始めに、これらの細胞株で誘導した腫瘍の組織学的形態観察と、腫瘍に浸潤する免疫細胞の割合の比較を行った。CT-26 は腫瘍内に水分を多く含み、立体的に成長する。対して 4T1 腫瘍は、腫瘍内の水分は少なく、徐々に厚みの増加が停滞し、腫瘍の中央部分から痂皮を形成し、最終的には平たい形状を取る。このような 4T1 の腫瘍では表面のみでなく内側でも高い頻度で細胞死が起きていることが予想された。一方で、正常細胞のアポトーシス誘導時における組織の恒常性維持についての新たな報告があった。既述の通り、正常細胞が Panx1 を介して代謝産物を放出し、炎症を抑制するという知見である（13）。また、4T1 は遺伝子変異の数が CT-26 に比べ少ない細胞株であることが報告されている（23）。

このことから、4T1細胞はがん細胞であるにも関わらず、正常細胞と同様、腫瘍という組織内でアポトーシスを利用して免疫を抑制するのではないかと考えられた。また、フローサイトメトリーによって腫瘍中のミエロイド系細胞の割合を比較した結果、4T1由来腫瘍における TAN の浸潤量が CT-26 に比べて8-10倍程度も多いことが明らかになった。そこで、4T1腫瘍の形態学的特徴と TAN を多量に呼び込むという形質について着目し、抗腫瘍免疫の低下に関わることが報告されている（7, 15）NETs が腫瘍で形成されているかどうかと、腫瘍におけるアポトーシス頻度を検討した。その結果、4T1で誘導した腫瘍では、TAN が高頻度に NETs を形成しており、腫瘍内で多数のアポトーシスが起きていた。

NETs の形成が腫瘍の成長に与える影響を検討するため、*Padi4*<sup>-/-</sup> マウスに4T1細胞株を移植したモデルを作製した。NETs 形成が起こらない

*Padi4*<sup>-/-</sup> マウスにおいて、腫瘍の形成に遅延が確認されたため、NETs は腫瘍の成長を促進させることが明らかになった。また、抗腫瘍活性に関連する遺伝子の発現を比較したところ、*Padi4*<sup>-/-</sup> マウスの TAN は野生型マウスの TAN と比較して抗腫瘍活性が上昇していた。NETs 形成については、抗腫瘍免疫の中核である T 細胞や NK 細胞のがん細胞への接触を妨害する機能が報告されているが（7）、このような他の免疫細胞の抑制・妨害のみでなく、好中球自体の抗腫瘍活性の低下も伴っていることを示している。一部の腫瘍において、腫瘍の初期の TAN は N1 型の表現型が多く、腫瘍の肥大化とともに徐々に N2 型が支配的になることが知られている（16）。よって、4T1腫瘍においてもそのように好中球の表現型が変化していくことが予測される。実際に、4T1腫瘍モデルにおいて比較的腫瘍サイズの小さかった個体の TAN は、腫瘍サイズが大きかった個体の TAN と比較して N1 型を示すマーカーである ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) の発現がわずかに高かった。好中球は N1 型、N2 型に示されるように腫瘍に対して抑制と促

進の両面の作用を有しているが、NETsを形成する好中球がN1型、N2型のどちらに相当するかは現時点では不明である。

次に、4T1におけるPanx1が腫瘍形成に与える影響を調べるため、Panx1-KO株を作製した。Panx1の欠損により、*in vitro*における増殖力とアポトーシス頻度は変化しなかったが、*in vivo*では腫瘍の成長に遅延が見られた。また、4T1におけるPanx1の欠損はTANの割合には変化を与えないが、腫瘍のNETs頻度が低下していたことから、NETsの形成には4T1のPanx1の発現が必要であることが明らかになった。これらの結果から、4T1腫瘍において、Panx1を介して放出された分子がNETs形成を促進しており、NETs形成は腫瘍促進に働くと考えられた。

さらに、NETsの誘導に関わる分子を同定するために、4T1細胞株の培養上清を限外ろ過法により3kDaで分画した。骨髄由来好中球を4T1の培養上清の3kDa以上または以下の画分で刺激した場合、特に3kDa以下の画分において高頻度でNETsが誘導されていた(未発表データ)。これまでに、4T1腫瘍におけるNETs誘導に関わる因子としてG-CSFやIL-8が報告されているが(17,7)、これらは3kDa以上の分子である。3kDa以下の画分がNETsをより誘導していたことから、これら以外に強くNETsを誘導する低分子が存在することが示された。正常細胞がPanx1を介して放出する免疫抑制性の分子として報告されているのは全て3kDa以下の低分子であり、4T1からPanx1を介して放出される低分子がNETsを誘導することを示唆する結果となった。実際に、Pax1 KO 4T1の培養上清およびアポトーシス阻害剤を用いることにより、培養上清中のNETs誘導活性をもつ低分子は、アポトーシスおよびPanx1依存的に放出されるものであることが示された。

Panx1を介して放出する免疫抑制性の分子として、ATPやスペルミジンが報告されている。これらのうち、ATPは既にNETs形成を促進する因子として同定されており(18)、4T1培養上清によるNETs誘導活性の一部は

ATPによるものである可能性も考えられる。一方で、複数の乳がん細胞株において、スペルミジン自体の産生やポリアミンの合成に関わる遺伝子の発現が高いことが報告されている（14）ことから、本研究では特にスペルミジンに注目した。乳がんの細胞株である4T1は、スペルミジンの産生によってNETsを誘導していると仮定し、スペルミジンがNETs形成に与える影響について *in vitro* で検討した。Panx1-KOの4T1細胞株は、培養上清中のスペルミジン濃度が減少しており、さらに試薬グレードのスペルミジンがNETsを誘導したことから、4T1細胞株は、アポトーシスに伴ってPanx1依存的にスペルミジンを放出し、NETsの形成を誘導すると考えられた。

生体内のスペルミジンは加齢とともに減少するが、摂取することによりオートファジーやタンパク質翻訳、ミトコンドリア代謝の活発化などにより加齢関連病態を改善または遅らせることが知られている。最近のがん研究で、スペルミジンが、加齢に伴って低下するT細胞の免疫力を回復させ、老齢・若齢マウス両方におけるPD-1チェックポイント阻害剤によるがんの治療効果を促進するという報告があった（19, 20）。具体的なメカニズムとしては、スペルミジンが、ミトコンドリアに存在する脂肪酸酸化の中心的酵素に直接結合し、その酵素活性を増強することでCTLの増殖力・エフェクター機能を高めるといえる。これは、スペルミジンが抗腫瘍免疫を増強するといった効果を示す報告であるが、本研究では逆に、スペルミジンがTANのNETs形成を介して抗腫瘍活性の低下を誘導する作用を持つことを初めて明らかにした。

最後に、*in vivo*におけるスペルミジンの影響を検討するために、4T1担がんマウスにDFMOを投与し、ポリアミン合成を担う酵素を阻害した。その結果、著しく腫瘍の形成が遅延し、腫瘍内ではNETs形成が抑制されていた。一部のがんにおいて、DFMOは腫瘍に浸潤する免疫抑制性の細胞の機能を低下させ、CTLの細胞傷害活性を回復させるという報告がある（21）。

よってこの実験系では、この作用に加えて NETs 形成の抑制により相乗的に抗腫瘍免疫が活性化され、非常に強く腫瘍の成長が抑制されたと考えられる。なお、ポリアミンの合成は、アルギニン→オルニチン→ポリアミンという経路による。アルギニンは T 細胞の抗腫瘍活性に必要な栄養素であることから ( 22 )、4T1 細胞株は T 細胞と競合的にアルギニンを要求することで T 細胞を不活性化するとともに、アルギニンから産生されるスペルミジンにより NETs を誘導して T 細胞による攻撃を阻害する、といった一石二鳥の免疫抑制機構を備えているとも考えられる。

以上の結果から、4T1 細胞がアポトーシスを起こす際、Panx1 を介してスペルミジンを分泌し、TAN の NETs を誘導し抗腫瘍免疫を低下させることを明らかにした ( 図 22 )。また、がん細胞は増殖に有利な微小環境を構築するためのプロセスとして、“積極的にアポトーシスを起こす”という手段を持っており、それは正常な組織と同様、生理的意義があることを示している。4T1 細胞株は免疫チェックポイント阻害剤に不応答性の細胞株であるため、本研究で明らかにした免疫抑制機構が、免疫療法に不応答の患者に対する、新たな治療標的になる可能性が期待される。

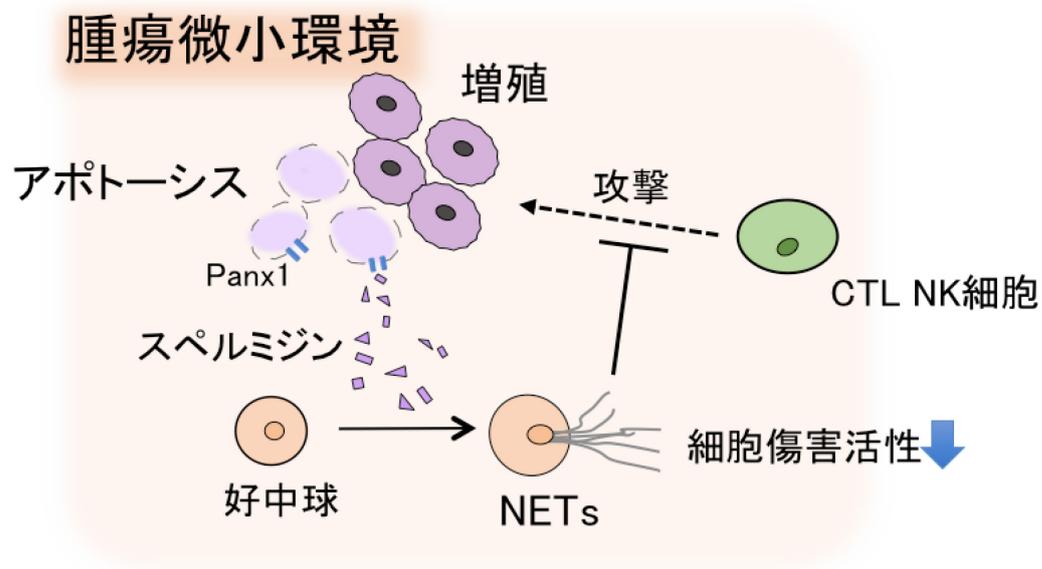


図 22 本研究で明らかにした免疫抑制機構

がん細胞は、アポトーシスの際に活性化される Panx1 を介してスペルミジンを放出し、好中球の NETs 形成を誘導する。腫瘍微小環境における NETs の形成は抗腫瘍免疫を低下させ、がん細胞の増殖をサポートする。

## 引用文献

1. Chen D.S. and Mellman I., Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle, *Immunity* 2013 39(1) 1-10
2. Binnewies M., Roberts E.W., Kersten K., et al., Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy, *Nat. Med.* 2018 16 (5) 541-550
3. Noy R., and Pollard J.W., Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy, *Immunity* 2014 41 (1) 49-61
4. Coffelt S.B., Wellenstein M.D., de Visser K.E., et al., Neutrophils in cancer: neutral no more, *Nat. Rev. Cancer* 2016 16 (7) 431-446
5. Colegio O.R., Chu N.Q., Szabo A.L., et al., Functional polarization of tumour associated macrophages by tumour-derived lactic acid, *Nature* 2014 513 (7519) 559-563
6. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., et al., Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science*. 2004 41 (1) 49-61
7. Teijeira A., Garasa S., Gato M., et al., CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor agonists produced by tumors induce neutrophil extracellular traps that interfere with immune cytotoxicity, *Immunity* 2020 52 (5) 856-871

8. Kono H., and Rock K., How dying cells alert the immune system to danger, *Nat. Rev. Immunol.* 2008 8 (4) 279-289
9. Green D.R., Ferguson T., Zitvogel L., et al., Immunogenic and tolerogenic cell death, *Nat. Rev. Immunol.* 2009 9 (5) 353-363
10. Sangiuliano B., Pérez N.M., Moreira D.F., et al., Cell death-associated molecular pattern molecules: inflammatory signaling and control, *Mediat. Inflamm.* 2014
11. Li J., Sun J., Rong R., et al., HMGB1 promotes myeloid-derived suppressor cells and renal cell carcinoma immune escape, *Oncotarget* 2017 8 (38) 63290-63298
12. Parker K.H., Sinha P., Horn L.A., et al., HMGB1 enhances immune suppression by facilitating the differentiation and suppressive activity of myeloid-derived suppressor cells, *Cancer Res.* 2014 74 (20) 5723-5733
13. Medina C.B., Mehrotra P., Arandjelovic S., et al., Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers, *Nature* 2020 580 (7801) 130-135
14. Akinyele O. and Wallace H., Characterising the response of human breast cancer cells to polyamine modulation, *Biomolecules* 2021 11 (5) 743

15. Masucci M.T., Minopoli M., Vecchio S.D., et al., The emerging role of neutrophil extracellular traps (NETs) in tumor progression and metastasis, *Front. Immunol.* 2020 (11) 1719
16. Quail D.F., Amulic B., Aziz M., et al., Neutrophil phenotypes and functions in cancer: A consensus statement, *J Exp Med* 2022 219 (6)
17. Liu L., Liu Y, Yan X., et al., The role of granulocyte colony-stimulating factor in breast cancer development: A review, *Mol Med Rep* 2020 21(5) 2019-2029
18. Sofoluwe A., Bacchetta M., Badaoui M., et al., ATP amplifies NADPH-dependent and -independent neutrophil extracellular trap formation, *Sci. Rep.* 2019 9 (1)
19. Muna A.H., Chamoto K., Matsumoto K., et al., Spermidine activates mitochondrial trifunctional protein and improves antitumor immunity in mice, *Science* 2022 378 (6618)
20. Holbert C.E., Cullen M.T., Casero R.A., et al., Polyamines in cancer: integrating organismal metabolism and antitumour immunity, *Nat. Rev. Cancer* 2022 22 (8) 467-480
21. Ye C., Geng Z., Dominguez D., et al., Targeting ornithine decarboxylase

by  $\alpha$ -difluoromethylornithine inhibits tumor growth by impairing myeloid-derived suppressor cells, *J. Immunol.* 2016 196 (2) 915-923

22. Bronte V. and Zanovello P., Regulation of immune responses by L-arginine metabolism, *Nat. Rev. Immunol.* 2005 5 (8) 641-654

23. Mosely S.I., Prime J.E., Sainson R.C., et al., Rational selection of syngeneic preclinical tumor models for immunotherapeutic drug discovery, *Cancer Immunol Res* 2017 5 (1) 29-41

## 謝 辞

本研究は、日本大学生物資源科学研究科応用生命科学専攻分子免疫生物学研究室の高橋恭子教授、中西祐輔専任講師の御指導のもとに行われたものであり、先生方の御助言ならびに校閲に心より感謝申し上げます。

また、*Padi4*<sup>-/-</sup> マウスを供与していただいた理化学研究所、山本一彦先生ならびに鈴木亜香里先生に深く感謝申し上げます。最後に、研究を行うにあたり御助言御協力いただいた分子免疫生物学研究室の皆様に感謝申し上げます。