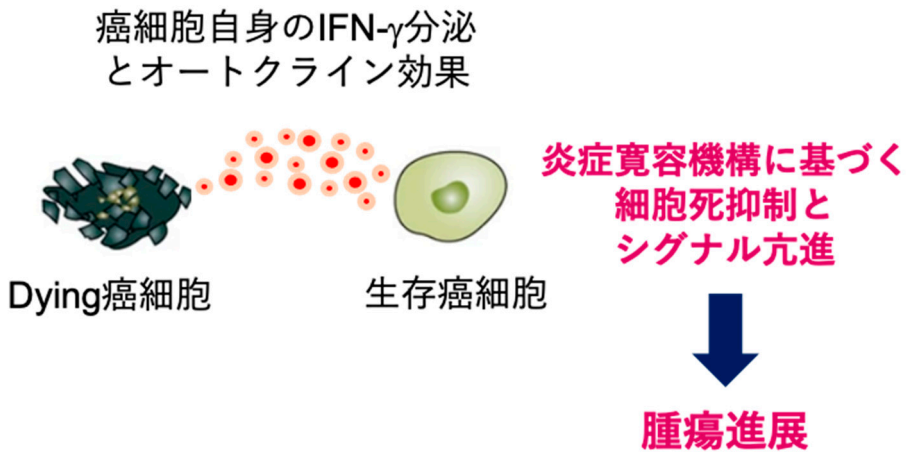
143　炎症寛容機構に基づく新規抗癌療法開発の基礎的検討	佐々木　克博

【目的】癌内炎症環境で産生される各種サイトカインは、癌細胞が主要な癌特性を獲得するための重要な誘導因子であると同時に、その多くは細胞死を誘導するデスリガンドとしても機能する。従って、各癌組織が独自の炎症環境を成立・維持するためには、「癌内浸潤性免疫細胞群」と「癌細胞特有の炎症誘導能」に加え、炎症性サイトカイン誘導性の細胞死（炎症誘導性細胞死）に対して持続的な抑制機能を発揮する「炎症環境寛容システム」を加えた三者の相互連携が必須であると考えられる。癌細胞自身の炎症学的ながん特性と炎症環境寛容システムの両者には因果関係が存在することが想定されており、本研究では、炎症誘導性細胞死の抑制シグナルに重要である LUBAC ユビキチンリガーゼの機能消失がもたらす各種サイトカインへの細胞死感受性獲得をリードアウトとし、癌細胞が誘導しうる炎症学的特性の理解を目指す。炎症反応を担う癌内浸潤性の免疫細胞群に着目した従来の研究提案とは異なり、癌細胞自身を解析対象とすることで、個々の癌がもつ微小環境の炎症学的な特徴をシンプルかつ統合的に理解し、癌細胞がもつ炎症学的特性に主眼を置いてがんを分類する方法論を確立することを目的とする。

【方法】LUBAC 機能を消失させたマウスメラノーマ細胞株 B16F10 を NSG（NOD/ShiLtJ を背景系統とする重度免疫不全 SCID と IL2 受容体γ鎖の欠損を併せ持つ超免疫不全マウス）の皮下に移植し、自己崩壊による進展抑制効果を確認した。次に主要なサイトカイン受容体を欠損させ、実験に用いて新規細胞死誘導因子の同定を試みた。最後に、その誘導因子が癌細胞自身によって発現誘導されるか組織染色や遺伝子発現解析などから確認した。

【結果】LUBAC 機能を消失させた B16F10 は培養条件での増殖阻害は起こらないが、マウスに移植すると明らかな進展障害を示した。宿主マウスが野生型マウスの場合その効果はとりわけ顕著だが、NSG においても明らかに進展抑制が認められた。さらに、*LUBAC* 欠損癌の細胞死を誘起するサイトカインとして IFN-γが重要な候補として同定されたため IFN-γを産生する腫瘍組織内の細胞を探索した結果、癌細胞自身が発現していることを見出した。さらに、この癌の進展には従来抗腫瘍効果をもつと考えられている IFN-g -STAT1 シグナルが必須であることが明らかとなった。今回炎症寛容システムとの相互作用に着眼した癌内炎症要素の探索から新たに IFN-γのオートクラインシグナルが B16F10 の腫瘍進展に必須であることを証明した。

癌細胞自身の炎症特性と炎症寛容機構の関連解析から見えてきた癌病態における IFN-γの新たな役割



143. 炎症寛容機構に基づく新規抗癌療法開発の基礎的検討

佐々木　克博

京都大学 大学院医学研究科 細胞機能制御学

Key words : 癌，炎症，サイトカイン，細胞死，IFN-γ

緒　言

近年開発が進む免疫システムを利用したがん治療法は、これまでにない大きな可能性を秘めている。がん免疫療法の中でも、現在最も臨床で使用されている免疫チェックポイント阻害剤（ICI : Immune Checkpoint Inhibitor）は、T リンパ球の過剰な活性化を抑える免疫チェックポイント分子（PD-1 や PD-L1 など）を標的とした抗体医薬であり、癌内 T リンパ球の細胞障害活性を促すことで、抗腫瘍効果を高めることができる。しかし残念なことに、約 8 割の癌は現有のがん免疫療法に強力な抵抗性をもち、退縮効果が認められない、いわゆる Cold tumor であり、Cold tumor をがん免疫療法が奏功しやすい炎症惹起性の癌（Hot tumor）へと変換する方法の開発や、ICI が修飾する炎症反応の場である“癌細胞と免疫システムが織り成す癌組織内の微小環境”を正確に理解することが目下の課題である。

しかし、癌内では多彩な細胞種により複雑な生体反応が繰り広げられていることに加え、従来の解剖学的分類に基づいた“癌種”を問わず、それぞれの癌が独自の炎症特性を有しているために癌組織内の炎症環境の解析は容易ではない。これまでの癌内炎症環境の研究では、炎症反応を担う癌内浸潤性の免疫細胞群が主な解析対象とされているが、がん免疫療法をさらに発展させていくためには、癌の基本的な生物学的特性を炎症学の視点から改めて理解・分類し直すことも喫緊の課題である。

癌内炎症環境で産生される各種サイトカインは、癌細胞が主要な特性（増殖シグナルの持続化・血管新生・浸潤転移・免疫回避・細胞死抵抗性など）を獲得するための重要な誘導因子であると同時に、その多くは細胞死を誘導するデスリガンドとしても機能する。近年、筆者らは複数の炎症性サイトカインシグナルに共通するユニークなシグナル伝達メディエーターである LUBAC ユビキチンリガーゼの機能解析から、炎症環境形成過程において癌細胞が LUBAC 依存的な細胞死抑制シグナルを獲得している可能性を新たに見出した［1，2］。つまり、癌細胞は炎症性サイトカイン誘導性の細胞死（炎症誘導性細胞死）に対して持続的な制御機能を獲得することで、細胞外で起きる慢性的な炎症環境条件に適応することができるのである。

従って、各癌組織が独自の炎症環境を成立・維持するためには、「癌内浸潤性免疫細胞群」と「癌細胞特有の炎症誘導能」に加え、炎症性サイトカイン誘導性の細胞死（炎症誘導性細胞死）に対して持続的な抑制機能を発揮する「炎症環境寛容システム」を加えた三者の相互連携が必須であると考えられる。癌細胞自身の炎症学的ながん特性と炎症環境寛容システムの両者には因果関係が存在することが想定されており、本研究では、炎症誘導性細胞死の抑制シグナルに重要である LUBAC ユビキチンリガーゼの機能消失がもたらす各種サイトカインへの細胞死感受性獲得をリードアウトとし、癌細胞が誘導しうる炎症学的特性の理解を目指す。炎症反応を担う癌内浸潤性の免疫細胞群に着目した従来の研究提案とは異なり、癌細胞自身を解析対象とすることで、個々の癌がもつ微小環境の炎症学的な特徴をシンプルかつ統合的に理解し、癌細胞がもつ炎症学的特性に主眼を置いてがんを分類する方法論を確立することを目的とする。

本研究ではマウスメラノーマ B16F10 細胞を中心に解析を行い、癌細胞がもつ炎症環境寛容システムを破綻させた際に生じる炎症脆弱性の獲得とそれに伴う癌組織性状変化の解析から、新たに IFN-γのオートクラインシグナルが B16F10 の腫瘍形成に必須であることを証明した。これまで免疫細胞によって分泌される抗腫瘍因子 IFN-γが癌細胞自身で産生されるとともに増殖に寄与することを初めて明らかにした。IFN-γへの癌感受性は癌免疫治療の奏効率を直接左右する重要な要素であることから本研究のさらなる発展が奏効率の上昇や治療予測に活用される成果が期待出

来る。

方　法

1. 細胞培養

マウスメラノーマ B16F10 細胞株は JCRB 細胞バンクから購入した。全細胞は 10%血清及びペニシリン・ストレプトマイシンを加えた DMEM 培地にて 37℃、5% CO_2 下で培養を行った。

2. マウスへの癌細胞株皮下移植

実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンターで微生物検査を実施した後、近交系 C57BL/6N または免疫不全 NSG（*NOD.Cg-Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Wjl}*/Sz*J, JAX stock＃：005557）マウスへの皮下移植実験に用いた。前日に鼠径部の剃毛を行い、当日イソフルランによる吸入麻酔下で 2×10^5 個の癌細胞株をマトリゲル基底膜マトリクスと混和し移植した。移植実施から 1 週間後、週 2〜3 回の頻度で腫瘍サイズを計測した（長軸、短軸、高さから体積を推定）。全てのマウス実験については京都大学動物実験委員会の承認の下実施された。

3. 遺伝子改変細胞作製

遺伝子欠損細胞は CRISPR-Cas9 法を用いて作製した。標的遺伝子に対するガイド配列を挿入したプラスミド px458（Addgene）をエレクトロポレーション法により一過性に細胞に導入した。翌日、プラスミドが導入された（ゲノム編集が行われた）細胞をフローサイトメトリー（FACS）解析下で GFP または BFP 陽性細胞として同定・ソーティングにより分取したのち、限界希釈培養法によりシングルクローンを得る。標的遺伝子の欠落はウエスタンブロットもしくは、膜タンパク質の場合は FACS にて確認した。

4. サイトカイン誘導性細胞死の検出

2×10^4 個の細胞を 24 ウェルプレートに播種した。翌日、サイトカインを終濃度 10 ng/ml（TNF-α、IFN-α、IFN-β）、20 ng/ml（IFN-γ）になるように加えて、37℃、5% CO_2 下でインキュベート。48 または 72 時間後、上清（死細胞を含む）及びディッシュ上の細胞を剥がしてまとめて回収し、Sytox Green（Thermo Fisher Scientific）1μM で 4℃ 30 分間、死細胞を染色したのち、FACS により検出した。

5. *In vivo* 癌生存比較試験

蛍光タンパク質 Venus を発現させた B16F10 コントロール細胞と tdTomato を発現させた各種遺伝子欠損 B16F10 細胞を各 1×10^5 個ずつマトリゲル（Corning）と混和しマウス皮下へ移植した。2〜3 週間後、腫瘍組織を取り出し、コラゲナーゼ処理によって分散したのち、FACS 解析を実施し、腫瘍内に存在する Venus もしくは tdTomato 陽性細胞を検出した。最終的に、tdTomato/Venus 比として各種遺伝子欠損がもたらす腫瘍内生存寄与率を算出した。

6. 組織免疫染色

皮下移植後の腫瘍組織を緩衝液含有 10%ホルマリンにて固定し、その後パラフィン包埋組織標本を作製した。無染組織切片に対して脱パラフィン操作を行った後、賦活化処理、過酸化水素処理を実施した後、一次抗体で 4℃ 一晩反応させた。翌日、ImmPRESS-HRP Polymer（Vector laboratories）で標識された二次抗体で室温 30 分間、反応させた後、3 3’ Diaminobenzidine（DAB）で染色を行った。

7. RNA-Scope（高感度 In situ hybridization 法）

RNA-Scope（ACD bio）の標準プロトコールに従って、パラフィン包埋腫瘍組織切片内の標的 mRNA の局在可視化を実施した。プローブは最終的に Opal 蛍光試薬（Akoya Biosciences）による多重染色を用いて検出した。

結果および考察

1. *LUBAC* 欠損による癌の炎症寛容機構の消失は、免疫依存的かつ非依存的な腫瘍進展抑制効果を引き起こした

直鎖ユビキチン鎖は外的刺激により形成が亢進するため [3]、癌組織内では直鎖型ユビキチン鎖形成を促す炎症刺激因子が存在すること、それに応じて炎症寛容機構が起動していることが推察できる（図 1a）。*LUBAC* 欠損 B16F10 細

胞株は腫瘍形成の際には進展の顕著な障害を認めた。この現象は 2D 培養条件では起きないことから、腫瘍化によって起きる種々の変化に依存していることが示唆された。図 1b では図 1c と比べて明らかに sg*Rnf31* の腫瘍サイズが小さく、免疫細胞による進展抑制効果が大きいと考えられた。しかしながら、図 1c においてもコントロールと比べて進展程度に明らかな差が認められ、非免疫細胞の寄与が想定された。

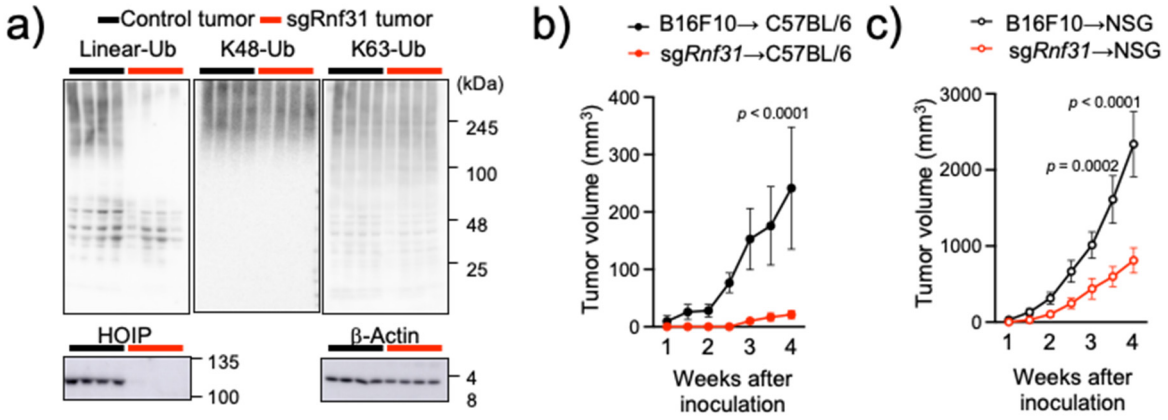


図 1. B16F10 メラノーマ *LUBAC* 欠損癌の腫瘍進展

a) 腫瘍組織のウエスタンブロット解析。*LUBAC* 欠損癌（sg*Rnf31*）では LUBAC の構成因子 HOIP の消失に加え、炎症寛容に必要な直鎖型ユビキチン鎖の形成消失を認めた。

b) 野生型マウスへの皮下移植後の腫瘍進展データ。Turkey's multiple comparisons test。

c) NSG 免疫不全マウスへの皮下移植後の腫瘍進展データ。Turkey's multiple comparisons test。

2. 癌内炎症性サイトカインによって *LUBAC* 欠損 B16F10 メラノーマの細胞死が容易に誘導された

癌内で産生が亢進している各サイトカインにより sg*Rnf31* の細胞死亢進を認めた（図 2）。炎症寛容機構が複数のサイトカイン刺激による相乗的な細胞死誘導を常に抑制している主要機構であることを証明した。さらに同時に、この B16F10 細胞は TNF-α や typeI IFN と比べて IFN-γ に対して高い細胞死感受性を示すことを図 2a の結果から発見した。

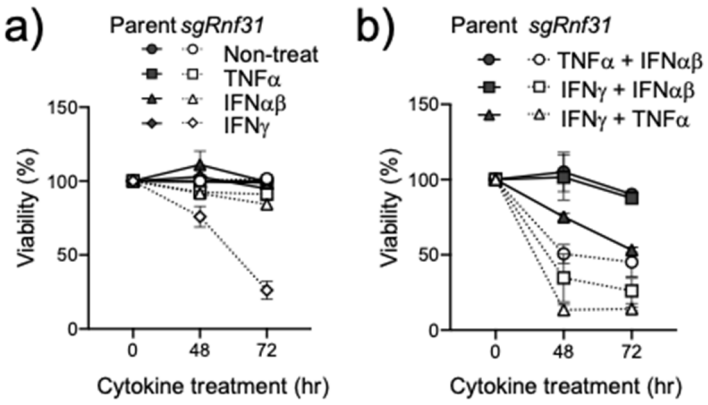


図 2. *LUBAC* 欠損による炎症誘導性細胞死に対する脆弱性の亢進

a) 培養条件下、各サイトカインで表記時間処理した際の細胞生存頻度。

b) 培養条件下、各サイトカインの組み合わせで表記時間処理した際の細胞生存頻度。

3. 癌細胞側の IFN-γ が *LUBAC* 欠損細胞の進展抑制に関与することが示唆された（図 3）

図 3b の結果から *LUBAC* 欠損癌が拒絶される要因として IFN-γ が重要因子であることが証明された。この実験では野生型マウスを宿主として利用しているので T 細胞を始めとする免疫細胞が IFN-γ の供給源であることが想定されたが、図 1 と 2 の結果から癌自身が産生する可能性も考慮し *Ifng* 欠損マウスや免疫不全マウスを宿主とする図 3c の実験を行った。予想通り IFN-γ の主要な供給源である T 細胞や NK 細胞を保持しない免疫不全マウスでも *LUBAC* 欠損癌の進展はそれほど改善しなかった。さらに *Ifng* 欠損マウスでも同様の結果となり、宿主マウス側の免疫細胞や間質細胞（内皮細胞や線維芽細胞）が少なくともこのモデルでは IFN-γ の供給源ではないことが示唆された。

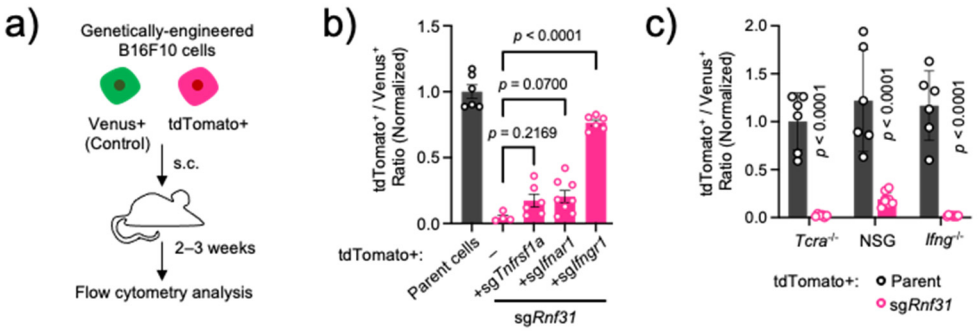


図 3. 癌細胞の *in vivo* 生存比較試験

a) *In vivo* 生存比較試験のスキーム。宿主は野生型マウスを用いた。

b) LUBAC と各種サイトカイン受容体を二重欠損した癌細胞の腫瘍組織内での生存頻度。Turkey's multiple comparisons test。

c) 各免疫不全マウスに *LUBAC* 欠損癌細胞を移植した際の腫瘍組織内での生存頻度。Unpaired t test。

4. 癌細胞自身によって IFN-γ は産生・分泌される現象を検出した

結果 3 から想定したように、癌細胞内で産生される IFN-γ を遺伝子発現レベル（図 4a）、タンパク質レベル（図 4b）で組織学的な解析から検出することに成功した。特に壊死組織（DT）に近い低酸素・低栄養状態にある癌細胞で発現が高い結果が得られた。癌による IFN-γ 産生はこれまで報告されておらず、IFN-γ の発現がどのように制御されているのか、癌病態形成においてどのような役割があるのか大変興味深い成果を得ることができた。

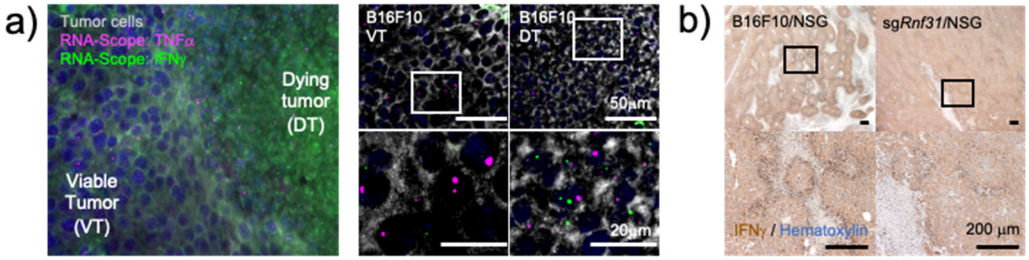


図 4. 癌組織内での IFN-γ 産生細胞の検出

a) RNA-Scope による B16F10 腫瘍組織内 TNF-α および IFN-γ mRNA の局在解析。

b) B16F10 腫瘍組織における IFN-γ 免疫組織染色解析。

5. B16F10 癌細胞は腫瘍進展に IFN-γシグナルを必要とする

IFN-γシグナルは JAK-STAT1 経路を介して抗原提示を亢進させ、免疫機能を上昇させる働きがあるため、一般的には腫瘍増大に対して抑制効果が期待されている。しかし今回の一連の解析から IFN-γシグナルの増大が癌進展を促すという負の効果を示すことが証明された（図 5）。このメカニズムについては現時点では何も提示できるデータはないが、癌免疫を抑制するという報告もあり、この謎の解明が今後の課題となるであろう。

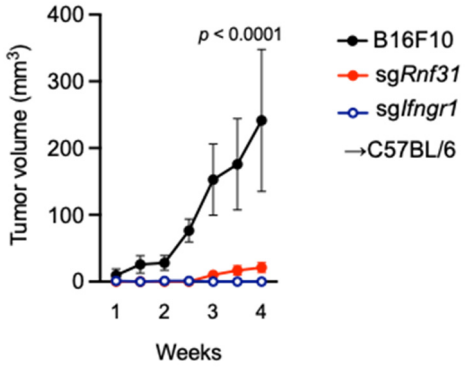


図 5. IFN-γシグナルが欠損した B16F10 の腫瘍進展
IFN-γ受容体を欠損した B16F10 細胞を野生型マウスに皮下移植した。B16F10 コントロール及び sg*Rnf31* は図 1 で用いたデータと同一であり比較対象として示した。Turkey's multiple comparisons test。

共同研究者・謝辞

本研究は、京都大学大学院医学研究科細胞機能制御学研究室の全てのメンバーの協力のもと成し遂げた成果であり、この場を借りて感謝申し上げたい。また、本研究を助成頂いた公益財団法人上原記念生命科学財団に改めてお礼申し上げます。本研究成果を糧に癌制御の発展の一助となりえるような成果を今後も目指して行く所存です。

文　献

1) Sasaki K, Himeno A, Nakagawa T, Sasaki Y, Kiyonari H, Iwai K. Modulation of autoimmune pathogenesis by T cell-triggered inflammatory cell death. Nat Commun. 2019 Aug 28;10(1):3878. PMID: 31462647. DOI: 10.1038/s41467-019-11858-7.

2) Sasaki K, Iwai K. Roles of linear ubiquitinylation, a crucial regulator of NF-κB and cell death, in the immune system. Immunol Rev. 2015 Jul;266(1):175-89. PMID: 26085215. DOI: 10.1111/imr.12308.

3) Tokunaga F, Sakata S, Saeki Y, Satomi Y, Kirisako T, Kamei K, Nakagawa T, Kato M, Murata S, Yamaoka S, Yamamoto M, Akira S, Takao T, Tanaka K, Iwai K. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. Nat Cell Biol. 2009 Feb;11(2):123-32. Epub 2009 Jan 11. PMID: 19136968. DOI: 10.1038/ncb1821.