

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07009

研究課題名(和文) 腫瘍微小免疫抑制環境下におけるI型IFN誘導『責任分子』の探索と免疫療法への応用

研究課題名(英文) Induction of type I IFN in the immunosuppressive tumor microenvironment

研究代表者

小坂 朱 (Kosaka, Akemi)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：40561030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：担がんマウスの腫瘍組織から回収した腫瘍関連マクロファージを用いた定量的PCR法および網羅的遺伝子発現解析より、STINGアゴニストはTLRアゴニストと比べてI型IFNの発現誘導能が高く、TLR3アゴニストはDNAセンサーおよびTLRシグナル経路系の遺伝子発現が低い傾向が認められた。また、マウス骨髄から誘導した免疫抑制性マクロファージを用いた検討では、TLR3アゴニストと同様にTLR4やTLR7、TLR9アゴニストにおいてもI型IFN誘導能の低下が確認された。さらに、TLRアゴニストによる免疫抑制性マクロファージのI型IFN誘導能低下にIL-13シグナルが関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

I型インターフェロン(IFN)は抗腫瘍免疫応答の誘導に重要な役割を担っておりSTINGやTLRシグナル伝達によって誘導されることから、これらを標的とした様々なアゴニストの研究開発が行われている。しかし、実臨床においては期待されたほどの効果が見られていない。その一因として、本研究ではがん組織などの免疫抑制環境下においてはI型IFN誘導能が減弱していること及びその誘導機序が定常状態とは異なる可能性を示した。さらに詳細な解析を行い、そのメカニズムを解明することでSTINGおよびTLRアゴニストによるI型IFN誘導の調節機能を介した免疫賦活能の増強を目指す。

研究成果の概要(英文)：We performed real-time PCR and RNA sequencing analysis of tumor-associated macrophages derived from mouse tumor tissues. It was found that STING agonist induced higher levels of type I IFN compared with TLR agonists and TLR3 agonist induced lower levels of genes associated with DNA sensors and TLR-signaling pathways. In using mouse born-marrow derived immunosuppressive macrophages, agonists of not only TLR3 but also TLR4, TLR7 and TLR9 showed decreased type I IFN expression. Furthermore, it was suggested that IL-13 signaling may contribute to decreased induction of type I IFN expression by TLR agonists in the immunosuppressive microenvironment.

研究分野：がん免疫

キーワード：免疫抑制 I型インターフェロン アゴニスト

## 1. 研究開始当初の背景

I型インターフェロン(IFN)は、ウイルスや細菌などに対する感染防御のみならず抗腫瘍免疫応答の誘導においても重要な役割を担っており、I型IFNシグナルの欠損によって悪性黒色腫(メラノーマ)や悪性軟部腫瘍など様々ながんで腫瘍形成が促進されることが報告されている。I型IFNはSTING(Stimulator of IFN genes)やTLR(Toll-like receptor)シグナル伝達を介して誘導されることから、抗腫瘍効果を目的としてこれらを標的とした様々なアゴニストの研究開発が行われており臨床認可されている薬剤もある。しかし、実臨床においては前臨床試験で認められたほどの効果が見られていない。一方、腫瘍微小環境には腫瘍関連マクロファージ(TAM, tumor-associated macrophages)や骨髄由来抑制細胞をはじめとする免疫抑制細胞が数多く浸潤しており、予後不良と相関することが様々ながんにおいて報告されている。そこで、免疫抑制環境下ではSTINGおよびTLRアゴニストによるI型IFN誘導能が通常状態と異なるために、期待された抗腫瘍効果が認められないのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

免疫抑制環境下におけるSTINGおよびTLRアゴニストの反応性や抗腫瘍効果に及ぼす影響の詳細などについて明らかになっていないことから、本研究では免疫抑制細胞におけるSTINGおよびTLRアゴニストによるI型IFN誘導機序を解明し、その調節機能による免疫賦活能の増強とがん免疫療法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)担がんマウスの腫瘍組織から回収したTAM(腫瘍関連マクロファージ)を用いた検討

C57BL/6マウスに接種した乳がん細胞株の腫瘍組織からgentleMACSを用いてシングルセルを分離する。セルソーターを用いてTAMを回収し、I型IFNを誘導するSTINGおよびTLRアゴニストで刺激後にmRNAを抽出してI型IFNに関する遺伝子発現について検討を行った。

#### 定量的PCR法による解析

TaqManプローブを用いたリアルタイムPCRを行い、遺伝子発現量の比較を行った。

#### 網羅的な(トランスクリプトーム)解析

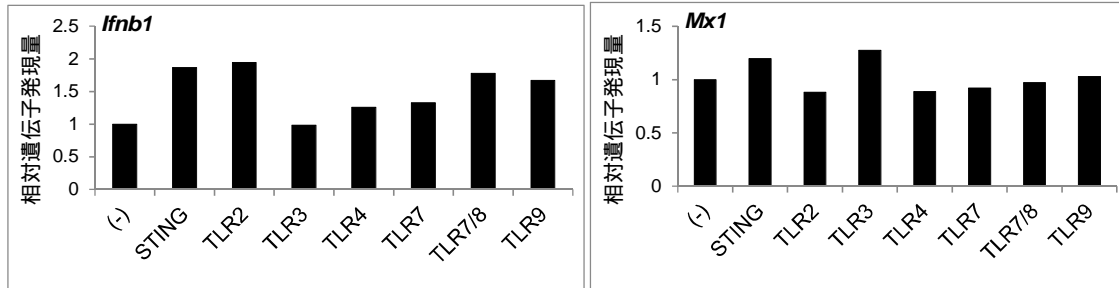
先進ゲノム支援による解析結果を用いて、網羅的な遺伝子発現量の比較および遺伝子機能解析を行った。

### (2)マウス骨髄から誘導したコントロールマクロファージ(M0)および免疫抑制性マクロファージ(M2)を用いた検討

腫瘍組織に存在するTAMは、抗腫瘍免疫応答の抑制や腫瘍増殖の促進作用を有することから免疫抑制性であるM2マクロファージと類似の細胞集団と考えられている。そこで、MACSを用いてマウス骨髄未熟細胞を分離し、M-CSF存在下で培養した細胞をコントロールマクロファージ(M0)、M-CSFに加えIL-6およびIL-13存在下で培養した細胞を免疫抑制性マクロファージ(M2)として誘導した。I型IFNを誘導するSTINGおよびTLRアゴニストで刺激後にmRNAを抽出し、I型IFNに関する遺伝子発現について検討を行った。

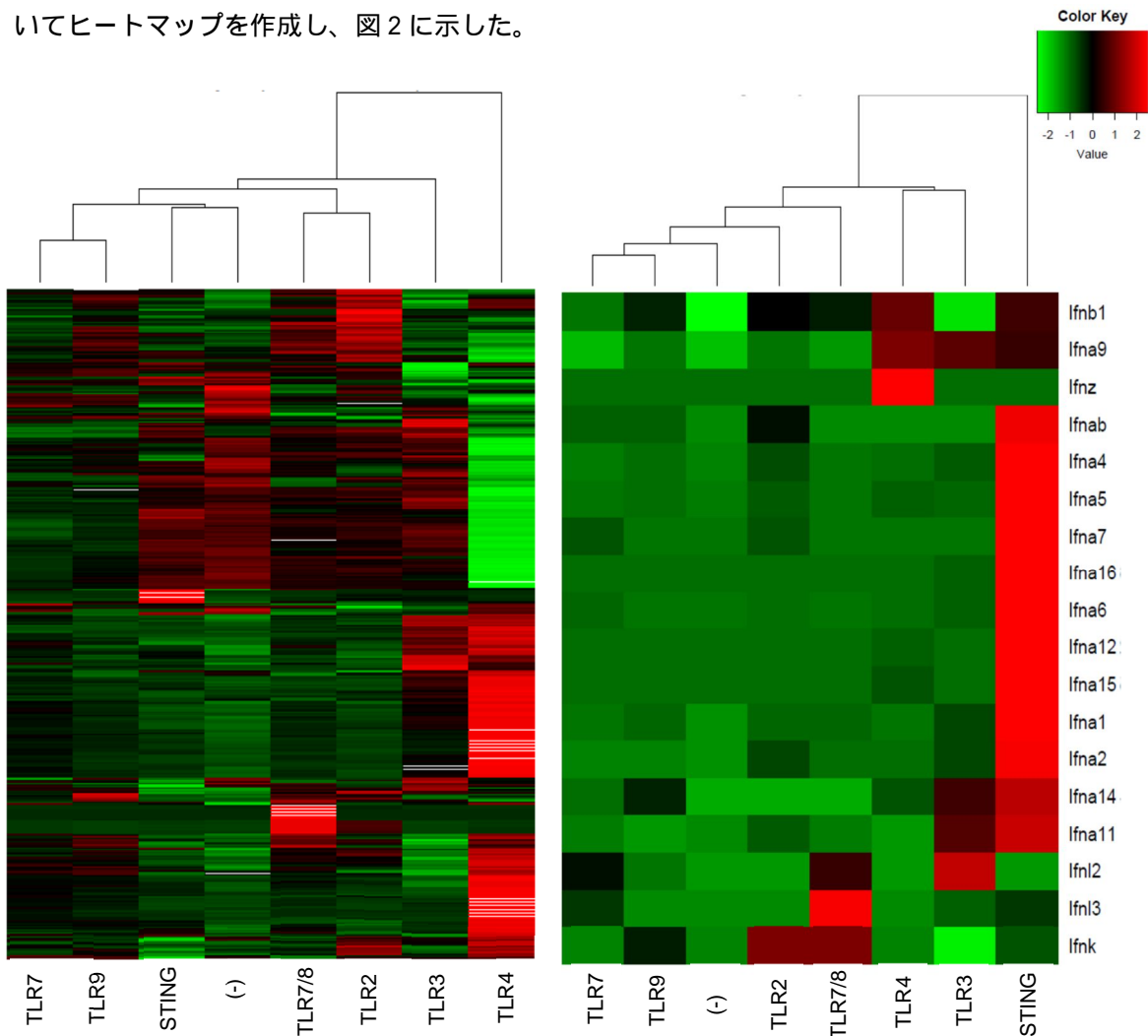
#### 4. 研究成果

(1) 担がんマウスの腫瘍組織から回収した TAM を I 型 IFN を誘導する STING および TLR アゴニストで TAM を刺激後に IFN-beta1 (Ifnb1) および I 型 IFN で誘導される Mx1 の mRNA 発現量を定量的 PCR 法を用いて測定したところ、図 1 に示すように STING アゴニストの Ifnb1 誘導能は TLR3 および TLR7 アゴニストより高いことが示された。一方、Mx1 の発現量は STING アゴニストと TLR3 アゴニストは同程度であった。



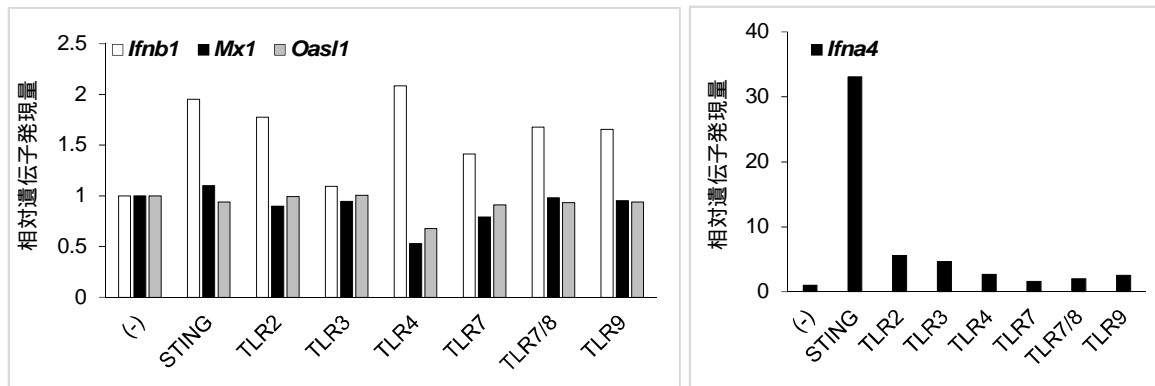
[図 1] TAM における Ifnb1 および Mx1 発現量

(2) TAM を用いて行った遺伝子発現の網羅的 (トランスクリプトーム) 解析結果を Z-score を用いてヒートマップを作成し、図 2 に示した。



[図 2] Z-score を用いたヒートマップ (左) 網羅的な遺伝子発現 (右) I 型 IFN 遺伝子発現

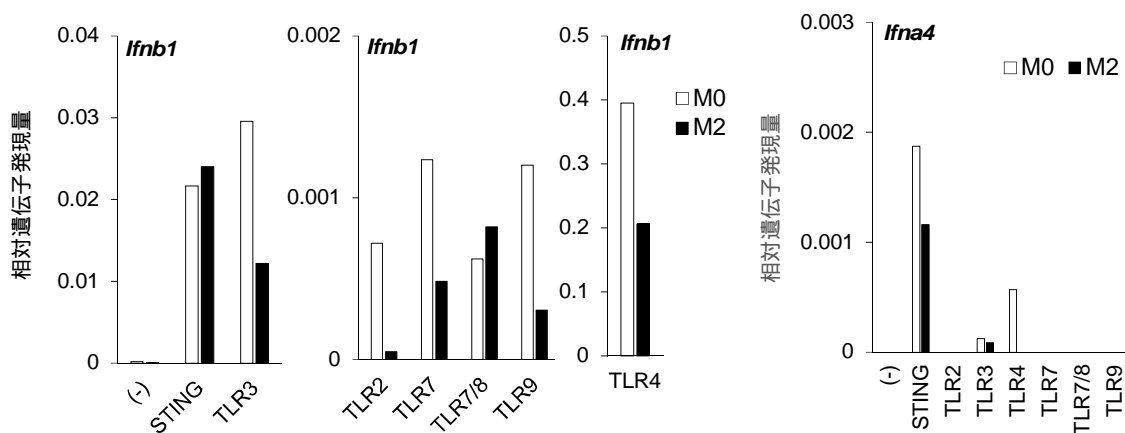
さらに、トランスクリプトーム解析の TPM 値を用いて各アゴニストで刺激した際の *Ifnb1*、*Mx1*、*Oas11*、*Ifna4*(IFN-alpha4)の相対的発現量を図3に示した。



[図3] 各アゴニストで刺激後の相対的な遺伝子発現量

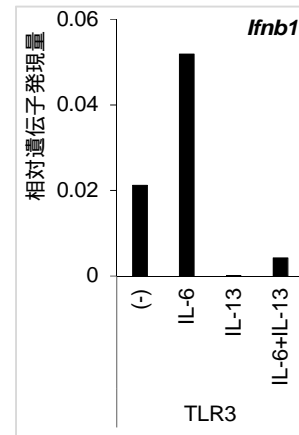
ヒートマップおよび TPM 値の解析結果より、TLR4 刺激による遺伝子発現パターンは STING およびその他の TLR アゴニスト刺激と比べて大きく異なっていたが、TLR4 による *Ifnb1* の遺伝子発現は STING アゴニストと同様に高い誘導能を有していた。また、STING アゴニストは各種 TLR アゴニストと比べて IFN-alpha の発現誘導能が非常に高いことが示された。さらに、遺伝子オントロジーのエンリッチメント解析結果より、TLR3 刺激では他のアゴニスト刺激と比べて DNA センサーおよび TLR シグナル経路系の遺伝子発現増加が少なかった。以上の結果より、担癌マウスの腫瘍組織に存在している TAM において、TLR アゴニストに比べて STING アゴニストは I 型 IFN、特に IFN-alpha の誘導能が高いこと、TLR3 アゴニストは免疫抑制環境下において I 型 IFN 誘導機序が影響を受けやすいことが示唆された。

(3)マウス骨髄から誘導した M0 および M2 を各アゴニストで刺激して *Ifnb1* の遺伝子発現量を測定したところ、定常状態 (M0) に比べ免疫抑制状態 (M2) では TLR3 アゴニストと同様に TLR2 や TLR4、TLR7、TLR9 アゴニスト刺激による *Ifnb1* 誘導能が低下する傾向が見られたが、STING アゴニストにおいては機能低下が見られなかった。同様に *Ifna4* の遺伝子発現量を測定したところ、STING アゴニストによる *Ifna4* 誘導能は M0 に比べて M2 で低下していたが、TLR アゴニストと比べて *Ifna4* 誘導能は非常に高いことが示された(図4)。



[図4] 各アゴニストで刺激後の *Ifnb1* および *Ifna4* 遺伝子発現量

TAM の誘導および機能に IL-6 や IL-13 などが関与していることが報告されていることから、本実験では IL-6 と IL-13 の両方を用いて M2 を誘導した。そこで、M0 に IL-6 のみ及び IL-13 のみで誘導したマクロファージを TLR3 アゴニストで刺激した際の *Ifnb1* mRNA 発現量を測定し、各々のサイトカインの影響について検討を行った。その結果、TLR3 アゴニストによる M2 の I 型 IFN 誘導能低下には、IL-6 に比べて IL-13 の関与が大きいことが示唆された (図 5)。IL-13 シグナルの下流にある転写因子 STAT6 は STING アゴニストによっても活性化されることから、免疫抑制環境に存在する TAM の STING アゴニストに対する高い I 型 IFN 誘導能に STAT6 を介した機序がある可能性が示唆された。



[図 5] TLR3 アゴニスト刺激による *Ifnb1* 発現量

本研究では免疫抑制環境下において STING アゴニストが高い I 型 IFN 誘導能を維持している一方で、TLR3 アゴニストなどはその機能に影響を及ぼす機序が存在する可能性を示した。メカニズムの一端として STAT6 の関与が示唆されたことを踏まえてさらに詳細な解析を行い、定常状態とは異なる免疫抑制環境下における I 型 IFN 誘導機序の解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------