

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17916

研究課題名(和文) 悪性グリオーマにおける免疫抑制と化学療法抵抗性：腫瘍微小環境でのIL-34の役割

研究課題名(英文) Immunosuppression and chemoresistance of malignant glioma: functions of IL-34 in the tumor microenvironment

研究代表者

杉井 成志 (Sugii, Narushi)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：10851090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：5種類の細胞株(TS、GL261、U251、U118、U87)に対して、4種(TMZ：テモゾロミド、PCV：プロカルバジン、ACNU：塩酸ニムスチン、VCR：ビンクリスチン)の化学療法剤の耐性株を作成した。作成した化学療法剤耐性細胞株を用いて、IL-34・CSF-1・CSF-1Rの発現量の変化をreal time RT-PCRを用いて評価し、siRNAを用いてIL-34の発現をノックダウンし、化学療法剤への感受性と細胞増殖への影響を評価した。化学療法暴露後のIL-34はほぼ上昇せず、「悪性グリオーマにおいてIL-34は、有望な治療標的分子とはいえない」、と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去の文献から、IL-34は腫瘍局所において、腫瘍自身の化学療法抵抗性と抗腫瘍免疫の抑制の2つの役割を果たしている可能性が考えられた。しかしながら、悪性グリオーマ細胞株においては、IL-34の影響は軽微であることがわかった。いまだに治療困難である悪性グリオーマの治療成績を向上させるためには、IL-34とは異なる標的を考える必要がある。

研究成果の概要(英文)：The principal investigator created five chemo-resistant strains (TS, GL261, U251, U118, U87) for four chemotherapeutic agents (temozolomide, procarbazine, nimustine hydrochloride, and vincristine). By using the chemo-resistant cells created, changes in the expression of IL-34, CSF-1, and CSF-1R were evaluated using real-time RT-PCR, and siRNA was used to knock down the expression of IL-34 and evaluate its effect on sensitivity to chemotherapeutic agents and cell proliferation. IL-34 did not nearly upregulate after chemotherapy exposure, and "IL-34 is NOT a promising therapeutic target molecule in malignant gliomas".

研究分野：脳腫瘍免疫

キーワード：IL34 悪性グリオーマ 化学療法耐性株 脳浸潤マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは極めて悪性の原発性脳腫瘍である。他癌腫においては転移に伴う全身状態の悪化が腫瘍死の主たる要因になるのに対し、悪性グリオーマは中枢神経以外への転移はしないにも関わらず局所制御が得られずに腫瘍死(中枢神経死)をきたすという点で特異な腫瘍であるといえる。悪性グリオーマの局所制御を困難にしている要因の1つには**腫瘍細胞による免疫破壊の回避**、すなわち腫瘍による免疫の抑制機序が挙げられる。悪性グリオーマ含め腫瘍の周囲には多くのマクロファージが浸潤しており**腫瘍関連マクロファージ (tumor associated macrophage: TAM)**と呼ばれている。マクロファージには**M1 (classical)**と**M2 (alternative)**という2つのフェノタイプがあり、**M1**はIL-12やCXCL10等のサイトカインを放出しNK細胞やTリンパ球を腫瘍局所へ誘導することで**抗腫瘍効果を発揮する**一方で、**M2**はIL-10やTGF- β 等の免疫抑制性のサイトカインを産生しTリンパ球を抑制して**腫瘍の免疫破壊の回避に貢献している**。さらに**M2**はVEGFやbFGF等を産生し**腫瘍親和性の微小環境の構築にも作用する**。腫瘍微小環境では**TAMの多くがM2の極性を示す**ことが知られているが、M2への極性を誘導する分子にはIL-4、IL-13、IL-10、TGF- β 、**IL-34**などがある。

悪性グリオーマを治療困難にしている別の要因として**再発時に使用できるセカンドラインの化学療法剤がない**ことが挙げられる(現在悪性グリオーマに対して有効性が認められている殺細胞性化学療法剤はテモゾロミドのみである)。腫瘍の化学療法抵抗性機序は様々あるが、近年**IL-34**が肺癌におけるdoxorubicin耐性(Muhammad, et al. Cancer Res., 2016)や悪性胸膜中皮腫におけるpemetrexed耐性(Cioce, et al. Cell Death Dis., 2014)に腫瘍の**化学療法抵抗性に関与している**との報告がなされている。

IL-34の主たるレセプターである**CSF-1R (colony stimulating factor-1 receptor)**は、マクロファージや単球などの免疫細胞はもちろんのこと、**腫瘍細胞にも発現している**。また、化学療法に暴露された**腫瘍細胞ではIL-34産生が上昇し、同時にレセプターであるCSF-1Rの発現も増加**することで腫瘍自身にIL-34/CSF-1Rシグナルが作用して化学療法抵抗性をもたらす(Muhammad, et al. Cancer Res., 2016)。

つまりは、**IL-34は腫瘍微小環境においてparacrineとして腫瘍局所でM2マクロファージを誘導し抗腫瘍免疫の抑制に関与し、autocrineとして腫瘍自身に作用することで腫瘍細胞の化学療法抵抗性を上昇させる**ことで、腫瘍の生存に有利に働いている(前ページ、図1)。

グリオーマにおけるIL-34を検討した報告はないが、**CSF-1Rはヒトのグリオーマ細胞にも発現している**こと(Komohara, et al. Cancer Sci., 2012)、肺癌や乳がんの**転移性脳腫瘍**でIL-34の発現が上昇すること(Rietkotter, et al. Oncotarget, 2015)などから、**IL-34が悪性グリオーマの腫瘍微小環境で重要な役割を担っている**可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、**悪性グリオーマの腫瘍微小環境においてIL-34が治療抵抗性の原因である腫瘍の免疫破壊の回避と腫瘍自身の化学療法抵抗性に関与しているか**を解明すること、ならびに**IL-34の阻害により悪性グリオーマの治療抵抗性の改善を図る**ことである。

3. 研究の方法

化学療法耐性グリオーマ細胞株の作成

複数のグリオーマ細胞株 (TS、GL261、U251、U118、U87 など) を用いて TMZ : テモゾロミド耐性株を作成し、以後の実験に使用可能な化学療法耐性細胞株を行った。当初の予定ではテモゾロミドのみを用いる予定だったが、テモゾロミドに並行してグリオーマに対して臨床で使用されうるほかの化学療法剤 (PCV : プロカルバジン、ACNU : 塩酸ニムスチン、VCR : ビンクリスチン) も加えた 4 剤に対してそれぞれ耐性株を作成した。

過去の文献から、各薬剤のおおむねの有効濃度を確認し、各細胞株の medium に薄い濃度から徐々に濃い濃度へ化学療法剤を溶解して培養を行っていった。各濃度は 1 週間以上の時間をかけて培養し、各細胞株は最終的に 3 か月以上の時間をかけて作成した。

試薬 : Temozolomide、Nimustine Hydrochloride、Vincristine Sulfate、Procarbazine Hydrochloride (すべて東京化成工業株式会社)

脳腫瘍モデルマウスの作成の準備

安定して腫瘍細胞が作成可能なマウス由来の glioma stem-like cell である TS を用いて、マウスの腫瘍モデルを作成し、*in vivo* での実験を行うことを計画した。脳腫瘍モデル作成は定位脳手術の技術を用いた手術が必要であり、まずは予備実験として腫瘍モデルの作成の予備実験を行った。

ヒト臨床腫瘍検体での免疫細胞の評価

化学療法施行前後で、脳腫瘍周囲へ浸潤している白血球、特に M1/M2 マクロファージの評価を行うために、flow cytometry を計画した。具体的には、同一症例における初発時と再発時の腫瘍摘出検体で解析を行うことで、化学療法前後での影響を比較できると考えた。

マクロファージや樹状細胞などを総合的に評価するためのマーカーは以下のものを考えた。CD45 (白血球)、CD3 (T 細胞)、CD11b (骨髄球系)、CD68 (マクロファージ)、HLA-DR (マクロファージ、活性化)、CD11c (樹状細胞系)、CD35、CD21 (fDC)、CD15 (polymorphonuclear MDSC)、CX3CR1 (microglia)、CD163 (M2 macrophage)。

グリオーマ細胞株での IL-34 とそのレセプター (CSF-1R) の発現量の評価

Real time RT-PCR を用いて mRNA の発現量を評価し、通常の細胞株とテモゾロミド耐性株とを比較した。IL-34 のほかに、IL-34 に関連する分子として、CSF-1、CSF-1R (IL-34 と CSF-1 の受容体) internal control として GAPDH を用いた。各実験は 3 回行った。

試薬や装置は以下の通り。リアルタイム PCR 装置 : QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific)、TB Green Premix DimerEraser (Perfect Real Time) (タカラバイオ)、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (タカラバイオ)、FastGene RNA Premium Kit (NIPPON Genetics)

IL34 : (forward: 5'-GTGCCTTACGAGGGGGTGTTC-3' and reverse: 5'-CACCTTGGGGCTGACCTCCAC-3'), CSF1 : (forward: 5'-CCTGAAGAGCTGCTTCACCAA-3' and reverse: 5'-CATTCTTGACCTTCTCCAGCAA-3'), CSF1R : (forward: 5'-TGCCTTACAACGAGAAGTGGGAG-3' and reverse: 5'-ATCTTCACAGCCACCTTCAGGAC-3').

化学療法耐性株における IL-34 関与

siRNA を用いて IL-34 をノックダウンし、化学療法耐性株での薬剤感受性が回復するかを細胞生存・毒性アッセイにて確認した。SiRNA はマウス、ヒト用それぞれ 3 種類購入して最もノックダウン効率がよいものを用いた。

siRNA (sigma aldrich): NM_029646 (Mm02_00335639、Mm01_00070503、Mm01_00070504)
Hs02_00366232 (Hs02_00366232、Hs01_00243325、Hs01_00243326)

トランスフェクション試薬：INTERFERin (Polyplus-Transfection 社)

MTT assay Kit (cell proliferation) (abcam)

4 . 研究成果

化学療法耐性株の作成

当初は 5 種類の細胞株を使用予定だったが、予備実験において U87 は化学療法剤への耐性が弱く有効な耐性株の作成が困難であったことに加えて、そもそも細胞株としての信頼性 (contamination) が懸念されるという過去の報告があり、U87 を除いた 4 種類 (TS、GL261、U251、U118) の細胞株を実験に用いることとした。作成した耐性株と薬剤濃度を (図 1) に示す。これらの株を

薬剤/細胞株	TS	GL261	U251	U118
TMZ	500	100	500	500
Procarbazine	500	500	500	500
ACNU	10	10	50	50
Vincristine	0.1	0.01	0.01	0.01

図1) 作成した耐性株と薬剤濃度 (μ M)

マウス脳腫瘍モデルの作成 (予備実験)

手術に用いる装置、麻酔、inoculation の細胞数や細胞液の濃度、手技の確立、腫瘍検体の処理法 (還流固定など) について習熟し、安定して脳腫瘍モデルを作成できるようになった。

具体的な方法は次の通りである。5~8 週のメスのマウス (C57BL/6N, 日本 SLC 株式会社) を購入し、ketamine (第一三共) 80 mg/kg と xylazine (Bayer Japan) 10 mg/kg を腹腔内投与して鎮静鎮痛筋弛緩を得た後、マウス用頭部固定装置 (SR-5M-HT/SM-15R/IMS-3; Narishige Japan) にマウスを固定し、頭皮を正中切開し、26G の針を用いて、bregma より 0.1 mm 後方、正中より 2.5 mm 右側の位置に 1 か所穿頭を行った。PBS 2 μ L に再懸濁した viable な TS 細胞 $1 * 10^3$ 個を、26G の Hamilton syringe (701RN, Hamilton, Reno, NV) を用いて、各マウスの右脳 (頭蓋骨表面から 4 mm の深さで、実質脳表から 3.5 mm の深さに相当する位置) に 2 分以上かけてゆっくりと定位的に接種し、その後針を 2 分間動かさずに保持したのち、ゆっくりと抜去する方法にて脳腫瘍モデルを作成した。腫瘍の生着率は 100% であり、生存期間中央値は 3 週間である (苦痛軽減・倫理的配慮から体重が 20% 以上低下した時点で安楽死としている)。

なお、マウスでの治療実験は行うことができなかった。理由は後述のように、*in vitro* の実験により、IL-34 が悪性グリオーマにおいて有望なターゲットとは言えない結果となったため、生体 (マウス) を利用した実験の継続が倫理的に認められない状況となったためである。しかしながら、本研究で培ったマウス脳腫瘍モデルの作成技術は、将来の別の研究に役立てる所存である。

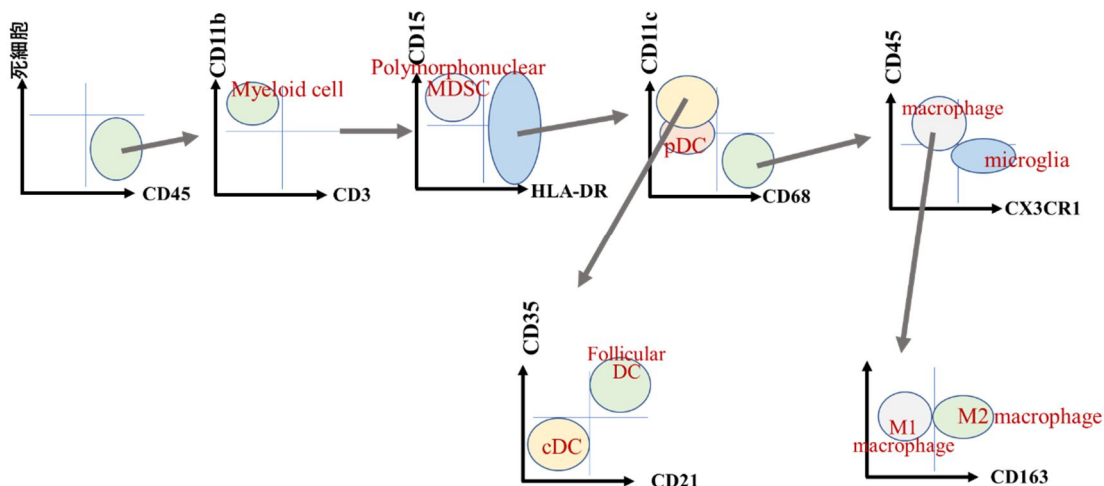
ヒト臨床腫瘍検体での免疫細胞の評価 (予備実験)

筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会により承認を受け、臨床検体を用いて解析前の処理方法 (白血球の抽出法など) を検討し、flow cytometry での測定条件設定、パネルの設定などを行った (図 2)。

なお、腫瘍の初発・再発とも手術を行った症例での解析は行っていない。理由としては、後述のように、*in vitro* の実験により、IL-34 が悪性グリオーマにおいて有望なターゲット

とは言えない結果となったため、臨床検体を使用する意義が乏しくなってしまう、実験を中止したためである。しかしながら、本研究で培ったヒト検体でのパネルは、将来的な腫瘍免疫の研究に役立てたいと考えている。

図2) 腫瘍浸潤マクロファージの評価のためのパネル



④ mRNA 発現の変化

TMZ 耐性株での IL-34 および CSF-1 および CSF-1R の発現量の増加はわずかであった。一方で、ACNU 耐性株では IL-34 の上昇がみられたが、CSF-1 や CSF-1R を比較すると上昇は非常にわずかであった（ここでは、例として最も上昇の見られた GL261 での結果を図 3 として示す）。

なお、TS 等のほかの細胞においては、IL-34 の上昇はさらにわずかなものであった。

図3) 化学療法naiveなGL261での発現量を1とした時の相対発現量

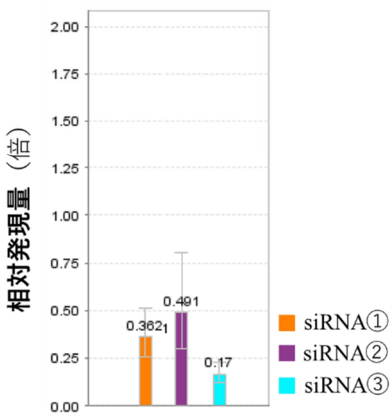
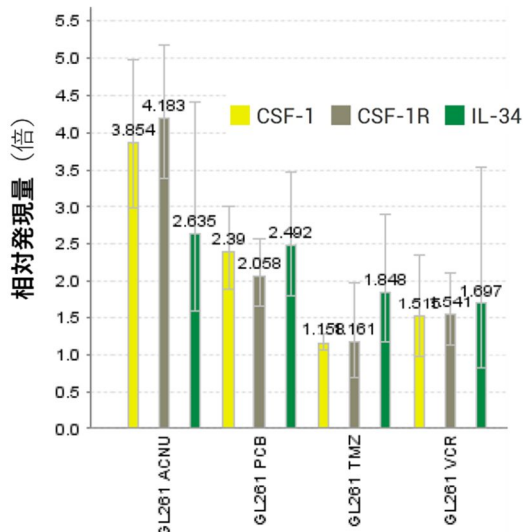


図4) ノックダウンしていないGL261でのIL-34発現量を1とした時の相対発現量

⑤ 化学療法耐性株における IL-34 関与

siRNA を用いて IL-34 の発現をノックダウンすることは可能であった。siRNA③が最もノックダウン効率が高かったため、以後の実験では siRNA③を用いた（図 4、ACNU 耐性の GL261 における IL-34 相対発現量）。

しかしながら IL-34 をノックダウンした細胞株を化学療法に各化学療法剤に再暴露したが、IL-34 をノックダウンしていない細胞株と比べて特に細胞増殖に変化は見られなかった。

結果のまとめ：

特定の細胞株において化学療法暴露後に IL-34 の上昇がみられることが示された（特に、GL261 における ACNU 暴露後）。しかしながら、その上昇は軽度であり、また臨床で最も使用される TMZ では IL-34 がほぼ上昇しないことがわかった。ゆえに、「悪性グリオーマにおいて IL-34 は、有望な治療標的分子とはいえない」と考える。

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
---------	---------