

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：中村 貴香

専攻分野：未来がん医療プロフェッショナル養成コース

指導教授：鈴木 直

主論文の題目：

Interleukin-34 Cancels Anti-tumor Immunity by PARP Inhibitor
(インターロイキン 34 は PARP 阻害薬による抗腫瘍免疫をキャンセルする)

共著者：

Nabeel Kajihara, Naoki Hama, Takuto Kobayashi, Ryo Otsuka, Nanumi Han, Haruka Wada, Yoshinori Hasegawa, Nao Suzuki, Ken-ichiro Seino

緒言

PARP 阻害薬 (PARPi) は相同組換え欠損を有する卵巣癌の新規治療選択である。しかし他の抗がん剤と同様に PARPi 治療を受けた多くの患者は、最終的に治療抵抗性を獲得する。腫瘍微小環境 (TME) の免疫細胞が多くの抗がん剤で抗腫瘍免疫に貢献するが、一方で腫瘍由来の炎症性サイトカインは TME において免疫抑制性に働き、薬剤耐性に寄与する。炎症性サイトカイン IL-34 は乳癌や大腸癌で独立した予後不良因子であり、IL-34 高発現が TME で免疫抑制性細胞(M2 マクロファージなど)を強力に分化誘導し、腫瘍増殖と治療抵抗性獲得に寄与することが明らかになっている。

そこで本研究では、IL-34 が TME 調節を介し卵巣癌に対する PARPi 治療効果にどのような影響を与えるかを検証する目的で研究を進めた。

方法・対象

ヒト卵巣漿液性癌 TCGA データセットから mRNA データを用いて、生存解析を行った。次に、PARPi (ニラパリブおよびオラパリブ) による抗腫瘍効果および免疫細胞変化を調査するため、マウス卵巣癌細胞株 (HM-1) とマウス乳癌細胞株 (4T1) を用い *in vitro* 細胞増殖アッセイを行った。*in vivo* アッセイでは腫瘍細胞の皮下接種とニラパリブの腹腔内投与を行い、腫瘍径計測と腫瘍浸潤免疫細胞解析を行った。又、それぞれの細胞株で CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用い、*Brca1* および *Il34* 欠損細胞株を作成し、腫瘍産生 IL-34 存在下の PARPi 治療効果を同様に評価し、腫瘍浸潤免疫細胞 (リンパ球分画、骨髄球分画、樹状細胞) を調査した。全ての動物実験は、北海道大学動物愛護委員会の承認を得て (承認番号: 19-0094) 行った。又、統計分析は JMP14 を使用し、2 グループ間比較は両側スチューデント t 検定を使用、3 つ以上のグループ間比較は Tukey 検定を使用、生存分析では Cox 比例ハザードモデルを使用し、p 値<0.05 で統計的に有意であるとし解析した。

結果

マウス *Brca1* 欠損細胞を作成し PARPi 治療効果を確認した結果、*in vitro* で *Brca1* 欠損細胞は増殖抑制を示したが、*in vivo* においては *Brca1* 欠損腫瘍に対する腫瘍抑制効果が認められなかった。IL-34 高発現が免疫抑制性 TME を形成し PARPi 治療効果を阻害する可能性が示唆された。

TCGA データ解析から、IL-34 高発現はヒト卵巣漿液性癌の全生存期間 (OS) に対する独立した予後不良因子であった。さらに IL-34 高発現と MHC クラス II の低発現が OS をより増悪させた。以上より、IL-34 を標的とした研究と介入が卵巣癌患者の予後改善に寄与する可能性が考えられた。

そこで、IL-34 と PARPi 治療効果との関係を調査するため、*Brca1* と

Il34 の両欠損細胞株を作成し、*in vitro* で *Brca1* 欠損細胞では PARPi への感受性が同等であることを確認し、*in vivo* で両欠損腫瘍は PARPi 治療によって腫瘍抑制が示された。次に、腫瘍浸潤免疫細胞を評価した結果、PARPi 治療は両欠損腫瘍でのみ活性化型 T 細胞（特に Cd8⁺T 細胞）増加させる結果が得られたことから、Il-34 喪失で Cd8⁺T 細胞が誘導され、抗腫瘍免疫性 TME の形成が示唆された。

Cd8 除去処理マウスでは前述の PARPi 治療効果の消失を認め、Cd4 除去処理マウスでは認められなかった。この結果から PARPi 治療の抗腫瘍免疫に Cd8⁺T 細胞が必須であると示唆された。又、両欠損腫瘍の PARPi 治療では、交差提示 (Xcr1⁺) 樹状細胞 (DC) 増加も認められた。PARPi 存在下 Il-34 非存在下でのみ Xcr1⁺DC の分化が誘導された ($P<0.05$)。これらの結果から PARPi 治療は、Il-34 非存在下で Xcr1⁺DC-Cd8⁺T 細胞軸の活性化を介した抗腫瘍免疫性 TME の形成を促すが、Il-34 存在下ではそれを強力に阻害する事実が明らかとなった。

考察

我々の研究成果で、今回 IL-34 がヒト卵巣漿液性癌において独立した予後不良因子であり、その高発現は OS を有意に短縮することを示した。さらに *Brca1* 欠損腫瘍から IL-34 を欠損することで、PARPi 治療が TME 内で活性化 CD8⁺T 細胞を増加させ、顕著な抗腫瘍免疫を獲得することが示された。又、腫瘍抗原特異的 CD4⁺T 細胞が CD8⁺T 細胞の活性化と増加を助け抗腫瘍効果を高めることは一般的に知られている。しかし、我々のデータは CD4⁺T 細胞を介さずに腫瘍抗原に対する CD8⁺T 細胞の活性化と増加が PARPi 治療の抗腫瘍効果に不可欠であることを示しており、CD8⁺T 細胞へ直接抗原提示できる細胞の関与を推測した。

特殊な Xcr1⁺DC は、一般的に MHC クラス II によって提示される外因性抗原が MHC クラス I を介して CD8⁺T 細胞へ直接効率的に抗原提示できることが知られていた。我々は、卵巣癌に対する PARPi 治療が

XCR1+DC 増加を介し、活性化 CD8+T 細胞増加に寄与し、抗腫瘍効果を得られることを示した。

IL-34 は STAT3/NF- κ B 経路を活性化し IL-6 や IL-10 産生を増強することで、免疫抑制性 TME の生成を強力にサポートすることが知られている。よって IL-34 存在下において、PARPi 治療は免疫細胞の活性化を常に抑制している可能性が示唆された。我々のデータは BRCA1 関連卵巣癌で PARPi 治療による抗腫瘍免疫では XCR1+DC-CD8+T 細胞軸が重要であり、IL-34 の存在がそれを強力に阻害することを初めて示した。

結論

本研究結果から、腫瘍由来 IL-34 が免疫抑制性 TME を形成し、PARPi 治療による抗腫瘍免疫に対する新規耐性機構が明らかとなった。卵巣癌における治療標的として IL-34 の必要性が示された。