

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	永田 真莉乃
<p>学位論文題目</p> <p>A critical role of STING-triggered tumor-migrating neutrophils for anti-tumor effect of intratumoral cGAMP treatment (STING活性化によって腫瘍内に集積する好中球はcGAMPの腫瘍内投与による抗腫瘍効果に重要な役割を果たす)</p> <p>共著者名</p> <p>小坂朱, 矢島優己, 安田俊輔, 大原みずほ, 大原賢三, 原渕翔平, 林隆介, 船越洋, 上田潤, 熊井琢美, 長門利純, 及川賢輔, 原渕保明, Esteban Celis, 大栗敬幸, 小林博也</p> <p>Cancer Immunology, Immunotherapy, published online: 28 January 2021 DOI: 10.1007/s00262-021-02864-0</p> <p>研究目的</p> <p>近年、悪性腫瘍の治療法として免疫療法が注目を集めている。免疫系ががん細胞を殺傷する仕組みは「がん免疫サイクル」と呼ばれる7つのステップで構成される回路が重要である[1]。免疫療法単独では十分な治療効果が得られない場合も多く、併用治療によって、効果的にがん免疫サイクルを促進できる治療法の開発が期待されている。</p> <p>好中球は、がん免疫応答においては、主に腫瘍促進的に働くことが報告されてきたが、腫瘍中に多くの好中球が浸潤すると予後が良いとする報告もあり、腫瘍微小環境において好中球が腫瘍促進的に働くのか、あるいは抗腫瘍的に働くのかは十分に解明されていない[2]。</p> <p>Stimulator of interferon genes (STING)は、cGAMPなどのリガンドを認識して、I型インターフェロン(IFN)の産生を誘導することで、抗ウイルス応答や抗腫瘍免疫応答を促進する[3]。これまで我々は、cGAMPを腫瘍内投与すると効果的に抗腫瘍免疫応答を活性化でき、さらに、cGAMPの腫瘍内投与により腫瘍内に浸潤してくる単球/マクロファージが、この抗腫瘍免疫応答に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。</p> <p>cGAMPの腫瘍内投与により単球/マクロファージとともに好中球も多く浸潤してくることから、今回我々はこの好中球の抗腫瘍免疫応答における役割とそのメカニズムを明らかにするべく検討を行った。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

1. 腫瘍移植マウスモデルに対するcGAMP腫瘍内投与による腫瘍組織内免疫細胞動態の変化の検討  
3種類のマウス腫瘍細胞株(E0771, B16F10, 3LL)をそれぞれ移植したC57BL/6J野生型マウスにcGAMPを腫瘍内投与し、腫瘍組織中の免疫細胞動態の変化をフローサイトメトリー(FCM)で解析した。また同様の検討を2種類のマウス腫瘍細胞株(E0771, B16F10)をそれぞれ移植したSTING欠損マウスを用いて行った。
2. STING活性化による好中球の腫瘍内集積のメカニズムの検討  
2種類のマウス腫瘍細胞株(E0771, B16F10)をそれぞれ移植した野生型マウスにcGAMPを腫瘍内投与するとともに、抗CXCR2抗体を腹腔内投与し、腫瘍組織中の免疫細胞における好中球の割合の変化をFCMで解析した。またB16F10移植野生型マウスにcGAMPを腫瘍内投与し、Cxcl1, Cxcl2, Ifnb1, Mx1の遺伝子発現の変化をリアルタイムPCR法を用いて検討した。さらにE0771移植野生型マウスにcGAMPを腫瘍内投与するとともに、NF- $\kappa$ B阻害剤を腹腔内投与し、腫瘍組織中の免疫細胞における好中球の割合の変化をFCMで解析した。
3. 好中球がcGAMP治療の抗腫瘍効果・抗腫瘍免疫応答に及ぼす影響の検討  
2種類のマウス腫瘍細胞株(E0771, B16F10)をそれぞれ移植した野生型マウスにcGAMPを腫瘍内投与するとともに、抗CXCR2抗体を腹腔内投与し、腫瘍面積を継続的に計測した。また、治療後に所属リンパ節と遠隔リンパ節を摘出し、免疫細胞動態の変化をFCMで解析した。
4. I型IFN欠損マウスでのcGAMP治療の検討  
2種類のマウス腫瘍細胞株(E0771, B16F10)を、STINGの下流にあるIRF3・IRF7のダブルノックアウト(DKO)マウス、あるいはI型IFN受容体であるIFNAR1をノックアウトしたマウス(IFNAR1KOマウス)に移植し、cGAMPを腫瘍内投与して、腫瘍組織中の免疫細胞における好中球の割合の変化をFCMで解析した。また、E0771を各マウスに移植し、所属リンパ節を摘出し、免疫細胞動態の変化をFCMで解析した。さらに、B16F10を野生型マウスとIFNAR1KOマウスに移植して、cGAMPを腫瘍内投与し、腫瘍面積の継続的な計測と生存時間解析を行った。
5. 好中球の細胞障害活性に対するI型IFNの影響の検討  
E0771を野生型マウスとIFNAR1KOマウスに移植して、cGAMPを腫瘍内投与し、腫瘍を摘出して組織学的に比較した。また、野生型マウスあるいはIFNAR1KOマウスの脾臓から好中球を分離して、IFN- $\beta$ の存在下あるいはそれに加えてNADPHオキシダーゼ阻害剤(DPI)の存在下でE0771細胞と共培養し、好中球の細胞障害活性を検討した。

## 成 績

1. 3種類の腫瘍移植マウスモデルではいずれもcGAMP治療により腫瘍内の好中球の割合が有意に増加した。またSTING欠損マウスでは好中球の割合の増加は認めず、cGAMPの腫瘍内投与による腫瘍内への好中球の集積はSTING依存性であることが示唆された。
2. 抗CXCR2抗体を投与すると、cGAMP治療による腫瘍内への好中球の集積は抑制された。ま

た、cGAMP治療により腫瘍組織でのCxcl1とCxcl2の遺伝子発現は、Ifnb1・Mx1と同様に増強した。また、NF-κBが阻害されることによっても、cGAMP治療による腫瘍内への好中球の集積は抑制された。以上、STING活性化による腫瘍内への好中球の集積は、NF-κB/CXCR2経路依存性であることが示唆された。

3. いずれのマウスモデルでもcGAMP治療により抗腫瘍効果が見られたが、抗CXCR2抗体を投与するとこの抗腫瘍効果は抑制された。同時に、所属リンパ節におけるCD4陽性あるいはCD8陽性T細胞、樹状細胞の活性化も抑制された。
4. DKOマウスあるいはIFNAR1KOマウスでも、野生型マウス同様にcGAMP治療による腫瘍内への好中球の集積が認められた。しかし、所属リンパ節におけるCD4陽性あるいはCD8陽性T細胞の活性化はDKOマウス・IFNAR1KOマウスでは抑制された。またIFNAR1KOマウスでは、cGAMP治療による抗腫瘍効果も抑制された。つまり好中球が腫瘍内に集積するだけでは抗腫瘍効果を発揮するには不十分であり、I型IFNの関与が必要であることが示唆された。
5. 野生型C57BL/6Jマウスでは、IFNAR1KOマウスと比較して、cGAMP治療により腫瘍細胞の接着性の低下、アポトーシスの増加、Cleaved caspase 3陽性領域の増大を認め、cGAMPによる組織障害活性にはI型IFNが重要であることが示唆された。また、好中球の細胞障害活性はI型IFN存在下で増強し、DPI存在下では抑制され、好中球の細胞障害活性にもSTING活性化によるI型IFNの産生が重要であることが示唆された。

#### 考 案

本研究において、cGAMPの腫瘍内投与によりSTING依存性に、CXCL1/CXCL2/NF-κB経路を介して腫瘍内に好中球が集積し、またIRF3/IRF7を介して産生されたI型IFNが好中球を活性化することで抗腫瘍効果が促進されることが明らかになった。IFNAR1KOマウスでは、cGAMPを腫瘍内投与しても抗腫瘍効果は得られず、T細胞の活性化も認めないこと、またin vitroで好中球はI型IFNにより活性化されると細胞障害活性を増強することが示唆されたことから、cGAMPの腫瘍内投与による抗腫瘍効果には、I型IFNにより活性化された好中球が重要な役割を果たすと考えられる。

近年、腫瘍関連好中球(TAN)を抗腫瘍作用をもつN1型と、腫瘍促進作用をもつN2型に分類する報告がある。また、I型IFNは好中球をN1型に傾けることや、活性酸素の産生によってN1型好中球は抗腫瘍効果を促進することも報告されている。本研究においても、活性酸素の産生を阻害するとI型IFNで活性化した好中球の細胞障害活性が抑制された。これらのことより、STINGの活性化は、CXCL1/CXCL2/NF-κB経路を介して好中球を腫瘍内に集積させると同時に、IRF3/IRF7をI型IFNを産生させることで好中球をN1型に分化させ、効果的に抗腫瘍効果を増強することが示唆される。

cGAMP治療とともに抗CXCR2抗体を投与すると、好中球の腫瘍内集積が阻害されるだけでなく、所属リンパ節における樹状細胞・T細胞の活性化も阻害された。また、抗CXCR2抗体を投与した場合や、I型IFN欠損マウスにcGAMP治療をした場合では、cGAMPの抗腫瘍効果は見られなかった。以上のことから、STINGの活性化した腫瘍内においては、N1型好中球は腫瘍を

直接殺傷するだけでなく、自然免疫と獲得免疫の橋渡し役として働くことによっても抗腫瘍効果を促進することが示唆される。

## 結 論

STINGはI型IFNの産生を介して抗原提示を促進したり、腫瘍特異的T細胞を誘導したりすることで抗腫瘍免疫応答を促進するとされてきたが、本研究によって、好中球を活性化することで、がん免疫サイクルにおける最初のステップにおいてもSTINGが重要な役割を果たすことが明らかになった。

## 引 用 文 献

1. Chen DS, Mellman I (2013) Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39(1):1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
2. Mishalian I, Bayuh R, Levy L, Zolotarov L, Michaeli J, Fridlender ZG (2013) Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol Immunother* 62(11):1745–1756.  
<https://doi.org/10.1007/s00262-013-1476-9>
3. Ishikawa H, Barber GN (2008) STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455(7213):674–678.  
<https://doi.org/10.1038/nature07317>