

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	担がんマウス生体内に存在する接着性新規免疫細胞の同定と機能解析
Title(English)	
著者(和文)	椿卓也
Author(English)	takuya tsubaki
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10821号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:近藤 科江,丸山 厚,中村 浩之,西山 伸宏,小倉 俊一郎
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10821号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

東京工業大学 生命理工学研究科
生体分子機能工学専攻 近藤研究室

担がんマウス生体内に存在する 接着性新規免疫細胞の 同定と機能解析

学生氏名：椿 卓也

指導教員（主査）：近藤 科江 教授

指導教員（副査）：丸山 厚 教授

目次

略語一覧.....	4
第1章 研究の背景.....	7
1.1. 腫瘍内の間質系細胞と腫瘍悪性化の関わり.....	8
1.2. Cytotoxic T lymphocyte (CTL).....	9
1.3. TAM.....	12
1.4. MDSC.....	14
第2章 新規骨髄由来細胞 MLAC の同定と性状解析.....	17
2.1. 序論.....	18
2.2. 実験材料および方法.....	18
2.3. 実験結果.....	22
2.4. 考察.....	27
第3章 MLAC の腫瘍増殖促進作用の解析.....	28
3.1. 序論.....	29
3.2. 実験材料および方法.....	30
3.3. 実験結果.....	33
3.4. 考察.....	35
第4章 MLAC のがん細胞増殖促進機構の解析.....	36
4.1. 序論.....	37
4.2. 実験材料および方法.....	38
4.3. 実験結果.....	41
4.4. 考察.....	46
第5章 MLAC による腫瘍増殖促進機構の解析.....	47
5.1. 序論.....	48
5.2. 実験材料および方法.....	50
5.3. 実験結果.....	53
5.4. 考察.....	55
第6章 MLAC による MDSC の腫瘍組織内への誘引作用の解析.....	56
6.1. 序論.....	57

6.2. 実験材料および方法.....	58
6.3. 実験結果.....	61
6.4. 考察.....	65
第7章 考察・今後の展望.....	66
引用文献.....	71
業績.....	82
謝辞.....	85

略語一覽

ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis
ANG2	angiopoietin 2
Arg1	arginase 1
ATRA	all-transretinoic acid
BID	BH3-interacting domain death agonist
BMDC	bone marrow-derived dendritic cell
bp	basepair
BSA	bovine serum albumin
BV8	Bombina variegata 8
CAF	cancer-associated fibroblast
CCL	C-C motif chemokine ligand
CCR	C-C motif chemokine receptor
cDNA	complementary DNA
CAF	cancer-associated fibroblast
<i>Cebp</i>	CCAAT/enhancer-binding protein
COX2	cyclooxygenase 2
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CX ₃ CR1	CX ₃ C Chemokine Receptor 1
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
CXCR	C-X-C motif chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
CM	conditioned medium
CSF-1R	colony stimulating factor 1 receptor
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FcεR1α	type I high-affinity IgE receptor alpha
FcγR	Fcγ receptor
FGF	fibroblast growth factor
Fluc	firefly luciferase
FoxP3	forkhead box P3
FPS	farnesyl diphosphate synthase

FS_Lin	forward scatter_linear
5-FU	5-fluorouracil
<i>g</i>	standard gravity (9.80665m/s ²)
Gal9	galectin 9
GFP	green fluorescence protein
GITR	glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPI	glycosylphosphatidylinositol
Gr-1	granulocyte-differentiation antigen-1
IDO	indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleukin
iNOS	induced nitric oxide synthase
<i>Irf8</i>	interferon regulatory factor 8
IVIS	<i>in vivo</i> imaging system
JAK	Janus kinase
KIR	killer cell immunoglobulin like receptor
LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
LLC	lewis lung carcinoma
<i>Mafb</i>	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MDSC	myeloid-derived suppressor cell
<i>Mertk</i>	c-MER proto-oncogene tyrosine kinase
MFI	mean fluorescent intensity
MHC-I	major histocompatibility complex class I
MHC-II	major histocompatibility complex class II
mKO2	monomer KusabiraOrange2
MLAC	MDSC-like adherent cell
MMP	matrix metalloproteinase
Mo-MDSC	monocytic MDSC
mRNA	messenger ribonucleic acid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NRP1	neuropilin 1
O.C.T.	optimum cutting temperature
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
PBS	phosphate-buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
PD-1	programmed cell death 1
PDE5	phosphodiesterase 5
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	PDGF receptor
PD-L1	programmed cell death ligand 1
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIGF	placental growth factor
PMN-MDSC	polymorphonuclear MDSC
qRT-PCR	quantitative real-time RT-PCR
Rluc	renilla luciferase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ROS	reactive oxygen species
<i>S100a8</i>	S100 calcium-binding protein A8
SCA1	stem cell antigen-1
sfGFP	superfolder GFP
shRNA	short hairpin RNA
Siglec-F	sialic acid-binding Ig-like lectin-F
α SMA	alpha smooth muscle actin
SS_Lin	side Scatter_Linear
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TAM	tumor-associated macrophage
TCR	T-cell receptor
TEPM	thioglycollate-elicited peritoneal macrophage
TGF- β	transforming growth factor beta
TIGIT	T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Trap	tartrate-resistant acid phosphatase
Treg	regulatory T cell
TTCM	tumor-tissue conditioned medium
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
VEGFC	vascular endothelial growth factor C

第 1 章

研究の背景

1.1. 腫瘍内の間質系細胞と腫瘍悪性化との関わり

がんの発生および進展の細胞自律的な機構として、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異が有名であるが、固形腫瘍組織内に存在するがん細胞と正常な間質系細胞との相互作用が腫瘍悪性化に大きく寄与しているとして長年注目されている[1]。固形腫瘍組織内には、血管・リンパ管を形成する内皮細胞や周皮細胞、cancer-associated fibroblast (CAF)、および非常に多くの種類の免疫細胞（リンパ球およびミエロイド細胞）など、多種多様な間質系細胞が存在している[2, 3] (Fig 1.1.)。

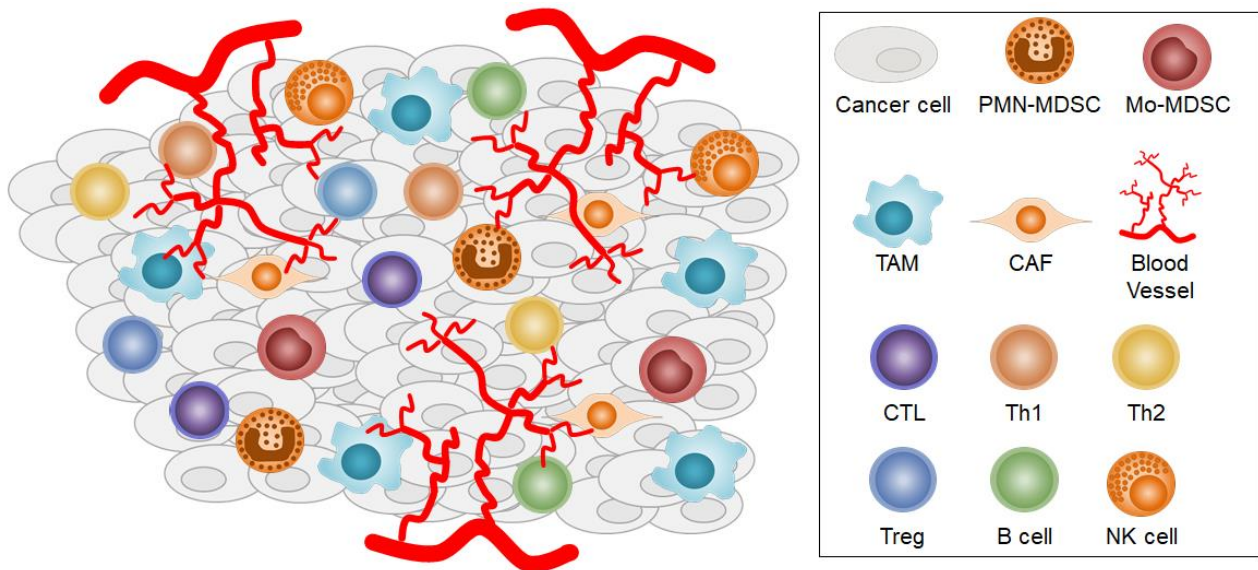


Fig 1.1. 固形腫瘍組織を構成する多種多様な間質系細胞

固形腫瘍組織を形成するのは、がん細胞のみでなく、血管を形成する血管内皮細胞、CAF、T細胞やB細胞やNK細胞などのリンパ球、TAMやMDSCなどのミエロイド細胞など、多くの間質系細胞が存在している。

免疫細胞は、本来異物であるがん細胞を認識・駆逐する働きを有しており、実際に腫瘍組織内に浸潤しているリンパ球が多い患者ほど予後が良いという数多くの報告がある[4-8]。しかしながら、がん患者の生体内の免疫細胞は、本来の免疫応答が抑制されている場合があり、逆に腫瘍悪性化を促進する免疫細胞も存在することも知られている[9, 10] (Table 1.1.)。これら免疫細胞の賦活化を狙った【がん免疫療法】の臨床試験が現在盛んに進められている[11-14] (Table 1.3.-1.5.)。

Table 1.1. 固形腫瘍組織内の主な免疫細胞による腫瘍悪性化機構

細胞種	細胞を定義するマーカー	機能
B 細胞	CD11b ⁻ CD19 ⁺ CD20 ⁺	IL-10 および IgG を放出するなどにより、TAM の活性化に寄与する。
1 型ヘルパーT 細胞 (Th1)	CD11b ⁻ CD3ε ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ IFNγ ⁺ T-bet ⁺	IFNγ を放出するなどにより、CTL の活性化に寄与する。
2 型ヘルパーT 細胞 (Th2)	CD11b ⁻ CD3ε ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ IL-4 ⁺ GATA-3 ⁺	IL-4, IL-13 を放出するなどにより、TAM の活性化に寄与する。
Treg	CD11b ⁻ CD3ε ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ FoxP3 ⁺	CTL の抑制、NK 細胞の抑制など、様々な機構で腫瘍悪性化に貢献する。
CTL	CD11b ⁻ CD3ε ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	がん抗原を提示するがん細胞を認識し、perforin や granzyme などにより殺す。
NK 細胞	CD3ε ⁻ NK1.1 ⁺ NKp46 ⁺	MHC-I を発現していないがん細胞を認識し、perforin や granzyme などにより殺す。
M1 マクロファージ	CD11b ⁺ F4/80 ⁺ MHC-II ^{hi}	抗原を提示することで、T 細胞の活性化に寄与する。
TAM	CD11b ⁺ F4/80 ⁺ MHC-II ^{low}	血管新生の促進、CTL の抑制、NK 細胞の抑制など、様々な機構で腫瘍悪性化に貢献する。
Mo-MDSC	CD11b ⁺ Gr-1 ^{low} Ly6C ^{hi} Ly6G ⁺	血管新生の促進、CTL の抑制、NK 細胞の抑制、TAM への分化など、様々な機構で腫瘍悪性化に貢献する。
PMN-MDSC	CD11b ⁺ Gr-1 ^{hi} Ly6C ^{low} Ly6G ⁻	
マスト細胞	CD11b ⁺ FcεR1α ⁺ c-Kit ⁺ SCA1 ⁺ CD34 ⁺	血管新生の促進、CTL の抑制、NK 細胞の抑制、など、様々な機構で腫瘍悪性化に貢献する。

表は、[2, 9]を参考にして作成。腫瘍悪性化に貢献する細胞を青色、腫瘍抑制に貢献する細胞を赤色で塗りつぶした。略語については、4-6 ページ目の略語一覧を参照。

1.2. Cytotoxic T lymphocyte (CTL)

リンパ球の一種である CTL は、がん細胞表面の major histocompatibility complex class I (MHC-I) とがん細胞特異的な抗原ペプチドの複合体を、T-cell receptor (TCR) およびその補助受容体である CD8 により認識する (Fig 1.2.)。すると、CD8 および TCR 下流のシグナルにより活性化された CTL は、膜に小孔を形成する因子 perforin およびセリンプロテアーゼである granzyme B (GzmB) を内包する顆粒を放出する[15] (Fig 1.2.)。perforin の小孔よりがん細胞内に入り込んだ GzmB は、(1) Caspase 3 を直接切断・活性化する、もしくは(2) BH3-interacting domain death agonist (BID) を切断・活性化することで間接的に Caspase 3 を活性化するという機構により、そのがん抗原陽性のがん細胞特異的かつ強力にアポトーシスへ誘導する[16] (Fig 1.2.-1.3.)。

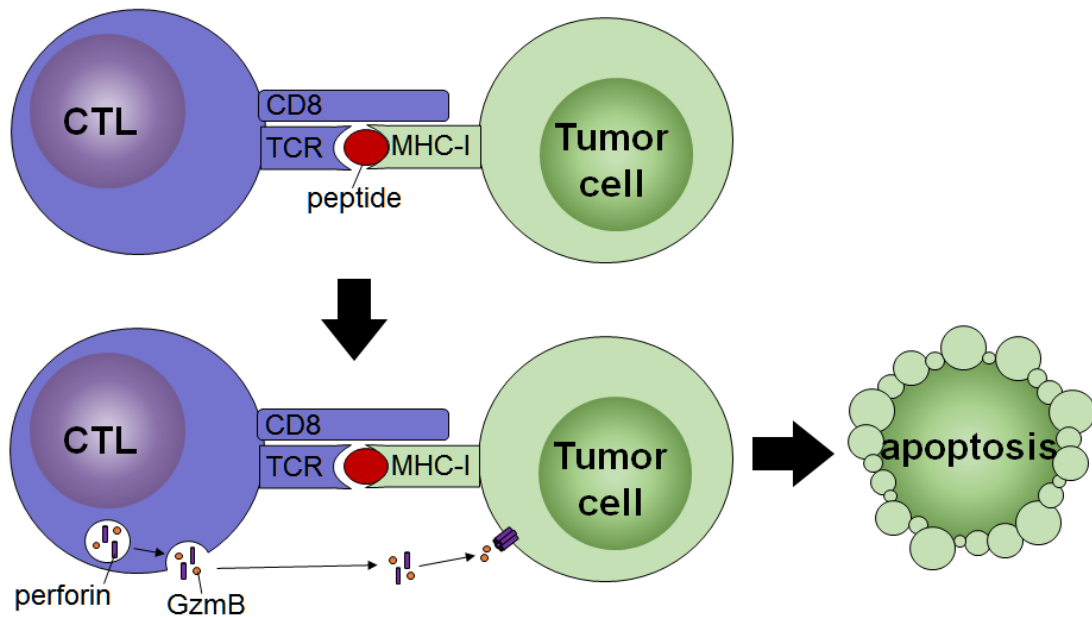


Fig 1.2. CTL ががん細胞を認識および攻撃する機構

CTL は、MHC-I 表面に提示されたがん抗原ペプチドを、TCR およびその補助受容体である CD8 により認識する。すると CTL は、膜に小孔を形成する因子 perforin およびセリンプロテアーゼである GzmB を放出することで、がん細胞をアポトーシスへ誘導する。

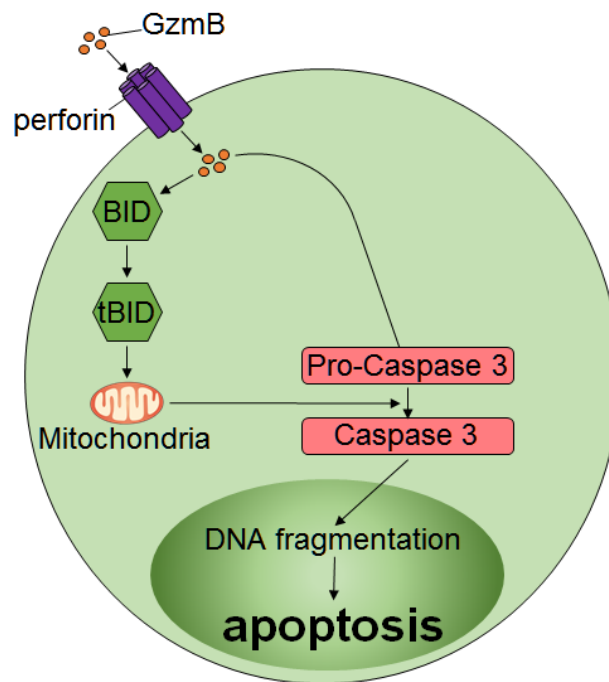


Fig 1.3. GzmB ががん細胞をアポトーシスへ誘導する機構

perforin の小孔よりがん細胞内へ入り込んだ GzmB は、Caspase 3 を直接切断・活性化するか、もしくは BID を切断・活性化することによりミトコンドリア経由で間接的に Caspase 3 を活性化することで、標的がん細胞を強力にアポトーシスへ誘導する。

がん細胞を殺す役割を担うもう 1 種のリンパ球 NK 細胞と比べて、CTLの方がその細胞傷害活性が高いと知られている[17]。しかし、myeloid-derived suppressor cell (MDSC)および tumor-associated macrophage (TAM)など様々な細胞が、CTL 本来の細胞傷害活性を抑制していることが報告されている[18] (Table 1.2.)。

Table 1.2. 固形腫瘍組織内における主な CTL 抑制機構

抑制機構の概要	トリガーとなる主な因子	発現する主な免疫細胞種
NO が TCR をニトロ化することで不活性化	iNOS	Mo-MDSC
準必須アミノ酸 Arg を枯渇させることで不活性化	Arg1	Mo-MDSC, TAM
ROS が TCR や IFN γ の発現を抑制することで不活性化	NADPH oxidase	PMN-MDSC
必須アミノ酸 Trp を枯渇させることで不活性化	IDO	MDSC, TAM
CTL 表面の PD-1, TIM-3 に結合することで不活性化シグナルを流す	PD-L1, Gal9	MDSC, TAM
CTL 表面の PD-1, CTLA-4 に結合することで不活性化シグナルを流す	PD-L2, CD80, CD86	TAM
CTL 表面の FASL, TRAIL に結合することでアポトーシスへ誘導する	FAS, TRAIL-R	TAM
TAM を活性化することで、CTL を不活性化	IgG	B 細胞
Treg への分化・活性化を促進することで、CTL を不活性化	TGF- β	Treg、マスト細胞、 TAM, MDSC
CTL による IFN γ , GzmB などの発現を抑制		

表は、[12, 18]を基にして作成した。略語については、4-6 ページ目の略語一覧を参照。

そのため、CTL を再活性化するための抗がん剤が、がん免疫療法の中で最も積極的に研究開発されている[11] (Table 1.3.)。中でも、抗 PD-1 抗体 (Nivolumab, Pembrolizumab) は極めて高い治療効果を発揮したが、単剤で投与した際の奏効率がわずか 20-30%であるという問題がある[19, 20]。そこで残り 70-80%の患者への治療効果を高めるための手段として、他の抗がん剤と併用する臨床試験が年々増加しており[21]、現在世界で 1,000 以上の併用臨床試験が進められている[22]。これまで、併用する薬剤標的の多くは T 細胞などの獲得免疫の主要担当細胞であったが、近年はマクロファージなどの自然免疫系を標的とする薬剤との併用が注目されている[22]。

Table 1.3. 現在臨床試験中の CTL 標的薬

薬剤	代表的な作用機構の概要
Anti-CTLA-4 antibodies (Ipilimumab, Tremelimumab)	CTL における、免疫チェックポイント分子の不活性化シグナルを阻害
Anti-PD-1 antibodies (Nivolumab, Pembrolizumab, Pidilizumab, AMP-224, AMP-514, PDR001)	
Anti-PD-L1 antibodies (BMS-936559, Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab)	
Anti-NKG2A antibody (Monalizumab)	
Anti-KIR antibodies (IHP2101, Lirilumab)	
Anti-B7-H3 antibody (Enoblituzumab)	
Anti-LAG-3 antibodies (IMP321, BMS-986016)	
Anti-TIGIT antibody (OMP-313M32)	
Anti-TIM-3 antibody (TSR-022)	
Anti-CD200 antibody (Samalizumab)	
Recombinant IL-2 (Aldesleukin)	CTL における、活性化シグナルを亢進
IL-15/soluble IL-15R α complex (ALT-803, hetIL15)	
Recombinant IL-21 (Denenickin)	
Agonistic anti-4-1BB antibodies (Urelumab, Utomilumab)	
Agonistic anti-OX40 antibodies (MEDI6383, MEDI0562, MEDI6469, MEDI6383)	
Agonistic anti-GITR antibody (TRX518)	
Agonistic anti-CD27 antibody (Varlilumab)	

表は [11] を基に作成し、National Library of Medicine、National Institutes of Health (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>) の情報を参考にして更新した。CTL 不活性化シグナルの阻害剤を青色、活性化シグナルの作動薬を赤色のカラムに示した。略語については、4-6 ページの略語一覧を参照。

1.3. TAM

TAM は、完全に分化成熟したミエロイド細胞の一種であり、未分化ミエロイド細胞 MDSC が骨髓や脾臓という造血系臓器から固形腫瘍組織へ誘引された後に、腫瘍内で分化成熟する[12]。また、固形腫瘍組織内に浸潤している免疫細胞の中で最も多くの割合を占めている[23]。

マクロファージは本来抗原提示細胞として、がん細胞特有のがん抗原ペプチドを認識して CTL による抗腫瘍免疫応答を助ける機能を有するが、腫瘍組織内でがん細胞により教育されることで TAM

となり、主に3つの機構により腫瘍悪性化に貢献している[12] (Fig 1.4.)。 (1) 様々な分子を発現してCTLの機能を抑制する。例えば、TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor (TRAIL-R)およびFASは、CTL表面のTRAILおよびFASLに結合することで、CTLをアポトーシスへ誘導する[24]。Arginase 1 (Arg1)はT細胞にとって必須アミノ酸であるL-アルギニンをL-オルニチンへ分解することでL-アルギニンを枯渇させ、T細胞の増殖およびTCRの発現を抑える[25]。CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, Galectin 9 (Gal9)は、CTL表面の免疫チェックポイント分子 (CTLA-4, PD-1, TIM-3) と結合することで、CTLに不活性化シグナルを誘導する[12]。 (2) VEGFA, WNT7 β , MMP9などを細胞外に発現・分泌することにより腫瘍内血管新生を促進し、その結果として腫瘍の成長を促進する[26-28]。 (3) がん細胞の幹細胞性を促進する。TAMが分泌するIL-6, TNF- α は、がん細胞内のNF- κ BシグナルおよびSTAT3シグナルを活性化し、がん細胞の幹細胞性に重要な遺伝子の発現を亢進する[29, 30]。また、固形腫瘍内のTAMの割合が高い患者ほど予後が悪いという相関が、多くのがん種において報告されている[31]。それゆえ、このTAMを標的とするがん免疫療法の研究開発が長年進められてきたが、最近ではTAM標的薬単剤投与ではなく、CTL標的薬との併用の有用性が臨床試験において盛んに検証されている[11, 12, 14] (Table 1.4.)。

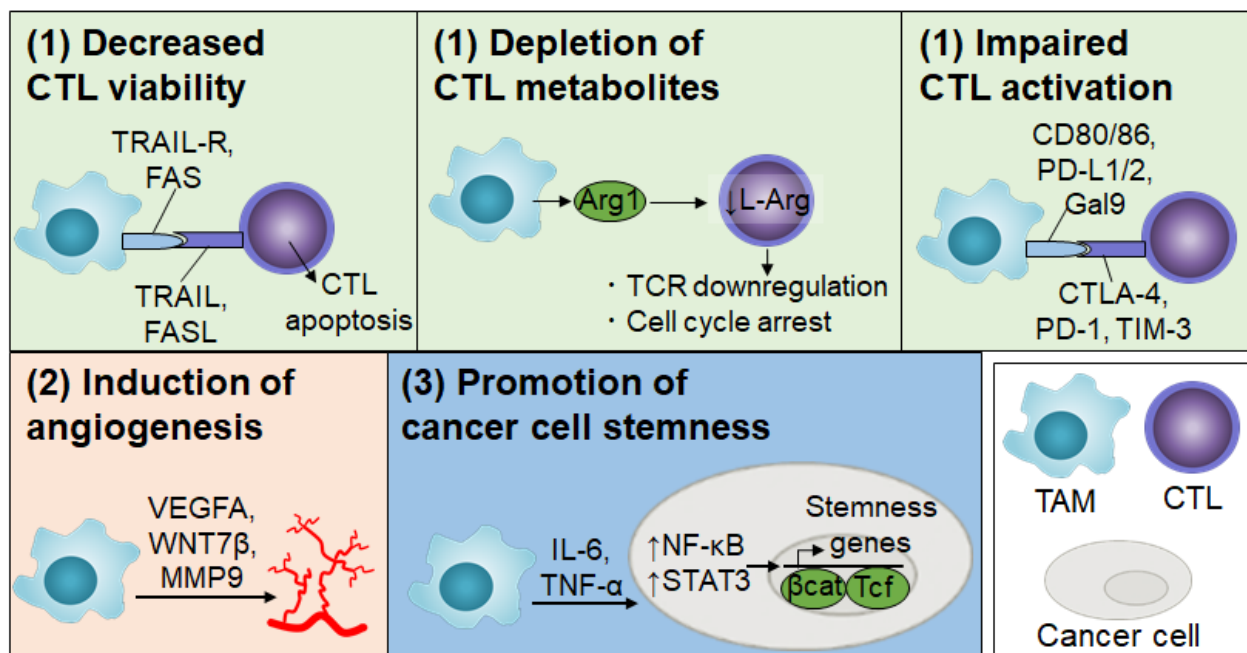


Fig 1.4. TAMによる腫瘍悪性化機構

背景が緑色 (1)はCTLによる免疫応答の抑制を、赤色(2)は血管新生の促進を、青色(3)はがん細胞の幹細胞性の促進を、それぞれ示している。図は、[12]を参考にして作成。略語については、4-6 ページの略語一覧を参照。

Table 1.4. 現在臨床試験中の TAM 標的薬

薬剤	作用機構
CSF-1R inhibitor (Pexidartinib, ARRY-382)	TAM の遊走阻害
Anti-CSF-1R antibodies (Emactuzumab, Cabiralizumab, LY3022855)	
Anti-CCL2 antibody (Carlumab)	
Anti-NRP1 antibody (Vesencumab)	
Anti-ANG2 antibody (Nesvacumab)	
Anti-IL6 antibodies (Clazakizumab, Olokizumab, Siltuximab, Sirukumab)	TAM の機能阻害
IDO inhibitors (Epacadostat, Indoximod, Navoximod)	TAM による CTL 抑制能阻害
Tie2 inhibitors (Pexmetinib, CEP-11981)	TAM による血管新生阻害
Anti-VEGF antibody (Bevacizumab)	
TLR3 agonist (Hiltonol)	マクロファージによる抗原提示促進
TLR4 agonist (OM-174)	
TLR7 agonist (PF-04878691)	
TLR7/8 agonist (Imiquimod)	
TLR8 agonist (Motolimod)	
TLR9 agonists (CpG 7909, lefitolimod, SD-101, IMO-2055, IMO-2125)	
Agonistic anti-CD40 antibodies (CP-870893, Lucatumumab, Dacetuzumab)	TAM による ADCC, ADCP 活性促進
Anti-CD47 antibodies (CC-90002, Hu5F9-G4)	

表は [11, 12, 14] を基に作成し、National Library of Medicine、National Institutes of Health (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>) の情報を参考にして更新した。略語については、4-6 ページの略語一覧を参照。

1.4. MDSC

骨髄におけるミエロイド細胞の分化制御が異常になるのはがん個体の特徴であり、健常者の場合は末梢組織内には存在せず骨髄などの造血系臓器内のみに存在する未成熟ミエロイド細胞が、がん患者の様々な組織内に集積する[32]。このような未成熟ミエロイド細胞は成熟ミエロイド細胞と比較して、(1) reactive oxygen species (ROS)、一酸化窒素、Arg1などを生産することで、CTLなどによる免疫応答を抑制すること、(2) 貪食能が低いことなどの特徴であり[33]、このような不均一なミエロイド細胞集団を MDSC と総称している[34, 35]。現在、この MDSC は 2 種類の細胞種に大別されており、polymorphonuclear MDSC (PMN-MDSC) および monocytic MDSC (Mo-MDSC) と呼ばれる。

MDSC は腫瘍悪性化に貢献しており、主に以下 3 つの機構が報告されている (Fig 1.5)。(1) MDSC

は CTL の活性を抑制する[36]。PMN-MDSC は NADPH oxidase 活性が高く、ROS を産生することにより CTL を抑制する[37]。ROS は TCR および IFN- γ の発現を抑制すると知られている[38]。対して、Mo-MDSC は inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) および Arg1 を発現することで、T 細胞の活性化を抑制する[36]。iNOS により生成された一酸化窒素は TCR をニトロ化することで、T 細胞活性化を抑える[39]。Arg1 は T 細胞にとって必須アミノ酸である L-アルギニンを枯渇させることで、T 細胞の増殖および TCR の発現を抑える[40]。Mo-MDSC および PMN-MDSC のどちらも発現する PD-L1, Gal9 は、CTL 表面の免疫チェックポイント分子 (PD-1, TIM-3) に結合することで、CTL に不活性化シグナルを誘導する。(2) Mo-MDSC および PMN-MDSC のどちらも、VEGFA, BV8, MMP-9などを放出することにより血管新生を促進し、その結果として腫瘍の成長を促進する[41]。(3) Mo-MDSC および PMN-MDSC のどちらも TAM へ分化することで、腫瘍悪性化に貢献する[36]。

がん患者の末梢血中に存在する MDSC の割合が高いほど予後が悪いことから[42]、現在は予後マーカーとしても利用され始めている[43]。また、末梢血中の MDSC 量が多いがん患者ほど抗 PD-1 抗体などの CTL 標的薬の応答が低いと報告されており[44, 45]、MDSC を標的とする薬と CTL 標的薬の併用も徐々に注目され始めている[46, 47][Clinical Trial #NCT03302247]。それゆえ、実際に MDSC 標的薬の臨床試験が近年進められているが[11-13] (Table 1.5)、未だ承認された MDSC 標的薬はない。その原因の 1 つとして、MDSC は非常に不均一な細胞であり、TAM や CTL などと比べると未解明な部分が非常に多いことが、MDSC 標的薬の開発を困難なものにしていると考えられる。

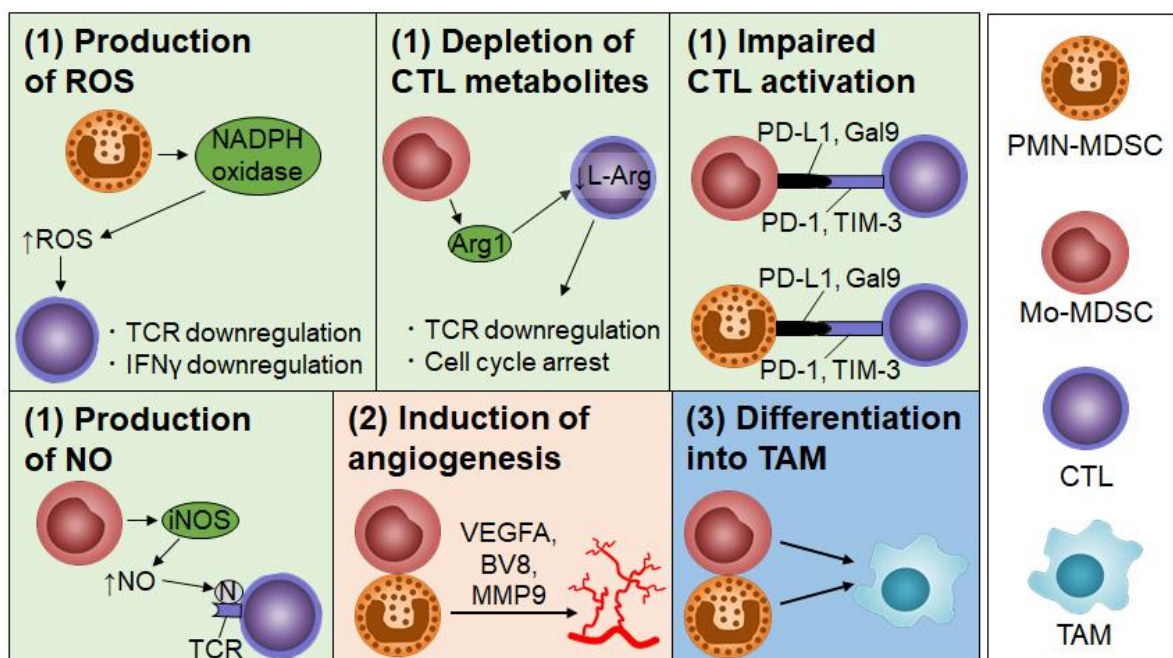


Fig 1.5. MDSC による腫瘍悪性化機構

緑色の背景の(1)は CTL による免疫応答の抑制を、赤色の(2)は血管新生の促進を、青色の(3)は TAM への分化を、それぞれ示している。図は、[12]を参考にして作成。略語については、4-6 ページ目の略語一覧を参照。

Table 1.5. 現在臨床試験中の MDSC 標的薬

薬剤	作用機構
5-FU	MDSC の増殖阻害
Gemcitabine	
VEGFR1/2/PDGFR α / β inhibitor (Sunitinib)	
FPS inhibitor (Amino-bisphosphonate)	
BRAF inhibitors (Vemurafenib, Dabrafenib)	MDSC の除去
Trabectedin	
Vitamin A derivative (ATRA)	MDSC の分化誘導
Vitamin D3	
Anti-CSF-1R antibody (LY3022855, Cabiralizumab, Emactuzumab)	MDSC の遊走阻害
CSF-1R inhibitors (Pexidartinib, ARRY-382)	
Anti-CCL2 antibody (Carlumab)	
ROS synthesis inhibitor (CDDO-Me)	MDSC の不活性化
Exosome inhibitor (Amiloride)	
iNOS/Arg1 inhibitor (NO-aspirin)	
IDO inhibitors (Epacadostat, Indoximod, Navoximod)	
PDE5 inhibitors (Tadalafil, Sildenafil, Vardenafil)	MDSC の不活性化/増殖阻害
Anti-VEGF antibody (Bevacizumab)	MDSC による血管新生阻害、 MDSC の増殖阻害
COX2 inhibitor (Celecoxib)	MDSC の増殖/活性/遊走阻害

表は [11-13] を基に作成し、National Library of Medicine、National Institutes of Health (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>) の情報を参考にして更新した。略語については、4-6 ページの略語一覧を参照。

第 2 章

新規骨髓由来細胞 MLAC の同定と性状解析

2.1. 序論

2.1.1. MDSC 不均一性と現在の課題

マウス生体内において MDSC は、ミエロイド細胞共通マーカー CD11b および顆粒球マーカー Gr-1 の両方を発現する細胞として定義されており[48]、数多くのがん種のモデルマウスの腫瘍組織内のみならず、末梢血、脾臓、骨髄、リンパ節内にも存在することが知られている[43, 49-52]。

第一章にも既述した通り、MDSC は不均一なミエロイド細胞集団であり、現在は Mo-MDSC と PMN-MDSC の二種に大別されている。各々の細胞集団は膜表面マーカーに基づいて区別することが可能であり、前者は CD11b⁺ Gr-1^{low} Ly6G⁻ Ly6C^{hi}、後者は CD11b⁺ Gr-1^{hi} Ly6G⁺ Ly6C^{low} と定義されている[36]。

2008 年の Youn らの報告によると、腫瘍組織内から CD11b⁺ Gr-1⁺細胞として回収した細胞のうち全てが TAM へ分化する能力を有する訳ではない[36]。さらに、肺がん自然発症モデルマウスの前病変肺組織より回収した CD11b⁺ Gr-1⁺細胞は CTL 抑制能を有さないことが知られている[53]。これらの報告を踏まえると、CD11b⁺ Gr-1⁺細胞群は現在 Mo-MDSC および PMN-MDSC という 2 種の細胞に大別されて定義されているが、実際は非常に不均一な細胞の集まりであり、CD11b⁺ Gr-1^{lo} Ly6G⁻ Ly6C^{hi} 細胞および CD11b⁺ Gr-1^{hi} Ly6G⁺ Ly6C^{low} 細胞の中には MDSC とそうでない未同定の新規細胞亜集団が混在している可能性が示唆される。つまり、CD11b⁺ Gr-1⁺細胞群を構成する細胞の全貌を解明し、どの細胞や因子を治療標的にすべきか適切に判断することが、より有効な MDSC 標的薬を開発するために極めて重要であると言える。

腫瘍内 CD11b⁺ Gr-1⁺細胞は非常にヘテロな細胞集団であり、MDSC とそうでない未同定の細胞が存在することが示唆されていた。そこで、皮下腫瘍から CD11b⁺ Gr-1⁺細胞群を単離し、解析するために培養したところ、一部の細胞が培養ディッシュに強く接着した。本章では、この強接着性の CD11b⁺ Gr-1⁺細胞群の性状解析を行い、新規の CD11b⁺ Gr-1⁺細胞であることを示す結果を得た。

2.2. 実験材料および方法

動物実験

B6(Cg)-Tyr^{c-2J}/J (B6 albino)は、ジャクソン研究所 (Maine, USA) より胚を購入し、京都大学再生医科学研究所 近藤玄 教授に樹立・飼育して頂いた。全ての実験には、同腹仔もしくは 6-11 週齢の雄のマウスを使用した。餌および水は絶えず供給された環境であり、東京工業大学 動物実験施設において飼育された。

本研究は、東京工業大学動物実験委員会の審査を受け、承認を得て行った。実験は、東京工業大学動物実験等管理規則を順守し、また、「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」「研究機関等における動物実験の実施に関する基本指針」等の関連法令を厳守し、可能な限り倫理面に配慮し、実験動物の尊厳を重視した実験を行った。

細胞および培養条件

Lewis lung carcinoma (LLC)細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) (Virginia, USA)より購入したものであり、100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を添加した 5% Fetal bovine serum (FBS) 含有の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, California, USA) 培地 (5% FBS-DMEM) を用いて、37°C, 5% CO₂で培養・維持した。恒常的に firefly luciferase (Fluc)を発現する LLC/Fluc は、当研究室の先行研究においてレポーター遺伝子 (pEF/Fluc)[54]をリン酸カルシウム法[55]により導入することで樹立した。

皮下腫瘍モデル

LLC/Fluc (3.0×10^5 cells)を懸濁した PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.0 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.47 mM KH₂PO₄)を等量の Geltrex (Invitrogen)と混和し、B6 Albino マウスの後脚の皮下に注入した。皮下腫瘍の直径が 15-20 mm に到達した時点で腫瘍を摘出し、各種実験に用いた。

フローサイトメトリーおよび細胞分取

腫瘍組織や脾臓や骨髓由来の単細胞を懸濁した PBS に 1:200 の希釈率となるように抗 Fcγ receptor (FcγR) II/III (CD16/32)抗体 (clone 93, Biolegend, California, USA) を添加し、4°C で 20 分インキュベートすることで、FcγR による抗体 Fc 領域への結合をブロッキングした。次に、FACS Buffer (2% FBS および 1 mM EDTA 含有 PBS)で細胞を 1 回洗浄した後、蛍光色素標識された抗体を添加し、暗室 4°C で 25 分インキュベートすることで、膜表面抗原を染色した。最後に FACS Buffer で細胞を 1 回洗浄した後、フローサイトメーター iCyt ec800 (Sony Biotechnology, California, USA) で蛍光測定をした。ただし、目的の細胞集団を単離する場合、FACS Aria (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)を用いた。

使用した抗体は以下の通り。抗 CCR2 抗体 (clone #475301, R&D Systems, Minnesota, USA, 1:50)、抗 CD11b 抗体 (clone M1/70, Biolegend, 1:200)、抗 CD11c 抗体 (clone N418, Biolegend, 1:200)、抗 CD45 抗体 (clone 30-F11, Biolegend, 1:200)、抗 CD68 抗体 (clone FA-11, Biolegend, 1:200)、抗 CSF-1R 抗体 (clone AFS98, Biolegend, 1:200)、抗 CX₃CR1 抗体 (polyclonal, R&D Systems, 1:200)、抗 F4/80 抗体 (clone Cl:A3-1, AbD Serotec, North Carolina, USA, 1:50)、抗 Gr-1 抗体 (clone RB6-8C5, Biolegend, 1:200)、抗 Ly6C 抗体 (clone HK1.4, Biolegend, 1:200)、抗 Ly6G 抗体 (clone 1A8, Biolegend, 1:200)、抗 c-Kit 抗体 (clone 2B8, Biolegend, 1:200)、抗 MHC-II 抗体 (clone M5/114.15.2, Biolegend, 1:400)、抗 CD34 抗体 (clone RAM34, Biolegend, 1:100)、抗 Siglec-F 抗体 (clone RNM44N, eBioscience, San Diego, USA, 1:200)、抗 FcεRIα 抗体 (clone MAR-1, Biolegend, 1:200)。

MDSC-like adherent cell (MLAC)の単離

皮下腫瘍の直径が 15-20 mm に到達した時点で腫瘍を摘出し、メスにより腫瘍組織を細かく刻ん

だ。続いて、0.13 U/mL Liberase DH (Roche Applied Science, Indiana, USA) および 2% FBS を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Life Technologies) に移し、37°C で 60 分間攪拌することで、分散させた。その後、孔径の異なる (500, 250, 100, 40 μm) 4 種のセルストレーナー (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) に順に通すことで凝集した細胞塊を除き、1× PharmLyse solution (BD Biosciences, New Jersey, USA) 中で室温 10 分間インキュベートすることで赤血球を除去した。分散させた単細胞を 2% FBS を添加した RPMI 1640 (2% FBS-RPMI1640) で懸濁し、10 cm ディッシュあたり 2.0×10^7 cells まいて 37°C で培養した。培養開始 30 分間経過した時点で培地を除き、2 mM EDTA/PBS で 3 回洗浄することで、接着力の弱い細胞を念入りに除いた。そして、最後までディッシュ底面に接着していた細胞 (強接着性細胞) をセルスクレーパーにより回収した。強接着性細胞を抗 CD11b 抗体と抗 F4/80 抗体で染色し、CD11b⁺ F4/80⁻細胞として単離した。

MDSC の単離

皮下腫瘍の直径が 15 - 20 mm に到達した時点で腫瘍を摘出し、メスにより腫瘍組織を細かく刻んだ。続いて、0.13 U/mL Liberase DH (Roche Applied Science) を添加した 2% FBS-RPMI1640 に移し、37°C で 60 分間攪拌することで、分散させた。その後、孔径の異なる (500, 250, 100, 40 μm) 4 種のセルストレーナー (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) に順に通すことで凝集した細胞塊を除き、1X PharmLyse solution (BD Biosciences) 中で室温 10 分間インキュベートすることで赤血球を除去した。分散させた単細胞を抗 CD11b 抗体と抗 Gr-1 抗体で染色し、CD11b⁺ Gr-1⁺細胞として単離した。PMN-MDSC および Mo-MDSC は各々、CD11b⁺ Gr-1^{hi}細胞、CD11b⁺ Gr-1^{low}細胞として単離した。

細胞形態の解析

MLAC, PMN-MDSC, Mo-MDSC, TAM 各々 1.0×10^4 cells ずつの細胞懸濁液をスライドガラスに滴下し、カバーガラスを用いて薄く塗り広げた。その後、メイグリュンワルド-ギムザ染色液 (Sigma Aldrich, Missouri, USA) を用いて、製品プロトコール通りの方法で染色した。

bone marrow-derived dendritic cell (BMDC) の調製

過去に報告された方法の通りに、骨髓細胞から樹状細胞を樹立した[56]。まず、健常の B6 Albino マウスの頸骨および大腿骨を摘出し、20 ng/mL GM-CSF (Peprotech, New Jersey, USA) および 50 μM 2-mercaptoethanol 含有 10% FBS-RPMI1640 で骨髓細胞を懸濁し、10 cm ディッシュあたり 2.0×10^5 cells まいて 37°C で培養した。4 日目に浮遊細胞を回収し、20 ng/mL GM-CSF (Peprotech) 含有 10% FBS-RPMI1640 で懸濁して再度 10 cm ディッシュにまいた。7 日目にも浮遊細胞を回収し、20 ng/mL GM-CSF (Peprotech) 含有 10% FBS-RPMI1640 で懸濁して再度 10 cm ディッシュにまいた。10 日目に浮遊細胞を回収し、接着細胞が残存している 10 cm ディッシュに 5 mL 2mM EDTA/PBS

を添加し、37°C でインキュベートした。5 分後に浮遊してきた細胞も回収し、先に回収した浮遊細胞と混和し、BMDC として各種実験に用いた。

RNA 抽出および qRT-PCR

MLAC, TAM, MDSC, BMDC より、RNeasy Mini Kit (Qiagen, California, USA)を用いて RNA を抽出した。その後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて増幅した cDNA を鋳型とし、Table2.1 に示したプライマーを用いて、THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (TOYOBO)で qRT-PCR を行った。各々の工程で用いた試薬の製品プロトコール通りの方法で行った。

Table 2.1. qRT-PCR に用いたプライマーのリスト

遺伝子名	順方向 or 逆方向	配列	長さ [bp]
<i>β-Actin</i>	順方向	GGCTACAGCTTCACCACCAC	20
	逆方向	TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	21
<i>S100a8</i>	順方向	GTCCTCAGTTTGTGCAGAATATAAA	25
	逆方向	TGAGATGCCACACCCACTTT	20
<i>Mafb</i>	順方向	GCAACGGTAGTGTGGAGGAC	20
	逆方向	TTCAGGCGGATCACCTCGT	19
<i>Zbtb46</i>	順方向	GCCGAGACTCAAATGTAGACCT	22
	逆方向	GGCCCAAGTAGCTGGTTTCT	20
<i>Cebp alpha</i>	順方向	GAACAGCAACGAGTACCGGG	20
	逆方向	GCGGTCATTGTCACTGGTCA	20
<i>Cebp beta</i>	順方向	ATCCGGATCAAACGTGGCTG	20
	逆方向	CCCGCAGGAACATCTTTAAGTGA	23
<i>Mertk</i>	順方向	AGCGCAGGGACTTACAAAGAG	21
	逆方向	TTCACTGGCTCACTGAAGGG	20
<i>Irf8</i>	順方向	ACACCATTGAGCTTTCTCCCAG	22
	逆方向	CGGCCCATACAACCTTAGGCA	20

統計学的解析

各実験結果の差が統計学的に有意であるか否かは、Student's t-test によって得た p 値が 0.05 を下回っているかどうかで判断した。全てのデータは、平均値±標準誤差で示した。

2.3. 結果

2.3.1. 強接着性細胞の単離

マウス肺がん細胞株 LLC 細胞を B6 Albino の皮下に同種移植し、皮下腫瘍の直径が 15 - 20 mm に到達した時点で腫瘍組織を摘出し、酵素などにより分散させた単細胞懸濁液を細胞培養用ディッシュ上で短時間インキュベートし、弱く接着していた細胞を除くために、PBS/EDTA で念入りに洗浄した。すると、一部の細胞が極めて強く培養ディッシュに接着していることが確認された。そこでまず、学士論文研究[57]において、回収する強接着細胞に、がん細胞が混入するのを最小限に抑えるために、superfolder GFP (sfGFP) を恒常的に発現する LLC (LLC/sfGFP) の皮下腫瘍から調製した単細胞懸濁液を用いて、(1)細胞培養用ディッシュでインキュベートする時間、(2) 培地中の血清濃度、(3) インキュベート後の洗浄バッファの組成、(4) 洗浄回数、を検討した[57]。その結果、[Fig. 2.1. 赤色ヒストグラム](#)に示す通り、sfGFP を発現するがん細胞 LLC/sfGFP の混入がほとんどなくなる最適な条件を決定した[57]。

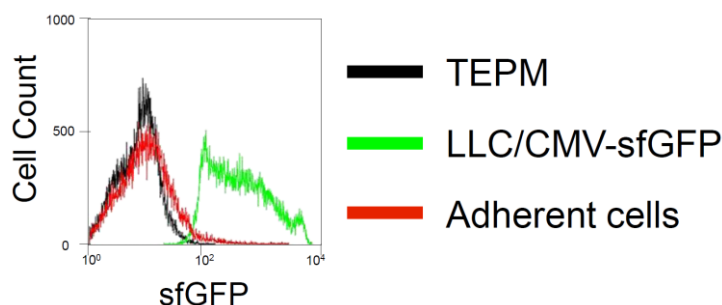


Fig 2.1. LLC/sfGFP 皮下腫瘍組織からの強接着細胞の回収

LLC/sfGFP 皮下腫瘍組織から回収した強接着性細胞における GFP 波長域の蛍光強度を、フローサイトメトリーで測定した。TEPM は、健常マウスから回収した腹腔内マクロファージ (TEPM)であり、ネガティブコントロールとして用いた。

2.3.2. MDSC 様強接着性細胞の同定

マクロファージは非常に接着力が強い特性を持ち[58]、また TAM は腫瘍内に最も多く存在する免疫細胞であること[59]から、当初これら強接着性細胞が TAM であると推測した。そこで、強接着系の細胞から、骨髄由来細胞マーカーCD45 陽性細胞において、ミエロイド細胞マーカーCD11b とマクロファージマーカーF4/80 の発現を調べたところ、予想に反して、強接着性細胞の半数以上(66.8%)が CD11b⁺F4/80⁻であった ([Fig 2.2.](#))。

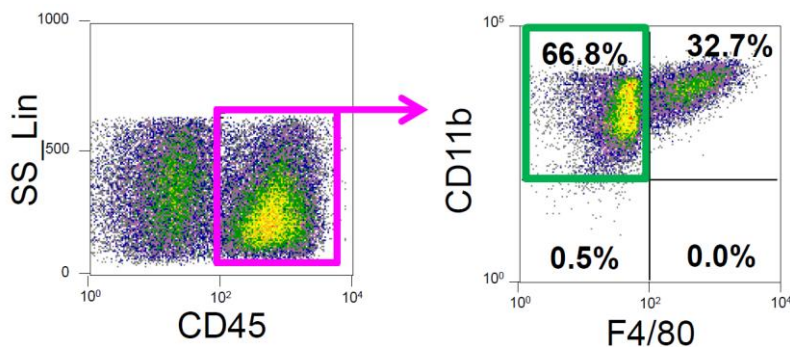


Fig 2.2. CD11b⁺ F4/80⁻ 強接着細胞の同定

皮下腫瘍組織から回収した強接着性細胞のフローサイトメトリー解析。CD45⁺ 強接着性細胞（ピンク色長方形）における、CD11b および F4/80 の発現解析を行った。

また、その CD11b⁺ F4/80⁻ 強接着性細胞において、MDSC に特徴的な膜表面マーカーである Gr-1, Ly6C, Ly6G の発現強度を解析した結果、CD11b⁺ F4/80⁻ 強接着性細胞は Gr-1^{low} Ly6G⁻ Ly6C^{hi} および Gr-1^{hi} Ly6G⁺ Ly6C^{low} の 2 種の細胞により構成されており（Fig 2.3.）、これらは PMN-MDSC および Mo-MDSC のマーカー発現パターンに一致する[60]。

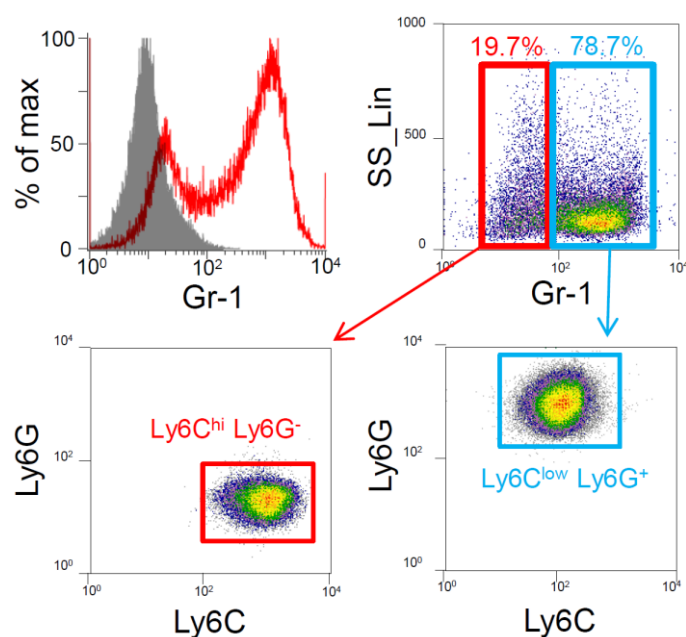


Fig 2.3. MDSC 様強接着細胞の同定

CD11b⁺ F4/80⁻ 強接着性細胞における、Gr-1 の発現（赤色ヒストグラム）を解析した。灰色のヒストグラムは、未染色サンプルのデータを示す。また、Gr-1^{hi} 分画（青色長方形）もしくは Gr-1^{low} 分画（赤色長方形）における、Ly6C および Ly6G の発現解析もさらに行った。

さらに、その CD11b⁺ Gr-1⁺ F4/80⁻ 強接着細胞は、単球マーカー (CX₃CR1, CD68)、樹状細胞マーカー (CD11c)、マスト細胞マーカー (c-Kit) [61]、好酸球マーカー (Siglec-F) [62]、好塩基球マーカー (FcεR1α) [63] の何れも陰性であったことから、これら既知の免疫細胞の何れとも異なることがわかった (Fig 2.4.)。また、未成熟血球系細胞マーカー (CD34)、および単球・マクロファージ・樹状細胞などミエロイド細胞に広く発現する CCR2 の両方は、弱く発現していた (Fig 2.4.)。

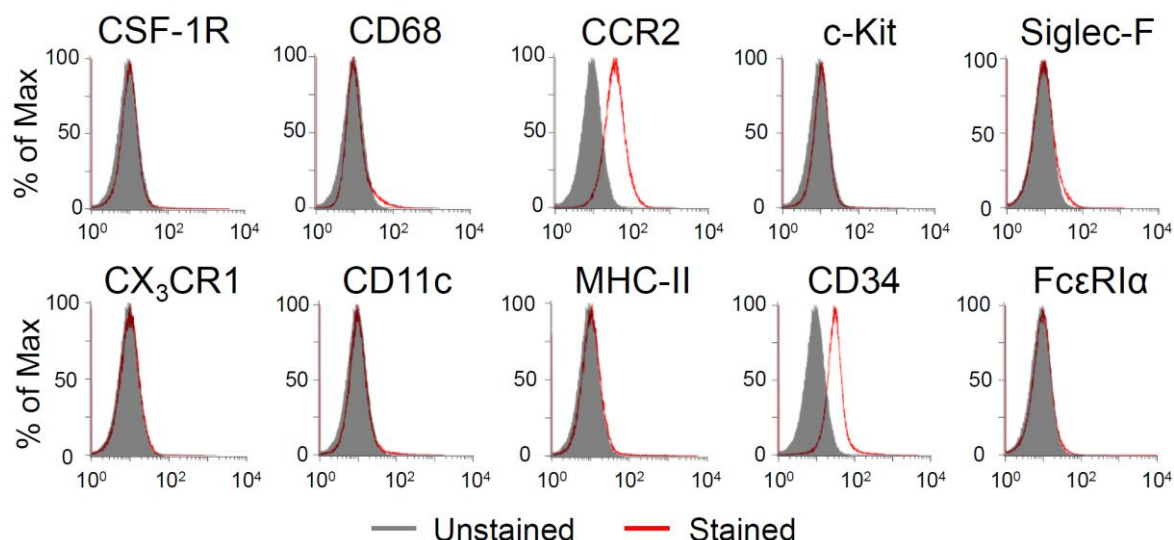


Fig 2.4. MDSC 様強接着細胞における各種マーカー発現解析

各々のマーカーに対する抗体で染色したサンプルのデータを赤色のヒストグラムで示し、灰色のヒストグラムは未染色サンプルのデータを示す。

2.3.3. MDSC 様強接着性細胞の基礎的な性状解析

次に、CD11b⁺ Gr-1⁺ F4/80⁻ 強接着細胞の形態を調べるために、LLC 皮下腫瘍組織から回収した強接着細胞 (Fig. 2.1. 赤色ヒストグラム) から、FACS を用いて CD11b⁺ Gr-1⁺ F4/80⁻ 分画の細胞 (Fig 2.2. 緑色の長方形内) を分取し、May-Grünwald-Giemsa を行った。また、腫瘍組織内から強接着細胞を回収する条件で接着せずに浮遊していた細胞群から、FACS を用いて PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6C^{low} Ly6G⁺ 細胞) および Mo-MDSC (CD11b⁺ Ly6C^{hi} Ly6G⁻ 細胞) を分取し (Fig. 2.5. 緑色長方形内)、対照サンプルとして用いた。その結果、CD11b⁺ Gr-1⁺ F4/80⁻ 強接着細胞は好酸球や好塩基球に特徴的な顆粒 [64] を有さなかったことから、細胞形態の点でも好酸球および好塩基球と違う細胞種であることを再確認した。一方、うす紫色の細胞質や核の形などの点が MDSC に共通していた (Fig 2.6.)。

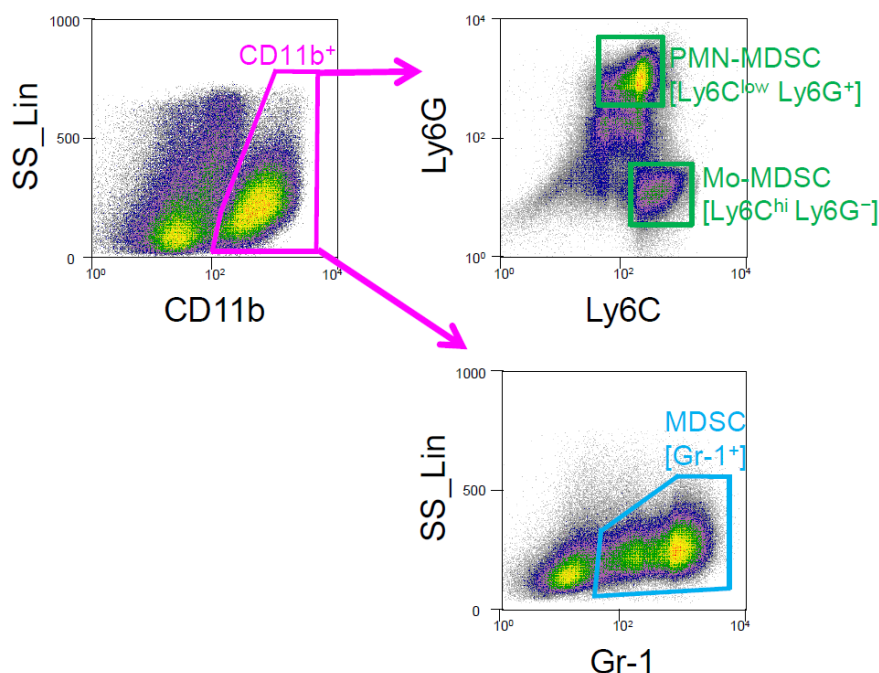


Fig 2.5. 腫瘍内浮遊細胞群内の MDSC をフローサイトメトリーで Gating する流れ

皮下腫瘍組織から回収した浮遊細胞のフローサイトメトリー解析。CD11b⁺ ミエロイド細胞（ピンク色長方形）における、Ly6C, Ly6G, Gr-1 の発現解析を行った。腫瘍内浮遊細胞には Mo-MDSC および PMN-MDSC の両方が存在する。

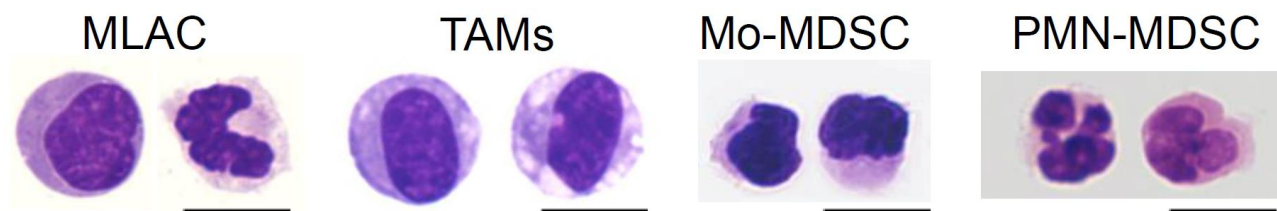


Fig 2.6. MDSC 様強接着細胞の形態観察

MLAC, TAM, PMN-MDSC, Mo-MDSC のメイ-グリュンワルド ギムザ染色結果の一例。スケールバーは 10 μ m。

続いて、CD11b⁺ミエロイド細胞群の各細胞種に特徴的な遺伝子の mRNA 量を qRT-PCR により測定した。その結果 CD11b⁺ Gr-1⁺ F4/80⁺強接着細胞は、MDSC などの未成熟ミエロイド細胞に特徴的な遺伝子 (*S100a8*, *Cebpa*, *Cebpb*) [65, 66]を MDSC と同程度に高発現しており (Fig 2.7.)、TAM に特徴的な遺伝子 (*Mertk*, *Mafb*) [67]および樹状細胞に特徴的な遺伝子 (*Zbtb46*, *Irf8*) [65, 68]の発現量は、それぞれ TAM および樹状細胞に比べて有意に低かった (Fig 2.7.)。

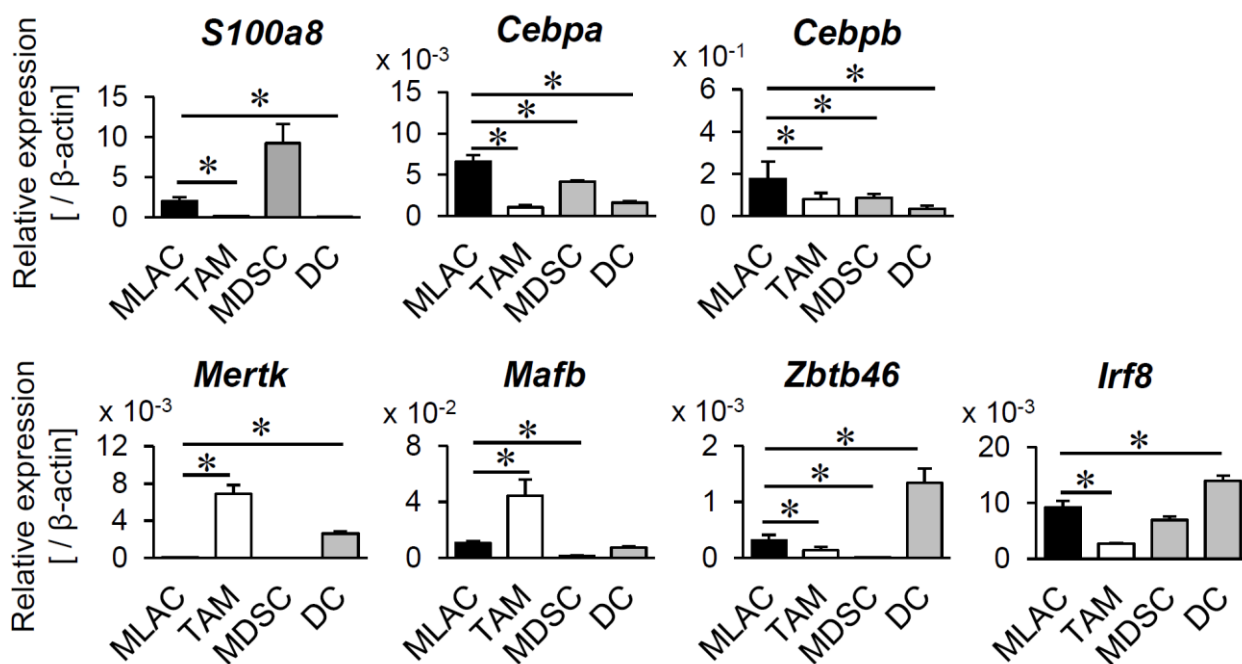


Fig 2.7. MDSC 様強接着細胞における、各種ミエロイド細胞に特徴的な遺伝子発現解析

DC は bone-marrow derived dendritic cell (BMDC)を示す。これら mRNA の発現量は、qRT-PCR により測定した。誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. MLAC. $n = 3$.

これらの細胞形態 (Fig 2.6.) および遺伝子発現解析 (Fig 2.7.) の結果から、 $CD11b^+ Gr-1^+ F4/80^-$ 強接着細胞は TAM や樹状細胞などの成熟ミエロイド細胞よりも未成熟な MDSC に近く、これまで報告されているいずれの細胞とも異なる新規細胞種であると考え、MDSC-like adherent cell (MLAC) と名づけた。

MLAC は、LLC 担がんマウスの腫瘍組織のみならず、末梢血、脾臓、骨髄の何れからも同じ方法で単離することができた (Fig 2.8.)。それに対して、健常の B6 Albino マウスの末梢血、脾臓、骨髄の何れからも同じ方法で細胞を得ることはできなかった。この結果は、MLAC が担がん個体特有な細胞種であることを示唆しており、これは MDSC と共通する[32, 33]。

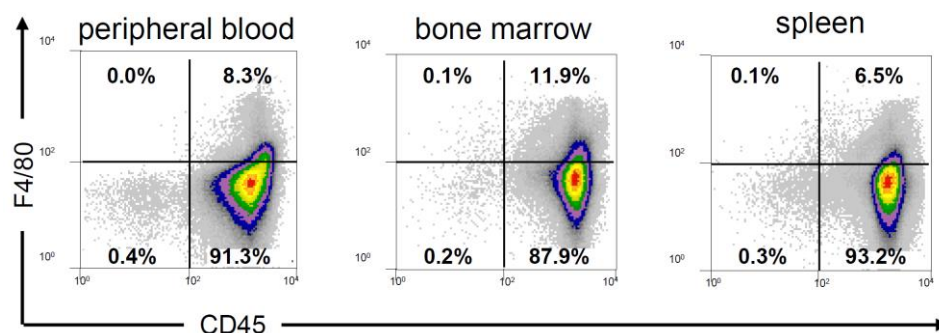


Fig 2.8. LLC 担がんマウスの正常組織における、新規免疫細胞種 MLAC の存在調査

LLC 皮下腫瘍組織が直径 15-20 mm に到達した時点で末梢血、骨髄、脾臓から強接着性細胞を回収し、CD45⁺ F4/80⁻細胞の存在を調査した。全ての実験を、少なくとも 3 回実施した。

2.4. 考察

MLAC は健常マウスには存在せず、担がんマウスにおいてのみ確認されたため (Fig 2.8.)、将来的にがん患者特異的なマーカーとしても利用できる可能性が示唆された。

また MLAC は、MDSC などの未分化ミエロイド細胞に特徴的な遺伝子(*S100a8*, *Cebpa*, *Cebpb*)を MDSC 同程度に高発現していたこと (Fig. 2.7.)、同じく未分化ミエロイド細胞に特徴的な CD34 を低レベルながら発現していた (Fig. 2.4.)。これらの結果を踏まえると、MLAC は未分化ミエロイド細胞であり、成熟ミエロイド細胞である TAM へ分化する能力を有する可能性が示唆された。これについては、後の第 5 章で検証した。

第 3 章

MLAC の腫瘍増殖促進作用の解析

3.1. 序論

3.1.1. *in vivo* 共移植モデル

MLAC が MDSC 同様に腫瘍促進効果を示すか否かを評価するために、「*in vivo* 共移植モデル」という手法[41]を用いて解析した。具体的には、解析したい細胞をがん細胞株と混ぜてマウスの皮下に共移植し、腫瘍を形成させる。また、比較対象として、がん細胞のみを単独移植したマウスも用意し、腫瘍組織の成長を経時的に観察することで、共移植した細胞の腫瘍促進効果もしくは抑制効果の有無を調べることができる。

3.1.2. 発光イメージング

生体光イメージングは、個体における細胞レベルあるいは分子レベルでの生物学的なイベントを可視化する手法で、蛍光と発光が主に使われている。生物発光は、発光酵素ルシフェラーゼによる基質の酸化反応によって生じる[69]。生物発光を利用した生体発光イメージングは、マウスやラットなどの小動物モデルにおいて、発光する分子、細胞の動態を高感度に検出できることから、がんやその他の疾患の研究、ドラッグスクリーニングなどの目的で、近年広く応用されている[70, 71] (Fig 3.1.)。発光イメージングの特徴として、(1) 非侵襲的に深部からのシグナルを観察できること、(2) 蛍光と異なり、自家発光がほとんどないことから、バックグラウンドの非特異的なシグナルが少ないこと、(3) 蛍光と異なり励起光を使用しないため退色せず長期観察が可能であること、(4) 基質や波長の異なる発光を産生する複数の発光酵素を用いることで、複数の目的分子や細胞をほぼ同時にイメージング可能であることなどが挙げられる[69]。

発光イメージングを用いたがん研究を行う場合は、例えば次のようなステップを経る必要がある。まず Fluc のような発光酵素を恒常的に発現するレポーター遺伝子をがん細胞株に導入し、そのがん細胞を動物に移植する。その後、D-luciferin のような発光基質を動物に投与し、腫瘍組織からの発光をイメージング装置で測定することで、がん細胞の成長や転移をリアルタイムかつ非侵襲的に検出することができる[70]。この技術により、同一個体でがんの成長や転移といった過程を経時的かつ定量的に評価することが可能である[72]。

本章では、生体発光イメージングを用いて MLAC の腫瘍促進効果を解析した。

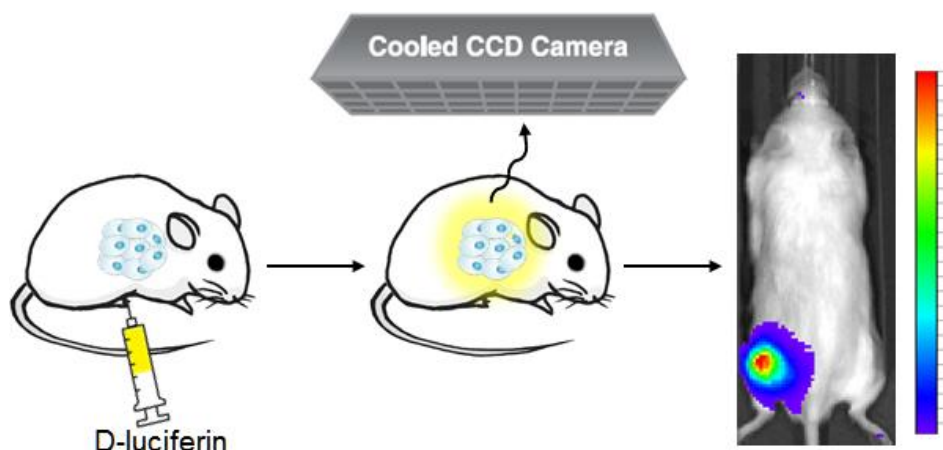


Fig 3.1. 生体発光イメージング

恒常的に発光酵素 firefly luciferase (Fluc)を発現するレポーター遺伝子が導入されたがん細胞をマウスに移植する。その後、発光基質 D-luciferin をマウスの腹腔内へ投与し、超高感度冷却 CCD カメラを搭載するイメージング装置を用いることで、リアルタイムかつ非侵襲的に生体内の現象をイメージングすることができる。

3.2. 実験材料および方法

動物実験

EGFP(K268Q)-GPI transgenic (GFP-Tg)マウス[73]は、京都大学再生医科学研究所 近藤玄 教授に樹立・飼育して頂いた。全ての実験には、同腹仔もしくは 6-11 週齢の雄のマウスを使用した。餌および水は絶えず供給された環境であり、東京工業大学 動物実験施設において飼育された。

細胞および培養条件

Renilla luciferase (Rluc)および monomer KusabiraOrange2 (mKO2)を恒常的に発現する LLC/mKO2-Rluc8.6 は、当研究室の先行研究においてレポーター遺伝子 (pT2/CMV-mKO2-Rluc8.6)をエレクトロポレーター (NepaGene Co., Chiba, Japan)により導入することで樹立した。この LLC/mKO2-Rluc8.6 も 5% FBS-DMEM で培養・維持した。

がん細胞の皮下移植モデル

第 2 章に既述した内容に同じ。

MLAC の単離

第 2 章に既述した内容に同じ。

MDSC の単離

第 2 章に既述した内容に同じ。

***In vivo* 生物発光イメージング**

MLAC (4.0×10^5 cells)、Mo-MDSC (4.0×10^5 cells)、もしくは PMN-MDSC (4.0×10^5 cells)を LLC/Fluc (3.0×10^5 cells)と混和した懸濁液を Geltrex (Invitrogen)と混和し、B6 Albino マウスの後脚の皮下に注入した。またネガティブコントロールとして、LLC/Fluc (3.0×10^5 cells)のみを懸濁した PBS を等量の Geltrex (Invitrogen)と混和し、B6 Albino マウスの後脚の皮下に注入した。移植した日から 4 日毎に、150 μ L D-luciferin solution (100 μ g/mL in PBS, Promega, Wisconsin, USA)をこれら担がんマウスの腹腔内へ注射し、20 分後に IVIS-spectrum (Perkin Elmer, Chicago, USA)で撮像した。

腫瘍組織内における MLAC 生存期間調査

LLC/Fluc 担がんの GFP-Tg マウスの皮下腫瘍が 15-20 mm に到達した時点で腫瘍を摘出し、第 2 章に既述の方法により強接着細胞を回収した。CD11b および F4/80 を染色し、FACS (BD)により GFP⁺ CD11b⁺ F4/80⁻細胞を単離した。GFP⁺ MLAC (4.0×10^5 cells)を LLC/mKO2-Rluc8.6 (3.0×10^5 cells)と混和した懸濁液を Geltrex (Invitrogen)と混和し、B6 Albino マウスの後脚の皮下に注入した。共移植後 8, 12, 20 日後に皮下腫瘍を摘出し、腫瘍組織内の GFP⁺ MLAC の存在を蛍光免疫染色法により染色し、LSM780 共焦点蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)で観察した。

蛍光免疫染色

摘出した腫瘍組織を optimum cutting temperature (O.C.T.) compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan)に浸し、凍結させた。Microm HM560MV cryostat (ThermoFisher Scientific)を用いて厚さ 10 μ m の凍結切片を作製し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (nacalai tesque) 中で室温 10 分間インキュベートすることで、固定した。続いて、0.05% Tween20/PBS (PBS-T)で 3 回洗浄し、3% BSA/PBS 中で室温 30 分間インキュベートすることで、ブロッッキングした。次に、3% BSA/PBS で希釈した一次抗体液中で 4°C で 16 時間インキュベートし、再度 PBS-T で 3 回洗浄した。次に、PBS-T で希釈した蛍光色素標識二次抗体液中で室温 1 時間インキュベートし、再度 PBS-T で 3 回洗浄した。最後に、0.1% Bisbenzimidazole H33342 Fluorochrome Trihydrochloride (Nacalai Tesque)を添加した Fluoromount (Diagnostic BioSystems, California, USA)を 3-4 滴スライドガラスに滴下し、カバーガラスをかぶせた。画像は、LSM780 共焦点蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss)で撮影した。用いた一次抗体は、抗 F4/80 (clone BM8, Biolegend, 1:50)、抗 GFP (polyclonal, Abcam, Massachusetts, USA, 1:250)、抗 Rluc (polyclonal, MBL international, Massachusetts, USA, 1:100)。蛍光色素標識二次抗体 (ThermoFisher Scientific) は、全て 1,000 倍希釈して用いた。

***In vivo* 共培養による LLC 増殖への直接的作用の解析**

0.4 μ m 孔径 Transwell® insert (Corning, New York, USA)を用いて、24 ウェルプレート (TPP, Trasadingen, Switzerland) を bottom chamber と upper chamber に分けて培養した。bottom chamber

には LLC/Fluc (2.4×10^4 cells)をまき、upper chamber には MLAC (3.2×10^4 cells)、Mo-MDSC (3.2×10^4 cells)、もしくは PMN-MDSC (3.2×10^4 cells)をまいて培養した。またネガティブコントロールとして、LLC/Fluc (2.4×10^4 cells)のみを bottom chamber にまき、upper chamber は空のまま培養するサンプルも用意した。37°C で 48 時間培養後、Passive Lysis Buffer (Promega)を用いて bottom chamber の LLC/Fluc 細胞のライセートを調整し、Luciferase Assay Kit (Promega)および luminometer GL-210A (Microtec Co., Ltd, Chiba, Japan)を用いてホタルルシフェラーゼ活性を測定した。

統計学的解析

各実験結果の差が統計学的に有意であるか否かは、Student's t-test によって得た p 値が 0.05 を下回っているかどうかで判断した。全てのデータは、平均値±標準誤差で示した。

3.3. 結果

3.3.1. MLAC と MDSC の腫瘍増殖促進効果の比較

MDSC と MLAC の腫瘍増殖への影響を比較するために、ホタルルシフェラーゼを恒常的に発現するマウス肺がん細胞株 LLC/Fluc を MLAC もしくは MDSC と共に B6 Albino マウスの皮下に移植し、*in vivo* 生物発光イメージングにより腫瘍成長を経時的に観察した (Fig 3.2A)。MLAC (CD11b⁺ F4/80⁻), MDSC (CD11b⁺ Gr-1⁺) どちらの細胞分取にも利用したマーカー CD11b は、がん細胞には発現しておらずミエロイド細胞特異的に発現しているため、がん細胞株 LLC は混入していない。それを踏まえると、MLAC も MDSC もどちらも LLC 腫瘍成長を有意に促進することがわかった。しかし、その影響は明確に異なった。MLAC との共移植では、共移植 8 日後付近と 20 日後付近で、2 段階の腫瘍増殖促進作用が確認されたのに対し、MDSC は共移植 20 日後付近のみ促進作用を示した (Fig 3.2B)。

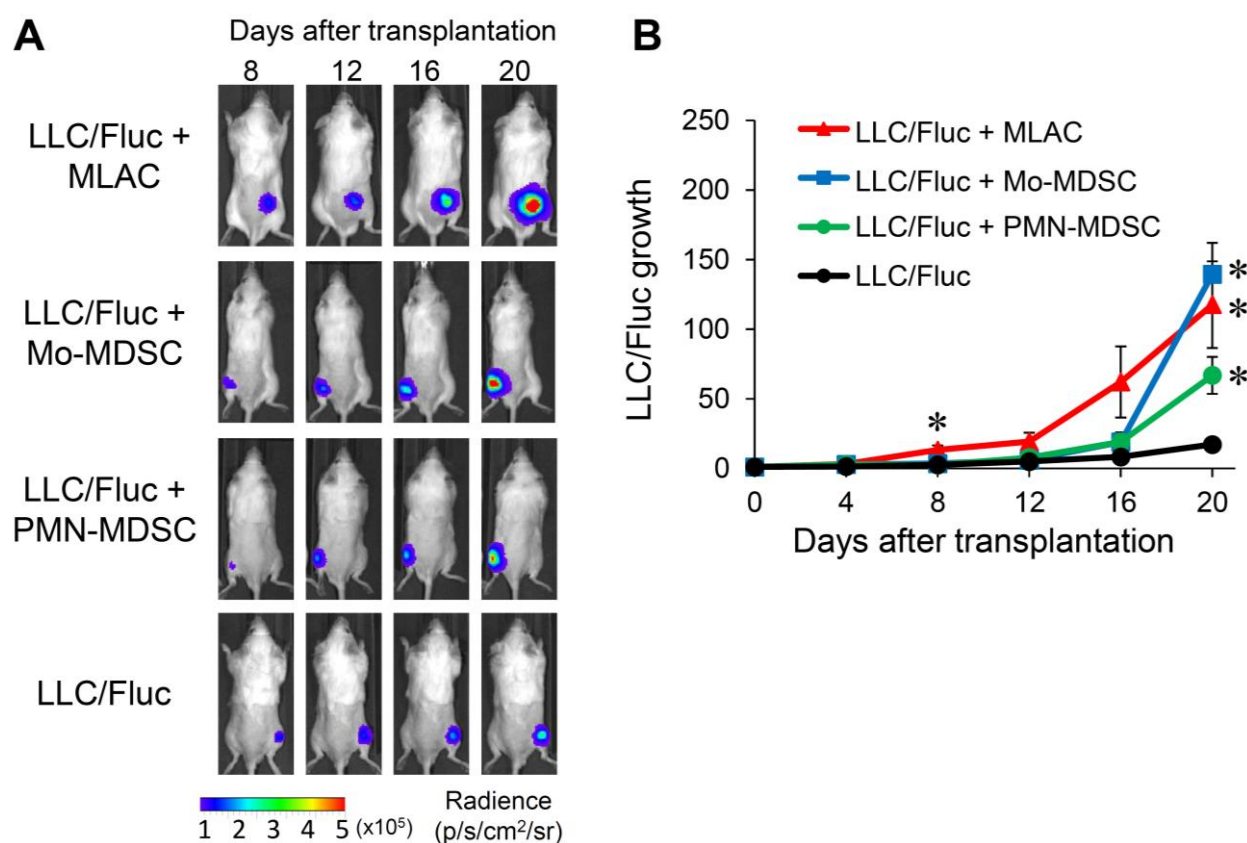


Fig 3.2. MLAC, Mo-MDSC, PMN-MDSC による腫瘍増殖促進作用

(A, B) LLC/Fluc を MLAC, Mo-MDSC, PMN-MDSC の何れかと混ぜて B6 Albino マウスの皮下に共移植した。(A) 移植 8, 12, 16, 20 日後における生物発光イメージングの一例。(B) 皮下腫瘍組織における生物発光強度の定量化解析。LLC/Fluc growth は、移植 0 日後の発光強度に対する相対値として示している。誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. LLC/Fluc. $n = 6$; LLC + MLAC, $n = 4$; LLC + Mo-MDSC, $n = 4$; LLC + PMN-MDSC, $n = 8$; LLC.

3.3.2. 腫瘍組織内における MLAC の生存期間の調査

上記結果をより詳しく考察するために、皮下移植後の腫瘍内における MLAC の生存期間を調査した。LLC/Fluc 担がん GFP-Tg マウスの皮下腫瘍組織から単離した MLAC を、LLC/mKO2-Rluc8.6 と混ぜて B6 Albino マウスの皮下に移植し、8, 12, 20 日後の腫瘍内における GFP⁺ MLAC の存在を観察した。その結果、8 日後には多く確認できたが、12 日後にはわずかに確認できる程度まで減少し、20 日後には完全に消失していた (Fig 3.3A-B)。つまり、共移植された MLAC は皮下腫瘍内において少なくとも 8 日間は機能していることがわかった。

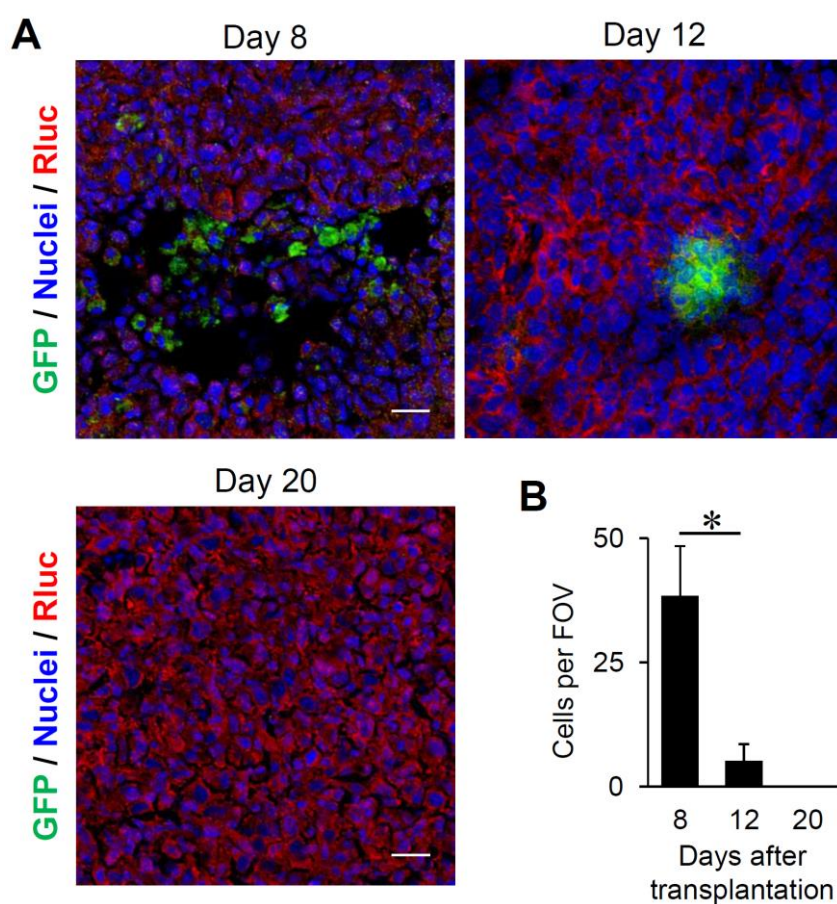


Fig 3.3. 腫瘍組織内における MLAC の生存期間調査

(A, B) LLC 担がんの GFP-Tg マウスの皮下腫瘍組織から GFP⁺ MLAC を単離し、LLC/mKO2-Rluc8.6 と混ぜて B6 Albino マウスの皮下に共移植した。移植 8, 12, 20 日後に皮下腫瘍を摘出し、腫瘍凍結切片の蛍光免疫染色により、GFP (緑色) と Rluc (赤色) と核 (青色) を検出した。(A) 蛍光免疫染色画像の一例を示す。(B) 視野当たりの GFP⁺ 細胞数を示す。データは 5 視野のデータの平均値であり、誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. Day 8.

3.3.3. 腫瘍増殖の直接的促進効果の MLAC と MDSC の間での比較

また、これらの結果は、MLAC 共移植 8 日後付近の腫瘍成長促進作用が MLAC による直接的な作用である可能性を示唆している。そこで、LLC/Fluc と MLAC を Transwell® insert で共培養し、48 時間後に生物発光強度を測定することで LLC の増殖への寄与を調査した。その結果、MLAC は LLC の増殖を有意に促進したのに対し、MDSC にはそのような作用を示さなかった (Fig 3.4.)。

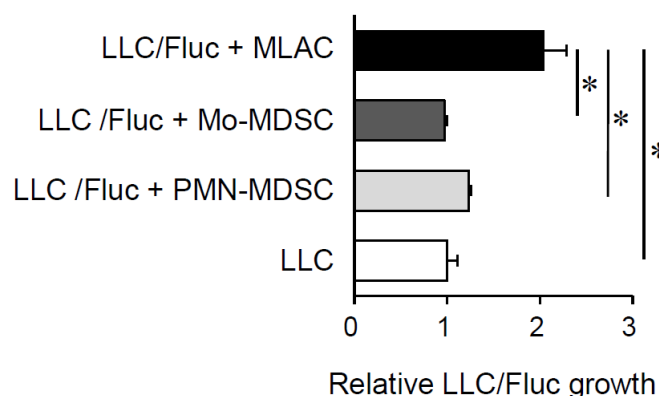


Fig 3.4. MLAC, Mo-MDSC, PMN-MDSC による腫瘍増殖への直接的作用

Transwell® insert を用いて、LLC/Fluc を MLAC, Mo-MDSC, PMN-MDSC の何れかと共培養し、48 時間後に LLC/Fluc の生物発光強度を測定した。誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. LLC/Fluc 単独培養。n = 4.

3.4. 考察

in vitro 共培養系の結果、MLAC は癌細胞の増殖を直接促進した (Fig 3.4.)。この *in vitro* 共培養系は Transwell® insert を用いており、がん細胞と MLAC が直接接触することができなかったことを踏まえると、MLAC の放出する液性因子が癌細胞の成長促進に寄与していると示唆される。この仮説については、次の第 4 章で詳細に検証した。

MDSC は共移植された後、腫瘍成長を有意に促進するまでに 20 日前後という長い時間を要した (Fig 3.2.)。これは、過去の報告と矛盾しない結果であり[41]、また MLAC と異なり MDSC が、がん細胞増殖を直接促進する機能を持たないことが *in vitro* 共培養系の実験結果から示されたこと (Fig 3.4.) で説明できると考えられる。

最後に、MLAC と違い MDSC はなぜがん細胞の成長を直接促進しなかったのかについては、MLAC 由来のがん細胞成長促進因子の発現量が MDSC は低い可能性が示唆される。この仮説についても、次の第 4 章で検証した。

MLAC は共移植された 12 日後にはほとんどが消失していたが (Fig 3.3.)、共移植 16 日後以降も、LLC 単独移植の腫瘍と比べて腫瘍成長を顕著に促進していた (Fig 3.2.)。これは、始めに共移植された MLAC が生きている間に、血管新生促進や宿主免疫細胞の誘引などを促すことで、がん細胞の成長に好都合な環境を築き上げた結果であると示唆される。この仮説については、第 5 章で検証した。

第 4 章

MLAC のがん細胞増殖促進機構の解析

4.1. 序論

4.1.1. サイトカインと腫瘍組織内におけるその役割

サイトカインとは、腫瘍微小環境の様々な細胞から発現される分泌型タンパク質であり[74, 75]、分泌されたサイトカインは、対応する受容体に結合して、受容体を発現する細胞内で下流シグナル（NF- κ B, JAK-STAT, MAPK など）を活性化することで、細胞間の情報伝達を担っている[76]。細胞の増殖・分化・老化・死など様々な細胞の機能を制御している（Fig 4.1.）。腫瘍組織内だけに注目しても、サイトカインは様々な細胞応答を引き起こす[74, 75]。例えば、VEGFA, FGF2, PDGF, PIGF などは血管内皮細胞に作用することで、腫瘍内血管新生を調整する[77]。IFN γ [78, 79]や IL-12[80, 81]などは、T 細胞に作用することで、T 細胞による抗腫瘍免疫応答を活性化する。

分泌されたサイトカインの受容体を分泌した細胞が発現していれば、自分自身に作用することもあり（オートクライン）、周辺の細胞の発現する受容体に結合して作用することもある（パラクライン）。加えて、サイトカインは血液やリンパ液により遠隔臓器まで運ばれ、その遠隔臓器内の細胞の発現する受容体に結合して作用すること（エンドクライン）も可能であり、他の臓器からの細胞の誘引や造血系臓器（骨髄や脾臓）内における血球細胞の分化・増殖などの調節にも貢献する[74]。

また、炎症性サイトカイン受容体からのシグナルを受けて活性化する NF- κ B は、腫瘍悪性化に寄与することが報告されており[82]、例えば IL-1, IL-6, IL-11, TGF β などいくつかのサイトカインは、がん細胞の増殖を促進すると知られている[83]。

この章では、MLAC 細胞のがん細胞増殖促進作用に寄与するサイトカインの解析を行った。

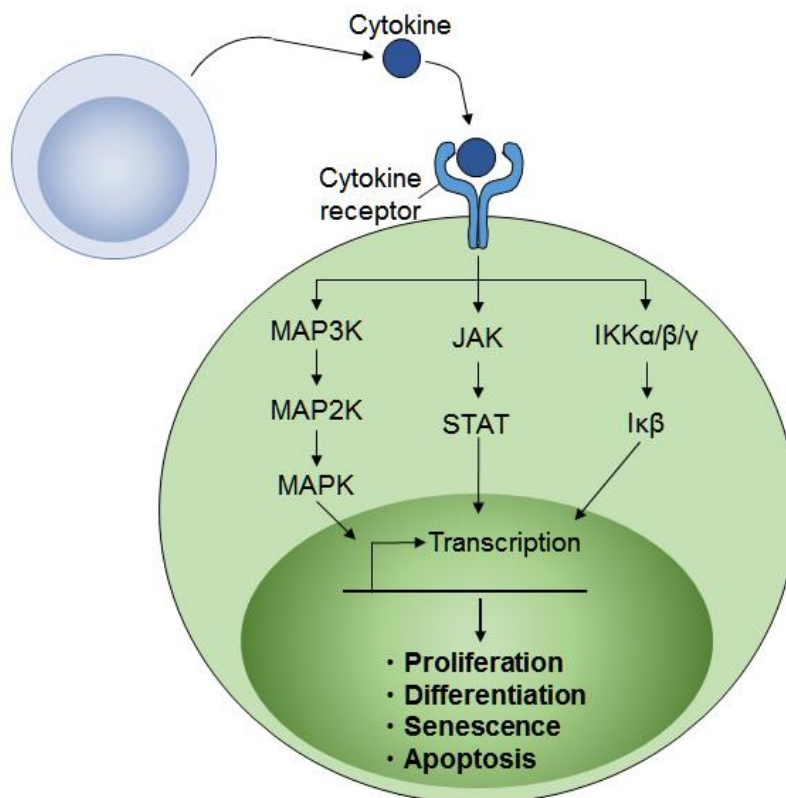


Fig 4.1. サイトカイン受容体による細胞間情報伝達

ある細胞が分泌したサイトカインは、そのサイトカインに対応する受容体を発現する周辺の細胞に作用することで、他の細胞間での情報伝達の役割を担う。サイトカインが受容体に結合すると、受容体下流のシグナルを活性化することで、細胞増殖・分化・活性化を制御する遺伝子の転写を調節する。

4.2. 実験材料および方法

がん細胞の皮下移植モデル

第 2 章に既述した内容に同じ。

MLAC の単離

第 2 章に既述した内容に同じ。

サイトカインアレイ

第 2 章に記述した *in vitro* 共培養と同じ条件で、単独培養もしくは共培養した後の bottom chamber の培地を回収した。次に、400 x g 4°C で 10 分間遠心し、上清を 0.22 μm 孔径セルストレーナー (Pall Corporation, New York, USA) へ通すことで、混入している浮遊細胞を完全に除いた。続いて、Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array Kit (R&D SYSTEMS, ARY028) のニトロセルロースメン

ブレンを、その培養上清中に浸してインキュベートし、製品プロトコール通りに実験を行った。化学発光シグナルは、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Pennsylvania, USA)で撮像し、ImageQuant TL software (GE Healthcare Life Sciences)で定量化した。

shRNA 発現プラスミドの作製

マウス *Cxcr2* に対する shRNA の配列 (#1; 5'- GGGAGAATTCAAGGTGGATAA -3' and #2; 5'- GCTATGAGGATGTAGGTAACA -3') は、Block-iT program (Invitrogen) を用いて設計した。そして、各々を pSUPER.neo+GFP vector (OligoEngine, Washington, USA)に組み込むことで、shRNA および GFP を恒常的に発現するプラスミド 2 種 (pSuper/shCXCR2-GFP#1, #2) を作製した。

CXCR2 ノックダウン株の樹立

作製した pSuper/shCXCR2-GFP を、エレクトロポレーター (NepaGene Co.) により LLC/Fluc へ導入した。その後、500 µg/mL G418 硫酸塩 (ThermoFisher Scientific) 含有の 5% FBS-DMEM で継続的に培養することで、マウス *Cxcr2* に対する shRNA を安定的に発現する細胞 2 種 (LLC/Fluc-shCXCR2#1, #2) を樹立した。また、ネガティブコントロール株として、空の pSUPER.neo+GFP vector (OligoEngine)を導入した細胞 (LLC/Fluc-empty) も樹立した。

ノックダウンされているかどうかを確認するために、CXCR2 の mRNA および膜表面タンパク質レベルでの発現量を、各々qRT-PCR およびフローサイトメトリーにより測定した。

細胞および培養条件

樹立した後の LLC/Fluc-shCXCR2 は、LLC/Fluc や LLC/mKO2-Rluc8.6 同様に 5% FBS-DMEM で培養・維持した。

RNA 抽出および qRT-PCR

LLC/Fluc-shCXCR2#1, LLC/Fluc-shCXCR2#2, LLC/Fluc-empty より、RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて RNA を抽出した。その後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO)を用いて増幅した cDNA を鋳型とし、Table4.1 に示したプライマーを用いて、THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (TOYOBO)で qRT-PCR を行った。各々の工程で用いた試薬の製品プロトコール通りの方法で行った。

Table 4.1. qRT-PCR に用いたプライマーのリスト

遺伝子名	順方向 or 逆方向	配列	長さ [bp]
<i>β-Actin</i>	順方向	GGCTACAGCTTCACCACCAC	20
	逆方向	TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	21
<i>Cxcr2</i>	順方向	CCTGCCTCAGACTTTTGGCT	20
	逆方向	GAAGACAAGGACGACAGCGA	20

MDSC の単離

第 2 章に既述した内容に同じ。

フローサイトメトリー

単細胞を懸濁した PBS に 1:200 の希釈率となるように抗 FcγR II/III (CD16/32)抗体 (clone 93, Biolegend) を添加し、4°C で 20 分インキュベートすることで、FcγR による抗体 Fc 領域への結合をブロッキングした。次に、FACS Buffer で細胞を 1 回洗浄した後、蛍光色素標識された抗 CXCR2 抗体 (clone #242216, R&D Systems, 1:100) を添加し、暗室 4°C で 25 分インキュベートすることで、CXCR2 を染色した。

引き続き細胞内抗原を染色する場合、fixation-permeabilization buffer (FoxP3/Transcription Factor Staining kit from eBioscience)で細胞を懸濁し、暗室 4°C で 25 分インキュベートすることで、細胞の固定および膜透過処理を行った。次に、Permeabilization Buffer (eBioscience)で細胞を 1 回洗浄した後、Permeabilization Buffer (eBioscience)で希釈した抗体液で細胞を懸濁し、暗室 4°C で 30 分インキュベートすることで、細胞内抗原を染色した。最後に、Permeabilization Buffer (eBioscience)、FACS Buffer の順で 1 回ずつ洗浄した後に、フローサイトメーター iCyt ec800 (Sony Biotechnology) を用いて、蛍光強度を測定した。

使用した抗体は以下の通り。抗 CXCL1 抗体 (polyclonal, R&D Systems, 1:200)、抗 CXCL2 抗体 (polyclonal, R&D Systems, 1:200)、抗 CXCL5 抗体 (polyclonal, R&D Systems, 1:400)。

統計学的解析

各実験結果の差が統計学的に有意であるか否かは、Student's t-test によって得た P 値が 0.05 を下回っているかどうかで判断した。全てのデータは、平均値±標準誤差で示した。

サイトカインアレイ。(A) 111 種サイトカインの各々に対する抗体がスポットされているニトロセルロースメンブレンを CM 中に浸してインキュベートし、製品プロトコールに従って 111 種類の相対的な存在量を測定した。各サイトカインのスポットにおける化学発光を ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences)で撮影した画像を示しており、赤色の長方形で囲っているスポットは、LLC/Fluc + MLAC 共培養 CM 中に多く含まれた候補因子を示す。また、A1, A2, A23, A24, J1, J2 のスポットは、ニトロセルロースメンブレンに最初からプロットされていたもので、ポジティブコントロールを示す。(B) これら 13 種のサイトカインは、共培養 CM 中に豊富に存在しており（ポジティブコントロールのスポットに対する相対発光強度が 0.3 以上）、かつ単独培養培地と比べて 1.5 倍以上多かった。Relative to positive control は、共培養 CM でインキュベートしたメンブレン上のポジティブコントロールスポットに対する、各サイトカインの相対化学発光強度を示す。Relative to SUM of mono-culture は、LLC 単独 CM の化学発光強度と MLAC 単独培養 CM の化学発光強度に対する、共培養 CM の相対化学発光強度を示す。

4.3.2. CXCL1/2/5/CXCR2 シグナルによる腫瘍増殖促進効果の調査

サイトカインアレイ解析結果から、MLAC の腫瘍増殖促進作用への関与が示唆された候補因子のうち、CXCL1, CXCL2, CXCL5 はケモカイン受容体 CXCR2 に結合する[84]。いくつかの悪性黒色腫細胞株は CXCR2 を発現していることが報告されており[85]、CXCL1/2/5/CXCR2 シグナルは悪性黒色腫細胞の増殖を促進することが *in vivo* および *in vitro* 両方の実験により示されている[86, 87]。そこで、これら 3 因子（CXCL1, CXCL2, CXCL5）の腫瘍増殖への直接的な影響を調査するために、各々のリコンビナントタンパク質を添加した培地中で LLC/Fluc を培養したところ、何れの因子も LLC 増殖を有意に促進した（Fig 4.3.）。

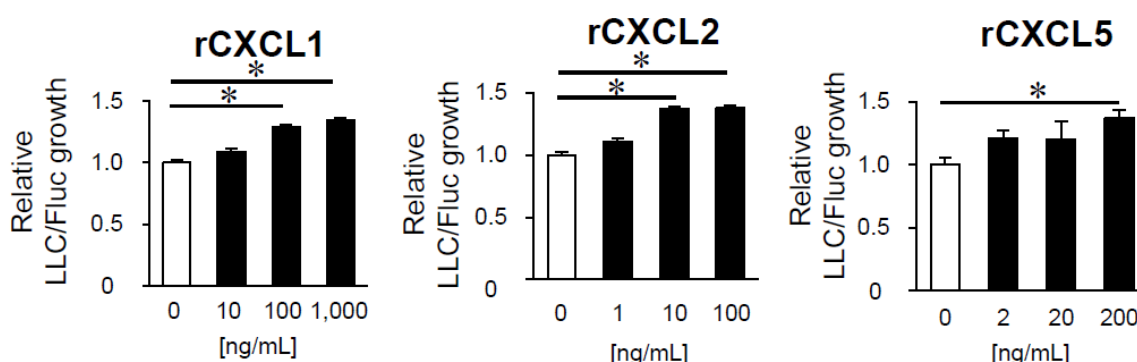


Fig 4.3. 候補因子 CXCL1, CXCL2, CXCL5 による LLC 増殖への影響

図中に示す濃度のリコンビナントサイトカインを添加した培地中で LLC/Fluc をインキュベートし、48 時間後の LLC/Fluc による生物発光強度を測定した。Relative LLC/Fluc growth は、リコンビナントサイトカイン非添加条件と比べた相対発光強度を示す。誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. PBS. $n = 4$

次に、MLAC による LLC 増殖促進作用が、これらサイトカインの作用に起因するのかを調べるために、まず LLC/Fluc と MLAC を共培養した CM を調製し、そこへ各々のサイトカインに対する中和抗体を添加してサイトカインの作用を阻害した培地を用いて LLC/Fluc を培養し、増殖への影響を解析した。その結果、何れの中和抗体も LLC 増殖を有意に抑制した (Fig 4.4.)。

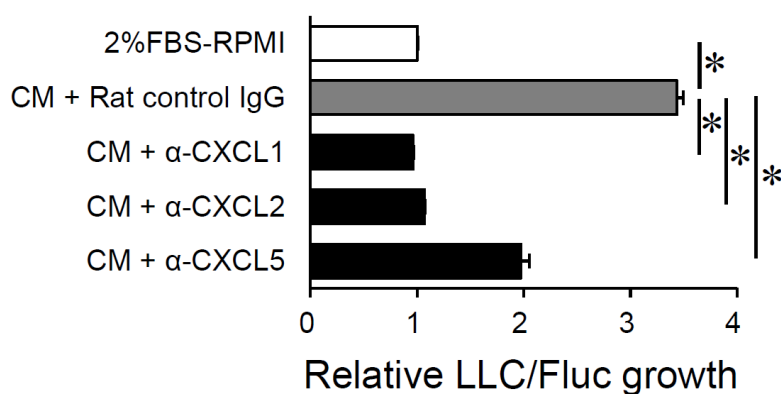


Fig 4.4. 候補因子の中和抗体による LLC 増殖への影響

候補因子 CXCL1, CXCL2, CXCL5 に対する中和抗体を添加した CM 中で LLC/Fluc をインキュベートし、48 時間後の LLC/Fluc による生物発光強度を測定した。Relative LLC/Fluc growth は、中和抗体非添加 2% FBS-RPMI1640 の条件と比べた相対発光強度を示す。誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. CM + Rat control IgG. $n = 4$

さらに、CXCR2 を shRNA によりノックダウンした LLC/Fluc 細胞株 (shRNA#1, shRNA#2) を樹立し (Fig 4.5A-B)、MLAC との共培養を行ったところ、shRNA#1, shRNA#2 細胞に有意な増殖促進は見られなかった (Fig 4.5C)。この結果は、MLAC による LLC 増殖促進作用が CXCR2 受容体を介した CXCL1/2/5 サイトカインの作用によることを示している。

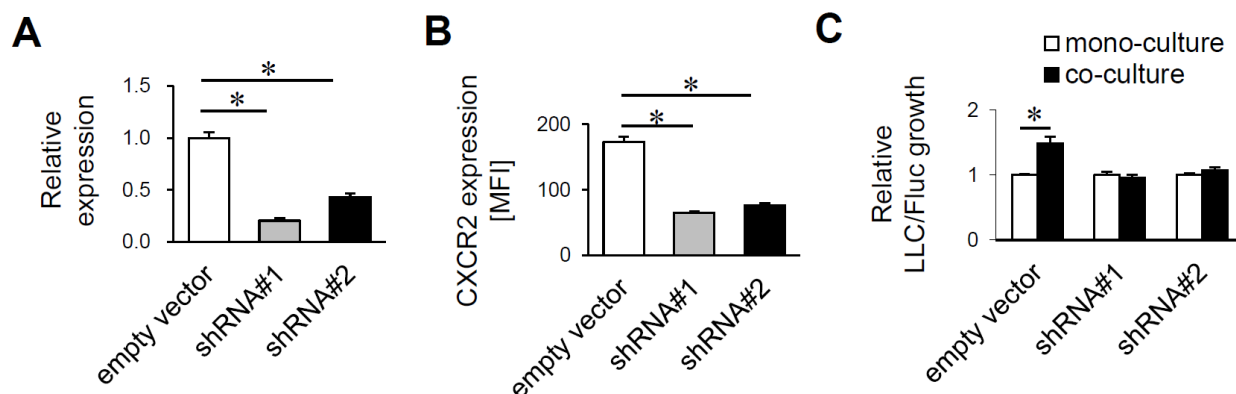


Fig 4.5. CXCR2 による LLC 増殖への影響

(A-B) shRNA を用いた LLC における CXCR2 ノックダウン。ネガティブコントロールとして、空ベクターを導入した LLC/Fluc も樹立し、mRNA レベル(A)およびタンパク質レベル(B)の発現強度を、各々qRT-PCR およびフローサイトメトリーによる測定した。(A) Relative expression は、空ベクター導入細胞株と比べた相対 mRNA 量を示す。誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. empty vector. $n = 3$ (B) CXCR2 染色の Mean fluorescent intensity (MFI)を示す。誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. empty vector. $n = 3$ (C) CXCR2 ノックダウンによる LLC 増殖への影響。CXCR2 を shRNA によりノックダウンした LLC/Fluc (shRNA#1, shRNA#2) を MLAC と 48 時間共培養し、LLC 由来の生物発光強度を測定した。誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. LLC/Fluc mono-culture. $n = 4$

4.3.3. CXCL1/2/5 発現量の MLAC と MDSC との間での比較

CXCL1, CXCL2, CXCL5 がどの細胞から分泌されているかを解析するために、*in vitro* 共培養と同じ条件で共培養した LLC と MLAC を別々に回収し、各々の細胞内の CXCL1, CXCL2, CXCL5 を抗体で染色し、フローサイトメトリーにより CXCL1, CXCL2, CXCL5 の発現レベルを測定した。その結果、3 つのサイトカインは、LLC と MLAC で何れも高発現していたが (Fig 4.6A)、PMN-MDSC および Mo-MDSC では発現レベルが低かった (Fig 4.6B-C)。

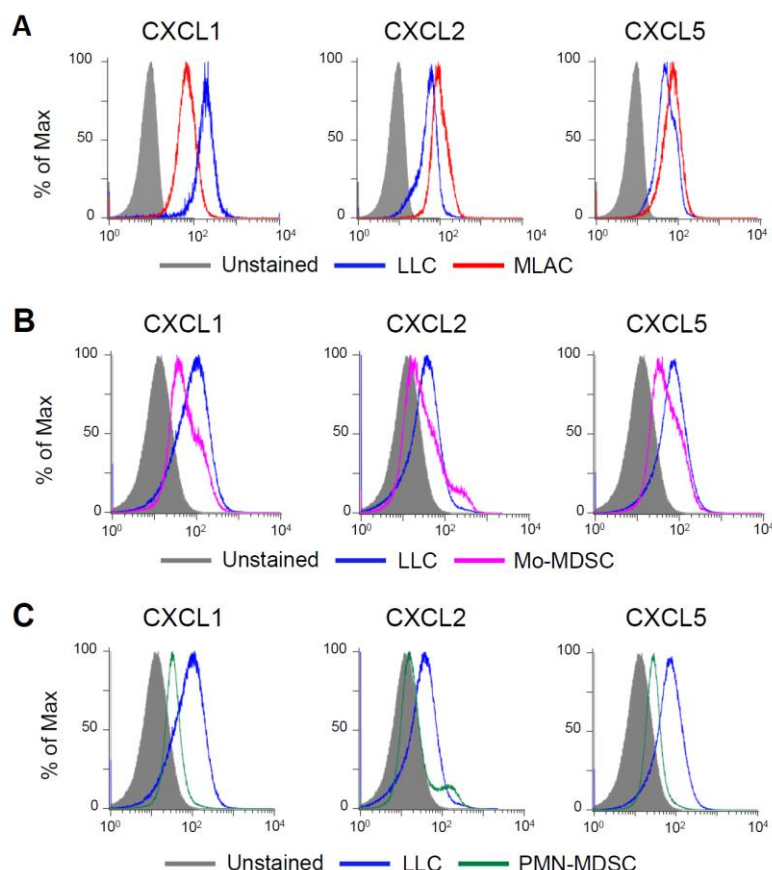


Fig 4.6. CXCL1/2/5 発現量の MLAC と MDSC の間での比較

(A-C) MLAC (A), Mo-MDSC (B), PMN-MDSC (C)を各々LLC と共培養した系における候補サイトカインの発現解析。48 時間共培養した後、各々の細胞を回収し、細胞内フローサイトメトリーにより CXCL1, CXCL2, CXCL5 に対する抗体で染色し、フローサイトメトリーで測定した。青色、赤色、ピンク、緑色のヒストグラムは各々LLC, MLAC, Mo-MDSC, PMN-MDSC の発現強度を示す。全ての実験を、少なくとも 3 回実施した。

4.4. 考察

サイトカインアレイの結果 (Fig 4A)、共培養 CM 中に増加した 13 種の候補因子のうち CCL3, CCL4, G-CSF, CXCL5, M-CSF, MMP-2, PAI-1, VEGFA は、LLC 単独培養 CM および MLAC 単独培養 CM の何れにおいても存在量が非常に少なく、共培養 CM においてのみ顕著に増加した (Fig 4A)。つまり、これら 8 因子の発現誘導には、LLC と MLAC の相互作用が非常に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

13 種の候補因子のうち CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL5, MMP-2, MMP-3, PAI-1, VEGFA は血管新生促進因子として報告されており [88-92]、MLAC は腫瘍内血管新生も促進している可能性が示唆された。この仮説については、後の第 5 章で検証した。さらに、同様に共培養 CM 中で増加した CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 は (Fig 4A)、MDSC のケモカインとして知られており [93-97]、MLAC は腫瘍内への MDSC の誘引も促進している可能性が示唆された。この仮説については、後の第 6 章で詳細に検証した。

第 5 章

MLAC による

腫瘍増殖促進機構の解析

5.1. 序論

5.1.1. 血管新生と腫瘍成長

がん細胞は自身が盛んに増殖していくために必要な酸素や栄養源を十分に確保するために、VEGFA などの血管新生促進する機能を有するサイトカイン（血管新生促進因子）を放出することで周囲に血管を誘引する。一般的に、近傍の既存の血管を構成する血管内皮細胞の発現するサイトカイン受容体に血管新生促進因子が作用すると、その血管内皮細胞の増殖が促されることで、その既存血管から新たな血管枝が分岐するようにして新しい脈管が形成される[98]（Fig 5.1.）。この血管新生が腫瘍成長に非常に重要であるということは、1972 年に Folkman らの血管新生阻害によって腫瘍増殖が抑制されることを示した *in vivo* 研究[99]で初めて明確に示されてから数多くの研究が報告されており、また実際のヒト臨床検体の様々な臓器の前がん病変において既に、血管密度もしくは VEGF 発現強度が顕著に高いという報告も数多くある[100-105]。これらを踏まえ、血管新生は代表的な腫瘍増殖機構の 1 つとして知られている。

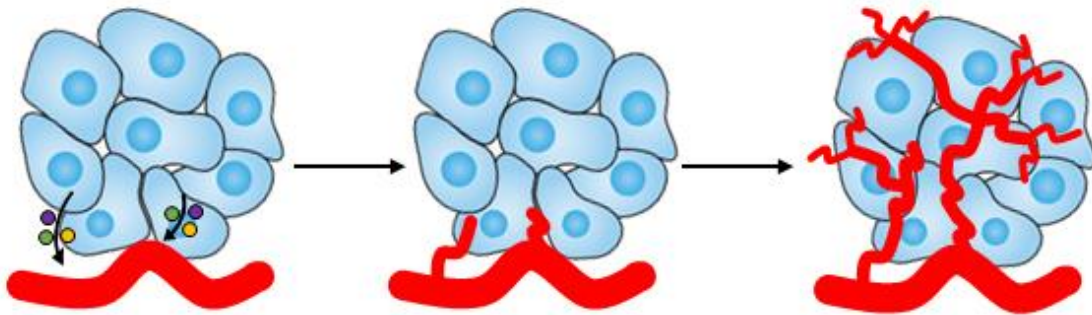


Fig 5.1. がん細胞が血管新生を促進する機構

がん細胞の放出する血管新生促進因子は、近傍の既存の血管を構成する血管内皮細胞に作用し、分岐するような形で新規脈管形成を誘導する。

5.1.2. 血管新生を促進する腫瘍内免疫細胞

がん細胞だけでなく、腫瘍内に存在するいくつかの免疫細胞も血管新生に貢献しており[77]、Table 5.1.に示すような免疫細胞は骨髄やリンパ節などから腫瘍組織内に浸潤すると、腫瘍内の血管新生を促進することで、腫瘍悪性化に貢献する[77]。

Table 5.1.血管新生を促進する主な免疫細胞

細胞種	細胞を定義するマーカー	分泌する血管新生促進因子
17 型ヘルパーT 細胞	CD11b ⁻ CD3ε ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ RORγt ⁺ IL-17 ⁺	IL-17
TAM	CD11b ⁺ F4/80 ⁺ MHC-II ^{low}	VEGFA, FGF2, CXCL8, CXCL12, PIGF, VEGFC, IL-1β, IL-6, TNF, WNT7B, MMPs, cathepsins
Mo-MDSC	CD11b ⁺ Gr-1 ^{low} Ly6C ^{hi} Ly6G ⁺	VEGFA, FGF2, BV8, MMP9
PMN-MDSC	CD11b ⁺ Gr-1 ^{hi} Ly6C ^{low} Ly6G ⁻	
マスト細胞	CD11b ⁺ FcεRIα ⁺ c-Kit ⁺ SCA1 ⁺ CD34 ⁺	VEGFA, FGF2, CXCL8, TNF, chymase, tryptase, MMP9

表は、[77]を基にして作成した。略語については、4-6 ページ目の略語一覧を参照。

5.1.3. 腫瘍内免疫応答の抑制と腫瘍悪性化

序論に既述した通り、TAM や MDSC などの免疫細胞は、CTL や NK 細胞などの細胞傷害性を抑制することで免疫抑制型の腫瘍微小環境の構築に貢献しており[18] (Table 1.2.)、このようにしてがん細胞は免疫監視機構から逃れることで、より一層の腫瘍成長につながる[106] (Fig 5.2.)。

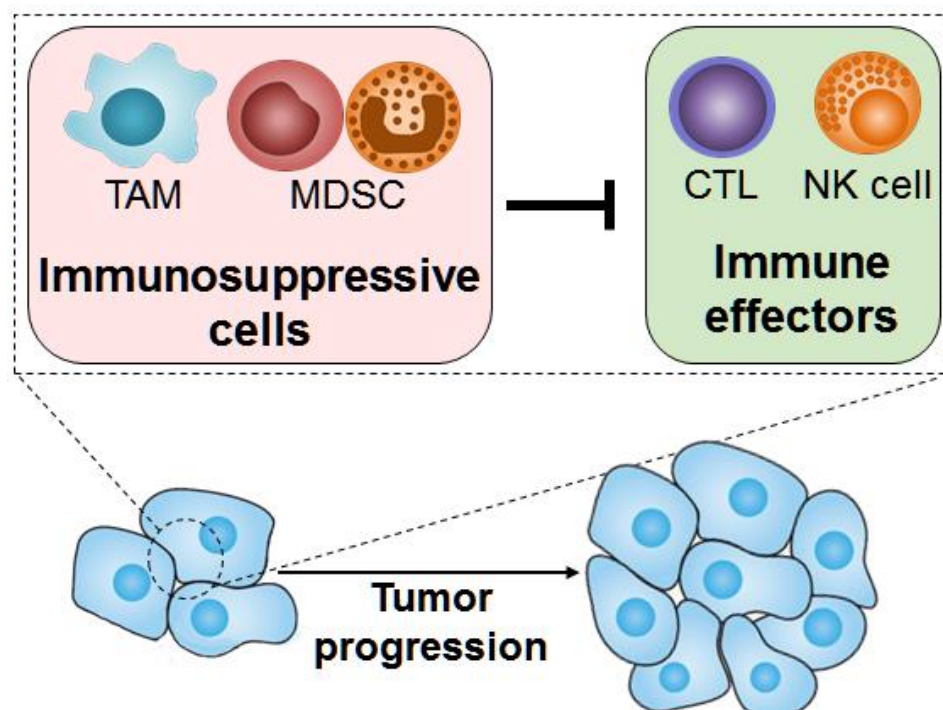


Fig 5.2. 腫瘍内の免疫監視逃避機構と腫瘍悪性化

腫瘍組織内の TAM や MDSC が CTL や NK 細胞などの活性を抑えることで、免疫抑制型の腫瘍微小環境が形成され、その結果として腫瘍成長が促進される。

MDSC の腫瘍促進機構に関する報告に基づく、LLC と MDSC 共移植 20 日後前後に確認された腫瘍成長促進効果は (Fig 3.2)、上述した 3 つの機構 (血管新生の誘導、CTL 抑制、TAM への分化) によるものと考えられる。そこで、本章では、LLC と MLAC 共移植後 20 日前後に確認された腫瘍成長促進効果 (Fig 3.2) が、同じ機構に依るものなのか、つまり、MLAC にも MDSC 同様の腫瘍増殖促進作用を有するかについて調べた。

5.2. 実験材料および方法

細胞および培養条件

第 2 章に既述した内容に同じ。

がん細胞の皮下移植モデル

第 2 章に既述した内容に同じ。

MLAC の単離

第 2 章に既述した内容に同じ。

MDSC の単離

第 2 章に既述した内容に同じ。

腫瘍内血管新生能力の調査

LLC/Fluc 担がんの B6 Albino マウスの皮下腫瘍が 15-20 mm に到達した時点で腫瘍を摘出し、MLAC および MDSC 各々を単離した。MLAC (4.0×10^5 cells) もしくは MDSC (4.0×10^5 cells) を LLC/Fluc (3.0×10^5 cells) と混和した懸濁液を Geltrex (Invitrogen) と混和し、B6 Albino マウスの後脚の皮下に注入した。共移植 8 日後に皮下腫瘍を摘出し、腫瘍組織内の CD31⁺ 血管内皮細胞を蛍光免疫染色法により染色し、LSM780 共焦点蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。また、視野内の CD31⁺ 領域の密度を Image J により定量化した。

蛍光免疫染色

摘出した腫瘍組織を O.C.T. compound (Sakura Finetek Japan) に浸し、凍結させた。Microm HM560MV cryostat (ThermoFisher Scientific) を用いて厚さ 10 μ m の凍結切片を作製し、4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (nacalai tesque) 中で室温 10 分間インキュベートすることで、固定した。続いて、PBS-T で 3 回洗浄し、3% BSA/PBS 中で室温 30 分間インキュベートすることで、ブロッキングした。次に、3% BSA/PBS で希釈した一次抗体液中で 4°C で 16 時間インキュベートし、再度 PBS-T で 3 回洗浄した。次に、PBS-T で希釈した蛍光色素標識二次抗体液中で室温 1 時間インキュベートし、再度 PBS-T で 3 回洗浄した。最後に、0.1% Bisbenzimidazole H33342 Fluorochrome Trihydrochloride (Nacalai Tesque) を添加した Fluoromount

(Diagnostic BioSystems)を 3-4 滴スライドガラスに滴下し、カバーガラスをかぶせた。画像は、LSM780 共焦点蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss)で撮影した。用いた一次抗体は、抗 CD31 (clone MEC13.3, BD Biosciences, 1:50)。蛍光色素標識二次抗体 (ThermoFisher Scientific) は、全て 1,000 倍希釈して用いた。

T 細胞の抑制能アッセイ

B6 Albino マウスの脾臓から CD8⁺ CTL を単離し、CD8⁺ CTL (5×10^5 cells)を MLAC (4×10^5 cells)もしくは MDSC (4×10^5 cells)と共培養した。その際の培地には、T 細胞刺激因子である 0.5 µg/mL 抗 CD3ε 抗体 (clone 145-2C11, Biolegend) および 3.0 µg/mL 抗 CD28 抗体 (clone 37.51, Biolegend) を添加した。72 時間培養した時点で細胞を回収し、CD8⁺ CTL 中の CD69⁺ 活性化 CTL の割合を、フローサイトメーター iCyt ec800 (Sony Biotechnology)で測定した。

フローサイトメトリー

単細胞を懸濁した PBS に 1:200 の希釈率となるように抗 FcγR II/III (CD16/32)抗体 (clone 93, Biolegend) を添加し、4°C で 20 分インキュベートすることで、FcγR による抗体 Fc 領域への結合をブロッキングした。次に、FACS Buffer で細胞を 1 回洗浄した後、蛍光色素標識された抗体を添加し、暗室 4°C で 25 分インキュベートすることで、膜表面抗原を染色した。最後に FACS Buffer で細胞を 1 回洗浄した後、フローサイトメーター iCyt ec800 (Sony Biotechnology)を用いて、蛍光強度を測定した。

使用した抗体は、抗 CD8 抗体 (clone 53-6.7, Biolegend, 1:100) および抗 CD69 抗体 (clone H1.2F3, Biolegend, 1:100)。

Tumor tissue conditioned medium (TTCM)の調製

LLC/Fluc 担がんの B6 Albino マウスの皮下腫瘍が 15-20 mm に到達した時点で腫瘍を摘出し、メスにより腫瘍組織を細かく刻んだ。次に、0.13 U/mL Liberase DH (Roche Applied Science)を添加した 2% FBS-RPMI1640 に移し、37°C で 60 分間攪拌することで、分散させた。続いて、 $400 \times g$ 4°C で 10 分間遠心し、上清を除いた。その細胞ペレットを無血清 RPMI1640 で再懸濁し、37°C で 48 時間インキュベートした後に培養上清を回収した。 $400 \times g$ 4°C で 10 分間遠心し、上清を 0.22 µm 孔径セルストレーナー (Pall Corporation) へ通すことで、混入している浮遊細胞を完全に除き、得られた培養上清を TTCM として実験に用いた。

in vitro 分化実験

LLC/Fluc 担がんの B6 Albino マウスの皮下腫瘍が 15-20 mm に到達した時点で腫瘍を摘出し、MLAC および MDSC 各々を単離した。25% TTCM および 10 ng/ml rGM-CSF (Peprotech)を 10% FBS-RPMI1640 に添加し、各々の細胞を培養した。5 日後に細胞を回収し、CD11b⁺ F4/80⁺

TAM の割合を、フローサイトメーター iCyt ec800 (Sony Biotechnology) で測定した。

***in vivo* 分化実験**

LLC/Fluc 担がんの GFP-Tg マウスの皮下腫瘍が 15-20 mm に到達した時点で腫瘍を摘出し、MLAC および MDSC 各々を単離した。GFP⁺ MLAC (4.0×10^5 cells) もしくは GFP⁺ MDSC (4.0×10^5 cells) を LLC/Fluc (3.0×10^5 cells) と混和した懸濁液を Geltrex (Invitrogen) と混和し、B6 Albino マウスの後脚の皮下に注入した。共移植 8 日後に皮下腫瘍を摘出し、腫瘍組織内の GFP⁺ F4/80⁺ TAM を蛍光免疫染色法により染色し、LSM780 共焦点蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。また、視野内の CD31⁺ 領域の密度を Image J により定量化した。

統計学的解析

各実験結果の差が統計学的に有意であるか否かは、Student's t-test によって得た P 値が 0.05 を下回っているかどうかで判断した。全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で示した。

5.3. 結果

5.3.1. MLAC における腫瘍増殖促進機構の解析

第 4 章でのサイトカインアレイによる解析の結果、血管新生促進因子として報告されている VEGFA, MMP-2, MMP-3, PAI-1, CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL5[88-92]が、LLC と MLAC 共培養の培地中に多く含まれており (Fig 4.2)、MLAC も血管新生を誘導する機能を有することが示唆されていた。そこでまず、血管新生の誘導について調べた。LLC と MLAC を共移植した腫瘍組織を蛍光免疫染色した結果、MLAC は MDSC と LLC の共移植腫瘍と同程度に血管密度を増加させていることがわかり、MDSC 同様に腫瘍血管新生の誘導促進作用があることが示された (Fig 5.3A-B)。

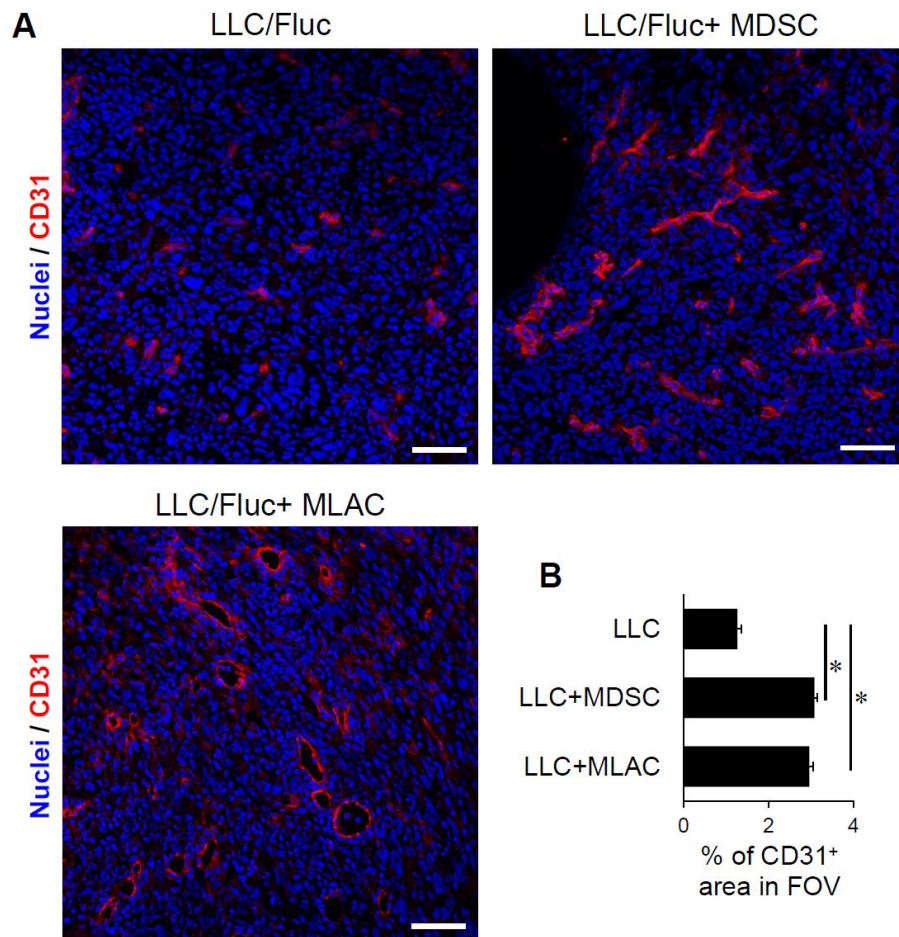


Fig 5.3. MLAC により誘導される血管新生

(A-B) LLC/Fluc を MLAC もしくは MDSC と混ぜて B6 Albino マウスの皮下に共移植した。移植 8 日後に摘出した腫瘍組織の凍結切片を用いて、蛍光免疫染色を行った。(A) 共焦点蛍光顕微鏡で撮影した画像の一例であり、赤色、青色は各々血管内皮細胞、各を示す。スケールバーは 50 μ m。(B) 視野当たりの CD31⁺ 領域の割合を示す。データは 5 視野のデータの平均値であり、誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. LLC/Fluc.

次に CTL 抑制作用について調査するために、T 細胞へ共刺激シグナルを誘導する CD3 抗体および CD28 抗体を添加した培地中で CD8⁺ CTL を培養した。その同じ培養ディッシュ内で MLAC を共培養したところ、CTL 単独培養の条件と比べて、活性化 CTL の割合が有意に変化しなかった (Fig. 5.4.)。つまり、MLAC は MDSC のように CTL を抑制する作用を有していないことが示唆された。

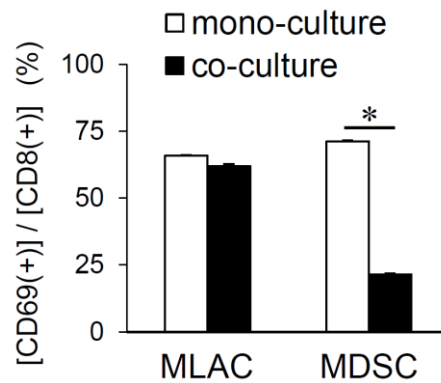


Fig 5.4. MLAC による CTL 抑制能の調査

MLAC による CTL 抑制。CTL を MLAC もしくは MDSC と *in vitro* で共培養し、72 時間後の活性化 CTL (CD8⁺ CD69⁺) の割合を測定した。誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. CTL mono-culture. $n = 3$.

最後に、第 2 章で、未分化ミエロイド細胞であることが示唆された MLAC が、MDSC 同様に TAM へ分化できるか否かを検証した。MDSC から TAM へ分化誘導できる *in vitro* 培養条件[36]で MLAC を培養した結果、MLAC は TAM へ分化できなかった (Fig 5.5.)。

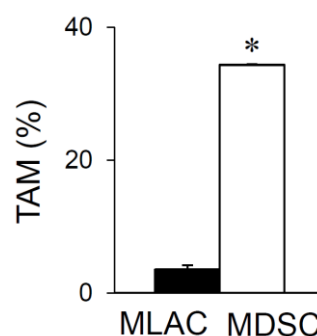


Fig 5.5. MLAC から TAM への *in vitro* 分化アッセイ

MLAC もしくは MDSC を、tumor tissue conditioned medium (TTCM) 中でインキュベートし、5 日後に細胞を回収して、TAM (CD11b⁺ F4/80⁺) の割合を測定した。誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. MLAC. $n = 3$.

しかし、*in vitro* のこの条件が MLAC の分化には適当でなかった可能性を否定できないので、腫瘍組織内における *in vivo* 分化実験を行った。LLC 担がん GFP-Tg マウスの皮下腫瘍組織から GFP⁺ MLAC および GFP⁺ MDSC を単離し、LLC/Fluc 細胞と混ぜて B6 Albino の皮下に移植した。このモデルにおいてドナーMLAC およびドナーMDSC は GFP⁺細胞であり、ホスト由来の MLAC および MDSC と区別することができるので、共移植 8 日後に皮下腫瘍組織を摘出し、GFP⁺ ドナー細胞および F4/80⁺ TAM を蛍光免疫染色により観察した。その結果、MDSC を共移植した腫瘍内には GFP⁺ F4/80⁺ TAM（黄色細胞）が存在したのに対し、MLAC を共移植した腫瘍内では GFP⁺ F4/80⁺ TAM を確認できず、全ての GFP⁺細胞が F4/80⁻のままであった(Fig 5.6.)。

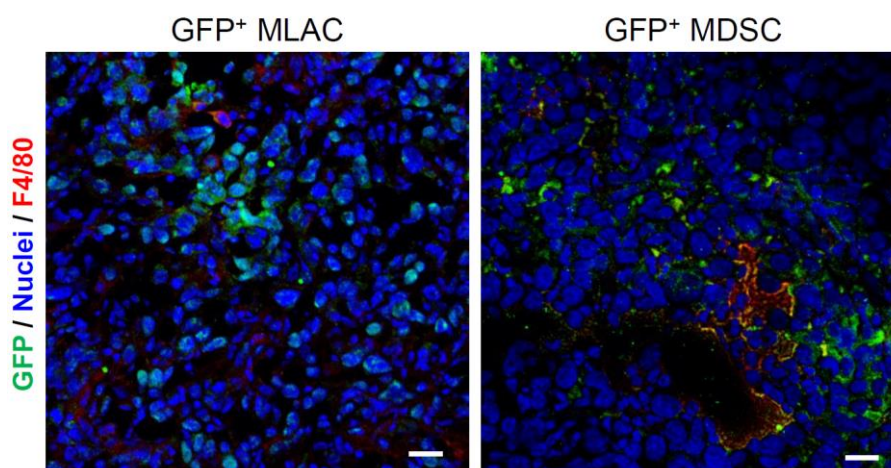


Fig 5.6. MLAC から TAM への *in vivo* 分化アッセイ

腫瘍組織内における MLAC の分化能。LLC 担がんの GFP-Tg マウスの皮下腫瘍組織から GFP⁺ MLAC および GFP⁺ MDSC を単離し、LLC/Fluc と混ぜて B6 Albino マウスの皮下に共移植した。移植 8 日後に皮下腫瘍を摘出し、腫瘍凍結切片の蛍光免疫染色により、GFP（緑色）と F4/80（赤色）と核（青色）を検出した。共焦点蛍光顕微鏡で撮影した画像の一例を示し、スケールバーは 20 μ m。全ての実験を、少なくとも 3 回実施した。

5.4. 考察

MLAC は MDSC 同様に、腫瘍血管新生誘導作用を有することが分かった。一方で、MLAC は MDSC とは異なり、TAM への分化能も CTL 抑制能も有しておらず (Fig 5.4-5.6)、機能的にも異なる細胞種であることが確認された。また、MLAC 共移植後 16-20 日目という既にドナー MLAC が死滅した後に腫瘍成長を有意に促進した (Fig 3.2-2.3) ことを踏まえると、MLAC は MDSC とは異なる機構で、腫瘍成長を間接的に促進することが示唆された。第 4 章に既述した通り、共培養 CM 中で増加した CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 は (Fig 4.2)、MDSC のケモカインとして知られており[93-97]、MLAC は MDSC の腫瘍内への誘引も促進することで腫瘍成長に貢献している可能性が考えられる。この仮説について、第 6 章で検証した。

第 6 章

MLAC による

MDSC の腫瘍組織内への

誘引作用の解析

6.1. 序論

6.1.1. ケモカインと腫瘍組織内におけるその役割

ケモカインとはサイトカイン（第 4 章 4.1.1.）の一種であり、ジスルフィド結合を構成するシステイン残基の配置の違いに基づいて、CC ケモカイン、CXC ケモカイン、C ケモカイン、CX₃C ケモカインの 4 種のファミリーに分類され、現在少なくとも 47 種類と非常に多くのケモカインが同定されている[84]。腫瘍微小環境の様々な細胞から分泌されたケモカインは、7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体に結合し、腫瘍微小環境においては、主に腫瘍内外への細胞輸送に重要である[84]。分泌されたケモカインは、対応する受容体を発現する細胞に受け取られると、下流シグナル（JAK-STAT, MAPK, PI3K-AKT など）を活性化することで、様々な細胞間での情報伝達を担っている。主に、細胞の増殖・運動性・活性などを制御に関与している[107]（Fig 6.1.）。

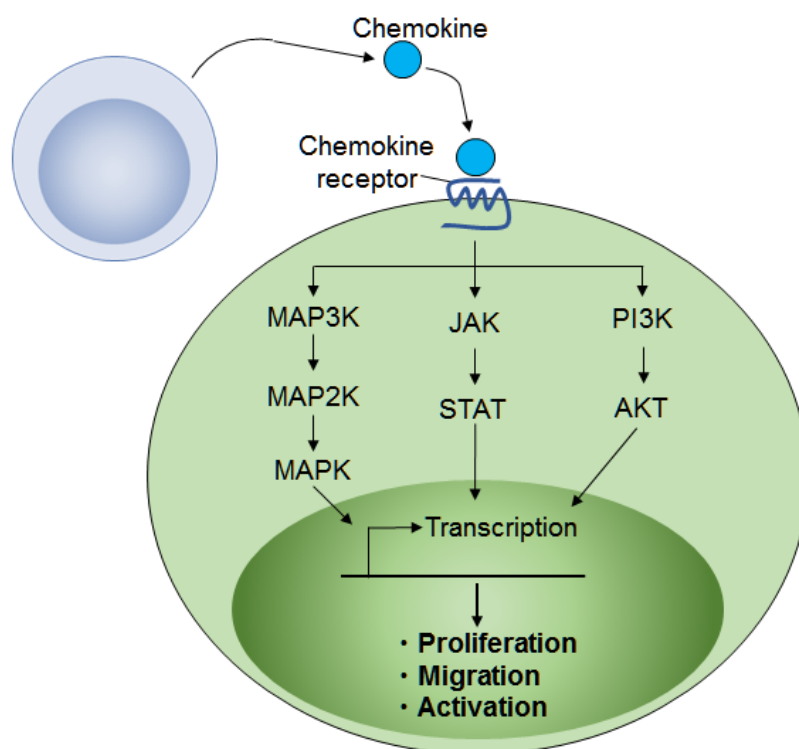


Fig 6.1. ケモカイン-受容体による細胞間情報伝達

ある細胞が分泌したケモカインは、そのケモカインに対応する受容体を発現する周辺の細胞に作用することで、他の細胞間での情報伝達の役割を担う。ケモカインが受容体に結合すると、受容体下流のシグナルを活性化することで、細胞増殖・運動性・活性化を制御する遺伝子の転写を調節する。

ケモカインもサイトカイン同様に、オートクライン・パラクライン・エンドクラインで作用することが可能であり、腫瘍組織内の細胞が分泌するケモカインが、造血系臓器（骨髄や脾臓）やリンパ節や血液中に存在する免疫細胞に作用することで、それら免疫細胞の増殖・分化・腫瘍組織内への誘引を調節するという報告が特に多い[84]。例えば、腫瘍内での CCL2[108-110]や M-CSF[111-113]の発現強度が高いがん患者ほど、腫瘍組織内の TAM 濃度が高く、予後が悪いということが多くのがん種で報告されている。

本章では、第 4 章で示唆された「MLAC は腫瘍内への MDSC の誘引を促進している可能性」について、共培養で有意に増加したケモカインや腫瘍内にリクルートされる免疫細胞の増加する時期などを解析し、MLAC の悪性化への寄与を検証した。

6.2. 実験材料および方法

動物実験

BALB/c および C3H は、日本チャールズリバー (Yokohama, Japan) より購入した。全ての実験には、同腹仔もしくは 6-11 週齢の雄のマウスを使用した。餌および水は絶えず供給された環境であり、東京工業大学 動物実験施設において飼育された。

細胞および培養条件

Colon26 細胞は、ATCC より購入し、LM8 細胞は吉川 秀樹 博士（大阪大学、Osaka, Japan）より分与して頂いた。Colon26 は 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Nacalai Tesque) を添加した 10% FBS-RPMI1640 を用いて、LM8 は 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Nacalai Tesque) を添加した 5% FBS-DMEM を用いて、各々 37°C, 5% CO₂ で培養・維持した。恒常的に firefly luciferase (Fluc) を発現する Colon26/Fluc および LM8/Fluc は、当研究室の先行研究においてレポーター遺伝子 (pEF/Fluc)[54]をリン酸カルシウム法[55]により導入することで樹立した。

がん細胞の皮下移植モデル

第 2 章に既述した内容に同じ。

MDSC の単離

第 2 章に既述した内容に同じ。

MLAC の単離

第 2 章に既述した内容に同じ。

膜表面抗原染色サンプルのフローサイトメトリーおよび細胞分取

腫瘍組織や脾臓や骨髓由来の単細胞を懸濁した PBS に 1:200 の希釈率となるように抗 Fcγ receptor (FcγR) II/III (CD16/32)抗体 (clone 93, Biolegend) を添加し、4°C で 20 分インキュベートすることで、FcγR による抗体 Fc 領域への結合をブロッキングした。次に、FACS Buffer で細胞を 1 回洗浄した後、蛍光色素標識された抗体を添加し、暗室 4°C で 25 分インキュベートすることで、膜表面抗原を染色した。最後に FACS Buffer で細胞を 1 回洗浄した後、フローサイトメーター iCyt ec800 (Sony Biotechnology)で蛍光測定をした。ただし、目的の細胞集団を単離する場合、FACS Aria (BD)を用いた。

使用した抗体は以下の通り。抗 CD8 抗体 (clone 53-6.7, Biolegend, 1:100)、抗 CD11b 抗体 (clone M1/70, Biolegend, 1:200)、抗 CD45 抗体 (clone 30-F11, Biolegend, 1:200)、抗 CD69 抗体 (clone H1.2F3, Biolegend, 1:100)、抗 F4/80 抗体 (clone Cl:A3-1, AbD Serotec, USA, 1:50)、抗 Gr-1 抗体 (clone RB6-8C5, Biolegend, 1:200)、抗 NK1.1 抗体 (clone PK136, Biolegend, 1:100)。

細胞内抗原の染色とフローサイトメトリー

単細胞を懸濁した PBS に 1:200 の希釈率となるように抗 FcγR II/III (CD16/32)抗体 (clone 93, Biolegend) を添加し、4°C で 20 分インキュベートすることで、FcγR による抗体 Fc 領域への結合をブロッキングした。次に、FACS Buffer で細胞を 1 回洗浄した後、fixation-permeabilization buffer (FoxP3/Transcription Factor Staining kit from eBioscience)で細胞を懸濁し、暗室 4°C で 25 分インキュベートすることで、細胞の固定および膜透過処理を行った。続いて、Permeabilization Buffer (eBioscience)で細胞を 1 回洗浄した後、Permeabilization Buffer (eBioscience)で希釈した抗体液で細胞を懸濁し、暗室 4°C で 30 分インキュベートすることで、細胞内抗原を染色した。最後に、Permeabilization Buffer (eBioscience)、FACS Buffer の順で 1 回ずつ洗浄した後に、フローサイトメーター iCyt ec800 (Sony Biotechnology)を用いて、蛍光強度を測定した。

使用した抗体は以下の通り。抗 CCL2 抗体 (clone 2H5, Biolegend, 1:200)、抗 CCL5 抗体 (clone 2E9/CCL5, Biolegend, 1:200)。

強接着性細胞の回収と MLAC の存在比調査

皮下腫瘍の直径が 10-20 mm に到達した時点で腫瘍を摘出し、メスにより腫瘍組織を細かく刻んだ。続いて、0.13 U/mL Liberase DH (Roche Applied Science)を添加した 2% FBS-RPMI1640 に移し、37°C で 60 分間攪拌することで、分散させた。その後、孔径の異なる (500, 250, 100, 40 μm) 4 種のセルストレーナー (Greiner bio-one) に順に通すことで凝集した細胞塊を除き、1X PharmLyse solution (BD Biosciences)中で室温 10 分間インキュベートすることで赤血球を除去した。分散させた単細胞を 2% FBS-RPMI で懸濁し、10 cm ディッシュあたり 2.0×10^7 cells まいて 37°C で培養した。培養開始 30 分間経過した時点で培地を除き、2mM EDTA/PBS で 3 回洗浄することで、

接着力の弱い細胞を念入りに除いた。そして、最後までディッシュ底面に接着していた細胞（強接着性細胞）をセルスクレーパーにより回収した。強接着性細胞を抗 CD11b 抗体と抗 F4/80 抗体で染色し、CD11b⁺ F4/80⁻細胞の割合を、フローサイトメーターiCyt ec800 (Sony Biotechnology)で測定した。

***in vitro* 細胞遊走アッセイ**

LLC/Fluc 担がんの GFP-Tg マウスの皮下腫瘍が 15 - 20 mm に到達した時点で腫瘍を摘出し、PMN-MDSC および Mo-MDSC 各々を単離した。まず、8 μ m 孔径 Transwell® insert (Corning)を用いて、24 ウェルプレート（TPP）を bottom chamber と upper chamber にわけ、GFP⁺ PMN-MDSC もしくは GFP⁺ Mo-MDSC を upper chamber へまいた。その際 bottom chamber は共培養 CM で満たし、CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL2, CXCL5 の各々に対する中和抗体を添加した。ネガティブコントロールとして、中和抗体の代わりに control IgG (R&D Biosystems)を添加した条件も用意した。37°C で 12 時間インキュベートした後、bottom chamber へ移動した細胞を回収し、フローサイトメーターiCyt ec800 (Sony Biotechnology)を用いて、細胞数をカウントした。

統計学的解析

各実験結果の差が統計学的に有意であるか否かは、Student's t-test によって得た P 値が 0.05 を下回っているかどうかで判断した。全てのデータは、平均値±標準誤差で示した。

6.3. 結果

6.3.1. 候補因子による MDSC 細胞遊走能促進効果の調査

前章までの結果から、MDSC が悪性化を促す主要な機構である CTL 抑制能も TAM への分化能も、MLAC は有さないことがわかった。そこで、MLAC による悪性化機構として、「MLAC は、腫瘍形成の早期に腫瘍にリクルートされ、血管新生やがん細胞増殖を亢進するとともに、MDSC をリクルートして、免疫抑制型の腫瘍微小環境の構築を開始することに貢献している」という仮説を立てた。サイトカインアレイで選出された 13 候補因子 (Fig 4.2.) のうち、CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 は MDSC のケモカインとして知られている[93-97]。予想通り、LLC と MLAC の共培養 CM を用いて *in vitro* 細胞遊走アッセイを行った結果、PMN-MDSC および Mo-MDSC どちらの遊走能も有意に促進された (Fig 6.2A-B)。CM による Mo-MDSC 遊走促進作用は、CCL2 もしくは CCL5 に対する中和抗体により有意に阻害された (Fig 6.2A)。それに対し、CM による PMN-MDSC 遊走促進作用は、何れの中和抗体単独添加条件でも有意に阻害されなかった (Fig 6.2B)。しかし、CXCL1, CXCL2, CXCL5 はどれも共通のケモカイン受容体 CXCR2 に対して結合することができるため[84]、これら 3 種のケモカインは重複して同じ的作用をもつために、1 つの因子のみを中和しても有意な阻害効果を確認できないという可能性がある。それを検証するために、共培養 CM 中に CXCL1, CXCL2, CXCL5 の 3 因子に対する中和抗体を全て添加して *in vitro* 細胞遊走アッセイを行った結果、PMN-MDSC の遊走能が有意に阻害された (Fig 6.2B)。

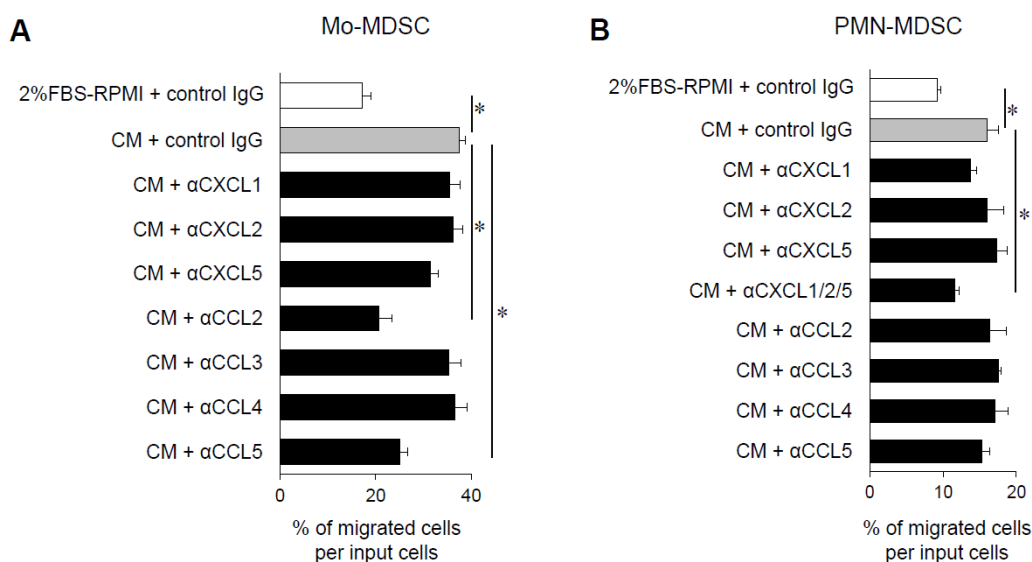


Fig 6.2. 候補因子による MDSC 細胞遊走能促進効果の調査

(A-B) 候補因子中和による Mo-MDSC (A)および PMN-MDSC (B)遊走能への影響。LLC 担がんの GFP-Tg マウスの皮下腫瘍組織から GFP⁺ Mo-MDSC および GFP⁺ PMN-MDSC を単離し、Transwell® insert の upper chamber にまいてインキュベートした。12 時間後に bottom chamber の細胞を回収し、フローサイトメトリーにより、GFP⁺ 細胞数を計測した。誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. CM + Rat control IgG. $n = 3$.

6.3.2. MLAC における CCL2/5 発現量調査

MDSC をリクルートする作用を有する CCL2/5 が、MLAC から分泌されていることを確認するために、*in vitro* 共培養と同じ条件で共培養した後の LLC と MLAC を別々に回収し、各々の細胞内の CCL2, CCL5 を抗体で染色し、フローサイトメトリーにより CCL2, CCL5 の発現レベルを測定した。その結果、MLAC は 2 因子を何れも高発現していた (Fig 6.3.)。また、MLAC は CXCL1, CXCL2, CXCL5 の 3 因子とも発現していた (Fig 4.6A)。これらの結果は、MLAC は CXCL1/2/5 により PMN-MDSC の遊走能を、CCL2/5 により Mo-MDSC の遊走能を促進し、腫瘍内にリクルートしていることを強く示唆している。

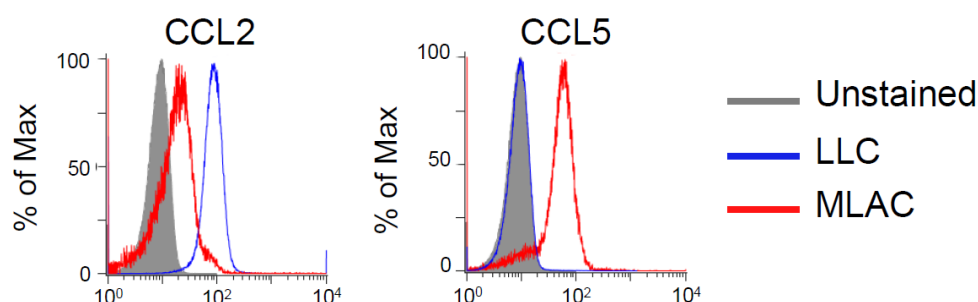


Fig 6.3. MLAC における CCL2/5 発現量調査

48 時間共培養した後、各々の細胞を別々に回収し、細胞内フローサイトメトリーにより CCL2, CCL5 に対する抗体で染色し、フローサイトメトリーで測定した。青色、赤色のヒストグラムは各々 LLC, MLAC の発現強度を示す。全ての実験を、少なくとも 3 回実施した。

6.3.3. MLAC の腫瘍内局在比の調査

MLAC が MDSC をリクルートする機能を有しているとする、MLAC が腫瘍形成のどの時期から腫瘍内に存在するのは重要である。また、MLAC の作用が LCC がん細胞に特有のものかどうかを検証する必要がある。それらを調べるために、肺がん細胞株 LLC のみならず結腸がん細胞株 Colon26 と骨肉種細胞株 LM8 を各々の由来マウスである BALB/c, C3H に皮下移植したモデルも用い、各腫瘍直径が 10, 15, 20 mm に到達した時点で皮下腫瘍を摘出し、MLAC の存在の有無を確認した。その結果、腫瘍サイズやがん細胞株の種類に依らず MLAC が存在すること (Fig 6.4.)、直径 10 mm の小さい腫瘍内においては、大きい腫瘍と同程度かやや高い割合で MLAC が存在することがわかった (Fig 6.4.)。

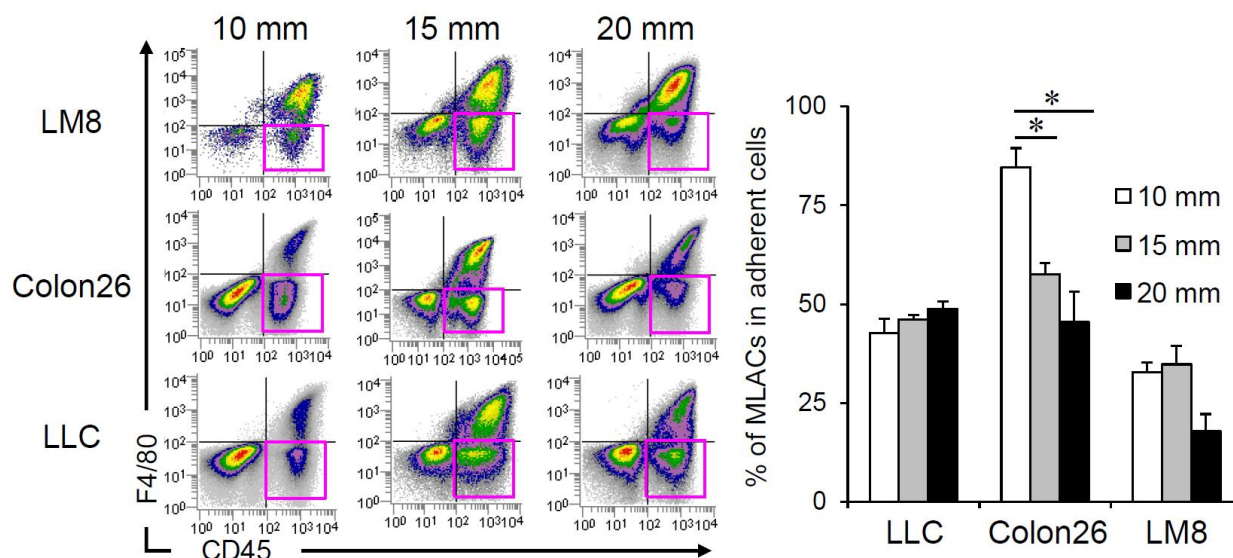


Fig 6.4. 異なるがん種・サイズの腫瘍組織内における MLAC の存在調査

異なるがん種・サイズの腫瘍組織内における MLAC の割合。3 種各々のがん細胞株の皮下腫瘍が直径 10, 15, 20 mm に到達した時点で回収した強接着性細胞において、CD45 および F4/80 の発現解析を行った。(左) フローサイトメトリー解析の結果の一例を示す。(右) 強接着性細胞における CD45⁺ F4/80⁺ 細胞 (上図中のピンクの長方形内) の割合を示す。誤差範囲は標準誤差を示す。

*, $P < 0.05$ vs. 10 mm. $n = 3$.

6.3.4. MLAC による腫瘍組織内への MDSC 誘引促進効果の調査

in vitro 細胞遊走アッセイの結果、MLAC が MDSC の遊走能を促進するとわかった (Fig 6.2.)。しかし、腫瘍組織内に最も多く存在するがん細胞 LLC も CCL2 (Fig 6.3.) および CXCL1, CXCL2, CXCL5 (Fig 4.6.) を発現していたことを踏まえると、MLAC が *in vivo* においては MDSC の遊走能に大きく貢献していない可能性も否めない。そこで次に、MLAC が実際の腫瘍内への MDSC の誘引に寄与しているかどうかを調べるために、LLC 担がん GFP-Tg マウスの皮下腫瘍組織から GFP⁺ MLAC を単離し、LLC/Fluc 細胞と混ぜて B6 Albino の皮下に移植した。このモデルにおいてドナー MLAC は GFP⁺ 細胞として宿主 MLAC と区別することができるので、共移植 20 日後に皮下腫瘍組織を摘出し、GFP⁺ ホスト MDSC の割合をフローサイトメトリーにより測定した。その結果、MLAC を共移植したことで、腫瘍組織内の PMN-MDSC および Mo-MDSC の割合が有意に増加した (Fig 6.5.)。また、TAM は有意に増加し、活性化 CTL の割合は有意に減少した (Fig 6.5.)。

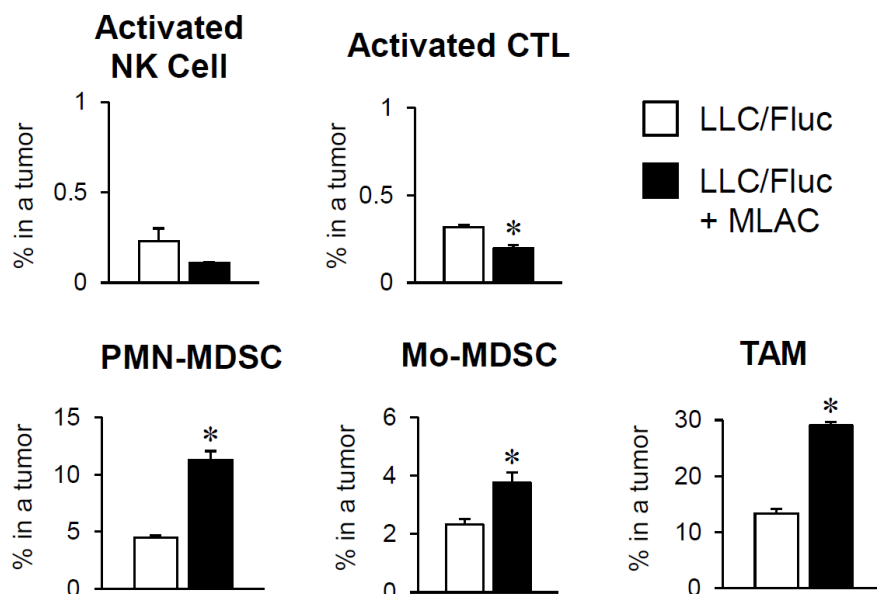


Fig 6.5. MLAC 共移植による宿主免疫細胞誘引への影響調査

MLAC による腫瘍内宿主免疫細胞への影響。LLC 担がんの GFP-Tg マウスの皮下腫瘍組織から GFP⁺ MLAC を単離し、LLC/Fluc と混ぜて B6 Albino マウスの皮下へ共移植した。20 日後の皮下腫瘍組織を摘出し、各種免疫細胞マーカーに対する抗体で染色し、フローサイトメトリーにより測定した。% in total は、腫瘍全体における GFP⁻ 宿主由来各種免疫細胞の割合を示す。activated NK cell; NK1.1⁺ CD69⁺, activated CTL; CD8⁺ CD69⁺, PMN-MDSC; CD11b⁺ Gr-1^{hi}, Mo-MDSC; CD11b⁺ Gr-1^{low}, TAM; CD11b⁺ F4/80⁺. 誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. LLC/Fluc. $n = 3$.

さらに、LLC/Fluc 細胞を皮下移植した後、10, 15, 20 mm という異なるサイズの腫瘍組織を摘出し、それら腫瘍内の活性化 CTL、PMN-MDSC、Mo-MDSC、TAM の割合を腫瘍サイズ毎に比較した。腫瘍サイズが大きくなるにしたがって、活性化 CTL の割合は低くなっていったのに対して、PMN-MDSC と Mo-MDSC と TAM の割合は高くなっていった (Fig 6.6.)。

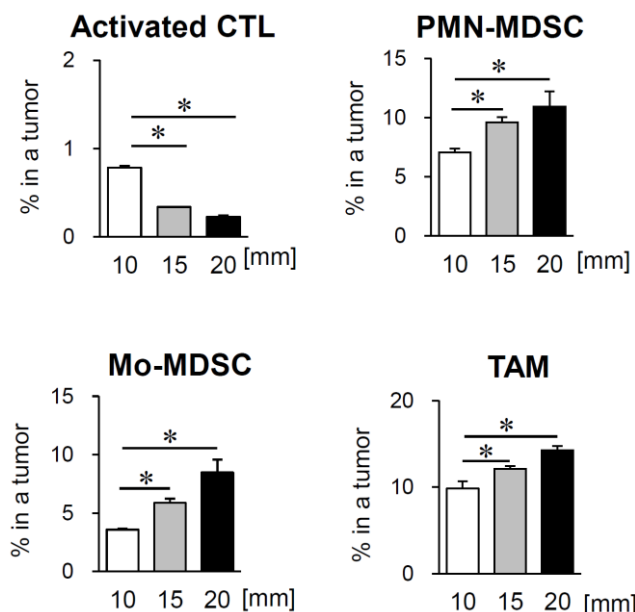


Fig 6.6. LLC 腫瘍成長による宿主免疫細胞の割合への影響調査

LLC 腫瘍サイズによる腫瘍内各種免疫細胞への影響。LLC 皮下腫瘍が直径 10, 15, 20 mm に到達した時点で摘出し、各種免疫細胞マーカーに対する抗体で染色し、フローサイトメトリーにより測定した。activated CTL; CD8⁺ CD69⁺, PMN-MDSC; CD11b⁺ Gr-1^{hi}, Mo-MDSC; CD11b⁺ Gr-1^{low}, TAM; CD11b⁺ F4/80⁺. 誤差範囲は標準誤差を示す。*, $P < 0.05$ vs. 10 mm. $n = 3$.

6.4. 考察

MLAC は小さな腫瘍内においても大きな腫瘍内と同程度の割合で存在していたことを踏まえると (Fig 6.4.)、早期段階の腫瘍内に存在する MLAC により MDSC が腫瘍内へ誘引されたことで、MDSC の割合が徐々に高まり (Fig 6.6.)、腫瘍成長によって都合の良い環境構築に MLAC が貢献している可能性が示唆された。

次に、MLAC と共移植された腫瘍組織内は、がん細胞 LLC 単独で移植した腫瘍組織と比べて、活性化 CTL の割合が有意に減少していた (Fig 6.5.)。 (1) MLAC と共移植された腫瘍組織内において MDSC および TAM が有意に増加していたこと (Fig 6.5.)、 (2) MDSC が TAM の前駆細胞であること [36]、 (3) TAM [26] および MDSC [36] が CTL の活性を抑制するということ、 (4) MLAC 自身は直接 CTL の活性を抑えることができないこと (Fig 5.4.) を踏まえると、MLAC が MDSC の誘引を促進し、間接的に TAM の増加や活性化 CTL の減少という免疫抑制型の腫瘍微小環境の構築に貢献したことが強く示唆される。

第 7 章

考察・今後の展望

今回の研究により、MDSC 同様に $CD11b^+ Gr-1^+ Ly6C^{low/hi} Ly6G^{+/-}$ という膜表面マーカー発現パターンを示す新規細胞亜集団 MLAC を同定し、MLAC が、(1) 直接的にがん細胞の増殖や腫瘍血管新生を促し、腫瘍増殖亢進作用を有すること、(2) MDSC の腫瘍内への誘引作用を有し、腫瘍内免疫抑制環境の構築に寄与していることを示すことができた(Fig 7.1.)。

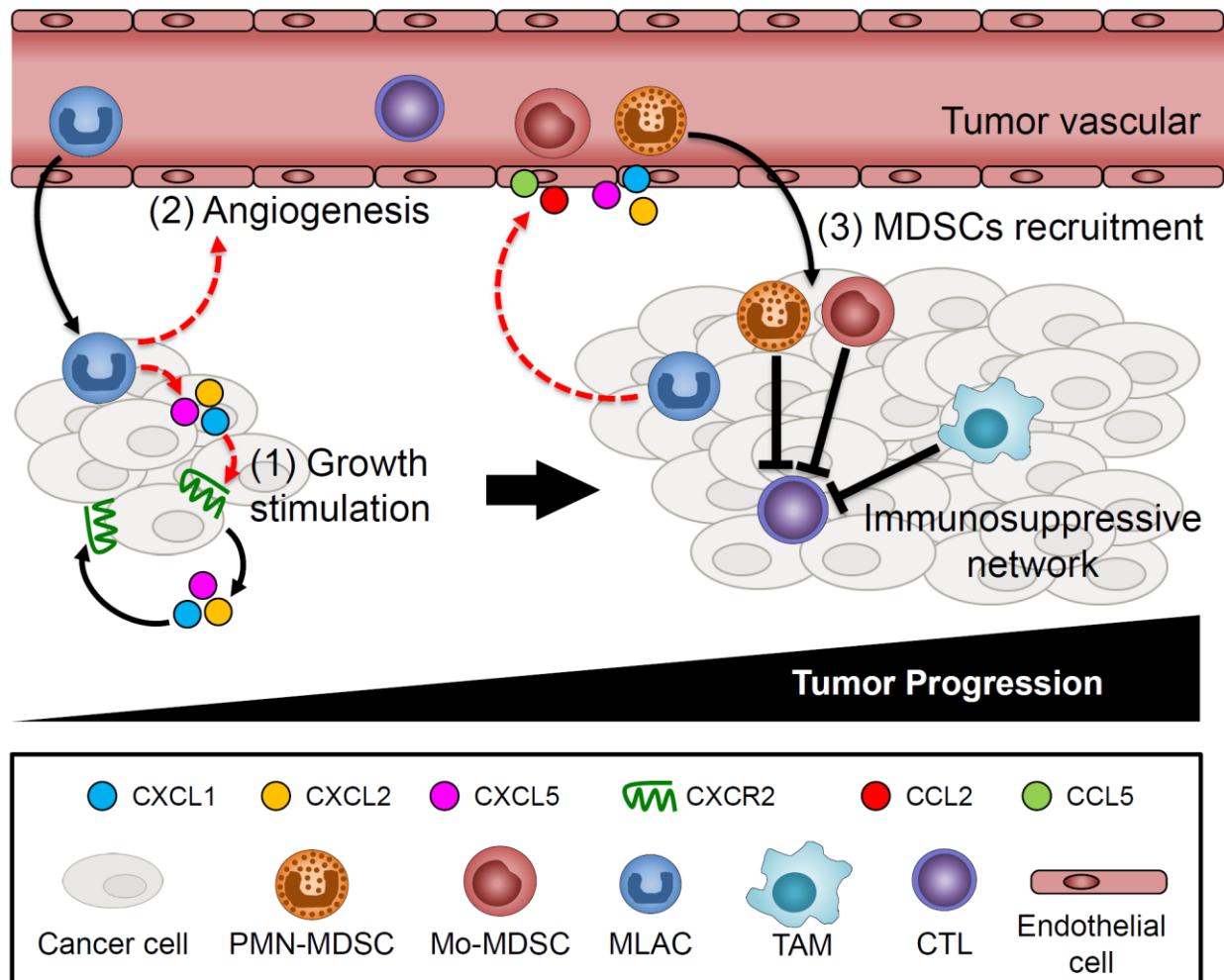


Fig 7.1. Graphical Summary

(1) MLAC は腫瘍発生後の早期段階で腫瘍組織内へ誘引され、CXCL1/2/5 を分泌し、がん細胞内の CXCL1/2/5/CXCR2 シグナルを活性化することで増殖を促進する。(2) MLAC は血管新生因子を分泌することで、腫瘍内血管新生を促進する。(3) MLAC はケモカインを放出することで、MDSC の腫瘍内への誘引を促す。その誘引された MDSC は TAM へ分化し、CTL を抑制することで、免疫抑制型の腫瘍微小環境構築の開始に貢献する。赤の点線は MLAC 自身が誘導する機能であり、黒の実線は MLAC の機能に密接に関与する他の細胞の機能を示す。

特定のマーカーを用いなかったことで、新規細胞 MLAC の同定に至ったが、MLAC を担がんマウスから回収するための MLAC 特異的な膜表面マーカーが無いことが、今後の研究推進の妨げになる。そこで、MLAC の非常に強い接着性に着目し、何らかの接着分子の発現が他のミエロイド細胞と比べて MLAC で顕著に高く、MLAC 特異的なマーカーになり得るのではないかと仮説を立てた。現在、macrophage receptor with collagenous structure (MARCO)や各種インテグリンなどのいくつかの接着分子の発現強度を、MLAC とその他免疫細胞とで比較する作業を進めている。もしこのアプローチでマーカーの同定が困難である場合は、プロテオーム解析もしくは RNA-seq などの大規模遺伝子発現解析を駆使することで、MLAC 特異的な膜表面マーカーを同定することが可能であると考えている。

担がんマウスの固形腫瘍組織内のみならず、骨髓、脾臓、末梢血中にも MLAC が存在したことから(Fig 2.8.)、MLAC は骨髓もしくは脾臓から血管を通して腫瘍組織へ誘引されている可能性が示唆された。MLAC が骨髓もしくは脾臓どちらで産生され、腫瘍形成後どのくらいの時期に腫瘍組織に誘引されるのかは、MLAC による腫瘍悪性化への寄与を深く知るうえで非常に重要である。これは、紫外光を照射により緑色から赤色へ蛍光が変化する蛍光タンパク質 Kikume Green-Red[114]を全身で恒常発現する KikGR マウスを用いた *in vivo* 免疫細胞動態評価モデルにより、今後検証していく予定である。具体的には、担がんマウスの骨髓もしくは脾臓どちらかに紫外光照射することで KikGR タンパク質の色を赤色へ変換し、数日後に腫瘍組織から回収し MLAC が赤色なのか緑色なのかを確認することで、どちらが由来臓器なのかを評価できると考えられる。MLAC 特異的な膜表面マーカーが同定されれば、マーカー遺伝子を用いたレポータープローブを作成することで、上記の検証結果を確認することも可能になる。

MLAC におけるケモカイン受容体の発現に注目すると、CSF-1R および CX₃CR1 は陰性であったのに対して、CCR2 は陽性であった(Fig 2.4.)。つまり、MLAC は、腫瘍組織由来の CCR2 リガンド CCL2 によって腫瘍組織へ誘引されている可能性が示唆された。これは、Fig 6.2.同様の *in vitro* 細胞遊走アッセイを行うことで、検証可能だと考えられる。さらに、MLAC 特異的なマーカーが同定されたら、MLAC 特異的に *Ccr2* をノックアウトしたマウスを樹立し、腫瘍組織内の MLAC の割合を野生型マウスと比較することでも、検証可能だと考えられる。

MLAC は腫瘍内血管新生を促進した (Fig 5.3.) が、分子レベルの機構についての検証は、まだできていない。サイトカインアレイの結果選出された候補因子 13 種のうちの血管新生促進因子である VEGFA, MMP-2, MMP-3, PAI-1, CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL5[88-92]のいずれが、主要な役割を担っているかを今後検証する必要がある。検証実験として、注目した因子 A に特異的な阻害剤もしくは中和抗体を担がんマウスへ全身投与するモデルを用いた論文が今までいくつも報告されているが、このような実験系では、マウス生体内の全ての細胞由来の因子 A (今回の場合は上記血管新生因子の何れか) を阻害した結果を観察することになってしまい、MLAC 由来の因子 A の作用を検証でき

ているという保証がない。そこで、より正確な代替実験をするためには、MLAC 特異的に因子 A をノックアウトした遺伝子改変マウスでの検証が最も確実であるが、そのコンディショナルノックアウトマウスを作製するためには、MLAC に特異的なプロモーターを同定することが必須である。つまり、MLAC 特異的なマーカーを同定することが、今後の研究を推進するために最重要かつ最優先課題であることは、この点からも明らかである。

MLAC は、MDSC 同様に未分化ミエロイド細胞に特徴的な遺伝子(*S100a8*, *Cebpa*, *Cebpb*)を高発現していたことから(Fig. 2.7.)、未分化ミエロイド細胞であることが示唆されたが、*in vitro*, *in vivo* どちらの分化実験の結果でも、成熟ミエロイド細胞 TAM へ分化しなかった (Fig 5.5-5.6)。TAM には *in vivo* においても分化しなかったものの、その他の成熟ミエロイド細胞である樹状細胞、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞などに分化している可能性を否定できていない。それらの可能性について正確に検証するために、樹状細胞、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞などあらゆるミエロイドの各々に特異的なマーカータンパク質に対する抗体を用いた *in vivo* 分化実験も、今後の重要な課題の 1 つである。

非常に小さな腫瘍内にも MLAC は大きな腫瘍と同程度、もしくはむしろ多い割合で存在したのに対して (Fig 6.4.)、MDSC や TAM は腫瘍の成長に伴って徐々に割合が上昇していた (Fig 6.6.)。これらの結果は、MLAC は腫瘍発生後の非常に早い段階に誘引され、MLAC が MDSC の誘引のトリガーになっていることを強く示唆している。これについては、もし MLAC 特異的なマーカーが同定されたら、MLAC 特異的にジフテリア毒素受容体を発現するマウスを用いることで検証可能と考えられる。具体的には、このトランスジェニックマウスにジフテリア毒素を投与して MLAC を除去し、腫瘍組織内の MDSC の割合をジフテリア毒素投与無マウスと比較することで、MLAC の MDSC リクルートへの寄与が検証する。また、実際に MLAC が腫瘍形成後のどの程度早い段階で腫瘍組織内へ誘引されているかどうかについては、MLAC 特異的に蛍光や発光のレポーター遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いることで検証可能とえられる。具体的には、このトランスジェニックマウスに LLC を移植し、その後 1 日おきに非侵襲的にイメージングするか、腫瘍を摘出して *ex vivo* および腫瘍切片の観察により、MLAC が初めて腫瘍内に検出されるタイミングを調査する。

サイトカインアレイの結果を見ると、MLAC 単独培養 CM 中に G-CSF および M-CSF が多く含まれていた (Fig 4.2.)。G-CSF は STAT3 経路を介して MDSC の生存および活性化を促進すること [115]、PMN-MDSC の量を全身的に増加させること [116] が報告されており、M-CSF は MDSC から樹状細胞への分化 [117] および TAM への分化 [118] を促進することが知られている。これらの報告を踏まえると、MLAC 共移植により腫瘍内の MDSC および TAM が増加した機構として、MDSC の誘引が促進されたのみならず、(1) MDSC そのものの量が全身で増加した、(2) MDSC から TAM への分化促進、なども寄与している可能性が考えられる。前者(1)については、末梢血、脾臓、骨髓中の MDSC の割合を LLC 単独移植したマウスと MLAC 共移植したマウスの間で比較することで、検証

可能だと考えられる。

新規接着性 MDSC 様細胞である MLAC は、MDSC の腫瘍組織内への誘引を強力に促進することで腫瘍内免疫抑制型ネットワークの形成に強く貢献していることが示唆された。もしヒトにも対応するタンパク質マーカーが存在すれば、そのマーカーを利用することでがん患者の生体内にも MLAC が存在するか否かを検証することが可能である。本研究で得られた結果と同様な作用をヒト MLAC がもっていれば、がん患者特異的な新たな診断法の開発が期待できる。また、MLAC の機能を阻害できる標的分子を同定することができれば、腫瘍内の MDSC および TAM による腫瘍免疫抑制環境を改善することが期待される。つまり MLAC は、既存のがん免疫療法の薬効を高めるために有望ながん治療標的であると考えられる。

引用文献

1. Hanahan D, RA. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70, 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
2. Joyce J. A., Pollard J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 239-52, 10.1038/nrc2618.
3. Hackl H, Charoentong P, Finotello F, Z. Trajanoski. Computational genomics tools for dissecting tumour-immune cell interactions. *Nat Rev Genet*. 2016; 17: 441-58, 10.1038/nrg.2016.67.
4. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, AC. Halpern. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1893-904.
5. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, N. Cascinelli. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996; 77: 1303-10, 10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1303::AID-CNCR12>3.0.CO;2-5.
6. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, H. Ohtani. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998; 58: 3491-4.
7. Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, Suzuki Y, Shintaku I, Nagura H, H. Ohtani. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res*. 2001; 61: 5132-6.
8. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, G. Coukos. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348: 203-13, 10.1056/NEJMoa020177.
9. Hanahan D, LM. Coussens. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012; 21: 309-22, 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
10. Engblom C., Pfirschke C., Pittet M. J. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16: 447-62, 10.1038/nrc.2016.54.
11. Smyth MJ, Ngiew SF, Ribas A, MW. Teng. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016; 13: 143-58, 10.1038/nrclinonc.2015.209.
12. Ugel S, De Sanctis F, Mandruzzato S, V. Bronte. Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *J Clin Invest*. 2015; 125: 3365-76, 10.1172/JCI80006.
13. Younos IH, Abe F, JE. Talmadge. Myeloid-derived suppressor cells: their role in the pathophysiology of hematologic malignancies and potential as therapeutic targets. *Leuk Lymphoma*. 2015; 56: 2251-63, 10.3109/10428194.2014.987141.

14. Ruffell B, LM. Coussens. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell*. 2015; 27: 462-72, 10.1016/j.ccell.2015.02.015.
15. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, JC. Becker. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*. 2006; 126: 32-41, 10.1038/sj.jid.5700001.
16. Trapani JA, MJ. Smyth. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 735-47, 10.1038/nri911.
17. Appay V, Douek DC, DA. Price. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med*. 2008; 14: 623-8, 10.1038/nm.f.1774.
18. Joyce JA, DT. Fearon. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*. 2015; 348: 74-80, 10.1126/science.aaa6204.
19. Bustamante Alvarez JG, González-Cao M, Karachaliou N, Santarpia M, Viteri S, Teixidó C, R. Rosell. Advances in immunotherapy for treatment of lung cancer. *Cancer Biol Med*. 2015; 12: 209-22, 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0032.
20. Kim JW, JP. Eder. Prospects for targeting PD-1 and PD-L1 in various tumor types. *Oncology (Williston Park)*. 2014; 28: 15-28.
21. C. Schmidt. The benefits of immunotherapy combinations. *Nature*. 2017; 552: S67-S9, 10.1038/d41586-017-08702-7.
22. A. Mullard. Can innate immune system targets turn up the heat on 'cold' tumours? *Nat Rev Drug Discov*. 2018; 17: 3-5, 10.1038/nrd.2017.264.
23. Balkwill FR, A. Mantovani. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin Cancer Biol*. 2012; 22: 33-40, 10.1016/j.semcancer.2011.12.005.
24. Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, Liguori M, Erba E, Ubaldi S, Zucchetti M, Pasqualini F, Nebuloni M, van Rooijen N, Mortarini R, et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell*. 2013; 23: 249-62, 10.1016/j.ccr.2013.01.008.
25. Biswas S. K., Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010; 11: 889-96, 10.1038/ni.1937.
26. Noy R, JW. Pollard. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014; 41: 49-61, 10.1016/j.immuni.2014.06.010.
27. Lewis J. S., Landers R. J., UNderwood J. C., Harris A. L., Lewis C. E. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol*. 2000; 192: 150-8, 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH687>3.0.CO;2-G.
28. Sierra J. R., Corso S., Caione L., Cepero V., Conrotto P., Cignetti A., Piacibello W., Kumanogoh A., Kikutani H., Comoglio P. M., Tamagnone L., Giordano S. Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *J Exp Med*. 2008; 205: 1673-85, 10.1084/jem.20072602.
29. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Göktuna SI, Ziegler PK, Canli O,

- Heijmans J, Huels DJ, Moreaux G, Rupec RA, Gerhard M, Schmid R, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*. 2013; 152: 25-38, 10.1016/j.cell.2012.12.012.
30. Wan S, Zhao E, Kryczek I, Vatan L, Sadovskaya A, Ludema G, Simeone DM, Zou W, TH. Welling. Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal via STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells. *Gastroenterology*. 2014; 147: 1393-404, 10.1053/j.gastro.2014.08.039.
 31. Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, Zhao YW, YQ. Wei. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One*. 2012; 7: e50946, 10.1371/journal.pone.0050946.
 32. Casbon AJ, Reynaud D, Park C, Khuc E, Gan DD, Schepers K, Passequé E, Z. Werb. Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: E566-E75, 10.1073/pnas.1424927112.
 33. Youn JI, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK, DI. Gabrilovich. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Leukoc Biol*. 2012; 91: 167-81, 10.1189/jlb.0311177.
 34. Millrud CR, Bergenfelz C, K. Leandersson. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget*. 2017; 8: 3649-65, 10.18632/oncotarget.12278.
 35. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, DI. Gabrilovich. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*. 2016; 37: 208-20, 10.1016/j.it.2016.01.004. Epub 2016 Feb 6.
 36. Youn J. I., Nagaraj S., Collazo M., Gabrilovich D. I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *The Journal of Immunology*. 2008; 181: 5791-802, 10.4049/jimmunol.181.8.5791.
 37. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC, DI. Gabrilovich. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*. 2009; 182: 5693-701, 10.4049/jimmunol.0900092.
 38. Schmielau J., Finn O. J. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res*. 2001; 61: 4756-60.
 39. Nagaraj S., Gupta K., Pisarev V., Kinarsky L., Sherman S., Kang L., Herber D. L., Schneck J., Gabrilovich D. I. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med*. 2007; 13: 828-35, 10.1038/nm1609.
 40. Bronte V., Serafini P., De Santo C., Marigo I., Tosello V., Mazzoni A., Segal D. M., Staib C., Lowel M., Sutter G., Colombo M. P., Zanolello P. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *The Journal of Immunology*. 2003; 170: 270-8,

- 10.4049/jimmunol.170.1.270.
41. Yang L., DeBusk L. M., Fukuda K., Fingleton B., Green-Jarvis B., Shyr Y., Matrisian L. M., Carbone D. P., Lin P. C. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2004; 6: 409-21, 10.1016/j.ccr.2004.08.031.
 42. Gabitass R. F., Annels N. E., Stocken D. D., Pandha H. A., Middleton G. W. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother*. 2011; 60: 1419-30, 10.1007/s00262-011-1028-0.
 43. Montero A. J., Diaz-Montero C. M., Kyriakopoulos C. E., Bronte V., Mandruzzato S. Myeloid-derived suppressor cells in cancer patients: a clinical perspective. *J Immunother*. 2012; 35: 107-15, 10.1097/CJI.0b013e318242169f.
 44. Meyer C, Cagnon L, Costa-Nunes CM, Baumgaertner P, Montandon N, Leyvraz L, Michielin O, Romano E, DE. Speiser. Frequencies of circulating MDSC correlate with clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63: 247-57, 10.1007/s00262-013-1508-5.
 45. Weber J, Gibney G, Kudchadkar R, Yu B, Cheng P, Martinez AJ, Kroeger J, Richards A, McCormick L, Moberg V, Cronin H, Zhao X, Schell M, et al. Phase I/II Study of Metastatic Melanoma Patients Treated with Nivolumab Who Had Progressed after Ipilimumab. *Cancer Immunol Res*. 2016; 4: 345-53, 10.1158/2326-6066.CIR-15-0193.
 46. Glodde N, Bald T, van den Boorn-Konijnenberg D, Nakamura K, O'Donnell JS, Szczepanski S, Brandes M, Eickhoff S, Das I, Shridhar N, Hinze D, Rogava M, van der Sluis TC, et al. Reactive Neutrophil Responses Dependent on the Receptor Tyrosine Kinase c-MET Limit Cancer Immunotherapy. *Immunity*. 2017; 47: 789-802, 10.1016/j.immuni.2017.09.012.
 47. Holmgaard RB, Zamarin D, Lesokhin A, Merghoub T, JD. Wolchok. Targeting myeloid-derived suppressor cells with colony stimulating factor-1 receptor blockade can reverse immune resistance to immunotherapy in indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing tumors. *EBioMedicine* 2016; 6: 50-8, 10.1016/j.ebiom.2016.02.024.
 48. Gabrilovich D. I., Bronte V., Chen S. H., Colombo M. P., Ochoa A., Ostrand-Rosenberg S., Schreiber H. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*. 2007; 67: 425; author reply 6, 10.1158/0008-5472.CAN-06-3037.
 49. Garrity T., Pandit R., Wright M. A., Benefield J., Keni S., Young M. R. Increased presence of CD34⁺ cells in the peripheral blood of head and neck cancer patients and their differentiation into dendritic cells. *Int J Cancer*. 1997; 73: 663-9, 10.1002/(SICI)1097-0215(19971127)73:5<663::AID-IJC9>3.0.CO;2-V.
 50. Pak A. S., Wright M. A., Matthews J. P., Collins S. L., Petruzzelli G. J., Young M. R. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage

- colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res.* 1995; 1: 95-103.
51. Young M. R., Wright M. A., Lozano Y., Matthews J. P., Benefield J., Prechel M. M. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer. *Int J Cancer.* 1996; 67: 333-8, 10.1002/(SICI)1097-0215(19960729)67:3<333::AID-IJC5>3.0.CO;2-S.
 52. Young M. R., Wright M. A., Matthews J. P., Malik I., Prechel M. Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide. *J Immunol.* 1996; 156: 1916-22.
 53. Ortiz M. L., Lu L., Ramachandran I., Gabrilovich D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the development of lung cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2: 50-8, 10.1158/2326-6066.CIR-13-0129.
 54. Kizaka-Kondoh S., Itasaka S., Zeng L., Tanaka S., Zhao T., Takahashi Y., Shibuya K., Hirota K., Semenza G. L., Hiraoka M. Selective killing of hypoxia-inducible factor-1-active cells improves survival in a mouse model of invasive and metastatic pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 3433-41, 10.1158/1078-0432.CCR-08-2267.
 55. Chen C., Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol.* 1987; 7: 2745-52, 10.1128/MCB.7.8.2745.
 56. Lutz M. B., Kukutsch N., Ogilvie A. L., Rossner S., Koch F., Romani N., Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods.* 1999; 223: 77-92, 10.1016/S0022-1759(98)00204-X.
 57. 卓也 椿. 悪性化を促進する腫瘍内マクロファージの同定. 学士論文. 2013.
 58. Fleit SA, Fleit HB, S. Zolla-Pazner. Culture and recovery of macrophages and cell lines from tissue culture-treated and -untreated plastic dishes. *J Immunol Methods.* 1984; 68: 119-29.
 59. Kelly PM, Davison RS, Bliss E, JO. McGee. Macrophages in human breast disease: a quantitative immunohistochemical study. *Br J Cancer.* 1988; 57: 174-7, 10.1038/bjc.1988.36
 60. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, Mandruzzato S, Murray PJ, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Rodriguez PC, Sica A, Umansky V, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* 2016; 7, 10.1038/ncomms12150.
 61. Khazaie K, Blatner NR, Khan MW, Gounari F, Gounaris E, Dennis K, Bonertz A, Tsai FN, Strouch MJ, Cheon E, Phillips JD, Beckhove P, DJ. Bentrem. The significant role of mast cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2011; 30: 45-60, 10.1007/s10555-011-9286-z.
 62. Dyer KD, Garcia-Crespo KE, Killoran KE, HF. Rosenberg. Antigen profiles for the quantitative assessment of eosinophils in mouse tissues by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2011; 369: 91-7, 10.1016/j.jim.2011.04.009.
 63. Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, Mizuno S, Shigematsu H, Ozawa H, Tenen DG, Austen KF, K. Akashi. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 18105-10, 10.1073/pnas.0509148102.

64. Metcalf D., Ng A. P., Baldwin T. M., Di Rago L., Mifsud S. Concordant mast cell and basophil production by individual hematopoietic blast colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 9031-5, 10.1073/pnas.1307711110.
65. Álvarez-Errico D, Vento-Tormo R, Sieweke M, E. Ballestar. Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15: 7-17, 10.1038/nri3777.
66. Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, Ortiz M, Nacken W, Sorg C, Vogl T, Roth J, DI. Gabrilovich. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med*. 2008; 205: 2235-49, 10.1084/jem.20080132.
67. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chua WJ, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol*. 2012; 13: 1118-28, 10.1038/ni.2419.
68. Miller JC, Brown BD, Shay T, Gautier EL, Jojic V, Cohain A, Pandey G, Leboeuf M, Elpek KG, Helft J, Hashimoto D, Chow A, Price J, et al. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat Immunol*. 2012; 13: 888-99, 10.1038/ni.2370.
69. James ML, SS. Gambhir. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiol Rev*. 2012; 92: 897-965, 10.1152/physrev.00049.2010.
70. Kaijzel EL, van der Pluijm G, CW. Löwik. Whole-body optical imaging in animal models to assess cancer development and progression. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 3490-7, 10.1158/1078-0432.CCR-07-0402.
71. Leblond F, Davis SC, Valdés PA, BW. Pogue. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *J Photochem Photobiol B*. 2010; 98: 77-94, 10.1016/j.jphotobiol.2009.11.007.
72. Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, Yu SF, Dusich J, Purchio T, PR. Contag. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2003; 20: 733-44, 10.1023/B:CLIN.0000006815.49932.98.
73. Watanabe H., Knodoh G. Mouse sperm undergo GPI-anchored protein release associated with lipid raft reorganization and acrosome reaction to acquire fertility. *J Cell Sci*. 2011; 124: 2573-81, 10.1242/jcs.086967.
74. G. Dranoff. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 11-22, 10.1038/nrc1252.
75. Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Y. Hayakawa. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev*. 2004; 202: 275-93, 10.1111/j.0105-2896.2004.00199.x.
76. Hervas-Stubbs S, Perez-Gracia JL, Rouzaut A, Sanmamed MF, Le Bon A, I. Melero. Direct Effects of Type I Interferons on Cells of the Immune System. *Clin Cancer Res*. 2011; 17: 2619-27, 10.1158/1078-0432.CCR-10-1114.
77. De Palma M, Biziato D, TV. Petrova. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis.

- Nat Rev Cancer. 2017; 17: 457-74, 10.1038/nrc.2017.51.
78. Smyth MJ, Crowe NY, Pellicci DG, Kyparissoudis K, Kelly JM, Takeda K, Yagita H, DI. Godfrey. Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood*. 2002; 99: 1259-66, 10.1182/blood.V99.4.1259
 79. Fallarino F, TF. Gajewski. Cutting edge: differentiation of antitumor CTL in vivo requires host expression of Stat1. *J Immunol*. 1999; 163: 4109-13.
 80. Noguchi Y, Richards EC, Chen YT, LJ. Old. Influence of interleukin 12 on p53 peptide vaccination against established Meth A sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 2219-23.
 81. Mortarini R, Borri A, Tragni G, Bersani I, Vegetti C, Bajetta E, Pilotti S, Cerundolo V, A. Anichini. Peripheral burst of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes and infiltration of metastatic lesions by memory CD8+ T cells in melanoma patients receiving interleukin 12. *Cancer Res*. 2000; 60: 3559-68.
 82. Karin M, FR. Greten. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 749-59, 10.1038/nri1703.
 83. Nicolini A, Carpi A, G. Rossi. Cytokines in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17: 325-37, 10.1016/j.cytogfr.2006.07.002.
 84. Nagarsheth N, Wicha MS, W. Zou. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17: 559-72, 10.1038/nri.2017.49.
 85. Varney ML, Li A, Dave BJ, Bucana CD, Johansson SL, RK. Singh. Expression of CXCR1 and CXCR2 receptors in malignant melanoma with different metastatic potential and their role in interleukin-8 (CXCL-8)-mediated modulation of metastatic phenotype. *Clin Exp Metastasis*. 2003; 20: 723-31, 10.1023/B:CLIN.00000006814.48627.bd.
 86. Singh S, Nannuru KC, Sadanandam A, Varney ML, RK. Singh. CXCR1 and CXCR2 enhances human melanoma tumorigenesis, growth and invasion. *Br J Cancer*. 2009; 100: 1638-46, 10.1038/sj.bjc.6605055.
 87. Singh S, Sadanandam A, Nannuru KC, Varney ML, Mayer-Ezell R, Bond R, RK. Singh. Small-molecule antagonists for CXCR2 and CXCR1 inhibit human melanoma growth by decreasing tumor cell proliferation, survival, and angiogenesis. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 2380-6, 10.1158/1078-0432.CCR-08-2387.
 88. Dimberg A. Chemokines in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010; 341: 59-80, 10.1007/82_2010_21.
 89. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, L. Claesson-Welsh. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7: 359-71, 10.1038/nrm1911.
 90. Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P, JS. Rao. MMP-2 alters VEGF expression via α V β 3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells. *Int J Cancer*. 2010; 127: 1081-95, 10.1002/ijc.25134.

91. Jin X, Yagi M, Akiyama N, Hirosaki T, Higashi S, Lin CY, Dickson RB, Kitamura H, K. Miyazaki. Matriptase activates stromelysin (MMP-3) and promotes tumor growth and angiogenesis. *Cancer Sci.* 2006; 97: 1327-34, 10.1111/j.1349-7006.2006.00328.x.
92. Chorostowska-Wynimko J, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E, Selman SH, J. Jankun. Plasminogen activator inhibitor type-1 mutants regulate angiogenesis of human umbilical and lung vascular endothelial cells. *Oncol Rep.* 2004; 12: 1155-62, 10.3892/or.12.6.1155.
93. Murdoch C., Giannoudis A., Lewis C. E. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood.* 2004; 104: 2224-34, 10.1182/blood-2004-03-1109.
94. Acharyya S., Oskarsson T., Vanharanta S., Malladi S., Kim J., Morris P. G., Manova-Todorova K., Leversha M., Hogg N., Seshan V. E., Norton L., Brogi E., Massague J. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell.* 2012; 150: 165-78, 10.1016/j.cell.2012.04.042.
95. Katoh H., Wang D., Daikoku T., Sun H., Dey S. K., Dubois R. N. CXCR2-expressing myeloid-derived suppressor cells are essential to promote colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2013; 24: 631-44, 10.1016/j.ccr.2013.10.009.
96. Toh B., Wang X., Keeble J., Sim W. J., Khoo K., Wong W. C., Kato M., Prevost-Blondel A., Thiery J. P., Abastado J. P. Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol.* 2011; 9: e1001162, 10.1371/journal.pbio.1001162.
97. Huang B., Lei Z., Zhao J., Gong W., Liu J., Chen Z., Liu Y., Li D., Yuan Y., Zhang G. M., Feng Z. H. CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers. *Cancer Lett.* 2007; 252: 86-92, 10.1016/j.canlet.2006.12.012.
98. J Folkman. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995; 1: 27-30, 10.1038/nm0195-27.
99. Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, J. Folkman. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med.* 1972; 136: 261-76, 10.1084/jem.136.2.261.
100. Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, Klein-Szanto A, Litwin S, M. Herlyn. *Clin Cancer Res.* Clin Cancer Res. 1999; 5: 775-82.
101. Smith-McCune KK, N. Weidner. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res.* 1994; 54: 800-4.
102. Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, XJ. Xie. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer.* 2002; 2: 8, 10.1186/1471-2407-2-8.
103. de la Torre NG, Buley I, Wass JA, HE. Turner. Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 931-44, 10.1677/erc.1.01210.
104. Garcia de la Torre N, Buley I, Wass JA, Jackson DG, HE. Turner. Angiogenesis and

- lymphangiogenesis in parathyroid proliferative lesions. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 2890-6, 10.1210/jc.2003-031651.
105. Einspahr JG, Thomas TL, Saboda K, Nickolof BJ, Warneke J, Curiel-Lewandrowski C, Ranger-Moore J, Duckett L, Bangert J, Fruehauf JP, DS. Alberts. Expression of vascular endothelial growth factor in early cutaneous melanocytic lesion progression. *Cancer.* 2007; 110: 2519-27, 10.1002/cncr.23076.
 106. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144: 646-74, 10.1016/j.cell.2011.02.013.
 107. Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Telegeev GD, A. Dubrovskaya. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Onco Targets Ther* 2013; 6: 1347-61, 10.2147/OTT.S36109.
 108. Leek RD, AL. Harris. Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2002; 7: 177-89, 10.1023/A:1020304003704.
 109. Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, K. Matsushima. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 3282-9.
 110. Saji H, Koike M, Yamori T, Saji S, Seiki M, Matsushima K, M. Toi. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer.* 2001; 92: 1085-91.
 111. Lin EY, Gouon-Evans V, Nguyen AV, JW. Pollard. The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2002; 7: 147-62, 10.1023/A:1020399802795.
 112. BM. Kacinski. CSF-1 and its receptor in ovarian, endometrial and breast cancer. *Ann Med.* 1995; 27: 79-85, 10.3109/07853899509031941.
 113. Scholl SM, Pallud C, Beuvon F, Hacene K, Stanley ER, Rohrschneider L, Tang R, Pouillart P, R. Lidereau. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86: 120-6, 10.1093/jnci/86.2.120.
 114. Tsutsui H., Karasawa S., Shimizu H., Nukina N., Miyawaki A. Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter. *EMBO Rep.* 2005; 6: 233-8, 10.1038/sj.embor.7400361.
 115. Kawano M, Mabuchi S, Matsumoto Y, Sasano T, Takahashi R, Kuroda H, Kozasa K, Hashimoto K, Isobe A, Sawada K, Hamasaki T, Morii E, T. Kimura. The significance of G-CSF expression and myeloid-derived suppressor cells in the chemoresistance of uterine cervical cancer. *Sci Rep.* 2015; 5, 10.1038/srep18217.
 116. Okazaki T., Ebihara S., Asada M., Kanda A., Sasaki H., Yamaya M. Granulocyte colony-stimulating factor promotes tumor angiogenesis via increasing circulating endothelial progenitor cells and Gr1+CD11b+ cells in cancer animal models. *Int Immunol.* 2006; 18: 1-9,

10.1093/intimm/dxh334.

117. Greter M, Helft J, Chow A, Hashimoto D, Mortha A, Agudo-Cantero J, Bogunovic M, Gautier EL, Miller J, Leboeuf M, Lu G, Aloman C, Brown BD, et al. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity*. 2012; 36: 1031-46, 10.1016/j.immuni.2012.03.027.
118. Van Overmeire E, Stijlemans B, Heymann F, Keirsse J, Morias Y, Elkrim Y, Brys L, Abels C, Lahmar Q, Ergen C, Vereecke L, Tacke F, De Baetselier P, et al. M-CSF and GM-CSF Receptor Signaling Differentially Regulate Monocyte Maturation and Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res*. 2015; 76: 35-42, 10.1158/0008-5472.CAN-15-0869.

業績

学術論文

1. **Tsubaki T**, Kadonosono T, Sakurai S, Shiozawa T, Goto T, Sakai S, Kuchimaru T, Sakamoto T, Watanabe H, Kondoh G, and Kizaka-Kondoh S, Novel Adherent CD11b+ Gr-1+ Tumor-infiltrating Cells Initiate an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Oncotarget*. 9:11209-11226, 2018. 10.18632/oncotarget.24359
2. Kadonosono T, Yabe E, Furuta T, Yamano A, **Tsubaki T**, Sekine T, Kuchimaru T, Sakurai M, Kizaka-Kondoh S. A fluorescent protein scaffold for presenting structurally constrained peptides provides an effective screening system to identify high affinity target-binding peptides. *PLoS One*. 9:e103397, 2014. 10.1371/journal.pone.0103397.
3. Kadonosono T, Yamano A, Goto T, **Tsubaki T**, Niibori M, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S. Cell penetrating peptides improve tumor delivery of cargos through neuropilin-1-dependent extravasation. *J Control Release*. 201:14-21, 2015. 10.1016/j.jconrel.2015.01.011.
4. Kadonosono T, Yimchuen W, **Tsubaki T**, Shiozawa T, Suzuki Y, Kuchimaru T, Sato Y, Kizaka-Kondoh S. Domain architecture of vasohibins required for their chaperone-dependent unconventional extracellular release. *Protein Sci*. 26:452-463, 2017. 10.1002/pro.3089.

国際学会発表（ポスター）

1. **Tsubaki T**, Goto T, Kadonosono T, Kuchimaru T, and Kondoh S. Imaging analysis of macrophage-like cells on tumor growth and metastasis. P-414, The 18th International Vascular Biology Meeting 2014, April 15, 2014, Kyoto Japan.
2. **Tsubaki T**, Goto T, Sakurai S, Kadonosono T, Kuchimaru T, and Kizaka-Kondoh S. Functional analysis of macrophage-like cells in tumor using optical imaging in vivo. P-250, World Molecular Imaging Congress 2014, September 19, 2014, Seoul, Korea.
3. **Tsubaki T**, Kadonosono T, Shiozawa T, Kuchimaru T, Ushiki T, Masuko M, and Kizaka-Kondoh S. Elucidation of tumor-promoting effects of novel adherent immature myeloid cells in tumor. #3690, 2016 ASH Annual Meeting, December 5, 2016, San Diego, United States.

国内学会発表（口頭）

1. **樁卓也**、桜井史門、塩澤唯、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江「腫瘍内マクロファージ様細胞の機能解析」J-1088、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日 名古屋国際会議場、愛知
2. **樁卓也**、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江「新規接着性ミエロイド細胞による腫瘍悪性化機構の解明」W11-1、第20回日本がん分子標的治療学会学術総会、2016年6月1日 別府国際コンベンションセンター、大分
3. **樁卓也**、門之園哲哉、塩澤唯、口丸高弘、近藤科江「腫瘍内新規接着性ミエロイド細胞による腫瘍悪性化機構の解明」OS-31、平成28年度 先端モデル動物支援 若手技術講習会、2016年9月17日 蓼科グランドホテル滝の湯、長野

国内学会発表（ポスター）

1. **樫卓也**、後藤俊樹、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江「マクロファージ様細胞による腫瘍進行の in vivo イメージング解析」P-2192、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 4 日 パシフィコ横浜、神奈川
2. **樫卓也**、後藤俊樹、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江「マクロファージ様細胞による腫瘍進行の in vivo イメージング解析」ポスター演題 13、第 11 回がんとハイポキシア研究会、2013 年 12 月 14 日 東北大学片平さくらホール、宮城
3. **樫卓也**、後藤俊樹、桜井史門、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江「光イメージングによる腫瘍関連マクロファージの機能解析」P-53、第 9 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2014 年 5 月 22 日 千里ライフサイエンスセンター、大阪
4. **樫卓也**、桜井史門、塩澤唯、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江「In vivo 発光イメージングによる腫瘍関連マクロファージの機能解析」ポスター演題 43、第 12 回がんとハイポキシア研究会、2014 年 11 月 22 日 ホテルマリターレ創世佐賀、佐賀
5. **樫卓也**、桜井史門、塩澤唯、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江「腫瘍内マクロファージ様細胞による悪性化機構の解明」ポスター演題 17、第 13 回がんとハイポキシア研究会、2015 年 6 月 5 日 国立遺伝学研究所 講堂、静岡
6. **樫卓也**、門之園哲哉、塩澤唯、口丸高弘、近藤科江「腫瘍内新規接着性ミエロイド細胞の機能解析」P-3225、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 8 日 パシフィコ横浜 展示ホール、神奈川
7. **樫卓也**、門之園哲哉、塩澤唯、口丸高弘、近藤科江「新規接着性ミエロイド細胞による腫瘍悪性化機構の機能解析」ポスター演題 3、第 14 回がんとハイポキシア研究会、2016 年 11 月 4 日 岐阜グランドホテル、岐阜
8. **樫卓也**、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江「in vivo 光イメージングを用いた新規ミエロイド細胞 F4/80(-)AMC の機能解析」P-28、第 12 回日本分子イメージング学会学術集会、2017 年 5 月 26 日 横浜港 大さん橋ホール、神奈川
9. **樫卓也**、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江「新規接着性ミエロイド細胞の同定とそれによる腫瘍悪性化機構の解析」P-19、第 15 回がんとハイポキシア研究会、2017 年 11 月 11 日 淡路夢舞台国際会議場、兵庫
10. **樫卓也**、門之園哲哉、口丸高弘、近藤科江「担癌マウス生体内に存在する接着性新規免疫細胞の同定と機能解析」、in vivo イメージングフォーラム 2017、2017 年 11 月 22 日 品川コクヨホール、東京

謝辭

本研究を行うに当たり、貴重な研究の場を与えていただくと共に、丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました東京工業大学大学院生命理工学研究科生体分子機能工学専攻 近藤科江 教授に心より感謝申し上げます。

本研究を進める上で、丁寧なご指導に加えて日々の議論を通して様々な知識やご助言を頂きました東京工業大学大学院生命理工学研究科 門之園哲哉 助教、口丸高弘 助教に心より感謝申し上げます。

データの取得および議論にご協力くださった後藤俊樹さん、桜井史門さん、塩澤唯さん、酒井栞さんに感謝致します。

また、貴重な B6 Albino マウスおよび GFP-Tg マウスを提供して頂いた京都大学大学院医学研究科統合生態プロセス分野 近藤玄 教授、渡邊仁美 助教、データに関する議論および研究の進め方に関するご助言をいただいた富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 早川芳弘 教授、東京大学医科学研究科人癌病因遺伝子分野 坂本毅治 助教、細胞の分取にご協力いただいた東大医科学研究所 FACS コアラボラトリーの皆様、DNA シークエンス解析にご協力いただいた東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター 遺伝子実験分野の皆様に感謝申し上げます。

本研究のために犠牲になった多くの実験動物に感謝するとともに、心より哀悼の意を表します。

末筆ではございますが、これまでの学生生活を様々な面から支え、応援してくださった両親ならびに家族に心より感謝し、博士論文の結びとさせていただきます。

2018 年 2 月 2 日

椿 卓也