The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Antitumor effect of Batf2 through IL-12 p40 up-regulation in tumor-associated macrophages
Author(s)	金丸, 央
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69456
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　　金丸　央

論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	審良静男
	副　査	大阪大学教授	竹田潔
	副　査	大阪大学招へい教授	竹田雅俊

論文審査の結果の要旨

近年、悪性腫瘍に対する免疫チェックポイント阻害薬等、一部の免疫療法で有効な治療成績を得ることが可能となってきた。これらの治療において予後良好な因子として腫瘍内浸潤CD8$^+$T細胞の増加が報告されており、マクロファージに代表される自然免疫によるサイトカインの影響が考えられている。そのサイトカイン産生に影響を与える遺伝子として*basic leucine zipper transcription factor ATF-like 2* (*Batf2*)に注目した。B16-F1メラノーマ皮下移植モデルにおいて*Batf2*欠損マウスでは野生型に比べ有意な腫瘍増大が認められ、腫瘍内のIL-12 p40陽性マクロファージとCD8$^+$T細胞の数が減少していることが分かった。このメカニズムについて解析を進めた結果、腫瘍関連マクロファージにおいて、BATF2はIL-12bプロモーター上でNF-κB p50/p65と作用しIL-12 p40の発現を促進することで、腫瘍内のCD8$^+$T細胞の活性化と分裂を促進し、抗腫瘍効果をもたらしていることが示された。以上の点から、本研究はBATF2の抗腫瘍メカニズムを初めて示したものであり、学位の授与に値すると考えられた。

[Format-P02]

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　　名 Name	金丸　央
論文題名 Title	Antitumor effect of *Batf2* through IL-12 p40 up-regulation in tumor-associated macrophages （腫瘍関連マクロファージにおける*Batf2*のIL-12p40発現促進による抗腫瘍効果について）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

近年、悪性腫瘍に対し免疫チェックポイント阻害薬やTLRアゴニスト等、一部の免疫療法で有効な治療成績を得ることが可能となってきた。これらの治療において予後良好な因子として腫瘍内浸潤CD8$^+$T細胞の増加が報告されており、マクロファージに代表される自然免疫によるサイトカインの影響が考えられている。その中でもI型インターフェロン(IFN)は重要な抗腫瘍因子として注目されている。そこで、I型IFNにより誘導される遺伝子が腫瘍免疫に関係している可能性を考え、I型IFN誘導遺伝子の一つである*basic leucine zipper transcription factor ATF-like 2* (*Batf2*)に注目した。*Batf2*はこれまでAP-1抑制因子として考えられてきたが、近年その他にユニークで促進的な転写活性があることが考えられてきており、本研究はその具体的な抗腫瘍メカニズムを明らかにすることを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

B16-F1メラノーマ皮下移植モデルにおいて*Batf2*$^{-/-}$マウスでは野生型(WT)に比べ有意な腫瘍増大が認められ、腫瘍内のIL-12 p40陽性マクロファージとCD8$^+$T細胞の数が減少していることが分かった。また*Batf2*$^{-/-}$マウスの腫瘍内浸潤CD8$^+$T細胞では、抗腫瘍効果を持つサイトカインの一つであるIFN-γと分裂マーカーの一つであるKi-67の発現がWTに比べ有意に減少していることが分かった。また放射線処理後の野生型マウスに、*Batf2*$^{-/-}$マウスもしくはWT由来の骨髄細胞を移植して作成したキメラマウスにおいても上記と同様の結果が確認できた。一方、*Batf2*$^{-/-}$マウスもしくはWT由来のCD8$^+$T細胞を、T細胞が欠損している*Rag2*$^{-/-}$マウスに移植し同じ腫瘍モデルを作成したところ、腫瘍サイズに有意差は認められなかった。このことから、*Batf2*$^{-/-}$マウスでの抗腫瘍効果の減弱はCD8$^+$T細胞以外の骨髄由来細胞が原因であることが考えられた。腫瘍に浸潤している各種免疫細胞の*Batf2*の発現を免疫染色法およびqPCRを用いて調べたところ、腫瘍関連マクロファージにおいて*Batf2*の発現が最も高いことが分かった。そこで、*Batf2*$^{-/-}$マウス由来のbone marrow-derived macrophage (BMDM)を用い、microarray、ELISAおよびqPCRを用いた解析を行ったところ、R848や腫瘍由来RNAといったTLR7リガンドの刺激下でWTに比べIL-12 p40の発現が有意に減少していることが明らかとなった。この結果を踏まえ、Ova peptideでパルスしたBMDMと、OT-Iマウス由来CD8$^+$T細胞をR848の刺激下で共培養を行ったところ、*Batf2*欠損BMDMの存在下ではWTに比べOT-I CD8$^+$T細胞の増殖低下が認められた。対照的に、R848に代えてrecombinant IL-12を加えた条件下で同様に共培養を行ったところ、OT-I CD8$^+$T細胞の分裂についてWTと*Batf2*$^{-/-}$マウス間に有意差は認められなかった。この結果から、*Batf2*$^{-/-}$マウスの腫瘍浸潤CD8$^+$T細胞の減少はマクロファージによるIL-12 p40の発現低下による可能性が考えられた。そこで、WTと*Batf2*$^{-/-}$マウスの腫瘍モデルを用い、recombinant IL-12もしくは抗IL-12 p40中和抗体を投与する実験を行った。その結果、recombinant IL-12はWTと*Batf2*$^{-/-}$マウス両方の腫瘍サイズを有意に抑制した一方、抗IL-12 p40中和抗体を投与した場合はWTと*Batf2*$^{-/-}$マウス間で認められていた腫瘍サイズの有意差が消失した。このことから*Batf2*$^{-/-}$マウスの抗腫瘍効果の減弱はIL-12 p40の発現低下による可能性が示唆された。これらの結果から、BATF2がIL-12bのプロモーター上で転写因子として促進的に関与している可能性を考え、IL-12bのプロモーターの下流にluciferaseをリンクさせたベクターを用いluciferase-reporter assayを行った。その結果、emptyベクターに比べBATF2を過剰発現させた細胞ではLPSもしくはR848存在下でluciferaseが有意に増強されることが分かった。さらに、IL-12bプロモーターの欠失/置換変異を用いたluciferase-reporter assay、DNA-binding assay、EMSA、クロマチン免疫沈降法、共免疫沈降法およびwestern blottingを用いた解析から、BATF2はNF-κB p50/p65に作用し、IL-12bプロモーター上のNF-κB結合領域を通してIL-12 p40の発現を促進することが分かった。

〔総　括(Conclusion)〕

腫瘍関連マクロファージにおいて、TLR7シグナルにより誘導されたBATF2は、IL-12bプロモーター上でNF-κB p50/p65と作用しIL-12 p40の発現を促進することで、腫瘍内のCD8$^+$T細胞の活性化と分裂を促進し、抗腫瘍効果をもたらしていることが示された。