

がん浸潤性免疫抑制細胞のがん組織集積におけるイオンチャネルの役割解明

名古屋市立大学大学院

医学研究科 大学院生 松井 未来

名古屋市立大学大学院

医学研究科 教授 大矢 進

研究員 梶栗 潤子

1. 研究の背景・目的

生体では、細胞傷害性 T 細胞が「がん細胞免疫監視機構の維持（強化）」の役割を担っている。一方、がん微小環境（tumor microenvironment, TME）では、がん関連マクロファージ（tumor-associated macrophage, TAM）、制御性 T 細胞（regulatory T cell, T_{reg} ）、ミエロイド系抑制細胞（myeloid-derived suppressor cell, MDSC）等の免疫抑制細胞群が腫瘍内に浸潤してがん免疫監視機構を抑制すると、「免疫監視機構からの逃避」が成立する¹⁻³。がん細胞の転移能増強、幹細胞化、抗がん剤耐性獲得などのがん悪性化には、がん浸潤性免疫抑制細胞群の浸潤・集積が関与しており、臨床的には、がん浸潤性免疫抑制細胞群の浸潤・集積密度が高い症例ほどがん悪性度が高く、予後が不良である³。

イオンチャネルは、免疫系細胞の増殖、分化、移動、サイトカイン産生、遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている。TME では、がん細胞だけでなく浸潤した非がん細胞群が低酸素、低栄養、高カリウム、高乳酸に曝露される⁴。最近、TME における死細胞による異常な細胞外カリウム濃度上昇（細胞内カリウムホメオスタシス異常）に起因する免疫監視機構の破綻が報告され⁵、TME における「カリウムイオン駆動性細胞内シグナル制御」という新概念が生まれた。

我々は、「がん免疫研究」に着手する中で、TAM、 T_{reg} 、MDSC、等のがん免疫抑制細胞群のサイトカイン・ケモカイン産生能とそれらの TME への浸潤・集積能におけるイオンチャネル、特に、カリウムチャネル、クライドチャネルの役割を解明することが、がん悪性化の克服に繋がるのではないかと考えた。また、TME における高カリウム環境への曝露が免疫監視機構の破綻に関与しており、イオンチャネル活性制御による細胞内イオンホメオスタシス維持ががん悪性化の克服に繋がるのではないかと考えた。

本研究の目的は、TME に集積してがん細胞免疫監視機構を脆弱化するがん浸潤性免疫抑制細胞におけるイオンチャネルの病態的役割とがん免疫賦活薬の標的としてのイオンチャネルの潜在性を明らかにすることである。がん浸潤性免疫抑制細胞が産生するがん悪性化因子の発現・産生におけるイオンチャネルの役割を解明することで、がん免疫療法の新戦略を提案する。

2. 研究の対象ならびに方法

(1) 細胞培養と M₂ マクロファージへの分化

ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100ng/mL) で 8 時間処理することにより、M₀ マクロファージへの分化を誘導した。培地除去後、細胞を IL-4 と IL-13 (各 20 ng/mL) を添加した RPMI-1640 培地で 72 時間インキュベートし、M₂ マクロファージに分化誘導した^{6,7}。

(2) リアルタイム PCR アッセイ

リアルタイム PCR アッセイ用の遺伝子特異的プライマーは、Primer Express™ software (Ver 1.5, Thermo Fisher Scientific) を用いて設計した。リアルタイム PCR は Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs Japan) を用い、ABI 7500 real-time PCR instrument (Applied Biosystems) で行った⁷。標準曲線を作成し、標的遺伝子の発現量を β -アクチン (ACTB) に対する比として算出した。

(3) ウェスタンブロット

分化誘導した THP-1 細胞から RIPA 緩衝液で全細胞溶解液を抽出した。等量のタンパク質を SDS-PAGE に供した。、トランスファーしたフィルターを用いて各種抗体でイムノブロッティングし、抗ウサギまたは抗マウス HRP 標識 IgG 二次抗体で染色した。ECL Advance 化学発光試薬キットとは Amersham Imager 600 (GE Healthcare Japan) を用いて画像解析した⁷。シグナルの光学密度を ImageJ ソフトウェア (Ver.1.42, NIH, USA) を用いて算出した。

(4) ELISA によるサイトカイン産生の定量解析

培養上清中のヒト CCL2 濃度は、Human CCL2 Uncoated ELISA キットを用いて測定した⁷。吸光度は、マイクロプレートリーダー SpectraMax 384 (Molecular Devices Japan) を用い、試験波長 450 nm で測定した。

(5) Nrf2 細胞質局在の共焦点イメージング解析

単離した細胞をホルマリン固定し、CytoFix/Perm キットを用いて透過処理した。P-Nrf2 及び Nrf2 抗体を Alexa Fluor 488 標識二次抗体で標識した。ガラスボトムディッシュへの播種後、共焦点レーザー走査型顕微鏡システム (Nikon A1R) を用いて蛍光画像を可視化した⁷。画像データは、ImageJ ソフトウェアを用いて定量的に解析した。

(6) 統計解析

統計解析は、統計ソフト XLSTAT を用いて行った。2 群間および複数群間の差の有意性を評価するために、Unpair/Pair Student *t* 検定、または Tukey の検定を伴う一元配置分散分析を用いた。P<0.05 を有意とみなした。平均値±標準誤差で示した。

3. 研究結果

(1) M₂分化マクロファージ (M₂-MAC) における K_{Ca}3.1 K⁺チャネル活性化と LRRC8A Cl⁻チャネル阻害による CCL2 の発現と産生の抑制

以前の報告と同様に⁷、M₂-MAC における M₂ マーカー遺伝子 CD163、アルギナーゼ 1 (ARG1)、CCL22 の発現を確認した。CCL2 は、がん随伴マクロファージ (TAM) や他の免疫抑制細胞のがん組織への浸潤に関与する主要なケモカインであり、腫瘍の成長、血管新生、転移の過程に寄与している。まず、M₂-MAC における K_{Ca}3.1 活性化と LRRC8A 阻害の CCL2 転写への影響を検討した。M₂-MAC における CCL2 の mRNA 発現レベルは、K_{Ca}3.1 活性化薬 SKA-121 (10 μM) で 12 時間処理することによって有意に低下した。また、CCL2 産生は、SKA-121 で 24 時間処理することにより有意に減少した。同様に、CCL2 発現と産生は、LRRC8A 阻害薬 endovion (10 μM) 処理により有意に減少した。

(2) M₂-MAC における細胞外高濃度 K⁺曝露による CCL2 発現の亢進とそれに対する K_{Ca}3.1 活性化薬および LRRC8A 阻害薬の効果

固形がん周辺の微小環境では、虚血状態により惹起されるがん細胞死により細胞内 K⁺が漏出し、細胞外の K⁺濃度が上昇する。実験的高 K⁺環境 (30 mM) により、M₂-MAC の細胞内 K⁺濃度は有意に上昇し (1.5 倍程度)、それに伴い、CCL2 の mRNA 発現レベルは、20 倍程度上昇した。上昇した CCL2 は、(1) の結果と同様に、K_{Ca}3.1 活性化薬および LRRC8A 阻害薬で処理することにより、有意に抑制された。

(3) M₂-MAC における ERK 阻害、JNK 阻害、NOX2 阻、Nrf2 阻害薬による CCL2 の発現と産生の抑制転写

以前、M₂-MAC において、K_{Ca}3.1 活性化薬が ERK および JNK シグナル経路を阻害すること、LRRC8A 阻害薬が NOX2-Nrf2-CEBPB 経路を抑制することにより、いずれも IL-8 および IL-10 の転写を抑制することを報告した^{7,8}。本研究において、M₂-MAC を ERK 阻害薬 SCH772984 (1 μM)、JNK 阻害薬 SP600125 (1 μM)、NOX2 阻害薬 GSK2795039 (10 μM)、Nrf2 阻害薬 ML385 (5 μM) で 12 時間処置したところ、それぞれ CCL2 発現を有意に抑制した。

また、Alexa488 で蛍光標識したリン酸化 Nrf2 (P-Nrf2) で固定した M₂-MAC を免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、核における P-Nrf2 局在が観察され、30 mM KCl 曝露によって P-Nrf2 シグナルが有意に増大した。

(4) M₂-MAC における高濃度 K⁺曝露による CCL2 発現の亢進に関与する可能性のある細胞内シグナル経路

高濃度 K⁺曝露による CCL2 転写亢進に関わる上記以外のシグナル経路を薬理的に検討したところ、AMP 活性化リン酸化酵素 (AMPK)、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC3)、転写因子 CREB2 が関与することが示唆された。詳細については、現在検討中である。

また、M₂-MAC を高濃度 Mg²⁺ (20 mM) に曝露したところ、CCL2 の mRNA 発現レベルが上昇した。高濃度 Mg²⁺ (20 mM) に曝露により上昇した CCL2 も K_{Ca}3.1 活性化薬および LRRC8A 阻害薬で処理することにより、有意に抑制された。

4. 考察

本研究により、免疫抑制細胞をがん組織に動員し、免疫抑制性の環境を形成することでがん細胞免疫監視機構からの逃避を助長する CCL2 の発現・産生が、TAM モデルの M₂ 型マクロファージにおいて、K_{Ca}3.1 活性化薬や LRRC8A 阻害薬により異なるシグナル経路を介して抑制されることを明らかにした。また、これらの薬物は、TME を模した高 K⁺環境下における CCL2 の発現亢進も有意に抑制した。

TME に高密度に集積して免疫監視機構を抑制するがん促進系のがん免疫抑制細胞群が、がん悪性化メカニズムの解明とがん創薬戦略のターゲットとして期待されている。また、CCL2 は TME における重要な調節因子であり、CCL2-CCR2 軸を標的としたがん治療戦略

は、新しいがん治療戦略として注目されている。本研究では、がん免疫抑制細胞群の機能調節におけるイオンチャネルおよびイオン駆動性細胞内シグナル制御分子に着目しており、がん研究において新局面を拓く独創的かつ新規性の高い研究への繋がる可能性が期待される。

5. 文献

1. Boutilier A.J., Elsawa S.F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6995 (2021).
2. Lin Y., Xu, J., Lan, H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J. Hematol. Oncol.* 12, 76 (2019).
3. Mantovani A., Allavena P., Marchesi F., Garlanda C. Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 21, 799-820 (2022).
4. Prevarskaya N., Skryma R., Shuba Y. Ion channels in cancer: Are cancer hallmarks oncochannelopathies? *Physiol. Rev.* 98, 559-621 (2018).
5. Eil R., Vodnala S.K., Clever D., Klebanoff C.A., Sukumar M., Pan J.H., Palmer D.C., Gros A., Yamamoto T.N., Patel S.J., Guittard G.C., Yu Z., Carbonaro V., Okkenhaug K., Schrumpp D.S., Linehan W.M., Roychoudhuri R., Restifo N.P. Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature.* 537, 539-543 (2016)
6. Genin M., Clement F., Fattaccioli A., Raes M., Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer.* 15, 577 (2015).
7. Ohya S., Matsui M., Kajikuri J., Kito H., Endo K. Down-regulation of IL-8 and IL-10 by the activation of Ca^{2+} -activated K^{+} channel $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ in THP-1-derived M_2 macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 8603 (2022).
8. Matsui M., Kajikuri J., Kito H., Elboray EE, Suzuki T, Ohya S. Downregulation of IL-8 and IL-10 by LRRC8A inhibition through the NOX2-Nrf2-CEBPB transcriptional axis in THP-1-derived M_2 macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 9612 (2024).

6. 論文発表

(1) 投稿予定論文

1. Matsui M., Kajikuri J., Kito H., Yamaguchi Y., Ohya S.
Transcriptional repression of CCL2 by $K_{Ca}3.1$ K^+ channel activation and LRRC8A Cl^- channel inhibition in THP1-derived M_2 macrophages

(2) 学会発表

1. 松井未来, 梶栗潤子, 鬼頭宏彰, 山口陽平, 大矢進
 Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル $K_{Ca}3.1$ 活性化による免疫抑制性マクロファージの極性化に
関与する CCL2 の発現・産生抑制
第 98 回日本薬理学会年会. 2025 年 3 月 18 日 (千葉)
2. Miki Matsui, Junko Kajikuri, Hiroaki Kito, Yohei Yamaguchi, Susumu Ohya
Down-regulation of IL-8 and IL-10 by the inhibition of LRRC8A through NOX2-Nrf2-
CEBPB axis in THP-1-derived M_2 macrophages
Ion Channel Modulation Symposium (ICMS 2025 Tokyo).
2025 年 5 月 29、30 日 (東京) (発表予定)