

IFN- γ 応答を一細胞レベルで定量する
バイオセンサーの開発

田中 泰生

目次

要旨	3
略語表	4
序論	5
IFN- γ と腫瘍免疫	5
腫瘍免疫	5
腫瘍微小環境	6
IFN- γ の機能	6
IFN- γ シグナル伝達経路	6
IFN- γ シグナルの定量的可視化の意義、戦略、課題	7
生体イメージング	8
蛍光プローブと二光子顕微鏡を用いた生体イメージング	8
発光を用いた生体イメージング	8
本研究の目的	8
材料と方法	9
試薬と抗体	9
使用したプラスミドとその構築	9
細胞培養	11
トランスフェクションと安定発現細胞株の樹立	11
CRISPR/Cas9 による遺伝子欠損細胞の樹立	12
フローサイトメトリー解析	13
ISP の活性評価	13
落射蛍光顕微鏡を用いた培養細胞のイメージング	13
細胞増殖アッセイ	14
抗 STAT1 抗体によるウエスタンブロッティング	14
マウス	15
皮下担がん	15
がんの破碎とフローサイトメトリー解析	15
発光イメージング	15
二光子顕微鏡を用いたがんの生体内イメージング	15
データ解析	17
結果	18
STAT1 バイオセンサーの開発と評価	18
STAT1-YPet は IFN- γ に応答して核へ移行する	18
STAT1-Fluoppi は IFN- γ に応答して核へ移行し、蛍光凝集点を形成する	18
STAT1 バイオセンサーの IFN- γ 応答は付加する蛍光タンパク質の種類に依存しない	20
STAT1-YPet は発現量が低いほど核内へ移行しやすい	20
核内マーカーを付加した STAT1-YPet は IFN- γ に応答して核へ移行する	21
IFN- γ 依存的転写因子の活性をモニターするバイオセンサーの開発と評価	23

GAS、ISRE は IFN- γ に応答して転写活性を示す	23
ISP の mCherry 発現は IFN- γ 依存的であり、Turquoise-GL 発現は IFN- γ 非依存的である	24
ISP は双方向性プロモーターにより、IFN- γ 応答定量の細胞間のばらつきを減少させる	25
<i>Ifngr1</i> ノックアウトにより、IFN- γ 依存的な ISP 活性上昇は消失する	27
ISP は様々な細胞種で IFN- γ 刺激に対する濃度依存的活性上昇を示す	27
IFN- γ に対する感受性及び ISP の活性上昇度は細胞種により異なる	28
ISP の生体内利用	30
STAT1 バイオセンサーを発現する <i>Braf</i> ^{V600E} 細胞は、担がん後 5 日で STAT1 の核内移行を呈する	30
ISP-GAS はマウス生体内において IFN- γ 受容体依存的な活性上昇を示す	30
<i>Gnaq</i> 遺伝子欠損 <i>Braf</i> ^{V600E} 細胞が形成する腫瘍微小環境では IFN- γ 応答増強が観測される	31
考察	35
STAT1 バイオセンサーの核内移行は細胞の IFN- γ 初期応答を一細胞レベルで可視化する	35
ISP はがん細胞の IFN- γ 応答を一細胞レベルで可視化する	35
生物発光は IFN- γ 応答の経時的モニタリングに有用である	36
ISP は IFN- γ に対する生物学的挙動を予測する	36
ISP-ISRE は、IFN- γ 非依存的な活性上昇を呈す	36
結語と展望	37
謝辞	38
参考文献	39

要旨

免疫細胞が分泌する IFN (Interferon)- γ は腫瘍免疫における重要なエフェクター分子のひとつであり、がん細胞に作用して多角的な効果を発揮する。しかし腫瘍微小環境における IFN- γ の時空間的な広がりに関する情報は未だ明らかになっておらず、IFN- γ 応答を一細胞の分解能で可視化するツールも成熟していない。

本研究ではがん細胞における IFN- γ 応答を可視化する新規ツール開発を目指した。STAT1 が IFN- γ に応答してリン酸化し、ホモ二量体を形成して核内へ移行することに着目し、STAT1 の cDNA に蛍光タンパク質を付加した融合タンパク質を細胞に導入した。その結果、導入した STAT1 バイオセンサーが IFN- γ に応答して核内へ移る様子が観察され、定量的評価が可能となった。

また、IFN- γ に応答して核内へ移行した STAT1 が下流因子の転写を開始することに着目し、IFN- γ 応答プロモーター活性を生物発光及び蛍光で検出する IFN- γ センシングプローブ(ISP)を作製した。ISP は IFN- γ 応答プロモーターと PGK 安定発現プロモーターを双方向に組み合わせた構造をとる。IFN- γ シグナルに応答して赤色蛍光タンパク質 mCherry と生物発光酵素 Akaluc を発現し、IFN- γ 応答プロモーター活性を生物発光及び蛍光で検出することができる。加えて、PGK プロモーター下でシアン色蛍光タンパク質 Turquoise-GL を安定的に発現し、ゲノム内挿入サイトの影響を補正することが可能である。5 種類の IFN- γ 応答プロモーターを比較した結果、GAS (Gamma-interferon activation site)及び ISRE (Interferon-stimulated response element)が IFN- γ に応答したプロモーター活性を示すことがわかった。これらを組み込んだ ISP を 4 種類の細胞に導入して IFN- γ 刺激を *in vitro* で与えたところ、すべての細胞種で ISP の活性上昇が見られ、かつその上昇度合いには IFN- γ に対する濃度依存性が見られた。また、これら 4 種類の細胞を IFN- γ で刺激した際、IFN- γ に対する感受性及び ISP の活性度合いが細胞種により異なることがわかった。

作製した STAT1 バイオセンサー及び ISP-GAS 発現がん細胞の皮下への同種移植モデルを利用することにより、生体マウスにおける移植がんの IFN- γ 応答可視化を試みた。STAT1 バイオセンサーを発現する Braf^{V600E} 細胞を皮下担がんしたところ、担がん後 5 日の時点で STAT1 バイオセンサーが核内に集積している様子が観察された。ISP-GAS を発現する B16F10 細胞を皮下担がんしたところ皮下担がん後 7 日の時点で IFN- γ 依存的な ISP-GAS 活性上昇を発光イメージングにより認めた。またこのとき、二光子顕微鏡観察及びフローサイトメトリーによる蛍光検出によりがんの IFN- γ 応答を一細胞レベルで検出することに成功した。

以上のことから、STAT1 バイオセンサーは IFN- γ 初期応答を、ISP-GAS は IFN- γ 二次的応答を可視化するバイオセンサーであることが示され、特に双方向性プロモーターを導入した ISP-GAS は、バイオセンサーのゲノム内挿入サイトの影響を克服しうる新規ツールとして有用であることが示された。

略語表

CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins 9
Fluoppi	Fluorescent based technology detecting Protein-Protein Interaction
GAF	Gamma-interferon activation factor
GAS	Gamma-interferon activation site
GqPCR	Gq protein-coupled receptor
IFN- γ	Interferon-gamma
IFNGR	Interferon-gamma receptor
IRES	Internal ribosome entry site
IRF1	Interferon regulatory factor 1
ISP	Interferon-gamma sensing probe
ISRE	Interferon-stimulated response element
JAK	Janus kinase
Ly-6E	Lymphocyte antigen 6E
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIG	Monokine induced by interferon-gamma
MinP	Minimal promoter
NA	Nuclear accumulation
NLS	Nuclear localization signal
PB1	Phox and Bem1p
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PGK	3-phosphoglycerate kinase
SH2	Src-homology 2
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
SV40	Simian virus 40
WPRE	Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
YPet	Yellow fluorescent protein for energy transfer
cDNA	Complementary DNA
mAG	Monomeric azami green
mRNA	Messenger RNA
sfGFP	Superfolder green fluorescent protein
sgRNA	Single-guide RNA

序論

IFN- γ と腫瘍免疫

腫瘍免疫

免疫は体内に存在する異物から生体を守り、正常に保つのに重要な役割を担う。免疫は、異物を「非自己」として認識することに端を発し、免疫の役割を担う多様な免疫細胞や物質が協働しながら、異物を排除しようとする。免疫は、常に体内を監視しながらいち早く異物を感知し、直ちに排除する自然免疫系と、監視の過程で得られた異物情報をもとに対象の異物を特異的に見分け、効率的に排除する獲得免疫系とに大別される。それぞれの免疫系においては異なる免疫細胞が関与し、複雑なネットワークを形成している。

免疫が異物として認識し排除するものの一つに、がん細胞がある。がん細胞は、遺伝子変異が蓄積して無秩序に増殖するようになった異常な細胞である。自身の細胞由来であるがん細胞も、遺伝子変異に伴う異常タンパク質の発現などにより異物として認識され、免疫により排除されている。この異常なタンパク質は細胞内でペプチドまで分解され、MHC クラス I 分子とともにがん細胞表面に露出される。これを細胞傷害性 T 細胞などの免疫反応が認識すると、がん細胞への攻撃が始まる。しかしがん細胞は、常に性質を変化させながら、免疫によるパトロールや攻撃から逃れる仕組みを獲得する。がんに対する免疫反応は、免疫細胞による攻撃と、がん細胞による逃避反応のせめぎあいの結果として理解される。

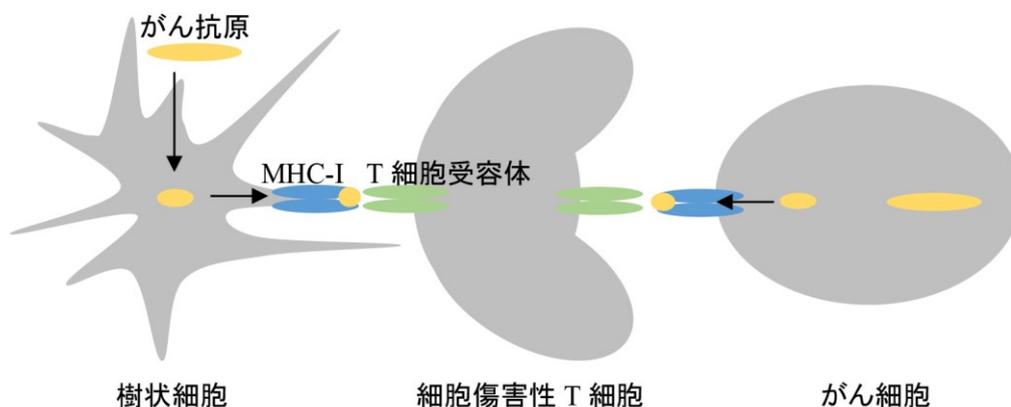


図 1 がん細胞を攻撃する免疫応答の例

樹状細胞が取り込んだがん細胞由来抗原は細胞内で短いペプチドに分解され、MHC クラス I 分子との複合体として細胞表面に運ばれる。T 細胞受容体を介してこの MHC クラス I 分子複合体を特異的に認識する細胞傷害性 T 細胞が樹状細胞と結合すると、細胞傷害性 T 細胞が活性化される。活性化された細胞傷害性 T 細胞は同じ抗原を発現するがん細胞、すなわちこの細胞傷害性 T 細胞が特異的に認識できるがん細胞を探し出し、攻撃を加えるようになる。

腫瘍微小環境

がん細胞が免疫による監視と排除から逃れた場合、がん細胞は増殖し、腫瘍組織を形成する。腫瘍組織は、繊維芽細胞、血管内皮細胞などがん細胞の周囲に混在する正常組織や、免疫細胞、分泌物質など様々な細胞・非細胞成分から構成され、総体として腫瘍微小環境と呼ばれる。がんの増殖や転移のしやすさは、がん細胞自体の性質だけではなく、がん細胞と腫瘍微小環境との相互関係もまた関わっている。たとえば腫瘍微小環境中のがん細胞は、プロスタグランジン E2 の放出により免疫細胞の働きを抑制しており、この機構は血管内皮細胞から分泌されるトロンボキサン A2 ががん細胞に働くためであることが示されている(Bonavita *et al.*, 2020; Konishi *et al.*, 2021; Zelenay *et al.*, 2015)。このように腫瘍免疫応答を明らかにするためには、がん細胞や免疫細胞そのものの性質だけでなく、それらが複雑に絡み合ったシステム全体を包括的に理解する必要がある。

IFN- γ の機能

IFN- γ は免疫細胞から分泌されるサイトカインの一種であり、腫瘍免疫において重要な役割を担う。IFN- γ は腫瘍微小環境において抗腫瘍免疫反応に寄与する(Dighe *et al.*, 1994; Kaplan *et al.*, 1998)。IFN- γ はがん細胞に直接作用して細胞死を誘導したり、細胞周期抑制を引き起こしたりすることにより、腫瘍の成長を抑制する(Bromberg *et al.*, 1996; Chin *et al.*, 1997; Chin *et al.*, 1996; Fulda and Debatin, 2002)。さらに IFN- γ は、がん細胞の MHC クラス 1 分子依存的な抗原提示能を増強させ、それにより細胞傷害性 T 細胞による攻撃を受けやすくする(Meunier *et al.*, 2005)。

しかしながら一方で、IFN- γ は腫瘍成長促進にも関与していることが報告されている(Beatty and Paterson, 2000; Taniguchi *et al.*, 1987)。IFN- γ はがん細胞の表面に PD-L1 などの免疫チェックポイント阻害分子を発現させ、腫瘍に浸潤している細胞傷害性 T 細胞からの免疫逃避に寄与する(Dong *et al.*, 2002; Freeman *et al.*, 2000; Garcia-Diaz *et al.*, 2017)。また、IFN- γ はがん細胞のゲノム不安定性を高め、免疫反応を回避する能力を与えうる可能性が報告されている(Takeda *et al.*, 2017)。

このように IFN- γ ががん細胞にもたらす影響は分子生物学的、細胞生物学的に理解されてきたものの、抗腫瘍免疫応答及び腫瘍促進応答という矛盾した効果をもたらす点に関しては、依然として腫瘍免疫研究上の重要な争点となっている。

IFN- γ シグナル伝達経路

IFN- γ の生物学的効果は、主に JAK-STAT 経路を介した細胞内分子シグナルネットワークの活性化によって惹起され、この経路は多くの遺伝子の転写を調節し、多様な生体反応を媒介する(Castro *et al.*, 2018)。IFN- γ による細胞内分子シグナルネットワークの活性化はまず、IFN- γ がその受容体に結合することから始まる。IFN- γ 受容体はリガンド結合能を持つ IFNGR1 鎖 2 本と、シグナル伝達能を持つ IFNGR2 鎖 2 本により構成される。IFNGR1、IFNGR2 の細胞内ドメインにはそれぞれ、JAK1、JAK2 が構成的に結合している。IFN- γ の結合に伴い、JAK2 の自己リン酸化と活性化が誘導される。JAK2 によりリン酸化され活性化した JAK1 は、各 IFNGR1 鎖のチロシン残基をリン酸化し、STAT1 の SH2 ドメインと隣接する 2 つのドッキング部位を形成する。STAT1 は、JAK1 及び JAK2 によって C 末端に位置する 701 番目のチロシン残基でリン酸化され、その結果、ガンマ活性化因子(GAF)として知られる STAT1 ホモダイマー複合体が形成される。この複合体が受容体から解離して核に移行し、インターフェロン活性化配列に結合するこ

とで遺伝子発現を制御する。

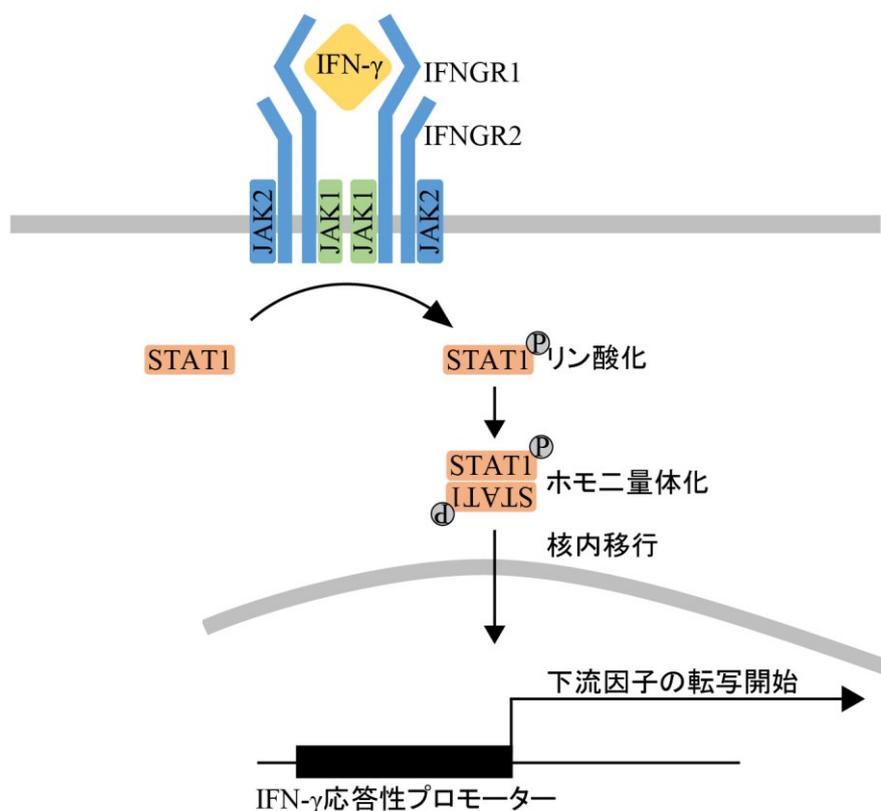


図2 IFN- γ シグナル伝達経路の概略図

IFN- γ シグナルの定量的可視化の意義、戦略、課題

腫瘍免疫の複雑性を理解するためには、細胞間のコミュニケーションを定量的に解析する必要がある(Altan-Bonnet and Mukherjee, 2019)。腫瘍免疫における IFN- γ の効果に着目する場合、腫瘍微小環境における IFN- γ の時空間的な広がりを分析することが重要である。生体内における IFN- γ の産生を直接可視化することは、その時間的変化及び組織特異性を巨視的に理解するのに有用である(Reynolds *et al.*, 2019)。IFN- γ が細胞傷害性 T 細胞から分泌される場合、細胞傷害性 T 細胞と標的細胞との間に形成される免疫シナプスを介して方向性を持って分泌されることが知られている(Huse *et al.*, 2006)。このことから IFN- γ は腫瘍微小環境中において局所的な活性をもたらすことが期待される。免疫シナプスに向かって放出された IFN- γ が周辺に漏れ込み、標的細胞周辺の細胞もまた、この活性の影響を受ける可能性が報告されている(Sanderson *et al.*, 2012; Trubiani *et al.*, 1994)。このとき、がん細胞における IFN- γ 応答を一細胞の分解能で可視化するツールが求められる。この目的のために、IFN- γ が活性化する JAK-STAT シグナル伝達経路は IFN- γ に対するがん細胞の応答を可視化するための汎用的な指標となり得る。例えば STAT1 の核内移行は、IFN- γ 刺激に対する初期応答の指標として用いることができる(Samsonov *et al.*, 2013; Sanderson *et al.*, 2012; Thibaut *et al.*, 2020)。また、STAT1 によって誘導される転写活性を蛍光タン

パク質の発現により定量することが可能である(Hoekstra *et al.*, 2020)。既存のバイオセンサーは、集積部位効果や導入遺伝子のコピー数に左右されるため、IFN- γ 活性を定量的に比較するためには、蛍光および生物発光信号を標準化する必要がある。

生体イメージング

蛍光プローブと二光子顕微鏡を用いた生体イメージング

生体イメージングは、組織や臓器の内部を生きた状態のまま観察し、細胞や分子の動態を解析する手法である。核磁気共鳴を利用した MRI、放射線を利用した PET や CT などと比較して、蛍光タンパク質を用いた蛍光生体イメージングは、観察したい細胞や分子に蛍光標識を付加することによって、生体内現象を高分解能で、時空間的情報として得ることができる(Key and Leary, 2014)。近年広く用いられるようになった二光子顕微鏡は、透過性の高い長波長領域のレーザー光を用い、焦点面のみで蛍光分子が励起されるため、従来の蛍光顕微鏡に比べ、深い組織での低侵襲で長時間のイメージングを可能にした(Schiessl and Castrop, 2016)。赤外線領域のレーザーを励起光として使用するため組織透過性に優れており、かつ二光子励起現象が焦点のみで起こるために蛍光の褪色や光毒性が比較的抑えられるという利点がある。また、長期間のイメージングに伴う技術的課題も多くあった。イメージングウィンドウなどのイメージング環境改良などにより、これらの問題はある程度克服されつつある(Bardehle *et al.*, 2013; Kienast *et al.*, 2010; Ritsma *et al.*, 2013)。

発光を用いた生体イメージング

光を用いたイメージング技術では、蛍光の他に生物発光も用いられる。生物発光はホタルやウミシイタケなどに見られるような生物が発光する現象であり、基質であるルシフェリンと酵素のルシフェラーゼの化学反応により生じる。観察したい細胞や分子にルシフェラーゼを付加しておき、ルシフェリンを加えることで発光検出が可能となる。蛍光生体イメージングにおいては観察対象を光で励起するのに対し、発光生体イメージングにおいては励起光が不要である一方、光放射反応を惹起するためのルシフェリンの投与が必要である。蛍光生体イメージングでは励起光が届かない場所の観察はできないが、発光生体イメージングでは体内深部においても観察が可能である。光毒性も問題とはならず、長期間にわたるイメージングが可能である。近年では基質及び発光の組織透過性を向上させることで生体での汎用性と検出感度の向上を実現した AkaBLI システム(Iwano *et al.*, 2018)が開発されるなど、汎用性の高い生物発光イメージング技術が進んでいる。

本研究の目的

本研究ではがん細胞における IFN- γ 応答を定量的に可視化する新たなバイオセンサーを開発することを目的に、STAT1 タンパク質に蛍光タンパク質を付加したバイオセンサー、及び STAT1 が制御する下流因子の転写活性を蛍光及び生物発光で検出するバイオセンサーを作製した。さらにこのバイオセンサーを用いて、マウス生体に移植したがんの IFN- γ 応答を可視化することを試みた。

材料と方法

試薬と抗体

試薬	製造元	
IFN- γ	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	
一次抗体	製造元	製品番号
Stat1 (D1K9Y) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology	#14994
二次抗体	製造元	製品番号
IRDye 680LT Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	LI-COR	#926-68021

使用したプラスミドとその構築

本研究で用いたプラスミドは以下の通りである。

プラスミド名	入手元
pCMV-mPBase	Allan Bradley (Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge) (Yusa <i>et al.</i> , 2009)
pCMV-VSV-G-RSV-Rev	三好浩之(理化学研究所)(Miyoshi <i>et al.</i> , 1998)
psPAX2	Addgene 製品番号#12260
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)	Addgene 製品番号#48139
pEFBOS-STAT1	生田宏一(京都大学 ウイルス・再生医科学研究所)
pCAGGS-scFv-GCN4-sfGFP-GB1	所属研究室作製
pCAGGS-His-Ras-Venus	所属研究室作製
pCAGGS-mCitrine-Rab5	所属研究室作製
3536NES-nTurquoise2GL	所属研究室作製
pPBbsr2-nTurquoiseGL-NLS	所属研究室作製
pPBbsr2-Ypet	所属研究室作製
pPBbsr2-mEGFP	所属研究室作製
pCX4puro-ASH-EV-RafRBD-P2A-hAG-HRasWT	所属研究室作製
pKUNOE-MCS	所属研究室作製

CRISPR/Cas9 により *Ifngr1* 遺伝子のノックアウトに用いるためのプラスミド作製のため、SpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)を制限酵素 BbsI で切断し、sgRNA 配列(5'-CTGATGCTGTCTGCGAAGGT-3')を含むオリゴ DNA をライゲーション反応により組み込んだ。

STAT1 バイオセンサー構築のため、マウス STAT1 cDNA(pEFBOS-STAT1 由来)に様々な蛍光タ

ンパク質タグ(YPet: pPBbsr2-Ypet 由来、sfGFP: pCAGGS-scFv-GCN4-sfGFP-GB1 由来、Venus: pCAGGS-His-Ras-Venus 由来、Citrin: pCAGGS-mCitrine-Rab5 由来、mEGFP: pPBbsr2-mEGFP 由来)及び homoFluoppi システムタグ(mAG、PB1 からなる。pCX4puro-ASH-EV-RafRBD-P2A-hAG-HRasWT 由来。)を付加した。これらを細胞内で発現させるベクター作製のため、pPB piggyBac トランスポゾンベクター(Yusa et al., 2009)に挿入した。

ISP 構築のため、赤色蛍光タンパク質 mCherry (Shaner *et al.*, 2004)と生物発光酵素 Akaluc (Iwano *et al.*, 2018)の融合タンパク質をコードする cDNA を、最小限プロモーター(MinP)及び下表に示したいずれかの応答因子の繰り返し配列で構成される IFN- γ 応答プロモーターの下流に配置した。Akaluc cDNA の下流には、転写される mRNA の安定性を高める WPRE 配列(Klein *et al.*, 2006)を挿入した。また、IFN- γ 応答プロモーターの直上にはインシュレーター配列を挟み、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーター(Adra *et al.*, 1987)下で Turquoise-GL (Komatsu *et al.*, 2011)を発現する遺伝子カセットを逆向きに挿入した。Turquoise-GL が核内に局在するよう、Turquoise-GL には SV40 ラージ T 抗原由来の核移行シグナル(NLS: PKKKRKV)(Kalderon *et al.*, 1984)を付加した。さらにこの下流には、ISP を安定的に発現する細胞株の薬剤選択を目的として、IRES 配列をはさみ Blasticidin S 耐性遺伝子を配置した(Yusa *et al.*, 2009)。このバイオセンサーを、IFN- γ sensing probe の頭文字をとって ISP と名付けた。ISP を細胞内で発現させるベクター作製のため、ISP を pPB piggyBac トランスポゾンベクター(Yusa *et al.*, 2009)及びレンチウイルスベクター-pKUNOE-MCS に挿入した。

応答因子名	配列	繰り返し数	由来
GAS	AGTTTCATATACTCTAAATC	4	(Hoekstra <i>et al.</i> , 2020)
ISRE	TAGTTTCACTTTCCC	5	(Weihua <i>et al.</i> , 1997)
IRF1	TTTCCCCGAAA	5	(Pellegrini and Schindler, 1993)
Ly-6E	ATTCCTGTAAG	5	(Pellegrini and Schindler, 1993)
MIG	CTTACTATAAA	5	(Pellegrini and Schindler, 1993)

細胞培養

本実験で使用した細胞株と培養条件は以下の通りである。細胞は 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。いずれの培地にも、10% FBS(Sigma Aldrich)及び 100 unit/mL penicillin・100 µg/mL streptomycin (Nacalai Tesque)が添加されている。

細胞株	由来	入手元	培地
B16F10	マウス メラノーマ	東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センター	RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific)
Panc02	マウス 膵臓管内腺癌	National Institutes of Health	DMEM high glucose (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
Braf ^{V600E}	マウス メラノーマ	Caetano Reis e Sousa (The Francis Crick Institute)	RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific)
MC-38	マウス結腸癌	瀬戸山健、千葉勉 (京都大学)	DMEM high glucose (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
Lenti-X 293T	ヒト胎児腎臓	Clontech	DMEM high glucose (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)

トランスフェクションと安定発現細胞株の樹立

各細胞に対するプラスミド導入方法は以下の通りである。トランスフェクション後の細胞は下表の通りの選抜薬剤を用いて選抜を行った。

細胞株	トランスフェクション手法	選抜薬剤
B16F10	エレクトロポレーション 通電プログラム: P-020	blasticidin S 10 µg/mL
B16F10	エレクトロポレーション 通電プログラム: P-020	blasticidin S 10 µg/mL
B16F10	レンチウイルス感染法	blasticidin S 10 µg/mL
Braf ^{V600E}	エレクトロポレーション 通電プログラム: T-023	blasticidin S 10 µg/mL
Braf ^{V600E}	リポフェクション法 試薬: 293Fectin	blasticidin S 10 µg/mL
Braf ^{V600E}	エレクトロポレーション 通電プログラム: T-023	blasticidin S 10 µg/mL
Panc02	リポフェクション法 試薬: Lipofectamine 3000	blasticidin S 10 µg/mL
MC-38	リポフェクション法 試薬: Lipofectamine 3000	blasticidin S 10 µg/mL
Lenti-X 293T	リポフェクション法 試薬: Polyethyleneimine “Max” MW 40,000	使用せず。

エレクトロポレーションによる遺伝子導入は次のとおりである。ペレット化した 5×10^5 個の細胞を $5 \mu\text{g}$ の DNA 及び下記組成のエレクトロポレーションバッファー $100 \mu\text{L}$ に懸濁し、上述のプログラムで通電した。その後、通電した細胞液を培養培地に懸濁した。pPB piggyBac トランスポゾンベクターを利用して遺伝子導入を行う場合は、導入するベクター $3.5 \mu\text{g}$ と pCMV-mPBBase $1.5 \mu\text{g}$ を混合して導入した。薬剤選抜を行う場合は通電後 48 時間後に開始した。

エレクトロポレーションバッファー

	最終濃度
KCl	4 mM
MgCl ₂	10 mM
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	107 mM
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	13 mM
HEPES pH 7.75	11 mM

リポフェクション法による遺伝子導入は次のとおりである。Opti-MEM I Reduced Serum Medium(Thermo Fisher Scientific)に導入プラスミドを加えたもの、及び Opti-MEM I Reduced Serum Medium に上述のリポフェクション試薬を加えたものをそれぞれ用意する。これらを混合して 20 分室温に放置し、遺伝子導入を行う細胞に加える。その 3 時間に培地を交換し、薬剤選抜を行う場合はこれより 48 時間後に開始した。

レンチウイルス感染法による遺伝子導入は次のとおりである。まず、感染させたい細胞に導入するベクター、pCMV-VSV-G-RSV-Rev、psPAX2 を、Lenti-X 293T 細胞にリポフェクション法で導入した。48 時間後、ウイルスを含む培地上清を $0.45 \mu\text{m}$ フィルターで濾過して感染させる細胞の培地に加えた。さらに、ポリブレン(Nacalai Tesque)を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加えた。その 7 時間に培地を交換し、薬剤選抜を行う場合はこれより 48 時間後に開始した。

CRISPR/Cas9 による遺伝子欠損細胞の樹立

Ifngr1 遺伝子を欠損した細胞株を樹立するため、CRISPR/Cas9 システムを用いた。pX459-IFNGR1gRNA-2 を Amaxa nucleofector system を用いたエレクトロポレーション法により B16F10 及び *Braf*^{V600E} 細胞に導入した。遺伝子導入した細胞を限界希釈法によりシングルセルクローニングし、ゲノム DNA シーケンシングにより遺伝子欠損が確認された細胞株を単離した。*Gnaq* 遺伝子を欠損した *Braf*^{V600E} 細胞株は同様の方法によって、小西義延博士(Dana-Farber Cancer Institute)により樹立された。本研究で用いられた遺伝子欠損細胞内の遺伝子変異は図 3 のようであった。

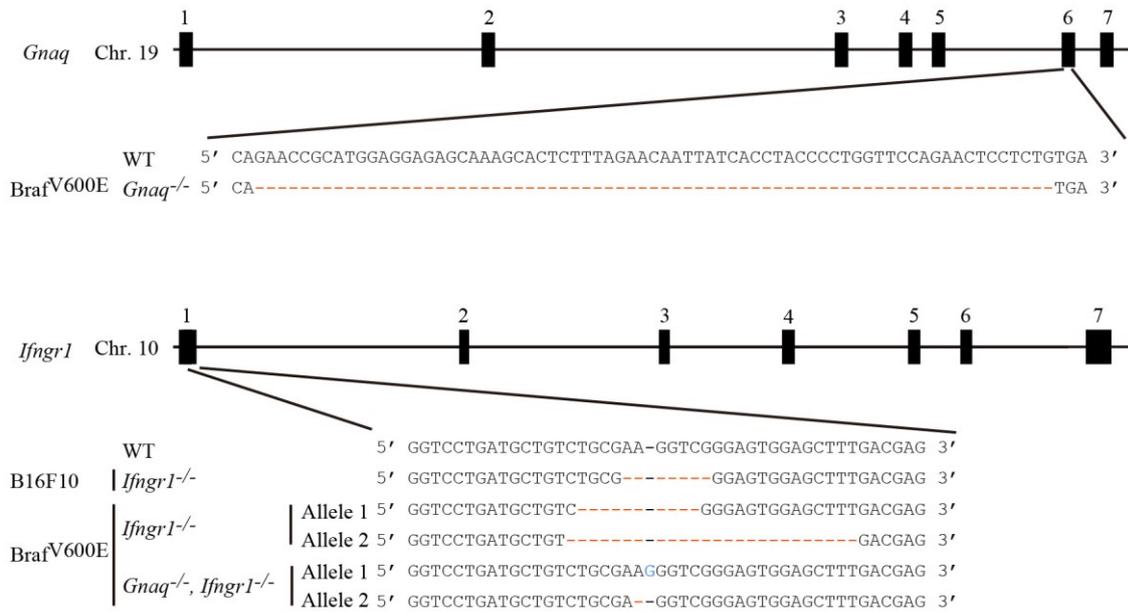


図3 遺伝子欠損細胞の変異箇所

B16F10 及び Brav^{V600E} 細胞に導入した標的遺伝子中の変異箇所。黒い長方形はエクソンを示す。赤字の塩基配列は欠損を、青字の塩基配列は挿入をそれぞれ示す。

フローサイトメトリー解析

解析する細胞を 3% FBS を含む PBS で懸濁後、40 µm セルストレーナーを通して FACS Aria IIIu セルソーター (Becton Dickinson) で分析した。データは FlowJo ソフトウェア (Tree Star) を用いて解析した。検出する蛍光タグ、励起レーザー、フィルターは以下の通りである。

蛍光タグ	励起レーザー波長(nm)	フィルター
Turquoise-GL	407	ET470/24m (Omega Optical)
Turquoise2-GL	407	ET470/24m (Omega Optical)
YPet	488	HQ530/30 (Omega Optical)
mCherry	561	DF610/20 (Omega Optical)

ISP の活性評価

ISP を発現する細胞を回収して 3% FBS を含む PBS で懸濁後、40 µm セルストレーナーを通して FACS Aria IIIu セルソーター (Becton Dickinson) で分析した。ISP のプロモーター活性を評価するため、mCherry の蛍光強度を Turquoise-GL の蛍光強度で割った値を算出した。ISP の IFN-γ 刺激に対する応答を評価するため、IFN-γ 刺激後の mCherry/Turquoise-GL 値を無刺激状態の ISP 細胞における mCherry/Turquoise-GL 平均値で標準化した。

落射蛍光顕微鏡を用いた培養細胞のイメージング

細胞を 0.3 mg/mL タイプ I-C コラーゲン (新田ゼラチン) でコートした 96 穴ガラス底プレートに播種し、IX83 倒立型顕微鏡 (Olympus) で撮影した。

IX83 倒立型顕微鏡セットアップ

UPlanSApo 40x/0.95 objective lens (Olympus)
PRIME scientific CMOS camera (Photometrics)
Spectra-X light engine (Lumencor)
IX2-ZDC laser-based autofocus system (Olympus)
incubation chamber (Tokai Hit)
MetaMorph ソフトウェア(顕微鏡制御) (Molecular Devices)

蛍光タグ	励起レーザー波長 (nm)	励起フィルター	ダイクロイック ミラー	蛍光フィルター
Turquoise-GL	440	430/24 (Olympus)	XF2034 (Omega Optical)	FF01-483/32 (Semrock)
Turquoise2-GL	440	430/24 (Olympus)	XF2034 (Omega Optical)	FF01-483/32 (Semrock)
YPet	490	500/20 (Olympus)	XF2034 (Omega Optical)	535/30 (Olympus)
sfGFP	490	470/20 (Olympus)	XF2034 (Omega Optical)	495-540 (Olympus)
Venus	490	500/20 (Olympus)	XF2034 (Omega Optical)	535/30 (Olympus)
Citrine	490	500/20 (Olympus)	XF2034 (Omega Optical)	535/30 (Olympus)
mEGFP	490	470/20 (Olympus)	XF2034 (Omega Optical)	495-540 (Olympus)
mAG	490	470/20 (Olympus)	XF2034 (Omega Optical)	495-540 (Olympus)

細胞増殖アッセイ

細胞増殖速度は ISP 発現細胞をタイムラプスイメージングで観察し、Turquoise-GL によりラベルされた核の数を経時計数することで評価した。ISP 発現細胞を 0.3 mg/mL タイプ I-C コラーゲン(新田ゼラチン)でコートした 96 穴ガラス底プレートに播種し、IX83 倒立型顕微鏡(Olympus)で撮影した。核数の経時計数には ImageJ ソフトウェア(National Institute of Health)を用いた。

抗 STAT1 抗体によるウエスタンブロッティング

細胞を PBS で洗い、下記組成のサンプルバッファーで溶解した後、Bioruptor USD-200TM (Cosmo Bio)を用いて超音波破碎し、95°Cのヒートブロックで5分間煮沸した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、タンパク質を PVDF メンブレン(Merk Millipore)に転写した。メンブレンを室温にて1時間、Odyssey Blocking Buffer (TBS)(LI-COR)に浸して振盪し、ブロッキングした。一次抗体の Stat1 (D1K9Y) Rabbit mAb を Odyssey Blocking Buffer (TBS)で 1000 倍希釈し、メンブレンを浸して 4°Cにて一晩回転混和し、一次抗体反応を行った。メンブレンを 0.1% Tween20 含有の PBS で3回洗った後、二次抗体の IRDye 680LT Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody を Odyssey Blocking Buffer (TBS)で 20000 倍希釈し、メンブレンを浸して室温にて1時間回転混和し、二次抗体反応を行った。その後、メンブレンの撮影を Odyssey Infrared scanner(LI-COR)を用いて行った。

サンプルバッファー

	最終濃度
Tris-HCl (pH 6.8)	50 mM
Glycerol	10 %
Sodium Dodecyl Sulfate	2 %
Bromophenol blue	0.2 %
2-Mercaptoethanol	5 %

マウス

B6 アルビノマウスは日本チャールス・リバー株式会社より購入し、自由摂食させた状態で SPF 施設にて飼育した。動物実験のプロトコルは京都大学動物実験委員会によって審査され、認可されたものを用いた(認可番号 20081)

皮下担がん

担がんするがん細胞をトリプシン処理によって回収し、PBS で 3 回洗った。回収したがん細胞 2×10^5 個を 50% マトリゲル(Corning)を含む PBS 100 μ L に懸濁し、マウス脇腹の皮下に注入した。腫瘍サイズは、長軸長、直行する短軸長、及び厚みの積として算出した。

がんの破碎とフローサイトメトリー解析

マウス側腹部に形成された腫瘍塊を剖出し、ハサミで 1 mm³ 角以下の大きさに破碎した。その後 200 U/mL タイプ IV コラゲナーゼ(Worthington Biochemical Corporation)及び 10 U/mL DNase I (Roche Diagnostics)を含む RPMI 1640 で懸濁し、37°C に保たれた恒温水槽で 30 分間保温した。細胞を PBS で洗い、蛍光を FACS Aria IIIu フローサイトメーターで検出した。

発光イメージング

マウス皮下に注入したがんの生体内発光イメージングは MIIS system (Molecular Devices Japan) を用いて実施した。まず、2%イソフルランで吸入麻酔をかけたマウスを 37°C に保たれた電気ヒートパッド上に仰向けで寝かせた。以下の装置が取り付けられた MIIS system で撮影した。撮影開始 5 分後に発光基質の 5 mM AkaLumine-HCl(Kurogane Kasei)100 μ L を腹腔内投与した。

画像解析においては、得られた発光シグナルのタイムラプス動画に最大値投影(Maximum intensity projection)を適用し、ImageJ ソフトウェアによる発光強度の定量に用いた。

MIIS system セットアップ

iXon Ultra EMCCD camera (Oxford Instruments)

lens (MDJ-G25F095, ϕ 16 mm, F: 0.95; Tokyo Parts Center)

MetaMorph ソフトウェア(顕微鏡制御) (Molecular Devices)

撮影条件

Binning	4
EM gain	0
撮影間隔	30 秒

二光子顕微鏡を用いたがんの生体内イメージング

マウス皮下に注入したがんの生体内蛍光イメージングは既報の方法に基づいて実施した (Konishi et al., 2021; Yamauchi et al., 2016)。まず、2%イソフルランで吸入麻酔をかけたマウスを

37°Cに保たれた電気ヒートパッド上に仰向けで寝かせた。その後皮膚を切開して皮下に形成された腫瘍を露出し、カバーガラス上に設置した。

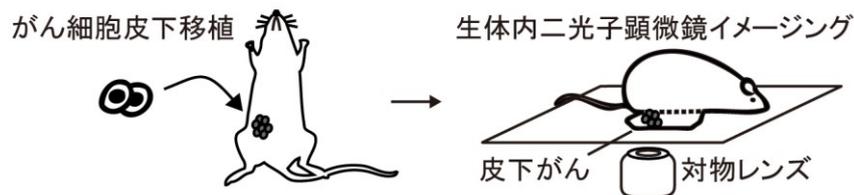


図4 皮下がんのマウス生体内イメージング

イメージングには FV1000MPE-IX-83 倒立顕微鏡を用いた。図5の様な光路及び励起波長レーザーを使用して観察した。

FV1000MPE-IX-83 倒立顕微鏡セットアップ

UPLSAPO 30XS/1.05 シリコン浸対物レンズ(Olympus)

InSight DeepSee Ultrafast laser(Spectra Physics)

検出器: GaAsP チャンネル、マルチアルカリ (RXD)チャンネル

FluoView ソフトウェア(顕微鏡制御) (Olympus)

保存形式: 多層 16 bit イメージファイル

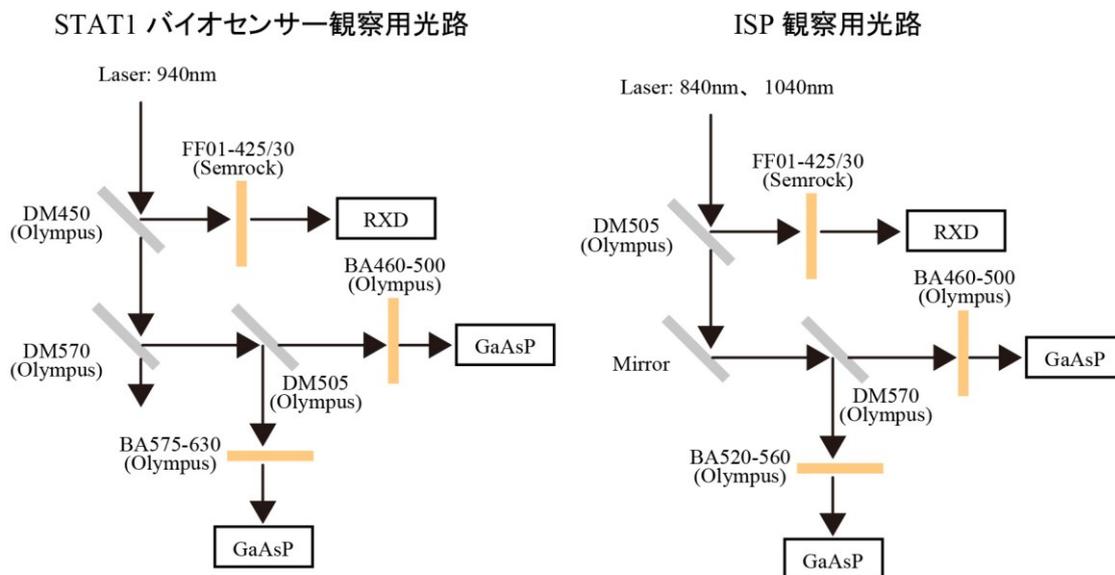


図5 顕微鏡光路

ISP 活性は、Turquoise-GL で標識された核領域内において、mCherry 平均蛍光強度を Turquoise-GL 平均蛍光強度で割った値として算出した。核領域は Cellpose プログラム(Stinger *et al.*, 2021) を用い自動で作成した。

データ解析

落射蛍光顕微鏡観察により得られた STAT1 バイオセンサーの核移行度合いを定量するために画像解析を行った。画像の処理には ImageJ ソフトウェアを用いた。まず解析対象のすべての画像について ImageJ ソフトウェアの Subtract Background 機能を適用し(Rolling ball radius: 50 pixels)、バックグラウンドを除算した。次に各細胞に対して、細胞核と細胞質の境界領域を手動で作成した。この画像を用いて、C/N 比または核蓄積量 NA を以下のように算出した。

$$\text{C/N 比} = \frac{\text{細胞質の平均蛍光強度}}{\text{核の平均蛍光強度}} \quad (\text{式 1})$$

$$\text{NA} = \frac{\text{核の STAT1-YPet 平均蛍光強度}}{\text{核の Turquoise2-GL-NLS 平均蛍光強度}} \quad (\text{式 2})$$

ISP 活性の IFN- γ 濃度依存曲線を描くため、実測データに対する Hill 方程式へのカーブフィッティングを行った。フィッティング時のパラメータ推定には Python(version 3.7)の科学技術ライブラリである scipy の curve_fit 関数を用いた。また、得られた IFN- γ 濃度依存曲線の方程式を元に、ISP 活性上昇に対する IFN- γ の EC₅₀ 値と ISP 活性上昇の理論最大値を求めた。

2 群の統計的有意差を調べるために Python を用いた。ウェルチの t 検定を用い、p 値を計算した。本研究では、P<0.05 の場合に統計的に有意であるとした。

データをグラフ化する手段の一つとして箱ひげ図を用いた。箱の上端線、下端線はそれぞれ 25 パーセンタイル、75 パーセンタイルを、箱内部の線は平均値を示す。また、箱の上下両端からそれぞれ、四分位範囲長の 1.5 倍相当の長さのひげを記した。

結果

STAT1 バイオセンサーの開発と評価

STAT1-YPet は IFN- γ に応答して核へ移行する

細胞の IFN- γ 応答を可視化するために、本研究ではまず STAT1 の核内移行に着目した。細胞に IFN- γ が作用すると JAK-STAT シグナル伝達経路が活性化され、STAT1 が核内へ移行する(図 2)。STAT1 タンパク質に蛍光タンパク質を付加して STAT1 が核内へ移る様子を可視化することで、細胞の IFN- γ 応答の指標とする。IFN- γ に応答する STAT1 バイオセンサー作製のため、マウス由来 STAT1 cDNA に YPet を付加した(図 6A)。これを発現する Braf^{V600E} 細胞を IFN- γ で刺激し、落射蛍光顕微鏡を用いて観察した。IFN- γ 刺激後、STAT1-YPet の蛍光が細胞質では減少、核内では上昇し、細胞質に局在していた STAT1-YPet が核内へ移ったように見えた(図 6B)。STAT1 の細胞内局在変化を細胞ごとに定量するため、細胞質と核の平均蛍光強度を測定し、その比(C/N 比)を算出した(図 6C)。IFN- γ 刺激により C/N 比は減少した。したがって細胞内で発現させた STAT1-YPet は、IFN- γ 刺激により核内へ移行することが示された。

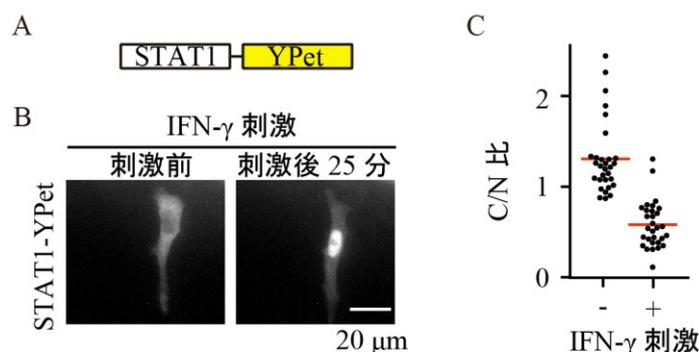


図 6 STAT1-YPet は IFN- γ に応答して核へ移行する

(A)STAT1-YPet の構造。

(B)STAT1-YPet を発現する Braf^{V600E} 細胞を IFN- γ (10 ng/mL)で刺激した前後の STAT1-YPet 代表画像。

(C)STAT1-YPet を発現する Braf^{V600E} 細胞を IFN- γ (10 ng/mL)で刺激した前後の STAT1-YPet C/N 比を蜂群図で示した。赤線は全細胞の平均値を示す(3 視野分の n=30 細胞)。

STAT1-Fluoppi は IFN- γ に応答して核へ移行し、蛍光凝集点を形成する

細胞の IFN- γ 応答を可視化する手段として、次に STAT1 のホモ二量体化に着目した。STAT1 のホモ二量体化を検出するために蛍光共鳴エネルギー移動法を利用した方法がある(Han *et al.*, 2008)。別の方法として、蛍光タンパク質の非蛍光断片を融合した 2 つのタンパク質が相互作用する際に蛍光複合体を形成することに基づく Split-GFP システムを用いる方法がある(Romei and Boxer, 2019)。この方法においては形成される複合体は不可逆的であるため、一度二量体を形成すると解離することが困難である。ここでは、生細胞でタンパク質間相互作用(PPI)を可逆的かつ定量的に検出する Fluoppi (Fluorescent based technology detecting Protein-Protein Interactions)を利

用する(Watanabe *et al.*, 2017)。このシステムでは、多量体形成能を有する Phox and Bem1p tag (PB1-tag) と四量体形成能を有する Azami-Green fluorescent protein tag (AG-tag) の2つのタグが目的のタンパク質に融合される。タグの付いたタンパク質同士が相互作用すると架橋形成が起こり、凝縮相分離液滴が形成される。その結果、液滴中の蛍光タンパク質タグは蛍光凝集点として観察される。タンパク質相互作用による凝集形成は可逆的である。近年、PB1-tag と単量体型 AG-tag(mAG-tag)を含む融合コンストラクトを用いたシステム(homoFluoppi)が開発され、目的タンパク質のホモ二量体化を検出することが可能となった(Okada *et al.*, 2018; Watanabe *et al.*, 2017)。

本研究においては homoFluoppi を応用して、STAT1 ホモ二量体化の検出を試みた。すなわち STAT1 に PB1/mAG1 タグを付加し、mAG の蛍光凝集点が形成される様子を可視化することで、細胞の IFN- γ 応答の指標とすることを目指した。(STAT1-homoFluoppi、図 7A)。2種類の STAT1-homoFluoppi を構築し、Braf^{V600E} 細胞に導入した。これを発現する Braf^{V600E} 細胞を落射蛍光顕微鏡を用いて観察した。2つのコンストラクトを導入した細胞とも mAG の蛍光が観察され、その大部分は細胞質に局在し、一部で蛍光凝集点が形成されていた(図 7B)。これらの細胞を IFN- γ で刺激したところ、2つのコンストラクトを導入した細胞とも蛍光が細胞質では減少、核内では上昇し、細胞質に局在していた STAT1 が核内へ移ったように見えた。さらにこのとき、核内で蛍光凝集点を形成する細胞が観察された。以上のことから homoFluoppi を応用して作製した STAT1 プローブは IFN- γ に応答して核内へ移行し、凝集形成をすることが示された。

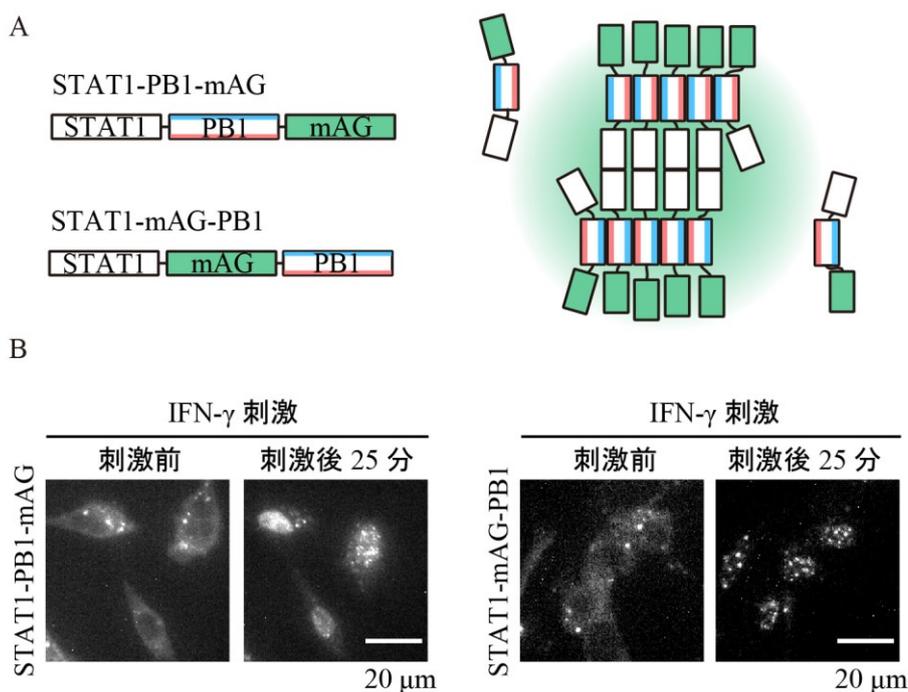


図 7 STAT1-Fluoppi は IFN- γ に応答して核へ移行し、蛍光凝集点を形成する

(A)STAT1-homoFluoppi の概要図。STAT1 に PB1/mAG1 タグを付加し、その順番を変えた二種類のコンストラクトを用意した。PB1/mAG1 タグが付加された STAT1 が IFN- γ に応答してホモ二量体化することで架橋を形成し、mAG1 が局所的に凝集することで蛍光凝集点が形成されることを期待する。

(B)PB1/mAG1 タグが付加された STAT1 を発現する Braf^{V600E} 細胞を IFN- γ (10 ng/mL)で刺激した前後の代表画像。

STAT1 バイオセンサーの IFN- γ 応答は付加する蛍光タンパク質の種類に依存しない

STAT1-homoFluoppi の蛍光凝集点形成を指標とした IFN- γ 応答の可視化においては、IFN- γ 未刺激の状態でも蛍光凝集点形成が起こっていた。そのため IFN- γ 応答の可視化を目的とする STAT1 バイオセンサーは、核内移行を定量するものであるほうが適していると考えた。STAT1 バイオセンサーで使用する蛍光タンパク質を選定するため、さまざまな蛍光タンパク質を STAT1 に付加した。STAT1 は IFN- γ に応答してホモ二量体を形成するため、蛍光タンパク質の選定にあたってはその二量体形成の起こりやすさに着目した。STAT1 タンパク質に付加して比較する蛍光タンパク質には、はじめに評価した YPet 及びそれと同程度の二量体形成能をもつ sfGFP、二量体形成能の高い Venus 及び Citrin、二量体形成能の低い mEGFP を用いた(Cranfill *et al.*, 2016)。発現する Braf^{V600E} 細胞を IFN- γ で刺激し、落射蛍光顕微鏡を用いて観察した。STAT1 の細胞内局在変化を細胞ごとに定量するため、細胞質と核の平均蛍光強度を測定し、その比 (C/N 比)を算出した(図 8)。すべての STAT1 バイオセンサーにおいて、IFN- γ に応答して C/N 比が減少した。C/N 比減少の割合については、付加する蛍光タンパク質間でほとんど差が見られなかった。

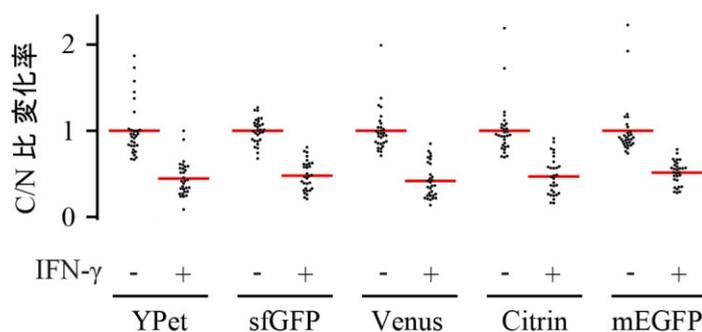


図 8 STAT1 バイオセンサーの IFN- γ 応答は付加する蛍光タンパク質の種類に依存しない

様々な蛍光タンパク質を付加した STAT1 を発現する Braf^{V600E} 細胞を IFN- γ (10 ng/mL)で刺激し、刺激前後の C/N 比を蜂群図で示した。IFN- γ 刺激前の C/N 比の平均値を用いてデータを標準化し、IFN- γ 刺激による C/N 比変化率を示した。赤線は全細胞の平均値を示す(3 視野分の n=30 細胞)。

STAT1-YPet は発現量が低いほど核内へ移行しやすい

遺伝子導入により生細胞に発現させた STAT1 は IFN- γ に応答して核内へ移行するものの、その応答性は細胞間で不均一であり、特に導入した STAT1 の発現量と IFN- γ に応答した核内移行の度合いは負の相関にあることが報告されている(Han *et al.*, 2011)。このことを確かめるため STAT1-YPet を発現する Braf^{V600E} 細胞を IFN- γ で刺激し、刺激前後の C/N 比と細胞の YPet 蛍光強度の関係を調べた。その結果、YPet 蛍光強度の強さにより STAT1-YPet の核内移行の様子が異なる

ることが観察された(図 9A)。細胞の YPet 蛍光強度が低いほど、STAT1-YPet が細胞質から核内へ移る度合いが大きく、C/N 比が大きく下がった(図 9B)。一方で細胞の YPet 蛍光強度が高いほど、STAT1-YPet は核内へ移りづらくなり、C/N 比もほとんど変化しなかった。

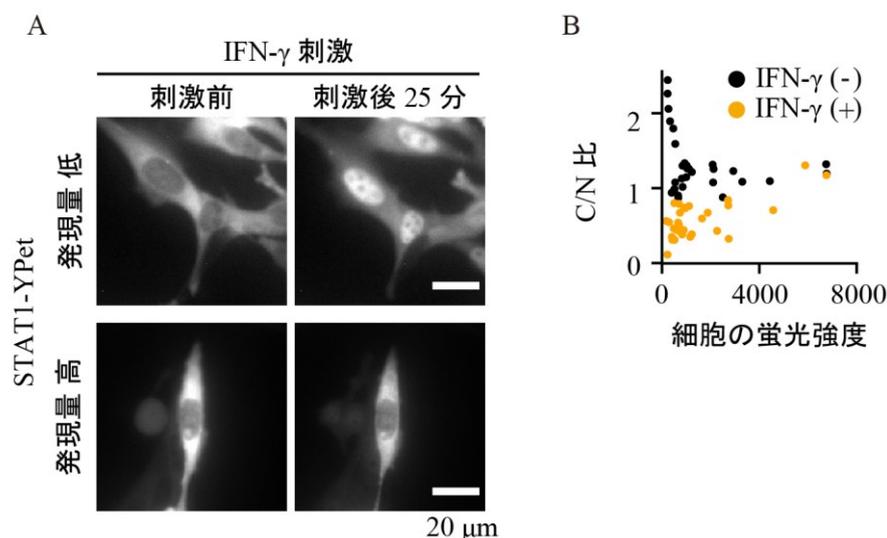


図 9 STAT1-YPet は発現量が低いほど核内へ移行しやすい

(A) STAT1-YPet を発現する Braf^{V600E} 細胞を IFN-γ(10 ng/mL) で刺激した前後の STAT1-YPet 代表画像。発現量の低い細胞の YPet 蛍光強度は約 1000、発現量の高い細胞の YPet 蛍光強度は約 6000 である。

(B) STAT1-YPet を発現する Braf^{V600E} 細胞を IFN-γ(10 ng/mL) で刺激した前後の STAT1-YPet C/N 比、及び YPet の蛍光平均強度を散布図で示した(3 視野分の n=30 細胞)。

核内マーカーを付加した STAT1-YPet は IFN-γ に応答して核へ移行する

STAT1 の核内移行を定量評価するために、C/N 比は従来よく用いられてきた。ここでは新たな指標として核内蓄積量(NA)を考える。NA は STAT1 の核内平均蛍光強度と、核内で別に安定発現させた蛍光タンパクの核内平均蛍光強度との比である。NA は C/N 比に比べ、画像解析におけるセグメンテーションが核のみであり簡便であることから、生細胞の大規模なタイムラプスイメージングにおいてより最適であることが指摘されている(Han et al., 2011)。

STAT1 の核内移行を NA で評価するための新たな STAT1 バイオセンサーを作製した。このバイオセンサーでは先に評価した STAT1-YPet に、P2A 自己切断配列を挟んで Turquoise2-GL (Komatsu et al., 2018) と SV40 ラージ T 抗原由来の核移行シグナルを付加した(図 10A)。STAT1-YPet と Turquoise2-GL-NLS が P2A 自己切断配列で繋がれているため両者の発現量は等しくなる。この STAT1 バイオセンサーを Braf^{V600E} 細胞に導入した。さらに、導入した STAT1 の発現量が低いほど核内移行評価には適していることから(図 9B)、STAT1 バイオセンサーを導入後、Turquoise2-GL が暗い細胞集団(下位 1%)を FACS Aria IIu (BD Biosciences) で選別し回収した。この細胞で STAT1-YPet の発現量を見積もるために、抗 STAT1 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。遺伝子導入を行っていない Braf^{V600E} 細胞由来のサンプル、STAT1 バイオセンサーを

導入して選別したサンプル、及びそれを段階希釈(1/3、1/9、1/27)したものを解析に用いた。遺伝子導入を行っていない $Braf^{V600E}$ 細胞由来のサンプルでは、75 kDa と 100 kDa の間のみバンドが検出されたのに対し、STAT1 バイオセンサーを導入したサンプルでは、100 kDa の上部にもバンドが確認された(図 10B)。したがって 75 kDa と 100 kDa の間のバンドは内因性の STAT1、100 kDa より上部のバンドは導入した STAT1-YPet 由来のものと結論づけた。このとき、STAT1 バイオセンサーを導入したサンプルにおいて、希釈しなかったサンプルの内因性 STAT1 のバンドと 1/27 希釈サンプルの STAT1-YPet のバンドの濃さがほぼ同じであったため、STAT1 バイオセンサーを導入して選別した細胞における STAT1-YPet の発現量は、内因性 STAT1 のおよそ 30 倍多く発現していると思われた。

STAT1 バイオセンサーを発現する細胞を IFN- γ で刺激し、落射蛍光顕微鏡を用いて観察した。IFN- γ 刺激後、STAT1-YPet の蛍光が核内で上昇し、細胞質に局在していた STAT1-YPet が核内へ移ったように見えた(図 10C)。また、Turquoise2-GL-NLS はほとんどが核に局在し、その挙動は IFN- γ 刺激前後で変わらないように見えた。核における NA を算出したところ、IFN- γ 刺激により NA は上昇した(図 10D)。一方で核内 Turquoise2-GL の蛍光強度は変化しなかった。さらに、刺激する IFN- γ の濃度を変えて同様に観察を行ったところ、IFN- γ 濃度が 0.5 ng/mL から 20 ng/mL の間で刺激したとき、NA の上昇が見られた(図 10E)。

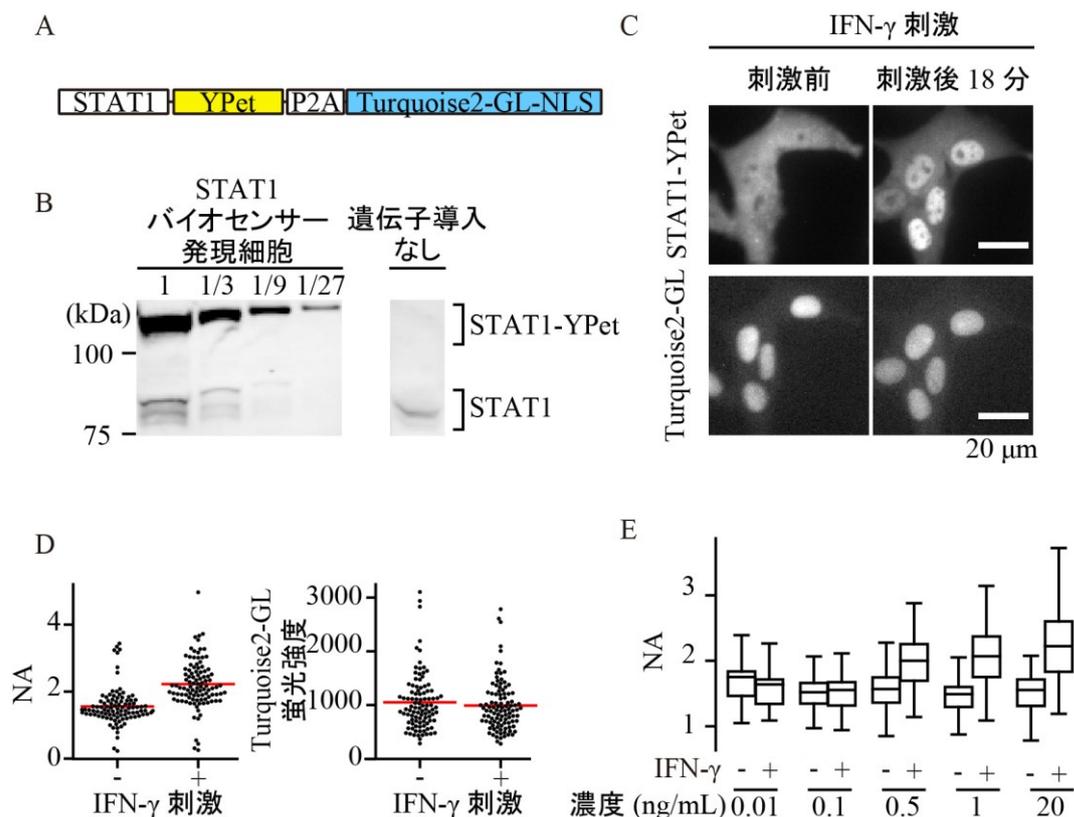


図 10 核内マーカーを付加した STAT1-YPet は IFN- γ に応答して核へ移行する

(A) STAT1-YPet-P2A-Turquoise2-GL-NLS の構造

(B) STAT1-YPet-P2A-Turquoise2-GL-NLS を導入して選別した $Braf^{V600E}$ 細胞、及び遺伝子導入を行っていない $Braf^{V600E}$ 細胞について、抗 STAT1 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

(C)STAT1-YPet-P2A-Turquoise2-GL-NLS を発現する Braf^{V600E} 細胞を IFN- γ (20 ng/mL)で刺激した前後の STAT1-YPet 及び Turquoise2-GL-NLS 代表画像。

(D)STAT1-YPet-P2A-Turquoise2-GL-NLS を発現する Braf^{V600E} 細胞を IFN- γ (20 ng/mL)で刺激した前後の NA 及び核内 Turquoise2-GL-NLS の平均蛍光強度を蜂群図で示した。赤線は全細胞の平均値を示す(3 視野分の n=約 100 細胞)。

(E)STAT1-YPet-P2A-Turquoise2-GL-NLS を発現する Braf^{V600E} 細胞を様々な濃度の IFN- γ で刺激した前後の NA を箱ひげ図で示す(3 視野分の n=約 100 細胞)。

IFN- γ 依存的転写因子の活性をモニターするバイオセンサーの開発と評価

GAS、ISRE は IFN- γ に応答して転写活性を示す

細胞の IFN- γ 応答を可視化するために、本研究では次に STAT1 が制御する下流転写因子の活性に着目した。細胞に IFN- γ が作用して STAT1 が核内へ移行すると、STAT1 を含む転写開始因子は特定の配列を認識してリクルートされ、下流因子の転写を開始する(図 2)。そこで、STAT1 の認識配列の下流に蛍光タンパク質を配置し、この蛍光強度の増加を観測することで細胞に IFN- γ が作用したことの指標とするバイオセンサーを作製した。このバイオセンサーは IFN- γ シグナル応答性プロモーター下で赤色蛍光タンパク質 mCherry と生物発光酵素 Akaluc の融合タンパク質を発現する(図 11A)。加えて、ゲノム内挿入サイトの影響を補正することを目的に、PGK プロモーター下でシアン色蛍光タンパク質 Turquoise-GL に核移行シグナル(NLS)を付加したものを安定的に発現する。このため、mCherry-Akaluc 融合タンパク質の発現を制御するプロモーター活性は mCherry の蛍光強度を Turquoise-GL の蛍光強度で割った値で表すことができる。この値を ISP 活性と呼ぶこととする。

IFN- γ 応答性プロモーターとして最小限プロモーター(MinP)及び STAT1 認識配列の繰り返し配列を配置したが、STAT1 認識配列には転写する下流因子の種類に依存して複数の種類がある(Pellegrini and Schindler, 1993)。IFN- γ 応答性プロモーターとして機能する認識配列を選定するため、5つの配列要素をそれぞれ ISP ベクターに組み込み、B16F10 細胞に導入した。このとき同時に、STAT1 認識配列を含まず最小限プロモーターのみ配置したベクターも用意した。これらの細胞を IFN- γ で刺激し、フローサイトメーターで分析したところ、GAS(interferon γ -activated sequence)及び ISRE(interferon-stimulated response element)を導入した細胞で、ISP 活性が上昇した(図 11B)。この結果から、GAS 及び ISRE を含むプロモーターが IFN- γ 応答性プロモーターとして選定された。GAS 及び ISRE を含むプロモーターが組み込まれた ISP を、それぞれ ISP-GAS 及び ISP-ISRE と呼ぶこととする。

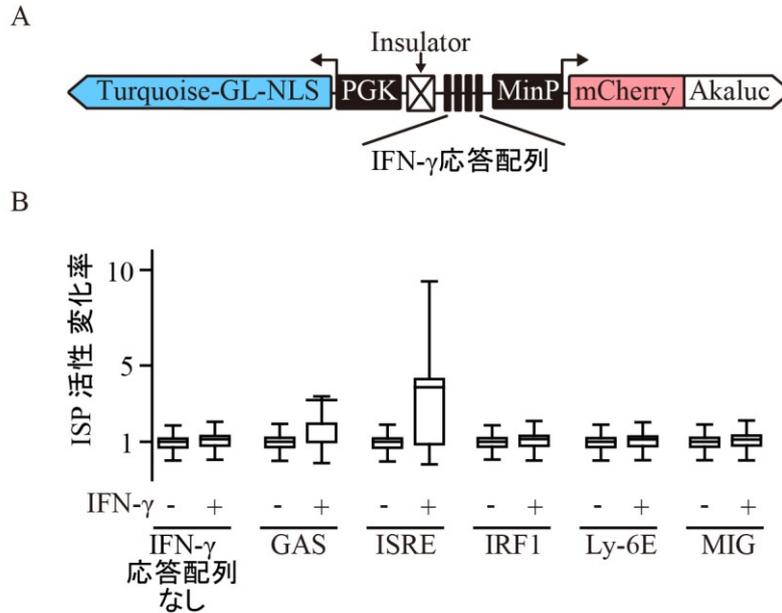


図 11 GAS、ISRE は IFN- γ に応答して転写活性を示す

(A)ISP 活性測定の概略。ISP を発現する B16F10 細胞を 10 ng/mL IFN- γ を含む培地、または含まない培地で 24 時間培養し、フローサイトメーターで蛍光を検出した。

(B)IFN- γ 応答性プロモーターを変えた ISP の、IFN- γ 刺激による ISP 活性上昇比較。各 ISP を一過的に発現する B16F10 細胞を 10 ng/mL IFN- γ を含む培地、または含まない培地で 24 時間培養し、フローサイトメーターで蛍光を検出した。測定された ISP 活性を、IFN- γ を含まない培地で培養した場合の ISP 活性平均値で標準化し、箱ひげ図で表した(n=1)。

ISP の mCherry 発現は IFN- γ 依存的であり、Turquoise-GL 発現は IFN- γ 非依存的である

ISP 内で双方向に配置したプロモーター活性が IFN- γ 依存的であるかどうかを確認するため、ISP-ISRE を安定発現する B16F10 細胞を IFN- γ で刺激した。ISP-GAS 及び ISP-ISRE とも、IFN- γ 刺激によって mCherry の蛍光強度のみが増加し、Turquoise-GL の蛍光強度は変化しなかった(図 12A)。また、ISP をオルガノイドやマウスの内在細胞にも導入できるように ISP-GAS のレンチウイルスベクターを作製した。このベクターを用いてウイルスを作製し B16F10 細胞細胞に感染させたところ、トランスポゾンベクターと同様に ISP-GAS を導入することができた。この細胞を IFN- γ で刺激したところ、IFN- γ 刺激によって mCherry の蛍光強度のみが増加し、Turquoise-GL の蛍光強度は変化しなかった(図 12B)。以上のことから、ISP の mCherry 発現は IFN- γ 依存的であり、Turquoise-GL 発現は IFN- γ 非依存的であることが示された。

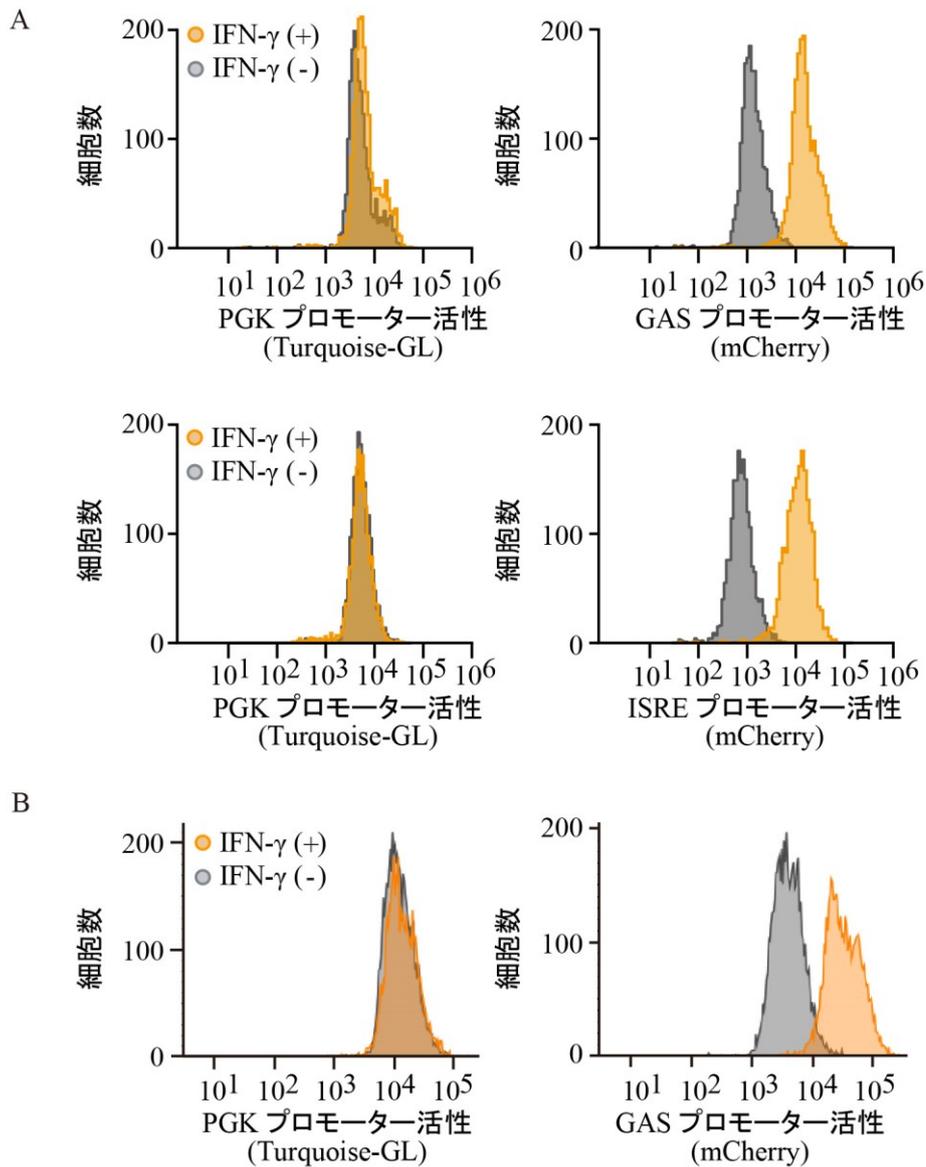


図 12 ISP の mCherry 発現は IFN- γ 依存的であり、Turquoise-GL 発現は IFN- γ 非依存的である
 (A)トランスポゾンベクターにより ISP-GAS 及び ISP-ISRE を導入した B16F10 細胞を 10 ng/mL IFN- γ を含む培地、または含まない培地で 24 時間培養し、フローサイトメーターで蛍光を検出した。IFN- γ 応答性プロモーター活性を mCherry の蛍光強度として、PGK 安定発現プロモーター活性を Turquoise-GL の蛍光強度として示し、ヒストグラムを描いた。
 (B)レンチウイルスベクターにより ISP-GAS を導入した B16F10 細胞を 10 ng/mL IFN- γ を含む培地、または含まない培地で 24 時間培養し、フローサイトメーターで蛍光を検出した。IFN- γ 応答性プロモーター活性を mCherry の蛍光強度として、PGK 安定発現プロモーター活性を Turquoise-GL の蛍光強度として示し、ヒストグラムを描いた。

ISP は双方向性プロモーターにより、IFN- γ 応答定量の細胞間のばらつきを減少させる

ISP 内に配置した双方向性プロモーターの効果を確認するため、ISP-GAS 及び ISP-ISRE を安

定発現する B16F10 細胞を IFN- γ で刺激し、フローサイトメーターで蛍光を解析した。各細胞 mCherry 蛍光強度及び Turquoise-GL の蛍光強度を散布図にしたところ、mCherry と Turquoise-GL の蛍光強度には正の直線関係が見られた。そこで ISP 活性を mCherry 蛍光強度と Turquoise-GL 蛍光強度の比(式 1)として定義した。IFN- γ 刺激前後で mCherry 蛍光強度単体及び ISP 活性の変化を比較したところ、ISP 活性の変化率のばらつきは、mCherry 蛍光強度単体の変化率変化のばらつきに比べて小さくなっていた(図 13B)。このことから、ISP は双方向性プロモーターにより、IFN- γ 応答定量の細胞間のばらつきを減少させることがわかった。

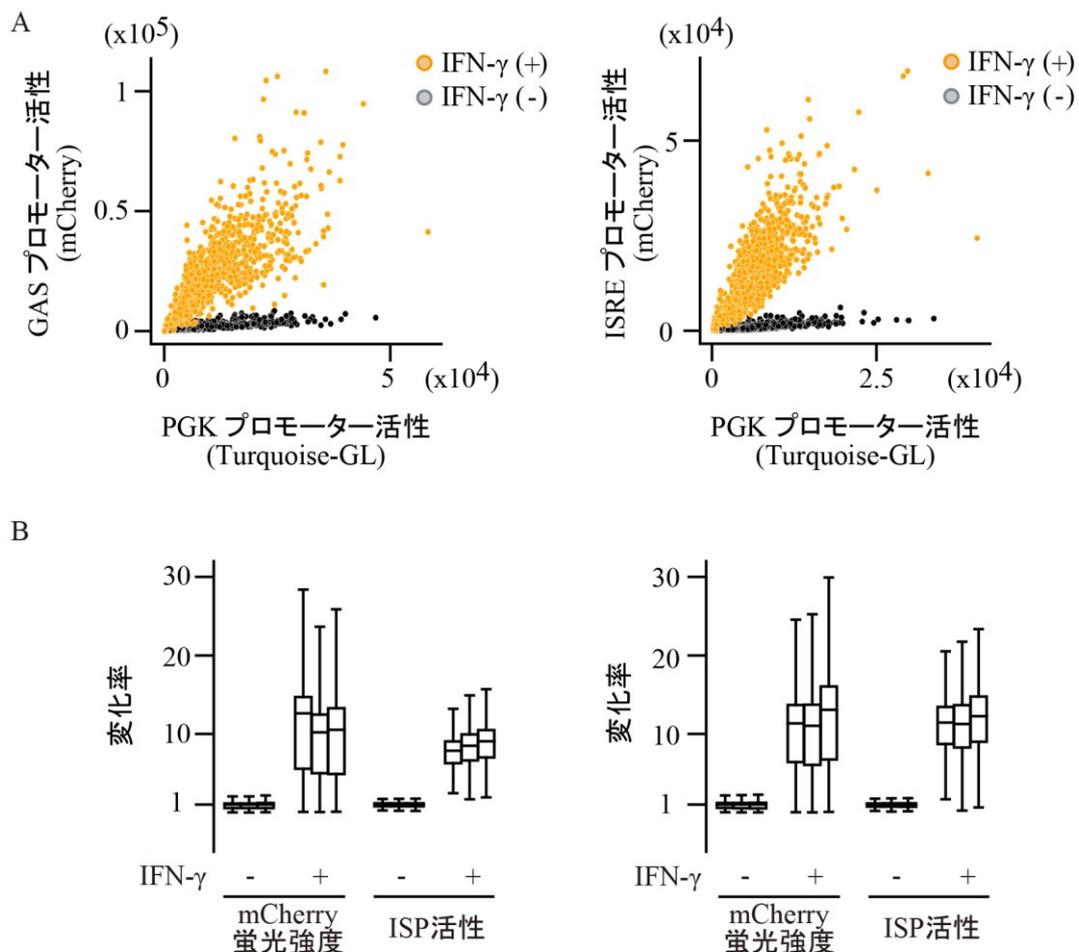


図 13 ISP は双方向性プロモーターにより、IFN- γ 応答定量の細胞間のばらつきを減少させる

(A)IFN- γ 応答性プロモーター活性と PGK 安定発現プロモーター活性の分布比較。ISP-GAS 及び ISP-ISRE を安定的に発現する B16F10 細胞を 10 ng/mL IFN- γ を含む培地、または含まない培地で 24 時間培養し、フローサイトメーターで蛍光を検出した。IFN- γ 応答性プロモーター活性を mCherry の蛍光強度として、PGK 安定発現プロモーター活性を Turquoise-GL の蛍光強度として示し、散布図として表した。

(B) ISP-GAS 及び ISP-ISRE を安定的に発現する B16F10 細胞を 10 ng/mL IFN- γ を含む培地、または含まない培地で 24 時間培養し、フローサイトメーターで蛍光を検出した。測定された mCherry 蛍光強度及び ISP 活性を、IFN- γ を含まない培地で培養した場合の ISP 活性平均値で標準化し、箱ひげ図で表した(n=3)。

Ifngr1 ノックアウトにより、IFN- γ 依存的な ISP 活性上昇は消失する

ISP 活性化が IFN- γ 受容体を介したものであることを確かめるため、IFN- γ 受容体を構成する *Ifngr1* 遺伝子をノックアウトした B16F10 細胞を作製し、ISP-GAS 及び ISP-ISRE を導入して IFN- γ 刺激を与えた。その結果 *Ifngr1* 遺伝子を欠損株した B16F10 細胞では、IFN- γ 刺激に対する ISP の活性上昇が消失した(図 14)。このことから IFN- γ 刺激による ISP 活性上昇は、IFN- γ 受容体を介したものであることがわかった。

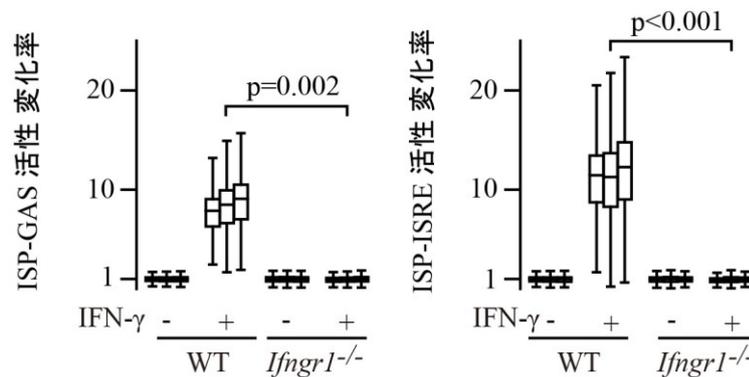


図 14 *Ifngr1* 遺伝子ノックアウトにより、IFN- γ 依存的な ISP 活性上昇は消失する

IFN- γ 刺激による ISP 活性上昇に対する、*Ifngr1* 遺伝子欠損の影響。ISP-GAS 及び ISP-ISRE を安定的に発現する B16F10 細胞を 10 ng/mL IFN- γ を含む培地、または含まない培地で 24 時間培養し、フローサイトメーターで蛍光を検出した。測定された ISP 活性を、IFN- γ を含まない培地で培養した場合の ISP 活性平均値で標準化し、箱ひげ図で表した。n=3 の平均値を用いたウェルチの t 検定により p 値を計算し、図中に記した。

ISP は様々な細胞種で IFN- γ 刺激に対する濃度依存的活性上昇を示す

ISP の汎用性を評価するため、ISP-GAS 及び ISP-ISRE をそれぞれ C57BL/6 マウス由来の 4 細胞種、B16F10、Panc02、Braf^{V600E}、MC-38 に導入し、IFN- γ 刺激に対する応答を確かめた。様々な濃度の IFN- γ で 24 時間刺激したところ、すべての細胞種において IFN- γ 依存的な ISP の活性上昇が見られ、その度合は IFN- γ 濃度依存的であった(図 15A)。ISP 活性の濃度依存曲線をカーブフィッティングにより描き EC50 値を求めたところ、ISP-GAS に対する IFN- γ の EC50 はどの細胞種も 0.2 ng/mL から 0.9 ng/mL の間に収まり、ISP-ISRE に対しては 0.1 ng/mL から 0.3 ng/mL の間に収まった(図 15B)。またすべての細胞種において、ISP-ISRE は ISP-GAS よりも IFN- γ 刺激に対する活性上昇が大きかった(図 15C)。このことは、*in vitro* における IFN- γ に対する検出感度が、ISP-ISRE が ISP-GAS よりも高いことを示している。

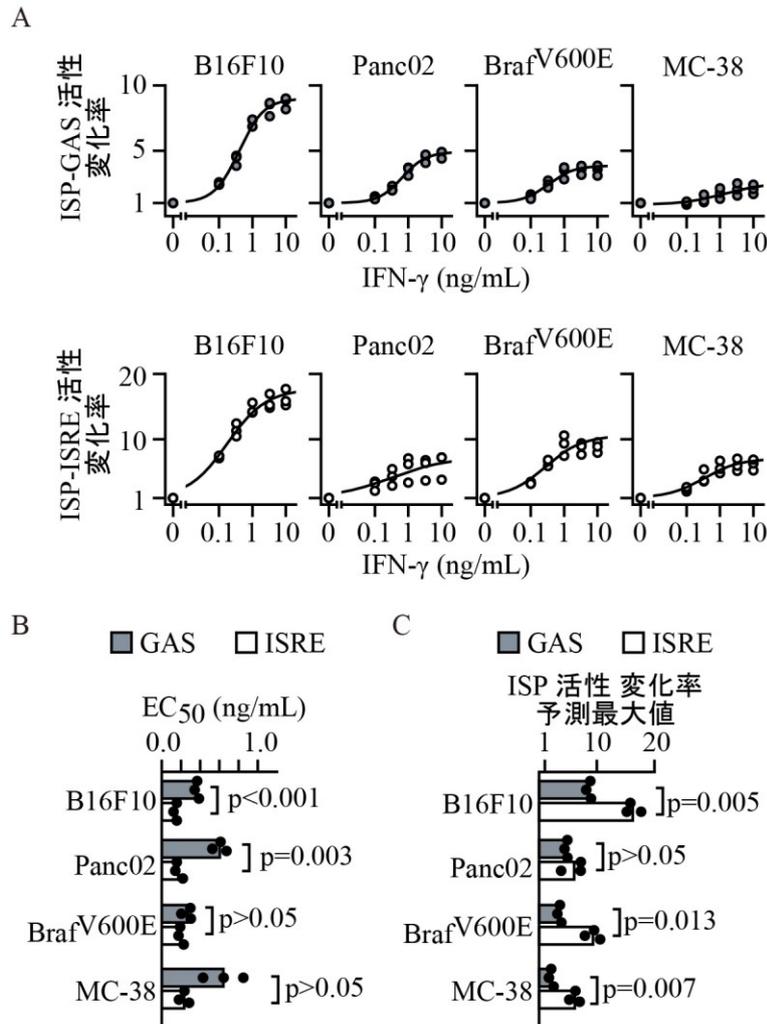


図 15 ISP は様々な細胞種で IFN- γ 刺激に対する濃度依存的活性上昇を示す

(A)ISP 活性の IFN- γ 濃度依存曲線。ISP-GAS 及び ISP-ISRE を安定的に発現する細胞を 0.1 ng/mL から 10 ng/mL の各濃度の IFN- γ を含む培地、または含まない培地で 24 時間培養し、フローサイトメーターで蛍光を検出した。測定された ISP 活性を、IFN- γ を含まない培地で培養した場合の ISP 活性平均値で標準化し、その平均値をプロットした(n=3)。また、n=3 の平均値を用いて Hill 方程式へのカーブフィッティングを行い、ISP 活性の IFN- γ 濃度依存曲線を描いた。

(B) IFN- γ 濃度依存曲線から求めた、ISP 活性上昇に対する IFN- γ の EC50 値。

(C)IFN- γ 濃度依存曲線から求めた、ISP 活性上昇の理論最大値。

IFN- γ に対する感受性及び ISP の活性上昇度は細胞種により異なる

がん細胞に作用した IFN- γ は JAK-STAT シグナル伝達経路を活性化させ、細胞増殖の抑制や細胞死誘導を引き起こす(Chin et al., 1997; Detjen et al., 2001; Trubiani et al., 1994)。しかしながらこうした IFN- γ に対する感受性は細胞種により様々であることが報告されている(Gerber et al., 2013; Mazzolini et al., 2003; Zoller, 1988)。本研究においても報告の通り、IFN- γ に応答して細胞増殖速度が変化しない細胞種と、低下した細胞種が見られた(図 16A)。Braf^{V600E} 及び MC-38 の増殖速度

が IFN- γ 刺激依存的に変わらなかったのに対し、B16F10 及び Panc02 は IFN- γ 刺激 10 時間後より、増殖速度の低下が見られた。IFN- γ 刺激に対する ISP の活性上昇を細胞種間で比較するため、ISP を発現する各細胞種を IFN- γ で刺激し、ISP の活性を測定した。その結果、ISP-GAS 及び ISP-ISRE とも活性度は細胞種によって差があり、Braf^{V600E} 細胞や MC-38 細胞に比べ、B16F10 細胞や Panc02 細胞では ISP 活性が高い傾向にあった(図 16B)。このとき Turquoise-GL の蛍光強度で表される PGK プロモーター活性は細胞種間で大きな差はなく(図 16C)、したがって細胞種間で見られる ISP 活性の違いは IFN- γ 応答性プロモーター活性の違いによるものであることが示された。

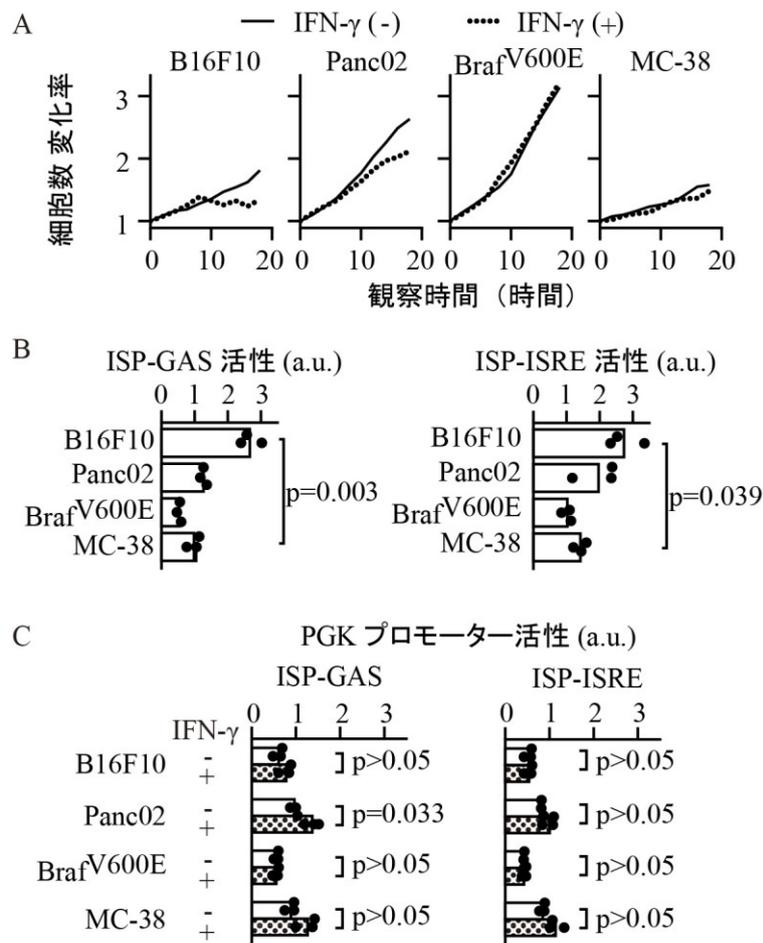


図 16 IFN- γ に対する感受性及び ISP の活性上昇度は細胞種により異なる

(A)各細胞種を 10 ng/mL IFN- γ を含む培地、または含まない培地で培養したときの細胞増殖曲線。

(B) IFN- γ 刺激時の ISP 活性。ISP 発現細胞を 10 ng/mL IFN- γ を含む培地で 24 時間培養し、フローサイトメーターで蛍光を検出した。測定された ISP 活性の平均値をプロットし、n=3 の平均値を棒グラフで示した。

(C) PGK 安定発現プロモーター活性。測定された PGK 安定発現プロモーター活性の平均値をプロットし、n=3 の平均値を棒グラフで示した。

ISP の生体内利用

STAT1 バイオセンサーを発現する $Braf^{V600E}$ 細胞は、担がん後5日で STAT1 の核内移行を呈する

生体内におけるがん細胞の IFN- γ 応答を STAT1 バイオセンサーで検出できるかどうかを検証するため、核内マーカーを付加した STAT1-YPet を発現する $Braf^{V600E}$ 細胞をマウス皮下に担がんした。担がん後 5 日、7 日、9 日経過後、皮下に形成された腫瘍を剖出し二光子顕微鏡で観察したところ、STAT1-YPet は細胞全体に、Turquoise2-GL-NLS は主に核内で発現している様子が観察された(図 17A)。また、担がん後 5 日の時点においてのみ、STAT1-YPet の局在が核内にやや寄っているように観察された。そこで核における NA を算出したところ、担がん後 5 日後での NA は、担がん後 7 日、9 日後の NA に比べ、有意に上昇していた。

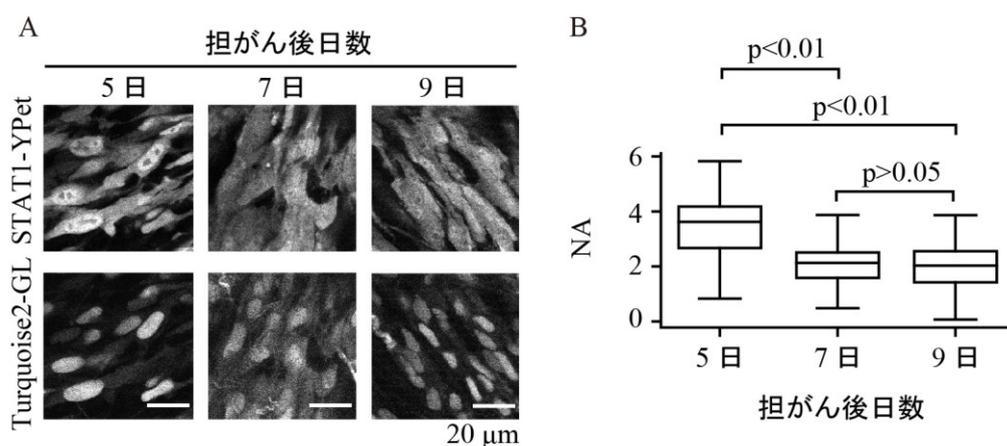


図 17 STAT1 バイオセンサーを発現する $Braf^{V600E}$ 細胞は、担がん後5日で STAT1 の核内移行を呈する

(A) 核内マーカーを付加した STAT1-YPet を発現する $Braf^{V600E}$ 細胞をマウス皮下に担がんした。皮下担がん後 5 日、7 日、9 日経過後に二光子顕微鏡で観察した。STAT1-YPet 及び Turquoise2-GL-NLS 代表画像を示した。

(B) 二光子顕微鏡観察により得られた画像より $Braf^{V600E}$ 細胞の核内 NA を算出し、担がん後日数間で比較した。箱ひげ図で示した。

ISP-GAS はマウス生体内において IFN- γ 受容体依存的な活性上昇を示す

生体内におけるがん細胞の IFN- γ 応答を ISP で検出できるかどうかを検証するため、ISP-GAS または ISP-ISRE を発現する B16F10 をマウス皮下に担がんした。ISP は IFN- γ 刺激に応答して蛍光タンパク質 mCherry と生物発光酵素 Akaluc の融合タンパク質を発現するため、がん細胞の IFN- γ 応答を生物発光で検出できると考えられる。そこで、ISP 発現 B16F10 が皮下担がんされたマウスに発光基質 Akalumine を投与し、発光検出を行った。比較対象として IFN- γ 非感受である *Ifngr1* 遺伝子欠損株を用意した。その結果、皮下担がんした箇所において腫瘍が形成され、発光シグナルが検出された(図 18A)。その強さは担がん 7 日後の時点で、野生型株のほうが *Ifngr1* 遺伝子欠損株よりも強かった(図 18B)。発光シグナルの強さは腫瘍中に含まれるがん細胞数にも依存すると考えられるため、野生型株と *Ifngr1* 遺伝子欠損株とで形成された腫瘍塊の大きさを比較

した。その結果、担がん7日後の時点で、優位な差はなかった(図 18C)。以上のことから ISP-GAS は生体内の IFN- γ シグナル経路を特異的にモニターすると結論付けられた。

一方で ISP-ISRE 発現 B16F10 をマウス皮下に担がんした場合、皮下担がんした箇所において発光シグナルが検出されたものの、その強さは担がん7日後の時点で、野生型株と *Ifngr1* 遺伝子欠損株との間で差は見られなかった(図 18B)。形成された腫瘍塊の大きさでも同様に優位な差は見られなかった(図 18C)。このことから ISP-ISRE は生体内がん細胞における IFN- γ 応答の検出には利用できないと結論付けられた。

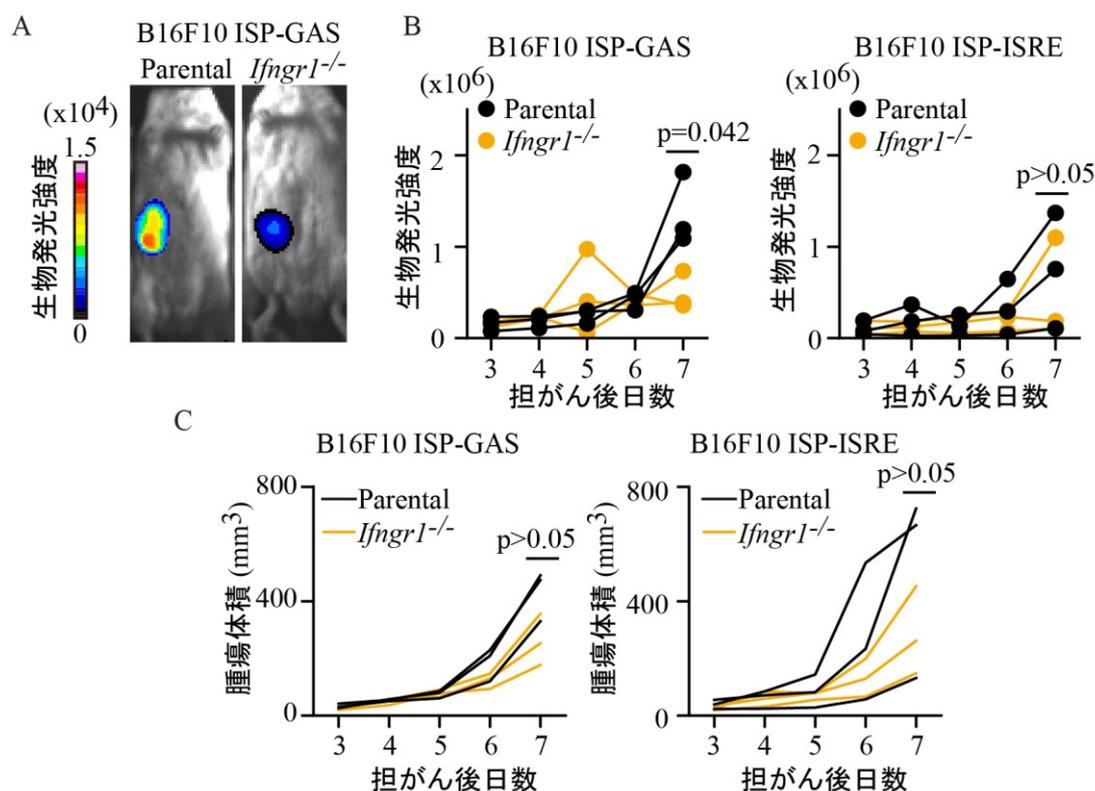


図 18 ISP-GAS はマウス生体内において IFN- γ 受容体依存的な活性上昇を示す

(A)ISP 発現 B16F10 細胞の皮下担がんと、発光イメージングの様子。野生型株または *Ifngr1* 遺伝子欠損株に ISP を導入したものを用意し、それぞれ B6 アルビノマウスに皮下担がんした。ISP-GAS 発現 B16F10 を皮下担がんして 7 日後の、明視野画像及びカラーで示された発光強度画像の重ね合わせ画像を示した。

(B)皮下担がん箇所検出された発光強度。

(C)皮下担がん箇所形成された腫瘍の体積。

Gnaq 遺伝子欠損 Braf^{V600E} 細胞が形成する腫瘍微小環境では IFN- γ 応答増強が観測される

Braf^{V600E} はトロンボキサン A2 を介した GqPCR の活性化により、腫瘍微小環境における免疫逃避を実現していることが報告されている (Konishi et al., 2021)。活性化された GqPCR はプロスタグランジン E2 の分泌を誘導し、IFN- γ の主要な放出元の一つである NK 細胞が腫瘍微小環境内にリクルートされることを阻害する (Zelenay et al., 2015)。そこで腫瘍微小環境内で起こるがん

細胞の IFN- γ 応答に対する、GqPCR シグナル伝達経路の影響を調べた。Gq タンパク質 α サブユニット遺伝子の欠損株に ISP-GAS を導入し、皮下担がんした。このマウスに発光基質を投与し、発光検出を行った。皮下担がんした箇所において発光シグナルが検出され、その強さは担がん7日後の時点で、野生型株のほうが *Ifngr1* 遺伝子欠損株よりも強い傾向が見られたものの、統計的に有意な差は見られなかった(図 19A)。一方で *Gnaq* 遺伝子欠損株については、*Gnaq* 遺伝子及び *Ifngr1* 遺伝子ダブルノックアウト株と比較し、強い発光シグナルが見られた。このことは *Gnaq* 遺伝子欠損 *Braf*^{V600E} により形成される腫瘍微小環境中に、IFN- γ がより多く存在することを示唆している。さらに、形成された腫瘍塊の大きさを比較すると、*Gnaq* 遺伝子欠損株と、*Gnaq* 遺伝子及び *Ifngr1* 遺伝子ダブルノックアウト株との間で、有意な差が見られた(図 19B)。

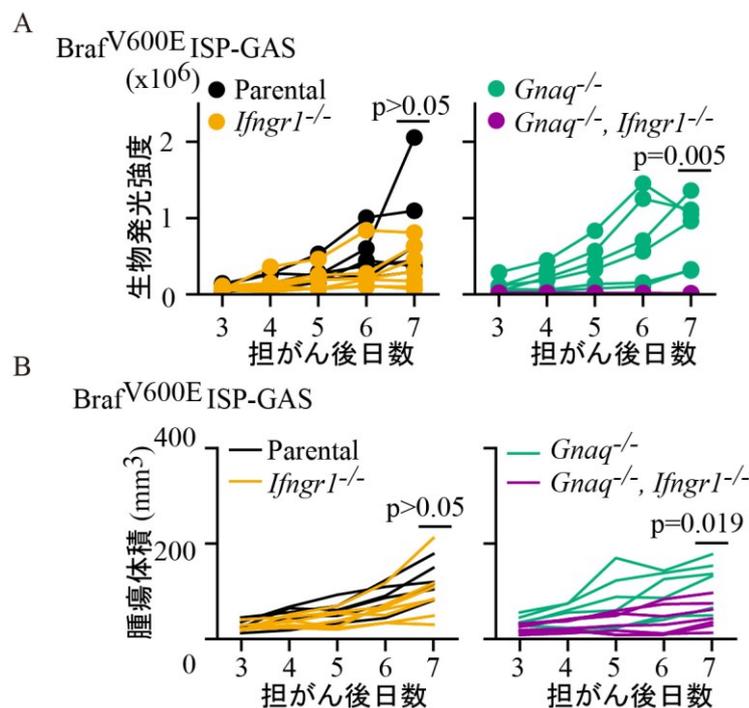


図 19 *Gnaq* 遺伝子欠損 *Braf*^{V600E} 細胞が形成する腫瘍微小環境では発光を指標とした IFN- γ 応答増強が観測される

Braf^{V600E} 細胞の野生型株、*Ifngr1* 遺伝子欠損株、*Gnaq* 遺伝子欠損、及び *Gnaq* 遺伝子と *Ifngr1* 遺伝子のダブルノックアウト株に ISP を導入したものを用意し、それぞれ B6 アルビノマウスに皮下担がんした。

(A)皮下担がん箇所検出された発光強度。

(B)皮下担がん箇所形成された腫瘍の体積。

Gnaq 遺伝子欠損株と、*Gnaq* 遺伝子及び *Ifngr1* 遺伝子ダブルノックアウト株間で見られた発光シグナルの差が、腫瘍塊の大きさの差に起因する可能性を否定できない。そこで ISP-GAS の IFN- γ 応答を一細胞の分解能で調べる必要がある。皮下に形成された腫瘍を剖出し二光子顕微鏡で観察したところ、mCherry は細胞全体一様に、Turquoise-GL は主に核内で発現している様子が

観察された(図 20A)。核の境界を識別することにより、二光子観察において ISP-GAS の活性を細胞レベルで評価することができる。がん細胞の ISP-GAS activity を核内の mCherry/Turquoise として算出した。*Gnaq* 遺伝子欠損株における ISP-GAS activity は野生型株と比較して高い傾向にあった(図 20B)。PGK プロモーター活性は *Gnaq* 遺伝子及び *Ifngr1* 遺伝子ダブルノックアウト株を除き、大差なかった。また、腫瘍を切り出して破碎しフローサイトメトリーで分析した場合も *Gnaq* 遺伝子欠損株における ISP-GAS activity は野生型株と比較して高い傾向にあり、統計的な有意差が見られた(図 20C)。これらの結果は *Gnaq* 遺伝子欠損株により形成される腫瘍微小環境内で IFN- γ がより豊富であることを示唆する。

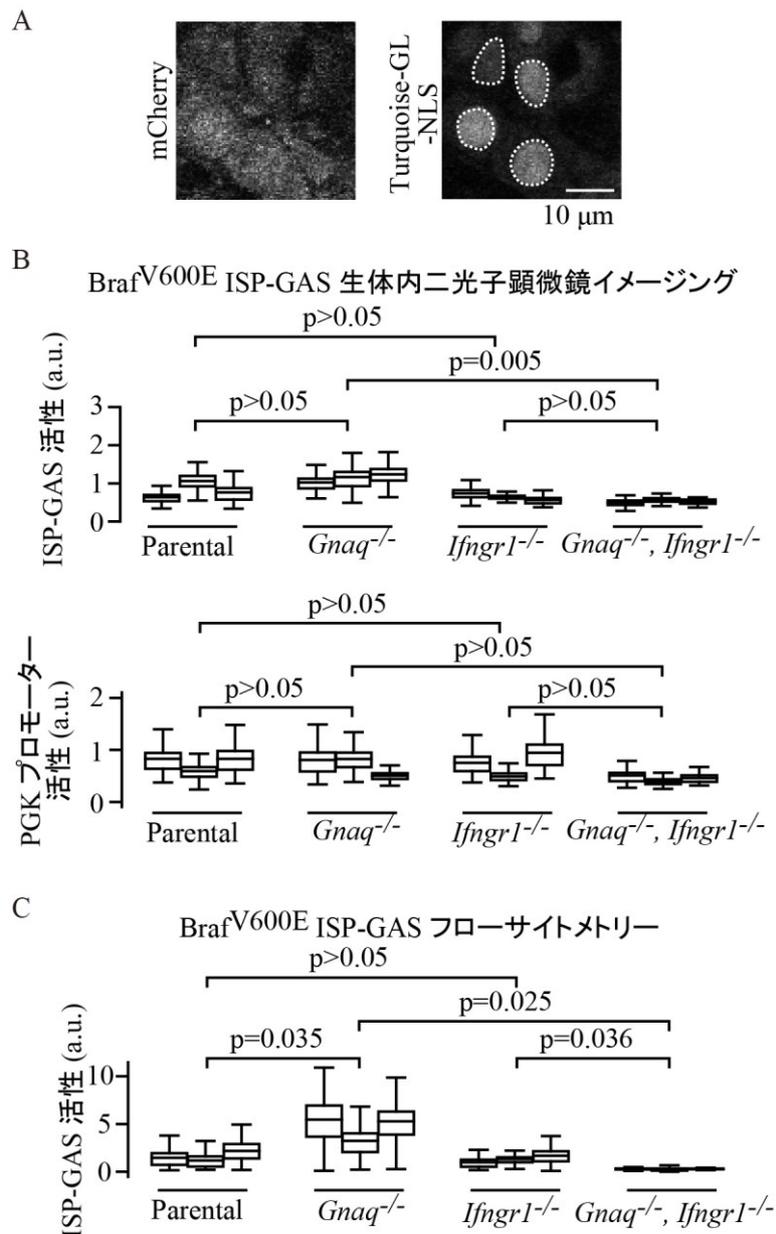


図 20 *Gnaq* 遺伝子欠損 Braf^{V600E} 細胞が形成する腫瘍微小環境では一細胞レベルでの蛍光観察を指標とした IFN- γ 応答増強が観測される

(A)皮下担がん 7 日後、皮下に形成された腫瘍を剖出し二光子顕微鏡で観察した。mCherry 及び

Turquoise-GL-NLS の観察画像を示し、Turquoise-GL-NLS で標識される核領域のの辺縁を白破線で縁取った。

(B)二光子顕微鏡観察により得られた ISP-GAS 活性及び PGK プロモーター活性の細胞間比較。箱ひげ図で示した。

(C)腫瘍のフローサイトメトリー解析により得られた ISP-GAS 活性の細胞間比較。箱ひげ図で示した。

考察

STAT1 バイオセンサーの核内移行は細胞の IFN- γ 初期応答を一細胞レベルで可視化する

がん細胞の IFN- γ 応答を一細胞の分解能で検出するバイオセンサー構築のため、STAT1 の核内移行及びホモ二量体化を検出するバイオセンサーを作製した。STAT1 に蛍光タンパク質を付加したバイオセンサーは、IFN- γ に応答して核内移行する様子を定量的に評価するのに有用であった。本研究においては STAT1 のホモ二量体化を蛍光凝集点として可視化するべく homoFluoppi システムも応用したが、IFN- γ 未刺激の状態でも蛍光凝集点が形成されることがわかり、IFN- γ 応答を可視化するバイオセンサーとしては不十分であった。ここで STAT1 は、JAK-STAT シグナル伝達経路が活性化されていない状態でも二量体を形成することが報告されている (Castro et al., 2018)。homoFluoppi システムを応用した STAT1 バイオセンサーが IFN- γ 未刺激の状態で示していた蛍光凝集点形成は、このような非活性化状態の STAT1 ホモ二量体化を可視化していた可能性がある。

STAT1 バイオセンサーを用いた IFN- γ 応答の定量には問題点も残る。バイオセンサーの発現量が高い場合、IFN- γ 応答に伴う核内移行が妨げられ、IFN- γ 応答を評価が不能となってしまう可能性がある (Han et al., 2011)。本研究においても STAT1 バイオセンサーの発現量が高い場合は IFN- γ に応答した核内移行が妨げられる様子が観察されている。これは、STAT1 バイオセンサーの発現量が多い場合に、核内移行が達成されるまでに時間がかかり、細胞があたかも IFN- γ に対し無反応であるかのように見える傾向にあることを示唆している。本研究においてはこの点を考慮し、STAT1 バイオセンサーの発現量が低いものを選別して用いていた。しかしながらその発現量は依然として高く、内在性 STAT1 のおよそ 30 倍であった。STAT1 バイオセンサーの核内移行を指標として IFN- γ 応答を定量する場合、より発現量を抑えたバイオセンサーの導入が求められるであろう。

また、STAT1 バイオセンサーが示す IFN- γ に応答した核内移行は、IFN- γ 応答の初期のみに限定される可能性がある。内因性 STAT1 が IFN- γ 刺激の 24 時間後にも核内に優位に局在する一方、蛍光タンパク質が付加された STAT1 の核内移行は解消してしまうとの観察結果から、蛍光タンパク質が付加された STAT1 は必ずしも内因性 STAT1 の動態と一致するとは限らないことが指摘されている (Koster and Hauser, 1999)。本研究において STAT1 バイオセンサー発現細胞の生体内イメージングを行った際、担がん後 5 日目に比較的高い NA が確認され、この時点でのがん細胞の IFN- γ 応答が可視化されていると考えられた。しかしながら担がん後 7 日目、9 日目には NA は下降していた。STAT1 バイオセンサーの挙動が必ずしも内因性 STAT1 の動態と一致しない場合、担がん後担がん後 7 日目、9 日目における観察結果はがん細胞の IFN- γ 応答を正しく評価できていない可能性がある。したがって STAT1 バイオセンサーを用いた IFN- γ 応答の可視化は、極めて初期の応答を可視化する用途に限定されると思われる。

ISP はがん細胞の IFN- γ 応答を一細胞レベルで可視化する

がん細胞の IFN- γ 応答を一細胞の分解能で検出するバイオセンサー構築のため、下流の転写活性を蛍光及び生物発光で検出するプローブを作製した。IFN- γ シグナル応答性プロモーター下で赤色蛍光タンパク質 mCherry と生物発光酵素 Akaluc の融合タンパク質を発現するプローブを作製し、がん細胞で安定的に発現させた。IFN- γ シグナルに応答しうるプロモーターを選定し、

GAS と ISRE が IFN- γ 応答を示した。生物発光によるプロモーター活性の検出は、腫瘍塊内の細胞数、体表面下の腫瘍の深さ、及び基質注入の技術的な再現性に影響される可能性がある(Baba *et al.*, 2007)。したがってプロモーター活性を蛍光及び生物発光で検出するようバイオセンサーを設計することで、フローサイトメトリーと蛍光顕微鏡による一細胞分解能での IFN- γ 応答可視化を実現した。

ゲノム内への組み込み箇所の影響やコピー数を補正することを目的に、IFN- γ 応答性プロモーターと安定発現プロモーターを双方向に配置した。ISP-GAS 及び ISP-ISRE とともに、IFN- γ 刺激によって mCherry の蛍光強度のみが増加し、Turquoise-GL の蛍光強度は変化しなかった。また、mCherry と Turquoise-GL の蛍光強度には正の直線関係が見られた。このことは、ISP 活性を mCherry と Turquoise-GL の蛍光強度比として定義したように、Turquoise-GL の蛍光強度でゲノム内への組み込み箇所の影響やコピー数を補正できることを示している。この補正は、さまざまな細胞株における IFN- γ 応答を *in vivo* で比較する際に有用である。IFN- γ 応答をさまざまな細胞株間で比較する際、細胞株間での Turquoise-GL 蛍光強度をセルソーティングにより揃えることで、IFN- γ 刺激に対する mCherry の蛍光強度上昇が揃い、細胞株間で比較することができる。また、IFN- γ を含むいくつかのエピジェネティック修飾因子が報告されており(Ivashkiv, 2018; Ivashkiv and Donlin, 2014)、これは ISP の発現を変化させるであろう。実際、本研究において ISP-GAS 発現 *Braf*^{V600E} 細胞をマウス生体に皮下担がんした際、担がん後 7 日目の時点で、*Gnaq* 遺伝子と *Ifngr1* 遺伝子のダブルノックアウト株の Turquoise-GL の強度が低下する傾向がみられた。このことは、ISP による IFN- γ 応答の定量を、ゲノム内への組み込み箇所の影響やコピー数で補正できることを示している。

生物発光は IFN- γ 応答の経時的モニタリングに有用である

ISP は IFN- γ 応答を生物発光による検出を可能とする。これにより、生きているマウスで IFN- γ 応答を経時的にモニタリングすることを容易にする。本研究では、ISP の IFN- γ 依存的な発光シグナルが皮下担がん 7 日目に顕著検出されており、この日時でがん細胞にたいする IFN- γ 応答が現れ始めるという時間情報を得た。蛍光タンパク質タグ付きの STAT1 は、その高速な動態から IFN- γ シグナルの検出に用いられている(Thibaut *et al.*, 2020)ものの、先述の通り長期間での IFN- γ 応答を検出するには不向きであろうと思われる。

ISP は IFN- γ に対する生物学的挙動を予測する

ISP を異なる 4 細胞種に導入して IFN- γ 刺激に対する応答を確かめたところ、ISP の活性上昇は細胞種により異なることがわかった。IFN- γ を感受し分裂阻害が見られた B16F10 と Panc02 では、分裂阻害が見られなかった *Braf*^{V600E} や MC-38 細胞に比べ、IFN- γ 刺激時の ISP-GAS 及び ISP-ISRE が高い傾向にあることを見出した。すなわち、IFN- γ に対する細胞の感受性と、ISP の活性には関係があることが示唆される。したがって ISP は、IFN- γ に対する細胞の生物学的反応を予測するツールとしても使える可能性が示唆された。

ISP-ISRE は、IFN- γ 非依存的な活性上昇を呈す

IFN- γ 応答の可視化プローブとして選定された ISP-ISRE は、必ずしも IFN- γ 特異的な応答見ているとは限らない可能性がある。ISP-ISRE を発現する B16F10 細胞をマウス皮下に担がんし経時

的に生物発光イメージングを行ったところ、IFN- γ 受容体を構成する *Ifngr1* 遺伝子をノックアウトした腫瘍においても野生型株と遜色ない発光が検出された。これは ISRE が IFN- α 、IFN- β 、IFN- ω を含むタイプ I IFN によっても活性化されるというこれまでの観察結果に起因するためであると考えられる (Khiar *et al.*, 2017; Tanaka *et al.*, 1993; Uccellini and Garcia-Sastre, 2018)。そうであれば ISP-ISRE は、さらなる特性評価を経て、II 型 IFN である IFN- γ を含む汎 IFN レポーターとして使用できる可能性がある。

本研究で *Braf*^{V600E} 細胞をマウス皮下に担がんした際、*Ifngr1* 遺伝子欠損細胞が *Gnaq* 遺伝子と *Ifngr1* 遺伝子のダブルノックアウト株細胞よりも高い ISP-GAS 活性を示した。JAK-STAT 経路は、IFN- γ ではなく他のサイトカインを介しても活性化される可能性があると推測される (O'Shea and Plenge, 2012; Salas *et al.*, 2020)。*Gnaq* 遺伝子を欠損した *Braf*^{V600E} 細胞により形成される腫瘍は免疫による腫瘍排除を感受しやすくなることが実証されており (Konishi *et al.*, 2021)、微小環境には IL-12b や IL-10 などのサイトカインが豊富に存在しうる (Zelenay *et al.*, 2015)。したがって *Ifngr1* 遺伝子欠損細胞が *Gnaq* 遺伝子と *Ifngr1* 遺伝子のダブルノックアウト株細胞よりも高い ISP-GAS 活性を示したという観察結果は、腫瘍微小環境中のサイトカイン環境が *Gnaq* 遺伝子欠損により変化したことを示唆している。

結語と展望

STAT1 バイオセンサーは IFN- γ 初期応答を、ISP-GAS は IFN- γ 二次的応答を可視化するバイオセンサーであることが示され、特に双方向性プロモーターを導入した ISP-GAS は、バイオセンサーのゲノム内挿入サイトの影響を克服しうる新規ツールとして有用であることが示された。

本ツールを生体内の腫瘍微小環境における IFN- γ 応答の可視化に利用することで、未だ明らかとなっていない IFN- γ 応答の時空間的情報に関する知見が得られる可能性が期待される。

謝辞

本研究及び論文作成を遂行するにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました松田道行教授、寺井健太准教授に心より感謝申し上げます。また京都大学生体制御学分野の皆様には、日々の研究生活の中で多岐にわたるご支援とご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、これまで著者を支え見守ってくださった家族、友人をはじめとする皆様に深く感謝申し上げます。

田中 泰生

連絡先: tanaka.aisei.73a@st.kyoto-u.ac.jp

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Taisei Tanaka, Yoshinobu Konishi, Hiroshi Ichise, Shinya Tsukiji, Michiyuki Matsuda, and Kenta Terai
A dual promoter system to monitor IFN- γ signaling *in vivo* at single-cell resolution
Cell Structure and Function, 46(2), 103-111, 2021

参考文献

- Adra, C.N., Boer, P.H., and McBurney, M.W. 1987. Cloning and expression of the mouse pgk-1 gene and the nucleotide sequence of its promoter. *Gene*, **60**: 65-74.
- Altan-Bonnet, G. and Mukherjee, R. 2019. Cytokine-mediated communication: a quantitative appraisal of immune complexity. *Nat. Rev. Immunol.*, **19**: 205-217.
- Baba, S., Cho, S.Y., Ye, Z., Cheng, L., Engles, J.M., and Wahl, R.L. 2007. How reproducible is bioluminescent imaging of tumor cell growth? Single time point versus the dynamic measurement approach. *Mol. Imaging*, **6**: 315-322.
- Bardehle, S., Kruger, M., Buggenthin, F., Schwausch, J., Ninkovic, J., Clevers, H., Snippert, H.J., Theis, F.J., Meyer-Luehmann, M., Bechmann, I., Dimou, L., and Gotz, M. 2013. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat. Neurosci.*, **16**: 580-586.
- Beatty, G.L. and Paterson, Y. 2000. IFN-gamma can promote tumor evasion of the immune system in vivo by down-regulating cellular levels of an endogenous tumor antigen. *J. Immunol.*, **165**: 5502-5508.
- Bonavita, E., Bromley, C.P., Jonsson, G., Pelly, V.S., Sahoo, S., Walwyn-Brown, K., Mensurado, S., Moeini, A., Flanagan, E., Bell, C.R., Chiang, S.C., Chikkanna-Gowda, C.P., Rogers, N., Silva-Santos, B., Jaillon, S., Mantovani, A., Reis e Sousa, C., Guerra, N., Davis, D.M., and Zelenay, S. 2020. Antagonistic Inflammatory Phenotypes Dictate Tumor Fate and Response to Immune Checkpoint Blockade. *Immunity*, **53**: 1215-1229 e1218.
- Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Wen, Z.L., Schreiber, R.D., and Darnell, J.E. 1996. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**: 7673-7678.
- Castro, F., Cardoso, A.P., Goncalves, R.M., Serre, K., and Oliveira, M.J. 2018. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front. Immunol.*, **9**: 847.
- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R.A., and Fu, X.Y. 1997. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 5328-5337.
- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Su, W.C., You, Z.H., Iwamoto, Y., and Fu, X.Y. 1996. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science*, **272**: 719-722.
- Cranfill, P.J., Sell, B.R., Baird, M.A., Allen, J.R., Lavagnino, Z., de Gruiter, H.M., Kremers, G.J., Davidson, M.W., Ustione, A., and Piston, D.W. 2016. Quantitative assessment of fluorescent proteins. *Nat Methods*, **13**: 557-562.
- Detjen, K.M., Farwig, K., Welzel, M., Wiedenmann, B., and Rosewicz, S. 2001. Interferon gamma inhibits growth of human pancreatic carcinoma cells via caspase-1 dependent induction of apoptosis. *Gut*, **49**: 251-262.
- Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, **1**: 447-456.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu,

- J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E., and Chen, L. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.*, **8**: 793-800.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R., and Honjo, T. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.*, **192**: 1027-1034.
- Fulda, S. and Debatin, K.M. 2002. IFN γ sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene*, **21**: 2295-2308.
- Garcia-Diaz, A., Shin, D.S., Moreno, B.H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G.A., Zaretsky, J.M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., Parisi, G., Saus, C.P., Torrejon, D.Y., Graeber, T.G., Comin-Anduix, B., Hu-Lieskovan, S., Damoiseaux, R., Lo, R.S., and Ribas, A. 2017. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.*, **19**: 1189-1201.
- Gerber, S.A., Sedlacek, A.L., Cron, K.R., Murphy, S.P., Frelinger, J.G., and Lord, E.M. 2013. IFN- γ mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor. *Am. J. Pathol.*, **182**: 2345-2354.
- Han, F., Liang, P., Wang, F., Zeng, L., and Zhang, B. 2011. Automated analysis of time-lapse imaging of nuclear translocation by retrospective strategy and its application to STAT1 in HeLa cells. *PLoS One*, **6**: e27454.
- Han, F., Luo, Y., Ge, N., and Xu, J. 2008. Construction of fluorescence resonance energy transfer vectors and their application in study of structure and function of signal transducers and activators of transcription 1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **40**: 934-942.
- Hoekstra, M.E., Bornes, L., Dijkgraaf, F.E., Philips, D., Pardieck, I.N., Toebes, M., Thommen, D.S., van Rheenen, J., and Schumacher, T.N.M. 2020. Long-distance modulation of bystander tumor cells by CD8(+) T cell-secreted IFN γ . *Nat Cancer*, **1**: 291-301.
- Huse, M., Lillemeier, B.F., Kuhns, M.S., Chen, D.S., and Davis, M.M. 2006. T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat. Immunol.*, **7**: 247-255.
- Ivashkiv, L.B. 2018. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, **18**: 545-558.
- Ivashkiv, L.B. and Donlin, L.T. 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.*, **14**: 36-49.
- Iwano, S., Sugiyama, M., Hama, H., Watakabe, A., Hasegawa, N., Kuchimaru, T., Tanaka, K.Z., Takahashi, M., Ishida, Y., Hata, J., Shimozono, S., Namiki, K., Fukano, T., Kiyama, M., Okano, H., Kizaka-Kondoh, S., McHugh, T.J., Yamamori, T., Hioki, H., Maki, S., and Miyawaki, A. 2018. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science*, **359**: 935-939.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., and Smith, A.E. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, **39**: 499-509.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance

- system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**: 7556-7561.
- Key, J. and Leary, J.F. 2014. Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine. *Int J Nanomedicine*, **9**: 711-726.
- Khlar, S., Lucas-Hourani, M., Nisole, S., Smith, N., Helynck, O., Bourguine, M., Ruffie, C., Herbeuval, J.P., Munier-Lehmann, H., Tangy, F., and Vidalain, P.O. 2017. Identification of a small molecule that primes the type I interferon response to cytosolic DNA. *Sci. Rep.*, **7**: 2561.
- Kienast, Y., von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W.E., Goldbrunner, R., Herms, J., and Winkler, F. 2010. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat. Med.*, **16**: 116-122.
- Klein, R., Ruttkowski, B., Knapp, E., Salmons, B., Gunzburg, W.H., and Hohenadl, C. 2006. WPRE-mediated enhancement of gene expression is promoter and cell line specific. *Gene*, **372**: 153-161.
- Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., and Matsuda, M. 2011. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell*, **22**: 4647-4656.
- Komatsu, N., Terai, K., Imanishi, A., Kamioka, Y., Sumiyama, K., Jin, T., Okada, Y., Nagai, T., and Matsuda, M. 2018. A platform of BRET-FRET hybrid biosensors for optogenetics, chemical screening, and in vivo imaging. *Sci. Rep.*, **8**: 8984.
- Konishi, Y., Ichise, H., Watabe, T., Oki, C., Tsukiji, S., Hamazaki, Y., Murakawa, Y., Takaori-Kondo, A., Terai, K., and Matsuda, M. 2021. Intravital Imaging Identifies the VEGF-TXA2 Axis as a Critical Promoter of PGE2 Secretion from Tumor Cells and Immune Evasion. *Cancer Res.*, **81**: 4124-4132.
- Koster, M. and Hauser, H. 1999. Dynamic redistribution of STAT1 protein in IFN signaling visualized by GFP fusion proteins. *Eur. J. Biochem.*, **260**: 137-144.
- Mazzolini, G., Narvaiza, I., Martinez-Cruz, L.A., Arina, A., Barajas, M., Galofre, J.C., Qian, C., Mato, J.M., Prieto, J., and Melero, I. 2003. Pancreatic cancer escape variants that evade immunogene therapy through loss of sensitivity to IFN γ -induced apoptosis. *Gene Ther.*, **10**: 1067-1078.
- Meunier, M.C., Delisle, J.S., Bergeron, J., Rineau, V., Baron, C., and Perreault, C. 2005. T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat. Med.*, **11**: 1222-1229.
- Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F.H., and Verma, I.M. 1998. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.*, **72**: 8150-8157.
- O'Shea, J.J. and Plenge, R. 2012. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity*, **36**: 542-550.
- Okada, Y., Watanabe, T., Shoji, T., Taguchi, K., Ogo, N., and Asai, A. 2018. Visualization and quantification of dynamic STAT3 homodimerization in living cells using homoFluoppi. *Sci. Rep.*, **8**: 2385.
- Pellegrini, S. and Schindler, C. 1993. Early events in signalling by interferons. *Trends Biochem. Sci.*, **18**: 338-342.
- Reynolds, C.J., Chong, D.L.W., Li, Y., Black, S.L., Cutler, A., Webster, Z., Manji, J., Altmann, D.M., and Boyton, R.J. 2019. Bioluminescent Reporting of In Vivo IFN γ Immune Responses during Infection and Autoimmunity. *J. Immunol.*, **202**:

2502-2510.

- Ritsma, L., Steller, E.J., Ellenbroek, S.I., Kranenburg, O., Borel Rinkes, I.H., and van Rheenen, J. 2013. Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. *Nat. Protoc.*, **8**: 583-594.
- Romei, M.G. and Boxer, S.G. 2019. Split Green Fluorescent Proteins: Scope, Limitations, and Outlook. *Annu Rev Biophys*, **48**: 19-44.
- Salas, A., Hernandez-Rocha, C., Duijvestein, M., Faubion, W., McGovern, D., Vermeire, S., Vetrano, S., and Vande Casteele, N. 2020. JAK-STAT pathway targeting for the treatment of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **17**: 323-337.
- Samsonov, A., Zenser, N., Zhang, F., Zhang, H., Fetter, J., and Malkov, D. 2013. Tagging of genomic STAT3 and STAT1 with fluorescent proteins and insertion of a luciferase reporter in the cyclin D1 gene provides a modified A549 cell line to screen for selective STAT3 inhibitors. *PLoS One*, **8**: e68391.
- Sanderson, N.S., Puntel, M., Kroeger, K.M., Bondale, N.S., Swerdlow, M., Iranmanesh, N., Yagita, H., Ibrahim, A., Castro, M.G., and Lowenstein, P.R. 2012. Cytotoxic immunological synapses do not restrict the action of interferon-gamma to antigenic target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**: 7835-7840.
- Schiessl, I.M. and Castrop, H. 2016. Deep insights: intravital imaging with two-photon microscopy. *Pflugers Arch.*, **468**: 1505-1516.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, **22**: 1567-1572.
- Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M., and Pachitariu, M. 2021. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods*, **18**: 100-106.
- Takeda, K., Nakayama, M., Hayakawa, Y., Kojima, Y., Ikeda, H., Imai, N., Ogasawara, K., Okumura, K., Thomas, D.M., and Smyth, M.J. 2017. IFN- γ is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoediting. *Nat Commun*, **8**: 14607.
- Tanaka, N., Kawakami, T., and Taniguchi, T. 1993. Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 4531-4538.
- Taniguchi, K., Petersson, M., Hoglund, P., Kiessling, R., Klein, G., and Karre, K. 1987. Interferon gamma induces lung colonization by intravenously inoculated B16 melanoma cells in parallel with enhanced expression of class I major histocompatibility complex antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**: 3405-3409.
- Thibaut, R., Bost, P., Milo, I., Cazaux, M., Lemaitre, F., Garcia, Z., Amit, I., Breart, B., Cornuot, C., Schwikowski, B., and Bousso, P. 2020. Bystander IFN-gamma activity promotes widespread and sustained cytokine signaling altering the tumor microenvironment. *Nat Cancer*, **1**: 302-314.
- Trubiani, O., Bosco, D., and Di Primio, R. 1994. Interferon-gamma (IFN-gamma) induces programmed cell death in differentiated human leukemic B cell lines. *Exp. Cell Res.*, **215**: 23-27.
- Uccellini, M.B. and Garcia-Sastre, A. 2018. ISRE-Reporter Mouse Reveals High Basal and Induced Type I IFN Responses in Inflammatory Monocytes. *Cell Rep.*, **25**: 2784-2796

e2783.

- Watanabe, T., Seki, T., Fukano, T., Sakaue-Sawano, A., Karasawa, S., Kubota, M., Kurokawa, H., Inoue, K., Akatsuka, J., and Miyawaki, A. 2017. Genetic visualization of protein interactions harnessing liquid phase transitions. *Sci. Rep.*, **7**: 46380.
- Weihua, X., Kolla, V., and Kalvakolanu, D.V. 1997. Interferon gamma-induced transcription of the murine ISGF3gamma (p48) gene is mediated by novel factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**: 103-108.
- Yamauchi, F., Kamioka, Y., Yano, T., and Matsuda, M. 2016. In Vivo FRET Imaging of Tumor Endothelial Cells Highlights a Role of Low PKA Activity in Vascular Hyperpermeability. *Cancer Res.*, **76**: 5266-5276.
- Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., and Bradley, A. 2009. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods*, **6**: 363-369.
- Zelenay, S., van der Veen, A.G., Bottcher, J.P., Snelgrove, K.J., Rogers, N., Acton, S.E., Chakravarty, P., Girotti, M.R., Marais, R., Quezada, S.A., Sahai, E., and Reis e Sousa, C. 2015. Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell*, **162**: 1257-1270.
- Zoller, M. 1988. IFN-treatment of B16-F1 versus B16-F10: relative impact on non-adaptive and T-cell-mediated immune defense in metastatic spread. *Clin. Exp. Metastasis*, **6**: 411-429.