

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08602

研究課題名(和文) セマフォリン7Aを標的とする、EGFR遺伝子変異陽性肺癌の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategies for EGFR mutation-positive lung cancer by targeting semaphorin 7A

研究代表者

長友 泉 (Nagatomo, Izumi)

大阪大学・キャンパスライフ健康支援・相談センター・教授

研究者番号：10570583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の抗腫瘍免疫に関して、当初の標的としたセマフォリン7Aではなく、セマフォリン4Aが関与する新しい機序を発見した。インターロイキン33(IL-33)が樹状細胞(DCs)のセマフォリン4A(SEMA4A)発現を誘導し、細胞傷害性T細胞(CTLs)を活性化させた結果、IFN- $\gamma$ を介する著明な抗腫瘍免疫反応が生じた。SEMA4Aノックアウトマウスでは、この効果は認められず、IL-33の抗腫瘍免疫にとってSEMA4Aが必須であった。腫瘍微小環境におけるDCsとCTLsの、IL-33誘導性・SEMA4A媒介性の相互活性化メカニズムは、これまでに知られていない新規の機序である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、肺癌においてインターロイキン33とセマフォリン4Aが抗腫瘍免疫にとって重要であることが証明された。また、これらの分子が治療標的となり得ること、及び、樹状細胞活性化状態のバイオマーカーとしても応用出来る可能性が示唆された。本研究で得られたデータを基に、ヒト肺癌患者においてもデータやサンプルを用いた解析を行い、臨床応用に向けて更に研究を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：We have discovered a new mechanism of lung cancer antitumor immunity involving semaphorin 4A (SEMA4A) instead of the original target semaphorin 7A. Interleukin 33 (IL-33) induces semaphorin 4A expression in dendritic cells (DCs), resulting in activation of cytotoxic T cells (CTLs) and IFN- $\gamma$ -mediated antitumor immune responses. This effect was not observed in SEMA4A knockout mice, demonstrating that SEMA4A is essential for the antitumor immunity by IL-33. The IL-33-induced, SEMA4A-mediated mutual activation of DCs and CTLs in the tumor microenvironment is a novel, previously unknown mechanism.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：セマフォリン がん免疫 肺癌薬物療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) EGFR 遺伝子変異陽性の進行非小細胞肺癌 (NSCLC) の治療において、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) の有効性は明らかであるが、耐性化が必発であり、その克服が大きな課題である。我々は先行研究において、変異EGFRシグナルのエフェクターとしてセマフォリン7A (SEMA7A) の過剰発現を同定し、肺癌細胞におけるSEMA7A発現がEGFR-TKI耐性化を促進することを明らかにした。

(2) 分子標的治療薬と並ぶ、進行肺癌の治療の柱は、免疫チェックポイント阻害薬である。その有効性は個人差が大きいが、それは薬剤投与前の腫瘍免疫活性化状況に左右されるためと考えられている。セマフォリンファミリーは免疫シグナルで重要な役割を果たしているため、(1)に記載した細胞内シグナル伝達への関与に加え、免疫療法のバイオマーカーや治療標的となる可能性がある。

### 2. 研究の目的

(1) 肺癌細胞のSEMA7A発現がEGFR-TKIの効果予測バイオマーカーであることを、臨床検体を使用して確認する。その結果を踏まえ、培養細胞とマウスを使用して、SEMA7A高発現により経時的にEGFR-TKI耐性化が生じるメカニズムを解明する。更に、耐性化細胞の治療法、及び、耐性化予防法の開発に向けた、基礎的なデータを得ることを主たる目的とする。

(2) SEMA7Aを含むセマフォリンファミリーは多彩な機能を有しているため、発現している細胞の種類や状態により、複雑なフェノタイプを示す。(1)に記載した Cell-Autonomous な作用のみならず、Non-Cell-Autonomous な作用、とりわけ、肺癌微小環境における免疫細胞に発現したセマフォリン分子の腫瘍免疫への関与を明らかにし、新たな診断・治療に向けた知見を得ることを副次的な目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 臨床検体を使用：

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の病理組織検体を使用して、SEMA7A 免疫染色スコアを計測する。高発現 50 例・低発現 50 例を当初の目標とする。組織検体に加えて、血清の ELISA によりデータを補完する。

#### 培養細胞とマウスを使用：

-1. EGFR遺伝子変異陽性ヒト肺癌細胞株と、免疫不全マウス (ヌードマウス) を使用して、「肺癌細胞のEGFR-TKI感受性が経時的に変化するメカニズム」の解析を行う。3次元培養 (マトリゲル等) にて長期間のEGFR-TKI曝露を行い、耐性化に至る経時的な変化を、イメージングサイトメーター (IN Cell Analyzer) 等により解析する。続いて、ヌードマウスでXenograftを形成させて、EGFR-TKI長期投与を行い、腫瘍形成を観察する。シグナル伝達については、抽出標本を使用して、リン酸化タンパクのメンブレン抗体アレイや蛍光標識抗体を用いた解析を行う。

-2. マウス肺腺癌細胞株 (LLC; Lewis lung carcinoma) と、同系のマウス (C57BL6) を使用した、Syngeneic Transplantation モデルを構築する。セマフォリンファミリー分子のノック

アウトマウスも併用する。セマフォリンと関連するサイトカインの投与による腫瘍細胞形成能の解析をまず行う。続いて、全身及び腫瘍局所の免疫細胞（T細胞、NK細胞、マクロファージ、樹状細胞等）の動態や活性化状態を、フローサイトメーターやELISAを用いて解析し、Non-Cell-Autonomous な機序による治療感受性の変化を解明する。

#### 4. 研究成果

臨床検体を使用：

本研究課題開始後、症例の集積が進まずに進捗が滞っていたところ、新型コロナウイルス感染症の流行が重なり、臨床サンプルの収集・解析が更に困難になってしまった。やむを得ず方針を転換し、臨床サンプルを使用せず、培養細胞とマウスを使用する実験を進めることとなった。

培養細胞とマウスを使用：

当初は、シグナル伝達を主とする解析を計画していたが、その計画は の臨床サンプルの解析にて予想通りの結果が得られることを前提としていたため、計画の変更を余儀なくされた。その結果、「代替活性化シグナルを抑制し、薬剤耐性を克服する」という方向性から、「セマフォリンを鍵として腫瘍免疫を増強し、（分子標的薬に限定せず）治療耐性を克服する」という、異なる方向性で研究を進めていく方針に転換した。

先行研究において腫瘍免疫に関連するサイトカインを探索し、その中から特にインターロイキン33（IL-33）に注目した。既報では、IL-33は腫瘍免疫を促進するという報告と抑制するという報告の両方があり、結論が得られていない状況であったが、我々が検証したところ、LLC と C57BL6 の系では IL-33 の腹腔内投与により著明な腫瘍縮小効果が認められた。その機序を探索した結果、次のような知見が得られた。

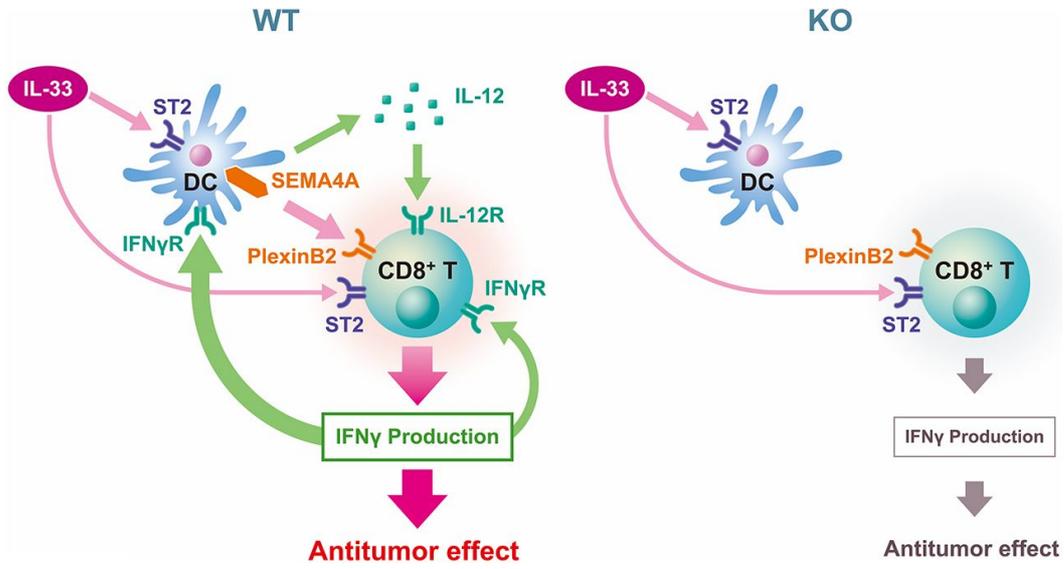
- (i) IL-33 の投与により、宿主の樹状細胞（DC）においてセマフォリン分子の発現が強く誘導された。中でもセマフォリン4A（SEMA4A）の発現誘導が顕著であった。
- (ii) DC で発現誘導された SEMA4A が、細胞傷害性T細胞（CTL）に発現するレセプター分子（PLXNB2）を介して、CTLを活性化させた。
- (iii) 活性化CTLから産生されたインターフェロン（IFN）が、抗腫瘍効果にとって重要であった。

これらの一連の作用は、SEMA4A ノックアウトマウスでは消失しており、IL-33による抗腫瘍免疫にとって SEMA4A が不可欠の分子であることが証明された。

また、更に詳細に解析したところ、IFN とインターロイキン12（IL-12）の positive feedback が存在することを証明した。すなわち、活性化 DC による CTL 活性化の結果、CTL から分泌された IFN が逆に DC を刺激し、DC による IL-12 産生を促進させ、それが CTL に作用して更なる活性化を促進していた。

これらの成果について、学会報告を3回（2020年度に1回、2021年度に2回）行った。また、2021年度には学術雑誌に論文を投稿し、受理・掲載された。

(成果の概略図)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suga Y, Nagatomo I, Kinehara Y, Koyama S, Okuzaki D, Osa A, Naito Y, Takamatsu H, Nishide M, Nojima S, Ito D, Tsuda T, Nakatani T, Nakanishi Y, Futami Y, Koba T, Satoh S, Hosono Y, Miyake K, Fukushima K, Shiroyama T, Iwahori K, Hirata H, Takeda Y, Kumanogoh A.	4. 巻 207
2. 論文標題 IL-33 Induces Sema4A Expression in Dendritic Cells and Exerts Antitumor Immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1456 ~ 1467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 菅 泰彦、長友 泉、小山 正平、内藤 祐二郎、福島 清春、三宅 浩太郎、白山 敬之、平田 陽彦、岩堀 幸太、武田 吉人、熊ノ郷 淳
2. 発表標題 IL-33は樹状細胞のSema4A発現を増強させ、抗腫瘍効果を示す
3. 学会等名 第61回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiko Suga, Izumi Nagatomo, Shohei Koyama, Koutarou Miyake, Atsushi Kumanogoh
2. 発表標題 Semaphorin 4A on dendric cells contributes to IL-33 induced antitumor immunity
3. 学会等名 The 27th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅 泰彦、長友 泉、小山 正平、三宅 浩太郎、熊ノ郷 淳
2. 発表標題 IL-33は腫瘍環境を修飾し抗腫瘍免疫を高めることで腫瘍増殖を抑える
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------