

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08511

研究課題名(和文) IPF合併肺癌におけるマクロファージ免疫チェックポイント分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular regulation mechanisms of immune checkpoints by macrophages in IPF-related lung cancer

研究代表者

関根 郁夫 (Sekine, Ikuo)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：10508310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肺癌サンプルのシングルセル RNA シーケンスと空間オミックス解析を行ったが、肺構成細胞のアンバランスが目立つ結果しか得られなかった。ヒト肺サンプルから作成したPulmosphereによる解析では、Thromboxane-Prostanoid Receptor signalingの下流にVISTA (V-domain Ig-containing Suppressor of T cell Activation)が位置していることが示唆された。ヒト肺癌サンプルから作成した肺癌sphereでは、マクロファージVISTAのノックアウトによって肺癌細胞の数、増殖能に変化を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初想定したIPF合併肺癌の病態におけるVISTAの役割は確定的に示すことは出来なかった。そのため、我々は肺線維症と肺癌の両方の病態を促進する抗原提示細胞のcomponentとして候補に挙がっていたLAMP3 (lysosomal associated membrane protein 3)に研究の軸足を移すことにした。IPF合併肺癌の病態は複雑で、完全解明までの道のりは未だ遠いが、その一つの道筋は得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the role of macrophage immune checkpoints in IPF-associated lung cancer. Single-cell RNA sequencing and spatial omics analysis of human lung cancer samples yielded only biased results due to a noticeable imbalance in lung constituent cells. Analysis with Pulmosphere generated from human lung samples suggested that VISTA (V-domain Ig-containing Suppressor of T cell Activation) was located in the downstream of Thromboxane-Prostanoid Receptor signaling. In lung cancer spheres generated from lung cancer cells, noncancerous epithelial cells, lung fibroblasts, and macrophages isolated from human lung cancer samples, knockout of macrophage VISTA did not alter the number or proliferative potential of lung cancer cells.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：特発性肺線維症 肺癌 マクロファージ 免疫チェックポイント VISTA

## 1 . 研究開始当初の背景

特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis : IPF) は慢性かつ進行性の経過をたどり、高度な線維化が進行して不可逆性の蜂巢肺形成を来す原因不明の肺疾患である。肺の線維化は慢性炎症/組織傷害に引き続く異常修復過程であり、そこではマクロファージが中心的役割を演じていると考えられている。一方、IPFは肺癌を高率に合併し、その合併率は喫煙者のその7~14倍に及ぶ。IPFに合併した肺癌の多くが末梢肺線維化領域に発生することから、そこに肺癌の発癌/悪性化を育む微小環境が存在すると考えられる。

最近、肺癌では間質組織に多い免疫抑制細胞Tumor-associated macrophages (TAM)が免疫チェックポイント分子VISTA (V- domain Ig- containing Suppressor of T cell Activation)を高発現し、活性化T細胞反応を低下させている事が明らかになった(Blando J, et al. Proc Natl Acad Sci U.S.A., 2019)。しかし、VISTAがいかなるマクロファージのsubpopulationに発現するか、VISTAの発現を制御する因子が何か、さらにIPFやIPF合併肺癌の病態形成にVISTAがいかなる役割を果たしているかについてはよく分かっていない。

## 2 . 研究の目的

本研究の目的は、1 )VISTA が IPF 合併肺癌においても抑制性の免疫チェックポイント分子となっているかについての検証、2 ) VISTA のさらに上流に位置する VISTA 制御因子を同定、3 )VISTA 以外の抑制性のマクロファージ免疫チェックポイント分子の同定することを介して、VISTA の IPF 合併肺癌の病態形成における役割を解明することである。

## 3 . 研究の方法

肺線維症患者から単離した肺上皮、線維芽細胞、マクロファージから構成される Pulmosphere を用いてマクロファージ VISTA シグナルが肺線維症病態形成において果たす役割を検証した後、患者由来肺癌細胞をそれに含めた肺癌 sphere を作成し、同様の検証を行った。肺癌 sphere における検証においては、PC9 細胞株を利用した EGFR 変異肺癌 sphere でも検証を行い、erlotinib 併用下で VISTA 発現をコントロールする効果も確認した。

次に肺線維症を母地に発癌したサンプルを用いてシングルセル RNA シーケンス(scRNAseq)を実施し、実際の複雑なヒト癌組織の中で同様の VISTA シグナルによる病態形成が確認できるかを調査した。FFPE サンプルを用いて Xenium in situ 解析、PhenoCyler 解析も実施し、VISTA 発現マクロファージにターゲットを絞った Cell neighborhood analyses を実施し、特に周辺癌細胞と線維芽細胞のエンドタイプを調査した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト肺 Pulmosphere における VISTA シグナル

F2-isoprostanes は細胞膜やリポ蛋白に含まれるリン脂質がフリーラジカルにより酸化されて形成されるプロスタグランジン様の化合物だが、Thromboxane-Prostanoid Receptor (TRr) signaling activation を介して TGF- $\beta$  signaling の上流を制御し、肺線維症の線維芽細胞の活性化維持機構へ深く関与していることを報告した (Suzuki T, et al. Am J Respir Crit Care Med 2022)。同現象は免疫細胞が不在の状況下でも再現でき、線維芽細胞における TPr signaling が免疫細胞を介さない Reactive Oxygen Species (ROS) の直接的な作用でも発生し得ることが明らかになり、Thromboxane A2/B2 を介さない経路であることも判明したが、マクロファージ上に存在する TPr signaling を介しても pulmonary fibroblast activation が起こることを確認した。

ヒト肺サンプルを用いて作成した Pulmosphere を用いた検証では、TPr signal を TPr antagonist で抑制すると、マクロファージ VISTA の発現が低下することが明らかになり、TPr signaling の下流に VISTA signal が位置していることが示唆された。さらに、VISTA signal の抑制によって M2 polarization が抑制されることも確認した。しかし、TPr antagonist の非存在下に CRISPR/Cas9 技術を使用して、マクロファージで VISTA をノックアウトして作成した Pulmosphere では線維芽細胞の活性化が認められ、Pulmosphere のサイズ縮小が認められ線維化の誘導が示された。

### (2) ヒト肺癌 sphere における VISTA シグナル

次にヒト肺癌サンプルより単離した肺癌細胞と非癌上皮細胞、肺線維芽細胞、マクロファージからなる肺癌 sphere を作成し、(1)と同様の検証を行い、VISTA シグナルが肺癌細胞に及ぼす影響を探索した。肺癌サンプルは肺腺癌、肺扁平上皮癌サンプルからそれぞれ単離して実施した。

我々が設計した肺癌 sphere モデルでは、マクロファージ VISTA のノックアウトによって肺癌細胞の数、増殖能に変化を認めなかった。一方、sphere 内の線維芽細胞の  $\alpha$ SMA 陽性率は上昇した。

PC9 を用いて作成した EGFR 変異肺癌 sphere においても、やはり VISTA ノックアウトによる肺癌細胞数、増殖能に有意差を認めなかったが、erlotinib による治療効果を強める効果が確認された。しかし、一方で、線維芽細胞の  $\alpha$ SMA 陽性率の増加を認めた。

### (3) ヒト肺癌サンプルの scRNAseq

ヒト肺癌での上記シグナル同様のメカニズムが作用しているかを確認すべく、scRNAseq 解析を実施したが、免疫組織染色で得られる結果と比して肺構成細胞のアンバランスが目立ち、バイアスのかかった結果しか得られず、信憑性のあるデータ採取のためには、単一細胞化のプロセスに問題があると考えられた。線維芽細胞とマクロファージに着目した研究であり、線維芽細胞の単一細胞化を優先させると特定のマクロファ

ージの死滅が誘導され、またマクロファージの単一細胞化にプライオリティを置くと線維芽細胞の単一細胞化が不十分になる結果が得られ、多様な細胞の相互作用を解明するためには他の手法を用いる必要性があると判断した。

#### (4) ヒト肺癌サンプルの空間オミックス解析

(2)の問題を解決するべくヒト肺癌 FFPE サンプルを用いた空間オミックス解析を実施した。VISTA 発現抗原提示細胞の空間オミックス解析を実施した。そのうち、PhenoCycler 解析において Cell neighborhood analysis を実施したが、特記すべき有意所見が得られなかった。解析サンプル数が少なかったことも原因と考えられる。

#### (5) ヒト肺癌サンプルの LAMP3 発現解析

2023 年度までに解析した肺癌 sphere および Pulmosphere の解析結果から LAMP3 も肺線維症および肺癌の両方の病態を促進する抗原提示細胞の component として候補に挙がっていたため、LAMP3 発現細胞の cell-cell interaction を検討する方針とした。Xenium in situ による human sample 解析では LAMP3 発現細胞はヒト肺サンプルにおいて線維化部位に高発現しており、IHC で CD47-SIRPA を高頻度に高発現し、さらに、PD-L1 も共発現する傾向であることが確認された。T 細胞機能抑制系 signature が確認され、これらの機序により、腫瘍細胞は免疫系の監視を回避し、生存と増殖を続けることができる可能性が示唆された。

LAMP3 発現細胞の周囲には M2 macrophage が集簇する傾向にあり、このように多彩な component を有する human sample において得られた cell neighborhood analysis の結果については、追加の in vitro 介入系試験が必要であると考えられ、より単純な component を搭載した肺癌オルガノイド系を用いた今後の追加研究が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木 敏夫
2. 発表標題 Integration of high-resolution 3D organoid engineering and spatial transcriptomics as a next-generation drug discovery platform for lung cancer
3. 学会等名 先進ゲノム支援 拡大班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 敏夫
2. 発表標題 肺オルガノイド空間的トランスクリプトーム解析による次世代創薬プラットフォーム開発 -ニッチオーム介入評価系の新ツールとしての可能性-
3. 学会等名 第64回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木 敏夫
2. 発表標題 Integration of high-resolution 3D organoid engineering and spatial transcriptomics as a next-generation drug discovery platform for pathologic lung remodeling
3. 学会等名 American Thoracic Society 2024 International Conference (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木 敏夫
2. 発表標題 呼吸器疾患オルガノイド創薬の幕開け-translational bioengineering を可能にするiPS細胞由来オルガノイド-空間オミックス統合創薬基盤プラットフォーム-
3. 学会等名 第26回日本医薬品情報学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2024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
研究分担者	野口 雅之 (Noguchi Masayuki)  (00198582)	筑波大学・医学医療系・教授  (12102)	
研究分担者	鈴木 絢子 (Suzuki Ayako)  (00770348)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授  (12601)	
研究分担者	鈴木 穰 (Suzuki Yutaka)  (40323646)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授  (12601)	
研究分担者	鈴木 敏夫 (Suzuki Toshio)  (70771856)	筑波大学・医学医療系・講師  (12102)	

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
---------	---------