

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16188

研究課題名（和文）間質性肺炎合併肺癌における癌関連線維芽細胞の特徴に関する検討

研究課題名（英文）The roles of cancer associated fibroblasts in lung adenocarcinoma with interstitial pneumonia

研究代表者

井上 千裕 (INOUE, Chihiro)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10865447

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：間質性肺炎合併肺腺癌は通常の肺癌より予後不良であり、新たな治療法の開発が望まれている。今回、癌間質に存在し、癌の悪性度を高める癌関連線維芽細胞に着目した。間質性肺炎合併肺癌の間質におけるタンパク発現について網羅的なプロテオーム解析を行うと共に、組織での発現を免疫染色で確認した。結果、間質性肺炎合併肺癌の癌関連線維芽細胞マーカーの発現パターンは、間質性肺炎非合併肺癌とは異なることが明らかになった。また、hyaluronan and proteoglycan link protein 1とaggrecan core proteinといった細胞外基質の発現が他の組織よりも高いことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、癌関連線維芽細胞（cancer associated fibroblasts: CAFs）を標的とした治療や画像診断が注目を集めている。また、間質性肺炎合併肺腺癌は、間質性肺炎の急性増悪の恐れがあるため、標準的な薬物療法が行えないという問題点があり、新たな治療法の開発が急がれる。今回の研究では、間質性肺炎合併肺癌の間質におけるタンパク発現や、CAFマーカーの発現パターンの特徴、特に細胞外基質の重要性が明らかになった。今後、間質性肺炎合併肺癌のCAFによる細胞外基質の産生や働きに着目した研究から、間質性肺炎合併肺癌のCAFを標的とした治療の実現に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Interstitial pneumonia (IP) is a cause of respiratory failure and a risk factor of lung adenocarcinoma (LAC). LAC with IP has a poorer prognosis than conventional lung adenocarcinoma, and a novel therapeutic target is needed. In this study, we focused on cancer-associated fibroblasts (CAFs), which are known to exist in the stromal area of cancers and increase malignant potential of the cancer. We performed a comprehensive proteomic analysis and immunohistochemical analysis of proteins expressed in stroma of LAC with IP. The results showed that the expression pattern of CAF markers in LAC with IP was different from that in LAC without IP. The expressions of extracellular matrix such as hyaluronan and proteoglycan link protein 1 and aggrecan core protein were higher than in other tissues.

研究分野：病理学

キーワード：肺癌 癌関連線維芽細胞 癌微小環境 間質性肺炎 免疫染色 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎とは、肺の間質を炎症、線維化の主座とする疾患である。代表的なものに特発性肺線維症 (**idiopathic pulmonary fibrosis: IPF**) があり、進行性の呼吸機能低下を来す疾患であり、また、肺癌のリスク因子でもある。**IPF** 合併肺癌は、背景疾患を有さない肺癌よりも予後不良であるにもかかわらず、**IPF** の急性増悪の可能性から、標準的治療が行えないという問題があり、有効な治療法の開発が望まれている。

近年、免疫チェックポイント阻害薬といった、癌微小環境に着目した治療法が注目を集めている。癌間質に存在する活性化した線維芽細胞は、癌間質に存在する活性化した線維芽細胞、癌関連線維芽細胞 (**cancer associated fibroblasts: CAFs**) と呼ばれ、サイトカインや細胞外基質の分泌を介した、癌細胞や周囲の細胞との相互作用を通じ、癌細胞の増殖、浸潤、転移を促したり、化学療法耐性を誘導したりするなど、癌の生物学的悪性度を高めることが知られている。一方、間質性肺炎における線維芽細胞は、線維化関連線維芽細胞 (**Fibrosis associated fibroblasts: FAFs**) と呼ばれており、**CAF**s と同様に、種々のサイトカインや細胞外基質を分泌し、上皮細胞の遊走を促すなど、**CAF**s と類似した機能を有する。**IPF** では、上皮細胞の傷害と再活性の周期的な繰り返し、**FAFs** を活性化し、肺の破壊、リモデリングを進行させると言われている。**IPF** は肺癌の危険因子とされているが、**IPF** 合併肺癌の間質に存在する **CAF**s (**IPF-CAF**s) に特有の性質については明らかにされていない。由来の違いや微小環境との相互作用といった外的刺激が加わることで **CAF**s は性質を変化させることが知られている。したがって、**IPF** による慢性的な刺激やリモデリングの加わった組織に発生した、**IPF** 合併肺癌に含まれる **CAF** (**IPF-CAF**s) には、背景疾患を欠く通常の肺癌の **CAF**s とは異なる性質を有する **CAF**s が含まれ、新規の治療標的となり得る可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

IPF 合併肺腺癌の (A) 癌間質、(B) 非癌部肺組織、(C) **IPF** 非合併肺腺癌の癌間質、(D) 肺癌非合併 **IPF** の線維性間質におけるタンパク発現を比較し、**IPF** 合併肺腺癌の有する **CAF** の特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

IPF 合併肺腺癌については、東北大学病院にて 2001 年～2020 年に外科的切除され、臨床的・病理学的に **IPF** 合併肺腺癌と診断された 19 例すべてを対象とした。また、**IPF** 非合併肺腺癌は、東北大学病院で 2003 年～2005 年に切除された肺腺癌 (Inoue et al. *Virchows Archiv* 2019) のうち、**IPF** を合併していない症例を選び、上記の **IPF** 合併肺腺癌 19 例と喫煙歴、年齢、性別について最近傍マッチングを行い選定された 14 例を対象とした。肺癌非合併 **IPF** については、東北大学病院で 2000 年～2018 年に、肺移植や部分切除を行い、癌や二次性の間質性肺炎の原因となりうる合併症がなく、臨床的・病理学的に **IPF/UIP** と診断された、6 例を対象とした。

本研究にあたっては、ヘルシンキ宣言、ヒトを対象とする医学研究の倫理的現職を遵守し、全ての症例において術前に患者の同意を得た。全ての検体・症例の使用に関しては、東北大学医学系研究科倫理委員会 (2021-1-916) を受けた。

(2) 免疫組織学的検討

病理診断時に用いられた標本から、肺癌については 1 症例につき 1 枚、**IPF** 合併肺腺癌の非癌部肺組織については 1 症例について 2 枚、代表的な標本を選定し免疫組織化学的検討に用いた。下記の抗体を用いて免疫組織化学染色を行った; α -smooth muscle actin (α -SMA) (希釈倍率: 1/3000, クローン: 1A4, DAKO), periostin (希釈倍率: 1/3000, カタログ番号: ab14041, Abcam), podoplanin (希釈倍率: 1/200, クローン: D2-40; Signet Laboratories), fibroblast activation protein (FAP) (希釈倍率: 1/3000, クローン: EPR20021, Abcam), Aldo-keto reductase family 1 member B10 (AKR1B10) (希釈倍率: 1/500, クローン: ERP14421, Abcam), aggrecan core protein (希釈倍率: 1/100, カタログ番号: HPA038242, Sigma Aldrich), Adducin γ (希釈倍率: 1/100, クローン: G-2, SantaCruz), hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1) (希釈倍率: 1/200, カタログ番号: HPA019105, Sigma Aldrich), carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8 (CEACAM8) (希釈倍率: 1/100, クローン: G10F5, Abcam), matrix metalloproteinase 8 (MMP8) (希釈倍率: 1/500, クローン: EPR20021, Abcam), mucin 2 (MUC2) (希釈倍率: 1/200, クローン: Ccp58, Leica Biosystems), dolichyl-diphosphooligosaccharide STT3 oligosaccharyltransferase complex catalytic subunit B (STT3B) (希釈倍率: 1/500, カタログ番号: HPA036646, Sigma Aldrich), Splicing factor 3B subunit 1 (SF3B1) (希釈倍率: 1/500,

カタログ番号: A9737, Abclonal)。STT3B, HAPLN1 の抗原賦活化として抗原賦活性化液 pH9.0 (Nichirei) に浸し、オートクレーブによる 121、5 分間の加熱を行った。CEACAM8, podoplanin の抗原賦活として、マイクロウェーブにて 20 分間の加熱を行った。 α -SMA, periostin については抗原賦活化を行わなかった。他の抗体については、抗原賦活化としてクエン酸緩衝液に浸しオートクレーブによる 121、5 分間の加熱を行った。一次抗体を添加後、4 で一晚インキュベートした。二次抗体とのインキュベーション後、免疫複合体を 3,3-diaminobenzidine (DAB) で発色し、ヘマトキシリンで核染を行った。

癌組織については、腫瘍内部の線維性間質で陽性となった領域の割合を、顕微鏡下で評価した。非癌部肺組織(間質性肺炎)については、標本中の線維芽細胞巣における陽性となった領域の割合を、顕微鏡下で評価した。

(3) プロテオーム解析

IPF 合併肺腺癌の癌組織、非癌部肺組織、IPF 非合併肺腺癌の癌組織、肺癌非合併 IPF の線維性間質の各 5 症例の FFPE 検体から、Qproteome FFPE Tissue (QIAGEN) を用いて、タンパク抽出した。IPF 合併肺腺癌および IPF 非合併肺腺癌の癌組織については、癌細胞の混入を防ぐため、レーザーマイクロダイセクション (MMI CellCut®, Tomy Digital Biology) にて癌細胞を除去した。

サンプル前処理および、nano LC MS/MS プロテオーム解析を、バイオシス・テクノロジースに委託した。タンパク質同定には MASCOT Matrix Science, タンパク質解析には Scaffold Matrix Science を用いた。ペプチドの同定は、同定確率 66.0%以上、False Discovery Rate (FDR) 1.0%未満を基準とした。タンパク質の同定は、同定確率 27.0%以上、FDR が 1.0%未満、2 個以上のペプチドの同定を基準とした。

(4) 共培養

肺腺癌細胞として A549、成人由来正常ヒト肺線維芽細胞として NHLF – Normal Human Lung Fibroblasts (Lonza), HPF-c (Takara) を、成人慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) 患者由来ヒト肺線維芽細胞として、Diseased Human Lung Fibroblast (DHLF) – COPD (Lonza), 成人 IPF 患者由来ヒト肺線維芽細胞として、DHLF-IPF (Lonza) を使用した。

6 ウェルプレートに線維芽細胞を 1×10^4 細胞/ 2mL ずつ播種し、24 時間後に $0.4 \mu\text{m}$ の孔を有するインサート (ThinCerts cell culture transparent membrane insert, Greiner Bio-One) を設置し、インサート内に A549, PC-9, H1975 細胞を 5×10^3 細胞/ 1 mL 播種した。7 日間の培養後、線維芽細胞を回収した。

(5) セルブロック作製

回収した線維芽細胞を 10%中性緩衝ホルマリンで 20 分間固定した後に、細胞浮遊液ゼリー化試薬 (iPGell, GenoStaff) を用いて固め、パラフィン包埋を行った。

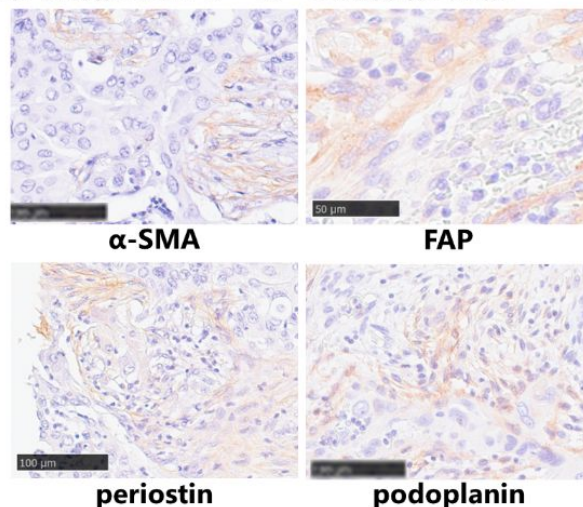
4. 研究成果

(1) 既存の CAF マーカー 4 種類の発現に関する免疫組織学的解析

IPF 合併肺腺癌における各 CAF マーカー発現と臨床病理学的因子との関連性

既存の CAF マーカー 4 種類 (α -SMA、ペリオスチン、ポドプラニン、FAP) について免疫染色を行った (図 1)。IPF 合併肺腺癌の間質における、 α -SMA、ペリオスチン、ポドプラニン、FAP の陽性率の中央値は、それぞれ 40%、40%、20%、30%であった。各マーカーについて、陽性率が中央値以上の症例を高値群、中央値未満の症例を低値群として症例を 2 群に分けて、臨床病理学的因子 (年齢: 75 歳以上/未満、性別、Brinkman Index、腫瘍径、血管浸潤、リンパ管侵襲、胸膜浸潤、リンパ節転移、組織亜型) との関連性について検討を行った。ペリオスチン高値群では、75 歳未満の群が多い傾向 ($p=0.09$)、ポドプラニン高値群では、Brinkman index が高い傾向 ($p=0.06$) が見られた。 α -SMA、FAP については、低値群、高値群で統計学的に有意な関連性は見出されなかった。また、5 年全生存率や疾患特異的 5 年生存率についても同様に比較を行ったが、有意差は認められなかった。

図1：既存のCAFマーカーの免疫染色の例



CAF マーカー発現に関する組織の種類間での比較検討

次に、**IPF** 合併肺腺癌の癌間質、**IPF** 合併肺腺癌の非癌部組織（間質性肺炎部）、**IPF** 非合併肺癌の癌間質、癌非合併 **IPF** の 4 種類の組織について、各マーカーの発現率について比較を行った。**IPF** 合併肺腺癌の癌間質では、非癌部組織に比べてポドプラニン、**FAP** の発現率が高値、**IPF** 非合併肺癌の癌間質に比べて、 α -**SMA** が低値、ポドプラニンが高値、癌非合併 **IPF** に比べて、 α -**SMA**、ポドプラニン、ペリオスチン、**FAP** がいずれも高値だった。

階層型クラスター解析

また、すべての標本に対して、各マーカー発現率を用いて階層型クラスター解析を行い、4 個のクラスターに分類した。クラスター1 は α -**SMA**、ペリオスチン、ポドプラニン、**FAP** のいずれも低値、クラスター2 は α -**SMA** 低値、ペリオスチン高値、ポドプラニン低値、**FAP** 低値、クラスター3 は α -**SMA**、ペリオスチン高値、ポドプラニン低値、**FAP** 高値、クラスター4 は α -**SMA**、ペリオスチン、ポドプラニン、**FAP** すべて高値となった。**IPF** 合併肺腺癌の癌間質では、**IPF** 非合併肺腺癌の癌間質に比して、クラスター3、クラスター4 の割合が高値であった。また、癌非合併 **IPF**、**IPF** 合併肺腺癌の非癌部組織、**IPF** 合併肺腺癌の癌間質の順に、クラスター3、4 の割合が増えていた。

以上より、**IPF** 合併肺腺癌の癌間質を構成する **CAF** マーカー発現の傾向が、**IPF** 非合併肺腺癌合併肺腺癌とは異なることが明らかになった。背景に **IPF** が存在して、長年にわたり慢性的な刺激の加わった癌微小環境は、背景疾患のない癌微小環境とは異なる性質を示すと推測された。また、癌非合併 **IPF** と **IPF** 合併肺腺癌の非癌部組織（間質性肺炎部）との間に、マーカー発現の差があることから、癌の発生しやすい **IPF** 組織と発生しにくい **IPF** 組織とで線維芽細胞の性質が異なる可能性や、離れた領域にある癌が、サイトカイン等の可溶性因子をもって肺全体の組織に影響を与えている可能性などが考えられた。

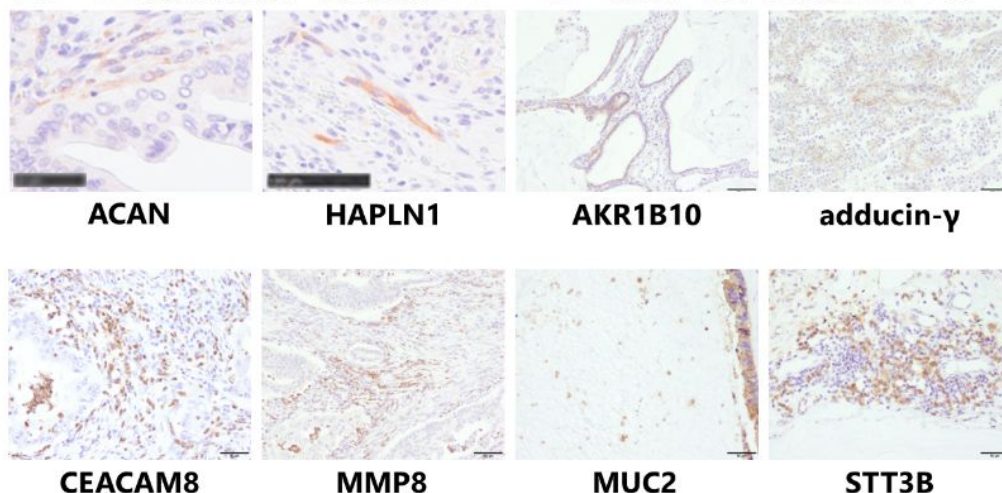
(2) FFPE 検体を用いたプロテオーム解析

次に、新規に **IPF** 合併肺腺癌の **CAF** マーカーを探索するため、**IPF** 合併肺腺癌の癌組織、非癌部肺組織、**IPF** 非合併肺腺癌の癌組織、肺癌非合併 **IPF** の線維性間質について、**FFPE** 検体を用い、プロテオーム解析を行った。1699 種類のタンパクが検出され、うち、63 種類は **IPF** 合併肺腺癌の癌間質のみに認められた。1549 種類は他組織と共通して観察された。また、63 種類のうち、同定確率が 95% を超えていたタンパクから 7 種類 (**MUC2**, **AKR1B10**, **CEACAM8**, **HPLAN1**, **STT3B**, **aggrecan core protein**, **adducin- γ**)、また、共通して検出された 1549 種類のうち、**IPF** 合併肺腺癌の癌間質で検出されたペプチド数が 10 倍以上高値であったタンパクから 2 種類 (**MMP8**, **SF3B1**) に着目し、免疫組織学的解析を行った。

(3) プロテオーム解析で指摘された **IPF** 合併肺腺癌 **CAF** のマーカー候補タンパクに関する免疫組織学的解析

プロテオーム解析を行った **FFPE** 検体から作製された標本を用いて免疫組織学的解析を行った (図 2)。

図2：IPF合併肺腺癌に特異的なCAFマーカー候補に対する免疫染色の例



MUC2 については癌細胞や癌周囲に観察された核腫大を示す上皮細胞、これらに由来する壊死組織や粘液が陽性となっていた。癌細胞は **LMD** で除去していたため、粘液や壊死組織を反映したと考えられた。**CEACAM8**、**MMP8** は好中球、**STT3B** は形質細胞において主に陽性像が認められ、線維性間質での発現は小範囲に留まった。**IPF** 合併肺腺癌の癌間質への炎症細胞浸潤の量を反映したと考えられた。**AKR1B10** は、**IPF** 合併肺腺癌の癌組織周囲に観察された、過形成を

示す 2 型肺胞上皮や気管支上皮において陽性となっており、これらを反映したものと考えられた。SF3B1 については、ほぼすべての細胞で陽性像が認められたため、マーカーとして利用するのは困難であった。

Adducin- γ については、5 例中 3 例の **IPF** 合併肺腺癌の癌間質に発現が観察されたものの、5 例中 5 例の **IPF** 非合併肺腺癌の癌間質にも発現が見られた。**IPF** 合併肺腺癌の非癌部組織や癌非合併 **IPF** 組織においても、小範囲ながら陽性像が認められた。**IPF** 合併肺腺癌の **CAF** マーカーとしての利用には適さないと考えられた。

HAPLN1 については、5 例中 4 例の **IPF** 合併肺腺癌の癌間質において、間質の 1%未満とごく小範囲であったが、紡錘形細胞に陽性像が認められた。**IPF** 非合併肺腺癌の間質には陽性像が認められなかった。**IPF** 合併肺腺癌の非癌部組織、癌非合併 **IPF** 組織ではそれぞれ 1 例ずつ、小範囲の陽性像が認められた。以上より、癌間質における **HAPLN1** の発現は、**IPF** を母地として癌が発生した既往を反映している可能性があると考えられた。

ACAN については、5 例すべての **IPF** 合併肺腺癌の癌間質において、間質の 1%未満とごく小範囲であったが、紡錘形細胞に陽性像が認められた。**IPF** 非合併肺腺癌では 5 例中 2 例に陽性像が見られた。**IPF** 合併肺腺癌の非癌部組織では 5 例中 2 例で一部の線維性間質で陽性となったが、癌非合併 **IPF** では陽性像が認められなかった。以上より、**IPF** 合併肺腺癌の癌間質に特異的とは言えない **CAF** マーカーであるが、**IPF** 組織からの癌の発生と関連するマーカーである可能性が考えられた。

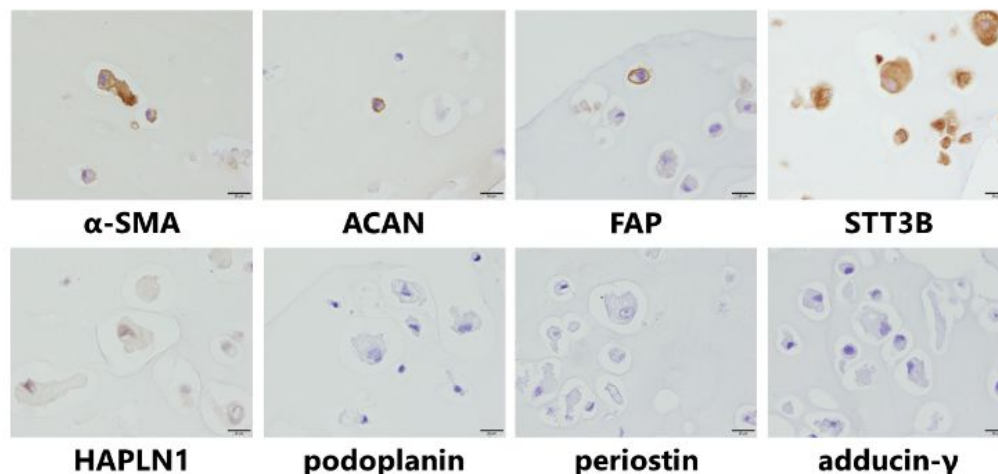
HAPLN1 と **ACAN** の 2 種類のタンパク発現について、既存の 4 種類の **CAF** マーカーと局在を比較した。**HAPLN1** と **ACAN** の分布は一致せず、また、**HAPLN1**、**ACAN** の分布は、既存の 4 種類のマーカーと必ずしも一致しなかった。他のマーカーとは独立した因子である可能性がある。症例数を増やすとともに、**HAPLN1** や **ACAN** の発現に関与する因子についても網羅的な検討が必要である。

(4) 共培養によるマーカー発現の変化

ヒト成人の正常肺、**IPF**、**COPD** それぞれに由来する線維芽細胞を、肺腺癌細胞と共培養し、 α -**SMA**、ペリオスチン、ポドプラニン、**FAP**、**HAPLN1**、**ACAN**、**Adducin- γ** 、**STT3B** について免疫染色を行った(図 3)。共培養を行わなかった対照群についても同様に免疫染色を行った。

α -**SMA** は、いずれの細胞株においても陽性像が認められた(平均 30%)。共培養の有無で陽性率の有意な変化は認められなかった。ペリオスチン、ポドプラニンの発現はいずれの細胞株においても認められなかった。**FAP** はいずれの細胞株にも陽性像が認められた。共培養によって、**HPF-C** では陽性率が 20%から 50%に上昇したが、**NHLF** や **DHLF-COPD** はそれぞれ 30%、60%のまま陽性率に変化は見られなかった。**DHLF-IPF** については 70%から 50%と陽性率が低下した。**HAPLN1** は、いずれの細胞株も小範囲に弱陽性で、共培養の有無で変化は見られなかった。**ACAN** はいずれの細胞株においても陽性細胞が数個ずつ観察された。**Adducin- γ** は、癌細胞と共培養をした **HPF-C** (正常肺由来線維芽細胞)で、2 個の細胞に発現が認められたのみであった。細胞株、共培養の有無にかかわらず、**STTB3** はほとんど全ての細胞が陽性像を示した。以上、組織における発現の差異を説明しうる結果ではなかった。癌細胞と線維芽細胞の相互作用のみならず、免疫細胞や血管内皮細胞といった、微小環境を構成する他の因子との関連性や、低酸素状態、喫煙等の影響など、種々の因子が複雑に関与している可能性が考えられる。今後、動物モデルやオルガノイド等での検討が望まれる。

図3：A549と共培養したDHLF-IPFのセルブロック



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田 さき、井上 千裕、三木 康宏、齊藤 涼子、岡田 克典、笹野 公伸
2. 発表標題 特発性肺線維症合併肺腺癌における癌関連線維芽細胞マーカータンパク発現に関する検討
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------	---------