

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08891

研究課題名(和文)腫瘍血管内皮細胞のimmune set point制御スイッチとしての機能の解明

研究課題名(英文)An analysis on the function of tumor vascular endothelial cells as a switch controlling the immune set point

研究代表者

羽藤 泰(Hato, Tai)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10365281

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)：がん組織に病的血管新生で誘導される血管内皮細胞は、がん細胞による直接的・間接的な作用によって抗腫瘍免疫抑制的に働くようにハイジャックされている可能性を考え、in vivoおよび臨床病理学的側面からその関与を明らかとすることを試みた。動物実験で、マウスの腫瘍皮下移植モデルを用いて作製した腫瘍を摘出し、単一細胞懸濁液に分離したのちにCD31陽性細胞のみを磁気ビーズ法で間引いたものと間引かないものを用意して、別個体に再移植するモデルで腫瘍増殖の比較を検討した。またヒトの肺癌切除検体を用いて、血管構築と微小環境構築の関連、生存に関する比較検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの免疫療法を高める方法として、腫瘍血管機能を正常化する抗血管新生療法との併用療法が提案されている。実際に、肝細胞癌では免疫チェックポイント療法と抗VEGF/VEGFR2抗体の併用療法は有用な治療方法である。そのメカニズムとして、血管構築が正常化した結果、がん微小環境の改善がえられて免疫応答が改善する可能性が示唆されている。本研究では、治療介入のない腫瘍の血管内皮細胞は一見正常であっても機能的には免疫応答を維持する機能は欠けている可能性を示唆している。抗VEGF/VEGFR2抗体による免疫応答改善は、微小環境改変よりも直接的な免疫応答改善機能の影響が強いと推察される。

研究成果の概要(英文)：Our hypothesis is that vascular endothelial cells induced by pathological angiogenesis in cancer tissues may be hijacked to suppress antitumor immunity through direct and indirect actions of cancer cells. We attempted to clarify their involvement from in vivo and clinical pathological aspects. In animal experiments, tumors created using a subcutaneous tumor transplantation model in mice were excised and isolated into single-cell suspensions, and then CD31-positive cells were depleted using a magnetic bead method, and the tumor growth was compared in a model in which the cells were re-transplanted into a different mouse. In addition, we used human lung cancer specimens to compare the relationship between vascular structure and microvessel density, tumor microenvironment, and survival.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：がん微小環境 腫瘍血管内皮細胞 肺癌 がん免疫 VEGF VEGFR2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんに対する免疫応答は、腫瘍側因子、宿主側因子および環境因子などの複合的なバランスで決定されており、“閾値”ともいふべき免疫セットポイントによって制御されていると考えられる (Chen DS & Mellman I, Nature 2017)。がんは増殖過程において、低酸素・低 pH・低栄養・固形ストレスの増大といった過酷な混沌とした微小環境を生み出す。微小環境にいる血管内皮細胞や線維芽細胞をはじめとする間質細胞をハイジャックし、免疫抑制的な myeloid-derived suppressor cells (MDSC)、腫瘍浸潤マクロファージ (TAM) や制御性 T 細胞 (Treg) など呼び込み、免疫逃避に好都合な状況を生み出すことで、宿主免疫系からの攻撃をかわして増大を続ける。がん微小環境を乗っ取られることは、がん免疫サイクルをサイクル外から破綻させる重要な要因で、宿主側と腫瘍側の両方に作用することで免疫セットポイントを上昇させ、難治性に直結する。がんに対する外科的切除は、腫瘍の完全摘出による治癒以外にも、免疫学的な効果が起こりうる。すなわち、進行がんに対して、主たる大きな腫瘍を除去することで微小環境のハイジャック状態を開放し、免疫セットポイントを下げることが理論上期待できる。しかしながら、実際に、肺癌に対する根治的切除を受けた症例を対象に、術前後の免疫状態を好中球リンパ球比率 Neutrophil-to-lymphocyte ratio などの血液学的指標を比較すると、手術単独で免疫応答が改善している症例は全体のわずかである。たとえば、リンパ球/単球比率に血清アルブミン値を加味した包括的免疫指標 Systemic Inflammation Score, SIS について当院での解析を実施すると、原発性肺癌手術例 265 例中 62 例(23.3%)の症例では SIS は術前後で高値(免疫低下)-低値(免疫亢進)が入れ替わっており、これらの症例の生存曲線は術前後とも高値例と術前後とも低値例の間を走行していた。すなわち、手術による微小環境の改変によって免疫セットポイントが変動しうることを示唆していると考えられる。一方、ひとたび免疫不応に改変された免疫ポイントスイッチは容易には改変できないことも示している。3LL 肺癌細胞株を C57BL/6J マウスに皮下移植する動物実験でも、コントロール群として片側胸部に1個だけ腫瘍を植える 両側胸部に各1個ずつ腫瘍を植える群と、外科切除群として 両側胸部に各1個ずつ腫瘍を植えて片側を切除する群を作製し、腫瘍増大スピードを比較すると、の増大速度は よりも統計学的有意に早く、と同等であった。これらの知見は、一度高いレベルに設定されてしまった免疫セットポイントは外科切除だけでは容易に改変することができないことを示唆している。では、その免疫セットポイントを制御する因子とはいったい何なのだろうか。われわれは、腫瘍血管内皮細胞に過剰に発現した VEGFR2 の活性化が、腫瘍細胞とのクロストークを通じて免疫セットポイントを引き上げ、免疫逃避を起こすスイッチとして機能していることを仮説とした。

### 2. 研究の目的

腫瘍血管内皮細胞の免疫セットポイント制御スイッチとしての機能を明らかとすること。

この点を示すために、( -1)マウスの腫瘍皮下移植モデルを用いた *in vivo* の研究で、腫瘍にハイジャックされた“腫瘍血管内皮細胞”が癌細胞の増殖速度にクリティカルな影響を持っていることを示し、( -2)その機序が抗 VEGFR2 抗体投与によって阻害されるかどうかを検証した。またそもそもの肺癌組織での免疫制御に血管内皮細胞や微小環境のハイジャックが重要な役割を持っていることを裏付けるために、肺癌切除検体の微小環境構築について免疫組織学的な定量評価を実施し、免疫セットポイントスイッチにクリティカルな血管内皮細胞が腫瘍のどこに存在するのかを検証することを計画した。最後にメカニズムの立証のためにマウス腫瘍細胞から単一細胞懸濁液を作製し、低酸素スフェロイド培養を行った際に抗 VEGFR2 抗体の添加が炎症性サイトカイン産生に影響を持つことを示す *in vitro* 実験を行った。

### 3. 研究の方法

(*in vivo* での実証実験)マウスの皮下腫瘍反復移植モデルを用いて、血管内皮細胞の存在が腫瘍増殖促進および免疫応答制御に重要な役割を持つことを示す。

C57BL/6 雄マウスの皮下に ExLLC 細胞株 100 万個/100 $\mu$ l を移植し、初代腫瘍を作製した。この腫瘍が長径 13mm を超えたところで、切除して、単一細胞懸濁液を作製した。懸濁液に磁気ビーズ法をもちいて CD31 陽性細胞分画とそれ以外を分離した。単純反復移植群 (A 群: control) と CD31 陽性細胞除去懸濁液 (B 群: CD31 dep1) を別の個体に反復皮下移植を行った。さらに、腫瘍由来血管内皮細胞による抗腫瘍免疫制御が VEGF/VEGFR2 経路を介することを示すため、抗 VEGFR2 抗体である DC101 を 10mg/kg、3 日おきに腹腔内投与する群を作製した (A' 群: DC101 群)。CD31 陽性細胞除去懸濁液から作製した個体に抗 VEGFR2 抗体である (C 群: CD31 dep1+DC101) 群を作製し、エンドポイントまでの期間を観察した。

(現実世界での立証・免疫セットポイント制御にかかわる血管構造の局在の検討)ヒトの肺腺癌外科切除検体を用いて、腫瘍血管構築や微小環境の正常化が抗腫瘍免疫応答と直接的な関連

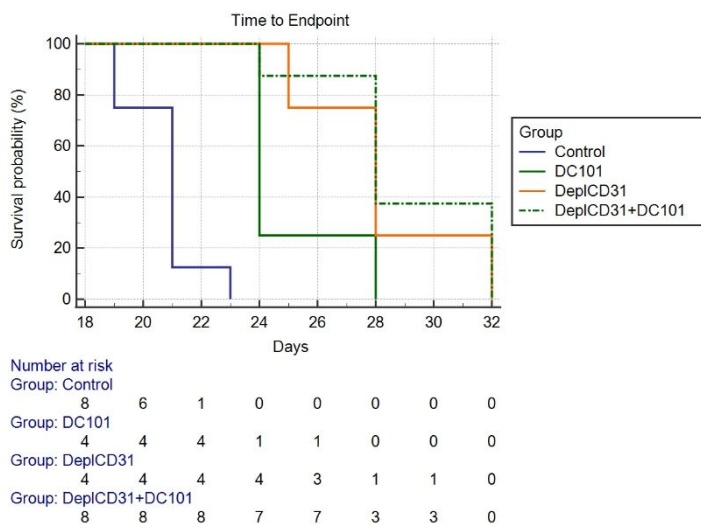
を持つことを示す現実世界でのエビデンスの追究

当院で切除した臨床病期 I 期の肺腺癌症例 6 年分の組織切片を用いて、免疫組織学的に免疫セットポイントに関連すると思われる微小血管構築および高位血管内皮細胞の出現頻度を定量した。対象症例の腫瘍のパラフィン包埋ホルマリン固定ブロックを 4 μm 厚で薄切し、免疫染色を行った。血管内皮細胞の染色は抗 CD31 抗体 (clone: JC70A, Dako, アメリカ合衆国) 100 倍希釈、二次抗体に抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体 (I-View DAB, ultra View DAB, ロシユダイアグノスティック社) を使用し熱処理 5 分 pH9.0 での免疫賦活を付加した。高位血管内皮細胞の染色は、一次抗体として抗 PNAd 抗体 (clone: MECA-79, Biologend Japan) を 100 倍希釈、二次抗体に HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Leica マイクロシステムズ社) を使用した。染色切片の撮影は BZ-800 顕微鏡 (キーエンス社、日本) で実施した。EMG 染色切片は低倍 (4 倍) 対物レンズで組織切片全体の撮影を行った。免疫染色切片 (PNAd および CD31) の撮影は 20 倍対物レンズを用いて、腫瘍組織内の染色強度が強い hot spot を選択して実施した。hot spot を含む 3x3 の 9 枚分の領域を撮影した。染色された血管密度を測定する方法として ImageJ ソフトウェアを使用し機械的に定量を行った。免疫染色切片デジタル画像 (TIFF 形式あるいは JPEG 形式) について、液晶タブレットを用いて、染色された脈管構造のみをマーキングし、その領域を被覆する近似楕円を作製し、その長径、短径、面積、角度について定量を行った。同時に血管密度測定法として stereological point counting 法 (SPC 法) による定量も併用した。間質構造の定量は Elastica-Masson-Goldner 染色を用いて実施した。切片画像の TIFF 形式ファイルについて、Image J を用いて周辺非腫瘍領域を消去し、Hue-Saturation-Brightness 法 (HSB 法) を用いて画像の色相情報 (Hue) のみを抽出した。Hue 値が弾性線維や弾性線維色調を示すピクセルを選択し、腫瘍切片中に占める割合を定量した。生存分析は Kaplan-Meier 法を用いて解析した。染色割合の 2 変数の比較には、ピアソンの積率相関係数を用い、3 群間の変数比較については、One-way analysis of variance を用いた。統計学的有意水準として p<0.05 を使用した。すべての統計学的解析に MedCalc ver 22.016 (MedCalc 社、ベルギー) を用いた。

(メカニズムの in vitro での検証) 腫瘍組織から作製した単一細胞懸濁液から磁気ビーズ法を用いて CD31 陽性血管内皮細胞を回収した。直接的な癌細胞と腫瘍由来血管内皮細胞のインタラクションを評価するため、ExLLC 細胞株 10000 個に腫瘍由来血管内皮細胞 5000 個を添加する群と添加しない群を作製し、スフェロイド共培養を実施した (Nano-culture plate, Scivax 社)。腫瘍の微小環境を再現するため、培養条件は 0.1% 低酸素で行った (Bionix 低酸素キット, スギヤマゲン社)。(A) (Control 1) 腫瘍細胞 + 腫瘍由来血管内皮細胞の正常酸素下培養群、(B) 腫瘍細胞 + 腫瘍由来血管内皮細胞の低酸素酸素下培養群、(B) の条件の培養液上清に抗 VEGFR2 抗体 (clone: DC101, BioX 社) 5ng/1000 μl を添加する群の 4 群を作製した。72 時間培養を継続した後、培養上清を回収した。培養上清について、サンドイッチ ELISA 法 (Proteintech 社) を用いて IFN- 濃度を定量比較した。

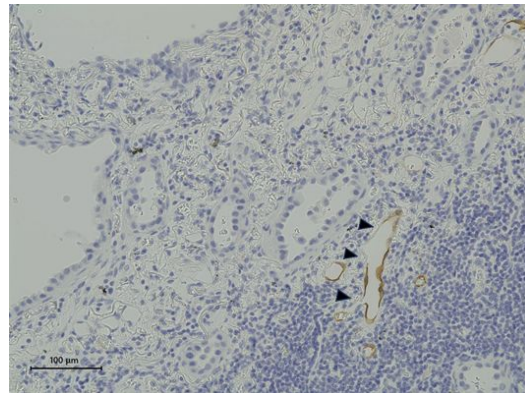
#### 4. 研究成果

腫瘍由来血管内皮細胞を除去して反復移植を行った群 (B) は、コントロールである単純反復移植群に比して、エンドポイントまでの日数が有意に延長した (+8 日, A 群 vs B 群 = 29 日 vs 21 日, P=0.05)。このことから、腫瘍由来血管内皮細胞が腫瘍増殖の支持作用を有していることが示唆された。DC101 を単独で投与した場合であっても腫瘍増殖速度は遅延した (A' 群) が、その影響は CD31 除去群には及ばなかった (+3 日, p=0.4)。CD31 陽性細胞を除去した上に DC101 を投与しても、上乘せ現象は生じず、エンドポイントまでの期間は同等であった。したがって、VEGFR2 抑制による腫瘍増殖抑制は腫瘍由来血管内皮細胞への直接的作用によって生じていることが示された。



上記のマウス実験で、腫瘍内の性質が改変された血管内皮細胞が抗腫瘍免疫を抑制的に制御

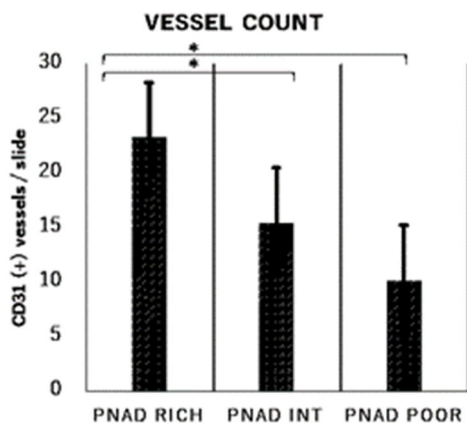
していることが示されたが、実臨床で同様の現象が観測されるかをヒト臨床検体を用いて生存解析を行った。臨床病期Ⅰ期の肺腺癌症例 105 例について、CD31 免疫染色を実施し、成熟した抗腫瘍免疫応答の指標である高位血管内皮細胞出現頻度（右図：免疫染色の例）との相関を検討した。7890 本の CD31 陽性血管を定量し術後再発率について生存解析を行ったところ微小血管密度が高い群では再発はみられず予後良好な傾向であったが（5 年無再発生存確率 100%対 83.0%、 $p=0.12$ 。）統計学的有意差には到達しなかった。微小血管がより正常に近い組織では血管が開存しているため腫瘍血管断面面積平均値が高値になることから、単位血管当たりの断面面積で同様の生存解析を行ったが、血管断面面積では予後に統計学的差がなかった（5 年無再発生存確率 93.0%対 82.0%、 $p=0.14$ ）。血管の走行方向について、均一度を標準偏差の高低に注目して 2 群にわけて比較すると、走行方向が多様な症例では予後が良好な傾向であった（5 年無再発生存確率 91.7%対 75.0%、 $p=0.04$ ）。



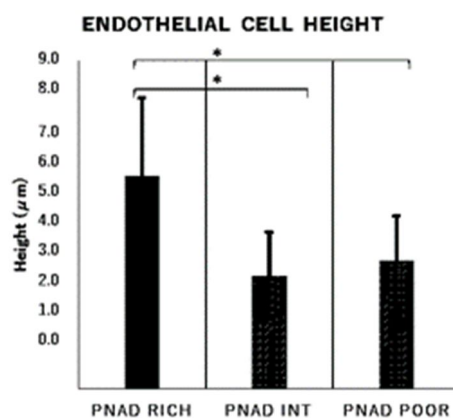
これらの腫瘍血管密度定量および血管構築と、高位血管内皮細胞出現頻度に関連があるかを相関分析したが、相関を示した因子は見いだされず、動物実験の場合とは異なり腫瘍血管構築が成熟していたとしても抗腫瘍免疫応答が高まるわけではないことが示された。

しかし、腫瘍組織全体ではなく、腫瘍内で免疫細胞集塊が多く集まる濾胞状構造にだけ注目して定量すると、有意な相関が出現することを見いだした。腫瘍内の高位血管内皮細胞密度を高、中、低の 3 群に分離し（すなわち抗腫瘍免疫応答の高中低）、各群からランダムにリンパ濾胞様構造を選別し、その組織構築を解析した。するとリンパ濾胞内の CD31 陽性微小血管本数と有意な相関関係があることが確認された（高：中：低 = 23 ± 15 本：15 ± 11 本：10 ± 6 本、 $p < 0.001$ ，下図 A）。

さらにリンパ濾胞内の高位血管内皮細胞の形態について評価を行うと、密度が高い腫瘍では高位血管内皮細胞の丈が高く（高：中：低 = 5.8 ± 2.1 μm：3.1 ± 1.2 μm：3.5 ± 1.2 μm、 $p < 0.001$ ，下図 B）、非癌組織でみられる成熟した高位血管内皮細胞と類似した成熟した形状を呈していた。このことから、免疫セットポイントスイッチとしての血管内皮細胞の機能は、腫瘍全体の微小血管に存在するものではなく、免疫細胞集塊から刺激を受けた濾胞内に存在する選ばれた血管内皮細胞がコミットして果たされるものであることが示された。



A) 腫瘍リンパ濾胞内の血管密度と高位血管内皮細胞の関連  
免疫応答が高い場合には濾胞内の微小血管密度は高い

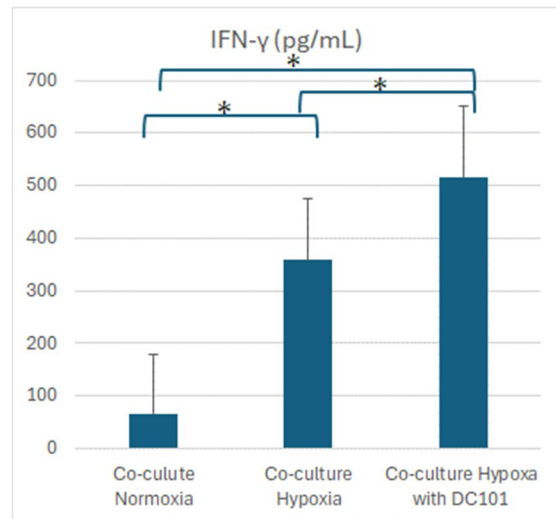


B) 腫瘍リンパ濾胞内に存在する免疫セットポイントにコミットした血管内皮細胞の丈の高さの比較  
免疫応答が高まっている腫瘍のリンパ濾胞内では血管内皮細胞の形態がより“成熟”している

C57BL/6J マウスで作製した ExLLC 由来腫瘍を摘出し、単一細胞に分けたあと、CD31 磁気ビーズを用いて腫瘍由来血管内皮細胞を抽出した。腫瘍細胞と血管内皮細胞の直接的インタラクションを評価するため、ExLLC 細胞株と腫瘍由来血管内皮細胞を個数をそろえて共培養しメカニズム解析を試みた。通常大気と低酸素(1%O<sub>2</sub>)に分けて 3 日間培養を実施した。本研究では VEGFR2 の免疫制御スイッチとしての機構を解析するため、培養上清に抗 VEGFR2 抗体を添加し、培養上清での INF-、IL-2 発現を ELSIA で定量した。低酸素下では通常大気下に比して培養上清中の

IFN- $\gamma$  濃度が高値となっていた。さらに、抗 VEGFR2 抗体を上清に添加すると、IFN- $\gamma$  発現量がさらに上昇し、抗腫瘍免疫活性が高まることが示された。IL-2 発現については有意な差が得られなかった。

この *in vitro* 実験については反復実験を行ったものの、IFN- $\gamma$  発現量の程度にばらつきが多く、とくに腫瘍由来血管内皮細胞については生体から採取してすぐに実験に供した場合と、凍結ストックを作製して反復した場合とでは、後者では有意な差が生じなくなっていた。この理由として、凍結過程を経たことで血管内皮細胞の形質がリセットされてしまった可能性を考えたが、確定的な結果を得るには至らなかった。



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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aoki S, Inoue K, Klein S, Halvorsen S, Chen J, Matsui A, Nikmaneshi MR, Kitahara S, Hato T, et al.	4. 巻 71
2. 論文標題 Placental growth factor promotes tumour desmoplasia and treatment resistance in intrahepatic cholangiocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 185-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/gutjnl-2020-322493	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山 亜斗, 羽藤 泰, 鹿島田 寛明, 山口 雅利, 井上 慶明, 青木 耕平, 福田 祐樹, 河野 光智, 儀賀 理暁, 中山 光男
2. 発表標題 Elastica Masson Goldner(EMG)染色切片のデジタル定量評価を用いたI期肺腺癌の腫瘍内弾性線維増生に関する因子の臨床病理学的探索
3. 学会等名 第75回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 羽藤 泰, 鹿島田 寛明, 山口 雅利, 杉山 亜斗, 井上 慶明, 青木 耕平, 福田 祐樹, 儀賀 理暁, 河野 光智, 中山 光男
2. 発表標題 非小細胞肺癌手術症例における包括的免疫栄養スコアの有効性の比較(PNI vs SIS vs GRIm-score)
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 羽藤 泰, 鹿島田 寛明, 山口 雅利, 杉山 亜斗, 井上 慶明, 青木 耕平, 福田 祐樹, 河野 光智, 儀賀 理暁, 中山 光男
2. 発表標題 切除肺静脈血の免疫細胞分画と好中球リンパ球比率Neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLRの相関解析
3. 学会等名 第74回 日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 羽藤 泰, 鹿島田寛明, 山口雅利, 杉山亜斗, 井上慶明, 青木耕平, 福田祐樹, 河野光智, 儀賀理暁, 中山光男
2. 発表標題 非小細胞肺癌手術症例における包括的免疫栄養スコアの有効性の比較(PNI vs SIS vs GRIm score)
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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