

令和元年6月17日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05309

研究課題名(和文) 肺がん微小環境の新たな標的：線維細胞を基軸とした薬剤耐性克服と革新的治療への展開

研究課題名(英文) Novel target cells in tumor microenvironment of lung cancer: focusing on fibrocytes to overcome drug resistance and develop the innovative therapy

研究代表者

西岡 安彦 (NISHIOKA, Yasuhiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：70274199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺がんに対する薬物療法、特に血管新生阻害薬の耐性化機序として重要な線維細胞に関する研究を進め、線維細胞の作用を調節したり、線維細胞を目印にすることにより有効な治療法を開発することを目的に研究を行った。血管新生阻害薬に耐性となった肺がん患者の末梢血には線維細胞が増加しておりマーカーとなる可能性が示唆された。線維細胞には肺がん細胞をがん幹細胞に変化させる性質があり、線維細胞の調節が重要なことが明らかになるとともに、動物モデルにおいて線維細胞が生体の免疫機能を調節することによってがん免疫療法との併用効果を発揮することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から線維細胞は肺がん細胞に直接作用して肺がんの腫瘍としての性格を悪い方向(がん幹細胞化)に調節していることが明らかになったことから、線維細胞を標的に治療法の開発研究を行う重要性が高まったと考えられる。血管新生阻害薬に耐性となった肺がん患者の末梢血には線維細胞が増加しており、耐性化のマーカーとなる可能性が示唆された。さらに、血管新生阻害薬と免疫チェックポイント阻害薬の併用効果に線維細胞の作用が関与している新たな可能性が示され、がん免疫療法のメカニズムの理解に繋がる重要な結果が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To overcome drug resistance and develop the innovative therapy, the analysis of function of fibrocytes, which were identified to mediate the resistance mechanism for anti-angiogenic agents, were performed in the present study. We found the increased number of fibrocytes in peripheral blood of patients with lung cancer who showed the clinical resistance to anti-angiogenic therapy. In addition, fibrocytes showed the ability to generate stem cell-like phenotype of lung cancer cells in in vitro experiments, indicating the notion that regulating the function of fibrocytes might be critical to inhibit the progression of lung cancer. Immunological analysis showed that fibrocytes had the effects to up- or down-regulate T cell-immunity in vitro. Intra-tumoral administration with fibrocytes, furthermore, enhanced the anti-tumor activity mediated by anti-PD-1 or anti-PD-L1 antibodies. These results indicate that fibrocytes play an important role in tumor-immunity.

研究分野：呼吸器内科学、がん免疫

キーワード：線維細胞 肺がん 血管新生 がん幹細胞 免疫チェックポイント がん免疫

1. 研究開始当初の背景

線維細胞 (fibrocyte) は、1994 年に Bucala らによって同定された末梢血単核球由来の collagen 産生細胞である。末梢血中から主に CXCL12-CXCR4 axis により線維化組織へ遊走し、組織修復のみならず肺線維症や気管支喘息における線維化病態に重要な役割を果たすと考えられてきた。一方、腫瘍内にも線維細胞の存在を示唆する報告は散見されるが、肺がんにおける線維細胞の機能については検討されていなかった。我々は、マウスモデルを用いて肺がんや悪性胸膜中皮腫に対する血管新生阻害薬 (ベバシズマブ、SU5416) の耐性メカニズムについて検討を進め、腫瘍内における線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) -2 の高発現が耐性機序に重要であることを見出した。そこで FGF-2 発現細胞の解析を進めた結果、血管新生阻害薬耐性腫瘍内で著明に増加しており、かつ FGF-2 を高発現する CXCR4+ Collagen-I+ の新たな細胞として線維細胞を同定した (Nat Commun 2015)。さらに、ベバシズマス治療後に手術にて切除されたヒトの肺がん組織を収集し、線維細胞数について検討した結果、ベバシズマブと化学療法により術前治療を行った肺がん組織において、化学療法単独治療群あるいは無治療群と比較して、有意に線維細胞数が増加していることを確認した。耐性腫瘍内の線維細胞数は肺がん組織の腫瘍血管長 (血管新生) と相関していた。以上の結果から、線維細胞は肺がん組織において腫瘍血管新生を制御している可能性が示唆され、肺がん腫瘍内線維細胞の機能解析を進めることは、血管新生阻害薬のバイオマーカー開発あるいは耐性克服への足掛かりになる可能性があると考えられた。

また、肺がんに対する免疫療法として脚光を浴びている抗 PD-1/PD-L1 抗体と血管新生阻害薬の併用療法が注目されている。しかしながら、この併用療法のメカニズムは不明であり、血管新生阻害薬により腫瘍内に集積する線維細胞が何らかの重要な役割を果たしている可能性がある。線維細胞は免疫担当細胞としての機能が報告されており、免疫学的視点からの解析も興味を持たれるところである。さらに我々の検討から、線維細胞が肺がん細胞の幹細胞化 (sphere 形成能) 促進作用を有することが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では肺がんにおける線維細胞の機能解析を3方向から進め、それぞれ以下の点を明らかとすることを目的とした。

(1)線維細胞の血管新生あるいは血管新生阻害薬耐性に対するバイオマーカーあるいは治療標的としての検討：肺がん組織における線維細胞と腫瘍の血管新生の関連を明らかにし、血管新生阻害薬治療のバイオマーカーとしての可能性の検討、ヒト末梢血を用いた線維細胞の同定法の確立と血管新生阻害薬治療前後の線維細胞の検討によるバイオマーカーとしての可能性の検討、マウスモデルを用いて血管新生阻害効果と線維細胞集積の時間経過の再検討を行うことにより、血管新生阻害薬 (特にベバシズマブ) の至適投与間隔の検討および線維細胞の機能抑制薬を用いた血管新生阻害薬耐性克服法の開発

(2)線維細胞による肺がん細胞の幹細胞化のメカニズム解析とその制御法の検討：線維細胞による肺がんの sphere 形成能の亢進に関与する新たな因子の同定と治療法への展開、血管新生阻害薬および抗がん剤耐性メカニズムへの関与とその制御法の検討

(3)抗 PD-1/PD-L1 抗体と血管新生阻害薬の複合免疫療法における線維細胞の役割の解析：肺がん組織に浸潤する線維細胞の PD-L1 発現を検討し、間質の PD-L1 発現との関連を明らかにする、マウスモデルを用いて抗 PD-1 抗体治療あるいは抗 PD-L1 抗体による治療効果に及ぼす線維細胞の役割の解明

3. 研究の方法

ヒト肺がん組織内の線維細胞同定には既報と同様にFSP (fibroblast specific protein)-1とCD45に対する2重免疫染色法を用いた (Nat Commun 2015)。腫瘍血管の染色は抗CD31抗体で行った。ヒト線維細胞は、比重遠心法にて分離した末梢血単核球を20%ウシ胎児血清を添加したDMEM培地を用いてフィブロネクチンコートディッシュ上で1週間培養後、付着細胞から分離した。マウス線維細胞は、正常マウス肺の細胞浮遊液をヒト末梢血単核球の培養と同様にフィブロネクチンコートディッシュ上で1週間培養後、付着細胞から分離した。同系マウスモデルとして、C57BL/6マウスにおけるLewis Lung Carcinoma (LLC)、BALB/cマウスにおけるAB1-HAを用いた。SCIDマウスモデルにおいては、ヒト肺がん細胞株のA549およびSBC-5を用いた。マウスモデルにおける腫瘍内線維細胞の染色は、Collagen-IおよびCD45に対する2重免疫染色で同定した。線維細胞の表面抗原解析は、フローサイトメトリー法を用いた。線維細胞のT細胞刺激活性は、ヒト末梢血単核球あるいはマウス脾細胞から磁気ビーズ法 (autoMACS) で回収したCD8陽性T細胞を線維細胞と共培養し、T細胞の増殖を3H-TdR取り込み試験で測定することで解析した。CD8陽性T細胞の刺激

に抗CD3抗体、抗CD28抗体を使用した。がん幹細胞の評価は、ultralow-attachment plate (Corning)で培養後に形成されたsphere forming assayで評価した。肺がん組織におけるがん細胞の幹細胞化は、Sox-2、Nanog、Oct-4に対する免疫染色を用いて評価した。ヒト検体を用いた研究計画は徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会にて承認を受け実施した。動物実験については徳島大学動物実験委員会よりプロトコールについて承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1)線維細胞の血管新生あるいは血管新生阻害薬耐性に対するバイオマーカーあるいは治療標的としての検討：

肺がん組織における線維細胞と腫瘍の血管新生の関連を明らかにし、血管新生阻害薬治療のバイオマーカーとしての可能性の検討：手術切除検体を用いた多数例の検討では、肺がん腫瘍組織内に線維細胞の浸潤を認めたものの、血管新生阻害薬投与後と比較した場合、線維細胞数は明らかに少なく、そのため腫瘍血管数との相関を認めなかった。一方で、肺がん組織には線維細胞の遊走に働くサイトカインであるCXCL12、MCP-1、PDGF-AA、PDGF-BBの発現を認め、現在線維細胞数との相関を検討中である。ヒト末梢血を用いた線維細胞の同定法の確立と血管新生阻害薬治療前後の線維細胞の検討によるバイオマーカーとしての可能性の検討：ベバシズマブ投与前後の肺がん患者末梢血単核球から *in vitro* 培養法を用いて同定した線維細胞数は、評価可能であった13例中8例でベバシズマブ投与後には明らかに増加しており、ベバシズマブ耐性のマーカーとなる可能性が示唆された。マウスモデルを用いて血管新生阻害効果と線維細胞集積の時間経過の再検討を行うことにより、血管新生阻害薬（特にベバシズマブ）の至適投与間隔の検討および線維細胞の機能抑制薬を用いた血管新生阻害薬耐性克服法の開発：マウスモデルを用いた検討ではベバシズマブにより腫瘍内へ集積した線維細胞は、ベバシズマブ投与中止後数日の経過で減少する一方で、血管新生阻害効果は比較的長く7日間程度持続することが明らかとなった。そこでベバシズマブ投与間隔を2倍にしたスケジュールで治療実験を行ったところ、少なくとも両レジメンの抗腫瘍効果には大きな差を認めなかった。以上から、ベバシズマブの投与スケジュールの調整による抗腫瘍効果の最適化の可能性が示唆された。

(2)線維細胞による肺がん細胞の幹細胞化のメカニズム解析とその制御法の検討：

線維細胞による肺がんの sphere 形成能の亢進に關する新たな因子の同定と治療法への展開：線維細胞の培養上清中は単球の上清は肺がん細胞の幹細胞化を誘導する活性が有意に高く、中和抗体および阻害薬を用いた検討から、CCL-18、osteopontin (OPN)、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)の関与が示唆された(図1)。さらにこれらの分子の共通のシグナル伝達分子であるAKTの阻害薬を用いることで、線維細胞による肺がん細胞の幹細胞化が抑制された(図2)。血管新生阻害薬および抗がん剤耐性メカニズムへの関与とその制御法の検討：上記、線維細胞によるがん幹細胞化の誘導活性と、血管新生阻害薬耐性あるいは抗がん剤耐性の関与についての直接的な検討は行っていないが、*in vitro* の検討では sphere 細胞は明らかに抗がん剤耐性を示した。

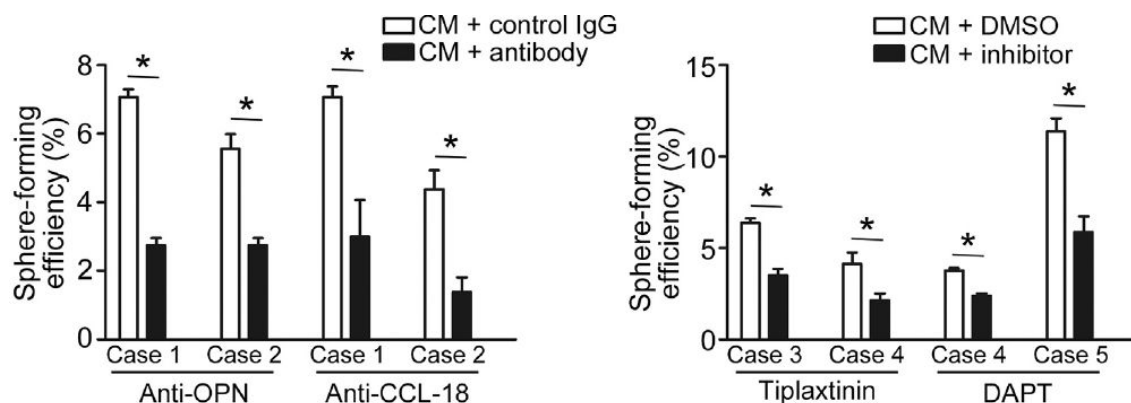
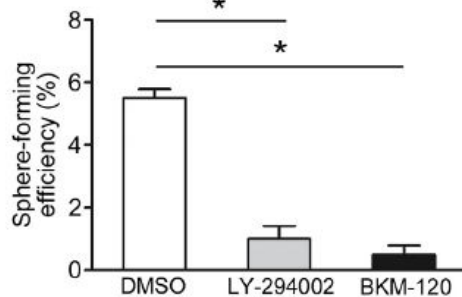


図1 各種中和抗体および阻害薬による線維細胞培養上清の sphere 形成能抑制効果

Sphere-forming assay に抗 osteopontin (OPN)抗体、抗 CCL-18 抗体、Tiplaxtinin (PAI-1 inhibitor)、DAPT (-secretase inhibitor) を添加し、A549 細胞の sphere 形成能を検討した。(Saijo et al. Cancer Lett 2018)



図2 AKT 阻害薬による線維細胞培養上清の sphere 形成能に対する抑制効果



AKT 阻害薬である LY-294002 及び BKM-120 を用いて線維細胞培養上清の A549 細胞の sphere 形成能に対する効果を検討した。(Saijo et al. Cancer Lett 2018)

(3)抗 PD-1/PD-L1 抗体と血管新生阻害薬の複合免疫療法における線維細胞の役割の解析：

肺がん組織に浸潤する線維細胞の PD-L1 発現を検討し、間質の PD-L1 発現との関連を明らかにする：肺がん組織における線維細胞における PD-L1 発現は、多重免疫染色の必要性等の手技的問題により実施できていない。しかしながら、正常肺由来マウス線維細胞及びヒト末梢血単核球由来線維細胞には PD-L1 が高発現していることを確認した。さらにヒト末梢血単球由来の線維細胞はアロ CD8 陽性 T 細胞の増殖刺激作用を有するが、CD8 陽性 T 細胞を IL-2 や PMA などの活性化物質であらかじめ活性化し PD-1 発現を増強させると、逆に CD8 陽性 T 細胞の増殖抑制効果を示した。この増殖抑制作用は、抗 PD-L1 抗体の添加でキャンセルされ、CD8 陽性 T 細胞の増殖は、線維細胞添加なしのレベルまで回復した。マウスモデルを用いて抗 PD-1 抗体治療あるいは抗 PD-L1 抗体による治療効果に及ぼす線維細胞の役割の解明：マウス同系腫瘍モデルにおいて、腫瘍内に線維細胞を投与することにより抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果が増強した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 34 件)

Goto H, Nishioka Y, Fibrocytes, A Novel Stromal Cells to Regulate Resistance to Anti-Angiogenic Therapy and Cancer Progression, Int J Mol Sci, 19, 75-92, 2018, 査読有, DOI: 10.3390/ijms19010098.

Hanibuchi M(1 番目), 他 14 名, Goto H(13 番目), Nishioka Y(14 番目), A multicenter, open-label, phase II trial of S-1 plus carboplatin in advanced non-small cell lung cancer patients with interstitial lung disease, Lung Cancer, 125, 93-99, 2018, 査読有, DOI: 10.1016/j.lungcan.2018.09.007.

Tabata S, 他 21 名, Goto H(2 番目), Saijo A(12 番目), Hanibuchi M(14 番目), Nishioka Y(15 番目), Thymidine catabolism promotes NADPH oxidase-derived reactive oxygen species (ROS) signalling in KB and yumoto cells, Sci Rep, 8, 6760, 2018, 査読有, DOI: 10.1038/s41598-018-25189-y.

Saijo A, Goto H, Nakano M, Mitsuhashi A, Aono Y, Hanibuchi M, Ogawa H, Uehara H, Kondo K, Nishioka Y, Bone marrow-derived fibrocytes promote stem cell-like properties of lung cancer cells, Cancer Lett, 421, 17-27, 2018, 査読有, DOI: 10.1016/j.canlet.2018.02.016.

後東久嗣, 西條敦郎, 西岡安彦, がんの進展における線維細胞の機能と役割 ~ 血管新生阻害薬耐性とがん幹細胞様細胞の誘導 ~, 分子呼吸器病, 22, 49-51, 2018, 査読無, http://www.sentan.com/products/list.php?category_id=38

Tabata S, 他 20 名, Goto H(2 番目), Saijo A(12 番目), Hanibuchi M(13 番目), Nishioka Y(14 番目), Thymidine Catabolism as a Metabolic Strategy for Cancer Survival, Cell Rep 19, 1313-1321, 2017, 査読有, DOI: 10.1016/j.celrep.2017.04.061.

Kakiuchi S, 他 11 名, Hanibuchi M(1 番目), Saijo A(3 番目), Goto H(7 番目), Nishioka Y(11 番目), Analysis of acute exacerbation of interstitial lung disease associated with chemotherapy in patients with lung cancer: a feasibility of S-1, Respir Investig, 55, 145-152, 2017, 査読有, DOI: 10.1016/j.resinv.2016.10.008.

Kaneko MK, 他 9 名, Nishioka Y(8 番目), Chimeric Anti-Human Podoplanin Antibody NZ-12 of Lambda Light Chain Exerts Higher Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity and

Complement-Dependent Cytotoxicity Compared with NZ-8 of Kappa Light Chain, Monoclonal Antibody Immunodiagn Immunother, 36, 25-29, 2017, 査読有, DOI: 10.1089/mab.2016.0047.
後東久嗣, 西岡安彦, 血管新生阻害薬耐性のメカニズム, 日本臨牀, 75, 1039-1043, 2017, 査読無, <http://www.nippon-rinsho.co.jp/>
後東久嗣, 西岡安彦, 線維細胞による肺がんに対する血管新生阻害薬の耐性メカニズム, 最新医学, 72, 132-137, 2017, 査読無, <http://www.saishin-igaku.co.jp/directshop/directshop.htm>
Saijo A, Hanibuchi M, Goto H, Toyoda Y, Tezuka T, Nishioka Y, An analysis of the clinical features of lung cancer in patients with connective tissue diseases, Respir Investig, 55, 153-160, 2017, 査読有, DOI:10.1016/j.resinv.2016.11.003.
Abe S, 他 13 名, Nishioka Y(13 番目), Antitumor effect of novel anti-podoplanin antibody NZ-12 against malignant pleural mesothelioma in an orthotopic xenograft model, Cancer Sci, 107, 1198-1205, 2016, 査読有, DOI: 10.1111/cas.12985.
後東久嗣, 三橋惇志, 西岡安彦, 線維細胞がかかわる血管新生阻害薬に対する獲得耐性メカニズム, 分子呼吸器病, 20, 111-114, 2016, 査読無, http://www.sentan.com/products/list.php?category_id=38

〔学会発表〕(計 47 件)

Hiroshi Kawano, 他 9 名, Hisatsugu Goto(7 番目), Nishioka Yasuhiko(9 番目), Development of improved method to identify and analyze lung fibrocytes with flow cytometry in a reporter mouse strain, ERS International Congress 2018, 2018
荻野広和, 大塚憲司, 三橋惇志, 木宿昌俊, 西岡安彦, 肺癌・悪性胸膜中皮腫マウスモデルを用いた免疫チェックポイント阻害薬と化学療法の併用効果に関する検討, 第 31 回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 2018
西岡安彦, 肺がん進展に関わる線維細胞の機能解析から治療への展開, 第 27 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2018
荻野広和, 後東久嗣, 大塚憲司, 西條敦郎, 埴淵昌毅, 西岡安彦, 線維細胞が腫瘍免疫に及ぼす影響についての検討, 第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2018
佐藤正大, 他 10 名, 後東久嗣(9 番目), 西岡安彦(10 番目), 気管支肺泡洗浄液中 fibrocyte における miR-21 発現の疾患別差異に関する検討, 第 27 回日本呼吸器内視鏡学会中国四国支部会, 2018
Hisatsugu Goto, Atsushi Mitsuhashi, Yasuhiko Nishioka, Mechanism of acquired resistance to anti-angiogenic therapy mediated by fibrocytes, The 22nd Congress of APSR, 2017
Hirokazu Ogino, 他 12 名, Hisatsugu Goto(1 番目), Masaki Hanibuchi(10 番目), Yasuhiko Nishioka(12 番目), Phase II study of S-1 with patient-reported outcome evaluation in elderly patients with previously untreated advanced non-small cell lung cancer, ERS International Congress 2017, 2017
Atsuro Saijo, 他 9 名, Hisatsugu Goto(1 番目), Masaki Hanibuchi(8 番目), Yasuhiko Nishioka(9 番目), Bone Marrow-Derived Fibrocytes Promote Stem Cell-Like Properties of Lung Cancer Cells, ATS 2017 International Conference, 2017
Hisatsugu Goto, 他 8 名, Atsuro Saijo(2 番目), Hirokazu Ogino(3 番目), Masaki Hanibuchi(7 番目), Yasuhiko Nishioka(8 番目), Fibrocytes as a Possible Cellular Biomarker for Anti-Angiogenic Therapy in Lung Cancer, ATS 2017 International Conference, 2017
西岡安彦, がん免疫療法の基礎と臨床～最近の話題～, 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会ランチョンセミナー, 2017
後東久嗣, 西岡安彦, 悪性胸膜中皮腫に対する抗血管新生療法の可能性と耐性機序, 第 24 回石綿・中皮腫研究会, 2017
阿部真治, 加藤幸成, 西岡安彦, 悪性胸膜中皮腫に対するポドプラニンを標的とした抗体療法の開発, 第 24 回石綿・中皮腫研究会, 2017
後東久嗣, 三橋惇志, 西條敦郎, 埴淵昌毅, 西岡安彦, 線維細胞(fibrocyte)を標的としたがん転移・進展メカニズムの解明と血管新生阻害薬耐性克服の試み, 第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2017
西條敦郎, 後東久嗣, 荻野広和, 軒原浩, 西岡安彦, 骨髄由来線維細胞(fibrocyte)は肺癌のがん幹細胞様特性を促進する, 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017

西條敦郎, 荻野広和, 大塚憲司, 手塚敏史, 後東久嗣, 西岡安彦, Clinical efficacy of bevacizumab for non-squamous non-small cell lung cancer patients with malignant pleural effusion, 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2017

後東久嗣, 西條敦郎, 中野万有里, 飛梅亮, 大塚憲司, 米田浩人, 埴淵昌毅, 西岡安彦, がん幹細胞化の誘導を介した fibrocyte の肺がん進展・転移促進メカニズム, 第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2017

大塚憲司, 埴淵昌毅, 後東久嗣, 西岡安彦, 肺癌・悪性胸膜中皮腫に対する抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体と化学療法の併用効果の基礎的検討 . 第 21 回日本がん分子標的学会学術集会, 2017

Atsuro Saijo, Hisatsugu Goto, Mayuri Nakano, Atsushi Mitsuhashi, Hirokazu Ogin, Makoto Tobiume, Kenji Otsuka, Hiroto Yoneda, Masaki Hanibuchi, Yasuhiko Nishioka, Bone marrow-derived fibrocytes promote stem cell-like properties of lung cancer cells, 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会, 2017

6 . 研究組織

研究分担者氏名：後東 久嗣

ローマ字氏名：(GOTO, Hisatsugu)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（医学域）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00437641

研究分担者氏名：西條 敦郎

ローマ字氏名：(SAIJO, Atsuro)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（医学域）

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：00467812

研究分担者氏名：荻野 広和

ローマ字氏名：(OGINO, Hirokazu)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（医学域）

職名：助教

研究者番号（8桁）：20745294

研究分担者氏名：埴淵 昌毅

ローマ字氏名：(HANIBUCHI, Masaki)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（医学域）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80335794

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。