

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09314

研究課題名(和文) 線維芽細胞を標的とする肺線維症・間質性肺炎および肺癌の新たな治療戦略の探索

研究課題名(英文) New Therapeutic Strategy for Lung Cancer with Interstitial Lung Diseases

研究代表者

木村 亨 (Kimura, Toru)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・呼吸器外科特別研究員

研究者番号：90580796

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)：Fibroblast Activation Protein (FAP) は、活性化した線維芽細胞において細胞膜に発現することが知られており、これまで SMAと共に線維芽細胞の活性化マーカーとして捉えられてきたが、FAP陽性細胞が細胞外器質の産生・代謝を介して組織の線維化に関わることが報告された。本研究では、間質性肺炎合併肺癌の臨床検体を用いてFAPの発現と臨床経過について調査することで、間質性肺炎の病勢にFAP陽性細胞の存在が関与していることや肺癌におけるFAPの発現を確認し、難治性疾患である間質性肺炎やこれに併発する肺癌に対するFAP陽性細胞を標的とした治療法が有用である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺線維症・間質性肺炎は予後不良な難治性・進行性の疾患で、有効な治療法がないのが現状である。これらの疾患に高率に合併する肺癌もまた、日本における癌死亡の第1位を占める予後不良な疾患で、新たな治療法の開発が望まれている。

近年血液腫瘍で適応となったChimeric Antigen Receptor (CAR) T細胞療法は、現在、固形癌や難治性の良性疾患への適応拡大に向けて世界中で研究が進められている。本研究により、FAPを標的としたCAR T細胞を、未だ有効な治療法のない間質性肺炎や肺線維症に適応できる可能性が示唆されたものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast Activation Protein (FAP) is known to be expressed on the cell surface of activated fibroblasts and is recognized as one of the markers of activated fibroblasts, along with alpha-smooth muscle actin. Recently, it is reported that fibroblasts expressing FAP are responsible for tissue fibrosis by secreting and/or breaking down extra-cellular matrix. In this study, we investigated the relationship between FAP expression and clinical course by using surgically resected tissue samples obtained from lung cancer patients with interstitial lung diseases. We showed the possibility that the treatment targeting FAP-positive cells might be useful for interstitial lung diseases and lung cancers.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺線維症 間質性肺炎 肺癌 癌関連線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肺線維症・間質性肺炎は診断後の平均生存期間が 2.5～5 年間という予後不良な難治性・進行性の疾患で、有効な治療法がないのが現状である。また、経過中に感冒などを契機として急激に病状が進行する急性増悪を来した場合、その平均生存期間は 2 ヶ月以内とされる。さらに、これらの疾患に高率に合併する肺癌もまた、日本における癌死亡の第 1 位を占める予後不良な疾患である。間質性肺炎を合併した肺癌の手術療法については、急性増悪を含む合併症の頻度が高く、また術後再発のリスクが高いことも知られており、肺癌の重要な予後不良因子の一つである。術後に発症する間質性肺炎の急性増悪は、胸部外科領域の術後合併症の中でも、特に致死率が高く、日本呼吸外科学会学術委員会にて臨床的側面からの調査・解析結果が報告され、注目されている。

肺線維症や間質性肺炎は、肺間質と呼ばれる肺胞隔壁を炎症・線維化病変の場とする疾患で、その病態において線維芽細胞は、増殖因子や炎症性サイトカイン、細胞外基質を産生し、炎症・線維化の進行に重要な役割を果たすとされている。また、癌組織は癌細胞と癌間質とから成り、癌間質は、線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージやリンパ球などの炎症細胞から構成される。癌の増殖・転移において、これら癌間質の細胞が産生する増殖因子や血管新生因子等が注目されている。中でも、癌組織内の線維芽細胞は癌細胞に活性化され、癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast) と呼ばれる。癌関連線維芽細胞が、癌細胞に作用して、癌細胞の上皮-間葉系移行 (endothelial-mesenchymal transition; EMT) を惹起し、増殖・転移を促進する。さらに、肺線維症モデルマウスの肺に癌細胞株を移植することで、腫瘍の増殖と転移が促進されることが確認されており、肺線維症・間質性肺炎の病態である、肺における線維芽細胞の増加・活性化が、癌の増殖・転移の促進に寄与する可能性が示唆される。

Fibroblast Activation Protein (FAP) は、コラゲナーゼ活性等を有するセリン・プロテアーゼの一つで、活性化した線維芽細胞において細胞膜に発現することが知られており、これまで  $\alpha$ SMA と共に線維芽細胞の活性化マーカーとして捉えられてきた。一方、近年、線維化過程の組織や腫瘍内の線維芽細胞において、FAP および  $\alpha$ SMA 発現の不均一性が報告され、活性化した線維芽細胞によるコラーゲンの生成と分解への寄与について新たな知見が得られつつある。肺線維症患者の肺組織中で、線維化の中心部分における線維芽細胞で FAP の発現が確認されている一方、その役割は明らかにされていない。

肺線維症モデルマウスでは、線維化肺における FAP 陽性線維芽細胞の動向を確認すると共に、FAP を標的とした Chimeric Antigen Receptor (CAR) T 細胞を用いて FAP 陽性線維芽細胞を除去することで肺の線維化に影響することが確認されている。この線維化過程にある組織と癌組織の間の表現型の相違に、組織中の FAP 陽性線維芽細胞の動向が関与すると考え、臨床検体における肺組織および癌組織中の FAP 陽性細胞と臨床所見・予後との相関を明らかにすることが重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、肺線維症・間質性肺炎において病的に活性化した FAP 陽性線維芽細胞が、肺の線維化や肺線維症合併肺癌の増殖・転移に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。また、CAR T 細胞は、特定の抗原タンパクを発現する細胞を標的とした、新たな免疫療法として注目されており、これを用いて癌細胞を標的とする従来の治療法とは異なる、FAP 陽性線維芽細胞を標的とした新たな機序を介した癌治療とその臨床応用の可能性について検討し、その際の肺線維症・間質性肺炎に対する影響について検証した。

従来の肺線維症・間質性肺炎に対する治療薬には、抗線維化作用を有するピルフェニドンやニンテダニブ等が挙げられるが、その効果は未だ限定的である。この中で、ヒト肺線維症の組織中に存在するとされる FAP 陽性線維芽細胞の役割を明らかにすることで、FAP 陽性細胞を標的とした新たな治療法を模索したいと考えており、難治性疾患に対する新たな治療法確立を目指すという点で、非常に特色のある研究になると思われた。本研究では、肺線維症・間質性肺炎という難治性疾患への挑戦的な治療法の可能性を探索するとともに、手術検体を用いた解析を行い、臨床データと合わせて FAP 陽性線維芽細胞の役割を検討することで、次世代の免疫療法として注目される CAR T 細胞を利用した FAP 陽性細胞を標的とした新規治療法の臨床応用に繋げることができると考えた。

### 3. 研究の方法

(1) 肺線維症・間質性肺炎における FAP 陽性線維芽細胞における FAP 発現の動向と臨床的因子との相関関係を検討した。

肺線維症・間質性肺炎合併肺癌切除症例の背景肺（非癌部）における FAP および  $\alpha$ SMA について免疫組織学的染色を行い、これらの同在(fibrotic foci、その他の線維部位)と発現の程度について評価した。

術後の長期経過の中で、間質性肺炎の急性増悪、CT/レントゲン上の間質陰影の増悪、呼吸状態の悪化(呼吸苦などの症状出現や在宅酸素療法導入)などの呼吸器イベントとの関連を解析した。

肺線維症・間質性肺炎合併する肺癌組織中の線維芽細胞における FAP 発現と臨床的因子との関係を解析した。

(2) FAP-CART 細胞を用いてマウス肺線維症モデルおよびマウス肺癌モデルにおける抗線維化・抗腫瘍効果を検討した。

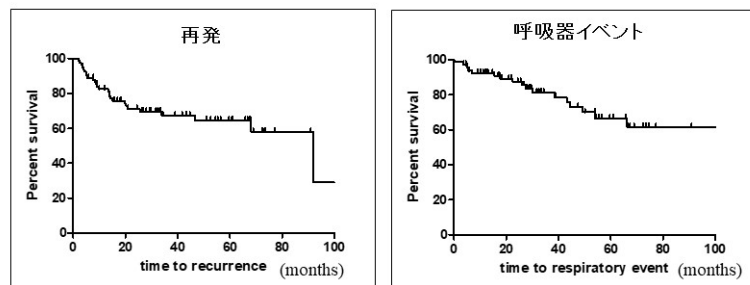
### 4. 研究成果

大阪国際がんセンターにおける間質性肺炎合併肺癌切除症例を、当科肺癌手術症例データベースから集積した。これらの症例について、詳細な臨床データを収集、解析を行った。まず、術前 CT 画像と切除検体組織像の比較検討を行い、腫瘍の背景となる肺の炎症・線維化巣の有無により、肺癌の組織型が異なることを明らかにし、炎症や線維化巣を背景とする肺癌組織では、病理学的な胸膜浸潤、リンパ管・血管浸潤が多い傾向を認めた。その原因として、慢性的な炎症を背景として tumor mutation burden の増加の他に、背景肺における炎症や活性化した線維芽細胞による、癌細胞の活性化が関与している可能性が挙げられた。

再発までの期間は他の肺癌症例に比して短く、また間質性肺炎を背景とした肺に新規病変を認める症例も多かった。間質性肺炎を合併していることは、再発や新規病変発生の際の治療方針にも影響を与えており、術後再発や第 2 癌による予後不良例が多いことを確認した(図 1)。

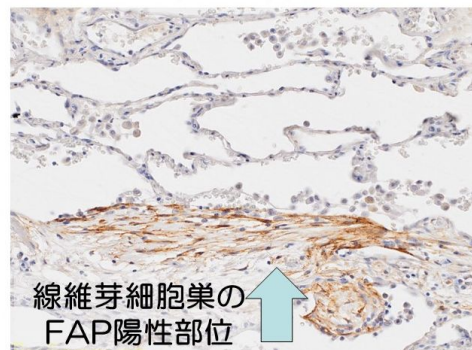
さらに、間質性肺炎合併肺癌術後では肺機能の影響から縮小手術の選択を余儀なくされることが少なくないが、縮小手術例において予後不良で、その理由として肺疾患より腫瘍学的な影響が大きいと考えられた。現在、縮小手術の妥当性が全国規模の施設共同研究で検証されているが、間質性肺炎合併肺癌では、未だ治療の選択肢は限られており、外科切除による根治性の向上が次に解決すべき課題として挙げられた。

図 1. 間質性肺炎合併肺癌術後の長期予後



術後経過フォロー中、画像での間質性肺炎像の悪化傾向を約半数に認め、非癌死も約 1 割に認めた。間質性肺炎の急性増悪、CT/レントゲン上の間質陰影の増悪、呼吸状態の悪化(呼吸苦などの症状出現や在宅酸素療法導入)などの呼吸器イベント発生が多く、呼吸状態の悪化が予後に影響する症例も散見した(図 1)。間質性肺炎合併症例について、切除検体から背景肺の詳細な病理学的検討を行うと、線維芽細胞巢に FAP の発現が認められ(図 2)、線維芽細胞巢が多い症例で呼吸機能低下や急性増悪などが多い傾向を認めた(図 3)。間質性肺炎合併肺癌に対して、手術適応となる症例は、間質性肺炎が比較的軽度で肺機能が未だ保たれている症例に限られるが、その中でも肺癌の経過観察中に、間質性肺炎の病状進行には症例間で差があり、切除肺における FAP 陽性の線維芽細胞巢が病状進行の予測に有用な可能性が示唆された。今後、このような、切除肺を用いた間質性肺炎の長期予後を判断するマーカー探索と、これに応じた治療介入が重要と思われた。

図 2. 間質性肺炎における FAP 発現 (DAB 染色)





また、間質性肺炎合併肺癌の腫瘍における FAP の発現を確認したところ、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌など、組織型に限らず、FAP の発現を認めたと (図 4)。扁平上皮癌では腫瘍間質に比較的均一に発現していた一方、腺癌では、その発現に heterogeneity を認めた。背景肺の間質性肺炎における FAP 陽性線維芽細胞巣と、発生した腫瘍組織の間質における FAP の発現について、一定の関連を見出すことはできなかった。肺腺癌では元来形態学的に heterogeneity を有することが知られているが、腫瘍間質における FAP の発現にも heterogeneity があることが示された。肺胞上皮置換性に癌細胞が増殖する比較的早期の病変から、内部に線維化を形成しながら段階的に浸潤癌へ発展していくとされているが、今後は、腫瘍間質形成における FAP の役割についても検討が必要と思われる。

図3. FAP陽性線維芽細胞巣と呼吸器イベントとの関連

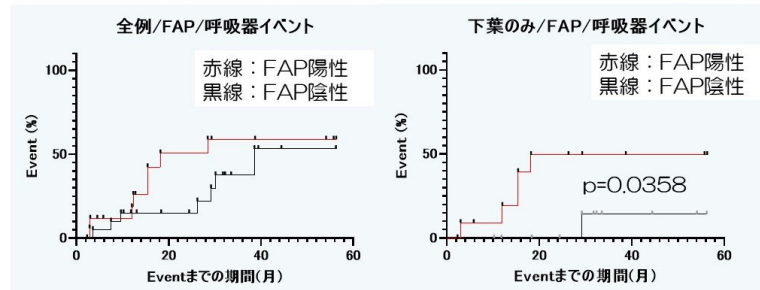
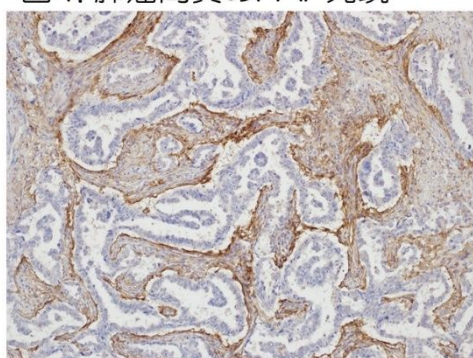
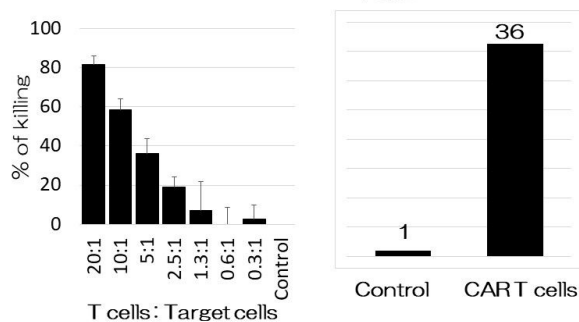


図4. 肺癌間質のFAP発現



次に、肺癌における FAP 陽性線維芽細胞の役割について検討するため、マウスモデルを用いた検討を行った。肺癌の腫瘍から初代培養で採取した線維芽細胞において、FAP の発現を確認した。癌細胞株とこの線維芽細胞をマウスへ共移植して腫瘍を作製したところ、腫瘍径の増大を認めたと、FAP-CAR T 細胞を投与して FAP 陽性線維芽細胞を除去することで、線維芽細胞による腫瘍増大の影響を抑制する傾向を認めた。一方で、肺線維症モデルにおいては FAP-CAR T 細胞の効果が確認できなかったため、CAR T 細胞に抗線維化作用を持つペプチドを分泌させる方針に変更し、これを作製した (図 5)。

図5. 抗線維化ペプチドを産生する FAP-CAR T細胞



FAP陽性細胞への殺細胞性の確認 (Killing assay)

ペプチドの遺伝子発現上昇 (qPCR)

肺癌間質における FAP 陽性線維芽細胞の役割と、肺線維症合併肺癌の予後と FAP 陽性線維芽細胞巣の関連について、現在論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村亨、阪上未紀、中村ハルミ、渡洋和、大村彰勲、坂田龍平、馬庭知弘、本間圭一郎、岡見次郎
2. 発表標題 間質性肺炎合併肺癌切除例における背景肺の病理学的評価と術後遠隔期の経過に関する検討
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村亨、田中諒、大村彰勲、川岸紗千、渡洋和、馬庭知弘、岡見次郎
2. 発表標題 早期肺腺癌病変における間質形成とFibroblast Activation Protein発現に関する検討
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 木村亨、大村彰勲、池見弘、寛島隆史、馬庭知弘、岡見次郎、東山聖彦
2. 発表標題 術式選択から見た間質性肺炎合併肺癌に対する肺切除術後予後の後方視的検討
3. 学会等名 第37回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村亨、池見弘、石田裕人、馬庭知弘、岡見次郎、東山聖彦
2. 発表標題 間質性肺炎合併肺癌における腫瘍の病理学的因子と背景肺との関連についての検討
3. 学会等名 第36回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村亨、大村彰勲、池晃弘、寛島隆史、馬庭知弘、岡見次郎、東山聖彦、Ellen Pure '、Steven M Albelda
2. 発表標題 肺線維症モデルマウスにおけるFibroblast Activation Proteinと肺線維化に関する検討
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村亨、大村彰勲、寛島隆史、池晃弘、馬庭知弘、岡見次郎、東山聖彦
2. 発表標題 間質性肺炎合併肺癌の術後経過において肺癌と間質性肺炎が予後の与える影響についての検討
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019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	舟木 壮一郎  (Soichiro Funaki)  (50464251)	大阪大学・医学系研究科・准教授   (14401)	
研究 分担者	新谷 康  (Yasushi Shintani)  (90572983)	大阪大学・医学系研究科・教授   (14401)	

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