

令和元年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06971

研究課題名（和文）がん関連線維芽細胞に着眼した腫瘍内不均一性の分子機構解明と新規がん治療戦略の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the role of cancer associated fibroblasts in intratumor heterogeneity of lung adenocarcinoma

研究代表者

佐藤 亮 (Sato, Ryo)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10802069

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：肺腺癌組織では単一の腫瘍内に組織型の異なる腫瘍が混在して存在する。申請者は、このような組織学的な腫瘍内不均一性の発症メカニズムを解明するため、がん関連線維芽細胞に着目した研究を行った。研究開始当初に想定していた転写共役因子であるYAPは、腫瘍組織構築の変化を制御していないことが明らかとなったが、興味深いことに組織型の変化に応じて腫瘍免疫環境が変化する新たな知見を見出すことができた。肺腺癌細胞はがん関連線維芽細胞とのクロストークによって免疫療法の効きづらい好中球優位の腫瘍免疫環境を生み出している可能性が考えられ、今後の肺腺癌に対する新規治療戦略構築の基盤となる成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫療法は予後不良な進行肺癌において長期生存や根治が期待できる治療法として確立しつつある。しかし、免疫療法が著効する患者は限定的であり、治療抵抗性のメカニズム解明が喫緊の課題となっている。本研究では、免疫療法の効きづらい好中球優位の腫瘍免疫環境ががん関連線維芽細胞によって誘導されることが明らかとなった。がん細胞とがん関連線維芽細胞の相互作用に重要なシグナル伝達機構であるTGF $\beta$ シグナルを阻害することで、より免疫療法の効きやすい腫瘍免疫環境へ誘導することのできる可能性が考えられ、本研究で得られた成果は今後の肺腺癌に対する新たな治療戦略を構築する上で重要な知見になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In almost all lung adenocarcinoma cases, tumor tissues contain several histological components within each tumor. To clarify the mechanisms of histologic intra-tumor heterogeneity, we focused on the crosstalk between lung adenocarcinoma cells and cancer associated fibroblasts (CAFs). We found that during interaction with CAFs lung adenocarcinoma cells express higher CXCL8 via TGF $\beta$  signaling, and they attracted neutrophils to their own tumor tissue. Because tumor infiltrated neutrophils have been considered to suppress T cell immunity against tumor cells, the TGF $\beta$ -CXCL8 axis can be the potential therapeutic target for lung adenocarcinoma patients.

研究分野：肺癌

キーワード：肺腺癌 がん関連線維芽細胞 腫瘍免疫

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍内不均一性は遺伝子変異の蓄積によって生み出されると考えられてきたが、近年がん幹細胞や上皮間葉転換など遺伝子変異に起因しないメカニズムによっても生み出されることが明らかとなってきている。このような遺伝子変異に起因しない不均一性には可塑性があり、腫瘍細胞周囲の環境因子によって誘導されると考えられる。申請者は、がん微小環境と腫瘍細胞との相互作用に着目した研究から、がん関連線維芽細胞が腫瘍内不均一性を誘導することを見出してきた。

そこで、本研究計画ではがん関連線維芽細胞によって誘導される腫瘍内不均一性のメカニズム解明に挑むこととした。

## 2. 研究の目的

申請者は最近、がん間質に存在するがん関連線維芽細胞が TGF- $\beta$  signaling の活性化したがん微小環境を作り出すことによって、組織構築の異なる腫瘍を誘導していることを見出した。更に TGF- $\beta$  signaling の活性化は転写共役因子として知られる YAP の局在を変化させ、腫瘍細胞にエピジェネティックな変化をもたらしていることを示唆する実験結果を得ている。本研究では、がん関連線維芽細胞と腫瘍細胞との相互作用における TGF- $\beta$  signaling と YAP、エピジェネティクスとの関係を明確にし、腫瘍内不均一性をターゲットとした新たな肺癌治療戦略を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、次の3つの研究計画からがん関連線維芽細胞によって誘導される腫瘍内不均一性の分子機構を解明することとした。

・ ヒト肺腺癌細胞株とがん関連線維芽細胞の3次元共培養法を用いて、がん関連線維芽細胞によって誘導される腫瘍細胞側の変化を解明する。特に TGF- $\beta$  signaling、YAP、エピジェネティクスに着目して解析を行う。

・ 本研究で明らかとした分子メカニズムを基に、腫瘍内不均一性をターゲットとした治療実験を行う。治療実験には3次元共培養系とマウスモデルを用いて検証する。

・ 肺腺癌患者の外科的切除検体を用いて、TGF- $\beta$  signaling、YAP、エピジェネティクスの関連性を解析する。

## 4. 研究成果

ヒト肺腺癌細胞株を TGF- $\beta$  1 で刺激することによって YAP が細胞質から核内へ移行することを確認したが、shRNA を用いて肺腺癌細胞株の YAP をノックダウンしても、がん関連線維芽細胞によって誘導される肺腺癌細胞株の3次元構築に変化を認めなかった。従って、YAP は肺癌の組織亜型を規定する働きを有していないと考えられた。

一方で、マウス肺腺癌モデルの凍結標本から組織構築の異なる Solid type と Acinar type の腫瘍組織をレーザーマイクロダイセクション法 (LMD7000、Leica Microsystems) で分離し、組織亜型毎の遺伝子発現パターンを RNA sequence で解析した結果、興味深いことに Solid type から Acinar type に変化する過程で好中球遊走因子である CXCL8 の発現が上昇することを発見した (図 1 a)。更に、CXCL8 は TGF- $\beta$  刺激によって発現上昇することを確認し (図 1 b)、がん関連線維芽細胞とのクロストークにおける TGF- $\beta$  刺激が肺腺癌細胞株における CXCL8 の制御メカニズムとなり得ることがわかった (図 2)。

CXCL8 は腫瘍細胞の増殖や浸潤を促進する作用に加え、強力な好中球遊走因子として働いている。近年、腫瘍組織内に入り込んだ好中球は腫瘍免疫を抑制する働きを有していることがわかってきており、より有効な肺癌に対する免疫療法を開発するためには、このような腫瘍免疫を抑制するメカニズムを明らかとするこ

図 1

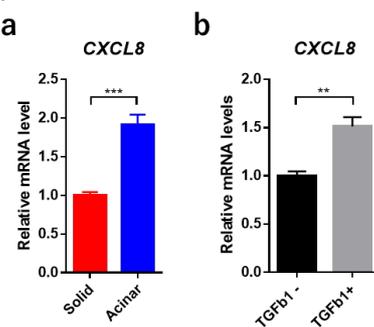
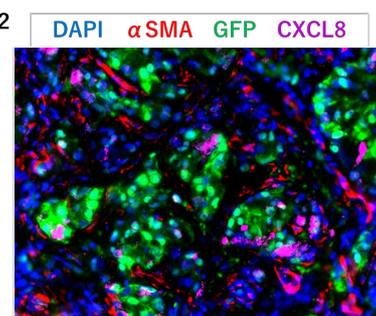


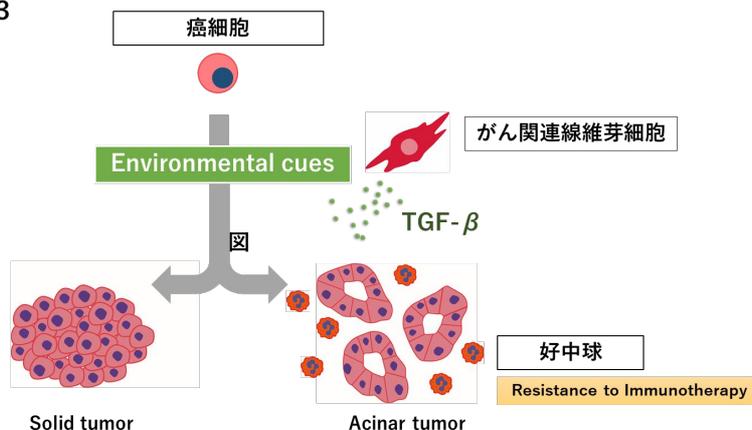
図 2



がん関連線維芽細胞 (αSMA陽性) が豊富な環境で、癌細胞 (GFP陽性) のCXCL8の発現が認められる。

とが極めて重要である。本研究で得られた知見から、肺腺癌細胞はがん関連線維芽細胞とクロストークすることで免疫療法の効きづらい好中球優位の腫瘍免疫環境を生み出している可能性が考えられ(図3)、TGF signalingを抑制してがん関連線維芽細胞とのクロストークを阻害することで、新たな免疫療法の治療戦略を構築できる可能性がある。今後、本研究で見出した知見をもとに、肺腺癌に対する新規治療戦略の構築を目的とした研究を進めて行く予定である。

図3



## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 4 件 )

1. Saruwatari K, **Sato R (co-first author)**, Nakane S, Sakata S, Takamatsu K, Jodai T, Mito R, Horio Y, Saeki S, Tomita Y, Sakagami T. The Risks and Benefits of Immune Checkpoint Blockade in Anti-AChR Antibody-Seropositive Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancers* (Basel). 2019 Jan 24;11(2). pii: E140. ( 査読あり )
2. Jodai T, Yoshida C, **Sato R**, Kakiuchi Y, Sato N, Iyama S, Kimura T, Saruwatari K, Saeki S, Ichiyasu H, Fujii K, Tomita Y. A potential mechanism of the onset of acute eosinophilic pneumonia triggered by an anti-PD-1 immune checkpoint antibody in a lung cancer patient. *Immunity Inflammation and Disease* 2018 Nov 21. doi: 10.1002/iid3.238. ( 査読あり )
3. Akaike K, Saruwatari K, Okabayashi H, Hamada S, Jodai Y, Jodai T, Sakata S, Iyama S, **Sato R**, Iriki T, Tomita Y, Saeki S, Ichiyasu H, Fujii K. Negative Impact of Coexisting Interstitial Lung Disease on Clinical Outcomes in Small-cell Lung Cancer Patients. *Anticancer Research* Nov;38(11):6543-6550, 2018. ( 査読あり )
4. Horio Y, Takamatsu K, Tamanoi D, **Sato R**, Saruwatari K, Ikeda T, Nakane S, Nakajima M, Saeki S, Ichiyasu H, Fujii K, Tomita Y. Trousseau's syndrome triggered by an immune checkpoint blockade in a non-small cell lung cancer patient. *European Journal of Immunology* 48(10):1764-1767, 2018. ( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

1. Semba T, **Sato R**, Kasuga A, Suzuki M, Saya H, Arima Y. Enriching EpCAM + /Sca-1 + mouse bronchioalveolar stem cells to generate lung adenocarcinoma. AACR annual

meeting, Apr 14-18th 2018. Chicago, USA.

2. **Sato R**, Semba T, Ichiyasu H, Fujii K, Saya H, Arima Y. TGF- $\beta$  Signaling Mediated by Fibroblasts is Associated with the Histological Subtypes of Lung Adenocarcinoma. IASLC 18th World Conference on Lung Cancer, Oct 15-18<sup>th</sup> 2017. Yokohama, Japan.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ：<https://kumamoto-respir.com/>