

令和元年5月22日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16606

研究課題名(和文) 肺癌における薬剤抵抗性腫瘍微小環境変化の解明

研究課題名(英文) Elucidation of alteration of tumor microenvironment for drug resistance in lung cancer

研究代表者

神崎 隆 (KANZAKI, RYU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10779060

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)：癌関連線維芽細胞マーカーPDGF receptor- 発現と予後の関係性を検討したところ、化学療法後の切除検体においてPDGF receptor- 発現と予後不良の関係性を見出した。肺癌切除検体より分離し樹立した癌関連線維芽細胞細胞株と担癌マウスモデルを用いた実験により、化学療法中の肺癌腫瘍内の微小環境の変化を検討した。その結果肺癌において、抗癌剤治療により癌関連線維芽細胞のGas6発現が上昇し、CAF由来のGas6が癌細胞に作用しその遊走を促した。切除検体にてAxl陽性(かつstromal Gas6陽性)群は予後不良であり、化学療法が上記機序により遠隔転移を促進している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は我が国の死因の首位であり、その治療成績の改善は喫緊の課題である。肺癌の主たる治療方法の一つに化学療法があるが、抗癌剤を使い続けると癌は薬剤耐性を示し転移能を獲得することが知られており、この現象に癌間質の関与が示唆されている。今回我々は、癌関連線維芽細胞が抗癌剤治療時に癌細胞の悪性を促す可能性を示唆する機序の一つを解明した。この結果、癌細胞そのものではなく、腫瘍微小環境を構成する細胞が治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。今後腫瘍微小環境をターゲットとした新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Relationships between stromal PDGFR- expression and survival after operation were analyzed in patients with NSCLC undergoing preoperative chemo- or chemoradiotherapy. Stromal PDGFR- expression is negatively associated with worse outcomes in these patients. We assessed alterations of tumor microenvironment using cancer-associated fibroblast (CAF) cell line established from resected specimen and mouse model. We found that Gas6 expression by CAFs was upregulated following cisplatin treatment and Gas6 derived from CAFs promote Axl-expressing lung cancer cells. In clinical samples, stromal Gas6 expression increased after chemotherapy and tumor Axl- and stromal Gas6-positive tumors were significantly worse than for the double negative group. Based on these findings, it is presumed that Gas6 derived from CAFs promotes migration of Axl-expressing lung cancer cells during chemotherapy and is involved in poor clinical outcome.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 化学療法 腫瘍微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌は我が国の死因の首位を占め、その治療成績の向上は喫緊の課題である。化学療法は肺癌治療において重要な役割を担うが、その問題点として、癌細胞の薬剤耐性獲得や悪性化が起こることが報告されている。

(2) 腫瘍組織には癌細胞の他に癌関連線維芽細胞や炎症細胞などが存在し、腫瘍微小環境を構築している。私たちは術前化学療法後に手術を行った肺癌症例における、癌細胞に発現する予後規定因子を解析し報告した。また、癌関連線維芽細胞が癌の悪性化に関わることを報告してきた。最近、動物実験において化学療法によって腫瘍微小環境が変化し、癌の悪性化や増殖を促すことが報告され、化学療法による腫瘍微小環境変化のメカニズムの解明が課題となっている。

2. 研究の目的

ヒト肺癌において化学療法による腫瘍微小環境の変化とそれに伴う癌細胞の悪性化のメカニズムを解明し、腫瘍微小環境を標的とした新規治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス担癌モデルを用いて、癌関連線維芽細胞に発現し、抗癌剤治療によりその発現が変化する分子を探索する。その分子の機能解析を肺癌切除検体より分離し癌関連線維芽細胞細胞株を樹立して *in vitro* で行う。

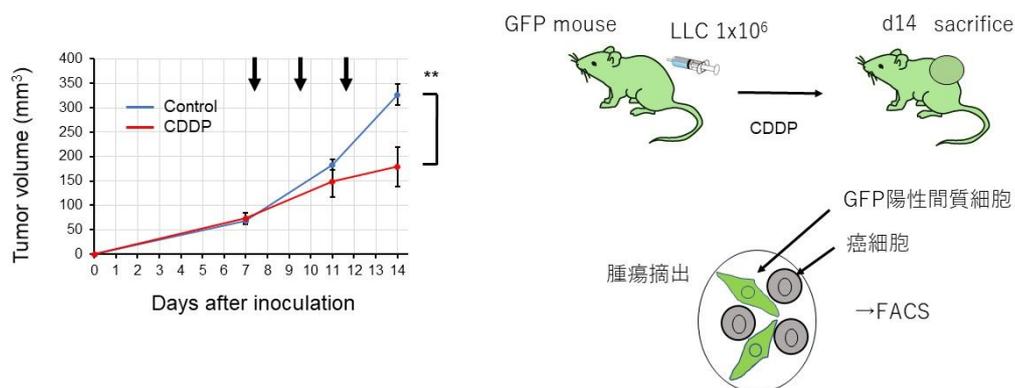
(2) 化学療法後の切除検体肺癌切除検体を用いて、癌関連線維芽細胞マーカー PDGF receptor- 発現と予後の関係性、抗癌剤治療により発現が変化する間質に発現する分子の意義をあきらかにする。

4. 研究成果

(1) 我々は癌関連線維芽細胞に発現する分子 Gas6 に着目した。C57BL6mouse の皮下にマウス肺癌細胞株 Lewis lung carcinoma(以下 LLC)を移植し、移植後 7/9/11 日目に CDDP を腹腔内投与すると、CDDP 投与群は 14 日目に control 群と比して腫瘍体積が小さかった。癌細胞と宿主由来の細胞を分離する為以下の実験を GFPmouse を用いて行った。LLC 移植後 14 日目に腫瘍を酵素分解して CAF(GFP-CD31-CD45-PDGFR- +細胞)を分取し、RT-qPCR にて Gas6 の発現を解析したところ、CDDP 投与群の CAF の Gas6 の遺伝子発現は、非投与群のそれに比して有意に高かった。

マウス皮下腫瘍モデルを用いた抗癌剤投与時のCAFのGas6の発現の比較

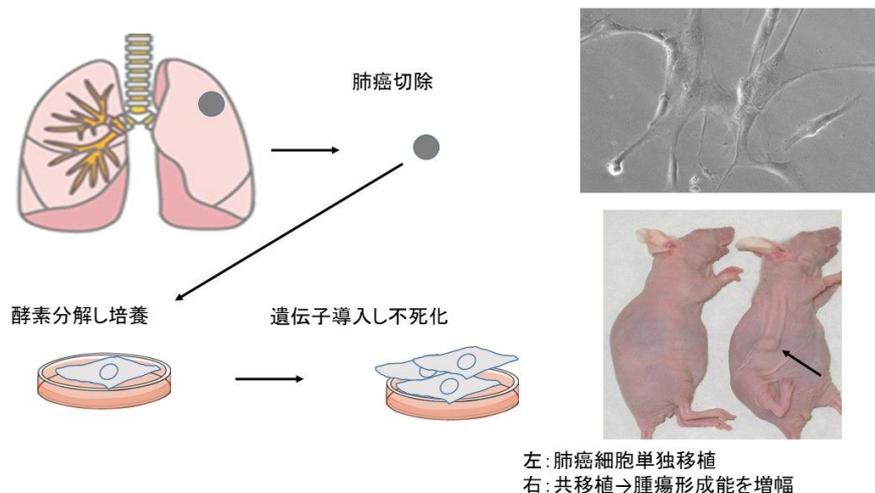
Lewis lung carcinoma (マウス肺癌細胞株)皮下移植モデルの腫瘍体積



(2)肺癌切除検体より、正常肺組織及び肺癌組織をコラゲナーゼで分解しディッシュに付着する細胞を継代純化して normal lung fibroblast (NF)及びCAFの primary culture を行った(n=4)。CAFに hTERT を導入して不死化 CAF 細胞株を樹立した(LCAF^{hTERT})。我々は実験の結果及び、化学療法によって腫瘍内の血流が低下するという既報に基づき、腫瘍内の血流低下が Gas6 の発現制御に関与していると仮定し、腫瘍内の血流低下を模して CAF に血清飢餓ストレスを加えた。Primary culture CAF 及び LCAF^{hTERT} を血清飢餓状態で培養すると、Gas6 の遺伝子発現の有意な上昇を認めた。通常の培養条件で LCAF^{hTERT} の Gas6 を siRNA を用いてノックダウン(KD)すると、増殖の抑制を認めた。H1299 は Axl の発現を認め Gas6 の発現は乏しく、外来性の Gas6 に反応

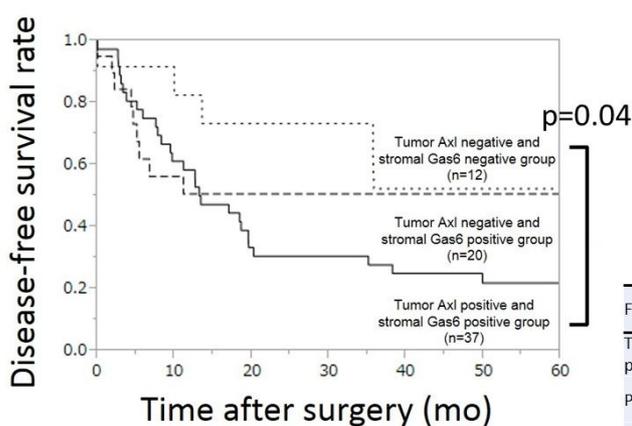
し AxI のリン酸化を認めた。Migration assay にて、H1299 の遊走能は Gas6 により亢進し、AxI 特異的 inhibitor により減弱した。LCAF^{hTERT} の培養上清は H1299 の遊走を亢進し、LCAF^{hTERT} の Ga6 を KD するとその効果は減弱し、AxI 特異的 inhibitor はその効果を阻害した。

不死化ヒト肺癌関連線維芽細胞の樹立



(3) 術前化学療法・化学放射線療法を施行後肺切除を行った肺癌 69 例を対象に、AxI 及び Gas6 の発現を免疫染色にて検討した。AxI は主に癌細胞に発現し、37 例で陽性であった。Gas6 は癌細胞にも間質にも発現が認められ、stromal Gas6 は 57 例で陽性であった。AxI 陽性例は全例 stromal Gas6 陽性であった。AxI 陽性(かつstromal Gas6 陽性)群(n=37)は、AxI 陰性かつstromal Gas6 陰性群(n=12)に比し、有意に 5 年無再発生存率が不良で(22% vs 51%, p=0.04)、再発形式は遠隔転移が多かった。また、化学療法前後の検体が入手可能であった 22 例では、14 例が化学療法前に AxI 陰性であったが、内 11 例では化学療法後に陽転化していた。以上より、肺癌において、抗癌剤治療により CAF の Gas6 発現が上昇し、CAF 由来の Gas6 が癌細胞に作用しその遊走を促した。切除検体にて AxI 陽性(かつstromal Gas6 陽性)群は予後不良であり、化学療法が上記機序により遠隔転移を促進している可能性が示唆された。

AxI、stromal Gas6発現と予後の関係



AxI強陽性(即ちstromal Gas6も陽性)
37例中29例に再発

遠隔転移再発 21例(72%)
局所再発 7例(24%)
不明 1例(4%)

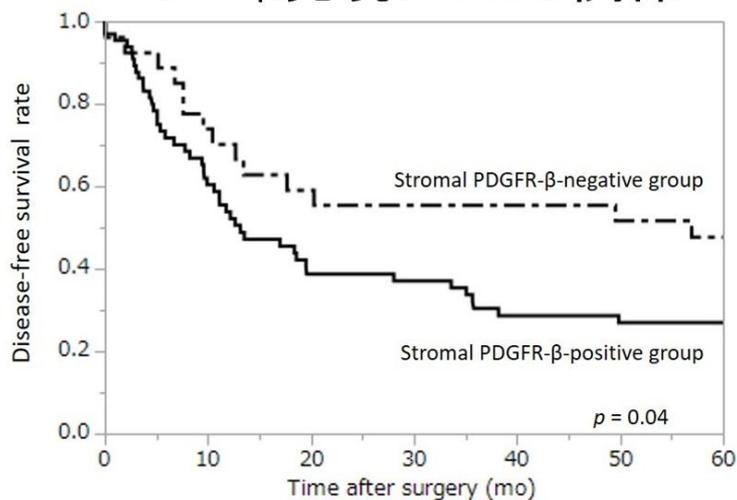
Tumoral AxI, stromal Gas6と、他の単変量で有意であった因子を用いた多変量解析

Factor	Hazard ratio	95% CI	p value
Tumoral AxI, stromal Gas6 (double positive group/ another group)	1.41	0.74-2.83	0.3043
Preoperative treatment (CRT/CT)	1.82	0.98-3.43	0.0598
Completeness of resection (complete/ incomplete)	2.22	1.00-4.57	0.0493
Pathologic stage (I,II,III,IV)	2.49	1.29-4.93	0.0064

(4) 1996-2014年に術前化学療法または化学放射線療法後に切除した92人の患者を対象に、切除検体を用いて癌間質におけるPDGFR- 発現を免疫染色を用いて評価し、その予後との相関を検討した。腫瘍間質におけるPDGFR- 発現は65人(71%)に認め、この割合は術前療法無しで手術した対照群の発現割合49%に比して有意に高かった(p=0.02)。間質PDGFR- 陽性例の5年無再発生存率は、陰性例のそれに比して有意に低かった(27 vs 48%, p=0.04)。また、5年癌特異的生存率においても、陽性例は陰性例のそれに比して有意に低かった(vs 48%, p=0.04)。一方、術前療法無しで手術した対照群においては間質PDGFR- 陽性例・陰性例間に長期成績の差を認めなかった。以上より、肺癌に対して術前化学療法または化学放射線療法後に切除した例では、間質における

PDGFR- 発現は予後不良関連因子となることが示された。

PDGFR-β発現とDFSの関係



Pts at risk	0	10	20	30	40	50	60
Stromal PDGFR-β negative	27	21	17	16	16	15	12
Stromal PDGFR-β positive	65	38	24	23	18	17	13

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Kanzaki R, Ose N, Kawamura T, Funaki S, Shintani Y, Minami M, Takakura N, Okumura M. Stromal PDGFR- Expression is Associated with Postoperative Survival of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Receiving Preoperative Chemo- or Chemoradiotherapy Followed by Surgery. *World Journal of Surgery*. 査読有、Vol.42, No.9, 2018、p2879-2886.

DOI: 10.1007/s00268-018-4560-7.

Kanzaki R, Naito H, Kise K, Takara K, Eino D, Minami M, Shintani Y, Funaki S, Kawamura T, Kimura T, Okumura M, Takakura N, Gas6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes migration of Axl-expressing lung cancer cells during chemotherapy. *Scientific Reports*. 査読有、Vol. 7, No.1, 2017、p10613

DOI: 0.1038/s41598-017-10873-2.

Funaki S, Shintani Y, Kawamura T, Kanzaki R, Minami M, Okumura M. Chemotherapy enhances programmed cell death 1/ligand 1 expression via TGF- induced epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Oncology Report*. 査読有、Vol.38, No.4, 2017、p2277-2284.

DOI: 10.3892/or.2017.5894.

〔学会発表〕(計6件)

神崎隆、大瀬尚子、川村知裕、舟木壮一郎、新谷康、南正人、奥村明之進 cT3-4 非小細胞肺癌に対する術前化学放射線療法後肺切除の検討 第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会 2018 年

舟木壮一郎、福井絵里子、川村知裕、神崎隆、新谷康、南正人、奥村明之進 非小細胞性肺癌における PD-L1 発現制御について 第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017 年

舟木壮一郎、福井絵里子、川村知裕、神崎隆、新谷康、南正人、奥村明之進 免疫チェックポイント経路 PD-1/PD-L1 の発現制御による肺癌治療法の確立 第 34 回日本呼吸器外科学会総会 2017 年

Funaki S, Shintani Y, Ose N, T. Kawamura T, Kanzaki R, Minami M, Okumura M Prognostic impact of Programmed cell death-1 (PD-1) tumor-infiltrating lymphocytes and Programmed cell death-1 -ligand 1(PD-L1) expression in thymic cancer 18th World Conference on Lung Cancer (国際学会) 2017年

Fujiwara A, Shinatni Y, Funaki S, Kawamura T, Kanzaki R, Fukui E, Minami M, Okumura M Effects of pirfenidone targeting EMT and tumor-stroma interaction as novel treatment for non-small cell lung cancer 18th World Conference on Lung Cancer (国際学会) 2017 年

Kanzaki R, Naito H, Eino D, Kawamura T, Ose N, Funaki S, Shintani Y, Minami M, Okumura M, Takakura N. Stromal PDGFR- expression influences postoperative survival of non-small

cell lung cancer patients receiving preoperative chemo- or chemo-radiotherapy. 18th World Conference on Lung Cancer (国際学会) 2017年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし