

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16372

研究課題名（和文）がん関連線維芽細胞が腫瘍関連マクロファージの分化/動員を誘導する分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying differentiation/mobilization of tumor-associated macrophages by cancer-associated fibroblasts.

研究代表者

鈴木 潤（Suzuki, Jun）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80869933

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）：非小細胞肺癌において、がん関連線維芽細胞(CAFs)は腫瘍促進的な腫瘍関連マクロファージ(TAMs)の集積と相関していることが示された。特にpodoplanin陽性の表現型を呈するCAFsでは免疫抑制的な腫瘍微小環境に関わるサイトカイン遺伝子発現の亢進が認められた。CAFsがTAMsに何らかの経路で影響を与え免疫抑制的で腫瘍促進的な免疫微小環境構築に関与することが示唆された。我々の報告からTGF- β が関与することが示唆されている。単球からマクロファージに分化させる実験系を確立して、CAFsとTAMsの相互採用メカニズムの詳細を明らかにすることが今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞肺癌（NSCLC）の免疫微小環境（IME）を研究することは、治療法の開発と予後の改善において極めて重要である。免疫チェックポイント阻害剤のような新たな免疫療法の効果を予測・最適化するためには、IMEの詳細な理解が不可欠である。我々は腫瘍間質に着目し、がん関連線維芽細胞と腫瘍関連マクロファージの関係性を明らかにした。今後さらなる詳細なメカニズムを含むIMEの特性を解明することで、新たなバイオマーカーの発見や、個別化医療の推進が期待されると考えている。

研究成果の概要（英文）：In non-small cell lung cancer, cancer-associated fibroblasts (CAFs) have been shown to correlate with the accumulation of tumor-promoting tumor-associated macrophages (TAMs). Specifically, CAFs exhibiting a podoplanin-positive phenotype demonstrated enhanced expression of cytokine genes involved in creating an immunosuppressive tumor microenvironment. This suggests that CAFs influence TAMs through some pathway, contributing to the formation of an immunosuppressive and tumor-promoting immune microenvironment. Our report suggests the involvement of TGF- β . Establishing an experimental system to differentiate monocytes into macrophages and elucidating the detailed mechanisms of interaction between CAFs and TAMs is a future challenge.

研究分野：腫瘍微小環境

キーワード：がん関連線維芽細胞 腫瘍関連マクロファージ 腫瘍微小環境

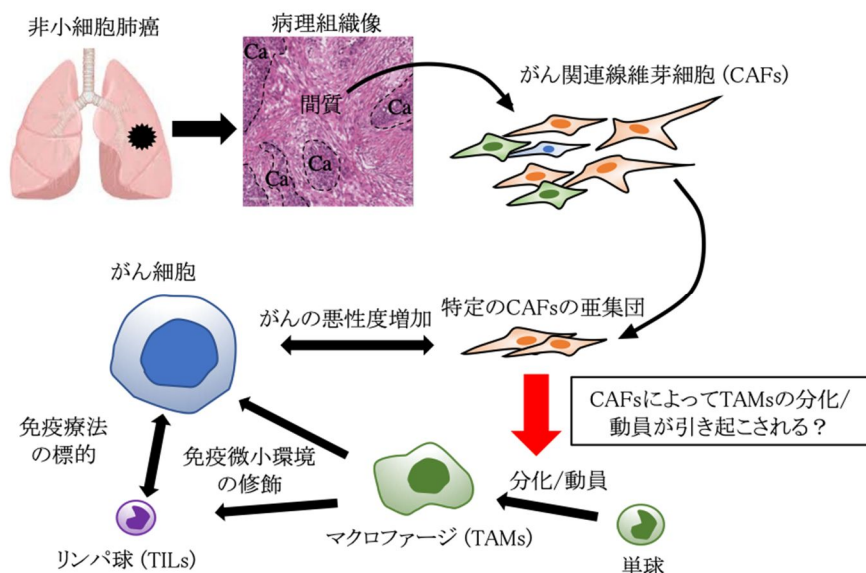
1. 研究開始当初の背景

がん細胞の周囲にはリンパ球やマクロファージといった免疫細胞や線維芽細胞などの非がん細胞が存在し、間質と呼ばれる組織を構成している。特にがん組織の中にあるこれらの細胞は、腫瘍浸潤リンパ球(tumor-infiltrating lymphocytes: TILs)、腫瘍関連マクロファージ(tumor-associated macrophages: TAMs)、がん関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblasts: CAFs)と呼ばれており、それぞれ特異な生物像を獲得した細胞集団である。がんの悪性化はがん細胞だけでなく、これらの間質細胞が形成するがん微小環境にも大きく影響されることが分かっている。

我々の研究グループは非小細胞肺癌のがん間質細胞に着目した研究に取り組んでおり、CAFの亜集団に Podoplanin 分子陽性分画 (PDPN 陽性 CAFs)が存在することを世界で初めて報告した。In vitro および In vivo の検討から、PDPN 陽性 CAFs は、がん細胞の浸潤能、生着率を亢進した。さらに、PDPN 陽性 CAFs の存在は、外科手術を受けた患者における予後因子となることなど、PDPN 陽性 CAFs が機能的分子として腫瘍促進的にはたらくことを明らかにした (*Int J Cancer*, 2008, *Cancer Res.* 2011)。

TAMs はがん組織において単球がマクロファージに分化して浸潤したものである。TAMs もまた様々な亜集団が存在し、我々はその中でも CD204 分子陽性分画のマクロファージ (CD204 陽性 TAMs)が腫瘍促進的な性質を有することも報告してきた (*J Thorac Oncol*, 2010, 2012)。

興味深いことに、現在進行中の検討において、PDPN 陽性 CAFs が多いがん組織では CD204 陽性 TAMs も多いことが判明した。これらのことから、PDPN 陽性 CAFs はがん細胞だけでなく、TAMs などの免疫細胞とも相互作用を示してがんの悪性化に関与する可能性が示唆される。TAMs は直接的あるいは間接的にがん組織内の免疫微小環境を修飾するとの報告もあり、TAMs と CAFs の相互作用を解明することで、TAMs の腫瘍促進的な機能を抑制する新たな治療ターゲットを発見する上で非常に重要なものであると考えられる。



2. 研究の目的

腫瘍促進的 CAFs の亜集団が、1) TAMs の分化、動員に影響を与えるのか、2) 与える場合は、その分子機構の解明、を目的とする。

3. 研究の方法

<具体的な検証手順>

1) 臨床病理学的検討

当院で 2007 年から 2014 年の間において手術された非小細胞肺癌患者の病理検体を用いて免疫染色を行う。PDPN 陽性 CAFs が 10%以上存在する症例を PDPN 陽性症例、10%未満を PDPN 陰性症例として扱う。まず、PDPN 陽性症例と陰性症例について、CD204 陽性 TAMs の集積数を評価して比較する。さらに、PDPN 陽性症例において、同一症例内で PDPN 陽性 CAFs が存在する領域と PDPN 陰性 CAFs が存在する領域での CD204 陽性 TAMs の集積数を比較する。このようにして PDPN 陽性 CAFs が腫瘍内における CD204 陽性 TAMs の集積数だけでなく、がん組織内における局在に関与するかを検討する。

2) CAFs と単球の分離

当院で肺がん患者から採取された CAF および単球を分離培養する。この CAF 検体を用いて、PDPN 陽性 CAFs と PDPN 陰性 CAFs の cell-sorting を行う。Cell-sorting については当施設所有の FACS-ARIA II を使用して行う。単球は、切除された肺の肺静脈血より免疫磁気ビーズを用いて CD14 陽性分画を分離する。

3) PDPN 陽性 CAFs のトランスクリプトーム解析

PDPN 陽性 CAFs と PDPN 陰性 CAFs の mRNA を用いて RNAseq を実施する。両者において 2 倍以上発現量に差を認め、かつ CD204 陽性 TAMs の分化 / 動因に関与する因子を抽出する。

4) PDPN 陽性 CAFs と単球との共培養

分離した CD14 陽性単球と PDPN 陽性 CAFs とを共培養する。1 週間培養後、CD204 分子発現の定量を行う。さらに、Double chamber migration assay を施行する。下層に上記 CAFs を培養し、upper chamber (8um の pore を有する) に CD14 陽性 / CD204 陽性 TAMs を静置する。1 日後に、下層に移動する TAM の数を検討する。

RNAseq により得られた候補分子を、PDPN 陽性 CAFs に過剰発現、あるいは PDPN 陰性 CAFs にノックダウンし、上記現象がキャンセルされるかを検討する。PDPN 陽性 CAFs 由来のどの因子が、TAM の分化、動員に関与するかを検討する。

3) 上記の実験で PDPN 陽性 CAFs と CD204 陽性 TAMs との間の相関が認められなかった場合

Podoplanin とは別の因子が CD204 陽性 TAMs に関与している可能性がある。その場合、podoplanin 以外に CD204 陽性 TAMs に影響を与える CAFs の亜集団を探索する。

当研究室では、患者由来の CAFs に関して、CAFs を single cell 単位で分離 / 培養し、それぞれの CAF ごとくクローンを確立している (*J Cancer Res Clin Oncol*, 2017)。これによって樹立された CAF の各クローンと CD204 陽性 TAMs において関連が認められるもの / 認められないものを抽出する。これらのクローン間での CAF の特性の違いを RNAseq にて明らかにし、該当因子に関しては 2-4 に従って詳細なメカニズムを明らかにしていく。

4. 研究成果

非小細胞肺癌において、podoplanin 陽性がん関連線維芽細胞 (PDPN+ CAFs) 胞は腫瘍促進的な TAMs の集積と 相関しており、in vitro の実験において、PDPN+ CAFs では免疫抑制的な腫瘍微小環境に関わるサイトカイン遺伝子発現の亢進が認められ、これを報告した (Relationship between podoplanin-expressing cancer-associated fibroblasts and the immune microenvironment of early lung squamous cell carcinoma. *Lung Cancer*. 2021 Mar;153:1-10)。それ以降、CAFs と TAMs の間にどのような相互作用が働いているのを明らかにすることを課題として取り組んできた。CAFs が免疫抑制的な腫瘍微小環境に関わる因子として TGF- β が関与することが想定された。これを単球からマクロファージに分化させる系を確立して実証しようと試みたが、実験系の確立に非常に難渋し、直接的なメカニズムの解明な困難であった。それでも CAFs が TAMs になんらかの経路で影響を与え免疫抑制的で腫瘍促進的な免疫微小環境構築に関与することは複数の研究報告からも濃厚だと考えられる。さらに改善した実験系の確立によってこの詳細なメカニズムが実証されることが待たれる。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Jun, Aokage Keiju, Neri Shinya, Sakai Takashi, Hashimoto Hiroko, Su Yinghan, Yamazaki Shota, Nakamura Hiroshi, Tane Kenta, Miyoshi Tomohiro, Sugano Masato, Kojima Motohiro, Fujii Satoshi, Kuwata Takeshi, Ochiai Atsushi, Tsuboi Masahiro, Ishii Genichiro	4. 巻 153
2. 論文標題 Relationship between podoplanin-expressing cancer-associated fibroblasts and the immune microenvironment of early lung squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2020.12.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	石井 源一郎 (Ishii Genichiro)		

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