

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17174

研究課題名（和文）癌関連線維芽細胞の活性化維持機構を標的としたIPF合併肺癌の新規治療法探索

研究課題名（英文）Exploring Novel Therapies for IPF-Associated Lung Cancer by Targeting the Mechanisms Sustaining the Activation of Cancer-Associated Fibroblasts

研究代表者

鈴木 敏夫（Suzuki, Toshio）

筑波大学・医学医療系 臨床腫瘍学/腫瘍内科・専任講師

研究者番号：70771856

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）：癌微小環境、特に癌細胞と線維芽細胞の相互作用に焦点を当てた治療戦略の開発が求められる中、本研究はF2-Isoprostanes（F2-IsoPs）によるシグナル伝達が癌の進行や治療抵抗性に与える影響を検証した。F2-IsoPsはThromboxane-Prostanoid受容体（TPR）を介して線維芽細胞を持続的に活性化し、その解除にはTPR antagonistが有効で、EGFR変異肺癌でのEGFR-TKIとの併用効果も確認された。しかし、空間オミックス解析からはTPR陽性線維芽細胞の分布が癌細胞周囲に特に多いことを示せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症および線維化病態は発癌母地として様々な臓器で問題になり、そこで発生した癌は難治性であることが知られているが、線維化のエフェクター細胞である線維芽細胞と癌細胞の相互作用をターゲットにした治療戦略は確立していない。本研究によってがん関連線維芽細胞がF2-isoprostanesシグナルを介して持続活性化し、癌の難治化を誘導している結果が示唆された。一方、空間オミックス解析ではF2-Isoprostanesの受容体であるThromboxane-Prostanoid receptorの発現は癌細胞に隣接する位置でのみ発現するわけではなく、他のシグナル経路も本病態に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：There is an urgent need for new therapies targeting the cancer microenvironment, particularly the interactions between cancer cells and fibroblasts. Our research focused on how F2-Isoprostanes (F2-IsoPs) signal between cancer cells and fibroblasts, potentially driving malignancy and treatment resistance through sustained activation of cancer-associated fibroblasts. F2-IsoPs were found to activate fibroblasts in both non-cancerous and cancerous tissues via the Thromboxane-Prostanoid receptor (TPR), an effect reversible by TPR antagonists. Combining TPR antagonists with EGFR-TKI in EGFR-mutant lung cancer reduced drug-resistant cells. However, spatial omics analyses of lung cancer tissues showed no TPR-positive fibroblasts near cancer cells, suggesting other factors may influence pathogenesis, possibly due to limited sample size or additional regulatory mechanisms involving TBXA2R protein.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺癌 癌ニッチ がん関連線維芽細胞 細胞間相互作用 空間的トランスクリプトーム解析 肺癌オルガノイド EGFR変異陽性肺腺癌 薬剤耐性

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

がんゲノム解析の飛躍的進展に伴い、発癌および癌の悪性を牽引するドライバー遺伝子の詳細なリストを一望することができるようになってきた。それに伴い各種肺癌分子標的薬の開発が進んでいるが、一方で、たとえその癌分子標的薬が奏功してもその持続時間が1年に満たない症例も多く、完成した肺癌に対する治療法探索研究だけでなく、未だ解明が進んでいない発癌メカニズム、癌微小環境をターゲットにした治療戦略の探索が望まれている。

IPF は、原因不明の間質性肺炎の中で最も頻度の高い病型で、肺癌を高率に合併する。IPF は、線維化と末梢気道のリモデリングを特徴とする持続する肺の慢性炎症であり、このような慢性炎症の過程が DNA 損傷を招来し、発癌リスクを増加させると考えられている。しかし、その詳細については未だ解明が進んでいない。IPF に合併した肺癌の多くが末梢肺線維化領域に発生することから、そこに肺癌の発生源が存在すると考えられる。

Myofibroblast による線維芽細胞巣が IPF における肺線維化の起点であると考えられているが、同様に癌微小環境においても CAFs が重要な構成成分と考えられている。がんの周囲に存在する CAFs はがんの増殖、浸潤、転移において重要な役割を持っている。Heterogenous な起源をもつと考えられる CAFs であるが、一つ共通して言えるのは、CAFs の誘導因子として TGF- $\beta$  系シグナルが重要であるという事である。

これまで TGF- $\beta$  系の下流のシグナル探索は広く行われてきたが、その上流のシグナル解析については未だ不明な部分が多かった。我々のこれまでの研究から、肺の末梢領域を中心に存在する組織常在性血管内皮細胞において、血管内皮ミトコンドリア由来の Reactive Oxygen Species (ROS) をトリガーにして TGF- $\beta$  系の活性化が起こり、EndMT により myofibroblast 様の細胞が誘導される事が明らかになった(Suzuki T, et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016)。

さらに 2019 年度科研費研究活動スタート支援の助成により申請者は、血管内皮ミトコンドリア Sirt3 により制御される ROS-F2-Isoprostanes (F2-IsoPs) が、EndMT、fibroblast-to-myofibroblast transition を調整し、線維化病態の制御に関与している事を同定した。通常、myofibroblast は創傷治癒の完了とともにアポトーシスするが、IPF における myofibroblast や肺がん組織における CAFs は、活性化した形質を維持し続ける。我々は IPF においてこの現象が F2-IsoPs シグナルに制御されている事を明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、F2-IsoPs シグナルが腫瘍促進性 CAF の形成に関与するか否かを明らかにし、もし関与するのであればそれをターゲットにした治療の有効性について検討する事である。最近の遺伝子改変動物作成技術の進歩により様々な細胞種の lineage tracing マウスを用いて各細胞の起源を検討する事ができるようになったが、CAFs の様に特異的なマーカーが明らかになっておらず、しかも多様な起源を持つ集団と考えられている細胞群については、今回予定しているシングルセル解析が細胞起源解析/細分化/各クラスターの機能探索において非常に強力な解析ツールになると予想される。

## 3. 研究の方法

まず、非癌肺組織において F2-IsoPs が Thromboxane-Prostanoid receptor (TPr) を介して線維芽細胞の持続活性化を誘導しているかを検証すべく、3 種類の肺線維症モデルマウスに対する TPr antagonist (ifetroban) の薬効評価、Tbxa2r KO マウスを用いた検

証を実施した。さらに TPr signaling のうち線維芽細胞持続活性化に関与するリガンドが Thromboxane A2 か F2-IsoPs であるかを検証すべく、Thromboxane A2 合成阻害薬を用いた検証も実施した。さらに、非癌肺組織から単離した肺線維芽細胞に対する F2-IsoPs の影響を検証した。

次に、ヒト肺癌組織においても同様の検証を実施した。ヒト肺癌組織から単離した線維芽細胞を用いた検証の他、ヒト EGFR 変異肺癌組織から肺癌細胞を単離した上で、線維芽細胞との共培養から肺癌オルガノイドを作成し、ifetroban の薬効、ifetroban と EGFR-TKI の併用の薬効を検証した。

最後に、ヒト肺癌組織サンプルを用いて scRNAseq、空間オミックス解析 (Visium, Xenium, PhenoCycler) を実施し、validation を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) *in vitro* ヒト非癌肺培養モデル系および *in vivo* 肺線維症モデルでの検証

炎症性メディエーターとしての認知度が高いプロスタノイドであるが、各種受容体のノックアウトマウス解析が進み、新たな作用役割が報告されている。そのうち TP receptor (TPr) については、ThromboxaneA2 (TxA2) とアラキドン酸酸化により形成される F2-IsoPs の共受容体として知られている。脂質過酸化と各種線維化の関連が示唆されている事から、我々は TPr signaling が肺線維症病態形成に関与しているかどうかについて、異なる 3 種類の肺線維症モデルマウス (薬剤, 遺伝性, 放射線) 及び IPF 患者検体を用いて検討した。その結果、TPKO マウスではブレオマイシン誘導性の肺線維化が抑制され、線維化形成後の治療において、TxA2 合成阻害剤ではなく TPr アンタゴニストの投与が有用である事を確認した。ヒト肺線維芽細胞培養系および肺線維症モデル sphere を利用し、Thromboxane-Prostanoid Receptor signaling が TGF- signaling の上流を制御し、肺線維症の線維芽細胞の活性化維持機構へ深く関与していることを 2022 年に 報告した (Suzuki T, et al. Am J Respir Crit Care Med 2022)。非常に興味深いことに同シグナルは ThromboxaneA2/B2 ではなく、F2-IsoPs によるシグナル経路であることが判明し、線維化のキーとなる TGF シグナルがなぜ遷延性に活性化を維持するかについての一つの候補シグナルを明らかにした。本結果をもって 2023 年に IPF に対する ifetroban (TPr アンタゴニスト) の Phase2 試験が開始されている。

##### (2) *in vitro* ヒト肺癌組織由来線維芽細胞培養系での検証

(1) と同様のメカニズムが肺癌ニッチ環境の癌関連線維芽細胞でも作動していることを肺癌患者サンプルから単離した線維芽細胞を用いて確認した後、肺癌細胞との共培養系での検証を実施した。

具体的にはまず、患者肺癌組織由来の肺癌細胞と胎児肺線維芽細胞 (TIG1-20) からなる肺癌オルガノイドを樹立した。TPr antagonist, ifetroban を添加した群では癌細胞の生存率、増殖能に有意差を認めなかったが、erlotinib との併用下においては、併用群の方が癌細胞数、増殖能を有意に抑制することが示された。同オルガノイドには非癌肺胞上皮細胞も共培養されていたが、その非癌肺胞上皮細胞の生存数、増殖能には影響を及ぼさないことが示された。以上を American Thoracic Society 2020、日本呼吸器学会 学術集会 2020 にて報告した。

##### (3) ヒト肺癌サンプル single cell RNAseq/空間オミックス解析

肺線維症の線維化巢の線維芽細胞と癌周囲の癌関連線維芽細胞との cell cell interaction について、single cell RNAseq を用いて実証しようと試みたが、シングルセル化の際に特定の細胞種のダメージが条件を変えても発生してしまう状況が続いた。本手法では信憑性の高い結論には到達し得ないと考え、研究手法を大きく変更することにした。

FFPE 検体を用いて Visium 解析を実施し、実際のヒト症例での傍証を得ることにした。しかし、Visium 解析では免疫細胞と他肺構成細胞のオーバーラップ検出の問題が出たため、Xenium in situ によって空間オミックス解析を実施した。細胞分散時に特定の細胞腫が細胞死してしまう、あるいは特定の細胞種の生細胞下での 1 細胞化を優先させたため、特に線維芽細胞での細胞分散が不良となるエラーは、本手法によって回避できた。10X chromium 社が提供する、DAPI 陽性核間の距離から基に cell segmentation を定義する手法を用いて、組織切片中の細胞クラスタリングを実施した。癌細胞と線維芽細胞のクラスタリング結果を組織上でマッピングさせたところ、癌細胞ニッチの線維芽細胞のエンドタイプによって癌細胞のエンドタイプも異なってくるようになった。Xenium 解析切片と sequential な切片で PhenoCycler を実施し、癌細胞に対する cell neighborhood analyses を実施したが、TBXA2R 発現陽性線維芽細胞が有意なニッチ細胞としては候補に挙がらなかった。解析サンプル数が少ないが故の結果である可能性もある他、必ずしも TBXA2R の蛋白発現のみが F2-IsoPs による本受容体シグナルの活性化を反映している訳ではない可能性がある。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki T, Kropski JA, Chen J, Carrier EJ, Chen X, Sherrill TP, Winters NI, Camarata JE, Polosukhin VV, Han W, Rathinasabapathy A, Gutor S, Gulleman P, Sabusap C, Banovich NE, Tanjore H, Freeman ML, Tada Y, Young LR, Gokey JJ, Blackwell TS, West JD.	4. 巻 206(5)
2. 論文標題 Thromboxane-Prostanoid Receptor Signaling Drives Persistent Fibroblast Activation in Pulmonary Fibrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 596-607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1164/rccm.202106-15030C.	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Toshio Suzuki
2. 発表標題 Thromboxane-Prostanoid Receptor Signaling In Fibroblasts Is A Potential Interventional Target For Pulmonary Fibrosis
3. 学会等名 ATS (American Thoracic Society) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木敏夫, 鈴木英雄, 関根郁夫
2. 発表標題 線維化/癌微小環境制御においてThromboxane-prostanoid receptorシグナルが果たす役割
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木敏夫
2. 発表標題 Integration of high-resolution 3D organoid engineering and spatial transcriptomics as a next-generation drug discovery platform for lung cancer
3. 学会等名 先進ゲノム支援 拡大班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木敏夫
2. 発表標題 肺オルガノイド空間的トランスクリプトーム解析による次世代創薬プラットフォーム開発 -ニッチオーム介入評価系の新ツールとしての可能性-
3. 学会等名 第64回日本呼吸器学会学術講演会 若手呼吸器最前線シンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Toshio Suzuki
2. 発表標題 Integration of high-resolution 3D organoid engineering and spatial transcriptomics as a next-generation drug discovery platform for pathologic lung remodeling
3. 学会等名 ATS (American Thoracic Society) 2024, Mini symposium (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木敏夫
2. 発表標題 呼吸器疾患オルガノイド創薬の幕開け -translational bioengineering を可能にするiPS細胞由来オルガノイド-空間オミックス統合創薬基盤プラットフォーム-
3. 学会等名 第26回日本医薬品情報学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木敏夫
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来-肺オルガノイド創薬/毒性評価 -空間オミックス配備型プラットフォーム-
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会・日本ヒト細胞学会合同学術集会 2024 (招待講演)
4. 発表年 2024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
研究協力者	鈴木 穣  (Suzuki Yutaka)		
研究協力者	鈴木 絢子  (Suzuki Ayako)		
研究協力者	ブラックウェル ティモシー  (Blackwell Timothy)		

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		
米国	Vanderbilt University Medical Center		