

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08159

研究課題名(和文)1細胞解析結果に基づく肺癌の発癌責任間葉サブクラスターとCAF起源細胞の決定

研究課題名(英文) Determination of the mesenchymal subcluster responsible for carcinogenesis of lung cancer and origin of CAF based on the results of single-cell analysis

研究代表者

柳 重久 (Yanagi, Shigehisa)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：60404422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、研究代表者らが新規に見出した肺腺癌自然発癌モデルとシングルセル解析を用い、癌微小環境の構築プロセス、発癌責任間葉サブクラスターを明らかにし、癌治療全体の底上げに資することである。今回、2種類の肺腺癌自然発症モデルを樹立した。モデルマウスの未発病期のシングルセル解析の結果、ミトコンドリア電子伝達系分子群の高発現を特徴とし、上皮間葉転換(EMT)-likeプロファイルを示す間葉サブクラスターが、2種類の肺腺癌自然発症モデルで共通して出現することを発見した。電子伝達系は細胞内ROSの主な供給源であることから、この間葉サブクラスターが発癌の開始に必須であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌を含む癌の発生は、正常な成体幹細胞と遺伝子変異を生じた成体幹細胞との競合に依存する確率的プロセスにより生じる。すなわち、変異した成体幹細胞が癌化するには「周囲の手助け」が不可欠である。癌化の最重要イベントはこの「周囲の手助け」を作ること、「発癌微小環境の形成」であり、有望な癌治療標的となりえるが、いまだ十分に解明されていない。発癌責任サブクラスターと責任パラクラインシグナルが同定されることで、例えば喫煙者などのハイリスク群を対象とした全く新しいがん先制医療の確立が期待される。他臓器の癌、臓器リモデリングの新規治療開発をも加速度的に前進させる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the origins of the tumor microenvironment and tumorigenesis by using a novel model of spontaneous lung adenocarcinoma developed by principal investigator and single cell analysis. In the present study, we have established two mouse models of spontaneous tumorigenesis of lung adenocarcinoma. Lung mesenchymal cells from the unaffected stages of these mice were isolated and subjected to single-cell analysis. Single-cell analysis revealed that emergence of mesenchymal subcluster characterised by high expression of a group of mitochondrial electron-transfer system molecules and exhibiting an epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like profile appeared in common in the two spontaneous lung adenocarcinoma models. The electron transport system is the main source of intracellular ROS, suggesting that this mesenchymal subcluster is essential for the initiation of carcinogenesis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：発がん シングルセル解析 癌微小環境 肺癌 2型肺胞上皮 Pten RhoA 肺腺癌自然発癌モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌を含む癌の発生は、正常な成体幹細胞と遺伝子変異を生じた成体幹細胞との競合に依存する確率的プロセスにより生じる。すなわち、変異した成体幹細胞が癌化するには「周囲の手助け」が不可欠である。癌化の最重要イベントはこの「周囲の手助け」を作ること、「発癌微小環境の形成」であり、有望な癌治療標的となる。発癌において、変異した成体幹細胞が与える微小環境への影響、変異成体幹細胞が形成する病的微小環境が、どのようなシグナルで変異成体幹細胞の発癌を誘導するかは、未解明の研究領域である。

癌関連線維芽細胞(CAF)は癌微小環境の鍵因子であり、癌の浸潤・転移を促進する。細胞外マトリックス産生とリモデリング、癌細胞や免疫細胞との多重な相互情報伝達を統制する。CAFは癌薬物療法の治療抵抗性にも寄与し、新規治療標的として期待されている。しかし、CAFは起源が不明で、多様な機能を有する不均一なサブクラスターの集団であり、有効なマーカーが存在しない。このことが、CAF標的治療開発の大きな障壁となっている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、癌微小環境の構築プロセス、発癌責任間葉サブクラスター、CAFの起源を明らかにし、癌治療全体の底上げに資することである。未発症期の肺間葉細胞の sc-RNAseq 解析結果をもとに、発癌責任間葉サブクラスターを決定する。空間的トランスクリプトミクス、細胞系譜追跡、臨床検体を用い、CAFの起源細胞を特定する。「2型肺胞上皮(AT2)の細胞老化加速が誘導する発癌環境の構築とCAFの新生」という独創的な観点から、発癌・進展機構を解明し、高選択性の発癌イニシエーション・CAF標的治療戦略を創出する。

### 3. 研究の方法

#### (1) scRNA-seq 解析結果を用いた発癌責任間葉サブクラスターの同定

非発症期の AT2 特異的 Pten 欠損(*Sftpc<sup>CreERT2</sup>;Pten<sup>FL/FL</sup>*)マウスと対照マウスから単離した肺間葉細胞(CD31<sup>neg</sup>CD45<sup>neg</sup>EPCAM<sup>neg</sup>)の scRNA-seq 解析データを用い、t-SNE プロットの比較解析を行う。各肺間葉細胞サブクラスターについて、間葉系マーカーの発現レベルをバイオリンプロットにて解析し、サブクラスターを間葉系マーカーの発現レベルに応じたサブセットに細分化する。各サブセットについて、肺腺癌発症と関連する遺伝子群とのパスウェイ解析を行い、特定のパラクラインシグナル分子(X分子と仮称)を同定する。X分子の発現が濃縮されるサブセットを同定する。

#### (2) 筋線維芽前駆細胞(AMP)の非発症期と発癌後の局在追跡

仮に scRNA-seq 解析で発癌責任間葉サブクラスターの同定に至らない場合を想定し、発癌責任間葉サブクラスターとCAFの起源細胞の候補として考えるAMPを解析する。AMP遺伝系譜追跡(Axin2-TQ)マウスと *Sftpc<sup>CreERT2</sup>;Pten<sup>FL/FL</sup>* マウスの交配を完了している。同マウスの非発症期とのAMPの数をFACSで解析する。

#### (3) 複数の肺腺癌モデルでの発癌責任間葉サブクラスターの普遍性

*Sftpc<sup>CreERT2</sup>* マウスと *RhoA<sup>FL/FL</sup>* マウスをそれぞれ交配し、複数の肺腺癌モデルを作製する。非発症期に肺間葉細胞を単離し、実験1で同定したX分子を発現する細胞集団の有無をFACSで解析する。

#### (4) 未発病期変異AT2での細胞老化、不良ミトコンドリア蓄積の確認

未発病期 AT2 特異的 Pten 欠損マウスから AT2 を単離する。未発病期の細胞老化を SPiDER-βGal、ROS 蓄積を CellROX、不良ミトコンドリア蓄積を TMRM で解析する。

## 研究成果

#### (1) scRNA-seq 解析結果を用いた発癌責任間葉サブクラスターの同定

未発病期の AT2 特異的 Pten 欠損マウスとコントロールマウスからそれぞれ肺間葉細胞を単離し、シングルセル RNA 解析を行った。その結果、AT2 特異的 Pten 欠損マウス由来の肺間葉細胞では、コントロールマウス由来の肺間葉細胞と比較し、突出して増加するサブクラスターが出現することを発見した。デマルチプレックス解析の結果、この新規肺間葉サブクラスターは統計学的有意差をもって AT2 特異的 Pten 欠損マウスで増加することがわかった。

## (2) 筋線維芽前駆細胞(AMP)の非発症期と発癌後の局在追跡

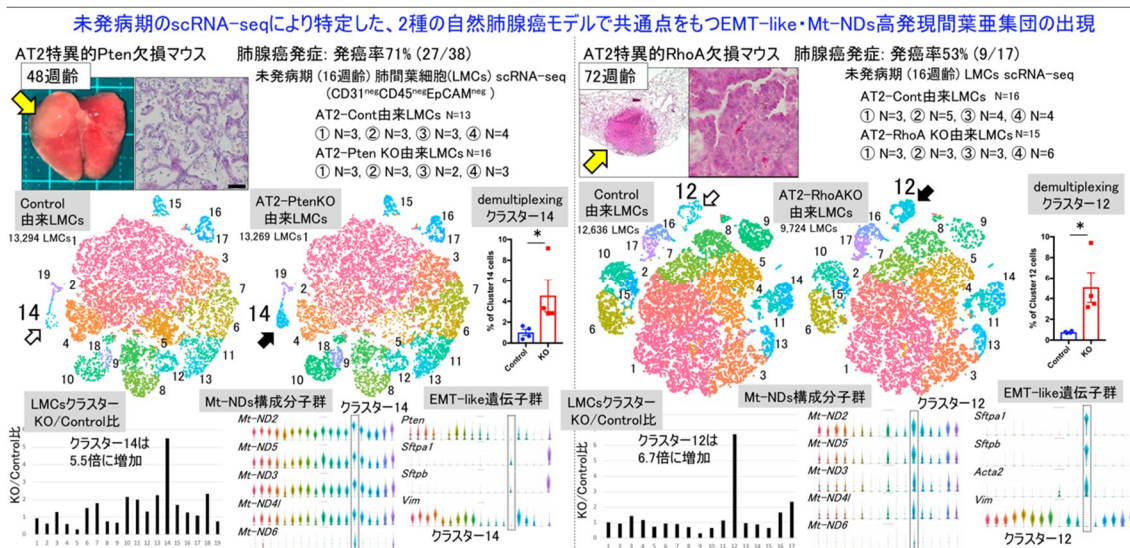
AT2 での Pten 欠損が与える肺泡ニッチ間葉細胞(MANC)と筋線維芽前駆細胞(AMP)数への影響を解析した。Sftpc<sup>CreERT2</sup>;Pten<sup>F1/F1</sup> マウスと、PDGFR<sup>EGFP</sup> マウスと Axin2<sup>mTurquoise2</sup> マウスを交配し、AT2 で Pten 欠損かつ MANC と AMP を lineage tracing するマウスを作成した。FACS 解析の結果、コントロールマウスと AT2-PtenKO マウスでは、MANC 数と AMP 数は同等であった。

## (3) 複数の肺腺癌モデルでの発癌責任間葉サブクラスターの普遍性

AT2 特異的 Pten 欠損マウスとは異なる肺腺癌自然発症モデルとして、AT2 特異的 RhoA 欠損マウスを作製した。このマウスは 50%以上のマウスが 1.5 歳齢で肉眼的な肺腫瘍を形成し、その全てが腺癌であることを組織学的に確認した。

未発病期の AT2 特異的 RhoA 欠損マウス由来の単離肺間葉細胞のシングルセル解析の結果、未発病期の AT2 特異的 RhoA 欠損マウス由来の肺間葉細胞で出現するサブクラスターを発見した。このサブクラスターは、コントロールと比較して突出して、有意差を持って増加していた。このサブクラスターは、Pten 欠損マウスでみられたサブクラスターと同様に、EMT-like プロファイルを呈するサブクラスターであることがわかった。単離肺間葉細胞内に存在するこのサブクラスターは、上皮マーカーである sftpa や sftpb、abca3 を発現しつつ、間葉細胞マーカーである vimentin は発現していなかった。このサブクラスターも、Pten 欠損マウスでみられたサブクラスターと同様に、全遺伝子の中で、MT-NDs の構成分子群を軒並み高発現する population で濃縮されることがわかった。

以上のことから、AT2-PtenKO マウスと AT2-RhoAKO マウスは肺腺癌を自然発症すること、未発病期の AT2-PtenKO マウス由来の肺間葉細胞クラスター、未発病期の AT2-RhoAKO マウス由来の肺間葉細胞クラスターで、それぞれ有意に増加するサブクラスターが出現すること、これらの 2 つのサブクラスターは、Mt-NDs の高発現を特徴とし、EMT-like プロファイルを示す共通の特性を保持していることがわかった。



## (4) 未発病期変異 AT2 での細胞老化、不良ミトコンドリア蓄積の確認

AT2-Pten 欠損が発癌前に肺間葉細胞クラスターを損動するメカニズムについて、16 週齢ならびに 1 歳齢(未発癌)の AT2-PtenKO マウスより AT2 を単離し、老化細胞数を FACS で解析した。その結果、AT2-PtenKO マウスでは未発病期から AT2 での細胞老化が加速し、高齢期でも老化細胞が存続していた。また、高齢期で AT2-肺間葉細胞 cell circuit の不良ミトコンドリアの蓄積と酸素消費率の亢進、ROS 蓄積が生じていた。AT2-Pten 欠損による発癌の性差を検討し、雌の AT2 特異的 Pten 欠損マウスでも雄と同等に肺腺癌を自然発癌することがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Tanida R, Tsubouchi H, Yanagi S, Saito Y, Toshinai K, Miyazaki T, Takamura T, Nakazato M.	4. 巻 589
2. 論文標題 GHS-R1a deficiency mitigates lipopolysaccharide-induced lung injury in mice via the downregulation of macrophage activity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 260-266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.12.044.	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 -

1. 著者名 Setoguchi K, Yanagi S, Gi T, Tsubouchi H, Uto K, Shigekusa T, Matsumoto N, Sato Y, Nakazato M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Transition From Distinct Types of KRAS Mutation-Harboring Multifocal Lung Adenocarcinoma to Rhabdoid Tumor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Case Rep.	6. 最初と最後の頁 e932452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12659/AJCR.932452.	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳重久、坪内拓伸、宮崎泰可
2. 発表標題 2型肺胞上皮細胞内因子による肺間葉細胞の摂動で出現する発癌責任間葉サブクラスター
3. 学会等名 日本肺サーファクタント・界面医学会第58回学術研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀口崇典、柳 重久、坪内拓伸、松尾彩子、重草貴文、松元信弘、中里雅光.
2. 発表標題 2型肺胞上皮でのPten欠損は細胞老化を加速し、ミトコンドリア恒常性とニッチ恒常性を破綻させ、加齢性の肺気腫を誘導する.
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳 重久
2. 発表標題 加齢性呼吸器疾患における内因性幹細胞ニッチ機構
3. 学会等名 公益財団法人アステラス病態代謝研究会 第51回研究報告会
4. 発表年 2021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	坪内 拡伸 (Tsubouchi Hironobu)  (60573988)	宮崎大学・医学部・助教  (17601)	
研究分担者	小田 康晴 (Oda Yasuharu)  (90843235)	宮崎大学・医学部・助教  (17601)	
研究分担者	重草 貴文 (Shigekusa Takafumi)  (90867730)	宮崎大学・医学部・医員  (17601)	

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