

厚生労働科学研究費補助金
(政策科学総合研究事業 (臨床研究等 ICT 基盤構築・人工知能実装研究事業))
分担研究報告書

課題名 : 肺がん患者のシングルセル・マルチオミックス解析

研究分担者名 : 西岡 安彦 徳島大学大学院医歯薬学研究部 呼吸器・膠原病内科学分野

研究要旨

がん細胞とその周囲の間質細胞にはサイトカインや増殖因子のパラクライン作用を介した相互作用が存在し、がんの治療抵抗性やがん転移の頻度等にも関与している。そのため肺がん組織の間質細胞のシングルセル解析データを基に間質細胞のプロファイル解析や遺伝子発現解析を行うことで肺がん治療開発のための有用なデータとなり得る可能性がある。本研究では間質性肺炎合併/非合併肺がん患者の肺がん手術検体から採取した間質細胞に対してscRNA-seqおよびscATAC-seqによりシングルセル解析のデータを回収すると同時に、肺組織のmRNA発現解析や患者の血清サンプルのエクソソーム解析を行うことで、間質性肺炎合併肺がん組織に特異的な間質細胞プロファイルやがんの進行に関わる生体分子を見出し、創薬ターゲット候補を特定するAI開発および、その元となるデータベース作製につなげることを目的とした。外科手術を受けた12症例（間質性肺炎合併例4例、非合併例8例）の肺がん組織を用いてscRNA-seqを行い、正常肺組織、肺がん組織および間質性肺炎組織を比較することで、それぞれに特徴的な線維芽細胞のクラスターパターンを同定した。肺がんおよび間質性肺炎に特徴的な線維芽細胞クラスターの遺伝子発現解析から間質細胞を標的とした創薬ターゲット分子の同定を進めている。

A. 研究目的

創薬ターゲット候補を特定するAI開発につなげることを目的として、間質性肺炎合併/非合併肺がん患者の手術検体より間質細胞のシングルセル解析を行い、これら疾患の臨床的・生物学的データの収集を行う。

シングルセル解析においては過去に特発性肺線維症の肺の解析 (Am J Respir Crit Care Med. 2019;199:1517-36) や肺がん以外のがん間質細胞の解析 (Cancer Discov. 2019;9:1102-23) について報告があり、それぞれで新規細胞クラスターや特異的な遺伝子発現を指摘しており、その疾患の成り立ちや微小環境の解明につながっている。一方で肺がんにおいてはシングルセル解析の報告はまだなされていない。がん細胞とその周囲の間質細胞にはサイトカインや増殖因子のパラクライン作用を介した相互作用が存在し、がんの治療抵抗性やがん転移の頻度等にも関与している。本研究により肺がん組織の間質細胞のシングルセル解析データを基に間質細胞のプロファイル解析や遺伝子発現解析を行うことで肺がん治療開発のための有用なデータとなり得る可能性がある。そのため、本研究では間質性肺炎合併/非合併肺がん患者の肺がん手術検体より間質細胞を収集し、がん組織と非がん組織で比較するためのシングルセル解析のデータを回収して、肺がん組織に特異的な間質細胞プロファイルやがんの進行に関わる生体分子を見出し、創薬ターゲットの探索に発展させることを目標とする。本研究では多様な間質細胞の中でも線維芽細胞に着目し検討を進める。また、同一患者の血清サンプルのエクソソームなどの解析や組織からのRNA抽出も行い、多角的にデータベースを構築していく。

B. 研究方法

当研究では間質性肺炎合併および非合併肺がん患者の肺がん切除検体を用いてシングルセル解析を主に実施し、癌周囲の間質細胞の遺伝子発現を網羅的に検討して間質性肺炎合併肺がんに特徴的な間質細胞プロファイルを明らかにするとともに、癌の進展に影響を与える可能性があり治療標的となり得る生体分子の同定を目指したデータベース構築を行った。具体的には、①肺がん切除検体を用いたシングルセル解析 (scRNA-Seq; single-cell RNA-sequencing, scATAC-Seq; single-cell assay for transposase accessible chromatin with high-throughput-sequencing)、②肺がん切除検体の組織の mRNA 発現解析、③同一症例の血液サンプル解析、④臨床情報収集を下記のように実施した。

- ① シングルセル解析は間質性肺炎合併/非合併肺がん切除検体の肺がん部位、健常肺部位、間質性肺炎部位より、それぞれの間質細胞を Epcam⁺CD45⁻CD31⁻CD235⁻細胞として cell sorter を用いて採取し、10x genomics 社の Chromium Controller を用いて cDNA ライブラリーを作成する。調整した cDNA ライブラ

リーは次世代シーケンサーでシーケンスした後、Cell ranger を用いて Fastq ファイルや遺伝子発現マトリックスを作成し、Seurat もしくは Loupe Browser といった pipeline を用いて細胞クラスタリングや遺伝子発現状況について解析した。

- ② 組織の mRNA 発現解析は、シングルセル解析と同様に肺切除検体の肺がん部位、健常肺部位、間質性肺炎部位より mRNA を抽出し、遺伝子発現を網羅的に解析した。
- ③ 血液サンプルはシングルセル解析の対象となった肺がん患者より採血を行い、エクソソーム解析用に基盤・健康・栄養研究所に送付した。
- ④ 臨床情報収集はシングルセル解析を行った症例について患者背景（年齢、性別、既往歴、常用薬など）、身体所見、検査データ（血液、尿、呼吸機能、生理機能検査など）、胸部画像所見、病理組織所見を収集した。

（倫理面への配慮）

本検討では前例において全例インフォームドコンセントを行い、研究内容を理解しご同意いただいた被験者のみが対象となる。日常診療以上の侵襲を被験者に与えないが、プライバシーの保護に留意し試料および情報は対応表を作成した上で匿名化し、鍵のかかる保管場所に保管される。対応表は徳島大学のみで保管され、データの供与先には提供されない。本検討は人を対象とする医学系研究に関する倫理指針を遵守し徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

12 症例（間質性肺炎合併例 4 例、非合併例 8 例）にて scRNA-seq 解析を実施し、正常肺部分 3 件、間質性肺炎部分 4 件、間質性肺炎合併肺がん部分 4 件、間質性肺炎非合併肺がん部分 5 件の sc RNA-seq のデータが得られ 29472 個の間質細胞のデータが得られた（図 1）。

間質細胞は図 2 の如く A~H の 8 つのクラスターに分けられた（図 2A）。これらの内、クラスター A とクラスター B は正常肺組織で見られ、他のクラスターは肺線維症の部位や肺がんなど病的肺組織に見られた（図 2B）。病的肺組織で見られたクラスター C~F では間質性肺炎で報告されている *Cthrc1* 高発現の Collagen1 産生能の高い間質細胞と類似していた（Nat Commun 2020;11:1920）。間質性肺炎合併肺がんにて特異的な間質細胞クラスターは指摘できず、その間質細胞の分画は線維症と肺がんの間であり、正常組織で見られる間質細胞も多く含むことが特徴であった。一方で同一の間質性肺炎合併肺がん症例で線維症部位と肺がん部位で比較するとクラスター E とクラスター F の割合ががん部位で増加しており、これらのクラスターが特に肺がん組織に特徴的な間質細胞クラスターと考えられた（図 2C）。クラスター E と F では高発現の遺伝子プロファイルが類似しており、これらを統合して高発現遺伝子の GO 解析を行ったところ ECM organization、Vasculature development、Cell adhesion に関わる遺伝子発現レベルが高くがん組織における微小環境調整に関わっている可能性が示唆された（図 2D）。

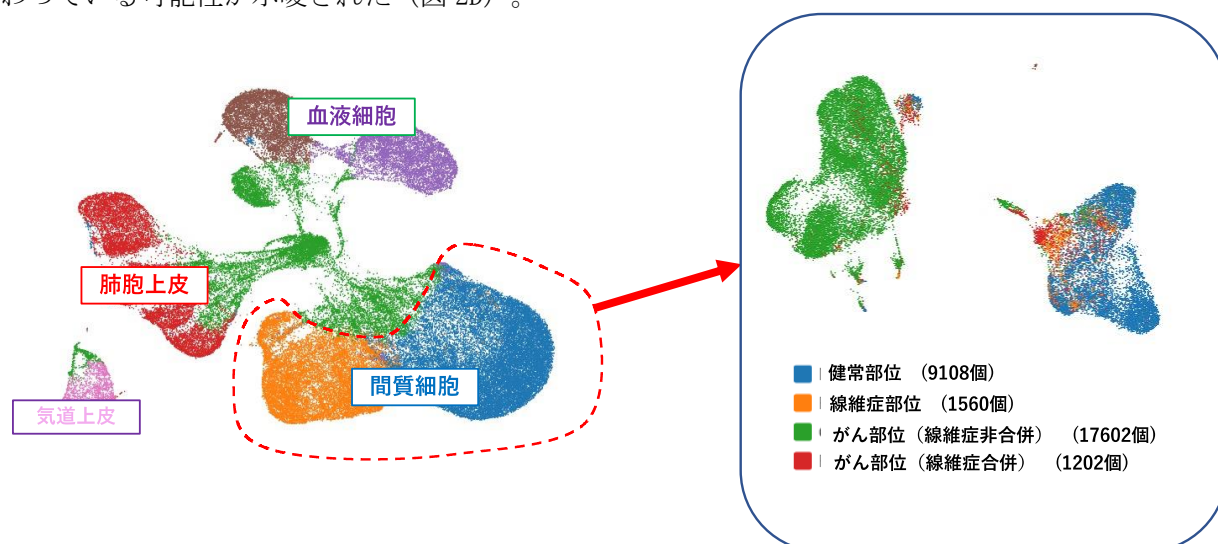


図 1. 肺がん手術検体の間質細胞の sc RNA-seq (UMAP)

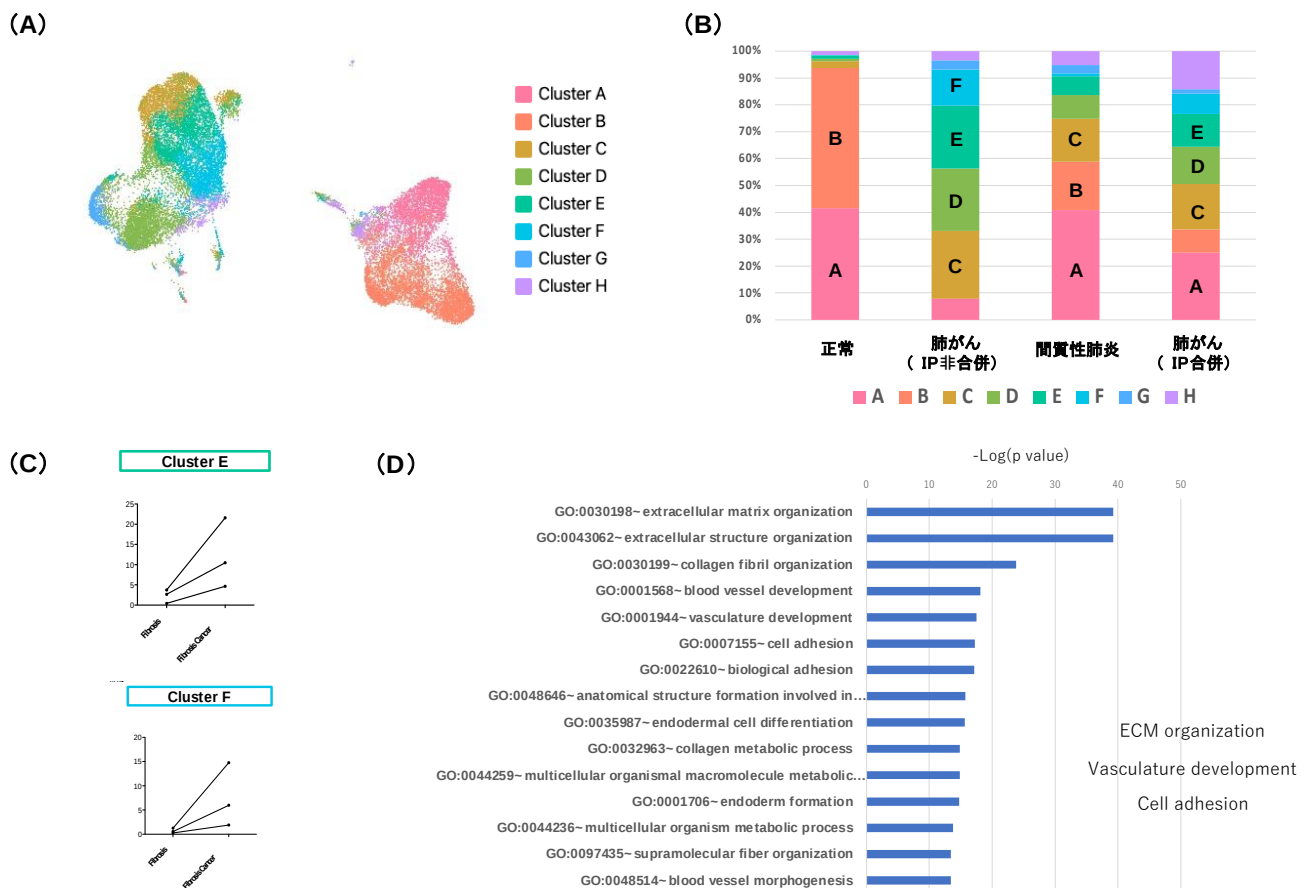


図2. 間質細胞のクラスタリング

(A) 肺がん手術検体より得られた sc-RNA seq データから抽出された間質細胞のクラスタリング (UMAP)。(B) 各採取組織における間質細胞のクラスターの割合。(C) 同一症例における間質性肺炎合併肺がんの線維症部位とがん部位での ClusterE、F の割合の比較。(Fibrosis：線維症部位、Fibrosis Cancer：間質性肺炎合併肺がんの肺がん部位) (D) Cluster E、F の GO 解析データ。

これら scRNA-seq の解析データより間質性肺炎合併肺がんの間質細胞では①特異的なクラスターは見られず、②その分画は線維症と肺がんの中間であり、肺がん組織であるものの正常組織もしくは線維症肺でみられる線維芽細胞ががん生存・増殖の微小環境調整に作用している可能性が考えられた。また、肺線維症で指摘された *Cthrc1* 陽性線維芽細胞は肺がんでも見られ疾患肺に普遍的に見られる線維芽細胞クラスターであること、中でも今回指摘されたクラスターE、F はがんに比較的特徴的に見られる細胞集団でありその ECM 産生や血管増生などの機能から治療標的となりうることを示唆された。

これら収集された scRNA-seq のデータ及び 8 症例（間質性肺炎非合併例 5 例（正常部位 5 件、肺がん部位 5 件）、間質性肺炎合併例 3 例（正常部位が 1 件、間質性肺炎部位が 4 件、肺がん部位が 3 件））での組織 bulk の mRNA 発現解析より創薬ターゲット候補を特定するデータベース作製につなげる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mitsunashi A, Kondoh K, Horikawa K, Koyama K, Nguyen N, Afroj T, Yoneda H, Otsuka K, Ogino H, Nokihara H, Shinohara T, Nishioka Y. PD-1/PD-L1 blockade mediates anti-angiogenic effects by tumor-derived CXCL10/11 as a potential predictive biomarker. *Cancer Sci* 12(12):4853-4866, 2021.
- 2) Sato S, Chong SG, Upagupta C, Yanagihara T, Saito T, Shimbori C, Belleys PS, Nishioka Y, Kolb M. Fibrotic extracellular matrix induces release of extracellular vesicles with profibrotic miRNA from fibrocytes. *Thorax* 76(9):895-906, 2021.
- 3) Afroj T, Mitsunashi A, Ogino H, Saijo A, Otsuka K, Yoneda H, Tobiume M, Nguyen TN, Goto H, Koyama K, Sugimoto M, Kondoh O, Nokihara H, Nishioka Y. Blockade of PD-1/PD-L1 pathway enhances the antigen-presenting capacity of fibrocytes. *J Immunol* 206(6):1204-1214, 2021.

4)Kawano H, Koyama K, Nishimura H, Toyoda Y, Kagawa K, Sato S, Naito N, Goto H, Inagaki Y, Nishioka Y. Development of improved method to identify and analyze lung fibrocytes with flow cytometry in a reporter mouse strain. Immun Inflamm Dis 9(1):120-127, 2021.

2. 学会発表
該当なし

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし