

シングルセル RNA シークエンスデータを用いたヒト腎細胞癌の 腫瘍微小環境下における補体関連遺伝子の発現解析

今井 優樹

名古屋市立大学大学院医学系研究科免疫学分野

Single-cell transcriptomics of complement components provide new insights into complement regulation in the tumor microenvironment of renal cell carcinoma.

Masaki Imai

Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

[抄録]

補体系は、自然免疫を担う血液中タンパク質及びその断片であり、感染免疫のみならず、がん免疫にも寄与していることが明らかになってきた。一方、がん組織は、がん細胞、間質細胞及び免疫細胞が相互に影響しあうことにより腫瘍微小環境が構築され、がん細胞に対する多様な免疫抑制が働く。この腫瘍微小環境下において C3 や C5 が腫瘍増殖や免疫抑制に寄与することはマウスモデルで報告されているが、ヒトでは未だ明らかにされていない。また、がん組織に浸潤した免疫細胞が産生する補体系の寄与もまだよくわかっていない。そこで、本論文ではヒト腎細胞癌と末梢血リンパ球のシングルセル RNA シークエンスのデータを用いて、腫瘍浸潤免疫細胞が特徴的に産生する補体関連遺伝子を明らかにしたので報告する。

[Abstract]

The complement system is responsible for innate immunity, and contributes to immunity against not only infections, but also cancers. The tumor microenvironment (TME), including the interactions of malignant cells with stromal cells and immune cells, is highly influential on tumor growth, thus impacting clinical outcomes. C3 and C5 are well documented as influencing tumor growth and immunosuppression in the TME in mouse models, but the contributions of complement components in human cancers are poorly understood in most cases. This study reports on the complement-related genes characteristically produced by tumor-infiltrating immune cells using data from single-cell RNA sequences of human renal cell carcinoma and peripheral blood lymphocytes.

[キーワード] 補体、シングルセル RNA シークエンス、腫瘍微小環境

[背 景]

免疫機構で、血清中の 30 種類以上のタンパク質とその断片で構成され、補体活性化より、オプソニン
補体は、自然免疫における最前線の防御網を担う

化や MAC (membrane attack complex) 形成により病原体を排除する^{1,2)}。また、補体系は、感染病原体の排除のみならず、組織の恒常性や自然免疫から獲得免疫への架け橋としても重要な役割を果たしている³⁾。病原体を排除する生体防御に寄与している補体系は、がん免疫応答にも関与している。がん組織における C3、C4 及び C5b-9 の沈着⁴⁻⁸⁾が検出されることから、補体がん細胞を認識し、排除することが示唆される。これに対し、がん細胞は補体制御膜因子の過剰発現により免疫監視機構からエスケープすると考えられている⁹⁾。一方、近年、補体活性化は炎症反応の重要な要素であり、補体関与する炎症が腫瘍形成とがんの進行のさまざまな段階に関与してがん促進に働く報告が相次いでいる¹⁰⁻¹²⁾。

がん細胞は無秩序に増殖する細胞だけではなく、周囲の微小環境と絶えず相互作用し¹³⁾、突然変異の蓄積により変化する悪性の細胞である¹⁴⁾。がん細胞が発生した微小環境はがんの成長のために重要な要素であり、がん細胞の増殖を促進する環境条件は腫瘍微小環境 (TME) と呼ばれ、がんの成長をサポートする。TME の主成分は、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、炎症性およびマトリックスリモデリング酵素を分泌して修飾された腫瘍間質を構築する線維芽細胞、血管細胞や免疫細胞などの非腫瘍細胞である¹⁵⁾。近年、腫瘍微小環境内における補体活性化が、がんの成長や制御性免疫細胞の誘導に関わっており、補体の多様なメカニズムが明らかにされている¹⁶⁾。しかしながら、多くがマウスの研究であり、ヒトにおける知見は末梢血サンプルの解析や免疫組織染色を用いたものととどまっている。そこで本研究ではこれまでに報告されているシングルセル RNA シークエンス (scRNA-seq) のデータを用い

てヒト腫瘍浸潤免疫細胞での補体系の遺伝子発現を解析し、腫瘍微小環境下での補体活性化及び制御メカニズムの解明を試みた。

[方法]

ヒト腎細胞癌の公開データセット取得

ヒト腎細胞癌浸潤細胞及び末梢血細胞のデータは米国国立バイオテクノロジー情報センターが管理する Gene Expression Omnibus (GEO) から取得したデータセットを用いた (GSE139555 : 表 1)¹⁷⁾。

scRNA-seq データの処理と視覚化

ダウンロードされた遺伝子発現マトリックスは、R 上で稼働する Seurat 4.0.1¹⁸⁾ ワークフロー (バージョン 4.0.4) を使用して Seurat オブジェクトに変換した。発現遺伝子が 200 未満または 2500 を超え、ミトコンドリアゲノム転写産物が 5% を超える細胞は解析に適していない細胞として除去した。次いで、デフォルトのパラメーターで NormalizeData を使用して、遺伝子発現行列の正規化を行った。統合、細胞のクラスタリング、および次元削減は、Seurat の標準な方法を用いて行った¹⁹⁾。各クラスターは、*CD3E*、*CD4*、*CD8* (T 細胞)、*FOXP3* (Treg)、*GZMB*、*GNLY*、*NKG7* (細胞傷害性 T、NK 細胞)、*MS4A1*、*CD19* (B 細胞)、*XBPI* (プラズマ細胞)、*FCN1*、*S100A9* (CD14+ 単球)、*FCGR3A*、*LST1*、*LILRB2* (CD16+ 単球)、*CLEC9A*、*FLT3* (コンベンショナル樹状細胞 : cDC1)、*CD1C*、*FCER1A* (コンベンショナル樹状細胞 : cDC2)、*GZMB*、*LILRA4*、*SERPINF1* (プラズマサイトイド樹状細胞 : pDC)、*SEPP1*、*C1QC* (マクロファージ) などの細胞特異的マーカーで細胞腫を決定した。

表 1. 今回使用したヒト腎細胞癌と PBMC のデータ情報

Patient	Selection	Age	Sex	Race	Pathology	TNM stage	scRNA-seq cell number	
							Blood	Tumor
Renal1	CD45+	65	M	White	Renal cell carcinoma, clear cell	T3a N0 MX	4800	7356
Renal2	CD45+	45	F	White	Renal cell carcinoma, clear cell	T1a N0 MX	8552	5025
Renal3	CD45+	62	M	White	Renal cell carcinoma, clear cell	T1a N0 MX	3941	6587

〔結果〕

細胞腫の同定と細胞分布の比較

末梢血とがん組織に浸潤した細胞の組成変化を調

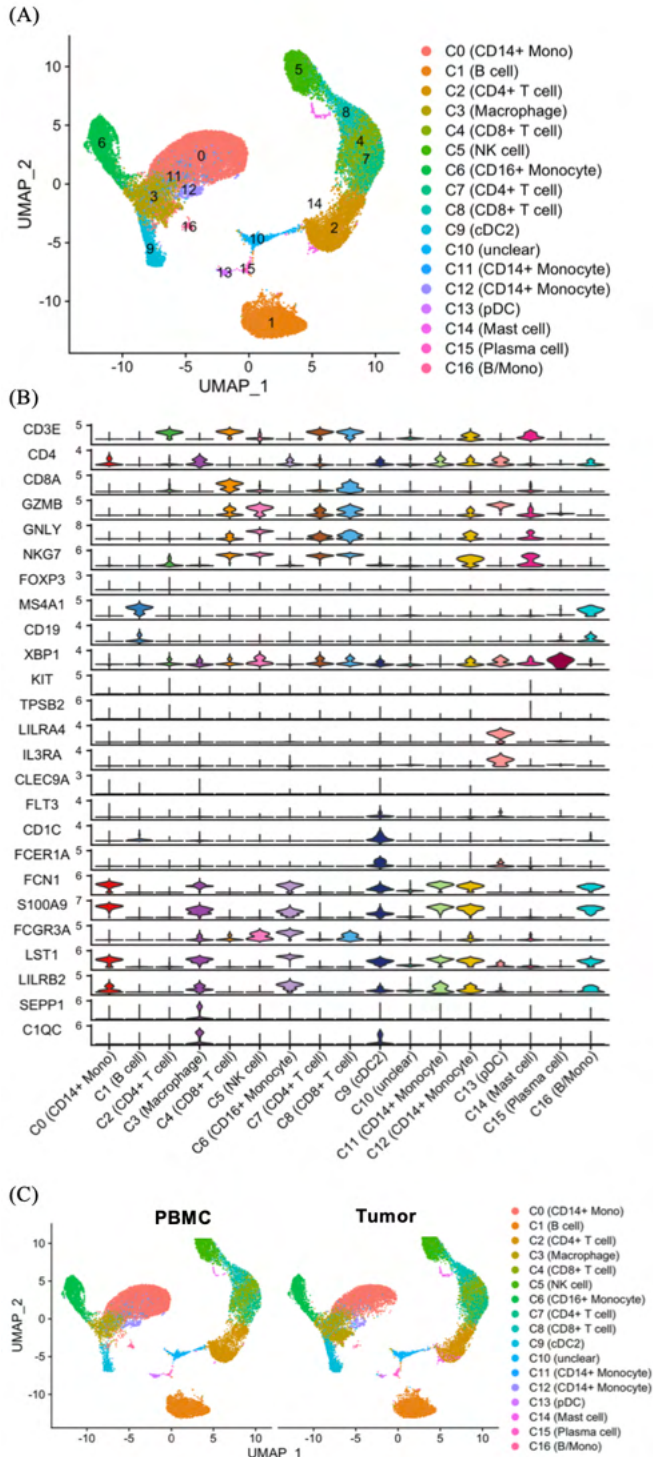


図 1. ヒト腎細胞癌と PBMC のトランスクリプトーム解析。
(A) UMAP プロット、(B) 細胞特異的マーカーのバイオリン
プロット、(C) PBMC と腫瘍浸潤細胞の UMAP プロットの比較

べるため、CD45+細胞をソートした末梢血単核細胞 (PBMC) 及び腎細胞癌浸潤血球細胞の scRNA-seq データ (表 1) を統合し、Seurat で解析を行った。方法で示した標準的な細胞マーカーを用いて細胞腫の同定を試みたところ、T、B、NK 細胞、マクロファージや樹状細胞等を含む 17 の細胞クラスターが検出された (図 1 A 及び B)。クラスター C10 はマーカー遺伝子が検出されず、細胞種が確定できなかったため unclear クラスターとし、クラスター C16 は B 細胞と単球のマーカーが混在したため B 細胞と単球混在クラスターとした (図 1 A 及び B)。PBMC と腫瘍浸潤血球細胞の細胞分布を比較したところ、ほぼ同じ細胞分布であった (図 1 C)。

初期活性化経路関連遺伝子の発現比較

まず、古典経路 (CP)、第 2 経路 (AP) 及びレクチン経路 (LP) の 3 つの補体初期活性化経路に関連する遺伝子発現を比較した。古典経路関連遺伝子は腫瘍浸潤マクロファージ、cDC2 および C16 クラスターで *C1QA*、*C1QB*、*C1QC* が高発現し、PBMC ではほとんど発現していなかった (図 2A)。他の遺伝子は血球細胞では発現が低かった。次いで第 2 経路では、*C3* の発現は古典経路の *C1Q* 遺伝子と同様に腫瘍浸潤マクロファージ、cDC2 および C16 クラスターで高かった。対照的に、*CFP* の発現は PBMC 中のマクロファージ、cDC2 および C16 クラスターで発現が高かった。また、C0、C11 及び C12 の CD14+ 単球でも PBMC の方で発現が高かった。*CFD* はミエロイド系の細胞で発現が認められたが、PBMC と腫瘍浸潤免疫細胞との間で発現の差は認められなかった (図 2B)。最後にレクチン経路では、*FCN1* の発現が PBMC 中のマクロファージや cDC2 で発現が高く、*CFP* と同様の発現パターンであった。その他のレクチン経路関連遺伝子はどの細胞腫でも発現は低く、*MBL2*、*FCN3* は遺伝子が全く検出されなかった (図 2C)。

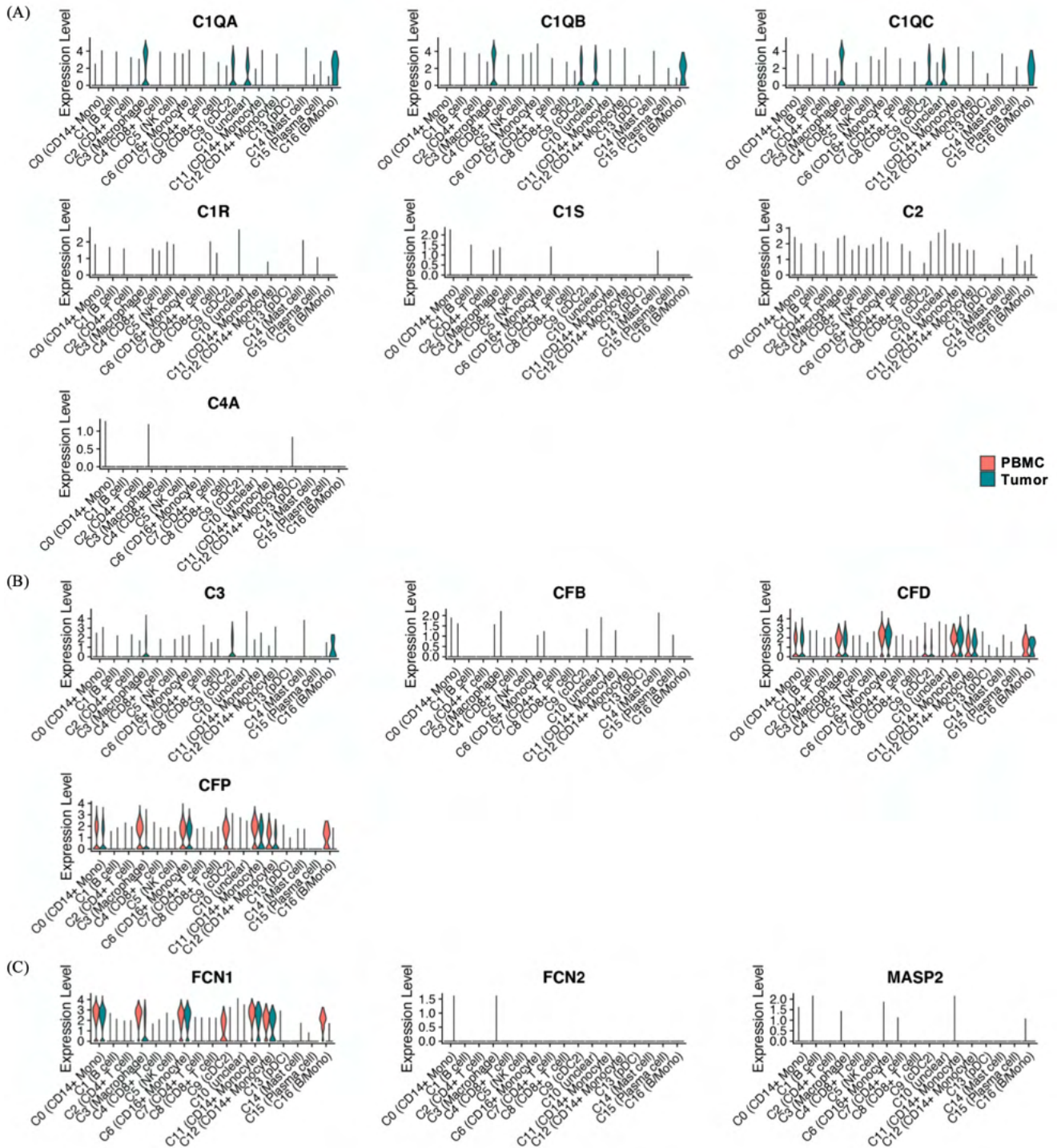


図 2. (A) 古典経路、(B) 第二経路および(C) レクチン経路に関連する遺伝子の各細胞クラスターにおける発現比較。左側（ピンク）が PBMC、右側（緑）が腫瘍浸潤細胞の遺伝子発現を示している。

後期経路関連遺伝子の発現比較

後期経路は MAC 形成や C5a 産生に重要な遺伝子群であるが、PBMC と腫瘍浸潤免疫細胞共に *C5*、*C7*、*C8G*、*C9* は非常に低発現で、*C6*、*C8A*、*C8B* は全

く検出されなかった（図 3）。

補体制御関連遺伝子の発現比較

補体制御関連遺伝子はしばしばがん細胞で高発現す

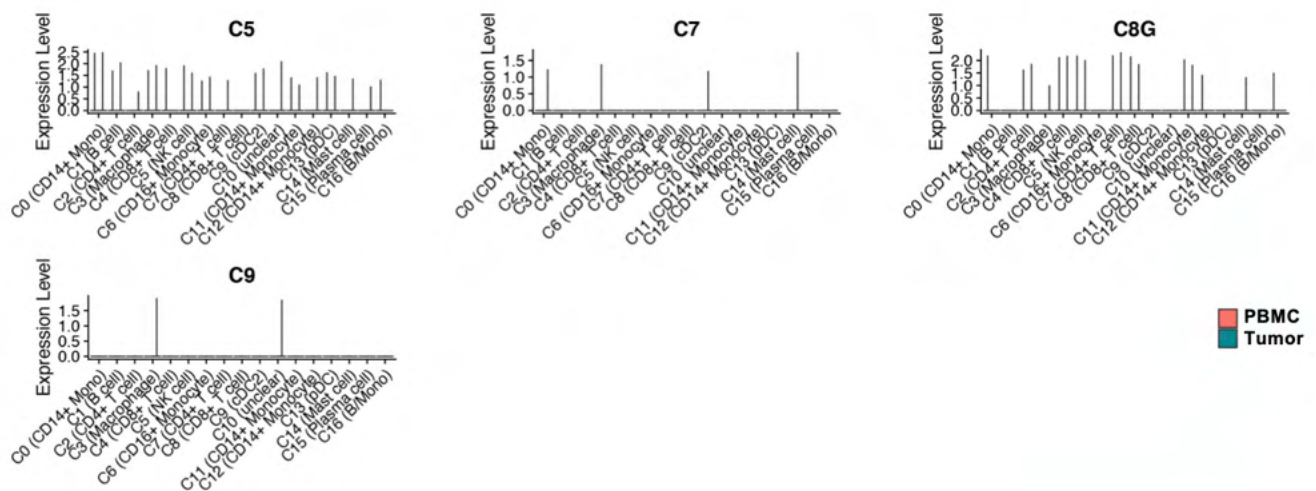


図 3. 後期経路に関連する遺伝子の各細胞クラスターにおける発現比較。

る⁹⁾。しかし、PBMCと腫瘍浸潤免疫細胞での発現の違いを報告した例はほとんどない。今回のデータ解析で、その発現の違いを検討したところ、腫瘍組織に浸潤した単球やcDC2等といったミエロイド系の細胞やB細胞において*CD55*が高発現していた(図4A)。*CD46*および*CD59*の発現は限定的で、*CD46*はマクロファージ、*CD59*は腫瘍浸潤細胞の

マスト細胞で高い傾向が見られたが、他のクラスターではPBMCと腫瘍浸潤免疫細胞との間で大きな差は認められなかった。

一方、*CFI*、*CFH*、*C4BPB*、*SERPING1*といった液性補体制御因子は、PBMCと腫瘍浸潤免疫細胞共に低発現であった(図4B)。

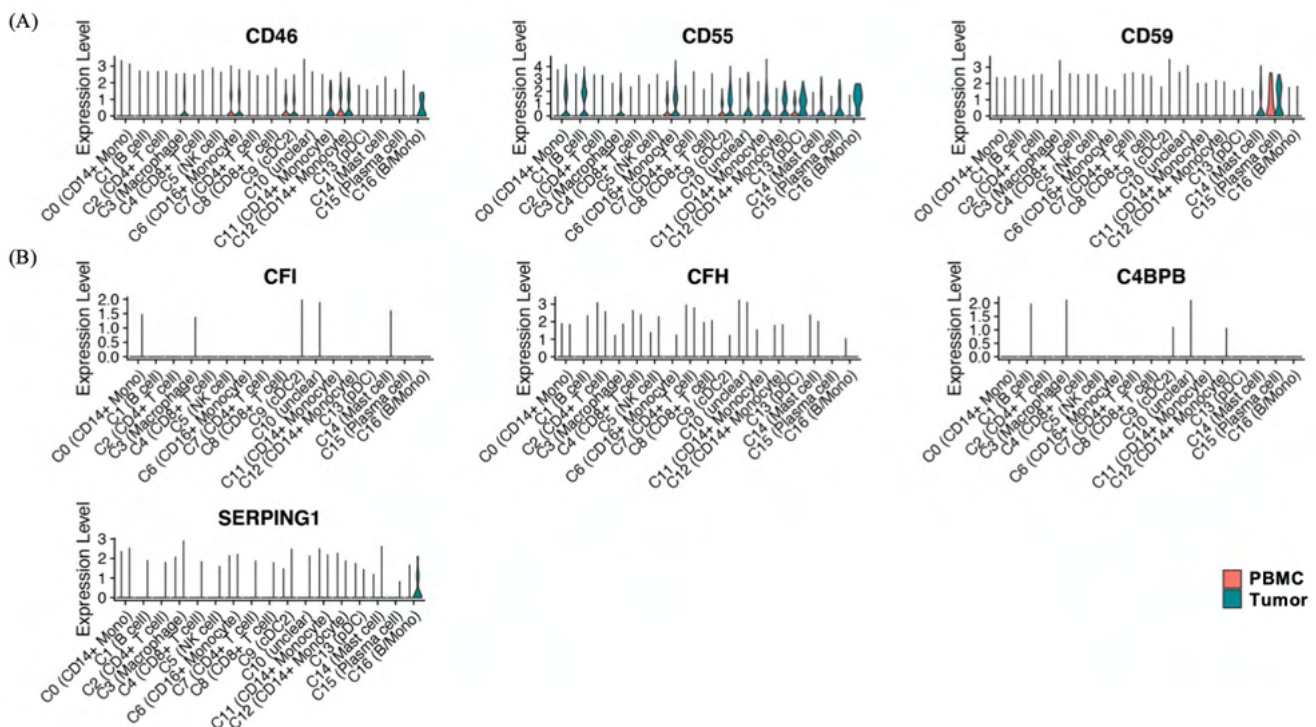


図 4. (A)膜型補体制御因子および(B)液性補体制御因子に関連する遺伝子の各細胞クラスターにおける発現比較。

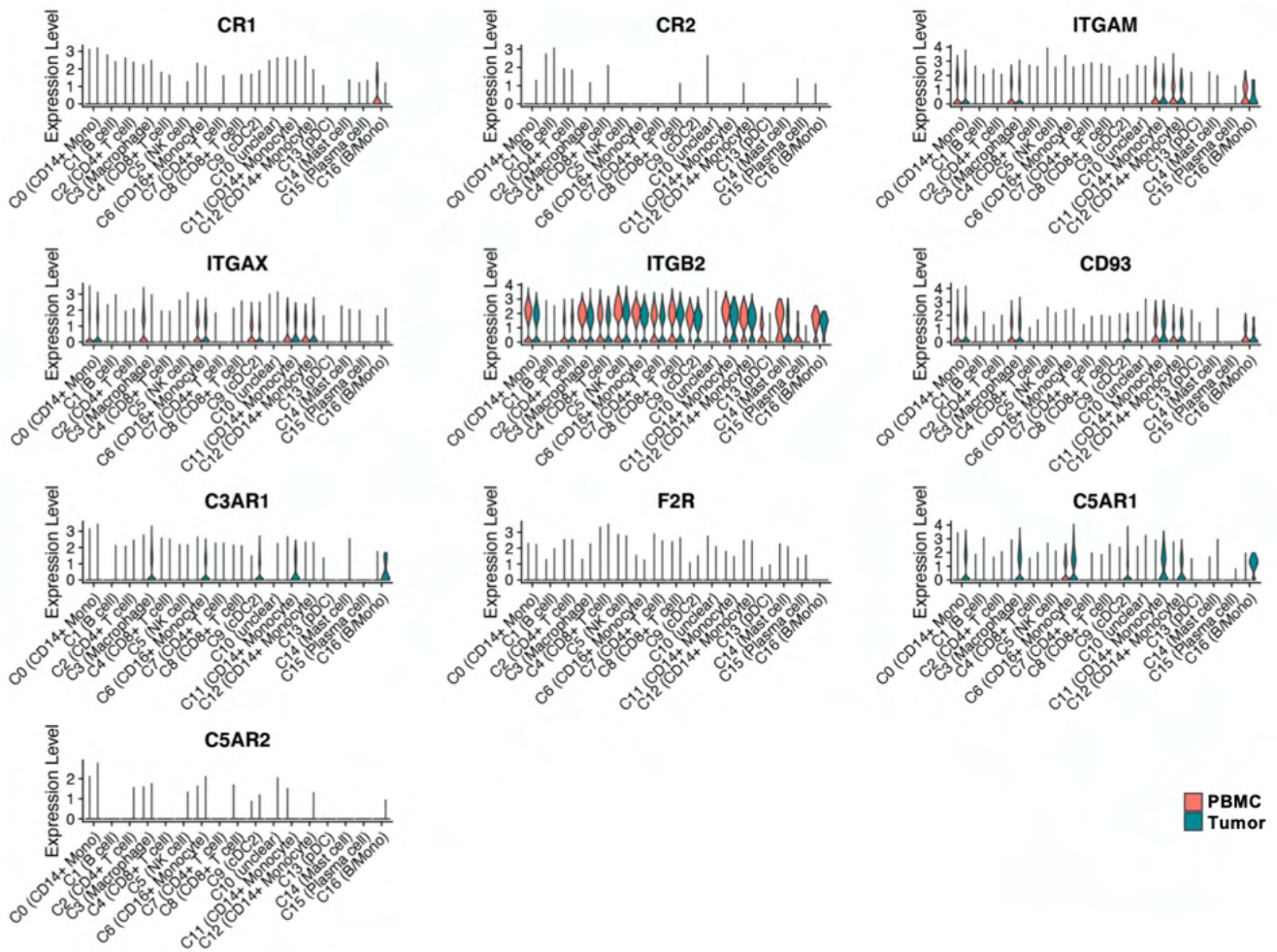


図 5. 補体レセプターに関連する遺伝子の各細胞クラスターにおける発現比較。

補体レセプター関連遺伝子の発現比較

C4b や C3b とその分解産物のレセプターである CR1~CR4 関連遺伝子の発現は、*ITGB2*(CD18)がミエロイド系の細胞と T、NK 細胞で、*ITGAM*(CD11b)、*ITGAX*(CD11c)はミエロイド系細胞で発現していたが、マクロファージにおいて *ITGAX* が若干 PBMC で発現が強い程度のみで、PBMC と腫瘍浸潤免疫細胞との間で大きな差は認められなかった(図 5)。C1q のレセプターである *CD93*の発現は単球やマクロファージに発現が認められたが、PBMC と腫瘍浸潤免疫細胞との間で差は認められなかった(図 5)。アナフィラトキシンレセプターでは、腫瘍組織に浸潤したミエロイド系の細胞 (C0、C3、C6、C9、C11、C12 および C16) において *C5AR1*が高発現してい

た。発現は低い、*C3AR1*も同様の傾向が認められた(図 5)。腫瘍微小環境におけるこれら 2 つのレセプターの発現上昇は腫瘍の慢性炎症状態を保つためにこれらのレセプターを発現している単球や樹状細胞が呼び寄せられている可能性が示唆された。

[考察]

腫瘍免疫応答は抗腫瘍免疫と免疫抑制のバランスにより排除か成長かが決定されると考えられ、この考え方はがん免疫編集 (Cancer Immunoediting) と呼ばれ、現在のがん免疫の主流となっている²⁰⁾。免疫系によって認識されて排除される状態 (排除相)、次第に免疫系によって排除されにくいがん細胞が発生し、増殖しないが排除もできない状態 (平衡相)、

さらにがん細胞は、免疫系の攻撃を抑制する分子を取り込むことにより、免疫監視をくぐり抜けて増殖する状態（逃避相）となり、臨床的に診断される「がん」になる。このように腫瘍微小環境では、がん細胞に対する免疫系の攻撃は、さまざまなメカニズムによって抑制された状態となっていく。自然免疫を担う補体系も活性化によるがん細胞を排除する報告^{4,8)}と逃避する報告があることから、がん免疫編集に寄与していると考えられる¹⁰⁻¹²⁾。本研究は血清中の補体ではなく、腫瘍微小環境における免疫応答変化への補体系の寄与を検討するために、オープンソースである scRNA-seq のデータを用いて腫瘍に浸潤した免疫細胞の補体関連遺伝子発現変化を解析した。腫瘍微小環境下では、それぞれの細胞種毎に異なる変化が観察されるが、補体遺伝子も細胞毎に発現変動を示し、腫瘍微小環境下での補体系の関与が示唆された。

補体活性化関連遺伝子は腫瘍浸潤マクロファージ及び cDC2 で *C1QA*、*C1QB*、*C1QC* が高発現していた。*C1q* はがん細胞への沈着が多く報告されていることから^{5,11)}、腫瘍に浸潤したマクロファージなどの細胞が産生する *C1q* が腫瘍局所での補体活性化に寄与している可能もある。また、*C1q* は、オートクリンまたはパラクリンによるシグナル伝達によって、アポトーシス細胞の排除やサイトカイン産生を誘導する^{21,22)}。腫瘍浸潤マクロファージ及び cDC2 は、*C1q* レセプターである *CD93* も発現していたことから、腫瘍微小環境ではオートクリンでアポトーシスしたがん細胞を排除している可能性も示唆された。一方、第 2 経路やレクチン経路はマウスレベルの解析では腫瘍への沈着やがんの成長促進に関与していない¹¹⁾。今回の解析においても、PBMC では *CFP* や *FCN1* の発現が高いミエロイド系のクラスターが検出されたが、腫瘍微小環境下では発現が低く補体活性化への寄与の可能性は低いことが示唆された。

補体制御因子は、がん細胞が補体依存性の細胞傷

害反応から逃れるべく、高発現している^{9,23)}。そのため、制御因子の高発現と治療抵抗性や予後不良と関連も数多く報告される^{24,25)}。今回の解析結果では、腫瘍に浸潤したミエロイド系のクラスターや B 細胞において *CD55* が高発現していたことから、補体系が活性化している腫瘍微小環境下^{4,8)}では、がん細胞だけでなく免疫系細胞も *CD55* の発現によって補体を制御している可能性が示唆された。

補体関連レセプターは貪食や抗体関連などに関わる、CR1~CR4 関連遺伝子については PBMC と腫瘍浸潤免疫細胞との間に差は見られなかった。しかしながら、*C5AR1* の発現は腫瘍浸潤ミエロイド細胞で高発現していた。これは、近年報告されている *C5aR* を発現している骨髄由来抑制細胞 (MDSC) が腫瘍局所に集積し、がん免疫の抑制に寄与していることと合致する。その細胞クラスターに MDSC が含まれるかは本研究の解析解像度では明らかにできなかったが、ほとんどのミエロイド系の細胞で *C5AR1* の発現が高かったのは興味深い。がん細胞自身が *C5* を産生し、*C5a*-*C5aR* シグナルを介してオートクリンで増殖させる報告²⁶⁾があることから、腫瘍微小環境は *C5aR* を発現しているミエロイド系の細胞が集積しやすい環境にあるのかもしれない。一方、Wang らはマウスモデルでメラノーマ及び乳がん浸潤 CD8+T 細胞に発現する *C3aR* 及び *C5aR* が CD8+T 細胞の抗腫瘍免疫を抑制することを報告している²⁷⁾。しかしながら、今回のデータ解析からは、CD8+T 細胞は *C3aR* および *C5aR* を発現していなかった。この理由は、マウスとヒトの種の違いか、癌腫による違いかははっきりしないが、今後議論の余地があると思われる。

以上のように補体系の反応は産生されたタンパクが分解し、様々な活性を得ることから遺伝子発現のみではすべての事象を捉えることは難しいが、scRNA-seq のデータを用いた解析は、限られたヒト臨床サンプルデータを解析することで新たな発見が可能なツールであり、今回の結果のように補体系の

解析においても非常に有用なツールであった。また、今回の解析結果は、ヒトの腫瘍微小環境でも補体系が動いていることを示しており、補体を標的とした治療法の標的分子を見出すのに役立つ可能性もあると考える。

[結論]

scRNA シークエンスのデータを用いてヒト腎細胞癌における腫瘍浸潤免疫細胞が特徴的に産生する補体関連遺伝子を明らかにした。

[謝辞]

本研究は、文部科学省科学研究補助金(20K09911)により行われた。

[利益相反]

著者は本論文内容に関連した開示すべき COI 関係にある企業等はない。

[文献]

- 1) Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(10):729-40.
- 2) Sjöberg AP, Trouw LA, Blom AM. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol.* 2009;30(2):83-90.
- 3) Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity.* 2012;37(2):199-207.
- 4) Lin K, He S, He L, Chen J, Cheng X, Zhang G, et al. Complement component 3 is a prognostic factor of nonsmall cell lung cancer. *Mol Med Rep.* 2014;10(2):811-7.
- 5) Bouwens TA, Trouw LA, Veerhuis R, Dirven CM, Lamfers ML, Al-Khawaja H. Complement activation in Glioblastoma multiforme pathophysiology: evidence from serum levels and presence of complement activation products in tumor tissue. *J Neuroimmunol.* 2015;278:271-6.
- 6) Ajona D, Pajares MJ, Chiara MD, Rodrigo JP, Jantus-Lewintre E, Camps C, et al. Complement activation product C4d in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2015;21(7):899-904.
- 7) Chen J, Yang WJ, Sun HJ, Yang X, Wu YZ. C5b-9 Staining Correlates With Clinical and Tumor Stage in Gastric Adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(7):470-5.
- 8) Niculescu F, Rus HG, Retegan M, Vlaicu R. Persistent complement activation on tumor cells in breast cancer. *Am J Pathol.* 1992;140(5):1039-43.
- 9) Yu J, Caragine T, Chen S, Morgan BP, Frey AB, Tomlinson S. Protection of human breast cancer cells from complement-mediated lysis by expression of heterologous CD59. *Clin Exp Immunol.* 1999;115(1):13-8.
- 10) Habermann JK, Roblick UJ, Luke BT, Prieto DA, Finlay WJ, Podust VN, et al. Increased serum levels of complement C3a anaphylatoxin indicate the presence of colorectal tumors. *Gastroenterology.* 2006;131(4):1020-9; quiz 284.
- 11) Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, et al. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol.* 2008;9(11):1225-35.
- 12) Corrales L, Ajona D, Rafail S, Lasarte JJ, Riezu-Boj JI, Lambris JD, et al. Anaphylatoxin C5a creates a favorable

- microenvironment for lung cancer progression. *J Immunol.* 2012;189(9):4674-83.
- 13) Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* 2015;368(1):7-13.
 - 14) Bozic I, Antal T, Ohtsuki H, Carter H, Kim D, Chen S, et al. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(43):18545-50.
 - 15) Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012;21(3):309-22.
 - 16) Roumenina LT, Daugan MV, Petitprez F, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Context-dependent roles of complement in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(12):698-715.
 - 17) Wu TD, Madireddi S, de Almeida PE, Banchereau R, Chen YJ, Chitre AS, et al. Peripheral T cell expansion predicts tumour infiltration and clinical response. *Nature.* 2020;579(7798):274-8.
 - 18) Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM, 3rd, Zheng S, Butler A, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell.* 2021;184(13):3573-87 e29.
 - 19) https://satijalab.org/seurat/articles/pbmc3k_tutorial.html.
 - 20) Ward JP, Gubin MM, Schreiber RD. The Role of Neoantigens in Naturally Occurring and Therapeutically Induced Immune Responses to Cancer. *Adv Immunol.* 2016;130:25-74.
 - 21) Fraser DA, Laust AK, Nelson EL, Tenner AJ. C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *J Immunol.* 2009;183(10):6175-85.
 - 22) Ghebrehiwet B, Hosszu KH, Peerschke EI. C1q as an autocrine and paracrine regulator of cellular functions. *Mol Immunol.* 2017;84:26-33.
 - 23) Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S, Kirschfink M. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol.* 2003;40(2-4):109-23.
 - 24) Terui Y, Sakurai T, Mishima Y, Mishima Y, Sugimura N, Sasaoka C, et al. Blockade of bulky lymphoma-associated CD55 expression by RNA interference overcomes resistance to complement-dependent cytotoxicity with rituximab. *Cancer Sci.* 2006;97(1):72-9.
 - 25) Liu M, Yang YJ, Zheng H, Zhong XR, Wang Y, Wang Z, et al. Membrane-bound complement regulatory proteins are prognostic factors of operable breast cancer treated with adjuvant trastuzumab: a retrospective study. *Oncol Rep.* 2014;32(6):2619-27.
 - 26) Cho MS, Vasquez HG, Rupaimoole R, Pradeep S, Wu S, Zand B, et al. Autocrine effects of tumor-derived complement. *Cell Rep.* 2014;6(6):1085-95.
 - 27) Wang Y, Sun SN, Liu Q, Yu YY, Guo J, Wang K, et al. Autocrine Complement Inhibits IL10-Dependent T-cell-Mediated Antitumor Immunity to Promote Tumor Progression. *Cancer Discov.* 2016;6(9):1022-35.