

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10574

研究課題名(和文) 進行性腎細胞癌患者の予後因子および治療標的となるMDSCs特異的マーカーの探索

研究課題名(英文) Investigation of MDSC-specific marker as prognostic factor and therapeutic target of patients with advanced renal cell carcinoma

研究代表者

加藤 智幸 (Kato, Tomoyuki)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：40396560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：転移性腎細胞癌(mRCC)患者末梢血中の骨髄由来抑制細胞(MDSC)の解析パターンについて検討し、予後予測に有用な因子を検討した。mRCC患者の末梢血好中球および単球の骨髄系細胞抗原をフローサイトメトリーで測定した。また、多形核白血球(PMN)における包括的RNA発現を分析した。その結果、好中球または単球細胞上のCD16、GPI-80、およびLAP-1のMFI(蛍光強度の平均)またはCV(係数変動)が増加しており、骨髄系細胞集団の多様性が増加していた。また、mRNA発現は腎癌患者において健常人との相違を認めた。単球細胞上のGPI-80のMFIは予後予測因子として有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The patterns of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in peripheral blood of patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC) were studied and useful prognostic factors were examined. Myeloid cell antigens on peripheral blood neutrophilic cells and monocytic cells in mRCC patients were measured by flow cytometry. A comprehensive RNA expression in polymorphonuclear leukocytes (PMN) was also analyzed. As a result, the MFI (average fluorescence intensity) or CV (coefficient variation) of CD16, GPI-80, and LAP-1 on neutrophilic cells or monocytic cells were increased. It was indicated that the diversity of the myeloid cell population is increased. In addition, mRNA expression of PMNs was different between healthy volunteers and mRCC patients. MFI of GPI-80 on monocytic cells was associated with the clinical outcome and considered to be a useful prognostic marker of mRCC.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 MDSC GPI-80

1. 研究開始当初の背景

好中球は生体内に最も多く存在する免疫細胞であり、生体防御の最前線で働く食細胞である。最近、好中球が癌の進展、転移に関連するという報告が増えている。好中球が放出する活性酸素が発癌につながる遺伝子変異を引き起こすこと (*Mutagenesis* 2010 25: 149-154)、サイトカインにより活性化された好中球が **vascular endothelial growth factor (VEGF)** を分泌し血管新生を促進すること (*Fertil. Steril.* 2000 74: 107-112)、好中球のインテグリンが転移を促進すること (*Cancer Res.* 2010 70:6071-6082) などが報告されている。さらに、好中球が腫瘍血管新生に働くことも明らかになってきた (*Int J Exp Pathol.* 2009; 90:222-231、*Cancer Res.* 2011 71: 2411-6)。これらの報告により、腎細胞癌組織内の微小環境の中においては、好中球が、癌の増殖、進展、転移に関与している可能性が示唆される。臨床的には転移性腎細胞癌において、原発巣の腫瘍内好中球の存在は全生存率の独立した危険因子であることが報告されている (*J Clin Oncol.* 2006 24:1997-2005)。また末梢血中の好中球の増加はインターロイキン 2 を用いた免疫療法の予後不良因子であることも明らかにされた (*Br J Cancer.* 2006 94: 218-226)。さらに、限局性腎細胞癌においても腫瘍内好中球の存在が無再発生存期間、癌特異的生存期間、全生存期間の短縮につながる予後因子であることも明らかとなった (*J Clin Oncol.* 2009 28:4709-4716)。以上より好中球は腎細胞癌の予後に関連した新規の重要な因子であると考えられるようになってきた。

一方、動物モデルにおいて、好中球が獲得免疫を抑制することが報告されている (*J Immunol* 150:3728-3738 1993)。近年、Ochoa et al. により、腎細胞癌患者において好中球様の形態を示す **myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)** が存在し、この細胞による獲得免疫制御作用が再注目された (*Cancer Res* 65:3044, 2005)。腎細胞癌も含め腫瘍の多くは、自己組織の崩壊等により、多様な炎症性物質を産生する。この炎症性物質が、**MDSCs** を誘導し、その結果、リンパ球増殖が抑えられ、腫瘍に対するがん免疫応答を無力化することが明らかになりつつある。実際に、マウス腫瘍モデルでは、MDSCs に発現する抗原に対する抗体で MDSCs を除去すると、腫瘍に対する免疫治療の劇的な改善が得られる (*PLoS One* 7:e40677, 2012, *J Immunol* 190:3806-3814, 2013)。

2. 研究の目的

本研究では、

臨床検体における MDSCs と関連する GPI-80 など骨髄系抗原の発現変動の同定

MDSC 候補細胞の発現遺伝子の網羅的解析
腎細胞癌患者の予後、治療効果と MDSC 発現遺伝子の関連性の検討
の3点を目的とした。これにより、免疫抑制に関わるヒト MDSC のマーカーが明らかになるとともに、がん免疫治療法の開発に貢献できると考えた。

3. 研究の方法

末梢血白血球表面抗原の測定
進行性腎細胞癌患者の末梢血において、GPI-80 発現など異常となった細胞比率を明らかにする。その発現異常比率と薬剤の抗腫瘍効果や患者の予後との関連を調べる。採血・経過観察するスケジュールは、治療開始前・治療後 1 週間 (早期)・治療後 1 カ月 (後期) とした (右図)。なお、本試験は、山形大学医学部倫理委員会の承認を得た (平成 26 年度承認番号 15 番)。

MDSCs 候補細胞の特徴的な RNA 発現パターンの同定
治療前の GPI-80 発現異常分画と治療後の好中球分画を、分離回収した。分離回収した細胞の mRNA を回収して microarray 解析を行った。

予後関連 MDSCs パラメータの同定
GPI-80 発現異常等に基づいた、MDSCs マーカーセットを明らかにし、それらを構成するパラメータから予後と関連するパラメータを統計的に検討した。

4. 研究成果

(1) 骨髄系細胞の分化異常 (MDSCs 出現) の指標化

mRCC 患者血液での検証: GPI-80, CD16, LAP-1 の有意な上昇

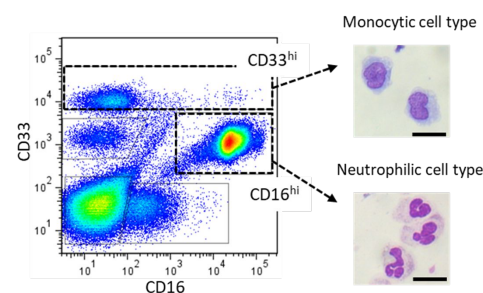


図1 フローサイトメトリーによる末梢血の単球・好中球様細胞の解析例

治療前・後の患者末梢血を用い、単球・好中球様分画についてフローサイトメトリーにて解析した (図 1)。それぞれの分画において、GPI-80, CD16, LAP-1 の分散性 (CV) と発現量 (MFI) を測定した。治療後においては、造血抑制の影響が大きく、癌性炎症による MDSCs の出現を類推するには難しかった。治療前の末梢血について解析したところ、mRCC 患者の好中球様分画における GPI-80 CV, CD16+% が有意に上昇していた。また、単球様分画におい

ても、CD16 MFI, GPI-80 MFI, LAP-1 MFI が有意に上昇していた (図2)。

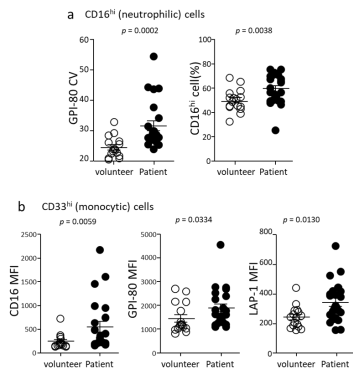


図2 mRCC患者におけるGPI-80, CD16, LAP-1パラメータの上昇

また、GPI-80 CV, CD16+, CD16 MFI, GPI-80 MFI, LAP-1 MFI の5つのパラメータは、互いに相関関係が認められた (データ示さず)。

MDSCs 活性と GPI-80 CV との相関

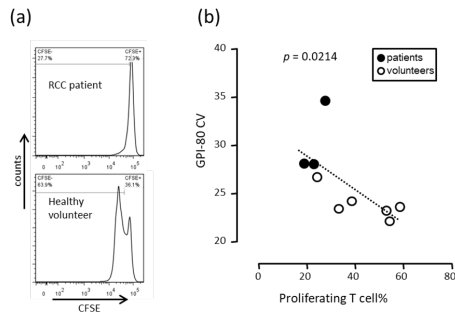


図3 GPI-80 CV上昇とT細胞増殖率の逆相関

MDSCs 活性の代表的作用として、T細胞増殖抑制が挙げられる。そこで、末梢血のT細胞と好中球様分画を比重分離し、抗CD3/CD28抗体による刺激でT細胞を刺激して増殖能を測定した。その際、分離した好中球様分画を1:1にて混合すると共に、GPI-80 CVを測定した。その結果、GPI-80 CVが上昇していた好中球様細胞分画は、T細胞増殖を抑制した。個別の末梢血サンプルの結果をプロットすると、T細胞増殖率とGPI-80 CVは有意に逆相関しており、GPI-80 CV上昇は、MDSCs活性を反映することが確認できた。

(2) 網羅的解析による MDSC 特異的候補分子の検討

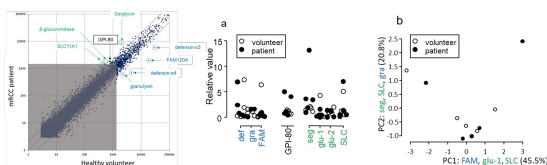


図4 mRNA網羅的解析によるmRCC患者・健康者におけるmRNAの発現量比較

GPI-80 CV の上昇が認められた患者検体を用いて、好中球様分画のmRNAの網羅的解析を行

った。その結果、患者由来の検体からは、Serglycin, -glucuronidase といった抗炎症性物質の mRNA が高く、健康者では defensin, granulysin といった抗菌ペプチドや細胞傷害物質の mRNA が高かった。この発現変動は、MDSCs の作用を説明し得る変化と考えられた。しかし、定量的 RT-PCR で個別のサンプルを検査すると、ばらつきが大きく、有意な差を見いだすには、より多くの検体による解析が必要であった (図4)。

(3) 予後予測可能なパラメータ CD16

多検体解析を必要とする mRNA 発現ではなく、検体自体のばらつきを反映させることが可能な方法を検討したところ、フローサイトメトリーにより見いだした5つのパラメータを用いた主成分分析により、患者由来の MDSCs を含む骨髄系細胞分画と健康者の骨髄系細胞分画のばらつきを比較した。その結果、明確な分散性の違いを認めた (図5)。

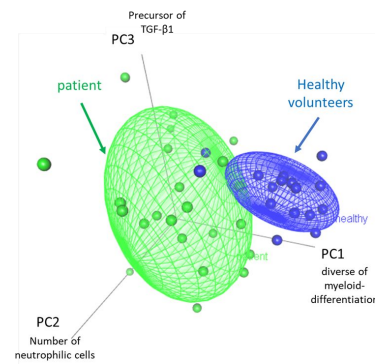


図5 フローサイトメトリー解析パラメータを用いた主成分分析

主成分 1 (PC1) を構成するパラメータは、GPI-80 CV, GPI-80 MFI が大きく関与しており、PC2 は CD16+ と LAP-1 MFI の寄与率が大きく、PC3 は、AP-1 と GPI-80 MFI の寄与率が大きい。CD16 MFI は、PC1, 2, どちらにも大きく寄与していた。

そこで、治療前の5つのパラメータが、予後因子となり得るか検討したところ、単変量解析では好中球様細胞の GPI-80 CV 高値 (> 29.1) 単球様細胞の CD16 MFI 高値 (> 250) および GPI-80 MFI 高値 (> 1625) 群において有意に全生存期間が短かった (図6)。また、多変量解析では単球様細胞の GPI-80MFI が独立した予後因子であった (表1)。

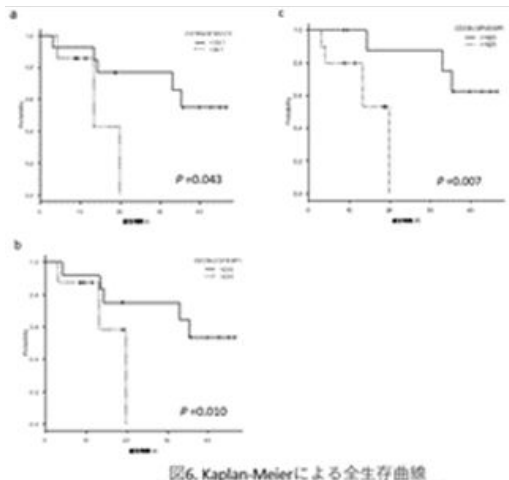


図6. Kaplan-Meierによる全生存曲線

表1 Cox比例ハザードモデルによる予後因子の解析

	Hazard ratio	95% confidence interval	p value
CD33 ⁺ CD16 MFI ≤250 vs. >250	1.1610	0.1560-8.647	0.88380
CD16 ⁺ GPI80.CV ≤29.1 vs. >29.1	0.8766	0.1259-6.101	0.89410
CD33 ⁺ GPI80 MFI ≤1625 vs. >1625	14.000	1.0850-180.7	0.04311

(4) 結語

MDSCs 出現を反映する複合パラメータを同定した。このうちで、ダイナミックレンジが広い単球細胞上の GPI-80 MFI に着目したところ、予後予測に用いることができると考えられた。今後、この複合パラメータを用いることで、少量の末梢血で短時間に患者の免疫動態を推測することを可能であると考えられる。さらには転移性腎細胞癌患者に対する分子標的治療や免疫治療等の治療開始時期判別や治療効果予測に有効と考えられ、臨床応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Takeda Y, Nara H, Asao H. Analysis of signal transducers using flow cytometry is useful for detection of contractive and fluctuating signals. Bulletin of the Yamagata University Medical Science : Yamagata medical journal 2017;35:21-32

Takeda Y, Kato T, Ito H et al. The pattern of GPI-80 expression is a useful marker for unusual myeloid maturation in peripheral blood. Clin Exp Immunol 2016;186:373-86

[学会発表](計 8 件)

加藤智幸, 武田裕司, 伊藤裕美, 黒田悠太, 奈良英利, 櫻井俊彦, 西田隼人, 内藤整, 川添久, 荒木明美, 一柳統, 浅尾裕信, 土谷順彦: 転移性腎細胞癌患者予後因子としての末梢血中 GPI-80 発現 第 106 回日本泌尿器科学会総会, 京都, 2018 年 4 月

加藤智幸, 武田裕司, 伊藤裕美, 黒田悠太, 奈良英利, 櫻井俊彦, 西田隼人, 内藤整, 川添久, 荒木明美, 一柳統, 浅尾裕信, 土谷順彦: 転移性腎細胞癌患者における末梢血中 GPI-80 発現は予後因子となりうる 第 55 回日本癌治療学会学術集会, 横浜, 2017 年 10 月

加藤智幸, 武田裕司, 伊藤裕美, 黒田悠太, 八木真由, 櫻井俊彦, 内藤整, 川添久, 一柳統, 土谷順彦, 浅尾裕信: 転移性腎癌患者末梢血における MDSC 誘導の指標としての GP-80 発現パターンは新たな MDSC 指標探索の基準となる 第 76 回日本癌学会学術集会, 横浜, 2017 年 9 月

加藤智幸, 武田裕司, 伊藤裕美, 黒田悠太, 山岸敦史, 櫻井俊彦, 内藤整, 奈良英利, 荒木明美, 浅尾裕信, 土谷順彦: 腎細胞癌患者における MDSC マーカーとしての末梢血中 GPI-80 発現. 第 105 回日本泌尿器科学会総会, 鹿児島, 2017 年 4 月

加藤智幸, 武田裕司, 黒田悠太, 土谷順彦, 浅尾裕信. 転移性腎癌患者末梢血における GPI-80 発現パターンは MDSC 誘導の指標となる. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜; 2016, 10 月

黒田悠太, 加藤智幸, 武田裕司, 伊藤裕美, 工藤千恵, 浅尾裕信, 土谷順彦. 腎癌細胞における GPI-80 の発現とその機能. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜; 2016, 10 月

加藤智幸, 武田裕司, 櫻井俊彦, 伊藤裕美, 川添久, 浅尾裕信. 腎がんにおける GPI-80 発現分散は MDSC 出現を示唆する. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋; 2015, 10 月

武田裕司, 加藤智幸, 櫻井俊彦, 伊藤裕美, 川添久, 浅尾裕信. 炎症性サイトカインは好中球分化における GPI-80 発現の分散を増加させる. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋; 2015, 10 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤智幸 (KATO TOMOYUKI)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号: 40396560

(2)研究分担者

武田 裕司 (TAKEDA YUJI)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：90302299