

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10595

研究課題名(和文) 臨床検体データによる肉腫様腎癌実験モデルの有用性の検討と新たな治療標的の模索

研究課題名(英文) Evaluation of usefulness of sarcomatoid renal cell carcinoma experiment model using clinical specimen data and search for new therapeutic targets.

研究代表者

望月 保志 (MOCHIZUKI, Yasushi)

長崎大学・病院(医学系)・准教授

研究者番号：40404256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、悪性度が高く、薬物療法による治療が困難とされる肉腫様腎癌(s-RCC)について、その悪性度と関連する特異的分子の同定とその悪性度に関する機能の解明を目的とした。まずs-RCCの実験系を確立するために、s-RCC類似細胞株の樹立を行い、臨床検体として使用可能なヒトs-RCC組織と比較検討を行い、s-RCCの進展に関連する分子の同定とメカニズムの解明を行った。また腎癌の進展に免疫機構の特異性が考えられており、s-RCCにおいて免疫系の関与するメカニズムの解明が必要であると考え、s-RCCと免疫関連細胞の臨床的意義について検討した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research is to identify sarcomatoid renal cell carcinoma (s-RCC), which is highly malignant and difficult to treat by medication therapy, and to elucidate the specific molecules and mechanism associated with its malignancy. To produce s-RCC experimental system, s-RCC like cell line was established and compared with human s-RCC tissue which could be used as a clinical specimen. We elucidated the association of molecules with the development of s-RCC and identified the mechanism of the progression. In addition, it is considered that abnormality of the immune system may be involved in the progress of RCC. We consider that it is necessary to elucidate the mechanism involving the immune system in s-RCC, and we investigated the clinical significance of s-RCC and association of immune related cells with its malignant potential.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：肉腫様腎細胞癌 予後不良因子 標的分子

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎細胞癌 renal cell carcinoma (RCC)において外科的切除困難症例などの進行性 RCC の治療で中心的役割を果たすのは、分子標的療法や免疫チェックポイント阻害療法などの薬物療法である。しかしその治療効果は現在も満足のものではない。RCC の中でも約 5% とされる肉腫様腎細胞癌 sarcomatoid RCC (s-RCC) は、特に臨床的に悪性度が高く、予後不良であり、薬物療法抵抗性である。s-RCC における血管新生あるいは腫瘍進展形式に関連する分子の検索やメカニズムの解明を目的とした研究は全世界的に少なく、また臨床効果を期待できる薬剤の開発は皆無である。上記の研究結果による新規薬物療法の開発が必要な状況であると言える。

(2) これまでにわれわれの研究グループでは s-RCC に関する臨床病理学的特徴および癌関連分子との関連性に関する研究を行ってきた。その中で淡明 RCC や乳頭状 RCC などの臨床的に一般的に多く見られる他の組織型と比較して、浸潤形式あるいは転移形式が異なることがわかってきた。また RCC では免疫チェックポイント阻害剤の普及に伴い、腫瘍免疫システムの異常が進展形式に関与することが報告され、s-RCC における腫瘍免疫機構の破綻あるいは異常の関連性について研究する必要性があると考えられた。そこで細胞実験あるいは動物実験モデルを用いて、s-RCC の転移あるいは浸潤に関与する分子あるいはメカニズムの解明と、免疫システム異常に関与の可能性について研究する必要性があると考えに至った。

2. 研究の目的

(1) 悪性度が高く、臨床的に予後不良であり、薬物療法抵抗性である s-RCC について各種細胞株あるいは動物モデルを用いた実験系を確立することにより、s-RCC の進行に関与する分子の同定を行う。そのために、s-RCC と形態の類似している s-RCC 類似細胞株を樹立し、それと、これまでに一般に使用されている腎癌細胞株を用いて、ヒト s-RCC 組織で高発現している分子との関連性を調べ、s-RCC の腫瘍進展に関連している分子の検索を行う。

(2) s-RCC における免疫関連細胞と臨床病理学的意義の関連性について網羅的解析を行い、他の RCC 組織型との違いについて調査、研究を行う。s-RCC と免疫関連細胞との関連性について解明することができたら、さらに s-RCC の腫瘍進展に関連する免疫応答分子の解明あるいは免疫システムの関連する機序の解明を行い、さらには免疫関連分子の阻害による s-RCC に対する治療薬開発の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) s-RCC の病態の解明および治療標的分子の開発を目的として以下のような網羅的研究を計画した。病理組織学的に肉腫様増殖を示すことが認められている鉄ニトリロ三酢酸腹 (Fe-NTA) 誘導ラット腎癌と Fe-NTA 誘導ラット腎癌から作成した樹立細胞株 RKFe 細胞を樹立する。それら確立した細胞実験あるいは動物実験モデルとヒト s-RCC 組織の発現分子を比較検討し、s-RCC との類似点、相違点を調査研究する。

(2) s-RCC の免疫システムの異常および免疫関連細胞の関連について調査研究を行う。免疫応答細胞の関連が判明した場合には、s-RCC における免疫システムの異常に関連する腫瘍関連分子の同定および腫瘍進展に関連するメカニズムの解明を行う。免疫関連細胞として CD57 陽性細胞 (Natural killer cell)、CD68 陽性細胞 (macrophage)、肥満細胞 (mast cell) を用いて、各種免疫細胞の s-RCC における臨床病理学的意義を検討し、免疫システムの異常が関連するメカニズムの解明を主に免疫組織学的手法を用いて行う。さらに臨床的意義との関連性について多変量解析などの統計学的手法を用いて解明する。

4. 研究成果

(1) s-RCC の病態の解明および治療標的分子の開発を目的として病理組織学的に肉腫様増殖を示すことが認められている鉄ニトリロ三酢酸腹 (Fe-NTA) 誘導ラット腎癌と Fe-NTA 誘導ラット腎癌から作成した樹立細胞株 RKFe 細胞を樹立することを計画し、実験を行った。

(2) RCC の進行に関する腫瘍免疫システムの破綻によるものが知られている。そのメカニズムの解明に関する研究を、s-RCC を主な対象として行った。免疫関連細胞である CD57 陽性細胞 (CD57+)、CD68 陽性細胞 (CD68+)、肥満細胞 (mast cell, MC) のヒト RCC 組織における細胞密度の臨床的意義について検討したところ、CD68+ および MC では、細胞異型度、腫瘍深達度、転移のありなしなどの臨床的パラメーターと正の相関を認めしたが、CD57+ では負の相関を認めた。組織型における検討では淡明 RCC や嫌色素性 RCC と比較して、乳頭状 RCC は CD68+ 細胞密度が有意に高いという特徴的な結果であり、乳頭状 RCC が他の RCC と比較して、生物学的特性が異なる可能性が示唆される結果であった。中でも s-RCC は MC の細胞密度が高いという特徴があり、その生物学的意義に関するメカニズムの解明が必要であると考えられた。

(3) RCC における免疫関連細胞の細胞密度と生命予後の関連について検討した。単変量解析では CD57+、CD68+、MC、CD68+/CD57+ の細胞

胞密度あるいはパラメーターについて生命予後との関連について検討した。いずれも疾患特異的生存率と相関し、CD57+の細胞密度は臨床的悪性度と負の相関を示し、それ以外は予後不良因子となる結果であった。しかし多変量解析ではいずれの因子も相関を認めなかった。ところが、s-RCCを除くRCCで検討すると、CD68+/CD57+が予後不良因子となることが明らかとなった ($p < 0.05$)。CD68+/CD57+はRCCにおける予後不良因子としての有用な臨床的マーカーとなる可能性が示唆された。さらにs-RCCは他の組織型のRCCとは異なる予後不良因子を併せ持つ腫瘍学的特性を持つ可能性が示唆された。

表 1. 免疫関連細胞の細胞密度およびパラメーターと疾患特異的生存率の関連

	単変量解析 (全例)	多変量解析 (全て)	多変量解析 (s-RCC以外)
CD57+	N	-	-
CD68+	P	-	-
MC	P	-	-
CD68+/CD57+	P	-	P

P: 正の相関あり、N: 負の相関あり、-: 相関なし

(4) RCCにおける免疫関連細胞の悪性度に関連するメカニズムの解明に関する研究を行った。特に細胞増殖および血管新生の関与について検討した。各免疫関連細胞の細胞密度およびパラメーターとの関連について検討した。免疫組織学的手法を用いて、proliferative index (PI)およびmicrovascular density (MVD)を定量化して評価検討をおこなった。結果は以下の通りとなった。

表 2. 免疫関連細胞の血管密度と細胞増殖および血管新生との関連

	CD57+	CD68+	MC	CD68+/CD57+
PI	N	P	-	P
MVD	N	P	P	P

P: 正の相関あり、N: 負の相関あり、-: 相関なし

以上の結果より、CD68+は細胞増殖および血管新生を介した腫瘍の進展に関与していた。一方s-RCCではMC細胞密度が高値であり、s-RCC腫瘍進展メカニズムに、MCの誘導による血管新生促進が関与する可能性が示唆された。

(5) 以上の実験結果より、RCCの腫瘍進展メカニズムに免疫関連細胞が何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。特に臨床的悪性度の高いs-RCCではMCによる血管新生促進の関与が考えられ、s-RCCの治療戦略を検討するにあたって、MCおよびMCによる血

管新生を促進する分子を標的とすること検討する必要がある。今後は上記結果を踏まえて治療につながる標的分子の検索を検討したい。

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1件)

1. Nakanishi H, Miyata Y, Mochizuki Y, Yasuda T, Nakamura Y, Araki K, Sagara Y, Matsuo T, Oba K, Sakai H. Pathological significance and prognostic roles of densities of CD57+ cells, CD68+ cells, and mast cells, and their ratios in clear cell renal cell carcinoma. Hum Pathol. 査読有, 2018 May 19. Doi: 10.1016/j.humpath.2018.05.007. (in press)

〔学会発表〕(計1件)

1. Mochizuki Y, Pathological and prognostic significance of densities of CD57+ (natural killer cells), CD68+ (macrophage), and mast cells in renal cell carcinoma tissue. Congress of European association of Urology 2017, 2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 保志 (MOCHIZUKI, Yasushi)
長崎大学・病院(医学系)・准教授

研究者番号：40404256

(2)研究分担者

宮田 康好 (MIYATA, Yasuyoshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
准教授
研究者番号：60380888

(3)連携研究者

竹原 浩介 (TAKEHARA, Kosuke)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
客員研究員
研究者番号：40580345

(4)研究協力者

中西 裕美 (NAKANISHI, Hiromi)
長崎大学・病院(医学系)・助教

中村 裕一郎 (NAKAMURA, Yuichiro)
長崎大学・病院(医学系)・医員

荒木 杏平 (ARAKI, Kyohei)
長崎大学・病院(医学系)・医員