

令和元年5月15日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08657

研究課題名(和文) 癌微小環境に着目した腎細胞癌の進展および治療耐性機構の解明

研究課題名(英文) Study of the tumor microenvironment during progression and acquisition of treatment resistance of renal cell carcinoma

研究代表者

三上 修治 (Mikami, Shuji)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20338180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腎細胞癌の進展および分子標的薬に対する治療耐性獲得の分子機構を調べるため、未治療およびVEGF-TKI治療後の腎細胞癌組織を解析した。VEGF-TKI治療より微小血管密度は低下するが、血管制御因子VASH1陽性血管内皮細胞数は増加したため、VEGF-TKIに対する治療耐性にVASH1が関与していることが示唆された。未治療腎細胞癌組織ではPD-1、PD-L1陽性免疫細胞数が癌の悪性度と相関し、VEGF-TKI治療後の腎細胞癌組織ではPD-1、PD-L1陽性細胞数が亢進していた。そのため、VEGF-TKI治療抵抗性腎細胞癌にはPD-1/PD-L1を標的とした免疫治療が有効であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行性腎細胞癌の第一選択はVEGF-TKI阻害剤であるが、治療開始後約1年で大部分の症例が治療抵抗性になる。そのため、薬剤耐性の分子機構の解明が腎細胞癌の根治には重要である。本研究課題では、病理医と泌尿器科医が共同で腎細胞癌の臨床所見、病理学的所見に基づき、VEGF-TKI耐性に関する腎細胞癌のがん微小環境を系統的に解析した。その結果、血管内皮細胞における血管制御因子VASH1発現および免疫担当細胞におけるPD-1/PD-L1発現がVEGF-TKI治療耐性に関与していることが判明したため、これらの分子を標的とした治療がVEGF-TKI抵抗性腎細胞癌の効果的な治療につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：VEGF-TKIs have become the first-line drugs for the treatment of metastatic and unresectable renal cell carcinoma. However, most cases become resistant to the treatment about 1 year after the initiation of the treatment. Therefore, elucidation of the molecular mechanism of the treatment resistance is important for the development of effective treatment. In this study, we focused on tumor micro-environment to investigate the molecular mechanism of the progression and acquisition of treatment resistance. As a result, it was found that expression of VASH1, a regulator of angiogenesis, in endothelial cells and PD-1/PD-L1 expression in tumor infiltrating immune cells were involved in resistance to VEGF-TKIs. This study suggested that targeting these molecules might be effective treatment for VEGF-TKI-resistant renal cell carcinoma.

研究分野：泌尿器病理

キーワード：腎細胞癌 微小環境 プレシージョンメディシン PD-1 PD-L1 VASH1 微小血管密度 腫瘍免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

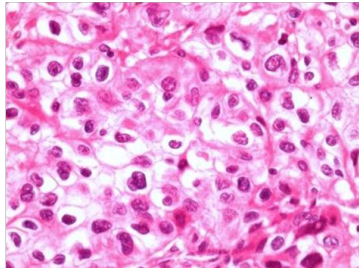
## 1. 研究開始当初の背景

### (1)腎細胞癌治療への分子標的薬の導入と薬剤耐性

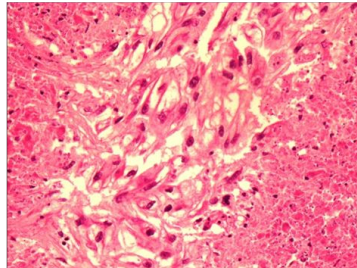
腎細胞癌は術後に高率に再発することが知られている。転移性腎細胞癌には、抗癌化学療法で効果のある薬剤はなく、インターフェロン $\alpha$ あるいはインターロイキン 2 を中心としたサイトカイン療法が行われてきたが、奏効率は 10~20%に留まっている。2008 年に血管新生阻害剤である分子標的薬の vascular endothelial growth factor-inhibitor (VEGF-TKI) (ソラフェニブとスニチニブ) が認可された。これらの新規分子標的薬はサイトカイン治療に比べると優れた腫瘍縮小効果が得られるものの、抗腫瘍効果は未だ不十分であり、治療開始後約 1 年で大部分の症例が治療に対し耐性となることが問題となっている。しかし、VEGF-TKI 治療と再発・死亡率に関する臨床統計による研究が多数の施設で実施されているが、耐性機構の解明につながる基礎的研究は殆ど行われていない。

研究代表者はスニチニブ治療後の腎細胞癌組織では血管密度が減少していることを見出した。スニチニブによる血管内皮細胞障害が示唆されたが、残存している少数の血管周囲に紡錘形の脱分化傾向の顕著な紡錘形細胞の残存が確認された(下図)。

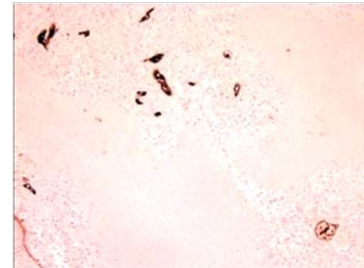
Clear cell renal cell carcinoma  
without targeting molecular therapy



Clear cell renal cell carcinoma  
after sunitinib treatment



CD34 staining of clear cell RCC  
after sunitinib treatment



### (2)VEGF-TKI による上皮間葉転換(epithelial mesenchymal transition: EMT)と癌幹細胞誘導

研究代表者は転写因子である tumor necrosis factor- $\alpha$ が腎細胞癌の EMT および CD44 発現を誘導することおよび VEGF-TKI 治療後残存癌細胞では、E-cadherin 発現減少、N-cadherin 発現亢進および癌幹細胞マーカーである CD44 発現亢進が起きることを報告した(Mikami S, et al, *Int J Cancer*, 2015)。そのことから、腎細胞癌の EMT および癌幹細胞性に関与する分子が特定出来れば、腎細胞癌の分子標的薬治療効果を予測するバイオマーカーとなり、根治療法の開発に必要な新規標的分子の発見につながることを期待される。

### (3)腎細胞癌における微小血管密度と悪性度の関連

一般的に血管新生の程度は多くの固形腫瘍の悪性度と相関することが知られており、CD31, CD34 等の血管内皮マーカー発現によって測定された微小血管密度は血管新生のバイオマーカーと考えられている。しかし、腎細胞癌では、微小血管密度が高い症例が予後不良であるという報告と微小血管密度が高い症例が予後良好であるという矛盾する結果が報告されている。これは血管内皮マーカーが休止している血管内皮細胞・活性化している血管内皮細胞のいずれにも発現されるため、これらのマーカーを用いて測定した微小血管密度は血管新生の程度を正確に反映していないことが原因と考えられる。また、VEGF-TKI 治療後に微小血管密度の減少が報告されているが、微小血管密度が腎細胞癌の悪性度を正確に反映されていない可能性も否定できない。

### (4)腎細胞癌の微小免疫環境

腫瘍浸潤免疫細胞: tumor infiltrating immune cells (TIIC)は腫瘍抗原を認識し腫瘍細胞を攻撃する役割を担っていると考えられる。しかし、腎細胞癌では TIIC が豊富な症例はむしろ予後不良であるため、免疫を抑制する機構の存在が示唆される。

## 2. 研究の目的

### (1)腎細胞癌の血管新生制御機構の解明

血管新生部位に発現する血管制御因子 vasohibin-1 (VASH1)に着目する。VASH1 は類内臓腺癌、前立腺癌、尿路上皮癌等の悪性腫瘍では腫瘍組織内の血管内皮細胞に発現しているものの、非腫瘍部では VASH1 発現がみられないことおよび VASH1 の密度が悪性度と相関することが報告されている。また、VASH1 は serum-starvation stress や酸化ストレスから血管内皮細胞を防御することも知られている。VEGF-TKI は腫瘍血管を標的としているが、症例によって治療効果に差があることから、腫瘍血管の構造は症例によって異なると考えられる。そのため、VASH-1 発現と VEGF-TKI 耐性の関連を調べ、腫瘍血管の異質性と VEGF-TKI 耐性の関連を明らかにして、耐性克服に向けた知見を得る。

### (2)腎細胞癌の免疫微小環境と VEGF-TKI 治療耐性の関連の検討

近年同定された免疫抑制機構を担う分子である programmed death-1 (PD-1)/PD-ligand 1 (PD-L1)は腫瘍免疫を抑制することが知られており、実際これらを抑制する immune checkpoint inhibitor (ICI)による治療が腎細胞癌にも導入されている。しかし、治療効果を予測する因子は確立されていない。そのため、腎細胞癌の PD-1/PD-L1 発現を含めた免疫微小環境および VEGF-TKI 治療との関連に注目して解析を進める。また、腎癌研究会を通じた多施設共同研究により多数の

VEGF-TKI 治療後腎細胞癌組織を収集し、上記研究で判明した癌細胞の分子標的治療耐性に関するマーカー分子の免疫染色を行う。これらのマーカー分子と治療効果や予後との相関を統計学的に解析し、分子標的治療薬の指標となる分子を同定し、治療効果判定基準および分子標的薬治療の適応指標基準の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1)対象

本研究では、1994年から2014年まで慶應義塾大学病院で切除された未治療の原発性淡明細胞型腎細胞癌を対照として VEGF-TKI 治療後腎細胞癌組織を共同研究参加機関から集めて比較・検討した。各参加機関の施設内審査委員会による承認後、VEGF-TKI 治療後の腎細胞癌組織が中央施設である慶應義塾大学病院に集められ、中央病理診断の後、腫瘍の病期分類は TNM 分類、組織学的異型度は WHO/ISUP 分類に従って行った。VEGF-TKI(ソラフェニブまたはスニチニブ)の投与はプロトコルに従って行われ、治療効果は固形腫瘍の治療効果判定ガイドライン(RECIST)に従って評価した。Complete response (CR)を達成した症例はなく、partial response (PR), stable disease (SD), progressive disease (PD)を示す症例が観察された。

#### (2)免疫組織化学

血管新生の程度については抗 CD34 抗体(mouse monoclonal, clone QBEnd 10; Dako), 抗 VASH1 抗体(mouse monoclonal, clone 4E12; Merck)を用いた免疫染色により評価した。微小免疫環境の評価は抗 PD-1 抗体(goat polyclonal, R&D Systems), 抗 PD-L1 抗体(rabbit monoclonal, clone: E1L2N, Cell signaling)を用いた免疫染色により行った。免疫染色は自動染色装置 Benchmark; Ventana) により行い、ヘマトキシリンによる対比染色が施行された。PD-1/PD-L1 陽性対照には、PD-1 および PD-L1 陽性のリンパ球を含む扁桃組織を使用した。陰性対照として各抗体に使用したのと同じ濃度で、non-immune goat, rabbit or mouse IgG とインキュベートした切片を用いた。

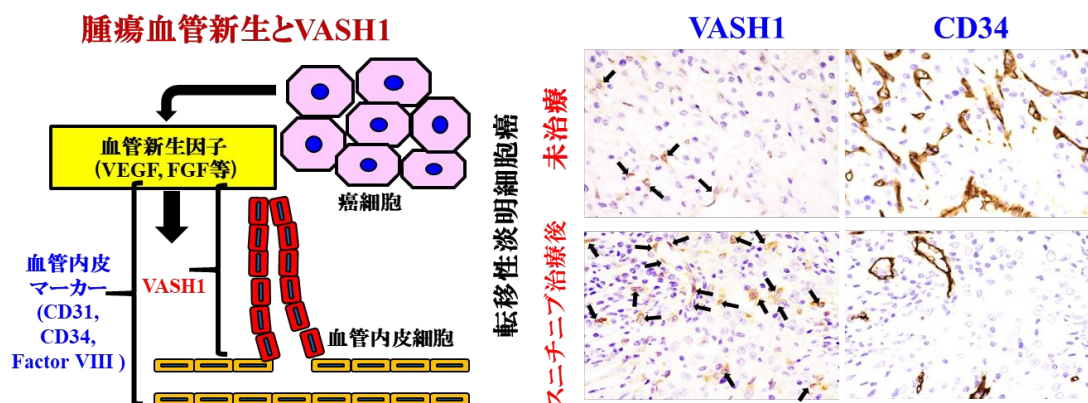
#### (3)染色標本の評価

微小血管密度は CD34 染色を行った標本の任意の 3 箇所を x200 で観察し計測した血管数の平均値とした。VASH1 染色標本では同じ血管内腔を覆う血管内皮細胞には VASH1 陽性細胞と陰性細胞が混在していた。そのため、任意の 3 箇所を x400 で観察し計測した VASH1 陽性血管内皮細胞の平均を VASH1 密度とした。

PD-1 または PD-L1 発現は、PD-L1、PD-L1 陽性 THIC の数を x400 で観察し、切片の代表的な 3 箇所の平均値として評価した。腫瘍細胞については細胞膜において PD-L1 陽性となる細胞の割合(%)を PD-L1 陽性腫瘍スコアとして評価した。

#### (4)統計分析

Unpaired t-test を用いて、微小血管密度、VASH1 密度、PD-1 陽性 THIC スコア、PD-L1 陽性 THIC スコア、または PD-L1 陽性腫瘍スコアと臨床病理学的パラメータとの間の関係を分析した。未治療の腎細胞癌組織の統計分析は、pT1, pT2 群および pT3, pT4 群、または低異型度群(Grade 1, 2)、高異型度群(Grade 3, 4)に分類することによって行った。Receiver operation curve(ROC)分析により area under curve (AUC)を決定し、最適カットオフ値を曲線の対角線から最も遠い点とした。PD-1 陽性の症例 THIC スコア、PD-L1 陽性 THIC スコア、または PD-L1 陽性腫瘍スコアは、カットオフ値よりも高い場合を高発現症例と定義し、カットオフ値よりも低いものは低発現症例と定義した。ログランク検定およびカプラン - マイヤー法を生存分析に使用した。各解析における群間の差は、P 値が 0.05 未満の場合に有意と判断した。これらの分析は IBM SPSS 24, windows version を用いて行った。



Mikami S, et al, *Lab Invest*, 97, 854-862, 2017.

### 4. 研究成果

#### (1)腎細胞癌における微小血管密度と VASH1 密度

非腫瘍部腎組織は VASH1 染色陰性であったが、すべての毛細血管が CD34 陽性であった。低異型度の淡明細胞型腎細胞癌では、腫瘍組織内の毛細血管において VASH1 陽性の血管内皮細胞が散在していた(前頁図)。一方、すべての毛細血管がびまん性に CD34 陽性であった。高異型

度の淡明細胞型腎細胞癌では、低異型度症例と比べ VASH1 陽性の血管内皮細胞が多数みられたが、CD34 陽性の微小血管は低異型度症例に比べむしろ減少していた。統計学的に VASH1 密度は遠隔転移と正相関を示していた(他の臨床病理学的因子との相関はみられなかった)。一方、微小血管密度は原発巣の進展度、遠隔転移、WHO/ISUP grade と逆相関を示した。

VASH1 低発現例は高発現例に比べ有意に再発率・死亡率が低い傾向にあった。一方、低微小血管密度症例は高微小血管密度症例に比べ有意に再発率・死亡率が高い傾向にあった。

単変量解析の結果、原発巣の進展度、リンパ節転移、遠隔転移、WHO/ISUP grade、VASH1 密度、微小血管密度が再発予測因子であり、多変量解析では原発巣の進展度、WHO/ISUP grade、VASH1 密度が独立した再発予測因子であることが判明した。同様に VASH1 密度は独立した予後予測因子であることが確認された。

VEGF-TKI 治療後腎細胞癌組織では、微小血管密度が未治療腎細胞癌症例に比べ有意に低下していたが、VASH1 陽性細胞は治療後組織において多数観察された(前頁図)。

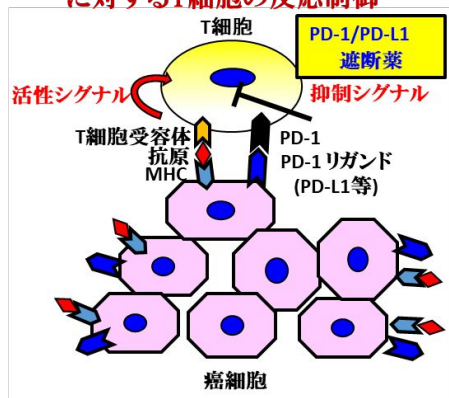
### (2)腎細胞癌における PD-1, PD-L1 発現の意義

未治療の低異型度腎細胞癌組織では、少数の PD-1 陽性 THIC がみられるのみであったが、高異型度腎細胞癌組織では、PD-1 陽性 THIC が増加していた。また、低異型度腎細胞癌組織では、PD-L1 陽性 THIC および PD-L1 陽性腫瘍細胞は殆ど見られなかったが、高異型度腎細胞癌組織では PD-L1 陽性 THIC および PD-L1 陽性腫瘍細胞が観察された(下図)。統計学的に PD-1 陽性 THIC スコア、PD-L1 陽性 THIC スコアは病期、遠隔転移、および WHO/ISUP grade と相関していた。PD-L1 陽性腫瘍スコアは組織学的異型度と相関していたが、その他の臨床病理学的因子との相関はみられなかった。また、PD-1 陽性 THIC スコア、PD-L1 陽性 THIC スコア、PD-L1 陽性腫瘍細胞スコアは予後因子であった。

経過観察中に転移性腫瘍の治療のために VEGF-TKI を行った症例の治療効果を RECIST により、complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD), progressive disease (PD)として評価した。CR を示した症例はみられなかった。PR, SD を示した患者の原発巣における PD-1 陽性 THIC スコア、PD-L1 陽性 THIC スコアは PD であった患者のスコアよりも低い値であった(下図)。しかし、VEGF-TKI の治療効果と PD-L1 腫瘍スコアとの間に有意な相関はなかった。

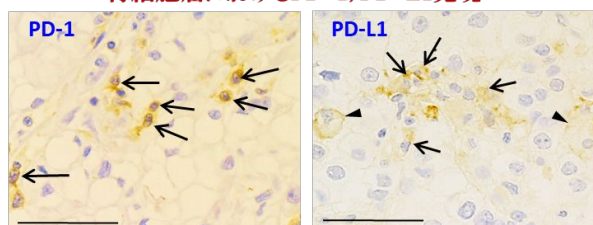
VEGF-TKI 治療後の腎細胞癌組織では、局所的な変性および壊死が散発的に観察されたが、viable tumor cells はすべての症例で観察された。VEGF-TKI 治療後のすべての症例において微小環境に PD-1 陽性 THIC がみられ、約 70%の症例において PD-L1 陽性 THIC が観察された。一方、PD-L1 陽性腫瘍細胞は約 40%の症例においてごく少数観察された。統計学的に VEGF-TKI 治療後組織は未治療症例に比べ PD-1 陽性 THIC スコア、PD-L1 陽性 THIC スコアが高かった。一方、PD-L1 陽性腫瘍スコアと治療効果の関連は見られなかった。

### 刺激性・抑制性受容体による腫瘍抗原に対するT細胞の反応制御

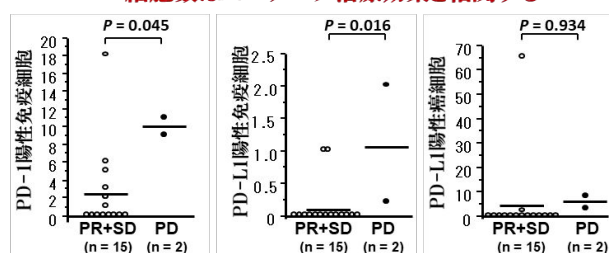


Mikami S, et al, *Cancer Sci*, in press.

### 腎細胞癌におけるPD-1, PD-L1発現



### 腎細胞癌におけるPD-1, PD-L1陽性免疫細胞数はスニチニブ治療効果と相関する



### (3)考察

VEGF-TKI 治療により微小血管密度は減少するが、VASH1 陽性血管内皮細胞が増加することは VASH1 が VEGF-TKI 治療に対する血管内皮細胞の耐性獲得に関与している可能性を示唆している。そのため、VEGF-TKI 治療の有効性を高めるために VASH1 を標的とした分子標的治療の開発が有望と考えられる。また、腎細胞癌の微小環境では多数の THIC が存在しているにも関わらず、THIC が豊富な症例は予後不良であることが知られており、THIC の機能が PD-1/PD-L1 経路により抑制されていることが示唆される。VEGF-TKI 治療後組織の微小環境では多数の PD-1/PD-L1 陽性 THIC が存在していることから、VEGF-TKI 治療に抵抗性の症例には PD-1/PD-L1 を標的とした ICI が有効と考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 10 件)

- (1) Mikami S, Mizuno R, Kondo T, Shinohara N, Nonomura N, Ozono S, Eto M, Tatsugami K, Takayama T, Matsuyama H, Kishida T, Oya M Clinical significance of PD-1 and PD-L1 expression in the tumor microenvironment of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci*, 査読有, 印刷中, DOI: 10.1111/cas.14019.
- (2) Ogihara K, Kikuchi E, Okazaki S, Hagiwara M, Takeda T, Matsumoto K, Kosaka T, Mikami S, Saya H, Oya M. Sulfasalazine could modulate the CD44v9-xCT system and enhance cisplatin-induced cytotoxic effects in metastatic bladder cancer, *Cancer Sci*, 査読有, 110, 2019, 1431-1441, DOI: 10.1111/cas.13960.
- (3) Ito K, Masunaga A, Tanaka N, Mizuno R, Shirotake S, Yasumizu Y, Ito Y, Miyazaki Y, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Momma T, Masuda T, Nakagawa K, Oyama M, Asano T, Oya M. Impact of inflammatory marker levels one month after the first-line targeted therapy initiation on progression-free survival prediction in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma, *Jpn J Clin Oncol*, 査読有, 48, 2019, 69-76, DOI: 10.1093/jjco/hyy154.
- (4) Tanaka N, Katayama S, Reddy A, Nishimura K, Niwa N, Hongo H, Ogihara K, Kosaka T, Mizuno R, Kikuchi E, Mikami S, Miyakawa A, Arenas E, Kere J, Oya M, Uhlén P. Single-cell RNA-seq analysis reveals the platinum resistance gene COX7B and the surrogate marker CD63. *Cancer Med*, 査読有, 7, 2018, 6193-6204, DOI: 10.1002/cam4.1828.
- (5) **Ito K, Mikami S, Tatsugami K, Masumori N, Shinohara N, Kondo T, Nakanishi S, Nagashima Y, Eto M, Kamba T, Kuroda N, Tomita Y, Matsuyama H, Onishi T, Tsushima T, Nakazawa H, Oya M, Ozono S, Naito S, Asano T, Clinical outcomes in patients with metastatic papillary renal-cell carcinoma: a multi-institutional study in Japan. *Clin Genitourin Cancer*, 査読有, 16, 2018, e1201-e1214, DOI: 10.1016/j.clgc.2018.07.028.**
- (6) **Fukumoto K, Kikuchi E, Mikami S, Hayakawa N, Matsumoto K, Niwa N, Oya M, Clinical role of programmed cell death-1 expression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer recurring after initial Bacillus Calmette-Guérin therapy, *Ann Surg Oncol*, 査読有, 25, 2018, 2484-2491, DOI: 10.1245/s10434-018-6498-2.**
- (7) **Takamatsu K, Mizuno R, Omura M, Morita S, Matsumoto K, Shinoda K, Kosaka T, Takeda T, Shinojima T, Kikuchi E, Asanuma H, Oyama M, Mikami S, Oya M, Prognostic value of baseline serum C-reactive protein level in intermediate-risk group patients with metastatic renal-cell carcinoma treated by first-line vascular endothelial growth factor-targeted therapy, *Clin Genitourin Cancer*, 査読有, 16, 2018, e927-e933, DOI: 10.1016/j.clgc.2018.03.012.**
- (8) **Mizuno R, Mikami S, Takamatsu K, Shinojima T, Kikuchi E, Oya M, Baseline risk stratification or duration of prior therapy predicts prognosis in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with axitinib, *Jpn J Clin Oncol*, 査読有, 47, 2017, 1170-1174, DOI: 10.1093/jjco/hyx134.**
- (9) **Shigeta K, Kikuchi E, Hagiwara M, Ando T, Mizuno R, Abe T, Mikami S, Miyajima A, Nakagawa K, Oya M, The conditional survival with time of intravesical recurrence of upper tract urothelial carcinoma, *J Urol*, 査読有, 2017, 198, 1278-1285, DOI: 10.1016/j.juro.2017.06.073.**
- (10) **Mikami S, Oya M, Kosaka T, Mizuno R, Miyazaki Y, Sato Y, Okada Y, Increased vasohibin-1 expression is associated with metastasis and poor prognosis of renal cell carcinoma patients, *Lab Invest*, 査読有, 97, 2017, 854-862, DOI: 10.1038/labinvest.2017.26.**

### 〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 三上 修治, 腎腫瘍の非典型例 WHO 分類(2016 年)に基づいた非淡明細胞型腎細胞癌の病理診断, 第 36 回日本画像医学会学術大会, 2017.
- (2) 三上 修治, 腎腫瘍の病理診断 病理医が知っておくべき基礎知識, 第 105 回日本病理学会総会, 2016.
- (3) 三上 修治, 尿路上皮癌の総合診断学の up to date, 第 35 回日本画像医学会学術大会, 2016.

### 〔図書〕(計 3 件)

- (1) 三上 修治, 医歯薬出版株式会社, 腎腫瘍・尿路腫瘍. 病理組織の見方と鑑別診断, 第 6 版, 331-342, 2018.
- (2) 長嶋 洋治, 菅原 江美子, 稲村 健太郎, 小島 史好, 三上 修治, 黒田 直人, メディカルレビュー社, 腎癌診療ガイドライン 2017 年度改定のポイント-病理-. Year Book of RCC 2017, 23-32, 2017.

- (3) 三上 修治, 黒田 直人, 長嶋 洋治, 中山書店, 紡錘細胞癌(肉腫様変化). 腎・尿路 / 男性生殖器腫瘍 (癌診療指針のための病理診断プラクティス), 118-121, 2016.

【産業財産権】

なし

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

【その他】

研究代表者の研究者情報データベース:

<https://k-riis.keio.ac.jp/Profiles/73/0007299/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 水野 隆一

ローマ字氏名: **MIZUNO, Ryuichi**

所属研究機関名: 慶應義塾大学

部局名: 医学部

職名: 専任講師

研究者番号 (8 桁): 60383824

研究分担者氏名: 小坂 威雄

ローマ字氏名: KOSAKA, Takeo

所属研究機関名: 慶應義塾大学

部局名: 医学部

職名: 専任講師

研究者番号 (8 桁): 30445407

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。