

令和元年5月26日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15635

研究課題名(和文) 尿路上皮癌微小環境の統合的解析

研究課題名(英文) Integrated analysis of urothelial carcinoma microenvironment

研究代表者

森川 鉄平 (MORIKAWA, Teppei)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・客員研究員

研究者番号：80451772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：上部尿路上皮癌271症例のうち腫瘍PD-L1発現陽性例は31例(11%)であり、無転移生存期間と全生存期間が有意に短かった。興味深いことに、血小板数が中央値よりも低い群では腫瘍PD-L1発現は予後に関連しないが、血小板数が高い群では腫瘍PD-L1陽性例は予後不良であり、両者の相互作用が示唆された。尿路上皮癌細胞株と血小板との共培養系を用いた実験でも、血小板と腫瘍PD-L1発現が相乗的に遊走浸潤能を増加させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後、尿路上皮癌においてPD-1 / PD-L1を標的とする免疫チェックポイント阻害薬がさらに普及していくと思われるが、尿路上皮癌微小環境を統合的に解析した本研究の検討結果より、腫瘍PD-L1発現と血中血小板数を組み合わせることでより優れたバイオマーカーとなりうることを示唆された。さらに、抗血小板薬との併用により免疫チェックポイント阻害薬の効果を高めることができる可能性も考えられた。

研究成果の概要(英文)：We immunohistochemically examined tumor PD-L1 expression in 271 patients with upper tract urothelial carcinoma, which revealed PD-L1 positivity in 31 cases (11%). The associations of tumor PD-L1 expression with outcomes varied among patients with high or low platelet counts. Among patients with high platelet counts, PD-L1 positivity was significantly associated with shorter metastasis-free survival and overall survival. In contrast, among patients with low platelet counts, PD-L1 positivity was not significantly associated with these outcomes. Our results suggest that tumor PD-L1 expression and platelet count might interact and help regulate tumor progression. In vitro experiments also suggested that tumor PD-L1 expression and platelet synergistically enhance migration of cancer cells.

研究分野：人体病理学

キーワード：尿路上皮癌 免疫微小環境 血小板

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、各種癌において、腫瘍局所における免疫微小環境と予後との関連を示す報告が多数発表されている。しかし、複数のリンパ球マーカーやその他の炎症細胞マーカーを用いた詳細な免疫微小環境の解析は尿路上皮癌においては実施されておらず、尿路上皮癌における免疫微小環境の意義についていまだ十分解明されているとは言いがたい。一方、全身の免疫応答を反映する血中マーカーと予後との関連も報告されてきている。しかし、腫瘍局所の免疫微小環境と全身の免疫応答を反映する血中マーカーとの関連や、予後に及ぼす交互作用はこれまでに検討されていない。両者を統合的に解析することにより、より正確に患者予後を推定できるようになる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、尿路上皮癌の腫瘍局所の免疫微小環境を網羅的に解析するとともに、全身の免疫応答を反映する血中マーカーと合わせ統合的に解析することで、尿路上皮癌の予後を正確に予測することを目指す。さらに、生存解析において交互作用の認められた腫瘍 PD-L1 と血小板に着目し、両者が尿路上皮癌細胞に及ぼす影響を *in vitro* の系で検証する。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体を用いた解析

東京大学医学部附属病院で 1990 年から 2017 年の間に上部尿路上皮癌に対して行われた腎尿管全摘術検体 271 症例のホルマリン固定パラフィン標本を用い、腫瘍中心部と辺縁部から組織マイクロアレイを作成した。各炎症細胞のマーカー (CD204、CD68、PD-1、FoxP3、CD3、CD4、CD8、CD45RO、CD66b、CD20、S100) および PD-L1 の発現を確認するため、免疫組織化学染色を行った。各種炎症細胞マーカーの発現については画像解析ソフトを用いて定量的に解析し、解析した面積に占める炎症細胞マーカーの陽性面積密度 (%) を算出した。PD-L1 の発現については 2 名の病理医が目視で評価した。腫瘍 PD-L1 発現は腫瘍中心部あるいは辺縁部のコアいずれかにおいて、癌細胞の 5% 以上に染色が見られた場合を陽性とした。各マーカーの発現の程度と臨床病理学的因子および術後の予後との相関を検討した。さらに、術前の血液検査の結果 (赤血球数、白血球数、血小板数、CRP 等) が免疫染色マーカーと予後との相関に影響を及ぼすかどうか検討した。

(2) 細胞株での検討

ヒト尿路上皮癌細胞株 9 種類 (JON、T24、RT112、VMCUB1、JMSU1、UMUC3、SW800、5637、J82) を用いて、健常人の血液から精製した洗浄血小板と 24~72 時間共培養し、癌細胞株の形態観察と遊走浸潤能、増殖能の評価をした。遊走浸潤能はスクラッチアッセイとトランスウェルアッセイを用い、増殖能は MTT アッセイを用いた。血小板の活性化についても検討するため、多血小板血漿に各細胞株を添加し、15 分間攪拌して透過法により凝集能を測定した。また、共培養後に RNA を抽出し、上皮間葉転換マーカーおよび PD-L1 の発現量の変化を検討した。さらに、血小板との共培養により遊走浸潤能が増加した細胞株のうち 3 種類 (JON、T24、RT112) について、siRNA を用いて PD-L1 発現のノックダウンを行った上で血小板と共培養をして遊走浸潤能の評価を行い、PD-L1 の発現状態と血小板がどのように遊走浸潤能に影響するか検討した。また、癌細胞における PD-L1 の発現が血小板の活性化に影響するかどうかを検討するため、先の 3 種類の細胞株 (JON、T24、RT112) について、予め siRNA を用いて PD-L1 発現のノックダウンを行い、これらの細胞株を多血小板血漿に添加し、凝集能を測定した。

4. 研究成果

(1) 臨床検体を用いた解析

画像解析により算出した炎症細胞マーカーの腫瘍辺縁部のコアにおける陽性面積密度の中央値を基準に多い群と少ない群で分け生存時間分析を行ったところ、マクロファージや制御性 T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、活性化した T 細胞の浸潤が多い群では無転移生存期間と全生存期間が有意に短かった。Cox 回帰モデルを用いた全生存期間の多変量解析では、腫瘍関連マクロファージの浸潤が多いことが独立した予後不良因子であった。腫瘍 PD-L1 発現陽性は 31 例 (11%) であった。腫瘍 PD-L1 発現は間質 PD-L1 発現と正に相関しているほか、マクロファージや各種 T 細胞、樹状細胞の浸潤と正に相関していた。腫瘍 PD-L1 発現の臨床病理学的意義について検討したところ、腫瘍 PD-L1 陽性例は扁平上皮亜型、高度の腫瘍浸潤リンパ球、リンパ管侵襲、高

い深達度、リンパ節転移陽性と有意に相関した。生存時間分析では、腫瘍 PD-L1 陽性例では無転移生存期間と全生存期間が有意に短かった。興味深いことに、血小板数の中央値 ($23.4 \times 10^4 / \mu\text{l}$) を基準に血小板数が高い群と低い群に分けたところ、血小板数が高い群では腫瘍 PD-L1 陽性例は無転移生存期間と全生存期間が有意に短かったのに対し、血小板数が低い群では腫瘍 PD-L1 発現は予後に影響しなかった。

(2) 細胞株での検討

細胞株と血小板を共培養し形態を確認したところ、JON と RT112 では胞体が大きくなり突起を伸ばすといった変化がみられた。増殖能に関する検討では、細胞株と血小板を 3 日間共培養し非共培養群と比較したが、両者における増殖率に大きな差はみられなかった。トランスウェルアッセイによる遊走浸潤能の検討では、血小板共培養群で JON、RT112、T24、JMSU1 の移行細胞数が上昇した。スクラッチアッセイによる遊走能の検討では、血小板共培養群で RT112、T24、5637 の傷修復率が上昇した。また血小板の活性化の指標として多血小板血漿にそれぞれの細胞株を添加して 15 分間攪拌し、凝集能を検討したところ、JON、RT112、T24、VMCUB1、J82、5637 を添加した多血小板血漿に凝集がみられた。血小板と癌細胞の共培養 24 時間後に回収した RNA を用いた qRT-PCR による検討では、JON、T24、RT112、JMSU1、VMCUB1、5637 において N-cadherin などの上皮間葉転換マーカーの発現が増加した。また、J82 を除く全ての細胞株で PD-L1 発現の増加を認めた。特にこれらの発現変化が大きかった JON で、セルブロックを作成し免疫組織化学的検討を行ったところ、N-cadherin、Vimentin 及び PD-L1 の発現増加を確認した。また、JON、RT112、T24 に siRNA を導入して PD-L1 発現をノックダウンし、PD-L1 発現が血小板による浸潤遊走能の影響を変化させるかどうかについても調べた。JON では、血小板非存在下では PD-L1 発現は遊走浸潤能に影響しないものの、血小板存在下では PD-L1 発現が保たれている群の方が、ノックダウンした群と比較して遊走浸潤能が高く、血小板と PD-L1 発現が相乗的に遊走浸潤能を増加させることが明らかとなった。T24 では血小板の有無に関わらず、PD-L1 のノックダウンにより遊走浸潤能が低下し、PD-L1 発現による遊走浸潤能への影響が明らかとなったが、血小板との相乗効果は確認できなかった。RT112 では血小板の有無に関わらず、PD-L1 発現は遊走浸潤能に影響しなかった。

(3) 考察

臨床検体を用いた解析の結果から、上部尿路上皮癌ではマクロファージや T 細胞の浸潤が多いと予後不良であり、中でも腫瘍関連マクロファージの浸潤は独立した予後不良因子であるため、CD204 陽性細胞の浸潤を検討することは臨床的な意義が大きいといえる。また、腫瘍 PD-L1 陽性例は予後不良であった。さらに、術前の血中血小板数と腫瘍 PD-L1 発現には強い交互作用がみられ、血中血小板と腫瘍 PD-L1 発現が相乗的に腫瘍進展に寄与することが示唆された。尿路上皮癌細胞株 (JON) を用いた検討でも、血小板と腫瘍 PD-L1 発現が相乗的に癌細胞の遊走浸潤能を増加させることが示され、臨床検体を用いた解析の結果を裏付けるものであった。今後、尿路上皮癌において PD-1 / PD-L1 を標的とする免疫チェックポイント阻害薬がさらに普及していくと思われるが、今回の検討により腫瘍 PD-L1 発現と血中血小板数を組み合わせることにより優れたバイオマーカーとなることが示唆された。さらに、抗血小板薬との併用により免疫チェックポイント阻害薬の効果を高めることができる可能性も考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Miyama Y, Morikawa T, Miyakawa J, Koyama Y, Kawai T, Kume H, Fukayama M. The prognostic value of PD-L1 expression in upper tract urothelial carcinoma varies according to platelet count. *Cancer Med.* 2018 Sep;7(9):4330-4338. (査読あり)

Miyakawa J, Morikawa T, Miyama Y, Nakagawa T, Kawai T, Homma Y, Fukayama M. Loss of Stromal Antigen 2 (STAG2) Expression in Upper Urinary Tract Carcinoma: Differential Prognostic Effect According to the Ki-67 Proliferating Index. *Ann Surg Oncol.* 2017 Dec;24(13):4059-4066. (査読あり)

Koyama Y, Morikawa T, Miyakawa J, Miyama Y, Nakagawa T, Homma Y, Fukayama M. Diagnostic utility of Ki-67 immunohistochemistry in small endoscopic biopsies of the ureter and renal pelvis. *Pathol Res Pract.* 2017 Jul;213(7):737-741. (査読あり)

〔学会発表〕(計3件)

美山優，森川鉄平，深山正久．尿路上皮癌では腫瘍 PD-L1 発現と血小板は相互に腫瘍進展に寄与する．第 108 回日本病理学会総会、2019 年．

美山優，森川鉄平，宮川仁平，小山雄一，川合剛人，久米春喜，深山正久．上部尿路上皮癌における PD-L1 発現の予後因子としての意義は血小板数により異なる．第 108 回日本病理学会総会、2019 年．

森川鉄平，宮川仁平，美山優，小山雄一，中川徹，本間之夫，深山正久．尿管鏡下生検検体における EZH2 および p53 免疫染色の有用性．第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017 年．

6．研究組織

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。