

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09170

研究課題名(和文)腎癌幹細胞に癌周囲微小環境変化が与える影響の解析：新たな治療戦略の開発を目指して

研究課題名(英文)analysis of the effect of changes in the microenvironment around cancer on renal cancer stem cells: development of new treatment strategies

研究代表者

大庭 康司郎 (Ohba, Kojiro)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：20593825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：まず腎癌微小環境における、組織学的特徴と癌の悪性度の関係を検討したところ、NK細胞、マクロファージ、mast cellが腎癌の悪性度と関連していた。さらに腎癌治療中の患者の血中に発現を認めるケモカインとして、TNF-、TGF-、IL-6、マクロファージコロニー刺激因子(MSCF)の役割について検討したところ、TNF-は腫瘍増大に関与し、TGF-は食思不振や倦怠感といった治療に伴う有害事象の促進に関与することが示唆された。一方でMSCFの発現はIL-6を介した倦怠感の抑制に関与する事が示唆された。また、血清アルブミンおよび好中球/リンパ球比が治療効果予測因子となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎癌の微小環境において、免疫関連細胞が癌の悪性度と関与していることが示されたことにより、近年腎癌治療の主流となっている癌免疫療法の治療効果予測に有効な因子が浮かび上がった。これらの因子は、癌免疫療法による治療効果を予測できるバイオマーカーになりうる可能性がある。同様に有害事象の発現に関与する因子も示されたことから、癌治療を行う前にバイオマーカーの発現を確認することにより、多岐にわたる腎癌治療レジメンから、適切な治療法を選択する一助になりうる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：When we examined the relationship between histological features and malignant behavior in RCC microenvironment, NK cells, macrophages and mast cells were associated with malignant potential of RCC. Furthermore, when we investigated the roles of TNF-, TGF-, IL-6, and macrophage colony stimulating factor (MSCF) as chemokines expressed in the serum of patients treated with drug, it was suggested that TNF- was associated with tumor growth, and TGF- was involved in promoting treatment-related adverse events such as anorexia and malaise. On the other hand, it was suggested that the expression of MSCF is involved in the decrease of fatigue mediated by IL-6. It was also suggested that serum albumin and neutrophil /lymphocyte ratio may be predictors of therapeutic effect.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 癌免疫 TNF- TGF- マクロファージ ローヤルゼリー

1. 研究開始当初の背景

転移性腎細胞癌に対する分子標的治療では、一旦効果を認めても短期間で再増悪するケースが多い。一方、免疫チェックポイント阻害薬は、重篤な有害事象が起きる可能性があるものの、一度治療効果を認めると、その後も治療効果が継続する可能性が高いことが特徴である。しかし、治療効果がみられない患者が一定数みられるため、本治療の抵抗性や効果予測を可能にすることが課題である。さらに、治療抵抗性には腎癌幹細胞の存在やがん免疫環境が関与していると報告されているが、腎癌の治療効果や抵抗性とがん微小環境の関連性は十分には解明されていない。

2. 研究の目的

腎癌細胞における微小環境の果たす役割やその意義および相互関連性について網羅的な解析を行い、生命予後を含む臨床病理学的特徴との関連を明らかにすることを目的とした。さらに癌微小環境の変化に伴う治療効果や副作用の関連性をもとに、新たな治療戦略の構築に関わる有用な情報を提供することが最終的な目的である。

また、がん微小環境に強く影響を与えることが推測される因子や治療薬の投与方法と、腎癌患者の治療成績との関係性について検討し、予後予測や効果予測の可能性についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 腎癌細胞における腫瘍免疫関連因子の発現状況の確認

腎癌組織を用いて免疫組織化学染色を行った。抗体は、ki-67、CD31、CD57、CD68、抗 mast cell トリプターゼ抗体を用い、加えて TUNEL 法によるアポトーシスの検討も行った。

(2) 腎癌 cell line における、癌幹細胞の確認と微小環境関連因子の発現確認

まず癌幹細胞の確認のために、CD44 の発現を確認する。その後、CD44 発現の有無と、アポトーシスやがん微小環境因子 (MMPs、EPRs、COX-2、uPA) の発現を、培養条件を変えて網羅的に比較検討した。

(3) 腎癌細胞のヌードマウスへの移植

GFP を発現させた腎癌細胞および腎癌幹細胞を、ヌードマウスの腎皮膜下に接種し、マウスを、免疫チェックポイント阻害薬「投与あり群」と「なし群」に分け、腎癌の腫瘍サイズや浸潤の程度、転移数を比較した。

(4) 腎癌患者における分子標的治療の成績

転移性腎癌に対するアキシチニブ投与の効果について後方視的研究を行った。まず当施設を含む他施設共同研究を立ち上げ、データを収集し、治療成績を評価した。次に、予後予測因子の検索を行うために多変量解析を行った。さらに、高齢者における治療成績や CRP 値との関連性についても検討した。

(5) 微小環境と腎癌に対する治療薬の血中濃度

転移性腎癌に対するスニチニブ治療は有効であるが、有害事象による治療継続の困難性が課題であった。その1つの要因としてがん微小環境が薬物代謝に影響を与え血中濃度変動に関与することが推測されたため、内服方法を変えて血中濃度の測定を行ったところ、投与間隔を延長することにより血中濃度の適正化が可能になることを確認できた。このデータをもとに、従来の通常投与と隔日投与に分け治療成績を比較した。

(6) ローヤルゼリーによる転移性腎癌の微小環境への影響について

腎癌の微小環境に関する検索を行っていく中で、これらに様々な影響を与えるものとしてローヤルゼリーの作用に着目した。また、ローヤルゼリーの作用として抗炎症作用、抗酸化作用、免疫との関連性などが知られており、抗癌治療の副作用対策としての有効性があることを推測した。そこで、腎癌患者が薬物治療を行う際にローヤルゼリーの併用の有無で群分けし、腎癌治療の治療や副作用の評価を行った。また、各患者の血清を用いて、治療前後の TNF- α 、TGF- β 、IL-6、MSCF (マクロファージコロニー刺激因子) を測定し、前述の臨床成績との関連性を検討した。

4. 研究成果

(1) 腎癌における CD57 の発現は癌の悪性度と逆相関、一方 CD68、mast cell の発現は悪性度と相関関係を認めた。中でも CD68 細胞/CD57 細胞の比は、癌のグレード、ステージ、転移に加え、細胞増殖、アポトーシス、血管新生とも有意に関連しており、多変量解析により強力な予後予測因子となることが示唆された (HR 1.41, $p=0.031$)。(文献1)

(2) いくつかの因子の発現に関しては腎癌微小環境との関連性が希薄であった。さらに近年の報告および昨年までの我々の研究から、癌微小環境に関しては腫瘍免疫との関係性が重要と考え、他のマーカーの発現を調べている。また、我々の研究の中で、他癌腫において重要な働きが示唆された複数の因子について (Anticancer Res, 2020, p5567, Molecules 2020, p5252 ほか) 腎癌との関連性を調べているところであり、腎癌細胞の培養と並行して新たに各種抗体の購入手続きを行っている。

(3) 投与あり群の腎皮膜下腫瘍は投与なし群と比較し、腫瘍サイズは縮小傾向でがん浸潤の軽減傾向と転移数の減少傾向を認めたが、有意な差は認められなかった。この結果の要因として、免疫チェックポイント阻害薬の投与量や方法について再考中である。

(4) 転移性腎癌に対するアキシチニブの治療成績は、OS 中央値は 34 ヶ月、PFS 中央値は 13 ヶ月であった。また多変量解析を行ったところ、好中球リンパ球比、血清アルブミン値、初診時のステージ、治療開始時の転移巣の数の 4 因子が独立した予後予測因子であった (文献2)。さらに、この結果を元に、アルブミン値、CRP、LDH による新たなリスク分類も確立した (文献3)。また 80 歳以上の高齢者における治療成績も検討し、80 歳未満と比較して PFS、OS 共に有意差は見られず ($P=0.71$, $P=0.67$)、高齢者への有用性も確認できた (文献4)。

(5) 隔日投与では、有害事象の発生や治療中断症例が少なく (28.1% vs 56.3%, $p=0.042$)、無増悪期間および全生存期間は隔日投与の患者で有意に延長していた ($p<0.001$, $p=0.002$)。以上より、転移性腎癌に対するスニチニブの隔日投与は有効であることが示された。(文献5)

(6) ローヤルゼリーの投与が、抗癌治療に伴う副作用の一部に対し抑制効果がある事が示された(文献6)。また治療前後の各因子の濃度比を解析すると、ローヤルゼリーの内服により TNF- α 、TGF- β の前後比はそれぞれ有意に低下していた ($p=0.007$, $p=0.006$)。さらに、治療奏効別にこれらの変化を解析したところ、治療奏効が見られた患者においては治療前後の TNF- α が有意に低下していた ($p=0.002$)。一方で、治療に伴う食思不振、倦怠感が出現した患者においては TGF- β の前後比が有意に上昇していた ($p=0.03$, $p=0.03$)。このことから、ローヤルゼリーによる効果として、TNF- α の抑制による抗腫瘍効果、および TGF- β の抑制による食思不振、倦怠感の軽減が示唆された(文献7)。

また、同様に MSCF についても解析したところ、ローヤルゼリー投与早期(4週間以内)と12週後で上昇していた ($p=0.007$, $p<0.001$)。さらに、投与早期には食思不振や倦怠感の抑制と関連しており、12週後には IL-6 の発現を介して倦怠感の抑制に関連することが示された(文献8)。

研究成果の総括

腎癌組織を用いた研究では、マクロファージや mast cell の発現が、腎癌の悪性度に相関していることが確認され、がん微小環境とがん免疫との関与が示唆された。しかし、cell line を用いた研究ではがん微小環境として key となる因子の同定にまでは至らなかったが、ローヤルゼリーを用いた研究において、TNF- α が腫瘍進展と相関し、それがローヤルゼリーにより制御されることが示唆されていた。これらのことから、腎癌の微小環境において免疫担当細胞が癌進展や抑制の制御におけるバランスをとることで重要な役割を果たす可能性が示唆された。ただしその作用機序は複雑多岐にわたり、未知の因子が関与していることも予想されるため、今後、免疫を制御する他の因子やサイトカインについて、それらの発現、相互作用についても検討が必要と考える。

また、臨床研究の結果、転移性腎癌の予後予測因子として、好中球リンパ球比、血清アルブミン値、初診時のステージ、治療開始時の転移巣の数が挙げられ、治療選択の指標としての有用性が示唆された。さらに、腎癌治療において、治療薬の血中濃度を適正にすることが治療成績に反映していたことは、今後の薬物治療戦略に有益な情報であったと考える。近年、さらに新しい治療薬が使用可能となっており、今後は新たな薬剤に関しても検討を進めたい。

参考文献

- [1] Nakanishi H., Ohba K., et al. 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. 79 : 102-108, 2018.
- [2] Osawa T., Ohba K., et al. Oncological outcomes of a multicenter cohort treated with axitinib for metastatic renal cell carcinoma. Cancer Sci. 111(7) : 2460-2471, 2020.
- [3] Tamura K., Ohba K., et al. External validation of the albumin, C-reactive protein and lactate dehydrogenase model in patients with metastatic renal cell carcinoma

receiving second-line axitinib therapy in a Japanese multi-center cohort. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 51(5) : 810-818, 2021.

[4] Nakai Y., Ohba K., et al. Efficacy and safety of second-line axitinib in octogenarians with metastatic renal cell carcinoma. *J. Geriatr. Oncol.* 12(5) 2021.

[5] Ohba K., et al. Alternative Treatment with Every-Other-Day Dosing of Sunitinib for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Extended Follow-Up. *Urol. Int.* 19:1-7, 2022

[6] Araki K., Ohba K., et al. Oral Intake of Royal Jelly Has Protective Effects Against Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced Toxicity in Patients with Renal Cell Carcinoma: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. *Medicines (Basel)*. 6(1) : 2, 2018.

[7] Miyata Y., Ohba K., et al. Oral intake of royal jelly improves anti-cancer effects and suppresses adverse events of molecular targeted therapy by regulating TNF- and TGF- in renal cell carcinoma: A preliminary study based on a randomized double-blind clinical trial. *Mol. Clin. Oncol.* 13(4) : 29, 2020.

[8] Yuno T., Ohba K., et al. Mechanisms Underlying the Inhibition of Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced Anorexia and Fatigue by Royal Jelly in Renal Cell Carcinoma Patients and the Correlation between Macrophage Colony Stimulating Factor and Inflammatory Mediators. *Med. Sci. (Basel)*. 8(4) : 43, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Nakanishi H, Miyata Y, Mochizuki Y, Yasuda T, Nakamura Y, Araki K, Sagara Y, Matsuo T, Ohba K, Sakai H. | 4. 巻 79 |
| 2. 論文標題 Pathological significance and prognostic roles of densities of CD57+ cells, CD68+ cells, and mast cells, and their ratios in clear cell renal cell carcinoma. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Human pathology | 6. 最初と最後の頁 102-108 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.humpath.2018.05.007. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ohba K, Miyata Y, Mitsunari K, Matsuda T, Mukae Y, Nakamura Y, Matsuo T, Sakai H. | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Alternative Treatment with Every-Other-Day Dosing of Sunitinib for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Extended Follow-Up. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Urologia Internationalis | 6. 最初と最後の頁 1-7 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000520652. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Araki K, Miyata Y, Ohba K, Nakamura Y, Matsuo T, Mochizuki Y, Sakai H. | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Oral Intake of Royal Jelly Has Protective Effects Against Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced Toxicity in Patients with Renal Cell Carcinoma: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Medicines | 6. 最初と最後の頁 1-11 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/medicines6010002. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Miyata Yasuyoshi, Araki Kyohei, Ohba Kojiro, Matsuo Tomhiro, Nakamura Yuichiro, Yuno Tsutomu, Mukai Yuta, Otsubo Asato, Mitsunari Kensuke, Mochizuki Yasushi, Sakai Hideki | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Oral intake of royal jelly improves anti-cancer effects and suppresses adverse events of molecular targeted therapy by regulating TNF- and TGF- in renal cell carcinoma: A preliminary study based on a randomized double-blind clinical trial. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology | 6. 最初と最後の頁 29 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2020.2099 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 Yuno T, Miyata Y, Mukae Y, Otsubo A, Mitsunari K, Matsuo T, Ohba K, Sakai H. | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Mechanisms Underlying the Inhibition of Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced Anorexia and Fatigue by Royal Jelly in Renal Cell Carcinoma Patients and the Correlation between Macrophage Colony Stimulating Factor and Inflammatory Mediators. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Medical sciences | 6. 最初と最後の頁 43 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medsci8040043. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 大庭康司郎 |
| 2. 発表標題 ICI時代における当科のmRCC治療戦略 |
| 3. 学会等名 第72回西日本泌尿器科学会総会(招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大庭康司郎、迎祐太、中西裕美、光成健輔、松尾朋博、宮田康好、酒井英樹 |
| 2. 発表標題 転移性腎細胞がんに対するスニチニブ隔日投与の長期フォローアップ成績 |
| 3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kojiro Ohba, Yasuyoshi Miyata, Yuichiro Nakamura, Kyohei Araki, Takuji Yasuda, Yuji Sagara, Tomohiro Matuso, Yasushi Mochizuki, Hideki Sakai |
| 2. 発表標題 Intake of royal jelly prevents sunitinib-induced appetite loss in patients with renal cell carcinoma: Correlation with serum levels of transforming growth factor- and macrophage colony-stimulating factor. |
| 3. 学会等名 113th AUA annual meeting(国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|--|--|----|
| 研究 分担者 | 望月 保志 (Mochizuki Yasushi) (40404256) | 長崎大学・病院(医学系)・准教授 (17301) | |
| 研究 分担者 | 宮田 康好 (Miyata Yasuyoshi) (60380888) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|