

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：32653

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23925

研究課題名（和文）腎細胞がんにおける腫瘍関連免疫抑制性ミエロイド系細胞に着目した腫瘍微小環境の解析

研究課題名（英文）The analysis of the tumor microenvironment of renal cell carcinoma using flow cytometry

研究代表者

福田 洋典（Fukuda, Hironori）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：60848951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：腎細胞がんにおける腫瘍免疫微小環境をミエロイド系細胞に着目してフローサイトメトリーにて解析し、臨床病理学的な情報と統合的に解析を行った。その結果腎細胞がんの腫瘍免疫微小環境は、T細胞浸潤が多いクラスター、ミエロイド系細胞が多いクラスター、免疫細胞の浸潤が乏しいクラスターの3群に分かれることが判明した。これらの免疫細胞種のデータと治療効果及び予後データとの相関性の解析は観察期間が足りず今回は報告することができなかったが、今後十分な観察期間を経たのちに行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討にて、腎細胞がんは免疫学的に上記3つのクラスターに分かれることが判明し、さらにクラスター内の組織型の内訳が異なることが示された。これはがん細胞の性質が腫瘍免疫微小環境の構築に影響していることを示唆しており、腎細胞がんによる腫瘍免疫微小環境構築の分子的理解の一助になると考えている。また腎細胞がんにおいて免疫チェックポイント阻害剤の効果を予測できるバイオマーカーは現在確立されていないが、今後全身治療の効果と相関するクラスター又は免疫細胞種を同定できれば、有望なバイオマーカーとして治療選択に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We broadly, including myeloid cells fraction, investigated the immune tumor microenvironment (TME) in renal cell carcinoma using flow cytometry and analyzed by combining the immune cells data and clinicopathological data. The TMEs of the renal cell carcinomas were divided into three clusters (Cluster 1: T cell enriched subtype, Cluster 2: Myeloid cell enriched subtype, Cluster 3: Immune cells poorly infiltrated subtype). We will analyze the association between the immune cells data and prognosis data when enough observation period is reached.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎細胞がん 腫瘍免疫微小環境 ミエロイド系細胞 フローサイトメトリー バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

腎細胞がんは、その罹患率が世界で男性では7位、女性では9位のがんであり、全がん中のその割合は男性では5%、女性では3%を占めている(CA Cancer J Clin. 2018;68(1):7-30.)。WHOの統計データでは、世界で年40万人が発症し、14万人が死亡する死因第13位のがんである(Eur Urol. 2019;75(1):74-84)。腎細胞がんの多くは初期のステージで発見され、外科的切除により根治が可能だが、初発時の約15%には転移が認められ、その場合には予後不良である(Int J Urol. 2019 doi: 10.1111/iju.13956.)。免疫チェックポイント阻害薬の抗PD-1抗体ニボルマブは、2016年に腎細胞がんを適応症として国内で承認され、2018年には抗CTLA-4抗体イピリムマブとの併用が承認され、将来的には分子標的薬との併用も保険適用となる見通しである(本報告書作成時はすでに保険適応済み)。しかし、これらの治療効果を予測するバイオマーカーは確立されていない。一般的に、腫瘍組織内に浸潤したリンパ球においてCD8+T細胞の割合が多い場合には予後良好であるとの報告が多い。しかし腎細胞がんでは、がん組織中に浸潤するCD8+T細胞が多い場合には予後不良との相反する報告があり、いまだその結論は出ていない。我々はこれまでの研究で、腫瘍内に浸潤したCD8+T細胞が抗腫瘍活性を有しているサブタイプと疲弊を起こしているサブタイプとがあり(Clin Cancer Res. 2015;21(13):3031-40, 2017;23(15):4416-4428)、このCD8+T細胞の疲弊にはmyeloid-derived suppressor cell (MDSC)やtumor-associated macrophage (TAM)といった免疫抑制能をもつミエロイド系細胞が関与する可能性を見出している。これらの細胞は、総称してtumor-associated myeloid cells (TAMC)と呼ばれており、担がん状態で正常な骨髄造血が障害されることで出現し、健康成人ではほとんど存在していない。またTAMCは非常に可塑性が高い不均一な細胞集団でもある(Cancer Microenviron. 2012;5(2):133-49, FEBS J. 2018;285(4):717-733)。しかしこのようなミエロイド系細胞も含めた上で腎細胞がんにおける腫瘍浸潤免疫細胞を解析し、臨床病理学的特徴との関連を報告したものはほとんど存在しない。

## 2. 研究の目的

当研究では、腎細胞がんにおける腫瘍浸潤免疫細胞を、ミエロイド系細胞も含めてフローサイトメトリーで解析し、臨床病理学的特徴との関連を解析する。

## 3. 研究の方法

手術で摘出された腎細胞がんのがん部から細胞を分離し、免疫細サブセットを解析できるマルチカラー・フローサイトメトリー (FCM)を用いた包括的解析を行う。免疫細胞の種類とその割合について同定し、クラスター解析によってサブタイプ分類を行う。これらの免疫細胞のプロファイルと臨床病理学的所見を統合して解析する。

## 4. 研究成果

### (1)腎細胞がんにおける腫瘍浸潤免疫細胞のフローサイトメトリーによる解析

手術で摘出された58症例の無治療の腎細胞がんの摘出検体をシングルセル化し、細胞保存液を用いて液体窒素に保存した。患者背景は、性別は男性が31例(53%)、女性が27例(47%)であった。臨床病期はstage1が30例(52%)、stage2が1例(2%)、stage3が8例(14%)、stage4が19例(32%)であった。病理組織学的診断は、clear cell carcinomaが47例(81%)、papillary renal cell carcinomaが6例(10%)、chromophobe renal cell carcinomaが2例(3%)、Xp11.2 translocation renal cell carcinomaが1例(2%)、Bellini ductが1例(2%)、unclassifiedが1例(2%)であった。Fuhrman gradeは、grade1が2例(3%)、grade2が21例(36%)、grade3が23例(40%)、grade4が11例(19%)、不明が1例(2%)であった。液体窒素に保存した細胞を起眠した後に、抗原の染色を行い、マルチカラーフローサイトメーターにて免疫細胞の解析を行った。生存細胞中の免疫細胞の割合を解析した。

### (2)腫瘍浸潤免疫細胞によるクラスタリング

(1)で解析した免疫細胞種のデータを用いてUnsupervised clusteringを行い、Immune phenotypeの分類を行うと3つのクラスターに分けることができた。Cluster1はT細胞浸潤を特徴とするクラスターで23例(40%)、Cluster2はT細胞浸潤に加えてCD14陽性細胞などのMyeloid系細胞の浸潤を特徴とするクラスターで14例(24%)、Cluster3は免疫細胞浸潤が少ないクラスターで21例(36%)であった。

### (3)Immune phenotypeの免疫学的特徴

Cluster1とCluster2はCluster3と比較して、免疫細胞を示すCD45陽性細胞(CD45+ cells/live cells)が増加していた(Cluster1:71.5%, Cluster2:68.9%, Cluster3:10.4%,  $P < 0.0001$ )。T細胞(T cells/live cells)は、Cluster1で多く、Cluster3で少なかった(Cluster1:46.4%, Cluster2:28.3%, Cluster3:3.2%,  $P < 0.0001$ )。CD8陽性T細胞(CD8+ T cells/live cells)も

同様の傾向であった(Cluster1:26.6%, Cluster2:9.4%, Cluster3:1.4%,  $P < 0.0001$ )。CD4 陽性 T 細胞(CD4+ T cells/live cells)は、Cluster1 と Cluster2 で多く、Cluster3 で少なかった(Cluster1:11.1%, Cluster2:12.1%, Cluster3:0.7%,  $P < 0.0001$ )。Natural killer T(NKT)細胞(NKT cells/live cells)も同様の傾向であった(Cluster1:3.3%, Cluster2:2.4%, Cluster3:0.4%,  $P < 0.0001$ )。CD14 陽性細胞(CD14+ cells/live cells)は、cluster2 で上昇していた(Cluster1:6.9%, Cluster2:16.7%, Cluster3:1.6%,  $P < 0.0001$ )。CD14 陽性 HLA-DR 陰性の Monocytic myeloid derived suppressor cells (M-MDSC)(M-MDSC/live cells)も cluster2 で上昇していた(Cluster1:0.2%, Cluster2:1.0%, Cluster3:0.04%,  $P < 0.0001$ )。CD56 陽性 CD16 陽性の major natural killer(major NK)細胞(major NK cells/live cells)は cluster2 で多かった(Cluster1:2.2%, Cluster2:4.4%, Cluster3:0.3%,  $P < 0.0001$ )。CD56 陽性 CD16 陰性の minor natural killer 細胞(minor NK)(minor NK/live cells)は cluster1 と cluster2 で多かった(Cluster1:1.2%, Cluster2:1.5%, Cluster3:0.1%,  $P = 0.0001$ )。CD19 陽性細胞(CD19+ cells/live cells)は、cluster1 と cluster2 で多かった(Cluster1:0.5%, Cluster2:0.6%, Cluster3:0.1%,  $P = 0.0022$ )。CD3 陰性 CD19 陰性 CD56 陰性 CD14 陰性 HLA-DR 陽性の細胞(CD3-CD19-CD56-CD14-HLA-DR+ cells/live cells)は cluster2 で多かった(Cluster1:0.9%, Cluster2:1.3%, Cluster3:0.4%,  $P = 0.0002$ )。これらの結果から、cluster1 は T 細胞浸潤が多いことが、cluster2 は Myeloid 系細胞の浸潤が多いことが、cluster3 は免疫細胞の浸潤が少ないことが特徴的であることが分かった。

### (3) Immune phenotype の臨床病理学的特徴

Immune phenotype と臨床病理学的特徴との関係を解析した。性別( $P = 0.61$ )、臨床病期( $P = 0.29$ )、Fuhrman grade( $P = 0.59$ )においては差を認めなかったが、組織型では clear cell renal cell carcinoma の割合が、cluster1 が最も多く、ついで cluster2、cluster3 の順であった(Cluster1:100%, Cluster2:86%, Cluster3:57%,  $P = 0.02$ )。Immune phenotype 及び免疫細胞種と予後との関係については、報告書作成時点では、観察期間が不十分なため記載せず。十分な観察期間が得られた時点で解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田洋典
2. 発表標題 腎細胞がんにおける腫瘍免疫微小環境のフローサイトメトリーによる解析
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------