

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09546

研究課題名(和文)腎細胞癌におけるエネルギー代謝異常とがん免疫回避機構の分子細胞学的な解析

研究課題名(英文)Molecular biological analysis of disorders of energy metabolism and mechanisms of Immune Escape in cancer in renal cell carcinoma

研究代表者

釜井 隆男(kamai, takao)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：80316562

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)：以下のことを報告しました。(1)腫瘍細胞におけるPD-L1の発現上昇とTILDの上昇は、組織学的悪性度、pTステージおよび末梢血好中球とリンパ球の比率の上昇と関連していた。腫瘍細胞におけるPD-L1の発現上昇、より高いTILDおよびPD-L1またはTILDのいずれかの発現上昇をともなうI型、III型、またはIV型腫瘍は、分化度および局所浸潤と正の相関を示した。(2)ヒトRCCにおけるSDHA遺伝子変異の役割を検討した。129例のヒトRCCにおけるSDHA/B/C/D遺伝子変異を検討した。SDHA遺伝子の1塩基変異(SNVs)が検出された。しかし、SDHB/C/D遺伝子変異は検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)腫瘍微小環境におけるPD-L1の発現とthe tumor-infiltrating lymphocyte density (TILD)がupper urinary tract urothelial carcinoma (UTUC)の進行に影響を与えることを示した。したがって、この癌のより効果的な治療戦略を開発するには、腫瘍微小環境の免疫学的特性を解明する重要性を明らかにした。(2)この研究では、SDH欠損腎細胞癌(RCC)においてはSDHA遺伝子の1塩基変異体(SNVs)が129例中11例に検出され、SDHB/C/D遺伝子変異は検出されないことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We reported (1) Elevated expression of PD-L1 by tumor cells and a higher TILD were associated with a worse histological grade, higher pT stage, and higher peripheral blood neutrophil-to-lymphocyte ratio. Elevated expression of PD-L1 by tumor cells, a higher TILD, and type I, III, or IV tumors with elevated expression of either PD-L1 or TILD showed a positive correlation with poorer differentiation and local invasion. (2) This study assessed the role of SDHA gene mutations in human RCC. Targeted next-generation sequencing and direct Sanger sequencing revealed single nucleotide variants (SNVs) of the SDHA gene with amino acid sequence variations in 11/129 tumors, while no SDHB/C/D gene mutations were found. Tumor cells with SNVs of the SDHA gene were characterized by eosinophilic cytoplasm and various patterns of proliferation.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 FH SDH HLRCC Keap1 Nrf2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞では、エネルギーの供給源が酸素からブドウ糖へと変移しており、aerobic glycolysis (Warburg 効果) を特徴とする代謝リプログラミングに注目が集まっている。腎細胞癌ではこの aerobic glycolysis が顕著に見られる。特に、1 番染色体の長腕 (1q43) に位置する FH 遺伝子の変異に起因する Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer (HLRCC) 関連腎癌では、Warburg 効果と Nrf2 の高発現が特徴的である。最近、同じく TCA 回路のメンバーである SDH 遺伝子の変異による SDH 欠失関連腎癌が 2013 International Society of Urological Pathology (ISUP) で報告され、WHO 分類でも記載された。このことは、ミトコンドリア内での細胞の生命活動のエネルギー源である TCA 回路のメンバーである FH や SDH の経路の異常と、抗酸化作用とエネルギー代謝に関係している Keap1-Nrf2 の経路の異常とが何がしかの関連性を持って、がんのエネルギー代謝異常に関与していることを示唆している。我々は、次世代シーケンスを用いての遺伝子異常と、メタボロミクスを用いての細胞の活動によって生じる特異的な分子を網羅的に解析することで、腎細胞癌におけるエネルギー代謝異常と免疫回避機構の関連性を分子レベルで検討することができると考えた。

2. 研究の目的

我々は、FH や SDH 遺伝子異常による Epigenetics 変化は、腎細胞癌のエネルギー代謝異常や免疫回避に深く関わっていると予想している。そこで、細胞の生命活動のエネルギー源である TCA 回路のメンバーである FH や SDH 経路と、抗酸化作用とエネルギー代謝に関係している Keap1-Nrf2 経路の遺伝子やタンパク質レベルにおいて、腎細胞癌が異常をきたしている場合に、免疫回避機構にどのような異常が認められるのかを、その臨床病理学的側面を分子レベルで検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 手術検体を用い、PCR-SSCP 法および direct sequencing 法により癌組織での FH・SDH 遺伝子および Nrf2・Keap1 遺伝子異常の検索や、qRT-PCR 法によるこれらの遺伝子の mRNA の半定量的解析を行う。さらに、免疫回避機構に関与している PD-L1・制御性 T 細胞 (Treg)・tumor-associated macrophages (TAMs) のタンパク質の発現レベルを検討する。これを基に、個々の患者で得られた FH・SDH 遺伝子および Nrf2・Keap1 遺伝子の異常と PD-L1・Treg・TAMs の発現レベルとの相関、
でのデータと、異型度、pT stage、リンパ節転移や遠隔転移の有無等の腫瘍因子との相関について検討した。

(2) 摘出した組織より QIAamp DNA mini kit を用いて DNA を抽出した。Invitrogen Qubit 4 Fluorometer を用い、抽出した DNA の濃度を正確に測定し、1ng の DNA を出発材料とし Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 を用いてライブラリーを作製した。テンプレート調製には Ion Chef システムを用い、Ion Gene Studio S5 system を使用し 遺伝子変異解析を行うことにより、精度の高い結果を得ることができた。変異検出は、得られた結果を Thermo Fisher Scientific 社が提供するクラウドサービスである Torrent Suite ソフトウェアまたは Ion Reporter ソフトウェアを用いて解析することにより、詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍細胞による PD-L1 の発現増加と TILD の増加は、組織学的悪性度、pT ステージおよび末梢血好中球とリンパ球の比率の増加と関連していた。腫瘍細胞による PD-L1 の発現増加、より高い TILD、および PD-L1 または TILD のいずれかの発現増加を伴う I 型、III 型、または IV 型腫瘍は、分化度および局所浸潤と正の相関を示した。これらの 1 つの変数は、単変量解析では無増悪生存期間と全生存期間の短縮と関連していたが、多変量解析では後者のみが独立した因子であった。PD-L1 発現が低く、TILD が低い II 型腫瘍を有する患者は、他の 3 つのグループよりも良好な生存率を示した。

(2) ヒト RCC における SDHA 遺伝子変異の役割を検討した。129 例のヒト RCC における SDHA/B/C/D 遺伝子変異を検討し、次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing, NGS) 法とサンガーシーケンシング法により、SDHA 遺伝子の一塩基変異体 (SNVs) が 129 症例中 11 例においてアミノ酸配列に変異を有することが明らかになった。しかし、SDHB/C/D 遺伝子変異は見つからなかった。SDHA 遺伝子の SNVs を有する腫瘍細胞は、好酸球性細胞質および様々な増殖パターンによって特徴付けられた。一方、同時に行っている免疫組織化学染色法および western blotting 法による検討では、SDHA 遺伝子の SNVs を有する 11 例の腫瘍は、変異のない 19 例の腫瘍と比較して、nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) のタンパク質発現が高かった。

(3) 摘出した腎細胞癌組織を用い、組織よりタンパクを抽出し、western blotting 法を用いてタンパクを検出した。腎細胞癌における FH・SDH および Nrf2・Keap1 タンパク発現量の半定量的解析を行い、腎細胞癌の発生と進行への関与機序の解明を行った。さらに、免疫回避機構に参与している PD-L1・Treg・TAMs のタンパク質の発現レベルを検討した。これを基に、個々の患者で得られた FH・SDH タンパクおよび Nrf2・Keap1 タンパクと PD-L1・Treg・TAMs の遺伝子発現レベルとの相関、
でのデータと、異型度、pT stage、リンパ節転移や遠隔転移の有無等の腫瘍因子との相関について検討した。

さらに、癌組織での FH・SDH および Nrf2・Keap1 遺伝子異常の検索、免疫回避機構に参与している PD-L1・制御性 T 細胞 (Treg)・tumor-associated macrophages (TAMs) の遺伝子異常および熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein, HSP) の遺伝子異常を検討した。作成した 44 種類の因子に対する 684amplicon の primer を使用し、腎癌症例 32 例と尿路上皮癌症例 32 例につき手術により摘出した組織を用い、DNA を精製し、NGS 法により解析を行った。その結果重大な遺伝子変異を起こす可能性がある終止コドンとなる変異およびフレームシフト変異が認められた。得られた解析結果を 8 グループに分け詳細に検討を行った。

SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, FH
KEAP1, NFE2L2 PBRM1, BAP-1, VHL AKT1, PTHRP, RET RhoA, RHOB, RHOC,
RHOG, ROCK1, ROCK2, ARHGDI, ARHGDI, ARHGDI, KRAS cAMP, CD4, CD8, PD-1, PD-L1(B7-H1), CTLA, B7-H4, CD39(ENTPD1), CD73(5'-NT,NTSE), ADORA2B, ADORA2A HIF1A,
HIF1B,HIF2A, HIF2B HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1, TRAP1, HSF1 検出された遺伝子変異に基づき、変異数を 0・1・2・3・5・6・9 の 5 群に分け検討した。また変異の種類についても検討しその結果重大な遺伝子変異を起こす可能性がある終止コドンとなる変異およびフレームシフト変異が認められた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nukui Akinori, Kamai Takao, Arai Kyoko, Kijima Toshiki, Kobayashi Minoru, Narimatsu Takahiro, Kambara Tsunehito, Yuki Hideo, Betsunoh Hironori, Abe Hideyuki, Fukabori Yoshitatsu, Yashi Masahiro, Yoshida Ken-ichiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Association of cancer progression with elevated expression of programmed cell death protein 1 ligand 1 by upper tract urothelial carcinoma and increased tumor-infiltrating lymphocyte density	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 689 ~ 702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02499-7	査読の有無 無
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 Kamai Takao, Kijima Toshiki, Tsuzuki Toyonori, Nukui Akinori, Abe Hideyuki, Arai Kyoko, Yoshida Ken-ichiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Increased expression of adenosine 2A receptors in metastatic renal cell carcinoma is associated with poorer response to anti-vascular endothelial growth factor agents and anti-PD-1/Anti-CTLA4 antibodies and shorter survival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 2009 ~ 2021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02843-x	査読の有無 無
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 Mizuno Tomoya, Kamai Takao, Tsuzuki Toyonori, Nishihara Daisaku, Kijima Toshiki, Arai Kyoko, Yoshida Ken-ichiro	4. 巻 71
2. 論文標題 Elevated expression of B7 homolog 4 is associated with disease progression in upper urinary tract urothelial carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 565 ~ 578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-021-03011-5	査読の有無 無
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 Kamai Takao, Higashi Satoru, Murakami Satoshi, Arai Kyoko, Namatame Takashi, Kijima Toshiki, Abe Hideyuki, Jamiyan Tsengelmaa, Ishida Kazuyuki, Shirataki Hiromichi, Yoshida Ken Ichiro	4. 巻 112
2. 論文標題 Single nucleotide variants of succinate dehydrogenase A gene in renal cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3375 ~ 3387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14977	査読の有無 無
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 Kamai Takao, Murakami Satoshi, Arai Kyoko, Nishihara Daisaku, Uematsu Toshitaka, Ishida Kazuyuki, Kijima Toshiki	4. 巻 22
2. 論文標題 Increased expression of Nrf2 and elevated glucose uptake in pheochromocytoma and paraganglioma with SDHB gene mutation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 2368 ~ 2377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-09415-5	査読の有無 無
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 Kamai Takao, Murakami Satoshi, Arai Kyoko, Ishida Kazuyuki, Kijima Toshiki	4. 巻 113
2. 論文標題 Association of Nrf2 expression and mutation with Weiss and Helsinki scores in adrenocortical carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2368 ~ 2377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15379	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西原 大策, 貫井 昭徳, 木島 敏樹, 釜井 隆男
2. 発表標題 尿路上皮癌に対するペムプロリズマブの治療効果予測バイオマーカーとしてのPD-L1および腫瘍組織浸潤リンパ球 (TIL)
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西原 大策, 岡崎 明仁, 淵澤 寛崇, 横山 愛, 坂本 和優, 鈴木 一生, 木島 敏樹, 別納 弘法, 深堀 能立, 安土 正裕, 釜井 隆男
2. 発表標題 尿路上皮癌に対するペムプロリズマブの治療効果予測バイオマーカーとしてのPD-L1および腫瘍組織浸潤リンパ球(TIL)
3. 学会等名 第48回獨協医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西原 大策, 木島 敏樹, 中村 岳, 植松 稔貴, 坂本 和優, 鈴木 一生, 武井 航平, 貫井 昭徳, 別納 弘法, 新井 京子, 安土 正裕, 釜井 隆男
2. 発表標題 上部尿路上皮癌における HHLA2 (B7-H7) 発現と臨床的/病理学的因子との関連
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西原 大策, 木島 敏樹, 新井 京子, 釜井 隆男
2. 発表標題 上部尿路上皮癌におけるPD-L1およびFAPの発現と臨床的/病理学的因子との関連.
3. 学会等名 第49回獨協医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西原大策、木島敏樹、貫井昭徳、新井京子、釜井隆男
2. 発表標題 上部尿路上皮癌におけるPD-L1およびFAPの発現と臨床的/病理学的因子との関連
3. 学会等名 第99回日本泌尿器科学会栃木地方会
4. 発表年 2022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
---------	---------