

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09398

研究課題名(和文)腎細胞がん微小環境におけるCD8陽性T細胞と癌線維芽細胞の相互作用の病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of interactions between CD8-positive T cells and cancer fibroblasts in the renal cell carcinoma microenvironment.

研究代表者

北野 弘之 (Kitano, Hiroyuki)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：60721933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌細胞株はMSCとの共培養で細胞増殖や遊走能が上昇した。ルシフェラーゼ、GFP発現ヒト腎癌細胞株Caki-1を用いた同所移植モデルマウスをコントロール群(C群)とMSCを尾静脈から注入したMSC群に振り分けた。MSC群で腫瘍量が増大した。摘出腫瘍の免疫染色からMSCは線維芽細胞に分化したことを確認した。Caki-1はMSCとの共培養では有意に細胞増殖と遊走能が増強された。またNesprin1の腎細胞癌における機能は不明瞭であり線維芽細胞との関連も考えて機能解析を施行した。Nesprin1陰性群でOS、CSS、PFSが短縮した。腎癌でのNesprin1欠失は浸潤能と遊走能の亢進に寄与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎細胞癌において癌線維芽細胞は骨髄由来のstem cellから分化する可能性を明らかにし、Nesprin1という分子がその発現により腎細胞癌の生存期間や非再発率を増加する事を明らかにした。そのため骨髄由来stem cellやNesprin1は腎細胞癌の治療標的となる可能性があると思われる。特にNesprin1は口腔がんや胃癌、肺がん、肝細胞癌、また新血管系疾患など癌だけではなく良性疾患においてもその機能が注目されており、癌治療だけではなく良性疾患での治療標的にもなる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Co-culture of renal cancer cell lines with MSCs increased cell proliferation and migration. The luciferase- and GFP-expressing human renal carcinoma cell line Caki-1 was used in an orthotopic transplantation model of mice, which were divided into a control group (group C) and an MSC group injected via the tail vein. Immunostaining of excised tumors confirmed that MSCs differentiated into fibroblasts, and Caki-1 significantly enhanced cell proliferation and migration when co-cultured with MSCs. Nesprin1-negative tumors had shorter OS, CSS, and PFS. Deletion of Nesprin1 in renal carcinoma contributes to increased invasive and migratory potential.

研究分野：腎細胞癌

キーワード：癌線維芽細胞 癌微小環境 Nesprin1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌微小環境は、癌細胞以外に、間質細胞と免疫細胞により構成されて、間質細胞と免疫細胞の局在により、癌は3つの phenotype に分類されている。しかし、腎細胞癌において、これら phenotype と癌の増殖・進展、予後との関連は報告されていない。

これまでに我々は腎細胞がんにおける癌微小環境について研究してきたが、腎細胞癌周囲に集簇する線維芽細胞が癌線維芽細胞であることを同定し、さらにそれらが PDGFR を発現していることを明らかにした。更に、PDGFR を介する事によりその機能が低下して、癌の進行は抑制されることを見出した。そのため、腎細胞癌の治療において当時は単剤のチロシキナーゼの投与が主流であった時期において、mTOR 阻害薬により癌細胞の増殖を抑制し、PDGFR を抑制する分子標的薬が癌微小環境に存在する癌線維芽細胞と腫瘍血管内皮細胞などの機能を低下して癌を縮小する事を発表した。

ただし、癌微小環境はマクロファージや T 細胞などの腫瘍免疫に関連する細胞も存在しており、我々が使用したヌードマウスはこのような免疫細胞が存在していない事が問題であった。そのため癌微小環境とはいえ限定的な治療効果としか論ずることができないので、腎細胞癌の腫瘍免疫の役割を明らかにする必要があると考えた。

これらを証明するために、これまで当科の研究室において作製してきた腎細胞癌同所移植モデルマウスを用いて癌線維芽細胞の分化から明らかにすることも必要であると考えた。

### 2. 研究の目的

私たちは、これまでに間質細胞の癌線維芽細胞(CAF)が癌の増殖に関与している事を明らかにしてきたが、間質細胞のなかで中心的役割を持つ CAF と免疫細胞である CD8 陽性 T 細胞との相互作用を検証する事により腎細胞癌における腫瘍免疫の役割を明らかにできると考えた。

主には CD8 陽性 T 細胞の浸潤に着目したヒト腎細胞がんの phenotype 分類、CD8 陽性 T 細胞と癌関連線維芽細胞が腎細胞癌に与える影響、腎細胞癌の同所移植モデルを用いた薬物療法の効果と治療効果予測因子を明らかにするため、まずは public data base を使用して腎細胞癌の進行に関わるその他の分子を同定する事にした。

### 3. 研究の方法

Cancer Genome Atlas(TCGA)を用いて、腎細胞癌と臨床的因子である年齢、性別、左右差、臨床病期、病理学的 T 因子、Furman grade に関係する蛋白質とコードする遺伝子を同定し、それらが腎細胞癌における腫瘍免疫に関連する遺伝子であるかを腎癌細胞株とヒト組織検体を用いて検証する。

これらは腎癌細胞株を用いてコードされる遺伝子をノックダウンして細胞増殖 assay、遊走能を見るための wound healing assay を施行する。

ヒト検体を用いて免疫染色を施行する。またそれら分子と CAF との相互作用については、GFP 発現ヒト腎癌細胞株 Caki-1 により作成した腎細胞癌同所移植モデルマウスを作製して腎細胞癌 phenotype を組織学的免疫染色で同定する。

### 4. 研究成果

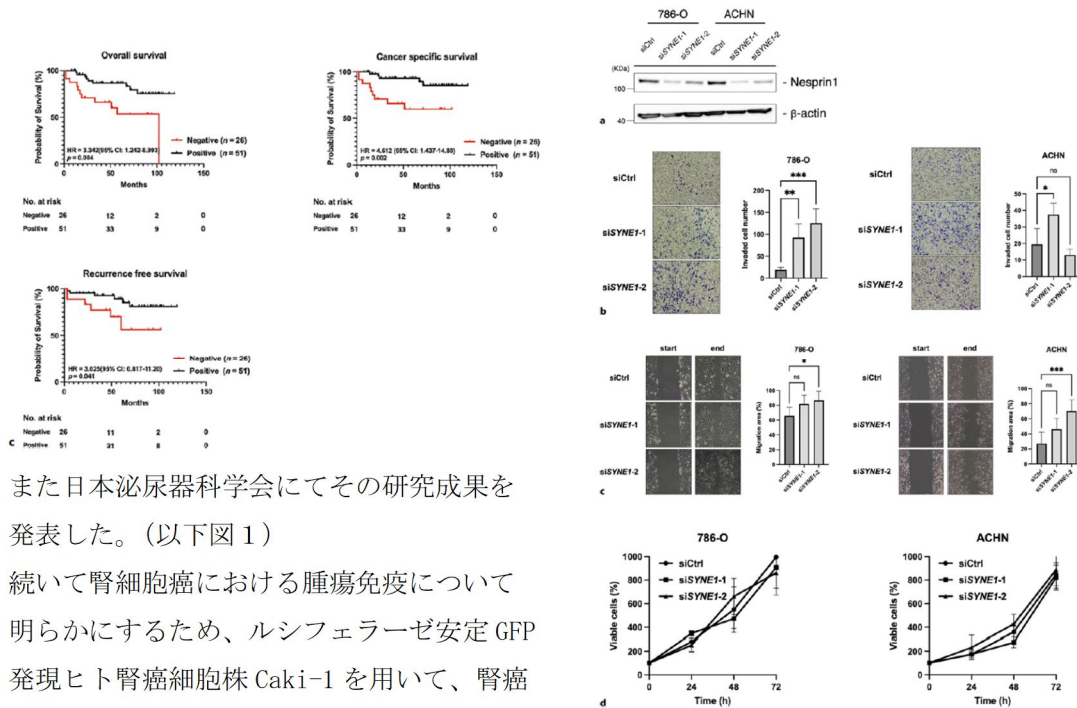
Cancer Genome Atlas (TCGA) において研究方法で述べた臨床因子から 451 人のデータサンプルを用いて、SYNE1 によってコードされる Nuclear envelope spectrin repeat protein 1 (Nesprin 1) の役割について着目した。

まずは広島大学病院腎泌尿器科で 2002 年から 2012 年の間に施行した腎摘除もしくは腎部分切除（開腹、腹腔鏡、ロボット支援手術は問わず）の薄切を用いて Nesprin1 の発現を確認した。77 例のうち 51 例 (66.2%) が発現し、26 例で陰性であった。発現の有無により全生存率と癌特異的生存率、非再発率を解析した。Nesprin1 が陽性であれば予後は良く、陰性である場合のそれリスク比はそれぞれ、2.449, 9.640, 2.354 であった。p 値は 0.007, 0.002, 0.051 であった（図 1）。

腎癌細胞株の 786-O と ACHN を用いて細胞増殖と遊走能を測定した。SYNE1 をノックダウンしてそれぞれの細胞増殖をみたが、有意に両細胞株でノックダウンした細胞群で増加した。Wound healing assay の結果も同様でありノックダウンした細胞群で有意に低下した。

これらの結果から Nesprin1 は腎癌細胞の進行に関与しており、これらは発現することで予後に影響することも明らかとなった。

この研究は Oncology に Nesprin1 deficiency is associated with poor prognosis of renal cell carcinoma and resistance to sunitinib treatment. という論文に投稿して受理された。



また日本泌尿器科学会にてその研究成果を発表した。（以下図 1）

続いて腎細胞癌における腫瘍免疫について明らかにするため、ルシフェラーゼ安定 GFP 発現ヒト腎癌細胞株 Caki-1 を用いて、腎癌細胞株の同所移植モデルマウスを作製し

た。これらのマウスはまずは癌線維芽細胞の発現を確認するために、ヌードマウスを使用した。

癌線維芽細胞の発現を確認するために MSC をマウスの尾静脈から投与した。

MSC はマウスの腎臓に形成した腎細胞癌を薄切し、PDGFR や SMA の発現を確認して、それらは癌線維芽細胞に分化していると確認した。

さらに Caki-1 は MSC の Condition Medium による培養では細胞増殖と遊走能に変化を認めなかったが、MSC との共培養では有意に細胞増殖と遊走能が増強された。

また第 8 回泌尿器腫瘍学会にて腎細胞癌における骨髄由来間葉系幹細胞の役割解明として発表した。

腎癌細胞の phenotype を病理組織学的に分類する為には phenotype に関連する分子をまずは明らかにする事が必要であると考えて Nesprin1 に着目した。これは癌微小環境の多くの組織や細胞

に発現しており、腎細胞癌だけではなく口腔がんや胃癌や肺がんm肝細胞癌などでもその機能が注目されている。腎細胞癌の癌微小環境における phenotype 分類についてその役割が少し解明できたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Fukushima Takafumi	4. 巻 5
2. 論文標題 Nesprin1 deficiency is associated with poor prognosis of renal cell carcinoma and resistance to sunitinib treatment.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000536539	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北野弘之
2. 発表標題 腎細胞癌における骨髄由来間葉系幹細胞の役割解明
3. 学会等名 第8回泌尿器腫瘍学会
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
研究分担者	北台 靖彦 (Kitadai Yasuhiko) (10304437)	県立広島大学・人間文化学部・教授  (25406)	
研究分担者	仙谷 和弘 (Sentani Kazuhiro) (30508164)	広島大学・医系科学研究科(医)・講師  (15401)	
研究分担者	弓削 亮 (Yuge Ryo) (70794791)	広島大学・病院(医)・講師  (15401)	

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