

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15392

研究課題名（和文）腎細胞癌におけるTGF- 発現の意義の解析

研究課題名（英文）The Significance of TGFB1 Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma

研究代表者

高原 大志（Takahara, Taishi）

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：50790317

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：TGFB1発現 が淡明細胞型腎細胞癌（ccRCC）の免疫微小環境への影響を調べるために、158例の腫瘍組織と12例の正常組織に関する組織マイクロアレイを作成し、TGFB1発現と臨床病理学的特徴との関連性を調査した。得られた結果は下記のとおり。1. 正常組織に比較して腫瘍組織のTGFB1シグナルは高かった。2. グレードが高い腫瘍では、TGFB1発現レベルが高かった。3. TGFB1高発現群はTGFB1低発現群よりも無再発生存期間が短かった。4. 転移巣は原発巣に比較して優位にTGFB1発現が高かった。5. 微小環境におけるリンパ組織形成を示す症例は、TGFB1発現が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、mRNAのin situ hybridizationを用いてccRCC組織におけるTGFB1発現の臨床病理学的意義を報告した最初の研究である。現在の進行期腎細胞癌の治療においては、PD-L1などを標的とした免疫チェックポイント療法が治療戦略の主体となっているが、今回我々の研究により、腫瘍のTGFB1発現が腫瘍の免疫環境と強い関連があることが示された。我々の研究データはTGF- を標的とした新たな治療戦略の開発を促進する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To determine whether TGFB1 affects the immune microenvironment of ccRCC, we investigated the association between TGFB1 expression and clinicopathological features using tissue microarray sample from 158 ccRCC and 12 normal kidney tissue. TGFB1 expression was assessed by RNAscope. TGFB1 was significantly upregulated in ccRCC tissue than in normal kidney tissues. Tumors with a high WHO/ISUP grade had higher TGFB1 expression levels. TGFB1-high group displayed significantly shorter relapse-free survival than TGFB1-low group. TGFB1 expression was significantly upregulated in patients who developed distant metastasis after surgery than in patients without metastasis. TGFB1 expression positively correlated with the number of PD-L1-positive cells in the tumor stroma. TGFB1 expression was associated with the formation of tertiary lymphoid structures. Our data provide new insights into the association between tumor biology and tumor microenvironment in ccRCC.

研究分野：外科病理 腫瘍免疫 腫瘍生物学

キーワード：腎癌 TGF- 腫瘍微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌は世界的にみて、死亡原因の16位を占める悪性腫瘍である。限局期の腎細胞癌の多くは手術により完治が見込めるが、約3割の患者は再発・転移をきたす。また、腎細胞癌全体の約3割は初発時から転移を有する。これらの進行期となった患者は Vascular endothelial growth factor (VEGF) 阻害剤や mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤によって治療されてきたが、これらの患者は予後不良であり、最終的に死の転帰をたどる。近年、免疫チェックポイント阻害剤により、進行期腎細胞癌の予後が改善されることが報告されており、臨床応用が始まっているが、いまだその効果は限定的である。免疫チェックポイント阻害剤は、エフェクターT細胞を抑制する経路である、PD-1/PD-L1経路を阻害し、エフェクターT細胞の活性を上昇させることにより腫瘍免疫を活性化させると考えられている。近年、膀胱癌において、免疫チェックポイント阻害剤を受けた症例の網羅的遺伝子発現解析により、Transforming growth factor beta (TGF- β) の発現が高い症例は免疫チェックポイント阻害剤に対して抵抗性であること、TGF- β 阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の併用により、抗腫瘍効果が高まることが示された。腎細胞癌における TGF- β 高発現は、予後不良因子であることがすでに示されているが、免疫環境と TGF- β の発現の関連を示した報告はなされていない。

2. 研究の目的

上記背景より、TGF- β は腎細胞癌の PD-L1 発現症例において高発現しており、それにより腫瘍免疫が抑制されているのではないかと、また、これらの免疫治療には TGF- β 阻害と免疫チェックポイント阻害剤の併用が有効なのではないかと推定される。本研究では、腎細胞癌組織における TGF- β の発現解析を行い、腎細胞癌における TGF- β の産生機序(どのような細胞が産生しているか)、組織標本におけるリンパ球浸潤の程度などの免疫環境の評価、腫瘍の組織型、予後といった、臨床病理学的因子との関連を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

2010年1月から2018年12月にかけて、愛知医科大学病院で淡明細胞型腎細胞癌と診断され、全腎摘除術または部分腎摘除術が施行された患者の試料を用いた。腎摘除術を受けた患者は86名、部分腎摘除術を受けた患者は72名であった。腎摘除術検体の、非腫瘍性腎組織を12サンプル用いて、腫瘍の対照群とした。すべての標本は10%中性ホルマリンで固定され、HE標本が通常通り作成された。2名の病理医により評価された検体は、最も炎症細胞浸潤が強い部位が選択され、その部位において直径5mmの組織マイクロアレイが作成された。組織マイクロアレイにおける *TGFB1* 発現は、メーカーのガイドラインに従って、RNAscope®アッセイを用いて評価された。*TGFB1* 発現は、ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用して細胞ごとの DAB シグナルの平均数として定量した。組織マイクロアレイサンプルでは、1部位あたり 0.25 mm^2 ($0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$) の領域をランダムに選択し、その部位ごとに *TGFB1* 信号ドットおよび核の数をそれぞれ計測し、細胞ごとの *TGFB1* シグナルの個数を算出した。明確な陽性コントロール信号 (*Hs-POLR2A*) が検出されなかったサンプルは解析から除外した(9検体)。

4. 研究成果

(1) 腫瘍のグレードと TGF- β 発現の関連

組織マイクロアレイと全断面における *TGFB1* 発現の再現性を調べるため、18件のサンプルでは組織マイクロアレイと、全切片での評価を併せて行った。これらの発現値は、有意に相関を示した ($r = 0.543$, $P = 0.012$)。腫瘍検体140例は、非腫瘍性腎組織の12検体に比較して、優位に高い *TGFB1* 発現を示した (図1, $P = 1.03 \times 10^{-9}$)。正常組織における *TGFB1* シグナルは1胞あたり0.1から1.7(中央値0.51)の範囲であったのに対し、腫瘍組織におけるそれは0.01から17.2(中央値1.61)の範囲であった。*TGFB1* シグナルドットは主に癌細胞に観察された。WHO/ISUPグレードが高い腫瘍は、より高い *TGFB1* 発現レベルを示した (図2, $P = 7.05 \times 10^{-3}$)。

(2) TGF- β 発現と予後の関連

TGF- β 発現の臨床的意義を評価するために、における *TGFB1* 高発現群(ここでは1細胞あたりの *TGFB1* シグナルの中央値1.61を超える)と *TGFB1* 低発現群(1細胞あたりの *TGFB1* シグナルが1.61以下)との間で臨床病理学的比較を行った。核グレードは *TGFB1* 高発現群で有意に高く、腫瘍壊死が高頻度で観察された。*TGFB1* 発現を評価した149人の患者のうち、140人のフォローアップデータが利用可能であった。患者の中央値のフォローアップ期間は59ヶ月(範囲3~123ヶ月)であった。陽性手術マージンを有する1人の患者を除外した後、139人の患者の予後を分析した。*TGFB1* 高発現群は *TGFB1* 低発現群よりも再発までの無病生存期間が有意に短かった (図3A, $P = 0.0251$)。 *TGFB1* 発現レベルは、術後に遠隔転移を発症

した患者(n=12)で転移のない患者(n=127)よりも有意に高かった(図3B, P=0.00167)。高 *TGFB1* 発現および病理学的 T ステージが pT1 以上であることは、単変量解析および多変量解析の両方で再発までの無病生存期間に対する有意な予後不良指標であった。

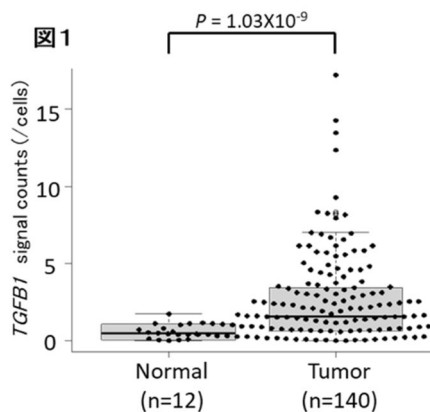
(3) 転移巣における TGF- 発現

全腎摘除術または部分腎摘除術後に遠隔転移を示した12人の患者のうち、転移病変の *TGFB1* 発現を評価するための5つの標本が利用可能であった。転移部位の *TGFB1* 発現レベルは原発部位よりも有意に高かった(図3C, P=0.0215)。

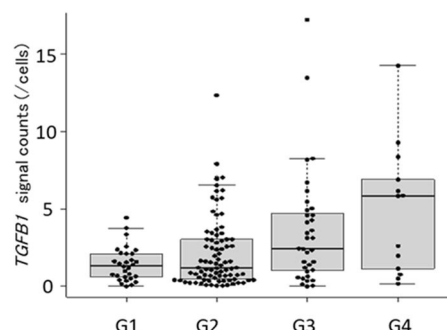
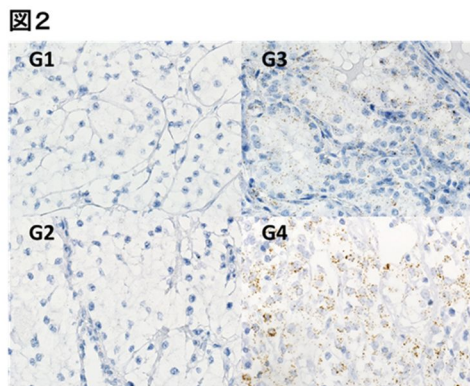
(4) TGF- 発現と腫瘍の微小環境

TGFB1 発現が特定の炎症細胞のタイプと関連しているかどうかを評価した。*TGFB1* 発現と腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞数との関連では明確な相関は観察されなかった(図4A, $r = -0.0147$, P=0.428)。一方で、*TGFB1* 発現と FOXP3 陽性 T 細胞数との間には弱い有意な正の相関が観察された(図4B, $r = 0.136$, P=0.045)。さらに、CD138 陽性形質細胞を数え、*TGFB1* 発現と有意に関連していることが判明した(図4C, P=0.015, $r = 0.173$)。さらに、腫瘍微小環境における PD-L1 陽性細胞の数は *TGFB1* 発現と関連しており(図4D, P=0.0206, $r = 0.163$) PD-L1 陽性腫瘍はより高い *TGFB1* 発現レベルを示した(P=0.016)。本研究では、PD-L1 発現は炎症細胞に限定され、腫瘍細胞は PD-L1 を発現していなかった。次に、*TGFB1* 発現とリンパ濾胞(tertiary lymphoid structure)の関連を評価した。微小環境におけるリンパ濾胞は最近、B 細胞が豊富な淡明細胞型腎細胞癌で見られると報告されている。PAX5 陽性 B 細胞集積として定義されるリンパ濾胞を有する淡明細胞型腎細胞癌は、有意に高い *TGFB1* 発現レベルを示した(図4E,F, P=0.0106)。

本研究は、TGF- の発現上昇が高い組織学的グレード、悪性度の高い臨床経過、遠隔転移と関連していることを示している。さらに、TGF- の発現上昇が高度の形質細胞浸潤、リンパ濾胞形成、および PD-L1 発現などの特定の微小環境の特徴と関連していることを示している。本研究では、*TGFB1* シグナルは主に腫瘍細胞に観察され、一部の炎症細胞や血管内皮にもわずかな *TGFB1* シグナルが観察された。これらの発見は、淡明細胞型腎細胞癌の発生母地である腎尿管細胞による TGF- 産生を模倣しているものと考えられる。しかし、TGF- 過剰発現のメカニズムを調査するためにはさらなる研究が必要である。

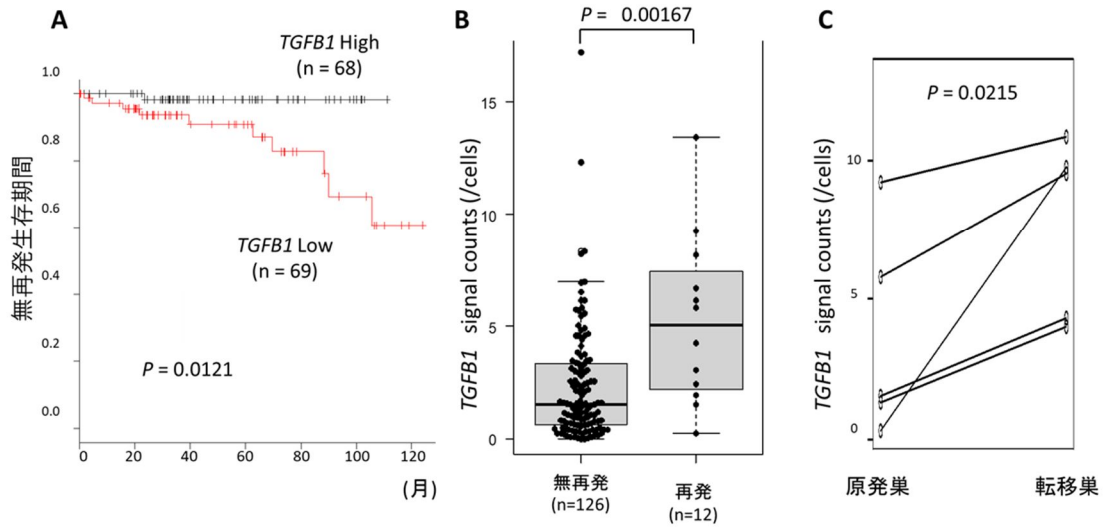


腫瘍と正常組織の *TGFB1* 発現の比較



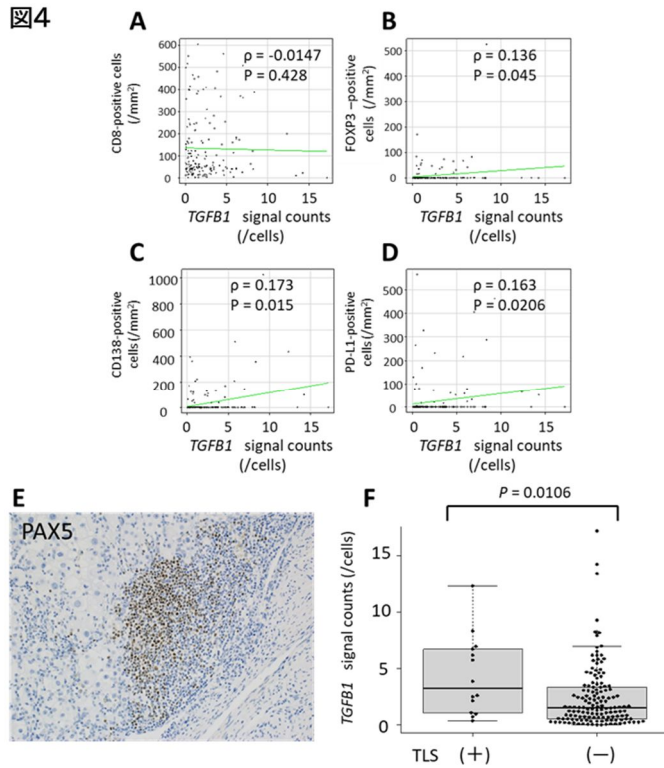
腫瘍のグレードと *TGFB1* 発現の関連

図3



(A) TGFβ1 発現と予後の関連、(B) 再発の有無による TGFβ1 発現の違い、(C) 原発巣と転移巣での TGFβ1 発現の違い

図4



(A-D) TGFβ1 発現と微小環境における CD8 陽性細胞、FOXP 陽性細胞 3、CD138 陽性細胞、PD-L1 陽性細胞のそれぞれの相関

(E, F) TGFβ1 発現と微小環境におけるリンパ濾胞 (TLS) 形成の関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Taishi Takahara	4. 巻 480
2. 論文標題 TGFβ1 mRNA expression is associated with poor prognosis and specific features of inflammation in ccRCC	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virchows Archive	6. 最初と最後の頁 635-643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-021-03256-6	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 Takahara Taishi, Tsuyuki Takuji, Satou Akira, Wada Eriko, Sakurai Kaneko, Ueda Ryuzo, Tsuzuki Toyonori	4. 巻 480
2. 論文標題 TGFβ1 mRNA expression is associated with poor prognosis and specific features of inflammation in ccRCC	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 635 ~ 643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-021-03256-6	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0件

〔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
---------	---------