

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20076

研究課題名(和文)免疫寛容離脱を目的とした腎癌治療における脾臓摘除の可能性

研究課題名(英文) Splenectomy for renal cell carcinoma to restore immuno activity

研究代表者

野原 隆弘 (Nohara, Takahiro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：20733372

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)：腫瘍随伴性マクロファージは腎細胞癌細胞との相互作用によりサイトカインシグナルを活性化し、そのシグナルがさらに腫瘍随伴性マクロファージ自体の活性化と骨髄由来サプレッサー細胞の活性化をもたらす可能性が示唆された。進行腎細胞癌患者の血中制御性T細胞数は比較的多かったが、症例毎のばらつきが多いことが明らかになった。骨髄由来サプレッサー細胞も進行癌患者では末梢血中で増加する可能性が示唆された。分子標的薬は骨髄由来サプレッサー細胞の作用を減弱することによる抗腫瘍効果が報告されているが、骨髄由来サプレッサー細胞がすでに分子標的薬で抑制されたあとにIL-2療法を行っても意義が少ないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tumor-associated macrophages activated cytokine signaling through the interaction with renal cell cancer cells, and then this signaling activated tumor-associated macrophages themselves resulting in myeloid derived suppressor cells. The number of regulatory T cells in blood of advanced kidney cancer patients is relatively high and the number of myeloid derived suppressor cells might increase in blood of advanced kidney cancer patients, too. As molecular targeting agents can suppress the effect of myeloid derived suppressor cells, it may be better to use IL-2 prior to molecular targeting agents.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：腎細胞癌 ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 転移性腎細胞癌に対する薬物療法では現在分子標的療法が主流である。本邦では6種類の分子標的薬が保険適応となっており、転移性腎細胞癌の予後は改善しつつある。分子標的薬は、主に腫瘍の血管新生を阻害することによって腫瘍縮小効果をもたらす薬剤である。いずれの薬剤も一定の効果はあるものの奏効期間が限られており、満足のいく予後の改善は得られていないのが現状である。新たな機序による治療法の開発が求められている。

(2) 多発転移を有する巨大な左腎細胞癌患者に対し、脾臓の摘出を伴う左腎摘除術を行ったところ、腎細胞癌の中でも最も予後が不良とされている肉腫様成分を50%以上含む腎細胞癌であったにもかかわらず、長期生存した症例が報告されている¹。免疫細胞を豊富に含む脾臓を摘出したことが予後に影響を与えている可能性について、文献的な考察を行い、着目したのが骨髄由来サプレッサー細胞の癌進展促進作用である。骨髄由来サプレッサー細胞は、骨髄由来の機能的に多様性をもった細胞集団であり、ほとんどすべての担癌患者や、癌を有する実験用マウスでその発現が亢進している²。骨髄由来サプレッサー細胞は、抗腫瘍免疫の担い手であるCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、NK細胞、NKT細胞の作用を阻害し、主な抗原提示細胞である樹状細胞の成熟をブロックすることにより、腫瘍の増殖を助長すると報告されている。また、担癌状態にある患者ならびに実験用マウスにおいて、骨髄由来サプレッサー細胞の発現亢進は骨髄や血液のみならず、脾臓においても顕著に認められると報告されている。骨髄由来サプレッサー細胞の活性化には腫瘍随伴性マクロファージとの相互作用が極めて重要であることが報告されている³。腎細胞癌はもともとIL-2やIFNなどの免疫賦活を促す薬剤が抗腫瘍効果を発揮することが報告されているユニークな癌であり、他の悪性腫瘍と比較し免疫賦活化は腎細胞癌に対しては有効な治療法であると考えられる。実際IL-2によって骨髄由来サプレッサー細胞が抑制されると報告されている⁴。また、免疫療法や分子標的薬は、直接的な抗腫瘍効果のみならず、腫瘍随伴性マクロファージや骨髄由来サプレッサー細胞の作用を減弱することによる間接的な抗腫瘍効果を発揮するという報告も散見される^{5,6}。以上のことから、腫瘍随伴性マクロファージと骨髄由来サプレッサー細胞による抗腫瘍免疫の抑制が腎細胞癌の活性化に大きく寄与していると考えた。しかし、腎細胞癌の治療手段として、臨床的にこれらの研究成果が応用されたという報告は未だない。

2. 研究の目的

(1) 腫瘍随伴性マクロファージはM2タイプの

マクロファージとして分類されるが、通常のM1タイプのマクロファージからM2への分化によって近傍の腎細胞癌細胞がどのような影響を受けるか(主に転移能の変化)を明らかにする。

(2) 進行腎細胞癌患者の血液サンプルを用い、血中の骨髄由来サプレッサー細胞数ならびに骨髄由来サプレッサー細胞によって活性化される免疫抑制系の細胞である制御性T細胞数をカウントし、免疫寛容状態を定量的に評価する。

(3) 腎摘除術と同時に脾臓を摘出した進行腎細胞癌の症例と、IL-2点滴療法を行った症例を後ろ向きに解析し、その背景因子(病理学的事項も含む)と各種予後の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト腎癌細胞株ACHNおよびCaki-1、ヒト単球細胞株THP-1およびU937を用いてin vitroの実験を行う。ACHNおよびCaki-1とTHP-1およびU937の共培養を行い、腎細胞癌細胞の遊走能の変化を調べる。遊走能試験は、24-well transwell plate (BD Biosciences)を使用する。また、THP-1およびU937についてはphorbol myristate acetate処理するなどして、成熟マクロファージに類似した性質を持つU937M/THP-1Mを作製し、これらとの共培養を行う。さらにU937M/THP-1Mは腎細胞癌細胞の培養上清を用いて培養し、M2タイプ、すなわち腫瘍随伴性マクロファージへと分化させ、ACHNおよびCaki-1に対する影響が変化するかどうか検討する。共培養によって培養上清へ大量に分泌されるケモカインに対する受容体がACHNおよびCaki-1に発現していることをフローサイトメトリーにて行った。

(2) 金沢大学医学倫理審査委員会の所定の手続きを行い、承認を得た上で、進行腎細胞癌患者の血液を採取し、血中の骨髄由来サプレッサー細胞数ならびに制御性T細胞数を測定した。

(3) 金沢大学医学倫理審査委員会の所定の手続きを行い、承認を得た上で、進行腎細胞癌に対しIL-2点滴療法を行った症例を後ろ向きに集積・解析し、その背景因子と各種予後の関係を明らかにした上で文献的考察を行った。

4. 研究成果

(1) ACHNとCaki-1はTHP-1およびU937と共培養すると24時間後、48時間後ともに有意に遊走能が亢進した。THP-1をphorbol myristate acetate処理した場合(THP-1M)のACHNの遊走能へ与える影響は、THP-1とほとんど変わらなかった。しかし、THP-1MをACHN

の培養上清でしばらく培養したもの、すなわち M2 タイプに分化させたものと腎細胞癌細胞を培養すると、強力に ACHN の遊走能が亢進した。前立腺癌細胞ではこれらの M2 タイプによる癌細胞の遊走能亢進はケモカイン CCL2 の過剰分泌によるものであることがわかっているため、腎細胞癌細胞におけるその受容体 CCR2 の発現をフローサイトメトリーにて調べた。ACHN および Caki-1、両方とも表面に CCR2 が発現していた。非常に興味深いことに、前立腺癌細胞では CCL2-CCR2 シグナルの下流とされる CCL22 の受容体 CCR4 の発現も認められた。これらの結果から、腫瘍随伴性マクロファージは腎細胞癌細胞との相互作用により CCL2 をはじめとするサイトカインシグナルが活性化され、そのシグナルがさらに腫瘍随伴性マクロファージ自体の活性化と骨髄由来サプレッサー細胞の活性化をもたらす可能性が示唆された。

(2) 進行腎細胞癌患者の全血から赤血球等を除去したのち、表面抗原 CD4 陽性 CD25 陽性で定義した制御性 T 細胞をフローサイトメトリーにてカウントした。6 症例での検討ではリンパ球分画のうち 5-33% が制御性 T 細胞であったが、非常にばらつきが大きかった。表面抗原 CD11b 陽性 CD33 陽性で定義した骨髄由来サプレッサー細胞は 1 症例でのみ解析を行うことができたが骨髄由来細胞の 9% を占めており、進行癌患者では末梢血中で増加する可能性が示唆された。

(3) 進行腎細胞癌に対して IL-2 点滴療法を行った 37 症例について後ろ向きに検討した。このうち 33 症例が淡明細胞癌であった。年齢、性別、パフォーマンスステータス、腎摘除術の有無、腎細胞癌のサブタイプ、MSKCC リスク分類、全身治療としての IL-2 の順序(サイトカイン療法として最初または 2 番目かそれ以後か)について、無増悪生存期間に寄与する因子であるかどうかを解析した。唯一、全身治療としての IL-2 の順序が最初または 2 番目であることが有意に無増悪生存期間を延長する因子であった(図 1)。

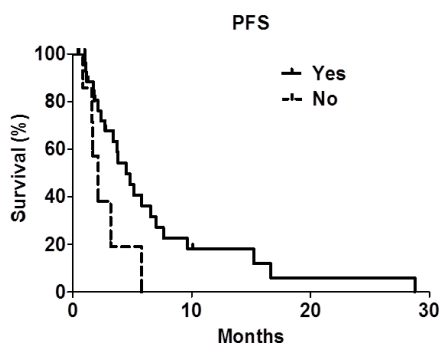


図 1

「Yes」は全身治療としての IL-2 点滴療法の順序が最初または 2 番目であった症例

分子標的薬は、直接的な抗腫瘍効果のみならず、腫瘍随伴性マクロファージや骨髄由来サプレッサー細胞の作用を減弱することによる間接的な抗腫瘍効果を発揮することが報告されているが、骨髄由来サプレッサー細胞がすでに分子標的薬で抑制されたあとに IL-2 療法を行っても意義が少ないことが示唆された。

<引用文献>

Yaegashi H, Izumi K, Konaka H, Mizokami A, Namiki M. Long-term survival following multidisciplinary treatment of metastatic sarcomatoid renal cell carcinoma: a case report. *J Med Case Rep.* 2015;9:261.

Bunt SK, et al. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* 2007;67:10019-26.

Ugel S, et al. Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *J Clin Invest.* 2015;125:3365-76.

Weiss JM, et al. Regulatory T cells and myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment undergo Fas-dependent cell death during IL-2/ CD40 therapy. *J Immunol.* 2014;192:5821-9.

Yuan H, et al. Axitinib augments antitumor activity in renal cell carcinoma via STAT3-dependent reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation. *Biomed Pharmacother.* 2014 ;68:751-6.

Najjar YG, Finke JH. Clinical perspectives on targeting of myeloid derived suppressor cells in the treatment of cancer. *Front Oncol.* 2013;3:49.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Takezawa Y, Izumi K, Shimura Y, Maolake A, Natsagdorj A, Iijima M, Shigehara K, Nohara T, Narimoto K, Kadono Y, Kitagawa Y, Konaka H, Mizokami A. Treatment outcome of low-dose interleukin-2 therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2016;36:4961-4. <http://ar.iiarjournals.org/content/36/9/4961.long> 査読あり

[学会発表](計 2 件)

1. 転移性腎細胞癌患者に対する低用量イン

ターロイキン2 使用例の検討 武澤雄太、泉浩二、田谷正樹、野原隆弘、成本一隆、上野悟、角野佳史、北川育秀、小中弘之、溝上敦、並木幹夫 第449回日本泌尿器科学会北陸地方会、金沢、9月5日、2015.

2.Treatment of metastatic renal cell carcinoma with low-dose interleukin-2 武澤雄太、泉浩二、野原隆弘、成本一隆、上野悟、角野佳史、北川育秀、小中弘之、溝上敦、並木幹夫 第13回日本臨床腫瘍学会学術集会、札幌、7月18日、2015.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野原 隆弘 (NOHARA, Takahiro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：20733372