

令和元年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11013

研究課題名(和文)腎癌におけるマクロファージ関連分子に注目した抗癌剤耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analyzation of anticancer drug resistance mechanism focusing on macrophage related molecules in renal cancer

研究代表者

元島 崇信 (Motoshima, Takaonobu)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：60726355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：TIMD4を発現している淡明型腎細胞癌では有意に予後が悪くTIMD4が分子標的薬への感受性に関与していることを明らかにした。CD163は、癌細胞内部に可溶性CD163を取り込む事で陽性になることが示唆された。乳頭型腎細胞癌組織を解析した結果、PD-L2の発現は認められなかった。PD-L1発現は臨床病理学的因子との相関性は見られなかったが、核異型度やTypeと関連する傾向にあった。原発巣と転移巣のTAMフェノタイプ解析からは、転移巣においてTotal TAMは増加していたがCD163やCD204の陽性率が低下しており、転移巣においてはM1-likeフェノタイプが増加している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎癌においてTAMあるいはTAM関連分子の重要性を明らかにした。予後予測因子やあらたな治療法開発につながるように今後も研究を続けていきたい。

研究成果の概要(英文)：We tested if TAM or TAM-rated molecules would be associate clinicopathological factors or cancer progression. PD-L1 expression in papillary RCC was detected, however, no significant correlation with clinicopathological factors were seen. This study was first report described the PD-L1 expression in papillary RCC. TIMD4 and CD163-positive cancer cells were observed in clear cell RCC, and positive cases showed poor clinical course. TIMD4 was suggested to be involved in chemo-resistance by means of in vitro study using RCC cell lines. TAM phenotype between primary RCC and metastatic RCC was tested, and M1-like TAMs were suggested to be increased in metastatic site.

研究分野：癌免疫

キーワード：腎細胞癌 癌免疫 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

TIMD4 (T cell immunoglobulin- and mucin domain-containing molecule-4) はマクロファージがアポトーシス細胞を取り込むために重要な役割を有する受容体であり、アポトーシス細胞表面のホスファチジルセリンを認識する。(1) マクロファージだけでなく樹状細胞にも(つまり抗原提示細胞全般に)発現しており、免疫系への関わりも指摘されていた。我々は、TIMD4 欠損マウスを用いた研究で、TIMD4 欠損により皮下移植した癌の増殖が有意に抑制され、その抑制効果は抗腫瘍免疫の活性化によるものであることを見いだした。更に、TIMD4 は抗原提示細胞におけるオートファジーを誘導することで、貪食した癌細胞の癌抗原を MHC-class I に提示するのを妨げるという新しいメカニズムを明らかにした。(2) 抗原提示細胞における TIMD4 を抑制することで抗腫瘍免疫の誘導が期待できることから、TIMD4 阻害剤の開発にも現在取り組んでいる。私たちは、以前からマクロファージに注目し、ヒトの病理検体を用いてがんの悪性度とマクロファージの浸潤・分化との関連性についての研究を行っている。これまでの研究で、腎癌をはじめ、グリオーマ、肝内胆管癌、悪性リンパ腫では、悪性度の高い症例の腫瘍組織中に多数のマクロファージ、特に抗炎症性の機能を有する亜群 (CD163 陽性 M2 マクロファージ) が浸潤していることを見出した。(3) 更に培養実験を行いがん細胞とマクロファージの細胞間相互作用を検討したところ、がん細胞がマクロファージの M2 亜群への分化を誘導し、がん細胞へさまざまな成長因子を供給していることが明らかとなった。腎細胞癌を用いた検討では、腎細胞癌細胞株とヒトマクロファージを共培養することで、癌細胞株での STAT3 が活性化し、癌幹細胞 (Cancer-Stem like cell, CSC) マーカーである CD44 の発現が増加することを突き止めた。一連の研究のなかで、ヒト腎細胞癌組織における TIMD4 の発現解析を行うために、市販のポリクローナル抗体を購入し、パラフィン切片を使用した免疫染色の系を立ち上げた。80 症例の腎細胞癌患者の切除癌検体を用いて免疫染色を行ったところ、マクロファージと思われる間質細胞にも陽性所見を認めたと驚いたことに一部の症例では癌細胞にも強い陽性所見を認めた。そこで、癌細胞に TIMD4 が発現している症例群と発現していない症例群に分けて、生存率の解析を行ったところ、TIMD4 強陽性群で有意に生存率が低いことが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

### **研究1：腎癌におけるマクロファージ関連分子に注目した抗癌剤耐性メカニズムの解明**

腎細胞癌は泌尿器系悪性腫瘍の中でも、最も頻度の高い腫瘍である。近年、新しい分子標的剤の登場とともに臨床予後は改善傾向にあるものの、再発症例や進行癌症例に対する治療効果は限局的である。これまで我々は、腎細胞癌の組織内のマクロファージの浸潤数が多い症例ほど予後が悪いことを明らかにしてきた。(4)一連の研究の中で、マクロファージにおいて重要な役割を果たしている TIMD4 が腎細胞癌にも発現しており、更に予後不良と密接に関与していることを見いだした。TIMD4 はマクロファージにおいて死細胞の貪食や抗原提示に関わる重要な分子であるが、腎細胞癌における役割に関する報告は無い。本研究では、腎細胞癌における TIMD4 の役割を解明するとともに、その阻害抗体の開発にも取り組み新たな標的分子となり得るかどうかを検討した。

### **研究2：腎細胞癌における CD163 陽性がん細胞の意義**

CD163 はマクロファージ特異的に発現すると言われているが、乳癌や大腸癌の癌細胞でも陽性(発現?)になる。乳癌や大腸癌では CD163 の発現ががん細胞に認められた症例は治療抵抗性で予後が悪いことが知られている。(5)今回、淡明型腎細胞癌における CD163 発現について免疫

染色を用いて検討し、臨床病理学的因子との相関性を検討した。

### 研究3：腎細胞癌の原発巣 VS 転移巣におけるマクロファージフェノタイプの解析

様々な癌腫において TAM とそのフェノタイプが解析されている。腎癌においても我々も含めて多数の TAM に関する研究が報告されている。(6)しかしながら、原発巣と転移巣における TAM フェノタイプを解析した研究はみられない。33 症例の原発巣および転移巣（主に肺）検体を用いて、マクロファージマーカーの免疫染色を行い細胞数を評価した。

### 研究4：腎乳頭細胞癌における PD-L1/2 発現

免疫チェックポイント阻害剤の登場により腎細胞癌の治療法も変化しつつある。抗 PD-1 あるいは抗 PD-L1 抗体は腎細胞癌に対して一定の効果を示している。腎細胞癌においては淡明型腎細胞癌の次に乳頭型腎細胞癌の頻度が高い。淡明型腎細胞癌における PD-L1/2 発現については複数の論文が発表されているが(7)、乳頭型腎細胞癌における PD-L1/2 発現については未だ論文報告がない。そこで、九州大学病院と熊本大学病院で切除された 102 例の病理検体を用いて免疫染色により PD-L1/2 の発現を検討した。

## 3. 研究の方法

### 研究1：腎癌におけるマクロファージ関連分子に注目した抗癌剤耐性メカニズムの解明

腎がん細胞株や腎癌病理検体を用いて TIMD4 の発現や臨床病理学的因子との相関性、その役割について検討した。

### 研究2：腎細胞癌における CD163 陽性がん細胞の意義

今回、淡明型腎細胞癌における CD163 発現を免疫染色を用いて検討し、臨床病理学的因子との相関性を検討した。また、腎細胞癌細胞株における CD163 の発現を PCR 等の手法を用いて検討した。

### 研究3：腎細胞癌の原発巣 VS 転移巣におけるマクロファージフェノタイプの解析

33 症例の原発巣および転移巣（主に肺）検体を用いて、マクロファージマーカーの免疫染色を行い細胞数を評価した。

### 研究4：腎乳頭細胞癌における PD-L1/2 発現

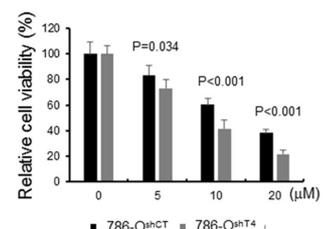
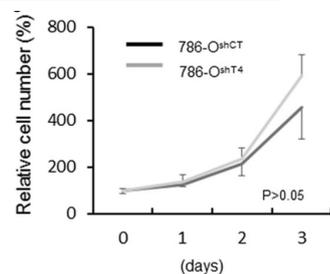
九州大学病院と熊本大学病院で切除された 102 例の病理検体を用いて免疫染色により PD-L1/2 の発現を検討した。

## 4. 研究成果

### 研究1：腎癌におけるマクロファージ関連分子に注目した抗癌剤耐性メカニズムの解明

TIMD4 ががん細胞で発現しているのかをデータベース（NCI-Cancer panel 60, GDS4296）で調べたところ、様々な癌腫でも腎癌のみで発現が認められた。そこで、腎細胞癌細胞株での発現を見たところ、786-O, ACHN で TIMD4 の強い発現が認められた。89 症例の淡明型腎細胞癌の検体を用いて免疫染色を施行したところ、35 症例で強い発現が認められた。TIMD4 高発現症例は有意に生存率や無再発生存率が低い傾向にあった。786-O 細胞における TIMD4 発現を解析したところ、細胞表面ではなく細胞内に発現が認められた。(図1) siRNA を用いて TIMD4 の発現を抑制したところ、増殖能に変化は見られなかったが(図2)、ソラフェニブに対する感受性が高くなっていった。詳細なメカニズムを明らかにすることは出来なかったが、TIMD4 が治療抵抗性に関与していることが示唆された。

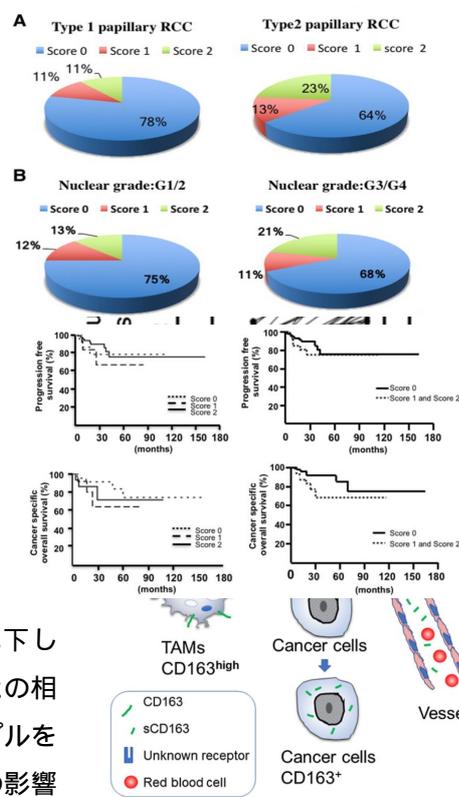
(上：図1、下：図2)



## 研究2：腎細胞癌におけるCD163

### の意義

今回、淡明型腎細胞癌における免疫染色を用いて検討し、臨床病の相関性を検討した。また、腎細胞癌におけるCD163の発現をPCR等の手法をた。103症例中、36症例でがん細胞発現を認めた。CD163の発現はマクロ較すると弱い強度であった。臨床病の相関性を検討した結果、CD163陽発生存率および全生存率が有意に低下しCD163陽性TAMと臨床病理学的因子との相なかった(分子標的薬登場前のサンプルをは有意差が出ていたことから、治療の影響た)がん細胞でCD163が陽性であった症例では、CD163陽性TAMの浸潤密度が高い傾向であった。また、同一症例内でも、CD163陽性エリアではCD163陽性TAMが陰性エリアよりも多い傾向であった。(図1)腎癌細胞でのCD163mRNA発現を検索したが、腎癌細胞株ではCD163mRNAの発現は見られなかった。CD163陽性腎癌細胞の存在は、予後と相関している可能性が考えられた。がん細胞株でCD163の発現が全く見られなかったことから、腎癌細胞が血清中の可溶性CD163を取り込んでいることが考えられた。(図2)(上:図1 下:図2)



## 陽性がん細胞

CD163 発現を理学的因子と癌細胞株にお用いて検討しに CD163 の発ファージと比理学的因子と性例では無再ていたが、関性はみられ用いた研究でと考えられ

## 研究3：腎細胞癌の原発巣 VS 転移巣におけるマクロファージフェノタイプの解析

Iba1 陽性 Total TAM は転移巣で多い傾向にあったが、CD204 陽性 TAM は転移巣で減少していた。CD163 陽性 TAM に関しては有意な差は見られなかった。しかしながら、Total TAM 中の CD163 陽性率あるいは CD204 陽性率は転移巣で低い傾向にあった。このことから、転移巣においては M1-like フェノタイプが増加している可能性が示唆された。(図1)

右: 図1

## 研究4：腎乳頭細胞癌におけるPD-L1/2発現

102 例中、29 例で、PD-L1 の発現を認めたが、PD-L2 の発現はみられなかった。Type2 での陽性率は 36%、Type1 での陽性率は 22%と Type2 で高い傾向にあったが、統計学的な有意差はみられなかった。特に強い陽性像を示した症例も Type2 での陽性率は 23%、Type1 での陽性率は 11%と Type2 で高い傾向にあったが、統計学的な有意差はみられなかった。PD-L1 の陽性率は核異型度が高い症例では 32%、低い症例では 26%と核異型度が高い症例で高い傾向にあったが、統計学的な有意差はみられなかった。(図1)PD-L1 発現と生存率あるいは無再発生存率には統計学的な相関性はみられなかった。(図2)

(上: 図1 下: 図2)

### <引用文献>

1. Miyanishi, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura & S. Nagata (2007) Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, 450, 435.
2. Baghdadi, M., A. Yoneda, T. Yamashina, H. Nagao, Y. Komohara, S. Nagai, H. Akiba, M. Foretz, H. Yoshiyama, I. Kinoshita, H. Dosaka-Akita, M. Takeya, B. Viollet, H. Yagita & M. Jinushi (2013) TIM-4 Glycoprotein-Mediated Degradation of Dying Tumor Cells by Autophagy Leads to Reduced Antigen Presentation and Increased Immune Tolerance. *Immunity*, 39, 1070-1081.
3. Komohara, Y., M. Jinushi & M. Takeya (2014) Clinical significance of macrophage

- heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci*, 105, 1-8.
4. Komohara, Y., H. Hasita, K. Ohnishi, Y. Fujiwara, S. Suzu, M. Eto & M. Takeya (2011) Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci*, 102, 1424-31.
  5. Shabo, I., H. Olsson, R. Elkarim, X.-F. Sun & J. Svanvik (2014) Macrophage Infiltration in Tumor Stroma is Related to Tumor Cell Expression of CD163 in Colorectal Cancer. *Cancer Microenvironment*, 7, 61-69.
  6. Mantovani, A., F. Marchesi, A. Malesci, L. Laghi & P. Allavena (2017) Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14, 399.
  7. Thompson, R. H., H. Dong & E. D. Kwon (2007) Implications of B7-H1 Expression in Clear Cell Carcinoma of the Kidney for Prognostication and Therapy. *Clinical Cancer Research*, 13, 709s.

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 8 件)

- Ma, C., H. Horlad, K. Ohnishi, T. Nakagawa, S. Yamada, S. Kitada, T. Motoshima, T. Kamba, T. Nakayama, N. Fujimoto, M. Takeya & Y. Komohara (2018) CD163-positive cancer cells are potentially associated with high malignant potential in clear cell renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol*, 51, 13-20.
- Motoshima, T., Komohara, H. Horlad, H. Tsukamoto, M. Fujita, Y. Saito, K. Tanoue, Y. Kasejima, Y. Sugiyama, Y. Kawano, Y. Nishimura, M. Takeya & M. Eto (2016) CXCL10 and CCL2 mRNA expression in monocytes is inversely correlated with the HLA-DR lower fraction of monocytes in patients with renal cell carcinoma. *Oncol Lett*, 11, 1911-1916.
- Iida, Y., N. Harashima, T. Motoshima, Y. Komohara, M. Eto & M. Harada (2017) Contrasting effects of cyclophosphamide on anti-CTL-associated protein 4 blockade therapy in two mouse tumor models. *Cancer Sci*, 108, 1974-1984.
- Motoshima, T., Y. Komohara, C. Ma, A. K. Dewi, H. Noguchi, S. Yamada, T. Nakayama, S. Kitada, Y. Kawano, W. Takahashi, M. Sugimoto, M. Takeya, N. Fujimoto, Y. Oda & M. Eto (2017) PD-L1 expression in papillary renal cell carcinoma. *BMC Urology*, 17, 8.
- Yano, H., T. Motoshima, C. Ma, C. Pan, S. Yamada, T. Nakayama, S. Kitada, N. Fujimoto, T. Kamba, M. Takeya & Y. Komohara (2017) The significance of TIMD4 expression in clear cell renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol*, 50, 220-226.
- Asano, T., K. Ohnishi, T. Shiota, T. Motoshima, Y. Sugiyama, J. Yatsuda, T. Kamba, K. Ishizaka & Y. Komohara (2018) CD169-positive sinus macrophages in the lymph nodes determine bladder cancer prognosis. *Cancer Sci*, 109, 1723-1730.
- Ma, C., H. Horlad, K. Ohnishi, T. Nakagawa, S. Yamada, S. Kitada, T. Motoshima, T. Kamba, T. Nakayama, N. Fujimoto, M. Takeya & Y. Komohara (2018) CD163-positive cancer cells are potentially associated with high malignant potential in clear cell renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol*, 51, 13-20.
- Motoshima, T., Y. Miura, N. Wakigami, N. Kusada, T. Takano, N. Inoshita, T. Okaneya, Y. Sugiyama, T. Kamba, M. Takeya & Y. Komohara (2018) Phenotypical change of tumor-associated macrophages in metastatic lesions of clear cell renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol*, 51, 57-63.

### 〔学会発表〕(計 6 件)

- 2016年10月第2回日本泌尿器腫瘍学会 PD-L1 and PD-L2 expression in papillary renal cell carcinoma. Takanobu Motoshima, Yoshihiro Komohara, Chaoya Ma, Arni Kusuma Dewi, Hirotsugu Noguchi, Sohsuke Yamada, Toshiyuki Nakayama, Shohei Kitada, Yoshiaki Kawano, Wataru Takahashi, Masaaki Sugimoto, Motohiro Takeya, Naohiro Fujimoto, Yoshinao Oda, Masatoshi Eto
- 2017年9月第76回日本癌学会 Characterization of chimeric TFE3 transcription factors found in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma. Motoshima Takanobu, Hasumi Hisashi, Ying Huang, Sato Yorifumi, Miyazato Paola, Kadomatsu Tsuyoshi, Yao Masahiro, Nagashima Yoji, Furuya Mitsuko, Oike Yuchi, Kamba Tomomi, Laura S Schmidt, W Marston Linehan, Baba Masaya
- 2017年10月日本癌治療学会 TFE-3染色で陽性と診断された腎癌3症例のレトロスペクティブな解析. 元島崇信, 馬場理也, 西澤秀和, 古谷充子, 加藤生真, 神波大己
- 2018年10月第56回日本癌治療学会 進行性腎癌に対するNivolumab(Opdivo)投与の初期

経験. 元島崇信、福島結美、村上英嗣、矢津田旬二、田上憲一郎、杉山豊、山口隆大、神波大己

2019年2月第8回日本泌尿器病理研究会 若年男性で精嚢に発生した明細胞癌の一例. 元島崇信、近浦慶太、矢津田旬二、安里嗣晴、三上芳喜、神波大己

2019年4月第107回日本泌尿器科学会総会 進行性腎細胞癌患者に対するオプジーボ治療の有効性と副作用発現の関連性についての検討. 元島崇信、福島結美、近浦慶太、矢津田旬二、村上洋嗣、山口隆大、田上憲一郎、神波大己

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：菰原 義弘

ローマ字氏名：KOMOHARA, yoshihiro

所属研究機関名：熊本大学

部局名：生命科学研究部細胞病理学分野

職名：准教授

研究者番号(8桁): 40449921