

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11122

研究課題名(和文)腎癌と膀胱癌における免疫抑制型好中球と抗腫瘍型好中球の分類法確立

研究課題名(英文) Establishment of separation method for immunosuppressive neutrophils and antitumor neutrophils in renal cancer and bladder cancer

研究代表者

武田 裕司 (Takeda, Yuji)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：90302299

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)：腎癌患者では、癌性の慢性炎症によりmyeloid-derived suppressor cells (MDSCs)と呼ばれる免疫抑制型好中球が出現する。一方、非筋層浸潤膀胱癌に対するBCG膀胱内注入療法は、強い炎症反応を誘導し、高い抗腫瘍効果を示す。本研究は、BCGによる炎症反応について検討し、抗腫瘍型好中球様細胞の指標を明らかにすることを試みた。その結果、BCG治療ではMDSCs指標の上昇は認められず、尿中好中球様細胞にHLA-IIとCXCL10の上昇が認められた。HLA-IIとCXCL10は、獲得免疫系の活性化を惹起することから、抗腫瘍型好中球様細胞の有用な指標になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、免疫抑制型好中球と抗腫瘍型好中球の指標を得ることが出来た。これは、がん治療の予後予測や適切な治療時期の判断に使用できる可能性がある。具体的には、免疫抑制型好中球が少ない時期を狙って、免疫チェックポイント阻害剤治療を開始する治療方法や、過剰な炎症により免疫抑制型好中球が増加してきた時期には、治療を中断し、がん免疫応答の回復を待つなど、様々ながん治療の最適化を実現できるかもしれない。また、BCGを用いて、体外および体内で『抗腫瘍型好中球』を補完・誘導する免疫治療法に発展できる可能性もある。これらが実現すれば、免疫治療を受ける患者の負担軽減や、医療費削減効果をもたらすと予想できる。

研究成果の概要(英文)：In renal cancer patients, immunosuppressive neutrophils called myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) appear due to cancerous chronic inflammation. On the other hand, intravesical BCG instillation therapy for non-muscle invasive bladder cancer induces strong inflammation and provides a strong anti-tumor immune response. In this study, we investigated the BCG-induced inflammatory response and tried to find the indicators of neutrophil-like cells associated with anti-tumor immune response. As a result, no increase in MDSCs was observed during the BCG treatment. While, the expression of HLA-II and CXCL10 were increased in neutrophil-like cells in urine. Since it is known that HLA-II and CXCL10 induce activation of the adaptive immune system, it was considered that they could be useful indicators of anti-tumor neutrophil-like cells.

研究分野：免疫学

キーワード：膀胱がん 炎症 BCG 好中球 抗腫瘍活性 MDSCs

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

好中球は生体内に最も多く存在する免疫細胞であり、細菌感染・ストレスなど、環境要因によりその数や機能が劇的に変動する。転移性腎細胞癌では、原発巣の腫瘍内好中球の存在は全生存率の独立した危険因子であることが報告されている(Donskov and von der Maase, 2006)。近年、Ochoa らにより、好中球様の形態を示す myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) の概念が提案され、慢性炎症時の『免疫抑制型好中球』による獲得免疫制御作用が再注目された(Zea et al., 2005)。

一方、非筋層浸潤性膀胱癌に対するウシ型弱毒結核菌ワクチン(BCG)の膀胱内投与は、7割を超える高い治癒率が報告されており、最も有効な癌免疫療法といっても過言ではない。これはBCGによって誘導される好中球が、直接、あるいはマクロファージや細胞障害性T細胞などを活性化することにより、高い抗腫瘍効果をもたらしていると考えられている(Brincks et al., 2013)。すなわち、BCG投与の膀胱癌治療は、MDSCsとは全く異なる、『抗腫瘍型好中球』を誘導すると考えられる。本研究開始当初、BCG治療時の好中球を、他の癌患者好中球と比較する研究は、ほとんど試みられていなかった。

本研究のアプローチは、我々が、ヒト好中球に特異的に発現している GPI-80 と命名した分子を同定・報告したに基づいている(Suzuki et al., 1999)。我々は、GPI-80発現が、コロニー刺激因子の違いで発現量が制御され、好中球機能との関連性を見いだしており(Takeda et al., 2003)、更に、転移性腎癌患者末梢血における多様な MDSCs の出現を GPI-80 の発現上昇と分散性上昇という指標で評価できることを報告した(Kato et al., 2019; Takeda et al., 2016)。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、

- (1)末梢血中および尿中の好中球 GPI-80 発現解析法を確立する。
  - (2) GPI-80 発現パターンを腎癌と膀胱癌検体にて比較する。
  - (3) BCG 治療奏効症例の GPI-80 発現パターンを明らかにする。
- の3点を目的とした。これにより、『免疫抑制型好中球』と『抗腫瘍型好中球』分離法の確立が可能になると考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 臨床検体の測定スケジュール

膀胱癌患者の尿中および末梢血中 GPI-80 発現測定を治療経過的に行った。測定のスケジュールは、治療開始前・治療開始後1週目から第6週目までのBCG投与開始直前に尿と末梢血を採取した。(図1)。さらに治療3ヶ月後にも尿、末梢血を採取し GPI-80 発現測定を行った。なお、本試験は、山形大学医学部倫理審査委員会に申請し、承認を得ている(承認番号 No.15)。

#### (2) 白血球の解析

ヘパリン採血した末梢血は、先行論文(Takeda et al., 2016)と同様に免疫染色し、フローサイトメトリー(FCM)による測定を行った。

尿は、50 mL 遠心管に入れ、遠心して細胞沈殿を得た後、リン酸緩衝溶液にて洗浄し、免疫染色を行った。その後、2%ホルマリン固定し、FCM 測定を行った。GPI-80 等の陽性率・平均蛍光強度(MFI, mean of fluorescence intensity) ・変動係数(CV, coefficient of variation)を FlowJo software ver.7.6.5 (BD Biosciences) を用いて解析した。CXCL10 の細胞内染色は、Cytotfix/Cytoperm (BD Bioscience) を用いて処理し、PE 標識抗ヒト CXCL10 抗体(clone, J034D6; BioLegend)を用いた。

#### (3) mRNA 発現網羅解析

尿中の滲出細胞数が上昇した患者3名より、末梢血と尿、それぞれから好中球様細胞を分離した。それぞれの好中球様細胞から、Trizol を用いて RNA を回収し、3D-gene (東レ、鎌倉テクノサイエンス)を用いて mRNA の網羅解析を行った。

#### (4) 統計解析

2群間比較は、Prism software ver.5 (GraphPad Software)を用い、unpaired Student's *t*-test にて行った(ns, no significant; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )。主成分分析は、EZR を用い、各データ散布図と、各層別の 50%集中楕円を合わせて表示した。

### 4. 研究成果

#### (1) BCG 治療時の末梢血

本研究では、21 症例が登録され、14 症例から測定可能な一連の BCG 治療過程の検体を得ることが出来た。

先行研究で、我々は、腎細胞癌患者の骨髄系細胞[CD16 強陽性(CD33<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup>)の好中球様細胞と CD33 強陽性(CD33<sup>hi</sup>)の単球様細胞]において、MDSCs の複合指標(CD16%, GPI-80 CV, LAP-

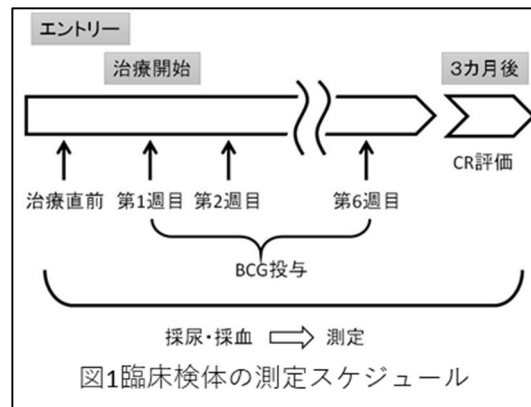
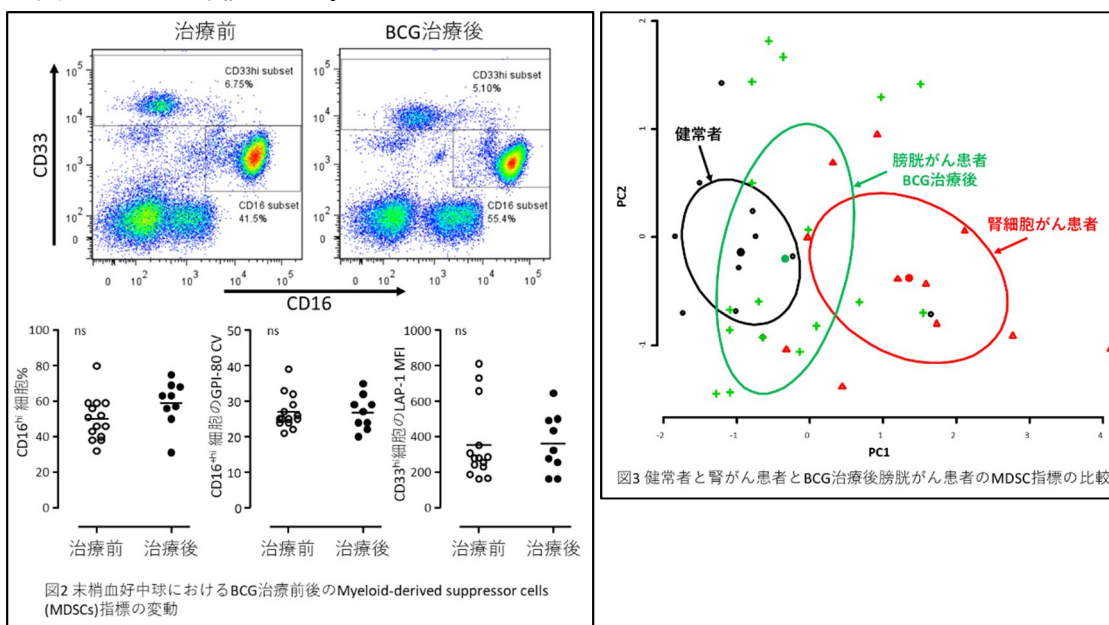


図1臨床検体の測定スケジュール

1 MFI)を確立している(Kato et al., 2019)。先行論文と同様の指標を用い、骨髄系細胞に着目して、BCG 治療前と治療後(治療 6 週後)の末梢血を比較した。その結果、BCG 治療後に骨髄系細胞における MDSCs 指標の上昇は認められなかった(図 2)。

この BCG 治療後の骨髄系細胞を、主成分分析にて、腎細胞癌患者と比較した。その結果、BCG 治療後の末梢血の骨髄系細胞は、健常者と腎細胞癌患者との中間に位置する分布を示した(図 2)。これらの結果から、BCG 治療は、全身性(末梢血)において、MDSCs を誘導する癌性炎症とは異なることを確認できた。

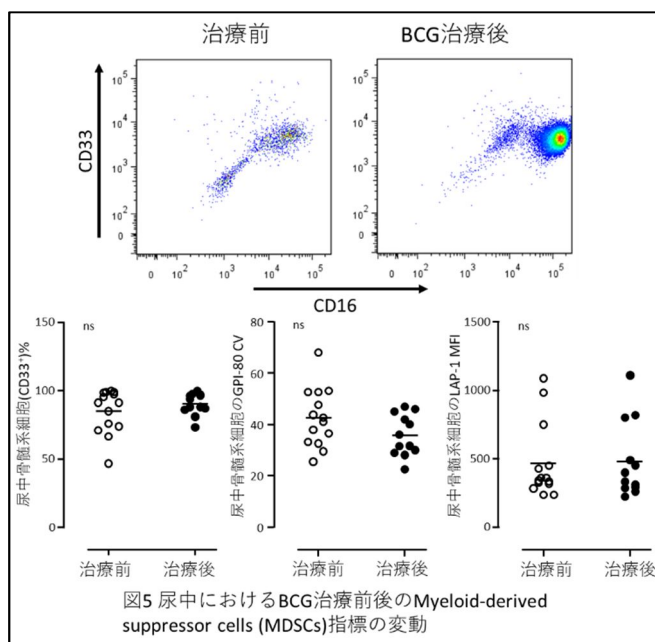
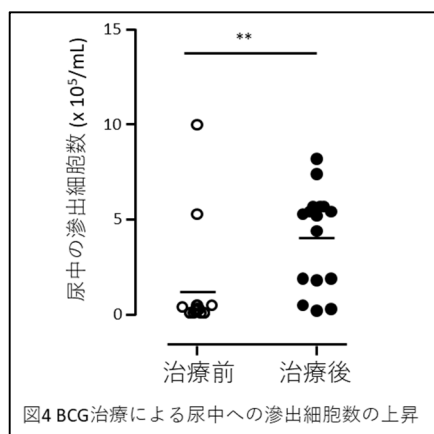


## (2)BCG による尿中の滲出細胞

治療開始前と BCG 治療開始後 5 回処置以前は、尿中の滲出細胞が極めて少ない献体もあったため、測定可能な検体について解析を行った。BCG 治療前と治療後(治療 6 週後)の尿中への滲出細胞数を測定したところ、BCG 治療後に滲出細胞が有意に増加していた(図 4)。

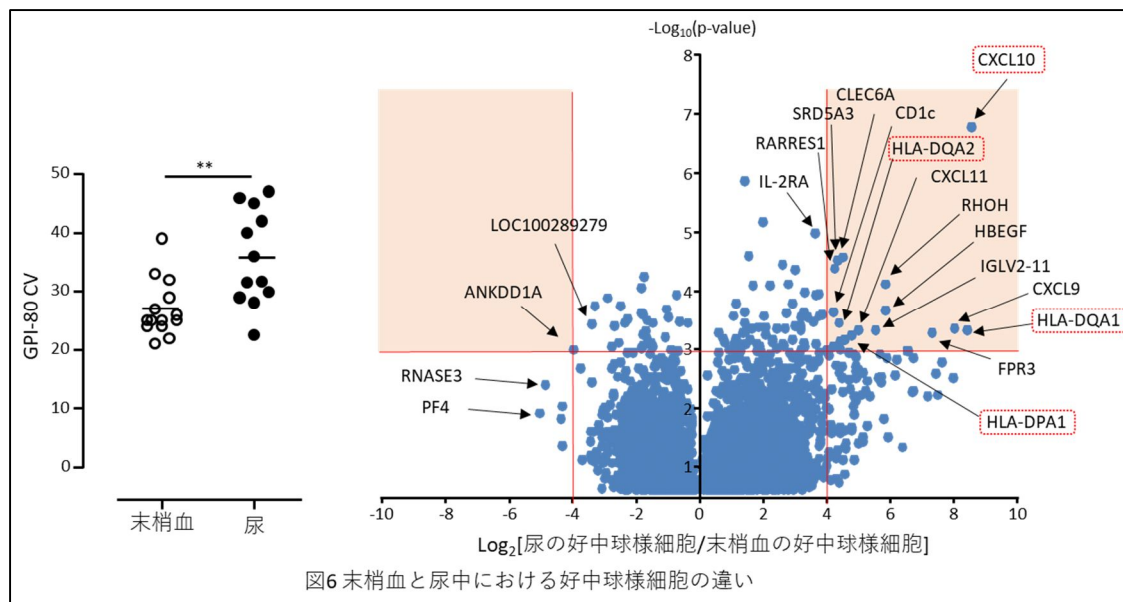
尿中の滲出細胞の 80% 以上が CD33<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup> 好中球様細胞であった(図 5)。その形態を確認したところ、やはり多くが好中球様の形態を示した(データ示さず)。この CD33<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup> 好中球様細胞の MDSCs 指標が、BCG 治療によって変動するか検討したが、末梢血と同様、MDSCs 指標の上昇は認められなかった(図 5)。このことから、膀胱内局所においても、MDSCs を誘導する癌性炎症とは異なることを確認できた。

末梢血と尿中の BCG 治療後の CD33<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup> 好中球様細胞を比較すると、尿中の好中球様細胞では、GPI-80 CV の上昇が有意に見られた(図 6, 左)。GPI-80 CV の上昇は、好中球分化の多様性が上昇していることを示唆する(Takeda et al., 2016)。このことから、尿中の CD33<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup> 好中球様細胞は、末梢血の CD33<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup> 好中球様細胞より、多様な好中球が混在していると考えられた。



### (3) BCG 誘導性の抗腫瘍型好中球

尿中に存在する好中球様細胞が、末梢血とは異なることを明らかにするため、末梢血と尿中の好中球様細胞の mRNA 発現を比較した。その結果、尿中の好中球様細胞では、複数の HLA class II (HLA-II) 遺伝子の mRNA が有意に上昇していた。また、IP-10 (CXCL10) の mRNA の上昇も認められた(図 6, 右, 赤破線囲み)。



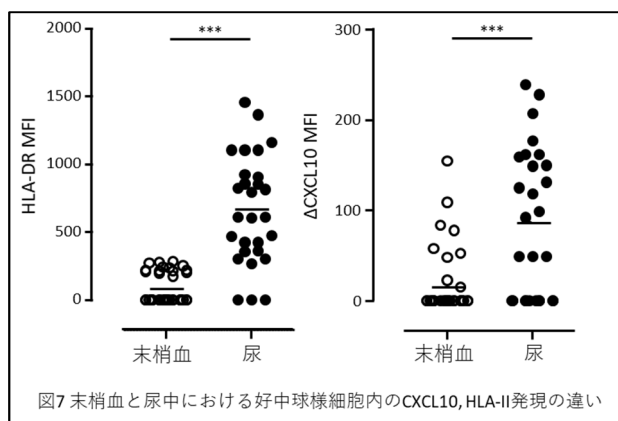
通常、HLA-II と CXCL10 は、好中球に発現していない。好中球は、赤血球を貪食すると HLA-II を発現することが報告されていることから(Meinderts et al., 2019)、HLA-II 発現は、膀胱内局所にて生じている可能性が考えられた。一方、BCG 治療時には、CXCL10 の尿中濃度が上昇することが知られているが、BCG 刺激を受けた好中球で CXCL10 は発現上昇しないという報告もある(Ashiru et al., 2019; Suttman et al., 2003)。

そこで、CD33<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup>好中球様細胞の HLA-II と CXCL10 の発現を細胞内染色して FCM 測定することで、それらの発現の確認を試みた。

その結果、BCG 治療後の尿中の CD33<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup>好中球様細胞において、HLA-II が有意に上昇していることが確認できた(図 7)。

ケモカインの CXCL10 は、分泌性タンパク質であり、臨床検体をタンパク質分泌阻害剤で前処置することは難しいため、細胞内に残存している微量の CXCL10 の変動を検出する必要があった。

そこで、検体間誤差が生じるのを抑えるため、陰性対照群の MFI を差し引いた値を求めた。その結果、BCG 治療経過に伴い、CD33<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup>好中球様細胞において有意に CXCL10 が上昇していた(図 7)。しかし、BCG 治療後期(6 週間)には CXCL10 産生が認められない場合もあった。このことから、CXCL10 産生は、BCG 治療時に上昇するが、恒常的に上昇してはいないことが判明した(データ示さず)。



### (4) BCG 治療有効例との比較

現在、解析した症例の多くを継続観察中である。本研究終了時には、全例で BCG 治療が有効であった。

以上の結果から、『免疫抑制型好中球』と『抗腫瘍型好中球』の分離法として、GPI-80 CV の変動と HLA-II の上昇が有用な指標とであると考えられた。そして、『抗腫瘍型好中球』は、一過性に CXCL10 発現上昇が生じると考えられた。今後、動物実験にて、BCG 投与により誘導される『抗腫瘍型好中球』の指標を確認し、その有用性の確証を得る予定である。

### <引用文献>

Ashiru, O., Estes, G., Garcia-Cuesta, E.M., Castellano, E., Samba, C., Escudero-Lopez,

- E., Lopez-Cobo, S., Alvarez-Maestro, M., Linares, A., Ho, M.M., *et al.* (2019). BCG Therapy of Bladder Cancer Stimulates a Prolonged Release of the Chemoattractant CXCL10 (IP10) in Patient Urine. *Cancers (Basel)* *11*.
- Brincks, E.L., Risk, M.C., and Griffith, T.S. (2013). PMN and anti-tumor immunity--the case of bladder cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol* *23*, 183-189.
- Donskov, F., and von der Maase, H. (2006). Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* *24*, 1997-2005.
- Kato, T., Takeda, Y., Ito, H., Kurota, Y., Yamagishi, A., Sakurai, T., Naito, S., Araki, A., Nara, H., Asao, H., *et al.* (2019). GPI-80 as a Useful Index for Myeloid Cell Heterogeneity and a Potential Prognostic Biomarker for Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Tohoku J Exp Med* *249*, 203-212.
- Meinderts, S.M., Baker, G., van Wijk, S., Beuger, B.M., Geissler, J., Jansen, M.H., Saris, A., Ten Brinke, A., Kuijpers, T.W., van den Berg, T.K., *et al.* (2019). Neutrophils acquire antigen-presenting cell features after phagocytosis of IgG-opsonized erythrocytes. *Blood Adv* *3*, 1761-1773.
- Suttman, H., Lehan, N., Bohle, A., and Brandau, S. (2003). Stimulation of neutrophil granulocytes with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis. *Infect Immun* *71*, 4647-4656.
- Suzuki, K., Watanabe, T., Sakurai, S., Ohtake, K., Kinoshita, T., Araki, A., Fujita, T., Takei, H., Takeda, Y., Sato, Y., *et al.* (1999). A novel glycosylphosphatidyl inositol-anchored protein on human leukocytes: a possible role for regulation of neutrophil adherence and migration. *J Immunol* *162*, 4277-4284.
- Takeda, Y., Fu, J., Suzuki, K., Sendo, D., Nitto, T., Sendo, F., and Araki, Y. (2003). Expression of GPI-80, a beta2-integrin-associated glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, requires neutrophil differentiation with dimethyl sulfoxide in HL-60 cells. *Exp Cell Res* *286*, 199-208.
- Takeda, Y., Kato, T., Ito, H., Kurota, Y., Yamagishi, A., Sakurai, T., Araki, A., Nara, H., Tsuchiya, N., and Asao, H. (2016). The pattern of GPI-80 expression is a useful marker for unusual myeloid maturation in peripheral blood. *Clin Exp Immunol* *186*, 373-386.
- Zea, A.H., Rodriguez, P.C., Atkins, M.B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., *et al.* (2005). Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* *65*, 3044-3048.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Takeda Yuji, Kato Tomoyuki, Nemoto Nobuhito, Araki Akemi, Gazi Mohammad Yeashin, Nara Hidetoshi, Asao Hironobu	4. 巻 110
2. 論文標題 Augmentation of the expression of the eotaxin receptor on duodenal neutrophils by IL-21	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 194 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2018.05.007	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 Takeda Y, Nara H, Asao H.	4. 巻 35
2. 論文標題 Analysis of signal transducers using flow cytometry is useful for detection of contractive and fluctuating signals	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bulletin of the Yamagata University. Medical science : Yamagata medical journal	6. 最初と最後の頁 21-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://doi.org/10.15022/00004195">http://doi.org/10.15022/00004195</a>	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 Kato Tomoyuki, Takeda Yuji, Ito Hiromi, Kurota Yuta, Yamagishi Atsushi, Sakurai Toshihiko, Naito Sei, Araki Akemi, Nara Hidetoshi, Asao Hironobu, Tsuchiya Norihiko	4. 巻 249
2. 論文標題 GPI-80 as a Useful Index for Myeloid Cell Heterogeneity and a Potential Prognostic Biomarker for Metastatic Renal Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 203 ~ 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.249.203	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 Takeda Yuji, Asao Hironobu, Wakabayashi Ichiro	4. 巻 1916
2. 論文標題 An Analysis of the Intracellular Signal Transduction of Peripheral Blood Leukocytes in Animal Models of Diabetes Using Flow Cytometry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 177 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8994-2_17	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 1件）

1. 発表者名 Tomoyuki Kato, Yuji Takeda, Yuta Kurota, Sei Naito, Hiromi Ito, Akemi Araki, Hironobu Asao, Norihiko Tsuchiya
2. 発表標題 Myeloid cell heterogeneity indicating appearance of myeloid derived suppressor cells (MDSCs) in peripheral blood of metastatic renal cell carcinoma (mRCC)
3. 学会等名 ASCO GU - Genitourinary Cancers Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeda Yuji, Kato Tomoyuki, Kurota Yuta, Ito Hiromi, Akemi Araki, Tsuchiya Norihiko, and Asao Hironobu
2. 発表標題 Analysis of urinary leukocytes during intravesical immunotherapy with BCG for non-muscle invasive bladder cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoyuki Kato, Yuji Takeda, Hitomi Ito, Yuta Kurota, Mayu Yagi, Toshihiko Sakurai, Sei Naito, Hisashi Kawazoe, Osamu Ichiyanagi, Norihiko Tsuchiya, Hironobu Asao
2. 発表標題 GPI-80, a useful marker of MDSC in mRCC patients, is a reference for the search for new MDSC markers
3. 学会等名 第76回日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤智幸, 武田裕司, 伊藤裕美, 黒田悠太, 奈良英利, 櫻井俊彦, 西田隼人, 内藤整, 川添久, 荒木明美, 一柳統, 浅尾裕信, 土谷順彦
2. 発表標題 転移性腎細胞癌患者における末梢血中GPI-80発現は予後因子となりうる
3. 学会等名 第55回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeda Yuji, Kurota Yuta, Kato Tomoyuki, Araki Akemi, Saitoh Shinichi, and Asao Hironobu
2. 発表標題 Function of GPI-80 on prostate cancer cell line, PC3 cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山形大学医学部免疫学講座 武田裕司のページ <a href="http://www.id.yamagata-u.ac.jp/lmm/h29-takeda/index.html">http://www.id.yamagata-u.ac.jp/lmm/h29-takeda/index.html</a>
--

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	奈良 英利  (Nara Hidetoshi)  (00375338)	石巻専修大学・理工学部・准教授    (31308)	
研究分担者	黒田 悠太  (Kurota Yuta)  (00594326)	山形大学・医学部・助教    (11501)	
研究分担者	加藤 智幸  (Kato Tomoyuki)  (40396560)	山形大学・医学部・准教授    (11501)	



## 6. 研究組織（つづき）

	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	土谷 順彦  (Tsuchiya Norihiko)  (70282176)	山形大学・医学部・教授    (11501)	
研究 分 担 者	浅尾 裕信  (Asao Hironobu)  (80250744)	山形大学・医学部・教授    (11501)	