

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791668

研究課題名(和文)腎細胞癌腫瘍免疫における芳香族炭化水素受容体発現の意義と機能解析

研究課題名(英文)Increased expression of aryl hydrocarbon receptor in clear cell renal cell carcinoma and infiltrating lymphocytes: Implications for cancer invasion, prognosis and tumor immunity

研究代表者

石田 勝 (ISHIDA, MASARU)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：80383876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：腎細胞癌切除検体での検討では、男性、喫煙歴あり、組織学的グレードが高い症例は、腫瘍組織でのAhRの発現が有意に高かった。また、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)におけるAhRの発現は、組織学的グレードが高い症例、病理学的病期において、筋層浸潤以上(pT2以上)の症例で高かった。腫瘍内部ではB細胞よりT細胞が有意に存在した。癌死症例においては、細胞傷害性T細胞と比較してヘルパーT細胞が優位に認められ、腫瘍辺縁部ではTILとregulatory T細胞が多く認められた。さらに生存分析では、TILのAhRの発現が高い症例は有意に再発・進展が多かった。腫瘍免疫においてAhRが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：AhR in RCC was significantly associated with the smoking history, gender and histological grade. The number of AhR-positive TIL was significantly associated with histological grade and pathological T stage. In tumor tissues, the number of T cell was significantly higher than that of B cell. In the patients who have poor prognosis, the number of helper T cell was significantly higher than that of cytotoxic T cell. Furthermore, in those patients AhR-positive TIL and regulatory T cell more infiltrated in tumor adjacent tissues than in tumor tissues. The AhR expression in TIL was a significant predictor for progression free survival. A multivariate analysis revealed that AhR in cancer cells was an independent prognostic factor for the progression free survival and disease specific survival. These results suggest that AhR may be involved in tumor immunity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 芳香族炭化水素受容体 浸潤 発癌

1. 研究開始当初の背景

(1)近年腎細胞癌の発生は全世界的に増加しており、先進国においてはその傾向は顕著である。腎細胞癌の発生要因は未だ大部分が明らかになっていないが、職業的・環境的因子の関与が推測されている(Murai and Oya. *Curr Opin Urol.* 14: 229-233, 2004)。実際、腎臓は血液を濾過し老廃物を排泄する臓器であるため、発癌物質に暴露されている。これまでの疫学的研究によると、喫煙は肥満、高血圧とともに腎細胞癌の危険因子である。

(2)タバコに含まれる多環芳香族炭化水素(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)やハロゲン化芳香族炭化水素(halogenated aromatic hydrocarbon, HAH)などの外因性生理活性物質は発癌物質とされており、これらの物質は生体内では共通の受容体、aryl hydrocarbon receptor, AhRに結合する。AhRは発癌物質の暴露による発癌過程において重要な役割を果たしていると考えられており(下図)、喫煙が発癌に大きく影響している肺癌においてAhRの過剰発現が報告されている(Lin et al. *Toxicol Pathol.* 31: 22-30, 2003)。

(3)また、AhRは他のシグナル伝達系と相互作用し、細胞周期やアポトーシスの制御など(Ma and Whitlick. *Mol Cell Biol.* 16: 2144-2150, 1996, Elizondo et al. *Mol Pharmacol.* 57: 1056-1063, 2000)、様々なカスケードに働きかけることが報告されている(Marlowe and Puga. *J cell Biochem.* 96: 1174-1184, 2005)。さらに、AhRのシグナルは細胞外マトリックスの主要成分を分解し、癌の浸潤に関与するmatrix metalloproteinaseなどの遺伝子の発現を調節する(Hillegass et al. *Biol Chem.* 387: 1159-1173, 2006)。これらのことから、AhRは癌の増殖や浸潤・転移に関与する因子であると考えられている。これまでにわれわれは、上部尿路上皮癌において、癌細胞におけるAhRの発現が転移および生命予後と相関することを免疫組織学的に解明した。また、*in vitro*の検討でAhR発現を調節することで癌細胞の浸潤能が変化することを明らかにした(Ishida et al. *Carcinogenesis* 31 (2): 287-295, 2010)。

(4)我々はこれまでの腎細胞癌および尿路上皮癌におけるAhR発現の免疫組織学的検討においてAhRは癌細胞のみではなく、癌胞巣周囲に浸潤しているリンパ球においても高発現していることに気づいた。実際、外因性生理活性物質などの低分子化学物質は免疫系にも作用し、AhRを介した免疫毒性を発揮することが知られている(Esser et al. *Trends*

Immunol. 30: 447-454, 2009)。

(5)癌の生物学を解明する上でhost-parasite relationshipの双方からのアプローチは重要であり、腫瘍におけるAhRの機能を解明するために本研究を立案した。

2. 研究の目的

芳香族炭化水素受容体 Aryl hydrocarbon receptor (AhR)は、他のシグナル伝達系との相互作用により細胞増殖、アポトーシスを制御し、癌の浸潤に関与する遺伝子の発現を調節し、癌の進展に関与すると考えられている。我々はこれまでに尿路上皮癌および腎細胞癌において、癌細胞のAhRが腫瘍の浸潤を促進することを明らかにしてきた。一方、AhRはTh17細胞や樹状細胞で高発現しており、免疫担当細胞の分化において重要な役割を果たしている。しかしながら腫瘍免疫においてAhRがどのような役割を果たしているかは未だ明らかになっていない。そこで我々は、腫瘍免疫におけるAhRの機能を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)腎細胞癌切除検体を用いて免疫組織染色を行った。AhRは転写因子であるため、核に染色性がみられる細胞を陽性細胞と判断する。核染色陽性の癌細胞の割合が50%以上を高発現群、50%以下を低発現群と定義した。AhRの発現と臨床病理学的因子との関連を検討し、多変量解析を行い疾患特異的生存期間および無病生存期間を予測する因子を検討した。

(2)外科切除検体の切片を、各種細胞表面マーカー(Foxp3, L26, CD3, CD4, CD8)の抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。外科的切除後に再発を認めずに生存している症例(good prognosis)と腎細胞癌死症例(poor prognosis)とを免疫組織学的に比較検討した。

4. 研究成果

(1)腎細胞癌に対して施行した腎摘除術による外科切除検体120例を用いて、AhRの免疫染色を施行し臨床病理学的に検討を行った。男性、喫煙歴あり(1日1本1年以上の喫煙歴をありと定義)、組織学的グレードが高い(G3, G4)症例は、グレードが低い(G1, G2)症例と比較して腫瘍組織でのAhRの発現が有意に高かった(表1.)。

また、組織学的グレードが高い(G3, G4)症例は腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte: TIL)におけるAhRの発現が高かった($p < 0.05$)。病理学的病期(T因子)において、筋層浸潤以上(pT2以上)の症例は筋

層浸潤未滿(pT1 以下)の症例と比較して TIL における AhR の発現が高かった(p<0.05)(表 2.)

表 1. Association between expression of AhR and clinicopathological features

	No. of pts	Nuclear AhR of cancer cell mean ± SD (%)	p Value
clear cell RCC Pts.	102	25.3 ± 22.2	
Gender			0.002
Male	76	28.7 ± 22.4	
Female	26	15.2 ± 18.7	
Smoking history			0.007
Negative	44	20.1 ± 18.4	
Positive	55	33.1 ± 24.6	
Unknown	3		
Histological tumor grade			0.020
Low (G1 and G2)	79	20.7 ± 17.6	
High (G3 and G4)	23	40.9 ± 29.0	
pathological T			0.38
pT1	68	22.8 ± 19.0	
pT2	34	30.2 ± 27.2	

表 2. Association between expression of AhR-positive TIL and clinicopathological features

	No. of pts	AhR-positive TIL mean ± SD (%)	p Value
clear cell RCC Pts.	102	34.6 ± 32.0	
Gender			0.51
Male	76	32.0 ± 29.2	
Female	26	41.4 ± 38.1	
Smoking history			0.70
Negative	44	35.6 ± 32.7	
Positive	55	33.5 ± 31.6	
Unknown	3		
Histological tumor grade			0.03
Low (G1 and G2)	79	29.7 ± 28.6	
High (G3 and G4)	23	53.3 ± 37.9	
pathological T			0.03
pT1	68	29.2 ± 27.8	
pT2	34	49.3 ± 38.3	

さらに生存分析において、TIL の AhR の発現

が高い(50%以上)症例は低い(50%未満)症例と比較して有意に再発・進展が多いことを明らかにした(p<0.05)(表 3,4.)

表 3. Cox regression analysis of progression free survival

	Progression free survival		
	Univariate	Multivariate	
	P value	Hazards Ratio (95% CI)	P value
High Age (≥ 60)	<0.05		n.s.
Histological tumor Grade	< 0.001	10.32 (2.90 - 36.77)	< 0.001
≥ Pathological T2	<0.001		n.s.
Vascular invasion	< 0.001	2.11 (1.25-11.3)	< 0.01
pN	< 0.05		n.s.
high AhR TIL	< 0.05		n.s.
High AhR	< 0.001	7.39 (2.32 - 23.56)	< 0.001

表 4. Cox regression analysis of disease specific survival

	Disease specific survival		
	Univariate	Multivariate	
	P value	Hazards Ratio (95% CI)	P value
High Age (≥ 60)	< 0.05		n.s.
Histological tumor Grade	< 0.01		n.s.
≥ Pathological T2	0.49		
Vascular invasion	0.83		
pN	< 0.01		n.s.
high AhR TIL	0.77		
High AhR	< 0.05	9.21 (1.23 - 68.60)	0.03

(2)外科切除検体の切片を、リンパ球の各種細胞表面マーカーの抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。外科的切除後に再発を認めずに生存している症例(good prognosis)と腎細胞癌死症例(poor prognosis)とを免疫組織学的に比較検討した。

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

AhR 発現 TIL と regulatory T 細胞は癌死症例に多く認められ、特に腫瘍辺縁部でその傾向が強い

症例の予後にかかわらず、B 細胞よりも T 細胞が優位に認められ、特に腫瘍内部でその傾向が強い

癌死症例では、細胞傷害性 T 細胞と比較して helper T 細胞が優位に認められた

といった知見が得られた。

制御性 T 細胞および helper T 細胞のうち Th17 細胞の分化に AhR が関与していることが報告されており (Quintana et al. Nature 453: 65-71, 2008)、本研究の結果からも腫瘍免疫において AhR が関与している可能性が示唆された。

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. Miyazaki Y, Kosaka T, Mikami S, Kikuchi E, Tanaka N, Maeda T, Ishida M, Miyajima A, Nakagawa K, Okada Y, Sato Y, Oya M. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. Clinical Cancer Research 査読有り 18(15) 2012, 145-153.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Ishida M, Mikami S, Kosaka T, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Nakagawa K, Okada Y, Oya M. Increased expression of aryl hydrocarbon receptor in clear cell renal cell carcinoma and infiltrating lymphocytes: Implications for cancer invasion, prognosis and tumor immunity. The 109th annual meeting of American Urological Association. 2014/5/18 Orlando, USA

2. Miyazaki Y, Kosaka T, Mikami S, Kikuchi E, Tanaka N, Maeda T, Ishida M, Miyajima A, Nakagawa K, Okada Y, Sato Y, Oya M. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. The 108th annual meeting of American Urological Association. 2013/5/5 San Diego, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.keio-urology.jp/achievement/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 勝 (ISHIDA MASARU)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 80383876