

博士論文（要約）

M2-like macrophages in the injured-kidney cortex promoted kidney cancer progression via the direct protumor effect and the inhibition of CD8 T cell infiltration

（障害腎の腎皮質における M2-like マクロファージは直接的機序および腫瘍内への CD8 T 細胞浸潤抑制を介して腎がん発達を促進する）

石井太祐

悪性腫瘍を有する患者において慢性腎臓病(chronic kidney disease: CKD)の合併は予後不良因子であることが多くの先行研究で示されている。悪性腫瘍の中でも特に腎がん患者においてこの傾向が顕著である。CKD 合併患者に対しては非 CKD 合併患者と比較して治療がひかえられている可能性も考えられたが、治療の有無や全身状態とは独立して CKD の合併が予後不良因子であることが知られている。しかし、CKD が悪性腫瘍の進行に及ぼす生物学的な機序については明らかでない。

マクロファージは自然免疫の代表的な細胞であるが、炎症性の表現型を示すもの以外に抗炎症作用を示すマクロファージがあることが知られており、M2-like マクロファージと呼ばれている。この M2-like マクロファージは腎臓において線維化を促進する因子の 1 つである。また、悪性腫瘍においては悪性腫瘍の進展と共に腫瘍組織内に増加し、免疫抑制に関わるサイトカインや血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)などの液性因子を介して腫瘍の発達を促進させる。また、腎がんにおいても M2-like マクロファージは腫瘍発達に寄与している。しかし、障害腎における M2-like マクロファージの発生した腎がんに対する影響については今までに検討されていない。

本研究では、障害腎における M2-like マクロファージの存在が腎がん発達を促進させている可能性を検証するため、急性腎障害(acute kidney injury: AKI)後に CKD(AKI to CKD)へと進展するマウスモデルにマウス由来腎細胞がん株である RenCa 細胞を接種することで、腫瘍発達の変化及び腫瘍組織内の免疫細胞分布を評価した。

まず AKI to CKD の代表的なモデルである片側腎虚血再灌流(unilateral ischemia reperfusion injury: uIRI)モデルを使用し、腎線維化を誘導した。uIRI 実施 14 日後に評価し、腎皮質の線維化および F4/80 陽性マクロファージ浸潤を確認した。uIRI 実施 14 日後に RenCa 細胞を腎被膜下へ接種し、20 日後に腫瘍発達を評価した。uIRI 実施群では sham 手術群と比較して、腫瘍発達が促進した。フローサイトメトリーを用いた解析では F4/80 陽性細胞中で F4/80lowLy6Clow 分画の割合が uIRI 群で増加し、CD45 陽性細胞における CD3+細胞、CD4+細胞、CD8+細胞の割合が uIRI 群で低下した。同様の実験をその他の AKI to CKD モデルであるアリストロキア酸腎症モデルでも実施した。アリストロキア酸投与 14 日後の腎皮質では F4/80 陽性マクロファージ浸潤が増加した。そこに RenCa 細胞を移植するとアリストロキア酸投与群で腎がん発達は促進し、腫瘍内 F4/80lowLy6Clow マクロファージの割合は増加し、T 細胞の割合は低下した。障害腎に移植された腎がんでは免疫抑制的な微小環境が形成されることがわかった。

次に F4/80lowLy6Clow マクロファージの特徴を確認するため、セルソーターを用いて F4/80lowLy6Clow マクロファージと F4/80highLy6Clow マクロファージを単離し、qPCR とスクラッチヒーリングアッセイを行った。qPCR では M2 マクロファージマーカーである Arg1 や Vegfa 発現が F4/80lowLy6Clow マクロファージで増加し、スクラッチヒーリングアッセイでは F4/80lowLy6Clow マクロファージと共培養した RenCa 細胞でスクラッチ

チ部分の面積が縮小し RenCa 細胞の migration 能が促進された。このことから F4/80lowLy6Clow マクロファージは M2-like マクロファージであると考えられた。

F4/80lowLy6Clow マクロファージの生体での効果を確認するため移植実験を行った。uIRI 腫瘍から単離した F4/80lowLy6Clow マクロファージもしくは F4/80highLy6Clow マクロファージを RenCa 細胞と共に正常腎被膜下に移植した。F4/80lowLy6Clow マクロファージ接種群で腫瘍は増大し、腫瘍内 F4/80lowLy6Clow マクロファージの割合は増加し、CD3+細胞および CD4+細胞の割合は低下した。このことから F4/80lowLy6Clow マクロファージは生体内でも M2-like マクロファージとして作用し、免疫抑制的な微小環境を再現することが示された。

次に障害腎皮質におけるマクロファージと腎がん発達との関連を調べるために、クロドロンネート(clodronate liposome: CL)を用いてマクロファージを除去する実験を行った。uIRI 後 14 日目の腎皮質では F4/80lowLy6Clow マクロファージ割合が増加しており、uIRI 後に CL を投与すると F4/80lowLy6Clow マクロファージ割合が減少し、線維化が抑制された。M2-like マクロファージは AKI to CKD における線維化促進因子であることが知られており、今回の結果から F4/80lowLy6Clow マクロファージは障害腎においても M2-like マクロファージとして作用していることがわかった。uIRI 後 CL 投与した腎被膜下に RenCa 細胞を移植すると、腫瘍発達が抑制された。腫瘍組織内では F4/80lowLy6Clow マクロファージ割合が減少し、CD3+細胞および CD8+細胞割合が増加した。M2-like マクロファージの存在下で T 細胞浸潤が抑制されたが、CD8 T 細胞・CD4 T 細胞のいずれが腫瘍発達に寄与しているかを調べるために抗 CD8 抗体もしくは抗 CD4 抗体を用いて実験を行った。抗 CD8 抗体を CL 投与腎被膜下に RenCa 細胞を移植したマウスに投与するとマクロファージ除去による腫瘍抑制効果が打ち消されたが、CL 投与をしなかった場合には抗 CD8 抗体は効果を示さなかった。一方で、抗 CD4 抗体は腫瘍発達に影響しなかった。これらの結果から障害腎皮質における F4/80lowLy6Clow マクロファージの存在が、障害腎に移植された腎がんでの免疫抑制的な微小環境を形成する要因であり、特に CD8 T 細胞の浸潤抑制が腫瘍発達を促進していることが示された。

抗 PD-1 抗体は腎がんにおいて重要な治療薬であるが治療抵抗性を示す患者がおり、その原因として T 細胞浸潤低下や M2 マクロファージの存在が考えられている。M2-like マクロファージが抗 PD-1 抗体の効果に影響するかどうかを調べるために、CL もしくは PBS 投与腎被膜下に RenCa 細胞を移植したマウスに抗 PD-1 抗体を投与した。PBS 投与群では抗 PD-1 抗体は腫瘍縮小効果を示さなかったが、CL 投与群では腫瘍縮小効果を示した。障害腎皮質における M2-like マクロファージは抗 PD-1 抗体への抵抗性にも寄与していることがわかった。

次に M2-like マクロファージの分子的特徴を調べるために、腎皮質および腎がん検体から uIRI 後の Ly6Clow マクロファージ、Sham 手術後の Ly6Clow マクロファージを単離し、total RNA シークエンスを実施した。uIRI 群の Ly6Clow マクロファージで腎皮質検

体および腎がん検体で共に発現上昇している 26 の遺伝子が同定された。その中で Slc7a11 に着目し、qPCR にて F4/80highLy6Clow マクロファージと比較して F4/80lowLy6Clow マクロファージで発現上昇していることを確認した。Slc7a11 がコードするシスチン・グルタミン酸アンチポーターの阻害剤である sulfasalazine を用いた実験を行った。培養細胞において sulfasalazine 単独では RenCa 細胞の増殖抑制効果を示さないが、uIRI 後に RenCa 細胞を移植したマウスに抗 PD-1 抗体と共に投与することで抗 PD-1 抗体に対する抵抗性を改善させた。しかし、腫瘍内 F4/80lowLy6Clow マクロファージ割合や T 細胞割合は変化しなかった。F4/80lowLy6Clow マクロファージによる RenCa 細胞の migration 促進に対する sulfasalazine の影響を確認するために、sulfasalazine 投与した F4/80lowLy6Clow マクロファージないしは通常の F4/80lowLy6Clow マクロファージを RenCa 細胞と共培養して、スクラッチヒーリングアッセイを行った。通常の F4/80lowLy6Clow マクロファージ群よりも sulfasalazine 前投与群では RenCa 細胞スクラッチ部分の面積が縮小しなかった。このことから、sulfasalazine は M2-like マクロファージの RenCa 細胞に対する腫瘍促進的な影響を阻害することが示された。

以上より、障害腎における M2-like マクロファージの存在が腎がん組織内での M2-like マクロファージ増加を引き起こし、腫瘍組織内の M2-like マクロファージは腎がん細胞の migration 能を促進させるとともに、CD8 T 細胞浸潤を抑制することで腎がん発育を促進させ、抗 PD-1 抗体の効果を減弱させる。Sulfasalazine は M2-like マクロファージの腎がん細胞に対する腫瘍促進的な形質を変化させることで、抗 PD-1 抗体抵抗性を改善させた。