

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20123

研究課題名(和文) LDLによる腎癌ソラフェニブ耐性の獲得機序の解明と新規マーカー、薬剤の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism that LDL counteracts the antitumor effect of sorafenib in renal cell carcinoma

研究代表者

内藤 整 (Naito, Sei)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：00431643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： ソラフェニブを含めた分子標的薬治療の普及により有転移腎癌の生存期間は著名に延長している。しかし多くの場合、分子標的薬に対して結局は耐性を示すようになり、ほとんどの患者は癌死に至る。我々は腎癌細胞株にLDLを添加した場合、ソラフェニブによる抗腫瘍効果が減弱することをつき止めており、その機序解明のため研究を行った。

LDLを腎癌細胞株に添加した場合、細胞増殖や抗細胞死を誘導するAkt/mTOR系の活性化が起こることを見出した。これによりソラフェニブやスニチニブによる細胞死誘導が阻害されることが解明された。

研究成果の概要(英文)： Development of targeted agents including sorafenib have been improving the overall survival in metastatic renal cell carcinoma patients. However, most of the patients acquire resistant for targeted agents, and develop cancer death. We defined that LDL counteracts the antitumor effect of sorafenib. Hence we investigated the mechanism.

Adding LDL into renal cancer cell lines, Akt/mTOR pathway was activated; which leads to cell proliferation and anti-cell-death. This mechanism inhibits cell-death by sorafenib and sunitinib.

研究分野： genitourinary cancer

キーワード： renal cell carcinoma sorafenib LDL

1. 研究開始当初の背景

有転移腎癌に対する薬剤治療としてソラフェニブ、スニチニブなどのマルチキナーゼ阻害剤 (MKI) が広く使用されている。これらの薬剤により有転移腎癌患者の予後は飛躍的に改善した。実際、MKI 臨床応用前の本邦での有転移腎癌の全生存期間は 21 カ月 (Naito S, et al. Eur Urol, 2009) であったが、MKI 導入後は 27 カ月と延長している。しかし、ほとんどの患者は MKI に対して最終的には治療抵抗性となり癌死に至る。MKI 耐性の克服が求められている。

我々は生活習慣病と大きくかかわりのある low-density lipoprotein (LDL) と癌の薬剤耐性を調査してきた。その中で、腎癌細胞株に LDL を添加することにより、マルチキナーゼ阻害薬、特にソラフェニブに対して耐性を示すようになることを見出していた。

また、我々の研究協力者は前立腺癌、腎癌細胞株において、PTEN 阻害による Akt/mTOR 系の亢進がスニチニブ耐性化を引き起こすことを in vivo、in vitro の系で明らかにし、報告してきた (Makov P, et al. Mol Cancer Ther. 2012)。

2. 研究の目的

腎癌細胞株において LDL が MKI の耐性化を引き起こす機序の解明と MKI 耐性の克服。

3. 研究の方法

腎癌細胞株において LDL により細胞増殖が増加することを確認。

腎癌細胞株において LDL 添加が MKI 耐性に寄与することを確認。

腎癌細胞株移植マウスを高脂質ダイエット + スニチニブ投与、高脂質ダイエット + プラセボ投与、通常食 + スニチニブ投与、通常食 + プラセボ投与の 4 群にわけ、スニチニブの効果、高コレステロールによる薬剤耐性の有無について in vivo で確認する。

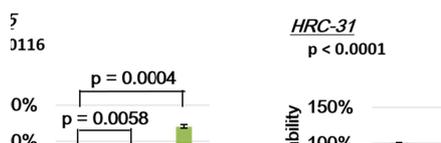
腎癌細胞株に LDL を添加前後での、Akt/mTOR 系のリン酸化カスケードの変化をウェスタンブロット法で調査。

LDL 添加により変化する発現遺伝子の網羅的解析を行い、LDL により発現量が変化する mRNA を把握する。

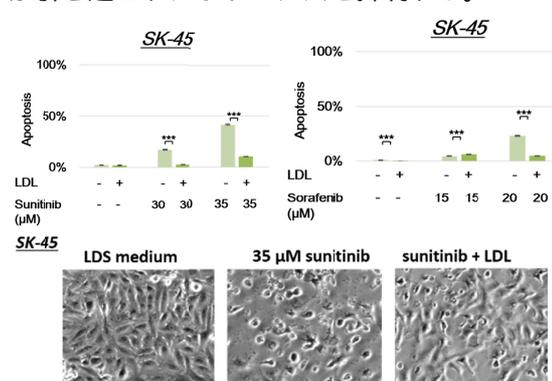
発現量に変化があった遺伝子を抑制し、治療ターゲットとなりうるか検討する。

4. 研究成果

LDL 添加により腎癌細胞株の増殖能は増大していた。(LDS: 脂質除去培地)

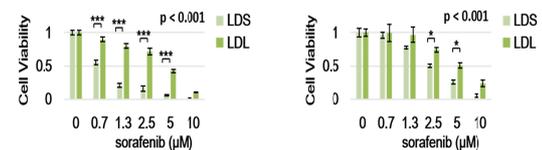
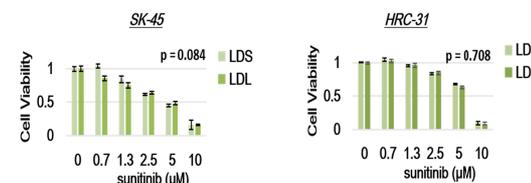


LDL 添加によりスニチニブやソラフェニブが引き起こすアポトーシスを抑制する。



また、ソラフェニブが引き起こす細胞増殖抑制を減弱させた。

一方、スニチニブは LDL 投与時と非投与時では同様の細胞増殖抑制であった。

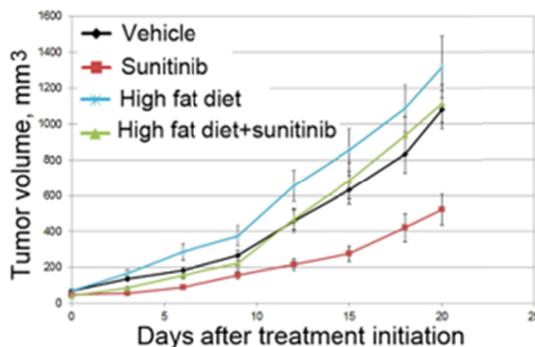


ヒト腎癌細胞株 PNX0010 をヌードマウスに皮下移植した上で高脂質ダイエットマウスと通常食マウスの血中総コレステロール、LDL、HDL コレステロール値を比較したところ、全ての値が高脂質ダイエットマウスで高かった。

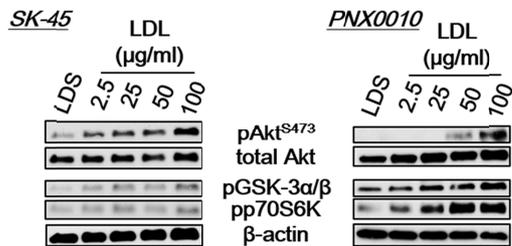
Diet	Total cholesterol, mg/dL	LDL, mg/dL	HDL, mg/dL
2018SX diet	197.2±25.6*	11.5±4.8*	108±17.1**
2018 high-fat diet with 2% added cholesterol	298.2±42.2*	25.2±5.3*	125.8±36.5**

\* p<0.005; \*\* Not statistically significant.

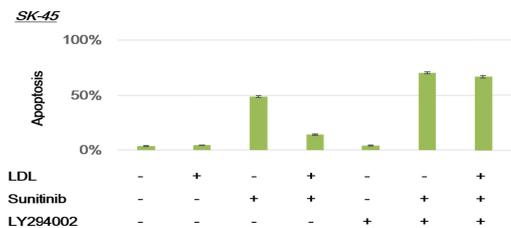
抗脂質ダイエットマウスではスニチニブによる治療効果が低かった。



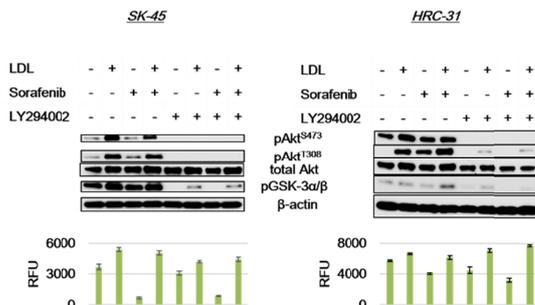
腎癌細胞株に LDL を添加すると Akt、GSK-3、p70S6K のリン酸化レベルが濃度依存的に上昇する。



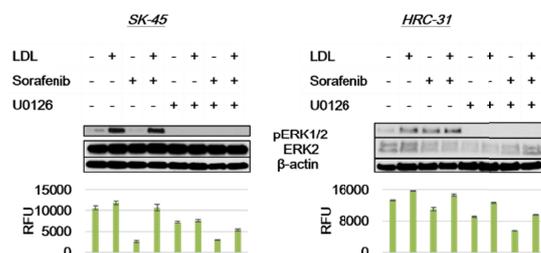
また、Akt/mTOR 阻害剤 (LY294002) は LDL によるアポトーシス阻害効果を抑制する。



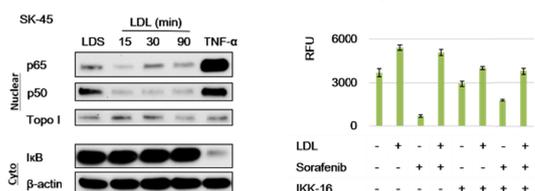
ただし、Akt/mTOR 阻害剤 (LY294002) は LDL によるソラフェニブの細胞増殖抑制の減弱化には影響しない。



LDL によるソラフェニブの細胞増殖抑制の減弱化は MEK 阻害剤 (U0126) によっても影響を受けない。



LDL は NF-κB を活性化せず、NF-κB 阻害剤 (IKK-16) は LDL によるソラフェニブの細胞増殖抑制の減弱化に影響しない。



以上の結果から、LDL 添加によりスニチニブ、ソラフェニブが誘導するアポトーシスが抑制されること、その機序として Akt/mTOR 経路の活性化が関与することが示唆された。

しかし、細胞増殖を見ると LDL 添加によりソラフェニブの効果が減弱している一方、スニチニブでは効果の減弱は見られなかった。また、これらソラフェニブの細胞増殖抑制阻害効果については Akt/mTOR 経路、ERK1/2 経路、NF-κB を介する経路によるものは否定された。

LDL 添加前後で CAGE 法による遺伝子発現解析を行ったところ、複数の遺伝子で発現量の違いが見られた。

Gene ontology 解析で分類したところ、LDL 添加 6 時間後との比較で "regulation of cytokine production", "cytokine production" にかかわる遺伝子 (APOA2/ARRB1/CCL2/CSF2/DTX4/LTB) の発現上昇がみられ、24 時間後との比較では栄養や脂質への反応を示す遺伝子項目や細胞増殖抑制にかかわる遺伝子項目の他、筋、神経細胞に関連する遺伝子項目なども発現上昇が見られた。

CAGE 法による解析で発現上昇が見られた Ankrd1 に着目し、腎癌細胞株及びラパマイシン耐性腎癌細胞株で発現を見たところ、通常の腎癌細胞株では Ankrd1 の発現上昇は見られなかったが、ラパマイシン耐性株で Ankrd1 の発現上昇が見られた。Ankrd1 の siRNA を行ったところ、ラパマイシン非耐性株では細胞増殖に違いは見られなかったが、耐性株では細胞増殖抑制がおこった。

## 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)

Naito S, et al. LDL cholesterol counteracts the antitumour effect of tyrosine kinase inhibitors against renal cell carcinoma. British Journal of Cancer. Mar 2017. 査読あり

[学会発表](計 2 件)

1) Naito S, Makhov P, Kolenko VM,

Tsuchiya N, Uzzo RG: LDL compromises efficacy of multitargeted tyrosine kinase inhibitors against renal cell carcinoma. American Urological

Association annual meeting 2016, San diego; 2016 May.

- 2) 内藤整, 一柳統, 伊藤裕美, 菅野秀典, 土谷順彦: LDL compromises efficacy of multitargeted tyrosine kinase inhibitors against renal cell carcinoma. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜; 2016 年 10 月

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

内藤 整(Naito Sei )  
山形大学医学部腎泌尿器外科学講座・助教  
研究者番号: 00431643

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4) 研究協力者

( )