

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11121

研究課題名(和文)腎細胞癌のmTOR阻害剤耐性における癌幹細胞の意義の解明

研究課題名(英文)Cancer stem cell characteristics in mTOR inhibitor-resistant kidney cancer cells

研究代表者

沼倉 一幸 (Numakura, Kazuyuki)

秋田大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90566415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：786-0 PARと比較して786-0 ESTは有意にEVEに対して耐性であり(IC50: 9.9uM vs. 5.6nM)、癌幹細胞の特性を示すtumor sphereの形成能を獲得した(45.8 vs 6.3, $p < 0.001$)。また、786-0 ESTは放射線に対する交差耐性を認めた(area % of colony at 4Gy RTx: 3.02% vs 0.55%, $p = 0.01$)。ALDH陽性の細胞数は増加しており(28.1% vs 0.3%, $p < 0.001$)、ALDHの特異的阻害剤であるdisulfiramの投与により、細胞分裂能は抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mTORi耐性RCCにおいて癌幹細胞特性が有意に亢進していることが明らかになった。ALDHは癌幹細胞の維持する上で重要な役割を果たしており、mTORi耐性克服の標的となる可能性がある

研究成果の概要(英文)：Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity increased in a time-dependent manner, showing resistance to EVE but not 786-0 PAR. Cancer stem cell characteristics were confirmed by tumor sphere-formation assay (45.8 versus 6.3, $p < 0.001$) and colony formation assay, which showed tolerance to irradiation (RTx) (area % of colony at 4-Gy RTx: 3.02% versus 0.55%, $p = 0.01$), and supported by an increase in G0/G1 phase (53.4% versus 42.0% $p = 0.04$) via bromodeoxyuridine assay. ALDH activity by flow cytometry showed marked increasing ALDH-positive sub-populations (28.1% versus 0.3%, $p < 0.001$), and inhibition of ALDH activity by disulfiram (ALDH-specific inhibitor) showed a significant decrease in cell viability.

研究分野：医学

キーワード：腎細胞癌 癌幹細胞 mTOR阻害薬 Aldehyde dehydrogenase

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

mTOR 阻害剤の実臨床での効果

腎細胞癌(RCC)は、泌尿器系悪性腫瘍の中では、前立腺癌、膀胱癌に次いで多い疾患である。mTOR 阻害剤は転移を有する RCC 患者に対する治療薬として、2010 年から投与が可能となっている。しかし、実際の臨床では、むしろ予後への悪影響が報告されるなど(Harrison MR et al. J Oncol Prac 2014)、その効果は期待されたものに程遠い。主要な原因の一つとして、RCC の mTOR 阻害剤への耐性がある。耐性の具体例としては、投与開始時から効果がない症例、投与開始直後は効果があるものの速やかに効果がなくなってしまう症例、などである。

mTOR 阻害剤耐性の機序と克服の試み

このような耐性を生み出す機序として、mTOR 複合体(mTORC)2 による PI3K/AKT 経路の feed-back activation が考えられた(Battelli C. et al. Therapy. 2011)。理論的背景として、既存の mTOR 阻害剤(everolimus, temsirolimus)は、mTORC1 のみを阻害し、もう一つの複合体である mTORC2 への阻害効果は少ないためとされる。しかし、これを標的とした、mTORC1/mTORC2 dual inhibitor は、in vitro で効果に否定的な結果が出たほか(Zhang H, et al. PLoS One 2013)、phase II ではむしろ mTOR 阻害剤に劣るとの結果であった(Powles T, et al. Eur Urol 2016)。すなわち、mTOR 阻害剤への耐性には未だ有効な解決策がない。

癌幹細胞と薬剤耐性

癌幹細胞は、癌の治療への耐性獲得や転移、再発を説明する有力なコンセプトである。ホモな集団と考えられていた癌細胞が、多種多様な遺伝子プロファイルや分化度を持つことが知られてきており、その中心をなすのが、自己複製能と多分化能を持つ集団、癌幹細胞である。癌幹細胞は腫瘍の生存、増大に必須であり、腫瘍から癌幹細胞を取り除いてしまうと、腫瘍はそれ以上細胞分裂できず、退縮していくことがわかっている(Nguyen LV. Nat Rev Cancer 2012)。また、癌幹細胞は、抗がん剤や放射線などの治療への耐性獲得にも重要な働きをしている。従来の抗腫瘍治療では、すでに分化した癌細胞は殺せても、癌幹細胞への効果はないか、あっても非常に少なく、生存した幹細胞が治療への抵抗性を持った細胞へと分化することにより耐性を持つようになる(図 1)。

癌幹細胞と mTOR 阻害剤耐性

mTOR 阻害剤に対する耐性において、癌幹細胞の意義は不明の部分が多く、他の癌種を含めて、詳細な報告がない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、mTOR 阻害剤耐性の腎細胞癌における癌幹細胞の意義を調べ、その治療法を開発すること、である。そのため、以下の 3 項目を具体的な目標とした。

- 1 腎細胞癌の mTOR 阻害剤耐性における癌幹細胞の意義を確認する。
- 2 癌幹細胞の効果的な治療標的分子を in vitro および in vivo で解析する。
- 3 上記でえられた標的分子の発現の状態を、臨床検体(腎細胞癌組織)で確認し、臨床応用を目指す。

3 . 研究の方法

1.in vitro mTOR 阻害剤耐性 RCC モデルの作成と情報伝達系の検討

(1)mTOR 阻害剤耐性 RCC モデルの作成

多数の RCC のセルラインの中から、 mTOR 阻害剤に感受性のある細胞を選別し、恒久的な mTOR 阻害剤(100nM)の存在 下で培養することで、耐性株を樹立する。これを mTOR 阻害剤耐性 RCC モデルとして、癌幹細胞の特性を確認する。すなわ ち自己複製能や多分化能の有無を、腫瘍 スフェア形成アッセイ、コロニー形成アッセイおよびフローサイトによるアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)活性の有無 などで確認する(図 4)。

(2)癌幹細胞に特異的な分子の特定 癌幹細胞の特性を確認したのち、幹細胞の代表的な情報伝達系として知られる Wnt/ catenin、Hedgehog、Notch および TGF- β などをスクリーニングする。スクリーニングには、各経路に代表的 なタンパクおよび mRNA を、それぞれウエスタンブロットおよび qRT-PCR で定量する。もし、この方 法で分子の特定が困難であれば、mRNA を用いたマイクロアレイやタンパクを用いたプロテオミク スで遺伝子発現のプロファイルを網羅的に解析し、標的分子を特定する。

(3)特定された分子の特異的阻害剤の効果

特定された分子の特異的阻害剤(Wnt: ICG-001、Hedgehog:BMS-833923、Notch:MK-0752 など)によ る抑制効果の有無を MTS アッセイなどの細胞増殖アッセイで確認する。

(4)既知薬剤の癌幹細胞への効果

(2)および(3)に並行して、mTOR 阻害剤耐性 RCC 株に対し、既知の薬剤の re-purposing drug とし ての効果を検証する。Hedgehog 情報伝達経路を抑制する抗真菌薬 Itraconazole や、autophagy の後期過程を抑制する抗真菌薬 Chloroquine、アルデヒドデヒドロゲナーゼを阻害する断酒薬 Disulfiram など、癌幹細胞に対する有用性が知られている薬剤の効果を検証する。

4 . 研究成果

ALDH の活性は、継代ともに増加していった。786-0 PAR と比較して 786-0 EST は有意に EVE に対して耐性であり(IC50: 9.9uM vs. 5.6nM)、癌幹細胞の特性を示す tumor sphere の形成能を獲得した(45.8 vs 6.3, $p < 0.001$)。また、786-0 EST は放射線に対する交差耐性を認めた(area % of colony at 4Gy RTx: 3.02% vs 0.55%, $p = 0.01$)。細胞周期を調べると、786-0 EST で G0/G1 期の割合が増加していた(53.4% vs 42.0%, $p = 0.04$)。ALDH 陽性の細胞数は著名に増加しており(28.1% vs 0.3%, $p < 0.001$)、ALDH の特異的阻害剤である

disulfiram の投与により、細胞分裂能は著名に抑制された。

結論

mTORi 耐性 RCC において癌幹細胞特性が有意に亢進していることが明らかになった。ALDH は癌幹細胞の維持する上で重要な役割を果たしており、mTORi 耐性克服の標的となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Numakura Kazuyuki, Kobayashi Mizuki, Hatakeyama Shingo, Naito Sei, Horikawa Yohei, Tanaka Toshikazu, Kamada Sachiko, Muto Yumina, Yamamoto Ryohei, Koizumi Atsushi, Nara Taketoshi, Kanda Sohei, Saito Mitsuru, Narita Shintaro, Inoue Takamitsu, Shimoda Naotake, Tsuchiya Norihiko, Ohyama Chikara, Habuchi Tomonori	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficacy and safety of nivolumab for renal cell carcinoma in patients over 75?years old from multiple Japanese institutes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-020-01693-y	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 Numakura K, Muto Y, Saito M, Narita S, Inoue T, Habuchi T.	4. 巻 30
2. 論文標題 Robot-assisted laparoscopic pyeloplasty for ureteropelvic junction obstruction with duplex system.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Urol Case Rep	6. 最初と最後の頁 101138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.eucr.2020.101138.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Numakura K, Nara T, Kanda S, Saito M, Narita S, Inoue T, Habuchi T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Overweight Patients Less Improved Kidney Function After Laparoscopic Surgery for Adrenocortical Adenoma With Excess Cortisol Secretion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Endocrinol (Lausanne).	6. 最初と最後の頁 572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2019.00572.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Numakura K, Horikawa Y, Kamada S, Koizumi A, Nara T, Chiba S, Kanda S, Saito M, Narita S, Inoue T, Shimoda N, Habuchi T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficacy of anti-PD-1 antibody nivolumab in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma: A retrospective multicenter analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 320-324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2019.1887.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Numakura Kazuyuki, Fujiyama Nobuhiro, Takahashi Makoto, Igarashi Ryoma, Tsuruta Hiroshi, Maeno Atsushi, Huang Mingguo, Saito Mitsuru, Narita Shintaro, Inoue Takamitsu, Satoh Shigeru, Tsuchiya Norihiko, Niioka Takenori, Miura Masatomo, Habuchi Tomonori	4. 巻 9
2. 論文標題 Clinical implications of pharmacokinetics of sunitinib malate and N-desethyl-sunitinib plasma concentrations for treatment outcome in metastatic renal cell carcinoma patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 25277-25284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuyuki Numakura, Nobuhiro Fujiyama, Makoto Takahashi, Ryoma Igarashi, Hiroshi Tsuruta, Atsushi Maeno, Mingguo Huang, Mitsuru Saito, Shintaro Narita, Takamitsu Inoue, Shigeru Satoh, Norihiko Tsuchiya, Takenori Niioka, Masatomo Miura and Tomonori Habuchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical implications of pharmacokinetics of sunitinib malate and N-desethyl-sunitinib plasma concentrations for treatment outcome in metastatic renal cell carcinoma patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 5件)

1. 発表者名 Numakura, K
2. 発表標題 Panel discussion on renal cell cancer: How do you treat this patient?
3. 学会等名 The 34th Annual European Association of Urology Congress, March, Barcelona, Spain (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Numakura, K., Fujiyama, N., Takahashi, M., Igarashi, R., Nara, T., Chiba, S., Kanda, S., Saito, M., Narita, S., Inoue, T., Habuchi, T
2. 発表標題 Clinical implications of pharmacokinetics of sunitinib malate and N-desethyl-sunitinib plasma concentrations for treatment outcome in metastatic renal cell carcinoma patients
3. 学会等名 The 34th Annual European Association of Urology Congress, March, Barcelona, Spain (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Numakura, K., Igarashi, R., Takahashi, M., Nara, T., Chiba, S., Kanda, S., Saito, M., Narita, S., Inoue, T., Habuchi, T.
2. 発表標題 Influence of genetic polymorphisms of vascular endothelial related genes on clinical outcome of axitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma
3. 学会等名 The 34th Annual European Association of Urology Congress, March, Barcelona, Spain (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Numakura, K., Fujiyama, N., Takahashi, M., Tsuruta, H., Maeno, A., Saito, M., Inoue, T., Narita, S., Huang, M., Satoh, S., Niioka, T., Miura, M., Habuchi, T.
2. 発表標題 CLINICAL IMPLICATIONS OF SUNITINIB AND N-DESETHYL-SUNITINIB PLASMA CONCENTRATIONS FOR TREATMENT OUTCOME IN METASTATIC RENAL CELL CARCINOMA PATIENTS.
3. 学会等名 34th Annual EAU Congress in Barcelona, 15 - 20 March 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Numakura, K., Novac, J., Pignon, J. C., Choueiri, T., Sabina, S.
2. 発表標題 Cancer stem cell feature can induce resistance to mTOR inhibitors via the Notch pathway in renal cell carcinomas.
3. 学会等名 The 113th Annual Meeting of the American Urological Association, May, San Francisco, CA, USA (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------