

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09150

研究課題名(和文) 癌関連遺伝子におけるヒストン修飾異常に着目した腎細胞癌バイオマーカーの基礎研究

研究課題名(英文) Aberrant histone modification patterns of tumor-related gene promoter as a new biomarker for renal cell carcinoma

研究代表者

篠島 利明 (SHINOJIMA, Toshiaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：60306777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腎細胞癌の網羅的遺伝子解析により、ヒストン修飾やクロマチンリモデリングに関わる遺伝子変異の頻出が明らかとされている。本研究では、腎細胞癌で重要なドライバー遺伝子であるHIF2Aのヒストン修飾解析を行い、活性化修飾パターンに違いがあることを見出した。また、これらエピジェネティクスにかかわる遺伝子群の変異は、病理組織学的なグレードとT分類には影響を与えない一方で、無増悪生存期間や全生存期間の独立した有意な予後不良因子であった。さらに、いくつかの免疫細胞マーカーは、遺伝子群の変異を認める症例で有意な低下を認めており、エピジェネティクス関連遺伝子と腫瘍免疫の関係が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術時に転移を認めない症例でも、従来の病理診断にエピジェネティクス関連遺伝子変異の有無を加味することは、フォローアップスケジュールの決定や術後補助療法の必要性の判断などに有用な可能性があり、臨床での応用が期待される。また、転移や再発のリスクが高い非転移性腎細胞癌の術後補助療法に、腫瘍免疫を制御する薬物療法が有効である可能性が示唆されたことは、今後の発展が大いに期待される知見である。

研究成果の概要(英文)：Recent high-throughput profiling of renal cell carcinomas (RCC) has identified a recurrent mutation including chromatin regulators, such as genes involved in the chromatin remodeling or in histone modifications. In this study, using a chromatin immunoprecipitation assay, we found that there was a significant difference in active modification patterns in the promoter region of HIF2A, which is a potent oncogenic driver in RCC. The mutation in chromatin regulators, did not affect the pathological tumor grade nor T stage; however, it revealed to be an independent significant factor that affect overall and progression free survival of RCC patients. Moreover, some molecular markers of immune cells was significantly decreased in the tumor samples harboring the mutation, suggesting the interaction of chromatin regulators and tumor-immune system.

研究分野：医歯薬系

キーワード：腎細胞癌 エピジェネティクス 遺伝子変異 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌は他の固形癌と異なり、放射線や殺細胞性抗がん剤に高度の耐性を示す。したがって集学的な治療戦略を構築するためには、分子腫瘍学的なアプローチによって腎細胞癌固有の腫瘍化メカニズムを明らかにしておくことが重要である。

がん抑制遺伝子である *VHL* 遺伝子の不活化は、腎細胞癌の分子腫瘍学的特徴の一つだが、酸素応答因子 Hypoxia inducible factors (HIFs) の翻訳後制御機構に *VHL* 蛋白が重要な役割を担っていることが 2001 年に解明された。その後行われた数多くの基礎研究は *VHL*-Hypoxia inducible factors (HIFs) 経路を介した腫瘍増殖機構の重要性を明らかとし、現在臨床の現場で広く使われている分子標的治療薬の理論的根拠となっている。

2010 年には淡明細胞型腎細胞癌の網羅的遺伝子解析により、ヒストン修飾やクロマチンリモデリングに関わる遺伝子変異の頻出が初めて明らかにされた。追従する複数の施設からの網羅的解析でも、腎細胞癌における重要な遺伝子変異は *VHL*-HIFs 経路を活性化するもののみならず、エピジェネティクスの変化に関与するものであることが示された。しかし、これらの遺伝子群の変異が、腎細胞癌の進行・進展とどのように関わっているのかは依然明らかでなく、治療標的となりうる知見もほとんど得られていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究ではヒストン修飾やクロマチンリモデリングといったエピジェネティクスを制御する遺伝子群の変異がもたらす腎細胞癌の進行・進展のメカニズムを明らかにすることを目的とした。細胞株を用いた腫瘍モデルにおいて、腫瘍増大に重要な役割を担う *HIF2* のヒストン修飾解析を行い、mRNA 発現レベルとの関連を解析した。また臨床検体において、エピジェネティクスにかかわる遺伝子群の変異と、臨床パラメーターや各種マーカー発現との関連を網羅的に解析した。

3. 研究の方法

- (1) **腎細胞癌由来の細胞株における *HIF2* mRNA 発現の定量**: *VHL* 活性型の腎癌細胞株である Caki-1, Caki-2, ACHN の *HIF2* mRNA 発現量を RT-PCR により定量した。既存のデータベースである Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) をもとに、mRNA 発現とコピー数多型や DNA メチル化の関連を解析した。
- (2) ***HIF2A* プロモーター領域のヒストン修飾解析**: *HIF2* 発現が最も強い ACHN と最も弱い Caki-2 における *HIF2A* プロモーター領域のヒストン修飾をクロマチン免疫沈降(ChIP)によって解析した。遺伝子発現を活性化する H3K4 トリメチル (H3K4me3)、H3K9 アセチル (H3K9ac)、また発現を抑制する H3K27 トリメチル (H3K27me3) に対する抗体を用いて ChIP を行った。転写開始点を基準として -2kbp、+0.5kbp、+1kbp、+83kbp にターゲットのシークエンスを設定し、プロダクトサイズ 100-150bp 程度の PCR プライマーを設計した。
- (3) **腎細胞癌の臨床検体におけるエピジェネティクスを制御する遺伝子群の変異の解析**: 手術時に遠隔転移を伴っていなかった淡明細胞型腎細胞癌 43 症例の臨床検体 (術後再発あり 26 例、再発なし 17 例) に対して、エピジェネティクスにかかわる遺伝子変異のパネル解析 (GeneRead DNaseq Targeted Panels V2) を行い、病理学的因子や予後との関連を検討した。
- (4) **臨床検体における免疫細胞関連マーカーなどの発現とエピジェネティクス関連遺伝子変異の関連解析**: 組織マイクロアレイを用いて、免疫細胞関連マーカーなどを免疫染色イメージアナライザー (Definiens Tissue Studio, HistoQuest) を用いて定量化した。これらの発現量とエピジェネティクスを制御する遺伝子群の変異の関係を解析した。
- (5) **倫理面への配慮**: 患者の組織を用いた解析は、慶應義塾大学倫理委員会の承認のもと、厚生労働省の倫理指針を遵守して行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

腎癌細胞株における *HIF2A* の発現とプロモーター領域のヒストン修飾解析: Caki-1, Caki-2, ACHN の3つの細胞株における *HIF2* の mRNA 発現は、ACHN が最も強く、Caki2 が最も弱かった。CCLE から得られたコピー数多型や DNA メチル化の程度は、mRNA の発現量との相関を認めなかった。ACHN と Caki2 におけるヒストン修飾解析では活性修飾である H3K4me3 や H3K9ac は、転写開始点近傍を結合のピークとし、-2kbp や +83kbp で著しく結合が下がることが示された(図)。また *HIF2* を強く発現している ACHN では、H3K27me3 修飾が低下し、H3K4me3 修飾が H3K9ac 修飾よりも有意であることも明らかとなった。

エピジェネティクス関連遺伝子変異と臨床パラメーターの関連: エピジェネティクス関連遺伝子変異を、43 例中 15 例 (35%) に認めた。内訳は *PBRM1* が 12 例 (28%)、*SETD2* が 4 例 (9%)、*BAP1* が 2 例 (5%)、*KMT2D/ARID1A/SMARCA4* が各 1 例 (2%) であった。これらの遺伝子変異を認める症例と認めない症例の間で、病理組織学的なグレードと T 分類に有意差は認めなかった。しかしながら無増悪生存期間や全生存期間は遺伝子変異を認める症例で有意 (それぞれ $p=0.0032$, $p=0.0003$) に不良であった。多変量解析でも無増悪生存期間に関してはグレード、T 病期、遺伝子変異の有無がそれぞれ独立した有意な因子であり、全生存期間に関しては遺伝子変異の有無のみが独立した予後因子 (リスク比 13.3, $p=0.0003$) であった。

エピジェネティクス関連遺伝子変異と各種マーカー発現の関連: 43 症例の組織マイクロアレイを

作成し、免疫細胞関連 (CD3, CD8, FOXP3, CD20, PD1, PDL1, CTLA4, LAG3, TIM3, TIGIT, CD68, CD163, CSF1R, MHC1, CD47)、細胞内代謝関連 (Ki67, IDO1, CD73, GLUT1, LAMP2)、がん幹細胞関連 (TNFA, CD44) のマーカー発現を定量化した。その結果エピジェネティクス関連遺伝子変異を認める症例では、免疫細胞関連では CD8, FOXP3, TIM3, TIGIT, CD68 が、細胞内代謝関連では CD73 が、そしてがん幹細胞マーカーでは CD44 が、それぞれ有意に発現が低下していた。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

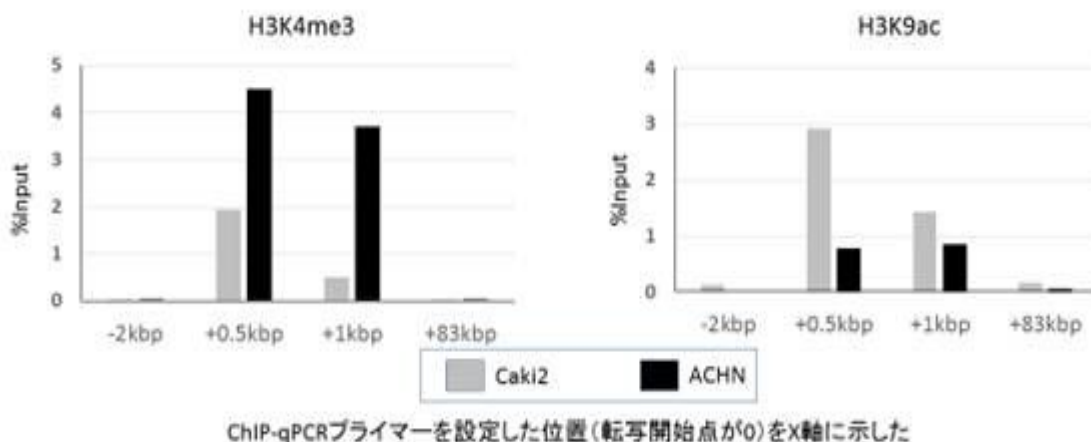
転写因子 HIFs によって発現が活性化される数多くの遺伝子の中で、VEGF などの血管新生に関わるサイトカインは、腫瘍の増殖や浸潤、転移に重要な役割を果たしている。これまで血管新生阻害を目的とした数多くの分子標的薬が開発され、腎癌診療の現場で使われているが、術後補助療法としての有効性が示せないことや、一般的にはその効果は一時的であり、薬剤耐性を生じてしまうことなどが問題とされている。

HIFs の 3 つのサブタイプの中で、HIF1 は多くの癌種で腫瘍増殖に対して促進的に作用することが知られている。しかしながら *VHL* 遺伝子変異によって HIFs が恒常的に活性化する腎細胞癌では、HIF1 はむしろ抑制的に作用している可能性がある。CCLE データではハウスキーピング遺伝子であるにもかかわらず HIF1 mRNA が欠損もしくは異常低発現となっているがん細胞株を認めるが、これらの大部分は腎癌由来である。恒常的な HIF1 の活性化はがん細胞株の樹立や継代に不利に働いている可能性が示唆される。

一方で HIF2 は腎癌細胞株を用いた基礎実験で腫瘍増殖にかかわる重要な因子であることが示されており、CCLE データでもすべての腎癌細胞株で有意に発現している。また HIF1 ほどではないが、その発現レベルは細胞株間に多様性がある。本研究で用いた Caki2 は CCLE 上の 31 種の腎癌細胞株の中でも発現レベルが 2 番目に低く、ACHN は 6 番目に高い細胞株であった。コピー数多型や DNA のメチル化はこの差に関与しておらず、活性化ヒストン修飾の違いが関与している可能性が本研究で初めて示された。バイオマーカーとしての有効性の検証を試みたが、臨床検体で行った ChIP で *HIF2A* のヒストン修飾に関する再現性のある結果を得ることが、本研究期間内では達成することができなかった。

その一方で、臨床検体における網羅的な遺伝子解析では、クロマチンリモデリングに関わる遺伝子 (*PBRM1, BAP1, ARID1A, SMARCA4*) やヒストン修飾酵素遺伝子 (*SETD2*) の変異を約 1/3 に認められた。本研究では、これらの変異が病理学的因子と独立して全生存率に有意な影響を与えていることを初めて示すことができた。手術時に転移を認めない症例でも、従来の病理診断にエピジェネティクス関連遺伝子変異の有無を加味することは、フォローアップスケジュールの決定や術後補助療法の必要性の判断など、臨床での応用が期待された。

近年、免疫チェックポイント阻害剤をはじめとする免疫治療ががん患者に対する次世代の治療戦略として脚光を浴びている。腎細胞癌でも PD-1, PDL-1, CTLA-4 を標的とした治療薬が従来の血管新生阻害薬を凌駕する勢いで急速に広まっている。本研究では、遺伝子変異のある症例では、免疫チェックポイント分子の TIM3, TIGIT の発現低下、細胞傷害性 T 細胞のマーカーである CD8 の低下、制御性 T 細胞の機能にかかわる FOXP3 の低下、そして腫瘍関連マクロファージのマーカーである CD68 の低下などを認めた。エピジェネティクス関連遺伝子と腫瘍免疫の関係は不明な部分が多いが、*PBRM1* の変異と免疫チェックポイント阻害剤の有効性の関連が検討されるなど、注目され始めている領域である。本研究からは、ハイリスクの非転移性腎細胞癌の術後補助療法として、腫瘍免疫を制御する薬物療法の選択肢となりうる可能性が示され、将来の発展性が大いに期待される知見であると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Kimiharu Takamatsu, Ryuichi Mizuno, Nobuyuki Tanaka, Toshikazu Takeda, Shinya Morita, Kazuhiro Matsumoto, Takeo Kosaka, Toshiaki Shinojima, Eiji Kikuchi, Hiroshi Asanuma, Masafumi Oyama, Shuji Mikami, Mototsugu Oya	4. 巻 24
2. 論文標題 Prognostic value of serum C-reactive protein level prior to second-line treatment in intermediate risk metastatic renal cell carcinoma patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1069-1074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-019-01459-1	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 Miura Yuji, Imamura Chiyo K., Uchino Keita, Kishida Takeshi, Matsubara Nobuaki, Shinojima Toshiaki, Kondo Keiichi, Hongo Fumiya, Yoshimura Kenichi, Tanigawara Yusuke, Takano Toshimi	4. 巻 17
2. 論文標題 Individualized Dosing of Axitinib Based on First-Dose Area Under the Concentration-Time Curve for Metastatic Renal-Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Genitourinary Cancer	6. 最初と最後の頁 e1 ~ e11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clgc.2018.09.015	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 Takamatsu Kimiharu, Mizuno Ryuichi, Omura Minami, Morita Shinya, Matsumoto Kazuhiro, Shinoda Kazunobu, Kosaka Takeo, Takeda Toshikazu, Shinojima Toshiaki, Kikuchi Eiji, Asanuma Hiroshi, Oyama Masafumi, Mikami Shuji, Oya Mototsugu	4. 巻 16
2. 論文標題 Prognostic Value of Baseline Serum C-Reactive Protein Level in Intermediate-Risk Group Patients With Metastatic Renal-Cell Carcinoma Treated by First-Line Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Genitourinary Cancer	6. 最初と最後の頁 e927 ~ e933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clgc.2018.03.012	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mizuno R, Takamatsu K, Tanaka N, Hayakawa N, Kosaka T, Kikuchi E, Oya M
2. 発表標題 Predictors of first line systemic therapy for metastatic renal cell carcinoma in IMDC favorable risk patients
3. 学会等名 ASCO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takamatsu K, Mizuno R, Hayakawa N, Tanaka N, Kosaka T, Kikuchi E, Oya M
2. 発表標題 The change of serum C-reactive protein levels during molecular-targeted treatments could predict the response to anti-PD-1 treatment in metastatic renal cell carcinoma patients
3. 学会等名 ASCO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高松公晴、水野隆一、田中伸之、武田利和、森田伸也、松本一宏、小坂威雄、篠島利明、菊地栄次、浅沼宏、三上修治、大家基嗣
2. 発表標題 転移性腎細胞癌に対するニボルマブの効果予測因子の検討
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
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
研究分担者	水野 隆一 (MIZUNO Ryuichi) (60383824)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授 (32612)	

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