

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K15265

研究課題名(和文) 分子標的薬に対する腎がんの抵抗性獲得機序の解明と新たな効果予測因子の探索

研究課題名(英文) Mechanism of drug resistance to Tyrosine Kinase Inhibitor in renal cell carcinoma.

研究代表者

中村 真樹 (Nakamura, Masaki)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：70805788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腎がんモデル/肺転移モデルの作成および、腫瘍の免疫染色
マウスの皮下にマウス腎がん細胞株を移植して腫瘍を作成しTyrosine Kinase Inhibitor 4 剤を投与した。各薬
剤を調整しマウスに経口投与を1週間行った。治療開始1週間後に残存した腫瘍を摘出してホルマリン固定し
た。抗CD31抗体によるwhole mount stainingは既報の方法で染色を確認した。その後2019年秋頃から研究室の移転
が開始となり、それに伴って実験室も実際上使用不可能となった。引き続きCovid-19感染症の蔓延に伴い研究室
の使用が中止されたため、マウスを新たに購入しての新規実験が休止された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの皮下にマウス腎がん細胞株を移植して腫瘍を作成しTyrosine Kinase Inhibitor 4 剤を投与した。各薬
剤を調整しマウスに経口投与を1週間行った。治療開始1週間後に残存した腫瘍を摘出してホルマリン固定し
た。抗CD31抗体によるwhole mount stainingは既報の方法で染色を確認した。その後2019年秋頃から研究室の移転
が開始となり、それに伴って実験室も実際上使用不可能となった。引き続きCovid-19感染症の蔓延に伴い研究室
の使用が中止されたため、マウスを新たに購入しての新規実験が休止された。本研究は重要なテーマであり、今
後の研究再開を目指したい。

研究成果の概要(英文)：Investigation of Mechanisms Underlying Resistance to Molecular Targeted
Drugs in Renal Cancer and Exploration of Novel Predictive Factors for Their Effects” Creation of
Mouse Renal Cancer Model and Lung Metastasis Model, and Immunostaining of Tumors: As a preliminary
experiment, mouse renal cancer cell line (Renca) was subcutaneously implanted in mice to create
tumors. Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) drugs were administered daily to treat the tumors. Each drug
dosage was adjusted, and oral administration was performed for one week.
After one week of treatment, the remaining tumors were excised and fixed in formalin. Immunostaining
using anti-CD31 antibodies was successfully performed, but staining for pericytes using anti-NG2
antibodies was challenging. Laboratory relocation began around autumn 2019, rendering the lab
facilities practically unusable. Consequently, new experiments involving the purchase of additional
mice were put on hold due to the ongoing COVID-19 pandemic.

研究分野：腎細胞がん

キーワード：腎細胞がん

1. 研究開始当初の背景

転移性腎がんにおいて使われるチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)の早期の治療抵抗性獲得が問題となっている。TKIが阻害する受容体チロシンキナーゼは多岐にわたり、一部は血管周囲のペリサイトやマクロファージにも発現している。私は留学先のカロリンスカ研究所で血管新生に関する研究を行ってきた。その中で、治療抵抗性の解明には血管内皮細胞のみではなく、周囲の細胞や標的外臓器の観察が重要であることを報告した。本研究では血管周囲の構成細胞やそれらの相互作用に各種TKI投与が与える影響を調べ、TKI治療抵抗性の機序の解明を目指す。また、TKIの投与/休薬が正常臓器の血管にあたえる変化を観察する。本研究により、1.転移性腎がんのTKI治療抵抗性獲得の機序、2.腎がんの転移機序、3.各種TKI治療の効果予測因子、を解明し、よりよい治療戦略の開発をめざす。

2. 研究の目的

(1) TKIが腫瘍血管周囲微小環境に与える影響と治療抵抗性獲得機序に関する研究

転移性腎がんに対する分子標的薬のうち血管新生阻害作用をもつチロシンキナーゼ阻害薬(Tyrosine Kinase Inhibitor: TKI)は現在4剤が保険収載されている。TKIの出現により転移性腎がんの治療選択の幅が広がったが、早期の薬剤耐性の獲得が問題となっている。しかし、各種TKIの治療抵抗性獲得の過程で腫瘍血管とその周囲の微小環境にどのような変化が起きているのかに関してこれまでに共通の見解はない。TKIはVascular Endothelial Growth Factorレセプター(VEGFR)、Platelet Derived Growth Factorレセプター(PDGFR)、Stem Cell Factorレセプター(KIT)、Fms-like tyrosine kinase-3(FLT-3)、Colony Stimulating Factor Receptor-1(CSF1R)などのチロシンキナーゼ活性を阻害することにより血管新生を阻害し、抗がん作用を発揮する。これらの受容体チロシンキナーゼ(Receptor Tyrosine Kinase: RTK)の中で最も強い血管新生作用を有するのはVEGFR-2であり、主にVEGFが結合することによりその下流へのシグナルが伝えられ、血管新生が誘導される。一方、VEGFR-1はVEGFのVEGFR-2への結合を阻害するおとりレセプターとして知られ、弱い血管新生作用しかもたない。実際我々が抗VEGFR-1抗体を担癌マウスに投与したところ、腫瘍血管が増加し腫瘍が増大するという結果が得られた(未発表データ)。実際の腎がんの血管においては様々に異なるレベルでのRTKの発現が予想されるが、各TKI投与によりおこるRTKの発現変化、血管の性質の変化は、多分にTKI治療抵抗性に寄与していることが想像される。我々はこれまでの研究で、PDGFRβが血管周皮細胞(ペリサイト)に発現しPDGF-BBを誘引因子として血管被覆に関与していることを明らかにした。さらに我々は腫瘍のPDGFの濃度によってPDGFR阻害薬の働きが異なることを報告した(Nat Commun. 2013;4:2129)。すなわち、PDGF-BBの濃度が低い腫瘍においてPDGFR阻害薬はペリサイトを血管からはがす作用を持ち腫瘍の転移を促進するのに対し、PDGF-BB濃度の高い腫瘍においてはその逆の現象がみられた。さらに我々は角膜における血管新生モデルにおいて、血管周囲のペリサイトをさらに外側から裏打ちするマクロファージを発見した(未発表データ)。CSF-1Rは一部のTKIのターゲットであるが、マクロファージ上に発現し、CSFをリガンドとしてマクロファージの腫瘍関連マクロファージ(TAM)への分化を促進することが報告されている(Mol Cancer Ther. 2017 Aug;16(8):1544-1554)。TKIによりCSF-1R活性を阻害したときに、腫瘍血管周囲のマクロファージにおこる変化の研究はこれまでにない新規のテーマである。これらの知見を総合すると、TKI治療が腫瘍血管自体のみならず、血管周囲の微小環境に多大な影響を与えていることがわかる。これらの現象を詳細に、かつ正確に明らかにすることで、TKIに対する腎がんの治療抵抗性獲得の機序を明らかにする一助になると考えられる。

(2) TKIの休薬が腫瘍血管/転移先臓器の血管に及ぼす影響の研究

TKI治療は、元来の投与プロトコール自体、あるいはその有害事象によりやむなく、投薬と休薬を繰り返しながら継続していく性質がある。我々はこれまでの研究で担癌マウスに投与する抗VEGF抗体を休薬することにより肝臓の血管が増加し、その新生血管は治療前の血管に比べて大きな孔のある有窓血管内壁をもつことを明らかにした(Nat. Commun. 2016; 7:12680)。正常臓器である肺や肝臓の血管がそれぞれのTKI投与/休薬によりどのような影響を受けるかは興味のある問題であり、腫瘍の血管外漏出と転移の機序の解明につながる重要な研究課題である。

(3) TKIの治療効果を予測する因子の探索 TKI治療の効果予測因子としてはいくつかの報告があるが、信頼性のあるマーカーはまだ見つかっていない。ヒト腎がんサンプルを用いて免疫染色あるいは核細胞の遺伝子発現プロファイリングをし、腫瘍ごとの血管、ペリサイ

トなどの微小環境の構成、各 RTK の発現強度を観察する。また、腫瘍を直接ヌードマウス腎に移植し、TKI 治療とその効果を観察することで、RTK 発現と治療効果の関係を追及する。

3. 研究の方法

(1) マウス腎がんモデル/肺転移モデルの作成および、腫瘍の免疫染色ヒト腎がん 768-O 細胞ならびに A498 細胞をマウスの腎に注射し、腎がんモデルを作成する。腫瘍生着後各種 TKI を投与し、投与群、コントロール群から腫瘍を切除する。腫瘍の一部は 24 時間のホルマリン固定後に 2-3 mm に薄切し、ホールマウント免疫染色に用いる。具体的には腫瘍薄切をスキムミルク溶液でブロック後、抗 CD31 抗体 (腫瘍血管)、抗 NG2 抗体 / 抗デスミン抗体 (ペリサイト)、抗 Iba1 抗体 / 抗 CD68 抗体 (マクロファージ) を一次抗体として染色する。さらに、洗浄、ブロック後に蛍光標識した二次抗体で染色し、レーザー共焦点顕微鏡 (NIKON A1R) を用いて観察する。

(2) 血管内皮細胞/ペリサイト/マクロファージの単離、RNA 抽出と遺伝子発現の比較
腫瘍の微小環境を理解するためにはそれぞれの構成細胞を単離し、RNA 抽出/遺伝子発現解析をすることが必須である。当研究では MACS ビーズを用いた磁気細胞分離、ならびにレーザーマイクロダイセクションを用いた選択的組織回収の手法を用いて、血管内皮細胞、ペリサイト、あるいは腫瘍細胞を単離し、RNA 抽出、遺伝子発現解析に使用する。

(3) ニコン共焦点顕微鏡 (A1R) システムを利用した in-vivo イメージング
上記の方法で腎がんを作成したマウスの腫瘍を体外に露出し、イソフルラン麻酔下に顕微鏡に固定する。高解像度のガルパノスキャナーならびにレゾナントスキャナーを利用して生体内の腫瘍血管を観察する。in-vivo イメージング時の血管標識には蛍光デキストランを静脈注射する。またペリサイト標識には Fluoro-Nissl dye (Eyiymisi et al. Nat Neurosci. 2017 Jul;20(7):1023-1032)、あるいは NG2-cre:Tomato トランスジェニックマウス (Leone DP, et al. Mol Cell Neurosci. 2003 Apr;22(4):430-40) を用いる。この方法により、TKI 投与開始後/休薬後の血管周囲組織の構成、血管透過性などを生体内で経時的に観察することが可能である。

4. 研究成果

(1) マウス腎がんモデル/肺転移モデルの作成および、腫瘍の免疫染色
予備実験としてマウスの皮下にマウス腎がん細胞株 Renca を移植して腫瘍を作成し、Tyrosine Kinase Inhibitor 4 剤を連日投与して治療した。マウスはそれぞれ 3 匹とし、腫瘍の免疫染色を行う目的とした。各薬剤を調整しマウスに経口投与を 1 週間行った。治療開始 1 週間後に残存した腫瘍を摘出してホルマリン固定し、一部はパラフィンブロックを作成、一部は Whole mount staining 用とした。抗 CD31 抗体による whole mount staining は既報の方法で染色を確認できた一方、抗 NG2 抗体によるペリサイトの染色ではペリサイトの染色は確認できなかった。

2019 年秋頃から研究室の移転が開始となり、それに伴って実験室も実際上使用不可能となった。そのため、マウスを新たに購入しての新規実験が休止された。

(2) 血管内皮細胞/ペリサイト/マクロファージの単離、RNA 抽出と遺伝子発現の比較
上記で作成した腫瘍を染色したところ、当初の予定に反してペリサイトの染色がうまくいかなかったため、条件検討を行っていく予定とした。その後各種細胞の単一化を行い、RNA 抽出を予定する予定であったが、Covid-19 感染症の蔓延に伴い研究室の使用が中止されたため、研究予定は延期となった。

(3) ニコン共焦点顕微鏡 (A1R) システムを利用した in-vivo イメージング
同所性に作成した腎癌モデルを用いてニコン共焦点顕微鏡でライブイメージを撮影することを予定していたが、Covid-19 感染症の蔓延に伴い動物実験および研究室利用が中止されたため計画は一時中止となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------