

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16736

研究課題名(和文) 進行性腎癌における至適逐次薬物療法マーカーとなるmicroRNAの同定

研究課題名(英文) Identification of microRNAs as optimal sequential drug therapy markers in advanced renal cancer

研究代表者

岩本 秀人 (IWAMOTO, Hideto)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：80621010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト RCC 細胞株である ACHNと比較しスニチニブ耐性モデル(SR-ACHN)において、リソソーム関連膜タンパク2(LAMP-2)の3つのスプライスバリエントであるLAMP-2A、2B、2Cの全てにおいて、その発現が上昇していることが確認された。しかし、強制発現株における細胞毒性試験では、LAMP-2Aと2Bの強制発現株がACHNと比較してスニチニブに対して有意に高い耐性を示すことが確認された。以上のことから、LAMP-2AおよびLAMP-2BはRCCのスニチニブ耐性に関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、進行性腎癌の薬物療法においてスニチニブが使用される機会は減少したが、その他のチロシンキナーゼ阻害薬は1次併用療法の一剤として使用頻度が高い。本研究の成果は、そのようなチロシンキナーゼ阻害薬に対する薬剤耐性メカニズムの解明の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the sunitinib resistance model (SR-ACHN) compared to the human RCC cell line ACHN, the expression of all three splice variants of lysosome-associated membrane protein 2 (LAMP-2), LAMP-2A, 2B and 2C, was found to be elevated. However, cytotoxicity studies in forced-expression strains confirmed that forced-expression strains of LAMP-2A and 2B were significantly more resistant to sunitinib compared to ACHN. Taken together, these results indicate that LAMP-2A and LAMP-2B are involved in sunitinib resistance in RCC.

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：腎細胞癌 スニチニブ耐性 microRNA

1. 研究開始当初の背景

本邦を含む先進諸国において、腎細胞癌(腎癌)の罹患率は近年増加傾向にある。そして、診断や治療の技術が進歩しているものの、その癌特異的死亡率は現在も増加傾向にある。その原因の一つとして、腎癌は一般的に化学療法や放射線治療への感受性が乏しいという特徴が挙げられる。それ故、転移を有する進行性腎癌症例に対しては、古くからインターフェロンやインターロイキンなどを用いた免疫療法が行われてきたが、その効果は10%程度で予後は極めて不良であった。近年、チロシンキナーゼ・インヒビター(TKI)やmTORインヒビター(mTOR-I)などの分子標的薬の登場により、一定の予後改善効果が得られるようになったが、著名な奏功を示す症例がある一方で、経過中に薬剤耐性となる症例や、全く効果を示さない症例も少なからず経験され、分子標的薬の効果は未だ限定的と言わざるを得ない。また、複数の分子標的薬が次々と承認されているものの、その歴史が浅いため至適な逐次療法に関するエビデンスは少なく、未だ確立されたものは存在しない。さらに近年では、免疫チェックポイント阻害薬に代表される新規免疫療法薬(総称してImmune-Oncology drug; I-O drug)が登場したことにより、逐次療法は一層複雑化している。

このような状況の中で、進行性腎癌に対する薬物療法において、現在の日常診療で大きな問題となるのは、一次薬物療法に抵抗性となった症例に対する二次薬物療法の薬剤選択である。これまで二次薬物療法の中心は、TKIであるアキシチニブであった。アキシチニブは、一次薬物療法に抵抗性となった転移性腎癌に対する二次薬物療法としての第III相試験(723例)において、ソラフェニブ(TKI)と比較して有意な癌特異的生存率の改善を示したことにより、二次薬物療法として強く推奨されることになった薬剤である。一方、免疫チェックポイント阻害薬であるニボルマブは、二次治療としての第III相試験(821例)において、エベロリムス(mTOR-I)と比較して有意な全生存率の改善を示したことにより、二次薬物療法として強く推奨されることになった薬剤である。欧米諸国におけるガイドラインでは、いずれの薬剤も最高グレードでの推奨となつてはいるが、全生存率での改善を示したニボルマブをより高く評価した論調となっており、今後は二次治療におけるニボルマブの使用頻度が増加すると予想される。治療効果の高い薬剤の開発は非常に望ましいことである一方で、これらの新規免疫療法薬は高価なため医療費への莫大な影響が懸念されるのも事実である。この問題を解決するには、アキシチニブで十分な効果が得られる患者を的確に選別することが重要となるが、それを可能とするバイオマーカーは現在のところ発見されていない。

microRNA(蛋白質をコードしていない non-coding small RNA)は、mRNAから蛋白への翻訳を抑制することで発生や細胞増殖など様々な細胞生物学的プロセスを制御しており、その発現異常が癌の発生や進展に関与していることが多くの癌種において報告されている。そして、microRNAはexosomeなどに内包された状態でRNaseからの分解を免れ、血液や尿などの体液中でも安定して存在することが証明されており、新規バイオマーカーとして利用する研究が多数報告されている。また、特に最近ではmicroRNAの発現異常と分子標的薬の奏功性に関する研究も盛んに行われ、複数の癌腫において徐々に薬剤の奏功性を制御しているメカニズムが報告されつつある。

以上のことより、microRNAを分子標的薬の治療効果予測のバイオマーカーとして利用することで、進行性腎癌の二次薬物療法における適切な薬剤選択が可能となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「進行性腎癌に対する二次薬物療法において、アキシチニブの治療効果を予測するバイオマーカーとなるmicroRNAを同定すること」である。我々は過去の実験において、スニチニブ(現在、進行性腎癌の一次薬物療法として最も使用頻度の高いTKI)抵抗性ヒト腎細胞癌株の作成に成功している。まずは、既存の腎癌細胞株とこのスニチニブ抵抗性腎癌細胞株を用いて、アキシチニブ抵抗性腎癌細胞株を複数作成し、これらに共通して発現異常を示すmicroRNAを解析する。次に、アキシチニブ抵抗性株を移植した転移モデルマウスを作成し、マウス体液(血液や尿)中でも同様のmicroRNAに発現異常が見られるかを確認する。そして、体液でも発現異常が確認できたmicroRNAをアキシチニブ抵抗性マーカーのcandidateとする。さらに、アキシチニブ抵抗性マーカーの異常を示したモデルマウスにアキシチニブを投与し、実際にアキシチニブが無効であるかを検証する。

3. 研究の方法

我々は過去の実験において、スニチニブ(現在、進行性腎癌の一次薬物療法として最も使用頻度の高いTKI)抵抗性ヒト腎細胞癌株の作成に成功している。まずは、既存の腎癌細胞株とこのスニチニブ抵抗性腎癌細胞株を用いて、アキシチニブ抵抗性腎癌細胞株を複数作成し、これらに共通して発現異常を示すmicroRNAを解析する。次に、アキシチニブ抵抗性株を移植した転移モデルマウスを作成し、マウス体液(血液や尿)中でも同様のmicroRNAに発現異常が見られるか

を確認する。そして、体液でも発現異常が確認できた microRNA をアキシチニブ抵抗性マーカーの candidate とする。さらに、アキシチニブ抵抗性マーカーの異常を示したモデルマウスにアキシチニブを投与し、実際にアキシチニブが無効であるかを検証する。

詳細として、以下の5段階の方法で研究を予定する。

(1) アキシチニブ抵抗性腎癌細胞株の作成

鳥取大学泌尿器科において所有しているヒト腎癌細胞株 (ACHN、RCC23、Caki-1、KMRC-1、RCC10RGB、TUHR10TKB、TUHR14TK) と独自に作成したスニチニブ抵抗性腎癌細胞株2種を用いて、これらの細胞株をアキシチニブ含有培養液で継続して培養し、徐々にスニチニブ濃度を上げ、各細胞の 50% Inhibitory Concentration (IC50) でも安定して増殖を示すアキシチニブ耐性腎癌細胞株を作成する。

(2) アキシチニブ抵抗性腎癌細胞株に共通して発現異常を示す microRNA を網羅的に解析

(1) で作成した複数のアキシチニブ抵抗性腎癌細胞株と親株における microRNA 発現量を microarray により網羅的に解析し、親株と比較して抵抗性株に共通して発現異常を示す microRNA を同定する。

(3) アキシチニブ抵抗性モデルマウスを作成

(1) で作成したアキシチニブ抵抗性腎癌細胞株をマウス皮下に移植し、アキシチニブ抵抗性腎癌転移モデルマウスを作成する。

(4) マウスの体液中で発現異常を示す microRNA の解析

アキシチニブ抵抗性モデルマウスの体液 (血液や尿) サンプルを採取し、発現異常を示す microRNA を同定する。(2) で同定したものと一致する microRNA をアキシチニブ抵抗性マーカーの candidate とする。

(5) アキシチニブ抵抗性マーカーの診断能を検証

(4) において、アキシチニブ抵抗性マーカーの異常を示したモデルマウスにアキシチニブを投与し、実際にアキシチニブが無効であるかどうかを検証する。

4. 研究成果

これまでにヒト RCC 細胞株である ACHN を用いて、スニチニブ耐性モデル (SR-ACHN) を確立してスニチニブ耐性獲得メカニズムを研究し、リソソーム関連膜タンパク 2 (LAMP-2) の発現増加がスニチニブ耐性獲得に関与することを解明してきた。LAMP-2 には生理機能の異なる LAMP-2A、2B、2C という3つのスプライスバリエントがあるが、RCC のスニチニブ耐性に主に関与するバリエントは未だ同定されていなかった。我々は ACHN および SR-ACHN を使用して、スニチニブ耐性に関与する LAMP-2 バリエントを同定する実験を行った。ACHN、SR-ACHN における LAMP-2A、2B、2C それぞれの発現、及び強制発現株作成の評価は PCR を行って確認した。LAMP-2A、2B、2C 強制発現株のスニチニブ耐性獲得は細胞毒性試験を行って評価した。

結果として、ACHN と比較し SR-ACHN において LAMP-2A、2B、2C の全ての発現が上昇していることが確認されたが、強制発現株における細胞毒性試験では、LAMP-2A と 2B の強制発現株が ACHN と比較してスニチニブに対して有意に高い耐性を示すことが確認された。以上のことから、LAMP-2A および LAMP-2B は RCC のスニチニブ耐性に関与していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryoma Nishikawa, Osaki M, Sasaki R, Ishikawa M, Yumioka T, Yamaguchi N, Iwamoto H, Honda M, Kabuta T, Takenaka A, Okada F.	4. 巻 44
2. 論文標題 Splice variants of lysosome-associated membrane proteins 2A and 2B are involved in sunitinib resistance in human renal cell carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol Rep.	6. 最初と最後の頁 1810-1820
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔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
---------	---------