

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09731

研究課題名(和文)腎癌におけるフェロトーシスの分子機構の解明と新たな治療戦略の構築

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of ferroptosis and construction of new therapeutic strategy in renal cell carcinoma

研究代表者

望月 保志(MOCHIZUKI, Yasushi)

長崎大学・病院(医学系)・准教授

研究者番号：40404256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌などの悪性腫瘍における病態あるいは病勢進行に、鉄あるいは鉄代謝といった体内の鉄動態が重要な役割を果たすことが、これまで明らかとなっている。また、鉄の依存する細胞死=フェロトーシスといった事象が存在し、腎癌における病理学的役割および分子生物学的機序への関与は不明な点が多い。そこで、腎癌におけるフェロトーシス関連因子の臨床病理学的特徴の解明を目指し、近年の主たる腎癌治療薬である分子標的薬あるいは免疫チェックポイント阻害剤の治療効果に関わるマーカーとなりうる可能性について探求した。また、関連因子として各種サイトカインの役割について解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移性腎癌などの進行腎癌の主たる治療には、分子標的療法あるいは免疫チェックポイント阻害剤を用いた免疫療法がある。近年、治療方法の改善により、進行腎癌の生命予後も以前と比較して改善している。ただし、多くの症例は、予後不良であり、フェロトーシスやフェロトーシス関連因子としてのサイトカインの動態の解明は、治療効果を予測する臨床的マーカーとなる可能性がある。さらに病理学的特徴と臨床的マーカーの関連性を占めることにより、適切な治療選択の可能性の幅が広がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is now clear that iron kinetics, or iron metabolism, in the body plays an important role in the pathogenesis and progression of malignant tumors such as renal cancer. In addition, there are events such as iron-dependent cell death (i.e., ferroptosis), and their role in the pathology and molecular mechanisms of renal cancer is still unclear. In this study, we sought to elucidate the clinicopathological characteristics of ferroptosis-related factors in renal cancer and explored their potential as markers for therapeutic efficacy of molecularly targeted drugs or immune checkpoint inhibitors, which are the major recent drugs for renal cancer. We also elucidated the role of various cytokines as associated factors.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腫瘍学 腎細胞癌 薬物療法 治療効果

1. 研究開始当初の背景

当研究グループでは、腎癌における局所浸潤あるいは転移出現などの病勢進行に、鉄動態あるいは鉄代謝の分子生物学的あるいは臨床病理学的関与について報告してきた。一方、鉄に依存する細胞死 (=フェロトーシス) の存在が各種癌細胞で証明され、その生物腫瘍学的役割について近年注目されるようになった。特に、2012年にフェロトーシスが初めて報告され、癌細胞におけるフェロトーシスの病理学的役割や、抗悪性腫瘍治療薬によるフェロトーシス誘導の可能性が報告され、さらに注目されるようになった。しかし、腎癌におけるフェロトーシスの分子生物学的あるいは病理学的役割や分子生物学的な機能については不明な点が多い。そこで、研究開始当初は以下の研究計画を立案して、腎癌におけるフェロトーシスの分子生物が機序の解明およびフェロトーシス関連分子の探索による腎癌治療の治療効果に關与する臨床的マーカーの探索を行うことを計画した。実際の研究計画の立案内容は以下である。腎癌細胞株でフェロトーシスの制御により生じる分子生物学的特徴の変化の有無を調べ解明する。各種治療薬を用いた動物モデルを作成することで、動物モデルに生じる病理学的特徴の変化とフェロトーシスの関連を解明する。そして、の結果を総合的に検討することで、腎癌におけるフェロトーシス関連因子を同定する。次に、フェロトーシス関連因子の腎癌患者組織における臨床病理学的役割と機能解明、腎癌治療に使用されている分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬の治療効果や生命予後とのフェロトーシス関連因子の臨床的関与を明らかにする。さらにフェロトーシスが腎癌組織で果たす役割や分子生物学的機序を利用した「新たな予後予測モデル」や「斬新な治療戦略」構築に有用な情報を提供する。上述のような研究計画を立案し、の実験的手法を用いて、腎癌のフェロトーシスに關与する生物学的分子の解明と腎癌治療薬の治療効果を予測するモデルの開発を行うことを主目的とする事とした研究を開始した。本研究では、腎癌細胞株に加えて、動物モデル、腎癌摘出標本といった臨床検体を用いたフェロトーシスの生理学的機能と病理学的意義の解明を、トランレーショナル・リサーチ的手法を用いた網羅的解析により研究結果を示すことを目指した。

2. 研究の目的

フェロトーシスという現象が確認され、報告され始めたのは研究開始当初は数年程度であり、腎癌におけるフェロトーシスの分子生物学的役割について *in vitro* / *in vivo* で網羅的に解析が行われた研究は皆無である。現在、局所浸潤あるいは全身転移性腎癌などの進行腎癌に対する標準的治療の一つに腫瘍免疫賦活を標的とした免疫チェックポイント阻害剤によるものがある。上記のような治療に腎癌の進行に關与するフェロトーシスが關与する可能性は考慮されるが、そういった内容に關連した研究あるいは報告は皆無である。そこで当研究グループでは腎癌におけるマクロファージ、ナチュラルキラー細胞、マスト細胞といった免疫関連細胞の関連を証明してきた。そこで、これまでの研究結果を考慮して、炎症や腫瘍細胞死との関連の可能性が示唆されるフェロトーシスへの關与を調査し、フェロトーシスと免疫細胞との関連を示し、進行腎癌における免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を示すことのできる臨床マーカーの開発を検討した。また本研究を進めるにあたって、腎癌の病勢進行に鉄動態あるいは鉄代謝の關与が証明されていることが、以前に示されていたことを参考にすることとした。鉄代謝には抗炎症作用あるいは抗酸化作用の生化学的關与が明らかであり、進行性腎癌の治療である分子標的療法あるいは免疫療法の治療効果に關連する炎症性サイトカインの研究調査を合わせて行った。そのことにより治療効果を予測する炎症関連マーカーを検索することを目的とした。

3. 研究の方法

研究開始時当初は、腎癌におけるフェロトーシスの分子生物学的機序の解明と臨床病理学的役割について、各種細胞実験、動物モデル、腎癌臨床検体を用いた実験計画を立案していた。さらに腎癌におけるフェロトーシスに關与する促進因子あるいは阻害因子を探求し、その分子の機能解析により、腎癌治療薬の治療効果に關連する臨床マーカーの探索を行う予定とした。上述したように、当研究グループでは、腎癌の進行に鉄代謝が關与することを以前に示しており、鉄代謝では炎症作用や酸化作用の關連が考えられている。各種疾患において、抗炎症作用あるいは抗酸化作用を指摘されているロイヤルゼリーと進行腎癌の治療効果との関連について検討を行った。進行腎癌の治療薬である分子標的薬の一つであるチロシンキナーゼ阻害剤の抗腫瘍効果におけるロイヤルゼリーの臨床病理学的役割の解明について初期研究を行うこととした。腎癌薬物療法の代表的治療薬であるチロシンキナーゼ阻害剤には種々の副作用を認めるが、特に全身倦怠感と食欲低下は高頻度の事象である。当グループにおける臨床研究において、進行腎癌患者においてロイヤルゼリーの投与により全身倦怠感および食欲低下が明らかに減少するという結果であった。そこで、ロイヤルゼリーの有害事象の軽減効果に關連する生物学的因子の解明を行った。特に抗炎症作用あるいは抗酸化作用に關連するサイトカインについて分子生物学的意義について研究を行った。

4. 研究成果

上記 2.3. に述べた研究目的、研究方法に準じて以下、(1)、(2)の研究を行った。

(1) 進行腎癌における治療薬であるチロシンキナーゼのロイヤルゼリーによる進行腎癌治療薬チロシンキナーゼ阻害剤の有害事象軽減効果に関する研究。

ランダム化、二重盲検、プラセボコントロール臨床試験を行った。患者群をプラセボ群とロイヤルゼリー群(実薬群)に 1:1 にランダムに割り付けた。実薬群 16 名とプラセボ群 17 名について臨床病理学的背景には有意差はなし。チロシンキナーゼに対する有害事象は、高血圧、全身倦怠感、食欲低下、手足症候群、骨髄抑制、腎機能障害、肝機能障害、甲状腺機能障害が代表的なものであった。実薬群では全身倦怠感、食欲低下の発生頻度が有意に低下していた。一方、高血圧、全身倦怠感では、両群間に、発生頻度に有意差は認めなかった。また臨床検査的検討では、骨髄抑制、腎機能障害、肝機能障害、甲状腺機能障害の発生頻度は両群間で有意差は認めなかった。

実薬群ではチロシンキナーゼ阻害剤による有害事象であり、QOL(生活の質)に影響する有害事象である全身倦怠感や食欲低下といった有害事象の軽減効果が示された。さらに実薬群では、プラセボ群より相対的投与量が大きい傾向にあり、治療効果を改善する可能性が考えられた。

(2) チロシンキナーゼ阻害剤の有害事象軽減効果に関連する生物学的因子の解明に関する研究

上記(1)のロイヤルゼリーによる QOL に大きく関与する有害事象の軽減効果が示されたので、その軽減効果に関連する生物学的因子の解明について炎症性サイトカインを目的分子として研究を行った。

実薬群 16 名とプラセボ群 17 名について炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)-、transforming growth factor (TGF)-、interleukin(IL)-6 を enzyme-linked immunosorbent assay 法を用いて治療前後測定値による評価を行った。最初に、実薬群の方がプラセボ群と比較して治療効果が良好であることが判明した(表 1)。また実薬群では、食欲低下および全身倦怠感といった有害事象がより軽度であり(表 2)、治療薬の相対的投与量が大きくなる確認できた(表 3)。すなわち、実薬群では腎癌治療薬の有害事象が軽減されるため、相対的投与量がより増加し、そのことが治療効果を改善させている可能性が示唆された。

そこで、治療前後の各種サイトカインの低下率による各種パラメーターの評価を行ったところ、治療前後の TNF-、TGF- が実薬群の方がプラセボ群より低下率が高値であり(表 4)、治療効果のある群は、治療効果のない群と比較して、TNF-、TGF- 低下率が高値であった。一方、IL-6 低下率は治療の有無及び治療効果と関連は認めなかった(表 5)。また治療前後の TGF- の低下率が全身倦怠感や食欲低下といった治療薬の有害事象の有無と統計学的相関が認められた(表 6)。

表 1. 治療効果

治療効果	全症例 n(%)	プラセボ群 n(%)	実薬群 n(%)	P 値
完全奏功	1 (3.0)	0(0.0)	1(6.3)	0.037
部分奏功	11(33.3)	3(17.6)	8(50.0)	
不変	16(48.5)	9(52.9)	7(43.8)	
進行	5(15.2)	5(29.4)	0(0.0)	

表 2. 有害事象の発生頻度

有害事象	プラセボ群 n(%)	実薬群 n(%)	P 値
食欲低下あり	4(23.5)	11(68.8)	0.009
食欲低下なし	13(76.5)	5(31.2)	
全身倦怠感あり	2(11.8)	11(68.8)	<0.001
全身倦怠感なし	15(88.2)	5(31.2)	

表 3. 相対的投与量(チロシンキナーゼ阻害剤)

治療期間	プラセボ群/実薬群	P 値
治療 1 ヶ月後	プラセボ群 vs 実薬群	0.007
治療 2 か月後	プラセボ群 vs 実薬群	0.031
治療 3 ヶ月後	プラセボ群 vs 実薬群	0.084

表 4. 各種サイトカインの治療前後比（プラセボ群と実薬群の比較検討）

	プラセボ群/実薬群	P 値
TNF- 治療前後比	プラセボ群 vs 実薬群	0.007
TGF- 治療前後比	プラセボ群 vs 実薬群	0.006
IL-6 治療前後比	プラセボ群 vs 実薬群	0.360

表 5. 各種サイトカインの治療前後比（治療効果）

	治療効果	P 値
TNF- 治療前後比	完全奏功 + 部分奏功 vs 不変	0.018
	完全奏功 + 部分奏功 vs 進行	0.002
TGF- 治療前後比	完全奏功 + 部分奏功 vs 不変	0.219
	完全奏功 + 部分奏功 vs 進行	0.333
IL-6 治療前後比	完全奏功 + 部分奏功 vs 不変	0.911
	完全奏功 + 部分奏功 vs 進行	0.999

表 6. 各種サイトカインの治療前後比（治療による有害事象に関する検討）

	有害事象	P 値
TNF- 治療前後比	食欲低下の有無	0.805
	全身倦怠感の有無	0.294
TGF- 治療前後比	食欲低下の有無	0.030
	全身倦怠感の有無	0.030
IL-6 治療前後比	食欲低下の有無	0.626
	全身倦怠感の有無	0.387

本研究において、腎癌治療薬であるチロシンキナーゼ阻害剤にロイヤルゼリーといった抗炎症作用の期待できる治療薬を併用することで、有害事象軽減が相対的投与量の増加をもたらし、効果改善効果につながる可能性が考えられた。さらに、そのメカニズムについて研究したところ、TGF- の抑制作用を介する副作用軽減による相対的薬物投与量の増大ならびに TNF- の抑制作用による直接的な腫瘍抑制作用が腎癌治療効果改善に寄与している可能性が示唆された。

上記の腎癌の病勢進行に関与する抗炎症作用あるいは事象が、腎癌治療に治療効果あるいは治療効果を反映する臨床的マーカーとなる可能性が考えられた。今後は抗炎症作用に関連するフェロトシスの進行腎癌における関連分子の同定および機能解析を続けて行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyata Y, Araki K, Ohba K, Mastuo T, Nakamura Y, Yuno T, Mukai Y, Otsubo A, Mitsunari K, Mochizuki Y, Sakai H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Oral intake of royal jelly improves anti-cancer effects and suppresses adverse events of molecular targeted therapy by regulating TNF- and TGF- in renal cell carcinoma: A preliminary study based on a randomized double-blind clinical trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2020.2099.	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 Ohba K, Miyata Y, Shinzato T, Funakoshi S, Maeda K, Matsuo T, Mitsunari K, Mochizuki Y, Nishino T, Sakai H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of oral intake of royal jelly on endothelium function in hemodialysis patients: study protocol for multicenter, double-blind, randomized control trial.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trials	6. 最初と最後の頁 950
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13063-021-05926-x.	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 Aibara N, Miyata Y, Araki K, Sagara Y, Mitsunari K, Matsuo T, Ohba K, Mochizuki Y, Sakai H, Ohyama K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Detection of Novel Urine Markers Using Immune Complexome Analysis in Bladder Cancer Patients: A Preliminary Study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 2073-2080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12476.	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 Harada J, Miyata Y, Araki K, Matsuda T, Nagashima Y, Mukae Y, Mitsunari K, Matsuo T, Ohba K, Mochizuki Y, Sakai H.	4. 巻 35
2. 論文標題 Pathological Significance and Prognostic Roles of Thrombospondin-3, 4 and 5 in Bladder Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In vivo	6. 最初と最後の頁 1693-1701
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12429.	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
研究分担者	大庭 康司郎 (OHBA Kojiro) (20593825)	長崎大学・病院(医学系)・講師 (17301)	
研究分担者	宮田 康好 (MIYATA Yasuyshi) (60380888)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	

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