

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07582

研究課題名（和文）癌代謝解析による腎癌細胞のチロシンキナーゼ阻害薬耐性獲得機序と新規治療標的の解明

研究課題名（英文）Investigation of new therapeutic target of renal cell carcinoma resistant to a tyrosine kinase inhibitor by elucidating the drug tolerance by cancer metabolomics

研究代表者

川崎 芳英（Kawasaki, Yoshihide）

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：80722256

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）：進行腎細胞癌は免疫チェックポイント阻害薬（immune checkpoint inhibitor: ICI）の登場により生存期間が延長しつつあるが、さらなる予後延長には、ICIとの併用および逐次療法としてのチロシンキナーゼ阻害薬（tyrosine kinase inhibitor: TKI）を如何に有効に使用するかが鍵となっている。尿中代謝物測定にて、TKIの一つのsunitinib耐性となった患者は全例で尿中glutamateが上昇し、高い上昇率が予後増悪因子であること明らかにした。さらには、glutamine代謝経路を有効に制御することでTKI耐性を克服する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎癌細胞の癌代謝を一元的にとらえ、代謝制御によりTKI耐性を克服することで進行腎癌患者のさらなる予後改善が期待されるようになった。また、研究過程におけるglutamine代謝制御とVEGFシグナリングの関連を解析することでTKI耐性のメカニズムの一端がわかり、腎癌細胞の悪性化やTKI耐性を予測する尿中バイオマーカーが付随的に確立しつつある。本研究結果として、腎癌診療において、進行腎細胞癌患者のさらなる予後改善だけでなく、画像検査の効率化による患者の被ばくの低減と医療費削減にも寄与できると考える。

研究成果の概要（英文）：Since, the key to further prolonging prognosis lies in the effective use of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in combination with ICIs and as sequential therapy. However, the key to further prolonging prognosis is the effective use of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in combination with ICIs and as sequential therapy. Urinary metabolite assays revealed that urinary glutamate was elevated in all patients who became resistant to one of the TKIs, sunitinib, and that the high elevation rate was a prognostic aggravating factor. Furthermore, the study revealed the possibility of overcoming TKI resistance by effectively regulating the glutamine metabolic pathway.

研究分野：癌代謝

キーワード：腎細胞癌 癌代謝 チロシンキナーゼ阻害薬 グルタミン

1. 研究開始当初の背景

根治切除不能もしくは転移性腎癌に対して、tyrosine kinase inhibitor (TKI) が治療薬として用いられ、免疫療法の登場後も腎癌治療に重要な薬剤である。TKI は一時的な奏効がえられても、その後に病勢の増悪がしばしば見られ、TKI への耐性の克服が課題である。腎細胞癌には診断や予後を反映する体液腫瘍マーカーがなく、また、薬物治療の効果を反映するようなバイオマーカーも存在しないのが現状である。しかし、近年、癌患者の検体から代謝化合物(脂質、有機酸、糖、アミノ酸、ペプチド、核酸塩基、塩類)を包括的に捉えるメタボロミクスが手術の癌のバイオマーカー探索に有用との報告がなされている。私たちも、手術検体を用いて、淡明型腎細胞癌と病理診断された症例の癌部と非癌部組織における代謝化合物を分析対象としたグローバル(網羅的)メタボロミクスを行ってきた。その結果、淡明腎細胞癌の早期診断に有用な代謝化合物とその代謝経路を見出した。さらに、腫瘍体積、pT stage、Fuhrman 分類、凝固壊死、遠隔転移の有無などの悪性度評価に関わる代謝化合物とその代謝経路も明らかにした。そこで、これら代謝化合物を基にしたメタボロミクスにより、TKI 耐性にグルタミンの代謝経路の関与が示唆された。本研究では、癌代謝の観点から、TKI 代謝に関わる酵素やその関連遺伝子の解析を行い、腎細胞癌の TKI 耐性機構を解明したい。また、癌代謝をターゲットとした TKI 耐性を制御する新たな治療を構築したい。

2. 研究の目的

術後再発や根治切除不能および転移性腎細胞癌に対して免疫チェックポイント阻害薬が新規に保険適応となり、腎癌患者の予後改善が期待されている。しかし、進行性腎細胞癌の治療における TKI は、免疫療法との併用や逐次療法に必須であり、その重要性は今後も変わらぬと考えられる。TKI による治療効果判定は画像検査に依存し、時に、次の画像検査までの期間、無効な TKI を投与することもあり得る。無効な TKI の継続は、副作用による弊害だけでなく、未だ高価な薬剤であるため医療経済的な損失もあり、TKI の薬効判定マーカーの確立が実臨床に与える影響は大きい。

近年、いくつかの癌種において、患者の検体から代謝化合物を包括的に捉えるグローバルメタボロミクスがバイオマーカー探索に有用と報告されている。私たちは、淡明型腎細胞癌と病理診断された症例の癌部および非癌部組織を分析対象とし、グローバルメタボロミクスによる腎癌のプロファイルを示す代謝化合物を解析した。アミノ酸から脂質まで幅広く、より多くの代謝化合物を検出できるように、独自のカラム選択および溶媒の調整にてメタボロミクスを行い、一つの工程で 2000 以上もの代謝化合物を検出するプロトコルを構築した。癌部で有意に上昇する 58 の代謝化合物を同定した。代謝化合物の ROC 曲線を作成し、area under the curve (AUC)を求め、AUC0.8 超を高い診断能を有する代謝化合物と判定した。うち 34 化合物が AUC0.8 超の診断能を有する代謝化合物であることが示めされ、主に glycerophospholipid、glutathione、glycoglycerolipid、glycolysis、carnitine、tocopherol の代謝経路に属していることを明らかにした(図 1)。特に、腫瘍体積が小さい段階から上昇し、体積との相関関係を認めない glutathione と energy store の代謝経路が早期診断に有用であると推測された。さらに、悪性度に関連する代謝化合物を検出するため、腫瘍体積、pT stage、Fuhrman 分類、凝固壊死の有無、遠隔転移の有無などの臨床病理学的因子と代謝化合物の関連を調査した。その結果、主に nucleotide sugar、TCA cycle、inositol の代謝経路に属することを明らかにした。

腎細胞癌におけるメタボロミクスの報告いくつか存在するものの、現時点で、TKI を含めた薬剤耐性機構に関わる代謝化合物の報告はない。最近、MET/AXL のリン酸化が腎癌細胞の TKI 耐性機構において重要なシグナリングであることが分かってきた。MET/AXL 等のリン酸化シグナルとわたしたちが明らかにした代謝化合物との関連はどうだろうか？関連あるいくつかの重要な代謝化合物や代謝経路が分かれば、その代謝酵素の遺伝子発現を分析することで腎癌細胞の TKI 耐性機構が解明できないだろうか？これらの問いを解決し、進行性腎細胞癌における実臨床に応用可能な TKI の薬効判定マーカーを確立し、TKI 耐性腎細胞癌に対する新規治療を構築したい。

3. 研究の方法

(1) 癌代謝からみた腎癌細胞の TKI 耐性機構の解明

● TKI 耐性腎癌細胞の確立

TKI 含有培養液を用いて腎癌細胞株 786-0 および ACHN を培養し、徐々に投与する TKI 濃度を高くし、10 μ M の TKI 含有培地の細胞株を樹立する。TKI は Sunitinib、Axitinib および Pazopanib

を用いる。すでに、Sunitinib については 786-0 腎癌細胞を用いた耐性細胞株 (786-R) を樹立し、図 2a および 2b に示すように、非耐性細胞株 (786-P) と比較し、Sunitinib 含有培地において、786-R は培養開始から 72h 以降も有意な増殖がみられ、Sunitinib により浸潤能が抑制されない。今回用いる TKI は Vascular Endothelial Growth Factor 阻害薬であり、血管内皮との関連において効果が発揮される薬剤である。TKI 耐性細胞株の樹立は *in vitro* だけでは不十分であるため、*in vitro* で樹立した TKI 耐性 O-786 および ACHN をヌードマウスに皮下接種し、マウスに TKI を一定期間経口摂取にて増大する腫瘍から *in vivo* を介した耐性細胞株を樹立する。

- 樹立した TKI 耐性腎癌細胞の癌代謝の解明

樹立した TKI 耐性細胞株と非耐性細胞株において、メタボロミクスによる耐性化に関する代謝化合物を同定する。また、同定した代謝化合物の代謝に関わる代謝酵素の発現を qPCR およびウエスタンブロットで解析する。

- (2) 臨床応用可能な TKI 薬効判定マーカー確立

- 患者 (TKI 治療患者) および健常者の検体 (体液) を用いて評価

すでに、100 例以上の TKI 治療患者と 60 例の健常者の尿及び全血検体を凍結保存している。グローバルメタボロミクスに加え、上記で同定した代謝化合物の標準物質を用意し、ローカルメタボロミクスを開始している。一部の TKI 治療患者の尿及び血液で定量的な代謝化合物の安定した検出が可能であることを確認している。

- TKI の薬効判定マーカーの確立

本研究で同定した複数の TKI の耐性に関わる代謝化合物について、単変量および多変量解析を用いて TKI 薬効判定の予測式を構築する。時間が許せば、この予測式の妥当性を、より多くの患者検体による前向き validation cohort 研究にて評価する。

- (3) TKI 耐性シグナルに関連する代謝化合物その代謝経路および代謝酵素の解明

- MET/AXL に関連する代謝化合物の解明

TKI の投与により、通常、MET/AXL のリン酸化は抑制される。よって、同定した TKI の耐性化に関わる代謝化合物と、MET/AXL のリン酸化の解析は必須であり、その関連を統計学的に評価する。私たちの先行研究で、いくつかの代謝化合物の MET/AXL のリン酸化への有意な関与が示されている。

- MET/AXL のリン酸化と nucleotide sugar、TCA cycle、inositol 代謝経路の関連の解明

先行研究で明らかになった悪性度評価に関わる nucleotide sugar、TCA cycle、inositol の代謝経路における関連を解析し、TKI 耐性化のキーとなる代謝化合物および代謝経路を解明する。TKI 投与により、通常、解糖系も抑制される。しかし、TKI 耐性化において解糖系は亢進し、さらにグルタミンの代謝経路の亢進が報告され、私たちの先行研究においてもグルタミンの代謝経路の亢進が示されている。

- (4) 代謝酵素制御による TKI 耐性腎癌細胞の TKI 感受性獲得機構の解析

- 代謝酵素の Knockdown による TKI 耐性腎癌細胞におけるメタボロミクスおよび MET/AXL のリン酸化の解析

グルタミンは腎細胞癌の TKI 耐性化のキー代謝化合物のひとつと推測する。グルタミン代謝に関わるいくつかの酵素の knockdown (KO) による代謝の変化、MET/AXL のリン酸化に及ぼす影響を解析する。KO による TKI 耐性腎癌細胞の TKI の感受性の変化をみることで、薬効判定マーカーの可能性や TKI 耐性腎細胞癌の新規治療標的を明らかにする。

4. 研究成果

尿中代謝物測定にて、TKI の一つの sunitinib 耐性となった患者は全例で尿中 glutamate (薬効判定マーカー) が上昇し、高い上昇率が予後増悪因子であること明らかにした。さらには、glutamine 代謝経路を有効に制御することで TKI 耐性化を克服する可能性を明らかにした。そのメカニズムとして、腎癌細胞の glutamine 代謝制御が VEGF 受容体や VEGF シグナリングを変化させ、さらに血管新生阻害効果を増強することによって、生体でのより腫瘍縮小効果が期待できることを解明した。

腎癌細胞の癌代謝を一元的にとらえ、代謝制御により TKI 耐性化を克服することで進行腎癌患者のさらなる予後改善が期待されるようになった。また、研究過程における glutamine 代謝制御と VEGF シグナリングの関連を解析することで TKI 耐性化のメカニズムの一端がわかり、腎癌細胞の悪性化や TKI 耐性化を予測する尿中バイオマーカーが付随的に確立しつつある。本研究結果として、腎癌診療において、進行腎細胞癌患者のさらなる予後改善だけではなく、画像検査の効率化による患者の被ばくの低減と医療費削減にも寄与できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morozumi Kento, Kawasaki Yoshihide, Maekawa Masamitsu, Takasaki Shinya, Sato Tomonori, Shimada Shuichi, Kawamorita Naoki, Yamashita Shinichi, Mitsuzuka Koji, Mano Nariyasu, Ito Akihiro	4. 巻 113
2. 論文標題 Predictive model for recurrence of renal cell carcinoma by comparing pre and postoperative urinary metabolite concentrations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 182 ~ 194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15180	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 Sato T, Kawasaki Y, Maekawa M, Takasaki S, Morozumi K, Sato M, Shimada S, Kawamorita N, Yamashita S, Mitsuzuka K, Mano N, Ito A.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Metabolomic Analysis to Elucidate Mechanisms of Sunitinib Resistance in Renal Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo11010001	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 諸角謙人 川崎芳英
2. 発表標題 Regulation of glutaminolysis by glutamine transporter knockdown to establish a new therapy for TKI-resistant RCC
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 諸角謙人 川崎芳英
2. 発表標題 グルタミン代謝経路制御による腎細胞癌TKI耐性化の克服
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 諸角謙人 川崎芳英
2. 発表標題 メタボロミクス解析に基づく尿中代謝物測定による腎細胞癌術後の再発予測モデルの構築
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 諸角謙人 川崎芳英
2. 発表標題 TKI耐性腎癌細胞に対するグルタミン代謝制御による新規治療 戦略
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 諸角謙人 川崎芳英
2. 発表標題 メタボロミクス解析に基づく尿中代謝物測定による 腎細胞癌術後の再発予測モデルの構築
3. 学会等名 第31回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 諸角謙人 川崎芳英
2. 発表標題 癌代謝とシグナリングから見た腎細胞癌のTKI耐性 機序の解明とその克服
3. 学会等名 第32回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 諸角謙人 川崎芳英
2. 発表標題 Glutaminolysis and VEGF analysis to elucidate and overcome the mechanism of tyrosine kinase inhibitor resistance in Renal Cell Carcinoma
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023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	伊藤 明宏 (Ito Akihiro) (70344661)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	三塚 浩二 (Mitsuzuka Koji) (80568171)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	嶋田 修一 (Shimada Shuichi) (80749218)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	方山 博路 (Katayama Hiromichi) (90466558)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

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