

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18143

研究課題名(和文)腎癌免疫療法時代の新たな治療戦略構築を目的としたDDX41の機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of DDX41 for the construction of new therapeutic strategies in the era of renal cancer immunotherapy.

研究代表者

稗田 圭介(Hieda, Keisuke)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：60625630

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)：腎細胞がんの内部に腫瘍壊死という状態がある場合、がんの悪性度が高い傾向にある事が知られています。しかし、なぜそうなるのかはあまりわかっていませんでした。我々のグループは、腫瘍壊死によって分解された細胞内のDNAを感知するDDX41というタンパクの発現が、がんの悪性度に関係するのではないかと考えました。腎細胞がんに対して手術を行った患者さんの組織を用いて、DDX41というタンパク質の発現レベルを評価したところ、DDX41の発現レベルが高いと腫瘍壊死を有する頻度が高く、さらにがんの再発率や生存率が悪くなる事が判明しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、腎細胞癌における腫瘍壊死が、なぜ悪性度や予後増悪に関与するのか未知の点が多かった。我々は、腫瘍壊死により放出される分解されたdsDNAをDDX41が感知して発現が上昇し、間接的に予後増悪に寄与すると考えた。本研究は、腎細胞癌のうち最も頻度の高い淡明細胞型腎細胞癌において、DDX41の発現が腫瘍壊死や生命予後と有意に関係している事を初めて明らかにした。淡明細胞型腎細胞癌はVHL機能欠失型変異を特徴とするが、VHL欠失下においてのみ、DDX41の発現上昇はケモカインファミリーの発現亢進や腫瘍増殖に寄与する事が判明した。DDX41の高発現は、淡明細胞型腎細胞癌の予後予測因子となる。

研究成果の概要(英文)：It is known that the presence of tumor necrosis within renal cell carcinoma is associated with a higher malignancy. However, the underlying mechanisms have not been well understood. Our group hypothesized that the expression of a protein called DDX41, which detects intracellular DNA degraded by tumor necrosis, might be related to cancer malignancy. Using tissue samples from patients who underwent surgery for renal cell carcinoma, we evaluated the expression levels of DDX41. We found that higher expression levels of DDX41 were associated with increased recurrence rates and poorer survival outcomes.

研究分野：腎細胞癌

キーワード：腎細胞癌 DDX41 ケモカイン 予後予測因子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行性腎細胞癌に対して、複数の新規免疫治療薬 (I-O drug) の有効性が示されている。抗 PD-1 抗体は、奏効率が 15-30% と極めて低いことから、効果予測による最適な患者選択が望まれている。他癌腫では PD-1 のリガンド PD-L1 の発現が効果予測に有用とされるが、腎細胞癌には不適であり、新たな効果予測因子の解明は急務である。そこで我々は、その候補として自然免疫に関与する蛋白 DDX41 (DEAD-box helicase 41) に着目した。DDX41 は、STING 経路と呼ばれる免疫応答経路を活性化し、PD-1/PD-L1 シグナル賦活化に寄与し得る。腎細胞癌における DDX41 の機能的役割は全く不明であるが、我々は事前の調査により、腎細胞癌における DDX41 の発現亢進は (1) 抗 PD-1 抗体の効果を予測する (2) STING 経路の賦活化を介して悪性度を高める という仮説を得た。本研究はこれらの仮説の検証を目的とする。我々の研究成果は、腎細胞癌 I-O drug 時代の新規治療戦略構築の布石となる。

2. 研究の目的

RCC に対する抗 PD-1 抗体療法は、奏効率が極めて低いことから、効果予測による最適な患者選択が望まれている。他癌腫では、PD-1 のリガンドである PD-L1 発現がその効果を予測する因子とされるが、RCC では PD-L1 発現は効果予測因子とならないため、これに代わる新規効果予測因子の確立は喫緊の課題である。我々は、自然免疫応答に関与する蛋白 DDX41 に着目し、上記の学術的「問い」を得た。加えて、DDX41 の固形癌における機能的役割は未だ不明であることから、RCC と DDX41 の関連性について以下に示す予備解析も行った。

3. 研究の方法

広島大学病院および関連施設において、ccRCC に対して抗 PD-1 抗体を使用した症例を抽出する。事前に腎摘除術または生検を受けた症例について、病理標本を用意する。DDX41, STING, IRF3, PD-1, PD-L1, PD-L2 の免疫染色後、各発現強度を層別化する。各患者背景、OS, PFS を算出し、層別化した免疫染色結果と比較検討する。

4. 研究成果

まず、公共データベースを用いて淡明細胞型腎細胞癌 (ccRCC) 患者の遺伝子プロファイルを手入れし、各症例の手術時の腫瘍径、腫瘍内壊死の有無について全ての病理学的所見をダウンロードし、調査した。その結果、腫瘍径が大きいほど有意に腫瘍壊死所見の頻度が高く、また腫瘍径と DDX41 遺伝子の相対的発現値 (z-score) は有意な正の相関がある事が判明した。さらに臨床的因子と DDX41 遺伝子の関連性を調査したところ、DDX41 の相対的発現値が高い方が有意に腫瘍壊死の頻度が高く、有意に病理学的グレードが高く、有意に病理学的病期分類が高い事が判明した。

次に DDX41 の発現と生存率について解析したところ、DDX41 発現が高い症例は、それ以外の症例と比較して有意に非再発率および全生存率が増悪する事が判明した。腫瘍壊死の有無でも同様に調査したところ、やはり腫瘍壊死のある症例ではない症例よりも有意に非再発率と全生存率が増悪した。これらの事から、ccRCC における DDX41 遺伝子の高発現は、腫瘍壊死と関連し、予後増悪因子であることが示唆された。

次に、腎細胞癌に対して当院で根治的腎摘除術または腎部分切除術を施行された症例を対象として、DDX41 タンパクの免疫組織化学的染色 (IHC) を施行した。DDX41 の染色の程度から 2g 群に分類 (DDX41-negative, DDX41-positive) して比較検討したところ、DDX41 positive 症例では、有意に腫瘍径が大きく、病理学的 Grade が高く、また病理学的病期分類も高かった。更に、生命予後についても解析したところ、DDX41-positive 症例では癌特異的生存率や非再発生存期間が増悪している事が判明した。また、腫瘍壊死の有無についても解析したところ、腫瘍壊死のある症例では有意に癌特異的生存率が増悪しており、また DDX41 陽性例が有意に多いことが判明した。

また、多変量解析により、ccRCC における癌特異的生存率を規定する独立因子について調査した。その結果、IHC における DDX41 の発現 (Positive)、病理学的 Grade (3, 4)、病理学的病期分類 (III, IV) が独立因子として規定された (表 1)。

当院の検体における DDX41 のタンパク発現を用いたこれらの解析結果は、公共データベースを用いた DDX41 の mRNA レベルの解析結果と全く矛盾しない結果であり、より強く DDX41 が ccRCC の腫瘍壊死および生命予後と関連している事を示唆するものであった。

表 1. 癌特異的生存率に対する独立した予後規定因子の解析

		Univariate analysis for CSS			Multivariate analysis for CSS		
		HR	(95% CI)	P	HR	(95% CI)	P
DDX41- expression	(Positive)	4.255	1.384 – 15.716	0.011	3.711	1.059 – 16.703	0.040
Tumor diameter	(> 7cm)	1.050	0.997 – 1.088	0.062			
Histologic grade	(Grade 3, 4)	11.358	3.867 – 49.00	< 0.001	3.650	1.105 – 16.717	0.033
Disease Stage	(Stage III, IV)	5.912	3.029 – 16.712	< 0.001	5.059	2.274 – 16.606	< 0.001

さらに DDX41 の ccRCC における分子機能的役割を解明するためヒト ccRCC 細胞株 (786-0, Caki-1) を用意し、DDX41 過剰発現株を作成した。DDX41 発現 786-0 では有意に腫瘍増殖能が亢進し、また Sphere 形成能も亢進していた一方で、DDX41 発現 Caki-1 ではこの現象は認められなかった。この背景には、同じ ccRCC であっても、786-0 は ccRCC の最大の特徴である VHL 変異を有する一方で、Caki-1 は野生型 VHL を有している事が関与しているのではないかと予想された。

DDX41 過剰発現による遺伝子発現プロファイルの変化を調査するため、各細胞株の mRNA-sequencing を施行した。786-0, Caki-1 それぞれ DDX41 発現株とコントロール株を比較したところ、数万の Protein-coding 遺伝子のうち、DDX41 の発現はいずれの DDX41 発現株でも上位 10 位に入るほど上昇していた。次に RNA-Seq データを用いた Gene set enrichment analysis を施行したところ、いずれの DDX41 発現株でも、共通して E2F ターゲット遺伝子群と G2M チェックポイント関連遺伝子群、細胞増殖関連遺伝子群、さらに Cancer progenitor 関連遺伝子群の発現が有意に正にエンリッチされている事が判明した。

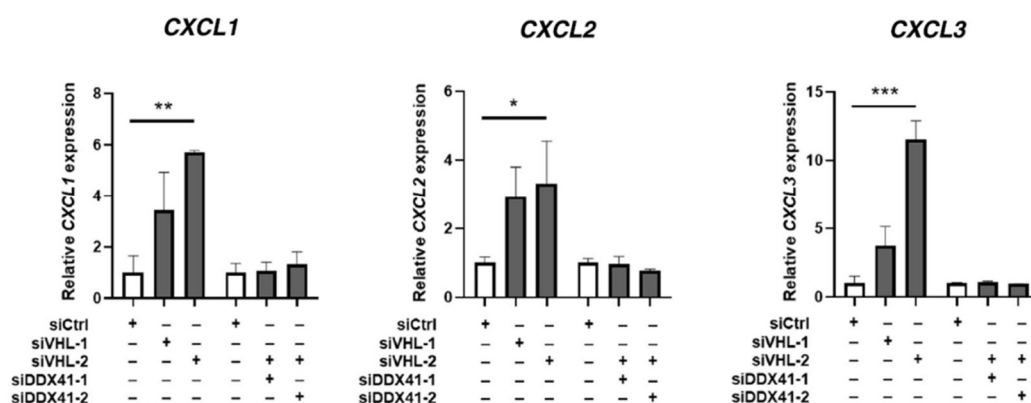
これらの共通した遺伝子群の変化がある一方で、DDX41 発現 786-0 ではケモカインファミリーの一部である CXCL1,2,3 発現が有意に亢進していたにも関わらず、DDX41 発現 Caki-1 ではこの現象は全く認められなかった。我々は、この現象の違いが VHL の変異の有無に関与していると考えた。

我々は、DDX41 発現 C a k i - 1 でも、(786-0 と同様に) V H L を抑制する事でケモカインファミリーの発現上昇を惹起できるのではないかと考え、VHL, DDX41 をそれぞれ標的とした各 2 種類の異なる siRNA (siVHL1, siVHL2, siDDX41-1, siDDX41-2) を用意した。

786-0 は VHL が欠失しているが、Caki-1 では siVHL により VHL 発現は著明に低下した。同時に DDX41 発現も観察したが、発現に変化はなかった。次に、Caki-1 を用いて VHL と D D X 4 1 のダブルノックダウンを行い、これらの siRNA が正常に Work する事を確認したところ、両方のタンパクレベルでの低下を確認した。

次に、DDX41 発現 Caki-1 を用意し、これに siVHL 1 および 2 を導入した。その結果、どちらの siVHL を導入した場合でも、予想通り CXCL1,2,3 の発現がすべて有意に上昇する事を確認した。次に、この DDX41 発現 Caki-1 に対して、siVHL, siDDX41 によるダブルノックダウンを施行した。すると、VHL の抑制のみであれば CXCL ファミリー発現は上昇していたにも関わらず、DDX41 が抑制されると CXCL ファミリーの発現は全てコントロールと全く変化がない事が判明した。これらの現象は、ccRCC において、DDX41 の高発現は、VHL の機能欠失があつて初めて CXCL ファミリーの発現上昇に関与する事を示唆するものであった。(図 1)

図 1. DDX41 発現 C a k i - 1 を用いた、VHL および DDX41 の抑制と CXCL ファミリーの発現変化



まとめると、本研究により、淡明細胞型腎細胞癌における DDX41 の発現は腫瘍壊死と関連しており、癌特異的生存率を規定する独立した予後予測因子であるのみならず、腫瘍増殖などに寄与し、VHL の機能欠失がある場合は協調してケモカインの一種である CXCL ファミリーの発現上昇に関与することが判明した。淡明細胞型腎細胞癌における DDX1 の阻害が、全く新たな新規標的治療法となり得る事が示唆された。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kohei Kobatake	4. 巻 Oct;40(10)
2. 論文標題 DDX41 expression is associated with tumor necrosis in clear cell renal cell carcinoma and in cooperation with VHL loss leads to worse prognosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Urol Oncol .	6. 最初と最後の頁 456.e9-456.e18.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.urolonc.2022.07.001.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島浩平
2. 発表標題 DDX41 expression causes deregulation of cell cycle and worse prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島浩平
2. 発表標題 DDX41発現亢進は淡明細胞型腎細胞癌における予後不良因子である
3. 学会等名 第72回西日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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