

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09341

研究課題名（和文）腎癌のIO drugおよびTKI併用療法に対する耐性獲得機構解明と新規治療法開発

研究課題名（英文）Investigation of the molecular mechanism mediating the resistance to combined treatment with IO drug and TKI in renal cell carcinoma and the development of the novel therapy targeting this mechanism

研究代表者

三宅 秀明（Miyake, Hideaki）

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：60379435

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）：マウス腎癌細胞株RenCaを用いて確立したIO-TKI併用療法に対する耐性を獲得したin vivo腫瘍モデルを用いて種々の解析を施行し、治療抵抗性に関与すると考えられる数種類の候補遺伝子を同定した。それらの遺伝子を標的としたアンチセンスオリゴをデザインし、標的遺伝子の発現抑制効果を確認した。さらに、IO-TKI併用療法に同アンチセンスオリゴを併用投与することにより、IO-TKI併用療法に対する耐性克服効果が得られるか否かを現在in vivo腫瘍モデルを用いて検証中である。また、アンチセンスオリゴ併用による抗腫瘍効果増強メカニズムも併せて詳細に解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎細胞癌は高頻度に遠隔転移を来し、抗癌剤および放射線療法に高度の耐性を有することで知られている。今後の進行腎細胞癌治療に対して中心的役割を果たしていくと考えられるIO-TKI併用療法に対する治療抵抗性機序が明らかになれば、同療法に抵抗性となる期間を延長し得る有用な新規併用療法の確立に繋がる可能性があると考えられ、転移性腎細胞癌患者の予後改善を目指した多角的な新規治療戦略構築へ向けて大きな成果が得られるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Several assessments were performed using a model system using mouse renal cell carcinoma cell line, RenCa, acquired resistance to IO-TKI combination therapy, and we identified a few candidate genes involved in the acquired resistance to IO-TKI combination therapy. We then generated antisense oligonucleotide targeted against these genes, and confirmed the inhibitory effects on the expression of these genes. We currently examine whether the acquired resistance to IO-TKI combination therapy could be overcome by the additional treatment with antisense oligonucleotide. In addition, we analyzed the mechanism involved in the enhanced antitumor activity by additional treatment with antisense oligonucleotide.

研究分野：泌尿器科

キーワード：腎細胞癌 チロシンキナーゼ阻害剤 IO drug 治療抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌 (RCC: renal cell carcinoma) は抗癌剤および放射線療法に高度の耐性を有することで知られ、転移性 RCC (mRCC: metastatic RCC) に対してはサイトカイン療法が治療の主体であったが、その成績は不良でありサイトカイン療法時代における mRCC の全生存期間は 1 年程度であった。しかし、2008 年より本邦においてもチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI: tyrosine kinase inhibitor) を中心とした分子標的薬が導入され、現時点で 7 剤の分子標的薬が使用可能となり mRCC の治療体系は劇的な変化を遂げるとともに、その予後は顕著に改善された。また、2016 年には既治療 mRCC に対してニボルマブが、2018 年には未治療 mRCC に対してニボルマブ+イピリムマブ併用療法が導入され、Immuno-Oncology drug (IO drug) が mRCC に対する薬物療法において重要な役割を担いはじめていた。さらに、2019 年の末には未治療 mRCC に対して、2 種類の IO-TKI 併用療法 (comb Tx) が保険収載され、先に導入されていたニボルマブ+イピリムマブ併用療法と併せて、mRCC に対する薬物療法は IO-based comb Tx が主体となり、根治も期待し得る新たな時代を迎えている。しかし、IO-based comb Tx の奏効率および完全奏効率は、それぞれ 40~60% および 5~10% と決して満足出来るものではない。しかし、現在も IO-TKI comb Tx を中心に IO-based comb Tx の mRCC に対する効果改善を目的とした多数の研究が試みられているが、その多くは異なる IO drug および TKI を組み合わせて、その効果を検証するものであり、現在施行可能な IO-TKI comb Tx を凌ぐ効果を必ずしも期待出来る訳ではない。したがって、より抜本的な対策、つまり RCC が IO+TKI comb Tx に対する耐性を獲得する分子機序を明らかにし、それに基づく耐性克服を目指した新規治療の開発が必要であるとの仮説の下、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

RCC は抗癌剤および放射線療法に高度の耐性を有することで知られ、mRCC に対してはサイトカイン療法が治療の主体であったが、その成績は不良でありサイトカイン療法時代における mRCC の全生存期間は 1 年程度であった。しかし、2008 年より本邦においても TKI を中心とした分子標的薬が導入され、現時点で 7 剤の分子標的薬が使用可能となり mRCC の治療体系は劇的な変化を遂げるとともに、その予後は顕著に改善された。また、2016 年には既治療 mRCC に対してニボルマブが、2018 年には未治療 mRCC に対してニボルマブ+イピリムマブ併用療法が導入され、IO drug が mRCC に対する薬物療法において重要な役割を担いはじめていた。さらに、2019 年の末には未治療 mRCC に対して、2 種類の IO-TKI comb Tx が保険収載され、先に導入されていたニボルマブ+イピリムマブ併用療法と併せて、mRCC に対する薬物療法は IO-based comb Tx が主体となり、根治も期待し得る新たな時代を迎えている。しかし、IO-based comb Tx の奏効率および完全奏効率は、それぞれ 40~60% および 5~10% と決して満足出来るものではない。しかし、現在も IO-TKI comb Tx を中心に IO-based comb Tx の mRCC に対する効果改善を目的とした多数の研究が試みられているが、その多くは異なる IO drug および TKI を組み合わせて、その効果を検証するものであり、現在施行可能な IO-TKI comb Tx を凌ぐ効果を必ずしも期待出来る訳ではない。したがって、より抜本的な対策、つまり RCC が IO+TKI comb Tx に対する耐性を獲得する分子機序を明らかにし、それに基づく耐性克服を目指した新規治療の開発が必要であるとの仮説の下、本研究を計画した。

本研究は今後 mRCC に対する薬物療法の中心的役割を担うと考えられる IO-based comb Tx の中でも最も使用頻度が高くなると予想される IO-TKI comb Tx の抗腫瘍効果改善を通じて mRCC 患者の予後改善に寄与する可能性のある基礎的所見を集積するために、IO-TKI comb Tx に対する耐性獲得機序解明およびその分子機構に基づく耐性克服戦略の構築を目指して計画したものである。研究代表者は以前より腎癌細胞株を用いて、複数の分子標的薬に対する耐性獲得機序の解明に取り組んできたが (Harada K, Miyake H et al, Clin Transl Oncol 2014; 16: 801-806, Harada K, Miyake H et al, Br J Cancer 2013; 109: 2389-2395, Sakai I, Miyake H et al, BJU Int 2013; 112: E211-E220)、これらは *in vitro* の系で培養 RCC 細胞を用いた研究成果に基づくものである。しかし、IO drug の効果は host の免疫反応の影響を介して発現されるものであり、IO drug を含む治療に関する研究遂行には、*in vivo* の実験系を確立することが必須である。そこで、後に詳述するが研究代表者はマウス RCC 細胞株および同系マウスを用いて IO-TKI comb Tx に対する *in vivo* での耐性獲得機構解析モデルの確立に向けた研究に着手し、良好な結果を得つつある。また、IO-TKI comb Tx に耐性化した腫瘍および母細胞由来腫瘍の遺伝子発現レベルを含む形質の違いを、研究代表者等が独自に開発、作成した cDNA microarray を用いて網羅的に解析する (Terakawa T, Miyake H et al, Br J Cancer 2009; 101: 1731-1739)。さらに、研究代表者の過去の薬物耐性に関連した基礎研究の経験から、IO-TKI comb Tx に対する耐性獲得にも、主要なシグナル伝達系の恒常的活性化、アポトーシスおよび epithelial-mesenchymal transition (EMT) に関連する諸分子の adaptive な発現増強等の関与が予想され、これらの形質変化に焦点を当てた解析も予定する。さらに、IO-TKI comb Tx に対する耐性化腫瘍および母細胞由来腫瘍の違いを免疫学的な観点、特に免疫チェックポイント関連分子、

抑制系免疫調整因子および抗原提示分子等に焦点を当てて検証する。また、これらの所見に基づき、IO-TKI comb Tx 施行下でも継続的に活性化される分子カスケード等の有力な治療標的分子候補が同定されれば、それらを研究代表者が豊富な経験と独自の開発システムを有するアンチセンスオリゴあるいは siRNA 等の核酸関連医薬開発の手技を中心に(Miyake H et al, Cancer Res 2000; 60: 170-176, Miyake H et al, Cancer Res 2000; 60: 2547-2554, Miyake H et al, Clin Cancer Res 2000; 6: 1655-1663)、各種キナーゼに対する特異的阻害剤、中和抗体等も駆使して不活性化することにより IO-TKI comb Tx の耐性を克服し得る新たな分子標的治療の確立を目指すものである。

### 3. 研究の方法

#### [1] RCC の IO-TKI comb Tx に対する耐性獲得機序

IO-TKI comb Tx 抵抗性 *in vivo* 腫瘍モデルの確立：研究代表者は癌細胞株を薬物に持続的に暴露させ、薬物濃度を段階的に上昇させることにより、その薬物に一定の耐性を獲得した癌細胞株の樹立方法に精通しており、本研究でも同様の着想の下、研究代表者が豊富な使用経験を有するマウスアンドロゲン依存性乳癌腫瘍モデルを用いた *in vivo* 腫瘍継代法 (Miyake H et al, J Natl Cancer Inst 2000; 92: 34-41) を併用し、IO-TKI comb Tx 抵抗性 *in vivo* 腫瘍モデルの確立を目指す。具体的には、マウス腎癌細胞株 RenCa を同系マウスの皮下に移植後、IO-TKI comb Tx (マウス抗 PD-1 抗体+アキシチニブ、マウス抗 PD-L1 抗体+アキシチニブ) を施行し、皮下腫瘍を採取、細切後、再度同系マウスの皮下に移植し、IO-TKI comb Tx を施行するというステップを繰り返すことにより、IO-TKI comb Tx に対する抵抗性徐々に高め、最終的に同療法に対する高度の耐性を獲得した *in vivo* 腫瘍モデルを確立する。IO-TKI comb Tx 抵抗性腫瘍における遺伝子発現プロファイルの評価：上記の方法で確立した IO-TKI comb Tx 抵抗性腫瘍および母細胞株由来腫瘍を、同系マウスで増殖させ、無治療あるいは IO-TKI comb Tx 施行直後に採取した腫瘍の計 4 種類の腫瘍組織を対象に、以下の解析を施行する。研究代表者は自身の過去の研究成果に基づき、IO-TKI comb Tx 施行直後であっても治療抵抗性腫瘍においては、細胞増殖関連シグナル伝達に關与する主要分子のリン酸化が恒常的に認められることを想定している。そこで上記 4 種類の腫瘍組織における Akt, MAPK, STAT3, JNK 等を介するシグナル伝達経路の主要分子の活性化の評価に加え、チロシンキナーゼ活性を有する種々の受容体蛋白のリン酸化を RTK Phosphorylation Antibody Array (RayBiotech, Norcross, GA, USA) を用いて評価する。また、上記に加え 4 種類の腫瘍組織におけるアポトーシス、EMT および免疫 (免疫チェックポイント関連分子、抑制系免疫調整因子および抗原提示分子等) 関連分子の発現レベルを Western blotting、免疫組織化学染色等により評価する。さらに、本研究では泌尿器癌に対する分子標的療法の開発をテーマに 2000 年以來、研究代表者と共同研究を展開している Dr Martin Gleave (University of British Columbia, Vancouver, Canada) と作成した複数のマウス悪性腫瘍細胞の cDNA microarray を用いて、4 種類の腫瘍組織における網羅的遺伝子解析を施行する。研究代表者は従来より cDNA microarray を用いた網羅的遺伝子解析を頻繁に行っており、コンピュータープログラムを使用し客観的で信頼性の高い結果解析を行うことが可能である。

#### [2] RCC の IO-TKI comb Tx に対する耐性獲得機序に基づく新規治療の開発

上記の実験により、RCC の IO-TKI comb Tx に対する耐性獲得に重要な役割を果たす可能性のある分子が同定される見込みである。本研究では、それらの候補分子の活性を阻害し、IO-TKI comb Tx に対する耐性克服を目指した新規治療の確立に向けた検討を行う。具体的には、特異的阻害剤、アンチセンスオリゴ (AS ODN: antisense oligodeoxynucleotide) siRNA および中和抗体等を治療手段として用いることが想定されるが、経済性、我々の過去の実績および臨床応用の可能性等を考慮すると、AS ODN を用いた新規治療開発が最も適したストラテジーであると考えている。至適 AS ODN の同定：詳述は控えるが我々の豊富な経験を有する手法を用いて効果的に標的遺伝子の発現を抑制し得る AS ODN を複数デザインし(Miyake H et al, Expert Opin Investig Drugs 2006; 15: 507-17, Miyake H et al, Expert Rev Anticancer Ther 2005; 5: 1001-1009)、*in vitro* にて RenCa における標的遺伝子の発現が濃度依存的に阻害される AS ODN を選別する。次いで、*in vivo* にて増殖した IO-TKI comb Tx 抵抗性腫瘍および母細胞株由来腫瘍における AS ODN の標的遺伝子発現抑制効果を無治療および IO-TKI comb Tx 下のいずれでも評価し、最終的に以後の実験に供する至適 AS ODN を決定する。AS ODN の IO-TKI comb Tx に対する耐性克服効果の検討：IO-TKI comb Tx 抵抗性腫瘍および母細胞株由来腫瘍が皮下で増殖した同系マウスを、IO-TKI comb Tx あるいは IO-TKI comb Tx+AS ODN 投与を施行する計 4 群での治療実験を行い、AS ODN 併用の効果を検証する。また、我々が過去に報告した RenCa の腎被膜下同所性腫瘍移植モデルでは腫瘍移植後肺転移が発症することを報告しているが(Miyake H et al, Cancer Res 1996; 56: 2440-5, Miyake H et al, Clin Cancer Res 1999; 5: 2824-9)、同モデルを用いて上記と同様の設定で治療実験を行い、IO-TKI comb Tx に AS ODN を併用することにより、肺転移抑制効果が認められるか否かを検討する。また、治療実験終了後に皮下腫瘍および肺を摘出し、腫瘍組織における AS ODN の標的遺伝子発現抑制効果を確認するとともに、[1] において検証したシグナル伝達、アポトーシス、EMT および免疫関連分子の活性化および発現様式の変化を評価し、AS ODN 併用による抗腫瘍効果増強メカニズムを詳細に解析する。さらに、治療実験中のマウスの体重測定、肝臓、腎臓、腸管等の主要臓器を摘出し、組織学的検索を施行し、IO-TKI comb Tx+AS ODN 療法に伴う有害事象の有無を併せて評価する。

#### 4 . 研究成果

マウス腎癌細胞株 RenCa を用いて確立した I0-TKI comb Tx( マウス抗 PD-1 抗体+アキシチニブ、マウス抗 PD-L1 抗体+アキシチニブ ) に対する耐性を獲得した in vivo 腫瘍モデルを用いて、I0-TKI comb Tx 抵抗性腫瘍および母細胞株由来腫瘍を、同系マウスで増殖させ、無治療あるいは I0-TKI comb Tx 施行直後に採取した腫瘍の計 4 種類の腫瘍組織を対象に、アポトーシス、EMT および免疫 ( 免疫チェックポイント関連分子、抑制系免疫調整因子および抗原提示分子等 ) 関連分子の発現レベルを Western blotting、免疫組織化学染色等により評価した結果、I0-TKI comb Tx 抵抗性腫瘍で高発現し、かつ I0-TKI comb Tx 施行後もその発現レベルが維持されている複数の分子を同定した。さらに、cDNA microarray を用いて上記 4 種類の腫瘍組織の遺伝子発現レベルを網羅的に解析した結果、上記解析にて同定された分子と同様のプロファイルを有する遺伝子を複数同定した。さらに、これらの解析にて同定された複数の遺伝子の中から、治療標的として活性阻害を行う対象としての候補遺伝子の選定を終えた。また、上記 4 種類の腫瘍組織におけるチロシンキナーゼ活性を有する種々の受容体蛋白のリン酸化を RTK Phosphorylation Antibody Array を用いて評価を行った。今後治療標的遺伝子を標的とした治療の有効性を検証していく予定である。

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 1件）

1. 著者名 Watanabe H, Matsushita Y, Tamura K, Motoyama D, Sugiyama T, Otsuka A, Miyake H	4. 巻 13
2. 論文標題 Assessments of therapeutic effects according to timings for combined therapy with axitinib and immune check point inhibitor in a mouse renal cell carcinoma model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-37857-9	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
---------------------------	-----------------------	----

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