

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592389

研究課題名(和文)腎細胞癌のチロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性獲得機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of mechanism mediating resistant phenotype of renal cell carcinoma to tyrosine kinase inhibitors and development of novel therapy to overcome its resistance

研究代表者

三宅 秀明 (Miyake, Hideaki)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60379435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：転移性腎細胞癌の治療において中心的役割を果たしているチロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性獲得に、MAP kinaseおよびAkt等のシグナル伝達系の恒常的活性化が重要な役割を果たしており、これらに対する特異的阻害剤を使用することでチロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性が克服される可能性を明らかにした。また、チロシンキナーゼ阻害剤であるsunitinibにて治療中の腎細胞癌患者の血清MMP-9/TIMP-2比を測定することにより、sunitinibに対する耐性獲得を早期に診断し得る可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the acquisition of phenotype in renal cell carcinoma cells resistant to tyrosine kinase inhibitors could be achieved by the maintained activation of MAP kinase and Akt, and that the additional treatment of renal cell carcinoma cells with specific inhibitors for MAP kinase or Akt was shown to contribute to overcome the resistance to tyrosine kinase inhibitors. In addition, the measurement of serum MMP-9/TIMP-2 ratio in patients with renal cell carcinoma treated with sunitinib appeared to be useful for the early diagnosis with the acquired resistance to sunitinib in these patients.

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 MAP kinase Akt

### 1. 研究開始当初の背景

RCC は抗癌化学療法や放射線療法に対する感受性が低く、外科的切除が唯一有効な治療であり、転移を有する症例に対しては、その奏効率は低いものの interferon- (IFN-) や interleukin-2(IL-2)による免疫療法が第一選択の治療として選択されてきた。しかし、RCC の発症および進展を司る分子機構の詳細が徐々に明らかになり、その機構に基づいて開発された分子標的薬が転移性 RCC の治療に導入されてきた。本邦においても、2008 年に multiple TKI である sorafenib および sunitinib が、2010 年には mammalian target of rapamycin (mTOR)阻害剤である everolimus および temsirolimus が保険収載され臨床現場で使用可能となり、転移性 RCC の治療はパラダイムシフトと称するに足る劇的な変化を遂げた。しかし、これら RCC に対する分子標的薬にも既に幾つかの問題点が指摘されている。その一つが高い奏効率を示すにもかかわらず、比較的短期間の内に治療抵抗性を獲得するという点であり、その克服は TKI による転移性 RCC 治療の非常に重要な課題となっている。

### 2. 研究の目的

(1) TKI に対する耐性を獲得した数種類のマウスおよびヒト RCC 細胞株を樹立し、それらを用いた予備実験の所見から、RCC における TKI 耐性機構解明の鍵は、TKI 存在下での細胞増殖等の悪性形質亢進に関わるシグナル伝達系の恒常的活性化維持にあると推測し、未解析のシグナル伝達関連分子の活性を TKI 投与前後の耐性細胞株および母細胞株において比較解析するとともに、シグナル伝達関連分子以外の遺伝子発現レベルも cDNA microarray を用いて網羅的に評価し、RCC における TKI に対する耐性獲得を司る分子機構を明らかにする。

(2) 上記の所見に基づき、RCC において TKI 存在下でも継続的に活性化される分子カスケードを特異的阻害剤、アンチセンスオリゴ、siRNA あるいは中和抗体等を用いてブロックすることで、耐性克服に繋がる新たな分子標的治療の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

TKI に対する耐性獲得機序を解明するために、TKI 耐性 RCC 細胞株および母細胞株の TKI 投与前後での変化を、シグナル伝達関連分子の活性を中心に、EMT およびアポトーシス関連分子等の発現レベルも含めて比較解析する。この結果、耐性株においてのみ TKI 存在下でも恒常的に活性化している標的分子を明らかにし、特異的阻害剤、アンチセンスオリゴ、siRNA 等の種々の手段を用いてその活性を阻害することで TKI に対する耐性克服に繋がる新規治療の開発を目指す。また、研究代表者が有する臨床標本 (TKI 投与歴を有する約 100 例の根治的腎摘除術標本

および TKI 投与前後に得た約 50 例の血清サンプル)における上記標的分子の発現を免疫組織化学染色および ELISA 法により評価し、TKI 投与後の臨床経過との相関を検討する。これにより、RCC の TKI に対する耐性獲得を早期に診断し得る分子マーカーを同定する。

### 4. 研究成果

(1) ヒト RCC 細胞株 ACHN を用いた実験においては、sunitinib に対する ACHN 耐性株である ACHN/R を作製し、母細胞株 ACHN/P との形質変化を比較検討した。その結果、ACHN/R は TKI である sorafenib に対しては交叉耐性を示したが、mTOR 阻害剤である everolimus および temsirolimus に対しては、ACHN/P と同等の感受性を示した。また、ACHN/R における MAP kinase および Akt は sunitinib 存在下においても恒常的に活性化されていることを明らかにした (図 1)。また、Akt の特異的阻害剤を併用投与すると、ACHN/R の sunitinib に対する感受性が ACHN/P とほぼ同等のレベルに回復することを示した (図 2)。

図 1

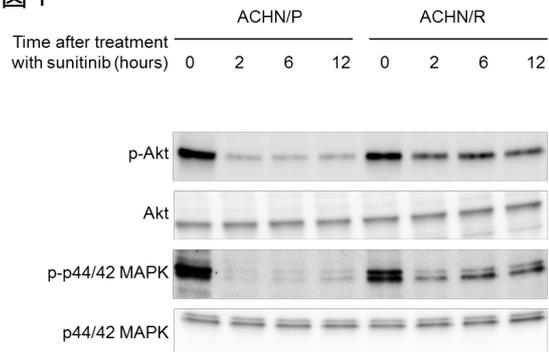
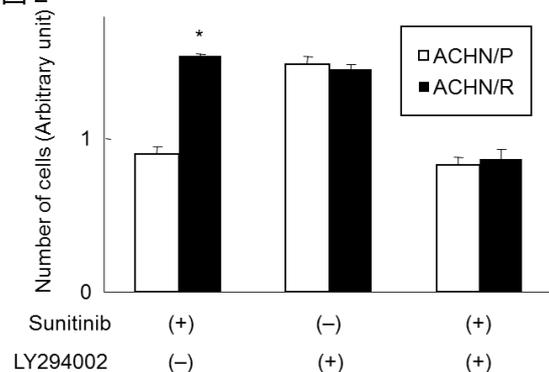


図 2

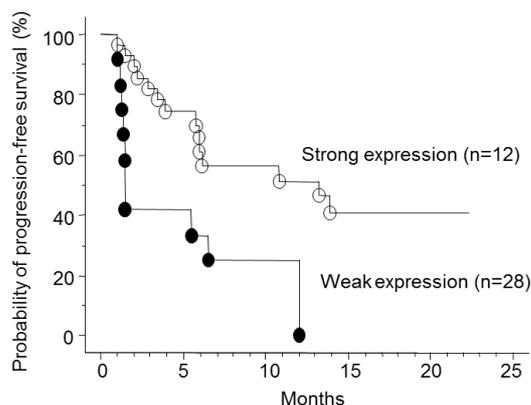


(2) マウス RCC 株を用いて sorafenib に対する耐性株を作製し、上記と同様の実験を施行した。Sorafenib 耐性株である RenCa/R は、母細胞株である RenCa/P に比し、sorafenib 存在下において MAP kinase の顕著な活性化を認め、MAP kinase に対する特異的阻害剤を併用投与することにより、RenCa/R の sorafenib に対する感受性が RenCa/P とほぼ同等のレベルに回復することを示した。また、同系マウスを用いた動物実験においても、こ

れらと同様の所見を確認した。

(3) 転移性 RCC に対する sunitinib の効果を予測する分子マーカーを同定するために、RCC の原発巣における 10 種類の候補分子の発現レベルを免疫組織化学染色を用いて評価した。この結果、VEGFR2 の発現レベルが progression-free survival (PFS) の独立した予測因子として同定され、VEGFR2 高発現例の PFS が、低発現例に比し有意に良好であった (図 3)。

図 3



(4) 転移性 RCC 症例における sunitinib に対する抵抗性獲得を早期に予測する血清分子マーカーとして、MMP (MMP-2, MMP-9) および TIMP (TIMP-1, TIMP-2) family の濃度を測定した。その結果、MMP-9/TIMP2 ratio の上昇例における PFS が有意に不良であるのみならず (図 4)、病勢進行つまり sunitinib に対する抵抗性獲得時に、MMP-9/TIMP2 ratio が有意に上昇することが示された (表 1)。

図 4

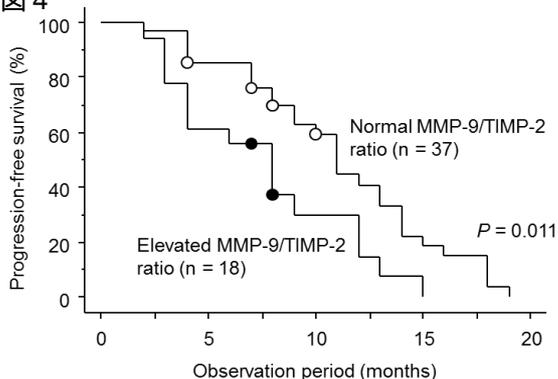


表 1

	Baseline	Time of progression	P value
MMP-2 (ng/ml)	691 ± 139	701 ± 157	0.74
MMP-9 (ng/ml)	718 ± 147	735 ± 173	0.61
TIMP-1 (ng/ml)	649 ± 141	636 ± 158	0.67
TIMP-2 (ng/ml)	515 ± 120	481 ± 138	0.21
MMP-9/TIMP-2 ratio	1.47 ± 0.26	1.60 ± 0.27	0.019

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Terakawa T, Miyake H, Kusuda Y, Fujisawa M. Expression level of vascular endothelial growth factor receptor-2 in radical nephrectomy specimens as a prognostic predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. Urol Oncol, 査読有, 31 巻, 2013, 493-498.

Doi: 10.1016/j.urolonc.2011.02.012

Sakai I, Miyake H, Fujisawa M. Acquired resistance to sunitinib in human renal cell carcinoma cells is mediated by constitutive activation of signal transduction pathways associated with tumour cell proliferation. BJU Int, 査読有, 112 巻, 2013, E211-220.

Doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.

Miyake H, Nishikawa M, Tei H, Furukawa J, Harada K, Fujisawa M. Significance of circulating matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinases-2 ratio as a predictor of disease progression in patients with metastatic renal cell carcinoma receiving sunitinib. Urol Oncol, 査読有, 32 巻, 2014, 584-588.

Doi: 10.1016/j.urolonc.2014.01.016.

Harada K, Miyake H, Kusuda Y, Fujisawa M. Characterization of mechanism involved in acquired resistance to sorafenib in a mouse renal cell cancer RenCa model. Clin Transl Oncol. 査読有, 16 巻, 2014, 801-806.

Doi: 10.1007/s12094-013-1151-9.

[学会発表](計 2 件)

三宅秀明, Post-TKI としての分子標的治療戦略、日本泌尿器科学会中部総会、2014.10.18、アクトシティ浜松 (静岡県)  
三宅秀明, 実臨床から考える腎細胞がん治療の最適な薬剤選択とは? 日本泌尿器科学会中部総会、2014.10.18、アクトシティ浜松 (静岡県)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三宅 秀明 (MIYAKE, Hideaki)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：60379435

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：