

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462494

研究課題名(和文) FDG PET/CTを活用した腎細胞癌の血液マーカー・新規治療法開発のための研究

研究課題名(英文) The development of novel biomarker and treatment for renal cell carcinoma based on the assessment by FDG PET/CT

研究代表者

中井川 昇 (NAKAIGAWA, Noboru)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00237207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：私達は従来の血液検査、CT画像診断では困難な腎細胞癌の分子標的薬に対する抵抗性の予測とリアルタイムでの抗腫瘍効果の判定がFDG PET/CTによって可能になることを明らかにしてきた。しかし、FDG PET/CTは経済性、放射線被ばくといった問題があり、簡便、安全に検査が行える血液バイオマーカーの開発が求められている。そこで、FDG PET/CTによって評価した腎癌患者の血液、手術検体を解析し、分子標的薬による抗腫瘍効果を診断できる血液バイオマーカーを同定した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported the possibility of FDG PET/CT as an imaging biomarker to assess the response of renal cell carcinoma (RCC) to molecular-targeted therapy simultaneously, which was difficult to judge by conventional computed tomographic scanning. FDG PET/CT has some problems including cost and radiation exposure, and the blood biomarker which can be examined easily and safely was desired. In this study, we isolated the blood biomarker to assess the response of renal cell carcinoma to molecular-targeted therapy, by analyzing the blood samples from the patients with RCC treated by molecular-targeted therapy and monitored by FDG PET/CT.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 血液マーカー 治療効果判定 分子標的治療 FDG PET/CT

### 1. 研究開始当初の背景

我々は1993年に腎細胞癌の8割を占める淡明細胞型腎癌の原因遺伝子 VHL 遺伝子を同定した。その後 VHL 遺伝子の不活性化によって hypoxia inducible factor (HIF) と呼ばれる転写因子の細胞内の蓄積が起これ、その結果として血管内皮細胞成長因子(VEGF)の過剰産生が生じ、腫瘍内の血管新生が誘導され腎癌が進行するというメカニズムが明らかになってきた。この知見を踏まえ VEGF の受容体を標的とした分子標的薬が開発され進行性腎癌細胞患者の生命予後は著明に延長した。しかし、分子標的薬には従来の抗癌剤のような腫瘍縮小効果はなく CT 画像診断ではその効果判定が困難であることや、分子標的薬に抵抗性を示す腎細胞癌が存在すること、一時的に進行を抑えられた腎細胞癌もやがて耐性を獲得し再び進行することなど、様々な問題も同時に明らかになってきた。そこで、分子標的薬に対する耐性機序を明らかにするために腎癌細胞を血管新生を阻害した状態に近い低酸素状態で培養し、生き残った腎癌細胞の細胞内蛋白発現の変化をプロテオミクス解析という手法で網羅的に測定したところ、エネルギー源である糖の取り込みを担う膜蛋白や糖代謝に関わる酵素の発現が上昇していることが明らかになった。この結果から糖の集積の高い腎細胞癌は低酸素状態に対し耐性を獲得していると予想され、糖の集積を評価することで分子標的薬に対する耐性を予測・判定できると考えました。この仮説を立証、臨床応用するために組織内の糖集積の状態を測定できる画像診断法である FDG PET/CT を用いて進行性腎細胞癌の患者さんをモニタリングしたところ、糖の集積の高い腎細胞癌は分子標的薬に対して抵抗性を示すことを明らかにした。さらに、糖集積が比較的低い腎細胞癌では分子標的薬によって糖の集積が低下するものと、低下しないものに分かれ、前者は長期間進行が抑えられ、後者では早期に癌が進行を再開すること、また、糖の集積が低下した腎癌でも一定期間の後に糖の集積が上昇を始め、その後3か月前後で CT 画像でも確認できる腫瘍の増大、進行が起きてくることも明らかにした。すなわち、FDG PET/CT は進行性腎細胞癌の分子標的薬に対する耐性の予測とリアルタイムでの分子標的薬の抗腫瘍効果判定が可能な画像バイオマーカーであると言えるが、放射線被曝の問題や経済的な面から頻回に行える検査ではないこと、施行できる施設も限られていることから、より侵襲少なく安価に簡便にモニタリングができる方法が求められる。

### 2. 研究の目的

我々は従来の血液検査、CT 画像診断では困難な腎細胞癌の分子標的薬に対する抵抗性の予測とリアルタイムでの抗腫瘍効果の判定が FDG PET/CT を用いてグルコースの癌組織

への集積を定量的に評価することで可能になることを明らかにしてきた。そこで、FDG PET/CT によって評価した腎癌患者の血液、手術検体を解析し、分子標的薬による抗腫瘍効果、抵抗性の有無を判定できる血液バイオマーカーを同定し、簡便、低コストに分子標的薬の抗腫瘍効果を診断・予測する血液検査法を確立する。

### 3. 研究の方法

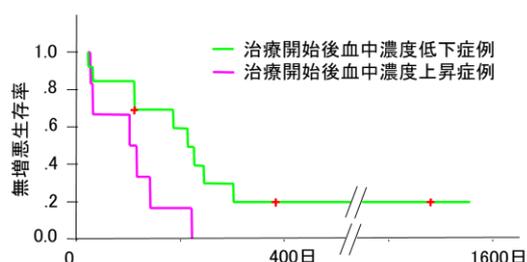
- (1) FDG PET/CT にて血管新生阻害剤による治療をモニタリングしている腎細胞癌患者の血液を用いてプロテオミクス解析を行い、FDG PET/CT での評価と相関する血中蛋白を検索した。
- (2) 血液プロテオミクス解析の結果から得られた数種の蛋白のうち、海外、国内のデータベース等を参考に血液バイオマーカーとなりうる蛋白を絞り込んだ。
- (3) 腎細胞癌の診断にて摘出術を施行した症例の手術検体を用いて、上記バイオマーカー候補の mRNA レベルの発現を RT-PCR 法にて、蛋白レベルでの発現を免疫組織染色法にて確認、腎癌組織に発現しており、病態と相関のある蛋白を検索した。
- (4) 最終的に絞り込んだ蛋白についてプロテオミクス解析の結果を再現できる測定法の確立を試みた。
- (5) 血管新生阻害剤による治療を行っている腎細胞癌患者の血液を用いて、血液マーカーとしての有用性を検討した。
- (6) 絞り込んだ血中蛋白が腎細胞癌の血液新生阻害剤に対する抵抗性獲得のメカニズムに関与しているか確認するために siRNA を用いて transient に発現を抑えた腎癌細胞を低酸素条件で培養し変化を検討した。
- (7) 本血液マーカーが血管新生阻害剤の効果を特異的に評価するものなのか、腎癌病態を反映するものなのか検討するために、mTOR 阻害剤で治療を行っている腎細胞癌患者の血液を ELISA 法にて測定し、臨床経過との相関を検討した。

### 4. 研究成果

- (1) FDG PET/CT にて血管新生阻害剤による治療をモニタリングしている腎細胞癌患者の血液を用いてプロテオミクス解析を行なったところ、FDG PET/CT での評価と相関する血中蛋白が複数同定された。
- (2) 血液プロテオミクス解析の結果から得られた数種の蛋白のうち、海外、国内のデ

ータバンク等を参考に血液バイオマーカーとなりうる蛋白を数種に絞り込み、腎細胞癌の診断にて摘出術を施行した症例の手術検体を用いて、その mRNA レベルの発現を RT-PCR 法にて測定を行ったところ、腎癌組織内の発現が確認できただけでなく、ステージの進行に伴い発現が上昇し、摘出後の無再発期間も予測できることが明らかになった。同蛋白の腎癌組織内の発現を免疫組織染色法にて確認したところ、腎癌細胞において発現していることが明らかになった。

- (3) 同蛋白についてプレオテオミクス解析の結果を再現できる ELISA 測定法を確立した。
- (4) 血管新生阻害剤による治療を行っている腎細胞癌患者の血液を用いて、ELISA 法を用いて血液マーカーとしての有用性を検討したところ、治療開始前と比較し開始後 2 週間目で同蛋白の血中濃度が低下している症例では上昇している症例と比較して血管新生阻害剤による無増悪生存期間が有意差を持って延長していることが明らかになった。



- (5) 同蛋白が腎細胞癌の血液新生阻害剤に対する抵抗性獲得のメカニズムに関与しているか確認するために siRNA を用いて transient に発現を抑えた腎癌細胞を低酸素条件で培養し変化を検討したところ、増殖速度、形態、増殖に関与する細胞内情報伝達系に差は認めなかった。
- (6) 同蛋白の血中濃度の変化が血管新生阻害剤の効果を特異的に評価するものなのか、腎癌病態そのものを反映するものなのか検討するために、mTOR 阻害剤で治療を行っている腎細胞癌患者の血液を ELISA 法にて測定し、臨床経過との相関を検討したところ、治療開始後血中濃度が低下する症例では mTOR 阻害剤による治療効果が得られ、変化のないものは治療効果が得られない傾向にあることが明らかになった。

## 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 7 件)

- ① Minamimoto R, Nakaigawa N, Nagashima Y, Toyohara J, Ueno D, Namura K, Nakajima K, Yao M, Kubota K. Comparison of (11)C-4DST and (18)F-FDG PET/CT imaging for advanced renal cell carcinoma: preliminary study. *Abdom Radiol.* 査読あり 41 (3) 2016. 521-30. doi: 10.1007/s00261-015-0601-y
- ② Nakaigawa N, Kondo K, Tateishi U, Minamimoto R, Kaneta T, Namura K, Ueno D, Kobayashi K, Kishida T, Ikeda I, Hasumi H, Makiyama K, Kubota Y, Inoue T, Yao M. FDG PET/CT as a prognostic biomarker in the era of molecular-targeting therapies: max SUVmax predicts survival of patients with advanced renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 査読あり 16. 2016 ;67. doi: 10.1186/s12885-016-2097-4.
- ③ 中井川昇. 腫瘍に対する分子標的療法の現状と画像評価. *画像診断* 査読なし 35(7) 837-850 (2015) <http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201502260251755737>
- ④ 中井川昇. FDG PET/CT—進行性腎細胞癌の新たな Imaging Biomarker としての可能性. *泌尿器外科* 査読なし 28(臨増) 573-576 (2015) <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=aa6hngke/2015/0028s2/017&name=0573-0575.j&UserID=163.212.32.57>
- ⑤ Kakizoe M, Yao M, Tateishi U, Minamimoto R, Ueno D, Namura K, Makiyama K, Hayashi N, Sano F, Kishida T, Kobayashi K, Noguchi S, Ikeda I, Ohgo Y, Taguri M, Morita S, Inoue T, Kubota Y, Nakaigawa N. The early response of renal cell carcinoma to tyrosine kinase inhibitors evaluated by FDG PET/CT was not influenced by metastatic organ. *BMC Cancer.* 査読あり 14. 2014;390. doi: 10.1186/1471-2407-14-390.
- ⑥ 中井川昇. 尿路上皮癌における PET 診断の現状. *臨床泌尿器科* 査読なし 68(13)1010-1014 (2014) <http://dx.doi.org/10.11477/mf.141320055>
- ⑦ 中井川昇. FDG PET/CT 評価に基づいた進行性腎細胞癌の治療戦略—1st line の選

扱を中心に. 泌尿器外科 査読なし  
26( 臨 増 )683-685 (2013)  
<http://www.igakutosho.co.jp/magazine/urinary/2013/zh26s2.html>

[学会発表] (計 5 件)

- ① 中井川昇 シンポジウム 経時的 FDG PET/CT による腎細胞癌の血管新生阻害剤に対する抵抗性の評価 第 53 回日本癌治療学会 京都国際会議場 (京都府京都市) 2015 年 10 月 29 日
- ② Nakaigawa N. FDG PET/CT as imaging biomarker in the era of molecular targeting therapies: sequential FDG PET/CT demonstrated biological response and acquisition of resistance to tyrosine kinase inhibitor therapy for renal cell carcinoma. 26th AACR-NCI-EORTC International Conference, Barcelona Spain, 18<sup>th</sup> Nov. 2014
- ③ 中井川昇 シンポジウム泌尿器科領域 PET 診断の cutting edge FDG PET/CT - 進行性腎細胞癌の新たな Imaging Biomarker としての可能性 第 79 回日本泌尿器科学会東部総会 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2014 年 10 月 29 日
- ④ 中井川昇 パラダイムシフトを迎えた腎・尿路の画像診断 FDG PET/CT を用いた腎細胞癌の質的診断 第 102 回日本泌尿器科学会総会 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市) 2014 年 4 月 24 日
- ⑤ 中井川昇 パネルディスカッション PET による泌尿器癌の治療効果判定-腎細胞癌の治療効果判定における PET 検査の有用性 第 102 回日本泌尿器科学会総会 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市) 2014 年 4 月 24 日

[図書] (計 1 件)

中井川 昇、後藤 百万 EBM 泌尿器疾患の治療 分子標的薬治療の効果判定としての PET-CT の意義は? 208-212 2015 年 中外医学社

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 腎細胞癌の薬物療法に対する効果判定を目的とした血中マーカー  
発明者: 中井川昇  
権利者: 横浜市立大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-202614  
出願年月日: 平成 27 年 10 月 14 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中井川 昇 (NAKAIGAWA, Noboru)  
横浜市立大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 00237207

### (2) 研究分担者

矢尾 正祐 (YA0, Masahiro)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 00260787

### (3) 連携研究者

なし