

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462504

研究課題名(和文)腎細胞がんにおける新しい分子標的治療およびバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Novel biomarker and therapeutic target in the targeted therapy for the patients with metastatic renal cell cancer

研究代表者

湯浅 健 (Takeshi, Yuasa)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・研究員

研究者番号：00314162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回は、臨床サンプルを用いた次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析では、databaseから、がんの進行・転移に関わる遺伝子変化と、治療効果と関連する遺伝子変化の解明に向けて研究を継続している。さらに、腎癌細胞株を用いた次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析では、グルコース枯渇という比較的シンプルなストレスについて網羅的な解析をおこない、新しいシグナルの解明に繋がった。腎がんの分子標的治療は血管新生阻害剤による治療をおこなっている。今回のグルコース枯渇下での腎がん細胞の遺伝子応答は、これらの治療薬の機序に対する新しい知見を提供し、治療薬及び治療法の進歩に資するものと思っている。

研究成果の概要(英文)：Resistance to the targeted therapy is emerging as an obstacle to successful cancer treatment. In this study, we investigated whether N-GlcNAc2-modified proteins induce G2/M arrest and cell death under glucose deprivation in renal cell cancer (RCC), which is sensitive to nutritional stress. Four of seven RCC cell lines produced N-GlcNAc2-modified proteins and led G2/M arrest under glucose deprivation, leading to cell death. The remaining three cell lines did not produce N-GlcNAc2-modified proteins and undergo G1/S arrest, leading to survival. In this study, we demonstrated that the RCC cells which accumulate N-GlcNAc2-modified proteins do not survive with abnormally prolonged unfolded protein response (UPR) pathway. By contrast, cells that do not accumulate N-GlcNAc2-modified proteins survive. Further studies to clarify these findings will lead to the development of novel targeted therapy for RCC.

研究分野：泌尿器科腫瘍学

キーワード：腎癌 分子標的治療 次世代シーケンサー 遺伝子発現 糖枯渇

## 1. 研究開始当初の背景

腎細胞がんは、VHL 遺伝子に変異やメチル化異常を認める淡明細胞がんや c-Met 遺伝子や FH 遺伝子異常に伴う乳頭状細胞がんなど、固形腫瘍の中では原因遺伝子の解明が進んでおり、がん細胞に特異的な異常、腫瘍血管を治療の標的とした「分子標的治療 molecular target therapy」という新しい概念によるがん治療を行っている。しかし、優れた腫瘍縮小効果は認めるものの、complete response は稀であり、効果の維持は時限的で再燃する。

前立腺がんにおいて transmembrane protease の Transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2)と転写因子 ETS ファミリー、腎細胞がんでも Xp11.2 転座/TFE3 融合遺伝子が同定された。肺がんでは EML4-ALK 融合遺伝子が報告され、新規分子標的として薬剤開発が進み、国際的な臨床試験が施行されている。最近我々は腎細胞がん症例中にも ALK 融合遺伝子を持つ症例を同定した(Sugawara et al. *Cancer* 2012)。ALK 融合遺伝子肺がんと同様の低頻度であるが、正常細胞ではこれらの融合遺伝子は皆無であることから治療標的として期待できる。この事象は同時に、これまでの手法では腎細胞がんの遺伝子変化、本来の標的を未だ解明しきれていないことが示唆される。がん細胞特異的な融合遺伝子は、慢性白血病に対する Bcr/Abl 融合遺伝子や、先述の肺がんにおける EML4-ALK 融合遺伝子に対する新規薬剤が承認され、臨床投与が開始されるなど、まさに注目された領域と思われる。

## 2. 研究の目的

腎がんのがん組織と周囲正常組織をペアで用いて、遺伝子発現の網羅的解析をおこない、臨床病理学的データベースを用いて、分子標的治療薬の効果を予測するバイオマーカーの同定と、新規分子標的の発見を目的とする。具体的には新規分子標的としては新規融合遺伝子の発見が最も理想的であるが、遺伝子

発現の網羅的解析、microRNA の発現解析と臨床データベースを用いる事によって予後不良とする発現遺伝子や新規がん遺伝子、oncogenic microRNA の同定を目的とする。発現遺伝子解析から治療薬への効果予測をおこない、予後予測・危険因子の抽出およびテーラーメイド治療法の開発から、将来的にはあたらしい治療薬の開発に結びつけることを目的としている。

## 3. 研究の方法

- ① グルコース枯渇耐性腎がん細胞と感受性腎がん細胞それぞれ4株について、グルコース存在下と枯渇下とにて、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。解析は解析ソフト AvadisNGS を用い、分枝生物学的手法にて確認した。
- ② 腎がん database を構築し、生存期間に関しては Kaplan-Meier 法を用いて解析し、予後不良因子の抽出を、単変量解析、多変量解析は、それぞれ log-rank test および Cox proportional hazard model を用いておこなった。

## 4. 研究成果

### 1 腎がん細胞におけるグルコース枯渇状態での細胞応答

- 1 腎細胞がん株では、NC65, Caki1, Caki2, ACHN の4種は VHL が wild type であり、SW839, VMCR-RCW, KMRC-1 は VHL 遺伝子の変異を認めた。
- 2 4種の VHL wild type の腎がん細胞株はグルコース枯渇条件下にて N-GlcNAc<sub>2</sub> 修飾タンパク質群が小胞体に蓄積し、小胞体ストレス応答の亢進を認め、G2/M 細胞周期が抑制され、有糸分裂カタストロフィー様の細胞死が観察された。VHL 遺伝子の変異のある3種の細胞株では、G1/S で細胞周期が抑制され、細胞死は認めなかった。(Figure 1)
- 3 4種の VHL wild type の腎がん細胞株はグルコース枯渇条件下にて、UDP-GlcNAc<sub>2</sub>

合成経路の mRNA が亢進し、p53 がん抑制蛋白質のリン酸化亢進が見られたが、VHL 遺伝子の変異のある 3 種の細胞株では、これらの変化はなかった (Isono T et al. *PlosOne* 2014)。

## 2 転移性腎細胞がん腓膵転移の臨床報告

262 例の database からは、20 例の腓膵転移症例について注目し、①腎摘後晩期に再発すること、②比較的腓膵単独転移が多く、外科的切除が有効な症例が多く、分子単独治療の効果も秀逸であること。③したがって、転移後も 10 年以上の長期生存例も少なくないこと (Figure 2)。などがわかった。 (*BMC Cancer* 2015)。

### 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 31 件)

- 1 Ko JJ, Xie W, Kroeger N, Lee JL, Rini BI, Knox JJ, Bjarnason GA, Srinivas S, Pal SK, Yuasa T, Smoragiewicz M, Donskov F, Kanesvaran R, Wood L, Ernst DS, Agarwal N, Vaishampayan UN, Rha SY, Choueiri TK, Heng DY. The International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium model as a prognostic tool in patients with metastatic renal cell carcinoma previously treated with first-line targeted therapy: a population-based study. *Lancet Oncol*. 2015 Mar;16(3):293-300.
- 2 Hayashi T, Yuasa T, Uehara S, Inoue Y, Yamamoto S, Masuda H, Fujii Y, Fukui I, Yonese J. Clinical outcome of urachal cancer in Japanese patients. *Int J Clin Oncol*. 2016 Feb;21(1):133-8.
- 3 Yuasa T, Inoshita N, Saiura A, Yamamoto S, Urakami S, Masuda H, Fujii Y, Fukui I, Ishikawa Y, Yonese J. Clinical outcome of patients with pancreatic metastases from renal cell cancer. *BMC Cancer*. 2015 15:46.
- 4 Uehara S, Yuasa T, Fujii Y, Yano A, Yamamoto S, Masuda H, Fukui I, Yonese J. Prior administration of a non-steroidal anti-androgen failed to prevent the flare-up caused by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist in a patient with metastatic prostate cancer. *BMC Res Notes*. 2015 Aug 5;8:335.
- 5 Tanaka H, Yoshida S, Komai Y, Sakai Y, Urakami S, Yuasa T, Yamamoto S, Masuda H, Koizumi M, Kohno A, Fukui I, Yonese J, Fujii Y, Kihara K. Clinical Value of F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography/Computed Tomography in Upper Tract Urothelial Carcinoma: Impact on Detection of Metastases and Patient Management. *Urol Int*. 2016;96(1):65-72.
- 6 Yuasa T, Inoshita N, Tanaka H, Urakami S, Yamamoto S, Fujii Y, Masuda H, Fukui I, Ishikawa Y, Yonese J. Surveillance policy for Japanese patients with stage I testicular germ cell cancer in the multi-detector computed tomography era. *Int J Clin Oncol*. 2015 Dec;20(6):1198-202.
- 7 Urakami S, Yuasa T, Yamamoto S, Sakura M, Tanaka H, Hayashi T, Uehara S, Inoue Y, Fujii Y, Masuda H, Fukui I, Yonese J. Clinical response to induction chemotherapy predicts improved survival outcome in urothelial carcinoma with clinical lymph nodal metastasis treated by consolidative surgery. *Int J Clin Oncol*. 2015 Dec;20(6):1171-8.
- 8 Yuasa T. Editorial comment on: p21-activated kinase 1 predicts recurrence and survival of patients with non-metastatic clear&hyphen;cell renal cell carcinoma. *Int J Urol*. 2015 May;22(5):453-4.
- 9 Fay AP, Xie WL, Lee LC, Harshman LC, Bjarnason GA, Knox SE, Wood L,

- Vaishamayan UN, Yuasa T, Tan MH, Rha SY, Donskov F, Agarwa N, Kollmannsberger CK, North SA, Rini BI, Choueiri TK, Heng DY. Characteristics of Long-term and Short-term Survivors of Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Targeted Therapies: Results from the International mRCC Database Consortium. *Clinical Genitourinary Cancer* 2015 Apr;13(2):150-5.
- 10 Kyriakopoulos CE, Chittoria N, Choueiri TK, Kroeger N, Lee JL, Srinivas S, Knox JJ, Bjarnason GA, Ernst SD, Wood LA, Vaishampayan UN, Agarwal N, Pal SK, Kanesvaran R, Rha SY, Yuasa T, Donskov F, North SA, Heng DY, Rini BI. Outcome of Patients With Metastatic Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma: Results From the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium. *Clin Genitourin Cancer* 2015 Apr;13(2):e79-85.
- 11 Heng DY, Wells JC, Rini BI, Beuselinck B, Lee JL, Knox JJ, Bjarnason GA, Pal SK, Kollmannsberger CK, Yuasa T, Srinivas S, Donskov F, Bamias A, Wood LA, Ernst DS, Agarwal N, Vaishampayan UN, Rha SY, Kim JJ, Choueiri TK. Cytoreductive Nephrectomy in Patients with Synchronous Metastases from Renal Cell Carcinoma: Results from the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium. *Eur Urol*. 2014 Oct;66(4):704-10.
- 12 Yasuda Y, Fujii Y, Yuasa T, Yamamoto S, Yonese J, Fukui I. Do testosterone levels have prognostic significance in patients with metastatic prostate cancer treated with combined androgen blockade? *Int J Urol*. 2015 Jan;22(1):132-3.
- 13 Yuasa T, Urakami S. Decreased incidence of skeletal-related events in mRCC. *Nature Reviews in Urology*. 2014 Apr;11(4):193-4.
- 14 Mashima T, Soma-Nagae T, Migita T, Kinoshita R, Iwamoto A, Yuasa T, Yonese J, Ishikawa Y, Seimiya H. TRIB1 supports prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival by regulation of endoplasmic reticulum chaperone expression. *Cancer Res*. 2014 Sep 1;74(17):4888-97.
- 15 Tanaka H, Yuasa T, Fujii Y, Sakura M, Kitsukawa S, Urakami S, Yamamoto S, Masuda H, Fukui I, Yonese J. First-line combination chemotherapy with cisplatin, etoposide, and ifosfamide for the treatment of disseminated germ cell cancer: re-evaluation in the granulocyte colony-stimulating factor era. *Chemotherapy* 2014 Oct;12(5):335-40.
- 16 Yuasa T. Editorial Comment to Efficacies of traditional and alternative sunitinib treatment schedules in patients with metastatic renal cell carcinoma in a Japanese population. *Int J Urol* 2014 Oct;21(10):1069-70.
- 17 Isono T, Chano T, Kitamura A, Yuasa T. Glucose Deprivation Induces G2/M Transition-Arrest and Cell Death in N-GlcNAc2-Modified Protein-Producing Renal Carcinoma Cells. *PLoS One*. 2014 May 5;9(5):e96168. doi:
- 18 Harshman LC, Kroeger N, Rha SY, Donskov F, Wood L, Tantravahi SK, Vaishampayan U, Rini BI, Knox J, North S, Ernst S, Yuasa T, Srinivas S, Pal S, Heng DY, Choueiri TK. First-Line Mammalian Target of Rapamycin Inhibition in Metastatic Renal Cell Carcinoma: An Analysis of Practice Patterns From the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium. *Clin Genitourin Cancer*. 2014 Oct;12(5):335-40.
- 19 Heng DY, Choueiri TK, Rini BI, Lee J, Yuasa T, Pal SK, Srinivas S, Bjarnason GA,

- Knox JJ, Mackenzie M, Vaishampayan UN, Tan MH, Rha SY, Donskov F, Agarwal N, Kollmannsberger C, North S, Wood LA. Outcomes of patients with metastatic renal cell carcinoma that do not meet eligibility criteria for clinical trials. *Ann Oncol*. 2014 Jan;25(1):149-54.
- 20 Yuasa T. Editorial Comment to Localized non-conventional renal cell carcinoma: Prediction of clinical outcome according to histology. *Int J Urol*. 2014;21(4):364-5.
- 21 Ko JJ, Choueiri TK, Rini BI, Lee JL, Kroeger N, Srinivas S, Harshman LC, Knox JJ, Bjarnason GA, MacKenzie MJ, Wood L, Vaishampayan UN, Agarwal N, Pal SK, Tan MH, Rha SY, Yuasa T, Donskov F, Bamias A, Heng DY. First-, second-, third-line therapy for mRCC: benchmarks for trial design from the IMDC. *Br J Cancer*. 2014 Apr 15;110(8):1917-22.
- 22 Schutz FA, Xie W, Donskov F, Sircar M, McDermott DF, Rini BI, Agarwal N, Pal SK, Srinivas S, Kollmannsberger C, North SA, Wood LA, Vaishampayan U, Tan MH, Mackenzie MJ, Lee JL, Rha SY, Yuasa T, Heng DY, Choueiri TK. The Impact of Low Serum Sodium on Treatment Outcome of Targeted Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results from the International Metastatic Renal Cell Cancer Database Consortium. *Eur Urol*. 2014 Apr;65(4):723-30.
- 23 Tsuchiya N, Yuasa T, Maita S, Narita S, Inoue T, Numakura K, Saito M, Satoh S, Yonese J, Habuchi T. Organ-specific and tumor-size-dependent responses to sunitinib in clear cell renal cell carcinoma. *BMC Urology* 2014, 14:26
- 24 Fujii Y, Yamamoto S, Yonese J, Masuda H, Urakami S, Kitsukawa S, Sakura M, Yuasa T, Kihara K, Fukui I. The Processus Vaginalis Transection Method to Prevent Postradical Prostatectomy Inguinal Hernia: Long-term Results. *Urology*. 2014 Jan;83(1):247-52.
- 25 Kroeger N, Choueiri TK, Lee JL, Bjarnason GA, Knox JJ, Mackenzie MJ, Wood L, Srinivas S, Vaishampayan UN, Rha SY, Pal SK, Yuasa T, Donskov F, Agarwal N, Tan MH, Bamis A, Kollmannsberger CK, North SA, Rini BI, Heng DY. Survival Outcome and Treatment Response of Patients with Late Relapse from Renal Cell Carcinoma in the Era of Targeted Therapy. *Eur Urol*. 2014 Jun;65(6):1086-92.
- 26 Kroeger N, Xie W, Lee JL, Bjarnason GA, Knox JJ, MacKenzie MJ, Wood L, Srinivas S, Vaishampayan UN, Rha SY, Pal SK, Yuasa T, Donskov F, Agarwal N, Kollmannsberger CK, Tan MH, North SA, Rini BI, Choueiri TK, Heng DY. Metastatic non clear cell renal cell carcinoma (nccRCC) treated with targeted therapy agents: Characterization of survival outcome and application of the International mRCC Database Consortium (IMDC) Criteria. *Cancer* 2013;119(16):2999-3006.
- 27 Urakami S, Fujii Y, Yamamoto S, Yuasa T, Kitsukawa S, Sakura M, Yano A, Saito K, Masuda H, Yonese J, Fukui I. Phase II trial of first-line chemotherapy with gemcitabine, etoposide, and cisplatin for patients with advanced urothelial carcinoma. *Urol Oncol*. 2014 Jan;32(1):35.e1-7.
- 28 Yuasa T, Kitsukawa S, Sukegawa G, Yamamoto S, Kudo K, Miyazawa K, Kozuka T, Harada S, Yonese J. Early onset recall pneumonitis during targeted therapy with sunitinib. *BMC Cancer*. 2013; 13:3.
- 29 Yasuda Y, Yuasa T, Yamamoto S, Urakami S, Ito M, Sukegawa G, Kitsukawa S, Fujii Y,

- Yonese J, Fukui I. Evaluation of the RENAL nephrometry scoring system in adopting nephron-sparing surgery for cT1 renal cancer *Urologia Int* 2013;90(2):179-83.
- 30 Yasuda Y, Fujii Y, Yuasa T, Kitsukawa S, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Takahashi S, Fukui I. Possible improvement of survival with use of zoledronic acid in patients with bone metastases from renal cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2013 Oct;18(5):877-83.
- 31 Yasuda Y, Saito K, Yuasa T, Kitsukawa S, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Takahashi S, Fukui I. Prognostic impact of pretreatment C-reactive protein for patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors. *Int J Clin Oncol*. 2013 Oct;18(5):884-9.

[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：  
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

湯浅 健 (Takeshi Yuasa)  
(公財) がん研究会有明病院泌尿器科・副部長

研究者番号：00314162

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

磯野高敬 (Takahiro Isono)  
滋賀医科大学実験実習支援センター・准教授

研究者番号： 20176259

石川雄一 (Yuichi Ishikawa)  
(公財)がん研究会有明病院泌尿器科・センター長

研究者番号： 8022975

米瀬淳二 (Junji Yonese)  
(公財) がん研究会有明病院泌尿器科・部長

研究者番号： 70469633