

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26253078

研究課題名(和文) 新規疾患モデルを用いた次世代OMICS解析に立脚した革新的診断治療シーズの探索

研究課題名(英文) Search for innovative diagnostic and therapeutic seeds based on next generation OMICS analysis using new disease models

研究代表者

小川 修(Ogawa, Osamu)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90260611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は泌尿器科癌の患者癌組織由来xenograftを樹立してきた。その新たな疾患モデルは臨床患者のように治療に対する反応に多様性を示す。これらのモデルを用いて、次世代高感度質量分析装置により腫瘍組織および体液中の各種オーム解析を行い、癌の悪性度や治療抵抗性に関連する分子群を同定してきた。今後、臨床検体を用いて検証し、これらの分子のバイオマーカーおよび新規治療標的としての応用の可能性を検討する。

研究成果の概要(英文)：We have established patient-derived tumor tissue (PDTT) xenograft models of urological cancer. Those models show diversity in response to treatment like clinical patients. We have analyzed tumor tissues and body fluid of the PDTT xenograft models by next generation high sensitive mass spectrometry, and identified new molecules related to cancer malignancy and treatment resistance. We are planning to evaluate whether those molecules could be biomarkers or therapeutic targets in clinical setting.

研究分野：泌尿器科癌

キーワード：omics 質量分析 前立腺癌 腎癌 xenograft

1. 研究開始当初の背景

泌尿器癌は超高齢化社会を迎えた日本において、臨床のみならず社会的にも重要な癌腫であるが、その癌治療成績の向上には、個々の患者における癌の臨床的特徴を正確に診断し、その個性に対応した治療戦略を立てることが必須である。特に泌尿器癌の中でも、前立腺癌と腎細胞癌ではキーシグナル経路とそれらを標的とした治療法が実践されているが、患者個々において標的治療に対する治療反応性に差が存在し、薬剤に対する抵抗性の獲得が臨床的に重要な解決問題となっている。

前立腺癌では進行例においても治療開始当初はアンドロゲン除去療法にほとんどの症例が反応するものの、2~3年以内に多くが去勢抵抗性癌(CRPC)となるが、その治療抵抗性の分子機序は個々の患者で異なると考えられている。また腎細胞癌は von Hippel-Lindau (VHL)遺伝子変異による HIF/VEGF 経路の活性化が発癌進展に大きく寄与し、本経路を標的とした分子標的治療が進行腎癌の標準治療として脚光を浴びたが、治療に反応しない症例もあり、また大半の症例で早期に耐性を獲得する。

我々はベンチサイドとベッドサイドを双方向性に結びつけるトランスレーショナル研究の考えのもと、実臨床を反映する動物モデルとして、患者癌組織に由来する xenograft (Patient-derived tumor tissue (PDTT) xenograft) を継続的に樹立してきた。

さらにこれまで PDTT xenograft の OMICS 研究では核酸分析が主体であったが、遺伝子発現とタンパク量とのあいだには常に間接的な修飾が加わっている。一方、近年の高感度質量分析装置では、fmol 単位でのより微量のタンパクの同定が可能となっている。それは PDTT xenograft というベンチサイドと、患者検体というベッドサイドの両者から高い効率でタンパク、脂質、糖鎖など、疾患の病態そのものに関連する物質を直接検出しうる手段となることを意味している。

以上の背景に基づき、先行の“次世代質量分析装置と新規 xenograft による泌尿器科癌の革新的診断治療シーズの開発”(小川、基盤 A、平成 23-26 年度)からの継続課題として、個々の癌患者の個性を維持した臨床材料由来 xenograft を用いた双方向性研究こそが、革新的な診断・治療シーズの同定を可能にすると考えに至った。

2. 研究の目的

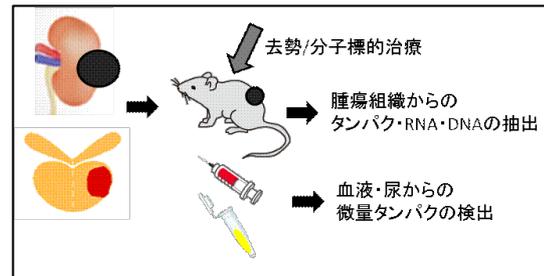
我々の樹立した治療抵抗性を獲得した動物モデルを利用し、治療抵抗性獲得前後で変化する分子(蛋白質、糖鎖、脂質、その他の代謝産物)を高感度質量分析装置にて解析し、治療抵抗性獲得に関与する因子を複数の xenograft モデルより同定する。

本研究室で蓄積してきた臨床情報とリンクしたヒト癌組織、血液、尿などの臨床サンプル

ライブラリー(前立腺癌 250 例以上、腎細胞癌 200 例以上)を用いて、その発現の有無、病期との関連性などを評価し、臨床応用可能かどうかを検討する。

上記で同定された治療抵抗性候補因子の機能的意義を、より還元化された実験系である細胞培養系などを用いて明確にし、最終的には創薬や治療抵抗性マーカーとしての臨床研究を計画する(図 1)。

図 1. Xenograft モデルの樹立



3. 研究の方法

(1) 前立腺癌患者の癌組織から樹立した xenograft モデルのうち KUCaP2 と KUCaP3 はマウスの去勢に対して去勢抵抗性を獲得する。また KUCaP3 は移植した腫瘍が増殖すると嚢胞を形成するという特徴を有する。KUCaP3 の血液や嚢胞内容液中の蛋白質を高感度質量分析装置 LCMS で網羅的に解析し (proteomics)、去勢抵抗性を獲得する前後で発現が変化する分子を同定する。

(2) KUCaP2 の腫瘍組織で RNA-seq を行い、transcriptome 解析を行う。また前立腺癌細胞の増殖においてキーとなるアンドロゲン受容体(AR)に着目し、KUCaP2 の腫瘍組織に対して AR 抗体を用いたクロマチン免疫沈降シークエンス(AR-ChIP-seq)を行い、AR が結合する遺伝子領域を確認する。RNA-seq と AR-ChIP-seq を去勢抵抗性の獲得前後で分析比較して、AR の DNA に対する結合が変化することで発現が変動している遺伝子を同定する。

(3) 前立腺癌の前立腺全摘標本を高感度質量顕微鏡(IMS)で分析し、脂質の発現と予後の相関を分析する(Lipidomics)。分析手法には、前立腺癌患者由来 xenograft である KUCaP2 を使って確立した OCT 包埋した組織を IMS で分析するという方法(Goto, PLoS One, 2014)を用いて行う。

(4) 前立腺癌患者および前立腺肥大症患者から採取した血漿を用いて代謝物を抽出する。極性の高い分子は 75% Acetonitrile で抽出し、極性の低い脂質系の代謝物は Bligh & Dyer method で抽出し、それらを質量分析して二群のタンパクや脂質の発現を比較する。

(5) ヒト前立腺癌由来 xenograft 組織に対し

て質量分析装置 LCMS でリン脂質を網羅的に分析する(lipidomics)。LCMS による脂質に対する網羅的な分析系の確立を目指し前立腺癌細胞株のリン脂質網羅的解析を行う。

(6) 進行腎細胞癌患者から採取した組織を用いて作成した腎細胞癌モデル KURC1 および 3 は抗血管新生療法であるスニチニブに対し 2-4 週で耐性となり、KURC2 に関しては約 6 か月間奏功し続ける。感受性が異なる性質を利用して、KURC-1 の耐性獲得前後および、感受性を維持し続ける KURC-2 のマイクロアレイによる transcriptome 解析を行い、スニチニブ耐性に関係する可能性のある分子として IL13RA2 などの候補分子を見出した。IL13RA2 の機能解析を行う。

(7) KURC-1 はアキシチニブを投与すると奏効し続けるが、KURC-3 はアキシチニブを投与すると治療抵抗性を獲得するという特徴を有する。この治療抵抗性を獲得した KURC-3 の腫瘍組織を継代してアキシチニブを投与するということを数回繰り返して完全耐性モデルを作成した。このアキシチニブ耐性 KURC-3 と感受性のある KURC-1 に対して transcriptome 解析を行う。

(8) 同様に KURC-3 にテムスロリムスを投与して抵抗性を獲得した組織の継代を繰り返すことでテムスロリムス完全耐性モデルを作成した。Vehicle 投与群とテムスロリムス投与群の各継代での組織を Whole-Exome sequence(WES)することで、耐性獲得過程において変異が出現した遺伝子を同定する。

(9) 腎腫瘍は正常部と腫瘍部の境界が明瞭であることから、腎癌患者組織の癌組織と正常腎組織を Bligh & Dyer method で脂質を抽出して LCMS による分析を行う。正常部と癌部で発現の異なるリン脂質を同定する。

4. 研究成果

(1) まずは去勢前の KUCaP3 の囊胞内容液と血清中の蛋白質を抽出し、高感度質量分析装置による網羅的な解析を行い、どちらにも含まれる分子を分析した。前立腺癌組織で発現が確認できている PSA や Chromogranin A のほかに、前立腺癌との関連が報告されている TICN1、CRISP3、GDF15 といった分子がリストアップされ、そのリストの上位に前立腺癌との関連が未知である NPC2 という分子が同定された。

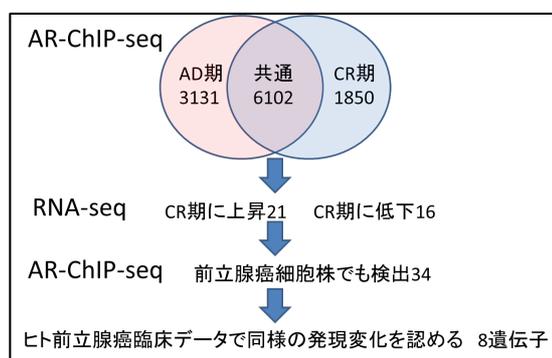
分子マーカーの候補になりえるか調べるために、この分子の機能解析を行った。マトリゲルを使った三次元培養で腺管形成を評価したところ、NPC2 を shRNA で抑制した細胞は腺管形成が抑えられ、腺管形成に関与する遺伝子であることが分かった。また前立

腺癌の生検標本を NPC2 で免疫染色したところ、悪性度が高いほど NPC2 の発現は低下するという関係を認めた。

去勢抵抗性獲得前後の囊胞内容液と血液を質量分析したところ、去勢抵抗性を獲得した後で発現が亢進したタンパクとして Spondin2、PLRP2、Swiprosin1、Nudix hidrolase 2 が同定された。Spondin2 は既に前立腺癌のバイオマーカー候補としての報告もあり、それ以外のタンパクを候補分子としてさらに研究していく。

(2) KUCaP2 の去勢前のアンドロゲン受容体感受性期(AD 期)と去勢抵抗性獲得後(CR 期)の AR-ChIP-seq と RNA-seq を分析して、抵抗性にかかわる AR binding site を分析した。AR-ChIP-seq で AD 期もしくは CR 期だけに検出され、かつ RNA-seq で有意に発現変化を認めた遺伝子は 41 遺伝子認めた。さらに前立腺癌細胞株 LNCaP とそのアンドロゲン非依存性株 AI-LNCaP でも AR-ChIP-seq で検出され、ヒト CRPC 組織でも同様の変化を認める 8 遺伝子に絞り機能解析を進めている(図 2)。

図 2. 候補遺伝子絞り込みのシエーマ



(3) 当院で保有する前立腺全摘組織標本に対して IMS によるリン脂質の分析を行ったところ、癌部では非癌部に比べて LPC(16:0/OH)と SM(d18:0/16:0)の発現が低いことがわかった。またそれらの患者の予後との関係を検討したところ、LPC(16:0/OH)の発現が低い患者では有意に術後再発率が高いことが分かった(図 3)。これは術後再発の予後予測マーカーとなる可能性を示唆する結果であった。

(4) 前立腺癌患者血漿および非癌症例としての前立腺肥大症患者血漿それぞれ 30 例を分析した。有意差を認めながらも、1000 以上のイオンピーク強度を認める分子を分析したところ、前立腺癌の血中バイオマーカー候補となる分子 X を認めた(図 4)。分子 X は気分障害やうつ病の治療候補薬としても研究されている分子で、引き続き前立腺癌バイオマーカーとなりうるのか研究を進めている。

図 3. IMS (上) LPC と再発率の関係 (下)

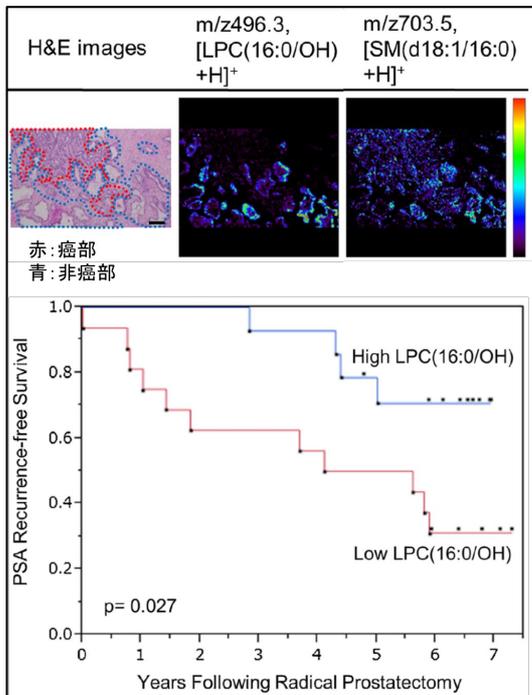
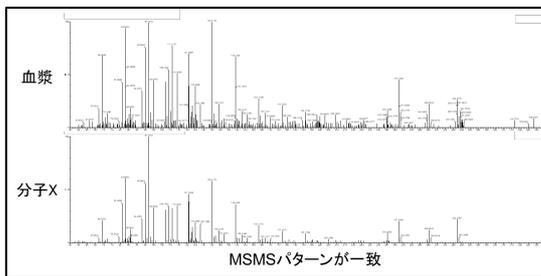


図 4. 血漿と分子 X 標準品の MSMS パターン



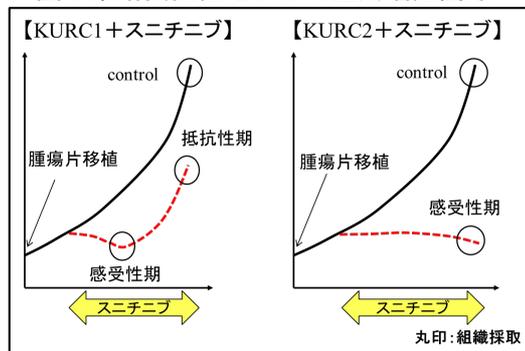
(5) 4 つの前立腺癌細胞株 LNCaP、PC3、DU145、アンドロゲン非依存性 LNCaP(AI-LNCaP) に対して質量分析装置 LCMS と LC/MS/MS MRM ライブラリ リン脂質プロファイリング(Shimadzu)を用いてリン脂質を網羅的に解析できる条件を設定した。リン脂質の発現を比較すると高悪性度の細胞株ほど多価不飽和脂肪酸を含むリン脂質の発現が亢進する傾向を認めた。この分析系を用いてさらに前立腺癌における脂質発現の詳細な分析を進めている。

(6)

KURC1 においても KURC2 においてもスニチニブに感受性があるときは発現に変化を認めないが、スニチニブ抵抗性となった KURC1 で発現が亢進している分子を分析したところ、治療抵抗性に関連があると考えられる分子の候補として IL13RA2 が見つかった (図 5)。

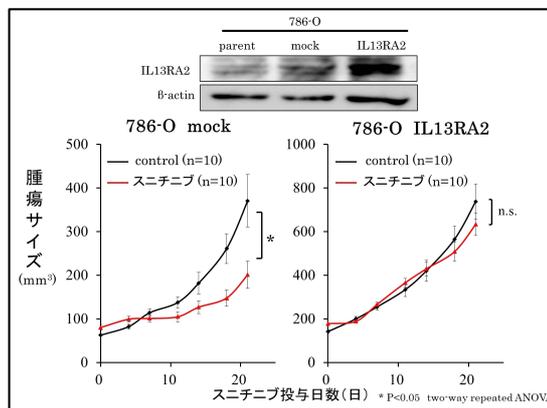
腎癌細胞株 786-O から作成した xenograft はスニチニブに感受性を認め、IL13RA2 の発現は低い。逆に腎癌細胞株 caki-1 はスニチニブに抵抗性を示し IL13RA2 の発現は高い。

図 5. 薬剤抵抗性モデルの腫瘍増殖曲線



そこで 786-O に IL13RA2 を強制発現させたところ xenograft のスニチニブ感受性は低下し、逆に caki-1 に shRNA を使って IL13RA2 をノックダウンさせるとスニチニブに感受性を示すようになった (図 6)。

図 6. 786-O xenograft の IL13RA2 強制発現



さらに IL13RA2 がスニチニブ抵抗性を生じさせる機序を研究したところ、IL13RA2 の発現が高いとアポトーシス誘導が抑制されることが分かった。また IL13RA2 の発現が変動してもスニチニブによる血管新生抑制作用は変化しないことがわかった。

(7) アキシチニブ抵抗性 KURC3 とアキシチニブに感受性を保ち続ける KURC1 に発現する遺伝子をスニチニブと同様の方法で網羅的に分析したところ、抵抗性獲得に関連がある分子として 7 分子が抽出された。中でも WNT1 signaling pathway の下流にある分子 WISP1 に着目して機能解析を行っている。

(8) テムスロリムスに対して完全耐性となった KURC3 と Vehicle を投与したコントロール群の KURC3 の WES の結果、治療抵抗性に関連すると思われる 9 つの遺伝子に変異を認めた (表 1)。これらの変異はサンガーシーケンスでも確認できた。また各継代で調べたところ、テムスロリムスを投与した群では 9 つのうち 3 つの遺伝子が初めの継代、3 つの遺伝子が 2 回目の継代で変異が出現して以降も保たれていた。Vehicle 群では全く変異は出現せず、現在これらの遺伝子に関して機能解

析を行っている。

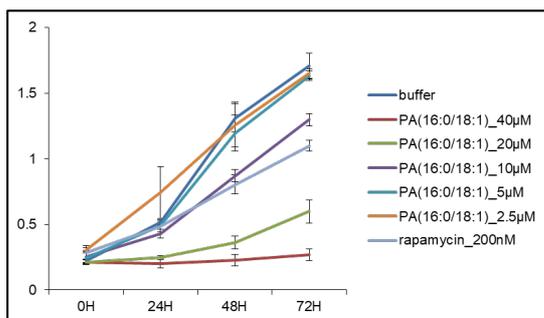
表 1. 変異が出現した遺伝子

Temporary name	Gene	Chr	Position	Ref	Obs	mutation_type
Gene A	####	1	#####	C	A	missense
Gene B	####	2	#####	A	C	missense
Gene C	####	5	#####	C	T	missense
Gene D	####	5	#####	A	C	missense
Gene E	####	11	#####	G	C	splice
Gene F	####	17	#####	C	A	stop_gained
Gene G	####	17	#####	G	C	splice
Gene H	####	18	#####	A	T	missense
Gene I	####	19	#####	C	G	missense

(9)

腎癌組織と正常腎組織から脂質を抽出し、徳にリン脂質のホスファチジン酸(PA)を質量分析装置で調べたところ、二つの組織で発現に差のある PA を複数認めた。それらのうち癌部で発現が低く、高純度化合物が入手可能な PA(16:0/18:1)を使って腎癌細胞株に対する投与実験を行ったところ、PA 投与群では濃度依存的に増殖抑制効果を認められた(図 7)。さらに FACS で細胞周期を評価したところ、高濃度に投与した細胞ほど G2/M 期の細胞の割合が増えていた。引き続き Kinome 解析を行い、PA 投与によって変化するパスウェイを解析している。

図 7. 腎癌(786-O)に対する PA 投与実験



更に前立腺癌については新たな患者由来 xenograft を KUCaP3 以降も随時樹立している。それらの AR、PSA の発現状況や去勢に対する反応性などは既に調査済みであり、CRPC 患者の病態と同様に多様性を認める。それらを使って引き続き研究を進めていく予定である。

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 8 件)

1. Inoue T, Ogawa O. Patient-derived xenografts as in vivo models for research in urological malignancies. *Nat Rev Urol*. 査読有 2017 May;14(5):267-283. doi: 10.1038/nrurol.2017.19.

2. Arakaki R, Ogawa O, Kamba T. CCL2 as a potential therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Med*. 査読有 2016 Oct;5(10):2920-2933. doi: 10.1002/cam4.886.

3. Yoshikawa T, Ogawa O, Inoue T. An original patient-derived xenograft of prostate cancer with cyst formation. *Prostate*. 査読有 2016 Aug;76(11):994-1003. doi: 10.1002/pros.23188.

4. Goto T, Inoue T, Ogawa O. Decreased expression of lysophosphatidylcholine (16:0/OH) in high resolution imaging mass spectrometry independently predicts biochemical recurrence after surgical treatment for prostate cancer. *Prostate*. 査読有 2015 Dec;75(16):1821-30. doi: 10.1002/pros.23088.

5. Shibasaki N, Ogawa O, Kamba T. Role of IL13RA2 in Sunitinib Resistance in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *PLoS One*. 査読有 2015 Jun 26;10(6):e0130980. doi: 10.1371/journal.pone.0130980. eCollection 2015.

6. Nakayama K, Inoue T, Ogawa O. The C-terminal fragment of prostate-specific antigen, a 2331 Da peptide, as a new urinary pathognomonic biomarker candidate for diagnosing prostate cancer. *PLoS One*. 査読有 2014 Sep 18;9(9):e107234. doi: 10.1371/journal.pone.0107234. eCollection 2014.

7. Maeno A, Ogawa O, Inoue T. Up-regulation of miR-582-5p regulates cellular proliferation of prostate cancer cells under androgen-deprived conditions. *Prostate*. 査読有 2014 Dec;74(16):1604-12. doi: 10.1002/pros.22877.

8. Goto T, Inoue T, Ogawa O. The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer. *PLoS One*. 査読有 2014 Feb 28;9(2):e90242. doi: 10.1371/journal.pone.0090242. eCollection 2014.

[学会発表](計 20 件)

1. 岡所広祐、井上貴博、小川修ほか、「LCMS を用いた前立腺癌細胞株のリン脂質発現解析」、第 27 回泌尿器科分子細胞研究会、2018 年 2 月 2 日(東京)

2. 宇都宮紀明、小川修ほか、「淡明型腎細胞癌におけるホスファチジン酸の検討」、第 27 回泌尿器科分子細胞研究会、2018 年 2 月 2 日(東京)

3. 宇都宮紀明、小川修ほか、「An analysis of phosphatidic acid for clear cell renal cell carcinoma」、第 76 回日本癌学会学術総会、2017

年 9 月 28 日 (横浜)

4. 坂元宏匡、小川修ほか「全エクソンシーケンスによる腎細胞癌テムシロリムス耐性獲得機序の解明」第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017 年 4 月 22 日 (鹿児島)

5. 牧野雄樹、井上貴博、小川修ほか、「An original patient-derived xenograft model for castration-resistant prostate cancer expressing AR-V7」第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017 年 4 月 21 日 (鹿児島)

6. 坂元宏匡、小川修ほか「全エクソンシーケンスによる腎細胞癌テムシロリムス耐性獲得機序の解明」第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 7 日 (横浜)

7. 宇都宮紀明、小川修ほか、「An analysis of renal cell carcinoma (RCC) xenograft models developing resistance to axitinib」第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 日 (横浜)

8. 宇都宮紀明、小川修ほか、「An analysis of renal cell carcinoma (RCC) xenograft models developing resistance to axitinib」第 14 回アジア泌尿器科学会、2016 年 7 月 19 日 (シンガポール)

9. 宇都宮紀明、小川修ほか、「Primary xenograft を用いた腎細胞癌アキシチニブ耐性獲得機序の解明」第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016 年 4 月 22 日 (仙台)

10. 宇都宮 紀明、小川修ほか、「Primary Xenograft を用いた腎細胞癌アキシチニブ耐性獲得機序の解明」第 25 回泌尿器科分子・細胞研究会、2016 年 2 月 26 日 (大阪)

11. 坂元宏匡、小川修ほか、「多発両側嫌色素性腎癌を主病態とし、全エクソンシーケンスにて同定した結節性硬化症の 1 例」第 25 回泌尿器科分子・細胞研究会、2016 年 2 月 26 日 (大阪)

12. 坂元宏匡、小川修ほか、「全エクソンシーケンスによる腎細胞癌スニチニブ耐性獲得機序の解明」第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日 (名古屋)

13. 坂元宏匡、小川修ほか、「Genetic analysis for resistance to sunitinib in Renal Cell Carcinoma by exome sequencing」13th UAA Congress、2015 年 9 月 3 日 (上海)

14. 前野 淳、小川修ほか、「マイクロ RNA miR-582-5p はアンドロゲン除去下での前立腺癌細胞増殖を制御する」第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015 年 4 月 18 日 (金沢)

15. 柴崎昇、小川修ほか「IL13RA2 mediates Resistance to Sunitinib in Primary Xenograft Models of Clear Cell Renal Cell Carcinoma」The 31st Japan-Korea Urological Congress、2014 年 9 月 27 日 (東京)

16. 新垣隆一郎、小川修ほか「Investigation of CCL2 as a potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma」第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日 (横浜)

17. 植垣正幸、井上貴博、小川修ほか「ヒト前立腺小細胞癌由来のゼノグラフトマウスモデルの樹立」第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日 (横浜)

18. 柴崎昇、小川修ほか、「IL13RA2 mediates resistance to sunitinib in primary xenograft models of clear cell renal cell carcinoma」, 2014 American Urological Association Annual Meeting、2014 年 5 月 16 日 (orland)

19. 柴崎昇、小川修ほか「スニチニブ感受性に関係する腫瘍および間質由来遺伝子変化の探索」第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014 年 4 月 24 日 (神戸)

20. 新垣隆一郎、小川修ほか、「腎細胞癌に対する新規治療ターゲットとしての CCL2 の検討」第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014 年 4 月 24 日 (神戸)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
京都大学医学研究科泌尿器科学教室 HP
<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 修 (OGAWA, Osamu)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：90260611

(2)研究分担者

井上 貴博 (INOUE, Takahiro)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80511881

根来 宏光 (NEGORO, Hiromitsu)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：80708595