

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462426

研究課題名(和文)腎癌におけるFHがん抑制遺伝子解析とメタボロミクスによるエネルギー代謝異常解析

研究課題名(英文)Relationship between FH tumor-suppressor gene and aerobic glycolysis (Warburg effect)

研究代表者

釜井 隆男 (Kamai, Takao)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：80316562

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)：腎細胞癌に関して、以下の三つの知見につき報告した。1) Aerobic glycolysis (Warburg 効果)に関して。原発巣のSUVmax とリン酸化Aktの発現量との間に正の相関関係があり、SUVmax・リン酸化Aktが高い症例は予後不良である。2) Fumarate hydratase (fumarase, FH)の異常に関して。HLRCC関連腎癌では、転写因子であるNrf2とリン酸化Aktの発現が著明に亢進している。第二世代のチロシナーゼ阻害剤であるAxitinibに対しての治療抵抗性にはリン酸化Aktが関連している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The main findings of the present study were as follows: 1) A higher standard glucose uptake value (SUVmax) on 18F-FDG-PET was correlated with higher expression of phosphorylated Akt(Ser-473) in the primary tumor. A higher SUVmax and increased expression of phosphorylated Akt(Ser-473) was associated with a higher pT stage, and metastasis, as well as shorter overall survival in RCC patients. 2) Targeted next-generation sequencing revealed that fumarate hydratase (fumarase, FH) mutation and loss of the second allele were completely identical between blood and tumor samples in Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer (HLRCC) cancer patients. Furthermore, surgically resected samples showed high expression of phosphorylated Akt (Ser-473) as well as nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), suggesting that FH mutation plays a direct role in a metabolic shift to aerobic glycolysis, and increased an anti-oxidant response phenotype in HLRCC-associated kidney cancer.

研究分野：泌尿器科

キーワード：腎細胞癌 HLRCC Akt Nrf2 aerobic glycolysis

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、2012年に Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer (HLRCC) として、日本国内はもとより、モンゴロイド(アジア人)初の HLRCC の家系を報告した[引用文献 1]。HLRCC は筋腫(皮膚筋腫および子宮筋腫)と腎細胞癌とを主体とする常染色体優性遺伝疾患であり、2001年に北欧から初めて報告された新しい疾患である。HLRCC の原因は、1番染色体の長腕(1q43)に存在する fumarate hydratase (fumarase, FH) の mutation である。FH はミトコンドリア内での Krebs (TCA) 回路の一部を担っており、細胞のエネルギー産生に参与している。一方、癌細胞ではエネルギーの供給源が酸素からブドウ糖へと変異しており、aerobic glycolysis (Warburg 効果) として有名である。Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路は、aerobic glycolysis (Warburg effect) に関しての中心的な役割を果たしている。近年、ミトコンドリア内でのエネルギー産生異常と癌との関連が報告され、Krebs (TCA) 回路を担う FH 等の遺伝子異常と癌との関連性に注目が集まっている。FH の異常が腎細胞癌の発症にどのような役割を演じているのかに関しては、以下の2つの仮説が提唱。ひとつは、Pseudo-hypoxia 仮説である[引用文献 2,3]。FH の異常でフマル酸がリンゴ酸へと変換されないと、フマル酸が細胞内に貯まり hypoxia-inducible factor (HIF) prolyl hydroxylase を競合的に抑制し、HIF が分解されないため、VEGF 等の産生が亢進するというもの。もう一つは、反対に HIF 非依存仮説である。ひとつの仮説として、転写因子である nuclear factor (erythroid-driven 2)-like 2 (Nrf2) のシグナル異常が関しているとの報告が注目されている[引用文献 4]。

(2) 腎細胞癌は immunogenic (免疫応答性) な腫瘍であることが知られている。特に、aerobic glycolysis (Warburg 効果) の状態では、腫瘍組織内での programmed cell death 1 (PD-1)/PD-ligand 1 (PD-L1) の発現が Akt を活性化し、T 細胞の機能を抑制していることが報告されている[引用文献 5,6]。

### 2. 研究の目的

FH 遺伝子異常の Warburg 効果への関与に関しては、総論的な論文の掲載が始まったばかりである[引用文献 7]。患者の臨床検体(血液および手術組織)を用いての腎細胞癌における FH がん抑制遺伝子の異常、Nrf2 シグナルの異常とエネルギー代謝異常を分子レベルで調べることで、HIF-vascular endothelial growth factor (VEGF) 経路とは異なる別の signaling pathway の腎細胞癌における役割の解明が目的であるが、このことで、新たな治療対象分子の候補を見つける可能性につなげたいと考えている。

### 3. 研究の方法

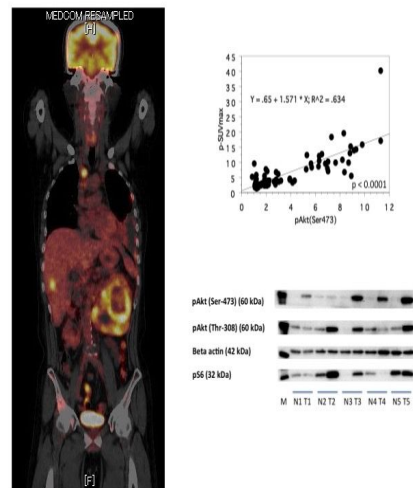
第1段階として、実際の臨床検体(血液および腎細胞癌手術組織)を用いて、FH 遺伝子の検査(突然変異、過剰発現、LOH等)を行い、FH 遺伝子の異常を解析する。まず、血液を用いて、FH 遺伝子の変異の検索を行う。さらに、手術組織を用いて、腎細胞癌組織中の FH 遺伝子の変異・過剰発現・LOH等の検索を行う。

第2段階として、FH 遺伝子の異常およびエネルギー代謝異常と、治療効果や生存期間等の臨床経過との関連性につき検討する。さらに、Akt等のエネルギー代謝異常と FH 遺伝子の異常との関連性についても検討する。

第3段階として、上記の実験中のデータから派生した興味深い結果があれば、その内容を発展させる。今回は、腫瘍で見られる Warburg 効果に関与している Akt が、PD-L1 の発現を介して免疫応答を調整しているという最新の論文報告を受け、Akt と PD-L1 との関連に関して検討を加えた。

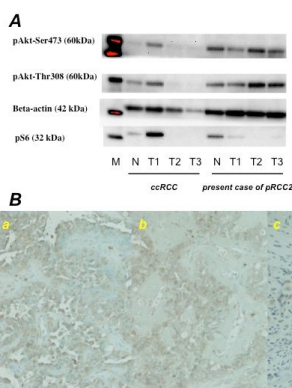
### 4. 研究成果

(1) Aerobic glycolysis (Warburg 効果) に関して。



Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路は、aerobic glycolysis (Warburg effect) に関しての中心的な役割を果たしている。また、臨床的に観察可能な Warburg 効果として  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxy-glucose positron emission tomography ( $^{18}\text{F}$ -FDG-PET) における standard glucose uptake value (SUVmax) が aerobic glycolysis の指標とされている。我々は、原発巣の SUVmax と原発巣のリン酸化 Akt(Ser-473) とリン酸化 Akt(Thr-308) の発現量との間に正の相関関係があることを示した。更に、SUVmax・リン酸化 Akt(Ser-473)・リン酸化 Akt(Thr-308) が高い腫瘍は、低分化、局所浸潤能、脈管浸潤能、遠隔転移能と関連があり、且つ、このような腫瘍を持つ症例は予後不良であるこ

とを報告した[発表論文 3]。これらのことは、SUVmax が癌のエネルギー需要と生存能を反映する imaging biomarker となる可能性を示唆していると同時に、リン酸化 Akt を標的とするような分子標的剤の開発への取り組みの重要性を示唆していると考えられる。(2) Fumarate hydratase (fumarase, FH)の異常に関して。

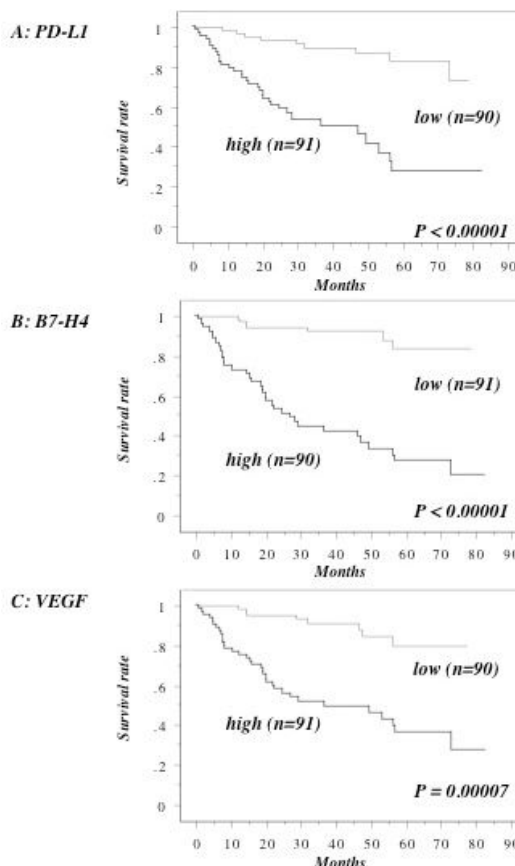


Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer (HLRCC) 家系のうちの 3 症例の検体を用いての検討では、次世代シーケンサーにおいて、FH 変異が germ-line と癌組織で完全に一致しており、FH 変異が HLRCC 関連腎癌の中心的な分子異常であることを発見した[発表論文 1]。また、HLRCC 関連腎癌においては、転写因子である nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) とリン酸化 Akt(Ser-473)の発現が著明に亢進していることを報告した[発表論文 1]。第二世代のチロシキナーゼ阻害剤である Axitinib を術前に投与し、摘出標本を用いて nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) とリン酸化 Akt(Ser-473)の発現を検討したところ、治療抵抗性癌組織では Nrf2 の発現は減弱しているものの、リン酸化 Akt(Ser-473)の発現は依然として高発現を呈していることから、治療抵抗性にはリン酸化 Akt(Ser-473)が大いに関連している可能性があることを報告した[発表論文 1]。同様に、肉腫様成分を含む Sarcomatoid 腎癌においても、Axitinib を術前に投与し、摘出標本を用いてリン酸化 Akt(Ser-473)の発現を検討したところ、治療抵抗性癌組織ではリン酸化 Akt(Ser-473)の発現が依然として高発現を呈していることを見出している[発表論文 4]。これらのことは、腎癌治療においては、リン酸化 Akt(Ser-473)を抑制することが治療成績の向上につながる可能性を示唆していると考えられる。

(3) B7 family moleculesの血清レベルの検討に関して。

Immune check point において中心的な役割を演じている B7 family molecules (CD80, CD86, PD-1, PD-L1, B7-H3, B7-H4, and

CTLA-4, and CD28) の手術前の血清レベルを検討したところ、PD-L1 と B7-H4 値が高い症例では、腫瘍の分化度が低く、局所浸潤能と転移能が高く、anti-VEGF therapy に対しての治療抵抗性が高く、予後不良であることを報告した[発表論文 2]。これらのことは、B7 family molecules を測定することは、腎細胞癌の生物学的活性度を推察するのみならず、anti-VEGF therapy の治療効果をも推察できる可能性を示唆していると考えられる。



< 引用文献 >

1. Kamai T, et al. Protein Profiling of Blood Samples from Patients with Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer by Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Int J Mol Sci*, **2012**;13; 14518-14532.
2. Sudarshan S, et al. Mechanisms of disease: Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer—A distinct form of hereditary kidney cancer. *Nat Clin Pract Urol*. **2007**;4:104–110.
3. Sudarshan S, et al. HIF and fumarate hydratase in renal cancer. *Br J Cancer* **2007**;96:403–407.
4. Adam J, et al. Renal cyst formation in Fh-1-Deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: Roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell* **2011**;20:524–537.

5. Chang CH, et al. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. Cell. **2015**;162:1229–1241.  
6. Ho PC, et al. Phosphoenolpyruvate is a metabolic checkpoint of anti-tumor T cell responses. Cell. **2015**;162:1217–1228.  
7. Linehan WM and Rouault TA. Molecular pathways: Fumarate hydratase-deficient kidney cancer–targeting the Warburg effect in cancer. Clin Cancer Res. **2013**;19:3345–3352.

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)

1. Kamai T, et al. Radical nephrectomy and regional lymph node dissection for locally advanced type 2 papillary renal cell carcinoma in an at-risk individual from a family with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: a case report. BMC Cancer. **2016**;16:232.

2. Fukuda T, Kamai T, et al. Higher preoperative serum levels of PD-L1 and B7-H4 are associated with invasive and metastatic potential and predictable for poor response to VEGF-targeted therapy and unfavorable prognosis of renal cell carcinoma. Cancer Med. **2016**;5: 1810-1820.

3. Mizuno T, Kamai T, et al. Clinically significant association between the maximum standardized uptake value on 18F-FDG PET and expression of phosphorylated Akt and S6 kinase for prediction of the biological characteristics of renal cell cancer. BMC Cancer. **2015**;15; 1097.

4. Yuki H, Kamai T, et al. Axitinib for preoperative downstaging of renal cell carcinoma with sarcomatoid differentiation and direct invasion of the duodenum and inferior vena cava: a case report. Onco Targets Ther. **2014**;7; 289-229.

〔学会発表〕(計0件)

〔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：  
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

釜井 隆男 (KAMAI Takao)  
獨協医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80316562

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )