

令和元年6月17日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11035

研究課題名(和文)腎癌における遺伝子変異・遺伝子発現を基にした治療体系確立への基礎研究

研究課題名(英文)Towards the personalized medicine for metastatic renal cell cancer

研究代表者

湯浅 健 (YUASA, Takeshi)

公益財団法人がん研究会・有明病院 泌尿器科・副部長

研究者番号：00314162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：現在の転移性腎細胞癌に対する治療の主軸のひとつは血管新生阻害による分子標的治療であり、その効果の一つにglucose deprivationがある。我々はglucose deprivation抵抗性細胞株と感受性細胞株との比較から、抵抗性細胞株は、優良なミトコンドリア機能を有し、原因の一つとしてROSの分解酵素のひとつSOD2の発現が高くROSが低下し、治療抵抗性を示す可能性を示した。さらにHIF-2およびそのnetworkがglucose deprivation耐性に関連していることが示し、腎癌原発巣のトランスクリプトーム解析から、ARL4C高発現症例は予後不良であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移性腎細胞癌に対して、血管新生阻害剤治療時においてHIF-2(hypoxia inducible factor)シグナルによる治療耐性をあきらかにし、新規の予後不良遺伝子ADP-ribosylation factor-like 4Cを同定することによって将来的に新たな治療戦略の基礎になる可能性がある。さらにInternational Metastatic renal cell cancer database Consortium (IMDC)国際共同研究は後方視的研究ではあるが、現時点の実臨床における様々な問題点を解決するヒントになっていると思う。

研究成果の概要(英文)：One of the most important efficacies of angiogenesis inhibitors is glucose deprivation for RCC cells. We investigated the mechanism of resistance against glucose deprivation of cancer cell. We found that the resistant type possessed higher activities for both mitochondrial oxidative phosphorylation and glycolysis than the sensitive types. These higher activities were supported by the stored carbon, lipid and carbohydrate sources, and by a low level of mitochondrial ROS due to sustained SOD2 expression in the resistant RCC cells. Next, deprivation-resistant RCC, that had lost von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor expression, expressed hydroxyl-HIF2-alpha in the nucleus, but not sensitive- RCCs. Hydroxyl-HIF2-alpha might be a potential therapeutic target for RCCs. At last, by global transcriptome analysis, ARL4C was shown to be a predictive biomarker for poor prognosis in patients with RCC and may be a novel target in the treatment of RCC.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：腎癌 分子標的治療 予後因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーなどを基にした遺伝子解析が進むにおいて、腎癌をはじめとする泌尿器科癌において、様々な遺伝子変異が明らかになってきた。腎癌の80%を占める淡明細胞癌は、VHL遺伝子の変異が多くみられ、VHL蛋白質の主な働きの一つとして hypoxia inducible factor (HIF-1)のユビキチン化、分解があげられることから、現在は血管新生やシグナル中の重要な蛋白である mammalian target of rapamycin (mTOR)を分子標的とした治療が中心である。最近、肺癌や尿路上皮癌など他癌と同様に、PD-1/PDL-1の免疫チェックポイントを標的とした分子標的治療が有効なことが示唆され、国際第 相試験の結果からも間もなく臨床使用され、腎癌、尿路上皮癌など多くの癌で治療体系が大きく変化している(1-4)。

2. 研究の目的

申請者は実臨床において泌尿器科癌に対する薬物療法に対して取り組んでおり、転移性腎細胞癌においては海外との国際共同研究において、これまで分子標的治療の治療成績・危険因子・合併症などを明らかにしてきた。一方、泌尿器科癌では、免疫チェックポイントを標的とした分子標的治療の有効性が示され、現在治療体系が大きく変化しており、免疫チェックポイント阻害剤を中心とした治療体系の再構築が必要であり、それに関連する遺伝子変化の理解が必須と考えられる。今回は、泌尿器科癌の既知の遺伝子変化のみならず、普遍的なシグナル因子や免疫チェックポイント遺伝子を含めた遺伝子発現解析と *in vitro*での糖枯渇耐性機構のメカニズム解析を進め、テーラーメイドな泌尿器科癌の治療体系を考えるための基礎研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 腎細胞癌、周囲正常周囲組織および転移巣から次世代シーケンサーを用いて発現解析

腎細胞癌で原発巣摘出のみならず、肺転移や膵転移など転移巣手術を行った症例を対象にして、次世代シーケンサーGenome analyzer を用いてトランスクリプトーム解析をおこない、網羅的な発現解析データについて、解析ソフト AvadisNGS などにて、パスウェイ、ネットワークが癌細胞の生存戦略の制御に関わるかどうかを精査する。発現に有意な差を認める候補遺伝子および候補パスウェイが決まれば、さらに再度 mRNA を抽出し、quantitative RT-PCR および DNA シーケンシングによって転移巣に発現する癌の進行・転移に関連する遺伝子候補、また原発巣にて発現の高い新規癌遺伝子候補に対して遺伝子発現・遺伝子変異解析の validation を行う。

(2) *in vitro* の解析により glucose deprivation 耐性のメカニズムおよび耐性関連遺伝子群の同定

血管新生阻害により deprivation を受けるものの重要な一つが glucose であり、治療耐性メカニズムと関連していると考え、研究を継続している。7種の腎細胞癌細胞株 NC65、Caki1、Caki2、ACHN、SW839、VMCR-RCW、KMRC-1 を用い、glucose deprivation 時の酸化的リン酸化の解析はフラックスアナライザー用い、ミトコンドリア内 Reactive oxygen species (ROS) は MitSOXRed アッセイにて測定酸素消費速度、ミトコンドリア予備呼吸容量および共役効率や、細胞内に含有する糖および脂質の容量、および glucose 耐性関連の遺伝子群を同定する。

(3) データベースを用いて病理学的および臨床的解析を行う。

腎細胞癌原に発現増強あるいは低減している遺伝子を確認し database に立ち返って、病理学的・臨床的性格を検討し、現行治療のバイオマーカーを検索する。さらに治療成績とも比較検討する事から、今後の PD-1/PD-L1 抗体治療に最適な症例像を検討する。

4 . 研究成果

(1) glucose deprivation 感受性細胞株と抵抗性細胞株でのミトコンドリア oxidative phosphorylation 活性の違い

glucose deprivation 時のミトコンドリア oxidative phosphorylation 活性を Flux analyzer を用いて測定したところ、glucose deprivation 抵抗性細胞株は感受性細胞株と比較して有意に高い spare respiratory capacity を認めた。両群間に basal respiration に差はなく、glucose deprivation 抵抗性細胞株は感受性細胞株と比較して糖が 25mM 時も glucose deprivation 時においても coupling efficiency が有意に高いことがわかった。これらのことから、glucose deprivation 抵抗性細胞株は感受性細胞株と比較して高いミトコンドリア oxidative phosphorylation 活性を有していることが分かった。一方で、glucose deprivation 時の glycolysis を調べたところ、glucose deprivation 抵抗性細胞株は感受性細胞株と比較して高い glycolysis capacity を持っていることがわかった。これらのことから glucose deprivation 抵抗性細胞株は感受性細胞株と比較して優良なミトコンドリア機能と、carbon store を有していることが分かった。

(2) glucose deprivation 抵抗性細胞株における HIF-2 および関連遺伝子の発現について

腎細胞癌の多くは淡明細胞癌(clear cell cancer)であり、責任遺伝子として癌抑制遺伝子 *von Hippel-Lindau (VHL)* 遺伝子の変異が知られている。HIF-1 および HIF-2 は VHL 遺伝子の変異により HIF-1 および HIF-2 のユビキチン化が行われず、したがって不活化がされない。HIF-1 遺伝子および HIF-2 遺伝子の siRNA を用いて glucose deprivation 時の細胞死について調べたところ、HIF-2 siRNA を用いて HIF-2 遺伝子発現が抑制されると glucose deprivation 抵抗性細胞株も細胞死が起こることがわかった。また、glucose deprivation 時の HIF transcription factor network pathway の発現が抑制されていることがわかった。これらのことから、VHL 遺伝子の標的として HIF-2 およびその network が glucose deprivation 耐性に関連していることが示唆された。

(3) 腎癌臨床サンプルの遺伝子解析

discovery cohort として、腎摘後 5 年以上転移なく生存症例(n=27)、腎摘、転移巣診断後 4 年以上生存症例(n=7)、腎摘、転移診断後 2 年以内に死亡例(n=9)、3 つのグループに分類しグローバルトランスクリプトーム解析を行った。Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析で 90%以上の確率で予後不良を示した、ARL4C、BUB1、BIRC5、CPS1、ECT2、FSTL1、STEAP3 と 7 つの遺伝子が抽出された (図 1, $P<0.001$)。Cox proportional hazards regression 解析によって、ARL4C 高発現症例はハザード比 167 (95%信頼区間 4.71-1000, $P<0.001$) で独立した予後因子であった。次に validation cohort として滋賀医科大学泌尿器科にて根治的腎摘除された 97 例の腎癌原発巣を用いて ARL4C 発現を免疫組織染色法により調べた。Kaplan-Meier 法を用いた全生存期間解析によっても ARL4C 高発現症例は有意に予後不良であった(図 2, $P<0.001$)。Cox proportional hazards regression 解析によっても ARL4C 高発現症例はハザード比 9.41 (95%信頼区間 2.03-43.6, $P=0.004$) で独立した予後因子であった。

引用文献

Yuasa T, Urakami S. Decreased incidence of skeletal-related events in mRCC. *Nature Reviews in Urology*. 2014 Apr;11(4):193-4.

Yuasa T, Takahashi S, Hatake K, Yonese J, Fukui I. Biomarkers to Predict Response

to Sunitinib Therapy and Prognosis in Metastatic Renal Cell Cancer. *Cancer Science* 2011;102:1949-57.

Yuasa T, Urakami S, Yonese J. Recent advances in medical therapy for metastatic urothelial cancer. *Int J Clin Oncol*. 2018 Aug;23(4):599-607. doi: 10.1007/s10147-018-1260-0.

Yuasa T, Masuda H, Yamamoto S, Numao N, Yonese J. Biomarkers to predict prognosis and response to checkpoint inhibitors. *Int J Clin Oncol*. 2017 Aug;22(4):629-634. doi: 10.1007/s10147-017-1122-1

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Isono T, Chano T, Yoshida T, Makino A, Ishida S, Suzaki M, Kageyama S, Kawauchi A, Yonese J, Yuasa T. ADP-ribosylation factor-like 4C is a predictive biomarker of poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Am J Cancer Res* 2019;9:415-423.

Isono T, Chano T, Yoshida T, Kageyama S, Kawauchi A, Yonese J, Yuasa T. Abundance of TRAIL attenuated by HIF2 and c-FLIP affects malignancy in renal cell carcinomas. *Oncotarget*. 2018 May 1;9(33):23091-23101. doi: 10.18632/oncotarget.25214.

eCollection 2018 May 1.

Yip SM, Wells C, Moreira R, Wong A, Srinivas S, Beuselinck B, Porta C, Sim HW, Ernst DS, Rini BI, Yuasa T, Basappa NS, Kanesvaran R, Wood LA, Canil C, Kapoor A, Fu SYF, Choueiri TK, Heng DY. Checkpoint inhibitors in patients with metastatic renal cell carcinoma: Results from the international metastatic renal cell carcinoma database consortium. *Cancer*. 2018 Sep 15;124(18):3677-3683.

〔学会発表〕(計5件)

Bhindi B, Graham J, Wells C, Donskov F, Pasini F, Lee JL, Basappa NS, Hansen AR, Wood L, Kollmannsberger CK, Kanesvaran R, Yuasa T, Ernst DS, Srinivas S, Rini BI, Bowman IA, Sumanta K, Pal SK, Choueiri TK, Heng DY. Deferred cytoreductive nephrectomy among patients with newly diagnosed metastatic renal cell carcinoma treated initially with sunitinib. ASCO Annual meeting 2019 (Chicago).

Dudani S, Graham J, Wells C, Bakouny Z, Pal SK, Dizman N, Donskov F, Porta C, de Velasco G, Hansen AR, Iafoffa MAJ, Beuselinck B, Vaishampayan UN, Wood L, Liow ECH, Yan F, Yuasa T, Bjarnason GA, Choueiri TK, Heng DY. First-line (1L) immuno-oncology (IO) combination therapies in metastatic renal-cell carcinoma (mRCC): Results from the international mRCC database consortium (IMDC). ASCO Annual meeting 2019 June (Chicago).

Dudani D, Graham J, Wells C, Pal SK, Dizman D, Donskov F, Bjarnason GA, Hansen AR, Iafoffa MAJ, Vaishampayan UN, Porta C, Beuselinck B, Yan F, Wood L, Liow ECH, Christian K, Kollmannsberger CK, Yuasa T, Zhang CA, Choueiri TK, Heng DY. First-line (1L) immuno-oncology (IO) combination therapies in metastatic renal cell carcinoma (mRCC): Preliminary results from the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium (IMDC). Genitourinary Cancers Symposium. 2019 February (San Francisco)

湯浅健 前立腺がん -男性ホルモンと骨代謝・骨転移- ランチョンセミナー 日本泌尿器

科学会総会 2019年4月 (名古屋)

湯浅健 シンポジウム-膀胱癌における薬物療法の最前線- 免疫チェックポイント阻害
剤の現状と展望 日本泌尿器科学会総会 2019年4月 (名古屋)

〔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

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：米瀬 淳二

ローマ字氏名：(YONESE, junichi)

研究協力者氏名：石川 雄一

ローマ字氏名：(ISHIKAWA, yuichi)

研究協力者氏名：磯野 高敬

ローマ字氏名：(ISONO, takahiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。