

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09426

研究課題名（和文）腎細胞癌におけるBACH1機能解析を基礎とした抗PD-1抗体抵抗性獲得機序の解明

研究課題名（英文）Clarification of the mechanism of anti-PD-1 antibody resistance acquisition based on BACH1 functional analysis in renal cell carcinoma

研究代表者

武本 健士郎（Takemoto, Kenshiro）

広島大学・病院（医）・医科診療医

研究者番号：70887124

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、淡明細胞型腎細胞癌において代表的な酸化ストレス応答因子(OSR)であるBACH1の役割を明らかにした。BACH1は、腎摘除術を受けた患者の予後不良因子であり、腎癌細胞株の浸潤能および遊走能に関与していた。さらに、マウスモデルにおいてはBACH1は、EMT関連遺伝子の活性化を伴い、生体での腫瘍の増殖能亢進に寄与していた。炎症反応、血管新生、mTORシグナル伝達など、OSRに関連する経路関与が、BACH1ノックダウン細胞株のRNAシーケンスによってさらに明らかになった。以上のことからOSRの促進を介した腎細胞癌の腫瘍活性亢進においてBACH1が重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

さまざまな悪性腫瘍の中でも、特に腎細胞癌は炎症との深い関連が古くから指摘されているが、炎症は生体内で非特異的な反応であり、定量評価困難である。一方で、炎症により誘導される活性酸素種(ROS)が酸化ストレスを誘発することから、酸化ストレスが炎症における定量評価可能なメディエーターと見做すことができる。そこで、我々は代表的な酸化ストレス関連転写因子であるBACH1に着目し、腎細胞癌における分子機能解析を行った。その結果、BACH1が腎細胞癌の浸潤能、遊走能を制御していることを世界で初めて報告した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the role of BACH1, a key transcription factor for oxidative stress responses (OSRs), which is a poor prognostic factor in patients undergoing nephrectomy and is involved in the invasive and migratory potential of renal cancer cell lines. Furthermore, in mouse models, BACH1 affected to tumor growth activity in vivo, with the activation of EMT-related genes. BACH1 involvement in other OSR-linked pathways, including inflammatory responses, angiogenesis, and mTOR signaling, was further revealed by RNA sequencing analysis of BACH1-knockdown cells. In conclusion, the crucial role of BACH1 in the pathogenesis and poor prognosis of renal cancer through the promotion of OSRs is suggested.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 酸化ストレス 腫瘍活性

1. 研究開始当初の背景

さまざまな悪性腫瘍の中でも、特に腎細胞癌は炎症との深い関連が古くから指摘されているが、炎症は生体内で非特異的な反応であり、定量評価困難である。一方で、炎症により誘導される活性酸素種(ROS)が酸化ストレスを誘発することから、酸化ストレスが炎症における定量評価可能なメディエーターと見做すことができる。そこで、我々は代表的な酸化ストレス関連転写因子である BTB and CNC homology 1(BACH1)に着目し、公共データベースを用いた解析を行ったところ BACH1 の高発現が腎細胞癌における治療奏効率を有意に低下させる事を発見した。さらに、BACH1 は ROS の産生を促進し、抗酸化酵素の発現を抑制的に制御することも明らかとなっていたが、腎細胞癌における BACH1 の担う役割については全く解明されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では炎症および炎症により誘導される酸化ストレス応答因子が腎細胞癌において担う具体的な分子メカニズム解明を目的とした。

具体的には 腎細胞癌患者における BACH1 の臨床的検討、腎癌細胞株における BACH1 の分子機能解析、生体モデルにおける BACH1 の腫瘍増殖能評価を解析することで腎細胞癌における酸化ストレス応答因子の担う意義を解明することを主題とした。

3. 研究の方法

腎細胞癌患者における BACH1 の臨床的検討

当院にて 2002 年～2012 年までに施行した腎細胞癌患者における腎摘除術標本 77 例を対象とし、BACH1 における免疫組織学的染色を行った。BACH1 の発現による患者背景、予後の評価を行い臨床的検討を施行した。また BACH1 により抑制的に制御されている抗酸化酵素 Heme oxygenase-1(HO-1)についても免疫組織学的染色を行い、BACH1 発現との相関を解析した。

腎癌細胞株における BACH1 の分子機能解析

ヒト腎癌細胞株(786-O、Caki-1、ACHN)を用いて分子機能解析を行った。BACH1 のノックダウン細胞株および過剰発現株を樹立し、invasion assay、wound-healing assay、proliferation assay を用いて、それぞれ浸潤能、遊走能および増殖能を評価した。また、抑制的に制御されている抗酸化酵素 HO-1 についても BACH1 発現による発現調整を qRT-PCR およびウエスタンブロッティング法にて解析した。

生体モデルにおける BACH1 の腫瘍増殖能評価

ヒト腎癌細胞株(786-O)の BACH1 過剰発現株をヌードマウスに異種移植し、生体モデルにおける BACH1 の増殖能への影響を解析する。また、マウス腎癌細胞株である RenCa の BACH1 CRISPR-KO 細胞株を樹立し、同種移植においても増殖能への影響を検討した。

4. 研究成果

腎細胞癌患者における BACH1 の臨床的検討

手術検体における BACH1 の免疫組織学的染色においては、BACH1 発現は腎細胞癌の進行度(pT stage、臨床病期)と有意な相関を認めた。さらに下記の図 1 のごとく、BACH1 陽性例は無再発生存率および癌特異生存率が有意に低く、BACH1 発現は腎摘除術症例における予後不良因子であることが明らかとなった(p<0.001、p=0.007)。さらに、血清炎症性マーカーである CRP や NLR においても BACH1 発現と相関していることが明らかとなり(図 2)、日常診療で多用されているマーカーとの関連が実証されたのは世界で初めての報告であった。

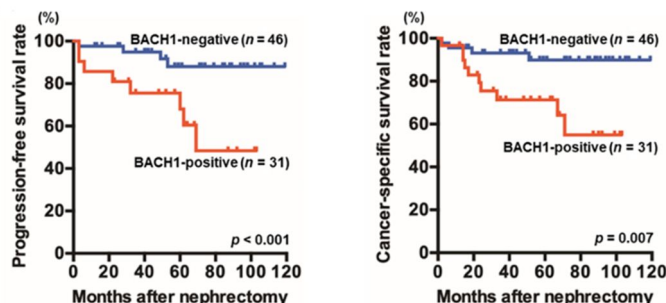


図 1. 予後と関連

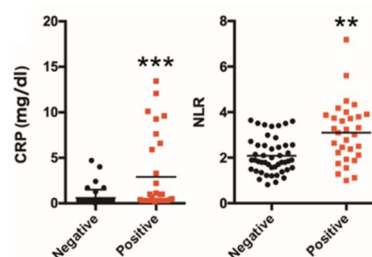


図 2. 炎症性マーカーと関連

腎癌細胞株における BACH1 の分子機能解析

ヒト腎癌細胞株における分子機能解析では、BACH1 発現は浸潤能および遊走能に關与していることが明らかとなった。BACH1 をノックダウンすると浸潤能および遊走能は低下し、過剰発現すると上昇することから、BACH1 が腎癌細胞株の浸潤能および遊走能を制御していることが解明された(図 3)。さらに、一般的に BACH1 は抗酸化酵素である HO-1 を抑制することで炎症を惹起することが分かっているが、腎癌細胞株においても BACH1 は HO-1 発現を抑制的に制御していることを mRNA レベルおよび蛋白レベルで確認した。

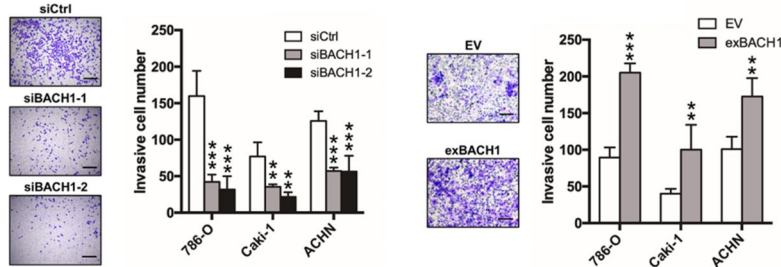


図 3. 浸潤能評価

さらに RNA シーケンスによる網羅的遺伝子解析を行ったところ、BACH1 発現は腎癌細胞株において腫瘍活性亢進に非常に重要な遺伝子経路に複数關与していることが明らかとなった。代表的なものとして、悪性腫瘍の浸潤・転移に深く關与する上皮間葉転換關連遺伝子との正の相関を認めた。

生体モデルにおける BACH1 の腫瘍増殖能評価

マウスモデルにおいて、ヒト腎癌細胞株の BACH1 過剰発現株のヌードマウスへの異種移植、マウス腎癌細胞株の BACH1 CRISPR-KO 細胞株の同種移植を行い、生体内での増殖能への影響を評価した。下記の図 4 のごとく BACH1 発現により増殖能は制御されており、腫瘍増殖において非常に重要であることが明らかとなった。

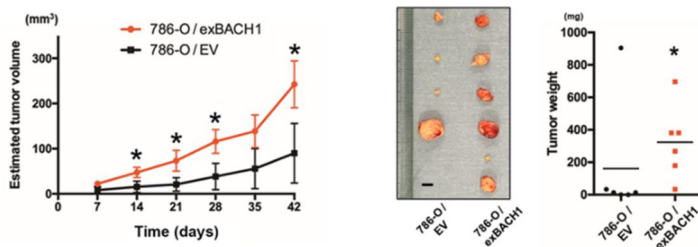


図 4. 増殖能評価

さらに腫瘍活性亢進の具体的なメカニズムを解析したところ、RNA シーケンスの結果で得られたように、採材した腫瘍においては、浸潤・転移に深く關与する上皮間葉転換關連遺伝子との強い相関が認められた。

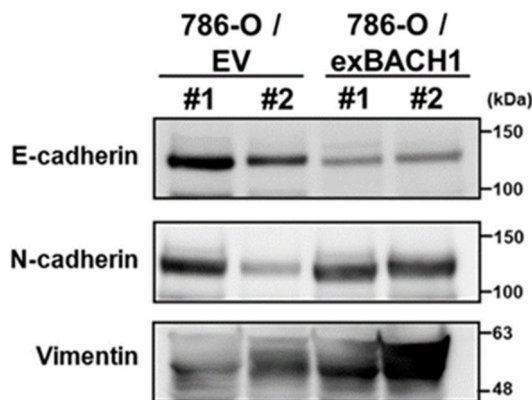


図 5. EMT 關連遺伝子との相関

以上のようにわれわれは、酸化ストレス応答因子である BACH1 が腎細胞癌において担う具体的な分子機能を解析した。浸潤・転移に深く關与する上皮間葉転換關連遺伝子を介した BACH1 による腫瘍活性亢進が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kenshiro Takemoto	4. 巻 114
2. 論文標題 BACH1 promotes clear cell renal cell carcinoma progression by upregulating oxidative stress-related tumorigenicity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 436-448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15607.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kenshiro Takemoto
2. 発表標題 BACH1 promotes the progression of renal cell carcinoma via upregulating oxidative stress-related tumorigenic activity
3. 学会等名 The 74th Annual Meeting of West Japan Urological Association
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武本健士郎
2. 発表標題 腎細胞癌において酸化ストレス応答因子BACH1がもつ分子機構の解明
3. 学会等名 第32回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小島 浩平 (Kobatake Kohei) (10749998)	広島大学・病院(医)・助教 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	亭島 淳 (Teishima Jun) (20397962)	広島大学・医系科学研究科(医)・准教授 (15401)	
研究分担者	池田 健一郎 (Ikeda Kenichiro) (50624863)	広島大学・病院(医)・助教 (15401)	
研究分担者	神沼 修 (Kaminuma Osamu) (80342921)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関