

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390367

研究課題名(和文) 患者癌組織移植モデルの網羅的シーケンシング解析による泌尿器癌薬剤耐性機構の探索

研究課題名(英文) Genetic analysis for drug resistance in urological cancer by whole exome sequencing using xenograft model

研究代表者

神波 大己 (Kamba, Tomomi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20402836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、現在までに臨床患者癌組織由来泌尿器癌xenograftモデルを樹立してきた。本研究ではこれらのモデルを用いて分子標的薬耐性モデルを樹立して、網羅的シーケンス解析を用いて薬剤耐性獲得機構の解明を目指した。temsirolimusならびにsunitinibに対する耐性モデルを樹立し、それぞれに全エクソンシーケンス解析を行い、いくつかの候補遺伝子変異を同定した。今後、候補遺伝子変異の機能解析などを検討している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to elucidate potential resistance mechanisms in urological cancer in vivo model by exome sequencing. We have generated several cohort of patient-derived primary xenograft model, and some of which develop complete resistance to temsirolimus or sunitinib with continuous drug exposure. We performed whole exome sequencing. Comparison of resistant and control data identified common Non-synonymous single nucleotide variants (SNVs) among resistant tumor that were absent in control tumor. Further studies to explore whether these variants arise in urological cancer are expected to reveal the clinical relevance of genetic alterations identified in these model system.

研究分野：泌尿器科癌

キーワード：腎癌 前立腺癌 mTOR 全エクソンシーケンス 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

泌尿器癌、特に前立腺癌や腎細胞癌は患者数の増加とともに、その重要性が増している。転移を伴う進行癌ではキーシグナル経路を標的とした治療が実践されているものの、最終的には薬剤抵抗性を獲得し死に至る癌種である。腎細胞癌では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Tyrosine kinase inhibitor (TKI) 剤による分子標的治療が進行性腎癌の標準治療となった。さらに、mTOR 阻害剤の有効性が示され、TKI 剤抵抗症例などに対して臨床応用されている。しかし、その効果にも限界があり、大半の症例で投与開始数ヶ月以内に病状の悪化がみられる。(Motzer RJ et al, Lancet 2008) 一方、進行性前立腺癌ではアンドロゲン受容体 (AR) 経路を遮断する去勢療法が主たる治療であるが、2~3 年以内に多くが抵抗性を獲得し、去勢療法抵抗性癌 (CRPC) となる。最近の我々の研究では、mTOR 経路の恒常的活性化が CRPC への変異機序のひとつであると考えられ (Mol Endocrinol 2010, Prostate 2010)、この経路を標的とした治療が CRPC の新治療として期待されている。実際に海外での臨床試験が始まっているものの、やはりその効果は数ヶ月程度であり、いずれ病勢の悪化が認められるとされている。(Pan C et al, J Clin Oncol 2011)

泌尿器科癌の重要な治療ターゲットである mTOR 経路の阻害剤などの分子標的薬に対する耐性機序は未知な点が多く、これらの機序の解明が、さらなる新規薬剤の開発の上で強く要望される。

本申請者はこれまで約20 年間、臨床現場で進行泌尿器科癌の治療に関わってきた。その難治性がゆえに、治療抵抗性克服を目指し、その機序の解明に関する研究に携わってきた。また、個々の癌組織の性質を維持し、臨床泌尿器癌をより“還元”化したモデルとして、患者癌組織に由来するPDTT (Patient derived tumor tissue) xenograftモデルの樹立を積極的に試み、その解析を行ってきた。

【前立腺癌】

CRPC 変異獲得モデルKUCaP-1,2 を樹立・報告し、さらに3 種の新規前立腺癌xenograft を樹立した。KUCaP-1 はAR のW741C 変異を有し、抗アンドロゲン剤ピカルタミドがagonist として作用することや、KUCaP-2 は野生型AR を発現し、EP4 発現亢進が去勢抵抗性獲得に関与することを示した。(Cancer Res 2005, 2010) また、mTOR 阻害剤であるrapamycin がアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株でも増殖を抑制することを報告した。(Prostate 2010)

【腎細胞癌】

腎細胞癌xenograft モデルKURCC1,2,3 を樹立し、1,3 においてスニチニブ (VEGFR 阻害剤) に対し耐性を獲得することを確認した。また、VHL 遺伝子不活化による転写因子JunB の活性化が、HIF 非依存的な腫瘍増生に関与することを示し、RCC 臨床検体の解析では、いくつかのmTOR 経路関連分子の遺伝子変異がmTORC1 の恒常的活性化に関与することを報告した。(Oncogene 2011, Mol Cancer Res 2011)

肺癌では、EGFR TKI 剤の耐性にEGFR の新たな遺伝子変異が関与しており、前立腺癌の去勢抵抗性獲得にはAR の遺伝子変異が一部関与している、と考えられている。これらと同様に、新規分子標的薬においても、治療標的となる遺伝子の変異が抵抗性獲得の一因であることが推測される。

以上の背景に基づき、申請者はmTOR 阻害剤の耐性獲得にmTOR 経路関連分子の遺伝子変異が関与するとの仮説を立て、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、当科研究室で樹立し、解析を進めてきた患者癌組織由来の初期xenograft モデルを用いて、細胞成長や増殖のkey 分子であるmTOR を標的とした薬剤の治療抵抗性変異獲得メカニズムを解析する。技術革新の目覚ましい次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスを施行し、抵抗性獲得時のmTOR 経路関連分子の遺伝子変異に特に着目し、その遺伝子変異の生物学的意義を見出すことで、創薬開発の基礎とする。

3. 研究の方法

ヒト前立腺癌の臨床経過と類似した前立腺癌去勢抵抗性変異モデル、KUCaP-1,2 および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、KURCC-1,2,3 を用い、それらを移植した免疫不全マウスにtemsirolimus などの分子標的薬を投与する。経時的に経過を追いつつ、薬剤耐性モデルを樹立する。

上記で経時的に採取した組織からDNA を抽出し、エキソーム濃縮後、次世代シーケンサーをもちいて全エクソンシーケンスを行う。

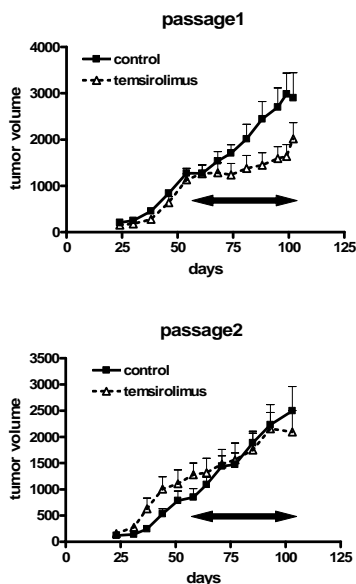
腫瘍関連分子に着目し、で検出した遺伝子変異の機能的意義を培養細胞の実験で解析する。

4. 研究成果

(1).我々は、PDTT xenograft を用いて、腎細胞癌において mTOR 阻害剤である temsirolimus 抵抗性モデル (Fig.1) ならびに TKI の sunitinib 抵抗性モデルを、前立腺癌

においては、去勢後に再増大し去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）となるモデルの樹立にそれぞれ成功した。

Fig.1



(2). 上記の temsirolimus 耐性モデル、sunitinib 耐性モデルの腫瘍組織から得られた DNA を用いて、全エクソンシーケンスを行った。Temsirrolimus 耐性モデルに対する全エクソンシーケンスの結果は、平均 coverage 98.8%、平均 depth は 47.1 であった。耐性モデルとコントロールモデルの比較、絞込みを行い、耐性に関与する遺伝子変異として 6 個の候補を見出した。(Fig.2) サンガーシーケンスによる評価でも同部位に遺伝子変異を認めた。(Fig.3) その候補遺伝子の中には mTOR 関連遺伝子も含まれており、現在、その機能的意義につき培養細胞での実験で解析中である。sunitinib 耐性モデルの全エクソンシーケンスでも同様の解析を行い、15 の候補遺伝子変異を認めた。サンガーシーケンスでの評価を行い、同様に機能解析を行っている。

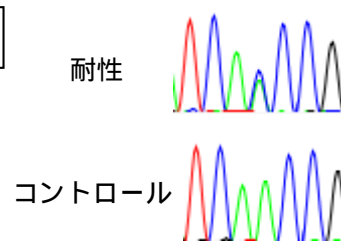
Fig.2

chromosome	position	gene	reference	allele	Effect
4	#####	###	G	T	splice_region_variant
5	#####	###	C	T	missense_variant
5	#####	###	A	C	missense_variant
5	#####	###	GTTCTTCT	GTTCT	inframe_deletion
11	#####	###	G	C	splice_acceptor_variant
20	#####	###	TTT	TTTGTT	intron_variant

結語

臨床患者癌組織由来 xenograft モデルを用いて分子標的薬耐性モデルを樹立した。全エクソンシーケンスを行い、耐性に関連する可能性のある候補遺伝子変異を見出した。今後、その機能解析を進めるとともに、薬剤抵抗性患者の転移組織を生検などで採取して、個別化医療の基盤を作成していくことが課題である。

Fig.3



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 12 件)

1. The effect of ABCG2 genotype on the population pharmacokinetics of sunitinib in patients with renal cell carcinoma. Mizuno T, Kamba T(他 8 名、6 番目), Yamasaki T, Ogawa O. *The Drug Monit.* 査読有 Jun;36(3):310-6, 2014
doi: 10.1097/FTD.000000000000025.
2. Improvement of prognosis in patients with metastatic renal cell carcinoma and Memorial Sloan-Kettering Cancer Center intermediate risk features by modern strategy including molecular-targeted therapy in clinical practice. Kamba T(他 7 名、1 番目), Yamasaki T, Ogawa O. *Int J Clin Oncol.* 査読有 19(3):505-15, 2014
doi: 10.1007/s10147-013-0581-2. Epub 2013 Jun 28.
3. Exposure-toxicity relationship of sorafenib in Japanese patients with renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma. Fukudo M, Kamba T(他 8 名、7 番目), Yamasaki T, Ogawa O. *Clin Pharmacokinet.* 査読有 Feb;53(2):185-96, 2014
doi: 10.1007/s40262-013-0108-z
4. Up-regulation of miR-582-5p regulates cellular proliferation of prostate cancer cells under androgen-deprived conditions. Maeno A, Kamba T(他 6 名、7 番目), Ogawa O. *Prostate.* 査読有 2014 Dec;74(16):1604-12,
doi: 10.1002/pros.22877. Epub 2014 Aug 29
5. The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer. Goto T, Kamba T(他 10 名、11 番目), Ogawa O. *PLoS One.* 査読有 28;9(2):e90242, 2014
doi: 10.1371/journal.pone.0090242. eCollection 2014.
6. Long-term outcomes of dynamic

- conformal arc irradiation combined with neoadjuvant hormonal therapy in Japanese patients with T1c-T2NOMO prostate cancer: case series study. Ikeda I, Kamba T(他 7 名、5 番目), Ogawa O. *Jpn J Clin Oncol*. 査読有 ;44(2):180-5. 2014
doi: 10.1093/jjco/hyt197. Epub 2013 Dec 29.
7. Experimental evidence of persistent androgen-receptor-dependency in castration-resistant prostate cancer. Kobayashi T, Inoue T, Kamba T, Ogawa O. *Int J Mol Sci*. 査読有 14(8):15615-35, 2013
doi: 10.3390/ijms140815615.
 8. STAT3 polymorphism can predict the response to interferon- therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. Eto M, Kamba T(他 10 名、2 番目), Ogawa O. *Eur Urol*. 査読有 63(4):745-52, 2013
doi: 10.1016/j.eururo.2012.09.052. Epub 2012 Sep 28.
 9. Role of mammalian target of rapamycin inhibitor in the treatment of metastatic epithelioid angiomyolipoma: A case report. Kohno J, Kamba T(他 6 名、5 番目), Ogawa O. *Int J Urol*. 査読有 20(9):938-41, 2013
doi: 10.1111/iju.12095. Epub 2013 Jan 24.
 10. JunB promotes cell invasion and angiogenesis in VHL-defective renal cell carcinoma. Kanno T, Kamba T(他 10 名、2 番目), Ogawa O. *Oncogene* 査読有 31(25):3098-110, 2012
doi: 10.1038/onc.2011.475. Epub 2011 Oct 24.
 11. Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese. Akamatsu S, Ogawa O(他 22 名、22 番目). *Nat Genet*. 査読有 44(4):426-9, 2012
doi: 10.1038/ng.1104.
 12. Tumor microvasculature with endothelial fenestrations in VHL null clear cell renal cell carcinomas as a potent target of anti-angiogenic therapy. Yamasaki T, Kamba T(他 8 名、2 番目), Shibasaki N, Ogawa O. *Cancer Sci*. 査読有 103(11):2027-37, 2012
doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02412.x. Epub 2012 Oct 10.
- (横浜)
神波 腎癌骨転移症例の予後予測モデルの構築と既存モデルとの比較
2012/4/23 第 100 回日本泌尿器科学会総会 (横浜)
柴崎 腎細胞癌のマウス primary xenograft を用いた Sunitinib 抵抗性モデルの樹立
2012/8/22-26 11th Asian Congress of Urology (Thailand Pataya)
N Shibasaki An analysis of renal cell carcinoma(RCC) xenograft models developing resistance to sunitinib
2012/9/21 第 71 回日本癌学会学術総会学術総会 (札幌)
柴崎 スニチニブ耐性腎細胞癌 Xenograft モデルの解析
2012/10/26 IFOM-Kyoto University joint Symposium(Italy Milan)
N Shibasaki An analysis of renal cell carcinoma(RCC) primary xenograft models developing resistance to sunitinib
2013/3/9 第 22 回泌尿器科分子・細胞研究会 (高知)
柴崎 Primary xenograft を用いた腎細胞癌スニチニブ抵抗性獲得機序の解明
2013/4/25 第 101 回日本泌尿器科学会総会 (札幌)
柴崎 Primary xenograft を用いた腎細胞癌スニチニブ耐性獲得機序の解明
2013/4/25 第 101 回日本泌尿器科学会総会 (札幌)
神波 分子標的療法による恩恵を受ける患者群の同定を目的とした進行性腎細胞癌患者に対する分子標的治療と免疫療法の比較
2014/9/27 The 31st Japan-Korea Urological Congress(東京)
N Shibasaki IL13RA2 mediates Resistance to Sunitinib in Primary Xenograft Models of Clear Cell Renal Cell Carcinoma
2014/4/24 第 102 回日本泌尿器学会総会(神戸)
柴崎 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
2014/5/16 AUA 2014 annuala meeting Orlando
N Shibasaki IL13RA2 mediates resistance to sunitinib in primary xenograft models of clear cell renal cell carcinoma
- [学会発表] (計 11 件)
2012/4/21 第 100 回日本泌尿器科学会総会

〔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

神波 大己 (Kamba Tomomi)

京都大学 医学研究科 准教授

研究者番号：20402836

(2) 研究分担者

山崎 俊成 (Yamasaki Toshinari)

京都大学 医学研究科 助教

研究者番号：00607749

井上 貴博 (Inoue Takahiro)

京都大学 医学研究科 講師

研究者番号：80511881

小川 修 (Ogawa Osamu)

京都大学 医学研究科 教授

研究者番号：90260611

(3) 連携研究者 なし