

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04973

研究課題名(和文)患者由来マウスゼノグラフトのゲノミクス解析による薬剤感受性予測血中マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of predictive markers for drug-susceptibility in blood by genomic analysis using PDX models

研究代表者

神波 大己 (Kamba, Tomomi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：20402836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌において血中遊離DNA(cell-free DNA; cfDNA)や血中循環腫瘍細胞(circulating tumor cell; CTC)は薬剤効果を予測したり、病勢を把握する有効なバイオマーカーになりうることが示唆された。腎細胞癌においても血中cfDNAでVHL遺伝子変異の検出は可能であったことから、今後のバイオマーカー探索が期待される。また、転座型腎細胞癌において転座により形成されるキメラ遺伝子の種類による個別化治療の可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study suggested that cfDNA and CTC were both potential biomarkers for predicting the efficacy of a therapeutic drug in or for monitoring the disease status of a patient with prostate cancer. The present study also demonstrated that mutations of VHL gene could be detectable using cfDNA from patients with VHL-defective renal cell carcinoma, which suggests the possibility of exploring useful biomarkers for renal cell carcinoma using cfDNA. Furthermore, our study suggested that precision medicine approach could be introduced according to the types of chimeric protein in patients with translocation renal cell carcinoma.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：バイオマーカー CTC cfDNA

1. 研究開始当初の背景

本邦において、泌尿器癌、特に前立腺癌や腎細胞癌の患者数は増加し続けており、その治療の重要性は増している。進行した前立腺癌にはアンドロゲン除去療法が一定の効果を示すが、ほとんどの症例が去勢抵抗性癌 (CRPC) となる。その後は、従来から使用されているアンドロゲン受容体 (AR) 阻害薬やドセタキセル以外に、CYP17 阻害薬アピラテロンや新規 AR 阻害薬エンザルタミド、新規タキサン系抗癌剤カバジタキセルなどが使用可能となり、治療選択肢が増えてきた。また腎細胞癌では、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、本経路に対する分子標的薬が標準治療となっているうえに、2016 年には PD1 阻害剤ニボルマブが使用可能になった。

このように CRPC や腎細胞癌の治療選択肢は飛躍的に増加したが、症例毎に適切な薬剤を投与することは困難になっている。特に最初から無効な薬剤を選択することは、他に有効な可能性のある治療を受ける機会を喪失させるだけではなく、副作用やコストの面からも大きな不利益となる。したがって個別化医療のためには遺伝子情報に基づいて薬剤の感受性を予測できる血中ゲノムマーカーが強く求められている。

2. 研究の目的

本研究では血中遊離 DNA (cfDNA) および血中循環腫瘍細胞 (CTC) に着目し、CRPC や腎細胞癌における薬剤感受性や病勢を予測するシステムを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

①細胞株やマウスモデルを用いて cfDNA から遺伝子異常 (増幅や変異) を同定する方法、CTC の mRNA からスプライスバリエントの異常を同定する方法を確立する。

②CRPC 症例にて、継時的に採取した cfDNA を用いて薬剤の感受性に関わるアンドロゲン受容体遺伝子 (AR) の異常 (増幅や変異) を評価し、薬剤感受性を予測するシステムを構築する。

③腎細胞癌症例にて、組織中の VHL 遺伝子 (VHL) の遺伝子変異を cfDNA に認めるか検証する。

④転座型腎細胞癌における TFE3 キメラ遺伝子の種類による標的遺伝子発現プロファイルの差異を検証し、転座型腎細胞癌症例の個別化治療標的を探索する。

4. 研究成果

①cfDNA や CTC を用いた実験方法の確立

Digital PCR にて前立腺癌細胞株 (VCaP) の gDNA や移植したマウスの血中 cfDNA から AR の増幅を同定することができた。(Fig. 1, 2)。

Fig. 1

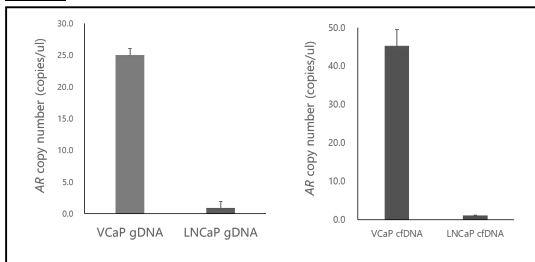
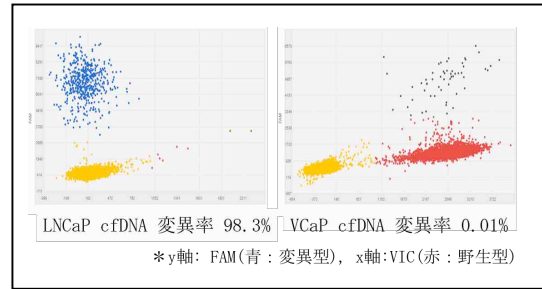
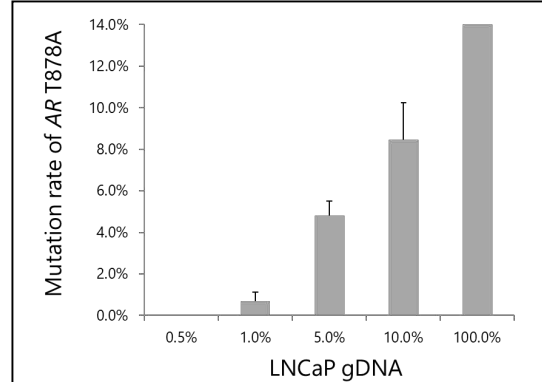


Fig. 2



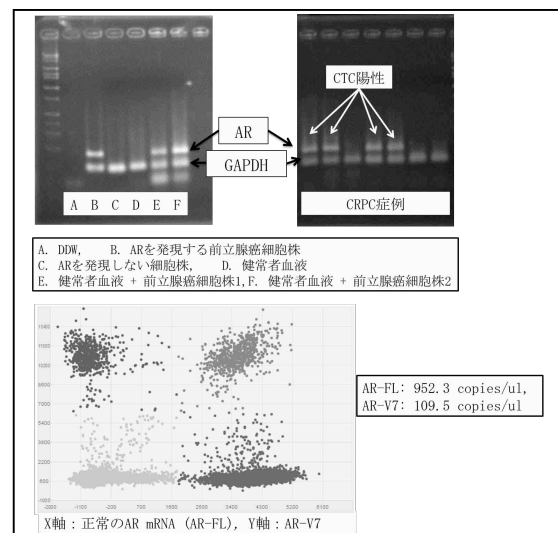
また NGS では LNCaP gDNA を 1.0% まで希釈したサンプルまで変異を同定することができた (Fig. 3)。

Fig. 3



CTC のスプライスバリエント異常を評価するため、磁気ビーズ法を用いて前立腺癌細胞株を混ぜた健常者血液から AR の mRNA を抽出する方法を確立した (Fig. 4)。次に digital PCR を用いて薬剤感受性にかかわる AR のスプライスバリエント”AR-V7”を定量化した (Fig. 4)。

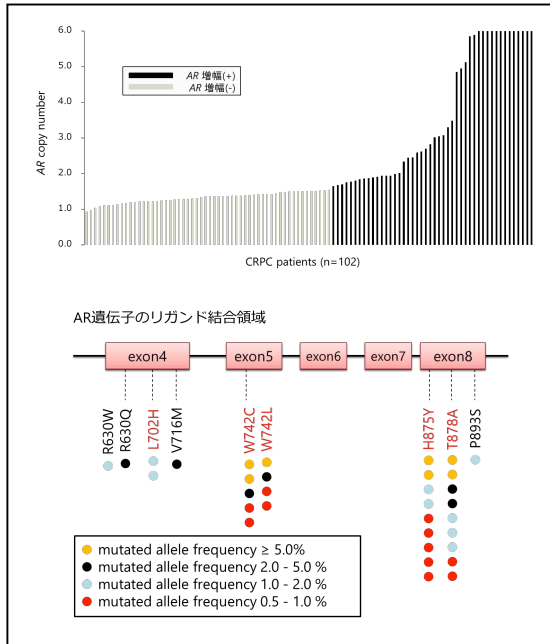
Fig. 4



②CRPC 症例の cfDNA を用いた薬剤感受性を予測するシステムの構築

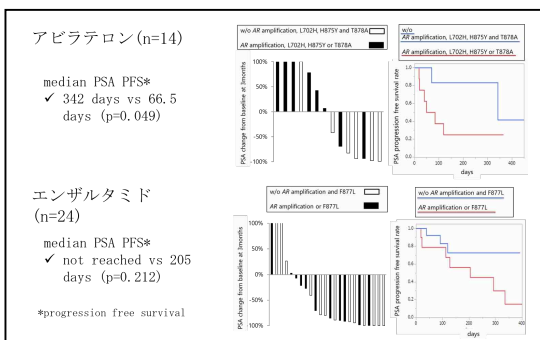
CRPC102 症例中、47 例 (46.08%) で AR 増幅を、24 例 (23.53%) で AR 変異を cfDNA 中に認めた (Fig. 5)。

Fig. 5



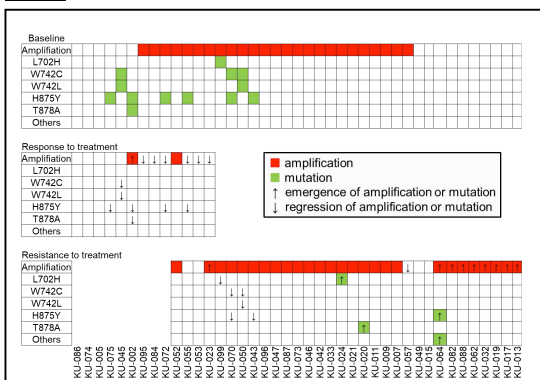
効果不良予測因子になりうる可能性が示唆された (Fig. 6)。一方エンザルタミドについては関連が認められなかった。

Fig. 6



41 症例は血液を継時的に採取し、治療奏効または耐性に応じて AR の増幅や変異が大きく変化することが示唆された (Fig. 7)。

Fig. 7



③腎細胞癌での cfDNA 中の VHL 異常の同定

腎癌 32 症例の cfDNA および対応した組織 gDNA を NGS で解析した。組織 gDNA では 21 症例 (65.35%) に変異を認め (indel17 症例、snv15 症例)、そのうち 4 症例では cfDNA 中に同じ変異を認めた

(Table. 1)。今後サンプルを増やし、病勢を把握できるバイオマーカーになりうるかまずは検証する予定である。

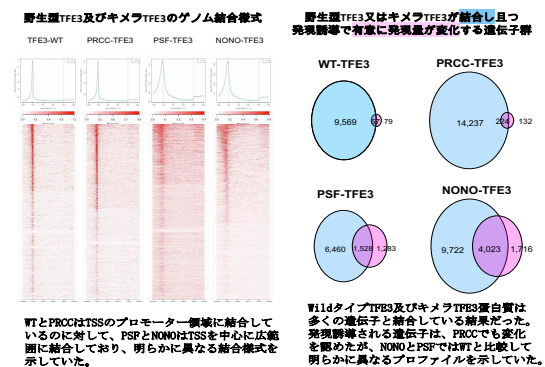
Table 1.

sample	転移	原発巣摘除	IVC塞栓	現治療	組織gDNA変異 allele frequency	cfDNA変異 allele frequency
1	no	no	yes	no	10188202, C>A 3.0-10%	10188202, C>A 0.13%
2	lung	yes	no	IFN	10183876, G>C 40% 10183820, delC 32.12%	10183876, G>C 27%
3	LN	no	yes	no	10188201, T>A 20%	10188201, T>A 3%
4	no	no	no	no	10188263, delT 31.86%	10188263, delT 0.14%

④転座型腎細胞癌における TFE3 キメラ遺伝子の種類による標的遺伝子発現プロファイルの解析

キメラ TFE3 (PRCC-TFE3, PSF-TFE3, NONO-TFE3, WT-TFE3) 遺伝子におけるそれぞれの結合配列をシーケンシングにより網羅的に解析した。その結果、PSF-TFE3 と NONO-TFE3 は野生型 TFE3 とは明らかに異なるゲノムへの結合様式を示し、発現誘導は野生型 TFE3 と比較して明らかに異なる遺伝子発現プロファイルを示した。一方、PRCC-TFE3 は野生型 TFE3 に類似したゲノムへの結合様式を示したが、遺伝子発現パターンの変化は PRCC-TFE3 誘導と野生型 TFE3 の誘導とは大きく異なっていた。

Fig. 8



結語

前立腺癌において血中 cfDNA や CTC は薬剤効果を予測するまたは病勢を把握する有効なバイオマーカーになりうることを示唆された。腎細胞癌においても血中 cfDNA で VHL 遺伝子変異の検出は可能であることが示され、今後のバイオマーカー探索が期待される。また、転座型腎細胞癌に対する個別化治療の可能性も示唆された。

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 32 件)

1. Tsuruta M, Ueda S, Yew PY, Fukuda I, Yoshimura S, Kishi H, Hamana H, Hirayama M, Yatsuda J, Irie A, Senju S, Yuba E, Kamba T, Eto M, Nakayama H, Nishimura Y. Bladder cancer-associated cancer-testis antigen-derived long peptides encompassing both CTL and promiscuous HLA class II-restricted Th cell epitopes

- induced CD4+ T cells expressing converged T-cell receptor genes in vitro. *Oncoimmunology*. Jan 5;7(4): e1415687. 2018. [査読あり]
2. Asano T, Ohnishi K, Shiota T, Motoshima T, Sugiyama Y, Yatsuda J, Kamba T, Ishizaka K, Komohara Y. CD169-positive sinus macrophages in the lymph nodes determine bladder cancer prognosis. *Cancer Sci*. Mar 9. 2018. [査読あり]
 3. Motoshima T, Miura Y, Wakigami N, Kusada N, Takano T, Inoshita N, Okaneya T, Sugiyama Y, Kamba T, Takeya M, Komohara Y. Phenotypical change of tumor-associated macrophages in metastatic lesions of clear cell renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol*. Mar;51(1):57-63. 2018. [査読あり]
 4. Takizawa A, Kawai K, Kawahara T, Kojima T, Maruyama S, Shinohara N, Akamatsu S, Kamba T, Nakamura T, Ukimura O, Jikuya R, Kishida T, Kakimoto K, Nishimura K, Harabayashi T, Nagamori S, Yamashita S, Arai Y, Sawada Y, Sekido N, Kinoshita H, Matsuda T, Nakagawa T, Homma Y, Nishiyama H. The usefulness of testosterone administration in identifying false-positive elevation of serum human chorionic gonadotropin in patients with germ cell tumor. *J Cancer Res Clin Oncol*. Jan;144(1):109-115. 2018. [査読あり]
 5. Nakamura K, Mizowaki T, Inokuchi H, Ikeda I, Inoue T, Kamba T, Ogawa O, Hiraoka M. Decreased acute toxicities of intensity-modulated radiation therapy for localized prostate cancer with prostate-based versus bone-based image guidance. *Int J Clin Oncol*. Feb;23(1):158-164. 2018. [査読あり]
 6. Ma C, Horlad H, Ohnishi K, Nakagawa T, Yamada S, Kitada S, Motoshima T, Kamba T, Nakayama T, Fujimoto N, Takeya M, Komohara Y. CD163-positive cancer cells are potentially associated with high malignant potential in clear cell renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol*. Mar;51(1):13-20. 2018. [査読あり]
 7. Yano H, Motoshima T, Ma C, Pan C, Yamada S, Nakayama T, Kitada S, Fujimoto N, Kamba T, Takeya M, Komohara Y. The significance of TIMD4 expression in clear cell renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol*. Dec;50(4):220-226. 2017. [査読あり]
 8. Okumura Y, Asai K, Kobayashi T, Miyata H, Tanaka Y, Okada Y, Sakai K, Kamba T, Tsuji H, Shide K, Nagashima K, Yanagita M, Inagaki N, Ogawa O, Negoro H. Dietary Sodium Restriction Reduces Nocturnal Urine Volume and Nocturnal Polyuria Index in Renal Allograft Recipients With Nocturnal Polyuria. *Urology*. Aug;106:60-64. 2017. [査読あり]
 9. Inoue T, Terada N, Kobayashi T, Ogawa O. Patient-derived xenografts as in vivo models for research in urological malignancies. *Nat Rev Urol*. 14:267-283. 2017. [査読あり]
 10. Okada Y, Sonoshita M, Kakizaki F, Aoyama N, Itatani Y, Uegaki M, Sakamoto H, Kobayashi T, Inoue T, Kamba T, Suzuki A, Ogawa O, Taketo MM. Amino-terminal enhancer of split gene AES encodes a tumor and metastasis suppressor of prostate cancer. *Cancer Sci*. 108:744-752. 2017. [査読あり]
 11. Terada N, Maughan BL, Akamatsu S, Kobayashi T, Yamasaki T, Inoue T, Kamba T, Ogawa O, Antonarakis ES. Exploring the optimal sequence of abiraterone and enzalutamide in patients with chemotherapy-naïve castration-resistant prostate cancer: The Kyoto-Baltimore collaboration. *Int J Urol*. 24:441-448. 2017. [査読あり]
 12. Kamba T, Kamoto T, Maruo S, Kikuchi T, Shimizu Y, Namiki S, Fujimoto K, Kawanishi H, Sato F, Narita S, Satoh T, Saito H, Sugimoto M, Teishima J, Masumori N, Egawa S, Sakai H, Okada Y, Terachi T, Ogawa O: ZAPCA Study Group. A phase III multicenter, randomized, controlled study of combined androgen blockade with versus without zoledronic acid in prostate cancer patients with metastatic bone disease: results of the ZAPCA trial. *Int J Clin Oncol*. 22(1):166-173. 2017[査読あり]
 13. Mizuno K, Inoue T, Kinoshita H, Yano T, Kawanishi H, Kanda H, Terada N, Kobayashi T, Kamba T, Mikami Y, Shiraishi T, Uemura Y, Imai Y, Honjo G, Shirase T, Okumura K, Kawakita M, Ogura K, Sugimura Y, Matsuda T, Ogawa O. Evaluation of predictors of unfavorable pathological features in men eligible for active surveillance using radical prostatectomy specimens: a multi-institutional study. *Jpn J Clin Oncol*. Dec;46(12):1156-1161. 2016. [査読あり]
 14. Tanaka A, Yano I, Shinsako K, Sato E, Fukudo M, Masuda S, Yamasaki T, Kamba T, Ogawa O, Matsubara K. Population Pharmacokinetics of Everolimus in Relation to Clinical Outcomes in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *Ther Drug Monit*. Dec;38(6):663-669. 2016. [査読あり]
 15. Asai K, Kobayashi T, Miyata H, Tanaka Y, Okada Y, Sakai K, Negoro H, Kamba T, Tsuji H, Shide K, Yanagita M, Inagaki N, Ogawa O. The Short-Term Impact of Dietary Counseling on Sodium Intake and Blood Pressure in Renal Allograft Recipients. *Prog Transplant*. Dec;26(4):365-371. 2016. [査読あり]

16. Kobayashi T, Kamba T, Terada N, Yamasaki T, Inoue T, Ogawa O. High incidence of urological complications in men dying from prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. Dec;21(6):1150-1154. 2016. [査読あり]
17. Kobayashi T, Kimura T, Lee C, Inoue T, Terada N, Kono Y, Kamba T, Kim CS, Egawa S, Ogawa O. Subclassification of high-risk clinically organ-confined prostate cancer for early cancer-specific mortality after radical prostatectomy. *Jpn J Clin Oncol*. Aug;46(8):762-7. 2016. [査読あり]
18. Kawano Y, Takahashi W, Eto M, Kamba T, Miyake H, Fujisawa M, Kamai T, Uemura H, Tsukamoto T, Azuma H, Matsubara A, Nishimura K, Nakamura T, Ogawa O, Naito S. Prognosis of metastatic renal cell carcinoma with first-line interferon- α therapy in the era of molecular-targeted therapy. *Cancer Sci*. Jul;107(7):1013-7. 2016. [査読あり]
19. Kimura G, Yonese J, Fukagai T, Kamba T, Nishimura K, Nozawa M, Mansbach H, Theeuwes A, Beer TM, Tombal B, Ueda T. Enzalutamide in Japanese patients with chemotherapy-naïve, metastatic castration-resistant prostate cancer: A post-hoc analysis of the placebo-controlled PREVAIL trial. *Int J Urol*. May;23(5):395-403. 2016. [査読あり]
20. Mizowaki T, Norihisa Y, Takayama K, Ikeda I, Inokuchi H, Nakamura K, Kamba T, Inoue T, Kamoto T, Ogawa O, Hiraoka M. Long-term outcomes of intensity-modulated radiation therapy combined with neoadjuvant androgen deprivation therapy under an early salvage policy for patients with T3-T4N0M0 prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. Feb;21(1):148-55. 2016. [査読あり]
21. Inoue T, Ogura K, Kawakita M, Tsukino H, Akamatsu S, Yamasaki T, Matsui Y, Segawa T, Sugino Y, Kamoto T, Kamba T, Tanaka S, Ogawa O. Effective and Safe Administration of Low-Dose Estramustine Phosphate for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. Feb;14(1):e9-e17. 2016. [査読あり]
22. Mizowaki T, Norihisa Y, Takayama K, Ikeda I, Inokuchi H, Nakamura K, Kamba T, Inoue T, Kamoto T, Ogawa O, Hiraoka M. Ten-year outcomes of intensity-modulated radiation therapy combined with neoadjuvant hormonal therapy for intermediate- and high-risk patients with T1c-T2N0M0 prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. Aug;21(4):783-790. 2016. [査読あり]
23. Fukui T, Matsui Y, Umeoka S, Inoue T, Kamba T, Togashi K, Ogawa O, Kobayashi T. Predictive value of radiological response rate for pathological response to neoadjuvant chemotherapy and post-cystectomy survival of bladder urothelial cancer. *Jpn J Clin Oncol*. Mar 8. pii: hyw025. 2016. [査読あり]
24. Arakaki R, Yamasaki T, Kanno T, Shibasaki N, Sakamoto H, Utsunomiya N, Sumiyoshi T, Shibuya S, Tsuruyama T, Nakamura E, Ogawa O, Kamba T. CCL2 as a potential therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Med*. 5(10):2920-2933. 2016. [査読あり]
25. Terada N, Akamatsu S, Okada Y, Negoro H, Kobayashi T, Yamasaki T, Matsui Y, Inoue T, Kamba T, Ogawa O. Factors predicting efficacy and adverse effects of enzalutamide in Japanese patients with castration-resistant prostate cancer: results of retrospective multi-institutional study. *Int J Clin Oncol*. 21(6):1155-1161. 2016. [査読あり]
26. Yoshikawa T, Kobori G, Goto T, Akamatsu S, Terada N, Kobayashi T, Tanaka Y, Jung G, Kamba T, Ogawa O, Inoue T. An original patient-derived xenograft of prostate cancer with cyst formation. *Prostate*. 76(11):994-1003. 2016. [査読あり]
27. Goto T, Terada N, Inoue T, Kobayashi T, Nakayama K, Okada Y, Yoshikawa T, Miyazaki Y, Uegaki M, Utsunomiya N, Makino Y, Sumiyoshi S, Yamasaki T, Kamba 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*. 75(16):1821-30. 2015. [査読あり]
28. Shibasaki N, Yamasaki T, Kanno T, Arakaki R, Sakamoto H, Utsunomiya N, Inoue T, Tsuruyama T, Nakamura E, Ogawa O, Kamba T. Role of IL13RA2 in Sunitinib Resistance in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *PLoS One*. 26;10(6):e0130980. 2015. [査読あり]
29. Nozawa M, Mukai H, Takahashi S, Uemura H, Kosaka T, Onozawa Y, Miyazaki J, Suzuki K, Okihara K, Arai Y, Kamba T, Kato M, Nakai Y, Furuse H, Kume H, Ide H, Kitamura H, Yokomizo A, Kimura T, Tomita Y, Ohno K, Kakehi Y. Japanese phase I study of cabazitaxel in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. Oct;20(5):1026-34. 2015. [査読あり]
30. Inoue T, Kinoshita H, Terada N, Kobayashi T, Yamasaki T, Matsui Y, Kamba T, Inui H, Sugi M, Matsuda T, Ogawa O. Evaluation of prognostic factors after radical prostatectomy in pT3b prostate cancer patients in Japanese population. *Jpn J Clin Oncol*. Aug;45(8):780-4. 2015. [査読あり]

31. Ito N, Kojima S, Teramukai S, Mikami Y, Ogawa O, Kamba T. Outcomes of curative nephrectomy against renal cell carcinoma based on a central pathological review of 914 specimens from the era of cytokine treatment. *Int J Clin Oncol*. Dec;20(6):1161-70. 2015. [査読あり]
32. Sunada T, Kobayashi T, Furuta A, Shibuya S, Okada Y, Negoro H, Terada N, Yamasaki T, Matsui Y, Inoue T, Kamba T, Ogawa O. Large Retroperitoneal Mass Diagnosed as Adrenal Chronic Expanding Hematoma. *Urology*. Oct;86(4):e17-9. 2015. [査読あり]

[学会発表] (計 11 件)

1. 住吉崇幸 Digital PCR を用いた去勢抵抗性前立腺癌における血漿遊離 DNA のアンドロゲン受容体遺伝子コピー数の同定 第 105 回日本泌尿器科学会総会 2017 年 4 月 21 日～24 日
2. 元島崇信 TFE3 活性化腎細胞癌の診断補助マーカーの探索と評価 第 105 回日本泌尿器科学会総会 2017 年 4 月 21 日～24 日
3. Takayuki Sumiyoshi Detection of copy number variations of androgen receptor gene in cell-free DNA from castration-resistant prostate cancer by digital PCR 34th KOREA-JAPAN UROLOGICAL CONGRESS 2017 年 9 月 22 日～23 日
4. 住吉崇幸 Detection of copy number variations of androgen receptor gene in cell-free DNA from castration-resistant prostate cancer using digital PCR 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 28 日～30 日
5. 元島崇信 Characterization of chimeric TFE3 transcription factors found in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 28 日～30 日
6. Shusuke Akamatsu Dynamic alteration of androgen receptor amplification status detected by ctDNA during treatment of castration-resistant prostate cancer. 37th Congress of SIU 2017 年 10 月 19 日～22 日
7. 住吉崇幸 去勢抵抗性前立腺癌における血漿遊離 DNA 中のアンドロゲン受容体遺伝子変異の解析 第 27 回泌尿器科分子・細胞研究会 2018 年 2 月 2 日～3 日
8. 住吉崇幸 Detection of androgen receptor gene aberrations in cell-free DNA from prostate cancer using digital PCR 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6 日～8 日
9. 住吉崇幸 Digital PCR を用いた去勢抵抗性前立腺癌における血漿遊離 DNA のアンドロゲン受容体遺伝子コピー数の同定 第 26 回泌尿器科分子・細胞研究会 2017 年 3 月 10 日～11 日
10. 赤松修輔 去勢抵抗性前立腺癌における血漿循環腫瘍 DNA 解析 第 1 回 Liquid Biopsy 研究会 2017 年 1 月 21 日
11. 神波大己 CRPC 治療におけるバイオマーカー 日本泌尿器腫瘍学会第 2 回学術集会 (招待講演) 2016 年 10 月 22 日～23 日

[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:無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神波 大己 (KAMBA, Tomomi)
熊本大学・生命科学研究所・教授
研究者番号: 20402836

(2) 研究分担者

元島 崇信 (MOTOSHIMA, Takanobu)
熊本大学・生命科学研究所・助教
研究者番号: 60726355

山崎 俊成 (YAMASAKI, Toshinari)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 00607749

小林 恭 (KOBAYASHI, Takashi)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 00642406

寺田 直樹 (TERADA, Naoki)
宮崎大学・医学研究科・講師
研究者番号: 60636637

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

中村 英二郎 (NAKAMURA, Eijiro)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 90293878

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者