

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04977

研究課題名(和文)腎細胞癌における血管新生阻害薬に対する耐性の機序の解明と新規治療の探索

研究課題名(英文)Elucidation of refractory mechanism to the molecular targeted therapy for renal cell carcinoma

研究代表者

大家 基嗣(Oya, Mototsugu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：00213885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：芳香族炭化水素受容体(AhR)の腎細胞癌の浸潤や進展との関連を解析した。AhRの発現は予後不良因子であり、活性化によって上皮間葉転換が促進され、腫瘍の浸潤を促進することを示した。スニチニブ治療後のがん組織を解析した結果、腫瘍血管はほとんど死滅しているものの、細かな腫瘍血管が残存し、その腫瘍血管にはVasohibin-1が発現していることを発見した。またスニチニブの効果に血中のMDSC(myeloid derived suppressor cell)の数が予後不良因子であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Aryl hydrocarbon receptor (AhR) was investigated in 120 patients with RCC using immunohistochemistry. AhR was predominantly expressed in the nuclei of high-grade clear cell RCC (ccRCC) and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), and its expression levels in cancer cells and TILs correlated with the pathological tumor stage and histological grade. Expression of VASH1 were immunohistochemically examined. Multivariate Cox analysis indicated that an elevated VASH1 density, but not microvascular density, was a significant and independent predictor of overall survival (odds ratio, 7.71; P=0.003). Blood samples were collected at baseline in 90 patients to analyze serum angiogenic and inflammatory markers together with peripheral blood immunological marker. Immunologic (myeloid-derived suppressor cells, percentage of T helper type 1 cells) markers at baseline predicted the response to sunitinib therapy and/or disease progression in patients with metastatic renal cell carcinoma.

研究分野：泌尿器科学、腫瘍学

キーワード：腎細胞癌 分子標的治療 治療抵抗性 リスク分類

## 1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌は泌尿器癌の中でも難治性のがんである。抗癌化学療法で効果のある薬剤はなく、インターフェロン $\alpha$ あるいはインターロイキン2を中心としたサイトカイン治療が広く行われてきたが効果は不十分であった。2008年に血管新生阻害薬である分子標的薬、sorafenib(ネクサバル<sup>®</sup>)とsunitinib(スーセント<sup>®</sup>)が相次いで承認され、腎細胞癌治療は大きな変革を遂げた。現在ではaxitinib(インライタ<sup>®</sup>)とpazopanib(ヴォトリエント<sup>®</sup>)も承認されている。しかし、血管新生阻害薬による抗腫瘍効果は一時的で、ほとんどの症例が治療に耐性となる。腎細胞癌の発がんにも最も重要な遺伝子はvonHippel-Lindau(VHL)腫瘍抑制遺伝子であり、変異によって不活化するとhypoxia-inducible factor(HIF)の恒常的活性化が生じ、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor:VEGF)が誘導される。腎細胞癌は血管新生が顕著であり、この豊富な血管を血管新生阻害薬はターゲットにしている。上記4剤はVEGFのレセプターであるVEGF-R2に対するチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)であり、血管の増生を阻害する。しかし、何故死滅する腫瘍血管と生き残る腫瘍血管が存在するのか?血管内皮細胞はどこも均一に観察されるが、治療に対する反応性に差がある。もし血管内皮細胞がすべて同じ性質を持つとしたら理論上すべての腎細胞癌に対して効果的である筈である。つまり我々は血管内皮細胞に異質性(heterogeneity)が存在すると考え、血管内皮細胞であるHUVEC細胞の発現プロファイルより血管内皮細胞に特異的な分子でかつ血管内皮細胞すべてには発現せず、腫瘍血管により特異的な分子を検索した。治療後に発現が増強する分子があるとすればこの分子は治療抵抗性に関与し、かつ治療のターゲットになると考えた。プロファイルの網羅的探索から血管が新生される部位にのみ存在するバソヒビン-1(VASH-1)を候補分子として選択した。

## 2. 研究の目的

進行腎細胞癌の薬物療法は近年大きく進歩し、血管新生阻害薬による分子標的薬が治療の中心となった。分子標的薬投与により当初は腫瘍縮小効果がみられ治療成績は向上しているが、ほとんどすべての症例で治療中に耐性が生じることが臨床における最大の問題である。本研究では血管新生阻害薬に対する腎細胞癌の耐性獲得の分子機構を1)腫瘍血管の異質性と2)耐性がん細胞の幹細胞性に着目して解析し、研究を通して根治のための新規治療方法の探索を行う。具体的には、腎細胞癌における腫瘍血管の異質性の探索-バソヒビンの意義-と腎細胞癌の免疫環境および治療後の変化を臨床所見と比較して探索する。

## 3. 研究の方法

腎細胞癌における血管新生阻害薬に対する耐性のメカニズムについて微小環境を構成する要素である血管、がん細胞、間質の各々の挙動を評価して多層的かつ統合的に解明する。病理学的にVASH-1の発現によって血管内皮細胞の挙動を評価し、壊死巣(間質)における骨髄由来細胞などによるリモデリングも評価する。発癌および進展に關与すると考えられる芳香族炭化水素受容体(AhR)の意義を切除検体と細胞株を使用して探索する。TKI治療後の組織を利用して免疫環境の変化も探索する。

## 4. 研究成果

### (1)腎細胞癌における芳香族炭化水素受容体(AhR)の意義

ヒトにおける癌の多くは上皮組織に由来し、悪性度進展に伴い、上皮-間充織形質転換に類似した事象が誘導され、高い浸潤性や転移性、場合によっては幹細胞的性質も獲得されると考えられている。我々は腎細胞癌が先進国で増加し、環境汚染と関連していること、喫煙がリスクファクターであることを考え、さらに上皮間葉転換を誘導する可能性から芳香族炭化水素受容体(AhR)が腎細胞癌の浸潤や進展と関連する可能性を考慮し、AhRの発現を腎細胞癌の120例の切除標本を使用して発現を解析した。AhRを活性化するindirubinとTCDDをin vitroで腎細胞癌の細胞株に投与した結果、CYP1A1とCYP1B1を誘導し、さらにマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の発現誘導を介して細胞の浸潤は増加した。siRNAによってAhRの発現を源弱させると浸潤能は低下した。当初は腎細胞癌におけるAhRの発現を検索する予定で開始した研究であったが、切除検体の発現を検索する過程でAhRの発現が癌だけでなく、腫瘍周囲に浸潤するリンパ球にも発現することを発見した。腎細胞癌のグレードやステージが高い腫瘍においてAhRを発現する腫瘍浸潤リンパ球が多く存在する事を明らかにした。このようにAhRは予後予測因子であり、上皮間葉転換を促進することで腫瘍の浸潤を促進するため、治療標的分子となりうることを示した。

### (2)腎細胞癌に対するTKI治療後の血管リモデリングにおけるVasohibin-1の意義

スニチニブ治療後のがん組織を解析した結果、腫瘍血管はほとんど死滅しているものの、細かな腫瘍血管が残存し、その腫瘍血管にはVasohibin-1が発現していることを発見した。このことはVEGFによる血管新生をTKIで阻害すると腫瘍の微小環境では血管のリモデリングによりがんは生存し、抵抗性を獲得することを示唆する。この機序においてVasohibin-1が関与することを示した。抵抗性を獲得した腎細胞癌はがん細胞のフェノ

タイプとして紡錘形に変化し、これまで、上皮間葉転換(EMT)が浸潤・転移に関与するだけでなく、治療抵抗性のメカニズムであることを示してきた。EMTをきたす機序について解析し、脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸が Arf6 を活性化する経路が寄与するという腎細胞癌独自のメカニズムを発見した。Arf6 経路の分子の高発現は患者の予後不良因子であり、バイオマーカーとして利用可能であることを示した。

### (3) 転移性腎細胞癌における TKI 治療による免疫環境の変化と予後因子との関連

2016年に免疫チェックポイント阻害薬のうち PD-1 抗体であるニボルマブの腎細胞癌に対する適応が承認された。PD-1 抗体のポジショニングは TKI 治療に抵抗性のセカンドライン以降である。我々は TKI 治療後の腎細胞癌組織を検索したところ、がんおよびリンパ球の PDL-1 の発現とリンパ球の PD-1 の発現が顕著に増強されていることを発見した。PD-1 抗体であるニボルマブと CTLA-4 抗体であるイピリムマブとの併用がファーストラインの治療薬として sunitinib よりも有効であることが報告された。しかし、これは IMDC リスク分類において intermediate と poor リスク群にのみ観察され、favorable 群においてはむしろ sunitinib が有効であった。日常の臨床での適応を今後考えるにあたって、ここで問題なのは IMDC リスク分類である。Intermediate 群が全体の 50%以上を占め、不均一性、つまり予後がばらつく。ファーストラインの治療を始めた際の反応性により Intermediate 群の不均一性を解消できることを示した。また、sunitinib の効果に MDSC (myeloid derived suppressor cell) がバイオマーカーであることを示した。これは分子標的薬治療の予後因子が自然免疫に関わる単球由来の細胞の数であることを明らかにしたと言える。血管新生が腎細胞癌の発癌に強く関連するが、難治性のフェノタイプは炎症に関連することを示した。

#### 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 28 件)

1. Mizuno R, Kimura G, Fukasawa S, Ueda T, Kondo T, Hara H, Shoji S, Kanao K, Nakazawa H, Tanabe K, Horie S, Oya M: Angiogenic, inflammatory and immunologic markers in predicting response to sunitinib in metastatic renal cell carcinoma: Cancer Sci, 査読有, 2017, 108(9), 1858-1863, doi: 10.1111/cas.13320.
2. Mikami S, Oya M, Kosaka T, Mizuno R, Miyazaki Y, Sato Y, Okada Y: Increased

vasohibin-1 expression is associated with metastasis and poor prognosis of renal cell carcinoma patients: Lab Invest, 査読有, 2017, 97(7), 854-862, doi: 10.1038/labinvest.2017.26.

3. Tanaka N, Mizuno R, Yasumizu Y, Ito K, Shirotake S, Masunaga A, Ito Y, Miyazaki Y, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Nakagawa K, Momma T, Masuda T, Asano T, Oyama M, Oya M: Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with first-line and subsequent second-line targeted therapy: A proposal of the modified-IMDC risk model: Urol Oncol, 査読有, 2017, 35(2), 39.e19-39.e28, doi: 10.1016/j.urolonc.2016.10.001.
  4. Hashimoto S, Mikami S, Sugino H, Yoshikawa A, Hashimoto A, Onodera Y, Furukawa S, Handa H, Oikawa T, Okada Y, Oya M, Sabe H: Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer: Nat Commun, 査読有, 2016, 7, 10656, doi: 10.1038/ncomms10656.
  5. Tanaka N, Mizuno R, Shirotake S, Ito K, Yasumizu Y, Masunaga A, Ito Y, Miyazaki Y, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Nakagawa K, Momma T, Masuda T, Asano T, Oyama M, Oya M: Effect of reclassification of the IMDC model in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with targeted therapy in the first-line and second-line settings: Urol Oncol, 査読有, 2016, 34(7), 293.e17-25, doi: 10.1016/j.urolonc.2016.02.023.
  6. Ishida M, Mikami S, Shinojima T, Kosaka T, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Okada Y, Oya M: Activation of aryl hydrocarbon receptor promotes invasion of clear cell renal cell carcinoma and is associated with poor prognosis and cigarette smoke: Int J Cancer, 査読有, 137(2), 2015, 299-310, doi: 10.1002/ijc.29398.
- [学会発表](計 24 件)
1. Oya M: Real-world data analysis of patients treated with immune checkpoint inhibitors in Japan: Asia Urological Oncology Forum, 2017, Kaohsiung, Taiwan.
  2. Mizuno R, Kimura G, Ueda T, Kondo T,

Hara H, Shoji S, Kanao K, Nakazawa H, Tanabe K, Horie S, Oya M: A prospective multicentre biomarker identification trial for sunitinib in Japanese patients with metastatic RCC: 31th Annual EAU Congress, 2016, Munich, Germany.

3. Oya M: Role of TNF- and CD44 in resistance to sunitinib treatment in clear cell renal cell carcinomas: 35th CONGRESS OF THE SOCIETE INTERNATIONALE D'UROLOGIE, 2015, Melbourne, Australia.

〔図書〕(計1件)

1. 富田 善彦、金山 博臣、植村 天受、篠原 信雄：メディカルレビュー社：Year Book of RCC 2017：2018、97～103

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大家 基嗣(Oya, Mototsugu)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授  
研究者番号：00213885

### (2)研究分担者

三上 修治(Mikami, Shuji)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師  
研究者番号：20338180

浅沼 宏(Asanuma, Hiroshi)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授  
研究者番号：70245570

菊地 栄次(Kikuchi, Eiji)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授  
研究者番号：10286552

水野 隆一(Mizuno, Ryuichi)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師  
研究者番号：60383824

小坂 威雄(Kosaka, Takeo)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師  
研究者番号：30445407

篠島 利明(Shinojima, Toshiaki)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師  
研究者番号：60306777

宮嶋 哲(Miyajima, Akira)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授  
研究者番号：90245572  
(平成29年度より削除)