

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06854

研究課題名(和文) 遺伝子発現解析データのエビデンスに基づいた腎癌細胞の抗癌剤応答マーカーの探索

研究課題名(英文) The exploratory research of biomarkers of renal cell carcinomas for therapeutic drugs based on the evidence of global transcriptome analysis.

研究代表者

磯野 高敬 (Isono, Takahiro)

滋賀医科大学・実験実習支援センター・准教授

研究者番号：20176259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： グルコース枯渇耐性腎癌細胞株と感受性腎癌細胞株に対する次世代シーケンサーを用いた網羅的な発現解析データと腎癌の臨床検体の網羅的遺伝子発現解析データを活用して、予後予測マーカーの同定と、新規分子標的の発見を試みた。その結果、腎癌患者の予後予測マーカーとして、SOD2、HIF-2、TRAIL、ARL4C遺伝子等を同定した。SOD2等によるミトコンドリア活性を標的とする糖尿病治療薬Buforminと脂肪酸のベータ酸化阻害剤のEtomoxir、並びに、TRAILによるアポトーシスを抑制するFLIPを活性化するHIF-2を標的とするChetominを腎癌の治療薬候補として示すことができた。

研究成果の概要(英文)： This study analyzed the global transcriptional expression of deprivation-resistant and deprivation-sensitive renal cell carcinomas (RCC) cells and tissues of patients with RCC using a next generation sequencer to search for new biomarkers and therapeutic targets for RCC. Our analysis demonstrated that SOD2, HIF-2, TRAIL, ARL4C genes were useful for predict poorer prognosis in patients with RCC. And according to the results that therapeutic inhibition of mitochondrial function supported by SOD2 and metabolite stock induces cell death and HIF-2 and FLIP attenuated from TRAIL-induced apoptosis in starvation-resistant renal cell carcinomas, we demonstrated that buformin, a biguanide used in the treatment of diabetes mellitus, etomoxir, an inhibitor of beta-oxidation from fatty acids, and chetomin, a nuclear HIF-inhibitor, might be potential therapeutic drugs for RCC.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：腎癌 栄養枯渇耐性 遺伝子発現解析 予後予測マーカー 新規分子標的 ミトコンドリア 活性酸素
アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

腎細胞がんは、VHL 遺伝子に変異やメチル化異常を認める淡明細胞がんや c-Met 遺伝子や FH 遺伝子異常に伴う乳頭状細胞がんなど、固形腫瘍の中では原因遺伝子の解明が進んでおり、がん細胞に特異的な異常、腫瘍血管を治療の標的とした「分子標的治療 molecular target therapy」という新しい概念によるがん治療が行われている。しかし、優れた腫瘍縮小効果は認めるものの、complete response は稀であり、効果の維持は時限的で再燃するため、より有効な分子標的が求められている。一般に、がん細胞は、主としてグルコースを用いたエネルギー代謝を行なうが、生体内の微小環境では、グルコース枯渇状況にあり、グルコース枯渇に対する耐性を持っていることが知られている。近年、がんはこの代謝系を標的とした治療薬の開発に注目が注がれており、この耐性機構を明らかにし、分子標的を同定することは、有効な新たな分子標的治療の開発につながると思われる。

2. 研究の目的

グルコース枯渇耐性腎がん細胞と感受性腎がん細胞を用いた次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析データのエビデンスに基づき、グルコース代謝を含むエネルギー代謝関連のパスウェイを標的とする抗がん剤に対する腎癌細胞の応答を解析し、効果を予測するバイオマーカーの同定と、新規分子標的の発見を目的とする。これらの知見を、腎がんの臨床検体の網羅的遺伝子発現解析データを活用して抗癌剤の効果予測をおこない、予後予測・危険因子の抽出およびテーラーメイド治療法の開発から、将来的にはあたらしい治療薬の開発に結びつけることを目的としている。

3. 研究の方法

次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析は、本研究課題で購入した高性能の解析サーバーを用いて、多検体、多変量の統計解析を行った。

細胞外フラックスアナライザーを用いて、細胞外液の溶存酸素と pH を測定してがん細胞のエネルギー代謝を評価した。評価に基づ

く検証実験は、リアルタイム PCR、蛍光顕微鏡等の研究代表者の属する滋賀医科大学実験実習支援センターの設備機器を用いて行なった。

4. 研究成果

腎がん細胞株並びに臨床腎がん組織の網羅的遺伝子発現データを用いて、以下のことを明らかにした。

(1)細胞外フラックスアナライザーを用いて、グルコース枯渇耐性腎がん細胞株と感受性腎がん細胞株のグルコース代謝と呼吸能について解析したところ、枯渇耐性株は、感受性株に比べて、炭素源のストックが高くグルコース枯渇下でも解糖並びに呼吸が維持できること、並びに、ミトコンドリア内の活性酸素発生量が低く効率よく呼吸による ATP 産生を行っていることが解った。更に、糖尿病治療薬の Buformin、脂肪酸のベータ酸化阻害剤の Etomoxir が、枯渇耐性株をグルコース枯渇下でその呼吸能を阻害することにより細胞死に至らしめることが解った。この結果は、栄養枯渇による標準薬物治療に抵抗性の腎がんに対して、これらの薬剤の併用が有効であることを示した。また、ミトコンドリア内の活性酸素発生量を低くする因子として、SOD2 の寄与が予想された。グルコース枯渇耐性腎がん細胞株と感受性腎がん細胞株に対する次世代シーケンサーを用いた網羅的な発現解析データ、並びに、がん研有明病院由来の臨床腎がん組織の次世代シーケンサーを用いた網羅的な発現解析データにおいて、SOD2 遺伝子の発現が、枯渇耐性株、並びに、術後再発して予後不良の腎がん組織で高いことが予備的に示されていたので、標準薬物治療後に再発した患者の予後と SOD2 の遺伝子発現とを調べたところ強い相関があり、SOD2 の発現が腎がんの予後予測マーカーとして有用であることを明らかにした (Scientific Reports 2016)。また、滋賀医科大学病院由来の臨床腎がん組織の免疫組織染色解析においても、SOD2 の発現が腎がん予後予測マーカーとして有用であることを明らかにした (Cancer Biomarkers に掲載確定)。

(2) グルコース枯渇耐性腎がん細胞株と感受性腎がん細胞株に対する網羅的な発現解析データを用いて27年度に行ったパスウェイ解析から導かれたグルコース枯渇耐性腎がん細胞株ではヒドロキシル化した HIF-2 がその耐性に寄与しているという結果、グルコース枯渇耐性腎がん細胞株は、siRNA 処理で HIF-2 の発現をノックダウンすると死滅するという結果、並びに HIF の阻害剤である chetomin がグルコース枯渇耐性腎がん細胞を死滅させるという結果から、HIF-2 が腎がんの治療標的になることを明らかにした (Am J Cancer Res2016)。更に、グルコース枯渇耐性腎がん細胞株で特に発現が高かった細胞死を誘導する TRAIL に着目して、上記の HIF-2 の発現をノックダウンすると死滅するという現象との関連を調べた。その結果、グルコース枯渇耐性腎がん細胞株では、HIF-2 の発現により、TRAIL から誘導されるアポトーシスを抑制する FLIP の発現が亢進されており、自ら発現している TRAIL によるアポトーシスを HIF-2 により抑制していることが解った。TRAIL を発現することにより、免疫細胞からの防御を行っている可能性が考えられたので、腎がん罹患患者の標準薬物治療後に再発した予後と臨床がん組織における TRAIL の遺伝子発現を調べたところ強い相関があり、TRAIL が腎がんの予後予測マーカーとして有用であることが解った。また、HIF-2 と FLIP が腎がんの治療ターゲットであることが示された (Oncotarget 2018)。

(3) 術後再発の無い検体、術後再発後予後良好の検体、術後再発後予後不良の検体の3群からなるがん研有明病院由来の43検体の原発巣の臨床腎がん組織の次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析を行ない、腎がんの診断マーカーと治療分子標的の探索を行なった。その結果、予後不良を診断率90%以上で予測できる遺伝子を7個見つけた。その一つの ARL4C について滋賀医科大学病院由来の臨床腎がん組織の免疫組織染色においても予後不良の診断率が85%となり、2つのコホートから予後不良マーカーとして臨床応用可能であることを明らかにした (投稿準備中)。

以上の結果を踏まえて、予後予測マーカーとして有用であった遺伝子を標的とした治療薬の選別並びに開発を行い、腎がんのテーラーメイド治療法の開発につなげていきたい。

また、この研究の過程で、グルコース枯渇耐性腎がん細胞株が、細胞外小胞 exosome を放出しており、その中に、TRAIL が含まれていることを見出した。Exosome は、がんやその転移に関与していることが示されており、腎がんの悪性化に関与していることが考えられるので、今後、その働きを解析し、腎がんの治療法の開発につなげていきたい。

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 4件)

1: Yoshida, T., Kageyama, S., Isono, T., Yuasa, T., Kushima, R., Kawauchi, A., & Chano, T. (2018). Superoxide dismutase 2 expression can predict prognosis of renal cell carcinoma patients. *Cancer Biomarkers, in press.*

2: Isono, T., Chano, T., Yoshida, T., Kageyama, S., Kawauchi, A., Yonese, J., & Yuasa, T. (2018). Abundance of TRAIL attenuated by HIF2 α and c-FLIP affects prognosis in malignant renal cell carcinomas. *Oncotarget, 9*, 23091-23101. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25214>

3: Isono, T., Chano, T., Yonese, J., & Yuasa, T. (2016). Therapeutic inhibition of mitochondrial function induced cell death in starvation-resistant renal cell carcinomas. *Scientific Reports, 6*, 25669. DOI: 10.1038/srep25669

4: Isono, T., Chano, T., Yoshida, T., Kageyama, S., Kawauchi, A., Suzaki, M., & Yuasa, T. (2016). Hydroxy-HIF2- α is potential therapeutic target of renal cell

carcinomas. *American Journal of Cancer Research*, 6, 2263-2276.

www.ajcr.us/files/ajcr003917

〔学会発表〕(計 5件)

1: 磯野高敬(代表)・湯浅健

遺伝子発現解析データのエビデンスに基づいた腎がんの診断マーカーと治療分子標的の探索

第40回日本分子生物学会年会

2017年11月 神戸

2: 磯野高敬(代表)

Deprivation-resistant renal cell carcinomas expressed TRAIL and evaded the apoptotic cell death through TRAIL by HIF2.

第76回日本癌学会学術総会

2017年9月 横浜

3: 磯野高敬(代表)・茶野徳宏・湯浅健

Hydroxyl-HIF2- α の阻害は栄養枯渇耐性腎癌細胞に細胞死を誘導できる

第75回日本癌学会学術総会

2016年10月 横浜

4: 磯野高敬(代表)・茶野徳宏・湯浅健

HIF2- α の阻害は栄養枯渇耐性腎癌細胞に細胞死を誘導できる

第40回日本分子生物学会年会

2015年12月 神戸

5: 磯野高敬(代表)・茶野徳宏・湯浅健

ミトコンドリアの品質阻害はグルコース枯渇耐性腎癌細胞に細胞死を誘導する

第74回日本癌学会学術総会

2015年10月 名古屋

〔その他〕

磯野高敬

実験実習支援センターの機器を駆使した泌尿器がん研究

滋賀医科大学

実験実習支援センター公報誌

Central Research Laboratory News No.68

2017年5月1日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯野 高敬 (ISONO Takahiro)

滋賀医科大学・実験実習支援センター

・准教授

研究者番号：20176259

(2) 連携研究者

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

茶野 徳宏 (CYANO Tokuhiko)

滋賀医科大学・臨床検査医学・准教授

研究者番号：40346028

影山 進 (KAGEYAMA Susumu)

滋賀医科大学・泌尿器科学・講師

研究者番号：50378452

吉田 哲也 (YOSHIDA Tetsuya)

滋賀医科大学・泌尿器科学・助教

研究者番号：60510310

河内 明宏 (KAWAUCHI Akihiro)

滋賀医科大学・泌尿器科学・教授

研究者番号：90240952

(3) 研究協力者

洲崎 雅史 (SUZAKI Masafumi)

喜多 寛子 (KITA Hiroko)

木村 史子 (KIMURA Fumiko)

牛尾 明代 (USHIO Akiyo)

石田 正平 (ISHIDA Syouhei)

牧野 愛 (MAKINO Ai)

山元 武史 (YAMAMOTO Takefumi)

漆山 昇 (URUSHIYAMA Noboru)

森 康博 (MORI Yasuhiro)