

令和元年6月18日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16799

研究課題名(和文)ゲノム編集技術を用いた腎癌における分子標的治療薬への耐性化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the resistance mechanism to the molecular targeting drug in renal cancer using the genome editing technology

研究代表者

米森 雅也 (YONEMORI, Masaya)

鹿児島大学・附属病院・医員

研究者番号：00758013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用いて当科で作成したスニチニブ耐性低酸素誘導因子(HIF)ノックアウト腎癌細胞株を使用して腎癌の増殖・浸潤・転移および薬剤耐性に関わる癌シグナル経路解明を行った。その結果、HIFをノックアウトした際に、代謝の流れが解糖系からセリン合成経路に移行することを見出し、更にセリン合成経路で重要なPHGDHという遺伝子が治療標的になることを証明した。また、公共データベースを用いた腎癌の臨床統計解析で、PHGDHの遺伝子増幅群は全生存期間が有意に低下しており、初回治療時においても、その遺伝子増幅群を認める症例では治療標的となる可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移性腎癌の多くは分子標的治療薬に治療抵抗性を獲得し、再発・転移に至るが、低酸素誘導因子(HIF)の恒常的な活性化は腎癌の進展のみでなく、腎癌治療に一時治療として使用されているmTOR阻害剤や血管新生阻害剤の耐性獲得にも重要な役割を果たすとされている。本研究では、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用いて当科で作成したスニチニブ(マルチキナーゼ阻害剤)耐性HIFノックアウト腎癌細胞株を使用して、腎癌の増殖・浸潤・転移および薬剤耐性に関わる癌シグナル経路を解明することが出来た。本研究の成果により、転移性腎癌に対する新たな治療戦略の可能性が提案された。

研究成果の概要(英文)：We established a sunitinib-resistant RCC cell line, followed by the establishment of HIF2⁻ knockout cell line (HIF2⁻-KO-SU-R-786-o) by CRISPR/Cas9. By using omics analyses using the cell, we found that serine biosynthesis was significantly activated in HIF2⁻-KO-SU-R-786-o, and that PHGDH, a key enzyme for serine synthesis, was accelerated in HIF2⁻-KO-SU-R-786-o. PHGDH inhibitor reduced cell growth in vivo and in vitro by inducing apoptosis in HIF2⁻-KO-SU-R-786-o more than in parent cells. Public database showed that patients with PHGDH gene amplification had poor overall survival (P = 0.0003) compared to patients without amplification. In conclusion, PHGDH can be a therapeutic target for patients showing activated serine biosynthesis after HIF2⁻ deficiency. Furthermore, PHGDH inhibitor should be considered as a first treatment in patients with PHGDH amplification.

研究分野：Urological cancer

キーワード：腎癌 CRISPR/Cas9 PHGDH 低酸素誘導因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎癌治療の現状

腎癌は、国内で年間約 2 万人が罹患し、すべての癌の約 2% を占める。泌尿器科系悪性腫瘍の中では前立腺癌、膀胱癌について多い腫瘍である。手術以外に根治的治療法がなく、化学療法や放射線療法は有効ではない。また、転移性腎癌の 5 年生存率は約 5-10% と著しく低い。生存率の低さは、再発や遠隔転移に起因しており、再発・転移の制御が腎癌の治療の重要課題である。

近年、Sorafenib, スニチニブ, Axitinib 等のマルチキナーゼ阻害薬や、Everolimus や Temsirolimus などの mTOR 阻害薬が実用化された。これら分子標的治療薬の奏効率は 40% 程度であり、一定の治療効果を上げている。しかしながら、転移性腎癌の多くは分子標的治療薬に治療抵抗性を獲得し、再発・転移に至る。また 2016 年 8 月 26 日進行性腎細胞癌に対してこれまでの分子標的薬とは全く違うコンセプトで作られた PD-1 抗体薬であるニボルマブが保険承認された。ニボルマブによる前臨床試験(CheckMate 025)では奏効率は 25% であり、対照群に比較して有意な延命効果を示したが、残りの 75% は無効であり治療としてはやはり不十分である。そのため、治療抵抗性を獲得した腎癌患者に対する有効な治療法は限定的で、そして無効例の予後は極めて悪いため、更なる新規の治療法の開発が必要である。

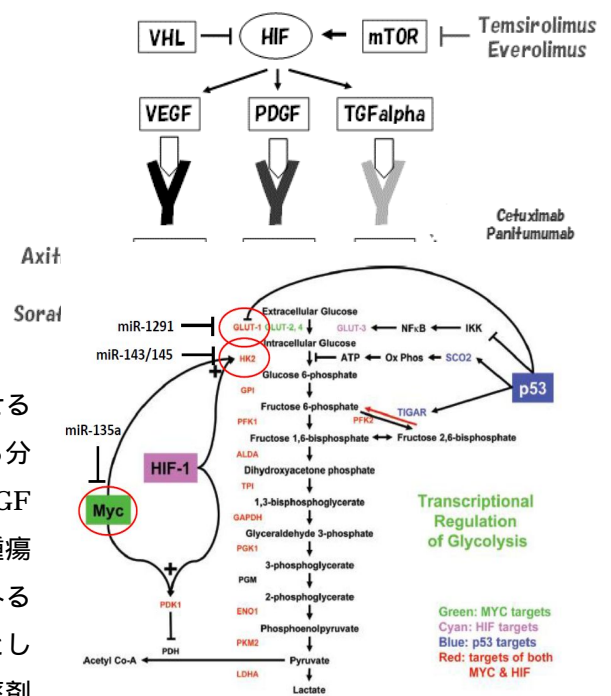
(2) 腎細胞がんの基礎研究の現状

腎癌は病理学的に細分化すると、淡明型腎癌・乳頭型腎癌・嫌色素細胞型腎癌・その他(ペリニ管癌等)に分けられる。約 70% を占めるのが淡明型腎癌であり、そのうち約 60% で von Hippel Lindau (VHL) 遺伝子の不活化が認められる。VHL 遺伝子は癌抑制遺伝子であり、VHL 遺伝子は転写調節因子である HIF タンパクの分解に関与している。腎癌では VHL 遺伝子の不活化の下、HIF の恒常的活性化が生じ、結果、腫瘍細胞の増殖因子である transforming growth factor (TGF)、血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF)、platelet-derived growth factor (PDGF) の転写を促進させることが明らかになっている。現在、臨床で使用されている分子標的治療薬は、この HIF の蓄積に伴う VEGF、PDGF、TGF の発現と機能亢進をその受容体側で遮断することで抗腫瘍効果を発揮する。改めて腎癌の分子メカニズムを考えると、腎癌治療のさらなる発展のためにはこの HIF を中心とした分子機構のさらなる解明と分子標的治療薬使用による薬剤耐性のメカニズムを解明することが重要と考えられた。

(3) 申請者の腎癌研究

申請者らは、泌尿器科癌(腎癌、膀胱癌、前立腺癌)において機能性 RNA (miRNA) の研究を行い、その中で、泌尿器科癌の癌抑制型 miRNA の解析を通して泌尿器科癌の癌進展に重要な機能を持つ標的遺伝子を明らかにしてきた。申請者らの研究グループにおける腎癌の機能性 RNA 解析では明らかに HIF と関連ある分子が認められた。

Molecular pathway for renal cell carcinoma



腎癌の臨床検体より miRNA 発現プロファイルを行い、癌抑制的 miRNA (miR-1285) と

その標遺伝子を報告した(Hidaka et al. Oncotarget 2012)

miR-135a は腎癌において転写因子 c-myc を制御していることを明らかにした。(Yamada et al. Cancer Science 2013)

miR-1291 は腎癌において GLUT1 を制御することによりが癌抑制効果を示すことを報告した。(Yamasaki et al. Cancer Science 2013)

さらに腎癌で miR-143/145 cluster は Warburg effect に寄与する遺伝子 HK2 を制御することを明らかにした。(Yosino et al. Cancer Science 2013)

このような背景の基、腎癌分子標的治療薬の薬剤耐性に関わる分子ネットワークを解明するため、今回は HIF を起点とした分子ネットワークを再構築し、治療抵抗性腎癌患者に特徴的な癌シグナル経路を遮断する新たな治療戦略の基礎データを収集する提案を考案した。

2 . 研究の目的

本研究では HIF を起点として、腎癌の増殖・浸潤・転移及び薬剤耐性に関わるシグナル伝達の再構築を行い、新たな治療戦略の基礎データを収集する提案である。研究は大きく分けて以下の4段階のステップを経て行う予定である。

- (1) 当科で作成した腎癌 miRNA 発現プロファイルから HIF と関連があると報告されるものを抽出し機能解析を行い標的分子の同定を行う。これまでのデータと合わせ HIF を起点とした分子ネットワークの再構築を行う。
- (2) 当科で作成したスニチニブ耐性腎癌細胞株、及びスニチニブ耐性 HIF ノックアウト腎癌細胞株を用いて行った RNA sequence 解析を基に、治療抵抗性腎癌の分子ネットワーク探索を行う。
- (3) 治療抵抗性を獲得した臨床検体を用いて、上記解析結果の検証を行う。
- (4) スニチニブ耐性腎癌細胞株やスニチニブ耐性 HIF ノックアウト腎癌細胞株において活性化されている分子経路を遮断する戦略を考案して、in vitro/in vivo にて検証を行う。

3 . 研究の方法

本研究では HIF を起点として、腎癌の増殖・浸潤・転移及び薬剤耐性に関わるシグナル伝達の再構築を行い、新たな治療戦略の基礎データを収集する提案である。研究は大きく分けて以下の4段階のステップを経て行う予定である。

- (1) HIF と関連のある miRNA の機能解析と標的分子の同定。HIF を起点とした分子機構の再構築。
- (2) 治療抵抗性を獲得した際に活性化される癌シグナルの解明とその経路を遮断する分子の選択。
- (3) 臨床検体を用いて のシグナル伝達機構の確認。
- (4) 治療抵抗性腎癌において活性化されている分子経路を遮断する戦略を考案して、in vitro/in vivo にて検証。

4 . 研究成果

研究成果として、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて HIF をノックアウトした際に、代謝リプログラミングが起り代謝が解糖系からセリン合成経路に移行することを見出した。更にセリン合成経路で重要な PHGDH という遺伝子が治療標的になることを証明した。セリンはヌクレオチド、タンパク質、脂質の生合成に必要なアミノ酸であり、新たな癌細胞作成の材料

としてセリンが必要とされることが予想された。また、公共データベースを用いた臨床統計解析を行ったところ、腎癌患者(n=524)において、PHGDHの遺伝子増幅群は全生存期間が有意に低下していた。つまり、初回治療時においても、その遺伝子増幅群を認める症例では治療標的となる可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件、全て査読あり)

1. Sugita S, Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Matsushita R, Sakaguchi T, Itesako T, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H. Tumor-suppressive microRNA-223 targets WDR62 directly in bladder cancer. *Int J Oncol.* 2019 Jun; 54(6):2222-2236.
2. Osako Y, Yoshino H, Sakaguchi T, Sugita S, Yonemori M, Nakagawa M, Enokida H. Potential tumor-suppressive role of microRNA-99a-3p in sunitinib-resistant renal cell carcinoma cells through the regulation of RRM2. *Int J Oncol.* 2019 May; 54(5):1759-1770.
3. Yoshino H*, Yonezawa T*, Yonemori M, Miyamoto K, Sakaguchi T, Sugita S, Osako Y, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H. (* equal contribute). Downregulation of microRNA-1274a induces cell apoptosis through regulation of BMPR1B in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2018; 39:173-181.
4. Sugita S*, Enokida H*, Yoshino H, Miyamoto K, Yonemori M, Sakaguchi T, Osako Y, Nakagawa M. (* equal contribute). HRAS as a potential therapeutic target of salirasib RAS inhibitor in bladder cancer. *Int J Oncol.* 2018 Aug; 53(2):725-736.
5. Sakaguchi T*, Yoshino H*, Sugita S, Miyamoto K, Yonemori M, Osako Y, Meguro-Horike M, Horike SI, Nakagawa M, Enokida H. (* equal contribute). Bromodomain protein BRD4 inhibitor JQ1 regulates potential prognostic molecules in advanced renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2018; 9: 23003-23017.
6. Yoshino H, Nohata N, Miyamoto K, Yonemori M, Sakaguchi T, Sugita S, Kofuji S, Nakagawa M, Dahiya R, Enokida H. PHGDH as a key enzyme for serine biosynthesis in HIF2 targeting therapy for renal cell carcinoma. *Cancer Research.* 2017; 77:6321-6329.
7. Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Tatarano S, Kofuji S, Nohata N, Nakagawa M, Enokida H. microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017; 8:20881-20894.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 吉野裕史、宮元一隆、米森雅也、杉田 智、坂口 大、榎田英樹、中川昌之。代謝リプログラミングを標的とした腎癌治療薬抵抗性獲得機序の解明と克服。第106回日本泌尿器科学会総会。2018。
2. 米森雅也、吉野裕史、宮元一隆、坂口 大、杉田 智、榎田英樹、中川昌之。ゲノム編集技術(CRISPR/Cas9)を使用した腎癌における分子標的治療薬への耐性化機序の解明と革新的治療法の開発。第106回日本泌尿器科学会総会。2018。
3. Hideki Enokida, Hirofumi Yoshino, Kazutaka Miyamoto, Masaya Yonemori, Masayuki Nakagawa. Elucidation of the resistance mechanism to the molecular target drugs in renal cell carcinoma using the genome editing technology. 米国泌尿器科学会。2017。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者：
研究分担者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中川 昌之
ローマ字氏名：Nakagawa Masayuki

研究協力者氏名：榎田 英樹
ローマ字氏名：Enokida Hideki

研究協力者氏名：吉野 裕史
ローマ字氏名：Yoshino Hirofumi

研究協力者氏名：Gutkind JS
ローマ字氏名：Gutkind JS

研究協力者氏名：野畑 二次郎
ローマ字氏名：Nohata Nijiro

研究協力者氏名：杉田 智
ローマ字氏名：Sugita Satoshi

研究協力者氏名：坂口 大
ローマ字氏名：Sakaguchi Satoshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。