

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16043

研究課題名（和文）Influx・effluxの統合的理解による新薬カボザンチニブ非感受性機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of resistance to cabozantinib in renal cell carcinoma based on expression of influx and efflux transporters

研究代表者

松本 准（Matsumoto, Jun）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：60709012

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腎癌に対する新規分子標的薬カボザンチニブ（CAB）の非感受性メカニズムの解明を目指し、腎に高発現する薬物トランスポーターOATP2A1（取り込み）およびMATE1（排泄）に着目した。その結果、両トランスポーターのCABに対する輸送活性は低いことが示唆された。一方、これらのトランスポーターによるCABの輸送を解析する必要があるが、両トランスポーターを含めて、CABのみならず他の分子標的薬の感受性や患者予後に関わるトランスポーターを複数特定することで、腎癌患者に対する治療の個別適正化が推進されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、OATP2A1およびMATE1の発現が腎癌患者の予後に影響を及ぼすことが初めて明らかとなった。一方で、これらのトランスポーターがCABの輸送を担う可能性は低いことが示唆された。今後はOATP2A1やMATE1以外のトランスポーターによるCABの輸送を解析する必要があるが、両トランスポーターを含めて、CABのみならず他の分子標的薬の感受性や患者予後に関わるトランスポーターを複数特定することで、腎癌患者に対する治療の個別適正化が推進されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Renal cell carcinoma (RCC) is the most frequently observed cancer in the kidney. The clinical outcome for patients with RCC has improved with recent advances in cancer therapy; however, the overall prognosis remains unsatisfactory. Cabozantinib (CAB) has been approved for the treatment of advanced RCC. CAB is an effective agent against RCC; however, most RCC patients who received prior treatment with a tyrosine kinase inhibitor show resistance to CAB. The aim of this study was to elucidate the mechanism of resistance to CAB in RCC based on expression of influx and efflux transporters, such as OATP2A1 and MATE1. In this study, both of the transporters have a minor role in transporting of CAB, but these expression levels were significantly correlated the prognosis of RCC patients. The findings of the present study may facilitate better understanding of the importance of OATP2A1 and MATE1 and may have implications for future prognostication and treatment planning for patients with RCC.

研究分野：医療薬学

キーワード：カボザンチニブ 腎細胞がん OATP2A1 MATE1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎癌(腎細胞癌)の罹患数・死亡数は世界的に増加していることから、その対策は国際的に重要な課題である。近年、腎癌の治療薬として免疫チェックポイント阻害剤(ICI)が登場し、大きな話題を呼んだ。一方で、現在最も効果的な経口薬として脚光を浴びているのが、新規分子標的薬カボザンチニブ(CAB)である。CABは現行の第1選択薬スニチニブと比較し、患者予後を有意に改善する。また、CABはICIと同等以上の優れた延命効果を示し、最近になってICIとの併用療法も確立されている。したがって、CABは腎癌の治療において極めて重要な薬物となっている。

CABはマルチキナーゼ阻害剤であり、VEGFRの他にも血管新生阻害薬の感受性に関わるMETやAXLなどのキナーゼを阻害することが知られている。そのため、スニチニブなど他の分子標的薬適用後の患者への有効性が期待されていた。しかしながら、他の分子標的薬適用後にCABが投与された場合の客観的奏効率は約2割程度であり、大多数の患者がカボザンチニブに非感受性を示す。従って、その感受性にはキナーゼ経路以外でさらに重要な機序が存在することは明白であり、「CABの非感受性を規定する機序は何か」という重要な「問い」が存在する。CABは単剤もしくはICIとの併用で既に1次治療からの使用が可能であることから、本機序の早急な解明が腎癌全体の治療成績の向上に直結する可能性がある。

分子標的薬の感受性に関与する機序は種々報告されているが、その多くは全体のうち一部を説明するものであり、大多数の腎癌患者におけるCABの感受性を網羅できない。そこで本研究では、CABの感受性に関与する主要因として薬物トランスポーターに着目した。腎は基質送達機構が高度に発達しており、腎に作用する薬物の感受性においてトランスポーターに着目することは支持される。従来、薬物の感受性においては排泄トランスポーターに着目されてきたが、取り込みトランスポーターの影響も重要であり、双方を統合的に理解する必要がある。つまり、腎癌細胞においてCABの取り込みもしくは排泄に関わるトランスポーターが、腎癌細胞内のCAB濃度を変化させることで、CABの感受性に影響を及ぼす可能性は高い。

2. 研究の目的

腎に高発現するトランスポーターとしては、organic anion transporting polypeptide 2A1(*SLC02A1*、OATP2A1:取り込み)および multidrug and toxin extrusion protein 1 (*SLC47A1*、MATE1:排泄)などが知られている。そこで本研究では、OATP2A1およびMATE1に着目し、両トランスポーターがCABの感受性に及ぼす影響と腎癌の進展との関わりを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CAB定量系の確立

各トランスポーターによるCABの輸送を解析する上では、CABの定量系が必須となる。これまでCABの定量系としては、主にLC-MS/MS(液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計)による定量法が使用されてきた。そこで本研究では、より汎用性の高いHPLC-UV(高速液体クロマトグラフ-紫外吸収検出器)を用いて、CAB定量系の確立を試みた。内部標準物質(internal standard, IS)としてはアキシチニブ(AXI)を用い、各薬物は全てメタノールで段階希釈した。分析カラムにはInertSustain AQ-C18(150×4.6 mm i.d., 5 μm)を用い、カラム温度は40°C、移動相の流速は1.0 mL/minとした。移動相としてはメタノールと水をグラジエント条件下で用い、UVの検出波長はCABおよびAXIの両薬物で強い吸収が認められた244 nmに設定した。

(2) 患者組織における各トランスポーター発現量の解析

岡山大学病院泌尿器科において外科手術を受けた腎癌患者より、腎癌組織および癌部位近傍の腎正常組織を取得し、各組織から総RNAおよび総タンパク質を抽出した。各トランスポーターmRNAの発現はreal-time PCR法により、またタンパク質の発現はWestern blot分析により解析し、トランスポーターの発現量で各患者を2群(HighもしくはLow)に分けた。患者の臨床病理学的パラメータおよび予後情報は、岡山大学病院の電子カルテから抽出した。なお、本研究における患者組織の利用については、岡山大学研究倫理審査委員会の承認を得た(承認番号:研1802-033)。

(3) 各トランスポーターによるCABの輸送活性の解析

HEK293細胞にpcDNA3.1 vector、またOATP2A1もしくはMATE1コーディング配列を含むpcDNA3.1プラスミドを安定的に組み込むことで、コントロール細胞(HEK-mock)、OATP2A1もしくはMAT1過剰発現細胞(HEK-OATP2A1もしくはHEK-MATE1)を構築した。各細胞はFetal Bovine Serum(10%)およびG418(0.5 mg/mL)を含有したDulbecco's Modified Eagle's Medium培地において、37°C、5% CO₂条件下で培養した。輸送活性の解析には、6 well plateに細胞を7.0×10⁵ cells/wellとなるように播種し、24時間後に培地を1、5、10、20、50もしくは100 μMのCABを含有したTransporting Buffer(10 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acidおよびHanks' balanced salt solution)に交換し、37°Cで5分間インキュベートした。Phosphate-buffered salineで2回洗浄後にメタノールで細胞を溶解し、ISを20 μMとなるように添加し、HPLC-UVを用いてCABを定量した。CABの輸送量は、各細胞におけるタンパク質濃度で補正した。

(4) 統計学的解析

2 群間の比較には Student の *t* 検定を、2 群間の相関には Pearson の相関係数を、また多群間の比較には Tukey の範囲検定を用いた。各トランスポーターの発現量と臨床病理学的パラメータとの関連はカイ二乗検定もしくは Fisher の正確確率検定により、また患者予後との関連については Kaplan-Meier 曲線および COX 回帰分析を用いた。全ての解析において、 $P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

4. 研究成果

(1) CAB 定量系の確立

本研究で考案した CAB 定量系の条件下では、CAB および IS である AXI は 12.0 分および 10.7 分にそれぞれの薬物に由来する明確なピークが認められた (図 1a)。また、両薬物の定量に際して、7.5-100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で極めて良好な直線性を示した (図 1b および 1c)。日間変動・日内変動における真度および精度については、CAB の 7.5 $\mu\text{g/mL}$ を除き、全て FDA (アメリカ食品医薬品局) の推奨基準を満たした (表 1)。また、細胞懸濁液およびヒト血漿に各薬物を混合し、メタノールおよび遠心分離操作により各薬物を抽出・分析したところ、いずれのサンプルにおいても各薬物に由来する明確なピークが認められた。以上より、これまで CAB の定量系としては LC-MS/MS が主流であったが、本研究により HPLC-UV を用いた定量系が新たに確立された。また、本定量系は培養細胞等を用いた *in vitro* における分析に加えて、患者血液等の生体試料を用いた分析にも応用が可能であることが示唆された。

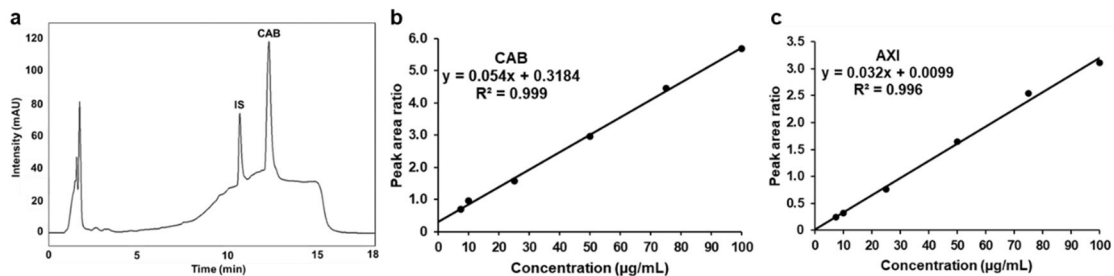


図 1 CAB 定量系の確立

(a) CAB および AXI (IS) のピーク、(b) CAB 定量の直線性、(c) AXI 定量の直線性

表 1 CAB および AXI 定量の日間・日内変動

	Spiked ($\mu\text{g/mL}$)	Inter-day (n = 5)			Intra-day (n = 5)		
		Found ($\mu\text{g/mL}$)	R.S.D. (%)	R.E. (%)	Found ($\mu\text{g/mL}$)	R.S.D. (%)	R.E. (%)
CAB	7.5	10.9	49.8	45.4	10.4	12.2	38.9
	25	28.1	13.7	12.5	26.5	4.1	6.0
	50	56.1	11.7	12.1	49.6	3.1	-0.89
	100	105	9.5	5.3	87.1	2.7	-12.9
AXI	7.5	6.86	14.2	-8.6	6.06	5.0	-19.3
	25	23.3	10.4	-6.9	24.1	1.5	-3.6
	50	51.6	8.3	3.1	49.3	0.45	-1.4
	100	107	9.1	6.8	106	0.24	6.1

R.S.D. : relative standard deviation、R.E. : relative error

(2) 腎癌における OATP2A1 の発現と CAB の取り込みについて

腎組織における OATP2A1 の発現を解析した。腎正常組織のみならず、腎癌組織においても SLCO2A1 mRNA および OATP2A1 タンパク質の発現が認められた。一方で、腎癌組織と腎正常組織における SLCO2A1 mRNA 発現量に有意な差は認められなかった (図 2a)。なお、腎癌組織における SLCO2A1 mRNA 発現量と OATP2A1 タンパク質発現量には有意な正の相関が認められた ($P < 0.001$)。各腎癌組織における OATP2A1 タンパク質発現量には大きな相違が認められた (図 2b)。以上より、腎癌組織における OATP2A1 発現量は腎正常組織と比較し大差はないが、腎癌組織における OATP2A1 発現量には大きな個人差が認められることが示唆された。

OATP2A1 の発現量と各腎癌患者の臨床病理学的パラメータおよび予後との関連を解析した。SLCO2A1 mRNA 低発現群では腫瘍径、リンパ節転移、遠隔転移、ステージ、および grade が不良であった (表 2)。さらに、SLCO2A1 mRNA 低発現群では高発現群と比較し、がん特異的生存率 (cancer-specific survival、CSS) および全生存率 (overall survival、OS) が有意に短かった (図 3a および 3b)。OATP2A1 タンパク質においても同様に解析したところ、低発現群では高発現群と比較し、CSS および OS が有意に短かった (図 3c および 3d)。以上より、腎癌組織における OATP2A1 発現量が低い患者は、予後不良であることが示唆された。

本研究で確立した CAB 定量系を用い、OATP2A1 による CAB の輸送を解析した。腎癌由来 Caki-1 細胞において CAB を 1–100 μM の範囲で曝露させたところ、濃度依存的に細胞増殖が阻害された。また、Caki-1 細胞を 20 μM の CAB で 30 分間曝露させ、細胞内における CAB を抽出・検出したところ、CAB に由来する明確なピークが認められたことから、腎癌細胞は CAB を輸送することが明らかとなった。一方で、1–100 μM の範囲のうち 6 濃度において、HEK-mock と HEK-OATP2A1 での CAB の輸送能を比較したが、大差は認められなかった。以上より、腎癌細胞における CAB の取り込みには、OATP2A1 ではなく別のトランスポーターが関与することが示唆された。

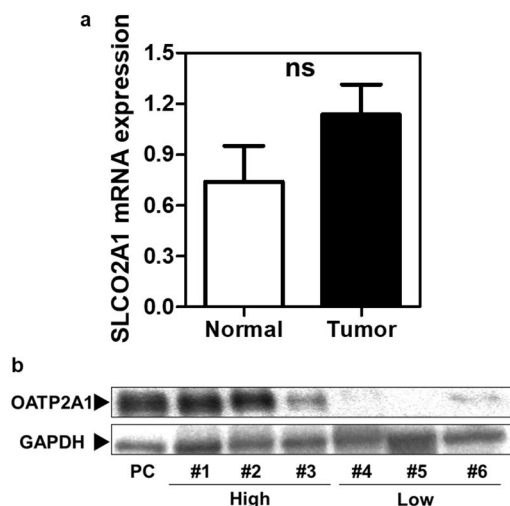


図 2 腎癌組織における OATP2A1 の発現
(a) 腎癌組織と腎正常組織における SLCO2A1 mRNA 発現量の比較、(b) 腎癌組織における OATP2A1 の発現、ns : not significant、GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase、PC : positive control

表 2 SLCO2A1 mRNA 発現量と各パラメータ

Characteristics	Patients (%)	SLCO2A1 mRNA		P value
		Low	High	
Age				
< 60	54 (46%)	29	25	0.408
60	63 (54%)	29	34	
Gender				
Male	75 (64%)	38	37	0.752
Female	42 (36%)	20	22	
T status				
1 + 2	83 (71%)	36	47	0.035
3 + 4	34 (29%)	22	12	
Lymph node status				
Positive	11 (9%)	9	2	0.020
Negative	106 (91%)	49	57	
Metastasis				
Positive	19 (16%)	14	5	0.020
Negative	98 (84%)	44	54	
TNM stage				
I + II	79 (68%)	33	46	0.014
III + IV	38 (32%)	25	13	
Grade				
1 + 2	87 (74%)	34	53	< 0.001
3 + 4	30 (26%)	24	6	
Subtypes				
Clear cell	92 (79%)	42	50	0.102
Other	25 (21%)	16	9	

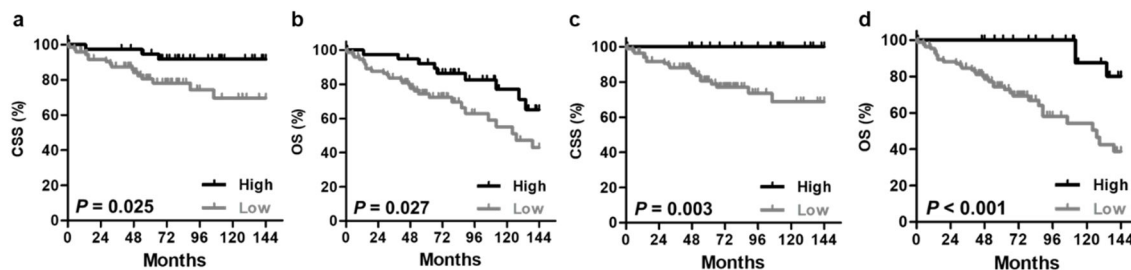


図 3 腎癌組織における OATP2A1 の発現と患者予後
SLCO2A1 mRNA 発現量と CSS (a) および OS (b)、OATP2A1 発現量と CSS (c) および OS (d)

(3) 腎癌における MATE1 の発現と CAB の排泄について

腎組織における MATE1 の発現を解析した。腎正常組織のみならず、腎癌組織においても SLC47A1 mRNA および MATE1 タンパク質の発現が認められた。腎正常組織と比較し、腎癌組織における SLC47A1 mRNA 発現量は有意に低く (図 4a)、また各腎癌組織における MATE1 タンパク質発現量には大きな相違が認められた (図 4b)。以上より、腎癌組織においては多くの患者で MATE1 の発現量が低下し、また各腎癌組織における MATE1 の発現量には大きな個人差が認められることが示唆された。

MATE1 の発現量と各腎癌患者の臨床病理学的パラメータおよび予後との関連を解析した。SLC47A1 mRNA 低発現群では grade が高く、また淡明細胞型以外の組織型が多く認められた (表 3)。さらに、SLC47A1 mRNA 低発現群では高発現群と比較し、CSS および OS が有意に短かった (図 5a および 5b)。MATE1 タンパク質においても同様に解析したところ、低発現群では高発現群と比較し、CSS および OS が有意に短かった (図 5c および 5d)。以上より、腎癌組織における MATE1 発現量が低い患者は、予後不良であることが示唆された。

MATE1 による CAB の輸送を解析した。上記 OATP2A1 の際と同様に 6 濃度において HEK-mock および HEK-MATE1 における CAB の輸送量を比較したところ、両者で大差は認められなかった。以上より、腎癌細胞における CAB の排泄には、MATE1 ではなく別のトランスポーターが関与することが示唆された。

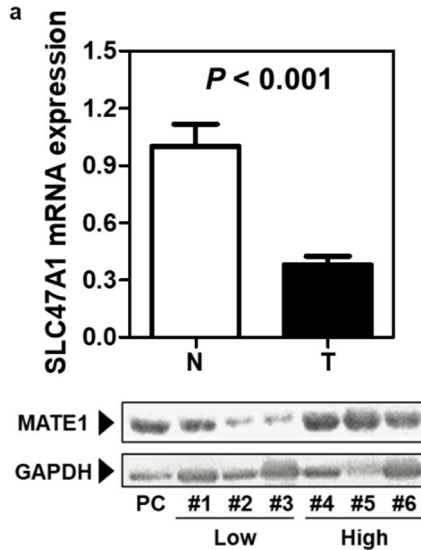


図4 腎癌組織における MATE1 の発現
(a) 腎癌組織と腎正常組織における SLC47A1 mRNA 発現量の比較、(b) 腎癌組織における MATE1 の発現、GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase、PC : positive control

表3 SLC47A1 mRNA 発現量と各パラメータ

Characteristics	Patients (%)	SLC47A1 mRNA expression		P value
		Low	High	
Age				
< 60	51 (37%)	25	26	0.810
60	88 (63%)	45	43	
Gender				
Male	91 (65%)	47	44	0.676
Female	48 (35%)	23	25	
T status				
1 + 2	100 (72%)	48	52	0.373
3 + 4	39 (28%)	22	17	
Lymph node status				
Positive	11 (8%)	8	3	0.208
Negative	128 (92%)	62	66	
Metastasis				
Positive	21 (15%)	13	8	0.251
Negative	118 (85%)	57	61	
TNM stage				
I + II	96 (70%)	46	50	0.389
III + IV	43 (30%)	24	19	
Grade				
1 + 2	106 (76%)	46	60	0.003
3 + 4	33 (23%)	24	9	
Subtypes				
Clear cell	112 (81%)	50	62	0.004
Other	27 (19%)	20	7	

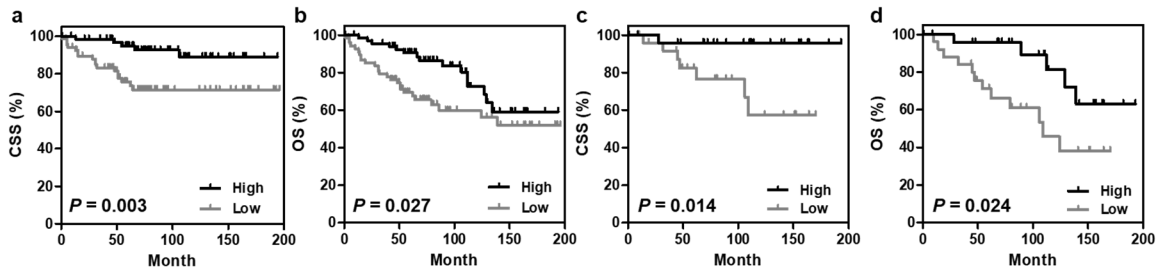


図5 腎癌組織における MATE1 の発現と患者予後
SLC47A1 mRNA 発現量と CSS (a) および OS (b)、MATE1 発現量と CSS (c) および OS (d)

(4) 本研究のまとめと今後の展望について

本研究において、腎癌細胞における CAB の取り込み・排泄には、OATP2A1 および MATE1 以外のトランスポーターが関与することが示唆された。OATP2A1 および MATE1 以外で腎に高発現するトランスポーターとしては OCT2 や MRP2 などが知られており、今後はこれらのトランスポーターによる CAB の輸送を解析することで、CAB の輸送に影響を及ぼすトランスポーターを特定できる可能性がある。

CAB は比較的新しい分子標的薬であるため、本研究で対象とした腎癌患者において、CAB を使用した経験のある患者はごく少数であった。そのため、本研究では各患者の腎癌組織における OATP2A1 および MATE1 の発現量と CAB の奏効率および延命効果との関連については解析することができなかった。一方で、近年は CAB を単剤、もしくはニボルマブとの併用で使用する患者が増加していることから、今後は実際に CAB を使用した腎癌患者の組織を取得し、複数のトランスポーターの発現量と CAB の感受性との関連を解析することで、CAB の感受性に影響を及ぼすトランスポーターについてより強固なエビデンスが構築できる可能性がある。

腎癌は細胞障害性抗がん剤や放射線療法の効果がほとんど期待できないなど、他のがん種とは異なったプロファイルを示す。そのため、CAB を含めた分子標的薬による薬物治療が重要な位置づけを有している。分子標的薬と ICI の併用療法が確立された現在では、薬物治療の選択肢も以前と比較し各段に増加している。しかしながら、多剤を併用することで有害事象の発生率や発生様式が複雑化していることから、各患者に適した薬物療法を選別することは重要である。一方で、現時点では本選別に係る指標は極めて乏しい。本研究で OATP2A1 および MATE1 が CAB の輸送には関与しないことが示唆されたが、その反面でこれらのトランスポーターの発現量は患者予後と有意に相関していた。そのため、今後は OATP2A1 や MATE1 を含め、CAB のみならず他の分子標的薬の感受性や患者予後に関わる因子を複数特定することで、腎癌患者に対する治療の個別適正化が推進されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村朱里、松本准、藤吉正哉、有吉範高
2. 発表標題 腎癌の1次治療で使用可能な 分子標的薬に対するHPLC-UVによるin vitro定量系の確立
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	有吉 範高 (Ariyoshi Noritaka)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究協力者	藤吉 正哉 (Fujiyoshi Masachika)	鳥取大学・薬剤部・准教授 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------