

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791654

研究課題名(和文)腎細胞癌におけるTKI耐性獲得機序の解明

研究課題名(英文)Mechanism of resistance to tyrosine-kinase inhibitor in renal cell carcinoma

研究代表者

島本 力 (SHIMAMOTO, TSUTOMU)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10600794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：染色体や遺伝子発現異常による高血管新生は、直接の薬物療法(チロシンキナーゼ阻害剤)耐性機序ではなく、高血管新生-微小環境との相互作用が耐性機序の要因であると考えた。また、これら耐性反応の一部は可逆性(もとに戻る性質)であった。

以上の研究結果より、チロシンキナーゼ阻害剤耐性腎細胞癌の克服は、腫瘍微小環境へのアプローチや他の治療法との併用など、これまでとは異なる新規治療戦略が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hyperangiogenesis has not been a role of resistance to tyrosine-kinase inhibitor in renal cell carcinoma. Cross-talk with Hyperangiogenesis and microenvironment might be a key mechanism of resistance to tyrosine-kinase inhibitor in renal cell carcinoma. The resistance has been reversible reaction.

Thus, novel therapeutic strategies are really needed for resolving resistance to tyrosine-kinase inhibitor or such as approaching to tumor-microenvironment and combination therapy with others.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 血管新生 チロシンキナーゼ阻害剤 耐性

1. 研究開始当初の背景

近年、外科手術不能転移性腎細胞癌の第一選択として、tyrosine kinase inhibitor (TKI) を含めた、分子標的治療が行われている。一方、TKI 抵抗性の機序は解明されておらず、mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害薬や次世代の薬剤の効果も限定的である。TKI 耐性腎癌患者において、機序解明は急務である。また、多くの重篤な有害事象が報告されており、新たな治療の開発が望まれる。

2. 研究の目的

我々は、TKI 耐性転移性腎細胞癌の患者から樹立した細胞株の解析により、複数の染色体異常を確認した。の染色体異常に伴い、各種血管新生因子が著明に高発現することを見出した。これらのことより、TKI 耐性機序の一つとして、多数の血管新生因子における、一様な高発現-hyperangiogenesis-が関連していると考えられた。

本研究では、この細胞株を用いて、TKI 抵抗性獲得の機序を解明するとともに、より高発現している血管新生因子を選択し、次なる標的分子を同定することで、より効果のある治療を行っていくことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) TKI 耐性機序の解明

【種々の腎細胞癌株における、TKI 耐性の検討】

市販の腎細胞癌株に加え、腎細胞癌患者から樹立した性質の異なる多数の細胞株を保存している。これらを用いて、sorafenib を含めた TKI 耐性の程度を *in vitro* (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, yellow tetrazole) MTT assay にて確認する。Sorafenib 濃度は、0 から 10 $\mu$ M を設定し、治療開始後 72 時間で評価を行う。

【血管新生関連因子発現の解析】

TKI 耐性細胞における、高発現している各種血管新生因子の mRNA 発現を real time-PCR にて確認する。腎癌細胞株を順次高濃度の sorafenib 添加培養液で培養する。Sorafenib 存在下で生存した細胞より、シングルセルクローンを生成し、これを耐性株とする。また、TKI 耐性腎細胞癌患者から樹立した細胞株を用いる。

【TKI 耐性細胞における、転写因子発現解析】

前記の Sorafenib 耐性株における、血管新生因子を調節する転写因子の発現を検討した。細胞株 RCC1 と RCC2 において、TKI 耐性株を製作した。核内タンパクを抽出して、ウエスタンプロット法により各種転写因子の発現を解析した。

【動物実験モデルを用いた、TKI 耐性機序の解明】

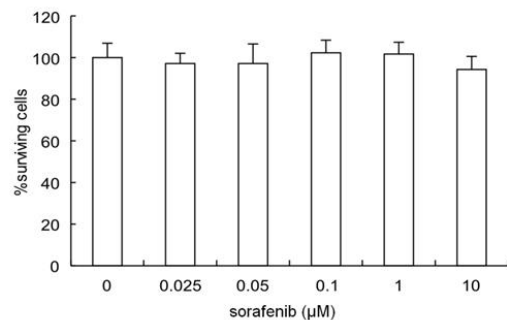
各細胞、10<sup>6</sup>個/100 $\mu$ l をネンブータル麻酔下に胸腺無形性ヌードマウスの腎臓に同所

移植する。Sorafenib を含めた TKI 治療を行い、その抗腫瘍効果を解析する。Sorafenib の場合、癌細胞移植後 5 日後より治療開始する。10 mg/kg の sorafenib の連日強制経口投与を 4 週間を目安に行う。4 週後に、麻酔により無痛下にマウスを安楽死させ、腫瘍体積を評価する。

4. 研究成果

*In vitro* MTT assay, Sorafenib therapy to Sorafenib-resistant metastatic renal cell carcinoma

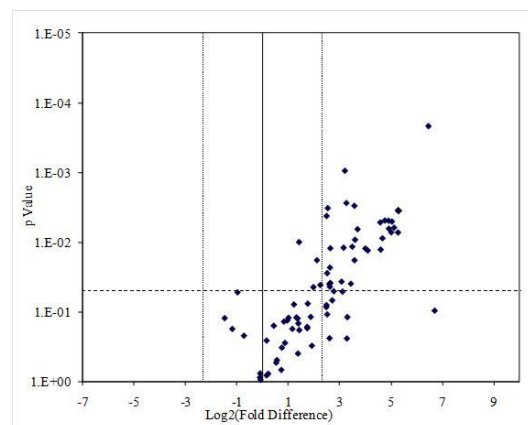
図 1



*In vitro*での sorafenib による細胞増殖抑制効果を MTT assay にて検討した。転移巣由来の sorafenib 耐性腎細胞癌株において、10 10 $\mu$ M の高濃度 sorafenib においても細胞増殖抑制効果は認められなかった。また、市販されている多くの腎癌細胞株では、一定の *in vitro*における sorafenib 自然耐性が認められた (Karashima T. et al., Int J Urol. 2013 Sep;20(9):923-30 より改変 図 1)。

Volcano-blot of angiogenesis related gene mRNA expressions

図 2



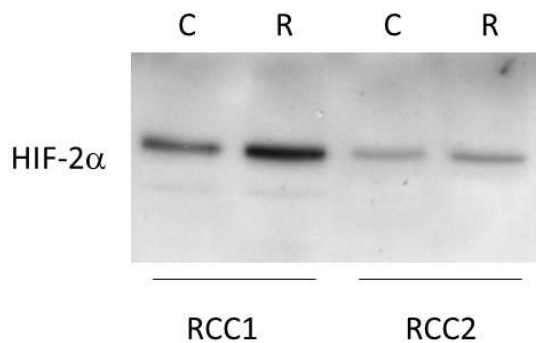
Sorafenib 耐性腎細胞癌転移巣と未治療原発巣との血管新生因子の発現比較。Sorafenib 耐性腎細胞癌で、ほとんどの血管新生因子の mRNA 発現が、更新していた (Karashima T. et al., Int J Urol. 2013 Sep;20(9):923-930 より改変 図 2)。

定量的 PCR による発現確認において、特に

CXC ケモカイン関連因子、Fibroblast growth factor、Vascular endothelial growth factor、Transforming growth factor の更新が目立った。また、Angiopoietin、Interferon、Interleukin、Plasminogen、Prokineticin の発現にも差が認められた。

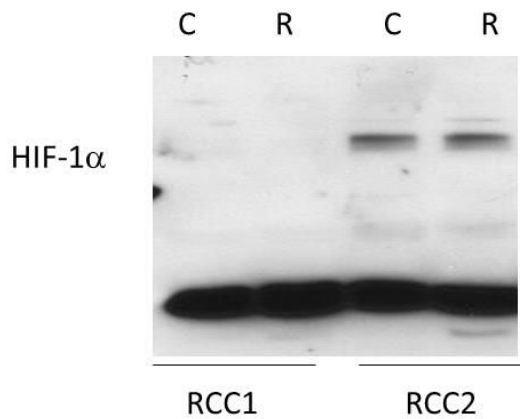
Comparison of HIF-2 $\alpha$  and -1 $\alpha$  expression in conventional RCC and TKI-resistant RCC

図 3



腎細胞癌細胞株 RCC1 ならびに RCC2 細胞において、conventional (オリジナル) および sorafenib 耐性株の HIF-2 $\alpha$  の核内タンパク発現を比較検討した。Conventional 株と比較して、Sorafenib 耐性株において HIF-2 $\alpha$  が高発現していた (図3)。

図4

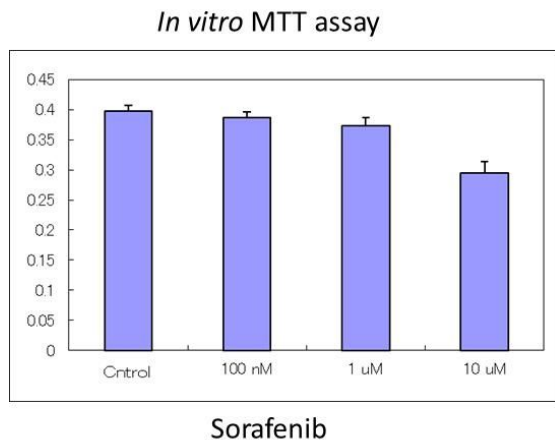


C: conventional cell  
R: resistant cell

一方、HIF-1 $\alpha$  においては conventional 株と sorafenib 耐性株とで発現の差は認められなかった (図 4)。

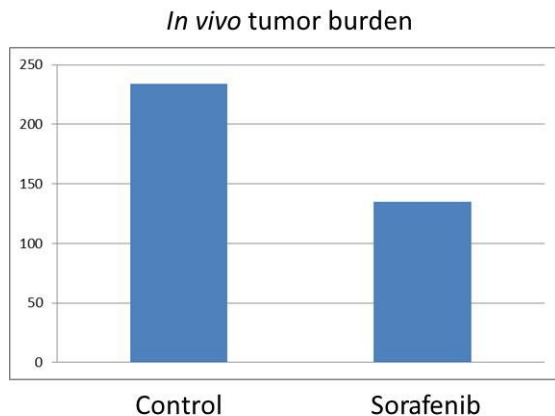
*In vitro* Sorafenib therapy to 786-H1-Sorafenib-resistant cells

図 5



*In vivo* Sorafenib therapy to 786-H1-Sorafenib-resistant cells

図 6



各種血管新生因子を高発現しており、高い腫瘍形成能を保持している 786-H1-sorafenib 耐性腎細胞癌株-における、*in vitro* ならびに *in vivo* での sorafenib による腫瘍抑制効果を検討した。本細胞は、*In vitro* MTT assay において、10 $\mu$ M の高濃度 sorafenib に対しても耐性を示した (図 5)。一方、本細胞を胸腺無形性ヌードマウスの腎臓に同所移植した *in vivo* モデルにおいて、10mg/kg の sorafenib 強制経口投与を 4 週間行った場合、無治療コントロール群と比較して、sorafenib 治療による腫瘍増殖抑制効果が認められた (図 6)。

以上の結果より、染色体や遺伝子発現異常による血管新生の高発現だけでは、TKI 耐性機序は説明できない。*In vitro* での耐性は、*in vivo* においては減弱した結果より、薬剤による直接耐性ではなく、高発現している血管新生因子と微小環境との相互作用が TKI 耐性機序の最も重要な要因であると考えられた。また、これら耐性反応の一部は、TKI 非存在下で一定期間細胞培養すると、消失した。つまり、TKI 耐性機序の一部は可逆性 (もどに戻る性質) であることがわかった。

以上の研究結果より、TKI 耐性腎細胞癌の克服は、腫瘍微小環境へのアプローチや他の治療法との併用など、これまでとは異なる新規治療戦略が必要と考えられた。また、一定期間の休薬によって、TKI 耐性がもとに戻る可能性があるため、withdrawal 症候群の可能性や、TKI リチャレンジの戦略に貢献できる可能性が考えられた。

## 5 . 研究組織

### (1)研究代表者

島本 力 ( SHIMAMOTO, Tsutomu )  
高知大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：10600794