

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670695

研究課題名（和文）末梢循環中セルフリーの核酸解析による泌尿器癌薬物療法抵抗因子の同定

研究課題名（英文）Identification of factors associated with drug-therapy resistance by peripheral blood serum cell-free nucleotic acids

研究代表者

羽瀧 友則（Habuchi, Tomonori）

秋田大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：00293861

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）：転移を有する腎癌等の患者で、治療前、治療中の血清・血漿を採取。タンパク、エキソソームmiRNAを得、薬物療法耐性にかかわる核酸を含む血清マーカーを同定する。今回、進行腎癌の治療薬であるアキシチニブ（AXT）で治療した進行腎癌患者血清中のmiRNAや血清蛋白の発現と予後の関連を解析した。AXT投与後miR-21低下群は有意に無増悪生存期間が延長した。AXT投与4週後の血清PAI-1濃度が0週より低下した群で、有意にPFSおよびOSが延長し、0週での濃度が高い群で有意に奏効果が良好であった。以上より、AXT治療前後の血清miR-21や血清PAI-1濃度がバイオマーカーとなりうると思われた。

研究成果の概要（英文）：To explore candidate serum cell-free nucleotic acid or protein biomarkers associated with drug resistance in advanced urological cancers, we collected and analyzed the serum exosome RNA and proteins. As the results focusing on Axitinib therapy in advanced RCC patients, patients whose serum miR-21 level was decreased after Axitinib treatment had significantly better progression free survival. Patients whose serum PAI-1 level was decreased after Axitinib treatment had significantly better progression free survival and overall survival. In addition, the pre-treatment PAI-1 level was significantly associated with the objective response rate. In conclusion, the serum miR-21 level or PAI-1 protein level may be a promising biomarker in the Axitinib treatment for advanced RCC patients.

研究分野：泌尿器科

キーワード：腎癌 膀胱癌 エキソソーム 分子標的薬 液性生検 PAI-1 miR-21

1. 研究開始当初の背景

腎癌を含む泌尿器癌や他の固形癌でも、転移巣はもちろん原発巣でも腫瘍細胞には遺伝子変異に著しい多様性があることが示され、単に腫瘍の生検から治療抵抗性に関連する遺伝子異常を同定・予測することは困難なことが示唆された(*N Engl J Med.* 366, 883–, 2012)。また転移のある患者は病状が進行すると多発転移となり、どの病巣が治療抵抗性の核となるかも不明である。末梢循環血漿中フリーDNA やエクソソーム中のRNA は大部分が腫瘍細胞由来であることが多くの報告で示唆されている。この抹消血液中 DNA やエクソソーム RNA は多発転移や多発腫瘍を伴う患者では多くの病巣の総和のDNA プロフィールやRNA プロフィールの集合体である。従って、転移病巣の生検が不可能な症例でもこの抹消血液中 DNA やRNA を解析し治療経過とともにフォローすると、治療抵抗性の変異や変化を知ることが出来る可能性がある。

2. 研究の目的

転移を伴う泌尿器癌のうち、腎癌に対する分子標的薬、前立腺癌に対する内分泌療法、尿路上皮癌に対する化学療法をモデルとして、薬物療法開始前、治療中、抵抗性となった時点での、末梢循環血漿 DNA や RNA から変異探索や RNA 発現プロフィール解析を行う。

次に、抵抗性となった時点での変異解析や RNA 発現プロフィールから、過去の変異フラクションや発現フラクションを解析し、治療抵抗関連遺伝子変異や miRNA 発現を突き止め、これらの泌尿器癌の薬物療法抵抗性のコアをなす変異や発現異常と、その生物学的本態を明確にする。

上記により、泌尿器癌薬物療法抵抗性のマーカーの同定とともに抵抗性克服への布石となる知見を得、Liquid Biopsy (= 体液からの腫瘍生検、*Nature Med* 2013)の良いモデルとなることを目指す。

3. 研究の方法

転移を有する腎癌、尿路上皮癌、前立腺癌患者で、各々、血管新生阻害分子標的薬、CDDPを含む化学療法、内分泌療法を行う患者を書面での同意の下、治療前、治療中の画像診断による効果判定時に血漿を採取。各血漿サンプルより Cell-free の DNA、エクソソーム miRNA、蛋白を得る。病勢進行や治療耐性状態になった血漿 DNA、miRNA を解析。ドミナントな変異やドミナントな miRNA 異常発現、Bio-Plex Pro™ Human Cancer Biomarker Panel1&2 で顕著なサイトカインや増殖因子を絞る。このドミナントな異常を過去の経時サンプルでの fraction を

評価。治療抵抗性へのキーとなる異常を同定する。

具体的には:

先ず各患者で薬物療法によって、()効果を示し最も病変が少なくなった時点の血漿サンプルと、()抵抗性となり明らかな病変が多発化・進行した時点での血漿サンプルにおいて、この()と()の miRNA の発現量プロフィールを比較し、著しい違いを示した、miRNA を治療抵抗性関連候補として、解析する。

Cell-free の血漿より DNA については NucleoSpin® Plasma XS、エクソソーム miRNA は ExoMir™キット等で抽出し、解析に用いる。

患者の薬物療法への反応性、効果、再発、憎悪、などの臨床情報とともに、エクソソーム由来 miRNA の解析を、miRNA Array 解析 (miRCURY LNA microRNA Array)を用いて、3000 を超える miRNA 種を一挙にスクリーニングする。血清蛋白は Bio-Plex Pro™ Human Cancer Biomarker Panel #1&2 で解析する。

4. 研究成果

- 1) 進行(とくに転移性)腎癌に対する主要な分子標的薬であるアキシチニブ治療抵抗性との関連に注目して、研究を進めた。アキシチニブで治療を受けた進行腎癌患者を対象とし、アキシチニブ投与開始前(0 週)の各種血清蛋白濃度と PFS、OS、奏功率との関連を検討したが、血清 sVEGF-R2 と PDGF-AB/BB の 0 週での濃度が低い群、および血清 PAI-1 (Plasminogen) の 0 週での濃度が高い群で有意に奏功率が良好な傾向にあった(図 2)。一方、PFS・OS と 0 週の血清蛋白濃度との有意な関連は認められなかった。
- 2) 0 週と 4 週間の各種血清蛋白濃度の増減と PFS、OS、奏功率との関連を検討したところ、血清 PAI-1 および IL-18 濃度が 0 週より低下した群で有意に奏功率が良好であった(表 4: p = 0.014, p = 0.014)。
- 3) アキシチニブ投与開始 4 週後に血清 PAI-1 濃度が 0 週より低下した群で、有意に PFS および OS が延長した。(図 3: 15.0 ヶ月 vs 5.1 ヶ月: p = 0.027, 35.0 ヶ月 vs 14.2 ヶ月: p=0.026)
- 4) 多変量解析では、血清 PAI-1 濃度の治療前後での変化は独立した PFS および OS の予測因子であった(p = 0.015, p = 0.032)。
- 5) アキシチニブ投与後 miR-21 低下群は有意に無増悪生存期間が延長した。
- 6) 以上より、アキシチニブ治療前後の末梢血中エクソソーム内の miR-21 や血清 PAI-1 濃度が進行腎癌に対するアキシチニブ治療におい

て、末梢血由来のバイオマーカーとなりうると考えられた。

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 16 件)

Takahashi M, Inoue T, Huang M, Numakura K, Tsuruta H, Saito M, Maeno A, Nakamura E, Narita S, Tsuchiya N, Habuchi T. Inverse relationship between insulin receptor expression and progression in renal cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2017 ;37(5):2929-2941. doi: 10.3892/or.2017.5552.

Takayama K, Inoue T, Narita S, Maita S, Huang M, Numakura K, Tsuruta H, Saito M, Maeno A, Satoh S, Tsuchiya N, Habuchi T. Inhibition of the RANK/RANKL signaling with osteoprotegerin prevents castration-induced acceleration of bone metastasis in castration-insensitive prostate cancer. *Cancer Lett*. 2017. pii: S0304-3835(17)30216-1. doi: 10.1016/j.canlet.2017.03.034

Ito R, Narita S, Huang M, Nara T, Numakura K, Takayama K, Tsuruta H, Maeno A, Saito M, Inoue T, Tsuchiya N, Satoh S, Habuchi T The impact of obesity and adiponectin signaling in patients with renal cell carcinoma: A potential mechanism for the "obesity paradox". *PLoS One*. 2017;12(2):e0171615. doi: 10.1371/journal.pone.0171615.

Kurobe M, Kojima T, Nishimura K, Kandori S, Kawahara T, Yoshino T, Ueno S, Iizumi Y, Mitsuzuka K, Arai Y, Tsuruta H, Habuchi T, Kobayashi T, Matsui Y, Ogawa O, Sugimoto M, Kakehi Y, Nagumo Y, Tsutsumi M, Oikawa T, Kikuchi K, Nishiyama H. Development of RNA-FISH Assay for Detection of Oncogenic FGFR3-TACC3 Fusion Genes in FFPE Samples. *PLoS One*. 2016;11(12):e0165109. doi: 10.1371/journal.pone.0165109.

Nara T, Narita S, Huang M, Yoshioka T, Koizumi A, Numakura K, Tsuruta H, Maeno A, Saito M, Inoue T, Tsuchiya N, Satoh S, Habuchi T. Altered miRNA expression in high-fat diet-induced

prostate cancer progression. *Carcinogenesis*. 2016;37(12):1129-1137.

Tomita Y, Fukasawa S, Oya M, Uemura H, Shinohara N, Habuchi T, Rini BI, Chen Y, Bair AH, Ozono S, Naito S, Akaza H. Key predictive factors for efficacy of axitinib in first-line metastatic renal cell carcinoma: subgroup analysis in Japanese patients from a randomized, double-blind phase II study. *Jpn J Clin Oncol*. 2016. [Epub ahead of print

Huang M, Koizumi A, Narita S, Inoue T, Tsuchiya N, Nakanishi H, Numakura K, Tsuruta H, Saito M, Satoh S, Nanjo H, Sasaki T, Habuchi T. Diet-induced alteration of fatty acid synthase in prostate cancer progression. *Oncogenesis*. 2016;5:e195. doi: 10.1038/oncsis.2015.42

Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, Nanjo H, Takasuga S, Liu H, Eguchi S, Nakamura R, Itoh R, Ueno N, Asanuma K, Huang M, Koizumi A, Habuchi T, Yamazaki M, Suzuki A, Sasaki J, Sasaki T. INPP4B is a PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase that can act as a tumor suppressor. *Cancer Discov*. 2015;5(7):730-9. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-1329

Ishibashi Y, Tobisawa Y, Hatakeyama S, Ohashi T, Tanaka M, Narita S, Koie T, Habuchi T, Nishimura S, Ohyama C, Yoneyama T. Serum tri- and tetra-antennary N-glycan is a potential predictive biomarker for castration-resistant prostate cancer. *Prostate*. 2014;74(15):1521-9. doi: 10.1002/pros.22869. Epub 2014 Aug

Koie T, Mitsuzuka K, Narita S, Yoneyama T, Kawamura S, Tsuchiya N, Tochigi T, Habuchi T, Arai Y, Ohyama C. Efficiency of pretreatment risk stratification systems for prostate cancer in a Japanese population treated with radical prostatectomy. *Int J Urol*. 2015;22(1):70-3. doi: 10.1111/iju.12597.

Numakura K, Tsuchiya N, Akihama S, Inoue T, Narita S, Huang M, Satoh S, Habuchi T. Successful mammalian target of rapamycin inhibitor maintenance therapy following induction chemotherapy with gemcitabine and doxorubicin for metastatic sarcomatoid renal cell

carcinoma. *Oncol Lett.* 2014;8(1):464-466.

Yoneyama T, Ohyama C, Hatakeyama S, Narita S, Habuchi T, Koie T, Mori K, Hidari KI, Yamaguchi M, Suzuki T, Tobisawa Y. Measurement of aberrant glycosylation of prostate specific antigen can improve specificity in early detection of prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 448(4):390-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.107.

Kanda S, Tsuchiya N, Narita S, Inoue T, Huang M, Chiba S, Akihama S, Saito M, Numakura K, Tsuruta H, Satoh S, Saito S, Ohyama C, Arai Y, Ogawa O, Habuchi T. Effects of functional genetic polymorphisms in the CYP19A1 gene on prostate cancer risk and survival. *Int J Cancer.* 2015;136(1):74-82. doi: 10.1002/ijc.28952.

Tsuchiya N, Yuasa T, Maita S, Narita S, Inoue T, Numakura K, Saito M, Satoh S, Yonese J, Habuchi T. Organ-specific and tumor-size-dependent responses to sunitinib in clear cell renal cell carcinoma *BMC Urol.* 2014;14(1):26. doi: 10.1186/1471-2490-14-26

Chiba S, Tsuchiya N, Horikawa Y, Narita S, Inoue T, Akihama S, Saito M, Numakura K, Tsuruta H, Huang M, Satoh S, Habuchi T. Functional mononucleotide repeat polymorphism in the promoter region of HGF is associated with risk and malignant aggressiveness of bladder cancer. *Int J Oncol.* 2014;44(3):678-84. doi: 10.3892/ijo.2013.2221.

Hatakeyama S, Amano M, Tobisawa Y, Yoneyama T, Tsuchiya N, Habuchi T, Nishimura SI, Ohyama C. Serum N-glycan alteration associated with renal cell carcinoma detected by high-throughput glycan analysis. *J Urol.* 2014;191(3):805-13. doi: 10.1016/j.juro.2013.10.052.

〔学会発表〕(計4件)

第103回日本泌尿器科学会総会、2015年4月、金沢市：鈴木直子、土谷順彦、成田伸太郎、井上高光、齋藤満、秋濱晋、鶴田大、佐藤滋、羽瀧友則：進行性腎癌におけるアキシチニブの効果予測を目的とした血清バイオマーカーの探索

第32回 日本DDS学会学術集会、2016年6月、静岡市：喜早祐介、本間直子、鶴田

大、沼倉一幸、前野淳、齋藤満、成田伸太郎、井上高光、佐藤滋、羽瀧友則：進行腎癌におけるアキシチニブ治療効果に關与する血清バイオマーカーの探索

Annual Meeting of American Urological Association 2016, San Diego, CA, USA. 2016 May.: N. Honma, N. Tsuchiya, T. Inoue, S. Narita, M. Saito, H. Tsuruta, A. Maeno, S. Satoh, T. Habuchi: Exosomal miRNAs and serum cytokines as predictors for treatment outcomes in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with Axitinib.

第105回日本泌尿器科学会総会、2017年4月、鹿児島市：鈴木直子、土谷順彦、井上高光、鶴田大、前野淳、沼倉一幸、齋藤満、成田伸太郎、佐藤滋、羽瀧友則 転移性腎癌における治療効果を予測するバイオマーカーの探索

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~hinyoki/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

羽瀧友則 (HABUCHI, Tomonori)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00293861

(2)研究分担者

大山 力 (OHYAMA, Chikara)

弘前大学・医学研究科・教授
研究者番号：80282135

南條 博 (NANJO, Hiroshi)

秋田大学・医学部・准教授
研究者番号：70250892

黄 明国 (HUANG, Mingguo)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60448503

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし