慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	進行性透析腎癌のmTOR阻害薬抵抗性の克服に向けた基礎研究
Sub Title	Resistance to mTOR inhibitor in metastatic dialysis-related renal cell carcinoma
Author	水野, 隆一(Mizuno, Ryuichi) 大家, 基嗣(Oya, Mototsugu) 浅沼, 宏(Asanuma, Hiroshi)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では, 通常腎癌に比較して透析腎癌では血管密度が低くmTORの活性化の頻度が高いことが明らかとなった。加えて透析腎の尿細管では恒常的にmTORの活性化が確認され, 透析腎癌の発生にはこの恒常的活性化が反映されている可能性が示唆された。さらにはチロシンキナーゼ阻害剤への暴露によってmTOR経路がさらに活性化することが明らかとなり, 治療抵抗性の一因となっている可能性が示唆された。 In dialysis-related renal cell carcinoma, mTOR was more strongly activated compared with conventional renal cell carcinoma. In addition, constitutive activation was also found in renal tubular cell in dialysis kidney, which would affect dialysis-related cancer initiation. Tyrosine kinase inhibitors accelerated mTOR activation in dialysis-related renal cell carcinoma.
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2012～2014 課題番号：24592410 研究分野：泌尿器癌全般
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24592410seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月 １１ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４５９２４１０

研究課題名（和文）進行性透析腎癌のｍＴＯＲ阻害薬抵抗性の克服に向けた基礎研究

研究課題名（英文）Resistance to mTOR inhibitor in metastatic dialysis-related renal cell carcinoma

研究代表者
水野　隆一（Ryuichi, Mizuno）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：６０３８３８２４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、通常腎癌に比較して透析腎癌では血管密度が低くmTORの活性化の頻度が高いことが明らかとなった。加えて透析腎の尿細管では恒常的にmTORの活性化が確認され、透析腎癌の発生にはこの恒常的活性化が反映されている可能性が示唆された。さらにはチロシンキナーゼ阻害剤への暴露によってmTOR経路がさらに活性化することが明らかとなり、治療抵抗性の一因となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In dialysis-related renal cell carcinoma, mTOR was more strongly activated compared with conventional renal cell carcinoma. In addition, constitutive activation was also found in renal tubular cell in dialysis kidney, which would affect dialysis-related cancer initiation. Tyrosine kinase inhibitors accelerated mTOR activation in dialysis-related renal cell carcinoma.

研究分野：泌尿器癌全般

キーワード：透析腎癌

１．研究開始当初の背景
腎細胞癌（RCC）は抗癌剤や放射線治療に抵抗性であるため、転移性 RCC の治療にはサイトカイン療法が広く行われてきた。しかしながらその治療成績は良好とは言えず、新たな治療法が長く待ち望まれていた。近年の科学技術の発展により RCC の発生・進展のメカニズムが分子レベルで解明されると、VHL 遺伝子の不活性化から血管内皮増殖因子（VEGF）などが恒常的に産生されていることが明らかとなり、VEGF 経路をターゲットとした分子標的治療が開発されるようになった。また、哺乳類ラパマイシン標的蛋白質（mTOR）を阻害する新たな分子標的薬も治療に用いられている。透析腎癌は von Hippel Lindau（VHL）遺伝子の変異が少ないためチロシンキナーゼ阻害剤抵抗性となる場合が多く、mTOR 阻害薬にもほどなく抵抗性になってしまう。進行性透析腎癌治療における mTOR 阻害薬抵抗性のメカニズムとして、①mTOR 複合体 2 による治療抵抗性②JNK 恒常的活性化の阻害による抵抗性が予想されていた。

２．研究の目的
本研究では腎細胞癌組織における mTOR 複合体 2 及び JNK 阻害作用を持つホスファターゼである MKP-1 の発現を検討し、細胞実験にて mTOR 阻害薬と Akt 阻害薬あるいは MKP-1 阻害薬を併用することで抗腫瘍効果が増強されるかを検討した。最終的には mTOR 阻害薬抵抗性の克服を目的とした。

３．研究の方法
1)RCC 組織における mTOR、MKP-1 の発現および Akt の Ser473 リン酸化の検討
透析腎癌を含む RCC 症例のパラフィン切片を用いて、mTOR 阻害薬抵抗性のメカニズムとなっている可能性のある mTOR 複合体 2 およびそのターゲットである Ser473 リン酸化 Akt、あるいは MKP-1 の発現を免疫染色にて検討した。
2）mTOR 阻害薬と Akt 阻害薬あるいは MKP-1 阻害薬の併用による抗腫瘍効果の検討
透析腎癌および RCC 細胞株に mTOR 阻害薬と Akt 阻害薬あるいは MKP-1 阻害薬を同時に作用させ、MTT アッセイにて殺細胞効果を検討する。また、FACS にてアポトーシスの検出を行い、ウエスタンブロットや定量 PCR アレイにて細胞内シグナルの変化を検討した。
3）臨床データを含めた解析
透析腎腎癌のみならず通常腎癌の分子標的治療の臨床成績をまとめ、1)の基礎実験のデータと組み合わせた解析を行った。

４．研究成果
1）透析腎癌を含む症例に対する分子標的治療の現状
当施設ににおいて透析腎癌を含む進行性 RCC に対して分子標的療法が行われた症例の全生存率を検討したところ、ファーストラインからの全生存期間中央値は 1468 日（48.9 ヶ月）であった。サイトカイン療法時代と比較して明らかに生存期間が延長していることが明らかとなった。

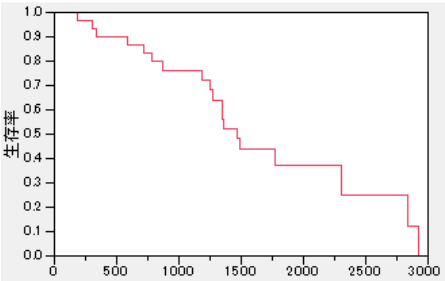

図１ファーストラインからの全生存曲線

また、透析腎癌を含む症例に対するサードライン以降のアキシチニブの無進行生存期間中央値は 5.6 ヶ月で、ほとんどの症例がサードライン以降の症例であっても腫瘍縮小効果が見られていることが明らかとなった。

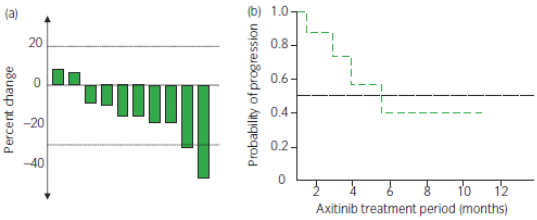

図２　a）アキシチニブによる腫瘍縮小率
　b)アキシチニブの無増悪生存曲線

2）透析腎癌を含む RCC 組織における mTOR 活性化に関する検討
透析腎癌を含む RCC 症例のパラフィン切片を用いてリン酸化 mTOR の免疫染色を行った。健常腎組織の尿細管においてリン酸化 mTOR はまばらに発現しているのみであった（図 3a）。一方、透析導入後の萎縮腎においてはリン酸化 mTOR が恒常的に発現しているのが明らかとなった（図 3b）。さらには後天性嚢胞においても強いリン酸化 mTOR の発現が確認された(図 3d)。通常の RCC においては低グレードの腫瘍では弱いリン酸化 mTOR の発現しか認められなかったが（図 3e)、ハイグレードの RCC においては透析腎癌と同じように強いリン酸化 mTOR の発現が確認された（図 3f)。これらの免疫染色の結果より、萎縮腎や後天性嚢胞腎においては mTOR が恒常的に活性化していることが明らかとなり、それらを発生母地とする透析腎癌も同じように mTOR が恒常的に活性化しているという性質を有していることが示唆された。この結果は透析腎癌に対する薬物治療の現状に一石を投じるものであり、進行性透析腎癌の薬物治療にはチロシンキナーゼ阻害薬よりもむしろ mTOR 阻害剤を第一選択薬とするほうが効果的かもしれないという可能性が示唆された。

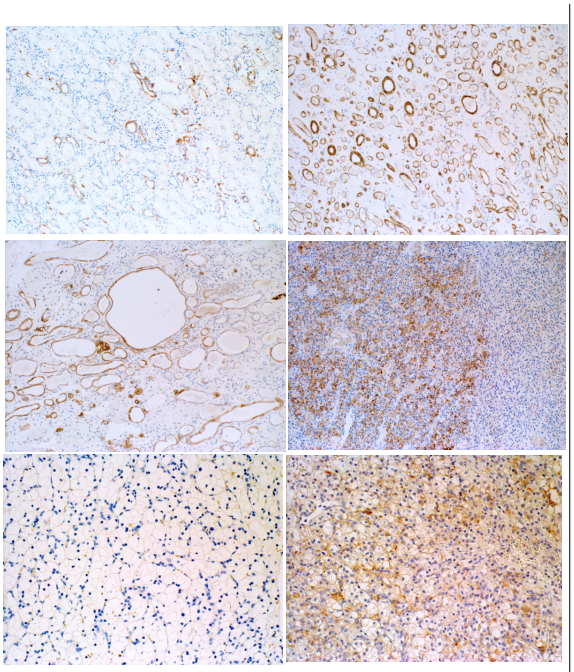

図３　腎癌組織における mTOR の活性化
a)左上　健常腎（尿細管）
b)右上　萎縮腎
c)左中　後天性嚢胞腎
d)右中　透析腎癌
e)左下　RCC（低グレード）
f)右下　RCC（ハイグレード）

3）mTOR 阻害薬と MKP-1 阻害薬の併用による抗腫瘍効果の検討
透析腎癌細胞株である KU20-02 を用いて mTOR 阻害薬と MKP-1 阻害薬の併用による抗腫瘍効果を検討した。KU20-02 に mTOR 阻害薬(mTORI)を作用させると WTT アッセイにて殺細胞効果が確認された。しかしながら mTORI と MKP1 阻害薬（MKP1-I）を併用しても殺細胞効果は増強されなかった。これらの結果から mTORI が通常の RCC のみならず透析腎癌に対しても殺細胞効果を有していることが示された。しかしながらその殺細胞効果は MKP1 経路の阻害では増強されないことが明らかとなった。

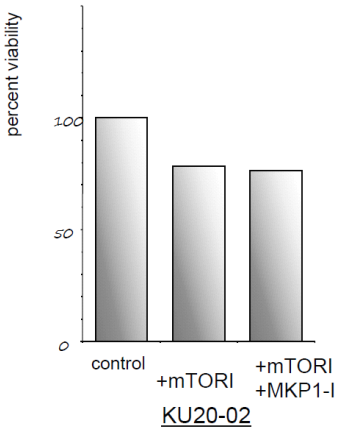

図３　透析腎癌細胞株に対する mTOR 阻害剤および MKP1 阻害剤による殺細胞効果の検討

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　3　件）

1. Mizuno R, Miyajima A, Oya M.：Activity of axitinib in patients with mRCC previously treated with both VEGFR-TKI and mTORI. 査読有.Int J Urol. 2014 July, 740.
2. Mikami S, Oya M, Mizuno R, Kosaka T, Katsube KI, Okada Y.： Invasion and metastasis of renal cell carcinoma. 査読有.Med Mol Morphol. 2013 Nov 9.
3. Suzuki K, Mizuno R, Suenaga K, Teruya T, Tanaka N, Kosaka T, Oya M.：Bisebromoamide, an extract from Lyngbya species, induces apoptosis through ERK and mTOR inhibitions in renal cancer cells. 査読有. Cancer Med. 2013 Feb;2(1):32-9.

〔学会発表〕（計　1　件）

1. 水野隆一、森田伸也、香野日高、中川健、林松彦、大家基嗣. 透析腎癌における mTOR の活性化の検討. 第 59 回日本透析医学会学術集会総会 平成 26 年 6 月 15 日 神戸国際会議場

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特になし

６．研究組織

(1)研究代表者

水野　隆一（MIZUNO, Ryuichi）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：60383824

(2)研究分担者

大家　基嗣（OYA, Mototsugu）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：00213885

浅沼　宏（ASANUMA, Hiroshi）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：70245570

(3)連携研究者

なし