

論 文 内 容 要 旨

Combination therapy using molecular-targeted drugs
modulates tumor microenvironment and
impairs tumor growth in renal cell carcinoma

(分子標的薬の併用療法は、腎細胞癌の癌微小環境を
制御して、癌の増殖を阻害する)

Cancer Medicine, 2017, in press.

主指導教員：松原 昭郎教授

(医歯薬保健学研究科 腎泌尿器科学)

副指導教員：安井 弥教授

(医歯薬保健学研究科 分子病理学)

副指導教員：亭島 淳准教授

(医歯薬保健学研究科 腎泌尿器科学)

北野 弘之

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景と目的】チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) と mTOR 阻害剤 (mTORi) は進行性腎細胞癌に対する代表的な分子標的薬であるが、単剤での治療効果には限界があり、併用療法など新たな戦略が急務となっている。これらの薬剤の主な作用機序が、癌細胞増殖だけでなく血管新生に関わる分子の阻害であるとされてきた事からわかるように、これらの薬剤が癌細胞を取り巻く間質すなわち癌微小環境に対してどのような影響を及ぼすのか、さらなる理解を深めることは新たな治療戦略を探る上で極めて重要である。そのような中、最近、癌間質への癌細胞の作用として、これまで考えられてきた古典的な血管新生だけでなく、癌細胞が血管周囲を覆う周皮細胞の血管透過性を亢進させ癌間質への薬剤移行を抑制する事、癌細胞が正常組織から癌関連線維芽細胞 (CAF) を誘導して癌の進展を促す環境を作る事、これらの作用が CAF や周皮細胞の血小板由来増殖因子受容体 (PDGF-R β) を介するものである事が消化器癌の研究から明らかになっている。そこで、本研究では、TKI と mTORi による腎細胞癌の癌微小環境、特に CAF、血管、周皮細胞、細胞外基質への影響を組織学的に解析するとともに、腎細胞癌に対する両薬剤の併用効果を明らかにすることを目的とした。

【方法】*in vitro*の実験:ルシフェラーゼ発現ヒト腎癌細胞株 Caki-1 における PDGF-B の産生と PDGF-R β の発現、ならびに mTOR 蛋白、S6 蛋白、PDGF-R β のリン酸化に対する mTORi (エベロリムス:Ev)、TKI (スニチニブ:Su) の影響をウエスタンブロット法で解析した。さらに、Caki-1 の培地に Ev と Su を単独または同時に添加して Caki-1 に対する両薬剤の増殖抑制効果を MTT assay にて検討した。*in vivo*の実験:Caki-1 の同所移植マウスを作製し、無治療群、Ev 群、Su 群、併用群の 4 群 (各群 10 匹) に分けて薬剤を 4 週間投与し、投与期間中の癌細胞数を 2 週間毎に In Vivo Imaging System (IVIS) を用いて計測した。投与終了後、腫瘍を摘出し、腫瘍重量を計測するとともに、癌細胞数を Ki67 labeling Index (Ki67LI) によって組織学的に解析した。また、Caki-1 による間質反応として CAF の誘導、血管周囲を被覆する周皮細胞の割合の変化、細胞外基質量の変化を、それぞれ α SMA、desmin、type1-collagen に対する抗体を用いた免疫染色で定量的に評価した。Caki-1 によ

る血管新生への影響については、CD31 に対する抗体を用いた免疫染色で血管数を指標として定量評価した。さらに CAF と周皮細胞における PDGF-R β の発現について、CAF では抗 α SMA 抗体と抗 PDGF-R β 抗体、周皮細胞では抗 desmin 抗体と抗 PDGF-R β 抗体による蛍光 2 重免疫染色で定性的に評価した。

【結果】 Caki-1 細胞は PDGF-B を産生し、PDGF-R β を発現していた。Caki-1 細胞における mTOR および S6 蛋白のリン酸化は Ev によって抑制されたが、Su では抑制されなかった。逆に、PDGF-R β のリン酸化は Ev で抑制されず、Su によって抑制された。いずれの薬剤も単独で Caki-1 の細胞増殖を濃度依存性に抑制したが、Ev（最大発育阻止濃度の 1/2）と Su（同 1/5）を併用することで単独投与時と同程度の増殖抑制効果が発揮された。

同所移植マウスから摘出した腫瘍重量は Ev 群より Su 群で有意に低値であり、併用群は単独群より有意に低値であった。一方、IVIS で測定した癌細胞数、Ki67LI で組織学的に評価した癌細胞数はいずれも Su 群より Ev 群で有意に低値であった。単独群と併用群を比較すると、摘出腫瘍重量、癌細胞数のいずれについても併用群は単独群よりも有意に低値であった。蛍光 2 重免疫染色による検討では、CAF と周皮細胞はいずれも PDGF-R β を発現していた。Caki-1 による間質反応のうち、CAF の誘導と細胞外基質量の増加は Su 群で有意に抑制されていたが、Ev 群では全く抑制効果を示さなかった。周皮細胞の割合は、Ev 群よりも Su 群で有意に抑制されていた。血管新生抑制効果は Ev 群よりも Su 群が高かったが有意には至らなかった。併用群では Caki-1 による間質反応、血管新生のいずれにおいても、単独投与と比較して有意な抑制が認められた。

【結論】 腎細胞癌に対するエベロリムスは癌細胞を、スニチニブは癌間質をそれぞれ主たる標的にすること、両薬剤の併用は単独に比較して有意に強力な抗腫瘍効果を発揮することが明らかになった。これらの結果は、mTORi と TKI の併用が癌微小環境全体を標的とした進行性腎細胞癌に対する新たな治療戦略として有望であることを示すものである。