Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Molecular mechanism mediating cytotoxic activity of axitinib in sunitinib-resistant human renal cell carcinoma cells

Miyazaki, A.

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2016-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第6688号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006688

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Molecular mechanism mediating cytotoxic activity of axitinib in sunitinib-resistant human renal cell carcinoma cells

Sunitinib 耐性腎細胞癌に対する Axitinib の抗腫瘍効果発現機序の解析

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
腎泌尿器科学
（指導教員：藤澤　正人教授）

宮崎　彰

【背景】

転移性腎細胞癌症例に対しては、これまでインターフェロンαやインターロイキン-2 などを中心としたサイトカイン療法が行われてきた。しかし、近年では腎細胞癌発癌のメカニズムに基づき多数の分子標的薬が開発され臨床応用されている。そのなかでも、経口チロシンキナーゼ阻害薬（TKI）であるスニチニブは転移性腎細胞癌症例に対する一次治療として多くの症例に使用される薬剤である。しかし、スニチニブを含む分子標的薬による治療を行った転移性腎細胞癌症例の多くは腫瘍がそれらの薬剤への抵抗性を獲得することにより最終的に病勢の増悪を認めさらなる別の薬剤への変更が必要となる。スニチニブを含む一次治療抵抗性腎細胞癌症例におけるアキシチニブとソラフェニブの第Ⅲ相試験（AXIS trial）の結果、アキシチニブはソラフェニブと比較して無増悪生存期間を 6.7 か月 vs 4.7 か月と有意に延長し、一次治療としてスニチニブを投与した群においても同様に無増悪生存期間を 4.8 か月 vs 3.4 か月と有意に延長した。そのような結果を鑑みて、現在の診療ガイドラインではスニチニブを含むチロシンキナーゼ阻害薬に抵抗性を獲得した腎細胞癌症例に対する二次治療としてアキシチニブが推奨されている。アキシチニブはスニチニブと比べ血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）-1, -2, -3 をより強力かつ選択的に阻害することが知られているが、スニチニブ抵抗性を獲得した腎細胞癌に対してアキシチニブが抗腫瘍効果を示す分子機構はいまだ明らかにされていない。

【目的】

本論文の目的は、ヒト由来腎細胞癌株の母細胞株およびスニチニブ耐性腎細胞株を用いてそれぞれの細胞株に対するスニチニブおよびアキシチニブの抗腫瘍効果を検討し、それぞれの薬剤の投与前後における分子像の変化を解析することでスニチニブ耐性腎細胞癌に対してアキシチニブが抗腫瘍効果を示す分子機構を明らかにすることである。

【方法】

腫瘍細胞はヒト由来腎細胞癌株 ACHN の母細胞株 ACHN/P および我々が以前に樹立 *(BJU Int 2013; 112: E211-20)* した ACHN スニチニブ抵抗性株（ACHN/R）を用いた。両細胞株にスニチニブもしくはアキシチニブを投与した際の細胞増殖を解析することで両薬剤の治療効果を検討した。また、Western Blot Analysis を用いて ACHN/P および ACHN/R におけるスニチニブおよびアキシチニブ投与時の Akt、リン酸化 Akt、p42/44 MAPK、リン酸化 p42/44 MAPK、STAT 3、リン酸化 STAT 3 の変化を解析した。VEGFR-2 およびリン酸化 VEGFR-2 については ELISA を用いて比較を行った。次に ACHN/P および ACHN/R を皮下に播種させたヌードマウスを作成し、それぞれスニチニブ群、アキシチニブ群にわけて 4 週間の治療を行い、治療過程の腫瘍体積を測定することでマウスにおける治療効果を比較、解析した。薬剤での治療後、マウスを安楽死させ腫瘍を摘出し、腫瘍組織におけるリン酸化 p42/44-MAPK、リン酸化 VEGFR-2、CD-31 および Ki-67 の発現について免疫組織化学染色法を用いて比較

検討を行った。また、TUNEL 法を用いることでアポトーシス細胞を検出、比較解析を行った。

【結果】

ACHN/R のスニチニブに対する IC50 は ACHN/P に比し約 6 倍上昇していたがアキシチニブには明らかな交叉耐性を認めなかった。ACHN/P および ACHN/R におけるリン酸化 Akt およびリン酸化 STAT 3 の発現量はスニチニブを投与した場合とアキシチニブを投与した場合のいずれも低く、明らかな差を認めなかった。一方で、p42/44 MAPK および VEGFR-2 のリン酸化は ACHN/P においてはスニチニブ、アキシチニブの両剤で阻害されていたが ACHN/R においてはスニチニブ投与下ではいずれも維持されていた。しかしながら、ACHN/R にアキシチニブを投与した場合は p42/44 MAPK および VEGFR-2 のリン酸化阻害が認められた。ACHN/R において MAPK キナーゼ阻害薬である U-0126 とスニチニブもしくはアキシチニブを併用したところ、U-0126 の併用により ACHN/R のスニチニブに対する感受性は明らかに増強した。ヌードマウスを用いた実験では、ACHN/R のアキシチニブ群の腫瘍体積はスニチニブ群に比べ有意に小さくアキシチニブの治療効果が確認できた。また、腫瘍の免疫組織化学染色では ACHN/R のスニチニブ群でリン酸化 p42/44 MAPK およびリン酸化 VEGFR-2 の発現が他の 3 群に比べ維持されていた。さらに、血管新生およびアポトーシスについて検討したところ、TUNEL 法では 4 群に明らかな差を認めなかったが Ki-67 はアキシチニブ群ではスニチニブ群に比べ ACHN/P および ACHN/R において発現が抑制されていた。また CD-31 の発現は ACHN/P では明らかな差を認めなかったが ACHN/R においてはスニチニブ群に比べアキシチニブ群で有意に抑制されていた。

【考察】

アキシチニブは他のチロシンキナーゼ阻害薬に比べ VEGFR-1、-2、-3 により選択的に作用し、VEGFR-2 のリン酸化や血管新生を阻害することで腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することが認められており、第Ⅲ相試験である AXIS trial の結果から転移性腎細胞癌症例に対する二次治療として多く用いられている薬剤である。しかしながら一次治療に抵抗性を獲得した腎細胞癌症例に対する抗腫瘍効果を示す分子機構についての知見は限られている。今回我々はスニチニブ耐性ヒト腎細胞癌細胞株におけるアキシチニブの作用を分子的に解明した。

我々の以前の研究では、スニチニブ耐性腎細胞癌細胞株 ACHN/R はソラフェニブに対して交叉耐性を有していた。しかし、本研究ではアキシチニブに対しては母細胞株である ACHN/P と ACHN/R の間で薬剤感受性に明らかな差を認めなかった。このことから、ACHN/R は一次治療として投与されたスニチニブに抵抗性を獲得した腎細胞癌に対してアキシチニブが示す抗腫瘍効果の分子機構を解明するうえで適切であると考えられた。

今日までにいくつかの報告で腎細胞癌の薬剤耐性にはシグナル伝達系が関与していることが指摘されていることから、我々はまず ACHN/P および ACHN/R にスニチニブ、アキシチニブを投与した際の主要なシグナル伝達経路への影響について検討した。すると、ACHN/R にアキシチニブを投与した際の p42/44 MAPK のリン酸化がスニチニブ投与時に比べ有意に阻害されていることが明らかとなり、MAPK キナーゼ阻害薬を併用することで ACHN/R のスニチニブに対する薬剤抵抗性が減弱することが示された。次にアキシチニブが他のチロシンキナーゼ阻害薬に比べ VEGFRs に高い選択性と阻害作用を持つことから、それぞれの細胞株における VEGFR-2 およびリン酸化 VEGFR-2 の発現量について比較検討を行ったところ ACHN/R におけるリン酸化 VEGFR-2 のタンパク発現量はスニチニブ投与時と比較し、アキシチニブ投与時に明らかに下方制御されていた。*In vivo* の腫瘍組織の免疫組織化学染色でも p42/44 MAPK および VEGFR-2 のリン酸化は *in vitro* で得られた結果と同様であった。また、血管新生について腫瘍組織における CD-31 の発現量を検討した結果、ACHN/R ではスニチニブ群に比べアキシチニブ群で有意に抑制されておりスニチニブ耐性を獲得した後もアキシチニブによる血管新生阻害作用が得られる可能性が示唆された。これらのことからスニチニブ耐性腎細胞癌細胞におけるアキシチニブの抗腫瘍効果は MAPK 経路の不活性化および VEGFR-2 の不活性化が一因であると考えられた。

【結論】

アキシチニブは腎細胞癌細胞がスニチニブ耐性を獲得した後も、シグナル伝達系の阻害などの機序によりその抗腫瘍効果を発現すると考えられた。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2590号	氏　名	宮崎　彰
論文題目 Title of Dissertation	Molecular mechanism mediating cytotoxic activity of axitinib in sunitinib-resistant human renal cell carcinoma cells Sunitinib 耐性腎細胞癌に対する Axitinib の抗腫瘍効果発現機序の解析		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 掛地吾弘 副　査 Vice-examiner 南 樹信 副　査 Vice-examiner 佐々木良平		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

背景：経口チロシンキナーゼ阻害薬（TKI）であるスニチニブは転移性腎細胞癌症例に対する一次治療として多くの症例に使用される薬剤である。スニチニブを含む一次治療抵抗性腎細胞癌症例におけるアキシチニブとソラフェニブの第Ⅲ相試験（AXIS trial）の結果、アキシチニブはソラフェニブと比較して無増悪生存期間を 6.7 か月 vs 4.7 か月と有意に延長し、一次治療としてスニチニブを投与した群においても同様に無増悪生存期間を 4.8 か月 vs 3.4 か月と有意に延長した。アキシチニブはスニチニブと比べ血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）-1, -2, -3 をより強力かつ選択的に阻害することが知られているが、スニチニブ抵抗性を獲得した腎細胞癌に対してアキシチニブが抗腫瘍効果を示す分子機構はいまだ明らかにされていない。

目的：本論文の目的は、ヒト由来腎細胞癌株の母細胞株およびスニチニブ耐性腎細胞株を用いてそれぞれの細胞株に対するスニチニブおよびアキシチニブの抗腫瘍効果を検討し、それぞれの薬剤の投与前後における分子像の変化を解析することでスニチニブ耐性腎細胞癌に対してアキシチニブが抗腫瘍効果を示す分子機構を明らかにすることである。

方法：腫瘍細胞はヒト由来腎細胞癌株 ACHN の母細胞株 ACHN/P および我々が以前に樹立 *(BJU Int 2013; 112: E211-20)* した ACHN スニチニブ抵抗性株（ACHN/R）を用いた。次に ACHN/P および ACHN/R を皮下に播種させたヌードマウスを作成し、それぞれスニチニブ群、アキシチニブ群にわけて 4 週間の治療を行い、治療過程の腫瘍体積を測定することでマウスにおける治療効果を比較、解析した。

結果：ACHN/R のスニチニブに対する IC50 は ACHN/P に比し約 6 倍上昇していたがアキシチニブには明らかな交叉耐性を認めなかった。ACHN/P および ACHN/R におけるリン酸化 Akt およびリン酸化 STAT 3 の発現量はスニチニブを投与した場合とアキシチニブを投与した場合のいずれも低く、明らかな差を認めなかった。一方で、p42/44 MAPK および VEGFR-2 のリン酸化は ACHN/P においてはスニチニブ、アキシチニブの両剤で阻害されていたが ACHN/R においてはスニチニブ投与下ではいずれも維持されていた。しかしながら、ACHN/R にアキシチニブを投与した場合は p42/44 MAPK および VEGFR-2 のリン酸化阻害が認められた。ACHN/R において MAPK キナーゼ阻害薬である U-0126 とスニチニブもしくはアキシチニブを併用したところ、U-0126 の併用により ACHN/R のスニチニブに対する感受性は明らかに増強した。ヌードマウスを用いた実験では、ACHN/R のアキシチニブ群の腫瘍体積はスニチニブ群に比べ有意に小さくアキシチニブの治療効果が確認できた。また、腫瘍の免疫組織化学染色では ACHN/R のスニチニブ群でリン酸化 p42/44 MAPK およびリン酸化 VEGFR-2 の発現が他の 3 群に比べ維持されていた。さらに、血管新生およびアポトーシスについて検討したところ、TUNEL 法では 4 群に明らかな差を認めなかったが Ki-67 はアキシチニブ群ではスニチニブ群に比べ ACHN/P および ACHN/R において発現が抑制されていた。また CD-31 の発現は ACHN/P では明らかな差を認めなかったが ACHN/R においてはスニチニブ群に比べアキシチニブ群で有意に抑制されていた。

考察：今日までにいくつかの報告で腎細胞癌の薬剤耐性にはシグナル伝達系が関与していることが指摘されていることから、我々はまずACHN/PおよびACHN/Rにスニチニブ、アキシチニブを投与した際の主要なシグナル伝達経路への影響について検討した。すると、ACHN/Rにアキシチニブを投与した際のp42/44 MAPKのリン酸化がスニチニブ投与時に比べ有意に阻害されていることが明らかとなり、MAPKキナーゼ阻害薬を併用することでACHN/Rのスニチニブに対する薬剤抵抗性が減弱することが示された。次にアキシチニブが他のチロシンキナーゼ阻害薬に比べVEGFRsに高い選択性と阻害作用を持つことから、それぞれの細胞株におけるVEGFR-2およびリン酸化VEGFR-2の発現量について比較検討を行ったところACHN/Rにおけるリン酸化VEGFR-2のタンパク発現量はスニチニブ投与時と比較し、アキシチニブ投与時に明らかに下方制御されていた。*In vivo*の腫瘍組織の免疫組織化学染色でもp42/44 MAPKおよびVEGFR-2のリン酸化は*in vitro*で得られた結果と同様であった。また、血管新生について腫瘍組織におけるCD-31の発現量を検討した結果、ACHN/Rではスニチニブ群に比べアキシチニブ群で有意に抑制されておりスニチニブ耐性を獲得した後もアキシチニブによる血管新生阻害作用が得られる可能性が示唆された。これらのことからスニチニブ耐性腎細胞癌細胞におけるアキシチニブの抗腫瘍効果はMAPK経路の不活性化およびVEGFR-2の不活性化が一因であると考えられた。

結論：アキシチニブは腎細胞癌細胞がスニチニブ耐性を獲得した後も、シグナル伝達系の阻害などの機序によりその抗腫瘍効果を発現すると考えられた。

本研究は、転移性腎細胞癌症例に対する経口チロシンキナーゼ阻害薬（TKI）の薬剤耐性と抗腫瘍効果を示す分子機構について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。