

【44】

氏 名	ふる や のぶ たか 古 谷 信 隆
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	乙第724号
学位授与の日付	平成26年2月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	Serum interferon alpha receptor 2 mRNA may predict efficacy of interferon alpha with/without low-dose sorafenib for metastatic clear cell renal cell carcinoma （血中インターフェロンα2型受容体mRNAは、転移性淡明細胞型腎細胞癌に対するインターフェロンα±低用量ソラフェニブ療法の治療効果予測となり得る）
論文審査委員	（主査）教授 加藤 広行 （副査）教授 今井 裕 教授 安西 尚彦

論文内容の要旨

【背景】

腎細胞癌（RCC）は一般に外科的治療の適応と考えられている。しかし手術時限局性であった患者のうち約30%は、3年以内に転移へと進展している。これは限局性RCCにおいて、高い頻度で診断時にすでに微小転移しているか、あるいは腎摘除術後に再発しやすいからである。遠隔転移を伴った腎細胞癌患者は予後不良で5年生存率は10%に満たない。RCCは化学療法と放射線療法に抵抗性がある一方で、RCCは免疫誘導能が高い癌と考えられるため、その治療法はインターフェロン（IFN） α を用いる免疫サイトカイン療法がこれまで中心であった。2008年に分子標的薬のソラフェニブ（Sor）、スニチニブが保険収載が承認され治療の選択肢が増えた。RCCは予後と治療効果を適切に予測するバイオマーカーの検索が盛んに行われているが今のところ確立されていない。

【目的】

IFN α はIFN- α 受容体（IFNAR）と結合することによって生物学的活性を発揮する。申請者らは、IFNAR2 mRNAの発現量が腫瘍部で増加している群ではRCCの進展と転移能に関連し、またIFN α への反応性が低いことを報告した。

今回の検討ではquantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction（qRT-PCR法）を用い、血中、摘出組織中の腫瘍部（T）と非腫瘍部（N）でのIFNAR2 mRNA発現量を測定し、

転移性RCCの臨床病理学的因子との関連性を検討すると同時に、IFN α ±低用量Sor療法の有効性についての予測因子となるかについても検討した。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学生命倫理審査委員会の承認を得て実施した。2008年から2010年の間に腎細胞癌で摘除術を行った症例のうち、淡明細胞癌と病理診断され、血液と組織を本研究のために用いることに対しての同意を得られた66例（男性39例・女性27例、年齢平均62.9歳）を対象とした。26例の遠隔転移症例に対しては全腎摘術後IFN α 療法を行った。投与は天然型IFN α を300、500、600万単位のいずれかの量で2～3回/週、静注か筋注にて投与した。IFN α 単独療法にて効果が低い21症例に対しては、IFN α に低用量Sorを上乗せする形での治療を行った（Sor 400mg/日）。Grade 3あるいは4の副作用を認める場合はIFN α 、Sorを減量した。IFN α ±低用量Sor療法開始後追跡調査を行った。2から3ヶ月ごとに採血し測定した。治療効果については、RECIST基準に従って評価した。

血液及び組織より抽出したトータルRNAをcDNAに転写した後、qRT-PCR法を行った。Control RNAを用い標準曲線を作成しIFNAR2 mRNAの相対的発現量を求めた。各サンプルは β アクチンを用いて補正を行った。

同一人での血液中、およびT、N組織中のIFNAR2 mRNAの発現量を求め比較検討した。組織でのIFNAR2の発現量はN部での発現量に対する、T部での発現量の比（T/N比）を用い算出した。

phosphorylated-Akt (Ser-473) (p-Akt)、Akt、phosphorylated-S6 ribosomal protein (Ser-235/236) (p-S6) の発現量に関しては、15例の転移症例 (M1) と4例の非転移症例 (M0) での手術検体を用いて、Western blotting法にて検討を行った。RCCのTとN由来蛋白を電気泳動で分離し、それぞれに対する抗体を用い化学発光法にて検出した。測定した腫瘍組織での各蛋白発現量を比較するために、正常組織を1.0として相対的発現量を求めた。

統計学的解析は、3群間はKruskal-Wallis testを用い2群間はMann-Whitney U testを用い検討した。血液及び組織のIFNAR2 mRNA、血清中CRP値、p-S6、p-Akt、腫瘍サイズについては、スピアマンの順位相関係数分析法にて解析を行った。生存率についてはKaplan-Meier法によるlog-rank testにて比較検討した。すべての解析において、 $P < 0.05$ を有意とした。

【結 果】

血中IFNAR2 mRNAの発現量は、腫瘍組織中IFNAR2 mRNAの発現量とは相関がなかった。また血清CRP値とも相関がなかったが、腫瘍サイズと有意に正の相関を認めた ($P < 0.05$)。血中IFNAR2 mRNA発現量はgrade、pT、転移の有無、顕微鏡的脈管浸潤とは相関がなかった。一方腫瘍組織中IFNAR2 mRNAの発現量はgrade、pT、転移の有無、顕微鏡的脈管浸潤、血清CRP値と正の相関を認めた ($P < 0.05$)。

腫瘍部でのp-S6、p-Aktの発現量は非転移群に比べ転移群で有意に高かった。対照的にAktは非転移群と転移群で差がなかった。血中IFNAR2 mRNAの発現量は、腫瘍組織中のp-Akt、p-S6発現量と負の相関を呈する傾向を認めた (各々 $P = 0.09$, $P = 0.33$)。腫瘍組織中IFNAR2 mRNAの発現量は、p-S6とは正の相関を認めたが ($P < 0.05$)、p-Aktの発現量とは、正の相関を呈する傾向にとどまった

($P=0.09$)。また腫瘍組織中のp-Aktの発現量はp-S6の発現量と正の相関を認めた ($P<0.05$)。Kaplan-Meier法では、転移症例群において、IFN- α 療法奏効群は不応群より有意に生存期間の延長を認めた ($P<0.05$)。IFN- α 療法抵抗症例群に対して行ったIFN- α + 低用量Sor療法において、奏効群は、不応群より有意に生存率が高かった ($P<0.001$)。このようにIFN- α ± 低用量Sor療法に奏効する群は全体的に全生存期間の延長を認めた。

IFN- α 療法奏効群と不応群との比較においては、血中IFNAR2 mRNA発現量に有意差を認めないが、腫瘍組織中IFNAR2 mRNA発現量では不応群において高値を認めた ($P<0.05$)。IFN- α ± 低用量Sor療法の治療効果に対して、血中IFNAR2 mRNA発現量は不応群で低値、奏効群で高値であった ($P<0.0001$)。腫瘍組織中IFNAR2 mRNA発現量は不応群で高値、奏効群で低値であった ($P<0.05$)。血中IFNAR2 mRNA発現量はIFN- α 療法奏効群及びIFN- α ± 低用量Sor療法奏効群に比べ、IFN- α + 低用量Sor療法不応群で低値であった ($P<0.005$)。腫瘍組織中IFNAR2 mRNA発現量はIFN- α 療法奏効群及びIFN- α + 低用量Sor療法奏効群に比べ、IFN- α + 低用量Sor療法不応群で高値であった ($P<0.01$)。血中IFNAR2 mRNA発現量を経時的に測定するとIFN- α ± 低用量Sor療法奏効群は不応群に比べ高値を示していた。腫瘍組織中p-Akt発現量はIFN- α ± 低用量Sor療法奏効群において、不応例よりも有意に低値を認めた ($P<0.05$)。一方腫瘍組織中のp-S6発現量はIFN- α ± 低用量Sor療法奏効群において、不応例よりも低値の傾向を認めた。Kaplan-Meier法において、血中IFNAR2 mRNA発現量が高い群、腫瘍組織中IFNAR2 mRNA発現量が低い群、腫瘍組織中p-Akt発現量低値群、p-S6発現量低値群では有意に全生存期間の延長を認めた (各々 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.05$)。

【考 察】

RCCの進行には、mTOR経路の活性が関与している。一方IFN α の作用発現にはmTOR経路を介したmRNAの翻訳が必要とされている。mTOR経路にはmTORC1、mTORC2があり、それぞれ増殖と生存に関連するといわれている。しかしIFNAR2の活性化がどのようにRCCの進行に、そして治療への抵抗性に関連があるのかは解明されていない。またIFNAR2がどのようにmTORC1とmTORC2と相互作用するかは不明である。今回の検討ではmTORC1、mTORC2を直接測定できる良い抗体が無いため、代わりに各々の下流に位置するp-S6、p-Aktを測定し検討した。その結果IFN- α ± 低用量Sor治療に抵抗性を示した群において、腫瘍組織中のp-Aktの発現量が高かった。また転移症例において、腫瘍組織中IFNAR2 mRNA発現量と腫瘍組織中p-S6の発現量は有意に正の相関を示していた。p-Aktの発現量が高い群で治療抵抗性症例が多いことより、IFNAR2-mTORC2経路が治療の奏効と関係していることを示唆していると考えられる。またp-S6の発現量が高い群で転移症例が多いことより、p-S6を経たIFNAR2- mTORC1経路がmRNA翻訳を修正することによって腫瘍内での増殖と転移を促進している可能性を示唆していると考えられる。

一方今回の実験ではIFN- α がどのように末梢血細胞のIFNAR2と結合し、抗腫瘍効果を示すかは解明することができなかった。しかし手術前の血中IFNAR2 mRNAが腫瘍サイズと相関し、さらに血中IFNAR2 mRNAの高い群ではIFN- α ± 低用量Sor療法に対して反応性が高く全生存期間が有意に長かったことより、血中IFNAR2 mRNAは予後予測因子としても有用であり、さらに治療効果に対す

る反応性の予測因子としても有用であることが推測された。

【結 論】

血中IFNAR2 mRNA発現量は転移性RCCに対するIFN- α ±低用量Sor療法の効果を予測する有用なマーカーとなりうることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

腎細胞癌（RCC）は化学療法と放射線療法に抵抗性がある一方で、免疫誘導能が高い癌であると考えられるため、その治療法はインターフェロン（IFN）- α を用いる免疫サイトカイン療法がこれまで中心であった。しかし、2008年に分子標的薬のソラフェニブ（Sor）、スニチニブの保険収載が承認され治療の選択肢が増えた。RCCは予後と治療効果を適切に予測するバイオマーカーの検索が盛んに行われているが今のところ確立されていない。

申請者は、IFN α 2型受容体 mRNAの発現量（IFNAR2 mRNA）が腫瘍部で増加している群ではRCCの進展と転移能に関連し、またIFN- α 療法への反応性が低いことを2007年に報告した。今回の検討では腎摘除術を行った症例のうち、淡明腎細胞癌と病理診断された66例を対象とした。26例の遠隔転移症例に対しては全例腎摘除術後IFN- α 療法を行った。IFN α 単独療法にて効果が低い21症例に対しては、IFN- α と低用量Sor併用療法を行った（Sor 400 mg/日）。さらに IFN- α ±低用量Sor療法開始後追跡調査を行った。治療効果については、RECIST基準に従って評価した。血液中、摘出組織中の腫瘍部（T）と非腫瘍部（N）より、qRT-PCR法を用いIFNAR2 mRNAを測定した。phosphorylated-Akt（Ser-473）（p-Akt）、Akt、phosphorylated-S6 ribosomal protein（Ser-235/236）（p-S6）の発現量に関しては、15例の転移例と4例の非転移例の摘出検体を用いて、Western blotting法にて検討を行った。血液中IFNAR2 mRNAは、腫瘍組織中IFNAR2 mRNAおよび血清CRP値と相関は認められなかったが、腫瘍サイズと有意に正の相関を認めた（ $P < 0.05$ ）。血液中IFNAR2 mRNAはgrade、pT、転移および顕微鏡的脈管浸潤の有無とは有意差がなかった。血液中IFNAR2 mRNAはIFN- α ±低用量Sor療法に不応群で低値、奏効群で高値であった（ $P < 0.0001$ ）。一方腫瘍組織中IFNAR2 mRNAは grade、pT、転移の有無、顕微鏡的脈管浸潤、血清CRP値で有意差が認められた（ $P < 0.05$ ）。腫瘍部でのp-S6の発現量は非転移群に比べ転移群で高かった。腫瘍組織中IFNAR2 mRNAはIFN- α 療法奏効群及びIFN- α +低用量Sor療法奏効群に比べ、IFN- α +低用量Sor療法不応群で高値であった（ $P < 0.01$ ）。腫瘍組織中p-AktはIFN- α ±低用量Sor療法奏効群において、不応群よりも有意に低値であった（ $P < 0.05$ ）。Kaplan-Meier法による解析において、血液中IFNAR2 mRNAが高い群、腫瘍組織中IFNAR2 mRNAが低い群、腫瘍組織中p-Akt低値群、p-S6低値群では有意に全生存期間の延長を認めた（各々 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ ）。血液中IFNAR2 mRNAは転移性RCCに対するIFN- α ±低用量Sor療法の効果を予測する有用なマーカーとなりうることが示唆された。

【研究方法の妥当性】

腎摘除術を行った症例のうち、淡明腎細胞癌と病理学的に診断された66例の血液と組織を対象としている。RCC摘出組織については組織染色を行い、局在を確認した上で腫瘍部と非腫瘍部に分けRNAを抽出し、qRT-PCR法を行っている。さらに必ず β アクチンを内部標準に置き、補正したのちIFNAR2 mRNAを求めている。Western-blotting法では定量に用いる蛋白量を一定に調整した上で電気泳動を行っている。さらに測定した腫瘍組織での発現量を比較するために、正常組織を1.0として相対的発現量を求めている。また研究結果については客観的な統計解析を行っており、本研究方法は妥当といえる。本研究においては全例インフォームドコンセントを得ており、倫理的にも問題ないと判断される。

【研究結果の新奇性・独創性】

RCCは予後と治療効果を適切に予測するマーカーの報告はない。申請論文は、RCC症例においてIFNAR2 mRNAを血液中、腫瘍部および非腫瘍部組織より測定し、腫瘍サイズ、grade、pT、転移および顕微鏡的脈管浸潤の有無との関係を検討するのみではなく、26例の遠隔転移例に対しては腎摘除術後IFN- α 療法を行い、さらにIFN- α 単独療法にて効果が低い21例に対してはIFN- α と低用量Sor併用療法を行い治療効果の予測因子となるかについても探求している。血液中IFNAR2 mRNAが腫瘍サイズと相関し、さらに高い群ではIFN- α ±低用量Sor療法に対して反応性が高く全生存期間が有意に長い結果より、血液中IFNAR2 mRNAは治療効果を予測する有用なマーカーとなりうると結論づけている。これらの点において本研究は新奇性と独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文は、多数の症例を適切な内部標準を置き、確立された実験手法と統計解析を用いて血中IFNAR2 mRNA発現量が、転移性腎細胞癌に対するIFN- α ±低用量Sor療法の効果を予測する有用なマーカーとなりうるかを検討している。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、また、腫瘍学、生化学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置づけ】

遠隔転移を伴ったRCCは予後不良で5年生存率は10%に満たない。申請論文では、RCC症例の血液中、摘出組織中の腫瘍部と非腫瘍部でのIFNAR2 mRNA発現量を測定し、転移性RCCの臨床病理学的因子との関連性を検討すると同時に、IFN- α ±低用量Sor療法の有効性についての予測因子となるかについて検討し有用性を明らかにしている。これらの研究成果は泌尿器科学領域において新たな知見であり、腫瘍学の基礎的研究にも寄与し、ひいては今後の進歩に大いに貢献する意義深く優れた研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、泌尿器科学や生化学の理論と実践を学んだ上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し貴重な知見を得ている。その結果を国際誌に発表しており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって博士(医学)の学位授与に相応しいと判断した。

(主論文公表誌)

Cancer Immunol Immunother

60 : 793-808, 2011