

【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する同意を得られた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例腎摘術後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 400 mg/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 土低用量 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 土低用量 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 土低用量 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。