

## 論 文 要 旨

**Targeting Heat Shock Transcription Factor 4  
Enhances the Efficacy of Cabozantinib and  
Immune Checkpoint Inhibitors in Renal Cell Carcinoma**

HSF4 を標的とした治療戦略は、腎細胞癌における  
カボザンチニブや免疫チェックポイント阻害薬の効果を増強する

齋藤 朗毅

**【序論及び目的】**

腎細胞癌 (RCC)は全腎悪性腫瘍の約 90%を占め、2020 年には世界中で 40 万人以上の新規症例が発生している。淡明細胞癌はその最も一般的な型であり、腎細胞癌の約 80%を占めている。多くの患者は、超音波検査やコンピューター断層撮影などの腹部画像検査に基づいて偶発的に RCC と診断される。近年、手術、免疫チェックポイント阻害薬 (ICI)、チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI)、およびこれらの併用療法が、疾患の病期に応じた RCC 患者の治療に使用されている。しかしながら、これらの治療方法により RCC 患者全員が良好な結果を得られるわけではなく、薬剤耐性の克服や新たな治療標的の探索は課題である。私たちは、The Cancer Genome Atlas (TCGA)データベースを用いて RCC に関連する新たな治療標的遺伝子を検索した。TCGA は、がんゲノムプロジェクトの一環として 2006 年に米国で開始されたプロジェクトであり、がんの診断、治療、予防に関する重要なデータを提供している。本研究では、RCC の TCGA データを網羅的に解析し、予後解析において高発現群で有意に予後不良と関連していた遺伝子をリストアップし、その上位に位置するものとして熱ショック転写因子 4 (HSF4)を検出した。HSF4 は、結腸直腸癌細胞における MET 発現を増強することにより、腫瘍の進行を促進することが報告されている。本研究の目的は、RCC における HSF4 の機能解析を行い、HSF4 のノックダウンと標準治療との併用効果を評価し、HSF4 の治療標的としての可能性を検討することである。

**【材料及び方法】**

本研究では、ヒト RCC 細胞株 786-O、A498、Caki1、Caki2、およびマウス RCC 細胞株 Renca (いずれも American Type Culture Collection より購入)、スニチニブ耐性 A498 (SUR-A498、当科で樹立)を使用した。HSF4 の機能喪失アッセイによる細胞機能解析を行ったが、HSF4 のノックダウンには si-RNA を用い、qRT-PCR で目的の RNA がノックダウンされていることを確認した。HSF4 をノックダウンした RCC 細胞を用いて RNA sequencing を行い、その結果からアポトーシスに着目し、アポトーシスアッセイを行い、またウェスタンブロット法による関連タンパク質の発現量変動を評価した。HSF4 が他癌腫において MET の発現を制御するという報告を参考に、RCC 細胞株における HSF4 ノックダウンと MET 発現量の関連について qRT-PCR やウェスタンブロット法を用いて評価した。また、HSF4 のノックダウンが細胞発育に与える影響について、ICI や MET を標的とした TKI (カボザンチニブ)との併用を行い評価した。ICI を用いた細胞増殖能評価には、マウスを用いた皮下異種移植アッセイを用いた。

## 【結 果】

si-RNA を用いた機能喪失アッセイでは、細胞の増殖能、浸潤能、遊走能、腫瘍塊形成能が低下することが示された。RNA sequencing の結果を受け行ったアポトーシスアッセイでは、HSF4 のノックダウンによるアポトーシス誘導が観察された。ウェスタンブロット法によるタンパク質発現量の比較を行ったところ、HSF4 のノックダウンによって cleaved Caspase3 の発現増加を認め、RNA sequencing の結果を支持するものであった。続いて、RCC 細胞株において HSF4 をノックダウンすると、結腸直腸癌での報告と同様に MET の発現が低下することがウェスタンブロット法で観察された。MET を標的とする TKI であるカボザンチニブと HSF4 のノックダウンを、以前当科で樹立していた SUR-A498 に対して併用すると、細胞増殖は各単独治療群と比較して有意に抑制され、また qPCR とウェスタンブロット法により MET の発現も併用治療群でより低下することが確認された。この併用療法の効果は、Bliss 独立性モデルを用いた評価において、相乗的な効果であるとされた。皮下異種移植アッセイにおいて HSF4 のノックダウンと ICI を併用すると、各単独治療群と比較して腫瘍増殖が有意に抑制された。この効果は、Bliss 独立性モデルを用いた評価において、相乗的な効果であるとされた。腫瘍検体の免疫染色では、各単独治療群と比較して併用治療群で Ki-67 発現量がより低下することが確認された。

## 【結論及び考察】

この研究では、TCGA データベースを使用して、RCC の予後に関連する遺伝子として HSF4 を同定した。また、HSF4 のノックダウンが RCC 細胞の増殖、遊走、および浸潤の可能性を有意に減少させること、RCC 細胞のアポトーシスを誘導することを示した。HSF4 が RCC における MET 発現を調節していることも示され、これは結腸直腸癌における以前の報告と同様であった。

カボザンチニブは、スニチニブ、パゾパニブ、アキシチニブなどの以前より使用されていた TKI とは異なり MET を標的としていることから、他の TKI に対して耐性を持った RCC に対する late line として使用されることがある。スニチニブ耐性 RCC 細胞株においてカボザンチニブと HSF4 のノックダウンを併用することで、カボザンチニブの有効性が向上した。この効果は、両治療とも MET を標的としているため相加効果ではないかと考えたが、実際には相乗効果であることが示唆された。両治療の MET 発現と細胞増殖を抑制するシグナル経路の違いについては評価ができておらず、HSF4 のノックダウンがカボザンチニブ耐性も克服できるかどうかなど、さらなる検討が必要である。

ICI は進行性 RCC の標準治療になりつつあり、複数の ICI や TKI との併用療法など、幅広い治療オプションがある。TKI と ICI の併用療法では、TKI が VEGFR と MET の免疫抑制的な役割を阻害することにより、ICI の効果を高めることが示されている。この研究では、in vivo において ICI を HSF4 のノックダウンと併用すると、より強い腫瘍抑制効果を発揮することが示された。HSF4 と免疫チェックポイントとの直接的な関連を示す報告は見当たらなかったが、HSF4 のノックダウンと ICI の組み合わせによる腫瘍抑制効果は、MET 阻害による免疫抑制環境の是正を介して作用する相乗反応であると考えられた。この研究によって、ICI を使用した新しい併用療法としての可能性が示された。しかしながら、現在 HSF4 に対する阻害剤はなく、動物実験では shRNA を用いて HSF4 の発現を抑制したことから、siRNA や shRNA などの RNA 干渉法 (RNAi) の臨床応用について、さらなる研究が必要である。RNAi を治療薬として用いる場合、オフターゲット効果や RNA の不安定性が問題となり、標的臓器への特異的な運搬が必要である。化学修飾やその他の方法を使用した siRNA に関するいくつかの研究が報告されており、RNAi の臨床応用が期待されている。

以上より、HSF4 を標的とした治療は、RCC 治療の有望な候補になると考えている。