

マルチキナーゼ阻害薬による皮膚障害発症機序の解明と
個別化治療に関する研究

2016

山本 和宏

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、以下の論文の転載については出版社より許可を得ている。

1. Kazuhiro Yamamoto, Atsushi Mizumoto, Kohji Nishimura, Atsushi Uda, Akira Mukai, Kazuhiko Yamashita, Manabu Kume, Hiroo Makimoto, Toshinori Bito, Chikako Nishigori, Tsutomu Nakagawa, Takeshi Hirano, and Midori Hirai : Association of Toxicity of Sorafenib and Sunitinib for Human Keratinocytes with Inhibition of Signal Transduction and Activator of Transcription 3 (STAT3). *PLoS One*, **9**, e102110 (2014). [第 1 章]
2. Kazuhiro Yamamoto, Kazuaki Shinomiya, Takeshi Irooi, Sachi Hirata, Kenichi Harada, Manabu Suno, Tatsuya Nishioka, Manabu Kume, Hiroo Makimoto, Tsutomu Nakagawa, Takeshi Hirano, Toshinori Bito, Chikako Nishigori, Hideaki Miyake, Masato Fujisawa, and Midori Hirai : Association of single nucleotide polymorphisms in STAT3 with hand-foot skin reactions in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with multiple tyrosine kinase inhibitors: a retrospective analysis in Japanese patients. *Target. Oncol.*, **11**, 93–99 (2016). [第 2 章]
3. Kazuhiro Yamamoto, Takeshi Irooi, Kazuya Kanaya, Kazuaki Shinomiya, Shiho Komoto, Sachi Hirata, Kenichi Harada, Aimi Watanabe, Manabu Suno, Tatsuya Nishioka, Manabu Kume, Hiroo Makimoto, Tsutomu Nakagawa, Takeshi Hirano, Hideaki Miyake, Masato Fujisawa, and Midori Hirai : STAT3 polymorphism rs4796793 may be a predictive factor of tumor response to multiple tyrosine kinase inhibitors in metastatic renal cell carcinoma in Japanese population. *Med. Oncol.*, **33**, 24 (2016). [第 3 章]

目次

序論	1
第1章 マルチキナーゼ阻害薬によるヒト表皮角化細胞の <i>STAT3</i> シグナル経路に及ぼす影響	
第1節 緒言	3
第2節 方法	4
1. 試薬	4
2. 抗体	4
3. 細胞培養	4
4. WST-8 colorimetric assay	4
5. アポトーシス解析	5
6. Western blot 法	5
7. プラスミド構築	5
8. 一過性遺伝子導入	6
9. 蛍光免疫染色によるイメージングサイトメトリー法	6
10. 統計解析	6
第3節 結果	7
第4節 考察	11
第2章 <i>STAT3</i> 遺伝子多型と転移性腎細胞がん患者におけるマルチキナーゼ阻害薬による手足皮膚反応との関連性	
第1節 緒言	14
第2節 方法	15
1. 対象患者	15
2. HFSR の評価	15
3. 血液検体の収集と遺伝子多型解析	15
4. 統計解析	16
第3節 結果	17
1. <i>STAT3</i> 遺伝子多型の分布と患者背景	17
2. <i>STAT3</i> 遺伝子多型と HFSR の発症との関係	19
3. <i>STAT3</i> 遺伝子多型と HFSR の重症度との関係	20
4. スニチニブ治療患者における <i>STAT3</i> 遺伝子多型と HFSR の発症との関係	20
第4節 考察	21
第5節 小括	23

第3章	<i>STAT3</i> 遺伝子多型と転移性腎細胞がん患者における治療効果との関連性	
第1節	緒言	24
第2節	方法	25
1.	対象患者	25
2.	治療反応性の評価	25
3.	血液検体の収集と遺伝子多型解析	25
4.	統計解析	25
第3節	結果	27
1.	<i>STAT3</i> 遺伝子多型の分布と患者特性	27
2.	<i>STAT3</i> 遺伝子多型と最良総合効果との関連性	29
3.	<i>STAT3</i> 遺伝子多型と時間-イベント推移との関連性	30
第4節	考察	31
第5節	小括	33
	総括	34
	謝辞	36
	引用文献	37

略語表

ABC	ATP-binding Cassette Sub-family
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CI	confidence interval
CR	complete response
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
ECOG-PS	Eastern Cooperative Oncology Group-Performance Status
ERK	extracellular signal- regulated kinase
HFSR	hand-foot skin reaction
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon
IL-6	interleukin-6
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia
MEK	MAPK/ERK kinase
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
mTKI	multiple tyrosine kinase inhibitor
OR	odds ratio
PBS	phosphate buffered saline
PD	progressive disease
PD-1	Programed death-1
PD-L1	PD-Ligand 1
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PFS	progression-free survival
PI	propidium iodide
PR	partial response
QOL	quality of life
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
SD	stable disease
SNP	single nucleotide polymorphism
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TTF	time-to-treatment failure
TTR	time-to-treatment response
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptors
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium

序論

2014年における本邦のがん死亡者数は約37万人であり¹⁾、日本のみならず海外においてもがん死亡者数の経年的な増加は問題となっているため、がんの治療成績向上は国際的に重要な課題である。一方で、がん化学療法は分子標的治療薬の登場により飛躍的に進歩した。様々ながん種に対して分子標的治療薬の適応が広がり、今後も更なる発展が期待されている。分子標的治療薬は、がん細胞に特異的な標的に対して作用するため、開発当初は安全性が高いと考えられていた。しかしながら、その臨床使用の拡大に伴い、治療に影響を及ぼす重大かつ特有の副作用が認められてきた。なかでも皮膚障害は、多くの分子標的治療薬において共通して高頻度に発症し、治療の中断やQOLを低下させる要因となっている²⁻⁴⁾。

血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) や血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) など複数のキナーゼを阻害するマルチキナーゼ阻害薬 (mTKI) は、手足皮膚反応 (HFSR) とも呼ばれる皮膚障害が高頻度に発症することが治療上重大な問題となる。mTKIによる皮膚障害は、5-フルオロウラシルやタキサン系などの細胞障害性の抗がん薬に起因する皮膚障害とは明確に区別されており、その特有の病理像から表皮角化細胞の増殖低下が原因であることや、発症部位が手掌や足底部に限局的であることが報告されている²⁻⁴⁾。特筆すべき点は、皮膚障害発症の有無と治療効果との間に関連性が示唆されていることである^{5,6)}。つまり、皮膚障害はmTKIの抗腫瘍作用と共通の分子メカニズムにより発症する可能性が考えられる。このように臨床上重要な症状であることは認識されているにも関わらず、詳細な発症メカニズムについては未だ解明されていない。現在においても、VEGFなどの増殖因子に関連するシグナル伝達分子阻害薬は様々ながん種に対して臨床試験が進められているが、多くの薬剤で皮膚障害が認められ、共通の課題としてその解決が急務となる。

皮膚の恒常性維持に関与する因子としてインターロイキン (IL)-6などの炎症性サイトカインとその受容体から刺激を受けるJanus kinase /Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 経路が知られている⁷⁾。この経路において中心的な役割を果たすSTAT3は、全身の細胞に発現しており、細胞増殖、細胞周期、炎症などの細胞の恒常性維持に関わるタンパク質を転写制御することにより、幅広い細胞機能を担っている^{8,9)}。また、STAT3は細胞のアポトーシスにも密接に関係しており、アポトーシス抑制因子の発現を転写制御している¹⁰⁾。近年、乾癬やアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患では、病変の角化細胞における炎症性サイトカインの産生増大とそれに伴うSTAT3の恒常的な活性化が認められることが明らかにされ¹¹⁻¹³⁾、STAT3が皮膚組織における恒常性維持に非常に重要な役割を担っていることが認識されてきた。また一方で、STAT3は様々な成長因子からのシグナルを集束する下流因子であることから、成長因子および血管新生因子に関連するシグナル因子を標的とする既存の分子標的治療薬がSTAT3の活性に影響を及ぼすことは自明である。以上をふまえると、mTKIによる皮膚障害において、STAT3の活性変動が関与する可能性は極めて高いと考えられる。

また、mTKIであるスニチニブの腎細胞がんに対する抗腫瘍作用メカニズムにはSTAT3を介したアポトーシスの誘導が寄与することが報告されている¹⁴⁾。つまり、STAT3はmTKIの治療効果にも

関与することが知られているため、皮膚障害の発症と mTKI の治療効果の両方の関連因子となる可能性は十分にある。

本論文では、mTKI による皮膚障害の発症メカニズムの解明と皮膚障害および治療効果に関する予測因子を特定することを目的として、STAT3 の活性変動に着目した検討を行うこととした。

すなわち、mTKI であるソラフェニブおよびスニチニブの表皮角化細胞における STAT3 活性変動に関する基礎的検討に加えて、*STAT3* 遺伝子の多型に着目して STAT3 の発現に影響を及ぼす一塩基多型 (SNP) と皮膚障害の発症との関連性を臨床的に検討した。さらに、*STAT3* 遺伝子多型と mTKI の治療効果との関連性についても臨床的に検討した。その結果、mTKI による皮膚障害に関する発症メカニズムとともに皮膚障害の発症および治療効果に関連する因子についての知見を得ることができたため、以下 3 章に渡り論述する。

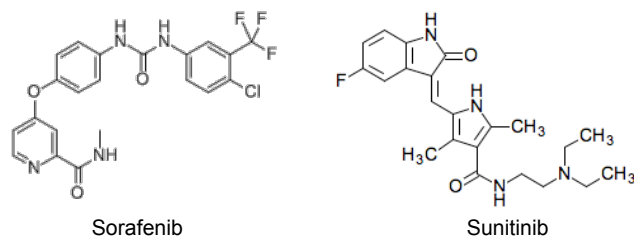


Figure 1-1 Chemical structures of sorafenib and sunitinib

Yamamoto K., *et al.*, *PLoS One*, **9**, e102110 (2014)

第1章 マルチキナーゼ阻害薬によるヒト表皮角化細胞の STAT3 シグナル経路に及ぼす影響

第1節 緒言

ソラフェニブおよびスニチニブは、VEGFR、PDGFR、Proto-oncogene tyrosine-protein kinase (c-Kit)、the rearranged during transfection (RET)など、多種のチロシンキナーゼを標的とする経口 mTKI として臨床で使用されている^{15,16)}。特に、これらは転移性腎細胞がんの一次治療としては標準的に使用されており、その有効性は高く評価されている^{17,18)}。しかしながら、いずれの薬剤においても共通の副作用として皮膚障害が発症することで、患者の QOL を著しく低下させている。mTKI による皮膚障害は、その病理像と発症部位が極めて特徴的であり¹⁹⁻²¹⁾、HFSR とよばれている。これらの副作用は極めて高頻度に発症し、特に日本人における発症頻度が高いことが報告されている^{22,23)}。HFSR の病理としては表皮角化細胞における増殖能の低下による異常角化が認められ、疼痛を伴う表皮の肥厚や剥離などを生じる。しかし、特徴的な病理像であることは認識されつつあるにも関わらず、発症の詳細な分子生物学的メカニズムは解明されていない。

STAT3 は、アポトーシス抑制因子を含む関連遺伝子の転写制御を介して、細胞増殖、生存、炎症などの様々な生物応答において中心的な役割を果たしている^{7,10,24-26)}。特に皮膚組織においては、各種皮膚関連疾患において発現量の変化が報告されている survivin や B-cell lymphoma (Bcl-2) などのタンパク質の転写を STAT3 が担うことから、STAT3 の皮膚組織の恒常性における機能は非常に重要である^{27,28)}。また、STAT3 の活性変化は各種の皮膚疾患の病態に関連することが報告されており、乾癬やアトピー性皮膚炎などの病態における STAT3 の役割はよく知られている²⁹⁾。一方で、STAT3 は mTKI が標的としている VEGFR、PDGFR、EGFR、Src などの分子の集束点に位置することも知られている^{30,31)}。つまり、mTKI に起因する HFSR において、mTKI が STAT3 の活性阻害を介して表皮角化細胞の増殖抑制とアポトーシスに大きく影響を及ぼすことが推察され、この現象が mTKI による HFSR の発症メカニズムに寄与する可能性が十分に考えられる。

本章では、mTKI の表皮角化細胞に対する増殖抑制作用に STAT3 が関与する可能性を明らかにすることを目的とし、mTKI であるソラフェニブおよびスニチニブのヒト表皮角化細胞 (HaCaT 細胞) に対する増殖抑制作用に及ぼす STAT3 およびその関連因子の活性および発現の影響について検討した。

第2節 方法

1. 試薬

ソラフェニブは、LKT Laboratories (St. Paul, MN, US) より購入した。スニチニブマレイン酸塩およびヘキスト 33258 は、Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。STAT3 の小分子阻害薬である Stattic は、Enzo Life Science (Farmingdale, NY, USA) より購入した。p38 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) の特異的阻害剤である SB203580 は、Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) より購入した。MAPK/ extracellular signal- regulated kinase (ERK) Kinase (MEK) 1 および MEK2 の選択的阻害剤である U0126 は、Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA) より購入した。

2. 抗体

ウサギ由来抗リン酸化 (アミノ酸配列 705 番目のチロシン残基のリン酸化; Tyr705) STAT3 抗体、リン酸化 (アミノ酸配列 727 番目のセリン残基のリン酸化 ; Ser727) STAT3 抗体、マウス由来抗 STAT3 抗体、ウサギ由来 survivin 抗体、ウサギ由来抗 Bcl-2 抗体、ウサギ由来 Myeloid cell leukemia (Mcl-1) 抗体、ウサギ由来抗リン酸化 ERK 1/2 抗体 (Thr202/Tyr204)、ウサギ由来抗 ERK1/2 抗体、ウサギ由来抗リン酸化 p38 MAPK (Thr180/Tyr182) 抗体、およびウサギ由来抗 p38 MAPK 抗体は、Cell Signaling Technology より購入した。ウサギ由来西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合型 IgG、マウス由来 HRP 結合型 IgG およびウサギ由来 FITC 結合型 IgG は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。ウサギ由来抗 β -actin 抗体は、Sigma-Aldrich Chemical より購入した。

3. 細胞培養

ヒト表皮角化細胞株である HaCaT 細胞は、Norbert Fusenig 教授 (German Cancer Research Centre, Heidelberg, Germany) より提供を受けた³²⁾。ヒト肝がん由来細胞株である HepG2 細胞ならびにヒト転移性腎細胞がん由来細胞株である Caki-1 細胞は、JCRB (大阪) より購入した。HaCaT および HepG2 細胞は、10%ウシ胎児血清 (lot. No. 9866 J; MP Biomedicals, Solon, OH, USA)、終濃度 100 units/mL ペニシリンおよび終濃度 100 μ g/mL ストレプトマイシン (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 含有の Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich) を用いて培養した。Caki-1 細胞は HaCaT 細胞同様、10%ウシ胎児血清、終濃度 100 units/mL ペニシリンおよび終濃度 100 μ g/mL ストレプトマイシン含有の Eagle's Minimum Essential Medium (Sigma-Aldrich) を用いて培養した。各細胞は培養フラスコに播種し、5% CO₂ および 37°C で加湿条件下により培養し、0.05%トリプシン (Life Technologies) により継代操作を行った。

4. WST-8 colorimetric assay

薬剤の細胞増殖抑制作用は、先行研究を参考に Cell Counting Kit-8 (同仁科学研究所, 熊本) を用いた WST-8 assay により評価した³³⁾。細胞は 2×10^3 cells/well で 96-well プレートに播種し、24 時間の前培養を行った。前培養後の細胞は、段階的に希釈した薬剤を含む培養液に置換し、さらに 48

時間培養した。48 時間後の培養液は、WST-8 試薬を含む培養液に置換し、3 時間反応させた後、630 nm を参照波長とする 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Ltd., Ortenberg, Germany) により測定した。

5. アポトーシス解析

アポトーシスを介した細胞死は、FITC 標識アネキシン V/ヨウ化プロピジウム (PI) アポトーシス検出キット (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて常法に従い評価した。まず、薬剤を処置した細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で十分に洗浄し、FITC 標識アネキシン V および PI 染色液を含有する PBS で 37°C、30 分間処置した。細胞を十分に洗浄した後、10 μ M ヘキスト 33258 および 4%パラホルムアルデヒドを含有する PBS で 30 分間処置した。各蛍光色素の蛍光強度を IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK) により検出し、細胞膜におけるフォスファチジルセリンの表出および PI の透過性を IN Cell Investigator (GE Healthcare) により解析した。解析条件として、アネキシン V が検出される細胞をアポトーシス初期、アネキシン V および PI の両方が検出される細胞をアポトーシス後期またはネクローシス細胞として解析を行った。

6. Western blot 法

Western blot 法は先行研究に示す方法により行った³⁴⁾。細胞の溶解は 1 mM ジチオトレイトール、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニルおよび 5 μ g/mL ロイペプチンを含む Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology) を用いて行った。タンパク質の分離は 7.5 または 12%ドデシル硫酸ナトリウム-アクリルアミドゲルによる電気泳動により行い、ポリフッ化ビニリデンメンブレン (Hybond-P membrane; GE Healthcare) に転写した。ブロッキング操作は 5%スキムミルクを含有したウォッシュバッファーにより行った。転写したメンブレンは、一次抗体を含むウォッシュバッファーに 12 時間以上浸漬し、その後、HRP を結合した二次抗体を 1 時間反応させた。タンパク質の検出は、メンブレンを ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) に浸漬することで発色させ、ChemiStage 16-CC による画像撮影により行った (KURABO Industries Ltd.,大阪)。メンブレンはストリップ操作により結合抗体を除去し、再度一次抗体を反応させることで、複数のタンパク質の評価を行った。

7. プラスミド構築

STAT3 恒常活性体である STAT3C の哺乳類細胞用発現プラスミド (pcDNA3-STAT3C) は、宮島篤教授 (東京大学) より提供を受けた。STAT3C はアミノ酸配列の 662 番目のアラニン残基と 664 番目のアスパラギン残基をシステインに置換したものであり、人工的に核移行させるために STAT3 二両体を翻訳産物として生成することで恒常的に活性状態を示す³⁵⁾。プラスミドは QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden, German) を用いて大腸菌より抽出した後、フェノールおよびクロホルムにより細胞培養に使用可能なグレードまで精製し、1 μ g/ μ L で凍結保存した。

8. 一過性遺伝子導入

発現プラスミドを用いた一過性遺伝子導入は Lipofectamine LTX transfection reagent (Life Technologies) により常法に従い行った。細胞は 24 時間後に 90%コンフルエントとなる密度で播種した。培養液は血清非含有 Opti-MEM (Life Technologies) に置換し、DNA-Lipofectamine 混合液を添加することで遺伝子導入を行った。HaCaT 細胞においては 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ (96 well プレート) の DNA を導入した。

9. 蛍光免疫染色によるイメージングサイトメトリー法

細胞は 4% パラホルムアルデヒドにより 15 分間室温で固定し、5%ウシ血清アルブミン含有 PBS によりタンパク質ブロッキングを行った。その後、細胞を希釈した一次抗体溶液と反応させ、FITC 結合ウサギ由来 IgG (Santa Cruz) および PI 含有 PBS と反応させた。画像撮影は IN Cell Analyzer 2000 により各 well に対して 1,000 cells ずつ行い、IN Cell Analyzer Workstation version 3.2 を用いて解析を行った。STAT3 の核移行は、Nuclear Translocation analysis module を用いて核および細胞質の蛍光強度の比を算出することにより評価した。

10. 統計解析

二群間の比較は unpaired Student's t-test により、多群間の比較は Dunnett test により行った。また、有意水準は両側 1%とした。

第3節 結果

1. ソラフェニブおよびスニチニブの細胞増殖抑制作用に及ぼす STAT3 阻害剤の影響

HaCaT 細胞および Caki-1 細胞におけるソラフェニブおよびスニチニブの増殖抑制作用は、STAT3 特異的阻害剤である Stattic を前処置することにより顕著に増大した (Figure 1-2)。一方、HepG2 細胞においては、本現象は認められなかった。

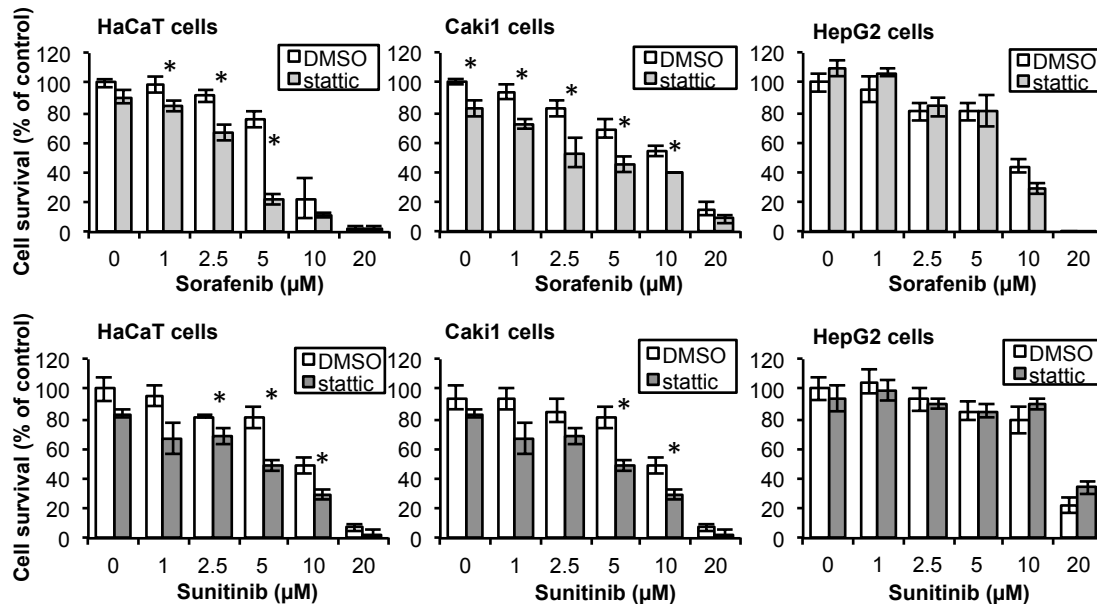


Figure 1-2 Effects of STAT3 inhibitor on sorafenib- and sunitinib-induced cell growth inhibition

After pretreatment with Stattic (STAT3 inhibitor, 10 μM) or DMSO (solvent) for 20 min, HaCaT, Caki-1, and HepG2 cells were incubated in a medium that included sorafenib or sunitinib at the indicated concentrations for 48 h. Cell viability was determined by WST-8 colorimetric assay. * $p < 0.01$ (Student's t-test) as compared with control (DMSO). Each bar represents mean \pm SD (n = 4).

Yamamoto K., *et al.*, *PLoS One*, **9**, e102110 (2014)

2. 各種細胞株の STAT3 活性に及ぼすソラフェニブおよびスニチニブ処置の影響

各種細胞株におけるソラフェニブおよびスニチニブの存在下での STAT3 の活性を Figure 1-3A および 3B に示す。HaCaT 細胞および Caki-1 細胞においては、STAT3-Tyr705 のリン酸化がソラフェニブおよびスニチニブを 2 時間処置することにより濃度依存的に減少したが、HepG2 細胞においては本現象を認めなかった (Figure 1-3A)。一方、STAT3-Ser727 のリン酸化はいずれの細胞株においても影響を受けなかった。さらに、STAT3 の活性化の指標である核内移行率は、ソラフェニブおよびスニチニブを処置することにより減少を示した (Figure 1-3B)。STAT3 恒常活性体である STAT3C 遺伝子導入 HaCaT 細胞においては、空ベクター導入細胞と比較して、ソラフェニブおよびスニチニブの増殖抑制作用が減弱された (Figure 1-3C)。

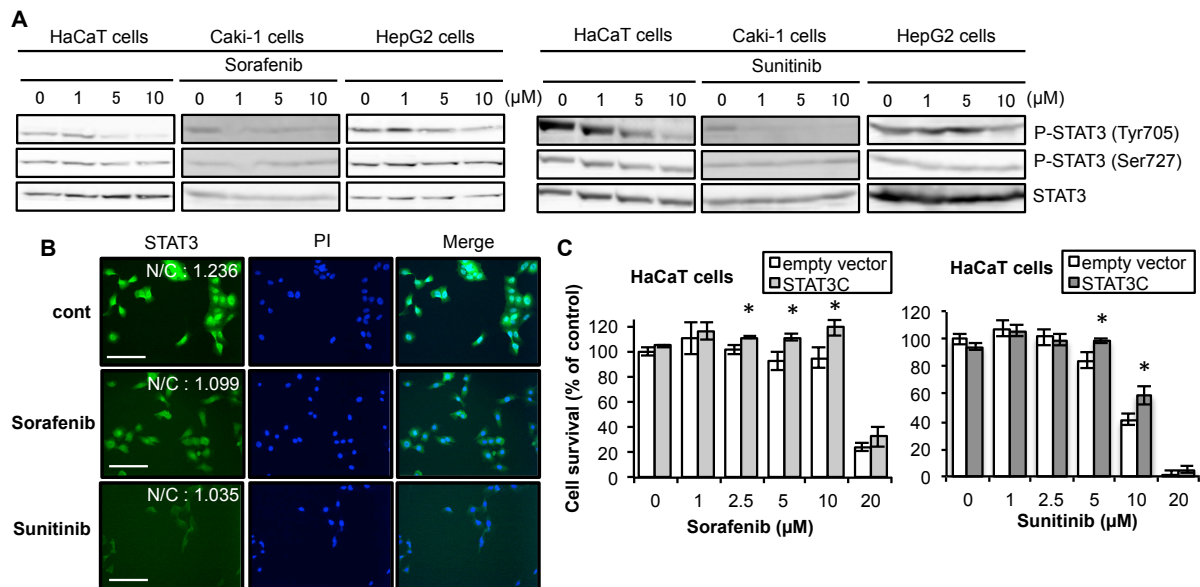


Figure 1-3 Signal transduction alterations involved in STAT3 after treatment with sorafenib and sunitinib and effects of STAT3C on cytotoxicity of sorafenib and sunitinib

(A) HaCaT, Caki-1, and HepG2 cells were incubated with a medium that included sorafenib or sunitinib at the indicated concentrations for 2 h. (B) Immunostaining images. HaCaT cells were treated with sorafenib (10 μ M), sunitinib (10 μ M), or DMSO (Control; cont) for 2 h and were fixed and incubated with an anti-STAT3 antibody, followed by incubation with FITC-conjugated anti-rabbit IgG (green). Bar shows 50 μ m. (C) Effects of STAT3C transfection on sorafenib- and sunitinib-induced cell growth inhibition. HaCaT cells transiently transfected with STAT3C or an empty vector were preincubated for 24 h, followed by incubation in medium containing sorafenib or sunitinib at the indicated concentrations for 48 h. * $p < 0.01$ as compared with control (DMSO). Each bar represents mean \pm SD ($n=4$).

Yamamoto K., *et al.*, *PLoS One*, **9**, e102110 (2014)

3. HaCaT 細胞に対するソラフェニブおよびスニチニブのアポトーシス誘導作用およびアポトーシス抑制因子に及ぼす STAT3 活性の影響

ソラフェニブおよびスニチニブの処置によるアポトーシス細胞の分布は、Stattic を前処置することにより顕著に増大した (Figure 1-4A)。さらに、STAT3 により転写制御を受けている survivin および Bcl-2 などのアポトーシス抑制因子の発現は、ソラフェニブの短時間処置により減少し、長時間処置により増加した (Figure 1-4B)。この変動は、STAT3-Tyr705 リン酸化の変動と相動的な挙動を示している。一方、スニチニブ処置時は、STAT3-Tyr705 リン酸化と survivin はソラフェニブ処置時と同様の挙動を示したが、Bcl-2 についてはソラフェニブと異なり発現変動を示さなかった。ソラフェニブやスニチニブの 24 時間処置は、STAT3-Tyr705 のリン酸化、Bcl-2 および Mcl-1 の発現を減少させ、survivin の発現もわずかに減少させた。STAT3C を遺伝子導入した HaCaT 細胞においては空ベクターを導入した細胞と比較して、Bcl-2 や survivin の発現が上昇した (Figure 1-4C)。

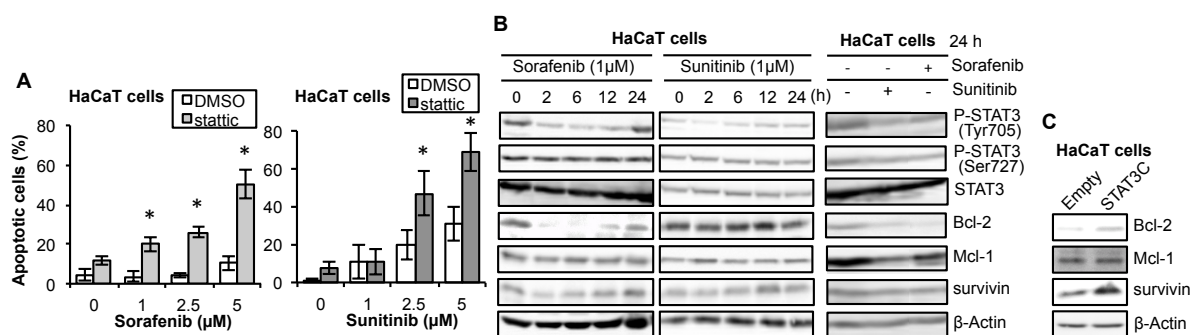


Figure 1-4 Effects of sorafenib and sunitinib on cellular apoptosis and the expression of apoptosis suppressors

(A) After pretreatment with 10 μM Stattic or DMSO for 20 min, HaCaT cells were incubated in medium containing sorafenib or sunitinib at the indicated concentrations for 24 h. Apoptotic cells were detected using FITC-labeled Annexin V/PI staining with the IN Cell Analyzer 2000. *p<0.01 as compared with control (DMSO). Each bar represents mean ± SD (n = 4). (B) Alterations in STAT3 signal transduction and apoptosis suppressors. HaCaT cells were incubated in medium containing 1 μM sorafenib or sunitinib for the indicated times and with 10 μM sorafenib or sunitinib for 24 h. (C) Alterations of expression of apoptosis suppressors in transfected cells. HaCaT cells transiently transfected with STAT3C or an empty vector were prepared to total cell lysate.

Yamamoto K., *et al.*, *PLoS One*, **9**, e102110 (2014)

4. HaCaT 細胞の MAPK 活性に及ぼすソラフェニブおよびスニチニブの影響

HaCaT 細胞にソラフェニブおよびスニチニブを処置した後の MAPK 活性を Figure 1-5A に示す。ソラフェニブの処置は、p38 MAPK および ERK のリン酸化を亢進させた。また、スニチニブの処置では、p38 MAPK のリン酸化の亢進が 2 時間のみ認められた。また、ソラフェニブの増殖抑制作用は、p38 MAPK 阻害剤である SB203580 ならびに MEK1/2 阻害剤である U0126 の前処置により抑制された (Figure 1-5B)。また、スニチニブの増殖抑制作用は、SB203580 の前処置時のみで減弱した。これら MAPK 阻害剤の STAT3 活性に及ぼす影響を Figure 1-5C に示す。SB203580 の前処置は、ソラフェニブやスニチニブによる処置時間依存的な STAT3-Tyr705 のリン酸化の亢進を増強する傾向を示した。一方、U0126 の前処置は、ソラフェニブによる STAT3-Tyr705 のリン酸化亢進を増強する傾向を示したが、スニチニブにおいてはこの傾向は認めなかった。

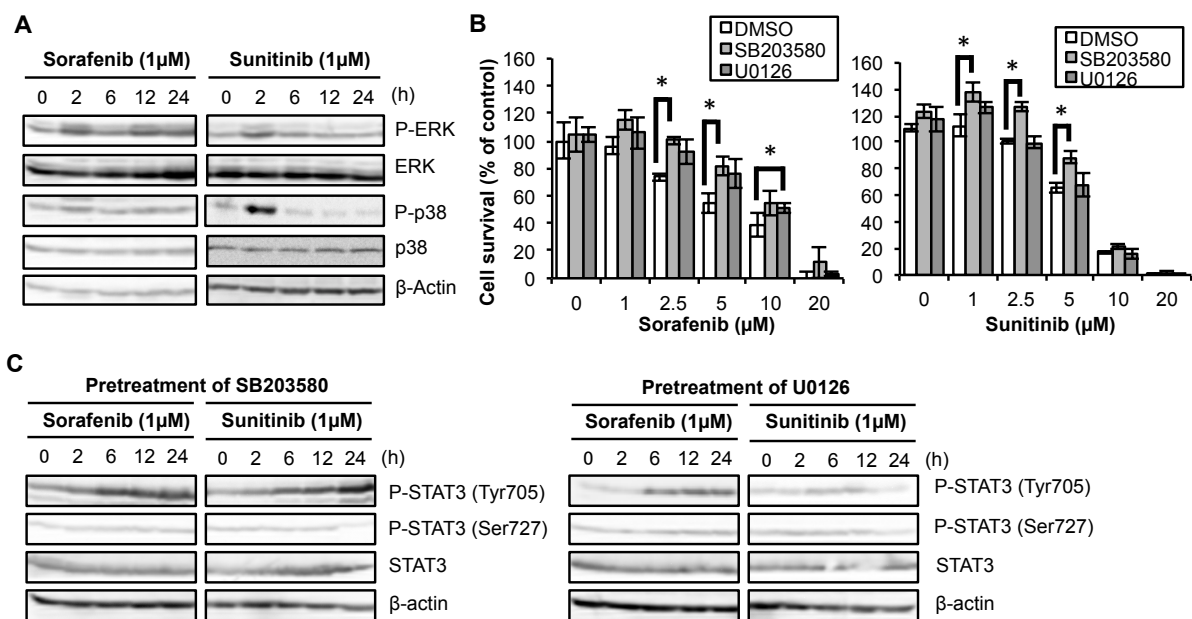


Figure 1-5 Effects of sorafenib and sunitinib on MAPK activation in HaCaT cells and effects of MAPK inhibitor on sorafenib and sunitinib-induced cell growth inhibition and signal transduction (A) Alterations in MAPKs signal transduction. HaCaT cells were incubated in medium containing 1 μ M sorafenib or sunitinib for the indicated times. (B) Effects of MAPK inhibitor on sorafenib- and sunitinib-induced cell growth inhibition. HaCaT cells were incubated with medium containing sorafenib at the indicated concentrations for 48 h after pretreatment with either U0126 (MEK1/2 inhibitor, 10 μ M), SB203580 (p38 MAPK inhibitor, 10 μ M), or DMSO (solvent) for 2 h. * p <0.01 as compared with control (DMSO). Each bar represents mean \pm SD (n = 4). (C) Alterations in STAT3 signal transduction in the presence of MAPK inhibitors. HaCaT cells were incubated in medium containing 1 μ M sorafenib or sunitinib for the indicated times after pretreatment with 10 μ M U0126 for 2 h or 10 μ M SB203580 for 2 h.

Yamamoto K., et al., *PLoS One*, **9**, e102110 (2014)

第4節 考察

STAT3 の特異的な小分子阻害剤である Stattic の前処置は、ソラフェニブおよびスニチニブの HaCaT 細胞に対する細胞増殖抑制作用を相乗的に増大させ、アポトーシスによる細胞死の割合も増大させた (Figure 1-2 および 1-4A)。さらに、STAT3 恒常活性体である STAT3C を遺伝子導入した HaCaT 細胞は、空ベクターを導入した HaCaT 細胞と比較してソラフェニブおよびスニチニブの細胞増殖抑制作用が減弱する傾向を示した (Figure 1-3C)。STAT3 は表皮角化細胞の増殖を制御することで恒常性を維持する分子として機能することが報告されていることから^{7,25)}、ソラフェニブおよびスニチニブの角化細胞に対する増殖抑制作用には STAT3 の活性が重要な寄与を有していることが示唆された。

本検討では、ソラフェニブおよびスニチニブの処置は、STAT3-Tyr705 のリン酸化のみを変動させ、STAT3-Ser727 のリン酸化には影響しなかった (Figure 1-3A、1-4B および 1-5C)。STAT3 には活性化に関わるリン酸化サイトとして Tyr705 および Ser727 を有している。STAT3 が完全な活性状態となるためには、2 つのリン酸化サイトが協働して活性化する必要があることが報告されているが³⁶⁻³⁸⁾、主たる活性は Tyr-705 のリン酸化に依存していることが明らかにされている³⁹⁾。したがって、ソラフェニブおよびスニチニブは、STAT3 の主たる活性制御機構を阻害する可能性が考えられる。

ソラフェニブおよびスニチニブの Stattic 前処置による細胞増殖抑制作用の増強は、HaCaT 細胞と同様に、Caki-1 細胞においても認められた (Figure 1-2)。さらに、HaCaT および Caki-1 細胞における STAT3-Tyr705 のリン酸化は、ソラフェニブおよびスニチニブの処置濃度依存的に減少したが、この現象は HepG2 細胞では認められなかった (Figure 1-3A)。近年、基礎研究において、mTKI であるソラフェニブおよびスニチニブの腎細胞がんに対する抗腫瘍メカニズムに、STAT3 の阻害作用が寄与している可能性が報告されている^{14,40)}。また、臨床研究では、mTKI による皮膚障害の発症はその治療効果と関連していることも知られている⁶⁾。以上をふまえると、HaCaT および Caki-1 細胞では、細胞増殖の制御が STAT3 の活性に強く依存していることが、これらの現象を認める要因となると考えられる。

ソラフェニブおよびスニチニブは STAT3 の活性を阻害すると共に、アポトーシス抑制因子の発現を減少させた (Figure 1-4B)。また、これらの挙動は STAT3-Tyr705 のリン酸化の変動と同様の挙動を示した。さらに、STAT3C を遺伝子導入した HaCaT 細胞においては、Bcl-2 および survivin の発現量が顕著に増大した (Figure 1-4C)。STAT3 はアポトーシス抑制因子である Mcl-1、Bcl-2 および survivin などの転写を正に制御していることが報告されており^{10,24,41)}、特に survivin は正常表皮角化細胞に発現し、角化細胞における分化を主に制御する核内因子として重要な役割を果たしていることが報告されている⁴²⁾。このことから、ソラフェニブおよびスニチニブによる角化細胞への細胞毒性には STAT3 を介したアポトーシス抑制因子の発現変動が関連していることが示唆される。著者の検討では、STAT3C 導入細胞において Mcl-1 の発現に顕著な変化を認めなかったため、細胞種によって STAT3 による Mcl-1 の発現制御の寄与が異なる可能性が考えられる。

ソラフェニブおよびスニチニブの処置は、STAT3-Tyr705 のリン酸化を濃度依存的に減少させ、STAT3 の核移行率を減少させた (Figure 1-3B)。しかしながら、比較的低濃度のソラフェニブおよび

スニチニブは長時間処置することにより、減少したリン酸化が回復する傾向を示した (Figure 1-4B)。STAT3 活性は、様々なシグナルの制御を受けることが知られており³¹⁾、複数の代償経路が存在するため、ソラフェニブおよびスニチニブによる STAT3 の阻害作用は間接的作用である可能性がある。また、著者の検討では、p38 MAPK の活性化が HaCaT 細胞に対するソラフェニブおよびスニチニブの増殖抑制および STAT3 の活性阻害に寄与する可能性が示され (Figure 1-5A および 1-5B)、ソラフェニブでは ERK の活性化も増殖抑制作用に影響を及ぼした (Figure 1-5B)。MAPK 経路は STAT3 を負に制御するシグナル経路の一つである⁴³⁾。表皮角化細胞において、MAPK の亢進による乾癬様の表皮過形成の病態には STAT3 シグナル経路の寄与が大きいことが報告されており、MAPK 経路と STAT3 経路の相互制御が角化細胞の増殖と分化において極めて重要な役割を果たすことが知られている⁴⁴⁾。したがって、ソラフェニブの HaCaT 細胞に対する増殖抑制作用においては、ERK および p38 MAPK を介した STAT3 の活性制御が大きく寄与し、スニチニブでは p38 MAPK を介した STAT3 の活性制御が大きく寄与する可能性が考えられた。

ソラフェニブおよびスニチニブは、様々な細胞株に対して活性酸素種の産生を誘導することが明らかにされており⁴⁵⁻⁴⁷⁾、生じた酸化ストレスにより p38 MAPK が活性化し、STAT3 の活性を低下させる可能性が考えられる。近年、mTKI による HFSR は、歩行、手洗いあるいは他の日常生活より受ける物理的圧力により惹起されることが報告されている^{22,48,49)}。mTKI による p38 MAPK の活性化は、物理的なストレスと酸化ストレスが複合的に作用することにより促進される可能性が考えられ、この現象が HFSR の発症につながる可能性が考えられる。

STAT3 は乾癬の発症に重要な役割を果たすことが既に知られている^{50,51)}。乾癬の病理像は表皮の異常角化であり、STAT3 の恒常的活性化が主たるメカニズムと考えられている。近年、ソラフェニブの治療が乾癬の症状を改善させた症例が報告された⁵²⁾。ソラフェニブの表皮角化細胞に対する STAT3 活性を阻害する作用が乾癬治療のメカニズムとして考えられる。一方で、STAT3 が阻害されることが HFSR の発症につながることを著者は提唱しているが、STAT3 が高度に活性化し、乾癬の発症につながることをふまえると、表皮角化細胞の正常な角化には、STAT3 の活性を一定に維持する必要があることが考えられる。

以上より、本研究では、mTKI であるソラフェニブおよびスニチニブの表皮角化細胞に対する増殖抑制作用には STAT3 の活性阻害が寄与していることを明らかにした。この阻害作用は間接的な作用であり、ソラフェニブは p38 MAPK と ERK を、スニチニブは p38 MAPK を介した STAT3 阻害機構が寄与する可能性を示した。本研究の進展により、皮膚障害のバイオマーカーの特定やメカニズムベースの皮膚障害予防法の開発が期待される。

第 5 節 小括

本章では mTKI であるソラフェニブおよびスニチニブの表皮角化細胞 (HaCaT 細胞) に対する細胞増殖抑制作用およびアポトーシス誘導作用における STAT3 の関連性について検討し、次の知見を得た。

1. ソラフェニブおよびスニチニブによる HaCaT 細胞に対する細胞増殖抑制作用およびアポトーシス誘導作用は、STAT3 の活性阻害が寄与している可能性が示された。
2. Stattic によるソラフェニブおよびスニチニブの細胞増殖抑制作用の増強は、腎がん細胞 (Caki-1 細胞) においても認められ、STAT3 の活性阻害作用が腎細胞がんに対する抗腫瘍効果と関連する可能性が示されたが、肝がん細胞 (HepG2 細胞) においては認められなかった。
3. ソラフェニブおよびスニチニブの表皮角化細胞に対するアポトーシス誘導作用は、STAT3 の活性低下を介したアポトーシス抑制因子 survivin および Bcl-2 の発現低下に起因する可能性が示された。
4. ソラフェニブおよびスニチニブの STAT3 活性阻害作用は間接的な作用であり、ソラフェニブは p38 MAPK および ERK、スニチニブは p38 MAPK を介した STAT3 の阻害メカニズムが関与する可能性が明らかとなった。

第2章 STAT3 遺伝子多型と転移性腎細胞がん患者におけるマルチキナーゼ阻害薬による手足皮膚反応との関連性

第1節 緒言

転移性腎細胞がんの治療に対する分子標的治療薬の使用は、腫瘍縮小効果、生存期間の延長が期待され、推奨されている治療の一つである⁵³⁾。なかでも mTKI は、予後リスクに関わらず 1 次治療の選択薬として用いられ、その有効性は多くの臨床試験で報告されている^{18,54-56)}。しかしながら、高頻度に発症する皮膚障害が投与量の減量や治療の中断の要因となることが大きな課題となっている。mTKI に起因する HFSR は、日本人において特に発症頻度の高い副作用である^{22,23,49)}。海外の臨床試験ではソラフェニブで 48%、スニチニブで 36%と報告されているが⁴⁹⁾、国内の臨床試験では 80%程度の患者に発症すると報告されている^{22,23)}。そのため、HFSR の発症には遺伝薬理的な要因が存在する可能性は十分に考えられるが、未だ検討がなされていない。また、HFSR の発症と mTKI の治療効果との間には関連性が報告されていることから⁶⁾、リスク因子を特定することが安全性のみならず有効性の因子を特定するためにも重要な意味を持つ。

前章より、著者はソラフェニブおよびスニチニブの表皮角化細胞に対する毒性において、STAT3 の活性阻害の寄与が大きいことを論述している。また、STAT3 をコードする遺伝子には、日本人において一塩基多型 (SNP) が多数報告されている⁵⁷⁻⁶⁰⁾。特に転移性腎細胞がん患者においては、STAT3 の遺伝子多型がインターフェロン (IFN) - α 治療の反応性を予測する因子として報告されており^{57,58)}、さらに一部の SNP は遺伝子型によって STAT3 の mRNA 発現量が異なることが明らかにされている⁵⁸⁾。以上をふまえると、STAT3 の機能変異が報告されている SNP と mTKI に起因する HFSR の発症には関連性がある可能性が十分に考えられる。

本章では、転移性腎細胞がん患者において STAT3 の SNP が HFSR のリスク因子となる可能性を明らかにすることを目的として、STAT3 の SNP と mTKI による HFSR の発症および重症度との関連性について検討した。

第2節 方法

1. 対象患者

対象は、神戸大学医学部附属病院泌尿器科に通院中の根治的腎摘出術を施行した腎細胞がん患者であり、mTKI 治療を経験した患者とした。患者登録期間は本研究の実施が神戸大学大学院医学研究科長に承認された 2013 年 9 月 19 日から 2015 年 3 月 31 日までとした。mTKI はスニチニブ、ソラフェニブおよびアキシチニブとした。選択基準は、DNA 抽出のための血液が入手可能であること、患者情報の追跡が可能であることならびに初回 mTKI の導入時点で全身状態の尺度である Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG-PS) が 2 以下であることとした。また、除外基準は、初回 mTKI 導入時点で the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), version 4.0 における皮膚疼痛および手掌・足底発赤知覚不全症候群に相当する皮膚障害を有する患者ならびに HFSR を除く事由により 4 ヶ月以内に治療を中断した患者とした。予後リスク分類は Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) リスク分類を用いて行った⁶¹⁾。なお、本研究は「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守するとともに、神戸大学大学院医学研究科等医学倫理委員会の承認を得た上で実施した。また、全ての患者から書面による同意を取得し、患者の診療情報は泌尿器科医師とともに電子カルテよりレトロスペクティブに収集・評価した。

2. HFSR の評価

HFSR は、CTCAE ver. 4.0 により規定された手掌・足底発赤知覚不全症候群とし、患者の診療情報に基づきグレード分類された情報を抽出した。HFSR の発症患者は初回 mTKI 治療の開始 4 ヶ月以内に grade 1 以上の HFSR を発症した患者とした。診療情報より抽出が困難な場合については、主治医と協議の上で HFSR の診断を行った。外来患者においては、HFSR と診断された最初の外来診療日を HFSR の発症日とした。

3. 血液検体の収集と遺伝子多型解析

治療および診断目的で採取した血液の残渣を血液検体とした。ゲノム DNA は、末梢血液から NucleoSpin[®] Blood kit (MACHEREY-NAGEL, GmbH, Düren, Germany) により抽出した。STAT3 遺伝子多型 (rs4796793、rs9891119、rs1905341 および rs744166) の解析は TaqMan[®] SNP Genotyping Assays kit (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA, assay ID: C_27977213_10, C_30193884_10, AHD2B96, and C_3140282_10) を用いて行った。PCR 反応は 95°C で 10 秒間の変性反応に続き、95°C で 15 秒間のアニーリング反応、60°C で 1 分間の伸長反応を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。反応後の解析は ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) により行い、STAT3 の遺伝子型を決定した。

4. 統計解析

皮膚障害発症群および非発症群における患者背景の比較は unpaired Student's t-test, Welch's test, Mann–Whitney's U-test または χ^2 test により評価した。*STAT3* の遺伝子型と皮膚障害の発症との関連性については χ^2 test により評価し、オッズ比 (OR) と 95%信頼区間 (95% CIs) を算出した。遺伝子型による皮膚障害の発症と時間推移は Kaplan–Meier 法および log-rank test により評価した。有意水準は両側 5%以下とした。全ての統計学的処理は SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を用いた。

第3節 結果

1. *STAT3* 遺伝子多型の分布と患者背景

65名の患者を登録した。4名の患者はそれぞれ、間質性肺炎、紅斑、整形外科手術施行および消化管穿孔の理由から、4ヵ月間以内に治療を中断したため除外した。また、1名の患者は血液サンプルを得ることができなかった。そのため、解析は65名中の60名を対象に実施した (Figure 2-1)。

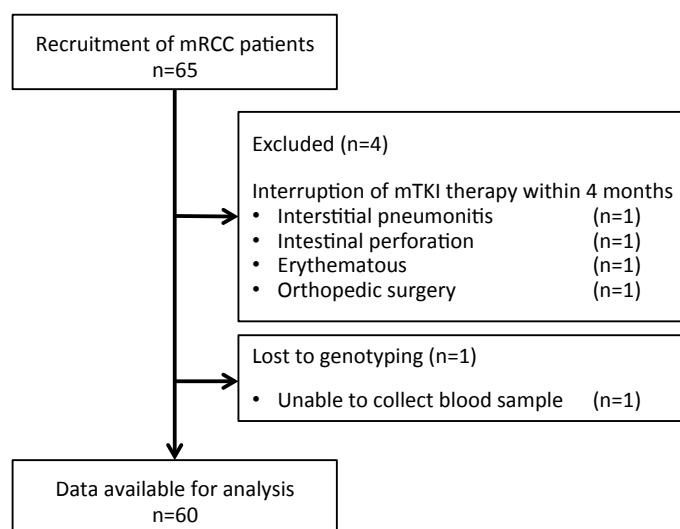


Figure 2-1 Distribution of patients

Yamamoto K., *et al.*, *Target. Oncol.*, **11**, 93–99 (2016)

60名の患者背景および *STAT3* 遺伝子多型の各 SNP の分布を Table 2-1 に示した。本研究での対象患者において rs9891119、rs1905341 および rs744166 は連鎖不均衡を示した。また、rs4796793 は他の SNP と極めて近い遺伝子型分布を示したが、一部の症例で他の SNP と異なる変異パターンを示した。解析対象 60名のうち、4ヵ月間以内に grade 1 以上の HFSR を発症した患者は 46名 (76.6%) であり、grade 2 以上の重症例は 23名 (38.3%)であった。発症群と非発症群において、年齢、性別および MSKCC リスク分類に顕著な差は認めなかった。また、本研究対象による各 SNP の遺伝子型の分布は国立生物工学情報センター (NCBI) データベースの日本人における分布と同様の分布を示した。

Table 2-1 Characteristics of 60 patients with mRCC treated with mTKI

Patient characteristic	
Median age, year (range)	70.6 (40.0–90.0)
Gender, n (%)	
Male	43 (71.7)
Female	17 (28.3)
MSKCC risk group, n (%)	
Favorable	18 (30.0)
Intermediate	39 (65.0)
Poor	3 (5.0)
First mTKI, n (%)	
Sunitinib	35 (58.3)
Sorafenib	16 (26.7)
Axitinib	9 (15.0)
HFSR grade, n (%)	
0	14 (23.4)
1	28 (46.7)
2	13 (21.6)
3	5 (8.3)
rs4796793 genotypes, n (%)	
G/G	9 (15.0)
G/C	27 (45.0)
C/C	24 (40.0)
rs744166 genotypes, n (%)	
C/C	10 (16.7)
C/T	26 (43.3)
T/T	24 (40.0)
rs9891119 genotypes, n (%)	
C/C	10 (16.7)
C/A	26 (43.3)
A/A	24 (40.0)
rs1905341 genotypes, n (%)	
T/T	10 (16.7)
T/C	26 (43.3)
C/C	24 (40.0)

mRCC metastatic renal cell carcinoma, *mTKI* multiple tyrosine kinase inhibitor, *HFSR* hand-foot skin reaction, *MSKCC* Memorial Sloan-Kettering Cancer Center

Yamamoto K., *et al.*, *Target. Oncol.*, **11**, 93–99 (2016)

2. STAT3 遺伝子多型と HFSR の発症との関係

STAT3 の 4 つの遺伝子多型のうち、rs4796793 の遺伝子型が最も顕著に HFSR の発症と関連性を示した。rs4796793 の G のアレル頻度は、HFSR 非発症群で 64.3%、HFSR 発症群で 29.3%であった (OR = 4.33; 95% CI, 1.80-10.45; P = 0.001; Table 2-2)。また、HFSR の発症群と非発症群では、rs4796793 の遺伝子型の分布が顕著に異なることが示された (P = 0.002, trend test)。rs4796793 の G/G は HFSR の発症と顕著な負の関連性を示した (G/G vs. G/C + C/C; OR = 10.75; 95% CI, 2.38-48.07; P = 0.001)。加えて、Kaplan–Meier 法による解析では、HFSR 発症までの時間の中央値において G/G と G/C + C/C との間に顕著な差を認めた (P = 0.009, log-rank test; Figure 2-2)。

Table 2-2 Association between STAT3 polymorphisms and the development of HFSR

rs4796793	No. (%) of genotypes		Genotype comparison				
	Non-HFSR	HFSR		OR	95 % CI	P	
Allele	G	18 (64.3)	27 (29.3)	G vs. C	4.33	1.80 - 10.45	0.001
	C	10 (35.7)	65 (70.7)				
Genotype	G/G	6 (42.9)	3 (6.5)	G/G vs. G/C vs. C/C	-	-	0.002 ^a
	G/C	6 (42.9)	21 (45.7)	G/G vs. G/C + C/C	10.75	2.38 - 48.07	0.001
	C/C	2 (14.2)	22 (47.8)	G/G + G/C vs. C/C	5.50	1.21 - 24.16	0.025

OR odds ratio, CI confidence interval, HFSR hand-foot skin reaction

^aP for trend test

Yamamoto K., et al., *Target. Oncol.*, **11**, 93–99 (2016)

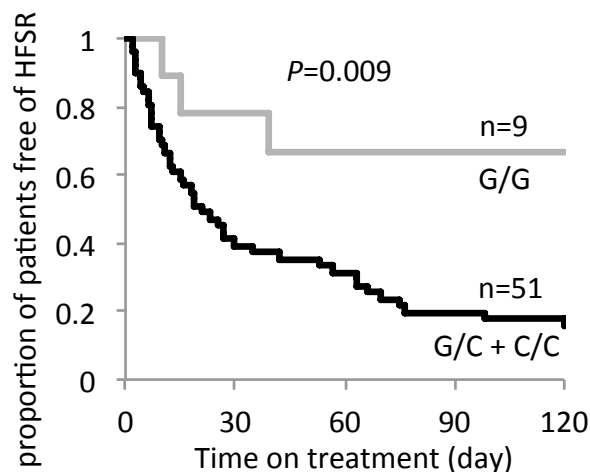


Figure 2-2 Kaplan-Meier analysis of time to incidence of HFSR on different rs4796793 genotypes
Gray line, G/G genotype; black line, G/C genotype + C/C genotype. P value was calculated by log-rank test.

Yamamoto K., et al., *Target. Oncol.*, **11**, 93–99 (2016)

3. STAT3 遺伝子多型と HFSR の重症度との関係

rs4796793 の遺伝子型と HFSR の重症度の関連性について評価するために、grade 1 の軽度 HFSR と grade 2 以上の中等度～重症 HFSR における遺伝子型の分布を比較したが、2 群間に顕著な差は認めなかった (Table 2-3)。

Table 2-3 Associations between STAT3 polymorphism and the severity of HFSR

SNP	No. (%) of genotypes		Genotype comparison	OR	95 % CI	P	
	Grade 1	Grade ≥2					
rs4796793	G/G	3 (10.7)	0	G/G vs G/C vs C/C	-	-	0.755 ^a
	G/C	11 (39.3)	10 (55.6)	G/G vs G/C + C/C	-	-	0.270
	C/C	14 (50.0)	8 (44.4)	G/G + G/C vs C/C	0.80	0.25–2.58	0.769

HFSR hand-foot skin reaction SNP single nucleotide polymorphism, OR odds ratio, CI confidence interval

^a P for trend test

Yamamoto K., *et al.*, *Target. Oncol.*, **11**, 93–99 (2016)

4. スニチニブ治療患者における STAT3 遺伝子多型と HFSR の発症との関係

スニチニブを一次治療に使用した 35 名の患者を抽出して同様の比較を行った。rs4796793 の G/G 型は HFSR の発症において有意な負の関連性を示し、全患者での解析と同様の結果であった (OR = 15.00; 95% CI, 2.37–93.28; P = 0.002; Table 2-4)。

Table 2-4 Association between STAT3 polymorphism and the development of HFSR with patients treated by sunitinib as first mTKI

SNP	No. (%) of genotypes		Genotype comparison	OR	95 % CI	P	
	non-HFSR	HFSR					
rs4796793	G/G	5 (55.6)	2 (7.7)	G/G vs G/C vs C/C	-	-	0.008 ^a
	G/C	2 (22.2)	10 (38.5)	G/G vs G/C + C/C	15.00	2.37–93.28	0.002
	C/C	2 (22.2)	14 (53.8)	G/G + G/C vs C/C	4.08	0.78–20.45	0.101

HFSR hand-foot skin reaction, mTKI multiple tyrosine kinase inhibitor, SNP single nucleotide polymorphism, OR odds ratio, CI confidence interval

^a P for trend test

Yamamoto K., *et al.*, *Target. Oncol.*, **11**, 93–99 (2016)

第4節 考察

本研究において、著者は *STAT3* の遺伝子多型がスニチニブ、ソラフェニブまたはアキシチニブの一次治療を受けた腎細胞がん患者の HFSR の発症においてリスク因子となることを示した。一次治療としてスニチニブによる治療を受けた患者のみを抽出した解析においても、全患者対象の解析と同様に、*STAT3* の遺伝子多型と HFSR の発症に関連性を示したことから (Table 2-4)、特にスニチニブ使用患者においては rs4796793 の遺伝子型が HFSR 発症のリスク因子となることが示唆される。

アジア地域、特に日本人においては、他の人種と比較して mTKI による治療を受けた患者の HFSR の発症率が極めて高い^{17,62)}。そのため、本研究では日本人において遺伝子変異の頻度が高いことが知られている SNP について評価した。NCBI データベースによると、rs4796793 の遺伝子型の日本人における分布は G/G、G/C および C/C がそれぞれ 15.6%、48.9% および 35.6% であり (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4796793)、腎細胞がん患者を対象とした本研究においても同様の分布を認めた (Table 2-1)。また、同データベースでは、rs4796793 の C アレル保有者は白色人種と比較してアジア系人種において非常に多いという情報が公開されている。さらに、腎細胞がんの IFN- α の治療反応性と関連する因子を特定した先行研究において、rs4796793 は *STAT3* の他の遺伝子多型である rs1026916、rs1905341、rs744166 および rs2306581 と非常に強い連鎖不均衡を示すことが報告されている⁵⁸⁾。本研究においても rs4796793 は、rs1905341、rs9891119 および rs744166 と強い連鎖不均衡を示し (Table 2-1)、mTKI による HFSR の発症に対して最も顕著な関連性が認められた (Table 2-2)。

STAT3 の SNP と各種疾患および薬物反応性との関連性については、日本人を対象とした研究結果が報告されている⁵⁷⁻⁶⁰⁾。しかし、*STAT3* の SNP の多くはその機能が明らかにされていない。一方、rs4796793 については、*STAT3* をコードする領域の 5'末端近傍に存在し、B リンパ球における *STAT3* mRNA 発現量が遺伝子型により異なると報告されている⁵⁸⁾。また、第1章において示した、ソラフェニブやスニチニブによる皮膚毒性が *STAT3* の活性阻害に起因することをふまえると、*STAT3* mRNA 発現量の低い患者は、mTKI による *STAT3* 阻害作用をより受けやすく、*STAT3* 活性の回復制御を示しにくいいため、結果として、表皮角化細胞における survivin、Mcl-1、Bcl-2 などのアポトーシス抑制因子の転写の低下を来し^{10,24,41)}、HFSR の発症に繋がるというメカニズムが考えられる。しかし、各遺伝子型に応じた *STAT3* mRNA 発現量の違いは、B リンパ球を用いた検討のみであり、表皮角化細胞の情報は報告されていない。今後、このことを検証するために rs4796793 の各遺伝子型の患者から表皮角化細胞を採取し、皮膚組織における *STAT3* mRNA 発現量を評価することで、rs4796793 が HFSR の発症と関連する詳細なメカニズムを特定できると考える。

rs4796793 の遺伝子型と HFSR の重症度には関連性が認められなかった (Table 2-3)。grade 2 以上の重症 HFSR は、血漿中薬物濃度、累積薬物血中濃下面積または薬物の維持投与量に関連することが報告されている⁶³⁻⁶⁶⁾。また、近年、ATP-binding Cassette Sub-family B Member 1 (*ABCB1*) や *ABCG2* などの mTKI の体内動態に影響を及ぼす様々な遺伝薬理学的要因が報告されているため^{63,66-69)}、これらの要因が HFSR の重症度と関連する可能性も高い。さらに、HFSR の発症は皮膚の圧力のかかる部位に限局する傾向にある^{21,70)}。そのため、HFSR の重症度は観察期間内の身体的活動性にも関

連している可能性も否定できない。したがって、HFSR の重症度は *STAT3* の遺伝子多型以外の要因に寄与するのかもしれない。

近年、mTKI は *STAT3* の活性を阻害することにより腎がん細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている^{14,71)}。さらに、腎細胞がんに関する報告によると、がん組織中の *STAT3* のリン酸化レベルは臨床転帰と関連することが明らかにされており⁷²⁾、がん細胞により増大した免疫細胞内の *STAT3* の活性化は、抗腫瘍効果を減弱させる重要な要因であることも知られている⁷³⁾。その上、HFSR の発症は mTKI の治療効果と関連していることから⁶⁾、*STAT3* の発現量に影響を及ぼす遺伝子多型は、mTKI の治療効果に関連する因子となる可能性もある。本知見に基づく探索的研究については第 3 章で論述する。

本研究結果の限界として、少数例の患者をレトロスペクティブに調査した研究であることを意識しなければならない。症例数は神戸大学医学部附属病院泌尿器科の通院患者数に基づき、実現可能性を優先的に考慮して設定したため、仮説に対する統計学的検出力は不十分であると言える。この探索的な研究結果を活用し、検証的な臨床試験を実施することで、HFSR の事前予測因子の臨床応用に向けて発展させることが可能となる。

結論として、著者のレトロスペクティブな解析により、*STAT3* の遺伝子多型は日本人の腎細胞がん患者における mTKI による HFSR のリスク因子となりうることを明らかにした。本知見は、第 1 章で得られた HFSR 発症メカニズムの基礎的な研究結果を、臨床研究により立証した重要な情報である。

第 5 節 小括

本章では、転移性腎細胞がん患者において *STAT3* の遺伝子多型と mTKI による HFSR の発症および重症度との関連性について評価し、*STAT3* の遺伝子多型が HFSR のリスク因子となる可能性について検討することで、以下の知見を得た。

1. rs4796793、rs9891119、rs1905341 および rs744166 は非常に近い遺伝子型分布を示した。
2. mTKI による HFSR 発症群と非発症群において、*STAT3* 遺伝子多型である rs4796793 の遺伝子型の分布が顕著に異なることを明らかにした。
3. mTKI による HFSR を発症した患者の重症度は、rs4796793 の遺伝子型と関連性を認めなかった。
4. rs4796793 の遺伝子型 G/G の患者群と G/C および C/C の患者群において、mTKI による HFSR の発症と時間推移の曲線に顕著な差を認めた。G/C および C/C を有する患者において HFSR の発症リスクが高いと考えられた。

第3章 STAT3 遺伝子多型と転移性腎細胞がん患者における治療効果との関連性

第1節 緒言

腎細胞がんは予後不良の腫瘍として認識されている。臨床転機が極めて悪い要因の一つとして、その転移性の高さが問題とされており⁷⁴⁾、転移性腎細胞がんの治療においては化学療法の有効性が非常に重要となる。転移性腎細胞がんの標準治療には分子標的治療薬が多用される。なかでも mTKI は、標準治療に用いられているソラフェニブやスニチニブに加えて、アキシチニブおよびパゾパニブが使用されるようになり、腎細胞がんの分子標的治療における重要な位置を占めるに至っている^{75,76)}。さらに、エベロリムスやテムシロリムスなどのラパマイシン標的タンパク質 (mTOR) 阻害薬に加え、近年では、未分化リンパ腫キナーゼ融合タンパク質阻害薬や Programmed death-1 (PD-1) 抗体などが臨床試験され、治療成績の更なる向上が期待されている⁷⁷⁾。様々な作用機序の薬剤が登場し、これらを逐次的に使用することで腎細胞がんの治療成績は向上したが、各薬剤の有効性に関わる因子については情報が不足している。また、腎細胞がん治療に用いる分子標的治療薬は、高額な薬価が問題となるため⁷⁸⁾、有効性を事前予測し、治療初期から最適な化学療法を提供するためのツールの開発が急務とされている。

STAT3 は、細胞の分化、生存および増殖に広く関与しており⁷⁹⁾、様々ながん種において恒常的に活性化していることが報告されている³⁵⁾。そのため、STAT3 はがん治療の標的として以前から注目を集めてきた^{31,51)}。特に mTKI の細胞増殖抑制作用は、STAT3 を介した機構が寄与することが示唆されている^{14,80,81)}。また、STAT3 をコードする遺伝子は、日本人において STAT3 の機能が異なる SNP が知られており、日本人の腎細胞がん患者における IFN- α 治療の有効性を事前予測するツールとして応用可能であることが報告されている^{57,58)}。報告されている SNP には機能的な変化が生じていることも示唆されているため、著者は STAT3 の SNP が mTKI による腎細胞がん治療の効果と関連する可能性を考えた。

著者は、第1章において、mTKI に起因する表皮角化細胞の増殖抑制作用およびアポトーシスは STAT3 の活性阻害を介しており、腎がん細胞においても同様のメカニズムが存在する可能性について論じた。以上をふまえると、mTKI の治療効果と STAT3 の遺伝子多型が関連する可能性は十分に考えられる。

本章では、STAT3 の遺伝子多型が腎細胞がん治療における mTKI の効果関連因子となる可能性を明らかにすることを目的とし、mTKI に対する腎細胞がんの治療反応性と STAT3 の SNP との関連性を検討した。

第2節 方法

1. 対象患者

対象は、神戸大学医学部附属病院泌尿器科に通院中の根治的腎摘出術を施行した腎細胞がん患者であり、mTKI 治療を実施した経験のある患者または実施予定の患者である。mTKI はスニチニブ、ソラフェニブおよびアキシチニブとした。患者登録期間は、本研究の実施が神戸大学大学院医学研究科長に承認された2013年9月19日から2015年9月30日までとした。適合基準として、DNA 抽出のための血液サンプルが入手可能であること、患者情報の追跡が可能であることならびに一次治療の導入時点で全身状態の尺度である ECOG-PS が2以下であることとした。また、除外基準としては、対象薬剤治療中に有効性評価のための CT 画像が未取得である患者、一次治療においてテムシロリムスを使用した患者、mTKI と IFN- α の併用療法を施行した患者とした。予後リスク分類は MSKCC リスク分類を用いて行った⁶¹⁾。なお、本研究は「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守するとともに、神戸大学大学院医学研究科等医学倫理委員会の承認を得た上で実施した。また、全ての患者から書面による同意を取得し、患者の診療情報は泌尿器科医師とともに電子カルテよりレトロスペクティブに収集・評価した。

2. 治療反応性の評価

mTKI の治療反応性は、mTKI 導入前と導入後一定の治療間隔における CT 画像により評価した。mTKI の治療反応性を評価する項目は、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) ver. 1.1.に基づき、最良総合効果、無増悪生存期間 (PFS)、治療成功期間 (TTF) および治療反応期間 (TTR) とし、主治医による判定を行った。また、最良総合効果において、完全奏功 (CR) および部分奏功 (PR) であった患者を奏効群、安定 (SD) および進行 (PD) であった患者を非奏効群と定義した。

3. 血液検体の収集と遺伝子多型解析

血液検体は治療および診断目的で採取した血液の残渣とした。ゲノム DNA は血液から NucleoSpin[®] Blood kit により抽出した。STAT3 遺伝子多型 (rs4796793、rs9891119 および rs744166) の解析は、TaqMan[®] SNP Genotyping Assays kit (assay ID: C_27977213_10, C_30193884_10, and C_3140282_10) を用いて行った。PCR 反応は 95°C で 10 秒間の変性反応に続き、95°C で 15 秒間のアニーリング反応、60°C で 1 分の伸長反応を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。反応後の解析は、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System により行い、STAT3 の SNP の遺伝子型を決定した。

4. 統計解析

各遺伝子型や患者背景と最良総合効果の関連性については、Fisher の正確確率検定により評価し、OR と 95% CI を算出した。PFS、TTF および TTR は Kaplan-Meier 法により STAT3 遺伝子型毎の時

間イベント推移曲線を推定し、log-rank testにより2群の曲線における差を評価した。有意水準は、両側5%以下とした。全ての統計学的処理は、EZRソフトウェア(自治医科大学附属さいたま医療センター、埼玉)を用いた⁸²⁾。EZRはR ver.3.2.2のグラフィカル・ユーザー・インターフェースであり、生物統計に多用される計算を支援するR Commanderの改良版である。

第3節 結果

1. STAT3 遺伝子多型の分布と患者特性

本研究では、71名の患者を登録し、21名は除外された。除外理由は、血液検体の損失した患者1名、一次治療としてテムシロリムスを使用した患者8名、mTKIとインターフェロンの併用療法を施行した患者2名、CT画像の評価前に治療を終了した患者7名、追跡不能患者3名であった (Figure 3-1)。

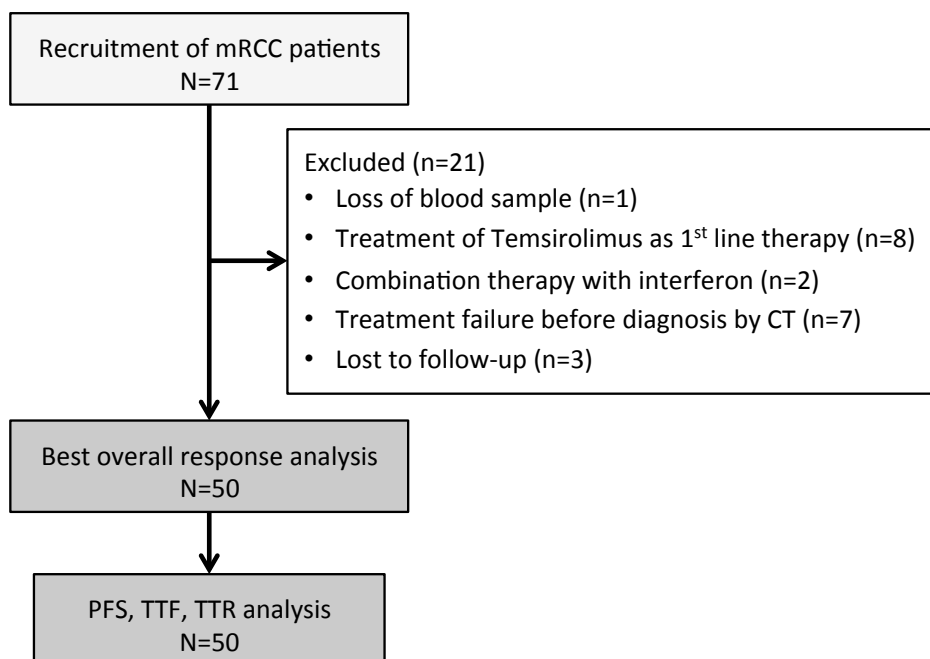


Figure 3-1 Distribution of patients Yamamoto K., *et al.*, *Med. Oncol.*, **32**, 24 (2016)

STAT3 の SNP は解析計画に一致した 50 名で実施した。各 SNP の分布を Table 3-1 に示す。本研究の対象患者において rs4796793 は他の SNP と極めて近い遺伝子型分布を示したが、一部の症例で他の SNP と異なる変異パターンを示した。

Table 3-1 Distribution of SNPs

STAT3 SNP	n = 50
rs4796793 genotype [n (%)]	
G/G	9 (18.0 %)
G/C	23 (46.0 %)
C/C	18 (36.0 %)
rs744166 genotype [n (%)]	
C/C	10 (20.0 %)
C/T	22 (44.0 %)
T/T	18 (36.0 %)
rs9891119 genotype [n (%)]	
C/C	10 (20.0 %)
C/A	22 (44.0 %)
A/A	18 (36.0 %)

Yamamoto K., *et al.*, *Med. Oncol.*, **32**, 24 (2016)

その他の患者背景について Table 3-2 に示す。一次治療に使用された mTKI はスニチニブが 34 名、ソラフェニブが 13 名、アキシチニブが 3 名であった。mTKI の最良総合効果において CR は該当患者がおらず、PR は 17 名、SD は 31 名、PD は 2 名であった。

Table 3-2 Characteristics of 50 patients with mRCC treated with mTKI

Patient characteristic	<i>n</i> = 50
Median age [years (range)]	70.9 (40.0–90.0)
Gender [<i>n</i> (%)]	
Male	34 (68.0 %)
Female	16 (32.0 %)
MSKCC risk factor [<i>n</i> (%)]	
Favorable	25 (50.0 %)
Intermediate	24 (48.0 %)
Poor	1 (2.0 %)
First mTKI [<i>n</i> (%)]	
Sunitinib	34 (68.0 %)
Sorafenib	13 (26.0 %)
Axitinib	3 (6.0 %)
Site of metastasis [<i>n</i> (%)]	
Lung	36 (72.0 %)
Liver	5 (10.0 %)
Bone	6 (12.0 %)
Lymph nodes	7 (14.0 %)
Others	21 (42.0 %)
Overall best response [<i>n</i> (%)]	
CR	0
PR	17 (34.0 %)
SD	31 (62.0 %)
PD	2 (4.0 %)

Yamamoto K., *et al.*, *Med. Oncol.*, **32**, 24 (2016)

2. STAT3 遺伝子多型と最良総合効果との関連性

STAT3 の SNP と mTKI の最良総合効果との関連性を Table 3-3 に示す。rs4796793 の C のアレルを有する患者の割合は非奏効群と比較して奏効群で有意に高かった (76 vs. 50%; $P = 0.018$)。また、奏効群と非奏効群では、rs4796793 の遺伝子型の分布が異なる傾向を示した ($P = 0.057$, trend test)。C/C 型の割合が奏効群で顕著に高いことが示された ($P = 0.028$; OR = 4.46; 95%CI, 1.31-15.28)。rs744166 および rs9891119 においても奏効群と非奏効群で遺伝子型の分布が異なることが示された。

Table 3-3 Association between each polymorphism and the overall best response

Allele/genotype	Count		Frequency		OR	95 % CI	p	
	NON	RES	NON	RES				
STAT3 (rs4796793)								
G	33	8	0.50	0.24	G vs. C	3.25	1.30–8.07	0.018*
C	33	26	0.50	0.76				
G/G	8	1	0.24	0.06	G/G vs. G/C vs. C/C	–	–	0.057
G/C	17	6	0.52	0.35	G/G vs. G/C + C/C	5.12	0.73–33.84	0.141
C/C	8	10	0.24	0.59	C/C vs. G/G + G/C	4.46	1.31–15.28	0.028*
STAT3 (rs744166)								
C	33	9	0.50	0.26	C vs. T	2.78	1.14–6.74	0.032*
T	33	25	0.50	0.74				
C/C	8	2	0.24	0.12	C/C vs. C/T vs. T/T	–	–	0.060
C/T	17	5	0.52	0.29	C/C vs. C/T + T/T	2.40	0.50–11.20	0.461
T/T	8	10	0.24	0.59	T/T vs. C/C + C/T	4.46	1.31–15.28	0.028*
STAT3 (rs9891119)								
C	33	9	0.50	0.26	C vs. A	2.78	1.14–6.74	0.032*
A	33	25	0.50	0.74				
C/C	8	2	0.24	0.12	C/C vs. C/A vs. A/A	–	–	0.060
C/A	17	5	0.52	0.29	C/C vs. C/A + A/A	2.40	0.50–11.20	0.461
A/A	8	10	0.24	0.59	A/A vs. C/C + C/A	4.46	1.31–15.28	0.028*

NON non-responder, RES responder

* $P < 0.05$

Yamamoto K., et al., *Med. Oncol.*, **32**, 24 (2016)

さらに、mTKIの奏効群と非奏効群の患者背景 (MSKCC リスク分類、年齢、性別、体格指数、転移組織、手足皮膚反応の発症、C 反応性タンパク、血小板数およびアルブミン値)に顕著な偏りは認めなかった (Table 3-4)。

Table 3-4 Univariate analysis of association between various parameters with the overall best response with mRCC treated with mTKI

	To response		
	OR	95 % CI	p value
MSKCC risk score (favorable vs. others)	1.20	0.38–3.77	1.000
Age (<65 vs. 65≤)	1.55	0.43–5.67	0.728
Gender (male vs. female)	1.20	0.35–4.09	1.000
BMI (<25 vs. 25≤)	0.58	0.43–7.05	0.467
Lung metastasis (positive vs. negative)	1.41	0.38–5.11	0.746
Liver metastasis (positive vs. negative)	3.32	0.59–18.56	0.321
Bone metastasis (positive vs. negative)	0.97	0.19–5.16	1.000
Lymph metastasis (positive vs. negative)	0.28	0.04–2.01	0.398
CRP (≤0.3 vs. 0.3<)	1.26	0.30–5.15	1.000
PLT (≤3.0 × 10 ⁵ vs. 3.0 × 10 ⁵ <)	1.60	0.21–11.92	1.000
Alb (<4.1 vs. 4.1≤)	1.08	0.34–3.47	1.000
HFS (G1 ≤ vs. G0)	2.67	0.67–10.33	0.209

Yamamoto K., et al., *Med. Oncol.*, 32, 24 (2016)

3. STAT3 遺伝子多型と時間-イベント推移との関連性

rs4796793 の遺伝子型による PFS、TTF および TTR の Kaplan–Meier 曲線を Figure 3-2 に示す。最良総合効果においては rs4796793 の遺伝子型 C/C と G/C および G/G で有意な関連性を示したにも関わらず、PFS および TTF においては 2 群に顕著な差を認めなかった (PFS; $p=0.599$, TTF; $p=0.683$, log-rank test)。一方で、TTR においては rs4796793 の遺伝子型 C/C と G/C および G/G に有意な差を認めた ($p=0.021$, log-rank test)。

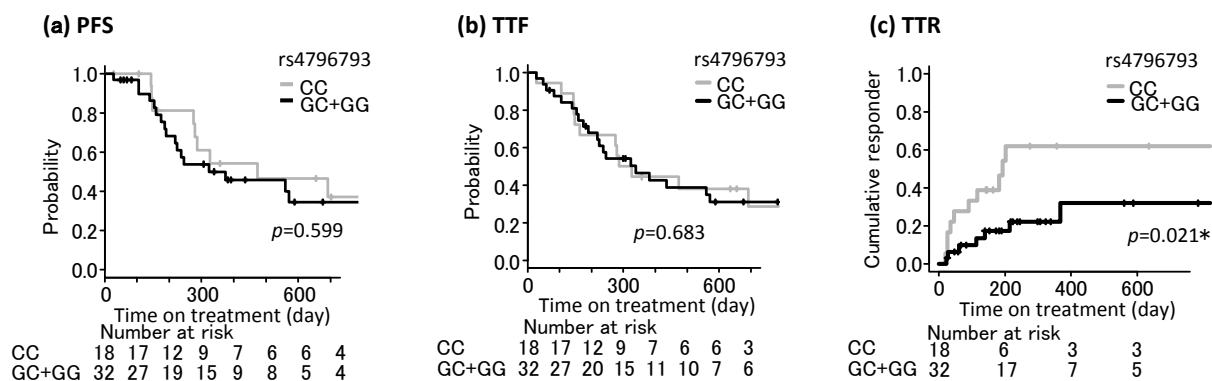


Figure 3-2 Time-to-event analysis according to the rs4796793 genotype

Kaplan-Meier curves for 50 patients with clear cell RCC according to different rs4796793 genotypes. Gray line, C/C genotype; black line, G/C + G/G genotypes. p values are calculated using the log-rank test. * $p < 0.05$. Abbreviations: PFS progression-free survival, TTF time- to-treatment failure, TTR time-to-treatment response

Yamamoto K., et al., *Med. Oncol.*, 32, 24 (2016)

第4節 考察

STAT3は細胞の増殖やアポトーシスを転写因子として制御する一方で、炎症や免疫応答においても中心的な役割を果たしている^{9,25,31,83})。また、今回検討したrs4796793はSTAT3をコードするmRNA発現量が遺伝子型毎に異なり、Cアレルを有するヒトほどmRNA発現量が低いことが既に知られているため⁵⁸)、遺伝子多型における薬剤感受性の違いはSTAT3の発現量に起因する可能性が高い。以上を踏まえ、著者はSTAT3遺伝子多型とmTKIの最良総合効果が関連性を示した理由として、がん細胞自身の特性と免疫システムの特性の2つのモデルを想定した。

がん細胞自身の特性として、がん細胞内のSTAT3が上皮間葉転換(EMT)関連因子やアポトーシス抑制因子の発現量の制御を介して、化学療法の感受性を制御する可能性が考えられる。STAT3の活性レベルは、シグナル伝達阻害薬の耐性を規定していることが知られており、がん治療の標的となることが報告されている^{83,84})。特にスニチニブは、腎がんでの抗腫瘍作用メカニズムにSTAT3が関与する基礎的研究が報告されている^{14,85})。さらに、腎がん細胞株を用いた*in vitro*の検討では、STAT3の発現量を遺伝子導入により変化させることでスニチニブの感受性が変化することが報告されている¹⁴)。また、STAT3はEMTを制御する因子であることも知られており^{86,87})、STAT3が活性化することで間葉系細胞の形質に近づき、化学療法の感受性を低下させることが報告されている^{88,89})。これらを踏まえると、STAT3の発現量が低いがん細胞に対してmTKIによる化学療法の感受性が高いことは妥当であると考えられる。しかしながら、著者の検討でmTKIの一次治療におけるPFSおよびTTFには関連性を示さず、TTRに関連性を示したことを考慮すると(Figure 3-2)、がん細胞自身のSTAT3発現量の違いは一過性の反応性を規定するのみであり、長期的な曝露においてはフィードバックにより影響が消失する可能性が考えられる。

一方、免疫システムの特性として、免疫チェックポイントを介した抗腫瘍免疫応答がSTAT3の発現量によって異なる可能性が考えられる。細胞障害性T細胞が抗腫瘍免疫応答を起こすと、IFN- γ やTNF- α を分泌し、炎症を惹起することで、がん細胞は二次的にPD-Ligand 1(PD-L1)を発現する⁹⁰)。この際に、サイトカインの刺激からPD-L1の発現制御を行う因子がProtein Kinase B(Akt)やSTAT3などのシグナル伝達因子である^{91,92})。これらの因子の活性化によってPD-L1の発現が亢進したがん細胞では、CD8陽性T細胞に発現するPD-1がPD-L1と複合体を形成することで、主要組織適合性複合体-T細胞受容体シグナルが抑制され、腫瘍細胞は免疫系に排除されない。つまり、STAT3はがん細胞におけるPD-L1の発現制御に関わる重要な因子であり、STAT3発現量の違いが抗腫瘍免疫の程度を規定している可能性が考えられる。PDL-1は特定のがん細胞において恒常的に発現しており、腎がんにおいてもPDL-1の過剰発現は報告されている⁹³⁻⁹⁵)。したがって、STAT3の遺伝子多型がPDL-1の発現量を規定し、T-cellからのアポトーシスを受ける程度が異なることが、STAT3の遺伝子多型による治療反応性の違いに一部寄与する可能性が考えられる。

HFSRはmTKIの治療継続に影響を及ぼす重大な副作用である。HFSRの発症はmTKI治療における臨床転機と関連することが報告されており⁶)、第2章では、HFSRの発症におけるSTAT3のrs4796793の遺伝子型が関連することについて論述した。つまり、STAT3の遺伝子多型と治療反応性が関連するという本研究の結果はこれらの報告を一部支持するものであり、rs4796793がmTKIの皮

膚障害と治療効果の共通した関連因子となる可能性を示している。さらに、本研究において C/C と G/C および G/G における TTF に差を認めなかった要因として (Figure 3-2)、C アレルの保有者は、有効性と毒性の両面が表現系として現れたことが考えられる。

本研究結果の限界として、サンプル数の過少があげられる。本研究は探索的な研究であるため、今後、検証的な臨床試験を実施することで、臨床応用への発展に繋がると考える。また、mTKI の投与量や血中濃度が治療効果に及ぼす影響を評価することが重要である。薬物血中濃度やそれに影響を及ぼす輸送単体および代謝酵素の SNP が治療効果と関連することが報告されている^{66,68,96}。また、mTKI の有効性や安全生は期間中の投与量や AUC に依存することも報告されている⁹⁷⁻¹⁰⁰。今後、薬物動態-薬力学的パラメーターを統合的に評価する研究を実施し、投与量を詳細に規定するためのツールとして確立することが、本研究で得られた知見を臨床応用するためには重要である。

結論として、*STAT3* の SNPs が mTKI の最良総合効果と関連することが示された。また、*STAT3* の rs4796793 の遺伝子型において、PFS や TTF に差を認めなかったものの、TTR に顕著な差を認めた。薬物動態に関連する因子と合わせた評価を行うことで、*STAT3* の SNP が治療効果に関連する因子となる可能性を示した。

第 5 節 小括

本章では、mTKI による皮膚障害の発症と治療効果との関連性に基づき、第 2 章で論述した HFSR の発症と関連する遺伝子多型に着目して、mTKI の治療効果との関連性を検討し、以下の結果を得た。

1. mTKI 治療の最良総合効果に基づく奏効群と非奏効群では、*STAT3* 遺伝子多型である rs4796793 の遺伝子型の分布が異なる傾向を示すことを明らかにした。
2. mTKI 治療の最良総合効果に対して、*STAT3* の遺伝子多型以外の患者背景は関連性を示さなかった。HFSR についても最良総合効果と関連を認めなかった。
3. rs4796793 の遺伝子型 C/C の患者群と G/C および G/G の患者群では、無増悪生存期間 (PFS)、治療成功期間 (TTF) において顕著な差は認めなかったものの、治療反応期間 (TTR) においては有意な差を認めた。

総括

分子標的治療薬は、がん化学療法的发展において必要不可欠であり、その貢献は今後も高まっていくことが自明である。しかしながら、特有の副作用発現への対応は未だ進展しておらず、分子標的治療薬の進歩にはこれらの克服が必須である。また、治療効果および副作用の発症を予測する因子の確立は、医薬品の適正使用に大きく貢献するものである。著者は、mTKI に共通の副作用である皮膚障害について、分子生物学的なメカニズムの解明と予測因子の確立を目的として、皮膚組織の恒常性を維持する重要な因子である STAT3 の活性変動に着目して検討した。ヒト表皮角化細胞株を用いた基礎的検討により分子生物学的発症メカニズムを探索し、さらに、ヒトを対象とした臨床研究により基礎研究での仮説を立証すると共に、有効性および皮膚障害を事前予測するバイオマーカーを特定するための探索的観察研究を実施した。

第1章 マルチキナーゼ阻害薬によるヒト表皮角化細胞の STAT3 シグナル経路に及ぼす影響

mTKI であるソラフェニブおよびスニチニブの HaCaT 細胞に対する細胞増殖抑制作用およびアポトーシス誘導作用において、STAT3 の活性阻害に伴うアポトーシス抑制因子の発現減少が寄与することを明らかにした。さらに、その阻害機構は間接的であり、ソラフェニブは ERK および p38 MAPK を介して、スニチニブは p38 MAPK を介してそれぞれ STAT3 を阻害する可能性を示した。しかし、STAT3 活性を阻害することによるソラフェニブおよびスニチニブの増殖抑制作用の増強は Caki-1 細胞においても認められたことから、腎細胞がんに対する抗腫瘍作用においても同様のメカニズムが寄与する可能性を示唆した。

第2章 STAT3 の遺伝子多型と転移性腎細胞がん患者におけるマルチキナーゼ阻害薬による手足皮膚反応との関連性

mTKI による HFSR の発症患者と非発症患者において、STAT3 の SNP である rs4796793 の遺伝子型の分布が顕著に異なることを示した。また、rs4796793 の遺伝子型が G/G の患者群と G/C および C/C の患者群において、HFSR の発症と時間推移の曲線に顕著な差を認めたことから、HFSR の発症と rs4796793 の遺伝子型には関連性があることが示唆された。しかしながら、HFSR の重症度と rs4796793 の遺伝子型に関連性は認められず、HFSR の重症度については血中濃度等その他の要因が関連する可能性が考えられた。

第3章 STAT3 の遺伝子多型と転移性腎細胞がん患者における治療効果との関連性

mTKI 治療の最良総合効果に基づく奏効群と非奏効群では、STAT3 遺伝子多型である rs4796793 の遺伝子型の分布が異なる傾向を示すことを明らかにした。また、STAT3 の遺伝子多型以外の患者背景は最良総合効果と関連性を示さなかった。rs4796793 の遺伝子型 C/C の患者群と G/C および G/G の患者群では、PFS、TTF において顕著な差は認めなかったものの、TTR においては有意な差を認めた。STAT3 の mRNA 発現量が低い遺伝子型の患者は mTKI の治療効果が高い可能性が示された。

以上より、著者は mTKI による皮膚障害に STAT3 の活性変動が寄与することを基礎・臨床の両面から解明し、*STAT3* の遺伝子多型を皮膚障害のリスク因子ならびに治療効果に関連する因子として応用する可能性について提唱した。今後、皮膚障害との関連が示唆されている既存の因子と推定精度を比較することにより、事前予測因子としての有用性を評価することができる。本研究結果は、HFSR の発症メカニズムの解明ならびに事前予測因子の特定や治療効果の予測において重要な知見になり、mTKI 治療において遺伝子型毎の至適用量を規定することによる個別化治療の実現に繋がるものと考えられる。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました神戸大学大学院医学研究科 平井みどり教授、現北海道医療大学薬学部（前神戸大学大学院医学研究科准教授）平野剛教授、神戸大学大学院医学研究科 中川勉特命講師に衷心より御礼申し上げます。

また、本論文提出の機会を与えて戴くと共に、御懇意なる御指導と御鞭撻を賜りました京都薬科大学臨床薬学分野 西口工司教授に深甚たる謝意を表します。そして、本論文の作成に際して多大なご助言を賜りました京都薬科大学 薬物動態学分野 栄田敏之教授、病態生理学分野 芦原英司教授に衷心より御礼申し上げます。

さらに、多くの有益な御助言と御協力賜りました京都薬科大学臨床薬学分野 辻本雅之講師、峯垣哲也助教、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 四宮一昭准教授、須野学准教授、神戸大学大学院医学研究科腎泌尿器科分野 三宅秀明准教授、藤澤正人教授、同皮膚科学分野 尾藤利憲講師、錦織千佳子教授、神戸薬科大学薬学臨床教育センター、神戸大学医学部附属病院薬剤部および神戸大学大学院医学研究科薬物動態学分野および薬剤学分野の諸氏に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. 厚生労働省. 人口動態統計 (2014).
2. Campistol J.M., de Fijter J.W., Flechner S.M., Langone A., Morelon E., Stockfleth E. mTOR inhibitor-associated dermatologic and mucosal problems. *Clin. Transplant.*, **24**, 149-156 (2010).
3. Heidary N., Naik H., Burgin S. Chemotherapeutic agents and the skin: An update. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **58**, 545-570 (2008).
4. Hu J.C., Sadeghi P., Pinter-Brown L.C., Yashar S., Chiu M.W. Cutaneous side effects of epidermal growth factor receptor inhibitors: clinical presentation, pathogenesis, and management. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **56**, 317-326 (2007).
5. Petrelli F., Borgonovo K., Cabiddu M., Lonati V., Barni S. Relationship between skin rash and outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with anti-EGFR tyrosine kinase inhibitors: a literature-based meta-analysis of 24 trials. *Lung. Cancer.*, **78**, 8-15 (2012).
6. Poprach A., Pavlik T., Melichar B., Puzanov I., Dusek L., Bortlicek Z., Vyzula R., Abrahamova J., Buchler T. Skin toxicity and efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic renal cell carcinoma: a national registry-based study. *Ann. Oncol.*, **23**, 3137-3143 (2012).
7. Sen N., Che X., Rajamani J., Zerboni L., Sung P., Ptacek J., Arvin A.M. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and survivin induction by varicella-zoster virus promote replication and skin pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 600-605 (2012).
8. Akira S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells*, **17**, 138-146 (1999).
9. Jarnicki A., Putoczki T., Ernst M. Stat3: linking inflammation to epithelial cancer - more than a "gut" feeling? *Cell Div.*, **5**, 14 (2010).
10. Aoki Y., Feldman G.M., Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood*, **101**, 1535-1542 (2003).
11. Shiratori-Hayashi M., Koga K., Tozaki-Saitoh H., Kohro Y., Toyonaga H., Yamaguchi C., Hasegawa A., Nakahara T., Hachisuka J., Akira S., Okano H., Furue M., Inoue K., Tsuda M. STAT3-dependent reactive astrogliosis in the spinal dorsal horn underlies chronic itch. *Nat. Med.*, **21**, 927-931 (2015).
12. Andres R.M., Montesinos M.C., Navalon P., Paya M., Terencio M.C. NF-kappaB and STAT3 inhibition as a therapeutic strategy in psoriasis: in vitro and in vivo effects of BTH. *J. Invest. Dermatol.*, **133**, 2362-2371 (2013).
13. Lee C.H., Hong C.H., Yu W.T., Chuang H.Y., Huang S.K., Chen G.S., Yoshioka T., Sakata M., Liao W.T., Ko Y.C., Yu H.S. Mechanistic correlations between two itch biomarkers, cytokine interleukin-31 and neuropeptide beta-endorphin, via STAT3/calcium axis in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.*, **167**, 794-803 (2012).
14. Xin H., Zhang C., Herrmann A., Du Y., Figlin R., Yu H. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell

- carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res.*, **69**, 2506-2513 (2009).
15. Carlomagno F., Anaganti S., Guida T., Salvatore G., Troncone G., Wilhelm S.M., Santoro M. BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *J. Natl. Cancer Inst.*, **98**, 326-334 (2006).
 16. Wilhelm S.M., Carter C., Tang L., Wilkie D., McNabola A., Rong H., Chen C., Zhang X., Vincent P., McHugh M., Cao Y., Shujath J., Gawlak S., Eveleigh D., Rowley B., Liu L., Adnane L., Lynch M., Auclair D., Taylor I., Gedrich R., Voznesensky A., Riedl B., Post L.E., Bollag G., Trail P.A. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.*, **64**, 7099-7109 (2004).
 17. Escudier B., Eisen T., Stadler W.M., Szczylik C., Oudard S., Siebels M., Negrier S., Chevreau C., Solska E., Desai A.A., Rolland F., Demkow T., Hutson T.E., Gore M., Freeman S., Schwartz B., Shan M., Simantov R., Bukowski R.M. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **356**, 125-134 (2007).
 18. Motzer R.J., Hutson T.E., Tomczak P., Michaelson M.D., Bukowski R.M., Rixe O., Oudard S., Negrier S., Szczylik C., Kim S.T., Chen I., Bycott P.W., Baum C.M., Figlin R.A. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **356**, 115-124 (2007).
 19. Fischer A., Wu S., Ho A.L., Lacouture M.E. The risk of hand-foot skin reaction to axitinib, a novel VEGF inhibitor: a systematic review of literature and meta-analysis. *Invest. New Drugs*, **31**, 787-797 (2013).
 20. Wozel G., Sticherling M., Schon M.P. Cutaneous side effects of inhibition of VEGF signal transduction. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, **8**, 243-249 (2010).
 21. Yang C.H., Lin W.C., Chuang C.K., Chang Y.C., Pang S.T., Lin Y.C., Kuo T.T., Hsieh J.J., Chang J.W. Hand-foot skin reaction in patients treated with sorafenib: a clinicopathological study of cutaneous manifestations due to multitargeted kinase inhibitor therapy. *Br. J. Dermatol.*, **158**, 592-596 (2008).
 22. Iijima M., Fukino K., Adachi M., Tsukamoto T., Murai M., Naito S., Minami H., Furuse J., Akaza H. Sorafenib-associated hand-foot syndrome in Japanese patients. *J. Dermatol.*, **38**, 261-266 (2011).
 23. Uemura H., Shinohara N., Yuasa T., Tomita Y., Fujimoto H., Niwakawa M., Mugiya S., Miki T., Nonomura N., Takahashi M., Hasegawa Y., Agata N., Houk B., Naito S., Akaza H. A phase II study of sunitinib in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma: insights into the treatment, efficacy and safety. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **40**, 194-202 (2010).
 24. Epling-Burnette P.K., Liu J.H., Catlett-Falcone R., Turkson J., Oshiro M., Kothapalli R., Li Y., Wang J.M., Yang-Yen H.F., Karras J., Jove R., Loughran T.P., Jr. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J. Clin. Invest.*, **107**, 351-362 (2001).
 25. Levy D.E., Darnell J.E., Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell*

- Biol.*, **3**, 651-662 (2002).
26. Real P.J., Sierra A., De Juan A., Segovia J.C., Lopez-Vega J.M., Fernandez-Luna J.L. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene*, **21**, 7611-7618 (2002).
 27. Dallaglio K., Marconi A., Pincelli C. Survivin: a dual player in healthy and diseased skin. *J. Invest. Dermatol.*, **132**, 18-27 (2012).
 28. Pincelli C., Marconi A. Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, **22**, 71-79 (2000).
 29. Sano S., Chan K.S., DiGiovanni J. Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases. *J. Dermatol. Sci.*, **50**, 1-14 (2008).
 30. Gao S.P., Mark K.G., Leslie K., Pao W., Motoi N., Gerald W.L., Travis W.D., Bornmann W., Veach D., Clarkson B., Bromberg J.F. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J. Clin. Invest.*, **117**, 3846-3856 (2007).
 31. Yu H., Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 97-105 (2004).
 32. Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.*, **106**, 761-771 (1988).
 33. Yamamoto K., Uda A., Mukai A., Yamashita K., Kume M., Makimoto H., Bito T., Nishigori C., Hirano T., Hirai M. Everolimus-induced human keratinocytes toxicity is mediated by STAT3 inhibition. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **32**, 83 (2013).
 34. Nakamura A., Hara K., Yamamoto K., Yasuda H., Moriyama H., Hirai M., Nagata M., Yokono K. Role of the mTOR complex 1 pathway in the in vivo maintenance of the intestinal mucosa by oral intake of amino acids. *Geriatr. Gerontol. Int.*, **12**, 131-139 (2012).
 35. Bromberg J.F., Wrzeszczynska M.H., Devgan G., Zhao Y., Pestell R.G., Albanese C., Darnell J.E., Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell*, **98**, 295-303 (1999).
 36. Aggarwal B.B., Kunnumakkara A.B., Harikumar K.B., Gupta S.R., Tharakan S.T., Koca C., Dey S., Sung B. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1171**, 59-76 (2009).
 37. Lufei C., Koh T.H., Uchida T., Cao X. Pin1 is required for the Ser727 phosphorylation-dependent Stat3 activity. *Oncogene*, **26**, 7656-7664 (2007).
 38. Quadros M.R., Peruzzi F., Kari C., Rodeck U. Complex regulation of signal transducers and activators of transcription 3 activation in normal and malignant keratinocytes. *Cancer Res.*, **64**, 3934-3939 (2004).
 39. Lim C.P. Serine Phosphorylation and Negative Regulation of Stat3 by JNK. *J. Biol. Chem.*, **274**, 31055-31061 (1999).
 40. Bai L., Yang J.C., Ok J.H., Mack P.C., Kung H.J., Evans C.P. Simultaneous targeting of Src kinase and

- receptor tyrosine kinase results in synergistic inhibition of renal cell carcinoma proliferation and migration. *Int. J. Cancer*, **130**, 2693-2702 (2012).
41. Stephanou A., Brar B.K., Knight R.A., Latchman D.S. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ.*, **7**, 329-330 (2000).
 42. Marconi A., Dallaglio K., Lotti R., Vaschieri C., Truzzi F., Fantini F., Pincelli C. Survivin identifies keratinocyte stem cells and is downregulated by anti-beta1 integrin during anoikis. *Stem Cells*, **25**, 149-155 (2007).
 43. Lo R.K., Cheung H., Wong Y.H. Constitutively active Galpha16 stimulates STAT3 via a c-Src/JAK- and ERK-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, **278**, 52154-52165 (2003).
 44. Tarutani M., Nakajima K., Takaishi M., Ohko K., Sano S. Epidermal hyperplasia induced by Raf-MAPK signaling requires Stat3 activation. *J. Dermatol. Sci.*, **72**, 110-115 (2013).
 45. Coriat R., Nicco C., Chereau C., Mir O., Alexandre J., Ropert S., Weill B., Chaussade S., Goldwasser F., Batteux F. Sorafenib-induced hepatocellular carcinoma cell death depends on reactive oxygen species production in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.*, **11**, 2284-2293 (2012).
 46. Park G.B., Choi Y., Kim Y.S., Lee H.K., Kim D., Hur D.Y. ROS-mediated JNK/p38-MAPK activation regulates Bax translocation in Sorafenib-induced apoptosis of EBV-transformed B cells. *Int. J. Oncol.*, **44**, 977-985 (2014).
 47. Rainer P.P., Doleschal B., Kirk J.A., Sivakumaran V., Saad Z., Groschner K., Maechler H., Hoefler G., Bauernhofer T., Samonigg H., Hutterer G., Kass D.A., Pieske B., von Lewinski D., Pichler M. Sunitinib causes dose-dependent negative functional effects on myocardium and cardiomyocytes. *B.J.U. Int.*, **110**, 1455-1462 (2012).
 48. Lacouture M.E., Wu S., Robert C., Atkins M.B., Kong H.H., Guitart J., Garbe C., Hauschild A., Puzanov I., Alexandrescu D.T., Anderson R.T., Wood L., Dutcher J.P. Evolving strategies for the management of hand-foot skin reaction associated with the multitargeted kinase inhibitors sorafenib and sunitinib. *Oncologist*, **13**, 1001-1011 (2008).
 49. Lee W.J., Lee J.L., Chang S.E., Lee M.W., Kang Y.K., Choi J.H., Moon K.C., Koh J.K. Cutaneous adverse effects in patients treated with the multitargeted kinase inhibitors sorafenib and sunitinib. *Br. J. Dermatol.*, **161**, 1045-1051 (2009).
 50. Sano S., Chan K.S., Carbajal S., Clifford J., Peavey M., Kiguchi K., Itami S., Nickoloff B.J., DiGiovanni J. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat. Med.*, **11**, 43-49 (2005).
 51. Miyoshi K., Takaishi M., Nakajima K., Ikeda M., Kanda T., Tarutani M., Iiyama T., Asao N., DiGiovanni J., Sano S. Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 inhibitor. *J. Invest. Dermatol.*, **131**, 108-117 (2011).
 52. Fournier C., Tisman G. Sorafenib-associated remission of psoriasis in hypernephroma: case report. *Dermatol. Online J.*, **16**, 17 (2010).

53. 日本泌尿器科学会編. 腎癌診療ガイドライン 2011 年版【第 2 版】. 金原出版, (2011).
54. Motzer R.J., Hutson T.E., Tomczak P., Michaelson M.D., Bukowski R.M., Oudard S., Negrier S., Szczylik C., Pili R., Bjarnason G.A., Garcia-del-Muro X., Sosman J.A., Solska E., Wilding G., Thompson J.A., Kim S.T., Chen I., Huang X., Figlin R.A. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **27**, 3584-3590 (2009).
55. Motzer R.J., Michaelson M.D., Redman B.G., Hudes G.R., Wilding G., Figlin R.A., Ginsberg M.S., Kim S.T., Baum C.M., DePrimo S.E., Li J.Z., Bello C.L., Theuer C.P., George D.J., Rini B.I. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **24**, 16-24 (2006).
56. Ratain M.J., Eisen T., Stadler W.M., Flaherty K.T., Kaye S.B., Rosner G.L., Gore M., Desai A.A., Patnaik A., Xiong H.Q., Rowinsky E., Abbruzzese J.L., Xia C., Simantov R., Schwartz B., O'Dwyer P.J. Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **24**, 2505-2512 (2006).
57. Eto M., Kamba T., Miyake H., Fujisawa M., Kamai T., Uemura H., Tsukamoto T., Azuma H., Matsubara A., Nishimura K., Nakamura T., Ogawa O., Naito S. STAT3 polymorphism can predict the response to interferon-alpha therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Eur. Urol.*, **63**, 745-752 (2013).
58. Ito N., Eto M., Nakamura E., Takahashi A., Tsukamoto T., Toma H., Nakazawa H., Hirao Y., Uemura H., Kagawa S., Kanayama H., Nose Y., Kinukawa N., Nakamura T., Jinnai N., Seki T., Takamatsu M., Masui Y., Naito S., Ogawa O. STAT3 polymorphism predicts interferon-alfa response in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **25**, 2785-2791 (2007).
59. Sato K., Shiota M., Fukuda S., Iwamoto E., Machida H., Inamine T., Kondo S., Yanagihara K., Isomoto H., Mizuta Y., Kohno S., Tsukamoto K. Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population. *J. Clin. Immunol.*, **29**, 815-825 (2009).
60. Yamazaki K., Umeno J., Takahashi A., Hirano A., Johnson T.A., Kumasaka N., Morizono T., Hosono N., Kawaguchi T., Takazoe M., Yamada T., Suzuki Y., Tanaka H., Motoya S., Hosokawa M., Arimura Y., Shinomura Y., Matsui T., Matsumoto T., Iida M., Tsunoda T., Nakamura Y., Kamatani N., Kubo M. A genome-wide association study identifies 2 susceptibility Loci for Crohn's disease in a Japanese population. *Gastroenterology*, **144**, 781-788 (2013).
61. Motzer R.J., Bacik J., Murphy B.A., Russo P., Mazumdar M. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **20**, 289-296 (2002).

62. Ogasawara S., Kanai F., Obi S., Sato S., Yamaguchi T., Azemoto R., Mizumoto H., Koushima Y., Morimoto N., Hirata N., Toriyabe T., Shinozaki Y., Ooka Y., Mikata R., Chiba T., Okabe S., Imazeki F., Yoshikawa M., Yokosuka O. Safety and tolerance of sorafenib in Japanese patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Int.*, **5**, 850-856 (2011).
63. Boudou-Rouquette P., Narjoz C., Golmard J.L., Thomas-Schoemann A., Mir O., Taieb F., Durand J.P., Coriat R., Dauphin A., Vidal M., Tod M., Lorient M.A., Goldwasser F., Blanchet B. Early sorafenib-induced toxicity is associated with drug exposure and UGT1A9 genetic polymorphism in patients with solid tumors: a preliminary study. *PLoS One*, **7**, e42875 (2012).
64. Cheng A.L., Kang Y.K., Chen Z., Tsao C.J., Qin S., Kim J.S., Luo R., Feng J., Ye S., Yang T.S., Xu J., Sun Y., Liang H., Liu J., Wang J., Tak W.Y., Pan H., Burock K., Zou J., Voliotis D., Guan Z. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.*, **10**, 25-34 (2009).
65. Fukudo M., Ito T., Mizuno T., Shinsako K., Hatano E., Uemoto S., Kamba T., Yamasaki T., Ogawa O., Seno H., Chiba T., Matsubara K. Exposure-toxicity relationship of sorafenib in Japanese patients with renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma. *Clin. Pharmacokinet.*, **53**, 185-196 (2014).
66. Teo Y.L., Wee H.L., Chue X.P., Chau N.M., Tan M.H., Kanesvaran R., Wee H.L., Ho H.K., Chan A. Effect of the CYP3A5 and ABCB1 genotype on exposure, clinical response and manifestation of toxicities from sunitinib in Asian patients. *Pharmacogenomics J.*, **16**, 47-53 (2016).
67. Brennan M., Williams J.A., Chen Y., Tortorici M., Pithavala Y., Liu Y.C. Meta-analysis of contribution of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes or transporters to axitinib pharmacokinetics. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **68**, 645-655 (2012).
68. Mizuno T., Fukudo M., Fukuda T., Terada T., Dong M., Kamba T., Yamasaki T., Ogawa O., Katsura T., Inui K., Vinks A.A., Matsubara K. The effect of ABCG2 genotype on the population pharmacokinetics of sunitinib in patients with renal cell carcinoma. *Ther. Drug Monit.*, **36**, 310-316 (2014).
69. Tsuchiya N., Narita S., Inoue T., Hasunuma N., Numakura K., Horikawa Y., Satoh S., Notoya T., Fujishima N., Hatakeyama S., Ohyama C., Habuchi T. Risk factors for sorafenib-induced high-grade skin rash in Japanese patients with advanced renal cell carcinoma. *Anticancer Drugs*, **24**, 310-314 (2013).
70. Porta C., Paglino C., Imarisio I., Bonomi L. Uncovering Pandora's vase: the growing problem of new toxicities from novel anticancer agents. The case of sorafenib and sunitinib. *Clin. Exp. Med.*, **7**, 127-134 (2007).
71. Tai W.T., Cheng A.L., Shiau C.W., Huang H.P., Huang J.W., Chen P.J., Chen K.F. Signal transducer and activator of transcription 3 is a major kinase-independent target of sorafenib in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, **55**, 1041-1048 (2011).
72. Horiguchi A., Oya M., Shimada T., Uchida A., Marumo K., Murai M. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in renal cell carcinoma: a study of incidence and its association with

- pathological features and clinical outcome. *J. Urol.*, **168**, 762-765 (2002).
73. Kortylewski M., Kujawski M., Wang T., Wei S., Zhang S., Pilon-Thomas S., Niu G., Kay H., Mule J., Kerr W.G., Jove R., Pardoll D., Yu H. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat. Med.*, **11**, 1314-1321 (2005).
 74. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA. Cancer J. Clin.*, **65**, 5-29 (2015).
 75. Larkin J., Paine A., Tumor I., Cappelleri J.C., Healey P.J., Sr., Foley G., Mitchell S., Kroes M., Chen C. Second-line treatments for the management of advanced renal cell carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Expert Opin. Pharmacother.*, **14**, 27-39 (2013).
 76. Sonpavde G., Choueiri T.K., Escudier B., Ficarra V., Hutson T.E., Mulders P.F., Patard J.J., Rini B.I., Staehler M., Sternberg C.N., Stief C.G. Sequencing of agents for metastatic renal cell carcinoma: can we customize therapy? *Eur. Urol.*, **61**, 307-316 (2012).
 77. Philips G.K., Atkins M.B. New agents and new targets for renal cell carcinoma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book*, e222-227 (2014).
 78. 佐藤 淳., 工藤 賢. 【これからの治療法を紐解く!分子標的治療薬の最新事情と今後の展望】今さら聞けない分子標的治療薬の基本と最新の副作用対策 分子標的治療の今とこれから. *Oncology Nurse*, **7**, 3-9 (2014).
 79. Darnell Jr J.E. STATs and Gene Regulation. *Science*, **277**, 1630-1635 (1997).
 80. Chen K.F., Tai W.T., Liu T.H., Huang H.P., Lin Y.C., Shiau C.W., Li P.K., Chen P.J., Cheng A.L. Sorafenib overcomes TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of STAT3. *Clin. Cancer Res.*, **16**, 5189-5199 (2010).
 81. Yuan H., Cai P., Li Q., Wang W., Sun Y., Xu Q., Gu Y. Axitinib augments antitumor activity in renal cell carcinoma via STAT3-dependent reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation. *Biomed. Pharmacother.*, **68**, 751-756 (2014).
 82. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.*, **48**, 452-458 (2013).
 83. Wake M.S., Watson C.J. STAT3 the oncogene - still eluding therapy? *FEBS J.*, **282**, 2600-2611 (2015).
 84. Zhao C., Li H., Lin H.J., Yang S., Lin J., Liang G. Feedback Activation of STAT3 as a Cancer Drug-Resistance Mechanism. *Trends Pharmacol. Sci.*, **37**, 47-61 (2016).
 85. Guo C., Yang G., Khun K., Kong X., Levy D., Lee P., Melamed J. Activation of Stat3 in renal tumors. *Am. J. Transl. Res.*, **1**, 283-290 (2009).
 86. Wendt M.K., Balanis N., Carlin C.R., Schiemann W.P. STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas. *JAKSTAT*, **3**, e28975 (2014).
 87. Xiong H., Hong J., Du W., Lin Y.W., Ren L.L., Wang Y.C., Su W.Y., Wang J.L., Cui Y., Wang Z.H., Fang J.Y. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.*, **287**, 5819-5832 (2012).
 88. Tan F.H., Putoczki T.L., Stylli S.S., Luwor R.B. The role of STAT3 signaling in mediating tumor

- resistance to cancer therapy. *Curr. Drug. Targets*, **15**, 1341-1353 (2014).
89. Tania M., Khan M.A., Fu J. Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer. *Tumour Biol.*, **35**, 7335-7342 (2014).
 90. Pardoll D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 252-264 (2012).
 91. Marzec M., Zhang Q., Goradia A., Raghunath P.N., Liu X., Paessler M., Wang H.Y., Wysocka M., Cheng M., Ruggeri B.A., Wasik M.A. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 20852-20857 (2008).
 92. Parsa A.T., Waldron J.S., Panner A., Crane C.A., Parney I.F., Barry J.J., Cachola K.E., Murray J.C., Tihan T., Jensen M.C., Mischel P.S., Stokoe D., Pieper R.O. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat. Med.*, **13**, 84-88 (2007).
 93. Jilaveanu L.B., Shuch B., Zito C.R., Parisi F., Barr M., Kluger Y., Chen L., Kluger H.M. PD-L1 Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: An Analysis of Nephrectomy and Sites of Metastases. *J. Cancer*, **5**, 166-172 (2014).
 94. Massari F., Santoni M., Ciccicarese C., Santini D., Alfieri S., Martignoni G., Brunelli M., Piva F., Berardi R., Montironi R., Porta C., Cascinu S., Tortora G. PD-1 blockade therapy in renal cell carcinoma: current studies and future promises. *Cancer Treat. Rev.*, **41**, 114-121 (2015).
 95. Thompson R.H., Dong H., Kwon E.D. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 709s-715s (2007).
 96. van der Veldt A.A., Eechoute K., Gelderblom H., Gietema J., Guchelaar H.J., van Erp N.P., van den Eertwegh A.J., Haanen J.B., Mathijssen R.H., Wessels J.A. Genetic polymorphisms associated with a prolonged progression-free survival in patients with metastatic renal cell cancer treated with sunitinib. *Clin. Cancer Res.*, **17**, 620-629 (2011).
 97. Houk B.E., Bello C.L., Poland B., Rosen L.S., Demetri G.D., Motzer R.J. Relationship between exposure to sunitinib and efficacy and tolerability endpoints in patients with cancer: results of a pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **66**, 357-371 (2010).
 98. Noda S., Otsuji T., Baba M., Yoshida T., Kageyama S., Okamoto K., Okada Y., Kawauchi A., Onishi H., Hira D., Morita S.Y., Terada T. Assessment of Sunitinib-Induced Toxicities and Clinical Outcomes Based on Therapeutic Drug Monitoring of Sunitinib for Patients With Renal Cell Carcinoma. *Clin. Genitourin. Cancer*, **13**, 350-358 (2015).
 99. Teo Y.L., Chue X.P., Chau N.M., Tan M.H., Kanesvaran R., Wee H.L., Ho H.K., Chan A. Association of drug exposure with toxicity and clinical response in metastatic renal cell carcinoma patients receiving an attenuated dosing regimen of sunitinib. *Target. Oncol.*, **10**, 429-437 (2015).
 100. Terada T., Noda S., Inui K. Management of dose variability and side effects for individualized cancer

pharmacotherapy with tyrosine kinase inhibitors. *Pharmacol. Ther.*, **152**, 125-134 (2015).