

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09729

研究課題名(和文) 抗がん剤耐性膀胱がんにおける抗NOTCH2抗体と抗PD-1抗体併用療法の確立

研究課題名(英文) The combination therapy of immuno-checkpoint inhibitor with anti NOTCH2 antibody for chemotherapy resistant bladder cancer

研究代表者

林 哲太郎 (Hayashi, Tetsutaro)

広島大学・医系科学研究科(医)・講師

研究者番号：60612835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ゲムシタピン耐性膀胱がん細胞株とシスプラチン耐性膀胱がん細胞株、その親株を用い、in vitroでの抗NOTCH2抗体による細胞増殖能と浸潤能の評価や、TCGAなどのpublic databaseからNOTCH2/HEY1シグナルの膀胱癌進展の関与が明らかとなった。抗がん剤耐性の臨床検体では、STAT1シグナルが亢進し、PD-L1発現亢進、リンパ球浸潤の亢進と関連していた。薬剤耐性の膀胱癌に免疫チェックポイント阻害剤に加え分子標的治療を併用することで治療効果が改善されることを期待している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TCGAなどのpublic databaseと臨床検体、細胞株によるin vitroのデータを統合することで、コホートによるバイアスを減らし、より正確に研究を遂行できることを研究を通じて実感した。薬剤耐性の膀胱癌に免疫チェックポイント阻害剤に加え分子標的治療を併用することの意義を臨床試験で明らかにされることを期待している。

研究成果の概要(英文)：Using gemcitabine- and cisplatin-resistant bladder cancer cell lines and their parental lines, in vitro evaluation of cell proliferation and invasiveness with anti-NOTCH2 antibodies and public databases such as TCGA have revealed that NOTCH2/HEY1 signaling is involved in bladder cancer progression. The results of this study are summarized in the following table. In clinical specimens resistant to anticancer drugs, STAT1 signaling was upregulated, correlating with increased PD-L1 expression and lymphocyte infiltration. We expect that the combination of molecular targeted therapy in addition to immune checkpoint inhibitors will improve therapeutic efficacy in drug-resistant bladder cancer.

研究分野：膀胱癌

キーワード：薬剤耐性膀胱がん PD-1抗体 NOTCH2/HEY1シグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移性膀胱がんに対する1次治療(GC療法)の奏効率は約60%までであり、さらにその有効性が持続することは稀で、ほとんどの症例がGC療法耐性となる。2次治療として抗PD-1抗体の有効性が示されたが、その奏効率は約25%までであり、新規治療法の確立が課題である。NOTCH2が上皮間葉移行(EMT)とがん幹細胞性の維持を介して膀胱がんの進展を促進し予後不良因子であること、抗NOTCH2抗体はNOTCH2シグナルを遮断することで膀胱がんの進展を抑制すること、膀胱がんのClaudin-lowサブタイプは、がん微小環境内への免疫細胞浸潤が多く、PD-L1が高発現することが報告されている。NOTCH2高発現膀胱がんは、典型的なClaudin-lowサブタイプの特徴を示すことから、抗PD-1抗体が有効となる可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

NOTCH2高発現膀胱がんはがん微小環境への免疫細胞浸潤亢進に関わらずがん免疫寛容を獲得するという論文報告と、抗がん剤耐性膀胱癌でNOTCH2が高発現するという研究結果から、抗NOTCH2抗体と抗PD-1抗体併用療法を考案した。NOTCH2高発現膀胱がんは、がん免疫の観点から抗PD-1抗体の最高の適応であり、抗NOTCH2抗体もNOTCH2シグナル遮断と抗体依存性細胞障害を誘導することで治療効果の増強が期待できる。さらにNOTCH2高発現のがん幹細胞を治療標的とすることで、完全治癒を目指した治療となる。

抗NOTCH2抗体と抗PD-1抗体併用療法の有効性を、私たちが樹立したマウスNotch2過剰発現膀胱がんモデルを用いて評価する。本研究で治療効果予測因子を同定し、根拠に基づいた併用療法で膀胱がん治療の改善に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

抗NOTCH2抗体と抗PD-1抗体併用療法の有効性をin vitro とin vivo を用いて評価する

Notch2過剰発現マウス膀胱がんモデルでの抗Notch2抗体と抗Pd-1抗体併用療法の評価

マウス膀胱がんのNotch2、PD-L1、CD8発現評価：私たちの樹立したマウスNotch2

過剰発現膀胱がんモデルを用いて、Notch2発現と局在、PD-L1の発現、CD8陽性リ

ンパ球浸潤の有無、がん幹細胞マーカーの発現を免疫組織学的に確認する。

マウス膀胱がんでの治療効果の評価：私たちのNotch2過剰発現マウス膀胱がん自然

発生モデルでは、ルシフェラーゼ遺伝子が導入されており、腫瘍の増大や転移をin

vivo imaging systemで評価可能である。治療としては、1)コントロール抗体、2)抗

Notch2抗体、3)抗Pd-1抗体、4)抗Notch2抗体と抗Pd-1抗体の併用の4群に分け、

マウス膀胱がんのサイズの変化と転移の有無、マウスの予後を評価する。

マウス膀胱がんの病理組織学的検証：最終的に摘出した膀胱がん転移巣は、病理組織学的に抗腫瘍効果を評価する。さらに免疫組織染色によって残存Notch2陽性がん細胞の有無、がん幹細胞、CD8陽性リンパ球の浸潤、PD-L1の発現を評価し、治療効果との相関を明らかにする。

ゲムシタピン耐性膀胱がん細胞株を用いた抗 NOTCH2 抗体の抗腫瘍効果の評価

抗NOTCH2抗体でのin vitro評価：NOTCH2高発現のゲムシタピン耐性膀胱がん細胞株とその親株を用い、in vitroでの抗NOTCH2抗体による細胞増殖能と浸潤能への影響を評価する。

抗NOTCH2抗体でのin vivo評価：マウス同所性膀胱がんモデルを用いて、NOTCH2高発現のゲムシタピン耐性膀胱がん細胞株でマウス膀胱がんを作成し、抗NOTCH2抗体とコントロール抗体による膀胱がんの増大と転移への効果を評価する。

膀胱がんの病理組織学的検証：摘出した膀胱がん転移巣で抗腫瘍効果を病理学的に評価する。がん幹細胞の有無やアポトーシス、リンパ球浸潤、抗体依存性細胞障害に基づ

くNK細胞の貪食効果を免疫組織学的に評価し、抗がん剤耐性膀胱がんへの抗

NOTCH2抗体治療の理論的根拠を示す。(臨床検体の免疫染色でのNOTCH2発現と局在、PD-L1発現、CD8陽性リンパ球の浸潤度評価。

臨床検体の免疫染色での NOTCH2 発現と局在、PD-L1 発現、CD8 陽性リンパ球の浸潤度評価。

免疫組織染色による分類：多数の臨床検体で、NOTCH2 の細胞膜染色症例、細胞質染色症例、核染色症例と、CD8 陽性リンパ球の腫瘍内浸潤症例、間質浸潤症例、浸潤を認めない症例に分類する。NOTCH2 発現と PD-L1 発現、リンパ球浸潤の関係性、臨床病理学的因子との関連を明らかにして、抗 NOTCH2 抗体と抗 PD-1 抗体併用療法の適応を検討する。

抗がん剤使用検体での評価：同一症例の診断時 TURBT 標本と術前 GC 療法後の膀胱全摘標本を用いて、と同様に NOTCH2 発現と局在、PD-L1 発現、CD8 陽性リンパ球の浸潤度を検討する。GC 療法が NOTCH2 や PD-L1 亢進とリンパ球の浸潤を誘導することを確認する。

4 . 研究成果

ゲムシタピン耐性膀胱がん細胞株とシスプラチン耐性膀胱がん細胞株、その親株を用い、in vitro での抗 NOTCH2 抗体による細胞増殖能と浸潤能の評価や、TCGA などの public database から NOTCH2/HEY1 シグナルの膀胱癌進展の関与が明らかとなった。抗がん剤耐性の臨床検体では、STAT1 シグナルが亢進し、PD-L1 発現亢進、リンパ球浸潤の亢進と相関していた。薬剤耐性の膀胱癌に免疫チェックポイント阻害剤に加え分子標的治療を併用することで治療効果が改善されることを期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hayashi Tetsutaro, Teishima Jun	4. 巻 3
2. 論文標題 Editorial Comment to Progressive plasmacytoid variant bladder cancer with retroperitoneal dissemination: An autopsy case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 169 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12183	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi T, Ito K, Kojima T, Kato M, Kanda S, Hatakeyama S, Matsui Y, Matsushita Y, Naito S, Shiga M, Miyake M, Muro Y, Nakanishi S, Kato Y, Shibuya T, Hayashi T, Yasumoto H, Yoshida T, Uemura M, Taoka R, Kamiyama M, Ogawa O, Kitamura H, Nishiyama H, the Japan Urological Oncology Group	4. 巻 112
2. 論文標題 Risk stratification for the prognosis of patients with chemoresistant urothelial cancer treated with pembrolizumab	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 760 ~ 773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14762	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 TAKEMOTO KENSHIRO, TEISHIMA JUN, KOHADA YUKI, IKEDA KENICHIRO, NAGAMATSU HIROTAKA, GORIKI AKIHIRO, INOUE SHOGO, HAYASHI TETSUTARO, KAJIWARA MITSURU, MATSUBARA AKIO	4. 巻 40
2. 論文標題 The Impact of Histological Variant on Oncological Outcomes in Patients With Urothelial Carcinoma of the Bladder Treated With Radical Cystectomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4787 ~ 4793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.14481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kohada Yuki, Hayashi Tetsutaro, Hsi Ryan S., Yukihiro Kazuma, Sentani Kazuhiro, Goto Keisuke, Inoue Shogo, Ohara Shinya, Teishima Jun, Kajiwara Mitsuru, Nishisaka Takashi, Yasui Wataru, Black Peter C., Matsubara Akio	4. 巻 127
2. 論文標題 Recurrence and progression free survival in intermediate risk non muscle invasive bladder cancer: the impact of conditional evaluation and subclassification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BJU International	6. 最初と最後の頁 473 ~ 485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bju.15209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobatake K, Ikeda K, Nakata Y, Yamasaki N, Ueda T, Kanai A, Sentani K, Sera Y, Hayashi T, Koizumi M, Miyakawa Y, Inaba T, Sotomaru Y, Kaminuma O, Ichinohe T, Honda Z, Yasui W, Horie S, Black Peter C., Matsubara A, Honda H	4. 巻 26
2. 論文標題 Kdm6a Deficiency Activates Inflammatory Pathways, Promotes M2 Macrophage Polarization, and Causes Bladder Cancer in Cooperation with p53 Dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2065 ~ 2079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-19-2230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shigematsu Yoshinori, Oue Naohide, Sekino Yohei, Sakamoto Naoya, Sentani Kazuhiro, Uraoka Naohiro, Hayashi Tetsutaro, Teishima Jun, Matsubara Akio, Yasui Wataru	4. 巻 86
2. 論文標題 SEC11A Expression Is Associated with Basal-Like Bladder Cancer and Predicts Patient Survival	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 208 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000497206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawai Y, Imada K, Akamatsu S, Zhang F, Seiler R, Hayashi T, Leong J, Beraldi E, Saxena N, Kretschmer A, Oo HZ, Contreras-Sanz A, Matsuyama H, Lin D, Fazli L, Collins CC, Wyatt AW, Black PC, Gleave ME.	4. 巻 10
2. 論文標題 Paternally Expressed Gene 10 (PEG10) Promotes Growth, Invasion, and Survival of Bladder Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cancer Ther	6. 最初と最後の頁 2210 ~ 2220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hatayama Tomoya, Hayashi Tetsutaro, Matsuzaki Shinji, Masumoto Hiroshi, Yanai Hiroyuki, Abdi Hamidreza, Teishima Jun, Hasegawa Yasuhisa	4. 巻 3
2. 論文標題 Successful treatment of recurrent small cell carcinoma of urinary bladder with pembrolizumab	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 252 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12208	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Tetsutaro, Teishima Jun	4. 巻 3
2. 論文標題 Editorial Comment to Progressive plasmacytoid variant bladder cancer with retroperitoneal dissemination: An autopsy case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 169 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12183	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tetsutaro Hayashi, Kazuhiro Sentani, Kenichiro Ikeda, Keisuke Goto, Keisuke Hieda, Shogo Inoue, Jun Teishima, Wataru Yasui, Akio Mtasubara
2. 発表標題 Immunohistochemical classification of upper and lower tract urothelial carcinoma using differentiation markers can stratify clinicopathological parameters.
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsutaro Hayashi, Kazuhiro Sentani, Kenichiro Ikeda, Ryan Hsi, Yohei Sekino, Keisuke Goto, Shogo Inoue, Jun Teishima, Hideki Yamamoto, Takao Hinoi, Wataru Yasui, Akio Matsubara
2. 発表標題 Clinicopathological characteristics of upper tract urothelial cancer with loss of immunohistochemical expression of mismatch repair proteins in universal screening
3. 学会等名 AUA2020 Annunal Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohei Kobatake, Kenichiro Ikeda, Yuichiro Nakata, Norimasa Yamasaki, Kazuhiro Sentani, Tetsutaro Hayashi, Shigeo Horie, Osamu Kaminuma, Akio Matsubara, Hiroaki Honda
2. 発表標題 Kdm6a deficiency activates inflammatory pathways, promotes M2 macrophage polarization and causes bladder cancer in cooperation with p53 dysfunction
3. 学会等名 AUA2020 Annunal Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林哲太郎、池田健一郎、関野陽平、後藤景介、井上省吾、亭島淳、仙谷和弘、谷山大樹、安井弥、檜井孝夫、山本秀喜、倉岡和矢、松原昭郎
2. 発表標題 上部尿路上皮癌におけるミスマッチ修復遺伝子異常の頻度と臨床的意義
3. 学会等名 第29回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsutaro Hayashi
2. 発表標題 Transition of ANXA10 expression is a useful diagnostic and prognostic marker in upper tract urothelial carcinoma
3. 学会等名 International bladder cancer network2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林哲太郎
2. 発表標題 Clinicopathological characteristics of upper tract urothelial cancer with loss of immunohistochemical expression of mismatch repair proteins in universal
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林哲太郎
2. 発表標題 尿路上皮癌におけるGC療法と免疫チェックポイント阻害剤の効果予測因子としてのSTAT1シグナルの意義
3. 学会等名 日本泌尿器腫瘍学会第66回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林哲太郎、池田健一郎、関野陽平、後藤景介、井上省吾、亭島淳、仙谷和弘、谷山大樹、安井弥、檜井孝夫、山本秀喜、倉岡和矢、松原昭郎
2. 発表標題 上部尿路上皮癌におけるミスマッチ修復遺伝子異常の頻度と臨床的意義
3. 学会等名 第29回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林哲太郎
2. 発表標題 Predictive value and potentials for co-targeted therapy of STAT1 signaling for systemic therapy in advanced urothelial carcinoma
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林哲太郎
2. 発表標題 膀胱癌micropapillary variantの臨床病理学的特徴
3. 学会等名 第30回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松原 昭郎 (Matsubara Akio) (10239064)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	亭島 淳 (Teishima Jun) (20397962)	広島大学・医系科学研究科(医)・准教授 (15401)	
研究分担者	安井 弥 (Yasui Wataru) (40191118)	広島大学・医系科学研究科(医)・名誉教授 (15401)	
研究分担者	井上 省吾 (Inoue Shogo) (90457177)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関