

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23899

研究課題名(和文) SORL1を中心とした分子ネットワーク解析による進行性膀胱癌の新規治療標的の探索

研究課題名(英文) The association between SORL1 and advanced bladder cancer

研究代表者

内海 孝信 (UTSUMI, Takanobu)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80594275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌細胞株のSORL1の発現をウェスタンブロット法にて確認し、CRISPR-Cas9法によりSORL1をknock-outした。SORL1 knock-out細胞は遊走能・浸潤能が有意に上昇し、ウェスタンブロット法でSORL1の喪失によりROCK1およびROCK2発現の上昇が起きLIMKを介してリン酸化cofilinが優位になることによりF-アクチン重合が進んでいると考えられた。

ROCK阻害剤Y-27632を投与することによりSORL1 knock-out細胞の遊走能・浸潤能は有意に低下し、リン酸化cofilinの発現も低下しておりF-アクチンを切断・脱重が進んでいると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行性膀胱癌に対する薬物療法は白金製剤を中心とした化学療法のみであったが、2016年以降転移性尿路上皮癌の二次治療薬としてFDAに承認されてから、免疫チェックポイント阻害剤が一定の治療効果を示している。しかしながら、その奏効率はおおむね25～30%であり、新規の治療標的やバイオマーカーとなり得る分子の探索が求められている。

本研究では膀胱癌におけるSORL1の基礎的な機能解析を行い、SORL1の喪失がROCK/LIMK/cofilinシグナルを介して膀胱癌の進展に関与していることが判明し、ROCK阻害剤により進展を抑制できることが判明した。進行性膀胱癌治療への応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression of SORL1 in bladder cancer cell lines was confirmed by Western blotting, and SORL1 was knock-out by CRISPR-Cas9 method. SORL1 knock-out cells showed significantly increased migration and invasion ability, and Western blotting showed that the loss of SORL1 resulted in increased ROCK1 and ROCK2 expression. The loss of SORL1 caused an increase in ROCK1 and ROCK2 expression, suggesting that LIMK-mediated phosphorylation of cofilin predominates in SORL1 knockout cells, leading to F-actin polymerization.

Treatment with the ROCK inhibitor Y-27632 significantly decreased the migration and invasion ability of SORL1 knock-out cells. The ROCK inhibitor Y-27632 significantly decreased the migration and invasion ability of SORL1 knock-out cells, and the expression of phosphorylated cofilin was also decreased, suggesting that F-actin was cleaved and depolymerized.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：膀胱癌 SORL1 ROCK cofilin

1. 研究開始当初の背景

進行性膀胱癌に対する薬物療法は長年に渡って白金製剤を中心とした全身化学療法のみであったが、2016年以降 atezolizumab や nivolumab が転移性尿路上皮癌の二次治療薬としてFDAに承認されてから、抗PD-1/PD-L1抗体を中心とした免疫チェックポイント阻害剤が一定の治療効果を示している。しかしながら、その奏効率はおおむね25~30%であり、新規の治療標的やバイオマーカーとなり得る分子の探索が求められている。

現在までに SORL1 は急性白血病と悪性リンパ腫に高発現し、可溶性 SORL1 が患者血清で高値となり大細胞性 B 細胞型リンパ腫では治療予後予測のバイオマーカーになることが報告されている (Sugita Y, et al. Clin Chim Acta. 2016)。固形癌では可溶性 SORL1 が胆道癌や膵癌でバイオマーカーになり得ることが報告されているが (Terai K, et al. Clin Chim Acta. 2016) 現在までがんに細胞における SORL1 そのものの機能解析は行われていない。

以上の学術的背景より本研究開始当初、膀胱癌における SORL1 の機能解析を行い、SORL1 を中心とした分子ネットワーク解析から新規の治療標的分子およびバイオマーカーとしての可能性を検証する学術的な課題があった。

2. 研究の目的

基礎医学研究として、膀胱癌細胞株を用いて SORL1 の機能解析を行い、膀胱癌の進展に関する機序を明らかにすること、膀胱癌治療における SORL1 を中心とした分子ネットワーク解析で新規の治療標的分子の探索を行うこと、膀胱癌に対する SORL1 と腫瘍微小環境の関係を解析することが目的であった。

本研究では、目的 ~ を達成するために独自に樹立したマウス膀胱癌細胞株を用い、目的においては研究結果の普遍性の担保のためにヒト膀胱癌細胞株も用いて検証した。

3. 研究の方法

マウス膀胱癌細胞株とヒト膀胱癌細胞株の SORL1 の発現をウェスタンブロット法にて確認し、中でも高発現していたマウス膀胱癌細胞株 B-UPPL3 および B-UPPL4 とヒト膀胱癌細胞株 CAL29 を用いて CRISPR-Cas9 法により SORL1 を knock-out した。B-UPPL3 および B-UPPL4、CAL29 において、SORL1 を knock-out した細胞では empty vector を transfection した control 細胞と比較して有意に遊走能が上昇することを確認した (図1)。

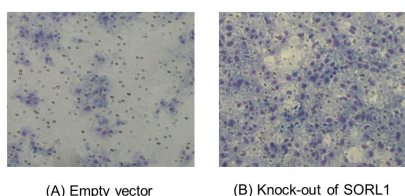


図1: SORL1 knock-out による遊走能の上昇

SORL1 の knock-out は増殖能で有意な変化を認めなかった。そのため、SORL1 は膀胱癌細胞においては遊走を抑制するがん抑制遺伝子の可能性があると推察された。

並行して SORL1 を中心とした分子ネットワーク解析の予備実験を行った。SORL1 knock-out 細胞は、control 細胞と比較して遊走能に関与が推定される ROCK1/2 の発現が上昇していることを確認した (図2)。

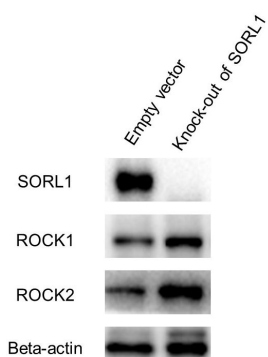


図2: ウェスタンブロット

本研究では、機能解析実験で残っている浸潤能の評価を B-UPPL3 および B-BPPL4、CAL29 を用いて行った。また、分子ネットワーク解析としては、遊走能に関与するシグナル伝達分子を中心にウェスタンブロット法で解析した。さらに SORL1 knock-out 細胞に対する ROCK 阻害剤 Y-27632 の治療効果判定も行った。

4. 研究成果

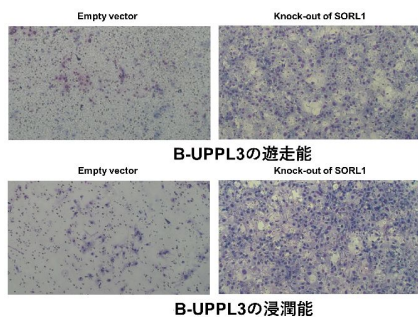


図 3:遊走能と浸潤能の上昇

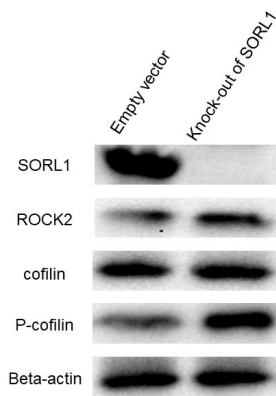


図 4:ウェスタンブロット

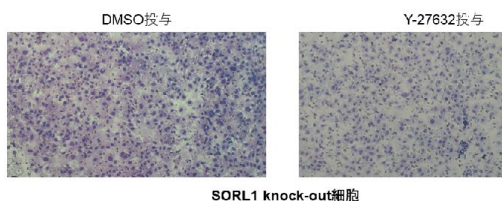


図 5:Y-27632 の効果

前述した遊走能の有意な上昇に加えて、SORL1 を knock-out した細胞では empty vector を transfection した control 細胞と比較して、有意に浸潤能が上昇することを確認した (図 3)。

また前述のようにウェスタンブロット法で SORL1 knock-out 細胞では ROCK1 および ROCK2 の発現が上昇に伴い、さらにその下流シグナルであるリン酸化 cofilin (不活性化型) の発現上昇していることが確認された (図 4)。

以上より、SORL1 knock-out 細胞における遊走能・浸潤能の上昇に關与する分子生物学的な機序として、SORL1 の喪失により ROCK1 および ROCK2 発現の上昇が起き LIMK を介してリン酸化 cofilin (不活性化型) が優位になり F-アクチン重合が進んで遊走能や浸潤能が有意に上昇したと考えられた。

次に SORL1 knock-out 細胞に対する ROCK 阻害剤 Y-27632 の治療効果判定を行った。Y-27632 と溶解液 Dimethyl sulfoxide (DMSO) をそれぞれ SORL1 knock-out 細胞と control 細胞に投与し比較した。Y-27632 を投与することより SORL1 knock-out 細胞の遊走能・浸潤能は有意に低下したが (図 5)、control 細胞では変化は認められなかった。DMSO では SORL1 knock-out 細胞の遊走能・浸潤能は変化しなかった。Y-27632 を投与した SORL1 knock-out 細胞では、リン酸化 cofilin の発現が低下しており F-アクチンを切断・脱重が進んでいると考えられた。

以上の結果より、膀胱癌において SORL1 は ROCK1/2 からリン酸化 cofilin (不活性化型) の発現を制御し遊走能や浸潤能を抑制しているがん抑制遺伝子であると考えられた。また、SORL1 の発現の有無により ROCK 阻害剤 Y-27632 の治療効果を予測できる新規の膀胱癌治療標的分子の特定とバイオマーカーの可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内海孝信、野呂卓秀、鈴木悠太、杉崎裕香、森堂道、三田真朗、加藤精二、杉山真康、岡了、遠藤匠、矢野仁、神谷直人、William Y. Kim、鈴木 啓悦
2. 発表標題 免疫応答性マウスへの皮下移植可能な新規マウス膀胱癌細胞株の樹立
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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------