

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16691

研究課題名（和文）PDL1発現制御に着目した膀胱癌新規治療標的の探索

研究課題名（英文）Exploration of novel treatment for bladder cancer targeting PD-L1 expression

研究代表者

齊藤 亮一（SAITO, Ryoichi）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：30792270

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：転移性膀胱癌に対する治療は免疫療法の登場により治療成績が向上した。しかし免疫療法の有効率は30%程度であるため、その有効性増強が求められている。本研究ではまずPD-L1発現量を制御することが知られている既存のリン酸化酵素阻害剤と新規の薬剤を抽出した。さらに報告者が新規に樹立したマウス膀胱がんモデルを用いて、これらの薬剤が免疫療法薬剤との併用で治療効果を増強するかを検討したところ、上乘せ効果をわずかに認めたと、統計学的有意差は認められなかった。TCGAデータではPD-L1高発現症例でLAG3、TIGITなどのPD1経路以外の免疫チェックポイントが活性化しており、本研究での耐性機序の可能性があら。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PD-1経路に着目した免疫チェックポイント阻害剤（ICI）は様々な癌腫の治療成績を向上させたが、奏効する症例は膀胱癌を含め概ね30%程度に過ぎない。そのため、ICIの治療効果をどのように増強するかが重要であり、新規免疫チェックポイント分子を標的とした治療開発が進んでいる。本研究ではPD-L1分子の発現制御によるPD1阻害の増強を目指したが、有意な上乘せ効果は認めなかった。遺伝学的解析からは、LAG3やTIGITなど別系統の免疫チェックポイント分子の阻害と組み合わせるほうがPD1経路阻害効果を増強可能かもしれない。今後は新規チェックポイント阻害剤とPD1阻害剤の併用効果を検討していく予定である。

研究成果の概要（英文）：For years, the gold standard treatment for metastatic bladder cancer has been CDDP-based chemotherapy. Since several years ago, immune-checkpoint inhibition (ICI) has been shown to be effective in the 2nd line setting post induction chemotherapy. The efficacy of ICI, however, is unfortunately limited up to 30%. We tried to explore new treatment targets that increase the efficacy of ICI in metastatic bladder cancer in combination. One kinase inhibitor and a couple of new agents downregulated the expression of PD-L1 in mouse bladder cancer cells. These agents seemed to suppress the growth of mouse bladder cancer tumor in combination with ICI, but not statistically significant. Genetic analysis of TCGA data showed that PD-L1 high cases had enriched expression of another immune checkpoints such as LAG3 and TIGIT. It might be more important to suppress these signals when treating with PD-1 blockade for metastatic urothelial cancer.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 尿路上皮癌 マウス PD-L1 免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移性膀胱癌に対する抗 PD-1/PD-L1 抗体を中心とした新規免疫療法の有効性が明らかになり、キードラッグとして期待されている。しかし単剤での治療効果は限定的であり、薬剤耐性機序も不明である。そのため治療効果予測バイオマーカーの同定と治療抵抗性のメカニズムの解明と克服が望まれる。

2. 研究の目的

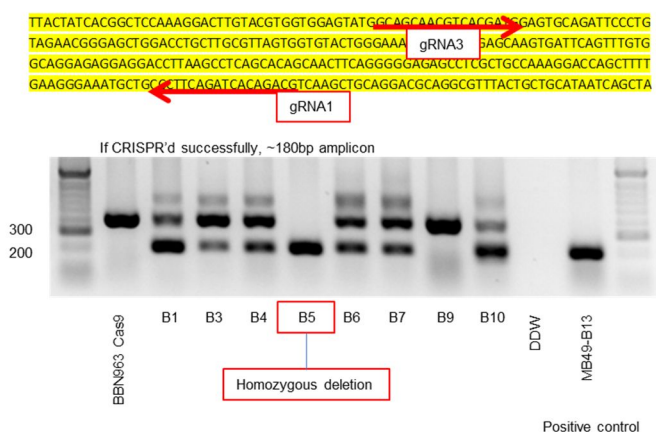
抗 PD-1 抗体は PD-1/PD-L1 経路の遮断が主たる作用点と考えられる。そこで、PD-L1 の腫瘍細胞における発現を抑制できれば、PD1 経路阻害剤の効果を増強できるのではないかと考えた。本研究では化合物スクリーニングによってマウス膀胱癌細胞表面の PD-L1 蛋白の発現を抑制する化合物を探索し、抗 PD-1 抗体治療との併用効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Pd-I1 発現抑制によるマウス膀胱癌アログラフト増殖抑制の検討 (再現性の確認):

図 1 のようにマウス CD274 遺伝子 (Pd-I1 をコード) の CRISPR ノックアウト gRNA を設計した。マウス膀胱癌細胞株は BBN963/BBN975/UPPL1541/UPPL1595 の 4 種類を用いた。

図 1 CD274 遺伝子ノックアウトデザイン



(2) マウス膀胱癌細胞の PD-L1 蛋白発現を抑制する薬剤の探索:

UPPL1541 細胞において IFN- 投与下に PD-L1 発現を誘導し蛍光抗体標識 (Alexa488) の後に蛍光強度を測定する。

蛍光強度を低下させる化合物が発現抑制効果を有すると判断し、候補薬剤としてピックアップする。化合物スクリーニングにおける細胞増殖への影響を補正するために、DAPI による核染色で細胞数を半定量する。得られた候補化合物で UPPL1541 細胞を処理し、PD-L1 蛋白発現が低下するかどうかをフローサイトメトリーで評価する。

図 2 マウス膀胱癌細胞の Pd-I1 蛍光標識



(3) 候補化合物の抗腫瘍効果の同系皮下移植モデルでの評価:

UPPL1541 細胞株の同系皮下移植モデルを作成し、候補化合物で治療する。単剤及び抗 PD-1 抗体との併用で行い、腫瘍増殖抑制効果を検討する。さらに腫瘍組織内浸潤免疫細胞をフローサイトメトリーで解析し、候補化合物による治療が局所免疫環境にどのような影響を及ぼすかを検討する。

(4) ヒト膀胱癌細胞の PD-L1 蛋白発現を抑制する薬剤の探索

上記 (3) で PD-L1 発現の抑制により抗腫瘍効果が認められた場合には、実臨床での応用を目指して、(2) で行った検討をヒト膀胱癌細胞株に行う。

4. 研究成果

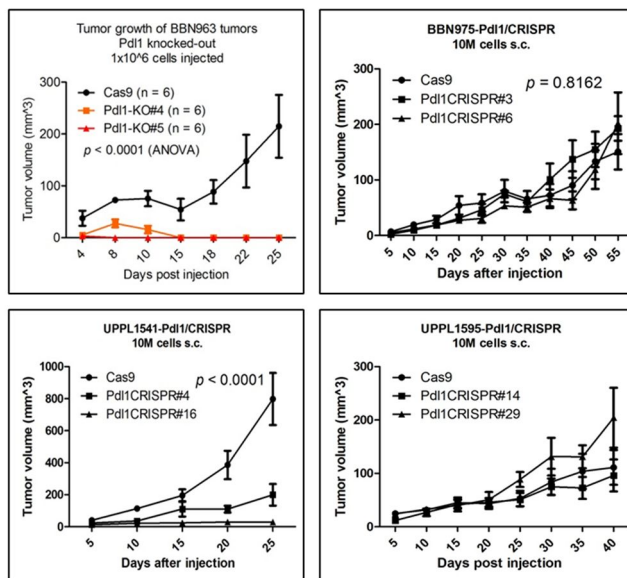
(1) Pd-I1 発現抑制はマウス膀胱癌アログラフト (2 種類) の増殖を抑制したが、2 種類では増殖抑制に関与しなかった: BBN963/BBN975/UPPL1541/UPPL1595 の 4 種類のマウス膀胱癌細胞株において CD274 遺伝子 (Pd-I1 をコードする) の CRISPR-ノックアウトを行った。ノックアウト細胞は単クローンとして樹立したため、複数株で実験した。図 3 (次頁) に示すように、BBN963 細胞株と UPPL1541 細胞株では CD274 ノックアウトにより同系マウス皮下移植腫瘍の増殖が有意に抑制された。しかし、BBN975 細胞株と UPPL1595 細胞株ではこのような差は認められなかった。

そこで、UPPL1541 を用いて以下の実験を行うこととした。

(2) マウス膀胱癌 UPPL1541 での Pd-11 発現を抑制する薬剤のスクリーニング

マウス膀胱癌細胞表面の Pd-11 分子を抗 Pd-11 抗体と Alexa488 で蛍光標識したうえで、既存の化合物ライブラリーから Pd-11 分子の発現を低下させる薬剤を検討した。Pd-11 発現の上流と考えられている既知の JAK/STAT 経路を阻害する JAK 阻害剤である化合物 A とこれとは異なる作用を有する化合物 B が候補として抽出された。In vitro で UPPL1541 細胞をこれらの薬剤で処理したところ、Pd-11 (CD274) mRNA レベルは軽度低下していたが、免疫染色による蛍光顕微鏡での Pd-11 発現はももとの蛍光強度が強くないため、実際の蛍光陽性細胞数として定量するのは技術的に困難であった。

図3 Pd1 knockout by CRISPR/Cas9



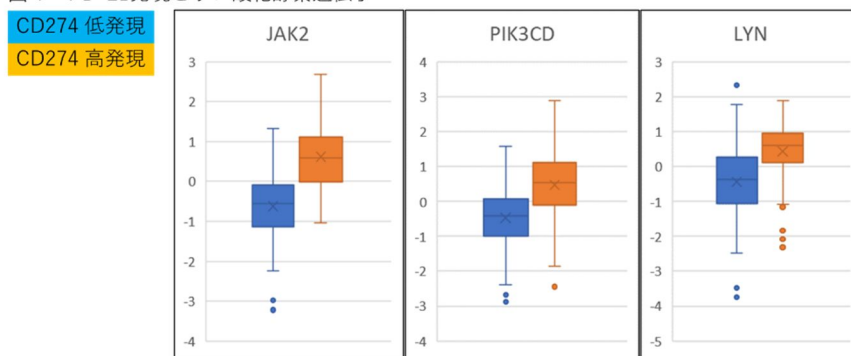
(3) 候補化合物の抗腫瘍効果の同系皮下移植モデルでの評価：UPPL1541 の同系マウス皮下移植モデルを用いて、抗 PD-1 抗体に化合物 A または化合物 B を併用し、併用群、PD1 抗体単剤群、化合物単剤群、コントロール群で腫瘍増殖を評価した。化合物 A の併用で増殖抑制を認める傾向にあったが統計学的有意差は認められなかった。化合物 B については増殖抑制に差を認めなかった

(4) ヒト膀胱癌細胞株での検討

上記(3)で有意な結果を得られなかったため、ヒト膀胱癌臨床データを用いて PD-L1 高発現の症例における新規治療標的として可能性のある分子を探索した。

cBioportal から TCGA (膀胱癌/2020 年版) データをダウンロードした。トランスクリプトーム解析がなされた 296 症例を解析対象とした。CD274 (PD-L1) 発現の中央値で、高発現 148 例と低発現 148 例の 2 群に分けた。高発現群では JAK2 の高発現を認め、本研究でのマウス細胞における化合物スクリーニングの結果と合致した。そのほか、主なリン酸化酵素をコードする遺伝子として、PIK3CD と LYN が CD274 発現量と有意な相関関係を示した(図4)

図4 PD-L1発現とリン酸化酵素遺伝子

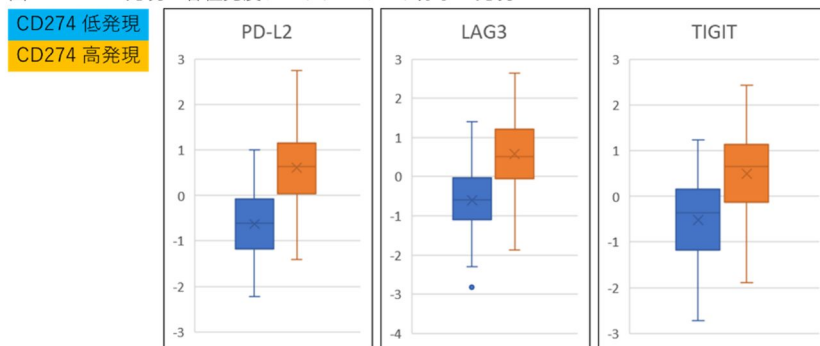


め、本研究でのマウス細胞における化合物スクリーニングの結果と合致した。そのほか、主なリン酸化酵素をコードする遺伝子として、PIK3CD と LYN が CD274 発現量と有意な相関関係を示した(図4)

さらに、PD-L1 発現と各種免疫チェックポイント分子との関連を検討したところ、PD-L2, LAG3, TIGIT, FOXP3 の発現と相関関係を認めた(図5)。PD-L2 発現が PD-1 阻害治療に与える

正確な影響は不明だが、マウス皮下腫瘍の増殖実験で PD-1 阻害剤と化合物との併用効果を認めなかった原因の一つである可能性はある。今後マウスモデルにおける PD-L2 発現の意義を検討していきたい。また LAG3, TIGIT などすでにこれらを標的とした新規薬剤が開発されている状況から、PD-L1 高発現症例では他のチェックポイント分子も共発現している可能性

図5 PD-L1発現と各種免疫チェックポイント分子の発現



が高く、PD-1 経路の PD-L1 発現制御と PD1 阻害剤による Dual inhibition よりも、PD-1 経路とそれ以外のチェックポイント分子の同時阻害のほうが有用である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

化合物を用いた動物実験で統計学的に有意な差を認められなかったことから現時点のデータのみでは論文化は難しいが、遺伝学的解析から別のリン酸化酵素阻害剤とPD1抗体併用がPD-L1高発現症例で有効な可能性が示唆されたため、この実験を追加することで本研究データの一部と合わせて研究発表を行う予定としている。

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