

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18567

研究課題名（和文）リゾリン脂質に着目した膀胱癌再発・進展メカニズムの解明と新規治療の開発

研究課題名（英文）Elucidation of bladder cancer recurrence and progression mechanism focusing on lysophospholipid and establishment of new treatment

研究代表者

片岡 政雄（Kataoka, Masao）

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90554204

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：臨床検体による解析にて筋層浸潤性膀胱癌でのリゾフォスファチジン酸受容体1（LPA1）の発現亢進が確認された。LPA1を発現するヒト膀胱癌細胞株T24は生理的尿中濃度のLPA存在下にRho活性化、ROCK1リン酸化、MYPT1リン酸化、MLC発現亢進とラメリポディアの形成が認められ、浸潤能が亢進することが確認された。また、LPAによる遊走能亢進、MMP2活性化亢進も確認され、これらはLPA1阻害剤、ROCK阻害剤により抑制されることが同定された。LPAによる増殖能への影響は認められなかった。以上よりLPA1阻害剤、ROCK阻害剤が膀胱癌浸潤能を抑制させる新規治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱癌の多くは診断時に筋層に浸潤が見られない筋層非浸潤性膀胱癌（NMIBC）である。しかし術後の膀胱腔内再発や再発時に進展する可能性の高い癌でもある。筋層浸潤性膀胱癌（MIBC）となると、膀胱自体の温存は困難で膀胱全摘除術が選択されることが多い。NMIBCでは組織学的因子や腫瘍の数、再発の有無などでリスク分類がなされ、再発予防のための治療が施される。今回の研究結果から、膀胱癌におけるLPA1発現は再発、進展リスクが高い可能性が示唆された。これまで膀胱癌に対する薬物治療は殺細胞性抗癌剤や免疫チェックポイント阻害剤であったが、LPA1阻害剤、ROCK阻害剤が新規治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Analysis of clinical specimens showed increased expression of lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA1) in muscle invasive bladder cancer (MIBC). The human bladder cancer cell line T24 expressing LPA1 was confirmed to have enhanced invasive potential in the presence of physiological urinary concentrations of LPA, with increased Rho activation, ROCK1 phosphorylation, MYPT1 phosphorylation, MLC expression and lamellipodia formation. In addition, increased migration and MMP2 activation by LPA were also observed, and these were identified to be suppressed by LPA1 and ROCK inhibitors. No effect of LPA on proliferative ability was observed. These results suggest that LPA1 and ROCK inhibitors may be novel therapeutic agents to suppress the invasive potential of bladder cancer.

研究分野：尿路悪性腫瘍

キーワード：膀胱癌 浸潤 リゾフォスファチジン酸

1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌の特徴は時間的、空間的な多発性であり、その高い再発率、進展率は重大な問題である。しかしながら、その再発、進展メカニズムは今だ解明されていないことが多いのが現状である。近年、細胞の運動、遊走に關与する生理活性物質の研究が注目を浴びている。中でも細胞膜脂質二重層の構成物質であるリゾリン脂質の一つであるリゾフォスファチジン酸(LPA)の細胞増殖・遊走、がん浸潤、血管新生、炎症などへの作用が注目されている。様々な疾患のバイオマーカーとして注目されているところである。私たちはこれまでに、膀胱癌におけるリゾフォスファチジン酸受容体 1 (LPA1) の役割に注目し研究を行ってきた。今回の研究ではこれまでにやってきた *in vitro* での研究成果を進展させ、尿路上皮癌の再発、浸潤メカニズムを解明するとともに、新規治療薬の開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究は、尿路上皮癌の再発、進展メカニズムを解明するとともに、尿路上皮癌患者における LPA 受容体サブタイプ発現解析、LPA や LPA 受容体の尿路上皮癌バイオマーカーとしての可能性の解明、そして LPA に着目した再発予防法の開発を目的としている。具体的には以下の 4 点から、尿路上皮癌の再発・浸潤メカニズムを統合的に解析し、臨床応用に向けた研究を並行して行う。(1)膀胱癌細胞株 T24 を用いて LPA 受容体下流のシグナル経路を解明する。細胞浸潤、細胞間接着に關わる因子を探索する。(2)免疫組織化学染色法や定量的リアルタイム PCR により尿路上皮癌組織における LPA 受容体サブタイプの発現解析を行う。(3)尿路上皮癌患者と正常対象の尿中 LPA 濃度を測定し、尿路上皮癌の診断やバイオマーカーとしての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1)LPA1 のノックダウンおよび阻害剤処理を行った膀胱癌細胞株 T24 を作成し、LPA の効果を確認するべく各種アッセイを行う。LPA の下流シグナルである Rho/ROCK との關連についての解析を行う。さらにゼラチンザイモグラフィアッセイによりマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 活性を測定することで LPA の細胞接着に与える影響についての解析を行う。

(2)手術により得られた病理組織検体を用いて、LPA 受容体サブタイプや LPA 産生酵素である ATX の発現解析 (免疫組織化学染色、定量的リアルタイム PCR) を行う。さらに再発率や生存率、進展率など各種臨床パラメーターとの解析を行い、LPA 受容体の尿路上皮癌のバイオマーカーとしての可能性について検討を行う。

(3)尿路上皮癌患者及び正常対象群より得られた尿サンプルを用いて、尿中の LPA および LPA 産生に關わる酵素 Autotaxin (ATX) の濃度を測定し、尿路上皮癌患者と正常群での比較を行う。さらに、腎盂癌、尿管癌、膀胱癌といった部位別、また stage 別の比較も行う。尿サンプルは当院泌尿器科にて加療されている患者からの同意を得て採取する。尿路上皮癌のみならず、コントロール群として他疾患症例の尿も採取する。

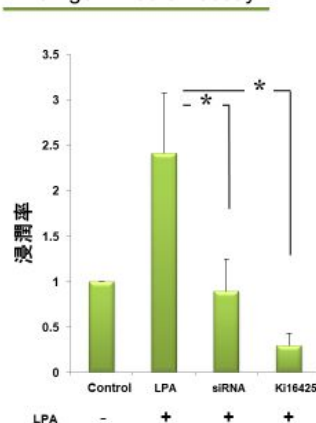
4. 研究成果

(1)LPA1 を発現するヒト膀胱癌細胞株 T24 では LPA 投与により ROCK1、リン酸化 MYPT1、リン酸化 MLC 発現亢進とラメリポディアの形成が認められることを確認した。さらに LPA1 阻害剤、および LPA1 ノックダウンによりこれらが抑制されることを確認した。また、LPA により T24 膀胱癌細胞株の浸潤能が亢進すること、LPA 受容体阻害剤やノックダウンにより浸潤能は抑制されることを確認した。

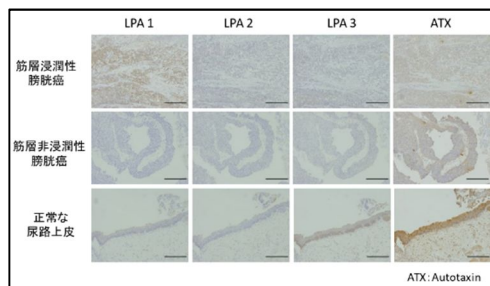
LPA が浸潤能亢進に關与していることが明らかになった一方、BrdU 細胞増殖アッセイの結果によると LPA は細胞増殖には影響を及ぼさない可能性が示唆された。T24 膀胱癌細胞を用いたスクラッチアッセイでは、LPA 濃度依存性に遊走能亢進が認められた。また、LPA1 阻害剤投与下、siRNA による LPA1 発現抑制により遊走能亢進は抑制されることが確認された。

Rho-activation assay により LPA 投与下に T24 膀胱癌細胞における Rho 活性化を確認した。これは Ki16425 投与にて抑制された。ゼラチンザイモグラフィによるマトリックスメタロプロテアーゼ解析を行ったところ、LPA 存在下に MMP2 活性が認められる傾向が認められたが、MMP-9 活性は認められなかった。LPA1 受容体阻害剤 および LPA1 ノックダウンによる MMP-2 活性亢進は抑制された。これらの結果より T24 は LPA1 を介して Rho-ROCK 経路が活性化し、細胞遊走能、浸潤能が亢進することが示唆された。また、LPA1 を介して MMP2 活性が更新し、浸潤能が亢進する可能性が示唆された。

Matrigel invasion assay



(2) 臨床検体の免疫組織化学染色の結果では筋層浸潤性膀胱癌においては LPA1、LPA 産生酵素である ATX 発現が確認されたが、LPA2、LPA3 の発現は認められなかった。筋層非浸潤性膀胱癌、正常尿路上皮では LPA1、LPA2、LPA3 発現が確認されなかったが、ATX は正常膀胱粘膜で発現が認められ、恒常的な LPA 産生が示唆された。



(3) 尿路上皮癌患者及び正常対象群より得られた尿サンプルを用いての尿中 LPA 解析についてはサンプル数が少なく、現在もサンプルの収集、解析継続中である。

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〕

-

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