

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18101

研究課題名（和文）long non-coding RNAが果たす膀胱がんでの働きの解明

研究課題名（英文）The role of long non-coding RNA in bladder cancer

研究代表者

梅田 浩太（UMEDA, Kota）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：20868260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：膀胱がんにおける long non-coding RNA (lncRNA) の臨床的意義を検討し、免疫チェックポイント阻害薬であるペムブロリズマブとの関係を調べた。新規 RNA detection system である quantitative in situ hybridization chain reaction (qHCR) を用いて低コストにホルマリン固定された切片から lncRNA を同定できることが分かった。合わせてペムブロリズマブ使用症例のデータベースを作成し NLR (好中球リンパ球比) の動態が有用なバイオマーカーであることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱がんにおいて qHCR を用いて 5 種類の lncRNA の発現を確認することができた。従来の in-situ hybridization 法と比較して低コストでハイスループットに行うことができ、更なる機能解析・臨床応用につながると考えられる。また、免疫チェックポイント阻害薬により治療が飛躍的に進歩したが、未だ有用なバイオマーカーは確立していない。NLR に着目することで早期に有効性の判断材料とすることができ、不必要な副作用を減らし、免疫治療による医療費の大幅な削減につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the clinical role of long non-coding RNA (lncRNA) in bladder cancer and its relationship with pembrolizumab, the immune checkpoint inhibitor. We found that lncRNA could be identified from formalin-fixed sections using a novel RNA detection system, quantitative in situ hybridization chain reaction (qHCR), which is a low-cost and high-throughput method compared to conventional methods. In addition, we built a database of patients treated with pembrolizumab and found that early NLR (neutrophil-lymphocyte ratio) kinetics is a useful predictor, and early assessment of efficacy could lead to reduced side effects and medical costs.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：膀胱がん lncRNA ペムブロリズマブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膀胱がんは限局していれば予後は良好であるが、膀胱外への伸展やリンパ節転移を認める進行膀胱がんでは5年生存率は40%程度であり、遠隔転移を有する場合は6%程度と極めて予後不良である。進行がんにおける治療成績はM-VAC療法が開発された過去30年以降、大きな改善はみられなかった。近年、免疫チェックポイント阻害薬の登場により、予後の改善が期待されるが、未だこれらの薬剤が無効な症例も多くみられる。

大規模トランスクリプトーム解析によるゲノム～遺伝子発現パターンの理解から、ヒトゲノムの大部分はタンパク質のアミノ酸一次配列情報をコードしないnon-coding RNAで構成されることが判明した。短鎖であるmicro RNAはこれまでも研究が進んでいたが、近年になって長鎖であるlong non-coding RNA (lncRNA)が注目されてきている。

癌研究においてもlncRNAとの関連は報告され始めているが、それらは発癌、癌の転移再発、治療抵抗性との関連を示したものに過ぎず、腫瘍細胞内や腫瘍微小環境での局在や具体的なエピジェネティックな調節機能を明らかにした報告はなかった。

そこで今回、我々は膀胱がんにおいてlncRNAに着目し、免疫応答との関りを含めた免疫チェックポイント阻害薬との関連や細胞内や腫瘍微小環境での局在といった機能面のみならず、三次元での位置関係を明らかにすることで、よりlncRNAの動きの解明が進むと考えた。

2. 研究の目的

本研究は膀胱がんにおいて、ハイスループットな新規RNA detection systemであるquantitative in situ hybridization chain reaction (qHCR)を用いて、ヒト膀胱がん組織のlncRNA発現を網羅的に同定し、免疫チェックポイント阻害薬との関りを含めた実臨床との関連を検討することを第一の目的とする。更に革新的な膨張顕微鏡法(expansion microscopy)をqHCRに適用し、lncRNAの空間分布や細胞内局在を、回折限界を越えるナノスケールで可視化することを目的とした。

3. 研究の方法

ペムプロリズマブを使用した55例においてデータベースを作成し、RECISTに基づいて測定可能な病変の115か所を経時的にサイズの変化について評価した。CRPやNLR(好中球リンパ球比)に関してはその動態に着目した。

文献的に免疫関連細胞や免疫療法との関りの可能性を指摘されているlncRNAとしてHOTAIR, MALAT1, NEAT1, UCA1, GAS5の5種類をまず選定し、膀胱がんペムプロリズマブを使用した症例の中で8例において計40検体でlncRNAの発現を検討した。

更にペムプロリズマブ使用前後の検体がある8例においては、剖検例を中心に88か所に及ぶDNAやRNAの抽出を行い、次世代シーケンスで遺伝子変異解析及びトランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

(1)ペムプロリズマブを使用した55例のデータベースを作成し、評価病変のサイズ変化のみならず、採血データの推移も検討した。CRPやNLRに関してはその動態に着目し、responder, flare-responder, non-responderの3群に分けることができた。臓器ごとのサイズの変化としては、RECISTに基づくCR/PR/SDの割合は、原発巣67%、リンパ節70%、肺44%、肝臓40%、腹膜播種56%であった。臓器ごとの効きの違いは腫瘍微小環境が関わっていると考えられ、lncRNAが関与している可能性も考えられる。CRPやNLR、それぞれのkineticsとの関連を検討し、特にリンパ節に対する効きに関してNLR kineticsが有用なバイオマーカーであった(図1)($p=0.005$)。

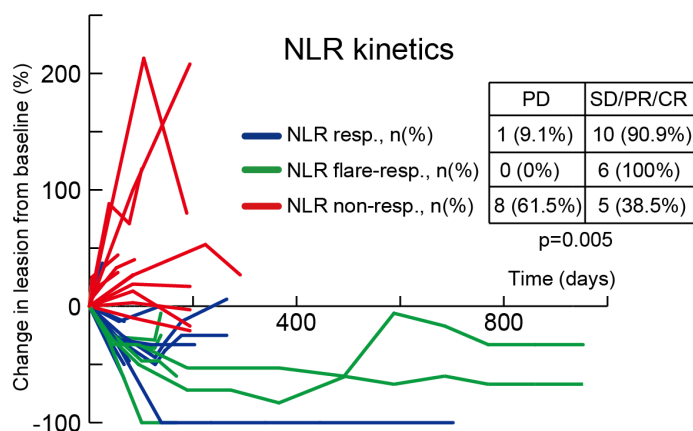


図1: NLR kinetics 3群でのリンパ節のサイズの変化

NLR kinetics は全生存率とも関わっており(図 2)($p=0.017$)、更に多変量解析で PS や肝転移と共に独立した因子であることが判明した($p=0.007$)。NLR kinetics に着目することで、早期に有効性を評価することができ、薬剤の継続の判断材料とすることができると考えられる。不必要な副作用を減らし、免疫治療による医療費の大幅な削減につながると思われる。

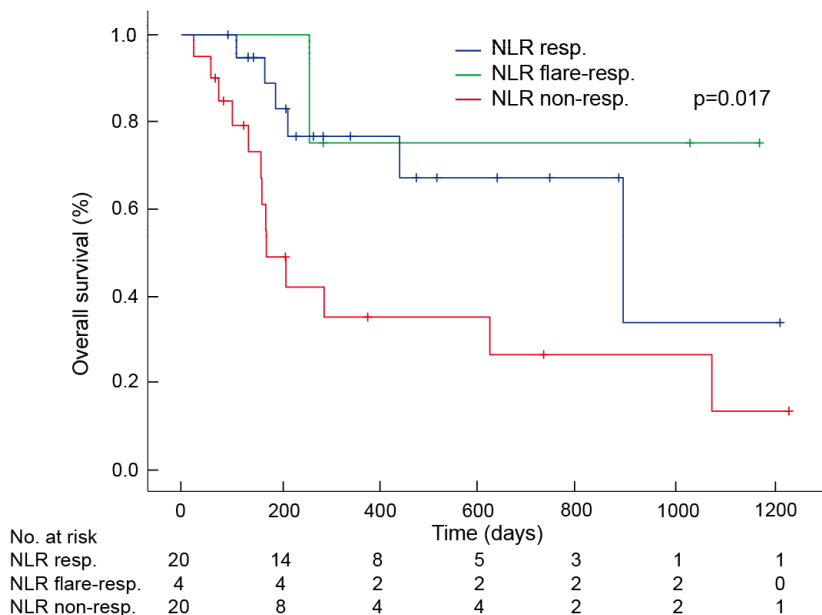


図 2:NLR kinetics3 群での全生存率のカプランマイヤー曲線

(2)膀胱がんの 40 検体において qHCR を用いて実際に 5 種類の lncRNA (HOTAIR, MALAT1, NEAT1, UCA1, GAS5)を同定できることをホルマリン固定された切片から確認した(図 3)。低コストでハイスループットな手法であり、膀胱がんでも有用であることが分かった。この手法を用いることでさらに多数の lncRNA について発現を確認し、膨張顕微鏡法と組み合わせることで、lncRNA の可視化をナノスケールまで展開し、空間分布や細胞内局在をあきらかにしていく。また、(1)のデータベースと組み合わせることでバイオマーカーとしての有用性を評価していく。

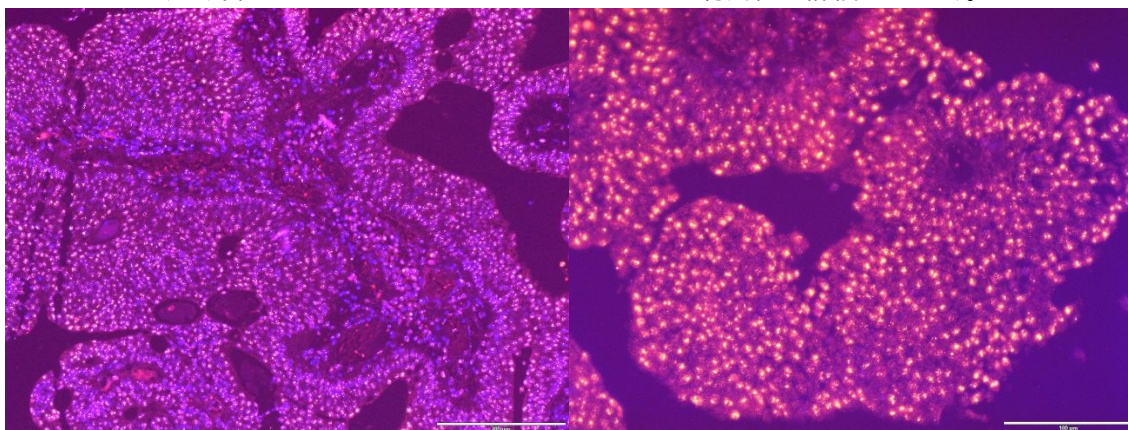


図 3:NEAT1 の発現を確認

(3)ペムプロリズマブ使用前後での検体がある 8 例においては、剖検例を中心に 88 か所に及ぶ DNA や RNA の抽出を行い、次世代シーケンスで遺伝子変異解析及びトランスクリプトーム解析を行っている。免疫チェックポイント阻害薬の使用前後を比較することで治療による修飾の影響や、治療での効きの違いを比較することができると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Umeda Kota, Tanaka Nobuyuki, Yasumizu Yota, Takeda Toshikazu, Matsumoto Kazuhiro, Morita Shinya, Kosaka Takeo, Mizuno Ryuichi, Oya Mototsugu	4. 巻 21
2. 論文標題 Site-Specific Differences in PD-1 Blockade Success and Biomarkers in Urothelial Carcinoma Treated with Pembrolizumab	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Genitourinary Cancer	6. 最初と最後の頁 128 ~ 135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.clgc.2022.08.004	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅田浩太
2. 発表標題 尿路上皮癌における臓器別のペムプロリズマブの治療成績
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅田浩太
2. 発表標題 当院における尿路上皮癌に対するペムプロリズマブの初期使用経験および筋肉量との関連
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
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
---------	---------