

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18126

研究課題名(和文)膀胱癌におけるSORL1を中心とした腫瘍免疫微小環境の解明と新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel immunotherapy for bladder cancer with SORL1 signaling and tumor immune microenvironment

研究代表者

内海 孝信 (UTSUMI, Takanobu)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：80594275

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)：SORL1の発現の有無による膀胱癌細胞の挙動に関して研究した。SORL1を発現していない膀胱癌細胞では遊走能・浸潤能が上昇しており、Cdc42シグナルおよび膜型MMPシグナルが上昇しており、がん浸潤突起(invadopodia)を形成していることが観察された。また、SORL1-Cdc42シグナルをCdc42阻害剤で阻害すると遊走能・浸潤能が低下し、invadopodiaの形成が抑制された。SORL1を発現しない膀胱癌細胞ではCdc42-N-WASP-Apr2/3シグナルを標的として阻害することで、invadopodia形成抑制が起こり遊走能・浸潤能が低下して治療効果が現れると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SORL1を発現しない膀胱癌ではCdc42-N-WASP-Apr2/3シグナルを標的として阻害することで、invadopodia形成抑制が起こり遊走能・浸潤能が低下して治療効果が現れると考えられた。また、SORL1の発現の有無によって、治療標的となるシグナルが判別できバイオマーカーとして可能性が示唆された。さらに、膀胱癌の細胞膜表面のPD-L1の発現をフローサイトメトリー法で確認しており、将来的に抗PD-1/PD-L1抗体療法とCdc42阻害剤との複合免疫療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The behaviour of bladder cancer cells with and without SORL1 expression was studied in this study. It was observed that bladder cancer cells without SORL1 expression had increased migration and invasive capacity, increased Cdc42 and membrane MMP signalling, and formed invadopodia. Inhibition of SORL1-Cdc42 signalling with Cdc42 inhibitors reduced migration and invasive capacity and inhibited invadopodia formation, while targeted inhibition of Cdc42-N-WASP-Apr2/3 signalling in bladder cancer cells that do not express SORL1. This suppression of invadopodia formation was thought to reduce migration and invasive capacity, resulting in a therapeutic effect.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：膀胱癌 SORL1 Cdc42 複合免疫療法 PD-L1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、一次療法として白金製剤を中心とした MVAC 療法や GC 療法が長年に渡って中心であったが、一次療法抵抗性となった場合の二次療法の有効性は乏しかった。進行性膀胱癌に対するタキサン系抗がん剤やチロシンキナーゼ阻害剤、mTOR 阻害剤の二次療法での有効性は 0~25%と限定的であったが、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、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。しかしながら、現在までにがん細胞における SORL1 の分子ネットワーク解析は行われていない。

これらの学術的背景より、本研究では、膀胱癌における SORL1 を key molecule としたがん免疫微小環境の解析を行い、SORL1 に関連する分子ネットワークを基にがん免疫療法における新規の治療標的分子・機構およびバイオマーカーとしての可能性を検証することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、膀胱癌細胞株を用いて、SORL1 を中心とした分子ネットワークを特定して、新規の治療標的分子・機構およびバイオマーカーとしての可能性を検証すること、PD-L1 発現を確認した後に抗 PD-1/PD-L1 抗体療法と SORL1 分子ネットワーク解析によって判明した新規治療標的との複合免疫療法の可能性を検証することを目的とした。

本研究では、目的 および を達成するために、ヒト膀胱癌細胞株 (CAL29) と独自に樹立したマウス膀胱癌細胞株 (B-UPPL3 および B-UPPL4) を用いた。

3. 研究の方法

本研究の準備段階として、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。これらの knock-out 細胞した細胞と empty vector を入れた control 細胞を用い、SORL1 に関連する分子ネットワークの解析を行った。また、PD-L1 の発現を確認して新規の複合免疫療法の可能性について検証した。

4. 研究成果

(1) 膀胱癌細胞では SORL1 の発現が消失すると遊走能・浸潤能の上昇した

ウェスタンブロット法により、SORL1 の発現を control 細胞・knock-out 細胞で比較した (図 1)。また、knock-out 細胞は、control 細胞と比較して遊走能・浸潤能は有意に上昇していた (図 2: 図は浸潤能の結果のみ表示)。これらの結果はマウス・ヒト膀胱癌細胞株で共通していた。一方で、増殖能に関しては、control 細胞・knock-out 細胞で有意差を認めなかった。

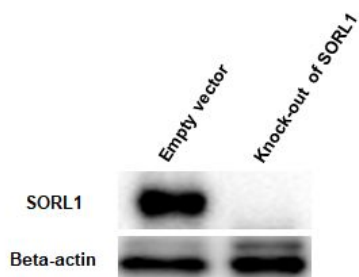


図1:ウェスタンブロット

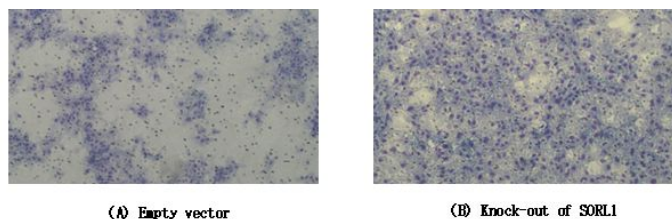


図2:浸潤能

また、control 細胞および knock-out 細胞の培養上清を用いて、可溶性 SORL1 の測定を ELISA 法で行った。Knock-out 細胞では、培養上清からは可溶性 SORL1 は測定されなかったため、ウェスタンブロットや細胞免疫染色を行わなくても、容易に SORL の発現量を測定できバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。

(2) SORL1 を中心としたシグナル解析と浸潤能の背景

ウェスタンブロット法により、SORL1 の発現を knock-out した細胞では、control 細胞と比較すると Cdc42 およびリン酸化 Cdc42、膜型 MMP (MT1-MMP) の発現が上昇していることを確認した (図 3)。Cdc42 シグナルと MT1-MMP シグナルが協調してがん浸潤突起 (invadopodia) を形成していることが観察された。以上の結果より、SORL1 は Cdc42 の発現およびリン酸化、MT1-MMP の発現を制御するがん抑制的な機能を持つと考えられた。

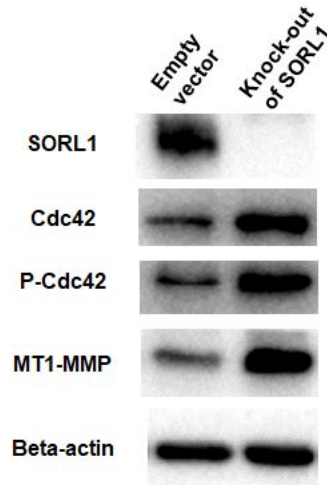
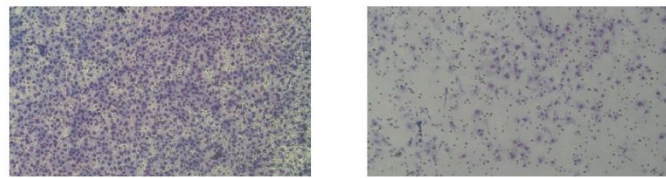


図3:ウェスタンブロット

(3) Cdc42 阻害剤 (CASIN) による遊走能・浸潤能の低下

(2) の結果を基に、SORL1 を knock-out した細胞では、Cdc42-N-WASP-Apr2/3 シグナルが活性化していることが考えられたため、Cdc42 阻害剤 (CASIN) による膀胱癌細胞の機能解析を行った。Cdc42 阻害剤を作用させると、knock-out 細胞では invadopodia の形成抑制が起こり、遊走能・浸潤能が低下することが確認された (図 4: 図は浸潤能の結果のみ表示)。Control 細胞では、Cdc42 阻害剤を作用させても遊走能・浸潤能に有意な変化を認めなかった。SORL1 knock-out 細胞では、Cdc42 阻害剤を作用させると Cdc42 およびリン酸化 Cdc42 の発現も低下していることをウェスタンブロット法で確認した。



(A) Cdc42阻害剤投与なし

(B) Cdc42阻害剤投与あり

図4:Cdc42阻害剤による

以上の結果より、SORL1 の発現の

有無によって治療標的となる Cdc42 シグナルが判別でき、可溶性 SORL1 をバイオマーカーとして利用できると考えられた。

(4) 膀胱癌細胞における PD-L1 の発現の確認

マウス・ヒト膀胱癌細胞株の control 細胞および SORL1 knock-out 細胞にインターフェロン (IFN) 刺激を加えてから細胞膜表面の PD-L1 の発現量を確認した (図 5)。本研究で用いたマウス膀胱癌細胞株 B-UPPL3 および B-UPPL4 は、過去に免疫応答性のある C57BL/6 マウスでも皮下移植で高い腫瘍形成能を認めているため、抗 PD-1/PD-L1 抗体療法に利用可能である。

本研究では、膀胱癌細胞株で Cdc42 阻害剤の治療の有効性を確認しており、将来的な新規の複合免疫療法の可能性があると示唆された。

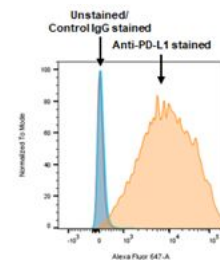


図5:フローサイトメトリー

以上の結果より、膀胱癌において SORL1 は Cdc42 の発現を制御しており、SORL1 の発現が低下することは膀胱癌の悪性度 (遊走能・浸潤能の上昇) に関与していることが判明した。SORL1 の発現の有無により、Cdc42 シグナルおよび MT1-MMP シグナルの活性化や Cdc42 阻害剤の有効性を予測できるバイオマーカーとして有望であると考えられた。また、本研究で用いた膀胱癌細胞では PD-L1 の発現も確認しているため、Cdc42 阻害剤による治療のみならず新規の複合免疫療法への応用の可能性があると考えられた。

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〕

-

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