

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791482

研究課題名（和文） 膀胱粘膜への cAMP を介した BCG 感染機序およびその細胞増殖抑制機構の解明

研究課題名（英文） The elucidation of the cell proliferation control mechanism and the infection mechanism to bladder mucosa of BCG via cAMP

研究代表者

福田 勝洋 (FUKUTA KATSUHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：30468251

研究成果の概要（和文）：

1. cAMP 活性化剤投与による膀胱がん細胞株での BCG 感染率への影響：ヒト膀胱癌細胞株 RT4、5637、T24 に BCG を感染させた後、cAMP 活性化剤であるフォルスコリンを投与し、H.E 染色で検鏡した。結果としてフォルスコリンの濃度依存的に BCG 菌の感染が抑制されていた。
2. cAMP 関連細胞増殖因子の変化：cAMP 関連細胞増殖因子である PKA をウエスタンブロットで検討するとフォルスコリン非投与群の細胞と比較し、フォルスコリン処理した細胞で、PKA の発現が約 2-3 倍増加していた。
3. cAMP 活性化剤投与による腫瘍増殖への影響：BBN 誘発膀胱癌モデルマウスに BBN 投与 8 週から BCG およびフォルスコリンをそれぞれ膀胱、腹腔に投与した。BBN 投与 26 週で膀胱を摘出し、膀胱重量を測定した。結果として膀胱重量はフォルスコリン非投与群とフォルスコリン投与群で 2.68g と 2.83g であった。フォルスコリン非投与群で膀胱重量が少ない傾向を示した（フォルスコリン投与により、腫瘍増殖効果が促進される傾向を示した）が、有意差は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

1. Influence on BCG infection rate in bladder cancer cell line by cAMP activator administering: After BCG had been infected with the human bladder cancer cell line, the cAMP activator was administered. The infection of BCG was controlled to the density of cAMP activator.
2. Examination of change in cellular growth factor related to cAMP: The expression of PKA that is the cellular growth factor related to cAMP has increased by about 2-3 times compared with cAMP activator non-administering group.
3. Influence on tumor proliferation by cAMP activator administering: First, BBN was administered to the mouse. After 8 weeks, BCG and cAMP activator were administered to the bladder and ventral cavity, respectively. After 26 weeks, the bladders were removed and the bladder was weighed. The weight of the bladder was 2.68g and 2.83g in the cAMP activator non-administration group and the cAMP activator administering group respectively. A significant difference was not admitted though the tendency

with a little weight of the bladder was shown in the cAMP activator non-administration group compared with the cAMP activator administering group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：膀胱癌、BCG、cAMP

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌はそのほとんどが表在性であり、予後も比較的良好な癌であり、内視鏡的切除で治療できる。しかし、膀胱内再発が多いことと、膀胱再発癌の20%程度が浸潤癌に移行する。浸潤癌になると、膀胱全摘および尿路変更が必要となるため患者のQOLを著しく低下させてしまうことが問題である。現在、膀胱内再発に対する治療としてBCG膀胱内注入療法が確立されている。しかし、T1 Grade3の症例ではBCGを行うべきか膀胱全摘を行うべきか未だに選択方法は確立されていない。私たちはBCGの効果を予測する因子を検討することにより、T1 Grade3症例における膀胱全摘を回避できるのではないかと考えた。そこで私たちは膀胱粘膜におけるcAMPの関与に着目した。大腸菌を用いた膀胱炎モデルマウスにおいて、cAMP活性剤を投与すると、cAMPを介した大腸菌のexocytosisが引き起こされることが報告されている。BCG膀胱内注入療法はBCG菌が膀胱粘膜に感染して初めて免疫応答を介して抗腫瘍効果を引き起こすことが知られている。そこで私たちは膀胱粘膜におけるcAMP活性の違いが、BCG膀胱内注入療法の効果の違いに現れるのではないかと考えた。またBCG療法におけるCamp関与を明らかにすることができれば、cAMP活性剤を併用し、BCG膀胱内注入療法の効果を向上させることもできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

BCG療法においては、BCG菌が膀胱粘膜の感染し、その感染が維持されることが必須である。その感染の維持にcAMPが関与しているかどうかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 膀胱癌細胞株におけるBCGの感染率の観察

シャーレ内にカバーガラスを入れ、そこにヒト膀胱癌細胞株RT4、5637、T24を37℃、5%CO₂インキュベーターで培養。そこに、BCG Tokyo172株およびcAMP活性剤であるフォルスコリンを各濃度(0、10、100μM)で添加。カバーガラスを取り出し、H.E染色、チール・ネルゼン染色を施行。細胞における感染したBCGをカウントし、感染率を測定した。

(2) PKAの発現

ヒト膀胱癌細胞株RT4、5637、T24を37℃、5%CO₂インキュベーターで培養。そこに、BCG Tokyo172株およびcAMP活性剤であるフォルスコリンを各濃度(0、10、100μM)で添加。細胞をPBSで洗浄し、セルスクレーパーで細胞を回収したのちタンパクを抽出。ウエスタンブロット法にてPKAの発現を検討した。

(3) cAMP活性剤投与による抗腫瘍効果の検討
C57BL6マウスに0.05%BBNを自由飲水投与。BBN投与8週後より、BCG Tokyo172株およびフォルスコリン(100μM)を膀胱内および

腹腔内に投与。BBN 投与 26 週後に膀胱を摘出し、膀胱重量および PKA の免疫染色を施行した。

4. 研究成果

ヒト膀胱癌細胞株である RT4、5637、T24 にフォルスコリンを投与して検鏡すると、フォルスコリンの濃度依存的に BCG 菌の感染が抑制されていた。そこで、フォルスコリン 100 μ M で処理した細胞からタンパクを抽出し、ウエスタンブロット法で PKA の発現量を検討すると non-treat の細胞と比較し、フォルスコリン処理した細胞で、PKA の発現が約 2-3 倍増加していた。しかし、実験の手技的な問題かはっきりしないが、結果の再現性が取れなかった。*In vivo* の実験では膀胱重量はフォルスコリン非投与群とフォルスコリン投与群で 2.68g と 2.83g であった。フォルスコリン非投与群で膀胱重量が少ない傾向を示した（フォルスコリン投与により、腫瘍増殖効果が促進される傾向を示した）が、有意差は認めなかった。膀胱組織における PKA の発現を免疫染色で検討すると、フォルスコリン非投与群と比較し、フォルスコリン投与群の膀胱 basal cell に PKA の発現を強く認めた。私たちが行った実験結果から、cAMP を介して BCG 菌の感染が妨げられ、抗腫瘍効果が得られにくい傾向があることが分かった。また cAMP 活性化剤であるフォルスコリンを投与することによって、cAMP の下流に存在する PKA が活性化され、腫瘍増殖効果が増強されることが示唆された。ただ、現段階では、有意差をもった実験結果ではないため、さらなる検討を要すると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kubota Hiroki, Naruyama Hiromichi, Hirose Masahito, Fukuta Katsuhiko, Kubota Yasue, Yamada Yasuyuki, Kohri Kenjiro: Garcin syndrome as the initial presentation of metastatic adenocarcinoma of the prostate. International Cancer Conference

Journal, 査読有り, Vol.1, 2012, pp.113-115

DOI: 10.1007/s13691-012-0023-4

- ② 福田 勝洋、山田 泰之、成山 泰道、窪田 裕樹、広瀬 真仁、安藤 亮介、本間 秀樹:「IV. 検査法」、泌尿器科レジデントマニュアル(監修 郡 健二郎、編集 佐々木 昌一、戸澤 啓一、丸山 哲史), 医学書院, 査読無し, 2011, pp.39-100
- ③ Taguchi Kazumi, Yasui Takahiro, Kubota Hiroki, Fukuta Katsuhiko, Kobayashi Daichi, Naruyama Hiromichi, Okada Atsushi, Yamada Yasuyuki, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Simple method of preventing postoperative inguinal hernia after radical retropubic prostatectomy. Urology, 査読有り, Vol.76, 2010, pp.1083-1087 DOI: 10.1016/j.urology.2010.05.002.

[学会発表] (計 12 件)

- ① Kanemoto Kazuhiko, Fukuta Katsuhiko, Okamoto Koji, Kanai Yae, Katoh Masaharu, Kohri Kenjiro, Nakagama Hitoshi: Genomic landscapes of BBN-induced bladder cancer in rodents, and its application to human bladder cancer: gene amplification and overexpression of Cyp2a5/CYP2A6 in invasive bladder cancer. European Association of Urology Annual Meeting 2013, 2013.3.15-19, Milan(Italy)
- ② 河合 憲康、小林 大地、内木 拓、山田 健司、安藤 亮介、福田 勝洋、池上 要介、金本 一洋、秋田 英俊、岡村 武彦、戸澤 啓一、芝本 雄太、郡 健二郎: 前立腺癌に対する強度変調放射線治療(IMRT)における内分泌療法併用の意義。第 49 回日本癌治療学会学術集会、2011.10.27-29、名古屋市
- ③ 小林 大地、河合 憲康、佐藤 慎哉、内木 拓、山田 健司、池上 要介、安藤 亮介、福田 勝洋、戸澤 啓一、郡 健二郎: 磁性ナノ粒子(マグネタイト)投与によるホルモン耐性前立腺癌に対する

- る新しい治療法の開発。第 70 回日本癌学会学術総会、2011. 10. 3-5、名古屋市
- ④ 山田 健司、福田 勝洋、河合 憲康、内木 拓、池上 要介、戸澤 啓一、中釜 斉、郡 健二郎：浸潤性膀胱がんの関連遺伝子 UQCRB の同定とその機能解析。第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011. 4. 21-24、名古屋市
- ⑤ 福田 勝洋、広瀬 真仁、成山 泰道、窪田 裕樹、山田 泰之：膀胱前がん病変における PTEN は浸潤がんへの進行を抑制する。第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011. 4. 21-24、名古屋市
- ⑥ 河合 憲康、戸澤 啓一、小林 大地、山田 健司、内木 拓、安藤 亮介、池上 要介、成山 泰道、福田 勝洋、永田 大介、秋田 英俊、橋本 良博、山田 泰之、岡村 武彦、郡 健二郎：再燃前立腺癌に対するドセタキセル療法におけるリン酸エストラスムチン併用の効果。第 48 回日本癌治療学会学術集会、2010. 10. 28-30、京都市
- ⑦ 山田 泰之、安井 孝周、成山 泰道、広瀬 真仁、福田 勝洋、窪田 裕樹、戸澤 啓一、郡 健二郎：腹腔鏡下前立腺全摘除術導入にあたっての工夫と手術成績の検討。第 24 回日本 Endourology ・ ESWL 学会総会、2010. 10. 21-23、京都市
- ⑧ 福田 勝洋、広瀬 真仁、成山 泰道、窪田 裕樹、山田 泰之：前立腺小細胞癌の 1 例。第 248 回日本泌尿器科学会東海地方会、2010. 6. 12、名古屋市
- ⑨ 池上 要介、戸澤 啓一、山田 健司、安藤 亮介、福田 勝洋、神谷 浩行、彦坂 敦也、橋本 良博、岩瀬 豊、森田 明理、郡 健二郎：新規光感受性物質フラレーンを併用した長波長紫外線 (UVA-1) による膀胱癌治療に向けての基礎研究。第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010. 4. 27-30、盛岡市
- ⑩ 田口 和己、福田 勝洋、窪田 裕樹、安井 孝周、山田 泰之：前立腺全摘術後に発症する鼠径ヘルニアの予防テクニックの確立調査：第 2 弾。第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010. 4. 27-30、盛

岡市

- ⑪ 窪田 裕樹、田口 和己、小林 大地、福田 勝洋、安井 孝周、山田 泰之：当院における無症候性血尿患者の統計。第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010. 4. 27-30、盛岡市
- ⑫ 安井 孝周、廣瀬 泰彦、小林 隆宏、濱本 周造、宇佐美 雅之、広瀬 真仁、岡田 淳志、伊藤 恭典、福田 勝洋、窪田 裕樹、山田 泰之、戸澤 啓一、郡 健二郎：尿路結石患者における年代別骨塩量(BMD)の検討。第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010. 4. 27-30、盛岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 勝洋 (FUKUTA KATSUHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・
研究員

研究者番号：30468251