

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462499

研究課題名(和文) 膀胱癌の浸潤過程における炭酸脱水酵素2の役割解明と治療への応用

研究課題名(英文) Inhibitory effects of carbonic anhydrase 2 inhibitor on the invasion of urinary bladder cancer

研究代表者

魏 民 (GI, Min)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70336783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：浸潤性膀胱癌において炭酸脱水酵素2(CA2)の発現増加が明らかになった。BBN誘発マウス膀胱癌モデルを用いて、CA阻害薬であるAcetazolamide(Ace)の浸潤抑制効果について検討した結果、BBN単独群と比較して膀胱癌の発生頻度はBBN Ace+Cisplatin(Cis)群で有意に低下した。また、BBN単独群と比較してBBN Ace群及びBBN Ace+Cis群では、筋層浸潤性膀胱癌の発生頻度及び数が有意に抑制された。以上より、Aceと従来の抗癌剤であるCisを併用することにより膀胱癌の浸潤抑制効果が認められた。Aceがヒト浸潤性膀胱癌において臨床応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that that carbonic anhydrase 2 (CA2) is an invasion-associated factor in urothelial carcinoma (UC). The purpose to the present study is to examine the inhibitory effects of CA inhibitor Acetazolamide (Ace) on the N-butyl-N-(hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)-induced mouse urinary bladder carcinogenesis. We found that concurrent treatment with Ace and Cisplatin (Cis) significantly inhibited the development of BBN-induced UC. Moreover, muscle invasive UC were significantly decreased by the Ace alone and concurrent treatment with Ace and Cis. These findings indicate that CA could serve as a potential therapeutic molecular target for bladder cancers and suggest that CA inhibitors are useful for prevention of UC invasion.

研究分野：実験病理学

キーワード：膀胱癌 炭酸脱水酵素2阻害薬

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は、非浸潤性膀胱癌と浸潤性膀胱癌に分類され、非浸潤性膀胱癌については、再発、進行が問題となっているが、浸潤性膀胱癌についてはリンパ節転移、遠隔転移による予後不良が問題となっている。しかしながら、浸潤、進行のメカニズムはいまだはっきりとは解明されておらず、治療についても従来の抗癌剤による化学療法が主であり、新規治療法は開発されていない。

ヒト膀胱癌では約 20%に H-ras の変異を認め、H-ras の過剰発現は表在性膀胱癌から浸潤性膀胱癌への関与が指摘されている。これまでに我々はヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラット (Hras128) を使用して、ラット浸潤性膀胱癌モデルを作成した。この動物モデルにより得られた浸潤性膀胱癌のプロテオーム解析により炭酸脱水酵素 2 (carbonic anhydrase 2: CA2) の発現の増加を認めた。また、ヒト膀胱癌における CA2 の発現頻度は深達度が進むにつれて上昇していた。さらに、経尿道的膀胱腫瘍切除術後 follow up することができた pTa および pT1 症例について予後解析を行った結果、CA2 陰性膀胱癌に比較して、CA2 陽性膀胱癌の upstaging の頻度は、有意に高いことが示された。以上より、浸潤性膀胱癌において高発現しており、CA2 は膀胱癌の新規浸潤関連因子である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究により、浸潤性膀胱癌において CA2 の発現の増加を認めており、新規浸潤関連因子である可能性が示唆されている。CA2 の膀胱癌の予後予測因子としての有用性を明らかにするとともに、CA inhibitor (Acetazolamide, Ace) の膀胱癌に対する浸潤抑制効果を検討することを目的とする。さらに、CA2 の膀胱癌浸潤における役割を明らかにし、CA2 をターゲットとした治療への応用を検討する。

3. 研究の方法

実験 1. 0.025% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) を 6 週齢 C57BL-6J マウス 120 匹に 10 週間飲水投与した。その後、Acetazolamide (Ace)、Cisplatin (Cis) を用いて、BBN 単独群、BBN Cis 群、BBN Ace 群、BBN Ace+Cis 群の各群 25 匹ずつ 4 群、Ace 単独群、コントロール群の各群 10 匹ずつ 2 群に分け、計 6 群 120 匹に対して、12 週間、Ace を強制胃投与、Cis を腹腔内投与した。BBN 投与開始から 22 週間後に解剖を施行し、膀胱癌の発生頻度、浸潤度について比較した。

実験 2. 0.05% BBN を 6 週齢 C57BL-6J マウス 120 匹に 10 週間飲水投与した。その後、BBN 単独群、BBN Cis 群、BBN Ace 群、BBN Ace+Cis 群の各群 30 匹ずつ 4 群に分け、12 週間、Ace を強制胃投与、Cis を腹腔内投与

した。BBN 投与開始から 22 週間後に解剖を施行し、膀胱重量の測定、膀胱癌の発生頻度、浸潤度について比較した。

4. 研究成果

実験 1. 0.025% BBN 誘発マウス膀胱癌モデルにおける Acetazolamide の予防効果の検討
膀胱癌の発生頻度は BBN 単独群: 8/25 例 (32%)、BBN Cis 群: 4/25 例 (16%)、BBN Ace 群: 2/25 例 (8%)、BBN Ace+Cis 群: 1/25 例 (4%) であり、BBN Ace+Cis 群、BBN Ace 群では BBN 単独群に対して有意な発生頻度の低下を認めた。その他の投与群と単独群間では膀胱癌の発生頻度共に有意な差は認めなかった (表 1)。Ace 単独群、コントロール群における膀胱上皮の組織学的変化は認めなかった。また、pT2 以上の筋層浸潤性膀胱癌については BBN 単独群: 1/25 例 (4%)、BBN Cis 群: 2/25 例 (4%)、BBN Ace 群: 1/25 例 (4%)、BBN Ace+Cis 群: 0/25 例 (0%) であり、BBN 単独群においても、筋層浸潤性膀胱癌の発生数は少なく、Ace による浸潤抑制効果の検討は困難であった。原因としては、BBN が 0.025% であり、浸潤を誘発させるためには initiation が弱かったことが考えられたため、0.05% へと BBN 濃度を上げ、再度同様の検討を行った。

表 1 膀胱癌の発生頻度 (実験 1)

	No. of mice	Incidence of UC (%)			Total
		pTa	pT1	≥pT2	
BBN	25	3 (12)	4 (16)	1 (4)	8 (32)
BBN→Cis	25	2 (8)	0 (0)	2 (8)	4 (16)
BBN→Ace	25	1 (4)	0 (0)	1 (4)	2 (8) *
BBN→Ace+Cis	25	1 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (4) *
Ace alone	10	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Control	10	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

* p < 0.05 vs BBN alone

実験 2. 0.05% BBN 誘発マウス膀胱癌モデルにおける Acetazolamide の予防効果の検討

前回 0.05% BBN へと濃度を上昇させ、検討を施行した。解剖時における膀胱マクロ所見は図の通りとなっている (図 1)。

膀胱癌の発生頻度は BBN 単独群: 16/30 例 (53.3%)、BBN Cis 群: 11/30 例 (36.7%)、BBN Ace 群: 14/30 例 (46.7%)、BBN Ace+Cis 群: 3/30 例 (10%) であり、BBN Ace+Cis 群において、BBN 単独群に対して有意な発生頻度の低下を認めた。その他の投与群と単独群間では膀胱癌の発生頻度共に有意な差は認めなかった (表 2)。また、pT2 以上の筋層浸潤性膀胱癌については BBN 単独群: 10/30 例 (33.3%)、BBN Cis 群: 7/30 例 (23.3%)、BBN Ace 群: 2/30 例 (6.7%)、BBN Ace+Cis 群: 1/30 例 (3.3%) であり、BBN Ace 群及び BBN Ace+Cis 群では BBN 単独群と比較して、有意に浸潤が抑制されていた。

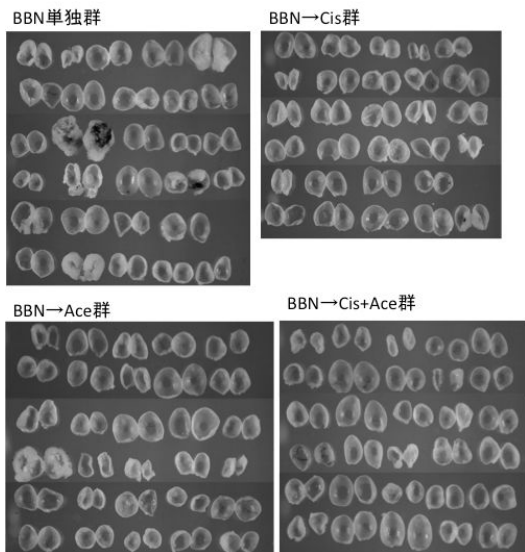


図1 解剖時における膀胱マクロ所見(実験2)

しかし、BBN Ace 群において pT1 の腫瘍が 9/30 例 (30%) であり、今回は BBN の initiation が強すぎたことにより Ace で浸潤を抑制しきれなかった可能性がある。さらに、腫瘍径 (t) を t < 1mm, 1mm < t < 3mm, 3mm < t と分類し、各群腫瘍の発生数を検討したところ、t > 3mm では、BBN 単独群: 14/30 例 (46.7%)、BBN Cis 群: 4/30 例 (13.3%)、BBN Ace 群: 4/30 例 (13.3%)、BBN Ace+Cis 群: 1/30 例 (3.3%) であり、BBN Cis 群、BBN Ace 群及び BBN Ace+Cis 群では BBN 単独群に比べて、腫瘍サイズは有意に減少した(図1)。

表2 膀胱癌の発生頻度(実験2)

	No. of mice	Incidence of tumor (%)			
		pTa	pT1	≥pT2	Total
BBN	30	6 (20)	0 (0)	10 (33.3)	16 (53.3)
BBN→Cis	30	1 (3.3)	3 (10)	7 (23.3)	11 (36.7)
BBN→Ace	30	4 (13.3)	9 (30)	2 (6.7)*	15 (50)
BBN→Ace+Cis	30	1 (3.3)	1 (3.3)	1 (3.3)**	3 (10)**

** p < 0.05, 0.01 vs BBN alone, respectively.

以上の結果より、Acetazolamide と Cisplatin を併用することにより、腫瘍の発生、浸潤抑制効果を認めた。Acetazolamide の単独投与では、腫瘍の発生に関しては BBN 単独群と比べて有意差を認めなかったが、浸潤抑制においては有意差を認め、浸潤初期から CA2 が関連している可能性が示唆された。今後、CA2、CA9、Ki67、EMT 関連因子、HIF-1 の免疫染色を行い、膀胱癌における局在、それぞれとの関連性について明らかにしていく必要はあるが、Acetazolamide がヒト浸潤性膀胱癌において臨床応用できる可能性が示唆された。

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4件)

Yamano S, Gi M, Tagoy, Doi K, Okada S, Hirayama S, Tachibana H, Ishii N, Fujioka M, Tatsumi K and Wanibuchi H. The role of deltaNp63 CD44v cells in the development of NTCU-induced peripheral type of mouse lung squamous cell carcinomas. Cancer Sci, 査読有, 107-2, 2016, 123-132. DOI: 10.1111/cas.12855

Gi M, Wanibuchi H. Roles of Leucine and Isoleucine in experimental models of bladder carcinogenesis. Food Safety, 査読有, 3(4), 2015, 136-142. DOI:10.14252/foodsafetyfscj.2015019

Gi M, Fujioka M, Yamano S, Shimomura E, Kanki M, Kawachi S, Tachibana H, Tatsumi K, Fang H, Ishii N, Kakehashi A, Wanibuchi H. Modifying effects of 1,2-dichloropropane on N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced cholangiocarcinogenesis in male Syrian hamsters. J Toxicol Sci, 査読有, 40, 2015, 647-656. DOI: 10.2131/jts.40.647.

Gi M, Fujioka M, Yamano S, Shimomura E, Ishii N, Kakehashi A, Takeshita M, Wanibuchi H. Determination of Hepatotoxicity and Its Underlying Metabolic Basis of 1,2-dichloropropane in Male Syrian Hamsters and B6C3F1 Mice. Toxicol Sci, 査読有, 145, 196-208, 2015. DOI: 10.1093/toxsci/kfv045.

(学会発表)(計1件)

Gi M, Tachibana H, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A and Wanibuchi H. Establishment of a novel invasive urinary bladder cancer model using Has128 transgenic rats for the identification of invasion-associated factors. The 20th Japan-Korea Cancer Research Workshop (第20回日韓がんワークショップ), 平成27年12月1日, ロイヤルパークホテル ザ 汐留, 東京.

6. 研究組織

(1)研究代表者

魏 民 (GI, Min)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 70336783

(2)研究分担者

玉田 聡 (TAMADA, Satoshi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20382179