

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861450

研究課題名(和文)膀胱癌に対するNVP-BEZ235の抗腫瘍効果の検討

研究課題名(英文)NVP-BEZ235 Therapy for Bladder Cancer and Prevention of Tumor Invasion and Metastasis

研究代表者

松島 将史(Matsushima, Masashi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00464850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroにおいてNVP-BEZ235投与により濃度依存性の抗腫瘍効果を認めた。また、pAkt、pS6、p4EBP1の発現を濃度依存性に有意に抑制した。マウス膀胱癌同所性モデルでは、NVP-BEZ235投与群では膀胱重量がコントロール群と比較して有意な低下を認めた( $p < 0.05$ )。western blottingではコントロール群と比較してpAkt、pS6、p4EBP1の発現が有意に抑制されており、in vitroの結果との相同性を認めた。以上より、筋層非浸潤性膀胱癌に対するadjuvant治療としてNVP-BEZ235の膀胱内注入療法が新たな治療選択枝となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：NVP-BEZ235 inhibited the viability of MBT-2 cells in a dose-dependent manner. Furthermore, the expression of pAkt, pS6, and p4EBP1 was inhibited in NVP-BEZ235-treated MBT-2 cells. Orthotopic models were established by implanting MBT-2 cells into the bladders of female C3H/He mice. Bladder weights were significantly lower in the NVP-BEZ235-treated group than in the control group ( $P < 0.05$ ). An analysis of the tumor tissues revealed that the NVP-BEZ235 treatment strongly reduced pAkt, pS6, and p4EBP1 levels. An immunohistochemical analysis showed that NVP-BEZ235 significantly inhibited the expression of pS6. Intravesically administered NVP-BEZ235 exerted significant antitumor effects in the orthotopic bladder cancer model by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR pathway. The intravesical instillation of a dual PI3K/mTORC1/2 inhibitor may represent a novel therapy for the treatment of bladder cancer.

研究分野：医歯薬学 外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：膀胱癌 NVP-BEZ235 mTOR 膀胱内注入

## 1. 研究開始当初の背景

筋層非浸潤性膀胱癌に対しては通常 TUR-BT (経尿道的膀胱腫瘍切除術) を施行するが、3年以内に約70%のケースが再発し、また進行癌に進展するものも少なくない。再発予防のための adjuvant 治療として、BCG 膀胱内注入療法がスタンダードな治療法として現在世界中で広く施行されている。現時点で各種抗癌剤膀胱内注入療法に比べ、再発予防の点で有効であることが判明している。しかし現状の BCG 膀胱内注入療法の問題点として、④依然として3年以内に約40%のケースが再発しており進展するものも少なくない、⑤長期間の再発予防効果が乏しく、また効果が膀胱局所的であるため晩期の再発進展や転移が認められる、⑥誘導される免疫反応により、高頻度に排尿困難、血尿、発熱等の強い副作用を認める等が挙げられる。

我々は膀胱癌モデルとして MBT-2 膀胱腫瘍同所性モデルを用いて、BCG と MMC を併用した検討から、各々の単独治療と比較し BCG と MMC の併用により細胞障害効果、in vivo 抗腫瘍効果の増強を確認している (Matsushima et al, Oncology Letters, 2011)。しかしながら膀胱癌においては BCG の副作用で治療継続できない症例や、BCG・抗癌剤の膀胱内注入療法施行後に再発・進展する症例も数多く存在し、より強力な根治性の高い癌治療の開発は急務の課題である。そこで PI3K-Akt-mTOR pathway 及びそのフィードバック機構を解明し、その制御によって膀胱癌に対する新規治療戦略を確立する研究に着目するに至った。

## 2. 研究の目的

PI3K-Akt-mTOR pathway は、アミノ酸、細胞内エネルギー状態、ストレス、細胞増殖因子からのシグナルを受ける。活性化した Akt は TSC1/2 の抑制を介して mTORC1 を活性化し、S6K、4EBP1、STAT3 などをリン酸化する。リン酸化された S6K、4EBP1 はタンパク質合成を制御し、STAT3 は細胞成長・転写を制御する。mTOR 阻害剤は、mTORC1 複合体を標的とし、S6K、4EBP1 等のリン酸化を阻害し、抗腫瘍効果をめしめす。

膀胱癌における PI3K-Akt-mTOR pathway の活性化と予後に着目し、in vitro にて種々のヒト膀胱癌細胞株に対する mTOR 阻害剤の有用性が報告されている (Fechner G., et al. Urology, 2009 73, 665-8, Mansure JJ., et al. Cancer Biol Ther, 2009 8, 2339-47)。また、in vivo 皮下腫瘍モデルでの有用性を示す報告を認める (Hansel DE., et al. Am J Pathol, 2010 176, 3062-72, Makhlin I., et al. BJU Int, 2011 108, 84-90, Chiong E., et al. Clin Cancer Res, 2011 17, 2863-73) 他、マウス膀胱内注入療法が有用で

あったとする報告も認める (Catherine MS., et al. Cancer Prev Res, 2009 2, 1008-14)。しかしながら mTOR 阻害剤は腎細胞癌、マントルリンパ腫等には有用性が報告されているが、多くの癌で十分な効果が示されておらず、その治療抵抗性の機序は明らかでない。また、膀胱癌において PI3K・mTORC1/2 阻害剤を用いた報告は in vitro、in vivo とともに認めていない。mTOR 阻害剤は mTORC1 の活性を阻害するが、mTORC2 は阻害しない。mTORC2 に関するシグナル伝達の解析は、mTORC1 と比較し不明な点が多いが、mTOR2 を介した Akt のリン酸化が報告され (SaOrbassov DD et al, Science, 307, 1098-1101, 2005)、この機構が mTOR 阻害剤抵抗性に関与する可能性が示唆された。mTORC2-Akt のリン酸化の経路を阻害することによってさらなる抗腫瘍効果を得ることができる可能性がある。PI3K・mTORC1/2 阻害剤である NVP-BE2235 は、他癌種ではあるが胃癌・肝癌・卵巣癌等での有用性が報告され (Thorsten, Clin Cancer Res, 2011、Dubrovska A, Clin Cancer Res, 2010)、既に進行性乳癌に対して phase I の臨床試験が開始されており、臨床上的有効性も示唆されている。また、当教室においても in vitro、in vivo で CRPC にドセタキセルとの併用での有用性が報告されている (Yasumizu Y, J Urol, 2014)。以上より NVP-BE2235 による膀胱癌治療は将来的に臨床応用が十分に可能であると考えられる。本来、PI3K-Akt-mTOR pathway は免疫との関連も強いことから、免疫応答のある動物実験モデルでのシグナルの検証が重要となる。そこで、immuno-competent mouse を用いる研究を次いで行う。マウス膀胱癌同所性モデルは再現性の高い、人膀胱癌臨床により近い形で作成された、膀胱癌モデルである。当教室では長年にわたりマウス膀胱癌同所性モデルの確立を維持してきた。これは C3H/HeN マウスの膀胱内に MBT-2 細胞 (マウス膀胱癌細胞) を注入し生着させる方法であり、技術的に安定している現在ではほぼ 100% の癌生着率を示す (Kikuchi E et al, J. Urol., 2003)。また生着した膀胱癌の Biology は臨床のヒト膀胱癌に類似しており、時間とともに筋層浸潤へと進展していくことが既に確認されており、実際の臨床に則した十分に研究モデルとして使用できるものである。これを用いて PI3K-Akt-mTOR pathway とそのフィードバック機構を解析する。このヒトにより近い動物モデルを用いることで、他癌種における mTOR 阻害剤を用いた治療戦略にも波及効果を与えようとする。また、膀胱癌への NVP-BE2235 の膀胱内注入療法により BCG 抵抗性の CIS や high grade の膀胱癌において Complete response が達成できれば、膀胱全摘術を回避することが可能になり、膀胱癌の治療戦略そのものを根底から変える可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) *in vitro* での NVP-BEZ235 投与時の抗腫瘍効果の検討

マウス膀胱癌細胞株 MBT-2 に対する NVP-BEZ235 の細胞傷害効果を WST assay による吸光度測定法を用いて検討した。具体的には種々の濃度の NVP-BEZ235 (0nM (コントロール), 100nM, 250nM, 500nM, 1000nM) を投与して、NVP-BEZ235 の MBT-2 に対する抗腫瘍効果を評価した。次に MBT-2 に NVP-BEZ235 を投与し、PI3K-AKT-mTOR pathway の阻害効果を、pAkt, pS6, p4EBP1 の発現の程度で評価した。ウエスタンブロットを行い pAkt (s473)、pS6 及び p4EBP1 の発現を確認した。PI3K-AKT-mTOR pathway のシグナル伝達経路及びそのフィードバック機構について、同検討における阻害剤の使用によって検証した。

#### (2) マウス膀胱癌同所性モデルの作成

MBT-2 細胞を用いて、C3H/HeN マウスに膀胱腫瘍を膀胱移植する。具体的にはマウスをネンブタール 50mg/kg 腹腔内注射にて麻酔を行い、仰臥位とする。経尿道的に 24G 血管カテーテル外筒を挿入し、MBT-2 細胞浮遊液  $5 \times 10^5$  個/0.05ml を注入し、2 時間尿道を糸で縛り内溶液を貯留させる。準備段階として、我々は当教室にて再現性を持って、MBT-2 同所性膀胱腫瘍モデルの確立に成功している。この手法により技術的に安定している現在ではほぼ 100% の癌生着率を示す。

#### (3) *in vivo* (マウス膀胱癌同所性モデル) での NVP-BEZ235 の抗腫瘍効果の検討

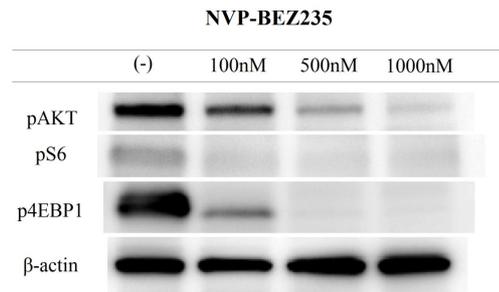
MBT-2 細胞を C3H/HeN マウス に膀胱移植する。NVP-BEZ235 の膀胱内注入は、腫瘍移植後第 5 日目 (day 5) より 3 日毎に計 5 回施行。コントロール群と NVP-BEZ235 投与群の 2 群に分け、腫瘍重量を比較検討する。コントロール群 15 匹、NVP-BEZ235 投与群 15 匹の計 30 匹で比較検討を行う。Day 21 にて安楽死させ、膀胱内の腫瘍を確認し、腫瘍の摘出を行う。群間における腫瘍重量を比較検討する。摘出した腫瘍から蛋白を抽出する。ウエスタンブロット、免疫染色を行いそれぞれの腫瘍における pAkt, pS6, p4EBP1 の発現を検討し、*in vitro* の結果との相同性を確認する。

### 4. 研究成果

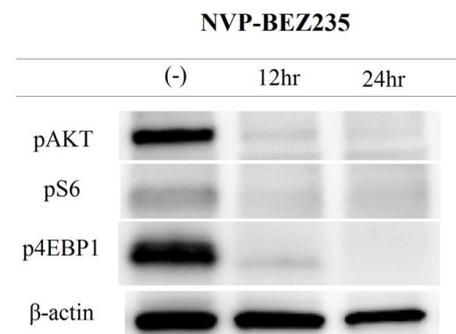
#### (1) *In vitro* での NVP-BEZ235 投与時の抗腫瘍効果の検討

WST assay において、NVP-BEZ235 各濃度 (100nM, 250nM, 500nM, 1000nM) 投与による cell viability は  $36.6 \pm 10.2\%$ 、 $30.3 \pm 8.0\%$ 、 $20.4 \pm 6.0\%$ 、 $9.5 \pm 4.7\%$  と濃度依存性の細胞増殖抑制効果を確認した。次に、MBT-2 に NVP-BEZ235 を 12 時間暴露し、

pAkt、pS6 及び p4EBP1 の発現をコントロールと比較検討した。その結果 pAkt、p4EBP1 は濃度依存性の発現抑制を確認した。pS6 は 100nM から抑制された。



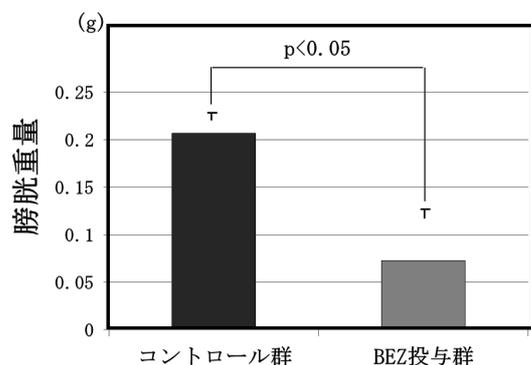
次に、MBT-2 に NVP-BEZ235 (1000nM) を投与し、12 時間、24 時間での pAkt、pS6 及び p4EBP1 の発現をコントロールと比較検討した。その結果 pAkt、pS6、p4EBP1 いずれにおいても 24 時間まで抑制されていた。



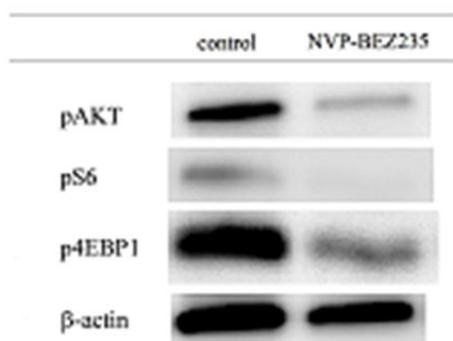
(2) マウス膀胱癌同所性モデルの作成  
全身麻酔下に C3H/HeN マウスの膀胱内へ MBT-2 細胞 ( $5 \times 10^5$  cells) を注入し 2 時間尿道を結紮した。この手法により 100% の腫瘍生着を確認できた。顕微鏡下に Day 3 には腫瘍巢の形成を確認し、Day 10 には肉眼的にも腫瘍の確認が可能であった。

#### (3) *in vivo* (マウス膀胱癌同所性モデル) での NVP-BEZ235 の抗腫瘍効果の検討

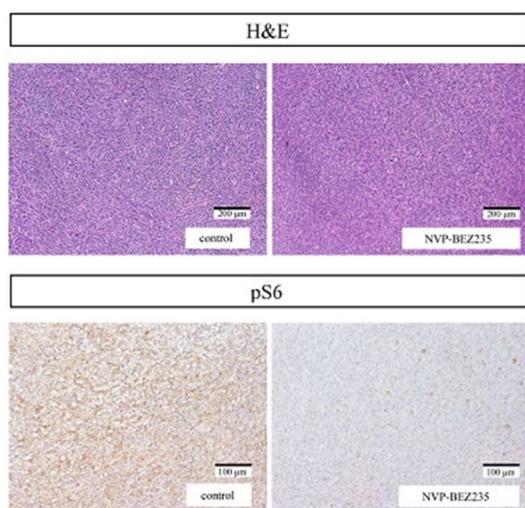
マウス膀胱癌同所性モデルでは、コントロール群と比較して  $1 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$  の NVP-BEZ235 膀胱内注入では膀胱重量に有意差を認めなかったのに対して、 $40 \mu\text{M}$  の NVP-BEZ235 投与群では膀胱重量が  $72.8 \pm 54.5 \text{ mg}$  と、コントロール群  $206.6 \pm 154.9 \text{ mg}$  と比較して有意な低下を確認した ( $p < 0.05$ )。



また、5回目の膀胱内注入から12時間後に抽出した腫瘍から蛋白を抽出、western blottingを行ったところ、コントロール群と比較してpAkt、pS6及びp4EBP1の発現が有意に抑制されており、invitroの結果との相同性を認めた。



また、抽出した腫瘍の免疫染色では、NVP-BE2235投与群において、pS6の発現抑制を認めた。



(左: コントロール群、右: BEZ 投与群)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

著者名: Masashi Matsushima, Eiji Kikuchi, Kazuhiro Matsumoto, Seiya Hattori, Toshikazu Takeda, Takeo Kosaka, Akira Miyajima, and Mototsugu Oya  
論文表題: Intravesical dual PI3K/mTOR complex 1/2 inhibitor NVP-BE2235 therapy in an orthotopic bladder cancer model  
雑誌名: International Journal of Oncology  
査読の有無: 有り  
巻: Epub ahead of print  
発行年(西暦): 2015  
ページ数: Epub ahead of print  
DOI: 10.3892/ijo.2015.2995.

〔学会発表〕(計2件)

(1)発表者名: 松島 将史  
発表標題: マウス膀胱癌同所性モデルを用いた NVP-BE2235 膀胱内注入療法の抗腫瘍効果の検討  
学会等名: 第102回日本泌尿器科学会総会  
発表年月日: 2014/4/24-4/27  
発表場所: 神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

(2)発表者名: 松島 将史  
発表演題: マウス膀胱癌同所性モデルを用いた PI3K 及び mTORC1/2 阻害剤 (NVP-BE2235) 膀胱内注入療法の抗腫瘍効果の検討  
学会等名: 第18回日本がん分子標的治療学会学術集会  
発表年月日: 2014/6/25-6/27  
発表場所: 仙台市情報・産業プラザ(AER)・ホテルメトロポリタン仙台・TKP ガーデンシティ仙台(宮城県仙台市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕  
特になし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
松島 将史 (MATSUSHIMA MASASHI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 00464850

(2)研究協力者  
菊地 栄次 (KIKUCHI EIJI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 10286552

宮嶋 哲 (MIYAJIMA AKIRA)

慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：90245572

大家 基嗣 (OYA MOTOTSUGU)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：00213885