

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462428

研究課題名(和文)膀胱癌に対するmTORC1/2阻害剤を併用した新規抗癌治療戦略の確立

研究課題名(英文) Novel anti-cancer therapeutic strategy with mTORC1/2 inhibitor against bladder cancer

研究代表者

菊地 栄次 (KIKUCHI, EIJI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：10286552

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)：以下の5つの結果を得た。

1) TAM familyの一つであるAXL、そのリガンドGas6が腎盂尿管癌の予後因子であることを同定した。2) ニコチン曝露によりT24膀胱癌細胞においてPI3K-Akt-mTORの活性化が誘導された。NVP-BEZ235はその活性を阻害し細胞増殖を抑制した。3) NVP-BEZ235はニコチン投与により生じた皮下腫瘍の増殖、pS6活性を抑制した。4) シスプラチンとNVP-BEZ235併用により有意な殺細胞傷害効果が確認された。5) 同所性膀胱腫瘍モデルにおいてNVP-BEZ235膀胱内注入はPI3K-Akt-mTOR経路を阻害し有意な抗腫瘍効果を示した。

研究成果の概要(英文)：The following five results were obtained.

1) We found that AXL, which is in the TAM family of receptor tyrosine kinases and its ligand, Gas6 expression were the independent prognostic factors for upper tract urothelial carcinoma. 2) After exposed to nicotine, T24 bladder tumor cell growth was induced through activation of PI3K-Akt-mTOR. NVP-BEZ235 reduced the cell growth by inhibiting the activated PI3K-Akt-mTOR. 3) NVP-BEZ235 inhibited subcutaneous tumor growth and pS6 overexpression induced by nicotine. 4) The combination of cisplatin and NVP-BEZ235 had strong cytotoxic effect. 5) In an orthotopic bladder tumor model, intravesical administration of NVP-BEZ235 had a significant antitumor effect through inhibiting PI3K-Akt-mTOR pathway.

研究分野：膀胱癌

キーワード：分子標的 膀胱癌 腎盂尿管癌 抗癌剤

## 1. 研究開始当初の背景

再発・病期進展の可能性が高い筋層非浸潤性膀胱癌は通常 TUR-BT 後、抗癌剤あるいは BCG 膀胱内注入療法が行われる。しかしながら 3 年以内に約 40% のケースが再発し、そのうち約 10% が病期進展する。再発・病期進展抑制効果が高く、副作用発現の少ない新規膀胱内注入療法の確立は必至である。転移性腎盂・尿管・膀胱癌の標準治療は多剤併用化学療法であるが、長期生命例は少なく、その副作用も決して無視できない。現行の化学療法では転移性尿路上皮癌の有効性、副作用軽減には限界があり、新規抗癌治療戦略の開発は我々に課せられた急務の課題である。

抗癌剤治療に対する癌細胞、あるいは宿主の防御機構の解明は、抗癌剤を用いた新規治療戦略の確立に際し重要である。癌抑制遺伝子 p53 の変異・欠損、抗アポトーシス蛋白の過剰産生、あるいは multidrug resistance gene の過剰発現などはその防御機構破壊のひとつであるが、近年 PI3K-Akt-mTOR pathway の活性化が抗癌剤治療抵抗性と強い関連があると報告されている (Cancer Res 2012, 205, 459; Lancet Oncol 2009, 10, 1179)。ある種の抗癌剤は、癌細胞内において PI3K-Akt-mTOR pathway の活性化が生じ、抗癌剤のアポトーシス誘導作用を抑制し、抗癌治療抵抗性を生じさせる。尿路上皮癌における抗癌剤耐性と PI3K-Akt-mTOR pathway 活性化の関連は詳細に検討されていないのが現状である。そこで応募者は PI3K-Akt-mTOR pathway を制御することは癌進展のメカニズムの解明と新しい治療の開発に寄与すると考え、本研究の立案に至った。

## 2. 研究の目的

PI3K-Akt-mTOR pathway の尿路上皮癌における膀胱内再発・癌進展の役割を検討し、抗癌剤耐性に PI3K-Akt-mTOR pathway が関連しているか検証した上で、最終的には抗癌剤に mTOR 阻害剤を組み合わせた新規治療戦略の確立を研究の目的とし、具体的には下記の 5 つのプロジェクトを行う。今回は、mTOR 阻害剤として mTOR complex 1 および 2 を同時に阻害する PI3K-mTORC1/2 阻害剤を使用する。通常の mTOR 阻害剤 (rapamycin およびその類似物) は mTOR complex 1 の活性のみを阻害する。近年 mTOR complex 2 を介した Akt のリン酸化が報告され (Science 2005, 307, 1098)、mTOR 阻害剤抵抗性に関与するとされている。mTORC1/2 阻害剤を用いることで強力な mTOR-Akt のリン酸化の経路の阻害が可能であると考え。

### (1) 尿路上皮癌における PI3K-Akt-mTOR pathway の臨床的意義の解明

尿路上皮癌という組織系においての

PI3K-Akt-mTOR 経路の活性化が予後不良因子、あるいは治療抵抗性獲得の機序の一因であるのかを検証することは非常に重要と考える。まずは尿路上皮癌における Akt-mTOR1 の下流の因子 (S6K, 4EBP1) のリン酸化の頻度と臨床所見との関連、予後解析を臨床検体を用いて進めたい。個々の症例に適した治療法の確立、さらなる新規治療の確立が急務である再発、転移性尿路上皮癌臨床において S6K, 4EBP1 活性の有無が予後不良症例の抽出を可能とし、個別化治療の確立の一助になりうると予測される。我々は、上部尿路上皮癌に対して詳細な臨床データが集積されたデータベース、未染のプレパラート、病理標本を多数所有している (N=350)。筋層非浸潤性膀胱癌 (N=500)、浸潤性膀胱癌 (N=100) に対しても同様に組織検体、未染プレパラートを所有している。術前化学療法を施行した膀胱癌症例 (N=40) においては TUR-BT 切除標本と全摘標本を比較検討することで、抗癌剤治療前後の S6K, 4EBP1 活性化の変化が解析でき、抗癌剤治療獲得の過程が検討可能と考えている。

### (2) 抗癌剤耐性制御における PI3K-Akt-mTOR pathway の役割と mTOR 阻害剤と各種抗癌剤併用治療効果の検証

再発性、転移性尿路上皮癌で使用されている各種抗癌剤による PI3K-Akt-mTOR pathway 活性化の詳細を検討することは抗癌剤抵抗性機序解明という面で重要と考える。本研究では各種抗癌剤における PI3K-Akt-mTOR pathway 活性化に注目し、抗癌剤抵抗性の機序を解明したい。当教室では、CDDP、gemcitabine などの膀胱癌で頻用されている抗癌剤で長期曝露し、樹立した CDDP、gemcitabine 耐性株を既に所有している。これらを用いて PI3K-Akt-mTOR pathway の活性の変遷を解析する。また各種抗癌剤を耐性株に投与し PI3K-Akt-mTOR pathway の変化を検討する。mTOR 阻害剤を使用し、耐性株での殺細胞効果や PI3K-Akt-mTOR 経路の制御を検証する。

### (3) 喫煙による PI3K-Akt-mTOR pathway 亢進機序解明と mTOR 阻害剤の治療効果検証

膀胱癌とタバコに関する今までの基礎的研究は尿中 tryptophan, N-acetyltransferase2, p53 mutation の関連などいずれの検討も古く、また十分とは言えない。改めて喫煙と膀胱癌発症・癌進展のメカニズム解明が必要と考える。予備実験としてニコチン暴露により pAkt の亢進を認めることを応募者は検証している。この結果は PI3K-Akt-mTOR pathway がニコチンにより活性化され、癌進展に寄与している可能性を示唆している。タバコが尿路上皮癌進展に与える影響と PI3K-Akt-mTOR pathway 活性化との関連から得られた知見は、他の癌腫に対してもタバコによる発癌や癌

進展メカニズム解明の糸口となり、がん研究全体に対する波及効果は大きいと考える。

- (4) MBT-2 同所性膀胱腫瘍モデルを用いた、mTOR 阻害剤併用 CDDP、paclitaxel、docetaxel、gemcitabine 膀胱内注入の抗腫瘍効果の検討

同所性に膀胱腫瘍を確立し、膀胱内注入の研究を行うには MBT-2 同所性膀胱腫瘍モデルが現在の膀胱癌臨床に即したモデルとして最適である。当教室では長年にわたりこのマウス膀胱癌正所性モデルの確立を維持している (J Urol 2003, 170, 1375, Hum Gene Ther 2011)。PI3K-Akt-mTOR pathway は免疫との関連も強いことから、免疫応答 (immuno-competent) のある動物実験モデルでのシグナルの検証が重要でその点からも本モデルは有用と考える。mTOR 阻害剤と各種抗癌剤の併用治療による抗腫瘍効果増強の有無を検討する。今まで mTORC1/2 阻害剤と各種抗癌剤の併用治療で癌治療増強を図る試みはなく、本研究の推進は広く癌研究の新たな切り口となり、その波及効果は大きいと推測される。

- (5) 膀胱癌肺転移モデルを用いた mTOR 阻害剤併用 CDDP、paclitaxel、docetaxel、gemcitabine 投与の肺転移抑制効果の検討

膀胱癌の転移モデルにおける mTOR 阻害の有用性を検討した報告は存在しない。転移性膀胱癌モデルとして MBT-2 variant 膀胱腫瘍転移モデルを用いる。これは高率に肺転移を起こすモデルであり、当教室が中心に安定したモデルの確立を維持している (Urology 2005, 66, 676)。本免疫応答を有するマウス肺転移モデルを用いて投与経路、投与量、投与期間を調整しながら NVP-BE235 投与、ならびに抗癌剤併用での転移抑制効果を検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) 尿路上皮癌における転移関連因子の臨床的意義の解明

上部尿路上皮癌検体を用いて Akt-mTOR1 の下流の因子である S6 のリン酸化の免疫染色を行った。中間解析の結果、使用した抗体において十分な免疫染色の結果を得ることが出来なかった。そこで、尿路上皮癌の転移に重要な因子と考えられている AXL、Gas6 に注目した。AXL はレセプターチロシンキナーゼの TAM family の一つであり、また Gas6 はそのリガンドである。臨床病理組織データと AXL、Gas6 蛋白発現との関連を確認した。さらにこれらのタンパク発現が癌特異的生存に関与するかを検証した。

- (2) ニコチン暴露膀胱癌細胞に対する PI3K-Akt-mTOR 阻害による殺細胞傷害効果の検証

膀胱癌細胞株 T24 を用いて mTOR complex1/2 阻害剤である NVP-BE235 による殺細胞傷害効果の有無を WST assay により検討した。また Western blot analysis により pAkt および pS6 の蛋白発現の変化を検証した。

- (3) 皮下腫瘍モデルを用いたニコチン投与下における PI3K-Akt-mTOR 阻害による抗腫瘍効果の検証

$2 \times 10^6$  の T24 細胞をヌードマウスの背部皮下に移植した。経時的に腫瘍径を測定し、腫瘍径は縦 x 横 x 高さ x 0.52 で計算した。マウスを無治療群、ニコチン単独投与群 (1 mg/kg のニコチンを週 3 回投与)、NVP-BE235 単独投与群 (40 mg/kg の NVP-BE235 を連日経口投与)、ニコチンおよび NVP-BE235 併用投与群の 4 群に分けて検討した。またそれぞれの腫瘍組織を、免疫組織染色法を用いて pS6 の蛋白発現を確認した。

- (4) ニコチン暴露膀胱癌細胞に対するシスプラチン及び PI3K-Akt-mTOR 阻害による殺細胞傷害併用効果の検証

10  $\mu$ mol/L のニコチン曝露の下、10  $\mu$ mol/L のシスプラチン、500 nmol/L の NVP-BE235、またシスプラチンおよび NVP-BE235 併用曝露を T24 細胞に行った。殺細胞傷害効果の有無を WST assay により検討した。また Western blot analysis により pAkt および pS6 の蛋白発現の変化を検証した。

- (5) 同所性膀胱腫瘍モデルを用いた PI3K-Akt-mTOR 阻害による抗腫瘍効果の検証

マウス膀胱癌細胞株 MBT-2 に対する NVP-BE235 の細胞傷害効果を WST assay にて検討した。Western blot analysis を用いて、pAkt、pS6、p4EBP1 の発現を評価した。次に、マウス膀胱癌同所性モデルにて NVP-BE235 膀胱内注入療法の抗腫瘍効果の検討を行った。5 x 10<sup>5</sup> 個の MBT-2 細胞をメスの C3H/He マウスの膀胱内へ移植し、同所性膀胱腫瘍モデルを作成した。コントロール群 (PBS 投与のみ)、40  $\mu$ mol/L の NVP-BE235 投与群の 2 群に分け、腫瘍重量を比較検討した。また免疫染色にて pS6 の発現を評価した。

### 4. 研究成果

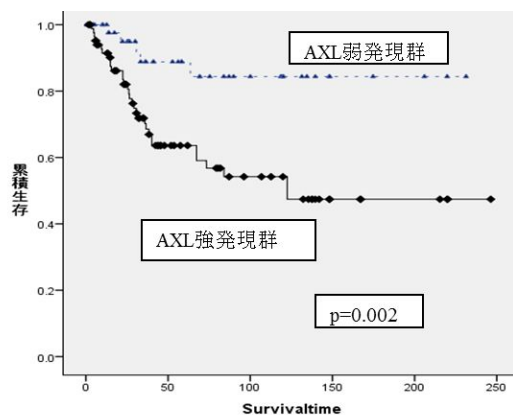
- (1) 尿路上皮癌における転移関連因子の臨床的意義の解明

上部尿路上皮癌に対し手術療法を施行し 161

例において AXL は 67 症例 (42%) で発現が高く、Gas6 は 72 症例 (45%) で発現が高かった。AXL の強発現の有無は術後転移の有無、及び Gas6 強発現の有無と関連した。Cox 単変量解析では、病理学的 T 因子 ( $pT \geq 2$ )、high grade 腫瘍、壁内脈管侵襲陽性、AXL 強発現、Gas6 強発現が有意に癌特異的生存に關与した。Cox 多変量解析では、病理学的 T 因子 ( $pT \geq 2$ )、Gas6 強発現、AXL 強発現が独立して癌特異的生存に關与していた。Kaplan-Meier 曲線解析においても AXL 強発現群は有意に癌特異的生存率の低下を示した (図 1)。

以上より AXL 及びそのリガンドである Gas6 の発現はお互いに関係し、術後の腫瘍転移に關与し、共に上部尿路上皮癌の術後の疾患特異的生存率に独立して關与する予後予測因子である可能性が示唆された。

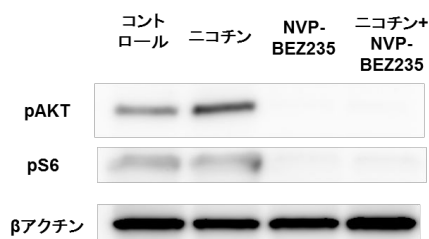
図 1.



(2) ニコチン暴露膀胱癌細胞に対する PI3K-Akt-mTOR 阻害による殺細胞傷害効果の検証

ニコチン暴露下、非暴露下においてともに NVP-BE2235 投与により T24 細胞において濃度依存性に殺細胞効果が確認された。ニコチン非暴露下のコントロール細胞の細胞数を 100% とすると NVP-BE2235 投与により細胞数は 49% に減少した。またニコチン暴露により細胞数は 131% に増加したが、NVP-BE2235 投与により細胞数は 46% に減少した。pAkt および pS6 はともにニコチン暴露により発現が増加したが、NVP-BE2235 投与によりこれらの発現の消失を認めた (図 2)。

図 2



以上のことからニコチン曝露により膀胱

癌細胞において PI3K-Akt-mTOR の活性化が誘導され細胞増殖が生じるが、PI3K-Akt-mTOR 阻害剤はその活性を完全に阻害することでニコチンによる細胞増殖を抑制することが示唆された。

(3) 皮下腫瘍モデルを用いたニコチン投与下における PI3K-Akt-mTOR 阻害による抗腫瘍効果の検証

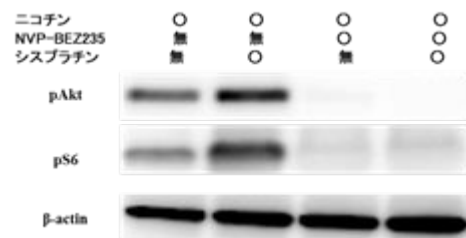
検討した 4 群 (無治療群、ニコチン単独投与群、NVP-BE2235 単独投与群、ニコチンおよび NVP-BE2235 投与群) の 21 日目の平均腫瘍径はそれぞれ、470 mm<sup>3</sup>、930 mm<sup>3</sup>、282 mm<sup>3</sup>、295 mm<sup>3</sup> であった。無治療群の腫瘍径に比較しニコチン単独投与の腫瘍径は有意に大きかった。また NVP-BE2235 単独投与群の腫瘍径は無治療群と比較し有意に小さかった。さらにニコチンおよび NVP-BE2235 投与群の腫瘍径はニコチン単独投与と比較し有意に小さかった。免疫染色解析において腫瘍内の pS6 の発現は無治療群と比較しニコチン投与群で有意に高く、NVP-BE2235 単独投与群、ニコチンおよび NVP-BE2235 投与群において有意に低かった。

以上のことからニコチン投与により皮下腫瘍の増殖、pS6 蛋白発現の増加が認められたが、NVP-BE2235 は pS6 を抑制することで皮下腫瘍の増殖を抑制すると考えられた。

(4) ニコチン暴露膀胱癌細胞に対するシスプラチン及び PI3K-Akt-mTOR 阻害による殺細胞傷害併用効果の検証

シスプラチン単独投与群、NVP-BE2235 単独投与群、シスプラチン及び NVP-BE2235 投与群の細胞数はニコチン単独コントロール群の細胞数を 100% とすると、それぞれ 58%、45%、11% であり、シスプラチンに NVP-BE2235 を併用することにより有意な殺細胞傷害効果が確認された。またシスプラチン投与により pAkt、pS6 蛋白の発現は増加し、NVP-BE2235 はこれらの発現を強く抑制した (図 3)。

図 3



(5) 同所性膀胱腫瘍モデルを用いた PI3K-Akt-mTOR 阻害による抗腫瘍効果の検証

In vitro の検討において NVP-BE2235 各濃度 (100nM、250nM、500nM、1000nM) 投与により濃度依存性の殺細胞傷害効果を認めた。また

pAkt、pS6、p4EBP1 の発現の濃度依存性の抑制が確認された。マウス膀胱癌同所性モデルにおいて、NVP-BEZ235 膀胱内注入群の平均膀胱重量は72.8 mgで、コントロール群の207 mgと比較して有意な低下を認めた。免疫染色の検討において NVP-BEZ235 膀胱内注入群では pAkt、pS6、p4EBP1 の発現が有意に抑制されていた。

以上より NVP-BEZ235 膀胱内注入は PI3K-Akt-mTOR の活性を抑制し、有意な抗腫瘍効果を示すと考えられた。

#### 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 1件)

Hattori S, Kikuchi E, Kosaka T, Miyazaki Y, Tanaka N, Miyajima A, Mikami S, Oya M: Relationship between increased expression of the Axl/Gas6 signal cascade and prognosis of patients with upper tract urothelial carcinoma. Ann Surg Oncol 査読有 23(2):663-670, 2016.

〔学会発表〕(計 5件)

- (1) Yuge K, Kikuchi E, Ogihara K, Fukumoto K, Hagiwara M, Yasumizu Y, Tanaka N, Matsumoto K, Kosaka T, Miyajima A, Iinuma S, Oya M、Nicotine induces aggressiveness and acquiring chemoresistance in bladder cancer cells (ニコチンの尿路上皮癌増殖・抗癌剤耐性獲得に与える影響の基礎的検証)、第104回日本泌尿器科学会総会、2016/4/23-25、仙台国際センター(宮城県仙台市)
- (2) 弓削和之、菊地栄次、荻原広一郎、福本桂資郎、萩原正幸、安水洋太、田中伸之、松本一宏、小坂威雄、宮嶋哲、大家基嗣、尿路上皮癌細胞におけるニコチンのPI3K/Akt/mTOR経路を介した抗癌剤耐性獲得に関わる基礎的研究、第25回泌尿器科分子・細胞研究会、2016/2/26-27、ハイアットリージェンシー 大阪(大阪府大阪市)
- (3) 弓削和之、菊地栄次、安水洋太、萩原正幸、小坂威雄、宮嶋哲、飯沼誠一、大家基嗣、尿路上皮癌におけるニコチン曝露がPI3K/Akt pathwayに及ぼす影響の基礎的検討、第103回日本泌尿器科学会総会、2015/4/18-21、石川県立音楽堂(石川県金沢市)
- (4) 服部盛也、菊地栄次、小坂威雄、宮嶋哲、三上修治、大家基嗣、AXL-Gas6カスケード亢進と上部尿路上皮癌術後の予後との関連、第103回日本泌尿器科学会総会、2015/4/18-21、石川県立音楽堂(石川県

金沢市)

- (5) 服部盛也、菊地栄次、小坂威雄、宮嶋哲、三上修治、大家基嗣、上部尿路上皮癌における新規術後予測因子の探索、第73回日本癌学会学術総会、2014/9/25-27、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
菊地 栄次 (Kikuchi Eiji)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：10286552

(2)研究分担者  
宮嶋 哲 (Miyajima Akira)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：90245572

小坂 威雄 (Kosaka Takeo)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：30445407

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし