

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2014～2015

課題番号：26861295

研究課題名(和文)喫煙による膀胱癌治療への影響の解明と新規治療戦略の検討

研究課題名(英文)Smoking induces tumor aggressiveness and acquiring chemoresistance in bladder cancer.

研究代表者

弓削 和之(Yuge, Kazuyuki)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70464906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はニコチンが腫瘍にどのように影響を与えるのかを調査した。膀胱癌細胞株を用いてニコチン・シスプラチン(CDDP)・PI3K/mTOR阻害薬(BEZ)による影響を調査した。ニコチンを曝露させた所、細胞のviabilityが上昇し、pS6の活性上昇を認めた。BEZ投与は活性上昇したpS6を有意に抑制した。マウス皮下腫瘍モデルに対しニコチンの投与を行うと、腫瘍体積は有意な増大を認め、CDDP投与にても腫瘍縮小効果は確認できず、治療抵抗性獲得が示唆された。尿路上皮癌においてニコチンがPI3K/Akt/mTOR経路を介し腫瘍増殖や抗癌剤耐性の獲得に関連があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim was to investigate whether nicotine could affect tumor aggressiveness and acquiring chemoresistance in urothelial carcinoma. We evaluated the bladder cancer cell line T24 exposed to nicotine, cisplatin (CDDP) and/or PI3K/mTOR dual inhibitor (BEZ) treatment. The cell growth was induced and the pS6 was up-regulated after exposure to nicotine. In T24 cells exposed to nicotine, pS6 expression was increased and cell growth was not significantly inhibited by CDDP. The pS6 activation induced by nicotine was significantly reduced by BEZ. In a subcutaneous bladder tumor model, tumor volume in mice given nicotine was significantly increased as compared with that of control. In mice given nicotine, tumor volume in mice administered CDDP was not significantly decreased as compared with that of control. In conclusion, nicotine increases tumor growth and induces acquiring chemoresistance through activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in bladder cancer cells.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：膀胱癌 喫煙 抗癌剤耐性

### 1. 研究開始当初の背景

本邦での膀胱癌は癌の中で第8番目の罹患率であり、膀胱癌の発症は年齢が高齢になるほど多く、今後の高齢化に伴い罹患率は徐々に上昇することが予想される。現在、ヒトの膀胱癌に關与する benzidine、2-naphthamine などの芳香族アミンの使用は禁止され、曝露されることは少ない。その他の膀胱癌の発癌危険因子として喫煙、尿路感染症などが挙げられ、このうち喫煙は今後、膀胱癌の発癌因子としてより重大なものとなると考えられている。

今までの喫煙の膀胱癌発症に与えるリスクは後ろ向き研究が中心であるが、多くの研究で喫煙と膀胱癌発症の関連を強く示唆されている。これらの報告から膀胱癌の発症リスクを改善するためには禁煙を勧められるが、実際の臨床現場においては初期膀胱癌治療後の患者に再発・進展の回避のための禁煙を勧めるべきか、明確となっていない。

喫煙と再発、進展への關与について、他癌における報告が散見され、臨床的検討・基礎的研究において報告がある。一方、膀胱癌の臨床、基礎的分野においてはこれらの検討がほとんどなされておらず、たばこの含有物質の代謝産物、発癌物質が尿路上皮に直接曝露するという機序は膀胱癌特有の現象であり、他癌腫に無い癌進展経路である為、膀胱癌におけるこれらの研究は必須のものとする。

### 2. 研究の目的

本研究では、膀胱癌細胞株を用いてニコチンの膀胱癌の再発・進展への寄与について解明する。さらに喫煙による膀胱癌に対する現在の治療法への影響を明らかにし、新規治療戦略を検討する。

### 3. 研究の方法

我々はヒト膀胱癌細胞株 T24 を用いて研究を行う。T24 細胞株は American Type Culture Collection より購入し使用する。

まずは In vitro 実験系での研究を行う。膀胱癌細胞株 T24 に対し、ニコチンの曝露が細胞の viability に影響をどのように与えるのかを WST-1 assay を用いて調査し、Western blot 法を用いて PI3K/Akt/mTOR 経路への影響を検討する。特に p70 S6 のリン酸化(pS6)の発現を検討する。

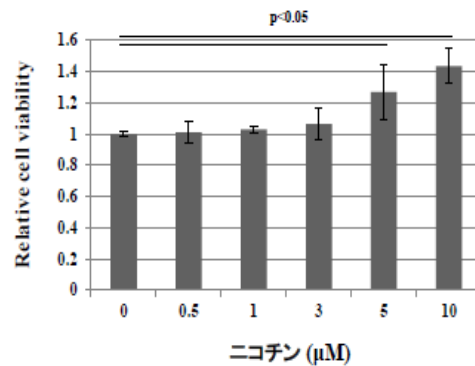
さらに、各種治療薬を用いてニコチン曝露下での効果・PI3K/Akt/mTOR 経路への影響と変化につき検討を行う。各種治療薬としてはニコチン性アセチルコリン受容体 7 サブユニットアンタゴニストである methyllycaconitine (MLA)、シスプラチン (CDDP)、PI3K/mTOR dual inhibitor として NVP-BEZ235 を用いる。

次に、In vivo 実験系での研究を行う。生後6週 BALB/c ノドマウスを用いて、T24 細胞株による皮下腫瘍モデルを作成する。皮下腫瘍体積が約 150mm<sup>3</sup> になった時点で、各種

薬剤の投与を開始する。ニコチンは 1mg/kg を週3回、腹腔内投与を行い、NVP-BEZ235 は 40mg/kg の連日胃管を用いて投与、CDDP は 2mg/kg の腹腔内単回投与とする。投与開始から 21 日目まで腫瘍体積を測定し、その後、腫瘍を摘出し、腫瘍切片に対し pS6 免疫組織学的検討を行う。

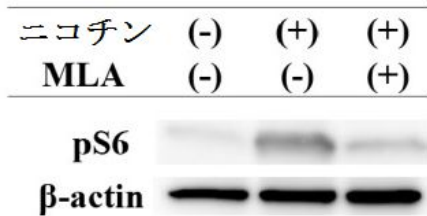
### 4. 研究成果

(1) 初めに、In vitro 実験系での研究を行った。まず、ニコチン曝露が、膀胱癌細胞の viability に影響をどのように与えるのかを WST-1 assay を用いて調査した。0-10μM の濃度にて 24 時間の曝露を行い、WST-1 assay を施行し、細胞の viability を比較した所、5-10μM の濃度に曝露した細胞の viability はコントロール(ニコチン非曝露)と比較して有意に viability が高かった。

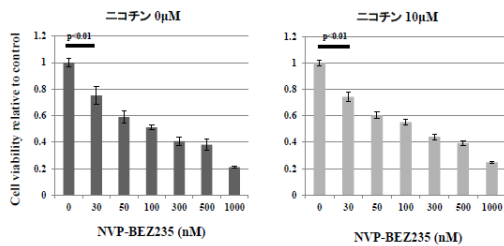


そこで、我々は、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に着目し、まずはその阻害を検討した。nAChR には複数のサブタイプがあり、どの細胞にどのサブタイプが存在しているかはわかっていない。最近の研究では他癌細胞において、特に 7 サブユニットが腫瘍増大と進展に関連があると報告されている。その為、我々も 7 サブユニットに着目し、そのアンタゴニストである methyllycaconitine (MLA) を用いて、ニコチンによる影響の阻害を行った。10μM ニコチンと共に 100μM の MLA を同時に投与し、その時の viability を検討した所、ニコチン単独投与と比較して有意に viability を抑えることができた。しかし、コントロールと比較すると、ニコチンによる viability の上昇を完全には抑えることができなかった。

ニコチン曝露による PI3K/Akt/mTOR 経路への影響を検討した。実験には Western Blot 法を用いて p70 S6 のリン酸化(pS6)の発現を検討した。10μM のニコチンを曝露した細胞における pS6 は共にコントロールと比較して有意に発現の上昇を認めた。一方、100μM MLA の同時投与により、pS6 はニコチン単独投与と比較して有意に発現を抑えられたが、完全に抑制することは確認できなかった。



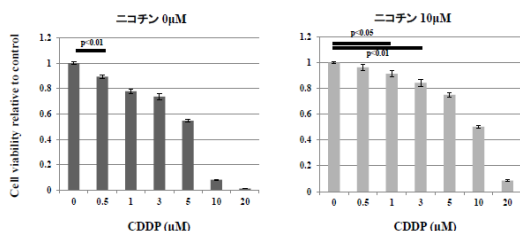
次に我々は、PI3K/Akt/mTOR 経路を直接阻害するべく、PI3K/mTOR dual 阻害薬である NVP-BE235 を用いて、その効果を検討した。まず、T24 細胞株における NVP-BE235 の効果を検討するために 0-1000nM の濃度での viability を検討した。500nM NVP-BE235 の投与にて viability はコントロールと比較して  $38.1 \pm 4.5\%$  と有意に低下した。一方、 $10\mu\text{M}$  ニコチン曝露細胞においても同様に NVP-BE235 の効果の検討を行った。ニコチン曝露下でも 500nM NVP-BE235 の投与にて viability は  $39.0 \pm 2.0\%$  と有意に低下した。



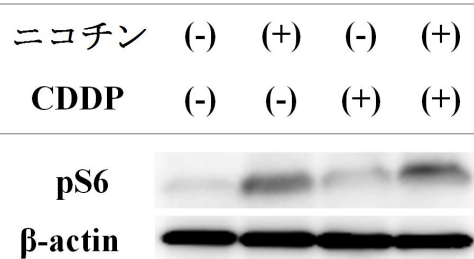
NVP-BE235 投与時における PI3K/Akt/mTOR 経路への影響を Western blot 法を用いて検討した。ニコチン非曝露細胞における NVP-BE235 の投与により pS6 の発現は有意に抑制することができた。一方、ニコチン曝露細胞においても NVP-BE235 の投与により pS6 の発現は有意に抑制することができた。



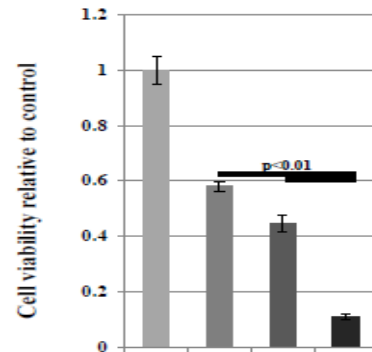
次に現在尿路上皮癌に対し有効な治療効果を認めているシスプラチン (CDDP) を用いて、ニコチン曝露下での治療効果の検討を行った。WST-1 assay を用いて CDDP の殺細胞効果を検討した所、ニコチン曝露なしでの  $10\mu\text{M}$  CDDP の殺細胞効果は  $91.8 \pm 0.4\%$  であったのに対し、ニコチン曝露下では  $49.8 \pm 1.2\%$  となり、有意に殺細胞効果の減弱を認めた。



さらに PI3K/Akt/mTOR 経路への影響を Western blot 法にて検討すると、CDDP 単独投与でも、pS6 の発現は上昇し、ニコチン曝露においてより発現の上昇を確認した。



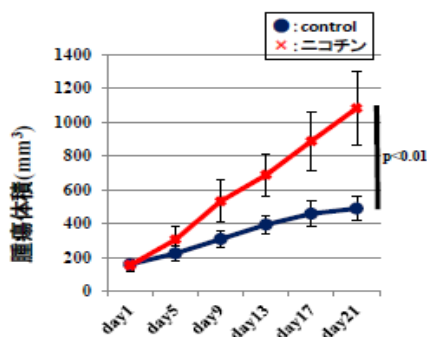
次に CDDP と NVP-BE235 のニコチン曝露下での併用効果につき検討を行った。WST-1 assay において  $10\mu\text{M}$  の CDDP と 500nM NVP-BE235n の併用により cell viability は  $10.9 \pm 1.0\%$  となり、それぞれの単独投与と比較して有意に低下した。



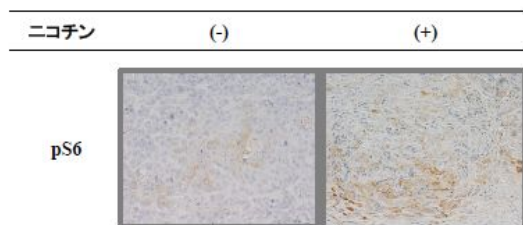
ニコチン	(+)	(+)	(+)	(+)
NVP-BE235	(-)	(-)	(+)	(+)
CDDP	(-)	(+)	(-)	(+)

また、ニコチン・CDDP にて発現が上昇した pAkt/pS6 も、NVP-BE235 により有意にその発現を抑制することができた。

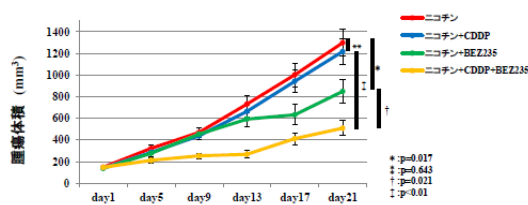
(2)次に In vivo 実験系においてニコチンの影響と機序解明につき検討を行った。皮下腫瘍モデルマウスに対し、ニコチンは  $1\text{mg}/\text{kg}$  を週 3 回、腹腔内投与を行い、NVP-BE235 は  $12.5\text{mg}/\text{kg}$  の連日胃管を用いて投与、CDDP は  $2\text{mg}/\text{kg}$  の腹腔内単回投与を行った。ニコチン投与群と非投与群において、21 日目の腫瘍体積は有意に投与群のほうが大きかった。



腫瘍切片における pS6 の発現を免疫組織学的に評価した所、ニコチン投与マウスの腫瘍内の pS6 は有意に発現の増加がみられた。



次に、ニコチン投与マウスにおける各種治療薬の抗腫瘍効果につき検討した所、CDDP 単剤投与では有意な抗腫瘍効果を認めることができなかつたが、NVP-BE235 単剤投与では有意な抗腫瘍効果を認めた。さらに CDDP・NVP-BE235 の併用投与を行った所、NVP-BE235 単剤投与よりもさらに強い抗腫瘍効果を認め、CDDP の効果を認めることができた。



これらの結果から、ニコチン曝露は PI3K/Akt/mTOR 経路を介し、腫瘍増大効果をもたらすことが確認された。また、CDDP に代表される現在の抗癌剤に対し、その耐性化の一因になっている可能性が示唆された。一方、NVP-BE235 のような PI3K/Akt/mTOR 経路を直接阻害する薬剤は、ニコチンの影響を受けづらく、抗腫瘍効果の減弱を認めない可能性があることが確認された。また、既存の抗癌剤と併用で用いることで、喫煙者に対し、さらなる治療効果が期待できる可能性を示唆した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kazuyuki Yuge, Eiji Kikuchi, Masayuki Hagiwara, Yota Yasumizu, Nobuyuki Tanaka, Takeo Kosaka, Akira Miyajima and Mototsugu Oya, Nicotine Induces Tumor Growth and Chemoresistance through Activation of the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Bladder Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 査読有、2015 年、14 巻、2112-2120、DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0140

〔学会発表〕(計 2 件)

弓削 和之、菊地 栄次、萩原 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 年 2 月 27 日、ACT コンベンションルーム (大阪府大阪市) 弓削 和之、菊地 栄次、萩原 正幸、安水 洋太、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 年 4 月 18 日、ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川県金沢市)

〔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〕  
なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

弓削 和之 (YUGE, Kazuyuki)  
慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
研究者番号: 70464906