

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09179

研究課題名(和文) ドラッグ・リポジショニングを用いた、膀胱癌に対する新規膀胱内注入療法

研究課題名(英文) Drug repositioning approaches for novel intravesical treatment against bladder cancer

研究代表者

松本 一宏 (MATSUMOTO, Kazuhiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80366153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌剤(Mitomycin C)膀胱内注入療法とPDE5阻害薬(Tadalafil)併用による、膀胱癌に対する抗腫瘍効果増強の検討を行った。In vitro実験ではヒト膀胱癌細胞株3種とマウス膀胱癌細胞株1種において、Mitomycin CとTadalafilとの相乗効果の傾向を確認した。特に相乗効果の強かったT24細胞株を用いた機能解析にて、Tadalafilによる酸化ストレス作用の抗腫瘍効果への関与が示唆された。またIn vivo実験にて両者を併用することにより、腫瘍サイズが低下する傾向を認めた。また併用群ではMitomycin C投与単独群に比べ、膀胱容量が維持されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋層非浸潤性膀胱癌に対する膀胱内注入療法の分野では、今世紀に入ってから新規薬剤は全く出現していない。本研究結果により、現在のスタンダードな抗癌剤(Mitomycin C)膀胱内注入療法にTadalafilを付加することにより抗腫瘍効果が増強する傾向を認め、またそこには酸化ストレスが関与している可能性が示唆された。さらに実臨床で問題となっている、膀胱内注入療法に伴う萎縮膀胱などの副作用軽減効果も期待される結果であった。よって本研究結果は、膀胱癌の再発進展や転移抑制、また副作用の予防につながる新たな治療戦略を提供することにつながるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined the possibility in drug repositioning use of PDE5 inhibitor (Tadalafil), and investigated the combination anticancer effect against bladder cancer, using the current clinical standard intravesical chemotherapy (Mitomycin C) and Tadalafil. In vitro, we confirmed the combination efficacy in one mouse bladder cancer cell line, and three human cell lines. Using T24 cell line in which the strongest synergistic effect was observed, we performed several oxidative stress assays and found that antioxidative stress effect of Tadalafil might play a role in anti-cancer activity. In vivo, we observed that combination therapy could reduce that tumor size compared to the control, and Tadalafil monotherapy cohorts, and furthermore bladder capacity was maintained compared to the Mitomycin C monotherapy cohort.

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：筋層非浸潤性膀胱癌 Tadalafil 酸化ストレス

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。根治または再発予防目的の adjuvant 治療として、様々な抗癌剤や BCG 膀胱内注入療法がスタンダードな治療として古くより広く施行されている。抗癌剤は BCG に比べ副作用が少ない反面、腫瘍細胞が抗癌剤耐性を獲得することにより、再発進展や転移をコントロールできない症例を少なからず認めることが問題である。一方 BCG でも同様に腫瘍細胞が免疫逃避機構を獲得することにより、晩期の再発進展や転移が認められることが問題として挙げられる。それぞれの治療法の弱点を克服するために、抗癌剤と BCG 治療との併用等様々な工夫がなされているが、効果および副作用の両面でその成績は芳しくない(Solsona E *et al*, *Eur Urol*. 2015)。よって新規治療戦略の確立は喫緊の課題である。そこで当教室では、これらの問題点を克服するための次世代の治療として、様々な膀胱内注入治療の研究を行ってきた。これまでインターロイキンの遺伝子膀胱内導入治療として IL-2(Horiguchi Y *et al*, *Gene Ther*. 2000)、IL-12(Horinaga M *et al*, *Urology*. 2005)、IL-15(Matsumoto K *et al*, *Hum Gene Ther*. 2011)の治療効果を確認したが、遺伝子導入治療は実臨床への応用が難しいという問題点がある。また、両親媒性ポリマーである

2-methacryloxyethyl phosphorylcholine(MPC)polymer に Paclitaxel を封入した薬剤(Tamura K *et al*, *BMC cancer*. 2015)や、PI3K/mTOR complex 1/2 の阻害剤である NVP-BEZ235(Matsushima M *et al*, *Int J Oncol*. 2015)の膀胱内注入療法での有用性を示したが、新規薬剤を臨床応用するためには様々な倫理的・社会的障壁が高く、解決すべき点も多い。そこで現在当教室では他疾患に対する既存薬を膀胱癌の治療に転用する「ドラッグ・リポジショニング」による薬剤探索へと、研究の方向性をシフトしている。

Phosphodiesterase(PDE)は生体内で、グリコーゲンの分解、細胞のアポトーシス、血小坂の凝集、平滑筋の弛緩など、さまざまな現象に関与しており、PDE1 から 12 まだが同定されている。その中で、PDE5 は肺動脈や男性生殖器、そして尿路組織の平滑筋などに存在しており、NO によって産生される cGMP を分解する酵素である。よって PDE5 を阻害することで、cGMP 濃度を上昇させて局所の平滑筋の弛緩を促すことが知られている。PDE5 阻害薬である Tadalafil は、実臨床にて前立腺肥大症による排尿障害改善薬、勃起不全改善薬、肺高血圧治療薬として現在幅広く使用されている。最近、前立腺肥大症を合併した膀胱癌患者において、Tadalafil 内服開始後に抗癌剤(Mitomycin C)膀胱内注入療法を行ったところ著効した症例を偶然立て続けに実臨床にて経験したため、Tadalafil をドラッグ・リポジショニングの候補として考えている。文献上も、悪性黒色腫(Hassel JC *et al*, *Oncoimmunology*. 2017)、非小細胞肺癌(Booth L *et al*, *Oncotarget*. 2017)、頭頸部扁平上皮癌(Tuttle TR *et al*, *Cancer Lett*. 2015)、甲状腺癌(Sponziello M *et al*, *Endocrine*. 2015)、悪性リンパ腫(Wang R *et al*, *J Neurooncol*. 2015)などにおいて単剤または他剤との併用療法での有用性が、実験レベルで散見されるようになってきている。膀胱癌細胞株に対しては、過去に同じく PDE5 阻害薬である Sildenafil の Doxorubicin または Mitomycin C との併用効果が示されているが(Booth L *et al*, *Mol Pharmacol*. 2014)、*in vitro* のみの検討でありそのメカニズムはいまだ判然としていない。そこで我々は、膀胱癌においてスタンダードな抗癌剤膀胱内注入療法と Tadalafil を組み合わせることにより、より強力な抗腫瘍効果を発揮することができ実臨床に応用できるのではと本研究を着想した。

2. 研究の目的

再発・病期進展のリスクが高い筋層非浸潤性膀胱癌に対して、古くより様々な抗癌剤や BCG の膀胱内注入療法が施行されてきた。抗癌剤は BCG に比べ副作用が少ない反面、腫瘍細胞が抗癌剤耐性を獲得することにより、最終的には再発進展や転移をきたすことが問題である。近年、前立腺肥大症に対する PDE5 阻害薬(Tadalafil)が保険収載された。我々は実臨床において、抗癌剤(Mitomycin C)膀胱内注入療法が著効した PDE5 阻害薬内服中の症例を経験したことから、本研究を着想した。文献上も、他癌種において PDE5 阻害薬による抗腫瘍効果増強の実験データが近年散見される。当教室ではこれまでユニークなマウス膀胱癌同所性モデルを用い、様々な新規膀胱癌治療法を開発してきた。そこで同モデルを用い、スタンダードな抗癌剤膀胱内注入療法と既存薬である PDE5 阻害薬を組み合わせることにより、実臨床に応用可能な膀胱癌に対する新規治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膀胱癌細胞株を用いた Tadalafil と Mitomycin C の併用効果の *in vitro* での確認

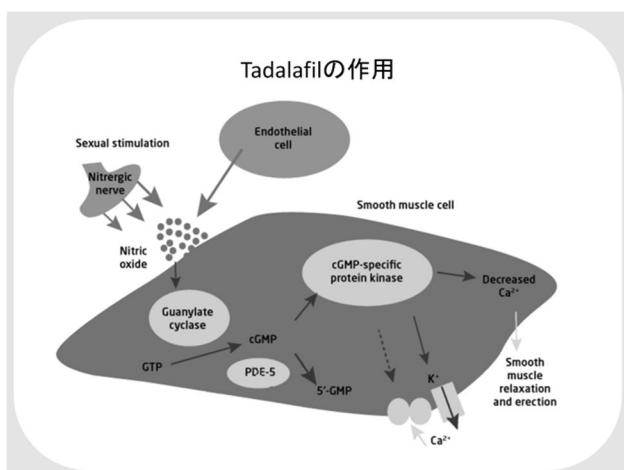
ヒト膀胱癌細胞株3種(T24, 5637, UMUC-3)とマウス膀胱癌細胞株1種(MBT2)を用い、Tadalafil と Mitomycin C の併用効果を *in vitro* に WST assay にてスクリーニングを行った。

(2) mRNA マイクロアレイ解析による Tadalafil の抗腫瘍効果メカニズムの検討

Tadalafil 投与前後のヒト膀胱癌細胞株 T24 を用いて mRNA マイクロアレイ解析の比較を行い、Tadalafil による抗腫瘍効果のメカニズムとしての候補 pathway を検討した。

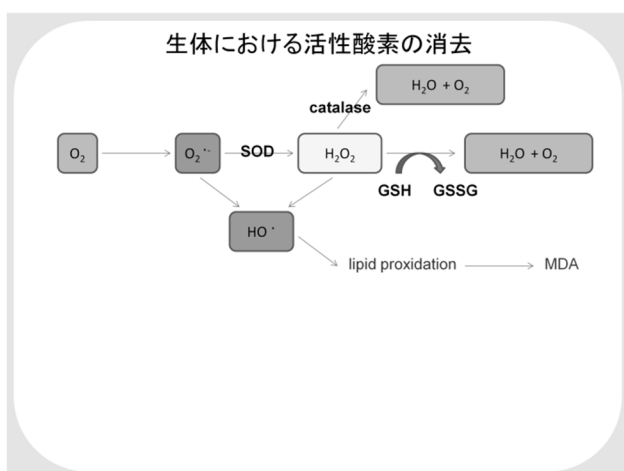
(3) ヒト膀胱癌細胞株 T24 における PDE5 阻害作用の検討

Tadalafil と Mitomycin C の最も強い併用効果を認めた T24 細胞株を用い以下 *in vitro* 実験を行った。NO によって賛成された cGMP を不活化するのが PDE5 であり、Tadalafil 投与により cGMP が上昇し平滑筋弛緩がおり、排尿障害改善薬、勃起不全改善薬、肺高血圧治療薬として使用されている。そこでまず腫瘍細胞においても Tadalafil 投与による PDE5 活性の変化および cGMP 濃度の細胞内濃度測定を行った。



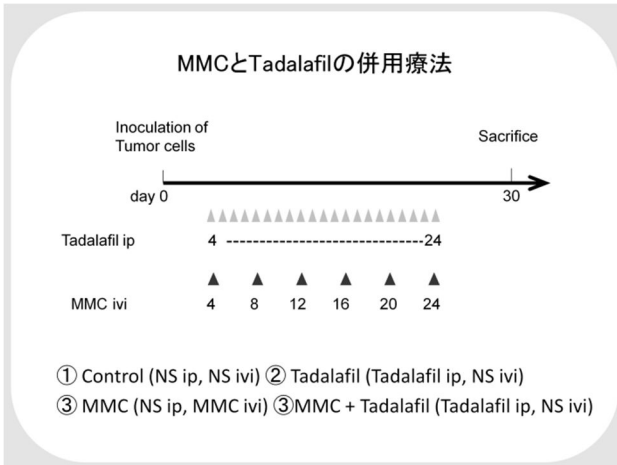
(4) Tadalafil と Mitomycin C の併用に伴う酸化ストレスマーカーの変化

一般的には抗がん剤投与にて酸化ストレスは増加するが、Tadalafil 併用による酸化ストレスマーカーの変化を確認した。具体的には強力な ROS であるスーパーオキシドを過酸化水素に弱毒化する SOD 活性、過酸化水素を分解するカタラーゼ濃度、還元型グルタチオン (GSH)/酸化型グルタチオン (GSSG) 比、強力なヒドロキシラジカルから始まる過脂質過酸化反応の最終代謝物である MDA 濃度を測定した。



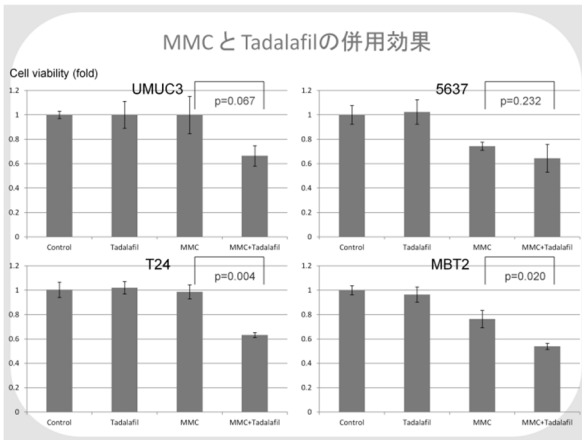
(5) マウス膀胱癌同所性モデルを用いた抗腫瘍効果の検討

マウスを4群に分け、Control群、Tadalafil群連日腹腔内投与、Mitomycin C群4日に一回膀胱内流入、併用群とし、Day30に膀胱腫瘍量(膀胱重量)を確認した。また病理学的に、膀胱壁の形態変化も確認した。



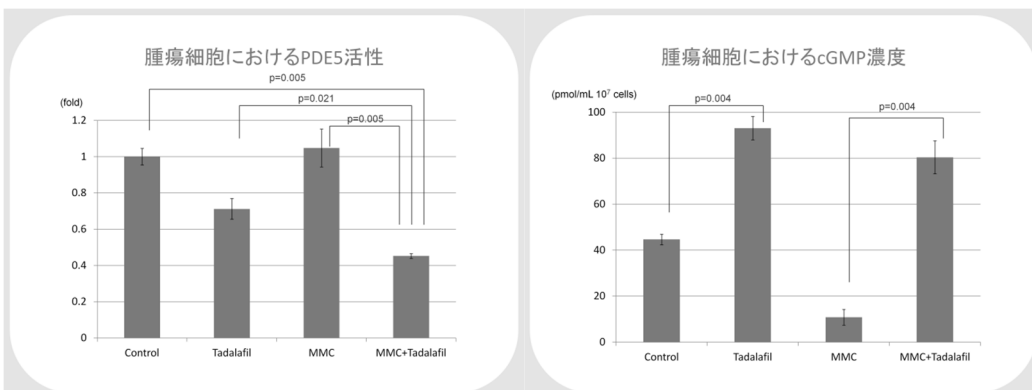
4. 研究成果

(1) *In vitro*のWST assayの結果、ヒト膀胱癌細胞株3種とマウス膀胱癌細胞株1種すべてにおいて、通常臨床にてTadalafil投与時の血中濃度とほぼ同量(100 µg/mL)をMitomycin Cに付加するだけで、有意な抗腫瘍効果の増強を認めた。一方、Tadalafil単剤では明らかな抗腫瘍効果を認めなかったため、その相乗効果には腫瘍の抗癌剤耐性や修復機構が関与しているものと推測された。

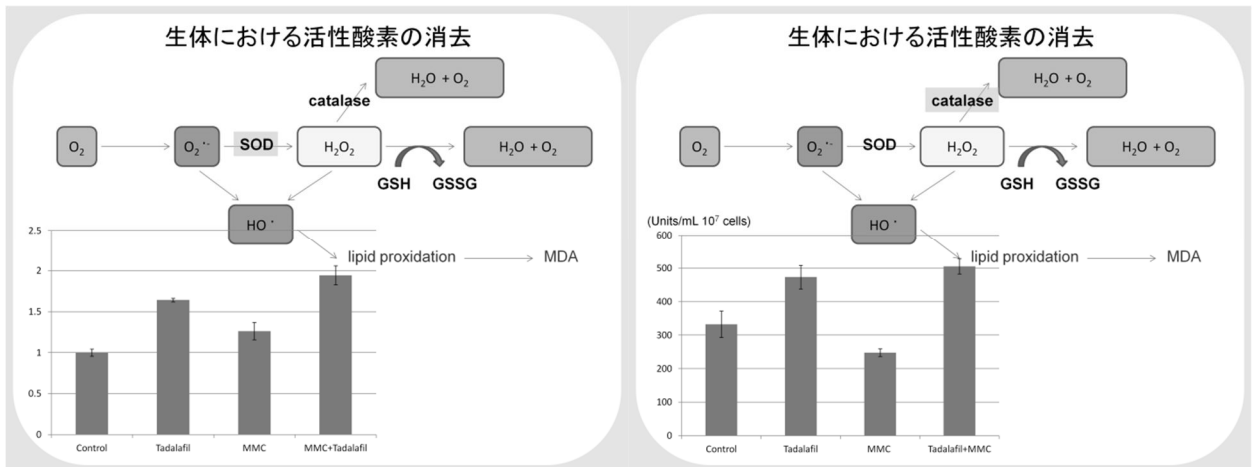


(2) さらにTadalafil投与前後の膀胱癌細胞株を用いたmRNAマイクロアレイ解析の比較を行い pathway アッセイにて検討した結果、Tadalafilによる抗腫瘍効果のメカニズムとして、抗癌剤により生じた活性酸素の分解制御、抗癌剤に伴い誘導されたオートファジーの抑制、Wnt/ -カテニンシグナル伝達経路と薬剤耐性遺伝子(MDR1)活性化の抑制、RB経路によるE2Fの不活化の4つの pathway が候補として挙げられた。もっとも mRNAの変動が大きかったの経路につき以下検討を行った。

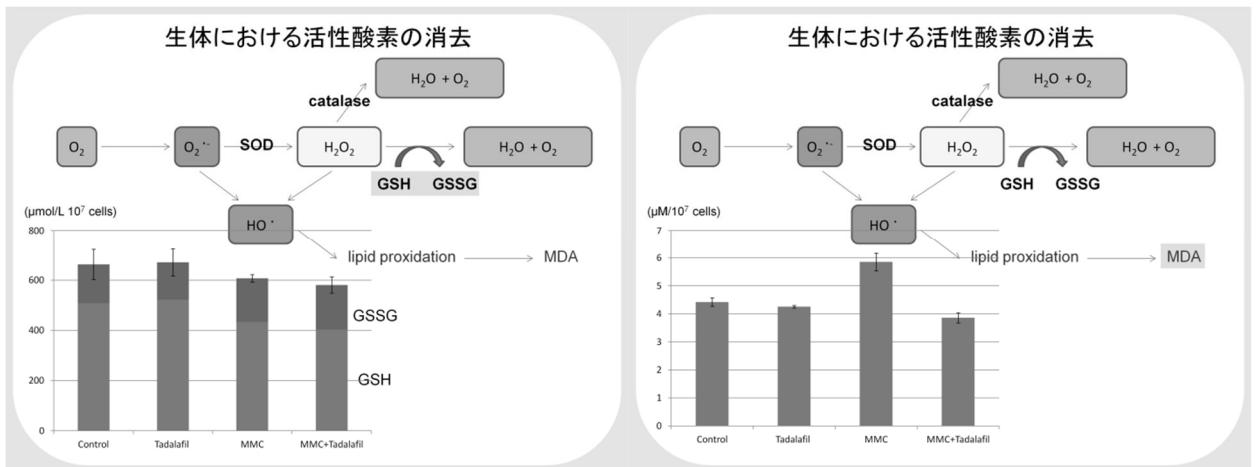
(3) Control群、Tadalafil群、Mitomycin C群、併用群にてそれぞれPDE5活性を測定したところ、Tadalafil投与にてPDE5活性の低下を認め、それに伴いTadalafil投与によるcGMP濃度の上昇を認めた。



(4) Control 群、 Tadalafil 群、 Mitomycin C 群、 併用群にて SOD 活性を測定したところ、Tadalafil 投与にて増加していた。カタラーゼ濃度も、Tadalafil 投与にて濃度の上昇していた。

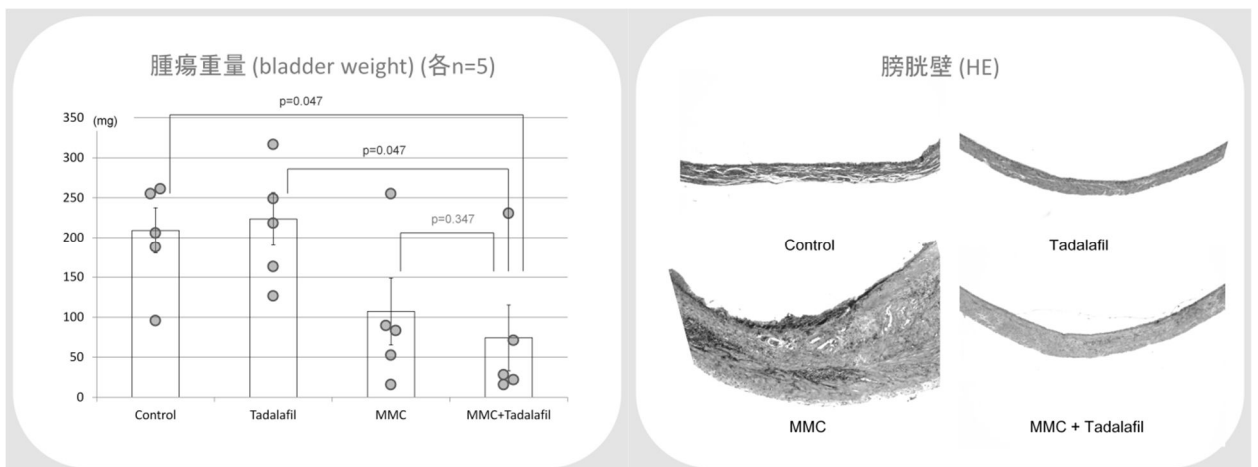


還元型グルタチオン (GSH)/酸化型グルタチオンに (GSSG)比は、Mitomycin C 投与で GSH がやや減少するのみで Tadalafil の関与は確認できなかった。Mitomycin C 投与にて MDA 上昇を認めたが、Tadalafil 併用にて上昇が抑制された。



全体として Mitomycin C に Tadalafil を併用することにより酸化ストレスの軽減を認め、抗腫瘍効果に関与している可能性が示唆された。

(5) In vivo 実験にて Mitomycin C 単独群と併用群の間に有意差は認めませんでした抗腫瘍効果の増強傾向を認めた。また病理学的に Mitomycin C 単独では筋層肥厚および線維化、炎症細胞の浸潤傾向を認め、Tadalafil を併用することによりその予防効果が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本一宏
2. 発表標題 ドラッグ・リポジショニングを用いた、筋層非浸潤性膀胱癌に対する新規膀胱内注入療法の開発
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菊地 栄次 (Kikuchi Eiji) (10286552)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授 (32612)	
研究分担者	小坂 威雄 (Kosaka Takeo) (30445407)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
研究分担者	武田 利和 (Takeda Toshikazu) (10383829)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------