

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18620

研究課題名(和文)膀胱癌における性ホルモン受容体シグナルと放射線感受性並びに放射線性膀胱炎との関連

研究課題名(英文)The impact of sex hormonal receptor signaling on radio-sensitivity in bladder cancer

研究代表者

井手 広樹 (Ide, Hiroki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：70365360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膀胱尿路上皮細胞株 5637、T24においてエストロゲン受容体(ER) の発現を確認できた。その細胞でタモキシフェンの投与並びに、ER ノックダウンによる放射線感受性の有意な増強効果を認めた。次に、雌の皮下腫瘍モデルにて、コントロール群、タモキシフェン単剤、放射線単独療法群、併用療法群の4群に分けた。コントロール群とタモキシフェン単剤とは腫瘍体積の有意差を認めなかったが、併用群は放射線単独療法より有意に強い抗腫瘍効果を認めた。更に、5637細胞においてエストロゲン投与と非投与と下での放射線照射を行い、遺伝子発現の比較を行い、投与群に有意に上昇したDNA修復関連遺伝子を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移のない浸潤性膀胱癌の標準治療として、膀胱全摘除術があがるが、侵襲度が高く高齢の患者に負担を強いること、尿路変更を要するため、術後のQOLが著しく低下する問題点があげられる。近年、化学療法併用放射線治療が膀胱全摘除術に匹敵するが、十分ではなく非奏功例の後治療が困難を極める。今回の実験で、性ホルモン受容体シグナルと放射線感受性の実験の関連が明らかになり、性ホルモン受容体阻害剤を併用することで膀胱癌における放射線感受性の増強が期待され、現状の問題点が解決される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：At first, we confirmed the expression of Estrogen Receptor (ER) in 5637 and T24, human bladder cancer cell lines. In in vitro experiments, tamoxifen and knockdown of ER enhanced the radio-sensitivity in these cells. Next, in in vivo experiments using female xenograft models (5637 and T24), the combination treatment of tamoxifen and radiotherapy showed the significant anti-tumor effect, compared to single treatment. Finally, microarray showed that the expressions of several DNA repair-related genes in 5637 cells treated with radiation in medium with estradiol(E2) were significantly higher than those in medium without E2.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 放射線 性ホルモン受容体シグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移のない浸潤性膀胱癌の標準治療として、膀胱全摘除術があがるが、侵襲度が高く高齢の患者に負担を強いること、尿路変更を要するため、術後のQOLが著しく低下する問題点があげられる。近年、化学療法併用放射線治療が膀胱全摘除術に匹敵するが、十分ではなく非奏功例の後治療が困難を極める(Kulkarni GS *et al.*: *J Clin Oncol*, 2017)。また、問題点として正常膀胱部に照射されるため放射性膀胱炎を惹起し、QOLを損なう危険がある。

放射線抵抗性因子として、DNA修復や抗アポトーシスが関与していると報告されている(Dumont F *et al.*: *Expert Opin Ther Pat*, 2010)。具体的に、DNA修復関連遺伝子、EGFRやその下流のPI3K/Akt pathway関連分子、NF B関連分子があげられる。

近年、膀胱癌ではアンドロゲン受容体(AR)やエストロゲン受容体(ER)シグナルの関与が論証された、臨床、基礎のデータが散見され、今後の新規治療戦略の確立に向けての糸口として期待されている(Ide H *et al.*: *PLoS One*, 2017)。アンドロゲン依存性である前立腺癌において、既に抗アンドロゲン療法併用放射線治療が確立されているが、近年、抗アンドロゲン剤によるDNA修復関連因子の発現上昇の抑制が、放射線治療感受性の増強に大きく関与していることが示唆されている(Bartek J *et al.*: *Cancer Discov*, 2013)。膀胱癌においても、前に述べた放射線抵抗因子のEGFRやPI3K/Akt pathway関連分子、NF BがARシグナルと関与していることを我々は既に論証しており、抗アンドロゲン療法併用放射線治療の効果が期待される(Li Y *et al.*: *Jpn J Clin Oncol*, 2012)。

我々のdataでは、AR陽性膀胱癌細胞はAR陰性細胞より放射線感受性は有意に低く、AR陽性細胞株では抗アンドロゲン剤を併用することで、放射線感受性を有意に高めることが、*in vitro*, *in vivo*において示された(Ide H *et al.*: *Mol Cancer Ther*, 2018)。更にDNA2本鎖損傷を示すH2AX foci formationを放射線照射後、経時的に評価したところ、AR陽性細胞株は陰性細胞株よりfoci formationは有意に低く、抗アンドロゲン剤を併用することで、foci formationを有意に増加させた。このデータは、膀胱癌においてもARシグナリングと放射線感受性の有意な関連が示され、その原因として、DNA修復が関与している事が示唆される。

一方、膀胱癌におけるERシグナリングとの関連における報告は既に散見されており(Ide H *et al.*: *Dis Markers*, 2015)、浸潤性膀胱癌と乳癌のDNAプロファイルが類似している事が報告されていることも近年報告されている(Choi W *et al.*: *Cancer Cell*, 2014)。また、ERシグナリングと放射線抵抗因子と言われているDNA修復(Caldon CE *et al.*: *Front Oncol*, 2014)やアポトーシス(Bailey ST *et al.*: *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012)との関係が報告されている。しかしながら、膀胱癌の放射線感受性とERシグナルとの関連を示した研究は見当たらない。

2. 研究の目的

今後の実験予定としては、既に確認されているARシグナルと放射線感受性の関連と同様に、ERシグナリングと放射線感受性についての評価を行う。更に、ERシグナルと放射線感受性の関連が認められれば、*in vivo*での評価を行いつつ、具体的なメカニズム、下流の因子の解明を行うことを目的としている。

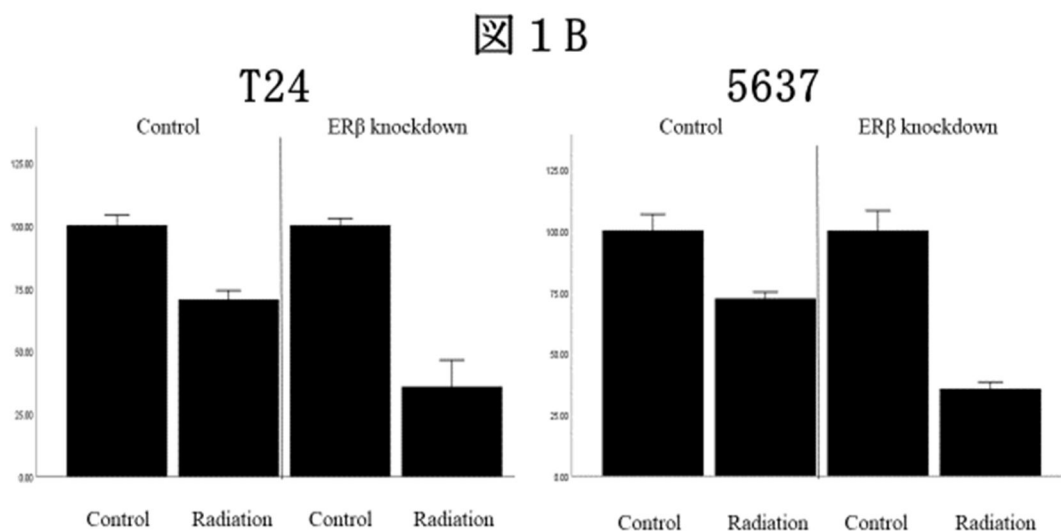
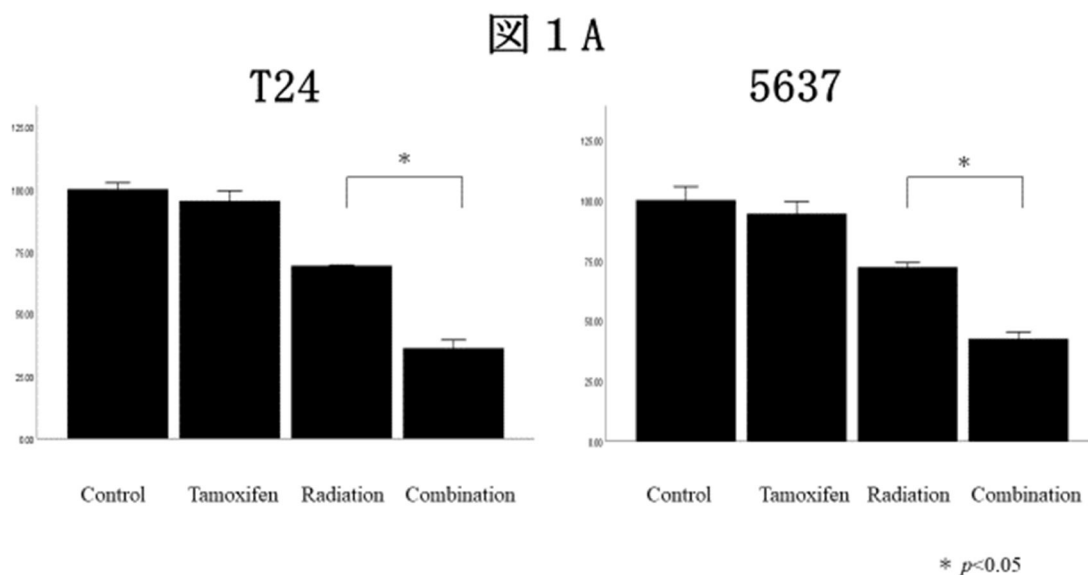
3. 研究の方法

初年度は、既に確認されているARシグナルと放射線感受性の関連と同様に、ERシグナリングと放射線感受性について*in vitro*にて評価を行った。具体的にはまずヒト膀胱癌細胞株のERの発現状況を確認した上で、ノックダウン細胞の作成、ならびに抗エストロゲン剤投与による放射線感受性の増強効果についてWST assayにて評価を行った。

更に、*in vivo*で皮下腫瘍モデルを作成した上で、同様の評価を行った。具体的には、雌のSCIDマウスを用いて皮下腫瘍モデルを作成した上で、コントロール群、放射線照射単独群(4Gy)、抗エストロゲン剤単独群、抗エストロゲン剤、放射線併用群の4群に分け、皮下腫瘍径を経時的に測定した。更にエストロゲン剤投与、非投与の上で放射線照射を行った膀胱癌細胞株のRNAを抽出し、microarrayで遺伝子発現の比較を行った。

4. 研究成果

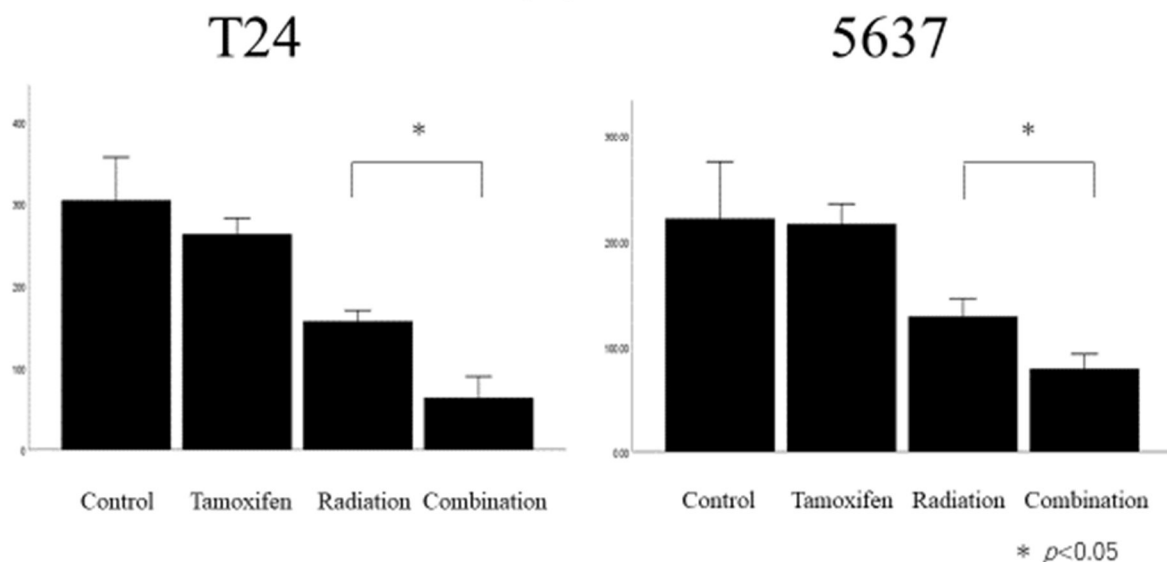
ヒト膀胱尿路上皮細胞株のエストロゲン受容体の発現をウェスタンブロットにて確認したところ、5637、T24 において ER β の発現を確認できた。過去の研究から浸潤性膀胱癌の予後と有意な関連を認めている ER β に着目し、抗エストロゲン剤であるタモキシフェンの投与並びに、ER β ノックダウンによる放射線感受性の増強効果を WST assay で確認したところ、有意な増強効果を認めた(図 1A、B)。



更に、5637、T24 の皮下腫瘍モデルを雌の SCID マウスにて作成することに成功し、腫瘍が生着したことを確認した段階で、コントロール群、タモキシフェン単剤、放射線単独療法群、タモキシフェン及び放射線照射の併用療法群の 4 群に分けた。その後、皮下腫瘍の体積を経時的に測定し、照射 14 日後の段階で、コントロール群とタモキシフェン単剤とは腫瘍体積の有意差を認

めなかった。一方、タモキシフェン、放射線治療併用群は放射線単独療法より有意に強い抗腫瘍効果を認めた(図2)。更に、5637細胞株においてエストロゲン投与と非投与下での放射線照射を行い、24時間後のそれぞれの細胞のRNAを抽出し、マイクロアレイによる遺伝子発現の比較を行った。その結果、エストロゲン非投与群に比べ、投与群に有意に上昇したDNA修復関連遺伝子(Rad51、Rad54B)を同定した。更にヒト膀胱癌細胞株の放射線抵抗株の樹立に成功し、WSTアッセイで親株に比べ有意に放射線抵抗性が高いことを確認できた。最後の段階として、ERの抵抗株における発現の上昇をウェスタンブロット、PCRにて確認すると同時に、DNA修復遺伝子のノックダウンが放射線感受性の増強に寄与することを確認する予定である。

図 2



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 井手広樹、井上聡、菊地栄次、宮本浩、大家基嗣
2. 発表標題 膀胱癌におけるアンドロゲン受容体シグナルによる放射線感受性の低下
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------