

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591866

研究課題名(和文)

膀胱癌に対する新規NF- κ B活性阻害剤を併用した抗癌治療戦略の確立

研究課題名(英文)

The chemotherapeutic strategy with a novel NF- κ B inhibitor in bladder cancer

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

研究成果の概要(和文)：膀胱癌に対する新規NF- κ B活性阻害剤であるDHMEQとCPT-11の併用による殺細胞効果増強の検討を行った。KU19-19細胞で恒常的なNF- κ B活性が確認された。NF- κ BはSN38単独投与で活性化されたが、DHMEQはこれを抑制した。DHMEQ+CPT-11併用群は単独治療群に比べ細胞傷害、抗腫瘍効果を認めた。DHMEQとCPT-11の併用は新規膀胱癌治療として期待できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The present study was undertaken to assess the possibility of enhancement of chemosensitivity to CPT-11 by a novel and strong NF- κ B inhibitor, DHMEQ in bladder cancer. Constitutive activation of NF- κ B was observed in KU19-19 cells. NF- κ B was activated by the treatment with SN38. However, pretreatment with DHMEQ inhibited the activation of NF- κ B induced by SN-38. The combination treatment resulted in a significantly higher level of growth inhibition compared to treatment with DHMEQ or SN-38 alone. Chemotherapy in combination with DHMEQ might be a novel therapeutic modality against bladder cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：膀胱癌、転写因子、抗癌治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 進行性あるいは転移性膀胱腫瘍の治療に対しては化学療法が選択される (Can Cont 2000; 7: 347-356)。尿路上皮腫瘍に対して現在用いられている多剤併用化学療法は

MVAC療法 (methotrexate, vinblastine, doxorubicin, cisplatin) で、その奏功率は約70%とされている (J Urol 1988; 139: 461-469)。一方、MVAC療法は生存予後の改善にはあまり寄与せず、その副作用も決して無視できるものではない (Semin Oncol 1996;

23: 633-644)。現在の化学療法では浸潤性尿路上皮腫瘍治療の有効性、副作用軽減には限界があり、新規抗癌治療戦略の確立が切望されているのが現状である。

(2) 表在性膀胱癌に対しては通常 TUR-BT (経尿的膀胱腫瘍切除術) による切除治療が行われるが、3年以内に約70%のケースが再発し、進行癌に進展するものも少なくない。再発予防のため adjuvant 治療として、BCG 膀胱内注入療法がスタンダードな治療として現在広く施行されている。現時点で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一方、現状の BCG 膀胱内注入療法の問題点として、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、依然として3年以内に約40%のケースが再発している、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。表在性膀胱癌に対しても新規膀胱内注入抗癌治療の確立が必至である。

(3) 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破壊機構のひとつであるが (Leukemia 1997; 11: 253-257, Cell Growth Differ 1993; 4: 41-47, Science 1998; 281: 1680-1683)、近年、転写因子のひとつである NF- κ B の活性化が各種の化学療法、放射線治療のアポトーシス誘導を抑制し、その癌治療に対する抵抗性を増加させると報告された (Science 1996; 274: 784-787)。ある種の抗癌剤は、癌細胞内において NF- κ B の活性化を生じ、その NF- κ B が抗癌剤のアポトーシス誘導作用を抑制し、抗癌治療抵抗性が生じるとされている。浸潤性尿路上皮腫瘍におけるこれらの研究の詳細はあまり報告されていない。

(4) NF- κ B の活性化を抑制する試みとして、アデノウイルスを用いた NF- κ B の抑制タンパクである I- κ B の導入 (Nat Med 1999; 5: 412-7)、proteasome inhibitor である PS-341 の使用 (Can Res 2001; 61: 3535-3540) などが報告されている。当教室でも以前より泌尿器科癌に対する NF- κ B 活性抑制の研究を精力的に行ってきた。Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) あるいは NF- κ B decoy を用いて、NF- κ B 活性を抑制し、TNF- α の殺細胞効果の研究を報告した。PDTC あるいは NF- κ B decoy は、前立腺癌細胞株 LNCaP、DU145 において NF- κ B 活性を抑制し、TNF- α の殺細胞効果を増強した (Sumitomo M, et al., J Urol, 161(2),

674-9, 1999)。膀胱癌細胞に対しては、各種サイトカインを過剰分泌する、当教室にて樹立した KU-19-19 細胞を用いて、I- κ B をアデノウイルスを用いて遺伝子導入した。KU-19-19 細胞において、非特異的 NF- κ B 活性阻害作用を有する dexamethasone では十分に NF- κ B 活性を抑えることができなかったが、I- κ B 遺伝子導入において NF- κ B 活性抑制、アポトーシス誘導、殺細胞効果が有意に認められた。本研究でアデノウイルスを用いた I- κ B 遺伝子導入は膀胱癌細胞において強力に NF- κ B 活性能を抑制し、殺細胞効果を誘導することを証明した (Sumitomo M, et al., Hum Gene Ther, 10(1), 37-47, 1999)。しかしながら臨床応用を考慮した場合、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療は今だ確立しておらず、PS-341、PDTC、dexamethasone などの薬剤の作用は非特異的で副作用発現が懸念される。我々はその後、当大学理工学部において開発、合成された NF- κ B の活性化を強力に抑制する dehydroxymehtylepoxyquinomicin (DHMEQ) に注目し、各種泌尿器科癌治療研究を行い報告してきた。ホルモン非感受性前立腺癌細胞に対する殺細胞効果の検討では、PC-3、DU145、JCA-1 前立腺癌細胞に対して DHMEQ は NF- κ B の活性化を抑制し、アポトーシスを誘導、殺細胞障害作用を示した。その効果は皮下腫瘍モデルにおいて *in vivo* で証明された。本研究において新規 NF- κ B 活性阻害剤 DHMEQ のホルモン抵抗性前立腺癌に対する新たな治療法の確立が示唆された (Kikuchi E., et al., Cancer Res 2003; 63: 107-110)。ついで進行性前立腺癌で生じる cachexia に注目し DHMEQ の有用性を検討した。前立腺癌において、病期が進むにつれ、NF- κ B 活性化、IL-6 の産生が上昇し、cachexia が進行することを確認した。DHMEQ はホルモン抵抗性前立腺癌 cachexia モデルにおいて、IL-6 の産生を抑制し、前立腺癌の cachexia を抑制した。本研究により DHMEQ は癌への直接殺細胞効果を示すのみならず、患者の生活の質を著しく障害する cachexia を有意に抑制することが証明された (Kuroda K., et al., Clin Cancer Res 2005; 11, 5590-594)。腎細胞癌に対しては腎細胞癌株 KU-19-20 を用いて、DHMEQ と INF- γ の併用効果を検証した。さらにアポトーシス抑制タンパクである Survivin に注目した。KU-19-20 細胞において Survivin の発現は上昇していたが、DHMEQ と INF- γ の併用治療によりその Survivin は有意に抑制され、アポトーシス誘導、殺細胞効果の増強が確認された。本研究により、臨床で使用している INF の効果を Survivin を抑制することで、DHMEQ が増強することが示された (Sato A., et al., Int J Oncol 2006; 28: 841-846)。DHMEQ は天然物由来の低分子化合物で、合成も比較的

容易である。またこれまでに検討された方法、薬剤とは異なり、NF- κ B の核内移行あるいは、NF- κ B の DNA 結合を直接阻害し、抗腫瘍効果を発揮する新規 NF- κ B 阻害剤である。

一方で、我々は DHMEQ 単剤での抗腫瘍効果に関して、多少限界があることも認識している。特にサイトカインを過剰分泌し増殖能の強い膀胱癌細胞に対しては、DHMEQ 投与により腫瘍の縮小は認めるものの、腫瘍自体の消失、根絶まで認めるにはいたっていない。したがって次に DHMEQ を用いて抗癌剤の効果増強を図ることに着眼した。DHMEQ の NF- κ B 活性阻害作用は癌細胞の持つ NF- κ B 活性を抑制するとともに、抗癌剤を用いた場合の NF- κ B 活性上昇能も同時に抑制する。このことは DHMEQ および抗癌剤併用療法が癌治療に対して協調的に働くことを示している。

(5)膀胱腫瘍の癌治療における NF- κ B 活性化の報告はいくつか散見される。Chen らは BCG 治療により NF- κ B が活性化され、IL-6 が過剰産生されると報告している。(Chen F et al, J Urol, 2003) また NF- κ B は IL-8 を介して膀胱腫瘍の転移、血管新生を誘導する (Karashima T et al, Clin Cancer Res, 2003) NF- κ B 活性化が膀胱癌細胞の増殖、進展に寄与し、また抗癌剤治療抵抗性に関与している可能性は高い。

2. 研究の目的

KU-19-19、および5637、UMUC-3尿路上皮癌細胞株を用いて膀胱癌細胞における詳細なNF- κ B活性能と癌進展との関連の解明を行うことを第一の目的とした。また新規抗癌剤であるCPT-11にDHMEQを併用し、アポトーシス誘導作用を増強し、膀胱内注入療法による表在性膀胱腫瘍あるいは全身投与による浸潤性尿路上皮腫瘍に対する新規抗癌治療戦略の確立を探求することを第二の目的とした。

本研究では尿路上皮癌の根治を目指すべく、DHMEQを併用し、各種抗癌剤の殺細胞効果の増強が目的である。将来、進行性膀胱腫瘍の新規治療法として臨床応用を視野に入れたpre-clinical studyとして本研究を位置づけている。

3. 研究の方法

(1)各種膀胱癌細胞株における NF- κ B の活性化の有無の検討

KU-1, KU-7, KU19-19, T24, 5637, UMUC3, RT4, MBT-2 各種膀胱癌細胞株を培養し、各細胞より核、細胞質のタンパクを別々に抽出し、ゲルシフトアッセイを行った。KU-19-19 細胞と KU-1 細胞においては核、細胞質のタンパクを Western blot 解析にてタンパクの局在

を検討した。DHMEQ は DMSO 溶液を用いて 10 mg/ml に溶解し使用した。10 μ g/ml の DHMEQ を添加し、0-24 時間経時的な NF- κ B の活性化の変化をゲルシフトアッセイで確認した。

(2) KU-19-19, KU-1 細胞における DHMEQ 単剤の細胞傷害効果、アポトーシス誘導、各種サイトカイン産生能変化の検討

細胞株を各種濃度の DHMEQ にて処理後、細胞傷害効果を WST assay を用いた吸光度測定法で測定した。またアポトーシス誘導の有無を検討するにあたり、ApopTag (Intergen Co., Purchase, NY, USA) による terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) reaction end labeling (TUNEL 法) を用いた。サイトカイン産生能は ELISA アッセイを用いた。

(3) In vitro における SN38 (CPT-11 の活性代謝産物) の膀胱癌細胞傷害効果ならびに DHMEQ 投与による細胞傷害、NF- κ B の活性化誘導抑制の検討

各種濃度の SN38 を KU-19-19 膀胱癌細胞株に加えた。細胞傷害効果を WST assay を用いた吸光度測定法で行った。さらに各種濃度の DHMEQ にて KU-19-19 細胞を処理後、種々の濃度の SN38 を加えた。細胞傷害効果を確認した。

さらに NF- κ B の活性化の抑制の有無は測定には TransAM NF- κ B p65 Transcription Factor Assay Kit (Active Motif) を用いた。

(4) KU-19-19 皮下腫瘍モデルにおける DHMEQ 併用 SN38 の抗腫瘍効果の検討

生後 6~8 週齢のオス BALB/c ノドマウス (nu/nu) を使用した。ケージに 5 匹のノドマウスを収容し、オートクレーブ滅菌を施した飼料と水を与え、1 日 2 回ノドマウスの状態を観察した。なお動物実験は、慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して施行した。KU19-19 細胞を (1 x 10⁶ 個/無血清培地 100 μ l) を、21G 注射針にてマウスの背部皮下に移植した。腫瘍直径が約 5 mm 程度となったところで無作為に 4 グループに分類し、連日、治療を開始した。治療群は、コントロール群 (治療群と等量の DMSO を含む無血清培地を腹腔内投与)、2mg/kg/マウスの DHMEQ、33mg/kg/マウスの CPT-11、DHMEQ+CPT-11 併用治療群とした。治療を開始した日を第 0 日目とし、腫瘍の長径と短径をスライディングキャリパーで測定した。腫瘍重量は推定腫瘍重量 (W) = 0.52 x (a x b²) [a: 長径 (cm), b: 短径 (cm)] の公式より算出した。さらに治療最終段階で皮下腫瘍を摘出し、組織内の CD31、MMP-9 の発現を免疫染色確認

した。また TUNEL 染色により組織内のアポトーシス誘導を検討した。

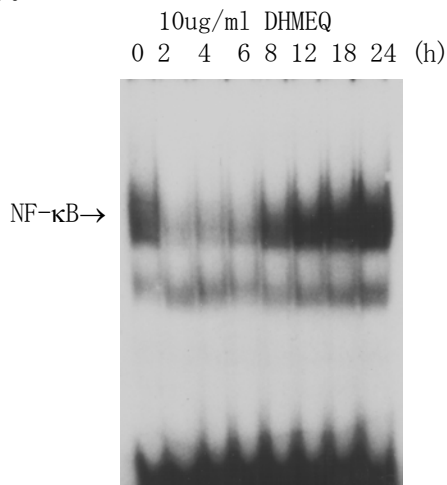
4. 研究成果

(1) 各種膀胱癌細胞株における NF- κ B 能の検討と DHMEQ に投与による NF- κ B 能の変化

KU-1, KU-7, KU19-19, T24, 5637, UMUC3, RT4, MBT-2 各種膀胱癌細胞株を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、KU-7, KU19-19, T24, 5637 細胞にて NF- κ B 活性が確認された。さらに KU19-19 細胞では強い活性が確認された。以後の検討は KU19-19 細胞で行い、NF- κ B 活性(-)細胞として KU-1 細胞と対照群とした。

KU19-19 細胞および KU-1 細胞における p65, I κ B α タンパクの発現をウエスタンブロットイング法により検討した。KU-1 細胞においては細胞質内に p65 タンパクの発現が認められるが、核内に認められなかった。一方、KU19-19 細胞においては p65 タンパクは核内、細胞質内ともに確認された。I κ B α は KU19-19, KU-1 細胞ともに細胞質内にその発現が確認された。

EMSA の検討では KU19-19 細胞においてコントロールで強い NF- κ B のバンドが確認された。10 μ g/ml の DHMEQ で処理後 2-6 時間で、NF- κ B のバンドの消失が確認された。その後 8 時間で NF- κ B と DNA の結合の回復が認められた(下図)。



(2) In vitro における DHMEQ の膀胱癌細胞に対する細胞傷害、アポトーシス誘導、サイトカイン産生能抑制効果

WST assay を用いた吸光度測定法で KU19-19 膀胱癌細胞に対して 5 μ g/ml 以上の DHMEQ 投与により著明な増殖抑制効果が認められた ($p < 0.01$)。一方、KU-1 細胞においては 20 μ g/ml の DHMEQ で細胞傷害活性が確認された。また KU19-19 細胞において 10 μ g/ml の DHMEQ で有意にアポトーシス誘導が検出された。

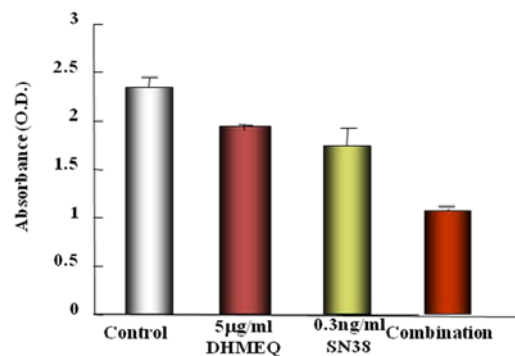
KU19-19 膀胱癌細胞に対して 5 μ g/ml 以上の

DHMEQ 投与により著明な IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-8 産生能の抑制が確認された。

(3) In vitro における SN38 (CPT-11 の活性代謝産物) の膀胱癌細胞傷害効果ならびに DHMEQ 投与による細胞傷害、NF- κ B の活性化誘導抑制効果

KU19-19 細胞において 0.15ng/ml 以上の SN38 投与により著明な増殖抑制効果が認められた ($p < 0.01$)。

KU19-19 細胞において、コントロールに対して 5 μ g/ml の DHMEQ 単独投与において 18%、0.3 ng/ml の SN38 単独投与において 26% の細胞障害効果増強が確認されたが、併用群においては 55% の細胞障害増強効果が確認された(下図)。

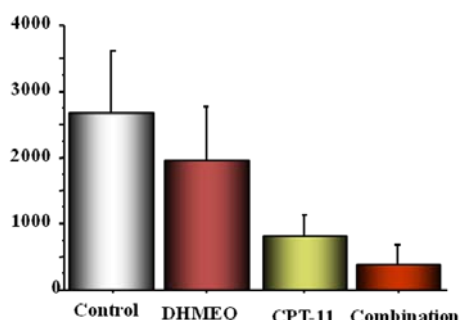


SN38 による NF- κ B 活性の変化を検討した。KU19-19 細胞を、5 μ g/ml の DHMEQ 単独投与、0.3 ng/ml の SN38 単独投与、DHMEQ、SN38 併用投与にて細胞を処理した後、核と細胞質を分離し、核タンパクを assay kit を用いて測定した。コントロール 0.87 \pm 0.07 の吸光度値に対して、5 μ g/ml の DHMEQ 単独投与により、0.33 \pm 0.03 と有意に NF- κ B 活性は抑制された。一方、0.3 ng/ml の SN38 単独投与により、1.07 \pm 0.10 と有意に NF- κ B は活性化された。DHMEQ、SN38 併用投与においては 0.31 \pm 0.01 と有意に NF- κ B 活性は抑制された。

(4) In vivo での DHMEQ, CPT-11 併用による抗腫瘍効果増強

KU19-19 細胞 (2×10^6 個) をマウスの背部皮下に移植し、腫瘍径が約 5mm 程度となったところで無作為に 4 グループ ($n=10$ /group) に分類した。治療群の内訳は無治療群、DHMEQ 単独治療群、各種抗癌剤単独治療群、DHMEQ 併用抗癌剤治療群とした。25 日目の腫瘍体積はコントロール群で 2675 \pm 238cm³、2mg/kg/マウスの DHMEQ 治療群で 1962 \pm 202cm³、33mg/kg/マウスの CPT-11 治療群で 821 \pm 82cm³、DHMEQ+CPT-11 併用治療群で 374 \pm 73cm³ であった。DHMEQ+CPT-11 併用治療群の腫瘍体積は DHMEQ 単独治療群、CPT-11 単独治療群の腫瘍

体積に比べて有意に減少していた。以上より、*in vivo* において DHMEQ+CPT-11 併用治療は KU19-19 膀胱腫瘍モデルにおいて単剤の治療より有意に抗腫瘍効果を認めた（下図）。



摘出組織内においては DHMEQ+CPT-11 併用治療群において有意に単独治療群に比べて CD31 の発現の減少、MMP-9 の減少、アポトーシスの誘導が確認された。

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）

Kodaira K, Kikuchi E, Kosugi M, Horiguchi Y, Matsumoto K, Kanai K, Suzuki E, Miyajima A, Nakagawa K, Tachibana M, Umezawa K, Oya M. Potent cytotoxic effect of a novel nuclear factor- κ B inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin on human bladder cancer cells producing various cytokines. *Urology* 査読有り 75: 2010, 805-812

〔学会発表〕（計 6 件）

(1) 鈴木絵里子、菊地栄次、堀口裕、大家基嗣、梅澤一夫. 高悪性度膀胱癌細胞の増殖・生存における転写因子 AP-1 および NF- κ B の抗癌剤治療抵抗性への関与. 第 14 回がん分子標的治療研究会総会・ワークショップ, 東京, 2010. 7. 7

(2) 菊地栄次、大家基嗣. 膀胱癌に対する新規 NF- κ B 活性阻害剤を併用した抗癌治療戦略の確立. 第 98 回日本泌尿器科学会総会・ヤングリサーチグラント受賞者記念講演, 盛岡, 2010. 4. 27

(3) 菊地栄次、堀口裕、宮嶋哲、梅澤一夫、大家基嗣. 前立腺癌における新規 NF- κ B 活性阻害剤 DHMEQ による放射線感受性増強効果. 第 13 回がん分子標的治療研究会総会, 徳島, 2009. 6. 26

(4) 菊地栄次、宮嶋哲、山崎恵一、堀口裕、中川健、中島淳、橘政昭、梅澤一夫、大家基嗣. 膀胱癌に対する新規 NF- κ B 阻害剤を用いた CPT-11 の抗癌作用増強. 第 18 回泌尿

器科分子・細胞研究会, 鹿児島, 2009. 2. 13
(5) 菊地栄次、堀口裕、宮嶋哲、中島淳、梅澤一夫、中川健、大家基嗣. 膀胱癌における新規 NF- κ B 活性阻害剤を用いた CPT-11 の抗癌治療の増強. 第 12 回がん分子標的治療研究会総会, 東京, 2008. 6. 26

(6) 菊地栄次、中島淳、堀口裕、宮嶋哲、中川健、大東貴志、山崎恵一、梅澤一夫、大家基嗣. 膀胱癌における新規 NF- κ B 活性阻害剤を用いた CPT-11 の抗癌作用増強の検討. 第 96 回日本泌尿器科学会総会, 横浜, 2008. 4. 25

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・講師
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

(3) 連携研究者

なし