

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592349

研究課題名(和文) 転写因子を制御した新規尿路上皮癌治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of the novel treatment strategy against urothelial carcinoma controlling for the transcription factors

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：以下の5つの結果を得た。

1. E-, P-cadherinの腎盂尿管癌の臨床病理因子との関連、Snailが予後因子であることを同定した。2. CDDP抗癌剤耐性株であるT24PRにおいてPI3K-Akt-mTORの亢進、NVP-BEZ235の投与によりPI3K-Akt-mTORの抑制、殺細胞効果が検証された。3. ニコチン暴露によりpAktの上昇、T24膀胱癌細胞増殖が誘導された。4. DHMEQはT24PR細胞において、NF-kappaBを抑制し、細胞・腫瘍増殖を抑制した。5. T24PR細胞においてDHMEQとPaclitaxelとの併用で有意な抗腫瘍効果が確認された。

研究成果の概要(英文)：The following five results were obtained.(1)We identified that the close association between E-, P-cadherin expression and clinico-pathological features and that Snail expression is an independent prognostic factor.(2)In CDDP-resistant cell line; T24PR, we confirmed that PI3K-Akt-mTOR signal was elevated and NVP-BEZ235 could inhibit the PI3K-Akt-mTOR signal and induce the cytotoxic effect. (3)By nicotine exposure, the pAkt was activated and cell viability and tumor growth increased in T24 cells. (4)In the T24PR cell, DHMEQ which is a novel NF-kappaB inhibitor could inhibit the activation of NF-kappaB, the cell viability, and tumor growth.(5)In the T24PR cell, significant anticancer efficacy was observed in the combination of DHMEQ with Paclitaxel.

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：尿路上皮癌 抗癌剤 シグナル伝達 喫煙

1. 研究開始当初の背景

転移性、再発性尿路上皮癌は予後不良である。また局所浸潤癌においても外科的切除を含めた、化学・放射線療法併用の集学的治療で、すべてが根治には至らず、転移・浸潤のメカニズムの解明、治療標的の同定、新規バイオマーカーの発見、新たな治療法の開発は我々に課せられた急務の課題である。

研究者が NF- κ B、AP-1 を含めた転写活性と尿路上皮癌研究に着目するに至った経緯は平成 19-21 年度科学研究費補助金 (基盤研究 C (一般)) 研究課題名: 「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」において、新規 NF- κ B 活性阻害剤: dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) を用いた検討から、NF- κ B を含めた癌関連転写因子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たからである。恒常的な NF- κ B 活性上昇を示す膀胱癌細胞においては DHMEQ 単剤にて細胞障害効果、アポトーシス誘導作用、サイトカイン産生抑制、in vivo 抗腫瘍効果を持つことが確認された (Kodaira et al, Urology, 2010)。しかしながら尿路上皮癌で NF- κ B の活性亢進が認められない症例や、NF- κ B 活性阻害に反応しない癌細胞も存在し、より強力に根治性の高い癌治療の改良が必要との見解に至った。

2. 研究の目的

転写活性因子の尿路上皮癌における癌進展への役割、転写活性阻害効果のさらなる改良へ向けた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立案した。

(1) 尿路上皮癌における NF- κ B、AP-1 転写活性の臨床的意義解明

尿路上皮癌における NF- κ B、AP-1 転写活性は臨床どのような意義があるのか、その詳細はほとんど検討されていない。他癌腫においてはこれらの転写因子の発現は予後不良因子と考えられているが、urothelial carcinoma という組織系においてこれら転写因子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の検証は非常に重要と考える。尿路上皮癌における NF- κ B、AP-1 転写因子の発現の頻度、臨床所見との関連、予後解析を臨床検体を用いて行うことを目的とした。

(2) 尿路上皮癌モデルにおける AP-1 阻害の治療効果検証

我々は NF- κ B に関して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 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 (Kikuchi E et al, Cancer Res, 2003; Kukoda K et al, Clin

Cancer Res, 2005; Kodaira K et al, Urology, 2010)。新たな分子化合物で AP-1 の活性を抑制する DTCM が当大学理工学部で開発・合成され、その治療効果の可能性に期待がもたれている。DTCM を用いて尿路上皮癌の治療効果検証を目的とした。

(3) 喫煙による転写活性亢進機序解明と関連因子の網羅解析

喫煙者は非喫煙者の約 4 から 5 倍膀胱癌発症のリスクが高く、膀胱癌の 30% から 40% は喫煙が原因で発生していると推測されている。膀胱癌とタバコの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、ニコチン曝露による膀胱癌増殖のメカニズムの検討を目的とした。

(4) 抗癌剤耐性制御における転写因子の役割の解明

転写因子は各種の化学療法により活性化され、抗癌剤の治療抵抗性獲得の機序の一つとして問題となっている。再発性、転移性膀胱癌で使用されている各種抗癌剤での詳細な転写因子の活性化の検討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 NF- κ B 活性能の変化に注目し、抗癌剤抵抗性の機序を解明することを目的とした。

(5) NF- κ B、AP-1 転写活性 dual 阻害による治療効果増強の検討

研究者は今まで NF- κ B に注目し、泌尿器科癌の進展のメカニズム、NF- κ B 阻害剤の治療効果検証を続けてきた。特に DHMEQ は強力かつ、ユニークな NF- κ B 阻害剤であると同時に副作用発現をほとんど認めない分子標的薬である。しかし一部の癌細胞においては DHMEQ 単剤だけでは十分な殺細胞効果を認めていない。癌細胞の中で NF- κ B だけが転写因子として活性化しているわけではない。転写因子として非常に重要な働きを持つ AP-1 を同時に制御し、その治療効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 尿路上皮癌における転写活性・接着・EMT 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 NF- κ B は p65 抗体を、AP-1 はその構成因子である c-Fos 抗体を用いて免疫染色を行った。中間解析の結果、p65 抗体による NF- κ B 検討においては使用した抗体でうまく染色がいかず、c-Fos 抗体を用いた検討では、臨床所見との相関が見出せなかった。そこで、尿路上皮癌の進展に重要な因子と考えられた接着因子の Cadherin、EMT 関連因子の Snail と臨床所見

との関連を免疫染色法にて検討した。

臨床病理組織データと E-, N-, P-cadherin ならびに Snail 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關与するかを検証した。

(2) 抗癌剤耐性株における PI3K-Akt-mTOR シグナルの変化

KU-1、KU-7、T24 膀胱癌細胞における恒常的 AP-1 活性が確認されたが、DTCM の細胞障害効果を WST アッセイによる吸光度測定法にて検討したが、これらの細胞に対して DTCM が十分な細胞増殖抑制効果を認めなかった。そこで PI3K-Akt-mTOR 経路に注目し抗癌剤耐性を獲得した尿路上皮癌細胞におけるこれらの活性亢進の有無を検証した。

我々は、膀胱癌細胞株 T24 ならびに 5637 を 6 ヶ月間 CDDP で長期暴露し作成した CDDP 耐性 T24 細胞 (T24PR) ならびに 5637 細胞 (5637PR) を樹立した。これらの細胞を通常の T24 細胞 (T24N) と 5637 細胞 (5637N) と比較し、PI3K-Akt-mTOR シグナルの違い、mTOR complex1/2 阻害剤である NVP-BE235 による殺細胞障害効果の有無を検討した。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 阻害剤を使用した。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、mTOR 阻害剤抵抗性に關与するとされている。

(3) 喫煙による転写活性亢進機序解明と関連因子の網羅解析

膀胱癌細胞株 T24 を用いて in vitro にニコチン曝露を行った。ニコチンの曝露は 1 μ M から 10 μ M とし、曝露時間は 24 時間で行った。24 時間後、Western blot 法を用いて Akt、ERK1/2 の蛋白発現の変化を確認した。

次いで膀胱癌細胞株 T24 に対し in vitro に 0 μ M から 50 μ M のニコチン曝露を行った際の細胞増殖の変化を WST assay を使用した吸光度測定法にて検討した。

さらにニコチンによる増殖促進能を in vivo で検証した。BALB/c ノードマウスを用いて 2 \times 10⁶/ml の T24 細胞を皮下に移植しニコチン 1mg/kg を週 3 回腹腔内投与した。

(4) 抗癌剤耐性制御における転写因子の役割の解明

T24PR 細胞を用いて、抗癌剤耐性制御における NF- κ B 経路亢進の有無をゲルシフトアッセイにて検証した。また 10 μ g/mL の DHMEQ 投与により NF- κ B 経路の変化を検討した。

次いで T24N ならびに T24PR 細胞に対し in vitro に各種濃度の DHMEQ を 48 時間暴露した際の細胞増殖の変化を WST assay を使用した吸光度測定法にて検討した。

In vivo の検討において、BALB/c ノードマウスを用いて 2 \times 10⁶/ml の T24PR 細胞を皮下

に移植し 2mg/kg の DHMEQ を連日腹腔内投与し NF- κ B 活性抑制による抗癌剤耐性細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。

(5) NF- κ B 阻害剤と抗癌剤併用による治療効果増強の検討

NF- κ B 阻害剤である DHMEQ と AP-1 阻害剤の DTCM との併用による治療効果増強を計画していたが、膀胱癌に対して DTCM 単剤での十分な細胞増殖抑制効果を認めなかったことより、DHMEQ と抗癌剤との併用治療検証を行った。T24PR 細胞を用いて DHMEQ (0 から 0.3 μ g/ml) と Paclitaxel (0 から 300nM) との併用による殺細胞効果を WST アッセイによる吸光度測定法にて検討した。また T24PR 皮下腫瘍モデルを用いて、DHMEQ を 2mg/kg 連日腹腔内投与し Paclitaxel を day7、day14 の 2 回腹腔内投与を行い、併用療法による抗腫瘍効果増強の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) 尿路上皮癌における転写活性・接着・EMT 関連因子の臨床的意義の解明

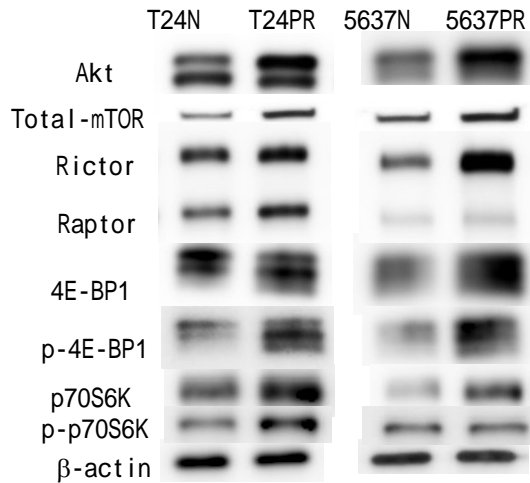
腎尿管腫瘍に対し手術療法を施行した 212 例において E-, P-, N-cadherin の発現様式の異常はそれぞれ 70.2%、19.5%、21.7% の症例に認められた。E-cadherin 低発現は pT2 以上 (p=0.001)、Grade 3 (p=0.019)、壁内脈管侵襲陽性 (p<0.001) 症例に多く、P-cadherin 高発現は pT2 以上 (p=0.037) 腫瘍に多く認められたが、N-cadherin の発現異常と臨床病理学的因子との関連は認めなかった。単変量解析では E-cadherin の低発現症例 (p=0.019) と P-cadherin の高発現症例 (p=0.028) において腫瘍再発を多く認めた。

また腎尿管腫瘍に対し手術療法を施行した 184 例において、Snail の発現は高 Grade、高 Stage、壁内脈管侵襲陽性例において有意に高かった。5 年癌特異的生存率は Snail 高発現群で 58.5% に対して低発現群では 85.9% であり有意に Snail 高発現群で予後不良であった。多変量解析では、Snail 高発現は Grade、壁内脈管侵襲と共に独立した予後予測因子であった。

(2) 抗癌剤耐性株における PI3K-Akt-mTOR シグナルの変化

Akt、mTOR、Rictor (mTOR complex2) および mTOR complex1 の下流の蛋白発現を Western blot 法にて検討したところ、T24PR 細胞において T24N 細胞と比較し Akt、Rictor、Raptor の亢進、4E-BP1 ならびに p70S6K のリン酸化の亢進を認めた。5637PR 細胞において 5637N 細胞と比較して Akt、Rictor の亢進、4E-BP1 のリン酸化の亢進を認めた (図 1)。以上より通常膀胱癌細胞株と比べて CDDP 耐性膀胱癌細胞株においては PI3K-Akt-mTOR シグナルが亢進していることが確認された。

図 1.



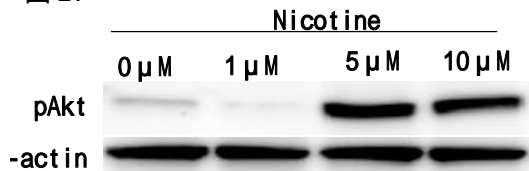
次いで T24N、T24PR 膀胱癌細胞株に NVP-BEZ235 を暴露し、PI3K-Akt-mTOR シグナルの抑制の有無を検証し、殺細胞障害効果を WST assay を用いた吸光度測定法にて確認した。NVP-BEZ235 暴露により濃度依存性に T24N、T24PR 細胞において mTOR、PTEN、pAkt 発現の抑制が確認された。また T24N、T24PR 細胞ともに NVP-BEZ235 暴露により濃度依存性に細胞増殖抑制が確認された。

以上より、mTOR complex1/2 阻害剤である NVP-BEZ235 は通常膀胱癌細胞株のみならず CDDP 耐性株においても PI3K-Akt-mTOR シグナルを抑制し、殺細胞効果を示すことが検証された。

(3) 喫煙による転写活性亢進機序解明と関連因子の網羅解析

Total Akt、total ERK1/2 には変化を認めなかったが、5 μM および 10 μM のニコチン暴露において Akt のリン酸化 (pAkt) の上昇が確認された (図 2)。

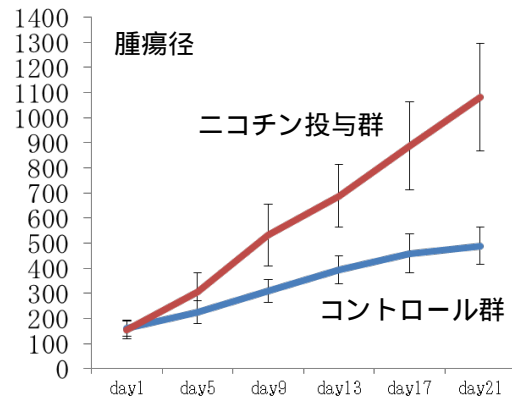
図 2.



次いでニコチン暴露による細胞増殖の変化を検討したが、ニコチン非暴露群 (コントロール群) と比較して、5 μM から 10 μM のニコチン暴露群において有意に T24 細胞の増殖能の亢進が確認された。

さらに膀胱癌皮下移植モデルにおいて、ニコチン非投与群 (コントロール群) に比べて有意にニコチン投与群で腫瘍サイズの増大が確認された (図 3)。

図 3.



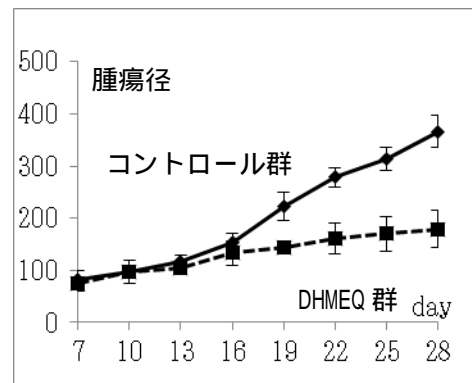
(4) 抗癌剤耐性制御における転写因子の役割の解明

ゲルシフトアッセイにおいて T24PR 細胞において NF-κB 活性が強く確認されたが、T24N 細胞では NF-κB 活性は弱かった。また T24PR 細胞において 10 μg/mL の DHMEQ により 2 から 6 時間で NF-κB 活性が消失したが、8 時間後には NF-κB 活性が再び確認された。

さらに T24N ならびに T24PR 細胞ともに濃度依存性に細胞増殖抑制が認められたが、T24PR 細胞の IC50 は 6.9 μg/ml で、有意に T24N 細胞 (17.3 μg/ml) と比較し低値であった。

T24PR 皮下腫瘍モデルに 2mg/kg の DHMEQ を連日腹腔内投与し、抗腫瘍効果を確認した。DHMEQ 投与群ではコントロール群に比べ、有意な腫瘍サイズの増殖抑制が確認された (図 4)。

図 4.



(5) NF-κB 阻害剤と抗癌剤併用による治療効果増強の検討

T24PR 細胞において DHMEQ と Paclitaxel との併用効果を検討したが、combination index は 0.87 でその併用治療効果は相加的であった。

T24PR を用いた皮下腫瘍モデルにおいて、腫瘍移植後 28 日目の腫瘍径は、無治療群 (486.3±25.3cm³)、Paclitaxel 単独治療群

(403.8±36.3cm³)、DHMEQ 単独治療群 (248.7±18.1 cm³)、併用治療群 (160.8±20.3 cm³)であった。併用群の腫瘍増殖は Paclitaxel 単独治療群、DHMEQ 単独治療群に比べて有意に低下していた。以上より CDDP 抵抗性膀胱癌において DHMEQ および Paclitaxel 併用治療は有用な治療法になりうると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 菊地栄次、萩原正幸、田中伸之、井手広樹、松本一宏、宮嶋哲、中川健、増田毅、中村聡、大家基嗣、手術治療が施行された上部尿路上皮癌において喫煙歴の有無が膀胱内再発に及ぼす影響、第 51 回日本癌治療学会学術集会、2013/10/24-26、国立京都国際会館(京都府)
- (2) 弓削和之、菊地栄次、萩原正幸、安水洋太、小坂威雄、宮嶋哲、大家基嗣、尿路上皮癌におけるニコチンの腫瘍増大に対する影響の検討、第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2013/6/12-14、国立京都国際会館(京都府)
- (3) 弓削和之、菊地栄次、萩原広一郎、萩原正幸、田中伸之、宮嶋哲、中川健、大家基嗣、筋層非浸潤性膀胱癌患者の喫煙と膀胱内再発の関連についての検討、第 77 回日本泌尿器科学会東部総会、2012/10/17-19、東京ドームホテル(東京都)
- (4) 小坂威雄、菊地栄次、三上修治、宮嶋哲、城武卓、前田高宏、岡田保典、大家基嗣、尿路上皮癌における SNAIL の発現と、微小環境における EMT 制御機構の解明、第 21 回泌尿器分子・細胞研究会、2012/2/10-11、北海道大学医学部友会館(北海道)
- (5) 前田高宏、菊地栄次、小坂威雄、篠田和伸、香野日高、水野隆一、長田浩彦、浅沼宏、宮嶋哲、大家基嗣、上部尿路腫瘍における cadherin の発現の意義、第 49 回日本癌治療学会総会、2011/10/27-29、名古屋国際会議場(愛知県)

〔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

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

大家 基嗣 (Oya Mototsugu)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：00213885

宮嶋 哲 (Miyajima Akira)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：90245572

田中 伸之 (Tanaka Nobuyuki)
慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)
研究者番号：60445244