

喫煙による膀胱癌の再発・進展の機序解明

慶應義塾大学医学部 泌尿器科学教室

専任講師 菊地 栄次

(共同研究者)

慶應義塾大学医学部 泌尿器科学教室 准教授 宮嶋 哲

はじめに

60年以上前から喫煙は尿路上皮癌（膀胱癌および上部尿路上皮癌（UTUC））発生の最も重要な原因の一つと言われている。最近の報告では喫煙者は非喫煙者と比較して約4倍の膀胱癌発生リスクがあるとされている⁽¹⁾。一方で、尿路上皮癌患者の喫煙が予後にどのように影響を与えるかははっきりしていない。最近、喫煙歴が膀胱癌の発生だけでなく、予後に影響を与えるとの報告が散見されるようになった⁽²⁻⁵⁾。Lammersらは筋層非浸潤性膀胱癌患者において喫煙者及び禁煙者は非喫煙者と比較して経尿道的手術後の再発率が高いと報告している⁽⁶⁾。また萩原らは喫煙歴がUTUCにおいて手術後の再発に関連があると報告している⁽⁷⁾。これらの研究結果から、喫煙が尿路上皮癌に対し、腫瘍増殖促進・血管新生誘導に働くと推察される。しかしながら喫煙が尿路上皮癌に対し腫瘍増悪にどのように関与しているかの詳細ははっきりしていない。

我々は、タバコに含まれるニコチンに注目し、膀胱癌細胞に与えるニコチンの影響について検討した。ニコチンの生物学的な働きは細胞表面に発現するニコチン性アセチルコリンレセプター（nAChR）を介して行われる。nAChRは体内では特に神経細胞・筋細胞に多く発現しているが、様々な癌細胞にも発現していると報告されている⁽⁸⁻¹²⁾。肺癌・口腔癌・乳癌などの細胞株を用いた研究ではニコチンはnAChRを介し、様々なシグナル伝達系の変化を生じさせると報告されている。またPI3K/Akt/mTOR経路は癌細胞において非常に重要な経路であり、その活性上昇は腫瘍形成・増大や治療抵抗性と関連があるとされている。膀胱癌領域において、膀胱癌細胞におけるシグナル伝達経路、特にPI3K/Akt/mTOR経路とニコチンとの関連についての研究はほとんどない。

今回、我々は①ニコチンの腫瘍増殖能の有無、②膀胱癌細胞株においてニコチンがPI3K/Akt/mTOR経路に及ぼす影響、③ニコチンによる腫瘍増殖能の変化に対するPI3K/Akt/mTOR阻害剤の効果につき基礎的研究を行った。

結 果

1) ニコチンによる膀胱癌細胞株T24の細胞増殖能の検討

ニコチン曝露（0-10 μ M、24時間）が、膀胱癌細胞の細胞増殖にどのように影響を与えるかをWST-1 assayを用いて検討した。5-10 μ Mの濃度のニコチン曝露下の細胞増殖はニコチン非曝露下と比較して有意に高かった（図1）。

図 1

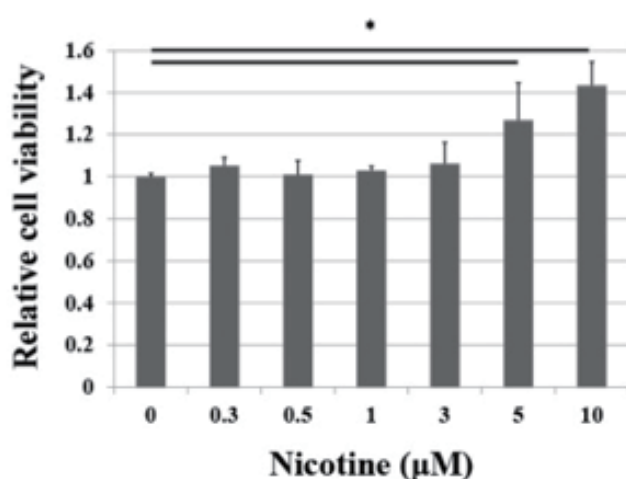
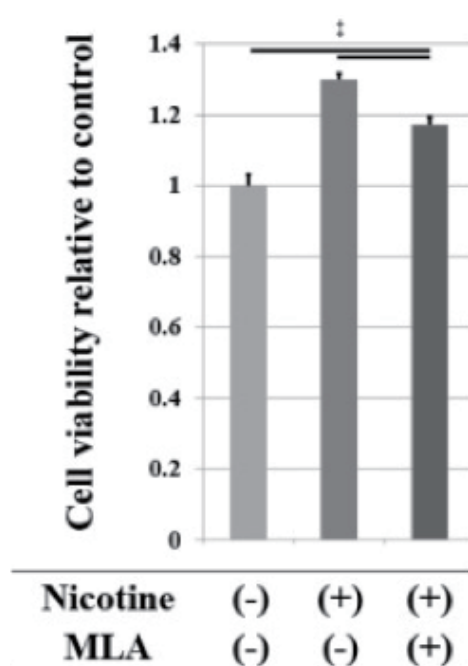


図 2



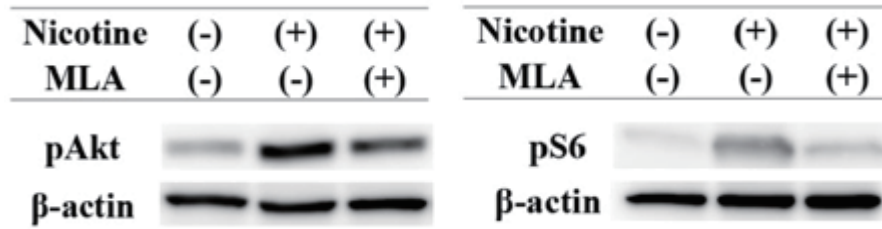
2) ニコチンとnAChRとの関連

nAChRには複数のサブタイプがあり、我々は $\alpha 7$ サブユニットに着目し、そのアンタゴニスト methyllycaconitine (MLA)を用いて、ニコチンによるリセプター阻害の影響を検討した。10 μ Mのニコチンと共に100 μ MのMLAを同時に投与したところ、ニコチン単独投与と比較して有意な細胞増殖抑制が確認された（図2）。

3) ニコチン曝露によるPI3K/Akt/mTOR経路への影響

Western Blot法を用いてAktのリン酸化（pAkt）およびp70 S6のリン酸化（pS6）の発現を検討した。10 μ Mのニコチン曝露にてコントロール群と比較し有意なpAkt/pS6の上昇を認めた（図3）。一方、100 μ MのMLAの同時投与により、ニコチン単独投与群と比較してpAkt/pS6の発現は有意に抑えられたが、完全な抑制は確認されなかった。

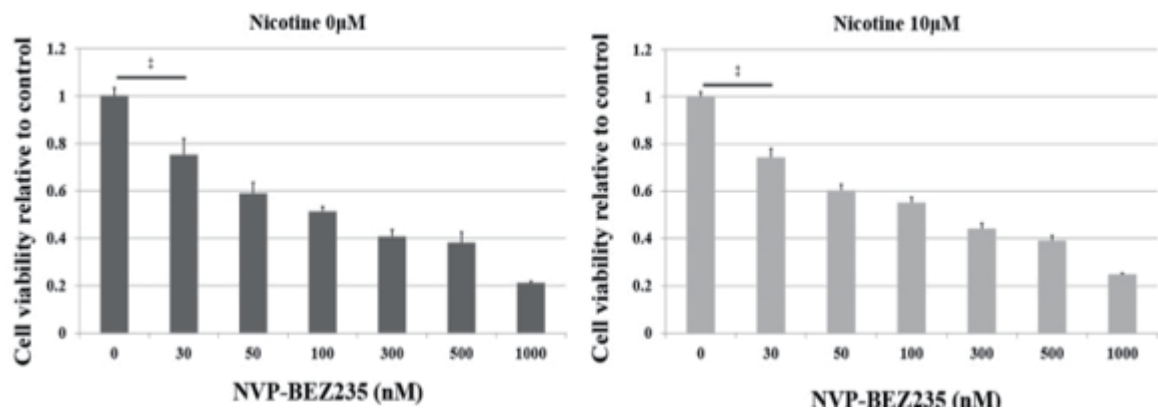
図 3



4) ニコチン曝露下におけるPI3K/mTOR阻害薬の効果

T24細胞株におけるPI3K/mTOR dual阻害薬であるNVP-BEZ235の細胞増殖への効果（0-1000nM）をニコチン非曝露下、および10 μ Mのニコチン曝露下で検討した。ともにPI3K/mTOR dual阻害薬の濃度依存性に細胞増殖抑制効果が確認された（図4）。

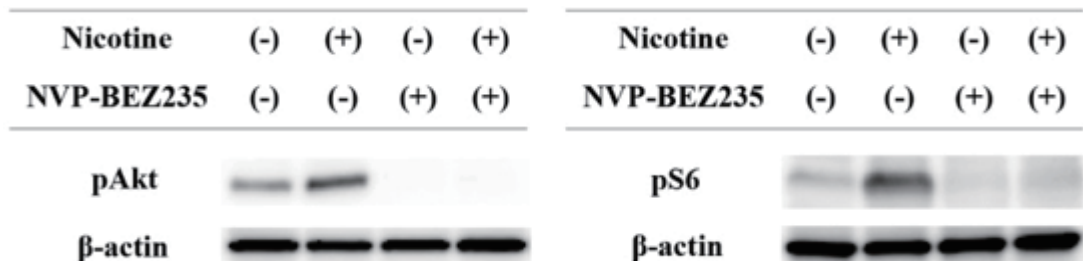
図 4



5) NVP-BEZ235投与時におけるPI3K/Akt/mTOR経路への影響

ニコチン非曝露細胞、ニコチン曝露細胞ともにNVP-BEZ235の投与によりpAkt/pS6の発現は有意に抑制された（図5）。

図 5



6) In vivoにおけるニコチンとNVP-BEZ235の影響・効果の検討

生後6週のBALB/c ノードマウスを用いて、T24細胞株による皮下腫瘍モデルを作成した。皮下腫瘍体積が約150 mm³になった時点で、薬剤の投与を開始した。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経口投与した。ニコチン投与群で21日目の腫瘍体積は平均929.1 ± 180.2 mm³であり、コントロール群の470.3 ± 73.4 mm³と比較して有意に増大を認めた（図6）。NVP-BEZ235単独投与群の腫瘍体積は282.0 ± 22.6 mm³とコントロール群と比較して有意に縮小していた。ニコチンとNVP-BEZ235同時投与群の腫瘍体積は295.4 ± 101.4 mm³とニコチン投与群と比較して有意に縮小していた。摘出した腫瘍切片の免疫組織学的検討においてニコチン投与群はコントロールと比較して有意にpS6の発現が上昇しており、NVP-BEZ235投与群ではニコチン投与の有無に関わらず、pS6の発現の有意な低下が確認された（図7）。

図6

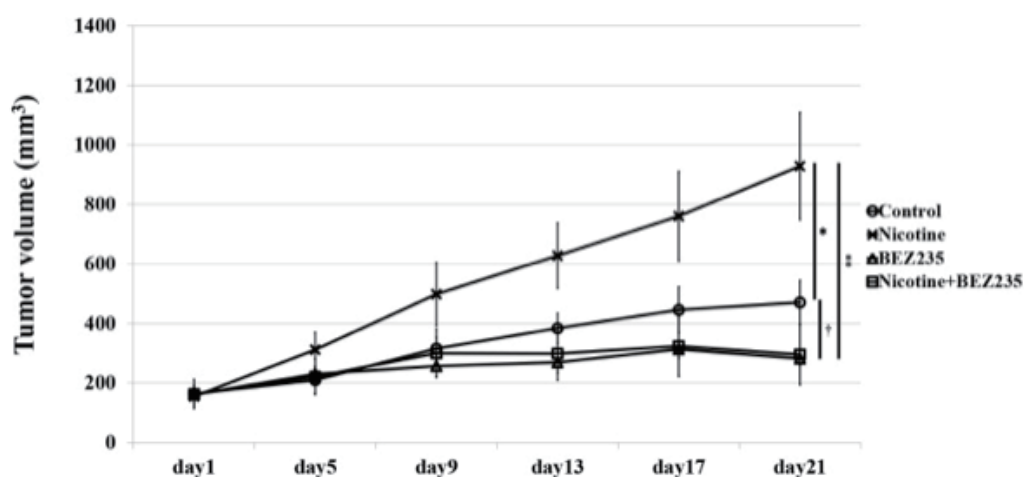
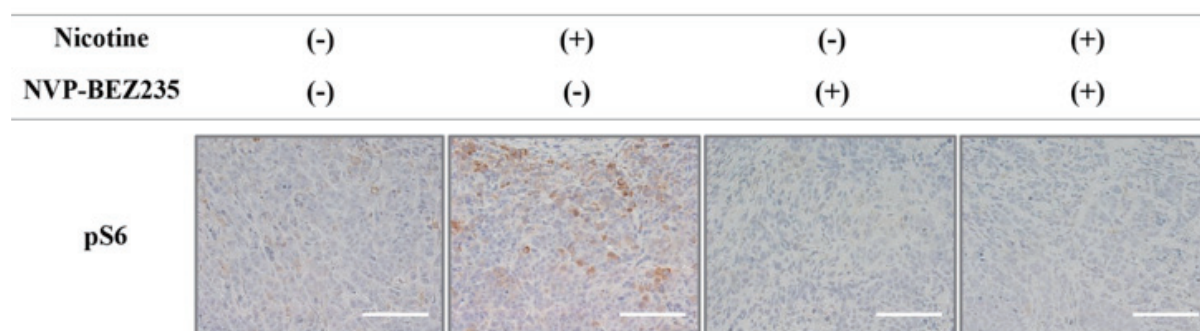


図7



考 察

最近の研究によると、喫煙歴は腫瘍発生のみならず、腫瘍進展のリスク因子であるとの報告がされている。Rinkらは膀胱全摘症例において喫煙期間と喫煙量が治療後の予後に関連があると報告している⁽¹³⁾。しかしながら喫煙の予後悪化への影響の基礎的背景は十分には解明されていないのが現状である。そこで我々は喫煙、特にニコチンに着目し、ニコチン曝露が膀胱癌細胞株に与える影響を詳細に検討した。WST-1 assayの結果から膀胱癌細胞にニコチンを曝露すると細胞増殖が確認された。これよりニコチン曝露は腫瘍細胞の増殖能を促進することが示唆された。その効果は5 μ M以上のニコチン濃度で有意に確認できた。今までの報告によると、喫煙後のニコチンの血中濃度は10-100 μ Mであることより⁽¹⁴⁻¹⁵⁾、生体内でも同様にニコチンによる癌細胞増殖が促進されている可能性が示唆される。また、nAChRの1つのサブユニットである $\alpha 7$ サブユニットを阻害し細胞増殖抑制を認めたことより、ニコチンによる細胞増殖能獲得はnAChRを介していると考えられる。またpAkt/pS6の活性上昇が確認され、ニコチンはPI3K/Akt/mTOR経路を介して細胞増殖能に影響を及ぼしていることも確認された。

そのため、ニコチンによる膀胱癌細胞の増殖促進に対してPI3K/Akt/mTOR経路の直接阻害は有効と考えた。我々はPI3k/mTOR dual阻害薬であるNVP-BEZ235を用いてその経路を阻害した。NVP-BEZ235は未処理の腫瘍細胞に対し殺細胞効果を認め、その効果はニコチン曝露下の細胞においても同様であった。またニコチンによって上昇したpAkt/pS6の活性についても、NVP-BEZ235によりその活性上昇は抑制された。マウス皮下腫瘍モデルを用いたin vivoの検討において、ニコチンは腫瘍増殖促進に働きNVP-BEZ235の投与により、その腫瘍増殖は有意に抑制された。免疫組織学的所見においてはニコチン投与下においてもNVP-BEZ235の投与により有意なpS6の発現抑制が確認された。

以上の結果から、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。NVP-BEZ235に代表されるPI3K/Akt/mTOR経路を直接阻害する薬剤は、喫煙歴を有する予後不良が想定される尿路上皮癌症例に対して、新たな治療戦略のひとつとなりえることが推察された。

要 約

喫煙は尿路上皮癌の発生リスク因子であるのみならず、腫瘍再発・進展に強く関わっているといわれている。しかし、そのメカニズムの詳細はほとんど解明されていない。我々はニコチンが腫瘍増殖に与える影響の有無を評価した。膀胱癌細胞株T24を用いてニコチン曝露を行ったところ、T24の細胞増殖は有意に上昇し、pAkt/pS6の活性上昇を認めた。ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha 7$ サブタイプの阻害あるいはPI3K/mTOR dual 阻害薬(NVP-BEZ235)により、ニコチン曝露下の細胞増殖に対してその抑制効果、活性化したpAkt/pS6の抑制を認めた。マウス皮下腫瘍モデルを用いたin vivo実験系においては、ニコチン投与に

より膀胱癌移植により生じた腫瘍体積の有意な増大が認められ、NVP-BEZ235投与はニコチン投与の有無に関わらず腫瘍縮小効果を示した。腫瘍の免疫組織学的検討においてpS6の発現はニコチン投与群でその発現の上昇、NVP-BEZ235投与群で発現の抑制が確認された。喫煙歴を有する尿路上皮癌症例に対してPI3K/Akt/mTOR経路阻害は新たな治療戦略のひとつとなりえると推察された。

文 献

1. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 306:737-45,2011.
2. Chen CH, Shun CT, Huang KH, Huang CY, Tsai YC, Yu HJ, et al. Stopping smoking might reduce tumour recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer. *BJU Int* 100:281-6,2007.
3. Fleshner N, Garland J, Moadel A, Herr H, Ostroff J, Trambert R, et al. Influence of smoking status on the disease-related outcomes of patients with tobacco-associated superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 86:2337-45,1999.
4. Oya M, Kikuchi E. Evidenced-based clinical practice guideline for upper tract urothelial carcinoma (summary - Japanese Urological Association, 2014 edition) . *Int J Urol* 22:3-13,2015.
5. Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van Den Brandt PA. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer* 89:630-9,2000.
6. Lammers RJ, Witjes WP, Hendricksen K, Caris CT, Janzing-Pastors MH, Witjes JA. Smoking status is a risk factor for recurrence after transurethral resection of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 60:713-20,2011.
7. Hagiwara M, Kikuchi E, Tanaka N, Matsumoto K, Ide H, Miyajima A, et al. Impact of smoking status on bladder tumor recurrence after radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma. *J Urol* 189:2062-8,2013.
8. Arredondo J, Chernyavsky AI, Grando SA. Nicotinic receptors mediate tumorigenic action of tobacco-derived nitrosamines on immortalized oral epithelial cells. *Cancer Biol Ther* 5:511-7,2006.
9. Laag E, Majidi M, Cekanova M, Masi T, Takahashi T, Schuller HM. NNK activates ERK1/2 and CREB/ATF-1 via beta-1-AR and EGFR signaling in human lung adenocarcinoma and small airway epithelial cells. *Int J Cancer* 119:1547-52,2006.
10. Schuller HM, Plummer HK, 3rd, Jull BA. Receptor-mediated effects of nicotine and its nitrosated derivative NNK on pulmonary neuroendocrine cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 270:51-8,2003.
11. Minna JD. Nicotine exposure and bronchial epithelial cell nicotinic acetylcholine receptor

- expression in the pathogenesis of lung cancer. *J Clin Invest* 111:31-3,2003.
12. Shin VY, Wu WK, Chu KM, Wong HP, Lam EK, Tai EK, et al. Nicotine induces cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 in association with tumor-associated invasion and angiogenesis in gastric cancer. *Mol Cancer Res* 3:607-15,2005.
 13. Rink M, Zabor EC, Furberg H, Xylinas E, Ehdaie B, Novara G, et al. Impact of smoking and smoking cessation on outcomes in bladder cancer patients treated with radical cystectomy. *Eur Urol* 64:456-64,2013.
 14. Armitage AK, Dollery CT, George CF, Houseman TH, Lewis PJ, Turner DM. Absorption and metabolism of nicotine from cigarettes. *Br Med J* 4:313-6,1975.
 15. Russell MA, Jarvis M, Iyer R, Feyerabend C. Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *Br Med J* 280:972-6,1980.