

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11292

研究課題名(和文) mTOR阻害に着目した老化防止と健康寿命延長につながる新規口腔癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new oral cancer treatments focused on mTOR inhibition leading to the anti-aging prevention and the healthy life-span extension

研究代表者

原田 耕志 (HARADA, Koji)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60253217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムスの何れかと、5-FU、CDDP、DOC、PTX、C-mab、RTの何れかとの併用効果の検索では、in vitroおよびin vivoにおいて、ラパマイシンと5-FUとの併用効果が最も高く、この際細胞老化促進につながるp16の発現は減弱し、生存シグナルであるPI3KおよびAktの発現は増強し、細胞周期を停止させるp27、p21の発現は増強し、さらに、血管新生に関わるVEGFとリンパ管新生に関わるpodoplaninは共に発現減弱したことから、ラパマイシンと5-FUとの併用療法は、老化防止ならびに健康寿命延長につながる治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the combined effect one of mTOR inhibitors (rapamycin, everolimus or temsirolimus) and any of conventional anticancer agents (5-FU, CDDP, DOC, PTX, C-mab or radiation). Rapamycin in combination with 5-FU exerted maximum growth inhibitory effects on OSCC cell lines and nude mice tumors. Immunohistochemical staining showed that the expressions of p16, VEGF and podoplanin were down-regulated, and the expressions of PI3K, Akt, p27, and p21 were up-regulated on nude mice tumors treated with rapamycin and 5-FU. These findings suggested that the combined therapy of rapamycin and 5-FU might be an new oral cancer treatments focused on mTOR inhibition leading to the anti-aging prevention and the healthy life-span extension.

研究分野：口腔外科学

キーワード：mTOR阻害剤 ラパマイシン 5-FU 老化防止 健康寿命延長 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

補助化学療法を受けた乳癌患者の末梢血T細胞の老化関連マーカーを測定すると、細胞老化に関わるp16^{INK4a}およびARF遺伝子発現と老化関連サイトカイン(VEGFAとMCP1)の増加が認められ、その程度が細胞老化10~15年間の促進に相当すると報告された(J Natl Cancer Inst. 2014; 106: dju057)。口腔癌治療によっても同様に口腔癌患者の老化を促進させている可能性は否めない。近年、医療費や介護費を減らすことから、平均寿命より健康寿命を延ばすことはもちろん、両者の差を縮めることの重要性が強調されるようになった。ただし、ケースによってはインテンシブな癌治療は平均寿命と健康寿命の差を広げているのかも知れない。これまで我々は、口腔癌に対する化学放射線療法を主体とした機能温存療法の開発(Cancer Lett. 2005; 226: 161)、フッ化ピリミジン系抗癌剤をベースとした化学療法レジメンの検討(Int J Oncol. 2013; 43: 271)、抗癌剤ならびに分子標的薬併用による効果増強機構の解明(Int J Oncol. 2014; 45: 2439)など、主に細胞障害性薬剤を用いて治療効果の向上を目指してきた。しかしながら、世代別(年齢別)の癌治療戦略の開発が望まれる今、高齢者や超高齢者に多く発症する口腔癌に対する治療戦略としては、インテンシブな治療法だけでなく、老化の進行を抑制でき、健康寿命を延長できるような治療法の開発が重要である。

臓器移植時に用いられる免疫抑制剤のラパマイシンには、寿命延長効果と抗癌効果を発現できる可能性がある。すなわち、生後600日のマウス(人間では60歳に相当)にラパマイシンを投与すると、通常に比べて雌は平均で13%、雄は9%長生きできたとの報告(Nature. 2009; 460: 392)や、ラパマイシンが、mammalian Target of Rapamycin (mTOR)に結合し、mTORの機能を抑制することにより、癌細胞の増殖を抑制し、apoptosisを引き起こすという報告(Curr Opin Pharmacol. 2003; 3: 371)がなされた。また、口腔癌を含む頭頸部扁平上皮癌の80%以上でAkt/mTORシグナル伝達系の活性が亢進していること(Expert Opin Ther Targets. 2011; 15: 63)、mTORの一種であるmTOR複合体1(mTORC1)はリンパ管新生を促進し、リンパ節転移を促進すること(Nat Genet. 2009; 41: 544)などから、mTOR阻害剤であるラパマイシンやその誘導体(テムシロリムス、エベロリムス)には、口腔癌に対する増殖・転移抑制効果が十分に期待できる。さらに口腔癌では癌治療に抵抗性を示す癌抑制遺伝子p53の変異が高頻度で生じているが、ラパマイシンはp53の変異を有する癌細胞に対しても有効である(Mol Cell. 2003; 11: 1419)。なお他剤との併用に関しては、再発あるいは治療抵抗性の固形癌を有する小児患者に対してmTOR阻害剤とビンクリスチンの併用療法は長期間の投与でも安全であり、血中を循環している血管新生を促進する因子(VEGFR2)を減らし、奏効率を高めること(Pediatr Blood Cancer. 2014; 61: 128)、再発・治療抵抗性の急性骨髄性白血病に対するデシタピンとラパマイシンの併用療法は目立った副作用を認めず安全であること(Leuk Res. 2013; 37: 1622)、再発した切除

不能の軟骨肉腫の治療におけるmTOR阻害剤とシクロフォスファミドの併用療法は安全かつ有望な組合せであること(Cancer Chemother Pharmacol. 2012; 70: 855)等が報告されている。米国ではすでに免疫抑制剤としてラパマイシンの内服がFDAより許可されており、長期内服で重篤な腎、肝障害が報告されているが、上記の如く至適用量を決定できれば、mTOR阻害剤は他の分子標的薬と同様既存の化学療法や化学放射線療法に上乗せできる可能性が十分に期待できる。すなわち、ラパマイシンやテムシロリムス、エベロリムスと既存の抗癌剤・分子標的薬を併用することにより、老化防止ならびに健康寿命延長につながる新規口腔癌治療法の開発が可能であると考えた。

2. 研究の目的

(1)口腔癌細胞に対するラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムスの細胞増殖抑制効果とmTOR阻害効果を検索する。
 (2)ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムスの細胞増殖抑制効果とmTOR阻害効果を指標に、口腔癌細胞に対する既存の抗癌剤・分子標的薬の細胞増殖抑制効果とmTOR阻害効果への影響を検索し、効果的なmTOR阻害につながる化学療法のレジメンを検討する。
 (3)検癌ヌードマウスモデルを対象に上記(2)で検討したレジメンを用いて治療を行い、至適用量を決定するとともに、老化防止ならびに健康寿命延長につながる治療法としての有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1)口腔癌細胞に対するラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムスの細胞増殖抑制効果ならびにmTOR阻害効果の検討

口腔癌細胞に対するラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス処理による細胞増殖抑制効果はMTT assayを用いて検索し、mTOR、p-mTORおよびmTORC1発現の検索はWestern blot法を用いた。すなわち、口腔癌細胞を各種濃度のラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムスにてそれぞれ処理後24時間、48時間、72時間後の生細胞数を評価することで細胞増殖抑制効果を検討し、また処理細胞をlysis bufferにて溶解し、SDS-PAGEにて展開後、PVDF膜に転写し、各抗体を用いてmTOR、p-mTORおよびmTORC1発現をそれぞれ検出した。
 (2)口腔癌細胞に対する5-FU、シスプラチン(CDDP)、ドセタキセル(DOC)、パクリタキセル(PTX)、セツキシマブ(C-mab)、放射線(RT)の細胞増殖抑制効果ならびにmTOR阻害効果の検討

口腔癌細胞(HSC2、HSC3、HSC4、Ca9-22、SAS、SCC25、SCC4)に対する5-FU、CDDP、DOC、PTX、C-mab、RTの処理による細胞増殖抑制効果ならびにmTOR、p-mTORおよびmTORC1発現の検索は、上記(1)と同様にMTT assayおよびWestern blot法を用いた。

(3)口腔癌細胞に対する効果的なmTOR阻害を目指した化学療法あるいは化学放射線療法レジメンの検討

上記(1)、(2)の実験結果から口腔癌細胞に対するラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、5-FU、CDDP、DOC、PTX、C-mab、RTそれぞれの細胞増殖抑制効果とmTOR阻害効果を比較し、効果的な併用療法を検討した。

(4) mTOR 阻害に着目した新規レジメンによる担癌ヌードマウスに対する治療効果および細胞老化、寿命延長、抗癌作用に関わる諸因子の発現の検討

上記(3)の結果から検討された最も効果的な mTOR 阻害につながるレジメンと考えられたラパマイシンと 5-FU との併用療法を用いて、口腔癌細胞を背部皮下に移植したヌードマウスに対して治療を行い、抗腫瘍効果、体重変化に加えて、残存腫瘍における細胞老化、寿命延長、抗癌作用に関わる諸因子の発現を検討した。すなわち、腫瘍体積の変化および体重の変化を計測することで、抗腫瘍効果と副作用の程度を観察する。さらに治療終了後残存腫瘍を切除し、サンプルはホルマリン固定を行い、パラフィンブロック、薄切切片を作製し、免疫組織染色法を用いて、mTOR (mTORC1)、p16^{INK4a}、PI3K/Akt、p27、p21、VEGF、podoplanin の発現を検索した。特に体重減少や皮膚障害の程度について慎重な観察を行い、未処理対照群である生理食塩水の腹腔内投与を行ったマウスと比較して有意な体重減少を示す薬剤の組み合わせは除外し、老化防止ならびに健康寿命延長につながる最も有用な治療法を検討した。

4. 研究成果

各種口腔癌細胞に対する mTOR、p-mTOR および mTORC1 の発現を Western blot にて検索したところ、それぞれ、SCC25 では顕著に発現が高く、HSC4 も高発現、HSC2、HSC3、Ca9-22 は中等度発現、SCC4 と SAS はやや低発現を示した(図 1)。次に、各種 mTOR 阻害剤による増殖抑制効果を検索したところ、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムスともに、m-TOR、p-mTOR および mTORC1 発現が高発現の細胞株程、低濃度の mTOR 阻害剤に感受性を示したが、ラパマイシンやエベロリムスはテムシロリムスより、顕著な細胞増殖抑制効果を発現した(図 2A-C)。一方、5-FU、CDDP、DOC、PTX、C-mab、RT の増殖抑制効果と mTOR、p-mTOR ならびに mTORC1 の発現の間には明らかな相関を認めなかった。またラパマイシンを含む mTOR 阻害剤は、濃度依存的に mTOR、p-mTOR ならびに mTORC1 の発現を抑制した(図 3)。そこで、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムスの何れか一つと、5-FU、CDDP、DOC、PTX、C-mab、RT の何れか一つの併用処理を行ったところ、それぞれ相加効果程度以上の増殖抑制効果を認められたが、mTOR 阻害剤と C-mab との併用も効果が認められ、この際、HaCat や線維芽細胞への増殖抑制効果が最も少なかった。なお、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムスの何れかと抗癌剤 5-FU、CDDP、DOC の何れかとの併用効果は大きく、それらの中で最も併用効果が優れていた組み合わせは、ラパマイシンと 5-FU の併用であった(図 4A-C)。

ヌードマウス背部皮下への移植の容易さからも、HSC4腫瘍、SAS腫瘍あるいはHSC2腫瘍を有する担癌ヌードマウスを作製し、ラパマイシン 5mg/kg/日ならびに5-FU 10mg/kg/日を、それぞれ単独あるいは併用にて週3回投与を3週間行った。コントロール群(未処理対照)と比較して、ラパマイシンと5-FUの併用療法では、HSC4腫瘍に対しては約72%の縮小を示し、SAS腫瘍に対しては約57%の縮小を示し、HSC2腫瘍に対しては約50%の縮小を示した。ラパ

マイシン、テムシロリムス、エベロリムスそれぞれと5-FUとの併用効果を確認するために、最も安定したヌードマウス背部皮下での増腫瘍性を有する細胞株を考慮した結果、HSC2細胞を移植したHSC2腫瘍を選択し、mTOR阻害剤と5-FUとの併用による治療効果を検討したところ、in vitroのデータと同様に、ラパマイシンと5-FUの併用療法が最も抗腫瘍効果が優れており、この際に顕著な体重減少を認めなかった(図5A-D)。ヌードマウスにおける残存腫瘍を対象に、免疫染色法を用いて細胞老化や寿命延長関連因子の発現を検索したところ、細胞老化促進につながるp16^{INK4a}の発現は、コントロール群と比較して、5-FU群では軽度の発現増強を認められたが、ラパマイシン群では顕著に発現が減弱し、ラパマイシン+5-FU群においても軽度の発現減弱が認められた。一方、生存シグナルであるPI3KおよびAktの発現は、コントロール群と比較して、5-FU群では発現減弱を認められたが、ラパマイシン群では発現増強を認め、ラパマイシン+5-FU群においても軽度の発現増強を認めた。また細胞周期を停止させるp27、p21の発現は、コントロール群と比較して、5-FU群では軽度の発現増強を認められたが、ラパマイシン群では顕著に発現が減弱し、ラパマイシン+5-FU群では軽度の発現増強を認めた。さらに、血管新生に関わるVEGFの発現およびリンパ管新生に関わるpodoplaninの発現はともに、コントロール群と比較して、5-FU群では軽度の発現減弱を認められたが、ラパマイシン群でも発現が減弱し、ラパマイシン+5-FU群において顕著な発現減弱を認めた。

図 1

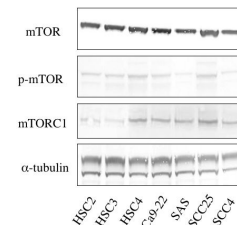


図 2 A

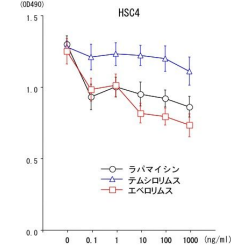


図 2 B

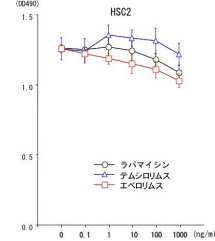


図 2 C

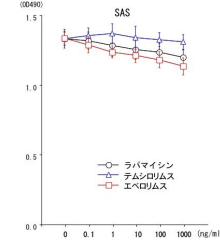
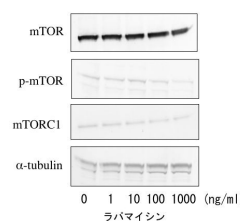
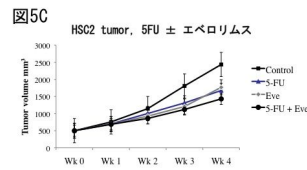
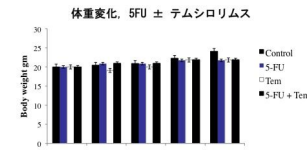
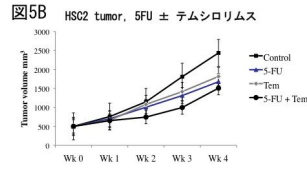
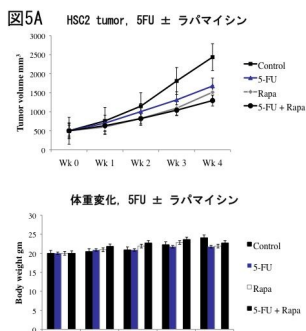
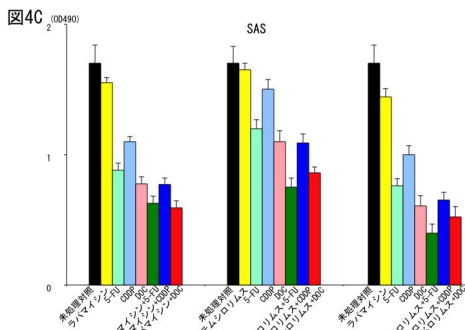
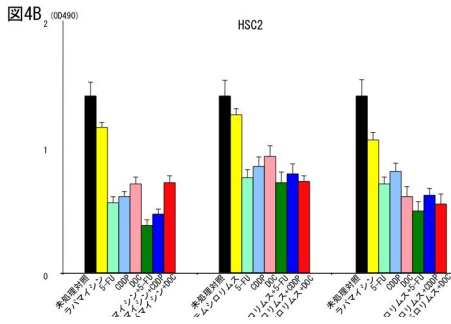
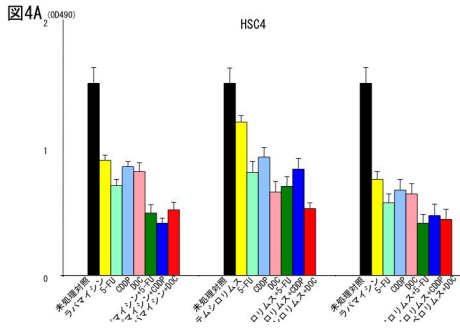


図 3





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13件)

Elemental diet inhibits pro-inflammatory cytokine production in keratinocytes through the suppression of NF- κ B activation. Harada K, Ferdous T, Mizukami Y, Mishima K. *Oncol Rep.* 査読有り 2018 ; 40(1) : 361-368. doi: 10.3892/or.2018.6440

Low carbonyl reductase 1 expression is associated with poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. Yamanouchi R, Harada K, Ferdous T, Ueyama Y. *Mol Clin Oncol.* 査読有り 2018 ; 8(3): 400-406. doi: 10.3892/mco.2018.1548

PD-L1 expression in malignant salivary gland tumors. Harada K, Ferdous T, Ueyama Y. *BMC Cancer.* 査読有り 2018; 18:156. doi: 10.1186/s12885-018-4069-3

Elemental Diet Accelerates the Recovery From

Oral Mucositis and Dermatitis Induced by 5-Fluorouracil Through the Induction of Fibroblast Growth Factor 2. Harada K, Ferdous T, Kobayashi H, Ueyama Y. *Integr Cancer Ther.* 査読有り 2018 ; 17(2):423-430.
doi: 10.1177/1534735417721014

Gimeracil enhances the antitumor effect of cisplatin in oral squamous cell carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. Harada K, Ferdous T, Harada T, Takenawa T, Ueyama Y. *Oncol Lett.* 査読有り 2017;14(3):3349-3356.
doi: 10.3892/ol.2017.6602

Therapeutic strategies with oral fluoropyrimidine anticancer agent, S-1 against oral cancer. Harada K, Ferdous T, Ueyama Y. *Jpn Dent Sci Rev.* 査読有り 2017;53(3): 61-77.
doi: 10.1016/j.jdsr.2016.11.001

Calreticulin is a novel independent prognostic factor for oral squamous cell carcinoma. Harada K, Takenawa T, Ferdous T, Kuramitsu Y, Ueyama Y. *Oncol Lett.* 査読有り 2017;13(6):4857-4862.
doi: 10.3892/ol.2017.6062

High expression of stathmin 1 is a strong prognostic marker in oral squamous cell carcinoma patients treated by docetaxel-containing regimens. Harada K, Ferdous T, Harada T, Ueyama Y. *Clin Exp Med.* 査読有り 2017;17(1):45-50.
doi: 10.1007/s10238-015-0403-0

Gimeracil Exerts Radiosensitizing Effects on Oral Squamous Cell Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo. Harada K, Ferdous T, Ueyama Y. *Anticancer Res.* 査読有り 2016;36(11): 5923-5930. doi: 10.21873/anticancer.11179

Induction of artificial cancer stem cells from tongue cancer cells by defined reprogramming factors. Harada K, Ferdous T, Cui D, Kuramitsu Y, Matsumoto T, Ikeda E, Okano H, Ueyama Y. *BMC Cancer* 査読有り 2016;16:548.
doi: 10.1186/s12885-016-2416-9

Metformin in combination with 5-fluorouracil suppresses tumor growth by inhibiting the Warburg effect in human oral squamous cell carcinoma. Harada K, Ferdous T, Harada T, Ueyama Y. *Int J Oncol.* 査読有り 2016;49(1):276-284.
doi: 10.3892/ijo.2016.3523

Efficacy of elemental diet on prevention for chemoradiotherapy-induced oral mucositis in patients with oral squamous cell carcinoma. Harada K, Ferdous T, Horinaga D, Uchida K, Mano T, Mishima K, Park S, Hanazawa H, Takahashi S, Okita A, Fukunaga M, Maruta J, Kami N, Shibuya K, Ueyama Y. *Support Care Cancer* 査読有り 2016; 24(2):953-959.
doi: 10.1007/s00520-015-2866-7

Osteogenic cell fractions isolated from tongue muscle. Harada K, Harada T, Ferdous T, Takenawa T, Ueyama Y. *Molecular Medicine Reports* 査読有り 2015;12(1):31-36.
doi: 10.3892/mmr.2015.3350

〔学会発表〕(計 14 件)

原田耕志、加藤芳明、堀永大樹、内田堅一郎、眞野隆充、三島克章、成分栄養剤エレンタール®の口内炎への直接作用の可能性、第

46 回日本口腔外科学会中国四国地方部会、2017.

原田耕志、口腔癌における免疫チェックポイント分子の発現とニボルマブの効果予測、第 71 回日本口腔科学会総会、2017.

梅田浩嗣、眞野隆充、原田耕志、内田堅一郎、三島克章、上山吉哉、過去 14 年間における遊離皮弁再建を行った症例の臨床的検討、第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2017.

三島克章、内田堅一郎、原田耕志、眞野隆充、上山吉哉、当科における逆行性超選択的動注化学放射線療法の効果、第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2017.

眞野隆充、内田堅一郎、原田耕志、山内良太、上山吉哉、TS-1 併用放射線治療および cetuximab の継続投与により寛解が得られた進行舌癌の 1 例、第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2017.

Takenawa T、Harada K、Ferdous T、Ueyama Y. Expression of calreticulin is a novel independent prognostic factor for oral squamous cell carcinoma, ESMO, 2016.

Ferdous T、Harada K、Ueyama Y. High Expression of FOXM1 is a Strong Prognostic Marker in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients Treated by Docetaxel-containing Regimens. ESMO 2016.

原田耕志、眞野隆充、上山吉哉、口腔扁平苔癬における PD-1 および Osteopontin の役割、第 26 回日本口腔内科学会・第 29 回日本口腔診断学会 合同学術大会、2016.

原田耕志、上山吉哉、口腔扁平上皮癌に対する Metformin と 5-Fu の併用療法による抗腫瘍効果の検討、第 40 回日本頭頸部癌学会、2016.

原田耕志、上山吉哉、成分栄養剤エレンタール®の口内炎抑制機序の解明、第 34 回日本口腔腫瘍学会総会、2016.

Harada K、Ferdous T、Harada T、Ueyama Y. Elemental diet accelerates the recovery from oral mucositis and dermatitis, induced by 5-fluorouracil through the induction of fibroblast growth factor 2, 37th ESPEN Congress on Clinical Nutrition & Metabolism, 2015.

原田耕志、化学放射線療法を受ける口腔癌患者の口内炎に対する成分栄養剤の有用性について、第 53 回日本癌治療学会総会、2015.

Harada K、Uchida K、Mano T、Ueyama Y. Efficacy of Elemental Diet on Prevention for Chemoradiotherapy-induced Oral Mucositis, 4th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology, 2015.

原田耕志、加藤芳明、梅田浩嗣、上山吉哉、ヒト唾液腺癌における PD-L1 の発現、第 69 回日本口腔科学会総会、2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~oms0/cus
tom7.html](http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~oms0/cus
tom7.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 耕志 (HARADA, Koji)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：6 0 2 5 3 2 17

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

フェルドゥス タランヌム (FERDOUS, Tarannum)

南 晴康 (MINAMI, Haruyasu)

藤原 里依子 (FUJIWARA, Rieko)