

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09114

研究課題名(和文) mTOR阻害剤と低酸素活性化プロドラッグ併用による大腸癌治療

研究課題名(英文) mTOR inhibitor in combination with hypoxia-activated prodrugs for the treatment of patients with colorectal cancer

研究代表者

金子 学 (Kaneko, Manabu)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：10790850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸癌の血管新生を阻害し腫瘍内に低酸素環境を惹起するmTOR阻害剤(Temsirolimus)と、低酸素環境下で活性化される低酸素活性化プロドラッグ(Banoxantrone)との併用療法が大腸癌に及ぼす影響を検討した。
In vitroの検討では、同併用療法は、大腸癌細胞株のアポトーシスを誘導し、細胞増殖を相加的に抑制した。
In vivoの検討では、大腸癌細胞のマウス皮下腫瘍モデルにおいて、同併用療法は大腸癌細胞株の皮下腫瘍の成長を相加的に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根治切除不能大腸癌に対する治療は薬物療法が主であるが、既存の薬剤では効果が得られない症例もいまだ多く、新たなバイオマーカーの同定や新規薬剤の開発が求められている。

mTOR阻害剤は腎細胞癌、膵・消化管神経内分泌腫瘍、乳癌などですでに臨床応用されており、低酸素活性化プロドラッグは他の癌腫に対し単剤療法または他剤との併用療法での臨床試験が検討されている。いずれも比較的容易に入手可能である。

本研究では上記2剤の併用療法の大腸癌に対する有用性が確認された。新規開発費がかからない既存の薬剤を用いた治療が臨床応用された際の社会的意義は非常に大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of combination therapy with mTOR inhibitor (Temsirolimus), which inhibits angiogenesis of colorectal cancer and induces hypoxic environment in tumors, and hypoxia-activated prodrug (Banoxantrone) activated in a hypoxic environment.

In vitro, the combination therapy induced apoptosis of colorectal cancer cell lines and additively suppressed cell proliferation.

In vivo, the combination therapy additively inhibited the growth of subcutaneous tumors in the mouse subcutaneous tumor model of colorectal cancer cells.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：大腸癌 mTOR阻害剤 低酸素プロドラッグ アポトーシス 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸癌は、悪性疾患のうち男性では第3位、女性では第2位の罹患率であり、世界で年間新たに140万人罹患していると推計されている。治療法としては手術療法が唯一の根治的治療であるが、一方で診断時すでに根治切除不能であることも多い。根治切除不能大腸癌に対する治療は薬物療法が主であるが、効果には個体差が存在し、既存の薬剤では効果が得られない症例もいまだ多い。従って、新たなバイオマーカーの同定や新規薬剤の開発が求められている。

(2) Mammalian target of rapamycin (mTOR)はラパマイシンの標的分子として同定されたセリン・スレオニンキナーゼ(タンパク質のセリンやスレオニンをリン酸化する酵素)で、細胞の分裂や生存などの調節に中心的な役割を果たすと考えられている。図1のごとく、ラパマイシンはFKBP12と結合し、mTORとraptorとの相互作用の阻害によってmTORC1の活性を阻害することにより抗腫瘍効果を発揮する(Johnson SC, et al. Nature 2013)。

我々はマウス皮下腫瘍モデルでの研究で、ラパマイシン誘導体であるTemsirrolimus (TEM)がヒトおよびマウス大腸癌細胞株の腫瘍増大を抑制することを示した(図2)。この機序としてmTORのリン酸化抑制によって下流のp70S6Kや4E-BP-1のリン酸化抑制が起こることを示した。さらに、腫瘍増大抑制の機序として、HIF-1およびVEGFタンパク発現抑制による血管新生抑制が働いていることを示した(Kaneko M, et al. J Cancer Res Clin Oncol 2014)。

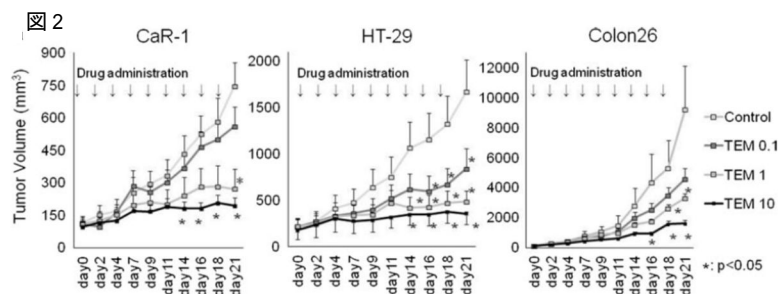
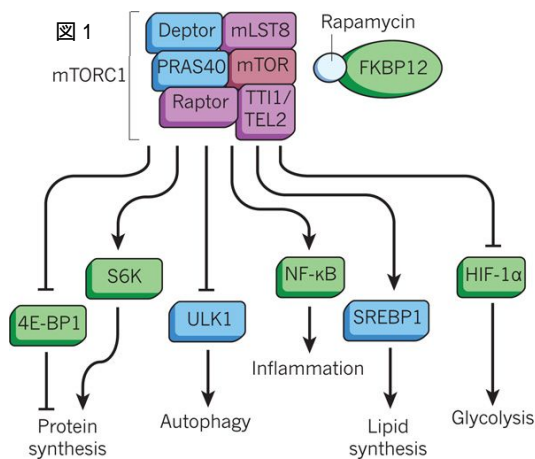


図2 Temsirrolimusはマウス皮下腫瘍の増大を抑制した

(3) 腫瘍が成長するためには栄養と酸素を供給して老廃物・代謝産物を運び出すことが必要である。腫瘍が小さいうちは腫瘍内に入り込む血管が無くても代謝が維持できるが、腫瘍が1~2mm以上に大きくなるためには腫瘍内への血管新生が必要になる。腫瘍内の血管新生は癌細胞が血管新生因子を放出することで誘導される。近年、血管新生阻害は癌治療の主要なターゲットの一つとなっている。上記実験結果から、mTOR阻害剤は大腸癌の血管新生を阻害することにより、腫瘍内に低酸素環境を惹起しているものと考えられるが、低酸素環境下において、抗悪性腫瘍薬の効果が減弱されることが報告されており、腫瘍の抗悪性腫瘍薬に対する耐性獲得の原因の一つと考えられている(Murono K, et al. Anticancer Res 2012)。

近年新たな抗悪性腫瘍薬として、低酸素環境下で活性化される低酸素活性化プロドラッグが注目されている。Banoxantrone(AQ4N)は低酸素環境下にてシトクロムP450により還元・活性化されトポイソメラーゼIIを阻害することで抗腫瘍効果を発揮することが報告されており(Nishida CR, et al. J Med Chem 2008)、いくつかのタイプの腫瘍において動物実験レベルでの有効性が報告されている(Phillips RM. Cancer Chemother Pharmacol 2016)。このようなmechanismから、mTOR阻害剤と低酸素活性化プロドラッグであるBanoxantroneとの併用が有効な治療方法となりうる、と考えられた。

2. 研究の目的

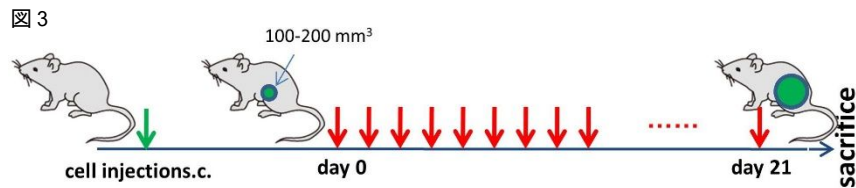
mTOR阻害剤は根治切除不能または転移性腎細胞癌、膵・消化管神経内分泌腫瘍、切除不能または再発乳癌などに対する薬剤として保険適応となっており、すでに臨床応用されている。AQ4Nはこれまでに放射線療法との併用療法がフェーズ1試験で行われている。実験試薬としても市販されており容易に入手可能である。他臓器の悪性腫瘍で開発が進められてきたmTOR阻害剤を、同剤により低酸素環境が惹起されているという理論的な裏付けにより、低酸素活性化プロドラッグと併用し大腸癌領域へ応用する試みはこれまでほとんど行われておらず、極めて独創的であると考えられた。本研究ではこの併用療法の有効性を検証した。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌細胞株での mTOR 阻害剤と低酸素活性化プロドラッグとの併用効果の検討-in vitro-
 AQ4N が抗腫瘍効果を発揮するためにはシトクロム P450 で還元・活性化され、AQ4 となる必要がある。大腸癌細胞中のシトクロム P450 の量は、細胞株にもよるが概ね少なく有効な結果が得られにくかったため、in vitro の検討では AQ4N の還元・活性化型である AQ4 を用いて実験を行った。ヒト大腸癌細胞株 CaR-1, HT-29 を、正常酸素環境下 (O₂ 21%)、低酸素環境下 (O₂ 1%) において TEM 単剤 (1-100 μM) 投与下、AQ4 単剤 (1-4 μM) 投与下、または TEM と AQ4 併用投与下に培養し、細胞増殖、細胞周期、アポトーシスなどの特性を MTS assay、フローサイトメトリーで評価する。さらに、HIF-1、p-S6、Bax、Bcl-2、Cyclin B-1、Cleaved PARP などの発現をウェスタンブロット法などにて評価する。

(2) 大腸癌細胞株のマウス皮下腫瘍モデルを用いた mTOR 阻害剤と低酸素活性化プロドラッグとの併用効果の検討-in vivo、腫瘍増大の抑制効果-

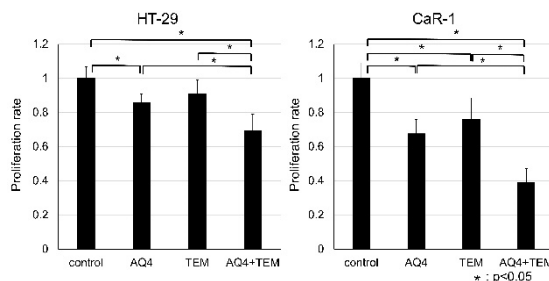
6-8 週齢の Balb/c nude マウスの皮下にヒト大腸癌細胞株 CaR-1 または HT-29 を 1×10⁶ 個注射する。皮下腫瘍が 100-200mm³ 程度の大きさ (皮下注射 3 週程度) から、毎日 TEM 単剤 (5 mg/kg)、AQ4N 単剤 (50 mg/kg)、TEM と AQ4N の両者を腹腔内に投与する (図 3)。対照群としては vehicle すなわち DMSO を腹腔内に注射する。週 2 回程度、腫瘍サイズや体重測定などを計測する。投与開始より 3 週目に犠牲死せしめ、皮下腫瘍の腫瘍サイズを評価する。



4. 研究成果

(1) 大腸癌細胞株での mTOR 阻害剤と低酸素活性化プロドラッグとの併用効果の検討-in vitro-
 正常酸素環境下と低酸素環境下における TEM と AQ4 の大腸癌細胞株に対する増殖抑制効果を MTS assay で検討した。正常酸素環境下と低酸素環境下両方で、それぞれ単剤で容量依存的に大腸癌細胞株の増殖を抑制した。正常酸素環境下では、TEM 単剤と比較し、TEM と AQ4 との併用は大腸癌細胞株の増殖を相加的に抑制した。低酸素下では、正常酸素下と比較し TEM 単剤での効果が低下したが、TEM と AQ4 との併用で大腸癌細胞株の増殖を相加的に抑制した (図 4)。

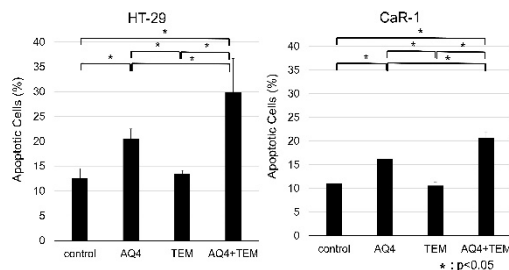
図4 細胞増殖 (低酸素環境下)



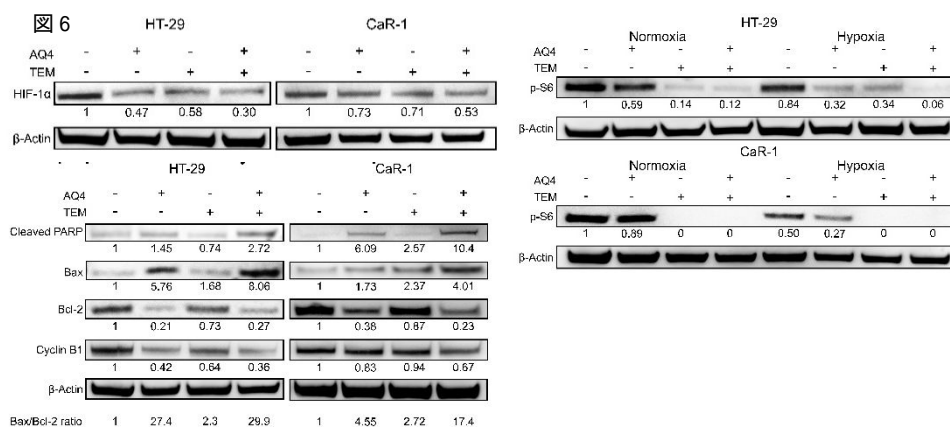
増殖抑制効果の機序として、細胞周期について検討した。AQ4 は大腸癌細胞株の細胞周期を G2/M 期で停止させた。しかし、TEM の上乘せ効果は認められなかった。

増殖抑制効果の機序として、アポトーシスの誘導をフローサイトメトリーを用いて測定した。TEM 単剤と比較し、TEM と AQ4 との併用は大腸癌細胞株のアポトーシスを相加的に増加させた (図 5)。

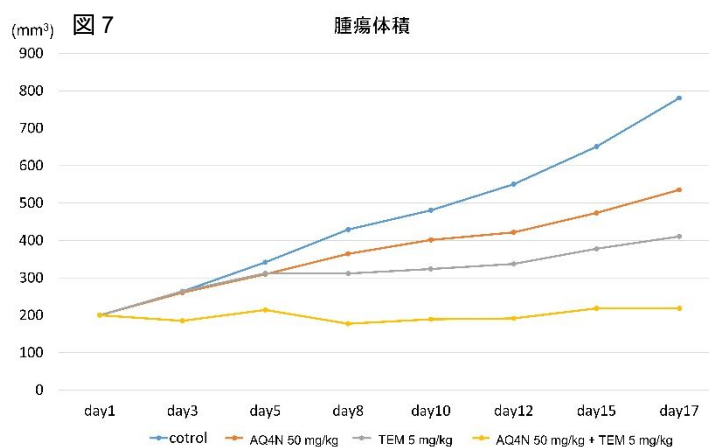
図5 アポトーシス (低酸素環境下)



HIF-1、p-S6、Cleaved PARP などの発現をウェスタンブロット法にて評価した。TEM と AQ4 の両者はともに HIF-1、p-S6 の発現を抑制し、併用することで相加的な効果を有することがわかった。また、TEM と AQ4 の両者はともに Bax の発現を促進させ、Bcl-2 および Cyclin B1 の発現を抑制し、それぞれ併用することで相加的な効果を示した (図 6)。



(2) 大腸癌細胞株のマウス皮下腫瘍モデルを用いた mTOR 阻害剤と低酸素活性化プロドラッグとの併用効果の検討 - in vivo、腫瘍増大の抑制効果 -
BALB/c マウスの側腹部にヒト大腸癌細胞株を皮下注射し、3 週間程度で皮下腫瘍の形成を確認してから TEM 単剤、AQ4N 単剤、TEM と AQ4N 両者の腹腔内投与を開始した。投与開始後 3 週目にマウスを sacrifice した。Control と比較し、TEM と AQ4N の両者はともに皮下腫瘍の成長を抑制し、併用にて相加的な効果を示した (図 7)。



(3) mTOR 阻害剤は腎細胞癌、膵・消化管神経内分泌腫瘍、乳癌などで保険適応となっており、すでに臨床応用されている。低酸素活性化プロドラッグは他の癌腫に対し単剤療法または他剤との併用療法での臨床試験が検討されている。いずれも比較的容易に入手可能である。

本研究では上記 2 剤の併用療法の大腸癌に対する有用性が確認された。新規開発費がかからない既存の薬剤を用いた治療が臨床応用された際の社会的意義は大きいものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	石原 聡一郎 (Ishihara Soichiro) (00376443)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	
研究分担者	田中 敏明 (Tanaka Toshiaki) (30647540)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究分担者	畑 啓介 (Hata Keisuke) (60526755)	東京大学・医学部附属病院・特任講師 (12601)	
研究分担者	野澤 宏彰 (Nozawa Hiroaki) (80529173)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	
研究分担者	川合 一茂 (Kawai Kazushige) (80571942)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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