

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591721

研究課題名（和文）大腸癌における PI3K 経路の解析と新規分子標的治療薬の検討

研究課題名（英文）Analysis of the PI3K pathway in colon cancer and new strategy of Molecular target-based drugs.

研究代表者 須並 英二 (SUNAMI EIJI)

東京大学・医学部附属病院・講師 研究者番号：70345205

研究成果の概要（和文）：

これまでに我々は、Rapamycin誘導体が大腸癌細胞に対し増殖抑制作用を有することを報告していたが、今回Temsirolimusが大腸癌細胞の細胞周期をG1期で停止させること、G1期の進行に必要なcyclin D1 蛋白の産生を抑制すること、また低酸素下で培養された大腸癌細胞において腫瘍血管新生に重要な働きを持つHypoxia-inducible factor-alpha蛋白の産生を抑制することを明らかとした。Temsirolimusの大腸癌に対する具体的な作用機序は、他剤との併用療法で薬剤選択根拠となりうるため、本研究の意義は高いものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that Teseirolimus cause G1 cell cycle arrest in colon cancer cell lines with inhibition of cyclin D1 protein production. Furthermore, we also indicated that Teseirolimus inhibits production of Hypoxia-inducible factor-alpha protein of colon cancer cell lines under the environment of hypoxia. Those explications of the mechanisms of Teseirolimus against cancer proliferation may play an important role in the selection of anticancer agents for colon cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸癌、化学療法、mTOR、Rapamycin、多剤併用療法

1. 研究開始当初の背景

進行大腸癌においては、手術に加えて化学療法を行うことが標準治療となっている。特

に切除不能／再発性大腸癌に対しては、化学療法の実効性は大きく、現在、5-FU, CPT-11, oxaliplatinを中心とした抗がん剤の組み合わせによりFOLFOX, FOLFIRIなどのレジメンが開発され、平均生存期間が約20ヶ月と飛躍的に延長してきた。加えて血管新生阻害薬として働く抗VEGF抗体bevacizumabや受容体型チロシンキナーゼ阻害剤cetuximabが分子標的治療薬として最近、本邦でも使用できるようになり、上述の抗がん剤との併用によりさらなる予後の改善が期待できるようになった。

しかしながら、上記の抗癌剤治療によく反応する患者群が存在する一方で、依然として治療抵抗性を示す群が半数を占めているのが現状である。これは、癌発育進展に関わるシグナル伝達経路が多岐にわたり、これに対して日本で認可されている分子標的治療薬の標的がごく限られているからである。

bevacizumabやcetuximabはそれぞれVEGF、EGFからのシグナル伝達のブロックを企図するものであるが、いずれも経路の上流にある標的分子に働く薬剤であり、シグナル伝達経路の下流の異常がある場合には、薬剤は無効である。具体例は、cetuximabがEGF受容体を阻害することによる抗腫瘍効果は、下流にあるrasに活性化型の変異が有る場合には、rasによるMAPキナーゼ経路へと続くシグナル伝達がブロックされず無効であるとされる。従って、各シグナル伝達経路の下流で働く分子を標的とした治療薬の開発、臨床応用が必要と考えられる。

今回我々の着目するPI3K-Akt-mTORシグナル伝達経路は、ras-MAPキナーゼ経路と同様、チロシンキナーゼ型受容体の下流にある経路であり、蛋白の転写調節、細胞周期制御、血管新生、アポトーシス制御など多様な細胞機能を司る。大腸癌を含む多種のヒト悪性腫

瘍でこの経路を構成する因子の異常が徐々に見つかってきており、発癌における同経路の重要性が示唆される。

近年ラパマイシンがmTORの機能を阻害することが明らかとなった。しかしラパマイシンに抗腫瘍効果が認められるようになったのは、この4-5年の研究成果であり、どのような種類の悪性腫瘍に効果があるのか、またメカニズムに関しては不明な点も多い。最近我々は、ラパマイシンが大腸癌細胞株LoVoとCaRIで細胞増殖を抑制すること、その際、mTORの下流分子であるp70 S6 kinaseのリン酸化が抑制されること、またヒトの臨床検体（組織プレパラート）を用いた解析では正常大腸粘膜ではp70 S6 kinaseはリン酸化されていないが、4割の腺腫、大腸癌でリン酸化が見られることを初めて明らかにした。これらの結果はPI3K-Akt-mTORシグナル伝達経路の大腸癌の発育進展における重要性を示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究では、大腸癌におけるPI3K-Akt-mTORシグナル伝達経路の役割をさらに明らかにするべく、この経路を構成するmTOR以外の因子(Akt、LKBなど)の特異的阻害剤が、大腸癌細胞株で増殖に抑制的に働くのか、あるいはアポトーシスを誘導するのか、また同一のシグナル伝達経路であればこれらの分子標的阻害の効果は一律であるのか、を検討する。またラパマイシンの抗腫瘍効果をリン酸化p70 S6 kinaseを高発現している大腸癌細胞株を用いた異種移植モデルで検討し、臨床応用の可能性があるのか探る予定である。抗腫瘍効果のメカニズムについては、PI3K-Akt-mTORシグナル伝達経路のみならず

他のシグナル伝達経路 (MAP キナーゼ経路) への影響を *in vitro*, *in vivo* のレベルで解析する。これらの実験結果をふまえ、ラパマイシン感受性を規定する因子などについても検討を加えることとする。

PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達経路は、これまでの細胞レベルあるいは臨床検体での解析結果から総合的に考えると、大腸癌においても重要な役割を担っていることが推測されるが、現在まで PI3K-Akt-mTOR およびその下流の因子に至るまで系統的に解析した研究がない。本研究では、ラパマイシンの抗腫瘍効果とそのメカニズムを *in vitro*, *in vivo*, *in situ* レベル、又 PI3K-Akt-mTOR 経路に加えて MAP キナーゼ経路も含めた 2 大シグナル伝達経路の観点から包括的に解析するという特色があり独創的である。更に、既存の抗がん剤やすでに本邦で認可された分子標的治療薬 bevacizumab, cetuximab に抵抗性の大腸癌に対して、ラパマイシンをはじめとするシグナル伝達経路のより下流の分子の標的治療により抗腫瘍効果が発揮される可能性を秘めている。

3. 研究の方法

(1) 多数の大腸癌細胞株 (LoVo, CaRI, SW480, DLD-1, HT-29, CaCo-2 など) において、比較的上流に存在する PI3K の阻害剤 LY-294002, wortmannin 処理を行い、細胞株の増殖への影響を細胞増殖曲線、MTS アッセイ、細胞周期解析などで検討し、アポトーシスなどの誘導などが見られた場合には更に Propidium Iodide-Annexin V 染色なども行う。これらの結果が完全にラパマイシン投与時と完全に一致するかどうかを検討する。同時に Akt, リン酸化 Akt, リン酸化 mTOR, S6K, リン酸化

S6K のレベルをウエスタンブロッティング法で検討する。

(2) 同様に MAP キナーゼ阻害剤 PD-98059 などで細胞株を処理して、ラパマイシン処理時との効果と比較検討を行う。2 種の薬剤による効果が乖離する場合は、MAP キナーゼのシグナル伝達経路、PI3K-Akt-mTOR 経路のいずれかがその細胞株で重要で他方は関与していないことになる。この実験も癌の heterogeneity (どのシグナル伝達経路が活性化しているか) と抗腫瘍薬の使い分けについて考察する材料となる。さらに MAP キナーゼ阻害剤、ラパマイシンの両方で *in vitro* の抗腫瘍効果があった場合、両薬剤の共投与を試み、相乗効果があるかを検討する。

(3) ラパマイシンに感受性のある細胞株 (LoVo および CaRI) とラパマイシンに抵抗性の細胞株 (CaCo2 など) について、ヌードマウスの皮下に注射し腫瘍を形成させた上で、ラパマイシンを腹腔内に連日投与し (1.5 mg/kg)、抗腫瘍効果を腫瘍のサイズの変化で検討する。また一定の期間の投与の後 (例えば 2 週間)、マウスを犠牲死させ、腫瘍の新鮮凍結標本、パラフィン包埋標本を作成し、CD31 染色、BrdU の染色、TUNEL 染色を行い、かつリン酸化 Akt, リン酸化 S6K の染色も行う。これにより、臨床を模倣した腫瘍モデル系でのラパマイシンの抗腫瘍効果を *in situ* で解析することが可能であり、かつそのメカニズムとして、血管新生、細胞増殖、アポトーシスの指標について *in vitro* で得られた知見と合致する結果が得られるか、多面的な解析をすることが可能である。

(4) ヒト大腸癌において PI3K キナーゼおよび MAP キナーゼ経路の構成因子が、癌発育のどの段階においてどのように発現、活性化されているかについて、内視鏡的に切除された

標本あるいは手術摘出標本などの臨床材料を用いて検討する。具体的には新鮮標本を凍結しタンパクを抽出、またホルマリン固定されたブロックから作製されたスライドを免疫染色（ストレプトアビジン・ビオチン法）によって定量的に検討する。

4. 研究成果

mTOR阻害剤であるRapamycin誘導体は抗腫瘍効果として腫瘍増殖抑制作用や腫瘍血管新生抑制作用を有することが報告されており、現在すでに腎細胞癌で臨床応用されている。本研究ではRapamycin誘導体の一つであるTemsirrolimusの大腸癌に対する効果を、単剤および他剤との併用療法の両面で評価することが目的である。これまでに我々はin vitroの実験系において、Rapamycin誘導体が大腸癌細胞に対し増殖抑制作用を有することを報告していたが、今回さらにin vitroの実験において、Temsirrolimusが大腸癌細胞の細胞周期をG1期で停止させること、G1期の進行に必要なcyclin D1 蛋白の産生を抑制すること、また低酸素下で培養された大腸癌細胞において腫瘍血管新生に重要な働きを持つHypoxia-inducible factor- α 蛋白の産生を抑制することを明らかとした。今回明らかとなったTemsirrolimusの大腸癌に対する具体的な作用機序は、他剤との併用療法で他の薬剤を選択する根拠となりうるため、本研究の意義は高いものと考えられる。In vivoの実験においても、マウス皮下腫瘍モデルを用いてTemsirrolimusが腫瘍の増殖を抑制すること、この効果の一部が腫瘍細胞の増殖を抑制すること、腫瘍切片を用いた免疫染色法にて腫瘍血管新生の抑制によることを明らかとした。Temsirrolimusのもう一方の作用である免疫抑

制作用に関しては、上記のIn vivoの実験においてTemsirrolimus投与群と非投与群間で、末梢血中の白血球数など血液学的に差がないこと、脾臓中の白血球分画に変化がないことを確認した。以上よりIn vitro, In vivo両面の検討において、重大な有害事象が生じない投与量において、Temsirrolimus単剤で大腸癌の抑制作用を有することを明らかとした。大腸癌に対するRapamycin誘導体の抗腫瘍効果に関する研究はまだ十分ではなく、本研究の結果が今後本薬剤を臨床応用する時に重要な根拠となりうると思われる。

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0件）

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須並 英二 (SUNAMI EIJI)

(2009.12-2012.3)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70345205

野澤 宏彰 (NOZAWA HIROAKI)

(2009.4-2009.11)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80529173

(2) 研究分担者

北山 丈二 (KITAYAMA JOJI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20251308

(3) 連携研究者

なし