

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09585

研究課題名(和文)PI3K/Akt/mTOR経路を標的とした頭頸部癌低侵襲治療の開発

研究課題名(英文)Development of minimally invasive treatment in head and neck cancer focused on PI3K/Akt/mTOR pathway

研究代表者

鈴木 幹男 (Suzuki, Mikio)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00226557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌のより低侵襲な治療開発のために、PI3K/Akt/mTOR経路に着目した解析を実施した。ラパログとして他癌で臨床応用されているテムシロリムス、エベロリムスを、Torin-1、2、PLD阻害薬を用いて、単独、ラパログとの併用効果について解析した。いずれの薬剤も高濃度では抗腫瘍効果を示した。一方、臨床容量以下で用いた場合には、抗腫瘍効果は減弱した。このなかでエベロリムスとTorin-1の組み合わせが、低濃度で最も抗腫瘍効果を示した。免疫不全マウスを用いたin vivo解析では、この低濃度でも、抗腫瘍効果を示すことが確認された。本研究はより低侵襲で副作用の少ない治療へ結びつくものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部は多くの感覚器を含んでおり、呼吸、嚥下、発声、容貌などの関連から、頭頸部癌治療には生命予後だけでなく、治療後のQuality of Survivalが重要である。頭頸部癌ではPI3K/Akt/mTOR経路活性化が腫瘍増殖に深く関連している。本研究ではラパログ(mTOR阻害薬)と別の作用点を持つmTOR阻害薬Torin-1、2に着目し、ラパログ、PLD阻害薬のin vitro, in vivoの効果を解析した。本結果から、ラパログとTorinを組み合わせることにより、それぞれ単独で用いるよりも相乗効果を示すことが分かった。本成果は、より低侵襲で副作用の少ない治療へ結びつくものである。

研究成果の概要(英文)：For the development of less invasive treatments for head and neck cancer, an analysis focusing on the PI3K/Akt/mTOR pathway was conducted. Using rapalogs (mTOR inhibitors) temsirolimus and everolimus, which are clinically applied in other cancers, along with Torin-1, 2, and PLD inhibitors, the effects of each drug alone and in combination with rapalogs were analyzed. All drugs showed antitumor effects at high concentrations. However, when used at or below clinical doses, the antitumor effects diminished. Examination of various combinations revealed that the combination of everolimus and Torin-1 demonstrated antitumor effects at low concentrations. In vivo analysis using immunodeficient mice confirmed the antitumor effects of this low-concentration combination. This study contributes to the development of less invasive treatments with fewer side effects.

研究分野：Head and neck cancer

キーワード：head and neck cancer mTOR inhibitor Torin PLD inhibitor

1. 研究開始当初の背景

頭頸部は呼吸・嚥下などの生命維持に関係する機能を持つだけでなく、容貌や音声を基本とするコミュニケーション関連機能が集中するため社会生活に極めて重要である。このため頭頸部癌治療には、生命予後だけでなく、治療後の Quality of Survival が大切になる。このための方略には、発がんリスク低減、早期発見・治療などの予防医学的アプローチに加え、生命予後を保ったより低侵襲な治療法が必要である。飲酒・喫煙因子による頭頸部癌は世界的に減少しているが、ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 関連癌は増加傾向が続いている。欧米からの報告では、HPV 陽性中咽頭癌の比率はスウェーデンで 23% (1970 - 1979 年) から 68% (2000-2002 年) へ、米国で 35% (1956-1969 年) から 72% (2007-2009 年) へ著明に増加している (Chenevert J, Hum Pathol 43:17-22, 2012)。本邦でもやや遅れて同様の経過を辿っている (水町ら, 2010; 徳丸ら, 2011)。HPV 関連癌は予後がよいものの、若年発症が多いことから長期生存を前提とした急性期・晩期合併症が少ない治療法が必要である。HPV 関連癌を対象に、世界中で多様な de-escalation 試験が実施されている。しかし、現時点で de-escalation の方法、有用性について確立されておらず、NCCN ガイドラインでも HPV 感染有無による治療変更は推奨されていない。頭頸部癌治療では従来からの手術、放射線治療、化学療法に加え、近年 PD-1/PD-L1 阻害による免疫治療が行われているが、これにとどまることなくより低侵襲な治療開発が必要である。

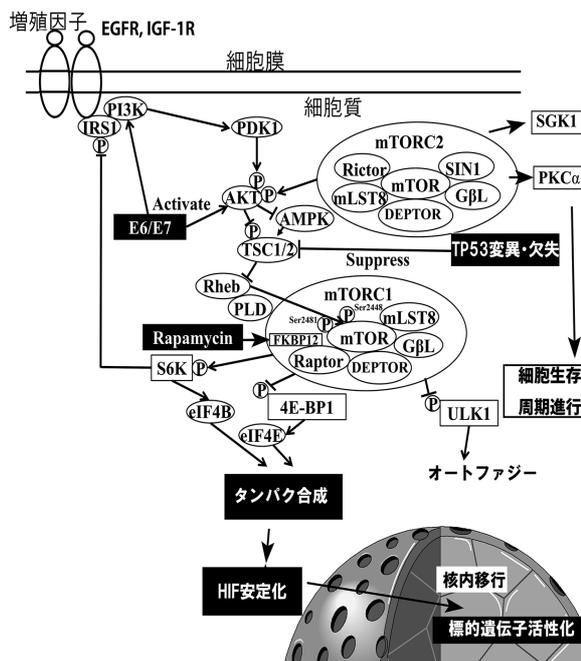
2. 研究の目的

頭頸部癌では TP53, PIK3CA, CDKN2A, FBXW7, HRAS,

NRAS などの癌関連遺伝子変異が報告され、他の癌腫と比較して Tumor mutation burden が大きいことが知られている (Cancer Genome Atlas Network, Nature, 2015)。これらの癌関連遺伝子の中で、PIK3CA は HPV(+) 例の 56%、HPV(-) 例の 34% に変異がみられ、HPV 感染に関わらず共通して変異頻度が高く、この遺伝子変異は PI3K/Akt/mTOR 経路を活性化し、癌細胞の増殖を促進する (図 1)。頭頸部癌では HPV 陽性、陰性の両者でこの経路が活性化している (Marquard, Biochemical Pharmacology, 2020)。一般的に癌組織内では血管新生が細胞増殖に追い付かず血管網が不完全な状態で、癌細胞巢は低酸素状態にある。低酸素状態下で、低酸素誘導因子 (HIF) は

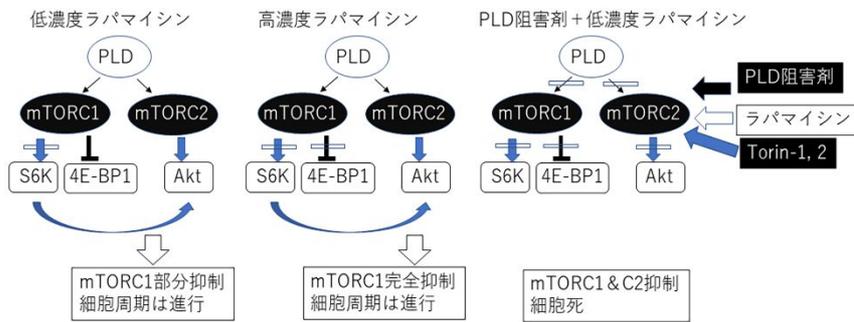
60 以上の遺伝子 (血管新生、浸潤転移、代謝シフト、薬剤耐性などに関与) に作用し、癌細胞は低酸素環境への適応と治療抵抗性を獲得する (図 2, Bredell, Oncotarget, 2016)。HIF-1 は通常の酸素濃度下ではユビキチン経路を介して速やかに分解されるが、低酸素環境下では HIF-1 は分解されず安定化し、転写因子として働く。PI3K/AKT/mTOR 経路の活性化は HIF を安定化させ、図 1 に示すような多くのがん関連タンパクを活性化させ腫瘍増殖に関与しており、本経路に着目して新規治療法開発への基盤となる研究を行う。

図 1 PI3K/Akt/mTOR 経路と HIF



mTOR 阻害剤の代表薬としてラパマイシン誘導体(ラパログ)があり,シロリムス(sirolimus),テムシロリムス(temsirolimus),エベロリムス(everolimus)が腎細胞癌,神経内分泌癌などに保

図2 mTOR 経路とラパログ



険適応されている。これらの mTOR 阻害剤は mTORC1 への特異性が比較的高く,低濃度でも S6K を不活化するが, negative feedback 経路が活性化し, Akt が逆に活性化され十分な細胞周期抑制ができない問題点がある

(Mukhopadhyay, et al, Mol Cancer Ther, 2016)。頭頸部癌では,ラパログにカルボプラチン,パクリタキセル,C-mab を用いた治験が行われ一部有用性が示された(Dunn, et al,Ann Oncol 2017; Fury et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013)が,Phase3 試験に進んだものはない。新たに開発された PLD 阻害剤(Lingelem, et al Cell Mol Life Scim 2020)や Torin-1,2 (ATP-competitive mTOR inhibitor: Liu, et al, J Biol Chem, 2012)は mTORC1,C2 選択性が低く,ラパマイシンとは作用点異なるため,低濃度ラパマイシンと併用することにより,効果的に mTOR 経路抑制が可能と考え本研究を想起した。

3. 研究の方法

研究1: 頭頸部癌細胞への PLD 阻害剤, Torin の効果, mTOR 阻害剤の併用効果

細胞株: HPV 陽性頭頸部癌株 (UM-SCC47, HPV-16), HPV 陰性頭頸部癌株 (SAS, SCC-4); 薬剤: 2 種類の PLD 阻害剤 (CAY10593, 10594, Cayman Chemical), Torin-1 (ab218606, abcom), Torin-2 (ab218607, abcom), ラパログ (temsirolimus, ab141999, abcom; everolimus, ab142151, abcom) を用いた。細胞増殖について WST-1 試験, 細胞周期解析を Flow cytometry, アポトーシスについて Annexin V アッセイや細胞周期解析による subG0/G1 期の率で解析した。それぞれ単独, ラパログ低容量 (50-100 nM) との相乗効果を解析した。

研究2: mTOR 阻害剤を用いた腫瘍マウスモデルに対する有効性・安全性の検討 (*in vivo* アッセイ)

免疫不全マウス (BALB/cAJcl-nu/nu, 日本クレア) を使用し, 1×10^5 個の頭頸部癌細胞株 (UM-SCC47, HPV 陽性) を皮下注入し皮下腫瘍モデルを作成する。研究1で PI3K/Akt/mTOR 経路が最も抑制された条件で薬剤を 2 週間経口投与し, 腫瘍サイズ, 体重を測定する。15 日目に断頭し腫瘍組織を摘出し, 凍結標本, 4%FA 固定標本を作製する。(週3回) 腹腔投与する。腫瘍サイズ, 体重を計測する。HE 染色, 免疫染色・real-time PCR (p-mTOR, HIF-1, VEGF, podoplanin, PD-L1 など) を行い抗腫瘍効果とそれに付随するシグナルの変化を解析する。

研究3: ヒト頭頸部癌標本における PI3K/Akt/mTOR 関連遺伝子, タンパク発現の検討

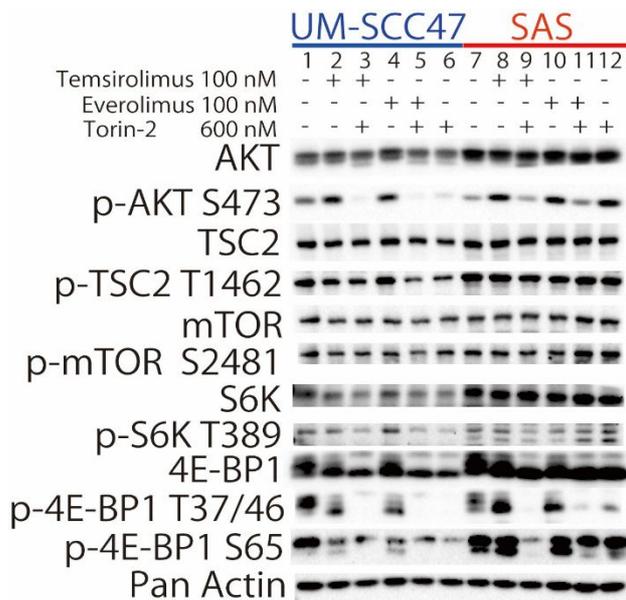
HPV PCR/*in situ* hybridization, p16 染色をおこない予後追跡可能な頭頸部癌症例 (中咽頭 105 例, 口腔 52 例, 下咽頭・喉頭 72 例) を対象に, ホルマリン標本を用いて Raptor, Rictor, SGK1, p70 S6K, 4E-BP1, HIF-1 のタンパク発現を免疫染色, 新鮮凍結標本を real-time PCR にて遺伝子発現を計測し予後を含めた臨床的特徴との関連を検討する。

4. 研究成果

研究1: 頭頸部癌細胞への PLD 阻害薬, Torin の効果, mTOR 阻害薬の併用効果

UMSCC-47 と SAS を比較すると, UMSCC-47 の方が, ラパログ, Torin-1, 2 処理によって細胞増殖

図3 ラパログ , Torin-2 と PI3K/Akt/mTOR



が抑えられた。ラパログと Torin の相乗効果は , everolimus と Torin-2 で最も顕著に観察された。各種条件を測定したところ , everolims 100nM+Torin-2 600nM の条件が最も抗腫瘍効果を示すことが判明した。この薬物濃度は、臨床使用容量よりも低い。二種類のラパログ , 二種類の Torin では , 単剤では Torin-2 が最も抗腫瘍効果を示し , また everolims と Torin-2 の併用は相乗効果を示すことがわかった。細胞株を用いて、Western blot によるシグナルタンパクを解析すると p-Akt S473、p-S6K T389、p-4E-BP1 T37/46、p-4E-BP1 S65 は temsirolimus や everolimus に Torin2 を組み合わせた方

がより発現を抑えることができた。

研究2 : mTOR 阻害薬を用いた腫瘍マウスモデルに対する有効性・安全性の検討 (*in vivo* アッセイ)

PBS, everolims, Torin-2, everolims+Torin2 の条件で比較した。免疫不全マウスに腫瘍組織は生着し、2 週間の投与期間中、動物の体重減少を認めなかった。Sacrifice 後、血液検査を実施したが、血球減少、肝腎機能障害を認めなかった。腫瘍増殖抑制効果では、Everolimus よりも Torin-2 の方がより強く増殖を減じた。また各条件の中で、Everolims+Torin-2 の条件が最も腫瘍体積は小さくなっていた。

この結果は、mTOR 阻害薬を組み合わせることによって抗腫瘍効果が増強することをしめすことができた。今後、さらに酸素濃度、PD-L1,2 発現との関連を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hirakawa Hitoshi, Ikegami Taro, Kise Norimoto, Kinjo Hidetoshi, Kondo Shunsuke, Agena Shinya, Hasegawa Narumi, Kawakami Junko, Maeda Hiroyuki, Suzuki Mikio	4. 巻 13
2. 論文標題 Human Papillomavirus Infection and EGFR Exon 20 Insertions in Sinonasal Inverted Papilloma and Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 657 ~ 657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm13040657	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Satoshi, Itoh Toshiya, Ikegami Taro, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Nakanishi Hiroshi, Ishikawa Ryuji, Kita Junya, Nakamura Yuki, Takizawa Yoshinori, Okamura Jun, Noda Yoshihiro, Iwashita Toshihide, Hariyama Takahiko, Suzuki Mikio, Misawa Kiyoshi, Kawasaki Hideya	4. 巻 13
2. 論文標題 Association between human papillomavirus particle production and the severity of recurrent respiratory papillomatosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5514 ~ 5514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-32486-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Katsunori, Maeda Hiroyuki, Kinjo Hidetoshi, Agena Shinya, Hirakawa Hitoshi, Suzuki Mikio	4. 巻 115
2. 論文標題 Effects of Nivolumab for the Head and Neck Carcinoma Patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Practica Oto-Rhino-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 875 ~ 881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴木 幹男	4. 巻 125
2. 論文標題 鼻科学の進歩 : 鼻副鼻腔腫瘍手術の進歩	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nippon Jibiinkoka Tokeibugeka Gakkai Kaiho(Tokyo)	6. 最初と最後の頁 1253 ~ 1259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴木 幹男、平川 仁	4. 巻 94
2. 論文標題 特集 ウイルス感染症に強くなる!-予防・診断・治療のポイント 《各論》 ヒト乳頭腫ウイルスと関連腫瘍	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 655 ~ 659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 比嘉 朋代、真栄田 裕行、鈴木 幹男	4. 巻 94
2. 論文標題 原著 当科で経験した孤立性線維性腫瘍3例の検討	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 99 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirakawa Hitoshi, Ikegami Taro, Touyama Masatomo, Ooshiro Yurika, Higa Tomoyo, Higa Teruyuki, Agena Shinya, Kinjyo Hidetoshi, Kondo Shunsuke, Kise Norimoto, Tanaka Katsunori, Maeda Hiroyuki, Tamaki Tomoko, Wada Naoki, Suzuki Mikio	4. 巻 12
2. 論文標題 p16 Overexpression in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma: Association with Human Papillomavirus and Prediction of Survival Outcomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 6861 ~ 6861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm12216861	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Katsunori, Hirakawa Hitoshi, Suzuki Mikio, Higa Teruyuki, Agena Shinya, Hasegawa Narumi, Kawakami Junko, Toyama Masatomo, Higa Tomoyo, Kinjyo Hidetoshi, Kise Norimoto, Kondo Shunsuke, Maeda Hiroyuki, Ikegami Taro	4. 巻 30
2. 論文標題 Biomarkers for Predicting Anti-Programmed Cell Death-1 Antibody Treatment Effects in Head and Neck Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Oncology	6. 最初と最後の頁 5409 ~ 5424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/curroncol30060410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Agena S, Hirakawa H, Ikegami T, Kinjyo H, Kise N, Maeda H, Uezato J, Kondo S, Kiyuna A, Yamashita Y, Hasegawa N, Suzuki M, Ganaha A	4. 巻 135
2. 論文標題 Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 expression in advanced pharyngeal cancer without human papillomavirus infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Laryngology & Otology	6. 最初と最後の頁 625 ~ 633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0022215121001468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikegami Taro, Hirakawa Hitoshi, Tsukahara Narutoshi, Murakami Akikazu, Kise Norimoto, Kiyuna Asanori, Kosugi Takayoshi, Agena Shinya, Kinjyo Hidetoshi, Hasegawa Narumi, Touyama Masatomo, Kondo Shunsuke, Maeda Hiroyuki, Suzuki Mikio, Ganaha Akira	4. 巻 9
2. 論文標題 Coordinated Expression of HPV-6 Genes with Predominant E4 and E5 Expression in Laryngeal Papilloma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 520 ~ 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9030520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikegami Taro, Kise Norimoto, Kinjyo Hidetoshi, Kondo Shunsuke, Suzuki Mikio, Tsukahara Narutoshi, Murakami Akikazu, Kiyuna Asanori, Agena Shinya, Tanaka Katsunori, Hasegawa Narumi, Kawakami Junko, Ganaha Akira, Maeda Hiroyuki, Hirakawa Hitoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of Antibodies against HPV-6 and HPV-11 for the Study of Laryngeal Papilloma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2024 ~ 2024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13102024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Mikio Suzuki, et al
2. 発表標題 Role of human papillomavirus infection and EGFR exon 20 insertions in malignant transformation of sinonasal inverted papilloma,
3. 学会等名 IFHNOS (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://ent-ryukyu.jp/>

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	池上 太郎 (Ikegami Taro) (00754409)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	
研究分担者	真栄田 裕行 (Maeda Hiroyuki) (40264501)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (18001)	
研究分担者	平川 仁 (Hirakawa Hitoshi) (50437993)	琉球大学・病院・講師 (18001)	

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