

機関番号：24601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592025
 研究課題名（和文）頭頸部がんにおける mTOR 阻害剤による放射線増感効果の基礎的研究
 研究課題名（英文）Effect of mTOR inhibitors on radiation sensitivity of head and neck cancer cells
 研究代表者
 太田 一郎（OTA ICHIRO）
 奈良県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00326323

研究成果の概要（和文）：放射線などに治療抵抗を示す頭頸部がん細胞において亢進している生存シグナル経路である Akt-mTOR pathway を阻害することで、放射線治療の増感効果を高めることを狙った。その結果、mTOR 阻害薬であるラパマイシンは、放射線およびシスプラチンにより誘導された Akt-mTOR pathway を抑制し、細胞周期を抑制することで細胞増殖抑制効果を示すとともに放射線およびシスプラチン誘導性のアポトーシスを増感することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A high extent of activation of the PI3K/Akt pathway is involved in head and neck cancer therapeutic resistance, including radiotherapy and chemotherapy. The aim of this study was to examine whether the effect of rapamycin, an inhibitor of mTOR, on chemo- and radio-sensitivity is affected in human head and neck cancer cells. Rapamycin could enhance the effect of radiation and cisplatin through the repression of pro-survival signals, including PI3K/Akt pathway, and the reduction in the apoptotic threshold.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部がん、放射線治療、抗がん剤、mTOR、p53、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性腫瘍の約半数以上は *p53* 遺伝子に異常があると考えられている。*p53* 遺伝子に突然変異を持つがん細胞は放射線治療や抗がん剤に対して抵抗性を示すことから、あらかじめがん細胞の *p53* 遺伝子型を知ることが治療効果の予測と、治療法の選択に有用である。我々はこれまで *p53* 遺伝子欠損型の患者には正常型 *p53* 遺伝子を

導入し、治療効果の向上を狙った研究をすすめてきた。さらに、変異型 *p53* 遺伝子のがん細胞には、変異型 *p53* タンパク質を正常型の機能に回復させる能力をもつシャペロン分子であるグリセロールを用いることによって、がん治療効果の向上を狙ってきた。さらに正常型 *p53* 細胞の感受性を超える効果は望めないことから、*p53* 遺伝子とは異なるシグナル経路を分

子標的とした化学・放射線療法による感受性の増強が必要であることが示唆されてきた。

- (2) 細胞増殖・エネルギー代謝を制御する mTOR シグナル経路は、元来、飢餓にตอบสนองした生物の生存シグナル経路と考えられてきたが、飢餓における栄養素確保以外に多様な役割を担っていることが判明してきた。これまでに種々のがん細胞において mTOR 阻害薬による増殖抑制作用が報告されている (Huang S *et al.* *Curr Opin Pharmacol.* 3: 371- 377, 2003)。興味深いことに、*p53* 遺伝子に変異を持つ細胞は mTOR 阻害薬に対して高感受性でアポトーシスが誘導されるのに対し、正常な *p53* 遺伝子を導入することによりアポトーシスが回避されることも報告されている (Huang S *et al.* *Cancer Res.* 61:3373-3381, 2001)。さらに、抗がん剤治療 (CDDP) と併用した場合、正常型 *p53* がん細胞においてのみ mTOR 阻害薬が p21 翻訳を阻害することで増感効果が認められることも報告されている (Beuvinck I *et al.* *Cell* 120: 747-759, 2005)。しかしながら、mTOR 阻害薬の放射線増感効果については十分な研究がなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

mTOR が新しいがん治療の標的として注目され、その阻害薬が強力かつ特異的な抗腫瘍活性を示すことが分かりつつある。現在、欧米で 3 種類のラパマイシン誘導体の臨床試験が腎細胞がんおよび乳がん患者などを対象に実施されている。特に、*p53* や *PTEN* の変異はヒト腫瘍の 50% 以上に認められ、mTOR 阻害薬がこれらの遺伝子に変異を持つ細胞に対して選択的に効果を発揮することは正常細胞への攻撃を回避し、腫瘍特異的ながん治療を行う上で非常に有用な薬物であることを示している。しかし、mTOR 阻害薬単独での治療効果は未だ十分とは言えない。この mTOR 阻害薬を効果的に用いるためには放射線治療との併用が考えられるが、未だ詳細な報告はない。したがって、mTOR 阻害薬による放射線治療の増感効果を探求することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) *p53* 遺伝子以外の遺伝的背景が一定な 2 種類のがん細胞 (H1299/wtp53, H1299/mp53)、および頭頸部扁平上皮癌細胞 (HSC-3、HSC-4) を用いて、ラパマイシンの有無によるシスプラチンに対する生存率、アポトーシス誘導、アポトーシス関連タンパク質の細胞内蓄積率などを調べた。

- (2) がん細胞の培養細胞レベルでの mTOR 阻害薬による放射線治療の増感効果について検討した。まず *p53* 遺伝子以外の遺伝的背景が一定な 2 種類のがん細胞

(H1299/wtp53、H1299/mp53)、および頭頸部扁平上皮癌細胞 (HSC-3、HSC-4) を用いて、ラパマイシンの有無による放射線に対する生存率、アポトーシス誘導、アポトーシス関連タンパク質の細胞内蓄積率などを調べた。

- (3) Akt-mTOR pathway による DNA 傷害性アポトーシスの制御メカニズムを細胞周期の観点から検討した。

4. 研究成果

- (1) *p53* 遺伝子型に依存せずラパマイシンによる細胞増殖の抑制効果が認められ、さらに、ラパマイシンがシスプラチン誘導性アポトーシスを増感させた (図 1)。これらのことから、ラパマイシンは *p53* 非依存的に抗腫瘍効果を発揮すること示唆された。

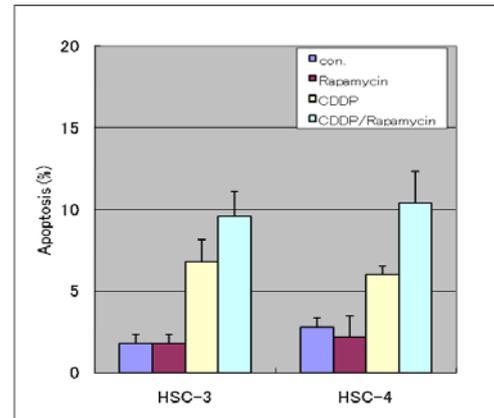


図 1 Hoechst33342 染色法によるアポトーシス解析

- (2) ラパマイシンが Akt-mTOR pathway を阻害することで、放射線誘導性アポトーシスを増感させた。(図 2)

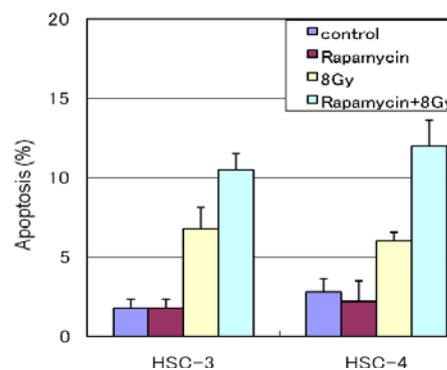


図 2 Hoechst33342 染色法によるアポトーシス解析

- (3) *p53* 遺伝子型に関わらずラパマイシン単独、シスプラチン及び放射線併用により

細胞増殖抑制効果を認めるとともに、細胞周期においてラパマイシン単独群では G₁ 停止を認め、併用群では G₁ 停止とともに S 期の減少を認めた。ラパマイシンは放射線および抗がん剤により誘導された Akt-mTOR シグナルの活性化を抑制し、正常型 p53 細胞で p53 依存的な p21^{WAF1} の誘導を抑制した。

これらの結果より、mTOR 阻害剤であるラパマイシンは、p53 遺伝子型に関わらず、放射線およびシスプラチンにより誘導された Akt-mTOR pathway を抑制し、細胞周期を抑制することで細胞増殖抑制効果を示すと共に、シスプラチンおよび放射線誘導性アポトーシスを増感させることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- (1) Nagata Y, Takahashi A, Ohnishi K, Ota I, Ohnishi T, Tojo T, Taniguchi S: Effect of rapamycin, an mTOR inhibitor, on radiation sensitivity of lung cancer cells having different p53 gene status. *Int J Oncol.* 37(4):1001-1010, 2010. 査読有
 - (2) Park SY, Kim HS, Kim NH, Ji S, Cha SY, Kang JG, Ota I, Shimada K, Konishi N, Nam HW, Hong SW, Yang WH, Roth J, Yook JI, Cho JW: Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycemic condition. *EMBO J.* 29(22):3787-3796, 2010. 査読有
 - (3) 太田一郎、家根旦有、細井裕司: Snail による MT1-MMP および MT2-MMP の癌浸潤・転移の制御. 耳鼻免疫アレルギー 28(3):235-238, 2010. 査読有
 - (4) 太田一郎、岡本倫朋、家根旦有、細井裕司: 明日の診療に役立つ頭頸部癌の基礎研究 - 分子標的治療、癌幹細胞と浸潤・転移. 頭頸部癌 36(4): 442-446, 2010. 査読有
 - (5) Ota I, Li XY, Hu Y, Weiss SJ: Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106, 20318-20323, 2009. 査読有
 - (6) Konishi N, Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Ota I, Tanaka N, Fujimoto K: Function of JunB in transient amplifying cell senescence and progression of human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 14(14): 4408-4416. 2008. 査読有
 - (7) Li XY, Ota I, Yana I, Sabeh F, Weiss SJ: Molecular dissection of the structural machinery underlying the tissue-invasive activity of membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Mol Biol Cell.* 19(8): 3221-3233, 2008. 査読有
- [学会発表] (計 16 件)
- (1) Ota I, Okamoto N, Yane K, Hosoi H: Snail1 mobilizes the membrane-anchored collagenases, MT1-MMP and MT2-MMP, to drive cancer invasion programs. The 8th AHNS 2010 Research Workshop on the Biology, Prevention and Treatment of Head and Neck Cancer. 2010/10/28, Arlington, VA, USA.
 - (2) Ota I, Yane K, Okamoto N, Hosoi H. : Snail mobilizes the membrane-anchored collagenases, MT1-MMP and MT2-MMP, to drive cancer cell invasion programs. The 13th Korea-Japan Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. 2010/09/11, Seoul, Korea.
 - (3) Ota I, Takahashi A, Yane K, Okamoto N, Hosoi H, Ohnishi T: Rapamycin inhibits proliferation and enhances cisplatin-induced apoptosis in human head and neck cancer cells. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010/09/24, 大阪市.
 - (4) 太田一郎: 明日の診療に役立つ頭頸部癌の基礎研究 I. 分子標的治療: 癌幹細胞と浸潤・転移 第 34 回 日本頭頸部癌学会 2010/06/11, 東京都.
 - (5) 太田一郎: がん癌研究 up to date 2010 世界の基礎研究の動向. 第 4 回頭頸部基礎研究会 2010/06/10, 東京都.
 - (6) 太田一郎、家根旦有、細井裕司: Snail による MT1-MMP および MT2-MMP 依存性の癌浸潤能の誘導. 第 111 回日本耳鼻咽喉科総会学術集会 2010/05/19, 仙台市.
 - (7) 太田一郎、細井裕司: Snail1 による MT-MMP および MT2-MMP の癌浸潤・転移能の制御. 第 28 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2010/02/19, 福井市.
 - (8) 太田一郎、岡本倫朋、澤西和恵、家根旦有、細井裕司: Snail を介した Wnt シグナル伝達によるがんの浸潤・転移の制御. 第 12 回癌治療増感研究シンポジウム 2010/02/13, 奈良市.
 - (9) Ota I, Yane K, Matsuura N, Takahashi A, Ohnishi T, Hosoi H: Snail1 induces the membrane-anchored collagenases, MT1-MMP and MT2-MMP, to drive

- cancer cell invasion programs *in vivo*.
第 68 回日本癌学会学術講演会、
2009/10/02、横浜市。
- (10) 太田一郎、岡本倫朋、家根旦有、細井裕司：
mTOR シグナル経路を標的とした放射線
増感効果の検討。第 33 回日本頭頸部癌学
会 2009/06/11、札幌市。
- (11) 太田一郎、岡本倫朋、家根旦有、細井裕司：
頭頸部癌細胞における mTOR 阻害薬によ
る放射線増感効果の検討。第 309 回日耳
鼻大阪地方連合会 2009/06/06、大阪市。
- (12) Ota I, Yane K, Okamoto N, Takahashi A,
Ohnishi K, Hosoi H, Ohnishi T：
Rapamycin inhibits proliferation and
enhances cisplatin- induced apoptosis in
human head and neck cancer cells. 2nd
Asian Congress of Radiation Research
(ACRR), 2009/05/ 17, Seoul, Korea.
- (13) Ota I, Sabeh F, Li XY, Yane K, Hosoi H,
Weiss SJ: The membrane-anchored
collagenase MT1-MMP and MT2-MMP
mediate tumor cell traffic through the
extracellular matrix cooperatively *in*
vivo 100th Annual Meeting of AACR,
2009/04/19, Denver, CO, USA.
- (14) 太田一郎、岡本倫朋、家根旦有、細井裕司、
大西 健、高橋昭久、大西武雄: 頭頸部が
ん細胞における mTOR シグナル経路を標
的としたシスプラチン増感効果の検討。
第 11 回 癌治療増感研究シンポジウム
2009/02/14, 奈良市。
- (15) 太田一郎、家根旦有、細井裕司 : Snail を
介した Wnt シグナル伝達によるがんの浸
潤・転移の制御。第 27 回日本耳鼻咽喉科
免疫アレルギー学会、2009/02/13、千葉市。
- (16) 太田一郎、岡本倫朋、家根旦有、細井
裕司 : mTOR シグナル経路を標的とした
シスプラチン増感効果の検討。第 32 回
日本頭頸部癌学会 2008/06/13、東京
都。

[その他]

ホームページ

<http://www.naramed-u.ac.jp/~oto/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

太田 一郎 (OTA ICHIRO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 00326323

(2)研究分担者

家根 旦有 (YANE KATSUNARI)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号 : 40220199

高橋 昭久 (TAKAHASHI AKIHISA)
群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニッ
ト・准教授
研究者番号 : 60275336