

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18318

研究課題名（和文）HPV関連頭頸部癌におけるmTOR経路Raptorを標的とした新規治療の開発

研究課題名（英文）Development of novel treatment targeting mTOR pathway Raptor in HPV-related head and neck cancer

研究代表者

上原 貴行（Uehara, Takayuki）

琉球大学・医学部・委託非常勤講師

研究者番号：00644402

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）：我々はHPV関連頭頸部癌に関し細胞増殖に関連するPI3K/Akt/mTOR経路のうちmTORC1の構成因子であるRaptorが重要な標的因子であることを先行研究で示した。今回我々は、mTORおよびRaptorを標的とし、mTOR阻害剤（テムシリムス、Torin2）を用い、Raptor高発現のHPV16関連癌細胞UMSCC047株と低発現のHPV非関連癌細胞SAS株に対する有効性を検討した。WST-1試験ではHPV関連細胞株では非関連株と比較し、上述のmTOR阻害剤併用により相乗的な増殖抑制効果を認めた。現在、免疫不全マウスでの皮下移植モデルにて同薬における効果を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPV関連頭頸部癌は本邦でも近年増加傾向にあり、その治療選択肢の拡大、特に創薬開発や従来薬における適応拡大が見込まれることは社会的に意義が高い。今回の我々の検討では分子標的治療の分野で新たな治療ターゲット候補についてその有効性を、まずは基礎実験で細胞株および動物実験において解析し、将来的に臨床での応用を目指すことを目的とする。Raptorを標的とした治療においては新薬創薬をmTOR経路の阻害剤については従来薬を利用した治療への応用が期待できると考える。

研究成果の概要（英文）：We have shown in previous studies that Raptor, a component of mTORC1, is an important target factor in the PI3K/Akt/mTOR pathway associated with cell proliferation for HPV-associated head and neck cancer. In this study, we investigated the efficacy of mTOR and Raptor targeting mTOR and using mTOR inhibitors (temsirolimus, Torin2) against Raptor high-expressing HPV16-associated cancer cell UMSCC047 and Raptor low-expressing HPV-unrelated cancer cell SAS strains. In the WST-1 study, a synergistic growth inhibitor effect was observed in HPV-related cell lines compared to unrelated strains, with the combination of the mTOR inhibitors described above. Currently, we are investigating the effects of the drug in a subcutaneous transplantation model in immunodeficient mice.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：HPV関連頭頸部癌 Raptor PI3K/Akt/mTOR経路

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

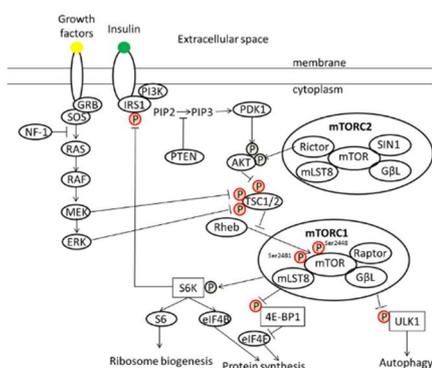
(1) HPV(ヒト乳頭腫ウイルス)関連頭頸部癌の疫学的および臨床的背景

頭頸部は呼吸・嚥下などの生命維持に関係する機能に加えて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な身体部位である。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 QOL の維持が大切になる。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、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・晩期合併症を減じる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が、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の継続が必要である。

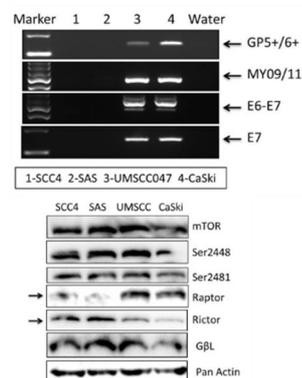
(2) HPV 関連癌における分子生物学的プロファイリング (mTORC1 / Raptor を含め)

HPV (ハイリスク型 16,18 型) はバリア機能の破綻した上皮細胞に持続的に感染し、宿主遺伝子にウイルスゲノムが integration され、ウイルス由来がん遺伝子である E6, E7 の恒常的発現により、遺伝子産物となる E6 蛋白はがん抑制因子 p53 の発現低下を、E7 蛋白はがん抑制因子 pRb 蛋白の分解を誘導し、p21 や転写因子 E2F の抑制により細胞周期の亢進、癌化を誘導することが知られている (Munger K et al, J Viol, 2004)。さらに我々の研究で感染した HPV ゲノムの LCR 領域における GpC 部位のメチル化が E6, E7 の発現に深く関与していることが明らかになった (Zhang C et al, PLoS One, 2015)。また、EGFR (Epidermal growth factor receptor)、c-MET、IGF-1R などの受容体型キナーゼや PI3K/Akt/mTOR 経路、Ras/Raf/MAPK 経路などの細胞内シグナル伝達系や血管新生に関連して VEGF (Vascular endothelial growth factor)、HIF-1 などが HPV 関連癌において特異的活性化シグナルとなりうる可能性が示唆されている (Rmolho et al, Onco Rep, 2010)。また頭頸部扁平上皮癌において、HPV 関連癌では HPV 非関連癌との比較で PIK3CA の遺伝子変異が多いとの報告もある (The Cancer Genome Atlas Network, Nature, 2015)。しかしながら、HPV 関連頭頸部癌においては特異的な活性化シグナル伝達経路や分子の同定については不明な点が多いのが現状である。

HPV関連癌に関連する主要な細胞内シグナル伝達系



HPV感染細胞株におけるmTOR経路/Raptorの発現(自験)



## 2. 研究の目的

我々が先行研究として行った検討において、これまでに HPV 関連頭頸部癌 (UMSCC047 株) 子宮頸癌細胞株 (CaSki 株) と HPV 非関連癌細胞株において、前述した細胞内シグナル伝達系に参与する各種阻害剤 (PI3K、MAPK、mTOR) を用いて、WST-1 試験による細胞増殖抑制効果を検討すると、mTOR 阻害剤である Temsirolimus において HPV 関連癌で有意により高い細胞増殖抑制効果を示すことを確認した。さらに、HPV 関連癌において重要な mTOR 複合体 (mTORC1) の構成因子である Raptor の発現が、細胞株においては mRNA および蛋白レベルで、また臨床検体においても mRNA レベルで有意に上昇していることを確認した (Kondo S et al, BMC Cancer, 2021)。今回、HPV 関連頭頸部癌における mTOR 経路および Raptor を治療標的とした分子標的治療への応用を目的に更なる検討を行うことを計画した。

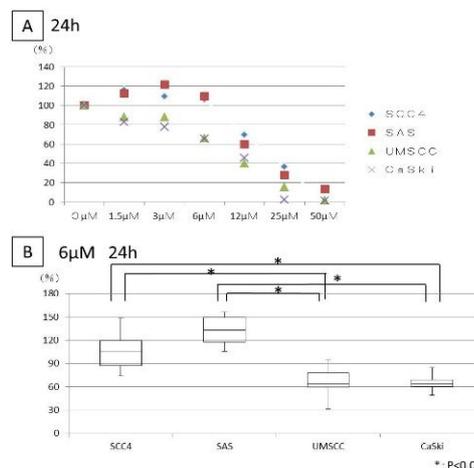
## 3. 研究の方法

先行研究から Raptor が高発現している HPV16 感染頭頸部癌細胞株 UMSCC047 を用いて、関連する経路である PI3K/Akt/mTOR 経路を標的とした抗腫瘍効果を検討するため、mTOR 阻害剤 (mTOR 核酸アナログ; テムシロリムス、Torin1,2 等) による細胞増殖抑制効果について WST-1 試験にて検討した。

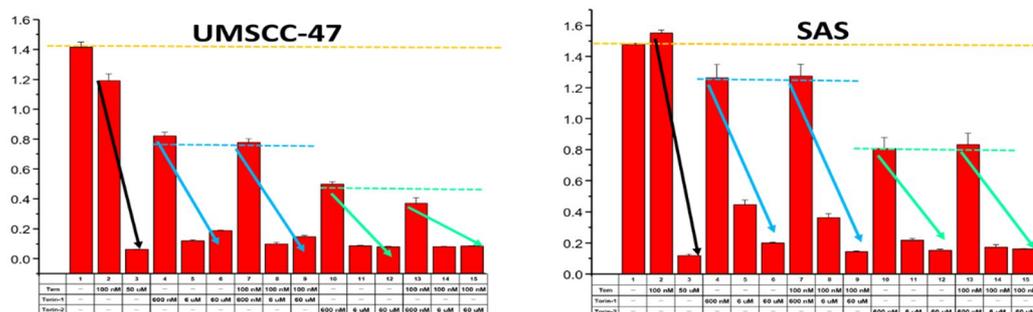
## 4. 研究成果

### (1) mTOR 阻害剤による Raptor 高発現の HPV 関連癌細胞株における細胞増殖抑制効果の検討

Raptor 高発現を認めた HPV 関連頭頸部癌である UMSCC047 株および子宮頸癌株 CaSki 株においてテムシロリムスを 24 時間曝露させると濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示し、特に Raptor 低発現株と比較しテムシロリムス 6 μM 下で有意に高い細胞増殖抑制効果を確認した。(右図)



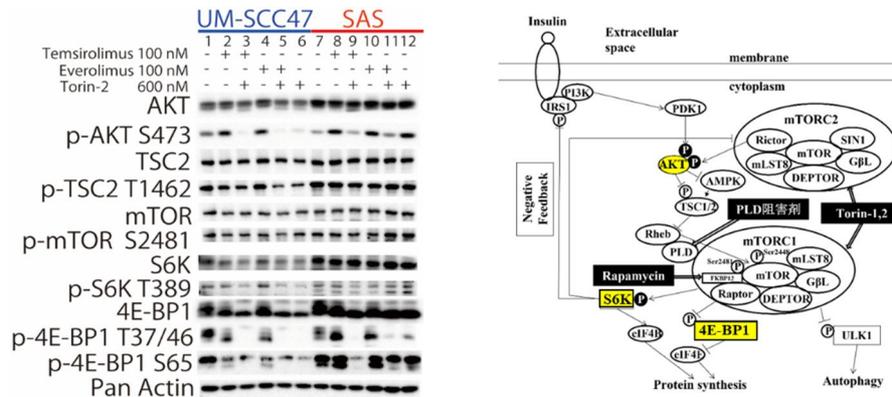
さらに、HPV 関連頭頸部癌細胞株である UMSCC047 と非関連細胞株である SAS にテムシロリムスと別経路の mTOR 阻害剤である Torin-1、Torin-2 を併用曝露下に WST-1 アッセイを行うとテムシロリムス (100nM) と Torin-2 (600nM) を併用した際に、相乗的に細胞増殖を抑制することが分かった。一方でテムシロリムスと Torin-1 併用では相乗効果は確認されなかった。(下図)



テムシロリムス (100 nM) と Torin-2 (600 nM) 曝露下に、PI3K/Akt/mTOR 経路に関連するシグナル伝達因子のタンパク発現への影響を検討すると、Torin-2 を併用することで Akt、S6K、4E-

BP1 のリン酸化が抑制された。これが細胞増殖抑制メカニズムに関与していると考えられた。

( 下图 )



( 2 ) mTOR 阻害剤を用いた腫瘍マウスモデルを用いた有効性・安全性の検討

さらに mTOR 阻害剤における in vivo の検討を行うために、免疫不全マウス ( NOD -SCID マウス ) を用いて UMSCC047 株の皮下移植腫瘍モデルを作成した。同マウスの皮下に  $1 \times 10^7$  個の細胞を注入し腫瘍生着を確認した後に、腹腔内に mTOR 阻害剤を単剤および併用で投与しプラセボ投与との比較で抗腫瘍効果を検討した。現在、マウスに対する耐毒性かつ抗腫瘍効果を示す薬剤至適濃度の設定に難渋しており、条件検討中である。

残された課題 :

当初 mTOR 阻害剤の実験と併せて Raptor に対する siRNA を用い遺伝子ノックダウンでの抗腫瘍効果の確認や mTOR 経路関連のシグナル伝達因子 ( p-mTOR、S6K/p-S6K、4EBP1 等 ) の発現解析を今後追加で実施する予定である。また上述の動物実験による in vivo での有効性検討についてもさらに追加検討が必要と考えている。

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

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