

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25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890124

研究課題名（和文） mTOR、HSP90が口腔癌血管新生に果たす役割

研究課題名（英文） The role of mTOR and HSP90 against oral cancer induced angiogenesis

研究代表者

奥井 達雄 (OKUI TATSUO)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：40610928

研究成果の概要（和文）：

下顎歯肉癌のサンプルにおいて CD31, VEGFR2 高発現を認める血管内皮細胞が多く認められた。癌細胞には VEGFA を強く発現していた。HSP90 と mTOR の阻害薬は単独で使用するよりも強く VEGFA 発現口腔癌細胞増殖を抑制し、同時に血管内皮細胞の増殖を抑制することが明らかになった。ゼラチンザイモグラフィより HSP90, mTOR 阻害薬の相互作用により血管内皮細胞の MMP-2 の活性が抑制することが明らかになった。口腔癌細胞マウス皮下移植モデルにおいて同薬剤の併用療法により腫瘍細胞の抑制だけでなく、血管内皮細胞の抑制が確認された。

研究成果の概要（英文）：

From surgically resected lower gingival squamous cell carcinoma samples, CD31 and VEGFR2 were highly expressed in vascular endothelial cells, and VEGF-A was expressed in tumor cells. The combination treatment of HSP90 inhibitor and mTOR inhibitor significantly inhibited VEGF induced cell proliferation, tube formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) more than the single treatment of them. Gelatin zymography showed that the combination treatment inhibited the activation of MMP-2 induced by VEGF in HUVEC more than the single treatment of them. Immunohistochemical analysis of mice xenografted with SAS oral squamous cell carcinoma cells showed a significant reduction in CD31-positive tumor vasculature in HSP90 inhibitor and mTOR inhibitor-administrated mouse tumor sections compared with the single treatment of them. Furthermore, the combination treatment of them suppressed both VEGFR2 and MMP-2 expression compared with both the control and the single treatments.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 総計 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

研究分野：口腔癌

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：HSP90 mTOR 口腔癌

1. 研究開始当初の背景
癌の増殖と血管新生は、多くの制御因子を共有している。また癌細胞が産生する血管新生因子により腫瘍組織周囲に新生血管が誘導され腫瘍を栄養している。癌治療における血管新生抑制は間接的に癌細胞の増殖を抑制することが報告されてきた。Temsirolimus, NVP-AUY922 はそれぞれ phosphatidylinositol3-kinase (PI3K)-Akt 下流に存在する mTOR と HSP90 を標的分子として同定された新規の免疫抑制剤である。mTOR は癌細胞の分裂や成長、生存における調節因子としての役割を果たし、HSP90 はそれらの増殖因子の活性化を促進している。こういった背景から近年、抗腫瘍薬の標的として肺癌、乳癌、腎癌など軟部組織腫瘍の増殖能抑制効果の報告がなされている。また mTOR, HSP90 は癌血管新生において主導的な役割を果たす血管内皮細胞においても強く発現しており、単に癌細胞の増殖のみならず癌血管新生においても促進的に働くことが予想される。しかしながら口腔癌の増殖、癌血管新生における mTOR, HSP90 の役割に関しての報告は殆ど無い。そこで申請者は口腔癌、癌血管新生における mTOR, HSP90 シグナルの役割を詳細に検討し同現象における mTOR, HSP90 を標的とした新たな治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的
口腔癌の進展過程において、腫瘍周囲への血管新生は治療法の選択、手術範囲の決定において重要な因子となっており、予後を左右する負の要因となっている。Heat Shock Protein 90 (HSP90) は mammalian Target of Rapamycin (mTOR) シグナルの下流に存在する Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) を活

性化することにより口腔扁平上皮癌の増殖・生存に関与することが報告されている。申請者は mTOR, HSP90 を選択的に阻害することで口腔扁平上皮癌の増殖が抑制されると同時に VEGF 発現が抑制されることを初めて報告した。しかしながら癌血管新生における HSP90, mTOR シグナルの生物学的な重要性はいまだ明らかにされておらず、そのメカニズムは不明である。したがって、本研究は 癌血管新生における mTOR, HSP90 シグナルの役割を解明し、口腔癌における新たな抗癌剤治療法を確立することを目的に行う。

3. 研究の方法

(1) 各種癌細胞における Akt, mTOR, HSP90 発現量、それらの活性化の比較検討

①各種口腔扁平上皮癌細胞株、また対照として高転移乳癌細胞株を用い、これら癌細胞における Akt, mTOR, HSP90 の発現量、活性化を調べる。その指標として phospho (p)-Ser⁴⁷³-Akt, p-Ser³⁰⁸-Akt, p-Ser²⁴⁴⁸-mTOR, HSP90-C45G5 抗体を用いた Western blot 法を行い Akt, mTOR, HSP90 のリン酸化高発現群と低発現群に分ける。

(2) mTOR 選択的阻害薬 Temsirolimus, HSP90 選択的阻害剤 NVP-AUY922 が癌細胞、血管内皮細胞における細胞増殖、アポトーシスに与える影響

① Temsirolimus, NVP-AUY922 IC₅₀ の測定：各種口腔扁平上皮癌細胞株、高骨転移乳癌細胞株、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)、(以下各種細胞と略) における Temsirolimus, NVP-AUY922 IC₅₀ の測定を行う。

② p-Ser²⁴⁴⁸-mTOR, p-p70S6K, p-S6 に及ぼす影響：各種細胞 (2.1) を 10% ウシ胎児血清 (FBS) 添加 DMEM 培地で刺激させ、

Temsirolimus を 1-100nM, NVP-AUY922 を 1-10nMで添加15, 30, 60, 120分後細胞を可溶化させp-Ser²⁴⁴⁸-mTOR, p-p70S6K, p-S6, HSP90 VEGFに与える影響をウエスタンブロット法を用いて確認する。さらにこれらの薬剤の影響をAkt-mTOR上流にあるphosphoinositide-3-kinase (PI3K)阻害剤と比較するためLY294002(20mM)でこれらの細胞を処理を行い比較検討を行う。

③細胞増殖能に与える影響：各種細胞(2.1)を10% FBS添加DMEM培地で刺激させ、Temsirolimus を 1-100nM, NVP-AUY922 を 1-10nMで添加後、^[3H] thymidineの取込みを測定する。

④アポトーシスに与える影響：各種細胞(2.1)を播種しTemsirolimus 1-100nM, NVP-AUY922 1-10nMで添加し、AnnexinV-FLUOS Apoptosis kit (Roshe)を用いてアポトーシスを起こした細胞を測定する。またCasupase3, 7, 9, Bax等のアポトーシス関連因子をウエスタンブロット法, activity assay kit(Biovision, Oncogene Res Prducts)を用いて明らかにする。

(3)

癌細胞におけるmTOR, HSP90シグナルが血管新生に及ぼす影響の検討：各種細胞(1.1)培養上清でヒト臍帯静脈血管内皮細胞を刺激し、血管内皮細胞の増殖能, 管腔形成能に関して検討する。またこれら細胞が産生する血管新生導因子, VEGF, MMP-2, MMP-9, VEGFRの発現を解析する。

4. 研究成果

口腔癌の進展過程において、腫瘍周囲への血管新生は治療法の選択、手術範囲の決定において重要な因子であり、予後を左右する負の要因となっている。申請者はHeat Shock Protein 90(HSP90), mammalian

Target of Rapamycin (mTOR)シグナルが下流のVascular Endothelial Growth factor (VEGF)を活性化することにより口腔扁平上皮癌の増殖ならびに血管新生に参与する事を見いだした。この結果をもとに申請者はmTOR, HSP90阻害薬による新規分子標的治療法を検討することとした。申請者はHSP90, mTOR選択的阻害薬Temsirolimus, NVP-AUY922を用いることで口腔扁平上皮癌の増殖が抑制されると同時にVEGF発現が抑制されることを報告した。さらに申請者はTemsirolimus, NVP-AUY922を用い癌血管新生においてHSP90, mTORの働きの一部を明らかにした。HSP90は多くのclient proteinを有しており、この中には血管内皮細胞上のVEGFR2も含まれる。HSP90阻害薬NVP-AUY922はmTOR阻害薬である

Temsirolimusと同調して血管内皮細胞の管腔形成を抑制した。このメカニズムはNVP-AUY922が血管内皮上のVEGFR2の発現を抑制し、それによりMMP2の発現を抑制することが関与すると考えられた。またHSP90はAktのclient proteinであるためin vitroにおいてNVP-AUY922がmTOR阻害薬Temsirolimusの非Akt依存性の抗悪性腫瘍効果を増加させた。上記のようにTemsirolimusとNVP-AUY922は異なるシグナル伝達阻害薬でありながらそれぞれの抗悪性腫瘍効果を増強し合っている。マウス皮下腫瘍移植モデルにおいてもHSP90阻害薬とmTOR阻害薬は協調的に腫瘍抑制にはたらし、新生血管を著明に抑制した。

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5件)

① Okui T, Shimo T, Fukazawa T, Mohammad

Monsur Hassan N, Honami T, Ibaragi S, Takaoka M, Naomoto Y, Sasaki A. Novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 enhances the anti-tumor effect of temsirolimus against oral squamous cell carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013 Mar;13(3):289-99 査読あり.

- ② Kurio N, Shimo T, Fukazawa T, Okui T, Hassan NM, Honami T, Horikiri Y, Hatakeyama S, Takaoka M, Naomoto Y, Sasaki A. Anti-tumor effect of a novel FAK inhibitor TAE226 against human oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2012 Nov;48(11):1159-70. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.05.019. Epub 2012 Jul 4. 査読あり
- ③ Kishimoto K, Yoshida S, Ibaragi S, Yoshioka N, Okui T, Hu GF, Sasaki A. Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin, besides VEGF, is related to progression of oral cancer. *Oral Oncol*. 2012 Nov;48(11):1120-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.05.009. Epub 2012 Jun 12. 査読あり
- ④ Honami T, Shimo T, Okui T, Kurio N, Hassan NM, Iwamoto M, Sasaki A. Sonic hedgehog signaling promotes growth of oral squamous cell carcinoma cells associated with bone destruction. *Oral Oncol*. 2012 Jan;48(1):49-55. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.08.026. Epub 2011 Sep 25. 査読あり
- ⑤ Okui T, Shimo T, Hassan NM, Fukazawa T,

Kurio N, Takaoka M, Naomoto Y, Sasaki A. Antitumor effect of novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 against oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2011 Apr;31(4):1197-204. 査読あり

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
奥井 達雄 (OKUI TATSUO)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号：40610928
- (2) 研究分担者
- (3) 連携研究者