

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591964

研究課題名(和文) HSP90阻害剤を用いた食道癌に対する新規分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Antitumor effect of a novel HSP90 inhibitor in esophageal cancer cells

研究代表者

山辻 知樹 (Yamatsuji, Tomoki)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40379730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌に対する新規分子標的療法の開発を目指し、HSP90阻害剤AUY922の食道癌培養細胞に対する増殖抑制効果を検討した。1) AUY922をヒト食道癌培養細胞TE-1, TE-4, TE-8およびTE-10に加えると、全細胞株において細胞増殖抑制効果がみられた。TE-4のIC50は25nM前後と高感受性株であり、TE-1, TE-8 およびTE-10は様々な培養条件によらず低感受性株であった。2) TE-4においてPTENの発現低下が示された。TE-4にAUY-922を加えるとAktおよびリン酸化Akt、さらにリン酸化ERKの抑制が認められ、感受性の差がPTENによって制御されている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the antitumor effects of a novel HSP90 inhibitor, AUY922, in esophageal squamous cancer cells (ESCC). Four ESCC cell lines (TE-1, TE-4, TE-8, TE-10) were examined. AUY922 inhibited the proliferation of ESCC, particularly in PTEN-null TE-4 cells with a 2-3 times lower IC50 than the other cell lines. Western blot analysis showed that PTEN-null TE-4 cells showed higher Akt activity, which contribute to cell proliferation and survival. AUY922 suppressed the activity of Akt in TE-4 but not in PTEN-proficient TE-10 cells. AUY922 exhibits a strong antiproliferative effect, revealing its potential as a novel therapeutic alternative to current ESCC treatment. The effect may be improved further by impeding PTEN expression.

研究分野：医歯薬学

キーワード：食道外科学

1. 研究開始当初の背景

(1)【食道癌とその予後について】

食道癌は我が国で年間約1万人以上が罹患し、近年増加傾向である。初期には嚥下困難などの症状に乏しく、診断時にはすでに転移を伴う進行がんであることも多く、手術・化学放射線療法いずれの治療法をもってしてもその予後は極めて厳しく、5年生存率は50%前後である。早期食道癌に対しては内視鏡治療、限局した進行がんに対しては開胸・開腹手術が適応となり、さらに進行した食道癌は化学放射線療法の適応となる。全身化学療法は遠隔転移を来した食道癌では唯一の治療法であるが、その奏効率は化学療法単独で40%程度と決して芳しくはない。全身化学療法はシスプラチンなどの白金製剤と5FUを組み合わせたFP療法が第一選択であり、無効例に対してはタキサン系が用いられるが、奏効率はさらに悪くなる。消化器癌の中でも大腸癌や胃癌に対してはEGFRをはじめ特定の分子の活性化を抑制する分子標的治療が臨床応用されてきたが、食道癌においてその開発は特に遅れている。切除不能再発食道癌の予後改善に貢献できるような治療薬は現れておらず、新たな分子標的治療法の開発が急務である。

(2)【HSP90とその阻害剤について】

HSP90は主要な細胞内分子シャペロンのひとつであり、細胞に対するストレス環境においてその発現量が増大する。HSP90は正常細胞にも多く存在するが、食道癌などの悪性腫瘍細胞には恒常的に多く発現され(図1)、その癌化にかかわる多くのタンパク質と相互作用することが知られている。このことから、HSP90は悪性腫瘍に対する新規治療のターゲットとして注目を集めている。HSP90の阻害薬として知られているゲルダナマイシンはHSP90のATP結合ポケットに結合してそのシャペロン機能を抑制し、HSP90依存性のクライアントタンパク質の不活性化や分解を引き起こす。ゲルダナマイシンと同様のHSP阻害効果を持つ17-AAGも、培養癌細胞の増殖抑制や、実験動物モデルでの腫瘍縮小を誘導することが報告されている。近年分子標的薬剤の創薬技術革新が進み、数種類のHSP90特異的阻害剤が開発された。合成開発された新規HSP90特異的阻害剤の一つであるAUY922はその阻害効果の高さと特異性から、最も臨床応用に近い阻害剤であると考えられている。

2. 研究の目的

(1) HSP90阻害剤AUY-922による食道癌培養細胞に対する増殖抑制効果の確認

(2) 新規HSP90阻害剤AUY-922による食道癌細胞の増殖抑制機序の解明 癌細胞増殖に関わる各種タンパク質の発現および活性化の検索

(3) HSP90阻害剤を用いた食道癌に対する新規分子標的療法の開発

食道癌は予後がきわめて不良な悪性腫瘍で、大腸癌やその他の消化器癌と比べると、明らかな原因遺伝子変異が確定されておらず、いくつかの遺伝子変異やエピジェネティックな変化が蓄積して癌が形成されると推定されている。このため、既存の分子標的治療薬の様に単一分子のリン酸化を特異的に抑制するような薬剤では効果が期待できない。HSP90は多くの悪性腫瘍に発現しており、新規分子標的治療の標的として期待されてきた。我々はこれまでHSP90阻害剤によるヘパラーゼとHSP90核内移行の抑制の研究を通じて、癌の転移・浸潤・分化と細胞遊走能がHSP90阻害剤であるゲルダナマイシンや17-AAGによって抑制されることを明らかにした(Nobuhisa T, Yamatsuji T, Naomoto Y et al. Cancer Sci 98: 535-540, 2007)。また、新規HSP90特異的阻害剤AUY922を導入し、消化器癌の転移・浸潤・分化能の解析(平成21年度科学研究費補助金基盤研究C)や、KRAS遺伝子に変異をもつ肺癌治療への応用(平成23年度科学研究費補助金基盤研究C)を通じて、HSP阻害剤を用いた新規分子標的治療法の開発に取り組んできた。本研究はこれまでに得られたHSP阻害薬を用いた研究成果を、予後不良の難治性悪性腫瘍である食道癌の治療に応用しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) HSP90阻害剤AUY-922による食道癌細胞増殖抑制効果の検討

我々はこれまで消化器癌培養細胞、KRas変異型肺腺癌培養細胞を用いてHSP90阻害剤による増殖抑制効果を示し、その分子生物学的機序を解析中である。本研究ではヒト食道癌細胞TE-1, TE-4, TE-8, TE-10を用いた。これらの培養細胞に新規HSP90阻害剤AUY922を各々加え、その細胞増殖に対する抑制効果を確認した。各培養細胞に低濃度から高濃度までのHSP90阻害剤を加え、24から72時間培養しトリパンブルー染色によって生細胞数を計算し、細胞増殖抑制効果を算出した。

(2) HSP90阻害剤AUY-922による増殖抑制機序の解析

HSP90阻害剤によって食道癌細胞の増殖抑制がみられた場合に、その分子生物学的機序

の探索を行う。癌細胞の増殖に深く関わる分子である PTEN, AKT および ERK の発現量と各分子のリン酸化をウエスタン・ブロッティング法により検索した。

HSP90 阻害剤を加えて 24 から 72 時間培養した細胞を回収し、溶解液にて細胞質・細胞膜成分と核タンパク成分を各々抽出し、タンパク量を測定した後、各 40 μg の試料を 8 - 12% のポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行う。泳動後のゲルからタンパクを PVDF 膜にブロッティングし、各種抗体で検出する。まず抗 HSP90 抗体によって HSP90 の発現量を確認し、PTEN, AKT および ERK と各々のリン酸化分子に対する抗体を用いて、HSP90 阻害剤が癌細胞の増殖シグナルに対する影響を詳細に検討した。

(3) 研究の総括・統計解析

HSP90 阻害剤 AUY-922 の食道癌培養細胞に対する増殖抑制効果・分子生物学的機構の検討結果を総括・統計解析し、PTEN, AKT や ERK に代表される癌細胞増殖関連分子発現との関連とその意義を検討し、近い将来臨床応用可能な新規分子標的治療法として、国内外の学会および誌上発表を行った。

4. 研究成果

(1) HSP90 阻害剤 AUY-922 による食道癌細胞増殖抑制効果の検討: AUY922 をヒト食道癌培養細胞 TE-1, TE-4, TE-8 および TE-10 に加えると、全細胞株において細胞増殖抑制効果がみられたが、細胞株間に感受性の差があることが判明した。当初トリパンブルー染色により細胞増殖抑制効果を算出していたが、2 年目以降は WST-1 法を導入して増殖抑制効果の測定を開始した。最終年度にはこれまでのトリパンブルー染色法および WST-1 法を総括し、各細胞株の IC50 を算出し、考察を加えた。TE-4 の IC50 は 25nM 前後と高感受性株であり、TE-1, TE-8 および TE-10 は様々な培養条件によらず低感受性株であった (表 1)。

表 1. HSP90 阻害剤 AUY-922 による食道癌細胞増殖抑制効果 - 各種食道癌培養細胞株における IC50 値 (発表論文 より改変)

Cell line	TE-1	TE-4	TE-8	TE-10
IC50(nM)	72.37	25.29	52.85	71.30

(2) AUY-922 による食道癌細胞増殖抑制機序: AUY-922 による増殖抑制の機序を明らかにするため、ウエスタン・ブロッティング法により癌増殖関連分子の発現を検索した。TE-1 および TE-8 ではリン酸化 Akt の発現抑制が認められた。TE-4 においては PTEN

の発現が認められなかった。TE-4 に AUY-922 を加えると Akt およびリン酸化 Akt、さらにリン酸化 ERK の抑制が認められた。PTEN が多く発現している TE-10 ではこれらの現象は認められず、AUY-922 に対する感受性の差は PTEN によって制御されている可能性が示された (図 1)。

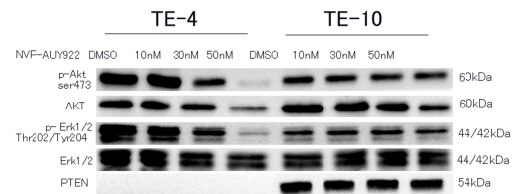


図 1. HSP90 阻害剤 AUY-922 の Akt および Erk の発現に対する効果 (発表論文 より改変)

(3) 総括: 我々はこれまで消化器癌培養細胞 (平成 21 年度基盤研究 C) KRas 変異型肺腺癌培養細胞 (平成 23 年度基盤研究 C) を用いて HSP90 阻害剤による増殖抑制効果とその機序を解析したが、食道癌においてはその意義は明らかではなかった。本研究は HSP90 阻害剤 AUY-922 の食道癌培養細胞に対する増殖抑制効果と増殖関連分子発現との関連とその意義を明らかにした。

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 4 件)

山辻知樹: HSP 阻害剤を用いた難治性消化器癌に対する新規分子の治療法の開発. 川崎医学会誌. 40(補遺号)Page53, 2014

Bao XH, Takaoka M, Hao HF, Fukazawa T, Yamatsuji T, Sakurama K, Takigawa N, Nakajima M, Fujiwara T, Naomoto Y. Antiproliferative effect of the HSP90 inhibitor NVP-AUY922 is determined by the expression of PTEN in esophageal cancer. *Oncol Rep.* 2013 ;29(1):45-50. (査読有) DOI: 10.3892/or.2012.2074.

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 ;13(3):289-99. (査読有) DOI: 10.2174/1568009611313030007

Nishikawa T, Takaoka M, Ohara T,

Tomono Y, Hao H, Bao X, Fukazawa T, Wang Z, Sakurama K, Fujiwara Y, Motoki T, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Tanaka N, Fujiwara T, Naomoto Y.
Antiproliferative effect of a novel mTOR inhibitor temsirolimus contributes to the prolonged survival of orthotopic esophageal cancer-bearing mice. Cancer Biol Ther. 2013 ;14(3):230-6. (査読有)
DOI: 10.4161/cbt.23294.

〔学会発表〕(計3件)

山辻知樹: HSP 阻害剤を用いた難治性消化器癌に対する新規分子的治療法の開発
第5回川崎医科大学学術集会 2014年8月2日 於川崎医科大学(岡山県倉敷市)

高岡宗徳、深澤拓也、山辻知樹、猶本良夫: HSP90 阻害剤 NVP-AUY922 による食道癌にたいする抗腫瘍効果は PTEN の発現により変化する .第66回日本食道学会学術集会 2012年6月22日 於軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県軽井沢町)

Takaoka M, Fukazawa T, Yamatsuji T, Naomoto Y: HSP90 inhibitor NVP-AUY922 exhibits the potent antiproliferative effect in gastrointestinal cancer cells with a lack of PTEN expression. AACR Annual Meeting 2012 2012年4月2日 於 McCormick Place West(米国シカゴ)

〔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:
出願年月日:

取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者

山辻 知樹 (YAMATSUJI TOMOKI)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40379730

(2) 研究分担者

猶本 良夫 (NAOMOTO YOSHIO)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00237190

深澤 拓也 (FUKAZAWA TAKUYA)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20379845