

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593025

研究課題名(和文) 分子標的治療薬mTOR阻害剤と放射線を併用した新たな口腔癌治療開発の基礎的研究

研究課題名(英文) Molecular targeting therapy by targeting mTOR pathway combined with radiation therapy for oral cancer

研究代表者

飛田 尚慶(TOBITA, Takayoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：00336174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 癌治療においてmTOR阻害剤の応用が期待されているが、口腔癌ではその抗腫瘍効果を調べた研究は少ない。一方で、放射線とmTOR阻害剤の併用効果に関する研究は、現在までに行われていない。そこで、本研究ではmTOR阻害剤の併用により、低強度の放射線濃度で癌細胞の増殖抑制を図ることが可能かを検討した。その結果、Hela細胞株、肺転移由来細胞株、シスプラチン耐性細胞株の3種の扁平上皮癌細胞株にmTOR阻害剤を添加培養したところ、全ての細胞株において50%細胞増殖阻止に必要な放射線強度の低下が認められた。

研究成果の概要(英文)： Although mTOR inhibitors are expected to be options for the treatment of cancers, it is little known about the treatment effects of mTOR inhibitors when combined with radiation therapy. Therefore, we assessed the potential of this combined therapy in vitro. As a result, cell proliferation of three cancer cell lines [Hela cell, cisplatin-resistant cell (RCB1152), and lung squamous carcinoma cell (RCB0444)] was strongly inhibited after irradiation when exposed to mTOR inhibitors in culture.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 分子標的治療薬 mTOR

1. 研究開始当初の背景

T3、T4 まで進展した口腔癌症例では、外科的切除による手術療法が第一選択となっているが、その後放射線と化学療法剤による術後補助治療 (neo-adjuvant 療法) を行うことが殆どである。しかし、この術後補助療法は放射線治療や化学療法剤の単独治療と比較して汎血球減少や粘膜炎などの有害事象 (副作用) が重篤化する傾向がある。また、一旦腫瘍が転移すると治療に抵抗性を示し、制御が困難になることが大変多い。

近年悪性腫瘍に対する創薬研究が国内外で盛んに行われている。この内細胞増殖に必要な増殖因子受容体や細胞内シグナル分子を阻害する作用を持つ分子標的治療薬の研究開発が盛んに行われている。この分子標的薬の中で、mTOR (mammalian Target of Rapamycin) 阻害薬があげられる。mTOR 阻害剤は細胞内シグナル伝達経路の P13K/Akt カスケードをブロックすることで、細胞の DNA 合成期の G1 停止を惹起させると共に、細胞の生存活動に必要なタンパク合成を阻害し、細胞増殖を止めることで抗腫瘍効果を示すと言われている。現在は肺癌や前立腺癌、腎癌に対する治療として mTOR 阻害剤の臨床応用が期待されているが、口腔癌に関しては mTOR 阻害剤の抗腫瘍効果を調べた研究は少ない。さらに、放射線と mTOR 阻害剤の併用効果に関する研究は、現在までに行われていない。

2. 研究の目的

本研究は、再発および抗癌剤耐性の口腔癌細胞株に対して、分子標的治療薬である mTOR 阻害剤のうち、作用機序が異なる 2 種類の薬であるラパマイシン誘導体: RAD001 と ATP 競合型阻害剤: Torin 1 の抗腫瘍効果の違いを調べると共に、どちらがより強い放射線増感作用を有するかを調べ、従来の方法では進展および再発口腔癌に対して治療効果

に乏しかった放射線・抗癌剤治療に代わる、新しい口腔癌治療法の開発のための基礎研究として企画した。具体的には、3 種類の扁平上皮癌株: HeLa 細胞株、肺転移由来株 RCB0444、シスプラチン耐性株 RCB1152 を培養し、70% コンフルエントに増殖した時点で mTOR 阻害剤の Rad001、Toirm1 を培地内に添加し、両薬剤の癌細胞に対する抗腫瘍効果を比較検討することである。

3. 研究の方法

mTOR は mTOR 複合体 1 (mTORC1) と mTOR 複合体 2 (mTORC2) の 2 種類が存在する。mTORC1 は細胞の蛋白合成と血管新生を制御しているのに対し、mTORC2 は細胞のアポトーシス制御やその上流にある Akt カスケードも制御している。本研究では、mTORC1 のみを阻害するラパマイシン誘導体と、mTORC1 と mTORC2 双方を阻害する ATP 競合型阻害剤の 2 剤の口腔癌細胞の増殖阻害効果の違いを調べると共に、放射線増感効果にどちらがより優れるかを検証することが目的である。このため、本研究では口腔癌細胞の 3 種類の由来株: 腫瘍本体由来株、転移巣由来株、シスプラチン耐性腫瘍由来株 を用いて、in vitro 上でラパマイシン誘導体の RAD001 と ATP 競合型阻害剤の Torin 1 の 2 剤が、どのような作用機序で増感を抑制するのか、又、由来の異なる口腔癌細胞株に対しても、どちらが安定した増殖抑制効果を有するかについて、分子生物学的手法 (細胞内シグナル伝達経路、細胞活性状態、DNA 合成周期および Apoptosis 頻度) から検討する。

次に、同様の細胞株に単独で放射線 (X 線) を照射し、腫瘍細胞の再増殖を阻害しない放射線照射量 (^{50}IC) を検索する。最終的に 2 つの mTOR 阻害剤を 3 種類の細胞株に添加した後、放射線照射を行い、2 種類の mTOR 阻害剤のどちらがより放射線増感効果を有するかを評価し、口腔癌の新たな治療法となり

うる放射線と分子標的治療薬の併用療法の基礎疾患を作り上げる。

本研究では、以下の3点について研究を行った。

ラパマイシン誘導体とATP活性阻害の2種類のmTOR阻害剤を由来の異なる癌細胞株に投与し、その増殖抑制効果の違いを検討する。

放射線照射による癌細胞の50%抑制照射量を検討する。

ラパマイシン誘導体とATP活性阻害剤2種類のmTOR阻害剤を細胞株に投与後、の放射線量を照射し、2剤の放射線照射に対する増感効果の違いを検討する。

4. 研究成果

1) 阻害剤の50%細胞抑制濃度(^{50}IC)の測定;

まずHela(扁平上皮癌株)細胞に対する2剤の ^{50}IC を検討した。32Pラベル化したATPとPI3Kキナーゼアッセイ法を使用して測定した。方法は、RAD001とTorin1を無血清のDMEM培地に溶解した後、70%コンフルエントまで培養し、液体シンチレーションカウンターで測定した。結果は、RAD001での ^{50}IC は25nMであり、Torin1の ^{50}IC は1.5 μ Mであった。

次に、肺転移由来細胞のRCB0444とシスプラチン耐性株RCB1152双方の ^{50}IC を測定した。結果は、RCB0444でRAD001が30nM、Torin1で2 μ Mであった。一方、RCB1152では、RAD001が90nMであったのに対し、Torin1では500nMと増殖抑制効果を示した。

2) 扁平上皮癌細胞の増殖およびviabilityの検討;

Hela細胞が70%コンフルエントになった時点で、RAD001とTorin1の ^{50}IC 濃度を培地に添加し、増殖抑制効果をMTT法により検討

した。その結果、RAD001の ^{50}IC 濃度では40%まで増殖能力が抑制された。又、Torin1では20%まで増殖抑制効果が認められた。

3) P13K/Aktキナーゼ活性に対する2剤の抑制効果の検討;

3種類の癌細胞株を70%コンフルエントまで増殖させた後、 ^{50}IC の濃度に調整したRAD001とTorin1を培地に添加し、それぞれのP13K/Aktキナーゼ活性抑制効果を評価した。その結果、シスプラチン耐性株でTorin1のキナーゼ活性抑制効果がRAD001の2倍認められた。他の2株はRAD001、Torin1双方でキナーゼ活性抑制効果を認めたものの、両者で有意差は認めなかった。

4) 細胞株の放射線に対する ^{50}IC の算出;

X線を各細胞株に照射後、細胞増殖能をClonogenic assayで調べ、生存曲線を作成した。結果は、Hela細胞株と肺転移由来細胞のRCB0444では、2Gyで ^{50}IC を得た。一方、シスプラチン耐性株RCB1152は2.5Gyと若干高い値を示した。

5) 細胞の増殖能力およびviabilityの検討;

^{50}IC 濃度の2種類のmTOR阻害剤を各細胞株へ添加後、 ^{50}IC 相当のX線を照射して、再度Clonogenic assayを行った。結果は、Hela、RCB0444で1.2Gy、RCB1152では1.5Gyと全ての細胞株で50%抑制に必要な放射線強度の低下を認めた。特にRCB1152で放射線強度のより大きい値を示した。

現在、mTOR阻害剤+線照射後の各扁平上皮癌細胞のG1 arrest状態とDNA合成のチェックポイント解析などを施行しているところである。

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1件)

1. Ikeda H, Tobita T, Ohaba S, Uehara M, Asahina I. Treatment outcome of Photofirin-based photodynamic therapy for T1 and T2 oral squamous cell carcinoma and dysplasia. Photodiagnosis Photodyn Ther, 10(3):229-235, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔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

飛田 尚慶 (TOBITA, Takayoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・

客員研究員

研究者番号: 00336174

(2)研究分担者

なし()

研究者番号:

(3)連携研究者

なし()

研究者番号: