

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462200

研究課題名(和文)悪性胸膜中皮腫に対する分子標的薬剤治療の模索

研究課題名(英文)The antitumor effect of PI3K/mTOR inhibitor against malignant pleural mesothelioma

研究代表者

長谷川 誠紀 (Seiki, Hasegawa)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10252438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は悪性胸膜中皮腫細胞株に対するmTOR阻害剤の抗腫瘍効果を確認出来た。耐性化の対策としてmTORとその上流のPI3Kを阻害するPI3K/mTOR阻害剤に着目した。PI3K/mTOR阻害剤に対して感受性が最も高いH2052では他の細胞株と比較して遺伝子(F)の発現が低下していた。wild typeである細胞株で遺伝子(F)を失活させるとmTORリン酸化の増強が確認された。手術検体の免疫染色においては多変量解析でp-mTORが治療ターゲットになる可能性を示唆した。遺伝子(F)欠損の中皮腫細胞株はPI3K/mTOR阻害剤投与により未治療群と比較し有意に皮下腫瘍の増殖抑制を認めた。

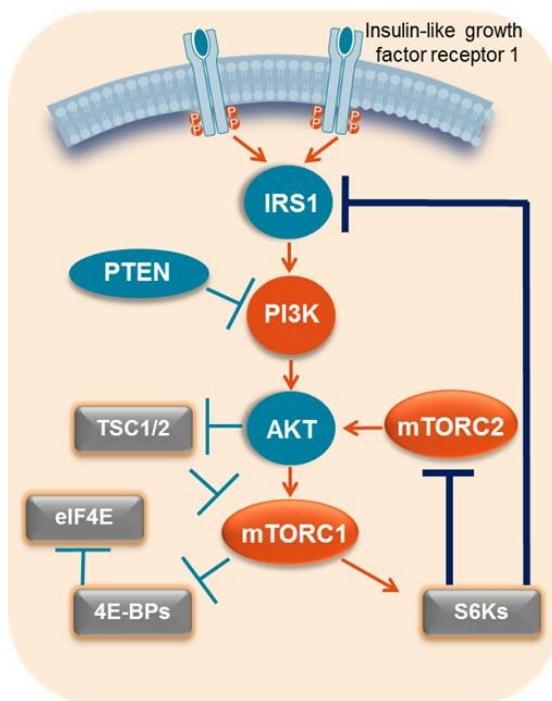
研究成果の概要(英文)：We could confirm the antitumor effect of mTOR inhibitor against malignant pleural mesothelioma cell lines in vivo and mouse subcutaneous model. We focused on a PI3K/mTOR inhibitor that inhibits both mTOR and PI3K, which is upstream of mTOR, as a measure for possible resistance development. In H2052, which is most sensitive to PI3K/mTOR inhibitors, expression of gene (F) was decreased compared with other cell lines. When gene (F) was inactivated in the wild-type cell line, enhancement of mTOR phosphorylation was confirmed. In immunostaining of surgical specimens, multivariate analysis suggested that p-mTOR could be a therapeutic target. In gene (F)-deficient mesothelioma cell line, subcutaneous tumor growth was significantly reduced by treatment with a PI3K/mTOR inhibitor compared to untreated group.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：中皮腫

1. 研究開始当初の背景

我々は悪性胸膜中皮腫に対する新規抗癌剤として mTOR 阻害剤について研究を行ってきた。mTOR は、PI3K/Akt シグナル伝達経路 (Fig.1) にある細胞内セリン/スレオニンキナーゼであり S6K, 4EBP1 を介して細胞増殖、血管新生、代謝に関与しており、悪性胸膜中皮腫の予後因子として mTOR, PI3K mRNA 発現についての報告がなされた (Varghese et al Cancer2011)。



(Fig.1) PI3K/Akt シグナル伝達経路

我々は悪性胸膜中皮腫細胞株に対する everolimus の抗腫瘍効果を in vivo とマウス皮下モデルで確認出来た (未発表)。しかし everolimus においては s6K, IRS1 を介する negative feed back も認められたため、その対策として mTOR およびその上流に位置する PI3K の両者を同時に阻害する PI3K/mTOR 阻害剤に着目してきた。PI3K/mTOR 阻害剤は数社の製薬企業が開発中の薬剤で、その内最も先行している薬剤は海外で乳癌に対してフェーズ試験が進行中である。日本では固形癌に対してフェーズ試験が進行中である。

ある。乳癌が対象となった理由として、PI3K/mTOR 阻害剤は PI3K 遺伝子変異に対して著効することが報告され (Engelman et al Nature Medicine2008)、乳癌患者の約 3 割がその変異を持つためであると考えられる。われわれは薬剤を入手し、悪性胸膜中皮腫細胞株に対する効果を検討した結果、in vivo とマウス皮下モデルともに everolimus 以上の抗腫瘍効果を認めた (未発表)。また他社の薬剤においても同様の効果を認めた (未発表)。これらデータは ASCO 2011 で発表されたフェーズ試験の内容と矛盾しない。

2. 研究の目的

悪性胸膜中皮腫患者に対する everolimus の臨床試験は米国において 2 件進行中である。これに続く悪性胸膜中皮腫患者に対する PI3K/mTOR 阻害剤の臨床試験も予想される。一方、日本では PI3K/mTOR 阻害剤の臨床試験は乳癌を中心に現在進行中である。悪性胸膜中皮腫に対する PI3K/mTOR 阻害剤の臨床試験の基礎データを得ることが目的である。

3. 研究の方法

(1) WST-8 による薬剤抗腫瘍効果測定

悪性胸膜中皮腫細胞株に対する PI3K/mTOR 阻害剤による抗腫瘍効果を WST-8 にて評価した。

(2) 悪性胸膜中皮腫における遺伝子(F)の作用解明

事前の実験にて H2052 が最も PI3K/mTOR 阻害剤(N)に対して感受性が最も高かった (IC50 5nM 以下)。他の PI3K/mTOR 阻害剤(G,P) も同様の結果を得ている。

a) mRNA 測定

TaqMan Gene Expression Cells-to-CT Kit を用いて mRNA 抽出。測定には 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用し、悪性胸膜中皮腫細胞

株ごとの遺伝子(F) mRNA 発現量を比較した。

(b) Western blot

遺伝子(F)が失活した状態ではPI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路上のいずれかに活性化(特に p-S6, p-S6K)が認められると予想される。そのため抗体(PI3K, AKT, p-AKT, mTOR, p-mTOR, S6, p-S6, S6K, p-S6K, 4EBP1, p-4EBP1(Cell Signaling Technology))を用いて遺伝子(F)が失活した場合、どの部分が活性化されるか検証した。

(3) PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路と中皮腫手術の予後の関連性

PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路の活性と集学的治療の予後との関連性を評価するため、切除標本を用いて免疫染色を行った。

(4) 動物実験

マウスの皮下に悪性胸膜中皮腫細胞株を接種し、皮下腫瘍を形成させた動物モデルを用いて、PI3K/mTOR 阻害剤の抗腫瘍効果を検討した。

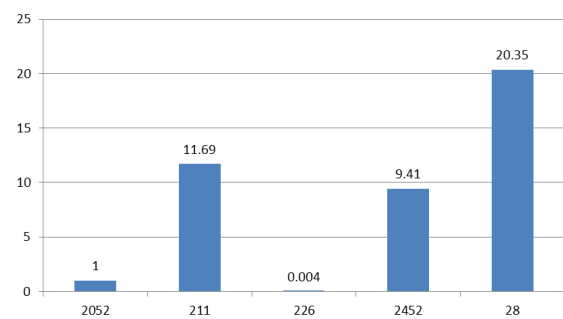
4. 研究成果

(1) WST-8 による薬剤抗腫瘍効果測定

H28, H226, H2052, H2452 で濃度依存性の抗腫瘍効果を認めた。

(2) 悪性胸膜中皮腫における遺伝子(F)の作用解明

PI3K/mTOR 阻害剤に対して感受性が最も高い H2052 では他の細胞株と比較して遺伝子(F)の mRNA 著明に発現が低下していた (Fig.2)。また、western blot において(F)の発現は認められなかった (Fig.3)。



(Fig.2) 中皮腫細胞株における遺伝子(F)の mRNA 発現



(Fig.3) 細胞株における(F)の発現

そのため、遺伝子(F)の PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路に対する作用を検討した。遺伝子(F) wild type である H211, H28 では遺伝子(F)を失活させると Western blot で mTOR リン酸化の増強が確認された。遺伝子(F)が失活している H2052 では mTOR リン酸化の増強は認められなかった。

(3) PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路と中皮腫手術の予後の関連性

PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路の活性と集学的治療の予後との関連性を評価するため、切除標本を用いて免疫染色を行った。phospho-S6RP 陽性患者群が陰性群と比較し有意に予後が良好であった(14.4 ヶ月対 43.6 ヶ月, P=0.03)。また、phospho-mTOR 陽性患者群が陰性群と比較し予後が良好な傾向にあった(14.4 ヶ月対 37.1 ヶ月, P=0.08)。PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路の活性と集学的治療の予後との関連性を評価するため、切除標本を用いて免疫染色を行った。phospho-S6RP 陽性患者群が陰性群と比較し有意に予後が良好であった(14.4 ヶ月対 43.6 ヶ月, P=0.03)。また、phospho-mTOR 陽性患者群が陰性群と

比較し予後が良好な傾向にあった (14.4 ヶ月 対 37.1 ヶ月, P=0.08)。次に単変量解析を行った。年齢 (60歳以下) で Hazard Ratio (HR) は 0.416 (95%CI:0.182-0.949) p=0.037、組織型 (上皮型 vs 非上皮型) で HR は 4.238 (95%CI:1.366-13.715) p=0.013、IMIG p-stage (, , vs) で HR は 3.698 (95%CI:1.231-11.115) p=0.02 、phospho-S6RP で HR は 0.435 (95%CI:0.2-0.946) p=0.036、phospho-mTOR で HR は 0.489(95%CI:0.213-1.123) p=0.091 であった。多変量解析では年齢 (60歳以下) で Hazard Ratio (HR) は 0.716 (95%CI:0.313-1.637) p=0.428、組織型 (上皮型 vs 非上皮型) で HR は 3.617 (95%CI:1.039-12.592) p=0.043、IMIG p-stage (, , vs) で HR は 5.782 (95%CI:1.57-21.299) p=0.008 、phospho-S6RP で HR は 0.64 (95%CI:0.268-1.525) p=0.314 、phospho-mTOR で HR は 0.471(95%CI:0.189-1.175) p=0.107 であった。PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路において p-mTOR がターゲットになる可能性を示唆した。

(4) 動物実験

マウスの皮下に悪性胸膜中皮腫細胞株を接種し、皮下腫瘍を形成させた動物モデルを用いて、PI3K/mTOR 阻害剤の抗腫瘍効果を検討した。遺伝子(F)欠損 である悪性中皮腫細胞株 の皮下腫瘍は PI3K/mTOR 阻害剤投与により未治療群と比較し有意に皮下腫瘍の増殖抑制を認めた。しかし遺伝子(F)wild type である悪性中皮腫細胞株 の皮下腫瘍は PI3K/mTOR 阻害剤投与により皮下腫瘍の増殖抑制を認めなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

黒田鮎美、松本成司、中道徹、橋本昌樹、多久和輝尚、近藤展行、辻村亨、中野孝司、長谷川誠紀 . 悪性胸膜中皮腫の手術予後と mTOR MAPK pathway の関連についての検討 . 第 33 回日本呼吸器外科学会総会 2016 年 5 月 13 日 京都国際会議場 (京都府、京都市)

Activation of mTOR signal pathway is associated with prolonged survival in malignant pleural mesothelioma patients treated with a multimodality therapy
Ayumi Kuroda, Seiji Matsumoto, Akifumi Nakamura, Masaki Hashimoto, Teruhisa Takuwa, Nobuyuki Kondo, Ikuko Torii, Toru Tsujimura, Seiki Hasegawa
第 15 回世界肺癌学会 (IASLC)
15th IASLC (15th World Conference on Lung Cancer)
(Sydney , Australia)
2013 年 10 月 27 日 ~ 30 日

Activation of mTOR and MAPK signal pathway are associated with prolonged survival in malignant pleural mesothelioma patients
Ayumi Kuroda, Seiji Matsumoto, Akifumi Nakamura, Masaki Hashimoto, Teruhisa Takuwa, Nobuyuki Kondo, Ikuko Torii, Toru Tsujimura, Takashi Nakano, Seiki Hasegawa
ASCO Annual Meeting 2014
(Chicago, Illinois, USA)
平成 26 年 5 月 30 日 ~ 平成 26 年 6 月 3 日

〔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：
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

長谷川 誠紀 (HASEGAWA, Seiki)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：10252438

(2) 研究分担者

近藤 展行 (KONDOU, Nobuyuki)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：50402889

松本 成司 (MATSUMOTO, Seiji)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：60412011

多久和 輝尚 (TAKUWA, Teruhisa)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00412049

橋本 昌樹 (HASHIMOTO, Masaki)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：40461074

黒田 鮎美 (KURODA, Ayumi)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：90642570