

Title	mTOR経路を標的とする放射線増感剤の開発：膵癌細胞を用いた基礎的検討
Sub Title	mTOR pathway targeted new radiosensitizing drug : preliminary study in pancreatic cancer cell
Author	砂口, 歩(Sunaguchi, Ayumu)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>膵臓癌に対する効果的な放射線増感剤の探索を目標として, mTOR経路阻害剤による基礎的検討を行った。ヒト膵臓癌培養細胞に放射線照射と3種類のmTOR経路阻害剤, 薬剤と照射併用を行い細胞生存率, アポトーシス分画, 細胞周期を測定した。細胞生存率はコロニー形成法(照射), MTT assay法(薬剤)により測定した。生存率については用量依存性を認めた。アポトーシス分画測定では, 薬剤NVP-BE235において併用による分画上昇を認めた。セルサイクルについては, 照射, 薬剤の投与によるG1期細胞比率の低下が軽度見られたが併用による顕著なG2アレストについては観察されなかった。</p> <p>The purpose of this study to detect effective radiosensitizing drug for pancreatic cancer. After three drug were selected, treatment effectiveness was assessed by irradiation, drug exposure alone and concurrent use of irradiation and drug in human pancreatic cell line. Cell survival was evaluated with colony formation. Apoptosis and cell cycle distribution was evaluated by flow cytometric analyses. Cell survival showed dose dependent curve. Combined NVP-BE235 and irradiation therapy showed higher apoptotic rate than the other drugs combination. The G1 ratio was slightly decreased in combination therapy but significant G2 ratio elevation could not be observed.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2017 課題番号：16K19848 研究分野：医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K19848seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19848

研究課題名(和文) mTOR経路を標的とする放射線増感剤の開発 - 膵癌細胞を用いた基礎的検討 -

研究課題名(英文) mTOR pathway targeted new radiosensitizing drug -preliminary study in pancreatic cancer cell

研究代表者

砂口 歩 (Sunaguchi, Ayumu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：90772575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌に対する効果的な放射線増感剤の探索を目標として、mTOR経路阻害剤による基礎的検討を行った。ヒト膵臓癌培養細胞に放射線照射と3種類のmTOR経路阻害剤、薬剤と照射併用を行い細胞生存率、アポトーシス分画、細胞周期を測定した。細胞生存率はコロニー形成法(照射)、MTT assay法(薬剤)により測定した。生存率については用量依存性を認めた。アポトーシス分画測定では、薬剤NVP-BEZ235において併用による分画上昇を認めた。セルサイクルについては、照射、薬剤の投与によるG1期細胞比率の低下が軽度見られたが併用による顕著なG2アレストについては観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study to detect effective radiosensitizing drug for pancreatic cancer. After three drug were selected, treatment effectiveness was assessed by irradiation, drug exposure alone and concurrent use of irradiation and drug in human pancreatic cell line. Cell survival was evaluated with colony formation. Apoptosis and cell cycle distribution was evaluated by flow cytometric analyses. Cell survival showed dose dependent curve. Combined NVP-BEZ235 and irradiation therapy showed higher apoptotic rate than the other drugs combination. The G1 ratio was slightly decreased in combination therapy but significant G2 ratio elevation could not be observed.

研究分野：医学

キーワード：放射線治療 放射線生物学 膵臓癌

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は最も予後不良な悪性腫瘍の一つである。その理由として、症状が乏しいことや非特異的であるため発見時に根治切除不能であることが挙げられる。また、切除可能例においても、手術後の再発や転移が多く認められる。したがって、抗癌剤治療や放射線療法など非手術療法の役割が期待されるが、膵臓癌は、血流に乏しく、抗癌剤、放射線療法とも腫瘍細胞に抵抗性であることから奏効率は十分とはいえない。

現時点で注目されている治療法の一つに集学的治療があり、研究代表者の施設でも術前放射線化学療法に積極的に取り組んでいる。放射線療法の問題点として、十二指腸など近接する消化管の有害事象があるため治療強度を高めることが難しいことがあり、抗癌剤も毒性のため投与量の限界があり、奏効率が低いことである。高精度放射線照射をもってしても、膵臓癌における肝転移や局所再発率は高く、治療成績改善には限界があると言わざるをえない。そこで従来の抗癌剤とは全く異なる機序による薬剤を用いた、放射線増感効果(局所病巣の制御)ならびに転移抑制効果(遠隔転移病巣の制御)を有する治療法の開発が期待される。

2. 研究の目的

本研究では放射線療法に併用する候補薬剤として主に細胞の増殖生存シグナルを伝える重要な役割を持つセリン/スレオニンリン酸化酵素である mTOR (mammalian target of rapamycin) 経路(右図 1.)の阻害剤に着目した。とりわけ膵臓癌組織では血流に乏しい線維組織に富んだ腫瘍間質を有するため、mTOR 経路の阻害は血管の成熟による正常化とそれに伴う酸素化が期待されることから放射線の増感効果が期待できる。膵臓癌細胞を用いた mTOR 経路阻害剤による放射線増感剤の開発が本研究の目標である。

3. 研究の方法

- (1) 代表的なヒト膵癌細胞のなかから使用する培養細胞株を選択する。作用機序の異なる mTOR 経路阻害剤を複数準備する。
- (2) ヒト膵癌細胞に対して、放射線照射、阻害剤の投与、照射と阻害剤投与を行い、それぞれの細胞生存率をコロニー形成法、WST (Water soluble Tetrazolium salts) assay 法にて測定する。照射と阻害剤投与は同時投与と逐次投与の両方を検討する。
- (3) 細胞生存率の測定により、照射と阻害剤の併用効果が観察されたら、細胞の応答を確認するため、生存率をフローサイトメトリー法で確認する。ヨウ化プロピジ

ウムおよびアネキシン V-FITC 抗体を使用することで、細胞周期およびアポトーシス分画の比率についても測定する。測定は処理後 24、48、72 時間後に測定する。前述と同様に放射線照射、阻害剤の投与、照射と阻害剤投与について比較検討する。

- (4) コントロール、放射線照射、阻害剤投与、両者併用時それぞれにおける mTOR 経路の活性度評価として関連するタンパクの発現を Western blot 法により測定し、放射線照射と薬剤の相互作用を解明する。
- (5) これまでの結果より、放射線照射との増併用効果が高い mTOR 経路阻害剤を選択する。

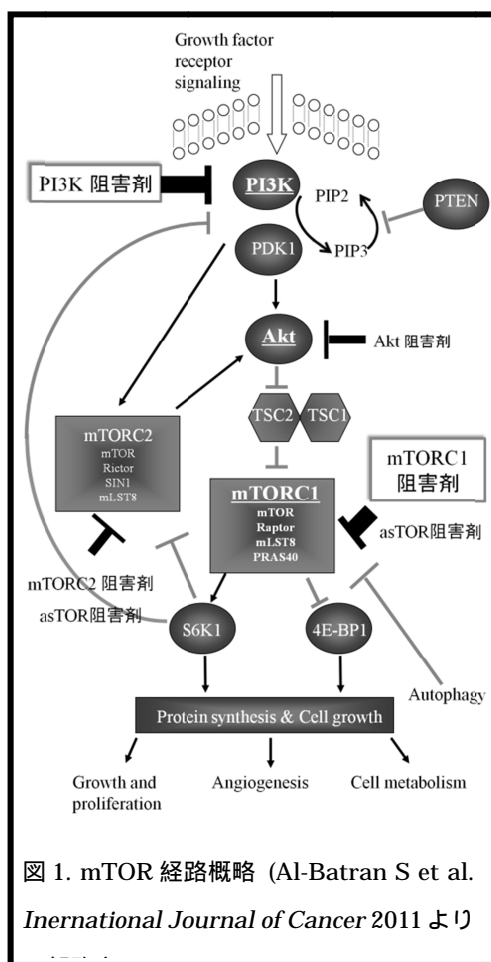


図 1. mTOR 経路概略 (Al-Batran S et al. International Journal of Cancer 2011 より)

4. 研究成果

- (1) 代表的なヒト膵癌細胞のなかから MiaPaCa2 を選択した。作用機序の異なる mTOR 経路阻害剤として、mTORC1 阻害剤の一つである everolimus と PI3K と mTORC1 の dual inhibitor である NVP-BE2235、PI3/Akt の機能阻害剤である低分子化合物 LY294002 を準備した。

(2) 放射線照射、阻害剤の投与、照射と阻害剤投与を行い、それぞれの細胞生存率をコロニー形成法、MTT assay 法にて測定する。照射と阻害剤投与は同時投与と逐次投与の両方を検討する。放射線照射については0Gyを100%として、(2Gy、4Gy、6Gy、8Gy)照射にてそれぞれ平均値で64、38、18、4.7%の相対生存率であった。下図2. に示す通り、放射線生物学の数学モデルであるLQモデルと矛盾しない結果が得られた。mTOR 阻害剤投与による生存率測定では、NVP-BEZ235 (100nM)、evelorimus (10nM)、LY294002 (10 μM) 投与において生存率低下が観察され、今回の投与濃度とした(図3.)。

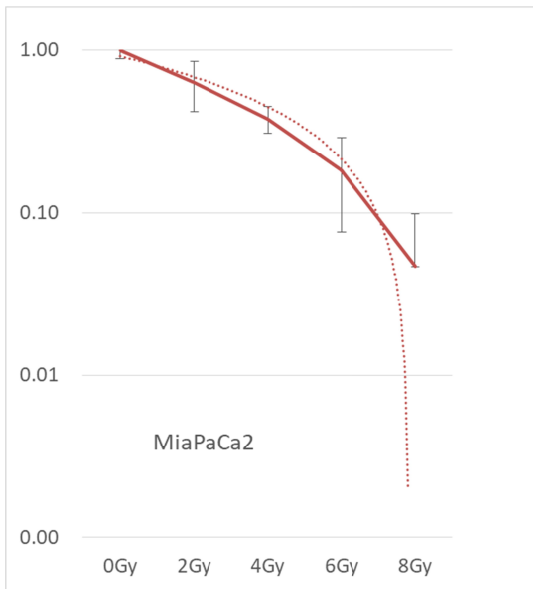


図2. コロニー形成法

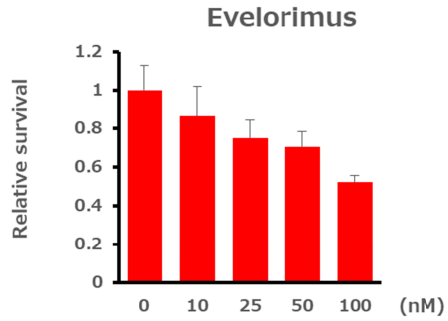
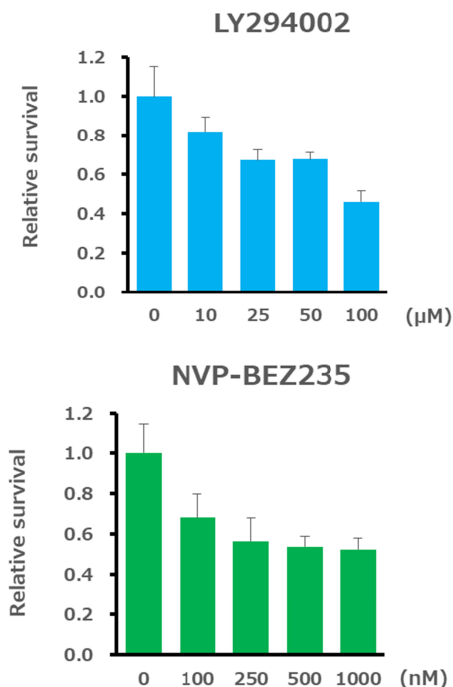
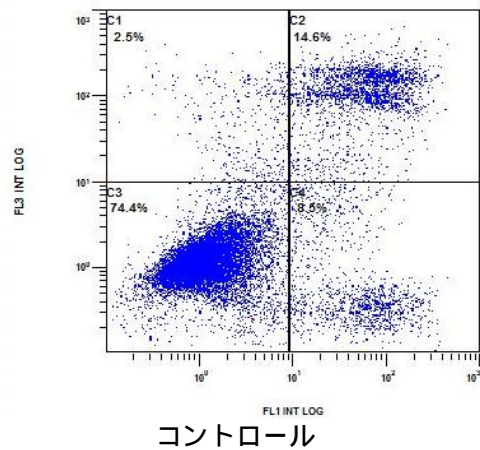


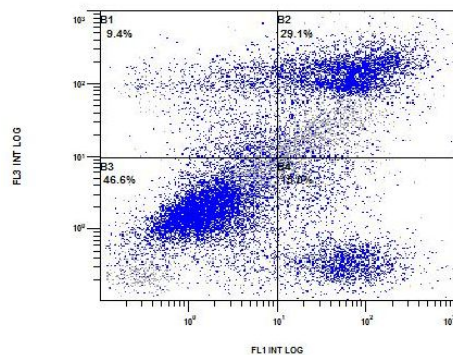
図3. MTT アッセイ

(3) フローサイトメトリー法 - 細胞周期 (PI 染色)
 薬剤による差や併用による顕著な G2 アレストについては観察されなかった。一例としてコントロール: G1/G2/S 65/10/24、ly294002: 72/6/22、NVP-BEZ235: 82/4/14、Evelorimus: 66/10/25、IR: 63/14/14、ly294002+IR: 66/13/21、NVP-BEZ235+IR: 74/10/16、Evelorimus+IR: 61/14/25 であった。

(3) フローサイトメトリー法- 生存率 (Annexin-V 抗体・PI 染色)
 薬剤投与、放射線照射によるアポトーシス分画の増加が観察され、両者の併用による増加も認められた。薬剤投与 (Evelorimus) と照射の併用の結果を例として下図4. に示す。



コントロール



薬剤投与 (evelorimus)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

砂口 歩 (SUNAGUCHI, Ayumu)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教

研究者番号 : 90772575

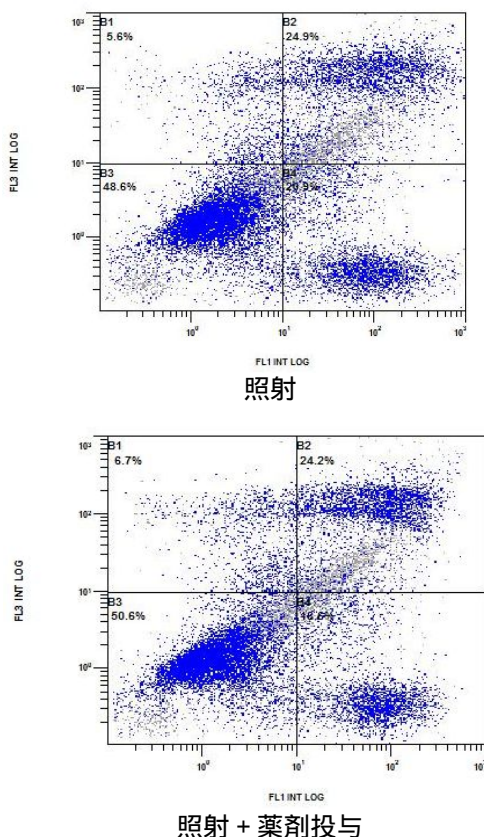


図 4 . アポトーシス分画測定 (フローサイトメトリー法)

(4) Western blot 法

コントロール、放射線照射、阻害剤投与、両者併用時それぞれにおける細胞を回収し、mTOR 経路のタンパク発現についてウェスタンブロッティングを行ったが現時点では良好なバンドを得ることが困難であった。

(5) 総括

mTOR 経路阻害剤として選択した、everolimus、NVP-BEZ235、LY294002 いずれも放射線照射と併用効果を示した。今回の研究では薬剤の優劣や作用機序に違いは明らかにできずさらなる検討が必要である。

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)

[学会発表](計 1 件)

竹下諒, 深田淳一, 北郷実, 酢谷真也, 板野理, 砂口歩, 花田剛士, 北川雄光, 茂松直之 膵癌症例における放射線治療中および治療期間中の病巣移動の定量的評価 第 75 回日本医学放射線学会総会・学術集会 2016 年 4 月 14-17 日、横浜